



Université de Bourgogne

Ecole Doctorale ES

---

THÈSE

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR de l'UNIVERSITE de BOURGOGNE

Mention : PHARMACIE

Spécialité : PHARMACOGNOSIE

Présentée et soutenue publiquement le 18 Décembre 2013 par :

Mahenina Jaovita MANASE

---

Étude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces

Malgaches appartenant aux familles des

CARYOPHYLLACEAE, PITTOSPORACEAE et SOLANACEAE

---

JURY

Rapporteur	Pr. François BAILLEUL	Université de Lille
Rapporteur	Pr. Elisabeth SEGUIN	Université de Rouen
Directeur	Pr. Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS	Université de Bourgogne
Co-encadrant	Pr. Anne-Claire MITAINE-OFFER	Université de Bourgogne
Invité	Pr. Patrick DUTARTRE	Université de Bourgogne

---

*Année 2012–2013*









## *Dédicace*

Je dédie cette thèse à mes adorables parents, mon père Jose Richardson JAOVITA et ma mère Jacqueline Ranivoarsoa RAKOTOSON qui ont été une source inépuisable d'encouragement et un pilier d'appui sans faille.

Vous avez grandement participé à cette thèse, notamment pour la recherche des matières végétales, et les dossiers administratifs. J'essaie de montrer modestement ma profonde gratitude en vous dédiant ce travail.

Mahenina Jaovita MANASE

# Remerciements

*Cette thèse est l'aboutissement de trois années de travail, commençant en septembre 2010. Elle a été réalisée au sein de l'unité EA 4267 (FDE/UFC), Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, dirigée par le Professeur Marie-Aleth LACAÏLLE-DUBOIS. C'est un immense plaisir pour moi de remercier tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.*

*A ma directrice de thèse, le Professeur Marie-Aleth LACAÏLLE-DUBOIS, Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Bourgogne. Veuillez trouver dans ces quelques lignes ma profonde reconnaissance de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Vous m'avez dirigé durant ces trois années avec dynamisme et rigueur, ce qui a été pour moi les caractères de base à la réalisation de cette thèse. 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.*

*A Madame, le Professeur Anne-Claire MITAÏNE-OFFER, mon co-directeur de thèse, Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Bourgogne. Recevez ici mes sincères remerciements pour les conseils et votre constant soutien, je vous remercie également pour votre encadrement et disponibilité.*

*Je remercie Madame le Professeur Odile CHAMBIN et le Monsieur le Professeur Tan KIMNY, qui m'ont honoré d'avoir accepté d'être membres du comité de suivi tout au long de ma thèse.*

*A Madame le Professeur Elisabeth SEGUIN, à Monsieur le Professeur François BAILLEUL, qui se sont déplacés et ont aimablement accepté d'être rapporteurs et membre de jury de cette thèse. Recevez ma sincère reconnaissance.*

*Je remercie vivement tous les collaborateurs du Laboratoire de Pharmacognosie, qui ont été l'une des parties prenantes à l'accomplissement de cette thèse, notamment le Docteur Tomofumi MIYAMOTO et le Docteur Chiaki TANAKA pour l'acquisition des spectres des composés isolés. Merci également aux Professeur Patrick DUTARTRE et le Docteur Stéphanie DELEMASURE de la société COHIRO pour les essais biologiques.*

*Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Benja RAKOTONIRINA, botaniste du Département de Biologie Végétale et d'Écologie, Université d'Antananarivo, à Madagascar, d'avoir réalisé les travaux d'identification des espèces travaillés dans cette thèse.*

*Je remercie tous mes amis et mes collègues du Laboratoire, je cite les Docteurs Gaoussou TIMITE et Jens LINNEK, les doctorants Soumeya Betina BENCHARIF et Abdelmalek REZGUI, merci pour les conseils techniques, scientifiques et votre chaleureuse amitié. Aux personnes techniques, Stéphanie MASSELOT, Sandrine PACQUELET et David PERTUIT, merci pour votre enthousiasme et votre professionnalisme.*

*Je remercie le gouvernement Malgache, particulièrement son représentant Monsieur Le Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour la confiance qu'il m'a témoigné par l'octroi d'une bourse de trois années d'études, malgré la difficile étape que traverse le pays.*

*A toutes celles et ceux qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse, mon père et ma mère, ma sœur, ma grande famille et à tous mes amis.*

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

## Acronymes et Abréviation

1D	Monodimensionnel
2D	Bidimensionnel
Ang	Acide angélique
Ac	Acide acétique
Ara	Arabinose
Araf	Arabinofuranose
<sup>13</sup> C	Isotope du carbone avec un masse de 13 amu (atomic mass unit)
CC	Column Chromatography
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
cm	centimètre
COSY	<b>C</b> ORrelated Spectroscop <b>Y</b>
$\delta$	Déplacement chimique mesuré en ppm
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	dublet doublet
DEPT	<b>D</b> istorsionless <b>E</b> nhancement by <b>P</b> olarization <b>T</b> ransfert
ESI	<b>E</b> lectro <b>S</b> pray <b>I</b> onization
EtOH	Ethanol
FAB	<b>F</b> ast <b>A</b> tom <b>B</b> ombardment
FID	<b>F</b> lame <b>I</b> onization <b>D</b> etectot
GC	<b>G</b> as <b>C</b> hromatography
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GlcA	Acide Glucuronique
<sup>1</sup> H	Proton
H <sub>2</sub> O	Eau
HMBC	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple- <b>B</b> ond <b>C</b> orrelation spectroscopy
HPLC	<b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography
HR-ESI	<b>H</b> igh <b>R</b> esolution- <b>E</b> SI
HSQC	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle- <b>Q</b> uantum <b>C</b> orrelation spectroscopy
Hz	<b>H</b> erz

IC <sub>50</sub>	<b>C</b> oncentration <b>I</b> nhibitrice médiane
<i>J</i>	Constante de couplage mesuré en Hz
$\lambda$	Lambda
$\mu\text{g}$	microgramme
<i>m</i>	multiplet
MeOH	Méthanol
mm	<b>m</b> illimètre
MPLC	<b>M</b> edium <b>P</b> ressure <b>L</b> iquide <b>C</b> hromatographie
MS	<b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry
MTT	bromure de 2H-terazolium,2-(4,5-diméthyl-2-thiazolyle)-3,5-diphényle
<i>m / z</i>	Rapport masse / charge élémentaire de l'ion
NOESY	<b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser <b>E</b> ffect <b>S</b> pectroscopY
OH	hydroxyle
ppm	<b>p</b> arts <b>p</b> er <b>m</b> illion
Rha	Rhamnose
RMN	<b>R</b> ésonance <b>M</b> agnétique <b>N</b> ucléaire
RP	<b>R</b> eversed <b>P</b> hase
<i>s</i>	singulet
Si	Silice
SM	<b>S</b> pectrométrie de <b>M</b> asse
TLC	<b>T</b> hin <b>L</b> ayer <b>C</b> hromatography
TOCSY	<b>T</b> otal <b>C</b> orrelation <b>S</b> pectroscopY
VLC	<b>V</b> acuum <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography
XTT	2H-tétrazolium,2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphophényle)-5-[(phénylamino)carbonyle]-,inner
Xyl	Xylose

**Résumé :** Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la thématique du Laboratoire de Pharmacognosie de l'UFR Pharmacie, au sein de l'Université de Bourgogne. Elle vise essentiellement la recherche de molécules d'origine végétale principalement des saponines biologiquement actives issues de la biodiversité tropicale. Dans ce contexte l'étude de plantes malgaches, *Polycarpaea corymbosa* Lamk. (CARYOPHYLLACEAE), *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* (PITTOSPORACEAE), *Solanum incanum* L. et *S. heteracanthum* Dunal. (SOLANACEAE) a conduit à l'isolement de quinze glycosides naturels par les techniques de chromatographie solide-liquide, de chromatographie liquide à moyenne pression, de flash chromatographie, et de chromatographie liquide sous vide. Les structures ont été élucidées principalement par les techniques spectroscopiques de RMN-1D et -2D, et de spectrométrie de masse. Il s'agit de neuf saponines triterpéniques de type oléane, parmi lesquelles sept sont des nouveaux composés naturels, ainsi que cinq saponines stéroïdiques de type spirostane et furostane, dont une nouvelle, et un glycoalcaloïde stéroïdique connu. Treize molécules isolées ont été testées en vue d'évaluer leurs activités cytotoxiques sur six lignées cellulaires cancéreuses humaine et animale. Nos résultats montrent que quatre d'entre elles possèdent une cytotoxicité significative sur les lignées HT-29, HCT 116, SW480, DU145, EMT6, et H9c2.

Mots-clés : saponines ; triterpènes ; stéroïdes ; RMN ; cytotoxicité ; flore Malgache

---

**Abstract:** This thesis was carried out in the Laboratory of Pharmacognosy, in the Pharmacy section of the University of Burgundy. The principal theme of this laboratory is the research of natural compounds from tropical biodiversity, mainly saponins. In this context, the study of Malagasy plants, *Polycarpaea corymbosa* Lamk. (CARYOPHYLLACEAE), *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* (PITTOSPORACEAE), *Solanum incanum* L. and *S. heteracanthum* Dunal. (SOLANACEAE) led to the isolation of fifteen natural glycosides by column chromatography, medium pressure liquid chromatography, flash chromatography, and vacuum liquid chromatography. The structures were elucidated mainly by the use of spectroscopic techniques, NMR-1D and -2D, and mass spectrometry. The compounds were characterized as nine triterpene saponins of the oleanane type, among them seven are new natural compounds, five steroid saponins of the spirostane or furostane type, among them one new, and one known steroid glycoalkaloid. Thirteen of compounds were tested for cytotoxicity against six human and animal cancer cell lines. Our results show that four of them have significant cytotoxicity on cell lines HT-29, HCT 116, SW480, DU145, EMT6, and H9c2.

Mots-clés : saponins ; triterpenes ; steroïdes ; NMR ; cytotoxicity ; Malagasy flora

# Table des matières

Dédicace & Remerciements .....	5
Acronymes et Abréviations .....	8
Résumé & Abstract .....	10
INTRODUCTION GENERALE .....	15
Chapitre I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	17
I. Étude botanique. ....	19
1.1. La flore Malgache. ....	19
1.2. Ordre des CARYOPHYLLALES. ....	19
1.2.1. La famille des CARYOPHYLLACEAE. ....	20
1.2.2. <i>Polycarpaea</i> Lamk. ....	21
1.2.2.1. <i>Polycarpaea corymbosa</i> Lamk. ....	21
1.3. Ordre des APIALES. ....	24
1.3.1. La famille des PITTOSPORACEAE. ....	24
1.3.2. <i>Pittosporum</i> Banks ex Gaertner. ....	25
1.3.2.1. <i>Pittosporum verticillatum</i> Bojer subsp. <i>verticillatum</i> . ....	26
1.4. Ordre des SOLANALES. ....	29
1.4.1. La famille des SOLANACEAE. ....	29
1.4.2. <i>Solanum</i> L. ....	29
1.4.2.1. <i>Solanum incanum</i> L. ....	30
1.4.2.2. <i>Solanum heteracanthum</i> Dunal. ....	32
II. Travaux phytochimiques antérieurs. ....	34
2.1. Généralités sur les saponines. ....	34
2.2. Structure des saponines. ....	35

2.2.1. Les aglycones. ....	35
2.2.2. Les sucres. ....	37
2.2.3. Les acides organiques. ....	39
2.3. Les saponines du genre <i>Polycarpaea</i> Lamk. ....	40
2.4. Les saponines du genre <i>Pittosporum</i> Banks ex Gaertner. ....	41
2.5. Les saponines du genre <i>Solanum</i> L. ....	44
III. Travaux biologiques antérieurs. ....	46
3.1. Les activités biologiques des saponines. ....	46
3.2. Les propriétés pharmacologiques du genre <i>Polycarpaea</i> Lamk. ....	46
3.3. Les propriétés pharmacologiques du genre <i>Pittosporum</i> Banks ex Gaertner. ....	47
3.4. Les propriétés pharmacologiques du genre <i>Solanum</i> L. ....	47
Chapitre II. ETUDE CHIMIQUE. ....	49
I. Matériels et Méthodes. ....	51
1.1. Matériel végétal. ....	51
1.1.1. <i>Polycarpaea corymbosa</i> Lamk. ....	51
1.1.2. <i>Pittosporum verticillatum</i> Bojer subsp. <i>verticillatum</i> . ....	51
1.1.3. <i>Solanum incanum</i> Linné. ....	51
1.1.4. <i>Solanum heteracanthum</i> Dunal. ....	51
1.2. Méthodes chromatographiques. ....	52
1.2.1. Chromatographie sur couche mince. ....	52
1.2.2. Chromatographie sur gel perméable. ....	52
1.2.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC). ....	53
1.2.4. Chromatographie flash. ....	54
1.2.5. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC). ....	54
1.3. Détermination structurale. ....	55
1.3.1. Méthodes physico-chimiques. ....	55
1.3.1.1. Hydrolyse acide. ....	55
1.3.1.2. Pouvoir rotatoire. ....	56
1.3.2. Méthodes spectroscopiques. ....	57
1.3.2.1. Spectrométrie de masse. ....	57
1.3.2.2. Résonance magnétique nucléaire. ....	59
1.3.2.2.1. Les spectres monodimensionnels. ....	59



1.3.2.2.2.	Les spectres bidimensionnels. ....	60
II.	Résultats des travaux personnels. ....	63
2.1.	<i>Polycarpha corymbosa</i> Lamk. ....	63
2.1.1.	Extraction et isolement. ....	63
2.1.2.	Elucidation structurale. ....	64
2.1.2.1.	Description du composé <b>PC1</b> . ....	64
2.1.2.2.	Description du composé <b>PC2</b> . ....	68
2.1.2.3.	Description du composé <b>PC3</b> . ....	71
2.1.2.4.	Description du composé <b>PC4</b> . ....	74
2.1.2.5.	Description du composé <b>PC5</b> . ....	77
2.1.2.6.	Les spectres des composés isolés. ....	80
2.2.	<i>Pittosporum verticillatum</i> Bojer subsp. <i>verticillatum</i> . ....	89
2.2.1.	Extraction et isolement. ....	89
2.2.2.	Elucidation structurale. ....	89
2.2.2.1.	Description du composé <b>PV1</b> . ....	89
2.2.2.2.	Description du composé <b>PV2</b> . ....	94
2.2.2.3.	Description du composé <b>PV3</b> . ....	97
2.2.2.4.	Description du composé <b>PV4</b> . ....	100
2.2.2.5.	Les spectres des composés isolés. ....	103
2.3.	<i>Solanum incanum</i> Linné. ....	113
2.3.1.	Extraction et isolement. ....	113
2.3.2.	Elucidation structurale. ....	113
2.3.2.1.	Description du composé <b>SI1</b> . ....	113
2.3.2.2.	Description du composé <b>SI2</b> . ....	117
2.3.2.3.	Description du composé <b>SI3</b> . ....	120
2.3.2.4.	Description du composé <b>SI4</b> . ....	123
2.3.2.5.	Description du composé <b>SI5</b> . ....	126
2.3.2.6.	Les spectres des composés isolés. ....	129
2.4.	<i>Solanum heteracanthum</i> Dunal. ....	133
2.4.1.	Extraction et isolement. ....	133
2.4.2.	Elucidation structurale. ....	133
2.4.2.1.	Description du composé <b>SH5</b> . ....	133
2.4.2.2.	Le spectre de masse de <b>SH5</b> . ....	136

Chapitre III.	TRAVAUX BIOLOGIQUES .....	137
I.	Matériels et méthodes. ....	139
1.1.	Les lignées cellulaires. ....	139
1.2.	Test au XTT. ....	140
1.3.	Test au MTT. ....	142
II.	Résultats des tests de cytotoxicité. ....	143
2.1.	Saponines des CARYOPHYLLACEAE. ....	143
2.2.	Saponines des PITTOSPORACEAE. ....	145
2.3.	Saponines des SOLANACEAE. ....	148
Chapitre IV.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	153
Chapitre V.	PARTIE EXPERIMENTALE .....	159
A.	Extraction des saponines brutes. ....	161
B.	Purification des saponines. ....	166
C.	Caractéristiques des composés isolés. ....	171
Chapitre VI.	ANNEXE.....	177
A.	Publications. ....	179
B.	Posters, communications orales. ....	189
C.	Glossaire Botanique. ....	190
	BIBLIOGRAPHIE .....	201

# INTRODUCTION GENERALE

‘Sublime est la science qui a pour objet de conserver la vie’, ce sont les mots du Professeur Albert Rakoto RATSIMAMANGA, pionner scientifique Malgache sur les études phytochimiques et pharmacologiques, notamment la valorisation de la pharmacopée de Madagascar. L’île rouge est connue pour son exceptionnel et unique biodiversité, cependant cette richesse de l’île est menacée. En effet une étude réalisée par le Groupe des Spécialistes des Plantes de Madagascar (GSPM) en collaboration avec Missouri Botanical Garden et l’IUCN (International Union for Conservation of Nature) conduit à la publication d’une liste rouge des plantes vasculaires endémiques de Madagascar en mai 2011. Il comprend 1 676 sur 3 000 espèces évaluées comme étant vulnérable, en danger ou en danger critique [[source Tropicos.org](#) ; [Mg.chm-cbd.net](#)]. Ainsi, il est important et nécessaire d’améliorer la connaissance sur le point botanique, pharmacologique aussi bien phytochimique, afin de promouvoir la conservation de la flore de Madagascar.

Sur le plan international, dans certains pays asiatiques et africains, 80% de la population dépend de la médecine traditionnelle, notamment les traitements à base de plantes. Le chiffre d'affaires annuel sur le commerce de traitement à base de végétaux, en Europe occidentale a atteint 5 milliards de dollars en 2003-2004, en Chine, les ventes de produits ont totalisé 14 milliards de dollars en 2005, et au Brésil l’économie sur la phytothérapie tournait à près de 160 millions de dollars en 2007 [[Source WHO.int](#)]. En outre, plusieurs études démontrent l’importante place qu’occupent les substances naturelles comme sources de médicament. [Newman et Cragg, 2012](#) affirment que la place de substances naturelles dans le développement de médicaments est irréfutable, effectivement les composés thérapeutiques pour le traitement du cancer par exemple, entre 1940 et 2010, sur les 175 petites molécules, 131 soit 74.8 % ne sont pas des produits de synthèse, dont 85 de ces molécules, soit 48,6% sont des produits naturels ou directement dérivés.

Dans ce contexte, le laboratoire de pharmacognosie EA 4267 (FDE/UFC) à l'Université de Bourgogne dirigé par le Professeur Marie-Aleth Lacaille-Dubois apporte sa contribution à la recherche de saponines biologiquement actives à partir de diverses familles végétales. Notre stratégie de recherches consiste à la sélectionner des familles de plantes connues pour leur richesse principalement en saponines. Après l'extraction, l'isolement et l'analyse structurale, les molécules étudiées sont soumises à une évaluation de leur activité cytotoxique sur des cellules cancéreuses *in vitro*.

Nous présentons dans cette thèse l'étude phytochimique de différentes espèces végétales issues de la flore Malgache, une de la famille des CARYOPHYLLACEAE (*Polycarpha corymbosa* Lamk.), une de la famille des PITTOSPORACEAE (*Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum*), riches en saponines triterpéniques ainsi que deux espèces de la famille de SOLANACEAE (*Solanum incanum* L. et *S. heteracanthum* Dunal.) riches en saponines stéroïdiques.

La structure de ce mémoire s'articule en trois grandes parties :

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

La deuxième partie portera sur l'étude chimique personnelle. Les matériels et méthodes ainsi que les résultats de l'investigation phytochimique des plantes choisies seront détaillés dans ce volet.

La troisième et dernière partie, décrira l'étude biologique des composés isolés. Celle-ci a été réalisée en collaboration avec la société Cohiro, une spin off localisée à la faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Bourgogne spécialisée dans des recherches ciblant l'inflammation, immunomodulation et le stress oxydant ; et la société de biotechnologie Oncodesign dont l'objectif est de découvrir des thérapies anticancéreuses efficaces, en utilisant des lignées de cellules cancéreuses humaines et animales.

# Chapitre I.

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



# I. Etude botanique.

## 1.1. La flore Malgache.

La flore Malgache décrit dans « Flore de Madagascar et des Comores », éditée par le Muséum National d'Histoire Naturelle depuis 1936, compte 189 familles dont 166 familles sont actuellement révisées. Les plantes de Madagascar sont remarquables par leur extraordinaire diversité et leur exceptionnel niveau d'endémisme. Aujourd'hui le nombre total de plantes à fleurs Malgaches est d'environ 14 000, avec un niveau d'endémisme qui peut dépasser 90% [Allorge, 2008].

## 1.2. Ordre CARYOPHYLLALES.

Les CARYOPHYLLALES constituent avec trois autres ordres, GUNNERALES, SANTALALES et SAXIFRAGALES le PRÉ Eu-DICOTYLÉDONES. On y observe le voisinage encore de certains caractères primitifs, comme la trimérie ou l'indifférenciation au niveau du périanthe ainsi que parfois la soudure entre eux des pétales ou des carpelles. Par ailleurs, on remarque ici certaines spécificités, comme la présence de périsperme, des embryons courbes ou des ovules imparfaits.

Cet ordre est important, regroupant plus de 11 000 espèces réparties dans 17 familles. Plusieurs caractères définissent cet ordre [Botineau, 2010].

➤ D'un point de vue morphologique :

Les ovules, en placentation centrale libre ou basale, sont souvent recourbés (campylotropes), et par conséquent l'embryon prend la même disposition autour du tissu nourricier, qui est ici un périsperme diploïque (issu de l'ovule) et non de l'albumen triploïde. Cependant, un certain nombre de plantes dont l'embryon est droit et les graines albuminées sont rattachés aujourd'hui au CARYOPHYLLALES [Botineau, 2010].

➤ D'un point de vue biochimique :

La coloration des fleurs et des fruits n'est pas due à des anthocyanes, pigments habituels des Angiospermes, mais à des bétalaines qui sont des pigments azotés; la présence de cet atome d'azote, sous forme d'ammonium quaternaire est responsable de cette coloration particulière rouge ou parfois jaune-orangé. Beaucoup de CARYOPHYLLALES se développent sur des milieux riches en nitrates (décombres, voisinage des habitations, rivages marins...) et son donc bien pourvues en cet élément. Mais chez les familles les plus évoluées, comme celles des CARYOPHYLLACEAE, se retrouvent les pigments anthocyaniques [Botineau, 2010].

### 1.2.1. La famille des CARYOPHYLLACEAE.

C'est une famille importante, avec 87 genres et environ 2 300 espèces présentant une large répartition, cependant surtout caractéristiques des régions tempérées et chaudes de l'hémisphère nord. La flore Malgache ne compte que 8 genres avec 18 espèces environ. [Botineau, 2010; Perrier De La Bathie et al., 1950].

Il s'agit d'herbes annuelles ou vivaces. Leur port se caractérise par des éléments foliacés opposés décussés, insérés sur des nœuds fortement renflés, d'où le nom de la famille (de *caryon* = nœud, et *phyllon* = feuille). Ces feuilles stipulées ou non, simples entières et étroites, et à nervation paraissant plus ou moins parallèle sont rarement pétiolées et de ce fait on les considère comme un élargissement de ce pétiole, comme chez les Monocotylédones. Au point de vue anatomique, les tiges peuvent présenter des faisceaux de xylème et de phloème disposés en cercles concentriques. Les pigments sont ici de nature anthocyanique. L'inflorescence se présente sous forme de forme d'une cyme bipare caractéristique, simple et parfois réduite à une fleur solitaire ou composée, parfois contractée et simulant alors plus ou moins un capitule : dans ce cas, les fleurs sont accompagnées de bractées scarieuses formant un petit involucre. La fleur est en général hermaphrodite, régulière, le plus souvent pentacyclique, tétramère ou pentamère, hypogyne. La pollinisation est entomophile, réalisée par des Diptères et des Lépidoptères venant récolter le nectar. Cette pollinisation croisée est d'autant plus nécessaire qu'il y a souvent protandrie. La graine ne possède en principe pas d'albumen, mais un péricarpe autour duquel s'enroule l'embryon [Botineau, 2010].



### 1.2.2. *Polycarpaea* Lamk.

Ce sont des herbes annuelles ou plantes sous-ligneuses pérennes, dressées. Les feuilles sont opposées ou subverticillées, et sont généralement linéaires (caulinaires), rarement obovales ou oblancéolées, mais toujours sessiles avec des stipules scarieuses. Les cymes sont terminales, multiflores, compactes ou assez denses, corymbiformes, ramifiées-dichotomes, avec des bractées scarieuses, le plus souvent semblables aux stipules. Le nombre de sépales est de cinq, et ils sont entiers, le plus souvent scarieux et d'un blanc d'argent. Les pétales au nombre de cinq sont membraneux et souvent colorés. Les étamines sont au nombre de cinq, subpérigynes, et sont courtement soudées à la base. L'ovaire est uniloculaire, pauci- ou pluriovulé; la placentation est basilaire; le style est filiforme; le stigmate est capité, subentier ou trilobé. Ils ont des capsules trivalves; les graines sont réniformes-globuleuses, et l'embryon est peu arqué avec cotylédons accombants.

Le genre *Polycarpaea* compte environ 45 espèces, dans les régions tempérées ou tropicales. Six espèces ont été déterminées à Madagascar, dont cinq sont endémiques à l'île : *P. angustipetala* H. Perr., *P. Douliotii* P. Danguy, *P. helichrysoïdes* H. Perr., *P. philippioides* H. Perr., *P. rubioides* H. Perr. [Perrier De La Bathie et al., 1950]

#### 1.2.2.1. *Polycarpaea corymbosa* Lamk.

*Polycarpaea corymbosa* Lamk est une plante annuelle, de 15–30 cm de haut, ordinairement simple à la base, elle ne se ramifie le plus souvent que dans l'inflorescence; les tiges sont plus ou moins pubescentes ou poilues et plus densément vers les sommets. Les stipules sont scarieuses-blanches, aiguës et vite lacérées. Elles possèdent des feuilles caulinaires opposées ou subverticillées par 5–7, sessiles, linéaires, et prolongées au sommet par une longue soie blanche. Les feuilles sont fragiles et caduques, avec des limbes assez épais, à peu près plan en dessous, et sont un peu caréné en dessus avec un sillon peu profond de chaque côté. Les feuilles radicales sont détruites à la floraison, par contre elles sont obovales-oblongues ou lancéolées sur les jeunes pieds, et sont atténuées en pétiole ou courtement pétiolées, avec des limbes de 6–18 x 4–8 mm. Les cymes sont corymbiformes, plus ou moins denses ou lâches, mais toujours multiflores; les bractées sont semblables aux stipules.

Les fleurs de 3 mm de long sont glabres ou à peu près, avec les inférieures plus ou moins pédicellées, celles des extrémités possédant des ramifications souvent disposées par trois. La fleur médiane est pédicellée et complète alors que les deux fleurs latérales sont sessiles, très incomplètes, stériles, avec seulement un rudiment informe d'androcée et de gynécée. Les sépales sont lancéolés, très aigus, et entièrement blancs-carieux. En revanche, les pétales sont très petits (0.7–1 x 0.4–0.5 mm), et font environ le tiers des sépales. Les étamines sont plus courtes que les pétales. L'ovaire est sphérique-trigone, et peut avoir 10–12 ovules. Le style est court (0.15 mm). La capsule est ovale (2 x 1 mm) avec 8–10 graines, et elle est globuleuses-réniformes (0.4 mm de diamètre).

*Polycarpaea corymbosa* Lamk pousse sur des terrains sablonneux, souvent près des habitations ou des cultures, à une altitude allant de 0 à 1 800 m, et sur tout le versant occidental de la Grande-Ile. La floraison a lieu de mars à octobre [[Perrier De La Bathie et al., 1950](#)].

Noms malgaches : *Tamborokijolahy*, *Malandivony* (fleurs blanches).



Photo 1. Photo de *Polycarpaea corymbosa* Lamk. A : plante entière ; B : planche d'herbier, source [Hostmann, Tropicos.org] ; C : partie florale ; D : partie aérienne sèche (C et D, source l'auteur).

### 1.3. Ordre des APIALES.

Les APIALES avec trois autres ordres, AQUIFOLIALES, ASTERALES et DIPSACALES définissent l'ensemble d'Eu-ASTERIDES II. Cet ensemble se différencie par des fleurs à sympétalie précoce, dont les pétales sont presque systématiquement soudés dès leur formation en un tube (à l'exception des APIALES), l'ovaire est général infère, l'androcée est isostémone; enfin, les métabolites secondaires sont souvent des polyacétylènes ou des sesquiterpènes. L'ordre des APIALES rassemble dix familles dont APIACEAE, ARALIACEAE, MACKINLAYACEAE, MYODOCARPACEAE, ARALIDIACEAE, GRISELINIACEAE, MELANOPHYLLACEAE, TORRICELLIACEAE, PENNANTIACEAE, et PITTOSPORACEAE. Ce sont des plantes ligneuses ou herbacées, à feuilles composées ou profondément découpées, ayant un caractère commun, l'inflorescence ombelliforme [Botineau, 2010].

#### 1.3.1. La famille des PITTOSPORACEAE.

Cette famille comprend, en plus de *Pittosporum* dont l'aire est très vaste, un genre s'étendant sur l'Australie, l'Indonésie et les Philippines et sept autres qui sont endémiques en Australie [Cufodontis et al., 1955]. Elle comptabilise donc neuf genres et environ 200 espèces réparties dans les régions paléotropicales [Botineau, 2010].

Ce sont des arbres, des arbustes ou des lianes, parfois épineux. Les feuilles, sans stipules, sont alternes, simples, et coriaces. On note la présence de canaux sécréteurs schizogènes. Les fleurs, solitaires ou rassemblées en corymbes ou en thyrses, sont régulières et hermaphrodites. Le périanthe comprend un calice de cinq sépales parfois soudés à la base, et une corolle de cinq pétales également soudés en général à la base en un tube plus ou moins développé. L'androcée est isostémone, avec cinq étamines alternipétales légèrement soudées à la base; les anthères s'ouvrent soit par des fentes longitudinales, soit souvent par des pores. Le gynécée est formé par deux à cinq carpelles, soudés en un ovaire supère habituellement uniloculaire. Il contient de nombreux ovules en placentation pariétale, et qui sont uni-tégumentés. Le fruit est une capsule loculicide (*Pittosporum*, *Hymenosporum*) ou une baie (*Billardiera*). Les

graines comportant de deux à cinq cotylédons baignent souvent dans une pulpe visqueuse à l'origine du nom de *Pittosporum* [« *Pittos* » = poix].

Cette famille est donc difficile à classer, et pendant longtemps, a été considérée comme appartenant à l'ordre des ROSALES, ayant même pendant un temps englobé le genre *Brunellia* (BRUNELLIACEAE, Eu-ROSIDES I) [Botineau, 2010].

### 1.3.2. *Pittosporum* Banks ex Gaertner.

Le genre *Pittosporum* compte environ 150 espèces, surtout dans les régions paléotropicales et chaudes; en Afrique tropicale et du sud, comme à Madagascar, aux Mascareignes, aux Seychelles; en Asie du Sud comme en Indes, en Indochine; dans le Sud de la Chine; et dans les archipels de l'Océanie comme le Sud du Japon et de la Corée, aux Philippines, en Australie, en Tasmanie, en Nouvelle-Zélande, aux Nouvelle-Guinée dans l'Archipel Bismarck, les îles Salomon, la Nouvelle-Calédonie, les îles Fidji et Tonga, l'archipel de Cook, Tahiti et les Hawaii.

Ce sont des arbrisseaux ou des arbres. Les feuilles sont persistantes, simples, et entières. Les fleurs à symétrie radiale sont pentamères à l'exception du pistil, qui est morphologiquement bisexué mais physiologiquement toujours mono-dynamiques, et par la suite, soit le pistil, soit les étamines, sont plus ou moins imparfaitement développés. Les placentas sont pariétaux-dorsaux, à 1–4 paires d'ovules superposés sur chaque carpelle. Les inflorescences sont homogènes au point de vue de la fonction sexuelle, et elles sont androdynamiques et gynodynamiques étant vraisemblablement, toujours, ou de façon prédominante, dioïques, rarement peut-être monoïques. Les fruits est une capsule à deux valves (trois, seulement dans des cas isolés anormaux), ces dernières finement coriaces et massivement lignifiées, s'ouvrant brusquement à pleine maturité. Les graines de chaque valve, avec leur funicule bien reconnaissable, sont rangées par 1–4 paires superposées. Ces graines sont d'abord ovoïdes, mais se déforment au cours de la maturation dans la capsule fermée pour devenir, suivant leur nombre, hémisphériques, en quart de sphère ou irrégulièrement prismatiques, de couleur rouge à brun rougeâtre, couvertes d'un suc visqueux, séchant difficilement, à odeur de résine. Les graines ont un tégument externe lisse, et sont constituées d'albumen dur, à embryon très petit et droit (caractères des espèces malgaches de *Pittosporum*) [Cufodontis et al., 1955].

1.3.2.1. *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum*.

Ce sont des arbrisseaux ou plus souvent des arbres atteignant ordinairement 12 m, plus rarement 25 m de haut. Les rameaux sont parfois rapprochés en faux verticilles, à écorce gris-brunâtre, possédant en général de nombreuses lenticelles. Les plus jeunes sont striés, glabres ou faiblement pubescents. Les feuilles, assez souvent rapprochées à l'extrémité des rameaux, sont parcheminées ou très finement coriaces. Elles sont en général vert foncé et luisantes sur la face supérieure et plus claires sur la face inférieure, plus rarement concolores sur les deux faces, et toujours entièrement glabres. Elles sont très variables de contour et de taille, mais toujours arrondies, échancrées ou obtuses, jamais acuminées-aiguës, graduellement atténuées jusque sur le pétiole, à plus grande largeur dans le tiers supérieur. La nervure médiane incurvée sur la face supérieure dans le tiers supérieur dans un étroit sillon; elle est fortement en relief sur la face inférieure, s'amincit rapidement vers la pointe. Les nervures latérales au nombre de 6–10 souvent divergentes de plus de 45°, possèdent des ramifications en bordure du limbe. Les réseaux des nervilles non homogènes ont des grandes mailles bien visibles, peu serrées, assez souvent en relief sur la face inférieure, toujours de couleur rougeâtre au début, et devenant parfois plus pâles ensuite, plus ou moins visibles par transparence.

L'inflorescence est terminale, en général composée, paniculée-subombelliforme, riche en fleurs, plus rarement simple. Elle se présente en corymbe ou grappe, et pauciflore, atteignant 50 mm de long, avec des axes délicatement pubescents, et plus tard ordinairement glabrescents. Les fleurs au nombre de 3–6 s'organisent en fascicules ombelliformes ou subracémiformes, sur des pédicelles longs de 4–6 mm, et sont glabrescents à la fin. Les sépales sont libres, non imbriqués, ovales, obtus, et en général sont finement ciliés sur la marge. Les pétales sont de couleur blanchâtre, jaune clair ou verdâtre; et se présentent en oblongs-étroits, obtus, et arqués en arrière. Le pistil plus ou moins sans pied est glabre ou pubescent. Les dimensions en moyenne dans les fleurs sont les suivantes :

- Dans les fleurs ♂: sépales 1.5 x 1.1 mm, pétales 5.5 x 1.6 mm, filet plus anthère 5.3 mm, pistil 3.9 mm.
- Dans les fleurs ♀ : sépales 1.7 x 1 mm, pétales 4.4 x 1.2 mm, filet plus anthère 3.7 mm, pistil 3.1 mm.

La capsule sans pied (ou munie d'un pied très court et aplati) est tronquée ou ombiliquée-plane à la base, plus ou moins sphérique par ailleurs. Elle est jaune rougeâtre, orangée ou rouge, glabre, à odeur de térébenthine. Les valves de la capsule mûre sont étalées horizontalement ou un peu recourbées vers le bas. Elles sont assez fortement coriaces, épaisses de 0.5–1 mm sur le bord, avec des contours à peu près ovale, longues de 5–8 mm et de largeur analogue à la base, convexes, finement grenues-ridées excepté à la base et dans une petite cavité sous le sommet. Les valves sont concaves dedans, parcourues par des rides pennées assez serrées, et en partie ramifiées. Le placenta est basilaire. Les ovules sont presque toujours au nombre de quatre, dont seulement 2 à 3 parviennent à maturité complète. Il existe deux sous-espèces : subsp. *pangalanense* et subsp. *verticillatum*. L'espèce *P. verticillatum* subsp. *verticillatum* var *verticillatum* possède les caractères cités ci-dessus avec quelques uns supplémentaires: les feuilles sont arrondies, rétuses, tronquées ou échancrées, d'une couleur presque toujours vert foncé et luisantes sur la face supérieure. La nervure médiane est très souvent évanescence avant la pointe. L'inflorescence est riche en fleurs, et composée. Les dimensions des feuilles : 40 x 17 mm jusqu'à 74 x 30 mm (moyenne 58 x 23 mm, quotient 2.5). L'espèce pousse dans les forêts, parfois au bord des ruisseaux, sur latérite de gneiss. On les trouve de 800 à 2 000 m d'altitude, et fréquemment dans la partie médiane du centre. La floraison a lieu de décembre à début mai, et les fruits sont mûrs de juin à décembre [Cufodontis et al., 1955].

Noms Malgaches : *Ambovitsika*, *Fandoabalo*, *Fantsikala*, *Mantsiloha*. Les Malgaches pensent que la plante éloigne les esprits à cause de sa mauvaise odeur [Cufodontis et al., 1955].





Photo 2. Photo de *Pittosporum verticillatum* Bojer. A : fruit vert et organisation des feuilles, source [[Ravelonarivo, 2011](#)] ; B : fruit mûr, source [[Razanatsima, 2007](#)] ; C : fleur, source [[Rakotovao, 2006](#)].



## 1.4. Ordre des SOLANALES.

Les ordres de SOLANALES, GARRYALES, GENTIANALES et LAMIALES constituent le sous-clade Eu-ASTERIDES, qui se caractérise par des fleurs à sympétalie tardive, dont les pétales se forment séparés avant de se souder entre eux, l'ovaire est presque toujours supère, l'androcée est isotone ou parfois oligostémone, et les métabolites secondaires sont généralement des iridoïdes ou des alcaloïdes. L'ordre des SOLANALES correspond à des plantes essentiellement herbacées, à feuilles alternes, dont les fleurs sont de grande taille, régulières, hermaphrodites, gamopétales, isostémones. Les ovules sont toujours unitégumentés et ténuinucellés. Depuis la séparation des BORAGINACEAE de cet ordre, celui-ci se limite désormais à environ 4 800 espèces regroupées en 5 familles [Botineau, 2010].

### 1.4.1. La famille des SOLANACEAE.

Cette famille rassemble 147 genres et environ 2 900 espèces réparties dans les régions chaudes et tempérées, avec un important centre de dispersion en Amérique du Sud, d'où sont originaires les pommes de terre, les aubergines, les tomates, les piments... [Botineau, 2010].

Les SOLANACEAE sont généralement divisées en 2 sous-familles : les *Solanoideae* et les *Cestroideae*. A Madagascar toutes les espèces de SOLANACEAE appartiennent aux *Solanoideae* à l'exception de *Tsoala* et des espèces introduites appartenant aux genres *Brunfelsia*, *Cestrum*, *Nicotiana* et *Petunia* [D'Arcy et Rakotozafy, 1994].

A Madagascar, les SOLANACEAE sont importantes sur le plan économique et par le nombre d'espèces qui ont été introduites dans de nouvelles régions durant ces derniers siècles. Les espèces de cette famille sont des plantes alimentaires, médicinales ou ornementales et beaucoup d'entre-elles sont nuisibles [D'Arcy et Rakotozafy, 1994].

### 1.4.2. *Solanum* L.

Le genre *Solanum* fait partie des plus grands genres de Phanérogames par son nombre élevé d'espèces, plus de 1000, qui existent dans toutes les régions où croissent des végétaux, mais surtout dans la zone néotropicale. De nombreuses espèces sont

rencontrées à Madagascar, plusieurs d'entre elles sont des espèces introduites (environ 1/3), et sont soit cultivées, soit complètement naturalisées.

Ce sont des arbres, arbustes, plantes sarmenteuses ou herbes. Les feuilles sont alternes ou géminées, simples ou entières à lobées ou composées; le pétiole est présent ou non.

Les inflorescences sont terminales, axillaires, latérales (extra-axillaires) ou pseudo-terminales, cymeuses, mais pas à la base. Les fleurs sont racémeuses en panicules ou solitaires. Les pédicelles sont présents ou non. Les bractées sont le plus souvent présentes ou absentes. Les fleurs 5-mères (pièces florales par multiple de 5) sont ♂ et ♀ (ou plantes andromonoïques). Le calice est généralement campanulé ou cupulaire, le plus souvent lobé. La corolle est parfois campanulée, peu ou profondément lobée. Les étamines sont insérées à la base du tube de la corolle. L'ovaire à 2 carpelles possède parfois 4 loges par formation de fausses cloisons. Les baies sont juteuses, charnues ou sèches à la fin. Les graines sont le plus souvent nombreuses et comprimées et les embryons sont fortement courbés [D'Arcy et Rakotozafy, 1994].

#### 1.4.2.1. *Solanum incanum* L.

C'est un arbuste ramifié atteignant 1 m de haut. Les rameaux sont d'abord rugueux, tomenteux (poils étoilés, pédicellés, à branches dans toutes les directions), parfois noirs ou rougeâtres, portant des épines éparses le plus souvent droites, courtes, et épaissies à la base ou aciculées. Les feuilles sont organisées par paires, les feuilles d'une même paire inégales. Les grandes feuilles sont elliptiques, aiguës ou obtuses au sommet, mais sont obtuses ou tronquées à la base, le plus souvent entières ou à 2-4 lobes irréguliers sinués de chaque côté, tomenteuses sur les deux faces, cependant un peu plus à la face inférieure. La nervure principale distincte est occasionnellement pourvue de quelques épines courtes et épaisses sur les deux faces. Les petites feuilles arrondies ont des pétioles grêles, tomenteux, atteignant 3 cm de long.

Les inflorescences se présentent en racèmes pauciflores, mais le plus souvent une seule fleur se développe dans chaque racème et les inflorescences paraissent formées de fleurs solitaires, latérales sur la tige. Les fleurs ♂ et ♀ sont sur la même plante, le plus souvent 5-mères. Les calices (7 mm de long) sont tomenteux avec des lobes

atteignant 4–5 mm. La corolle de couleur bleue, mauve ou blanche (15–30 mm de diamètre) est étoilée, profondément lobée, tomenteuse à l'extérieur. Les étamines au nombre de cinq, avec des filets longs de 1.5–1.8 mm sont glabres. Les anthères sont longues de 6.5–8 mm. L'ovaire est tomenteux au sommet; le style est exsert, avec la moitié inférieure tomenteuse, et les poils sont étoilés. Le fruit est une baie globuleuse, mate, jaune, et mesure de 2.5–5 cm de diamètre. Les graines discoïdes (diamètre de 2–3.5 mm), sont de couleur chamois, devenant plus sombres en vieillissant.

A Madagascar, *S. incanum* L. croît près des habitations et le long des routes près des villages. Les fruits sont comestibles et sont utilisés cuits en médecine locale. Cette espèce est proche de *S. melongena*, mais en diffère par ses fruits et par la forme du calice [D'Arcy et Rakotozafy, 1994].

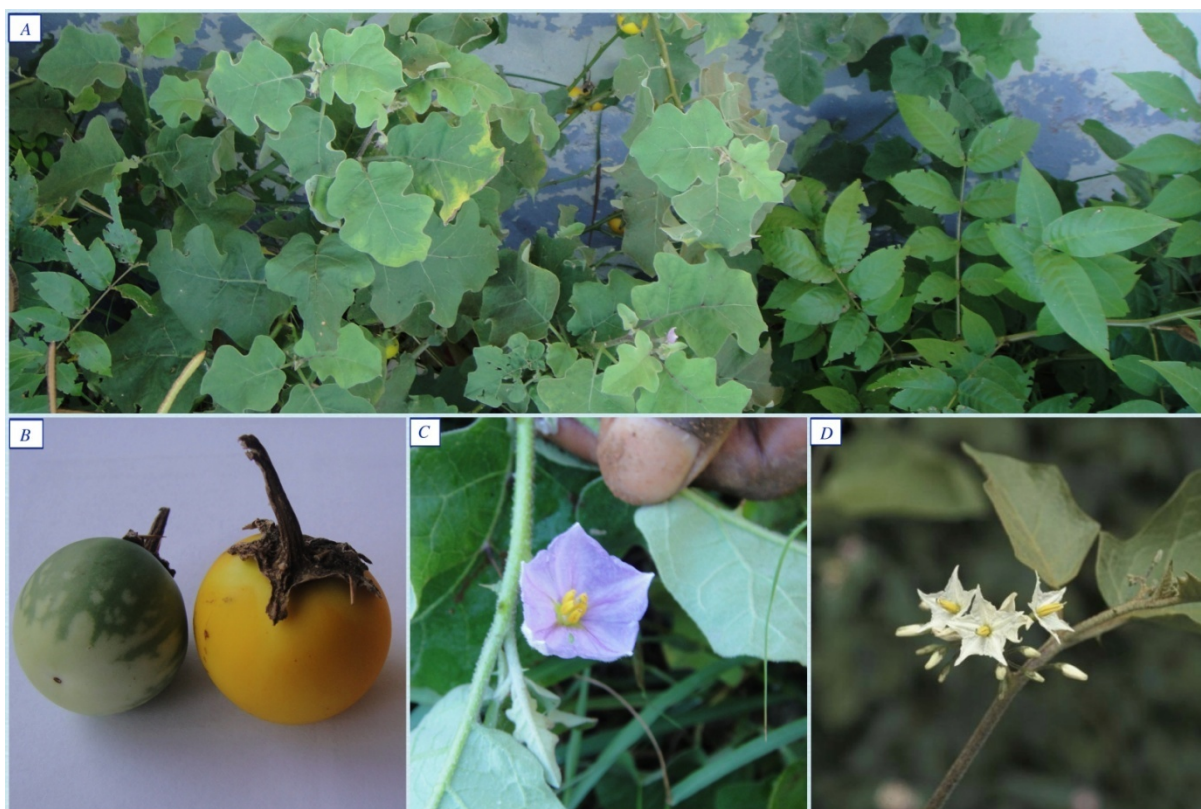


Photo 3. Photo de *Solanum incanum* L. A : la plante poussant au pied d'un mur, B : fruits, C : fleur (A, B et C, source l'auteur) ; D : fleur, source [Allorge, 2008].

#### 1.4.2.2. *Solanum heteracanthum* Dunal.

Cette espèce est décrite comme une synonymie de *Solanum melongena* L. [Hooker, 1885 ; Muséum national d'Histoire naturelle, 2013], dont la description botanique figure ci-dessous.

Il s'agit d'une herbe pérenne ou arbuste pouvant atteindre 1 m de haut. Les rameaux sont cylindriques, villos-tomenteux (poils blanchâtres, pédicellés, étoilés), parfois glabrescents, parfois pourvus d'épines éparses. Les feuilles sont par paires; les feuilles d'une même paire sont inégales, elliptiques, aiguës ou obtuses au sommet mais sont obtuses ou tronquées à la base (6–15 x 3–9 cm), le plus souvent lobées (2–4 lobes irrégulièrement sinués de chaque côté). Ces feuilles sont parfois entières, tomenteuses au-dessus, un peu plus en dessous. Les nervures majeures sont distinctes. Les feuilles mineures sont le plus souvent larges. Le pétiole est grêle, subcylindrique, tomenteux, et peut atteindre 7 cm de long.

L'inflorescence s'organise en racèmes d'une à quelques fleurs, mais une seule fleur se développe le plus souvent. Le pédoncule est simple, épais, cylindrique, tomenteux, pouvant atteindre 2 cm de long. Le pédicelle (1–2 cm) paraît articulé à la base. Les fleurs ♂ et ♀ sont sur la même plante, le plus souvent 5–6-mères. Le calice tomenteux long de 7–20 cm possède des lobes longs de 2–7 mm, qui sont précocement incisés. La corolle de couleur bleue, mauve ou blanche mesure 3.5–5 cm de diamètre, lobée sur la moitié. Les étamines (3–4 mm) sont égales, à filets glabres. Les anthères sont épaisses et longues de 6.5–8 mm. L'ovaire est glabrescent et tomenteux au sommet. Le fruit est une baie pouvant atteindre 40 cm de long; elle est ellipsoïdale, ovoïde, globuleuse ou cylindrique, et devient brune, rose, pourpre ou noire à jaune terne. Le calice enveloppe d'abord le fruit, mais se déchire précocement avant que le fruit soit mûr, devenant tuberculé et parfois épineux. Le pédicelle est dressé, devenant épais et allongé, atteint 3 cm de long, et se courbe brusquement vers le bas. Les graines (3 mm de diamètre), nombreuses, implantées dans une chair blanche de couleur chamois, deviennent plus sombres en vieillissant.

À Madagascar, cette espèce est cultivée dans de nombreuses régions pour ses grands fruits comestibles. Il s'agit probablement d'un taxon horticole dérivé de *S. incanum*, avec lequel il est facilement confondu. Par rapport à cette dernière espèce, *S. melongena* est une plante de plus grande dimension; ses feuilles, ses fleurs et ses fruits



(«aubergines», de formes et de couleurs diverses) sont aussi plus grands. Les fruits de *S. incanum* sont toujours jaunes et presque globuleux [D'Arcy et Rakotozafy, 1994].

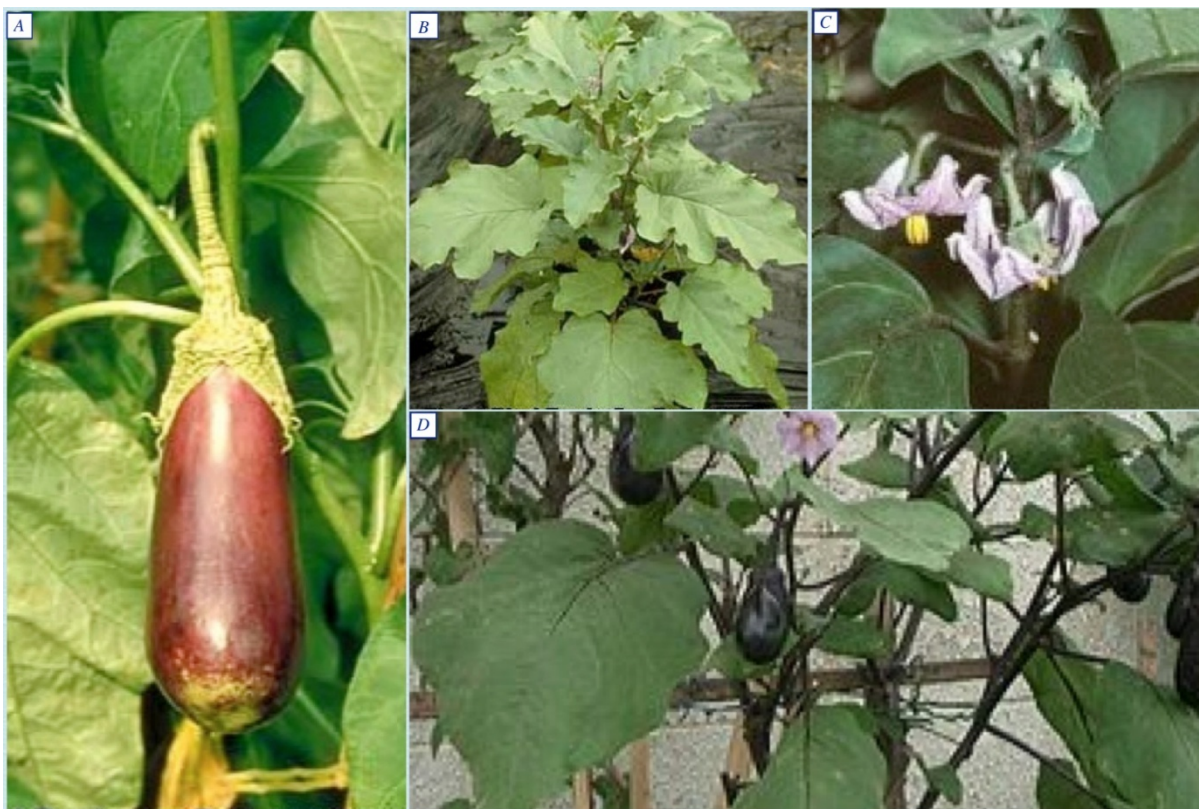


Photo 4. Photo de *Solanum melongena* L. A : fruit, B et D: plante entière, C : fleur ;  
source [Daunay et Chadha, 2004].

## II. Travaux phytochimiques antérieurs.

### 2.1. Généralités sur les saponines.

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal [Vincken et al., 2007]. Le nom «saponine» est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante. C'est d'ailleurs sur leur tensio-activité qu'est fondée l'utilisation multiséculaire de certaines plantes qui renferment : la saponaire (*Saponaria officinalis* L.) [Bruneton, 2009]. Il est intéressant de noter que des organismes marins comme le concombre de mer contiennent des saponines, par exemple le frondoside A isolé de *Cucumaria frondosa*, l'eximisoside A isolé de *Psolus eximius*, les thyonosides A et B isolés de *Thyone aurea*, et le neothyonidioside isolé de *Stichopus mollis* [Girard et al., 1990 ; Kalinin et al., 1997 ; Bonnard et Rinehart, 2004 ; Moraes et al., 2004].

Comme les flavonoïdes, les alcaloïdes et les antibiotiques pour en nommer seulement certains, les saponines font partie des métabolites secondaires. Ce sont des composés qui servent de défense à la plante. De nombreuses revues rapportent que les saponines existent dans les plantes sous forme biologiquement active et sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne [Hostettman et Marston, 1995 ; Osbourn, 1996a,b]. Les propriétés biologiques de ce métabolite secondaire ne sont pas limitées qu'à la protection des plantes, car de nombreuses espèces végétales à forte teneur en saponines sont utilisées en médecine traditionnelle, comme notamment les racines de *Bupleurum falcatum* L. [Fujioka et al., 2003] et de *Panax ginseng* C. A. Meyer [Kim et al., 1995 ; Park et al., 2005], pour ne citer que quelques exemples.

Les saponines retiennent l'attention aussi bien pour leur exploitation industrielle en lien avec leurs propriétés pharmacologiques. Plusieurs plantes à saponines sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques,

d'autres ont des applications en phytothérapie. Les saponines trouvent également de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie cosmétique en raison de leur propriété moussante et émulsifiante, les sources les plus importantes étant l'arbre *Quillaja saponaria* Molina et *Yucca schidigera*, et l'arbuste du Sud-Est asiatique *Camellia sinensis*, connue sous le nom de « tea plant » [Kobayashi et al., 2006 ; Wojciechowski, 2013]. Les applications des saponines s'étendent à l'agriculture, avec utilisation pour l'assainissement des sols [Chen et al., 2008] et pesticides naturels [Chapagain et al., 2007].

## 2.2. Structure des saponines.

Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique.

Hostettman et Marston, 1995, attribuent aux hétérosides d'amines stéroïdiques (solasolènes et solanidanes) le rang de troisième groupe dans la famille des saponines. Cependant d'autres auteurs distinguent ce groupe comme des alcaloïdes. Certes, ce ne sont biogénétiquement que des pseudo-alcaloïdes et, en termes de propriétés, leur comportement n'est pas sans rappeler celui des saponosides. Il n'en demeure pas moins que l'origine de leur atome d'azote les rapproche d'autres dérivés azotés du métabolisme terpénique que l'on s'accorde à considérer comme des alcaloïdes (ex. : aconitine) [Bruneton, 2009].

### 2.2.1. Les aglycones.

- Les saponines à génines stéroïdiques sont presque exclusivement présentes chez les Angiospermae Monocotyledonae (Liliopsida), les familles sont les suivantes : ALLIACEAE (*Allium*), AGAVACEAE (*Agave*, *Yucca*), ASPARAGACEAE, DIOSCOREACEAE (*Discorea*), FABACEAE, SOLANACEAE (*Solanum*) et PLANTAGINACEAE.

Le squelette à 27 atomes de carbone comporte habituellement six cycles : les deux cycles E (furanique) et F (pyranique) sont, la conséquence d'une cétylation intramoléculaire qui intervient après l'oxydation en C-16, C-22 et C-26 d'un précurseur cholestanique. Les carbones de l'hexacyclique comporte de nombreux carbones asymétriques, mais seule la configuration en C-25 est variable (25*S*, le

méthyl est axial ; 25*R*, le méthyl est équatorial). La fusion des cycles cycle B/C et C/D est toujours *trans*, celle des cycles D et E est toujours *cis* et la configuration des carbones C-20 et C-22, respectivement *S* et *R*. Les sapogénines stéroïdiques peuvent avoir une double liaison  $\Delta^{5,6}$ . Mais cette liaison peut être également réduite et permet d'expliquer l'existence d'une fusion des cycles A/B en *trans* (H-5 $\alpha$ ) ou en *cis* (H-5 $\beta$ ). L'hydroxyle porté par le C-3 est constant et d'autres hydroxylations sont possibles en C-1, C-2, C-5, C-6 et, plus rarement en C-17, C-24, C-15. Très exceptionnellement, on peut avoir une lactone (spirostan-26-ones, *Solanum*), une déméthylation (18-*norspirotanols*, *Trillium*) ou encore la sulfatation d'un hydroxyle de la génine [Bruneton, 2009].

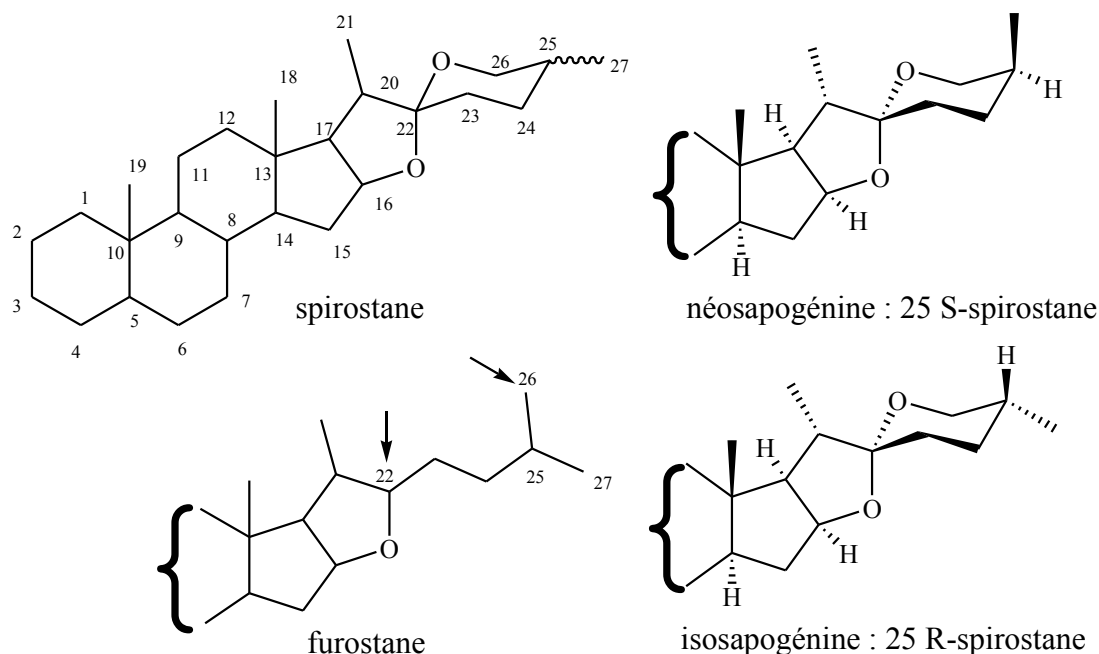


Figure 1.1 – Squelettes et configurations des génines stéroïdiques des saponosides [Bruneton, 2009].

- Les saponines à génines triterpéniques apparaissent en grande majorité dans les Dicotylédones telles que les plantes de la famille des CARYOPHYLLACEAE, ARALIACEAE, HIPPOCASTANACEAE, PRIMULACEAE et FABACEAE mais aussi les organismes notamment dans les Holothuries.

Les sapogénines triterpéniques, comme la majorité des triterpénoïdes, sont issues de la cyclisation du (3*S*)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène. L'oléane, l'ursane et le lupane sont les squelettes les plus communs. Au-delà de 50%, des saponines



connues peuvent être attribuées à l'oléanane, plus précisément à l'acide oléanolique et à l'hédéragénine. Sur le squelette de 30 carbones la double liaison  $\Delta^{12,13}$  est habituellement présente. Les positions C-2, C-7, C-11, C-15, C-16, C-21 et C-22 peuvent porter des groupements hydroxyle qui peuvent être oxydés en cétone. Une oxydation des méthyles C-23, C-28 et aussi C-30 est parfois constatée. Suite à la nature de la biosynthèse, le groupement hydroxyle en C-3 est constant [Bruneton, 2009].

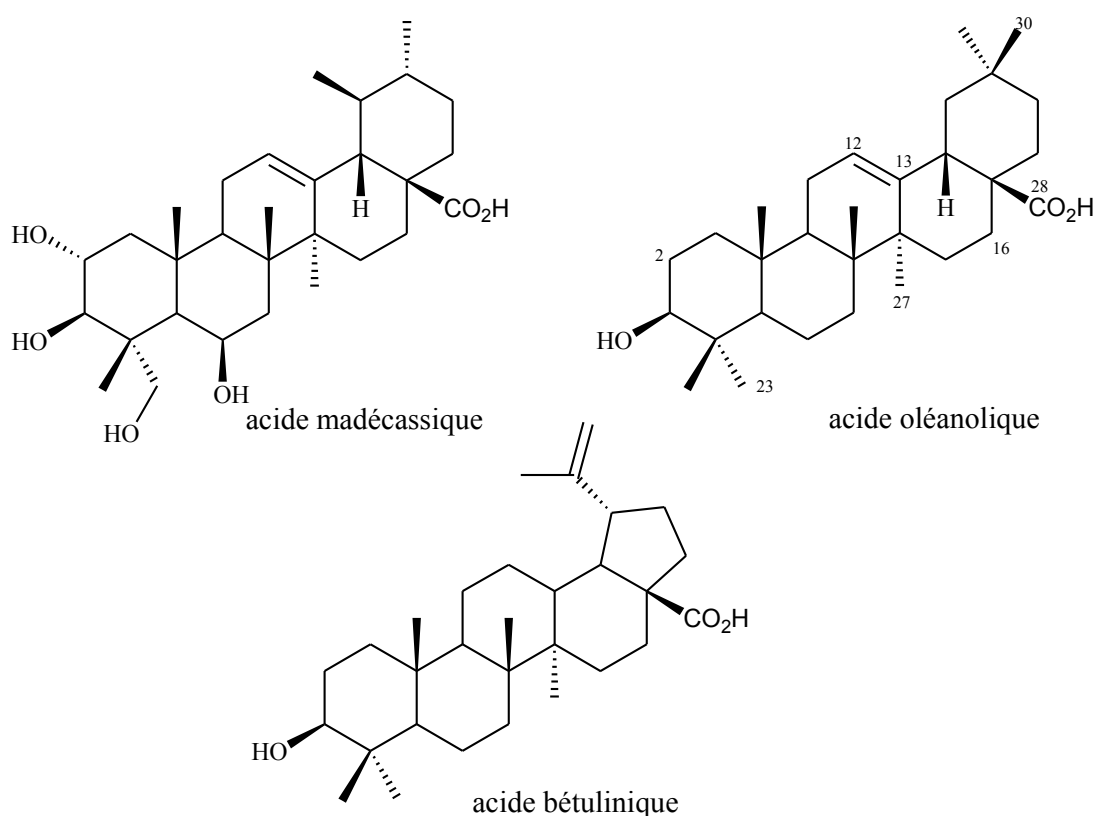


Figure 1.2 – Exemples de génines triterpéniques [Bruneton, 2009].

### 2.2.2. Les sucres.

Les sucres constituent la partie hydrophile des saponines. Elles peuvent être constituées d'une ou plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone. Les saponines stéroïdiques, ainsi que triterpéniques sont souvent des saponines monodesmosidiques en général C-3 par la fixation d'une unique chaîne de sucres. Des saponines bidesmosidiques sont rencontrées parmi les saponines triterpéniques de type oléanane avec une liaison en

C-3 et C-28 et pour les saponines stéroïdiques de type furostane avec une fixation en C-3 et C-26 [Bruneton, 2009]. Parmi les saponines triterpéniques de type cycloartane on peut trouver des structures tridesmosidiques, les chaînes de sucres sont fixés en C-3, C-6, C-16, C-24 et C-25 dans la plupart des cas [Bedir et al., 1999a,b ; Polat et al., 2009], et même des saponines tétradesmosidiques ont été décrites mais semblent être très rares [Perrone et al., 2008 ; Linnek et al., 2011].

Le tableau ci-dessous regroupe les sucres les plus fréquemment rencontrés dans les saponines:

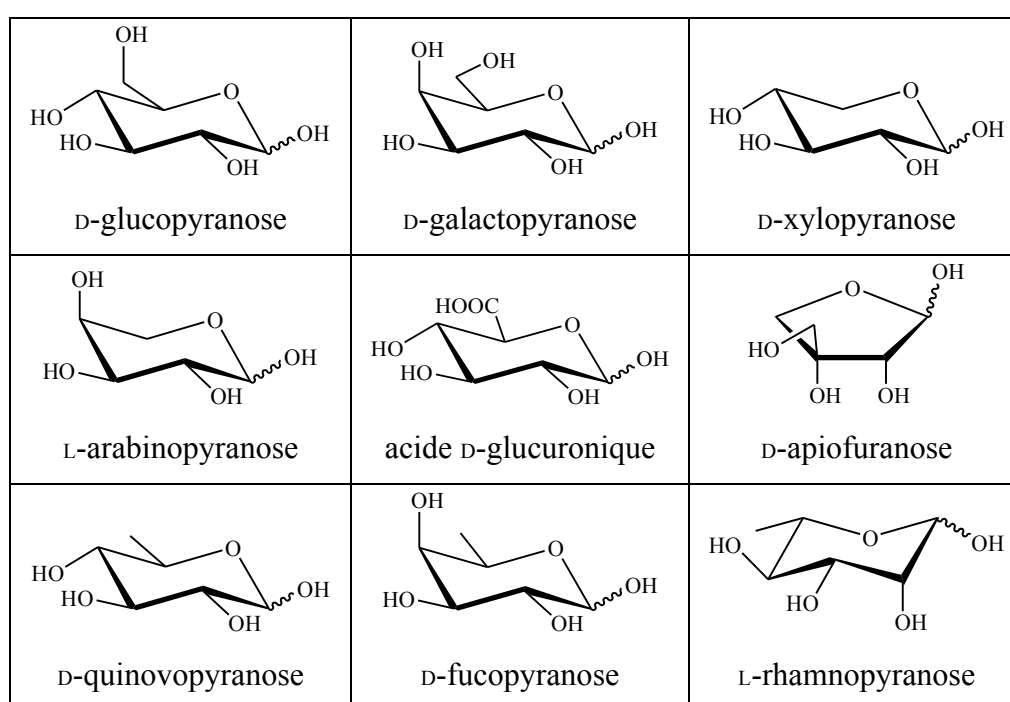


Figure 1.3 – Les principaux sucres constitutifs rencontrés dans les saponines [Bruneton, 2009].

### 2.2.3. Les acides organiques.

Des acides organiques peuvent être fixés au niveau de la génine ou des sucres par une liaison ester [Hostettmann et Marston, 1995 ; Dinda et al., 2010]. Les structures les plus souvent rencontrées sont récapitulées dans la figure 1.4 :

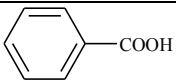
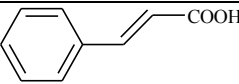
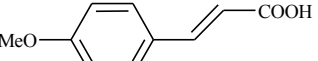
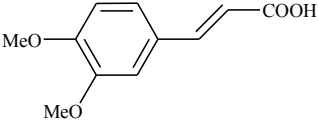
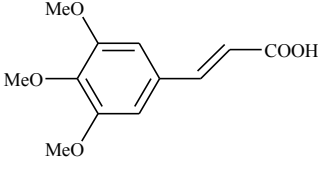
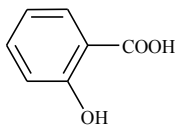
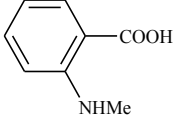
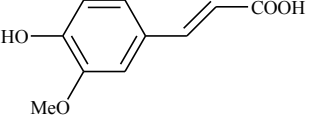
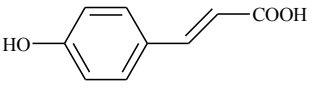
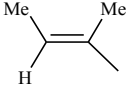
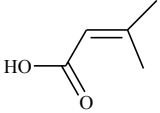
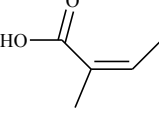
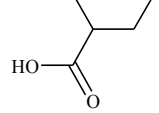
 Acide benzoïque	 Acide cinnamique	 Acide 4-méthoxycinnamique
 Acide 3,4-méthoxycinnamique	 Acide 3,4,5-méthoxycinnamique	 Acide salicylique
 Acide N-méthylantranilique	 Acide férulique	 Acide p-coumarique
 Acide tiglique	$\text{CH}_3\text{COOH}$ Acide acétique	$\text{HCOOH}$ Acide formique
 Acide 3,3-diméthylacrylique	 Acide angélique	 Acide 2-méthylbutyrique

Figure 1.4 – Les principaux acides organiques rencontrés dans les saponines [Hostettmann et Marston, 1995 ; Dinda et al., 2010].

### 2.3. Les saponines du genre *Polycarphaea* Lamk.

Les saponines de la famille des CARYOPHYLLACEAE ont en majorité les génines suivantes : gypsogénine à 46%, acide gypsogénique à 31%, et acide quillaïque à 33% [Böttger et al., 2011]. Les aglycones sont basés presque entièrement sur le squelette  $\beta$ -amyrine avec un groupement hydroxyle en C-3 et un carboxyle en C-17.

Les plantes du genre *Polycarphaea* Lamk. comptent environ 45 espèces, mais un seul article de la littérature rapporte la présence de deux génines qu'on peut rencontrer chez ce genre, la camelliagénine A et le A<sub>1</sub>-barrigénol (Fig. 1.5) isolés de *Polycarphaea corymbosa* Lamk [Chiang, 1978]. En revanche aucune saponine n'a été décrite.

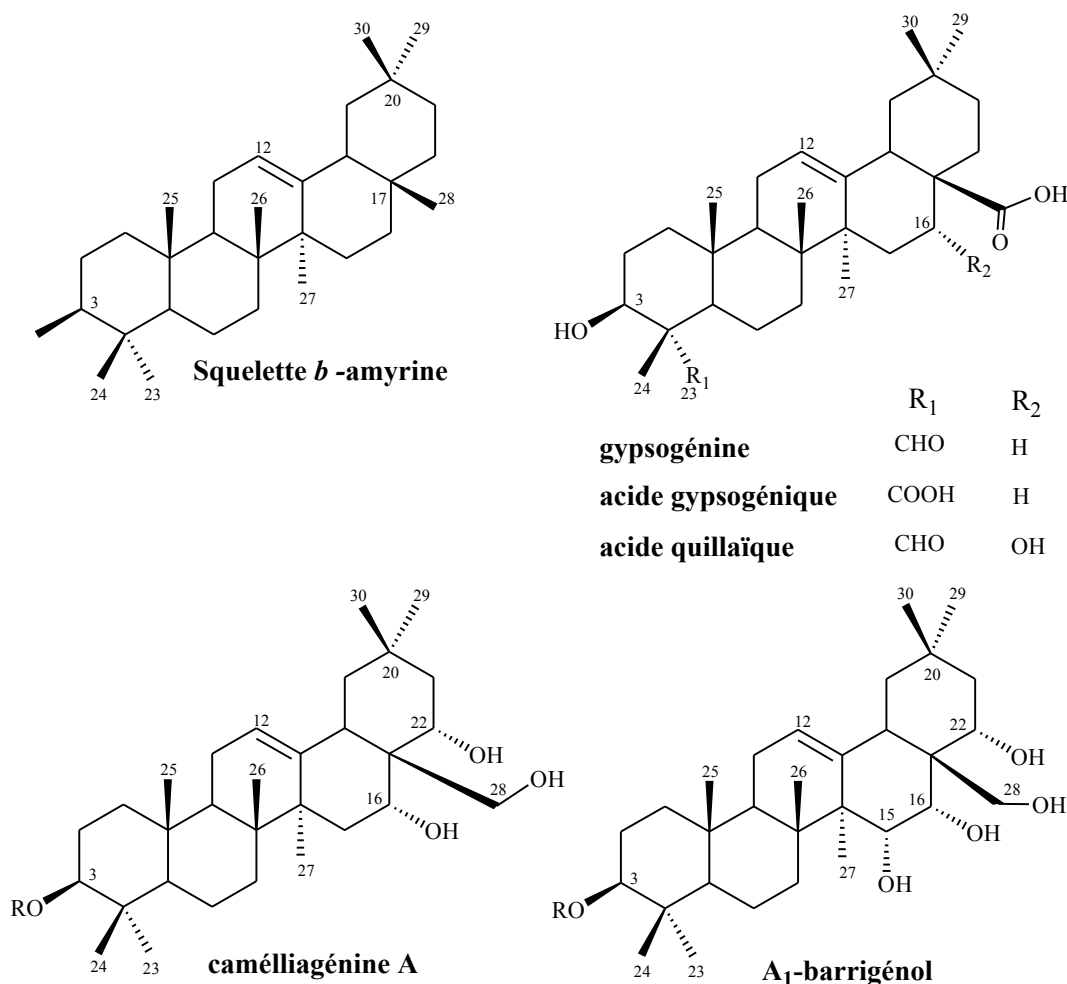


Figure 1.5 – Structure des génines rencontrées dans la famille des CARYOPHYLLACEAE et dans le genre *Polycarphaea* Lamk.

## 2.4. Les saponines du genre *Pittosporum* Banks ex Gaertner.

Les aglycones des saponines du genre *Pittosporum* Banks ex Gaertner sont de type oléan-12-ène, penta- ou tétrahydroxylés (en position 3, 15, 16, 21, 22, et 28). Les génines identifiées au R<sub>1</sub>-barrigénol et au A<sub>1</sub>-barrigénol sont les plus souvent rencontrées. Les fonctions hydroxyle en position 21, 22 et 28 sont fréquemment substituées par des acides organiques de type angéloyl,  $\beta,\beta$ -diméthylacryloyl, 2-méthylbutyroyl, et 2-acétoxy-2-méthylbutanoyl (Fig. 1.6). De plus il convient de souligner la présence de theasapogénol (caméliagénine A), hédéragénine, pittobrevigénine I (21-O-angéloyl-22-O-acétyl-R<sub>1</sub>-barrigénol), et R<sub>1</sub>-barrigénol dans l'espèce *P. brevicalyx* [Hungtung et al., 1986 ; Feng et al., 2010] ; et dans *P. phillyraeoides* Errington et Jefferies, 1988 ont isolés ces sapogénines : 27-désoxyphillyrigénine , phillyrigénine, barringtogénol C, caméliagénine A, et R<sub>1</sub>-barrigénol (Fig. 1.6).

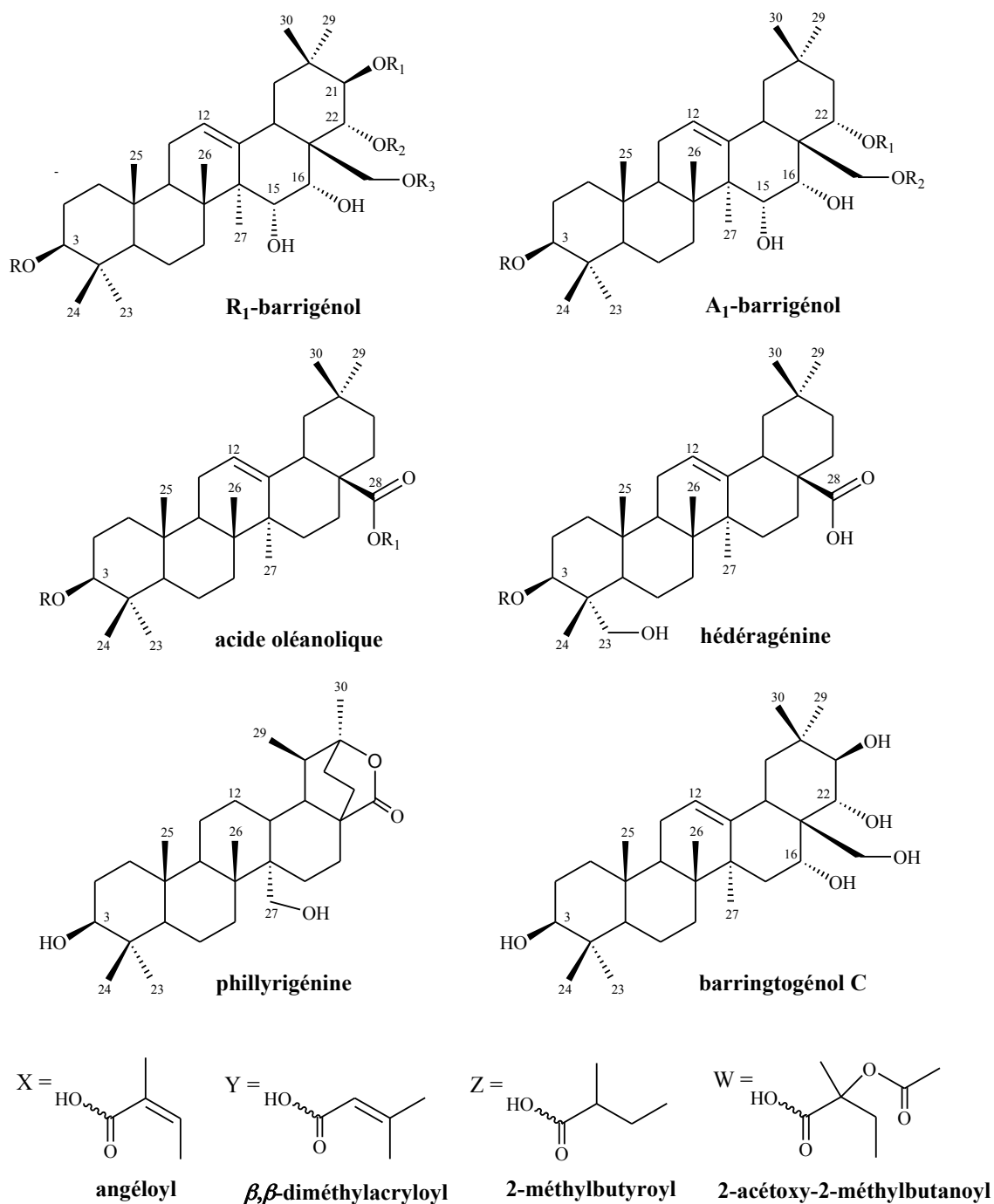


Figure 1.6 – Structure des aglycones rencontrés dans le genre *Pittosporum* Banks ex Gaertner.

Les tableaux ci-dessous résument les saponines isolées à partir de ce genre :

Tableau 1.1 – Saponine à acide oléanolique (acide 3β-hydroxyoléan-12-èn-28-oïque).

Nom	R	R <sub>1</sub>	<i>Pittosporum sp.</i>	[Référence]
senaciapittoside A	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	Glc	<i>P. senacia</i>	[Linnek et al., 2012]

Tableau 1.2 – Saponines à A<sub>1</sub>-barrigénol (oléan-12-ène-3β,15α,16α,22α,28-pentol).

Nom	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	<i>Pittosporum sp.</i>	[Référence]
PS-A	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>3-1</sup> Gal	Z	H	<i>P. undulatum</i>	[Higuchi et al., 1983]
	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>3-1</sup> Gal	Y	H		
PS-B	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	Z	H	<i>P. undulatum</i>	[Higuchi et al., 1983]
	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	Y	H		

Tableau 1.3 – Saponines à R<sub>1</sub>-barrigénol (oléan-12-ène-3β,15α,16α,21β,22α,28-hexol).

Nom	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	<i>Pittosporum sp.</i>	[Référence]
pittoside A	Rha <sup>4-1</sup> Ara	H	H	H	<i>P. nilghrense</i>	[Jain et al., 1980]
pittoside B	Ara <sup>4-1</sup> Rha <sup>4-1</sup> Ara	H	H	H	<i>P. nilghrense</i>	[Jain et al., 1980]
IIIA <sub>2</sub>	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	W	Ac	H	<i>P. tobira</i>	[D'Acquarica et al., 2002]
IIIA <sub>3</sub>	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	X	Ac	H	<i>P. tobira</i>	[D'Acquarica et al., 2002]
IIIB <sub>2</sub>	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	X	H	Ac	<i>P. tobira</i>	[D'Acquarica et al., 2002]
IIIC <sub>4</sub>	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	X	X	H	<i>P. tobira</i>	[D'Acquarica et al., 2002]
pittoviridoside	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	X	Y	H	<i>P. viridiflorum</i>	[Seo et al., 2002]
senaciapittoside B	Glc <sup>1-2</sup> Glc A <sup>4-1</sup> Ara <sub>f</sub>   3 1 Ara	Ac	Ara	H	<i>P. senacia</i>	[Linnek et al., 2012]

## 2.5. Les saponines du genre *Solanum* L.

Les glucosides stéroïdiques sont les saponines présentes chez le genre *Solanum*. L'aglycone est soit de type spirostanol soit de type furostanol.

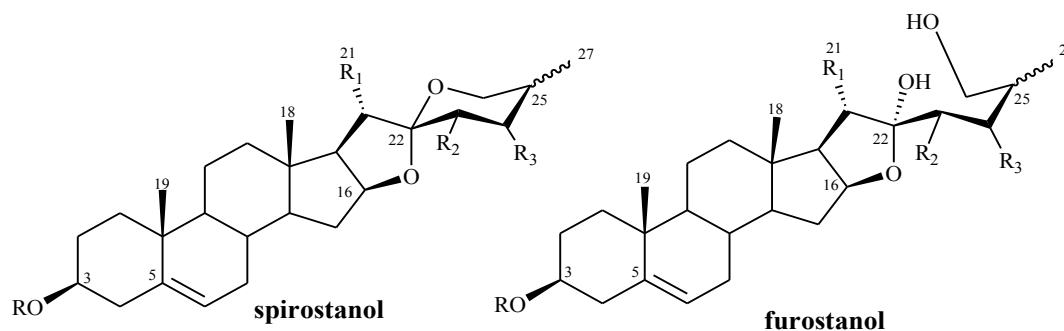


Figure 1.7 – Structures des génines rencontrées dans le genre *Solanum*.

Les tableaux ci-dessous montrent quelques saponines isolées à partir de ce genre :

Tableau 1.4 – Saponines à spirostanol  $\Delta^{5-6}$ , 25S.

Nom	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>x</sub>	<i>Solanum</i> sp.	[Référence]
solakhasoside	Rha <sup>1-2</sup> Gal <sup>3-1</sup> Xyl	Me	OH	H	17 OH	<i>S. khasianum</i>	[Putalun et al., 1999]
luciamin	Rha <sup>1-2</sup> Gal <sup>4-1</sup> [Glc <sup>2-1</sup> Glc]	Me	H	H	15 OH	<i>S. laxum</i>	[Soulé et al., 2000]
laxumin A	Rha <sup>1-2</sup> Gal <sup>4-1</sup> [Glc <sup>2-1</sup> Glc]	Me	OH	H	15 OH	<i>S. laxum</i>	[Ferreira et al., 1996]
laxumin B	Rha <sup>1-2</sup> Gal <sup>4-1</sup> Glc <sup>2-1</sup>	Me	OH	H	15 OH	<i>S. laxum</i>	[Ferreira et al., 1996]

Tableau 1.5 – Saponine à spirostanol  $\Delta^{5-6}$ , 25R.

Nom	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>x</sub>	<i>Solanum</i> sp.	[Référence]
indioside A	Rha <sup>1-2</sup> Glc <sup>3-1</sup> Xyl	Me	OH	H	26 OH	<i>S. indicum</i>	[Yahara et al., 1996]
indioside E	Rha <sup>1-2</sup> Gal <sup>3-1</sup> Xyl	Me	H	H	-	<i>S. indicum</i>	[Yahara et al., 1996]
indioside F	Rha <sup>1-2</sup> Glc <sup>4-1</sup> Rha	Me	OH	H	26 OH	<i>S. indicum</i>	[El-Aasr et al., 2009]
Anguivioside A	Rha <sup>1-2</sup> Glc <sup>4-1</sup> Rha	Me	H	H	26 OH	<i>S. anguivi</i>	[Zhu et al., 2000]
Anguivioside B	Rha <sup>1-2</sup> Glc <sup>4-1</sup> [Rha <sup>4-1</sup> mal]	Me	H	H	26 OH	<i>S. anguivi</i>	[Zhu et al., 2000]
Anguivioside C	Rha <sup>1-2</sup> Glc <sup>3-1</sup> Xyl	Me	H	H	26 OH	<i>S. anguivi</i>	[Zhu et al., 2000]
C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> O <sub>17</sub>	Rha <sup>1-2</sup> Glc <sup>4-1</sup> Rha	Me	OH	H	-	<i>S. sepicula</i>	[Sarg et al., 1995]

mal = malonyl



Tableau 1.6 – Saponine à furostanol  $\Delta^{5-6}$ , 25R.

Nom	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>x</sub>	<i>Solanum sp.</i>	[Référence]
indioside B	Rha <sup>1-2</sup> Glc <sup>3-1</sup> Xyl	Me	H	H	Glc	22 OMe	<i>S. indicum</i>	[Yahara et al., 1996]
indioside C	Rha <sup>1-2</sup> Gal <sup>3-1</sup> Xyl	Me	H	H	Glc	-	<i>S. indicum</i>	[Yahara et al., 1996]
indioside D	Rha <sup>1-2</sup> Gal <sup>3-1</sup> Glc	Me	H	H	Glc	-	<i>S. indicum</i>	[Yahara et al., 1996]
protodioscin	Rha <sup>1-2</sup> Glc <sup>4-1</sup> Rha	Me	H	H	Glc	-	<i>S. indicum</i>	[El-Aasr et al., 2009]

Tableau 1.7 – Saponine à 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -spirostanol, 25R.

Nom	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>x</sub>	<i>Solanum sp.</i>	[Référence]
cantalasaponin 3	Xyl <sup>1-4</sup> Gal <sup>2-1</sup> [Glc <sup>3-1</sup> Glc]	Me	H	H	-	<i>S. nigrescens</i>	[He et al., 1994]

Tableau 1.8 – Saponine à 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -spirostanol, 25S.

Nom	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>x</sub>	<i>Solanum sp.</i>	[Référence]
C <sub>33</sub> H <sub>55</sub> O <sub>8</sub>	H	Me	H	H	<sup>6</sup> Qui	<i>S. hispidum</i>	[González et al. 2004]
C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> O <sub>12</sub>	H	Me	H	H	<sup>6</sup> Qui <sup>3-1</sup> Xyl	<i>S. hispidum</i>	[González et al. 2004]
torvoside D	H	Me	OH	H	<sup>6</sup> Qui <sup>3-1</sup> Xyl	<i>S. hispidum</i> ; <i>S. torvum</i>	[González et al. 2004] [Yahara et al., 1996a]
C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	H	Me	OH	H	<sup>6</sup> Qui <sup>3-1</sup> Xyl	<i>S. hispidum</i>	[González et al. 2004]
torvoside C	H	Me	OH	H	<sup>6</sup> Qui <sup>3-1</sup> Rha	<i>S. torvum</i>	[Yahara et al., 1996a]

## III. Travaux biologiques antérieurs.

### 3.1. Les activités biologiques des saponines.

Les saponines sont des glycosides naturels de triterpènes ou de stéroïdes qui présentent des activités biologiques et pharmacologiques variées, principalement dans les domaines de l'immunologie, la cancérologie et la microbiologie [Lacaille-Dubois et Wagner, 2000 ; Lacaille-Dubois, 2005a,b, 2013 ; Lacaille-Dubois et al., 2013]. Les saponines sont connues pour leurs activités anti-tumorales [Lacaille-Dubois, 2005c ; Sautour et al., 2007b ; Podolak et al., 2010], anti-inflammatoires [Adão et al., 2011], immunostimulants et immunoadjuvants [Lacaille-Dubois, 1999], molluscicides [Lemmich et al., 1995 ; Chen et al., 2012 ; Diab et al., 2012], anti-microbiennes [Vermeersch et al., 2009], pour n'en citer que quelques-unes.

Ces activités biologiques s'expliquent par leurs caractéristiques physico-chimiques, et notamment par leurs structures. En effet, les travaux de Wang et al. 2007 indiquent que l'hémolyse et la cytotoxicité des saponines stéroïdes sont dépendantes de leurs structures, en particulier de la nature, du nombre et la séquence des sucres dans les saponines. Il est important de noter que le mécanisme d'action des saponines dans les activités biologiques empruntent différentes voix [Chwalek et al., 2006 ; Wang et al. 2007]. Une étude réalisée par Böttger et al., 2013 confirme cette relation structure-activité, ils décrivent qu'il y a une amélioration de la synergie entre la cytotoxicité des RIP-I (Ribosome-Inactivating Proteins type I) et la structure des saponines. L'activité cytotoxique naturellement faible de RIP-I peut être augmentée jusqu'à 100 000 fois, si elles sont appliquées en combinaison avec des saponines structurellement appropriées.

### 3.2. Les propriétés pharmacologiques du genre *Polycarpaea* Lamk.

Au cours de cette année 2013, une dizaine de brevets ont été déposés par des organisations chinoises sur l'utilisation traditionnelle de mélanges de plantes

contenant notamment le *Polycarpaea corymbosa* Lamk. pour traiter différentes maladies, comme les maladies rénales [Wensheng et al., 2013a], les verrues [Wensheng et al., 2013b], l'infertilité [Rui, 2013], pour n'en citer que quelques-unes. Une étude récente de *P. corymbosa* rapporte l'activité hépatoprotectrice sur des rats après l'administration de l'extrait de plante entière [Kiran et al., 2011]. Les feuilles sont utilisées en médecine traditionnelle indienne pour traiter les gonflements inflammatoires [Hukkeri et Kenganora, 2009].

### 3.3. Les propriétés pharmacologiques du genre *Pittosporum* Banks ex Gaertner.

L'activité cytotoxique des saponines isolées du genre *Pittosporum* a été rapportée par Seo et al., 2002 et D'Acquarica et al. 2002. Les études indiquent respectivement une faible activité de pittoviridoside isolé de *Pittosporum viridiflorum* sur la lignée cellulaire A2780 (cancer de l'ovaire humaine) avec une IC<sub>50</sub> de 10.1 µg/ml, et une activité significative *in vitro* et *in vivo* du mélange de saponines brut obtenu à partir de l'extrait EtOH des fruits de *Pittosporum tobira* AIT sur les lignées cellulaires humaines comme l'adénocarcinome du côlon, le cancer du sein, l'adénocarcinome du pancréas, le neuroblastome. L'activité cytotoxique des saponines isolées de ce genre n'est pas limitée aux les lignées cancéreuses, en effet le pittoside A et B isolés de *Pittosporum nilghrense* Wight et Apnott sont toxiques pour les spermatozoïdes humains [Jain et al., 1980].

### 3.4. Les propriétés pharmacologiques du genre *Solanum* L.

Les plantes du genre *Solanum* L., par exemple *Solanum dulcamara*, *S. lyratum*, *S. nigrum*, sont largement distribués dans le monde où ils sont traditionnellement utilisé pour traiter les tumeurs, ainsi ils sont consommés comme denrée alimentaire à titre de prévention [Ikeda et al., 2003]. En effet plusieurs glycosides stéroïdes isolés des *Solanum* montrent une activité cytotoxique sur des lignées de cellules cancéreuses comme par exemple PC-6 (cancer du poumon), SW620 (cancer du côlon), MCF-7 (cancer du sein), NUGC-3 (cancer de l'estomac) [Nakamura et al., 1996]. Plus

précisément, les composés torvosides M et N isolés de *Solanum torvum* montrent des activités cytotoxiques sur les lignées cellulaires MGC-803, HepG2, A549 et MCF-7 [Lu et al., 2009], et le degalactotigonine isolé de *S. nigrum* est cytotoxique sur des lignés cancéreuses humaines (HepG2, NCI-H460, MCF-7, et SF-268) avec les valeurs d'IC<sub>50</sub> de 0.25–4.49 µM [Zhou et al., 2006].

Les saponines isolées des *Solanum* ont présenté également des propriétés antivirales. En effet les spirostanol-glycosides de *Solanum sanitwongsei*, et de *S. nodiflorum* montrent une activité importante sur le virus de l'herpès de type 1 (HSV-1) [Ikeda et al., 2000], de même que les saponines de type furostane comme le torvoside H isolé de *Solanum torvum* [Arthan et al., 2002].

# Chapitre II.

## ETUDE CHIMIQUE



# I. Matériels et Méthodes.

## 1.1. Matériel végétal.

L'identification des espèces ci-dessous a été réalisée par Mr. Benja Rakotonirina, botaniste du Département de Biologie Végétale et d'Écologie, Université d'Antananarivo, à Madagascar ; à l'exception de *S. heteracanthum* Dunal. qui a été identifié par la société Sedaherb, France.

### 1.1.1. *Polycarpaea corymbosa* Lamk.

Les feuilles et racines de *Polycarpaea corymbosa* Lamk. var. *eriantha* Hochst ont été collectées dans la région d'Ivovona, province d'Antsiranana, Madagascar, en Mars 2011.

### 1.1.2. *Pittosporum verticillatum* Bojer.

Les écorces de racines de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* var. *verticillatum* ont été collectées à Joffreville, province d'Antsiranana, Madagascar, en Septembre 2011.

### 1.1.3. *Solanum incanum* L.

Les racines de *Solanum incanum* L. ont été collectées en périphérie de l'Université d'Antsiranana, Madagascar, en Octobre 2008.

### 1.1.4. *Solanum heteracanthum* Dunal.

Les racines de *Solanum heteracanthum* Dunal. ont été fournies par la Société d'Études et de Développement Agronomique de l'Herboristerie (Sedaherb), Saint-Léger-sur-Dheune, Saône et Loire, France.

## 1.2. Méthodes chromatographiques.

### 1.2.1. Chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode analytique qui permet de contrôler le profil de fractionnement et de purification des mélanges de composés.

**Conditions chromatographiques :**

***Phase stationnaire.***

Plaque de silice CCM (60 Å, F<sub>254</sub>, *Silicycle*),

Plaque de silice HPTLC (60 Å, F<sub>254</sub>, *Merck*).

***Phase mobile.***

CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O; 80:20:2, 70:30:5, 60:32:7.

***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 [[Hiai et al., 1976](#)] :

- Solution A : Vanilline à 1% dans de l'éthanol,
- Solution B : acide sulfurique, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
- Mélange de la solution A et solution B (50:1).

Les plaques sont ensuite chauffées à 120 °C pendant quelques minutes.

### 1.2.2. Chromatographie sur gel perméable.

La chromatographie sur gel perméable ou chromatographie d'exclusion stérique est une technique qui permet la séparation des molécules en fonction de leur taille (masse moléculaire) et de leur forme (structure spatiale) [[Hostettmann et al., 1997](#)]. La séparation se fait à l'aide de granules de gel poreux. Les grosses molécules, dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont exclues et sont donc éluées les premières. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leurs migrations sont retardées.

Dans la pratique nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion stérique pour séparer les saponines des molécules plus petites telles que les flavonoïdes et les alcaloïdes.



**Conditions chromatographiques :****Phase stationnaire.**

Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (*Pharmacia*) est un dextrane, un polymère linéaire de glucose, semi-rigide, possédant des ramifications par l'hydroxypropyle. Ce gel forme des particules qui possèdent des pores.

**Phase mobile.**

Méthanol, MeOH 100 %.

### 1.2.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC).

La chromatographie liquide sous vide (VLC, vacuum liquid chromatography) est une méthode alternative à la chromatographie flash pour obtenir un fractionnement grossier des extraits de plantes. C'est une étape qui précède généralement les étapes de séparations plus rigoureux et de purifications telles que la MPLC et la HPLC [Hostettmann et al., 1997]. Un verre fritté de diamètre et hauteur variable selon le poids de l'échantillon est fixé sur une fiole à vide. Il contient la phase stationnaire. Dans notre laboratoire cette méthode est utilisée pour éliminer les sucres et les tanins.

**Conditions chromatographiques :****Phase stationnaire.**

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

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

**Phase mobile.**

- Silice en phase normale :

CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O; 80:20:2, 70:30:5, et 60:32:7.

Dans ces conditions, les tanins sont retenus sur la silice et les composés d'intérêt sont élués.

- Silice en phase inverse, RP-18:

H<sub>2</sub>O (100%), MeOH- H<sub>2</sub>O (50:50), et MeOH (100%).

Cela permet d'éliminer les sucres dans la phase aqueuse, les saponines et autres composés étant élués dans les solutions méthanoliques.

### 1.2.4. Chromatographie flash.

La chromatographie flash est comme la VLC une méthode de séparations préparatives. Elle est souvent utilisée pour fractionner grossièrement des extraits issus de VLC ou de chromatographie d'exclusion stérique.

#### **Conditions chromatographiques :**

##### **Matériel.**

CombiFlash RETRIEVE.

##### **Phase stationnaire.**

Silice en phase normale (colonne de gel de silice 15–40 µm, 12 g, *RediSep*).

##### **Phase mobile.**

- Silice en phase normale :  
CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 90:10; CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O, 80:20:2, 70:30:5, et 60:32:7.
- Silice en phase inverse RP 18 :  
gradient MeOH-H<sub>2</sub>O.

### 1.2.5. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC).

La chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC, medium pressure liquid chromatography) permet de fractionner et de purifier plusieurs grammes d'un mélange de saponines.

#### **Conditions chromatographiques.**

##### **Matériel.**

- Colonnes de séparation à silice (*Büchi*) :  
Pré-colonne : 110 x 15 mm,  
Colonne : 460 x 25 mm, 460 x 15 mm, 230 x 15 mm.
- Pompe pour l'appareillage MPLC en phase normale :  
HPLC pump 426 (*Alltech*).

- Pompe pour l'appareillage en phase inverse, RP-18 :  
Büchi Manager C-605 à deux pompes, Büchi Pump Module C-601 (*Büchi*).
- Collecteur de fractions :  
C-600 (*Büchi*).

***Phase stationnaire.***

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

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

***Phase mobile.***

Les systèmes d'élutions employés sont généralement des mélanges binaires ou ternaires souvent en gradient de polarité :

- Silice en phase normale :  
CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O; 80:20:2, 70:23:4, 70:30:5, 60:32:7.
- Silice en phase inverse, RP-18:  
Différents gradients de MeOH-H<sub>2</sub>O.

## 1.3. Détermination structurale.

### 1.3.1. Méthodes physico-chimiques.

#### 1.3.1.1. Hydrolyse acide.

Cette méthode est utilisée pour l'identification des unités de sucres présents dans les chaînes oligosaccharidiques par comparaison à des sucres standards. La procédure consiste à rompre les liaisons osidiques par l'hydrolyse acide (2N de CF<sub>3</sub>COOH, aqueuse) à haute température (95°C), pendant 3 h. Le produit de l'hydrolyse est ensuite partagé entre du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et une phase aqueuse à plusieurs reprises. La phase aqueuse acide est neutralisée par évaporations successives à l'aide de méthanol. Les sucres libérés sont identifiés par comparaison en CCM avec des sucres standards [[Haddad et al., 2003](#) ; [Acharya et al., 2009](#)].

Par ailleurs, les résidus de sucres sont dissous dans la pyridine anhydre (100 µL), et on ajoute du chlorhydrate d'ester méthylique de L-cystéine (0.06 mol.L<sup>-1</sup>). Le mélange est agité à 60 °C pendant 1h. Ensuite, 150 µL de HMDS-TMCS (hexaméthylidisilazane-triméthylchlorosilane, 3:1) est ajouté puis agité à 60 °C

pendant 30 min. Le précipité formé est centrifugé et le surnageant est concentré sous un flux de N<sub>2</sub>. Le résidu est partagé entre le *n*-hexane et H<sub>2</sub>O (0.1 mL chacun). L'extrait hexanique mélangé avec des échantillons de sucres standard silylés est par la suite analysé par chromatographie en phase gazeuse. Les profils des pics obtenus permettent de déterminer la configuration des sucres, les pics standards sont : D-glucose à 18.6 min, D-galactose à 17.2 min, D-xylose à 13.4 min, L-rhamnose à 13.1 min et L-arabinose à 11.8 min.

**Matériel et conditions de mesures :**

Chromatographe en phase *Thermoquest*, avec :

- Colonne capillaire DB-1701 (30 m x 0.25 mm),
- Détecteur FID (température de détection 250 °C),
- Gaz hélium (He),
- Température d'injection 230 °C, température initiale est maintenue à 80 °C pendant 5 mn et monte à 270 °C (15°C / min).

1.3.1.2. Pouvoir rotatoire.

Les pouvoirs rotatoires des produits sont mesurés à l'aide du polarimètre automatique AA-OR, équipé d'une lampe à sodium.

Le pouvoir rotatoire d'un composé est déterminé par la formule ci-dessous

[Vollhardt et Schore, 2009] :

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha_{lu}}{l \cdot C}$$

Avec :

- *C*, la concentration du produit (g.mL<sup>-1</sup>),
- *l*, la longueur de la cellule dans laquelle est introduit la solution à mesurer (dm),
- *D*, la longueur d'onde du faisceau polarisé qui correspond à la raie D du sodium (λ 589.3 nm),
- $\alpha_{lu}$ , rotation optique observé en degrés (valeur lue sur le polarimètre, moyenne des essais effectués),
- *T*, température du laboratoire.

### 1.3.2. Méthodes spectroscopiques.

#### 1.3.2.1. Spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique qui joue un rôle important dans l'analyse des saponines grâce à sa sensibilité et de son importante capacité de détection. Elle donne des informations telles que le poids moléculaires du composé ainsi que des informations sur la fragmentation de ces derniers.

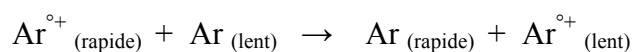
Les molécules d'intérêt sont introduites dans la source d'ionisation du spectromètre de masse, où ils sont alors ionisés pour acquérir des charges positives ou négatives. Les ions se déplacent ensuite à travers l'analyseur de masse, puis entre en contact avec le détecteur qui est relié à un système informatique. 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 ( $m/z$ ).

#### *Les méthodes d'ionisations.*

L'ionisation d'une molécule peut être obtenue par différents procédés. Les méthodes de bombardement d'atomes rapides et d'ionisation par électrospray sont utilisées pour déterminer la masse moléculaire de nos saponines pures.

**FAB (Fast Atom Bombardment).** Le bombardement d'atomes rapides est utilisé pour analyser les saponines naturelles, fournissant des informations sur la masse moléculaire et la séquence de sucres par clivage des liaisons glycosidiques [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 (échange de charges, voir la réaction ci-dessous). 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 [Constantin et al., 1996 ; De Hoffmann et al., 1999].



Une méthode similaire, la spectrométrie de masse par ionisation secondaire liquide, LSIMS, met en jeu des ions de césium encore plus énergétiques (10 à 30 KeV). Ces deux techniques produisent des ions positifs par captation de cation  $[M + 1]^+$  ou  $[M + 23, Na]^+$ , et des ions négatifs par déprotonation  $[M - 1]^-$ ; les deux type 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).** Plus récemment, l'ionisation électrospray est devenu l'un des outils d'analyse les plus efficaces pour la caractérisation structurale d'une variété de molécules polaires et thermiquement labile, (par exemple, les polypeptides, des glucides et des glycosides naturels. Des études récentes ont montré l'utilisation d'ESI-MS pour la détermination des saponines avec une sensibilité plus élevée et une meilleure reproductibilité que les autres types d'ionisation [Van Setten et al., 1998; Liu et al., 2004]. L'ionisation par ESI de la spectrométrie de masse peut être divisé en trois étapes : nébulisation d'une solution de l'échantillon en gouttelettes chargées électriquement, la libération d'ions à partir des gouttelettes, et le transport dans le vide des ions à partir de la région de source d'ionisation (à la pression atmosphérique) jusqu'à l'analyseur de masse [Bruins, 1998].

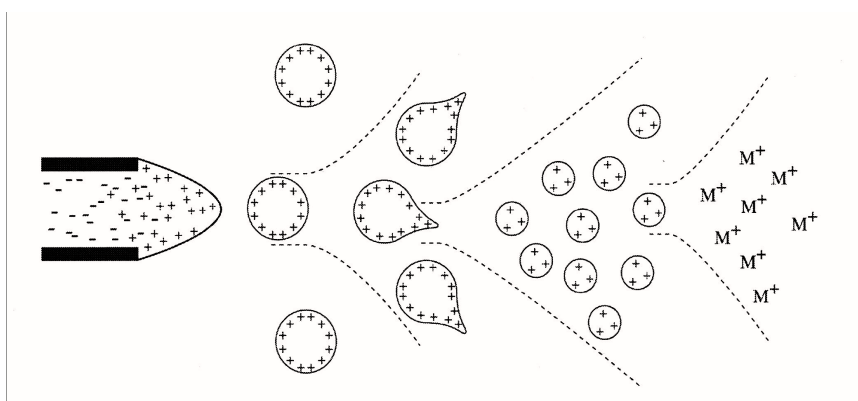


Figure 2.1 – Mécanisme de l'ionisation par électrospray. D'après Ho et al., 2003.

### **Matériel.**

HR-ESI-MS (ion positive): Q-TOF 1-Micromass spectrometer.

FAB-MS (ion negative): JEOL SX 102.

### 1.3.2.2. Résonance magnétique nucléaire.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est la méthode la plus efficace pour élucider la structure d'une saponine. En effet, le principe de la RMN repose sur le magnétisme nucléaire. L'énergie d'interaction des moments magnétiques nucléaires d'une substance avec un champ magnétique extérieur  $B_0$  est en fait constituée d'un certain nombre de niveaux discrets  $E_i$  caractéristiques. Il est possible, au moyen d'un émetteur à haute fréquence, d'induire des transitions entre ces niveaux d'énergie. L'absorption d'énergie qui en résulte est enregistrée, sous forme de « raie spectrale » ou signal de résonance (ou spectre de RMN). Seuls les noyaux atomiques possédant un moment magnétique nucléaire donnent lieu au phénomène de résonance magnétique, comme par exemple le proton  $^1\text{H}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$  [Günther, 1994].

Les données RMN sont enregistrées sous forme d'expériences monodimensionnelles et bidimensionnelles. Chaque expérience fournit des informations spécifiques à la détermination structurale de l'aglycone, des sucres, acides organiques, de l'enchaînement des sucres et des positions de fixation à l'aglycone des chaînes de sucres (ou d'un sucre) et des acides.

#### *Matériel.*

Les spectres RMN sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre UNITY-600 / Varian INOVA 600 équipé d'un système SUN 4 L-X DIM à la fréquence de fonctionnement de 600 MHz. Enregistrement RMN<sup>1</sup>-H à 600 MHz et RMN<sup>13</sup>-C à 150 MHz. Le solvant de mesure est la pyridine deutériée ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

#### 1.3.2.2.1. Les spectres monodimensionnels.

**RMN-<sup>1</sup>H.** Le spectre de RMN du proton d'une molécule est généralement constitué de plusieurs signaux de résonance. Les diverses fréquences de résonance correspondent aux différents types de proton de la molécule, c'est-à-dire à des protons situés dans des environnements différents [Günther, 1994].

Le spectre de RMN- $^1\text{H}$  d'une saponine se présente au trois zones de résonances [Massiot et Lavaud, 1995]:

- de 0.5 à 3 ppm : les protons de la génine, en particulier les méthyles,
- de 3 à 4.5 ppm : les protons osidiques sauf les anomères,
- de 4.5 à 6 ppm : les protons anomériques sous la forme de doublets ou de singulets élargis, et les protons éthyléniques de la génine.

**RMN- $^{13}\text{C}$ .** Le spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  se présente les zones de résonance suivante:

- de 10 à 60 ppm : les carbones de la génine,
- de 60 à 90 ppm : les carbones osidiques sauf les anomères, et quelques carbones hydroxylés de la génine,
- au-delà de 90 ppm : les carbones anomériques des sucres.

#### 1.3.2.2.2. Les spectres bidimensionnels.

Les spectres RMN (proton et carbone) des composés naturels (composé complexe) donnent des signaux qui se chevauchent, et complique donc l'interprétation des spectres. Cependant, le couplage interatomique qui est visible par l'analyse des spectres bidimensionnels permet d'élucider aisément la structure chimique du composé.

***Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC).*** L'interprétation des spectres HSQC met en évidence les couplages hétéronucléaires (H-C) directs  $^1J_{\text{H-C}}$  (Fig. 2.2). A l'aide du spectre HSQC, la majorité des carbones protonés sont alors déterminés [Massiot et Lavaud, 1995].

***Heteronuclear Multiple-Bound Correlation (HMBC).*** Cette expérience permet d'établir les couplages hétéronucléaires à longue distance avec les constantes de couplage  $^2J_{\text{H-C}}$  ou  $^3J_{\text{H-C}}$  (Fig. 2.2). L'interprétation des spectres HMBC optimise l'élucidation structurale de l'aglycone et est essentielle pour déterminer les séquences osidiques, ainsi que la liaison osidique sur l'aglycone et des acides organiques [Massiot et Lavaud, 1995].



***COrrrelated SpectroscopY (COSY)***. L'expérience COSY met en évidence les protons avec les couplages géminaux  $^2J_{H-H}$  et les couplages vicinaux  $^3J_{H-H}$  (Fig. 2.2). Cette expérience est utilisée pour déterminer l'ordre des protons dans un squelette de sucres [Massiot et Lavaud, 1995; Günther, 1996].

***TOtal Correlation SpectroscopY (TOCSY)***. A partir de cette expérience, les corrélations de tous les protons d'un même système de spin, comme pour l'expérience COSY mais sur des constantes de couplages plus importants (Fig. 2.2), sont mis en évidence. Elle donc importante pour l'analyse de la structure des sucres [Massiot et Lavaud, 1995; Günther, 1996].

***Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY (NOESY)***. L'expérience deux dimensions NOESY fournit des informations spatiales (Fig. 2.2) pour tous les protons dans une seule expérience et s'est avéré être l'une des plus précieuses des expériences de RMN dans élucidation de la structure [Jeener et al., 1979; Günther, 1996]. Elle est alors importante dans l'élucidation structurale des saponines, notamment, dans la stéréochimie des carbones asymétriques de l'aglycone, le séquençage des sucres et l'emplacement de la liaison sucres-génine.

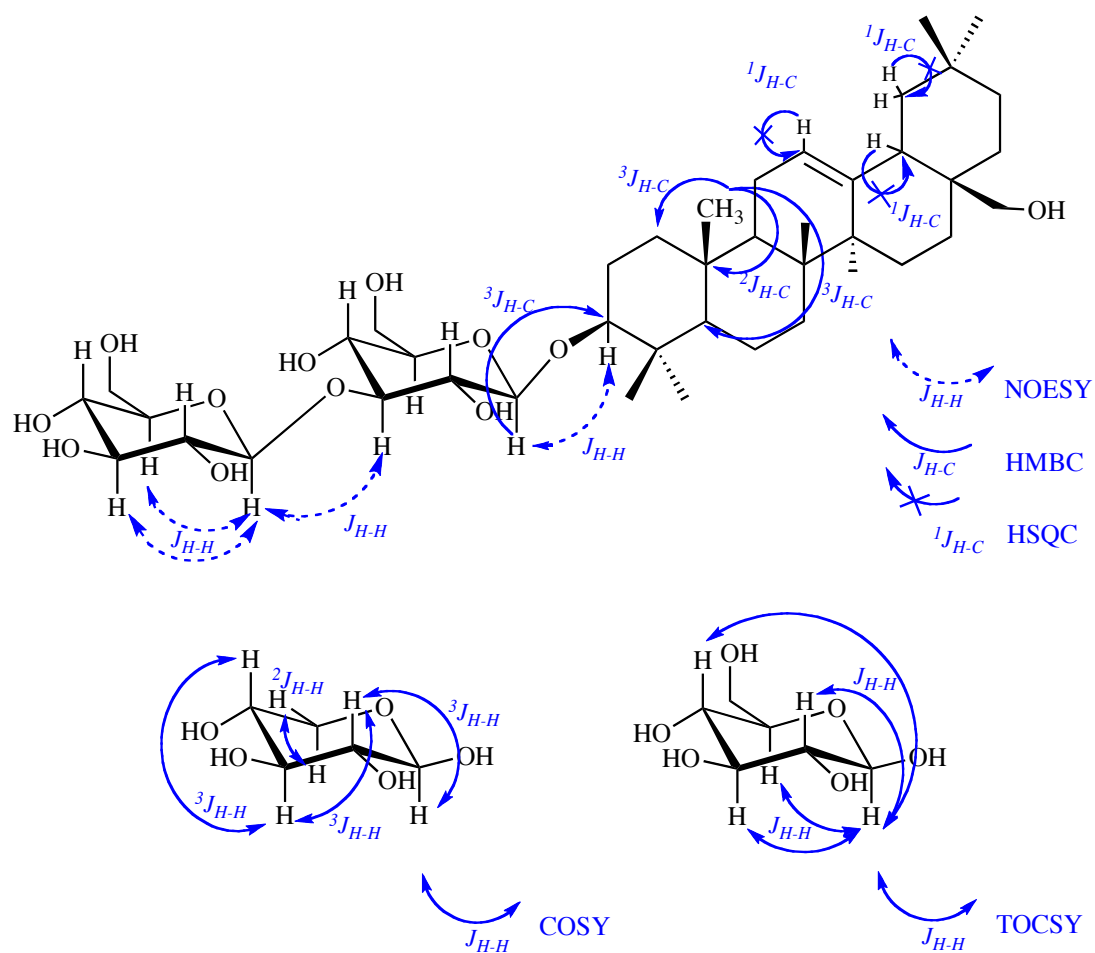


Figure 2.2 – Les corrélations observées à l'aide de différentes expériences bidimensionnelles.

## II. Résultats des travaux personnels.

Les résultats phytochimiques sont obtenus après extractions et isolements des molécules par les méthodologies décrites dans les pages précédentes. Ainsi que pour l'élucidation structurale des composés qui ont été réalisés par l'interprétation des spectres de résonance magnétique nucléaire et de spectrométrie de masse.

Les molécules isolées dans ce travail sont énumérées sous forme de code en fonction de leur espèce respective. Par exemple, la dénomination **PC1** représente la première molécule interprétée de l'espèce *Polycarpaea corymbosa* Lamk.

### 2.1. *Polycarpaea corymbosa* Lamk.

#### 2.1.1. Extraction et isolement.

Les feuilles de *P. corymbosa* ont été séchées et broyées (200 g). L'extraction à reflux a été réalisée sur toute la matière sèche pendant 1 h, avec le solvant MeOH (1 L). La procédure a été répétée trois fois. Après la répétition de l'extraction à reflux, les filtrats ont été réunis et évaporés à sec par évaporation sous vide (voir Fig. A.1, page 154). L'extrait méthanolique obtenu (8.8 g) a été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase normale (15–40 µm) éluée avec un gradient de CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (70:30:5; 60:32:7; 0:100:0). Après évaporation des solvants, trois fractions ont été obtenues: F<sub>1</sub> (70:30:5; 0.62 g), F<sub>2</sub> (60:32:7; 1.2 g), et F<sub>3</sub> (MeOH, 4.5 g). La deuxième fraction Fr<sub>2</sub> (1.2 g) soumise à une chromatographie sur colonne ouverte (CC) (Sephadex<sup>®</sup> LH-20, MeOH), et a conduit à cinq sous-fractions, F<sub>21</sub>-F<sub>25</sub>. La fraction riche en saponines F<sub>21</sub> (172 mg) 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 (80:20:2; 70:23:4; 70:30:5; 60:32:7; 0:100:0)] puis du système B [gel de silice RP-18, MeOH-H<sub>2</sub>O (40 à 100%)], a conduit à l'isolement de trois composés purs, **PC1** (4.8 mg), **PC2** (5.3 mg) et **PC3** (4.2 mg) (voir Fig. B.1, page 159).

Les procédures d'extraction sur les racines de *P. corymbosa* (100 g) sont les mêmes que celles décrites précédemment (voir Fig. A.2, page 155). L'extrait méthanolique obtenu (4.6 g) a été soumis à une VLC sur gel de silice en phase inverse éluée par H<sub>2</sub>O (3 x 100 ml), MeOH-H<sub>2</sub>O (5:5, 3 x 100 mL), et MeOH (3 x 100 ml). Après évaporation des solvants, trois fractions ont été obtenues: R<sub>1</sub> (H<sub>2</sub>O), R<sub>2</sub> (MeOH-H<sub>2</sub>O, 5:5; 1400 mg) et R<sub>3</sub> (MeOH, 172 mg). La fraction R<sub>2</sub> (1400 mg) soumise à une chromatographie flash à l'aide du système A, a conduit à six sous-fractions, R<sub>21</sub>-R<sub>26</sub>. La sous-fraction R<sub>24</sub> (80.8 mg) purifiée par plusieurs MPLC successives [systèmes A], a conduit à l'isolement de deux composés purs **PC3** (8.0 mg) et **PC5** (7.0 mg). Le composé **PC4** (6.4 mg) a été obtenu par MPLC à partir de la fraction R<sub>3</sub> (172 mg) à l'aide du système A (voir Fig. B.2, page 160).

## 2.1.2. Elucidation structurale.

### 2.1.2.1. Description du composé **PC1**.

#### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **PC1** montre dans le spectre de masse obtenu par ionisation par électro-nébuleuse de haute résolution (HR-ESI-MS) en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1067.5403 [M + Na]<sup>+</sup> (calc. 1067.5379). Le pic d'ion quasi-moléculaire en mode négatif (FAB-MS)  $m/z$  1043 [M - H]<sup>-</sup> indique une masse moléculaire de 1044 et confirme le résultat du mode positif. Ces valeurs sont en accord avec la formule brute C<sub>52</sub>H<sub>84</sub>O<sub>21</sub>. D'autres pics d'ions-fragments observés à  $m/z$  911 [(M - H) - 132]<sup>-</sup>, 749 [(M - H) - 132 - 162]<sup>-</sup> et 587 [(M - H) - 132 - 162 - 162]<sup>-</sup>, correspondent à l'élimination successive d'un pentosyle et de deux hexosyles.

#### *Spectroscopie RMN.*

*Détermination de l'aglycone.* Le spectre RMN-<sup>13</sup>C du composé **PC1** met en évidence 52 atomes de carbone, dont 7 méthyles, 13 méthylènes, 25 méthines et 7 carbones quaternaires. Tous les signaux des carbones et des protons sont déterminés et attribués d'après l'analyse des spectres COSY, NOESY, HSQC et HMBC. Les signaux caractéristiques du composé sont détaillés ci-dessous.

Le spectre RMN- $^1\text{H}$  montre sept signaux de méthyles à  $\delta_H$  0.80, 0.86, 0.94, 0.99, 1.11, 1.19 et 1.54 (3H chacun, *s*) caractéristiques pour les saponines de type triterpène. Une paire de protons méthylène oxygénés sont également observés à  $\delta_H$  3.28 et 3.49 (2H, *d*,  $J = 7.1$  Hz, H<sub>2</sub>-28). Cette paire de proton est corrélé dans le spectre HSQC avec un carbone à  $\delta_C$  77.4 (C-28). L'observation dans les spectres HMBC d'une corrélation à  $\delta_H / \delta_C$  1.54 / 84.7 (H<sub>3</sub>-27 / C-13), nous permet de suggérer la présence d'un pont 13,28 époxy comme décrit dans [Altunkeyik et al., 2012](#). Le déblindage du proton à  $\delta_H$  5.62 (1H, *dd*,  $J = 10.2, 2.4$  Hz) et la corrélation en spectre COSY avec  $\delta_H$  5.87 (1H, *d*,  $J = 10.4$  Hz) suggère la présence d'une double liaison. Ces protons oléfiniques sont attribués à H-11 et H-12, respectivement, en raison des corrélations HMBC observées entre  $\delta_H$  5.62 (H-11) et  $\delta_C$  52.4 (C-9), et entre  $\delta_H$  5.87 (H-12) et  $\delta_C$  84.7 (C-13).

Le spectre RMN- $^1\text{H}$  montre aussi deux signaux de protons de méthines portant des atomes d'oxygénés et sont observés à  $\delta_H$  3.11 (1H, *dd*,  $J = 11.7, 4.3$  Hz) et  $\delta_H$  4.17 (1H, *m*), caractéristiques d'une fonction alcoolique secondaire. De plus, la corrélation HMBC entre un méthyle à  $\delta_H$  1.11 (H<sub>3</sub>- 23) et  $\delta_C$  88,9 (C-3) confirme l'emplacement de la première fonction alcool secondaire en C-3. La deuxième fonction alcool secondaire en C-16 ( $\delta_H / \delta_C$  4.17 / 76.5) est déduite par la corrélation dans le spectre COSY à  $\delta_H / \delta_H$  4.17 / 2.04 (H-16 / H-15) et la corrélation dans le spectre HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  3.28, 3.49 / 76.5 (H<sub>2</sub>-28 / C-16). L'analyse du spectre NOESY nous a permis d'établir la stéréochimie de l'aglycone de **PC1**. Des taches de corrélations sont observées à  $\delta_H / \delta_H$  3.11 / 0.61 (H-3 / H-5<sub>ax</sub>), et à  $\delta_H / \delta_H$  1.19 / 1.51 (H<sub>3</sub>-26<sub>ax</sub> / H-15<sub>βax</sub>) et puis 1.51 / 4.17 (H-15<sub>βax</sub> / H-16), suggérant l'orientation de H-3 en  $\alpha$ -axial et de H-16 en  $\beta$ -équatorial. Par conséquent l'orientation des fonctions alcool secondaire sont  $\beta$ -équatorial en C-3 et  $\alpha$ -axiale en C-16 [[Nose et al., 1989](#) ; [Hartleb et al., 1994](#)].

Ainsi, l'aglycone de **PC1** est identifié au 13 $\beta$ ,28-époxyoléan-11-èn-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol précédemment caractérisé comme rotundiogénine A isolé de *Bupleurum rotundifolium* L. [[Kobayashi et al. , 1981](#) ; [Fujioka et al., 2006](#)].

**Détermination de la nature des sucres.** L'analyse du spectre HSQC de **PC1** permet de distinguer quatre signaux de protons anomériques résonnant à  $\delta_H$  4.71 (1H, *d*,  $J = 6.0$  Hz), 5.38 (1H, *d*,  $J = 7.9$  Hz), 4.85 (1H, *d*,  $J = 7.9$  Hz), et 4.83 (1H, *d*,  $J = 7.4$  Hz ) corrélant avec les signaux de quatre carbones à  $\delta_C$  104.4, 104.0, 103.9, et

106.9, respectivement, ce qui prouve la présence de quatre sucres. L'analyse approfondie des spectres RMN-2D et l'analyse des sucres par chromatographie en phase gazeuse (GC) ont permis d'identifier un  $\alpha$ -L-arabinopyranosyle (Ara), deux  $\beta$ -D-glucopyranosyles (Glc I et Glc II) et un  $\beta$ -D-xylopyranosyle (Xyl).

**Détermination de la fixation des sucres sur l'aglycone et leur enchaînement.**

Les spectres RMN- $^{13}\text{C}$  de **PC1** révèlent le déblindage d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  88.9 (C-3) dû à une liaison osidique. La corrélation observée dans le spectre NOESY à  $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$  4.71 / 3.11 (Ara H-1 / Agly H-3) montre qu'il s'agit de la fixation de l'arabinopyranosyle sur la génine en C-3.

L'enchaînement des sucres est déterminé par des corrélations NOESY à  $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$  5.38 / 4.42 (Glc I H-1 / Ara H-2), 4.85 / 4.18 (Glc II H-1 / Ara H-4), et par la corrélation HMBC à  $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$  4.83 (Xyl H-1) / 84.6 (Glc II C-2). La séquence complète des sucres est donc Xyl-(1 $\rightarrow$ 2)-Glc II-(1 $\rightarrow$ 4)-[Glc I(1 $\rightarrow$ 2)]-Ara en position C-3 de l'aglycone. Cette séquence des sucres est rencontrée dans plusieurs familles végétales, notamment la famille des PRIMULACEAE [Dall'Acqua et al., 2010 ; Altunkeyik et al., 2012 ; Bencharif-Betina et al., 2012], et MYRSINACEAE [Bloor et Qi, 1994 ; Huang et al., 2011 ; Liu et al., 2011a].

**Conclusion.** Au vu des résultats obtenus, la structure du composé **PC1** est élucidée au 3-O-( $\beta$ -D-xylopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle)-rotundiogénine A, nouveau composé naturel.

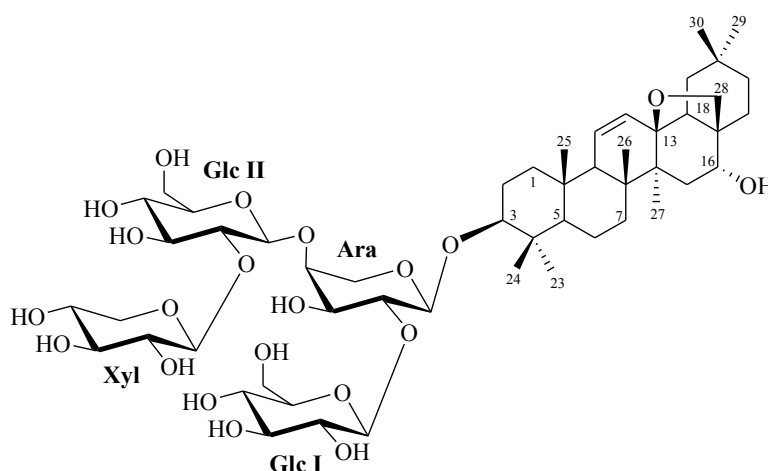


Figure 2.3 – Structure du nouveau composé naturel **PC1**.

Tableau 2.1 – Valeurs des déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) et -<sup>13</sup>C (150 MHz) de la génine (aglycone) et des sucres du composé **PC1** dans la pyridine *d*<sub>5</sub>.

Génine			Sucres		
Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$
1	38.1	0.80, 1.64 ( <i>d</i> , 12.8)			
2	25.9	1.82 ( <i>d</i> , 10.9), 1.94 ( <i>d</i> , 10.0)	1	104.4	4.71 ( <i>d</i> , 6.0)
3	88.9	3.11 ( <i>dd</i> , 11.7, 4.3)	2	78.9	4.42 ( <i>t</i> , 7.1)
4	39.4	-	3	73.0	4.22
5	54.9	0.61 ( <i>d</i> , 8.6)	4	78.5	4.18
6	17.4	1.38 ( <i>br s</i> ), <sup>a</sup>	5	64.4	3.70, 4.59 ( <i>d</i> , 12.1)
7	31.4	1.15, 1.35 ( <i>d</i> , 11.2)			
8	41.4	-			
9	52.4	1.89	1	104.0	5.38 ( <i>d</i> , 7.9)
10	35.9	-	2	75.8	3.97
11	131.4	5.62 ( <i>dd</i> , 10.2, 2.4)	3	77.4	4.21
12	131.8	5.87 ( <i>d</i> , 10.4)	4	71.3	4.05
13	84.7	-	5	77.6	3.96
14	43.2	-	6	62.5	4.26 ( <i>d</i> , 5.7), 4.46
15	34.7	1.51 ( <i>d</i> , 5.7), 2.04 ( <i>dd</i> , 9.5, 4.5)			
16	76.5	4.17			
17	44.9	-	1	103.9	4.85 ( <i>d</i> , 7.9)
18	50.9	1.90 ( <i>t-like</i> )	2	84.6	3.76
19	36.4	1.16, 2.40 ( <i>m</i> )	3	76.8	4.11 ( <i>d</i> , 9.1)
20	31.5	-	4	70.5	4.05
21	38.1	1.30 ( <i>d</i> , 11.2), 2.57 ( <i>m</i> )	5	77.6	3.75
22	30.7	1.52 ( <i>d</i> , 11.7), 1.89	6	61.7	4.17, 4.34 ( <i>d</i> , 11.7)
23	27.4	1.11 ( <i>s</i> )			
24	15.8	0.99 ( <i>s</i> )			
25	17.8	0.80 ( <i>s</i> )			
26	19.1	1.19 ( <i>s</i> )			
27	17.8	1.54 ( <i>s</i> )			
28	77.4	3.28 ( <i>d</i> , 7.1), 3.49 ( <i>d</i> , 7.1)			
29	33.4	0.94 ( <i>s</i> )			
30	24.0	0.86 ( <i>s</i> )			

<sup>a</sup> déplacement chimique non attribué.

### 2.1.2.2. Description du composé **PC2**.

#### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **PC2** montre dans le spectre de masse en mode positif HR-ESI-MS un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1067.5567  $[M + Na]^+$  (calc. 1067.5379). L'analyse du spectre de masse en mode négatif FAB-MS permet d'observer un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1043  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1044, en accord avec l'analyse HR-ESI-MS qui permet de lui attribuer la formule moléculaire  $C_{52}H_{84}O_{21}$ .

#### *Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** Le spectre RMN- $^{13}C$  du composé **PC2** indique la présence de 52 atomes de carbone, dont 7 méthyles, 13 méthylènes, 24 méthines, et 8 atomes de carbone quaternaire. Le spectre RMN- $^1H$  montre 7 signaux de méthyle tertiaire à  $\delta_H$  0.75, 0.80, 0.91, 0.95, 1.00, 1.14 et 1.61 (3H chacun, *s*), et deux signaux de protons oléfiniques à  $\delta_H$  5.58 (1H, *d*,  $J = 10.5$  Hz) et 6.62 (1H, *d*,  $J = 10.2$  Hz). Comme dans le composé **PC1**, la présence d'une double liaison ( $\Delta^{11,12}$ ) est déterminée par l'observation de corrélations COSY et HMBC. Par contre, les spectres HMBC montrent une corrélation caractéristique à  $\delta_H / \delta_C$  5.58 / 135.4 (H-12 / C-13) au lieu de 5.87 / 84.7 (H-12 / C-13) comme dans le composé **PC1**. De plus, la disparition du signal du proton méthine en C-18, qui est remplacé par un atome de carbone quaternaire déblindé à  $\delta_C$  132.8, suggère la présence d'une deuxième double liaison ( $\Delta^{13,18}$ ). Cela est confirmé par l'observation de corrélations dans le spectre HSQC à  $\delta_H / \delta_C$  6.62 / 125.6, 5.58 / 125.4 correspondant à la double liaison  $\Delta^{11,12}$ , et par conséquent les signaux des carbones quaternaires à  $\delta_C$  135.4, 132.8 à la double liaison  $\Delta^{13,18}$ . Le spectre RMN- $^1H$  révèle également deux signaux de protons d'oxyméthines résonant à  $\delta_H$  3.12 (1H, *m*, H-3) et à 4.77 (1H, *br s*, H-16). L'orientation des deux fonctions alcool sont déterminés par corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  3.12 / 0.68 (H-3 / H-5<sub>ax</sub>), et à  $\delta_H / \delta_H$  0.75 / 2.16 (H-3-26<sub>ax</sub> / H-15<sub>βax</sub>) et puis 2.16 / 4.77 (H-15<sub>βax</sub> / H-16), suggérant l'orientation de H-3 en  $\alpha$ -axial et de H-16 en  $\beta$ -équatorial, indiquant ainsi l'orientation des fonctions alcool secondaire :  $\beta$ -équatorial en C-3 et  $\alpha$ -axiale en C-16.



De plus les signaux de fonction d'alcool primaire sont observés à  $\delta_H$  3.68, 4.15 (2H, H<sub>2</sub>-28).

L'analyse des spectres RMN-2D permet l'identification de l'aglycone de **PC2** au oléana-11,13(18)-diène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,28-triol, précédemment décrit comme 16-épi-saikogénine C [Kobayashi et al., 1981; Fujioka et al., 2006].

**Détermination de la nature et de la séquence des sucres.** Le spectre HSQC montre quatre taches de corrélation à  $\delta_H / \delta_C$  4.74 / 104.4, 4.83 / 107.0, 4.87 / 103.9, et 5.40 / 104.2 indiquant la présence de quatre sucres. Par ailleurs, l'analyse complète des spectres RMN-1D et 2D de la partie oligosaccharidique de **PC2** conduit à l'identification de la même fraction de tétrasaccharidique lié en position C-3 de l'aglycone que dans le composé **PC1**.

**Conclusion.** Au vu des résultats obtenus, le composé **PC2** est élucidé au 3-*O*-( $\beta$ -D-xylopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle)-16-épi-saikogénine C, nouveau composé naturel.

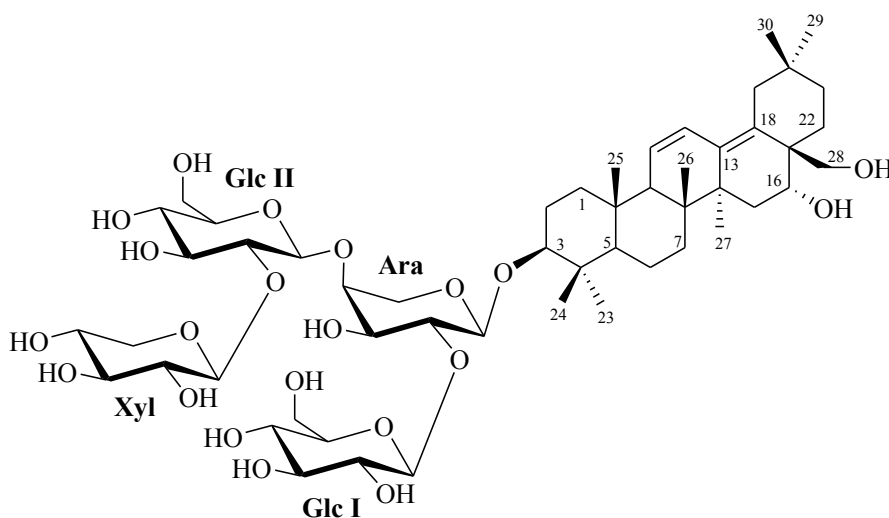


Figure 2.4 – Structure du nouveau composé naturel **PC2**.

Tableau 2.2 – Valeurs des déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) et -<sup>13</sup>C (150 MHz) de la génine et des sucres du composé **PC2** dans la pyridine *d*<sub>5</sub>.

Génine			Sucres		
Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$
1	38.4	0.82, 1.68 ( <i>d</i> , 12.9)			
2	26.0	1.82, 1.96	1	104.4	4.74 ( <i>d</i> , 6.0)
3	89.0	3.12 ( <i>m</i> )	2	78.9	4.44 ( <i>m</i> )
4	39.4	-	3	73.1	4.21
5	55.1	0.68 ( <i>d</i> , 9.5)	4	78.2	4.19
6	18.1	1.24, 1.44	5	64.4	3.68, 4.61 ( <i>t</i> , 9.4)
7	32.2	0.97, 1.20			
8	40.7	-			
9	53.4	1.96	1	104.2	5.40
10	36.2	-	2	75.6	4.00
11	125.6	6.62 ( <i>d</i> , 10.2)	3	77.6	4.21
12	125.4	5.58 ( <i>d</i> , 10.5)	4	71.4	4.08
13	135.4	-	5	77.5	3.98
14	41.5	-	6	62.6	4.27 ( <i>m</i> ), 4.49
15	31.4	1.70 ( <i>d</i> , 12.8), 2.16 ( <i>d</i> , 11.9)			
16	67.3	4.77 ( <i>br s</i> )	1	103.9	4.87 ( <i>d</i> , 7.4)
17	44.9	-	2	84.7	3.77
18	132.8	-	3	76.9	4.12 ( <i>d</i> , 9.3)
19	38.7	1.40, 2.58 ( <i>m</i> )	4	70.5	4.08
20	32.2	-	5	77.7	3.76
21	35.0	1.36, 1.74	6	61.7	4.20, 4.37 ( <i>d</i> , 11.7)
22	26.0	1.91 ( <i>m</i> ), <sup>a</sup>			
23	27.5	1.14 ( <i>s</i> )			
24	15.9	1.00 ( <i>s</i> )	1	107.0	4.83 5 ( <i>d</i> , 7.4)
25	17.9	0.80 ( <i>s</i> )	2	75.5	3.91 ( <i>t</i> , 8.1)
26	16.8	0.75 ( <i>s</i> )	3	77.1	4.01
27	21.6	1.61 ( <i>s</i> )	4	70.1	4.08
28	64.2	3.68, 4.15	5	67.0	3.68, 4.48
29	33.3	0.91 ( <i>s</i> )			
30	24.8	0.95 ( <i>s</i> )			

<sup>a</sup> déplacement chimique non attribué.

### 2.1.2.3. Description du composé **PC3**.

#### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **PC3** montre dans le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1085.5678  $[M + Na]^+$  (calc. 1085.5484). L'analyse du spectre de masse (FAB-MS en mode négatif) montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1061  $[M - H]^-$ , ce qui indique une masse moléculaire de 1062 conformément à la formule brute  $C_{52}H_{86}O_{22}$ . D'autres pics d'ions-fragments sont observés à  $m/z$  929  $[(M - H) - 132]^-$  et 767  $[(M - H) - 132-162]^-$ , suggérant l'élimination de deux sucres, un pentosyle et un hexosyle.

#### *Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** Le spectre RMN- $^1H$  de **PC3** montre les signaux de sept méthyles tertiaires à  $\delta_H$  0.78, 0.83, 0.93, 1.00, 1.03, 1.12 et 1.72 (3H chacun, *s*), et d'un proton oléfinique à  $\delta_H$  5.29 (1H, *br s*, H-12), caractéristiques d'un squelette oléanène. De plus l'observation des signaux de trois protons oxyméthine à  $\delta_H$  3.10 (1H, *dd*,  $J = 10.3, 4.1$  Hz, H-3), 4.99 (1H, *br s*, H-16) et 4.54 (1H, *dd*,  $J = 12.2, 4.2$  Hz, H-22) permet de suggérer la présence d'un squelette de type 3,16,22,28-tétrahydroxy-oléanène. La stéréochimie de l'aglycone est déterminée par l'observation de corrélations NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  3.10 / 0.63 (H-3 / H-5), 4.99 / 2.03 (H-16 / H-15), 2.03 / 0.83 (H-15 / H<sub>3</sub>-26), et de 4.54 / 1.03 (H-22 / H<sub>3</sub>-30). Celles-ci permettent de conclure que les trois protons sont respectivement H-3 $\alpha$ , H-16 $\beta$  et H-22 $\beta$  et donc que les fonctions alcool sont orientées en 3 $\beta$ -OH, 16 $\alpha$ -OH, et 22 $\alpha$ -OH. Les signaux d'une fonction alcool primaire à  $\delta_H$  3.57, 3.94 (2H, H<sub>2</sub>-28) sont également observés sur ce spectre RMN- $^1H$ .

L'analyse exhaustive des spectres de RMN-2D confirme l'identification de l'aglycone au oléan-12-ène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,22 $\alpha$ ,28-tétrol (caméliagénine A) [Itokama et al., 1969 ; Chakravarty et al., 1987].

**Détermination de la nature et de la séquence des sucres.** L'analyse des différents spectres de RMN-1D et-2D montre la présence de la même fraction tétrasaccharidique en C-3 que dans les composés **PC1** et **PC2**.

**Conclusion.** Au vu des résultats précédents, la structure du composé **PC3** est élucidée au 3-*O*-( $\beta$ -D-xylopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle)-caméliagénine A, nouveau composé naturel. La nouveauté de ce composé réside dans la liaison en C-3 de la caméliagénine avec le tétrasaccharide.

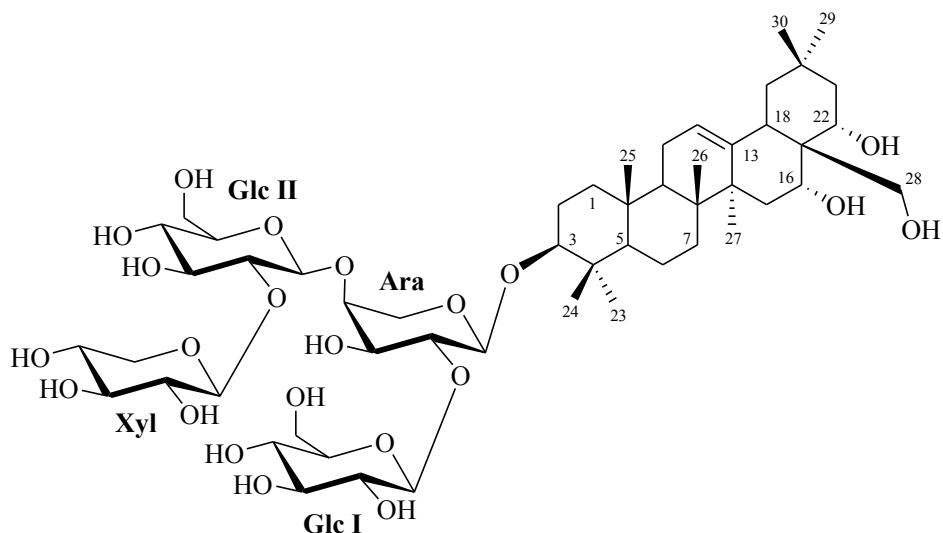


Figure 2.5 – Structure du nouveau composé naturel **PC3**.

Tableau 2.3 – Valeurs des déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) et -<sup>13</sup>C (150 MHz) de la génine et des sucres du composé **PC3** dans la pyridine *d*<sub>5</sub>.

Génine			Sucres		
Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$
1	38.5	0.80, 1.41			
2	26.1	1.76, 1.92	1	104.4	4.68 ( <i>d</i> , 5.5)
3	88.9	3.10 ( <i>dd</i> , 10.3, 4.1)	2	79.0	4.42 ( <i>m</i> )
4	39.3	-	3	72.9	4.21
5	55.5	0.63 ( <i>d</i> , 11.2)	4	78.6	4.18
6	18.1	1.17, 1.37	5	64.5	3.71, 4.60 ( <i>d</i> , 11.4)
7	32.7	1.14, 1.43			
8	41.9	-			
9	46.8	1.62 ( <i>m</i> )	1	104.0	5.38 ( <i>d</i> , 6.9)
10	36.6	-	2	75.6	3.97
11	23.9	1.75, 1.82	3	77.5	4.21
12	122.0	5.29 ( <i>br s</i> )	4	71.3	4.06
13	144.0	-	5	77.6	3.97
14	39.7	-	6	62.5	4.25 ( <i>m</i> ), 4.47
15	36.5	1.92, 2.03			
16	68.2	4.99 ( <i>br s</i> )	1	103.9	4.85 ( <i>d</i> , 7.6)
17	44.0	-	2	84.6	3.76
18	42.5	2.41 ( <i>d</i> , 13.1)	3	76.8	4.11 ( <i>d</i> , 9.3)
19	47.4	1.17, 2.74 ( <i>d</i> , 12.6)	4	70.5	4.06
20	31.4	-	5	77.6	3.75
21	45.4	1.77, 2.58 ( <i>m</i> )	6	61.7	4.18, 4.34 ( <i>d</i> , 11.2)
22	73.4	4.54 ( <i>dd</i> , 12.2, 4.2)			
23	27.7	1.12 ( <i>s</i> )	1	106.9	4.81 ( <i>d</i> , 7.6)
24	16.4	1.00 ( <i>s</i> )	2	75.4	3.89 ( <i>t</i> , 8.5)
25	15.3	0.78 ( <i>s</i> )	3	77.0	3.99
26	16.5	0.83 ( <i>s</i> )	4	70.2	4.07
27	27.1	1.72 ( <i>s</i> )	5	66.9	3.69, 4.46
28	69.1	3.57 ( <i>d</i> , 10.7), 3.94			
29	33.3	0.93 ( <i>s</i> )			
30	24.7	1.03 ( <i>s</i> )			

#### 2.1.2.4. Description du composé **PC4**.

##### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **PC4** a la formule brute  $C_{56}H_{90}O_{24}$ , établie d'après l'analyse du spectre de masse en mode positif HR-ESI-MS présentant un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1169.5888  $[M + Na]^+$  (calc. 1169.5694). Cette formule moléculaire est confirmée par l'analyse du spectre de masse FAB-MS en mode négatif qui montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1145  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1146. D'autres pics d'ions-fragments sont observés à  $m/z$  1103  $[(M - H) - 42]^-$ , 971  $[(M - H) - 42 - 132]^-$  et 809  $[(M - H) - 42 - 132 - 162]^-$ , suggérant l'élimination successive d'un acétyle, et de deux sucres, un pentosyle et un hexosyle.

##### *Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** L'analyse des spectres RMN- $^1H$  et  $^{13}C$  du composé **PC4** montre des similarités à celles du composé **PC3** à l'exception des signaux en C-16 et C-22. Le spectre HSQC montre deux signaux déblindés de protons d'oxyméthines à  $\delta_H$  5.79 (1H, *br s*) et 5.61 (1H, *br s*) qui corrélerent respectivement à  $\delta_C$  71.9 et 72.0. Ceci suggère l'acétylation en C-16 et C-22. Ceci est confirmé par l'observation de corrélations NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  5.79 / 1.60, 1.84 (H-16 / H<sub>2</sub>-15), et 5.61 / 1.48, 1.82 (H-22 / H<sub>2</sub>-21).

Ainsi, l'aglycone de **PC4** est identifié au 16,22-diacétoxy-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,22 $\alpha$ ,28-tétrol. Cette forme de camélliagénine A diacétylée est signalée pour la première fois dans le règne végétal.

**Détermination de la nature et de la séquence des sucres.** L'analyse du spectre HSQC de **PC4** permet de distinguer quatre taches anomériques à  $\delta_H / \delta_C$  4.68 / 104.4, 5.39 / 104.1, 4.85 / 103.9, et 4.82 / 106.9 ce qui prouve la présence de quatre sucres. L'analyse approfondie des spectres RMN-2D et l'analyse des sucres par GC ont permis d'identifier la même séquence tétrasaccharidique en C-3 que dans les précédents composés (**PC1**, **PC2** et **PC3**).

**Conclusion.** Au vu des résultats d'analyse détaillée de tous les spectres, la structure du composé **PC4** est élucidée au 3-*O*-( $\beta$ -D-xylopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle)-16,22-diacétoxy-caméliagénine A, nouveau composé naturel.

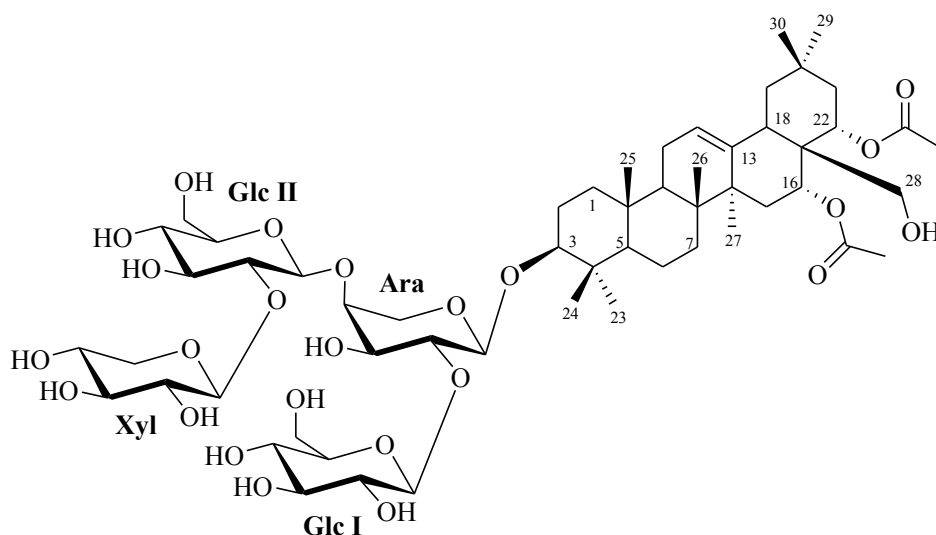


Figure 2.6 – Structure du nouveau composé naturel **PC4**.

Tableau 2.4 – Valeurs des déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) et -<sup>13</sup>C (150 MHz) de la génine, des sucres et des acides organiques du composé PC4 dans la pyridine *d*<sub>5</sub>.

Génine			Sucres et acides organiques		
Pos.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	Pos.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1	38.5	0.77, 1.37			
2	26.0	1.76, 1.90			
3	88.8	3.09 ( <i>dd</i> , 10.9, 5.0)			
4	39.2	-			
5	55.4	0.62 ( <i>d</i> , 11.9)			
6	17.9	1.17, 1.38			
7	32.6	1.04, 1.24			
8	41.2	-			
9	46.6	1.55 ( <i>br s</i> )			
10	36.4	-			
11	23.4	1.77, 1.81			
12	123.8	5.33 ( <i>d</i> , 14.5)			
13	141.3	-			
14	39.7	-			
15	31.1	1.60, 1.84			
16	71.9	5.79 ( <i>br s</i> )			
17	43.2	-			
18	40.9	2.80 ( <i>d</i> , 14.8)			
19	46.8	1.22, 2.36 ( <i>m</i> )			
20	31.2	-			
21	41.5	1.48, 1.82			
22	72.0	5.61 ( <i>br s</i> )			
23	27.7	1.14 ( <i>s</i> )			
24	16.4	1.00 ( <i>s</i> )			
25	15.3	0.73 ( <i>s</i> )			
26	16.4	0.74 ( <i>s</i> )			
27	26.6	1.38 ( <i>s</i> )			
28	63.9	3.48 ( <i>d</i> , 5.5), 3.54 ( <i>d</i> , 10.9)			
29	33.1	0.95 ( <i>s</i> )			
30	24.4	1.08 ( <i>s</i> )			
			3- <i>O</i> -Ara		
			1	104.4	4.68 ( <i>d</i> , 4.7)
			2	78.9	4.43 ( <i>t</i> , 5.6)
			3	73.0	4.21
			4	78.6	4.18
			5	64.4	3.70, 4.59 ( <i>d</i> , 10.7)
			Glc I-(1→2)-Ara		
			1	104.1	5.39 ( <i>d</i> , 7.4)
			2	75.6	3.98
			3	77.6	4.20
			4	71.4	4.06
			5	77.5	3.97
			6	62.5	4.25 ( <i>d</i> , 5.7), 4.47
			Glc II-(1→4)-Ara		
			1	103.9	4.85 ( <i>d</i> , 7.4)
			2	84.6	3.76
			3	76.8	4.11 ( <i>d</i> , 9.3)
			4	70.5	4.06
			5	77.6	3.75
			6	61.7	4.18, 4.34 ( <i>d</i> , 10.5)
			Xyl-(1→2)-Glc II		
			1	106.9	4.82 ( <i>d</i> , 7.2)
			2	75.4	3.90 ( <i>t</i> , 8.3)
			3	77.0	4.01
			4	70.2	4.06
			5	66.9	3.69, 4.46
			Ac à C-16		
			1	170.0	-
			2	21.8	2.13 ( <i>s</i> )
			Ac à C-22		
			1	170.8	-
			2	20.5	2.02 ( <i>s</i> )



### 2.1.2.5. Description du composé **PC5**.

#### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **PC5** montre dans le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1127.5788  $[M + Na]^+$  (calc. 1127.5614), en accord avec la formule brute  $C_{54}H_{88}O_{23}Na$ . Cette formule moléculaire est confirmée par l'analyse du spectre de masse FAB-MS en mode négatif qui présente un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1103  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1104. D'autres pics d'ions-fragments sont observés à  $m/z$  971  $[(M - H) - 132]^-$  et 809  $[(M - H) - 132 - 162]^-$ , suggérant l'élimination successive de deux sucres, un pentosyle et un hexosyle.

#### *Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** L'analyse des spectres RMN-1D et 2D de **PC5** montre une très forte similitude à ceux de **PC3** et **PC4**. L'aglycone de **PC5** diffère des deux autres par les taches de corrélations observées sur le spectre HSQC à  $\delta_H / \delta_C$  6.03 / 71.7 (H-16 / C-16), et 4.46 / 72.0 (H-22 / C-22), indiquant un acétyle en C-16 et un oxyméthine libre en C-22. Ainsi, l'aglycone de **PC5** est identifié au 16-acétoxy-oléan-12-ène-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,22 $\alpha$ ,28-tétrol.

**Détermination de la nature et de la séquence des sucres.** La comparaison des spectres RMN-2D, dans la partie oligosaccharide, du composé **PC5** à ceux des autres composés isolés de *P. corymbosa* montre une très forte similarité entre eux. Ceci indique donc la même fraction tétrasaccharidique en C-3.

**Conclusion.** Au vu des résultats d'obtenus, le composé **PC5** est identifié au 3-*O*-( $\beta$ -D-xylopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle)-16-*O*-acétoxy-camélliagénine A (apoanagallosaponin IV) précédemment isolé d'*Anagallis arvensis* L. (PRIMULACEAE) [Shoji et al., 1994].

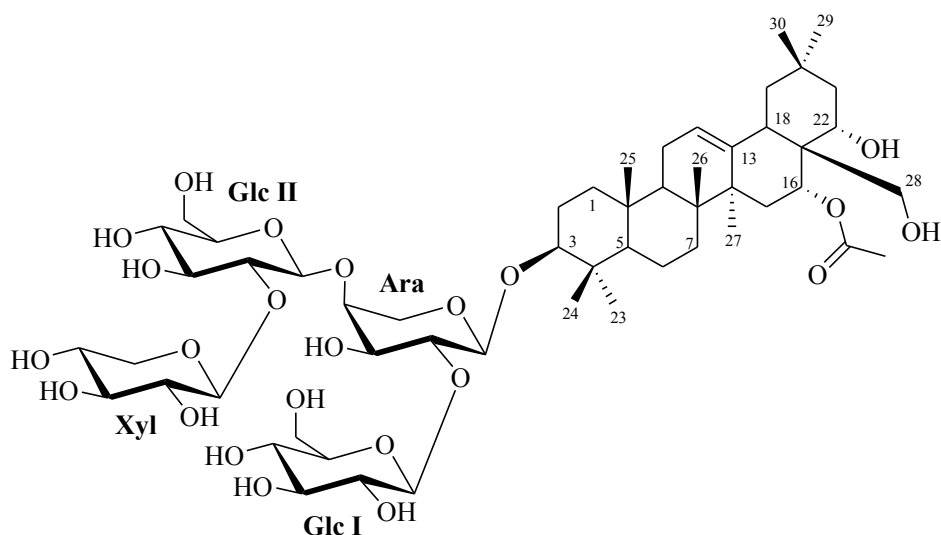


Figure 2.7 – Structure du composé **PC5**.

Tableau 2.5 – Valeurs des déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) et -<sup>13</sup>C (150 MHz) de la génine, des sucres et d'acide organique du composé **PC5** dans la pyridine *d*<sub>5</sub>.

Génine			Sucres et acides organiques		
Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$
1	38.5	0.76, 1.38			
2	26.0	1.76, 1.90 ( <i>d</i> , 10.5)	1	104.4	4.69 ( <i>d</i> , 6.2)
3	88.8	3.08 ( <i>dd</i> , 11.4, 4.1)	2	79.0	4.43
4	39.2	-	3	73.1	4.23
5	55.4	0.61( <i>d</i> , 11.4)	4	78.6	4.19
6	17.9	1.14, 1.35	5	64.5	3.71, 4.60
7	32.6	1.00, 1.24			
8	41.3	-			
9	46.6	1.55	1	104.1	5.39 ( <i>d</i> , 7.6)
10	36.4	-	2	75.6	3.99
11	23.4	1.71, 1.75	3	77.6	4.21
12	123.8	5.29 ( <i>br s</i> )	4	71.4	4.06
13	141.9	-	5	77.5	3.97
14	39.7	-	6	62.5	4.26, 4.48
15	30.7	<sup>a</sup>			
16	71.7	6.03 ( <i>br s</i> )			
17	43.5	-	1	103.9	4.86 ( <i>d</i> , 7.6)
18	41.4	2.39	2	84.6	3.76
19	47.1	1.18 ( <i>d</i> , 8.8), 2.38	3	76.3	4.10 ( <i>d</i> , 9.3)
20	31.1	-	4	70.5	4.05
21	44.5	1.75, 1.98 ( <i>m</i> )	5	77.7	3.76
22	72.0	4.46 ( <i>d</i> , 8.1)	6	61.8	4.18, 4.35 ( <i>d</i> , 11.4)
23	27.7	1.14 ( <i>s</i> )			
24	16.4	1.00 ( <i>s</i> )			
25	15.3	0.73 ( <i>s</i> )	1	107.0	4.82 ( <i>d</i> , 7.4)
26	16.4	0.74 ( <i>s</i> )	2	75.4	3.90 ( <i>t</i> , 8.3)
27	26.7	1.38 ( <i>s</i> )	3	76.8	4.01
28	68.5	3.56 ( <i>d</i> , 10.7), 3.94 ( <i>d</i> , 10.7)	4	70.2	4.07
29	33.5	0.96 ( <i>s</i> )	5	66.9	3.69, 4.47
30	24.9	1.01 ( <i>s</i> )			

<sup>a</sup> déplacement chimique non attribué.

## 2.1.2.6. Les spectres des composés isolés.

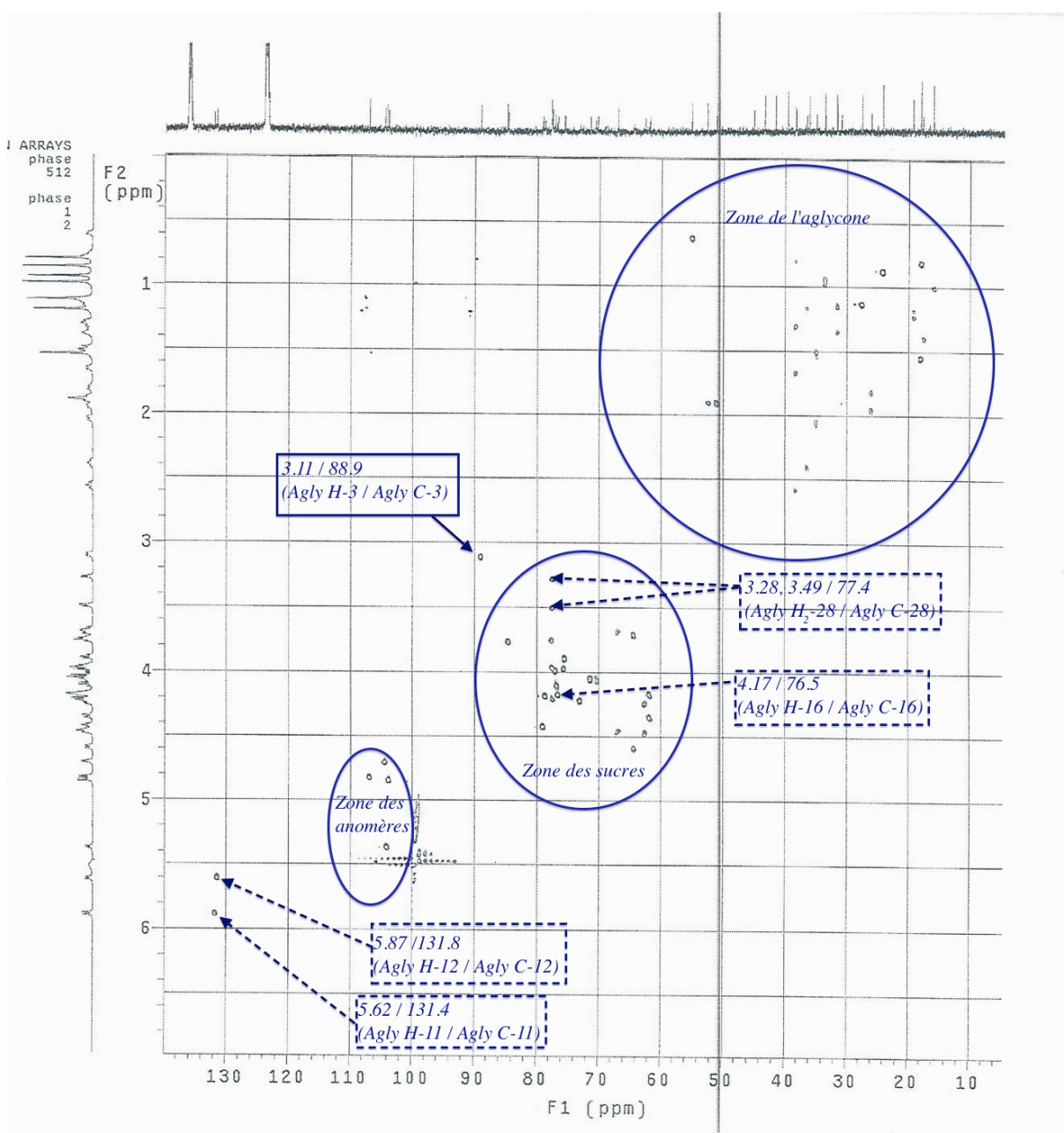


Figure 2.8 – Les corrélations HSQC du composé **PC1** montrant les différences (en trait discontinu) avec **PC2**, au niveau des taches de corrélations de  $\Delta^{11-12}$ , et des carbones 16 et 28 de l'aglycone.

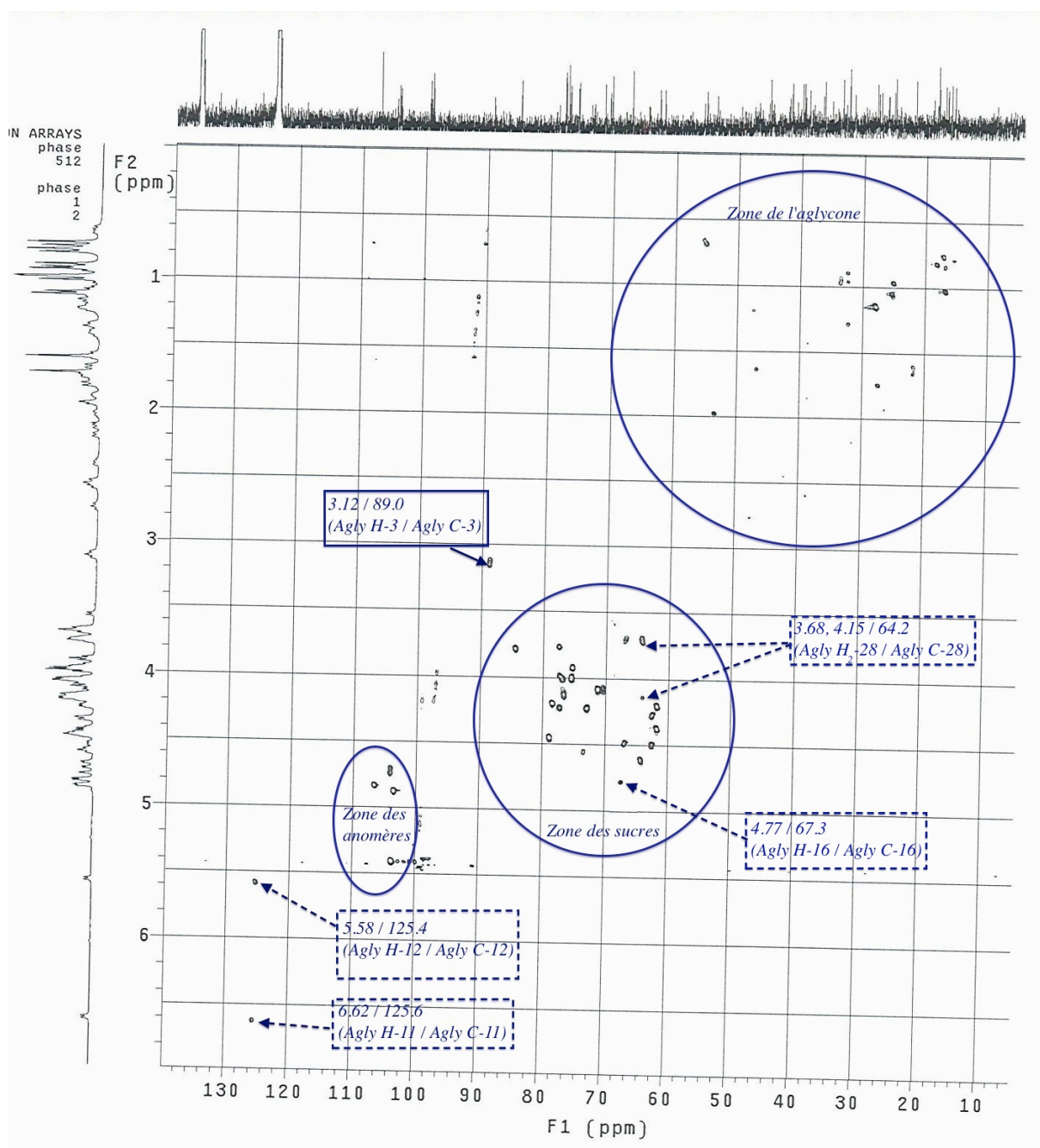


Figure 2.9 – Les corrélations HSQC du composé **PC2** montrant les différences (en trait discontinu) avec **PC1**, au niveau des taches de corrélations de  $\Delta^{11-12}$ , et des carbones 16 et 28 de l'aglycone.

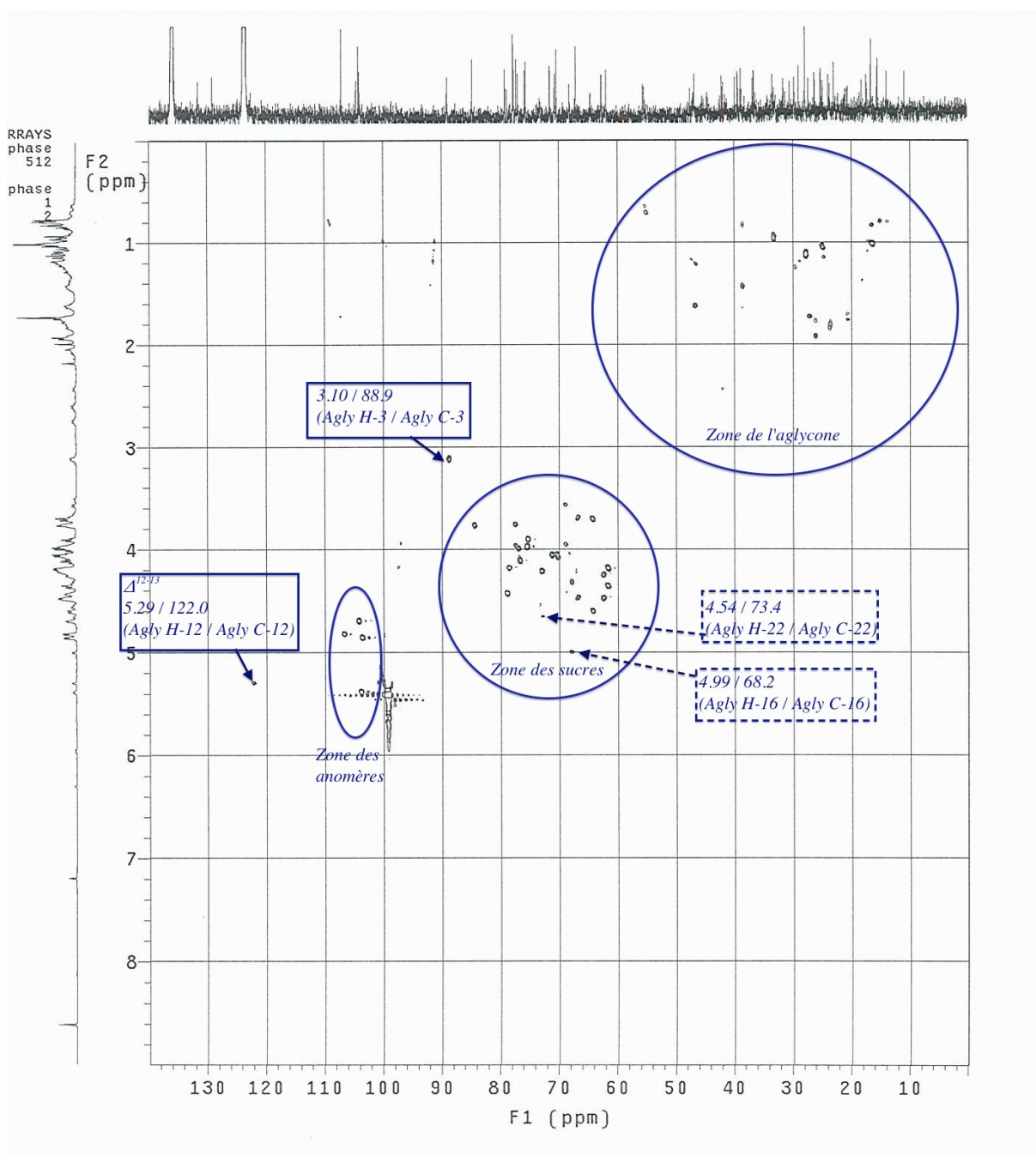


Figure 2.10 – Les corrélations HSQC du composé **PC3** montrant les différences (en trait discontinu) avec **PC4** et **PC5**, au niveau des taches de corrélations des carbones 16 et 22 de l'aglycone.



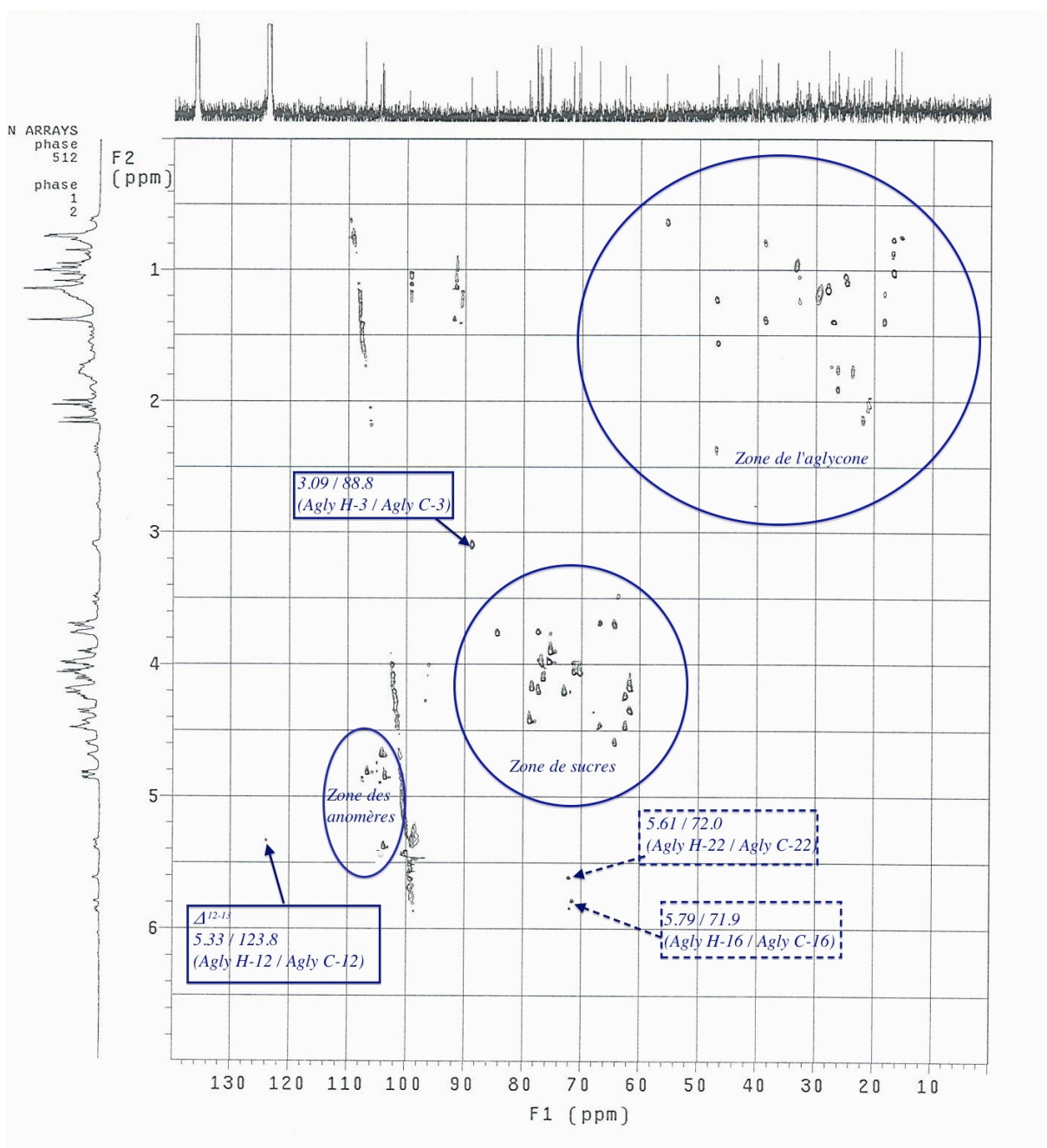


Figure 2.11 – Les corrélations HSQC du composé **PC4** montrant les différences (en trait discontinu) avec **PC3** et **PC5**, au niveau des taches de corrélations des carbones 16 et 22 de l'aglycone.

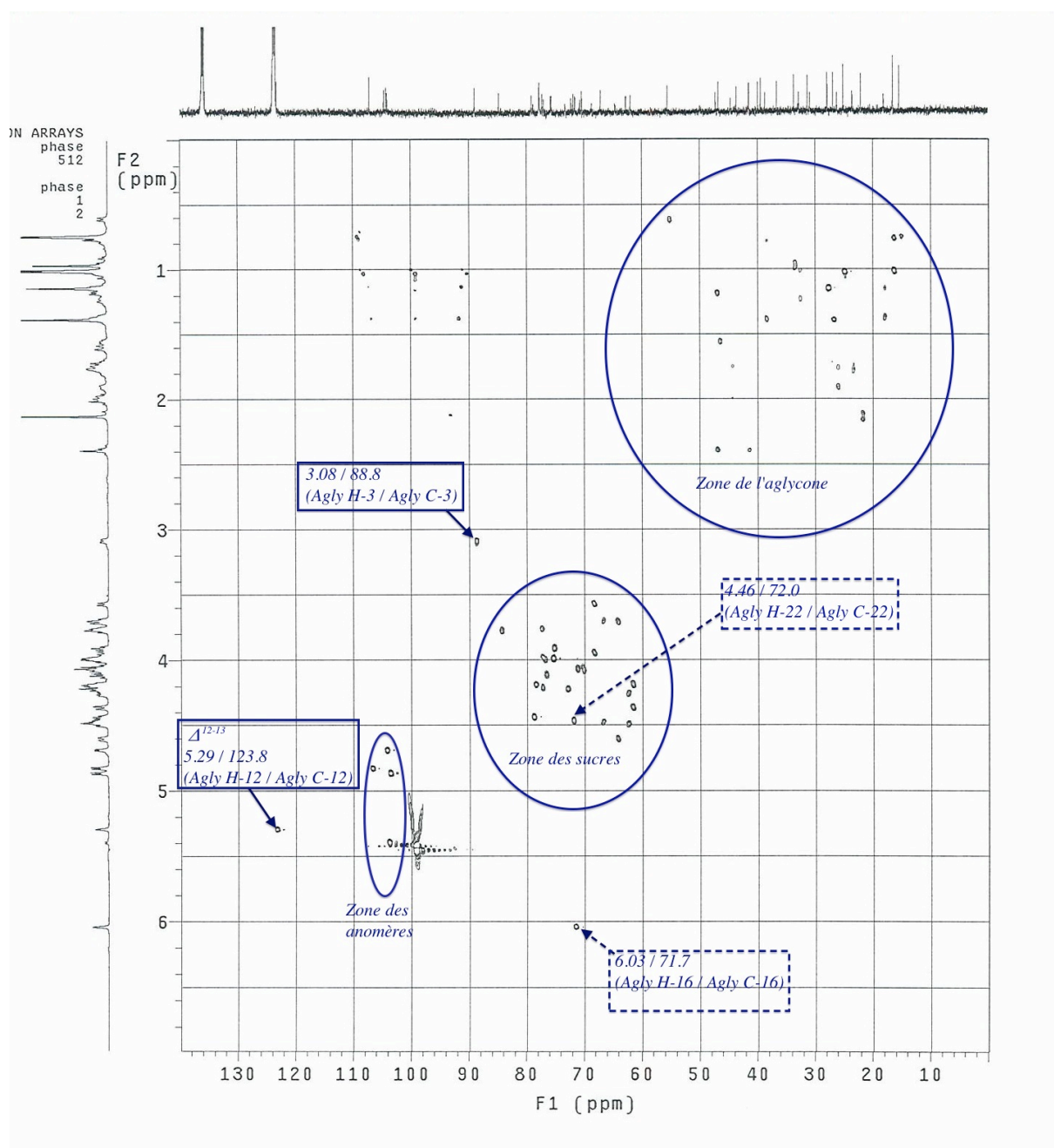


Figure 2.12 – Les corrélations HSQC du composé **PC5** montrant les différences (en trait discontinu) avec **PC3** et **PC4**, au niveau des taches de corrélations des carbones 16 et 22 de l'aglycone.



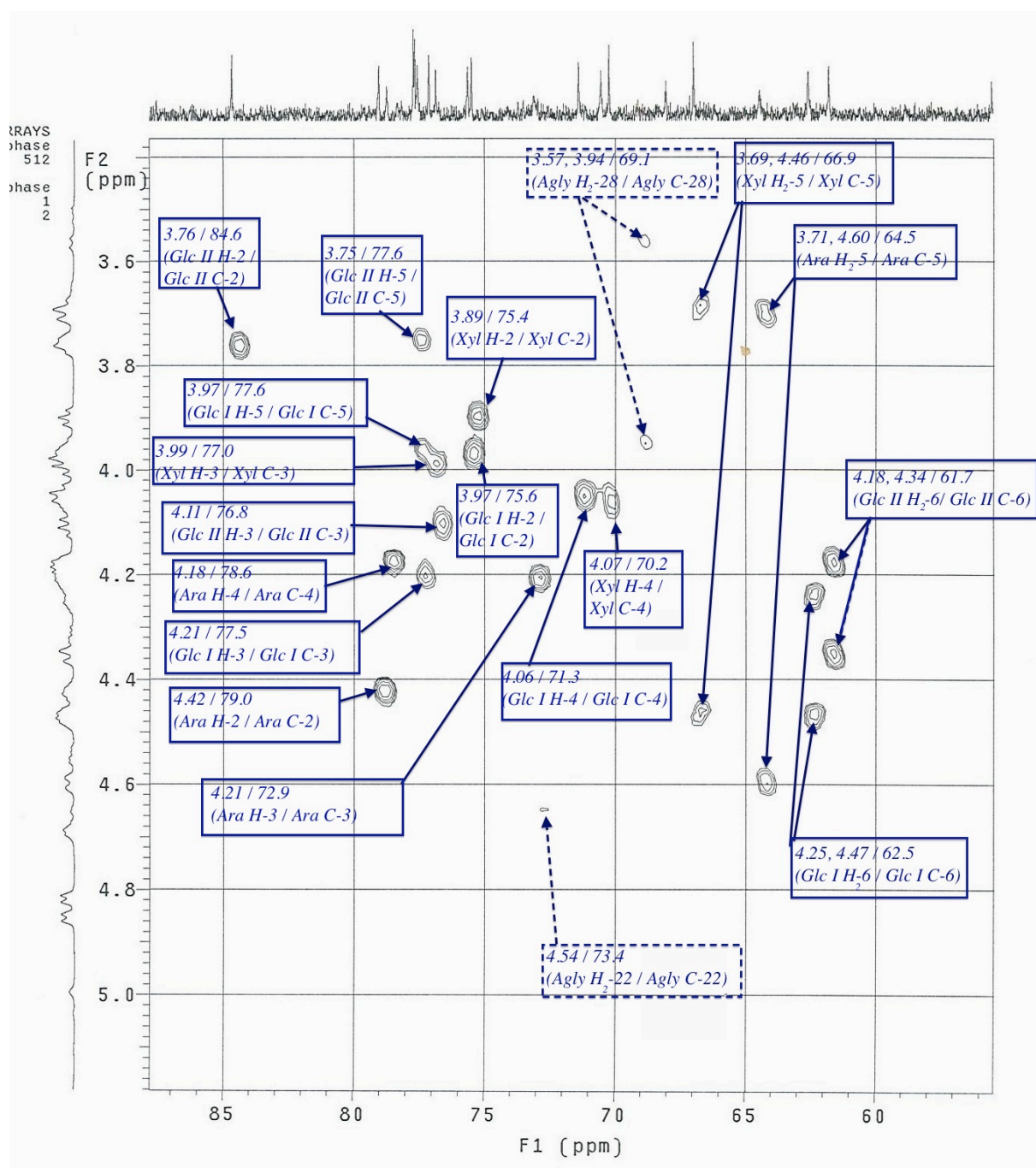


Figure 2.13 – Les corrélations HSQC des sucres du composé **PC3**. Les taches de corrélations des sucres sont quasi-similaires dans les cinq composés isolés de *P. corymbosa* Lamk.

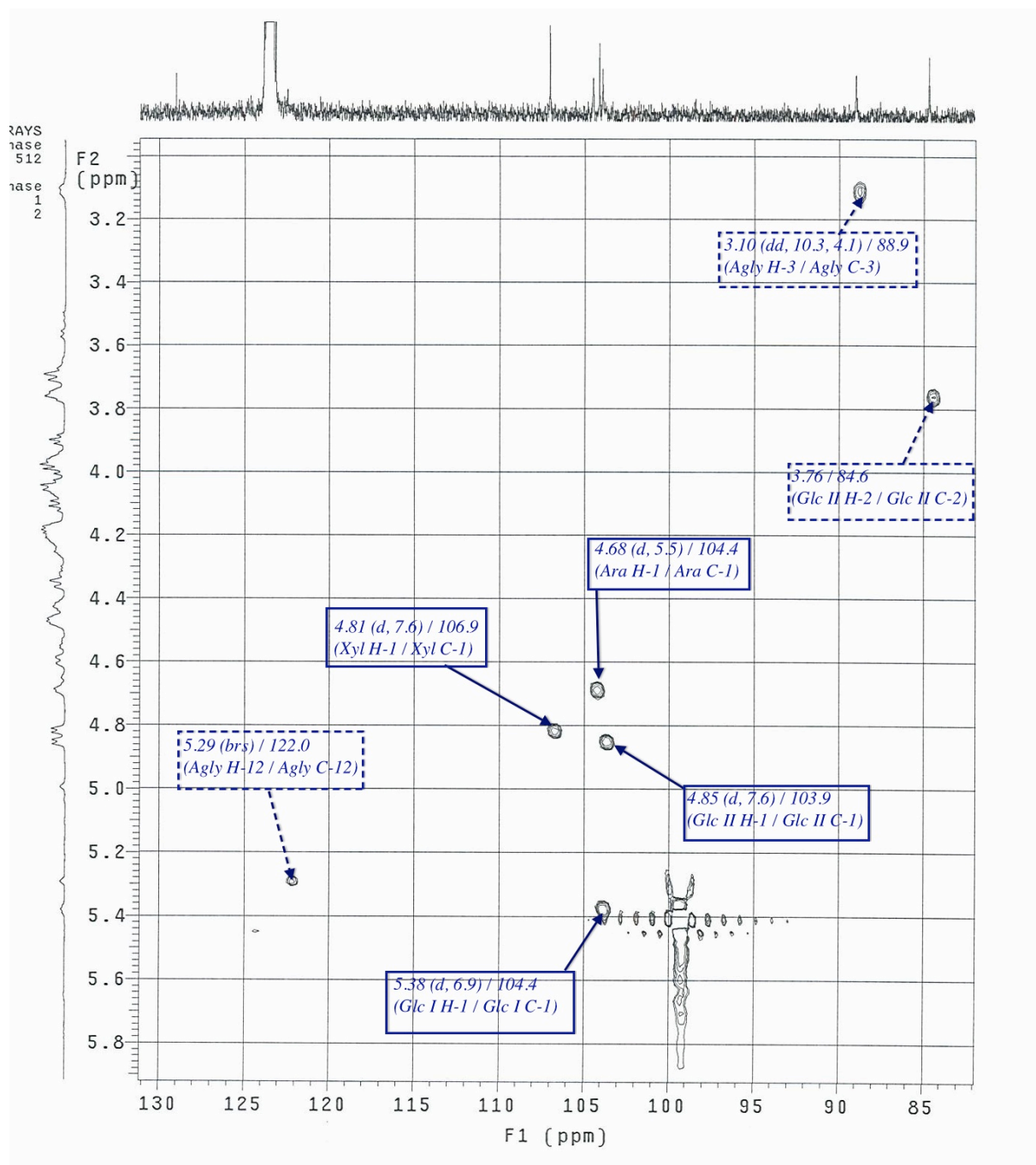


Figure 2.14 – Les corrélations HSQC des anomères du composé **PC3**.

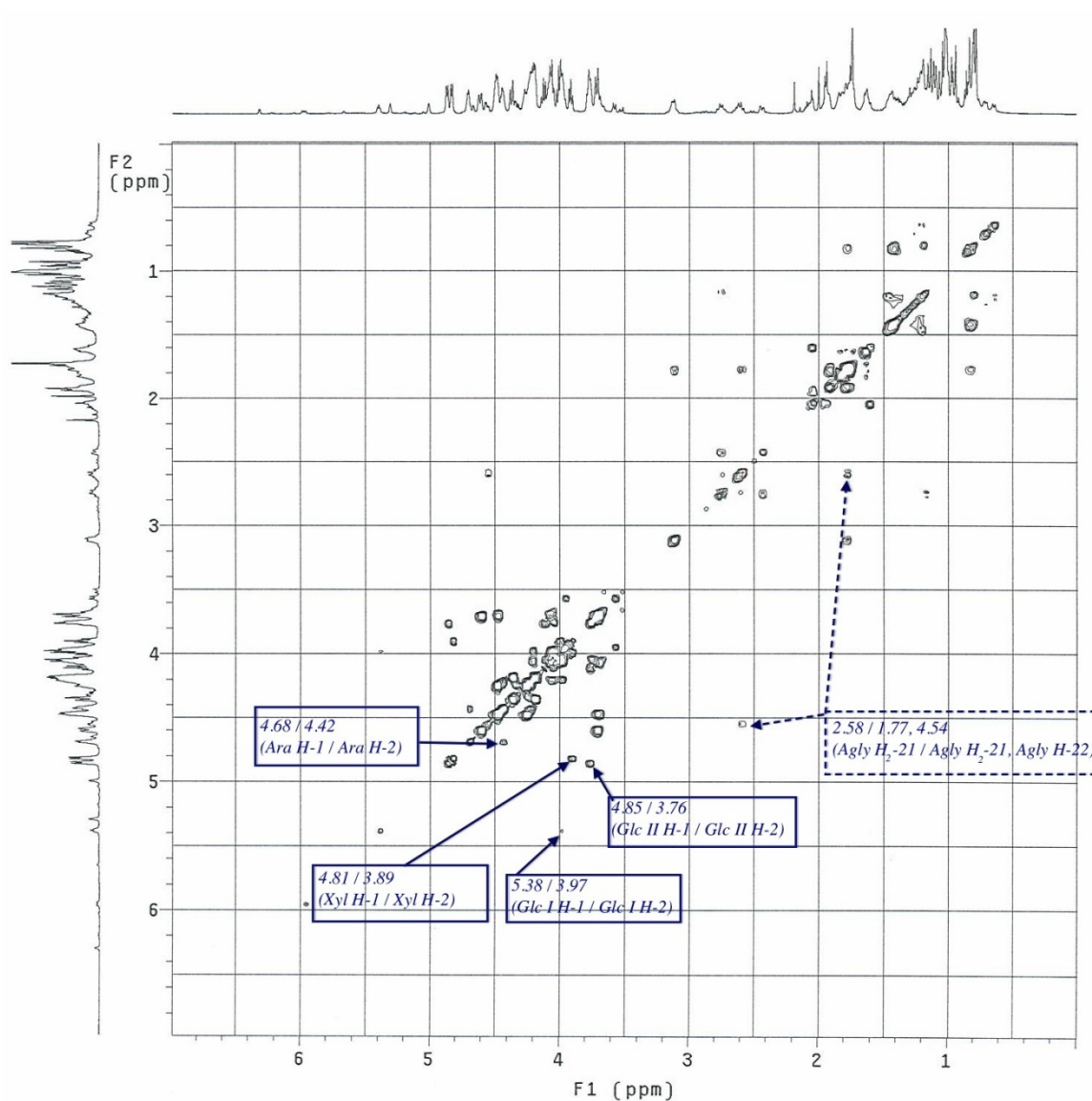


Figure 2.15 – Les corrélations COSY des sucres du composé **PC3** indiquant les protons voisins des protons anomériques.

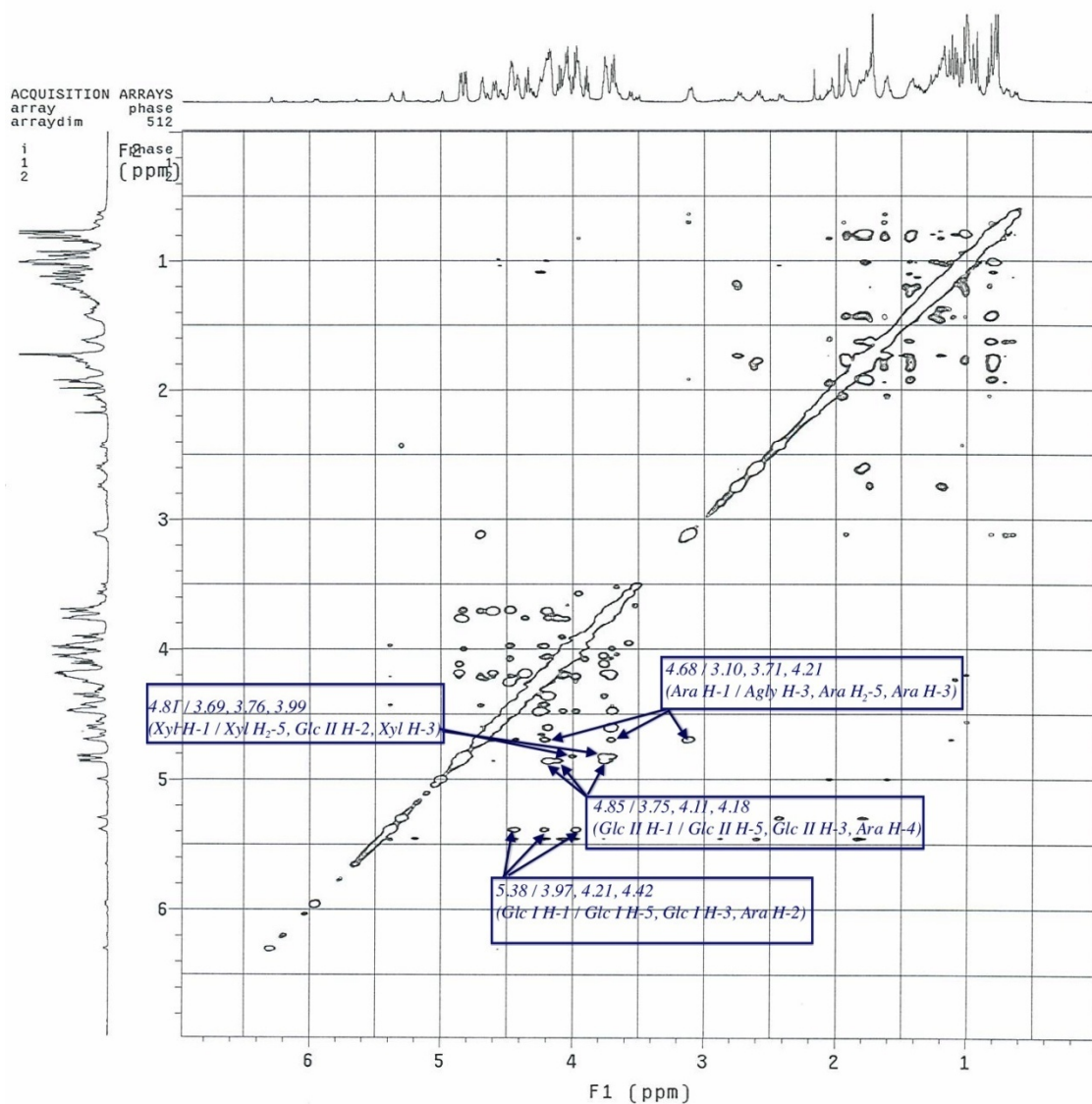


Figure 2.16 – Les corrélations NOESY des sucres du composé **PC3** montrant l'enchaînement des sucres et la liaison à l'aglycone.

## 2.2. *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum*.

### 2.2.1. Extraction et isolement.

Les écorces de racines séchées de *P. verticillatum* (380 g) ont été broyées et soumises à une extraction à reflux dans de l'éthanol (1 L) pendant 1 h, répétée trois fois. Après évaporation du solvant sous vide, un extrait brut de 55.8 g est obtenu (voir Fig. A.3, page 156). Un aliquot de celui-ci (30 g) a été dissout dans le solvant CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (60:32:7) et soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase normale (15–40 μm). Cette chromatographie a fourni, après évaporation du solvant, un substrat de 12.5 g qui a été réutilisé pour une VLC sur gel de silice en phase inverse RP-18 éluée avec H<sub>2</sub>O (5 x 200 ml) et MeOH (5 x 200 ml). Le résidu méthanolique (4.1 g) a été fractionné ensuite par Flash chromatographie sur gel de silice normale éluée avec des gradients de solvants CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:2; 70:23:4; 70:30:5; 60:32:7; 0:100:0). Douze fractions ont été obtenues, F<sub>1</sub>-F<sub>12</sub>. Le fraction F<sub>7</sub> (357.9 mg) a été purifiée par MPLC successives [système A: gel de silice (15–40 μm), CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:2; 70:23:4; 70:30:5; 60:32:7; 0:100:0) / système B: phase inverse gel de silice RP-18, MeOH-H<sub>2</sub>O (30 à 100%)], ce qui a conduit à l'isolement des composés **PV1** (5.4 mg) et **PV2** (8.9 mg). Les fractions F<sub>8</sub> (543.3 mg) et F<sub>11</sub> (124.8 mg) soumises à des MPLC (système B), ont conduit à l'isolement des composés **PV3** (16.0 mg) et **PV4** (13.7 mg), respectivement (voir Fig. B.3, page 161).

### 2.2.2. Elucidation structurale.

#### 2.2.2.1. Description du composé **PV1**.

##### *Spectrométrie de masse.*

Le spectre de masse HR-ESI-MS de **PV1** en mode positif présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1273.6757 [M + Na]<sup>+</sup> (calc. 1273.5829), en accord avec la formule moléculaire C<sub>59</sub>H<sub>94</sub>O<sub>28</sub>Na. L'analyse du spectre de masse FAB-MS en mode négatif montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1249 [M – H]<sup>–</sup>, indiquant une masse moléculaire de 1250. Un autre pic d'ion-fragment est observé à  $m/z$  1117 [(M – H) – 132]<sup>–</sup>, suggérant l'élimination d'un résidu pentosyle.



***Spectroscopie RMN.***

**Détermination de l'aglycone.** Les spectres RMN-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C indiquent la présence de signaux caractéristiques de sept protons de méthyle tertiaire résonnant à  $\delta_H$  0.72, 0.93, 0.95, 1.01, 1.16, 1.23, 1.74 (3H chacun, *s*), un proton oléfinique à  $\delta_H$  5.47 (1H, *br s*, H-12) et deux carbones oléfiniques à  $\delta_C$  124.8 (C-12) et 143.7 (C-13). Le spectre HSQC révèle la présence de cinq fonctions oxyméthines à  $\delta_H / \delta_C$  3.06 / 90.0, 4.19 / 67.3, 4.60 / 72.1, 4.61 / 72.0 et 6.26 / 82.5, et une fonction alcoolique primaire à  $\delta_H / \delta_C$  3.65, 3.91 / 64.5 suggérant un squelette de type hémihydroxy-oléanène. La corrélation HMBC entre deux méthyles angulaires à  $\delta_H$  1.16 (H<sub>3</sub>-29), 1.23 (H<sub>3</sub>-30) avec  $\delta_C$  82.5 suggère l'emplacement de la première fonction oxyméthine en C-21 dont le proton est déblindé à  $\delta_H$  6.26 d'après l'observation d'une tache de corrélation à  $\delta_H / \delta_C$  6.26 / 82.5 sur le spectre HSQC. De plus, les corrélations HMBC entre ce signal à  $\delta_H$  6.26 et deux signaux de carbone à  $\delta_C$  172.5 et 72.1, suggère l'acylation de la fonction alcool secondaire en C-21, et une fonction alcool en C-22. La présence de la fonction alcool en C-22 est confirmée par l'observation de la corrélation COSY à  $\delta_H / \delta_H$  6.26 / 4.60 (H-21 / H-22). Les autres méthines oxygénés sont localisés sur les positions C-3, C-15 et C-16 par l'observation de corrélations sur le spectre HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  1.01 / 90.0 (H<sub>3</sub>-23 / C-3), 1.74 / 67.3 (H<sub>3</sub>-27 / C-15), et une corrélation COSY à  $\delta_H / \delta_H$  4.19 / 4.61 (H-15 / H-16). Le spectre NOESY révèle la stéréochimie de l'aglycone par l'observation de corrélations à  $\delta_H / \delta_H$  3.06 / 0.64 (H-3 / H-5), 4.19 / 0.93 (H-15 / H<sub>3</sub>-26), 4.61 / 4.19 (H-16 / H-15), 4.60 / 1.23 (H-22 / H<sub>3</sub>-30), et 6.26 / 1.16 (H-21 / H<sub>3</sub>-29), indiquant ainsi l'orientation en  $\alpha$  de H-3 et H-21, et l'orientation en  $\beta$  de H-15, H-16 et H-22. Les précédentes données permettent d'identifier l'aglycone triterpénique au R1-barrigénol [Han et al., 1995 ; Kartal et al., 2005 ; Fu, et al., 2005 ; Zhang et Li, 2007 ; Linnek et al., 2012]. De plus, le spectre de RMN-<sup>13</sup>C montre des signaux particuliers à  $\delta_C$  172.5 (C-1'), 81.8 (C-2'), 31.3 (C-3'), 7.5 (C-4'), 21.2 (C-5'), 170.2 (C-6'), et 20.9 (C-7'), qui sont attribués d'après l'analyse de spectres HSQC et HMBC au groupement 2-acétoxy-2-méthylbutanoyle [Burczyk et al., 1995 ; D'Acquarica et al., 2002]. La fixation de ce groupement à l'aglycone est déterminée par la corrélation HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  6.26 / 172.5 (H-21 / C-1').

L'aglycone acylé de **PV1** est ainsi caractérisé pour la première fois au 21-(2-acétoxy-2-méthylbutanoyle)-R1-barrigénol.

**Détermination de la nature des sucres.** Les taches de corrélations dans le spectre HSQC de **PV1** montrent, respectivement, quatre protons anomériques à  $\delta_H$  4.75 (1H, *d*, *J* = 6.7 Hz), 5.59 (1H, *d*, *J* = 6.9 Hz), 5.63 (1H, *d*, *J* = 7.6 Hz), et 6.11 (1H, *s*) corrélant avec quatre carbones à  $\delta_C$  104.6, 103.6, 102.6, 108.0, indiquant la présence de quatre sucres. L'hydrolyse acide et l'analyse par GC combinées à l'interprétation des spectres COSY, TOCSY, NOESY et HSQC permettent l'identification d'un acide  $\beta$ -D-glucuronopyranosyle (GlcA), un  $\beta$ -D-glucoopyranosyle (Glc), un  $\alpha$ -L-arabinopyranosyle (Ara), et un  $\alpha$ -L-arabinofuranosyle (Araf).

**Détermination de la fixation des sucres sur l'aglycone et leur enchaînement.** Le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  de **PV1** révèle le déblindage d'un carbone à  $\delta_C$  90.0 (C-3) dû à une liaison osidique. La fixation de l'acide glucuronique sur l'aglycone est mise en évidence par la corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  4.75 / 3.06 (GlcA H-1 / Agly H-3). L'enchaînement des sucres est déterminé par les corrélations HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  5.63 / 78.9 (Glc H-1 / GlcA C-2), 5.59 / 79.6 (Ara H-1 / GlcA C-3), et 6.11 / 75.3 (Araf H-1 / GlcA C-4). La séquence ainsi caractérisée à [Glc-(1 $\rightarrow$ 2)]-[Ara-(1 $\rightarrow$ 3)]-[Araf-(1 $\rightarrow$ 4)]-GlcA, est donc liée à l'aglycone en position C-3.

**Conclusion.** Au vu des résultats d'analyse détaillée de tous les spectres, le composé **PV1** est élucidé au 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucoopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyle-21-*O*-(2-acétoxy-2-méthylbutanoyle)-R1-barrigénol, nouveau composé naturel.

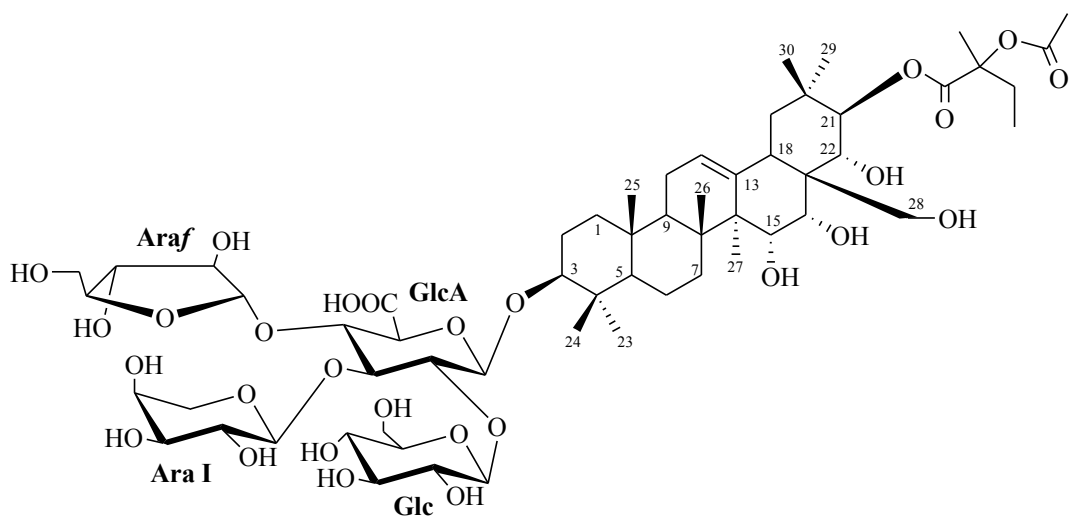


Figure 2.17 – Structure du nouveau composé naturel **PV1**.



Tableau 2.6 – Valeurs des déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) et <sup>13</sup>C (150 MHz) de la génine, des sucres et d'acide organique du composé **PV1** dans la pyridine *d*<sub>5</sub>.

Génine			Sucres et acide organique		
Pos.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	Pos.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1	38.6	0.65, 1.22	3- <i>O</i> -GlcA		
2	26.0	1.76, 2.04	1	104.6	4.75 ( <i>d</i> , 6.7)
3	90.0	3.06 ( <i>d</i> , 8.1)	2	78.9	4.58 ( <i>t</i> , 8.2)
4	39.1	-	3	79.6	4.49
5	55.1	0.64 ( <i>d</i> , 11.4)	4	75.3	4.62
6	18.4	1.40 ( <i>d</i> , 11.4), <sup>a</sup>	5	78.6	4.45
7	36.5	1.94, 2.03	6	174.1	-
8	41.1	-	Glc-(1→2)-GlcA		
9	46.8	1.58 ( <i>d</i> , 7.4)	1	102.6	5.63 ( <i>d</i> , 7.6)
10	36.5	-	2	75.8	3.98
11	23.6	1.74, 1.82	3	77.8	4.25 ( <i>t</i> , 8.3)
12	124.8	5.47 ( <i>br s</i> )	4	71.9	3.94
13	143.7	-	5	78.2	3.92
14	48.1	-	6	62.7	4.13, 4.47
15	67.3	4.19	Ara-(1→3)-GlcA		
16	72.0	4.61	1	103.6	5.59 ( <i>d</i> , 6.9)
17	44.8	-	2	72.5	4.38 ( <i>t</i> , 7.9)
18	41.1	2.84 ( <i>d</i> , 15.0)	3	73.8	4.10
19	47.5	1.3 ( <i>d</i> , 9.8), 2.95 ( <i>t</i> , 13.2)	4	69.2	4.11
20	35.9	-	5	66.4	3.63, 4.20
21	82.5	6.26 ( <i>d</i> , 10.0)	Araf-(1→4)-GlcA		
22	72.1	4.60	1	108.0	6.11( <i>s</i> )
23	27.4	1.01 ( <i>s</i> )	2	81.3	4.80 ( <i>br s</i> )
24	16.4	0.95 ( <i>s</i> )	3	78.5	4.47
25	15.4	0.72 ( <i>s</i> )	4	86.5	4.99 ( <i>d</i> , 3.1)
26	17.2	0.93 ( <i>s</i> )	5	62.3	3.93, 3.99
27	21.0	1.74 ( <i>s</i> )	Ac Mbut en C-21		
28	64.5	3.65, 3.91	1	172.5	-
29	29.4	1.16 ( <i>s</i> )	2	81.8	-
30	19.8	1.23 ( <i>s</i> )	3	31.3	1.99, 2.16 ( <i>m</i> )
			4	7.5	0.98 ( <i>s</i> )
			5	21.2	1.70 ( <i>s</i> )
			6	170.4	-
			7	20.9	2.00 ( <i>s</i> )

<sup>a</sup> déplacement chimique non attribué.

### 2.2.2.2. Description du composé **PV2**.

#### *Spectrométrie de masse.*

Le spectre de masse HR-ESI-MS de **PV2** en mode positif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1315.7056  $[M + Na]^+$  (calc. 1315.5935), en accord avec la formule moléculaire  $C_{61}H_{96}O_{29}Na$ . Le spectre de masse (FAB-MS en mode négatif) montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1291  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1292. Un autre pic d'ion-fragment est observé à  $m/z$  1159  $[(M - H) - 132]^-$ , suggérant l'élimination d'un groupement pentosyle.

#### *Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** Les déplacements chimiques de **PV2** attribués à l'aide des spectres RMN- $^1H$  et  $^{13}C$  sont quasi-similaires à ceux du composé **PV1**, à l'exception de la position C-28 de l'aglycone. Les signaux des protons déblindés de l'alcool primaire à  $\delta_H$  4.18 et 4.26 (au lieu de  $\delta_H$  3.65, 3.91 pour **PV1**) HSQC-corrélés avec un signal à  $\delta_C$  65.4 et la présence de signaux de RMN- $^{13}C$  caractéristiques d'un groupe acétyle à  $\delta_C$  170.6 et 20.3, suggèrent une acétylation en C-28 [Kartal et al., 2006] qui est confirmée par la corrélation HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  4.36 / 65.4 (H-22 / C-28). Ainsi, ce R1-barrigénol diacétylé est le 21-(2-acétoxy-2-méthylbutanoyle)-28-acétyl-R1-barrigénol, décrit ici pour la première fois.

**Détermination de la nature et de la séquence des sucres.** L'analyse exhaustive des spectres RMN-1D et 2D de la partie oligosaccharidique de **PV2** a conduit à l'identification du même tétrasaccharide lié en position C-3 de l'aglycone que dans le composé **PV1**.

**Conclusion.** Au vu de ces résultats, le composé **PV2** est élucidé au 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyle-21-*O*-(2-acétoxy-2-méthylbutanoyle)-28-*O*-acétyl-R1-barrigénol, nouveau composé naturel.

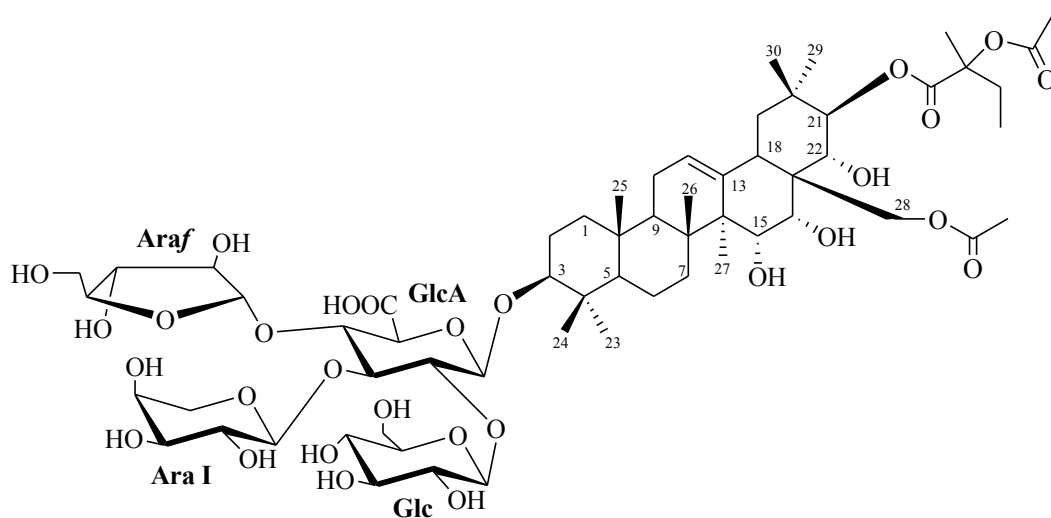


Figure 2.18 – Structure du nouveau composé naturel **PV2**.



### 2.2.2.3. Description du composé **PV3**.

#### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **PV3** montre dans le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1295.7063  $[M + Na]^+$  (calc. 1295.6037), suggérant la formule moléculaire  $C_{62}H_{96}O_{27}Na$ . Le spectre de masse FAB-MS en mode négatif donne un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1271  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1272. Des pics d'ions-fragments sont observés à  $m/z$  1139  $[(M - H) - 132]^-$ , 1007  $[(M - H) - 132 - 132]^-$  et 845  $[(M - H) - 132 - 132 - 162]^-$ , suggérant l'élimination de trois sucres, deux pentosyles et un hexosyle.

#### *Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** Les signaux de l'aglycone attribués à l'aide des spectres RMN- $^1H$  et  $^{13}C$  du composé **PV3** sont, comme pour le composé **PV2**, pratiquement superposables à ceux de **PV1**, à l'exception de ceux qui sont présentés ci-dessous.

Le spectre COSY montre deux groupes de méthyles vinyliques à  $\delta_H$  1.94 et 2.02 donnant une corrélation avec un méthine d'éthylène à  $\delta_H$  5.94, caractéristique de la présence d'un résidu angéloyle [Murakami et al., 2000 ; Zhang et Li, 2007]. Ceci est confirmé à l'aide des corrélations HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  1.94 / 168.0, 128.2 et 137.0. La corrélation HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  6.20 / 168.0 (H-22 / C-1''') permet également de déterminer la fixation du résidu en position C-22 de l'aglycone. Deux groupes de méthyles vinyliques à  $\delta_H$  1.50 (3H, s) et 2.06 (3H) corrélant dans le spectre HMBC avec un carbone quaternaire à  $\delta_C$  156.0 et un carbone de méthine éthylène à  $\delta_C$  116.0, révèlent la présence d'un acide  $\beta,\beta$ -diméthylacrylique [Dimbi et al., 1983 ; Voutquenne et al., 1998]. La corrélation HMBC à  $\delta_H$  6.56 (H-21) / 167,5 permet de déterminer la fixation de l'acide en C-21.

Par conséquent, l'aglycone diacylé de **PV3** est caractérisé pour la première fois au 21- $\beta,\beta$ -diméthylacryloyl-22-angéloyl-R1-barrigénol.

**Détermination de la nature et de la séquence des sucres.** L'analyse exhaustive des spectres RMN-2D et l'analyse des sucres par GC de **PV3** ont permis d'identifier la même unité tétrasaccharidique en C-3 que dans composés **PV1** et **PV2**.

**Conclusion.** Au vu des résultats précédents, le composé **PV3** est élucidé au 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyle-21-*O*- $\beta,\beta$ -diméthylacryloyl-22-*O*-angéloyl-R1-barrigénol, nouveau composé naturel. Cependant, le pittoviridoside analogue structural de **PV3** a été auparavant isolé de *Pittosporum viridiflorum*. La seule différence entre ces deux molécules réside sur l'interversion des groupements acides en position 21 et 22 de l'aglycone [Seo et al., 2002].

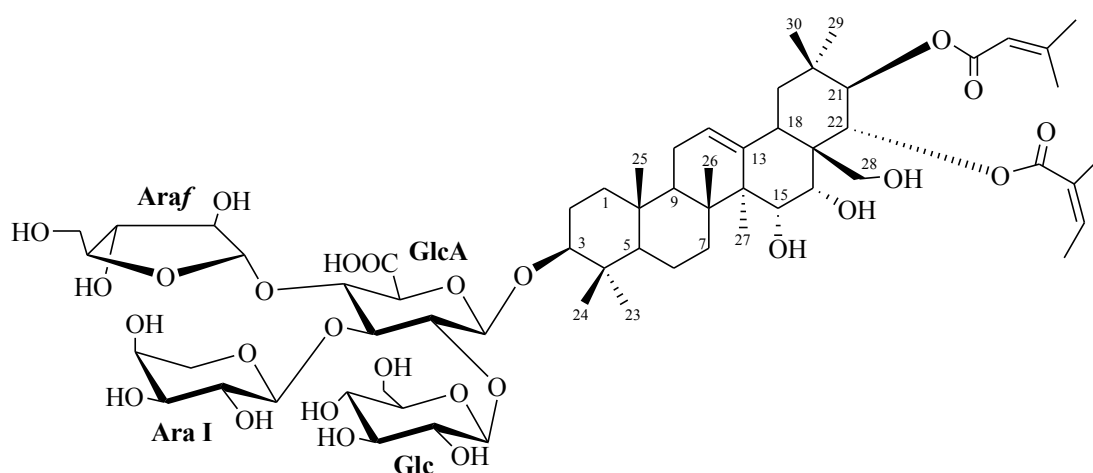


Figure 2.19 – Structure du nouveau composé naturel **PV3**.



2.2.2.4. Description du composé **PV4**.*Spectrométrie de masse.*

Le composé **PV4** montre dans le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1305.5731  $[M + Na]^+$  (calc. 1305.5728), suggérant la formule moléculaire  $C_{59}H_{94}O_{30}Na$ . Le spectre de masse FAB-MS en mode négatif montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1281  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1282.

*Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** L'analyse des spectres HSQC de **PV4** montre des signaux caractéristiques d'un aglycone de type R1-barrigénol, comme dans les composés **PV1**, **PV2** et **PV3**, et ceux d'un groupement acétyle. L'observation d'une corrélation HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  6.26 / 172.0 (H-21 / C-1') permet de localiser le groupement acétyle en position 21 de l'aglycone. L'interprétation exhaustive des spectres RMN-1D et -2D permet de déterminer que l'aglycone de **PV4** est le R1-barrigénol acétylé en C-21.

**Détermination de la nature des sucres.** L'analyse du spectre RMN- $^1H$  de **PV4** montre la présence de cinq protons anomériques à  $\delta_H$  4.74 (1H, *br d*), 4.89 (1H, *d*,  $J = 7.2$  Hz), 5.57 (1H, *d*,  $J = 6.9$  Hz), 5.64 (1H, *d*,  $J = 7.39$  Hz), 6.06 (1H, *s*), corrélant respectivement dans le spectre HSQC avec les signaux de carbones à  $\delta_C$  104.7, 106.1, 103.6, 102.6 et 107.6, indiquant la présence de cinq sucres. L'analyse des spectres RMN-2D et l'analyse des sucres par GC ont permis d'identifier un acide  $\beta$ -D-glucuronopyranosyle (GlcA), un  $\beta$ -D-glucopyranosyle (Glc), deux  $\alpha$ -L-arabinopyranosyle (Ara I et II), et un  $\alpha$ -L-arabinofuranosyle (Araf).

**Détermination de la fixation des sucres sur l'aglycone et leur enchaînement.**

L'ensemble des données RMN- $^{13}C$  de l'aglycone de **PV4** montre deux signaux déblindés à  $\delta_C$  89.8 (C-3) et 80.4 (C-22) suggérant une saponine bidesmosidique. La fixation en C-3 est mise en évidence par corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  3.11 / 4.74 (Agly H-3 / GlcA H-1), et la fixation en C-22 par corrélation HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  4.83 / 106.1 (Agly H-22 / Ara II C-1). La séquence du 3-O-tétrasaccharide pour le composé



**PV4** est exactement identique à l'enchaînement des sucres des composés **PV1**, **PV2** et **PV3**, suite à la comparaison des données d'analyse des spectres RMN-2D (HMBC et NOESY).

**Conclusion.** Au vu des résultats précédents, le composé **PV4** est identifié au 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyle-22-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle-21-*O*-acétoxy-R1-barrigénol (seneciapittoside B) précédemment isolé de *Pittosporum senecia* Putterlick [Linnek et al., 2012].

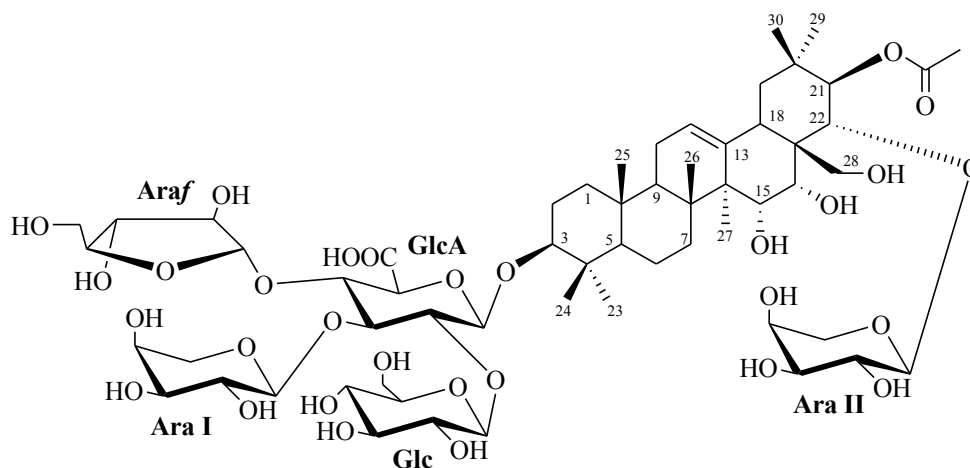


Figure 2.20 – Structure du composé **PV4**.



2.2.2.5. Les spectres des composés isolés.

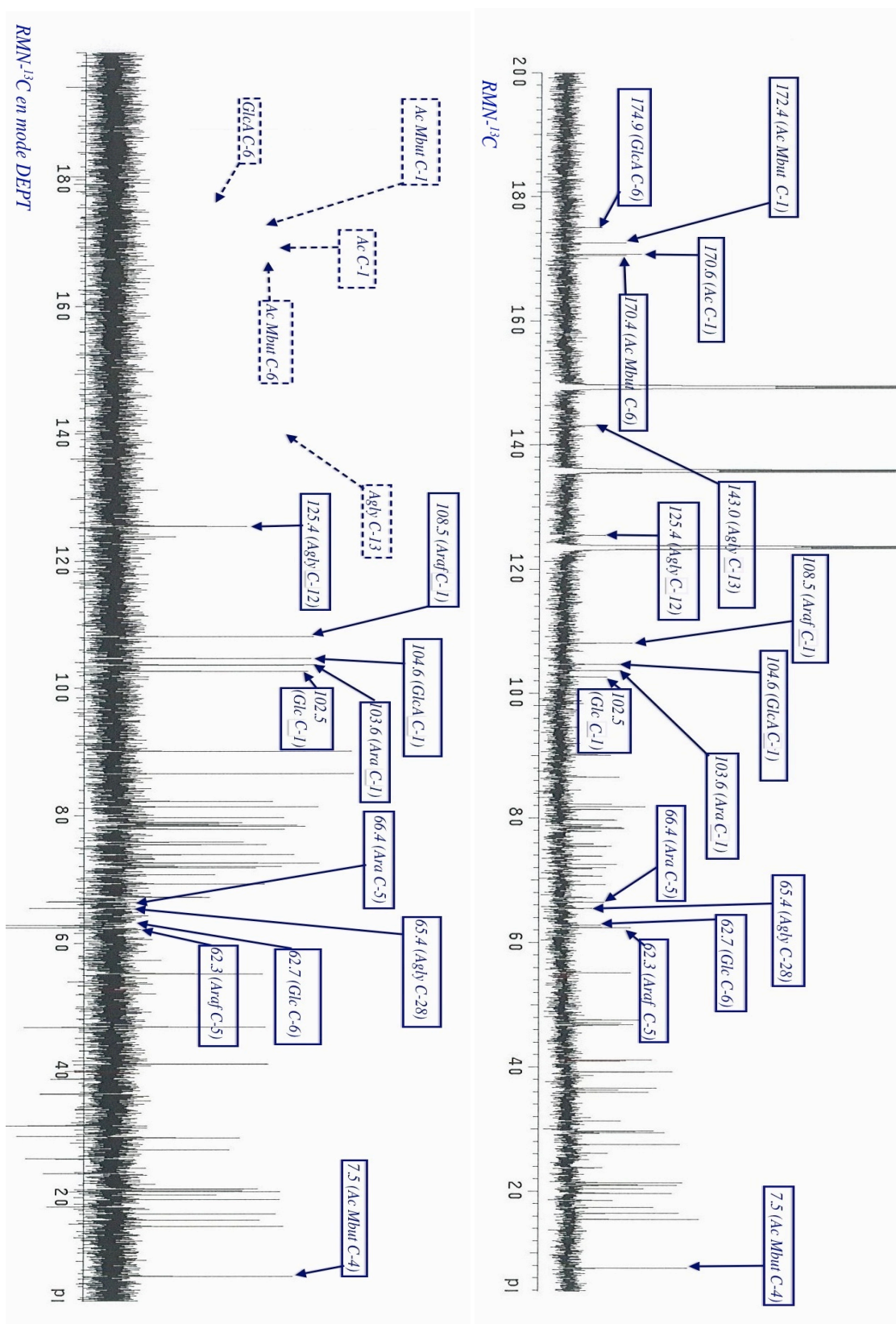


Figure 2.21 – Comparaison du spectre RMN- $^{13}\text{C}$  avec le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  en mode DEPT du composé PV2.

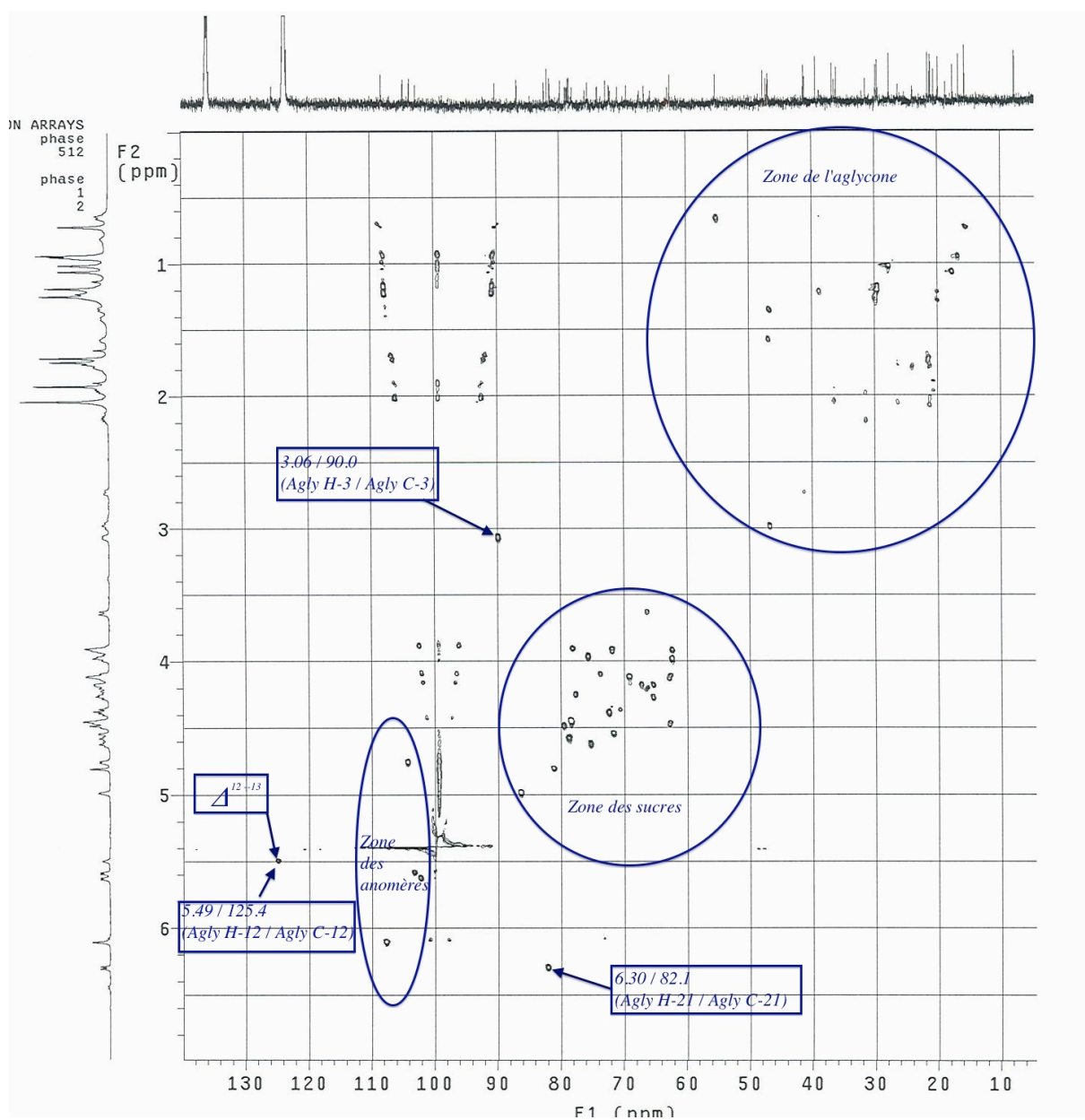


Figure 2.22 – Les corrélations HSQC du composé **PV2**.

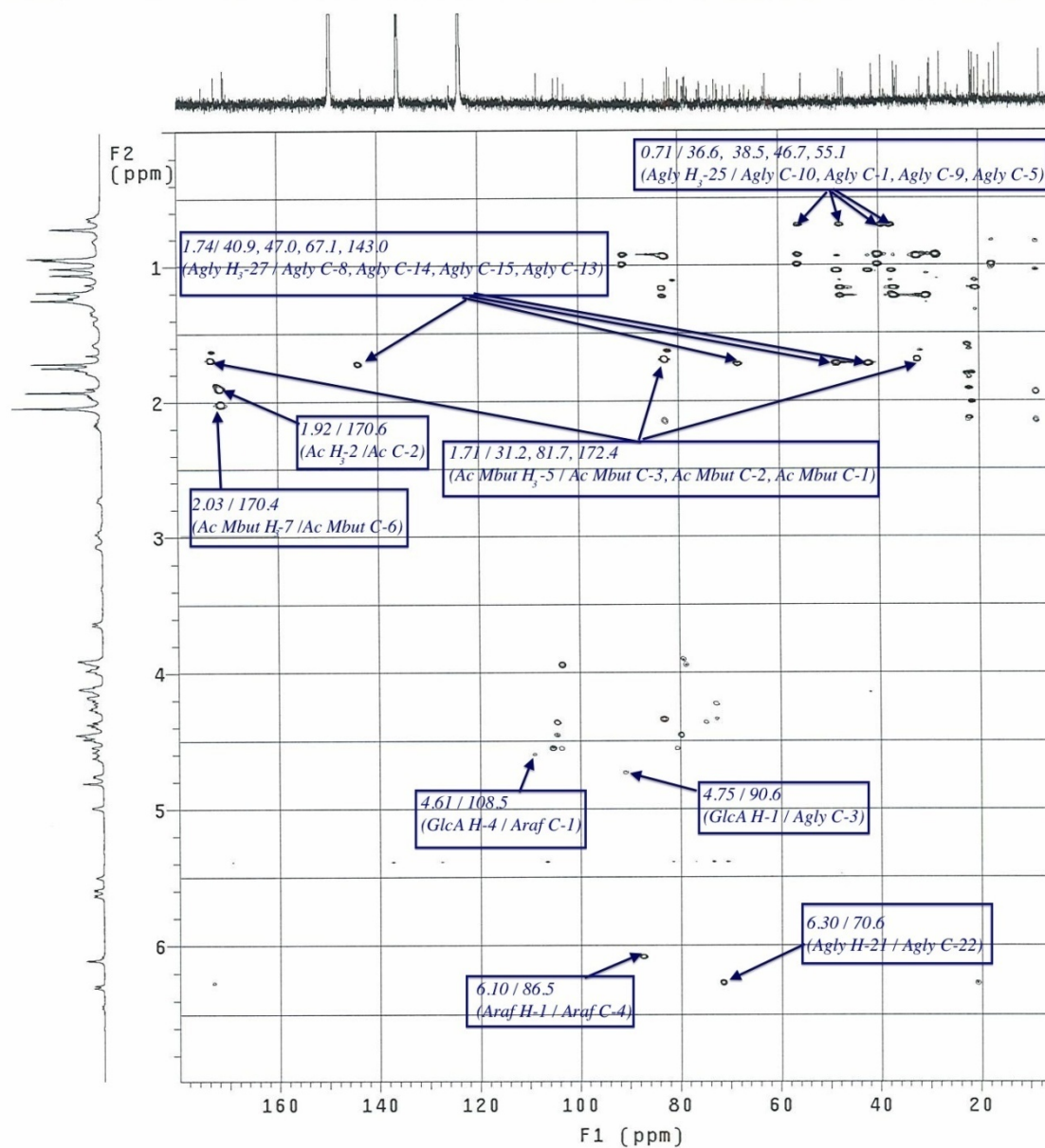


Figure 2.23 – Les corrélations HMBC du composé **PV2** montrant les différentes taches de corrélations HMBC de 2-acétoxy-2-méthylbutanoyle (Ac Mbut), des méthyles de l'aglycone, de l'enchaînement des sucres et la liaison des sucres à l'aglycone.



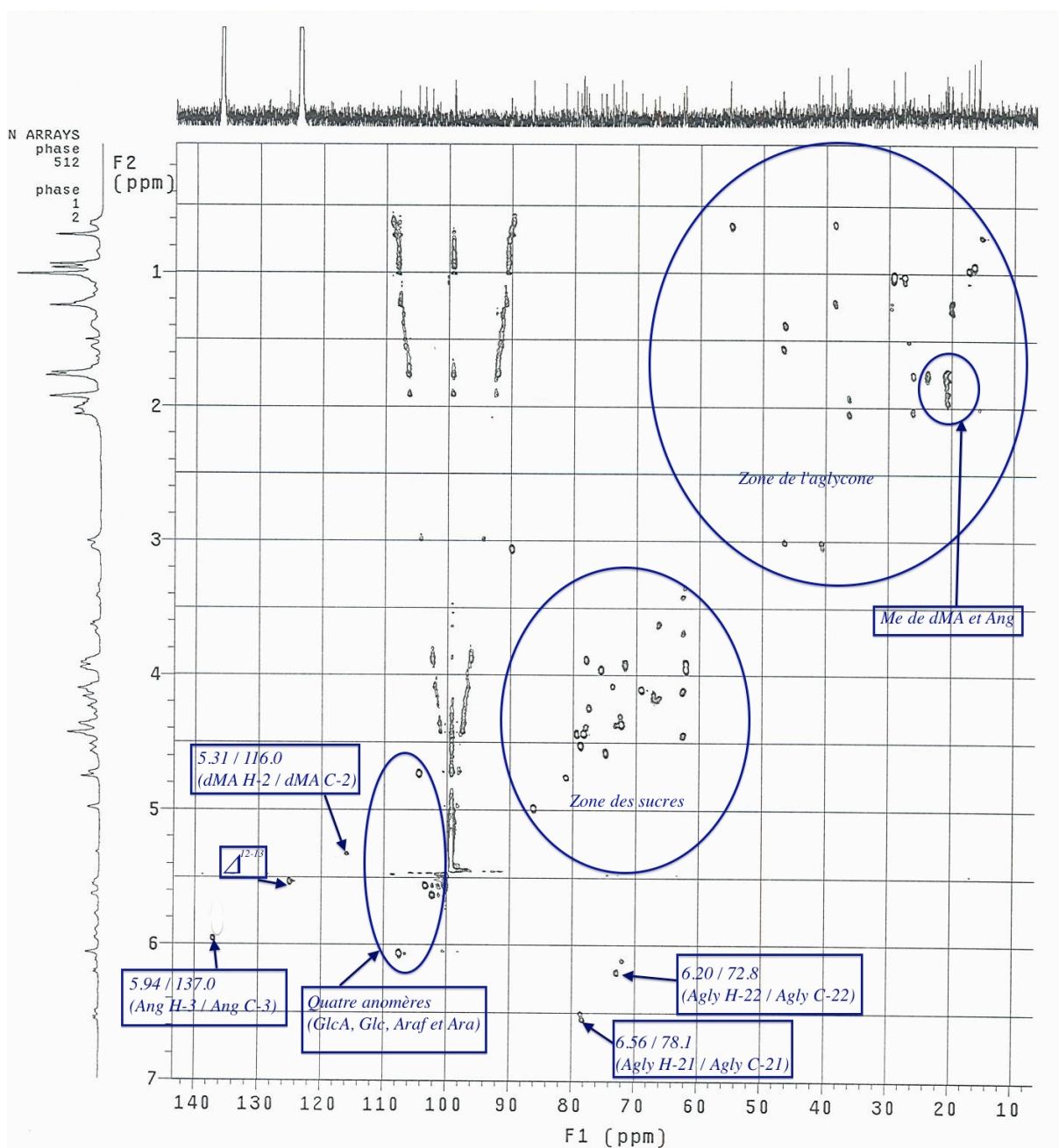


Figure 2.24 – Les corrélations HSQC du composé **PV3** montrant les différences avec **PV4**.

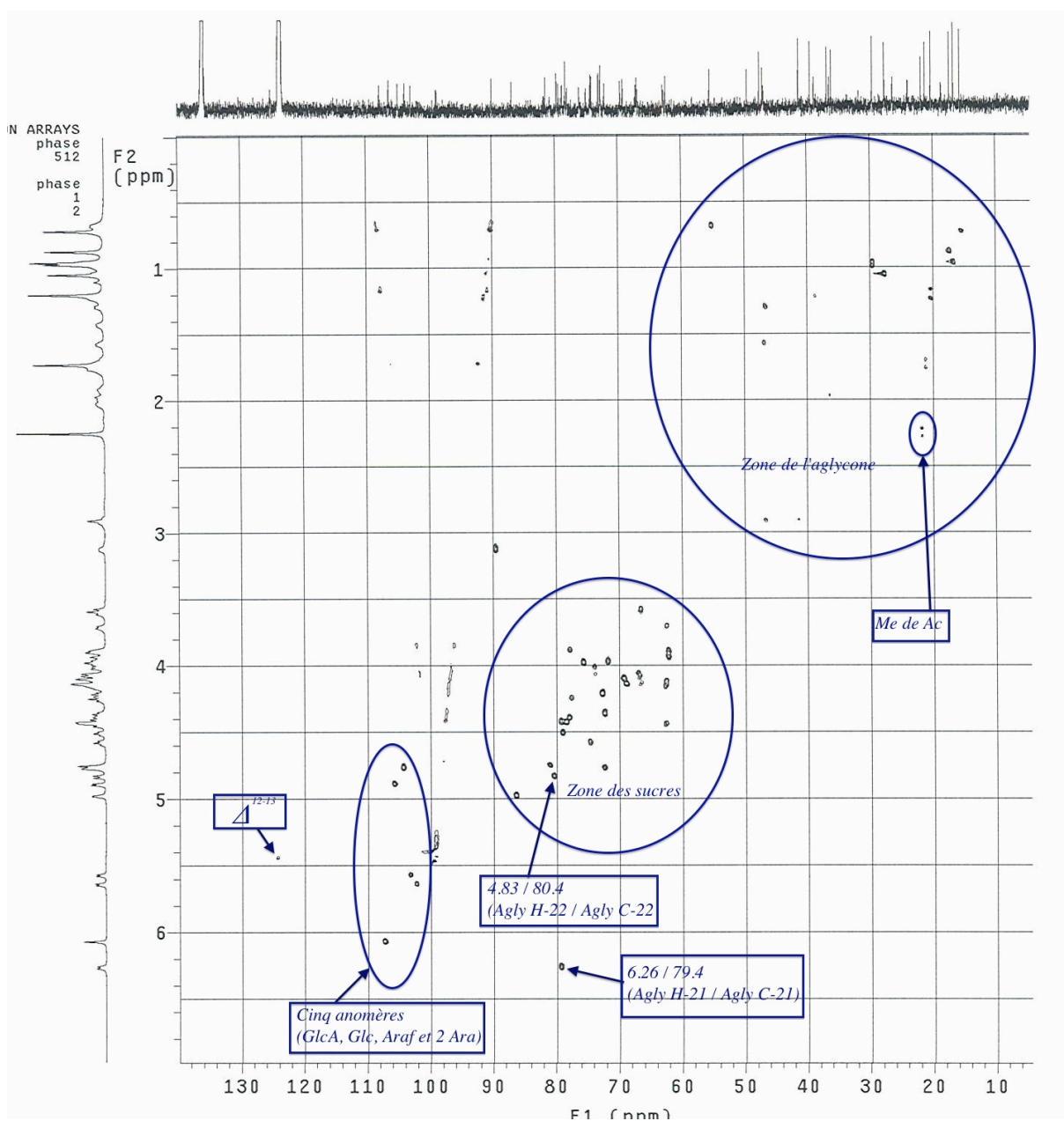


Figure 2.25 – Les corrélations HSQC du composé **PV4** montrant la différence avec **PV3**.

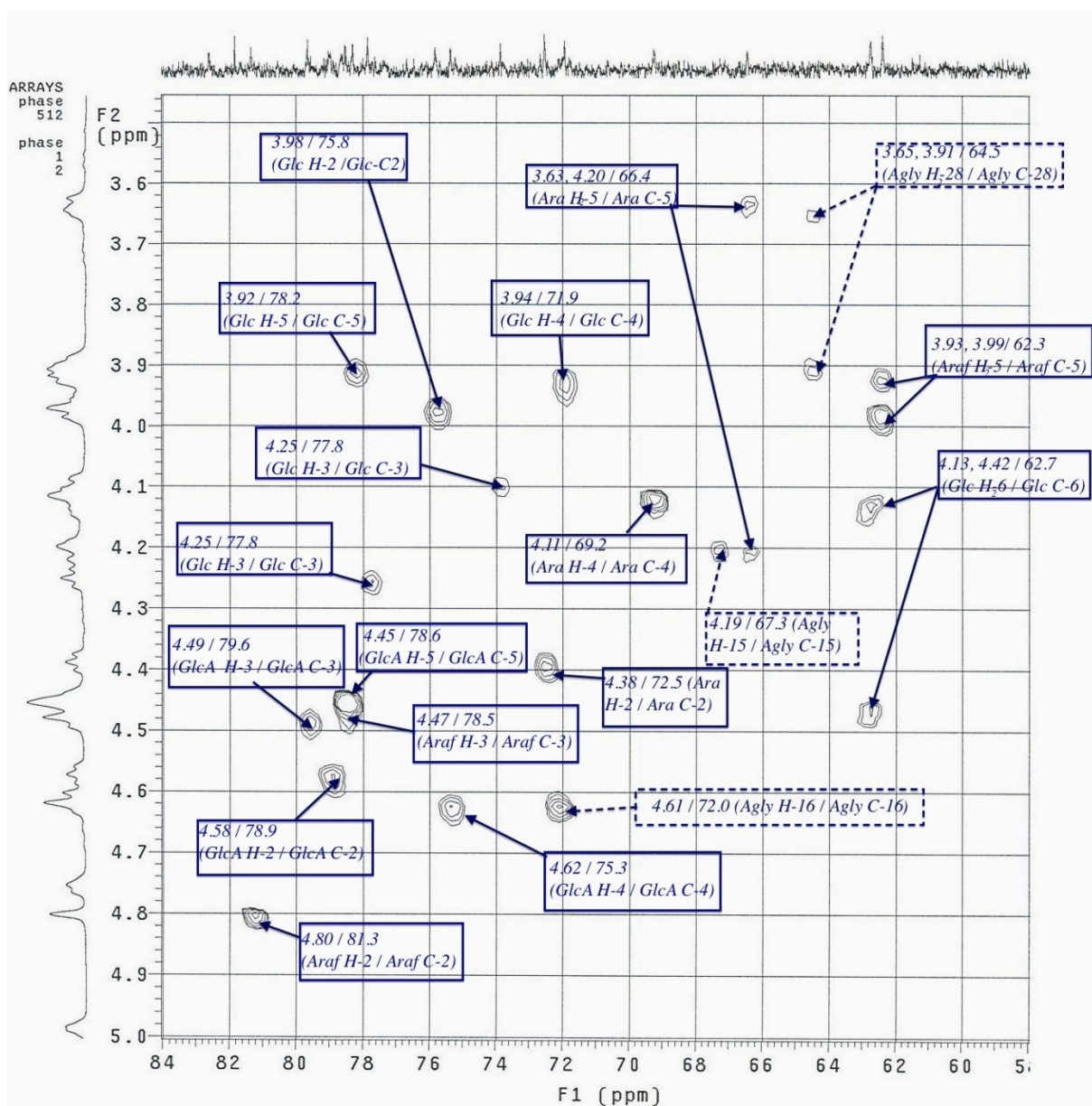
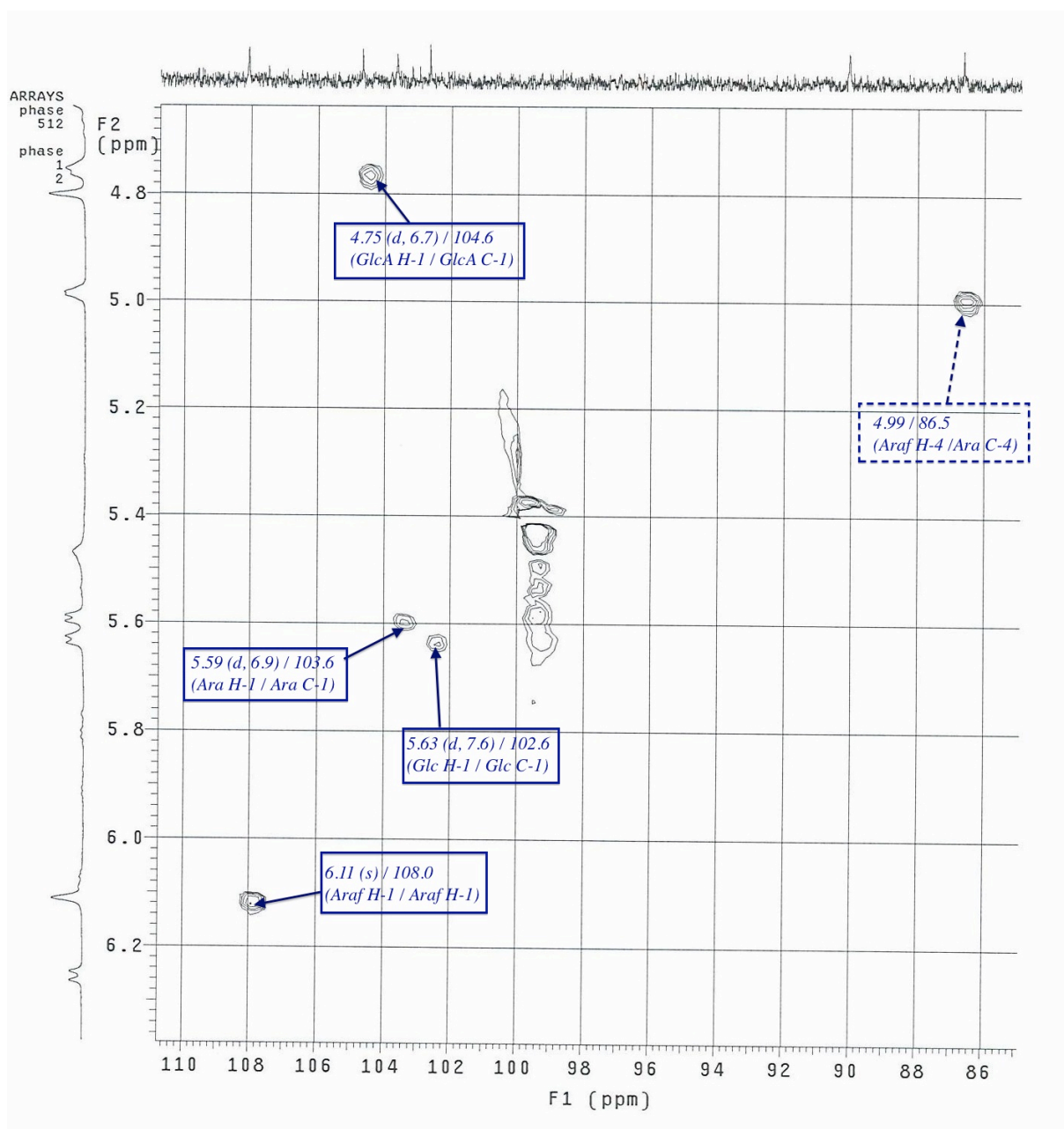


Figure 2.26 – Les corrélations HSQC des sucres du composé PV1.



Figure 2.27 – Les corrélations HSQC des anomères du composé **PV1**.

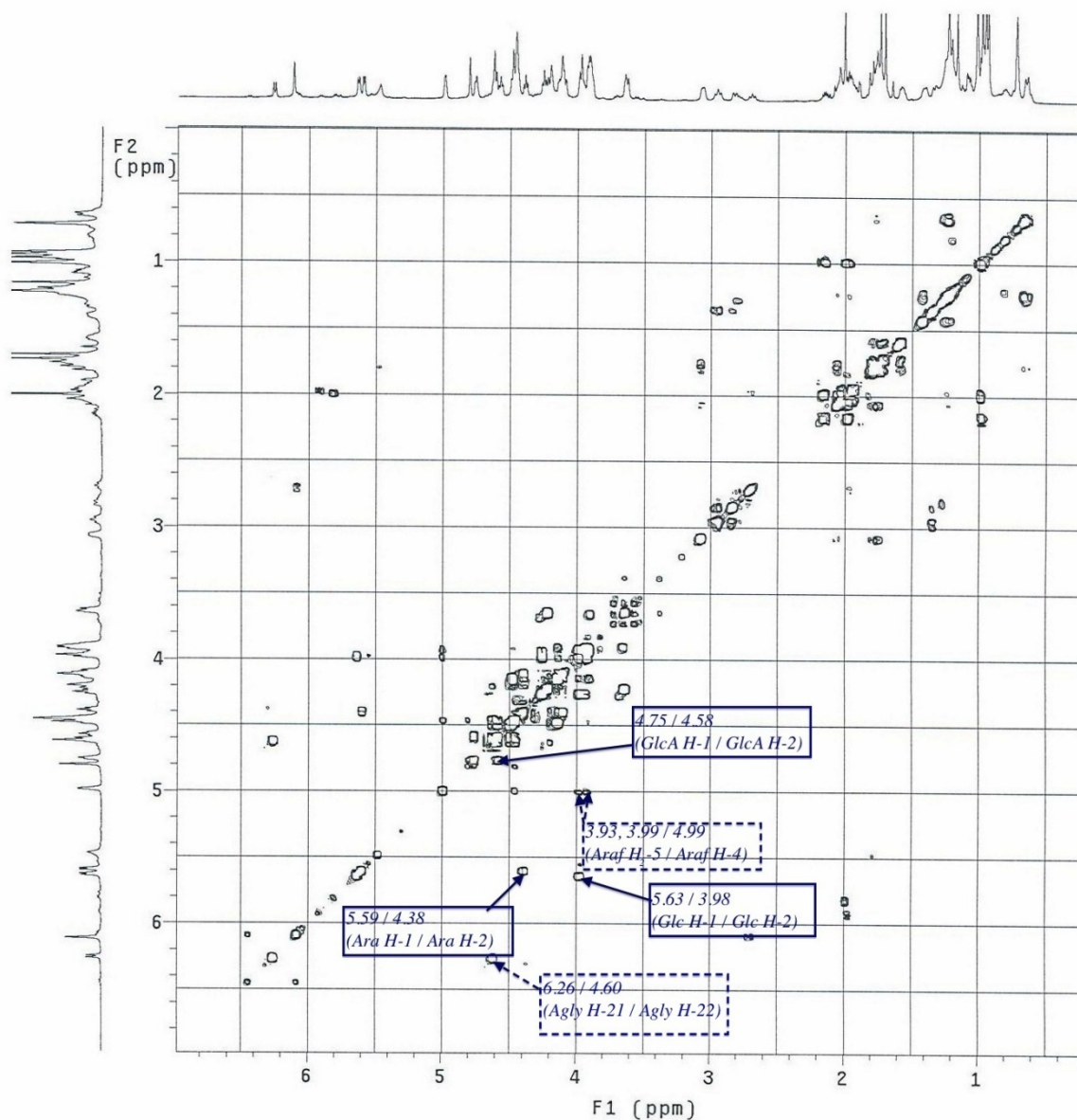


Figure 2.28 – Les corrélations COSY des sucres du composé **PV1** indiquant les protons voisins des protons anomériques.

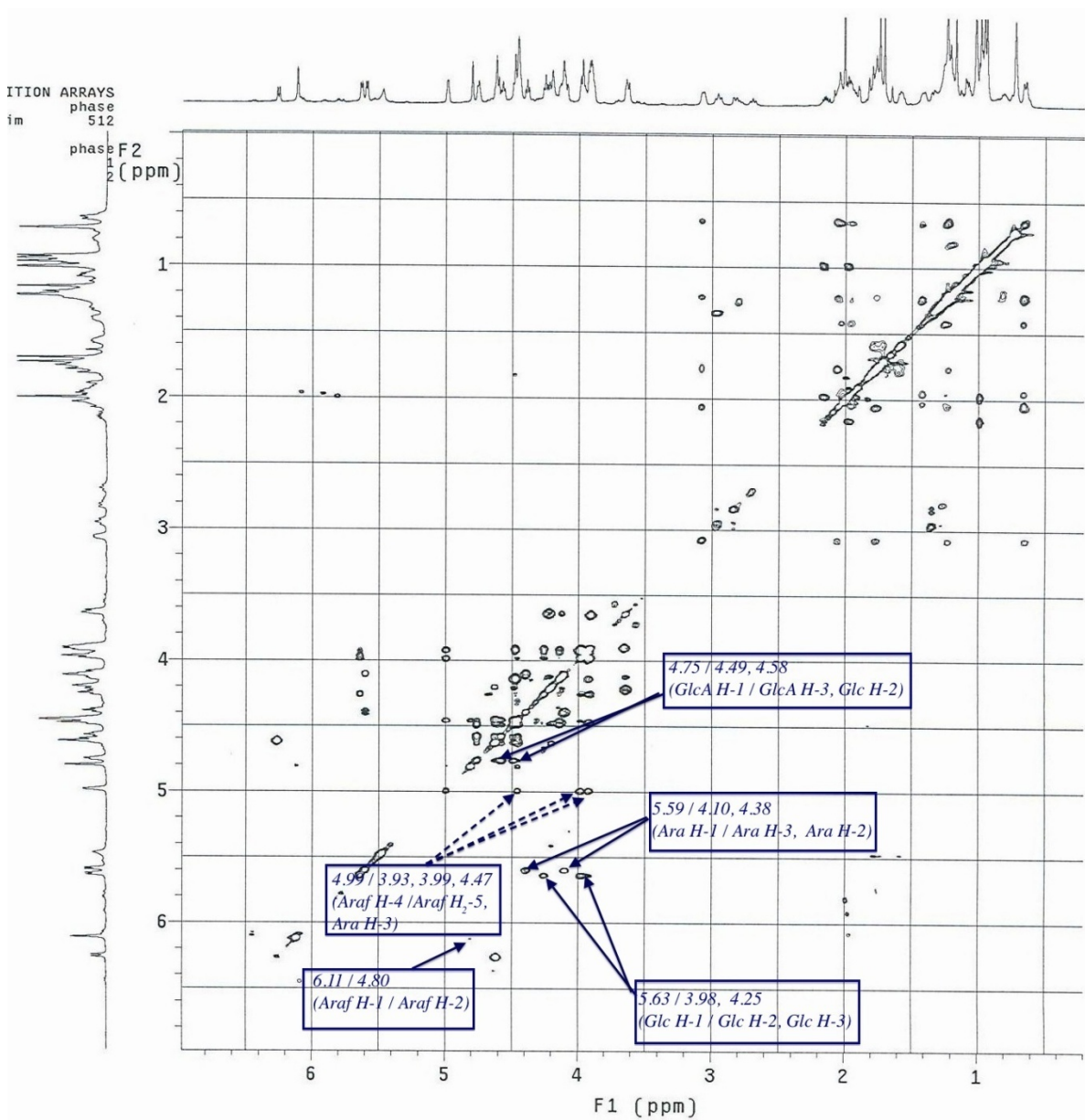


Figure 2.29 – Les corrélations TOCSY des sucres du composé **PV1**.

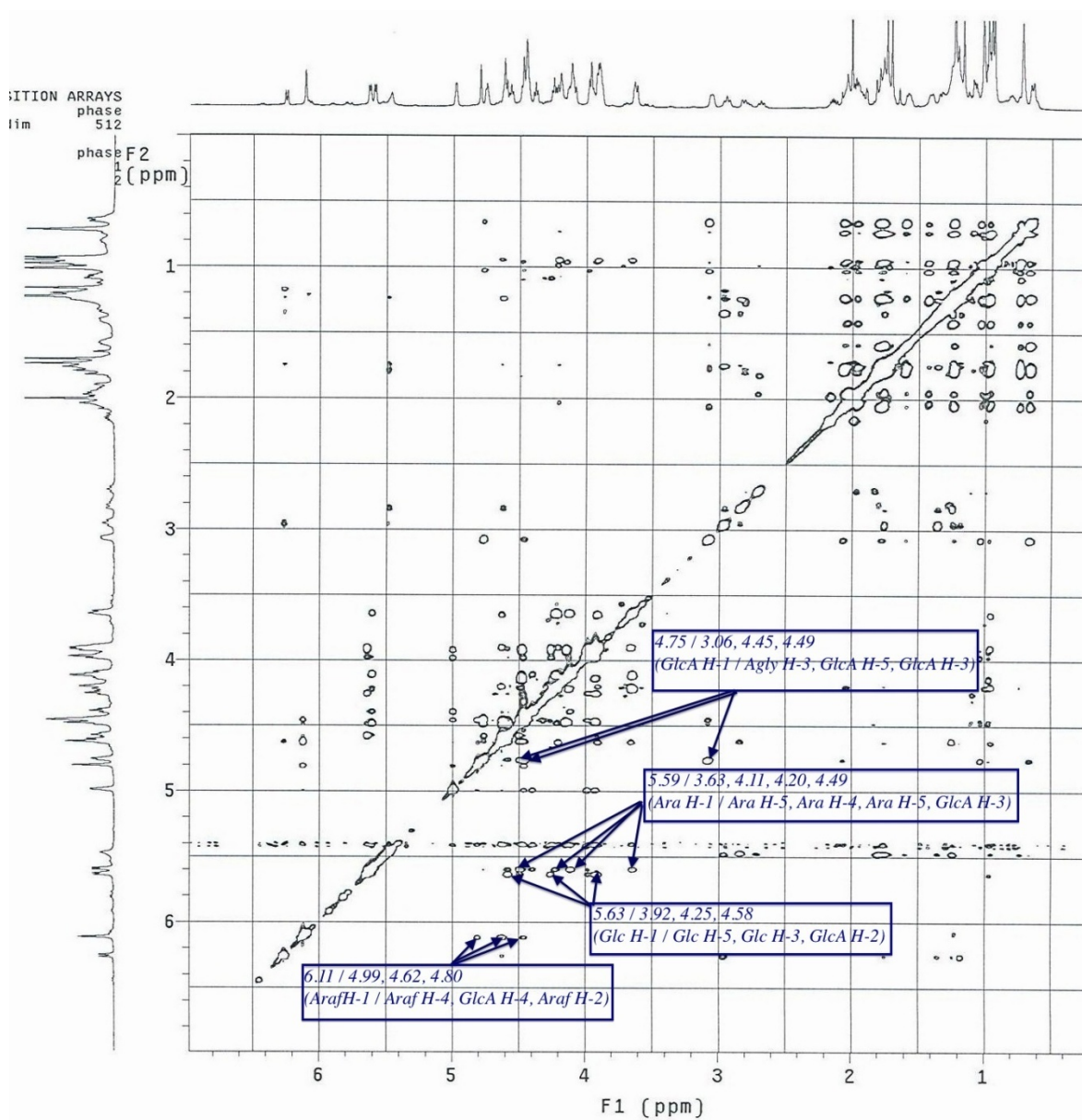


Figure 2.30 – Les corrélations NOESY des sucres du composé **PV1** indiquant l'enchaînement des sucres et la liaison à l'aglycones.

## 2.3. *Solanum incanum* L.

### 2.3.1. Extraction et isolement.

Les racines séchées à l'air libre de *S. incanum* (200 g) ont été broyées et puis soumises à trois extractions à reflux avec le solvant MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3, 2 L) pendant 1 h. Après évaporation du solvant sous vide un extrait brut de 24 g a été obtenu (voir Fig. A.4, page 157) Un aliquot de 6 g de ce dernier a ensuite été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice RP-18 éluée par les gradients de solvant H<sub>2</sub>O-MeOH (chaque éluant 100 ml). Les trois fractions suivantes ont été obtenues, F<sub>1</sub> (H<sub>2</sub>O), F<sub>2</sub> (MeOH:H<sub>2</sub>O) et F<sub>3</sub> (MeOH). La fraction F<sub>3</sub> (900 mg) a été purifiée par chromatographie sur colonne ouverte (CC) (Sephadex<sup>®</sup> LH-20, MeOH), et a conduit à quatre sous-fractions F<sub>31</sub>-F<sub>34</sub>. Des chromatographies liquides à moyenne pression (MPLC) successives [gel de silice 60, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30:5 et 60:32:7)] réalisées sur F<sub>31</sub> et F<sub>34</sub> ont conduit à l'isolement de **SI3** (10 mg) et **SI5** (4 mg), respectivement. F<sub>32</sub> (550 mg) soumise à une MPLC [système A: gel de silice, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20:2, 70:30:5, 60:32:7)] a conduit à 10 sous-fractions (F<sub>321</sub>-F<sub>3210</sub>), F<sub>324</sub> (6.8 mg) étant le composé **SI2**. Les sous fractions F<sub>326</sub> (23.1 mg) et F<sub>327</sub> (94 mg) ont été à nouveau purifiées par MPLC [système B: gel de silice RP-18, gradient H<sub>2</sub>O-MeOH] fournissant respectivement les composés **SI1** (3.5 mg) et **SI4** (27 mg) (voir Fig. B.4 et B.5, page 162–163).

### 2.3.2. Elucidation structurale.

#### 2.3.2.1. Description du composé **SI1**.

##### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **SI1** montre dans le spectre de masse HR-ES-IMS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1039.509 [M + Na]<sup>+</sup> (calc. 1039.5089), suggérant une formule moléculaire C<sub>50</sub>H<sub>80</sub>O<sub>21</sub>Na. Le spectre de masse FAB-MS en mode ion négatif montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1015 [M – H]<sup>–</sup>, indiquant une masse moléculaire de 1016. D'autres pics d'ions-fragments sont observés à  $m/z$  883 [(M – H) – 132]<sup>–</sup> et 737 [(M – H) – 132 – 146]<sup>–</sup>, suggérant l'élimination respective de deux sucres, un pentosyle et un 6-desoxyhexosyle.



**Spectroscopie RMN.**

**Détermination de l'aglycone.** Les spectres de RMN-<sup>1</sup>H et -<sup>13</sup>C en combinaison avec les expériences DEPT, HSQC, et HMBC du composé **SI1** montrent quatre méthyles à  $\delta_H$  0.94 (3H, *s*), 0.91 (3H, *s*), 1.14 (3H, *d*,  $J = 6.9$  Hz) et 0.65 (3H, *d*,  $J = 5.2$  Hz), une fonction alcool secondaire à  $\delta_H$  3.82 (H, *m*, H-3), une résonance caractéristique de carbone quaternaire à  $\delta_C$  111.4 (C-22), et deux signaux de carbone oléfinique à  $\delta_C$  140.5 (C-5) et 121.5 (C-6), indiquant la présence d'un squelette stéroïde spirost-5-èn-3-ol. La stéréochimie du fonction alcool en position C-3 est déterminé par la corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  3.82 / 0.91 (H-3 / H-19), indiquant l'orientation en  $\alpha$  de H-3 et donc l'orientation en  $\beta$  de l'hydroxyle en C-3. La position équatoriale du méthyle 27 (configuration *R* en C-25) est déduite par les résonances des protons et des carbones à  $\delta_H / \delta_C$  1.74 / 31.3 (H-25 / C-25), 3.41, 3.50 / 65.6 (H<sub>2</sub>-26 / C-26), 0.65 / 16.5 (H<sub>3</sub>-27 / C-27), et par la corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  1.74 / 3.50 (H-25 / H-26a), et 3.41 / 0.65 (H-26b / H<sub>3</sub>-27), ceci est confirmé en comparaison avec les données de la littérature [Yang et al., 2006]. De plus, la corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  1.74 / 3.80 (H-25 / H-23), et la tache de corrélation déblindé en HSQC à  $\delta_H / \delta_C$  3.80 / 66.9, indiquent la présence d'un groupement hydroxyle en C-23 orienté en position équatoriale (configuration *S* en C-23).

A partir de ces résultats, l'aglycone de **SI1** est identifié au (23*S*, 25*R*)-spirost-5-èn-3 $\beta$ ,23-diol (isoplexigenin B) [Yang et al., 2006; Matsushita et al., 2007].

**Détermination de la nature des sucres.** Le spectre RMN-<sup>1</sup>H de **SI1** montre les signaux de quatre protons anomériques à  $\delta_H$  4.85 (1H, *d*,  $J = 6.0$  Hz), 5.05 (1H, *d*,  $J = 7.6$  Hz), 5.81 (1H, *s*) et 6.19 (1H, *s*), qui corrélient respectivement dans le spectre HSQC avec quatre signaux de carbone à  $\delta_C$  99.8, 106.9, 101.1 et 101.7, indiquant la présence de quatre unités de sucres. L'attribution de tous les signaux de sucres à l'aide des expériences de RMN-1 et -2D nous a permis d'identifier deux  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyles (Rha-I et Rha-II), un  $\beta$ -D-glucopyranosyle (Glc), et un  $\beta$ -D-xylopyranosyle (Xyl).

**Détermination de la fixation des sucres sur l'aglycone et leur enchaînement.** Sur le spectre HSQC de **SI1**, la tache de corrélation à  $\delta_H / \delta_C$  3.82 / 77.9 (H-3 / C-3)

indique une glycosylation de l'aglycone. La corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  3.82 / 4.85 (Agly H-3 / Glc H-1) confirme la fixation du glucose en C-3 de l'aglycone.

L'enchaînement des sucres est déterminé par des corrélations HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  6.19 / 77.9 (Rha I H-1 / Glc C-2), 5.81 / 77.9 (Rha II H-1 / Glc C-4), 5.05 / 81.3 (Xyl H-1 / Rha II C-2). Cette séquence confirmée par les corrélations NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  6.19 / 4.08 (Rha I H-1 / Glc H-2), 5.81 / 4.21 (Rha II H-1 / Glc H-4), et 5.05 / 4.50 (Xyl H-1 / Rha II H-2), est caractérisée à Xyl-(1→2)-Rha II-(1→4)-[Rha I-(1→2)]-Glc fixée en C-3 de l'aglycone.

**Conclusion.** Ainsi, la structure de **SI1** est élucidée au (23*S*,25*R*)-spirost-5-èn-3β,23-diol 3-*O*-{β-D-xylopyranosyle-(1→2)-α-L-rhamnopyranosyle-(1→4)-[α-L-rhamnopyranosyle-(1→2)]-β-D-glucopyranoside}, nouveau composé naturel.

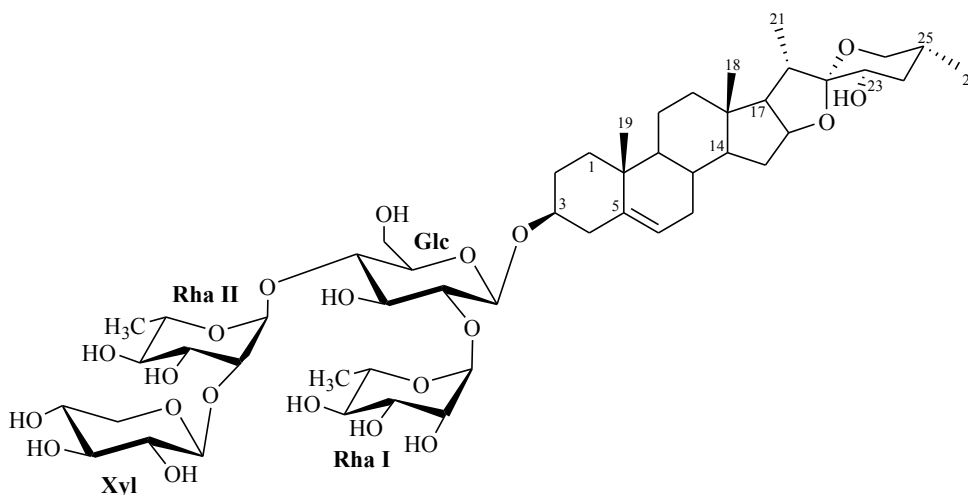


Figure 2.31 – Structure du nouveau composé naturel **SI1**.





### 2.3.2.2. Description du composé **SI2**.

#### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **SI2** montre dans le spectre de masse HR-ES-IMS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  891.4805  $[M + Na]^+$  (calc. 891.4718), suggérant une formule moléculaire  $C_{45}H_{72}O_{16}Na$ . Le spectre de masse (FAB-MS, en mode négatif) montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  867  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 868. Un autre pic d'ion-fragment est observé à  $m/z$  721  $[(M - H) - 146]^-$ , suggérant l'élimination d'un 6-désoxyhexosyle.

#### *Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** L'analyse des spectres RMN-2D de **SI2** montre des signaux quasi-similaires à ceux du composé **SI1**, correspondant à un aglycone de type 25*R*-spirost-5-èn-3β-ol. La différence entre les deux aglycones est la tache de corrélation sur le spectre HSQC, du méthylène en position C-23 à  $\delta_H / \delta_C$  1.60, 1.68 / 31.2 (H<sub>2</sub>-23 / C-23) dans **SI2**, alors que dans le composé **SI1** il s'agissait d'un signal de méthine à  $\delta_H / \delta_C$  3.80 / 66.9 (H-23 / C-23) correspondant à une fonction alcool secondaire. Ainsi, l'aglycone de **SI2** est identifié à la diosgénine [Espejo et al., 1982 ; Agrawal et al., 1985; Puri et al., 1993 ; Yang et al., 2009 ; Liu et al., 2011b].

**Détermination de la nature des sucres.** L'analyse du spectre HSQC de **SI2** montre trois taches de corrélation correspondant aux protons et carbones anomériques à  $\delta_H / \delta_C$  4.82 / 98.0, 6.14 / 101.9, et 5.64 / 102.5, indiquant la présence de trois sucres. L'étude des spectres RMN-2D et l'analyse GC ont permis d'identifier trois sucres, deux α-L-rhamnopyranosyles (Rha I et Rha II), et un β-D-glucopyranosyle (Glc).

**Détermination de la fixation des sucres sur l'aglycone et leur enchaînement.** Sur le spectre HSQC de **SI2** la tache de corrélation à  $\delta_H / \delta_C$  3.81 / 77.7 (H-3 / C-3) suggère une glycosylation de l'aglycone en C-3 qui est confirmée par la corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  3.81 / 4.82 (Agly H-3 / Glc H-1).

La séquence du trisaccharide est déterminée à l'aide des corrélations NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  6.14 / 4.06 (Rha I H-1 / Glc H-2), et HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  5.64 / 78.5 (Rha II H-1 / Glc C-4). En conséquence, le trisaccharide [Rha II-(1→4)]-[Rha I-(1→2)]-Glc

(chacotrioside) est lié en position C-3 de l'aglycone [Kawasaki et al., 1974 ; Ando et al., 1999 ; Ikeda et al., 2001 ; Miyashita et al., 2008].

**Conclusion.** Au vu de ces résultats, le composé **SI2** est identifié au (25*R*)-spirost-5-èn-3β-ol 3-*O*-[α-*L*-rhamnopyranosyle-(1→2)]-[α-*L*-rhamnopyranosyle-(1→4)]-β-*D*-glucopyranoside, molécule très connue sous le nom de dioscorine [Hirai et al., 1984 ; Ju et al., 1992 ; Sautour et al., 2004 ; Huang et al., 2009].

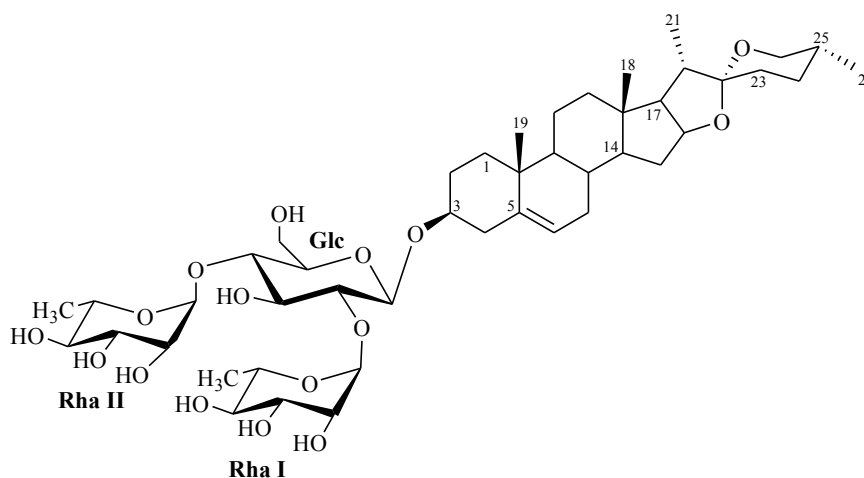


Figure 2.32 – Structure du composé **SI2**.

Tableau 2.11 – Valeurs des déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) et -<sup>13</sup>C (150 MHz) de la génine et des sucres du composé **SI2** dans la pyridine *d*<sub>5</sub>.

Génine			Sucres		
Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$
1	37.2	0.95, 1.73			
2	30.5	1.82, 2.10	1	98.0	4.82
3	77.7	3.81 ( <i>m</i> )	2	77.7	4.06
4	38.9	2.62, 2.71 ( <i>d</i> , 8.6)	3	77.0	4.06
5	141.0	-	4	78.5	4.18
6	122.0	5.30 ( <i>br s</i> )	5	76.2	3.55
7	32.6	1.42, 1.78	6	60.8	4.00, 4.13
8	31.4	1.53			
9	50.0	0.81			
10	36.7	-	1	101.9	6.14 ( <i>s</i> )
11	20.7	<sup>a</sup>	2	71.7	4.73
12	39.5	1.64, <sup>a</sup>	3	72.0	4.51
13	40.0	-	4	73.6	4.28
14	56.4	1.03	5	69.2	4.80 ( <i>m</i> )
15	32.0	1.52, 2.08	6	18.1	1.66 ( <i>d</i> , 6.2)
16	82.0	4.49 ( <i>m</i> )			
17	62.3	1.76	1	102.5	5.64 ( <i>s</i> )
18	15.0	1.08 ( <i>s</i> )	2	71.8	4.59 ( <i>br s</i> )
19	19.0	0.97 ( <i>s</i> )	3	71.8	4.45
20	35.0	2.40	4	73.0	4.24
21	15.0	1.08 ( <i>d</i> , 6.9)	5	70.0	4.72
22	109.2	-	6	18.0	1.51 ( <i>d</i> , 6.2)
23	30.0	1.42, 1.82			
24	28.7	1.51, <sup>a</sup>			
25	30.0	1.67 ( <i>d</i> , 6.2)			
26	66.5	3.53, 3.79			
27	16.9	0.63 ( <i>d</i> , 5.5)			

<sup>a</sup> déplacement chimique non attribué.

2.3.2.3. Description du composé **SI3**.*Spectrométrie de masse.*

Le composé **SI3** montre dans le spectre de masse HR-ES-IMS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1071.5389  $[M + Na]^+$  (calc. 1071.5352), suggérant une formule moléculaire  $C_{51}H_{84}O_{22}Na$ . Le spectre de masse FAB-MS en mode ion négatif montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1047  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1048. D'autres pics d'ions-fragments sont observés à  $m/z$  901  $[(M - H) - 146]^-$ , 755  $[(M - H) - 146 - 162]^-$ , et 593  $[(M - H) - 146 - 162 - 146]^-$ , suggérant l'élimination de trois sucres, deux 6-desoxyhexosyles et un hexosyle.

*Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** Les spectres de RMN- $^1H$  et  $^{13}C$  de **SI3** montrent quatre méthyles à  $\delta_H$  0.80 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-18), 0.95 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-19), 1.25 (3H, *d*,  $J = 6.7$  Hz, H<sub>3</sub>-21), et 0.91 (3H, *d*,  $J = 6.7$  Hz, H<sub>3</sub>-27), un proton oléfinique à  $\delta_H$  5.30 (1H, *br d*, H-6), et le signal déblindé à  $\delta_C$  110.5 suggèrent un squelette furostène [Belhouchet et al., 2008; Debella et al., 1999; Sautour et al., 2005, 2007a; Yang et al., 2004]. Ceci est confirmé par la tache de corrélation en HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  4.70 / 74.9 (Glc II H-1 / C-26) indiquant une glycosylation à cette position. La stéréochimie 25*R* du méthyle en C-27 est déduite à partir des résonances des protons et des carbones à  $\delta_H / \delta_C$  1.88 / 33.7 (H-25 / C-25), 3.55, 3.86 / 74.9 (H<sub>2</sub>-26 / C-26), et 0.91 / 17.0 (H<sub>3</sub>-27 / C-27) en comparaison avec les données de la littérature [Agrawal 2004, 2005; Sautour et al., 2007a]. La différence de déplacements chimiques observées en RMN- $^1H$  entre les protons géminaux H-26*a* et H-26*b* ( $\delta_a - \delta_b = 0.31$ ) confirme la stéréochimie 25*R* (cette différence est généralement > 0.57 ppm pour la stéréochimie 25*S* et < 0.48 ppm pour 25*R*) [Agrawal 2004, 2005; Sautour et al., 2007a].

L'analyse de tous les spectres de RMN-1D et -2D permettent d'identifier l'aglycone de **SI3** au 25*R*-furost-5-èn-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol.

**Détermination de la nature des sucres.** L'analyse du spectre HSQC de **SI3** montre quatre taches de corrélations correspondants aux signaux anomériques à  $\delta_H / \delta_C$  4.82 / 99.7, 6.12 / 101.6, 5.61 / 102.2, et 4.70 / 104.1 5.64 indiquant la présence de

quatre sucres. L'étude des spectres RMN-2D et l'analyse GC ont permis d'identifier quatre sucres, deux  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyles (Rha I et Rha II), et deux  $\beta$ -D-glucopyranosyles (Glc I et Glc II).

**Détermination de la fixation des sucres sur l'aglycone et leur enchaînement.** Le spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  de l'aglycone de **SI3** montre deux signaux déblindés à  $\delta_{\text{C}}$  77.6 (C-3) et 74.9 (C-26), suggérant une saponine bidesmosidique. La fixation en C-3 est mise en évidence par la corrélation NOESY à  $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$  3.85 / 4.82 (Agly H-3 / Glc I H-1), et la fixation en C-26 par la corrélation HMBC à  $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$  4.70 / 74.9 (Glc II H-1 / Agly C-26). La séquence du 3-*O*-trisaccharide pour le composé **SI3** est exactement identique à l'enchaînement des sucres du composé **SI2**.

**Conclusion.** Ainsi, le composé **SI3** est identifié au (25*R*)-furost-5-èn-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle-(1  $\rightarrow$  2)]-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucopyranoside-26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyle, molécule connue sous le nom de protodioscine [Shao et al., 1997; Huang et al., 2009].

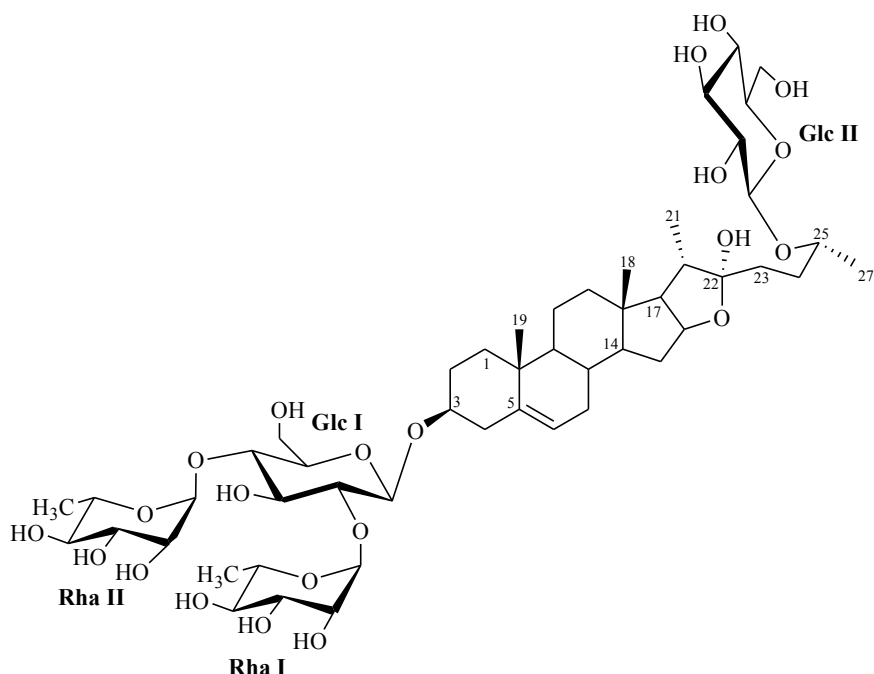


Figure 2. 33 – Structure du composé **SI3**.

Tableau 2.12 – Valeurs des déplacements chimiques RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de la génine et des sucres du composé **SI3** dans la pyridine  $d_5$ .

<b>Génine</b>			<b>Sucres</b>		
Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$
1	37.1	0.90, 1.65	3-O-Glc I		
2	29.8	2.03, <sup>a</sup>	1	99.7	4.82 ( <i>br d</i> )
3	77.6	3.85 ( <i>m</i> )	2	77.9	4.04
4	38.4	2.59 ( <i>t</i> , 10.7), 2.70 ( <i>d</i> , 9.8)	3	77.0	4.05
5	140.4	-	4	78.3	4.16
6	121.5	5.30 ( <i>s</i> )	5	76.2	3.55
7	31.9	1.37, 1.77	6	60.8	3.98, 4.12
8	31.2	1.43	Rha I-(1→2)-Glc I		
9	49.9	0.79	1	101.6	6.12 ( <i>s</i> )
10	36.7	-	2	71.7	4.72
11	20.7	<sup>a</sup>	3	72.0	4.48
12	39.5	1.03, 1.66	4	73.2	4.26 ( <i>t</i> , 9.5)
13	40.4	-	5	69.1	4.78 ( <i>m</i> )
14	56.1	0.96	6	18.1	1.66 ( <i>d</i> , 6.0)
15	31.9	1.98, 1.40	Rha II-(1→4)-Glc I		
16	80.8	4.89 ( <i>m</i> )	1	102.2	5.61 ( <i>s</i> )
17	63.0	1.87 ( <i>t</i> , 7.3)	2	71.8	4.57 ( <i>br s</i> )
18	16.0	0.80 ( <i>s</i> )	3	71.8	4.44
19	19.0	0.95 ( <i>s</i> )	4	73.1	4.23 ( <i>t</i> , 9.5)
20	40.1	2.16	5	69.9	4.70
21	15.9	1.25 ( <i>d</i> , 6.7)	6	17.9	1.51 ( <i>d</i> , 6.0)
22	110.5	-	28-O-Glc II		
23	36.4	1.98, <sup>a</sup>	1	104.1	4.70 ( <i>d</i> , 7.9)
24	27.8	1.58, 1.97	2	74.4	3.91
25	33.7	1.88	3	77.6	4.16
26	74.9	3.55, 3.86	4	71.0	4.04
27	17.0	0.91 ( <i>d</i> , 6.7)	5	74.9	3.55
			6	62.1	4.21, 4.41

<sup>a</sup> déplacement chimique non attribué.

#### 2.3.2.4. Description du composé **SI4**.

##### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **SI4** montre dans le spectre de masse HR-ES-IMS en mode positif un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1085.5796  $[M + Na]^+$  (calc. 1085.5508), suggérant une formule moléculaire  $C_{52}H_{86}O_{22}Na$ . Le spectre de masse (FAB-MS, en mode négatif) montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1061  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1062. D'autres pics d'ions-fragments sont observés à  $m/z$  915  $[(M - H) - 146]^-$ , 753  $[(M - H) - 146 - 162]^-$ , et 607  $[(M - H) - 146 - 162 - 146]^-$  suggérant l'élimination de deux 6-désoxyhexosyles et d'un hexosyle.

##### *Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** L'analyse des spectres HSQC de **SI4** montre des taches de corrélations quasi-similaires à ceux du composé **SI3**, correspondant à un aglycone de type 25*R*-furost-5-èn-3β,22α,26-triol, mais aussi la présence de signaux caractéristiques d'une fonction méthoxy à  $\delta_H / \delta_C$  3.23 / 47.0. La corrélation HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  3.23 / 112.5 ( $H_3 / C-22$ ) révèle la position du méthoxy en C-22.

Ainsi, l'aglycone de **SI4** est identifié au 25*R*-22-méthoxyfurost-5-èn-3β,22α,26-triol.

**Détermination de la nature et de la séquence des sucres.** L'analyse exhaustive des spectres RMN-1D et -2D de la partie oligosaccharidique de **SI4** a conduit à l'identification de la même saponine bidesmosidique que le composé **SI3**, avec un trisaccharide lié en position C-3 et un glucose en C-26 de l'aglycone.

**Conclusion.** Au vu de ces résultats, le composé **SI4** est identifié au (25*R*)-22-méthoxyfurost-5-èn-3β,22α,26-triol 3β-*O*-[α-L-rhamnopyranosyle-(1 → 2)]-[α-L-rhamnopyranosyle-(1 → 4)]-β-D-glucopyranoside-26-*O*-β-D-glucopyranosyle, composé connu sous le nom de méthylprotodioscine [Ju et al., 1992 ; Shao et al., 1997 ; Huang et al., 2009].

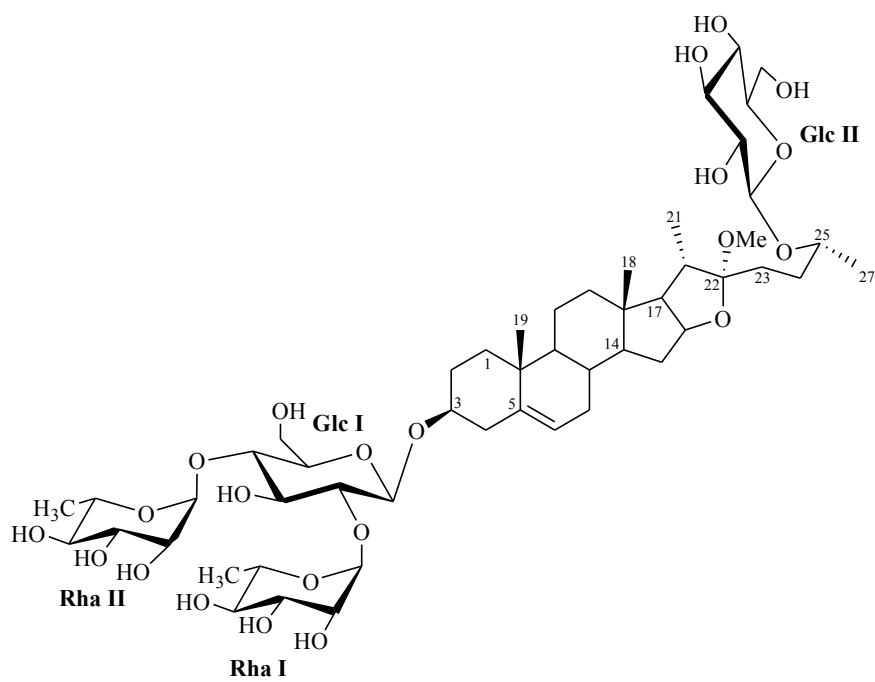


Figure 2.34 – Structure du composé **SI4**.





2.3.2.5. Description du composé **SI5**.*Spectrométrie de masse.*

Le composé **SI5** montre dans le spectre de masse HR-ES-IMS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  1087.5278  $[M + Na]^+$  (calc. 1087.5301), suggérant une formule moléculaire  $C_{51}H_{84}O_{23}Na$ . Le spectre de masse (FAB-MS, en mode négatif) montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  1063  $[M - H]^-$ , indiquant une masse moléculaire de 1064. D'autres pics d'ions-fragments sont observés à  $m/z$  901  $[(M - H) - 162]^-$ , 739  $[(M - H) - 162 - 162]^-$ , suggérant l'élimination successive de deux hexosyles.

*Spectroscopie RMN.*

**Détermination de l'aglycone.** L'analyse exhaustive des spectres RMN-1D et -2D de **SI5** montre des signaux quasi-similaires à ceux du composé **SI3**. Ainsi l'aglycone est identifié au 25*R*-furost-5-èn-3β,22α,26-triol.

**Détermination de la nature des sucres.** Le spectre HSQC de **SI5** montre quatre taches de corrélation à  $\delta_H / \delta_C$  4.82 / 100.0, 6.09 / 101.5, 5.02 / 105.1, et 4.70 / 104.2 indiquant la présence de quatre sucres. L'hydrolyse acide et l'analyse GC combinée à l'interprétation des spectres RMN-2D permettent l'identification de quatre sucres, deux β-D-glucopyranosyles (Glc I et Glc II), un α-L-rhamnopyranosyle (Rha), et un β-D-galactopyranosyle (Gal).

**Détermination de la fixation des sucres sur l'aglycone et leur enchaînement.** Le spectre RMN-<sup>13</sup>C de **SI5** révèle le déblindage de deux carbones à  $\delta_C$  77.7 (C-3) et 74.9 (C-26), suggérant un composé bidesmosidique. La fixation du galactose en C-3 de l'aglycone est mise en évidence par la corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  4.82 / 3.86 (Gal H-1 / Agly H-3), et la fixation d'un glucose en C-26 par la corrélation HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  4.70 / 104.2 (Glc II H-1 / Agly C-26).

L'enchaînement des sucres est déterminé par la corrélation NOESY à  $\delta_H / \delta_H$  4.54 / 6.09 (Gal H-2 / Rha H-1) et par la corrélation HMBC à  $\delta_H / \delta_C$  5.02 / 84.7 (Glc I H-1 / Gal C-3). La séquence ainsi caractérisée à [Rha-(1→2)]-[Glc I-(1→3)]-Gal est liée à l'aglycone en position C-3.

**Conclusion.** Ainsi, le composé **SI5** est identifié au (25*R*)-furost-5-èn-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyle-(1  $\rightarrow$  2)]-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1  $\rightarrow$  3)]- $\beta$ -D-galactopyranoside-26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyle (indioside D) précédemment isolé de *Solanum indicum* et *S. sodomaeum* [Yahara et al., 1996 ; Ono et al., 2006].

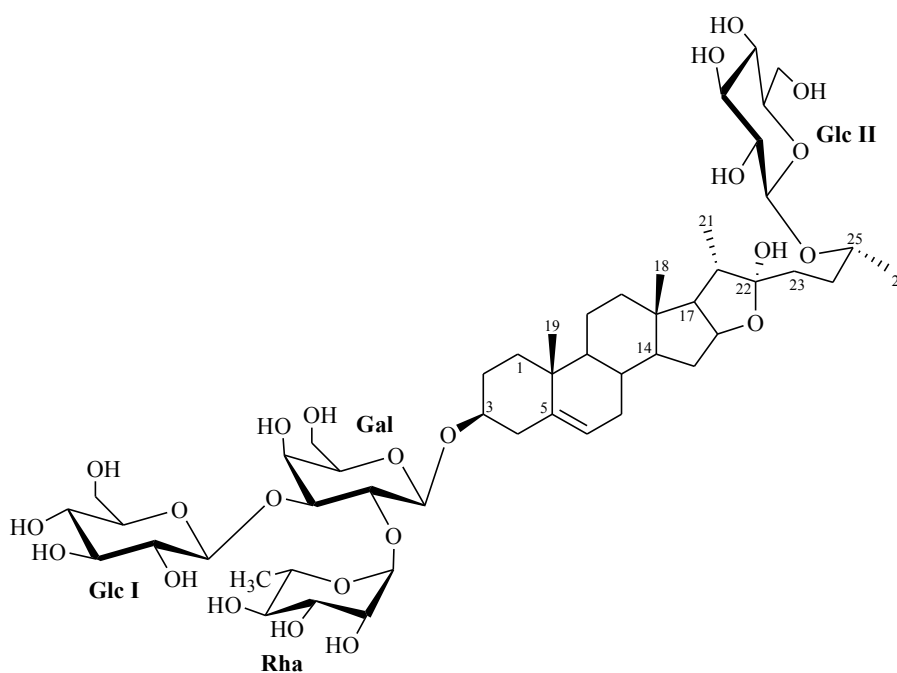


Figure 2.35 – Structure du composé **SI5**.



## 2.3.2.6. Les spectres des composés isolés.

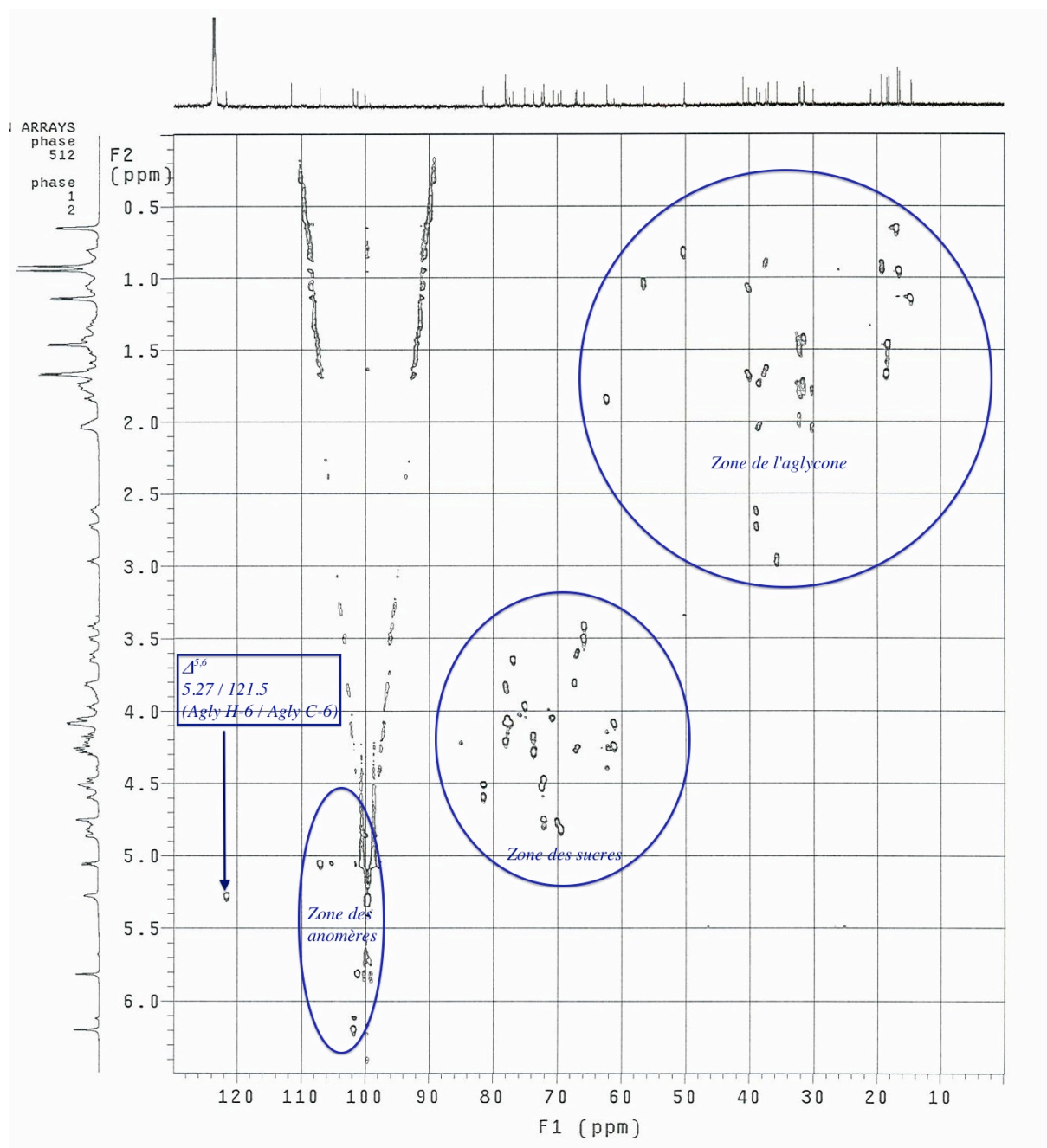


Figure 2.36 – Les corrélations HSQC du composé S11.

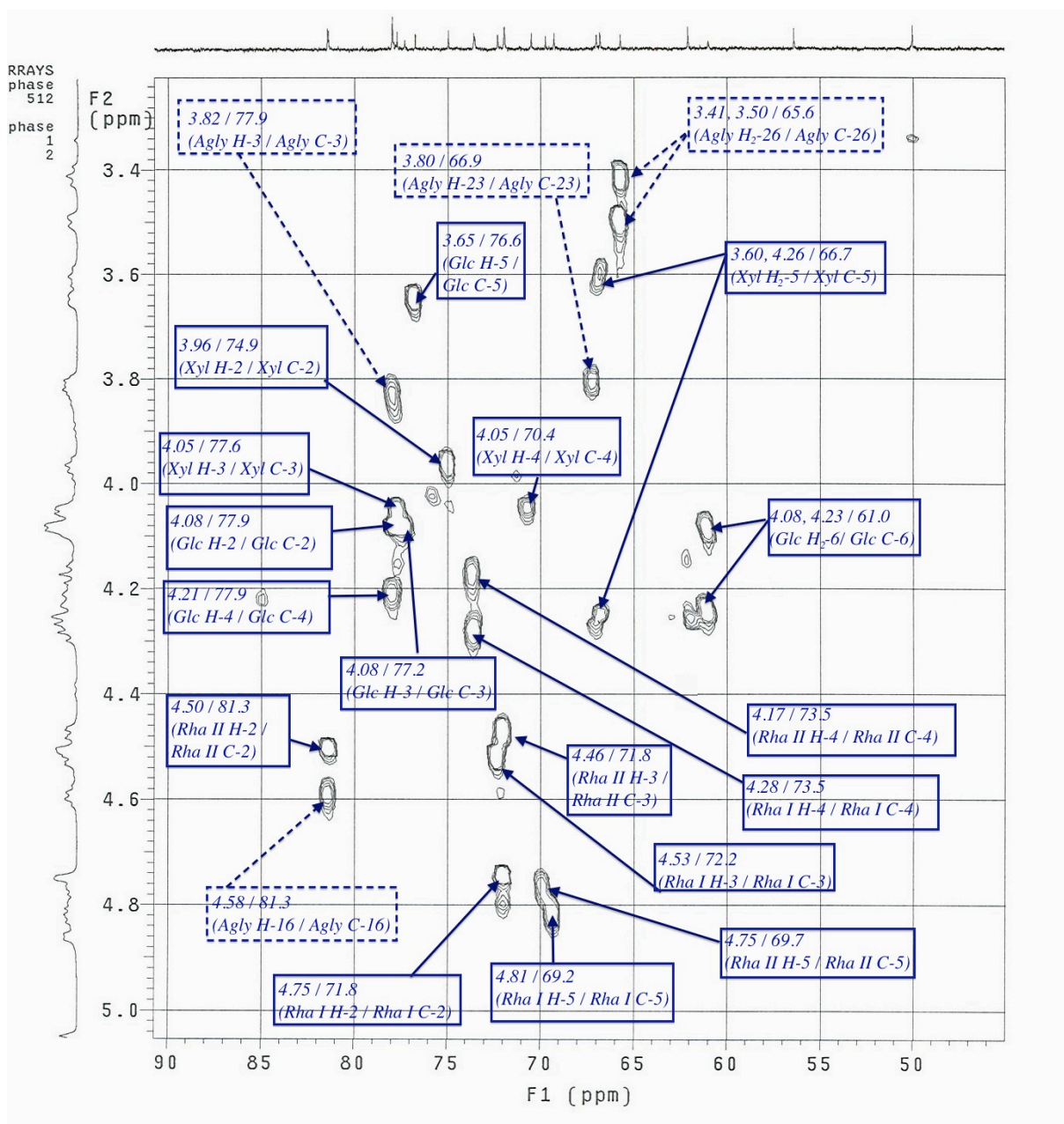


Figure 2.37 – Les corrélations HSQC des sucres du composé **S11**.

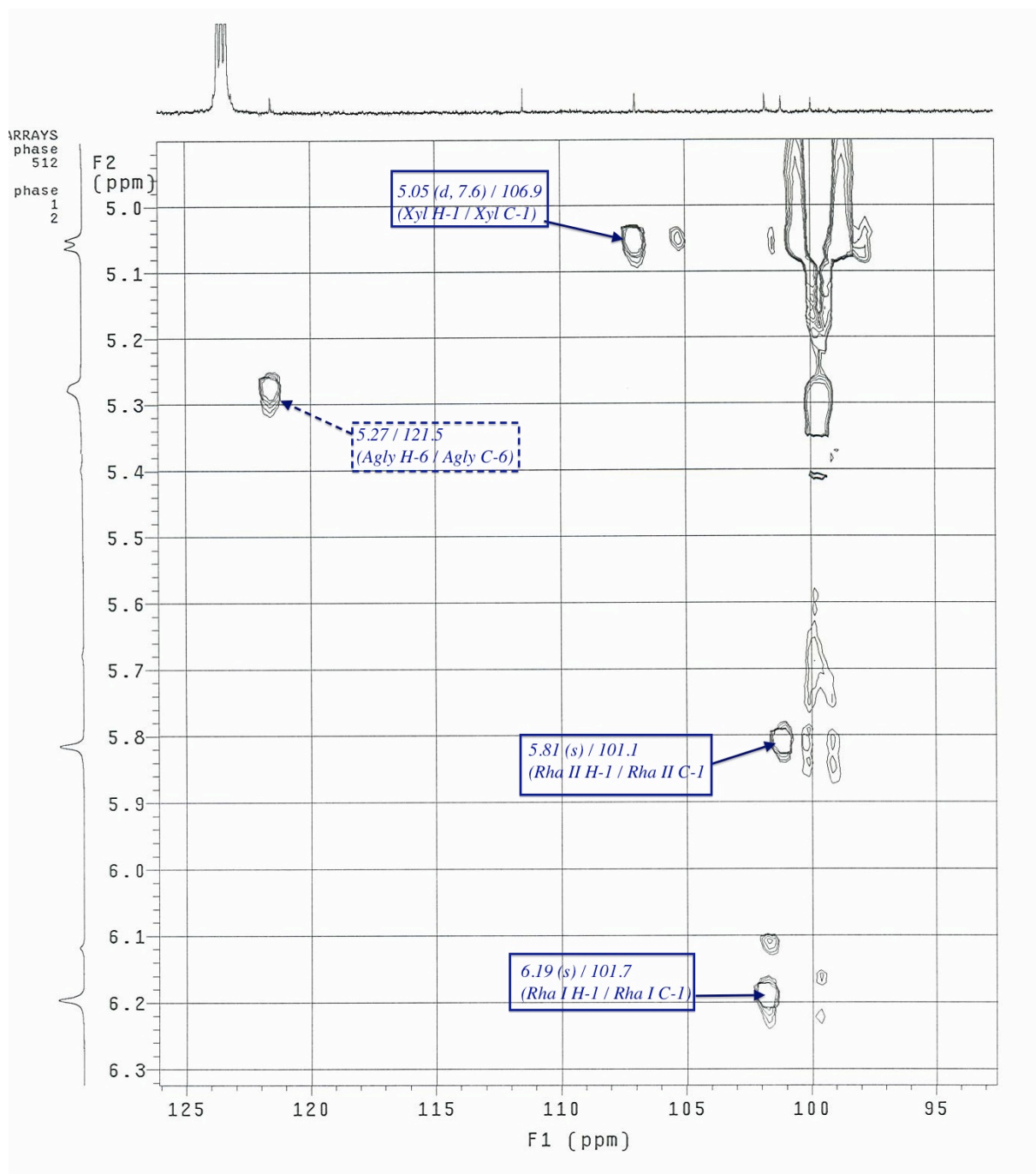


Figure 2.38 – les corrélations HSQC des anomères du composé **S11**.



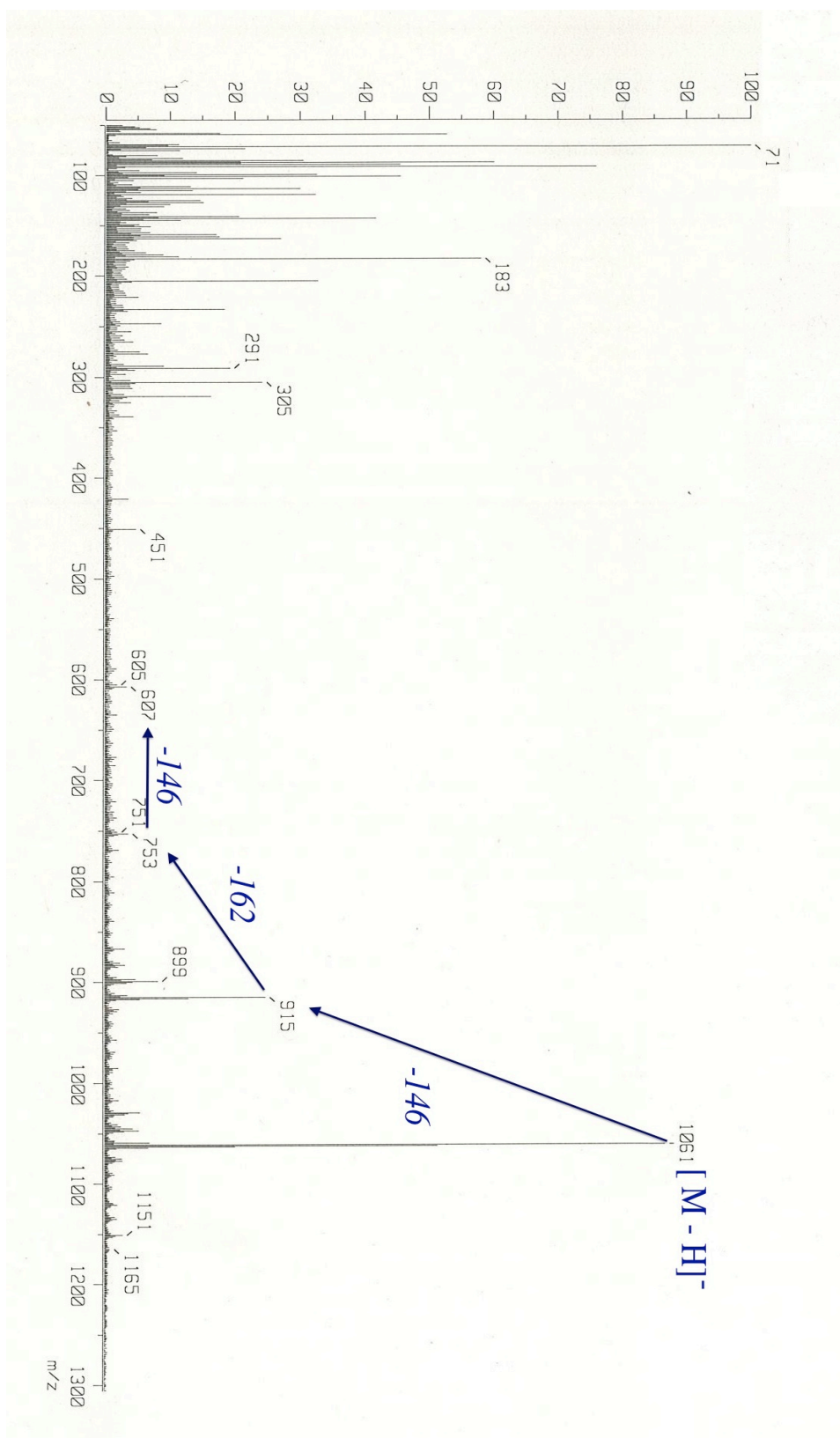


Figure 2.39 – Les principaux pics du spectre de masse du composé SI4.



## 2.4. *Solanum heteracanthum* Dunal.

### 2.4.1. Extraction et isolement.

Les racines séchées de *S. heteracanthum* (300 g) ont été broyées et soumises à une extraction à reflux dans du MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3, 2 L x 3) pendant 1 h (voir Fig. A.5, page 158) Après évaporation du solvant sous vide un extrait brut de 27 g a été obtenu. Un aliquot de 3 g a été utilisé pour isoler les composés. Les procédures d'isolement et de purification sont identiques à celles décrites pour *S. incanum* ; VLC sur phase inverse RP-18 et de silice gel 60, CC sur Sephadex<sup>®</sup> LH-20 et MPLC successives sur silice gel 60 et RP-18. Les composés suivants sont alors obtenus **SH1** (4 mg), **SH2** (7.1 mg), **SH3** (6.4 mg), **SH4** (4.2 mg) et **SH5** (6.0 mg) (voir Fig. B.4 et B.5, page 162–163).

### 2.4.2. Elucidation structurale.

L'analyse des spectres de masse et de RMN des composés **SH1**, **SH2**, **SH3** et **SH4** ont montré que ces produits sont respectivement identiques aux composés suivants **SI1**, **SI3**, **SI4** et **SI5** isolés de *S. incanum*. (**SH1** = **SI1**, **SH2** = **SI3**, **SH3** = **SI4**, et **SH4** = **SI5**).

#### 2.4.2.1. Description du composé **SH5**.

##### *Spectrométrie de masse.*

Le composé **SH5** montre dans le spectre de masse HR-ES-IMS en mode positif un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  890.4932 [M + Na]<sup>+</sup> (calc. 890.4878), suggérant une formule moléculaire C<sub>45</sub>H<sub>73</sub>O<sub>15</sub>NNa. Le spectre de masse FAB-MS en mode ion négatif montre un pic d'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  866 [M – H]<sup>–</sup>, indiquant une masse moléculaire de 867. Un autre pic d'ion-fragment est observé à  $m/z$  720 [(M – H) – 146]<sup>–</sup>, suggérant l'élimination d'un 6-désoxyhexosyle.

##### *Spectroscopie RMN.*

*Détermination de l'aglycone.* Le spectre de RMN-<sup>1</sup>H de **SH5** montre quatre signaux de méthyles à  $\delta_H$  0.81 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-18), 0.96 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-19), 1.05 (3H, *d*, *J* = 6.9 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0.73 (3H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H<sub>3</sub>-21), ainsi qu'un signal de proton oléfinique à

$\delta_H$  5.29 (1H, *br d*, H-6). Ces signaux ainsi que les résultats de la spectrométrie de masse montrent qu'il s'agit d'un squelette alcaloïde stéroïde. De plus la tache de corrélation sur le spectre HSQC déblindé à  $\delta_H / \delta_C$  2.81, 2.87 / 50.1 (H<sub>2</sub>-26 / C-26) confirme que l'aglycone de **SH5** est de type alcaloïde [Puri et al., 1994 ; Lu et al., 2011].

L'analyse exhaustive des spectres RMN-2D et la comparaison des données avec celles de la littérature ont permis d'identifier l'aglycone à (25*R*)-spirosol-5-èn-3β-ol, connu sous le nom de solasodine [Puri et al., 1994 ; Eltayeb et al., 1997 ; Lu et al., 2011].

**Détermination de la nature et de la séquence des sucres.** L'analyse exhaustive des spectres RMN-1D et -2D de la partie oligosaccharidique de **SH5** a conduit à l'identification du même trisaccharide [Rha I-(1→2)]-[Rha II-(1→4)]-Glc lié en position C-3 de l'aglycone que dans le composé **SI2**.

**Conclusion.** Au vu de ces résultats, le composé **SH5** est identifié au (25*R*)-22α*N*-spirosol-5-èn-3β-ol 3-*O*-[α-*L*-rhamnopyranosyle-(1 → 2)]-[α-*L*-rhamnopyranosyle-(1 → 4)]-β-*D*-glucopyranoside, composé connu sous le nom de solamargine [Fukuhara et Kubo, 1991 ; Puri et al., 1994 ; Wanyonyi et al., 2002].

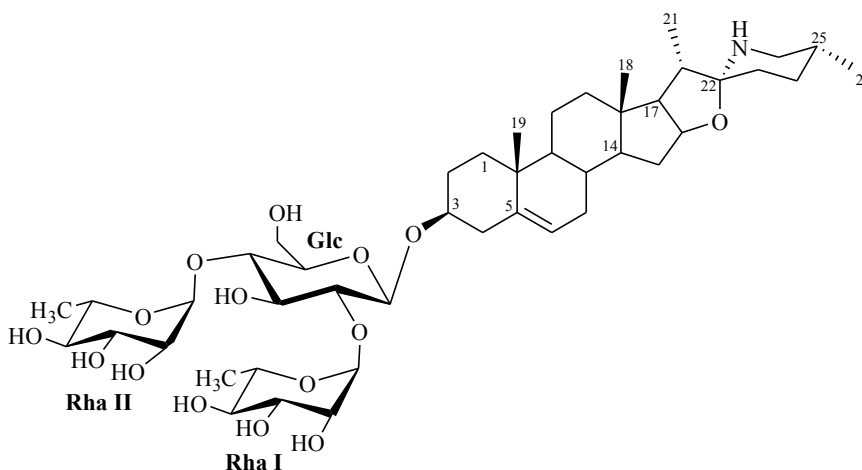


Figure 2.39 – Structure du composé **SH5**.

Tableau 2.15 – Valeurs des déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) et <sup>13</sup>C (150 MHz) de la génine et des sucres du composé **SI5** dans la pyridine *d*<sub>5</sub>.

<b>Génine</b>			<b>Sucres</b>		
Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$	Pos.	$\delta_C$	$\delta_H$
1	37.2	0.93, 1.66			
2	29.8	<sup>a</sup>	1	99.7	4.82 ( <i>d</i> , 5.96)
3	77.9	3.83 ( <i>m</i> )	2	77.9	4.04
4	38.6	2.63, 2.73	3	77.0	4.05
5	140.5	-	4	78.3	4.16
6	121.6	5.29 ( <i>br s</i> )	5	76.2	3.55
7	31.9	<sup>a</sup>	6	60.8	3.98, 4.12
8	31.2	1.58			
9	50.1	0.73			
10	36.8	-	1	101.6	6.12 ( <i>s</i> )
11	20.3	<sup>a</sup>	2	71.7	4.72
12	39.8	1.08, 1.62	3	72.0	4.48
13	40.4	-	4	73.2	4.26 ( <i>t</i> , 9.5)
14	55.7	0.96	5	69.1	4.78 ( <i>m</i> )
15	31.9	<sup>a</sup>	6	18.1	1.66 ( <i>d</i> , 6.2)
16	78.5	4.13 ( <i>m</i> )			
17	61.9	1.54 ( <i>t</i> , 7.3)			
18	16.5	0.81 ( <i>s</i> )	1	102.2	5.61 ( <i>s</i> )
19	19.1	0.96 ( <i>s</i> )	2	71.8	4.57 ( <i>br s</i> )
20	42.6	1.84	3	71.8	4.44
21	15.8	1.05 ( <i>d</i> , 6.9)	4	73.1	4.23 ( <i>t</i> , 9.5)
22	99.5	-	5	69.9	4.70
23	36.4	<sup>a</sup>	6	17.9	1.51 ( <i>d</i> , 6.0)
24	29.8	1.90, <sup>a</sup>			
25	31.3	1.67			
26	50.1	2.81 ( <i>d</i> , 3.8), 2.87 ( <i>t</i> , 10.9)			
27	19.8	0.73 ( <i>d</i> , 6.4)			

<sup>a</sup> déplacement chimique non attribué.

2.4.2.2. Le spectre de masse de **SH5**.

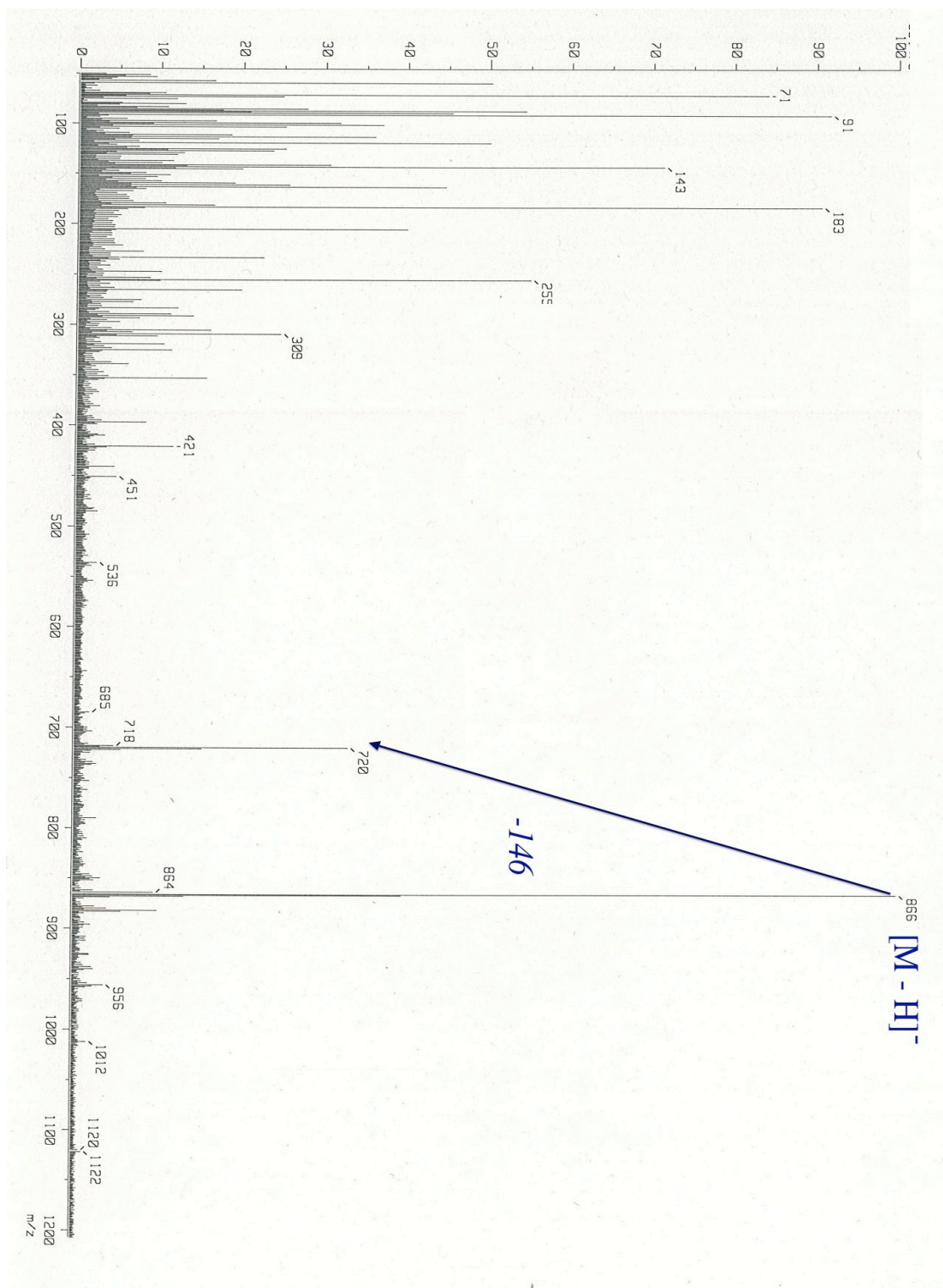


Figure 2.40 – Les principaux pics du spectre de masse du composé **SH5**.

# Chapitre III.

## TRAVAUX BIOLOGIQUES



# I. Matériels et méthodes.

Les composés isolés des espèces végétales récoltés à Madagascar, que nous avons décrit précédemment, présentent des caractères structuraux similaires à ceux de saponines cytotoxiques rencontrées dans la littérature. En effet, des études montrent la cytotoxicité des 13,28-époxy-saponines similaires à **PC1** isolé de *Polycarpha corymbosa* Lamk. [Fujioka et al., 2006 ; Li et al., 2012], de même pour les dérivés d'ester de R1-barigénol isolés de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* [D'Acquarica et al., 2002 ; Yuan et al., 2012], et les composés isolés des deux *Solanum* [Shao et al., 1997 ; Hu et Yao, 2003 ; Yang et al., 2003 ; Sautour et al., 2007b]. Ainsi, cette partie présente les résultats des tests cytotoxiques de quelques molécules que nous avons isolées. Ces tests ont été réalisés par deux laboratoires Dijonnais, Oncodesign et Cohiro. Chaque laboratoire possède sa propre méthodologie et ses propres lignées cellulaires. Ainsi, cinq lignées cellulaires cancéreuses et une lignée cellulaire embryonnaire ont été utilisées pour déterminer la cytotoxicité des saponines pures isolées.

## 1.1. Les lignées cellulaires.

### ***La société Oncodesign.***

Deux lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines, HT-29 (adénocarcinome colorectal) et HCT 116 (carcinome colorectal).

### ***La société Cohiro.***

Deux lignées cellulaires cancéreuses humaines, SW480 (adénocarcinome colorectal) et DU145 (carcinome de la prostate).

Une lignée cellulaire cancéreuse de souris, EMT6 (carcinome mammaire).

Une lignée cellulaire embryonnaire de cœur de rat, H9c2 (cardiomyoblaste).

## 1.2. Test au XTT.

Le test de prolifération cellulaire XTT a été décrit pour la première par [Scudiero et al., 1988](#) comme une méthode efficace pour mesurer la croissance cellulaire et la sensibilité aux médicaments dans des lignées cellulaires tumorales. Le sel de sodium de 2H-tétrazolium,2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphophényle)-5-[(phénylamino)carbonyle]-,inner (1:1) (XTT) est un composé incolore ou légèrement jaune qui lorsqu'il est réduit devient orange vif. La réaction est une réduction enzymatique par la succinate déshydrogénase mitochondriale (enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale) des cellules vivantes actives [[Jost et al., 1992](#)]. Le XTT formazan produit de la réduction du XTT est soluble et peut être utilisé dans des analyses en temps réel.

**Principe.** Le test est basé sur la capacité de métabolisme des cellules pour réduire le sel de tétrazolium (XTT) en un composé de couleur orange le XTT formazan. Le colorant formé est soluble dans l'eau. L'intensité du colorant, en rapport avec la concentration de formazan, peut être lue à une longueur d'onde comprise entre 450–500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Ainsi, l'intensité de la coloration est donc proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives.

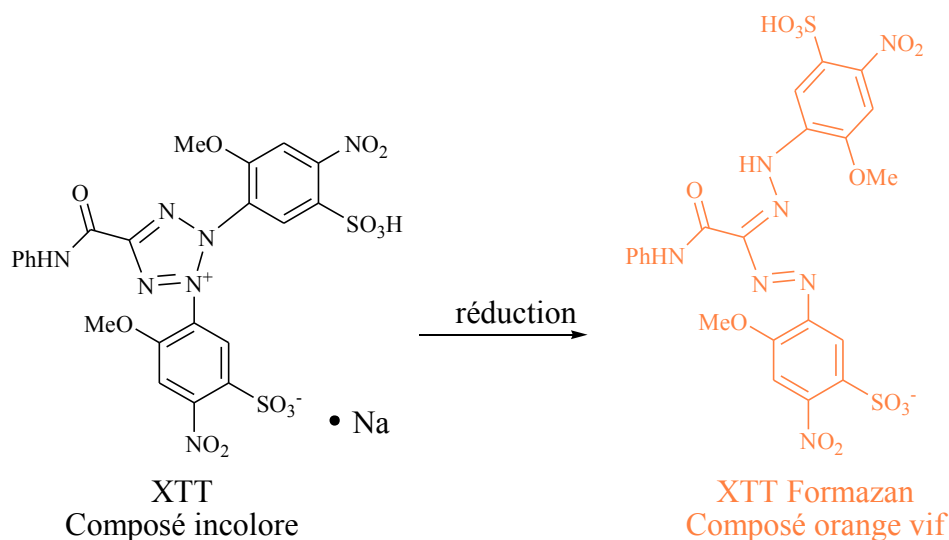


Figure 3.1 – Réaction de réduction enzymatique du XTT.



**Procédure du test.** Les cellules sont cultivées dans une plaque de 96 puits à plat. Pour chaque puits, 100 µl de milieu de croissance est ajouté contenant 5000 à 10000 cellules. Les cellules sont traitées par différentes concentrations de l'échantillon (saponines pures) sur une période de 76 à 96 heures dans un incubateur à CO<sub>2</sub> à 37 °C. Après la période d'incubation, 20 µl de XTT sont ajoutés par puits et la plaque est incubée pendant environ 4 heures. Au cours de cette deuxième période d'incubation, une couleur orange s'est formée, dont l'intensité peut être mesurée avec un spectrophotomètre, en l'occurrence, d'un lecteur de plaque 96 puits. L'absorbance (ou densité optique) des échantillons est mesurée à une longueur d'onde d'essai à 570 nm et à une longueur d'onde de référence à 630 nm.

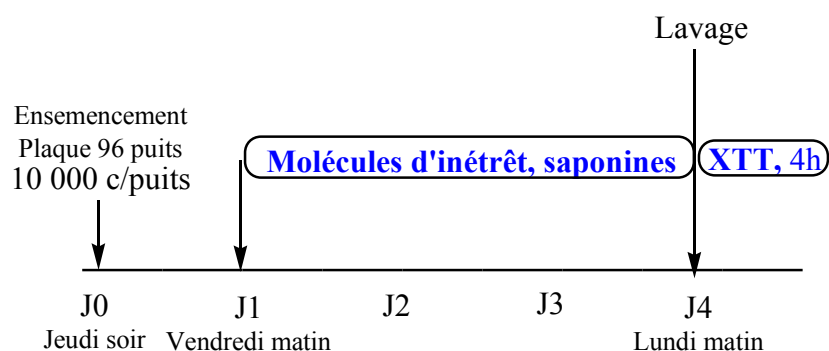


Figure 3.2 – Organisation générale d'un test XTT.

La densité optique (DO) mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules viables. Une diminution de DO indique une diminution de la viabilité cellulaire et donc une cytotoxicité de l'échantillon testé. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport aux cellules non traitées selon la formule suivante :

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

On obtient de cette manière une valeur d'IC<sub>50</sub> pour chaque expérience. L'activité cytotoxique de chaque saponine est représentée par cette valeur qui est la concentration à laquelle 50% de la croissance cellulaire est inhibée.

La société Cohiro utilise comme méthode interne le test au XTT, avec le médicament anticancéreux étoposide [Okamoto-Kubo et al., 1994 ; Hainsworth et al., 2006 ; Uesaka et al., 2007], la doxorubicine [Sternberg et al., 1989 ; Andersson et al., 1999 ; Fayette et Blay, 2006] et le méthotrexate [Sternberg et al., 1989 ; Andersson et al., 1999], comme contrôle positif (référence interne).

### 1.3. Test au MTT.

Le test au MTT est un test de colorimétrie basé sur la réduction enzymatique d'un substrat par des cellules viables. Le principe de ce test est similaire au test au XTT, et est même à l'origine de ce dernier [Slater et al., 1963 ; Mosmann, 1983]. Le réactif utilisé est un composé jaune le bromure de 2H-terazolium,2-(4,5-diméthyl-2-thiazolyle)-3,5-diphényle (1:1) qui est transformé en cristaux bleu, lorsqu'il est réduit en formazan.

La société Oncodesign utilise le test au MTT comme méthode interne, avec le médicament anticancéreux paclitaxel comme contrôle positif [Kuh et al., 1999 ; Hainsworth et al., 2006].

## II. Résultats des tests de cytotoxicité

### 2.1. Saponines des CARYOPHYLLACEAE.

Le caractère cytotoxique des saponines triterpéniques isolées de *Polycarphaea corymbosa* Lamk. a été évalué au sein de la société Cohiro à l'aide du test au XTT. Les lignées cellulaires ci-dessous sont alors utilisées :

- Deux lignées de cellules cancéreuses humaines, SW480 (sur tous les composés), et DU145 (**PC1**, **PC3**, **PC4**, et **PC5**).
- Une lignée de cellules cancéreuses de souris EMT6 (**PC1**, **PC3**, **PC4**, et **PC5**).
- Une lignée de cellules embryonnaires de cœur H9c2 (**PC2**).

**Résultats du test de cytotoxicité des composés PC1, PC2, PC3, PC4, et PC5** (Tableau 3.1). Les résultats des essais obtenus permettent de dire que la saponine **PC1** montre un potentiel cytotoxique sur SW480, DU145, EMT6 avec des valeurs  $IC_{50}$  inférieure à celle du médicament anti-cancéreux l'étoposide, utilisée comme contrôle positif, tandis que les composés **PC3**, **PC4**, et **PC5** sont inactifs ( $IC_{50} > 25 \mu M$ ). Le composé **PC2** est testé uniquement contre la lignée cellulaire SW480 par le même test au XTT, s'est révélé inactif ( $IC_{50} > 25 \mu M$ ).

Tableau 3.1 – Résultats des essais cytotoxiques des molécules **PC1**, **PC2**, **PC3**, **PC4** et **PC5**, isolées de *Polycarphaea corymbosa* Lamk., évalués à l'aide du test XTT.

Composés	$IC_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>			
	SW480	DU145	EMT6	H9c2
Etoposide <sup>b</sup>	13.22±3.79	41.26±17.57	>200	13.22±3.79
<b>PC1</b>	4.61±2.24	17.82	22.61	NT <sup>c</sup>
<b>PC2</b>	>28.70	-	-	>28.70
<b>PC3</b>	>28.25	>28.25	>28.25	NT
<b>PC4</b>	>26.18	>26.18	>26.18	NT
<b>PC5</b>	>27.17	>27.17	>27.17	NT

<sup>a</sup> Lignées cancéreuses utilisés sont SW480 (colon humain), DU145 (prostate humaine), EMT6 (carcinome mammaire de souris) et H9c2 (cardiomyoblaste de rat). <sup>b</sup> Etoposide est utilisé comme contrôle positif. <sup>c</sup> "NT" signifie non testé.

**Interprétation des résultats.** D'un point de vue structural, tous les composés ont la même fraction tétrasaccharidique, la différence entre les différents composés se situe dans la structure de l'aglycone. **PC1** possède un squelette 13 $\beta$ ,28-époxyoléan-11-èn-16 $\alpha$ -ol, alors que les autres possèdent un squelette oléanène avec une fonction alcoolique primaire en C-28 (Fig. 3.3). Par conséquent, il pourrait être considéré que le pont époxy entre la position C-13 et C-28 joue un rôle dans l'activité cytotoxique.

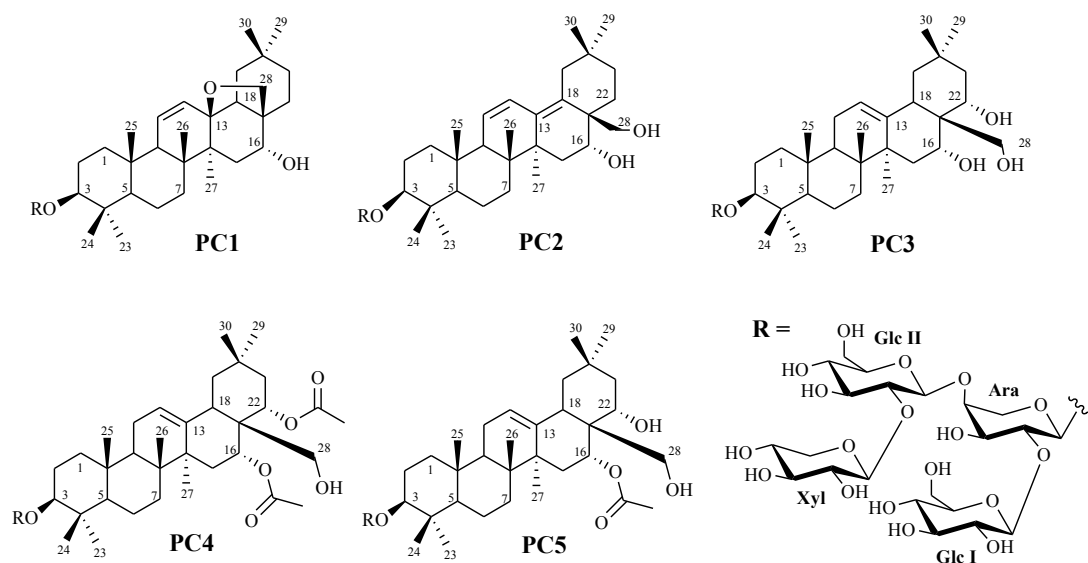


Figure 3.3 – Structure des composés isolés de *Polycarpaea corymbosa* Lamk.

Il est intéressant de noter que ce résultat corrobore les conclusions antérieures faites sur les saponines de type 13,28 époxy-ursane et -oléanane isolées de *Bupleurum rotundifolium* [Fujioka et al., 2003, 2006], ainsi que cette étude sur l'activité sélective de quelques 13,28-époxy-saponines qui inhibent la prolifération des cellules cancéreuses du foie, sans affecter les cellules normales [Li et al., 2012].

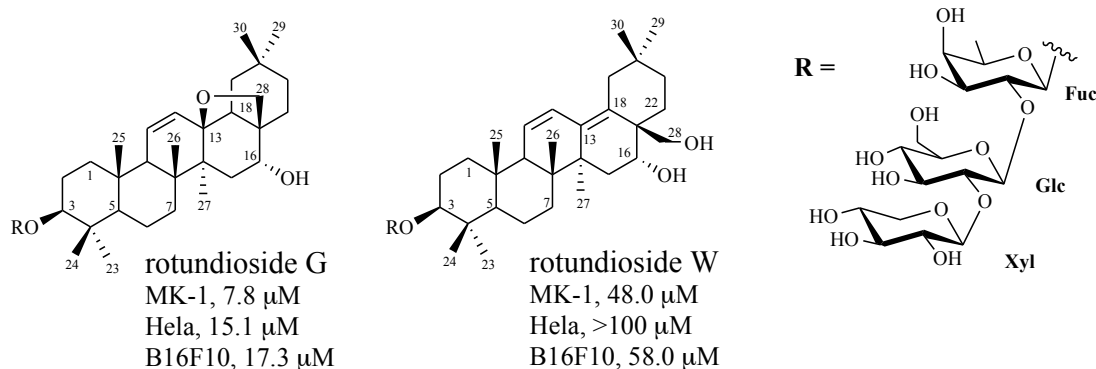


Figure 3.4 – Structure des composés isolés de *Bupleurum rotundifolium*. L'activité antiproliférative ( $\text{GI}_{50}$ ,  $\mu\text{M}$ ), contre les lignées cellulaires MK-1, HeLa et B16F10, de rotundioside G est compris entre 7.8–17.3  $\mu\text{M}$  ; et celui de rotundioside W est à > 40  $\mu\text{M}$  sur les trois lignées [Fujioka et al., 2006].

## 2.2. Saponines des PITTOSPORACEAE.

La cytotoxicité des ester-saponines isolées des racines de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* a été évaluée au sein de la société Cohiro à l'aide du test au XTT. Une lignée de cellules cancéreuses humaines SW480 (adénocarcinome colorectal), et une lignée de cellules embryonnaires de cœur H9c2 (cardiomyoblaste de rat) sont alors utilisées.

**Résultats du test de cytotoxicité des composés PV1, PV2, PV3, et PV4.** Le composé **PV3** montre une cytotoxicité modérée sur les lignées cellulaires SW480 et H9c2 avec des valeurs d' $\text{IC}_{50}$  à 12.19 et 17.30  $\mu\text{M}$ , respectivement. Ce niveau d'activité est supérieur à celui de l'étoposide sur les deux lignées cellulaires, et celui du méthotrexate sur SW480. Le composé **PV2** montre une activité faible dans les deux lignées cellulaires. Les composés **PV1** et **PV4** sont inactifs ( $\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{M}$ ). Par contre, en comparant les valeurs d' $\text{IC}_{50}$  avec ceux de la doxorubicine, tous les composés (**PV1–4**) sont inactifs.

Tableau 3.2 – Résultats des essais cytotoxiques des molécules **PV1**, **PV2**, **PV3** et **PV4**, isolées de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum*, évalués à l'aide du test XTT.

Composés	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
	SW480	H9c2
Etoposide	20.40	20.40
Doxorubicine	1.00	0.50
Méthotrexate	>20.00	5.00
<b>PV1</b>	>24.00	>24.00
<b>PV2</b>	17.03	>23.22
<b>PV3</b>	12.19	17.30
<b>PV4</b>	>23.40	>23.40

<sup>a</sup> Lignées cancéreuses utilisées sont SW480 (colon humain), et H9c2 (cardiomyoblaste de rat). <sup>b</sup>

Etoposide, doxorubicine et méthotrexate sont utilisés comme contrôle positif.

**Interprétation des résultats.** Les résultats pris dans leur ensemble montrent une cytotoxicité marginale des saponines de *P. verticillatum* comme cela avait été précédemment rapporté pour l'analogue structural de **PV3** isolé de *Pittosporum viridiflorum*, le pittoviridoside (Fig. 3.5) qui a montré une faible cytotoxicité contre la lignée cellulaire cancéreuse ovarienne humaine A2780 [Seo et al., 2002].

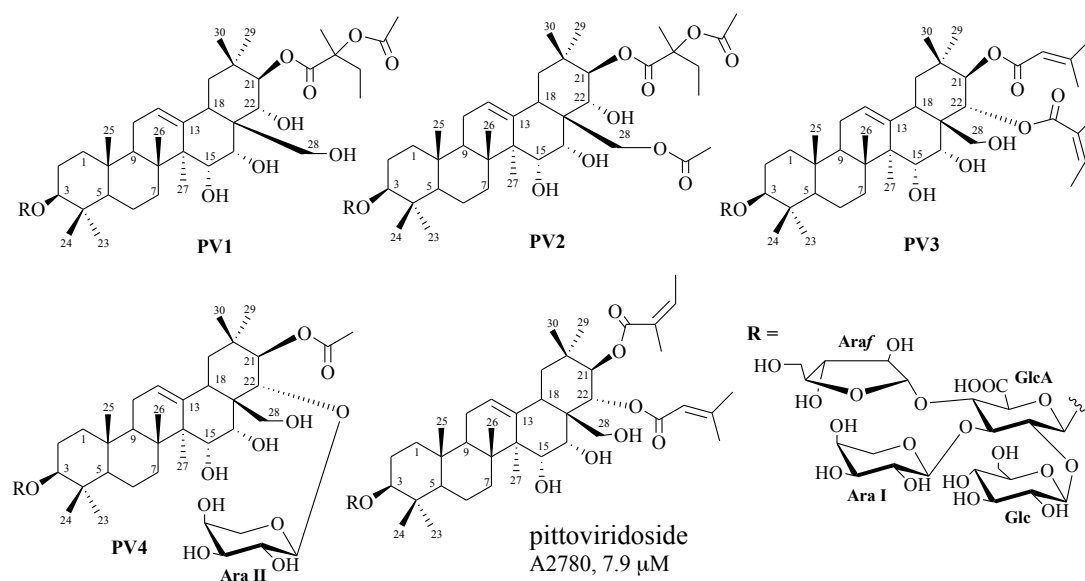


Figure 3.5 – Structure des composés isolés de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* (**PV1**, **PV2**, **PV3**, et **PV4**) et de *Pittosporum viridiflorum* (pittoviridoside).

Sur les composés isolés de *P. verticillatum*, la partie oligosaccharique est identique dans les quatre saponines, la source d'activité des saponines réside probablement dans la génine. Il est intéressant de noter que les esters de R1-barrigénol sont fréquemment isolés dans différentes familles, en particulier l'ordre des APIALES notamment dans la famille des APIACEAE (*Eryngium* [Kartal et al., 2005, 2006 ; Wang et al., 2013], *Hydrocotyle* [Tabopda et al., 2012]) et PITTOSPORACEAE (*Pittosporum*). De plus, les tests de cytotoxicité des ester-saponines isolées, dans les genres cités ci-dessous, montrent une faible toxicité sur les lignées de cellules cancéreuses. Nous suggérons alors que les saponines à R1-barrigénol acétylé n'est pas un aglycone de saponine qualifiée de cytotoxique. Cependant une étude réalisée par Chan, 2007 montre que le xanifolia-Y isolée de *Xanthoceras sorbifolia* possède des activités anti-tumorale et hémolytique. L'élimination de la chaîne de sucres de xanifolia-Y (en position C-3) réduit l'activité d'inhibition de la croissance cellule tumorale et aussi l'activité hémolytique, mais l'élimination des deux groupes d'angéloyl en positions C-21 et C-22 abolit ces deux activités. Ces données indiquent donc, l'acylation par deux groupes d'angéloyl en position C-21 et C-22 du R-1

barrigénol de saponine est essentiel pour l'activité cytotoxique, et la chaîne des sucres en position C-3 exerce une influence sur cette activité.

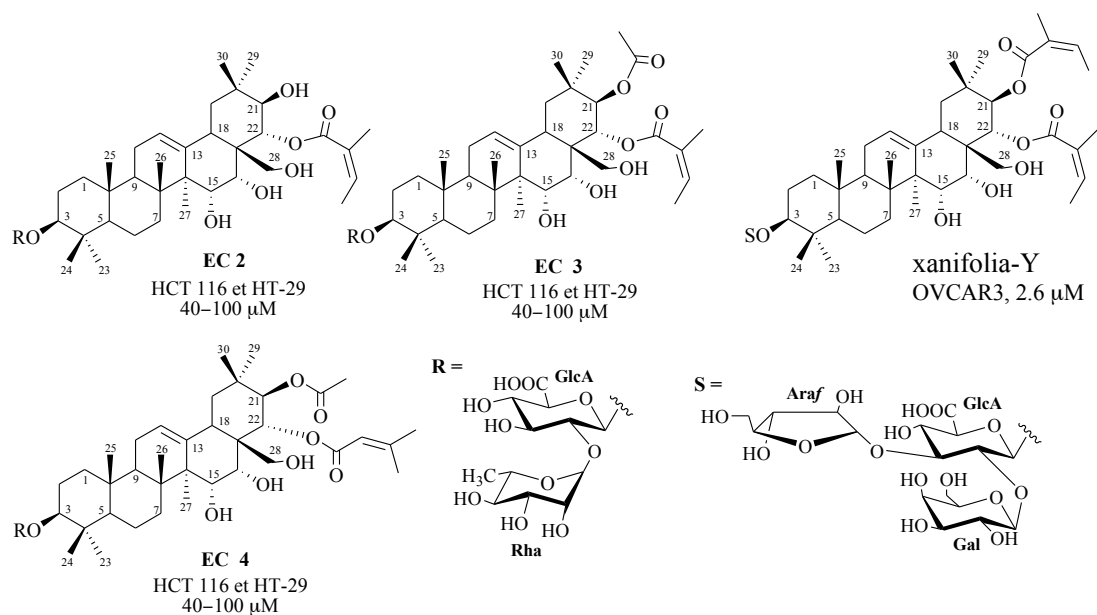


Figure 3.6 – Structure des composés isolés d'*Eryngium campestre* (EC 2, 3 et 4) [Kartal et al., 2006] et de *Xanthoceras sorbifolia* (xanifolia-Y) [Chan, 2007].

### 2.3. Saponines des SOLANACEAE.

L'évaluation de la cytotoxicité des produits isolés de *Solanum incanum* L. et de *S. heteracanthum* Dunal. a été effectuée dans deux sociétés. Le test au MTT décrit par Carmichael et al., 1987 est utilisé par la société Oncodesign sur deux lignées de cellules cancéreuses colorectales humaines (HCT 116 et HT-29). La seconde a été réalisée par la Société Cohiro en utilisant le test au XTT décrit par Jost et al., 1992, avec deux lignées de cellules cancéreuses humaines SW480 (adénocarcinome colorectal) et DU145 (carcinome de la prostate), et une lignée de cellules cancéreuses de souris EMT6 (carcinome mammaire).



**Résultats du test de cytotoxicité des composés SI1, SI3, SI4, et SI5.** Les résultats sont résumés ci-dessous et montrent que le nouveau composé **SI1** n'est pas cytotoxique sur toutes les cellules testées, alors que les autres composés connus **SI3**, **SI4** et **SI5** montrent une cytotoxicité variant de faible à modérée, en fonction des différentes lignées cellulaires utilisées.

Tableau 3.3 – Résultats des tests de l'activité cytotoxiques des molécules **SI1**, **SI3**, **SI4** et **SI5**, isolées de *Solanum incanum* L. et *S. heteracanthum* Dunal., évalués à l'aide du test MTT.

Composés	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>				
	HCT 116	HT-29	SW480	DU145	EMT6
Paclitaxel	2.65 x 10 <sup>-3</sup>	2.29 x 10 <sup>-3</sup>	-	-	-
Etoposide	-	-	13.22±3.79	41.26±17.57	>200
<b>SI1</b>	62.42±0.66	72.24±20.62	>29.53	>29.53	>29.53
<b>SI3</b>	2.26±2.29	3.48±3.01	6.68	>28.63	6.68
<b>SI4</b>	2.76±1.93	3.30±3.00	>28.25	>28.25	>28.25
<b>SI5</b>	3.87±2.51	5.28±0.51	20.68	>28.20	24.44

<sup>a</sup> Lignées cancéreuses utilisées sont HCT 116, HT-29, et SW480 (carcinome colorectal), DU145 (carcinome de la prostate) et EMT6 (carcinome mammaire de souris). <sup>b</sup> L'etoposide et le paclitaxel sont utilisés comme contrôles positifs.

**Interprétation des résultats.** Les saponines **SI1** et **SI2** sont des composés de type spirostanol (Fig. 3.7). Sur les cinq lignées cellulaires testé le composé **SI1** est inactif or que plusieurs études rapporte sur la cytotoxicité de la dioscine (**SI2**) [Liu et al., 2011b ; Hu et al., 2013]. Les différences entre ces deux composés sont la chaîne de sucres et dans l'aglycone par la présence de la fonction hydroxyle en C-23. L'absence d'activité de **SI1** est expliqué en observant l'activité cytotoxique sur d'autres saponines de type spirostanol comme la deltonine, la gracilline, la progénine II et les saponines polyhydroxylées (Fig. 3.7). Effectivement la deltonine testée sur les lignées cellulaires HT-29 et HCT 116 montre une toxicité importante, de même pour la gracilline, et la progénine II, testées sur un panel de lignées cancéreuses montrent des activités, alors que les saponines à aglycone de type spirostanol polyhydroxylé ne montrent pas d'activité cytotoxique [Sautour et al., 2007b ; Timité et al., 2013]. Par conséquent la présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyle fait perdre l'activité cytotoxique à la saponine de type spirostanol.

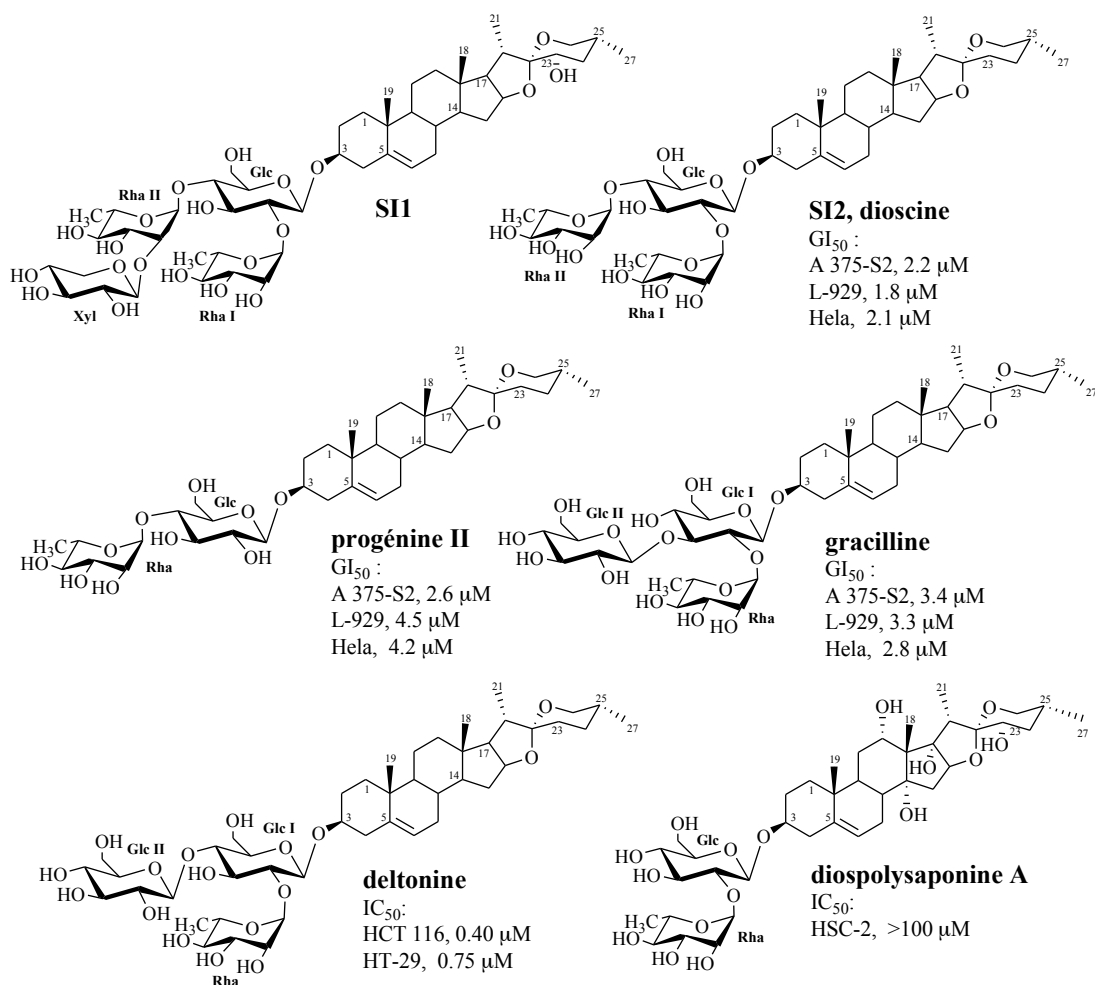


Figure 3.7 – Structure des composés isolés de *Solanum incanum* L. (**SI1**, **SI2**), des saponines isolées des DIOSCOREACEAE (dioscine, progénine II, gracilline, diospolysaponine A) [Sautour et al., 2007b] et d'*Allium schoenoprasum* (deltonine) [Timité et al., 2013].

Les composés **SI3**, **SI4** et **SI5** sont des saponines de type furostanol (Fig. 3.8), et leurs activités cytotoxiques dépendent du type cellulaire [Sautour et al., 2007b]. Nous pouvons constater que dans les deux types de squelette stéroïdique, la chaîne de sucres joue un infime rôle, voir négligeable dans l'activité cytotoxique.

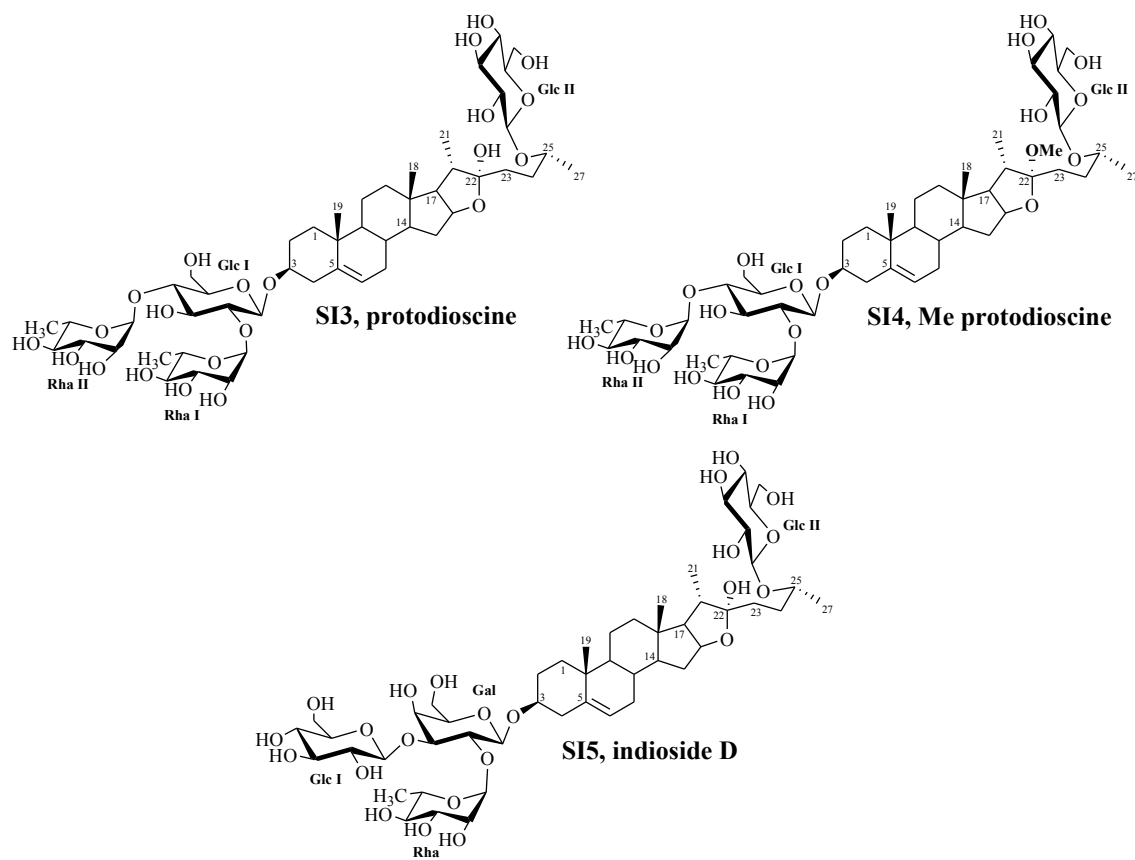


Figure 3.8 – Structure des composés isolés de *Solanum incanum* L. (**SI3**, **SI4**, et **SI5**) et de *S. heteracanthum* Dunal. (**SH2** = **SI3**, **SH3** = **SI4**, et **SH4** = **SI5**).



# Chapitre IV.

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La flore Malgache est connue pour sa grande diversité et son fort taux d'endémisme, par contre il y a encore très peu d'études qui valorisent cette particularité de l'île. Au cours de cette thèse, nous avons réalisé des travaux phytochimiques sur trois espèces récoltées à Madagascar et sur une autre fournie par une société localisée en France, appartenant à trois familles végétales différentes. Il s'agit de *Polycarpaea corymbosa* Lamk. (CARYOPHYLLACEAE), de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* (PITTOSPORACEAE), de *Solanum incanum* L. et *S. heteracanthum* Dunal. (SOLANACEAE). Le choix des espèces a été fondé, suite à une recherche bibliographique approfondie, sur la richesse en saponines de certaines espèces du même genre.

L'étude phytochimique a permis l'isolement de quinze composés naturels, dont huit nouveaux, à l'aide des techniques chromatographiques (Chromatographie d'exclusion moléculaire, Chromatographie Flash, Chromatographie liquide sous vide, et Chromatographie Liquide à Moyenne Pression). Leur caractérisation a été réalisée à l'aide de techniques spectroscopiques (Résonance Magnétique Nucléaire et Spectrométrie de Masse). Les molécules isolées de la famille de CARYOPHYLLACEAE et de PITTOSPORACEAE sont des saponines triterpéniques alors que celles des SOLANACEAE sont des saponines stéroïdiques.

A partir de *Polycarpaea corymbosa* Lamk (CARYOPHYLLACEAE), cinq saponines triterpéniques de type oléanane ont été isolées, dont quatre sont des nouveaux composés naturels. Les différences structurales de ces composés résident dans l'aglycone, puisqu'ils ont tous la même chaîne tétrasaccharidique,  $\beta$ -D-xylopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyle fixé sur la position C-3 de l'aglycone. Les génines caractérisées sont la rotundiogénine A, la 16-épi-saikogénine C et la camélliagénine A. Il est

intéressant de noter que dans cette espèce, une forme diacétylée de la caméliagénine A en C-16 et C-22 est signalée pour la première fois.

A partir de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* (PITTOSPORACEAE), quatre saponines triterpéniques de type oléanane ont été isolées, dont trois sont des nouveaux composés naturels, sous forme de dérivés d'esters de R1-barrigénol. Les trois aglycones estérifiés de ces saponines caractérisés au 21-(2-acétoxy-2-méthylbutanoyle)-R1-barrigénol, 21-(2-acétoxy-2-méthylbutanoyle)-28-acétyle-R1-barrigénol, et 21- $\beta,\beta$ -diméthylacryloyl-22-angéloyl-R1-barrigénol sont décrits pour la première fois. La chaîne oligosaccharidique fixée sur la position C-3 de l'aglycone est identique dans les quatre composés, à savoir le [ $\beta$ -D-glucopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyle-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyle-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyle.

A partir de *Solanum incanum* L. et *S. heteracanthum* Dunal. (SOLANACEAE), cinq molécules stéroïdiques ont été isolées dont un nouveau composé naturel, un glycoside de 23-hydroxydiosgénine. De plus, un glycoalcoïde stéroïdique, la solamargine, a été obtenu de *S. heteracanthum* Dunal. Les composés isolés ont permis de confirmer la synonymie existant entre les deux espèces.

Des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur treize molécules isolées contre six lignées de cellules cancéreuses, notamment les lignées HT-29, HCT 116, SW480, DU145, EMT6, et H9c2, en vue d'évaluer leurs activités biologiques, en comparaison avec les témoins positifs, l'étoposide, la doxorubicine, le méthotrexate et le paclitaxel. Les résultats montrent que quatre des molécules testées, à savoir le glycoside de rotundiogénine A, la protodioscine, la méthylprotodioscine et l'indioside D présentent des activités intéressantes. Il convient de souligner d'une part que les saponines stéroïdiques de type furostane se sont révélées actives, comme cela a été rapporté dans la littérature, et d'autre part que la présence du pont 13,28 époxy dans le glycoside de rotundiogénine A augmente considérablement la cytotoxicité.

En conclusion, cette thèse a permis de valoriser la flore Malgache par la caractérisation de molécules isolées des espèces récoltées dans la région Nord de l'île. Elle a contribué à l'enrichissement de la base de données des saponines, en indiquant que le genre *Polycarpaea* est également une source de saponines dans la famille de



Caryophyllaceae, et que le genre *Pittosporum* est une source de triterpène-esters glycosylés originaux. De plus, elle a aussi permis la confirmation de la synonymie entre les deux espèces de *Solanum*.

Au vu des résultats très prometteurs au niveau phytochimique, il est intéressant de lancer une investigation plus poussée sur la flore de l'île, spécialement sur les espèces endémiques de Madagascar et de les comparer avec les espèces naturalisées du même genre.

Les résultats des tests biologiques montrent que certains composés ont des activités cytotoxiques supérieures à des médicaments anticancéreux comme l'étoposide et le méthotrexate, en fonction de la lignée cellulaire. Il sera alors intéressant d'élargir les tests de cytotoxicité sur des lignées cellulaires plus variées, et d'élargir à des tests précliniques *in vivo* sur animal.



# Chapitre V.

## PARTIE EXPERIMENTALE



## A. Extraction des saponines brutes.

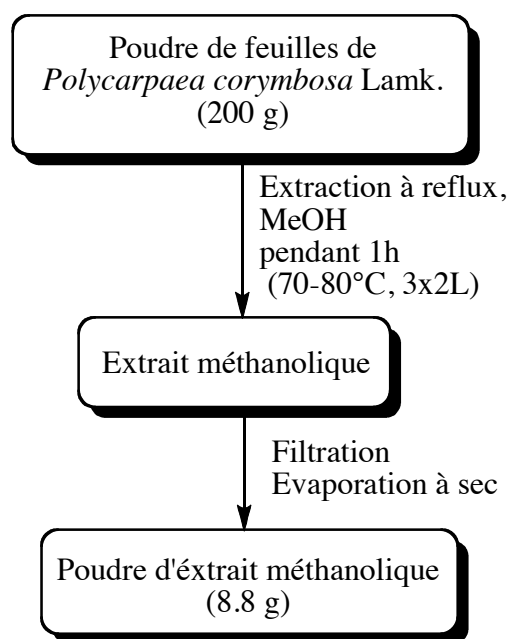


Figure A.1 – Schéma d'extraction de saponines brutes à partir des feuilles de *Polycarpaea corymbosa* Lamk. var. *eriantha* Hochst.

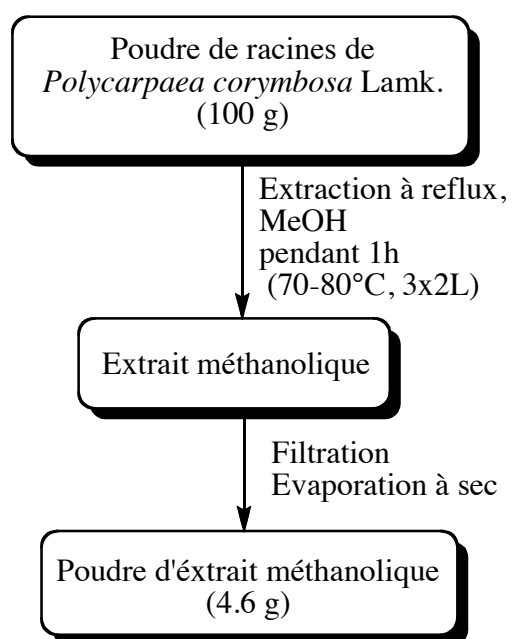


Figure A.2 – Schéma d'extraction de saponines brutes à partir des racines de *Polycarpaea corymbosa* Lamk. var. *eriantha* Hochst.

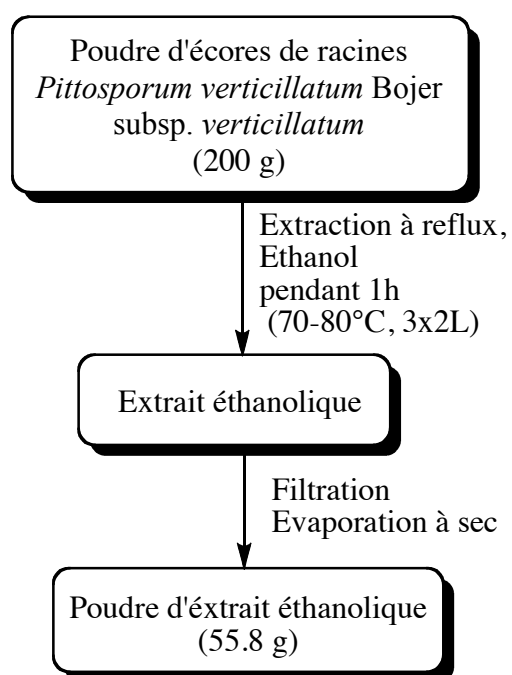


Figure A.3 – Schéma d'extraction de saponines brutes à partir de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *Verticillatum*.

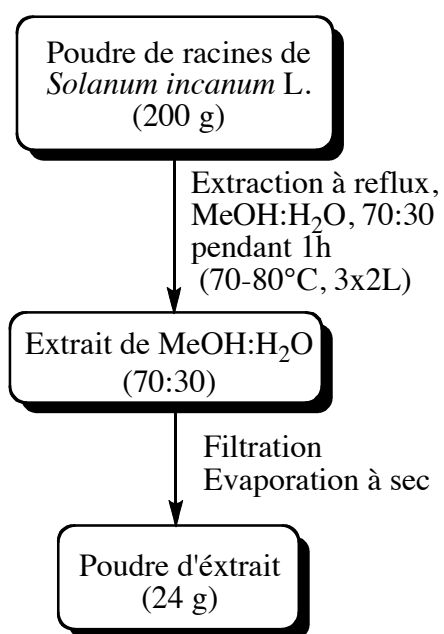


Figure A.4 – Schéma d'extraction de saponines brutes à partir de *Solanum incanum* L.



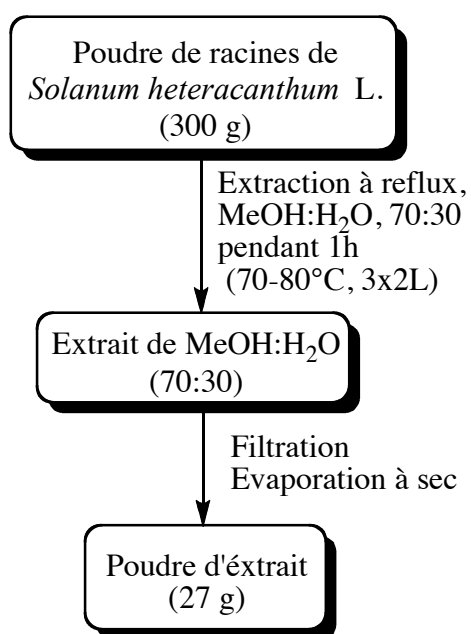


Figure A.5 – Schéma d'extraction de saponines brutes à partir de *Solanum heteracanthum* Dunal.

## B. Purification des saponines.

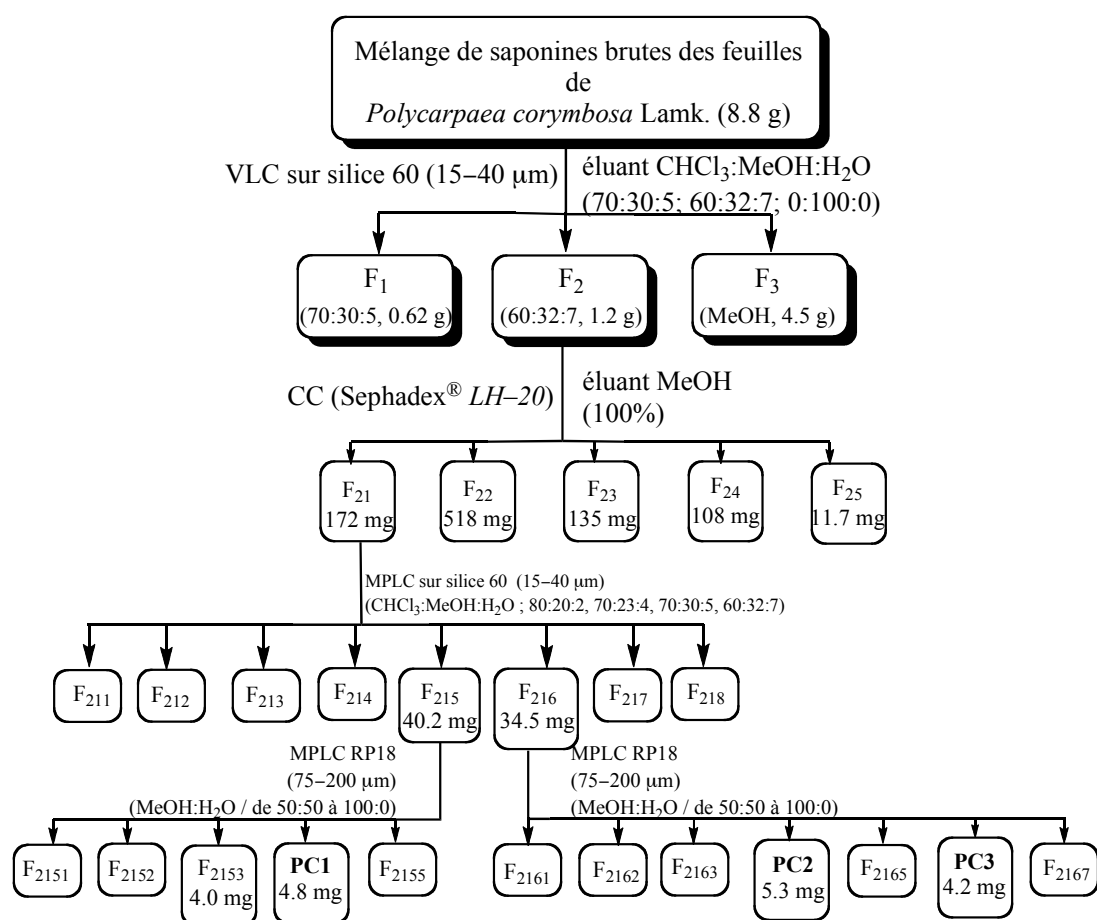


Figure B.1—Schéma d'isolement de saponines brutes à partir de feuille de *Polycarphaea corymbosa* Lamk.

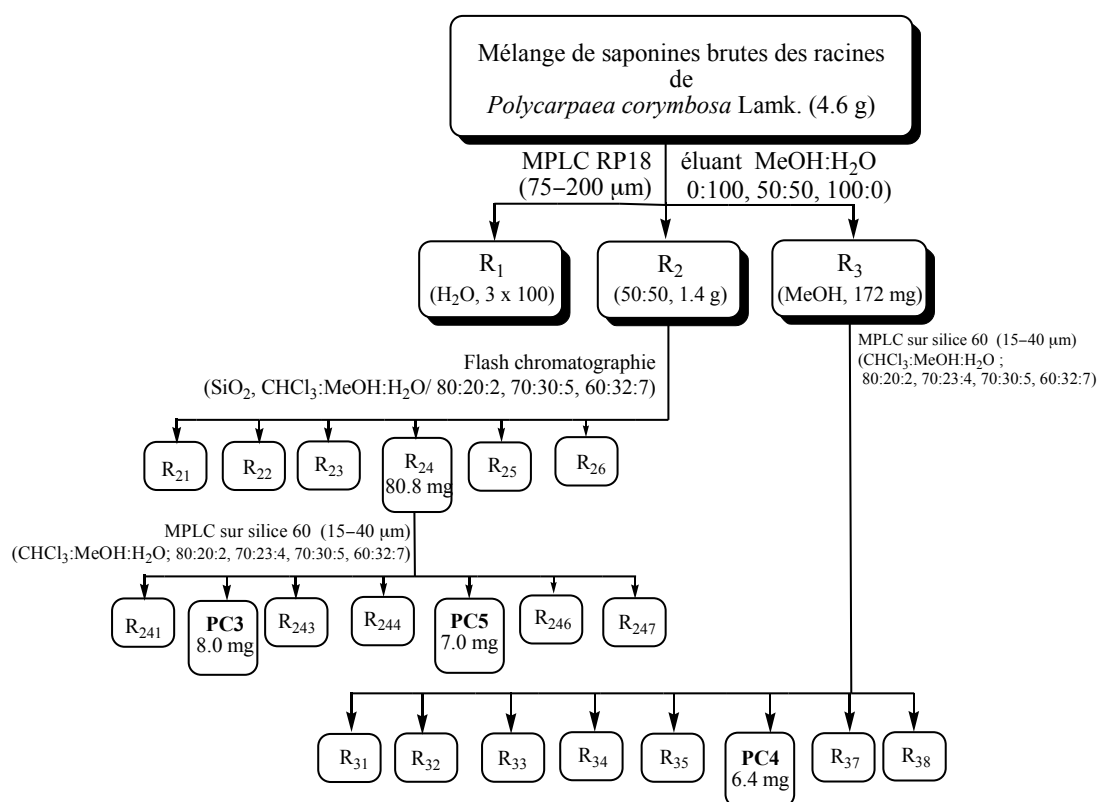


Figure B.2–Schéma d’isolement de saponines brutes à partir de racine de *Polycarphaea corymbosa* Lamk.

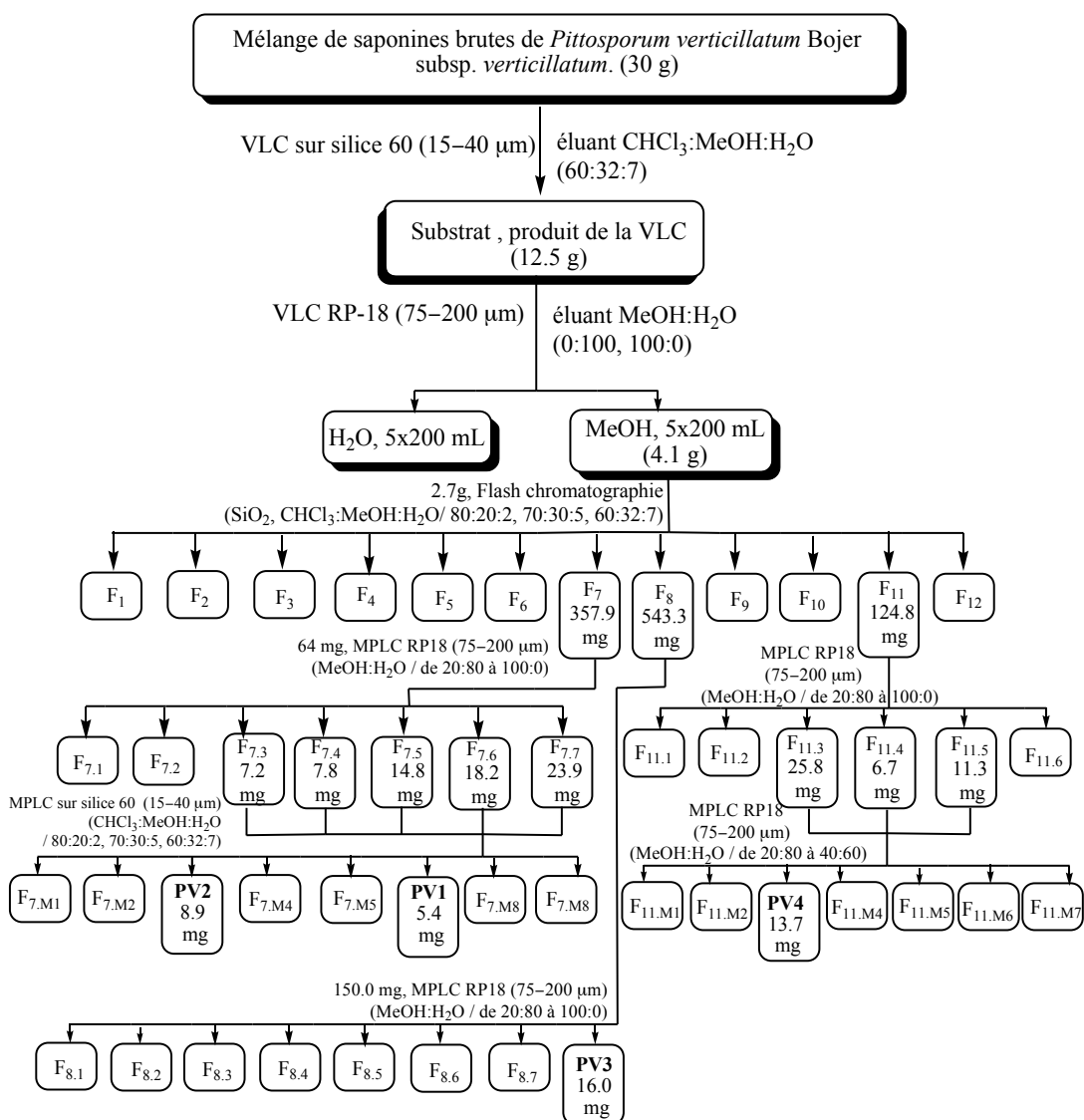


Figure B.3–Schéma d’isolement de saponines brutes à partir de *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *Verticillatum*.

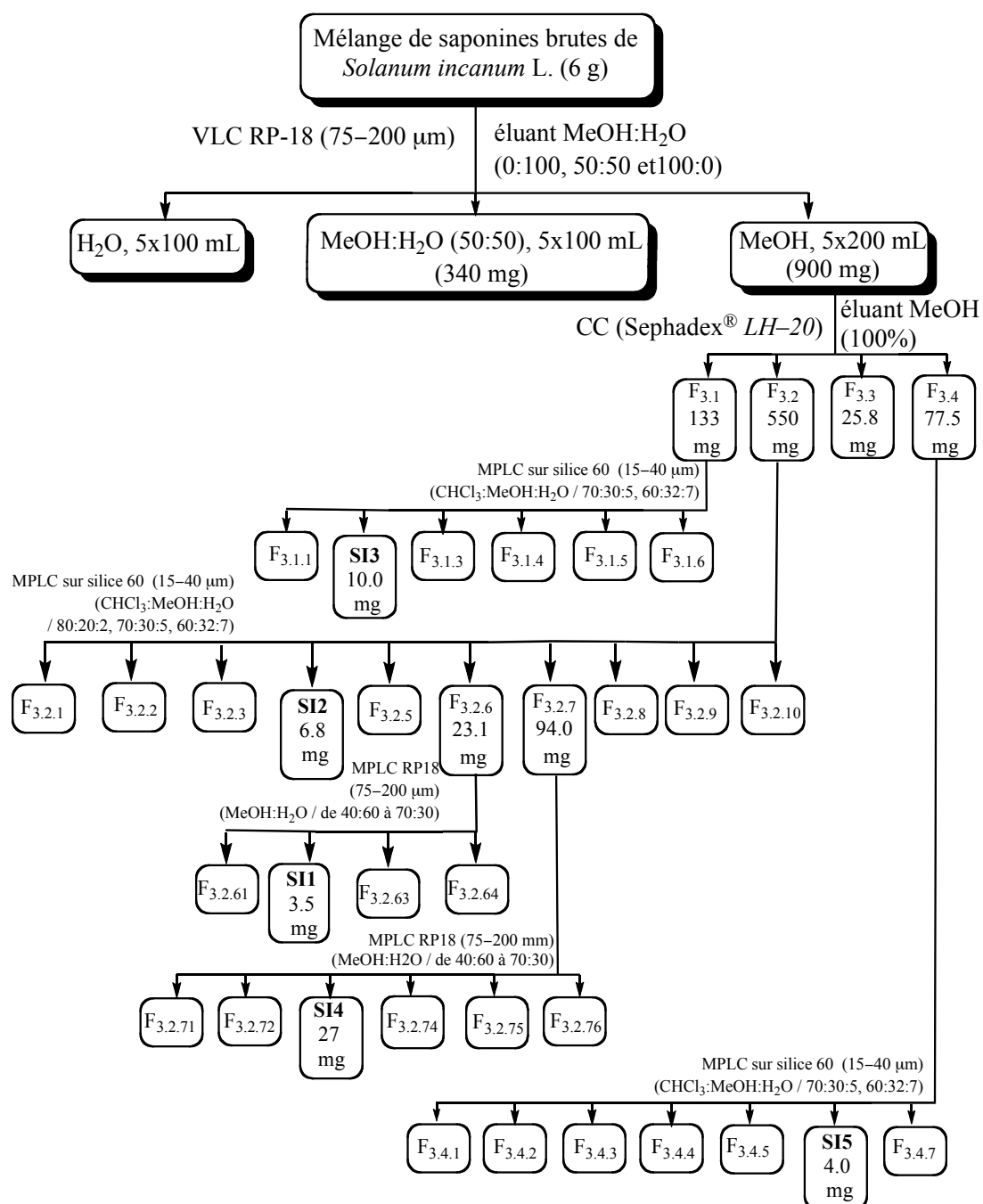


Figure B.4– Schéma d'isolement de saponines brutes à partir de *Solanum incanum* L.

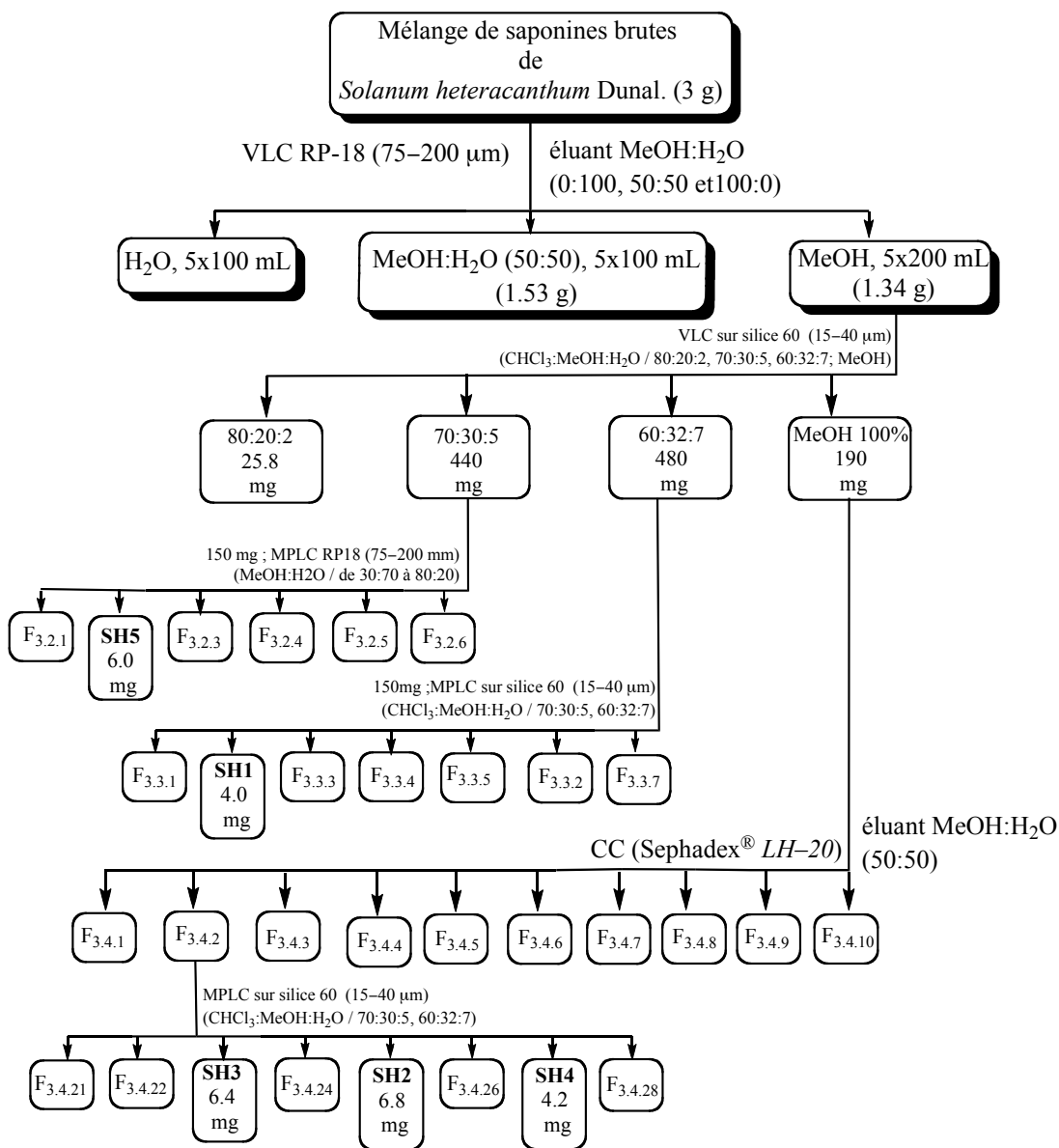
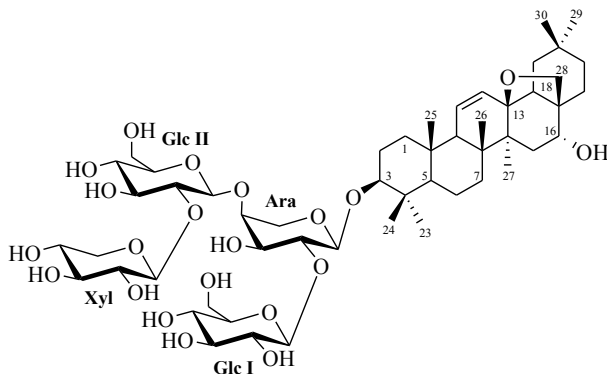
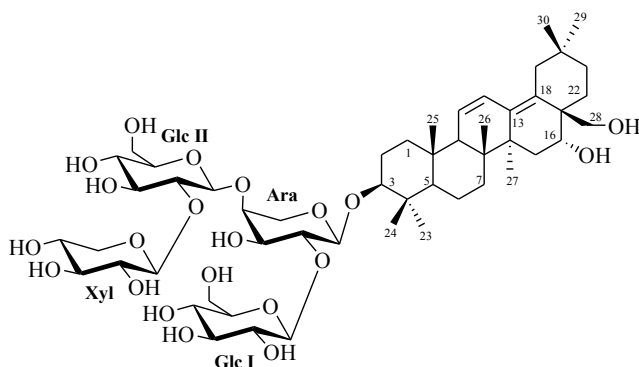
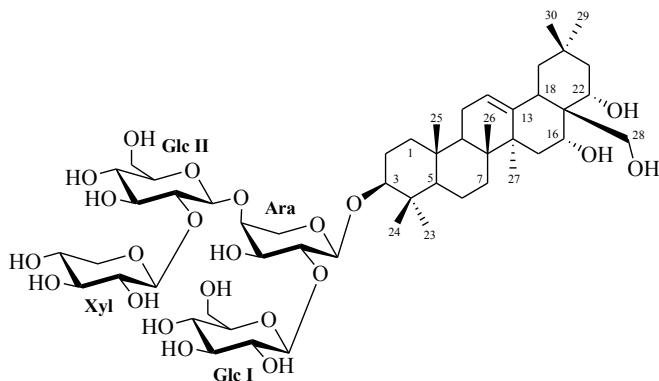
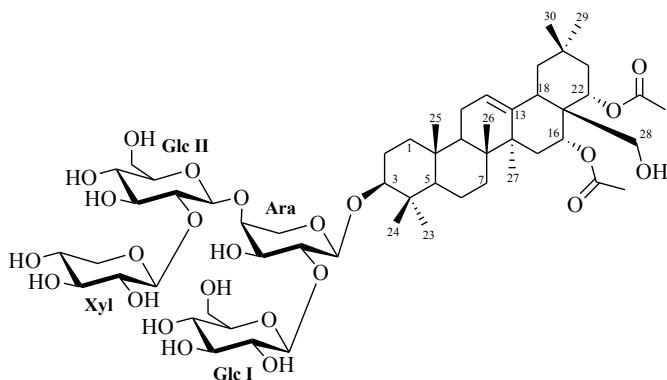


Figure B.5– Schéma d’isolement de saponines brutes à partir de *Solanum heteracanthum* Dunal.

## C. Caractéristiques des composés isolés.

**PC1****Formule brute:**  $C_{52}H_{84}O_{21}$ **HR-ESI-MS**  $m/z$  1067.5403  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{52}H_{84}O_{21}Na$ , 1067.5379)**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1043  $[M - H]^-$ , 911  $[(M - H) - 132]^-$ , 749  $[(M - H) - 132 - 162]^-$ , et 587  $[(M - H) - 132 - 162 - 162]^-$ **RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz)Poudre blanche, amorphe.  $[\alpha]_D^{20} + 70.0$  (c 0.1, MeOH)**PC2****Formule brute:**  $C_{52}H_{84}O_{21}$ **HR-ESI-MS**  $m/z$  1067.5567  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{52}H_{84}O_{21}Na$ , 1067.5379)**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1043  $[M - H]^-$ **RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz)Poudre blanche, amorphe.  $[\alpha]_D^{20} + 33.3$  (c 0.03, MeOH)**PC3****Formule brute:**  $C_{52}H_{86}O_{22}$ **HR-ESI-MS**  $m/z$  1085.5678  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{52}H_{86}O_{22}Na$ , 1085.5484)**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1061  $[M - H]^-$ , 929  $[(M - H) - 132]^-$ , et 767  $[(M - H) - 132 - 162]^-$ **RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz)Poudre blanche, amorphe.  $[\alpha]_D^{20} + 175.0$  (c 0.1, MeOH)

**PC4**



**Formule brute:**  $C_{56}H_{90}O_{24}$

**HR-ESI-MS**  $m/z$  1169.5888  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{56}H_{90}O_{24}Na$ , 1169.5694)

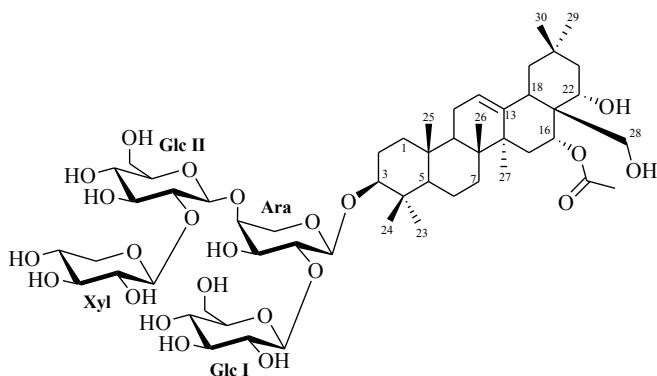
**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1145  $[M - H]^-$ , 1103  $[(M - H) - 42]^-$ , 971  $[(M - H) - 42 - 132]^-$ , et 809  $[(M - H) - 42 - 132 - 162]^-$

**RMN- $^1H$**  (pyridine- $d_5$ , 600 MHz)

**RMN- $^{13}C$**  (pyridine- $d_5$ , 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe.  $[\alpha]_D^{20} + 70.0$  (c 0.1, MeOH)

**PC5 (apoanagallosaponin IV)**



**Formule brute:**  $C_{54}H_{88}O_{23}$

**HR-ESI-MS**  $m/z$  1127.5788  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{54}H_{88}O_{23}Na$ , 1127.5614)

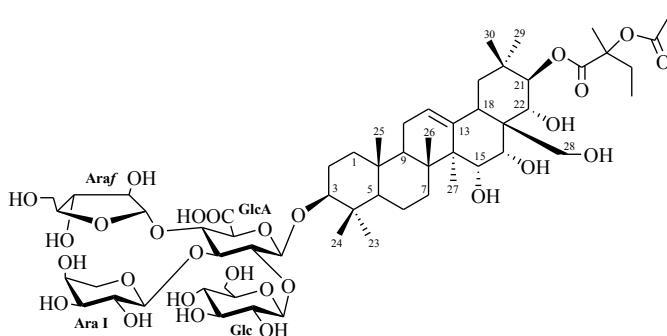
**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1103  $[M - H]^-$ , 971  $[(M - H) - 132]^-$ , et 809  $[(M - H) - 132 - 162]^-$

**RMN- $^1H$**  (pyridine- $d_5$ , 600 MHz)

**RMN- $^{13}C$**  (pyridine- $d_5$ , 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe.  $[\alpha]_D^{20} - 37.5$  (c 0.1, MeOH) [Shoji et al., 1994]

**PV1**



**Formule brute:**  $C_{59}H_{94}O_{28}$

**HR-ESI-MS**  $m/z$  1273.6757  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{59}H_{94}O_{28}Na$ , 1273.5829)

**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1249  $[M - H]^-$ , 1117  $[(M - H) - 132]^-$

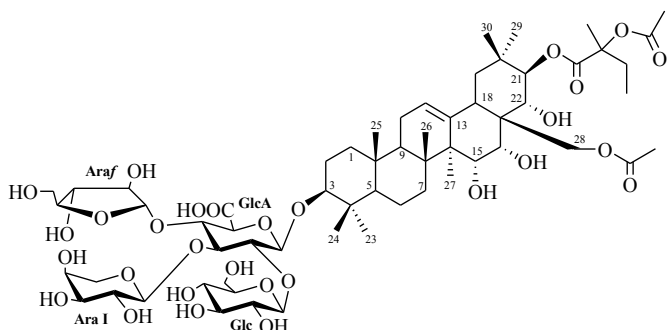
**RMN- $^1H$**  (pyridine- $d_5$ , 600 MHz)

**RMN- $^{13}C$**  (pyridine- $d_5$ , 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe.  $[\alpha]_D^{25} - 25.4$  (c 0.08, MeOH) [Manase et al., 2013]



**PV2**



**Formule brute:** C<sub>61</sub>H<sub>96</sub>O<sub>29</sub>

**HR-ESI-MS** *m/z* 1315.7056 [M + Na]<sup>+</sup> (calc. pour C<sub>61</sub>H<sub>96</sub>O<sub>29</sub>Na, 1315.5935)

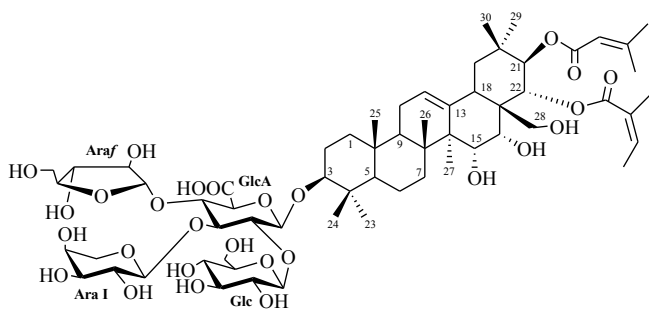
**FAB-MS** (glycerol matrix) *m/z* 1291 [M – H]<sup>–</sup>, 1159 [(M – H) – 132]<sup>–</sup>

**RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)

**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe. [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> – 17.9 (*c* 0.06, MeOH) [Manase et al., 2013]

**PV3**



**Formule brute:** C<sub>62</sub>H<sub>96</sub>O<sub>27</sub>

**HR-ESI-MS** *m/z* 1295.7063 [M + Na]<sup>+</sup> (calc. pour C<sub>62</sub>H<sub>96</sub>O<sub>27</sub>Na, 1295.6037)

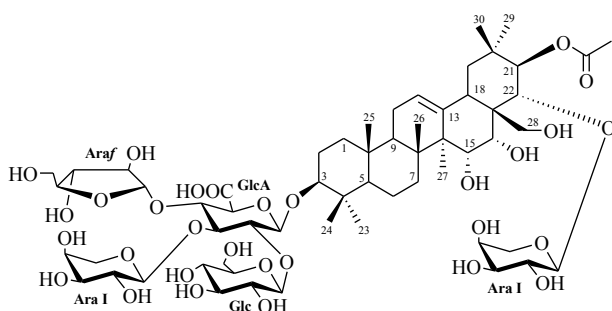
**FAB-MS** (glycerol matrix) *m/z* 1271 [M – H]<sup>–</sup>, 1139 [(M – H) – 132]<sup>–</sup>, 1007 [(M – H) – 132 – 132]<sup>–</sup> et 845 [(M – H) – 132 – 132 – 162]<sup>–</sup>

**RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)

**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe. [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> – 14.2 (*c* 0.03, MeOH) [Manase et al., 2013]

**PV4 (seneciapittoside B)**



**Formule brute:** C<sub>59</sub>H<sub>94</sub>O<sub>30</sub>

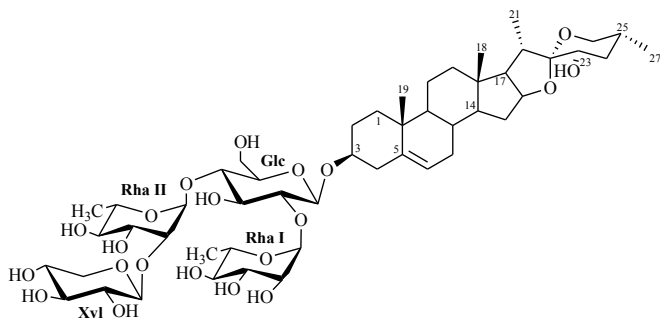
**HR-ESI-MS** *m/z* 1305.5731 [M + Na]<sup>+</sup> (calc. pour C<sub>59</sub>H<sub>94</sub>O<sub>30</sub>Na, 1305.5728)

**FAB-MS** (glycerol matrix) *m/z* 1281 [M – H]<sup>–</sup>

**RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)

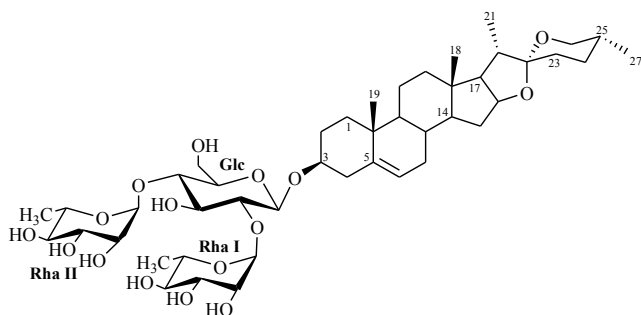
**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz),

Poudre blanche, amorphe. [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> – 9.5 (*c* 0.05, MeOH) [Linnek et al., 2012]

**SI1****Formule brute:**  $C_{50}H_{80}O_{21}$ **HR-ESI-MS**  $m/z$  1039.5090  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{59}H_{94}O_{28}Na$ , 1039.5089)**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1015  $[M - H]^-$ , 883  $[(M - H) - 132]^-$  et 737  $[(M - H) - 132 - 146]^-$ **RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz)

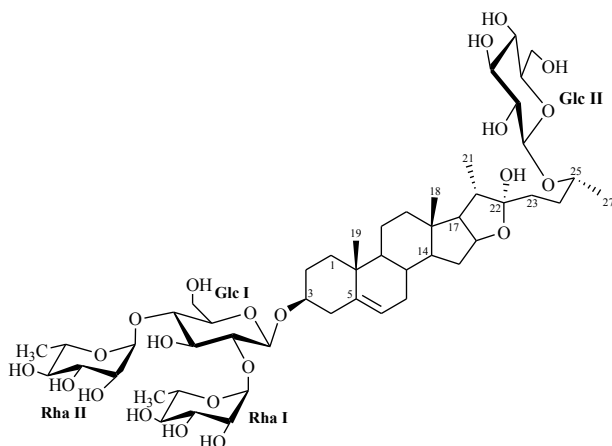
Poudre blanche, amorphe.

[Manase et al., 2012]

**SI2 (dioscine)****Formule brute:**  $C_{45}H_{72}O_{16}$ **HR-ESI-MS**  $m/z$  891.4805  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{45}H_{72}O_{16}Na$ , 891.4718)**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  867  $[M - H]^-$ , 721  $[(M - H) - 146]^-$ **RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz)

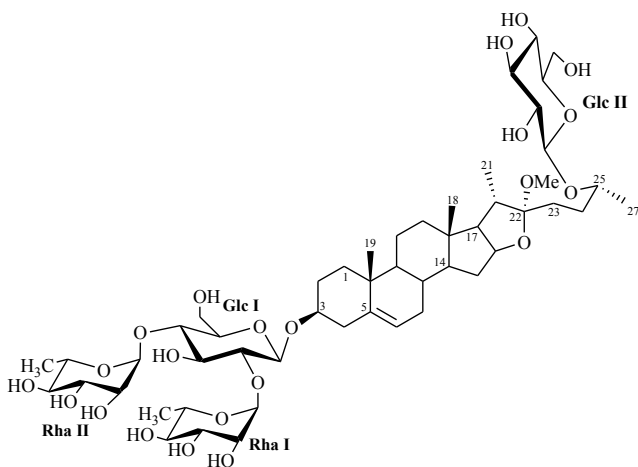
Poudre blanche, amorphe.

[Hirai et al., 1984; Ju et al., 1992; Huang et al., 2009]

**SI3 (protodioscine)****Formule brute:**  $C_{51}H_{84}O_{22}$ **HR-ESI-MS**  $m/z$  1071.5389  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{51}H_{84}O_{22}Na$ , 1071.5352)**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1047  $[M - H]^-$ , 901  $[(M - H) - 146]^-$ , 755  $[(M - H) - 146 - 162]^-$ , et 593  $[(M - H) - 146 - 162 - 146]^-$ **RMN-<sup>1</sup>H** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz)**RMN-<sup>13</sup>C** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe.

[Shao et al., 1997; Huang et al., 2009]

**SI4 (méthyl-protodioscine)**

**Formule brute:**  $C_{52}H_{86}O_{22}$

**HR-ESI-MS**  $m/z$  1085.5796  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{52}H_{86}O_{22}Na$ , 1085.5508)

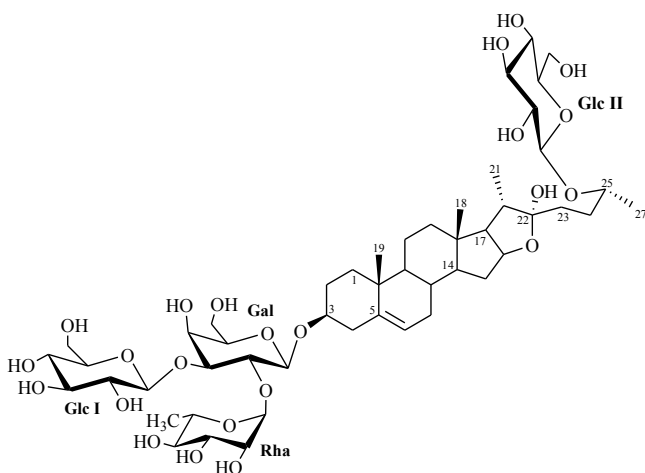
**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1061  $[M - H]^-$ , 915  $[(M - H) - 146]^-$ , 753  $[(M - H) - 146 - 162]^-$ , et 607  $[(M - H) - 146 - 162 - 146]^-$

**RMN- $^1H$**  (pyridine- $d_5$ , 600 MHz)

**RMN- $^{13}C$**  (pyridine- $d_5$ , 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe.

[Shao et al., 1997; Huang et al., 2009]

**SI5 (indioside D)**

**Formule brute:**  $C_{51}H_{84}O_{23}$

**HR-ESI-MS**  $m/z$  1087.5278  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{51}H_{84}O_{23}Na$ , 1087.5301)

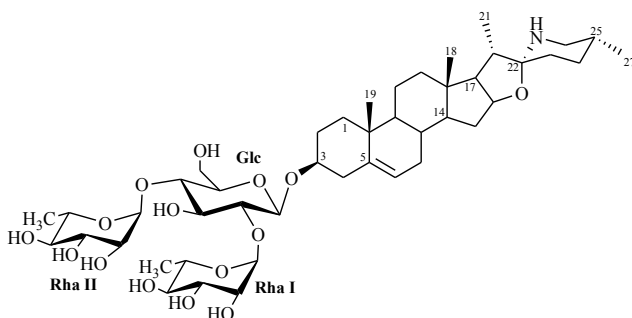
**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  1063  $[M - H]^-$ , 901  $[(M - H) - 162]^-$ , et 739  $[(M - H) - 162 - 162]^-$

**RMN- $^1H$**  (pyridine- $d_5$ , 600 MHz)

**RMN- $^{13}C$**  (pyridine- $d_5$ , 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe.

[Yahara et al., 1996; Ono et al., 2006]

**SH5 (solamargine)**

**Formule brute:**  $C_{45}H_{73}O_{15}N$

**HR-ESI-MS**  $m/z$  890.4932  $[M + Na]^+$  (calc. pour  $C_{45}H_{73}O_{15}NNa$ , 890.4878)

**FAB-MS** (glycerol matrix)  $m/z$  866  $[M - H]^-$ , et 720  $[(M - H) - 146]^-$

**RMN- $^1H$**  (pyridine- $d_5$ , 600 MHz)

**RMN- $^{13}C$**  (pyridine- $d_5$ , 150 MHz)

Poudre blanche, amorphe.

[Puri et al., 1994; Wanyonyi et al., 2002]



# Chapitre VI.

## ANNEXE



## A. Publications.

Fitoterapia 83 (2012) 1115–1119



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Fitoterapia

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fitote](http://www.elsevier.com/locate/fitote)

## *Solanum incanum* and *S. heteracanthum* as sources of biologically active steroid glycosides: Confirmation of their synonymy

Mahenina Jaovita Manase<sup>a</sup>, Anne-Claire Mitaine-Offer<sup>a</sup>, David Pertuit<sup>a</sup>, Tomofumi Miyamoto<sup>b</sup>, Chiaki Tanaka<sup>b</sup>, Stéphanie Delemasure<sup>c</sup>, Patrick Dutartre<sup>c</sup>, Jean-François Mirjolet<sup>d</sup>, Olivier Duchamp<sup>d</sup>, Marie-Aleth Lacaille-Dubois<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> EA 4267 (FDE/UFC), Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7, Bd. Jeanne D'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France

<sup>b</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812–8582, Japan

<sup>c</sup> Cohiro, UFR de Médecine de Dijon, 7, Bd. Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France

<sup>d</sup> Oncodesign, 20 rue Jean Mazon, BP 27627, 21076 Dijon Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 January 2012

Accepted in revised form 25 April 2012

Available online 2 May 2012

## Keywords:

*Solanum incanum**Solanum heteracanthum*

Steroidal saponins

Steroidal glycoalkaloid

Cytotoxicity

Antioxidant

## ABSTRACT

A new spirostanol saponin (**1**), along with four known saponins, dioscin (**2**), protodioscin (**3**), methyl-protodioscin (**4**), and indioside D (**5**), and one known steroid glycoalkaloid solamargine (**6**) were isolated from the two synonymous species, *Solanum incanum* and *S. heteracanthum*. The structure of the new saponin was established as (23S,25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ ,23-diol 3-O-[[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside, by using a combination of 1D and 2D NMR techniques including <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, TOCSY, NOESY, HSQC and HMBC experiments and by mass spectrometry. The compounds **1**, **3**, **4** and **5** were evaluated for cytotoxicity against five cancer cell lines and for antioxidant and cytoprotective activity.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The Solanaceae family is one of the best-studied groups of plants, in which there are still many unsolved questions concerning the relations among its members [1]. *Solanum incanum* and *S. heteracanthum* belonging to the subgenus *Leptostemonum* section *Melongena* are considered as synonymous species [2]. *S. incanum* is distributed throughout continental Africa, including South Africa. It is also found growing wild in Madagascar and Mauritius, where the fruits are considered edible. The whole plant of *S. incanum* has been widely used as a folk medicine for treating various diseases in Africa as indicated in the following examples. In Senegal a maceration of the leaves is used as an eye bath to cure ophthalmia. In Malawi, fruit sap is rubbed into scarifications around the eye to treat conjunctivitis. In Uganda, Tanzania and South Africa, extracts of leaves or

flowers are used as ear drops to cure inflammations and so on [3]. However, no studies have been reported on *S. heteracanthum*. Numerous *Solanum* species yielded a great variety of steroidal saponins and glycoalkaloids and are of interest from both ecological and human health points of view [4]. In this paper, we will try to see chemically the existence of synonymy between these two species. Thus, we report here the isolation and structure elucidation of a new spirostanol glycoside and five known steroid saponins present in both species. Their structures were unambiguously elucidated by 1D and 2D NMR experiments, including COSY, TOCSY, HSQC, HMBC spectroscopy and mass analyses. Furthermore, we assessed the biological activity of four of them (cytotoxicity and antioxidant activity).

## 2. Experimental

## 2.1. General

Optical rotations were recorded on a AA-OR automatic polarimeter. The 1D and 2D NMR spectra (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY,

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

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

TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC) were performed using a UNITY-600 spectrometer at the operating frequency of 600 MHz on a Varian INOVA 600 instrument equipped with a SUN 4 L-X computer system (600 MHz for  $^1\text{H}$  and 150 MHz for  $^{13}\text{C}$  spectra). Conventional pulse sequences were used for COSY, HSQC, and HMBC spectra. TOCSY spectra were acquired using the standard MLEV17 spin-locking sequence 90 ms mixing time. The mixing time in the NOESY experiment was set to 500 ms. The carbon type ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ) was determined by DEPT experiments. All chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm, and the samples were solubilized in pyridine- $d_5$  ( $\delta_c$  150.3, 155.9, 123.9). The NMR experiments of certain compounds were recorded in pyridine- $d_5$  on a Varian VNMR-S 600 MHz [5]. HRESIMS (positive-ion mode) was carried out on a Q-TOF 1-micromass spectrometer. FABMS (negative-ion mode, glycerol matrix) on a JEOL SX 102 mass spectrometer. GC analysis was carried out on a Thermoquest gas chromatograph. Isolations were carried out using vacuum liquid chromatography (VLC) on reversed-phase RP-18 (Spherical C18, 300 Å, 75–200  $\mu\text{m}$ , Silicycle) or silica gel 60 (Merck, 15–40  $\mu\text{m}$ ), column chromatography (CC) on Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) and a medium-pressure liquid chromatographic (MPLC) system [Gilson M 303 pump, Büchi glass column (460  $\times$  15 mm and 230  $\times$  15 mm), Büchi precolumn (110  $\times$  15 mm), silica gel 60 (Merck, 15–40  $\mu\text{m}$ ), RP-18 (Spherical C18, 300 Å, 75–200  $\mu\text{m}$ , Silicycle)]. Analytical TLC and HPTLC were carried out on silica gel plates 60F254 (Merck). The spray reagent for saponins was vanillin reagent (1% vanillin in EtOH-H $_2$ SO $_4$ , 50:1).

## 2.2. Plant material

The roots of *Solanum incanum* (Solanaceae) were collected in October 2008 near University of Antsirana, Madagascar. Mr. Benja Rakotonirina, botanist of Department of Plant Biology and Ecology, Antananarivo University, Madagascar, authenticated the plant material. A voucher specimen has been deposited n° 15488 in Missouri Botanical Garden Herbarium by W.G. D'Arcy and A. Rakotozafy.

The roots of *Solanum heteracanthum* (Solanaceae) were produced and identified by Sedaherb Company, Saint-Léger sur Deune, Saône et Loire, France. A voucher specimen, n° 5102011, is kept in the Laboratory of Pharmacognosy, Université de Bourgogne, Dijon, France.

## 2.3. Extraction and isolation

The air-dried plant material of *S. incanum* (200 g) and *S. heteracanthum* (300 g) was extracted three times under reflux by MeOH-H $_2$ O (7:3, 2 L) for 1 h. After evaporation of the solvent in vacuum the resulting extracts of *S. incanum* (24 g) and *S. heteracanthum* (27 g) were obtained (SI and SH, respectively). Of SI, 6 g was then submitted to VLC [silica gel RP-18, H $_2$ O-MeOH gradient (each eluent 100 ml)] to give three fractions (F1–F3). The fraction F3 (900 mg) eluted with MeOH was then separated by CC on Sephadex LH-20 eluting with MeOH to give four subfractions (Frs. 1–4). Fr.1 was fractionated by successive MPLC [silica gel 60, CHCl $_3$ :MeOH:H $_2$ O (70:30:5 to 60:32:7)] to give **3** (10 mg). The same procedure is applied to Fr.4 yielding compound **5** (4 mg). To obtain compounds **1**, **2** and **4**, whole Fr. 2 (550 mg) was

subjected to MPLC [system A: silica gel, CHCl $_3$ :MeOH:H $_2$ O (80:20:2, 70:30:5, 60:32:7) and MeOH] to give 10 subfractions (Fr. 2.1–2.10), one of them Fr. 2.4 (6.8 mg) being the pure compound **2**. Fr. 2.6 (23.1 mg) was further purified by MPLC [system B: silica gel RP-18, H $_2$ O-MeOH gradient], yielding compound **1**. Fraction Fr. 2.7 (94 mg) was subjected to successive MPLC (system A) and MPLC on RP-18 silica gel (system B) yielding compound **4** (27 mg).

An aliquot of SH, 3 g was used to isolate individual compounds. The procedures for isolation and purification are the same as that of SI; VLC on reversed-phase RP-18 and silica gel 60, CC on Sephadex LH-20 and successive MPLC on silica gel 60 and RP-18. The compounds **1** (4 mg), **3** (7.1 mg), **4** (6.4 mg), **5** (4.2 mg) and **6** (5.0 mg) were obtained in a pure form.

## 2.4. Acid hydrolysis and GC analysis

Each compound (3 mg) was hydrolyzed with 2 N aqueous CF $_3$ COOH (5 ml) for 3 h at 95 °C. After extraction with CH $_2$ Cl $_2$  (3  $\times$  5 ml), the aqueous layer was neutralized by elimination of the volatile acid using successive evaporations of the milieu in presence of MeOH. The resulting neutral fraction was analyzed by TLC over silica gel (CHCl $_3$ :MeOH:H $_2$ O, 8:5:1) in comparison with authentic samples. The trimethylsilyl thiazolidine derivatives of the sugar residue of each compound were prepared and analyzed by GC [6]. The absolute configurations were determined by comparing the retention times with thiazolidine derivatives prepared in a similar way from standard sugars (Sigma-Aldrich).

## 2.5. Cytotoxicity assays

Assays were done in two companies. One bioassay was carried out by using the MTT assay as described by Carmichael et al. [7], with two human colorectal cancer cell lines, HCT 116 and HT-29, provided by the Oncodesign Society, Dijon, France. Paclitaxel was used as a positive control, and exhibited IC $_{50}$  values of 2.65 and 2.29 nM against HCT 116 and HT-29, respectively. The second one was carried out by using the XTT assay as described by Jost et al. [8] with two human cancer cell line (colorectal SW480 and prostate DU145) and one mouse cancer cell line (mammary EMT6), provided by the Cohiro Society, Dijon, France. Etoposide was used as a positive control, and exhibited IC $_{50}$  values of 13.22  $\mu\text{M}$ , 41.6  $\mu\text{M}$  and >200  $\mu\text{M}$  against these three cell lines, respectively. Saponins were tested on SW480, DU145, and EMT6 cell lines in the concentration range 0–30  $\mu\text{M}$ .

## 2.6. Antioxidant and cytoprotective activity

Antioxidant activity was carried out according to the method of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), method described by Cao et al. [9] adapted by COHIRO Society, Dijon, France. This method is based on measuring the decay of the fluorescence of a protein, allophycocyanine (APC) up the presence of a free radical generator 2, 2'-azobis [2-amidinopropane] dihydrochloride (AAPH). The activity is expressed as  $\mu\text{M}$  of equivalent Trolox (TE) per gram of sample, which served as positive control. The values correspond to the mean of four independent experiments for



**3** and **5** and three independent experiments for **4**. Cytoprotective activity was done according to internal procedure in Cohiro Society, Dijon, according to Pesant et al. [10] adapted to the human macrophage cell line THP-1. Briefly phorbol-induced differentiated THP1 cells were pre-incubated for 1 or 24 h with tested compounds and hydrogen peroxide (Sigma) was added for 24 h at a concentration inducing between 50 and 80% cell mortality. Cytoprotection was measured by XTT test as previously described. In both experiments Trolox was used as a reference compound.

### 3. Results and discussion

After extraction by MeOH 70% of the roots of *Solanum incanum* and *S. heteracanthum*, and evaporation of the solvent, the resulting extracts were submitted to repeated VLC on reversed-phase RP-18, column chromatography on Sephadex LH-20, MPLC on normal and reversed-phase RP-18 silica gel, yielding a new steroidal glycoside **1** and five known compounds which were isolated as amorphous powders. The monosaccharides obtained by acid hydrolysis of each compound were identified by comparison on TLC with authentic samples and GC analysis as D-glucose, L-rhamnose and D-xylose for **1**; D-glucose and L-rhamnose for **2**, **3**, **4** and **6**; D-glucose, D-galactose and L-rhamnose for **5**. The known compounds **2–6** were identified by comparison of their spectral data with those reported in the literature as dioscin (**2**) [11], protodioscin (**3**) [11,12], methyl-protodioscin (**4**) [11,13], indioside D (**5**) [11,14], and solamargine (**6**) [11,15].

Compound **1** exhibited in the HRESIMS the  $[M+Na]^+$  peak at  $m/z$  1039.509, consistent with the molecular formula  $C_{50}H_{80}O_{21}$ . Its negative-ion FABMS displayed a quasimolecular ion peak at  $m/z$  1015  $[M-H]^-$ , indicating a molecular weight of 1016. Other fragment-ion peaks were observed at  $m/z$  883  $[(M-H)-132]^-$  and 737  $[(M-H)-132-146]^-$ , suggesting the elimination of one pentosyl and one desoxyhexosyl moiety, respectively. The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra in combination with DEPT, HSQC and HMBC spectra of **1** exhibited four methyls at  $\delta_H$  0.94(s), 0.91(s), 1.14 (d,  $J=6.9$  Hz) and 0.65 (d,  $J=5.24$  Hz) and a characteristic quaternary C atom resonance at  $\delta_C$  111.4 (C-22), indicating the presence of a steroidal spirostanol skeleton. The 27-methyl group in its equatorial position (*R*-configuration at C-25) was deduced by the resonances of protons and carbons at C-25 ( $\delta_H$  1.74/ $\delta_C$  31.3), C-26 ( $\delta_{H2}$  3.41, 3.50/ $\delta_C$  65.6), C-27 ( $\delta_H$  0.65, d,  $J=5.24$  Hz/ $\delta_C$  16.5), and by the NOESY cross peaks  $\delta_H$  1.74 (Agly H-25)/ $\delta_H$  3.50 (Agly H-26a), and  $\delta_H$  3.41 (Agly H-26b)/ $\delta_H$  0.65 (Agly H<sub>3</sub>-27), in comparison with literature data [16]. Moreover, the NOESY cross peak  $\delta_H$  1.74 (Agly H-25)/ $\delta_H$  3.80 (Agly H-23), and the HSQC correlation between this latter proton and the deshielded C-23 at  $\delta_C$  66.9, indicated a OH group at C-23 in its equatorial position (*S* configuration at C-23). From these results and by comparison with spectral data reported in the literature, the aglycone of **1** was identified as (23*S*, 25*R*)-spirost-5-ene-3 $\beta$ , 23-diol (isoplexigenin B) [16,17]. The  $^1H$  NMR spectrum of **1** displayed signals for four anomeric protons at  $\delta_H$  4.85 (d,  $J=5.96$  Hz), 5.05 (d,  $J=7.6$  Hz), 5.81 (s) and 6.19 (s) (Table 1), which gave correlations in the HSQC spectrum with four anomeric carbon signals at  $\delta_C$  99.8, 106.9, 101.1 and 101.7, respectively, indicating the presence of four sugar units. The evaluation of chemical

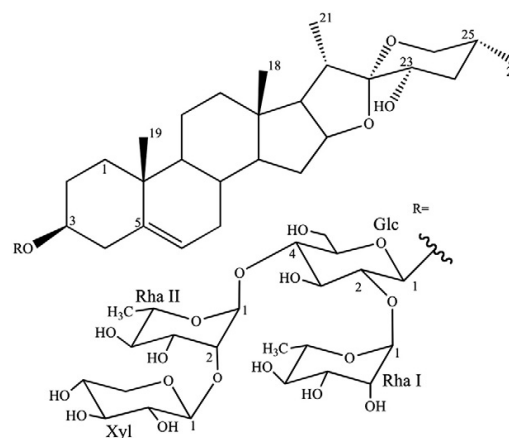
**Table 1**

$^1H$  and  $^{13}C$  NMR data for compound **1** in pyridine-*d*<sub>5</sub>,  $\delta$  in ppm ( $J$  in Hz)\*.

Position	$\delta_C$	$\delta_H$		$\delta_C$	$\delta_H$
1 CH <sub>2</sub>	37.1	0.87, 1.62	Glc		
2 CH <sub>2</sub>	29.8	1.76, 2.03	1	99.8	4.85 d (5.96)
3 CH	77.9	3.82 m	2	77.9	4.08
4 CH <sub>2</sub>	38.6	2.61 t (11.4) 2.71 d (10.5)	3	77.2	4.08
5 C	140.5	—	4	77.9	4.21
6 CH	121.5	5.27 s	5	76.6	3.65
7 CH <sub>2</sub>	31.8	1.46, 1.97	6	61.0	4.08, 4.23
8 CH	31.2	1.41	Rha I		
9 CH	49.9	0.80	1	101.7	6.19 s
10 C	36.8	—	2	71.8	4.75
11 CH <sub>2</sub>	20.7	1.34, nd	3	72.2	4.53
12 CH <sub>2</sub>	39.8	1.06, 1.67	4	73.5	4.28 t (9.5)
13 C	40.7	—	5	69.2	4.81 m
14 CH	56.4	1.04	6	18.2	1.67 d (6.2)
15 CH <sub>2</sub>	32.0	1.52, 2.00	Rha II		
16 CH	81.3	4.58 m	1	101.1	5.81 s
17 CH	62.0	1.83 t (7.7)	2	81.3	4.50 brs
18 Me	16.2	0.94 s	3	71.8	4.46
19 Me	19.0	0.91 s	4	73.5	4.17 t (9.5)
20 CH	35.4	2.96 t (6.9)	5	69.7	4.75
21 Me	14.4	1.14 d (6.9)	6	17.9	1.46 d (6.0)
22 C	111.4	—	Xyl		
23 CH	66.9	3.80	1	106.9	5.05 d (7.6)
24 CH <sub>2</sub>	38.1	1.72, 2.03	2	74.9	3.96
25 CH	31.3	1.74	3	77.6	4.05
26 CH <sub>2</sub>	65.6	3.41, 3.50 d (11.2)	4	70.4	4.05
27 Me	16.5	0.65 d (5.24)	5	66.7	3.60 t (7.8), 4.26 m

\*Overlapped signals are reported without designated multiplicity. nd: not determined.

shifts and spin-spin couplings obtained from the 2D NMR spectra allowed the identification of one  $\beta$ -glucopyranosyl (Glc), two  $\alpha$ -rhamnopyranosyl (Rha-I and Rha-II) and one  $\beta$ -xylopyranosyl (Xyl) units. The relatively large  $^3J$  value (5.96–7.60 Hz) of the anomeric proton signals of Glc and Xyl indicated a  $\beta$ -anomeric orientation. The large  $^1J$  (H-C (1, C-1)) value of both Rha (165–168 Hz) confirmed that the anomeric protons were equatorial, indicating an  $\alpha$ -pyranoid anomeric form. The linkage of Glc at C-3 of the aglycone was



**Fig. 1.** Structure of compound **1**.

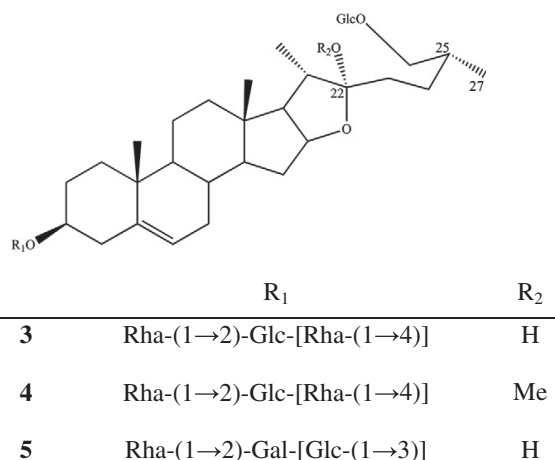


Fig. 2. Structure of compounds 3–5.

supported by the NOESY correlation between  $\delta_{\text{H}}$  4.85 (Glc H-1) and  $\delta_{\text{H}}$  3.82 (Agly H-3). Furthermore, the sequence of the oligosaccharidic chain linked at the C-3 position of the Agly was deduced by HMBC correlations between  $\delta_{\text{H}}$  6.19 (Rha I H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  77.9 (Glc C-2), between  $\delta_{\text{H}}$  5.81 (Rha II H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  77.9 (Glc C-4), and between  $\delta_{\text{H}}$  5.05 (Xyl H-1) and  $\delta_{\text{C}}$  81.3 (Rha II C-2). This sequence was confirmed by NOESY correlations  $\delta_{\text{H}}$  6.19 (Rha I H-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.08 (Glc H-2),  $\delta_{\text{H}}$  5.81 (Rha II H-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.08 (Glc H-4), and  $\delta_{\text{H}}$  5.05 (Xyl H-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.50 (Rha II H-2). Thus, the structure of **1** was elucidated as (23S,25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ ,23-diol 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1→2)-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→4)-[O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside (Fig. 1).

The isolated compounds were identical in *S. incanum* and *S. heteracanthum* from a structural point of view, contributing to the confirmation of the synonymies between both species.

Steroidal saponins were reported to possess, to varying degrees, cytotoxic activity in an NCI's (National Cancer Institute, USA) anticancer drug screening with a panel of 60 human cancer cell lines from colon cancer, prostate cancer, leukemia, central nervous system cancer, melanoma, ovarian cancer, renal cancer and breast cancer [18–24]. Therefore, we have tested compound **1**, protodioscin (**3**), methyl-protodioscin (**4**) and indioside D (**5**) (Fig. 2) for cytotoxicity against three types of human colon cancer cell lines (HT-29, HCT 116 and SW480), one human prostate carcinoma cell line

(DU145) and one mouse mammary cancer cell line (mammary EMT6). The results summarized in Table 2 showed that the new compound **1** was not cytotoxic in all the tested cells, whereas the other known compounds **3–5** showed low to moderate cytotoxic effects, depending of the cell lines.

Furthermore, we decided to test the antioxidant effect on **3–5** by the ORAC assay, since steroidal saponins were found to possess in vivo beneficial antioxidant effect [25,26]. Results show a significant antioxidant activity for compounds **3**, **4** and **5** with ORAC value of  $56 \pm 9$ ,  $193 \pm 18$  and  $77 \pm 5$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalent per gram respectively. Then compounds **4**, **5** were tested for the protection of macrophage THP1 cell line against hydrogen peroxide injury. Whatever the incubation conditions (24 or 1 h preincubation period with tested compounds at 0.1, 1, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) no cytoprotective activity was noticed while Trolox used as a reference drug was active (32% of cell protection at 1  $\mu\text{M}$ ). Namely, the cell viability of the three tested concentrations was in the range 22–24% by control, identical with the samples containing cells and  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone (22% by control).

In summary, our phytochemical investigation on two plants *S. incanum* and *S. heteracanthum* resulted in the isolation of one new (**1**), four known (**2–5**) steroid saponins and a known glykoalkaloid (**6**), which confirmed the synonymy between these two species. In the cytotoxicity assay realised on compounds **1**, **3–5**, the new compound **1**

Table 2

Cytotoxic effects of compounds **1**, **3**, **4** and **5** against five cancer cell lines (IC<sub>50</sub> values in  $\mu\text{M}$ ).

Cell line	Paclitaxel	Etoposide	<b>1</b>	Protodioscin ( <b>3</b> )	Methyl-protodioscin ( <b>4</b> )	Indioside D ( <b>5</b> )
HCT 116 <sup>+</sup>	$2.65 \times 10^{-3}$	–	$62.42 \pm 0.66$	$2.26 \pm 2.29$	$2.76 \pm 1.93$	$3.87 \pm 2.51$
HT-29 <sup>+</sup>	$2.29 \times 10^{-3}$	–	$72.24 \pm 20.62$	$3.48 \pm 3.01$	$3.30 \pm 3.00$	$5.28 \pm 0.51$
SW480 <sup>‡</sup>	–	$13.22 \pm 3.79$	> 29.53	6.68	> 28.25	20.68
DU145 <sup>‡</sup>	–	$41.26 \pm 17.57$	> 29.53	> 28.63	> 28.25	> 28.20
EMT6 <sup>‡</sup>	–	> 200	> 29.53	6.68	> 28.25	24.44

<sup>+</sup>Data represent mean values ( $\pm$  standard deviation) from two independent assays performed in triplicate. <sup>‡</sup>Data represent a single experiment. Paclitaxel and etoposide were used as positive controls.

was shown to be inactive in all the cancer cell lines (HT-29, HCT 116, SW480, DU145, EMT6). These results corroborate some literature data, in which it was suggested that the addition of hydroxyl functions on a spirostane-type saponin yielded inactive compounds [18], whereas the furostane-type saponins showed cytotoxicity depending of the cell type [18]. Additionally, even if the compounds (3–5) showed antioxidant properties using ORAC assay, they do not show any potential as cellular protectants against oxidative damage of macrophage THP1. Further phytochemical and biological studies (cytotoxic, cytoprotective and antioxidant assays) on such steroidal glycosides are warranted in order to establish some structure–activity relationships.

## References

- [1] Mino Y, Hazama T, Machida Y. Large differences in amino acid sequences among ferredoxins from several species of genus *Solanum*. *Phytochemistry* 2003;62:657–62.
- [2] Muséum national d'Histoire naturelle [Ed]. 2003–2010. Inventaire national du Patrimoine naturel, site Web: <http://inpn.mnhn.fr>. Document téléchargé le 25 août 2011.
- [3] Matu EN. *Solanum incanum* L. [Internet] Record from Protabase. In: Schmelzer GH, Gurib-Fakim A, editors. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands; 2008. <http://database.prota.org/search.htm>. Accessed 26 August 2011.
- [4] Colmenares AP, Alarcon L, Rojas LB, Mitaine-Offer AC, Pouységu L, Quideau S, et al. New steroidal alkaloids from *Solanum hypomalacophyllum*. *Nat Prod Commun* 2010;5:1743–6.
- [5] Acharya D, Mitaine-Offer AC, Kaushik N, Miyamoto T, Paululat T, Mirjole JF, et al. Cytotoxic spirostane-type saponins from the roots of *Chlorophytum borivilianum*. *J Nat Prod* 2009;72:177–81.
- [6] Hara S, Okabe H, Mihashi K. Gas–liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl) thiazolidine-4(R)-carboxylates. *Chem Pharm Bull* 1987;35:501–6.
- [7] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47:936–42.
- [8] Jost LM, Kirkwood JM, Whitesided TL. Improved short- and long term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods* 1992;147:153–65.
- [9] Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1993;14:303–11.
- [10] Pesant M, Sueur S, Dutartre P, Tallandier M, Grimaldi P, Rochette L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) activation protects H9C2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis. *Cardiovasc Res* 2006;69:440–9.
- [11] Ono M, Nishimura K, Suzuki K, Fukushima T, Igoshi K, Yoshimitsu H, et al. Steroidal glycosides from the underground parts of *Solanum sodomaeum*. *Chem Pharm Bull* 2006;54:230–3.
- [12] De Combarieu E, Fuzzati N, Lovati M, Mer calli E. Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Fitoterapia* 2003;74:583–91.
- [13] Bah M, Gutiérrez DM, Escobedo C, Mendoza S, Isela Rojas J, Rojas A. Methylprotodioscin from the Mexican medical plant *Solanum rostratum* (Solanaceae). *Biochem Syst Ecol* 2004;32:197–202.
- [14] Yahara S, Nakamura T, Someya Y, Matsumoto T, Yamashita T, Nohar T. Steroidal glycosides, indiosides A–E, from *Solanum indicum*. *Phytochemistry* 1996;43:1319–23.
- [15] Yoshikawa M, Nakamura S, Ozaki K, Kumahara A, Morikawa T, Matsuda H. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B, and antidiabetic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. *J Nat Prod* 2007;70:210–4.
- [16] Yang QX, Yang CR. Cytotoxic steroidal saponins from *Polygonatum punctatum*. *Chem Biodivers* 2006;3:1349–55.
- [17] Matsushita S, Yanai Y, Fusyuku A, Ikeda T, Ono M, Nohara T. Distinction of absolute configuration at C-22 of C-23-hydroxySpirostan and C-23-hydroxySpirosolan glycosides. *Chem Pharm Bull* 2007;55:1079–81.
- [18] Sautour M, Mitaine-Offer AC, Lacaille-Dubois MA. The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroid saponins. *J Nat Med* 2007;61:91–101.
- [19] Hu K, Yao X. Protodioscin (NSC-698 796): its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer lines in an anticancer drug screen panel. *Planta Med* 2002;68:297–301.
- [20] Hu K, Yao X. The cytotoxicity of methyl-protodioscin against human cancer cell lines in vitro. *Cancer Invest* 2003;21:389–93.
- [21] Liu M-J, Yue PY-K, Wang Z, Wong RN-S. Methyl-protodioscin induces G2/M arrest and apoptosis in K562 cells with the hyperpolarization of mitochondria. *Cancer Lett* 2005;224:229–41.
- [22] Ikeda T, Tsumagari H, Honbu T, Nohara T. Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *Solanum* plants. *Biol Pharm Bull* 2003;8:1198–201.
- [23] Wei G, Wang J, Du Y. Total synthesis of solamargine. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:2930–3.
- [24] Hu K, Kobayashi H, Dong A, Jing Y, Iwasaki S, Yao X. Antineoplastic agents III: steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. *Planta Med* 1999;65:35–8.
- [25] Amartya KG, Partha G, Upal KM, Shibnath G. Hepatoprotective and antioxidant effects of total extracts and steroidal saponins of *Solanum xanthocarpum* and *Solanum nigrum* in paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Pharmacology* 2009;1:757–68 [online].
- [26] Guohua G, Yuan Q, Wen H, Shu Z, Xiaohua W, Xiaohua Y, et al. Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Chem Biol Interact* 2010;184:366–75.



Contents lists available at ScienceDirect

Fitoterapia

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fitote](http://www.elsevier.com/locate/fitote)

## New triterpenoid estersaponins from the root barks of *Pittosporum verticillatum* subsp. *verticillatum* and evaluation of cytotoxicities



Mahenina Jaovita Manase<sup>a</sup>, Anne-Claire Mitaine-Offer<sup>a</sup>, Tomofumi Miyamoto<sup>b</sup>, Chiaki Tanaka<sup>b</sup>, Stéphanie Delemasure<sup>c</sup>, Patrick Dutartre<sup>c</sup>, Marie-Aleth Lacaille-Dubois<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> EA 4267 (FDE/UFC), Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7, Bd. Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex France

<sup>b</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

<sup>c</sup> Cohiro, UFR de Médecine de Dijon, 7, Bd. Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 July 2013

Accepted in revised form 6 September 2013

Available online 13 September 2013

#### Keywords:

*Pittosporum verticillatum*

Pittosporaceae

Triterpene saponin

Cytotoxicity

### ABSTRACT

The phytochemical investigation of the root barks of *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* led to the isolation of three new triterpene saponins, 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)]-[α-L-arabinopyranosyl-(1 → 3)]-[α-L-arabinofuranosyl-(1 → 4)]-β-D-glucuronopyranosyl-21-O-(2-acetoxy-2-methylbutanoyl)-R1-barrigenol (**1**), 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)]-[α-L-arabinopyranosyl-(1 → 3)]-[α-L-arabinofuranosyl-(1 → 4)]-β-D-glucuronopyranosyl-21-O-(2-acetoxy-2-methylbutanoyl)-28-O-acetyl-R1-barrigenol (**2**), 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)]-[α-L-arabinopyranosyl-(1 → 3)]-[α-L-arabinofuranosyl-(1 → 4)]-β-D-glucuronopyranosyl-21-O-β,β-dimethylacryloyl-22-O-angeloyl-R1-barrigenol (**3**), and one known saponin senaciapittoside B (**4**). Their structures were elucidated mainly by 1D- and 2D-NMR spectroscopy and HRESIMS. Compounds **1–4** were evaluated for their cytotoxicity against one human cancer cell line (SW480) and one rat cardiomyoblast cell line (H9c2).

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The Pittosporaceae family contains nine genera, seven of which being endemic to Australia, and another genus covering Australia, Indonesia and the Philippines. The last one, the *Pittosporum* genus including 160 species is widely distributed in tropical and subtropical areas in Africa, Asia, Australia and New Zealand. It is the only genus of the Pittosporaceae present in Malagasy flora [1]. Some species are used in traditional medicine as anti-inflammatory, antimicrobial and antispasmodic agents [2]. This genus is known as a good source of active secondary metabolites like essential oil [2,3], neolignan glycosides [4], saponins [5–7], but *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* growing in Madagascar, has never been investigated from a

chemical and pharmacological point of view. As part of our ongoing search for biologically active triterpene saponins from Pittosporaceae [7], we report in this paper the isolation and characterization of three new triterpenoid saponins (**1–3**) along with a known compound (**4**) from the ethanolic extract of *P. verticillatum* root barks. The structures were elucidated mainly by one-dimensional (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR) and two-dimensional (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC and HMBC) NMR spectroscopy, and mass spectrometry. We also evaluated their cytotoxicity against tumor cell lines.

### 2. Experimental

#### 2.1. General

Optical rotations were recorded on AA-OR automatic polarimeter. NMR experiments were performed on a UNITY-600 spectrometer at the operating frequency of 600 MHz on a Varian INOVA 600 instrument equipped with a SUN 4 L-X

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

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

computer system (600 MHz for  $^1\text{H}$  and 150 MHz for  $^{13}\text{C}$  spectra) in pyridine- $d_5$ . FABMS data (negative-ion mode, glycerol matrix) were obtained on a JEOL SX 102 mass spectrometer. HRESIMS (positive-ion mode) was measured on a Q-TOF 1-micromass spectrometer. GC analysis was carried out on a Thermoquest gas chromatograph. Isolations were performed using vacuum liquid chromatography (VLC) on reversed-phase RP-18 (Spherical C-18, 300 Å, 75–200  $\mu\text{m}$ , Silicycle) or silica gel 60 (Merck, 15–40  $\mu\text{m}$ ), and column chromatography (CC) on Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Flash chromatography was achieved using a CombiFlash RETRIEVE instrument (RediSep column silica gel 15–40  $\mu\text{m}$ , 12 g) and a medium-pressure liquid chromatographic (MPLC) system [Gilson M 303 pump, Büchi glass column (460  $\times$  15 mm and 230  $\times$  15 mm), Büchi precolumn (110  $\times$  15 mm), silica gel 60 (Merck, 15–40  $\mu\text{m}$ ), RP-18 (Spherical C-18, 300 Å, 75–200  $\mu\text{m}$ , Silicycle)]. Analytical TLC and HPTLC were carried out on silica gel plates 60 F254 (Merck). The spray reagent for saponins was vanillin reagent (1% vanillin in EtOH– $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 50:1).

## 2.2. Plant material

Dried root barks of *P. verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* var. *verticillatum* were collected from Joffreville, Antsiranana Province, Madagascar, in September 2011 and identified by Mr. Benja Rakotonirina, botanist of the Department of Plant Biology and Ecology, Antananarivo University, Madagascar, where a voucher specimen N° 20110913 was deposited.

## 2.3. Extraction and isolation

The dried, powdered root barks of *P. verticillatum* (380 g) were refluxed three times with EtOH (3  $\times$  1 L) for 1 h. After evaporation of the solvent under vacuum, 55.8 g of a crude extract was obtained. An aliquot of this extract (30 g) was submitted to VLC on normal-phase silica gel (15–40  $\mu\text{m}$ ) eluted with an isocratic solvent ( $\text{CHCl}_3$ –MeOH– $\text{H}_2\text{O}$ , 60:32:7). After evaporation of the solvent, the resulting residue (12.5 g) was fractionated by VLC on reversed-phase silica gel RP-18 eluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (5  $\times$  200 mL) and MeOH (5  $\times$  200 mL). The MeOH residue (4.1 g) was purified by flash chromatography on silica gel eluted with a gradient of  $\text{CHCl}_3$ –MeOH– $\text{H}_2\text{O}$  (80:20:2; 70:23:4; 70:30:5; 60:32:7; 0:100:0) affording twelve fractions, F<sub>1</sub>–F<sub>12</sub>. The saponin-containing fraction F<sub>7</sub> (357.9 mg) was further separated by successive MPLC [system A: silica gel (15–40  $\mu\text{m}$ ),  $\text{CHCl}_3$ –MeOH– $\text{H}_2\text{O}$  (80:20:2; 70:23:4; 70:30:5; 60:32:7; 0:100:0)/system B: reversed-phase silica gel RP-18, MeOH– $\text{H}_2\text{O}$  (30 to 100%)], giving compounds **1** (5.4 mg) and **2** (8.9 mg). Fraction F<sub>8</sub> (543.3 mg) was chromatographed by MPLC [system B], giving compound **3** (16.0 mg). Fraction F<sub>11</sub> (124.8 mg) was chromatographed by successive MPLC [system B], affording compound **4** (13.7 mg).

### 2.3.1. Compound 1

White, amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25}$  –25.4 (c 0.08, MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 150 MHz), see Tables 1, 2 and 3. Negative FABMS (glycerol matrix)  $m/z$  1249  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1117  $[(\text{M} - \text{H}) - 132]^-$ ,

**Table 1**

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) data for aglycone moieties of compounds **1–3** (pyridine- $d_5$ ,  $\delta$  in ppm)<sup>a,b</sup>.

No.	1		2		3	
	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)
1	38.6	0.65	38.5	0.64	38.5	0.61
		1.22		1.22		1.22
2	26.0	1.76	26.0	1.77	26.1	1.75
		2.04		2.02		2.02
3	90.0	3.06 d (8.1)	90.0	3.06 d (7.4)	90.0	3.04 br d
4	39.1	–	39.1	–	39.1	–
5	55.1	0.64 d (11.4)	55.1	0.63 d (11.7)	55.1	0.64 d (9.8)
6	18.4	1.40 d (11.4) <sup>b</sup>	18.4	<sup>b</sup>	18.4	<sup>b</sup>
7	36.5	1.94	36.2	1.91	36.5	1.92
		2.03		2.01		2.06
8	41.1	–	40.9	–	41.1	–
9	46.8	1.58 d (7.4)	46.7	1.56 d (7.6)	46.7	1.55 br d
10	36.5	–	36.5	–	35.9	–
11	23.6	1.74	23.7	1.78 <sup>b</sup>	23.6	1.74
		1.82				1.79
12	124.8	5.47 br s	125.4	5.49 br s	125.3	5.53 d (10.7)
13	143.7	–	143.0	–	143.1	–
14	48.1	–	47.0	–	47.0	–
15	67.3	4.19	67.1	4.17	67.5	4.16
16	72.0	4.61	71.6	4.54	72.5	4.30
17	44.8	–	47.5	–	46.8	–
18	41.1	2.84 d (15.0)	41.0	2.72 d (13.6)	40.5	3.00
19	47.5	1.3 d (9.8)	46.6	1.33 d (9.5)	46.4	1.38 d (11.2)
		2.95 t (13.2)		2.97 t (13.3)		3.00
20	35.9	–	35.8	–	35.9	–
21	82.5	6.26 d (10.0)	82.1	6.30 d (9.8)	78.1	6.56 d (10.0)
22	72.1	4.60	70.6	4.36	72.8	6.20 d (10.2)
23	27.4	1.01 s	27.4	1.00 s	27.4	1.01 s
24	16.4	0.95 s	16.4	0.93 s	16.3	0.94 s
25	15.4	0.72 s	15.4	0.71 s	15.3	0.72 s
26	17.2	0.93 s	17.3	1.05 s	17.2	0.96 s
27	21.0	1.74 s	21.0	1.74 s	20.9	1.77 s
28	64.5	3.65	65.4	4.18	62.6	3.42 d (10.0)
		3.91		4.26		3.68 d (10.5)
29	29.4	1.16 s	29.3	1.18 s	29.1	1.01 s
30	19.8	1.23 s	19.6	1.24 s	19.8	1.25 s

<sup>a</sup> Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity.

<sup>b</sup> Not determined.

HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1273.6757  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{59}\text{H}_{94}\text{O}_{28}\text{Na}$ , 1273.5829).

### 2.3.2. Compound 2

White, amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25}$  –17.9 (c 0.06, MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 150 MHz), see Tables 1, 2 and 3. Negative FABMS (glycerol matrix)  $m/z$  1291  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1159  $[(\text{M} - \text{H}) - 132]^-$ , HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1315.7056  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{61}\text{H}_{96}\text{O}_{29}\text{Na}$ , 1315.5935).

### 2.3.3. Compound 3

White, amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25}$  –14.2 (c 0.03, MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 150 MHz), see Tables 1, 2 and 3. Negative FABMS (glycerol matrix)  $m/z$  1271  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1139  $[(\text{M} - \text{H}) - 132]^-$ , 1007  $[(\text{M} - \text{H}) - 132 - 132]^-$  and 845  $[(\text{M} - \text{H}) - 132 - 132 - 162]^-$ , HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1295.7063  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{62}\text{H}_{96}\text{O}_{27}\text{Na}$ , 1295.6037).

**Table 2**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (150 MHz) data for the sugar portions of compounds **1–3** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, δ in ppm)<sup>a</sup>.

No.	1		2		3	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> mult. (J in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> mult. (J in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> mult. (J in Hz)
<i>GlcA</i>						
1	104.6	4.75 d (6.7)	104.6	4.75d (6.9)	104.6	4.72 br d
2	78.9	4.58 t (8.2)	78.6	4.57 t (8.2)	78.9	4.52 br t
3	79.6	4.49	79.6	4.47	79.5	4.43
4	75.3	4.62	75.3	4.61 t (9.1)	74.9	4.57 br t
5	78.6	4.45	78.4	4.45	78.1	4.38
6	174.1	–	174.9	–	171.9	–
<i>Glc</i>						
1	102.6	5.63 d (7.6)	102.5	5.63 d (7.6)	102.5	5.63 d (7.1)
2	75.8	3.98	75.7	3.96	75.7	3.95
3	77.8	4.25 t (8.3)	77.8	4.24	77.7	4.24 t (8.6)
4	71.9	3.94	71.9	3.91	71.8	3.92
5	78.2	3.92	78.2	3.90	78.0	3.89
6	62.7	4.13	62.7	4.12	62.6	4.12
		4.47		4.46		4.43
<i>Ara</i>						
1	103.6	5.59 d (6.9)	103.6	5.59 d (7.2)	103.5	5.55 d (7.4)
2	72.5	4.38 t (7.9)	72.4	4.37	72.4	4.36
3	73.8	4.10	73.8	4.09	73.8	4.07
4	69.2	4.11	69.2	4.11	69.2	4.10
5	66.4	3.63	66.4	3.64 d (11.4)	66.5	3.63 d (11.7)
		4.20		4.21		4.16
<i>Araf</i>						
1	108.0	6.11 s	108.5	6.10 s	107.7	6.06 s
2	81.3	4.80 br s	81.3	4.80 br s	81.3	4.75 s
3	78.5	4.47	78.4	4.44	78.4	4.43
4	86.5	4.99 d (3.1)	86.5	4.99 d (3.3)	86.4	4.98 br d
5	62.3	3.93	62.3	3.92	62.1	3.92
		3.99		3.97		3.95

<sup>a</sup> Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity.

#### 2.4. Acid hydrolysis and GC analysis

Each compound (3 mg) was hydrolyzed with 2 N aqueous CF<sub>3</sub>COOH (5 mL) for 3 h at 95 °C. After extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL), the aqueous layer was neutralized by elimination of the volatile acid using successive evaporations of the milieu in presence of MeOH. The resulting neutral fraction was analyzed by TLC over silica gel (CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O, 8:5:1) by comparison with authentic sample of sugars. The trimethylsilyl thiazolidine derivatives of the sugar residue of each compound were prepared and analyzed by GC as in Ref. [8]. The absolute configurations were determined by comparing the retention times with thiazolidine derivatives prepared in a similar way from standard sugars (Sigma-Aldrich). The following sugars were detected: L-arabinose, D-glucose, and D-glucuronic acid with standard silylated samples with *t*<sub>R</sub> 11.8, 18.6 and 15.2, respectively, from compounds **1–3**.

#### 2.5. Cytotoxicity bioassay

The triterpenoid saponins **1–4** were tested for cytotoxicity against one human cancer cell line, SW480 (colorectal adenocarcinoma), and one embryonic heart-derived cell line H9c2 (rat cardiomyoblast), by means of the XTT method

**Table 3**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (150 MHz) data for the acyl moieties of compounds **1–3** (pyridine-*d*<sub>5</sub>, δ in ppm)<sup>a,b</sup>.

No.	1		2		3	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> mult. (J in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> mult. (J in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> mult. (J in Hz)
<i>AcMbut at C-21</i>						
1'	172.5	–	172.4	–		
2'	81.8	–	81.7	–		
3'	31.3	1.99	31.2	1.97 m		
		2.16 m		2.16 m		
4'	7.5	0.98 s	7.5	0.94 s		
5'	21.2	1.70 s	21.3	1.71 s		
6'	170.4	–	170.4	–		
7'	20.9	2.00 s	20.8	2.03 s		
<i>Ac at C-28</i>						
1''			170.6	–		
2''			20.3	1.92 s		
<i>dMA at C-21</i>						
1'''					167.5	–
2'''					116.0	5.31 s
3'''					156.0	–
4'''					19.8	2.06
5'''					26.5	1.50 s
<i>Ang at C-22</i>						
1''''					168.0	–
2''''					128.2	–
3''''					137.0	5.94 d (6.7)
4''''					15.6	2.02
5''''					20.6	1.94 s

<sup>a</sup> Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity.<sup>b</sup> AcMbut: 2-acetoxy-2-methylbutanoyl, Ac: acetyl, dMA: β,β-dimethylacryloyl, Ang: angeloyl.

as described in the literature [9]. The following positive controls were used: doxorubicin (IC<sub>50</sub> 1.00 μM on SW480 and 0.50 μM on H9c2) and methotrexate (IC<sub>50</sub> > 20.00 μM on SW480 and 5.00 μM on H9c2).

### 3. Results and discussion

The EtOH extract from the root barks of *P. verticillatum* was submitted to several column chromatography steps yielding compounds **1–3** and the known seneciapittoside B (**4**) [7] (Fig. 1). All the compounds were obtained as amorphous powders. The elucidation of their structures was performed mainly by 600 MHz NMR spectroscopic analysis, including 1D- and 2D-NMR experiments, and mass spectrometry.

Compound **1** showed in the HRESIMS the [M + Na]<sup>+</sup> peak at *m/z* 1273.6757, consistent with the molecular formula C<sub>59</sub>H<sub>94</sub>O<sub>28</sub>Na. Its negative-ion in FABMS displayed a quasimolecular ion peak at *m/z* 1249 [M – H]<sup>–</sup>, indicating a molecular weight of 1250. Another fragment-ion peak was observed at *m/z* 1117 [(M – H) – 132]<sup>–</sup>, suggesting the elimination of one pentosyl moiety. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of the aglycone part exhibited seven tertiary methyl proton signals at δ<sub>H</sub> 0.72 (3H, s, H<sub>3</sub>-25), 0.93 (3H, s, H<sub>3</sub>-26), 0.95 (3H, s, H<sub>3</sub>-24), 1.01 (3H, s, H<sub>3</sub>-23), 1.16 (3H, s, H<sub>3</sub>-29), 1.23 (3H, s, H<sub>3</sub>-30), 1.74 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), one olefinic proton signal at δ<sub>H</sub> 5.47 (1H, br s, H-12) and two olefinic carbon signals at δ<sub>C</sub> 124.8 (C-12) and 143.7 (C-13), characteristic of



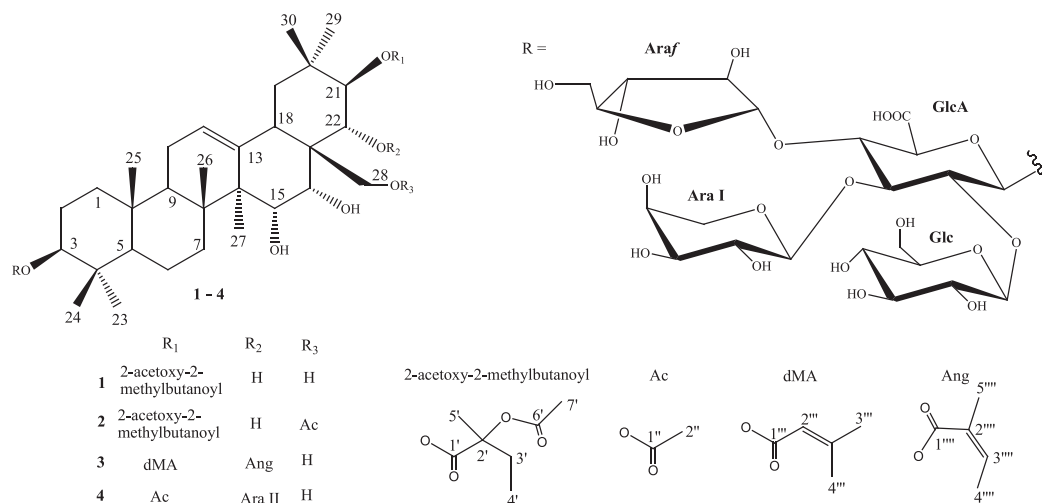


Fig. 1. Structures of compounds 1–4.

an oleanene-type skeleton. Additionally, the HSQC spectrum showed the presence of five oxygenated methines at  $\delta_{\text{H}} 3.06/\delta_{\text{C}} 90.0$ ,  $\delta_{\text{H}} 4.19/\delta_{\text{C}} 67.3$ ,  $\delta_{\text{H}} 4.60/\delta_{\text{C}} 72.1$ ,  $\delta_{\text{H}} 4.61/\delta_{\text{C}} 72.0$  and  $\delta_{\text{H}} 6.26/\delta_{\text{C}} 82.5$ , and one primary alcoholic function at  $\delta_{\text{H}} 3.65$ ,  $3.91/\delta_{\text{C}} 64.5$  suggesting a hexahydroxy-oleanene-type skeleton. The HMBC correlation between two angular methyls at  $\delta_{\text{H}} 1.16$  ( $\text{H}_3$ -29),  $1.23$  ( $\text{H}_3$ -30) with  $\delta_{\text{C}} 82.5$  suggested the location of the first oxygenated methine at C-21 which corresponds in the HSQC spectrum to the deshielded signal at  $\delta_{\text{H}} 6.26$  (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-21). Furthermore, the HMBC correlations between this signal at  $\delta_{\text{H}} 6.26$  and two carbon signals at  $\delta_{\text{C}} 172.5$  and  $72.1$ , suggested the acylation of the secondary alcoholic function at C-21, and the alcoholic function that C-22 bears. This was confirmed by the COSY cross peak at  $\delta_{\text{H}} 6.26$  (H-21)/ $\delta_{\text{H}} 4.60$  (H-22). The locations of other oxygenated methines were deduced to be at C-3, C-15 and C-16 also by HMBC cross peaks at  $\delta_{\text{H}} 1.01$  ( $\text{H}_3$ -23)/ $\delta_{\text{C}} 90.0$  (C-3),  $\delta_{\text{H}} 1.74$  ( $\text{H}_3$ -27)/ $\delta_{\text{C}} 67.3$  (C-15), and COSY cross peak at  $\delta_{\text{H}} 4.19$  (H-15)/ $\delta_{\text{H}} 4.61$  (H-16). NOESY cross peaks at  $\delta_{\text{H}} 3.06$  (H-3)/ $\delta_{\text{H}} 0.64$  (1H, d,  $J = 11.4$  Hz, H-5),  $\delta_{\text{H}} 4.19$  (H-15)/ $\delta_{\text{H}} 0.93$  ( $\text{H}_3$ -26),  $\delta_{\text{H}} 4.61$  (H-16)/ $\delta_{\text{H}} 4.19$  (H-15),  $\delta_{\text{H}} 4.60$  (H-22)/ $\delta_{\text{H}} 1.23$  ( $\text{H}_3$ -30), and  $\delta_{\text{H}} 6.26$  (H-21)/ $\delta_{\text{H}} 1.16$  ( $\text{H}_3$ -29), revealed the  $\alpha$ -orientation of H-3 and H-21, and  $\beta$ -orientation of H-15, H-16 and H-22, confirming the stereochemistry of the aglycone identified as the known triterpene, R1-barrigenol [7,10]. The  $^{13}\text{C}$  NMR signals at  $\delta_{\text{C}} 172.5$  ( $\text{C}_1'$ ),  $81.8$  ( $\text{C}_2'$ ),  $31.3$  ( $\text{C}_3'$ ),  $7.5$  ( $\text{C}_4'$ ),  $21.2$  ( $\text{C}_5'$ ),  $170.2$  ( $\text{C}_6'$ ), and  $20.9$  ( $\text{C}_7'$ ) assigned from HSQC and HMBC experiments were characteristic of 2-acetoxy-2-methylbutanoyl group (Table 3) [6]. The HMBC correlation at  $\delta_{\text{H}} 6.26$  (H-21)/ $\delta_{\text{C}} 172.5$ ,  $72.1$  revealed its location at C-21. The acylated aglycone of **1** was thus reported for the first time as 21-O-(2-acetoxy-2-methylbutanoyl)-R1-barrigenol. The sugar part of **1** consisted of four residues as evidenced by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra which displayed four anomeric protons at  $\delta_{\text{H}} 4.75$  (1H, d,  $J = 6.7$  Hz),  $5.59$  (1H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $5.63$  (1H, d,  $J = 7.6$  Hz),

and  $6.11$  (1H, s), giving correlations to four anomeric carbons at  $\delta_{\text{C}} 104.6$ ,  $103.6$ ,  $102.6$ , and  $108.0$ , respectively in the HSQC spectrum. Acid hydrolysis, GC analysis (see Section 2.4), and analysis of COSY, TOCSY, NOESY and HSQC experiments allowed the full identification of the sugar residues as one  $\beta$ -D-glucuronopyranosyl acid (GlcA), one  $\beta$ -D-glucopyranosyl (Glc), one  $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (Ara), and one  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl (Araf) (Table 2). The NOESY cross peak at  $\delta_{\text{H}} 4.75/\delta_{\text{H}} 3.06$  (GlcA H-1/Agly H-3), and the HMBC correlation between  $\delta_{\text{H}} 5.63/\delta_{\text{C}} 78.9$  (Glc H-1/GlcA C-2),  $\delta_{\text{H}} 5.59/\delta_{\text{C}} 79.6$  (Ara H-1/GlcA C-3), and  $\delta_{\text{H}} 6.11/\delta_{\text{C}} 75.3$  (Araf H-1/GlcA C-4) revealed the sequence [Glc-(1  $\rightarrow$  2)]-[Ara-(1  $\rightarrow$  3)]-[Araf-(1  $\rightarrow$  4)]-GlcA to be linked at Agly C-3. Consequently, the structure of **1** was concluded to be 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21-O-(2-acetoxy-2-methylbutanoyl)-R1-barrigenol.

Compound **2** showed in the HRESIMS the  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  peak at  $m/z$  1315.7056, consistent with the molecular formula  $\text{C}_{61}\text{H}_{96}\text{O}_{29}\text{Na}$ . Its negative-ion FABMS displayed a quasi-molecular ion peak at  $m/z$  1291  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , indicating a molecular weight of 1292. Another fragment-ion peak was observed at  $m/z$  1159  $[(\text{M} - \text{H}) - 132]^-$ , suggesting the elimination of one pentosyl moiety. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **2** (Tables 1, 2 and 3) showed 61 carbon signals, 30 of which were assigned to the aglycone, 22 to the sugar moieties, and the remaining nine signals to one acetyl and one 2-acetoxy-2-methylbutanoyl groups. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signals of **2** assigned from 2D-NMR spectra were almost similar with those of **1** except for the aglycone part at C-28. The deshielded primary alcoholic proton signals at  $\delta_{\text{H}} 4.18$  and  $4.26$  (instead of  $\delta_{\text{H}} 3.65$ ,  $3.91$  in **1**) which were HSQC-correlated with  $\delta_{\text{C}} 65.4$ , and the characteristic signals of one acetyl group, with  $^{13}\text{C}$  NMR signals at  $\delta_{\text{C}} 170.6$  and  $20.3$ , suggested the acetylation at C-28 [11]. HMBC correlations at  $\delta_{\text{H}} 4.36$  (1H, H-22)/ $\delta_{\text{C}} 65.4$  (C-28),  $82.1$  (C-21) confirmed the presence of the signal C-28 at  $\delta_{\text{C}} 65.4$ , consequently with the acylation at this position.

Thus, this diacylated derivative of R1-barrigenol elucidated as 21-O-(2-acetoxy-2-methylbutanoyl)-28-O-acetyl-R1-barrigenol, is described here for the first time. Accordingly, the structure of **2** was elucidated as 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21-O-(2-acetoxy-2-methylbutanoyl)-28-O-acetyl-R1-barrigenol.

Compound **3** showed in the HRESIMS the  $[M + Na]^+$  peak at  $m/z$  1295.7063, consistent with the molecular formula  $C_{62}H_{96}O_{27}Na$ . Its negative-ion FABMS displayed a quasi-molecular ion peak at  $m/z$  1271  $[M - H]^-$ , indicating a molecular weight of 1272. Fragment-ion peaks were observed at  $m/z$  1139  $[(M - H) - 132]^-$ , 1007  $[(M - H) - 132 - 132]^-$  and 845  $[(M - H) - 132 - 132 - 162]^-$ , suggesting the elimination of two pentosyl and one hexosyl units. The  $^{13}C$  NMR spectrum of **3** (Tables 1, 2 and 3) showed 62 carbon signals, 30 of which were assigned to the aglycone, 22 to the sugar moieties, and the 10 remaining signals to one angeloyl and one dimethylacryloyl residues. The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR signals of **3** assigned from 2D-NMR spectra (Tables 1, 2, 3) were almost superimposable to those of **1** and **2**, except for the signals of the aglycone part at C-21 and C-22 and the nature of the acyl residues. Two vinylic methyl groups at  $\delta_H$  1.50 (3H, s) and 2.06 (3H), which correlated in the HMBC spectrum with one ethylene quaternary carbon at  $\delta_C$  156.0 and an ethylene methine carbon at  $\delta_C$  116.0, revealed the presence of a  $\beta,\beta$ -dimethylacrylic acid, whereas the HMBC correlation at  $\delta_H$  6.56 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-21)/ $\delta_C$  167.5 supported its location at C-21. In the COSY spectrum, two vinylic methyl groups at  $\delta_H$  1.94, and 2.02 correlating with one ethylene methine at  $\delta_H$  5.94 revealed the presence of an angeloyl residue, which was confirmed by the HMBC correlations at  $\delta_H$  1.94/ $\delta_C$  168.0, 128.2, and 137.0. Its location at C-22 was deduced by the HMBC cross-peak at  $\delta_H$  6.20 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-22)/ $\delta_C$  168.0. Therefore, the diacylated aglycone part of **3** was characterized as 21-O- $\beta,\beta$ -dimethylacryloyl-22-O-angeloyl-R1-barrigenol, which is reported for the first time. However, its structural analog has been characterized by Seo et al. [5] as 21-O-angeloyl-22-O- $\beta,\beta$ -dimethylacryloyl-R1-barrigenol in *Pittosporum viridiflorum* from Madagascar. Thus, the structure of **3** was elucidated as 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21-O- $\beta,\beta$ -dimethylacryloyl-22-O-angeloyl-R1-barrigenol.

The known compound **4** was identified by comparison of spectroscopic data with literature values as seneciapittoside B that was previously isolated from *Pittosporum senacia* Putterlick [7].

Since the saponins were reported to possess cytotoxic activity [12,13], compounds **1–4** were tested against one human colorectal adenocarcinoma cell line (SW480), and one rat embryonic heart-derived cell line (H9c2, cardiomyoblast), by XTT assay (Table 4) [9]. Among them, compound **3** exhibited a moderate cytotoxicity on SW480 cell line, which was however higher than the positive control methotrexate, whereas a weak activity was observed on the H9c2 cell line. Compounds **1**, **2** and **4** were shown to be inactive on both cell types. All compounds (**1–4**) were inactive in comparison with the positive control doxorubicin. All these results taken together showed a marginal cytotoxicity of the saponins of

**Table 4**  
Cytotoxic activities of saponins **1–4** of *P. verticillatum* <sup>a,b</sup>.

Compounds	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	
	SW480	H9c2
Doxorubicin	1.00	0.50
Methotrexate	>20.00	5.00
<b>1</b>	>24.00	>24.00
<b>2</b>	17.03	>23.22
<b>3</b>	12.19	17.30
<b>4</b>	>23.40	>23.40

<sup>a</sup> Cancer cell lines used were SW480 (human colon), and H9c2 (rat cardiomyoblast). Results are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

<sup>b</sup> Doxorubicin and methotrexate were used as positive control.

*P. verticillatum* as it was previously reported for the structural analog of **3** isolated from *Pittosporum viridifolium* [5].

#### Acknowledgments

The authors are thankful to Mr. Benja Rakotonirina, botanist of the Department of Plant Biology and Ecology (Madagascar), who collected the plant material.

#### References

- [1] Cufodontis G. 92e Famille Pittosporacées. In: Humbert H, Gouvernement générale de Madagascar, editors. Flore de Madagascar et des Comores (plantes vasculaires). Typographie Firmin-Didot et Cie, Paris; 1955. p. 1–6 [33–39].
- [2] Ferreira NJ, Meireles de Sousa IG, Luís TC, Currais AJM, Figueiredo AC, Costa MM, et al. *Pittosporum undulatum* Vent. grown in Portugal: secretory structures, seasonal variation and enantiomeric composition of its essential oil. *Flavour Frag J* 2007;22:1–9.
- [3] Sadashiva CT, Sharanappa P, Remashree AB, Raghu AV, Udayan PS, Balachandran I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from bark of *Pittosporum dasycaulon* Miq. *Adv Biol Res* 2010;4:301–4.
- [4] Zhao H, Nie T, Guo H, Li J, Bai H. Two new neolignan glycosides from *Pittosporum glabratum* Lindl. *Phytochem Lett* 2012;5:240–3.
- [5] Seo Y, Berger JM, Hoch J, Neddermann KM, Bursucker I, Mamber SW, et al. A new triterpene saponin from *Pittosporum viridiflorum* from the Madagascar rainforest. *J Nat Prod* 2002;65:65–8.
- [6] D'Acquarica I, Di Giovanni MC, Gasparrini F, Misiti D, D'Arrigo C, Fagnano N, et al. Isolation and structure elucidation of four new triterpenoid estersaponins from fruits of *Pittosporum tobira* AIT. *Tetrahedron* 2002;58:10127–36.
- [7] Linnek J, Mitaine-Offer AC, Paululat T, Lacaille-Dubois MA. Two new triterpenoid saponins from *Pittosporum senacia* Putterlick (Pittosporaceae). *Magn Reson Chem* 2012;50:798–802.
- [8] Hara S, Okabe H, Mihashi K. Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)thiazolidine-4(R)-carboxylates. *Chem Pharm Bull* 1987;35:501–6.
- [9] Jost LM, Kirkwood JM, Whitesided TL. Improved short-and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods* 1992;147:153–65.
- [10] Kartal M, Mitaine-Offer AC, Abu-Asaker M, Miyamoto T, Calis I, Wagner H, et al. Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Chem Pharm Bull* 2005;53:1318–20.
- [11] Kartal M, Mitaine-Offer AC, Paululat T, Abu-Asaker M, Wagner H, Mirjolet JF, et al. Triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *J Nat Prod* 2006;69:1105–8.
- [12] Lacaille-Dubois MA. Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. In: Atta-Ur-Rahman, editor. *Studies in natural products chemistry series*, vol. 32. Amsterdam: Elsevier; 2005. p. 209–46.
- [13] Dinda B, Debnath S, Mohanta BC, Harigaya Y. Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chem Biodivers* 2010;7:2327–567.



## B. Communications orales, Posters.

### 1. 18<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, «Poster n° 23»

*Solanum incanum* et *S. heteracanthum*, sources de glucosides stéroïdiques biologiquement actifs: Confirmation de leur synonymie. Besançons, 06–07 septembre 2012, France.

### 2. International Congress on Natural Products Research (ICNRP), «Poster I262»

Phytochemical and biological studies of two synonymy species of *solanum* : *S. incanum* and *S. heteracanthum*. *Planta Medica* 78 (2012) 1204. New-York 28.07.2012–02.08.2012, USA.

### 3. 1<sup>er</sup> Congrès international de la Société Algérienne de nutrition, «Poster n° 118 »

*Solanum incanum* et *S. heteracanthum*, sources de glucosides stéroïdiques biologiquement actifs: Confirmation de leur synonymie. Oran, 05–06 décembre 2012, Algérie.

### 4. AFERP & STOLON, International Symposium, «Poster n° 27 »

*Polycarpaea corymbosa* as source of cytotoxic triterpenoids. Brussels, 22–24 May 2013.

### 5. 19<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, «Communication orale»

Nouvelles saponines triterpéniques cytotoxiques de *Polycarpaea corymbosa*. Dijon 13–14 Juin 2013, France.

## C. Glossaire Botanique.

[Marouf et Reynaud, 2007 ; Botineau, 2010 ; Jouy, 2010]

### **albumen (n. m.)**

Tissu de réserve (triploïde) de la graine des Angiospermes, riche en amidon et qui sera consommé par l'embryon.

### **alterne (adj.)**

Qualifie les organes homologues (feuilles, bractées, rameaux) qui se trouvent placés de part et d'autre de la tige ou d'une ramification sans être en face les uns des autres.

### **androcée (n. m.)**

Ensemble des étamines, qui se situe dans la fleur entre les pétales et le gynécée ; le nombre et la disposition des étamines permet de qualifier l'androcée (diadelphie, didyname, oligostémone,...).

### **annuelle (adj.)**

Se dit d'une plante dont le cycle de vie (étapes séparant la germination de la production des graines) se déroule sur une période inférieure à un an.

### **anthocyane (n.f.)**

Pigment colorant les vacuoles de certaines cellules végétales, leur conférant une couleur rouge, violette ou bleue, selon que le suc vacuolaire est acide, neutre ou alcalin.

### **axillaire (adj.)**

Qualifie un bourgeon ou une fleur située à l'aisselle du pétiole d'une feuille ou d'un rameau.

### **baie (n.f.)**

Fruit indéhiscent avec endocarpe et épicarpe membraneux, et mésocarpe charnu, dépourvu de noyau ; la pulpe, entièrement molle, contient une (baie monosperme) ou plusieurs (baie polysperme) graines (aussi appelées pépins).

**bétalaïne (n.f.)**

Pigment azoté confèrent aux plantes qui en contiennent une coloration rougeâtre typique ; les bétalaïnes remplacent les anthocyanes chez la plupart des familles de l'ordre des CARYOPHYLLALES, à l'exception notable des CARYOPHYLLACEAE.

**bractée (n.f.)**

Petit organe foliacé ou membraneux souvent coloré différemment des feuilles, à l'aisselle duquel naissent les fleurs chez certaines espèces, mais qui n'est ni un sépale ni un pétale.

**caduque (adj.)**

Se dit d'un organe (feuille, pétale, sépale) qui meurt et se détache après avoir accompli sa fonction lors de chaque cycle de vie annuel.

**carpelle (n.m.)**

Unité de base d'un gynécée chez les Angiospermes, constituée d'un organe d'origine foliaire modifié à sa base une cavité close appelée ovaire, contenant un ou plusieurs ovules.

**capsule (n.f.)**

Fruit sec déhiscent formé par un ovaire à carpelles soudés en une cavité unique s'ouvrant pour libérer des graines.

**composée (adj.)**

Se dit d'une feuille dont le limbe est divisé en sous-unités individualisées : ces divisions distinctes ou folioles, ressemblant à autant de petites feuilles sont attachés au pétiole commun reconnaissable à ce qu'il est le seul à posséder à sa base un bourgeon axillaire et éventuellement des stipules.

**corolle (n.f.)**

Ensemble des pétales, situé entre le calice et l'androcée ; outre un rôle protecteur des pièces reproductrices, les pétales contribuent à l'attraction des animaux pollinisateurs.

**corymbe (n.m.)**

Type d'inflorescence dans laquelle les pédicelles, de longueur inégale et insérés à des niveaux différents amènent les fleurs pratiquement dans un même plan.

**corymbiforme**

En forme de corymbe.

**cyme (n.f.)**

Type d'inflorescence formée par un axe principal qui porte une fleur terminale et dont partent un ou plusieurs axes secondaires, également terminés par une fleur, qui se ramifient à leur tour de telle sorte que l'ensemble des axes arrive à la même hauteur.

**Diptère (n.m.)**

Insecte n'ayant qu'une seule paire d'ailes, issues du mésothorax, et dont le métathorax porte seulement une paire d'organes d'équilibration (ou balanciers), recouverts ou non de cuillerons, tel que les mouches, moucheron et moustiques [Les diptères forment un très grand ordre, de plus de 100 000 espèces].

**endémique (adj.)**

S'applique à une espèce dont l'aire de répartition est très localisée ; l'endémisme est souvent lié au phénomène insulaire (endémiques malgaches par exemple).

**entomophile (pollinisation) (n.f.)**

Transport du pollen par les insectes, qui sont attirés en particulier par la production de nectar.

**étamine (n.f.)**

Organe mâle d'une fleur, porté par le réceptacle florale et placé entre la corolle et le pistil. Une étamine est généralement formée d'une partie allongé et grêle, le filet, terminé par une partie renflée appelée anthère. Celle-ci est le lieu de production des grains de pollen, dans des cavités appelées sacs polliniques, généralement au nombre de quatre, souvent fusionnés en deux loges séparées par un connectif.

**étoilé (adj.)**

Se dit d'un organe rayonnant comme une étoile.

**gamo-(sépale / pétale) (*adj.*)**

Pièces soudées entre elles [synonyme : sympétale].

**glabre (*adj.*)**

Se dit d'un organe dépourvu de poils ou d'autres excroissances à sa surface.

**glabrescent (*adj.*)**

Qualifie un organe quasiment dépourvu de poils, presque glabre.

**gynécée (*n.m.*)**

Organe femelle ou pistil, ensemble des carpelles, situés au centre d'une fleur ; comprend l'ovaire, surmonté du style et du stigmate.

**hermaphrodite (*adj.*)**

Se dit d'une fleur présentant à la fois les deux sexes, mâle et femelle.

**hypogyne (*adj.*)**

Se dit d'une fleur dont les pièces autres sont insérées au-dessous du gynécée ; on dit aussi que l'ovaire est supère.

**imbriqué (*adj.*)**

Qualifie les organes (feuilles et écailles en particulier) qui se recouvrent partiellement les uns et les autres, verticalement ou latéralement, comme les tuiles d'un toit.

**infère (*adj.*)**

Qualifie les ovaires fixés sous l'insertion des étamines ou au-dessous du calice et soudé à ce dernier.

**inflorescence (*n.f.*)**

Regroupement de fleurs en un ensemble physionomiquement bien individualisé, sur un même axe.

**involucre (*n.f.*)**

Ensemble de bractées florales insérées en verticille à la base d'un pédoncule floral ou des inflorescences (ombelles ou capitules), constituant ainsi une sorte de collerette.

**isostémone (*adj.*)**

Qualifie une fleur qui possède un nombre d'étamines égale à celui des pétales.

**lancéolée (*adj.*)**

En forme de fer de lance, c'est-à-dire, atténuée aux deux extrémités et plus large au milieu au milieu

**Lépidoptère (*n.m.*)**

Insecte dont l'adulte, qui possède une trompe pour aspirer les aliments liquides et quatre ailes couvertes d'écailles microscopiques, est un papillon, la larve une chenille, la nymphe immobile, une chrysalide. Les lépidoptères forment un ordre très vaste [plus de 100 000 espèces].

**limbe (*n.m.*)**

Partie plane et peu épaisse d'un organe (feuille, pétale...)

**monocotylédone (*n.f.*)**

Plante dans la plantule possède un seul cotylédon. En systématique, l'une des deux classes des Angiospermes.

**monoïque (*adj.*)**

Qualifie des espèces portant à la fois sur un même individu, des fleurs mâles et des fleurs femelles mais séparément (c'est à dire que les fleurs ne sont pas hermaphrodites).

**naturalisé (*adj.*)**

Plante introduite et qui, trouvant un milieu qui lui convenait, s'est totalement naturalisée (adventice, invasif).

**nerville (*n.f.*)**

Nervure très fine d'ordre ultime.

**nervure (n.f.)**

Zone apparente correspondant aux tissus conducteurs de sève chez certains organes (feuilles, pétales et sépales, en particulier). On distingue en générale une nervure principale correspondant au prolongement direct des faisceaux conducteurs du pétiole et les nervures secondaires, qui vont en diminuant de diamètre depuis la base de la feuille jusqu'à ses bords.

**oblongue (adj.)**

Qualifie un organe (feuille, en particulier) nettement plus long que large (deux à quatre fois), à bords parallèles sur une grande partie de la longueur et arrondi aux deux extrémités.

**obovale (adj.)**

Désigne un organe (feuille, pétale, sépale) de forme ovale mais élargi vers l'apex (pointe située à la base).

**oligostémone (adj.)**

Androcée possédant des étamines en nombre inférieur à celui des pétales.

**ordre (n.m.)**

Unité systématique comprenant le plus souvent plusieurs familles possédant en commun certains caractères. Plusieurs ordres forment une unité systématique plus vaste, la classe.

**panicule (n.f.)**

Type d'inflorescence indéfinie correspondant à une grappe composée, avec deux ou plusieurs fleurs sur chaque pédicelle. L'ensemble prend une forme pyramidale ou conique.

**parcheminé (adj.)**

Se dit d'un tissu sec et coriace, non coloré en vert.

**pauciflore (adj.)**

Ayant un petit nombre de fleurs.

**pédicelle (n.m.)**

Ramification du pédoncule portant une fleur unique ou un fruit à son sommet.

**penné (adj.)**

Qualifie une feuille dont les folioles sont disposées de chaque côté de l'axe principal de cette feuille.

**pentamère (adj.)**

Qualifie une fleur qui présente des cycles de cinq pièces florales identiques. Ex : Corolle de cinq pétales, calice de cinq sépales, androcée de cinq étamines par verticille.

**périanthe (n.m.)**

Ensemble des sépales et des pétales constituant respectivement le calice et la corolle.

**périsperme (adj.)**

Chez les Angiospermes, terme désignant un tissu nourricier diploïde, remplaçant l'albumen chez certaines graines exalbuminées (Pé Eu-Dicotylédones, en particulier le CARYOPHYLLALES).

**pétale (n.m.)**

Élément interne du périanthe, de couleurs et de formes variées, dont l'ensemble constitue la corolle.

**pétiole (n.m.)**

Partie rétrécie de la feuille qui unit le limbe à la tige. A sa base, se trouvent parfois des stipules. Les feuilles dépourvues de pétiole sont dites sessiles.

**phloème (n.m.)**

Tissu conducteur de la sève élaborée, dite «descendante», synonyme de «liber » ; dans une tige, le phloème se situe à la périphérique du xylème, dans une feuille, il se trouve au-dessous du xylème vers l'épiderme inférieur.

**placenta (n.m.)**

Région de l'ovaire où sont attachés les ovules au moyen du funicule. C'est à son niveau que transitent les aliments nécessaires pour la croissance de la graine issue de l'ovule après sa fécondation.



**placentation (n.f.)**

Mode d'insertion des ovules sur la paroi de l'ovaire. Il existe quatre types courants de placentation : pariétale, axile, basale, centrale.

**pluriovulé (adj.)**

Qui porte plusieurs fleurs.

**protandrie (n.m.)**

Se dit d'une fleur hermaphrodite dont les étamines se développent avant les carpelles.

**pubescente (adj.)**

Se dit d'un organe (tige, feuille) muni de poils fins plus ou moins courts, mous et peu denses formant un duvet discret.

**rameau (n.m.)**

En général, ce mot désigne une formation ayant une structure de tige, née d'un bourgeon porté par un axe principale, au niveau d'un nœud, et portant, elle aussi, des feuilles

**sarmenteuse (adj.)**

Tige ou branche ligneuse d'une plante grimpante.

**scarieux (adj.)**

Qualifie un organe (feuille, bractée) membraneux (mince), plus ou moins translucide, coriace, généralement de couleur paille ou blanchâtre, comme une écaille.

**schizogène (adj.)**

Se dit d'une poche sécrétrice (ou d'un canal) formée par multiplication puis écartement des cellules.

**sépale (n.m.)**

Élément constitutif de la fleur, généralement de couleur verte, situé à l'extérieure de la corolle, et dont l'ensemble forme le calice.

**sessile (adj.)**

Se dit d'une fleur sans pédoncule, d'une feuille sans pétiole ou de tout autre organe dépourvu de pédicelle.

**Simple (*adj.*)**

Se dit d'une feuille dont le limbe, formé d'une seule pièce, n'est pas composé.

**stipule (*n.f.*)**

Appendice foliacé souvent écailleux, épineux, parfois glanduleux, caduc ou persistant, se présentant le plus souvent deux par deux, l'un en face de l'autre, à la base du pétiole des feuilles de certaines espèces.

**style (*n.m.*)**

Extrémité effilée et plus ou moins allongée du pistil, prolonge l'ovaire et porte le stigmate.

**sympétalie (sympétale)**

Voir gamopétale.

**tégument (*n.m.*)**

Enveloppe protectrice des ovules. Il y en a généralement deux chez les Angiospermes.

**tomenteux (*adj.*)**

Se dit d'un organe aérien (feuille, tige, fruit) dont la surface est couverte de poils cotonneux (tomentum), plus ou moins longs, enchevêtrés et denses.

**triploïde (*adj.*)**

Qualifie une cellule ou un organisme à  $3n$  chromosomes.

**uniloculaire (*adj.*)**

Se dit d'un ovaire ou d'une anthère à une seule loge.

**verticille (*n.m.*)**

Ensemble d'organes similaires (feuilles, sépales, pétales, étamines) insérés en cercle à un même niveau, et au nombre d'au moins trois, autour ou au sommet d'un axe qui les porte.

**vivace (*adj.*)**

Désigne un végétal dont le cycle de vie peut être étendu sur plusieurs années. Ce sont notamment les plantes ligneuses mais également un grand nombre d'herbacées.

**xylème (*n.m.*)**

Tissu conducteur de la sève brute, dite «ascendante», synonyme de «bois» [voir phloème].



# BIBLIOGRAPHIE

ACHARYA, D., MITAINE-OFFER, A.-C., KAUSHIK, N., MIYAMOTO, T., PAULULAT, T., MIRJOLET, J.-F., DUCHAMP, O., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2009). Cytotoxic spirostane-type saponins from the roots of *Chlorophytum borivilianum*. *Journal of Natural Products*, 72:177–81.

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*, 4:306–10.

AGRAWAL, P. K., JAIN, D. C., GUPTA, R. K., THAKUR, R. S. (1985). Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal saponin and steroidal saponins. *Phytochemistry*, 24:2479–96.

AGRAWAL, P. K. (2004). Spectral assignments and reference data. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42:990–3.

AGRAWAL, P. K. (2005). Assigning stereodiversity of the 27-Me group of furostane-type steroidal saponins via NMR chemical shifts. *Steroids*, 70:715–24.

ALTUNKEYIK, H., GÜLCEMAL, D., MASULLO, M., ALANKUS-CALISKAN, O., PIACENTE, S., KARAYILDIRIM, T. (2012). Triterpene saponins from *Cyclamen hederifolium*. *Phytochemistry*, 73:127–33.

ANDERSSON, M., MADSEN, E. L., OVERGAARD, M., ROSE, C., DOMBERNOWSKY, P., MOURIDSEN, H. T. (1999). Doxorubicin versus methotrexate both combined with cyclophosphamide, 5-fluorouracil and tamoxifen in postmenopausal patients with advanced breast cancer – a randomised study with more

than 10 years follow-up from the Danish breast cancer cooperative group. *European Journal of Cancer*, 35:39–46.

ANDO, J., MIYAZONO, A., ZHU, X.-H., IKEDA, T., NOHARA, T. (1999). Studies on the constituents of Solanaceous plants, steroidal glycosides from *Solanum nodiflorum*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 47:1794–6.

ALLORGE, L. (2008). Plantes de Madagascar – Atlas, ULMER (Eds.). Impression Alicone, Trento, Italie.

ALTUNKEYIK, H., GÜLCEMAL, D., MASULLO, M., ALANKUS-CALISKAN, O., PIACENTE, S. KARAYILDIRIM, T. (2012). Triterpene saponins from *Cyclamen hederifolium*. *Phytochemistry*, 73:127–33.

ARTHAN, D., SVASTI, J., KITTAKOOP, P., PITTAYAKHACHONWUT, D., TANTICHAROEN, M., THEBTARANONTH, Y. (2002). Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. *Phytochemistry*, 59:459–63.

BEDIR, E., ÇALIS, I., AQUINO, R., PIACENTE, S., PIZZA, C. (1999a). Secondary metabolites from the roots of *Astragalus trojanus*. *Journal of Natural Products*, 62:563–8.

BEDIR, E., ÇALIS, I., AQUINO, R., PIACENTE, S., PIZZA, C. (1999b). Trojanoside H: a cycloartane-type glycoside from the aerial parts of *Astragalus trojanus*. *Phytochemistry*, 51:1017–20.

BELHOUCHE, Z., SAUTOUR, M., MIYAMOTO, T., LACAILLE-DUBOIS, M. - A. (2008). Steroidal saponins from the roots of *Smilax aspera* subsp. *mauritanica*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 56:1324–7.

BENCHARIF-BETINA, S., MIYAMOTO, T., TANAKA, C., KABOUCHE, Z., MITAINE-OFFER, A.-C., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2012). Two new triterpene saponins from *Cyclamen africanum* Boiss. & Reuter. *Helvetica Chimica Acta*, 95:1573–80.

- BLOOR, S. J., QI, L. (1994). Cytotoxic saponins from New Zealand *Myrsine* species. *Journal of Natural Products*, 57:1354–60.
- BONNARD, I., RINEHART, K. L. (2004). Thyonosides A and B, two new saponins isolated from the holothurian *Thyone aurea*. *Tetrahedron*, 60:2987–92.
- BOTINEAU, M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Tec & Doc (Eds.), Lavoisier.
- BÖTTGER, S., MELZIG M. F. (2011). Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochemistry Letters*, 4:59–68.
- BÖTTGER, S., WESTHOF, E., SIEMS, K., MELZIG, M. F. (2013). Structure–activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I). *Toxicon*, 73:144–50.
- BRUINS, A. P. (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794:345–57
- BRUNETON, J. (2009). Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Tec & Doc, Médicales internationales (Eds.), 4<sup>e</sup> édition.
- BURCZYK, J., REZNICEK, G., BAUMGARTEN, S., HUGH-BLOCH, M., JURENITSCH, J., SCHRÖDER, H., WERZ, U., HASLINGER, E. (1995). Saponins from *Hacquetia epipactis*. *Phytochemistry*, 39:195–8.
- CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W. G., GAZDAR, A. F., MINNA, J. D., MITCHELL, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47:936–42.
- CHAKRAVARTY, A.K., DAS, B., PAKRASHI, S.C. (1987). Triterpenoid prosaponins from leaves of *Maesa chisia* var. *angustifolia*. *Phytochemistry*, 26:2345–9.
- CHAN, P.-K. (2007). Acylation with diangeloyl groups at C21–22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Biochemical pharmacology*, 73:341–50.

- CHAPAGAIN, B. P., WIESMAN, Z., TSROR (LAHKIM), L. (2007). *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 26:109–15.
- CHEN, W.-J., HSIAO, L.-C., CHEN, K. K. (2008). Metal desorption from copper (II)/nickel(II)-spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponin biosurfactant. *Process Biochemistry*, 43:488–98.
- CHEN, Y. Q., XU, Q. M., LIU, Y. L., LI, X. R., YANG, S. L., ZHUGE, H. X. (2012). Laboratory evaluation of the molluscicidal activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins against the snail *Oncomelania hupensis*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25:224–9.
- CHIANG, H. C. (1978). Studies on the constituents of *Polycarpaea corymbosa* Lam. *Taiwan Yaoxue Zazhi*, 30:114–20.
- CHWALEK, M., LALUN, N., BOBICHON, H., PLE, K., VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L. (2006). Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760:1418–27.
- CONSTANTIN, E., TRALDI, P., FAVRETTO, D., SCHNELL, A. (1996). Spectrométrie de masse 2<sup>e</sup> édition : Principes et applications. Lavoisier, TEC & DOC (Eds.). Paris.
- CUFODONTIS, G. (1955). 92<sup>e</sup> Famille – Pittosporacées, HUMBERT, H., Gouvernement générale de Madagascar (Eds.), Flore de Madagascar et des Comores (plantes vasculaires). Typographie Firmin-Didot et Cie, Paris, pp. 1–6, 33–39.
- D'ACQUARICA, I., DI GIOVANNI, M. C., GASPARRINI, F., MISITI, D., D'ARRIGO, C., FAGNANO, N., GUARNIERI, D., IACONO, G., BIFULCO, G., RICCIO R. (2002). Isolation and structure elucidation of four new triterpenoid estersaponins from fruits of *Pittosporum tobira* AIT. *Tetrahedron*, 58:10127–36.
- DALL'ACQUA, S., CASTAGLIUOLO, I., BRUN, P., DITADI, F., PALÙ, G., INNOCENTI, G. (2010). Triterpene glycosides with in vitro anti-inflammatory activity from *Cyclamen repandum* tubers. *Carbohydrate Research*, 345:709–14.



D'ARCY, W. G., RAKOTOZAFY, A. (1994). 176<sup>e</sup> Famille – Solanaceae, MORAT, P. H., Ministère de la Recherche Scientifique et Technologique pour le développement de Madagascar, Missouri Botanical Garden (Eds.), Flore de Madagascar et des Comores. Laboratoire de Phanérogamie. Paris, pp. 1–97.

DAUNAY, M.-C., CHADHA, M. L. (2004). *Solanum melongena* L. [Internet] Record from PROTA4U, Grubben, G. J. H., Denton, O.A. (Eds.), PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. <http://www.prota4u.org/search.asp>. 15 October 2013.

DE HOFFMANN, E., CHARETTE, J., STROOBANT, V. (1999). Spectrométrie de masse : Cours et exercices corrigés, 2<sup>e</sup> édition. Dunod (Ed.). Paris.

DEBELLA, A., HASLINGER, E., KUNRET, O., MICHL, G., ABEBE D. (1999). Steroidal saponins from *Asparagus africanus*. *Phytochemistry*, 51:1068–75.

DIAB, Y., IOANNOU, E., EMAM, A., VAGIAS, C., ROUSSIS, V. (2012). Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from *Yucca desmettiana*. *Steroids*, 77:686–690.

DIMBI, M. Z., WARIN, R., DELAUDE, C., HULS, R., MPUZA, K. (1983). Triterpénoïdes de *Harpullia Cupanioïdes*. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 92 :473–84.

DINDA, B., DEBNATH, S., MOHANTA, B. C., HARIGAYA, Y. (2010). Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chemistry and Biodiversity*, 7: 2327–581.

EL-AASR, M., MIYASHITA, H., IKEDA, T., LEE, J.-H., YOSHIMITSU, H., NOHARA, T., MURAKAMI, K. (2009). A new spirostanol glycoside from fruits of *Solanum indicum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57:747–8.

ELTAYEB, E. A., AL-ANSARI, A. S., RODDICK J. G. (1997). Changes in the steroidal alkaloid solasodine during development of *Solanum nigrum* and *Solanum incanum*. *Phytochemistry*, 46:489–94.

ERRINGTON, S. G., JEFFERIES, P. R. (1988). Triterpenoid sapogenins of *Pittosporum phillyraeoides*. *Phytochemistry*, 27:543–5.

- ESPEJO, O., LIAVOT, J. C., JUNG, H., GIRAL, F. (1982). Spirostanic diosgenin precursors from *Dioscorea composite* tubes. *Phytochemistry*, 21:413–6.
- FAYETTE, J., BLAY, J.-Y. (2006). La chimiothérapie des sarcomes : optimisation des substances existantes et nouvelles molécules. *Cancer Radiothérapie*, 10:72–77.
- FENG, C., Li, B.-G., Gao, X.-P., QI, H.-Y, ZHANG, G.-L. (2010). A new triterpene and an antiarrhythmic liriiodendrin from *pittosporum brevicalyx*. *Archives of Pharmacal Research*, 33:1927–32.
- FERREIRA, F., SOULÉ, S., VAZQUEZ, A., MOYNA, P., KENNE, L. (1996). Steroid saponins from *solanum laxum*. *Phytochemistry*, 42:1409–16.
- FU, G.-M., WANG, Y.-H., GAO, S., TANG, M.-J., YU, S.-S. (2005). Five new cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Symplocos chinensis*. *Planta Medica*, 71:666–72.
- FUJIOKA, T., YOSHIDA, K., FUJII, H., NAGAO, T., OKABE, H., MIHASHI, K. (2003). Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VI. New ursane-type saikosaponin analogs from the fruits of *Bupleurum rotundifolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51:365–72.
- FUJIOKA, T., YOSHIDA, K., SHIBAO, H., NAGAO, T., YOSHIDA, M., MATSUNAGA, K., TAKATA, J., KARUBE, Y., IWASE, Y., OKABE, H., MIHASHI, K. (2006). Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. IX. New triterpenoid glycosides from the fruits of *Bupleurum rotundifolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54:1694–1704.
- FUKUHARA, K., KUBO, I. (1991). Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. *Phytochemistry*, 30:685–7.
- GIRARD, M., BELANGER, J., APSIMON, J. W., GARNEAU, F.,-X., HARVEY, C., BRISSON, J.-R. (1990). Frondoside A. A novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa*. *Canadian Journal of Chemistry*, 68:11–18.

- GONZALEZ, M., ZAMILPA, A., MARQUINA, S., NAVARRO, V., ALVAREZ, L. (2004). Antimycotic spirostanol saponins from *Solanum hispidum* leaves and their structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, 67:938–41.
- GÜNTHER, H. (1994). La spectroscopie de RMN: Principes de bases, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétiques nucléaires du carbone 13 en chimie. Elsevier Masson (Eds.).
- GÜNTHER, H. (1996). La spectroscopie de RMN: Principes de bases, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétiques nucléaires du carbone 13 en chimie. Elsevier Masson (Eds.).
- HADDAD, M., MIYAMOTO, T., LAURENS, V., LACAÏLLE-DUBOIS, M. -A. (2003). Two new biologically active triterpenoidal saponins acylated with salicylic acid from *Albizia adianthifolia*. *Journal of Natural Products*, 66:372–7.
- HAINSWORTH, J. D., SPIGEL, D. R., LITCHY, S., GRECO, F. A. (2006). Phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and etoposide in advanced poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: A minnie pearl cancer research network study. *Journal of Clinical Oncology*, 24: 3548–54.
- HAN, A. Y. T., GORKOM, L. V., MCFARLANE, I. J., BARROW, K. D. (1995). Prosapogenins from *Dodonaea attenuata*. *Phytochemical Analysis*, 6:157–63.
- HARTLEB, I., SEIFERT, K. (1994). Songarosaponin D–A triterpenoid saponin from *Verbascum songaricum*. *Phytochemistry*, 35:1009–11.
- HE, X. G., MOCEK, U., FLOSS, H. G., CÁCERES, A., GIRÓN, L., BUCKLEY, H., COONEY, G., MANNS, J., WILSON B. W. (1994). An antifungal compound from *Solanum nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 43:173–7.
- HIAI, S., OURA, H., NAKAJIMA, T. (1976). Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29:116–22.
- HIGUCHI, R., FUJIOKA, T., IWAMOTO, M., KOMORI, T., KAWASAKI, T., LASSAK, E. (1983). Triterpenoid saponins from leaves of *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*, 22:2565–9.

- HIRAI, Y., SANADA, S., IDA, Y., SHOJI, J. (1984). Studies on the constituents of palmae plants. I. The constituents of *Trachycarpus fortunei* (HOOK.) H. Wendl. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32:295–301.
- HO, C. S., LAM, C. W. K., CHAN, M. H. M., CHEUNG, R. C. K., LAW, L. K., LIT, L. C. W., NG, K. F., SUEN, M. W. M., TAI, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Chemistry Reviews*, 24:3–12.
- HOOKER, J. D. (1885). The flora of british India. Reeve L. & CO., 5, Henrietta Street, Covent Garden. pp. 234–235.
- HOSTETTMANN, K. et MARSTON, A. (1995). Saponins, (Chemistry pharmacology of natural products). Cambridge : Cambridge University Press.
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, M., HOSTETTMANN, M. (1997). Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation. Springer Verlag Berlin.
- HOSTMANN, W. R., KAPPLER, A. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Image/68762>. 15 Octobre 2013.
- HU, K., YAO, X. (2003). The cytotoxicity of methyl protoneogracillin (NSC-698793) and gracillin (NSC-698787), two steroidal saponins the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cell in vitro. *Phytotherapy Research*, 17:620–6.
- HU, M., XU, L., YIN, L., QI, Y., LI, H., XU, Y., HAN, X., PENG, J., WAN, X. (2013). Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways. *Journal of Applied Toxicology*, 33:712–722.
- HUANG, H.-L., LIU R.-H., SHAO, F. (2009). Structural determination of two new steroidal saponins from *Smilax china*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47:741–745.
- HUANG, X.-A., SHEN, X.-L., HU, Y.-J., LIU, Y.-M., LIU, K.-L., ZHANG, F.-X., ZHOU, X.-X. (2011). Two new triterpenoids from *Lysimachia heterogenea* Klatt and evaluation of their cytotoxicity. *Molecules*, 16:8076–82.

- HUKKERI, V.I., KENGANORA, M. (2007). Antioxidant and antiradical activity of leaves of *Polycarpha corymbosa* in vitro. *Acta Horticulturae*, 841:523–7.
- HUNGTUNG, Y., YUSHU, C., JIAMING, X., SHUNIAN, Z. (1986). Chemical constituents of *Pittosporum brevicalyx* (Oliv) Gagnep. *Huaxue Xuebao*, 44:946–50.
- IKEDA, T., ANDO, J., MIYAZONO, A., ZHU, X.-H., TSUMAGARI, H., NOHARA, T., YOKOMIZO, K., UYEDA, M. (2000). Anti-herpes virus activity of *solanum* steroidal glycosides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23:363–4.
- IKEDA, T., MIYASHITA, H., KAJIMOTO, T., NOHARA, T. (2001). Synthesis of neosaponins having an  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→4)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-D-glucopyranosyl glyco-linkage. *Tetrahedron Letters*, 42:2353–6.
- IKEDA, T., TSUMAGARI, H., HONBU, T., NOHARA, T. (2003). Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *Solanum* plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26:1198–201.
- ITOKAWA, H., SAWADA, N., MURAKAMI, T. (1969). The structures of Camelliagenin A, B and C obtained from *Camellia Japonica* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 17:474–80.
- JAIN, G. K., PAL, R., KHANNA, N. M. (1980). Spermicidal saponins from *Pittosporum nilghrense* Wight et Apnott. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42:12–3.
- JEENER, J., MEIER, B. H., BACHMANN, P., ERNST, R. R. (1979). Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics*, 71:4546–4553.
- JOST, L. M., KIRKWOOD, J. M., WHITESIDE T. L. (1992). Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *Journal of Immunological Methods*, 147: 153–65.
- JOUY, A. (2010). Dictionnaire de Botanique illustré, ULMER (Ed.).
- JU, Y., JIA, Z.-J. (1992). Steroidal saponins from the rhizomes of *Smilax menispermoides*. *Phytochemistry*, 31:1349–51.

- KALININ, V. I., AVILOV, S. A., KALININA, E. Y., KOROLKOVA, O. G., KALINOVSKY, A. I., STONIK, V. A., RIGUERA, R., JIMÉNEZ, C. (1997). Structure of Eximisoside A, a novel triterpene glycoside from the far-Eastern sea cucumber *Psolus eximius*. *Journal of Natural Products*, 60:817–19.
- KARTAL, M., MITAINE-OFFER, A. C., ABU-ASAKER, M., MIYAMOTO, T., CALIS, I., WAGNER, H., LACAILLE-DUBOIS, M. -A. (2005). Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53:1318–20.
- KARTAL, M., MITAINE-OFFER, A. C., PAULULAT, T., ABU-ASAKER, M., WAGNER, H., MIRJOLET, J. F., GUILBAUD, N., LACAILLE-DUBOIS, M. -A. (2006). Triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Journal of Natural Products*, 69:1105–8.
- KAWASAKI, T., KOMORI, T., MIYAHARA, K., NOHARA, T., HOSOKAWA, I., MIHASHI, K. (1974). Furostanol bisglycosides corresponding to dioscin and gracillin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 22:2164–75.
- KIM, D.-S., CHANG, Y.-J., ZEDK, U., ZHAO, P., LIU, Y.-Q., YANG, C.-R. (1995). Dammarane saponins from *Panax ginseng*. *Phytochemistry*, 40:1493–7.
- KIRAN, R. Y., MANJUNATH, C., KUMAR, R. M., BRAHMAIAH, Y., KUMAR, A. U., TAMIZHMANI, T. (2011). A review on traditional plants with hepatoprotective activity. *Pharmacologyonline*, 3:653–8.
- KOBAYASHI, K., TERUYA, T., SUENAGA, K., MATSUI, Y., MASUDA, H., KIGOSHI, H. (2006). Isotheasaponins B1–B3 from *Camellia sinensis* var. *sinensis* tea leaves. *Phytochemistry* 67:1385–9.
- KOBAYASHI, Y., TAKEDA, T., OGIHARA, Y. (1981). New triterpenoid glycosides from the leaves of *Bupleurum rotundifolium* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29:2222–9.
- KUH, H.-J., JANG, S. H., WIENTJES, M. G., WEAVER, J. R., AU J. L.-S. (1999). Determinants of paclitaxel penetration and accumulation in human solid tumor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290:871–80.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (1999). Saponins as immunostimulants and immunoadjuvants in: Immunomodulatory agents from plants, H. Wagner, Basel, Boston, Berlin (Eds.). Birkhäuser Verlag AG, pp 243–72.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A., WAGNER, H. (2000). Bioactive saponins from plants: an update in: Studies in Natural Products Chemistry Series, Atta-Ur-Rahman (Eds.), Elsevier Science, Vol. 21, pp 633–87.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2005a). Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: Recent developments, Atta-Ur-Rahman (Eds.), Studies in natural products chemistry series, vol. 32. Elsevier, Amsterdam; pp 209–46.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2005b). Bioactive saponins from plants: recent developments in "Handbook of Medicinal Plants", Yaniv Z., Bachrach, U. (Eds.). Food Products Press (FPP). The Haworth Medical Press (HMP): New York, Chapter 19, pp 399–428.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2005c). Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: recent developments in: Studies in Natural Products Chemistry Series, Atta-Ur-Rahman (Eds.). Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, Vol. 32, pp 209–46.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2013). Newest results of the chemistry and pharmacology of triterpene and steroid saponins containing TCM-drugs in "Evidence and rational based research on Chinese drugs", H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich (Eds.). Springer-Verlag Wien pp 87–135.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A., DELAUDE C., MITAINE-OFFER A.-C. (2013). Triterpenoid saponins: a focus on Polygalaceae in Handbook of Natural Products, K. G. Ramawat, J. M. Mérillon (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter 104, pp 3205–32.

LEMMICH, E., CORNETT, C., FURU, P., JØRSTIAN, C. L., KNUDSEN, A. D., OLSEN, C. E., SALIH, A., THIILBORG, S. T. Molluscicidal saponins from *Catunaregam nilotica*. *Phytochemistry*, 39:63–68.

- LI, Q., LI, W., HUI, L.-P., ZHAO, C.-Y., HE, L., KOIKE, K. (2012). 13,28-Epoxy triterpenoid saponins from *Ardisia japonica* selectively inhibit proliferation of liver cancer cells without affecting normal liver cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22:6120–5.
- LINNEK, J., MITAINE-OFFER, A.-C., MIYAMOTO, T., TANAKA, C., PAULULAT, T., AVUNDUK, S., ALANKUS-CALISKAN, Ö., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2011). Cycloartane glycosydes from three species of *Astragalus* (Fabaceae). *Helvetica Chimica Acta*, 94:230–7.
- LINNEK, J., MITAINE-OFFER, A. -C., PAULULAT, T., LACAILLE-DUBOIS, M. - A. (2012). Two new triterpenoid saponins from *Pittosporum senacia* Putterlick (Pittosporaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50:798–802.
- 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 for Mass Spectrometry*, 15:133–41.
- LIU, D.-L., WANG, N.-L., ZHANG, X., YAO, X.-S. (2011a). Three new triterpenoid saponins from *Ardisia crenata*. *Helvetica Chimica Acta*, 94:693–702.
- LIU, H., CHOU, G.-X., WANG, J.-M., JI, L.-L., WANG, Z.-T. (2011b). Steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea bulbifera* and their cytotoxicity. *Planta Medica*, 77:845–8.
- LU, Y., LUO, J., HUANG, X., KONG, L. (2009). Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities. *Steroids*, 74:95–101.
- LU, Y., LUO, J., KONG, L. (2011). Steroidal alkaloid saponins and steroidal saponins from *Solanum surattense*. *Phytochemistry*, 72:668–73.
- MAROUF, A., REYNAUD, J. (2007). La botanique de A à Z – 1 662 définitions, Dunod (Ed.), Paris.
- MASSIOT, G. et LAVAUD, C. (1995). Structural elucidation of saponins, Atta-Ur-Rahman (Eds.), Structure and chemistry (Part 3): Studies in natural products chemistry, Elsevier: Amsterdam, pp 187–224.



MATSUSHITA, S., YANAI, Y., FUSYUKU, A., IKEDA, T., ONO, M., NOHARA, T. (2007). Distinction of absolute configuration at C-22 of C-23-Hydroxyspirostane and C-23-Hydroxyspirosolane Glycosides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55:1079–81.

MIYASHITA, H., KAI, Y., NOHARA, T., IKEDA, T. (2008). Efficient synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chacotriosyl glycosides using appropriate donors, and their cytotoxic activity. *Carbohydrate Research*, 343:1309–15.

Mg.chm-cbd.net. Centre d'échange d'information de Madagascar (CHM), Convention sur la Diversité Biologique (CDB). <http://mg.chm-cbd.net/biodiversity/especes-et-ecosystemes/biodiversite/liste-rouge-des-plantes-vasculaires-endemiques-de-madagascar>.

MORAES, G., NORHCOTE, P. C., KALININ, V. I., AVILOV, S. A., SILCHENKO, A. S., DMITRENOK, P. S., STONIK, V. A., LEVIN, V. S. (2004). Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:637–650.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55–63.

Muséum National d'Histoire Naturelle (Ed.). Inventaire national du Patrimoine naturel, site Web : <http://inpn.mnhn.fr>. 7 octobre 2013.

MURAKAMI, T., NAKAMURA, J., KAGEURA, T., MATSUDA, H., YOSHIKAWA, M. (2000). Bioactive saponins and glycosides. XVII. Inhibitory effect on gastric emptying and accelerating effect on gastrointestinal transit of tea saponins: Structures of assamsaponins F, G, H, I and J from the seeds and leaves of the plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48:1720–5.

NAKAMURA, T., KOMORI, C., LEE, Y., HASHIMOTO, F., YAHARA, S., NOHARA, T., EJIMA, A. (1996). Cytotoxic activities of *Solanum* steroidal glycosides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19:564–6.

- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75:311–35.
- NOSE, M., AMAGAYA, S., TAKEDA, T., OGIHARA, Y. (1989). New Derivatives of saikosaponin C. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37:1293–6.
- OKAMOTO-KUBO, S., NISHIO, K., HEIKE, Y., YOSHIDA, M., OHMORI, T., SAIJO, N. (1994). Apoptosis induced by etoposide in small-cell lung cancer cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 33:385–90.
- ONO, M., NISHIMURA, K., SUZUKI, K., FUKUSHIMA, T., IGOSHI, K., YOSHIMITSU, H., IKEDA, T., NOHARA, T. (2006). Steroidal glycosides from the underground parts of *Solanum sodomaeum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54:230–3.
- OSBOURN, A. E. (1996a). Saponins and plant defence—a soap story. *Trends Plant Science*, 1:4–9.
- OSBOURN, A. E. (1996b). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell*, 8:1821–31.
- PARK, J. D., RHEE, D. K., LEE, Y. H. (2005). Biological activities and chemistry of saponins from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Phytochemistry Reviews*, 4:159–75.
- PERRIER DE LA BATHIE, H. (1950). 73<sup>e</sup> Famille – Caryophyllacées, HUMBERT, H., Gouvernement générale de Madagascar (Eds.), Flore de Madagascar et des Comores (plantes vasculaires). Typographie Firmin-Didot et Cie: Paris, pp 12–23.
- PERRONE, A., MASULLO, M., BASSARELLO, C., BLOISE, E., HAMED, A., NIGRO, P., PIZZA, C., PIACENTE, S. (2008). Unusual cycloartane glycosides from *Astragalus eremophilus*. *Tetrahedron*, 64:5061–71.
- PODOLAK, I., GALANTY, A., SOBOLEWSKA, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9:425–74.
- POLAT, E., CALISKAN-ALANKUS, O., PERRONE, A., PIACENTE, S., BEDIR, E. (2009). Cycloartane-type glycosides from *Astragalus amblolepis*. *Phytochemistry*, 70:628–34.

- PURI, R., WONG, T. C., PURI, R. K. (1993). Solasodine and diosgenin:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 31:278–82.
- PURI, R., WONG, T. C., PURI, R. K. (1994).  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR assignments and structural determination of novel glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. *Journals of Natural Products*, 57:587–96.
- PUTALUN, W., XUAN, L.-J., TANAKA, H., SHOYAMA, Y. (1999). Solakhasoside, a Novel Steroidal Saponin from *Solanum khasianum*. *Journal of Natural Products*, 62:181–3.
- RAKOTOVAO, C. (2006). Madagascar catalogue image gallery. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Image/76963>. 15 Octobre 2013.
- RAVELONARIVO, D. (2011). Madagascar catalogue image gallery. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Image/100225200>. 15 Octobre 2013.
- RAZANATSIMA, A. (2007). Madagascar catalogue image gallery. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Image/100126118>. 15 Octobre 2013.
- RUI, J. (2013). Traditional Chinese medicine for treating male infertility. CN103028039 (A).
- SARG, T. M., GLOMBITZA, K.W., FARRAG, N. M., HAFEZ, S. S., ABBAS, F. A. (1995). Steroidal alkaloids and saponins of *Solanum sepicula* (Dun). *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36:271–85.
- SAUTOUR, M., MITAINE-OFFER, A.-C., MIYAMOTO, T., DONGMO, A., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2004). Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Medica*, 70:90–2.
- SAUTOUR, M., MIYAMOTO, T., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2005). Steroidal saponins from *Smilax media* and their antifungal activity. *Journal of Natural products*, 69:1489–93.

- SAUTOUR, M., MIYAMOTO, T., LACAILLE-DUBOIS, M. -A. (2007a). Steroidal saponins from *Asparagus acutifolius*. *Phytochemistry*, 68:2554–62.
- SAUTOUR, M., MITAINE-OFFER, A.-C., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2007b). The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroid saponins. *Journal of Natural Medicines*, 61:91–101.
- STERNBERG, C. N., YAGODA, A., SCHER, H. I., WATSON, R. C., GELLER, N., HERR, H. W., MORSE, M. J., SOGANI, P. C., VAUGHAN, E. D., BANDER, N., WHITMORE, W. F., et al. (1989). Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium – efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer*, 64:2448–58.
- SCUDIERO, D. A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H., CURRENS, M. J., SENIFF, D., BOYD M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48:4827–33.
- SEO, Y., BERGER, J. M., HOCH J., NEDDERMANN, K.M., BURSUKER, I., MAMBER, S. W., KINGSTON, D. G. I. (2002). A new triterpene saponin from *Pittosporum viridiflorum* from the Madagascar rainforest. *Journal of Natural Products*, 65:65–68.
- SHAO, Y., POOBRASERT, O., KENNELLY, E. J., CHIN, C. -K., HO, C. -T., HUANG, M. -T., GARRISON, S. A., CORDELL, G. A. (1997). Steroidal saponins from *Asparagus officinalis* and their cytotoxic activity. *Planta Medica*, 63:258–62.
- SHOJI, N., UMEYAMA, A., YOSHIKAMA, K., ARIHARA, S. (1994). Triterpenoid glycosides from *Anagallis arvensis*. *Phytochemistry*, 37:1397–402.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. (2007). Identification spectrométrique de composés organiques, 2<sup>e</sup> édition. De Boeck & Larcier (Eds.). B-1000 Bruxelles.

SLATER, T. F., SWYER, B., STRÄULI, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica Biophysica Acta*, 77:383–93.

SOULÉ, S., GÜNTNER, C., VAZQUEZ, A., ARGANDONA, V., MOYNA, P., FERREIRA, F. (2000). An aphid repellent glycoside from *Solanum laxum*. *Phytochemistry*, 55:217–22.

TABOPDA, T. K., MITAINE-OFFER, A.-C., MIYAMOTO, T., TANAKA, C., MIRJOLET, J.-F., DUCHAMP, O., NGADJUI, B. T., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2012). Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* Lam. *Phytochemistry*, 73:142–7.

TIMITE, G., MITAINE-OFFER, A.-C., MIYAMOTO, T., TANAKA, C., MIRJOLET, J.-F., DUCHAMP, O., LACAILLE-DUBOIS M.-A. (2013). Structure and cytotoxicity of steroidal glycosides from *Allium schoenoprasum*. *Phytochemistry* 88:61–6.

Tropicos.org. Catalogue of the Vascular Plants of Madagascar. Missouri Botanical Garden, St. Louis, U.S.A. and Antananarivo, Madagascar. <http://www.tropicos.org/project/mada>.

UESAKA, T., SHONO, T., KUGA, D., SUZUKI, S. O., NIRO, H., MIYAMOTO, K., MATSUMOTO, K., MIZOGUCHI, M., OHTA, M., IWAKI, T., SASAKI, T. (2007). Enhanced expression of DNA topoisomerase II genes in human medulloblastoma and its possible association with etoposide sensitivity. *Journal of Neuro-Oncology*, 84:119–29.

VAN SETTEN, D. C., JAN TEN HOVE, G., WIERTZ, E. J. H. J., KAMERLING, J. P., VAN DE WERKEN, G. (1998). Multiple-stage tandem mass spectrometry for structural characterization of saponins. *Analytical Chemistry*, 70: 4401–9.

VERMEERSCH, M., FOUBERT, K., DA LUZ, R. I., 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*, 23:1404–10.

- VINCKEN, J.-P., HENG, L. DE GROOT, A., GRUPPEN, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68:275–297.
- VOLLHARDT, K. P. C., SCHORE, N. E. (2009). *Traité de chimie organique*, 5<sup>e</sup> édition. De Boeck Université (Eds.). B-1000 Bruxelles.
- VOUTQUENNE, L., LAVAUD, C., MASSIOT, G., DELAUDE, C. (1998). Saponins from *Harpullia cupanioides*. *Phytochemistry*, 49:2081–5.
- WANG, P., YUAN, W., DENG, G., SU, Z., LI, S. (2013). Triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium* ‘Kershaw Blue’. *Phytochemistry Letters*, 6:306–9.
- 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 and Medicinal Chemistry*, 15:2528–32.
- WANYONYI, A. W., CHHABRA, S. C., MKOJI, G., EILERT, U., NJUE, W. M. (2002). Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. *Phytochemistry*, 59:79–84.
- WENSHENG, J., DINGCONG, Z., SHILIANG, L., GUANGMING, F., LINHONG, C. (2013a). Traditional Chinese medicine for treating chronic nephritis. CN102940766 (A).
- WENSHENG, J., SHENGRONG, Z., JIAYU, W., LING, C., SHU, L. (2013b). Traditional Chinese medicine for treating flat wart. CN102940811 (A).
- WHO.int. World Health Organization. Health topics, Traditional medicine. [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/en/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/)
- WOJCIECHOWSKI, K. (2013). Surface activity of saponin from *Quillaja* bark at the air/water and oil/water interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108:95–102.
- YAHARA, S., YAMASHITA, T., NOZAWA, N., NOHARA, T. (1996a). Steroidal glycosides from *Solanum torvum*. *Phytochemistry*, 43:1069–74.

- YAHARA, S., NAKAMURA, T., SOMEYA, Y., MATSUMOTO, T., YAMASHITA, T., NOHARA, T. (1996). Steroidal glycosides, indiosides A–E, from *Solanum indicum*. *Phytochemistry*, 43:1319–23.
- YANG, D. J., LU, T. J., HWANG, L. S., (2003). Isolation and identification of steroidal saponins in Taiwanese Yam cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:6438–44.
- YANG, Q.-X., XU, M., ZHANG, Y.-J., LI, H. -Z., YANG, C.-R. (2004). Steroidal saponins from *Disporopsis pernyi*. *Helvetica Chimica Acta*, 87:1248–53.
- YANG, Q.-X., YANG C. R. (2006). Cytotoxic steroidal saponins from *Polygonatum punctatum*. *Chemistry and Biodiversity*, 3:1349–55.
- YANG, S.-L., LIU, X.-K., WU, H., WANG, H.-B., QING, C. (2009). Steroidal saponins and cytotoxicity of the wild edible vegetable–*Smilacina atropurpurea*. *Steroids*, 74:7–12.
- YUAN, W., WANG, P., DENG, G., LI, S. (2012). Cytotoxic triterpenoid saponins from *Aesculus glabra* Willd. *Phytochemistry*, 75 :67–77.
- ZHANG, Z., LI, S. (2007). Cytotoxic triterpenoid saponins from the fruits of *Aesculus pavia* L..*Phytochemistry*, 68:2075–86.
- ZHOU, X., HE, X., WANG, G., GAO, H., ZHOU, G., YE, W., YAO, X. (2006). Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. *Journal of Natural Products*, 69:1158–63.
- ZHU, X.-H., IKEDA, T., NOHARA, T. (2000). Studies on the constituents of Solanaceous Plants. (46). Steroidal glycosides from the fruits of *Solanum anguivi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48:568–70.





**Résumé :** Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la thématique du Laboratoire de Pharmacognosie de l'UFR Pharmacie, au sein de l'Université de Bourgogne. Elle vise essentiellement la recherche de molécules d'origine végétale principalement des saponines biologiquement actives issues de la biodiversité tropicale. Dans ce contexte l'étude de plantes malgaches, *Polycarpaea corymbosa* Lamk. (CARYOPHYLLACEAE), *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* (PITTOSPORACEAE), *Solanum incanum* L. et *S. heteracanthum* Dunal. (SOLANACEAE) a conduit à l'isolement de quinze glycosides naturels par les techniques de chromatographie solide-liquide, de chromatographie liquide à moyenne pression, de flash chromatographie, et de chromatographie liquide sous vide. Les structures ont été élucidées principalement par les techniques spectroscopiques de RMN-1D et -2D, et de spectrométrie de masse. Il s'agit de neuf saponines triterpéniques de type oléane, parmi lesquelles sept sont des nouveaux composés naturels, ainsi que cinq saponines stéroïdiques de type spirostane et furostane, dont une nouvelle, et un glycoalkaloïde stéroïdique connu. Treize molécules isolées ont été testées en vue d'évaluer leurs activités cytotoxiques sur six lignées cellulaires cancéreuses humaine et animale. Nos résultats montrent que quatre d'entre elles possèdent une cytotoxicité significative sur les lignées HT-29, HCT 116, SW480, DU145, EMT6, et H9c2.

Mots-clés : saponines ; triterpènes ; stéroïdes ; RMN ; cytotoxicité ; flore Malgache

---

**Abstract:** This thesis was carried out in the Laboratory of Pharmacognosy, in the Pharmacy section of the University of Burgundy. The principal theme of this laboratory is the research of natural compounds from tropical biodiversity, mainly saponins. In this context, the study of Malagasy plants, *Polycarpaea corymbosa* Lamk. (CARYOPHYLLACEAE), *Pittosporum verticillatum* Bojer subsp. *verticillatum* (PITTOSPORACEAE), *Solanum incanum* L. and *S. heteracanthum* Dunal. (SOLANACEAE) led to the isolation of fifteen natural glycosides by column chromatography, medium pressure liquid chromatography, flash chromatography, and vacuum liquid chromatography. The structures were elucidated mainly by the use of spectroscopic techniques, NMR-1D and -2D, and mass spectrometry. The compounds were characterized as nine triterpene saponins of the oleanane type, among them seven are new natural compounds, five steroid saponins of the spirostane or furostane type, among them one new, and one known steroid glycoalkaloid. Thirteen of compounds were tested for cytotoxicity against six human and animal cancer cell lines. Our results show that four of them have significant cytotoxicity on cell lines HT-29, HCT 116, SW480, DU145, EMT6, and H9c2.

Mots-clés : saponins ; triterpenes ; stéroïdes ; NMR ; cytotoxicité ; Malagasy flora