

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

ORGANIQUE

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET DE

FORMATION DOCTORALE EN

SCIENCES, TECHNOLOGIES ET

GEOSCIENCES

LABORATOIRE DE

PHARMACOCHEMIE DES

SUBSTANCES NATURELLES



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ORGANIC

CHEMISTRY

\*\*\*\*\*

POSTGRADUATE SCHOOL FOR

SCIENCES, TECHNOLOGY AND

GEOSCIENCES

NATURAL PRODUCTS

PHARMACOCHEMISTRY

LABORATORY

**Isolement et caractérisation des glycosides terpéniques de  
trois plantes médicinales camerounaises : Albizia chevalieri  
Harms, Calliandra calothyrsus Meisn (Mimosaceae),  
Lecaniodiscus cupanioides Planch.ex Benth (Sapindaceae) et  
évaluation de leurs propri**

Thèse présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de  
Doctorat /Ph.D en Chimie Organique

Par : **MESSI AMBASSA Lin Marcellin**

Master en Chimie Organique

Sous la direction de

**Joséphine NGO MBING**

Maître de Conférences

**Dieudonné Emmanuel PEGNYEMB**

Professeur

Année Académique : 2021



REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES, TECHNOLOGIES ET  
GEOSCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE CHIMIE ET APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace-Work-Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POSTGRADUATE SCHOOL OF SCIENCE,  
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES

RESEARCH AND POSTGRADUATE TRAINING UNIT  
FOR CHEMISTRY AND APPLICATIONS

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGNIQUE

DEPARTMENT OF ORGANIC CHIMISTRY.

## ATTESTATION DE CORRECTION

Noms et prénoms du candidat: **MESSI AMBASSA Lin Marcellin**

Matricule: **12T0971**

Titre de la thèse: « Isolement et caractérisation des glycosides terpéniques de trois plantes médicinales camerounaises : *Albizia chevalieri* Harms, *Calliandra calothyrsus* Meisn (Mimosaceae), *Lecaniodiscus cupanioides* Planch.ex Benth (Sapindaceae) et évaluation de leurs propriétés biologiques ».

Date de soutenance: **Vendredi 28 Mai 2021**

Nous membres du jury, après avoir lu le document qui nous a été présenté, relevons que le candidat a effectué toutes les corrections, conformément aux observations formulées lors de la soutenance.

En foi de quoi la présente attestation de correction lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le 04 Aout 2021

Le Président du jury

Prof B. N. T. T. T.

Les Membres du jury

M. H. A. D. A. B.

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES, TECHNOLOGIES ET  
GEOSCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE CHIMIE  
ET APPLICATIONS

LABORATOIRE DE PHARMACOCHEMIE DES SUBSTANCES NATURELLES  
*NATURAL PRODUCTS PHARMACOCHEMISTRY LABORATORY*



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POSTGRADUATE SCHOOL FOR  
SCIENCES, TECHNOLOGY AND  
GEOSCIENCES

RESEARCH AND  
POSTGRADUATE TRAINING  
UNIT FOR CHEMISTRY AND  
APPLICATIONS

Isolement et caractérisation des glycosides terpéniques de trois plantes médicinales camerounaises : *Albizia chevalieri* Harms, *Calliandra calothyrsus* Meisn (Mimosaceae), *Lecaniodiscus cupanioides* Planch.ex Benth (Sapindaceae) et évaluation de leurs propriétés biologiques.

Thèse présentée et soutenue publiquement le 28 Mai 2021

en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat /Ph.D en Chimie Organique

Par :

MESSI AMBASSA Lin Marcellin

Matricule: 12T0971

Master en Chimie Organique

Sous la direction de :

Joséphine NGO MBING  
*Maître de Conférences*

Dieudonné Emmanuel PEGNYEMB  
*Professeur*

*Année 2021*

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES, TECHNOLOGIES ET  
GEOSCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE CHIMIE  
ET APPLICATIONS

LABORATOIRE DE PHARMACOCHEMIE DES SUBSTANCES NATURELLES  
*NATURAL PRODUCTS PHARMACOCHEMISTRY LABORATORY*



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POSTGRADUATE SCHOOL FOR  
SCIENCES, TECHNOLOGY AND  
GEOSCIENCES

RESEARCH AND  
POSTGRADUATE TRAINING  
UNIT FOR CHEMISTRY AND  
APPLICATIONS

**Isolement et caractérisation des glycosides terpéniques de trois plantes médicinales camerounaises : *Albizia chevalieri* Harms, *Calliandra calothyrsus* Meisn (Mimosaceae), *Lecaniodiscus cupanioides* Planch.ex Benth (Sapindaceae) et évaluation de leurs propriétés biologiques.**

Thèse présentée et soutenue publiquement le 28 Mai 2021  
en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat /Ph.D en Chimie Organique

Par :

**MESSI AMBASSA Lin Marcellin**

**Matricule: 12T0971**

**Master en Chimie Organique**

Sous la direction de :

**Joséphine NGO MBING**  
*Maître de Conférences*

**Dieudonné Emmanuel PEGNYEMB**  
*Professeur*

*Année 2021*

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b>  <b>Faculté des Sciences</b>  Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b>  <b>Faculty of Science</b>  Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

**ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 12 Juin 2020**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

**1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)**

<b>N°</b>	<b>NOMS ET PRÉNOMS</b>	<b>GRADE</b>	<b>OBSERVATIONS</b>
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste

21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOULATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

**3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)**

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHÉ Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHO Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé deMiss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
8	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>

11	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
12	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUNI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste

17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
33	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

**5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)**

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFAK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département

5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste

33	ZONDENDEGOUNBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
----	--------------------------	------------------	----------

34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

#### 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOOU Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste

20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

**7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)**

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
---	---------------------	------------	---------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes &amp; Diplômes</i>
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste

17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thierry	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

### 8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
---	-------------------------	------------	----------------------------

2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste

11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

**9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)**

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste

15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directrice ENS/Yaoundé</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste

36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

**10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)**

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance &amp; du Matériel</i>
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste

19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

## Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	<b>39 (18)</b>
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	<b>46 (14)</b>
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	<b>33 (9)</b>
CI	10 (1)	9 (02)	12 (02)	03 (0)	<b>34 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	<b>35(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	<b>25 (2)</b>
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (02)	<b>30 (3)</b>
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	<b>18 (5)</b>
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	<b>43(7)</b>
<b>Total</b>	<b>69 (4)</b>	<b>99 (28)</b>	<b>130 (33)</b>	<b>45 (10)</b>	<b>343 (75)</b>

Soit un total de

**344 (75)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **99 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

( ) = Nombre de Femmes

**75**

## **DEDICACE**

Je dédie cette thèse à mes adorables parents, mon feu père **AMBASSA NGA Joseph** et ma mère **MENYE ZOGO Marie Thérèse**.

Et à mon grand frère **NDJAGA Jules Marcellin**

# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le **Pr. Dieudonné E. Pegnyemb**, qui a eu l'amabilité de m'accueillir dans son laboratoire et de superviser ce travail. Recevez ici mes sincères remerciements pour les conseils et votre constant soutien. Veuillez trouver dans ces quelques lignes ma profonde reconnaissance.

Le **Pr. Augustin E. Nkengfack** Chef de département de chimie Organique, pour ses multiples conseils et encouragements.

Je voudrais remercier très chaleureusement **Dr Mohamed HADDAD**, Chargé de Recherche à l'IRD (Toulouse), mon encadreur, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire PHARMA-DEV et pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions. Vous m'avez dirigé durant ces trois années avec dynamisme et rigueur. Je n'oublie pas votre engagement et votre forte implication au cours de cette thèse. Je vous remercie pour la confiance, les conseils, vos encouragements et surtout votre grande disponibilité que vous m'avez accordés tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir laissé une liberté d'action qui m'a permis d'évoluer constamment et d'acquérir de nouvelles compétences. Travailler à vos côtés a été un vrai plaisir et je ne garderai que de très bons souvenirs. Merci infiniment pour tout.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Madame le **Pr. Joséphine Ngo Mbing**, pour avoir accepté de m'encadrer depuis le master jusqu'à la thèse. Vous avez toujours œuvré sans relâche à la recherche des solutions pour l'aboutissement de ce travail, je vous en remercie infiniment. Merci de m'avoir accordée une très grande confiance tout au long de ce parcours, j'espère, de tout mon cœur, avoir été à la hauteur. Merci pour le soutien moral et professionnel indéfectible pendant la réalisation de ce travail. Merci pour votre gentillesse, vos conseils, votre rigueur scientifique et pour votre aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit. Ce fut pour moi un grand honneur de travailler avec vous.

J'adresse toute ma gratitude au **Pr Nicolas Fabre** de l'Université de Toulouse III Paul Sabatier d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son unité de recherche PHARMA-DEV.

Je tiens à remercier vivement le **Pr. Olivier Noté** qui m'a permis de faire mes premiers pas dans la recherche. Merci d'avoir accepté de tutorer ce travail. Merci pour votre disponibilité, votre dévouement sans tâche tout au long de la rédaction de cette thèse où on a formé une belle et

efficace équipe ; si j'ai pu finir, c'est en grande partie grâce à vous. Vous avez été pour moi un grand frère bienveillant. Merci encore pour tout.

Le **Pr. Alex de Théodore Atchadé** pour sa présence et ses conseils très appréciés dans notre laboratoire, ainsi que ses multiples encouragements.

Je remercie le **Dr. Hervé Hoste** de l'équipe 'Interaction tanins-nématodes digestifs' de l'UMR 1225 INRA/DGER 'Interaction Hôte-Agent Pathogène' pour m'avoir permis de réaliser mes tests anthelminthiques.

Merci également au **Dr Maëlle Carraz** et **Mme Sandra Bourgeade-Delmas** pour la réalisation des tests de l'activité antiproliférative.

Je remercie **Marc Vedrenne** et **Pierre Lavedan** de la plateforme analytique de l'Institut de Chimie de Toulouse, pour l'enregistrement des spectres de RMN des composés isolés.

Les membres du jury devant lequel cette thèse sera soutenue, pour m'avoir fait l'honneur de bien vouloir juger mon travail.

Les Enseignants des Départements de Chimie Organique et Inorganique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I pour la formation tant morale qu'intellectuelle qu'ils m'ont donnée.

**M. Victor Nana**, botaniste à l'herbier National du Cameroun, d'avoir réalisé les travaux d'identification des espèces travaillées dans cette thèse.

Je tiens également à remercier mon Chef de Laboratoire à l'IRAD, le **Dr Begoude** pour son soutien sans faille. Je n'oublie pas tout ce que tu as toujours fait pour me faciliter les choses comme l'obtention des ordres de missions. Merci infiniment.

Merci au **Dr Marieke Vansteelandt**, **Dr Anne-Cécile Le Lamer**, **Pr Karine Reybier**, **Mme Valérie Cristofoli**, **Dr Valérie Jullian** et **Dr Guillaume Marti** pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Je tiens à remercier madame le **Dr Geneviève Bourdy** pour son soutien, ses conseils et je n'oublie pas les sorties et restaurants que tu as organisés pour moi. Grand merci à toi.

Un merci tout particulier à **Franck** et **Ingrid** pour les différents échanges très chaleureux.

Mes remerciements vont également aux Professeurs **Dominique Ngono Bikobo**, **Thierry J. Ndongu**, merci pour les conseils techniques, scientifiques et votre chaleureuse amitié.

Je souhaite remercier **Dr Angelique N. Messi** pour m'avoir orienté et permis de rejoindre ce laboratoire car sans lui je ne serai jamais venu faire mon master à Yaoundé I. Merci infiniment grand frère.

Je tiens à remercier très chaleureusement **Dr Line SIMO** pour son soutien tout au long de ce travail et pour ses précieux conseils.

Aux Drs., **Eutrophe Ledoux Kamto, Auguste Abouem Azintchen, Gaetan Bahiya, Mc Jesus Kinyok, Norbert N. Mbabi, Eric R. Tiam** ils ont su chacun à sa manière et tous par leur disponibilité me guider, me conseiller, et m'aider à la finalisation de ce travail. Je les en remercie chaleureusement.

A tous les membres du Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles : **Jeanne-Louise Nkot, Marius Balemaken, Fred.A. Zoua, Mireille S. Beyala, Christelle Matene, Emmanuel Biang, Nama Alexis, André Bitomo, Guy-Roland Ebede, Jean Faustin Atangana, Daniel Toukea, Yolande Andrée Ngimbous.**

Je tiens aussi à remercier particulièrement **Michel POM BINGAN** pour son aide très précieux lors de mes travaux en laboratoire ainsi que son soutien sans faille.

Je remercie également **Grace Annie BAPA** pour son soutien et ses encouragements tout au long de ce travail.

Je remercie mon frère, ami et camarade **Jean Noel Evina** pour son aide sans mesure, ses encouragements et sa grande disponibilité.

Aussi, j'ai une pensée particulière pour mes amis **Dr. Aristide Mfifen, M. Onesime Mayega** grâce à qui les moments de découragements n'ont jamais été solitaires. Merci à tous de m'avoir tant aidé professionnellement et personnellement. Je n'oublierai jamais les très bons moments de rire que nous avons partagés durant ces années.

Je ne voudrais pas oublier tous mes collègues que j'ai côtoyé à l'UMR 152 PHARMA-DEV, Université de Toulouse III Paul Sabatier ainsi qu'à l'UMR 1225 INRA/DGER, notamment **Ines yolanda Castro, Aissata Camara, Romina Tapia, Manon Trinel, Fatima Barakat, Alexandre Mirre, Elise Crossay, Sergio Ortiz, Monivan** et bien d'autres encore.

Je tiens à remercier les **Drs Mahamane Haidara** et **Noufou Ouedraogo** pour le soutien morale et professionnel lors de mes différents séjours à Toulouse, et pour m'avoir encouragé dans les moments de doutes que j'ai traversés.

Je remercie toute la **famille Ambassa** pour le soutien.

A mes frères et sœurs : **Souga Ambassa, Nomo Ambassa, Ndongo Ambassa, Josiane Mballa, Marlyse Souga, Aimé Menye et Jean Tsanga** pour leurs encouragements, l'intérêt constant qu'ils ont montré envers mon travail, pour avoir été toujours à mes côtés sans réserve et avec amour, qu'ils trouvent ici l'expression de mon plus profond attachement.

A mes oncles et tantes pour leur soutien sans faille.

A mes cousins et cousines pour leurs encouragements.

A toutes celles et ceux qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse, j'adresse mes vifs remerciements

Enfin, Je tiens à remercier l'**Agence Universitaire de la Francophonie**, pour la bourse qui m'a été accordée dans le cadre du projet Planhelvet 2017/2020 afin de finaliser ma thèse.

A l'éternel DIEU tout puissant, sans qui toute œuvre humaine serait vanité.

# SOMMAIRE

<b>DEDICACE</b> .....	<b>xvii</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xviii</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>xxii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES</b> .....	<b>xxvi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xxviii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xxxv</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>xxxvii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xxxviii</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Revue de la littérature</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1. Etude botanique</b> .....	<b>7</b>
1.1.1. Ordre des Fabales .....	7
1.1.1.1. Famille des Fabaceae .....	7
1.1.1.1.1. Classification systématique.....	8
1.1.1.2. La sous-famille des Mimosaceae .....	9
1.1.1.3. Genre <i>Calliandra</i> .....	9
1.1.1.4. <i>Calliandra calothyrsus Meisn.</i> .....	9
1.1.1.4.1. Usages.....	11
1.1.1.5. Le genre <i>Albizia</i> .....	11
1.1.1.6. <i>Albizia chevalieri</i> .....	11
1.1.1.6.1. Usages.....	12
1.1.2. Ordre des Sapindales .....	12
1.1.2.1. Famille des Sapindaceae .....	13
1.1.2.2. Genre <i>Lecaniodiscus</i> .....	14
1.1.2.3. <i>Lecaniodiscus cupanioides</i> .....	15
1.1.2.3.1. Usages.....	15
<b>1.2. Généralités sur les glycosides terpéniques</b> .....	<b>16</b>
1.2.1. Cas des saponosides .....	16
1.2.1.1. Classification des saponines : .....	16
1.2.1.2. Les aglycones triterpéniques : .....	17
1.2.1.3. Les aglycones stéroïdiques .....	18
1.2.1.4. Les sucres .....	21

1.2.2. Cas des glycosides de farnésols .....	22
1.2.2.1. Aglycones de type farnesol .....	23
1.2.2.2. Les sucres .....	24
<b>1.3. Travaux phytochimiques antérieurs .....</b>	<b>25</b>
1.3.1. Saponosides isolés et évaluation des activités biologiques. ....	25
1.3.1.1. Cas des saponosides du genre <i>Calliandra</i> .....	25
1.3.1.1.1. <i>Calliandra anomala</i> .....	26
1.3.1.1.2. <i>Calliandra brevifolia</i> .....	27
1.3.1.1.3. <i>Calliandra pulcherrima</i> .....	28
1.3.1.2. Cas des saponosides du genre <i>Albizia</i> .....	30
1.3.1.2.1. <i>Albizia adianthifolia</i> .....	30
1.3.1.2.2. <i>Albizia anthelmintica</i> .....	31
1.3.1.2.3. <i>Albizia boromonensis</i> .....	32
1.3.1.2.4. <i>Albizia chinensis</i> .....	33
1.3.1.2.5. <i>Albizia coriaria</i> .....	33
1.3.1.2.6. <i>Albizia glaberrima</i> .....	34
1.3.1.2.7. <i>Albizia gummifera</i> .....	35
1.3.1.2.8. <i>Albizia inundata</i> .....	36
1.3.1.2.9. <i>Albizia julibrissin</i> .....	37
1.3.1.2.10. <i>Albizia lebbeck</i> .....	40
1.3.1.2.11. <i>Albizia mollis</i> .....	43
1.3.1.2.12. <i>Albizia procera</i> .....	44
1.3.1.2.13. <i>Albizia zygia</i> .....	45
1.3.1.3. Cas des saponosides du genre <i>Lecaniodiscus</i> .....	46
1.3.1.3.1. <i>Lecaniodiscus cupanioides</i> .....	46
1.3.2. Glycosides de farnésol isolés et évaluation des activités biologiques.....	47
1.3.2.1. Cas des glycosides de farnésol de la famille des Sapindaceae .....	47
1.3.2.1.1. <i>Eriocoelum microspermum</i> .....	48
1.3.2.1.2. <i>Guioa crenulata</i> Radlk.....	48
1.3.2.1.3. <i>Guioa villosa</i> Radlk.....	49
1.3.2.1.4. <i>Lepisanthes rubiginosa</i> .....	50
1.3.2.1.6. <i>Sapindus emarginatus</i> .....	51
1.3.2.1.7. <i>Sapindus mukorossi</i> Gaertn.....	52
1.3.2.1.8. <i>Sapindus trifoliatus</i> .....	53

1.3.2.2. Cas des glycosides de farnésol de la famille des Mimosaceae .....	54
1.3.2.2.1. <i>Albizia lebbek</i> .....	54
<b>1.4. Méthodes physicochimiques .....</b>	<b>54</b>
1.4.1. Spectrométrie de masse (MS) .....	55
1.4.1.1. Sources d'ionisations .....	55
1.4.1.1.1. Les méthodes d'ionisations les plus utilisées pour les glycosides terpéniques .....	56
1.4.2. Détermination de la configuration des oses par hydrolyse acide suivie d'une chromatographie liquide.....	57
1.4.3. Résonance magnétique nucléaire .....	59
1.4.3.1. Les spectres monodimensionnels .....	59
1.4.3.2. Les spectres bidimensionnels .....	64
<b>Chapitre 2 : Résultats et discussion .....</b>	<b>71</b>
<b>2.1. Etude phytochimique.....</b>	<b>72</b>
2.1.1. <i>Calliandra calothyrsus</i> .....	72
2.1.1.1. Extraction et isolement des composés de <i>Calliandra calothyrsus</i> .....	72
2.1.1.2. Caractérisation des composés.....	74
2.1.1.3. Conclusion partielle 1 .....	109
2.1.2. <i>Albizia chevalieri</i> .....	111
2.1.2.1. Extraction et isolement des composés de <i>Albizia chevalieri</i> .....	111
2.1.2.2. Caractérisation des composés .....	112
2.1.2.3. Conclusion partielle 2.....	145
2.1.3. <i>Lecaniodiscus cupanioides</i> .....	146
2.1.3.1. Extraction et isolement des composés de <i>Lecaniodiscus cupanioides</i> .....	147
2.1.3.2. Caractérisation des composés.....	149
2.1.3.3. Conclusion partielle 3.....	205
<b>2.2. Etudes biologiques .....</b>	<b>207</b>
2.2.1. Evaluation de l'activité anthelminthique des fractions enrichies de <i>L. cupanioides</i> (LCR) et <i>C. calothyrsus</i> (CCF).....	207
2.2.2. Evaluation de l'activité antiproliférative des composés et fractions de <i>L. cupanioides</i> et <i>C. calothyrsus</i> (CCF).....	209
2.2.2.1. Activité antiproliférative des fractions enrichies LCR ( <i>L. cupanioides</i> ) et CCF ( <i>C. calothyrsus</i> ) .....	209

2.2.2.2. Activité antiproliférative des saponines de <i>Calliandra calothyrsus</i> (calothyrsusosides A et B) .....	209
2.2.2.3. Activité antiproliférative des composés de <i>Lecaniodiscus cupanioides</i> (cupanioidesosides A -C et lecanioside A).....	211
2.2.3. Evaluation de l'activité biologique des saponines de <i>A. chevalieri</i> .....	212
2.2.3.1. Effets proapoptotiques des chevalierosides A-C .....	212
<b>Discussion générale.....</b>	<b>215</b>
<b>Conclusion générale et perspective .....</b>	<b>219</b>
<b>Chapitre 3 : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>223</b>
<b>3.1. Matériel végétal.....</b>	<b>224</b>
3.2. Séparation et isolement .....	224
3.3. Méthodes chromatographiques .....	226
3.3.1. Chromatographie sur couche mince .....	226
3.3.2. Chromatographie sur gel perméable .....	227
3.3.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	228
3.3.4. Chromatographie flash .....	228
3.3.5. Chromatographie liquide à moyenne pression.....	230
3.3.6. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....	231
3.3.7. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS ..	232
3.3.8. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse LC/MS ...	232
<b>3.4. Méthodes physico-chimiques.....</b>	<b>233</b>
3.4.1. Spectrométrie de masse .....	233
3.4.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	233
3.4.3. Hydrolyse acide.....	234
3.4.4. Pouvoir rotatoire.....	235
<b>3.5. Caractéristiques physico-chimiques.....</b>	<b>236</b>
<b>3.6. Evaluation de l'activité biologique .....</b>	<b>241</b>
3.6.1. Evaluation de l'activité anthelminthique.....	241
3.6.2. Activité antiproliférative.....	241
3.6.3. Evaluation de l'effet pro-apoptotique.....	242
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>244</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>260</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
Api		<i>apiose</i>
APCI		<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
Ara		<i>arabinose</i>
Araf		<i>arabinofuranose</i>
ASPC-1	:	<i>Lignée de cellules souches cancéreuses du pancréas humain</i>
$[\alpha]_D$		<i>Pouvoir rotatoire</i>
A431	:	<i>Cellules cancéreuses de l'épiderme humain</i>
brd		<i>Brond doublet</i>
brs		<i>Brond singulet</i>
brt		<i>Brond triplet</i>
BJ	:	<i>Lignée de cellules non cancéreuses de fibroblaste</i>
°C	:	Degré celcius
$^{13}\text{C}$	:	Carbone 13
CC	:	Chromatographie sur colonne
CI <sub>50</sub>	:	Concentration Inhibitrice à 50%
CE <sub>50</sub>	:	Concentration efficace médiane
CCM	:	Chromatographie sur couche mince
COSY	:	Correlation Spectroscopy
CMI		Concentration minimale inhibitrice
CMB		Concentration minimale bactérienne
CHCl <sub>3</sub>		<i>chloroforme</i>
d	:	Doublet
dd	:	Doublet dedoublé
DEPT	:	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL <sub>50</sub>		Dose létale médiane
DMSO-d <sub>6</sub>		<i>diméthylsulfoxyde deutéré</i>
$\delta$	:	Déplacement chimique en ppm
ESI	:	Electro Spray Ionization
Fig.	:	Figure
GC-MS		<i>Chromatographie Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse</i>
Glc		<i>Glucose</i>
HPLC	:	High Pressure Liquid Chromatography
$^1\text{H}$	:	Proton
HMBC	:	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HSQC	:	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	:	Hertz
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		<i>acide sulfurique</i>
ha		hectare
H <sub>2</sub> O		<i>Eau</i>

<i>J</i>		<i>Constante de couplage mesuré en Hz</i>
LC-MS		<i>Chromatographie Liquide Couplée à la Spectrométrie de Masse</i>
LPS		Lipopolysaccharides
m	:	Multiplet
MALDI		Matrix assisted laser desorption ionization
MTT	:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide
MHz	:	Mégahertz
MeCN		acétonitrile
MeOH		<i>Méthanol</i>
MPLC		<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
<i>m/z</i>	:	masse/charge d'un ion
nd	:	Non défini
<i>NO</i>		Monoxyde d'azote
NOESY	:	Nuclear Overhauser Effet Spectroscopy
<i>ppm</i>	:	Partie par million
PBS		<i>Phosphate Buffer Saline, (tampon phosphate salin)</i>
ROESY	:	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
Rha		<i>Rhamnose</i>
SD	:	Déviation standard
SM	:	Spectrométrie de masse
s	:	Singulet
t	:	Triplet
THP-1	:	<i>Cellules cancéreuses sanguines</i>
TOF		<i>Time of flight</i>
VLC	:	chromatographie liquide sous vide
Xyl		Xylose

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Carte de répartition géographique des Fabaceae .....	8
Figure 2: Feuilles et fleurs de <i>Calliandra calothyrsus</i> .....	10
Figure 3: Feuilles de <i>Albizia chevalieri</i> .....	12
Figure 4: Carte de répartition géographique des Sapindaceae .....	13
Figure 5: Feuilles et fruits de <i>Lecaniodiscus cupanioides</i> .....	15
Figure 6: Quelques squelettes triterpéniques : Oleanane (1), Ursane (2), Dammarane (3), et Lupane (4) .....	17
Figure 7: Exemples d'aglycones triterpéniques : acide oléanolique (5), echinocystique (6), hédéragénine (7) et ursolique (8) .....	18
Figure 8: Schéma de biogenèse des stéroïdes .....	19
Figure 9: Génines stéroïdiques .....	20
Figure 10: Génines stéroïdiques avec hydroxyles en positions 2, 6 et 11. ....	21
Figure 11: Schéma de biogenèse des farnésols .....	23
Figure 12: Aglycones de types farnésols .....	23
Figure 13: Séquences osidiques les plus rencontrées .....	24
Figure 14: Mécanisme de l'ionisation par électrospray .....	57
Figure 15 : Points de clivages des différentes hydrolyses chimiques .....	58
Figure 16: Spectre de RMN <sup>1</sup> H d'un saponoside triterpénique .....	60
Figure 17: Spectre de RMN <sup>1</sup> H élargi d'un saponoside triterpénique (partie des anomères) ...	60
Figure 18: Spectre de RMN <sup>1</sup> H élargi d'un glycoside de farnésol (partie aglycone) .....	61
Figure 19: Spectre de RMN <sup>1</sup> H élargi d'un glycoside de farnésol (partie des anomères et osidique) .....	61
Figure 20: Spectre de RMN <sup>13</sup> C d'un saponoside .....	62
Figure 22: Spectre de RMN <sup>13</sup> C élargi des glycosides de farnésol (zone osidique). ....	63
Figure 23: Spectre de RMN <sup>13</sup> C élargi des glycosides de farnésol (zone des anomères, des carbonyles et des carbones éthyléniques). ....	64
Figure 24: Spectre COSY élargi .....	65
Figure 25: Spectre HSQC élargi .....	66
Figure 26: Spectre HMBC élargi .....	67
Figure 27: Spectre TOCSY élargi .....	68

Figure 28: Spectre HSQC-TOCSY élargi.....	68
Figure 29: Spectre NOESY élargi.....	69
Figure 30: Spectre ROESY élargi.....	70
Figure 31: Corrélations observées à l'aide de différentes expériences bidimensionnelles .....	70
Figure 32: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des fleurs de <i>C. calothyrsus</i> .	72
Figure 33: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des branches de <i>C. calothyrsus</i> .....	73
Figure 34 : Spectre de masse du composé CC1 .....	74
Figure 35 : Spectres de RMN <sup>1</sup> H (a,b) et HSQC (c) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CC1 montrant les méthyles angulaires.....	76
Figure 36 : Spectres de RMN <sup>13</sup> C (a) (125 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) et HSQC (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CC1. ....	77
Figure 37 : dérivé de type 3,28-bidesmoside de l'acide echinocystique .....	78
Figure 38: Spectre HSQC élargi (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé CC1.....	80
Figure 39 : Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CC1 montrant les points de liaison des sucres. ....	82
Figure 40: Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CC1. ....	83
Figure 41: Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CC1. ....	84
Figure 42: Structure du composé CC1 .....	85
Figure 43: Spectre de masse du composé CC2 .....	87
Figure 44: Spectres HSQC élargi (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé CC2.....	89
Figure 45 : Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CC2 montrant les points de liaison des sucres. ....	90
Figure 46: Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CC2. ....	91
Figure 47: Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CC2. ....	92
Figure 49: Spectre de masse du composé CC3 .....	95

Figure 50: Spectres HSQC élargi (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé CC3.....	97
Figure 51: Spectre HMBC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CC3 montrant les points de liaison des sucres. ....	98
Figure 52 : Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CC3.....	99
Figure 53 : Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CC3.....	100
Figure 54: Structure du composé CC3 .....	101
Figure 55: Spectre de masse du composé CC4 .....	103
Figure 56: Spectres de RMN <sup>1</sup> H (a,b)(500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CC4.....	104
Figure 57: Spectres de RMN <sup>13</sup> C élargi partie des carbones oléfiniques de l'aglycone (125 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CC4.....	105
Figure 58: Dérivé de type 3 monodesmoside de l'acide oléanolique.....	105
Figure 59: Spectres HSQC élargi (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) montrant le signal de l'anomère du composé CC4.....	107
Figure 60: Spectre HMBC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CC4 montrant le point de liaison du sucre.....	108
Figure 61: Structure du composé CC4 .....	108
Figure 62: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des écorces de <i>A. chevalieri</i> .....	111
Figure 63: Spectre de masse du composé CHEV1 .....	112
Figure 64: Spectres de RMN <sup>1</sup> H (a,b) et HSQC (c) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CHEV1 montrant les méthyles angulaires. ....	114
Figure 65: Spectres de RMN <sup>13</sup> C (a) (125 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) et HSQC (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CHEV1.....	115
Figure 66: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé CHEV1. ....	117
Figure 67 : Spectre de RMN <sup>1</sup> H du composé CHEV1 (partie de cinnamoyle).....	118
Figure 68: Spectres HMBC(a) et ROESY élargi (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CHEV1 montrant les points de liaison des sucres.....	120

Figure 69: Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CHEV1. ....	121
Figure 70: Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CHEV1. ....	122
Figure 71: Structure du composé CHEV1 .....	123
Figure 72: Spectre de masse du composé CHEV2.....	125
Figure 73: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé CHEV2 .....	127
Figure 74: Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé CHEV2 (partie du MT). ....	128
Figure 75: Spectres HMBC (a) et ROESY élargi (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CHEV2 montrant les points de liaison des sucres. ....	130
Figure 76: Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CHEV2. ....	131
Figure 77: Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CHEV2. ....	132
Figure 78: Structure du composé CHEV2 .....	133
Figure 79: Spectre de masse du composé CHEV3.....	135
Figure 80: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé CHEV3 .....	137
Figure 81: Spectres HMBC (a) et ROESY élargi (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé CHEV3 montrant les points de liaison des sucres. ....	140
Figure 82: Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CHEV3. ....	141
Figure 83: Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CHEV3. ....	142
Figure 84: Structure du composé CHEV 3 .....	143
Figure 85: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des racines de <i>L. cupanioides</i> . .....	148
Figure 86: Spectre de masse du composé LCR1 .....	149
Figure 87: Spectres de RMN <sup>1</sup> H (a) et HSQC (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé LCR1 montrant les méthyles angulaires.....	150

Figure 88: Spectres HSQC (a,b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) élargie montrant les protons oléfiniques et le groupement oxyméthylène du composé LCR1. ....	151
Figure 89: Spectres de RMN <sup>13</sup> C (a,b) (125 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) montrant les carbones quaternaires et secondaires du composé LCR1. ....	152
Figure 90: Spectre HMBC montrant les corrélations des méthyles angulaires du composé LCR1. ....	153
Figure 91: Spectres de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) zone des méthylènes de l'aglycone du composé LCR1. ....	154
Figure 92: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé LCR1. ....	156
Figure 93: Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé LCR1 montrant les points de liaison des sucres. ....	158
Figure 94: Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone du composé LCR1. ....	159
Figure 95: Structure du composé LCR1 .....	160
Figure 96 : Spectre de masse du composé LCR2.....	162
Figure 97: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé LCR2. ....	164
Figure 98: Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b)(500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé LCR2 montrant les points de liaison des sucres. ....	166
Figure 99: Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone du composé LCR2. ....	167
Figure 100: Structure du composé LCR2 .....	168
Figure 101: Spectre de masse du composé LCR3 .....	170
Figure 102: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) montrant les signaux des anomères du composé LCR3. ....	172
Figure 103 : Spectres HMBC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé LCR3 montrant les points de liaison des sucres. ....	173
Figure 104 : Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone du composé LCR3.....	174
Figure 105: Structure du composé LCR3 .....	174
Figure 106: Spectre de masse du composé LCR4.....	176

Figure 107: Spectres de RMN $^1\text{H}$ (a) et HSQC (b) (500 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) du composé LCR4 montrant les méthyles angulaires.....	177
Figure 108: Spectres RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) montrant les méthines de l'aglycone du composé LCR4. ....	178
Figure 109: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé LCR4. ....	180
Figure 110: Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) du composé LCR4 montrant les points de liaison des sucres. ....	182
Figure 111: Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé LCR4. ....	182
Figure 112: Corrélation HMBC de l'unité osidique en position C-28 de l'aglycone du composé LCR4. ....	183
Figure 113: Structure du composé LCR4 .....	183
Figure 114: Spectre de masse du composé LCR5 .....	185
Figure 115: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé LCR5. ....	187
Figure 116: Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) du composé LCR5 montrant les points de liaison des sucres. ....	189
Figure 117: Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé LCR5. ....	190
Figure 118: Structure du composé LCR5 .....	191
Figure 119: Spectre de masse du composé LCR6 .....	193
Figure 120: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé LCR6. ....	195
Figure 121: Spectres HMBC élargi (500 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) du composé LCR6 montrant les points de liaison des sucres. ....	196
Figure 122 : Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé LCR6.....	197
Figure 123: Structure du composé LCR6 .....	197
Figure 124: Spectre de masse du composé LCR7 .....	199
Figure 125: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $\text{d}_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé LCR7. ....	201

Figure 126: Spectres HMBC élargi (500 MHz, pyridine-d <sub>5</sub> ) du composé LCR7 montrant les points de liaison des sucres. ....	202
Figure 127: Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé LCR7.....	203
Figure 128: Structure du composé LCR7 .....	203
Figure 129: Les effets inhibiteurs des deux fractions sur H. contortus .....	209
Figure 130: Effets proapoptotiques des chevalerosides A-C sur ASPc-1. ....	212
Figure 131 : Effets proapoptotiques des chevalerosides A-C sur THP-1.....	213
Figure 132: Plaque de CCM d'un échantillon après fractionnement par MPLC .....	227
Figure 133 : Appareil Combiflash (photo Messi, Pharmadev, Université de Toulouse 3) ....	229
Figure 134: Appareil de MPLC (photo Messi, Pharmadev, Université de Toulouse 3) .....	230
Figure 135: Appareil de HPLC Semi-préparative (photo Messi, Pharmadev, Université de Toulouse 3).....	231
Figure 136: Appareil de RMN (photo Messi, Pharmadev, Université de Toulouse 3).....	234

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principaux sucres rencontrés dans les saponosides .....	22
Tableau II : Informations apportées par les hydrolyses des glycosides terpéniques.....	58
Tableau III: comparaison des données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie aglycone de CC1 avec celles de la littérature .....	79
Tableau IV: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie osidique de CC1 .....	86
Tableau V: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de CC2 .....	88
Tableau VI: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie osidique de CC2 .....	94
Tableau VII: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de CC3.....	96
Tableau VIII: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie osidique de CC3 .....	102
Tableau IX: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de CC4.....	106
Tableau X: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie osidique de CC4 .....	109
Tableau XI: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie aglycone de CHEV1.....	116
Tableau XII: Valeurs des déplacements chimiques ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ) de l'unité cinnamoyle de CHEV 1 (pyridine- $d_5$ ).....	119
Tableau XIII: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie osidique de CHEV1.....	124
Tableau XIV: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie aglycone de CHEV2.....	126
Tableau XIV: Valeurs des déplacements chimiques ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ) de l'unité monoterpénique de CHEV2 (pyridine- $d_5$ ).....	129
Tableau XVI: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie osidique de CHEV2.....	134
Tableau XVII: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie aglycone de CHEV3.....	136
Tableau XVIII: Valeurs des déplacements chimiques ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ) de l'unité monoterpénique et cinnamoyle de CHEV 3 (pyridine- $d_5$ ) .....	139

Tableau XIX: données de RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) de la partie osidique de CHEV3.....	144
Tableau XX: données de RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) de la partie aglycone de LCR1.....	155
Tableau XXI: données de RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) de la partie osidique de LCR1.....	161
Tableau XXII: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie aglycone de LCR2 ...	163
Tableau XXIII: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie osidique de LCR2..	169
Tableau XXIV: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie aglycone de LCR3.	171
Tableau XXV: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie osidique de LCR3....	175
Tableau XXVI: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie aglycone de LCR4 .	179
Tableau XXVII: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie osidique de LCR4 .	184
Tableau XXVIII: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie aglycone de LCR5 .....	186
Tableau XXIX: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie osidique de LCR5 ..	192
Tableau XXX: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie aglycone de LCR6...	194
Tableau XXXI: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie osidique de LCR6 ..	198
Tableau XXXII: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie aglycone de LCR7	200
Tableau XXXIII: données RMN ( <sup>1</sup> H, 500 MHz et <sup>13</sup> C, 125 MHz) partie osidique de LCR7	204
Tableau XXXIV: Pourcentage d'efficacité après 1 heure d'incubation des fractions LCR et CCF à différentes concentrations avec les L3 de <i>H. contortus</i> , exprimés en Moyenne ± SD. ....	207
Tableau XXXV: Activité antiproliférative sur la lignée cellulaire Hep3B et Caco-2 des fraction LCR et CCF.....	209
Tableau XXXVI: Activités antiprolifératives sur la lignée cellulaire Hep3B et Caco-2 des composés CC1 et CC2 de <i>C. calothyrsus</i> . ....	210
Tableau XXXVII: Activité antiproliférative sur la lignée cellulaire Caco-2 des composés LCR1 à LCR4 de <i>L. cupanioides</i> .....	211
Tableau XXXVIII: Effets proapoptotiques des Chevalierosides A-C (1-3) sur AsPC-1 et THP-1 .....	213
Tableau XXXIX: Méthode d'éluion pour l'analyse des sucres.....	233
Tableau XL: Données spectrales et constantes physiques des composés isolés. ....	236

## Résumé

Ce travail présente l'étude phytochimique et biologique de trois plantes médicinales camerounaises, *Calliandra calothyrsus* Meissn. (Fabaceae), *Albizia chevalieri* Harms (Fabaceae) et *Lecaniodiscus cupanioides* Planch. ex Benth. (Sapindaceae). L'étude des fleurs de *Calliandra calothyrsus* a conduit à l'isolement de quatre composés dont trois décrits pour la première fois dans la littérature (calothyrsusosides A-C). A partir des racines de *Lecaniodiscus cupanioides*, sept composés ont été isolés, dont quatre nouveaux (cupanioidesosides **A-C** et le lecanioside **A**). Enfin, l'étude phytochimique des écorces du tronc de *Albizia chevalieri* a permis d'isoler trois saponosides nouveaux (chevalierosides A-C).

Les structures des composés isolés ont été établies grâce à l'analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY et ROESY/NOESY) couplées à spectrométrie de masse haute résolution (HRESI-MS), et par comparaison des données obtenues avec celles de la littérature.

Les composés isolés ont fait l'objet de diverses études biologiques. L'évaluation des propriétés antiprolifératives sur deux lignées de cellules cancéreuses du tube digestif humain (Hep3B et Caco-2) pour les composés isolés de *C. calothyrsus* montrent que ces composés possèdent une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire Hep3B, avec des valeurs de  $\text{CI}_{50}$  autour de 6,0  $\mu\text{M}$ , qui sont de l'ordre de celle du sorafenib, l'une des molécules les plus utilisées cliniquement. Aucune activité antiproliférative n'a été détectée pour les mêmes composés sur la lignée cellulaire Caco-2 ( $\text{CC}_{50} > 25 \mu\text{M}$ ). Par ailleurs, pour les composés isolés des racines de *L. cupanioides* (cupanioidesosides **A -C** et Lecanioside **A**), aucune activité antiproliférative n'a été détecté sur les cellules Caco-2 ( $\text{CC}_{50} > 25 \mu\text{M}$ ).

Pour les composés isolés de *Albizia chevalieri*, l'évaluation de leur effet d'induction d'apoptose sur deux lignées de cellules cancéreuses humaines (AsPC-1 et THP-1) a montré que le pourcentage de cellules apoptotiques après 24h de traitement a augmenté de façon concentration-dépendante, ce qui suggère que les composés testés ont une activité proapoptotique sur les deux lignées cellulaires.

Enfin, l'activité anthelminthique des fractions enrichies en saponines de *Calliandra calothyrsus* (CCF) et de *Lecaniodiscus cupanioides* (LCR) a été évaluée sur des larves de troisième stade (L3) d'*Haemonchus contortus* selon le test d'inhibition du dégainement larvaire (LEIA) avec une gamme des concentrations croissantes de 150  $\mu\text{g/mL}$  à 1200  $\mu\text{g/mL}$  par rapport à un contrôle négatif (PBS) afin de mesurer les cinétiques de dégainement selon la concentration appliquée.

Pour toutes les deux fractions (LCR et CCF), l'activité anthelminthique a suivi une courbe montrant une relation dose-réponse. En général, les valeurs calculées des  $\text{CI}_{50}$  ont été plus basses pour les CCF que pour les LCR. Ce résultat suggère une plus forte sensibilité de *Haemonchus contortus* à CCF par rapport à LCR.

**Mots clés :** *Calliandra calothyrsus*, *Albizia chevalieri*, *Lecaniodiscus cupanioides*, Saponosides, Glycosides de farnésol, activités biologiques, étude phytochimique.

## Abstract

This work presents the phytochemical study of three Cameroonian medicinal plants, *Calliandra calothyrsus* Meissn. (Fabaceae), *Albizia chevalieri* Harms (Fabaceae) and *Lecaniodiscus cupanioides* Planch. ex Benth. (Sapindaceae). The study of the flowers of *Calliandra calothyrsus* led to the isolation of four compounds, three of them were described for the first time. From the roots of *Lecaniodiscus cupanioides*, seven compounds were isolated, including four new ones. Finally, the phytochemical study of the stem bark of *Albizia chevalieri* led to the isolation of three new saponosides. The structures were established by extensive analysis of NMR techniques, mainly 1D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) and 2D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COZY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY and ROESY/NOESY) coupled with high resolution mass spectrometry (HRESI-MS), and by comparison with data from the literature. The isolated compounds were submitted to various biological studies. The evaluation of the antiproliferative properties on two cancer cell lines of the human digestive tract (Hep3B and Caco-2) of the compounds isolated from *C. calothyrsus* show that the compounds possess antiproliferative activity against the Hep3B cell line, with IC<sub>50</sub> values of 6.0 and 6.5 μM, respectively, which are of the order of that of sorafenib, one of the most clinically used molecules. However, no antiproliferative activity was detected for the same compounds on the Caco-2 cell line (CC<sub>50</sub> > 25 μM).

For compounds isolated from *Albizia chevalieri*, the evaluation of their effect of inducing apoptosis on two human cancer cell lines (AsPC-1 and THP-1) showed that the percentage of apoptotic cells after 24 hours of treatment increased in a concentration-dependent manner, which suggests that the compounds tested have proapoptotic activity on both cell lines.

Finally, the anthelmintic activity of the fractions enriched in saponins of *Calliandra calothyrsus* (CCF) and *Lecaniodiscus cupanioides* (LCR) was evaluated on third starved larvae (L3) obtained from goats and sheep exhibiting a monospecific infection with *Haemonchus contortus* according to the larval stripping inhibition test (LEIA) with a range of increasing concentrations from 150 μg / mL to 1200 μg / mL compared to a negative control (PBS) in order to measure the kinetics of stripping according to the applied concentration. For both fractions (LCR and CCF), anthelmintic activity followed a curve showing a dose-response relationship. In general, the calculated IC<sub>50</sub> values were lower for CCF than LCR. This result suggests a higher sensitivity of *Haemonchus contortus* to CCF compared to LCR.

*Key words:* *Calliandra calothyrsus*, *Albizia chevalieri*, *Lecaniodiscus cupanioides*, *Saponosides*, *Farnesol glycosides*, *biological activities*, *phytochemical study*.

# **INTRODUCTION**

Le parasitisme gastro-intestinal des nématodes continue de représenter un défi majeur à la santé, au bien-être et à la productivité des ruminants en raison des pertes de production importantes qu'il provoque dans le monde et plus particulièrement en zone tropicale (De Araújo-Filho *et al.*, 2018; Elmahalawy *et al.*, 2018). Les helminthes réduisent le niveau de la production de viande, de lait et de fumier et augmentent également la mortalité, en particulier chez les jeunes animaux (Da Silva *et al.*, 2013; Mavrot *et al.*, 2015). L'incidence et la gravité des diverses maladies parasitaires dues aux helminthes sont plus répandues dans les régions tropicales, en particulier dans les pays en voie de développement tels que le Cameroun, la République du Congo et la République Démocratique du Congo (Salifou *et al.*, 2013). C'est ainsi que des études épidémiologiques ponctuelles effectuées dans l'Adamaoua (Cameroun) ont montré que des pathologies parasitaires occasionnent des pertes importantes, estimées à 33,33% de mortalité chez les veaux (MINEPIA, 2001). Le contrôle de ces pathologies en vue d'améliorer la productivité des petits ruminants est donc une nécessité dans un contexte déjà marqué par l'accroissement rapide de la population humaine et l'augmentation croissante de la demande en protéines d'origine animale, tant au Cameroun que dans tous les pays en voie de développement.

Depuis longtemps, la lutte contre les maladies parasitaires s'est faite avec l'utilisation des molécules chimiques de synthèse. La diversité des médicaments anthelminthiques pour contrôler les nématodes des petits ruminants est très réduite, les infections à strongles gastro-intestinales ont été principalement contrôlées par des drogues synthétiques appartenant à différentes classes chimiques telles que benzimidazoles, imidazothiazoles, tétrahydropyrimidines, lactones macrocycliques, amino-acétonitrile dérivés et spiroindoles (Kenyon *et al.*, 2016), dont l'utilisation régulière et parfois excessive contribue à l'apparition d'une résistance à une ou plusieurs familles de médicaments, devenant ainsi un problème majeur pour les générations futures (Charlier *et al.*, 2018). La résistance des vers aux anthelminthiques devient de plus en plus inquiétante. En effet, des rapports font état d'une efficacité réduite de certains médicaments récemment commercialisés contre *Haemonchus contortus*, comme le monepantel ou le derquantel (Sales & Love, 2016). Face à l'inquiétante généralisation de la résistance des vers intestinaux à ces produits (Waller, 2006), il devient primordial de mettre au point de nouvelles méthodes de contrôle du parasitisme en mettant à profit nos connaissances et la médecine traditionnelle comme source de nouvelles molécules pour faire face à cette problématique mondiale.

Pour le contrôle des infections à strongles gastro-intestinales, il existe différentes approches non chimiques et respectueuses de l'environnement qui peuvent limiter l'utilisation

des drogues de synthèse chez les ruminants, comme la vaccination, le contrôle biologique, la supplémentation nutritionnelle et la gestion des pâturages, y compris leur rotation des pâturages (Hoste & Torres-Acosta, 2011), mais dans la plupart des cas, l'aide complémentaire à un traitement anthelminthique est toujours nécessaire (Charlier *et al.*, 2018). Pour cela, il existe un intérêt renouvelé pour la médecine traditionnelle et les plantes ethno-vétérinaires ayant des propriétés anthelminthiques dans les pays tropicaux (Waller, 2006), en particulier en Afrique (McCorkle & Mathias, 1996).

Ces médicaments issus des plantes ont l'avantage d'être disponibles, peu coûteux, et accessibles aux populations locales, en particulier celles à faible revenu (Cooper *et al.*, 2015). Plusieurs études « *in vitro* » et « *in vivo* » antérieures chez les petits ruminants ont montré que différents extraits de plantes possèdent des propriétés anthelminthiques contre les strongles gastro-intestinaux d'espèces diverses telles que *Schistosoma mansoni*, *Trichuris muris*, *Trichistrongylus columbriformis* et *Haemonchus contortus* (Giovanelli *et al.*, 2018; Cortes-Morales *et al.*, 2019). L'activité anthelminthique de ces extraits de plantes est liée à la présence de métabolites secondaires biologiquement actifs tels que des tanins condensés, des flavonoïdes, des stéroïdes, des terpénoïdes, des alcaloïdes et des saponines (Vargas-Magaña *et al.*, 2014; Spiegler *et al.*, 2017). Parmi celles-ci, les saponosides sont d'importants métabolites secondaires des plantes et ont montré leur importance en tant que composés naturels anthelminthiques (Gomes *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018). Il est rapporté que les fractions riches en saponosides stéroïdiques et en saponosides triterpéniques d'*Agave sisalana* ont un effet ovicide *in vitro* contre les nématodes de chèvres (Botura *et al.*, 2013). Plus récemment, le potentiel nématocide *in vitro* des saponosides de différentes *Medicago* spp. contre les nématodes d'âne a été mises en évidence (Maestrini *et al.*, 2019, 2020). Les effets biologiques des saponosides sont normalement attribués à leur interaction spécifique avec les membranes cellulaires (Tava & Avato, 2006), entraînant des changements dans la perméabilité cellulaire. Pour les nématodes, les saponosides ont été associés à la formation de complexes avec des composants de la membrane cellulaire présents dans différentes étapes du cycle de vie des nématodes, conduisant à une augmentation de la perméabilité des membranes et provoquant la mort de ces parasites (Doligalska *et al.*, 2011; Vo *et al.*, 2017). Les saponosides sont détectés dans de nombreuses espèces végétales, dans lesquelles ce sont des glycosides triterpéniques avec une large gamme de propriétés, y compris les activités antimicrobienne, cytotoxique et insecticide (Avato *et al.*, 2006; D'addabbo *et al.*, 2011; Abbruscato *et al.*, 2014; Noté *et al.*, 2016a; Maestrini *et al.*, 2019, 2020).

Pour cette raison, nous assistons à un regain d'intérêt pour ce type de composés naturels à activités anthelminthique dans le but de trouver une alternative durable aux médicaments de synthèse actuels.

C'est donc dans ce cadre que le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles (LPSN) de l'Université de Yaoundé I (Cameroun) en collaboration avec l'UMR 152 Pharma Dev de l'Université de Toulouse 3 Paul Sabatier (France) et sous l'hospice de l'Agence Universitaire de la Francophonie a mis sur pied ce projet de recherche. Dès lors, des enquêtes ethnobotaniques sur les plantes ethno-vétérinaires ont été réalisées dans le pays et une base de données a été élaborée. Ainsi, le projet a débuté par l'étude de 3 plantes utilisées en médecine traditionnelle, connues pour leurs propriétés anthelminthiques.

Par ailleurs, nous avons mené en parallèle des tests afin d'évaluer les propriétés antiproliférative et proapoptotique de nos composés et fractions pour déterminer leur sélectivité vis à vis des helminthes choisis.

#### ➤ **Objectif général**

Ce travail avait pour objectif principal d'isoler et de caractériser les glycosides terpéniques à potentiel anthelminthique à partir de trois plantes médicinales camerounaises : *Albizia chevalieri* (Mimosaceae), *Calliandra calothyrsus* (Mimosaceae), *Lecaniodiscus cupanioides* (Sapindaceae).

#### ➤ **Objectifs spécifiques**

Plus précisément, il s'agira de :

- Préparer les fractions enrichies en glycosides terpéniques à potentiel anthelminthique de nos plantes ;
- Isoler et caractériser les glycosides terpéniques à partir de fractions d'intérêts de ces trois plantes ;
- Evaluer leurs activités anthelminthiques et cytotoxiques à l'égard de quelques souches de cellules cancéreuses.

Notre travail sera divisé en trois chapitres principaux :

Le premier chapitre présente la synthèse bibliographique relative aux familles et aux genres des espèces étudiées. Il comprendra l'étude botanique, l'usage des plantes, la présentation des métabolites secondaires majoritaires : saponosides triterpéniques et glycosides de farnésol et leurs activités biologiques antérieures ; et enfin, l'étude des techniques d'élucidation structurale des saponosides triterpéniques et des glycosides de farnésol.

Le deuxième chapitre quant à lui, est consacré aux résultats des travaux réalisés au laboratoire sur les trois espèces. Nous présenterons le protocole d'extraction et d'isolement des

composés, l'identification et la caractérisation de leurs structures et les tests biologiques effectués sur les fractions et les composés isolés.

Le troisième chapitre présentera les techniques d'isolement, de purification et d'analyse structurale, ainsi que les différentes méthodes utilisées pour effectuer les tests biologiques. Une liste de la littérature consultée pour la rédaction de cette thèse sera présentée à la fin de ce document, et en annexe, une liste de publications issues des travaux de cette thèse.

# **Chapitre I : Revue de la littérature**

## **1.1. Etude botanique**

### **1.1.1. Ordre des Fabales**

L'ordre des Fabales est le deuxième ordre après celui des Asterales. Les plantes dicotylédones de l'ordre Fabales, dans la classe des Magnoliopsidés et la sous-classe des rosidés, ont une distribution dans le monde entier, quoique plus fréquente dans les régions tropicales, et une large distribution altitudinale. La famille des Fabaceae qui comporte 765 genres et 19500 espèces est la plus importante. De nombreuses espèces sont des plantes médicinales ou des plantes aromatiques, exploitées pour la production de médicaments, gommages industrielles, huiles et parfums. Ce sont des arbres, des arbustes, des herbes, des lianes et des plantes aquatiques. L'unité de cet ordre vient de son fruit qui est un légume, la gousse. On les appelait autrefois les légumineuses, nom qui désigne la gousse (fruit sec ou charnu) déhiscent par une ou deux fentes. D'après Cronquist (1981), celui-ci comporte trois grandes sous familles : Caesalpinaceae, Mimosaceae et Fabaceae. Mais depuis 2009 la classification phylogénétique APG III (2009) fait plutôt état de quatre sous familles : *Polygalaceae*, *Quillajaceae*, *Surianaceae*, *Fabaceae* ou *Leguminosae*, cette dernière sous famille inclue *Caesalpinaceae*, *Mimosaceae* et *Fabaceae* (ou *Papilionaceae*).

Les caractéristiques morphologiques des espèces en font un groupe homogène. Les fleurs sont actinomorphes ou zygomorphes (avec une tendance à la zigomorphie), hermaphrodites, pentamères, tendant à réduire le nombre d'étamines avec un carpelle. Les feuilles sont généralement composées. En général, des fruits secs et déhiscent par deux sutures (avec une nervation carpénne) définissent ces légumineuses.

Nous traiterons dans cette thèse la famille des Fabaceae qui renferme les taxons *Albizia chevalieri* et *Calliandra calothyrsus*.

#### **1.1.1.1. Famille des Fabaceae**

Les Fabaceae constituent la famille la plus nombreuse et la plus évoluée de l'ordre des Fabales. C'est l'une des plus importantes familles de plantes à fleurs, la troisième après les Orchidaceae et les Asteraceae par le nombre d'espèces. Elle compte environ 765 genres regroupant plus de 19 500 espèces. C'est une famille à répartition cosmopolite, présente dans tous les continents (à l'exception de l'Antarctique), des zones froides aux zones tropicales. Elle est particulièrement concentrée dans les régions subtropicales et tempérées chaudes, comme en Afrique du Sud ou sur le pourtour méditerranéen. Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées regorgent d'espèces herbacées.

Ce sont des arbres, des arbustes ou des lianes ligneuses, caduques ou persistantes, ou encore des herbes annuelles, vivaces ou pluriannuelles. Quelques espèces tropicales sont

épiphytes et d'autres, grimpantes, développent des tiges vrillées, tournant généralement dans le sens des aiguilles d'une montre, plus rarement dans le sens inverse (*Phaseolus*, *Wisteria*), ou des vrilles axillaires, ou encore des crochets. Quelquefois, les feuilles sont réduites, les fonctions photosynthétiques étant transférées aux tiges, ou modifiées en phyllodes. Elles possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques. Dans de nombreux cas, elles sont constituées d'alcaloïdes, parfois de composés cyanogénétiques. Les fleurs sont généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à hypanthium court, généralement cupuliforme. Les sépales sont généralement au nombre de 5, libres ou soudés, valvaires ou imbriqués, tous semblables, ou le pétale postérieur différent par la forme, la taille et la couleur, disposé intérieurement ou extérieurement dans le bouton, les deux pétales inférieurs étant souvent soudés ou adhérents et formant une carène, ou largement étalés. Les étamines sont parfois nombreuses, mais généralement au nombre de 10, abritées dans le périanthe ou longuement exsertes, parfois bien évidentes. Le fruit est généralement une gousse, parfois une samare, un fruit lomentacé, une gousse indéhiscente, un akène, une drupe ou une baie (Spichiger *et al.*, 2002).



**Figure 1: Carte de répartition géographique des Fabaceae d'après (Heywood, 1978)**

#### 1.1.1.1.1. Classification systématique

Le monophylétisme des Fabaceae est attesté par de nombreux caractères morphologiques. Trois sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des Fabaceae :

- ✓ Les Caesalpinioideae, qui se retrouvent en zone tropicale (Judd *et al.*, 2002),
- ✓ Les Mimosoideae, qui se retrouvent en zone tropicale (Judd *et al.*, 2002),
- ✓ Les Faboideae (= Papilionoideae), qui sont plutôt cosmopolites.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés aux plantes de la sous famille des Mimosaceae.

### **1.1.1.2. La sous-famille des Mimosaceae**

La famille des Mimosaceae fut créée en 1814 par Robert Brown, un botaniste écossais. Les végétaux qui composent cette famille sont des arbres ou arbustes originaires des régions tropicales ou subtropicales. Les Mimosaceae sont en premier lieu des arbres caducs ou persistants, plus secondairement des lianes ligneuses, des arbustes ou encore plus rarement des plantes herbacées. Les feuilles sont simples ou d'apparence simple (feuille réduite à la nervure centrale = phyllode), ou composées bi ou tri-pennées. Elles peuvent avoir des mouvements dus à des renflements particuliers (pulvinus) à la base des folioles (ex. le Mimosa). Les fleurs sont groupées en têtes globuleuses nombreuses. Les fruits sont des gousses qui peuvent faire jusqu'à 1 m de long, même si les fleurs sont toutes petites. Elle compte environ 50 à 60 genres regroupant plus de 3200 espèces, elles même présentent dans les régions tempérées chaudes, tropicales et subtropicales (Raven & Polhill, 1981). Sur le continent africain, les Mimosaceae se retrouvent plus au niveau des savanes que dans les forêts denses (Villiers, 1996). Les genres importants en nombre d'espèces sont *Acacia* (24), *Albizia* (20) et *Entada* (11). Pour Lebrun et Stork (1992), les genres *Acacia*, *Albizia*, *Entada* et *Newtonia* sont les plus riches en espèces en Afrique tropicale. Au niveau mondial, (Villiers, 1989) et (Mabberley, 1997) constatent que le genre *Acacia* est le plus prédominant avec environ 1200 espèces tropicales. Selon Ndayishimiye *et al.*, 2010, l'Afrique centrale regorge près de 81 espèces réparties dans 19 genres ; parmi lesquelles *Calliandra* et *Albizia*.

### **1.1.1.3. Genre *Calliandra***

*Calliandra* est un genre originaire du continent américain appartenant à la famille des Fabaceae (légumineuses), sous-famille des Mimosoideae et qui comprend environ 170 espèces. Ces espèces se retrouvent plus en Amérique tropicale et subtropicale, puis en Asie et Madagascar. Ce sont des arbres ou des arbustes, parfois appelés « arbres aux houppettes », le plus souvent cultivés à travers le monde comme plantes ornementales.

### **1.1.1.4. *Calliandra calothyrsus* Meisn.**

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Sous-famille : Mimosoideae

Genre : *Calliandra* Benth.

Espèce : *Calliandra calothyrsus*



**Figure 2: Feuilles et fleurs de *Calliandra calothyrsus***

*Calliandra calothyrsus* Meisn. est une plante de la sous-famille des Mimosaceae originaire d'Amérique tropicale et du Mexique où elle pousse du niveau de la mer jusqu'à 1900 m d'altitude. Celle-ci a été introduite en Indonésie, aux philippines, ainsi que dans certaines régions d'Afrique et des Antilles. Il s'agit d'un grand arbuste à tiges multiples, dont la taille atteint entre 4 à 6 m. Ses feuilles bipennées, se détachent de l'arbre au cours d'une saison sèche prolongée (Hernández, 1991; Palmer *et al.*, 1994). L'inflorescence est un racème comportant de nombreuses fleurs de petite taille et de longues étamines libres de couleur écarlate sortant de son extrémité inférieure, ce qui lui confère l'aspect d'une brosse rougeâtre. Le fruit consiste en une gousse déhiscente dont les deux moitiés se recroquevillent à la maturité lors de la libération des graines. Elles se conservent bien pendant une à deux années. Dans la plupart des cas, l'espèce se propage par plantes de semis. Son tronc à écorce brun noirâtre ne dépasse pas les 30 cm de diamètre. Les feuilles alternes sont bipennées, rachis d'environ 15 cm de long. La feuille est composée de 15 à 20 paires de folioles. L'inflorescence en grappes ombelliformes de 10 à 30 cm de longueur. Les sépales et les pétales sont verts, calice d'environ 2mm de long, corolle de 5 à 6 mm de long. Nombreuses étamines rouges de 4 à 6 cm de long. Le fruit est une gousse linéaire, aplatie, de 8 à 11 cm x 1 cm, légèrement effilées de haut à la base, avec des marges épaissies et élevées, finement pubescente ou glabre. La graine est ellipsoïde, aplatie, de 5 à 7 mm de long et tachetée de brun foncé. Cet arbuste convient bien sur divers sols, y compris des sols acides, infertiles et argileux. Sa croissance est optimale en hautes altitudes (1500 à 2000 m) sous les tropiques humides dont les précipitations annuelles sont comprises entre 2000 et 4000 mm. Cet arbuste résiste aux périodes de sécheresse mais ne tolère pas des sols sursaturés. Il est un bon concurrent des adventices (Hernández, 1991; Palmer *et al.*, 1994).

#### **1.1.1.4.1. Usages**

Les utilisations de *Calliandra calothyrsus* ont été détaillées dans un certain nombre de publications, notamment : (Lowry & Macklin, 1988), (Perhutani, P. & National Research Council, 1983), (Wiersum & Rika, 1992) et (Macqueen, 1992). Dans sa région d'origine, elle était inutilisée et ce n'est que lors de son introduction en Indonésie que sa valeur potentielle et ses utilisations polyvalentes sont devenues évidentes. On l'utilise comme bois de chauffage (5 à 20 m<sup>3</sup>/ha/an) ; pour la confection de perches, pour donner de l'ombre, lutter contre l'érosion, nourrir les abeilles, comme brise-vent, pour la restauration des sols, comme arbuste ornemental et plus récemment comme fourrage pour le bétail. Les feuillages et les rameaux sont donnés en pâture aux animaux, mais leur palatabilité se voit diminuée en raison d'une teneur élevée en tanin. Les agriculteurs indonésiens considèrent que *C. calothyrsus* a une valeur médicinale chez les ruminants (Mulley & English, 1991). Il est particulièrement apprécié en Indonésie, où plus de 170 000 ha ont été plantés pour le reboisement de terres érodées et de piètre qualité autour des villages (Perhutani, P. & National Research Council, 1983).

#### **1.1.1.5. Le genre *Albizia***

*Albizia* est un genre qui comprend environ 150 espèces largement répandu en zones tropicales. Il appartient à la famille des Mimosaceae selon la classification classique, ou à celle des Fabaceae, sous-famille des Mimosoideae selon la classification phylogénétique. Le genre est très souvent orthographié à tort « *Albizzia* ». Avec leurs ports amples à la ramure bien étalée, les espèces de ce genre ressemblent aux flamboyants, autres espèces des pays tropicaux. En Afrique continentale, on retrouve quelques 35 espèces, à Madagascar une trentaine. La hauteur des arbres varie entre 6-12 m. Il se caractérise par ses inflorescences en capitules, avec 1-2 fleurs centrales modifiées, fonctionnellement mâles et pourvues d'un tube staminal plus grand et nectarifère. Les feuilles sont composées de petites folioles qui se replient sur elles-mêmes en l'absence de lumière. Ce genre est plus favorable aux terres pauvres et sableuses et s'adapte aux sols riches en calcaire.

#### **1.1.1.6. *Albizia chevalieri***

Classification APG II (2003)

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Sous-famille : Mimosoideae

Genre : *Albizia*

Espèce : *Albizia chevalieri*



**Figure 3: Feuilles de *Albizia chevalieri***

*A. chevalieri* harms (Mimosaceae) est un arbre ou un arbuste qui pousse jusqu'à 12 m de haut dans des conditions les plus difficiles de la savane sèche du Sénégal, du Niger, du Nigéria et du Cameroun (Saidu *et al.*, 2007). L'arbre forme des fourrés sur des sites sablonneux au Niger et au Nigéria. Il peut contribuer à la stabilisation des dunes. Les feuilles longues de 30 à 50 cm sont bipennées et pétiolées avec une glande bien marquée avant la première paire de pinnules. Le bois est jaune pâle, à grain droit, alternant jaune et blanc, et de poids moyen. L'inflorescence blanche est en capitules globuleux au sommet de pédoncules axillaires. Le fruit est une gousse oblongue à valves papyracées, les graines sont aplaties et ont un funicule allongé, deux cotylédons et un embryon droit. Son habitat naturel selon Arbonnier, 2004, est la savane soudano-sahélienne et soudanienne, sur les sols sableux.

#### **1.1.1.6.1. Usages**

L'extrait de feuilles est utilisé pour la gestion du diabète sucré au Niger et dans l'est du Nigéria, et son écorce de tige a été signalée comme un remède contre la toux (Saidu *et al.*, 2007). La décoction de ses feuilles est utilisée dans le nord du Nigéria pour traiter la dysenterie (Arbonnier, 2004). Ses extraits aqueux de racines et de feuilles possèdent des propriétés hypoglycémiques significatives et des effets hypolipidémiques (Burkill, 1985; Saidu *et al.*, 2010). Le screening phytochimique a révélé que l'écorce de *A. chevalieri* contenait des alcaloïdes et des tanins suffisant pour le bronzage au Nigeria et au Sénégal (Aliyu *et al.*, 2010). Des rapports locaux font état de l'utilisation de son extrait de feuilles présumé pour le traitement du cancer dans la ville de Zaria, Kaduna État du nord-ouest du Nigéria et dans la savane du nord du Sahel de Sokoto-Nigeria et de la République du Niger (Saidu *et al.*, 2007).

#### **1.1.2. Ordre des Sapindales**

Les Sapindales sont un ordre qui regroupe les plantes dicotylédones et qui compte environ 7000 espèces. Les Sapindales au sens restreint ont des fleurs souvent zygomorphes, unisexuées, pentamères ou tétramères. Les feuilles sont généralement composées pennées. Les fruits sont vésiculeux ou ailés. Les graines exalbuminées sont fréquemment enveloppées d'un

arille engendré par le funicule. Selon la classification de (Cronquist & Takhtadzhian, 1981), il comprend 15 familles : Acéracées (famille de l'érable), Akaniacées, Anacardiaceae, Bretschneideraceae, Burséracées, Cnéoracées, Hippocastanacées, Julianacées, Méliacées, Mélianthacées, Rutacées, Sapindacées, Simaroubacées, Staphyléacées, Zygophyllacées. En classification phylogénétique APG II (2003), sa circonscription est légèrement modifiée : ordre des Sapindales : Anacardiaceae, Biebersteiniaceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrariaceae[+ famille des Peganaceae ][+ famille des Tetradiclidaceae ], Rutaceae, Sapindaceae et Simaroubaceae, tandis que dans la classification phylogénétique APG III (2009) la circonscription est : ordre des Sapindales Juss. ex Bercht. & J.Presl (1820) : famille des Anacardiaceae R.Br. (1818), famille des Biebersteiniaceae Schnizl. (1856), famille des Burseraceae Kunth (1824), famille des Kirkiaceae Takht. (1967), famille des Meliaceae Juss. (1789), famille des Nitrariaceae Lindl. (1835) (incluant Peganaceae Tiegh. ex Takht., Tetradiclidaceae Takht.), famille des Rutaceae Juss. (1789), famille des Sapindaceae Juss. (1789) et famille des Simaroubaceae DC. (1811). Les principaux traits des Sapindales sont :

- Leur localisation tropicale ou subtropicale,
- Le caractère ligneux de l'appareil végétatif,
- La présence d'un appareil sécréteur interne développé,
- La simplification du plan floral à partir d'une formule de base pentamère.

#### 1.1.2.1. Famille des Sapindaceae

La famille des Sapindaceae (Sapindacées) regroupe des plantes dicotylédones ; elle comprend environ 2000 espèces réparties en 140 genres. Elle est représentée dans le monde entier. Les Sapindaceae sont des espèces ligneuses, le plus souvent des arbres ou des arbustes, parfois des lianes.



*Figure 4: Carte de répartition géographique des Sapindaceae (Heywood, 1978)*

Selon les classifications phylogénétiques récentes (classification APG II), les Sapindaceae incluent désormais aussi les érables ainsi que les marronniers et apparentés, qui

appartenait respectivement, selon les classifications classiques, à la famille des Aceraceae et à celle des Hippocastanaceae. La famille tient son nom du genre *Sapindus*, « arbre à savon », qui produit des fruits utilisés comme « noix de lavage » en raison de leur pouvoir détergent dû à la présence importante de saponines. De nombreuses autres espèces de la famille des Sapindacées contiennent aussi des concentrations marquées de saponines qui leur confèrent de plus une certaine toxicité pouvant parfois ouvrir à des usages thérapeutiques. Les extraits de marron d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) ont été ainsi utilisés pour traiter des problèmes de circulation sanguine du fait des effets vaso-constricteurs des saponines. Les Sapindaceae comprennent plusieurs espèces d'arbres dont les fruits contiennent un arille charnu et comestible. Certaines comme les litchis (*Litchi chinensis*), les ramboutans (*Nephelium lappaceum*), les quenettiers (*Melicoccus bijugatus*), les longanes (*Dimocarpus longan*) sont largement cultivés dans les régions tropicales. Avec le rattachement des érables, les Sapindaceae comptent aussi maintenant des espèces de première importance pour l'ornement dans les régions tempérées, pour la production de bois de qualité et pour la confection du sirop d'érable, extrait des érables à sucre (*Acer saccharum* et *Acer nigrum*).

### **Caractères**

La fleur des Sapindaceae comporte fondamentalement 3 carpelles. Quelques espèces en possèdent plus (jusqu'à 8) mais chez de nombreuses autres il peut n'en subsister fonctionnellement que deux, comme c'est notamment le cas chez les érables et chez le litchi. Les carpelles sont attachés autour de l'axe de la fleur, ils forment un gynécée à placentation axile. La soudure est même souvent incomplète ce qui produit alors un fruit caractéristique d'aspect triple ou le cas échéant double, comme la samare à deux ailes des érables. Chez le litchi et les autres espèces fruitières, généralement un seul carpelle se développe et l'autre avorte.

#### **1.1.2.2. Genre *Lecaniodiscus***

*Lecaniodiscus* est un genre de plantes de la famille des Sapindaceae. Il contient les espèces suivantes : *Lecaniodiscus cupanioides* Planch. ex Benth, *Lecaniodiscus fraxinifolius* Baker, *Lecaniodiscus punctatus* J.B.Hall et *Lecaniodiscus vaughaniae* Dunkley donc deux sont acceptées par « The plant list » ( *Lecaniodiscus cupanioides* Planch. ex Benth, *Lecaniodiscus fraxinifolius* Bake). Ce sont des arbres ou arbustes à feuilles paripennées, à pétioles et tracts de 3 à 7 paires. L'inflorescence est racémoïde axillaire ou thyrses paniculé. Les sépales sont au nombre de 5 et libres presque à la base. Il ne possède pas de pétales. Il possède un fruit loculaire (par avortement), indéhiscent ou se divisant lentement et irrégulièrement de la base. Les graines sont complètement entourées d'anarillode.

### 1.1.2.3. *Lecaniodiscus cupanioides*

Ordre : Sapindales

Famille : Sapindaceae

Sous-famille : Sapindoideae

Genre : *Lecaniodiscus*

Espèce : *Lecaniodiscus cupanioides*



**Figure 5: Feuilles et fruits de *Lecaniodiscus cupanioides***

*Lecaniodiscus cupanioides* Planch. ex Benth. de la famille des Sapindaceae, est un arbre atteignant 12 m de haut ou plus, avec une couronne étalée à ramifications basses, au feuillage persistant de la forêt pluviale de plaine allant de Guinée à l'ouest du Cameroun ainsi qu'au Gabon (Burkill, 1985). Le fruit est globuleux à 2 cm de long contenant 2 à 3 graines entouré d'une pulpe douce, blanche et collante, qui est comestible. Cette plante possède de valeurs forestières aberrantes dans la zone de savane, sur la région du Sénégal à l'ouest du Cameroun, et à travers l'Afrique jusqu'au Soudan, en Ouganda et en Angola. L'arbre est parfois planté comme arbre d'ombrage de village et comme ornemental (Burkill, 1985).

#### 1.1.2.3.1. Usages

*Lecaniodiscus cupanioides* Planch (Sapindaceae), largement répandu dans le sud du Nigéria, est une plante médicinale traditionnelle couramment utilisée comme laxatif, galactogène, fébrifuge, contre la toux et les infections (Adesegun *et al.*, 2008). La décoction de la racine de cette plante est revendiquée par les Yoruba du Nigéria pour lutter contre l'épilepsie et améliorer l'érection du pénis. Traditionnellement, une infusion d'écorces ou de feuilles est utilisée pour soigner la fièvre et utilisée comme purgatif au Nigeria et au Gabon. Les feuilles broyées sont utilisées au Nigeria comme vinaigrette pour plaies (Inyang, 2003) et au Ghana, la sève des feuilles ou la poudre ou la feuille pulpée est appliquée sur les plaies et les coupures (Abbiw, 1990). Au Gabon, le fruit est considéré comme antihelminthique (Abbiw, 1990). Au Nigéria occidental, la racine et l'écorce sont utilisées pour le traitement de plaies, furoncles,

brûlures et ecchymoses, maux de dents, fièvre, douleurs abdominales et gonflement causé par un abcès du foie (Iwu, 1993). Les Décoctions des feuilles, les racines et les graines sont traditionnellement utilisées dans le traitement de la fièvre, les brûlures, l'abcès du foie, la jaunisse, la toux, le paludisme et comme aphrodisiaque par les gens du sud-ouest Nigéria (Olowokudejo *et al.*, 2008). Des études pharmacologiques ont également montré que la plante possède des propriétés analgésiques, antibactériennes et antifongiques (Okore *et al.*, 2007; Sofidiya *et al.*, 2008). L'application folklorique de sa décoction de racine en tant qu'agent chimiothérapeutique contre les rhumatismes dans les États du sud-ouest du Nigéria a également été mentionné par (Ogunmefun & Gbile, 2012). L'extrait aqueux de gousse de *L. cupanioides* aurait démontré une remarquable activité anti-*Candida* (Okore *et al.*, 2007); et l'activité antipaludique de son extrait aqueux de racine a également été rapporté (Nafiu *et al.*, 2013).

## **1.2. Généralités sur les glycosides terpéniques**

### **1.2.1. Cas des saponosides**

Les saponosides sont des glycosides de haut poids moléculaire, constitués d'un ou plusieurs fragments de sucre lié à une aglycone triterpénique ou stéroïdique. La définition classique des saponines a d'abord été basée sur leur activité de surface. De nombreuses saponines ont des propriétés détergentes, donnent des mousses stables dans l'eau, présentent une activité hémolytique, ont un goût amer et sont toxiques pour les poissons (piscicides). Bien qu'ils ne soient pas communs à toutes les saponines, ces attributs ont souvent été utilisés pour caractériser cette classe de produits naturels. Cependant, en raison de nombreuses exceptions qui existent, les saponines sont maintenant définies de manière plus pratique sur la base de leur structure moléculaire, à savoir comme glycosides triterpéniques ou glycosides stéroïdiques (Hostettmann & Marston, 1995). Leur génine (ou aglycone) est lipophile tandis que la partie osidique est hydrophile. Certaines plantes contenant des saponines sont utilisées depuis des centaines d'années comme savons et ce fait se reflète dans leurs noms communs : savon (*Sapindus saponaria*) et savon de noix (*Sapindus mukurossi*). Les sources les plus courantes de saponines sont les plantes supérieures, mais un nombre croissant se trouve chez les animaux marins.

#### **1.2.1.1. Classification des saponines :**

Selon la nature de leur génine, les saponines sont classées en deux groupes :

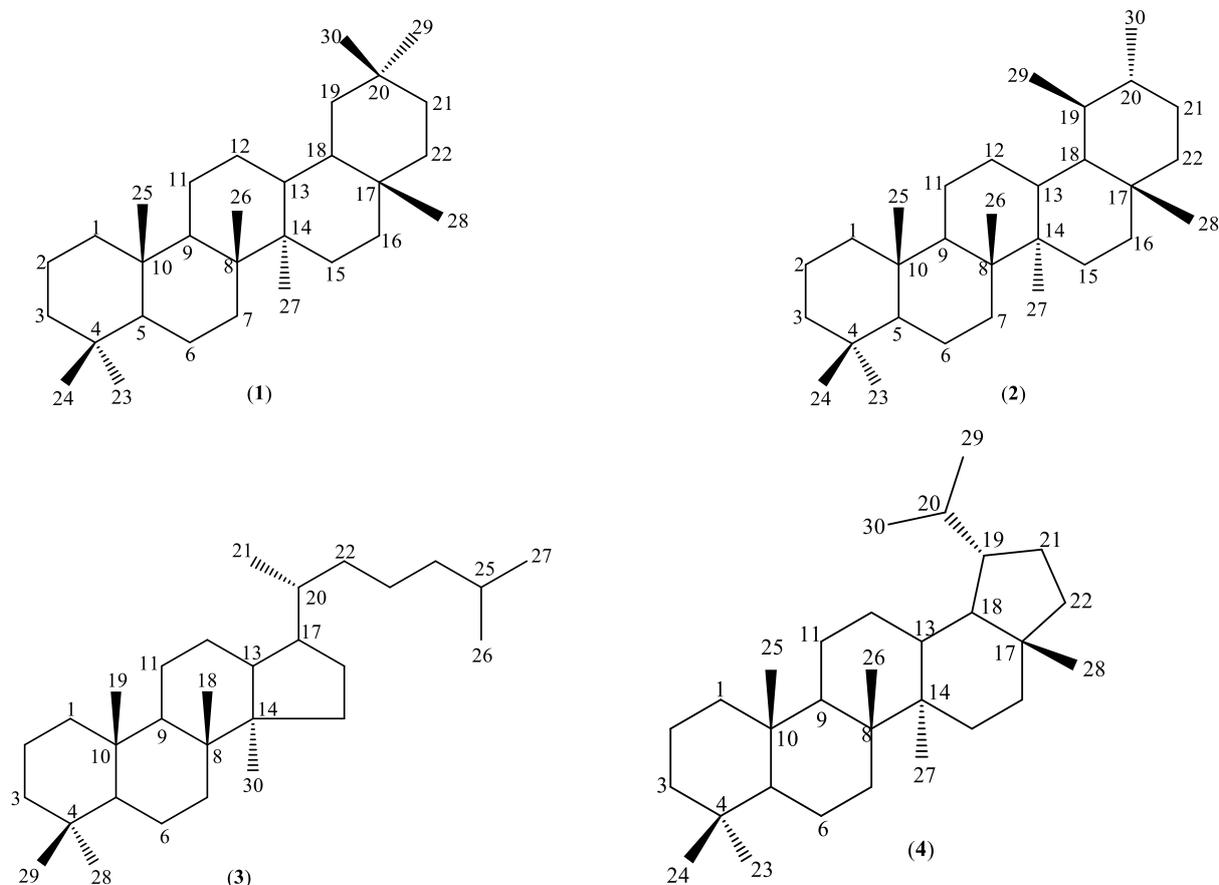
- ✓ Triterpéniques (30 atomes de carbones)
- ✓ Stéroïdiques (27 atomes de carbones).

Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponosides sont dits monodesmosidiques (chaîne oligosaccharidique liée au carbone en position 3 ou 28 de

l'aglycone) et lorsque la génine est substituée par deux ou plusieurs chaînes osidiques, on parle de saponosides bi- ou tri-desmosidiques (chaînes oligosacharidiques liées aux carbones en position 3, 28 et/ou 21 pour l'aglycone triterpéniques et en position 3, 26 pour l'aglycone stéroïdique). La partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des génines peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques.

### 1.2.1.2. Les aglycones triterpéniques :

Les saponines triterpéniques se trouvent en grande majorité dans les dicotylédones telles que les Caryophyllaceae, Araliaceae, Hippocastanaceae, Primulaceae et Fabaceae. Elles peuvent aussi se rencontrer chez des organismes marins telles que les étoiles de mer et les Holothuries. Les triterpènes quant à eux, sont une classe de métabolites secondaires de 30 atomes de carbones à cinq ou moins fréquemment quatre cycles. Comme la plupart des triterpénoïdes, les sapogénines triterpéniques sont issues de la cyclisation du (3*S*)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène et parfois du squalène lui-même. Ces composés sont pour la plupart hydroxylés en C-3, ceci en raison de l'ouverture de l'époxyde lors de la cyclisation. Les squelettes les plus fréquents sont de type oléane (1), ursane (2), dammarane (3) et lupane (4) (Figure 6).

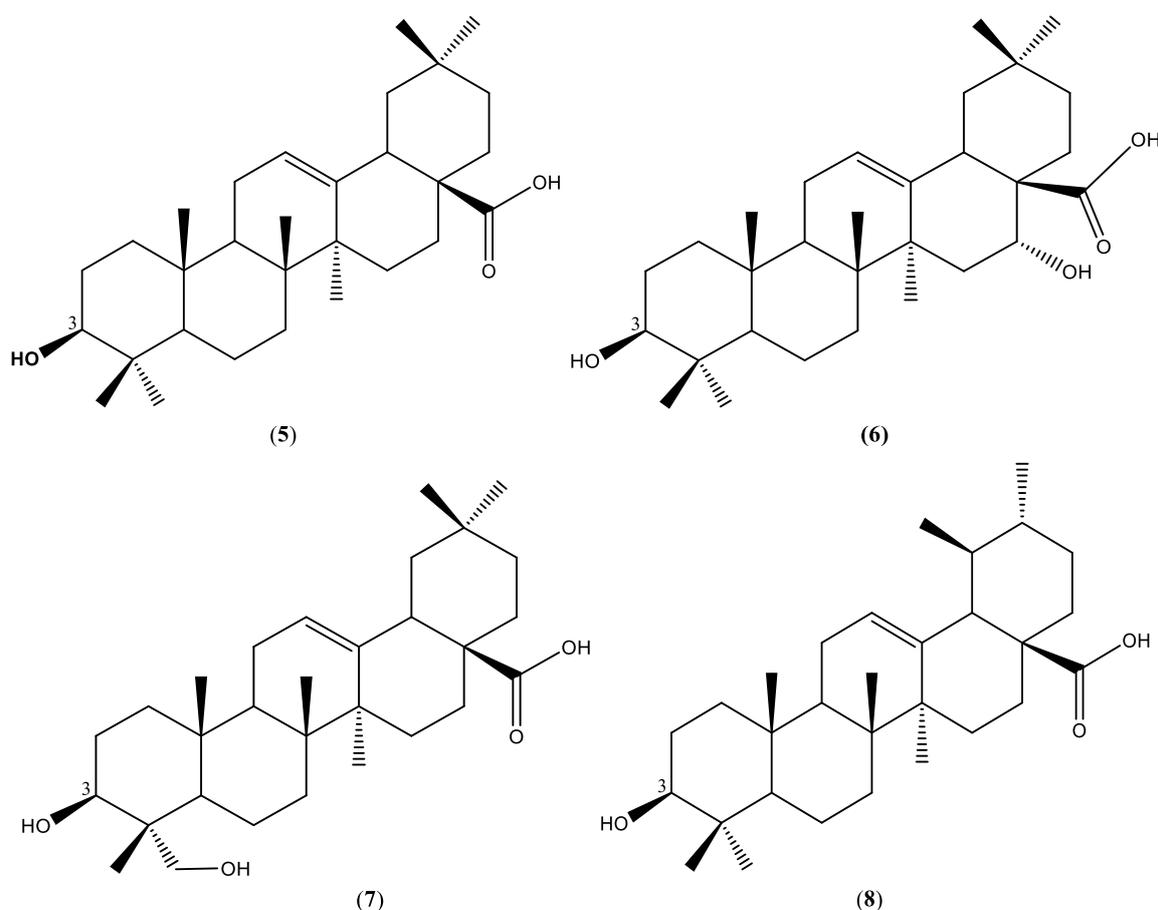


**Figure 6: Quelques squelettes triterpéniques : Oleanane (1), Ursane (2), Dammarane (3), et Lupane (4) (Bruneton, 2009).**

Les éléments structuraux peuvent être caractérisés par :

- Une insaturation en C-12 (13)
- Une oxydation fréquente des carbones des méthyles en C-23, C-28, C-30 (hydroxyméthyle, aldéhyde ou carboxyle)
- Une oxydation de carbones C-2, C-7, C-11, C-15, C-16, C-21, C-22 (Bruneton, 2009).

Plus de 50% des saponosides connues sont de type oléanane, plus précisément à l'acide oléanolique (5), de l'acide echinocystique (6), de l'hédéragénine (7) et l'acide ursolique (8). Dans la majorité des cas, ces composés sont hydroxylés en position 3 (**Figure 7**).



**Figure 7: Exemples d'aglycones triterpéniques : acide oléanolique (5), echinocystique (6), hédéragénine (7) et ursolique (8).**

### 1.2.1.3. Les aglycones stéroïdiques

Les aglycones stéroïdiques possèdent un squelette à 27 atomes de carbone, issu de la cyclisation de l'époxysqualène qui adopte la conformation chaise-bateau-chaise, pour donner un cation protostanyle. Ce dernier peut subir ultérieurement des réarrangements conduisant à la formation de stéroïdes (**Figure 8**). Elles se trouvent en grande majorité chez les Angiospermae monocotyledonae telles que : Alliaceae, Agavaceae, Asparagaceae, Dioscoreaceae, Fabaceae,

Liliaceae, Solanaceae et Plantaginaceae. Leurs structures sont proches de celles de nombreuses hormones humaines.

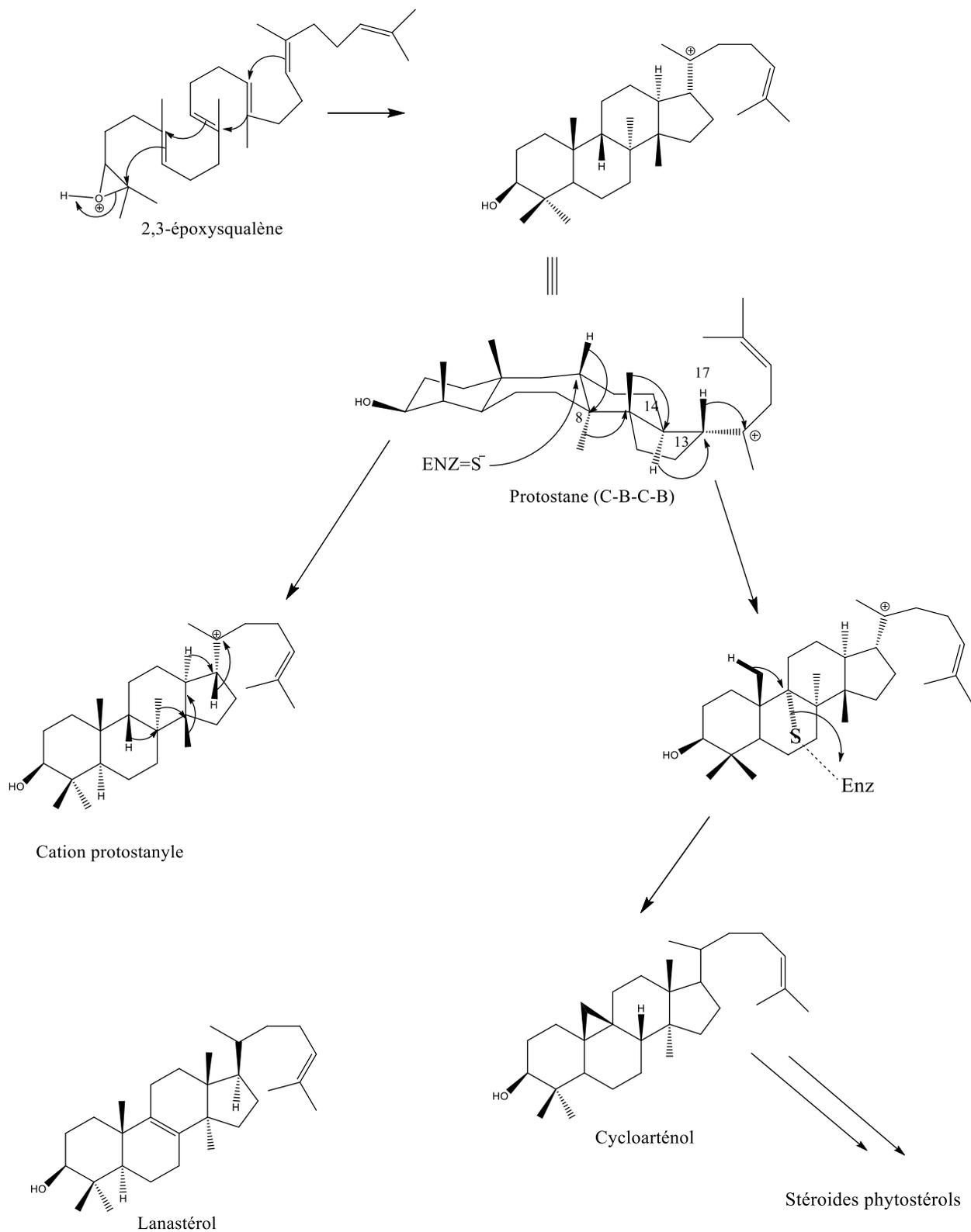
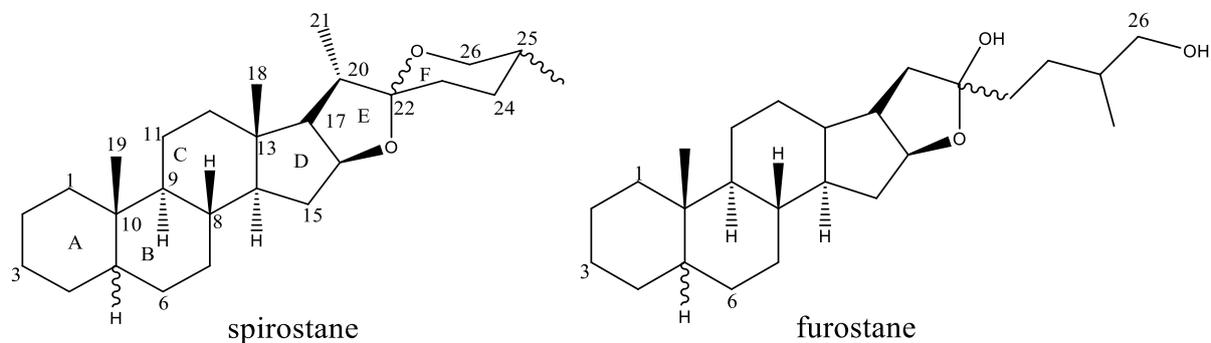


Figure 8: Schéma de biogenèse des stéroïdes (Vincken et al., 2007).

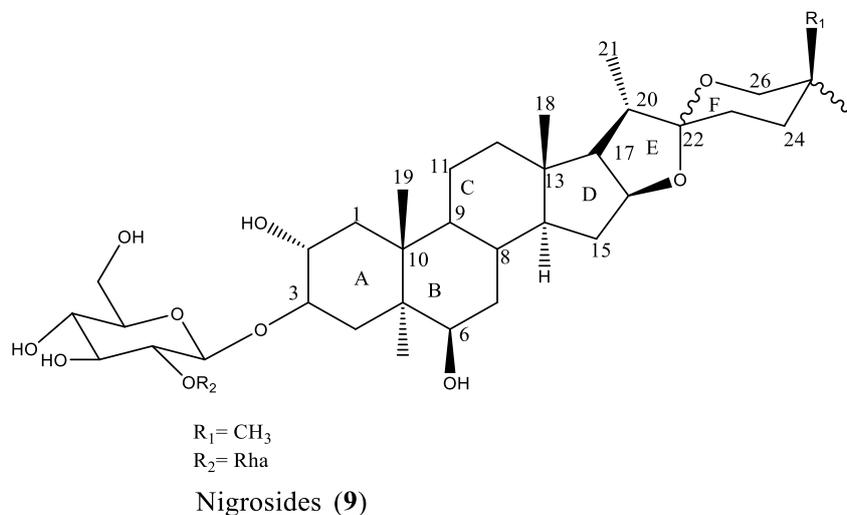
Deux principaux types de stéroïdes existent :

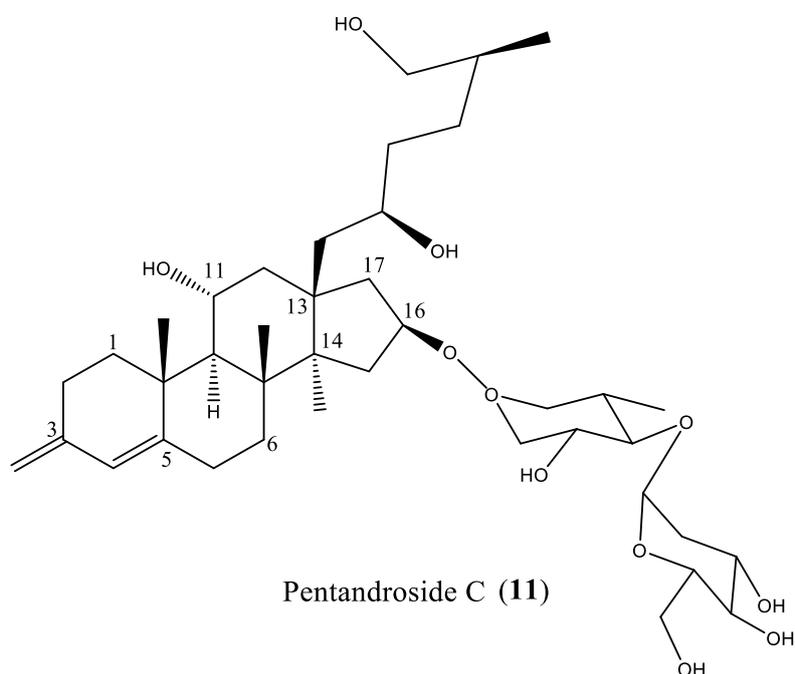
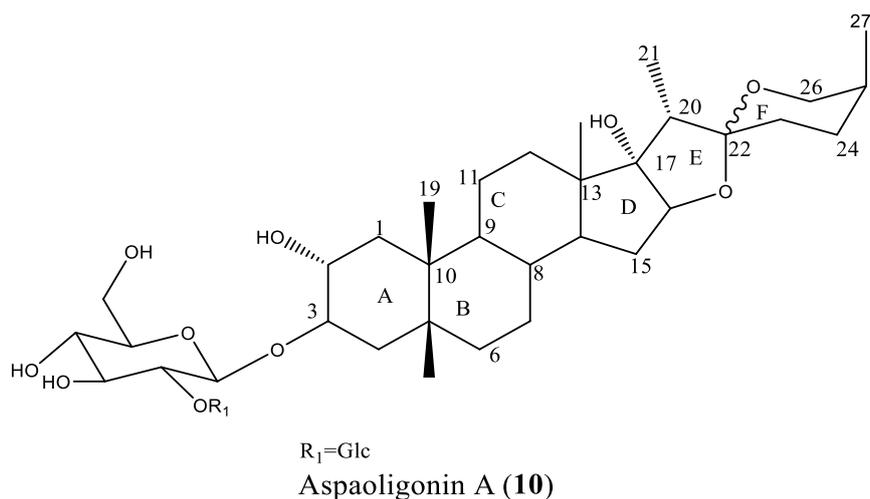
- hexacyclique (spirostane)
- pentacyclique (furostane)



**Figure 9: Génines stéroïdiques**

Les génines stéroïdiques possèdent aussi généralement un hydroxyle en position 3. D'autres hydroxyles peuvent être présents sur ce squelette, en positions 2, 6 (exemple : nigrosides (**9**)), 11 (exemple : pentandroside C (**10**)) (Hostettmann & Marston, 1995; Bruneton, 2009), et 17 (exemple : aspaoligonin A (**11**)) (**Figure 10**).





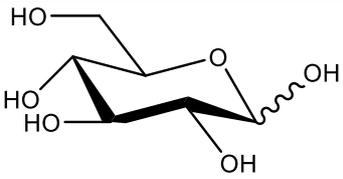
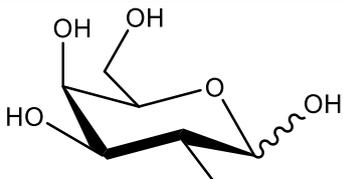
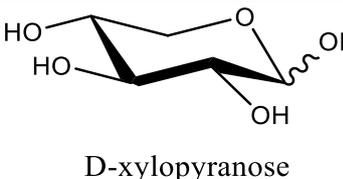
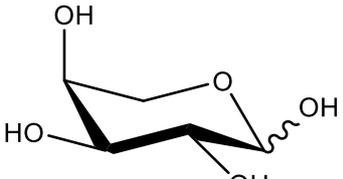
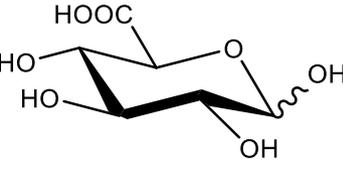
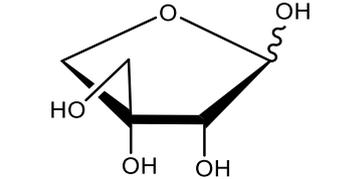
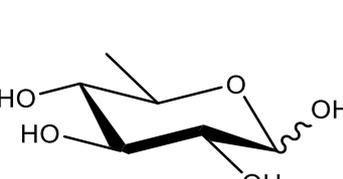
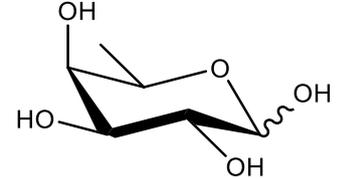
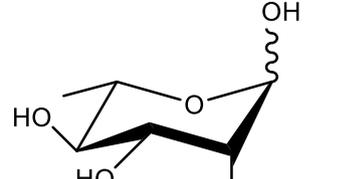
**Figure 10: Génines stéroïdiques avec hydroxyles en positions 2, 6 et 11.**

#### 1.2.1.4. Les sucres

Les sucres constituent la partie hydrophile des saponines. Ils peuvent être constitués d'une ou plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone. Les oses les plus fréquemment rencontrés sont : Le D-glucose, le D-galactose, le D-xylose, le D-fucose, le D-apiose, le L-arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique. Les différents hydroxyles, que ce soit au niveau de la génine ou de la partie osidique, peuvent être estérifiés par des acides organiques (Hostettmann & Marston, 1995; Jörg *et al.*, 2011).

Le tableau 1 ci-dessous regroupe les sucres les plus fréquemment rencontrés dans les saponosides

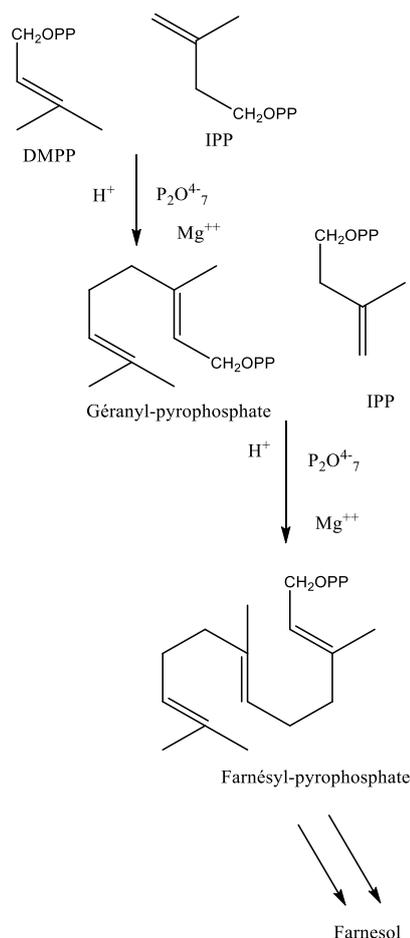
**Tableau I : Principaux sucres rencontrés dans les saponosides (Bruneton, 2009)**

 <p>D-glucopyranose</p>	 <p>D-galactopyranose</p>	 <p>D-xylopyranose</p>
 <p>L-arabinopyranose</p>	 <p>acide D-glucuronique</p>	 <p>D-apiofuranose</p>
 <p>D-quinovopyranose</p>	 <p>D-fucopyranose</p>	 <p>L-rhamnopyranose</p>

### 1.2.2. Cas des glycosides de farnésols

Parmi les autres substances naturelles présentes dans les espèces des Sapindaceae figurent les glycosides de farnésols, issues du métabolisme des terpènes.

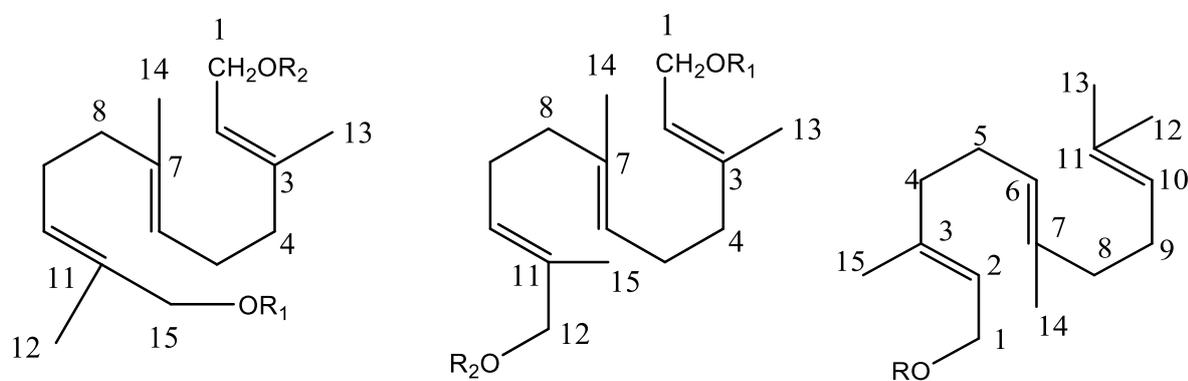
Le farnésol est un sesquiterpène acyclique à quinze carbones résultant de l'addition d'une molécule de pyrophosphate d'isopentényle (IPP) sur le pyrophosphate de géranyle (GPP), lui-même issu de la condensation de deux molécules d'IPP.



**Figure 11: Schema de biogenèse des farnésols (Cordell, 1975)**

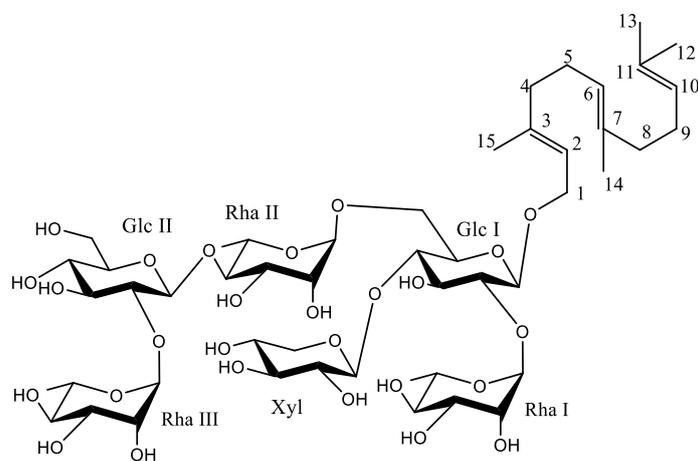
### 1.2.2.1. Aglycones de type farnésol

Les glycosides de farnésol sont des sesquiterpènes acycliques dont l'aglycone est le farnésol ou le 15 ou 12-hydroxyfarnésol. Lorsque l'aglycone est substitué par une seule chaîne osidique, les farnésols sont dits monodesmosidiques (chaîne oligosacharidique liée en position C-1 et rarement en C-5 de l'aglycone) et lorsque l'aglycone est substitué par deux chaînes osidiques, on parle de farnésols bidesmosidiques (chaîne oligosacharidique liée en position C-1 et C-12 ou C-1 et C-15 de l'aglycone). Ces molécules peuvent se retrouver sous quatre isomères différents, (2*E*, 6*Z*), (2*Z*, 6*Z*), (2*Z*, 6*E*) ou (2*E*, 6*E*) farnésol. Mais dans la plupart des cas, l'isomère le plus rencontré est le (2*E*, 6*E*) farnésol.

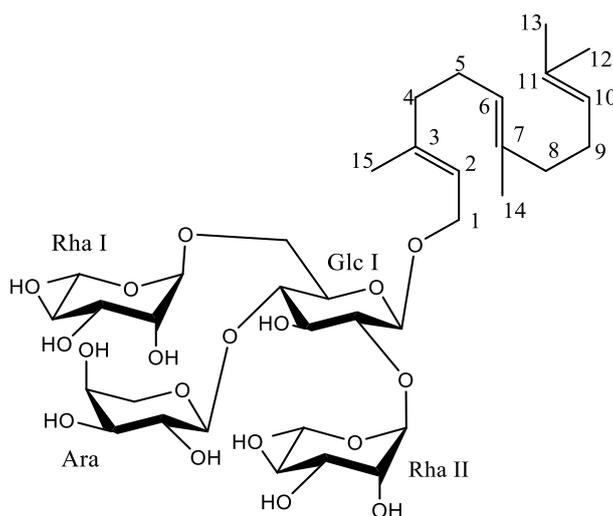


**Figure 12: Aglycones de types farnésols**

Ces molécules semblent être spécifiques à la famille des Sapindaceae, plus précisément de la sous famille des Sapindoideae puisqu'ils ont été mis en évidence dans plusieurs espèces (Kasai *et al.*, 1986, 1988; Wu-Hsiung *et al.*, 1991; Adesanya *et al.*, 1999; Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018). Les chaînes osidiques sont presque identiques dans ses espèces : un glucose directement lié en C-1 du farnésol substitué par au moins un rhamnose (**Figure 13**).



(Pertuit *et al.*, 2018)



(Adesanya *et al.*, 1999)

**Figure 13: Séquences osidiques les plus rencontrées**

#### 1.2.2.2. Les sucres

Les sucres constituent la partie hydrophile des glycosides de farnésol. Ils peuvent être constitués d'une ou de plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone (C-1, C-5 et C-12). Les oses les plus fréquemment rencontrés sont : Le D-glucose, le D-xylose, le L-arabinose et le L-rhamnose. Les différents hydroxyles de la partie osidique, peuvent être estérifiés par des acides organiques (Kasai *et al.*, 1986, 1988; Magid *et al.*, 2005, 2008).

### 1.3. Travaux phytochimiques antérieurs

#### 1.3.1. Saponosides isolés et évaluation des activités biologiques.

Les saponosides sont des molécules à haut poids moléculaire qui présentent une gamme très variée d'activités biologiques et pharmacologiques parmi lesquelles : activités anti-inflammatoire, anti-tumorale, chimiopréventive, antidiabétique, neuroprotecteurs, antituberculeux, anti-microbiennes (Haddad *et al.*, 2003; Noté *et al.*, 2009, 2018; Vermeersch *et al.*, 2009; Adão *et al.*, 2011). Le nombre d'effets biologiques attribués aux saponosides ne fait qu'accroître de jour en jour. Cependant, certaines propriétés mises en évidence dans le cas de certains saponosides, comme des propriétés immunoadjuvante (Da Silva & Parente, 2013) attirent de plus en plus l'attention des chercheurs car pouvant être utilisées dans la formulation de nouveaux vaccins. Ces activités biologiques s'expliquent par leurs caractéristiques physicochimiques, et notamment par leurs structures. Il est important de noter que le mécanisme d'action des saponosides dans les activités biologiques emprunte différentes voies (Chwalek *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). D'où l'intérêt de continuer à travailler sur cette classe de molécules.

##### 1.3.1.1. Cas des saponosides du genre *Calliandra*

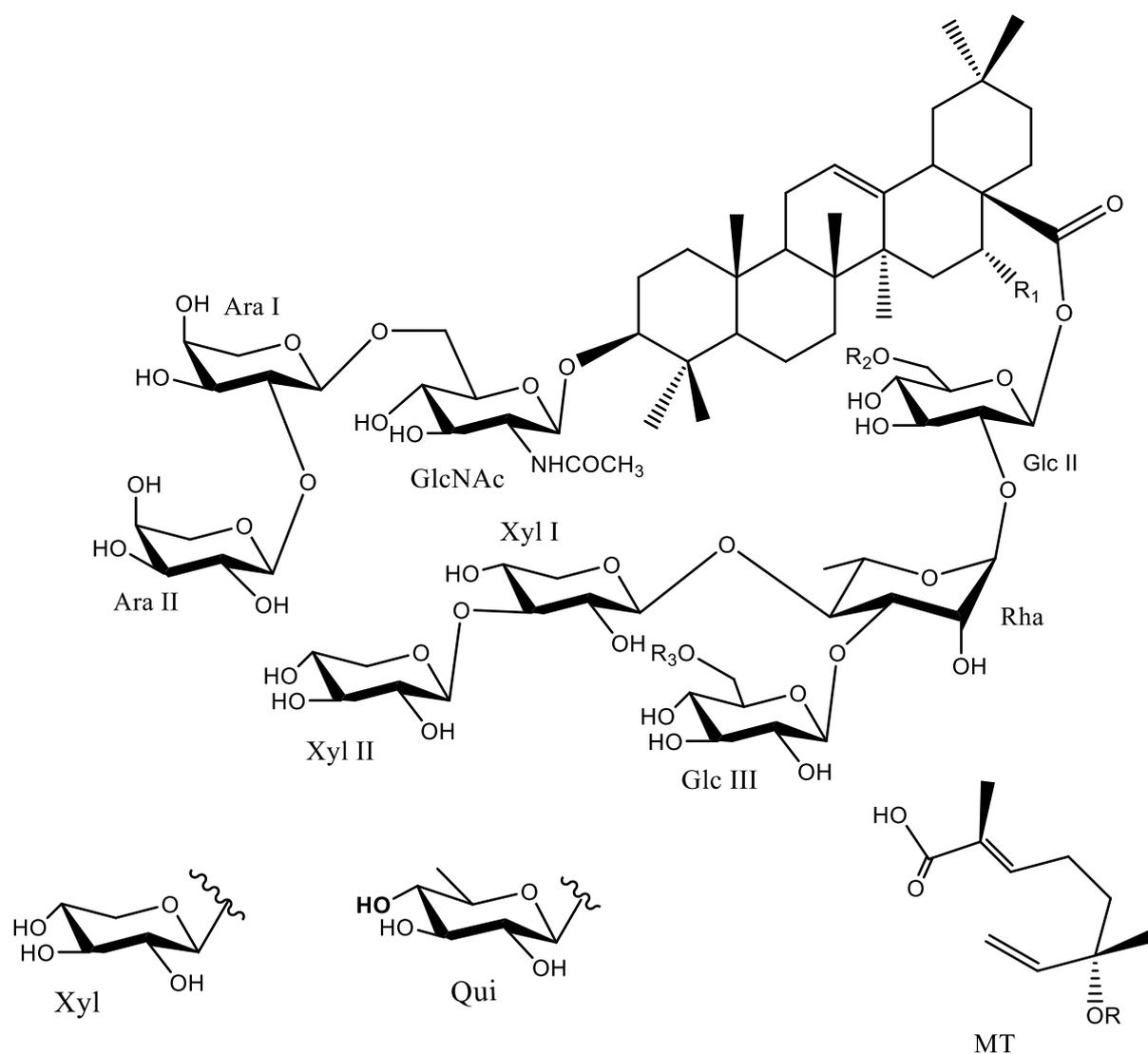
Les aglycones des saponosides du genre *Calliandra* sont de type oléan-12-ène ; di- ou monohydroxylés (en position 3 et 16). Les génines les plus rencontrées sont : l'acide oleanolique et l'acide echinocystique (Takeda *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1994; Tani *et al.*, 1996; Tani *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2008; Da Silva & Parente, 2013).

Le genre *Calliandra* compte environ 170 espèces acceptées, mais seulement sept articles dans la littérature rapportent la présence des saponosides et celles-ci sont isolées de trois espèces seulement : *Calliandra anomala* (KUNTH) Macbr.III. (Takeda *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1994; Tani *et al.*, 1996, 1998), *Calliandra pulcherrima* Benth. (Da Silva *et al.*, 2005) et *Calliandra brevifolia* Benth. (Barbosa *et al.*, 2008). La plupart des saponosides ont été isolées de l'espèce *Calliandra anomala* (15 composés).

Les plantes du genre *Calliandra* possèdent une large gamme d'activité biologique. C'est le cas des extraits acétoniques des feuilles de *C. calothyrsus* qui ont montré des effets négatifs *in vitro* sur les œufs et les larves du parasite *Haemonchus contortus* des ruminants (Kenne *et al.*, 2011). L'examen préliminaire d'extraits bruts de *C. portoricensis*, a révélé une activité antimicrobienne (Dimayuga & Garcia, 1991), et une activité inhibitrice de la prostaglandine synthétase (Christophersen, 1991). Un glycoside dérivé des espèces de *Calliandra* appelé « Calliandrine » est utilisé dans la médecine domestique (formulation) au Mexique contre la fièvre et le paludisme.

### 1.3.1.1.1. *Calliandra anomala*

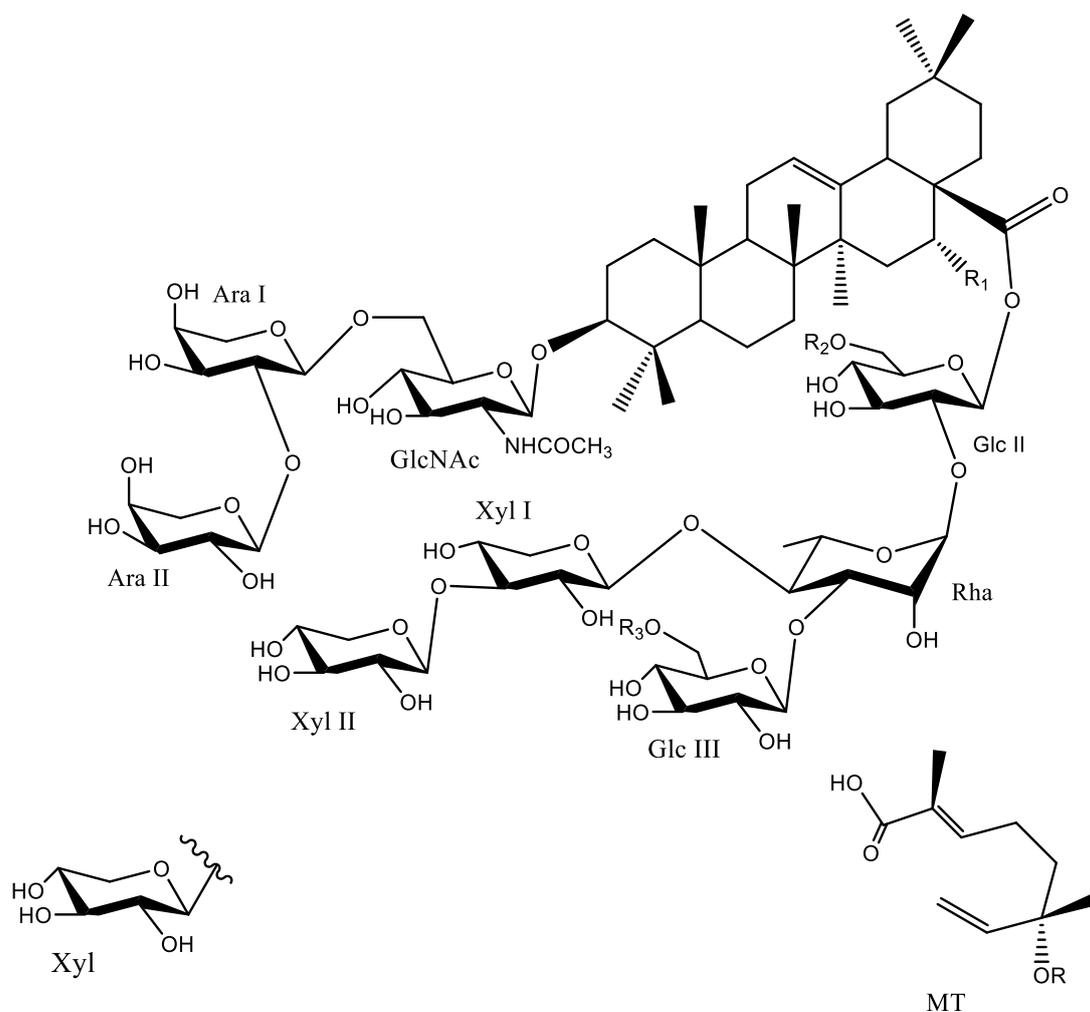
*Calliandra anomala* est un arbuste dont la hauteur varie de 1 à 4.5 mètres. Cette plante est utilisée comme médicament et source de tanins. Elle est également cultivée comme plante ornementale, étant particulièrement apprécié pour sa belle fleur. Les extraits aqueux de ses branches sont utilisés comme agent antipaludique et antifièvre au Mexique (Diaz, 1976). Les études phytochimiques menées à partir de ses branches, font état de plusieurs saponosides à structures complexes isolées ayant pour aglycones : l'acide oleanolique et l'acide echinocystique (Takeda *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1994; Tani *et al.*, 1996, 1998). Aucune activité biologique de ces saponosides n'a été reportée dans la littérature.



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
12	OH	MT-Xyl	H
13	OH	MT-Qui	H
14	OH	MT-Xyl-MT-Xyl	H
15	OH	MT-Xyl-MT-Xyl	H
16	OH	MT-Xyl-MT	H
17	OH	MT-Xyl-MT	COCH <sub>3</sub>
18	OH	MT-Qui-MT	H
19	OH	MT-Qui-MT	COCH <sub>3</sub>
20	OH	MT-Xyl-MT-Qui-MT	H
21	H	MT-Xyl-MT	H
22	OH	MT-Xyl-MT-Qui-MT	COCH <sub>3</sub>
23	H	MT-Xyl-MT	COCH <sub>3</sub>
24	OH	MT-Xyl-MT-Xyl-MT	H
25	H	MT-Xyl-MT-Xyl-MT	H
26	H	MT-Xyl-MT-Qui-MT	H

#### 1.3.1.1.2. *Calliandra brevifolia*

*Calliandra brevifolia* est une espèce indigène apparentée qu'on trouve en Amérique tropicale. Cette plante à feuilles persistantes est non envahissante mais très répandue. C'est une espèce ornementale cultivée dans les jardins et les parcs. Une étude phytochimique des feuilles réalisée (Barbosa *et al.*, 2008) sur cette plante a reportée l'isolement d'un saponoside nommé brevifoliasaponine (**27**). L'activité hémolytique de la brevifoliasaponine (**27**) a été évaluée à l'aide d'essais *in vitro* et son potentiel adjuvant sur la réponse immunitaire cellulaire contre l'antigène de l'ovalbumine a été étudié en utilisant des modèles *in vivo*. Les résultats obtenus suggèrent que la brevifoliasaponine (**27**) peut être un potentiel adjuvant pertinent dans la formulation d'un vaccin expérimental.

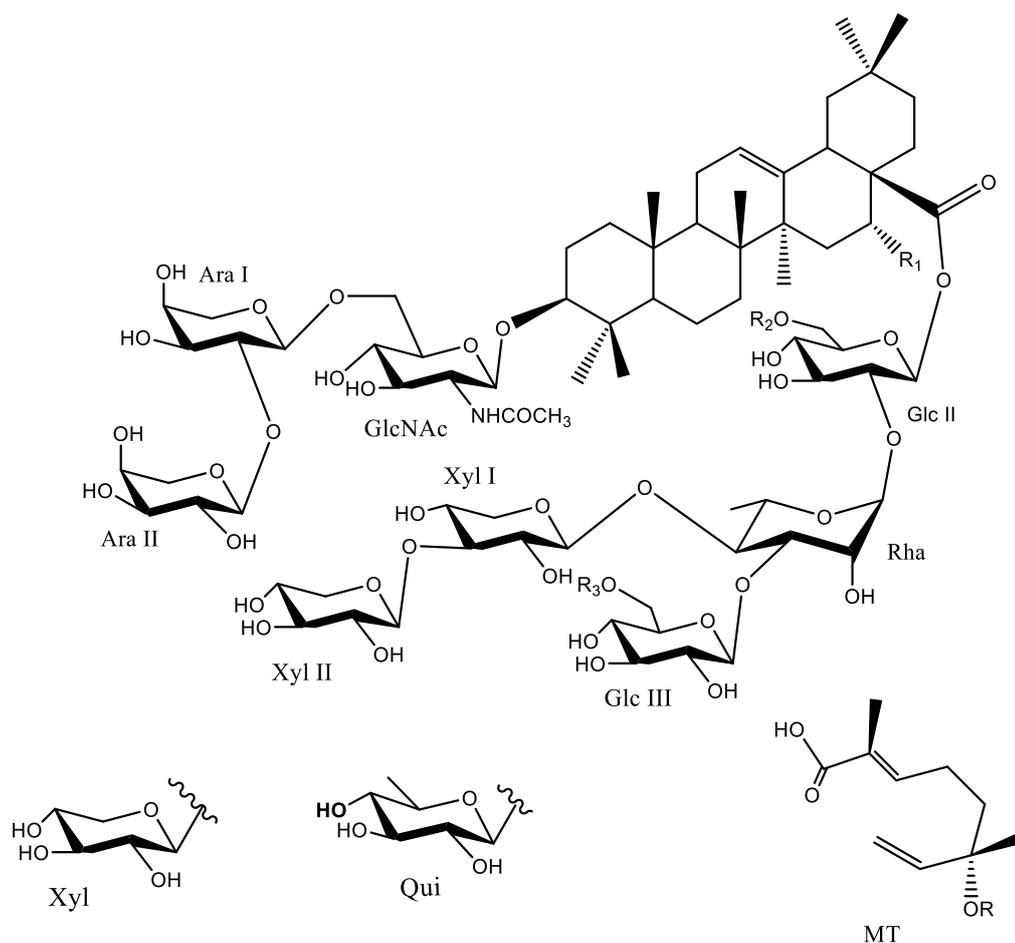


Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
27	OH	MT-Xyl-MT-Xyl-MT-Xyl	H

#### 1.3.1.1.3. *Calliandra pulcherrima*

*Calliandra pulcherrima* Benth. (Leguminosae) est une espèce indigène apparentée qu'on trouve en Amérique tropicale. Cette plante à feuilles persistantes, est une plante ornementale répandue qu'on cultive dans les jardins et les parcs (Lorenzi & Souza, 1995). Au Brésil, l'extrait aqueux des branches de *C. pulcherrima* est utilisé comme remède contre le paludisme et la leishmaniose (Miliken, 1997). A partir des feuilles de *C. pulcherrima*, deux saponosides ont été isolés : la pulcherrimasaponine (**28**) et le composé CP05 (**29**) (Silva *et al.*, 2005; Silva & Parente, 2013). Pour le composé CP05 (**29**), son potentiel effet adjuvant avec le ligand fucose-mannose (FML), antigène de *Leishmania donovani* comparé au mélange de saponosides QS21 de *Quillaja saponaria* Molina (Santos *et al.*, 1997), a été testé pour l'immunisation sur un modèle murin de la leishmaniose viscérale. Les résultats ont révélé le potentiel adjuvant pertinent de la pulcherrimasaponine (**28**) décrite de *Calliandra pulcherrima*

Benth soulignant ainsi son utilisation possible dans la formulation d'un nouveau vaccin (Silva *et al.*, 2005). L'activité hémolytique du composé CP05 (**29**) a été évaluée à l'aide d'essais *in vitro* et son potentiel adjuvant sur la réponse immunitaire cellulaire contre l'antigène de l'ovalbumine a été étudié. En conclusion, l'enquête sur la diversité biologique des propriétés du composé (**29**) indique que cette substance peut être un agent thérapeutique potentiel impliqué dans l'immunomodulation de la leishmaniose (Silva & Parente, 2013). Ce composé (**29**) est l'une des premières saponines triterpénoïde complexe contenant dans sa structure des fragments monoterpénoïdes et de l'acide oléanolique comme sapogénine avec une activité immunoadjuvante contre l'antigène de l'ovalbumine.

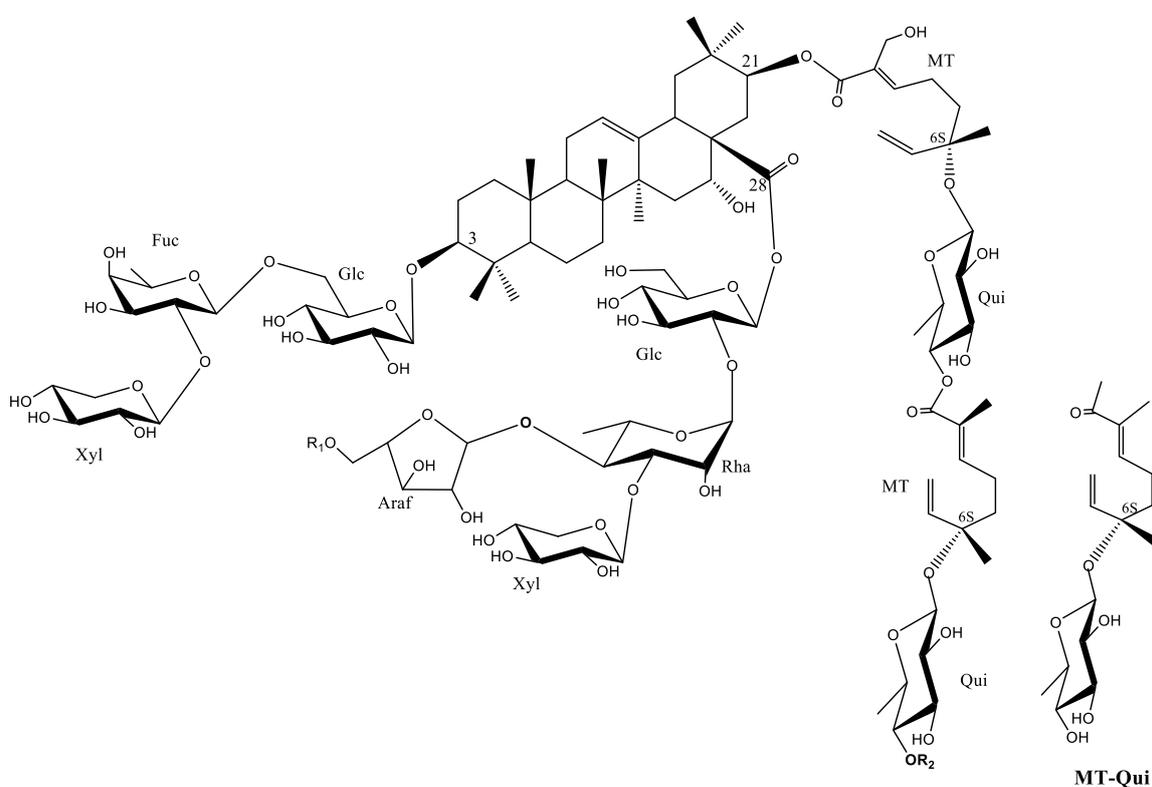


Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>28</b>	OH	MT-Xyl-MT-Qui-MT-Xyl	H
<b>29</b>	H	MT-Xyl-MT-Qui-MT-Xyl	H

### 1.3.1.2. Cas des saponosides du genre *Albizia* (2010-2020)

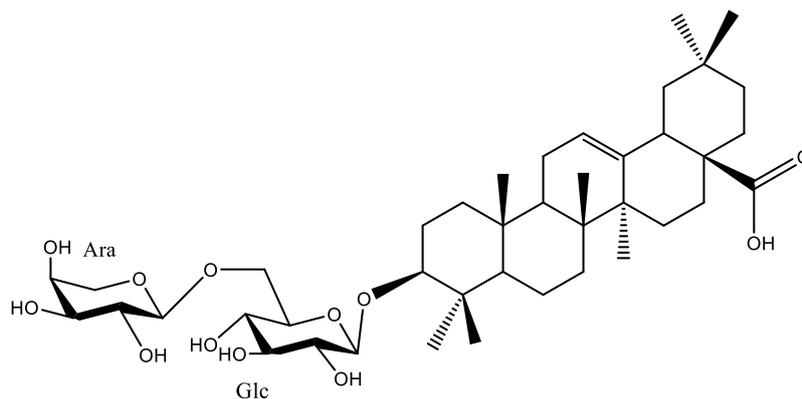
#### 1.3.1.2.1. *Albizia adianthifolia*

*Albizia adianthifolia* (Schum) W.F. est une espèce largement répartie en Afrique tropicale, de l'Afrique du Sud en Ethiopie et au Sénégal. C'est un arbre en forme de parapluie atteignant 25 m de haut. Ses racines sont utilisées contre les inflammations de l'œil chez l'homme, contre les morsures de serpent et aussi pour empoisonner les poissons et traiter les maladies de la peau. Noté *et al.* (2018) ont travaillé sur l'extrait hydroalcoolique des écorces du tronc de *A. adianthifolia* et ont isolé trois saponosides nommés : adianthifoliosides G (**30**), H (**31**) et I (**32**). L'effet apoptotique des saponosides G–I (**30-32**) a été évalué sur une lignée cellulaire du cancer de l'épiderme humain (A431). Les analyses cytométriques ont montré que ces saponosides induisent l'apoptose des cellules cancéreuses de l'épiderme humain (A341) de manière dose-dépendante après 24 h de traitement.



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>30</b>	Ac	H
<b>31</b>	H	H
<b>32</b>	H	MT-Qui

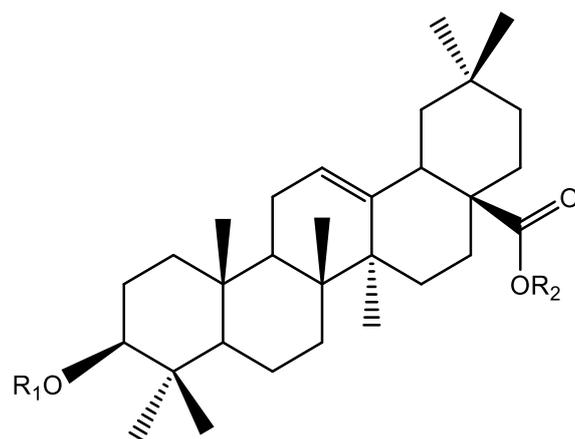
Sonfack *et al.* (2019), ont aussi travaillé sur l'extrait méthanolique des écorces de *A. adianthifolia* et ont isolés un saponoside nommé : Adianthifolioside GS1 (**33**). Ce composé inhibe la croissance de toutes les onze bactéries testées avec des CMI allant de 16 à 128 µg/mL. La valeur CMB a également été enregistrée avec le composé (**33**) contre 4/11 (36.4%) des bactéries. Ce composé a obtenu une faible valeur de CMI (16 µg/ml) contre *E. coli* ATCC8739 et *P. aeruginosa* PA01. Le potentiel de ce saponoside à empêcher la croissance des bactéries est probablement dû à leur pouvoir amphiphile car ils possèdent des propriétés hydrophobes et hydrophiles (Sonfack *et al.*, 2019).



**33**

#### 1.3.1.2.2. *Albizia anthelmintica*

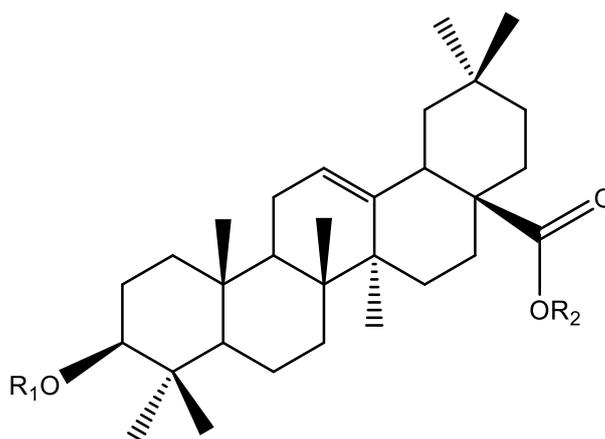
*Albizia anthelmintica* A. Brongn. est une plante très répandue au Soudan occidentale. En médecine traditionnelle soudanaise, ses écorces sont utilisées pour le traitement des troubles d'estomac, de la dysenterie amibienne, et pour le paludisme (Al-Sayed *et al.*, 2016). Deux saponosides triterpéniques dérivés de l'acide oléanolique (**34-35**) ont été isolés de la fraction insoluble à l'acétone des feuilles de *A. anthelmintica*. Cette fraction ainsi que les composés isolés, ont présenté une activité cytotoxique sur les lignées de cellules cancéreuses du foie et du colon (HepG-2 et HCT-116). Le composé **35** a montré une bonne activité sur les lignées de cellules cancéreuses HePG-2 avec une valeur  $CI_{50}$  de 3,60 µM ; quant au composé **34**, il a montré une activité cytotoxique plus intéressante sur HCT-116 avec une valeur  $CI_{50}$  de 4,75 µM (Al-Sayed *et al.*, 2016).



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>34</b>	Xyl (1→2) Glc-	Xyl(1→4) Rha (1→2)Glc-
<b>35</b>	Xyl (1→2) Ara (1→6) GlcNAc-	Glc-

### 1.3.1.2.3. *Albizia boromonensis*

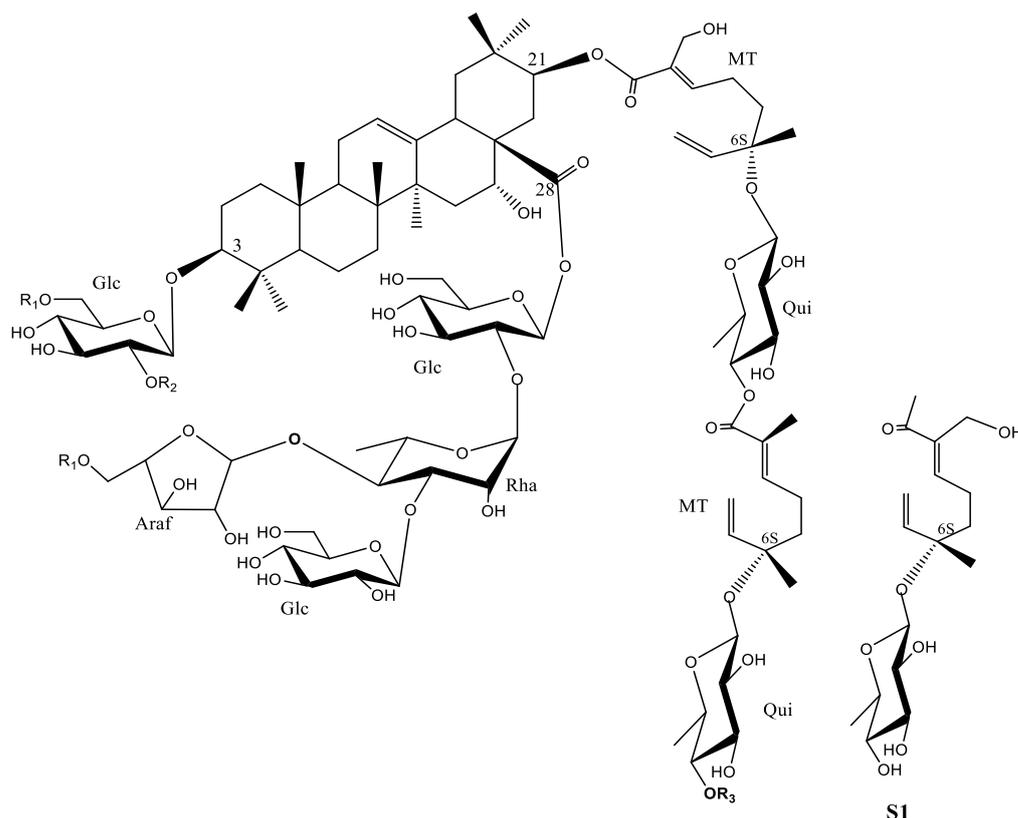
*Albizia boromonensis* Aubre. & pellegr est un arbre de la famille des Mimosaceae très répandu au Sénégal, au Cameroun et au Soudan (Arbonnier, 2004). Quatre saponosides triterpeniques ont été isolés et caractérisés à partir de l'extrait hydroalcoolique des racines de *A. boromonensis*, tous dérivés de l'acide oléanolique (**36-39**) (Noté *et al.*, 2015a). Aucun des composés isolés n'a montré une activité sur les glioblastomes.



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>36</b>	Xyl(1→2)[Ara(1→6)]Glc-	Glc(1→2)[Glc(1→6)]Glc-
<b>37</b>	Xyl(1→2)[Ara(1→6)]Glc-	Glc(1→6)Glc(1→2)Glc-
<b>38</b>	Xyl(1→2)[Ara(1→6)]Glc-	Glc
<b>39</b>	Xyl(1→2)[Ara(1→6)]Glc-	H

### 1.3.1.2.4. *Albizia chinensis*

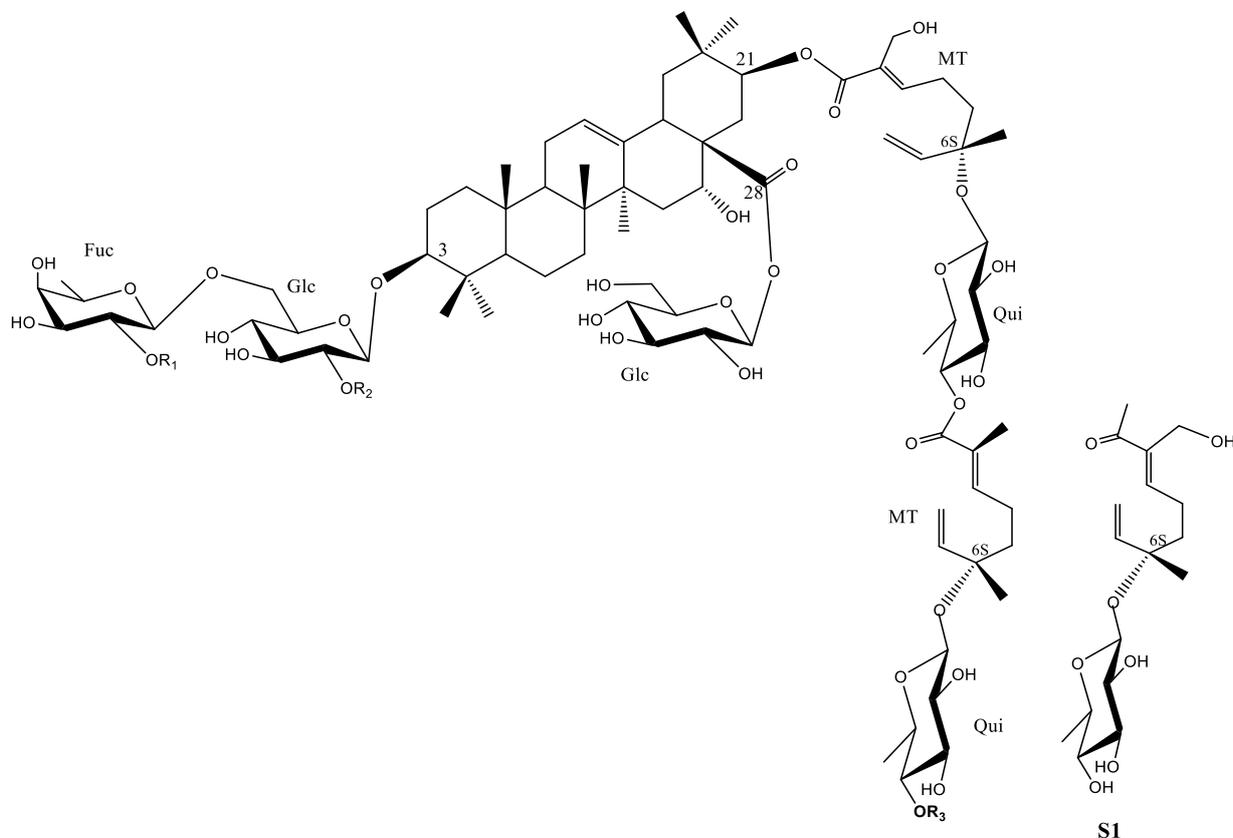
*Albizia chinensis* (Osb.) Merr. est un arbre qu'on retrouve au Sud et au Sud-Est de la Chine Continentale. Deux dérivés de l'acide acacique nommés albiziosides D (**40**) et E (**41**) ont été isolés des écorces du tronc de *A. chinensis* (Liu *et al.*, 2010) et testés sur cinq lignées cellulaires cancéreuses, HCT-8, Bel-7402, BGC-823, A549, A2780 (colon, hépatome, gastrique, épithélium pulmonaire et carcinome de l'épithélium, respectivement). Les deux composés, ont montré une activité cytotoxique modérée.



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>40</b>	Glc-	Xyl(1→2)Fuc-	H
<b>41</b>	H	Xyl(1→2)Ara-	S <sub>1</sub>

### 1.3.1.2.5. *Albizia coriaria*

*Albizia coriaria* welw. ex oliv. est une plante médicinale très répandue au Cameroun et en Ouganda. Ses écorces ou ses racines sont utilisées pour soigner la syphilis, les maladies de la peau, la jaunisse, les maladies des yeux, la toux et les maux de gorge (Tabuti & Mugula, 2007). Les études phytochimiques réalisées sur cette plante ont conduit à l'isolement et la caractérisation de trois dérivés de l'acide acacique : les coriarosides C (**42**), D (**43**) et E (**44**) (Noté *et al.*, 2009).

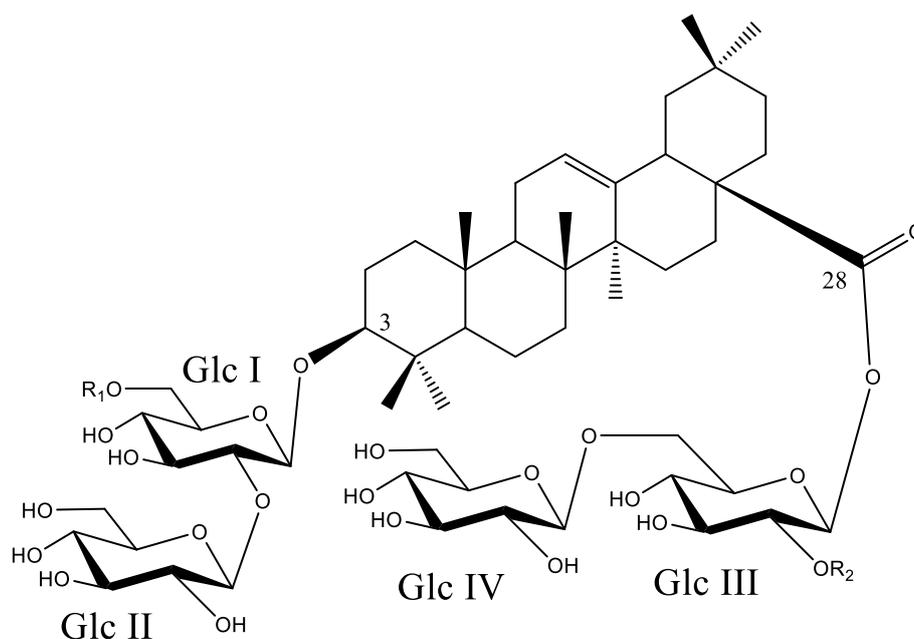


Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
42	Xyl	NHAc	Xyl(1→4)Rha-	S
43	H	O-Glc	Rha	S
44	H	OH	H	H

### 1.3.1.2.6. *Albizia glaberrima*

*A. glaberrima* est répandue de la Guinée-Bissau au Soudan, de la R.D. du Congo jusqu'au Kenya et de la Mozambique jusqu'à Madagascar. Au Cameroun, elle est caractéristique de la forêt secondaire. Dans le Sud du Nigéria, l'écorce de *A. glaberrima* est employée pour traiter la fièvre (Arbonnier, 2004). Au Cameroun, les écorces des jeunes rameaux sont utilisées pour lutter contre la blennorrhagie et une décoction de ses écorces sert à soulager les douleurs de la poitrine, alors que les racines sont employées pour éliminer les affections du foie (Arbonnier, 2004). Par ailleurs, les décoctions des feuilles ainsi que celles des racines sont également utilisées dans le traitement de l'épilepsie et l'anémie (Lawal *et al.*, 2010). Il a été reporté que l'extrait hydroalcoolique des racines de *A. glaberrima* a permis d'isoler trois saponosides, les glaberrimosides A (45), B (46) et C (47) (Noté *et al.*, 2016a). Les

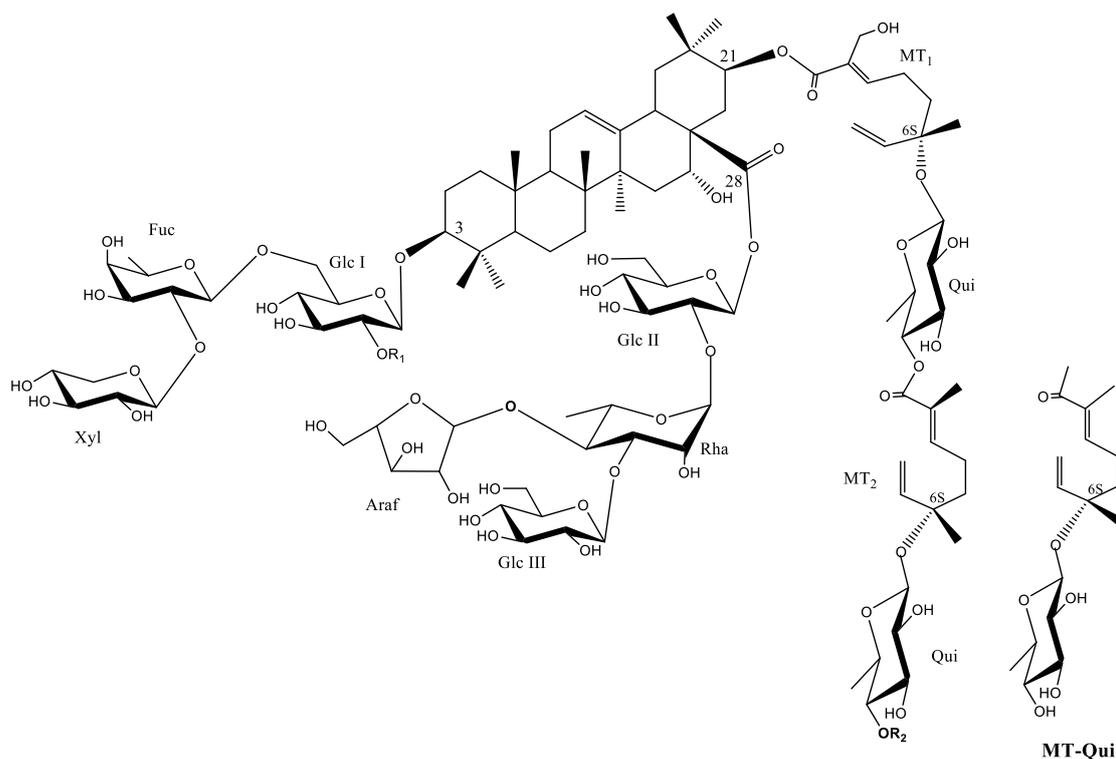
trois composés ont été testés sur les cellules souches cancéreuses du pancréas humain (ASPC-1), sur les cellules cancéreuses sanguines (THP-1) et sur une lignée de cellules non cancéreuses de fibroblaste (BJ) au moyen de la méthode par coloration à l'annexine V-FITC/PI. Après 24 h de traitement, aucune augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques n'a été observée sur les cellules cancéreuses sanguines (THP-1) et sur les cellules saines du fibroblaste (BJ) mettant ainsi en évidence leur sélectivité sur les cellules cancéreuses et leur inoffensivité sur les cellules saines.



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
45	Ara	Glc
46	Ara	H
47	H	Fuc

### 1.3.1.2.7. *Albizia gummifera*

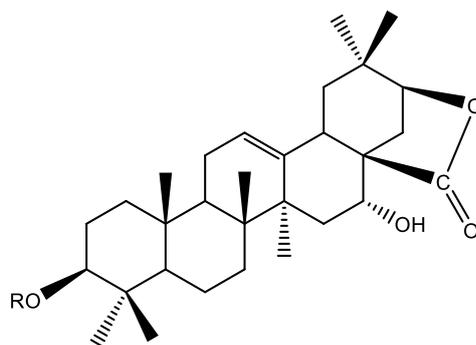
*Albizia gummifera* est une espèce de la famille des Mimosaceae dont la taille moyenne est de 30 m de haut. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle au Kenya, où on consomme une infusion d'écorces pour traiter le paludisme. En Ouganda, elle sert à précipiter l'accouchement, alors que ses racines sont employées pour traiter la maladie du sommeil. L'étude de l'extrait hydroalcoolique des racines de *A. gummifera* a conduit à l'isolement de trois saponosides : les Gummiferaosides D, E et F (48-50). L'effet apoptotique des saponosides 48 et 49 a été évalué sur une lignée cellulaire du cancer de l'épiderme humain (A431). Les analyses cytométriques ont montré que ces saponosides induisent l'apoptose des cellules cancéreuses de l'épiderme humain (A341) de manière dose-dépendante après 24 h de traitement (Simo *et al.*, 2017).



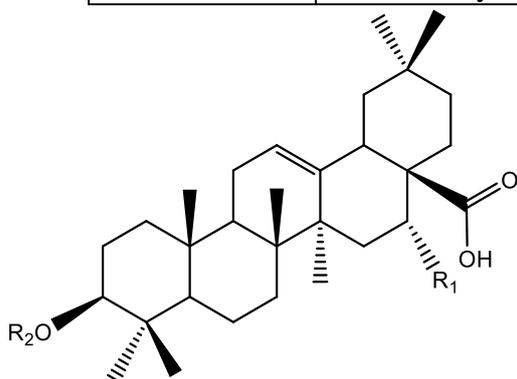
Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>48</b>	Glc	MT-Qui
<b>49</b>	H	MT-Qui
<b>50</b>	H	H

### 1.3.1.2.8. *Albizia inundata*

*Albizia inundata* (Martius) Barneby & Grimes est un arbre vivace qu'on retrouve en Argentine. L'isolement bioguidé des constituants de la partie aérienne de la plante, a conduit à deux dérivés d'acide acacique lactone (**51,52**). Lorsqu'ils ont été testés à une concentration de 20  $\mu$ M sur les cellules humaines squameuses de la tête et du cou (JMAR, MDA1986) et les cellules du mélanome (B16F10, SKMEL28), ils ont été tous inactifs (Zhang *et al.*, 2011). La même année, un dérivé d'acide échinocystique et un dérivé d'acide oléanolique ont été isolés et caractérisés de cette même plante (**53,54**) (Zhang *et al.*, 2011).



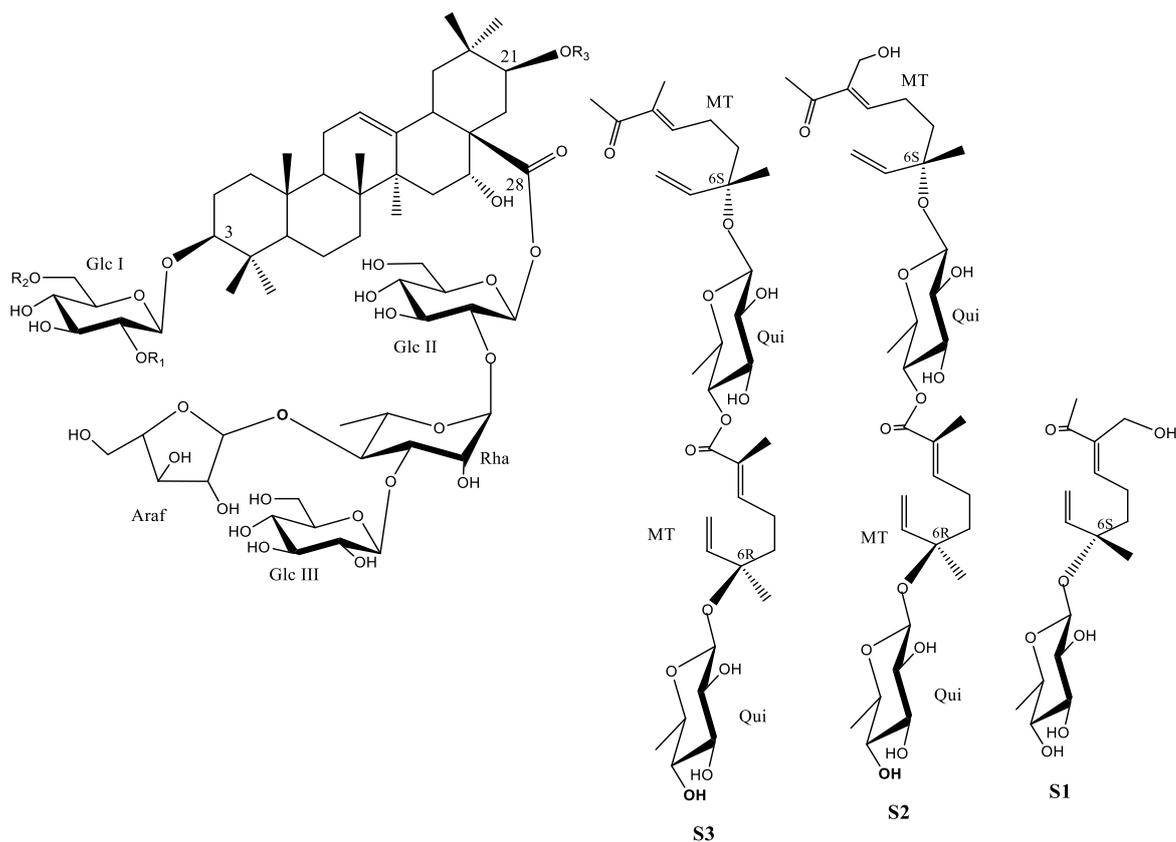
Composés	R
51	Ara-(1→2)-Ara-(1→6)-GlcNAc-
52	Xyl-(1→2)-Ara-(1→6)-GlcNAc-



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
53	Ara-(1→6)-GlcNAc-	H
54	Ara(1→6)GlcNAc-	OH

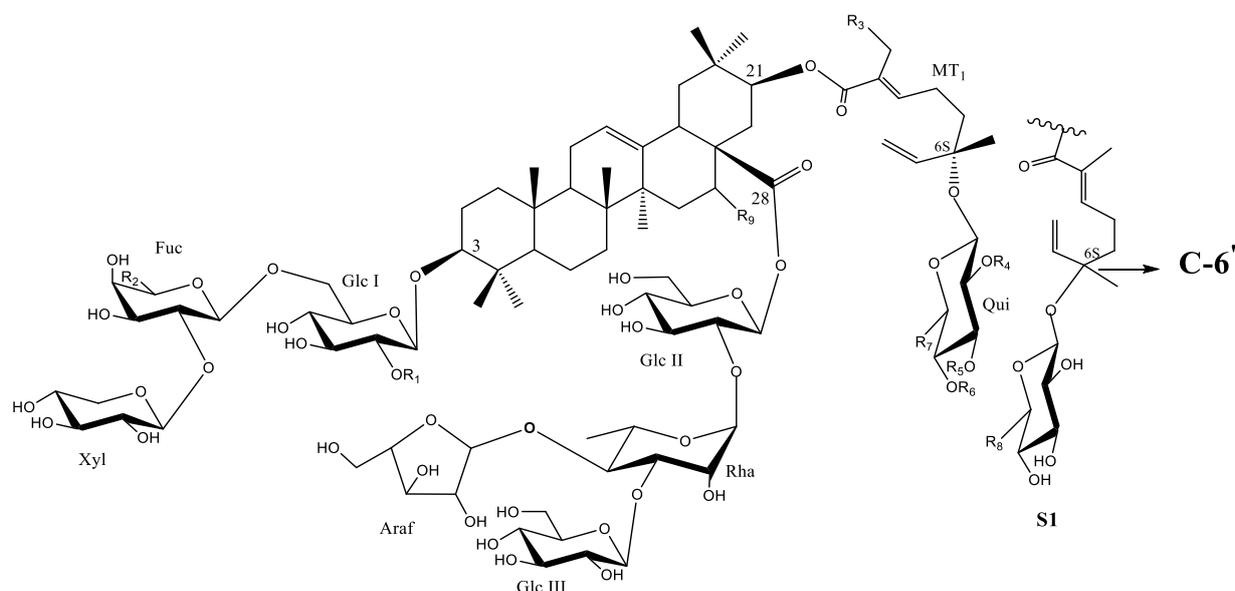
#### 1.3.1.2.9. *Albizia julibrissin*

*Albizia julibrissin* Durazz. est un arbre à feuillage caduque de la famille des Mimosaceae largement répandu en Asie. Ses écorces sont employées en médecine traditionnelle coréenne pour traiter l'insomnie, la diurèse, l'asthénie, et l'ascaridiase. En Chine, ses écorces sont utilisées comme médicament sédatif et comme un anti-inflammatoire pour traiter les gonflements et douleurs dans les poumons. Zheng *et al.* (2010) ont isolé à partir des écorces du tronc trois dérivés d'acide acacique : julibrosides J<sub>32</sub> (55), julibrosides J<sub>35</sub> (56) et julibrosides J<sub>14</sub> (57).



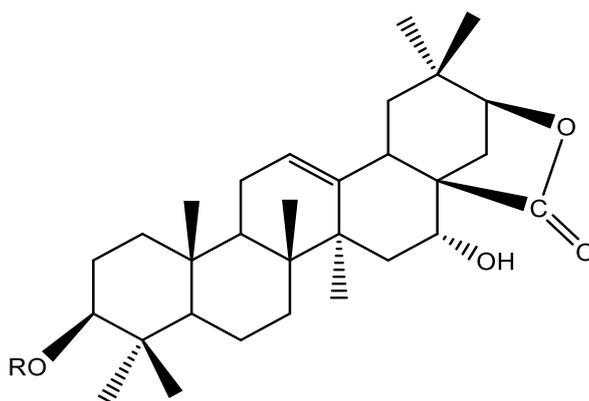
Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
55	Glc	Xyl-(1→2)-Fuc	S <sub>1</sub>
56	OH	Xyl-(1→3)-Ara	S <sub>3</sub>
57	Glc	Xyl-(1→2)-Fuc	S <sub>2</sub>

Le fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique des écorces de tige d'*A. julibrissin* réalisé par Han *et al.* (2017), a conduit à l'isolement de dix saponosides triterpéniques de type oléanane : julibrosides J<sub>37</sub> – J<sub>46</sub> (**58-67**). Les 10 saponosides ont été évalués pour leur activité cytotoxique contre quatre lignées cellulaires cancéreuses (BGC-823, A549, HCT-116, HepG2). La plupart des saponosides ainsi que leurs prosapogénines ont présenté une activité inhibitrice contre toutes les lignées cellulaires cancéreuses sensibles au médicament sélectionnée, excepté quatre (julibroside J<sub>37</sub> (58), julibroside J<sub>38</sub> (59), julibroside J<sub>39</sub> (60) et julibroside J<sub>40</sub> (61)) qui n'ont pas présenté d'activité.



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	C-6'
<b>58</b>	OH	Me	OH	S <sub>1</sub>	H	H	Me	Me	α-OH	S
<b>59</b>	OH	Me	OH	S <sub>1</sub>	H	H	Me	Me	α-OH	R
<b>60</b>	OH	Me	OH	H	S <sub>1</sub>	H	Me	Me	α-OH	R
<b>61</b>	NHAc	Me	OH	H	S <sub>1</sub>	H	Me	Me	α-OH	R
<b>62</b>	NHAc	Me	OH	H	H	S <sub>1</sub>	H	Me	α-OH	S
<b>63</b>	NHAc	Me	OH	H	H	S <sub>1</sub>	Me	H	α-OH	S
<b>64</b>	O-glc	Me	H	H	H	S <sub>1</sub>	Me	Me	α-OH	R
<b>65</b>	O-glc	Me	H	H	H	S <sub>1</sub>	Me	Me	H	S
<b>66</b>	O-glc	Me	H	H	H	S <sub>1</sub>	Me	Me	H	R
<b>67</b>	O-glc	Me	H	H	S <sub>1</sub>	H	Me	Me	H	R

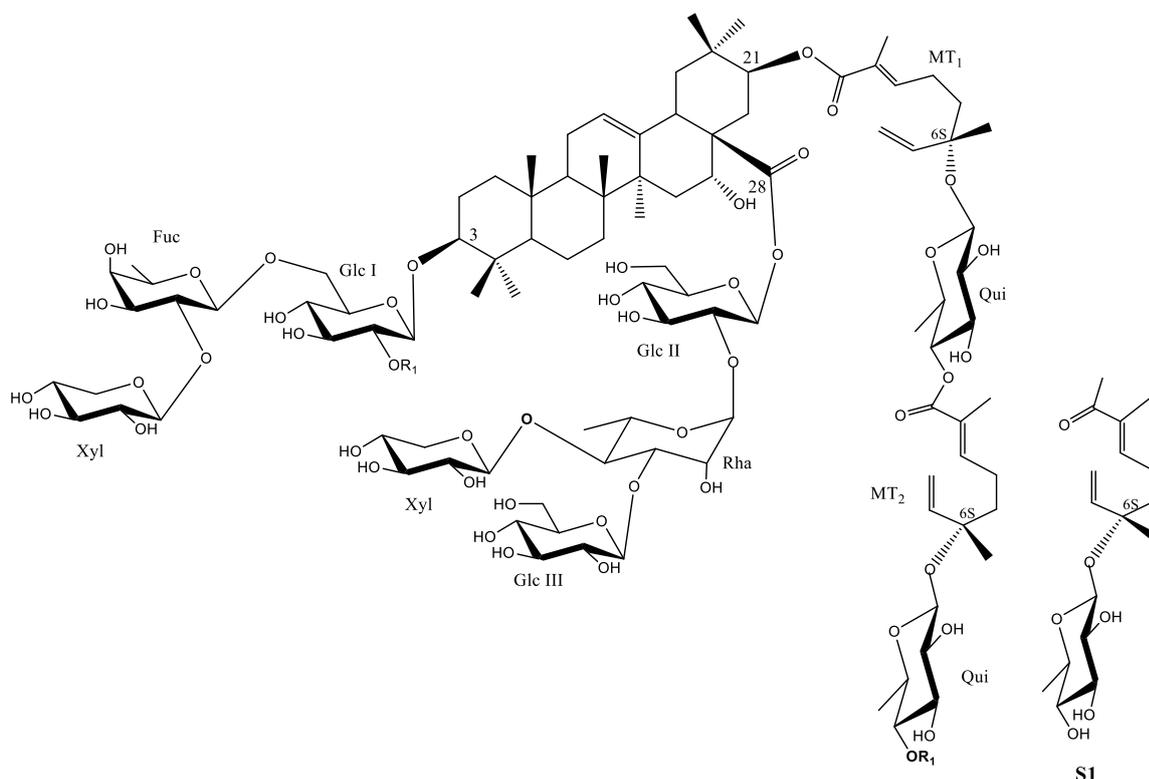
Par ailleurs, l'étude réalisée par Wang *et al.* (2019) sur l'extrait hydroalcoolique des écorces du tronc de *A. julibrissin* a conduit à l'isolement de trois saponosides : Julibroside A<sub>5</sub> (**68**), Julibroside A<sub>6</sub> (**69**) et Julibroside A<sub>7</sub> (**70**). Ces composés ont été évalués pour leur activité anti-inflammatoire *in vitro*. Ils ont aussi été testés pour leurs effets inhibiteurs du NO induit par le LPS produit dans les cellules microgliales BV-2. Les composés n'ont montré aucun effet remarquable contre la production du NO à 100 μM. Afin d'étudier la cytotoxicité, les effets de ces composés sur la prolifération cellulaire ont été mesurés en utilisant la méthode MTT. Aucun n'a montré une cytotoxicité évidente à une dose de 100 μM.



Composés	R
68	Fuc-(1→6)-Glc
69	Fuc-(1→6)-GlcNAc
70	GlcNAc

#### 1.3.1.2.10. *Albizia lebbbeck*

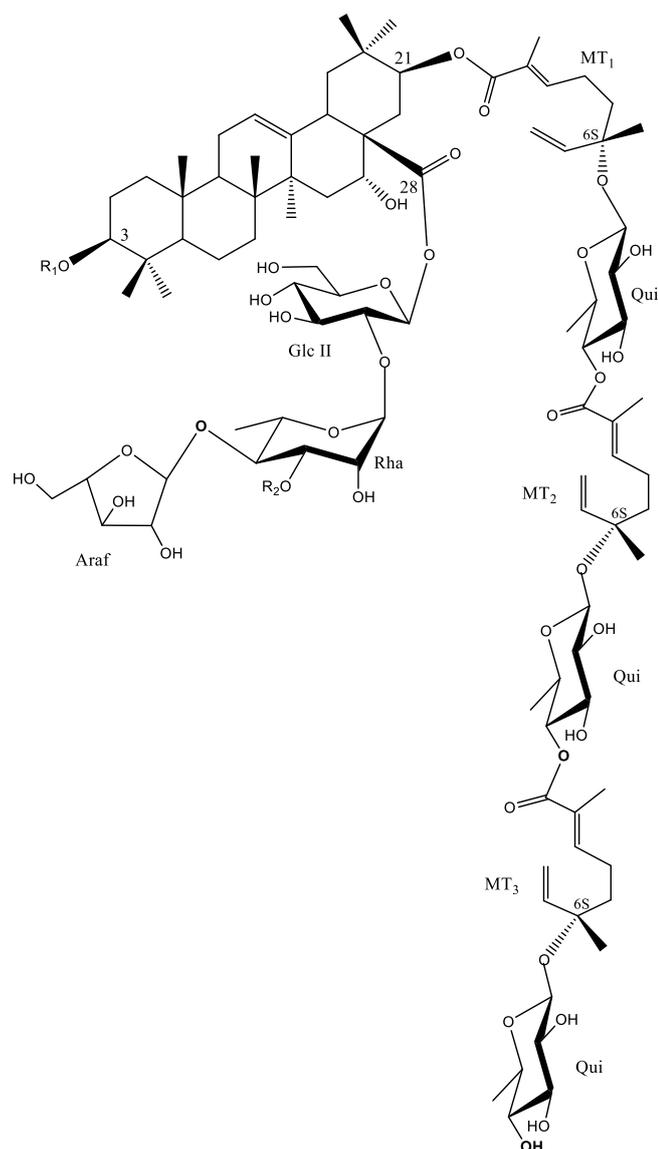
*Albizia lebbbeck* (L.) Benth est une espèce de la famille des Mimosaceae, originaire des régions tropicales du sud de l'Asie et largement cultivée et naturalisée dans d'autres régions tropicales et subtropicales. *A. lebbbeck* est un arbre qui atteint 18 à 30 m de haut avec un tronc de 50 cm à 1 m de diamètre. Son bois, très foncé et dense, est recherché pour la tournerie. En Afrique de l'Ouest, elle est utilisée traditionnellement pour traiter la diarrhée, la dysenterie, les hémorroïdes, l'asthme, la bronchite, l'eczéma, la lèpre. Noté *et al.* (2015b) ont isolé deux dérivés de l'acide acacique nommés lebbecosides A-B. Ces saponosides ont été testés afin d'évaluer leur effet inhibiteur du métabolisme des cellules tumorales du cerveau humain, le glioblastome humain U-87 MG et TG1 isolés d'un patient. Les deux composés, ont montré une activité cytotoxique significative sur les cellules cancéreuses U-87 MG et TG 1 avec une valeur de  $CI_{50}$  de 3,46  $\mu$ M et 1,36  $\mu$ M pour lebbecoside A (**71**), et 2,10  $\mu$ M et 2,24  $\mu$ M pour lebbecoside B (**72**).



Composés	R <sub>1</sub>
71	S <sub>1</sub>
72	H

Noté *et al.* (2019a) ont aussi isolé un saponoside à partir des écorces du tronc de *A. lebeck* qu'ils ont nommé lebeckoside C (**73**). Ce composé a été évalué pour son effet inhibiteur du métabolisme des cellules tumorales du cerveau humain, U-87 MG et TG1. Ce saponoside a montré une activité cytotoxique significative sur les cellules cancéreuses U-87 MG et TG 1 avec des valeurs de CI<sub>50</sub> de 1,69 et 1,44 µM, respectivement.

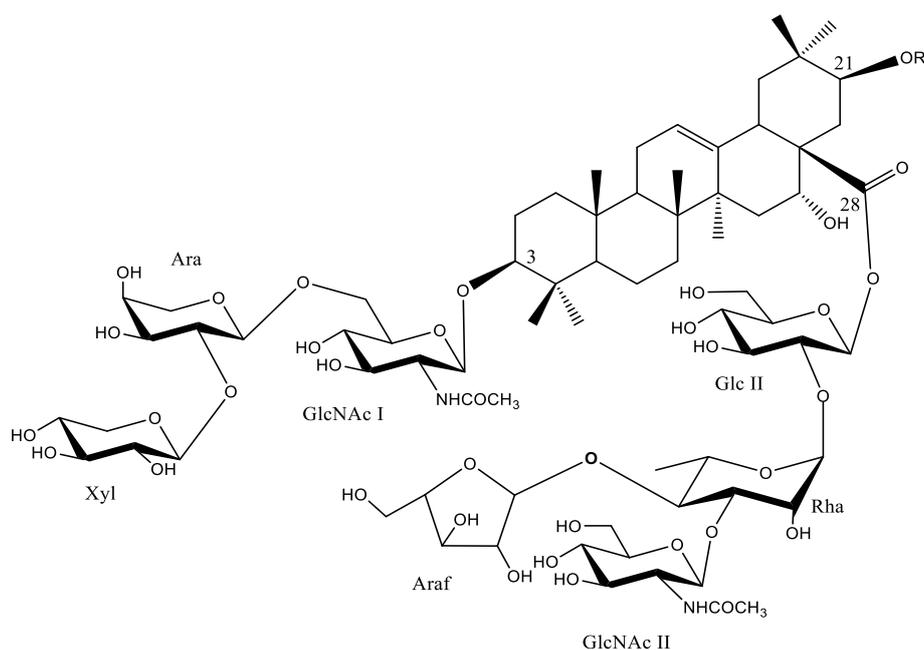
Par ailleurs, Viana *et al.* (2019) travaillant aussi sur les écorces de *A. lebeck*, ont isolé un autre saponoside (**74**). Une étude sur ses propriétés de perméabilité de la membrane a été réalisée ainsi qu'une évaluation de son potentiel toxicologique contre l'intégrité de la membrane. De plus, les interactions supramoléculaires du composé isolé avec des constituants membranaires et des composants intracellulaires ont été observés à l'aide de biomodèles expérimentaux *in vitro*. Enfin, il a été possible d'en déduire que son caractère amphiphile est responsable de sa capacité d'interaction membranaire et du déclenchement des structures supramoléculaires.



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
73	Xyl(1→2)Fuc(1→6)[Glc(1→2)]Glc	H
74	Xyl(1 →2)Ara(1 → 6)GlcNac	Glc

Ghani *et al.* (2016) ont aussi isolés deux saponosides des fleurs de *A. lebeck* qu'ils ont nommés : lebeckanin I (75) et lebeckanin II (76). L'activité antimicrobienne de la fraction contenant le mélange des deux composés a été testé contre les champignons ; *Aspergillus fumigatus* (RCMB O2568), *Syncephalastrum racemosum* RCMB 05922, *Geotrichum candidum* (RCMB 05097) et *Candia albicans* (RCMB 05036). La même fraction a également été testée contre *Pseudomonas aeruginosa* (RCMB 010043) et *Escherichia coli* (RCMB 010052), *Streptococcus pneumoniae* (RCMB 010010) et *Bacillus subtilis* (RCMB 010067). Cette fraction a présenté en même temps, une forte et/ou une activité modérée contre tous les

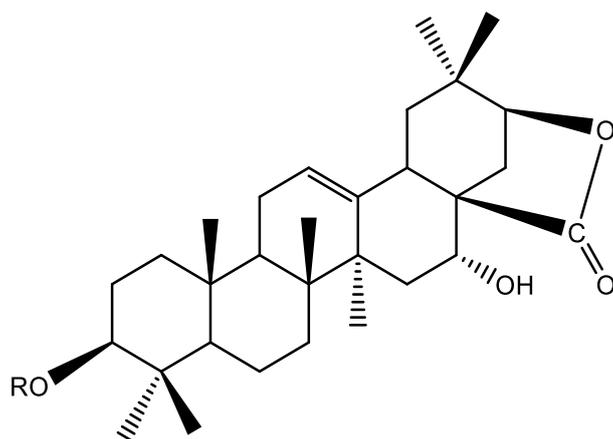
micro-organismes testés sauf *C. albicans*, où elle n'a montré aucune activité. Il est à noter qu'elle présentait une activité antifongique contre *Syncephalastrum racemosum* plus marquée que celle de l'amphotéricine B et un effet similaire que la gentamicine contre *Escherichia coli*. Les résultats de l'activité cytotoxique de la même fraction contre les lignées cellulaires cancéreuses HePG-2 (Hépatocarcinome), HEP-2 (carcinome du larynx), HELA (carcinome cervical), MCF-7 (carcinome du sein) et HCT-11 6 (carcinome du côlon) montre que l'échantillon présente une activité cytotoxique significative contre toutes les lignées cellulaires testées avec des valeurs DL<sub>50</sub> de 1,74 ; 3,42 ; 4,29 ; 0,65 et 0,74 µg /ml respectivement. Cette efficacité est plus forte que celle rapportée pour l'extrait d'écorces de *A. lebbeck*.



Composés	R
75	H
76	Glc

#### 1.3.1.2.11. *Albizia mollis*

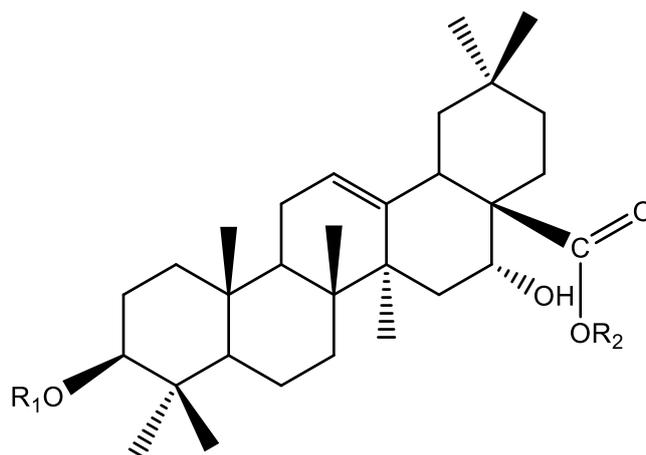
*Albizia mollis*, populairement appelée « maoyehewan » en Chine, est l'une des espèces végétales représentatives du genre *Albizia*. Cette plante est bien connue pour ses propriétés sédatives. Le travail phytochimique réalisé par Cheng *et al.* (2011) sur les écorces de cette plante a permis l'isolement et l'élucidation structurale de deux saponosides : molliside A (77) et molliside B (78) ; tous dérivés de l'acide acacique lactone.



Composés	R
77	Rha-(1→6)-Glc
78	Xyl-(1→3)-Rha-(1→6)-Glc

#### 1.3.1.2.12. *Albizia procera*

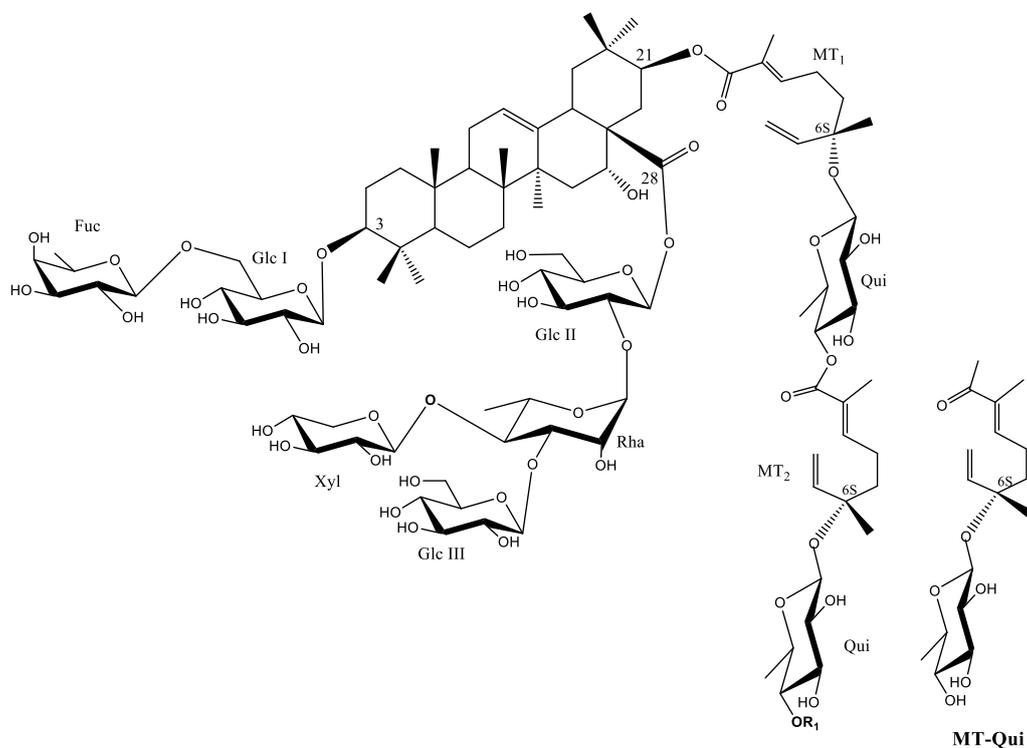
*Albizia procera* Benth. est une espèce originaire d'Asie tropicale et d'Océanie. En Inde, elle est communément appelée « Safed Siris ». Ce sont des larges arbres à feuilles caduques. En Egypte, on la rencontre dans les rues et les jardins publics. Ses écorces sont utilisées en médecine traditionnelle pour les grossesses et le mal d'estomac. Miyase *et al.* (2010) y ont isolé trois saponosides triterpeniques dérivés de l'acide échinocystique (**79-81**).



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
79	Xyl(1→2)Gal(1→6)GlcNAc-	Glc-
80	Xyl(1→2)Ara(1→6)GlcNAc-	Glc-
81	Ara(1→2)Ara(1→6)GlcNAc-	Glc-

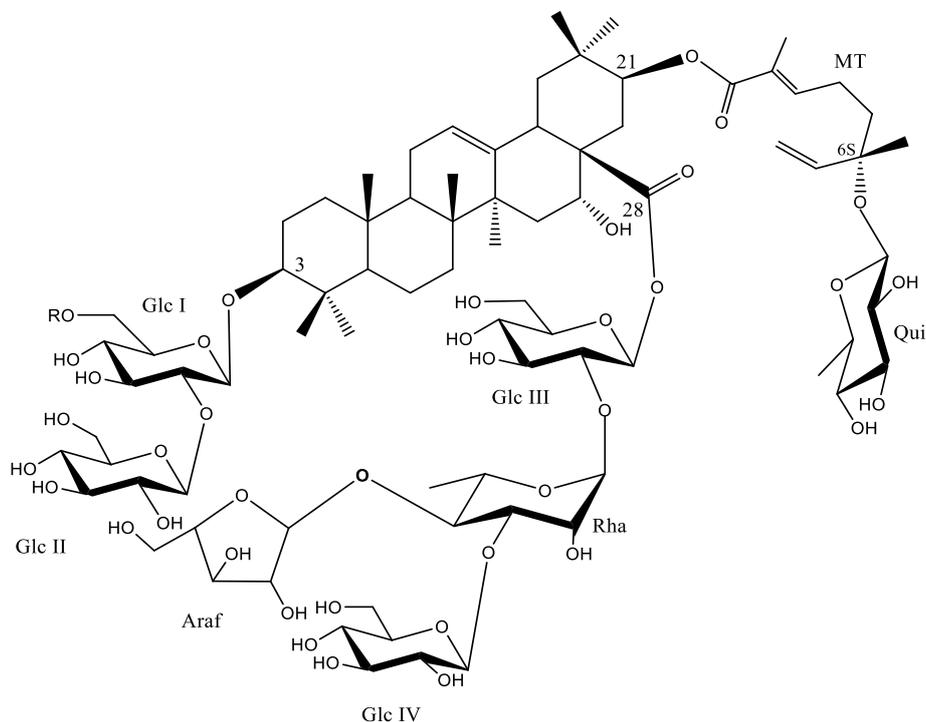
### 1.3.1.2.13. *Albizia zygia*

*Albizia zygia* est une plante largement répandue en Afrique de l’Ouest (Hutchinson *et al.*, 1972), du Sénégal au Cameroun et jusqu’au Soudan (Arbonnier, 2004). C’est un arbre décidu, à croissance rapide, dont la hauteur est comprise entre 12 et 15 m. Son bois est connu sous les noms commerciaux de nongo (nom général), de red nongo (Ouganda) et d’okuro (Ghana). Il est employé pour la construction intérieure, la parqueterie légère, les meubles, les pirogues, les instruments (par ex. pilons, manches de houe), les objets sculptés, les placages et contreplaqués. Ses écorces sont lisses ou finement crevassées, à tranche fine, granuleuse, de couleur blanc jaunâtre à orange. Les rameaux sont gris, plus ou moins pubescents. Ses écorces de racines sont employées dans le traitement de la toux. Quant aux écorces du tronc, elles sont utilisées comme purgatif, désinfectant et aphrodisiaque. D’autre part, on les utilise aussi pour le traitement des maladies vénériennes (Laird & Sidwell, 1996). L’extrait hydroalcoolique des racines de *A. zygia* a conduit à l’isolement de quatre saponosides dont deux isolés pour la première fois : les zygiaosides A–B (**82-83**). L’effet apoptotique des saponosides A–B (**82-83**) a été évaluée sur une lignée cellulaire de cancer de l’épiderme humain (A431). Les analyses cytométriques ont montré que les saponosides A (**82**) et B (**83**) induisaient l’apoptose des cellules cancéreuses de l’épiderme humain (A341) de manière dose-dépendante après 24 h de traitement (Noté *et al.*, 2016b).



Composés	R <sub>1</sub>
<b>82</b>	MT-Qui
<b>83</b>	H

L'étude de l'extrait hydroalcoolique des écorces de *A. zygia* a conduit à l'isolement de deux saponosides nommés zygiaosides C–D (**84-85**) (Noté *et al.*, 2019).



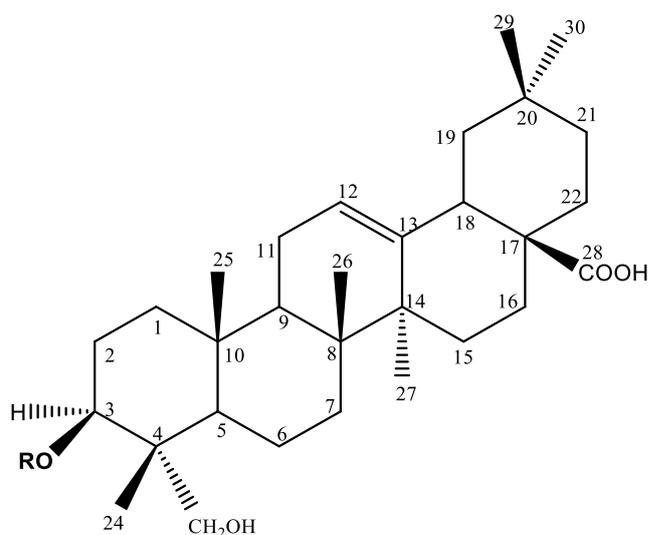
Composés	R
<b>84</b>	Ara
<b>85</b>	Fuc

### 1.3.1.3. Cas des saponosides du genre *Lecaniodiscus*

#### 1.3.1.3.1. *Lecaniodiscus cupanioides*

Le genre *Lecaniodiscus* appartient à la famille des Sapindaceae et possède quatre espèces dont la plus citée est *L. cupanioides* Planch. ex Benth. La littérature fait état de 4 saponosides isolés de ce genre (**86**, **87**, **88** et **89**), tous issus de l'espèce *L. cupanioides* Planch. ex Benth. (Encarnación *et al.*, 1981; Adesegun *et al.*, 2008). Le composé **88** a présenté une activité antitumorale contre le carcinome du côlon humain H-116, le carcinome pulmonaire humain A-549 et HT-29 avec des valeurs de CI<sub>50</sub> de 5,0 ; 2,5 et 2,5 µg/mL, respectivement. Le composé **86** a montré des activités similaires avec des valeurs de CI<sub>50</sub> de 5,0 ; 5,0 et 2,5 µg/mL respectivement. Cela suggère que les saponosides triterpénoïdes isolés peuvent être considérés comme des potentiels anticancéreux pour d'autres études (Adesegun *et al.*, 2014). L'activité antifongique de ces deux composés **88** et **86** a été évaluée par le test de diffusion sur puits d'agar. Le composé **88** a présenté une activité antifongique contre *C. albican*, *C. neoformans* et *A. fumigatus* avec une CI<sub>50</sub> de 4,5 µg/mL ; 15,0 µg/mL et une CMI 10,0 µg/mL, respectivement

et **86** a montré des activités similaires avec une  $CI_{50}$  de 8,5  $\mu\text{g/mL}$ , 10,0  $\mu\text{g/mL}$  et une CMI > 25,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Adesegun *et al.*, 2008).



Composés	R
<b>86</b>	Ara(1→3)Rha(1→2)Ara-
<b>87</b>	Xyl(1→3)Rha-(1→2)-Ara
<b>88</b>	Araf(1→3)Rha(1→2)Ara-
<b>89</b>	Rha-(1→2)-Ara

### 1.3.2. Glycosides de farnésol isolés et évaluation des activités biologiques.

A ce jour, les activités biologiques des glycosides de farnésol sont très peu connues. Magid *et al.* (2005) ont évalué l'activité antibactérienne des glycosides de farnésol de *Guioa crenulata* sur des souches de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Mycobacterium smegmatis* et d'*Enterococcus faecalis*, mais aucune activité n'a été détectée à 50  $\mu\text{g/mL}$ . Il en va de même de l'activité inhibitrice de la tyrosinase, enzyme clé de la synthèse de la mélanine qui a été évaluée sur les glycosides de farnésol de *Guioa villosa* (Magid *et al.*, 2008). Néanmoins, il existe un brevet japonais qui mentionne l'isolement et l'activité des diglycosides de farnésol d'un corail mou du genre *Sinularia*. Ces diglycosides constitués de deux unités arabinoses augmenteraient l'absorption du glucose et peuvent être utilisés pour le traitement et la prévention du diabète (Sato *et al.*, 1988; Shindo *et al.*, 1992).

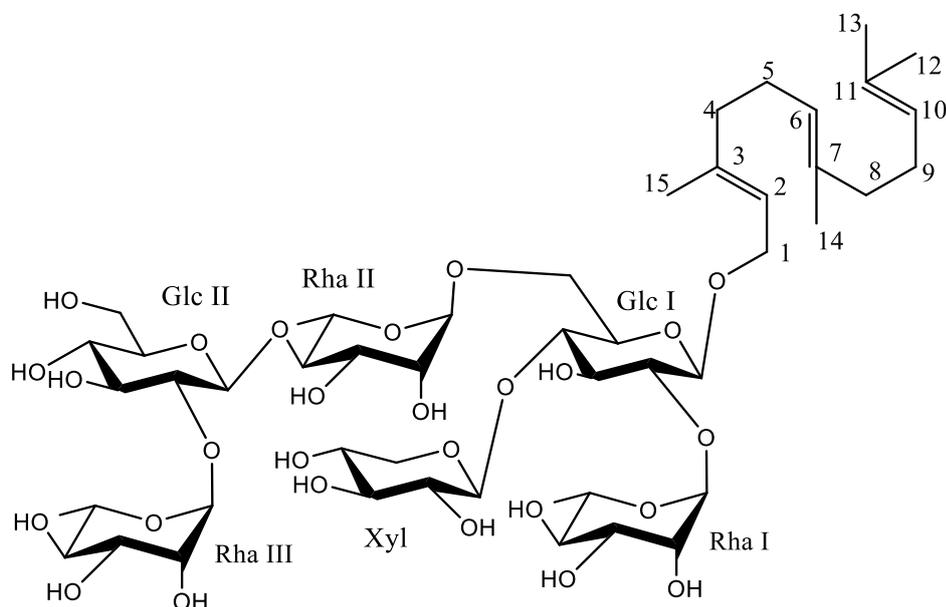
#### 1.3.2.1. Cas des glycosides de farnésol de la famille des Sapindaceae

Les glycosides de farnésol et leurs dérivés sont peu décrits dans la littérature. Chez les plantes supérieures, ils semblent être spécifiques de la sous-famille des Sapindaceae puisqu'ils ont été mis en évidence dans plusieurs espèces (Kasai *et al.*, 1986, 1988; Wu-Hsiung *et al.*, 1991; Adesanya *et al.*, 1999; Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018). En l'absence de

saponosides, les glycosides de farnésol pourraient s'avérer de bons marqueurs chimiotaxonomiques de la sous-famille des Sapindoideae.

### 1.3.2.1.1. *Eriocoelum microspermum*

Le genre *Eriocoelum* comprend environ une dizaine d'espèces et est limité à l'Afrique continentale tropicale. *E. microspermum* se rencontre depuis le Cameroun et la Centrafrique jusqu'en R.D. Congo et en Angola. En R.D. Congo, ses tiges servent à fabriquer des piquets. Le bois se prête à la construction, à la parqueterie, à la menuiserie, aux boiseries intérieures, à la construction navale, à la charronnerie, au mobilier et aux articles de sport. L'écorce sert en médecine traditionnelle à soigner la toux, l'entérite et les maladies vénériennes. Des écorces de racines ont été isolé deux dérivés de farnésol **90** et **91** (Pertuit *et al.*, 2018). Aucune activité biologique n'a été évaluée.



Composés	R
<b>90</b>	Xyl
<b>91</b>	Glc

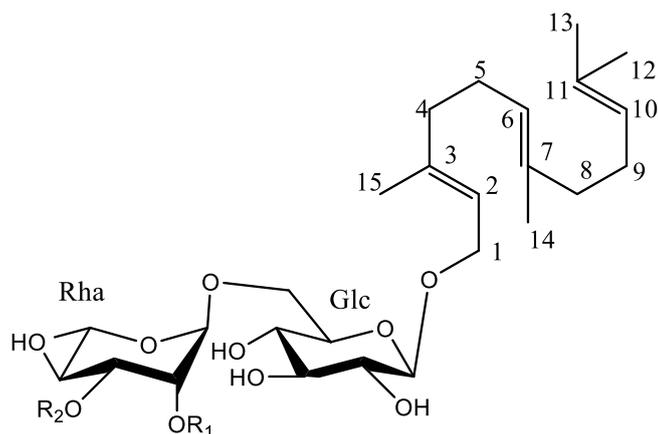
### 1.3.2.1.2. *Guioa crenulata* Radlk.

Le genre *Guioa* (Sapindoideae) est représenté par 105 espèces réparties en Indo Malaisie et en Australie (de Kok, 2002). *Guioa crenulata* Radlk., est un arbre de taille modérée (hauteur d'environ 5 m), poussant en Nouvelle-Calédonie.

Les extraits éthanoliques et d'acétate d'éthyle des feuilles ont été testés lors d'un screening biologique préliminaire, mais aucune activité cytotoxique *in vitro* n'a été révélée

contre les cellules cancéreuses P388. Par ailleurs, aucune activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase n'a été observée.

Les extraits de *Guioa crenulata* sont utilisés en cosmétique (crèmes antirides, amincissante et raffermissante) et dans des préparations pharmaceutiques pour le traitement du vieillissement cutané (Renimel *et al.*, 1998). L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Guioa crenulata* a conduit à l'isolement de quatre dérivés de farnésols : Crenuloside A-D (**92-95**) (Magid *et al.*, 2005).

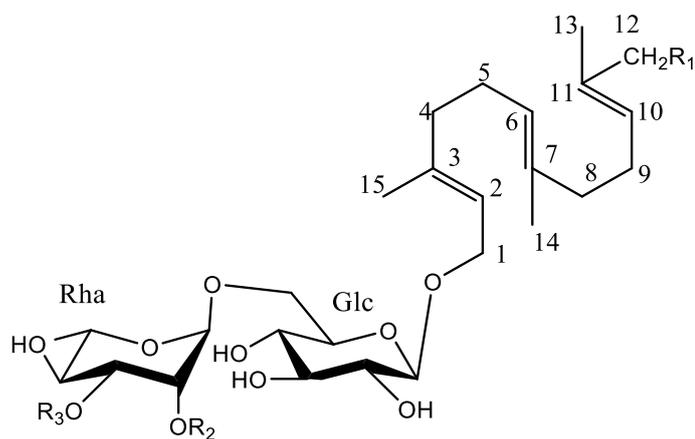


Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>92</b>	H	H
<b>93</b>	H	CH <sub>3</sub> CO-
<b>94</b>	CH <sub>3</sub> CO-	H
<b>95</b>	CH <sub>3</sub> CO-	CH <sub>3</sub> CO-

### 1.3.2.1.3. *Guioa villosa* Radlk.

C'est une plante qui fait partie des 105 espèces que comprend le genre *Guioa*. On la retrouve beaucoup plus en IndoMalaisie et en Australie.

L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Guioa villosa* a conduit à l'isolement de sept dérivés de farnésols dont trois décrits pour la première fois : Crenuloside E-G (**96-98**). Ces composés ont été évalués pour leur activité inhibitrice de la tyrosinase, enzyme clé de la synthèse de la mélanine. Aucune activité inhibitrice de la tyrosinase n'a été observée (Magid *et al.*, 2008).

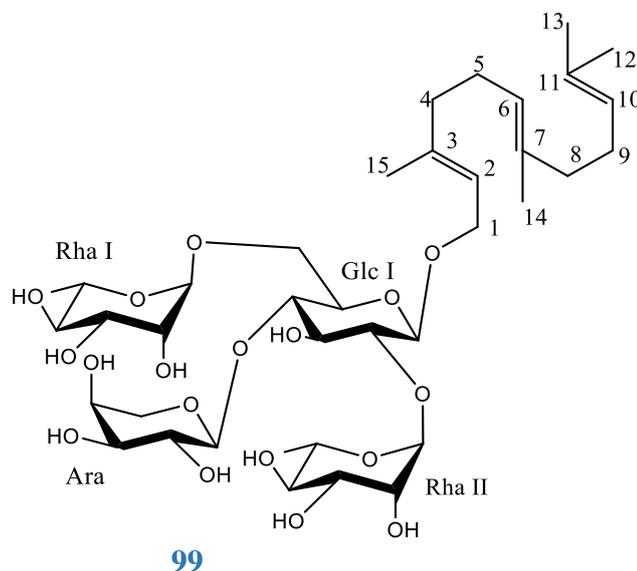


Ac=acétyl

Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
96	OH	Ac	Ac
97	OAc	Ac	H
98	OAc	H	Ac

#### 1.3.2.1.4. *Lepisanthes rubiginosa*

*Lepisanthes rubiginosa* est un arbuste ou petit arbre à feuilles persistantes, souvent de 2 à 3 mètres de haut mais parfois pouvant atteindre jusqu'à 16 mètres en Malaisie et serait encore plus grand en Inde. L'extrait alcoolique des écorces de *L. rubiginosa* a montré une toxicité non spécifique *in vivo* chez des souris sur un modèle de leucémie murine P388 à 40 mg/kg et une cytotoxicité *in vitro* contre les cellules tumorales A549 (poumon humain) à 10-30 µg/ml (Adesanya *et al.*, 1999). L'activité n'a pas été évaluée sur le dérivé du farnésol isolé (99).

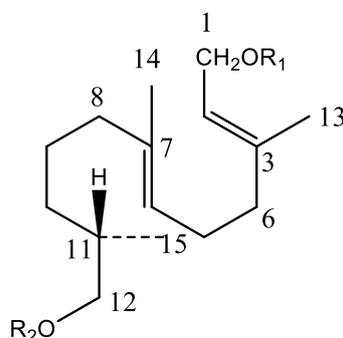


99

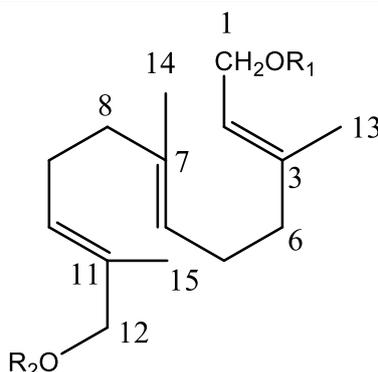
#### 1.3.2.1.5. *Sapindus delavayi*

*Sapindus delavayi* (Franch.) Radlk., ou arbre à savon, est largement cultivé dans les régions subtropicales à tropicales de la Chine comme arbre d'ombrage. Elle pousse dans le Yunnan et le Scichuan en Chine et son péricarpe (nom chinois : pyi-shiau-tzu) est utilisé comme

substitut de l'enmeihi au Japon. L'étude de l'extrait méthanolique du péricarpe de *S. delavayi* a conduit à l'isolement de 10 glycosides de farnésol parmi lesquelles 6 décrits pour la première fois : pyishiauosides Iva (**100**), IIIa (**101**), **102**, Ib (**103**), IIb (**104**) et IVb (**105**) (Wu-Hsiung *et al.*, 1991). Un proglycoside de farnésol a été obtenu par hydrolyse enzymatique avec de la pectinase brute du composé pyishiauoside IIIa.



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>100</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	Rha(1→2)-Ara (1→3)Glc-
<b>101</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	Rha(1→2)-Ara (1→3)Glc-
<b>102</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	OH

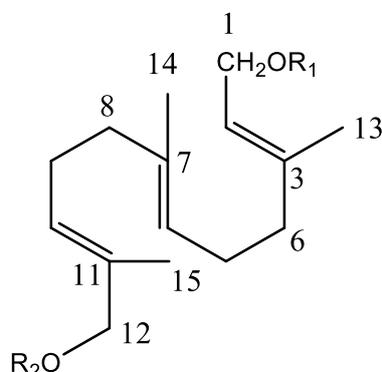


Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>103</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	Rha(1→2)-Ara (1→3)Glc-
<b>104</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	OH
<b>105</b>	Rha(1→2)-Ara (1→3)Glc-	OH

#### 1.3.2.1.6. *Sapindus emarginatus*

*Sapindus. emarginatus* Vahl. de la sous-famille des Sapindaceae, est un arbre à feuilles caduques de taille moyenne qui se trouve au sud de l'Inde. Il est communément appelé arbre à noix de savon. Cet arbre mesure 8 à 10 m de haut et possède de nombreuses branches à feuilles et folioles. Originaire du Sud de l'Inde, *S. emarginatus* est introduit dans les régions tropicales et subtropicales, en particulier la région indo-malayenne. Traditionnellement, *S. emarginatus* est utilisé comme anti-inflammatoire et antipruritique (Srikanth & Muralidharan, 2009). Il est aussi utilisé pour purifier le sang. La graine est enivrante et l'écorce du fruit a une action oxytropic. *S. emarginatus* a également montré une forte activité antibactérienne contre les

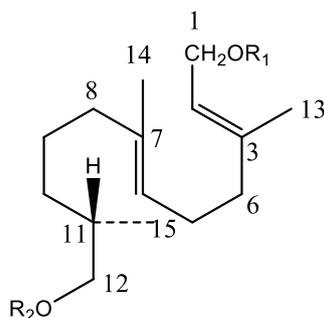
souches bactériennes testées. Dans une étude préliminaire, une action négative sur la fertilité a également été rapportée (Ahmed & Garg, 1998). Le péricarpe de cette plante a été extrait au méthanol et cet extrait a conduit à l'isolement d'un glycoside de farnésol (**100**) (Kanchanapoom *et al.*, 2001).



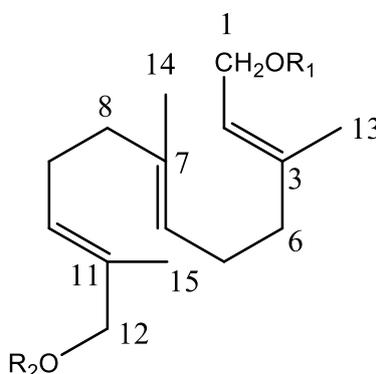
Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>106</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-

#### 1.3.2.1.7. *Sapindus mukorossi* Gaertn.

Ce petit arbre, dépassant rarement dix mètres, appartient à la famille des Sapindacées qui rassemble près de 2000 espèces essentiellement d'origine tropicale. Il pousse dans tout le Sud-Est asiatique, du Vietnam au Japon en passant par l'Inde et la Chine. Il y est très largement cultivé en raison de l'utilisation de son fruit. Ses feuilles caduques disposent d'un nombre de folioles impair. Son fruit est assez remarquable et atypique. Il s'agit d'un schizocarpe charnu : il est issu d'un pistil à carpelles soudés qui, lors de la formation du fruit, se divisent en segments que l'on appelle des méricarpes et qui sont, dans le cas présent, des « pseudo-drupes ». Bien souvent, l'un des méricarpes avorte (celui qui est plus petit que tous les autres). Il est utilisé en médecine traditionnelle orientale comme expectorant, ainsi que comme source de surfactant (Kasai *et al.*, 1986). Le péricarpe de cette plante a été extrait au méthanol et cet extrait a conduit à l'isolement de quatre glycosides de farnésol Mukuroziosides Ia (**106**), IIa (**107**), Ib (**109**) et IIb (**110**) (Kasai *et al.*, 1986), par hydrolyse enzymatique avec de la cellulase brute, Mukuroziosides Ia et Ib ont donné deux nouveaux proglycoside de farnésol (composés **108** et **111** respectivement).



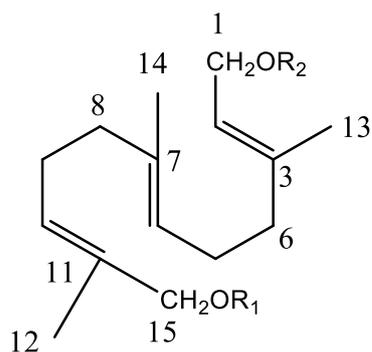
Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>106</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	Rha(1→2)Glc-
<b>107</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-
<b>108</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	OH



Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>109</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	Rha(1→2)Glc-
<b>110</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-
<b>111</b>	Rha(1→2)-Rha (1→3)Glc-	OH

### 1.3.2.1.8. *Sapindus trifoliatus*

*Sapindus trifoliatus* Linn. est une plante de la sous-famille des Sapindaceae à feuilles caduques de taille moyenne et qu'on trouve au sud de l'Inde. On l'appelle arbre de savon. Son péricarpe présente diverses propriétés médicinales. Il aurait entre autres des propriétés émétiques, toniques et astringentes (Arulmozhi *et al.*, 2005). Il est aussi utilisé dans le traitement de l'asthme, des coliques dues à l'indigestion, de la diarrhée et de la paralysie des membres. Une solution aqueuse épaisse du mésocarpe pulpeux est introduite dans le nez des patients pour le soulagement de l'hémicranie et la restauration de la conscience pendant les crises d'épilepsie et d'hystérie (Arulmozhi *et al.*, 2005). De l'extrait méthanolique du Péricarpe de *S. trifoliatus*, a été obtenu un dérivé de farnésol : Trifolioside II (**112**) (Kasai *et al.*, 1988). L'hydrolyse enzymatique avec de la cellulase brute de Trifolioside II, a donné des composés partiellement hydrolysés **113** et **114**, deux proglycosides de farnésol.

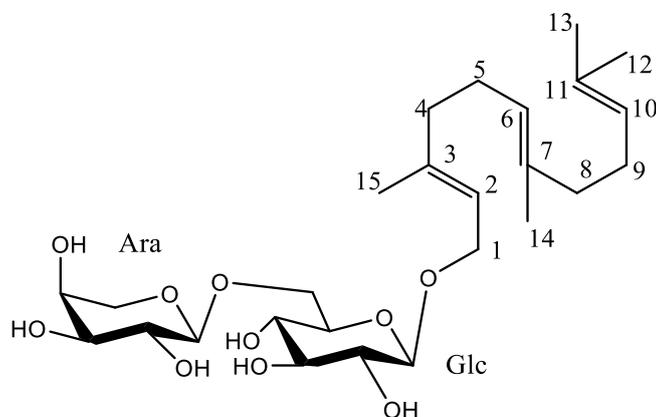


Composés	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>112</b>	Rha(1→2)-Xyl (1→3)Glc-	Rha(1→2)-Xyl (1→3)Glc-
<b>113</b>	Rha(1→2)-Xyl (1→3)Glc-	H
<b>114</b>	H	Rha(1→2)-Xyl (1→3)Glc-

### 1.3.2.2. Cas des glycosides de farnésol de la famille des Mimosaceae

#### 1.3.2.2.1. *Albizia lebeck*

C'est la seule étude qui fait état de la présence de cette classe de métabolites dans la famille des Mimosaceae. Cette étude a été effectuée sur les fleurs de *Albizia lebeck* et reportée par Al-Massarani *et al.* (2017). Un seul dérivé de farnésol a été décrit et aucune activité biologique n'a été réalisée sur celui-ci.



**115**

## 1.4. Méthodes physicochimiques

Les structures de ces classes de composés sont établies par une analyse approfondie des techniques de RMN, principalement des expériences de RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) et de RMN 2D (COSY, NOESY, HSQC, HSQC-TOCSY et HMBC). Une analyse en spectrométrie de masse HRESIMS est aussi réalisée pour confirmer leurs structures en apportant des données complémentaires (masse molaire et formule brute).

### 1.4.1. Spectrométrie de masse (MS)

C'est une technique d'analyse qui permet d'identifier les composés et de déterminer leurs masses moléculaires. Elle est très importante dans l'analyse des molécules à haut poids moléculaire grâce à sa capacité de détection et sa sensibilité. Cette technique est basée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation et provenant de la molécule en cours d'analyse. Pour les méthodes d'ionisation douce, l'ion formé peut être consécutif à l'addition d'un ion ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ) ou d'un électron, ou, à la soustraction d'un électron ou d'un hydrogène ionisé (hydrure ou proton), à la molécule. Celui-ci est donc appelé ion moléculaire ou ion pseudo-moléculaire (Menet, 2011). Ces ions vont se déplacer à travers un analyseur de masse, puis entrer en contact avec le détecteur qui est relié à un système informatique. L'ordinateur affiche graphiquement les signaux en tant que spectre de masse montrant l'abondance relative des signaux en fonction de leur rapport masse/charge ( $m / z$ ). La spectrométrie de masse est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine etc.

#### 1.4.1.1. Sources d'ionisations

L'ionisation des analytes d'un échantillon est effectuée dans la source du spectromètre de masse. Pour choisir une méthode d'ionisation à appliquer à une molécule, il faut connaître les propriétés physicochimiques de celle-ci et les informations que vous voulez en tirer. Par exemple, pour les composés facilement volatilisables et de faible masse moléculaire, l'utilisation de **l'ionisation par impact électronique** et **l'ionisation chimique à pression réduite** le plus souvent couplées à la chromatographie en phase gazeuse seront privilégiées. Mais depuis une vingtaine d'années, de nouvelles sources d'ionisation ont été développées (ionisations douces). Elles permettent l'ionisation de molécules sans provoquer (ou peu) leur fragmentation. Nous avons entre autres :

- La désorption et ionisation par impulsion laser et assistées par une matrice (source MALDI) fréquemment couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (TOF) pour l'analyse de molécules présentant une masse moléculaire élevée (au moins supérieure à 500 Da).
- L'électronébulisation (ESI)
- L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) utilisée pour l'ionisation de molécules de faible masse, en couplage avec la chromatographie en phase liquide.

#### 1.4.1.1.1. Les méthodes d'ionisations les plus utilisées pour les glycosides terpéniques

L'analyse des glycosides terpéniques se fait le plus souvent par deux méthodes :

- Le bombardement d'atomes rapides (*FAB*)
- L'ionisation par électrospray (*ESI*)

Depuis un certain temps, la méthode par bombardement d'atomes rapides (*FAB*) tend à disparaître en laissant place à l'ionisation par électrospray (*ESI*).

##### *FAB (Fast Atom Bombardment)*

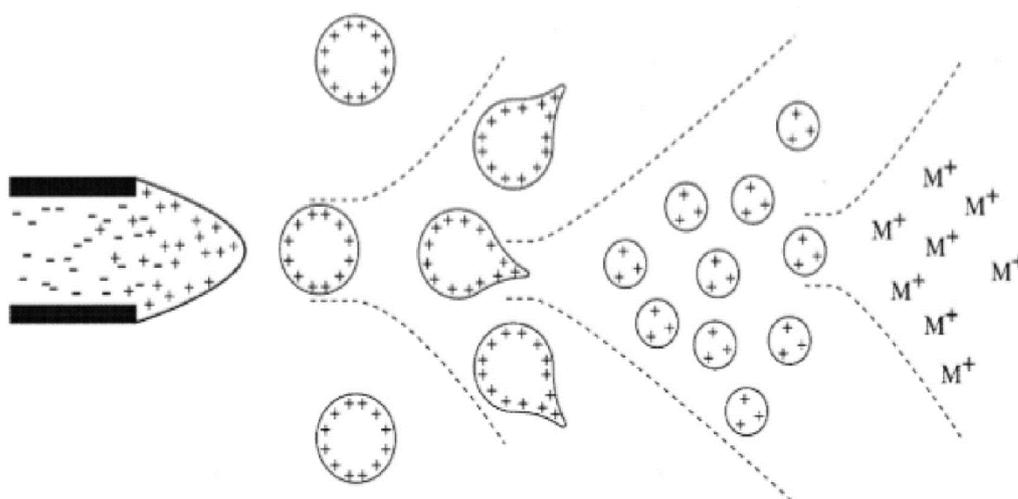
Le *FAB* est une expérience utilisée dans l'analyse des molécules telles que les saponosides et les glycosides de farnésols. Elle fournit des informations sur la séquence de sucres par clivage des liaisons glycosidiques ainsi que sur la masse des molécules (Liu *et al.*, 2004). L'ionisation de l'échantillon est obtenue par bombardement d'atomes généralement de l'argon ou de xénon (très énergétique, 6 à 10 KeV) qui a été précédemment ionisé, accéléré et neutralisé par collision avec des atomes d'argon neutre et lente. Les atomes neutres viennent alors 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 (Hoffmann & Stroobant, 2005).

Cette technique produit des ions positifs par captation de cation  $[M + 1]^+$  ou  $[M + 23]^+$ , et des ions négatifs par déprotonation  $[M - 1]^-$  ; les deux types d'ions sont habituellement mono chargés et, selon l'appareil, le *FAB* peut être utilisé en mode haute résolution (Silverstein *et al.*, 2007).

##### *ESI (ElectroSpray Ionisation)*

L'électro-nébulisation « electro spray » est l'une des techniques les plus efficaces dans la détermination structurale des glycosides terpéniques. Elle consiste à pulvériser une solution (une phase mobile par exemple) d'une part, à ioniser les espèces qui y sont présentes d'autre part et à assurer l'évaporation de celles-ci ; tout ceci, en appliquant à pression atmosphérique un champ électrique fort sur le liquide qui traverse le capillaire (nébuliseur). Une différence de potentiel de l'ordre de quelques milliers de volts entre le nébuliseur et une contre-électrode est appliquée (**Figure 14**). En mode positif par exemple (cas où l'embout du nébuliseur joue le rôle de l'anode), les ions chargés positivement ou négativement présents dans l'électrolyte vont migrer et se séparer à l'extrémité du capillaire, les ions positifs se plaçant à la surface du liquide (au niveau du ménisque) et les ions négatifs s'accumulant au niveau du capillaire. Les répulsions coulombiennes entre les charges positives tendent à étirer le ménisque et à former le cône de Taylor qui se transforme alors en filament liquide puis en fines gouttelettes au fur et à mesure que le champ augmente. L'échantillon est ainsi pulvérisé sous forme de fines

gouttelettes à la sortie du nébuliseur. Le solvant contenu dans les gouttelettes est ensuite progressivement évaporé à l'aide d'un gaz neutre à contre-courant (azote). Les ions sont formés par la simple évaporation d'une gouttelette ne contenant qu'une molécule en présence de protons ou par éjection de molécules chargées de la gouttelette du fait des répulsions électrostatiques. Puis, ces ions entrent dans le spectromètre de masse. Les liquides introduits dans la source ESI doivent être facilement volatilisables, les tampons minéraux (phosphate) sont en principe à proscrire. D'autres paramètres, comme le pH du solvant et la présence ou non de contre-ions en solution conjointement aux molécules, interviennent dans le degré d'ionisation des molécules. Peuvent être utilisés : l'acide acétique, l'acide formique, l'acide trifluoroacétique, l'acétate d'ammonium, la triéthylamine, l'acide heptafluorobutyrique (en mode positif) ; l'hydroxyde d'ammonium, l'ammoniaque (en mode négatif). Contrairement à l'impact électronique ce mode d'ionisation est peu reproductible d'un spectromètre de masse à l'autre.



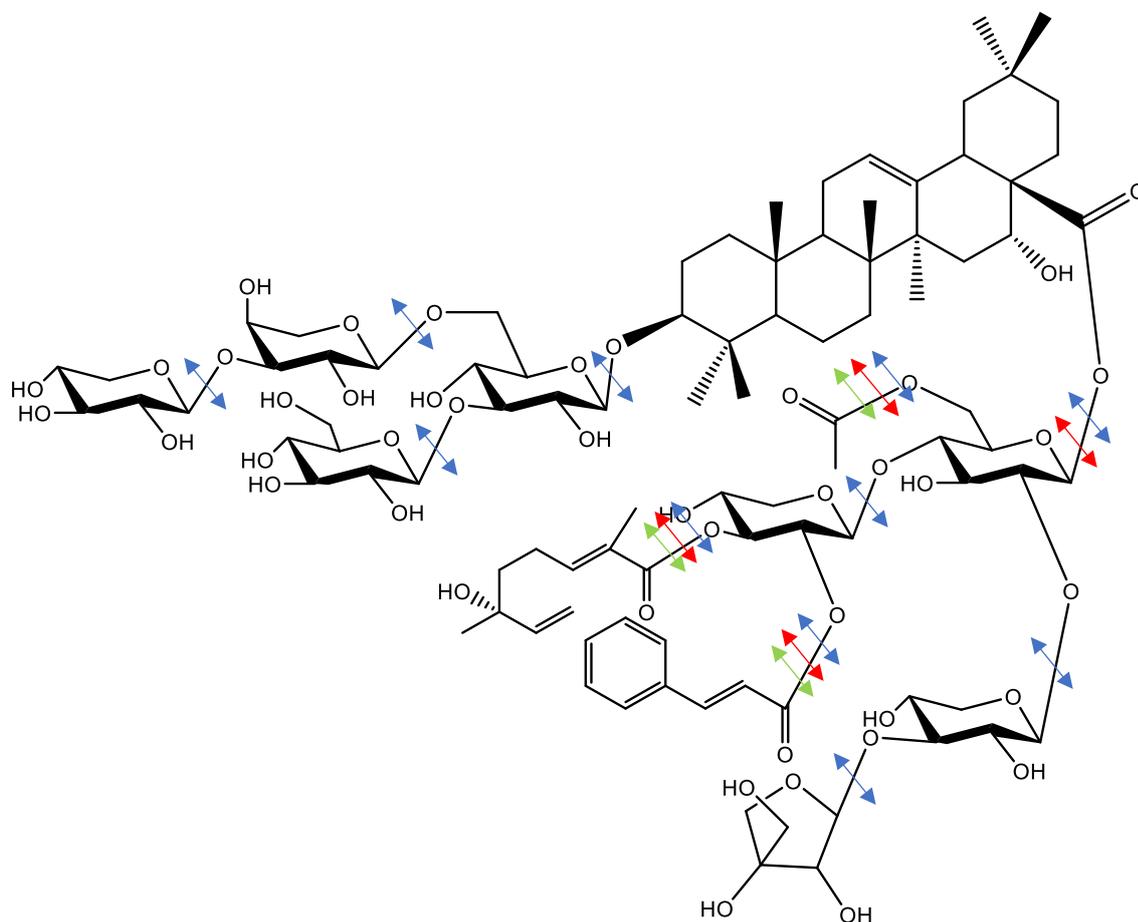
*Figure 14: Mécanisme de l'ionisation par électrospray.*

#### **1.4.2. Détermination de la configuration des oses par hydrolyse acide suivie d'une chromatographie liquide**

Cette technique permet la libération de toutes les unités osidiques engagées dans des liaisons *O*-glycosidiques et esters. Leur identification se fait par comparaison avec des sucres standards. Il s'agit d'effectuer une analyse chimique préliminaire des glycosides terpéniques par l'intermédiaire d'hydrolyses acides et alcalines fortes et douces afin d'obtenir les premières informations sur la structure du composé (nature de l'aglycone et des sucres).

**Tableau II : Informations apportées par les hydrolyses des glycosides terpéniques**

Type d'hydrolyse	Action	Information
<b>Hydrolyse acide fort</b>	Clivage de toutes les liaisons O-glycosidiques et des liaisons des sucres avec l'aglycone (hétéroside et ester)	Détermination de la nature des sucres et de l'aglycone par analyse sur couche mince en comparaison avec des échantillons témoins
<b>Hydrolyse alcaline forte</b>	Clivage de toutes les liaisons esters, notamment en C-28 de l'aglycone des saponosides	Saponoside mono-ou bidesmosidique et informations sur la nature de la prosapogénine
<b>Hydrolyse alcaline douce</b>	Clivage des liaisons esters entre des acides et les sucres	Acylation ou non par divers acides organiques



Hydrolyse acide forte



Hydrolyse alcaline forte



Hydrolyse alcaline douce



*Figure 15 : Points de clivages des différentes hydrolyses chimiques*

### 1.4.3. Résonance magnétique nucléaire

L'élucidation des glycosides terpéniques nécessite l'usage des techniques efficaces comme la résonance magnétique nucléaire (RMN). Celle-ci nous informe sur les éléments structuraux comme : la nature de l'aglycone, la nature des sucres de même que leurs jonctions avec l'aglycone et ainsi que les liaisons interglycosidiques. En effet, le principe de la RMN repose sur le magnétisme nucléaire. L'enregistrement des données se fait selon deux expériences :

- Monodimensionnels RMN 1D ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ )
- Bidimensionnels RMN 2D (HMBC, HSQC, COSY, TOCSY et/ou HSQC-TOCSY, NOESY et/ou ROESY)

#### 1.4.3.1. Les spectres monodimensionnels

Le spectre de RMN du proton et du carbone est parfois très complexe en ce qui concerne les glycosides terpéniques tels que les saponosides et les glycosides de farnésol. Malgré cela, nous pouvons relever quelques informations nécessaires à l'élucidation pour chaque classe de composés.

- **Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  des saponosides**

Il se présente sous trois zones de résonances (Massiot & Lavaud, 1995):

- de 0,5 à 3 ppm : les protons de l'aglycone, en particulier les méthyles,
- de 3 à 4,5 ppm : les protons osidiques sauf les anomères,

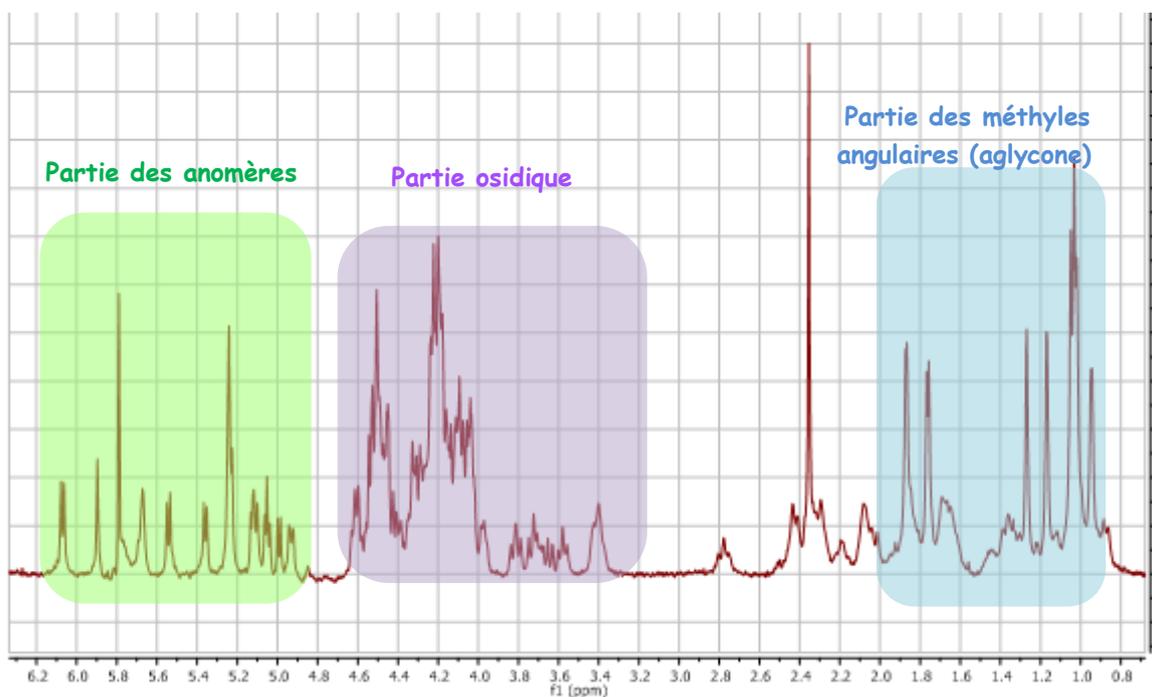


Figure 16: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  d'un saponoside triterpénique.

- de 4,5 à 6,5 ppm : les protons osidiques anomériques, et les protons éthyléniques

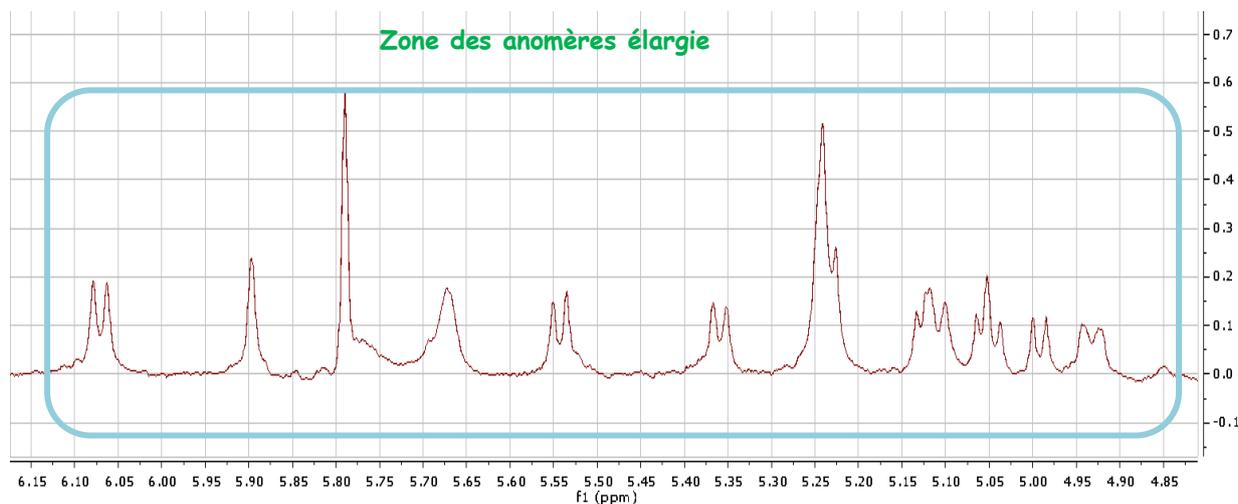
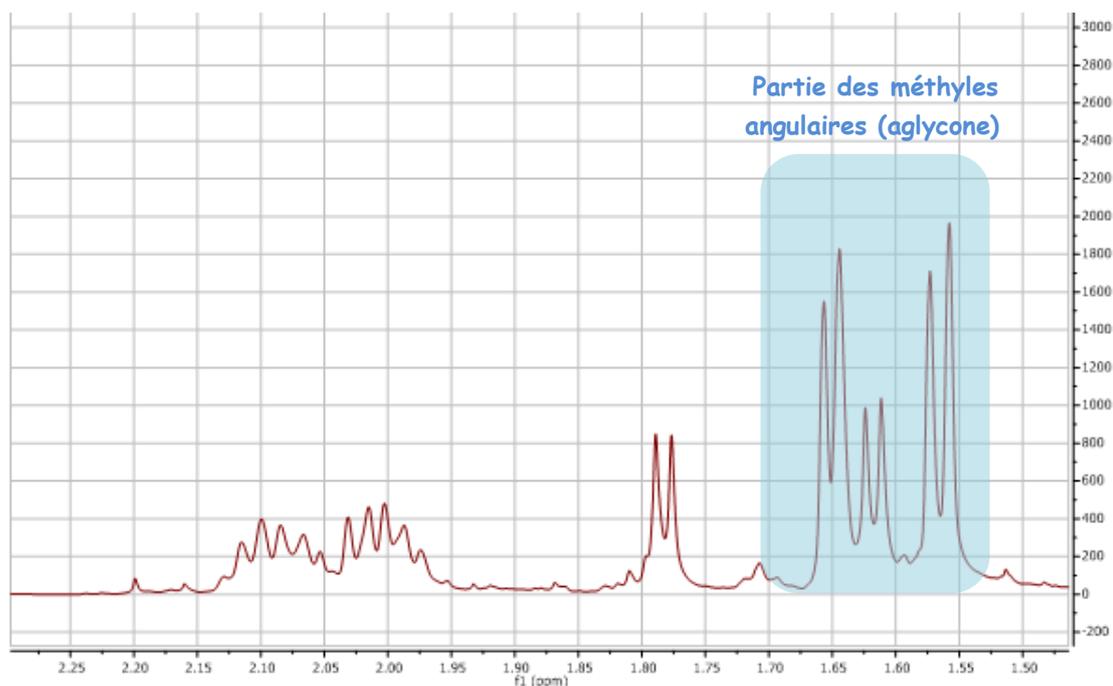


Figure 17: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  élargi d'un saponoside triterpénique (partie des anomères).

- **Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  des glycosides de farnesols.**

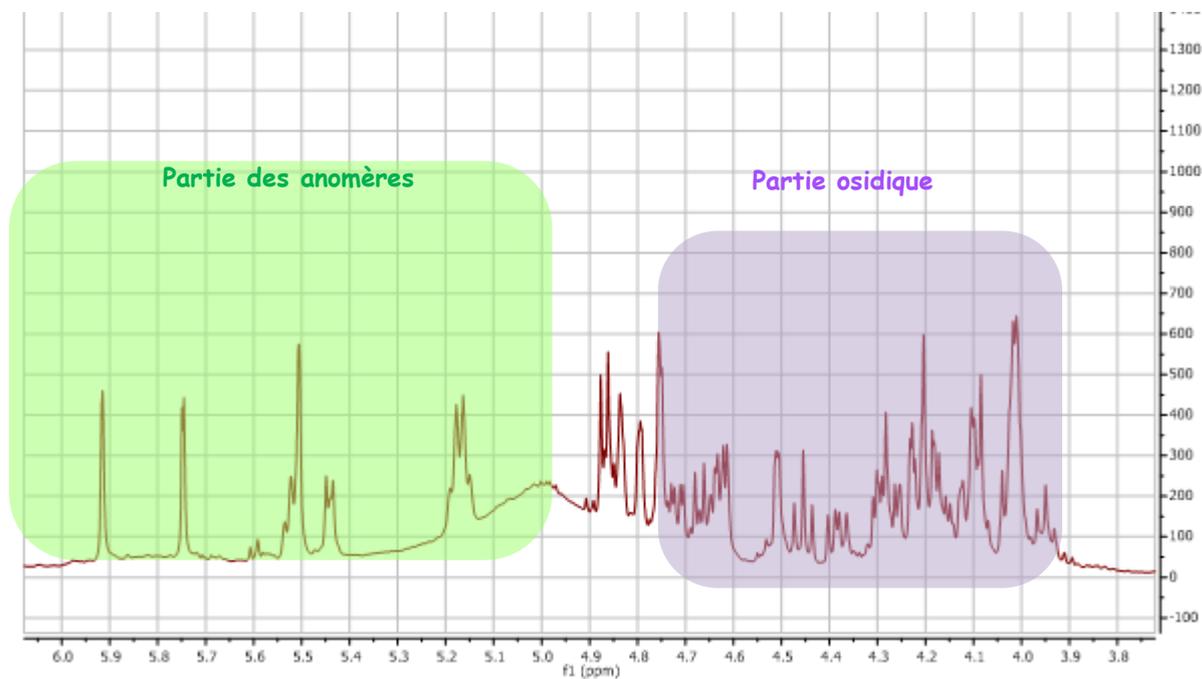
Il se présente sous trois zones de résonances (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018) :

- de 1,5 à 2,5 ppm : les protons de l'aglycone, en particulier les méthyles et aussi les méthyles des dexosucres.



**Figure 18: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  élargi d'un glycoside de farnésol (partie aglycone).**

- de 3 à 5 ppm : les protons osidiques sauf les anomères,
- de 4,5 à 6,5 ppm : les protons osidiques anomériques, et les protons éthyléniques



**Figure 19: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  élargi d'un glycoside de farnésol (partie des anomères et osidique).**

### ➤ Le spectre de RMN $^{13}\text{C}$ des saponosides

Il présente les zones de résonance suivante (Massiot & Lavaud, 1995):

- de 10 à 60 ppm : les carbones de l'aglycone,
- de 60 à 90 ppm : les carbones des fonctions alcooliques secondaires et primaires des sucres et de la génine
- de 95 à 112 ppm : les carbones anomériques des sucres,
- de 120 à 150 ppm : les carbones éthyléniques et aromatiques
- Au-delà de 170 : les carbones des aldéhydes, des esters, des acides et des cétones

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  enregistré en mode JMOD permet de distinguer tous les carbones. Les signaux des groupes C et  $\text{CH}_2$  sont au-dessus de la ligne de base alors que les groupes CH et  $\text{CH}_3$  sont en dessous.

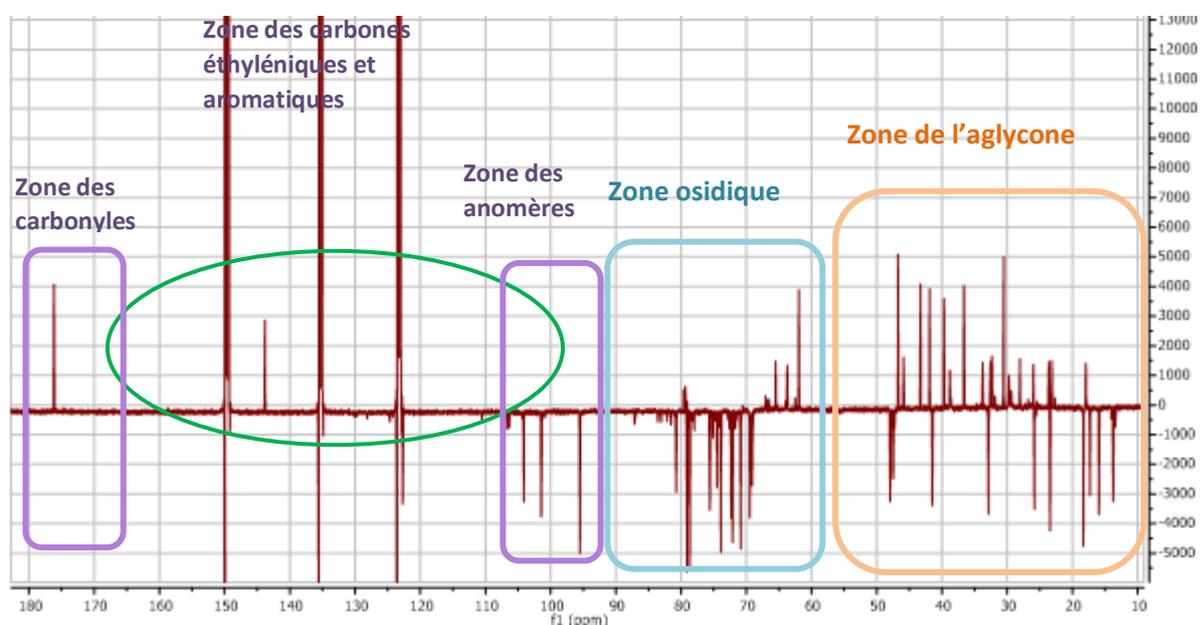
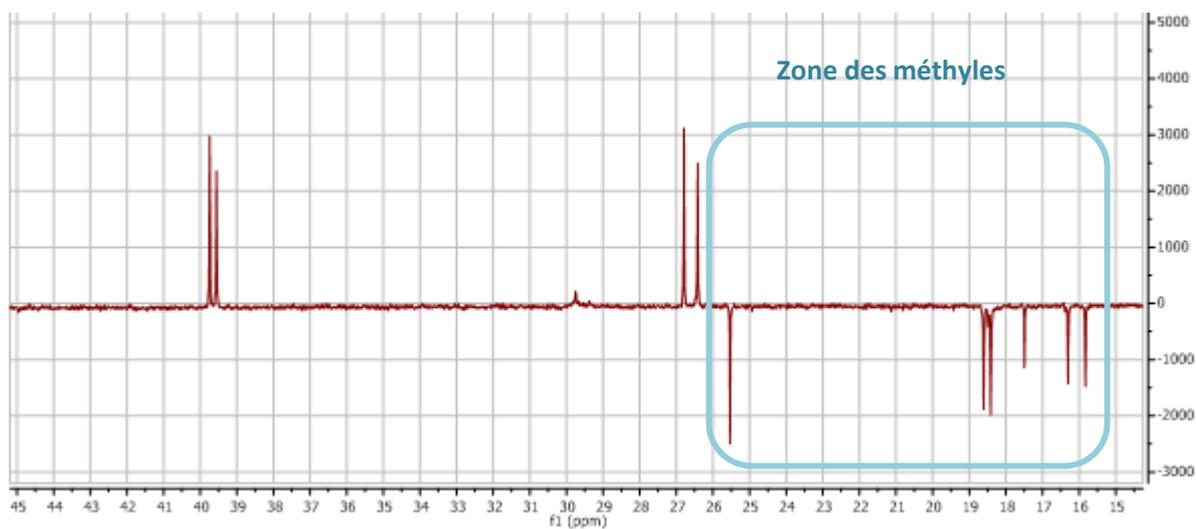


Figure 20: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  d'un saponoside

### ➤ Le spectre de RMN $^{13}\text{C}$ des glycosides de farnésol

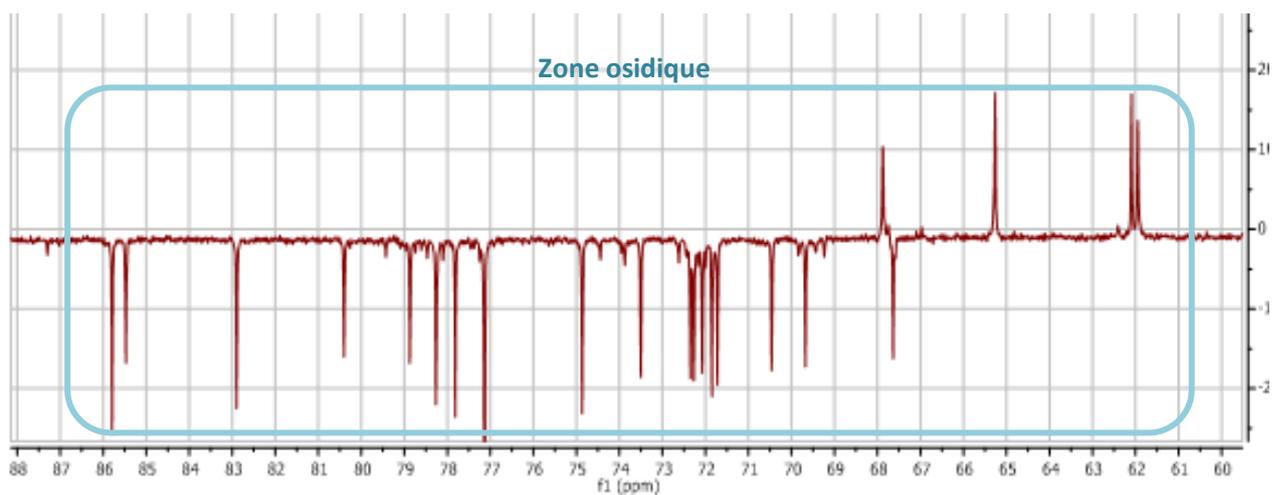
Il présente les zones de résonance suivante (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018):

- de 10 à 45 ppm : les carbones de l'aglycone,



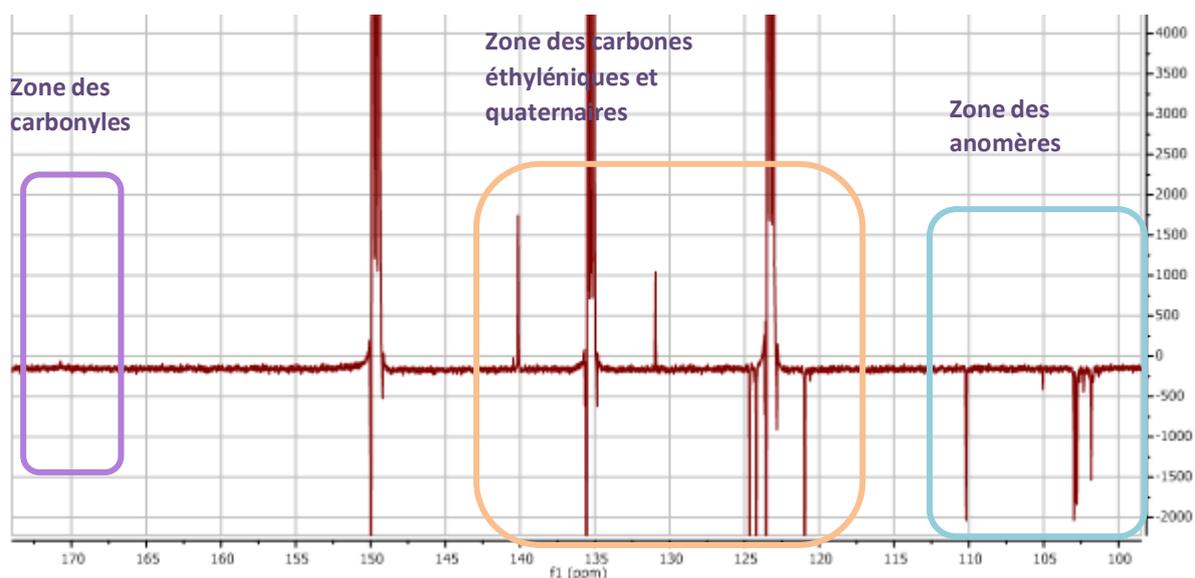
**Figure 21: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  élargi des glycosides de farnésol (zone des méthyles).**

- de 55 à 88 ppm : les carbones des fonctions alcooliques secondaires et primaires des sucres et de la génine



**Figure 22: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  élargi des glycosides de farnésol (zone osidique).**

- de 95 à 112 ppm : les carbones anomériques des sucres,
- de 117 à 150 ppm : les carbones éthyléniques et quaternaires
- Au-delà de 170 : les carbones des aldéhydes, des esters, des acides et des cétones



**Figure 23:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  élargi des glycosides de farnésol (zone des anomères, des carbonyles et des carbones éthyléniques).

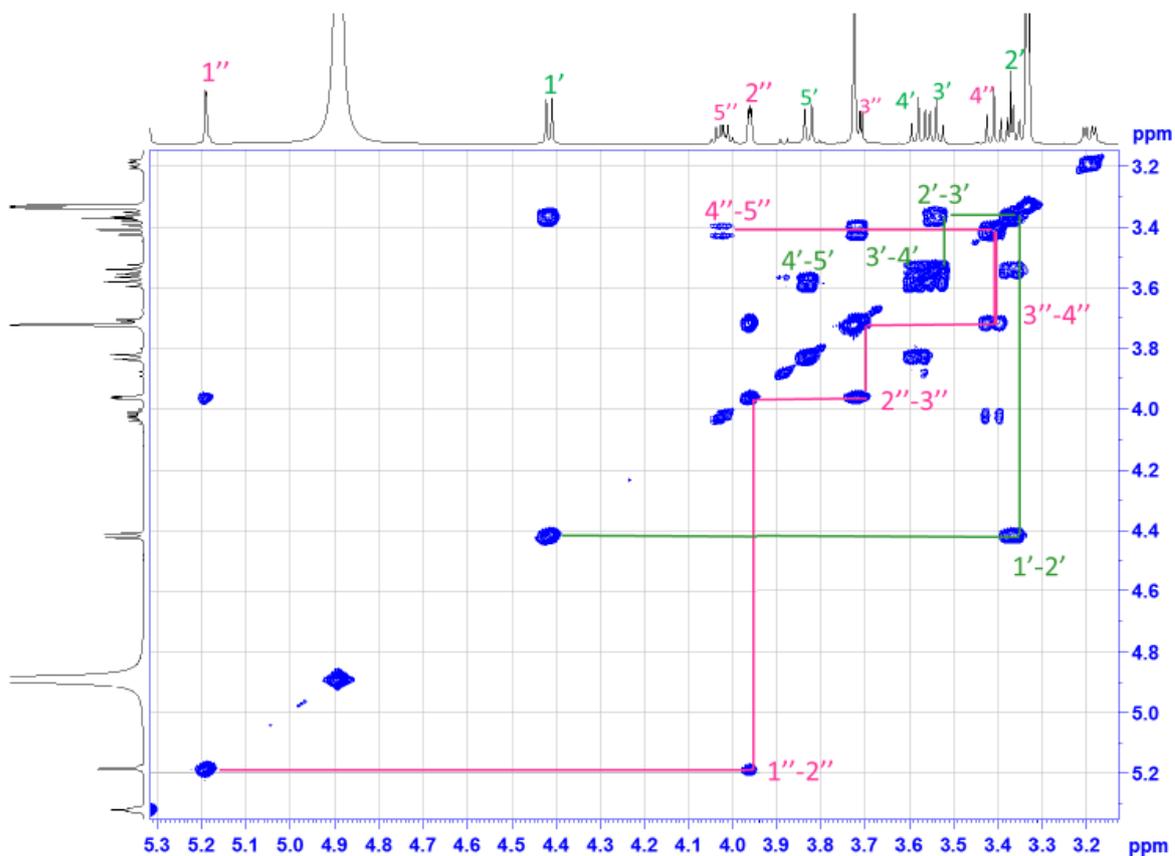
Comme dans le cas des saponosides tritèrpeniques, le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  enregistré en mode JMOD permet de distinguer tous les carbones.

#### 1.4.3.2. Les spectres bidimensionnels

Les expériences RMN 2D permettent de compléter les données des spectres monodimensionnels et concourent ainsi à une meilleure élucidation structurale des glycosides terpéniques par l'analyse du couplage interatomique.

##### *Correlated Spectroscopy (COSY).*

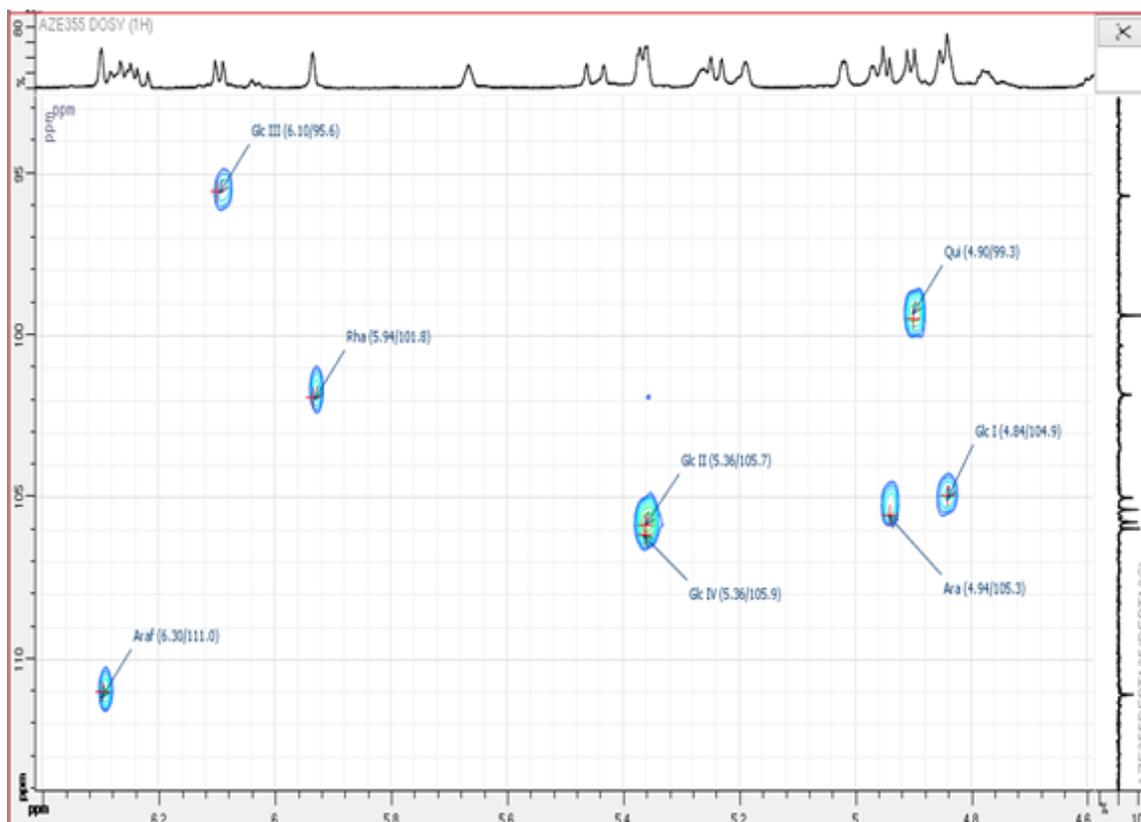
L'expérience 2D COSY homonucléaire  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  est l'expérience 2D la plus simple et la plus utilisée basée sur la polarisation de transfert par une impulsion de mélange entre des spins directement couplés en  $J$ . C'est à dire, elle met en évidence les protons avec les couplages géminaux  $^2J_{\text{H-H}}$  et les couplages vicinaux  $^3J_{\text{H-H}}$ . en les distinguant d'après l'orientation des taches de corrélation vis-à-vis de la diagonale. L'expérience COSY n'apporte aucune information sur l'enchaînement des sucres et leur position sur la génine mais permet de déterminer l'ordre des protons dans un squelette de sucres (Günther, 1994; Massiot & Lavaud, 1995). Elle est une alternative plus générale et plus utile aux expériences RMN 1D classiques.



**Figure 24: Spectre COSY élargi**

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

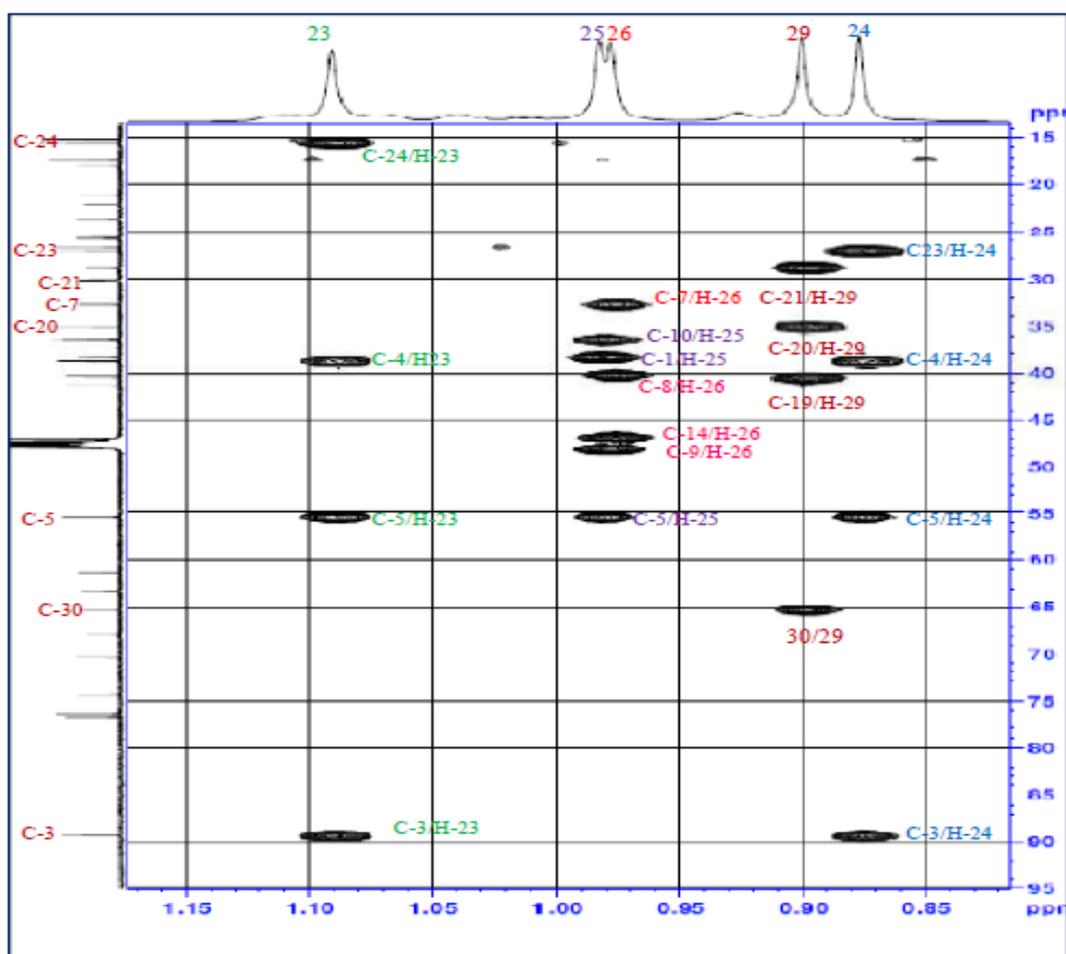
L'interprétation des spectres HSQC met en exergue les couplages hétéronucléaires (H–C) directs  $^1J_{H-C}$  (**Figure 31**) et permet en même temps d'attribuer à la majorité des carbones leurs protons correspondants (Massiot & Lavad, 1995). La connaissance des déplacements chimiques des carbones permet de déterminer la substitution par l'observation d'un « déblindage » des carbones. Des résultats similaires sont obtenus en utilisant l'expérience 2D HMQC.



*Figure 25: Spectre HSQC élargi*

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

L'expérience HMBC permet d'obtenir une carte de corrélation qui met en évidence les couplages hétéronucléaires à longue distance avec les constantes de couplage  $^2J_{H-C}$  ou  $^3J_{H-C}$  (**Figure 31**). L'analyse des spectres HMBC permet d'élucider la structure de l'aglycone et de déterminer les séquences osidiques, ainsi que les liaisons osidiques sur l'aglycone et les acides organiques (Massiot & Lavaud, 1995). Pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule, elle complète très bien l'expérience COSY. Elle aide aussi à positionner les carbones quaternaires sur l'aglycone.



*Figure 26: Spectre HMBC élargi*

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

L'expérience TOCSY permet de mettre en évidence tous les protons d'un même système de spin. C'est une expérience COSY longue distance et permet donc de confirmer les corrélations des protons, établies par le COSY. C'est une technique très importante pour l'analyse des sucres (Günther, 1994; Massiot & Lavaud, 1995). En effet, avec le proton anomérique, on identifie les autres protons de l'unité osidique aisément. L'expérience TOCSY n'apporte aucune information sur l'enchaînement des sucres et leur position sur la génine mais permet de déterminer l'ordre des protons dans un squelette de sucres (Günther, 1994; Massiot & Lavaud, 1995).

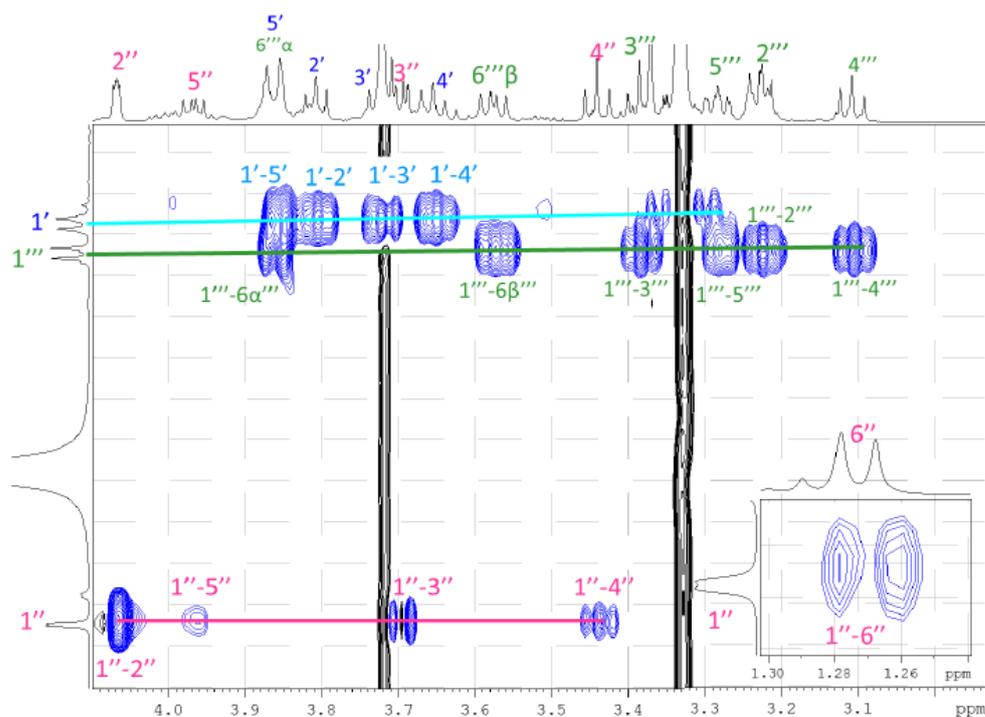


Figure 27: Spectre TOCSY élargi

### HSQC-TOCSY

L'expérience 2D HSQC-TOCSY est une expérience hybride inverse consistant en un train d'impulsions HSQC initial suivi d'une séquence de mélange TOCSY. Dans la première étape, la magnétisation est transférée du noyau X ( $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ) aux noyaux de protons directement liés via  $^1J$  (CH). Dans la deuxième étape, une telle aimantation est propagée pas à pas à travers l'ensemble du réseau de spin homonucléaire couplé via  $J$  (HH). Des résultats similaires sont obtenus à partir de l'expérience analogique 2D HMQC-TOCSY.

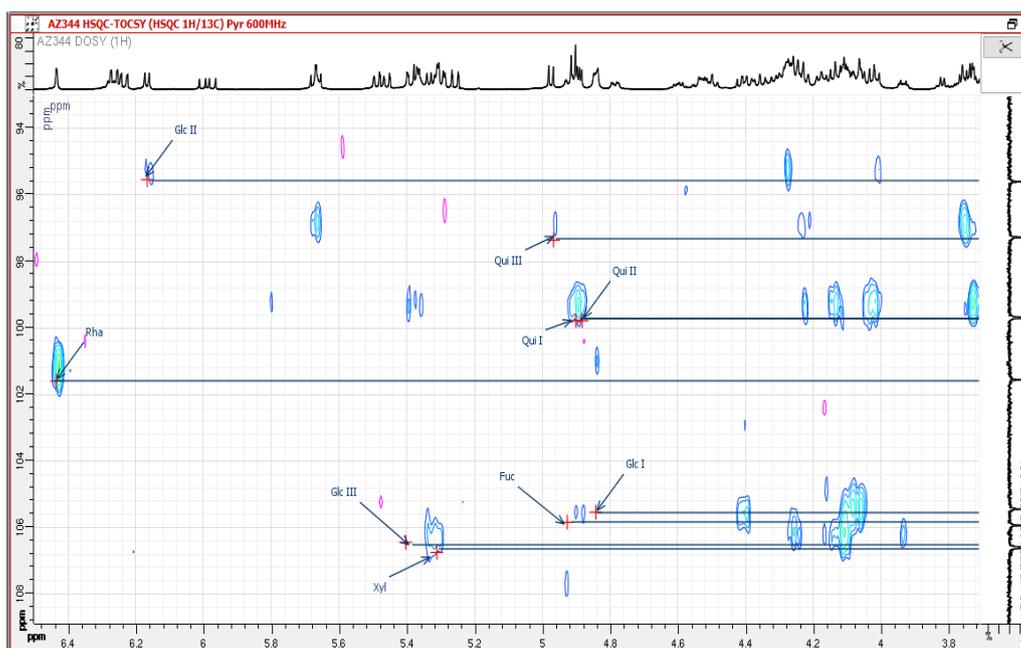
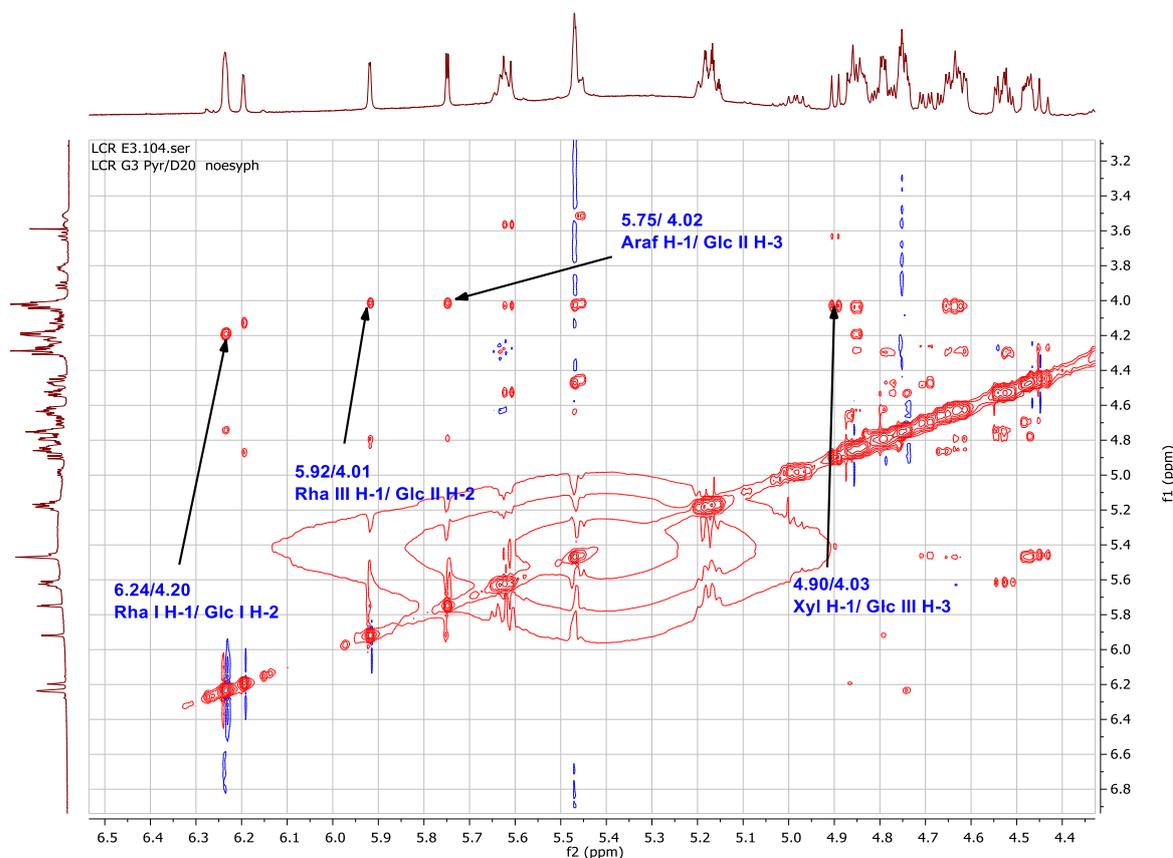


Figure 28: Spectre HSQC-TOCSY élargi

## *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY).*

Le spectre NOESY est l'une des expériences les plus précieuses de la RMN pour l'élucidation structurale (Günther, 1994). Le NOESY permet d'obtenir des informations spatiales (**Figure 31**) pour tous les protons dans une seule expérience. Elle nous permet donc de trouver la proximité spatiale de certaines parties de la molécule et par conséquent, de déduire les informations sur sa structure tridimensionnelle. Elle est efficace pour déterminer la stéréochimie des carbones asymétriques de l'aglycone, les liaisons interglycosides ainsi que la liaison sucre-génine. Le NOESY peut être une solution pour certaines difficultés rencontrées dans les spectres COSY. C'est souvent le cas où le couplage est bloqué par un atome de carbone quaternaire (Günther, 1994; Liu, 2011).



**Figure 29: Spectre NOESY élargi**

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

Grâce aux effets Overhauser entre protons proches dans l'espace, les spectres ROESY nous permettent de déterminer la configuration spatiale de certains groupements et par conséquent, d'en déduire des informations sur leur structure tridimensionnelle. Par ses corrélations intra sucres, elle permet de confirmer la structure des sucres (protons axiaux ou équatoriaux) et d'établir leur conformation (Massiot & Lavaud, 1995). Du fait que les effets

observés sont quasi-positif car indépendants du champ magnétique appliqué, ceci lui confère un avantage considérable sur le NOESY.

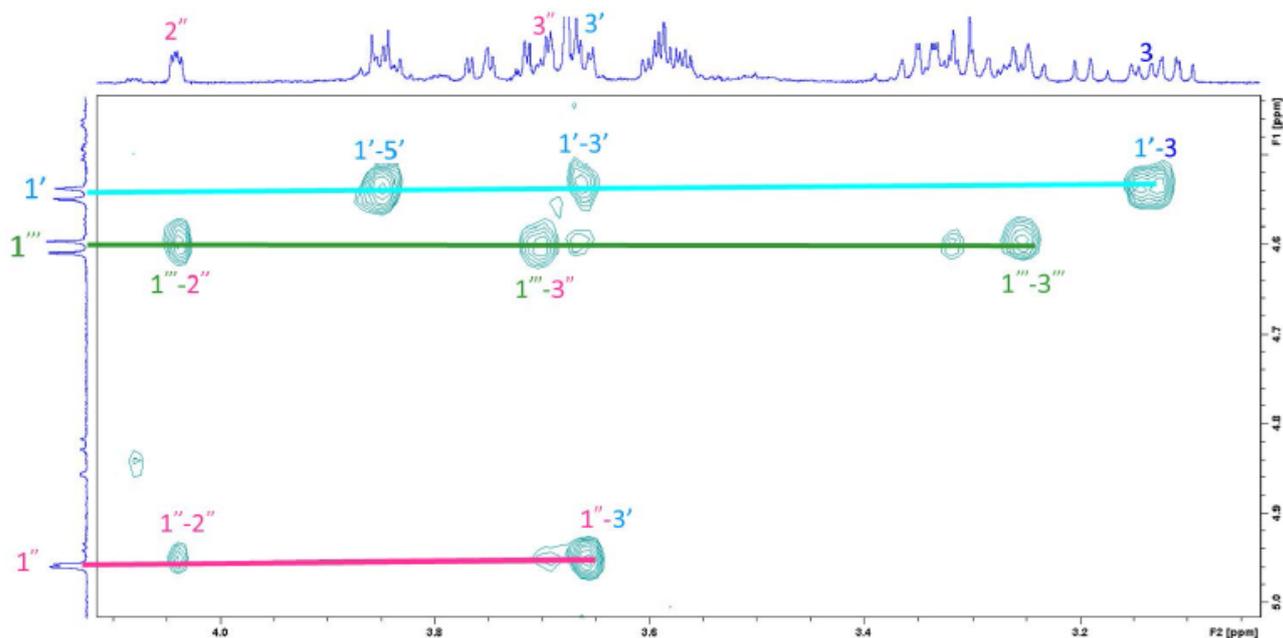


Figure 30: Spectre ROESY élargi

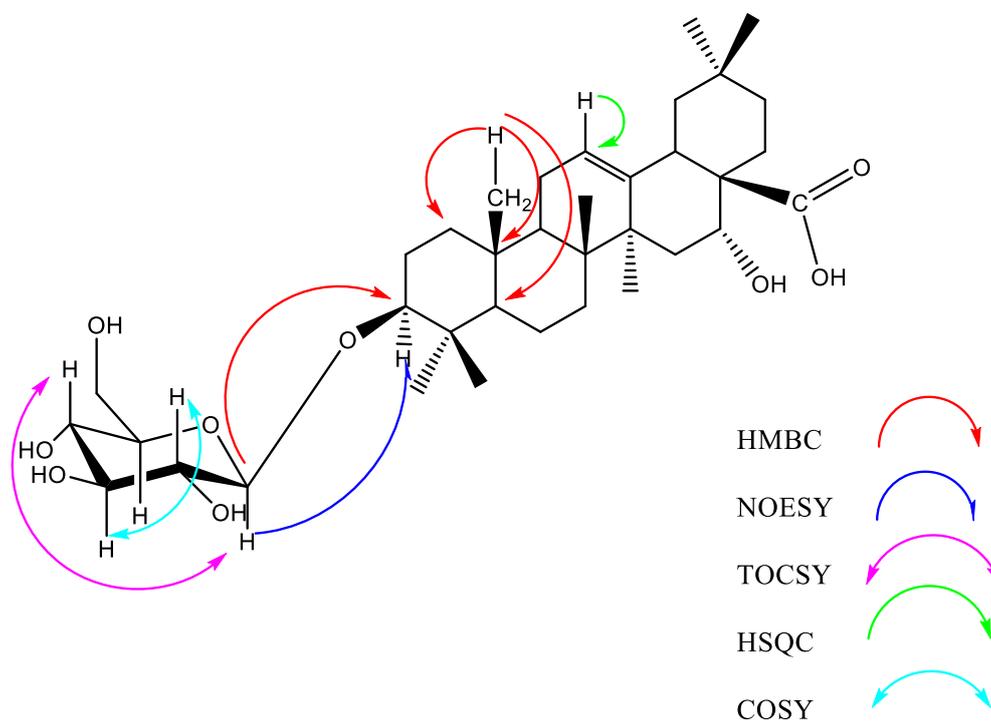


Figure 31: Corrélations observées à l'aide de différentes expériences bidimensionnelles

## **Chapitre 2 : Résultats et discussion**

## 2.1. Etude phytochimique

### 2.1.1. *Calliandra calothyrsus*

L'étude phytochimique de *Calliandra calothyrsus* Meissn. a conduit à l'isolement de quatre composés dont trois dérivés nouveaux. Leurs structures ont été établies grâce à l'interprétation des spectres de RMN, MS et la comparaison avec les données de la littérature.

#### 2.1.1.1. Extraction et isolement des composés de *Calliandra calothyrsus*

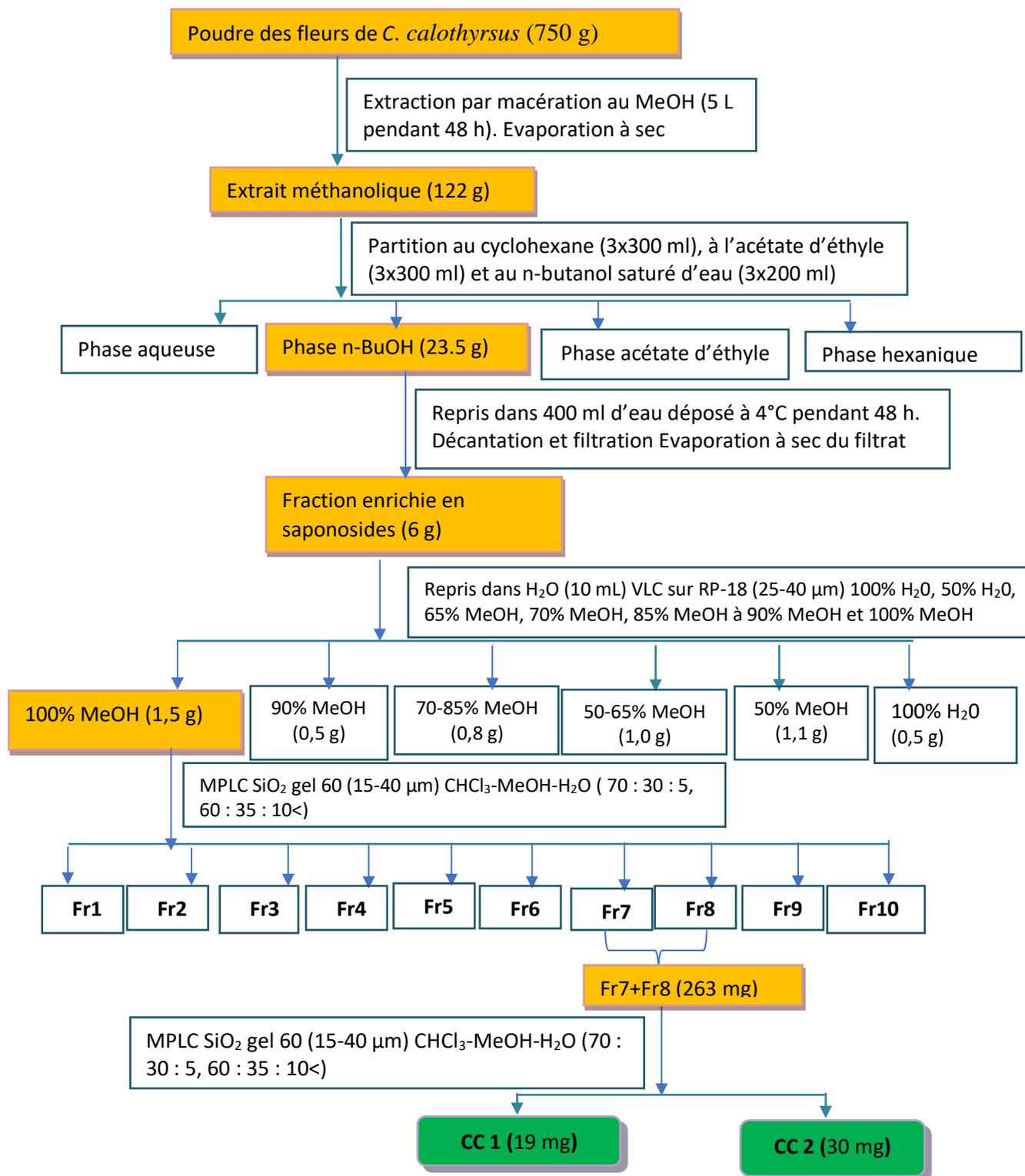
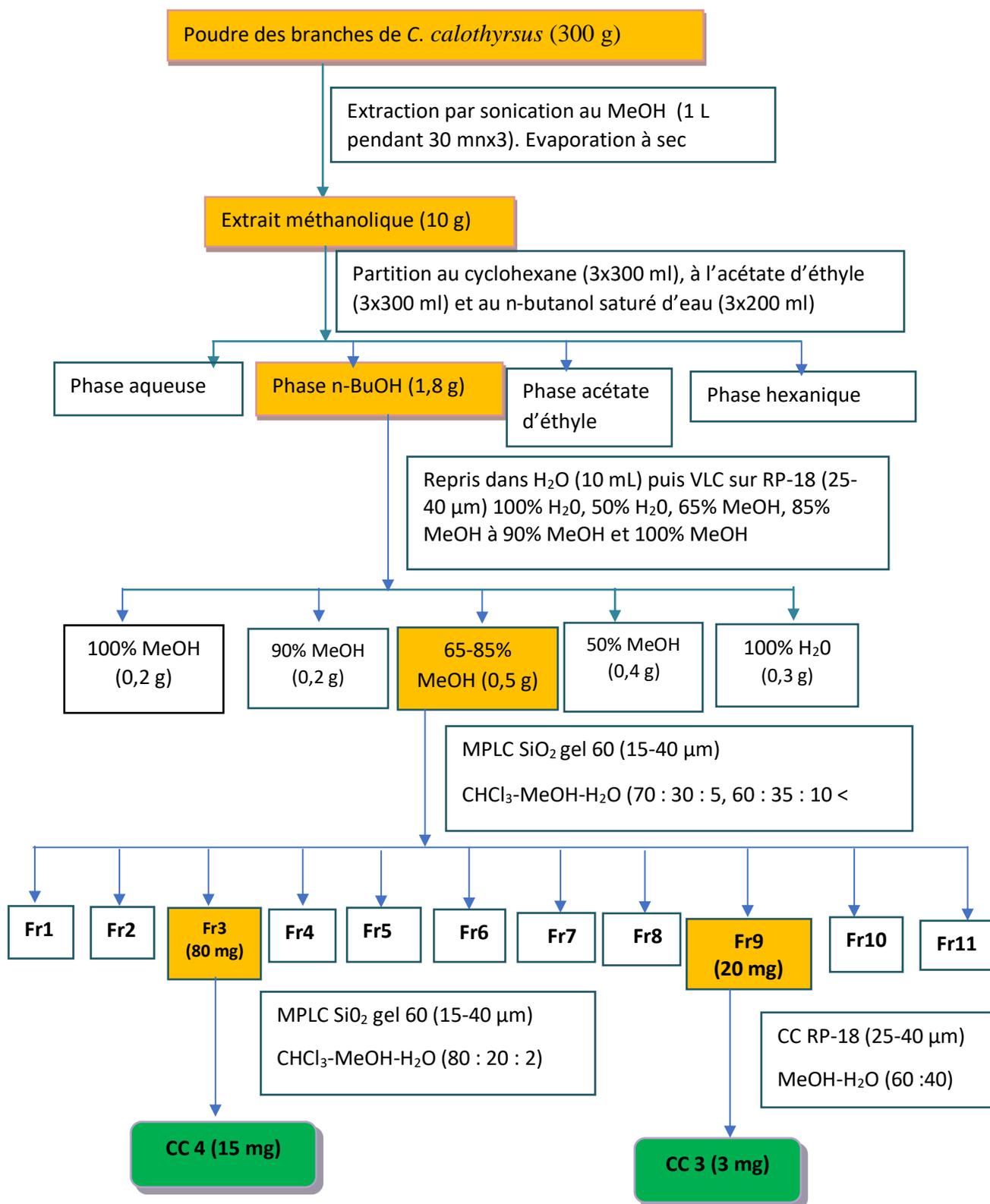


Figure 32: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des fleurs de *C. calothyrsus*



**Figure 33: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des branches de *C. calothyrsus*.**

### 2.1.1.2. Caractérisation des composés

La détermination des structures des composés isolés a été réalisée par une analyse des spectres de RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse, l'hydrolyse acide ainsi que par comparaison de nos données avec celles de la littérature.

#### a) Détermination de la structure de Calothyrsusoside A (CC1)

##### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **CC1** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre sur son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1960,9327  $[M + Na]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{86}H_{139}NO_{47}$ .

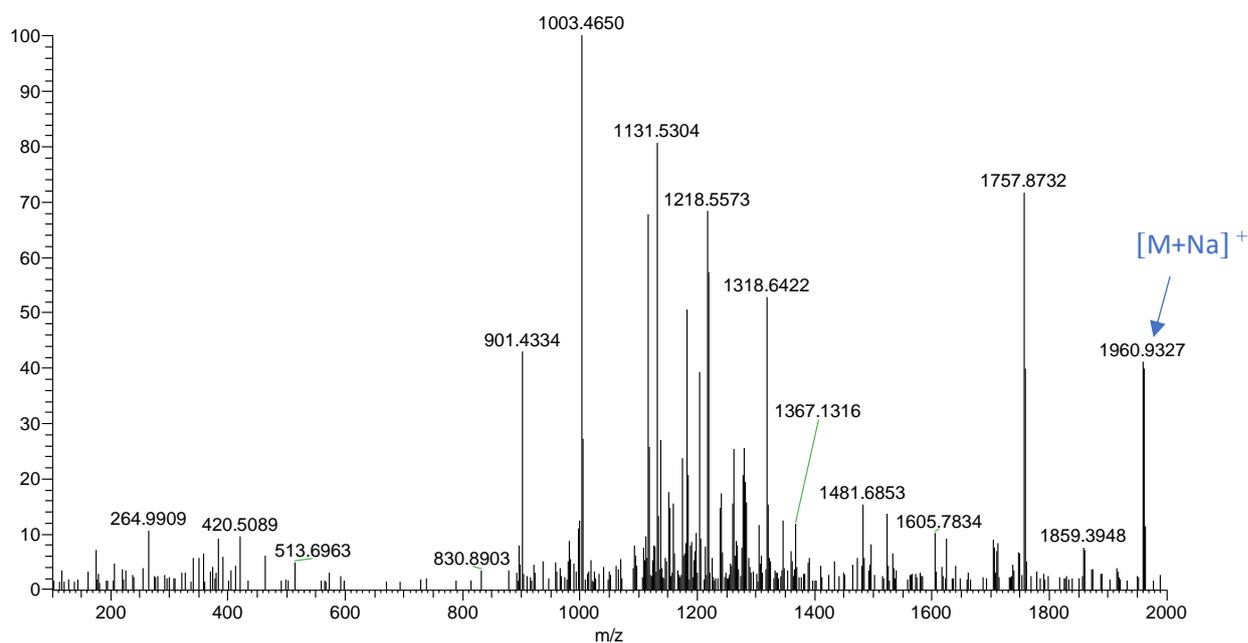


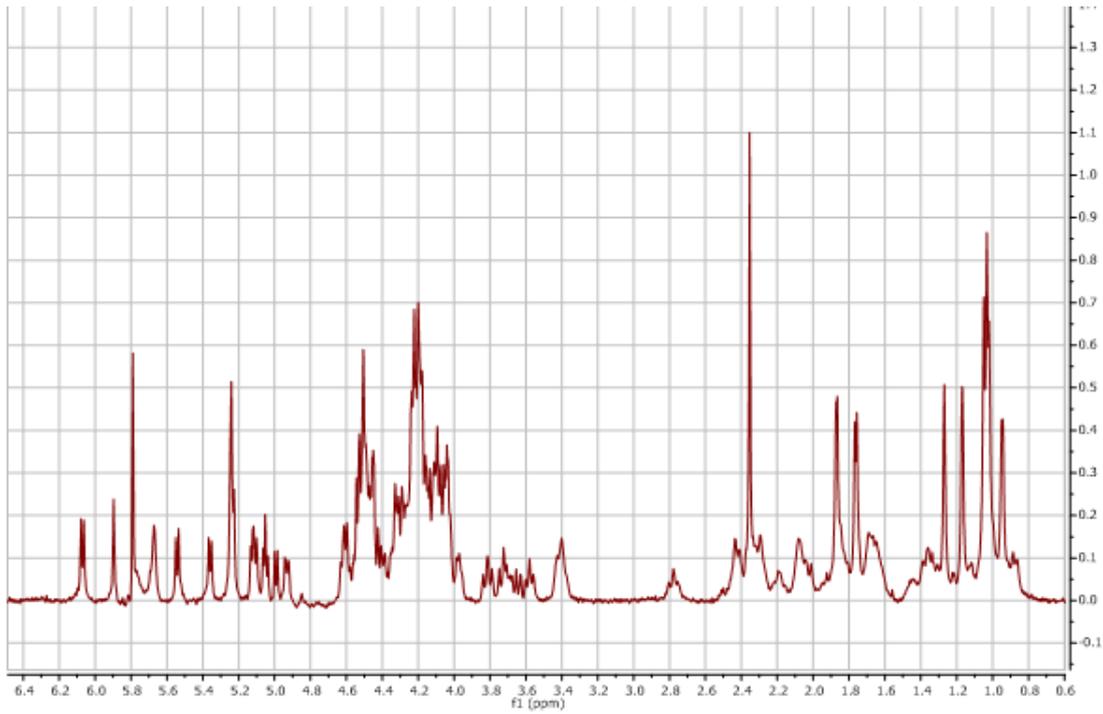
Figure 34 : Spectre de masse du composé CC1

##### ➤ Spectroscopie de RMN

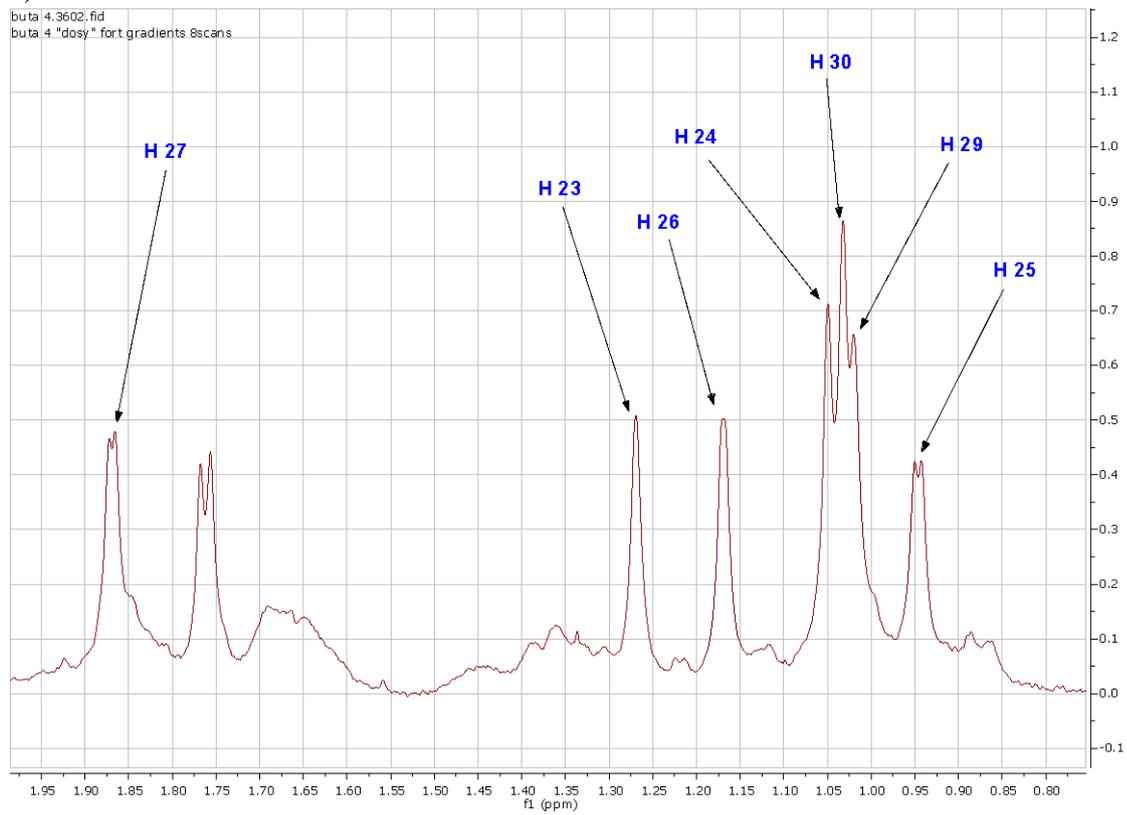
##### Identification de l'aglycone

Tous les signaux des carbones et des protons sont déterminés et attribués d'après l'analyse des spectres de RMN 1D et 2D. Les signaux caractéristiques du composé sont détaillés ci-dessous.

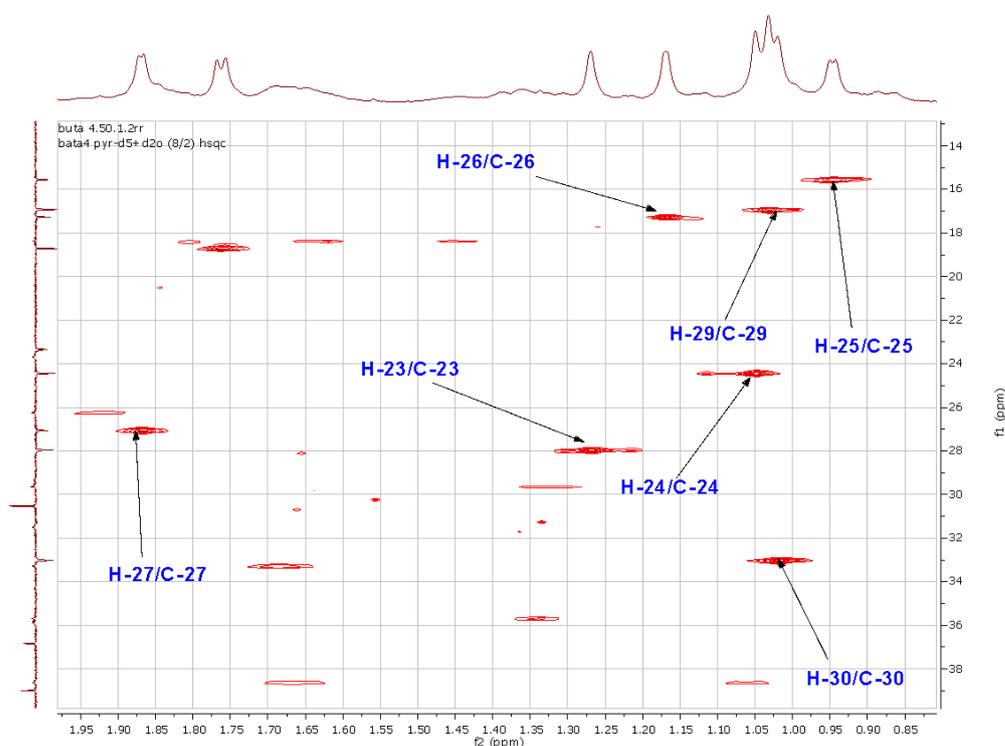
Le spectre de RMN  $^1H$  (Figure 35a, 35b) du composé **CC1** met en évidence sept signaux de méthyles angulaires à  $\delta_H$  0,94 (s, H-25) ; 1,02 (s, H-29) ; 1,05 (s, H-30) ; 1,03 (s, H-24) ; 1,17 (s, H-26) ; 1,27 (s, H-23) et 1,87 (s, H-27) (3H chacun, s) qui corrélient sur le spectre HSQC (Figure 35c) avec les carbones à  $\delta_C$  15,5 (C-25) ; 33,0 (C-29) ; 24,4 (C-30) ; 16,9 (C-24) ; 17,2 (C-26) ; 27,9 (C-23) et 27,1 (C-27) respectivement.



a)



b)



c)

**Figure 35 : Spectres de RMN  $^1\text{H}$  (a,b) et HSQC (c) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CC1 montrant les méthyles angulaires.**

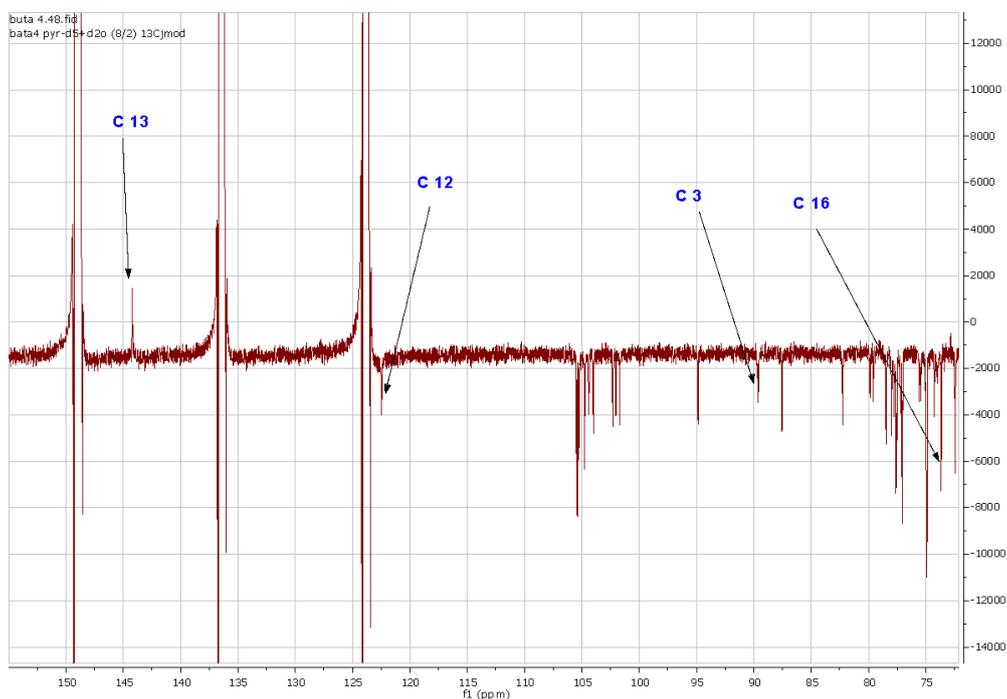
On observe également sur son spectre de RMN  $^1\text{H}$  un signal à  $\delta_H$  5,67 correspondant au proton oléfinique H-12, un signal de proton méthinique à  $\delta_H$  3,40 correspondant à H-3 de l'aglycone et un signal de proton d'alcool secondaire à 5,24 correspondant au proton 16 de notre aglycone.

Sur son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  enregistré en JMOD, on observe deux signaux de carbones éthyléniques à  $\delta_C$  122,4 et 144,6 ppm correspondant aux carbones de la double liaison  $\Delta^{12}$ , un signal de carbone méthinique à  $\delta_C$  89,9 ppm correspondant au carbone 3 de l'aglycone et un signal de carbone d'alcool secondaire à  $\delta_C$  73,8 ppm correspondant au carbone 16. Dans les champs faibles, on observe un signal à  $\delta_C$  176,3 ppm correspondant au carbone 28 de notre aglycone.

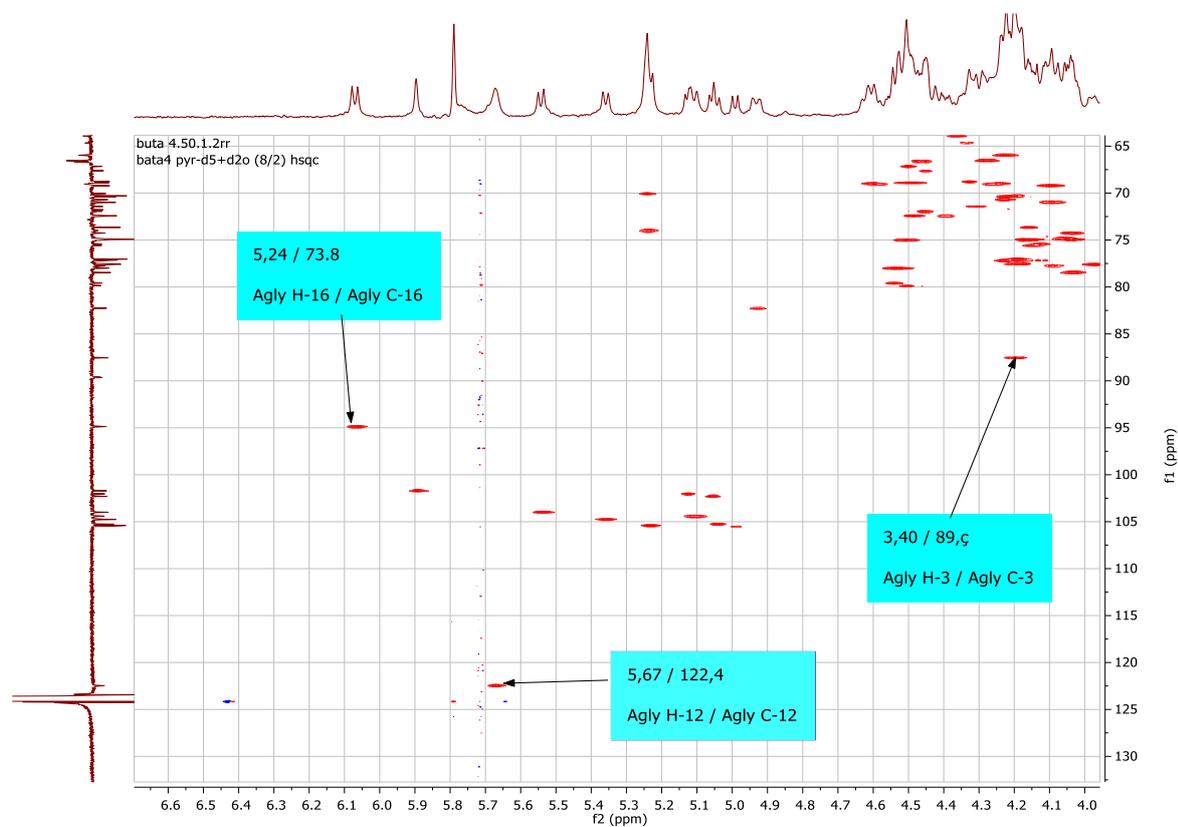
L'analyse approfondie des spectres de COSY, HSQC et HMBC de **CC1** a permis d'attribuer toutes les valeurs des déplacements chimiques de notre aglycone, qui a été identifié comme étant l'acide echinocystique ( $3\beta$ ,  $16\alpha$ -dihydroxyolean-12-ène-28-oïque) et donc les valeurs (**Tableau III**) sont en accord avec celle de la littérature (Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014)

L'observation des signaux de carbone résonnant à  $\delta_C$  89,9 ppm (C-3) et  $\delta_C$  176,3 ppm (C-28), montre que **CC1** est un dérivé de type 3,28-bidesmoside de l'acide echinocystique (**Figure 36**) ayant des chaînes oligosaccharidiques liées respectivement en C-3 et C-28 au

moyen des liaisons éther et ester (Taponjoui *et al.*, 2005; Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014).

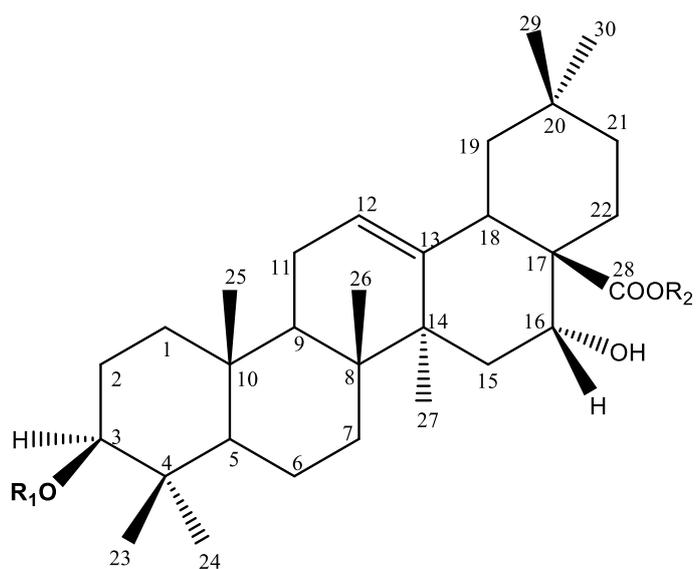


a)



b)

**Figure 36 : Spectres de RMN<sup>13</sup>C (a) (125 MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) et HSQC (b) (500 MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) du composé CCl1.**



*Figure 37 : dérivé de type 3,28-bidesmoside de l'acide echinocystique*

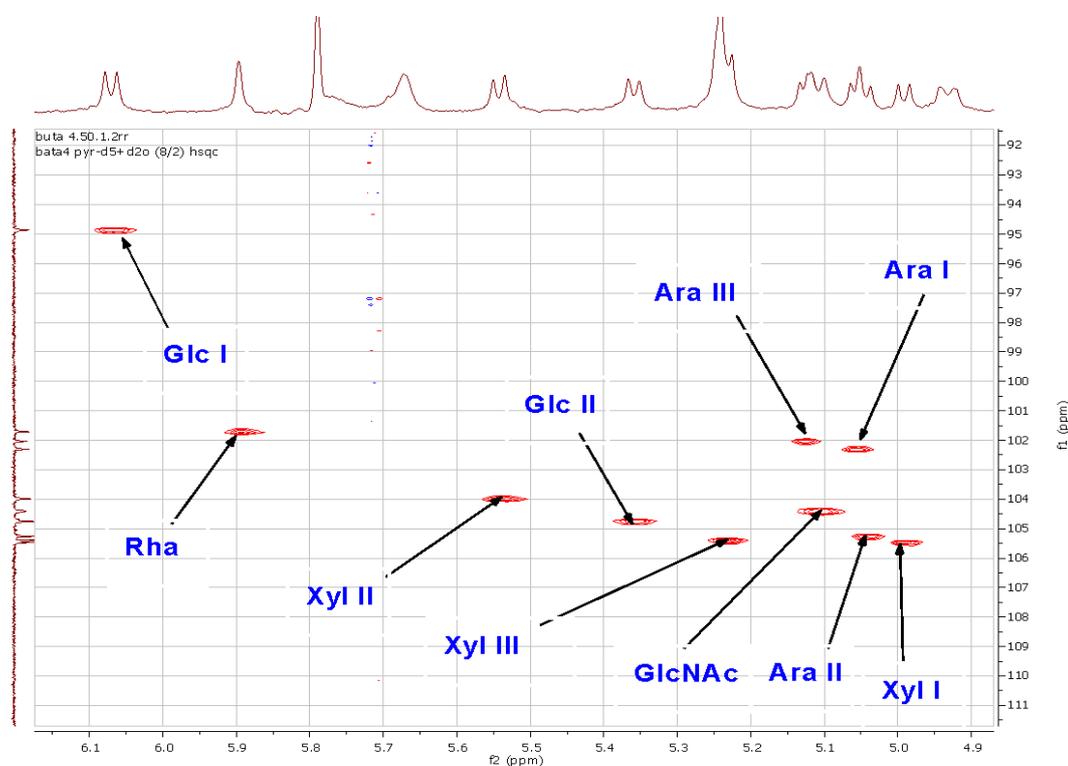
**Tableau III: comparaison des données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie aglycone de CC1 avec celles de la littérature (Tapondjou *et al.*, 2005).**

N° C	CC1								
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$ littérature	$\delta_H$ (J en Hz) littérature	N° C	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$ littérature	$\delta_H$ (J en Hz) littérature
<b>1a</b>	38,7	1,06	38,7	0,95	<b>15a</b>	35,8	2,03	35,7	1,85
<b>1b</b>		1,65		1,55	<b>15b</b>		2,32		2,25
<b>2a</b>	26,3	1,92	26,0	1,75	<b>16</b>	73,8	5,24 (brs)	73,5	5,24 (brs)
<b>2b</b>		2,30		2,18	<b>17</b>	49,1	-	48,8	-
<b>3</b>	89,9	3,40 (brd,13,7)	89,0	3,23 (brd, 10,7)	<b>18</b>	41,2	3,42 (d, 14,3)	41,0	3,28(brd, 11,7)
<b>4</b>	39,7	-	38,5	-	<b>19a</b>	47,3	1,38 m	46,3	1,18
<b>5</b>	55,5	0,88 (d, 12,5)	55,2	c	<b>19b</b>		2,78 m		2,60
<b>6a</b>	18,2	1,44	18,4	c	<b>20</b>	30,5	-	30,3	-
<b>6b</b>		1,63			<b>21a</b>	35,6	1,33 m	36,4	1,85
					<b>21b</b>		2,42 ; (d, 13,3)		2,05
<b>7a</b>	33,3	1,02	33,1	1,50	<b>22a</b>	31,5	2,19	31,2	2,08
<b>7b</b>		1,68			<b>22b</b>		2,43		2,28
<b>8</b>	39,9	-	39,6	-	<b>23</b>	27,9	1,27 (s)	27,7	1,03 (s)
<b>9</b>	46,9	1,84	46,7	1,64	<b>24</b>	16,9	1,03 (s)	16,6	0,82 (s)
<b>10</b>	36,8	-	36,6	-	<b>25</b>	15,5	0,94 (s)	15,2	0,77 (s)
<b>11a</b>	23,6	2,02	23,5	0,80	<b>26</b>	17,2	1,17 (s)	17,0	0,94 (s)
<b>11b</b>		2,12		1,95	<b>27</b>	27,1	1,87 (s)	26,7	1,71 (s)
<b>12</b>	122,4	5,67 (brs)	122,1	5,56 t	<b>28</b>	176,3	-	175,9	-
<b>13</b>	144,6	-	144,0	-	<b>29</b>	33,0	1,02 (s)	32,8	0,86 (s)
<b>14</b>	41,9	-	41,6	-	<b>30</b>	24,4	1,05 (s)	24,2	0,89 (s)

## Détermination du nombre et de la nature des sucres

Les sucres de **CC1**, ont été déterminés comme étant les monosaccharides suivants : D-Glc, L-Rha, D-GlcNAC, D-Xyl et L-Ara par hydrolise acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire.

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  de **CC1** permet de distinguer 10 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  5,11 (d,  $J = 7,1$  Hz) ; 5,06 (d,  $J = 6,2$  Hz) ; 5,04 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; 5,13 (d,  $J = 6,7$  Hz) ; 4,99 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; 6,07 (d,  $J = 7,8$  Hz) ; 5,89 (brs) ; 5,54 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; 5,23 (d,  $J = 7,9$  Hz) et 5,35 (d,  $J = 7,8$  Hz), et qui corrélient sur le spectre HSQC avec les carbonés à  $\delta_{\text{C}}$  104,4 ; 102,2 ; 105,2 ; 102,0 ; 105,4 ; 94,8 ; 101,7 ; 103,9 ; 105,4 et 104,7 ppm respectivement (**Figure 38**).



**Figure 38:** Spectre HSQC élargi (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) montrant les signaux des anomères du composé **CC1**

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY. Leurs carbonés correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées sur le spectre HSQC et confirmé par le spectre HMBC.

Le proton anomérique à  $\delta_{\text{H}}$  5,11 a été attribué à une unité de D-GlcNAC dont les signaux caractéristiques ont été observés à  $\delta_{\text{H}}$  9,0 et à  $\delta_{\text{H}}$  2,35. Cela a été confirmé par la corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal à  $\delta_{\text{H}}$  4,61 et le carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  172,3 ppm

(NHC<sub>3</sub>O). Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés sont sous la forme pyranose.

La configuration  $\beta$  a été attribuée au proton anomérique de Glc, GlcNAc et Xyl, et  $\alpha$  à Ara sur la base de leurs constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-3}$  comprises entre 6,2-7,5 Hz. La configuration  $\alpha$  attribuée au proton anomérique du Rha a été mise en évidence par la valeur de son carbone C-5 à  $\delta_C$  68,8 ainsi que son apparition sous forme de large singulet (Luo *et al.*, 2008).

En définitive, nous avons identifié :

- 1 groupement  $\beta$ -D-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl à  $\delta_H$  5,11 (d,  $J = 7,1$  Hz),
- 3 groupements  $\alpha$ -L-arabinopyranosyles Ara I-1 à  $\delta_H$  5,06 (d,  $J = 6,2$  Hz) ; Ara II-1 à  $\delta_H$  5,04 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; Ara III-1 à  $\delta_H$  5,13 (d,  $J = 6,7$  Hz) ;
- 3 groupements  $\beta$ -D-xylopyranosyles Xyl I-1 à  $\delta_H$  4,99 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; Xyl II-1 à  $\delta_H$  5,54 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; Xyl III-1 à  $\delta_H$  5,23 (d,  $J = 7,9$  Hz) ;
- 2 groupements  $\beta$ -D-glucopyranosyles Glc I-1 à  $\delta_H$  6,07 (d,  $J = 7,8$  Hz) ; Glc II-1 à  $\delta_H$  5,35 (d,  $J = 7,8$  Hz) ;
- 1 groupement  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle Rha-1 à  $\delta_H$  5,89 (brs).

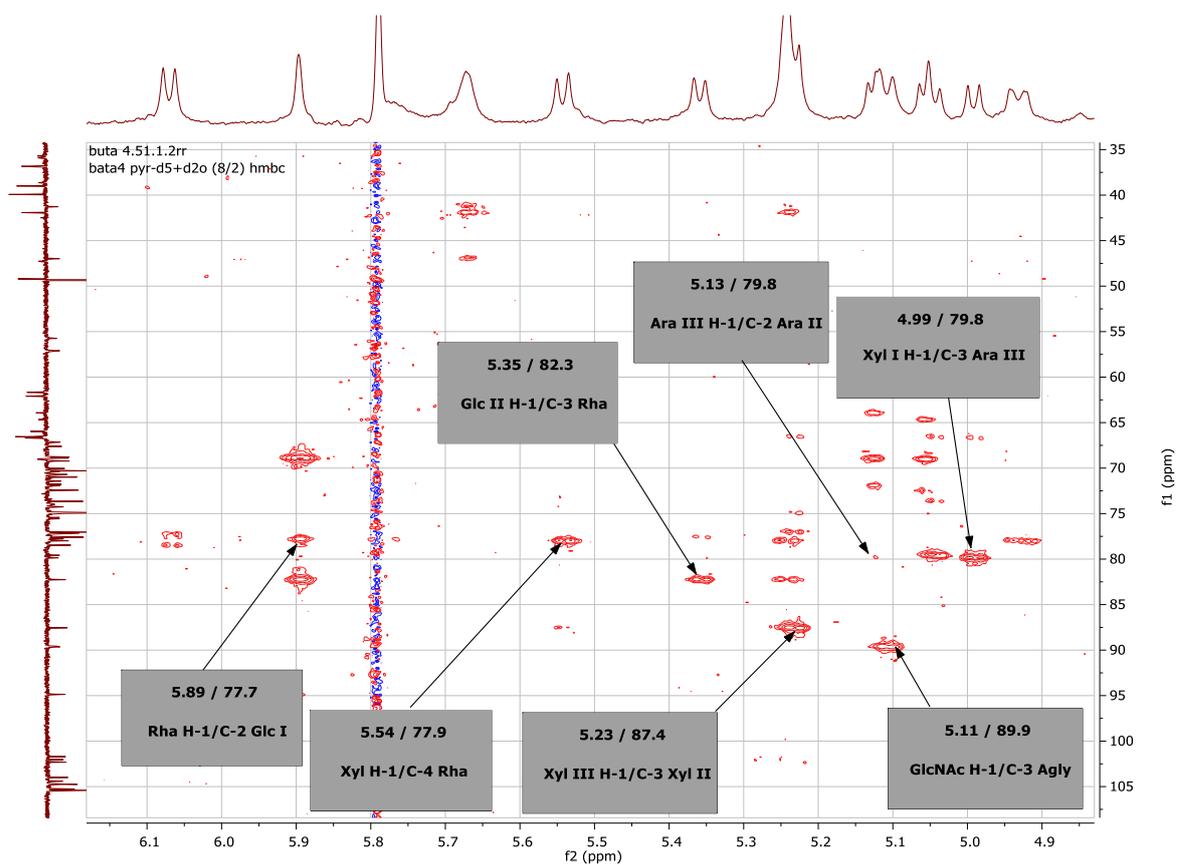
#### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

L'analyse des spectres HMBC et NOESY a permis de déterminer les points de jonction des chaînes osidiques sur l'aglycone ainsi que les liaisons interglycosiques.

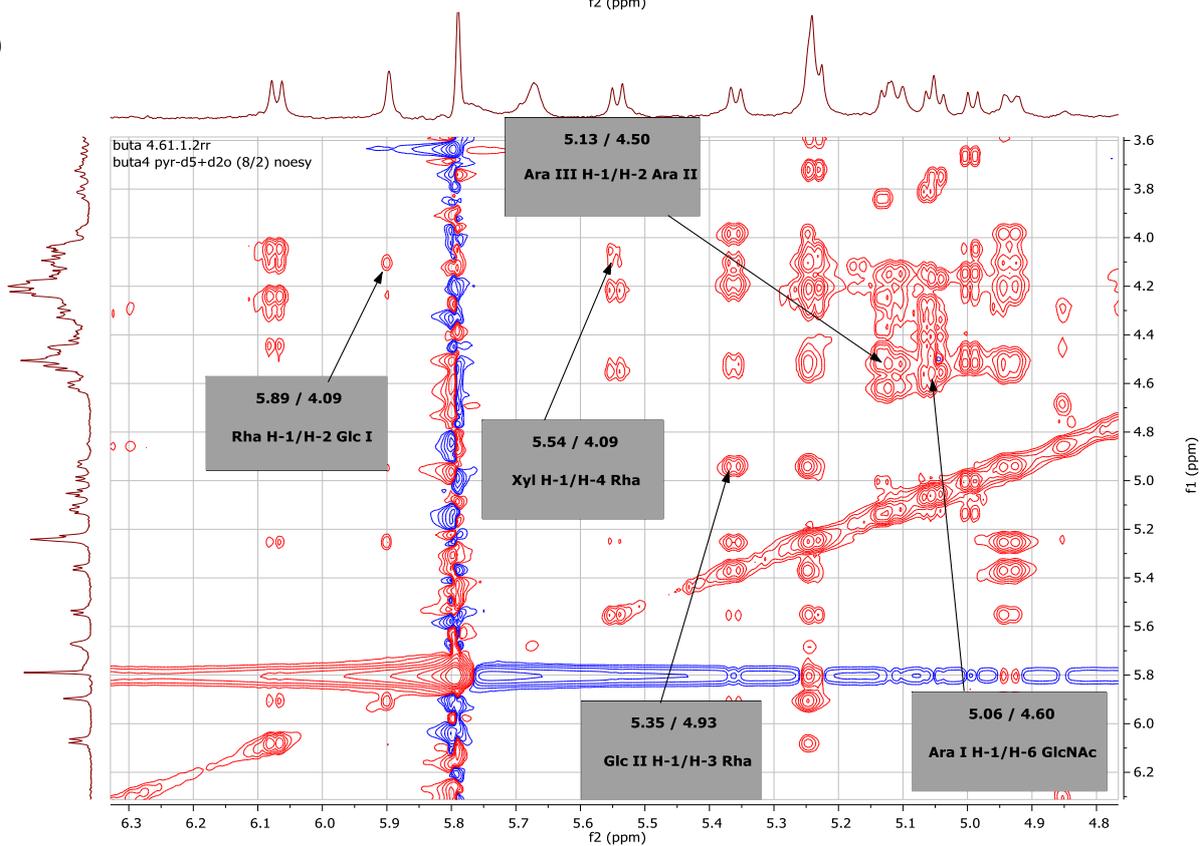
##### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  5,11 (H-1 GlcNHAc) et le signal  $\delta_C$  89,9 ppm (C-3 de l'aglycone) suggère que GlcNHAc est lié à la génine en position 3 ; cette liaison est confirmée par la corrélation observée sur le spectre NOESY entre les signaux  $\delta_H$  5,11 (H-1 GlcNHAc) et  $\delta_H$  3,40 (H-3 de l'aglycone).

L'enchaînement des sucres est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  5,06 /  $\delta_C$  69,0 (Ara I H-1 / GlcNHAc C-6) ; 5,04 / 79,5 (Ara II H-1 / Ara I C-2) ; 5,13 / 79,8 (Ara III H-1 / Ara II C-2) ; 4,99 / 79,8 (Xyl I H-1 / Ara III C-2), et confirmé par les corrélations NOESY à  $\delta_H$  5,06 /  $\delta_H$  4,60 (Ara I H-1 / GlcNHAc H-6) ; 5,04 / 4,54 (Ara II H-1 / Ara I H-2) ; 5,13 / 4,50 (Ara III H-1 / Ara II H-2) ; 4,99 / 4,52 (Xyl I H-1 / Ara III H-2).



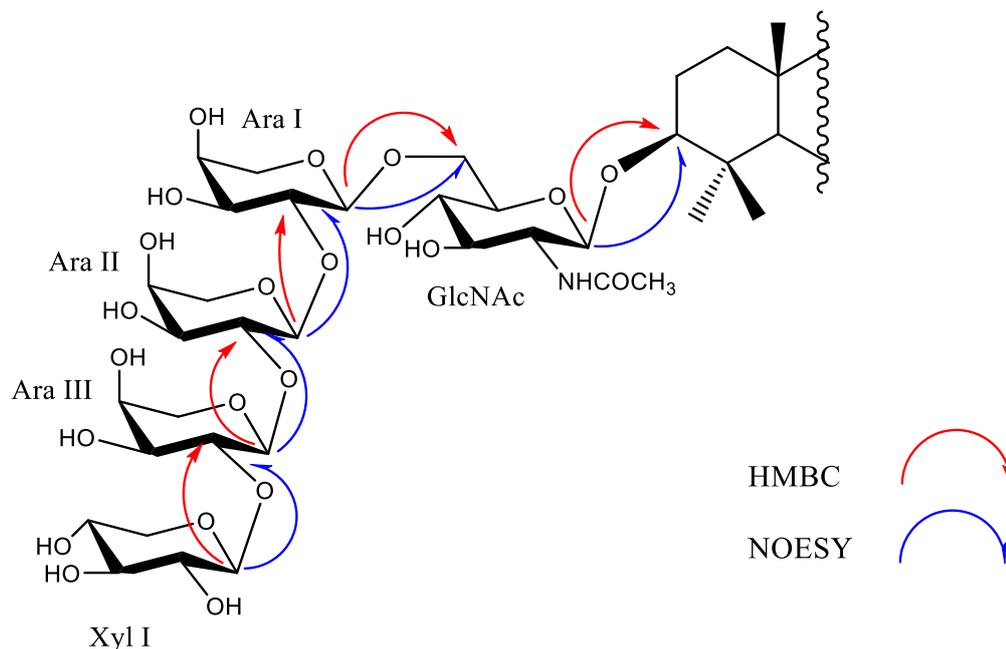
a)



b)

**Figure 39 : Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) du composé CC1 montrant les points de liaison des sucres.**

La séquence a donc été établie comme  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle en position C-3 de l'aglycone.

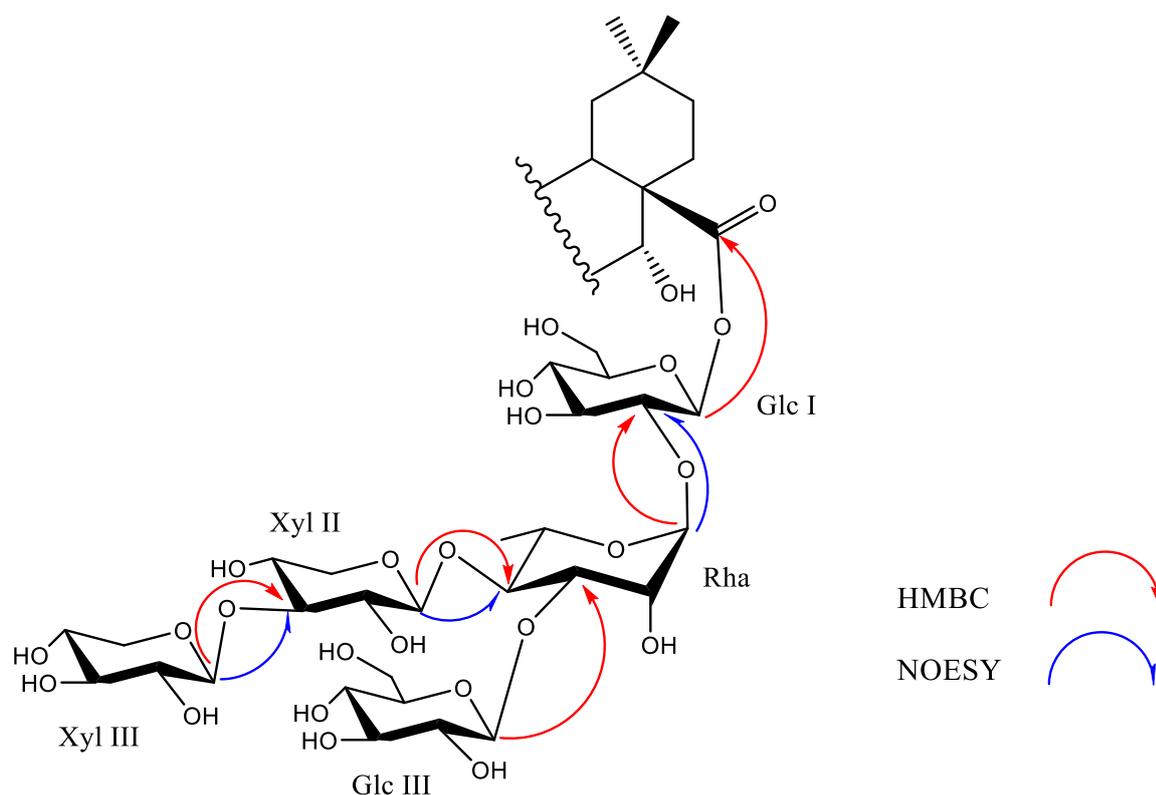


**Figure 40:** Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CCl.

### Chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone

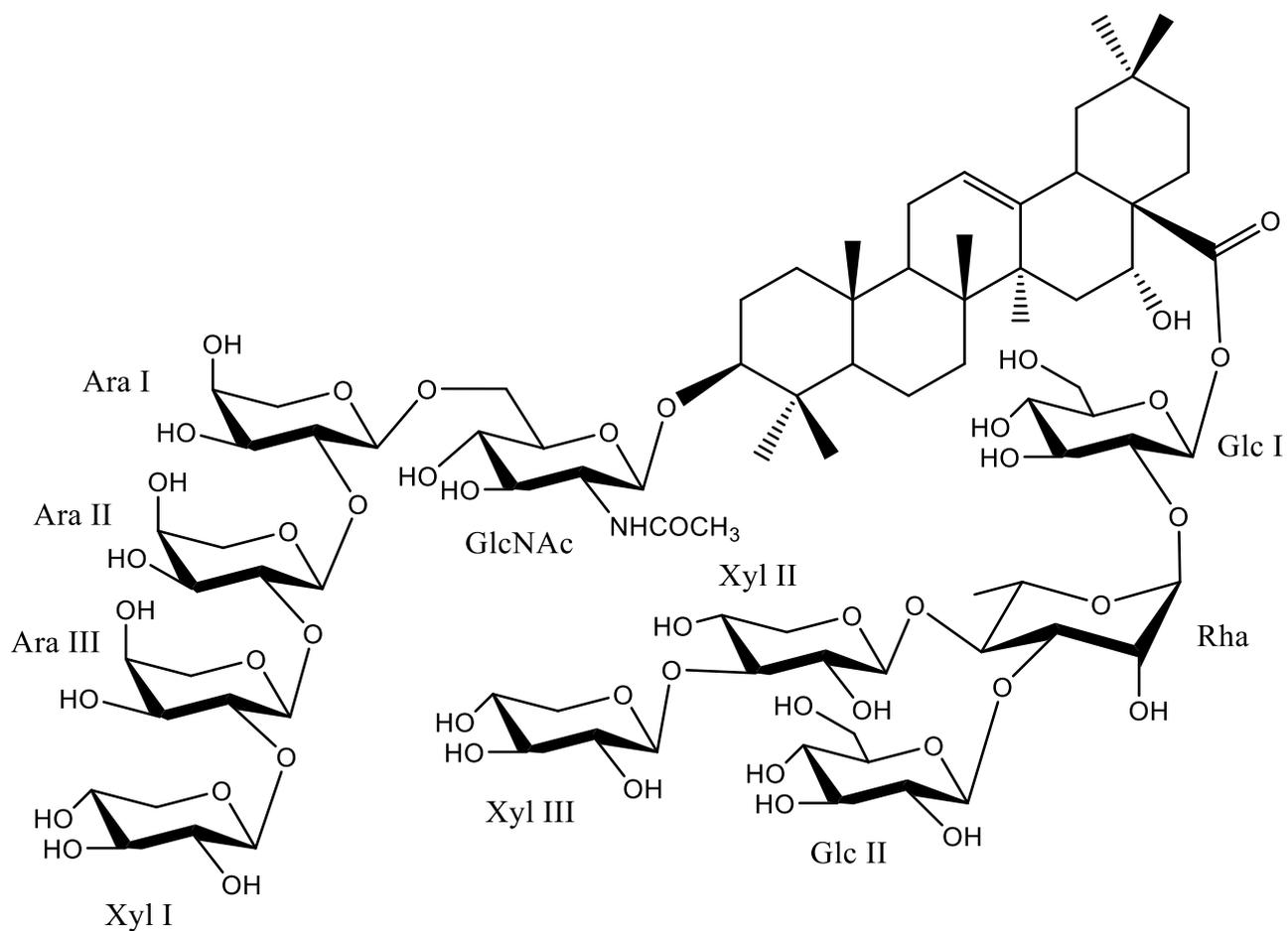
La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  6,07 (H-1 Glc I) et le signal  $\delta_C$  176,3 ppm (C-28 de l'aglycone) confirme que Glc I est lié à la génine en position 28.

L'enchaînement des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  5,89 /  $\delta_C$  77,7 (Rha H-1 / Glc I C-2) ; 5,54 / 77,9 (Xyl II H-1 / Rha C-4) ; 5,23 / 87,4 (Xyl III H-1 / Xyl II C-3) ; 5,35 / 82,3 (Glc II H-1 / Rha C-3), et confirmé par les corrélations NOESY à  $\delta_H$  5,89 /  $\delta_H$  4,09 (Rha H-1 / Glc I H-2) ; 5,54 / 4,09 (Xyl II H-1 / Rha H-4) ; 5,23 / 4,19 (Xyl III H-1 / Xyl II H-3). Ainsi, le pentasaccharide lié en C-28 de l'aglycone a été déterminé comme étant le  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyle (**Figure 41**).



**Figure 41:** Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CC1.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **CC1** a été établie comme étant l'acide echinocystique 3-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside, nouveau composé naturel, auquel nous avons donné le nom de **Calothyrsusoside A** (Messi *et al.*, 2020a).



*Figure 42: Structure du composé CCI*

**Tableau IV: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie osidique de CC1**

Pos.	CC1				
	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>Sucres en C-3</b>			<b>Sucres en C-28</b>		
GlcNHAc			Glc-I		
1	104,4 (CH)	5,11 (d, 7,1)	1	94,8 (CH)	6,07 (d, 7,8)
2	57,1 (CH)	4,61 (d, 8,5)	2	77,7 (CH)	4,09
3	74,9 (CH)	4,05	3	77,2 (CH)	4,20
4	71,7 (CH)	4,31	4	70,6 (CH)	4,24
5	75,4 (CH)	4,12	5	78,5 (CH)	4,04
6	69,0 (CH <sub>2</sub> )	4,25; 4,60 (d, 8,5)	6	61,5 (CH <sub>2</sub> )	4,30 (d, 8,7); 4,43
NHCOCH <sub>3</sub>	23,3 (CH <sub>3</sub> )	2,35	Rha		
Ara-I			1	101,7 (CH)	5,89 (brs)
1	102,2 (CH)	5,06 (d, 6,2)	2	70,3 (CH)	5,24
2	79,5 (CH)	4,54	3	82,3 (CH)	4,93
3	72,4 (CH)	4,40	4	77,9 (CH)	4,09
4	67,5 (CH)	4,45	5	68,8 (CH)	4,32
5	64,6 (CH <sub>2</sub> )	3,80 (dd, 10,5 ; 13,8); 4,34	6	18,7 (CH <sub>3</sub> )	1,76 (d, 6,0)
Ara-II			Xyl-II		
1	105,2 (CH)	5,04 (d, 7,5)	1	103,9 (CH)	5,54 (d, 7,5)
2	79,8 (CH)	4,50	2	74,2 (CH)	4,06
3	73,5 (CH)	3,97	3	87,4 (CH)	4,19
4	68,7 (CH)	4,27	4	69,2 (CH)	4,10
5	66,6 (CH <sub>2</sub> )	3,49; 4,36 m	5	65,9 (CH <sub>2</sub> )	3,58 (t, 11,1); 4,23
Ara-III			Xyl-III		
1	102,0 (CH)	5,13 (d, 6,7)	1	105,4 (CH)	5,23 (d, 7,9)
2	79,8 (CH)	4,52	2	74,9 (CH)	4,05
3	71,9 (CH)	4,46	3	77,0 (CH)	4,21
4	67,1 (CH)	4,50	4	70,2 (CH)	4,20
5	63,9 (CH <sub>2</sub> )	3,83 (dd, 10,7 ; 13,8); 4,36	5	66,5 (CH <sub>2</sub> )	3,71 (brd, 8,6); 4,27
Xyl-I			Glc-II		
1	105,4 (CH)	4,99 (d, 7,5)	1	104,7 (CH)	5,35 (d, 7,8)
2	74,8 (CH)	4,03	2	74,9 (CH)	4,17
3	77,1 (CH)	4,19	3	77,2 (CH)	4,21
4	70,4 (CH)	4,18	4	71,0 (CH)	4,09
5	66,5 (CH <sub>2</sub> )	3,65 m; 4,46	5	77,5 (CH)	3,98
			6	62,0 (CH <sub>2</sub> )	4,20 (d, 11,1); 4,51

## b) Détermination de la structure de calothyrsusoside B (CC2)

### Spectrométrie de masse

Le composé **CC2** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre sur son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1798,8802 ( $[M + Na]^+$ ). Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{80}H_{129}NO_{42}$ .

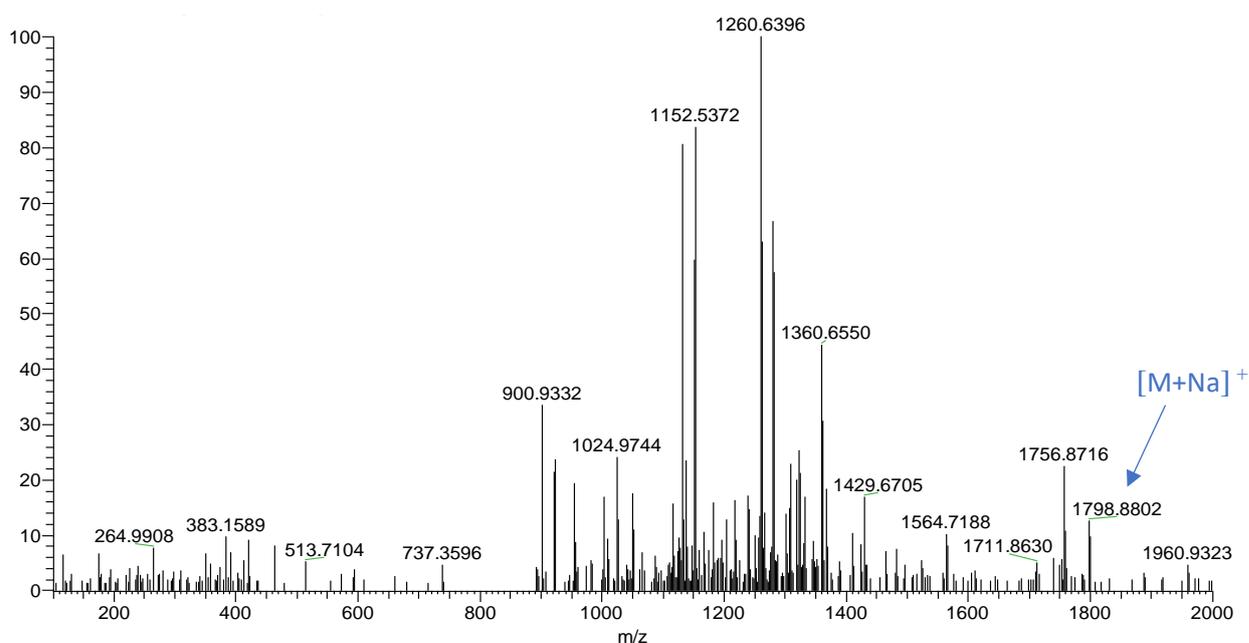


Figure 43: Spectre de masse du composé CC2

### ➤ Spectroscopie de RMN

#### Identification de l'aglycone

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques observées pour l'aglycone de **CC2** avec celles obtenues pour le composé **CC1**, montre que ces deux composés partagent le même aglycone, à savoir l'acide echinocystique ( $3\beta$ ,  $16\alpha$ -dihydroxyolean-12-ene-28-oïque) (Tapondjou *et al.*, 2005; Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014).

Une analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D de **CC2** a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone (**Tableau V**).

**Tableau V: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) partie aglycone de CC2**

N° C	CC2				
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)	N° C	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)
1a	38,5	1,06	15a	35,8	2,04
1b		1,64	15b		2,40
2a	26,3	1,89	16	73,8	5,24 (brs)
2b		2,29	17	49,1	-
3	89,9	3,35 (brd, 13,2)	18	41,2	3,42 (d, 13,2)
4	39,9	-	19a	47,2	1,35
5	55,8	0,86 (brd, 4,8)	19b		2,77 (brd, 13,9)
6a	18,4	1,41	20	30,4	-
6b		1,64	21a	35,6	1,30 m
			21b		2,40 m
7a	33,1	1,01	22a	31,8	2,16
7b		1,69	22b		2,43
8	41,9	-	23	28,1	1,25 (s)
9	47,1	1,82	24	16,9	0,98 (s)
10	36,7	-	25	15,5	0,86 (s)
11a	23,4	2,02	26	17,3	1,10 (s)
11b		2,40	27	27,0	1,85 (s)
12	122,4	5,64 (brs)	28	176,1	-
13	144,3	-	29	33,0	0,95 (s)
14	42,0	-	30	24,5	0,97 (s)

### Détermination du nombre et de la nature des sucres

Les sucres de **CC2**, ont été déterminés comme étant les monosaccharides suivants : D-Glc, L-Rha, D-GlcNAC, D-Xyl et L-Ara par hydrolise acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire.

L'analyse du spectre de RMN <sup>1</sup>H de **CC2** permet de distinguer 9 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_H$  5,05 (d,  $J = 7,8$  Hz) ; 5,06 (d,  $J = 4,6$  Hz) ; 5,02 (d,  $J = 6,8$  Hz) ; 5,13 (d,  $J = 5,1$  Hz) ; 4,96 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; 6,12 (d,  $J = 7,8$  Hz) ; 6,35 (brs) ; 5,20 (d,  $J = 7,5$  Hz) et 5,14 (d,  $J = 7,0$  Hz) respectivement, et qui corrélient sur le spectre HSQC avec les carbones à  $\delta_C$  104,6 ; 102,2 ; 105,5 ; 102,2 ; 105,7 ; 94,6 ; 101,0 ; 105,8 et 105,6 respectivement, ce qui prouve la présence de neuf sucres.



**Figure 44:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) montrant les signaux des anomères du composé CC2.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY (**Tableau VI**). Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées sur le spectre HSQC et confirmé par le spectre HMBC.

En définitive, nous avons identifié :

- 1 groupement  $\beta$ -D-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle à  $\delta_H$  5,05 (d,  $J = 7,8$  Hz),
- 3 groupements  $\alpha$ -L-arabinopyranosyles Ara I-1 à  $\delta_H$  5,06 (d,  $J = 4,6$  Hz) ; Ara II-1 à  $\delta_H$  5,02 (d,  $J = 7,8$  Hz) ; Ara III-1 à  $\delta_H$  5,13 (d,  $J = 5,1$  Hz),
- 3 groupements  $\beta$ -D-xylopyranosyles Xyl I-1 à  $\delta_H$  4,96 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; Xyl II-1 à  $\delta_H$  5,20 (d,  $J = 7,5$  Hz) ; Xyl III-1 à  $\delta_H$  5,14 (d,  $J = 7,0$  Hz),
- 1 groupement  $\beta$ -D-glucopyranosyle Glc I-1 à  $\delta_H$  6,12 (d,  $J = 7,8$  Hz),
- 1 groupement  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle Rha-1 à  $\delta_H$  6,35 (brs).

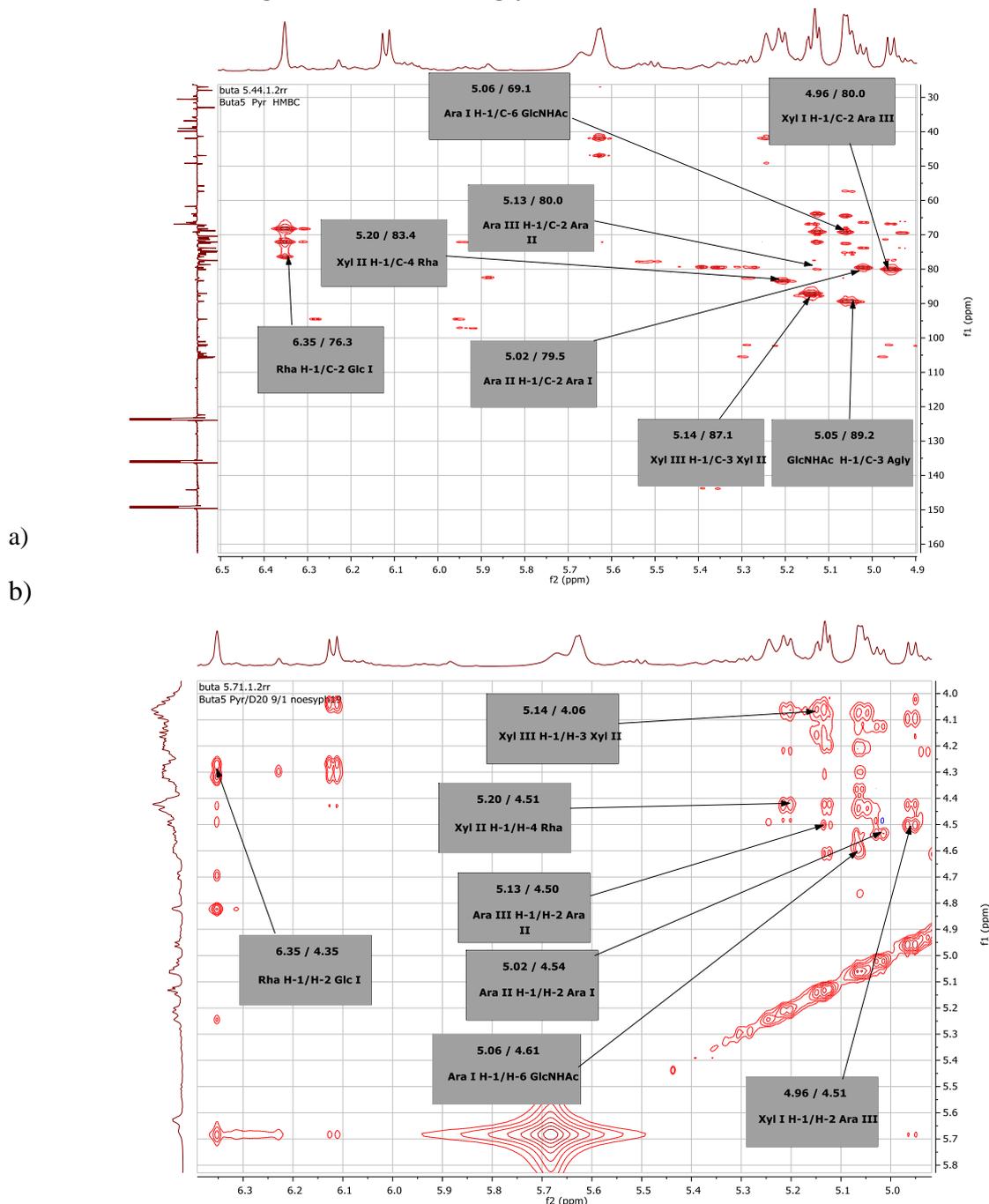
#### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

Comme dans le cas de CC1, l'observation sur le spectre RMN  $^{13}C$  des signaux de carbones respectivement à  $\delta_C$  89,2 ppm (C-3) et à  $\delta_C$  176,1 ppm (C-28), indique que CC2 et un dérivé bidesmosidique de l'acide échinocystique portant en ses carbones C-3 et C-28 des chaînes osidiques reliées à l'aglycone, respectivement par des liaisons éther et ester. La

séquence des chaînes oligosaccharidiques ainsi que leur point de fixation sur l'aglycone, ont été établis grâce aux spectres HMBC et NOESY.

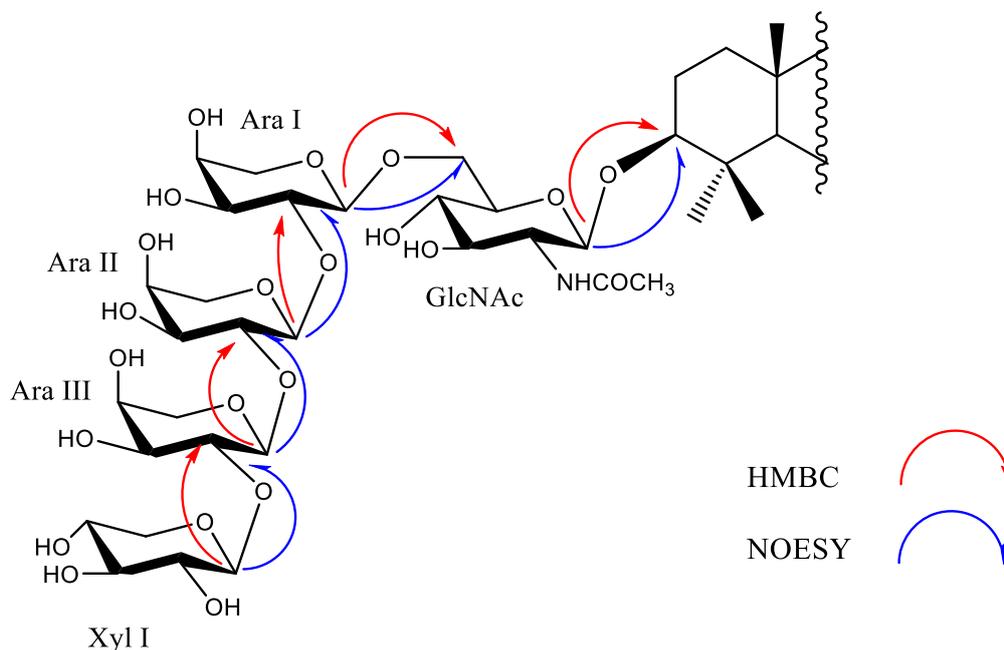
### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

L'étude comparative des spectres de RMN 1D et 2D des composés **CC2** et ceux de **CC1**, montre que la chaîne oligosaccharidique en C-3 de **CC2** est identique à celle établie dans le cas du composé **CC1**. Le pentasaccharide xyl(1→2)ara(1→2)ara(1→6) GlcNAc a été établi et fixé en C-3 par la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  5,05 (H-1 GlcNAc) et le signal  $\delta_C$  89,2 (C-3 Agly).



**Figure 45 : Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé **CC2** montrant les points de liaison des sucres.**

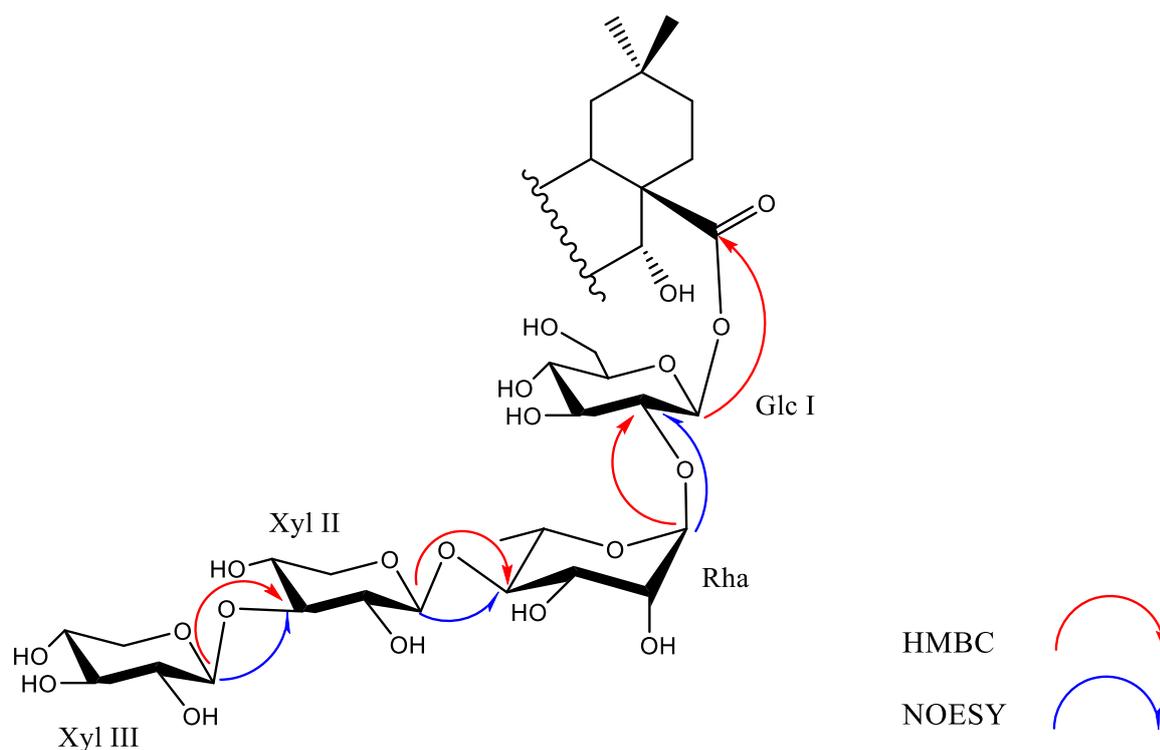
La séquence complète,  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle a été fixée en position C-3 de l'aglycone (**Figure 46**).



**Figure 46:** Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CC2.

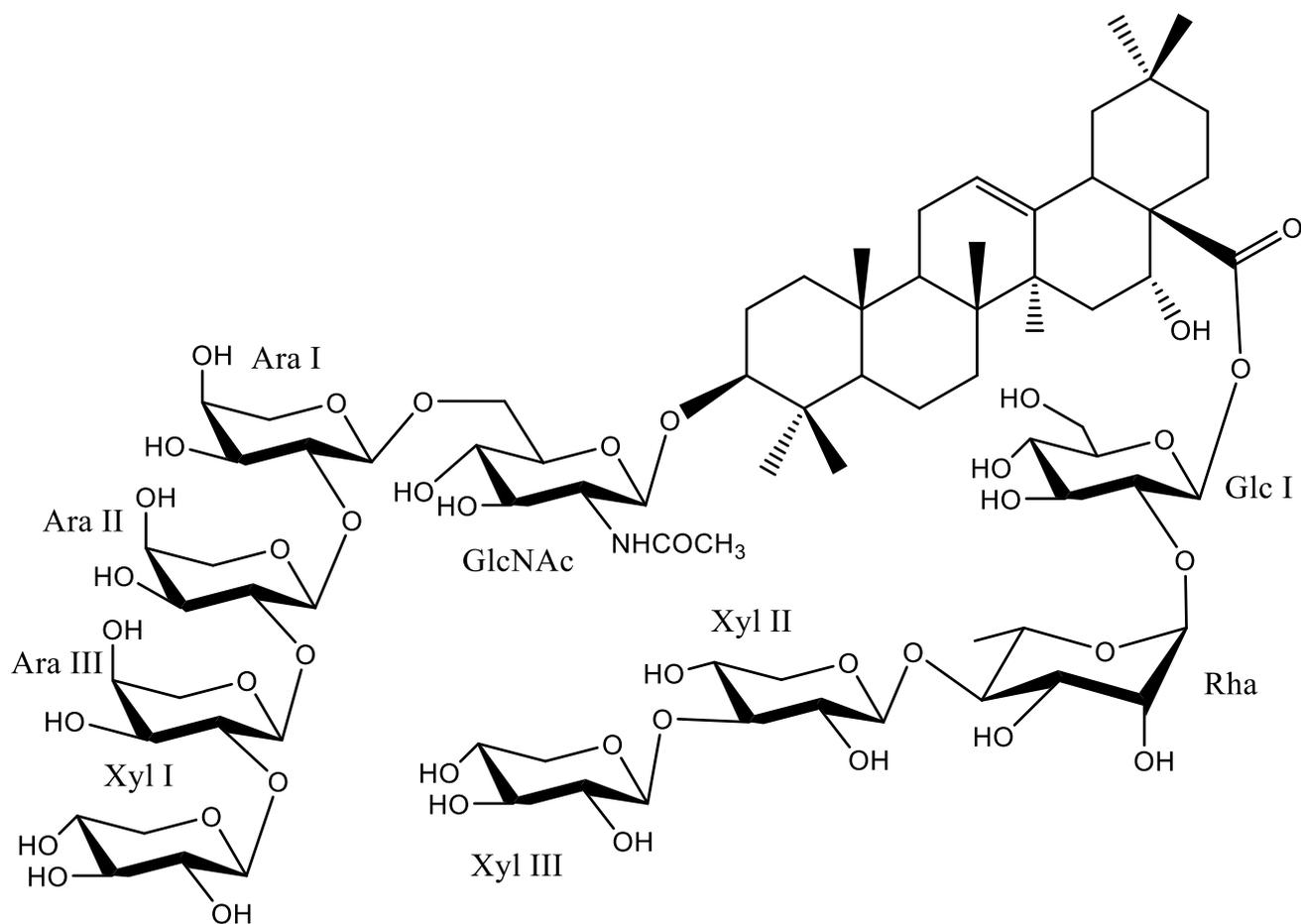
### Chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone

L'étude comparative approfondie des spectres RMN 1D et 2D des composés **CC2** et **CC1** montre que la chaîne en C-28 de l'aglycone de **CC2** ne diffère que par l'absence d'une unité hexosyle. Cela est d'ailleurs soutenu par le spectre de masse de **CC2** qui montre son ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1798,8802, soit 162 uma de moins que celui de **CC1**, observé à 1960,9327. Cette unité hexosyle a été établie comme étant le Glc sur la base de l'analyse des spectres RMN 2D. En effet, l'observation du blindage de C-3 ( $\delta_C$  72,1ppm) de Rha dans **CC2** indique la perte de son unité de glycosylation en comparaison à la valeur  $\delta_C$  82,3 ppm observée pour ce même C-3 de Rha dans le cas de **CC1**. Par conséquent, le tétrasaccharide xyl(1 $\rightarrow$ 3) xyl (1 $\rightarrow$ 3) rha (1 $\rightarrow$ 2) Glc a été établi et lié en C-28 de l'aglycone par la corrélation sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  6,12 (H-1, Glc I) et le signal  $\delta_C$  176,1 (C-28 Agly) de **CC2**.



**Figure 47:** *Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CC2.*

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **CC2** est élucidée comme étant celle de l'acide echinocystique 3-*O*- $\beta$ -[ $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside; nouveau composé naturel auquel nous avons donné le nom de **calothyrsusoside B** (Messi *et al.*, 2020a).



**Figure 48: Structure du composé CC2**

**Tableau VI: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie osidique de CC2**

Pos.	CC2				
	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>Sucres en C-3</b>			<b>Sucres en C-28</b>		
GlcNHAc			Glc-I		
1	104,6 (CH)	5,05 (d, 7,8)	1	94,6 (CH)	6,12 (d, 7,8)
2	57,3 (CH)	4,59 m	2	76,3 (CH)	4,31
3	75,1 (CH)	4,44	3	75,4 (CH)	4,43
4	72,3 (CH)	4,13	4	70,9 (CH)	4,27
5	75,4 (CH)	4,07	5	78,8 (CH)	4,03
6	69,1 (CH <sub>2</sub> )	4,20 (brd, 7,8); 4,61m	6	61,7 (CH <sub>2</sub> )	4,32; 4,44 (brd, 10,3)
NHCOCH <sub>3</sub>	23,2 (CH <sub>3</sub> )	2,28	Rha		
Ara-I			1	101,0 (CH)	6,35 (brs)
1	102,2 (CH)	5,06 (d, 4,6)	2	70,1 (CH)	5,24
2	79,5 (CH)	4,54	3	72,1 (CH)	4,69
3	72,4 (CH)	4,37	4	83,4 (CH)	4,42
4	67,5 (CH)	4,40	5	68,1 (CH)	4,48
5	64,4 (CH <sub>2</sub> )	3,76 (t, 12,0); 4,30	6	18,8 (CH <sub>3</sub> )	1,76 (d, 6,0)
Ara-II			Xyl-II		
1	105,5 (CH)	5,02 (d, 6,8)	1	105,8 (CH)	5,20 (d, 7,5)
2	80,0 (CH)	4,50	2	74,6 (CH)	4,06
3	73,8 (CH)	4,13	3	87,1 (CH)	4,06
4	68,7 (CH)	4,30	4	68,7 (CH)	4,29
5	66,3 (CH <sub>2</sub> )	4,29; 4,44 (d, 10,3)	5	66,4 (CH <sub>2</sub> )	4,22; 4,43 (brd, 10,3)
Ara-III			Xyl-III		
1	102,2 (CH)	5,13 (d, 5,1)	1	105,6 (CH)	5,14 (d, 7,0)
2	80,0 (CH)	4,51	2	74,8 (CH)	4,04
3	72,1 (CH)	4,14	3	77,3 (CH)	4,15
4	67,0 (CH)	4,30	4	70,4 (CH)	4,17
5	63,7 (CH <sub>2</sub> )	3,78 (t, 12,0); 4,33	5	66,8 (CH <sub>2</sub> )	4,30; 4,43 (brd, 10,3)
Xyl-I					
1	105,7 (CH)	4,96 (d, 7,5)			
2	75,0 (CH)	4,04			
3	77,4 (CH)	4,15			
4	70,6 (CH)	4,18			
5	66,8 (CH <sub>2</sub> )	4,28; 4,44 (brd, 10,3)			

### c) Détermination de la structure de Calothyrsusoside C (CC3)

#### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **CC3** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre sur le spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1858,9038 ( $[M + Na]^+$ ). Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{82}H_{133}NO_{44}$ .

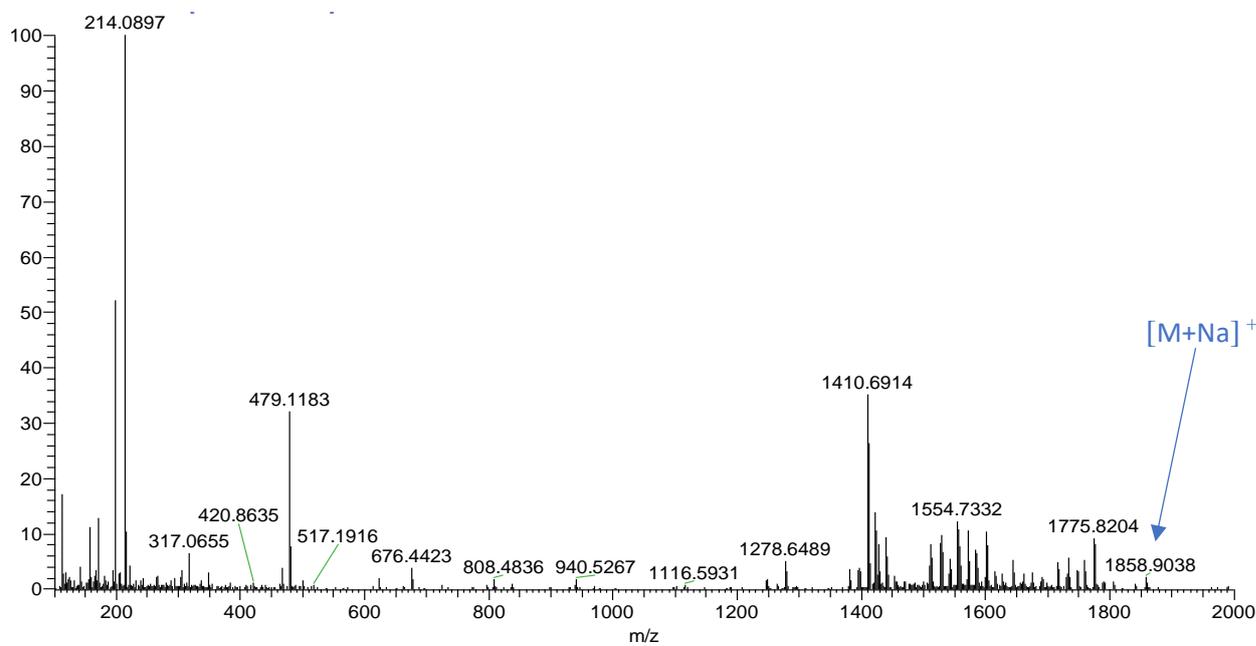


Figure 49: Spectre de masse du composé CC3

#### ➤ Spectroscopie de RMN

##### Identification de l'aglycone

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques observées pour l'aglycone de **CC3** avec celles obtenues dans le composé **CC1**, montre que ces deux composés partagent le même type d'aglycone à savoir l'acide echinocystique ( $3\beta$ ,  $16\alpha$ -dihydroxyolean-12-ene-28-oïque) (Tapondjou *et al.*, 2005; Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014).

Une analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D de **CC3** a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone (**Tableau VII**).

**Tableau VII: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de CC3**

N° C	CC3				
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	N° C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1a	38,6	0,94	15a	35,1	1,29
1b		1,53	15b		1,61
2a	26,1	1,50	16	73,3	4,35 (brs)
2b		1,80	17	48,3	-
3	88,3	3,06 (brd, 13,6)	18	40,7	2,84 (d, 14,4)
4	39,0	-	19a	47,1	1,01 (brd, 11,4)
5	55,4	0,71 m	19b		2,25 m
6a	18,2	1,25	20	30,6	-
6b		1,45	21a	35,5	1,10 m
			21b		1,93 m
7a	32,9	1,30	22a	31,1	1,65
7b		1,41	22b		1,83
8	39,4	-	23	28,0	0,90 (s)
9	46,5	1,53	24	16,9	0,65 (s)
10	36,6	-	25	15,7	0,86 (s)
11a	22,6	1,25	26	17,1	0,67 (s)
11b		1,32	27	27,0	1,31 (s)
12	122,0	5,23 (brs)	28	174,9	-
13	143,7	-	29	33,4	0,84 (s)
14	41,4	-	30	24,7	0,90 (s)

### Détermination du nombre et de la nature des sucres

La nature des sucres a été déterminée par hydrolyse acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire. Ainsi, le D-glucose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose et le D-GlcNAc ont été identifiés.

L'analyse du spectre HSQC de **CC3** permet de distinguer 9 signaux de protons anomériques résonnant à 4,29 (d,  $J = 8,2$  Hz) ; 4,48 (d,  $J = 4,5$  Hz) ; 4,26 (d,  $J = 7,3$  Hz) ; 4,42 (d,  $J = 8,0$  Hz) ; 5,30 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; 4,95 (brs) ; 4,67 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; 4,39 (d,  $J = 5,2$  Hz) et 4,40 (d,  $J = 7,8$  Hz), corrélant avec les signaux de 9 carbones à  $\delta_{\text{C}}$  103,8 ; 101,5 ; 105,1 ; 103,5 ; 93,7 ; 100,7 ; 103,2 ; 104,8 et 103,8, respectivement, ce qui prouve la présence de neuf sucres.



**Figure 50:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) montrant les signaux des anomères du composé CC3.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY (**Tableau VIII**). Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées sur le spectre HSQC et confirmé par le spectre HMBC.

En définitive, nous avons identifié :

- 1 groupement  $\beta$ -D-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle à  $\delta_H$  4,29 (d,  $J = 8,2$  Hz) ;
- 2 groupements  $\alpha$ -L-arabinopyranosyles Ara I-1 à  $\delta_H$  4,48 (d,  $J = 4,5$  Hz) ; Ara II-1 à  $\delta_H$  4,26 (d,  $J = 7,3$  Hz) ;
- 2 groupements  $\beta$ -D-xylopyranosyles Xyl I-1 à  $\delta_H$  4,67 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; Xyl II-1 à  $\delta_H$  4,39 (d,  $J = 5,2$  Hz),
- 3 groupements  $\beta$ -D-glucopyranosyles Glc I-1 à  $\delta_H$  4,42 (d,  $J = 8,0$  Hz) ; Glc II-1 à  $\delta_H$  5,30 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; Glc III-1 à  $\delta_H$  4,40 (d,  $J = 7,8$  Hz) ;
- 1 groupement  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle Rha-1 à  $\delta_H$  4,95 (brs).

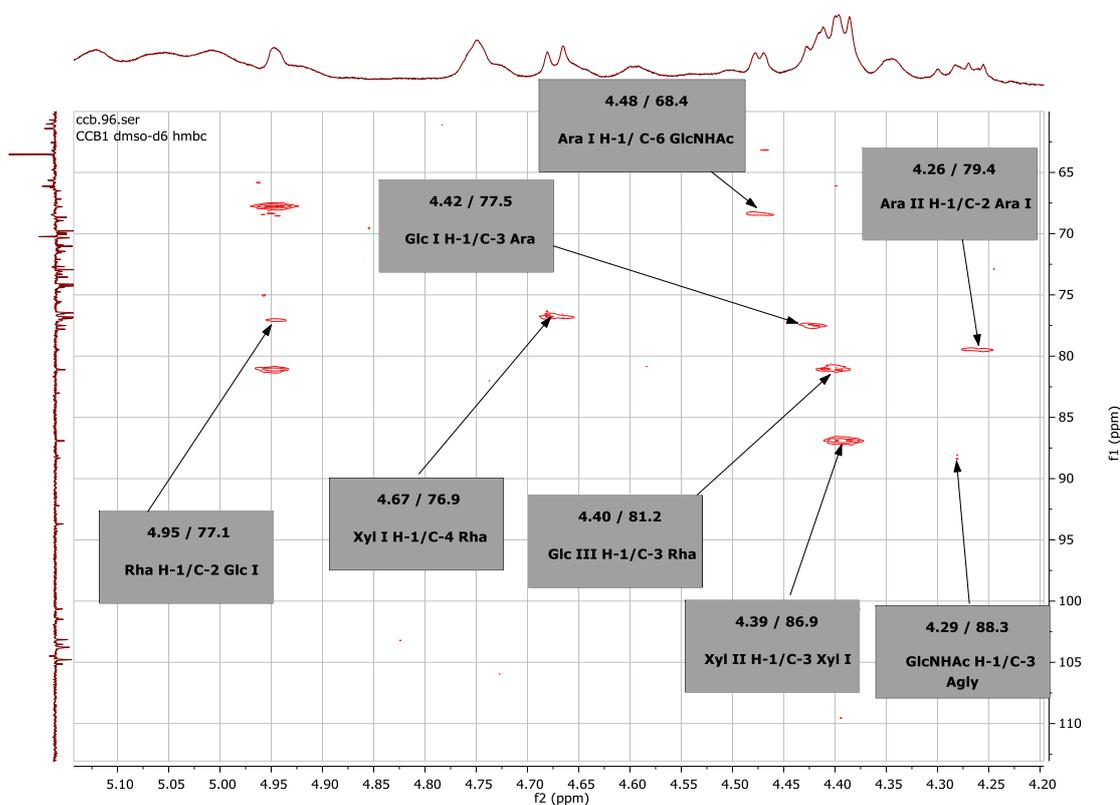
### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

La nature, dérivé bidesmosidique de l'acide echinocystique de CC3 a été établie comme précédemment décrit. La séquence des chaînes oligosaccharidiques ainsi que leurs points de

jonction sur l'aglycone ont également été déterminés par les techniques de HMBC et NOESY.

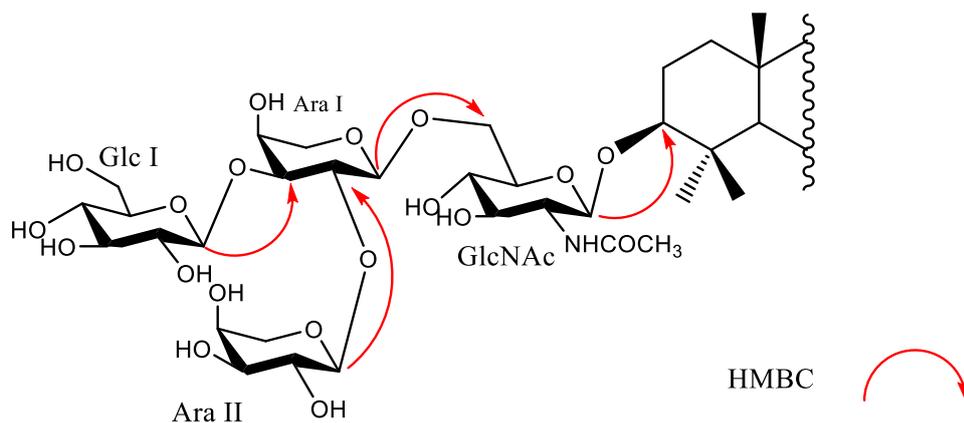
### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

L'enchaînement des sucres est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  4,48 /  $\delta_C$  68,4 (Ara I H-1 / GlcNHAc C-6), 4,26 / 79,4 (Ara II H-1 / Ara I C-2) et 4,42 / 77,5 (Glc I H-1 / Ara I C-3).



**Figure 51: Spectre HMBC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CC3 montrant les points de liaison des sucres.**

La séquence  $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)[- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle a été fixée en position C-3 de l'aglycone par la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  4,29 (H-1 GlcNac) et le signal  $\delta_C$  88,3 ppm (C-3, Agly).



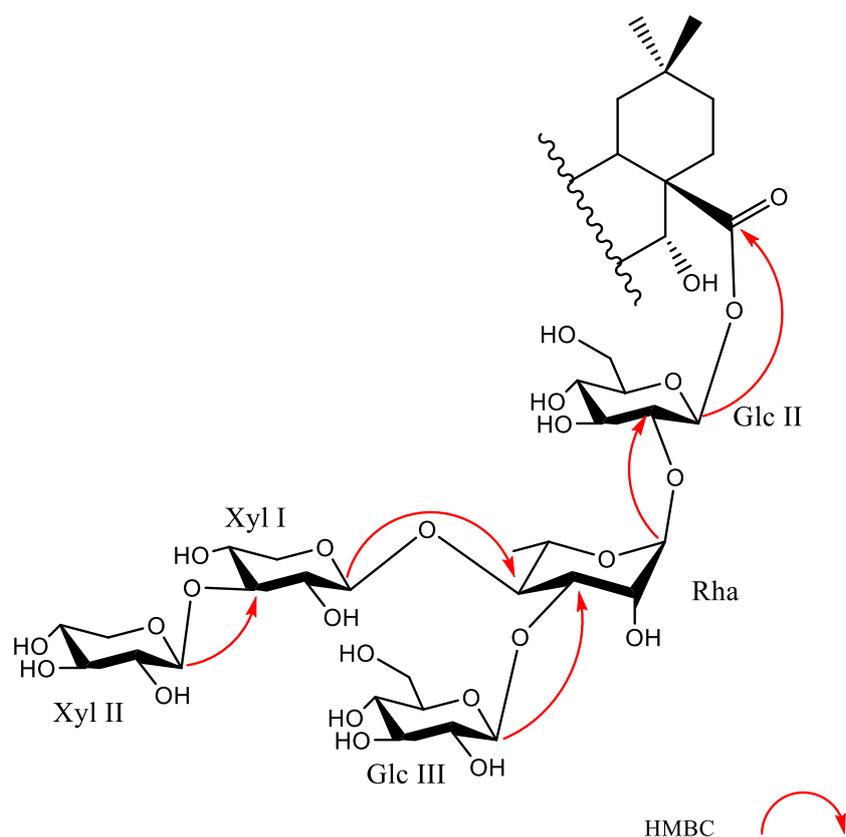
**Figure 52 : Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CC3.**

### Chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  5,30 (H-1 Glc I) et le signal  $\delta_C$  174,9 (C-28 de l'aglycone) confirme que Glc I est lié à la génine en position 28.

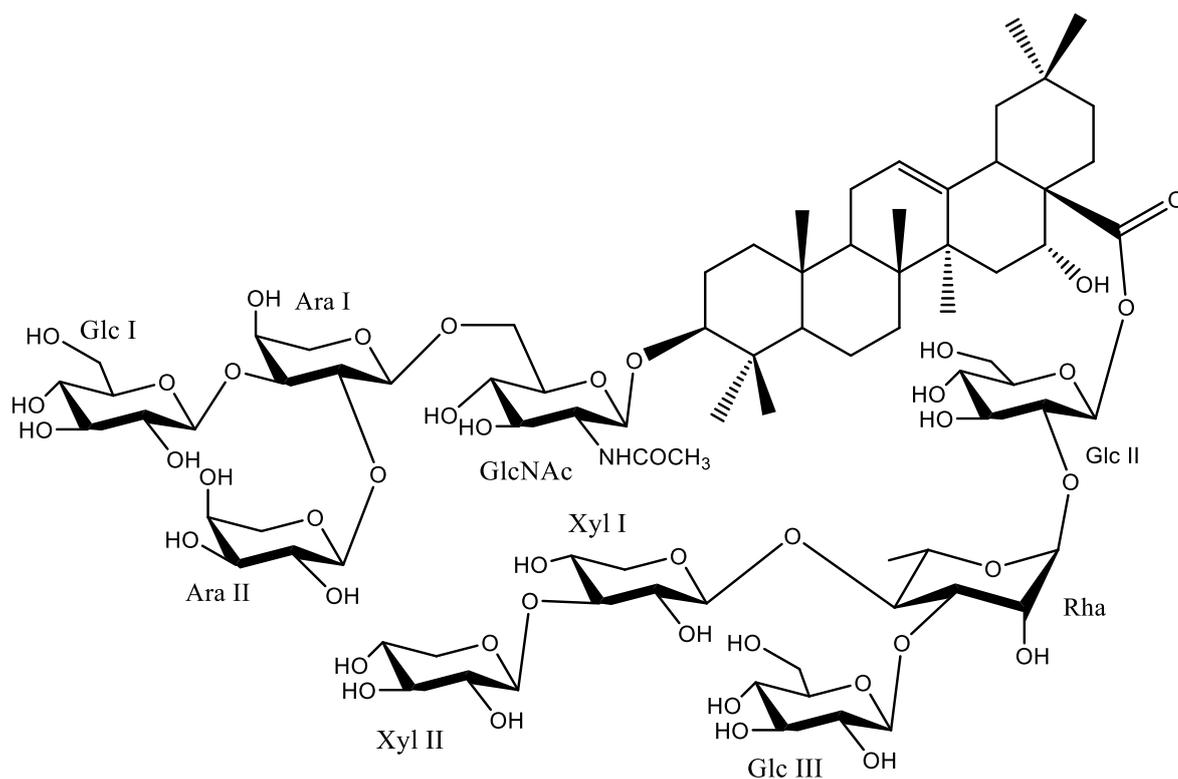
L'enchaînement des sucres est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  4,95 /  $\delta_C$  77,1 (Rha H-1 / Glc I C-2) ; 4,67 / 76,9 (Xyl II H-1 / Rha C-4) ; 4,39 / 86,9 (Xyl III H-1 / Xyl II C-3) ; 4,40 / 81,2 (Glc II H-1 / Rha C-3).

Ainsi, le pentasaccharide lié en C-28 de l'aglycone a été déterminé comme étant le  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1→3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1→4)[- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1→3)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- $\beta$ -D-glucopyranosyle.



**Figure 53 :** Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CC3.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **CC3** est élucidée comme étant l'acide echinocystique 3-*O*-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)][ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-28-*O*-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)][ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside, nouveau composé naturel au quel on n'a donné le nom trivial de **Calothyrsusoside C** (Messi *et al.*, 2020a)



**Figure 54: Structure du composé CC3**

**Tableau VIII: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie osidique de CC3**

Pos.	CC3				
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Pos.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>Sucres en C-3</b>			<b>Sucres en C-28</b>		
GlcNHAc			Glc-II		
1	103,8	4,29 (d, 8,2)	1	93,7	5,30 (d, 7,6)
2	56,1	3,42	2	77,1	3,28
3	74,1	3,14	3	76,8	3,55
4	71,5	3,57	4	70,1	3,52
5	74,3	3,29	5	77,7	3,20
6	68,4	3,53; 3,88 (brd, 9,0)	6	61,5	3,45 ; 3,59
NHCOCH <sub>3</sub>	23,8	1,77	Rha		
Ara-I			1	100,7	4,95 (brs)
1	101,5	4,48 (d, 4,5)	2	68,9	4,13
2	79,4	3,57	3	81,2	3,87
3	77,5	3,88	4	76,9	3,54
4	71,0	3,47	5	67,7	3,63
5	63,5	3,37; 3,68	6	18,4	1,15 (brd, 5,5)
Ara-II			Xyl-I		
1	105,1	4,26 (d, 7,3)	1	103,2	4,67 (d, 7,6)
2	74,4	3,02	2	73,5	3,14
3	76,5	3,17	3	86,9	3,35
4	69,9	3,32	4	68,6	3,39
5	66,2	3,10; 3,75	5	65,6	3,11 (brd, 10,4) ; 3,77
Glc-I			Xyl-II		
1	103,5	4,42 (d, 8,0)	1	104,8	4,39 (d, 5,2)
2	72,7	3,47	2	74,2	3,10
3	75,6	3,31	3	76,5	3,15
4	70,9	3,46	4	68,9	3,37
5	76,9	3,18	5	66,1	3,09; 3,73 (brd, 5,5)
6	61,0	3,45 (d, 10,4); 3,63	Glc-III		
			1	103,8	4,40 (d, 7,8)
			2	74,1	3,11
			3	76,5	3,31
			4	70,3	3,52
			5	76,8	3,16
			6	61,4	3,46; 3,68

#### d) Identification du composé CC4

##### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **CC4** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre sur son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  683,3992  $[M + Na]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{38}H_{61}NO_8$ .

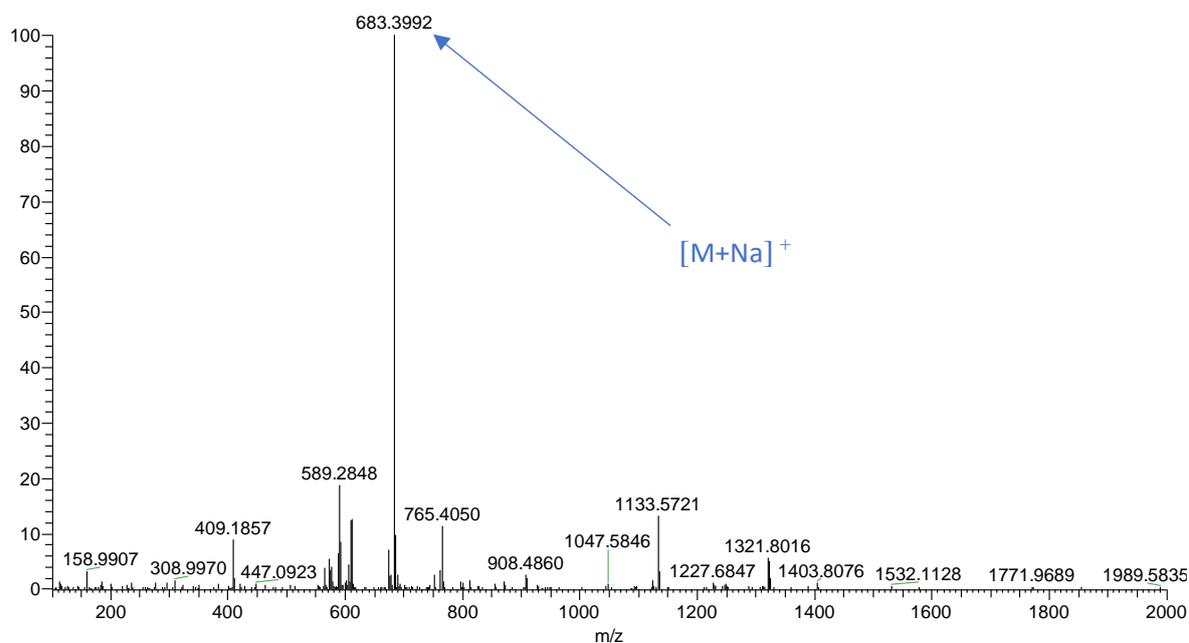


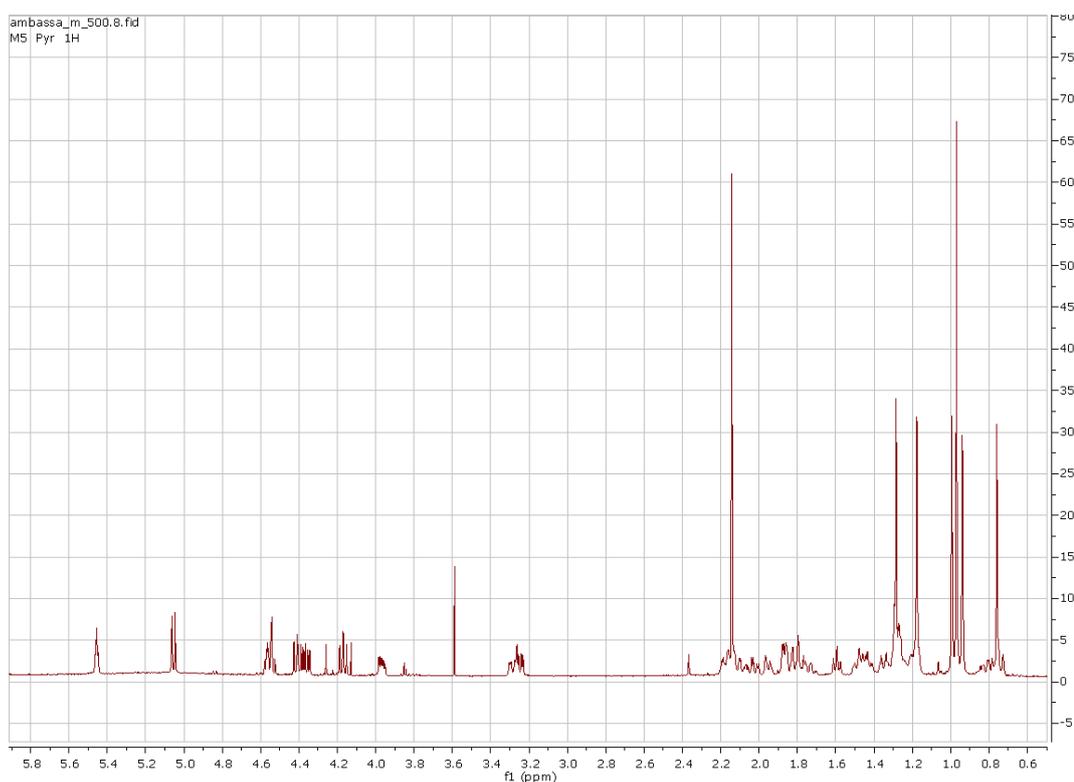
Figure 55: Spectre de masse du composé CC4

##### ➤ Spectroscopie de RMN

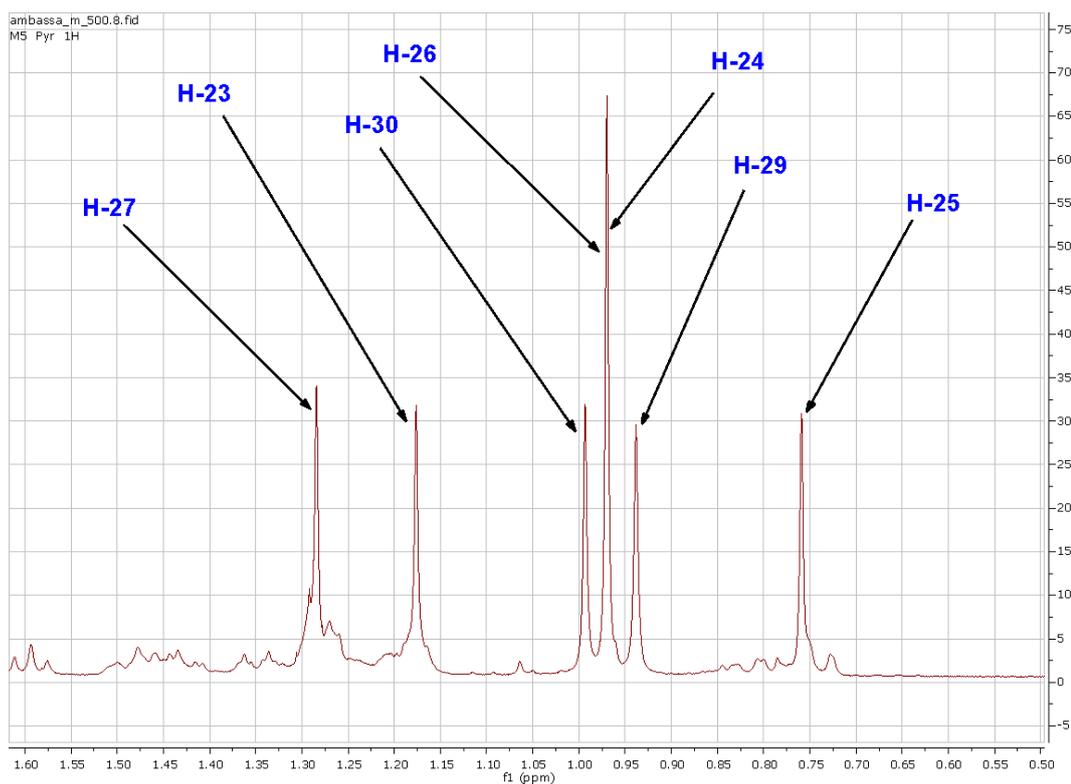
###### Identification de l'aglycone

Tous les signaux des carbones et des protons ont été déterminés et attribués d'après l'analyse des spectres COSY, NOESY, HSQC et HMBC.

Le spectre de RMN  $^1H$  met en évidence sept signaux de méthyles à  $\delta_H$  0,76 (s, H-25) ; 0,94 (s, H-29) ; 0,99 (s, H-30) ; 0,97 (s, H-24) ; 0,97 (s, H-26) ; 1,18 (s, H-23) et 1,28 (s, H-27) (3H chacun, s), un proton oléfinique à  $\delta_H$  5,64 (brs, H-12), un méthine portant un atome d'oxygène à  $\delta_H$  3,24 (dd,  $J = 7,6$  Hz, H-3).



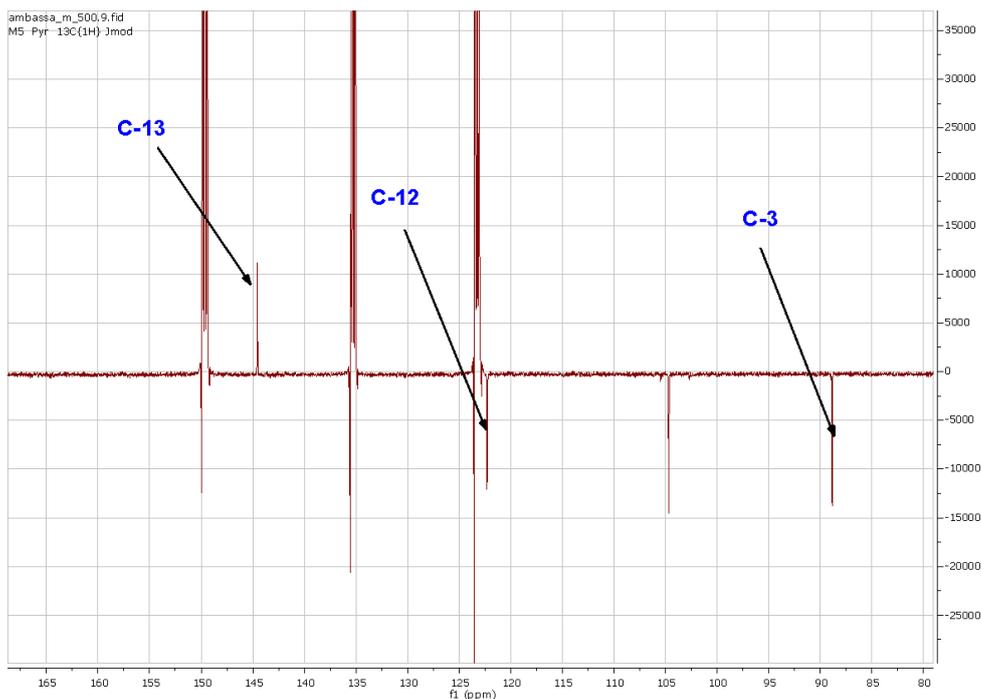
a)



b)

**Figure 56: Spectres de RMN  $^1\text{H}$  (a,b)(500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CC4.**

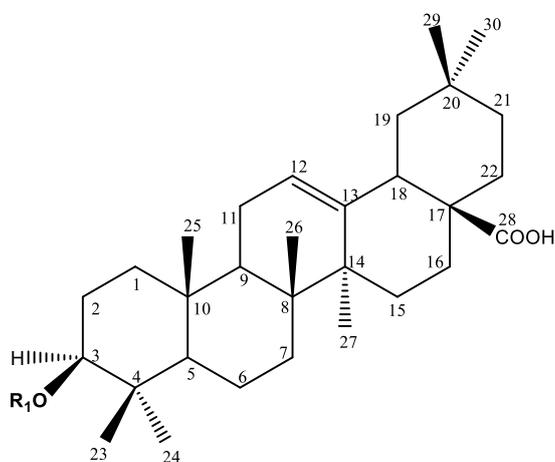
Par ailleurs, sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 57) de CC4, on observe les signaux de carbone oléfinique à  $\delta_{\text{C}}$  122,3 et 144,5. L'ensemble de toutes ces données suggèrent que l'aglycone du composé CC4 est triterpénique de type oléanane.



**Figure 57: Spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  élargi partie des carbones oléfiniques de l'aglycone (125 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CC4.**

Ainsi, l'analyse des spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC et HMBC de **CC4** a permis d'attribuer tous les signaux de l'aglycone, et par comparaison avec les données de la littérature, nous avons identifié celui-ci à l'acide oléanolique ( $3\beta$ -hydroxyolean-12-ène-28-oïque) (Noté *et al.*, 2016a).

L'observation des signaux de carbones résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  88,8 ppm (C-3 Agly) et à  $\delta_{\text{C}}$  180,0 ppm (C-28 Agly), montre que **CC4** est un dérivé de type monodesmoside de l'acide oléanolique ayant un oligosaccharide attaché en C-3 au moyen d'une liaison glycosidique ( Tapondjou *et al.*, 2005; Noté *et al.*, 2016a).



**Figure 58: dérivé de type 3 monodesmoside de l'acide oléanolique.**

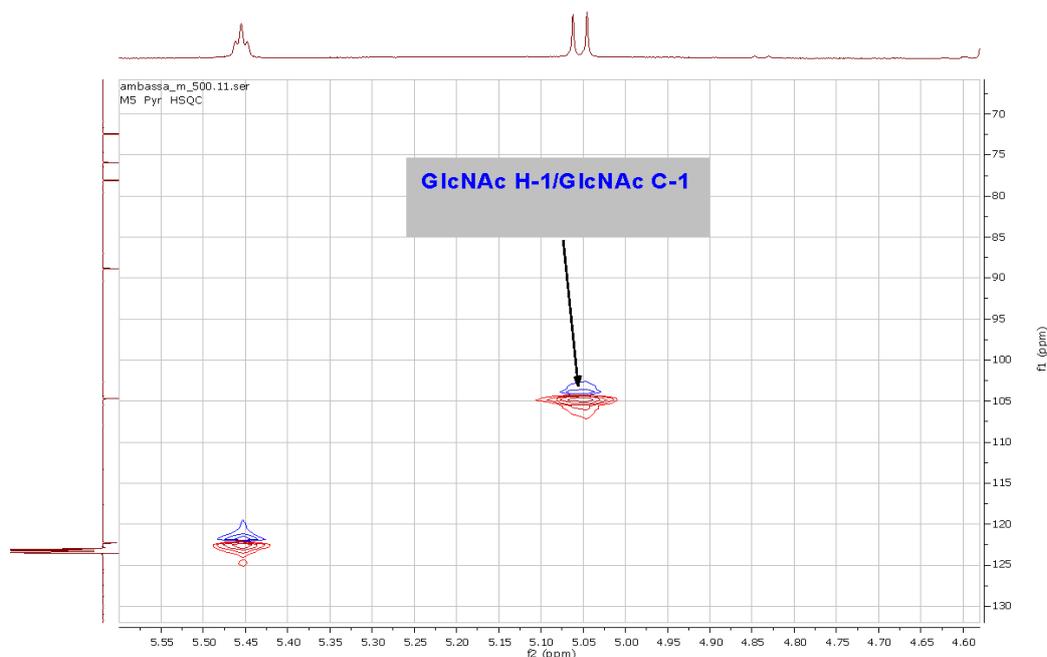
**Tableau IX: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) partie aglycone de CC4**

N° C	CC4				
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)	N° C	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)
1a	38,2	0,80	15a	28,0	1,05
1b		1,34	15b		2,12
2a	26,1	1,74	16	23,4	1,85; 1,95
2b		2,17	17	46,4	-
3	88,8	3,24 (dd, $J = 7,6$ )	18	41,7	3,27
4	39,0	-	19a	46,2	1,26
5	55,5	0,72	19b		1,80
6a	18,2	1,27	20	30,7	-
6b		1,47	21a	33,9	1,20
			21b		1,43
7a	32,9	1,27	22a	32,9	1,81
7b		1,44	22b		2,03
8	39,4	-	23	27,8	1,18 (s)
9	47,7	1,59	24	16,8	0,97 (s)
10	36,7	-	25	15,1	0,76 (s)
11a	23,4	1,86	26	17,2	0,97 (s)
11b		2,09	27	25,9	1,28 (s)
12	122,3	5,64	28	180,0	-
13	144,5	-	29	33,0	0,94 (s)
14	41,9	-	30	23,5	0,99 (s)

### Détermination du nombre et de la nature du sucre

La nature du sucre a été déterminée par hydrolyse acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de son dérivé triméthylsilylé et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire. Ainsi, le D-GlcNAc a été identifié.

L'analyse du spectre de RMN <sup>1</sup>H de CC4 permet de distinguer un signal de proton anomérique résonnant à 5,05 (d,  $J = 8,2$  Hz), qui corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  105,2 mettant ainsi en évidence la présence d'un seul sucre.



**Figure 59:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) montrant le signal de l'anomère du composé CC4.

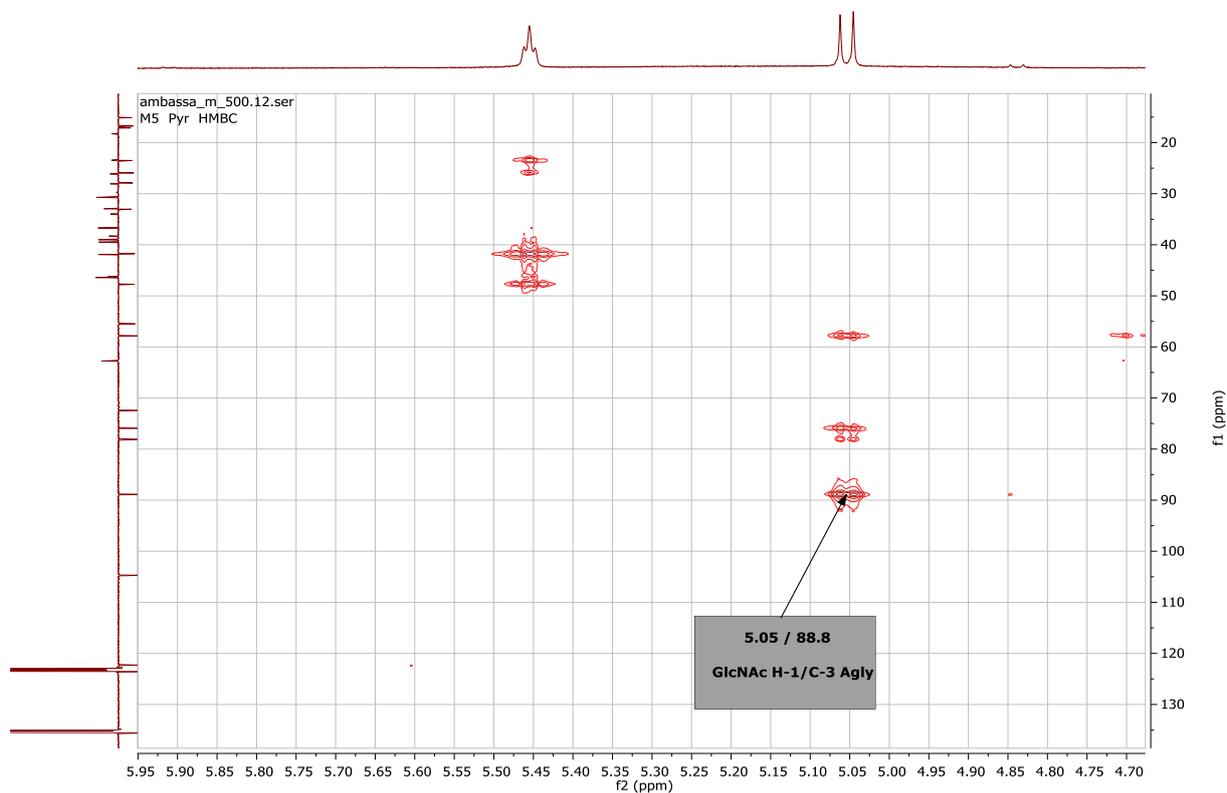
Tous les protons du sucre ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY (**Tableau X**). Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées sur le spectre HSQC et confirmé par le spectre HMBC.

En définitive, nous avons identifié :

1 groupement  $\beta$ -D-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle à  $\delta_H$  4,29 (d,  $J = 8,2$  Hz)

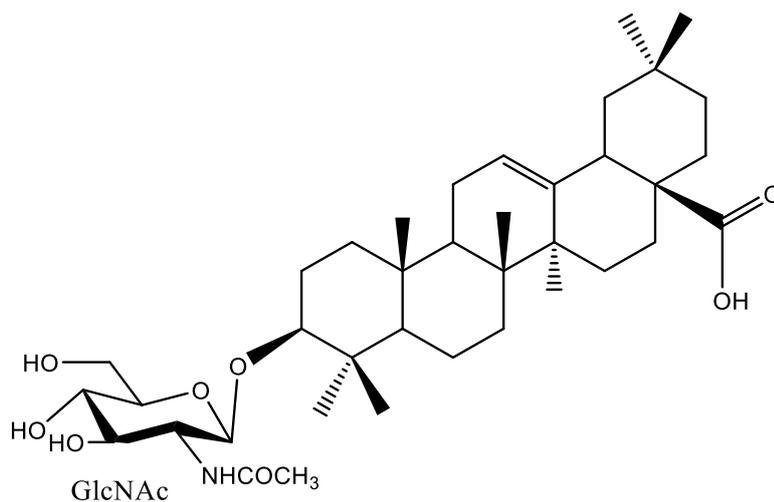
#### Détermination du site de fixation du sucre

La position du GlcNAc sur l'aglycone a été établie grâce au spectre HMBC (**Figure 60**). La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  5,05 (H-1 GlcNHAc) et le signal  $\delta_C$  88,8 (C-3 de l'aglycone) confirme que GlcNHAc est lié à la génine en position 3.



**Figure 60:** Spectre HMBC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CC4 montrant le point de liaison du sucre.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé CC4 est élucidée comme l'acide oléanolique 3-*O*-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside, composé connu, isolée pour la première fois des fruits (pulpes) de *Tetrapleura tetraptera* (Adesina & Reisch, 1985)



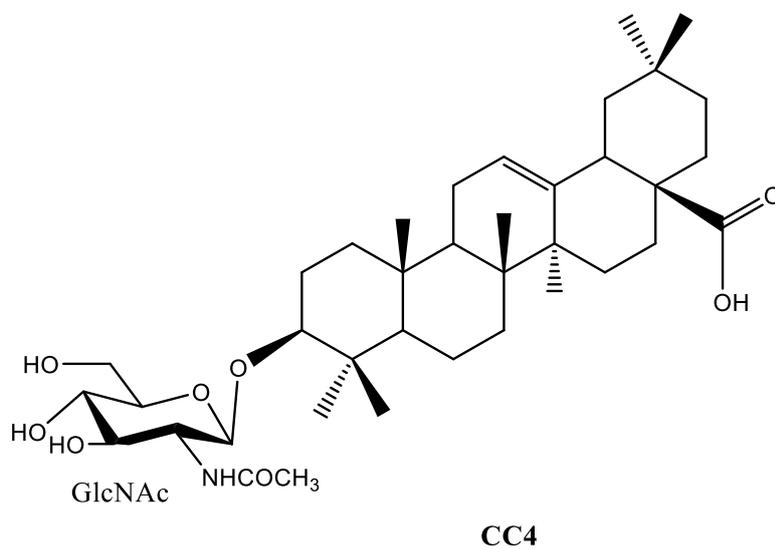
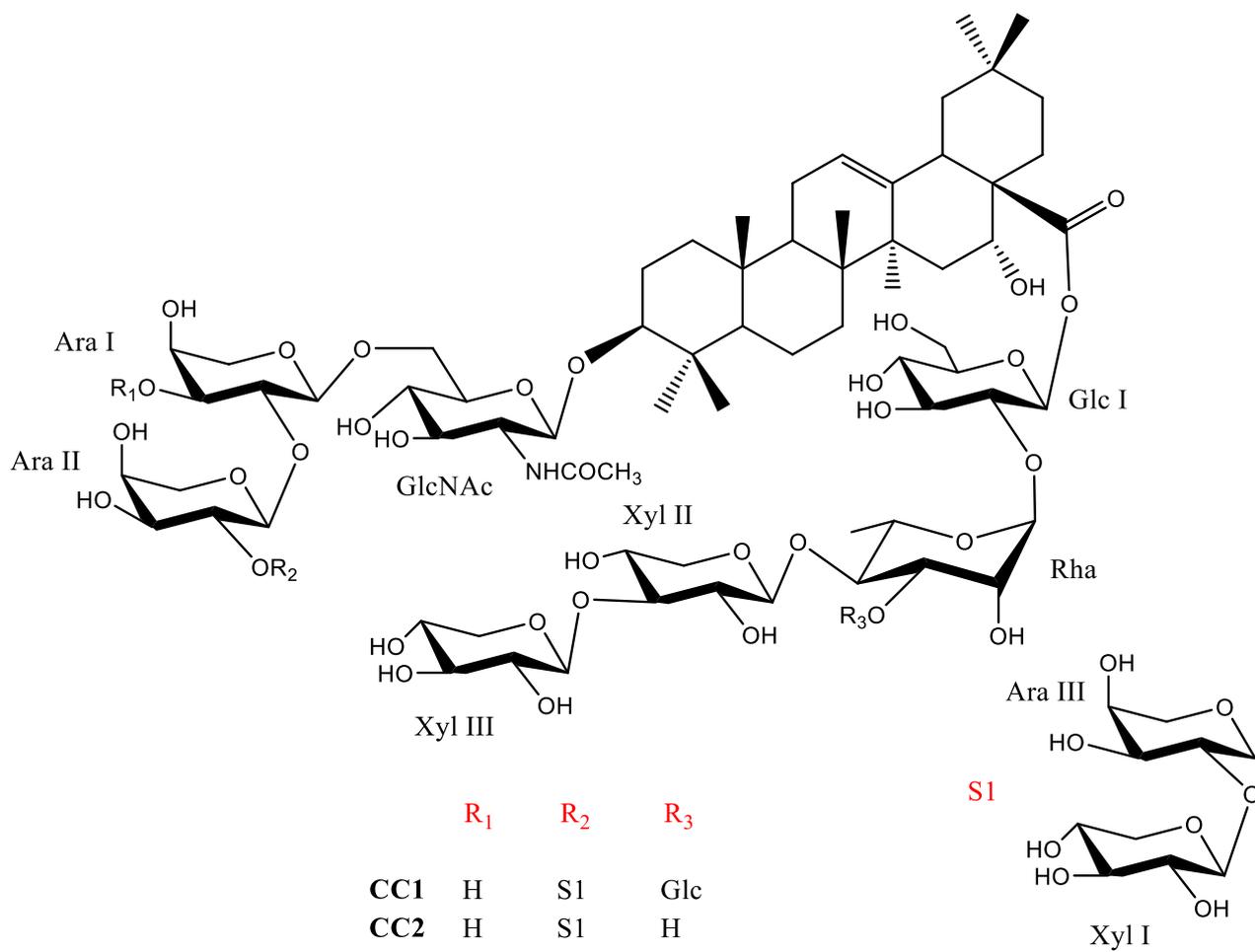
**Figure 61:** Structure du composé CC4

**Tableau X: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie osidique de CC4**

Pos.	CC4	
	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>Sucre en C-3</b>		
GlcNHAc		
1	105,2 (CH)	5,05 (d, 7,3)
2	57,8 (CH)	4,53
3	75,9 (CH)	4,39
4	72,5 (CH)	4,17
5	78,2 (CH)	3,95
6	62,7 (CH <sub>2</sub> )	4,35; 4,56
NHCOCH <sub>3</sub>	23,5 (CH <sub>3</sub> )	2,14

### 2.1.1.3. Conclusion partielle 1

Quatre saponosides ont été isolées de *Calliandra calothyrsus* dont deux (02) des fleurs et deux (02) des branches. Parmi les quatre composés, trois sont des dérivés bidesmosidiques (C-3 et C-28) de l'acide echinocystique et un est un dérivé monodesmosidique de l'acide oléanolique. Leurs structures ont été établies par une analyse détaillée de leurs données spectrales principalement les expériences de RMN 2D à 500 MHz (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC), et la spectrométrie de masse (electrospray). Les dérivés de l'acide echinocystique possèdent en leur sein 9 et 10 sucres. La chaîne tétrasaccharidique en C-3 est identique pour les composés **CC1** et **CC2**. En ce qui concerne la chaîne osidique en C-28, elle est identique pour les composés **CC3** et **CC2**. Cependant, d'un point de vue chimiotaxonomique, nos résultats représentent une contribution précieuse à la connaissance de la chimie des plantes du genre *Calliandra* de la sous famille des Mimosaceae, dont certaines espèces ont révélé la présence de saponosides de type oléanane. Ces saponosides présentent le N-acétylglucosamine directement attachée en C-3 de l'aglycone ainsi que la séquence de sucres Ara-<sup>2</sup>Ara-<sup>6</sup>GlcNAc-<sup>3</sup>Aglycone. Ces caractéristiques sont fréquentes dans les saponosides isolées du genre *Calliandra* (Takeda *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1994; Tani *et al.*, 1996, 1998; Silva *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2008; Silva & Parente, 2013). En comparant nos saponosides à celles précédemment isolées du genre *Calliandra*, il apparaît qu'elles partagent la même séquence d'oligosaccharides C-3 mais avec respectivement un et deux sucres supplémentaires. Tout ceci pourrait donc être une spécificité des saponosides de l'espèce *Calliandra calothyrsus*.



### 2.1.2. *Albizia chevalieri*

L'étude phytochimique des écorces d'*Albizia chevalieri* harms nous a permis d'isoler trois dérivés nouveaux de saponosides triterpéniques. L'élucidation structurale des composés a été réalisée grâce à une analyse approfondie des spectres de RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et de RMN 2D (COSY, NOESY, HSQC, HSQC-TOCSY et HMBC), couplée à la spectrométrie de masse.

#### 2.1.2.1. Extraction et isolement des composés de *Albizia chevalieri*

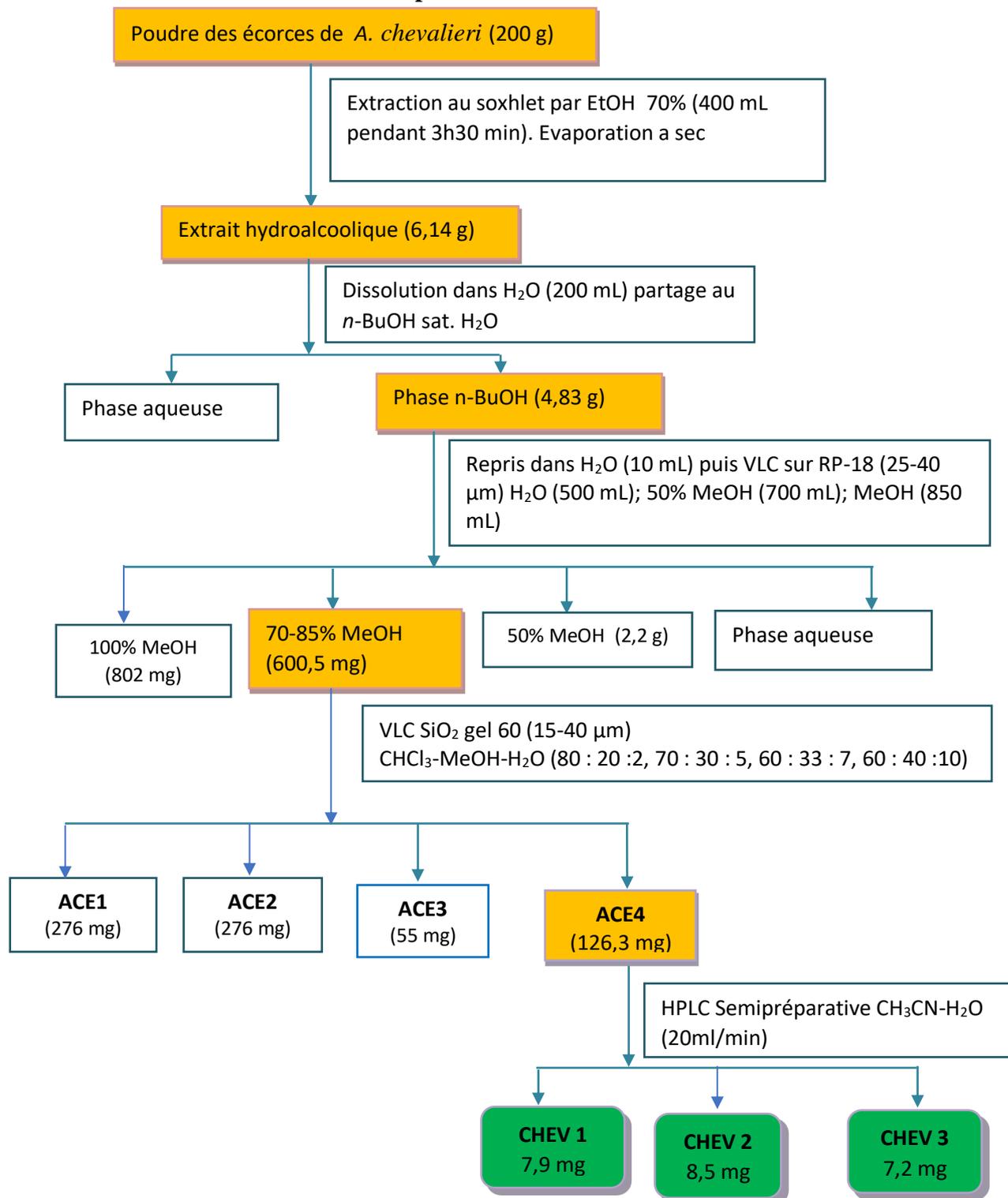


Figure 62: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des écorces de *A. chevalieri*

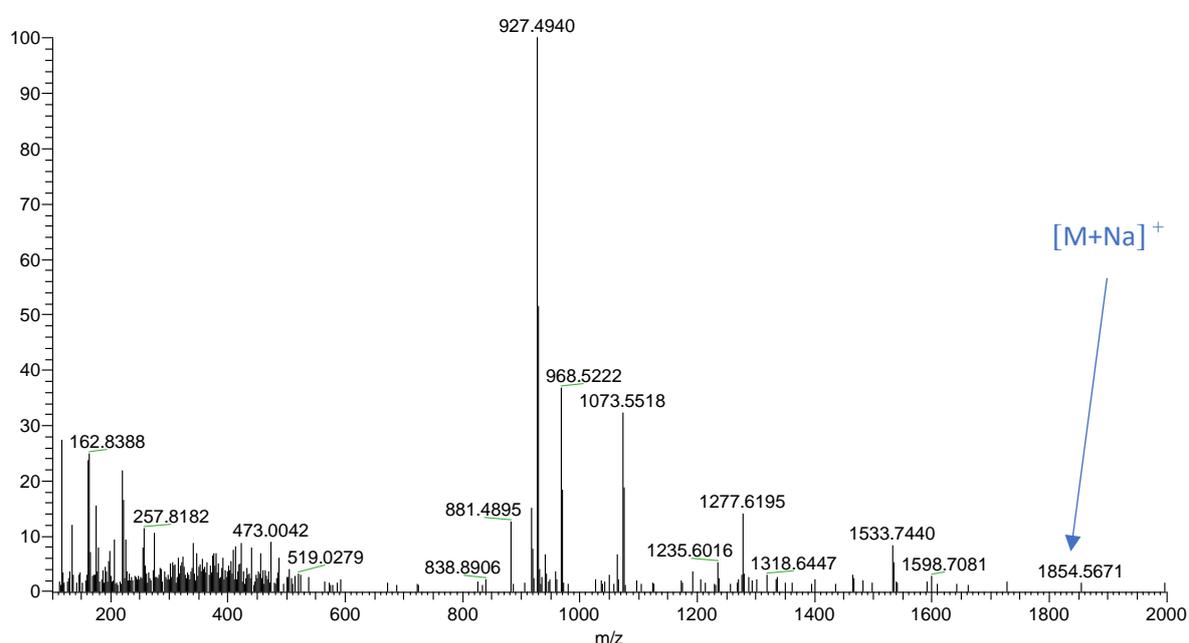
### 2.1.2.2. Caractérisation des composés

La détermination des structures des composés isolés a été réalisée par une analyse approfondie des expériences de RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse, l'hydrolyse acide ainsi que par comparaison de nos données avec celles de la littérature.

#### a) Détermination de la structure de Chevalieroside A (CHEV1)

##### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **CHEV1** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre sur son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1854,5671  $[M + Na]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{86}H_{129}NO_{41}$ .



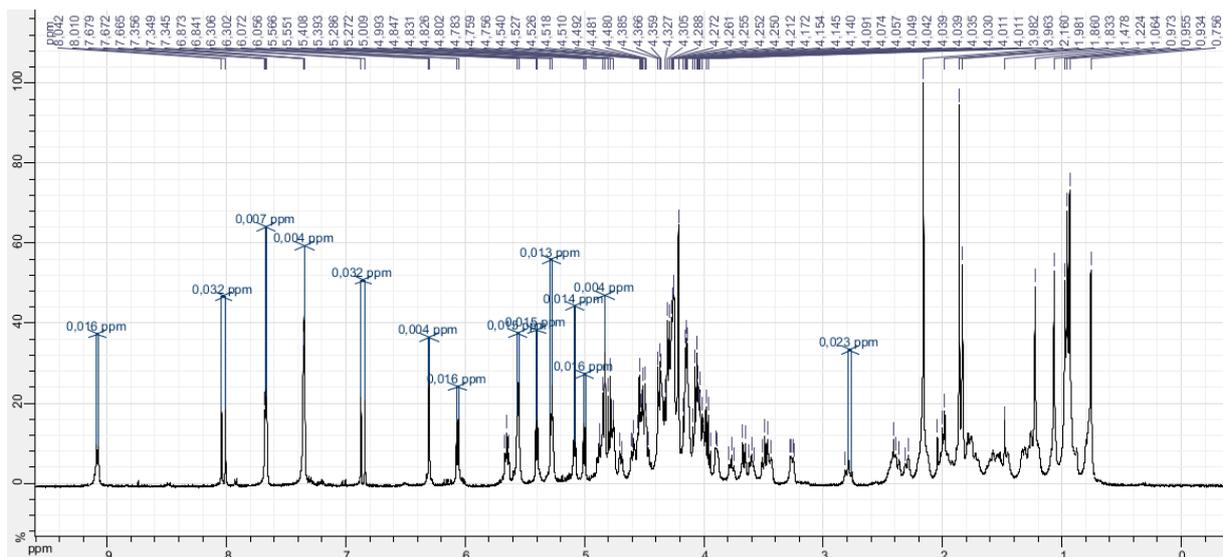
*Figure 63: Spectre de masse du composé CHEV1*

##### ➤ Spectroscopie de RMN

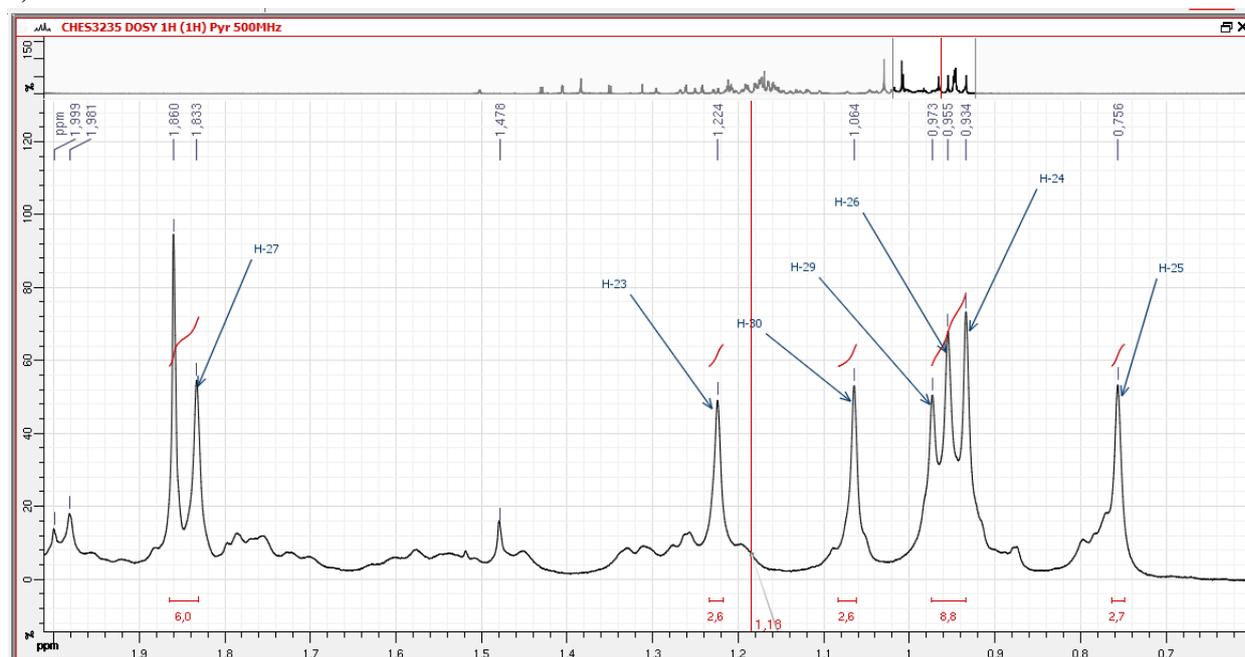
###### Identification de l'aglycone

Tous les signaux des carbones et des protons sont déterminés et attribués par l'analyse des spectres COSY, ROESY, HSQC et HMBC.

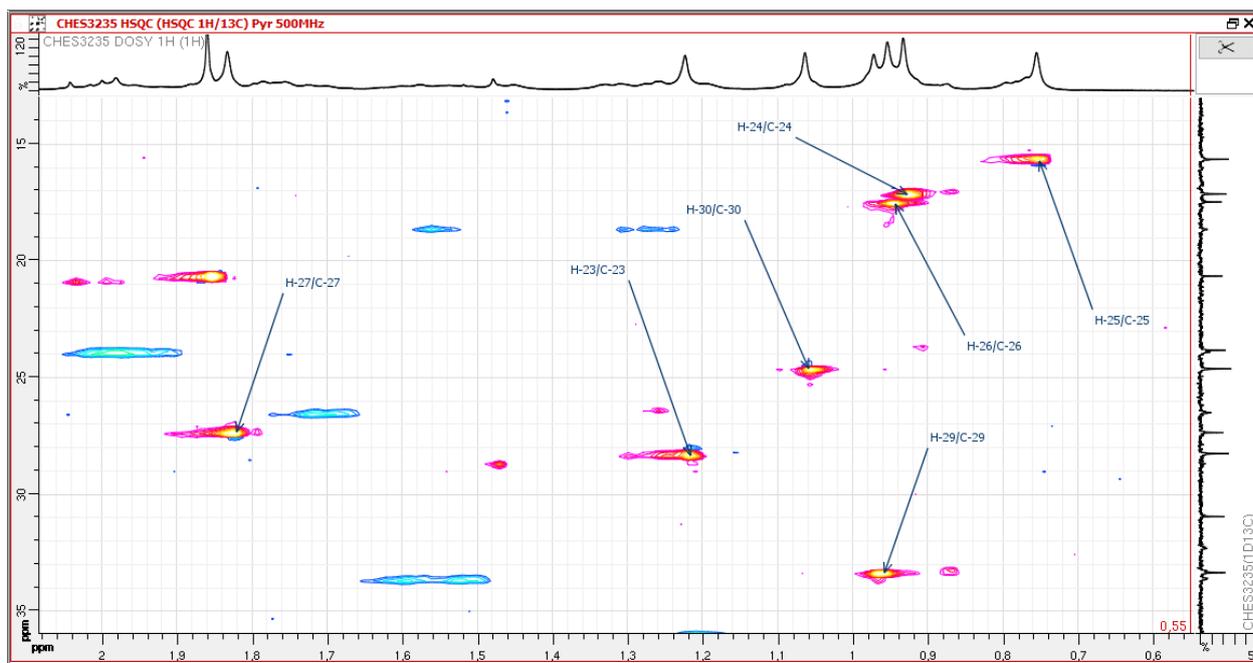
Le spectre de RMN  $^1H$  montre sept signaux de méthyles angulaires à  $\delta_H$  0,75 (s, H-25) ; 0,97 (s, H-29) ; 1,06 (s, H-30) ; 0,93 (s, H-24) ; 0,95 (s, H-26) ; 1,22 (s, H-23) et 1,83 (s, H-27) (3H chacun, s), qui corrélient sur le spectre HSQC avec les carbones à  $\delta_C$  15,6 ; 33,5 ; 24,6 ; 17,1 ; 17,4 ; 28,2 et 27,2 respectivement.



a)



b)

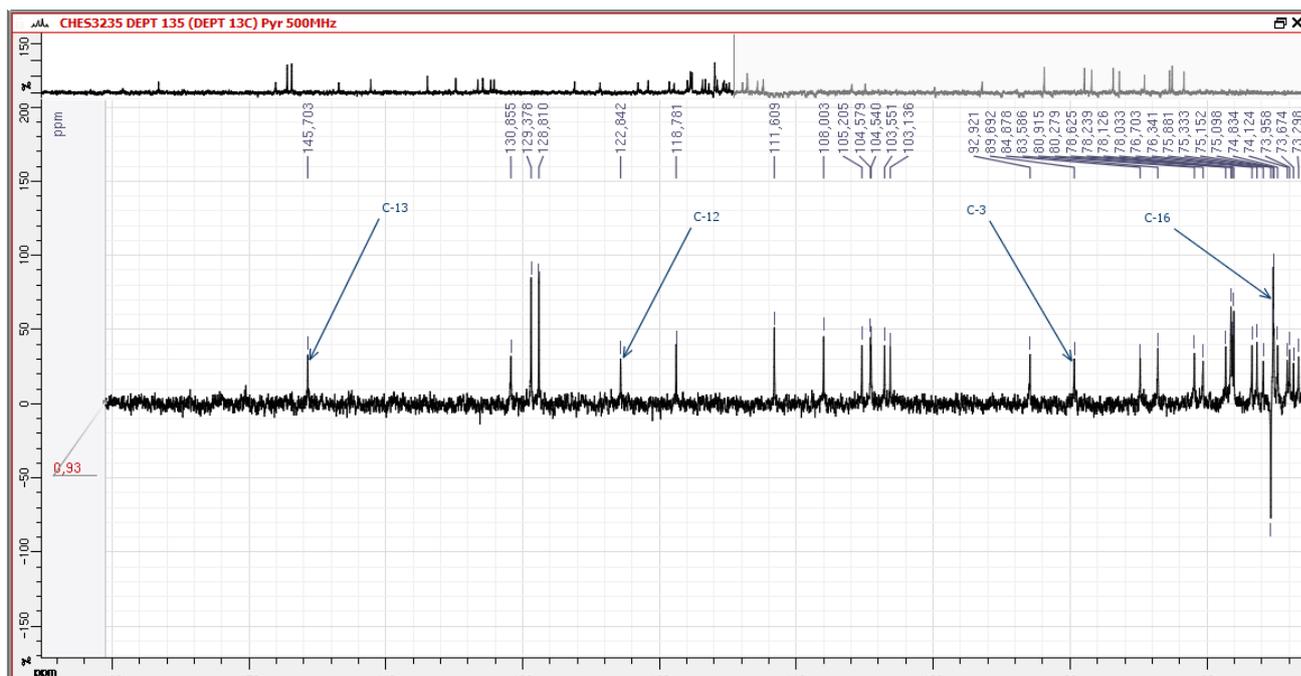


c)

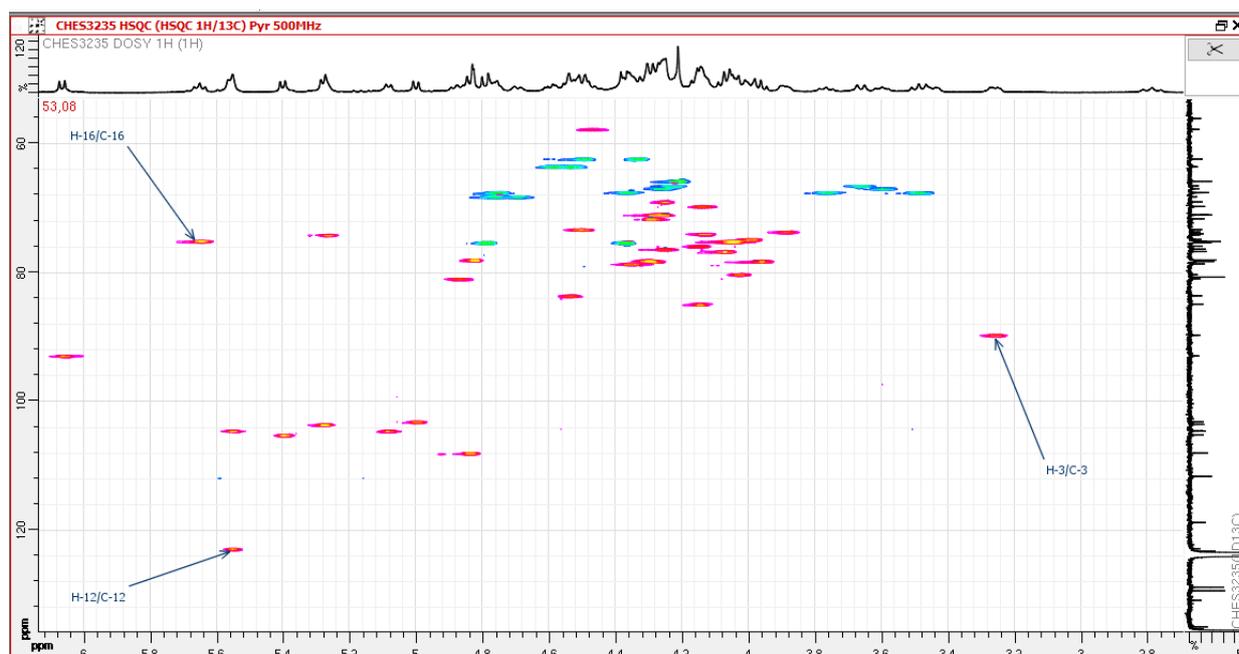
**Figure 64: Spectres de RMN  $^1\text{H}$  (a,b) et HSQC (c) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CHEV1 montrant les méthyles angulaires.**

On observe également sur son spectre de RMN  $^1\text{H}$  un signal à  $\delta_H$  5,55 correspondant au proton oléfinique H-12, un signal de proton méthinique à  $\delta_H$  3,26 correspondant à H-3 de l'aglycone et un signal de proton d'alcool secondaire à 5,65 correspondant au proton 16 de notre aglycone.

Sur son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  enregistré en JMOD, on observe deux signaux de carbones éthyléniques à  $\delta_C$  122,8 et 144,5 ppm correspondant aux carbones de la double liaison  $\Delta^{12}$ , un signal de carbone méthinique à  $\delta_C$  89,6 ppm correspondant au carbone 3 de l'aglycone et un signal de carbone d'alcool secondaire à  $\delta_C$  75,3 ppm correspondant au carbone 16. Dans les champs faibles, on observe un signal à  $\delta_C$  176,0 ppm correspondant au carbone 28 de notre aglycone.



a)

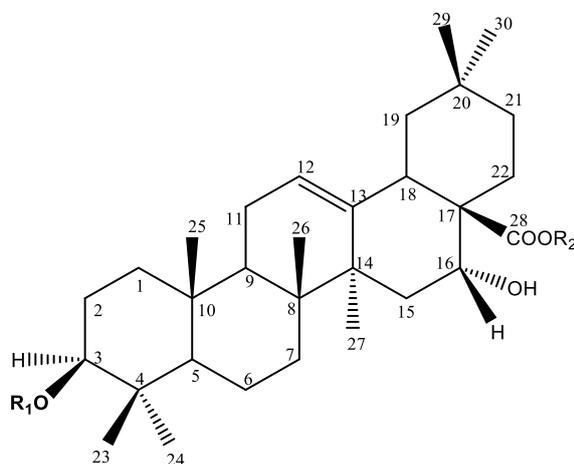


b)

**Figure 65: Spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  (a) (125 MHz, pyridine- $d_5$ ) et HSQC (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CHEV1.**

Ainsi, l'analyse des spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC et HMBC de **CHEV1** a permis d'attribuer tous les signaux de l'aglycone, et par comparaison avec les données de la littérature, nous avons identifié celui-ci à l'acide echinocystique ( $3\beta$ ,  $16\alpha$ -dihydroxyolean-12-ène-28-oïque) (Tapondjou *et al.*, 2005; Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014)

L'observation des signaux de carbone resonnant à  $\delta_C$  89,6 ppm (C-3) et  $\delta_C$  176,0 ppm (C-28) montre que **CHEV1** est un dérivé 3, 28-bidesmoside de l'acide echinocystique ayant des chaines oligosaccharidiques attachées respectivement en C-3 et C-28 au moyen des liaisons éther et ester ( Tapondjou *et al.*, 2005; Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014) (**Tableau XI**).



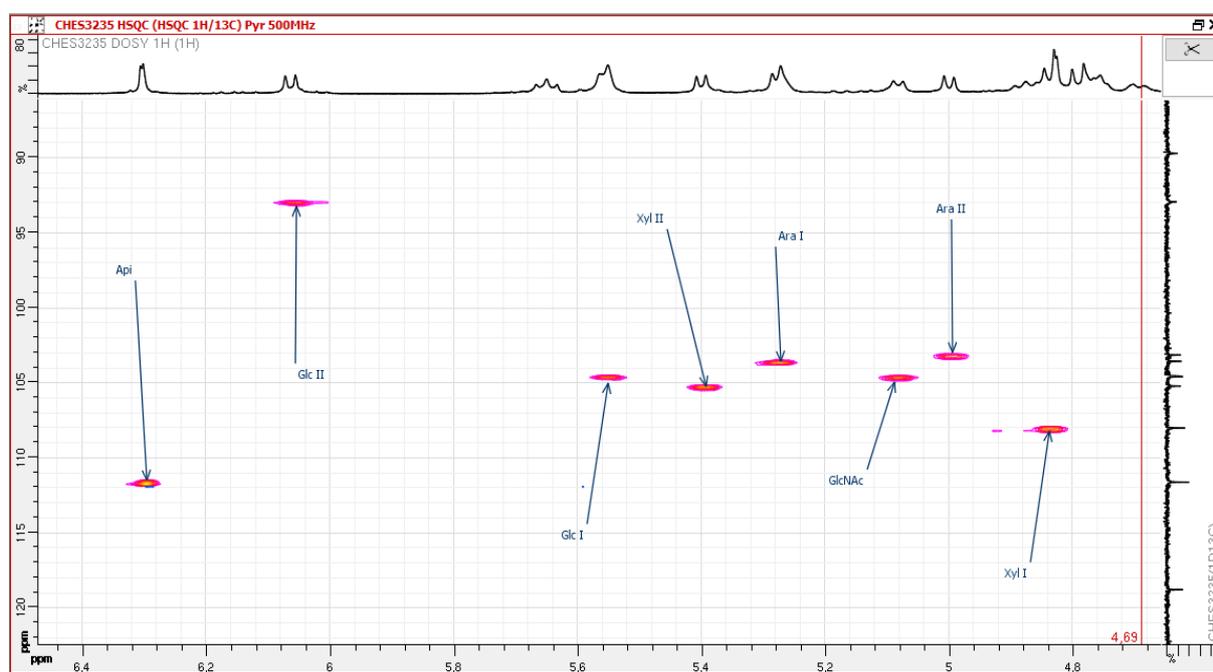
**Tableau XI: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie aglycone de CHEV1**

N° C	CHEV1				
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)	N° C	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)
1a	38,7	0,92	15a	36,4	1,76
1b		1,45	15b		2,36
2a	26,4	1,70	16	75,3	5,65
2b		2,13	17	49,1	-
3	89,6	3,26	18	41,2	3,44
4	39,3	-	19a	47,1	1,32
5	56,0	0,78	19b		2,79
6a	18,6	1,27	20	30,9	-
6b		1,57	21a	35,9	1,20
			21b		2,42
7a	33,6	1,52	22a	32,3	2,17
7b		1,58	22b		2,29
8	40,1	-	23	28,2	1,22 (s)
9	47,2	1,76	24	17,1	0,93 (s)
10	37,0	-	25	15,6	0,75 (s)
11a	23,8	1,93	26	17,4	0,95 (s)
11b		2,00	27	27,2	1,83 (s)
12	122,8	5,55	28	176,0	-
13	144,5	-	29	33,3	0,97 (s)
14	42,0	-	30	24,6	1,06 (s)

## Détermination du nombre et de la nature des sucres

Les sucres de **CHEV1**, ont été déterminés comme étant les monosaccharides suivants : D-Glc, D-GlcNAC, D-Xyl, D-Api et L-Ara par hydrolise acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse des leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire.

L'analyse du spectre HSQC de **CHEV1** permet de distinguer 8 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_H$  5,08 (d,  $J = 7,3$  Hz) ; 5,28 (d,  $J = 6,6$  Hz) ; 4,83 (d,  $J = 2,2$  Hz) ; 5,55 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; 6,06 (d,  $J = 8,2$  Hz) ; 5,00 (d,  $J = 8,0$  Hz) ; 5,40 (d,  $J = 7,6$  Hz) et 6,30 (d,  $J = 2,2$  Hz), corrélant avec les signaux de 8 carbones à  $\delta_C$  104,5 ; 103,5 ; 108,0 ; 104,5 ; 92,9 ; 103,1 ; 105,2 et 111,6 respectivement, ce qui prouve la présence de huit sucres.



**Figure 66:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé **CHEV1**.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et OESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées sur le spectre HSQC et confirmé par le spectre HMBC. Le proton anomérique à  $\delta_H$  5,08 a été attribué à une unité de D-GlcNac dont les signaux caractéristiques ont été observés à  $\delta_H$  9,08 et à  $\delta_H$  2,16. Cela a été confirmé par la corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal à  $\delta_H$  4,47 et le carbonyle à  $\delta_C$  170,2 (NHCOCH<sub>3</sub>).

Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés : Glc, GlcNac, Ara et Xyl sont sous leur forme pyranosyle tandis que le sucre Api est sous sa conformation furanosyle (**Tableau XIII**).

La configuration  $\beta$  a été attribuée au proton anomérique de Glc, GlcNAc et  $\alpha$  à Ara sur la base de leurs constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-3}$  comprises entre 6,6-8,2 Hz. La configuration  $\alpha$  attribuée aux protons anomériques de Xyl I a été mise en évidence par sa valeur de constante de couplage  $^3J_{H-1, H-2}$  à 2,2 Hz, tandis que la configuration  $\beta$  de Xyl et Api a été déterminé par leurs constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-2}$  à 7,6 et 2,2 Hz respectivement (Noté *et al.*, 2015b).

L'ensemble de toutes ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ - D-glucopyranosyl à  $\delta_H$  5,08 (d,  $J = 7,3$  Hz) ;
- 2 groupements  $\alpha$  - L-arabinopyranosyles Ara I-1 à  $\delta_H$  5,28 (d,  $J = 6,6$  Hz) ; Ara II-1 à  $\delta_H$  5,00 (d,  $J = 8,0$  Hz) ;
- 1 groupement  $\alpha$  - D-xylopyranosyle Xyl I-1 à  $\delta_H$  4,83 (d,  $J = 2,2$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ - D-xyl II-1 à  $\delta_H$  5,40 (d,  $J = 7,6$  Hz) ;
- 2 groupements  $\beta$ - D-glucopyranosyles Glc I-1 à  $\delta_H$  5,55 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; Glc II-1 à  $\delta_H$  6,06 (d,  $J = 8,2$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ - D-apiofuranosyle Api -1 à  $\delta_H$  6,30 (d,  $J = 2,2$  Hz).

### Identification de l'acide

Le spectre de RMN  $^1H$  du composé **CHEV1** présente deux signaux de protons d'un groupement trans-oléfinique à  $\delta_H$  6,85 (d,  $J = 16,2$  Hz) et  $\delta_H$  8,02 (d,  $J = 16,2$  Hz), et cinq signaux de protons aromatiques d'un groupe benzène monosubstitué par une partie cinnamoyle. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées sur le spectre HSQC et confirmé par le spectre HMBC (**Tableau XII**).

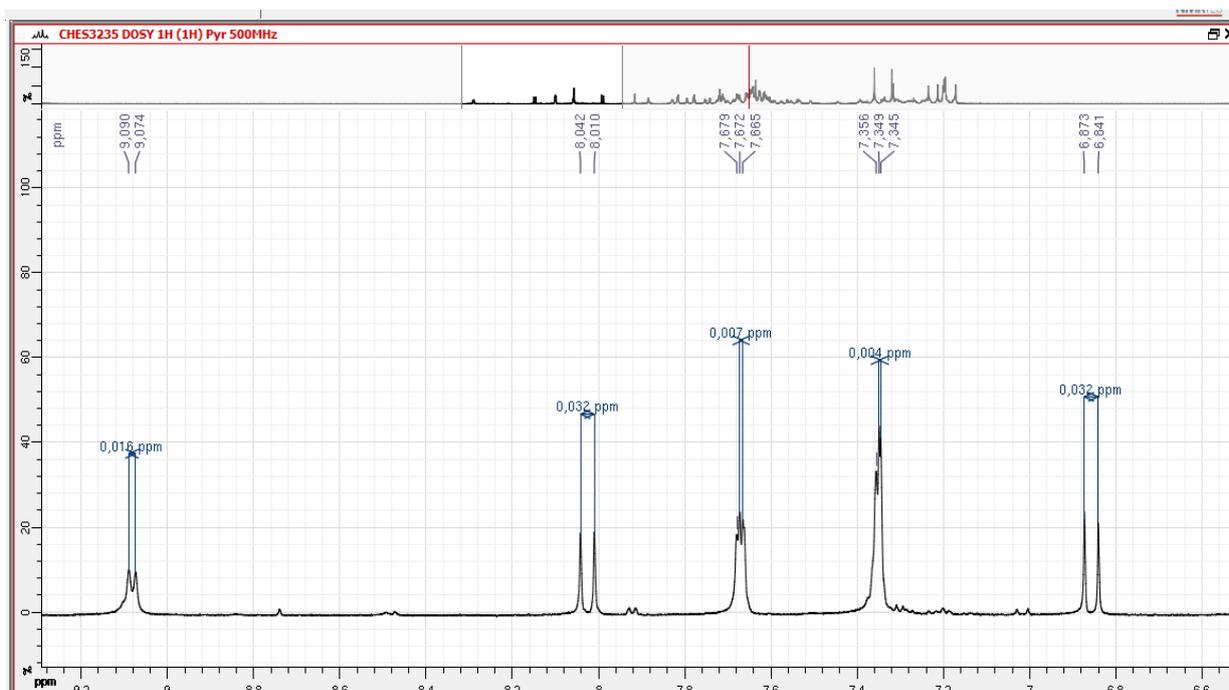


Figure 67 : Spectre de RMN  $^1H$  du composé **CHEV1** (partie de cinnamoyle).

**Tableau XII: Valeurs des déplacements chimiques ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de l'unité cinnamoyle de CHEV 1 (pyridine- $d_5$ )**

Cinnamoyle (Cynn)	$\delta_C$	$\delta_H$
Cinn		
1	170,8	-
2	118,7	6,85 (d, 16,2)
3	145,5	8,02 (d, 16,2)
4	134,9	-
5	130,8	7,34 (brd, 2,0)
6	129,3	7,35 (brd, 2,0)
7	128,8	7,67 (brd, 3,5)
8	129,3	7,35 (brd, 2,0)
9	130,8	7,34 (brd, 2,0)

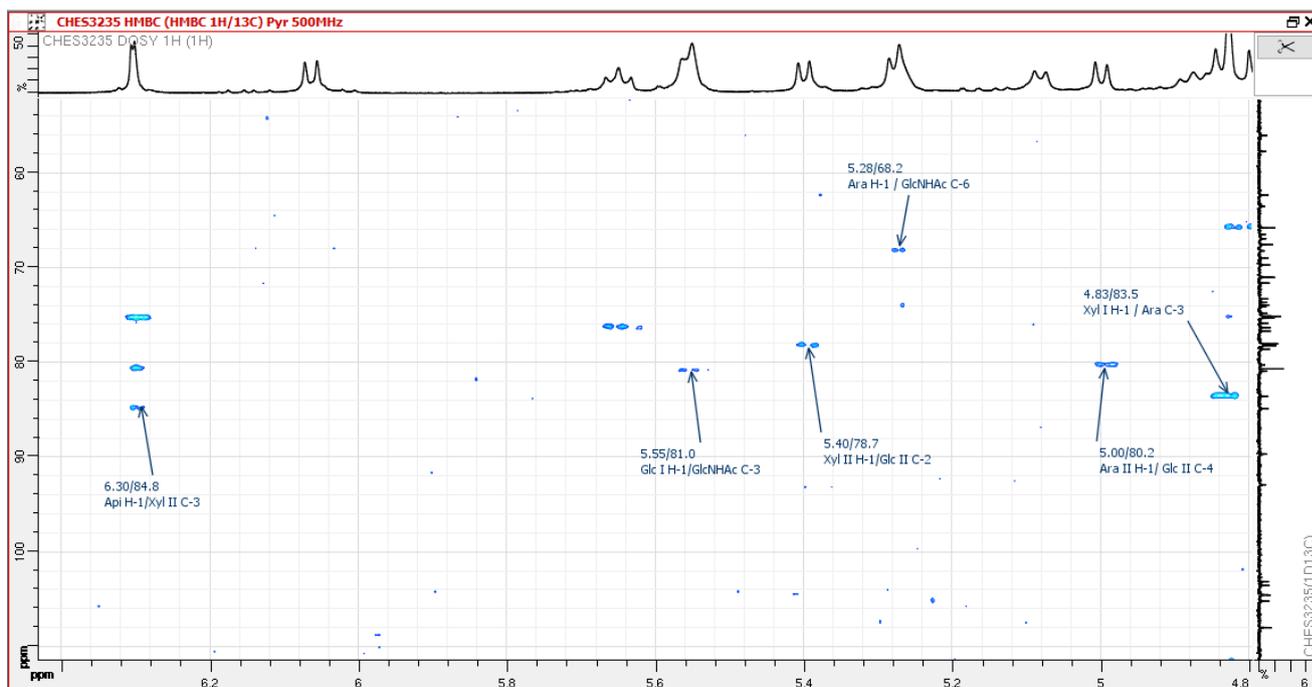
### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

L'analyse des spectres HMBC et ROESY a permis de déterminer les points de jonction des chaînes osidiques sur l'aglycone ainsi que les liaisons interglycosiques.

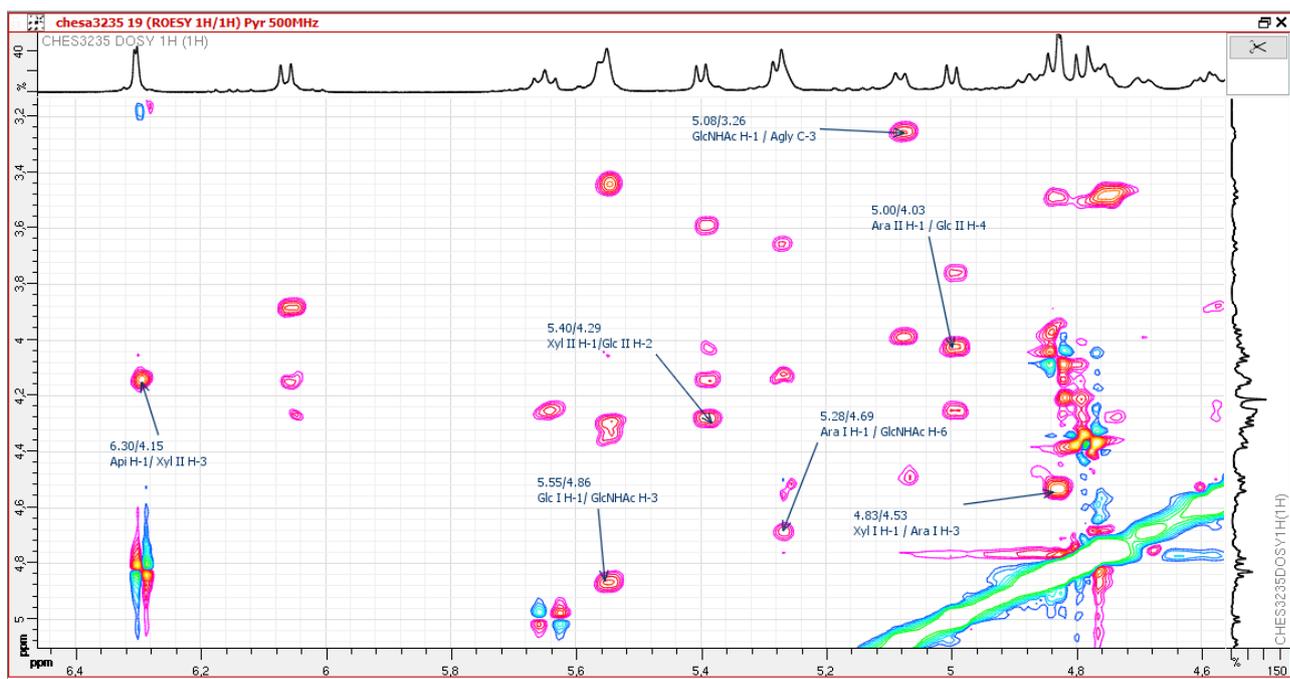
#### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  5,08 (H-1 GlcNHAc) et le signal  $\delta_C$  89,6 ppm (C-3 de l'aglycone) suggère que GlcNHAc est lié à la génine en position 3 ; cette liaison est confirmée par la corrélation observée dans le spectre ROESY entre les signaux  $\delta_H$  5,08 (H-1 GlcNHAc) et  $\delta_H$  3,26 (H-3 de l'aglycone).

L'enchaînement des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  5,55 /  $\delta_C$  81,0 (Glc I H-1 / GlcNHAc C-3) ; 5,28 / 68,2 (Ara I H-1 / GlcNHAc C-6) ; 4,83 / 83,5 (Xyl I H-1 / Ara I C-3) et confirmé par les corrélations ROESY à  $\delta_H$  5,55 /  $\delta_H$  4,86 (Glc I H-1 / GlcNHAc H-3) ; 5,28 / 4,69 (Ara I H-1 / GlcNHAc H-6) ; 4,83 / 4,53 (Xyl I H-1 / Ara I H-3).



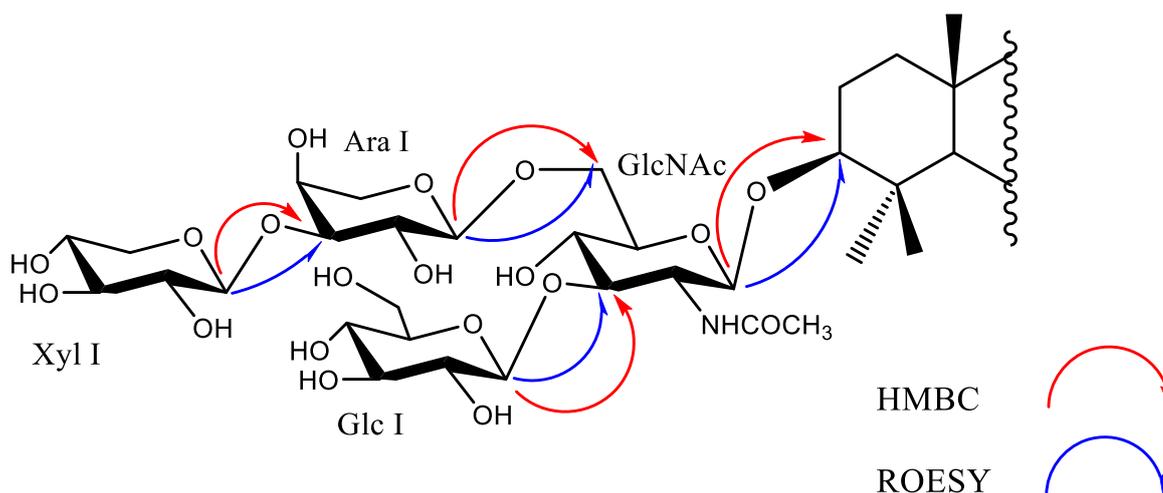
a)



b)

**Figure 68: Spectres HMBC(a) et ROESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CHEV1 montrant les points de liaison des sucres.**

La séquence complète des sucres,  $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle a été liée en position C-3 de l'aglycone.



**Figure 69:** Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CHEV1.

### Chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone

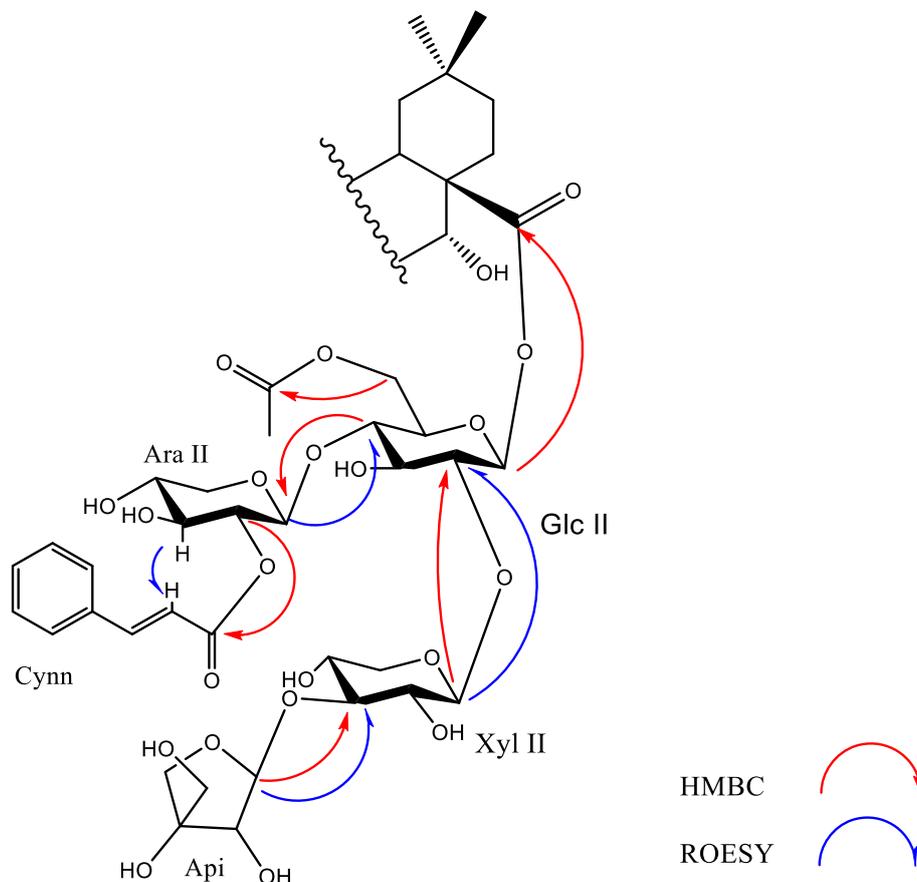
Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de CHEV1 révèlent le blindage d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  176,0 ppm (C-28) dû à une liaison carboxylique glycosidique. La séquence de l'oligosaccharide est établie grâce aux spectres HMBC (**Figure 68a**) et ROESY (**Figure 68b**). La corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal  $\delta_{\text{H}}$  6,06 (H-1 Glc II) et le signal  $\delta_{\text{C}}$  176,0 ppm (C-28 de l'aglycone) suggère que Glc II est lié à la génine en position 28.

Le reste de la chaîne des sucres est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_{\text{H}}$  5,40 /  $\delta_{\text{C}}$  78,7 (Xyl II H-1 / Glc II C-2) ; 6,30 / 84,8 (Ara I H-1 / Xyl II C-3) ; 5,00 / 87,4 (Ara II H-1 / Glc II C-4) et confirmé par les corrélations ROESY à  $\delta_{\text{H}}$  5,40 /  $\delta_{\text{H}}$  4,29 (Xyl II H-1 / Glc II H-2) ; 6,30 / 4,15 (Ara I H-1 / Xyl II H-4) ; 5,00 / 4,03 (Ara II H-1 / Glc II H-4). En plus, la localisation du groupe acétyle en C-6 de Glc II a également été mise en évidence par l'observation des signaux de C-6 de Glc II à  $\delta_{\text{C}}$  63,5 (déblindé, +1,2 ppm) et de C-5 de Glc II à  $\delta_{\text{C}}$  73,9 (blindé, -4,9 ppm) en comparaison avec Glc I ( $\delta_{\text{C}}$  78,4).

### Site de fixation du groupement cinnamoyle

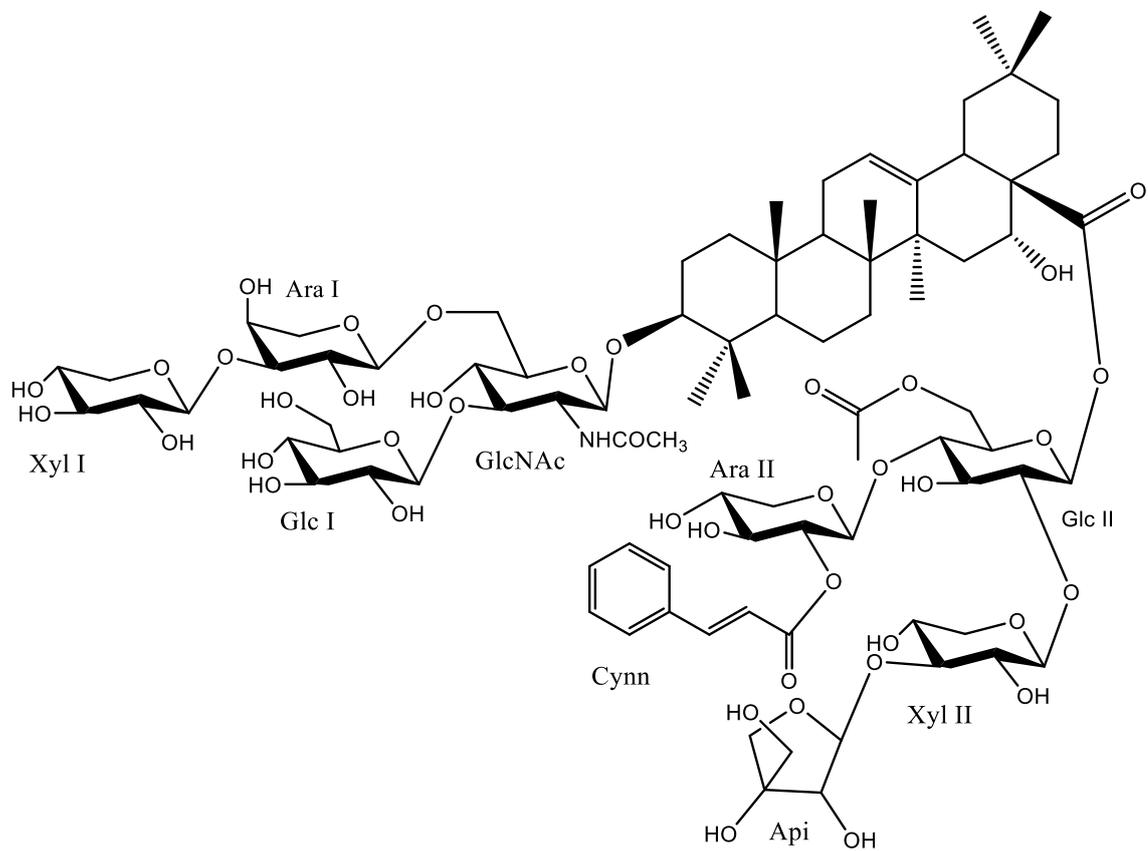
L'observation du signal de H-2 d'Ara II à  $\delta_{\text{H}}$  5,65 (déblindé, +1,15 ppm) et de C-2 de Ara II à  $\delta_{\text{C}}$  75,2 (blindé, -1,8 ppm) par rapport à Ara I ( $\delta_{\text{H}}$  4,51 et  $\delta_{\text{C}}$  73,3) indiquent que le C-2 de Ara II est estérifié. En conséquence, le groupement cinnamoyle a été placé en C-2 d'Ara II. Cela a été soutenu par les corrélations HMBC, observées entre  $\delta_{\text{H}}$  5,65 /  $\delta_{\text{C}}$  166,2 (Ara II H-2 / groupe carbonyle du trans-cinnamoyle) et confirmé par le ROESY entre H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4,13) d'Ara II et le proton oléfinique ( $\delta_{\text{H}}$  8,02) du trans-cinnamoyle.

Ainsi, le tetrasaccharide lié en C-28 de l'aglycone a été déterminé comme étant le  $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[(2-O-cinnamoyl)- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]-(6-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyle.



**Figure 70:** Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CHEV1.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **CHEV1** est élucidée comme étant le 3-O- $\beta$ -{ $\alpha$ -D xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-2 (acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl}-acide echinocystique 28-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{2-O-cinnamoyl- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}-(6-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester, nouveau composé naturel auquel nous avons donné le nom de **Chevalieroside A** (Noté *et al.*, 2017).



*Figure 71: Structure du composé CHEVI*

**Tableau XIII: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie osidique de CHEV1**

Position	CHEV1				
	$\delta_C$	$\delta_H$	Position	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>Sucres en C-3</b>			<b>Sucres en C-28</b>		
GlcNHAc			Glc-II		
1	104,5	5,08 (d, 7,3)	1	92,9	6,06 (d, 8,2)
2	57,7	4,47	2	78,7	4,29
3	81,0	4,86	3	76,0	4,14
4	73,4	4,50	4	80,2	4,03
5	75,0	4,00	5	73,9	3,89
6	68,2	4,69; 4,78	6	63,5	4,51; 4,60
NHCOCH <sub>3</sub>	23,8	2,16	Ara-II		
Ara-I			1	103,1	5,00 (d, 8,0)
1	103,5	5,28 (d, 6,6)	2	75,2	5,65
2	73,3	4,51	3	74,0	4,13
3	83,5	4,53	4	68,9	4,26
4	69,7	4,14	5	67,5	3,76; 4,37
5	66,5	3,65; 4,22	Xyl-II		
Xyl-I			1	105,2	5,40 (d, 7,6)
1	108,0	4,83 (d, 2,2)	2	75,3	4,04
2	75,2	4,05	3	84,8	4,15
3	78,3	3,97	4	71,1	4,27
4	71,1	4,27	5	66,9	3,65; 4,26
5	67,5	3,49; 4,36	Api		
Glc-I			1	111,6	6,30 (d, 2,2)
1	104,5	5,55 (d, 7,6)	2	78,1	4,82
2	75,2	4,05	3	80,6	-
3	78,2	4,30	4	75,3	4,37; 4,79
4	71,1	4,28	5	65,8	4,21; 4,25
5	78,4	3,95			
6	62,3	4,34; 4,49			

## b) Détermination de la structure de Chevalierisoside B (CHEV2)

### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **CHEV2** obtenu également comme une poudre amorphe de couleur blanche, montre dans son spectre de masse obtenu par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1885,81155  $[M+NH_4]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{87}H_{137}NO_{42}$ .

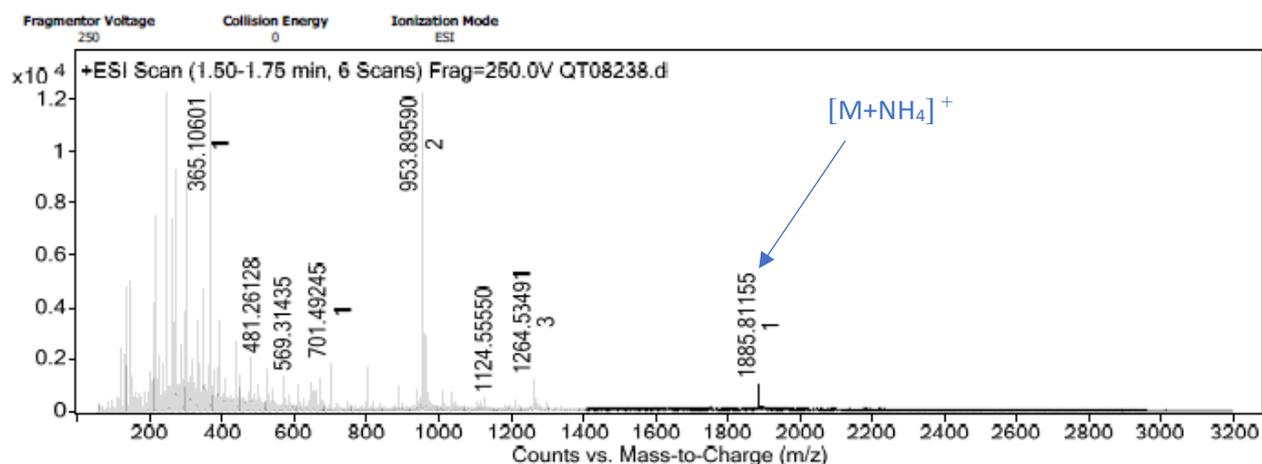


Figure 72: Spectre de masse du composé CHEV2

### ➤ Spectroscopie de RMN

#### Identification de l'aglycone

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques observées pour l'aglycone de **CHEV 2** avec celles obtenues dans le composé **CHEV1**, montrent que ces deux composés partagent le même aglycone, à savoir l'acide echinocystique ( $3\beta$ ,  $16\alpha$ -dihydroxyolean-12-ene-28-oïque) (Tapondjou *et al.*, 2005; Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014).

Une analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D de **CHEV2** a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone (**Tableau XIV**).

L'observation des signaux résonnant à  $\delta_C$  89,7 ppm (C-3) et  $\delta_C$  176,0 ppm (C-28) montre que **CHEV2** est un dérivé 3, 28-bidesmoside de l'acide echinocystique ayant des chaînes oligosaccharidiques attachées respectivement en C-3 et C-28 au moyen des liaisons éther et ester (Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014).

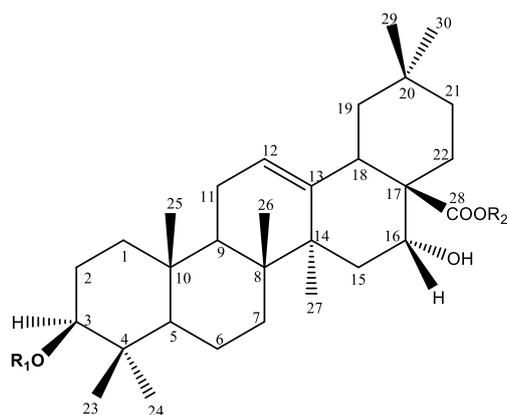


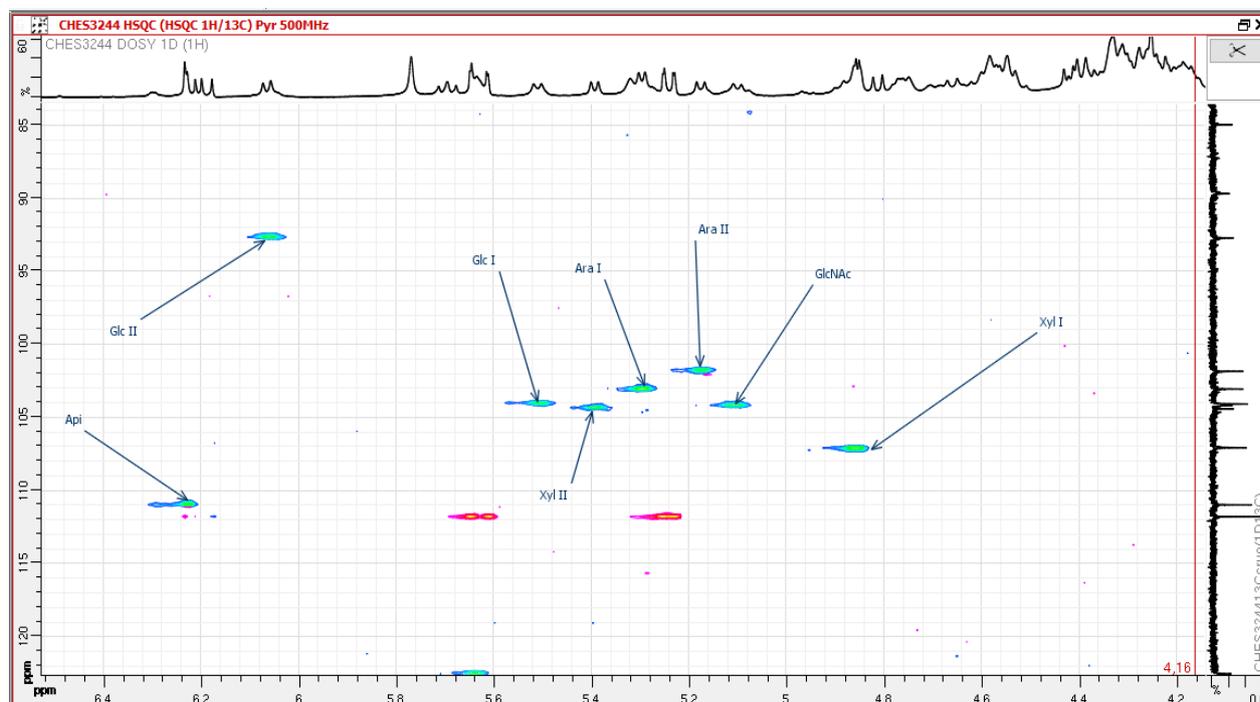
Tableau XIV: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie aglycone de CHEV2.

N° C	CHEV2				
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	N° C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1a	39,4	0,94	15a	36,5	1,85
1b		1,54	15b		2,39 ; nd
2a	26,1	1,79	16	75,2	5,69
2b		2,20	17	49,5	-
3	89,7	3,25 (brd, 13,7)	18	41,0	3,51
4	39,8	-	19a	47,8	1,37
5	56,8	0,78	19b		2,83
6a	18,3	1,32	20	30,6	-
6b		1,59	21a	35,6	1,28
			21b		2,47
7a	33,9	1,51	22a	32,7	2,20
7b		1,62	22b		2,37
8	40,9	-	23	28,9	1,28 (s)
9	46,9	1,79	24	17,7	0,98 (s)
10	36,7	-	25	16,8	0,83 (s)
11a	23,9	1,99	26	18,1	1,01 (s)
11b		2,13	27	27,9	1,85 (s)
12	122,5	5,64	28	176,0	-
13	145,1	-	29	33,9	1,02 (s)
14	41,7	-	30	24,2	1,12 (s)

#### Détermination du nombre et de la nature des sucres

La nature des sucres a été déterminée par hydrolyse acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire. Ainsi, le D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-Api et le D-GlcNAc ont été identifiés.

L'analyse du spectre HSQC de **CHEV2** permet de distinguer 8 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_H$  5,10 (d,  $J = 7,3$  Hz) ; 5,30 (d,  $J = 6,6$  Hz) ; 4,85 (d,  $J = 2,2$  Hz) ; 5,51 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; 6,06 (d,  $J = 8,2$  Hz) ; 5,17 (d,  $J = 8,0$  Hz) ; 5,39 (d,  $J = 7,6$  Hz) et 6,23 (d,  $J = 2,2$  Hz), corrélant avec les signaux de 8 carbones à  $\delta_C$  104,2 ; 103,0 ; 107,1 ; 104,0 ; 92,7 ; 101,8 ; 104,4 et 110,9 respectivement, ce qui prouve la présence de huit sucres.



**Figure 73: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé CHEV2**

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et ROESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées sur le spectre HSQC et confirmés par le spectre HMBC.

Le signal anomérique à  $\delta_H$  5,10 a été attribué à une unité de D-GlcNAc dont les signaux caractéristiques ont été observés à  $\delta_H$  9,06 et à  $\delta_H$  2,16. Cela a été confirmé par la corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal à  $\delta_H$  4,55 et le carbonyle à  $\delta_C$  170,1 (NHCOCH<sub>3</sub>).

Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés : Glc, GlcNAc, Ara et Xyl sont sous leur forme pyranosyle tandis que le sucre Api est sous sa conformation furanosyle (**Tableau XVI**).

La configuration  $\beta$  a été attribuée au proton anomérique de Glc, GlcNAc et  $\alpha$  à Ara sur la base de leurs constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-3}$  comprises entre 6,6-8,2 Hz. La configuration  $\alpha$  attribuée aux protons anomériques de Xyl I a été mise en évidence par sa valeur de constante

de couplage  $^3J_{H-1, H-2}$  à 2,2 Hz, tandis que la configuration  $\beta$  de Xyl et Api a été déterminé par leurs constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-2}$  à 7,6 et 2,2 Hz respectivement (Noté *et al.*, 2015b).

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl à  $\delta_H$  5,10 (d,  $J = 7,3$  Hz) ;
- 2 groupements  $\alpha$ -L-arabinopyranosyles Ara I-1 à  $\delta_H$  5,30 (d,  $J = 6,6$  Hz) ; Ara II-1 à  $\delta_H$  5,17 (d,  $J = 8,0$  Hz) ;
- 1 groupement groupement  $\alpha$ -D-xylopyranosyle Xyl I-1 à  $\delta_H$  4,85 (d,  $J = 2,2$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ -D-xylopyranosyle Xyl II-1 à  $\delta_H$  5,39 (d,  $J = 7,6$  Hz) ;
- 2 groupements  $\beta$ -D-glucopyranosyle Glc I-1 à  $\delta_H$  5,51 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; Glc II-1 à  $\delta_H$  6,06 (d,  $J = 8,2$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ -D-apiofuranosyle Api -1 à  $\delta_H$  6,23 (d,  $J = 2,2$  Hz).

### Identification de l'acide

Le spectre de RMN  $^1H$  du composé **CHEV2** présente un signal d'un proton oléfinique tri-substitué à  $\delta_H$  7,24 (d,  $J = 7,2$  Hz) et un groupe des signaux de protons oléfiniques à une substitution à  $\delta_H$  6,23 (dd,  $J = 10,9; 17,6$  Hz) ; 5,25 (d,  $J = 10,9$  Hz) et 5,47 (d,  $J = 17,6$  Hz), indiquant que ce composé, a une unité de fragment monoterpénoïde (MT) (Liu *et al.*, 2010). Tous les signaux de protons et de carbone de cette entité MT ont été entièrement attribués par une analyse approfondie du spectre HSQC et confirmés par le spectre HMBC.

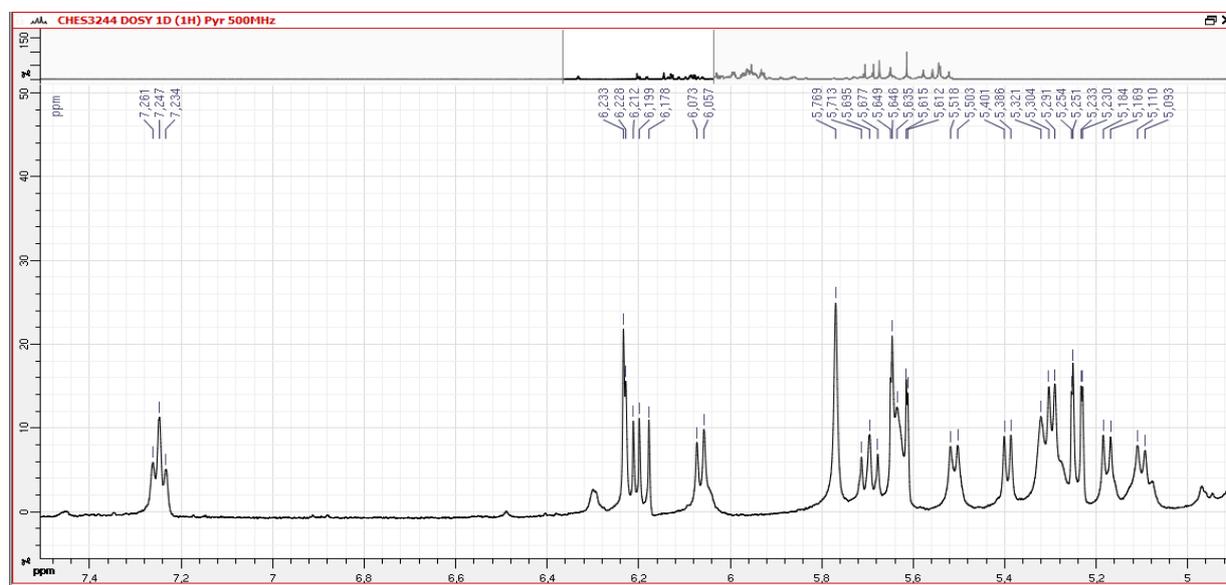


Figure 74: Spectre RMN  $^1H$  du composé CHEV2 (partie du MT).

**Tableau XIV: Valeurs des déplacements chimiques ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de l'unité monoterpénique de CHEV2 (pyridine- $d_5$ )**

Monoterpène (MT)	$\delta_C$	$\delta_H$
MT <sub>1</sub>		
1	167,3	-
2	127,4	-
3	144,3	7,24 (d, 7,2)
4a	23,9	2,47
4b		2,62
5a	41,0	1,86
5b		nd
6	79,8	-
7	144,1	6,21 (dd, 10,9; 17,6)
8a	112,7	5,63 (d, 17,6)
8b		5,25 (d, 10,9)
9	12,5	2,04
10	23,6	1,56

La stéréochimie de la double liaison tri-substituée est déterminée comme étant *E* à cause du déplacement chimique de H-3 à  $\delta_H$  7,24 or pour l'isomère *Z*, il apparaîtrait plutôt au champ supérieur (Zhang *et al.*, 1999). La configuration de C-6 de la fraction MT a été déterminée comme *S* sur la base des valeurs de déplacement chimique de C-5 ( $\delta_C$  41,0), C-7 ( $\delta_C$  144,1), C-8 ( $\delta_C$  112,7) et C-10 ( $\delta_C$  23,6) qui sont très proches des valeurs correspondantes aux données RMN  $^{13}\text{C}$  de l'acide (6*S*)-menthiafolique 6-*O*- $\beta$ -D-quinovoside (Liang *et al.*, 2005).

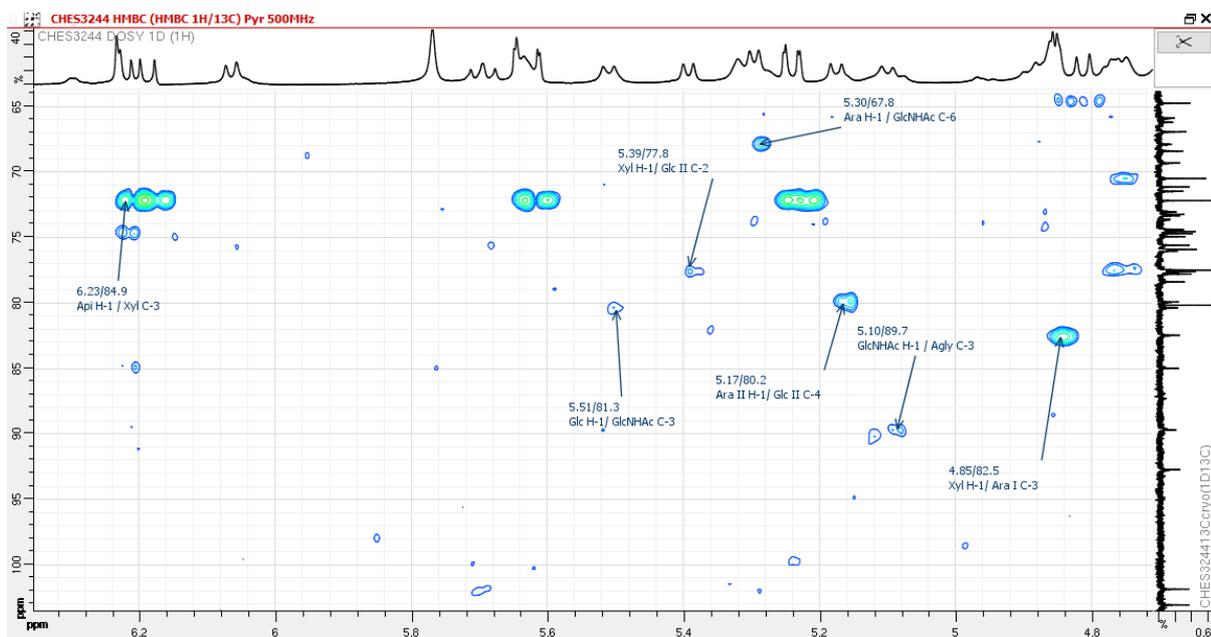
#### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

Les chaînes oligosaccharidiques ainsi que les points de fixation sur l'aglycone ont été réalisés grâce aux corrélations observées dans les spectres HMBC et ROESY.

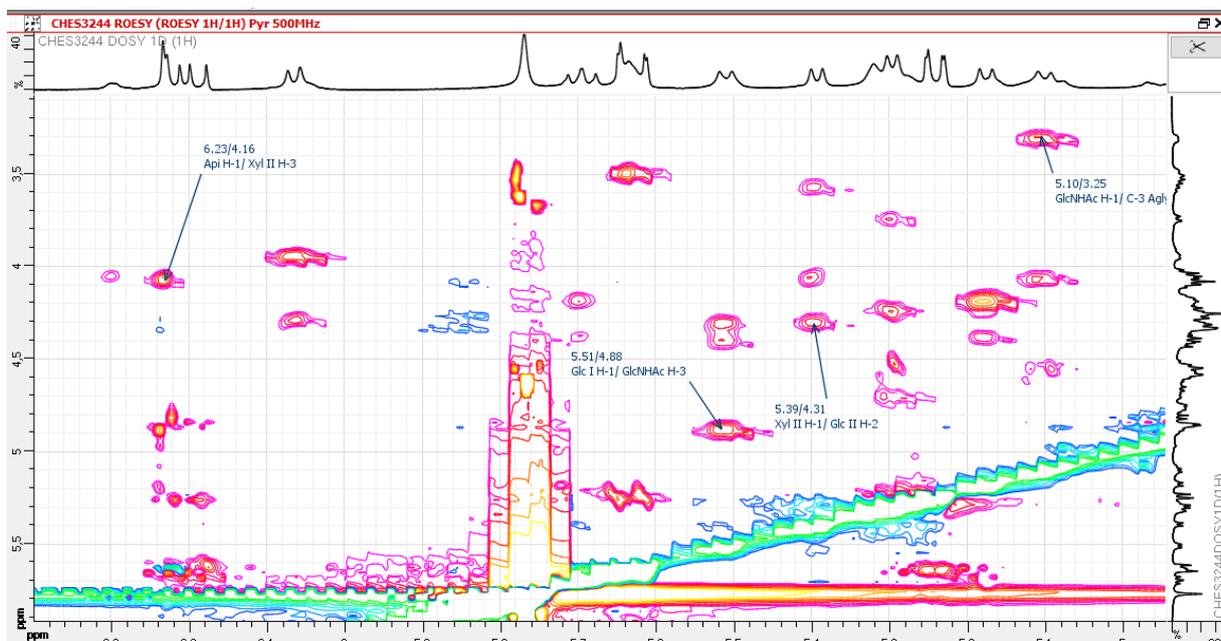
#### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

La séquence de l'oligosaccharide est établie grâce aux spectres HMBC (**Figure 75a**) et ROESY (**Figure 75b**). La corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  5,10 (H-1 GlcNHAc) et le signal  $\delta_C$  89,7 ppm (C-3 de l'aglycone) suggère que GlcNHAc est lié à la génine en position 3 ; cette liaison est confirmée par la corrélation observée sur le spectre ROESY entre les signaux  $\delta_H$  5,10 (H-1 GlcNHAc) et  $\delta_H$  3,25 (H-3 de l'aglycone).

Le reste de la chaîne oligosaccharidique est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  5,51 /  $\delta_C$  81,3 (Glc I H-1 / GlcNHAc C-3) ; 5,30 / 67,8 (Ara I H-1 / GlcNHAc C-6) ; 4,85 / 82,5 (Xyl I H-1 / Ara I C-3) et confirmé par les corrélations ROESY à  $\delta_H$  5,51 /  $\delta_H$  4,88 (Glc I H-1 / GlcNHAc H-3) ; 5,30 / 4,67 (Ara I H-1 / GlcNHAc H-6a) ; 4,85 / 4,59 (Xyl I H-1 / Ara I H-3).



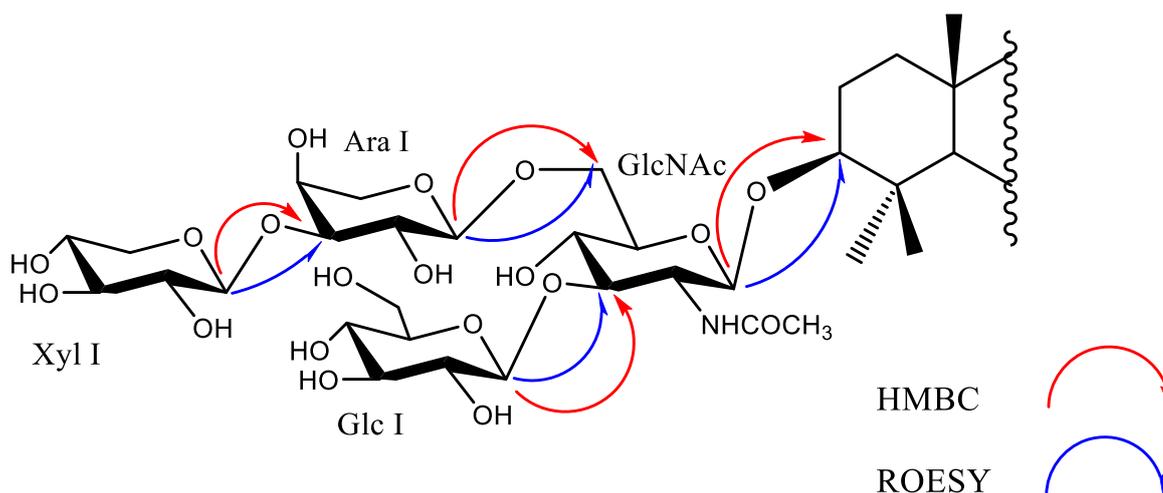
a)



b)

**Figure 75: Spectres HMBC (a) et ROESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CHEV2 montrant les points de liaison des sucres.**

La séquence complète,  $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle a été liée en position C-3 de l'aglycone.



**Figure 76:** Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CHEV2.

### Chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone

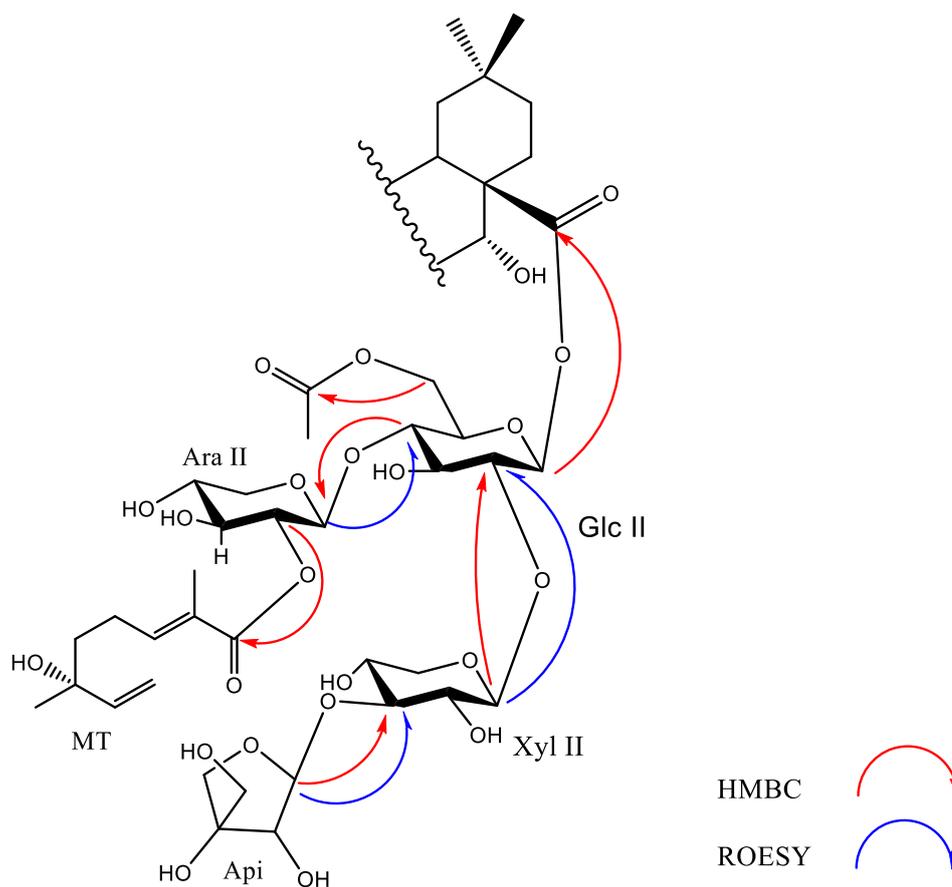
Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de CHEV2 révèlent le blindage d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  176,0 (C-28) dû à une liaison osidique. La séquence de l'oligosaccharide est établie grâce aux spectres HMBC (**Figure 75a**) et ROESY (**Figure 75b**). La corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal  $\delta_{\text{H}}$  6,06 (H-1 Glc II) et le signal  $\delta_{\text{C}}$  176,0 (C-28 de l'aglycone) suggère que Glc II est lié à la génine en position 28.

Le reste de la chaîne des sucres est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_{\text{H}}$  5,39 /  $\delta_{\text{C}}$  77,8 (Xyl II H-1 / Glc II C-2) ; 6,23 / 84,9 (Ara II H-1 / Xyl II C-3) ; 5,17 / 80,2 (Ara II H-1 / Glc II C-4) et confirmé par les corrélations ROESY à  $\delta_{\text{H}}$  5,39 /  $\delta_{\text{H}}$  4,31 (Xyl II H-1 / Glc II H-2) ; 6,23 / 4,16 (Ara II H-1 / Xyl II H-3) ; 5,17 / 4,03 (Ara II H-1 / Glc II H-4). En plus, la localisation du groupe acétyle en C-6 de Glc II a également été mise en évidence par l'observation des signaux de C-6 de Glc II à  $\delta_{\text{C}}$  63,5 (déblindé, +1,2 ppm) et de C-5 de Glc II à  $\delta_{\text{C}}$  73,3 (blindé, -4,6 ppm) en comparaison avec Glc I ( $\delta_{\text{C}}$  77,9).

### Site de fixation du groupement monoterpène (MT)

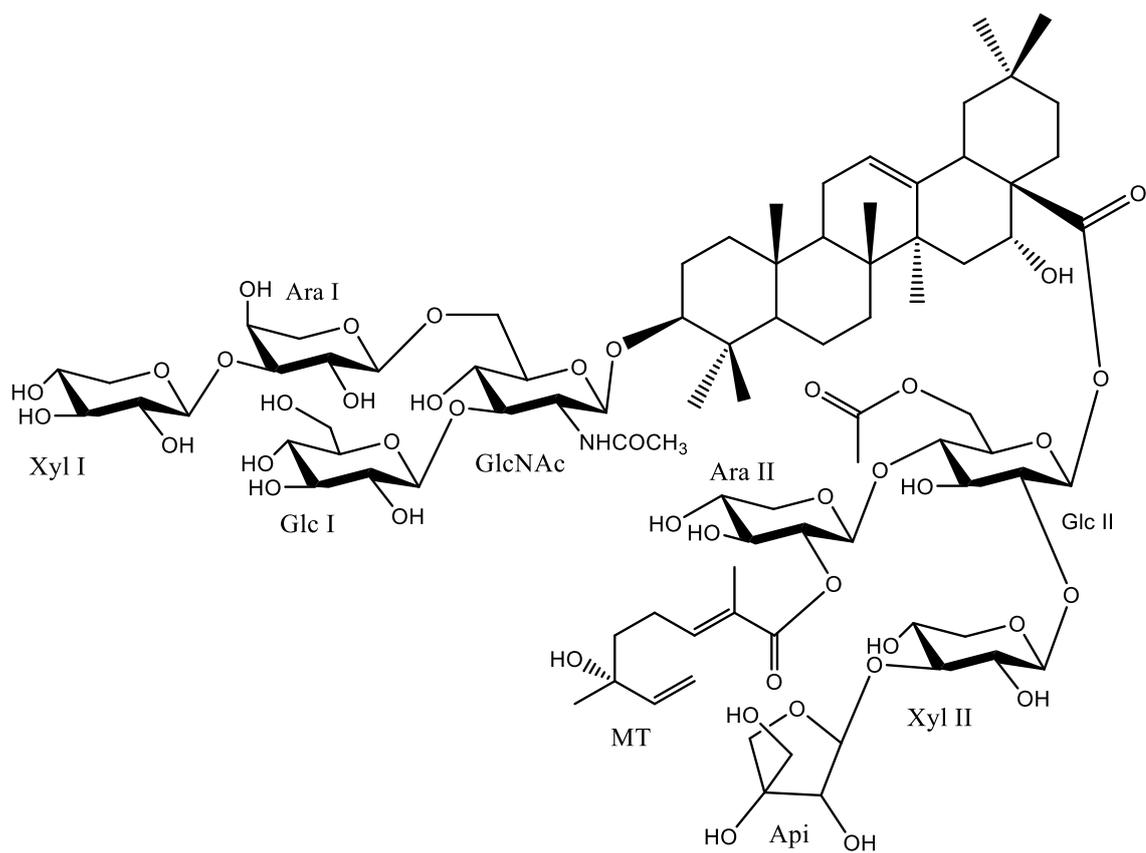
L'estérification du groupe hydroxyle en C-2 de Ara II par MT a été suggéré à partir de la position blindée de H-2 de Ara II et C-2 avec des résonances à  $\delta_{\text{H}}$  5,67 et  $\delta_{\text{C}}$  75,0 ppm, respectivement. Ceci a été confirmé par la corrélation HMBC, observées entre  $\delta_{\text{H}}$  5,67 /  $\delta_{\text{C}}$  167,3 (Ara II H-2 / groupe carbonyle du monoterpène).

Ainsi, le tetrasaccharide lié en C-28 de l'aglycone a été déterminé comme étant le  $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{2-O-[(6S,2E)-2,6-diméthyl-2,7-octadienoyl]-2}-{2-O-[(6S,2E)-2,6-diméthyl-2,7-octadienoyl]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}-6-O-acetyl-  $\beta$ -D-glucopyranosyle.



**Figure 77:** Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CHEV2.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **CHEV2** est élucidée comme étant le 3-*O*- $\beta$ -{ $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-2 (acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl} acide echinocystique 28-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-diméthyl-2,7-octadienoyl]-2}-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-diméthyl-2,7-octadienoyl]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}-6-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ester, nouveau composé naturel auquel nous avons donné le nom de **chevalieroside B** (Noté *et al.*, 2017).



*Figure 78: Structure du composé CHEV2*

**Tableau XVI: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie osidique de CHEV2**

Position	CHEV2				
	$\delta_C$	$\delta_H$	Position	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>Sucres en C-3</b>			<b>Sucres en C-28</b>		
GlcNHAc			Glc-II		
1	104,2	5,10 (d, 7,3)	1	92,7	6,06 (d, 8,2)
2	56,8	4,55	2	77,8	4,31
3	81,3	4,88	3	76,0	4,15
4	73,2	4,59	4	80,2	4,06
5	74,9	4,05	5	73,3	3,91
6	67,8	4,67; 4,80	6	63,5	4,54; 4,65
NHCOCH <sub>3</sub>	23,4	2,16	Ara-II		
Ara-I			1	101,8	5,17 (d, 8,0)
1	103,0	5,30 (d, 6,6)	2	75,0	5,67
2	73,2	4,53	3	74,4	4,16
3	82,5	4,59	4	71,1	4,26
4	69,4	4,15	5	66,3	3,57; 4,39
5	66,3	3,74; 4,29	Xyl-II		
Xyl-I			1	104,4	5,39 (d, 7,6)
1	107,1	4,85 (d, 2,2)	2	74,8	4,03
2	74,5	4,07	3	84,9	4,16
3	77,6	4,01	4	71,0	4,26
4	71,1	4,26	5	66,2	3,67; 4,28
5	66,3	3,53; 4,38	Api		
Glc-I			1	111,6	6,23 (d, 2,2)
1	104,5	5,51 (d, 7,6)	2	77,7	4,85
2	74,6	4,06	3	80,3	-
3	77,7	4,31	4	74,8	4,41; 4,79
4	71,1	4,26	5	64,8	4,23; 4,25
5	77,9	4,01			
6	62,5	4,35; 4,54			

### c) Détermination de la structure de chevalierioside C (CHEV3)

#### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **CHEV3** obtenu comme une poudre blanche amorphe, montre dans son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1999,0039  $[M + H]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{96}H_{143}NO_{43}$ .

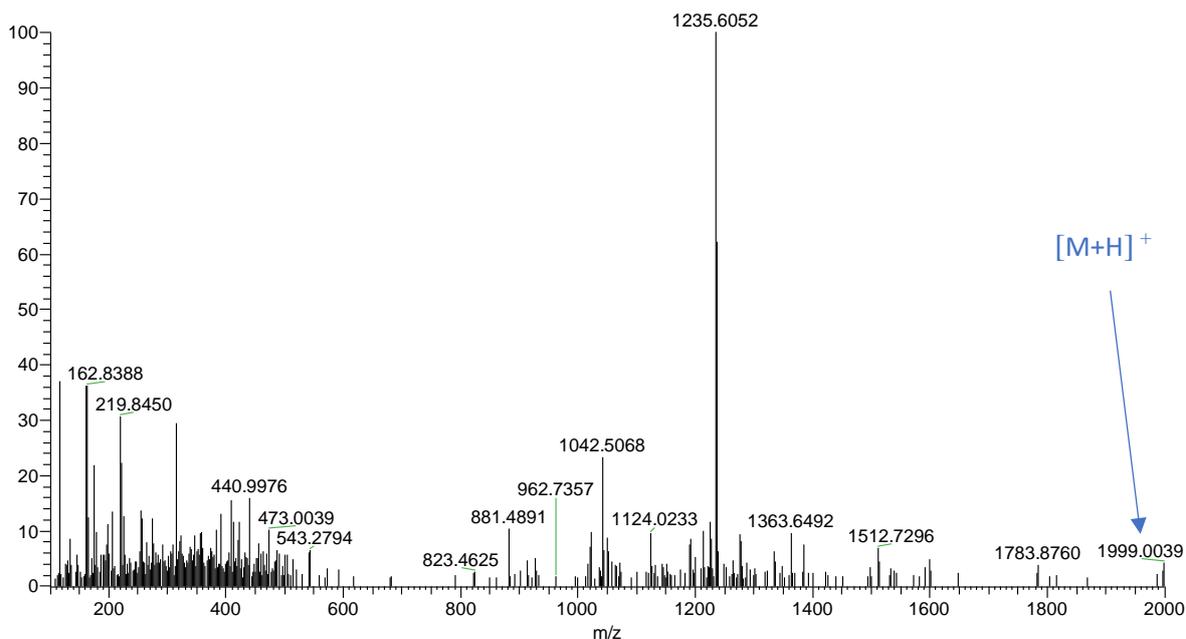


Figure 79: Spectre de masse du composé CHEV3

#### ➤ Spectroscopie de RMN

##### Identification de l'aglycone

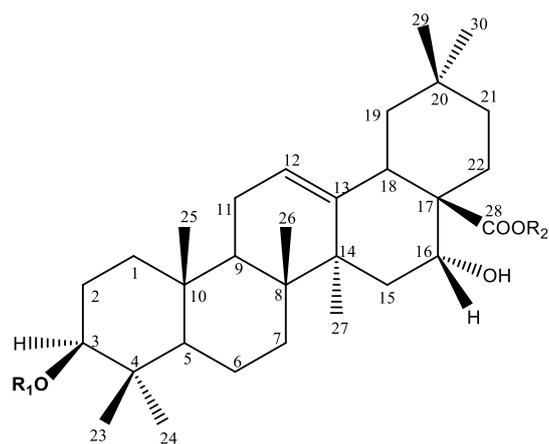
La comparaison des valeurs des déplacements chimiques observées pour l'aglycone de **CHEV 3** avec celles obtenues dans le composé **CHEV1**, montrent que ces deux composés partagent le même aglycone, à savoir l'acide echinocystique ( $3\beta$ ,  $16\alpha$ -dihydroxyolean-12-ene-28-oïque) (Tapondjou *et al.*, 2005; Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014).

Une analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D de **CHEV3** nous a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone (**Tableau XVII**).

**Tableau XVII: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie aglycone de CHEV3.**

N° C	CHEV 3				
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)	N° C	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)
1a	38,8	0,92	15a	36,2	1,78
1b		1,48	15b		2,40
2a	26,7	1,77	16	75,0	5,65
2b		2,16	17	49,2	-
3	89,8	3,25 (brd, 13,6)	18	41,4	3,48
4	39,4	-	19a	47,4	1,33
5	56,2	0,82	19b		2,80
6a	18,9	1,32	20	31,0	-
6b		1,59	21a	36,2	1,22
			21b		2,40
7a	33,8	1,52	22a	32,5	2,16
7b		1,62	22b		2,29
8	40,2	-	23	28,4	1,22 (s)
9	47,2	1,79	24	17,4	0,92 (s)
10	37,1	-	25	15,9	0,78 (s)
11a	24,3	1,98	26	17,7	0,94 (s)
11b		2,16	27	27,6	1,83 (s)
12	123,1	5,56	28	176,1	-
13	144,4	-	29	33,6	0,98 (s)
14	42,1	-	30	24,0	1,07 (s)

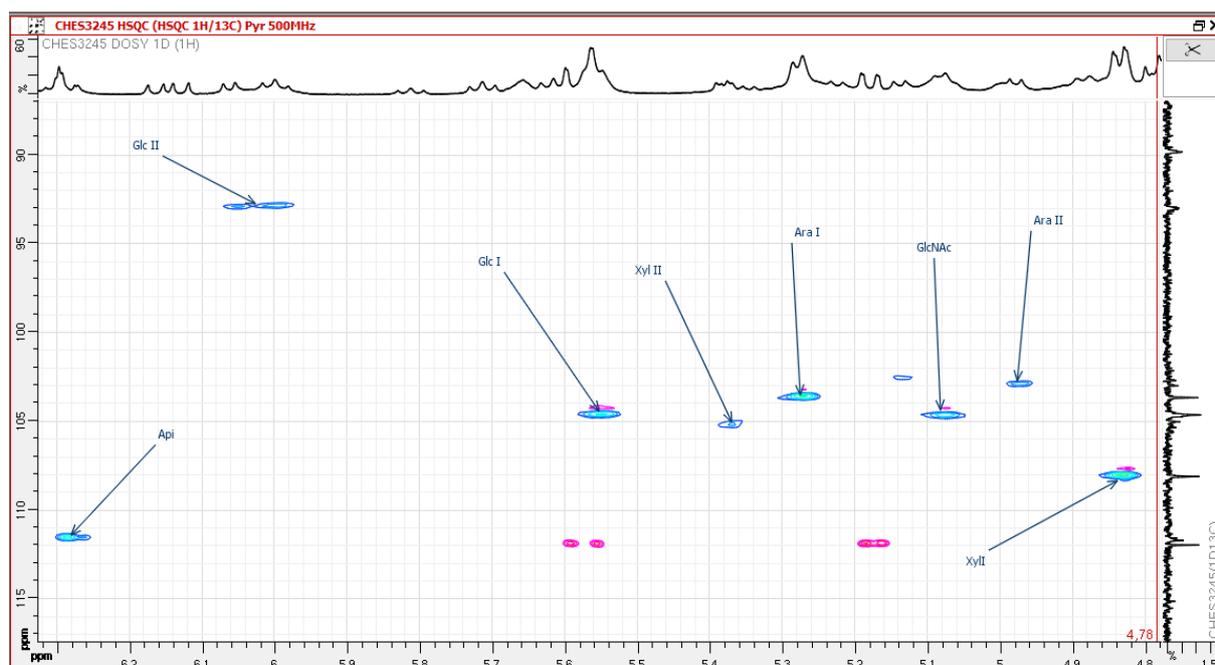
L'observation des signaux des carbones à  $\delta_C$  89,8 ppm (C-3) et  $\delta_C$  176,1 ppm (C-28) montre que **CHEV3** est un dérivé 3, 28-bidesmoside de l'acide echinocystique ayant des chaînes oligosaccharidiques attachées respectivement en C-3 et C-28 au moyen des liaisons éther et ester ( Tapondjou *et al.*, 2005; Miyase *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Melek *et al.*, 2014).



### Détermination du nombre et de la nature des sucres

La nature des sucres a été déterminée par hydrolyse acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire. Ainsi, le D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-Api et le D-GlcNAc ont été identifiés.

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  de **CHEV3** permet de distinguer 8 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  5,09 (d,  $J = 7,3$  Hz) ; 5,28 (d,  $J = 6,6$  Hz) ; 4,84 (d,  $J = 2,2$  Hz) ; 5,56 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; 6,06 (d,  $J = 8,2$  Hz) ; 4,98 (d,  $J = 8,0$  Hz) ; 5,39 (d,  $J = 7,6$  Hz) et 6,30 (d,  $J = 2,2$  Hz), et qui corrélient sur le spectre HSQC avec les signaux de 8 carbones à  $\delta_{\text{C}}$  104,8 ; 103,8 ; 108,2 ; 104,7 ; 93,1 ; 103,1 ; 105,1 et 111,9 respectivement, ce qui prouve la présence de huit sucres.



**Figure 80:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé CHEV3

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et ROESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées dans les spectres HSQC et confirmés par le spectre HMBC.

Le signal anomérique à  $\delta_H$  5,09 a été attribué à une unité de D-GlcNAc dont les signaux caractéristiques ont été observés à  $\delta_H$  9,07 et à  $\delta_H$  2,16. Cela a été confirmé par la corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal à  $\delta_H$  4,50 et le carbonyle à  $\delta_C$  170,1 (NHCOCH<sub>3</sub>).

Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés : Glc, GlcNAc, Ara et Xyl sont sous leur forme pyranosyle tandis que le sucre Api est sous sa conformation furanosyle (**Tableau XIX**).

La configuration  $\beta$  a été attribuée au proton anomérique de Glc, GlcNAc et  $\alpha$  à Ara sur la base de leurs constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-3}$  comprises entre 6,6-8,2 Hz. La configuration  $\alpha$  attribuée aux protons anomériques de Xyl I a été mise en évidence par sa valeur de constante de couplage  $^3J_{H-1, H-2}$  à 2,2 Hz, tandis que la configuration  $\beta$  de Xyl et Api a été déterminé par leurs constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-2}$  à 7,6 et 2,2 Hz respectivement (Noté *et al.*, 2015b).

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl à  $\delta_H$  5,09 (d,  $J = 7,3$  Hz) ;
- 2 groupements  $\alpha$ -L-arabinopyranosyles Ara I-1 à  $\delta_H$  5,28 (d,  $J = 6,6$  Hz) ; Ara II-1 à  $\delta_H$  4,98 (d,  $J = 8,0$  Hz) ;
- 1 groupement  $\alpha$ -D-xylopyranosyle Xyl I-1 à  $\delta_H$  4,84 (d,  $J = 2,2$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ -D-xylopyranosyle Xyl II-1 à  $\delta_H$  5,39 (d,  $J = 7,6$  Hz) ;
- 2  $\beta$ -D-glucopyranosyle Glc I-1 à  $\delta_H$  5,56 (d,  $J = 7,6$  Hz), Glc II-1 à  $\delta_H$  6,06 (d,  $J = 8,2$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ -D-apiofuranosyle Api -1 à  $\delta_H$  6,30 (d,  $J = 2,2$  Hz).

### Identification des acides

La comparaison détaillée des données RMN 1D et 2D de **CHEV3** avec celles de **CHEV 2**, indiquent la présence d'un groupement cinnamoyle (Cynn) et d'un groupement monoterpénoïde (MT), identifiés comme sur les structures de **CHEV 1** et **CHEV 2** respectivement.

**Tableau XVIII: Valeurs des déplacements chimiques ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) de l'unité monoterpénique et cinnamoyle de CHEV 3 (pyridine- $d_5$ )**

Cinnamoyle (Cynn)	$\delta_C$	$\delta_H$	Monoterpène (MT)	$\delta_C$	$\delta_H$
Cynn			MT <sub>1</sub>		
1	166,4	-	1	167,4	-
2	118,9	6,86 (d, 15,9)	2	127,7	-
3	145,7	8,03 (d, 15,9)	3	144,7	7,21 (t, 7,4)
4	135,6	-	4a	24,5	2,41
5	131,3	7,34 (brd, 2,0)	4b		2,56
6	129,4	7,34 (brd, 2,0)	5a	41,6	1,79
7	128,8	7,67 (d, 3,5)	5b		nd
8	129,4	-	6	79,8	-
9	131,3	7,34 (brd, 2,0)	7	146,7	6,14 (dd, 10,9; 15,9)
			8a	112,0	5,58 (brd, 7,5)
			8b		5,18 (d, 10,9)
			9	12,9	2,03 (s)
			10	23,5	1,48 (s)

#### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

Les chaînes oligosaccharidiques ainsi que les points de fixation sur l'aglycone ont été réalisés grâce aux corrélations observées dans les spectres HMBC et ROESY.

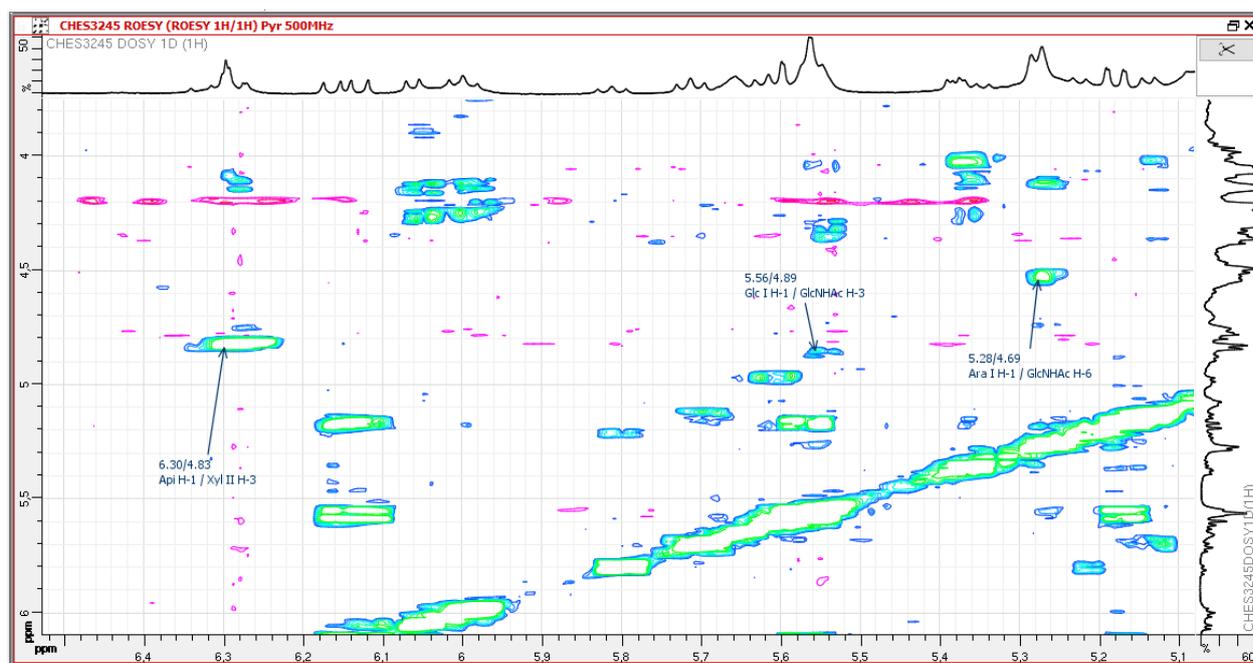
##### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de CHEV3 révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_C$  89,8 ppm (C-3) dû à une liaison glycosidique. La séquence de l'oligosaccharide est établie grâce aux spectres HMBC (**Figure 81a**) et ROESY (**Figure 81b**). La corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  5,09 (H-1 GlcNHAc) et le signal  $\delta_C$  89,8 (C-3 de l'aglycone) suggère que GlcNHAc est lié à la génine en position 3 ; cette liaison est confirmée par la corrélation observée sur le spectre ROESY entre les signaux  $\delta_H$  5,09 (H-1 GlcNHAc) et  $\delta_H$  3,25 (H-3 de l'aglycone).

Le reste de la chaîne des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  5,56 /  $\delta_C$  81,2 (Glc I H-1 / GlcNHAc C-3) ; 5,28 / 68,4 (Ara I H-1 / GlcNHAc C-6) ; 4,84 / 83,7 (Xyl I H-1 / Ara I C-3) et confirmé par les corrélations ROESY à  $\delta_H$  5,56 /  $\delta_H$  4,89 (Glc I H-1 / GlcNHAc H-3) ; 5,28 / 4,69 (Ara I H-1 / GlcNHAc H-6a) ; 4,84 / 4,54 (Xyl I H-1 / Ara I H-3).



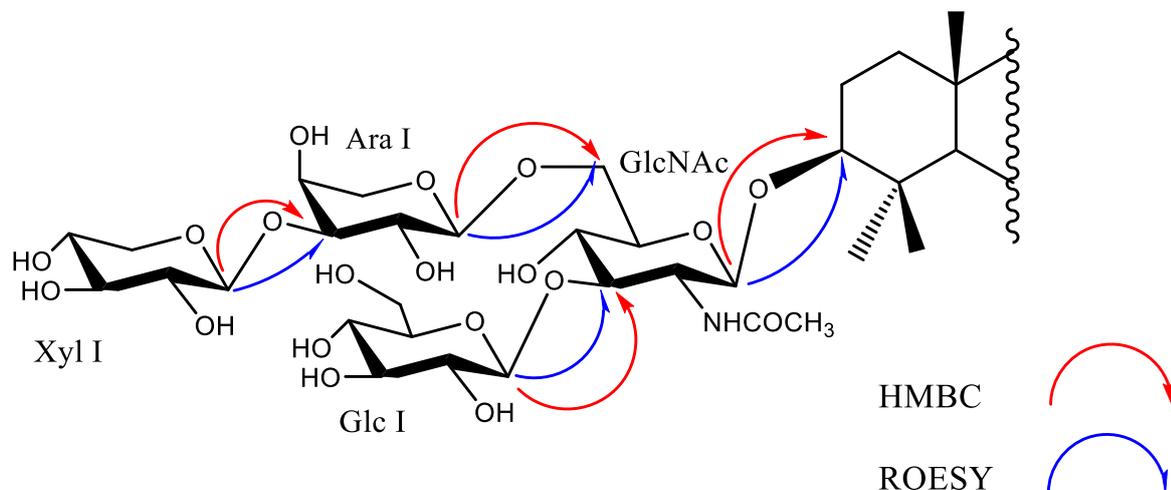
a)



b)

**Figure 81: Spectres HMBC (a) et ROESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé CHEV3 montrant les points de liaison des sucres.**

La séquence complète,  $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle a été fixée en position C-3 de l'aglycone.



**Figure 82:** Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé CHEV3.

### Chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de **CHEV3** révèlent le blindage d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  176,0 ppm (C-28) dû à une liaison carboxylique glycosidique. La séquence de l'oligosaccharide est établie grâce aux spectres HMBC (**Figure 81a**) et ROESY (**Figure 81b**). La corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal  $\delta_{\text{H}}$  6,06 (H-1 Glc II) et le signal  $\delta_{\text{C}}$  176,0 ppm (C-28 de l'aglycone) suggère que Glc II est lié à la génine en position 28.

Le reste de la chaîne des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_{\text{H}}$  5,39 /  $\delta_{\text{C}}$  78,3 (Xyl II H-1 / Glc II C-2) ; 6,30 / 84,9 (Ara I H-1 / Xyl II C-3) ; 4,98 / 80,0 (Ara II H-1 / Glc II C-4) et confirmé par les corrélations ROESY à  $\delta_{\text{H}}$  5,39 /  $\delta_{\text{H}}$  4,28 (Xyl II H-1 / Glc II H-2) ; 6,30 / 4,14 (Ara I H-1 / Xyl II H-3) ; 4,98 / 4,05 (Ara II H-1 / Glc II H-4).

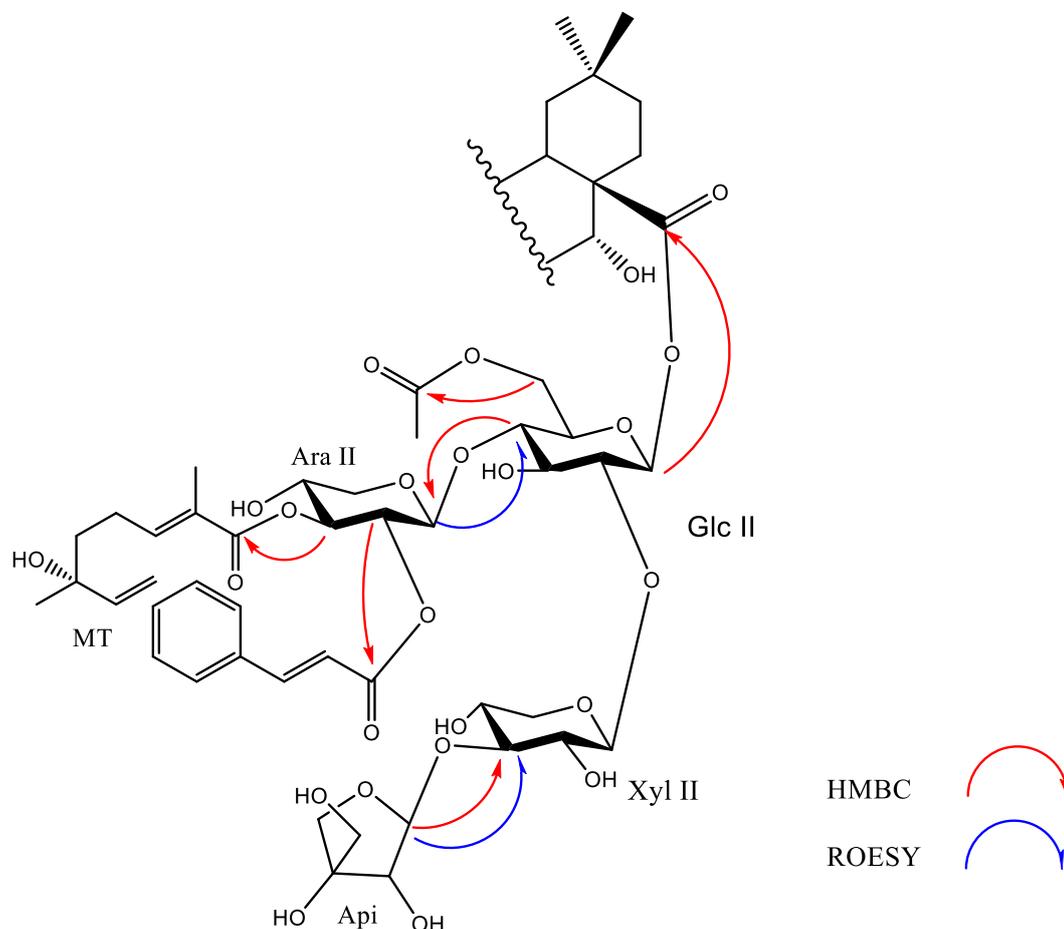
De plus, les spectres de RMN du composé **CHEV 3** ont montré des changements d'acylation à H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  4,52 ; 4,61) et C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  63,2) de Glc-II et à H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  5,65) et C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  75,2) et H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4,14) et C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  74,0) de Ara-II.

### Différents sites de fixation du monoterpène et du cinnamoyle

L'observation des corrélations HMBC entre H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  5,65) de Ara II et C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  166,4) du Cynn et entre H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4,14) de Ara II et C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  167,4) du Groupement MT, a confirmé les positions des groupements Cynn et MT à C-2 et C-3 d'Ara II, respectivement.

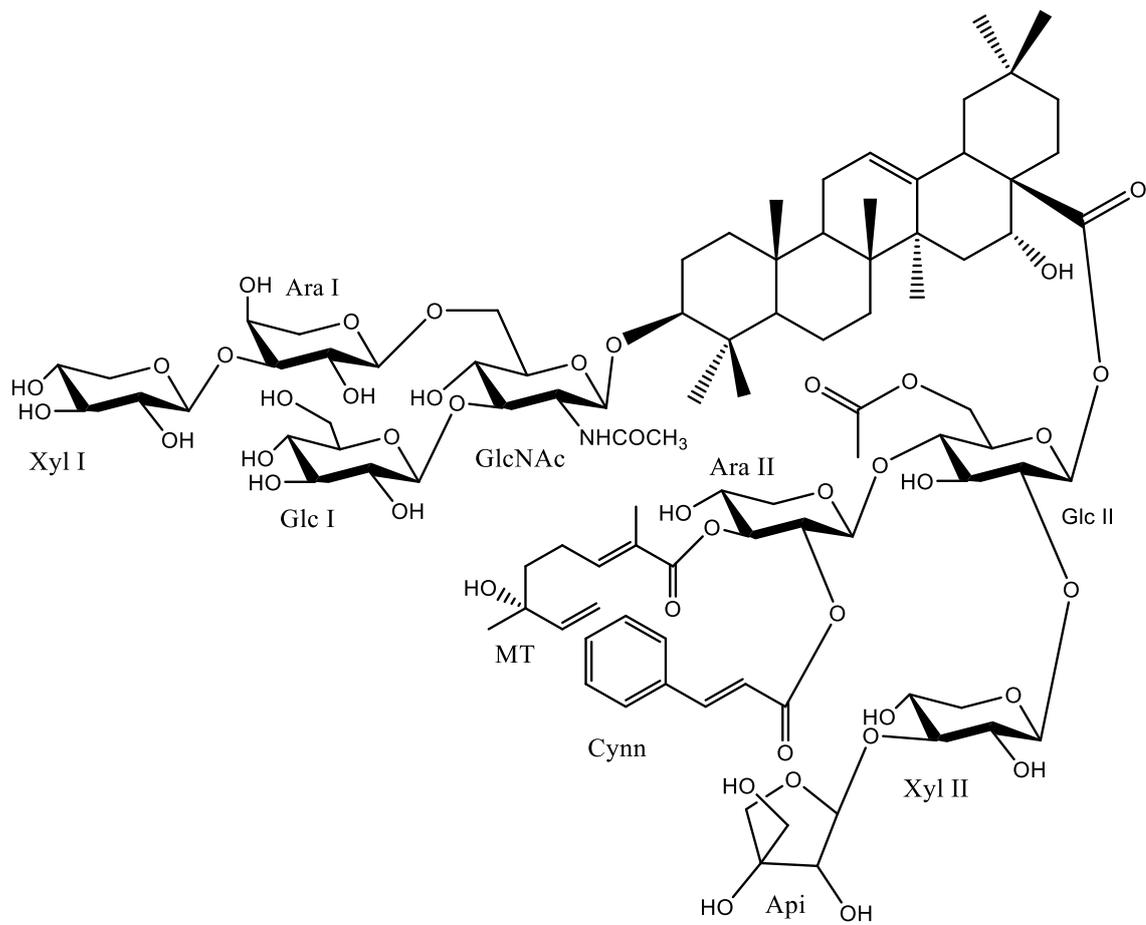
Ainsi, le tetrasaccharide lié en C-28 de l'aglycone a été déterminé comme étant le  $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{2-O-[(6S,2E)-2,6-diméthyl-2,7-octadienoyl-

3-*O*-cinnamoyl]-2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienoyl-3-*O*-cinnamoyl]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-6-*O*-acetyl-  $\beta$ -D-glucopyranosyle.



**Figure 83:** Corrélations HMBC et ROESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-28 de l'aglycone du composé CHEV3.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **CHEV3** est élucidée comme le 3-*O*- $\beta$ -{ $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl}-acide échinocystique 28-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienoyl-3-*O*-cinnamoyl]-2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienoyl-3-*O*-cinnamoyl]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}-6-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, nouveau composé naturel auquel nous avons donné le nom de **chevaleroside C** (Noté *et al.*, 2017).



*Figure 84: Structure du composé CHEV 3*

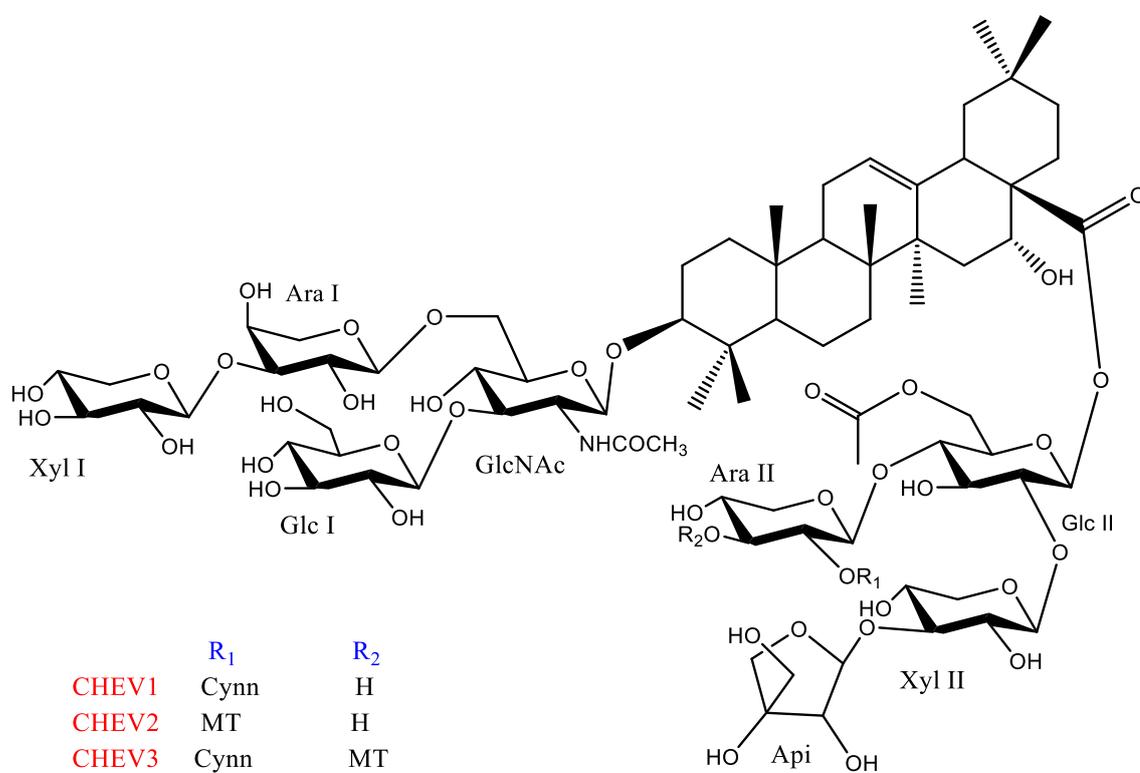
**Tableau XIX: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie osidique de CHEV3**

Position	CHEV3				
	$\delta_C$	$\delta_H$	Position	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>Sucres en C-3</b>			<b>Sucres en C-28</b>		
GlcNHAc			Glc-II		
1	104,8	5,09 (d, 7,3)	1	93,1	6,06 (d, 8,2)
2	57,9	4,50	2	78,3	4,28
3	81,2	4,89	3	76,0	4,14
4	73,4	4,51	4	80,0	4,05
5	75,0	3,97	5	73,3	3,87
6	68,4	4,69; 4,77	6	63,2	4,52; 4,61
NHCOCH <sub>3</sub>	23,9	2,16	Ara-II		
Ara-I			1	103,1	4,98 (d, 8,0)
1	103,8	5,28 (d, 6,6)	2	75,2	5,65
2	73,4	4,51	3	74,0	4,14
3	83,7	4,54	4	69,1	4,27
4	69,7	4,13	5	67,6	3,73; 4,77
5	66,8	3,64; 4,23	Xyl-II		
Xyl-I			1	105,1	5,39 (d, 7,6)
1	108,2	4,85 (d, 2,2)	2	75,2	4,04
2	75,3	4,07	3	84,9	4,14
3	78,4	3,97	4	71,0	4,28
4	71,2	4,25	5	66,7	3,65; 4,26
5	67,7	3,47; 4,35	Api		
Glc-I			1	111,9	6,30 (d, 2,2)
1	104,7	5,56 (d, 7,6)	2	78,1	4,83
2	75,4	4,05	3	80,7	-
3	78,4	4,30	4	75,5	4,38; 4,79
4	71,2	4,28	5	65,8	4,21; 4,26
5	78,5	3,98			
6	62,5	4,35; 4,52			

### 2.1.2.3. Conclusion partielle 2

L'étude phytochimique des écorces d'*A.chevalieri* nous a permis d'isoler trois saponosides, aux structures nouvelles. Tous ces saponosides sont des dérivés bidesmosidiques (C-3 et C-28) de l'acide echinocystique. Leurs structures ont été établies par une analyse détaillée de leurs données spectrales principalement par des expériences de RMN 1D et 2D à 500 MHz (COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC), et par spectrométrie de masse (electrospray).

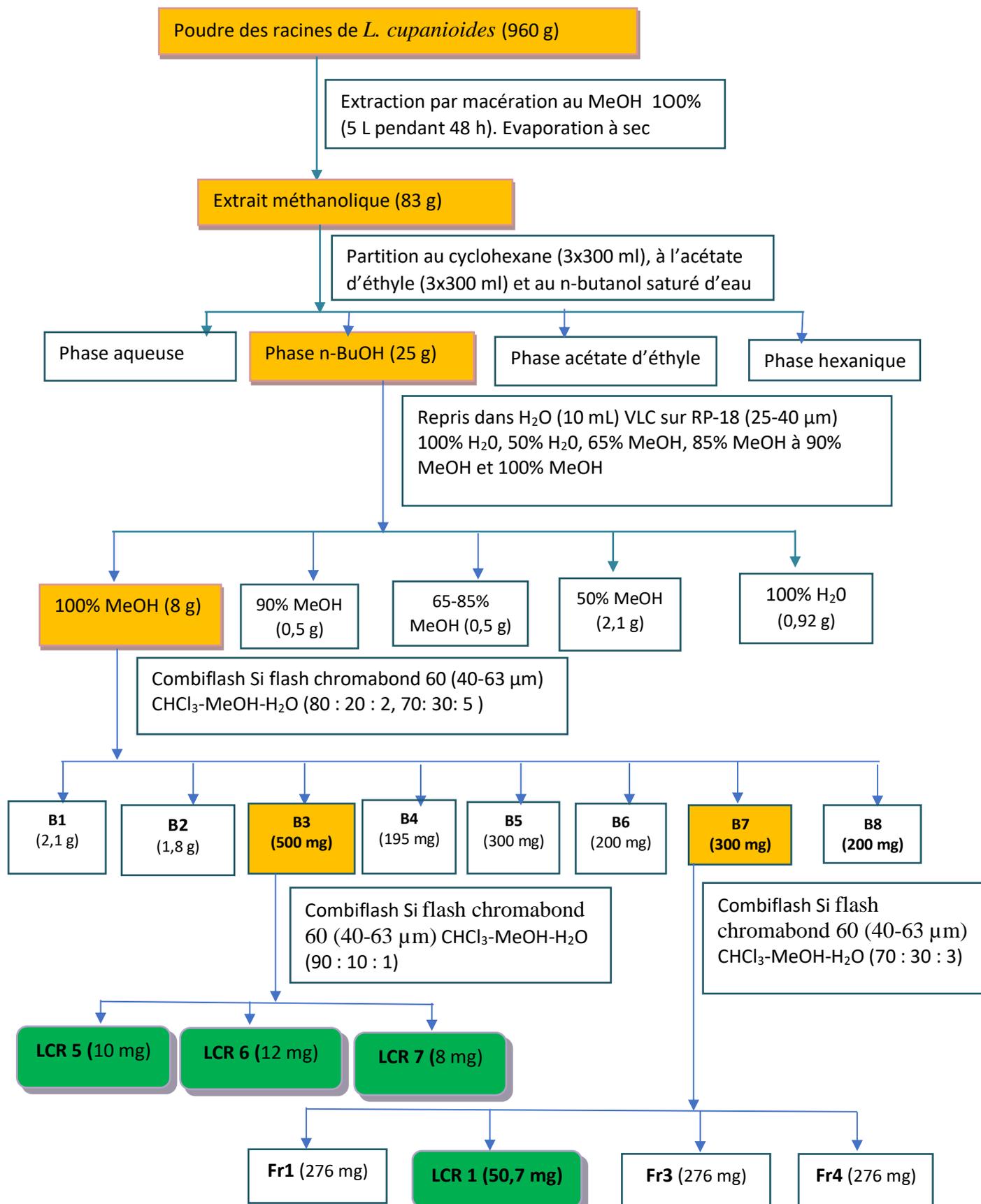
De ces analyses, Il ressort que tous possèdent en leur sein 8 sucres et que la chaîne tétrasaccharidique en C-3 est identique pour tous. En ce qui concerne la chaîne osidique en C-28, elle met en exergue la présence d'un groupement acétyle et ne diffère que par la substitution en position 2 et 3 de l'Ara II par les groupements Cinnamoyls et/ou Monoterpènes.



### **2.1.3. *Lecaniodiscus cupanioides***

L'étude phytochimique de *Lecaniodiscus cupanioides* est présentée ci-dessous. Après extraction et purification des molécules par les méthodologies décrites ci-dessous, l'élucidation structurale des composés a été réalisée grâce à une analyse approfondie des spectres RMN, principalement des expériences de RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et de RMN 2D (COSY, NOESY, HSQC, HSQC-TOCSY et HMBC), couplée à la spectrométrie de masse.

### 2.1.3.1. Extraction et isolement des composés de *Lecaniodiscus cupanioides*



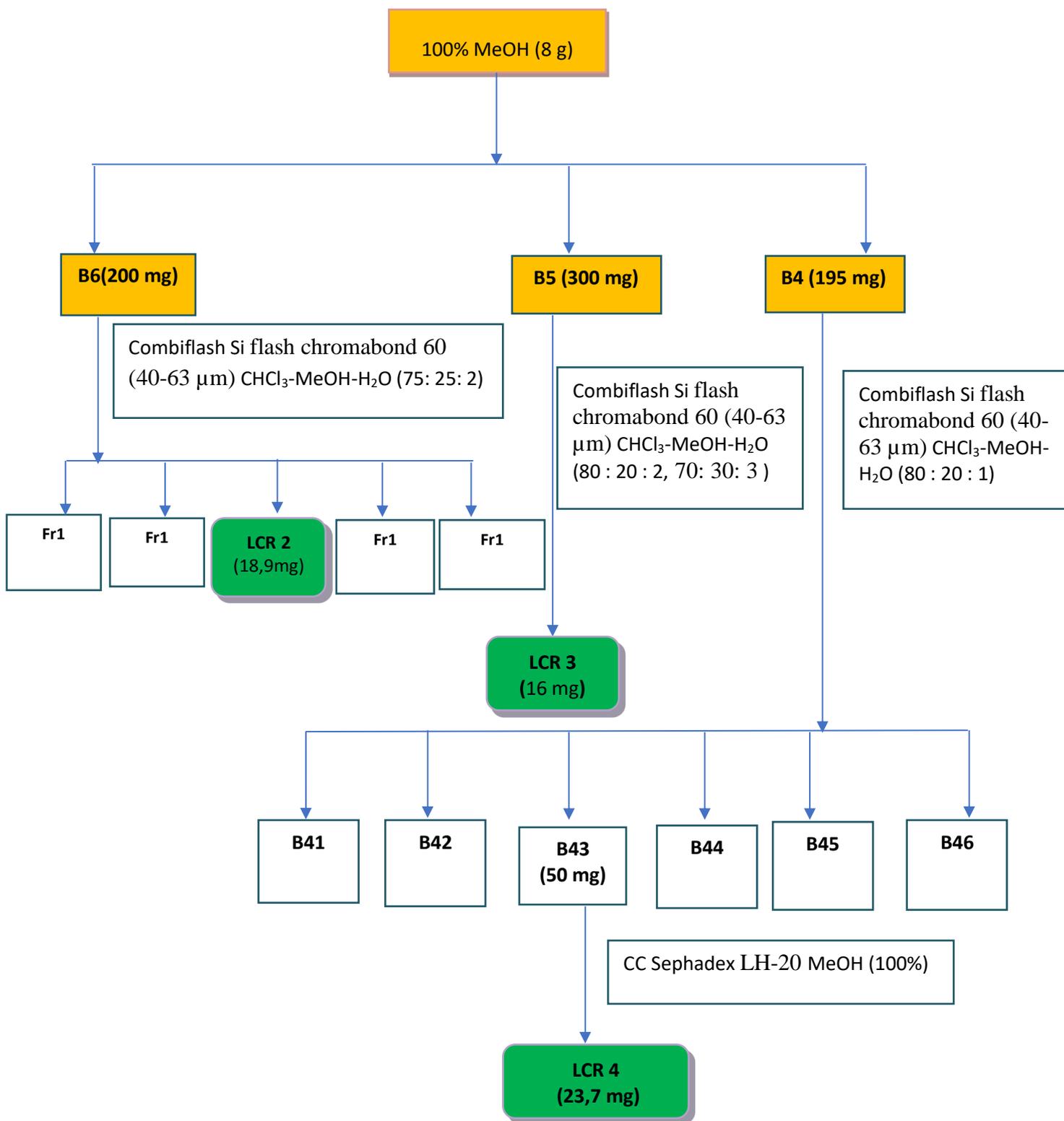


Figure 85: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des racines de *L. cupanioides*.

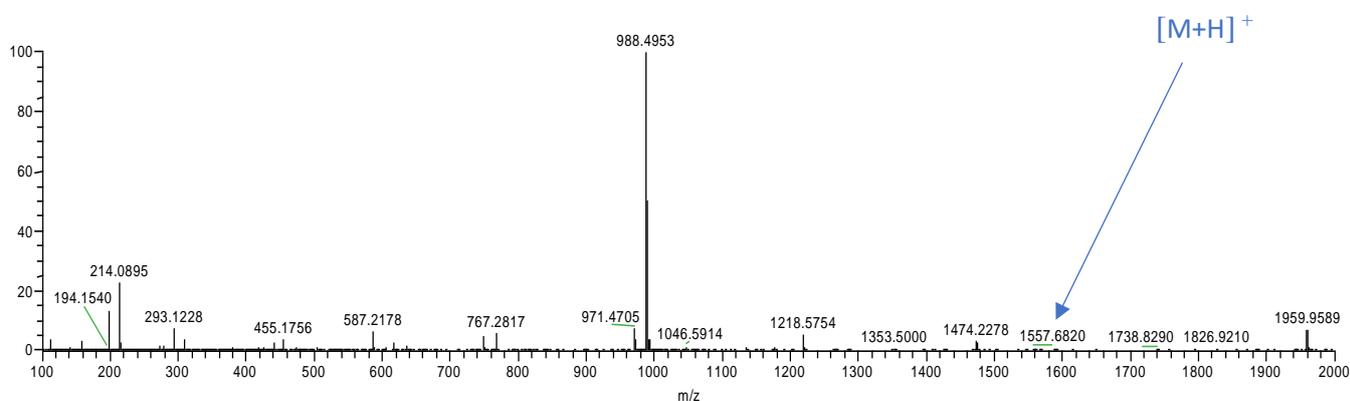
### 2.1.3.2. Caractérisation des composés

La détermination des structures des composés isolés a été réalisée par une analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse, l'hydrolyse chimique ainsi que par comparaison de nos données avec celles de la littérature.

#### a) Détermination de la structure de Cupanioideside A (LCR1)

##### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **LCR1** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre dans son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1557,6820  $[M+H]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{67}H_{112}O_{47}$ .



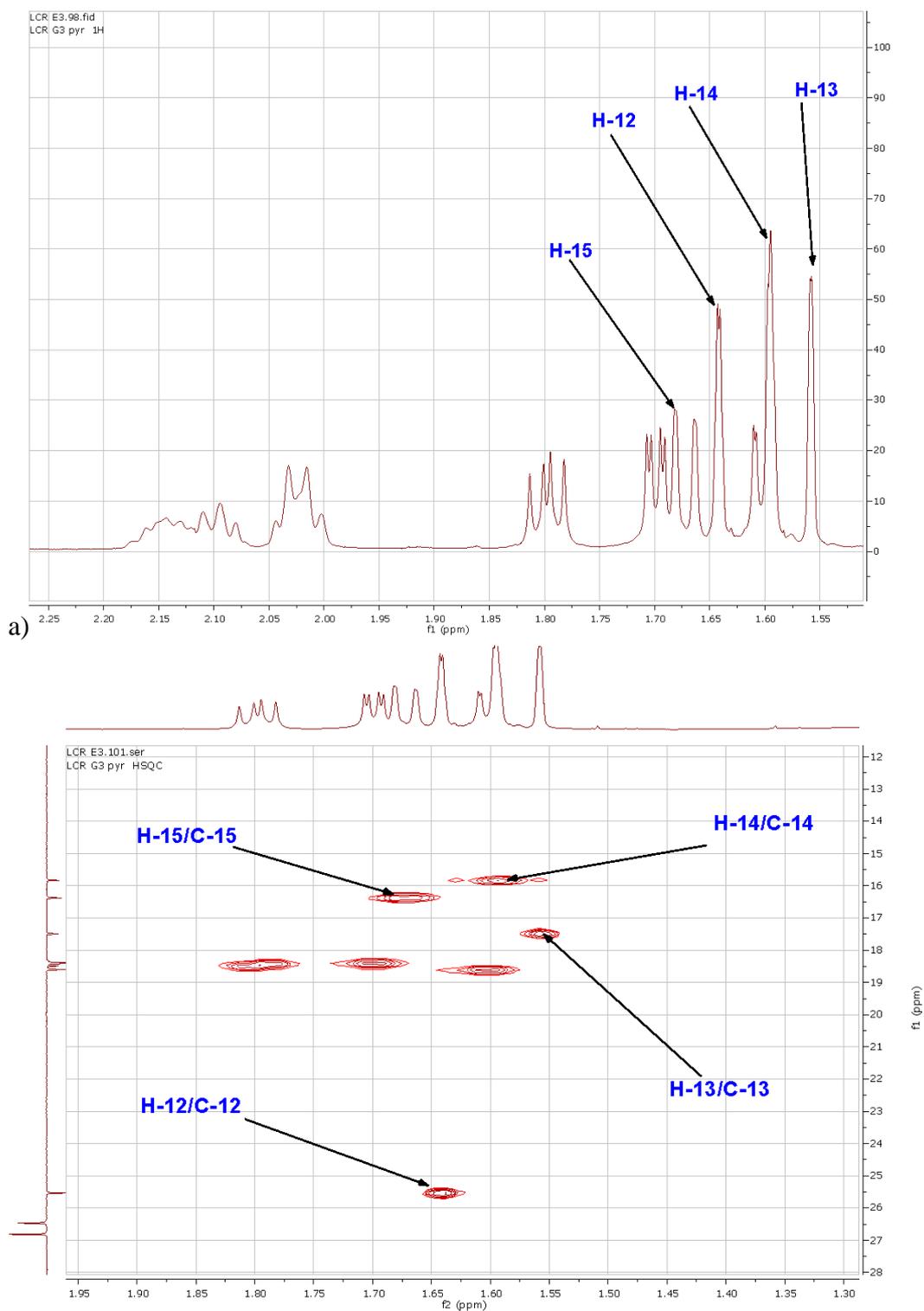
**Figure 86:** Spectre de masse du composé LCR1

##### ➤ Spectroscopie de RMN

##### Identification de l'aglycone

Tous les signaux des carbones et des protons sont déterminés et attribués d'après l'analyse des spectres RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, NOESY, HSQC et HMBC.

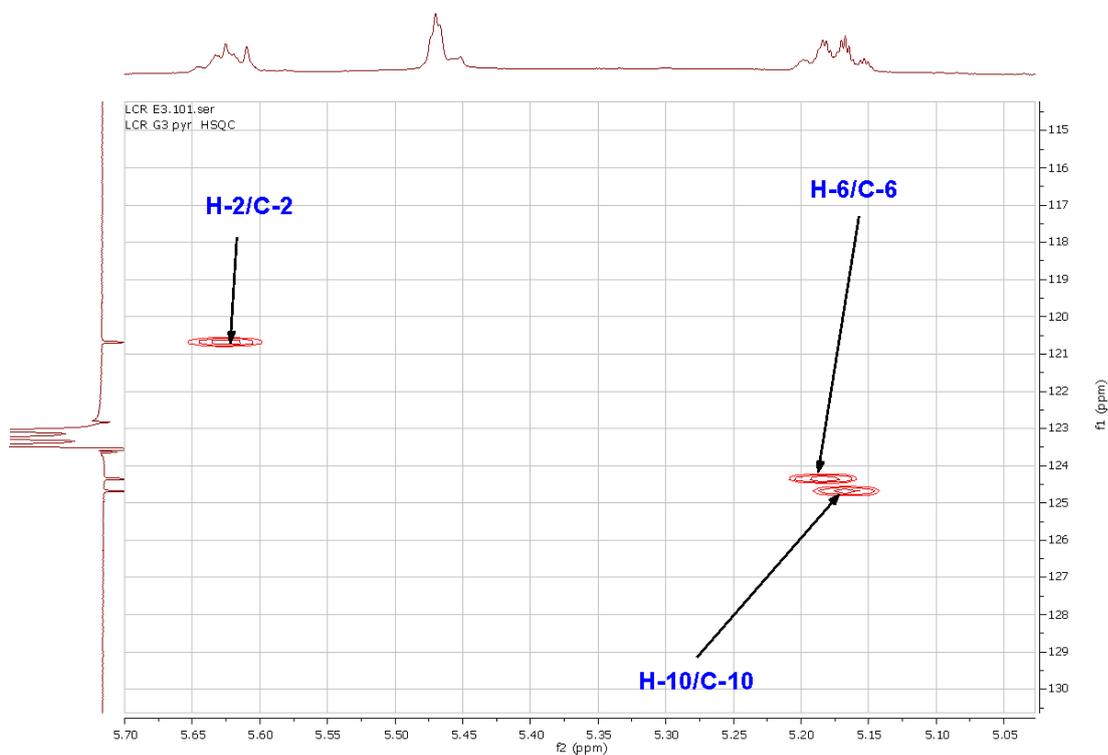
Le spectre RMN  $^1H$  montre quatre signaux de méthyles à  $\delta_H$  1,64 (s, H-12) ; 1,56 (s, H-13) ; 1,59 (s, H-14) et 1,67 (s, H-15) et qui corrélient dans le spectre HSQC avec les carbones  $\delta_C$  25,5 (C-12) ; 17,5 (C-13) ; 15,7 (C-14) et 16,2 (C-15).



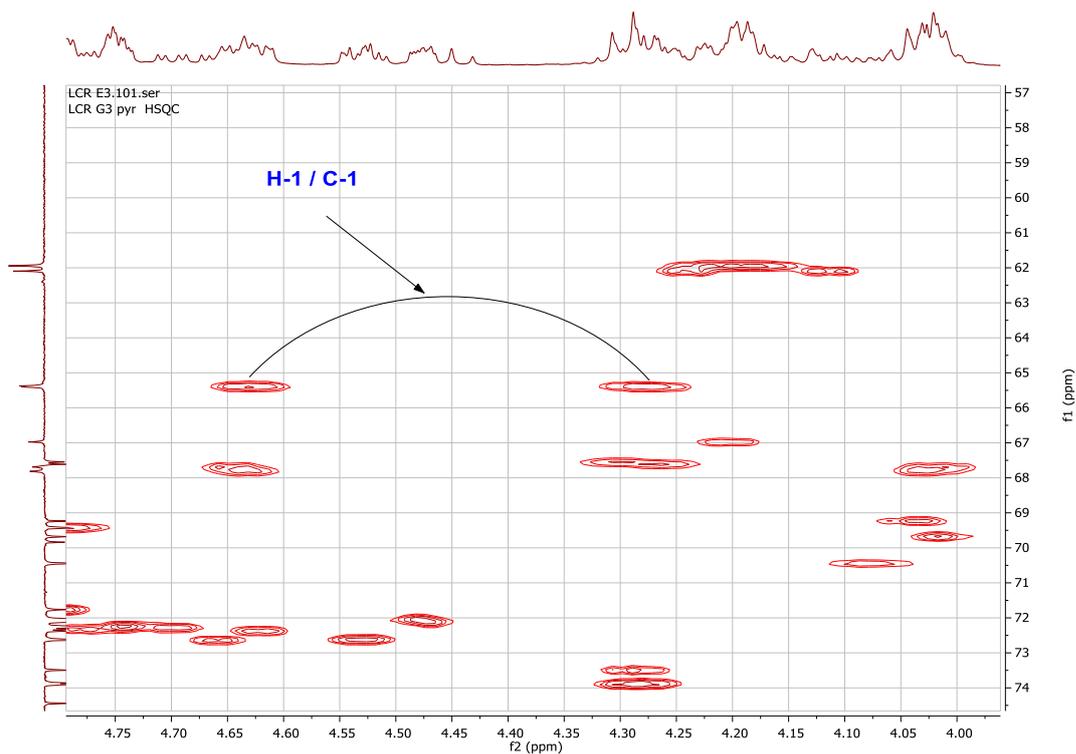
b)

**Figure 87: Spectres de RMN  $^1\text{H}$  (a) et HSQC (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé LCR1 montrant les méthyles angulaires.**

Trois protons oléfiniques résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  5,63 (m, H-2) ; 5,18 (m, H-6) et 5,16 (m, H-10) et montrant des corrélations avec les carbones dans le spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  120,4 ; 124,3 et 124,6 ppm ont été aussi observés, de même qu'un groupement oxyméthylène à  $\delta_{\text{H}}$  4,28 et 4,65 (m, H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>-1), montrant une corrélation dans le spectre HSQC avec  $\delta_{\text{C}}$  65,4 (C-1).



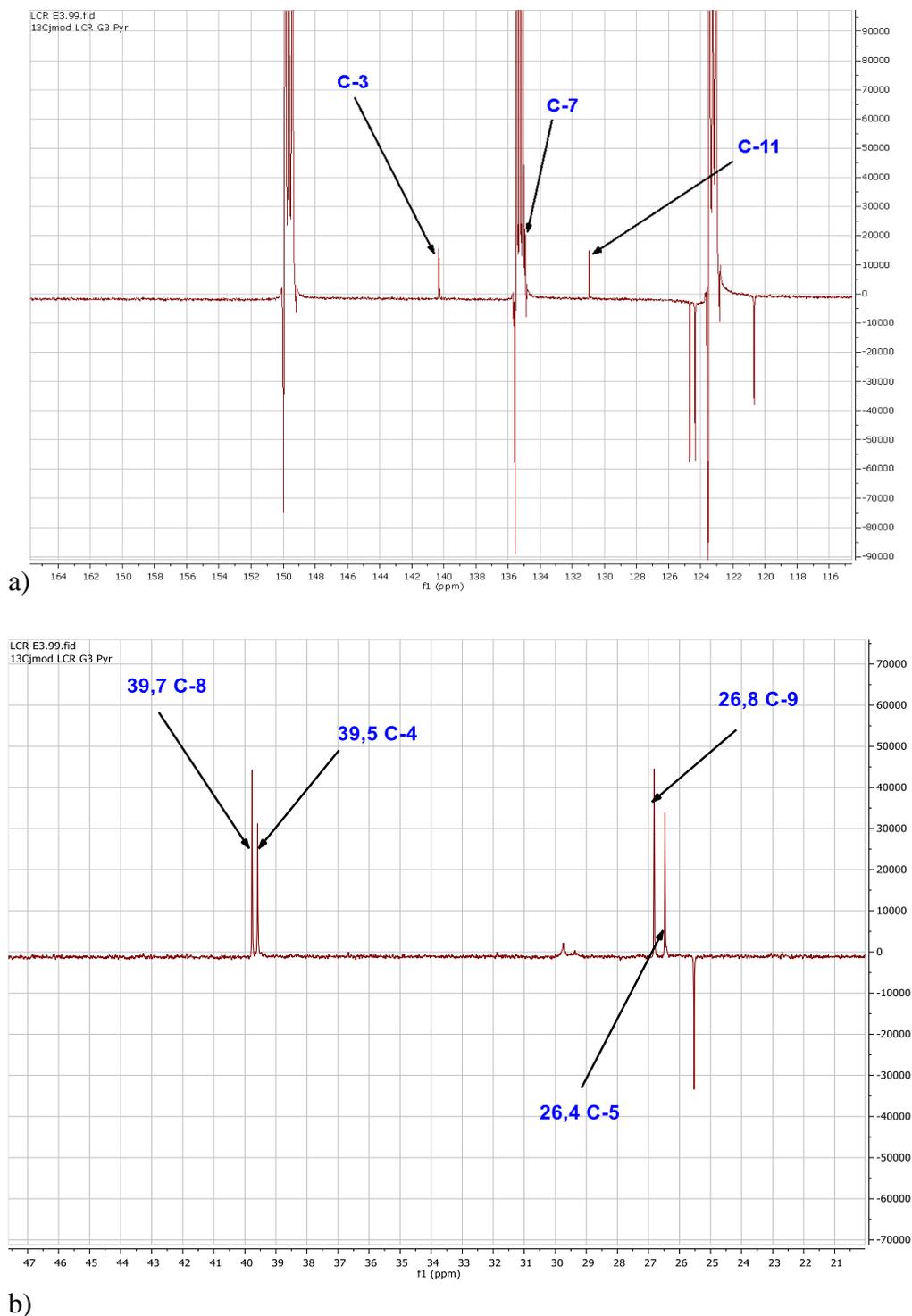
a)



b)

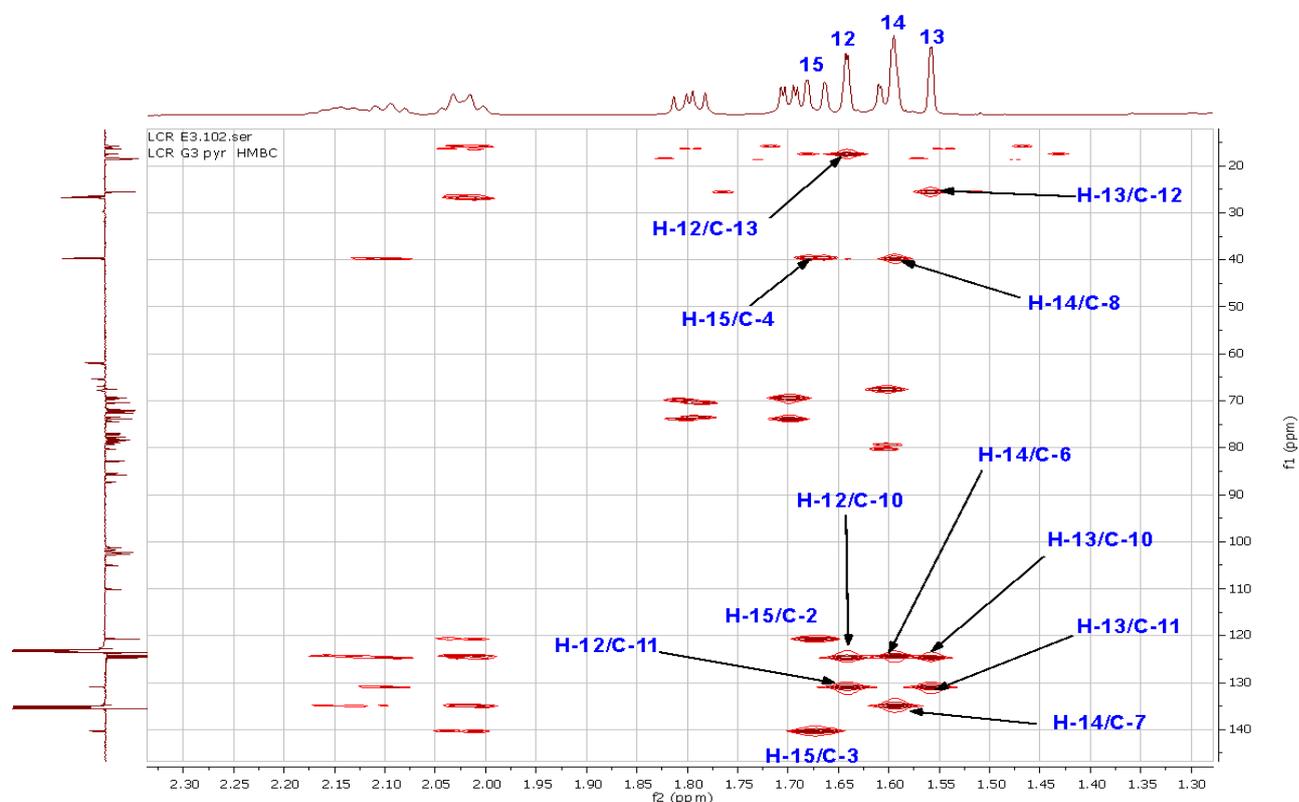
**Figure 88: Spectres HSQC (a,b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) élargie montrant les protons oléfiniques et le groupement oxyméthylène du composé LCRI.**

Dans le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ , on observe trois signaux de carbones quaternaires à  $\delta_{\text{C}}$  140,4 (C-3) ; 134,8 (C-7) et 130,0 (C-11), 4 signaux de carbones secondaires ( $\text{CH}_2$ ) à  $\delta_{\text{C}}$  39,5 ; 26,4 ; 39,7 et 26,8 ppm.



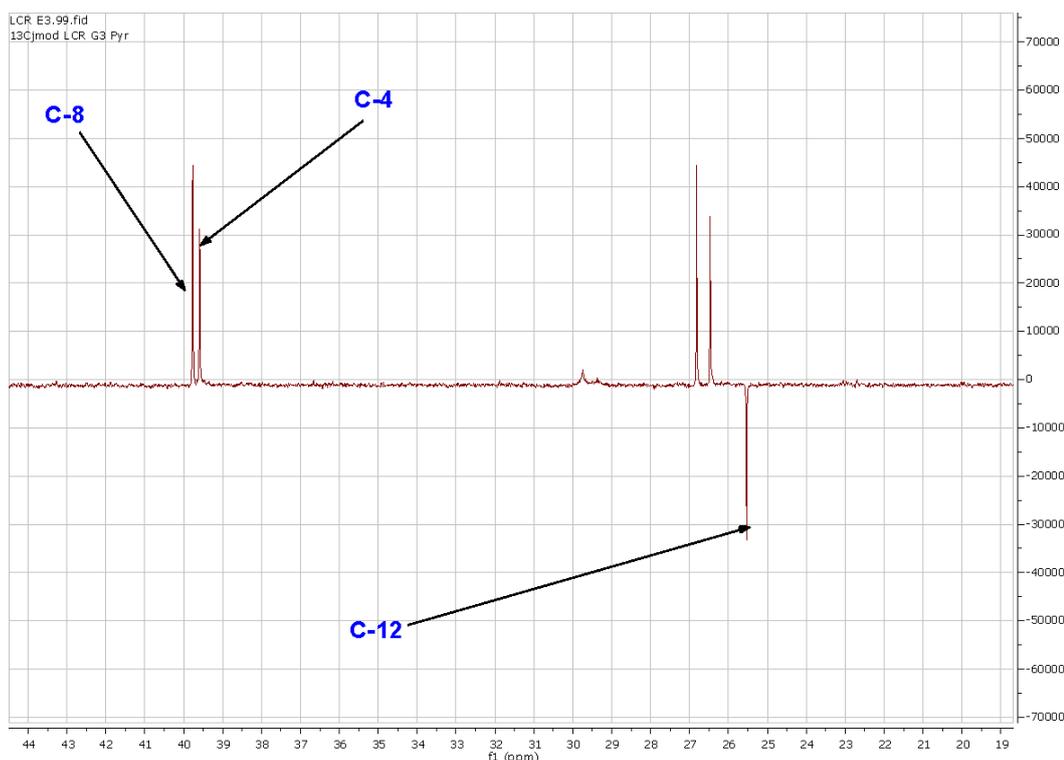
**Figure 89: Spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  (a,b) (125 MHz,  $\text{pyridine-d}_5$ ) montrant les carbones quaternaires et secondaires du composé LCRI.**

L'analyse de l'expérience HMBC montre que les protons du méthyle en position 15, corrélient avec les carbones éthyléniques C-3 et C-2, et que ceux du méthyle en position 14 corrélient avec les carbones éthyléniques C-6 et C-7 (**Figure 90**). Quant aux méthyles terminaux Me-12 et Me-13, on observe d'une part une intercorrélacion entre eux et d'autre part des corrélacions avec les carbones éthyléniques C-11 (quaternaire) et C-10 (CH).



**Figure 90:** Spectre HMBC montrant les corrélacions des méthyles angulaires du composé LCRI.

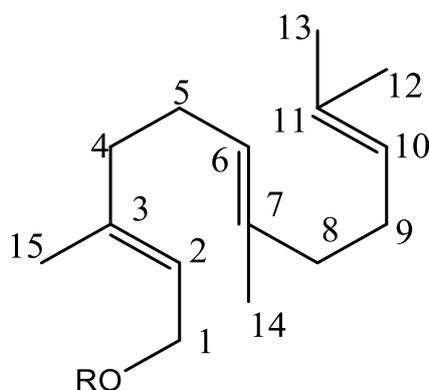
Les signaux de carbone dus aux méthyles oléfiniques C-14, C-15 à  $\delta_c$  15,7 ; 16,2 ppm et ceux de deux méthylènes C-4 et C-8 à  $\delta_c$  39,5 ; 39,7 ont été observés pratiquement aux mêmes positions que celles rapportées pour le (2*E*, 6*E*)-farnésol ; tandis que le méthyle terminal C-12 résonnant à  $\delta_c$  25,5 ppm, est particulièrement révélateur de la stéréochimie *E* des doubles liaisons dans la chaîne farnésyl selon la littérature (Kasai *et al.*, 1986; Numata *et al.*, 1992). Les autres configurations possibles (2*E*, 6*Z*), (2*Z*, 6*Z*) ou (2*Z*, 6*E*) ont été exclues, en considérant l'absence de signaux dans la région à  $\delta_c$  30-33 ppm (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018).



**Figure 91:** Spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, pyridine- $d_5$ ) zone des méthylènes de l'aglycone du composé LCR1.

Ainsi, l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC et HMBC de **LCR1** a permis d'attribuer tous les signaux de l'aglycone, et par comparaison avec les données de la littérature, nous l'avons identifié au (2*E*, 6*E*)-farnes-1-ol [(2*E*,6*E*)-3,7,11-triméthylDodéca-2,6,10-trién-1-ol] (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018) déjà trouvé dans la famille des Sapindaceae (**Tableau XX**).

La présence d'un seul groupement hydroxyméthylène resonnant à  $\delta_{\text{C}}$  65,4 (C-1), montre que **LCR1** est un dérivé monodesmosidique du (2*E*,6*E*)-farnésol ayant une chaîne oligosaccharidique attachée en C-1 au moyen d'une liaison éther (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018).



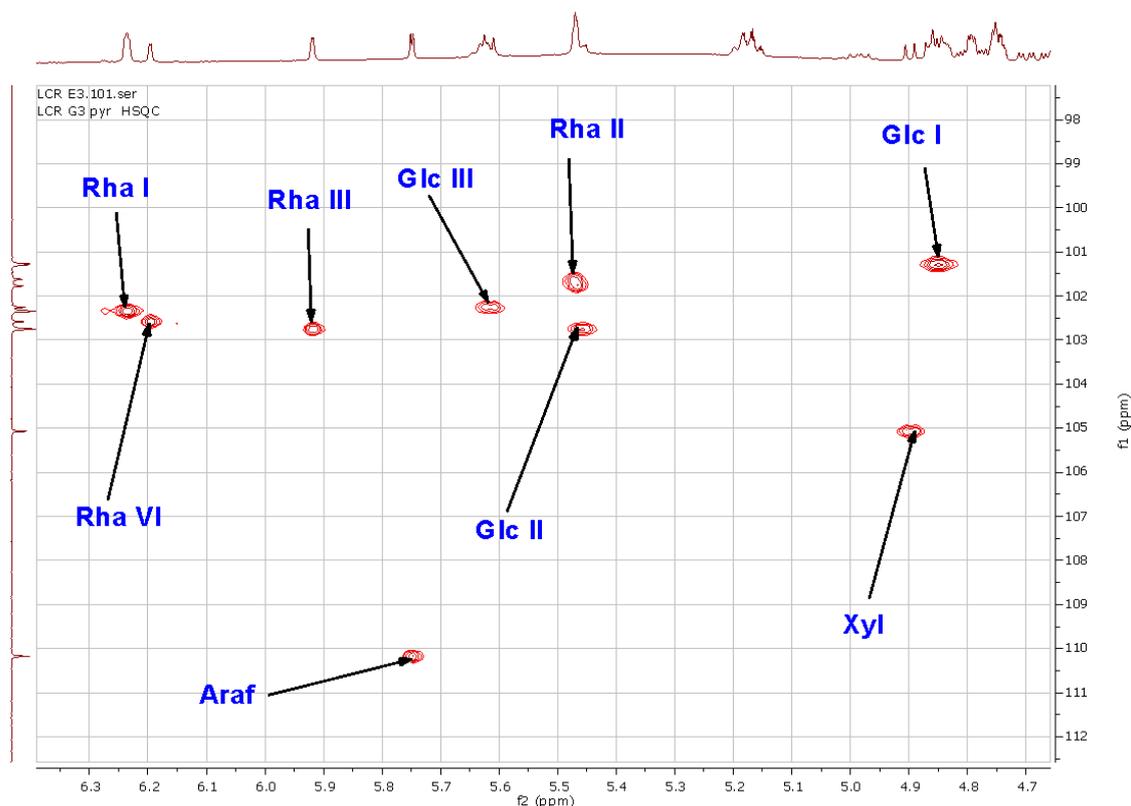
**Tableau XX: données de RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) de la partie aglycone de LCR1**

Pos	LCR1	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	65,4 (CH <sub>2</sub> )	4,28; 4,65 m
2	120,4 (CH)	5,63 m
3	140,4 (CH)	-
4	39,5 (CH <sub>2</sub> )	2,02
5	26,4 (CH <sub>2</sub> )	2,16
6	124,3 (CH)	5,18 m
7	134,8 (C)	-
8	39,7 (CH <sub>2</sub> )	2,09
9	26,8 (CH <sub>2</sub> )	2,09
10	124,6 (CH)	5,16 m
11	130,0 (C)	-
12	25,5 (CH <sub>3</sub> )	1,64 (s)
13	17,5 (CH <sub>3</sub> )	1,56 (s)
14	15,7 (CH <sub>3</sub> )	1,59 (s)
15	16,2 (CH <sub>3</sub> )	1,67 (s)

#### Détermination du nombre et de la nature des sucres

Les sucres de **LCR1**, ont été déterminés comme étant les monosaccharides suivants : D-Glc, L-Rha, D-Xyl et L-Araf par hydrolise acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) de leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire.

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  de **LCR1** permet de distinguer 9 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  4,85 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; 4,90 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; 5,46 (d,  $J = 7,6$  Hz) ; 5,47 (d,  $J = 2,0$  Hz) ; 5,62 (d,  $J = 7,8$  Hz) ; 5,75 (d,  $J = 2,1$  Hz) ; 5,92 (d,  $J = 1,6$  Hz) ; 6,20 (d,  $J = 1,6$  Hz) et 6,24 (d,  $J = 1,5$  Hz), et qui corrélient sur le spectre HSQC avec 9 carbones à  $\delta_{\text{C}}$  101,2 ; 105,0 ; 102,8 ; 101,8 ; 102,2 ; 110,1 ; 102,7 ; 102,5 et 102,3 respectivement, ce qui prouve la présence de 9 sucres.



**Figure 92: Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé LCRI.**

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées dans les spectres HSQC et confirmés par le spectre HMBC.

Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés : Glc, Ara, Rha et Xyl sont sous leur forme pyranosyle (**Tableau XXI**).

Les valeurs des constantes de couplages  $^3J_{H-1, H-2}$  comprises entre 7,6-7,8 Hz observées sur le spectre RMN  $^1H$  pour le Glc et le Xyl, indiquent l'orientation  $\beta$  de leur proton anomérique, alors que l'orientation  $\alpha$  des protons anomériques de Rha et Araf a été basée sur les valeurs de leurs constantes de couplage  $^3J_{H-1, H-2}$  comprises entre 1,5-2,0 Hz.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement  $\alpha$ -L-arabinofuranosyle Ara I-1 à  $\delta_H$  5,75 (d,  $J = 2,1$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ -D-xylopyranosyles Xyl I-1 à  $\delta_H$  4,90 (d,  $J = 7,5$  Hz) ;
- 3 groupements  $\beta$ -D-glucopyranosyles Glc I-1 à  $\delta_H$  4,85 (d,  $J = 7,6$  Hz), Glc II-1 à  $\delta_H$  5,46 (d,  $J = 7,6$  Hz), Glc III-1 à  $\delta_H$  5,62 (d,  $J = 7,8$  Hz) ;

- 4 groupements  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyles Rha I-1 à  $\delta_H$  6,24 (dd,  $J = 1,5 ; 2,8$  Hz), Rha II-1 à  $\delta_H$  5,47 (d,  $J = 2,0$  Hz), Rha III-1 à  $\delta_H$  5,92 (d,  $J = 1,6$  Hz), Rha VI-1 à  $\delta_H$  6,20 (d,  $J = 1,6$  Hz).

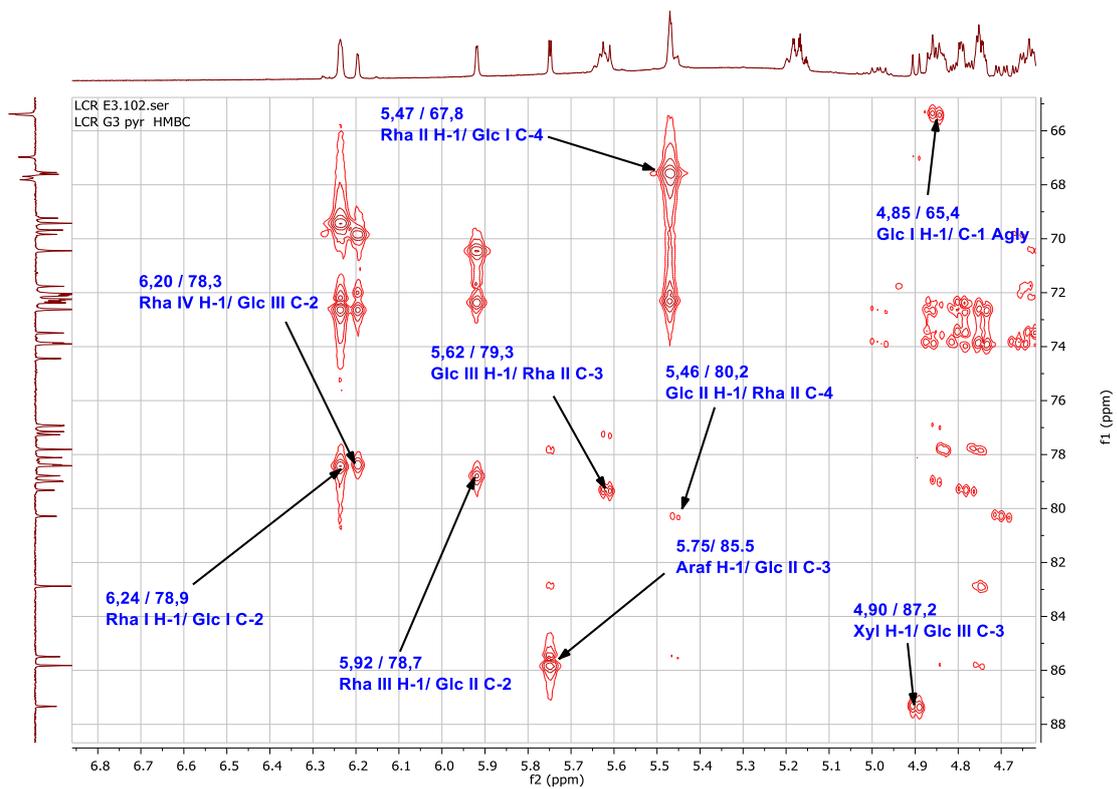
### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

Les chaînes oligosaccharidiques ainsi que les points de fixation sur l'aglycone ont été réalisés grâce aux corrélations observées dans les spectres HMBC et NOESY.

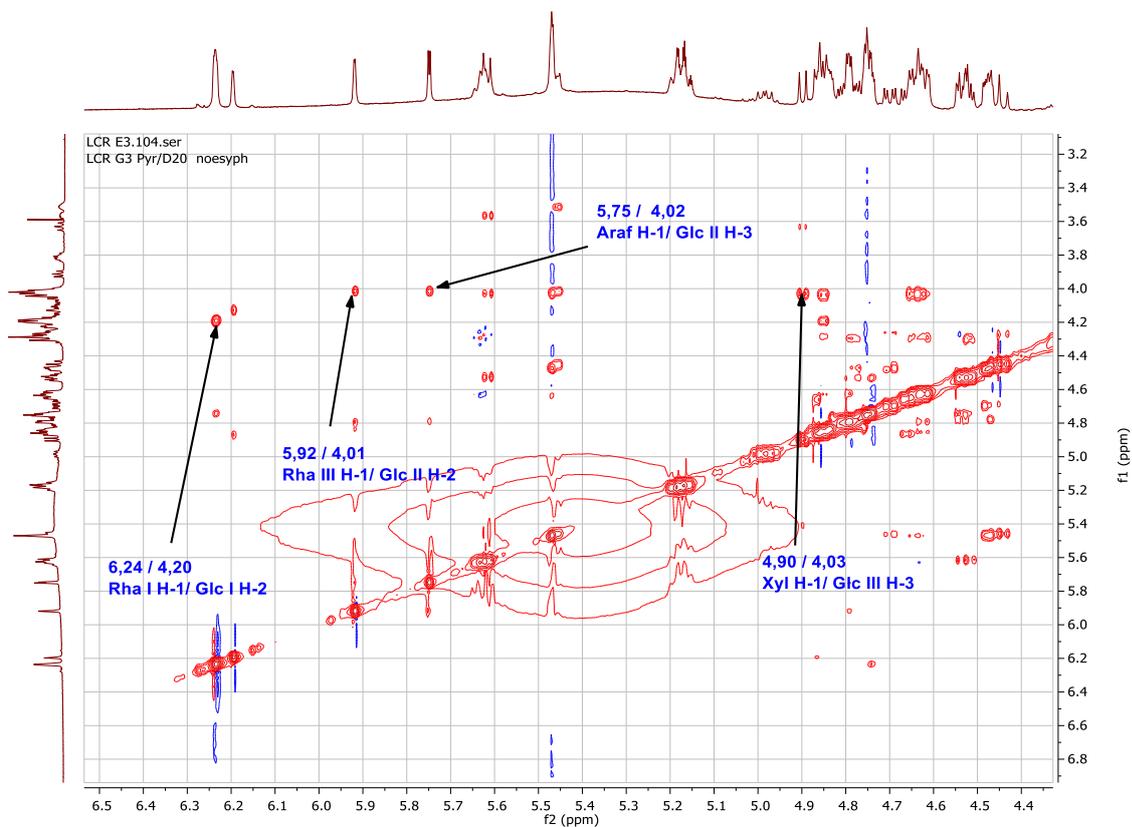
#### Chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  de **LCR1** révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_C$  65,4 (C-1) dû à une liaison glycosidique. La corrélation observée dans le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  4,85 (H-1 Glc I) et le signal  $\delta_C$  65,4 (C-1 de l'aglycone) suggère que Glc I est lié à la génine en position 1 ; cette liaison est confirmée par la corrélation observée sur le spectre NOESY entre les signaux à  $\delta_H$  4,85 /  $\delta_H$  4,65 (Glc I H-1/Agly H-1).

Le reste de la chaîne des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  6,24 /  $\delta_C$  78,9 (Rha I H-1/Glc I C-2) ; 5,47 / 67,8 (Rha II H-1/Glc I C-6) ; 5,46 / 80,2 (Glc II H-1/Rha II C-4) ; 5,75 / 85,5 (Araf H-1/Glc II C-3) ; 5,92 / 78,7 (Rha III H-1/Glc II C-2) ; 5,62 / 79,3 (Glc III H-1/Rha II C-3) ; 4,90 / 87,2 (Xyl H-1/Glc III C-3) et 6,20 / 78,3 (Rha IV H-1/Glc III C-2) et confirmé par les corrélations  $\delta_H$  6,24 /  $\delta_H$  4,20 (Rha I H-1/Glc I H-2) ; 5,47 / 4,02 (Rha II H-1/ Glc I H-6) ; 5,46 / 4,45 (Glc II H-1/ Rha II H-4) ; 5,75 / 4,02 (Araf H-1/Glc II H-3) ; 5,92 / 4,01 (Rha III H-1/Glc II H-2) ; 5,62 / 4,52 (Glc III H-1/Rha II H-3) ; 4,90 / 4,03 (Xyl H-1/ Glc III H-3) et 6,20 / 4,13 (Rha IV H-1/Glc III H-2).



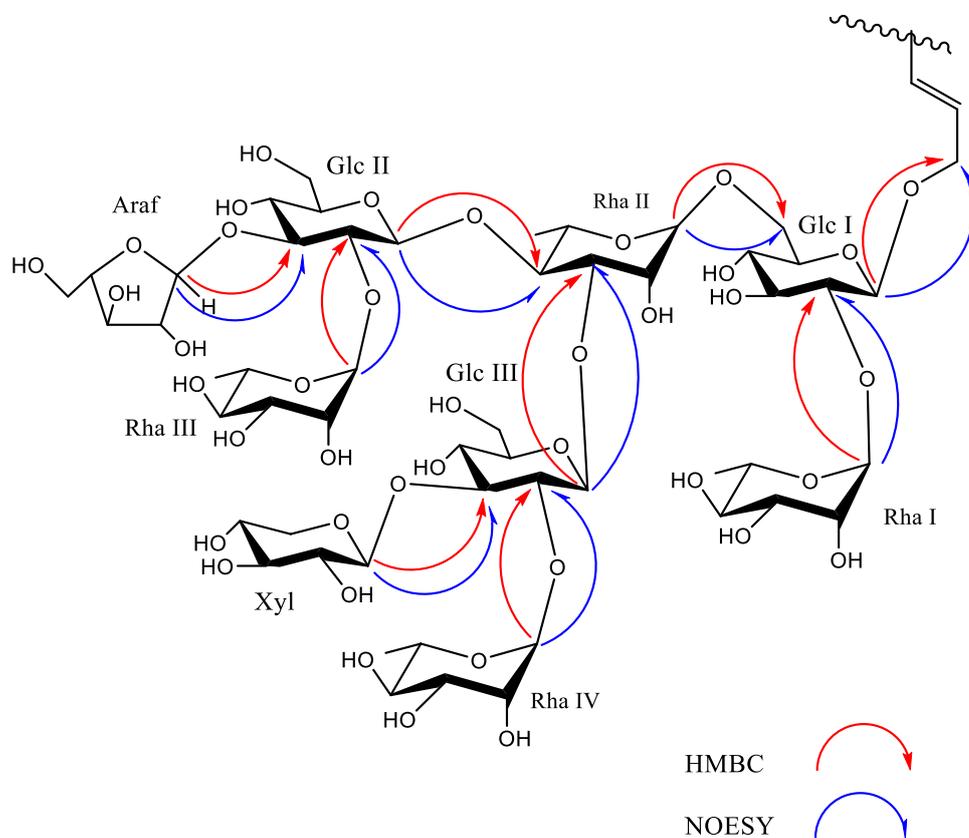
a)



b)

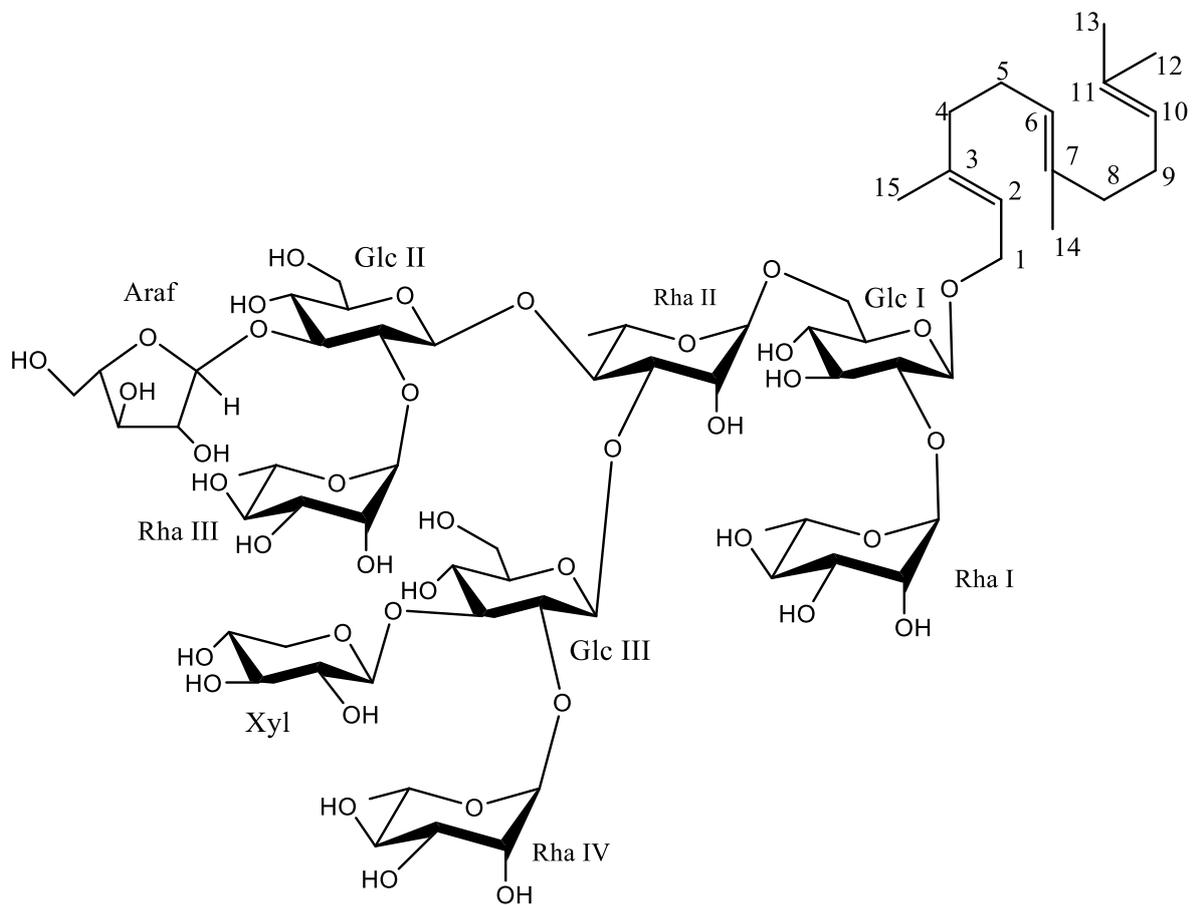
**Figure 93: Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé LCR1 montrant les points de liaison des sucres.**

La séquence complète,  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyle a été fixée en position C-1 de l'aglycone.



**Figure 94:** Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone du composé LCRI.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **LCRI** a été élucidée comme étant le 1-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(2*E*,6*E*)-farnes-1-ol, nouveau composé naturel auquel on a donné le nom de **cupanioidesoside A** (Messi *et al.*, 2020b).



*Figure 95: Structure du composé LCR1*

**Tableau XXI: données de RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) de la partie osidique de LCR1**

Pos.	LCR1		Pos	$\delta_C$	$\delta_H$
	$\delta_C$	$\delta_H$			
<b>Sucres en C-1</b>			<b>Sucres en C-1</b>		
Glc I			Rha-III		
1	101,2 (CH)	4,85 (d, 7,6)	1	102,7 (CH)	5,92 (d, 1,6)
2	78,9 (CH)	4,20	2	71,7 (CH)	4,80
3	78,3 (CH)	4,19	3	72,4 (CH)	4,53
4	72,1 (CH)	3,81	4	73,5 (CH)	4,28
5	76,8 (CH)	4,05	5	70,3 (CH)	4,87
6	67,8 (CH <sub>2</sub> )	4,02 m ; 4,64	6	18,4 (CH <sub>3</sub> )	1,79 (d, 6,2)
Rha-I			Glc-III		
1	102,3 (CH)	6,24 (d, 1,5)	1	102,2 (CH)	5,62 (d, 7,8)
2	71,9 (CH)	4,74	2	78,3 (CH)	4,13
3	72,5 (CH)	4,54	3	87,2 (CH)	4,03
4	73,8 (CH)	4,28	4	69,2 (CH)	4,04
5	69,8 (CH)	4,01	5	77,4 (CH)	3,52
6	18,5 (CH <sub>3</sub> )	1,81 (d, 6,2)	6	62,1 (CH <sub>2</sub> )	4,11 m ; 4,25
Rha-II			Xyl		
1	101,8 (CH)	5,47 (d, 2,0)	1	105,0 (CH)	4,90 (d, 7,6)
2	72,0 (CH)	4,49	2	74,6 (CH)	3,91
3	79,3 (CH)	4,52	3	77,9 (CH)	4,75
4	80,2 (CH)	4,45	4	70,3 (CH)	4,09
5	69,3 (CH)	4,78	5	66,8 (CH <sub>2</sub> )	3,63 (d, 10,6); 4,20
6	18,4 (CH <sub>3</sub> )	1,61(d, 1,3)	Rha-IV		
Glc-II			1	102,5 (CH)	6,20 (d, 1,6)
1	102,8 (CH)	5,46 (d, 7,6)	2	71,9 (CH)	4,85
2	78,7 (CH)	4,01	3	72,4 (CH)	4,62
3	85,5 (CH)	4,02	4	73,8 (CH)	4,29
4	69,5 (CH)	4,80	5	69,4 (CH)	4,01
5	76,8 (CH)	3,51	6	18,4 (CH <sub>3</sub> )	1,70 (d, 2,0)
6	61,7 (CH <sub>2</sub> )	4,15; 4,22			
Araf					
1	110,1 (CH)	5,75 (d, 2,1)			
2	82,9 (CH)	4,85			
3	77,8 (CH)	4,75			
4	85,8 (CH)	4,75			
5	61,7 (CH <sub>2</sub> )	4,15 m; 4,22			

## b) Détermination de la structure de cupanioidesoside B (LCR2)

### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **LCR2** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre dans son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic doublement chargé à  $m/z$  1161,5150  $[M + 2Na]^{2+}$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{50}H_{84}O_{27}$ .

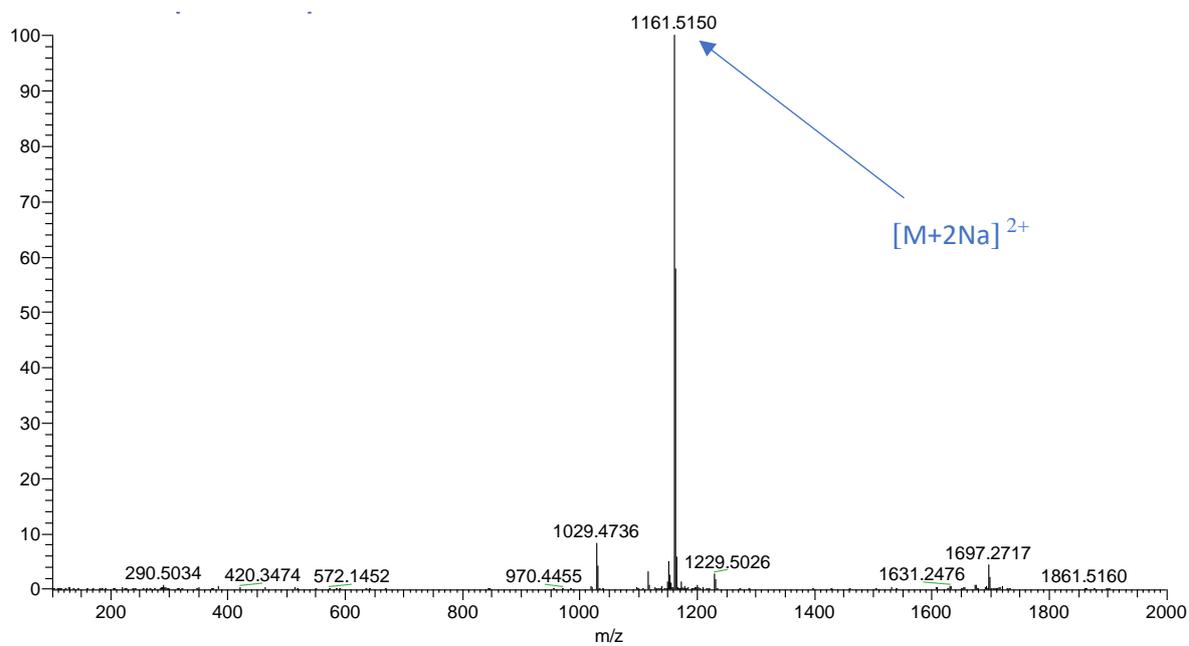


Figure 96 : Spectre de masse du composé LCR2

### ➤ Spectroscopie de RMN

#### Identification de l'aglycone

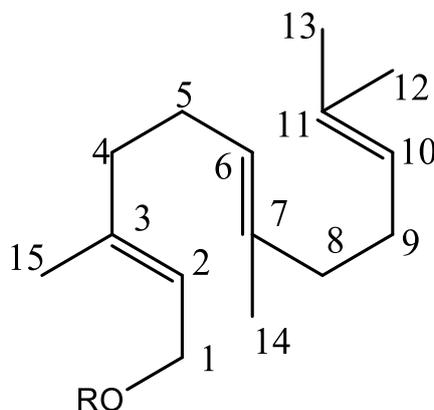
L'analyse des spectres RMN 1D et 2D et la comparaison des données de **LCR2** avec celles de **LCR1**, montre que ces deux composés partagent le même aglycone, à savoir le (2*E*, 6*E*)-farnes-1-ol (**Tableau XXII**). Les valeurs des déplacements chimiques des  $^1H$  et  $^{13}C$  de l'aglycone de **LCR2** ont été en accord avec celles de la littérature (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018).

Une analyse approfondie des spectres RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , HSQC et HMBC de **LCR2** a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone

**Tableau XXII: données RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) partie aglycone de LCR2**

Pos	LCR2	
	$\delta_C$	$\delta_H$
1	65,4 (CH <sub>2</sub> )	4,28; 4,63 m
2	120,7 (CH)	5,63 m
3	140,4 (C)	-
4	39,6 (CH <sub>2</sub> )	2,01
5	26,4 (CH <sub>2</sub> )	2,15
6	124,4 (CH)	5,19 m
7	134,9 (C)	-
8	39,7 (CH <sub>2</sub> )	2,05
9	26,8 (CH <sub>2</sub> )	2,10
10	124,6 (CH)	5,16 m
11	131,1 (C)	-
12	25,6 (CH <sub>3</sub> )	1,64 (s)
13	17,5 (CH <sub>3</sub> )	1,56 (s)
14	15,8 (CH <sub>3</sub> )	1,60 (s)
15	16,3 (CH <sub>3</sub> )	1,68 (s)

L'observation d'un seul groupement hydroxyméthylène résonant à  $\delta_C$  65,4 ppm montre que **LCR2** est un dérivé monodesmosidique du (2*E*,6*E*)-farnésol ayant une chaîne oligosaccharidique attachée en C-1 au moyen d'une liaison éther (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018).



#### Détermination du nombre et de la nature des sucres

Les sucres de **LCR2**, ont été déterminés comme étant les monosaccharides suivants : D-Glc, L-Rha et L-Araf par hydrolise acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) de leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire.

L'analyse du spectre de RMN <sup>1</sup>H de **LCR2** permet de distinguer 6 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_H$  4,85 (d,  $J = 7,4$  Hz) ; 6,23 (d,  $J = 1,5$  Hz) ; 5,47 (d,  $J = 1,3$  Hz) ;

5,46 (d,  $J = 9,1$  Hz) ; 5,75 (d,  $J = 2,1$  Hz) et 5,91 (d,  $J = 1,5$  Hz), qui corrélient en sur le spectre HSQC avec les signaux de 6 carbones à  $\delta_C$  101.2, 102.4, 101.8, 102.7, 110.2 et 102.7, respectivement, ce qui prouve la présence de 6 sucres.



**Figure 97:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé LCR2.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées sur les spectres HSQC et confirmés par le spectre HMBC.

Les valeurs des constantes de couplages observées sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  entre 7,4-9,1 Hz ont permis d'attribuer la configuration  $\beta$  au glucose et celles observées dans le spectre RMN  $^1\text{H}$  entre 1,3-2,1 Hz ont permis d'attribuer la configuration  $\alpha$  à Araf et Rha.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement  $\alpha$ - L-arabinofuranosyle Ara I-1 à  $\delta_H$  5,75 (d,  $J = 2,1$  Hz) ;
- 2 groupements  $\beta$ - D-glucopyranosyles Glc I-1 à  $\delta_H$  4,85 (d,  $J = 7,4$  Hz), Glc II-1 à  $\delta_H$  5,46 (d,  $J = 9,1$  Hz) ;
- 3 groupements  $\alpha$ - L -rhamnopyranosyles Rha I-1 à  $\delta_H$  6,23 (dd,  $J = 1,5$  Hz), Rha II-1 à  $\delta_H$  5,47 (d,  $J = 1,3$  Hz), Rha III-1 à  $\delta_H$  5,91 (d,  $J = 1,5$  Hz).

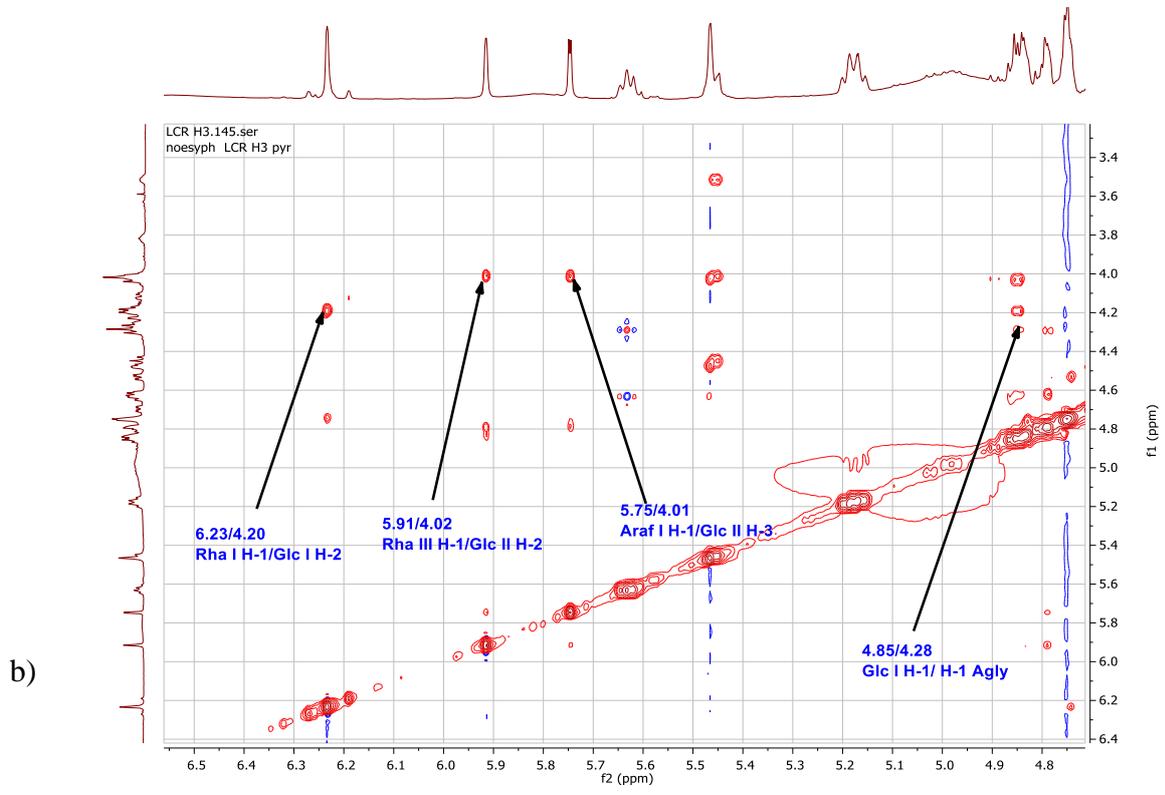
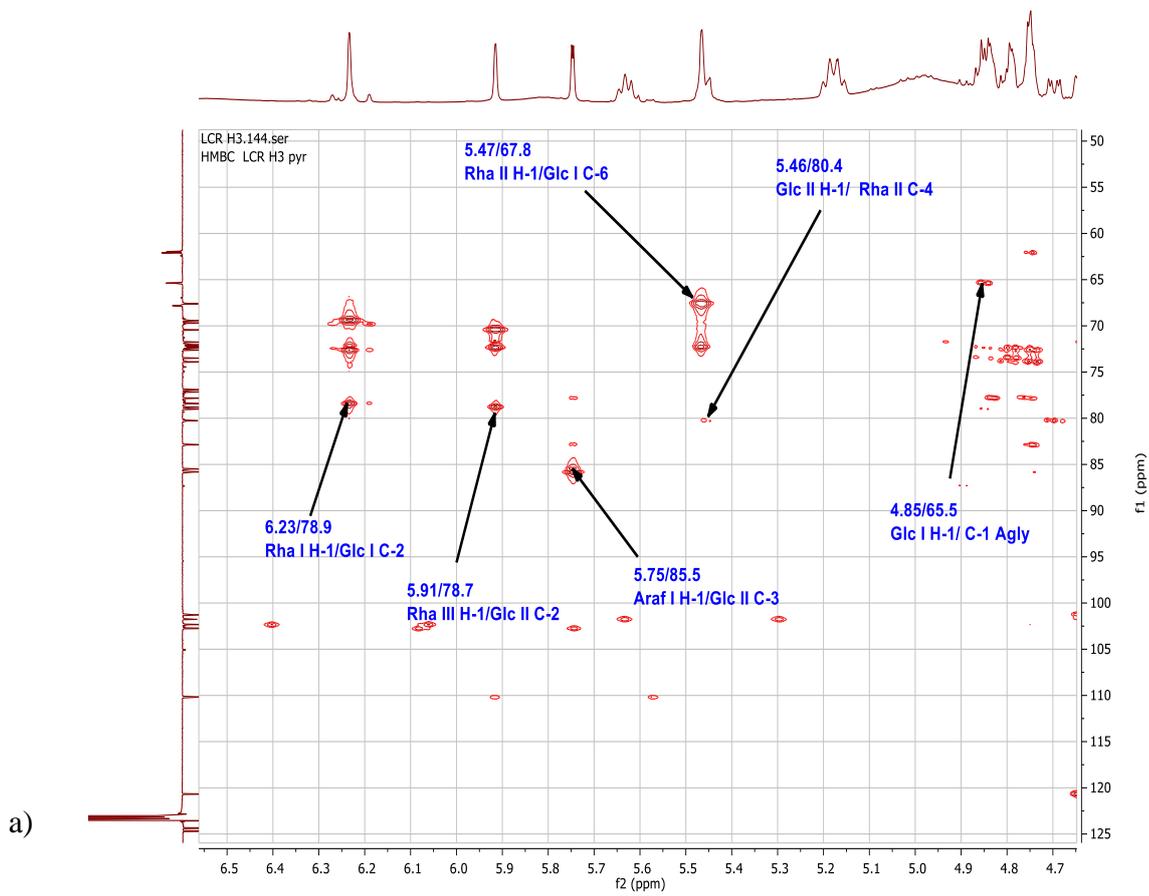
## Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

Les chaînes oligosaccharidiques ainsi que les points de fixation sur l'aglycone ont été réalisés grâce aux corrélations observées sur les spectres HMBC et NOESY.

### Chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone

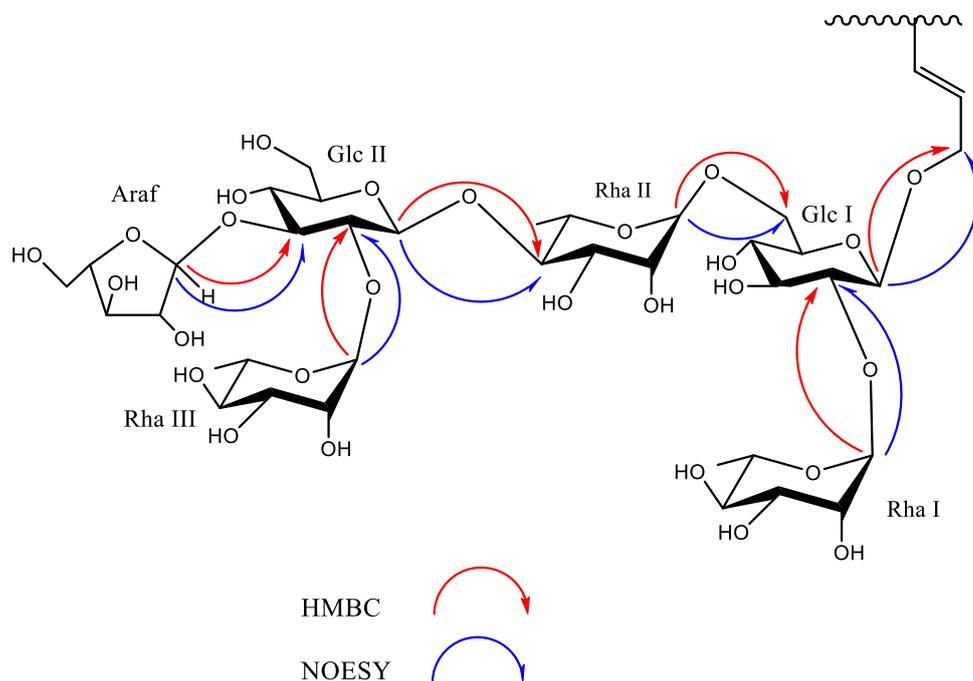
Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de **LCR2** révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  65,4 (C-1) dû à une liaison glycosidique. La séquence de l'oligosaccharide a été établie grâce aux spectres HMBC (**Figure 98a**) et NOESY (**Figure 98b**). La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_{\text{H}}$  4,85 (H-1 Glc I) et le signal  $\delta_{\text{C}}$  65,5 (C-1 de l'aglycone) suggère que Glc I est lié à la génine en position 1 ; cette liaison est confirmée par la corrélation observée sur le spectre NOESY entre les signaux à  $\delta_{\text{H}}$  4,85 /  $\delta_{\text{H}}$  4,28 (Glc I H-1/Agly H-1).

Le reste de la chaîne des sucres est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_{\text{H}}$  6,23 /  $\delta_{\text{C}}$  78,9 (Rha I H-1/ Glc I C-2) ; 5,47 / 67,8 (Rha II H-1/Glc I C-6) ; 5,46 / 80,4 (Glc II H-1/Rha II C-4) ; 5,75 / 85,5 (Araf H-1/Glc II C-3) et 5,91 / 78,7 (Rha III H-1/Glc II C-2), et confirmé par les corrélations  $\delta_{\text{H}}$  6,23 /  $\delta_{\text{H}}$  4,20 (Rha I H-1/Glc I H-2) ; 5,47 / 4,02 (Rha II H-1/Glc I H-6) ; 5,46 / 4,45 (Glc II H-1/Rha II H-4) ; 5,75 / 4,01 (Araf H-1/ Glc II H-3) et 5,91 / 4,02 (Rha III H-1/Glc II H-2).



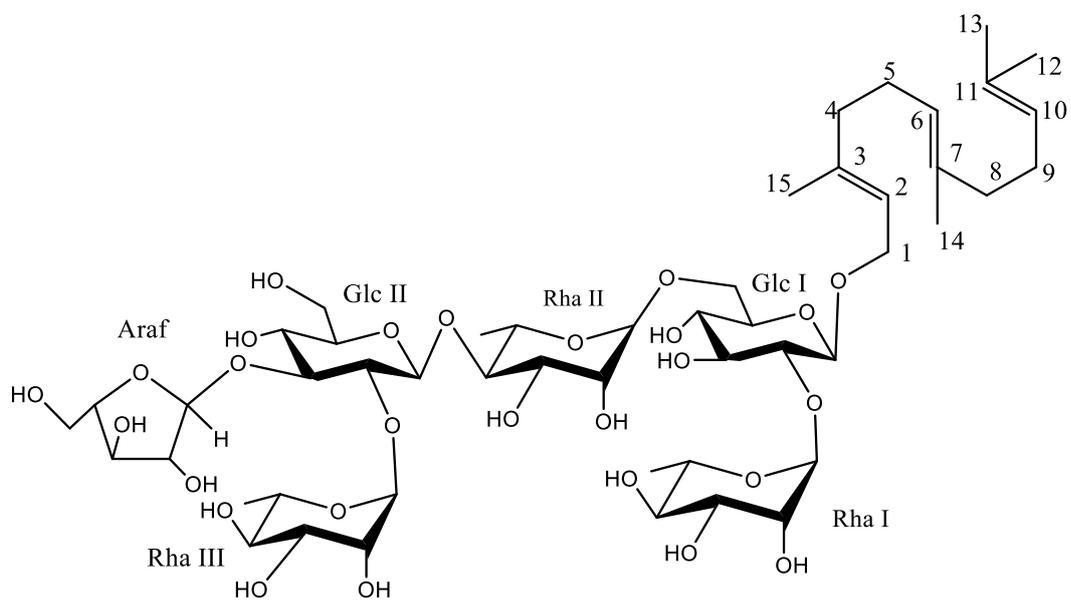
**Figure 98: Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b)(500 MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) du composé LCR2 montrant les points de liaison des sucres.**

La séquence complète,  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- [ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2) ]-  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyle a été établie en position C-1 de l'aglycone.



**Figure 99:** Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone du composé LCR2.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **LCR2** a été élucidée comme étant le 1-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- [ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2) ]-  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(2*E*,6*E*)-farnes-1-ol, nouveau composé naturel auquel on a donné le nom de **cupanioidesoside B** (Messi *et al.*, 2020b).



*Figure 100: Structure du composé LCR2*

**Tableau XXIII: données RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) partie osidique de LCR2**

Pos.	LCR2				
	$\delta_C$	$\delta_H$		$\delta_C$	$\delta_H$
<b>Sucres en C-1</b>			<b>Sucres en C-1</b>		
Glc I			Glc-II		
1	101,2(CH)	4,85 (d, 7,4)	1	102,7 (CH)	5,46 (d, 9,1)
2	78,9 (CH)	4,20	2	78,7 (CH)	4,02
3	78,4 (CH)	4,19	3	85,5 (CH)	4,01
4	70,5 (CH)	4,08	4	69,8 (CH)	4,80
5	76,9 (CH)	4,04	5	77,2 (CH)	3,51
6	67,8 (CH <sub>2</sub> )	4,02 m ; 4,63	6	61,9 (CH <sub>2</sub> )	4,16 m; 4,19
Rha-I			Araf		
1	102,4 (CH)	6,23 (d, 1,5)	1	110,2 (CH)	5,75 (d, 2,1)
2	72,0 (CH)	4,47	2	82,8 (CH)	4,83
3	72,5 (CH)	4,53	3	77,6 (CH)	4,75
4	73,8 (CH)	4,28	4	85,8 (CH)	4,75
5	69,5 (CH)	4,01	5	62,1 (CH <sub>2</sub> )	4,11 (d, 4,0); 4,24
6	18,5 (CH <sub>3</sub> )	1,81 (d, 6,2)	Rha-III		
Rha-II			1	102,7 (CH)	5,91 (d, 1,5)
1	101,8 (CH)	5,47 (d, 1,3)	2	71,7 (CH)	4,79
2	72,0 (CH)	4,49	3	72,3 (CH)	4,61
3	72,2 (CH)	4,70	4	73,5 (CH)	4,28
4	80,2 (CH)	4,45	5	70,4 (CH)	4,85
5	67,6 (CH)	4,27	6	18,5 (CH <sub>3</sub> )	1,79 (d, 6,2)
6	18,5 (CH <sub>3</sub> )	1,61 (d, 6,5)			

### c) Détermination de la structure de cupanioidesoside C

#### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **LCR3** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre dans son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic doublement chargé à  $m/z$  1015,4581  $[M + 2Na]^{2+}$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{44}H_{74}O_{23}$ .

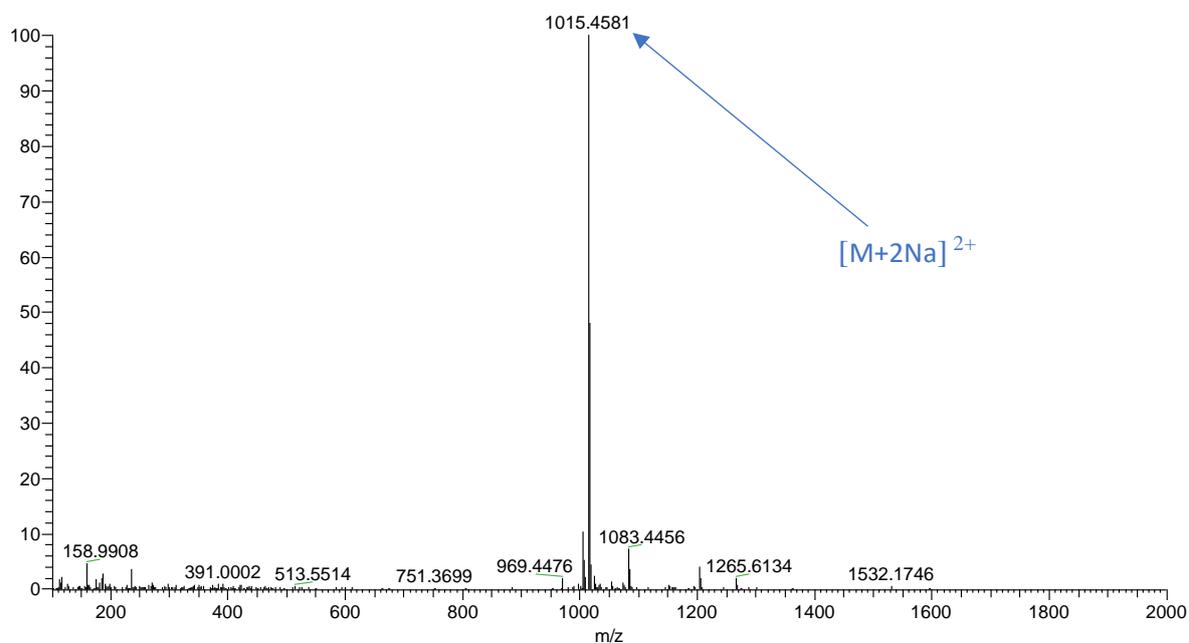


Figure 101: Spectre de masse du composé LCR3

#### ➤ Spectroscopie de RMN

##### Identification de l'aglycone

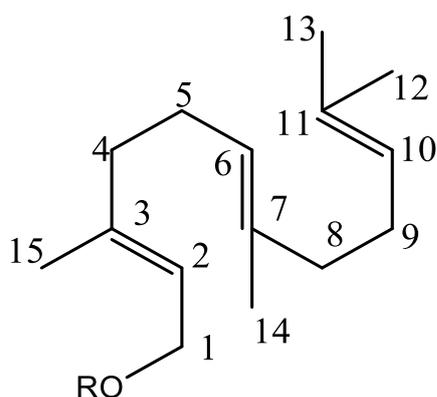
L'analyse des spectres RMN 1D et 2D et la comparaison des données de **LCR3** avec celles de **LCR1**, montre que ces deux composés partagent le même aglycone, à savoir le (2*E*, 6*E*)-farnes-1-ol (Tableau XXIV). Les valeurs des déplacements chimiques des  $^1H$  et  $^{13}C$  de l'aglycone de **LCR2** ont été en accord avec celles de la littérature (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018).

Une analyse approfondie des spectres RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , HSQC et HMBC de **LCR3** a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone

**Tableau XXIV: données RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de LCR3**

Pos	LCR3	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	65,4 (CH <sub>2</sub> )	4,28; 4,63 m
2	120,7 (CH)	5,63 m
3	140,4 (C)	-
4	39,6 (CH <sub>2</sub> )	2,01
5	26,4 (CH <sub>2</sub> )	2,15
6	124,4 (CH)	5,19 m
7	134,9 (C)	-
8	39,7 (CH <sub>2</sub> )	2,05
9	26,8 (CH <sub>2</sub> )	2,10
10	124,6 (CH)	5,16 m
11	131,1 (C)	-
12	25,6 (CH <sub>3</sub> )	1,64 (s)
13	17,5 (CH <sub>3</sub> )	1,56 (s)
14	15,8 (CH <sub>3</sub> )	1,60 (s)
15	16,3 (CH <sub>3</sub> )	1,68 (s)

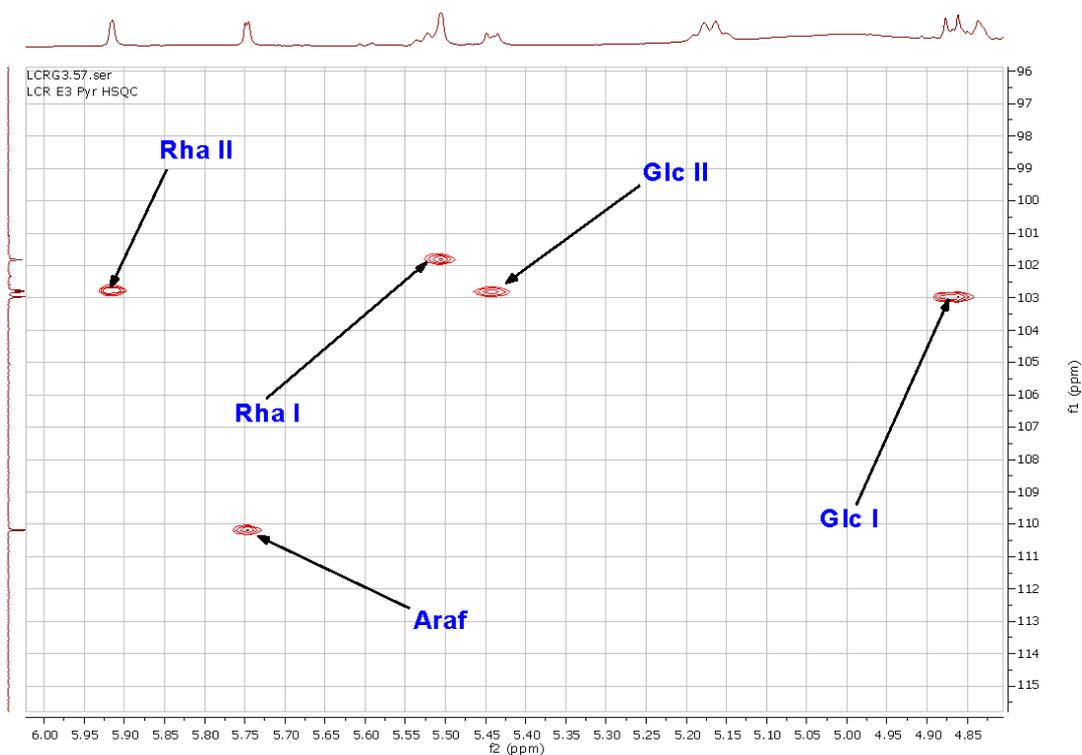
La présence d'un seul groupement hydroxyméthylène résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  65,4 ppm montre que **LCR3** est un dérivé monodesmosidique du (2*E*,6*E*)-farnésol ayant une chaîne oligosaccharidique attachée en C-1 au moyen d'une liaison éther (Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018).



### Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'hydrolyse acide du composé **LCR3**, suivie d'une CCM comparative de l'hydrolysate avec des échantillons de références du laboratoire et d'une analyse par chromatographie liquide, ont permis d'identifier les monosaccharides suivants : D-Glc, L-Rha et L-Araf.

L'analyse du spectre HSQC de **LCR3** permet de distinguer 5 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_H$  4,87 (d,  $J = 7,7$  Hz, Glc I), 5,51 (brs, Rha I H-1), 5,44 (d,  $J = 7,0$  Hz, Glc II H-1), 5,74 (d,  $J = 2,0$  Hz, Araf H-1) et 5,91 (brs, Rha II H-1), corrélant avec les signaux de 5 carbones à  $\delta_C$  102,9 ; 101,8 ; 102,7 ; 110,2 et 102,7 respectivement, ce qui prouve la présence de 5 sucres.



**Figure 102:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé LCR3.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées dans les spectres HSQC et confirmés par le spectre HMBC.

Les valeurs des constantes de couplages observées dans le spectre RMN  $^1H$  entre 7,0-7,7 Hz ont permis d'attribuer la configuration  $\beta$  au glucose et celles observées dans le spectre RMN  $^1H$  entre 1,3-2,1 Hz ont permis d'attribuer la configuration  $\alpha$  à Araf et Rha.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement  $\alpha$ - L-arabinofuranosyle Ara I-1 à  $\delta_H$  5,74 (d,  $J = 2,0$  Hz) ;
- 2 groupements  $\beta$ - D-glucopyranosyles Glc I-1 à  $\delta_H$  4,87 (d,  $J = 7,7$  Hz), Glc II-1 à  $\delta_H$  5,44 (d,  $J = 7,0$  Hz) ;
- 2 groupements  $\alpha$ - L-rhamnopyranosyles Rha I-1 à  $\delta_H$  5,51 (brs), Rha II-1 à  $\delta_H$  5,91 (brs).

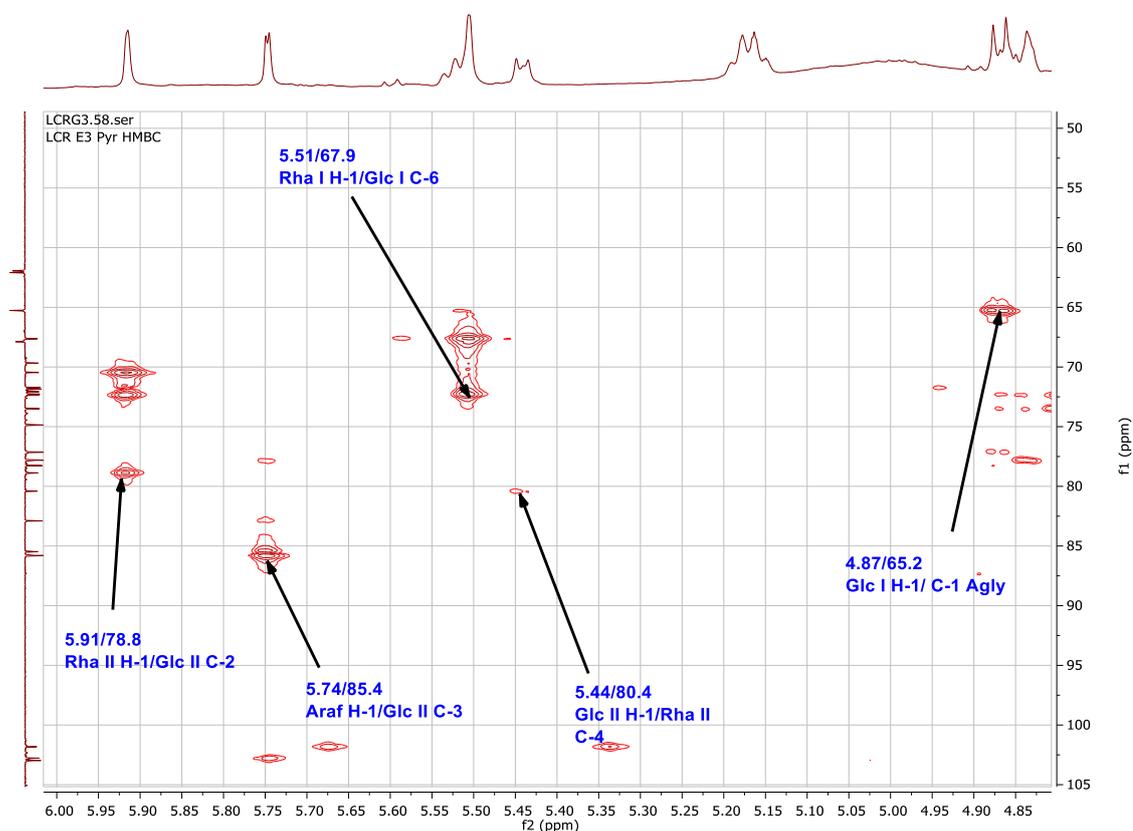
## Détermination des différents sites de fixation et d'enchainement des sucres

Les chaînes oligosaccharidiques ainsi que les points de fixation sur l'aglycone ont été réalisés grâce aux corrélations observées sur les spectres HMBC.

### Chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone

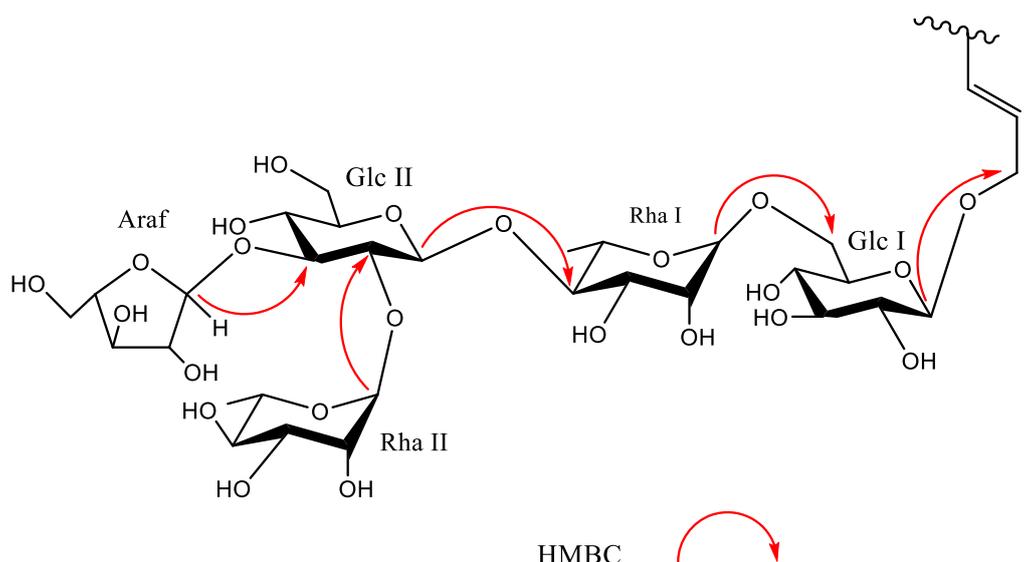
Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de LCR3 révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  65,2 (C-1) dû à une liaison glycosidique. La séquence de l'oligosaccharide a été établie grâce aux spectres HMBC (**Figure 103**). La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_{\text{H}}$  4,87 (H-1 Glc I) et le signal  $\delta_{\text{C}}$  65,4 (C-1 de l'aglycone) suggère que Glc I est lié à la génine en position 1.

Le reste de la chaîne des sucres est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_{\text{H}}$  5,51 /  $\delta_{\text{C}}$  67,9 (Rha I H-1/Glc I C-6) ; 5,44 / 80,4 (Glc II H-1/Rha II C-4) ; 5,74 / 85,4 (Araf H-1/ Glc II C-3) et 5,91 / 78,8 (Rha H-1/Glc II C-2).



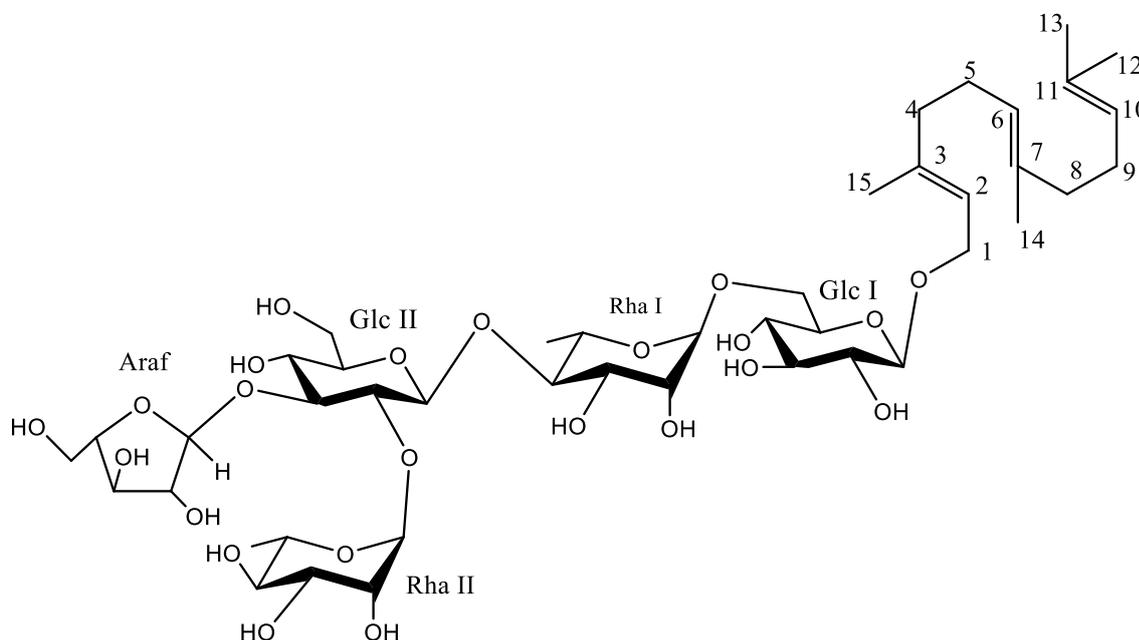
**Figure 103 :** Spectres HMBC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé LCR3 montrant les points de liaison des sucres.

La séquence complète,  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyle a été fixée en position C-1 de l'aglycone.



**Figure 104 :** Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-1 de l'aglycone du composé LCR3.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **LCR3** a été élucidée comme étant, 1-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(2*E*,6*E*)-farnes-1-ol, nouveau composé naturel auquel on a donné le nom de **cupanioideside C** (Messi *et al.*, 2020b).



**Figure 105:** Structure du composé LCR3

**Tableau XXV: données RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie osidique de LCR3**

Pos.	LCR3				
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Pos.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>Sucres en C-1</b>			<b>Sucres en C-1</b>		
Glc I			Araf		
1	102,9 (CH)	4,87 (d, 7,7)	1	110,2 (CH)	5,74 (d, 2,0)
2	74,8 (CH)	4,03	2	82,8 (CH)	4,84
3	78,2 (CH)	4,20	3	77,7 (CH)	4,75
4	71,8 (CH)	3,96	4	85,8 (CH)	4,76
5	77,1 (CH)	4,09	5	62,1 (CH <sub>2</sub> )	4,11 m; 4,24
6	67,9 (CH <sub>2</sub> )	4,09 m; 4,67	Rha-II		
Rha-I			1	102,7 (CH)	5,91 (brs)
1	101,8 (CH)	5,51 (brs)	2	71,6 (CH)	4,80
2	72,0 (CH)	4,51	3	72,4 (CH)	4,63
3	72,2 (CH)	4,71	4	73,4 (CH)	4,28
4	80,4 (CH)	4,45	5	70,4 (CH)	4,85
5	67,5 (CH <sub>2</sub> )	4,30	6	18,4 (CH <sub>3</sub> )	1,78 (d, 6,2)
6	18,6 (CH <sub>3</sub> )	1,62 (d, 6,2)			
Glc-II					
1	102,7 (CH)	5,44 (d, 7,0)			
2	78,8 (CH)	4,01			
3	85,4 (CH)	4,02			
4	69,6 (CH)	4,80			
5	77,1 (CH)	3,51			
6	61,9 (CH <sub>2</sub> )	4,18 m; 4,22			

#### d) Détermination de la structure de lecanioside A (LCR4)

##### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **LCR4** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre dans son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  913,5165  $[M+H]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{47}H_{76}O_{17}$ .

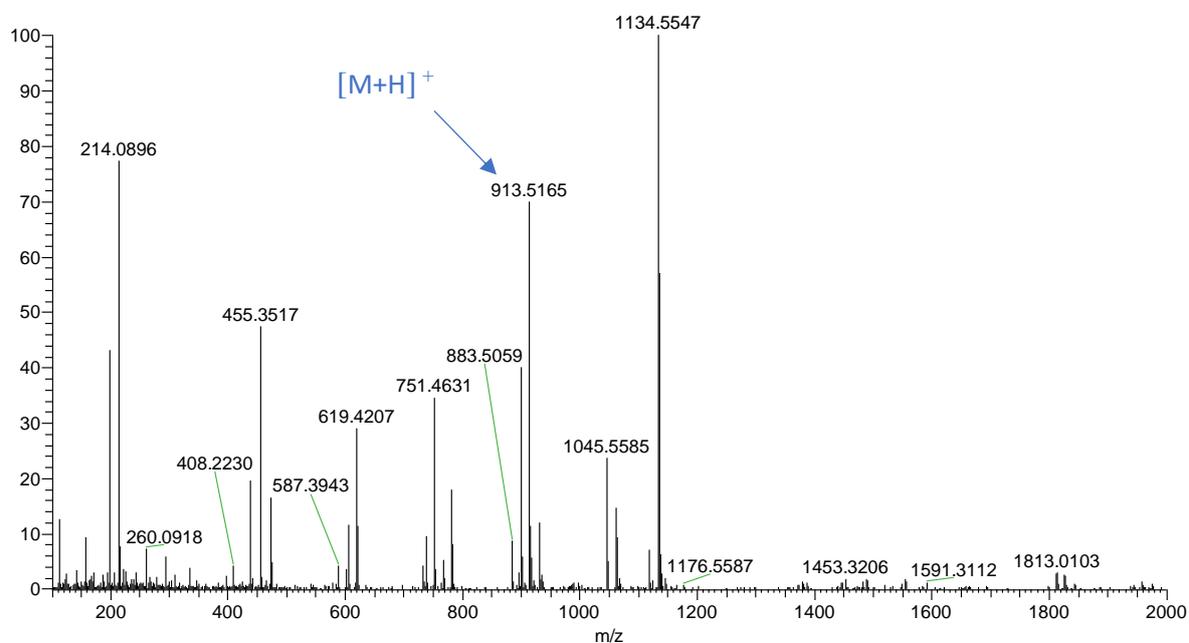


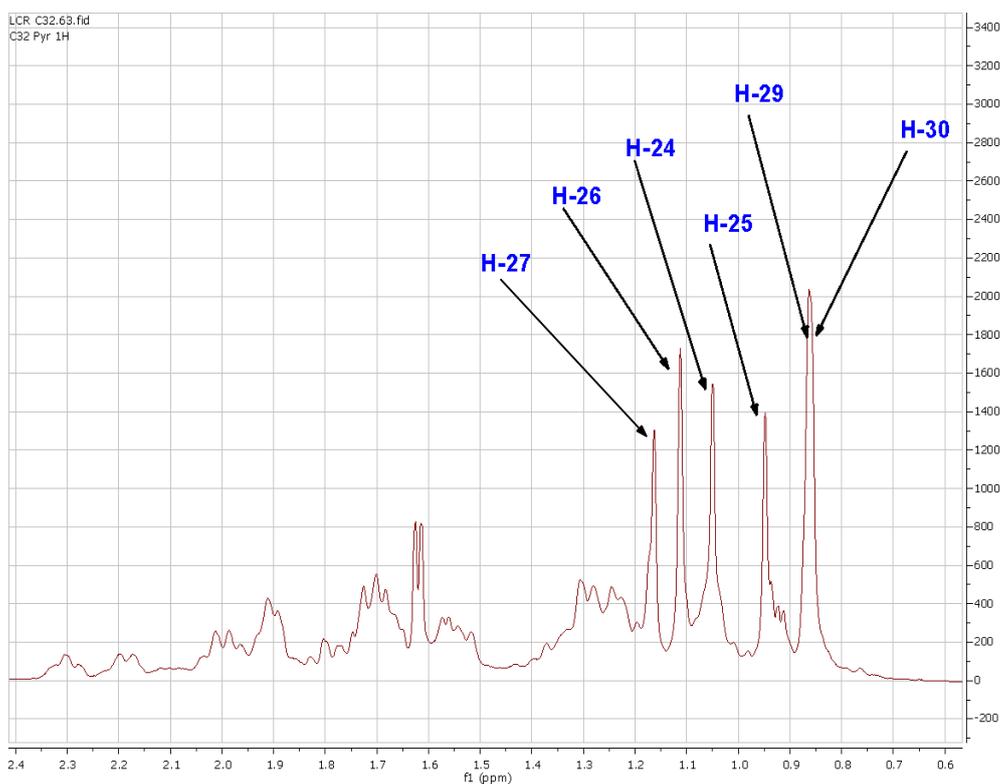
Figure 106: Spectre de masse du composé LCR4

##### ➤ Spectroscopie de RMN

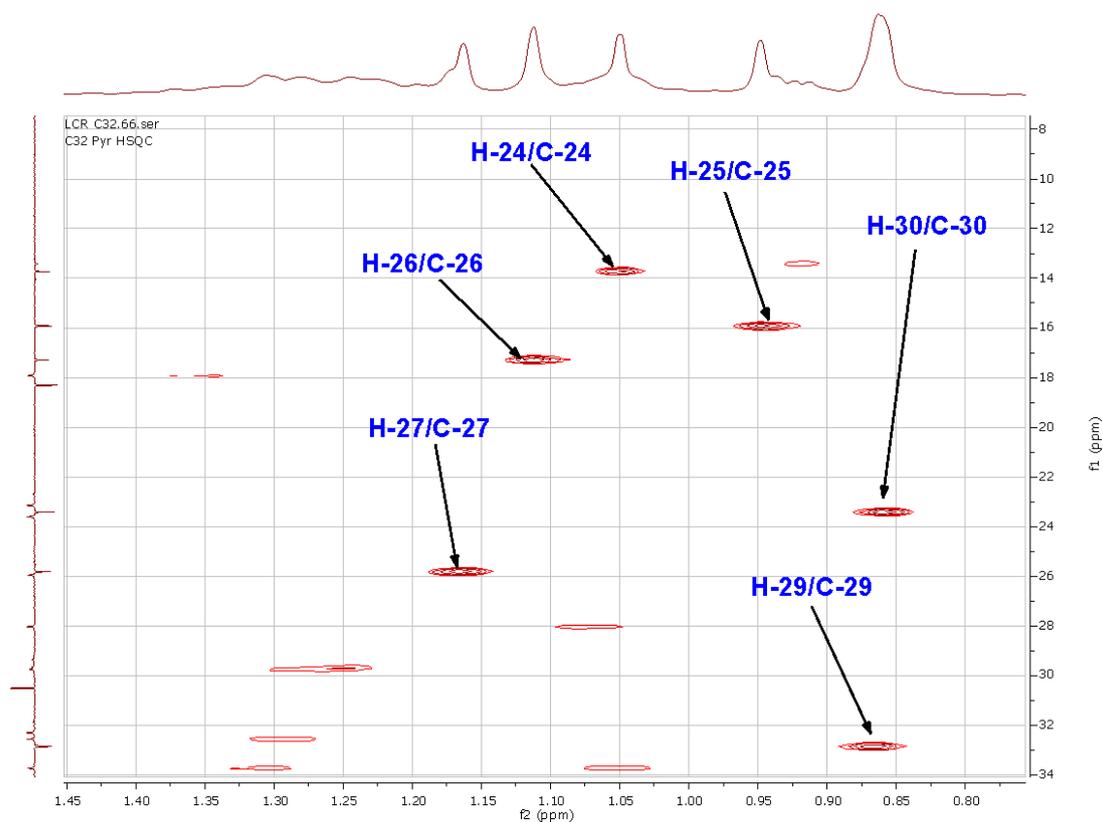
###### Identification de l'aglycone

Tous les signaux des carbones et des protons sont déterminés et attribués d'après l'analyse des spectres COSY, HSQC, HMBC et NOESY.

Le spectre de RMN  $^1H$  montre six signaux de méthyles à  $\delta_H$  0,86 (s, H-30) ; 0,87 (s, H-29) ; 0,95 (s, H-25) ; 1,05 (s, H-24) ; 1,11 (s, H-26) et 1,16 (s, H-27) et qui corrént sur le spectre HSQC avec les carbones à  $\delta_C$  23,3 (C-30) ; 32,9 (C-29) ; 15,9 (C-25) ; 13,7 (C-24) ; 17,3 (C-26) et 25,8 (C-27).



a)

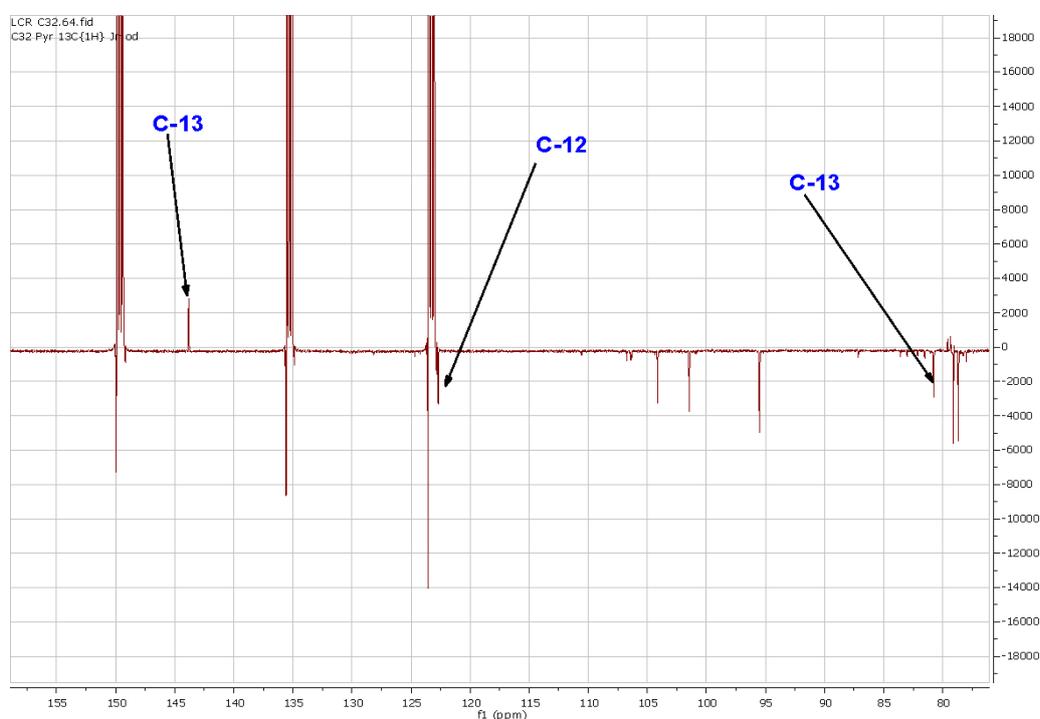


b)

**Figure 107: Spectres de RMN 1H (a) et HSQC (b) (500 MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) du composé LCR4 montrant les méthyles angulaires.**

On observe également sur son spectre de RMN  $^1\text{H}$  un signal à  $\delta_{\text{H}}$  5,41 correspondant au proton oléfinique H-12, un signal de proton méthinique à  $\delta_{\text{H}}$  4,25 correspondant à H-3 de l'aglycone et un signal de proton d'alcool primaire à  $\delta_{\text{H}}$  3,72 et 4,12 correspondant aux protons 23 de notre aglycone.

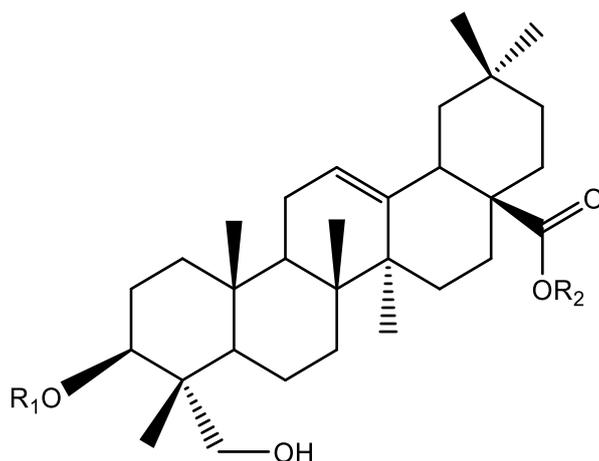
Sur son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  enregistré en JMOD, on observe deux signaux de carbones éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  122,6 et 143,6 ppm correspondant aux carbones de la double liaison  $\Delta^{12}$ , un signal de carbone méthinique à  $\delta_{\text{C}}$  80,7 ppm correspondant au carbone 3 de l'aglycone et un signal de carbone d'alcool primaire à  $\delta_{\text{C}}$  63,3 ppm correspondant au carbone 23. Dans les champs faibles, on observe un signal à  $\delta_{\text{C}}$  176,5 ppm correspondant au carbone 28 de notre aglycone.



**Figure 108:** Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les méthines de l'aglycone du composé LCR4.

L'analyse approfondie des spectres de COSY, HSQC et HMBC de **LCR4** a permis d'attribuer toutes les valeurs des déplacements chimiques de notre aglycone, qui a été identifié comme étant l'hédéragénine et dont les valeurs des carbones et protons (**Tableau XXVI**) sont parfaitement en accord avec la littérature (Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).

L'observation des signaux de carbone résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  80,7 et  $\delta_{\text{C}}$  176,5 ppm montre que **LCR4** est un dérivé 3, 28-bidesmoside de l'hederagenine ayant des chaînes oligosaccharidiques attachées respectivement en C-3 et C-28 au moyen des liaisons éther et ester (Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).



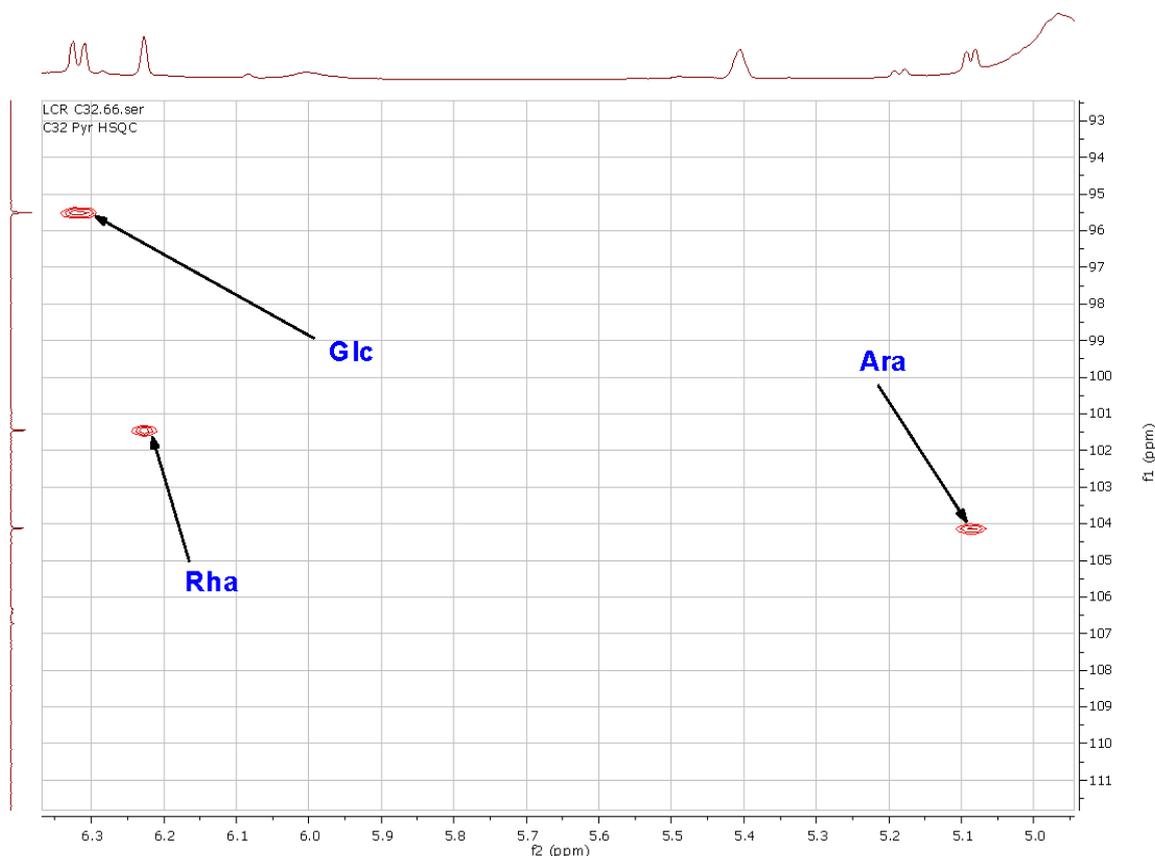
**Tableau XXVI: données RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de LCR4**

N° C	LCR4				
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	N° C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1a	38,8	1,03	15a	28,3	1,01
1b		1,53	15b		2,30
2a	26,0	1,98	16	23,1	1,91; 2,01
2b		2,19	17	46,6	-
3	80,7	4,25 (brs)	18	41,4	3,17 (d, 13,8)
4	43,1	-	19a	45,9	1,20
5	47,5	1,70	19b		1,70
6a	17,9	1,35	20	30,5	-
6b		1,67	21a	33,9	1,05
			21b		1,30
7a	32,6	1,30	22a	32,3	1,71
7b		1,58	22b		1,80
8	39,9	-	23	63,3	3,72; 4,12
9	47,8	1,74	24	13,7	1,05 (s)
10	36,2	-	25	15,9	0,95 (s)
11a	23,7	1,91	26	17,3	1,11 (s)
11b		1,91	27	25,8	1,16 (s)
12	122,6	5,41 (brd, 4,0)	28	176,5	-
13	143,6	-	29	32,9	0,87 (s)
14	41,7	-	30	23,3	0,86 (s)

### Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'hydrolyse acide du composé **LCR4**, suivie d'une CCM comparative de l'hydrolysats avec des échantillons de références du laboratoire et d'une analyse par chromatographie liquide, ont permis d'identifier les monosaccharides suivants : D-Glc, L-Rha et L-Ara.

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  de **LCR4** permet de distinguer 3 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  5,08 (d,  $J = 6,2$  Hz) ; 6,23 (brs) et 6,32 (d,  $J = 8,1$  Hz), qui corrélient sur le spectre HSQC avec les signaux de 3 carbones à  $\delta_{\text{C}}$  104,1 ; 101,7 et 95,5 respectivement, ce qui prouve la présence de 3 sucres.



**Figure 109:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé **LCR4**.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées dans les spectres HSQC et confirmés par le spectre HMBC. Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés sont sous la forme pyranose.

La configuration  $\alpha$  attribuée au proton anomérique du Rha a été mise en évidence par la valeur de son carbone C-5 à  $\delta_{\text{C}}$  69,4 ainsi que son apparition sous forme de large singulet (Luo *et al.*, 2008). La configuration  $\beta$  a été attribuée au proton anomérique de Glc et  $\alpha$  à Ara sur la base de leurs constantes de couplage  $^3J_{\text{H-1, H-3}}$  6,2 et 8,1 Hz respectivement.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement  $\beta$ -L-arabinopyranosyle Ara -1 à  $\delta_{\text{H}}$  5,08 (d,  $J = 6,2$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ -D-glucopyranosyle Glc -1 à  $\delta_{\text{H}}$  6,32 (d,  $J = 8,1$  Hz) ;

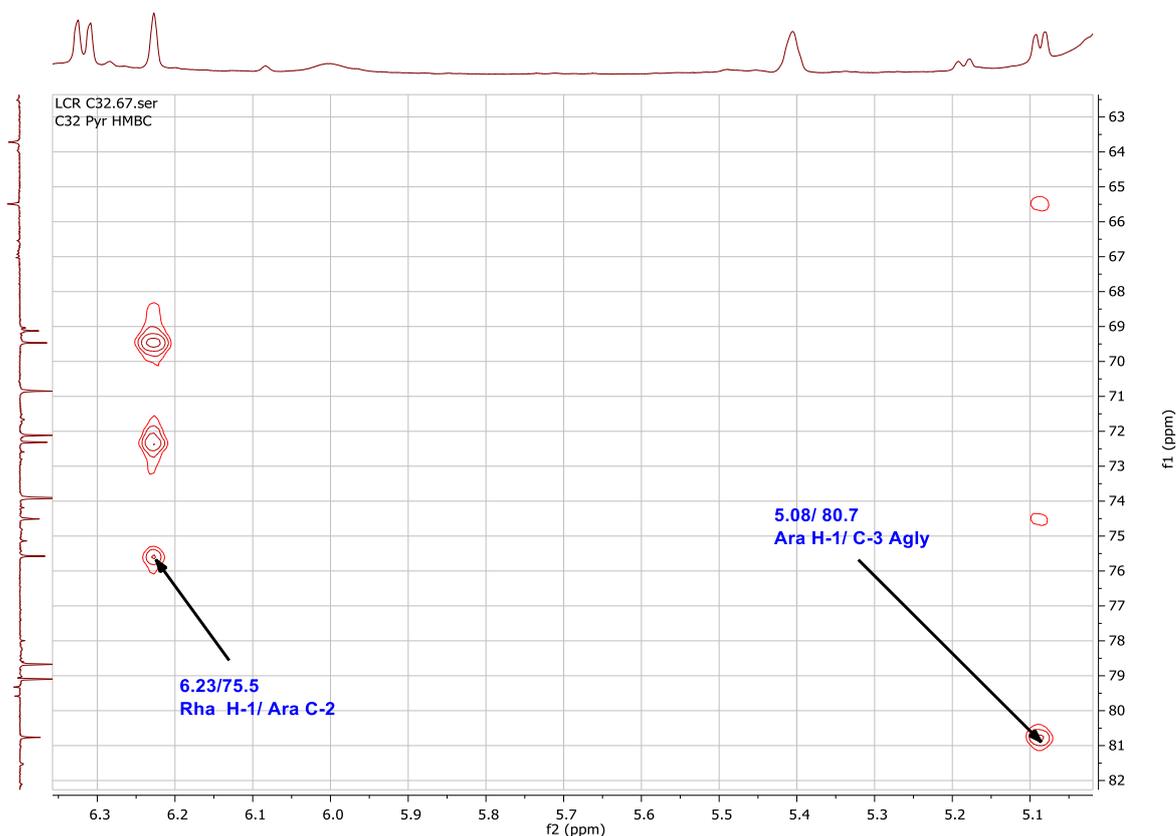
- 1 groupement  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle Rha -1 à  $\delta_H$  6,23 (brs).

## Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

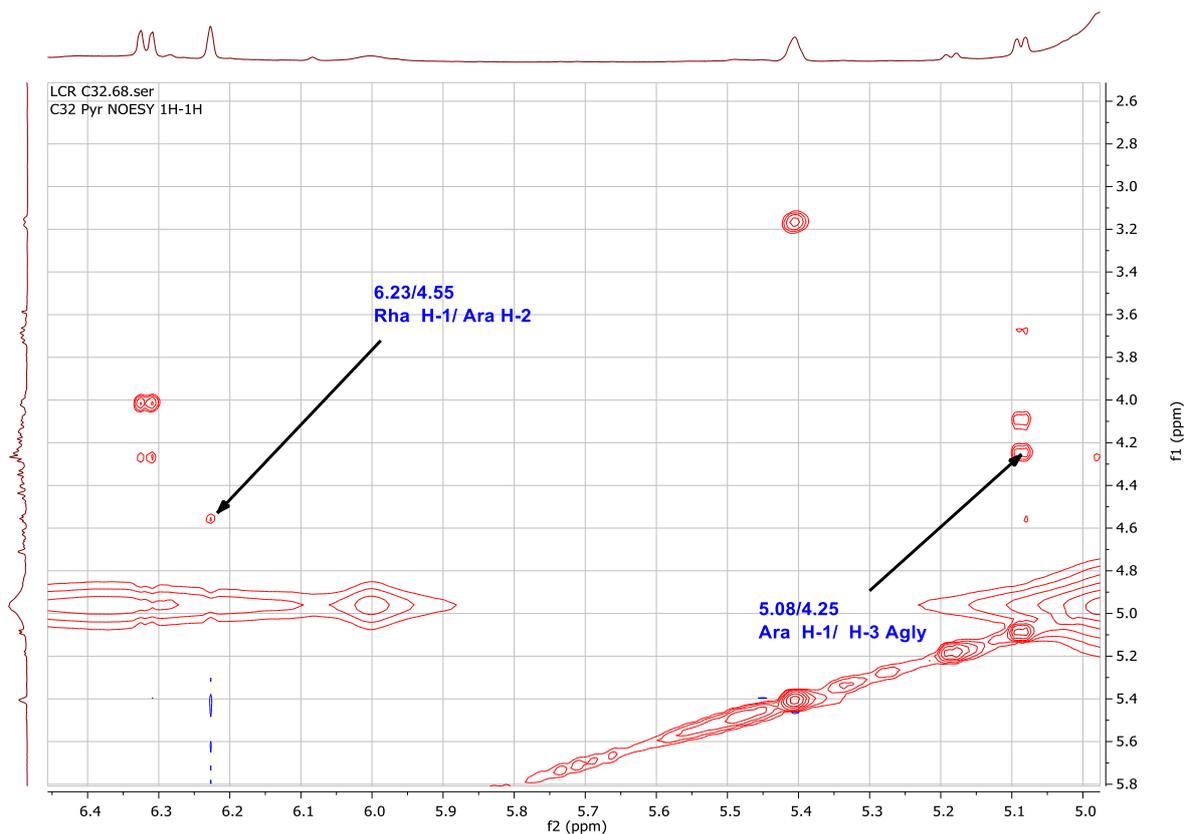
### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de **LCR4** révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_C$  80,7 (C-3) dû à une liaison glycosidique. La séquence de l'oligosaccharide est établie grâce aux spectres HMBC (**Figure 110a**) et NOESY (**Figure 110b**). La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  H-1 Ara ( $\delta_H$  5,08,  $J = 6,2$  Hz) et C-3 ( $\delta_C$  80,7) de l'aglycone, suggère que Ara est lié à la génine en position 3 ; cette liaison est confirmée par la corrélation observée sur le spectre NOESY entre les signaux  $\delta_H$  5,08 H-1 Ara (d,  $J = 6,2$  Hz) et H-3 de l'aglycone ( $\delta_H$  4,25 brs).

Le reste de la chaîne des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  6,23 /  $\delta_C$  75,5 (Rha H-1 / Ara C-2) et confirmé par les corrélations NOESY à  $\delta_H$  6,23 /  $\delta_H$  4,55 (Rha H-1 / Ara H-2).



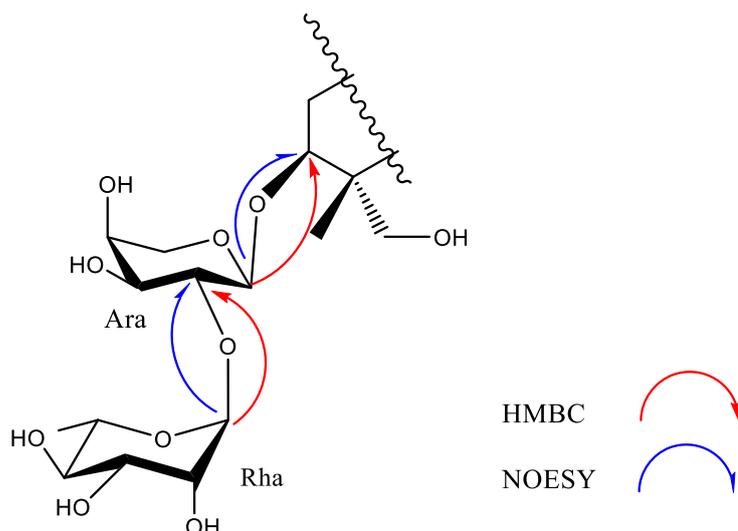
a)



b)

**Figure 110:** Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé LCR4 montrant les points de liaison des sucres.

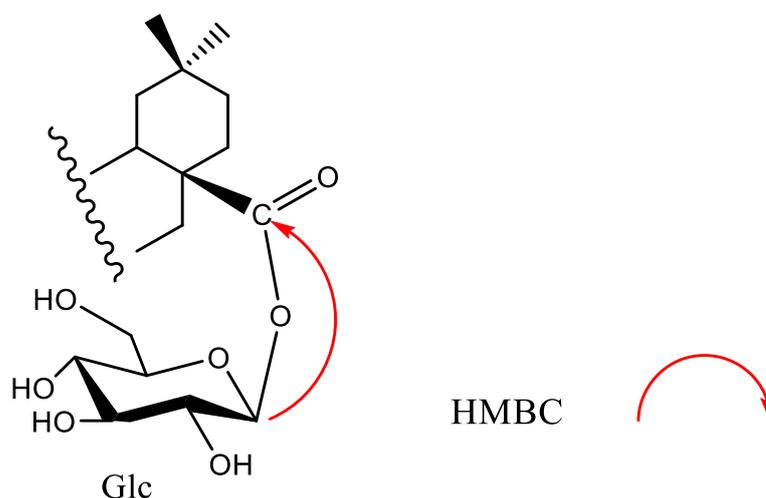
La séquence complète,  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle a été fixée en position C-3 de l'aglycone.



**Figure 111:** Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé LCR4.

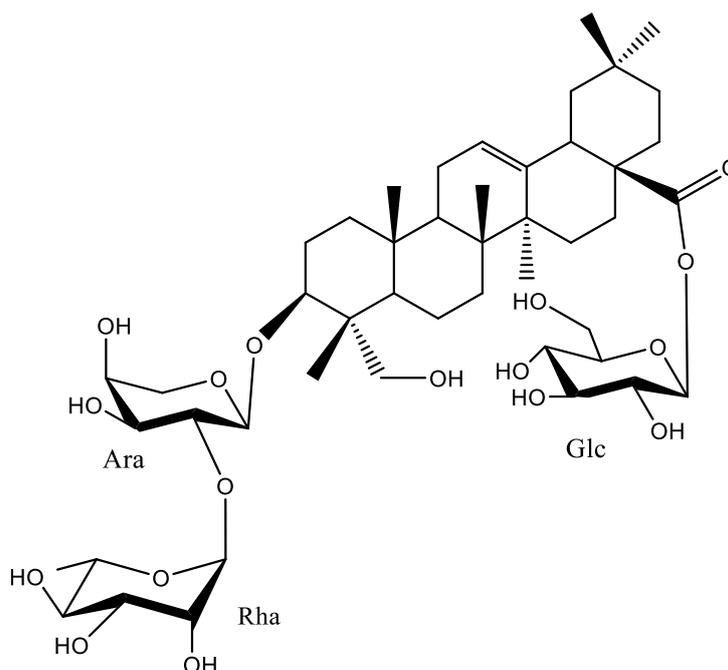
## Monosaccharide en position C-28 de l'aglycone

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de **LCR4** révèlent le blindage d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  176,5 (C-28) dû à une liaison ester. La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_{\text{H}}$  6,32 (H-1 Glc I) et le signal  $\delta_{\text{C}}$  176,5 (C-28 de l'aglycone) suggère que Glc est lié à la génine en position 28.



**Figure 112:** Corrélation HMBC de l'unité osidique en position C-28 de l'aglycone du composé **LCR4**.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **LCR4** a été élucidée comme étant le 3-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-28-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylhederagenin, nouveau composé naturel, **lecanioside A** (Messi *et al.*, 2020b).



**Figure 113:** Structure du composé **LCR4**

Tableau XXVII: données RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie osidique de LCR4

Pos.	LCR4	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>Sucres en C-3</b>		
Ara		
1	104,1 (CH)	5,08 (d, 6,2)
2	75,5 (CH)	4,55
3	74,5 (CH)	4,10
4	69,0 (CH)	4,15
5	65,5 (CH <sub>2</sub> )	3,68 (d, 12,2); 4,25
Rha		
1	101,7 (CH)	6,23 (brs)
2	72,0 (CH)	4,71
3	72,3 (CH)	4,62
4	73,9 (CH)	4,27
5	69,4 (CH)	4,67
6	18,3 (CH <sub>3</sub> )	1,62 (d, 1,8)
<b>28-O-Sugars</b>		
Glc		
1	95,5 (CH)	6,32 (d, 8,1)
2	73,9 (CH)	4,18
3	78,6 (CH)	4,28
4	70,9 (CH)	4,34
5	79,0 (CH)	4,02
6	62,0 (CH <sub>2</sub> )	4,40 m; 4,45

## e) Identification du composé LCR5

### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **LCR5** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre dans son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  883,5060  $[M + H]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{46}H_{74}O_{16}$ .

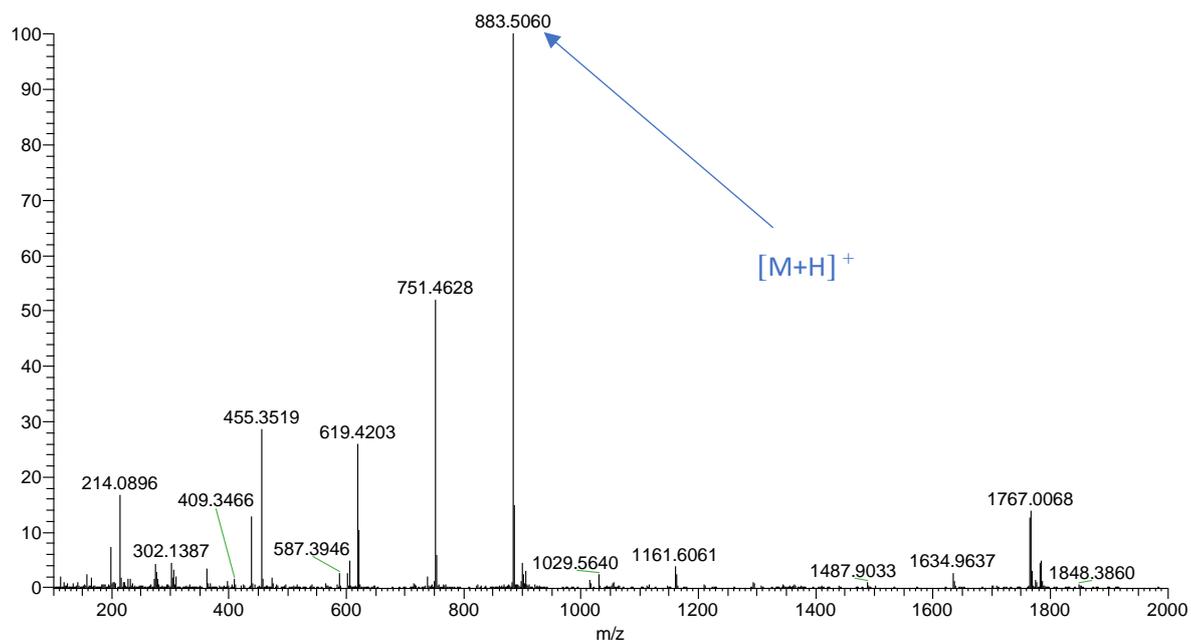


Figure 114: Spectre de masse du composé LCR5

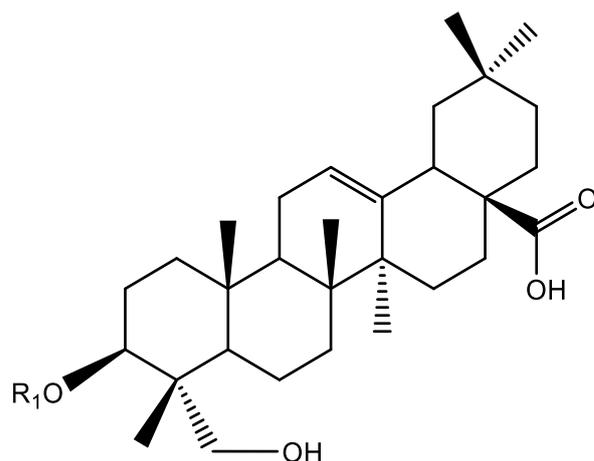
### ➤ Spectroscopie de RMN

#### Identification de l'aglycone

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques observées pour l'aglycone de **LCR5** avec celles obtenues dans le composé **LCR4**, montrent que ces deux composés partagent le même d'aglycone, à savoir l'hédéragénine (Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).

Une analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D de **LCR5** nous a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone (**Tableau XXVIII**).

L'observation du signal de carbone à  $\delta_C$  80,9 ppm (C-3) montre que **LCR5** est un dérivé 3, monodesmosidique de l'hédéragenine ayant une chaîne oligosaccharidique attachée en C-3 au moyen d'une liaison éther (Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).



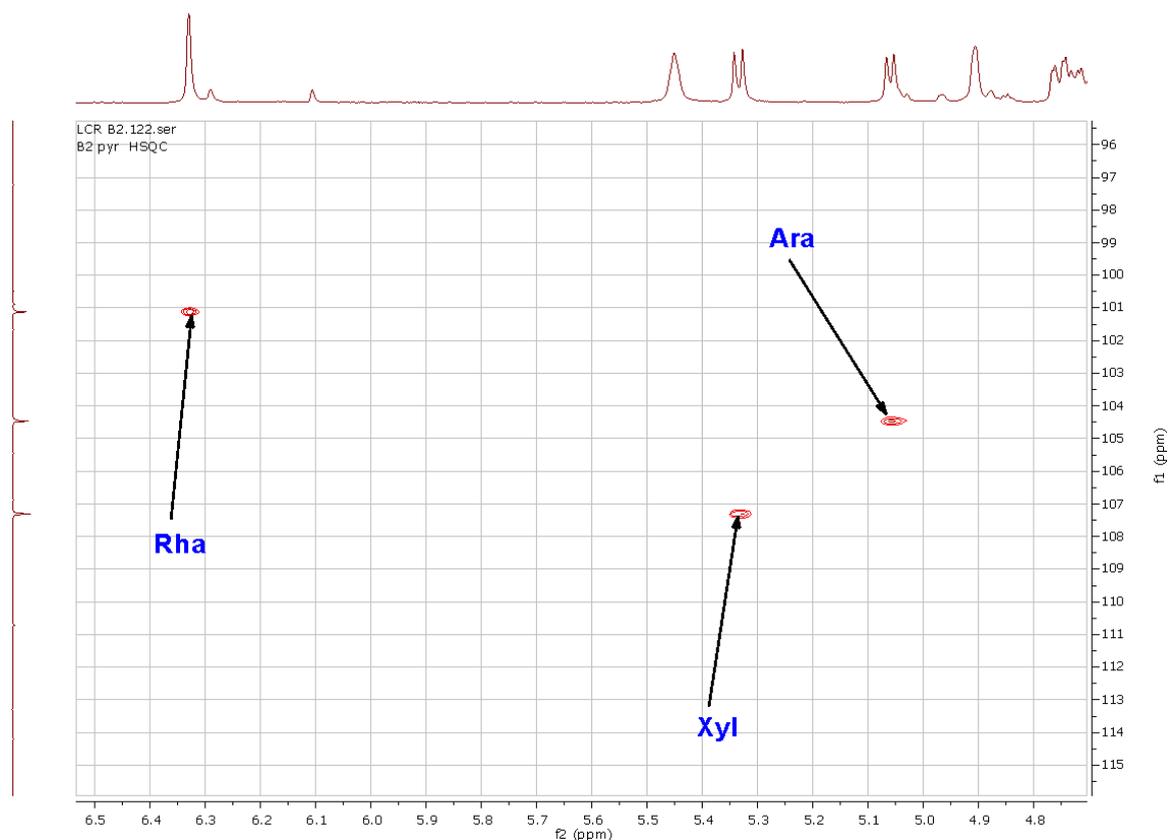
**Tableau XXVIII: données RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de LCR5**

N° C	LCR5				
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	N° C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1a	38,4	1,06	15a	28,2	1,12
1b		1,54	15b		2,18
2a	26,1	2,00	16	23,6	1,90; 1,95
2b		2,23	17	46,2	-
3	80,9	4,30 m	18	41,8	3,30
4	43,0	-	19a	46,3	1,25
5	47,4	1,76	19b		1,76
6a	17,9	1,33	20	30,8	-
6b		1,74	21a	34,1	1,17
			21b		1,42
7a	32,4	1,23	22a	33,0	1,80
7b		1,60	22b		2,04
8	39,3	-	23	63,8	3,90; 3,92
9	48,0	1,78	24	13,9	1,12 (s)
10	36,6	-	25	15,8	0,93 (s)
11a	23,7	2,04	26	17,2	1,01 (s)
11b		2,04	27	25,8	1,24 (s)
12	122,1	5,45	28	180,5	-
13	144,8	-	29	33,0	0,91 (s)
14	41,8	-	30	23,3	0,99 (s)

### Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'hydrolyse acide du composé **LCR5**, suivie d'une CCM comparative de l'hydrolysate avec des échantillons de références du laboratoire et d'une analyse par chromatographie liquide, ont permis d'identifier les monosaccharides suivants : D-Xyl, L-Rha et L-Ara.

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  de **LCR5** permet de distinguer 3 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  5,05 (d,  $J = 6,5$  Hz) ; 6,33 (brs) et 5,33 (d,  $J = 7,5$  Hz), et qui corrélient sur le spectre HSQC avec les signaux de 3 carbones à  $\delta_{\text{C}}$  104,4 ; 101,1 et 107,5 respectivement, ce qui prouve la présence de 3 sucres.



**Figure 115:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé **LCR5**.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées dans les spectres HSQC et confirmés par le spectre HMBC. Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés sont sous la forme pyranose.

La configuration  $\alpha$  attribuée au proton anomérique du Rha a été mise en évidence par la valeur de son carbone C-5 à  $\delta_{\text{C}}$  69,2 ainsi que son apparition sous forme de large singulet (Luo *et al.*, 2008). La configuration  $\beta$  a été attribuée au proton anomérique de Xyl et  $\alpha$  à Ara sur la base de leurs constantes de couplage  $^3J_{\text{H-1}, \text{H-3}}$  7,5 et 6,5 Hz respectivement.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement  $\alpha$  - L-arabinopyranosyle Ara -1 à  $\delta_{\text{H}}$  5,05 (d,  $J = 6,5$  Hz),
- 1 groupement  $\beta$  - D-xylopyranosyle Xyl -1 à  $\delta_{\text{H}}$  5,33 (d,  $J = 7,5$  Hz),

- 1 groupement  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle Rha -1 à  $\delta_H$  6,33 (brs)

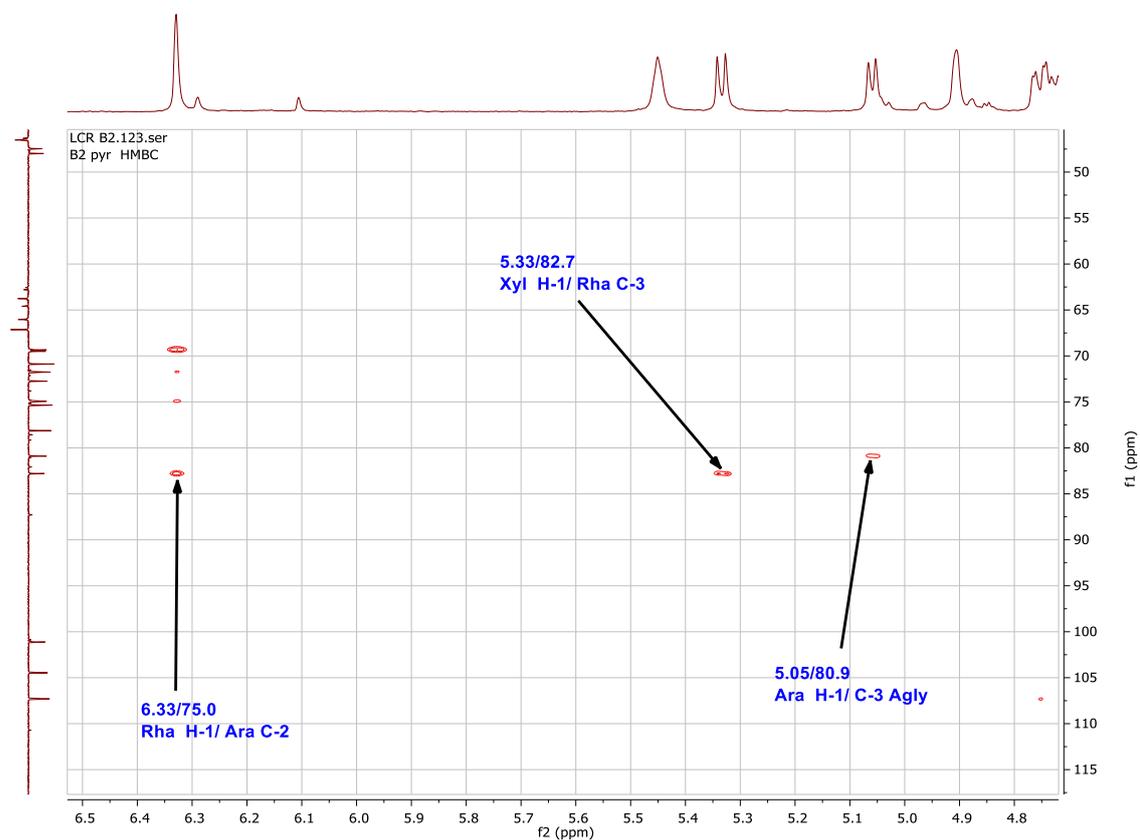
### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

Les chaînes oligosaccharidiques ainsi que les points de fixation sur l'aglycone ont été réalisés grâce aux corrélations observées sur les spectres HMBC et NOESY.

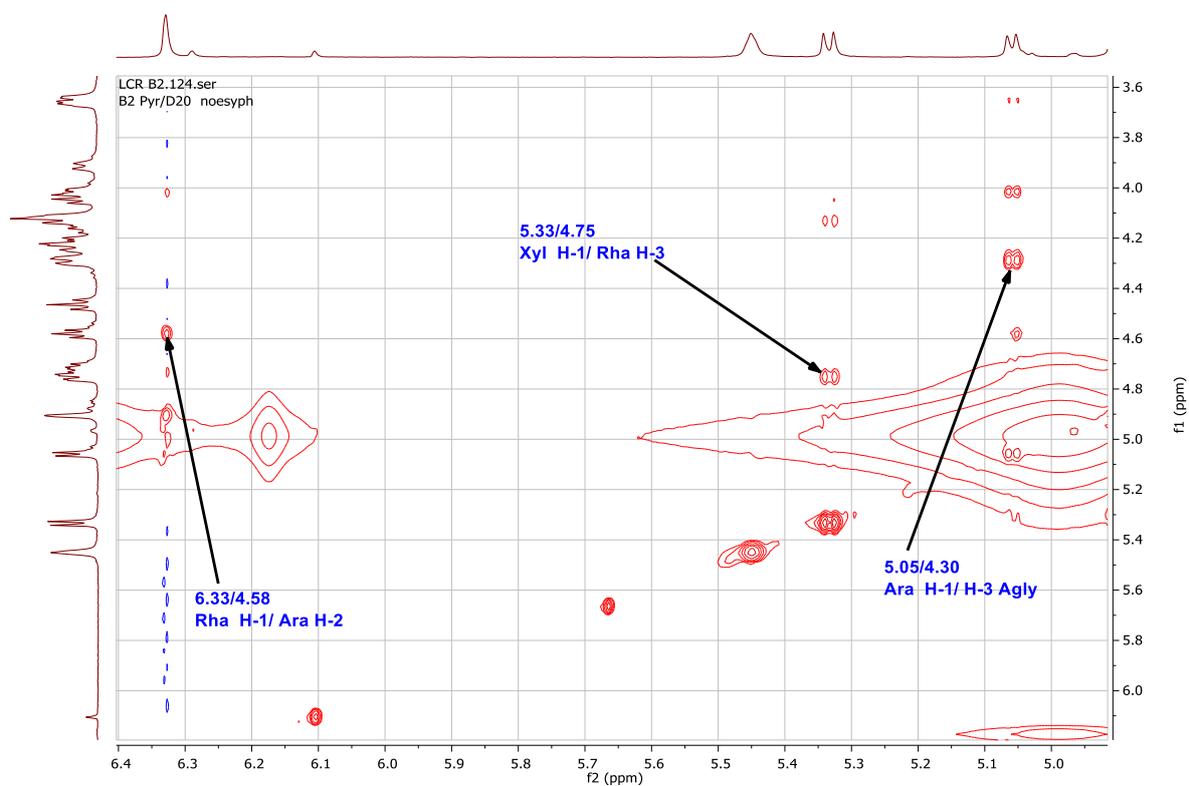
#### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de **LCR5** révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_C$  80,9 (C-3) dû à une liaison glycosidique. La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  H-1 Ara ( $\delta_H$  5,05 ;  $J=$  6,5 Hz) et C-3 ( $\delta_C$  80,9) de l'aglycone, suggère que Ara est lié à la génine en position 3 ; cette liaison est confirmée par la corrélation observée sur le spectre NOESY entre les signaux  $\delta_H$  5,05 H-1 Ara (d,  $J=$  6,5 Hz) et H-3 de l'aglycone ( $\delta_H$  4,30 ; m).

L'enchaînement des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  6,33 /  $\delta_C$  75,0 (Rha H-1 / Ara C-2) et 5,33 / 82,7 (Xyl H-1 / Rha C-3) et confirmé par les corrélations NOESY à  $\delta_H$  6,33 /  $\delta_H$  4,58 (Rha H-1 / Ara H-2) et 5,33 / 4,75 (Xyl H-1 / Rha H-3).



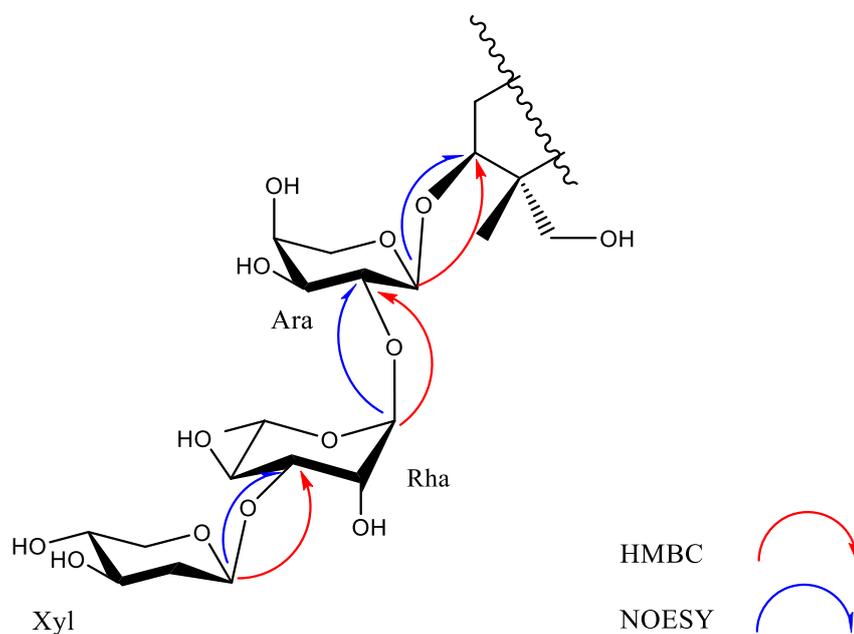
a)



b)

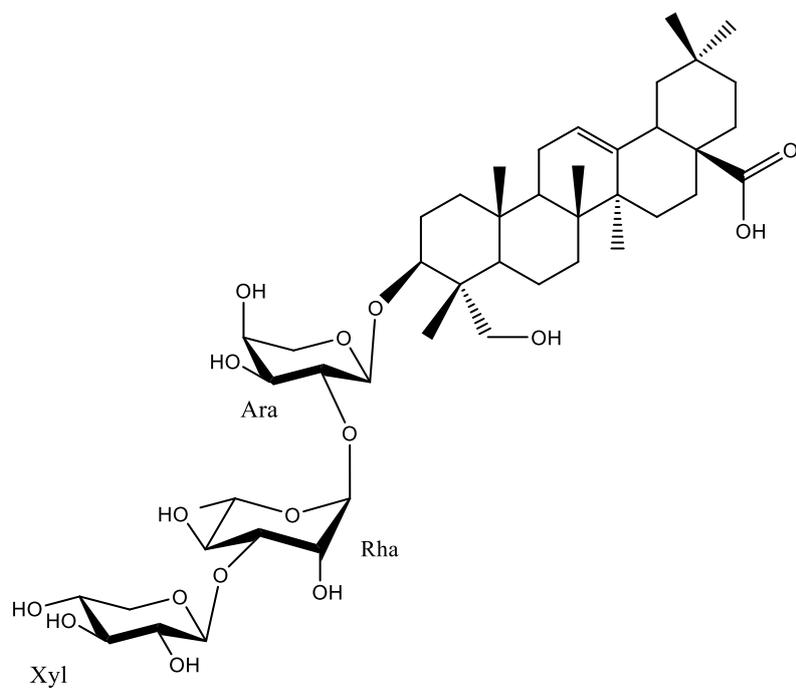
**Figure 116: Spectres HMBC (a) et NOESY élargi (b) (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé LCR5 montrant les points de liaison des sucres.**

La séquence complète,  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle a été établie en position C-3 de l'aglycone.



**Figure 117:** *Corrélations HMBC et NOESY entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé LCR5.*

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **LCR5** a été identifiée comme étant le 3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosylhederagenine, composé naturel connu (Encarnación *et al.*, 1981).



*Figure 118: Structure du composé LCR5*

\*

**Tableau XXIX: données RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie osidique de LCR5**

Pos.	LCR5	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
<b>Sucres en C-3</b>		
Ara		
1	104,4 (CH)	5,05 (d, 6,5)
2	75,0 (CH)	4,58
3	74,8 (CH)	4,02
4	69,5 (CH)	4,12
5	66,1 (CH <sub>2</sub> )	3,65; 4,23
Rha		
1	101,1 (CH)	6,33 (brs)
2	71,7 (CH)	4,91
3	82,7 (CH)	4,75
4	72,8 (CH)	4,46
5	69,2 (CH)	4,72
6	18,1 (CH <sub>3</sub> )	1,55 (d, 5,9)
Xyl		
1	107,5 (CH)	5,33 (d, 7,5)
2	75,2 (CH)	4,03
3	78,3 (CH)	4,12
4	70,7 (CH)	4,15
6	67,0 (CH <sub>2</sub> )	3,65; 4,21

## f) Identification du composé LCR6

### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **LCR6** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre dans son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  883,5060  $[M + H]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{46}H_{74}O_{16}$ .

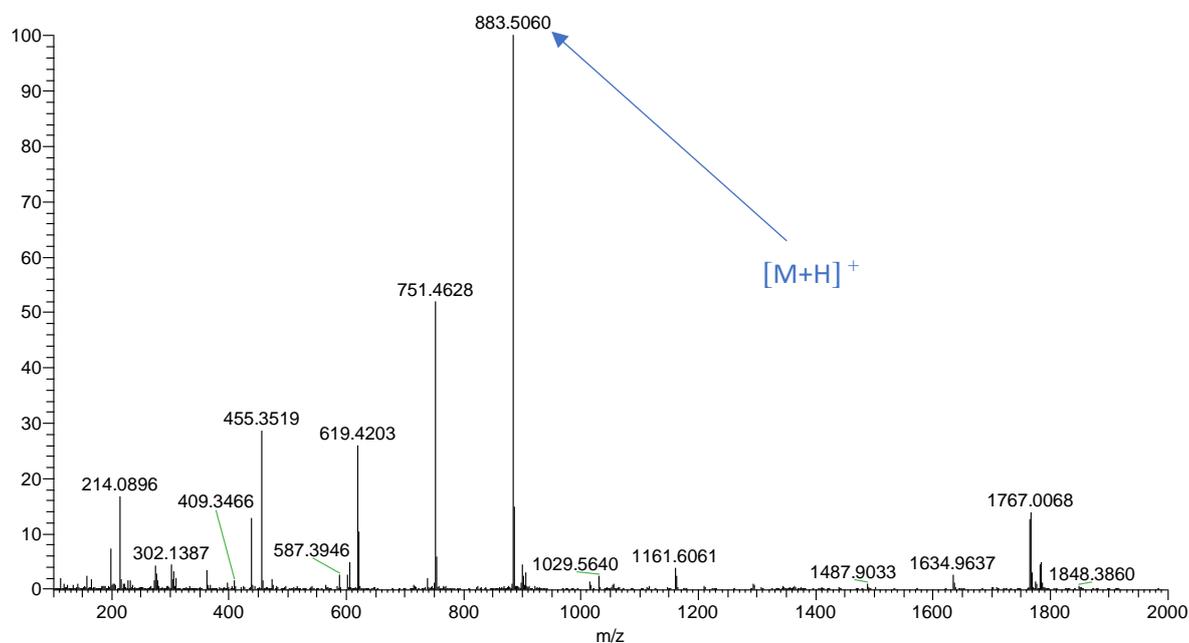


Figure 119: Spectre de masse du composé LCR6

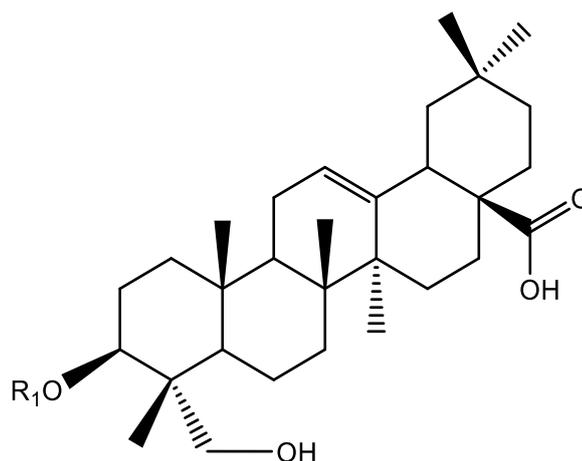
### ➤ Spectroscopie de RMN

#### Identification de l'aglycone

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques observées pour l'aglycone de **LCR6** avec celles obtenues dans le composé **LCR4**, montrent que ces deux composés partagent le même d'aglycone, à savoir l'hédéragénine (Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).

Une analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D de **LCR6** a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone (**Tableau XXX**).

L'observation du signal de carbone de l'aglycone à  $\delta_C$  81,1 ppm (C-3) montre que **LCR6** est un dérivé monodesmosidique de l'hederagenin ayant une chaîne oligosaccharidique attachée en C-3 au moyen d'une liaison éther (Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).



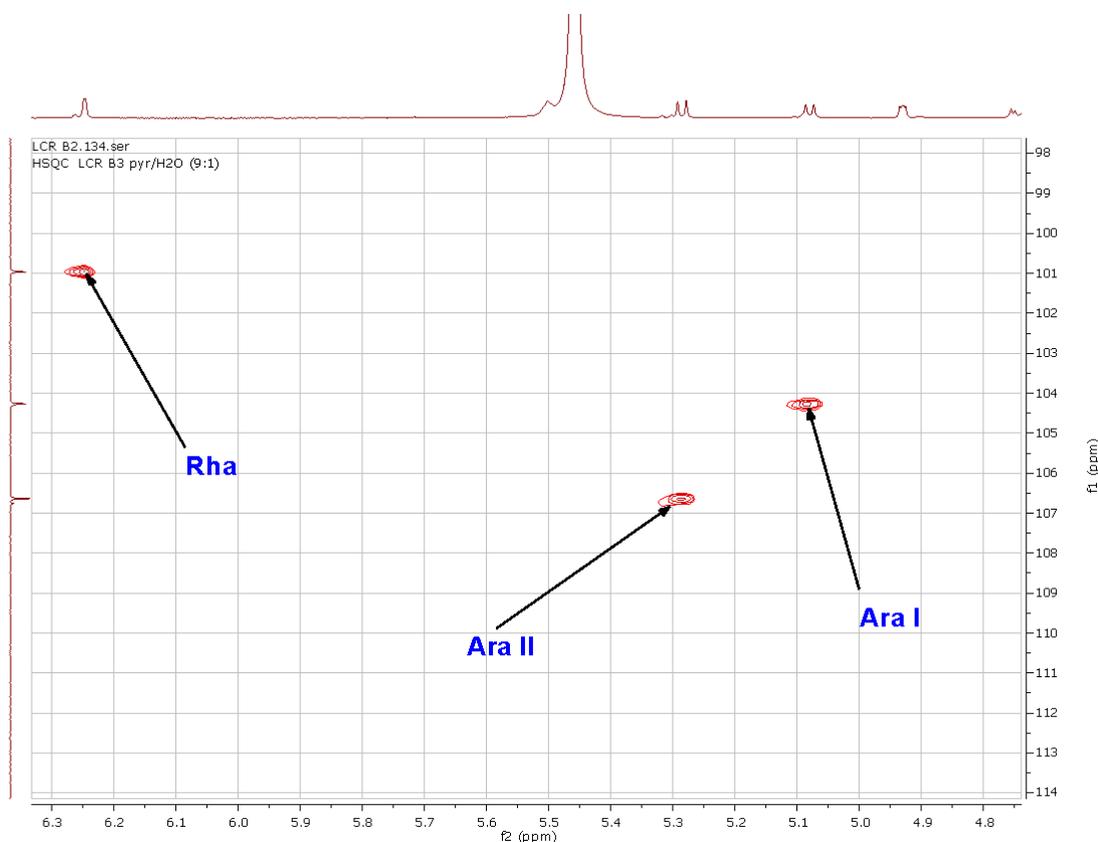
**Tableau XXX: données RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de LCR6**

N° C	LCR6				
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	N° C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1a	38,9	1,04	15a	28,3	1,12
1b		1,55	15b		2,19
2a	26,1	2,00	16	23,6	1,91; 1,93
2b		2,21	17	46,8	-
3	81,1	4,27 m	18	42,3	3,40
4	43,6	-	19a	46,7	1,29
5	47,2	1,76	19b		1,79
6a	17,9	1,33	20	30,8	-
6b		1,77	21a	34,4	1,15
			21b		1,42
7a	32,5	1,29	22a	33,4	1,87
7b		1,68	22b		2,09
8	39,4	-	23	63,7	3,90; 4,24
9	47,9	1,80	24	13,8	1,09 (s)
10	36,6	-	25	15,8	0,92 (s)
11a	23,6	1,90	26	17,4	1,06 (s)
11b		1,93	27	26,0	1,27 (s)
12	121,2	5,51	28	178,5	-
13	145,3	-	29	33,3	0,91 (s)
14	42,1	-	30	23,8	1,02 (s)

### Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'hydrolyse acide du composé **LCR6**, suivie d'une CCM comparative de l'hydrolysate avec des échantillons de références du laboratoire et d'une analyse par chromatographie liquide, ont permis d'identifier les monosaccharides suivants : L-Rha et L-Ara.

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  de **LCR6** permet de distinguer 3 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  5,08 (d,  $J = 6,4$  Hz) ; 6,25 (brs) et 5,29 (d,  $J = 6,9$  Hz), et qui corrélient sur le spectre HSQC avec les signaux de 3 carbones à  $\delta_{\text{C}}$  104,1 ; 101,0 et 106,7 respectivement, ce qui prouve la présence de 3 sucres.



**Figure 120:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé **LCR6**.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées dans les spectres HSQC et confirmés par le spectre HMBC. Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés sont sous la forme pyranose.

La configuration  $\alpha$  attribuée au proton anomérique du Rha a été mise en évidence par la valeur de son carbone C-5 à  $\delta_{\text{C}}$  69,4 ainsi que son apparition sous forme de large singulet (Luo *et al.*, 2008). La configuration  $\alpha$  attribuée au proton anomérique de Ara a été mise en évidence sur la base de ses constantes de couplage  $^3J_{\text{H-1}, \text{H-3}}$  comprises entre 6,4 et 6,9 Hz.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

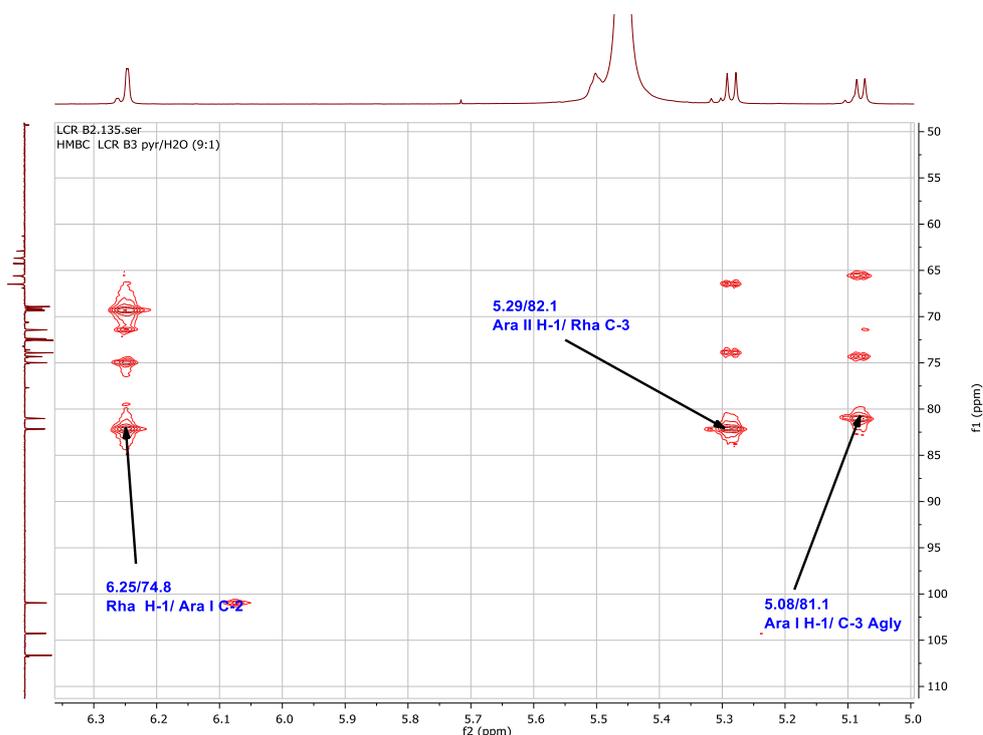
- 2 groupements  $\beta$ -L-arabinopyranosyles Ara I-1 à  $\delta_{\text{H}}$  5,08 (d,  $J = 6,4$  Hz), Ara II-1 à  $\delta_{\text{H}}$  5,29 (d,  $J = 6,9$  Hz) ;
- 1 groupement  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle Rha -1 à  $\delta_{\text{H}}$  6,25 (brs)

## Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

Les chaînes oligosaccharidiques ainsi que les points de fixation sur l'aglycone ont été réalisés grâce aux corrélations observées sur le spectre HMBC.

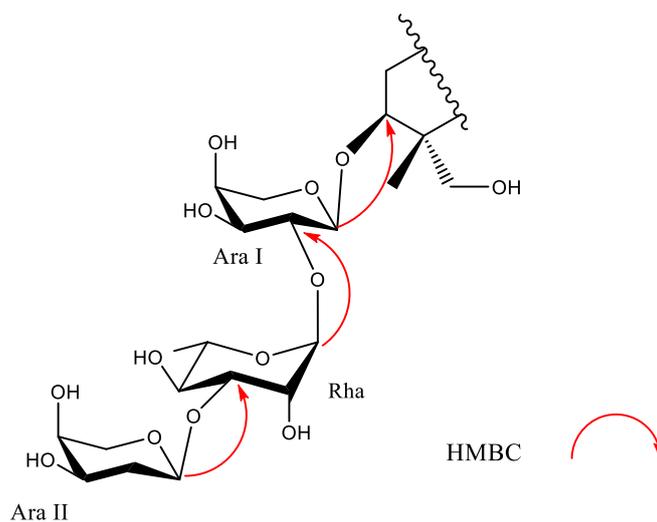
### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de **LCR6** révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  81,1 (C-3) dû à une liaison osidique. La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_{\text{H}}$  H-1 Ara I ( $\delta_{\text{H}}$  5,08 ;  $J= 6,4$  Hz) et C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  81,1) de l'aglycone, suggère que Ara est lié à la génine en position 3. L'enchaînement des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_{\text{H}}$  6,25 /  $\delta_{\text{C}}$  74,8 (Rha H-1 / Ara I C-2) et 5,29 / 82,1 (Ara II H-1 / Rha C-3).



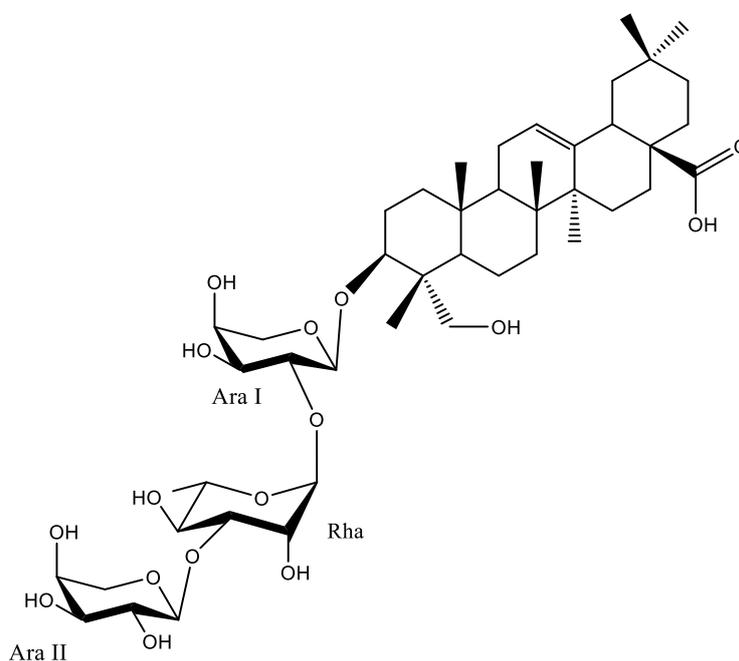
**Figure 121:** Spectres HMBC élargi (500 MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) du composé LCR6 montrant les points de liaison des sucres.

La séquence complète,  $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1→3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle a été fixée en position C-3 de l'aglycone.



**Figure 122 :** *Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé LCR6.*

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **LCR6** a été identifié comme étant le :3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosylhederagenine, composé naturel connu isolé de la même plante (Encarnación *et al.*, 1981)



**Figure 123:** *Structure du composé LCR6*

**Tableau XXXI: données RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) partie osidique de LCR6**

Pos.	LCR6	
	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_H$ (J en Hz)
<b>Sucres en C-3</b>		
Ara I		
1	104,1 (CH)	5,08 (d, 6,4)
2	74,8 (CH)	4,56
3	74,2 (CH)	4,06
4	69,2 (CH)	4,19
5	65,5 (CH <sub>2</sub> )	3,70; 4,27
Rha		
1	101,0 (CH)	6,25 (brs)
2	71,6 (CH)	4,93
3	82,1 (CH)	4,75
4	72,6 (CH)	4,44
5	69,4 (CH)	4,71
6	18,2 (CH <sub>3</sub> )	1,57 (d, 6,1)
Ara II		
1	106,7 (CH)	5,29 (d, 6,9)
2	72,5 (CH)	4,59
3	73,7 (CH)	4,17
4	68,8 (CH)	4,27
6	66,5 (CH <sub>2</sub> )	3,71; 4,24

## g) Identification du composé LCR7

### ➤ Spectrométrie de masse

Le composé **LCR7** obtenu sous forme de poudre blanche amorphe, montre dans son spectre de masse par ionisation par électrospray haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif, un pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  883,5060  $[M + H]^+$ . Cette valeur est en accord avec la formule brute  $C_{46}H_{74}O_{16}$ .

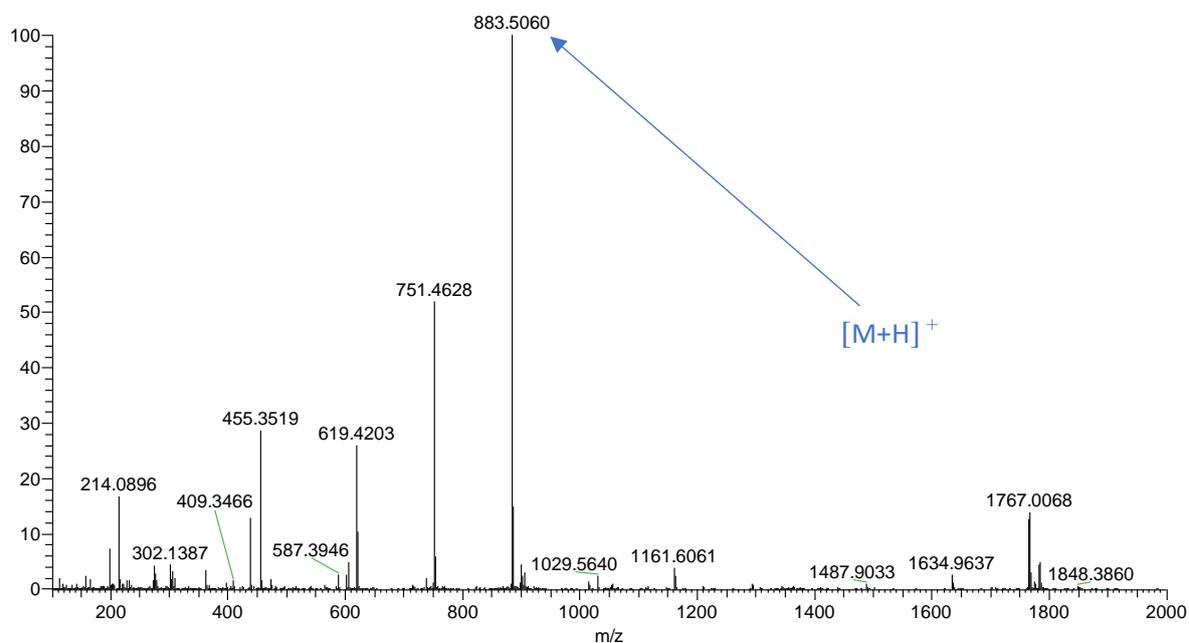


Figure 124: Spectre de masse du composé LCR7

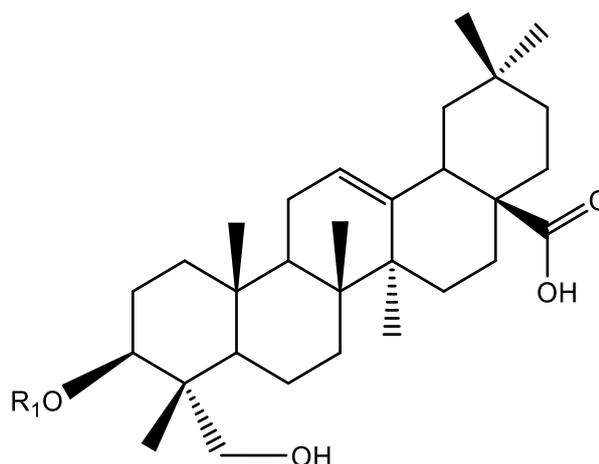
## Spectroscopie de RMN

### Identification de l'aglycone

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques observées pour l'aglycone de **LCR7** avec celles obtenues dans le composé **LCR4**, montrent que ces deux composés partagent le même d'aglycone, à savoir l'hédéragénine (Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).

Une analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D de **LCR7** a permis d'attribuer tous les signaux des protons et des carbones de l'aglycone (**Tableau XXXII**).

L'observation du signal du carbone à  $\delta_C$  81,4 ppm (C-3) montre que **LCR7** est un dérivé monodesmosidique de l'hédéragenin ayant une chaîne oligosaccharidique attachée en C-3 au moyen d'une liaison éther (Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019)



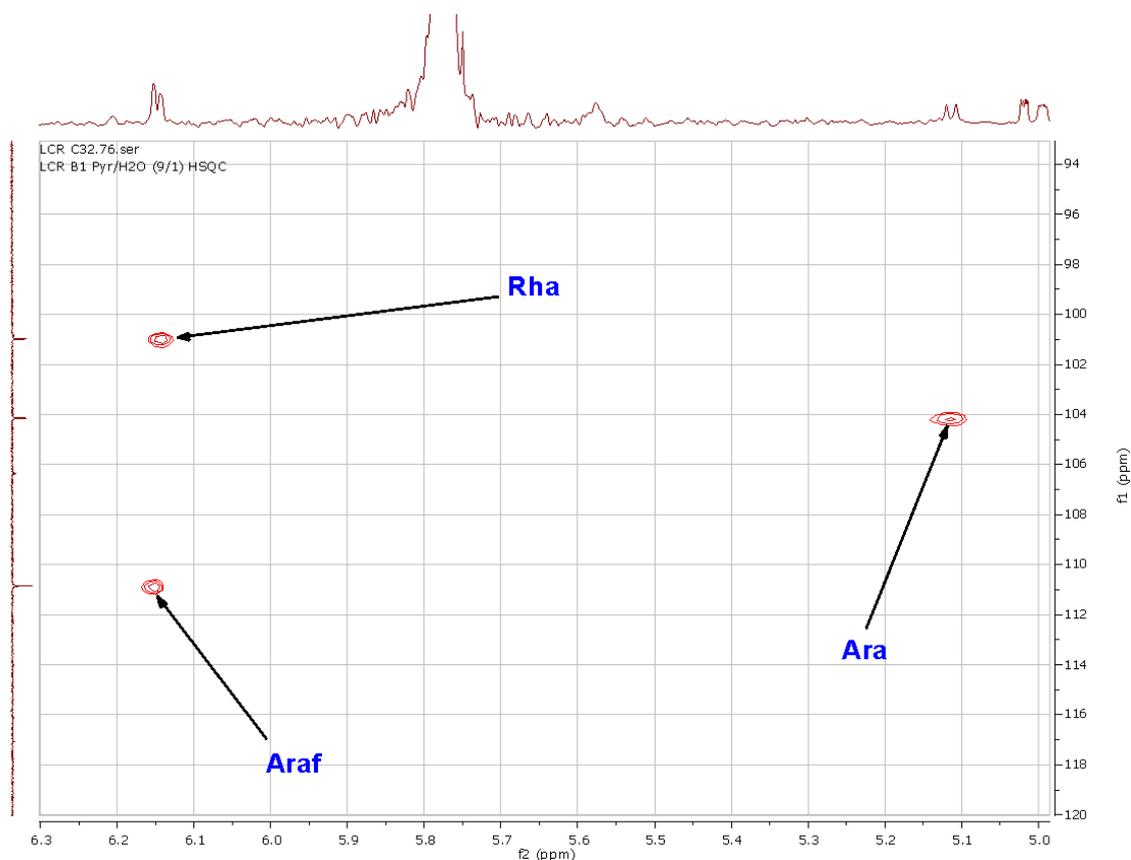
**Tableau XXXII: données RMN ( $^1\text{H}$ , 500 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) partie aglycone de LCR7**

N° C	LCR7				
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	N° C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1a	38,8	1,05	15a	28,4	1,18
1b		1,54	15b		2,32
2a	25,9	1,98	16	23,7	1,93; 2,00
2b		2,20	17	46,7	-
3	81,4	4,23 m	18	42,2	3,41
4	43,2	-	19a	47,0	1,30
5	47,3	1,70	19b		1,82
6a	18,0	1,32	20	30,9	-
6b		1,74	21a	34,5	1,17
			21b		1,43
7a	32,6	1,35	22a	33,2	1,92
7b		1,74	22b		2,12
8	39,5	-	23	63,7	3,91; 4,53
9	48,0	1,82	24	13,7	1,07 (s)
10	36,7	-	25	15,9	0,94 (s)
11a	23,8	2,10	26	17,5	1,12 (s)
11b		2,10	27	26,1	1,31 (s)
12	121,4	5,59	28	179,1	-
13	145,7	-	29	33,4	0,93 (s)
14	42,1	-	30	23,9	1,07 (s)

### Détermination du nombre et de la nature des sucres

La nature des sucres a été déterminée par hydrolyse acide suivie d'une analyse par c L'hydrolyse acide du composé **LCR7**, suivie d'une CCM comparative de l'hydrolysats avec des échantillons de références du laboratoire et d'une analyse par chromatographie liquide, ont permis d'identifier les monosaccharides suivants : L-Rha, L-Ara et L-Araf.

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  de **LCR7** permet de distinguer 3 signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  5,11 (d,  $J = 6,2$  Hz) ; 6,14 (brs) et 6,15 (d,  $J = 5,5$  Hz), et qui corrélient sur le spectre HSQC avec les signaux de 3 carbones à  $\delta_{\text{C}}$  104,2 ; 100,8 et 110,8 respectivement, ce qui prouve la présence de 3 sucres.



**Figure 125:** Spectres HSQC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) montrant les signaux des anomères du composé **LCR7**.

Tous les protons des sucres ont été identifiés par une analyse approfondie des spectres COSY, HSQC-TOCSY et NOESY. Leurs carbones correspondants ont été, quant à eux, attribués sur la base des corrélations observées dans les spectres HSQC et confirmés par le spectre HMBC. Les données spectrales ci-dessus indiquent que les sucres identifiés sont sous la forme pyranose.

La configuration  $\alpha$  attribuée au proton anomérique du Rha a été mise en évidence par la valeur de son carbone C-5 à  $\delta_{\text{C}}$  69,8 ainsi que son apparition sous forme de large singulet (Luo *et al.*, 2008). La configuration  $\alpha$  de Ara et Araf, a été attribuée sur la base de leurs constantes de couplage  $^3J_{\text{H-1, H-3}}$  comprises entre 5,5 et 6,2 Hz.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier :

- 1 groupement  $\beta$ -L-arabinopyranosyle Ara -1 à  $\delta_{\text{H}}$  5,11 (d,  $J = 6,2$  Hz) ;
- 1 groupement  $\beta$ -D-arabinofuranosyle Araf -1 à  $\delta_{\text{H}}$  6,15 (d,  $J = 5,5$  Hz) ;

- 1 groupement  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle Rha -1 à  $\delta_H$  6,14 (brs).

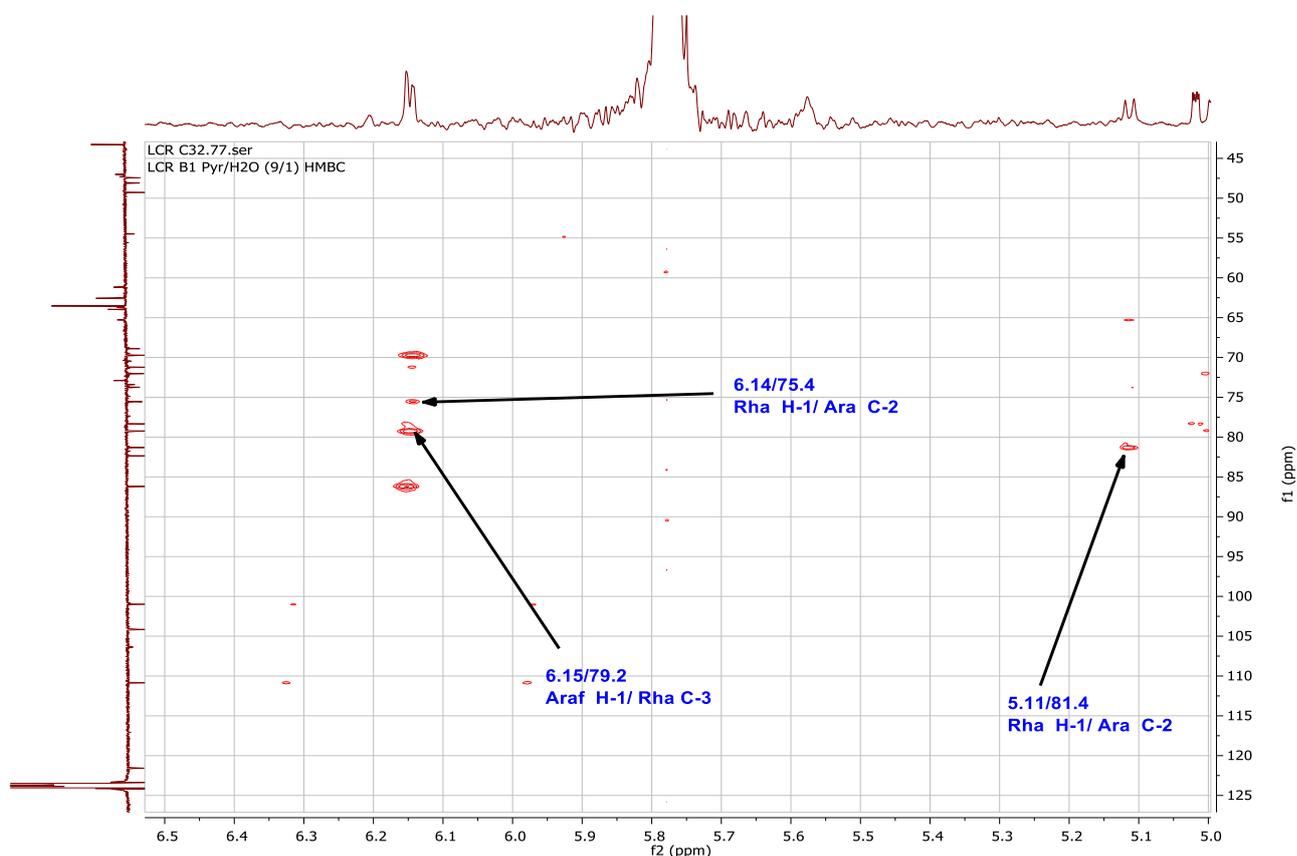
### Détermination des différents sites de fixation et d'enchaînement des sucres

Les chaînes oligosaccharidiques ainsi que les points de fixation sur l'aglycone ont été réalisés grâce aux corrélations observées sur le spectre HMBC.

#### Chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone

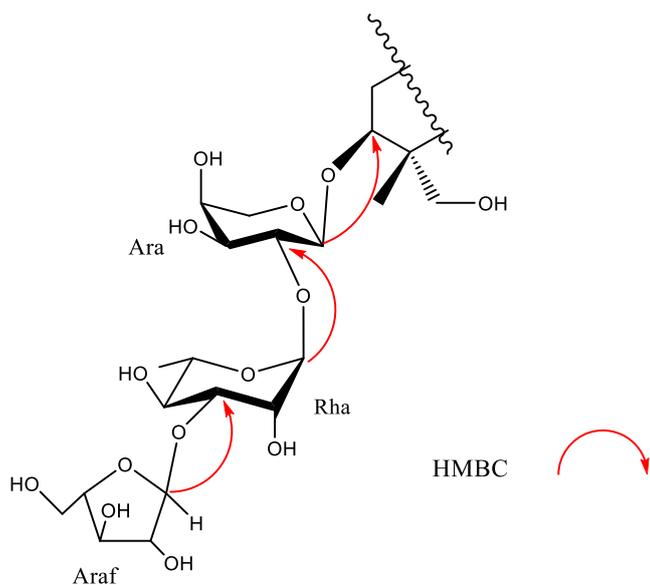
Les spectres de RMN  $^{13}C$  de **LCR7** révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_C$  81,4 (C-3) dû à une liaison osidique. La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal  $\delta_H$  H-1 Ara ( $\delta_H$  5,11  $J=$  6,2 Hz) et C-3 ( $\delta_C$  81,4) de l'aglycone, suggère que Ara est lié à la génine en position 3.

L'enchaînement des sucres a été déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H$  6,14 /  $\delta_C$  75,4 (Rha H-1 / Ara C-2) et 6,15 / 79,2 (Araf H-1 / Rha C-3).



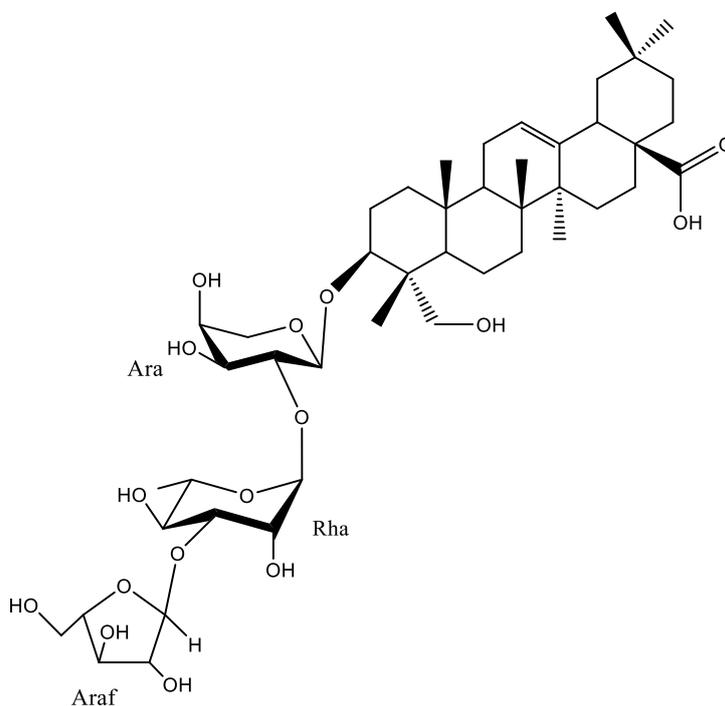
**Figure 126:** Spectres HMBC élargi (500 MHz, pyridine- $d_5$ ) du composé **LCR7** montrant les points de liaison des sucres.

La séquence complète,  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle a été établie en position C-3 de l'aglycone.



**Figure 127:** Corrélations HMBC entre les unités osidiques de la chaîne oligosaccharidique en position C-3 de l'aglycone du composé LCR7.

Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **LCR7** a été identifié comme étant le : 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosylhederagenine, composé naturel connu (Encarnación *et al.*, 1981).



**Figure 128:** Structure du composé LCR7

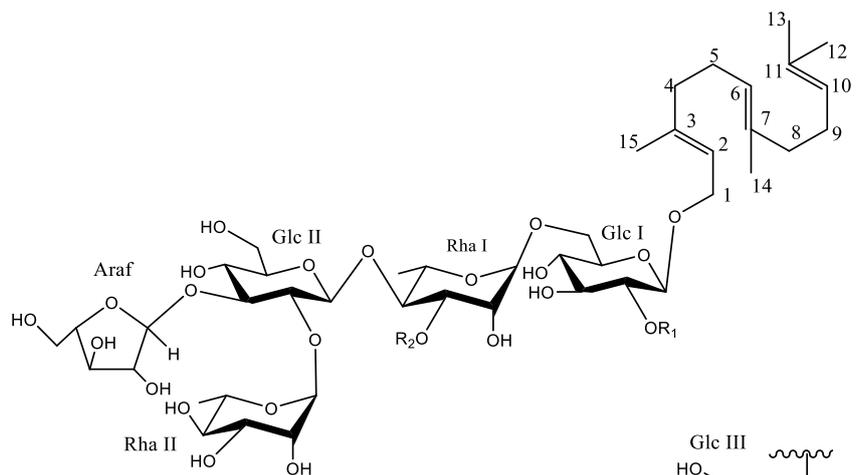
**Tableau XXXIII: données RMN (<sup>1</sup>H, 500 MHz et <sup>13</sup>C, 125 MHz) partie osidique de LCR7**

Pos.	LCR7	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)
<b>Sucres en C-3</b>		
Ara		
1	104,2 (CH)	5,12 (d, 6,2)
2	75,4 (CH)	4,53
3	73,7 (CH)	4,16
4	69,0 (CH)	4,28
5	65,3 (CH <sub>2</sub> )	3,77; 4,31
Rha		
1	100,8 (CH)	6,14 (brs)
2	71,0 (CH)	5,00
3	79,2 (CH)	4,76
4	71,9 (CH)	4,41
5	69,8 (CH)	4,69
6	18,2 (CH <sub>3</sub> )	1,64
Araf		
1	110,8 (CH)	6,15 (d, 5,5)
2	82,4 (CH)	5,02
3	78,4 (CH)	4,77
4	86,2 (CH)	4,93
6	62,8 (CH <sub>2</sub> )	4,17; 4,27

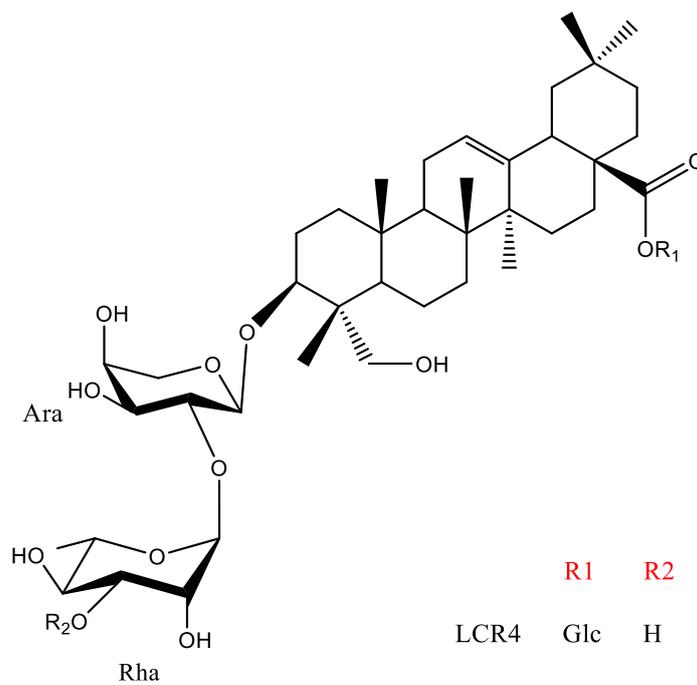
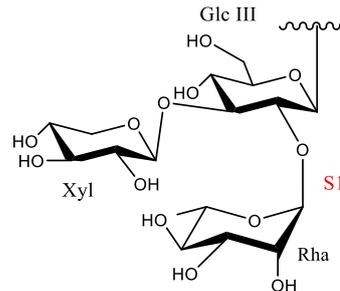
### 2.1.3.3. Conclusion partielle 3

Sept glycosides terpénoidiques ont été isolés des racines de *Lecaniodiscus cupanioides* dont quatre saponosides et trois glycosides monodesmosidiques du farnésol. Parmi les quatre saponosides dérivés de l'hédéragénine, trois sont monodesmosidiques en C-3 et l'autre est bidesmosidique (C-3 et C-28). Les saponosides **LCR5** à **LCR7** sont des composés connus précédemment isolés des écorces de cette même plante (Encarnacion et al 1981). La saponoside bidesmosidique **LCR4** est un dérivé nouveau de l'hédéragénine. Les quatre saponosides isolées, partagent le même fragment de la séquence oligosaccharidique en C-3 de l'hédéragénine (Rha(1→2) Ara-). Cette caractéristique structurale a été souvent rencontrée dans les saponosides de la sous-famille des Sapindoideae (Asao *et al.*, 2009; Voutquenne-Nazabadioko, 2010; Mazzola *et al.*, 2011; Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).

En ce qui concerne les glycosides de farnésol, ils possèdent 5, 6 et 9 sucres en position C-1 du farnésol. Après une analyse approfondie de leurs données spectrales, principalement les expériences de RMN 2D à 500 MHz (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC), et la spectrométrie de masse (electrospray), il ressort que tous sont des dérivés nouveaux. Dans la littérature, c'est la première fois qu'on rencontre des dérivés de farnésol à 5, 6 et 9 sucres en position C-1 du farnésol. Les trois glycosides de farnésol isolés, partagent le même fragment de la séquence oligosaccharidique en C-1 du farnésol (Rha(1→6)Glc-). Cette caractéristique structurale a été souvent rencontrée dans les glycosides de farnésol de la sous-famille des Sapindoideae (Adesanya *et al.*, 1999; Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018).



	R1	R2
LCR1	Rha	S1
LCR2	Rha	H
LCR3	H	H



	R1	R2
LCR4	Glc	H
LCR5	H	Xyl
LCR6	H	Ara
LCR7	H	Araf

## 2.2. Etudes biologiques

Les saponosides et les glycosides de farnésol sont rencontrés dans de nombreuses espèces végétales, avec une large gamme de propriétés, y compris les activités anthelminthiques et cytotoxiques (Avato *et al.*, 2006; D'addabbo *et al.*, 2011; Abbruscato *et al.*, 2014; Noté *et al.*, 2016c; Maestrini *et al.*, 2019, 2020). La plupart des composés isolés ainsi que les fractions ont été évalués sur ces différentes cibles biologiques.

### 2.2.1. Evaluation de l'activité anthelminthique des fractions enrichies de *L. cupanioides* (LCR) et *C. calothyrsus* (CCF).

#### ➤ Essai d'inhibition du dégagement larvaire (LEIA)

Le test d'inhibition du dégagement larvaire a été réalisé selon Jackson & Hoste 2010 en comparant l'effet inhibiteur de diverses fractions. Les fractions enrichies en saponines (CCF) et glycosides terpéniques (LCR) ont été évaluées sur des larves de troisième stade (L3) obtenues de chèvres et de moutons présentant une infection monospécifique à *H. contortus*. L'activité anthelminthique des fractions a été évaluée en appliquant le test d'inhibition du dégagement larvaire (LEIA) avec une gamme des concentrations croissantes de 150 µg/mL à 1200 µg/mL par rapport à un contrôle négatif (PBS) afin de mesurer les cinétiques de dégagement selon la concentration appliquée.

Concernant l'effet anthelminthique des fractions LCR et CCF, les pourcentages exprimés en moyenne et l'écart type de la moyenne (SD) de chaque traitement sont présentés dans le Tableau XXXIV.

**Tableau XXXIV: Pourcentage d'efficacité après 1 heure d'incubation des fractions LCR et CCF à différentes concentrations avec les L3 de *H. contortus*, exprimés en Moyenne ± SD.**

Concentration (µg/ml)	Fraction LCR	Fraction CCF
PBS (control -)	00 ± 0,0	00 ± 0,0
150	59 ± 16,2	95 ± 3,4
300	92.5 ± 9,2	98.5 ± 2,9
600	100 ± 0,0	99,6 ± 0,6
1200	100 ± 0,0	95 ± 7,7

(p <0,05).

### ✓ Fraction LCR

Les résultats de l'analyse présentée dans le tableau **33** ont montré de manière générale que tous les traitements de la fraction **LCR** ont eu une différence significative sur l'inhibition du dégagement larvaire par rapport au traitement témoin (PBS), mais aussi qu'il existe des différences significatives au sein de ces différents traitements ( $p < 0,05$ ).

L'analyse de la moyenne des données obtenues après 1h a permis de constater de façon générale, que les traitements 600 et 1200  $\mu\text{g/ml}$  ont eu une inhibition totale sur le dégagement larvaire ( $100 \pm 0,0\%$ ), suivi du traitement à 300  $\mu\text{g/ml}$  ( $92,5 \pm 9,2\%$ ), puis du traitement 150  $\mu\text{g/ml}$  ( $59 \pm 16,2\%$ ). Le traitement témoin quant à lui, présente une efficacité nulle ( $00 \pm 0\%$ ). En plus de cela, les résultats issus de l'analyse de ces moyennes ont permis de mettre en exergue l'existence des différences significatives entre les différents traitements plus précisément entre 1200  $\mu\text{g/ml}$  et 150  $\mu\text{g/ml}$  ; 600  $\mu\text{g/ml}$  et 150  $\mu\text{g/ml}$  et enfin entre 300  $\mu\text{g/ml}$  et 150  $\mu\text{g/ml}$ .

### ✓ Fraction CCF

En ce qui concerne l'effet anthelminthique de la fraction CCF, les résultats de l'analyse présentée dans le tableau **33** ont montré de manière générale que tous les traitements ont eu une différence significative sur l'inhibition du dégagement larvaire par rapport au traitement témoin (PBS).

L'analyse de la moyenne des données obtenues après une heure (d'expérimentation ou d'incubation selon le cas) a permis de constater que de façon générale, les traitements ont eu une inhibition sur le dégagement larvaire à plus de 95%. Le traitement témoin quant à lui, présente une efficacité nulle  $0,0 \pm 0,0\%$ . En plus de cela, les résultats issus de l'analyse de ces moyennes ont permis de dire qu'il n'existe pas des différences significatives entre les différents traitements. Les valeurs habituelles *in vitro* pour montrer une inhibition sur le dégagement larvaire vont de l'ordre de 1200 à 150  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  afin d'obtenir la  $CE_{50}$  mais pour la fraction **CCF** à la dose minimum de 150  $\mu\text{g/ml}$ , elle donne une effectivité de 95%. Par conséquent, le calcul de  $CE_{50}$  est impossible à ces concentrations, il faut donc faire des analyses à des doses plus basses pour obtenir une dose minimale  $CE_{50}$ .

**Résultats  $CE_{50}$  :** Pour déterminer la concentration efficace permettant d'obtenir 50% de l'inhibition du dégagement larvaire, la combinaison dose – effet de la fraction **LCR** a été calculée avec des intervalles de confiance respectifs à **CE 50% + CE 95%**.

Les effets inhibiteurs des 2 fractions ont été évalués sur le nématode de *H. contortus*. Sur la base des résultats visibles sur la **figure 129**, la  $CE_{50}$  n'a été observée que dans la fraction **LCR** (**Figure 129**). La  $CE_{50}$  pour l'extrait de CCF (**Figure 129**) dans *H. contortus* n'a pas pu être calculée car trop efficace à dose minimale 150  $\mu\text{g/ml}$  avec une inhibition de 95%.

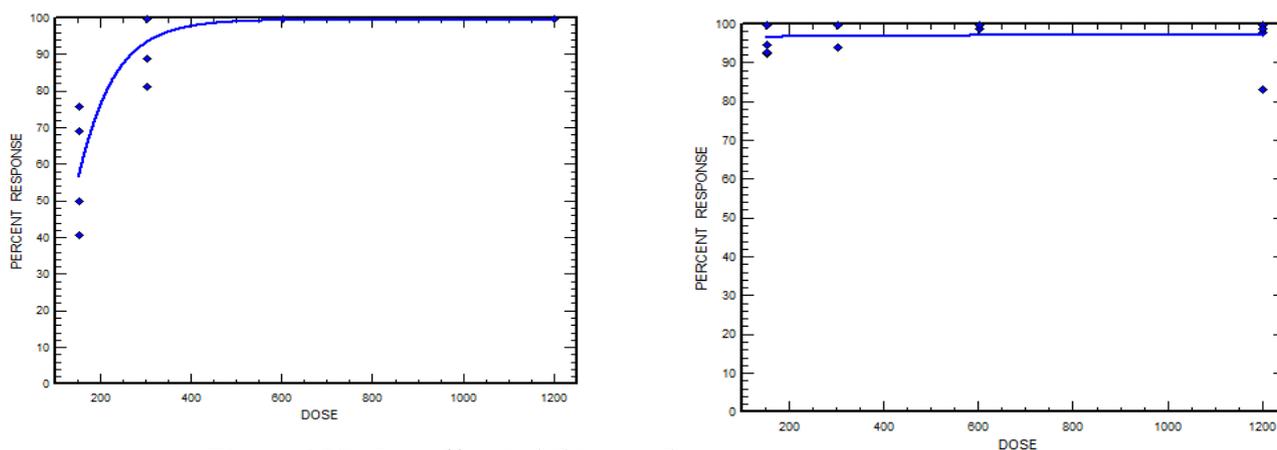


Figure 129: Les effets inhibiteurs des deux fractions sur *H. contortus*

## 2.2.2. Evaluation de l'activité antiproliférative des composés et fractions de *L. cupanioides* et *C. calothyrsus* (CCF).

### 2.2.2.1. Activité antiproliférative des fractions enrichies LCR (*L. cupanioides*) et CCF (*C. calothyrsus*)

L'activité antiproliférative des fractions enrichies LCR et CCF a été évaluée sur une lignée cellulaire adénocarcinome colorectal épithélial Caco-2.

Tableau XXXV: Activité antiproliférative sur la lignée cellulaire Hep3B et Caco-2 des fraction LCR et CCF

Fractions	CC <sub>50</sub> (μM)
LCR	> 25,0
CCF	> 25,0
doxorubicine	13,23

L'analyse des données obtenues dans ce tableau nous montre qu'aucune activité de ces fractions n'a été observée sur cette lignée cellulaire.

### 2.2.2.2. Activité antiproliférative des saponines de *Calliandra calothyrsus* (calothyrsusosides A et B)

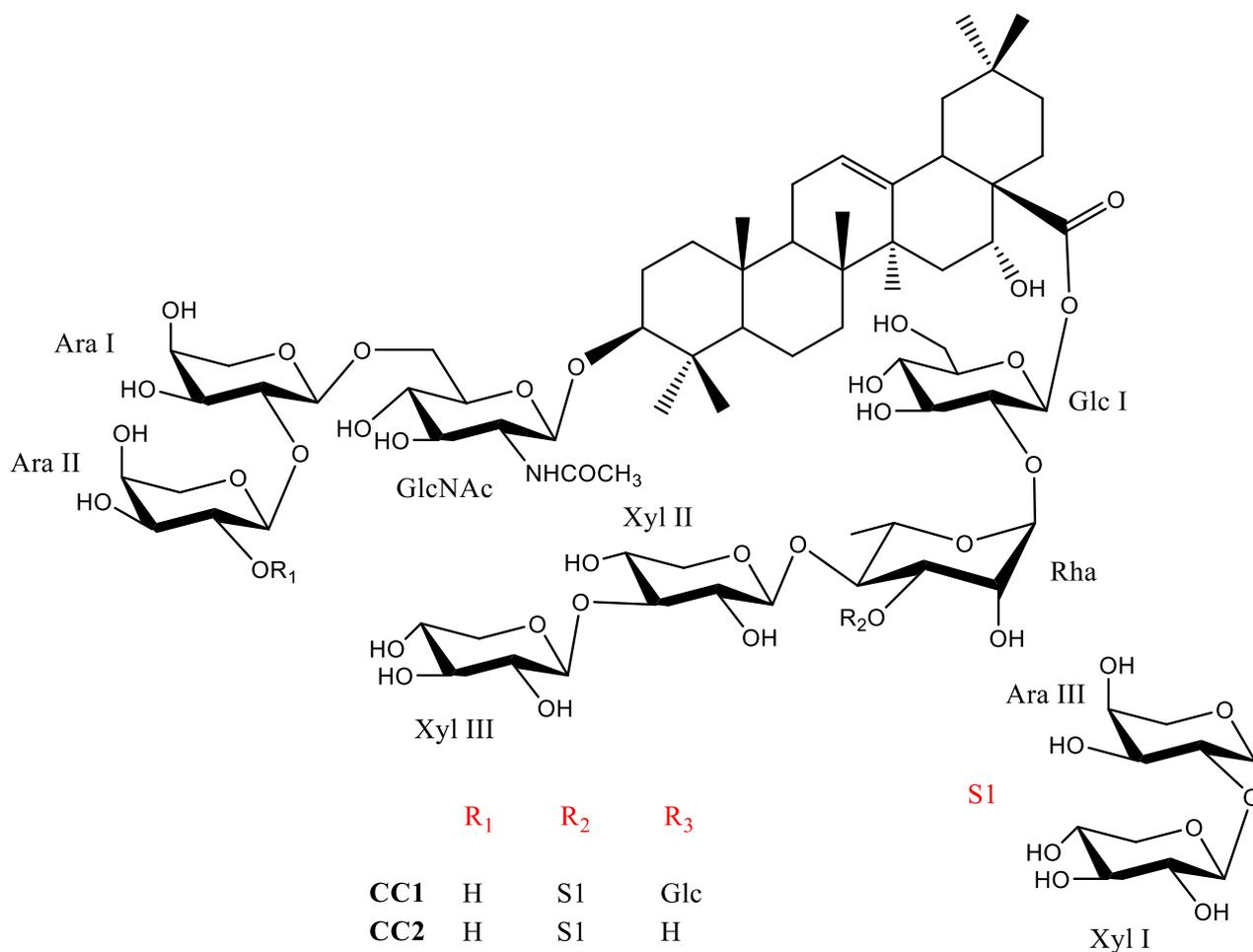
L'activité antiproliférative des composés **calothyrsusosides A** et **B** a été évaluée contre deux lignées de cellules cancéreuses du tube digestif humain : carcinome hépatocellulaire Hep3B et adénocarcinome colorectal épithélial Caco-2. Les résultats sont dans le tableau XXXV ci-contre.

**Tableau XXXVI: Activités antiprolifératives sur la lignée cellulaire Hep3B et Caco-2 des composés CC1 et CC2 de *C. calothyrsus*.**

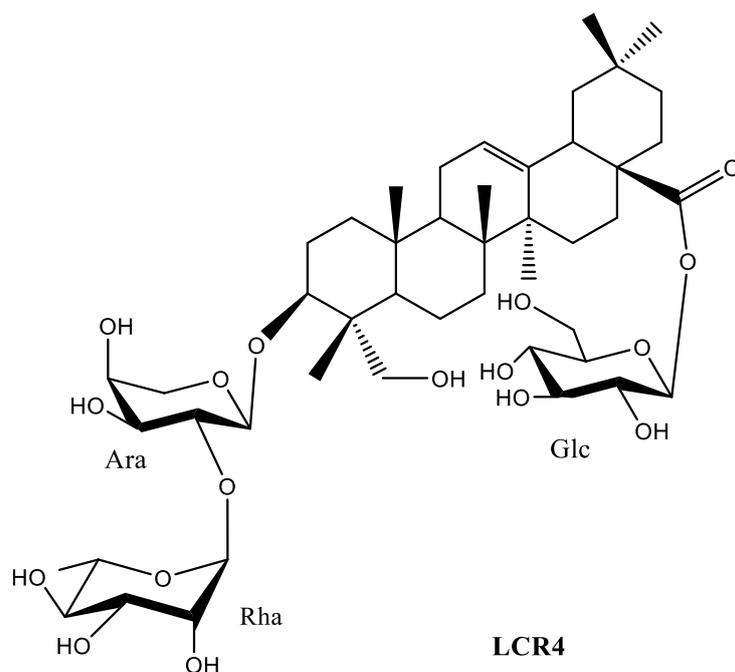
Composés	CI <sub>50</sub> (μM) de Hep3B	CC <sub>50</sub> (μM) de Caco-2
1	6,0	>25,0
2	6,5	>25,0
Sorafenib	7,6 ± 2,3	-
Doxorubicine	-	13,23

Après les tests réalisés, il ressort que les deux composés ont montré une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire Hep3B, avec des valeurs CI<sub>50</sub> de 6,0 et 6,5 μM, respectivement, qui sont de l'ordre de celle du sorafenib, l'une des molécules les plus utilisées cliniquement (Forner *et al.*, 2018). Cependant, aucune activité antiproliférative n'a été détectée pour les mêmes composés sur la lignée cellulaire Caco-2 (CC<sub>50</sub> > 25 μM).

Ces résultats montrent une certaine sélectivité de ces saponines par rapport à la lignée cellulaire Hep3B car n'ayant pas agi sur les cellules Caco-2. Par conséquent, des études plus approfondies doivent être entreprises pour mettre en lumière cette sélectivité.



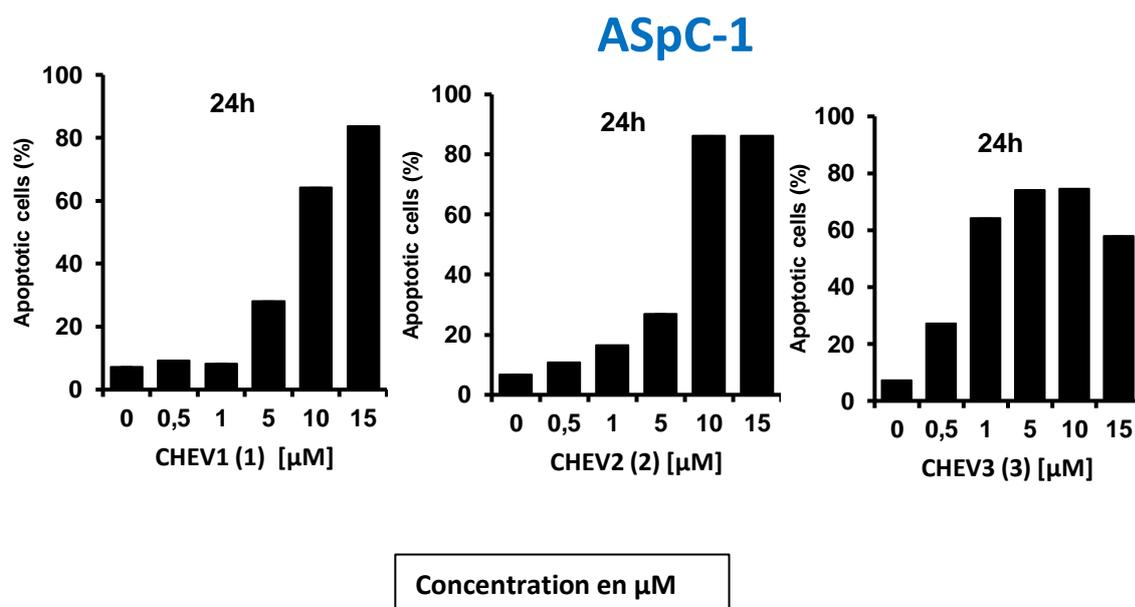




### 2.2.3. Evaluation de l'activité biologique des saponines de *A. chevalieri*

#### 2.2.3.1. Effets proapoptotiques des chevaliosides A-C

L'inhibition de l'apoptose des composés **chevaliosides A-C** a été évaluée sur deux lignées de cellules humaines : le carcinome du pancréas AsPC-1 et les lignées cellulaires cancéreuses monocytaires THP-1 (**Figure 130 et 131**).



**Figure 130: Effets proapoptotiques des chevaliosides A-C sur ASpC-1.**

## THP-1

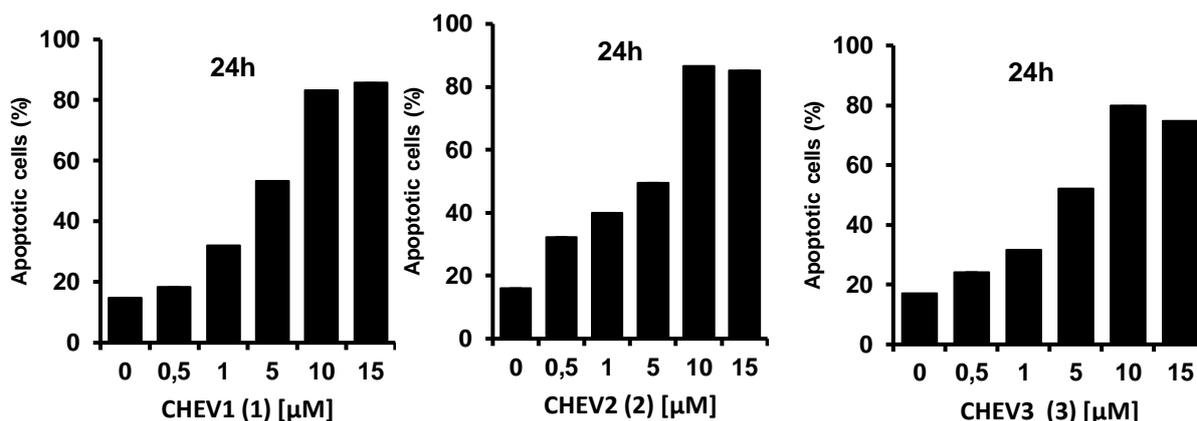


Figure 131 : Effets proapoptotiques des chevalirosides A-C sur THP-1

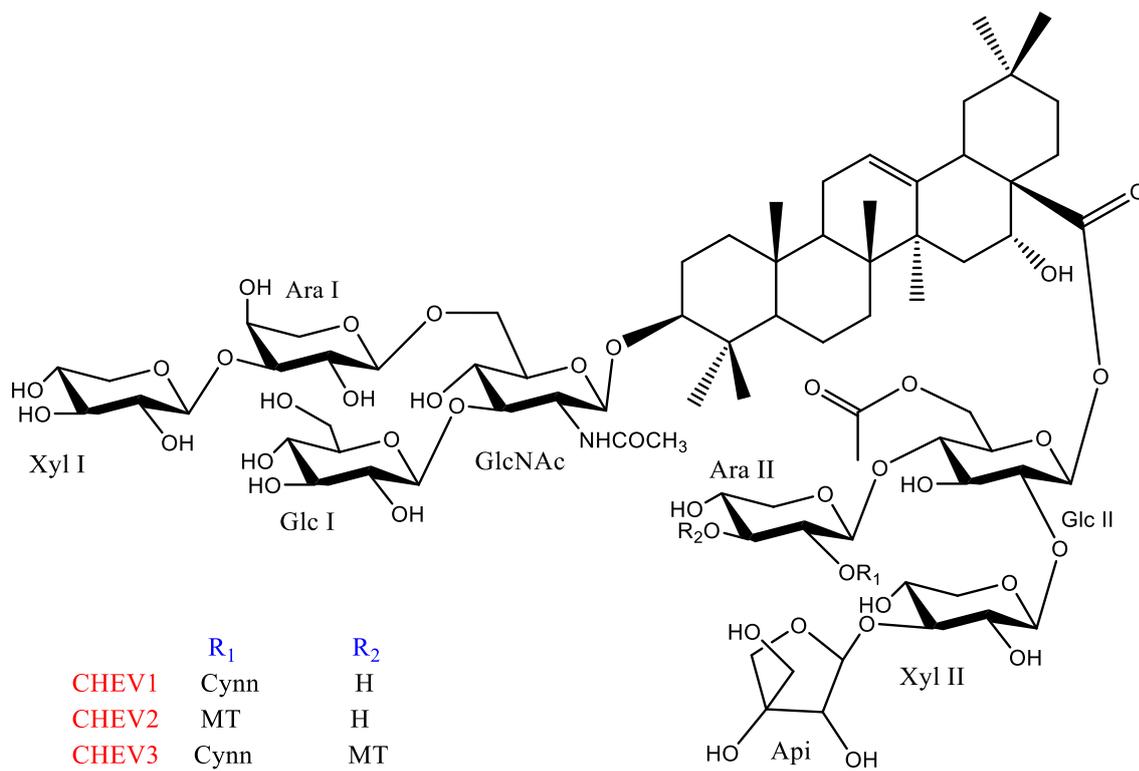
Tableau XXXVIII: Effets proapoptotiques des Chevalirosides A-C (1-3) sur AsPC-1 et THP-1

Composés	CE <sub>50</sub> (µM) cellules AsPC-1	CE <sub>50</sub> (µM) cellules THP-1
CHEV1	17,91	8,11
CHEV2	13,72	5,69
CHEV3	<b>3,10</b>	8,32

La concentration effective permettant l'induction d'apoptose de la moitié de la population cellulaire a été évaluée à 17,91 µM et 8,11 µM ; 13,72 µM et 5,69 µM et 3,10 µM et 8,32 µM sur des cellules AsPC-1 et THP-1 pour les composés **CHEV1**, **CHEV2** et **CHEV3** respectivement.

De cette analyse, il ressort une forte activité pro-apoptotique à faible concentration du composé **CHEV3** par rapport aux autres composés isolés concernant la lignée cellulaire AsPC-1. Le fort effet pro-apoptotique de **CHEV3** (CE<sub>50</sub> = 3,10 µM) sur la cellule souche cancéreuse du pancréas humain AsPC-1 peut être probablement dû au nombre et à la nature des groupements acyle du composé **CHEV3** par rapport aux composés **CHEV1** et **CHEV2**. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour étayer cette conclusion. Ces travaux sont en accord avec ceux rapportés par Noté *et al.* (2016b), selon lesquels les saponines de type oléanane, présentent une bonne activité proapoptotique.

Au vu des résultats obtenus, **CHEV3** pourrait être considéré comme un potentiel candidat-médicament contre le cancer du pancréas.



## **Discussion générale**

### ✓ **Activité anthelminthique**

La consommation des plantes contenant des glycosides terpéniques a été associée à des effets néfastes sur les nématodes gastro-intestinaux (GIs) dans de nombreuses études *in vitro* ou *in vivo*. Cette activité serait dû à leur interaction avec la membrane cellulaire qui entrainerait une plus grande perméabilité de celle-ci et par conséquent la lyse des cellules.

Les résultats obtenus montre que toutes les fractions **CCF** et **LCR** respectivement riches en saponines et en saponines + glycosides de farnésol, ont des effets inhibiteurs «*in vitro*» contre les larves de stade 3 de *H. contortus*. Bien qu'étant toutes efficaces, la fraction CCF de *C. calothyrsus* riche spécifiquement en saponines se présente comme la plus active. Pour déterminer la concentration efficace permettant l'obtention de 50% d'inhibition du dégagement larvaires (CE<sub>50</sub>), la combinaison dose – effet de chaque fraction (LCR ou CCF) a été calculée. Les valeurs obtenues sont de 100% ; 92,5% et 59,2% pour la fraction LCR et 95% ; 99,6% ; 98,5% et 95% pour la fraction CCF. Il ressort que l'inhibition du dégagement larvaire répond à une courbe dose-dépendante. Ces résultats sont en conformité avec les données disponibles dans la littérature sur l'activité anthelminthique «*in vitro*» de cette classe de composés contre les helminthes des ruminants. C'est le cas des fractions enrichies en saponines de *Phytolacca icosandra* (Vercruysse *et al.*, 2001), *Zizyphus joazeiro* (Cavalcanti *et al.*, 2016), et *Medicago* spp. (Maestrini *et al.*, 2019), qui ont montré «*in vitro*» une activité ovicide contre les nématodes des petits ruminants. De même, l'action ovicide «*in vitro*» de *Combretum molle* contre les œufs de *H. contortus* a été attribué à leur teneur en saponine (Ademola & Elo, 2010). Les propriétés biologiques des saponines sont normalement attribués à leur interaction spécifique avec la membrane cellulaire, provoquant des changements dans la perméabilité cellulaire (Tava & Avato, 2006 ; Sprag *et al.*, 2004). De cette manière, les saponines peuvent pénétrer à l'intérieur de la gaine des larves, altérant certaines fonctions biologiques conduisant ainsi à l'inhibition définitive du dégagement larvaire (Cavalcanti *et al.*, 2016). Il a été également émis l'hypothèse que ces molécules pourraient interférer avec les voies enzymatiques impliquées dans le dégagement larvaire, ce qui entraîne la mort des larves (Cavalcanti *et al.*, 2016). Il nous revient donc d'explorer le mécanisme d'action impliqué dans l'activité anthelminthique de nos fractions enrichies ainsi que nos glycosides de sesquiterpène isolés au cours de cette étude.

En ce qui concerne l'activité anthelminthique et les caractéristiques chimiques des fractions sur le dégagement larvaire de *H. contortus*, une relation a été observée entre les CE<sub>50</sub> et la composition majeure des fractions. En effet, la fraction CCF uniquement riche en saponine s'est avérée plus active que la fraction LCR riche en saponine + glycosides de farnésol. Ceci suggère que l'activité des deux fractions serait liée à leur forte teneur en saponines. Ces résultats

concordent avec les données précédemment rapportées sur les œufs et les larves de *H. contortus* (Ademola & Elo, 2010). L'efficacité «*in vitro*» de ces fractions riches en saponines sur le dégagement larvaire, encourage de nouvelles études visant à évaluer leur effet inhibiteur «*in vivo*» en tant que nouveaux candidat-médicaments anthelminthiques. Cependant, divers aspects liés à leur potentiel toxicité doivent être pris en compte. Les saponines en effet, s'ils sont ingérés en grande quantité, sont potentiellement toxiques et peuvent réduire la digestibilité des aliments (Copani *et al.*, 2016). Cependant, en cas de prise à des concentrations modérées, ils peuvent réduire la charge parasitaire (Copani *et al.*, 2013). Sachant qu'un anthelminthique est dit efficace lorsque son effet inhibiteur est d'au moins 90% (Vercruyse *et al.*, 2001), nos fractions enrichies doivent être considérées comme des potentiels anthelminthiques contre *H. contortus*, avec un intérêt plus prononcé pour la fraction CCF. Ainsi, l'activité *in vitro* élevée de ces différentes fractions contre *H. contortus* nous suggère d'évaluer leur potentiel anthelminthique *in vivo* à des doses non toxiques, ce qui serait prometteur en termes de perspectives relatives à la mise au point d'un MTA (médicaments traditionnels améliorés) à usage vétérinaire.

#### ✓ **Induction d'apoptose**

L'inhibition de l'apoptose des composés CHEV1, CHEV2 et CHEV3 a été évaluée sur deux lignées de cellules humaines : le carcinome du pancréas AsPC-1 et les lignées cellulaires cancéreuses monocytaires THP-1) au moyen de la méthode par coloration à l'annexine V-FITC/PI. Cette étude montre que les composés CHEV1, CHEV2 et CHEV3 ont une activité pro-apoptotique sur les lignées cellulaires utilisées de façon concentration-dépendante après 24h de traitement. La concentration effective permettant l'induction d'apoptose de la moitié de la population cellulaire a été évaluée à 17,91  $\mu\text{M}$  et 8,11  $\mu\text{M}$  ; 13,72  $\mu\text{M}$  et 5,69  $\mu\text{M}$  et 3,10  $\mu\text{M}$  et 8,32  $\mu\text{M}$  sur des cellules AsPC-1 et THP-1 pour les composés CHEV1, CHEV2 et CHEV3 respectivement. De cette analyse, il ressort une forte activité pro-apoptotique à faible concentration du composé CHEV3 par rapport aux autres composés isolés concernant la lignée cellulaire AsPC-1.

#### ✓ **Activité antiproliférative**

Les fractions enrichies LCR et CCF et les composés cupanioidesides A-C et lecanioside A n'ont montré aucune activité antiproliférative sur la lignée cellulaire adénocarcinome colorectal épithélial Caco-2. Cependant, les composés calothyrsusosides A et B évalués contre deux lignées de cellules cancéreuses du tube digestif humain : carcinome hépatocellulaire Hep3B et adénocarcinome colorectal épithélial Caco-2, ont montré une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire Hep3B, avec des valeurs  $\text{CI}_{50}$  de 6,0 et 6,5  $\mu\text{M}$ , respectivement, qui sont de

l'ordre de celle du sorafenib, l'une des molécules les plus utilisées cliniquement (Forner *et al.*, 2018). Cependant, aucune activité antiproliférative n'a été détectée pour les mêmes composés sur la lignée cellulaire Caco-2 (CC50 > 25  $\mu$ M). Ces résultats mettent en évidence l'effet sélectif des saponosides calothyrsusosides A et B sur ces deux types cellulaires. Les cellules Hep3B sont plus sensibles que les cellules Caco-2 par traitement avec les saponosides calothyrsusosides A et B. Par conséquent, des études plus approfondies doivent être entreprises pour mettre en lumière cette sélectivité.

✓ **Etudes préliminaire de la relation entre structures et activités biologiques**

Aux vues des faibles différences structurales entre les molécules, il nous est possible de comparer les effets biologiques obtenus pour un composé donné avec ceux d'un autre composé et de déduire ainsi l'influence des divers groupements sur une activité biologique donnée

✓ **Importance de l'acylation**

La comparaison des structures et des effets des CHEV1, CHEV2 et CHEV3 montre l'importance du nombre et à la nature des groupements acyle en position 2 et 3 de Ara II dans l'induction de l'apoptose de la cellule souche cancéreuse du pancréas humain AsPC-1, puisque CHEV1 (dépourvu du groupement monoterpène) et CHEV2 (dépourvu du groupement cinnamoyle) sont moins cytotoxiques, contrairement au composé CHEV3 (pourvu des groupements cinnamoyle et monoterpène) beaucoup plus actif. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour étayer cette conclusion. Ces travaux sont en accord avec ceux rapportés par Noté *et al* (2016b), selon lesquels les saponines de type oléanane, présentent une activité proapoptotique forte.

## **Conclusion générale et perspective**

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet commun : « *Valorisation des ressources de la biodiversité végétale du Cameroun et du Congo : criblage et caractérisation des molécules à fort potentiel anthelminthique pour l'amélioration de la santé animale* » entre le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles (LPSN) et le Laboratoire de Pharmacochimie et Biologie pour le développement PHARMA-DEV UMR-152 et financé par l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

Le travail a débuté par une étude phytochimique des différents extraits de plantes. Ainsi donc, l'étude des fleurs de *Calliandra calothyrsus* nous a permis d'isoler quatre composés dont trois décrits pour la première fois dans la nature. Les dérivés de l'acide echinocystique possèdent en leur sein 9 et 10 sucres. La chaîne tétrasaccharidique en C-3 est identique pour les composés **CC1** et **CC2**. En ce qui concerne la chaîne osidique en C-28, elle est identique pour les composés **CC3** et **CC2**. Cependant, d'un point de vue chimiotaxonomique, nos résultats représentent une contribution précieuse à la connaissance de la chimie des plantes du genre *Calliandra* de la sous famille des Mimosaceae, dont certaines espèces ont révélé la présence de saponines de type oléanane. Ces saponines présentent le N-acétylglucosamine directement attachée en C-3 de l'aglycone ainsi que la séquence de sucre Ara<sup>-2</sup>Ara<sup>-6</sup>GlcNAc<sup>-3</sup>Aglycone. Ces caractéristiques sont fréquentes dans toutes les saponines isolées du genre *Calliandra* (Takeda *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1994; Tani *et al.*, 1996, 1998; Silva *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2008; Silva & Parente, 2013). En comparant nos saponines à celles précédemment isolées du genre *Calliandra*, il apparaît qu'elles partagent la même séquence d'oligosaccharides C-3 mais avec respectivement un et deux sucres supplémentaires. Tout ceci pourrait donc être une spécificité des saponines de l'espèce *Calliandra calothyrsus*.

A partir des racines de *Lecaniodiscus cupanioides*, sept composés ont été isolés, dont quatre nouveaux (quatre saponosides et trois glycosides monodesmosidiques du farnésol). Parmi les quatre saponosides dérivés de l'hédéragenine, trois sont monodesmosidiques en C-3 et l'autre est bidesmosidique (C-3 et C-28). Les saponosides LCR5 à LCR7 sont des composés connus préalablement isolés des écorces de cette même plante (Encarnación *et al.*, 1981). Le saponoside bidesmosidique LCR4 est un dérivé nouveau de l'hédéragenine. Les quatre saponosides isolées, partagent le même fragment de la séquence oligosaccharidique en C-3 de l'hédéragenine (Rha(1→2) Ara-). Cette caractéristique structurale a été souvent rencontrée dans les saponosides de la sous-famille des Sapindoideae (Asao *et al.*, 2009; Voutquenne-Nazabadioko, 2010; Mazzola *et al.*, 2011; Pertuit *et al.*, 2018; Petit *et al.*, 2019).

En ce qui concerne les glycosides de farnésol, ils possèdent 5, 6 et 9 sucres en position C-1 du farnésol. Dans la littérature, c'est la première fois qu'on rencontre des dérivés de farnésol à 5, 6 et 9 sucres en position C-1 du farnésol. Les trois glycosides de farnésol isolées, partagent le même fragment de la séquence oligosaccharidique en C-1 du farnésol (Rha(1→6)Glc-). Cette caractéristique structurale a été souvent rencontrée dans les glycosides de farnésol de la sous-famille des Sapindoideae (Adesanya *et al.*, 1999; Magid *et al.*, 2005, 2008; Pertuit *et al.*, 2018).

Enfin, l'étude phytochimique des écorces du tronc de *Albizia chevalieri* nous a permis d'isoler trois saponosides nouveaux. Tous ces saponosides sont des dérivés bidesmosidiques (C-3 et C-28) de l'acide echinocystique. Il ressort que tous possèdent en leur sein 8 sucres et que la chaîne tétrasaccharidique en C-3 est identique pour tous. En ce qui concerne la chaîne osidique en C-28, elle met en exergue la présence d'un groupement acétyle et ne diffère que par la substitution en position 2 et 3 de l'Ara III par les groupements Cinnamoyls et/ou Monoterpènes.

En somme, l'investigation de ces plantes nous a permis d'isoler au total quatorze composés parmi lesquels :

- ✓ 11 saponosides dont 6 dérivés de l'acide echinocystique, un dérivé de l'acide oléanolique et quatre dérivés de l'hedéragénine ;
- ✓ 3 glycosides de farnésol.

Les structures des composés isolés ont été établies grâce à l'analyse approfondie des techniques de RMN 1D et 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY et ROESY/NOESY) couplées à la spectrométrie de masse haute résolution (HRESI-MS), et par comparaison avec les données de la littérature.

La prochaine étape était l'évaluation biologique des fractions et composés obtenus. Trois activités biologiques ont été retenues : l'activité anthelminthique et l'activité antiproliférative.

L'évaluation des propriétés antiprolifératives des composés calothyrsusoside **A** et **B** isolés de *C. calothyrsus* sur deux lignées de cellules cancéreuses du tube digestif humain (Hep3B et Caco-2) ont montré que ces composés possèdent une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire Hep3B, avec des valeurs CI<sub>50</sub> de 6,0 et 6,5 µM, respectivement, qui sont de l'ordre de celle du sorafenib, l'une des molécules les plus utilisées cliniquement. Cependant, aucune activité antiproliférative n'a été détectée pour les mêmes composés sur la lignée cellulaire Caco-2 (CC<sub>50</sub> > 25 µM). Par ailleurs, les composés isolés des racines de *L. cupanioides*

(les cupanioidesosides **A -C** et Lecanioside **A**) n'ont montré aucune activité antiproliférative sur les cellules Caco-2 ( $CC_{50} > 25 \mu\text{M}$ ).

Pour les composés isolés de *Albizia chevalieri*, l'évaluation de leur effet d'induction d'apoptose sur deux lignées de cellules cancéreuses humaines (AsPC-1 et THP-1) a montré que le pourcentage de cellules apoptotiques après 24h de traitement a augmenté de façon concentration-dépendante, ce qui suggère que les composés testés ont une activité proapoptotique sur les deux lignées cellulaires.

Enfin, l'activité anthelminthique des fractions enrichies en saponines de *Calliandra calothyrsus* (CCF) et de *Lecaniodiscus cupanioides* (LCR) a été évaluée sur des larves de troisième stade (L3) obtenues de chèvres et de moutons présentant une infection monospécifique à *Haemonchus contortus* selon le test d'inhibition du dégagement larvaire (LEIA) avec une gamme des concentrations croissantes de 150  $\mu\text{g/mL}$  à 1200  $\mu\text{g/mL}$  par rapport à un contrôle négatif (PBS) afin de mesurer les cinétiques de dégagement selon la concentration appliquée.

Pour toutes les deux fractions (LCR et CCF), l'activité anthelminthique a suivi une courbe montrant une relation dose-réponse. En général, les valeurs calculées des  $CI_{50}$  ont été plus basses pour les CCF que pour les LCR. Ce résultat suggère une plus forte sensibilité de *Haemonchus contortus* à CCF par rapport à LCR.

### **Perspectives**

- Nous envisageons de poursuivre la purification des composés des autres fractions enrichies en glycosides terpéniques ;
- Nous envisageons de poursuivre l'étude sur d'autres plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des helminthes ;
- Nous envisageons également d'entreprendre une étude antiproliférative approfondie sur les calothyrsusosides (A et B) et chevalioside C qui semblent prometteurs ;
- Évaluer l'activité anthelminthique des composés isolés *in vivo*.

## **Chapitre 3 : Matériels et Méthodes**

### 3.1. Matériel végétal

L'identification des espèces ci-dessous a été réalisée par Monsieur NANA Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun, de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (Cameroun).

#### *Calliandra calothyrsus* Meissn.

*Calliandra calothyrsus* Meissn. a été récolté en Juin 2018 à Nkolbisson (Région du Centre Cameroun). La plante une fois identifiée à l'Herbier National du Cameroun, un échantillon de référence y a été déposé sous le numéro (52065/HNC).

#### *Lecaniodiscus cupanioides*

*Lecaniodiscus cupanioides* Planch a été récolté en Juin 2019 à Mendong (Région du Centre Cameroun). La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun où un échantillon de référence a été déposé sous le numéro (56612/HNC).

#### *Albizia chevalieri*

*Albizia chevalieri* harms a été récolté en Juin 2016 à Nkolbisson (Région du Centre Cameroun). La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun où un échantillon de référence a été déposé sous le numéro (47196/HNC).

### 3.2. Séparation et isolement

#### ➤ Fractionnement et isolement des composés de *Calliandra calothyrsus* Meissn.

Nous avons travaillé à partir des fleurs séchées puis broyées de *C. calothyrsus* (750 g). L'extraction par macération a été réalisée sur toute la matière sèche à trois reprises pendant 72 h, avec du MeOH (4 L). A la fin des extractions par macération, les filtrats ont été réunis et évaporés à sec à l'aide d'un rotavapor de type Buchi. L'extrait méthanolique obtenu (122 g), a été partitionné successivement à l'hexane, l'acétate d'éthyle puis le *n*-BuOH saturé d'eau. La fraction butanolique (23,5 g) a été dissoute dans 400 ml d'eau et laissée pendant 48 h dans une chambre froide à -4° afin de précipiter les tanins. Une fois ce processus terminé, l'ensemble a été filtré et le filtrat obtenu a été évaporé à sec sous vide pour donner une masse de résidu de 6g. Ce résidu a été dissous dans 10 ml d'eau distillée et soumis à une chromatographie sous vide (VLC) sur gel de silice en phase inverse RP-18 (25-40 µm), élué avec un gradient de MeOH-H<sub>2</sub>O (100% H<sub>2</sub>O→100% MeOH). Après analyse par CCM, six fractions ont été obtenues : B1 (100% H<sub>2</sub>O ; 0,92 g), B2 (50% MeOH ; 2,1 g), B3 (55-65% MeOH ; 1,2 g), B4 (70-85% MeOH, 800 mg), B5 (90% MeOH, 500 mg) et B6 (100% MeOH ; 1,7 g). La fraction riche en saponines B6 (1,7 g) a été soumise à une chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) à l'aide du système A [gel de silice (15–40 µm), CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:5;

65:35:10 phase inferieur ; 0:100:0)] pour donner dix sous fractions (Fr1-F10). La sous fraction Fr7+Fr8 (263 mg) a été soumise à des chromatographies successives liquides à moyenne pression (MPLC) à l'aide du système A [gel de silice (15–40 µm), CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:5; 65:35:10 phase inferieur; 0:100:0)] et a conduit à l'isolement de deux composés purs, **CC1** (19 mg) et **CC2** (30 mg).

Les branches de *C. calothyrsus* ont été découpées, séchées, puis broyées pour donner une poudre de 500g. 300g de cette poudre ont été soumis à une extraction au MeOH par sonication. Après filtration, puis évaporation à sec, un extrait méthanolique de 10 g a été obtenu. Cet extrait méthanolique a été suspendu dans 200 ml de H<sub>2</sub>O puis partitionné successivement avec de l'hexane, de l'acétate d'éthyle et du *n*-BuOH sat.H<sub>2</sub>O. La fraction soluble dans le *n*-BuOH (1,8 g) a été dissoute dans 10 ml de H<sub>2</sub>O puis soumise à une chromatographie sous vide (VLC) sur gel de silice RP-18, 60 (25-40 µm) éluée avec un gradient de MeOH-H<sub>2</sub>O (100% H<sub>2</sub>O → 100% MeOH). La fraction de 65 à 85% de MeOH (500 mg) a été soumise à une MPLC sur gel de silice, phase normale 60 (15 à 40 µm) éluée avec un système de gradient de CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:5 et 65:35:10 en phase inverse) pour donner onze sous-fractions principales (F1-F11). La sous-fraction F3 (80 mg) a été purifiée par MPLC sur gel de silice 60 (15-40 µm) éluée de manière isocratique avec le système CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:2) pour donner le composé **CC4** (15 mg). La sous-fraction F9 (20 mg) a été purifiée par MPLC sur gel de silice RP-18 en phase inverse 60 (25-40 µm) éluée de manière isocratique avec le système MeOH-H<sub>2</sub>O (60:40) pour donner le composé **CC3** (3 mg).

➤ **Fractionnement et isolement des composés de *Albizia chevalieri*.**

Les écorces du tronc de *A. chevalieri* ont été broyées en poudre fine (200 g) puis extraites au soxhlet avec EtOH 70%. Cet extrait hydroalcoolique, évaporé à sec sous pression réduite a donné un résidu marron (6,14 g). Ce résidu a été suspendu dans 200 ml de H<sub>2</sub>O et partitionné avec *n*-BuOH sat. H<sub>2</sub>O (3 × 300 ml). La phase soluble au *n*-BuOH a été évaporée à sec donnant un résidu de 4,83 g, puis dissout dans (10 ml) d'eau distillée et soumis à une chromatographie sous vide-liquide (VLC) en utilisant le gel de silice RP-18, 60 (25–40 µm) éluée avec un gradient de MeOH-H<sub>2</sub>O (100%H<sub>2</sub>O → 100% MeOH). La fraction 70–85% (600,5 mg) obtenue, a été soumise à une VLC en utilisant du gel de silice 60 (15–40 µm) éluée respectivement avec les systèmes CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80: 20: 2, 70: 30: 5, 60: 33: 7 et 60:40:10) pour donner quatre sous-fractions principales (ACE1- ACE4). La sous-fraction ACE4 (126,3 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative en utilisant le système CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (20 ml /min) pour donner les composés **CHEV1** (t<sub>R</sub>, 13,20 min ; 7,9 mg), **CHEV2** (t<sub>R</sub>, 13,68 min ; 8,5 mg) et **CHEV3** (t<sub>R</sub>, 16,16 min ; 7,2 mg).

### ➤ Fractionnement et isolement des composés de *Lecaniodiscus cupanioides*

Nous avons travaillé à partir des racines séchées puis broyées de *L. cupanioides* (960 g). L'extraction par macération MeOH (4 L) a été réalisée sur toute la matière sèche à trois reprises pendant 72 h. A la fin des extractions par macération, les filtrats ont été réunis et évaporés à sec par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor de type Buchi. L'extrait méthanolique obtenu (83 g), a été mis en suspension dans 200 ml de H<sub>2</sub>O et partitionné successivement avec de l'hexane, de l'acétate d'éthyle et du *n*-BuOH sat.H<sub>2</sub>O. La fraction soluble dans le *n*-BuOH a été évaporée à sec pour fournir 25 g de résidu de gomme brune et dissoute dans 10 ml de H<sub>2</sub>O, puis soumise à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en phase inverse (RP-18 60, 25-40 μm) et éluée avec un gradient de MeOH-H<sub>2</sub>O (100% H<sub>2</sub>O à 100% MeOH). La fraction 100% MeOH (8 g) a ensuite été soumise à une Combiflash® en utilisant une cartouche de gel de silice flash Chromabond® 60 (40-63 μm) et éluée successivement avec les systèmes de solvants CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80: 20: 2 et 70: 30: 5) pour donner huit sous-fractions principales (B1-B8). Dans un premier temps, la sous-fraction B7 (300 mg) a été purifiée par Combiflash® en utilisant le système de solvants CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30: 3) pour donner quatre sous-fractions Fr1 à Fr 4, dont le composé **1 (LCR1)** correspondant à Fr 2 (50,7 mg). Dans un second temps, la sous-fraction B6 (200 mg) a été purifiée par Combiflash® en utilisant le système de solvants CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (75:25:2) pour donner cinq sous-fractions Fr1 à Fr 5, dont le composé **2 (LCR2)** correspondant à la fraction Fr 3 (18,9 mg). Puis la sous-fraction B5 (300 mg) a été purifiée par Combiflash® en utilisant le système de solvants CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80: 20: 2 et 70: 30: 3) pour donner le composé **3 (LCR3, 16 mg)**. Puis c'est la sous-fraction B4 (195 mg) qui a été purifiée par Combiflash® en utilisant le système de solvants CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80: 20: 1) pour donner six sous-fractions Fr1 à Fr6. La sous-fraction Fr3 (50 mg) a été quant à elle purifiée par le sephadex LH 20® en utilisant le MeOH à 100% pour donner le composé **4 (LCR4)** (23,7 mg). Enfin, la sous-fraction B3 (500 mg) a été purifiée par Combiflash® en utilisant le système CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (90:10:1) pour donner le composé **5 (LCR5, 10 mg)**, **6 (LCR6, 12 mg)** et **7 (LCR7, 8 mg)**.

### 3.3. Méthodes chromatographiques

#### 3.3.1. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une chromatographie simple et pratique qui permet le suivi et le contrôle des purifications. Le développement de ces plaques s'effectue dans des cuves en verre, saturées avec l'éluant approprié, constitué généralement d'un mélange tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaité. Pour la vérification de la pureté des composés isolés, on utilise une CCM haute performance (High

Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC), d'une granulométrie plus fine (Merck, type kieselgel 60 F254, 5-6  $\mu\text{m}$ ), permettant une meilleure séparation des composés

#### **Conditions chromatographiques :**

##### **Phase stationnaire**

Plaque de silice CCM (60 Å, F254, *Silicycle*),

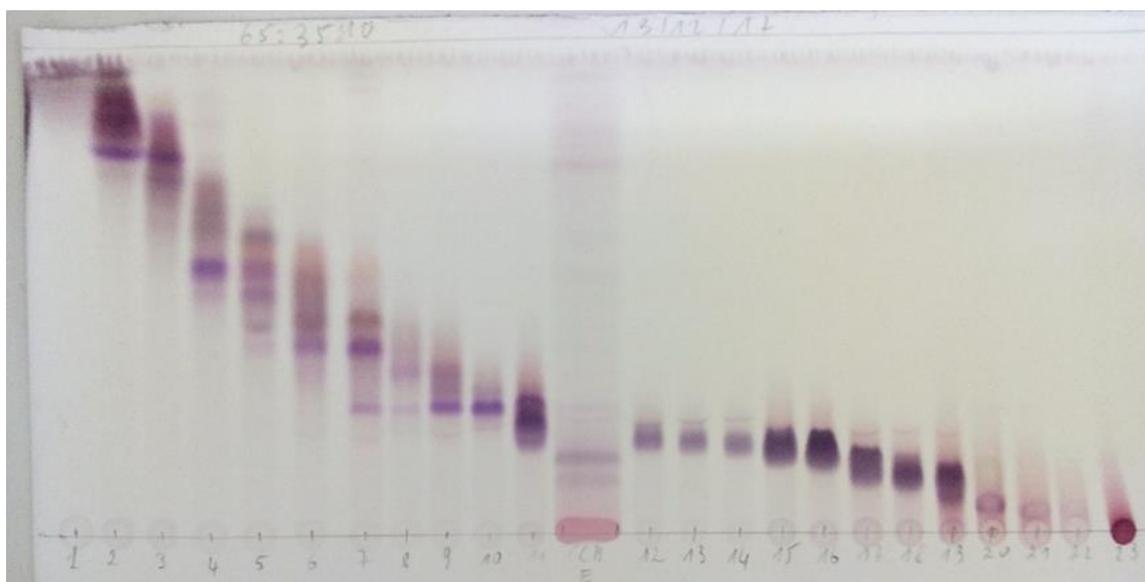
Plaque de silice HPTLC (60 Å, F254, *Merck*).

##### **Phase mobile.**

$\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  ; 80:20:1, 80:20:2, 70:30:3 ,70:30:5, 65:35:10<

##### **Révélation**

Les plaques sont observées sous lampe UV à 254 et 366 nm avant révélation. Le révélateur utilisé sur les plaques de silice est la vanilline sulfurique (mélange à 10% de solution concentrée de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et 1% de vaniline dans l'éthanol). Les plaques sont ensuite chauffées à 120 °C pendant quelques minutes.



**Figure 132: Plaque de CCM d'un échantillon après fractionnement par MPLC**

### **3.3.2. Chromatographie sur gel perméable**

C'est une technique qui nous aide à séparer les composés d'un mélange en fonction de leur taille et leur forme. On utilise les granules de gel poreux Sephadex® *LH-20*. Les premières molécules à sortir de la colonne remplie du gel sont les grosses molécules au diamètre supérieur aux pores du gel. Les petites molécules quant à elles, vont donc sortir les dernières car incluses dans le gel.

### **Conditions chromatographiques :**

#### **Phase stationnaire**

Sephadex® LH-20 (Pharmacia) est un dextrane, un polymère linéaire de glucose, semi-rigide, possédant des ramifications par l'hydroxypropyle

#### **Phase mobile**

Méthanol, MeOH 100 %.

### **3.3.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC)**

La chromatographie liquide sous vide (VLC) est une technique permettant d'obtenir un fractionnement grossier des constituants d'un extrait de polarité croissante. C'est une étape qui précède généralement les étapes de séparations et de purifications plus rigoureuses telles que la MPLC, HPLC et CombiFlash. L'appareillage est constitué d'un verre fritté relié à une pompe à vide. C'est sur ce verre fritté qu'on dépose une quantité de silice 2/3 du verre et on dépose l'échantillon une fois la silice conditionnée. L'élution est réalisée par un mélange binaire ou tertiaire de solvant de polarité croissante.

### **Conditions chromatographiques :**

- ✓ Si la phase stationnaire est la silice en phase inverse (RP-18) alors la phase mobile utilisée est : H<sub>2</sub>O (100%), MeOH- H<sub>2</sub>O (50:50), et MeOH (100%). Cette phase stationnaire permet d'éliminer les sucres dans l'eau ; les saponines, les glycosides de farnésol et autres composés étant élués dans les solutions méthanoliques.
- ✓ Si la phase stationnaire est la silice en phase normale (15–40 µm ou 40–63), alors la phase mobile utilisée est : CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:2, 70:30:5, 60:33:7 et 60:40:10).

### **3.3.4. Chromatographie flash**

Le système de chromatographie flash permet de réaliser des séparations et purifications de façon automatisée, ce qui apporte à l'utilisateur un gain de temps, une économie de solvant et une meilleure reproductibilité. La chromatographie Flash est une technique de séparation, utilisée sur un échantillon brut, avec pour objectif d'isoler et d'obtenir des composés purs. La particularité de cette technique est qu'elle est basée sur l'interaction entre les composés à purifier, la phase stationnaire et la phase mobile. Cette technique est très appréciée au sein des laboratoires car en plus d'être simple, rapide (au niveau de la purification des échantillons) et raisonnablement abordable (coût de l'instrumentation et consommables) elle présente des avantages conséquents : une grande capacité de charge des colonnes, des colonnes réutilisables de très nombreuses fois pour des silices greffés, une grande diversité de phase stationnaire (Silice vierge, silice greffée (NH<sub>2</sub>, diol, Cn, ...), Alumine, Echange d'ion...) et une large gamme

de détection (détecteurs, passeur d'échantillons ...). Nous disposons d'un appareil avec un système de pompage à gradient quaternaire avec une pompe double piston.



**Figure 133 : Appareil CombiFlash (photo Messi, Pharmadev, Université de Toulouse 3)**

**Conditions chromatographiques :**

**Matériel**

CombiFlash RETRIEVE.

Débit : jusqu'à 250mL/min

Pression max : 35 bars

Détecteur UV-Visible double longueur d'onde et scan de 200 à 600 nanomètres

Détecteur LT-ELSD Sedex80 Sedere

Injections de 0.9 – 12.0g de produit

**Phase stationnaire**

Colonne de silice en phase normale (Chromabond® Flash RS 25 SiOH 40–63 µm)

**Phase mobile**

CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (90 :10 :1, 80 :20 :1, 80 :20 :2, 70 :25 :2, 70 :30 :3 et 70 :30 :5)

### 3.3.5. Chromatographie liquide à moyenne pression

La MPLC est une technique quantitative utilisée pour le fractionnement et la purification des constituants d'un mélange supportant des pressions modérées, permettant ainsi d'accroître légèrement les débits. Dans l'industrie pharmaceutique et chimique, il peut être utilisé pour séparation des hydrocarbures saturés, des hydrocarbures aromatiques et des matériaux polaires. Il offre également de nombreuses applications dans l'isolement des produits naturels. La MPLC est largement utilisée dans les industries pharmaceutiques, chimique et alimentaire. Avant la HPLC, elle était la technique la plus indiquée pour l'isolement des molécules. Une fois que la colonne à utiliser est remplie avec la silice adéquate, celle-ci est conditionnée par le solvant d'éluion choisi après analyse CCM. L'échantillon fixé sur la silice est ensuite déposé dans la colonne après le conditionnement et l'éluion peut donc débuter. Les systèmes de solvants utilisés pour l'éluion sont généralement des mélanges dans des proportions variables en mode isocratique ou en gradient.



**Figure 134: Appareil de MPLC (photo MESSI, Pharmadev, Université de Toulouse 3)**

#### ***Conditions chromatographiques***

#### ***Matériel***

- Colonnes de séparation à silice (Büchi) :

Pré-colonne : 110 x 15 mm,

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

- Pompe pour l'appareillage en phase inverse, RP-18 et phase normale : Büchi Manager C-605 à deux pompes, Büchi Pump Module C-601 (*Büchi*).

#### ***Phase stationnaire***

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

#### ***Phase mobile***

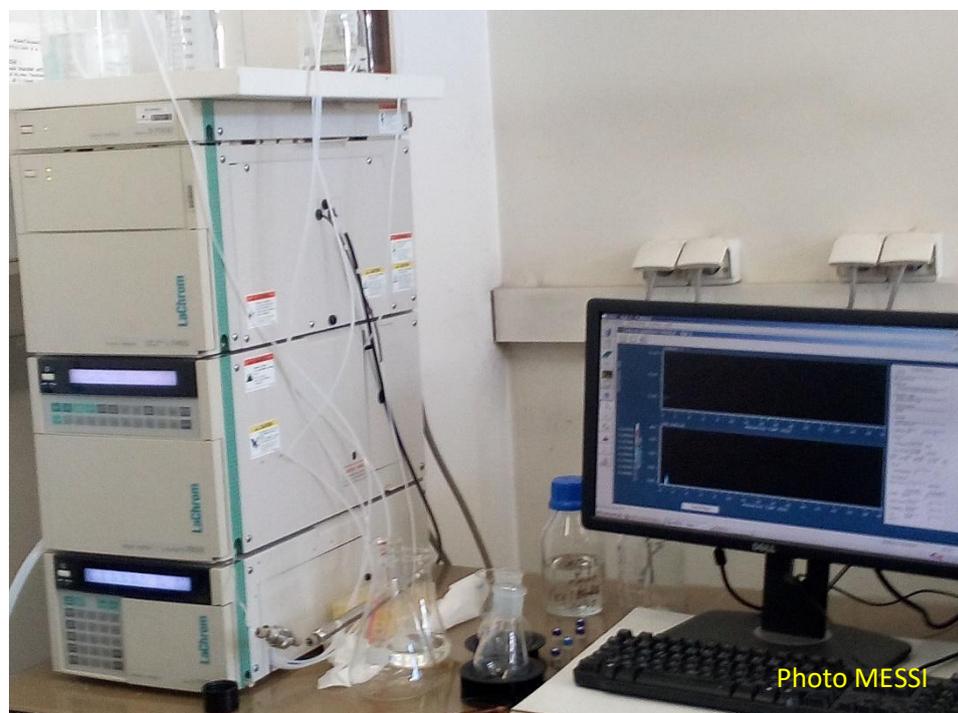
Les systèmes d'élutions employés sont généralement des mélanges ternaires en gradient de polarité :

- Silice en phase normale :

CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O; 80:20:2, 70:30:5, 65:35:10<

### **3.3.6. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

La HPLC est une technique utilisée pour le fractionnement et la purification de molécules dans l'industrie ainsi qu'en recherche, supportant des pressions élevées, permettant ainsi d'accroître rapidement les débits. La HPLC est appliquée dans les industries pharmaceutiques, pour étudier la stabilité des médicaments et pour l'analyse de contrôle qualité. De même, il est utilisé pour la purification et l'analyse de la pureté des produits naturels. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable.



***Figure 135: Appareil de HPLC Semi-préparative (photo Messi, Pharmadev, Université de Toulouse 3)***

### ***Conditions chromatographiques***

#### **Phase stationnaire :**

La chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC) semi-préparative, a été réalisée avec une pompe Gilson M 305, équipée d'un logiciel Trilution LC utilisant la colonne Nucleodur 100-5 C18ec (21x250 mm, 5 µm).

#### ***Phase mobile***

Les systèmes d'élutions employés sont généralement des mélanges binaires en gradient de polarité :

- Silice en phase inverse, RP-18: Différents gradients de CH<sub>3</sub>-CN-H<sub>2</sub>O.

### **3.3.7. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS**

L'analyse GC/MS ont été effectuée sur un appareil Finnigan SSQ 7000 muni d'un détecteur de masse couplé, du type thermo trace GC 2000, équipé d'une colonne de silice du type DB-5 (5% méthylphénylpolysiloxane), de 30 m x 0,25 mm i.d. épaisseur de film 0,25 µm.

Les conditions opératoires sont les mêmes pour les analyses GC, la température de four étant programmée de 40°C (3 min), puis à une vitesse de 3°C/min lorsque la température atteint 250°C.

Les paramètres MS étant :

Température de trappe d'ions : 200°C

- Rapport split : 1 :10

- Potentiel d'ionisation : 70 ev

- Bande de scans : 40- 400 u

- Temps de scan : 5s

- Résolution : 1000.

Les différents sucres ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des composés des bases de données Wiley et NIST, du spectromètre de masse CPG/SM et ceux de la base de données spectrales Adams. L'identification des molécules a été confirmée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux connus dans la littérature.

### **3.3.8. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse LC/MS**

Les différents composés et fractions ont été analysés par une méthode de couplage alliant la HPLC à 3 détecteurs. Les analyses ont été réalisées sur une chaîne équipée d'une pompe quaternaire (Ultimate 3000), d'un dégazeur, d'un four thermostaté à l'intérieur duquel se trouve une colonne Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm i.d, 1,7 µm, Waters, USA), et d'un passeur d'échantillon thermostaté (Ultimate 3000), couplée à 3 détecteurs : un détecteur DAD

(Diode Array Detector, Ultimate 3000 de 210 à 400 nm), un CAD (Charged Aerosol Detector, Corona Veo) qui permet de quantifier les composés présents dans une fraction. Le couplage au CAD a été réalisé à l'aide d'un split 1:1 en sortie du détecteur DAD pour moitié au spectromètre de masse et moitié en CAD et un spectromètre de masse haute résolution de type LTQ Orbitrap XL (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Royaume-Uni). Le système est piloté par le logiciel LCQ Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Les phases mobiles employées ont été les suivantes : solvant A (H<sub>2</sub>O+0,1% ou 0,05% de HCOOH) et B (MeCN ; 0,1% de HCOOH) avec une élution en gradient présenté dans le **Tableau XXXIX**. Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positive (IP) et négative (IN). Le mode HCD (High Energy Collisional Dissociation) utilisée dans la méthode, avec des énergies de collision de 40 eV a permis d'avoir la masse Haute Résolution des fragments obtenus.

**Tableau XXXIX: Méthode d'élution pour l'analyse des sucres**

Temps (min)	H <sub>2</sub> O + HCOOH (0.05%)	CH <sub>3</sub> CN+MeOH+iPrOH (50/25/25v/v)+ HCOOH (0.05%)	Débit (mL/min)
0	86%	14%	0.3
22	70%	30%	0.3
25	10%	90%	0.3
27	10%	90%	0.3
28	86%	14%	0.3
30	86%	14%	0.3

La température de la colonne était de 35 ° C

### 3.4. Méthodes physico-chimiques

#### 3.4.1. Spectrométrie de masse

Les spectres HRESIMS mode positif, ont été enregistrés en utilisant un instrument UHPLC-DAD-LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, UK) équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI).

#### 3.4.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'enregistrement des spectres RMN s'est fait à l'aide d'un spectromètre Bruker AVANCE 500MHz dans la pyridine deutériée (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) ou dans le dimethylsulfoxyde deutérié (DMSO-d<sub>6</sub>), équipé d'un système 5 mm Z-gradient TCI avec une sonde cryogénique à la fréquence de fonctionnement de 500 MHz. Enregistrement RMN <sup>1</sup>H à 500 MHz et RMN<sup>13</sup>C à 125 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et les constantes de couplage sont en Hz.



**Figure 136: Appareil de RMN (photo Messi, Pharmadev, Université de Toulouse 3)**

### **3.4.3. Hydrolyse acide**

#### **Méthode 1**

Cette technique permet la libération de toutes les unités osidiques engagées dans des liaisons O-glycosidiques, ainsi leur identification sera possible par comparaison à des sucres standards. Tous les glycosides terpenoidiques (2 mg) sont hydrolysées avec 2 ml de HCl 2M à 85 °C pendant 2 h. Après refroidissement, le solvant est éliminé sous pression réduite. Le mélange de sucre est extrait de la phase aqueuse (10 ml) et lavé avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 5 ml). Les extraits combinés de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont lavés avec de l'eau distillée pour donner après évaporation le fragment aglycone. Les sucres sont d'abord analysés par CCM sur gel de silice (CHCl<sub>3</sub> – MeOH – H<sub>2</sub>O, 8: 5: 1) par comparaison avec des échantillons standards. La configuration absolue de chaque monosaccharide a été déterminée à partir d'une analyse GC–MS de leurs dérivés triméthylsilylés par comparaison avec des échantillons authentiques en utilisant la méthode décrite précédemment (Chaabi *et al.*, 2010).

## Méthode 2

Chaque composé (2 mg) a été chauffé au reflux dans du  $\text{CF}_3\text{COOH}$  aqueux 2 N (3 ml) pendant 2 h à 100 °C. Le mélange réactionnel a été dilué avec  $\text{H}_2\text{O}$  (10 ml) et extrait avec le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 5 ml). Après extraction, la phase aqueuse acide a été évaporée à plusieurs reprises avec méthanol jusqu'à ce qu'elle atteigne un pH neutre. Les sucres ont été identifiés par CCM comparative sur gel de silice ( $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$ , 8: 5: 1) avec des échantillons standards. De plus, la configuration absolue des sucres a été déterminée comme décrit précédemment par Wang *et al.* (2012), avec de légères modifications. En bref, la dérivation des énantiomères monosaccharidiques avec l'ester méthylique de la L-cystéine et 10 phénylisothiocyanate les a convertis en arylthiocarbamates diastéréoisomères, qui ont été séparés et détectés par analyse UHPLC / MS. Les résidus des sucres ont été dissous dans 120  $\mu\text{L}$  d'une solution d'ester méthylique de L-cystéine dans de la pyridine (0,3 M) et incubés pendant 1 h à 90 °C. Ensuite, 160  $\mu\text{L}$  d'une solution d'isothiocyanate de phényle dans la pyridine (0,69 M) ont été ajoutés et incubés pendant 1 h à 90 °C. On a laissé le mélange réactionnel refroidir et dilué 20 fois avec  $\text{CH}_3\text{CN}$  et filtré avant analyse UHPLC / MS. Le volume d'injection était de 4  $\mu\text{L}$ . Chaque étalon de sucre (2 mg) a été soumis au même protocole, avec 240  $\mu\text{L}$  de la solution d'ester méthylique de L-cystéine et 320  $\mu\text{L}$  de la solution d'isothiocyanate de phényle. Les mélanges réactionnels ont été dilués 60 fois avec  $\text{CH}_3\text{CN}$  et filtrés avant analyse UHPLC / MS. Le volume d'injection était de 4  $\mu\text{L}$ . Les solutions obtenues ont été analysées avec une colonne ACQUITY UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm ; 1,7  $\mu\text{m}$ ), Waters. La température de la colonne était de 35 °C et le débit était de 0,3 ml / min. L'éluant A était un mélange d'eau et d'acide formique (0,05%). L'éluant B était un mélange de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , MeOH et iPrOH (50/25/25 v / v) avec 0,05% d'acide formique. Le gradient est constitué de mélanges linéaires de A et B, avec 14% d'éluant B à t = 0, atteignant 30% à t = 22 min et 90% à t = 25 min. Ensuite, le retour aux conditions initiales a été réalisé à t = 28 min et maintenu pendant 2 min avant la prochaine injection. L'analyse des chromatogrammes d'ions positifs extraits (correspondant à l'adduit  $[\text{M}+\text{H}]^+$  pour les arylthiocarbamates obtenus) a été obtenus à partir des échantillons et des étalons autorisés pour l'identification des fragments des sucres dans les composés. Les temps de rétention des différents sucres obtenus à partir des échantillons ont été comparé a ceux des sucres standards.

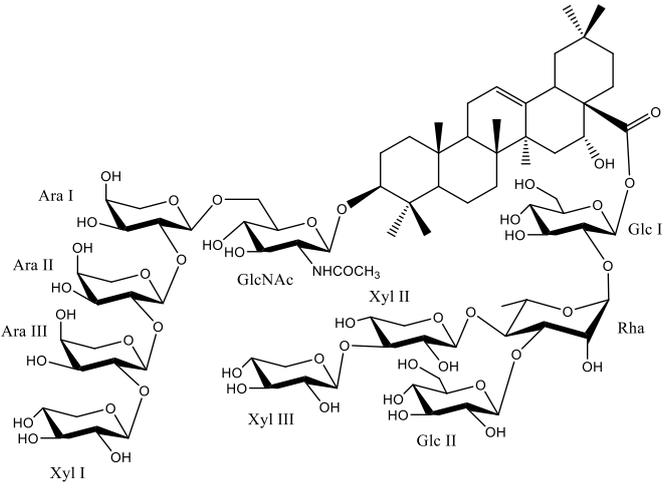
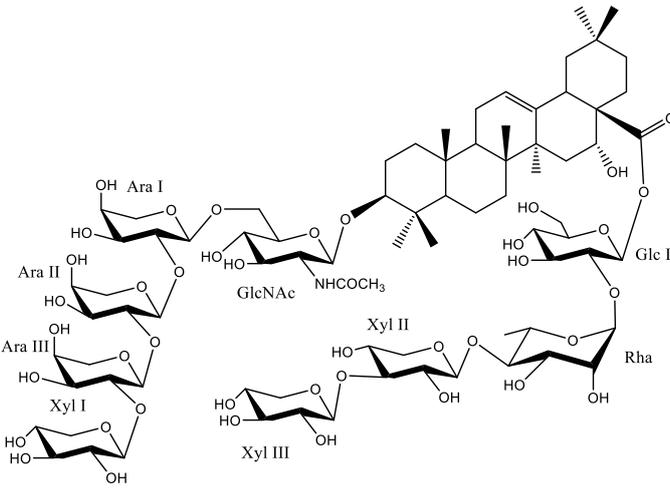
### 3.4.4. Pouvoir rotatoire

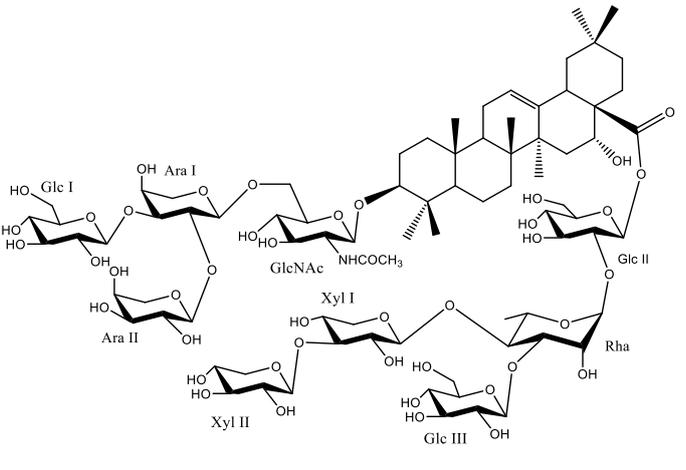
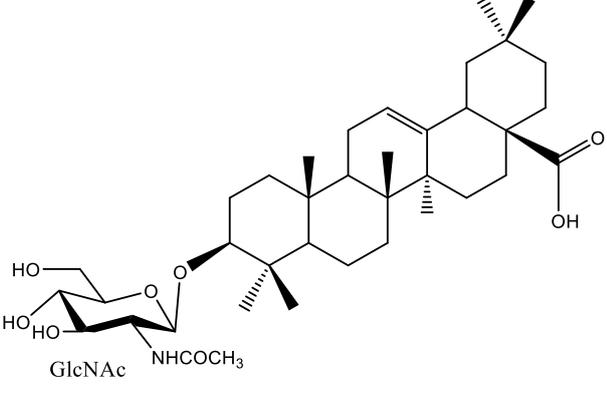
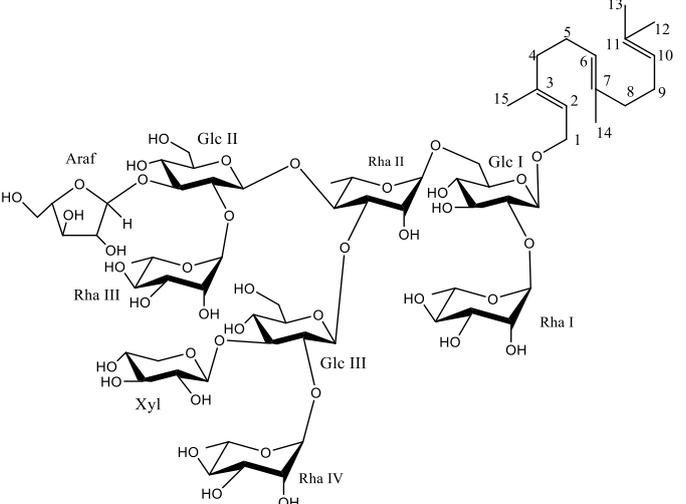
L'analyse du pouvoir rotatoire de tous les composés purs isolés a été réalisée au sein du laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB), UMR 5068, CNRS, UPS. Il a été mesuré en solution méthanolique par un polarimètre de type JASCO P-2000 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) dans une cuve de 1 dm à

20°C. Le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D$ , exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :  $[\alpha]_D = 1000 \cdot \alpha / l \cdot c$ , ( $\alpha$  : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre,  $l$  : longueur de la cuve en dm,  $c$  : concentration de la molécule en solution en g/L).

### 3.5. Caractéristiques physico-chimiques

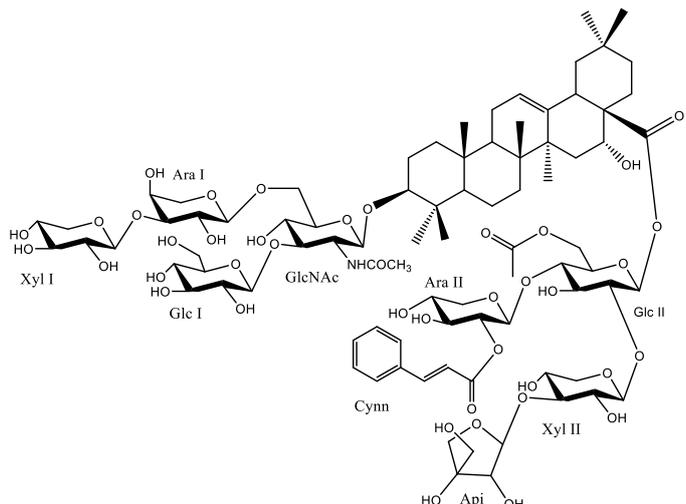
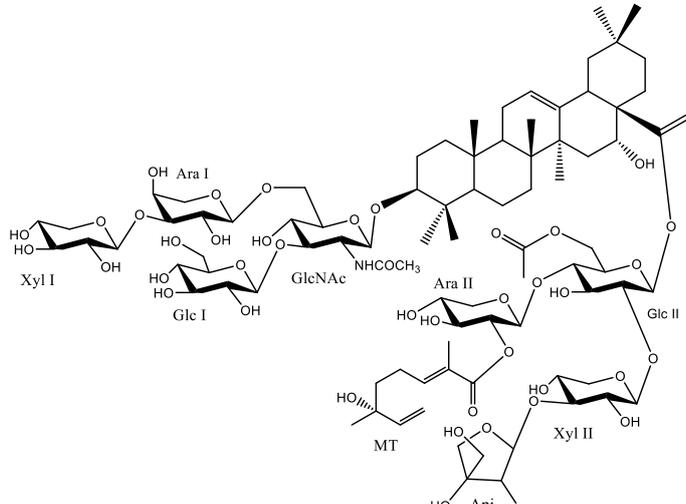
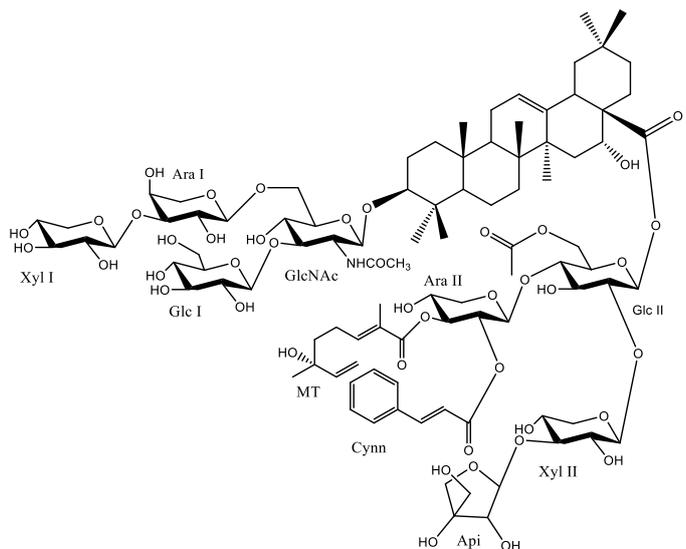
**Tableau XL: Données spectrales et constantes physiques des composés isolés.**

Composés isolés	Caractéristiques spectroscopiques
<p><b>CC1</b></p> 	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : pic de l'ion pseudo-moléculaire à <math>m/z</math> 1960,9327 <math>[M + Na]^+</math>.</p> <p><b>Formule brute</b>: <math>C_{86}H_{139}NO_{47}</math></p> <p><b>RMN <math>^1H</math> et <math>^{13}C</math> pyridine-<math>d_5</math></b>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>CC2</b></p> 	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : pic de l'ion pseudo-moléculaire à <math>m/z</math> 1798,8802 <math>[M + Na]^+</math>.</p> <p><b>Formule brute</b>: <math>C_{80}H_{129}NO_{42}</math></p> <p><b>RMN <math>^1H</math> et <math>^{13}C</math> pyridine-<math>d_5</math></b>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>

<p><b>CC3</b></p> 	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 1858,9038 [M + Na]<sup>+</sup>.</p> <p><b>Formule brute</b>: C<sub>82</sub>H<sub>133</sub>NO<sub>44</sub></p> <p><b>RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C pyridine-d<sub>5</sub></b>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>CC4</b></p> 	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 683,4095 ([M + Na]<sup>+</sup></p> <p><b>Formule brute</b>: C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>8</sub></p> <p><b>RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C pyridine-d<sub>5</sub></b>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>LCR1</b></p> 	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 1557,6820 [M+H]<sup>+</sup>.</p> <p><b>Formule brute</b>: C<sub>67</sub>H<sub>112</sub>O<sub>40</sub></p> <p><b>RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C pyridine-d<sub>5</sub></b>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> – 22,7 (c 0.6, MeOH).</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>

<p><b>LCR2</b></p>	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : pic de l'ion pseudomoléculaire à <math>m/z</math> 1161,5150 <math>[M+2Na]^{2+}</math>.</p> <p><b>Formule brute</b>: <math>C_{50}H_{84}O_{27}</math></p> <p><b>RMN <math>^1H</math> et <math>^{13}C</math> pyridine-<math>d_5</math></b>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. <math>[\alpha]^{25D} - 31,7</math> (c 1.1, MeOH)</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>LCR3</b></p>	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : un pic doublement chargé à <math>m/z</math> 1015,4581 <math>[M+2Na]^{2+}</math>.</p> <p><b>Formule brute</b>: <math>C_{44}H_{74}O_{23}</math></p> <p><b>RMN <math>^1H</math> et <math>^{13}C</math> pyridine-<math>d_5</math></b>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. <math>[\alpha]^{25D} - 38,7</math> (c 1.7, MeOH).</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>LCR4</b></p>	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : pic de l'ion pseudo-moléculaire à <math>m/z</math> 913,5165 <math>[M+H]^+</math>.</p> <p><b>Formule brute</b>: <math>C_{47}H_{76}O_{17}</math></p> <p><b>RMN <math>^1H</math> et <math>^{13}C</math> pyridine-<math>d_5</math></b>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. <math>[\alpha]^{25D} + 28,7</math> (c 0.8, MeOH)</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>

<p><b>LCR5</b></p>	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : un pic de l'ion pseudo-moléculaire à <math>m/z</math> 883,5060 [M + H]<sup>+</sup>.</p> <p><b>Formule brute:</b> C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>O<sub>16</sub>  <b>RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C</b> pyridine-d<sub>5</sub>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. [α]<sup>25</sup>D + 12,7 (c 0,6, MeOH).</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>LCR6</b></p>	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : un pic de l'ion pseudo-moléculaire à <math>m/z</math> 883,5060 [M + H]<sup>+</sup>.</p> <p><b>Formule brute:</b> C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>O<sub>16</sub>  <b>RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C</b> pyridine-d<sub>5</sub>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. [α]<sup>25</sup>D + 14,7 (c 0,5, MeOH)</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>LCR7</b></p>	<p><b>HR-ESI-MS mode positif</b> : un pic de l'ion pseudo-moléculaire à <math>m/z</math> 883,5060 [M + H]<sup>+</sup>.</p> <p><b>Formule brute:</b> C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>O<sub>16</sub>  <b>RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C</b> pyridine-d<sub>5</sub>: 500 et 125MHz</p> <p><b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. [α]<sup>25</sup>D + 15,7 (c 0,6, MeOH).</p> <p><b>Test de Molish</b> : positif</p>

<p><b>CHEV1</b></p> 	<p><b>HR-ESI-MS</b> mode positif: pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 1854,5671 [M + Na]<sup>+</sup>  <b>Formule brute</b> : C<sub>86</sub>H<sub>129</sub>NO<sub>41</sub>  <b>RMN <sup>1</sup>H</b> et <sup>13</sup>C pyridine-d<sub>5</sub>: 400 et 100 MHz  <b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> – 28,8 (c 0.01, MeOH).  <b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>CHEV2</b></p> 	<p><b>HR-ESI-MS</b> mode positif: pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 1885,8115 [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>  <b>Formule brute</b> : C<sub>87</sub>H<sub>137</sub>NO<sub>42</sub>.  <b>RMN <sup>1</sup>H</b> et <sup>13</sup>C pyridine-d<sub>5</sub>: 400 et 100MHz  <b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> – 45,7 (c 0.01, MeOH).  <b>Test de Molish</b> : positif</p>
<p><b>CHEV3</b></p> 	<p><b>HR-ESI-MS</b> mode positif: pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 1999,0054 [M + H]<sup>+</sup>  <b>Formule brute</b> : C<sub>96</sub>H<sub>143</sub>NO<sub>43</sub>.  <b>RMN <sup>1</sup>H</b> et <sup>13</sup>C pyridine-d<sub>5</sub>: 400 et 100MHz  <b>Aspect physique</b> : poudre amorphe blanche. [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> – 50,5 (c 0.01, MeOH).  <b>Test de Molish</b> : positif</p>

### 3.6. Evaluation de l'activité biologique

#### 3.6.1. Evaluation de l'activité anthelminthique

##### ➤ Essai d'inhibition du dégainement larvaire (LEIA)

Ce test a été réalisé selon (Jackson & Hoste, 2010). Des larves de troisième stade (L3) ont été obtenues de chèvres et de moutons présentant une infection monospécifique à *H. contortus*. Ces animaux ont été artificiellement infectés et maintenus dans les animaleries de l'UMR 1225 -INRA / ENVT, France. Les extraits (6mg) ont été dilués dans 2,5 ml de PBS et évalués à des concentrations décroissantes variant de 1 200 µg / ml à 18,75 µg / ml. Le contrôle négatif a été effectué au PBS (phosphate 0,1 M ; NaCl 0,05 M ; pH 7,2). Les différentes concentrations d'extraits ont un volume de 1 ml. Les larves L3 non dégainées (1ml) ont été incubées dans les différents traitements pendant 3 h à 22 ° C. Après incubation, les larves ont été lavées et centrifugées (3000 tr / min) trois fois avec du PBS. Environ 1 000 larves / tubes ont été soumis au processus de dégainement artificielle par contact avec de l'hypochlorite de sodium (2,0% ; p / v). Les tests ont été effectués avec quatre répétitions. Les pourcentages de processus de dégainement larvaire ont été surveillés à intervalles de 0, 20, 40 et 60 minutes par observation au microscope inversé. Les résultats ont été utilisés pour déterminer la concentration requise pour inhiber 50% de dégainement larvaires (CE<sub>50</sub>) avec des intervalles de confiance respectifs à 95% (CI à 95%) à l'aide du logiciel PoloPlus 1.0. L'extrait a été jugé significativement (P<0,05) plus ou moins efficace qu'un autre extrait lorsqu'il n'y a pas eu de chevauchement entre les limites de confiance à 95% des valeurs CE<sub>50</sub>.

##### **Analyses statistiques :**

Pour évaluer l'effet anthelminthique de chaque fraction, les pourcentages des larves engainées, dégainées pour chaque traitement ont été déterminés avec le logiciel Excel ®. Les résultats ont été présentés en moyenne suivi de la déviation standard (SD). L'action de l'extrait a été jugé significatif à (p<0,05) selon le test de Krustal Wallis.

#### 3.6.2. Activité antiproliférative

L'activité antiproliférative des composés **CC1** et **CC2** a été évaluée sur la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain Hep3B. Les cellules Hep3B ont été cultivées dans un milieu stérile DMEM additionné de 10% de sérum bovin foetal inactivé par la chaleur, de L-glutamine, de pyruvate de sodium et d'acides aminés non essentiels, à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules Hep3B ont étéensemencées en 5000 cellules par puits dans des microplaques à 96 puits. Après 24h, les cellules Hep3B ont été incubées pendant 48h avec les composés isolés avec une plage de concentration de 0,001 à 100 µg / mL contenant 0,1% de DMSO. L'activité antiproliférative a ensuite été évaluée par luminescence

en utilisant le test ATPlite (Perkin Elmer) selon la méthode précédemment décrite (Carraz *et al.*, 2015). Les concentrations inhibitrices à 50% (CI<sub>50</sub>) de la croissance cellulaire ont été calculées avec le logiciel GraphPad Prism 6.0, compilant 3 expériences indépendantes.

L'évaluation de la cytotoxicité des composés **CC1** et **CC2** contre la lignée cellulaire Caco-2 (lignée cellulaire épithéliale humaine, Sigma-Aldrich) a été réalisée selon la méthode de Mosmann avec de légères modifications. En bref, des cellules (1 10<sup>5</sup> cellules / mL) dans 100 µL de milieu complet, [DMEM High Glucose supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (FCS), 2 mM de L-glutamine, 1X NEAA et des antibiotiques (100U / mL de pénicilline et 100 µg / mL de streptomycine)] ont étéensemencés dans chaque puits de plaques à 96 puits et incubés à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> avec 95% d'air. Après une incubation de 24 h, 100 µL de milieu avec diverses concentrations de composés et contrôles appropriés (DMSO ; 0,5% final) ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 72 h à 37 °C. Chaque puits de la plaque a ensuite été examiné au microscope pour détecter une éventuelle formation de précipité avant que le milieu ne soit aspiré des puits. 100 µl de solution de MTT (0,5 mg / ml dans du DMEM) ont ensuite été ajoutés à chaque puits. Les cellules ont été incubées pendant 2 h à 37 °C. Après ce temps, la solution de MTT a été retirée et du DMSO (100 µl) a été ajouté pour dissoudre les cristaux de formazan résultants. Les plaques ont été secouées vigoureusement (300 tr / min) pendant 5 min. L'absorbance a été mesurée à 570 nm avec un spectrophotomètre pour microplaques. Le DMSO a été utilisé comme blanc et la doxorubicine (achetée auprès de Sigma Aldrich) comme témoin positif. Les CC<sub>50</sub> ont été calculés par une analyse de régression non linéaire traitée sur des courbes dose-réponse, à l'aide du logiciel Table Curve 2D V5. Les valeurs CC<sub>50</sub> représentent la valeur moyenne calculée à partir de trois expériences indépendantes.

### 3.6.3. Evaluation de l'effet pro-apoptotique

Les cellules ont été traitées avec les composés différents à savoir **CHEV1**, **CHEV2** et **CHEV3** à des concentrations variables (1 à 15 µM) puis collectées pour l'estimation de l'induction d'apoptose. Un minimum de 5000 cellules a été acquis par échantillon et analysé au moyen du logiciel Incyte (Guava/ Millipore /Merck, CA, USA). Les taux d'apoptose ont été évalués par cryométrie capillaire (Guava Easycyte plus, Millipore Merck) en utilisant l'Annexine V-FITC (ImmunoTools, Allemagne) et le PI (MiltenyibiotecInc., USA) selon les recommandations du fabricant. Des portes ont été tracées autour des populations de cellules appropriées en utilisant un diagramme de point d'acquisition de dispersion avant (FSC) par rapport à une dispersion de côté (SSC) pour exclure des débris. La concentration finale de

DMSO appliquée aux cellules pendant l'incubation avec les produits testés était toujours de 0,5%.

Dans la configuration testée, la concentration n'avait pas d'effets néfastes sur la viabilité cellulaire, ni sur la morphologie cellulaire. Pour discriminer les événements négatifs et positifs dans l'analyse, un échantillon témoin non coloré de chaque condition de culture accompagnait toujours l'acquisition des cellules colorées pour définir leur coupure. Le témoin négatif, c'est-à-dire l'échantillon avec des cellules sans composés mais avec la même quantité de DMSO que pour les composés dilués, ainsi que le contrôle positif avec 50  $\mu$ M de Celastrol, un triterpénoïde pentacyclique naturel (Enzo Life Sciences, Farmingdale, US) ont été inclus dans chaque expérience. Les performances des cytomètres sont vérifiées chaque semaine à l'aide du Guava Easy Check Kit 4500-0025 (Merck / Millipore / Guava Hayward, CA, USA).

## **Références bibliographiques**

Abbiw, D.K. (1990). Useful plants of Ghana, West Africa. Intermediate technology publication and the royal botanic gardens, 66–67.

Abbruscato, P., Tosi, S., Crispino, L., Biazzi, E., Menin, B., Picco, A.M., Pecetti, L., Avato, P. & Tava, A. (2014). Triterpenoid glycosides from *Medicago sativa* as antifungal agents against *Pyricularia oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 11030–11036.

Adão, C.R., da Silva, B.P. & Parente, J.P. (2011). A new steroidal saponin from *Allium ampeloprasum* var. porrum with antiinflammatory and gastroprotective effects. *Phytochemistry Letters* **4**, 306–310.

Ademola, I.O., Elo, J.N. (2010). *In vitro* anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. *Veterinary Parasitology* **169**, 198–203.

Adesanya, S., Martin, M., Hill, B., Dumontet, V., Tri, M., Sevenet, T. & Pais, M. (1999). Rubiginoside, a farnesyl glycoside from *Lepisanthes rubiginosa*. *Phytochemistry* **51**, 1039–1041.

Adesegun, S.A., Coker, H.A. & Hamann, M.T. (2008). Antifungal triterpenoid saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*. *Research Journal of Phytochemistry* **2**, 93–99.

Adesegun, S.A., Coker, H.A.B. & Hamann, M.T. (2014). Anti-cancerous triterpenoid saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*. *Journal of Natural Products (Gorakhpur)* **7**, 155–161.

Adesina, S.K. & Reisch, J. (1985). A triterpenoid glycoside from *Tetrapleura tetraptera* fruit. *Phytochemistry* **24**, 3003–3006.

Ahmed, B. & Garg, D. (1998). Antifertility activity of emerginatosides B and C of fruits of *Sapindus emarginatus*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* **20**, 362–363.

Aliyu, A., Musa, A., Ibrahim, M., Ibrahim, H. & Oyewale, A. (2010). Preliminary phytochemical screening and antioxidant activity of leave extract of *Albizia chevalieri* harms (Leguminosae-Mimosoideae). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* **2**, 149–153.

Al-Sayed, E., Omayma A. E., Bahgat, D.M., Abdel Nasser B. S. (2016). Cytotoxic oleanane-type saponins from the leaves of *Albizia anthelmintica* Brongn. *Chemistry & Biodiversity* **13**, 1666-1673

Al-Massarani, S.M., El Gamal, A.A., Abd El Halim, M.F., Al-Said, M.S., Abdel-Kader, M.S., Basudan, O.A. & Alqasoumi, S.I. (2017). New acyclic secondary metabolites from the

biologically active fraction of *Albizia lebbek* flowers. *Saudi Pharmaceutical Journal* **25**, 110–119.

Araújo-Filho, J.V., Ribeiro, W.L., André, W.P., Cavalcante, G.S., de CM Guerra, M., Muniz, C.R., Macedo, I.T., Rondon, F.C., Bevilaqua, C.M. & de Oliveira, L.M. (2018). Effects of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on *Haemonchus contortus* isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. *Industrial Crops and Products* **124**, 294–299.

Arbonnier, M. (2004). Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. CIRAD, Margraf Publishers GMBH MNHN, Cote d'Ivoire. 194 p.

Arulmozhi, D.K., Veeranjanyulu, A., Bodhankar, S.L. & Arora, S.K. (2005). Pharmacological studies of the aqueous extract of *Sapindus trifoliatu*s on central nervous system: possible antimigraine mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology* **97**, 491–496.

Asao, Y., Morikawa, T., Xie, Y., Okamoto, M., Hamao, M., Matsuda, H., Muraoka, O., Yuan, D. & Yoshikawa, M. (2009). Structures of acetylated oleanane-type triterpene saponins, rarasaponins IV, V, and VI, and anti-hyperlipidemic constituents from the pericarps of *Sapindus rarak*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **57**, 198–203.

Avato, P., Bucci, R., Tava, A., Vitali, C., Rosato, A., Bialy, Z. & Jurzysta, M. (2006). Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure-activity relationship. *Phytotherapy Research* **20**, 454–457.

Barbosa, A.P., da Silva, B.P. & Parente, J.P. (2008). Brevifoliasaponin with Adjuvant Activity from *Calliandra brevifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung B* **63**, 894–902.

Botura, M.B., dos Santos, J.D.G., da Silva, G.D., de Lima, H.G., de Oliveira, J.V.A., de Almeida, M.A.O., Batatinha, M.J.M. & Branco, A. (2013). In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr.(sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology* **192**, 211–217.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 4e éd, revue et augmentée, Paris, Tec & Doc, Éditions médicales internationales, 1288p.

Burkill, H.M. (1985). The useful plants of West Tropical Africa. Vol. 1. Families A-D. The useful plants of West Tropical Africa. Vol. 1. Families A-D. Royal Botanical Garden kew. 441-415 p.

Cavalcanti Gomes, D.C., de Lima, H.G., Vaz, A.V., Santos, N.S., Santos, F.O., Dias, Ê.R., Botura, M.B., Branco, A.; Batatinha, M.J. (2016). In vitro anthelmintic activity of the *Zizyphus*

*joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. *Veterinary Parasitology* **226**, 10–16.

Carraz, M., Lavergne, C., Jullian, V., Wright, M., Gairin, J.E., de la Cruz, M.G. & Bourdy, G. (2015). Antiproliferative activity and phenotypic modification induced by selected Peruvian medicinal plants on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Journal of Ethnopharmacology* **166**, 185–199.

Chaabi, M., Chabert, P., Vonthron-Sénécheau, C., Weniger, B., Ouattara, M., Corstjens, H., Sente, I., Declercq, L. & Lobstein, A. (2010). Acylated flavonol pentaglycosides from *Baphia nitida* leaves. *Phytochemistry Letters* **3**, 70–74.

Charlier, J., Thamsborg, S.M., Bartley, D.J., Skuce, P.J., Kenyon, F., Geurden, T., Hoste, H., Williams, A.R., Sotiraki, S. & Höglund, J. (2018). Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transboundary and Emerging Diseases* **65**, 217–234.

Cheng, Z.-Q., Yang, D., Ma, Q.-Y., Yi, X.-H., Zhang, N.-L., Zhou, J. & Zhao, Y.-X. (2011). Triterpenoid saponins from *Albizia mollis*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **32**, 1403–1406.

Christophersen, C., Larsen, C. & Dimayuga, R.E. (1991). Traditional Medicine-A potential resource exploitation of natural products. The H.C. Orsted Institute, Copenhagen, Denmark, 8-12 p.

Chwalek, M., Lalun, N., Bobichon, H., Plé, K. & Voutquenne-Nazabadioko, L. (2006). Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1760**, 1418–1427.

Cordell, G.A. (1976). Biosynthesis of sesquiterpenes. *Chemical Reviews* **76**, 425–460.

Cooper, K.M., McMahon, C., Fairweather, I. & Elliott, C.T. (2015). Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective. *Trends in Food Science & Technology* **44**, 21–35.

Copani, G., Hall, J.O., Miller, J., Priolo, A., Villalba, J.J. (2013). Plant secondary compounds as complementary resources: Are they always complementary? *Oecologia*, **172**, 1041–1049.

Cortes-Morales, J.A., Olmedo-Juárez, A., Trejo-Tapia, G., González-Cortazar, M., Domínguez-Mendoza, B.E., Mendoza-de Gives, P. & Zamilpa, A. (2019). *In vitro* ovicidal activity of *Baccharis conferta* Kunth against *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology* **197**, 20–28.

Cronquist, A. & Takhtadzhian, A.L. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York Columbia University Press. 1262 p.

Da Silva, A.S., Schafer, A.S., Aires, A.R., Tonin, A.A., Pimentel, V.C., Oliveira, C.B., Zanini, D., Schetinger, M.R., Lopes, S.T. & Leal, M.L. (2013). E-ADA activity in erythrocytes of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and its possible functional correlations with anemia. *Research in Veterinary Science* **95**, 1026–1030.

D'addabbo, T., Carbonara, T., Leonetti, P., Radicci, V., Tava, A. & Avato, P. (2011). Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. *Phytochemistry Reviews* **10**, 503–519.

de Kok, R. (2002). Are plant adaptations to growing on serpentine soil rare or common? A few case studies from New Caledonia. *Adansonia* **24**, 229–238.

Diaz, J.L. (1976). Index y Sinonoma de las Plantas medicinales de Mexico. *Instituto Mexicana para el Estudio de las Plantas Medicinales de Mexico*, 107-108 p.

Dibong SD, Mpondo Mpondo E, Ngoye A, Kwin NF, Betti JL. 2011a. Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales vendues sur les marchés de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* **37**, 2496–2507.

Dimayuga, R.E. & Garcia, S.K. (1991). Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* **31**, 181–192.

Doligalska, M., Józwicka, K., Kiersnowska, M., Mroczek, A., Pączkowski, C. & Janiszowska, W. (2011). Triterpenoid saponins affect the function of P-glycoprotein and reduce the survival of the free-living stages of *Heligmosomoides bakeri*. *Veterinary Parasitology* **179**, 144–151.

Elmahalawy, S.T., Halvarsson, P., Skarin, M. & Höglund, J. (2018). Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) as a novel method for absolute quantification of major gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology* **261**, 1–8.

Encarnación, R., Kenne, L., Samuelsson, G. & Sandberg, F. (1981). Structural studies on some saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*. *Phytochemistry* **20**, 1939–1942.

Forner, A., Reig, M. & Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet* **391**, 1301–1314.

Ghani, A.E.A., Dora, G.A., Hassan, W.H., Abdallah, R.H. & El-Salam, E.A. (2016). New saponins from *Albizia lebbek* (L) Benth flowers. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **7**, 3617.

Giovanelli, F., Mattellini, M., Fichi, G., Flamini, G. & Perrucci, S. (2018). In vitro anthelmintic activity of four plant-derived compounds against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Sciences* **5**, 78.

Gomes, D.C., de Lima, H.G., Vaz, A.V., Santos, N.S., Santos, F.O., Dias, Ê.R., Botura, M.B., Branco, A. & Batatinha, M.J.M. (2016). *In vitro* anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. *Veterinary Parasitology* **226**, 10–16.

Günther, H. (1994). La spectroscopie de RMN: principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en chimie. Elsevier Masson, Paris 557 pp.

Haddad, M., Miyamoto, T., Laurens, V. & Lacaille-Dubois, M.-A. (2003). Two new biologically active triterpenoidal saponins acylated with salicylic acid from *Albizia adianthifolia*. *Journal of Natural Products*. **66**, 372–377.

Han, Q., Qian, Y., Wang, X., Zhang, Q., Cui, J., Tu, P. & Liang, H. (2017). Cytotoxic oleanane triterpenoid saponins from *Albizia julibrissin*. *Fitoterapia* **121**, 183–193.

Hernández, H.M. (1991). Taxonomía, distribución geográfica y biología reproductiva de *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae, Mimosoideae), una especie con potencial agroforestal. *Anales Instituto Biología Universidad Nacional de México*, Ser. Bot **62**, 121-132.

Heywood, V. H. 1978. Flowering plants of the world. New York : Mayflower Books. 335 pp.

Hoffmann, E. de & Stroobant, V. (2005). *Spectrométrie de masse: cours et exercices corrigés*. 3<sup>ème</sup> édition Sciences Sup, Dunod 440 pp.

Hoste, H. & Torres-Acosta, J.F.J. (2011). Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology* **180**, 144–154.

Hostettmann, K. & Marston, A. (1995). Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins. Cambridge University Press, Cambridge, UK 548 pp.

Hutchinson, J., Dalziel, J.M., Keay, R.W.J. & Hepper, N. (1972). Flora of West Tropical Africa. London, UK: Crown Agents for Overseas Governments and Administrations. Retrieve from <https://archive.org/stream/FloraOfWestTropi00hutc/FloraOfWestTropicalAfricaJohnHutchinson#page/n0/mode/2up>.

Inyang, E. (2003). *Ethnobotany, conventional and traditional uses of plants*. The Verdict Press, Uyo, Nigeria **1**, 111p.

Iwu, M.M. (1993). *Handbook of African Medicinal plants* CRC press. *Boca Raton*, Maryland, 184 p.

Jackson, F. & Hoste, H. (2010). *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. (Eds.), *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. FAO/IAEA Springer Edition, 24–45 p.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. & Stevens, P. (2002). *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. De Boeck Supérieur, 467 p.

Jörg, M.A., Kuzina, V., Andersen, S.B. & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **72**, 435–457.

Kanchanapoom, T., Kasai, R. & Yamasaki, K. (2001). Acetylated Triterpene Saponins from the Thai Medicinal Plant, *Sapindus emarginatus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **49**, 1195–1197.

Kasai, R., Fujino, H., Kuzuki, T., Wong, W.-H., Goto, C., Yata, N., Tanaka, O., Yasuhara, F. & Yamaguchi, S. (1986). Acyclic sesquiterpene oligoglycosides from pericarps of *Sapindus mukurossi*. *Phytochemistry* **25**, 871–876.

Kasai, R., Nishi, M., Mizutani, K., Miyahara, I., Moriya, T., Miyahara, K. & Tanaka, O. (1988). Trifolioside II, an acyclic sesquiterpene oligoglycoside from pericarps of *Sapindus trifoliatus*. *Phytochemistry* **27**, 2209–2211.

Kenne, T.F., Mbida, M. & Bilong Bilong, C.F. (2011). In vitro activities of acetonic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **4**, 125–128.

Kenyon, F., Rinaldi, L., McBean, D., Pepe, P., Bosco, A., Melville, L., Devin, L., Mitchell, G., Ianniello, D. & Charlier, J. (2016). Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and Nematodirus infection. *Veterinary Parasitology* **225**, 53–60.

Laird, S.A. & Sidwell, K. (1996). *Medicinal plants of the Limbe botanic garden*. Limbe Botanic Garden: Limbe Cameroon, 42p.

Lawal, I.O., Uzokwe, N.E., Igboanugo, A.B.I., Adio, A.F., Awosan, E.A., Nwogwugwu, J.O., Faloye, B., Olatunji, B.P. & Adesoga, A.A. (2010). Ethno medicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institutes of South-west Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **4**, 001–007.

Liang, H., Tong, W.Y., Zhao, Y.Y., Cui, J.R., Tu, G.U. (2005). An antitumor compound julibroside J28 from *Albizia julibrissin*. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. **15**, 4493–4495.

Liu, R., Ma, S.-G., Liu, Y.-X., Yu, S.-S., Chen, X.-G. & Zhang, J.-J. (2010). Albizosides D and E, two new cytotoxic triterpene saponins from *Albizia chinensis*. *Carbohydrate Research* **345**, 1877–1881.

Liu, S., Cui, M., Liu, Z., Song, F. & Mo, W. (2004). Structural analysis of saponins from medicinal herbs using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society Mass Spectrometry* **15**, 133–141.

Liu, W.J. (2011). *Traditional herbal medicine research methods : identification, analysis, bioassay, and pharmaceutical and clinical studies*. John Wiley & Sons Inc, 477pp.

Lorenzi, H. & Souza, H. de. (1995). *Plantas ornamentais no Brasil: arbustos, herbáceas e trepadeiras*. São Paulo: Editora Plantarum, 1120 pp.

Lowry, J.B. & Macklin, B. (1988). *Calliandra calothyrsus* - an Indonesian favorite goes pan-tropic. NFT Highlights 88-02. NFTA, Hawaii, USA 2 p.

Luo, J.-G., Ma, L. & Kong, L.-Y. (2008). New triterpenoid saponins with strong  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from the roots of *Gypsophila oldhamiana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, 2912–2920.

Mabberley, D.J. (1997). *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. 2nd edition, Cambridge university press ISBN 0521-4142-0, 858 p.

Macqueen, D.J. (1992). *Calliandra calothyrsus*: Implications of plant taxonomy, ecology and biology for seed collection. *The Commonwealth Forestry Review* **71**, 20–34.

Maestrini, M., Tava, A., Mancini, S., Salari, F. & Perrucci, S. (2019). In vitro anthelmintic activity of saponins derived from *Medicago* spp. plants against donkey gastrointestinal nematodes. *Veterinary Sciences* **6**, 35.

- Maestrini, M., Tava, A., Mancini, S., Tedesco, D. & Perrucci, S. (2020). In vitro anthelmintic activity of saponins from *Medicago* spp. against sheep gastrointestinal nematodes. *Molecules* **25**, 242.
- Magid, A.A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Bontemps, G., Litaudon, M. & Lavaud, C. (2008). Tyrosinase inhibitors and sesquiterpene diglycosides from *Guioa villosa*. *Planta Medica* **74**, 55–60.
- Magid, A.A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Litaudon, M. & Lavaud, C. (2005). Acylated farnesyl diglycosides from *Guioa crenulata*. *Phytochemistry* **66**, 2714–2718.
- Massiot, G. & Lavaud, C. (1995). Structural elucidation of saponins. In *Studies in Natural Products Chemistry*: 187–224.
- Mavrot, F., Hertzberg, H. & Torgerson, P. (2015). Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* **8**, 557.
- Mazzola, E.P., Parkinson, A., Kennelly, E.J., Coxon, B., Einbond, L.S. & Freedberg, D.I. (2011). Utility of coupled-HSQC experiments in the intact structural elucidation of three complex saponins from *Blighia sapida*. *Carbohydrate Research* **346**, 759–768.
- McCorkle, C.M. & Mathias, E. (n.d.). Schillhorn van Veen Tw, 1996. Ethnoveterinary Research and Development. Intermediate Technology Publishers, London, 265-282.
- Melek, F.R., Kassem, I.A.A., Miyase, T. & Fayad, W. (2014). Caspicaosides E–K, triterpenoid saponins and cytotoxic acylated saponins from fruits of *Gleditsia caspica* Desf. *Phytochemistry* **100**, 110–119.
- Menet, M.-C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires* **2011**, 41–53.
- Messi, L.M., Noté, O.P., Mbing, J.N., Lavedan, P., Vedrenne, M., Ouedraogo, N., Carraz, M., Bourgeade-Delmas, S., Pegnyemb, D.E. & Haddad, M. (2020a). Triterpenoid saponins from *Calliandra calothyrsus* Meisn. and their antiproliferative activity against two digestive carcinoma human cell lines. *Fitoterapia* **146**, 1-9.
- Messi, L.M., Noté, O.P., Mbing, J.N., Vansteelandt, M., Lavedan, P., Vedrenne, M., Pegnyemb, D.E. & Haddad, M. (2020b). Farnesyl glycosides and one new triterpenoid saponin from the roots of *Lecaniodiscus cupanioides* Planch. ex Benth. *Carbohydrate Research* **495**, 1-8.
- Miliken, M. (1997). *Plants for Malaria, Plants for Fever. Medicinal Species in Latin America—a Bibliographic Study*. New York: Balogh Scientific Books, 122 p.

- MINEPIA. (2001). Cameroun. Rapport annuel.
- Miyase, T., Melek, F.R., Ghaly, N.S., Warashina, T., El-Kady, M. & Nabil, M. (2010). Echinocystic acid 3,16-O-bisglycosides from *Albizia procera*. *Phytochemistry* **71**, 1375–1380.
- Mulley, R.C. & English, A.W. (1991). Velvet antler harvesting from fallow deer *Dama dama*. *Australian Veterinary Journal* **68**, 309–311.
- Nafiu, M.O., Abdulsalam, T.A. & Akanji, M.A. (2013). Phytochemical analysis and antimalarial activity aqueous extract of *Lecaniodiscus cupanioides* root. *Journal of Tropical Medicine*, 1–4. doi:10.1155/2013/605393.
- Nakamura, T., Takeda, T. & Ogihara, Y. (1994). Studies on the Constituents of *Calliandra anomala* (KUNTH) MACBR. II. Structure elucidation of four acylated triterpenoidal saponins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **42**, 1111–1115.
- Ndayishimiye, J., Bigendako, M.J., Lejoly, J., Sibomana, S., Koffi, K.J. & Bogaert, J. (2010). Distribution model of the Mimosoideae in central Africa. *Systematics and conservation of African plants. Proceedings of the 18th AETFAT Congress, Yaoundé, Cameroun, 26 February to 2 March 2007* 245–252.
- Noté, O.P., Azouaou, S.A., Simo, L., Antheaume, C., Guillaume, D., Pegnyemb, D.E., Muller, C.D. & Lobstein, A. (2016a). Phenotype-specific apoptosis induced by three new triterpenoid saponins from *Albizia glaberrima* (Schumach. & Thonn.) Benth. *Fitoterapia* **109**, 80–86.
- Noté, O.P., Jihu, D., Antheaume, C., Guillaume, D., Pegnyemb, D.E., Kilhoffer, M.C. & Lobstein, A. (2015a). Triterpenoid saponins from *Albizia boromoensis* Aubrév. & Pellegr. *Phytochemistry Letters* **11**, 37–42.
- Noté, O.P., Jihu, D., Antheaume, C., Zeniou, M., Pegnyemb, D.E., Guillaume, D., Chneiweiss, H., Kilhoffer, M.C. & Lobstein, A. (2015b). Triterpenoid saponins from *Albizia lebbeck* (L.) Benth and their inhibitory effect on the survival of high grade human brain tumor cells. *Carbohydrate Research* **404**, 26–33.
- Noté, O.P., Kamto, E.L.D., Toukea, D.D., Aouazou, S.A., Mbing, J.N., Muller, C.D., Guillaume, D. & Pegnyemb, D.E. (2018). Pro-apoptotic activity of new triterpenoid saponins from the roots of *Albizia adianthifolia* (Schumach.) W.Wight. *Fitoterapia* **129**, 34–41.
- Noté, O.P., Messi, L.M., Mbing, J.N., Azouaou, S.A., Sarr, M., Guillaume, D., Muller, C.D., Pegnyemb, D.E. & Lobstein, A. (2017). Pro-apoptotic activity of acylated triterpenoid saponins from the stem bark of *Albizia chevalieri* Harms. *Phytochemistry Letters* **22**, 95–101.

- Noté, O.P., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Paululat, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Pegnyemb, D.E. & Lacaille-Dubois, M.-A. (2009). Cytotoxic Acacic Acid Glycosides from the roots of *Albizia coriaria*. *Journal of Natural Products* **72**, 1725–1730.
- Noté, O.P., Ngo Mbing, J., Kilhoffer, M.-C., Pegnyemb, D.E. & Lobstein, A. (2019a). Lebeckoside C, a new triterpenoid saponin from the stem barks of *Albizia lebeck* inhibits the growth of human glioblastoma cells. *Natural Product Research* **33**, 2292–2299.
- Noté, O.P., Simo, L., Mbing, J.N., Guillaume, D., Aouazou, S.A., Muller, C.D., Pegnyemb, D.E. & Lobstein, A. (2016b). Two new triterpenoid saponins from the roots of *Albizia zygia* (DC.) J.F. Macbr. *Phytochemistry Letters* **18**, 128–135.
- Noté, O.P., Simo, L.M., Mbing, J.N., Guillaume, D., Muller, C.D., Pegnyemb, D.E. & Lobstein, A. (2019b). Structural determination of two new acacic acid-type saponins from the stem barks of *Albizia zygia* (DC.) J. F. Macbr. *Natural Product Research* **33**, 180–188.
- Numata, A., Kanbara, S., Takahashi, C., Fujiki, R., Yoneda, M., Usami, Y. & Fujita, E. (1992). A cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile* and structures of chromenes. *Phytochemistry* **31**, 1209–1213.
- Ogunmefun, O.T. & Gbile, Z.O. (2012). An ethnobotanical study of anti-rheumatic plants in South Western States of Nigeria. *Asian Journal of Science and Technology* **4**, 63–6.
- Okore, V.C., Ugwu, C.M., Oleghe, P.O. & Akpa, P.A. (2007). Preliminary study on *Candida albicans* obtained from an AIDS patient. *Scientific Research and Essays* **2**, 043–046.
- Olowokudejo, J.D., Kadiri, A.B. & Travih, V.A. (2008). An ethnobotanical survey of herbal markets and medicinal plants in Lagos State of Nigeria. *Ethnobotanical Leaflets* **12**, 851–65.
- O’Toole, G.A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments* **47**, 1-3.
- Palmer, B., Macqueen, D.J. & Gutteridge, R.C. (1994). *Calliandra calothyrsus* - a multipurpose tree legume for humid locations. *Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture* **65**, 65–74.
- Perhutani, P. & National Research Council. (1983). *Calliandra: a versatile small tree for the humid tropics*. Washington, US: National Academic Press, 58 pp.
- Polo Plus. (2002). A user’s guide to probit or logic analysis. LeOra Software Berkeley, CA.

Pertuit, D., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delaude, C. & Lacaille-Dubois, M.-A. (2018). Terpenoid glycosides from the root's barks of *Eriocoelum microspermum* Radlk. ex Engl. *Phytochemistry* **152**, 182–190.

Petit, B., Mitaine-Offer, A.-C., Delaude, C., Miyamoto, T., Tanaka, C. & Lacaille-Dubois, M.-A. (2019). Hederagenin glycosides from the fruits of *Blighia unijugata*. *Phytochemistry* **162**, 260–269.

Raven, P.H. & Polhill, R.M. (1981). Advances in legume systematics. Part 1, Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 1–26.

Renimel, I., Olivier, M. & André, P. (1998). Use of Guioa plant extract in cosmetic and pharmaceutical compositions for the treatment of skin aging. *French Patent* **19961220**.

Saidu, Y., Lawal, M., Isezuo, S.A., Shehu, R.A., Sahabi, D.M. & Bilbis, L.S. (2007). Partial purification and elucidation of mechanism of hypoglycaemic agent of aqueous leaf extract of *Albizzia chevalieri* Harms (Leguminosae). *Journal of Pharmacology and Toxicology* **2**, 513–523.

Saidu, Y., Nwachukwu, F., Bilbis, L., Faruk, U. & Faruk, A. (2010). Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of root extracts of *Albizzia chevalieri* in alloxan induced diabetic rats. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences* **18**, 72–78.

Sales, N. & Love, S. (2016). Resistance of *Haemonchus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel/abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia *Veterinary Parasitology* **228**, 193–196.

Salifou, S., Daga, D.F., Attindehou, S., Deguenon, R. & biao, C.F. (2013). Antiparasitic effects of the water extract from *Chenopodium ambrosioides* L.(Chenopodiaceae) against some gastrointestinal nematodes in West African Long Legged goats. *Journal of Parasitology and Vector Biology* **5**, 13–16.

Santos, A.C.V., Santos, F.O., Lima, H.G., Da Silva, G.D., Uzêda, R.S., Dias, Ê.R., Branco, A., Cardoso, K.V., David, J.M. & Botura, M.B. (2018). In vitro ovicidal and larvicidal activities of some saponins and flavonoids against parasitic nematodes of goats. *Parasitology* **145**, 1884–1889.

Santos, W.R., Bernardo, R.R., Peçanha, L.M.T., Palatnik, M., Parente, J. & de Sousa, C.B.P. (1997). Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of periantra mediterranea saponin on the humoral response to the FML antigen of leishmania donovani. *Vaccine* **15**, 1024–1029.

Sato, A., Shindo, T., Horikoshi, H., Kuwano, H. & Kinoshita, T. (1988). Farnesol glycosides to enhance glucose absorption by insulin target cells. *Patent: JKXXAF JP 63203694*.

Shindo, T., Sato, A., Horikoshi, H. & Kuwano, H. (1992). A farnesyl arabinoside as an enhancer of glucose transport in rat adipocytes from a soft coral, *Sinularia* sp. *Experientia* **48**, 688–690.

Silva, B.P. da & Parente, J.P. (2013). A new complex triterpenoid saponin from *Calliandra pulcherrima* with haemolytic activity and adjuvant effect. *Phytochemistry Letters* **6**, 633–639.

Silva, B.P. da, Soares, J.B.R.C., Souza, E.P. de, Palatnik, M., Sousa, C.B.P. de & Parente, J.P. (2005). Pulcherrimasaponin, from the leaves of *Calliandra pulcherrima*, as adjuvant for immunization in the murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* **23**, 1061–1071.

Silverstein, R.M., Webster, F.X. & Kiemle, D.J. (2007). Spectroscopic methods for identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education* **84**, 12.

Simo, L.M., Noté, O.P., Mbing, J.N., Aouazou, S.A., Guillaume, D., Muller, C.D., Pegnyemb, D.E. & Lobstein, A. (2017). New cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Albizia gummifera* (J.F.G MEL.) C.A. SM. *Chemistry and Biodiversity* **14**, e1700260.

Sofidiya, M.O., Jimoh, F.O., Aliero, A.A., Afolayan, A.J., Odukoya, O.A. & Familoni, O.B. (2008). Antioxidant and antibacterial properties of *Lecaniodiscus cupanioides*. *Research Journal of Microbiology* **3**, 91–98.

Sonfack, G., Fossi Tchinda, C., Simo, I.K., Bitchagno, G.T.M., Nganou, B.K., Çelik, İ., Tene, M., Funda Görkem, S., Opatz, T., Penlap Beng, V., Kuete, V. & Tane, P. (2019). Saponin with antibacterial activity from the roots of *Albizia adianthifolia*. *Natural Product Research* 1–9.

Spichiger, R.-E., Figeat-Hug, M. & Jeanmonod, D. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. PPUR presses polytechniques.

Spiegler, V., Liebau, E. & Hensel, A. (2017). Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Natural Product Reports* **34**, 627–643.

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

Srikanth, J. & Muralidharan, P. (2009). CNS activity of the methanol extracts of *Sapindus emarginatus* Vahl in experimental animal models. *Journal of Scientific Research* **1**, 583–593.

Tabuti, J.R.S. & Mugula, B.B. (2007). The ethnobotany and ecological status of *Albizia coriaria* Welw. ex Oliv. in Budondo Sub-county, eastern Uganda. *African Journal of Ecology* **45**, 126–129.

Tahrioui, A., Ortiz, S., Azuama, O.C., Bouffartigues, E., Benalia, N., Tortuel, D., Maillot, O., Chemat, S., Kritsanida, M., Feuilleley, M., Orange, N., Michel, S., Lesouhaitier, O., Cornelis, P., Grougnet, R., Boutefnouchet, S. & Chevalier, S. (2020). Membrane-interactive compounds from *Pistacia lentiscus* L. Thwart *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *bioRxiv* 2020.03.17.995043.

Takeda, T., Nakamura, T., Takashima, S., Yano, O. & Ogihara, Y. (1993). Studies on the constituents of *Calliandra anomala* (KUNTH) MACBR. I. Structure elucidation of two acylated triterpenoidal saponins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **41**, 2132–2137.

Tani, C., Ogihara, Y., Mutuga, M., Nakamura, T. & Takeda, T. (1996). Studies on the constituents of *Calliandra anomala* (KUNTH) MACBR. III. Structure elucidation of six acylated triterpenoidal saponins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **44**, 816–822.

Tani, C., Ogihara, Y. & Takeda, T. (1998). Studies of the constituents of *Calliandra anomala* (KUNTH) MACBR. IV. Structure analysis by HPLC retention time and FAB-MS spectrum. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **46**, 723–725.

Tapondjou, A. L., Miyamoto, T., Mirjolet, J.-F., Guilbaud, N., & Lacaille-Dubois, M.-A. (2005). Pursaethosides A–E, triterpene saponins from *Entada pursaetha*. *Journal of Natural Products* **68**, 1185–1190.

Tava, A. & Avato, P. (2006). Chemical and biological activity of triterpene saponins from *Medicago* species. *Natural Product Communications* **1**, 1159–1180.

Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. & Chan-Pérez, J.I. (2014). Anthelmintic activity of acetone–water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology* **206**, 322–327.

Vercruyse, J., Holdsworth, P., Letonja, T.; Conder, G., Hamamoto, K., Okano, K., Rehbein, S. (2001). Veterinary International Co-operation on Harmonisation Working Group on anthelmintic guidelines. International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines (Part 2). *Veterinary Parasitology* **96**, 171–193.

Vermeersch, M., Foubert, K., Luz, R.I. da, Puyvelde, L.V., Pieters, L., Cos, P. & Maes, L. (2009). Selective antileishmania activity of 13,28-epoxy-oleanane and related triterpene

saponins from the plant families Myrsinaceae, Primulaceae, Aceraceae and Icacinaceae. *Phytotherapy Research* **23**, 1404–1410.

Viana, E.O.R., Cruz, M.F.S.J., da Silva, M.J., Pereira, G.M., da Silva, B.P., Tinoco, L.W. & Parente, J.P. (2019). Structural characterization of a complex triterpenoid saponin from *Albizia lebbbeck* and investigation of its permeability property and supramolecular interactions with membrane constituents. *Carbohydrate Research* **471**, 105–114.

Villiers, J.-F. (1989). Leguminosae-Mimosoideae. Leguminosae-Mimosoideae. Flore du Gabon, 3–174 p.

Villiers, J.F. (1996). Les Légumineuses Mimosoïdées ombrophiles de basse altitude africaines et malgaches : biodiversité et répartition. In: *The Biodiversity of African Plants*. Springer, Dordrecht, 121–130 p.

Vincken, J.P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **68**, 275-297.

Vo, N.N.Q., Fukushima, E.O. & Muranaka, T. (2017). Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and saponinins. *Journal of Natural Medicines* **71**, 50–58.

Voutquenne-Nazabadioko, L. (2010). Etude chimiotaxonomique de la famille des Sapindaceae. *Ethnopharmacologia* **45**, 49–52.

Waller, P.J. (2006). From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology* **139**, 1–14.

Wang, X.-D., Han, Q.-H., Zhang, J., Zhang, Q.-Y., Tu, P.-F. & Liang, H. (2019). Three new triterpenoid saponins from *Albizia julibrissin*. *Journal of Asian Natural Products Research* **21**, 535–541.

Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhu, S., Li, Y., Li, M. & Yu, B. (2007). Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 2528–2532.

Wang, Y.H., Avula, B., Fu, X., Wang, M., Khan, I. A. (2012). Simultaneous determination of the absolute configuration of twelve monosaccharide enantiomers from natural products in a single injection by a UPLC-UV/MS method. *Planta Medica* **78**, 834–837.

Wiersum, K.F. & Rika, I.K. (1992). *Calliandra calothyrsus* Meissn. In *Forages* 68–70.

Wu-Hsiung, W., Kasai, R., Choshi, W., Nakagawa, Y., Mizutani, K., Ohtani, K. & Tanaka, O. (1991). Acyclic sesquiterpene oligoglycosides from pericarps of *Sapindus delavayi*. *Phytochemistry* **30**, 2699–2702.

Zhang, H., Samadi, A.K., Rao, K.V., Cohen, M.S. & Timmermann, B.N. (2011). Cytotoxic oleanane-type saponins from *Albizia inundata*. *Journal of Natural Products*. **74**, 477–482.

Zhang, Z., Koike, K., Jia, Z., Nikaido, T., Guo, D. & Zheng, J. (1999). Triterpenoidal saponins acylated with two monoterpenic acids from *Gleditsia sinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **47**, 388–393.

Zheng, L., Zheng, J., Zhang, Q., Wang, B., Zhao, Y. & Wu, L. (2010). Three new oleanane triterpenoid saponins acetylated with monoterpenoid acid from *Albizia julibrissin*. *Fitoterapia* **81**, 859–863.

## **Annexes**



## Farnesyl glycosides and one new triterpenoid saponin from the roots of *Lecaniodiscus cupanioides* Planch. ex Benth

Lin Marcellin Messi<sup>a,b,c,\*\*</sup>, Olivier Placide Noté<sup>a</sup>, Joséphine Ngo Mbing<sup>a</sup>,  
 Marieke Vansteelandt<sup>c</sup>, Pierre Lavedan<sup>d</sup>, Marc Vedrenne<sup>d</sup>, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb<sup>a</sup>,  
 Mohamed Haddad<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, Département de Chimie Organique, Faculté de Sciences, Université de Yaoundé, BP 812, Yaoundé, Cameroon

<sup>b</sup> Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD), BP 2067, Yaoundé, Cameroon

<sup>c</sup> UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, France

<sup>d</sup> Institut de Chimie de Toulouse, UPS, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Lecaniodiscus cupanioides*  
 Sapindaceae  
 Sesquiterpene glycosides  
 Cupanioisides  
 2D NMR

### ABSTRACT

Chemical investigation of the methanol extract of the roots of *Lecaniodiscus cupanioides* led to the isolation and characterisation of three new sesquiterpene glycosides, named cupanioisides A (1), B (2) and C (3), together with one new triterpenoid saponin named lecanioside A (4). Their structures were established by extensive analysis of spectroscopic methods including 1D and 2D NMR techniques (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC, and HMBC) and HRESIMS. The four new compounds were evaluated for their antiproliferative activity against the Caco-2 cell line (human epithelial cell line). None of the isolated compounds showed positive activity in our assay. Our findings represent a valuable contribution to the chemotaxonomy *Lecaniodiscus* genus of the subfamily of Sapindoideae of Sapindaceae family, known to be a rich source of farnesol glycosides.

### 1. Introduction

*Lecaniodiscus cupanioides* Planch (Sapindoideae subfamily) of the Sapindaceae family, is a small tree 6–12 m high branching low down with a widely spreading crown. It is an evergreen under-storey tree of the lowland rain-forest occurring from Guinea to West Cameroons, and in East Cameroun and Gabon [1]. *L. cupanioides* is widely distributed in Southern Nigeria is a traditional medicinal plant that is commonly used as laxative, galactogen, febrifuge and for cough and infection [2]. It is known as aaka or akikka (Yoruba), kaafi-nnamaa-zaaki (Hausa) and okpu (Igbo) in Nigeria. Parts of the plant, such as roots and leaves have various applications in folk medicine for the treatment of boils, burns, wounds, oral hygiene, fever and abdominal swelling caused by liver abscess [3]. The decoction of the root of the plant is claimed among the Yoruba people of Nigeria to control epilepsy and to enhance penile erection. Pharmacological studies have also shown that the plant possesses analgesic, antibacterial and antifungal properties [4–6]. Previous phytochemical studies of *L. cupanioides* revealed the presence of triterpenoids saponins [2,7]. In this paper, we describe the isolation,

structure elucidation and the evaluation of the antiproliferative activities against the Caco-2 cell line (human epithelial cell line) of the four new isolated glycosides.

### 2. Results and discussion

The methanolic extract of the roots of *L. cupanioides* was purified by multiple chromatographic steps over silica gel and reversed phase. The purification steps yielded three new sesquiterpene glycosides named cupanioiside A (1), cupanioiside B (2) and cupanioiside C (3) together with one new saponin named lecanioside A (4) (Fig. 1). Their structures were established by extensive analysis of NMR techniques, mainly 1D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) and 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC, HSQC-TOCSY and HMBC) experiments, HRESIMS and by comparison with the literature data (see Fig. 2–4)).

Compound 1 was obtained as a white amorphous powder. The HRESIMS (positive-ion mode) exhibited a pseudomolecular ion peak at *m/z* 1579.6550 ([M+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>67</sub>H<sub>112</sub>O<sub>40</sub>Na 1579.6627) indicating a molecular formula of C<sub>67</sub>H<sub>112</sub>O<sub>40</sub>. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of

\* Corresponding author. UMR 152 PHARMA-DEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France.

\*\* Corresponding author. Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD), BP 2067, Yaoundé, Cameroon.

E-mail addresses: [linmarcellinmessi@yahoo.fr](mailto:linmarcellinmessi@yahoo.fr) (L.M. Messi), [mohamed.haddad@ird.fr](mailto:mohamed.haddad@ird.fr) (M. Haddad).

compound **1** revealed the presence of four methyl groups at  $\delta_{\text{H}}$  1.64 (s, H-12), 1.56 (s, H-13), 1.59 (s, H-14) and 1.67 (s, H-15), showing correlations in the HSQC spectrum with carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  25.5 (C-12), 17.5 (C-13), 15.7 (C-14) and 16.2 (C-15), respectively. Three olefinic proton signals at  $\delta_{\text{H}}$  5.63 (m, H-2), 5.18 (m, H-6) and 5.16 (m, H-10), showing correlations in the HSQC spectrum with carbon atom at  $\delta_{\text{C}}$  120.4, 124.3 and 124.6, respectively, were also observed, as well as four methylene carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  39.5, 26.4, 39.7, and 26.8, and one oxymethylene protons group at  $\delta_{\text{H}}$  4.28 and 4.65 (m, H<sub>a</sub>,H<sub>b</sub>-1), showing correlation in the HSQC spectrum with carbon atom at  $\delta_{\text{C}}$  65.4 (C-1). Furthermore, in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, three other carbon signals were observed as quaternary carbon at  $\delta_{\text{C}}$  140.4 (C-3), 134.8 (C-7) and 130.0 (C-11). These resonances, due to the sesquiterpene moiety, are characteristic of farnesol aglycone (Table 1), with was recognized to be (2*E*,

6*E*)-farnes-1-ol [(2*E*,6*E*)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatriene-1-ol] by  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR analyses using the correlations observed in COSY, HSQC, and HMBC spectra, and was in full agreement with literature data [8,9]. The chemical shifts of methyl carbons, C-14, C-15 at  $\delta_{\text{C}}$  15.7, 16.2, respectively, and those of two methylenes C-4 and C-8 at  $\delta_{\text{C}}$  39.5, 39.7, respectively, were observed at almost the same resonances as those reported for (2*E*, 6*E*)-farnesol, while the terminal methyl C-12 appeared at  $\delta_{\text{C}}$  25.5 ppm, which is particularly indicative of the *E* stereochemistry of the double bonds in the farnesyl unit [10,11]. The absence of signals in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum in the region between 30 and 33 ppm allowed us to eliminate the other possible configurations (2*E*, 6*Z*), (2*Z*, 6*Z*), or (2*Z*, 6*E*) for this farnesol unit. The deshielded shift  $\delta_{\text{C}}$  65.4 (C-1) of the farnesol unit suggested this carbon as the point of linkage of the sugar chain. The sugar moieties of **1** were determined to be D-glucose (Glc),

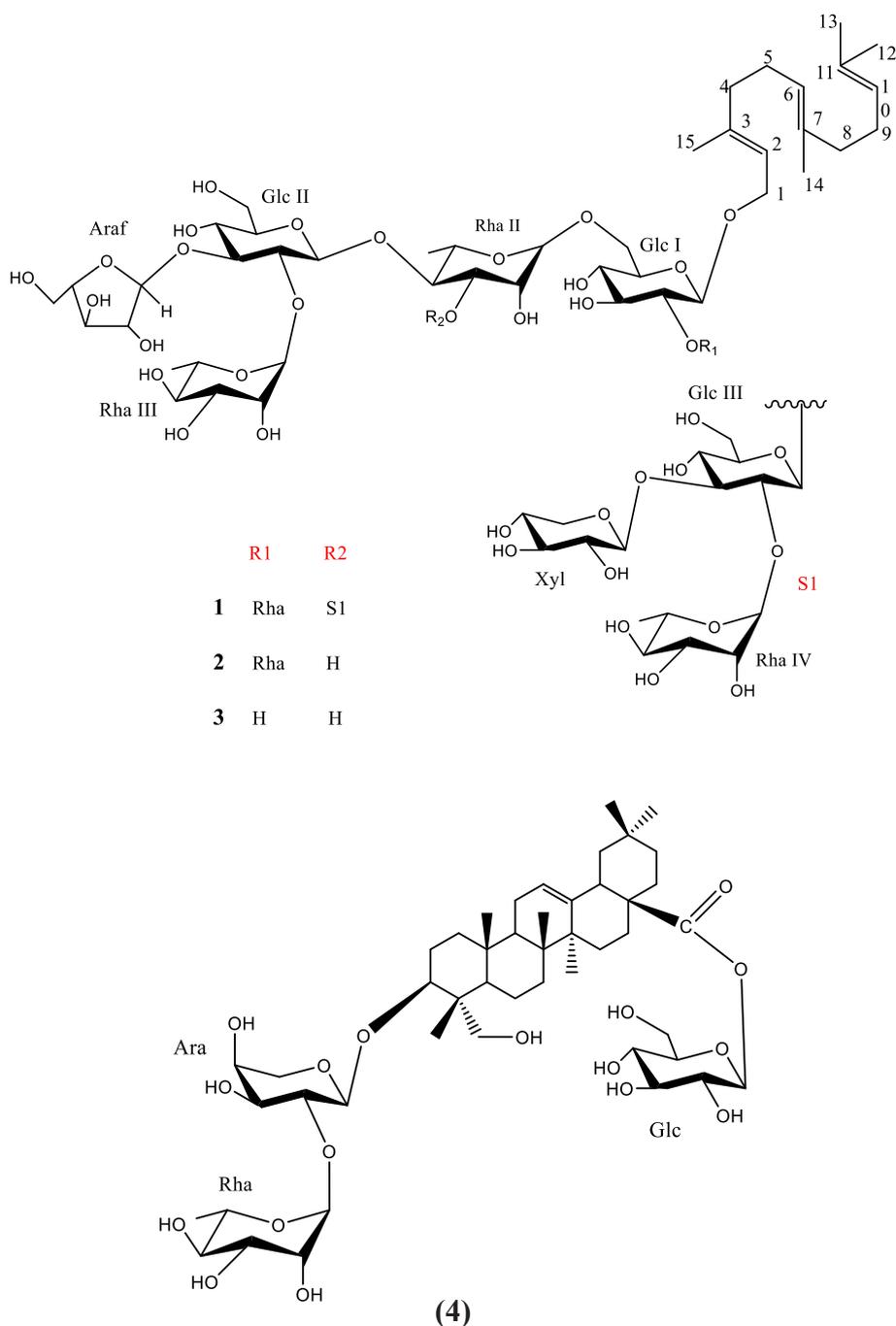


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–4.

L-rhamnose (Rha), D-xylose (Xyl), and L-arabinofuranose (Araf) by acid hydrolysis followed by GC analysis of their trimethylsilylated derivatives and comparison with authentic samples (Section 2). The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the sugar portion of compound **1** showed nine anomeric signals at  $\delta_{\text{H}}$  4.85 (d,  $J = 7.6$  Hz, Glc I H-1), 4.90 (d,  $J = 7.6$  Hz, Xyl H-1), 5.46 (d,  $J = 7.6$  Hz, Glc II H-1), 5.47 (d,  $J = 2.0$  Hz, Rha II H-1), 5.62 (d,  $J = 7.8$  Hz, Glc III H-1), 5.75 (d,  $J = 2.1$  Hz, Araf H-1), 5.92 (d,  $J = 1.6$  Hz, Rha III H-1), 6.20 (d,  $J = 1.6$  Hz, Rha VI H-1), and 6.24 (d,  $J = 1.5$  Hz, Rha I H-1), which correlated with nine anomeric carbon atom resonances at  $\delta_{\text{C}}$  101.2, 105.0, 102.8, 101.8, 102.2, 110.1, 102.7, 102.5, and 102.3, respectively in the HSQC spectrum (Table 2). All proton signals of the sugar moieties were identified by careful analysis of the COSY, HSQC-TOCSY and NOESY spectra. Carbon assignment was based on HSQC and further confirmed by HMBC spectrum (Table 2). Data indicated that eight of the nine sugar residues were in their pyranose form. Based on the coupling constants of the anomeric protons and the chemical shifts of the anomeric carbons, the anomeric configuration of the sugar moieties were determined as  $\beta$  for the glucose and xylose moieties and  $\alpha$  for the rhamnose and arabinofuranose moieties. The sequencing of the glycoside chains was achieved by analysis of HMBC and NOESY experiments. HMBC correlations observed between  $\delta_{\text{H}}$  4.85 (Glc I H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  65.4 (Agly C-1) allowed us to attach Glc I to the aglycone at its C-1. The HMBC correlations observed  $\delta_{\text{H}}$  6.24 (Rha I H-1) and 78.9 (Glc I C-2), and between  $\delta_{\text{H}}$  5.47 (Rha II H-1)  $\delta_{\text{C}}$  67.8 (Glc I C-6), permitted us to attach Rha I, and Rha II to C-2, and C-6 of Glc I, respectively. In addition, HMBC correlations observed between  $\delta_{\text{H}}$  5.46 (Glc II H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  80.2 (Rha II C-4), between  $\delta_{\text{H}}$  5.75 (Araf H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  85.5 (Glc II C-3), and between  $\delta_{\text{H}}$  5.92 (Rha III H-1) and 78.7 (Glc II C-2), suggested us to connect Glc II to C-4 of Rha II, Araf to C-3 of Glc II, and Rha III to C-2 of Glc II. Furthermore, HMBC correlations observed between  $\delta_{\text{H}}$  5.62 (Glc III H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  79.3 (Rha II C-3), between  $\delta_{\text{H}}$  4.90 (Xyl H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  87.2 (Glc III C-3), and between  $\delta_{\text{H}}$  6.20 (Rha IV H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  78.3 (Glc III C-2), permitted us to attach Glc III at C-3 of Rha II, and Xyl to C-3 of Glc III, and Rha IV to C-2 of Glc III. These connectivities were supported by NOESY cross-peaks correlations observed at  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$  4.85 (Glc I H-1)/4.65 (Agly H-1), 6.24 (Rha I H-1)/4.20 (Glc I H-2), 5.47 (Rha

II H-1)/4.02 (Glc I H-6), 5.46 (Glc II H-1)/4.45 (Rha II H-4), 5.75 (Araf H-1)/4.02 (Glc II H-3), 5.92 (Rha III H-1)/4.01 (Glc II H-2), 5.62 (Glc III H-1)/4.52 (Rha II H-3), 4.90 (Xyl H-1)/4.03 (Glc III H-3) and 6.20 (Rha IV H-1)/4.13 (Glc III H-2). Consequently, the structure of **1** was elucidated as 1-*O*-{ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl (1  $\rightarrow$  3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl}-(2*E*,6*E*)-farnes-1-ol, named cupanioideside A (**1**). Compound **1** is a nonaglycoside of (2*E*,6*E*)-farnesol (**1**) that is described for the first time in the Sapindaceae family, the previous one, been a heptaglycoside of (2*E*,6*E*)-farnesol isolated from *Eriocoelem microspermum* from the subfamily of Sapindoideae.

Compound **2** was obtained as a white amorphous powder. The HRESIMS (positive-ion mode) exhibited a doubly charged ion peak at  $m/z$  1162.5153 [ $M + 2\text{Na}$ ] $^{2+}$  (calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{O}_{27}\text{Na}_2$ , 1162.4995). Consequently Compound **2** was assigned a  $\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{O}_{27}$  molecular formula. Analysis of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **2** and comparison with compound **1** and literature data allowed the identification of (2*E*,6*E*)-farnes-1-ol as the aglycone of compound **2** (Table 1). The presence of six monosaccharide units was suggested by the six anomeric protons at  $\delta_{\text{H}}$  4.85 (d,  $J = 7.4$  Hz, Glc I), 6.23 (d,  $J = 1.5$  Hz, Rha I H-1), 5.47 (d,  $J = 1.3$  Hz, Rha II H-1), 5.46 (d,  $J = 9.1$  Hz, Glc II H-1), 5.75 (d,  $J = 2.1$  Hz, Araf H-1) and 5.91 (d,  $J = 1.5$  Hz, Rha III H-1), which correlated in the HSQC spectrum with  $\delta_{\text{C}}$  101.2, 102.4, 101.8, 102.7, 110.2 and 102.7, respectively. Extensive 2D NMR analysis (Table 2) and mass spectrometry showed that compound **2** differed from **1** only by the oligosaccharide moiety at C-3 of Rha II which was glycosylated by the moiety  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl, in compound **1** instead of being free at its C-3 in compound **2**. The absence of any glycosylation at C-3 of Rha II in compound **2** in comparison to compound **1**, was evidenced by the observation of the shielded signal  $\delta_{\text{C}}$  72.2 ( $-7.1$  ppm) of C-3 of Rha II in compound **2** in comparison to  $\delta_{\text{C}}$  79.3 (C-3 of Rha II) in compound **1**. This was confirmed by the observation in the mass spectrum of the difference in molecular mass of 440 mass units between **1** and **2**, corresponding to the

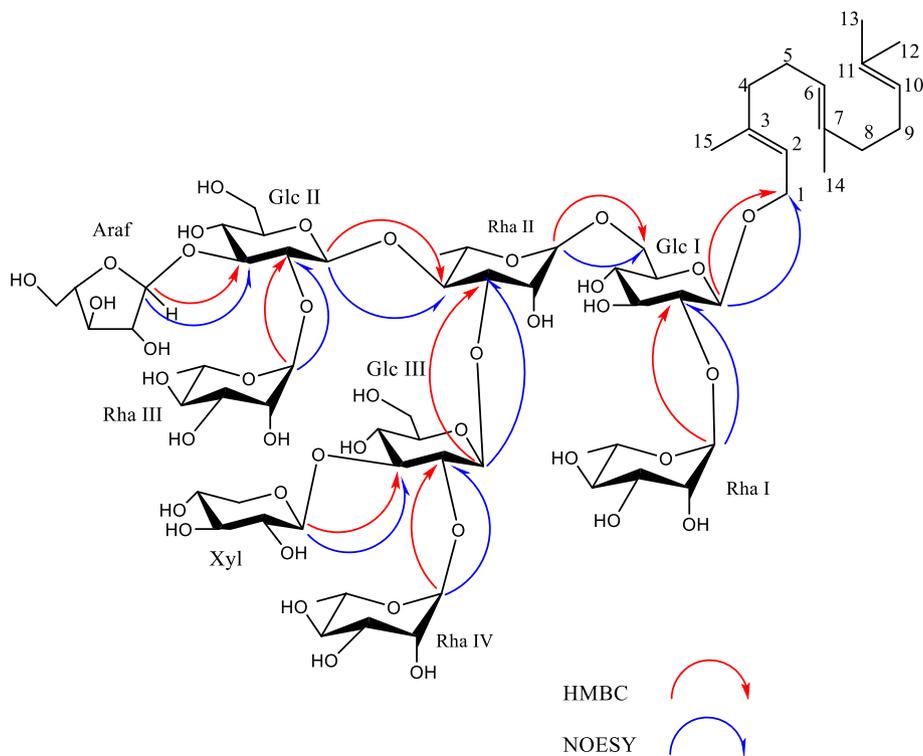


Fig. 2. Key HMBC and NOESY correlations of compound **1**.

loss of one pentose, one deoxyhexose, and one hexose, identified by extensive analysis of 2D NMR experiments as, one xylose, one rhamnose, and one glucose, compatible to the  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety, established in compound 1. Based on the above evidences, the structure of 2 was elucidated as 1-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(2E,6E)-farnes-1-ol, a new natural compound, given the trivial name cupanioideside B.

Compound 3 was obtained as a white amorphous powder. Its molecular formula  $C_{44}H_{74}O_{23}$  was deduced from its HRESIMS in positive-ion mode which exhibited a doubly charged ion peak  $[M+2Na]^{2+}$  at  $m/z$  1016.4581 (calcd 1016.4416 for  $C_{44}H_{74}O_{23}Na_2$ ). Almost all NMR signals of the aglycone part of 3 (Tables 1 and 2) were superimposable on those of 1 and 2, indicating that compound 3 has also of (2E,6E)-farnes-1-ol as aglycone. The difference between compounds 2 and 3 (146 amu lower) was identified to be one rhamnose moiety, which complete assignment was achieved by extensive analyses of 1D and 2D NMR experiments. In addition, this account for the similarities between the  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra of compounds 2 and 3 (Table 2). Instead of a hexasaccharide moiety at C-1 of (2E,6E)-farnes-1-ol aglycone in compound 2, compound 3 displayed signals for a pentasaccharide moiety attached at C-1 of the aglycone according to the analysis of 2D NMR experiments. Accordingly, the structure of 3 was elucidated as 1-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(2E,6E)-farnes-1-ol, a new natural product, given the name cupanioideside C.

Compound 4 was obtained as a white amorphous powder. The HRESIMS (positive-ion mode) exhibited a pseudomolecular ion peak at  $m/z$  935.4888 ( $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{47}H_{76}O_{17}Na$  935.4982) indicating a molecular formula of  $C_{47}H_{76}O_{17}$ . Extensive analysis of 1D and 2D-NMR spectra ( $^1H$  NMR,  $^1H$  NMR DOSY,  $^{13}C$ -JMOD, COSY, NOESY, HSQC, TOCSY and HMBC) indicated the presence of six tertiary methyl groups at  $\delta_H$  0.86 (s, H-30), 0.87 (s, H-29), 0.95 (s, H-25), 1.05 (s, H-24), 1.11 (s, H-26) and 1.16 (s, H-27) showing correlations in the HSQC spectrum with their corresponding carbons at  $\delta_C$  23.3 (C-30), 32.9 (C-29), 15.9 (C-25), 13.7 (C-24), 17.3 (C-26) and 25.8 (C-27), respectively. Furthermore, other characteristic signals were observed such as one olefinic

proton at  $\delta_H$  5.41 (brd,  $J = 4.0$  Hz, H-12), one oxygen bearing methine proton signal at  $\delta_H$  4.25 (brs, H-3), one primary alcoholic function at  $\delta_H$  3.72 and 4.12 (H<sub>a</sub> and H<sub>b</sub>-23) and one quaternary carbon, showing HSQC correlation with  $\delta_C$  122.6 (C-12), 80.7 (C-3), 63.3 (C-23) and 143.6 ppm (C-13) respectively. The aglycone moiety of 4 was thus recognized to be hederagenin by  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR analyses (Table 1) using the correlations observed in COSY, HSQC, and HMBC spectra, and was in full agreement with literature data [9,12]. The chemical shifts of C-3 ( $\delta_C$  80.7) and C-28 ( $\delta_C$  176.5) (Table 1) indicated that 4 is a bidesmosidic glycoside [9,12] of hederagenin with sugar chains linked to C-3 and C-28 of the aglycone through an ether and ester bond, respectively. The sugar moieties of 4 were determined to be D-glucose (Glc), L-rhamnose (Rha), and L-arabinose (Ara) by acid hydrolysis followed by GC analysis of their trimethylsilylated derivatives and comparison with authentic samples (Section 2). The  $^1H$  NMR spectrum of the sugar portion of compound 4 showed three anomeric signals at  $\delta_H$  5.08 (d,  $J = 6.2$  Hz, Ara H-1), 6.23 (brs, Rha H-1) and 6.32 (d,  $J = 8.1$  Hz, Glc H-1), which correlated with three anomeric carbon atom resonances at  $\delta_C$  104.1, 101.7 and 95.5, respectively in the HSQC spectrum (Table 2). All proton signals of the sugar moieties were identified by careful analysis of the COSY, HSQC-TOCSY and NOESY spectra. Carbon assignment was based on HSQC and further confirmed by HMBC spectrum (Table 2). Data from the above experiments indicated that Glc and Ara were in their pyranose form. The remaining anomeric protons of Glc and Ara were determined to have  $\beta$  anomeric configuration and  $\alpha$  anomeric configuration for Ara, based on their relative large  $^3J_{H-1, H-2}$  values (6.2–8.1 Hz) in their pyranose form. The sequencing of the glycoside chains was achieved by analysis of HMBC and NOESY experiments. The cross-peak correlations observed in the HMBC between H-1 of Ara ( $\delta_H$  5.08,  $J = 6.2$  Hz) and C-3 of the aglycone ( $\delta_C$  80.7), and in the NOESY spectrum between H-1 of Ara (d,  $J = 6.2$  Hz) and H-3 of hederagenin ( $\delta_H$  4.25, brs), suggested that Ara is directly attached to C-3 of the aglycone. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 of Rha ( $\delta_H$  6.23, brs) and C-2 of Ara ( $\delta_C$  75.5) established the connectivity between the two sugar units, which was confirmed by the NOESY correlation observed between H-1 of Rha ( $\delta_H$  6.23, brs) and H-2 of Ara ( $\delta_H$  4.55). The terminal positions of Rha was evidenced by the absence of any  $^{13}C$  NMR glycosylation shifts for this sugar moiety. Thus, the disaccharide  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety was

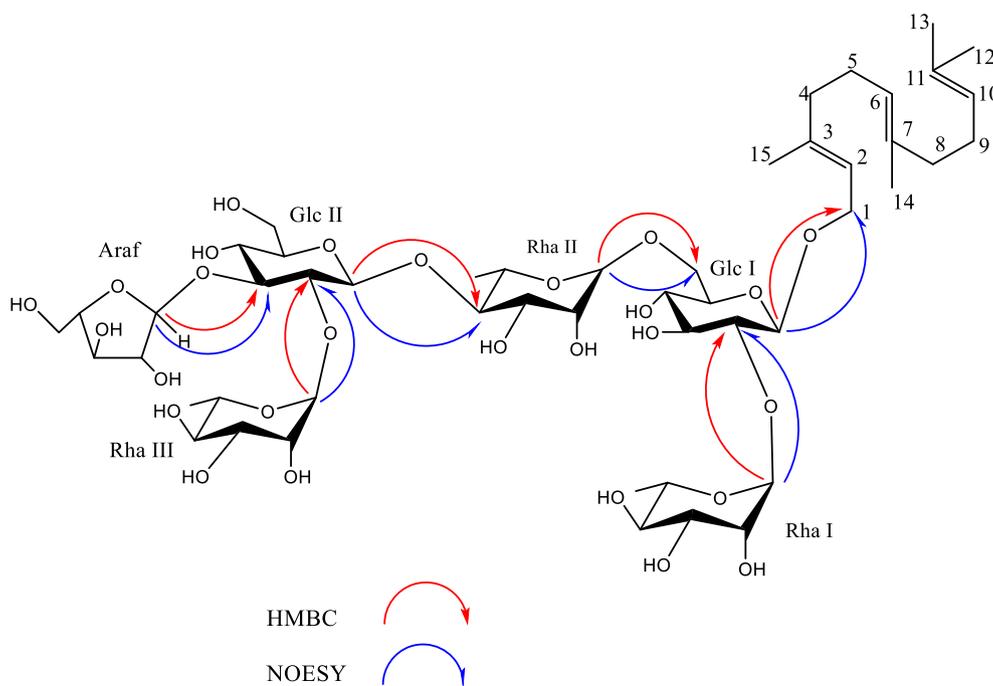


Fig. 3. Key HMBC and NOESY compound 2.

established to be linked at C-3 of the aglycone (Fig. 5). For the sugar chain attached at C-28 of the aglycone, the cross peak observed in the HSQC spectrum at  $\delta_H$  6.32/ $\delta_C$  95.5 (Glc H-1/C-1) suggested that this sugar should be directly attached to C-28 of the aglycone through an ester bond. The terminal positions of Glc was evidenced by the absence of any  $^{13}\text{C}$  NMR glycosylation shifts for this sugar moiety. Thus, Glc was established to be attached at C-28 of the aglycone (Fig. 5). Based on the above evidences, the structure of compound 4 was established as 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-28-O- $\beta$ -D-glucopyranosylhederagenin, a new natural compound, given the name lecanioside A.

The structure and absolute configuration of glucose, rhamnose and arabinose in compounds 1–4 was performed after hydrolysis of each saponin followed by derivatization and UHPLC/MS analysis. By comparison of the retention time (tR) of the monosaccharide derivatives with the standard samples, the absolute configuration of glucose, rhamnose, xylose and arabinose was determined to be D, L, D and L, respectively.

The new isolated compounds 1–4 were then tested for their anti-proliferative activities against Caco-2 cell line (human epithelial cell line). None of the isolated compounds exhibited anti-proliferative activity (Table 3).

### 3. Experimental

#### 3.1. General experimental procedures

Optical rotations were measured on a Jasco P-2000 polarimeter. NMR experiments were performed at 298 K in pyridine- $d_5$  and  $\text{D}_6\text{MSO}$  on a Bruker AVANCE 500 MHz spectrometer equipped with a 5 mm Z-gradient TCI cryoprobe. HRESIMS spectra were recorded using a UHPLC-DAD-LTQ Orbitrap XL instrument (Thermo Fisher Scientific, UK) equipped with an electrospray ionization source (ESI). Isolations were carried out using flash chromatography instrument (Spot Ultimate, Armen, France) on a silica column (Chromabond® Flash RS 25 SiOH 40–63  $\mu\text{m}$ ). Vacuum-liquid chromatography (VLC) was carried out using RP-18 silica gel 60 (25–40  $\mu\text{m}$ ). Thin layer chromatography (TLC) was performed on precoated silica gel plates (60 F<sub>254</sub>, Merck) using the system solvent *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O, 60:15:25 as eluent. The spray reagent for saponins was vanillin reagent (10% mixture of conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soln. and 1% vanillin in EtOH).

#### 3.2. Plant material

The roots of *L. cupanioides* were harvested at Mendong, Yaoundé peripheral quarter, in Cameroon in June 2019 under the guidance of Mr. Victor Nana, botanist of the National Herbarium of Cameroon (NHC), where one specimen (56612/HNC) was deposited.

#### 3.3. Extraction and isolation

The methanolic extract (83 g) of the roots of *L. cupanioides* (960 g) was suspended in 200 mL of H<sub>2</sub>O and partitioned successively with hexane, ethyl acetate and *n*-BuOH sat.H<sub>2</sub>O. The *n*-BuOH-soluble fraction was evaporated to dryness to afford (25g) of brown gum residue and dissolved in 10 mL of H<sub>2</sub>O and then submitted to vacuum-liquid chromatography (VLC) using RP-18 silica gel 60 (25–40  $\mu\text{m}$ ) eluted with a gradient of MeOH-H<sub>2</sub>O (100% H<sub>2</sub>O to 100%MeOH). The 100% MeOH fraction (8 g) was subjected to Combiflash using Chromabond® flash silica gel 60 (40–63  $\mu\text{m}$ ) eluted with the solvent systems CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:2 and 70:30:5) to give eight main sub-fractions (B1–B8). Subfraction B7 (300 mg) was purified by Combiflash using the solvent system CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:3) to give four sub-fractions Fr1 to Fr 4 including compound 1 in Fr 2 (50.7 mg). Subfraction B6 (200 mg) was purified by Combiflash using the solvent system CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (75:25:2) to give five sub-fractions Fr1 to Fr 5 including compound 2 in Fr 3 (18.9 mg). Subfraction B5 (300 mg) was purified by Combiflash using the solvent system CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:2 and 70:30:3) to give 3 (16 mg). Subfraction B4 (195 mg) was purified by Combiflash using the solvent system CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:1) to give six fractions Fr1 to Fr6. Fr3 (50 mg) was purified by sephadex LH-20 using MeOH 100% to give 4 (23.7 mg).

##### 3.3.1. Cupanioideside A (1)

White amorphous powder;  $[\alpha]^{25\text{D}} - 22.7$  ( $c = 0.6$ , MeOH)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) data, see Tables 1 and 2; HR-ESI-MS  $m/z$  1579.6550  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , (calcd for  $\text{C}_{67}\text{H}_{112}\text{O}_{40}\text{Na}$  1579.6627).

##### 3.3.2. Cupanioideside B (2)

White amorphous powder;  $[\alpha]^{25\text{D}} - 31.7$  ( $c = 1.1$ , MeOH)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz), see Tables 1 and 2; HR-ESI-MS:  $m/z$  1162.5153  $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$  (calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{O}_{27}\text{Na}_2$ ,

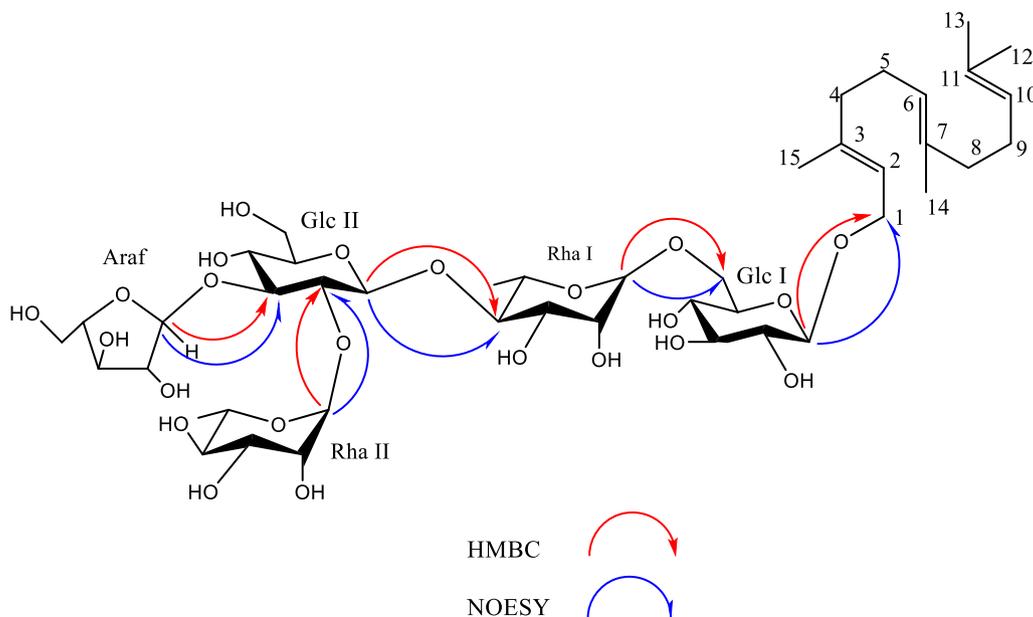


Fig. 4. Key HMBC and NOESY compound 3.

**Table 1**NMR spectroscopic data (500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) for the aglycone moieties of compounds 1–4 ( $\delta$  in ppm and  $J$  in Hz)<sup>a</sup>.

Pos	1		2		3	$\delta_{\text{H}}$	4		$\delta_{\text{H}}$
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$			$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
1	65.4	4.28; 4.65(2H, m)	65.4	4.28; 4.63(2H, m)	65.2	4.38; 4.63 (2H, m)	38.8	1.03; 1.53	
2	120.4	5.63 (1H, m)	120.7	5.63 (1H, m)	120.9	5.52 (1H, m)	26.0	1.98; 2.19	
3	140.4	–	140.4	–	140.4	–	80.7	4.25 (1H, brs)	
4	39.5	2.02	39.6	2.01	39.5	2.00	43.1	–	
5	26.4	2.16	26.4	2.15	26.4	2.16	47.5	1.70	
6	124.3	5.18 (1H, m)	124.4	5.19 (1H, m)	124.2	5.18 (1H, m)	17.9	1.35; 1.67	
7	134.8	–	134.9	–	134.9	–	32.6	1.30; 1.58	
8	39.7	2.09	39.7	2.05	39.7	2.02	39.9	–	
9	26.8	2.09	26.8	2.10	26.7	2.10	47.8	1.74	
10	124.6	5.16 (1H, m)	124.6	5.16 (1H, m)	124.6	5.16 (1H, m)	36.2	–	
11	130.0	–	131.1	–	131.0	–	23.7	1.91; 1.91	
12	25.5	1.64 (s)	25.6	1.64 (s)	25.5 (s)	1.64	122.6	5.41 (1H, brd, 4.0)	
13	17.5	1.56 (s)	17.5	1.56 (s)	17.5	1.56 (s)	143.6	–	
14	15.7	1.59 (s)	15.8	1.60 (s)	15.8	1.57 (s)	41.7	–	
15	16.2	1.67 (s)	16.3	1.68 (s)	16.2	1.66 (s)	28.3	1.01; 2.30	
16							23.1	1.91; 2.01	
17							46.6	–	
18							41.4	3.17 (1H, d, 13.8)	
19							45.9	1.20; 1.70	
20							30.5	–	
21							33.9	1.05; 1.30	
22							32.3	1.71; 1.80	
23							63.3	3.72; 4.12	
24							13.7	1.05 (s)	
25							15.9	0.95 (s)	
26							17.3	1.11(s)	
27							25.8	1.16 (s)	
28							176.5	–	
29							32.9	0.87 (s)	
30							23.3	0.86 (s)	

Assignments were based on the HMBC, HSQC, COSY and J mod experiments.

<sup>a</sup> Overlapped  $^1\text{H}$  NMR signals are reported without designated multiplicity; nf: not found.

1162.4995).

### 3.3.3. Cupanioideside C (3)

White amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  - 38.7 ( $c = 1.7$ , MeOH)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz), see Tables 1 and 2; HR-ESI-MS:  $m/z$  1016.4581  $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$  (calcd 1016.4416 for  $\text{C}_{44}\text{H}_{74}\text{O}_{23}\text{Na}_2$ ).

### 3.3.4. Lecanioside A (4)

White amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  + 28.7 ( $c = 0.8$ , MeOH)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz), see Tables 1 and 2; HR-ESI-MS:  $m/z$  935.4888  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd 935.4982 for  $\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{17}\text{Na}$ ).

## 3.4. Acid hydrolysis and sugar analysis

Each compound (2 mg) was refluxed in 2 N aqueous  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (3 mL) for 2 h at 100 °C. The reaction mixture was diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 5$  mL). After extraction, the aqueous layer was repeatedly evaporated to dryness with MeOH until it reached a neutral pH. The sugars were first analyzed by TLC over silica gel ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 8:5:1) by comparison with standard samples. The following sugars were detected: D-glucose, L-arabinose, D-xylose and L-rhamnose. Furthermore, the absolute configuration of the sugar moiety was determined as previously described by Wang et al. (2012), with slight modifications [13]. Briefly, derivatization of the monosaccharide enantiomers with L-cysteine methyl ester and phenylisothiocyanate converted them into diastereoisomeric arylthiocarbamates, which were separated and detected by UHPLC/MS analysis. The hydrolyzed compounds were dissolved in 120  $\mu\text{L}$  of a solution of L-cysteine methyl ester in pyridine (0.3 M) and incubated for 1 h at 90 °C. Then 160  $\mu\text{L}$  of a solution of phenyl isothiocyanate in pyridine (0.69 M) was added, and incubated for 1 h at 90 °C.

The reaction mixture was allowed to cool and diluted 20-fold with  $\text{CH}_3\text{CN}$  and filtered before UHPLC/MS analysis. The injection volume was 4  $\mu\text{L}$ . Each sugar standard (2 mg of L-glucose, D-glucose, L-rhamnose, D-rhamnose, L-xylose, D-xylose, L-arabinose and D-arabinose) was subjected to the same protocol, with 240  $\mu\text{L}$  of the L-cysteine methyl ester solution and 320  $\mu\text{L}$  of the phenyl isothiocyanate solution. The reaction mixtures were diluted 60-fold with  $\text{CH}_3\text{CN}$  and filtered before UHPLC/MS analysis. The injection volume was 4  $\mu\text{L}$ . The obtained solutions were analyzed with an ACQUITY UPLC BEH C18 column (100  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), Waters. The column temperature was 35 °C, and the flow rate was 0.3 mL/min. Eluent A was a mixture of water and formic acid (0.05%). Eluent B was a mixture of  $\text{CH}_3\text{CN}$ , MeOH, and iPrOH (50/25/25 v/v) with 0.05% formic acid. The gradient consisted of linear mixtures of A and B, with 14% of eluent B at  $t = 0$ , reaching 30% at  $t = 22$  min and 90% at  $t = 25$  min. Then, the return to initial conditions was achieved at  $t = 28$  min and maintained for 2 min before the next injection. Analysis of the positive extracted ion chromatograms at  $m/z$  433, 417 and 403 (corresponding to the  $[\text{M} + \text{H}]^+$  adduct for the arylthiocarbamates obtained from glucose, rhamnose, xylose and arabinose) obtained from the samples and standards allowed for the identification of the sugar moieties in compounds 1–4. The observed retention times were 11.64, 15.17, 13.90 and 12.77 min for the samples obtained from 1–3 and 11.64, 15.19, and 12.78 for the sample obtained from 4, respectively. These retention times were in agreement with those observed for D-glucose (11.65), L-rhamnose (15.19 min), D-xylose (13.94 min) and L-arabinose (12.77 min), compared to L-glucose (10.94), D-rhamnose (14.68 min), L-xylose (12.76 min), and D-arabinose (12.90 min).

## 3.5. Antiproliferative bioassay

The evaluation of the cytotoxicity of compounds 1–4 against the Caco-2 cell line (human epithelial cell line, Sigma-Aldrich) was done according to Mosmann method [14] with slight modifications. Briefly,

**Table 2**NMR spectroscopic data (500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) for the sugar moieties of compounds 1–4 ( $\delta$  in ppm)<sup>a</sup>.

Pos.	1		2		3		4	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		
<b>1-O-Sugars</b>								
<b>Glc-I</b>								
1	101.2	4.85 (1H, d, 7.6)	101.2	4.85 (1H, d, 7.4)	102.9	4.87 (1H, d, 7.7)	104.1	5.08 (1H, d, 6.2)
2	78.9	4.20	78.9	4.20	74.8	4.03	75.5	4.55
3	78.3	4.19	78.4	4.19	78.2	4.20	74.5	4.10
4	72.1	3.81	70.5	4.08	71.8	3.96	69.0	4.15
5	76.8	4.05	76.9	4.04	77.1	4.09	65.5	3.68 (1H, d, 12.2); 4.25
6	67.8	4.02 (1H, m); 4.64	67.8	4.02 (1H, m); 4.63	67.9	4.09 (1H, m); 4.67		
<b>Rha-I</b>								
1	102.3	6.24 (1H, d, 1.5)	102.4	6.23 (1H, d, 1.5)			101.7	6.23 (1H, brs)
2	71.9	4.74	72.0	4.47			72.0	4.71
3	72.5	4.54	72.5	4.53			72.3	4.62
4	73.8	4.28	73.8	4.28			73.9	4.27
5	69.8	4.01	69.5	4.01			69.4	4.67
6	18.5	1.81 (1H, d, 6.2)	18.4	1.70 (1H, d, 6.2)			18.3	1.62 (1H, d, 1.8)
<b>Rha-II</b>								
1	101.8	5.47 (1H, d, 2.0)	101.8	5.47 (1H, d, 1.3)	101.8	5.51 (1H, brs)	95.5	6.32 (1H, d, 8.1)
2	72.0	4.49	72.0	4.49	72.0	4.51	73.9	4.18
3	79.3	4.52	72.2	4.70	72.2	4.71	78.6	4.28
4	80.2	4.45	80.2	4.45	80.4	4.45	70.9	4.34
5	69.3	4.78	67.6	4.27	67.5	4.30	79.0	4.02
6	18.4	1.61 (1H, d, 1.3)	18.5	1.61 (1H, d, 6.5)	18.6	1.62 (1H, d, 6.2)	62.0	4.40 (1H, m); 4.45
<b>Glc-II</b>								
1	102.8	5.46 (1H, d, 7.6)	102.7	5.46 (1H, d, 9.1)	102.7	5.44 (1H, d, 7.0)		
2	78.7	4.01	78.7	4.02	78.8	4.01		
3	85.5	4.02	85.5	4.01	85.4	4.02		
4	69.5	4.80	69.8	4.80	69.6	4.80		
5	76.8	3.51	77.2	3.51	77.1	3.51		
6	61.7	4.15 (1H, m); 4.22	61.9	4.16 (1H, m); 4.19	61.9	4.18 (1H, m); 4.22		
<b>Araf</b>								
1	110.1	5.75 (1H, d, 2.1)	110.2	5.75 (1H, d, 2.1)	110.2	5.74 (1H, d, 2.0)		
2	82.9	4.85	82.8	4.83	82.8	4.84		
3	77.8	4.75	77.6	4.75	77.7	4.75		
4	85.8	4.75	85.8	4.75	85.8	4.76		
5	61.7	4.15 (1H, m); 4.22	62.1	4.11 (1H, d, 4.0); 4.24	62.1	4.11 (1H, m); 4.24		
<b>Rha-III</b>								
1	102.7	5.92 (1H, d, 1.6)	102.7	5.91 (1H, d, 1.5)	102.7	5.91 (1H, brs)		
2	71.7	4.80	71.7	4.79	71.6	4.80		
3	72.4	4.53	72.3	4.61	72.4	4.63		
4	73.5	4.28	73.5	4.28	73.4	4.28		
5	70.3	4.87	70.4	4.85	70.4	4.85		
6	18.4	1.79 (1H, d, 6.2)	18.4	1.79 (1H, d, 6.2)	18.4	1.78 (1H, d, 6.2)		
<b>Glc-III</b>								
1	102.2	5.62 (1H, d, 7.8)						
2	78.3	4.13						
3	87.2	4.03						
4	69.2	4.04						
5	77.4	3.52						
6	62.1	4.11 (1H, m); 4.25						
<b>Xyl</b>								
1	105.0	4.90 (1H, d, 7.6)						
2	74.6	3.91						
3	77.9	4.75						
4	70.3	4.09						
5	66.8	3.63 (1H, d, 10.6); 4.20						
<b>Rha-IV</b>								
1	102.5	6.20 (1H, d, 1.6)						
2	71.9	4.85						
3	72.4	4.62						
4	73.8	4.29						
5	69.4	4.01						
6	18.4	1.70 (1H, d, 2.0)						

Assignments were based on the HMBC, HSQC, COSY, TOCSY, NOESY and Jmod experiments.

<sup>a</sup> Overlapped  $^1\text{H}$  NMR signals are reported without designated multiplicity.

cells ( $1 \times 10^5$  cells/mL) in 100  $\mu\text{L}$  of complete medium, [DMEM High Glucose supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 1X NEAA and antibiotics (100U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin)] were seeded into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  with 95% air atmosphere. After a 24 h incubation, 100  $\mu\text{L}$  of medium with various compound's

concentrations and appropriate controls (DMSO, 0.5%final) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100  $\mu\text{L}$  of MTT solution (0.5 mg/mL in DMEM) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and

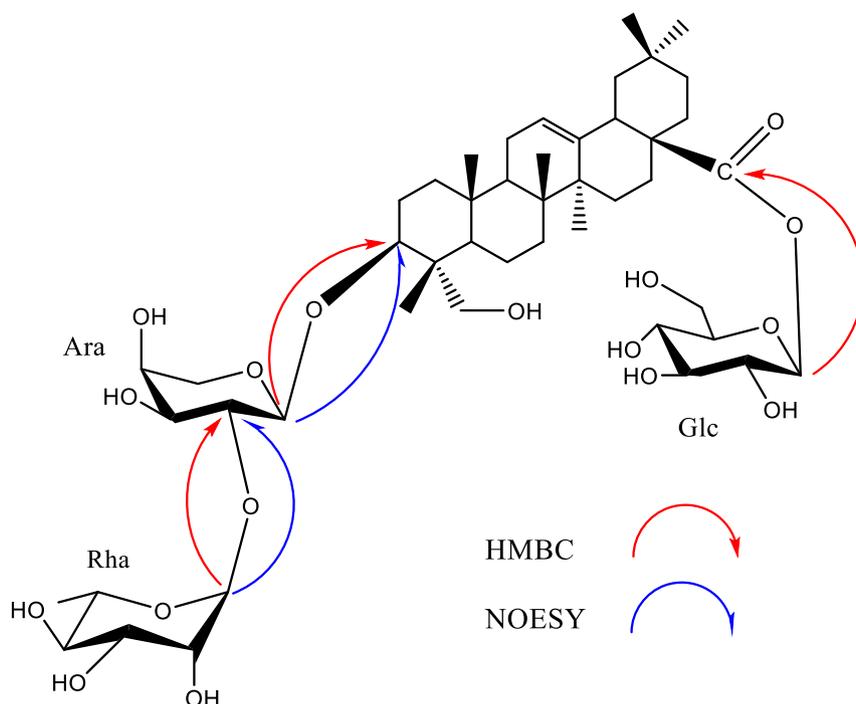


Fig. 5. Key HMBC and NOESY correlations of compound 4.

Table 3

Cytotoxic activities on human epithelial cell line (Caco-2) of compounds 1–4 of *L. cupanioides*.

Compounds	CC <sub>50</sub> (μM)
1	>25
2	>25
3	>25
4	>25
doxorubicine	13.23

CC<sub>50</sub>: Cytotoxic concentration 50%.

DMSO (100 μL) was added to dissolve the resulting formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer. DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. CC<sub>50</sub> were calculated by non-linear regression analysis processed on dose response curves, using Table Curve 2D V5 software. CC<sub>50</sub> values represent the mean value calculated from three independent experiments.

#### 4. Conclusion

Four terpenoid glycosides were isolated from the roots of *L. cupanioides*. Their structures, established from spectral data, highlighted the presence of three new farnesyl glycosides and a new saponin, a bidesmosidic derivative of hederagenin acid. Evaluated for their potential antiproliferative effect against a human epithelial cancer cell line (Caco-2), none of these new isolated compounds showed cytotoxicity. However, from a chemotaxonomic point of view, our results represent a valuable contribution to the knowledge of the chemistry of plants of the Sapindoideae subfamily of the Sapindaceae family, some of which have revealed the presence of farnesyl glycosides. It is also worthy to note that this study is the first to describe farnesyl glycosides from this family containing up to nine monosaccharides, the previous one described only up to seven monosaccharides.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

We thank the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) and UMR 152 Pharma-DEV IRD/UPS for the financial support. The authors are also grateful to Mr. Victor Nana of the National Herbarium of Cameroon (NHC) for the identification and collection of plant and to Dr Sandra Bourgeade-Delmas (UMR 152 Pharma-DEV) for performing the bioassays.

#### References

- [1] H.M. Burkill, *The Useful Plants of West Tropical Africa*, second ed., Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom, 1985, p. 2.
- [2] S.A. Adesegun, H.A.B. Coker, M.T. Hamann, *Res. J. Phytochem.* 2 (2008) 93–99.
- [3] Q.O. Nurudeen, T.O. Ajiboye, M.T. Yakubu, O.T. Owheh, O. osarieme, *J. Ethnopharmacol.* 175 (2015) 181–184.
- [4] S.A. Adesegun, H.A.B. Coker, M.T. Hamann, in: *Proceedings of the 5th Annual Conference of the Society for Medicinal Plant Research*, 2003, p. 71. Kiel, Germany.
- [5] C.O. Okore, C.M. Ugwu, P.O. Oleghe, P.A. Akpa, *Sci. Res. Essays* 2 (2007) 43–46.
- [6] M.O. Sofidiya, F.O. Jimoh, A.A. Aliero, A.J. Afolayan, O.A. Odukoya, O. B. Familoni, *Res. J. Microbiol.* 3 (2008) 91–98.
- [7] R. Encarnacion, L. Kenne, G. Samuelsson, F. Sandberg, *Phytochemistry* 20 (1981) 1939–1942.
- [8] A. Alabdul Magid, L. Voutquenne, M. Litaudon, C. Lavaud, *Phytochemistry* 66 (2005) 2714–2718.
- [9] D. Pertuit, A.-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, C. Tanaka, C. Delaude, M.-A. Lacaille-Dubois, *Phytochemistry* 152 (2018) 182–190.
- [10] R. Kasai, H. Fujino, T. Kuzuki, W.H. Wong, C. Goto, N. Yata, O. Tnaka, F. Yasuhara, S. Yamaguchi, *Phytochemistry* 25 (1986) 871–876.
- [11] A. Numata, S. Kanbara, C. Takahashi, R. Fujiki, M. Yoneda, Y. Usami, E. Fujita, *Phytochemistry* 31 (1992) 1209–1213.
- [12] W.J. Liang, Q.Y. Ma, H.Z. Jiang, J. Zhou, J. Pang, Y.-X. Zhao, *Chem. Nat. Compd.* 47 (2012) 935–939.
- [13] Y.H. Wang, B. Avula, X. Fu, M. Wang, I.A. Khan, *Planta Med.* 78 (2012) pp834–837, <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298432>.
- [14] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.



## Triterpenoid saponins from *Calliandra calothyrsus* Meisn. and their antiproliferative activity against two digestive carcinoma human cell lines



Lin Marcellin Messi<sup>a,b,c</sup>, Olivier Placide Noté<sup>a</sup>, Joséphine Ngo Mbing<sup>a,\*</sup>, Pierre Lavedan<sup>d</sup>, Marc Vedrenne<sup>d</sup>, Noufou Ouedraogo<sup>e</sup>, Maëlle Carraz<sup>c</sup>, Sandra Bourgeade-Delmas<sup>c</sup>, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb<sup>a</sup>, Mohamed Haddad<sup>c,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, Département de Chimie Organique, Faculté de Sciences, Université de Yaoundé, BP 812, Yaoundé, Cameroon

<sup>b</sup> Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD), BP 2067 Yaoundé, Cameroon

<sup>c</sup> UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, France

<sup>d</sup> Institut de Chimie de Toulouse, UPS, France

<sup>e</sup> Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (IRSS/CNRST), 03 BP 7047 Ouagadougou 03, Burkina Faso

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Calliandra calothyrsus  
Fabaceae  
Triterpenoid saponins  
Calothyrsoside  
Cytotoxicity

### ABSTRACT

The chemical investigation of the flowers and twigs of *Calliandra calothyrsus* (Fabaceae) led to the isolation of three new oleanane-type triterpenoid saponins, named calothyrsosides A–C (1–3). Their structures were established by direct interpretation of their spectral data, mainly HRESIMS, 1D NMR and 2D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H NMR DOSY, <sup>13</sup>C NMR, COSY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY and NOESY) and by comparison with literature data. Compounds 1 and 2 were tested for their antiproliferative activity against two digestive carcinoma human cell lines: Hep3B (hepatocellular carcinoma) and Caco-2 (epithelial colorectal adenocarcinoma). Both compounds exhibited an antiproliferative activity against the Hep3B cell line, with IC<sub>50</sub> values of 6.0 and 6.5 μM, respectively, while no effect was detected against the epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2 (CC<sub>50</sub> > 25 μM).

### 1. Introduction

The genus *Calliandra* (Fabaceae) is made up of about 140 species native to tropical and subtropical regions of the Americas. *Calliandra calothyrsus* Meisn. is a small leguminous tree of the Fabaceae family that is widely distributed throughout Central America and southern Mexico [1,2]. It is usually 13 to 20 ft (4 to 6 m) high but might reach 40 ft (12 m) under favorable conditions. The leaves are suitable for forage and give a higher yield than other shrub legumes, especially when grown on acid soil [3]. It has been introduced into many tropical regions where it is used in agroforestry systems for fuelwood, plantation shade, as an intercropping hedgerow and more recently as livestock forage. Acetonic extracts of the leaves of *C. calothyrsus* exhibited in vitro negative effects on eggs and larvae of *Haemonchus contortus* parasite of ruminants [4]. Previous phytochemical studies of *C. calothyrsus* revealed the presence of glycosylflavonoids of its leaves [5]. No previous phytochemical study has been reported on saponins from this plant, but studies on related species of this genus revealed the presence of triterpenoid saponins, consisting mainly of glycosides of oleanolic acid

and echinocystic acid as aglycon with an Ara<sup>2</sup>Ara<sup>6</sup>GlcNAc<sup>3</sup>Agly oligosaccharidic sequence commonly encountered [6–12]. In this paper, we describe the isolation and structure elucidation of three new triterpenoid saponins designated as calothyrsosides A–C (1–3). Compounds 1 and 2 were tested for their antiproliferative effects on two digestive cancer cell lines, i.e. Hep3B (hepatocellular carcinoma) and Caco-2 (epithelial colorectal adenocarcinoma).

### 2. Experimental

#### 2.1. General experimental procedures

Optical rotations were measured on a Jasco P-2000 polarimeter. NMR experiments were performed at 298 K in pyridine-*d*<sub>5</sub> and D<sub>6</sub>MSO on a Bruker AVANCE 500 MHz spectrometer equipped with a 5 mm Z-gradient TCI cryoprobe. HRESIMS spectra were recorded using a UHPLC-DAD-LTQ Orbitrap XL instrument (Thermo Fisher Scientific, UK) equipped with an electrospray ionization source (ESI). Isolations were carried out using a medium-pressure liquid chromatography

\* Correspondence to : Joséphine Ngo Mbing, Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, Faculté de Sciences, Université de Yaoundé, Yaoundé, Cameroon.

\*\* Correspondence to : Mohamed Haddad, UMR 152 PHARMA-DEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France.

E-mail addresses: [jpmbing15@gmail.com](mailto:jpmbing15@gmail.com) (J.N. Mbing), [mohamed.haddad@ird.fr](mailto:mohamed.haddad@ird.fr) (M. Haddad).

(MPLC) system [Buchi Pump manager C-615, Buchi Pump module C-605, Column Buchi, borosilikat (460 × 25 mm and 460 × 15 mm)] and column chromatography (CC) on reversed-phase RP-18 silica gel 60 (25–40 μm). Thin layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated silica gel plates (60 F<sub>254</sub>, Merck) using the system solvent *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O, 60:15:25 as eluent. Vacuum-liquid chromatography (VLC) was carried out using RP-18 silica gel 60 (25–40 μm) and silica gel 60 (15–40 μm and 40–63 μm). The spray reagent for saponins was vanillin reagent (10% mixture of conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soln. and 1% vanillin in EtOH).

## 2.2. Plant material

The flowers and branches of *Calliandra calothyrsus* Meisn. were harvested at Nkolbisson, Yaoundé peripheral quarter, in Cameroon in June 2017 under the guidance of Mr. Paul Nana, botanist of the National Herbarium of Cameroon (NHC), where one specimen (52,065/HNC) was deposited.

## 2.3. Extraction and isolation

The methanolic extract (122 g) of the flowers of *C. calothyrsus* (750 g) was suspended in 200 mL of H<sub>2</sub>O and partitioned successively with hexane, ethyl acetate and *n*-BuOH sat.H<sub>2</sub>O. The *n*-BuOH-soluble fraction (23.5 g) was precipitated in 400 mL H<sub>2</sub>O for 48 h to separate the saponins from the tannins. After filtration, the *n*-BuOH soluble phase was evaporated to dryness to afford (6 g) brown gum residue and dissolved in 10 mL of H<sub>2</sub>O and then submitted to vacuum-liquid chromatography (VLC) using RP-18 silica gel 60 (25–40 μm) eluted with a gradient of MeOH-H<sub>2</sub>O (100% H<sub>2</sub>O to 100%MeOH). The 65–85% MeOH fraction (3.32 g) was subjected to MPLC using silica gel 60 (15–40 μm) eluted with gradient system of CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:5 and 65:35:10, lower phase) to give six main subfractions (B1-B6). Subfraction B6 (1.7 g) was purified by MPLC using gradient system (70:30:5 and 65:35:10, lower phase) to give ten other subfractions Fr1 to Fr 10. Fr 7 (113 mg) and Fr 8 (150 mg) were purified by MPLC using silica gel 60 (15–40 μm) eluted with gradient system of CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:5 and 65:35:10, lower phase) to give **1** (19.7 mg) and **2** (30.0 mg).

The methanolic extract (10 g) of the branches of *C. calothyrsus* (300 g) was suspended in 200 mL of H<sub>2</sub>O and partitioned successively with hexane, ethyl acetate and *n*-BuOH sat.H<sub>2</sub>O. The *n*-BuOH-soluble fraction (1.8 g) were dissolved in 10 mL of H<sub>2</sub>O and then submitted to vacuum-liquid chromatography (VLC) using RP-18 silica gel 60 (25–40 μm) eluted with a gradient of MeOH-H<sub>2</sub>O (100% H<sub>2</sub>O → 100% MeOH). The 65–85% MeOH fraction (500 mg) was subjected to MPLC using silica gel 60 (15–40 μm) eluted with gradient system of CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:5 and 65:35:10, lower phase) to give eleven main subfractions (F1-F11). Subfraction F9 (20 mg) was purified by CC using reversed-phase RP-18 silica gel 60 (25–40 μm) eluted with isocratic system MeOH-H<sub>2</sub>O (60:40) to give compound **3** (3 mg).

### 2.3.1. Calothyrsusoside A (**1**)

White amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) data, see Tables 1 and 2; HR-ESI-MS *m/z* 1960.8799 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>86</sub>H<sub>139</sub>NO<sub>47</sub>Na<sup>+</sup>, 1960.8415).

### 2.3.2. Calothyrsusoside B (**2**)

White amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz), see Tables 1 and 2; HR-ESI-MS: *m/z* 1798.7714 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>80</sub>H<sub>129</sub>NO<sub>42</sub>Na<sup>+</sup>, 1798.7886).

### 2.3.3. Calothyrsusoside C (**3**)

White amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>6</sub>MSO, 500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (D<sub>6</sub>MSO, 125 MHz), see Tables 1 and 2; HR-ESI-MS: *m/z* 1858.9049 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>83</sub>H<sub>135</sub>NO<sub>44</sub>Na<sup>+</sup>, 1858.8098).

**Table 1**

NMR spectroscopic data (500 MHz for <sup>1</sup>H and 125 MHz for <sup>13</sup>C) for the aglycone moieties of compounds **1–3** (δ in ppm and *J* in Hz)<sup>a</sup>.

Pos	1		2		3	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1	38.7 (CH <sub>2</sub> )	1.06 1.65	38.5 (CH <sub>2</sub> )	1.06 1.64	38.6 (CH <sub>2</sub> )	0.94 1.53
2	26.3 (CH <sub>2</sub> )	1.92 2.30	26.3 (CH <sub>2</sub> )	1.89 2.29	26.1 (CH <sub>2</sub> )	1.50 1.80
3	89.9 (CH)	3.40 (1H, brd, 13.7)	89.2 (CH)	3.35 (1H, brd, 13.2)	88.3 (CH)	3.06 (1H, brd, 13.6)
4	39.7 (C)	–	39.9 (C)	–	39.0 (C)	–
5	55.5 (CH)	0.88 (1H, d, 12.5)	55.8 (CH)	0.86 (1H, brd, 4.8)	55.4 (CH)	0.71 m
6	18.2 (CH <sub>2</sub> )	1.44 1.63	18.4 (CH <sub>2</sub> )	1.41 1.64	18.2 (CH <sub>2</sub> )	1.25 1.45
7	33.3 (CH <sub>2</sub> )	1.02 1.68	33.1 (CH <sub>2</sub> )	1.01 1.69	32.9 (CH <sub>2</sub> )	1.30 1.41
8	39.9 (C)	–	41.9 (C)	–	39.4 (C)	–
9	46.9 (CH)	1.84	47.1 (CH)	1.82	46.5 (CH)	1.53
10	36.8 (C)	–	36.7 (C)	–	36.6 (C)	–
11	23.6 (CH <sub>2</sub> )	2.02 2.12	23.4 (CH <sub>2</sub> )	2.02 2.11	22.6 (CH <sub>2</sub> )	1.25 1.32
12	122.4 (CH)	5.67 (1H, brs)	122.4(CH)	5.64 (1H, brs)	122.0 (CH)	5.23 (1H, brs)
13	144.6 (C)	–	144.3 (C)	–	143.7 (C)	–
14	41.9 (C)	–	42.0 (C)	–	41.4 (C)	–
15	35.8 (CH <sub>2</sub> )	2.03 2.32	35.8 (CH <sub>2</sub> )	2.04 2.40	35.1 (CH <sub>2</sub> )	1.29 1.61
16	73.8 (CH)	5.24 (1H, brs)	73.8 (CH)	5.24 (1H, brs)	73.3 (CH)	4.35 (1H, brs)
17	49.1 (C)	–	49.1 (C)	–	48.3 (C)	–
18	41.2 (CH)	3.42 (1H, d, 14.3)	41.2 (CH)	3.42 (1H, d, 13.2)	40.7 (CH)	2.84 (1H, d, 14.4)
19	47.3 (CH <sub>2</sub> )	1.38 m  2.78 m	47.2 (CH <sub>2</sub> )	1.35  2.77(1H, t, 13.9)	47.1 (CH <sub>2</sub> )	1.01 (1H, brd, 11.4) 2.25 m
20	30.5 (C)	–	30.4 (C)	–	30.6 (C)	–
21	35.6 (CH <sub>2</sub> )	1.33 m 2.42 (1H, d, 13.3)	35.6 (CH <sub>2</sub> )	1.30 m 2.40 m	35.5 (CH <sub>2</sub> )	1.10 m 1.93 m
22	31.5 (CH <sub>2</sub> )	2.19 2.43	31.8 (CH <sub>2</sub> )	2.16 2.43	31.1 (CH <sub>2</sub> )	1.65 1.83
23	27.9 (CH <sub>3</sub> )	1.27 (s)	28.1 (CH <sub>3</sub> )	1.25 (s)	28.0 (CH <sub>3</sub> )	0.90 (s)
24	16.9 (CH <sub>3</sub> )	1.03 (s)	16.9 (CH <sub>3</sub> )	0.98 (s)	16.9 (CH <sub>3</sub> )	0.65 (s)
25	15.5 (CH <sub>3</sub> )	0.94 (s)	15.5 (CH <sub>3</sub> )	0.86 (s)	15.7 (CH <sub>3</sub> )	0.86 (s)
26	17.2 (CH <sub>3</sub> )	1.17 (s)	17.3 (CH <sub>3</sub> )	1.10 (s)	17.1 (CH <sub>3</sub> )	0.67 (s)
27	27.1 (CH <sub>3</sub> )	1.87 (s)	27.0 (CH <sub>3</sub> )	1.85 (s)	27.0 (CH <sub>3</sub> )	1.31 (s)
28	176.3	–	176.1	–	174.9	–
29	33.0 (CH <sub>3</sub> )	1.02 (s)	33.0 (CH <sub>3</sub> )	0.95 (s)	33.4 (CH <sub>3</sub> )	0.84 (s)
30	24.4 (CH <sub>3</sub> )	1.05 (s)	24.5 (CH <sub>3</sub> )	0.97 (s)	24.7 (CH <sub>3</sub> )	0.90 (s)

Assignments were based on the HMBC, HSQC, COSY and J mod experiments. nf: not found.

<sup>a</sup> Overlapped <sup>1</sup>H NMR signals are reported without designated multiplicity

## 2.4. Acid hydrolysis and sugar analysis

Each saponin (2 mg in MeOH) was hydrolyzed with 2 mL of 2 M HCl at 85 °C during 2 h. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. The sugar mixture was extracted from the aqueous phase (10 mL) and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). The combined CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extracts were washed with water to give after evaporation the aglycone moiety. The sugars were first analyzed by TLC over silica gel (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O, 8:5:1) by comparison with standard samples. The absolute configuration of each monosaccharide was determined from

**Table 2**  
NMR spectroscopic data (500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) for the sugar moieties of compounds 1–3 ( $\delta$  in ppm)<sup>a)</sup>.

Pos.	1		2		3	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>3-O-Sugars</b>						
GlcNHAc						
1	104.4	5.11 (1H, d, 7.1)	104.6	5.05 (1H, d, 7.8)	103.8	4.29 (1H, d, 8.2)
2	57.1	4.61 (1H, d, 8.5)	57.3	4.59 m	56.1	3.42
3	74.9	4.05	75.1	4.44	74.1	3.14
4	71.7	4.31	72.3	4.13	71.5	3.57
5	75.4	4.12	75.4	4.07	74.3	3.29
6	69.0	4.25; 4.60 (1H, d, 8.5)	69.1	4.20 (1H, brd, 4.8); 4.61 m	68.4	3.53; 3.88 (1H, brd, 9.0)
NHCOCH <sub>3</sub>	23.3	2.35	23.2	2.28	23.8	1.77
Ara-I						
1	102.2	5.06 (1H, d, 6.2)	102.2	5.06 (1H, d, 4.6)	101.5	4.48 (1H, d, 4.5)
2	79.5	4.54	79.5	4.54	79.4	3.57
3	72.4	4.40	72.4	4.37	77.5	3.88
4	67.5	4.45	67.5	4.40	71.0	3.47
5	64.6	3.80 (1H, dd, 10.7; 13.8); 4.34	64.4	3.76 (1H, t, 12.0); 4.30	63.5	3.37; 3.68
Ara-II						
1	105.2	5.04 (1H, d, 7.5)	105.5	5.02 (1H, d, 6.8)	105.1	4.26 (1H, d, 7.3)
2	79.8	4.50	80.0	4.50	74.4	3.02
3	73.5	3.97	73.8	4.13	76.5	3.17
4	68.7	4.27	68.7	4.30	69.9	3.32
5	66.6	3.49; 4.36 m	66.3	4.29; 4.44 (1H, brd, 10.3)	66.2	3.10 (1H, d, 10.4); 3.75
Ara-III						
1	102.0	5.13 (1H, d, 6.7)	102.2	5.13 (1H, d, 5.1)		
2	79.8	4.52	80.0	4.51		
3	71.9	4.46	72.1	4.14		
4	67.1	4.50	67.0	4.30		
5	63.9	3.83 (1H, dd, 10.7; 13.8); 4.36	63.7	3.78 (1H, t, 12.0); 4.33		
Xyl-I						
1	105.4	4.99 (1H, d, 7.5)	105.7	4.96 (1H, d, 7.5)		
2	74.8	4.03	75.0	4.04		
3	77.1	4.19	77.4	4.15		
4	70.4	4.18	70.6	4.18		
5	66.5	3.65 m; 4.46	66.8	4.28; 4.44 (1H, brd, 10.3)		
Glc-I						
					103.5	4.42 (1H, d, 8.0)
					72.7	3.47
					75.6	3.31
					70.9	3.46
					76.9	3.18
					61.0	3.45; 3.63
<b>28-O-Sugars</b>						
Glc-I						
1	94.8	6.07 (1H, d, 7.8)	94.6	6.12 (1H, d, 7.8)	Glc-II	
2	77.7	4.09	76.3	4.31	93.7	5.30 (1H, d, 7.6)
3	77.2	4.20	75.4	4.43	77.1	3.28
4	70.6	4.24	70.9	4.27	76.8	3.55
5	78.5	4.04	78.8	4.03	70.1	3.52
6	61.5	4.30 (1H, d, 8.7); 4.43	61.7	4.32; 4.44 (1H, brd, 10.3)	77.7	3.20
					61.5	3.45; 3.59
Rha						
1	101.7	5.89 (1H, brs)	101.0	6.35 (1H, brs)	100.7	4.95 (1H, brs)
2	70.3	5.24	70.1	4.82	68.9	4.13
3	82.3	4.93	72.1	4.69	81.2	3.87
4	77.9	4.07	83.4	4.42	76.9	3.54
5	68.8	4.32	68.1	4.48	67.7	3.63
6	18.7	1.76 (1H, d, 6.0)	18.8	1.76 (1H, d, 6.0)	18.4	1.15 (1H, brd, 5.5)
Xyl-II						
1	103.9	5.54 (1H, d, 7.5)	105.8	5.20 (1H, d, 7.5)	Xyl-I	
2	74.2	4.06	74.6	4.06	103.2	4.67 (1H, d, 7.6)
3	87.4	4.19	87.1	4.06	73.5	3.14
4	69.2	4.10	68.7	4.29	86.9	3.35
5	65.9	3.58 (1H, t, 11.1); 4.23	66.4	4.22; 4.43 (1H, brd, 10.3)	68.6	3.39
					65.6	3.11 (1H, d, 10.4); 3.77
Xyl-III						
1	105.4	5.23 (1H, d, 7.9)	105.6	5.14 (1H, d, 7.0)	Xyl-II	
2	74.9	4.05	74.8	4.04	104.8	4.39 (1H, d, 5.2)
3	77.0	4.21	77.3	4.15	74.2	3.10
4	70.2	4.20	70.4	4.17	76.5	3.15
5	66.5	3.71 (1H, brd, 8.6); 4.27	66.8	4.30; 4.43 (1H, brd, 10.3)	68.9	3.37
					66.1	3.09; 3.74 (1H, brd, 5.5)
Glc-II						
1	104.7	5.35 (1H, d, 7.8)			Glc-III	
					103.8	4.40 (1H, d, 7.8)

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Pos.	1		2		3	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
2	74.9	4.17			74.1	3.11
3	77.2	4.21			76.5	3.31
4	71.0	4.09			70.3	3.52
5	77.5	3.98			76.8	3.16
6	62.0	4.20 (1H, d, 11.1); 4.51			61.4	3.46; 3.68

Assignments were based on the HMBC, HSQC, COSY, TOCSY, NOESY and Jmod experiments.

<sup>a</sup>)Overlapped <sup>1</sup>H NMR signals are reported without designated multiplicity.

GC-MS analysis of their trimethylsilylated derivatives by comparison with authentic samples using the method previously described [13]. The following sugars were detected: D-glucose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose and N-acetylglucosamine.

### 2.5. Antiproliferative bioassays

The antiproliferative activity of compounds **1** and **2** was assessed against the human hepatocarcinoma cell line Hep3B. Hep3B cells were grown in a sterile medium DMEM supplemented with 10% of heat inactivated fetal bovine serum, L-glutamine, sodium pyruvate and non-essential amino acids, at 37 °C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Hep3B cells were seeded as 5000 cells per well in 96-well microplates. After 24 h, Hep3B cells were incubated for 48 h with the isolated compounds with a concentration range from 0.001 to 100 µg/mL containing 0.1% of DMSO. The antiproliferative activity was then evaluated by luminescence using the ATPlite assay (Perkin Elmer) according to the previous described method [14]. Inhibitory concentrations at 50% (IC<sub>50</sub>) of cell growth were calculated with the GraphPad Prism 6.0 software, compiling 3 independent experiments.

The evaluation of the cytotoxicity of compounds **1** and **2** against the Caco-2 cell line (human epithelial cell line, Sigma-Aldrich) was done according to Mosmann method with slight modifications. Briefly, cells (1.10<sup>5</sup> cells/mL) in 100 µL of complete medium, [DMEM High Glucose supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 1 × NEAA and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin)] were seeded into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> with 95% air atmosphere. After a 24 h incubation, 100 µL of medium with various compound's concentrations and appropriate controls (DMSO, 0.5%final) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 µL of MTT solution (0.5 mg/mL in DMEM) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 µL) was added to dissolve the resulting formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer. DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. CC<sub>50</sub> were calculated by non-linear regression analysis processed on dose-response curves, using Table Curve 2D V5 software. CC<sub>50</sub> values represent the mean value calculated from three independent experiments.

### 3. Results and discussion

The methanolic extract of the flowers and branches of *C. calothyrsus* was purified by multiple chromatographic steps over silica gel and reversed phase. This purification yielded three undescribed saponins, calothyrsusoside A (**1**), calothyrsusoside B (**2**) and calothyrsusoside C (**3**) (Fig. 1). Their structures were established by extensive analysis of NMR techniques, mainly 1D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) and 2D NMR (COSY,

NOESY, HSQC, HSQC-TOCSY and HMBC) experiments, HRESIMS and by comparison with the literature data.

Compound **1** was obtained as a white amorphous powder. The HRESIMS (positive-ion mode) exhibited a pseudomolecular ion peak at *m/z* 1960.8799 [M + Na]<sup>+</sup>, (calcd for C<sub>86</sub>H<sub>139</sub>NO<sub>47</sub>Na 1960.8415) indicating a molecular formula of C<sub>86</sub>H<sub>139</sub>NO<sub>47</sub>. Extensive analysis of 1D and 2D-NMR spectra (<sup>1</sup>H NMR, <sup>1</sup>H NMR DOSY, <sup>13</sup>C-JMOD, COSY, NOESY, HSQC, TOCSY and HMBC) indicated the presence of seven tertiary methyl groups at  $\delta_H$  0.94 (s, H-25), 1.02 (s, H-29), 1.03 (s, H-30), 1.05 (s, H-24), 1.17 (s, H-26), 1.27 (s, H-23) and 1.87 (s, H-27) showing correlations in the HSQC spectrum with their corresponding carbons at  $\delta_C$  15.5 (C-25), 33.0 (C-29), 24.4 (C-30), 16.9 (C-24), 17.2 (C-26), 27.9 (C-23) and 27.1 (C-27), respectively. Furthermore, other characteristic signals were observed such as one olefinic proton at  $\delta_H$  5.67 (1H, brs, H-12) showing HSQC correlation with  $\delta_C$  122.4 (C-12) and one quaternary carbon at  $\delta_C$  144.6 (C-13) and one oxymethine protons at  $\delta_H$  3.40 (brd, *J* = 13.7 Hz, H-3), in accordance with the typical signals of an olefin-12-ene skeleton. The downfield position of the axial group at C-14 (Me-27,  $\delta_C$  1.87) in the <sup>1</sup>H NMR spectrum, implied an additional axial ( $\alpha$ ) hydroxyl group at C-16. The locations of oxygenated methines were deduced to be at C-3 and C-16 also by HMBC cross peaks at  $\delta_H$  1.27 (H-23)/ $\delta_C$  89.9 (C-3), and COSY cross peak at  $\delta_H$  2.04 (H-15)/ $\delta_H$  5.24 (H-16). NOESY cross peaks at  $\delta_H$  3.40 (H-3)/ $\delta_H$  0.88 (d, *J* = 12.5 Hz, H-5),  $\delta_H$  2.04 (H-15)/ $\delta_H$  1.17 (H-26),  $\delta_H$  4.61 (H-16)/ $\delta_H$  2.04 (H-15), revealed the  $\alpha$ -orientation of H-3 and  $\beta$ -orientation of H-16, confirming the stereochemistry of the aglycone. The aglycone moiety of **1** was thus recognized to be echinocystic acid by <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR analyses (Table 1) using the correlations observed in COSY, NOESY, HSQC, and HMBC spectra, and was in full agreement with literature data [15–17]. The chemical shifts of C-3 ( $\delta_C$  89.9) and C-28 ( $\delta_C$  176.3) (Table 1) indicated that **1** is a bidesmosidic glycoside [18–20] of echinocystic acid with sugar chains linked to C-3 and C-28 of the aglycone through an glycosidic bond and acylglycosidic bond, respectively. The sugar moieties of **1** were determined to be D-glucose (Glc), L-rhamnose (Rha), D-acetamidoglucose (GlcNAc), D-xylose (Xyl) and L-arabinose (Ara) by acid hydrolysis followed by GC analysis of their trimethylsilylated derivatives and comparison with authentic samples (Section 2). The <sup>1</sup>H NMR spectrum of the sugar portion of compound **1** showed ten anomeric signals at  $\delta_H$  5.11 (d, *J* = 7.1 Hz, GlcNAc H-1), 5.06 (d, *J* = 6.2 Hz, Ara I H-1), 5.04 (d, *J* = 7.5 Hz, Ara II H-1), 5.13 (d, *J* = 6.7 Hz, Ara III H-1), 4.99 (d, *J* = 7.5 Hz, Xyl I H-1), 6.07 (d, *J* = 7.8 Hz, Glc I H-1), 5.89 (brs, Rha H-1), 5.54 (d, *J* = 7.5 Hz, Xyl II H-1), 5.23 (d, *J* = 7.9 Hz, Xyl III H-1) and 5.35 (d, *J* = 7.8 Hz, Glc II H-1), which correlated with ten anomeric carbon atom resonances at  $\delta_C$  104.4, 102.2, 105.2, 102.0, 105.4, 94.8, 101.7, 103.9, 105.4 and 104.7, respectively in the HSQC spectrum (Table 2). All proton signals of the sugar moieties were identified by careful analysis of the COSY, HSQC-TOCSY and NOESY spectra. Carbon assignment was based on HSQC and further confirmed by HMBC spectrum (Table 2). The sugar unit with anomeric signal at  $\delta_H$  5.11 (*J* = 7.1 Hz) was assigned to a 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucose unit. The characteristic signals were at  $\delta_H$  9.28 (d, *J* = 8.0 Hz, NHAc) and at  $\delta_H$  2.35 (s, NHCO-CH<sub>3</sub>) [15]. This

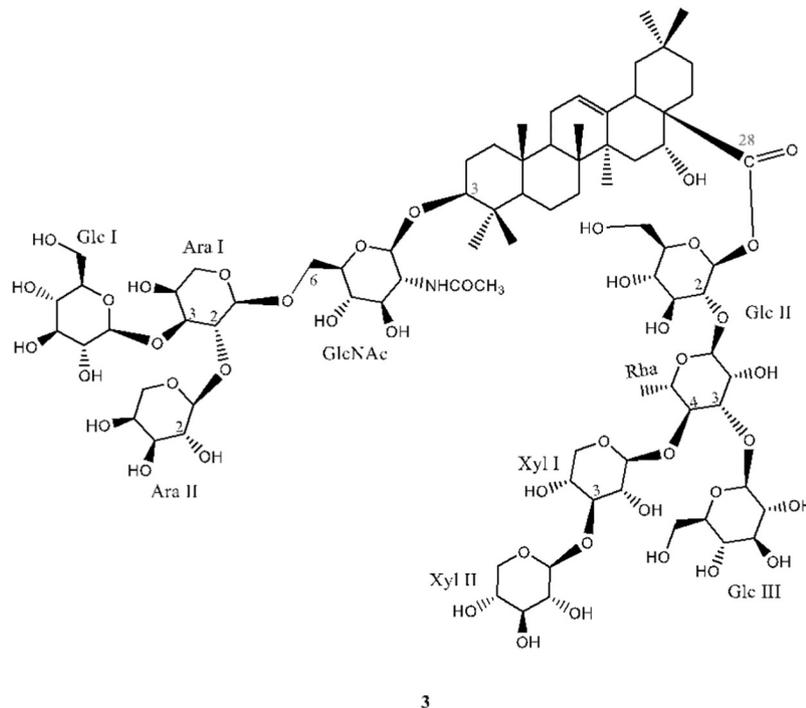
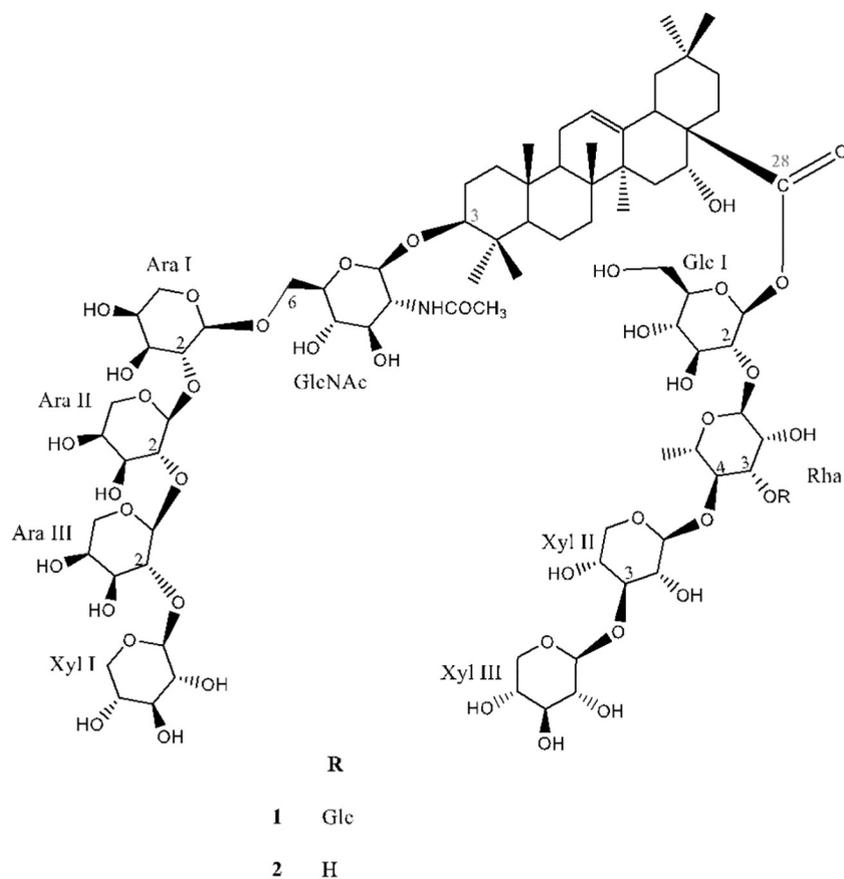


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–3.

was supported by the HMBC correlation observed between  $\delta_{\text{H}}$  4.61 (H-2) of GlcNAc and the carbonyl signal at  $\delta_{\text{C}}$  172.3 (NH-CO-CH<sub>3</sub>). Data from the above experiments indicated that Glc, GlcNAc, Xyl and Ara were in their pyranose form. The anomeric proton of Xyl I, II and III was determined to have the  $\beta$ -orientation based on its relatively large  $[^3\text{J}]_{\text{H}}$ .

$1, \text{H}-2$  value 7.5, 7.6 and 7.9 Hz, respectively. The remaining anomeric protons of Glc, GlcNAc were determined to have  $\beta$  anomeric configuration and  $\alpha$  anomeric configuration for Ara, based on their relative large  $[^3\text{J}]_{\text{H}-1, \text{H}-2}$  values (6.2–7.5 Hz) in their pyranose form. The sequencing of the glycoside chains was achieved by analysis of HMBC and

NOESY experiments. The cross-peak correlations observed in the HMBC correlations between H-1 of GlcNAc ( $\delta_H$  5.11  $J = 7.1$  Hz) and C-3 of the aglycone ( $\delta_C$  89.9), and in the NOESY spectrum between H-1 of GlcNAc ( $\delta_H$  5.11,  $J = 7.1$  Hz) and H-3 of echinocystic acid ( $\delta_H$  3.40,  $J = 13.7$  Hz), suggested that GlcNAc is directly attached to C-3 of the aglycone. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 of Ara I ( $\delta_H$  5.06,  $J = 6.2$  Hz) and C-6 of GlcNAc ( $\delta_C$  69.0) established the connectivity between the two sugar units, which was confirmed by the NOESY correlation observed between H-6 of GlcNAc ( $\delta_H$  4.60) and H-1 of Ara I ( $\delta_H$  5.06,  $J = 6.2$  Hz). HMBC correlation observed between H-1 of Ara II ( $\delta_H$  5.04,  $J = 7.5$  Hz) and C-2 of Ara I ( $\delta_C$  79.5) allowed us to locate Ara II at C-2 of Ara I. This was supported by the NOESY correlation observed between H-1 of Ara II ( $\delta_H$  5.04,  $J = 7.5$  Hz) and H-2 of Ara I ( $\delta_H$  4.54). This Ara II was substituted at its C-2 by Ara III, as evidenced by the direct and reverse correlations observed in the HMBC spectrum between H-1 of Ara III ( $\delta_H$  5.13,  $J = 6.7$  Hz) and C-2 of Ara II ( $\delta_C$  79.8) and between H-2 of Ara II ( $\delta_H$  4.50) and C-1 of Ara III ( $\delta_C$  102.0). This was supported by the NOESY correlation observed between H-1 of Ara III ( $\delta_H$  5.13  $J = 6.7$  Hz) and H-2 of Ara II ( $\delta_H$  4.50). Furthermore, HMBC correlation observed between H-1 of Xyl I ( $\delta_H$  4.99,  $J = 7.5$  Hz) and C-2 of Ara III ( $\delta_C$  79.8) allowed us to locate Xyl I at C-2 of Ara III. This was supported by the NOESY correlation observed between H-1 of Xyl I ( $\delta_H$  4.99,  $J = 7.5$  Hz) and H-2 of Ara III ( $\delta_H$  4.52). The terminal position of Xyl I was evidenced by the absence of any  $^{13}\text{C}$  NMR glycosylation shifts for this sugar moiety. Thus, the pentasaccharide  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety was established to be linked at C-3 of the aglycone (Fig. 2).

For the sugar chain attached at C-28 of the aglycone, the cross peak

observed in the HSQC spectrum at  $\delta_H$  6.07/  $\delta_C$  94.8 (Glc I H-1/C-1) suggested that this sugar should be directly attached to C-28 of the aglycone through an acylglycosidic bond. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 ( $\delta_H$  6.07,  $J = 7.8$  Hz) of Glc I and C-28 ( $\delta_C$  176.3) of the aglycone supported this location. The direct correlation observed in the HMBC spectrum between H-1 of Rha ( $\delta_H$  5.89) and C-2 of Glc I ( $\delta_C$  77.7) and the NOESY correlation observed between H-1 of Rha ( $\delta_H$  5.89) and H-2 of Glc I ( $\delta_H$  4.09) allowed us to locate Rha at C-2 of Glc I. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 of Xyl II ( $\delta_H$  5.54,  $J = 7.5$  Hz) and C-4 of Rha ( $\delta_C$  77.9) permitted us to attach Xyl II at C-4 of Rha. This was supported by the NOESY correlation observed between H-1 of Xyl II ( $\delta_H$  5.54  $J = 7.5$  Hz) and H-4 of Rha ( $\delta_H$  4.07). The direct and reverse correlations observed in the HMBC spectrum between H-1 of Xyl III ( $\delta_H$  5.23,  $J = 7.9$  Hz) and C-3 of Xyl II ( $\delta_C$  87.4) and between H-3 of Xyl II ( $\delta_H$  4.19) and C-1 of Xyl III ( $\delta_C$  105.4), and the NOESY correlation observed between H-1 of Xyl III ( $\delta_H$  5.23,  $J = 7.9$  Hz) and H-3 of Xyl II ( $\delta_H$  4.19) allowed us to locate Xyl III at C-3 of Xyl II. The terminal position of Xyl III was evidenced by the absence of any  $^{13}\text{C}$  NMR glycosylation shifts for this sugar moiety. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 ( $\delta_H$  5.35,  $J = 7.6$  Hz) of Glc II and C-3 ( $\delta_C$  82.3) of Rha permitted us to attach Glc II at C-3 of Rha. Thus, the pentasaccharide  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)[- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety was established to be attached at C-28 of the aglycone (Fig. 2). Based on the above evidences, the structure of compound 1 was established as 3-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)]-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl] echinocystic acid 28-O-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)[- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\alpha$ -L-

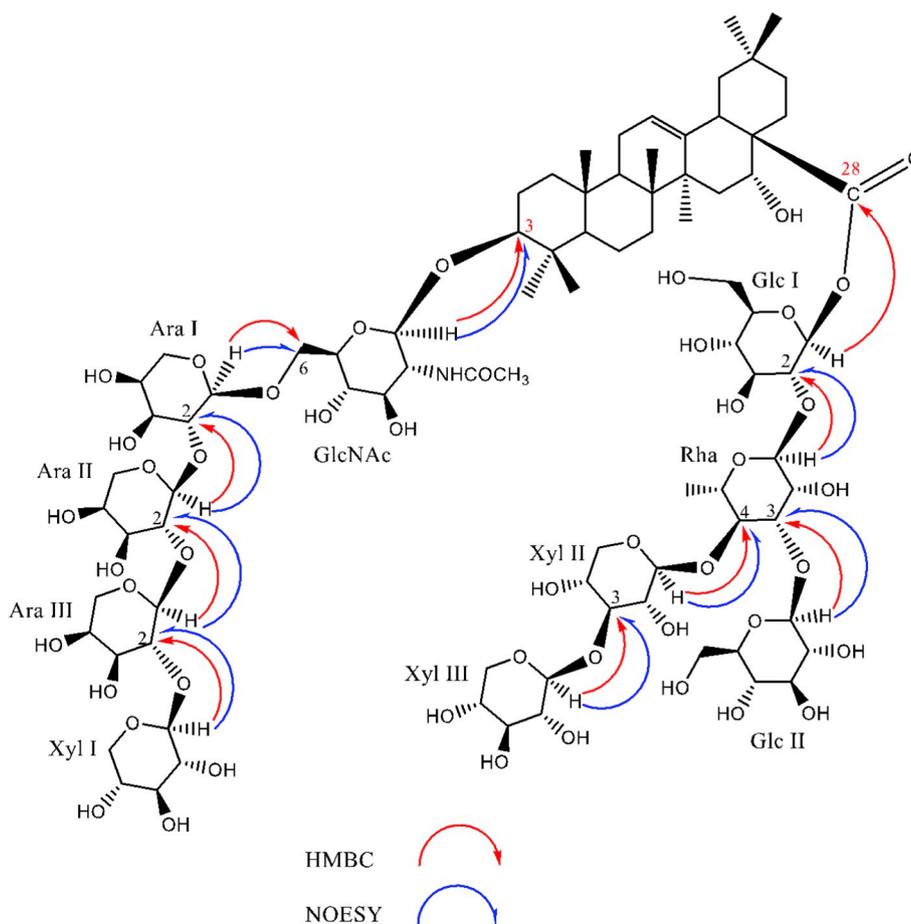


Fig. 2. Key HMBC and NOESY correlations of compound 1.

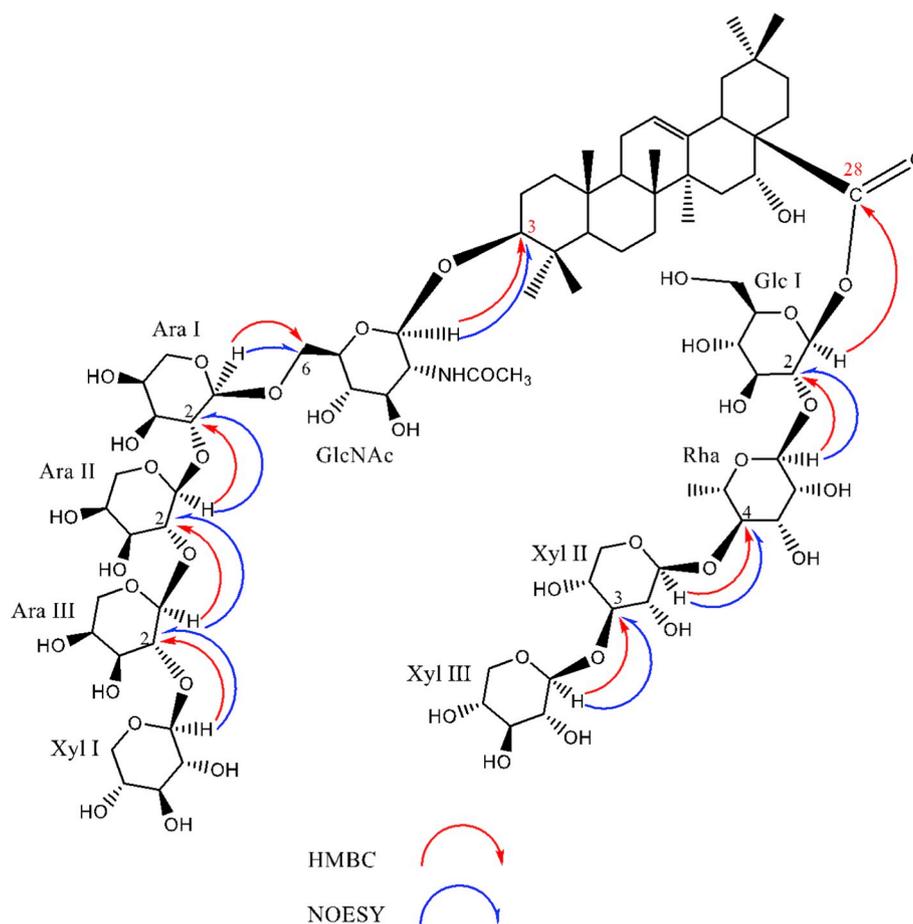


Fig. 3. Key HMBC and NOESY correlations of compound 2.

rhamnopyranosyl-(1 → 2)-β-D-glucopyranosyl ester.

Compound 2 was obtained as a white amorphous powder. The HRESIMS (positive-ion mode) exhibited a pseudo-molecular ion peak at  $m/z$  1798.7714  $[M + Na]^+$  (calcd for  $C_{80}H_{129}NO_{42}Na$ , 1798.7886) indicating a molecular formula of  $C_{80}H_{129}NO_{42}$ . Analysis of the  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra of 2 and comparison with compound 1 and literature data allowed the identification of echinocystic acid as aglycone (Table 1). The presence of nine monosaccharide units was suggested by the nine anomeric protons at  $\delta_H$  5.05 [d,  $J = 7.8$  Hz, acetamidoglucose (GlcNAc)], 5.06 (d,  $J = 4.6$  Hz, Ara I H-1), 5.02 (d,  $J = 6.8$  Hz, Ara II H-1), 5.13 (d,  $J = 5.1$  Hz, Ara III H-1), 4.96 (d,  $J = 7.5$  Hz, Xyl I H-1), 6.12 (d,  $J = 7.8$  Hz, Glc I H-1), 6.35 (brs, Rha H-1), 5.20 (d,  $J = 7.5$  Hz, Xyl II H-1), and 5.14 (d,  $J = 7.0$  Hz, Xyl III H-1), which correlated in the HSQC spectrum with  $\delta_C$  104.6, 102.2, 105.5, 102.2, 105.7, 94.6, 101.0, 105.8, and 105.6, respectively. Comparison of the NMR spectra of compounds 1 and 2 revealed that the sugar moiety at C-3 was identical to that of 1. These two compounds differ slightly only by the sugar chain attached at C-28 of the aglycone, which showed the disappearance of the signals of the glucopyranosyl unit previously attached at C(3) of Rha (Table 2) ( $\delta_C$  82.3) in compound 1 as evidenced from the observation of the shielded signal ( $-10.2$  ppm) of C-3 of Rha in compound 2 ( $\delta_C$  72.1) in comparison to C-3 of Rha ( $\delta_C$  82.3) in compound 1 (Fig. 3). From these data and by comparison of the NMR data with literature values [6–9], the structure of 2 was elucidated as 3-O-[β-D-xylopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 6)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl] echinocystic acid 28-O-[β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-β-L-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-β-D-glucopyranosyl ester.

Compound 3 was obtained as a white amorphous powder. Its

molecular formula  $C_{82}H_{133}NO_{44}$  was deduced from its HRESIMS in positive-ion mode which exhibited a pseudo-molecular ion peak  $[M + Na]^+$  at  $m/z$  1858.9049 (calcd 1858.8098 for  $C_{82}H_{133}NO_{44}Na$ ). Comparison of the  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR signals due to the aglycone part of 3 to those of 1 and 2, revealed that the aglycone of compound 3 was also echinocystic acid. The  $^1H$  NMR spectrum of the sugar portion of compound 3 showed nine anomeric signals at  $\delta_H$  4.29 [d,  $J = 8.2$  Hz, acetamidoglucose (GlcNAc)], 4.48 (d,  $J = 4.5$  Hz, Ara I H-1), 4.26 (d,  $J = 7.3$  Hz, Ara II H-1), 4.42 (d,  $J = 8.0$  Hz, Glc I H-1), 5.30 (d,  $J = 7.6$  Hz, Glc II H-1), 4.95 (brs, Rha H-1), 4.67 (d,  $J = 7.6$  Hz, Xyl I H-1), 4.39 (d,  $J = 5.2$  Hz, Xyl II H-1) and 4.40 (d,  $J = 7.8$  Hz, Glc II H-1), which correlated with nine anomeric carbon atom resonances at  $\delta_C$  103.8, 101.5, 105.1, 103.5, 93.7, 100.7, 103.2, 104.8 and 103.8, respectively in the HSQC spectrum (Table 2). The cross-peak correlations observed in the HMBC correlations between H-1 of GlcNAc ( $\delta_H$  4.29  $J = 8.2$  Hz) and C-3 of the aglycone ( $\delta_C$  88.3) of echinocystic acid ( $\delta_H$  3.06,  $J = 13.6$  Hz), suggested that GlcNAc was directly attached to C-3 of the aglycone. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 of Ara I ( $\delta_H$  4.48,  $J = 4.5$  Hz) and C-6 of GlcNAc ( $\delta_C$  68.4) established the connectivity between the two sugar units. HMBC correlation observed between H-1 of Ara II ( $\delta_H$  4.26,  $J = 7.3$  Hz) and C-2 of Ara I ( $\delta_C$  79.4) allowed us to locate Ara II at C-2 of Ara I. The terminal position of Ara II was evidenced by the absence of any  $^{13}C$  NMR glycosylation shifts for this sugar moiety. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 ( $\delta_H$  4.42,  $J = 8.0$  Hz) of Glc I and C-3 ( $\delta_C$  77.5) of Ara I permitted us to attached Glc I at C-3 of Ara I. Thus, the tetrasaccharide α-L-arabinopyranosyl-(1 → 2)[-β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)]-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 6)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl moiety was established to be linked at C-3 of the aglycone (Fig. 4). Moreover, comparison of the NMR spectra of compounds 1 and

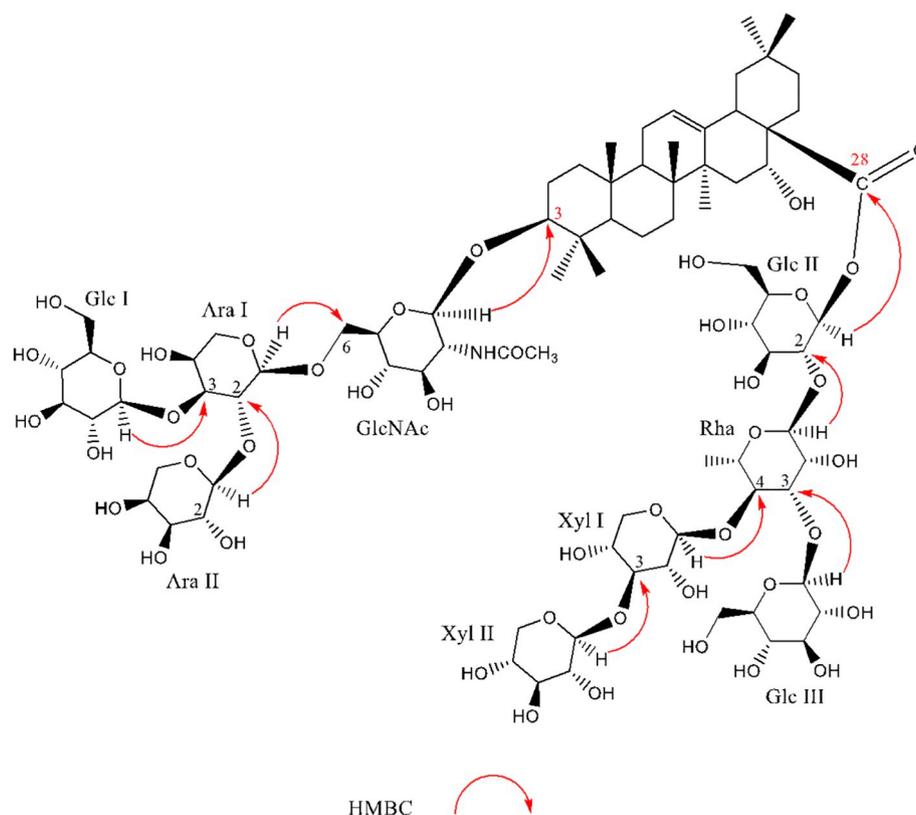


Fig. 4. Key HMBC correlations of compound 3.

Table 3

Antiproliferative and cytotoxic activities of 1 and 2 on human cancer cells Hep3B and Caco-2, respectively.

Compounds	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) on Hep3B	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) on Caco-2
1	6.0 $\pm$ 1.48	> 25
2	6.5 $\pm$ 1.87	> 25
Sorafenib	7.6 $\pm$ 2.3	–
Doxorubicine	–	13.23

3 revealed that the sugar moiety at C-28 was identical in both compounds. Thus, the tetrasaccharide  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -L-glucopyranosyl moiety was established to be attached at C-28 of the aglycone (Fig. 4). Based on the above evidences, the structure of compound 3 was established as 3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2) [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl] echinocystic acid 28-O-[ $\beta$ -L-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

Since compound 3 was not obtained in sufficient quantity to perform the biological tests, only compounds 1 and 2 were tested for their antiproliferative and cytotoxic effects on both human carcinoma cell lines Hep3B (hepatocellular carcinoma) and Caco-2 (epithelial colorectal adenocarcinoma), respectively (Table 3). Both compounds exhibited an antiproliferative activity against the Hep3B cell line, with IC<sub>50</sub> values of 6.0 and 6.5  $\mu$ M, respectively, which are in the range of the one of sorafenib, one of the most clinically used molecule [21]. However, none antiproliferative activity had been detected for the same compounds on the Caco-2 cell line (CC<sub>50</sub> > 25  $\mu$ M).

#### 4. Conclusion

Three new oleanane-type triterpenoid saponins were isolated from

the flowers and twigs of *Calliandra calothyrsus*. Their structures were established from spectral data, mainly HR-ESI-MS, 1D NMR, and 2D NMR and by comparison with the literature. Compounds 1 and 2 were evaluated for their antiproliferative activity against two human digestive cancer cell lines, i.e. Hep3B and Caco-2 cells. Both compounds exhibited a moderate antiproliferative activity against Hep3B cells, though in the range of the palliative molecule sorafenib. In contrast, none effect has been seen against the Caco-2 cells at the tested concentrations. As a perspective, we project to test compounds 1 and 2 against a wider range of cancer cell lines to assess their possible selectivity against hepatocarcinoma cells. This could contribute to identify specific molecular targets of this cancer type and promote the use of this plant for traditional medicine purpose. However, from a chemotaxonomic point of view, our results represent a valuable contribution to the knowledge of the chemistry of plants of the genus *Calliandra* of the Mimosaceae subfamily, some of which have revealed the presence of oleanane-type triterpenoid saponins. These saponins present the *N*-acetylglucosamine directly attached to the C-3 of the aglycone as well as the sugar sequence Ara-<sup>2</sup>Ara-<sup>6</sup>GlcNAc-<sup>3</sup>Agly. These characteristics are consistently encountered in all the isolated saponins of the genus *Calliandra* [6–12]. Comparing our saponins with those previously isolated from the genus *Calliandra*, it appears that they share the same C-3 oligosaccharide sequence but with one and two additional sugars, respectively. This could therefore be a specificity of the saponins of the *Calliandra calothyrsus* species.

#### Acknowledgements

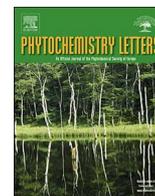
We thank the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) and UMR 152 Pharma-DEV IRD/UPS for the financial support. The authors are grateful to Mr. Victor Nana of the National Herbarium of Cameroon (NHC) for the identification and collection of plant.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflicting interest.

## References

- [1] H.M. Hernandez, Taxonomia, distribucion, geografica y biologica reproductiva de *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae, Mimosoideae), una especie con potencial agroforestal, 62 Anales Institute Biology University Autonomas Mexico, 1991, pp. 121–132.
- [2] D.J. Macqueen, *Calliandra calothyrsus*: implications of plant taxonomy, ecology and biology for seed collection, *Commonw For Rev.* 71 (1992) 20–34.
- [3] J.A. Maghembe, H. Prins, Performance of Multipurpose Trees for Agroforestry 2 Years after Planting at Makoka, Malawi for Ecol Manage, 64 (1994), pp. 171–182.
- [4] J. Wabo Poné, F. Kenne Tameli, M. Mpoame, E. Pamo Tedonkeng, C.F. Bilong Bilong, *In vitro* activities of acetonic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*, *Asian Pac J Trop Med* 4 (2011) 125–128.
- [5] B. Moreno-Murillo, A. Sanchez, R. Quevedo, M.L. Pabon, F. Carulla, E. Juan, 3-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl flavonoids and other phenolics compounds from *Calliandra calothyrsus* Meissner leaves (Mimosaceae), *Revista Colombiana de Quimica* 37 (2008) 287–295.
- [6] T. Takeda, T. Nakamura, S. Takashima, O. Yano, Y. Ogihara, Studies on the constituents of *Calliandra anomala* (Kunth) Macbr. I. Structure elucidation of two acylated triterpenoidal saponins, *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993) 2132–2137.
- [7] T. Nakamura, T. Takeda, Y. Ogihara, Studies on the constituents of *Calliandra anomala* (KUNTH) MACBR. II. Structure elucidation of four Acylated Triterpenoidal Saponins, *Chem. Pharm. Bull.* 42 (1994) 1111–1115.
- [8] C. Tani, Y. Ogihara, M. Mutuga, T. Nakamura, T. Takeda, Studies on the constituents of *Calliandra anomala* (Kunth) Macbr. III. Structure elucidation of six acylated triterpenoidal saponins, *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 816–822.
- [9] C. Tani, Y. Ogihara, T. Takeda, Studies on the constituents of *Calliandra anomala* (Kunth) Macbr. IV. Structure analysis by HPLC retention time and FAB-MS Spectrum, *Chem. Pharm. Bull.* 46 (1998) 723–725.
- [10] B.P. Da Silva, J.B. Soares, E.P. Souza, M. Palatnik, C.B. Sousa, J.P. Parente, Pulcherrimasaponin, from the leaves of *Calliandra pulcherrima*, as adjuvant for immunization in the murine model of visceral leishmaniasis, *Vaccine* 23 (2005) 1061–1071.
- [11] A.P. Barbosa, B.P. Da Silva, J.P. Parente, Brevifoliasaponin with adjuvant activity from *Calliandra brevifolia*, *Zeitschrift Für Naturforschung B* 63 (2008) 894–902.
- [12] B.P. Da Silva, J.P. Parente, A new complex triterpenoid saponin from *Calliandra pulcherrima* with haemolytic activity and adjuvant effect, *Phytochem. Lett.* 6 (2013) 633–639.
- [13] M. Chaabi, P. Chabert, C. Vonthron-Sénécheau, B. Weniger, M. Ouattara, H. Corstjens, I. Sente, L. Declercq, A. Lobstein, Acylated flavonol pentaglycosides from *Baphia nitida* leaves, *Phytochem. Lett.* 3 (2010) 70–74.
- [14] M. Carraz, C. Lavergne, V. Jullian, M. Wright, J.E. Gairin, M. Gonzales de la Cruz, G. Bourdy, Antiproliferative activity and phenotypic modification induced by selected Peruvian medicinal plants on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells, *J. Ethnopharmacol.* 166 (2015) 185–199.
- [15] F.R. Melek, T. Miyase, N.S. Ghaly, M. Nabil, Triterpenoid saponins with N-acetyl sugar from the bark of *Albizia procera*, *Phytochemistry* 68 (2007) 1261–1266.
- [16] T. Miyase, F.R. Melek, N.S. Ghaly, T. Warashina, M. El-Kady, M. Nabil, Echinocystic acid 3,16-O-bisglycosides from *Albizia procera*, *Phytochemistry* 71 (2010) 1375–1380.
- [17] Z. Zhang, K. Koike, Z. Jia, T. Nikaido, D. Guo, J. Zheng, Triterpenoidal saponins acylated with two monoterpene acids from *Gleditsia sinensis*, *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1999) 388–393.
- [18] G.M. Woldemichael, M. Wink, Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2327–2332.
- [19] N.P. Sahu, B. Achari, Advances in structural determination of saponins and terpenoid glycosides, *Curr. Org. Chem.* 5 (2001) 315–334.
- [20] O.P. Noté, L.M. Messi, J. Ngo Mbing, S. Ali Azouaou, C. Antheaume, D.E. Pegnyemb, D. Guillaume, C.D. Muller, M. Sarr, A. Lobstein, Pro-apoptotic activity of acylated triterpenoid saponins from the stem bark of *Albizia Chevalieri* harms, *Phytochem. Lett.* 22 (2017) 95–101.
- [21] A. Forner, M. Reig, J. Bruix, *Lancet* 391 (2018) 1301–1314.



## Pro-apoptotic activity of acylated triterpenoid saponins from the stem bark of *Albizia chevalieri* harms

Olivier Placide Noté<sup>a,b,\*</sup>, Lin Marcellin Messi<sup>b,c</sup>, Joséphine Ngo Mbing<sup>b</sup>, Sarah Ali Azouaou<sup>a</sup>, Mamadou Sarr<sup>d</sup>, Dominique Guillaume<sup>e</sup>, Christian Dominique Muller<sup>f</sup>, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb<sup>b</sup>, Annelise Lobstein<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pharmacognosie et Molécules Naturelles Bioactives, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR 7200, CNRS-Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, F-67401 Illkirch Cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, Département de Chimie Organique, Faculté de Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812 Yaoundé, Cameroun

<sup>c</sup> Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD), BP 2067 Yaoundé, Cameroon

<sup>d</sup> UMI 3189, FMPO, University Anta Diop of Dakar, Senegal

<sup>e</sup> UPR Médecine-Pharmacie, CNRS-UMR7312, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France

<sup>f</sup> Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, F-67401 Illkirch Cedex, France 67401 Illkirch, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Albizia chevalieri*

Mimosaceae

Triterpenoid saponins

Proapoptotic activity

Pancreatic carcinoma AsPC-1

### ABSTRACT

As a continuation of our interest in apoptosis-inducing triterpenoid saponins from *Albizia* genus, phytochemical investigation of the stem bark of *Albizia chevalieri* led to the isolation of three new oleanane-type saponins, named chevalierosides A–C (1–3). Their structures were established on the basis of extensive analysis of 1D and 2D NMR (<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C NMR, DEPT, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC and HMBC) experiments, HRESIMS studies, and by chemical evidence. The pro-apoptotic effect of the three saponins was evaluated on two human cell lines (pancreatic carcinoma AsPC-1 and hematopoietic monocytic THP-1). Cytometric analyses showed that saponins 1–3 induced apoptosis of both human cell lines (AsPC-1 and THP-1) in a dose-dependent manner.

### 1. Introduction

The genus *Albizia* comprises about 150 species widely distributed in the tropics, with the greatest diversity in Africa and South America (Abdel-Kader et al., 2001). Phytochemical investigations of *Albizia* genus revealed the presence of triterpenoid saponins, consisting mainly of glycosides of oleanolic acid, echinocystic acid, and acacic acid. These glycosides have demonstrated inhibitory activity of the growth of many cancer cells lines *in vitro* (Abdel-Kader et al., 2001; Haddad et al., 2003; Liu et al., 2009; Krief et al., 2005; Zheng et al., 2006; Melek et al., 2007; Cao et al., 2007; Noté et al., 2009, 2015; Miyase et al., 2010a,b). But few reports revealed the proapoptotic function of triterpenoid saponins isolated from plants of *Albizia* genus. In our knowledge, only three studies carried out on *Albizia adianthifolia*, *Albizia zygia*, and *Albizia glaberrima*, respectively, have shown the pro-apoptotic effect of adianthifoliosides A and D (Haddad et al., 2004), zygiasides A–B (Noté et al., 2016a), and of glaberrimosides A–C (Noté et al., 2016b) on cancer cells lines. One of our recent contribution revealed the first proapoptotic activity of glycosides of oleanolic acid, so far isolated from

*Albizia* genus with an interesting apoptosis-inducing selectivity degree effect on AsPC-1 cell line (Noté et al., 2016b), which was earlier described as a model of cancer stem cells (CSCs) (Wei et al., 2011). As a continuation of our interest in apoptosis-inducing triterpenoid saponins from *Albizia* genus (et al., 2016a,b; et al., 2016a,b), we screened the saponins content of *Albizia chevalieri*.

*A. chevalieri* harms (Mimosaceae) is a tree that grows up to 12 m high or a shrub growing under harsher conditions of the dry savannah from Senegal, Niger, Nigeria, and Cameroon (Saidu et al., 2007). Its leaves extract is used for the management of diabetes mellitus in Niger and in Eastern Nigeria, and its stem bark has been reported as a remedy for coughs (Saidu et al., 2007). The decoction of its leaves is used in Northern Nigeria to treat dysentery (Arbonnier, 2004). Its aqueous roots and leaves extracts have been reported to possess significant hypoglycaemic and hypolipidemic effects (Burkill 1995; Saidu et al., 2010). Previous phytochemical studies of *A. chevalieri* revealed the presence of triterpenoids (Mathias et al., 2016) from its stem bark and of glucosides of flavanol from its roots (Tchoukoua et al., 2016).

In the present paper, we report the isolation and structure

\* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, Département de Chimie Organique, Faculté de Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812, Yaoundé, Cameroun

E-mail address: [olivernote1@yahoo.fr](mailto:olivernote1@yahoo.fr) (O.P. Noté).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.09.008>

Received 7 May 2017; Received in revised form 24 August 2017; Accepted 22 September 2017

1874-3900/ © 2017 Published by Elsevier Ltd on behalf of Phytochemical Society of Europe.

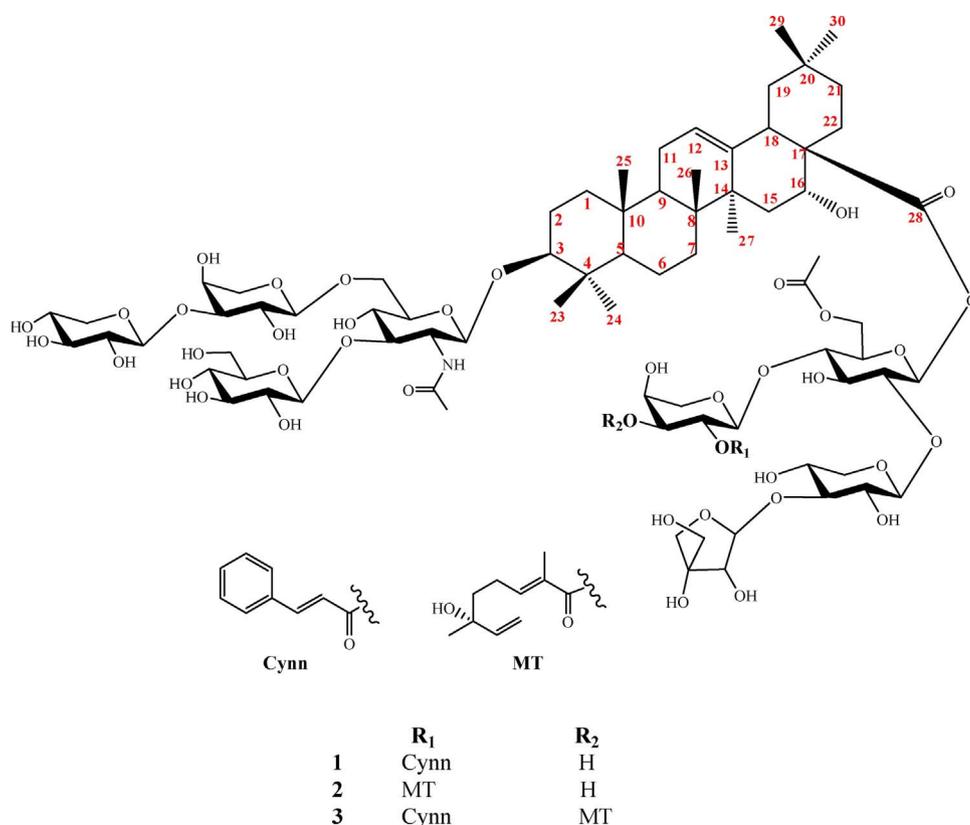


Fig. 1. Structures of isolated compounds 1–3.

characterization of three new triterpenoid saponins, named chevalierosides A–C (1–3), along with the evaluation for their pro-apoptotic effect on two human tumor cells, a human pancreatic cancer cell line AsPC-1 and a hematopoietic monocytic cancer cell line THP-1, results are reported herein.

## 2. Results and discussion

The air-dried powdered roots of *A. chevalieri* (150 g) were extracted with 70% EtOH in soxhlet and after evaporation of the solvent, the hydroalcoholic extract was partitioned against *n*-BuOH saturated with water. The *n*-BuOH fraction was then submitted to vacuum-liquid chromatography (VLC) on reversed phase silica gel yielding a methanol fraction that was subjected to a VLC on silica gel. Purification of the eluted fractions by semipreparative high pressure liquid chromatography (HPLC) afforded three new echinocystic acid glycosides, named chevalierosides A–C (1–3) (Fig. 1).

Chevalieroside A (1), obtained as a white amorphous powder, was assigned a C<sub>86</sub>H<sub>129</sub>NO<sub>41</sub> molecular formula, as deduced from the [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> ion at *m/z* 1849.8384 in the positive ion mode HRESIMS. Upon acid hydrolysis with 2.0 M HCl, 1 afforded echinocystic acid unit, which was identified with an authentic sample, and the sugar components 2-amino-2-deoxy-glucose (GlcNHAc), glucose (Glc), apiose (Api), xylose (Xyl) and arabinose (Ara), which were identified by co-TLC with authentic samples (Section 3). The absolute configuration of these sugar residues was determined to be D for GlcNHAc, Glc, Api, Xyl, and L for Ara based on GC analysis of their trimethylsilylated derivatives (Section 3) (Chaabi et al., 2010).

Extensive analysis of 1D and 2D NMR spectra (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT, COSY, ROESY, HSQC and HMBC) indicated the presence of seven tertiary methyl groups at  $\delta_H$  0.75, 0.93, 0.95, 0.97, 1.06, 1.22, and 1.83, an olefinic broad triplet proton at  $\delta_H$  5.55 (brt, *J* = 3.5 Hz, H-12) attached to a carbon at  $\delta_C$  122.8 (C-12), a quaternary carbon at  $\delta_C$  144.5 (C-13), one oxymethine proton at  $\delta_H$  3.26 (brd, *J* = 7.6 Hz, H-3), and sugars signals at  $\delta_H$  4.83–6.30, evidencing that 1 was an oleanane type

triterpenoid saponin. The unambiguous assignment of all <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signals of the aglycone of 1 (Table 1), identified as echinocystic, using correlations observed in COSY, ROESY, HSQC, and HMBC spectra, was in full agreement with literature data (Melek et al., 2014; Miyase et al., 2010a, 2010b). Substitutions at C-3 and C-28 of echinocystic acid were evidenced by the observed glycosylation-induced shifts of C-3 at  $\delta_C$  89.6 and of C-28 at  $\delta_C$  176.0 (Table 1) establishing that 1 was a 3,28-bidesmosidic echinocystic acid derivative with sugar chains linked to C-3 and C-28 of the aglycone through an ether and ester bond, respectively (Woldemichael and Wink, 2001; Sahu and Achari, 2001).

The <sup>1</sup>H NMR spectrum of the sugar portion of compound 1 showed eight anomeric signals at  $\delta_H$  5.08 [d, *J* = 7.3 Hz, 2-amino-2-deoxy-glucose (GlcNHAc)], 5.28 [d, *J* = 6.6 Hz, arabinose (Ara I)], 4.83 [d, *J* = 2.2 Hz, xylose (Xyl I)], 5.55 [d, *J* = 7.6 Hz, glucose (Glc I)], 6.06 [d, *J* = 8.2 Hz, glucose (Glc II)], 5.00 [d, *J* = 8.0 Hz, arabinose (Ara II)], 5.40 [d, *J* = 7.6 Hz, xylose (Xyl II)], and 6.30 [d, *J* = 2.2 Hz, apiose (Api)], which correlated with eight anomeric carbon atom resonances at  $\delta_C$  104.5, 103.5, 108.0, 104.5, 92.9, 103.1, 105.2, and 111.6, respectively in the HSQC spectrum (Table 2). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (Table 2) of the monosaccharide residues were assigned starting from the readily identifiable anomeric proton of each hexosyl or pentosyl unit, by means of COSY, TOCSY, ROESY, and HMBC spectra (Table 2). The <sup>13</sup>C NMR data indicated that the sugar residues Glc, GlcNHAc, Xyl, and Ara were in their pyranose form, whereas the Api residue was in furanose form. The anomeric proton of Xyl I was determined to have the  $\alpha$ -orientation based on its relatively small <sup>3</sup>*J*<sub>H-1,H-2</sub> value of 2.2 Hz, whereas Xyl II was  $\beta$ -orientated based on its relatively large <sup>3</sup>*J*<sub>H-1,H-2</sub> value of 7.6 Hz. The anomeric protons of Api was  $\beta$ -orientated based on its relatively small <sup>3</sup>*J*<sub>H-1,H-2</sub> value of 2.2 Hz. The remaining anomeric protons of Glc, GlcNHAc, and Ara, were determined to have  $\beta$ , and  $\alpha$  anomeric configuration, respectively, based on their relative large <sup>3</sup>*J*<sub>H-1,H-2</sub> values (6.6–8.2 Hz) in their pyranose form. The anomeric signal at  $\delta_H$  5.08 (d, *J* = 7.3 Hz) was assigned to 2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety (GlcNHAc) based on the observation its characteristic signals at  $\delta_H$  9.08 (d, *J* = 8.0 Hz,

**Table 1**

NMR spectroscopic data (500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) for the aglycone moieties of compounds 1–3 ( $\delta$  in ppm and  $J$  in Hz).

No	1		2		3	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.)
1a	38.7	0.92	39.4	0.94	38.8	0.92
1b		1.45		1.54		1.48
2a	26.4	1.70	26.1	1.79	26.7	1.77
2b		2.13		2.20		2.16
3	89.6	3.26	89.7	3.25	89.8	3.25
4	39.3	–	39.8	–	39.4	–
5	56.0	0.78	56.8	0.78	56.2	0.82
6a	18.6	1.27	18.3	1.32	18.9	nd
6b		1.57		1.59		nd
7a	33.6	1.52	33.9	1.51	33.8	1.52
7b		1.58		1.62		1.62
8	40.1	–	40.9	–	40.2	–
9	47.2	1.76	46.9	1.79	47.2	1.79
10	37.0	–	36.7	–	37.1	–
11a	23.8	1.93	23.9	1.99	24.3	1.98
11b		2.00		2.13		2.16
12	122.8	5.55	122.5	5.64	123.1	5.56
13	144.5	–	144.2	–	144.4	–
14	42.0	–	41.7	–	42.1	–
15a	36.4	1.76	36.5	1.85	36.2	1.78
15b		2.36		2.39		2.40
16	75.3	5.65	75.2	5.69	75.0	5.65
17	49.1	–	49.5	–	49.2	–
18	41.2	3.44	41.0	3.51	41.4	3.48
19a	47.1	1.32	47.8	1.37	47.4	1.33
19b		2.79		2.83		2.80
20	30.9	–	30.6	–	31.0	–
21a	35.9	1.20	35.6	1.28	36.2	1.22
21b		2.42		2.47		2.40
22a	32.3	2.17	32.7	2.20	32.5	2.16
22b		2.29		2.37		2.29
23	28.2	1.22 (s)	28.9	1.28 (s)	28.4	1.22 (s)
24	17.1	0.93 (s)	17.7	0.98 (s)	17.4	0.92 (s)
25	15.6	0.75 (s)	16.8	0.83 (s)	15.9	0.78 (s)
26	17.4	0.95 (s)	18.1	1.01 (s)	17.7	0.94 (s)
27	27.2	1.83 (s)	27.9	1.85 (s)	27.6	1.83 (s)
28	176.0	–	176.0	–	176.1	–
29	33.3	0.97 (s)	33.9	1.02 (s)	33.6	0.98 (s)
30	24.6	1.06 (s)	24.2	1.12 (s)	24.0	1.07 (s)

Assignments were based on the HMBC, HSQC, COSY and DEPT experiments.

NHCOCH<sub>3</sub>) and  $\delta_{\text{H}}$  2.16 (s, NHCOCH<sub>3</sub>) (Abdel-Kader et al., 2001). This assignment was supported by the correlation observed in the HMBC spectrum between the proton signal at  $\delta_{\text{H}}$  4.47 (H-2 of GlcNHAc) and the carbonyl signal at  $\delta_{\text{C}}$  170.2 (NHCOCH<sub>3</sub>). In addition, the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 exhibited two proton signals of a *trans*-olefinic group at  $\delta_{\text{H}}$  6.85 (d,  $J = 16.2$  Hz) and  $\delta_{\text{H}}$  8.02 (d,  $J = 16.2$  Hz), and five aromatic proton signals for a monosubstituted benzene group for a cinnamoyl moiety. It was also observed signals characteristic for acetyl group ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1.86/170.8). The sequencing of the glycoside chains was achieved by analysis of HMBC and ROESY experiments.

For the sugar chain attached at C-3 of the aglycone, the cross peak correlations observed in the HMBC spectrum between H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.08) of GlcNHAc and C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  89.6) of the aglycone, and in the ROESY spectrum between H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.08) of GlcNHAc and H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.26) of echinocystic acid, suggested that GlcNHAc was directly attached to C-3 of the aglycone. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.55) of Glc I and C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  81.0) of GlcNHAc established the connectivity between the two sugar units, which was confirmed by the ROESY correlation observed between H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4.86) of GlcNHAc and H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.55) of Glc I. On the other hand, the HMBC correlation observed between H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.28) of Ara I and C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  68.2) of GlcNHAc allowed us to locate Ara I at C-6 of GlcNHAc. This was supported by the ROESY correlation observed between H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.28) of Ara I and H-6a ( $\delta_{\text{H}}$  4.69) of GlcNHAc. This Ara I was substituted at its C-3 by Xyl I, as evidenced

**Table 2**

NMR spectroscopic data (500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) for the sugar moieties of compounds 1–3 ( $\delta$  in ppm and  $J$  in Hz).

Position	1		2		3	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
3-O-Sugars						
GlcNHAc						
1	104.5	5.08 (d, 7.3)	104.2	5.10 (d, 7.3)	104.8	5.09 (d, 7.3)
2	57.7	4.47	56.8	4.55	57.9	4.50
3	81.0	4.86	81.3	4.88	81.2	4.89
4	73.4	4.50	73.2	4.59	73.4	4.51
5	75.0	4.00	74.9	4.05	75.0	3.97
6	68.2	4.69; 4.78	67.8	4.67; 4.80	68.4	4.69; 4.77
NHCOCH <sub>3</sub>						
	23.8	2.16	23.4	2.16	23.9	2.16
Ara-I						
1	103.5	5.28 (d, 6.6)	103.0	5.30 (d, 6.6)	103.8	5.28 (d, 6.6)
2	73.3	4.51	73.2	4.53	73.4	4.51
3	83.5	4.53	82.5	4.59	83.7	4.54
4	69.7	4.14	69.4	4.15	69.7	4.13
5	66.5	3.65; 4.22	66.3	3.74; 4.29	66.8	3.64; 4.23
Xyl-I						
1	108.0	4.83 (d, 2.2)	107.1	4.85 (d, 2.2)	108.2	4.84 (d, 2.2)
2	75.4	4.05	74.5	4.07	75.3	4.07
3	78.3	3.97	77.6	4.01	78.4	3.97
4	71.1	4.27	71.1	4.26	71.2	4.25
5	67.5	3.49; 4.36	66.3	3.53; 4.38	67.7	3.47; 4.35
Glc-I						
1	104.5	5.55 (d, 7.6)	104.0	5.51 (d, 7.6)	104.7	5.56 (d, 7.6)
2	75.2	4.05	74.6	4.06	75.4	4.05
3	78.2	4.30	77.7	4.31	78.4	4.30
4	71.1	4.28	71.1	4.26	71.2	4.28
5	78.4	3.95	77.9	4.01	78.5	3.98
6	62.3	4.33; 4.49	62.5	4.35; 4.54	62.5	4.35; 4.52
28-O-Sugars						
Glc-II						
1	92.9	6.06 (d, 8.2)	92.7	6.06 (d, 8.2)	93.1	6.06 (d, 8.2)
2	78.7	4.29	77.8	4.31	78.3	4.28
3	76.0	4.14	76.0	4.15	76.0	4.14
4	80.2	4.03	80.2	4.06	80.0	4.05
5	73.9	3.89	73.3	3.91	73.3	3.87
6	63.5	4.51; 4.60	63.5	4.54; 4.65	63.2	4.52; 4.61
Ara-II						
1	103.1	5.00 (d, 8.0)	101.8	5.17 (d, 8.0)	103.1	4.98 (d, 8.0)
2	75.2	5.65	75.0	5.67	75.2	5.65
3	74.0	4.13	74.4	4.16	74.0	4.14
4	68.9	4.26	71.1	4.26	69.1	4.27
5	67.5	3.76; 4.37	66.3	3.57; 4.39	67.6	3.73; 4.77
Xyl-II						
1	105.2	5.40 (d, 7.6)	104.4	5.39 (d, 7.6)	105.1	5.39 (d, 7.6)
2	75.3	4.04	74.8	4.03	75.2	4.04
3	84.8	4.15	84.9	4.16	84.9	4.14
4	71.1	4.27	71.0	4.26	71.0	4.28
5	66.6	3.65; 4.26	66.2	3.67; 4.28	66.7	3.65; 4.26
Api						
1	111.6	6.30 (d, 2.2)	110.9	6.23 (d, 2.2)	111.9	6.30 (d, 2.2)
2	78.1	4.82	77.7	4.85	78.1	4.83
3	80.6	–	80.3	–	80.7	–
4	75.3	4.37; 4.79	74.8	4.41; 4.79	75.5	4.38; 4.79
5	65.8	4.21; 4.25	64.8	4.23; 4.25	65.8	4.21; 4.26

Assignments were based on the HMBC, HSQC, COSY and DEPT experiments.

by the direct and reverse correlations observed in the HMBC spectrum between H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  4.83) of Xyl I and C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  83.5) of Ara I and between H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4.53) of Ara I and C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  108.0) of Xyl I. This was supported by the ROESY correlation observed between H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  4.83) of Xyl I and H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4.53) of Ara I. The terminal position of Xyl I was evidenced by the absence of any  $^{13}\text{C}$  NMR glycosylation shifts for this sugar moiety. Thus, the tetrasaccharide  $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety was established to be linked at C-3 of the aglycone (Fig. 2).

For the sugar chain attached at C-28 of the aglycone, the cross peak observed in the HSQC spectrum at  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  6.06/ $\delta$  92.9 (Glc II H-1/C-1)

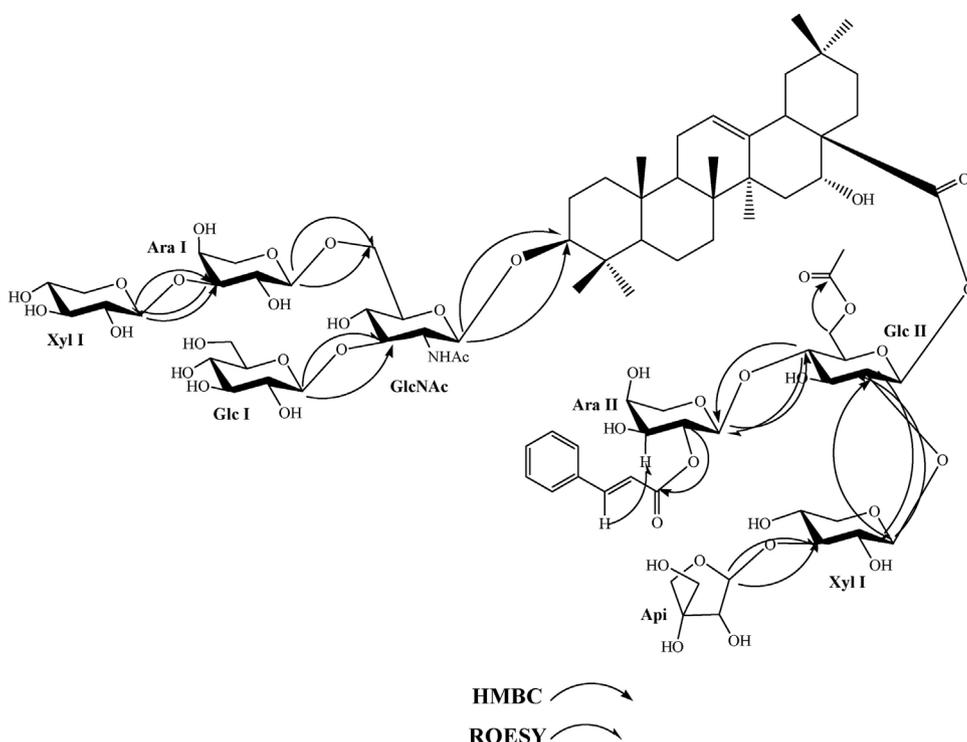


Fig. 2. Key HMBC and ROESY correlations for Compound 1.

suggested that this sugar should be directly attached to C-28 of the aglycone through an ester bond. The direct and reverse correlations observed in the HMBC spectrum between H-1 ( $\delta_H$  5.40) of Xyl II and C-2 ( $\delta_C$  78.7) of Glc II and between H-2 ( $\delta_H$  4.29) of Glc II and C-1 ( $\delta_C$  105.2) of Xyl II, and the ROESY correlation observed between H-1 ( $\delta_H$  5.40) of Xyl II and H-2 ( $\delta_H$  4.29) of Glc II allowed us to locate Xyl II at C-2 of Glc II. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 ( $\delta_H$  6.30) of Api and C-3 ( $\delta_C$  84.8) of Xyl II permitted us to attach Api at C-3 of Xyl II. This was supported by the ROESY correlation observed between H-1 ( $\delta_H$  6.30) of Api and H-3 ( $\delta_H$  4.15) of Xyl II. On the other hand, the direct and reverse correlations observed in the HMBC spectrum between H-1 ( $\delta_H$  5.00) of Ara II and C-4 ( $\delta_C$  80.2) of Glc II and between H-4 ( $\delta_H$  4.03) of Glc II and C-1 ( $\delta_C$  103.1) of Ara II, and the ROESY correlation observed between H-1 ( $\delta_H$  5.00) of Ara II and H-4 ( $\delta_H$  4.03) of Glc II allowed us to locate Ara II at C-4 of Glc II. In addition, the location of the acetyl group at C-6 of Glc II was also evidenced by the observation of the signals of C-6 of Glc II at  $\delta_C$  63.5 (deshielded, +1.2 ppm) and of C-5 of Glc II at  $\delta_C$  73.9 (shielded, -4.9 ppm) in comparison to Glc I ( $\delta_C$  78.4). Furthermore, the observation of the signal of H-2 of Ara II at  $\delta_H$  5.65 (deshielded, +1.15 ppm) and of C-2 of Ara II at  $\delta_C$  75.2 (deshielded, +1.8 ppm) in comparison to Ara I ( $\delta_H$  4.51 and 73.3) indicated that C-2 of Ara II was esterified. Accordingly, the cinnamoyl moiety was placed at C-2 of Ara II. This was supported by the HMBC and ROESY correlations, observed between H-2 ( $\delta_H$  5.65) of Ara II and the carbonyl group ( $\delta_C$  166.2) of the *trans*-cinnamoyl moiety, and between H-3 ( $\delta_H$  4.13) of Ara II and the olefinic proton ( $\delta_H$  8.02) of the *trans*-cinnamoyl moiety, respectively (Fig. 2). Thus, the tetrasaccharide  $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[(2-*O*-cinnamoyl)- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]-(6-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety was established to be attached at C-28 of the aglycone (Fig. 2). Based on the above evidences, the structure of compound 1 was established as 3-*O*- $\beta$ -{ $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl}-echinocystic acid 28-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienyl]-2}-2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienyl]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]-(6-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

The extensive analysis of 1D and 2D NMR experiments showed that the oligosaccharide chains at C-3 and C-28 of the echinocystic acid were

common in the three saponins. They will not be further discussed in the structural elucidation of compounds 2 and 3.

Chevalieroside B (2), obtained as a white amorphous powder, was assigned a  $C_{87}H_{137}NO_{42}$  molecular formula, as deduced from the  $[M + NH_4]^+$  ion at  $m/z$  1885.8960 in the positive ion mode HRESIMS. Detailed comparison of NMR data of 2 (1D and 2D NMR analysis) with those of 1, indicated identical acyl moiety at C-6 of Glc-II and the disappearance of the *trans*-cinnamoyl moiety signals observed for 1. In addition, the  $^1H$  NMR spectrum of compound 2 exhibited one tri-substituted olefinic proton signal at  $\delta_H$  7.24 (d,  $J = 7.2$  Hz) and one group of one-substituted olefin proton signals at  $\delta_H$  6.23 (dd,  $J = 10.9$ ; 17.6 Hz), 5.25 (d,  $J = 10.9$  Hz) and 5.47 (d,  $J = 17.6$  Hz), indicating that compound 1 had one unit of monoterpenoid moiety (MT) (Liu et al., 2010). All proton and carbon signals of this MT moiety were fully assigned by extensive analysis of HSQC and further confirmed by HMBC spectrum. The stereochemistry of the tri-substituted double bond was determined as *E* from the chemical shift of H-3 at  $\delta_H$  7.24 since the *Z* isomer would appear at higher field (Zhang et al., 1999). The configuration of C-6 of the MT moiety was determined as *S* based on the chemical shift values of C-5 ( $\delta_C$  41.0), C-7 ( $\delta_C$  144.1), C-8 ( $\delta_C$  112.7) and C-10 ( $\delta_C$  23.6) which were very close to the corresponding values in the  $^{13}C$  NMR data of (6*S*)-menthialofic acid 6-*O*- $\beta$ -D-quinovoside (Liang et al., 2005). The esterification of the hydroxyl group at C-2 of Ara II by MT was suggested from the deshielded position of H-2 of Ara II and C-2 of Ara II resonances at  $\delta_H$  5.67 and  $\delta_C$  75.0, respectively. This was supported by the HMBC correlation observed between H-2 ( $\delta_H$  5.67) of Ara II and C-1 ( $\delta_C$  167.3) of MT moiety. Accordingly, the structure of compound 2 was established as 3-*O*- $\beta$ -{ $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl}-echinocystic acid 28-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienyl]-2}-2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienyl]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]-(6-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

Chevalieroside C (3), obtained as a white amorphous powder, was assigned a  $C_{96}H_{143}NO_{43}$  molecular formula, as deduced from the  $[M + NH_4]^+$  ion at  $m/z$  2016.9416 in the positive ion mode HRESIMS. Detailed comparison of NMR data of 3 (1D and 2D NMR analysis) with those of 2, indicated also identical acyl moiety at C-6 of Glc-II, and the

presence of a cinnamoyl moiety (Cynn) and monoterpene moiety (MT), identified in **1** and **2**, respectively. In addition, the NMR spectra of compound **3** showed acylation shifts at H-6 ( $\delta_H$  4.52, 4.61) and C-6 ( $\delta_C$  63.2) of Glc-II and at H-2 ( $\delta_H$  5.65) and C-2 ( $\delta_C$  75.2), and H-3 ( $\delta_H$  4.14) and C-3 ( $\delta_C$  74.0) of Ara-II. The observation of the HMBC correlations between H-2 ( $\delta_H$  5.65) of Ara II and C-1 ( $\delta_C$  166.4) of the Cynn moiety, and between H-3 ( $\delta_H$  4.14) of Ara II and C-1 ( $\delta_C$  167.4) of the MT moiety, confirmed the positions of the Cynn and the MT moieties at C-2 and C-3 of Ara II, respectively. Consequently, the structure of **3** was established as 3-*O*- $\beta$ - $\alpha$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-echinocystic acid 28-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienyl-3-*O*-cinnamoyl]-2}-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienyl-3-*O*-cinnamoyl]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)}-(6-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl) ester.

The pro-apoptotic activity of compounds **1–3** was evaluated using Annexin V-FITC binding assay on two human cell lines: the pancreatic carcinoma AsPC-1 and the cancerous monocytic THP-1 cell lines. In result, percentage of apoptotic cells following 24 h of treatment was increased in a concentration-dependent manner for AsPC-1 and THP-1 cells, respectively (Fig. 3). Computed concentrations of each compound to induced half-maximal effects ( $EC_{50}$ ) on cell apoptosis were determined as being 17.91 and 8.11  $\mu$ M, 13.72 and 5.69  $\mu$ M, and 3.10 and 8.32  $\mu$ M on AsPC-1 and THP-1 cells for chevalierosides A–C, respectively. The strong pro-apoptotic effect of chevalieroside C (**3**) on the pancreatic carcinoma AsPC-1 cells observed at lowest concentration may be probably due to the number and nature of acyl moieties in compound **3** compared to compounds **1** and **2**. Someone can also wonder if the pro-apoptotic effect of saponins **1–3** on THP-1 cells is not due to the presence of acyl moieties in their sugar chains, since the increase of the percentage of apoptotic cells was not observed for the THP-1 cancerous cells when the non-acylated glaberrimosides A–C recently isolated from *A. glaberrima* (Noté et al., 2016a) were tested. Nevertheless, further studies are necessary to support this conclusion. Furthermore, the next steps will be to further explain the apoptotic route induced by chevalieroside C (**3**) specifically to this highly

resistant cancer cells. In addition, this study contributes to complete the knowledge of the chemical composition of *Albizia* species, which are natural sources of bioactive triterpenoid saponins.

### 3. Experimental

#### 3.1. General

Optical rotations were measured on a Jasco P-2000 polarimeter.  $^1H$  NMR (500 MHz) and  $^{13}C$  NMR (125 MHz) spectra were recorded at room temperature in pyridine- $d_5$  using a Bruker AVANCE III 500 spectrometer. Chemical shifts are given in  $\delta$  (ppm) value relative to TMS as internal standard. HRESIMS spectra were recorded on a microTOF ESI-TOF mass spectrometer (Agilent) operating in positive mode. Analytical HPLC was performed on Varian 920-LC apparatus equipped with an autosampler, a pump, a diode array detector (DAD), and Galaxie software. Semipreparative HPLC was performed on a Gilson apparatus equipped with Trilution LC software using a Nucleodur 100-5 C18ec (21  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) column purchased from Machery-Nagel (Germany). Thin layer chromatography (TLC) was performed on precoated silica gel plates (60 F<sub>254</sub>, Merck) using the system solvent *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O, 65:15:25 as eluent. The spots were observed after spray with Komarowsky reagent, which is a mixture (5:1) of phydroxybenzaldehyde (2% in MeOH) and Ethanolic H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50%). Vacuum-liquid chromatography (VLC) was carried out using RP-18 silica gel 60 (25–40  $\mu$ m) and silica gel 60 (15–40  $\mu$ m and 40–63  $\mu$ m).

#### 3.2. Plant material

The stem bark of *A. chevalieri* were harvested at Nkolbisson, Yaoundé peripheral quarter, in Cameroon in October 2011 under the guidance of Mr. Paul Nana, botanist of the National Herbarium of Cameroon (NHC), where one specimen (47196/HNC) was deposited.

#### 3.3. Extraction and isolation

The air-dried, powdered stem bark of *A. chevalieri* (150 g) were

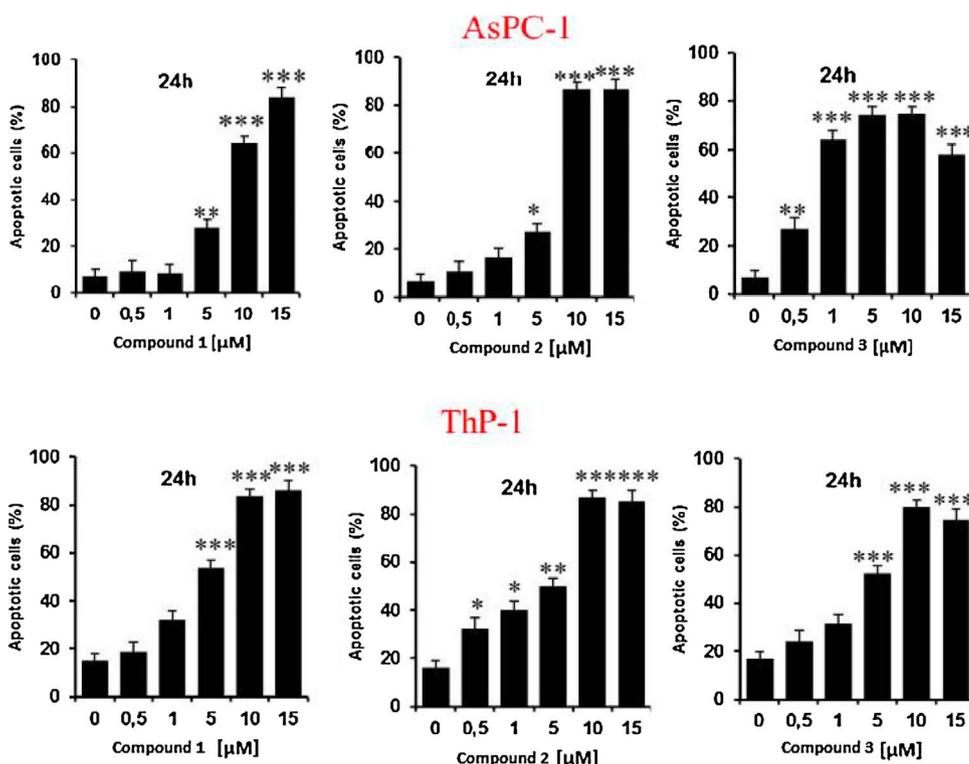


Fig. 3. The apoptotic effect of the three purified saponins was investigated on 2 human cell lines (AsPC-1 and THP-1) by capillary cytometry using the Annexin-V FITC/PI staining assay ( $n = 3$ ). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

extracted with 70% EtOH in soxhlet apparatus. The resulting hydroalcoholic solution was then evaporated to dryness under reduce pressure to yield a brown residue (4.83 g). This residue was suspended in 200 ml of H<sub>2</sub>O and partitioned with *n*-BuOH sat. H<sub>2</sub>O (3 × 300 ml). The *n*-BuOH soluble phase was evaporated to dryness affording 6.14 g of brown gum residue which was taken in a minimum of water (10 ml) and then submitted to vacuum-liquid chromatography (VLC) using RP-18 silica gel 60 (25–40 μm) eluted with a gradient of MeOH-H<sub>2</sub>O (100% H<sub>2</sub>O → 100%MeOH). The 70–85% MeOH extract (600.5 mg) was subjected to VLC using silica gel 60 (15–40 μm) eluted with CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:2, 70:30:5, 60:33:7, and 60:40:10) to give four main sub-fractions (ACE1- ACE4). Subfraction ACE4 (126.3 mg) was purified by semipreparative HPLC using gradient system of CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (20 ml/min) to yield compounds **1** (*t*<sub>R</sub>, 13.20 min, 7.9 mg), **2** (*t*<sub>R</sub>, 13.68 min, 8.5 mg), and **3** (*t*<sub>R</sub>, 16.16 min, 7.2 mg).

3-*O*-β-(α-D-xylopyranosyl-(1 → 3))-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 6)-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)]-2-(acetamido)-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-echinocystic acid 28-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1 → 3)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 2)-{2-*O*-cinnamoyl-α-D-arabinopyranosyl-(1 → 4)}-(6-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) ester (**1**), white amorphous powder; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> – 28.8 (c 0.01, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) data, see Tables 1 and 2. Positive HRESIMS: *m/z* 1849.8384 [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

3-*O*-β-(α-D-xylopyranosyl-(1 → 3))-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 6)-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)]-2-(acetamido)-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-echinocystic acid 28-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1 → 3)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienoyl]-2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienoyl]-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)}-(6-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) ester (**2**), white amorphous powder; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> – 45.7 (c 0.01, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) data, see Tables 1 and 2. Positive HRESIMS: *m/z* 1885.8960 [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

3-*O*-β-(α-D-xylopyranosyl-(1 → 3))-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 6)-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 3)]-2-(acetamido)-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-echinocystic acid 28-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1 → 3)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienoyl]-3-*O*-cinnamoyl]-2)-{2-*O*-[(6*S*,2*E*)-2,6-dimethyl-2,7-octadienoyl]-3-*O*-cinnamoyl]-α-L-arabinopyranosyl-(1 → 4)}-(6-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) ester (**3**), white amorphous powder; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> – 50.5 (c 0.01, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) data, see Tables 1 and 2. Positive HRESIMS: *m/z* 2016.9416 [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

### 3.4. Acidic hydrolysis of isolated saponins

Each saponin (2 mg) was hydrolyzed with 2 ml of 2 M HCl at 85 °C during 2 h. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. The sugar mixture was extracted from the aqueous phase (10 ml) and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 ml). The combined CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extracts were washed with water to give after evaporation the aglycone moiety, which was compared with an authentic standard sample by Co-TLC. The sugars were first analyzed by TLC over silica gel (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O, 8:5:1) by comparison with standard samples. The absolute configuration of each monosaccharide was determined from GC-MS analysis of their trimethylsilylated derivatives by comparison with authentic samples using the method previously described (Chaabi et al., 2010). The following sugars were detected: D-glucose, 2-(acetamido)-2-deoxy-D-glucose, D-xylose, L-arabinose, and D-apiose.

### 3.5. Pro-apoptotic evaluation

#### 3.5.1. Cell lines and culture conditions

The human pancreatic carcinoma cell line ASPC-1 was a gift from Dr. Timo Kehl (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Heidelberg, Germany), and THP-1 (TIB-202) cell lines, were purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France). ASPC-1 cells were cultivated in DMEM-based media (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier,

France), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (BioWhittaker, Verviers, Belgium), 2 mM ultraglutamine, 50 μM non-essential amino acids, 50 U/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). THP-1 cells were grown in RPMI 1640 medium with 2 mM L-alanyl-L-glutamine additionally supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 50 U/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). Cultures were kept at 37 °C in a humidified incubator equilibrated with 5% CO<sub>2</sub>. Before confluency adherent cells were trypsinized and subcultured twice a week.

#### 3.5.2. Pro-apoptotic evaluation

Cells were treated with the three different compounds of chevalieriosides A–C (**1–3**) in ranging concentrations (1–15 μM) then collected for apoptosis induction estimation. A minimum of 5000 cells was acquired per sample and analyzed on the InCyte software (Guava/Millipore/Merck, CA, USA). Apoptosis rates were assessed by capillary cytometry (Guava EasyCyte Plus, Millipore Merck) using Annexin V-FITC (ImmunoTools, Germany) and PI (MiltenyiBiotec Inc., USA) according to the manufacturer's recommendations. Gates were drawn around the appropriate cell populations using a forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC) acquisition dot plot to exclude debris. Final concentration of DMSO applied to cells during incubation with tested drugs was always 0.5%. In the tested setup that concentration had no adverse effects on cell viability, nor cell morphology. To discriminate between negative and positive events in the analysis, a non-stained control sample from each culture condition always accompanied acquisition of the stained cells to define their cut off. Negative control, i.e. sample with cells without compounds but with the same amount of DMSO as for diluted compounds, as well as positive control with 15 μM Celastrol, a natural pentacyclic triterpenoid (Enzo Life Sciences, Farmingdale, US), were included in each experiment. Cytometers performances were checked weekly using the Guava Easy Check Kit 4500-0025 (Merck/Millipore/Guava Hayward, CA, USA).

#### 3.5.3. Statistical analysis

Data presented as bar graphs, were expressed as means ± S.E.M. of at least three independent experiments. Statistical evaluation was performed with the one-way ANOVA test followed by the post-hoc Bonferroni test using GraphPad Prism software (Prism version 5.04 for Windows, GraphPad Software, CA, USA); a *p*-value less than 0.05 was considered as significant (\*), less than 0.01 very significant (\*\*), and less than 0.001 highly significant (\*\*\*).

### Acknowledgements

This work was financially supported by the World Academy of sciences (TWAS) (grant no: 3240277733). The authors are also grateful to Mr. Victor Nana of the National Herbarium of Cameroon (NHC) for the identification and collection of plant.

### References

- Abdel-Kader, M., Hoch, J., Berger, J.M., Evans, R., Miller, J.S., Wisse, J.H., Mamber, S.W., Dalton, J.M., Kingston, D.G.L., 2001. Two bioactive saponins from *Albizia subdimidiata* from the Suriname rainforest. *J. Nat. Prod.* 64, 536–539.
- Arbionnier, M., 2004. Trees, Shrubs and Lianas of West African Dry Zones, quæ ed. CIRAD-MNHN, Paris.
- Burkill, H.M., 1995. The Useful Plants of West Tropical Africa, vol. 3 Families J-L, Royal Botanic Gardens, Kew 857 pp (W).
- Cao, S., Norris, A., Miller, J.S., Ratovoson, F., Razafitsalama, J., Andriantsiferana, R., Rasamison, V.E., Tendyke, K., Suh, T., Kingston, D.G.L., 2007. Cytotoxic triterpenoid saponins of *Albizia gummifera* from Madagascar rain forest. *J. Nat. Prod.* 70, 361–366.
- Chaabi, M., Chabert, P., Vontron-Sénécheau, C., Weniger, B., Ouattara, M., Corstjens, H., Sente, I., Declercq, L., Lobstein, A., 2010. Acylated flavonol pentaglycosides from *Baphia nitida* leaves. *Phytochem. Lett.* 3, 70–74.
- Haddad, M., Miyamoto, T., Laurens, V., Lacaille-Dubois, M.A., 2003. Two new biologically active triterpenoidal saponins acylated with salicylic acid from *Albizia adianthifolia*. *J. Nat. Prod.* 66, 372–377.
- Haddad, M., Laurens, V., Lacaille-Dubois, M.A., 2004. Induction of apoptosis in a leukemia cell line by triterpene saponins from *Albizia adianthifolia*. *Bioorg. Med. Chem.*

- 12, 4725–4734.
- Krief, S., Thoison, O., Sevenet, T., Wrangham, R.W., Lavaud, C., 2005. Triterpenoid saponins anthranilates from *Albizia grandibracteata* leaves ingested by primates in Uganda. *J. Nat. Prod.* 68, 897–903.
- Liang, H., Tong, W.Y., Zhao, Y.Y., Cui, J.R., Tu, G.U., 2005. An antitumor compound julibroside  $J_{28}$  from *Albizia julibrissin*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 4493–4495.
- Liu, R., Ma, S., Yu, S., Pei, Y., Zhang, S., Chen, X., Zhang, J., 2009. Cytotoxic oleanane triterpene saponins from *Albizia chinensis*. *J. Nat. Prod.* 72, 632–639.
- Liu, R., Ma, S., Liu, Y., Yu, S., Chen, X., Zhang, J., 2010. Albizosides D and E, two new cytotoxic triterpene saponins from *Albizia chinensis*. *Carbohydr. Res.* 345, 1877–1881.
- Mathias, S.N., Abubakar, M.S., October, N., 2016. Pentacyclic triterpenoids from the stem-bark of *Albizia chevalieri* (Mimosaceae) Hams. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8, 261–265.
- Melek, F.R., Miyase, T., Ghaly, N.S., Nabil, M., 2007. Triterpenoid saponins with *N*-acetyl sugar from the bark of *Albizia procera*. *Phytochemistry* 68, 1261–1266.
- Melek, F.R., Kassem, I.A.A., Miyase, T., Fayad, W., 2014. Caspicaosides E-K, triterpenoid saponins and cytotoxic acylated saponins from fruits of *Gleditsia caspica* Desf. *Phytochemistry* 100, 110–119.
- Miyase, T., Melek, F.R., Ghaly, N.S., Warashina, T., El-Kady, M., Nabil, M., 2010a. Echinocystic acid 3,16-*O*-bisglycosides from *Albizia procera*. *Phytochemistry* 71, 1375–1380.
- Miyase, T., Melek, F.R., Warashina, T., Selim, M.A., El Fiki, N.M., Kassem, I.A.A., 2010b. Cytotoxic triterpenoid saponins acylated with monoterpene acids from fruits of *Gleditsia caspica* Desf. *Phytochemistry* 71, 1908–1916.
- Noté, O.P., Mitaine-offer, A.C., Miyamoto, T., Paululat, T., Mirjolet, J.F., Duchamp, O., Pegnyemb, D.E., Lacaille-Dubois, M.A., 2009. Cytotoxic acacic acid glycosides from the roots of *Albizia coriaria*. *J. Nat. Prod.* 72, 1725–1730.
- Noté, O.P., Jihu, D., Antheaume, C., Zeniou, M., Pegnyemb, D.E., Guillaume, D., Chneiweiss, H., Kilhoffer, M.C., Lobstein, A., 2015. Triterpenoid saponins from *Albizia lebeck* (L.) Benth and their inhibitory effect on the survival of high grade human brain tumor cells. *Carbohydr. Res.* 404, 26–33.
- Noté, O.P., Azouaou, S.A., Simo, L., Antheaume, C., Guillaume, D., Pegnyemb, D.E., Muller, C.D., Lobstein, A., 2016a. Phenotype-specific apoptosis induced by three new triterpenoid saponins from *Albizia glaberrima* (Schumach. & Thonn.) Benth. *Fitoterapia* 109, 80–86.
- Noté, O.P., Simo, L., Mbing, J.N., Guillaume, D., Aouazou, S.A., Muller, C.D., Pegnyemb, D.E., Lobstein, A., 2016b. Two new triterpenoid saponins from the roots of *Albizia zygia* (DC.) J.F. Macbr. *Phytochem. Lett.* 18, 128–135.
- Sahu, N.P., Achari, B., 2001. Advances in structural determination of saponins and terpenoid glycosides. *Curr. Org. Chem.* 5, 315–334.
- Saidu, Y., Lawal, M., Isezuo, S.A., Shehu, R.A., Sahabi, D.M., Bilbis, L.S., 2007. Partial purification and elucidation of mechanism of hypoglycaemic agent of aqueous leaf extract of *Albizia chevalieri* Harms (Leguminosae). *J. Pharmacol. Toxicol.* 6, 513–523.
- Saidu, Y., Nwachukwu, F.C., Bilbis, L.S., Faruk, U.Z., Abbas, A.Y., 2010. Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of root extracts of *Albizia chevalieri* in alloxan induced diabetic rats. *Niger J. Basic Appl. Sci.* 18, 72–78.
- Tchoukoua, A., Tabopda, T.K., Uesugi, S., Kimura, K.-I., Kwon, E., Momma, H., Ngadjui, B.T., Koseki, T., Shiono, Y., 2016. Two new 5-deoxyflavan-3,4-diol glucosides from roots of *Albizia chevalieri*. *Magn. Reson. Chem.* 54, 893–896.
- Wei, H.J., Yin, T., Zhu, Z., Shi, P.F., Tian, Y., Wang, C.Y., 2011. Expression of CD44, CD24 and ESA in pancreatic adenocarcinoma cell lines varies with local microenvironment. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 10, 428–434.
- Woldemichael, G.M., Wink, M., 2001. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2327–2332.
- Zhang, Z., Koike, K., Jia, Z., Nikaido, T., Guo, D., Zheng, J., 1999. Triterpenoidal saponins acylated with two monoterpene acids from *Gleditsia sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 388–393.
- Zheng, L., Zheng, J., Zhao, Y., Wang, B., Wu, L., Liang, H., 2006. Three anti-tumor saponins from *Albizia julibrissin*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 2765–2768.