

Année 2005

Thèse N°

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

MENTION : PHARMACIE

Spécialité : Pharmacognosie

Soutenue publiquement le 25 novembre 2005 par

Abdulmagid ALABDUL MAGID

Étude chimique de deux *Caryocar* de Guyane et d'un *Guioa* de Nouvelle Calédonie

JURY

Pr. Monique ZECHES-HANROT	Président
Pr. Guy BALANSARD	Rapporteur
Dr. Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA	Rapporteur
Pr. Joseph Donald CONNOLLY	Examineur
Pr. Catherine LAVAUD	Directeur de thèse
Dr. Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO	Co-directeur de thèse

Ce travail a été réalisé à l'Université de Reims Champagne-Ardenne dans le laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Reims, dirigé par Madame le Professeur Monique ZECHES, associé au CNRS (FRE 2715) : Isolement, Structure, Transformations et Synthèses de Substances Naturelles, unité dirigée par le Docteur Jean-Marc NUZUILLARD puis par le Professeur Janos SAPI.

À l'heure où ce travail se termine, je tiens à adresser tous mes remerciements à :

Monsieur le Professeur **Guy BALANSARD**

Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de Marseille

Madame le docteur **Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA**

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Monsieur le Professeur **Joseph Donald CONNOLLY**

Professeur de Chimie Organique à la Faculté des Sciences de Glasgow, Ecosse

Madame le Professeur **Monique ZECHES-HANROT**

Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de Reims

Madame le Professeur **Catherine LAVAUD**

Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de Reims

Madame le docteur Laurence **VOUTQUENNE-NAZABADIOKO**

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Reims

Qui ont accepté de juger ce travail.

En témoignage de ma profonde gratitude et de ma vive reconnaissance.

Je tiens à remercier plus particulièrement :

Monsieur le Professeur **Guy BALANSARD**

Qui, malgré ses nombreuses responsabilités et ses occupations, a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

En témoignage de ma grande considération

Madame le Docteur **Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA**

Qui, malgré un emploi de temps surchargé, a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

En témoignage de ma profonde gratitude

Monsieur le Professeur **Joseph Donald CONNOLLY**

Qui a fait le voyage depuis l'Ecosse et qui me fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

En témoignage de ma profonde gratitude.

Madame le Professeur **Monique ZECHES-HANROT**

Qui m'a accueilli dans son laboratoire pour y préparer le DEA de Chimie ainsi que cette thèse, et qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

En témoignage de ma reconnaissance.

Madame le Professeur **Catherine LAVAUD**

Pour m'avoir permis de réaliser ce travail en m'accueillant dans votre équipe, pour votre disponibilité, vos conseils, et pour m'avoir donné l'opportunité de me former en chimie des substances naturelles et d'avoir dirigé ce travail.

En témoignage de ma respectueuse gratitude

Madame le Docteur **Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO**

Pour avoir bien voulu encadrer cette thèse quotidiennement, pour ton soutien de tous les instants, ta confiance, tes conseils et ton amitié. J'ai beaucoup appris avec toi sur les différentes méthodes de chimie extractive et structurale utilisées dans ce travail, ce qui m'a donné un solide bagage pour la suite de ma carrière. Sans toi, je ne serais jamais allé jusque là. Tu as été aussi celle qui m'a donné envie de continuer dans ce métier. Tu es un modèle de rigueur, de disponibilité et d'ouverture aux autres.

Merci de m'avoir tant appris et tant donné.

Le Docteur **Christian MORETTI**

Pour m'avoir fourni les échantillons des fruits et écorces de tronc de *Caryocar glabrum* et *Caryocar villosum* et apporté de nombreux renseignements botaniques sur la famille des Caryocaraceae.

En témoignage de ma respectueuse gratitude

Le Docteur **Marc LITAUDON**

Pour m'avoir fourni l'échantillon de feuilles de *Guioa crenulata* et apporté des renseignements botaniques sur cette espèce.

En témoignage de ma sincère reconnaissance

J'aimerais également citer ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour plusieurs aspects de ce travail : Isabelle POUNY et Christophe LONG du centre de Recherche sur les substances naturelles de Pierre Fabre, Dominique HARAKAT de l'UMR 6519, Dominique PATIGNY de la FRE 2715, pour la réalisation des spectres de masse ESI-(MS)ⁿ. Je remercie en particulier Madame le Docteur Catherine CARON pour la réalisation des tests de toxicité et de activité antibactérienne, Madame le Docteur Isabelle RENIMEL qui a réalisé les tests dermatocsmétiques au sein des laboratoires Christian Dior, Monsieur le Docteur Michel SAUVAIN de l'UMR 152-IRD Toulouse pour la réalisation des tests antipaludiques et Monsieur Gautier MOROY de L.S.S.B.M., EA3305 Laboratoire de Spectroscopies et Structures Biomoléculaires pour la réalisation des spectres de dichroïsme circulaire.

J'exprime également ma reconnaissance aux autres membres de l'équipe du laboratoire de Pharmacognosie, le Dr. Jean-Marc NUZUILLARD, Elise PROST, Marie-José JACQUIER, Bernard RICHARD, le Dr. Karen PLE, le Dr. Jean-Hugues RENAULT, Agathe MARTINEZ, le Dr. Christophe BLIARD et Patricia DEMORGNY pour leur soutien quotidien, ainsi que le Dr. Pierre WAFFO-TEGUO pour son aide pendant la préparation de mon DEA de Chimie.

Bien que la thèse soit fondamentalement un travail individuel, elle n'aurait pu être menée à bien sans une équipe de collègues qui contribuent au bon fonctionnement du laboratoire, avec lesquels il est possible d'échanger conseils et suggestions, et qui assurent une atmosphère de travail donnant envie de se lever chaque matin. Je remercie pour cela tous mes anciens et actuels collègues du laboratoire de Pharmacognosie. Dans le désordre : Sabrina, Jaqueline, Philomène, Marguerite, Alexandre, Alix, Eldra, Martin, Ali, Virginie, Jean-François, Zouleika et Damien.

Un grand merci à Isabelle, ma femme, pour l'aide apportée pendant la rédaction de ce manuscrit et pour son soutien moral.

Toute ma gratitude va enfin à ma mère pour son soutien tout au long de mes études et durant cette thèse et sans qui je ne serais pas là ...

Cette thèse est dédiée...

À la mémoire de mon père,

À ma mère et à mes frères et sœurs,

À ma belle-famille,

À Isabelle.

Table des matières

Liste d'abréviations	11
Introduction	13
Partie I : Étude chimique de <i>C. glabrum</i> et de <i>C. villosum</i>	14
I. Présentation du genre <i>Caryocar</i>	16
I. 1. Généralités sur le genre <i>Caryocar</i>	16
I. 1. 1. Rappel botanique.....	16
I. 1. 2. Métabolites isolés du genre <i>Caryocar</i>	18
I. 1. 2. 1. Acides gras.....	18
I. 1. 2. 2. Huiles essentielles.....	19
I. 1. 2. 3. Saponosides et autres composés.....	20
I. 1. 3. Utilisation en médecine traditionnelle.....	22
I. 1. 4. Autres usages traditionnels.....	23
I. 1. 4. 1. Poison de pêche.....	23
I. 1. 4. 2. Usage alimentaire.....	23
I. 1. 4. 3. Usage tinctorial.....	23
I. 1. 5. Utilisation en cosmétologie.....	23
I. 1. 6. Activités biologiques.....	24
I. 2. <i>Caryocar glabrum</i> (Aubl.) Pers. subsp. <i>glabrum</i>	26
I. 2. 1. Description botanique.....	26
I. 2. 2. Composition chimique.....	29
I. 3. <i>Caryocar villosum</i> (Aubl.) Pers.....	30
I. 3. 1. Description botanique.....	30
I. 3. 2. Composition chimique.....	33
II. Chimie extractive.....	34
II. 1. Extraction et purification.....	34
II. 1. 1. Purification des saponosides des fruits de <i>Caryocar glabrum</i>	38
II. 1. 1. 1. A partir de la pulpe des fruits (Cgp).....	38
II. 1. 1. 2. A partir de l'enveloppe des fruits (Cge).....	40
II. 1. 2. Purification des composés des écorces de tronc de <i>C. glabrum</i> (Cgt).....	41
II. 1. 3. Purification des saponosides des fruits de <i>C. villosum</i>	43
II. 1. 3. 1. A partir de l'enveloppe des fruits (Cve).....	43
II. 1. 3. 2. A partir de la pulpe des fruits (Cvp).....	44
II. 1. 4. Purification des composés des écorces de tronc de <i>C. villosum</i> (Cvt).....	46
II. 2. Hydrolyses des composés.....	47
II. 2. 1. Hydrolyse acide totale.....	47
II. 2. 1. 1. Protocole.....	47
II. 2. 1. 2. Résultats.....	47
II. 2. 2. Hydrolyse alcaline.....	48
III. Saponosides de <i>Caryocar glabrum</i> et <i>Caryocar villosum</i>	49
III. 1. Présentation des saponosides.....	49
III. 1. 1. Partie aglycone.....	49
III. 1. 2. Partie osidique.....	50
III. 2. Détermination structurale des saponosides de <i>C. glabrum</i>	51
III. 2. 1. Saponosides de la pulpe des fruits (Cgp).....	51
III. 2. 2. Identification de la partie aglycone.....	54
III. 2. 2. 1. Analyse des spectres de RMN ¹ H.....	54
III. 2. 2. 2. Analyse des spectres de RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé.....	56
III. 2. 2. 3. Analyse des spectres COSY.....	56
III. 2. 2. 4. Analyse des spectres HSQC <i>J</i> -modulé.....	59
III. 2. 2. 5. Analyse des spectres HMBC.....	60
III. 2. 2. 6. Analyse des spectres ROESY.....	64
III. 2. 3. Identification de la partie osidique.....	66
III. 2. 3. 1. Structures des monoglucosides Cgp1 et Cgp2 (1 ^{ère} série).....	66
III. 2. 3. 2. Structures des monodesmosides (3- <i>O</i> -[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-]) Cgp3 , Cgp4 , Cgp5 et Cgp6	69
III. 2. 3. 3. Structures des bidesmosides (3- <i>O</i> -[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-], 28- <i>O</i> - β -D-Glc) Cgp10 et Cgp11	71
III. 2. 3. 4. Structure du monodesmoside (3- <i>O</i> -[β -D-Xyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-]).....	

]) Cgp7	73
III. 2. 3. 5. Structures des monodesmosides (3- <i>O</i> -[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-]) Cgp8 et Cgp9	75
III. 2. 3. 6. Structures des monoglucuronides Cgp12 , Cgp13 , Cgp14 , Cgp15 , Cgp26 et Cgp27 (2 ^{ème} série).....	76
III. 2. 3. 7. Structures des monodesmosides (3- <i>O</i> -[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-]) Cgp16 , Cgp17 , Cgp18 , Cgp19 , Cgp28 et Cgp29	79
III. 2. 3. 8. Structures des bidesmosides (3- <i>O</i> -[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-], 28- <i>O</i> - β -D-Glc) Cgp22 , Cgp23 , Cgp24 , Cgp25 et Cgp30	82
III. 2. 3. 9. Structures des monodesmosides (3- <i>O</i> -[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA]) Cgp20 et Cgp21	84
III. 2. 4. Saponosides isolés des écorces de tronc (Cgt).....	87
III. 3. Détermination structurale des saponosides de <i>C. villosum</i>	90
III. 3. 1. Saponosides de l'enveloppe des fruits (Cve).....	90
III. 3. 1. 1. Saponosides communs avec <i>C. glabrum</i> Cve3 , Cve9 , Cve10 , Cve12 , Cve20 et Cve2	92
III. 3. 1. 2. Saponosides connues Cve1 , Cve11 , Cve14 et Cve19	93
III. 3. 1. 3. Saponoside à chaîne disaccharidique de la 2 ^{ème} série, Cve2	95
III. 3. 1. 4. Saponosides à chaîne trisaccharidique de la 2 ^{ème} série, Cve5 et Cve4	96
III. 3. 1. 5. Saponoside à chaîne tétrasaccharidique de la 2 ^{ème} série, Cve6	98
III. 3. 1. 6. Saponosides à chaîne pentasaccharidique de la 2 ^{ème} série, Cve7 et Cve8	101
III. 3. 1. 7. Saponosides à chaîne trisaccharidique [β -D-Xyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-] de la 1 ^{ère} série, Cve13 et Cve22	103
III. 3. 1. 8. Saponosides à chaîne trisaccharidique [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-] de la 1 ^{ère} série, Cve15 et Cve23	105
III. 3. 1. 9. Saponosides à chaîne tétrasaccharidique de la 1 ^{ère} série, Cve16 , Cve17 et Cve24	107
III. 3. 1. 10. Saponosides à chaîne pentasaccharidique de la 1 ^{ère} série, Cve18 , Cve25 et Cve26	110
III. 4. 3. Saponosides des écorces de tronc (Cvt).....	122
III. 3. 2. 1. Saponoside Cvt9	123
III. 3. 2. 2. Saponoside Cvt10	123
III. 4. Conclusion.....	126
IV. Polyphénols de <i>Caryocar glabrum</i> et de <i>Caryocar villosum</i>	132
IV. 1. Présentation générale des polyphénols.....	132
IV. 1. 1. Coumarines.....	133
IV. 1. 1. 1. Coumarines simples.....	133
IV. 1. 1. 2. 3,4-dihydroisocoumarines.....	133
IV. 1. 2. Flavonoïdes.....	134
IV. 1. 3. Tanins.....	135
IV. 1. 4. 1. Gallotanins.....	135
IV. 1. 3. 2. Ellagitanins.....	136
IV. 1. 3. 3. Tanins complexes.....	136
IV. 1. 3. 4. Tanins condensés.....	136
IV. 2. Détermination structurale des polyphénols des écorces de tronc de <i>C. glabrum</i>	138
IV. 2. 1. Glucosides phénoliques.....	139
IV. 2. 1. 1. Glucosides connus Cgt1 et Cgt2	139
IV. 2. 1. 2. Glucosides nouveaux Cgt3 et Cgt4	142
IV. 2. 2. Galloylhamameloses.....	146
IV. 2. 2. 1. Composé Cgt5	146
IV. 2. 2. 2. Composé Cgt6	149
IV. 2. 2. 3. Composé Cgt7	151
IV. 2. 3. 3,4-dihydroisocoumarines.....	153
IV. 2. 3. 1. Structure plane de Cgt8 et Cgt9	153
IV. 2. 3. 2. Détermination de la configuration absolue.....	158
IV. 2. 3. 3. Origine biogénétique.....	162
IV. 2. 4. Ellagitanin Cgt12	163
IV. 3. Détermination structurale des ellagitanins des écorces de tronc de <i>C. villosum</i>	164
IV. 3. 1. Acide ellagique Cvt1	164
IV. 3. 2. Composé connu Cvt2	165
IV. 3. 3. Ellagitanins nouveaux.....	167
IV. 3. 3. 1. Composé Cvt3	168
IV. 3. 3. 2. Composé Cvt4	168

IV. 3. 3. 2. Composé Cvt5	169
IV. 4. Conclusion.....	171
Partie II : Étude chimique de <i>Guioa crenulata</i>	172
I. Présentation des Sapindaceae.....	173
I. 1. Rappel botanique.....	173
I. 2. Travaux antérieurs sur les Sapindaceae.....	175
I. 2. 1. Saponosides.....	175
I. 2. 2. Terpènes et dérivés.....	176
I. 2. 2. 1. Sesquiterpènes glycosylés.....	177
I. 2. 2. 2. Diterpènes.....	178
I. 2. 2. 3. Triterpènes libres et Stérols.....	178
I. 2. 2. 4. Polyisoprènes.....	179
I. 2. 3. Hétérosides d'alcool à longue chaîne.....	179
I. 2. 4. Flavonoïdes.....	180
I. 2. 5. Proanthocyanidines.....	180
I. 2. 6. Divers.....	180
II. Botanique et travaux antérieurs de <i>Guioa crenulata</i> Radlk.	182
III. Chimie extractive.....	184
III. 1. Extraction et purification des composés des feuilles.....	184
III.2. Hydrolyse acide totale.....	185
IV. Chimie structurale.....	186
IV. 1. Polyphénols isolés.....	186
IV. 1. 1. Hétérosides flavoniques.....	187
IV. 1. 1. 1. Composés Gc1 et Gc2	187
IV. 1. 1. 2. Composé Gc3	191
IV. 1. 2. Proanthocyanidine Gc4	193
IV. 1. 2. 1. Identification de l'unité terminale.....	194
IV. 1. 2. 2. Identification de l'unité centrale.....	198
IV. 1. 2. 3. Identification de l'unité supérieure.....	200
IV. 2. Détermination structurale des hétérosides sesquiterpéniques.....	203
IV. 2. 1. Composé Gc5	203
IV. 2. 2. Composé Gc6	206
IV. 2. 3. Composé Gc7	207
IV. 2. 4. Composé Gc8	208
V. Conclusion.....	210
Partie III : Étude des activités biologiques	211
I. Activité hémolytique des saponosides.....	212
I. 1. Travaux antérieurs.....	212
I. 1. 1. Mécanismes de l'hémolyse par les saponosides.....	112
I. 1. 2. Relations structure-activité hémolytique.....	213
I. 1. 2. 1. Influence de la génine.....	213
I. 1. 2. 2. Influence de la chaîne osidique.....	213
I. 2. Activité hémolytique des saponosides des <i>Caryocar</i>	216
I. 2. 1. Résultats.....	216
I. 2. 2. Discussion.....	218
I. 3. Conclusion.....	219
II. Autres activités biologiques	220
II. 1. Toxicité sur <i>Artemia salina</i>	220
II. 1. 1. Saponosides de <i>Caryocar glabrum</i>	220
II. 1. 2. Extraits de <i>Caryocar villosum</i>	222
II. 2. Activité antibactérienne.....	223
II. 3. Activité antipaludique.....	223
II. 3. 1. Test <i>in vitro</i> sur <i>Plasmodium</i>	223
II. 3. 2. Inhibition de la Protéine kinase.....	223
II. 4. Activité dermocosmétique.....	225
III. Activités biologiques des extraits de <i>Guioa crenulata</i>	226
IV. Conclusion.....	226
Conclusion générale	229

Partie IV : Partie expérimentale	235
I. Matériels et appareillage	236
I. 1. Chimie extractive.....	236
I. 1. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	236
I. 1. 2. Chromatographie sous pression réduite (VLC)	236
I. 1. 3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	236
I. 1. 4. Résine échangeuse d'ions.....	237
I. 1. 5. La chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	237
I. 2. Chimie structurale.....	238
I. 2. 1. Spectroscopie de RMN.....	238
I. 2. 2. Spectrométrie de masse.....	238
I. 2. 3. Pouvoir rotatoire spécifique.....	238
I. 2. 4. Spectrométrie UV-visible.....	238
I. 2. 5. Dichroïsme circulaire (DC).....	239
I. 2. 6. Spectrométrie Infra-Rouge (IR)	239
I. 3. Tests biologiques.....	239
I. 3. 1. Test hémolytique.....	239
I. 3. 1. 1. Préparation des solutions.....	239
I. 3. 1. 2. Préparation de la gamme d'échantillons.....	239
I. 3. 1. 3. Mesures.....	240
I. 3. 2. Toxicité sur les crevettes d'eau salée (<i>Artemia salina</i>)	240
I. 3. 2. 1. Préparation du milieu de culture et des larves.....	240
I. 3. 2. 2. Préparation des échantillons.....	240
I. 3. 2. 3. Mesures.....	240
I. 3. 3. Activité antibactérienne.....	241
II. Extraction, purification et hydrolyse	242
II. 1. Saponosides et composés polyphénoliques de <i>Caryocar glabrum</i>	242
II. 1. 1. À partir de la pulpe des fruits (Cgp)	242
II. 1. 2. À partir de l'enveloppe des fruits (Cge)	243
II. 1. 3. À partir des écorces de tronc (Cgt)	243
II. 2. Saponosides et composés polyphénoliques de <i>Caryocar villosum</i>	247
II. 2. 1. À partir de l'enveloppe des fruits (Cve)	247
II. 2. 2. À partir de la pulpe des fruits (Cvp)	250
II. 2. 3. À partir des écorces de tronc (Cvt)	250
II. 3. Composés des feuilles de <i>Guioa crenulata</i>	252
II. 3. 1. Purification de l'extrait aqueux.....	252
II. 3. 2. Purification de l'extrait d'acétate d'éthyle.....	252
II. 4. Hydrolyse.....	254
II. 4. 1. Hydrolyse acide	254
II. 4. 1. 1. Protocole.....	254
II. 4. 1. 2. Résultats.....	255
II. 4. 2. Hydrolyse alcaline.....	255
III. Caractéristiques des composés isolés	256
III. 1. Saponosides des <i>Caryocar</i>	258
III. 1. 1. Saponoside Cgp1 = Cve9	258
III. 1. 2. Saponoside Cgp2	258
III. 1. 3. Saponoside Cgp3	258
III. 1. 4. Saponoside Cgp4 = Cve10	258
III. 1. 5. Saponoside Cgp5	259
III. 1. 6. Saponoside Cgp6	259
III. 1. 7. Saponoside Cgp7	259
III. 1. 8. Saponoside Cgp8	260
III. 1. 9. Saponoside Cgp9	260
III. 1. 10. Saponoside Cgp10	260
III. 1. 11. Saponoside Cgp11	261
III. 1. 12. Saponoside Cgp12	261
III. 1. 13. Saponoside Cgp13	261
III. 1. 14. Saponoside Cgp14 = Cvt6	262
III. 1. 15. Saponoside Cgp15	262
III. 1. 16. Saponoside Cgp16	262
III. 1. 17. Saponoside Cgp17	263
III. 1. 18. Saponoside Cgp18 = Cvt7	263

III. 1. 19. Saponoside Cgp19	263
III. 1. 20. Saponoside Cgp20	264
III. 1. 21. Saponoside Cgp21	264
III. 1. 22. Saponoside Cgp22	264
III. 1. 23. Saponoside Cgp23 = Cve3	265
III. 1. 24. Saponoside Cgp24	265
III. 1. 25. Saponoside Cgp25	265
III. 1. 26. Saponoside Cgp26	266
III. 1. 27. Saponoside Cgp27	266
III. 1. 28. Saponoside Cgp28	266
III. 1. 29. Saponoside Cgp29	267
III. 1. 30. Saponoside Cgp30	267
III. 1. 31. Saponoside Cgt10 = Cvt8	267
III. 1. 32. Saponoside Cgt11 = Cvt11	268
III. 1. 33. Saponoside Cve1	268
III. 1. 34. Saponoside Cve2	268
III. 1. 35. Saponoside Cve4	269
III. 1. 36. Saponoside Cve5	269
III. 1. 37. Saponoside Cve6	269
III. 1. 38. Saponoside Cve7	270
III. 1. 39. Saponoside Cve8	270
III. 1. 40. Saponoside Cve11	270
III. 1. 41. Saponoside Cve13	271
III. 1. 42. Saponoside Cve14	271
III. 1. 43. Saponoside Cve15	272
III. 1. 44. Saponoside Cve16 et Cve17	272
III. 1. 45. Saponoside Cve18	273
III. 1. 46. Saponoside Cve19	273
III. 1. 47. Saponoside Cve22	273
III. 1. 48. Saponoside Cve23	274
III. 1. 49. Saponoside Cve24	274
III. 1. 50. Saponoside Cve25	274
III. 1. 51. Saponoside Cve26	275
III. 1. 52. Saponoside Cvt9	275
III. 1. 53. Saponoside Cvt10	276
III. 2. Polyphénols des <i>Caryocar</i>	287
III. 2. 1. Composé Cgt1	287
III. 2. 2. Composé Cgt2	287
III. 2. 3. Composé Cgt3	287
III. 2. 4. Composé Cgt4	287
III. 2. 5. Composé Cgt5	287
III. 2. 6. Composé Cgt6	288
III. 2. 7. Composé Cgt7	288
III. 2. 8. Composé Cgt8	288
III. 2. 9. Composé Cgt9	288
III. 2. 10. Composé Cgt12	288
III. 2. 11. Composé Cvt1	289
III. 2. 13. Composé Cvt3	289
III. 2. 14. Composé Cvt4	289
III. 2. 15. Composé Cvt5	289
III. 3. Polyphénols de <i>Guioa crenulata</i>	290
III. 3. 1. Composé Gc1	290
III. 3. 2. Composé Gc2	290
III. 3. 3. Composé Gc3	290
III. 3. 4. Composé Gc4	290
III. 4. Hétérosides sesquiterpéniques de <i>G. crenulata</i>	291
III. 4. 1. Composé Gc5	291
III. 4. 2. Composé Gc6	291
III. 4. 3. Composé Gc7	291
III. 4. 4. Composé Gc8	291
Références bibliographiques	292

Liste d'abréviations**Dénomination des sucres :**

Gal	:	β -D-galactopyranose
Glc	:	β -D-glucopyranose
GlcA	:	acide β -D-glucuronopyranosique
Ham (<i>f</i>)	:	β -D-hamamélofuranose
Ham (<i>p</i>)	:	β -D-hamamélopyranose
Rha	:	α -L-rhamnopyranose
Xyl	:	β -D-xylopyranose

Solvants et réactifs :

Ac ₂ O	:	anhydride acétique
AcOEt	:	acétate d'éthyle
AcOH	:	acide acétique
AlCl ₃	:	Chlorure d'aluminium
BuOH	:	butanol
CD ₃ OD	:	méthanol deutérié
CHCl ₃	:	chloroforme
DMSO- <i>d</i> ₆	:	diméthylsulfoxyde deutéré
H ₂ SO ₄	:	acide sulfurique
isoPro	:	isopropanol
KOH	:	hydroxyde de potassium
Me ₂ CO- <i>d</i> ₆	:	acétone deutéré
MeCN	:	acétonitrile
MeCOEt	:	méthyléthylcétone
MeOH	:	méthanol
MeONa	:	Méthanolate de sodium
P ₂ O ₅	:	oxyde de phosphore
TFA	:	acide trifluoroacétique

Techniques de chromatographie :

CCM	:	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	:	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPP	:	Chromatographie sur Plaque Préparative
l	:	litre
ml	:	millilitre
min	:	minute
Rdt	:	Rendement
<i>R_f</i>	:	Rapport frontal
SiO ₂	:	silice normale 60F
<i>tr</i>	:	temps de rétention
VLC	:	Chromatographie liquide sous vide

Détermination structurale :

<i>ax</i>	: axial
COSY	: COrelated SpectroscopY
D ₂ O	: eau deutérée
<i>d</i>	: doublet
<i>dd</i>	: doublet de doublets
<i>ddd</i>	: doublet de doublets de doublets
<i>dl</i>	: doublet large
<i>dq</i>	: doublet de quadruplets
<i>dt</i>	: doublet de triplets
<i>eq</i>	: équatorial
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Connectivity
<i>J</i> (Hz)	: constante de couplage exprimée en Hertz
<i>m</i>	: multiplet
<i>nOe</i>	: nuclear Overhauser effect
NOESY	: Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
ppm	: parties par million
<i>q</i>	: quadruplet
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹³ C	: Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ¹ H	: Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<i>rOe</i>	: rotation Overhauser effect
ROESY	: ROtating Overhauser Effect SpectroscopY
<i>s</i>	: singulet
<i>sl</i>	: singulet large
<i>t</i>	: triplet
<i>td</i>	: triplet de doublets
TOCSY	: TOal Correlation SpectroscopY
<i>w</i> _{1/2}	: largeur spectrale à mi-hauteur
δ	: déplacement chimique exprimé en ppm
ESI	: ElectroSpray Ionization (ionisation par électrospray)
<i>m/z</i>	: masse/charge électrique
MS ⁿ	: Spectrométrie de Masse en Tandem multi étapes (n= nombre de collisions successives) ESI-MS/MS = MS ⁿ
SM	: Spectrométrie de Masse
<i>uma</i>	: unité de masse atomique
IR	: Infra-Rouge
UV	: Ultra-Violet
λ_{max}	: longueur d'onde maximale
$[\alpha]_D$: Pouvoir rotatoire spécifique

Activité biologique :

CI ₅₀	: Concentration Inhibitrice à 50%
CMB	: Concentration Minimale bactéricide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DH ₁₀₀	: Dose Hémolitique minimale pour 100% d'hémolyse
DH ₅₀	: Dose Hémolitique minimale pour 50% d'hémolyse
LC ₁₀₀	: Lethal Concentration à 100% (Concentration létale à 100%)
LC ₅₀	: Lethal Concentration à 50% (Concentration létale à 50%)

Introduction

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle pour la découverte de nouveaux médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans chimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents.

Dans le cadre de la recherche des substances naturelles d'origine végétale à activités biologiques, il est donc préférable de ne pas sélectionner les plantes à étudier en se basant simplement sur le hasard, mais selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier, y compris dans les pays occidentaux. Les deux espèces de Caryocaraceae, *Caryocar glabrum* et *Caryocar villosum* que nous avons étudiées sont utilisées dans la médecine traditionnelle en Guyane. C'est dans le cadre d'une valorisation des matières végétales en vue d'une utilisation thérapeutique ou cosmétique que l'étude de ces deux espèces nous a été confiée par le Dr. C. Moretti (IRD-Guyane).

Une autre possibilité est d'étudier les plantes d'un point de vue chimiotaxonomique. Par exemple, les espèces de la famille des Sapindaceae contiennent souvent des saponosides et les structures de ces molécules diffèrent entre les deux sous-familles, permettant une classification chimiotaxonomique. C'est dans le cadre de la poursuite de l'étude chimiotaxonomique de la famille des Sapindaceae que nous avons entrepris l'étude chimique de *Guioa crenulata* qui nous a été confiée par le Dr. M. Litaudon (ICSN-Gif sur Yvette).

Ces trois plantes n'ont encore jamais fait l'objet d'investigation chimique, à part l'huile des fruits de *C. villosum*. L'étude chimique des métabolites de ces trois espèces a consisté premièrement en l'étude de ceux des fruits et des écorces de tronc des deux espèces de Caryocaraceae desquels nous avons isolé et déterminé les structures de nombreux saponosides et composés polyphénoliques. Dans un second temps, nous avons purifié et

déterminé les structures des composés isolés des feuilles de *Guioa crenulata*. La troisième partie a consisté en la mesure de quelques activités biologiques dont l'activité hémolytique des saponosides afin de poursuivre notre étude sur les relations structure-activité hémolytique, reconnues à cette classe d'hétérosides.

Notre travail se décompose en trois parties :

◆ **Étude chimique de *Caryocar glabrum* et de *Caryocar villosum***

- Présentation du genre *Caryocar*
- Chimie extractive : extraction, hydrolyse et purification des composés
- Détermination structurale des saponosides de *Caryocar glabrum* et de *Caryocar villosum*
- Détermination structurale des polyphénols de *Caryocar glabrum* et de *Caryocar villosum*

◆ **Étude chimique de *Guioa crenulata***

- Présentation des Sapindaceae
- Chimie extractive : extraction, hydrolyse et purification des composés
- Détermination structurale des polyphénols de *Guioa crenulata*
- Détermination structurale des sesquiterpènes de *Guioa crenulata*

◆ **Activités biologiques des extraits et de composés isolés**

- Activité hémolytique des saponosides de *Caryocar glabrum*
- Autres activités biologiques

Première partie
Étude chimique de
Caryocar glabrum et *Caryocar villosum*

- I. Présentation du genre *Caryocar*
- II. Chimie extractive
- III. Saponosides de *Caryocar glabrum* et *Caryocar villosum*
- IV. Polyphénols de *Caryocar glabrum* et *Caryocar villosum*
- V. Conclusion

I. Présentation du genre *Caryocar*

I. 1. Généralités sur le genre *Caryocar*

I. 1. 1. Rappel botanique

Les plantes de la famille des Caryocaraceae sont présentes dans les forêts humides des régions tropicales, principalement en Amérique du Sud. On dénombre 25 espèces réparties en deux genres : *Caryocar* et *Anthodiscus* ; le genre *Caryocar* comprenant 16 espèces ^{1,2} (tableau 1).

Tableau 1 : Espèces du genre *Caryocar* ².

	<i>Espèces</i>
1	<i>C. amygdaliferum</i> Mutis
2	<i>C. amygdaliforme</i> G. Don
3a	<i>C. brasiliense</i> Camb.ssp. <i>brasiliense</i>
3b	<i>C. brasiliense</i> Camb.ssp. <i>intermedium</i> (Wittmack) Prance & Freitas da Silva
4	<i>C. coriaceum</i> Wittmack
5	<i>C. costaricense</i> Donnell Smith
6	<i>C. cuneatum</i> Wittmack
7	<i>C. dentatum</i> Gleason
8	<i>C. edule</i> Casaretto
9a	<i>C. glabrum</i> (Aubl.) Pers. sp. <i>glabrum</i>
9b	<i>C. glabrum</i> (Aubl.) Pers. ssp. <i>Parviflorum</i> (A. C. Smith) Prance & Freitas da Silva
9c	<i>C. glabrum</i> ssp. <i>album</i> Prance & Freitas da Silva
10	<i>C. gracile</i> Wittmack
11	<i>C. harlingii</i> Prance & Encarnacion
12	<i>C. microcarpum</i> Ducke
13	<i>C. montanum</i> Prance
14	<i>C. nuciferum</i> L.
15	<i>C. pallidum</i> A. C. Smith
16	<i>C. villosum</i> (Aubl.) Pers.

Cette famille botanique appartient à l'ordre des *Theales*, superordre des *Theanae*, sous-classe des *Dilleniidae*, classe des *Magnoliidae* (Dicotylédones), division des *Magnoliopsida* (Angiospermes), superdivision des *Spermatophyta* ³.

Les Caryocaraceae sont des arbres, ou plus rarement des arbustes à feuillage vert persistant. Les feuilles sont alternes dans le genre *Anthodiscus* et opposées dans le genre *Caryocar*. Elles sont coriaces, pétiolées et peuvent posséder des stipules caduques. Elles sont composées trifoliolées ou parfois bipennées jusqu'à cinq folioles. Le limbe est palmé à marge entière ou dentée (figure 1) ³.

Les fleurs sont hermaphrodites, pourvues à la fois de nombreuses étamines (50 à 200) et de carpelles (4 à 20). Elles sont regroupées en inflorescence terminale racémeuse. Le périanthe est constitué d'un calice à 10-12 sépales et d'une corolle à 5 pétales.

Les fruits se présentent sous la forme d'une masse charnue avec un péricarpe séparable. Les graines sont réniformes avec ou sans endosperme, et possèdent un embryon de petite taille contenant deux petits cotylédons³.

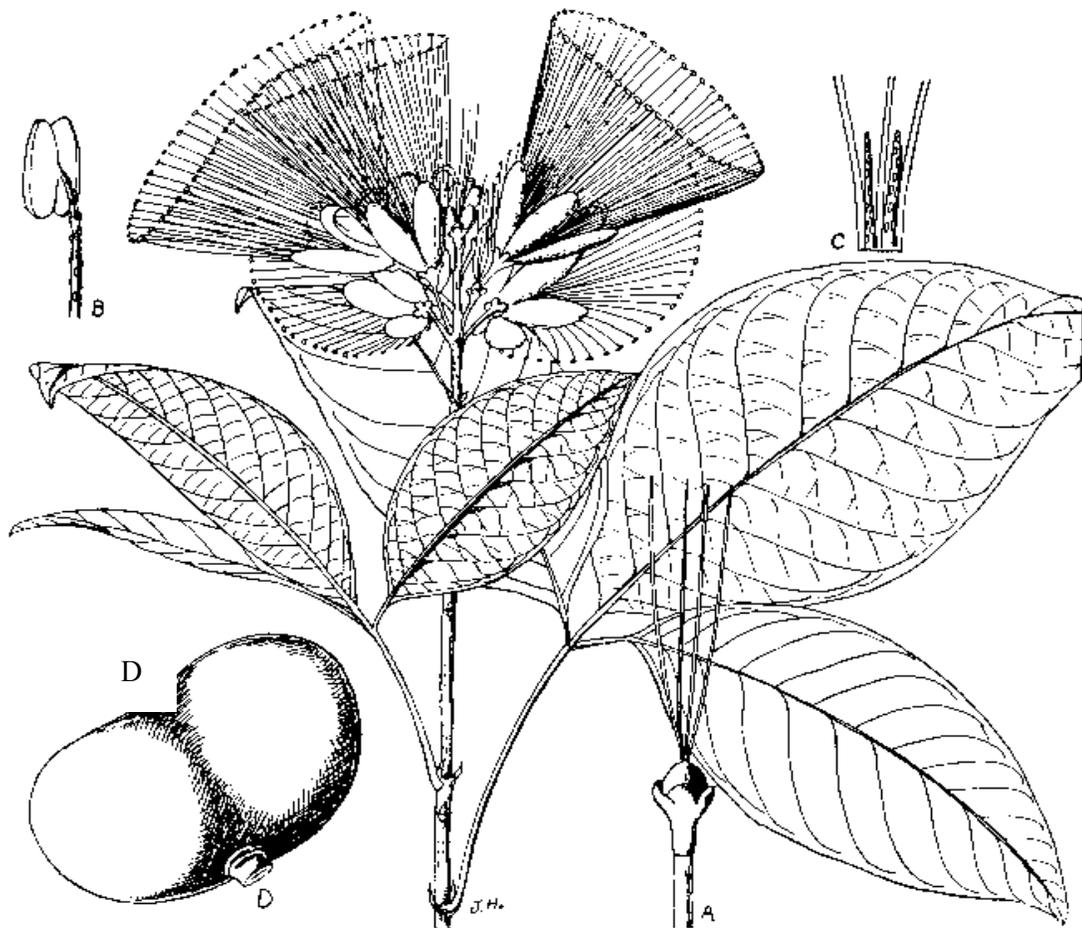


Figure 1 : *Caryocar glabrum*, branche fleurie³.

- A : carpelle
- B : étamine
- C : base du filament
- D : fruit

I. 1. 2. Métabolites isolés du genre *Caryocar*

I. 1. 2. 1. Acides gras

La composition chimique de l'huile des fruits de *C. villosum*⁴ et de *C. coriaceum*⁵ a fait l'objet de deux études. Les fruits de ces deux espèces se caractérisent par une teneur élevée en matières grasses (70% de la matière sèche), avec une majorité d'acides gras insaturés. Les principaux sont les acides palmitique (C₁₆) et oléique (C₁₈, Δ⁹) qui représentent plus de 50% de la matière grasse totale chez *C. villosum* et environ 95% chez *C. coriaceum*.

Chez *C. coriaceum*, l'huile se compose principalement de triacylglycérols (95%), d'acides gras libres (1,7%), de mono- et de diacylglycérols (1,7%), de squalène (0,3%) et de stérols (0,1%) dont 63% de stigmastérol et 37% de β-sitostérol. D'autres composés et acides gras sont présents mais en quantité négligeable (tableau 2)⁵.

Les principaux acides gras qui composent les triacylglycérols sont les acides oléique (48%) et palmitique (45%) (tableau 3).

Tableau 2 : Principaux composants de l'huile de graine et de pulpe de *C. coriaceum*⁵.

Principaux Composants	Graine (en %)	Pulpe (en %)
Triacylglycérols	95,1	95,3
Acides gras libres	1,7	1,6
Diacylglycérols	1,6	1,5
Squalène	0,3	0,3
Phospholipides	0,2	-
Stérols	0,1	0,1
Monoacylglycérols	0,1	0,1
Non identifiés	0,9	1,1

Tableau 3 : Composition des triacylglycérols de l'huile de graine et de pulpe de *C. coriaceum*⁵.

Structure des triacylglycérols	Graine (en %)	Pulpe (en %)	
— acide palmitique	3	< 0,1	
— acide palmitique			
— acide palmitique			
— acide oléique	52	30	
— acide palmitique			— acide palmitique
— acide palmitique			— acide palmitique
— acide palmitique	38	52	
— acide oléique			— acide oléique
— acide oléique			— acide oléique
— acide oléique	7	18	
— acide oléique			
— acide oléique			

I. 1. 2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles des graines et des feuilles de *C. brasiliense* ont fait l'objet d'une étude récente ⁶. Elles se composent de mono- et de sesquiterpènes et d'hydroalcanes (tableau 4). Elles représentent, selon la saison, de 0,01 à 0,1% de la matière sèche. Le composant majoritaire de l'huile essentielle des graines est l'éthyle hexanoate 71% (saison des pluies) et 91% (saison sèche), tandis que l'huile essentielle des feuilles contient de l'octacosane 9,3% (saison sèche) et 18,6% (saison des pluies), de l'heptadécane 14,9% (saison sèche) et 16,3% (saison des pluies) et de l'hexadécanol 15,5% (saison sèche) et 13,0% (saison des pluies) ⁶.

Tableau 4 : Composition de l'huile essentielle des feuilles et des graines de *C. brasiliense* (saison sèche) ⁶.

Principaux Composants	Graines (en %)	Feuilles (en %)
Monoterpènes	-	14,1
(<i>Z</i>)- β -Ocimène	-	-
Linalool	-	7,3
α -Terpinéol	-	4,4
Nérol	-	0,1
Géraniol	-	2,3
Sesquiterpènes	-	15,9
(<i>E</i>)-Caryophyllène	-	1,1
(<i>E</i>)-Nérolidol	-	1,5
Spathulénol	-	0,8
Caryophyllène oxide	-	7,2
Viridiflorol	-	2,3
α -Muurolol	-	2,0
α -Cadinol	-	1,0
C13-<i>Novisoprénoids</i>	-	12,2
Géranyl acetone	-	5,8
(<i>E</i>)- β -ionone	-	6,4
Hydroalcanes aliphatiques	100,0	44,3
Acide hexanoïque	0,8	-
Ethyle hexanoate	91,0	-
Ethyle-2-hexenoate	3,5	-
Ethyle octenoate	3,5	-
Ethyle 2-octanoate	1,2	-
Heptadecane	-	14,9
Hexadécanol	-	15,5
Ambrettolide	-	4,6
Octacosane	-	9,3

I. 1. 2. 3. Saponosides et autres composés

Les feuilles de *C. microcarpum* contiennent une quantité importante de tanins galliques, d'acide ellagique, d'acide gallique et de gallate de méthyle. Elles renferment également des glycosides de l'acide oléanolique et de ces dérivés hydroxylés : l'acide 2 β -hydroxyoléanolique, l'hédéragénine et la bayogénine, mais aucune étude n'a permis d'élucider la structure des glycosides (figure 2)⁷.

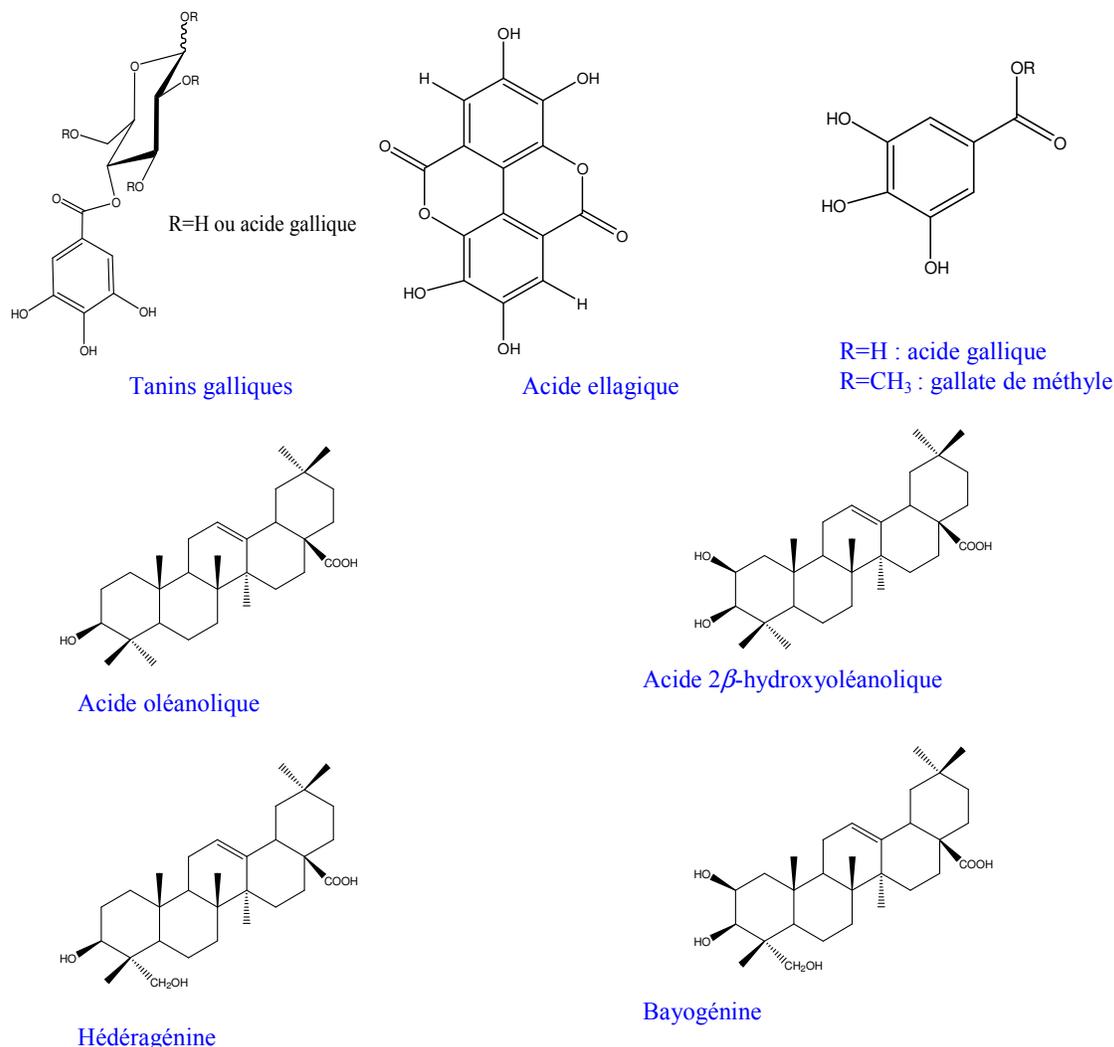


Figure 2 : Structures des polyphénols et des sapogénines des feuilles de *C. microcarpum*.

La présence des saponosides dans les feuilles de *C. brasiliense* a été révélée mais seules les structures de leurs génines ont été identifiées après une hydrolyse acide : acide oléanolique, friedéline et friedélanol. Des stérols, β -sitostérol et stigmastérol, ont également été détectés dans cette espèce⁸.

Les fruits de *C. brasiliense* contiennent des caroténoïdes dont les majoritaires ont été identifiés comme étant la violaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine et le β -carotène (1,2 $\mu\text{g/g}$). D'autres caroténoïdes présents en quantité moindre, ont également été détectés et identifiés comme la β -cryptoxanthine, l' α -carotène et la néoxanthine (figure 3) ⁹.

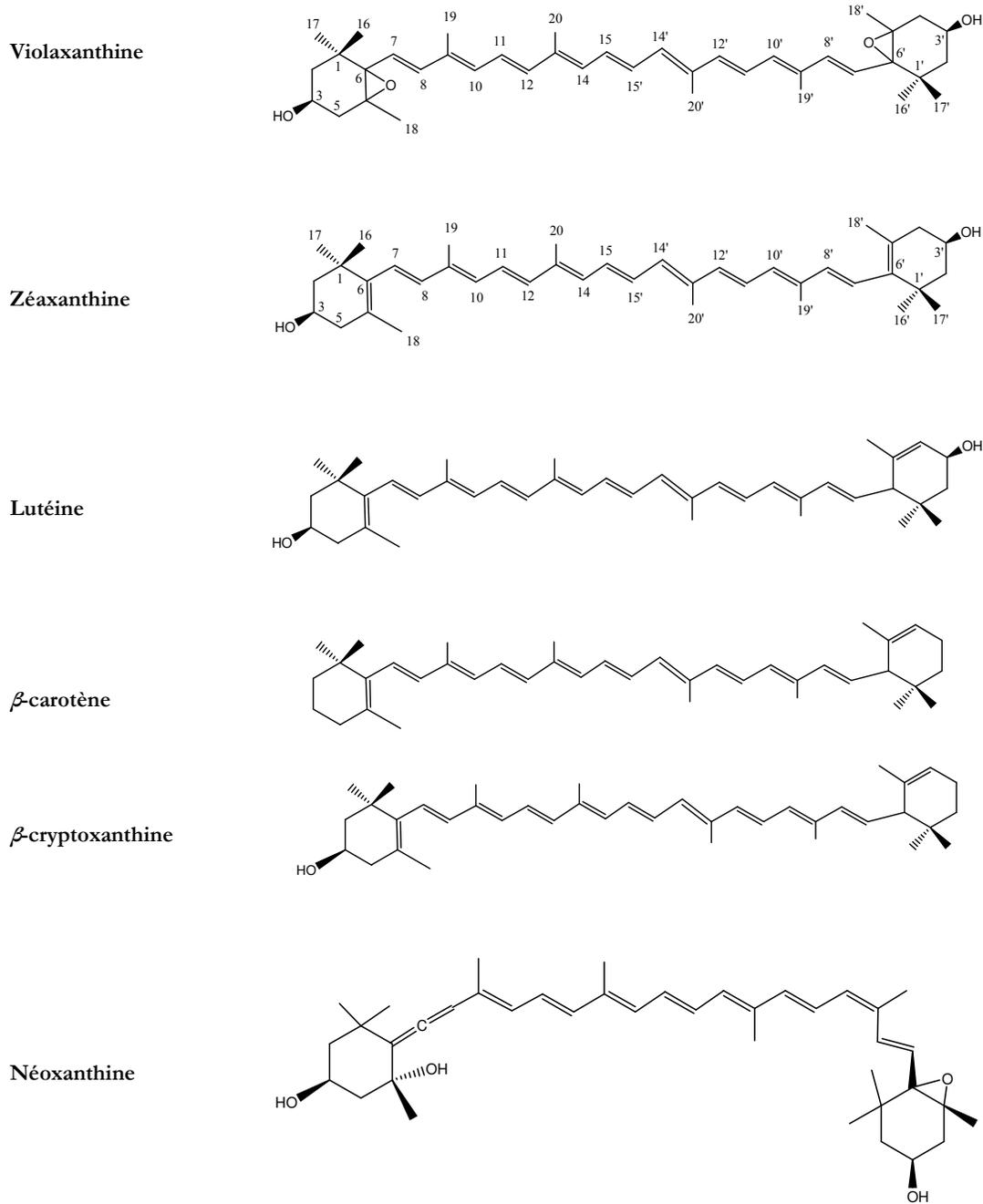


Figure 3 : Structure des caroténoïdes des fruits de *C. brasiliense*.

I. 1. 3. Utilisation en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces du genre *Caryocar* sont utilisées dans les médecines traditionnelles d'Amérique du Sud.

En Guyane, l'usage médicinal de cette famille est limité aux seuls « Palikur » (ethnie de Guyane et du Brésil). Les écorces de *Caryocar glabrum* sont utilisées pour soigner les tumeurs externes. L'écorce est grillée avec des morceaux de carapace de tortue terrestre (*Geochelone denticulata*). Le tout est réduit en poudre et mélangé à de la chandelle molle puis étalé sur le fond d'unealebasse. Le mélange est chauffé à feu doux et on l'applique sur la tumeur. Les « Kubeos » et les « Tukanos » du nord-ouest amazonien ingèrent les graines de cet arbre en cas de dysménorrhée¹⁰.

L'écorce de *Caryocar microcarpum* est un remède contre la mycose nommée « puwuski » et contre les micro-filaires « wiuri » en association avec les feuilles d'*Elephantopus scaber* (Asteraceae) et de *Lagenaria siceraria* (Cucurbitaceae). Le tout est mis à bouillir dans de l'eau jusqu'à épaississement du liquide. Les soins sont pratiqués sous forme de bains de pieds¹⁰.

La pulpe grasse de *Caryocar villosum* est quelquefois utilisée par l'ethnie des « Wayâpi » pour fabriquer une huile qui, mélangée au roucou, aurait les mêmes propriétés défatigantes que *Carapa guianensis* (Meliaceae)¹⁰.

Au Brésil, la décoction des feuilles de *Caryocar brasiliense* est utilisée comme tonique, aphrodisiaque, pour soigner les maladies hépatiques et la grippe^{6,11}.

L'huile extraite des graines et de la pulpe des fruits de *Caryocar brasiliense* possède des propriétés anti-inflammatoires. Elle est utilisée contre la grippe et pour soigner les problèmes des voies respiratoires comme la bronchite, l'asthme, la toux et la tuberculose pulmonaire^{6, 11}. Cette huile est utilisée comme antiseptique externe pour traiter les plaies cutanées, favoriser la cicatrisation des blessures et dans les tuméfactions et contusions⁶.

L'huile de *Caryocar brasiliense* est utilisée avec l'huile de *Caryocar villosum* pour le traitement de dermatophytoses comme l'herpès tonsurant (*Tinea capitis*)⁶.

Certaines espèces du genre *Caryocar* sont très toxiques comme *Caryocar gracile* qui est utilisé par les « Tukano » pour tuer les chiens en douceur¹⁰.

I. 1. 4. Autres usages traditionnels

I. 1. 4. 1. Poison de pêche

Les péricarpes de *C. glabrum* mélangés quelques jours avant l'emploi à de la boue sont utilisés par certaines ethnies amazoniennes comme poison de pêche. Pour un même usage le mésocarpe et l'endocarpe du fruit vert sont mixés avec de l'eau. L'épicarpe des fruits de *C. glabrum* et *C. villosum* est utilisé comme ichtyotoxique en Colombie, au Brésil et au Venezuela. Les feuilles de *C. microcarpum* sont utilisées de la même façon par les « Witoto » et les « Kubeos » d'Amazonie colombienne¹⁰.

I. 1. 4. 2. Usage alimentaire

Les graines et la pulpe des fruits de *Caryocar brasiliense* et *Caryocar villosum* fournissent, par pression, une huile de table dénommée « piquià », vendue sur les marchés amazoniens. Elle est utilisée à la place du beurre¹⁰.

Cuite à l'eau salée, la masse butyreuse qui recouvre les noyaux des fruits de *Caryocar villosum* est fort appréciée quand elle est douce, mais elle est parfois d'une amertume prononcée. Après cuisson à l'eau, la pulpe des fruits est très appréciée en Amazonie pour sa saveur et son odeur agréable. Les graines sont également comestibles cuites ou crues⁴.

I. 1. 4. 3. Usage tinctorial

Plusieurs espèces sont utilisées comme colorant corporel. Dans leur mythologie, les « Wayãpi » ont conservé le souvenir que la graisse s'exsudant du mésocarpe de *Caryocar villosum* et des amandes de *Caryocar glabrum* bleuit au contact de la peau. Les fruits sont aussi utilisés comme colorant jaune pour les vêtements (présence de tanins)¹⁰.

I. 1. 5. Utilisation en cosmétologie

De l'amande des fruits de *Caryocar villosum*, on extrait une graisse blanche, fine, solide en dessous de 24 degrés, fondant à la chaleur de la main en une huile incolore, excellente pour la parfumerie. Elle sert encore à la fabrication du savon^{4,10}.

L'huile de la pulpe des fruits de *C. brasiliense* est commercialisée sous le nom Crodamazon Pequi[®]¹². Sa composition en acides gras lui confère des vertus nutritives intenses et protectrices. Elle est riche en vitamine A¹³.

L'huile des pulpes et des graines de *C. villosum*, *C. coriaceum* et *C. brasiliense* est commercialisée par les laboratoires Noveon[®] sous le nom de Chemyforest[™] Pequi CG¹⁴. Riche en caroténoïdes (pro-vitamine A), elle possède un effet antioxydant et protège la peau

de la sécheresse par ses acides gras riches en omega-3 et -6. Elle intervient dans la formulation de produits cutanés, capillaires et dans des produits cosmétiques comme les mascaras. La concentration recommandée est de 1 à 5%. Par exemple, cette huile entre dans la composition d'un gel douche hydratant commercialisé par les mêmes laboratoires sous le nom de Honey and Almond Body Wash Featuring[®] 14.

L'extrait des fruits de *C. coriaceum* et *C. brasiliense* entre dans la composition des produits de beauté comme les crèmes préparées par les laboratoires Clarins[®] 13 :

- Crème Haute Exigence Jour[®]
- Crème Haute Exigence Soir[®]
- Crème Total Double Sérum Multi-Régénérant[®]

pour ses propriétés nourrissante, protectrice et stimulante.



Une gamme de produits contenant des extraits de *C. glabrum*, *C. villosum*, *C. coriaceum* et *C. brasiliense* est commercialisée au Japon, au Canada et en Angleterre par les laboratoires Lion Corp[®] (shampooing antipelliculaire, crèmes de soin pour cheveux, crème et émulsions à usage cosmétique...) 15.

I. 1. 6. Activités biologiques

L'extrait éthanolique des feuilles et des écorces de tronc de *Caryocar brasiliense* présente une activité molluscicide contre *Biomphalaria glabrata* : 90% de mortalité à 100 µg/ml et seulement 20% à la concentration 50 µg/ml ¹¹. *Biomphalaria glabrata* est l'hôte intermédiaire du parasite *Schistosoma mansoni*, l'agent pathogène responsable de la schistosomiase. Cet extrait présente aussi une activité cytotoxique contre le sarcome 180 chez l'animal. Cette activité serait due à la présence d'acide oléanolique ⁷.

L'extrait (CH₂Cl₂-MeOH, 1:1) des feuilles de *C. brasiliense* est toxique sur *Artemia salina* (LC₅₀ de 90 µg/ml après 24 h) et il présente également une activité antibactérienne. Cet extrait est très actif contre *Staphylococcus aureus*, actif contre *Bacillus cereus* et partiellement actif contre *Pseudomonas aeruginosa* ¹⁶.

L'extrait éthanolique des feuilles de *C. brasiliense* possède une activité antifongique sur les dermatophytes à 1000 µg/ml ¹⁷. L'huile essentielle des graines de *C. brasiliense* montre une activité antifongique contre *Paracoccidioides brasiliensis* (CMI de 500 µg/ml) et contre *Cryptococcus neoformans* (67% d'inhibition à une concentration ≤ 1000 µg/ml et 24% à une concentration ≤ 250 µg/ml). En revanche, aucune activité sur *Candida albicans* n'est observée à une concentration ≤ 1000 µg/ml ⁶.

I. 2. *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers. subsp. *glabrum*^{10, 18}

I. 2. 1. Description botanique

Synonymies :

Caryocar coccineum Pilg,

Saouari glabra Aublet.

Noms vernaculaires :

Français : le bois savonneux, Saouari à feuilles lisses,

Créole : chawari-montagne,

Espagnol : jigua (Venezuela),

Portugais : piquiarana, pequi.

Il est appelé par les « Wayãpi » *peke'a lã* de *peke'a* «arbre *Caryocar villosum* » et *lã* «qui ressemble à». Les « Palikur » l'appellent *sawa*, de *sawawitye* «hérissé», en raison de l'aspect de la graine débarrassée du mésocarpe.

C'est un grand arbre des forêts primaires, il peut atteindre jusqu'à 30 m de hauteur. Il est présent partout en Guyane et dans les forêts primaires de l'Amazonie du Nord (figures 4 et 5)¹⁰.



Figure 4 : Base du tronc de *Caryocar glabrum*.

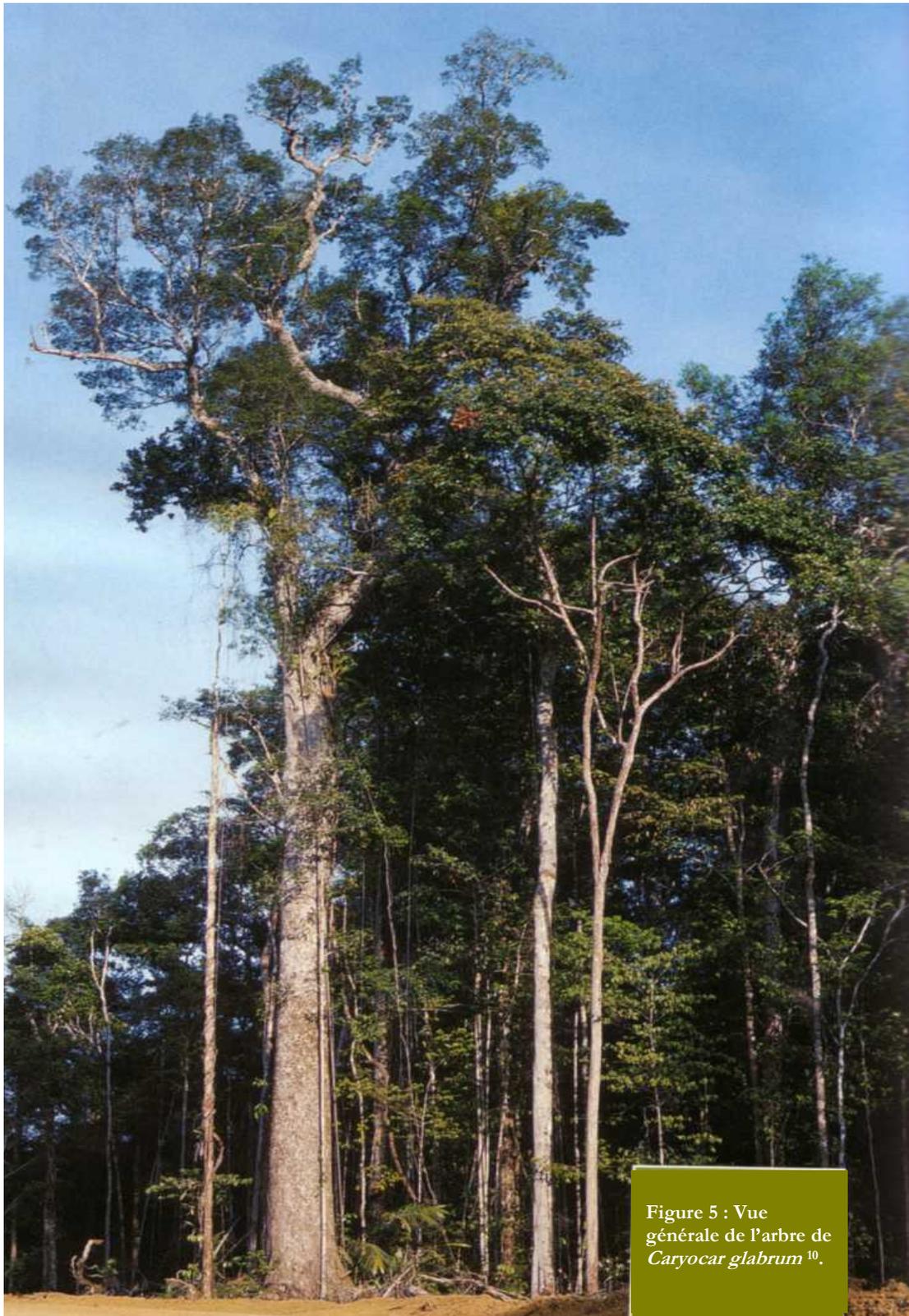


Figure 5 : Vue générale de l'arbre de *Caryocar glabrum*¹⁰.

Les feuilles sont opposées, coriaces, pétiolées, composées trifoliolées et possèdent des stipules caduques. Le limbe est palmé à marge légèrement dentée (figures 1 et 6) ².

Les fleurs sont hermaphrodites, jaunes avec de nombreuses étamines et disposées en inflorescence terminale racémeuse (figures 6 et 7).

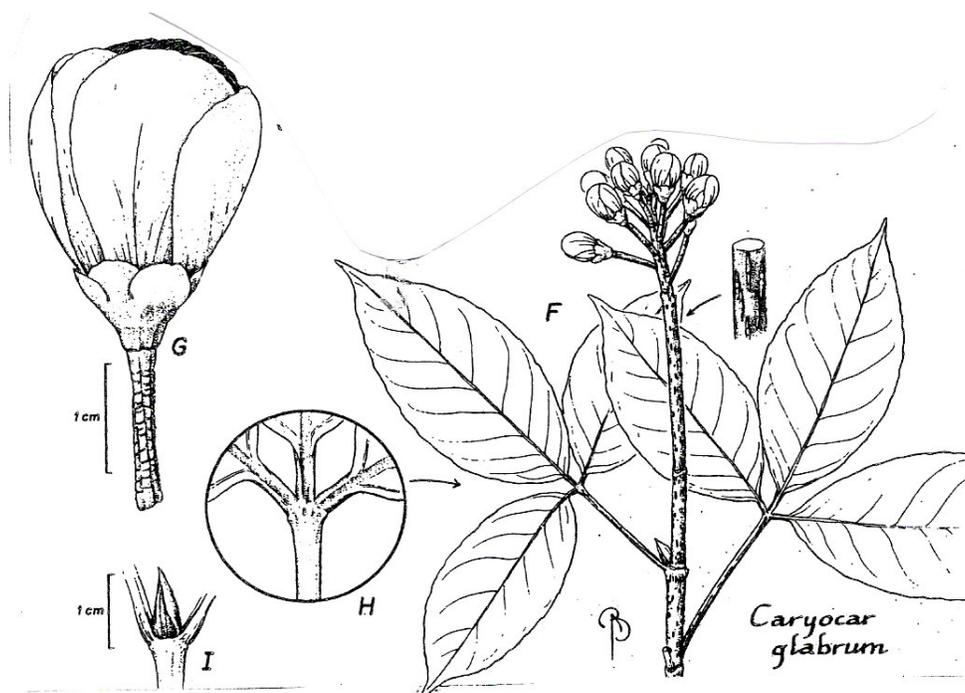


Figure 6 : (F) branche fleurie, (G) bouton floral, (H) base des feuilles, (I) stipules de *C. glabrum*².



Figure 7 : Fleurs et boutons floraux de *Caryocar glabrum* ¹⁹.

Le fruit est ellipsoïdal à globuleux, il mesure 5 à 6 cm de diamètre. C'est une drupe jaune recouverte de lenticelles ferrugineuses. Il se compose d'une enveloppe jaunâtre recouverte d'un épicarpe dur coriace d'1 mm d'épaisseur. L'enveloppe recouvre une pulpe charnue et blanchâtre (figures 8a et 8b).

La pulpe renferme généralement 1 à 2 noyaux brunâtres, très durs dont la masse ligneuse (endocarpe) est formée par l'agglomération de piquants déliés et effilés de 6 à 10 mm de longueur. Chaque noyau contient une amande sous la forme d'un ovoïde de 3 à 5 cm de longueur par 2 à 3,5 cm de diamètre.

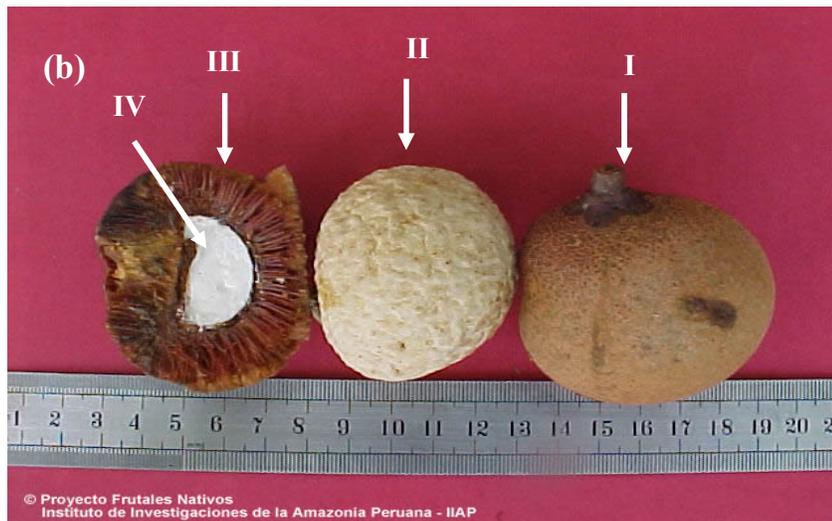


Figure 8 : (a¹⁹ et b²⁰) Fruit (I), pulpe (II), endocarpe (III) et amande (IV) de *Caryocar glabrum*.

I. 2. 2. Composition chimique

Les écorces de tronc, les feuilles et les fruits de *C. glabrum* renferment des saponosides. Les propriétés ichtyotoxiques du péricarpe des fruits seraient dues à la présence en grande quantité de saponosides et de tanins galliques dans cette partie du fruit. Tous ces composés sont présents dans tous les organes, sauf les graines¹⁰.

I. 3. *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers^{4, 10, 18, 19}

I. 3. 1. Description botanique

Synonymies

Caryocar nuciferum L.

*Caryocar butyrosu*m (Aubl.) Willd

Pekea butyrosa Aubel

Saouari villosa Aublet.

Noms vernaculaires

Créole : l'arbre à beurre « bwa-dibé » et pékéya (St. George),

Espagnol : almendro,

Portugais : piquiá, pequiá, pequiá verdadeiro, amêndoa de espinho, grão de cavalo,
amendoa do Perú,

Anglais : pekea.

Il est appelé par les « Wayãpi » *peke'a*, de *pe* « chemin », *ke* « ancien » et *a* « fruit », « l'arbre fruitier des anciens chemins ». Cette étymologie indique que les Amérindiens l'ont disséminé en jetant les graines après consommation de la pulpe.

C'est un très grand arbre des forêts primaires, originaire du nord de l'Amazonie et l'un des plus beaux arbres du Brésil. En Guyane, il est présent uniquement à l'est, vers la frontière brésilienne où on lui donne le nom brésilien «Pekea». Il atteint parfois des dimensions colossales (jusqu'à plus de 5 mètres de diamètre à la base du tronc) et 40 à 50 mètres de hauteur (figure 9). Son bois de bonne qualité est très utilisé en construction navale et civile.

Il fleurit pendant la saison sèche de juin à novembre et donne des fruits pendant la saison des pluies, de mars à mai. L'arbre se propage par ses graines qui germent en 3 à 6 mois. Les feuilles sont opposées, coriaces, pétiolées, composées trifoliolées. Le limbe est palmé à marge légèrement dentée (figure 10)¹⁰.

Les fleurs sont hermaphrodites, jaunes avec de nombreuses étamines et disposées en inflorescence terminale racémeuse (figure 10).



Figure 9 : Arbre de *C.villosum*²¹.



Figure 10 : Branche fleurie de *C. villosum*²².

Le fruit de la grosseur du poing, est ellipsoïdal à globuleux, de 7 à 9 centimètres de diamètre. Il est formé de 3 ou 4 baies distinctes réunies sous une enveloppe (péricarpe) grisâtre, grosse et charnue, analogue au brou de la noix, de 1 à 2 centimètres d'épaisseur. Cette enveloppe représente 65% du poids du fruit (figure 11).

Chaque baie a la forme d'un rein de 5 à 6 centimètres de longueur (figure 11). Elle se compose d'une pulpe butyreuse (mésocarpe) jaune, de 5 à 10 millimètres d'épaisseur, représentant 10% du fruit et qui contient 76% d'huile (par rapport à la matière sèche). La pulpe recouvre un noyau très dur dont la masse ligneuse (endocarpe) est formée par l'agglomération de piquants déliés et effilés, soudés entre eux, les pointes dirigées vers le centre. Chaque noyau contient normalement une amande (2-3 cm x 1-2 cm), mais parfois il y en a jusqu'à quatre, qui sont excellentes à manger, crues ou cuites. Elles fournissent une huile alimentaire d'excellente qualité culinaire.

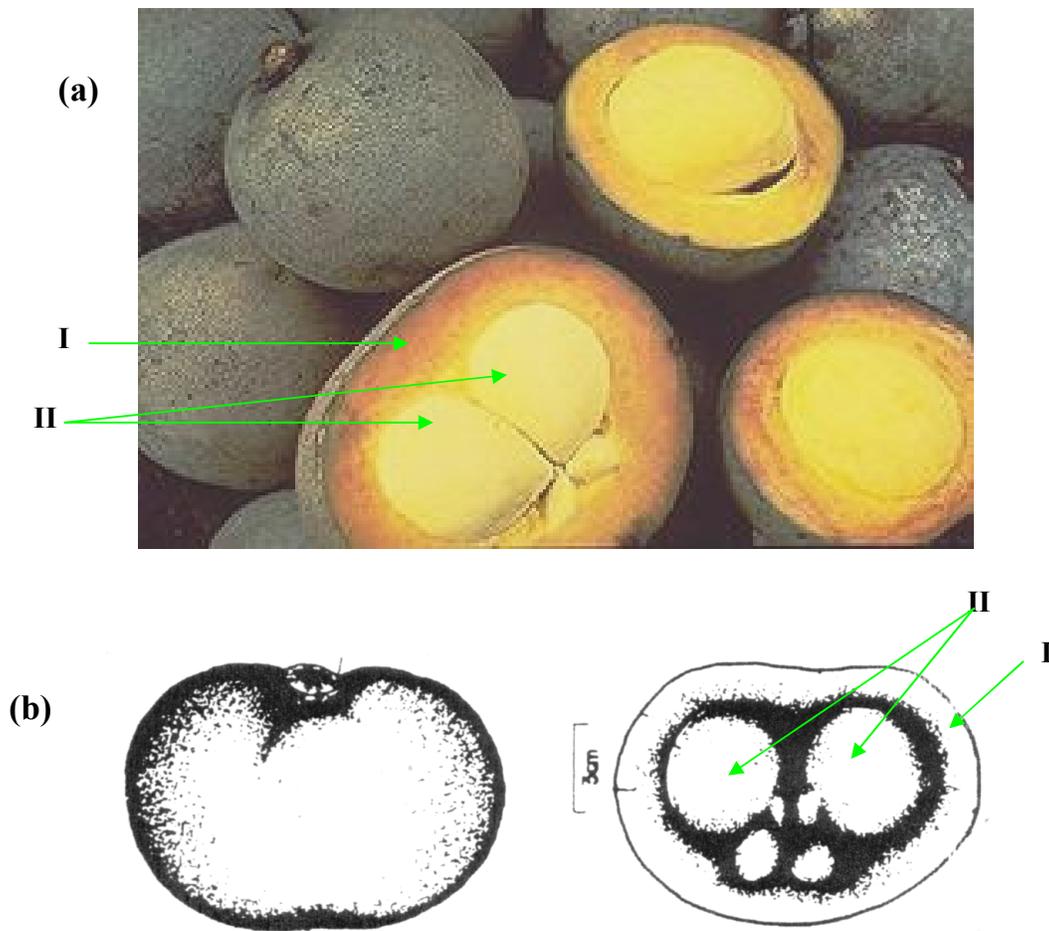


Figure 11 : Fruits de *C. villosum*

(a) Fruits ouverts montrant l'enveloppe (I) et 2 baies (II) de *Caryocar villosum*²³.

(b) Coupe transversale dans le fruit ⁴

I. 3. 2. Composition chimique

La composition chimique de la pulpe du fruit a été étudiée et se caractérise par une teneur en eau relativement faible (50,3%) et une teneur élevée en matières grasses (64,5% de la matière sèche). Les principaux acides gras sont les acides palmitique et oléique qui représentent plus de 50% de matière grasse totale. D'autres acides gras sont présents mais en quantité négligeable (tableau 5)⁴. La présence de saponosides dans le péricarpe des fruits, les feuilles, les écorces de tronc et de racine a été mise en évidence justifiant leur emploi comme ichtyotoxique. Cette espèce est également riche en tanins galliques¹⁰.

En accord avec l'impression sensorielle, les fruits renferment peu de sucres et d'acides organiques. La teneur en acides aminés libres est faible par comparaison avec la teneur des autres fruits, 180 mg/100 g au total dont seulement 68 mg/100g d'acides aminés essentiels (tableau 5)⁴.

La plupart des minéraux sont présents en quantité moyenne, seul le taux de sélénium est remarquablement élevé puisque le fruit en contient en effet 700 µg/100g. La consommation d'un fruit comble l'apport quotidien recommandé en sélénium⁴. Il est l'un des aliments les plus riches en sélénium ce qui lui confère des propriétés anti-radicalaires et une activité préventive contre le développement de certains cancers chez l'animal²⁴.

Les fruits de *C. villosum* contiennent également des caroténoïdes dont les majoritaires ont été identifiés à la zéaxanthine, la β -cryptoxanthine et le β -carotène (1,2 µg/g)⁹. D'autres caroténoïdes, avec des quantités moindres ont été détectés comme le γ -carotène et l' α -carotène.

Tableau 5 : Composition chimique des fruits de *Caryocar villosum* ⁴.

Principaux Composants	Quantité	Principaux Composants	Quantité
Glucides (g/100 g)		Phénylalanine	8,32
Glucose	0,92	Tyrosine	7,40
Fructose	0,26	Acide aspartique	8,84
Saccharose	0,79	Asparagine	18,16
Amidon	1,15	Sérine	9,92
Inositol	Traces	Acide glutamique	5,76
		Glutamine	10,36
Minéraux (mg/100 g)		Proline	6,12
Calcium	83	Glycine	5,36
Magnésium	52	Alanine	17,20
Phosphore	41	Histidine	2,76
Fer	0,64	Arginine	6,96
Manganèse	0,32	β -alanine	1
Zinc	0,52	3-méthylhistidine	0,12
Sélénium	0,70	Acide γ aminobutyrique	17,84
		Citruline	0,24
Acides gras (g/100 g)		Acide α -aminoadipique	0,04
Acide palmitique	33,50		
Acide palmitoléique	0,10	Amines biogéniques (mg / 100 g)	
Acide stéarique	0,59	Taurine	2,52
Acide oléique	29,50	Ethanolamine	0,88
Acide linoléique	0,52	Phosphoéthanolamine	3,04
Acide linoléénique	0,03	Ornithine	0,28
Matières insaponifiables (mg/100 g)		Composés volatiles (en %)	
Squalène	63,80	2-Heptanone	19,30
Stérols totaux	580	Furfural	14,62
Cholestérol	0,80	Méthyl butanoate	6,18
Campestérol	3,70	5-Méthyl-2-furfural	3,68
Stigmastérol	80,20	Phénylacétaldehyde	1,18
β -Sitostérol	129,70	Safrole	1,99
7-25-Stigmastadienol	195,75	β - Bisabolène	18,07
Acides aminés libres (mg/100 g)		Tridecane	0,49
Valine	11,80	Guaiazulène	1,32
Leucine	14,62	Acide palmitique	4,64
Isoleucine	7,36	Ethyl hexadecanoate	1,08
Lysine	8,40	(E)- Nérolidol	19,75
Thréonine	7,56	Ethyl 9-octadecanoate	1,00
Méthionine	2,48		

II. Chimie extractive

Les saponosides, molécules polaires du fait de leur forme hétérosides, sont généralement des poudres blanches non cristallisées, solubles dans l'eau et les solvants polaires comme les alcools dilués et insolubles dans les solvants apolaires comme l'acétone, l'éther et l'hexane. Ces composés existent dans la plante sous forme d'un mélange complexe de molécules de structures très proches et de propriétés physicochimiques similaires. De ce fait, les étapes de purification sont délicates et longues, nécessitant plusieurs techniques chromatographiques.

II. 1. Extraction et purification

L'extraction primaire à partir du matériel végétal sec est réalisée à chaud en utilisant le méthanol pur ou du méthanol aqueux à 20%. Après refroidissement et filtration, l'extrait méthanolique est concentré à sec. Cette extraction primaire conduit à un extrait brut renfermant un grand nombre de composés polaires, autres que les saponosides comme des mono- et des di-saccharides, des acides aminés, des tanins..., ou des composés moins polaires comme des graisses et des terpènes. Pour l'obtention des saponosides bruts, un protocole a été développé au laboratoire qui consiste, après l'extraction primaire au méthanol, en plusieurs étapes de purification (figure 12).

- La précipitation des saponosides dans l'acétone et/ou l'éther éthylique permet d'éliminer les composés peu polaires. En effet, les saponosides en tant que composés polaires précipitent de leur solution méthanolique par ajout d'un excès de solvant relativement apolaire. Le précipité est récupéré par filtration, alors que les stérols et les graisses sont éliminés dans le filtrat.
- Après dessiccation, le précipité est débarrassé des composés les plus polaires, en particulier les sucres et les acides aminés de faible poids moléculaire par dialyse contre de l'eau distillée au travers d'une membrane cellulosique. À l'intérieur de la cellule de dialyse, les saponosides forment des agrégats alors que les mono- et les di-saccharides (de faible masse moléculaire) diffusent au travers des pores de la membrane par osmose. Le diamètre des pores est choisi de telle sorte que les agrégats de saponosides soient retenus. Le dialysat est congelé puis lyophilisé. Ce protocole permet d'obtenir une poudre enrichie en saponosides.

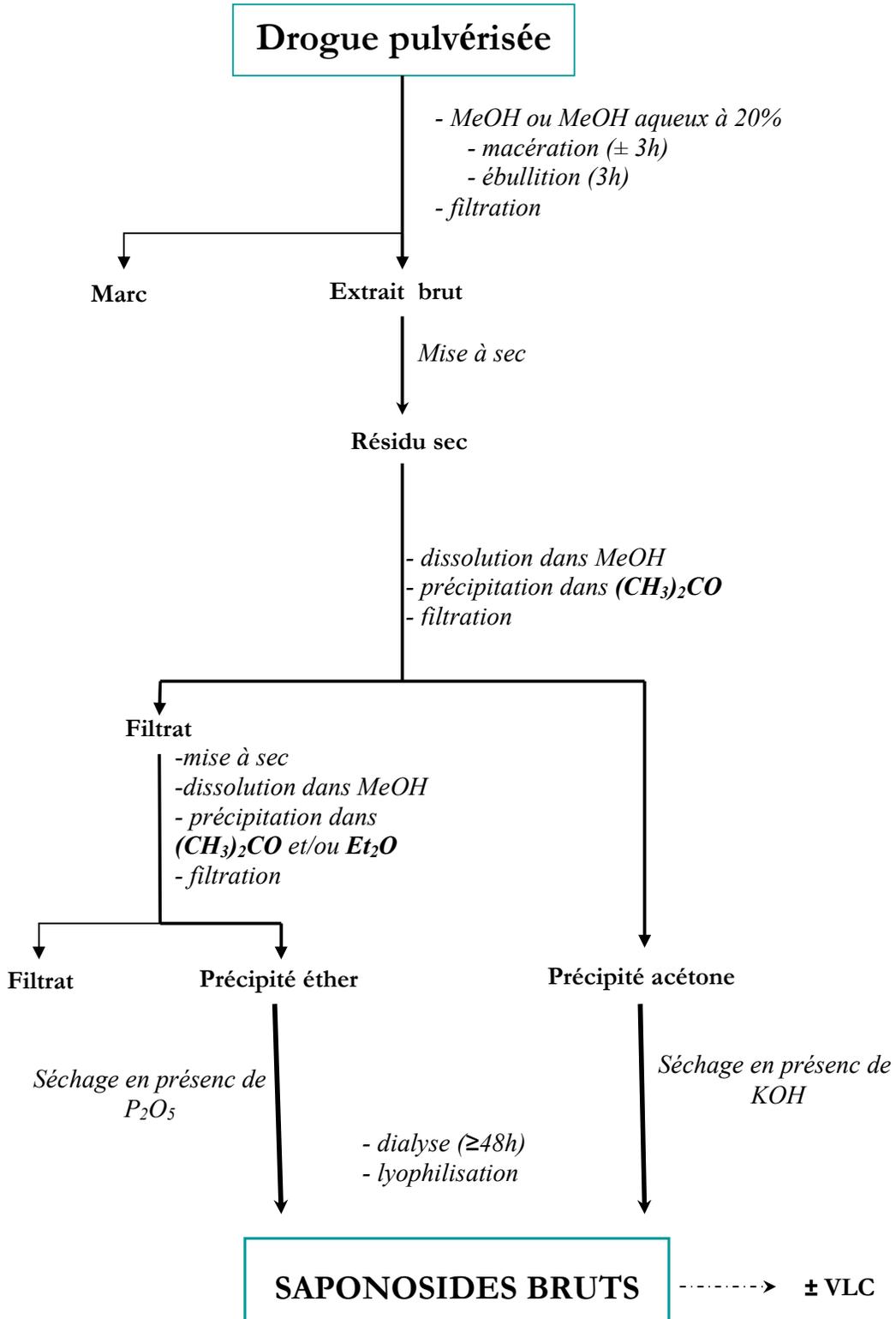


Figure 12 : schéma général d'extraction des saponosides ²⁵⁻³⁰.

A la suite de ces deux étapes de purification, les tanins, composés très polaires mais de haute masse moléculaire, restent présents dans le rétentat. Pour éliminer ces composés, on réalise une filtration sur silice (VLC). Les saponosides sont élués par un solvant sélectif, à savoir, en silice de phase normale : $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (60:40:7). Dans ces conditions d'éluion, les tanins restent adsorbés sur la silice.

La purification finale des saponosides, pour conduire à des échantillons analysables par les méthodes spectroscopiques, est réalisée à l'aide de différentes méthodes chromatographiques, en phase normale sur gel de silice ou en phase inverse sur silice greffée :

- chromatographie liquide sous vide (VLC),
- chromatographie liquide sous pression atmosphérique (CC),
- chromatographie liquide "Flash",
- chromatographie sur plaque préparative (CPP),
- chromatographie liquide sous basse pression (colonne Lobar[®]),
- chromatographie liquide haute performance (CLHP) semi-préparative.

Dans certains cas, un passage sur résine échangeuse cationique H^+ de type Amberlite[®] IRN 77, s'est avéré nécessaire afin de déplacer les formes sels des fonctions carboxyliques vers les formes acides libres dans les saponosides. Ce traitement facilite ultérieurement la purification par chromatographie des saponosides possédant un acide uronique au sein de leur chaîne osidique. En effet, les formes sels étant plus polaires, elles perturbent l'ordre d'éluion des saponosides lors du processus chromatographique. Le passage sur résine rétablit le comportement des saponosides sur colonne. De plus, cet échange améliore la solubilité des composés dans le méthanol deutéré et facilite ainsi leur analyse par RMN.

II. 1. 1. Purification des saponosides des fruits de *Caryocar glabrum*

Les échantillons des fruits et d'écorces de tronc de *C. glabrum* proviennent de la forêt de l'Amirande, île de Cayenne en Guyane et ont été identifiés par M. F. Prevost.

II. 1. 1. 1. A partir de la pulpe des fruits (Cgp)

Les pulpes séchées et pulvérisées sont extraites au méthanol à chaud. Selon le profil CCM en phase normale dans le solvant $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (70:30:5), l'extrait brut méthanolique s'est avéré très riche en saponosides et nous n'avons pas eu à procéder aux étapes supplémentaires pour accéder aux saponosides bruts (rendement : 57%). L'analyse par CLHP de cet extrait (figure 14) montre la présence d'au moins 17 composés en proportions variables.

6 g de l'extrait méthanolique (**Cgp**) sont soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale avec un gradient d'éluion $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (100:0:0 à 60:40:7) (tableau 53, partie expérimentale). Un passage sur résine Amberlite® IRN 77 a été réalisé sur certaines fractions afin d'échanger les formes sels. Ainsi, **30** saponosides (**Cgp1-Cgp30**) dont **21** de structures nouvelles ont été isolés (figure 13).

La purification de ce grand nombre de composés a pu être possible grâce à l'utilisation en alternance des chromatographies sur gel de silice en phase normale et sur silice greffé C_{18} . En effet, une filtration sur silice greffée C_{18} permet une première séparation en fonction de la polarité de la génine, puis une seconde purification cette fois sur silice normale permet de séparer les composés en fonction du nombre et de la nature des sucres, les saponosides à acide glucuronique étant les plus polaires. La purification finale est effectuée en CLHP semi-préparative.

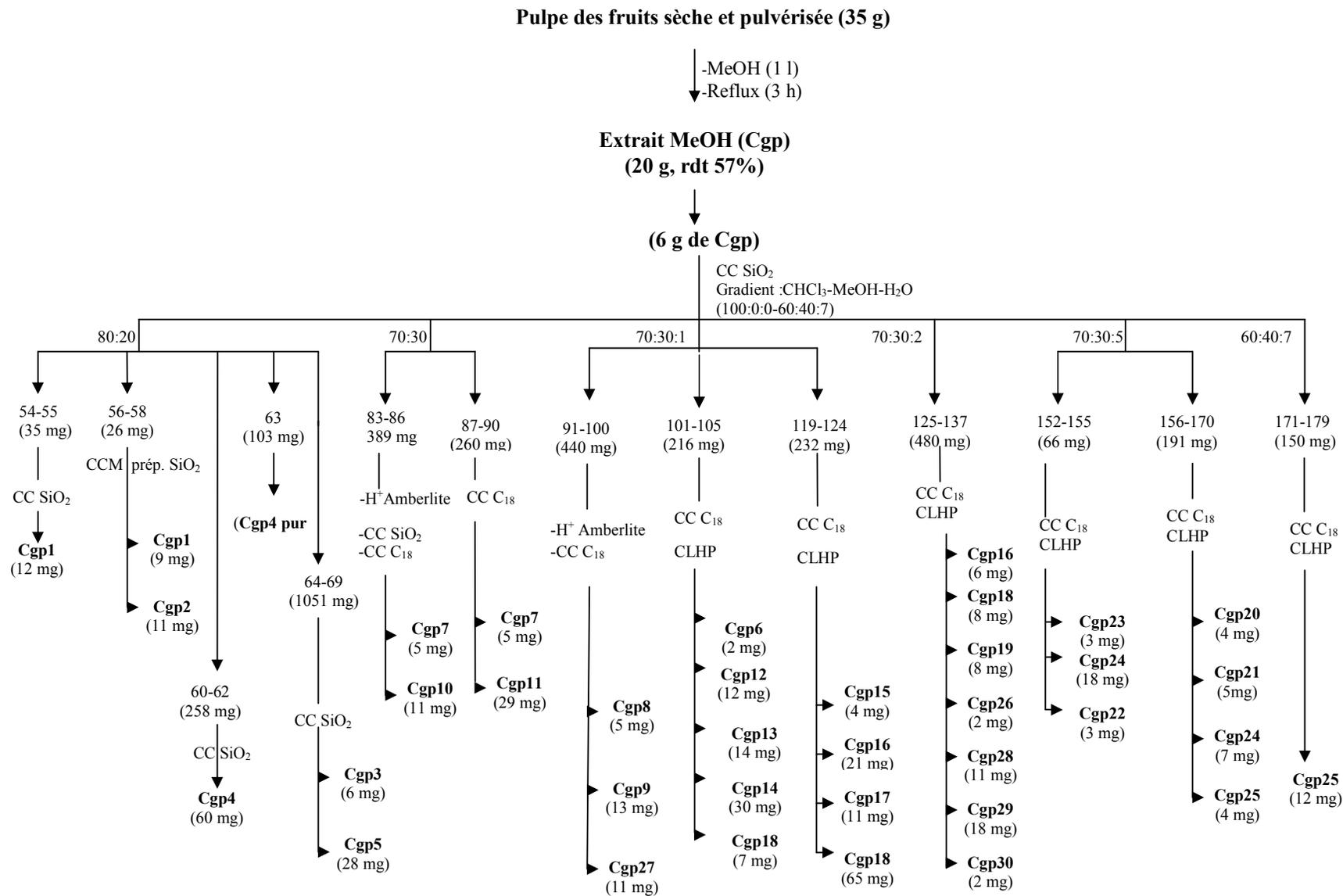


Figure 13 : Schéma d'extraction et de purification des saponosides de la pulpe des fruits de *C. glabrum*.

II. 1. 1. 2. A partir de l'enveloppe des fruits

L'enveloppe des fruits de *C. glabrum* est extraite selon le protocole adopté pour l'extraction de la pulpe des fruits avec un rendement de 31%. Comme pour l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits de *C. glabrum*, l'extrait méthanolique de l'enveloppe est très riche en saponosides ce qui ne nécessite pas d'étapes supplémentaires d'enrichissement.

La comparaison des deux extraits, pulpe et enveloppe, a montré qu'ils sont qualitativement identiques mais quantitativement différents. En effet, la quantité des bidesmosides est plus importante dans les pulpes. Cette comparaison est réalisée par CLHP analytique (gradient de 30% à 50% MeCN/H₂O pendant 75 min) (figure 14) et par CCM en phase normale (CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5)).

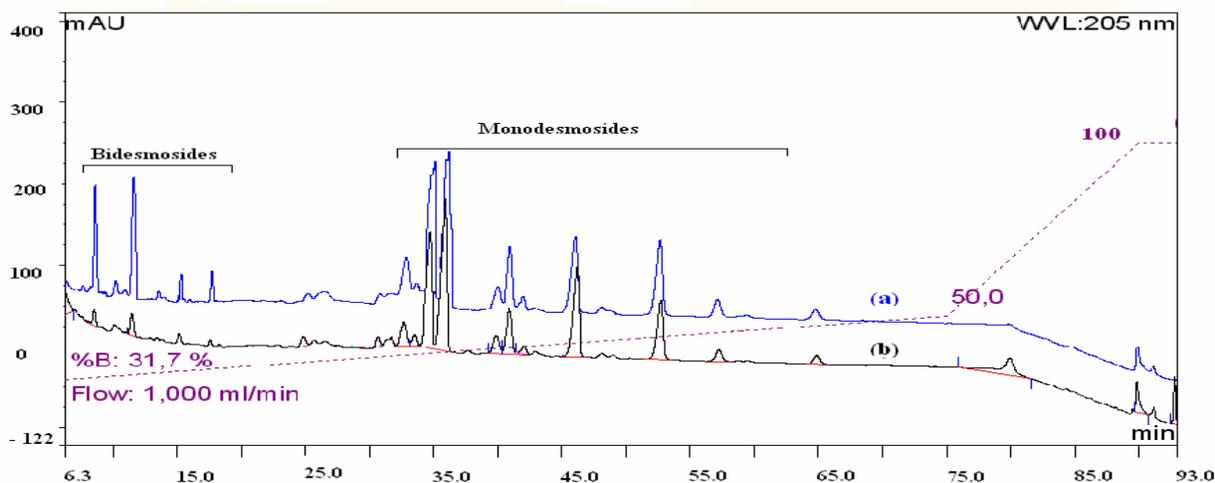


Figure 14 : Chromatogramme CLHP analytique de l'extrait méthanolique de la pulpe (a) et de l'enveloppe (b) des fruits de *Caryocar glabrum*.

La présence de deux séries de saponosides dans les fruits, des dérivés 3-*O*-monoglucosides et des dérivés 3-*O*-monoglucuronides, a posé un problème dans l'analyse des extraits par CLHP. En effet, les saponosides ne différant que par la nature du sucre attaché au C-3 de la génine (glucose ou acide glucuronique), possèdent le même temps de rétention sur la colonne CLHP. Par exemple, les deux saponosides majoritaires : Gal-(1 → 3)-**Glc**-hédéragénine (**Cgp4**) et Gal-(1 → 3)-**GlcA**-hédéragénine (**Cgp18**) possèdent des temps de rétention identiques (*tr* 35,88 min) en CLHP.

La CCM en phase normale permet de résoudre ce problème puisque les deux séries de saponosides ne possèdent pas les mêmes *R_F* sur la plaque (0,42 pour **Cgp4** et 0,14 pour **Cgp18**).

II. 1. 2. Purification des composés des écorces de tronc de *C. glabrum* (Cgt)

Nous avons effectué une extraction préliminaire sur une petite quantité des écorces de tronc de *C. glabrum*, selon le protocole classique utilisé pour les saponosides (figure 12). Cet extrait méthanolique (Cgt) contient très peu de saponosides, il est en revanche très riche en composés polyphénoliques. Il nous a paru inutile d'appliquer le protocole classique de purification des saponosides à savoir la précipitation dans l'acétone et/ou dans l'éther ainsi que la dialyse contre de l'eau. Nous avons recherché un protocole d'extraction qui nous permet d'obtenir à la fois les saponosides et les polyphénols.

Une extraction liquide-liquide de l'extrait sec méthanolique (Cgt) par partage entre l'eau et l'hexane a permis d'éliminer les matières grasses, puis un second partage entre l'eau et l'acétate d'éthyle a permis d'éliminer les tanins complexes (figure 15).

La fraction aqueuse résultante (extrait B₁) est ensuite purifiée par chromatographie d'exclusion-diffusion sur gel de Séphadex pour séparer le totum des saponosides de celui des polyphénols. Deux modes d'élution peuvent être suivis :

- le premier consiste en une élution avec le méthanol. Dans ce cas, les grosses molécules seront exclues du gel car contrairement aux petites molécules, elles ne diffuseront pas dans celui-ci. Par conséquent, les saponosides de poids moléculaires les plus élevés seront élués les premiers.
- le deuxième mode d'élution consiste en une élution avec un gradient eau-méthanol. Dans ce cas, la polarité et le poids moléculaire des composés joue un rôle dans l'exclusion du gel de Séphadex.

Nous avons choisi le deuxième mode d'élution vue la complexité de la fraction aqueuse. Les premières fractions sont enrichies en dérivés 3,4,5-triméthoxyphénoliques. Les suivantes contiennent des galloylhamaméloses, des dérivés 3,4-dihydroisocoumariniques, des dérivés de l'acide ellagique. Les dernières fractions sont enrichies en saponosides (figure 15).

Les fractions enrichies en polyphénols ont été purifiées essentiellement par CLHP semi-préparative en phase inverse. Ainsi, 12 composés dont 7 de structures nouvelles ont été isolés : un glycoside du 3,4,5-triméthoxybenzyl (Cgt1), trois glycosides du 3,4,5-triméthoxyphenol (Cgt2, Cgt3, Cgt4), trois galloylhamaméloses (Cgt5, Cgt6, Cgt7), deux dérivés de la 3,4-dihydroisocoumarine (Cgt8, Cgt9), deux saponosides (Cgt10, Cgt11) et un glycoside de l'acide ellagique (Cgt12).

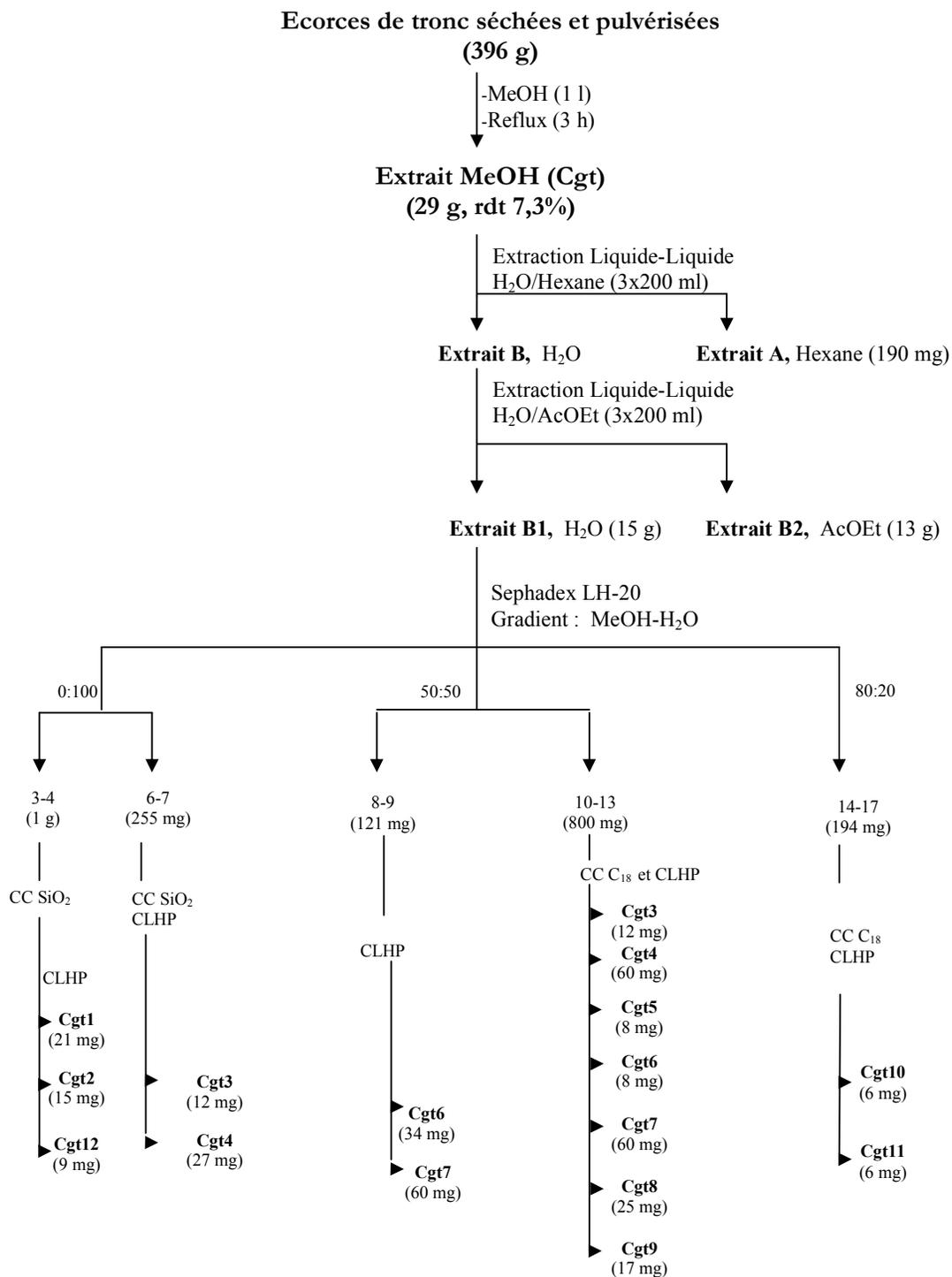


Figure 15 : Schéma d'extraction et de purification des composés des écorces de tronc de *C. glabrum*.

II. 1. 3. Purification des saponosides des fruits de *C. villosum*

Les échantillons des fruits et des écorces de tronc de *C. villosum* proviennent de la ville de Matoury, île de Cayenne en Guyane et ont été identifiés par M. F. Prevost.

Les fruits de *Caryocar villosum* sont beaucoup moins riches en saponosides que les fruits de *C. glabrum*. Un essai sur une petite quantité d'extrait méthanolique issu des enveloppes des fruits a montré qu'après les étapes de précipitation et de dialyse, une grande quantité de tanins était toujours présente dans le dialysat. Nous avons tenté de remplacer ces trois étapes de purification par une VLC sur silice greffée C₁₈. L'élution avec le mélange MeOH-H₂O à 40:60 et 60:40 a permis d'éliminer les polyphénols. L'élution avec le mélange MeOH-H₂O 80:20 a permis d'obtenir le totum des saponosides. Les composés peu polaires sont désorbés de la silice par le méthanol (figure 16).

II. 1. 3. 1. A partir de l'enveloppe des fruits (Cve)

Les enveloppes des fruits secs sont extraites au méthanol à chaud avec un rendement de 40%. Une partie de l'extrait méthanolique (Cve) est soumise à une VLC sur C₁₈ avec l'éluant MeOH-H₂O. Les saponosides bruts (rdt. 0,5%) sont élués avec le mélange MeOH-H₂O (80:20).

Le mélange de saponosides bruts est purifié par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈, ce qui permet de le fractionner en quatre groupes selon la polarité décroissante des génines et selon l'enchaînement osidique. Les trois premiers groupes correspondent aux bidesmosides de la bayogénine (MeOH-H₂O 60:40), de l'hédéragénine (MeOH-H₂O 65:35), de l'acide 2 β -hydroxyoléanolique et de l'acide oléanolique (MeOH-H₂O 70:30). Les dernières fractions élués à MeOH-H₂O 80:20, contiennent les monodesmosides (minoritaires) des quatre génines. Une seconde purification sur gel de silice en phase normale permet de séparer les composés en fonction du nombre et de la nature des sucres dans chaque groupe. La purification des saponosides est achevée par CLHP. Ainsi, **26** saponosides (**Cve1-Cve26**) dont **16** de structures nouvelles ont été isolés (figure 16).

La purification de ce grand nombre de composés a posé des problèmes à cause de leurs polarités voisines et surtout pour les saponosides régioisomères qui ne diffèrent que par le type d'enchaînement [...-Gal-(**1**→**3**)-Gal-(1→3)-Glc- ou ...-Gal-(**1**→**4**)-Gal-(1→3)-Glc-].

La séparation des deux saponosides bidesmosidiques **Cve16** et **Cve17** possédant ce type d'enchaînement n'a pu être réalisée et l'élucidation structurale a été effectuée sur le mélange.

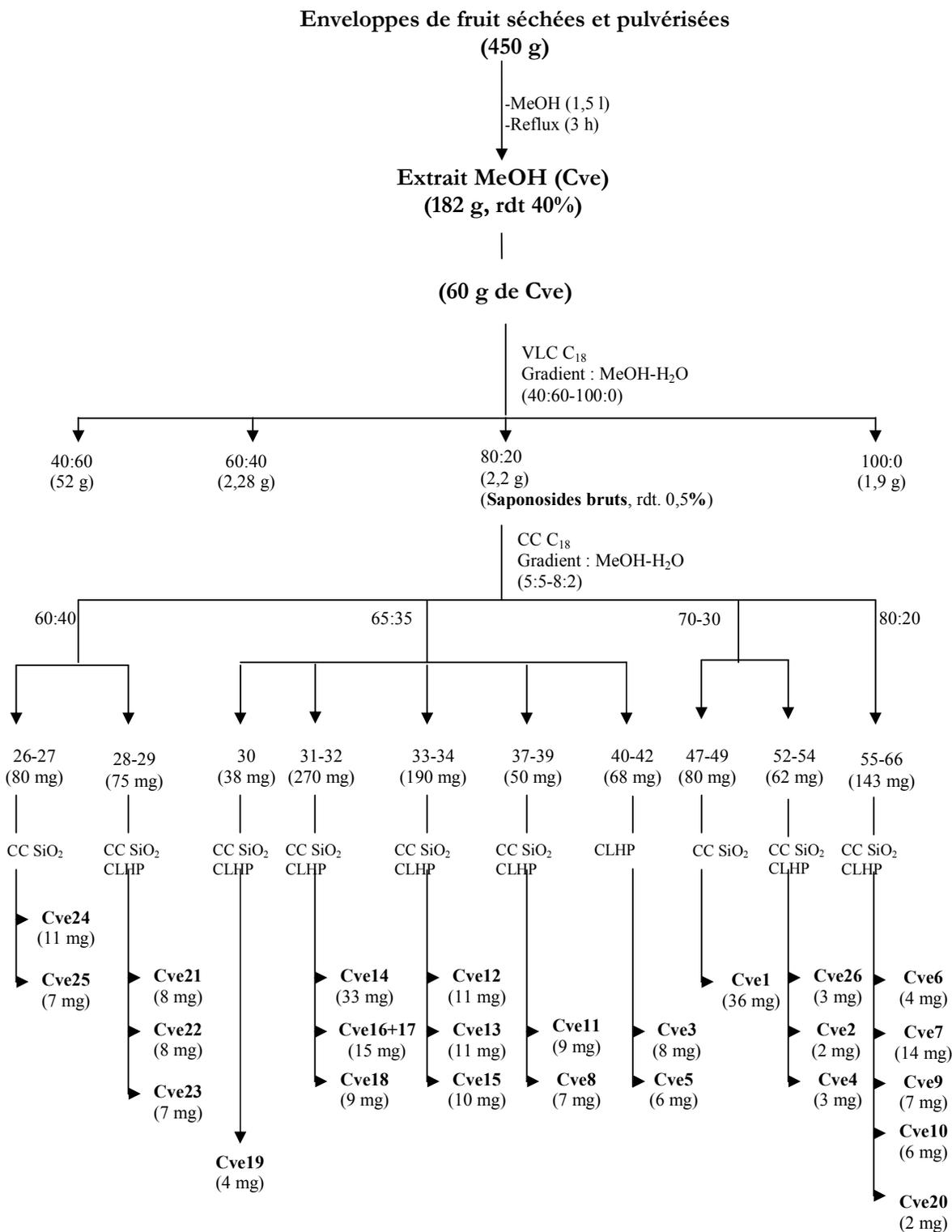


Figure 16 : Schéma d'extraction et de purification des saponosides des fruits (enveloppes) de *C. villosum*.

II. 1. 3. 2. A partir de la pulpe des fruits (Cvp)

Les pulpes des fruits de *C. villosum* sont extraites au méthanol à chaud selon le protocole adopté pour les enveloppes des fruits avec un rendement de 52%. Une comparaison de la composition des deux extraits méthanoliques, pulpe et enveloppe des fruits, par CLHP analytique (gradient de 30% à 50% MeCN/H₂O pendant 75 min) (figure 17) et par CCM en phase normale (CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:5) montre que ces deux extraits, **Cve** et **Cvp**, sont qualitativement identiques mais quantitativement différents. La différence la plus significative se situe au niveau de la quantité des saponosides **Cve3**, **Cve5**, **Cve12** et **Cve15**. Ces saponosides sont présents en quantité plus importante dans les pulpes.

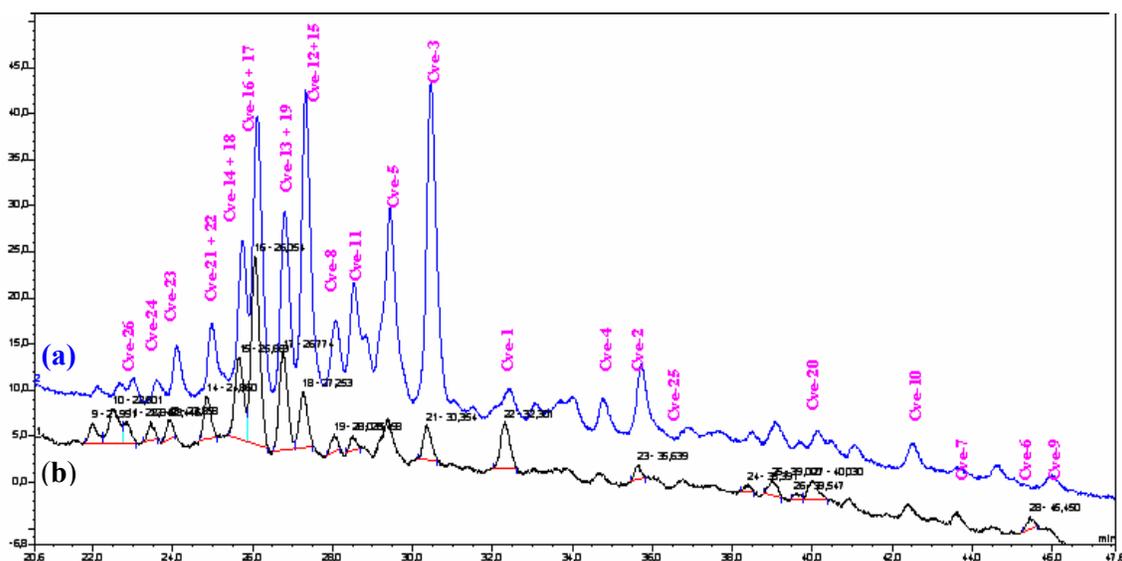


Figure 17 : Chromatogramme CLHP analytique des extraits méthanoliques de la pulpe (a) et de l'enveloppe (b) des fruits de *Caryocar villosum*.

II. 1. 4. Purification des composés des écorces de tronc de *C. villosum* (Cvt)

Les écorces de tronc de *C. villosum* sont extraites au méthanol à chaud avec un rendement de 9,3%. Une partie de l'extrait méthanolique (Cvt) est soumise à une VLC sur silice greffée C₁₈ avec l'éluant MeOH-H₂O (40:60, 60:40, 80:20 et 100:0) (figure 18). Les saponosides bruts (rdt. 0,21%) sont élués avec le mélange MeOH-H₂O (80:20) puis purifiés par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈ (tableau 56 dans la partie expérimentale). La purification a été achevée par chromatographie sur colonne en phase normale et par CLHP. Ainsi, **11** composés sont isolés, 5 dérivés de l'acide ellagique (**Cvt1-Cvt5**) et 6 saponosides (**Cvt6-Cvt11**) (figure 18). Parmi ces composés, 5 sont de structures nouvelles.

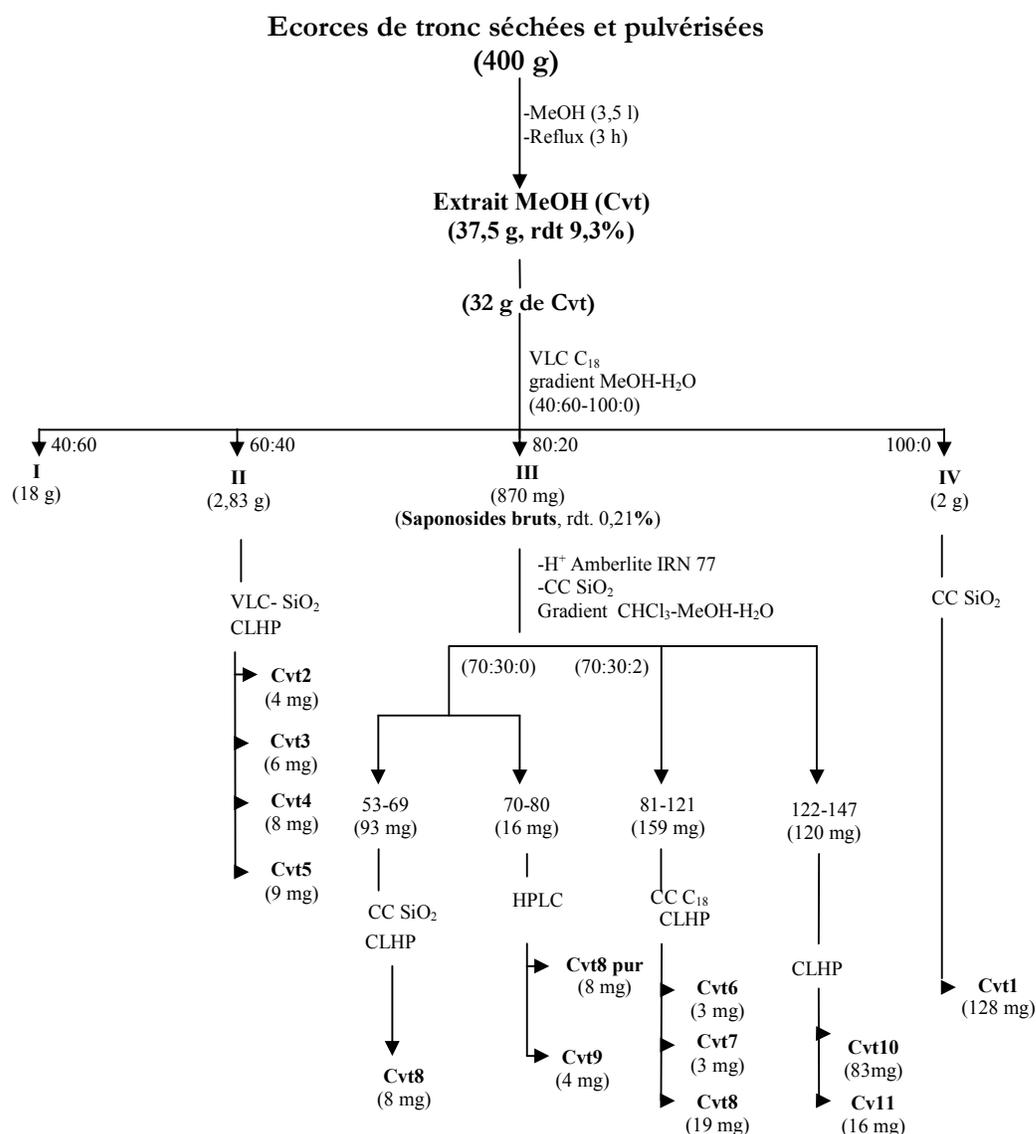


Figure 18 : Schéma d'extraction et de purification des composés des écorces de tronc de *C. villosum*.

II. 2. Hydrolyses des composés

L'élucidation structurale des saponosides étant généralement complexe, il est parfois utile de recourir à des méthodes sélectives de clivage, afin d'avoir accès aux différents composants de la molécule pour en faciliter la détermination structurale. Deux méthodes d'hydrolyse sont utilisées : l'hydrolyse acide totale et l'hydrolyse alcaline. Celles-ci sont réalisées le plus souvent sur l'extrait brut enrichi en saponosides pour ne pas détruire les saponosides purs isolés en quantités relativement faibles.

II. 2. 1. Hydrolyse acide totale

Elle rompt toutes les liaisons osidiques conduisant à la génine et aux monosaccharides constitutifs des saponosides. Elle permet de s'assurer d'une part de la nature des génines par comparaison en CCM avec des témoins ou par analyse par RMN et SM après purification si nécessaire, et d'autre part de la nature des monosaccharides par CCM comparativement à des témoins ainsi que de leur appartenance à la série D ou L après isolement et mesure de leur pouvoir rotatoire.

Cette méthode présente l'inconvénient de conduire parfois à la formation d'artéfacts résultant de réarrangements acido-catalysés des génines libérées.

II. 2. 1. 1. Protocole

Une quantité de saponosides bruts est dissoute dans HCl 2N. La solution est mise à reflux. L'évolution de l'hydrolyse est suivie par CCM.

Après refroidissement, le mélange réactionnel est soumis à une extraction liquide-liquide contre l'acétate d'éthyle afin d'extraire les génines et la phase aqueuse renfermant les sucres libres est neutralisée par KOH 0,5N. La solution aqueuse est congelée puis lyophilisée. Le mélange osidique est analysé par CCM avec des témoins commerciaux.

La phase organique contenant les génines est lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralisation puis mise à sec. Ces génines sont analysées par CCM par comparaison avec des témoins disponibles au laboratoire (acide oléanolique, hédéragénine entre autres).

II. 2. 1. 2. Résultats

Cinq sucres ont été identifiés après hydrolyse acide des extraits méthanoliques obtenus à partir des pulpes des fruits de *C. glabrum* (**Cgp**), des écorces de tronc de *C. glabrum* (**Cgt**), des enveloppes des fruits de *C. villosum* (**Cve**) et des écorces de tronc de *C. villosum* (**Cvt**). Il

s'agit de l'acide D-glucuronique, du D-galactose, du D-glucose, du D-xylose et du L-rhamnose (tableau 6).

Tableau 6 : Résultats de l'hydrolyse acide de **Cgp**, **Cgt**, **Cve** et **Cvt**.

	acide D-glucuronique	D-galactose	D-glucose	D-xylose	L-rhamnose
Cgp	X	X	X	X	-
Cgt	X	X	X	-	X
Cve	X	X	X	X	-
Cvt	X	X	X	-	X

II. 2. 2. Hydrolyse alcaline

Ce type d'hydrolyse clivant les liaisons esters, fournit des prosapogénines, saponosides de structures simplifiées résultant de la perte de la chaîne "ester" généralement greffée au C-28 (obtention de saponosides monodesmosidiques) et/ou de la perte d'acides organiques éventuellement greffés sur la génine et/ou les sucres.

Nous n'avons pas eu besoin d'utiliser cette méthode pour les saponosides de *Caryocar* étant donné que ceux-ci ne contiennent qu'une seule unité osidique lié au C-28 de la génine.

En revanche, nous avons hydrolysé en milieu alcalin les galloylhamaméloses pour obtenir l'hamamélose des écorces de tronc de *C. glabrum*.

Une partie d'une fraction enrichie en galloylhamaméloses est solubilisée dans une solution méthanolique de KOH à 5%. Le mélange est mis sous agitation à température ambiante. La solution est neutralisée par une filtration sur une résine échangeuse cationique H⁺ de type Amberlite® IRN 77 (élution par méthanol). Après évaporation du méthanol, une partie du résidu est purifiée par CPP. L'hamamélose a été identifié par RMN, et après mesure du pouvoir rotatoire, il s'agit de D-hamamélose.

III. Saponosides de *Caryocar glabrum* et *Caryocar villosum*

III. 1. Présentation des saponosides

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides, très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leur capacité à engendrer de la mousse en solution aqueuse après agitation. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la génine) et hydrophile (la partie osidique).

La plupart des saponosides présentent des propriétés hémolytiques et sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid, notamment les poissons et mollusques. Certaines plantes à saponosides sont ainsi utilisées traditionnellement comme poison de pêche.

Les saponosides présentent une multitude d'activités biologiques basées essentiellement sur leur activité membranolytique (anti-virale, anti-tumorale, cicatrisante, anti-inflammatoire...), justifiant l'utilisation de certains en médecine traditionnelle³¹⁻³⁴.

Les saponosides trouvent actuellement de nombreuses applications commerciales et industrielles, allant de leur utilisation en hémisynthèse des hormones stéroïdiques dans l'industrie pharmaceutique, à leur utilisation en industrie cosmétique ou comme additif alimentaire dans l'industrie agroalimentaire, mais aussi dans des émulsions photographiques, extincteurs chimiques et beaucoup d'autres applications dues généralement à leur tensioactivité non ionique³⁵⁻⁴⁷.

Un saponoside se compose de deux à trois parties distinctes : la génine ou aglycone, une, deux, voire plus rarement trois ou quatre chaînes osidiques, et un ou plusieurs groupements acylants aromatiques ou aliphatiques qui peuvent acyler les fonctions hydroxylées de la partie aglycone et/ou de la partie osidique.

Le grand nombre de structures décrites dérive d'un nombre réduit de génines. La variabilité des structures est essentiellement due aux nombreuses combinaisons possibles des unités osidiques, acylées ou non^{48, 49}.

III. 1. 1. Partie aglycone

Les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la structure de la génine : saponosides stéroïdiques et saponosides triterpéniques. Certains auteurs distinguent une troisième catégorie, les saponosides aux génines aminées stéroïdiques qui sont traitées par d'autres comme des alcaloïdes stéroïdiques.

Plus de 360 génines triterpéniques sont décrites dans la littérature. Elles possèdent un squelette à 30 carbones comportant habituellement cinq ou moins fréquemment quatre cycles. Les sapogénines tétracycliques sont issues des squelettes dammarane, cucurbitane et lanostane. Les sapogénines pentacycliques dérivent de trois squelettes principaux : les oléananes dérivés de la β -amyrine, les ursanes dérivés de l' α -amyrine et les lupanes (figure 19).

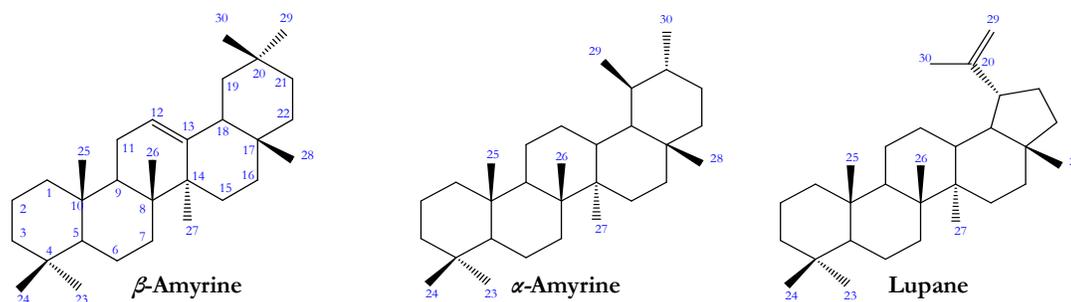


Figure 19 : Structures des trois principaux squelettes pentacycliques des génines triterpéniques⁴⁹.

III. 1. 2. Partie osidique

Sur les génines sont liées des chaînes osidiques linéaires ou ramifiées comportant jusqu'à une dizaine d'unités osidiques. La jonction entre la chaîne osidique et la génine est établie par une liaison de type « éther » ou par une liaison de type « ester ». L'éthérification implique classiquement l'hydroxyle en position 3. Assez fréquemment, la molécule comporte une deuxième chaîne osidique liée à la génine par une liaison ester avec le carboxyle en position 28.

En fonction du nombre de chaînes greffées sur la génine on distingue les monodesmosides possédant une seule chaîne et les bidesmosides à deux chaînes, (du grec *desmos* : chaîne)⁴⁹. Grâce à la performance des techniques chromatographiques et des techniques d'analyse, il a été mis en évidence durant ces dix dernières années des saponosides tridesmosidiques (trois chaînes) ou tétradesmosidiques (quatre chaînes)⁵⁰.

La partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des génines peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques. La purification de tels saponosides estérifiés est rendue difficile par les possibles hydrolyses ou migrations d'esters d'un hydroxyle à l'autre au sein de la génine ou des sucres (réaction de transestérification). Sur la génine, l'estérification est le plus souvent localisée au niveau des hydroxyles situés en position 16, 21, 22, voire 28 pour les squelettes de type β -amyrine.

III. 2. Détermination structurale des saponosides de *C. glabrum*

Les structures des saponosides ont été établies sur les dérivés natifs purifiés. La méthodologie employée est celle qui a été développée au laboratoire⁵¹. Elle repose essentiellement sur l'analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnels ¹H et ¹³C et à séquences multi-impulsionnelles à deux dimensions homo et hétéronucléaires ainsi que sur l'analyse des spectres de masse. Ces techniques permettent de déterminer une structure complexe sans avoir recours aux hydrolyses partielles et/ou aux dérivatisations.

III. 2. 1. Saponosides de la pulpe des fruits (Cgp)

Trente saponosides ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits de *Caryocar glabrum*, dont vingt-et-un possèdent des structures nouvelles. Parmi les saponosides isolés, sept sont des bidesmosides, les vingt-trois autres sont des monodesmosides. Ce sont des glycosides de l'acide oléanolique (**I**) (cinq saponosides), de l'acide 2- β -hydroxyoléanolique (**II**) (six saponosides), de l'hédéragénine (**III**) (dix saponosides), de la bayogénine (**IV**) (huit saponosides) et de l'acide gypsogénique (**V**) (un saponoside) (figure 20).

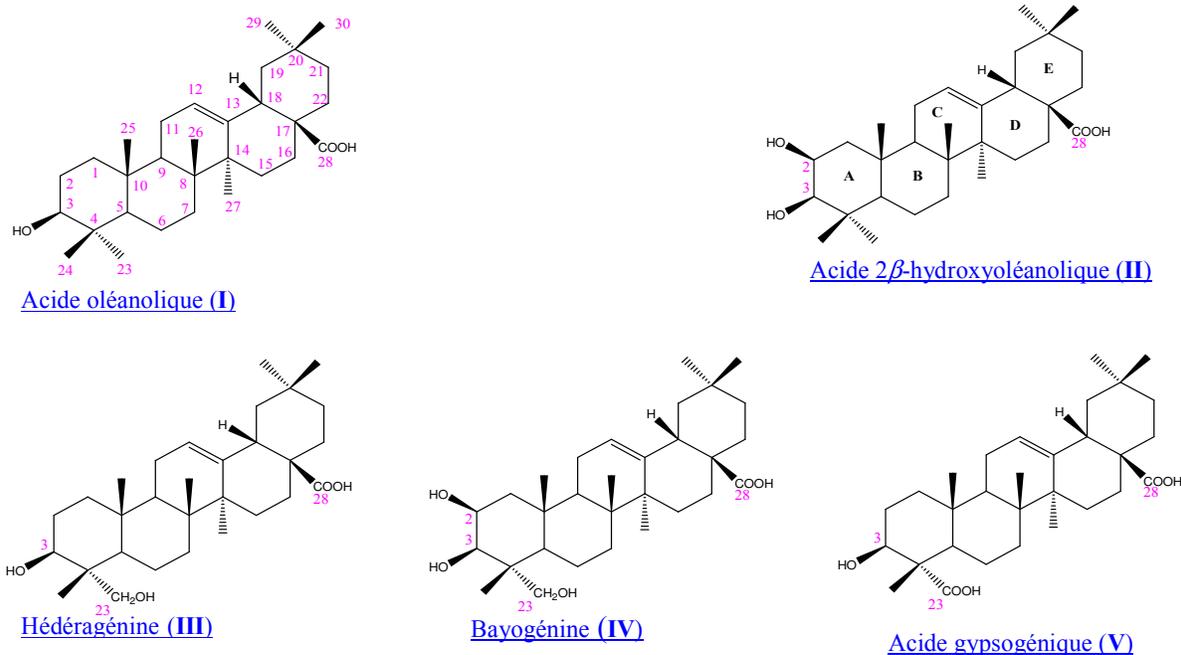


Figure 20 : Structures des sapogénines des saponosides contenus dans les fruits de *Caryocar glabrum*.

L'analyse structurale de ces saponosides n'a pas présenté de difficultés car ce sont des molécules de structures peu complexes dont la chaîne osidique liée en position 3 de la génine comporte de une à trois unités, disposées de façon linéaire. Pour les saponosides bidesmosidiques, une seule unité β -D-glucose compose la chaîne osidique en position 28.

Les saponosides isolés peuvent être classés en deux séries selon la nature du sucre directement lié en position C-3 de la génine :

- un β -D-glucose (série **1**)
- un acide β -D-glucuronique (série **2**) (figure 21).

Chacune de ces deux séries comprend des mono-, des di- ou des tri-glycosides. Pour les saponosides di-saccharidiques, le second sucre terminal est toujours un β -D-galactose. Pour les saponosides tri-saccharidiques, le sucre terminal de la chaîne est soit un second β -D-galactose, soit un β -D-xylose. Pour tous les saponosides, les liaisons interosidiques ont lieu avec les hydroxyles osidiques en position 3 (figure 21).

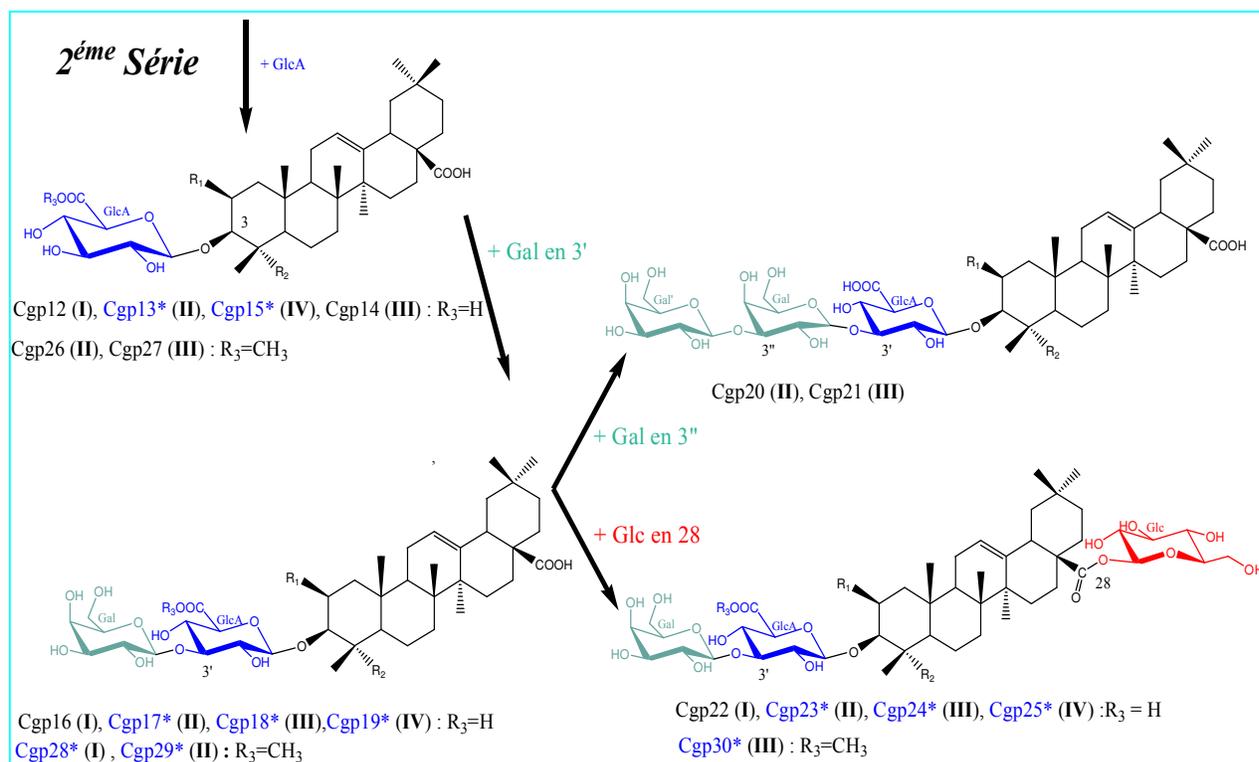
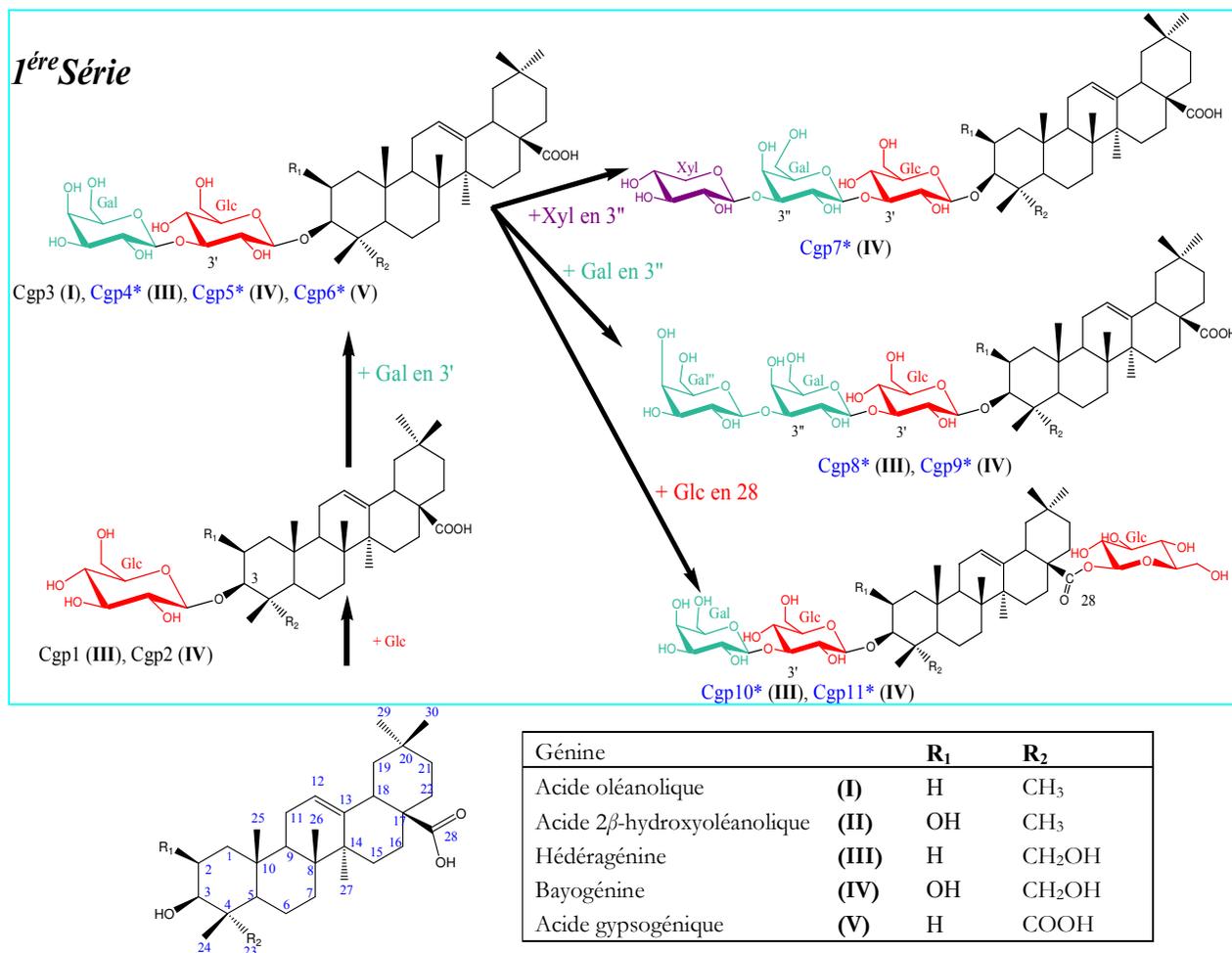


Figure 21 : Structures des saponosides isolés des fruits de *C. glabrum*.
* Saponoside de structure nouvelle

Nous exposerons dans chaque série les structures par ordre croissant de complexité et de polarité, ce qui correspond à un nombre croissant de sucres et à une polarité croissante des génines : l'acide oléanolique < l'acide 2 β -hydroxyoléanolique < l'hédéragénine < la bayogénine < l'acide gypsogénique.

Pour faciliter l'analyse structurale, nous présenterons l'identification et l'attribution des protons et carbones des cinq génines présentes, puis nous analyserons les spectres de masse et de RMN de la partie osidique des saponosides. Neuf enchaînements osidiques sont présents dans les 30 saponosides isolés et nous étudierons ensemble les composés renfermant le même enchaînement osidique.

III. 2. 2. Identification de la partie aglycone

L'identification des génines a été réalisée directement d'après l'analyse des spectres de RMN et de masse des saponosides. L'analyse des spectres de RMN ^1H , ^{13}C J -modulé, COSY, HSQC J -modulé, HMBC et ROESY permet d'attribuer les déplacements chimiques des protons et carbones.

Les données de la littérature, comparées à celles obtenues de l'analyse spectrale en RMN des saponosides isolés, confirment la présence de :

- l'acide oléanolique (**I**) pour **Cgp3**, **Cgp12**, **Cgp16**, **Cgp22** et **Cgp28**⁵²,
- l'acide 2 β -hydroxyoléanolique (**II**) pour **Cgp13**, **Cgp17**, **Cgp20**, **Cgp23**, **Cgp26** et **Cgp29**^{53, 54},
- l'hédéragénine (**III**) pour **Cgp1**, **Cgp4**, **Cgp8**, **Cgp10**, **Cgp14**, **Cgp18**, **Cgp21**, **Cgp24**, **Cgp27** et **Cgp30**^{52, 53},
- la bayogénine (**IV**) pour **Cgp2**, **Cgp5**, **Cgp7**, **Cgp9**, **Cgp11**, **Cgp15**, **Cgp19** et **Cgp25**^{52, 54},
- l'acide gypsogénique (**V**) pour **Cgp6**^{52, 55} (figure 21).

III. 2. 2. 1. Analyse des spectres de RMN ^1H

Sur les spectres de RMN ^1H (figure 22), les signaux caractéristiques suivants sont repérés :

- les méthyles résonants sous la forme de sept fins singulets dans le cas des génines **I** et **II** et de six fins singulets pour les génines **III**, **IV** et **V**. Les déplacements chimiques des protons méthyliques 26, 27, 29 et 30 ne montrent pas de variations significatives au sein des 30 saponosides isolés (tableau 7, p 49).

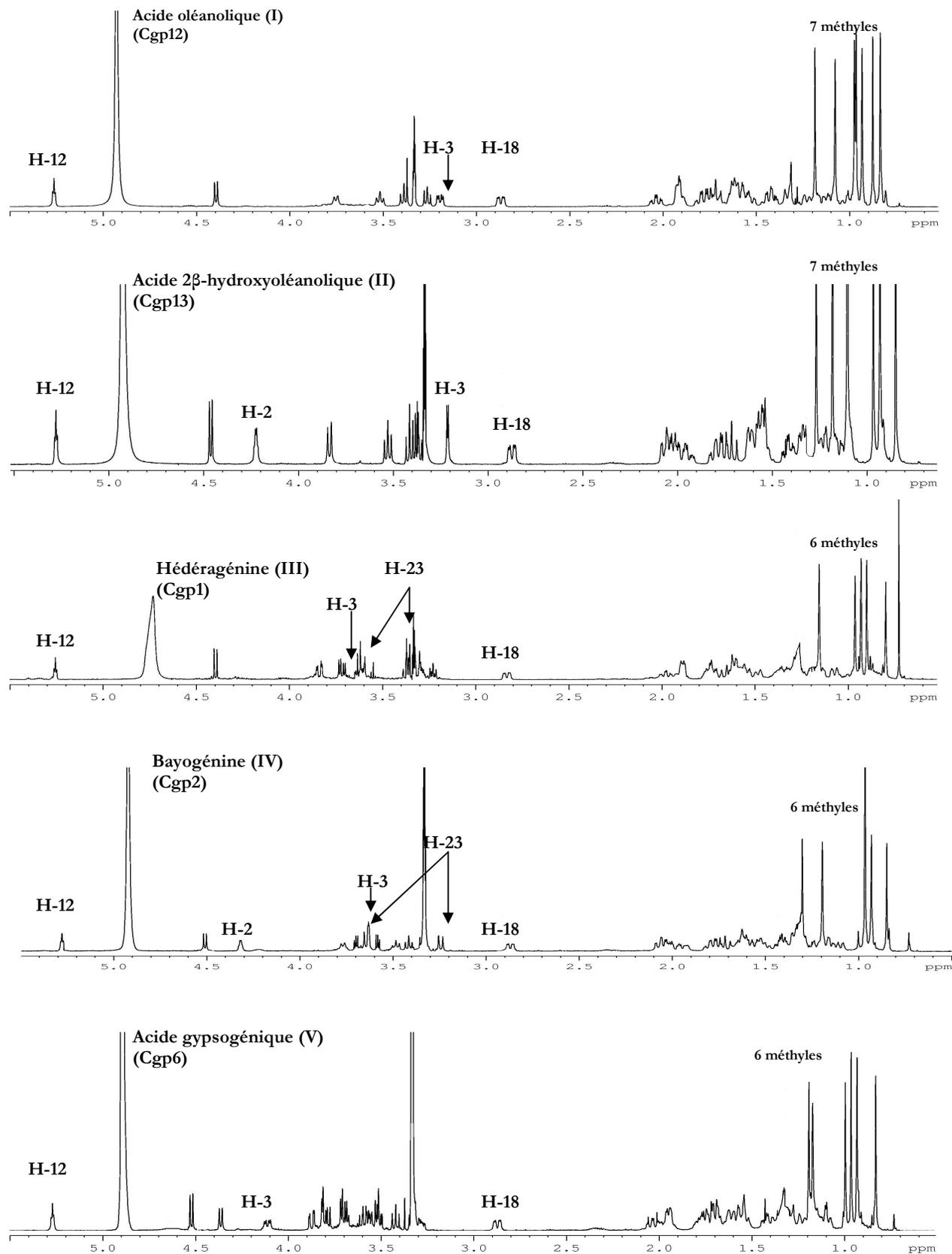


Figure 22 : Spectres de RMN ¹H des génines I, II, III, IV et V dans CD₃OD.

- un massif de protons résonants entre 0,73 à 2,10 ppm, correspondant aux -CH et -CH₂ des cinq cycles (tableau 7).
- le proton éthylénique H-12 (*t*, $J \approx 3,6$ Hz), déblindé à 5,26 ($\pm 0,02$) ppm.
- un doublet de doublets (H-18) à environ 2,87 ppm, déblindé du fait de sa position en face du cône d'anisotropie du carbonyle d'acide C-28 (tableau 7).
- un à quatre protons, selon la génine, dans la zone des protons portés par un carbone hydroxylé (entre 3,1 et 4,3 ppm) (tableau 7) :
 - le proton H-2 α -équatorial à 4,32 ppm (*q*, $J \approx 3,4$ Hz) dans la bayogénine (**IV**) et à 4,22 ppm (*q*, $J \approx 3,3$ Hz) dans l'acide 2 β -hydroxyléanolique (**II**).
 - le proton H-3 α -axial résonant sous la forme de doublet de doublets ($J_{ax-ax} \approx 11,4$ et $J_{ax-eq} \approx 3,5$ Hz) dans les génines **I** ($\delta_{H-3} \approx 3,20$ ppm), **III** ($\delta_{H-3} \approx 3,64$ ppm) et **V** ($\delta_{H-3} 4,11$ ppm), et sous la forme de doublet ($J_{ax-eq} \approx 3,5$ Hz) dans les génines **II** ($\delta_{H-3} \approx 3,20$ ppm) et **IV** ($\delta_{H-3} \approx 3,63$ ppm), (tableau 7).
 - deux protons géminés (H-23) portés par un carbone oxydé vers 3,25 et 3,65 ppm (*d*, $J \approx 12$ Hz), dans l'hédéragénine (**III**) et la bayogénine (**IV**).

III. 2. 2. 2. Analyse des spectres de RMN ¹³C *J*-modulé

Sur le spectre de RMN ¹³C *J*-modulé (figure 23), les signaux caractéristiques suivants sont observés :

- six ou sept méthyles dont les carbones C-23, C-27 et C-29 sont déblindés (> 25 ppm) du fait de leur position équatoriale sur les cyclohexanes (tableau 7).
- un ensemble de carbones résonants entre 18,5 et 57,0 ppm, attribuables aux CH₂, CH et C quaternaires.
- les carbones éthyléniques C-12 et C-13 de la double liaison trisubstituée respectivement vers 123,1 et 145,0 ppm.
- le carbonyle C-28 vers 182,0 ppm dans le cas d'un acide libre ou 178,0 ppm dans le cas d'un ester.
- le carbone C-3 résonant vers 91,0 ppm pour les génines **I** et **II** et vers 84,0 ppm pour les autres génines du fait de l'effet γ -blindant du carbone C-23 oxydé (tableau 7).

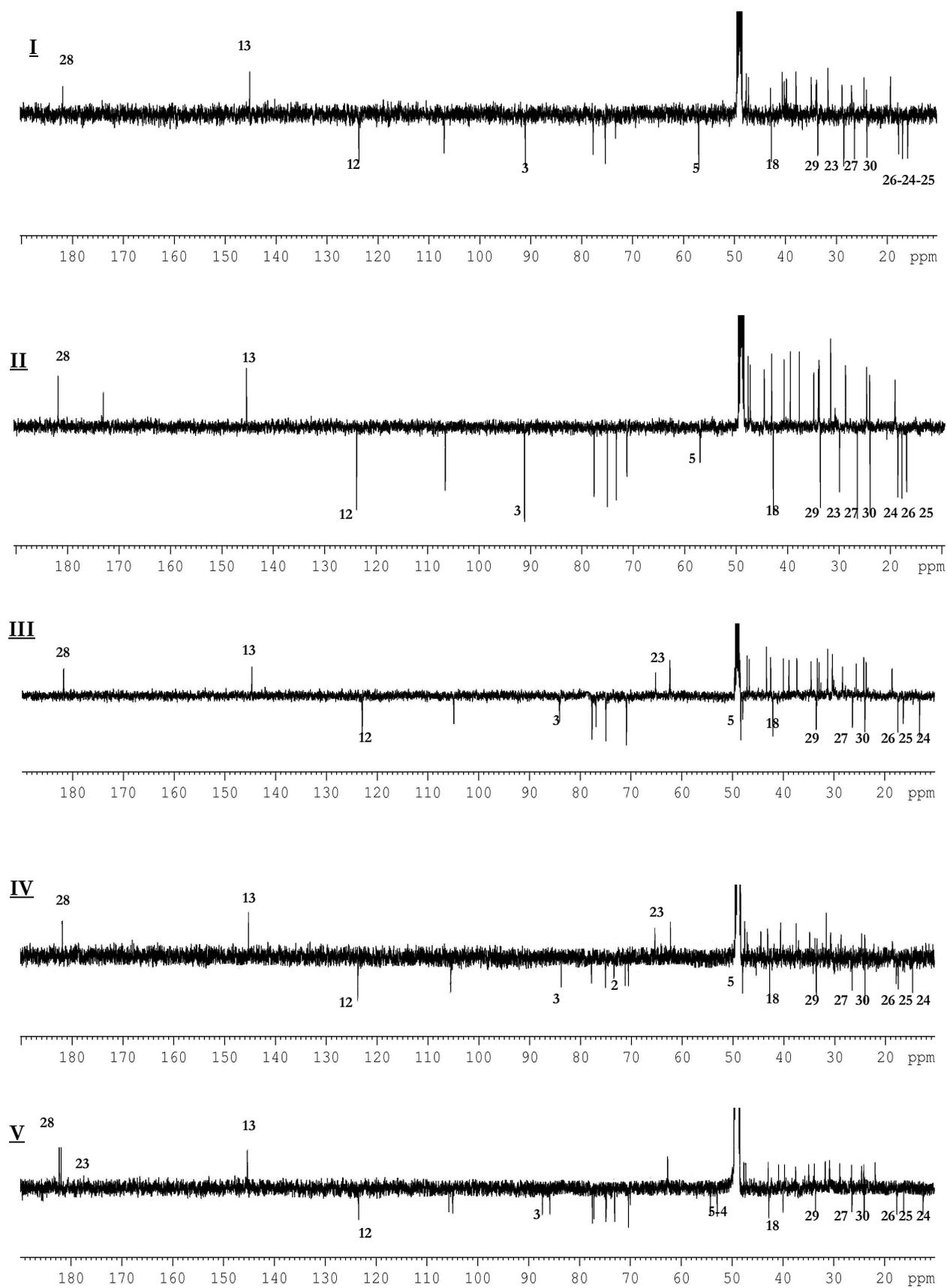


Figure 23 : Spectres RMN ^{13}C J-modulé des génines I, II, III, IV et V dans CD_3OD .

III. 2. 2. 3. Analyse des spectres COSY

À partir des protons caractéristiques individualisés et identifiés précédemment, l'expérience COSY permet de localiser les déplacements chimiques de la plupart des protons aliphatiques, non analysables directement sur le spectre de RMN ^1H (figures 24 et 25). Ces derniers apparaissent entre 0,73 et 2,10 ppm (tableau 7) :

- les protons H-2 à partir de leurs corrélations avec le proton vicinal H-3,
- les deux protons H-1 vicinaux au proton H-2 (dans les génines **II** et **IV**),
- les deux protons H-19 vicinaux au proton H-18,
- les deux protons H-11 à partir de leurs corrélations avec le proton vicinal H-12,
- le proton H-9 vicinal aux protons H-11.

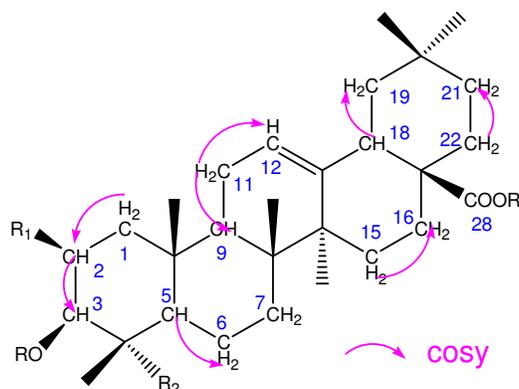


Figure 24 : Corrélations $^3J_{\text{H-H}}$ observées sur le spectre COSY des saponosides isolés.

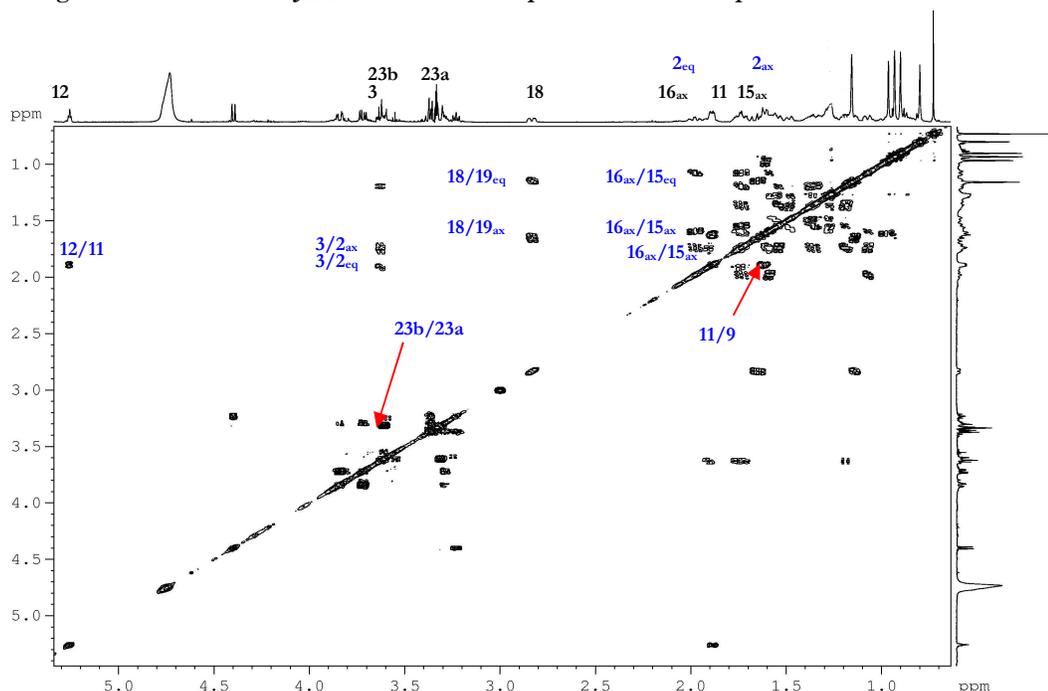


Figure 25 : Spectre COSY du saponoside Cgp1 (hédéragénine) dans CD_3OD .

III. 2. 2. 4. Analyse des spectres HSQC J -modulé

À partir de ces protons, l'analyse des corrélations hétéronucléaires $^1J_{H-C}$ observées sur le spectre HSQC J -modulé permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones (δ_C) les portant (C-1, C-2, C-3, C-9, C-11, C-12, C-18 et C-19) (figure 26). Les valeurs des δ_C et δ_H sont répertoriées dans le tableau 7.

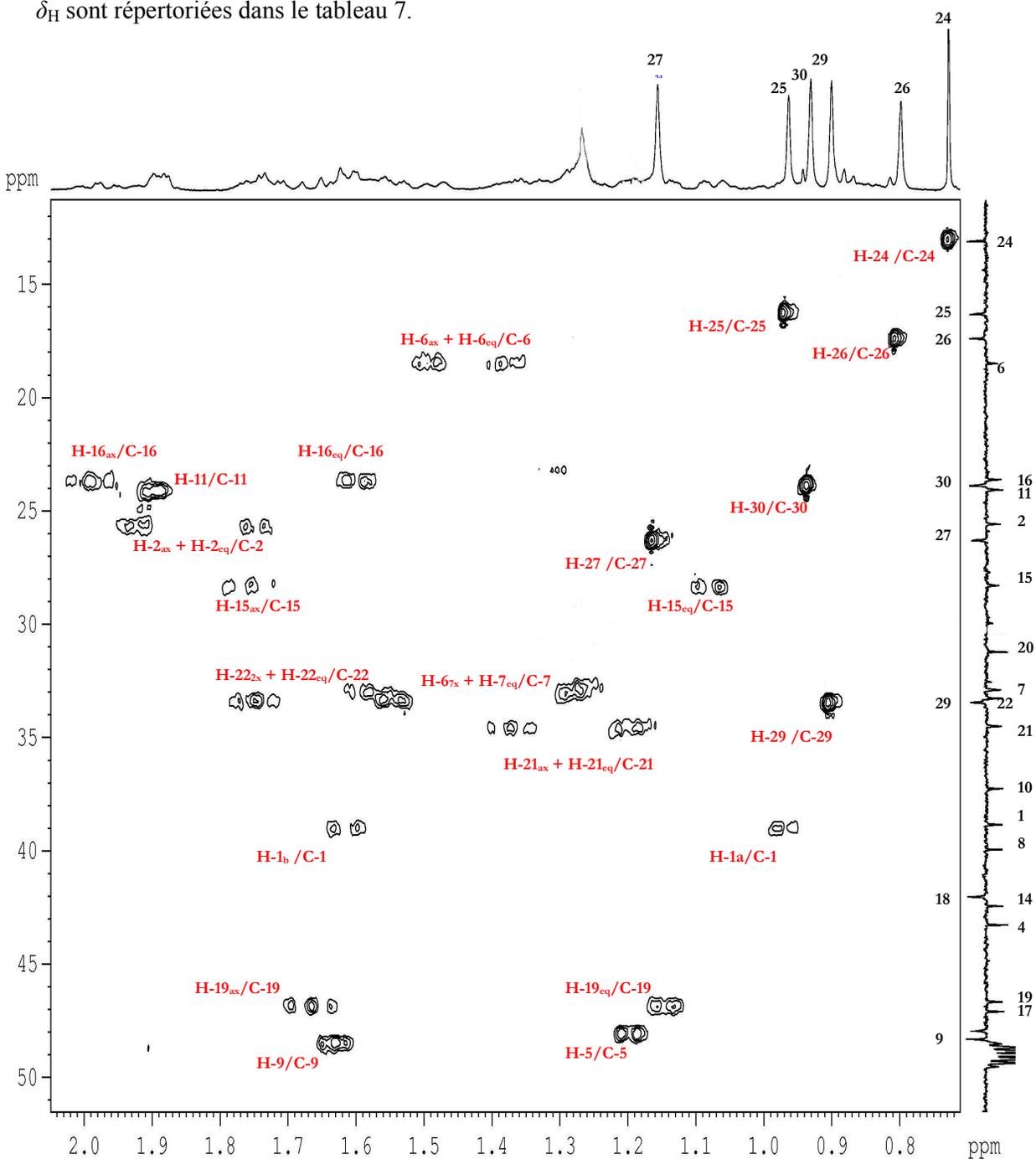


Figure 26 : Spectre HSQC J -modulé du saponoside Cgp1 (zone génine) dans CD_3OD .

III. 2. 2. 5. Analyse des spectres HMBC

L'analyse de l'expérience HMBC, qui visualise les couplages entre protons et carbones distants de deux ou trois liaisons ($^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$), permet l'attribution des méthyles et des autres carbones de la génine. Dans cette expérience, les protons des méthyles corréleront au maximum avec quatre carbones constituant le socle de la base carbonée qui les porte.

- Les protons H-23 et H-24 sont repérés sur le spectre HMBC par leur corrélation avec le carbone C-3 connu, et les carbones C-4 et C-5 (figure 27). L'attribution des carbones C-4 et C-5 sur le spectre de RMN ^{13}C J -modulé est aisée puisqu'il s'agit d'un quaternaire (C-4) et d'un CH (C-5) (figure 29).

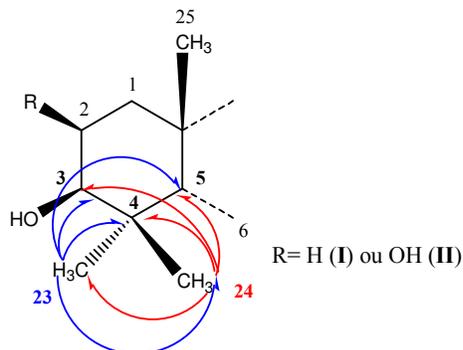


Figure 27 : Corrélations $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ des protons 23 et 24 au sein des génines I et II.

Dans les génines **I** et **II**, la distinction des deux méthyles 23 et 24 est possible grâce à la différence de déplacement chimique des carbones C-23 (vers 29,0 ppm) et C-24 (vers 17,0 ppm) du fait de la position β -axiale du CH_3 -24 (valeur la plus blindée) et α -équatoriale du CH_3 -23 (valeur la plus déblindée) ⁵².

Dans les génines **III** et **IV**, le CH_3 -23 est oxydé en alcool primaire et dans la génine **V** en acide carboxylique. La position axiale ou équatoriale du groupement CH_2OH ou $COOH$ est déterminée par le calcul des δ_C théoriques des méthyles dans les deux cas possibles. La substitution par un hydroxyle engendre un effet γ blindant de 5 ppm du méthyle adjacent. Les valeurs de référence utilisées sont celles des méthyles C-23 et C-24 de la génine **I** (acide oléanolique) : $\delta_{C-23} \approx 29,0$ et $\delta_{C-24} \approx 17,0$ ppm.

Hypothèse A : CH_2OH en 24

- la valeur théorique du δ_{C-23} est $29 - 5 = 24$ ppm (epihédéragnine et soyasapogénol) ⁵².

Hypothèse B : CH_2OH en 23

- la valeur théorique du δ_{C-24} est $17,0 - 5 = 12,0$ ppm. Les valeurs observées de 13,4, 14,7 et 12,0 ppm pour les génines **III**, **IV** et **V**, sont en accord avec celle théoriquement localisée.

D'après ces simples calculs, la fonction CH_2OH ou COOH est localisée en position 23. La comparaison de ces valeurs avec celles de la littérature⁵² le confirme.

- Les protons H-25 corrélient avec les carbones connus **C-1**, **C-5**, **C-9** et le carbone quaternaire **C-10** (figures 28 et 29).
- Les protons H-26 corrélient avec les carbones **C-7**, **C-8**, **C-9** et **C-14** (figures 28 et 29). La distinction entre les carbones quaternaires **C-8** et **C-14** est possible du fait de la corrélation $^3J_{\text{H-C}}$ du carbone **C-14** avec le proton éthylénique **H-12**.
- Les protons H-27 corrélient avec les carbones **C-8**, **C-13**, **C-14** et **C-15** (figures 28 et 29), ce qui permet de localiser le carbone **C-15**

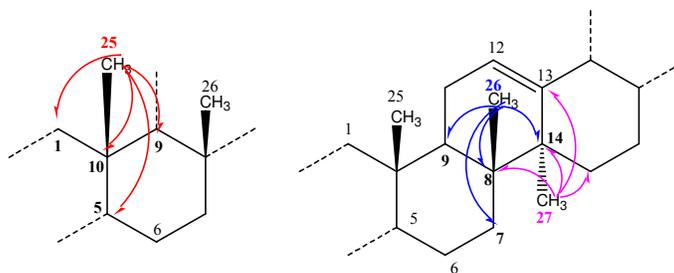


Figure 28 : Corrélations $^2J_{\text{H-C}}$ et $^3J_{\text{H-C}}$ des protons 25, 26 et 27 au sein des génines I - V.

- Les protons H-29 et H-30 corrélient avec les carbones **C-20**, **C-19** et **C-21**. Le CH_3 -29 en position α -équatoriale (vers 33,6 ppm), est plus déblindé que le CH_3 -30 β -axial (vers 24,0 ppm) (figure 29). La distinction entre les carbones **C-20** (quaternaire) et CH_2 -21 est réalisée à l'aide des spectres ^{13}C et HSQC J -modulé.

A partir des carbones **C-15** et **C-21**, l'analyse de l'expérience HSQC J -modulé permet d'attribuer leurs protons respectifs (figure 26). Ceux-ci vont nous permettre de localiser, d'après l'expérience COSY, les protons H-16 et H-22 (figure 24). Les carbones **C-16** et **C-22** sont attribués par l'analyse de leurs corrélations sur le spectre HSQC J -modulé.

La même démarche est appliquée aux carbones **C-5** et **C-7** ce qui permet d'attribuer les protons H-5, H-6 et H-7 et le carbone **C-6**. Lorsque le spectre COSY ne possède pas un bon rapport signal/bruit, tous les protons de la région ne peuvent être attribués. Dans ce cas, l'expérience HSQC J -modulé permet de déterminer le déplacement chimique des protons à partir de leur carbone.

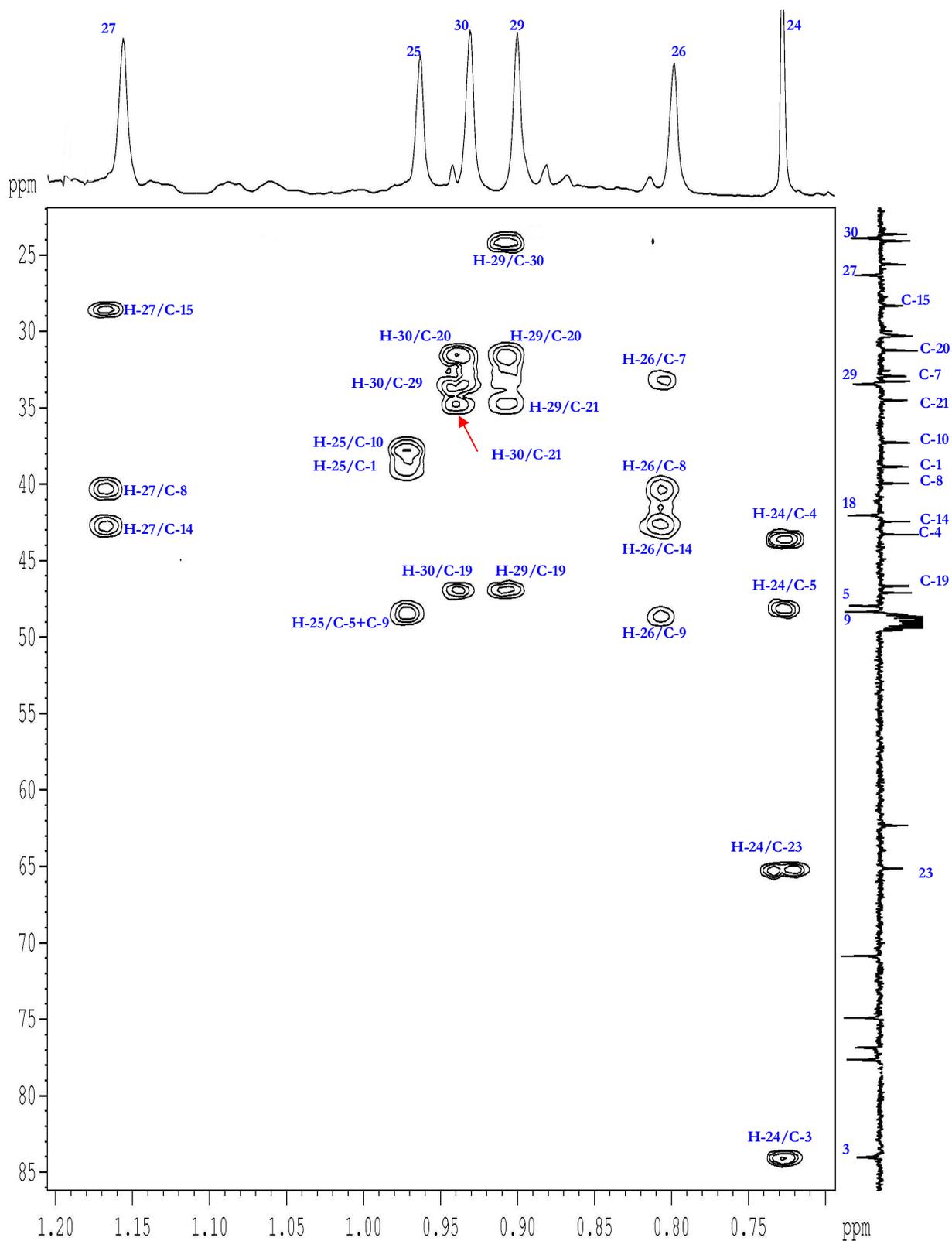


Figure 29 : Spectre HMBC du saponoside Cgp1 (zone génine) dans CD₃OD.

Tableau 7 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) des génines I, II, III, IV et V dans CD₃OD.

	Acide oléanolique (I) (Cgp12)		Ac. 2β-hydroxyoléanolique(II) (Cgp13)		Hédéragénine (III) (Cgp1)		Bayogénine (IV) (Cgp2)		Ac. gypsogénique (V) (Cgp6)	
	δ _H (m, J Hz)	δ _C	δ _H (m, J Hz)	δ _C	δ _H (m, J Hz)	δ _C	δ _H (m, J Hz)	δ _C	δ _H (m, J Hz)	δ _C
1	1,00 (m)	39,7	1,20 (dd, 14-3,3)	44,5	0,97 (m)	39,3	1,18 (dm, 14,6)	44,1	1,13 (m)	39,7
2	1,63 (m)		2,07 (dd, 14-3,3)		1,62 (m)		2,08 (dd, 14,6-2,4)		1,71 (m)	
2	1,72 (m)	27,0	4,22 (q, 3,3)	71,2	1,74 (m)	25,6	4,32 (q, 3,4)	70,9	1,71 (m)	26,4
3	1,90 (dd, 10,2-3,8)		-		1,91 (d, 11)		-		1,99 (m)	
3	3,19 (dd, 11,7-4,4)	91,0	3,20 (d, 3,7)	91,1	3,63 (dd, 11-2,7)	84,8	3,62 (d, 3,4)	83,9	4,11 (dd, 11,8-4,5)	85,8
4	-	40,2	-	39,4	-	43,2	-	43,1	-	54,2
5	0,82 (dm, 11,9)	57,0	0,92 (m)	57,0	1,20 (m)	47,9	1,30 (m)	48,2	1,53 (d, 11,6)	52,9
6	1,44 (td, 11,9-3,9)	19,3	1,54 (m)	19,1	1,37 (m)	18,5	1,48 (m)	18,5	1,16 (m)	21,9
7	1,59 (m)		1,62 (m)		1,48 (dm, 12,4)		1,48 (dm, 12,4)		1,57 (m)	
7	1,33 (dt, 13,6-3,5)	34,0	1,34 (m)	34,0	1,27 (m)	32,9	1,30 (m)	33,4	1,31 (m)	33,8
7	1,54 (td, 13,6-3,5)		1,54 (dq, 9,8-2,1)		1,57 (m)		1,58 (m)		1,56 (m)	
8	-	40,6	-	40,6	-	39,9	-	40,9	-	40,8
9	1,62 (m)	49,0	1,56 (m)	49,3	1,63 (m)	48,3	1,58 (m)	48,0	1,68 (m)	49,0
10	-	37,9	-	37,7	-	37,2	-	37,3	-	37,4
11	1,92 (m)	24,5	1,96 (ddd, 13,6-6,2-4,3)	24,5	1,89 (m)	24,1	1,99 (m)	24,4	1,95 (m)	24,5
1	1,92 (m)		2,02 (m)		1,89 (m)		1,91 (dd, 11,1-2,8)		1,95 (m)	
12	5,26 (t, 3,6)	123,7	5,28 (t, 3,6)	123,9	5,25 (t, 3,6)	122,9	5,24 (t, 3,4)	122,2	5,27 (t, 3,6)	123,4
13	-	145,1	-	145,2	-	144,6	-	144,7	-	145,2
14	-	42,9	-	43,0	-	40,3	-	40,3	-	42,9
15	1,10 (dm, 13,9)	28,8	1,10 (dm, 14,2)	28,7	1,08 (dm, 13,3)	28,3	0,99 (ddd, 10,2-4,7-2)	28,9	1,09 (dd, 12,1-4)	28,9
1	1,79 (td, 13,9-4,3)		1,80 (td, 14,3-4,4)		1,74 (td, 13,6-4,4)		1,87 (m)		1,77 (m)	
16	1,63 (m)	24	1,62 (m)	24,0	1,61 (m)	23,6	1,59 (dd, 10,2-4,7)	24,3	1,61 (dm, 13,5)	24,0
1	2,04 (td, 13,4-3,9)		2,03 (td, 13,6-4)		1,98 (td, 13,5-3,9)		1,87 (m)		2,04 (td, 13,7-4)	
17	-	47,6	-	47,6	-	47,1	-	47,5	-	47,6
18	2,87 (dd, 13,5-4,9)	42,7	2,87 (ddm, 14-3)	42,7	2,83 (dd, 13-3,7)	43,0	2,91 (dd, 13,6-3,5)	43,3	2,87 (dd, 14,2-4)	42,7
19	1,15(ddd,13,7-4,9-2,2)	47,2	1,15 (ddd, 13,6-4,8-2,5)	47,2	1,15 (dm, 13,8)	46,6	1,10 (dm, 13,6)	48,2	1,15 (m)	47,2
19	1,72 (t, 13,7)		1,71 (t, 13,8)		1,67 (t, 13,8)		1,64 (t, 13,6)		1,23 (t, 14,1)	
20	-	31,6	-	31,6	-	31,2	-	31,7	-	31,6
21	1,23 (ddd, 13,4-4-2,5)	34,9	1,23 (dm, 13,9)	34,9	1,20 (m)	33,2	1,13 (dm, 14)	35,4	1,42 (dm, 13,7)	35,0
21	1,42 (td, 13,4-3,9)		1,42 (td, 13,9-4,2)		1,37 (m)		1,34 (td, 14-3,8)		1,56 (td, 13,7-4,3)	
22	1,56 (dm, 13,6)	33,8	1,56 (m)	33,8	1,54 (m)	33,2	1,50 (dt, 14-3,3)	34,2	1,72 (m)	34,0
22	1,77 (td, 13,6-4,3)		1,77 (td, 13,8-3,4)		1,74 (dm, 11)		1,72 (td, 14-4,2)		1,76 (m)	
23	1,08 (s)	28,5	1,10 (s)	29,9	1,10 (s)	65,1	3,26 (d, 11,4)	65,5	-	181,9
23	-		-		3,61 (d, 12,5)		3,61 (d, 11,4)		-	
24	0,88 (s)	17,0	1,10 (s)	18,5	0,73 (s)	13,1	0,94 (s)	14,2	1,17 (s)	12,0
25	0,98 (s)	15,9	1,27 (s)	16,8	0,96 (s)	16,3	1,28 (s)	17,4	1,00 (s)	16,2
26	0,83 (s)	17,7	0,85 (s)	17,8	0,80 (s)	17,4	0,89 (s)	18,2	0,83 (s)	17,6
27	1,19 (s)	26,4	1,18 (s)	26,4	1,16 (s)	26,3	1,15 (s)	26,6	1,19 (s)	26,4
28	-	182,0	-	181,9	-	181,1	-	186,0	-	182,0
29	0,93 (s)	33,6	0,93 (s)	33,4	0,93 (s)	33,4	0,88 (s)	33,9	0,93 (s)	33,6
30	0,97 (s)	24,0	0,97 (s)	24,0	0,97 (s)	23,9	0,95 (s)	24,3	0,96 (s)	24,0

Les déplacements chimiques en RMN ¹H et ¹³C des génines des autres saponosides sont répertoriés dans les tableaux 65-74 dans la partie expérimentale.

III. 2. 2. 6. Analyse des spectres ROESY

La stéréochimie des carbones asymétriques dans les cinq génines est déterminée par l'analyse des valeurs des constantes de couplage (mesurées sur le spectre RMN ^1H) et des effets rOe observés sur les spectres obtenus avec l'expérience de RMN bidimensionnelle homonucléaire ROESY, visualisant les couplages dipolaires entre les protons proches dans l'espace (figure 31).

La stéréochimie α -axiale du proton H-3 est confirmée par les effets rOe entre les protons H-3/H-5 et H-3/H-23 (figures 30 et 31) et la valeur des constantes de couplage $^3J_{3\text{ax}-2\text{ax}} \approx 11,4$ Hz, valable seulement pour les génines **I**, **III** et **V** et $^3J_{3\text{ax}-2\text{eq}} \approx 3,5$ Hz pour les cinq génines.

L'orientation α -équatoriale du proton H-2 dans l'acide 2β -hydroxyléanolique (**II**) et la bayogénine (**IV**) est confirmée par l'effet rOe observé entre les protons H-2_{eq}/H-3 et la valeur de la constante de couplage $^3J_{3\text{ax}-2\text{eq}} \approx 3,5$ Hz.

L'orientation β -axiale du proton H-18 est confirmée par l'effet rOe qu'il présente avec le proton H-12 et les protons du méthyle β -axial CH₃-30 sur le spectre ROESY, et par la grande constante de couplage $^3J_{18\text{ax}-19\text{ax}} \approx 13,5$ Hz.

La distinction entre les protons des méthyles 23 et 24 est également possible par l'analyse des effets rOe observés pour le méthyle 23 α -équatorial avec les protons H-3 et H-5 α -axiaux. Pour l'hédéragénine (**III**) et la bayogénine (**IV**), un effet rOe entre le proton H-3 et l'un des deux protons du méthylène CH₂OH, confirme sa position α -équatoriale.

Les effets rOe observés entre les protons H-24, H-25 et H-26 confirment l'orientation β -axiale de ces trois méthyles.

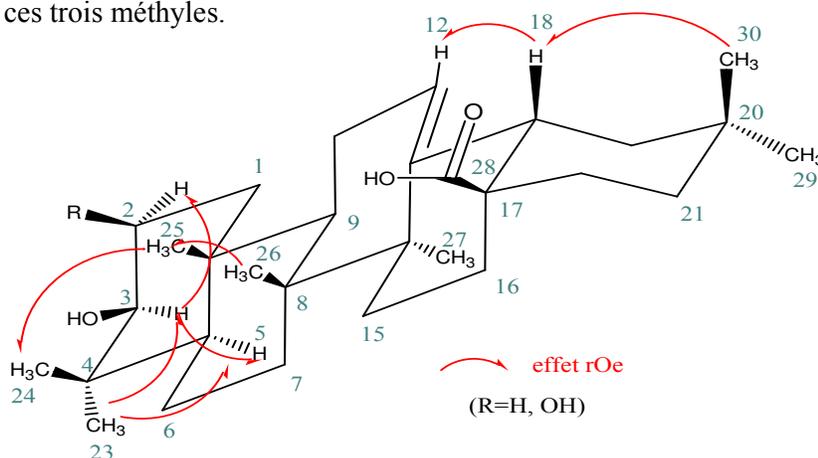


Figure 30 : Effets rOe observés sur les spectres ROESY des saponosides.

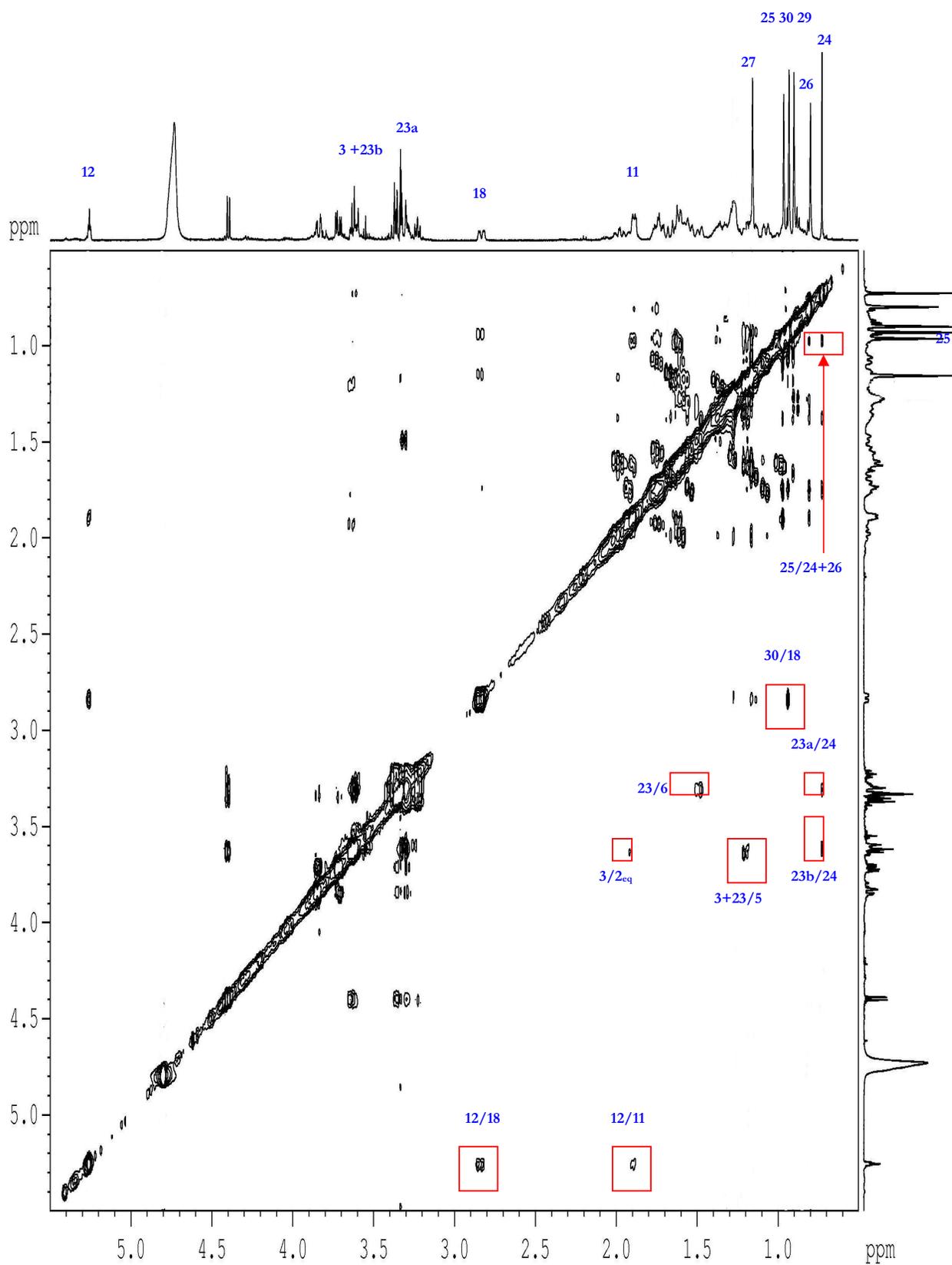


Figure 31 : Spectre ROESY du saponoside Cgp1 dans CD₃OD.

III. 2. 3. Identification de la partie osidique

III. 2. 3. 1. Structures des monoglucosides **Cgp1** et **Cgp2** (1^{ère} série)

Le spectre de masse obtenu par électro-ébulisaison (ESI-MS) en mode négatif, donne un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 633 pour **Cgp1** et 649 pour **Cgp2**. En soustrayant la masse de l'aglycone, l'hédéragénine pour **Cgp1** (471 *uma*) et la bayogénine pour **Cgp2** (487 *uma*), il reste 162 *uma* soit un hexose.

L'analyse des spectres de RMN est simple puisque le spectre de RMN 1H montre un seul proton anomérique pour chacun des deux saponosides, résonnant sous la forme d'un doublet à grande constante de couplage ($J_{H1'-H2'}=7,8$ Hz) à 4,40 (**Cgp1**) et 4,44 ppm (**Cgp2**). Ces protons montrent des corrélations $^1J_{H-C}$ sur le spectre HSQC J -modulé avec les carbones anomériques à 104,8 et 105,1 ppm (figure 33).

A partir du proton anomérique, l'analyse de l'expérience COSY permet d'attribuer les sept protons d'un hexose (figure 32).

Pour le composé **Cgp1**, le proton osidique H-2' résonne sous la forme d'un triplet ($J=8,4$ Hz) indiquant une position transdiaxiale des protons H-1', H-2' et H-3'. La valeur élevée de la constante de couplage ($J_{3'-4'}=8,9$ Hz) indique également une position transdiaxiale des protons H-3' et H-4'. Le proton H-5' (*ddd*), couple avec le proton H-4' et avec les deux protons géminés H-6' avec des constantes de couplage différentes $J_{5'-6'a}=4,9$ et $J_{5'-6'b}=2,7$ Hz (tableau 8).

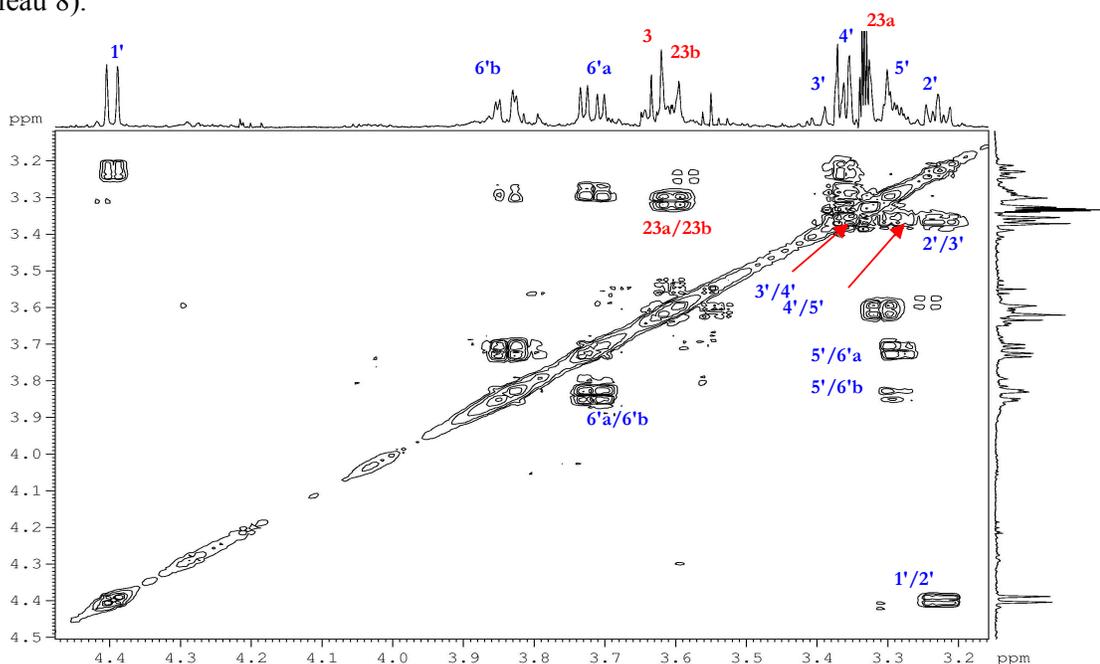


Figure 32 : Spectre COSY, partie osidique du saponoside **Cgp1**.

Les déplacements chimiques des carbones de l'hexose attribués par l'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (figure 33) et les grandes valeurs des constantes de couplage entre tous les protons (tableau 8) indiquent qu'il s'agit d'un β -D-glucopyranose^{56,57}. Les effets rOe observés sur le spectre ROESY (figure 34) entre les protons α -axiaux H-1'/H-3' et H-1'/H-5' confirment la configuration anomérique β de ce glucose.

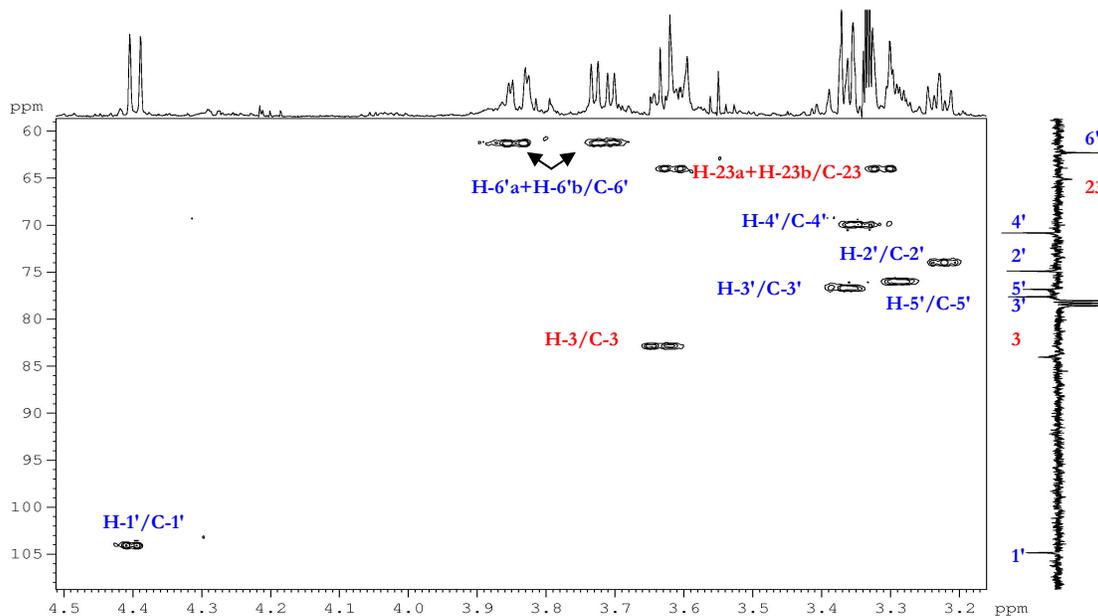


Figure 33 : Spectre HSQC *J*-modulé du saponoside Cgp1, partie osidique.

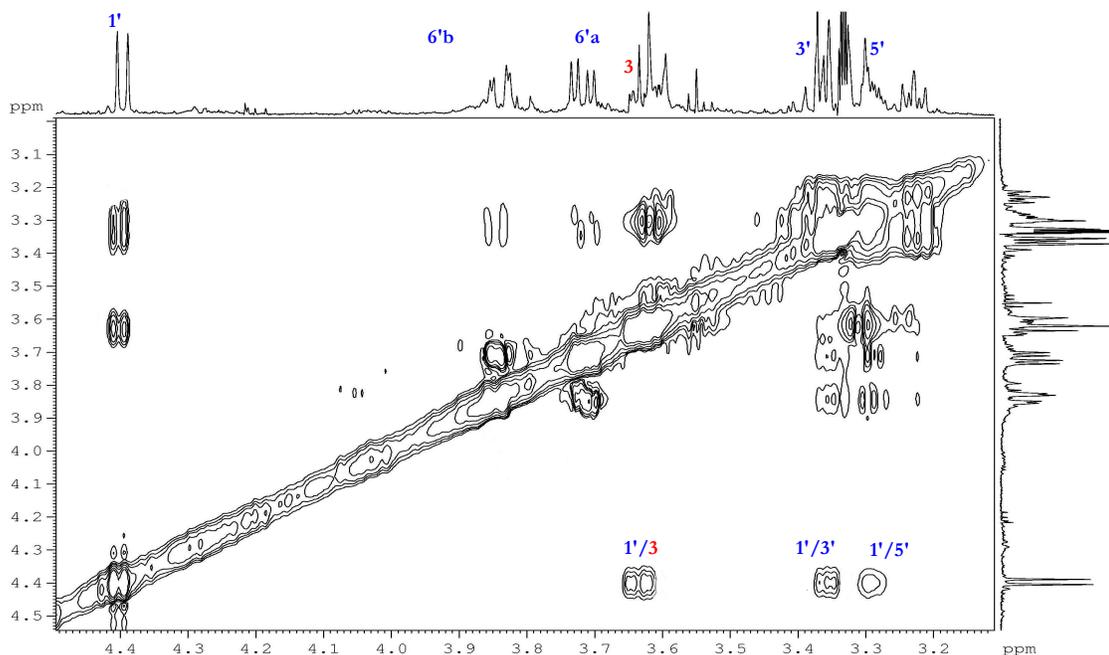


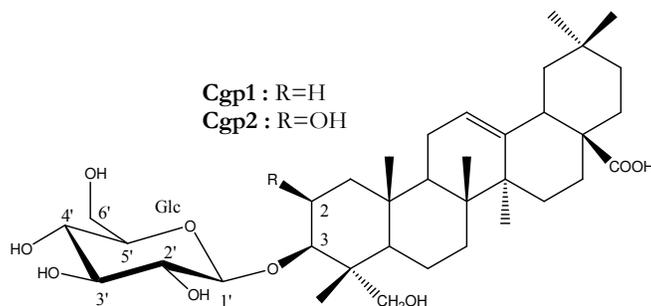
Figure 34 : Spectre ROESY du saponoside Cgp1, partie osidique.

De la même manière, un β -D-glucopyranose terminal a été identifié dans le composé **Cgp2**, à partir de son proton anomérique à 4,44 ppm (*d*, $J_{1'-2'}=7,8$ Hz) (tableau 8).

La corrélation $^3J_{H-C}$ observée sur les spectres HMBC entre le proton anomérique H-1' du glucose et le carbone C-3 de l'hédéragénine (**Cgp1**) ou de la bayogénine (**Cgp2**) montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position 3 de la génine. Ceci est confirmé par l'effet rOe observé entre le proton H-1' et le proton H-3 de l'hédéragénine (figure 34) ou de la bayogénine.

Les structures des deux saponosides ont été élucidées comme étant :

- pour **Cgp1**, la 3-*O*- β -D-glucopyranosyl hédéragénine,
- pour **Cgp2**, la 3-*O*- β -D-glucopyranosyl bayogénine.



Les structures de ces deux saponosides sont connues. Le composé **Cgp1** correspond au colchiside 4, isolé précédemment de *Hedera colchica*^{58, 59}, *Hedera nepalensis*⁶⁰ et *Swartzia schomburgkii*⁶¹. Il a été également isolé avec le composé **Cgp2** de *Dolichos kilimandscharicus*⁶².

Tableau 8 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp1** et **Cgp2** dans CD_3OD .

	Cgp1		Cgp2	
	δ_H (<i>m</i> , J Hz)	δ_C	δ_H (<i>m</i> , J Hz)	δ_C
Glc-				
1'	4,40 (<i>d</i> , 7,8)	104,8	4,44 (<i>d</i> , 7,8)	105,1
2'	3,23 (<i>t</i> , 8,4)	74,9	3,30 (<i>dd</i> , 7,8-8,8)	75,1
3'	3,37 (<i>t</i> , 8,9)	77,6	3,38 (<i>t</i> , 8,8)	77,9
4'	3,35 (<i>dd</i> , 9,6-8,9)	70,8	3,41 (<i>t</i> , 8,9)	70,8
5'	3,29 (<i>ddd</i> , 9,6-4,9-2,7)	76,8	3,29 (<i>ddd</i> , 8,8-4,5-2,7)	77,4
6'a	3,72 (<i>dd</i> , 11,9-4,9)	62,3	3,72 (<i>dd</i> , 11,9-4,5)	62,0
6'b	3,84 (<i>dd</i> , 12,1-2,9)		3,82 (<i>dd</i> , 11,9-2,2)	

III. 2. 3. 2. Structures des monodesmosides (3-*O*-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-]) **Cgp3**, **Cgp4**, **Cgp5** et **Cgp6**

Les spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif montrent un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 779 pour **Cgp3**, 795 pour **Cgp4** et 811 pour **Cgp5**, tandis que le composé **Cgp6** montre en ESI-MS mode positif, un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 833. L'analyse MS-MS de l'ion pseudomoléculaire montre le départ successif de deux unités hexoses (2x162 uma) indiquant une chaîne disaccharidique attachée à la génine.

Sur le spectre de RMN 1H de **Cgp3**, deux protons anomériques sont repérés à 4,41 ppm (d , $J_{H1'-H2''}=7,7$ Hz) et 4,55 ppm (d , $J_{H1'-H2''}=7,8$ Hz). Leurs carbones respectifs, attribués à l'aide du spectre HSQC J -modulé, résonnent à 105,6 et 104,9 ppm (tableau 9).

A partir du proton anomérique à 4,41 ppm et de l'analyse du spectre COSY, sont attribués sept protons d'un hexose. Les grandes valeurs des constantes de couplage montrent qu'il s'agit comme pour les saponosides précédents, d'un β -D-glucose (tableau 9). Le déblindage du carbone C-3' de ce glucose à 87,0 ppm comparativement à celui observé dans les saponosides **Cgp1** et **Cgp2** ($\approx +10$ ppm) est en faveur d'une substitution en cette position par le second hexose de la chaîne.

En partant du proton anomérique à 4,55 ppm, les sept protons du second hexose sont attribués. Le proton H-2'' résonne à 3,61 ppm sous la forme d'un doublet de doublets ($^3J_{H2''-H3''}=9,6$ et $^3J_{H1''-H2''}=7,8$ Hz) indiquant une position transdiaxiale des protons en H-1'', H-2'' et H-3''. Le proton H-3'' est localisé à 3,55 ppm (dd , $J=9,6$ et 3,3 Hz) et le proton H-4'' résonne à 3,85 ppm (d , $J=3,3$ Hz). La faible valeur de la constante de couplage entre ces deux protons ($^3J_{H3''-H4''}=3,3$ Hz) met en évidence une position équatoriale du proton H-4''. Le proton H-5'' (3,60 ppm, m) est localisé sur le spectre ROESY par sa corrélation avec le proton H-1''. Il couple, sur le spectre COSY, avec les deux protons H-6''a (dd , $J=11,6-4,5$ Hz) et H-6''b (dd , $J=11,6-7,9$ Hz). Les effets rOe observés sur le spectre ROESY entre les protons H-1''/H-3'' et H-1''/H-5'' et les constantes de couplage entre tous les protons de cet unité osidique sont caractéristiques d'un β -D-galactose. Les valeurs des déplacements chimiques de ses carbones, attribués après analyse du spectre HSQC J -modulé sont en accord avec celles d'un β -D-galactose terminal^{56,57}.

Sur le spectre de RMN ^{13}C J -modulé, le déplacement chimique du carbone C-3 de l'acide oléanolique (91,0 ppm) suggère que la chaîne di-osidique est liée en position 3 de la génine. Des corrélations $^3J_{H-C}$ ont été observées sur le spectre HMBC entre le proton H-1'' du

galactose et le carbone C-3' du glucose et entre le proton H-1' du glucose et le carbone C-3 de l'acide oléanolique (figure 35). Cet enchaînement est confirmé par la présence sur le spectre ROESY, d'effets rOe entre les protons H-1'' du galactose et H-3' du glucose et entre H-1' du glucose et H-3 de l'acide oléanolique.

La structure du saponoside **Cgp3** est l'acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] oléanolique. Ce saponoside a précédemment été isolé des parties aériennes de *Calendula arvensis* (arvensoside B)^{63, 64}, de *Calendula officinalis*⁶⁵ et d'une autre Asteraceae, *Osteospermum vaillantii*⁶⁶.

La partie osidique des composés **Cgp4**, **Cgp5** et **Cgp6** s'avère identique à celle de **Cgp3** comme l'indiquent les valeurs des δ_H et δ_C (tableau 9) et les effets rOe observés. Comme précédemment, la génine est substituée en position C-3 par le disaccharide [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-], confirmé par la visualisation des effets rOe entre proton H-1' du glucose et le proton H-3 de la génine. De plus, sur le spectre HMBC, on note des corrélations $^3J_{H-C}$ entre H-1'' du galactose et C-3' du glucose et entre H-1' de ce glucose et C-3 de la génine (figure 35).

Les données précédentes indiquent que la structure de ces saponosides est pour :

Cgp4, la 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine,

Cgp5, la 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine,

Cgp6, l'acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] gypsogénique.

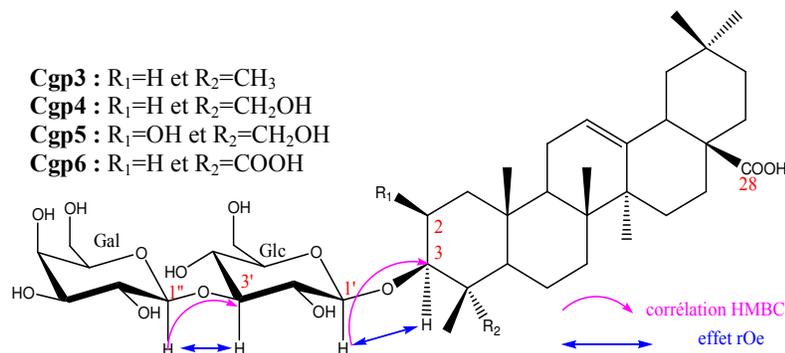


Figure 35 : Structures des saponosides **Cgp3**, **Cgp4**, **Cgp5** et **Cgp6**. Corrélations HMBC et effets rOe observés.

Tableau 9 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp3**, **Cgp4**, **Cgp5** et **Cgp6** dans CD₃OD.

	Cgp3		Cgp4		Cgp5		Cgp6	
	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c
Glc-								
1'	4,41 (<i>d</i> , 7,7)	105,6	4,48 (<i>d</i> , 7,9)	105,1	4,52 (<i>d</i> , 7,8)	105,2	4,37 (<i>d</i> , 7,7)	104,9
2'	3,44 (<i>dd</i> , 9,3-8)	74,4	3,40 (<i>dd</i> , 8,9-7,9)	74,7	3,50 (<i>dd</i> , 9-7,8)	74,7	3,33 (<i>t</i> , 8,4)	74,3
3'	3,58 (<i>t</i> , 9)	87,0	3,57 (<i>t</i> , 8,9)	88,0	3,60 (<i>t</i> , 8,9)	87,8	3,53 (<i>t</i> , 9)	87,3
4'	3,50 (<i>t</i> , 9)	69,3	3,45 (<i>dd</i> , 9,6-8,9)	69,8	3,51 (<i>dd</i> , 9,6-8,9)	69,5	3,42 (<i>t</i> , 8,8)	70,0
5'	3,31 (<i>m</i>)	76,4	3,34 (<i>ddd</i> , 9,6-5,1-2,4)	77,1	3,35 (<i>ddd</i> , 9,6 - 4,6 - 2,3)	77,3	3,28 (<i>ddd</i> , 10-5,1-2)	77,4
6'a	3,75 (<i>dd</i> , 12,3-4,8)	62,1	3,72 (<i>dd</i> , 12-5,1)	62,5	3,74 (<i>dd</i> , 12-4,6)	62,2	3,70 (<i>dd</i> , 11,6-4,7)	62,6
6'b	3,84 (<i>dd</i> , 12,3-2,5)		3,87 (<i>dd</i> , 12-2,4)		3,83 (<i>dd</i> , 12-2,3)		3,87 (<i>dd</i> , 12-3)	
Gal-								
1''	4,55 (<i>d</i> , 7,8)	104,9	4,52 (<i>d</i> , 7,7)	105,5	4,55 (<i>d</i> , 7,7)	105,8	4,52 (<i>d</i> , 7,6)	105,7
2''	3,61 (<i>dd</i> , 9,6-7,7)	72,5	3,63 (<i>dd</i> , 9,7-7,7)	72,9	3,64 (<i>dd</i> , 9,6-7,8)	73,0	3,60 (<i>dd</i> , 9,8-7,7)	73,1
3''	3,55 (<i>dd</i> , 9,6-3,3)	74,1	3,54 (<i>dd</i> , 9,7-3,3)	74,6	3,54 (<i>dd</i> , 9,6-3,4)	74,7	3,51 (<i>dd</i> , 9,8-3,6)	74,7
4''	3,85 (<i>d</i> , 3,3)	69,8	3,83 (<i>dd</i> , 3,3-0,1)	70,2	3,83 (<i>d</i> , 3,4)	70,3	3,82 (<i>d</i> , 3,5)	70,3
5''	3,60 (<i>m</i>)	76,4	3,60 (<i>ddd</i> , 9,6-5,8-1)	77,0	3,60 (<i>dd</i> , 7,7-4,4)	77,2	3,56 (<i>m</i>)	77,1
6''a	3,71 (<i>dd</i> , 11,6-4,1)	62,1	3,72 (<i>dd</i> , 11,6-4,5)	62,5	3,71 (<i>dd</i> , 11,5-4,4)	62,6	3,7 (<i>dd</i> , 11,6-4,6)	62,6
6''b	3,80 (<i>dd</i> , 11,6-7,9)		3,81 (<i>dd</i> , 11,6-7,8)		3,80 (<i>dd</i> , 11,5-7,7)		3,79 (<i>dd</i> , 11,6-7,6)	

III. 2. 3. 3. Structures des bidesmosides (3-*O*-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-], 28-*O*- β -D-Glc) **Cgp10** et **Cgp11**

Sur les spectres ESI-MS mode négatif des saponosides **Cgp10** et **Cgp11**, sont observés les ions pseudomoléculaires [M-H]⁻ à *m/z* 957 et 973, respectivement. Comparativement aux saponosides monodesmosidiques précédents **Cgp4** et **Cgp5**, les saponosides **Cgp10** et **Cgp11** comprennent un hexose supplémentaire (+162 *uma*). La partie osidique des saponosides **Cgp10** et **Cgp11** est donc constituée de trois hexoses.

Dans la zone des protons anomériques des saponosides **Cgp10** et **Cgp11**, et comparativement aux spectres de **Cgp4** et **Cgp5**, un doublet supplémentaire fortement déblindé est détecté à 5,40 ppm (*d*, *J*=8,1 Hz). Le carbone anomérique correspondant résonne à 95,7 ppm. Les valeurs déblindées du H-1''' et blindées du C-1''' sont caractéristiques d'une unité osidique impliquée dans une liaison ester avec le carbonyle C-28 de l'hédéragénine (**Cgp10**) ou de la bayogénine (**Cgp11**)⁶⁷.

L'analyse des spectres COSY et TOCSY révèle que ce proton anomérique fait partie du système de sept spins couplés d'un glucose. Les constantes vicinales entre les protons H-1''' (*d*, *J*=8,1 Hz), H-2''' (*dd*, *J*=9,3-8,1 Hz), H-3''' (*t*, *J*=9,3 Hz), H-4''' (*t*, *J*=9,3 Hz) et H-5''' (*m*), toutes supérieures à 8 Hz, révèlent des positions axiales pour ces protons, caractéristiques d'un β -D-glucose. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones sont en accord avec celles d'un β -D-glucose terminal (tableau 10)^{56,57}.

Les signaux des deux unités glycosidiques [3-*O*- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-Glc] liées en position 3 de la génine dans le composé **Cgp4** et **Cgp5** sont retrouvés sur les spectres de RMN de **Cgp10** et **Cgp11** (tableaux 9 et 10).

Le séquençage de ces deux bidesmosides est réalisé à partir de l'analyse des spectres HMBC sur lesquels sont visualisées les corrélations $^3J_{H-C}$ suivantes :

- H-1' Glc/C-3 de la génine et H-1'' Gal/C-3' Glc,
- H-1''' Glc/C-28 de la génine.

Le saponoside **Cgp10** est la 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Le saponoside **Cgp11** est la 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

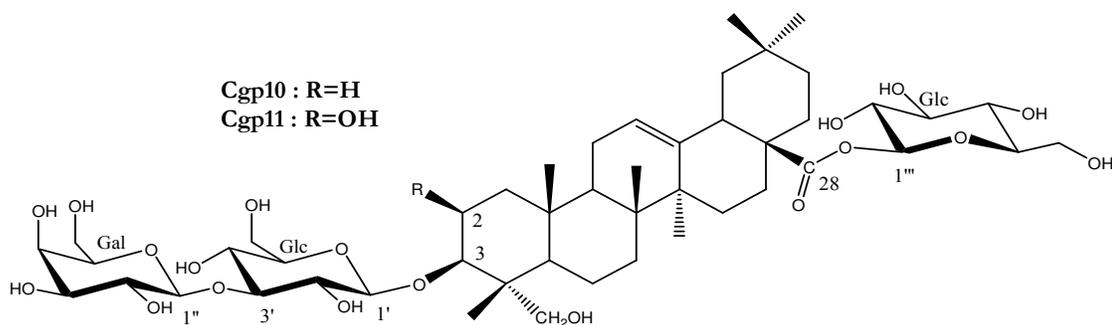


Tableau 10 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp10** et **Cgp11** dans CD_3OD .

	Cgp10		Cgp11	
	δ_H (<i>m</i> , J/Hz)	δ_C	δ_H (<i>m</i> , J/Hz)	δ_C
Glc - en C-3				
1'	4,48 (<i>d</i> , 7,9)	105,3	4,49 (<i>d</i> , 7,9)	104,6
2'	3,39 (<i>dd</i> , 8,9-7,9)	74,8	3,50 (<i>t</i> , 8,4)	74,2
3'	3,57 (<i>t</i> , 9)	88,1	3,58 (<i>t</i> , 8,3)	87,8
4'	3,45 (<i>dd</i> , 9,6-9)	69,9	3,53 (<i>t</i> , 8,7)	69,2
5'	3,33 (<i>m</i>)	77,3	3,33 (<i>m</i>)	76,9
6'a	3,72 (<i>dd</i> , 11,5-4,3)	62,6	3,74 (<i>dd</i> , 12-4,5)	61,9
6'b	3,87 (<i>dd</i> , 15-2)		3,83 (<i>dd</i> , 12-3,6)	
Gal - en C-3'				
1''	4,52 (<i>d</i> , 7,7)	105,7	4,50 (<i>d</i> , 7,8)	105,4
2''	3,63 (<i>dd</i> , 9,6-7,7)	73,0	3,64 (<i>dd</i> , 9,6-7,8)	72,7
3''	3,53 (<i>dd</i> , 9,6-3,3)	74,7	3,54 (<i>dd</i> , 9,6-3,2)	74,4
4''	3,82 (<i>d</i> , 3,3)	70,3	3,83 (<i>d</i> , 3,2)	69,9
5''	3,59 (<i>ddd</i> , 7,7-3,3-1)	77,2	3,58 (<i>m</i>)	76,8
6''a	3,71 (<i>dd</i> , 11,4-3,3)	62,5	3,71 (<i>dd</i> , 11,5-4)	62,3
6''b	3,80 (<i>dd</i> , 14-7,7)		3,81 (<i>dd</i> , 11,5-7,8)	
Glc' - ester				
1'''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,4
2'''	3,34 (<i>dd</i> , 9,3-8,1)	73,9	3,35 (<i>t</i> , 8,5)	73,5
3'''	3,43 (<i>t</i> , 9,3)	78,3	3,45 (<i>dd</i> , 9,1-8,5)	77,9
4'''	3,38 (<i>t</i> , 9,3)	71,1	3,40 (<i>t</i> , 9,3)	70,8
5'''	3,37 (<i>m</i>)	78,7	3,37 (<i>m</i>)	78,2
6'''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,4-3)	62,4	3,71 (<i>dd</i> , 11,6-3,4)	62,2
6'''b	3,84 (<i>dd</i> , 11,4-2)		3,83 (<i>dd</i> , 11,6-2,5)	

III. 2. 3. 4. Structure du monodesmoside (3-*O*-[β -D-Xyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-]) **Cgp7**

Le spectre de masse du saponoside **Cgp7** obtenu en ESI-MS mode négatif, montre un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 943. La fragmentation de cet ion conduit à la formation d'ions à m/z 811, 649 et 487, correspondant respectivement à $[M-H-132]^-$, $[M-H-132-162]^-$ et $[M-H-132-2 \times 162]^-$. Cette fragmentation indique que le saponoside **Cgp7** est constitué de la bayogénine, d'un pentose en position terminale (car éliminé en premier) et de deux hexoses.

Sur le spectre de RMN 1H de **Cgp7**, trois protons anomériques sont repérés à 4,51 ppm (d , $J=7,5$ Hz), 4,53 ppm (d , $J=7$ Hz) et 4,62 ppm (d , $J=7,5$ Hz). Leurs carbones respectifs, attribués à l'aide du spectre HSQC J -modulé, résonnent à 105,2, 105,2 et 106,3 ppm (tableau 11).

L'analyse du spectre COSY montre six spins couplés appartenant à un pentose dont l'anomère résonne à 4,53 ppm. Le proton H-2''' (δ_H 3,32, t , $J=9$ Hz) est couplé au proton H-3''' (δ_H 3,36, t , $J=9$ Hz) lui-même couplé au proton H-4''' résonnant sous la forme d'un multiplet. Ce dernier couple avec deux protons géminés H-5'''a (δ_H 3,24, t , $J=11,5$ Hz) et H-5'''b (δ_H 3,89, dd , $J=11,5-5$). Les valeurs des constantes de couplage $J_{H1'''-H2'''}$, $J_{H2'''-H3'''}$, $J_{H3'''-H4'''}$ et $J_{H4'''-H5'''a}$ sont toutes supérieures ou égales à 7 Hz indiquant une position transdiaxiale de ces protons, caractéristique d'un β -D-xylose. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones correspondants, obtenus d'après l'analyse du spectre HSQC J -modulé, sont en accord avec celles décrites pour un β -D-xylose terminal^{56, 57}.

À l'aide des spectres COSY et ROESY, un β -D-galactose est identifié en partant du proton anomérique résonnant à 4,62 ppm (d , $J=7,5$ Hz). La valeur du déplacement chimique du carbone C-3'', déblindée à 84,1 ppm, suggère une substitution en cette position (tableau 11).

Le troisième sucre dont le proton anomérique résonne à 4,51 ppm (d , $J=7,5$ Hz), a été identifié à un β -D-glucose. Son carbone C-3' déblindé à 87,7 ppm, traduit une substitution en cette position comme pour le saponoside **Cgp5**.

D'après l'analyse du spectre de masse, le xylose a une position terminale. Ceci est confirmé par les corrélations $^3J_{H-C}$ observées sur le spectre HMBC entre le proton H-1''' du xylose et le carbone C-3'' du galactose. Les autres corrélations interosidiques sont observées entre le proton H-1'' du galactose et le carbone C-3' du glucose et entre le proton H-1' du glucose et le carbone C-3 de la bayogénine.

Le saponoside **Cgp7** est la 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine.

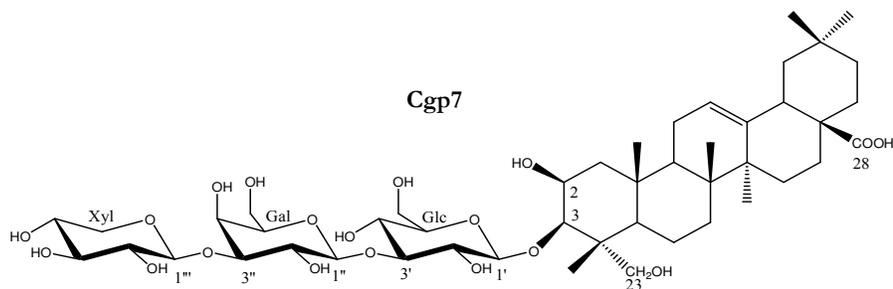


Tableau 11 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp7**, **Cgp8** et **Cgp9** dans CD_3OD .

	Cgp7		Cgp8		Cgp9	
	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c
Glc-						
1'	4,51 (<i>d</i> , 7,5)	105,2	4,48 (<i>d</i> , 7,9)	105,3	4,51 (<i>d</i> , 7,9)	105,2
2'	3,50 (<i>dd</i> , 9-7,5)	74,8	3,40 (<i>dd</i> , 8,9-7,9)	74,7	3,51 (<i>dd</i> , 8,9-7,9)	74,6
3'	3,61 (<i>t</i> , 9)	87,7	3,59 (<i>t</i> , 8,9)	87,9	3,62 (<i>t</i> , 8,9)	87,8
4'	3,52 (<i>t</i> , 8,9)	69,5	3,45 (<i>dd</i> , 9,6-8,9)	69,8	3,52 (<i>t</i> , 9)	69,5
5'	3,35 (<i>m</i>)	77,3	3,33 (<i>m</i>)	77,3	3,35 (<i>m</i>)	77,3
6'a	3,74 (<i>dd</i> , 11,5-4,5)	62,2	3,72 (<i>m</i>)	62,6	3,75 (<i>m</i>)	62,2
6'b	3,83 (<i>dd</i> , 11,5-2)		3,87 (<i>dd</i> , 12-2,2)		3,84 (<i>m</i>)	
Gal-						
1''	4,62 (<i>d</i> , 7,5)	106,3	4,62 (<i>d</i> , 7,8)	105,3	4,63 (<i>d</i> , 7,8)	105,3
2''	3,80 (<i>t</i> , 8)	72,2	3,80 (<i>dd</i> , 9,4-7,6)	72,2	3,81 (<i>dd</i> , 9-8)	72,1
3''	3,67 (<i>dd</i> , 7-3)	84,1	3,68 (<i>dd</i> , 9,4-2,9)	84,5	3,69 (<i>dd</i> , 9,3-3)	84,6
4''	4,04 (<i>dd</i> , 3-0,5)	69,8	4,13 (<i>d</i> , 3)	70,2	4,15 (<i>d</i> , 3,3)	69,8
5''	3,61 (<i>m</i>)	76,7	3,62 (<i>m</i>)	76,7	3,63 (<i>m</i>)	76,7
6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11-4)	62,5	3,71 (<i>dd</i> , 11,5-2,7)	62,5	3,74 (<i>dd</i> , 11,5-2,7)	62,6
6''b	3,80 (<i>dd</i> , 11-8)		3,81 (<i>dd</i> , 11,5-7,4)		3,80 (<i>dd</i> , 11,5-5)	
Gal' - en 3'' de Gal						
1'''			4,52 (<i>d</i> , 7,6)	106,3	4,53 (<i>d</i> , 7,8)	106,9
2'''			3,64 (<i>m</i>)	73,0	3,64 (<i>m</i>)	72,9
3'''			3,52 (<i>dd</i> , 9,7-3,3)	74,6	3,53 (<i>dd</i> , 9,7-3)	74,8
4'''			3,82 (<i>d</i> , 3,3)	69,8	3,85 (<i>d</i> , 3)	70,2
5'''			3,56 (<i>m</i>)	76,8	3,57 (<i>m</i>)	76,8
6'''a			3,73 (<i>m</i>)	62,6	3,74 (<i>m</i>)	62,6
6'''b			3,78 (<i>m</i>)		3,74 (<i>m</i>)	
Xyl en 3'' de Gal						
1''''	4,53 (<i>d</i> , 7)	105,2				
2''''	3,32 (<i>t</i> , 9)	75,2				
3''''	3,36 (<i>t</i> , 9)	77,6				
4''''	3,52 (<i>m</i>)	71,2				
5''''a	3,24 (<i>t</i> , 11,5)	66,9				
5''''b	3,89 (<i>dd</i> , 11,5-5)					

III. 2. 3. 5. Structures des monodesmosides (3-*O*-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-]) Cgp8 et Cgp9

Les composés **Cgp8** et **Cgp9** montrent respectivement, sur leurs spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif, un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 957 et 973. La fragmentation de cet ion conduit à la formation d'ions $[M-H-162]^-$, $[M-H-2 \times 162]^-$ et $[M-H-3 \times 162]^-$ suggérant que la partie osidique de **Cgp8** et **Cgp9** est constituée de trois hexoses.

La présence de trois hexoses est confirmée par l'observation sur les spectres de RMN de **Cgp8** de trois protons anomériques à 4,48, 4,52 et 4,62 ppm et de trois carbones anomériques, respectivement à 105,3, 106,3 et 105,3 ppm (tableau 11).

À partir des deux protons anomériques résonant à 4,48 (d , $J=7,9$ Hz) et 4,62 ppm (d , $J=7,8$ Hz) sont identifiés, comme pour le saponoside **Cgp7** :

- un β -D-glucose substitué en position 3', ($\delta_{C-3'}$ 87,9 ppm),
- un β -D-galactose substitué en position 3'' , ($\delta_{C-3''}$ 84,5 ppm).

En partant du troisième proton anomérique résonant à 4,52 ppm (d , $J=7,6$ Hz), un système à sept spins appartenant à un second β -D-galactose est identifié. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de ce galactose sont en accord avec celles d'un galactose terminal^{56,57}.

Sur le spectre HMBC sont observées des corrélations interglycosidiques entre le proton H-1''' du galactose terminal et le carbone C-3'' du galactose interne, entre le proton H-1'' du galactose interne et le carbone C-3' du glucose et entre le proton H-1' du glucose et le carbone C-3 de l'hédéragénine. L'enchaînement triosidique attaché en position 3 de l'hédéragénine est [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-].

L'analyse du spectre ROESY permet de confirmer cet enchaînement par la visualisation d'effets rOe entre les protons H-1''' du galactose terminal et H-3'' du galactose interne et entre les protons H-1'' du galactose interne et H-3' du glucose.

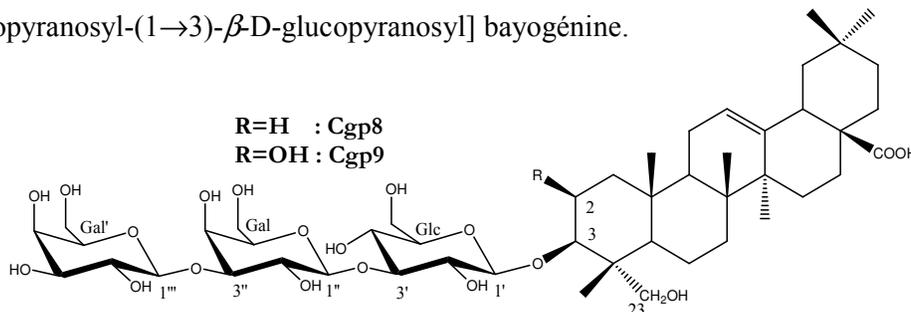
Le saponoside **Cgp8** est la 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine.

L'analyse combinée des spectres de RMN du saponoside **Cgp9** permet de retrouver les mêmes signaux osidiques décrits pour la chaîne triosidique de **Cgp8** (tableau 11), soit :

- un β -D-galactose terminal ($\delta_{H-1''''}$ 4,53),
- un β -D-galactose interne substitué en position 3'' ($\delta_{H-1''}$ 4,63, $\delta_{C-3''}$ 84,6),

- un β -D-glucose substitué en position 3' ($\delta_{H-1'}$ 4,51, $\delta_{C-3'}$ 87,8).

Le saponoside **Cgp9** est élucidé comme étant la 3-O-[β -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine.



III. 2. 3. 6. Structures des monoglucuronides **Cgp12**, **Cgp13**, **Cgp14**, **Cgp15**, **Cgp26** et **Cgp27** (2^{ème} série)

Sur les spectres de RMN 1H et ^{13}C *J*-modulé de ces six saponosides, sont présents les signaux caractéristiques de l'acide oléanolique pour **Cgp12**, l'acide 2 β -hydroxyoléanolique pour **Cgp13** et **Cgp26**, l'hédéragénine pour **Cgp14** et **Cgp27** et la bayogénine pour **Cgp15**.

Les spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif et les fragmentations MS^2 de l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ révèlent la présence d'un acide uronique dans quatre de ces saponosides (**Cgp12**, **Cgp13**, **Cgp14** et **Cgp15**) et d'un méthyluronate dans les saponosides **Cgp26** et **Cgp27** (tableau 12).

Tableau 12 : Spectres de masse en ESI-MS⁻ et ESI-MS/MS des saponosides **Cgp12**, **Cgp13**, **Cgp14**, **Cgp15**, **Cgp26** et **Cgp27**.

	ESI-MS ⁻	ESI-MS-MS ($[M-H]^-$)
Cgp12	631 $[M-H]^-$	455 $[M-H-176]^-$
Cgp13	647 $[M-H]^-$	471 $[M-H-176]^-$
Cgp14	647 $[M-H]^-$	471 $[M-H-176]^-$
Cgp15	663 $[M-H]^-$	487 $[M-H-176]^-$
Cgp26	661 $[M-H]^-$	647 $[M-H-14]^-$; 471 $[M-H-(14+176)]^-$
Cgp27	661 $[M-H]^-$	647 $[M-H-14]^-$; 471 $[M-H-(14+176)]^-$

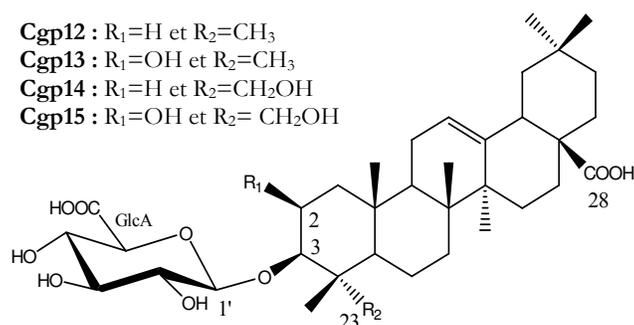
Comme nous l'avons observé pour les saponosides **Cgp1** et **Cgp2**, l'analyse des spectres RMN est aisée puisque le spectre RMN 1H montre un seul proton anomérique résonnant sous la forme d'un doublet avec une grande constante de couplage ($J=7,7\pm 0,2$ Hz). L'analyse des spectres COSY permet d'identifier pour chaque saponoside un système de spins à cinq protons. Les constantes de couplage entre les protons H-2' et H-3', H-3' et H-4' et H-4' et H-5' sont toutes supérieures à 8 Hz indiquant une position transdiaxiale de ces protons (tableaux 13 et 14). Le proton H-5' qui résonne sous la forme d'un doublet avec une constante de couplage $J_{H-4'-H-5'} > 9,2$ Hz est caractéristique d'un acide glucuronique. Sur le spectre de

RMN ^{13}C J -modulé, est visualisé la présence d'un carbonyle d'acide vers 173 ± 2 ppm correspondant au carbone C-6' de l'acide glucuronique.

Les déplacements chimiques des carbones de l'acide glucuronique attribués à partir de l'analyse des spectres HSQC J -modulé et les grandes valeurs des constantes de couplage entre tous les protons indiquent qu'il s'agit d'un acide β -D-glucuronopyranique (GlcA) ^{56, 57, 67} (tableau 13 et 14). Pour le saponoside **Cgp12**, le carbonyle C-6' n'a pas pu être déterminé, son temps de relaxation devant être plus lent que celui des autres carbones ⁶⁸. Les effets rOe observés sur le spectre ROESY entre les protons H-1'/H-3' et H-1'/H-5' confirment leurs positions α -axiales.

Les corrélations $^3J_{\text{H-C}}$ visualisées sur les spectres HMBC entre les protons H-1' de l'acide glucuronique et le carbone C-3 de la génine ainsi que les effets rOe observés sur les spectres ROESY entre le proton H-1' GlcA et H-3 de la génine montrent que l'acide glucuronique est attaché à l'hydroxyle en position 3 des différentes génines.

Le saponoside **Cgp12** est l'acide 3- O - β -D-glucuronopyranosyl oléanolique, le saponoside **Cgp13** l'acide 3- O - β -D-glucuronopyranosyl-2 β -hydroxyoléanolique, le saponoside **Cgp14** la 3- O - β -D-glucuronopyranosyl hédéragénine et le saponoside **Cgp15** la 3- O - β -D-glucuronopyranosyl bayogénine.



Le saponoside **Cgp12** a précédemment été isolé à partir des fruits de *Lonicera nigra* ⁶⁹ et *Hedera colchica* ⁵⁸, des parties aériennes de *Calendula officinalis* (glycoside F) ^{65, 70} et *Polyscias scutellaria* ⁷¹, des feuilles de *Beta vulgaris* ⁷² et de *Pisonia umbellifera* ⁷³, des écorces de tronc d'*Hedera nepalensis* ⁶⁰ et des graines de *Chenopodium quinoa* ⁷⁴.

Le saponoside **Cgp14** a également été isolé à partir des fruits de *Lonicera nigra* ⁶⁹ et des écorces de tronc d'*Hedera nepalensis* ⁶⁰.

Les saponosides **Cgp13**, **Cgp15** et **Cgp26** sont des structures nouvellement décrites.

Tableau 13 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp12**, **Cgp13** et **Cgp15** dans CD_3OD et **Cgp14** dans $\text{DMSO}-d_6$.

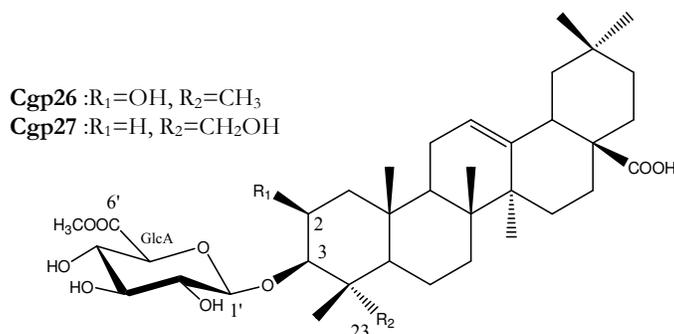
GlcA	Cgp12		Cgp13		Cgp14		Cgp15	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}						
1'	4,40 (d, 7,8)	106,9	4,46 (d, 7,5)	106,5	4,25 (d, 7,9)	104,4	4,51 (d, 7,7)	105,3
2'	3,26 (dd, 9,2-7,8)	75,3	3,36 (dd, 9,2-7,7)	75,0	2,97 (t, 8,1)	74,4	3,33 (dd, 9,1-7,7)	75,1
3'	3,39 (t, 9,2)	77,7	3,41 (t, 9,2)	77,6	3,13 (t, 8,1)	78,0	3,42 (t, 9,1)	77,8
4'	3,52 (t, 9,2)	73,3	3,53 (t, 9,5)	73,2	3,11 (m)	73,7	3,49 (t, 9,1)	73,3
5'	3,75 (d, 9,6)	77,0	3,83 (d, 9,7)	76,0	3,27 (d, 9,2)	75,8	3,77 (d, 10,2)	76,1
6'	-	nd	-	173,0	-	174,4	-	171,0

nd=non déterminé

Les spectres des saponosides **Cgp26** et **Cgp27**, comparés à ceux de **Cgp13** et **Cgp14**, possèdent un signal supplémentaire dans la zone des protons portés par un carbone oxygéné. Il s'agit d'un singulet intégrant pour trois protons déblindés à 3,78 (**Cgp26**) et 3,79 ppm (**Cgp27**) caractéristique d'un méthoxyle. Le carbone de ce méthoxyle est visualisé sur les spectres RMN ^{13}C *J*-modulé à 52,9 (**Cgp26**) et 52,0 ppm (**Cgp27**) (tableau 14).

L'expérience HMBC montre une corrélation entre les protons de ce méthoxyle et le carbonyle C-6' de l'acide glucuronique. La chaîne monoglycosidique des saponosides **Cgp26** et **Cgp27** est constituée de l'acide 6'-*O*-méthyl- β -D-glucuronique ou méthyl- β -D-glucuronate.

Le saponoside **Cgp26** est l'acide 3-*O*-[méthyl- β -D-glucopyranosiduronate]-2 β -hydroxyléanolique, et le saponoside **Cgp27** la 3-*O*-[méthyl- β -D-glucopyranosiduronate] hédéragénine.



Afin de vérifier si les saponosides **Cgp26** et **Cgp27** à méthylglucuronate sont naturels ou des artéfacts formés au cours des étapes de purification, une analyse par CLHP analytique de l'extrait méthanolique et de ces deux saponosides a été réalisée. Ces deux saponosides sont présents dans l'extrait méthanolique des fruits de *C. glabrum*. L'origine du méthyle estérifiant l'acide glucuronique peut donc être dû soit au solvant d'extraction (méthanol) soit naturellement présent. Certains auteurs ont montré que l'estérification de la fonction acide de l'acide glucuronique pouvait se réaliser facilement par chauffage à reflux avec le solvant, méthanol ou éthanol. Le pourcentage de composés estérifiés dépend de la durée de chauffage

et présente un maximum après 24h¹⁹¹. Les conditions de chauffage que nous avons utilisées à savoir un reflux au méthanol pendant 3 heures ne peuvent par conséquent pas conduire à de fortes proportions en ester méthylique. Les extractions au méthanol ont été réalisées en Guyane. N'ayant pas pu obtenir un échantillon de poudre de fruits, nous n'avons pas testé la formation des esters en présence de méthanol ou éthanol en variant les conditions de chauffage.

Le saponoside **Cgp27** a déjà été isolé à partir des écorces de tronc de deux Araliaceae : *Hedera nepalensis*⁶⁰ et *Schefflera impressa*⁷⁵ (extraction au méthanol à froid).

Tableau 14 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp26** et **Cgp27** dans CD₃OD.

	Cgp26		Cgp27	
	δ_1 (m, J Hz)	δ_c	δ_1 (m, J Hz)	δ_c
GlcA-				
1'	4,47 (d, 7,5)	106,7	4,48 (d, 7,9)	106,1
2'	3,36 (t, 7,6)	75,0	3,24 (dd, 9,2-7,9)	75,2
3'	3,40 (dd, 9,5-7,6)	77,4	3,38 (t, 9,2)	77,5
4'	3,54 (t, 9,5)	73,2	3,52 (t, 9,4)	73,2
5'	3,90 (d, 9,6)	76,5	3,86 (d, 9,7)	76,4
6'	-	171,5	-	171,4
-O-CH₃	3,78 (s)	52,9	3,79 (s)	52,0

III. 2. 3. 7. Structures des monodesmosides (3-O-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-]) **Cgp16**, **Cgp18**, **Cgp19**, **Cgp28** et **Cgp29**

Les spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif et les fragmentations MS² de l'ion pseudomoléculaire [M-H]⁻ de ces saponosides révèlent la présence d'une chaîne diosidique composée d'un acide uronique (176 *uma*) et d'un hexose terminal (162 *uma*) pour les saponosides **Cgp16**, **Cgp17**, **Cgp18** et **Cgp19** alors que cette chaîne est constituée d'un méthyluronate (190 *uma*) et d'un hexose terminal dans les saponosides **Cgp28** et **Cgp29** (tableau 15).

Tableau 15 : Spectres de masse obtenus en ESI-MS⁻ et ESI-MS/MS des saponosides **Cgp16**, **Cgp17**, **Cgp18**, **Cgp19**, **Cgp28** et **Cgp29**.

	ESI-MS⁻	ESI-MS-MS ([M-H]⁻)
Cgp16	793 [M-H] ⁻	631 [M-H-162] ⁻ , 455 [M-H-176] ⁻
Cgp17	809 [M-H] ⁻	647 [M-H-162] ⁻ , 471 [M-H-176] ⁻
Cgp18	809 [M-H] ⁻	647 [M-H-162] ⁻ , 471 [M-H-176] ⁻
Cgp19	825 [M-H] ⁻	663 [M-H-162] ⁻ , 487 [M-H-176] ⁻
Cgp28	807 [M-H] ⁻	775 [M-H-CH ₃ OH] ⁻ , 455 [M-H-162-(14+176)] ⁻
Cgp29	823 [M-H] ⁻	791 [M-H-CH ₃ OH] ⁻ , 471 [M-H-162-(14+176)] ⁻

D'après l'analyse des spectres de masse, la partie osidique de **Cgp16** est constituée de deux sucres : un acide uronique et un hexose. Ceci est confirmé par la présence sur le spectre RMN de deux protons anomériques à 4,46 ppm (*d*, *J*=7,9 Hz) et 4,56 ppm (*d*, *J*=7,7 Hz) et de

deux carbones anomériques à 106,6 et 105,6 ppm. Le carbonyle appartenant à l'acide uronique est observé à 172,6 ppm. L'analyse des spectres COSY et HSQC *J*-modulé permet d'identifier un acide β -D-glucuronique à partir du proton anomérique à 4,46 ppm (tableau 16). Le déblindage du carbone C-3' (δ_C 86,6) comparativement au composé **Cgp12** (tableau 13) suggère une substitution en cette position.

À partir du proton anomérique à 4,56 ppm est identifié à l'aide des spectres COSY, HSQC *J*-modulé et ROESY, un β -D-galactose, caractérisé par la position équatoriale du proton H-4'' ($J_{H3''-H4''}=3,3$ Hz, $J_{H4''-H5''}=0,6$ Hz). D'après les valeurs des δ_H et δ_C , ce β -D-galactose est en position terminale.

De la même manière, on identifie dans les trois saponosides **Cgp17**, **Cgp18** et **Cgp19**, un β -D-galactose en position terminale et un acide β -D-glucuronique substitué en position 3' (tableau 16).

Tableau 16 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp16** et **Cgp19** (CD₃OD) et **Cgp17** et **Cgp18** (DMSO-*d*₆).

	Cgp16		Cgp17		Cgp18		Cgp19	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
GlcA-								
1'	4,46 (<i>d</i> , 7,9)	106,6	4,40 (<i>d</i> , 8,1)	104,6	4,38 (<i>d</i> , 7,9)	104,2	4,60 (<i>d</i> , 7,8)	105,5
2'	3,46 (<i>dd</i> , 8,6-7,9)	74,7	3,27 (<i>t</i> , 8,4)	74,2	3,18 (<i>t</i> , 8,5)	73,5	3,56 (<i>t</i> , 8,4)	74,4
3'	3,62 (<i>t</i> , 8,9)	86,6	3,50 (<i>m</i>)	85,7	3,44 (<i>t</i> , 9,5)	86,3	3,65 (<i>m</i>)	86,5
4'	3,64 (<i>t</i> , 9)	71,9	3,30 (<i>t</i> , 9,2)	71,8	3,32 (<i>t</i> , 10,1)	72,0	3,64 (<i>t</i> , 9)	73,0
5'	3,83 (<i>d</i> , 8,9)	76,4	3,38 (<i>d</i> , 9,9)	75,0	3,38 (<i>d</i> , 9,5)	76,1	3,90 (<i>d</i> , 9)	76,0
6'	-	172,6	-	174,2	-	175,0	-	nd
Gal-								
1''	4,56 (<i>d</i> , 7,7)	105,6	4,33 (<i>d</i> , 7,7)	104,9	4,36 (<i>d</i> , 7,9)	105,1	4,55 (<i>d</i> , 7,7)	105,6
2''	3,62 (<i>dd</i> , 9,7-7,7)	73,0	3,46 (<i>t</i> , 8,5)	71,8	3,47 (<i>t</i> , 8,4)	71,7	3,63 (<i>dd</i> , 9,6-7,7)	71,9
3''	3,53 (<i>dd</i> , 9,7-3,3)	74,7	3,33 (<i>dd</i> , 8,5-3,3)	74,2	3,30 (<i>dd</i> , 9,7-3)	74,2	3,55 (<i>dd</i> , 9,7-3,2)	74,7
4''	3,82 (<i>dd</i> , 3,3-0,6)	70,4	3,62 (<i>d</i> , 3,3)	69,6	3,63 (<i>d</i> , 3)	69,5	3,83 (<i>d</i> , 3,2)	70,4
5''	3,59 (<i>ddd</i> , 7,8-4,3-0,6)	77,1	3,42 (<i>m</i>)	77,2	3,44 (<i>m</i>)	77,3	3,59 (<i>ddd</i> , 7,7-4,3-3,2)	77,2
6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,3)	62,7	3,51 (<i>m</i>)	61,9	3,51 (<i>m</i>)	61,8	3,71 (<i>dd</i> , 11,5-4,3)	62,7
6''b	3,80 (<i>dd</i> , 11,5-7,8)		3,51 (<i>m</i>)		3,51 (<i>m</i>)		3,81 (<i>dd</i> , 11,5-7,7)	

nd=non déterminé

Les déblindages des carbones C-3 de la génine et C-3' de l'acide glucuronique permettent de supposer une chaîne diosidique [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-] attachée sur l'hydroxyle en position 3 de la génine. Cet enchaînement est confirmé par l'analyse des spectres HMBC et ROESY. En effet, sur les spectres HMBC, sont visualisées des corrélations $^3J_{H-C}$ entre :

- H-1'' Gal/C-3' GlcA et inversement H-3' GlcA/C-1'' Gal,
- H-1' GlcA/C-3 génine et inversement H-3 génine/C-1' GlcA.

Sur les spectres ROESY, des effets rOe sont observés entre les protons H-1'' Gal et H-3' GlcA et entre H-1' GlcA et H-3 de la génine.

Le saponoside **Cgp16** est l'acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] oléanolique.

Le saponoside **Cgp17** est l'acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique.

Le saponoside **Cgp18** est la 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine

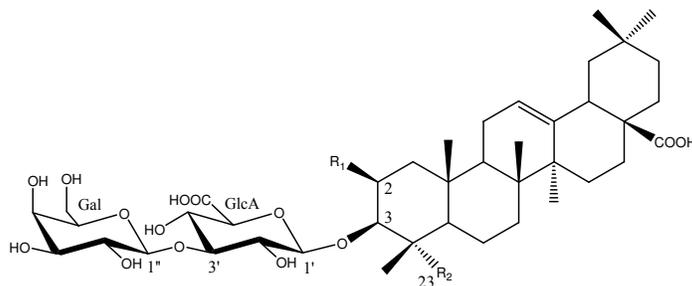
Le saponoside **Cgp19** est la 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] bayogénine.

Cgp16 : R₁=H et R₂=CH₃

Cgp17 : R₁=OH et R₂=CH₃

Cgp18 : R₁=H et R₂=CH₂OH

Cgp19 : R₁=OH et R₂=CH₂OH



Seul le saponoside **Cgp16** est de structure connue. Il a précédemment été isolé à partir de *Calendula arvensis*^{76, 64} et de *Calendula officinalis*⁷⁰. Les saponosides **Cgp17**, **Cgp18** et **Cgp19** sont de structures nouvelles.

L'analyse des spectres de RMN ¹H et ¹³C *J*-modulé des saponosides **Cgp28** et **Cgp29** montre la présence de signaux supplémentaires correspondants à un méthoxyle (tableau 17). Les protons de ces méthoxyles donnent une tache de corrélation sur les spectres HMBC avec le carbonyle C-6' de l'acide glucuronique.

L'enchaînement osidique et le site d'ancrage sur la génine sont identiques à ceux des saponosides **Cgp16** à **Cgp19**.

Le saponoside **Cgp28** est l'acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate] oléanolique. Celui-ci a précédemment été isolé à partir des écorces de tronc d'*Aralia elata* (extraction au méthanol à chaud)⁷⁷.

Le saponoside **Cgp29** est l'acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate]-2 β -hydroxyoléanolique, nouvellement décrit.

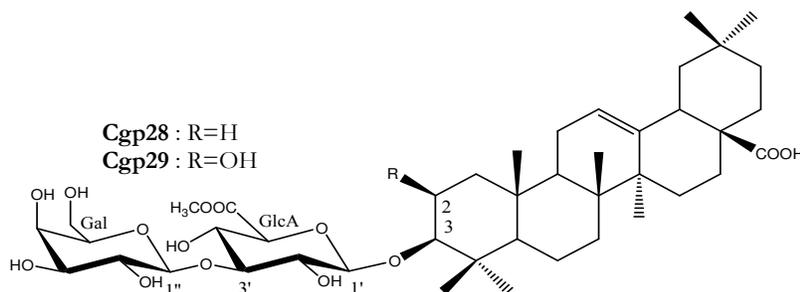


Tableau 17 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp28** et **Cgp29** dans CD₃OD.

	Cgp28		Cgp29	
	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c
GlcA-				
1'	4,47 (<i>d</i> , 7,9)	106,7	4,53 (<i>d</i> , 7,8)	104,2
2'	3,45 (<i>dd</i> , 9-7,9)	74,7	3,59 (<i>t</i> , 7,8)	73,0
3'	3,61 (<i>t</i> , 9)	86,5	3,66 (<i>m</i>)	84,8
4'	3,65 (<i>t</i> , 9)	71,8	3,66 (<i>m</i>)	71,6
5'	3,50 (<i>d</i> , 9,2)	76,2	3,95 (<i>d</i> , 9,6)	74,6
6'	-	171,1	-	169,7
-O-CH₃	3,79 (<i>s</i>)	52,9	3,80 (<i>s</i>)	51,5
Gal-				
1''	4,56 (<i>d</i> , 7,7)	105,6	4,57 (<i>d</i> , 7,7)	105,0
2''	3,62 (<i>dd</i> , 9,7-7,7)	73,0	3,64 (<i>dd</i> , 8,5-7,8)	70,4
3''	3,53 (<i>dd</i> , 9,7-3,3)	74,7	3,53 (<i>dd</i> , 8,5-3,3)	73,2
4''	3,82 (<i>dd</i> , 3,3-0,6)	70,3	3,80 (<i>d</i> , 3,3)	68,9
5''	3,59 (<i>ddd</i> , 7,8-4,3-0,6)	77,1	3,65 (<i>m</i>)	75,7
6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,3)	62,6	3,70 (<i>dd</i> , 11,8-4,3)	61,2
6''b	3,80 (<i>dd</i> , 11,5-7,8)		3,79 (<i>dd</i> , 11,8-5,5)	

III. 2. 3. 8. Structures des bidesmosides (3-*O*-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-], 28-*O*- β -D-Glc) **Cgp22**, **Cgp23**, **Cgp24**, **Cgp25** et **Cgp30**

L'analyse des spectres de RMN ¹H, ¹³C *J*-modulé, COSY, HSQC *J*-modulé et HMBC montre que les saponosides **Cgp22**, **Cgp23**, **Cgp24** et **Cgp25** ont une structure de base commune avec les saponosides **Cgp16**, **Cgp17**, **Cgp18**, **Cgp19**. Sont retrouvés les signaux de la chaîne diosidique [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA] attachée sur l'hydroxyle en position 3 de la génine (tableau 18). Le blindage du carbonyle C-28 de chaque génine vers 178 \pm 0,5 ppm (au lieu de 182 ppm) indique une estérification en cette position.

Tableau 18 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp22**, **Cgp23**, **Cgp24** et **Cgp25** dans CD₃OD.

	Cgp22		Cgp23		Cgp24		Cgp25	
	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c
GlcA-								
1'	4,46 (<i>d</i> , 7,8)	106,7	4,53 (<i>d</i> , 7,8)	106,3	4,60 (<i>d</i> , 7,9)	105,5	4,60 (<i>d</i> , 7,9)	105,5
2'	3,46 (<i>dd</i> , 8,6-8,2)	74,7	3,57 (<i>dd</i> , 9,5-7,8)	74,5	3,56 (<i>t</i> , 8,2)	74,4	3,56 (<i>t</i> , 8,2)	74,4
3'	3,61 (<i>t</i> , 8,3)	87,3	3,64 (<i>t</i> , 9,2)	86,4	3,65 (<i>m</i>)	86,5	3,65 (<i>m</i>)	86,5
4'	3,62 (<i>m</i>)	73,0	3,65 (<i>t</i> , 9,2)	71,9	3,65 (<i>m</i>)	71,8	3,65 (<i>m</i>)	71,8
5'	3,84 (<i>d</i> , 10,2)	76,0	3,90 (<i>d</i> , 9,4)	76,0	3,91 (<i>d</i> , 8,7)	75,4	3,91 (<i>d</i> , 8,7)	75,4
6'	-	172	-	172,2	-	172,0	-	172,0
Gal-								
1''	4,55 (<i>d</i> , 7,7)	105,6	4,57 (<i>d</i> , 7,7)	105,6	4,60 (<i>d</i> , 7,8)	105,5	4,56 (<i>d</i> , 7,7)	105,6
2''	3,62 (<i>dd</i> , 9,7-7,7)	73,1	3,63 (<i>dd</i> , 9,7-7,7)	73,1	3,65 (<i>dd</i> , 9,8-7,8)	72,8	3,63 (<i>dd</i> , 10,1-7,7)	73,0
3''	3,52 (<i>dd</i> , 9,7-3,3)	74,7	3,53 (<i>dd</i> , 9,7-3,3)	74,7	3,53 (<i>dd</i> , 9,8-3,4)	74,7	3,53 (<i>dd</i> , 10,1-3,4)	74,7
4''	3,82 (<i>dm</i> , 3,3)	70,4	3,82 (<i>dd</i> , 3,3-0,8)	70,4	3,82 (<i>dd</i> , 3,4-1,2)	70,5	3,82 (<i>dm</i> , 3,4)	70,4
5''	3,58 (<i>ddd</i> , 7,6-4,3-1)	77,2	3,58 (<i>ddd</i> , 7,8-4,1-0,8)	77,2	3,61 (<i>ddd</i> , 7,8-4,4-1,2)	77,2	3,59 (<i>dd</i> , 7,8-4,5)	77,2
6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,8-4,4)	62,7	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,1)	62,7	3,70 (<i>dd</i> , 11,9-4,5)	62,6	3,70 (<i>dd</i> , 11,8-4,5)	62,7
6''b	3,80 (<i>dd</i> , 11,5-7,7)		3,80 (<i>dd</i> , 11,5-7,8)		3,82 (<i>m</i>)		3,81 (<i>dd</i> , 11,8-7,8)	
Glc - ester								
1'''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7
2'''	3,34 (<i>dd</i> , 9-8,1)	73,9	3,38 (<i>dd</i> , 9-8,1)	73,9	3,34 (<i>dd</i> , 9,1-8,1)	73,9	3,34 (<i>t</i> , 8,6)	73,9
3'''	3,43 (<i>t</i> , 9)	78,3	3,43 (<i>t</i> , 9)	78,3	3,43 (<i>t</i> , 9,1)	78,3	3,43 (<i>t</i> , 8,6)	78,3
4'''	3,38 (<i>t</i> , 9,4)	71,1	3,37 (<i>t</i> , 9,5)	71,1	3,38 (<i>t</i> , 9,5)	71,1	3,38 (<i>t</i> , 9,5)	71,1
5'''	3,36 (<i>m</i>)	78,7	3,37 (<i>m</i>)	78,7	3,37 (<i>m</i>)	78,7	3,37 (<i>m</i>)	78,7
6'''a	3,70 (<i>dd</i> , 12,5-4,5)	62,4	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,1)	62,4	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,4)	62,4	3,70 (<i>dd</i> , 11,8-4,2)	62,4
6'''b	3,84 (<i>dd</i> , 12,2-2)		3,83 (<i>dd</i> , 11,5-1,8)		3,84 (<i>m</i>)		3,84 (<i>dm</i> , 11,8)	

Sur les spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif, la fragmentation MS² de l'ion pseudomoléculaire [M-H]⁻ conduit à la formation d'un ion fragment [M-H-162]⁻ pour chacun des saponosides **Cgp22** à **Cgp25** dont la masse correspond à celle de l'ion pseudomoléculaire [M-H]⁻ des saponosides **Cgp16** à **Cgp19**, suggérant la présence d'un hexose supplémentaire (tableau 19).

Cet hexose dont les signaux anomériques résonnent à δ_H 5,40 ppm ($d, J=8,1$ Hz) et δ_C 95,7 ppm a été identifié comme étant un β -D-glucose. Ce β -D-glucose estérifie l'acide carboxylique en C-28 de la génine comme le montre la tache de corrélation, sur le spectre HMBC, entre le proton à 5,40 ppm (H-1'') et le carbone C-28.

Tableau 19 : Spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif et ESI-MS/MS des saponosides **Cgp22**, **Cgp23**, **Cgp24** et **Cgp25**.

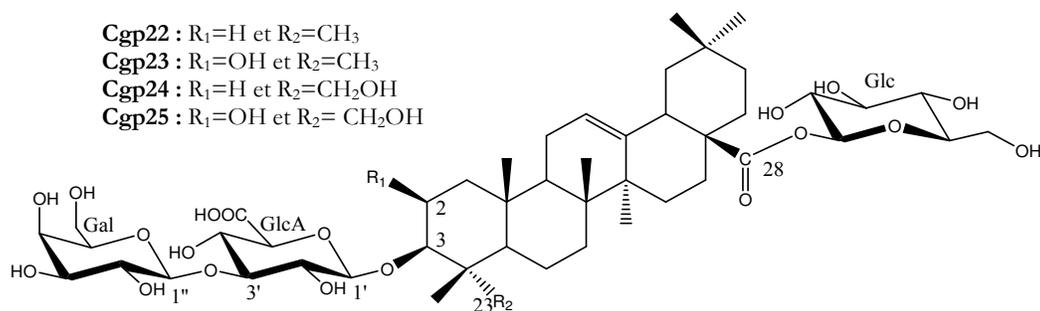
	ESI-MS-	ESI-MS-MS ([M-H] ⁻)
Cgp22	955 [M-H] ⁻	793 [M-H-162] ⁻ (= [M-H] ⁻ Cgp16), 455 [M-H-2x162-176] ⁻
Cgp23	971 [M-H] ⁻	809 [M-H-162] ⁻ (= [M-H] ⁻ Cgp17), 647 [M-2x162] ⁻ , 471 [M-2x162-176] ⁻
Cgp24	971 [M-H] ⁻	809 [M-H-162] ⁻ (= [M-H] ⁻ Cgp18), 647 [M-2x162] ⁻ , 471 [M-2x162-176] ⁻
Cgp25	987 [M-H] ⁻	825 [M-H-162] ⁻ (= [M-H] ⁻ Cgp19), 487 [M-2x162-176] ⁻

Le saponoside **Cgp22** est l'acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] oléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester. Celui-ci a précédemment été isolé à partir de *Calendula arvensis*^{76,64} et de *Calendula officinalis*^{65,70}.

Le saponoside **Cgp23** est l'acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Le saponoside **Cgp24** est la 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Le saponoside **Cgp25** est la 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] bayogénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.



Sur les spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé du saponoside **Cgp30**, sont présents les signaux caractéristiques du saponoside **Cgp24** et un méthyle supplémentaire à δ_{H} 3,80 et δ_{C} 52,9 ppm (tableau 20). Ce méthyle estérifie la fonction acide carboxylique de l'acide glucuronique comme le montre la corrélation $^3J_{\text{H-C}}$ sur le spectre HMBC entre les protons du méthyle et le carbonyle C-6'. Le saponoside **Cgp30** est l'ester méthylique du saponoside **Cgp24**. Cette hypothèse est confirmée sur le spectre de masse obtenu en ESI-MS mode positif par l'obtention d'ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 1009, correspondant à une masse moléculaire de 986 Da, indiquant un gain de 14 *uma* par rapport au saponoside **Cgp24**.

L'analyse des spectres HMBC et ROESY confirme la structure de **Cgp30** comme étant la 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate] hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

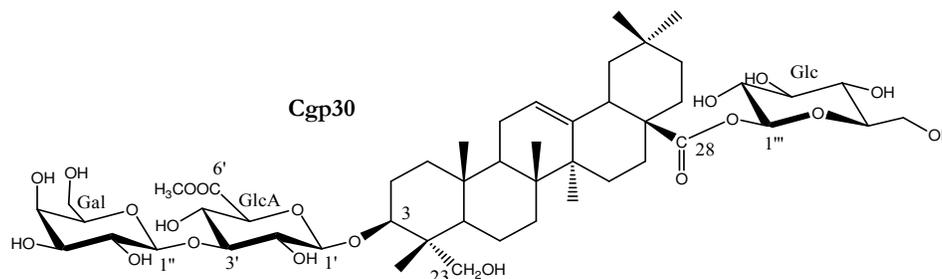


Tableau 20 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique du saponoside **Cgp30** dans CD_3OD .

δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}
GlcA-en C-3		Gal-en C-3'		Glc-ester	
1'	4,54 (<i>d</i> , 7,9)	105,6	1''	4,57 (<i>d</i> , 7,7)	105,6
2'	3,43 (<i>t</i> , 8)	74,6	2''	3,63 (<i>dd</i> , 9,7-7,7)	73,0
3'	3,63 (<i>m</i>)	86,8	3''	3,53 (<i>dd</i> , 9,7-3,3)	74,7
4'	3,63 (<i>m</i>)	71,8	4''	3,82 (<i>dd</i> , 3,3-0,8)	70,3
5'	3,91 (<i>d</i> , 9,3)	76,3	5''	3,58 (<i>ddd</i> , 7,8-4,1-0,8)	77,2
6'	-	169,7	6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,1)	62,2
-O-CH ₃	3,80 (<i>s</i>)	52,9	6''b	3,80 (<i>dd</i> , 11,5-7,8)	-
				1'''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)
				2'''	3,38 (<i>dd</i> , 9-8,1)
				3'''	3,43 (<i>t</i> , 9)
				4'''	3,37 (<i>t</i> , 9,5)
				5'''	3,37 (<i>m</i>)
				6'''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,1)
				6'''b	3,83 (<i>dd</i> , 11,5-1,8)

III. 2. 3. 9. Structures des monodesmosides (3-*O*-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-]), **Cgp20** et **Cgp21**

Les spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif de **Cgp20** et **Cgp21** montrent un ion pseudomoléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 971. La fragmentation MS^2 obtenue en ESI-MS-MS de l'ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ produit trois ions à m/z 809 $[\text{M}-\text{H}-162]^-$, 647 $[\text{M}-\text{H}-162-162]^-$ et 471 $[\text{M}-\text{H}-162-162-176]^-$ correspondant à la perte successive de deux hexoses et d'un acide uronique.

L'analyse spectrale permet d'identifier les deux hexoses comme étant un β -D-galactose terminal et un β -D-galactose substitué en position 3'' (tableau 21).

L'analyse de l'acide uronique est plus difficile. En effet, on assiste à un fort recouvrement des protons H-3' et H-4' sous forme de multiplets ce qui ne permet pas de déterminer les valeurs des constantes de couplage. La constante de couplage entre les protons H-2' et H-3' ($J=7,5$ Hz) est obtenue à partir du signal du proton H-2' indiquant une position axiale pour les protons H-2' et H-3'.

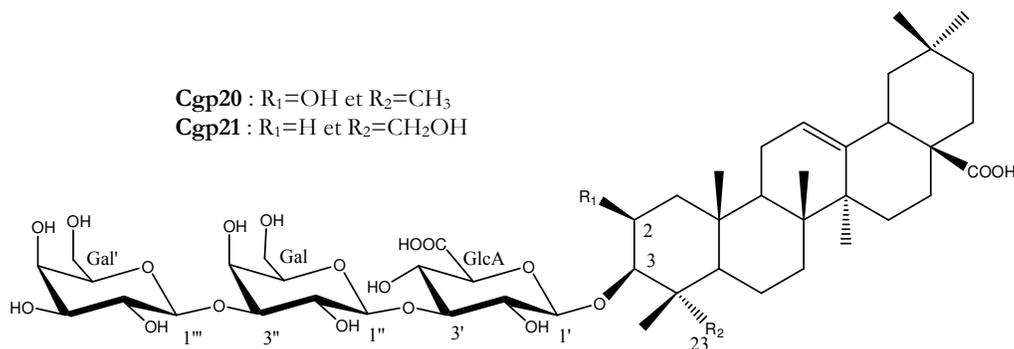
Pour le saponoside **Cgp21**, le proton H-5' résonant sous la forme d'un doublet à 3,83 ppm avec une constante $J_{H4'-H5'}=9$ Hz, indique une position axiale pour le proton H-4'. Ce sucre est identifié comme un acide β -D-glucuronique bien que le signal du carbone C-6' n'ait pu être observé (tableau 21).

Pour le saponoside **Cgp20**, le proton H-5' résonant également sous la forme d'un multiplet ne permet pas de déterminer la position axiale ou équatoriale des protons H-4' et H-5'. Ce sucre peut être soit un acide β -D-glucuronique soit un acide β -D-galacturonique. La constante de couplage entre les protons H-3' et H-4' est large dans le cas de l'acide β -D-glucuronique (environ 9 Hz) et faible dans le cas de l'acide β -D-galacturonique (environ 3 Hz). Sur le spectre TOCSY, tous les protons osidiques dont le proton H-5', corrélient avec le proton anomérique traduisant de grandes valeurs des constantes de couplage entre tous les protons de ce système. De plus, la forme des taches observées sur le spectre HSQC J -modulé en face des deux carbones C-3' et C-4' permettant d'évaluer les valeurs de ces deux constantes de couplage à environ 8 Hz, ce sucre est un acide β -D-glucuronique. Les déplacements chimiques des carbones comparés à ceux observés pour les saponosides **Cgp16** à **Cgp19** et à ceux des glucuronides de la littérature^{64, 67, 70}, sont en accord avec l'attribution d'un acide β -D-glucuronique monosubstitué en position 3 (tableau 21).

Les corrélations $^3J_{H-C}$ visualisées sur le spectre HMBC entre le proton H-3 de la génine et le carbone C-1' de l'acide glucuronique, entre le proton H-1'' du galactose interne et le carbone C-3' de l'acide glucuronique et entre le proton H-1''' du galactose terminal et le carbone C-3'' du galactose interne permettent le séquençage du trisaccharide des saponosides **Cgp20** et **Cgp21**.

La structure de **Cgp20** est l'acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique.

Le saponoside **Cgp21** est la 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine.


 Tableau 21 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgp20** et **Cgp21** dans CD₃OD.

	Cgp20		Cgp21	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
GlcA-				
1'	4,53 (<i>d</i> , 7,7)	106,3	4,54 (<i>d</i> , 7,9)	105,4
2'	3,59 (<i>dd</i> , 10,1-7,5)	74,6	3,47 (<i>dd</i> , 9,7-7,5)	74,6
3'	3,67 (<i>m</i>)	85,9	3,64 (<i>m</i>)	87,3
4'	3,67 (<i>m</i>)	71,2	3,63 (<i>m</i>)	71,2
5'	3,80 (<i>m</i>)	nd	3,83 (<i>d</i> , 9)	76,6
6'	-	174,2	-	nd
Gal-				
1''	4,66 (<i>d</i> , 7,9)	105,1	4,64 (<i>d</i> , 7,8)	105,2
2''	3,81 (<i>dd</i> , 9,6-7,9)	72,1	3,80 (<i>dd</i> , 9,8-8)	72,1
3''	3,69 (<i>dd</i> , 9,6-3,2)	84,5	3,68 (<i>dd</i> , 9,5-3,1)	84,5
4''	4,14 (<i>d</i> , 2,8)	69,9	4,13 (<i>d</i> , 3,1)	69,9
5''	3,63 (<i>dd</i> , 7,1-5)	76,8	3,63 (<i>m</i>)	76,8
6''a	3,71 (<i>dd</i> , 10,8-5)	62,6	3,71 (<i>dd</i> , 11,9-4,3)	62,6
6''b	3,82 (<i>dd</i> , 10,8-7,1)		3,77 (<i>m</i>)	
Gal'-				
1'''	4,53 (<i>d</i> , 7,6)	106,3	4,53 (<i>d</i> , 7,6)	106,3
2'''	3,64 (<i>dd</i> , 9,7-7,7)	73,0	3,64 (<i>dd</i> , 9,5-7,7)	73,3
3'''	3,52 (<i>dd</i> , 9,7-3,3)	74,6	3,52 (<i>dd</i> , 9,5-3,4)	74,6
4'''	3,84 (<i>d</i> , 3,3)	70,2	3,84 (<i>dd</i> , 3,4-0,5)	70,3
5'''	3,56 (<i>ddd</i> , 7-5-1)	76,8	3,56 (<i>ddd</i> , 7,3-5-0,5)	76,8
6'''a	3,72 (<i>dd</i> , 11,3-5)	62,6	3,72 (<i>dd</i> , 11,5-8)	62,6
6'''b	3,77 (<i>dd</i> , 11,3-7,2)		3,77 (<i>m</i>)	

nd= non déterminé

III. 2. 4. Saponosides isolés des écorces de tronc (Cgt)

Les écorces de tronc de *Caryocar glabrum* sont beaucoup moins riches en saponosides que les fruits, en revanche, elles sont très riches en composés polyphénoliques. Douze composés ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique des écorces de tronc de *Caryocar glabrum* dont dix sont des métabolites secondaires polyphénoliques dont la détermination structurale sera développée dans le chapitre IV. Seulement deux saponosides sont présents dans l'extrait, **Cgt10** et **Cgt11**, renfermant une chaîne triosidique [α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-] en position 3 de la génine.

Les spectres de masse obtenus en ESI-MS mode positif engendrent un ion pseudomoléculaire $[M-H+2Na]^+$ à m/z 1001 pour **Cgt10** et 1163 pour **Cgt11**, indiquant que **Cgt11** possède un hexose supplémentaire par rapport au saponoside **Cgt10** (+162 *uma*). La fragmentation MS² de l'ion à m/z 1001 (**Cgt10**) engendre des ions fragments à m/z 855 $[M-H+2Na-146]^+$, 693 $[M-H+2Na-146-162]^+$ et 517 $[M-H+2Na-146-162-176]^+$. Cette fragmentation indique que la partie osidique du saponoside **Cgt10** est constituée d'un desoxyhexose, d'un hexose et d'un acide hexosurionique.

De l'analyse des spectres COSY, ROESY et HSQC *J*-modulé sont identifiés dans les deux saponosides (tableau 22) :

- un acide β -D-glucuronique substitué en position 3', à partir du proton anomérique à 4,54 ppm,
- un β -D-galactose substitué en position 3'', en partant de l'anomère à 4,59 ppm,

Pour **Cgt11**, un β -D-glucose terminal supplémentaire à partir de l'anomère ester à 5,40 ppm.

L'analyse des spectres HMBC et ROESY montre que les saponosides **Cgt10** et **Cgt11** possèdent une structure commune avec le monodesmoside **Cgp18** et le bidesmoside **Cgp24**, sur laquelle se greffe un desoxyhexose en position 3'' du galactose.

Ainsi, un système de spins à huit protons a été identifié à partir du proton anomérique supplémentaire résonant à 5,08 ppm. L'analyse des spectres COSY et TOCSY permet d'attribuer tous les protons d'un 6-désyhexose. Pour le saponoside **Cgt10**, le proton H-1''' (*d*, $J=1,8$ Hz) corrèle avec le proton H-2''' (δ_H 3,99, *dd*, $J=3,4-1,7$ Hz), lui-même couplé au proton H-3''' (δ_H 3,79, *dd*, $J=9,5-3,2$ Hz). La grande constante de couplage $J_{H3'''-H4'''}=9,5$ Hz indique que le proton H-3''' est en position axiale alors que la faible valeur de la constante

$J_{H2''-H3''}=3,5$ Hz révèle une position équatoriale du proton H-2''. Le proton H-4'', couplé aux protons H-3'' et H-5'', résonne sous la forme d'un triplet à 3,42 ppm dont la constante de couplage ($J=9,5$ Hz) atteste d'une position transdiaxiale des protons H-4'' et H-5''. Les protons H-6'' résonnent sous la forme d'un doublet à 1,28 ppm intégrant pour trois protons. Ils sont couplés par une constante de 6,2 Hz avec le proton H-5'' à 3,78 ppm ($dq, J=9,8-6,2$ Hz) (tableau 22). Les constantes de couplage de ce 6-désoxyhexose indiquent qu'il s'agit d'un L-rhamnose.

La configuration anomérique α ou β du rhamnose ne peut être établie par la seule valeur de la constante $J_{H1''-H2''}=1,7$ Hz. La présence d'un effet rOe, entre les protons H-1''/H-2'' et l'absence d'effet rOe entre les protons H-1''/H-3'' et H-1''/H-5'', laisse supposer que le proton anomérique est en position équatoriale, soit une configuration α .

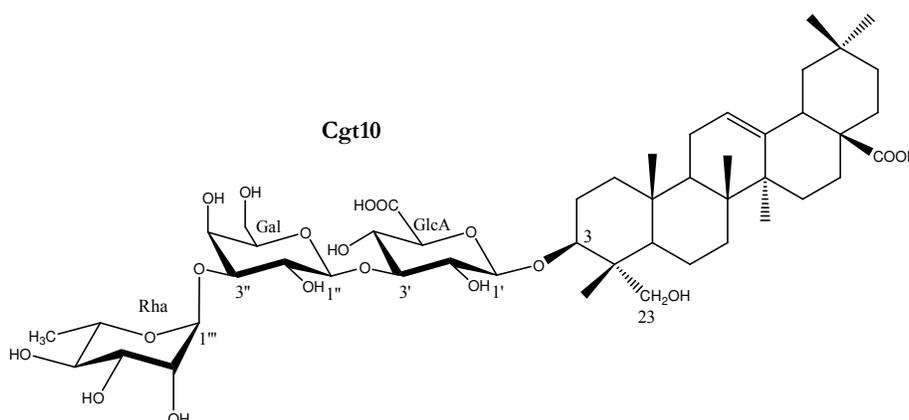
Les valeurs des déplacements chimiques des carbones osidiques, attribués à partir du spectre HSQC J -modulé, correspondent à celles d'un α -L-rhamnose terminal^{56,57}.

Sur le spectre HMBC, des taches de corrélations sont visualisées entre :

- H-1'' Rha/C-3'' Gal,
- H-1'' Gal/C-3' GlcA,
- H-1' GlcA/C-3 de l'hédéragénine.

Le spectre ROESY confirme l'enchaînement 3-*O*-[Rha-(1→3)-Gal-(1→3)-GlcA]-hédéragénine par la présence des effets rOe entre : H-1'' Rha/H-3'' Gal, H-1'' Gal/H-3' GlcA et H-1' GlcA/H-3 de l'hédéragénine.

Le saponoside **Cgt10** est la 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→3)- β -D-galactopyranosyl-(1→3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine.



Le saponoside **Cgt11** correspond au bidesmoside de **Cgt10**, soit la 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester

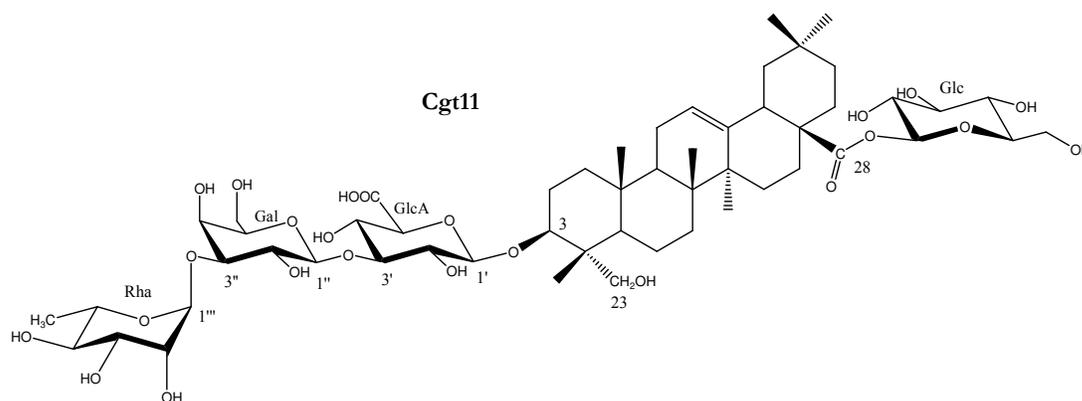


Tableau 22 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cgt10** et **Cgt11** dans CD_3OD .

	Cgt10		Cgt11	
	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}
GlcA-				
1'	4,54 (<i>d</i> , 7,9)	105,6	4,54 (<i>d</i> , 7,9)	105,5
2'	3,44 (<i>dd</i> , 9,2-7,9)	74,6	3,45 (<i>dd</i> , 9,3-7,9)	74,6
3'	3,63 (<i>m</i>)	86,8	3,62 (<i>t</i> , 9,5)	83,4
4'	3,64 (<i>t</i> , 9,2)	71,8	3,64 (<i>m</i>)	71,8
5'	3,87 (<i>d</i> , 9,5)	76,3	3,86 (<i>d</i> , 9,5)	76,3
6'	-	172,4	-	172,3
Gal-				
1''	4,59 (<i>d</i> , 7,8)	105,6	4,59 (<i>d</i> , 7,8)	105,6
2''	3,75 (<i>dd</i> , 9,8-7,8)	72,7	3,75 (<i>dd</i> , 9,7-7,8)	72,6
3''	3,61 (<i>dd</i> , 9,8-3,2)	81,2	3,61 (<i>dd</i> , 9,8-3,3)	81,2
4''	3,91 (<i>d</i> , 3,4)	70,1	3,91 (<i>d</i> , 3,3)	70,0
5''	3,60 (<i>m</i>)	77,1	3,60 (<i>m</i>)	77,1
6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,5)	62,5	3,69 (<i>dd</i> , 11,3-4,4)	62,5
6''b	3,79 (<i>dd</i> , 11,4-7,7)		3,79 (<i>dd</i> , 11,3-6,4)	
Rha-				
1'''	5,08 (<i>d</i> , 1,7)	103,8	5,08 (<i>d</i> , 1,7)	103,8
2'''	3,99 (<i>dd</i> , 3,4-1,7)	72,1	3,99 (<i>dd</i> , 3,5-1,7)	72,0
3'''	3,79 (<i>dd</i> , 9,5-3,2)	72,1	3,79 (<i>dd</i> , 9,3-3,5)	72,0
4'''	3,42 (<i>t</i> , 9,5)	74,0	3,41 (<i>t</i> , 9,5)	74,0
5'''	3,78 (<i>dq</i> , 9,8-6,2)	70,2	3,80 (<i>dq</i> , 9,8-6,2)	70,2
6'''	1,28 (<i>d</i> , 6,2)	18,0	1,28 (<i>d</i> , 6,2)	18,0
Glc- ester				
1''''			5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7
2''''			3,34 (<i>t</i> , 8,4)	73,9
3''''			3,43 (<i>t</i> , 9,1)	78,3
4''''			3,38 (<i>t</i> , 9,6)	71,1
5''''			3,37 (<i>m</i>)	78,7
6''''a			3,70 (<i>dd</i> , 12,2-4,5)	62,4
6''''b			3,83 (<i>dd</i> , 12,2-1,7)	

III. 3. Détermination structurale des saponosides de *C. villosum*

III. 3. 1. Saponosides de l'enveloppe des fruits (Cve)

Vingt-six saponosides ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique de l'enveloppe des fruits de *C. villosum* dont seize sont de structures nouvelles. Quatre des cinq génines caractérisées chez *C. glabrum* sont retrouvées : l'acide oléanolique (**Cve1**), l'acide 2 β -hydroxyoléanolique (**Cve2** à **Cve8**), l'hédéragénine (**Cve9** à **Cve18**) et la bayogénine (**Cve19** à **Cve26**). Les saponosides isolés sont essentiellement des bidesmosidiques à l'inverse des saponosides isolés dans les fruits de *C. glabrum*. Seulement six parmi les vingt-six saponosides isolés sont des monodesmosides (figure 36). Six saponosides sont communs entre les deux espèces : **Cve3**, **Cve9**, **Cve10**, **Cve12**, **Cve20** et **Cve21**.

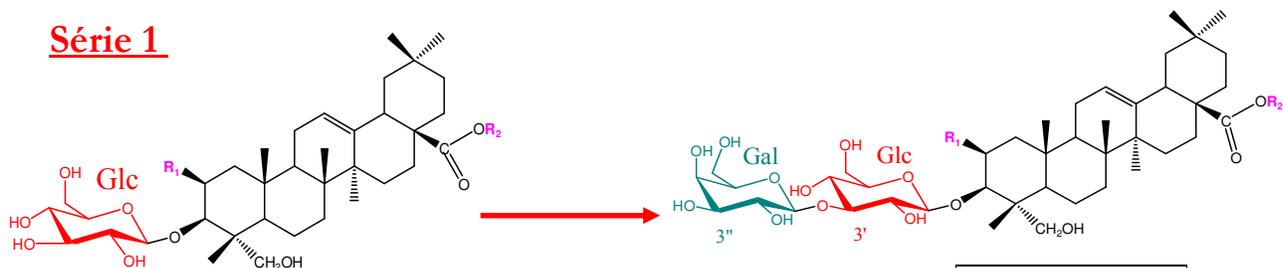
Contrairement aux saponosides de *Caryocar glabrum*, l'analyse structurale a présenté ici plus de difficultés car les saponosides sont de structures plus complexes et variées. La chaîne osidique liée à la génine en position 3 peut comporter de une à cinq unités osidiques, disposées de façon linéaire, alors que la chaîne osidique en C-28 ne comporte qu'un seul β -D-glucose.

Comme pour les saponosides des pulpes des fruits de *C. glabrum*, nous pouvons classer les structures des saponosides en trois séries en fonction de la nature du premier sucre de l'enchaînement osidique en position 3 de la génine (figure 36) :

- un glucose pour la **série 1**, la plus importante en nombre de molécules isolées,
- un acide glucuronique pour la **série 2**,
- un galactose pour la **série 3**.

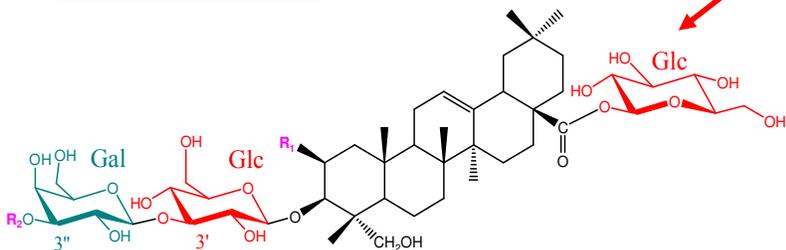
Les deux enchaînements [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-] et [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-] rencontrés précédemment dans les saponosides de *C. glabrum* sont également retrouvés, mais seuls les saponosides à acide 2 β -hydroxyoléanolique possèdent l'enchaînement [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-]. L'enchaînement [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-] est retrouvé uniquement dans les saponosides à hédéragénine et bayogénine. Les deux saponosides majoritaires isolés des fruits de *C. villosum* (**Cve1** et **Cve14**) sont constitués d'un nouvel enchaînement diosidique en position 3 de la génine, un galactose substitué en position 2 par un glucose [β -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-] (série **3**).

Série 1

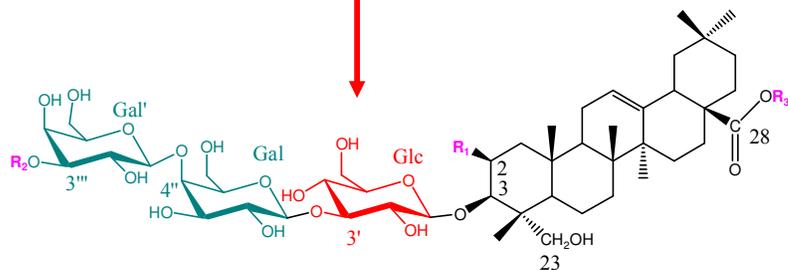


	R ₁	R ₂
Cve9	H	H
Cve11	H	Glc
Cve19	OH	Glc

	R ₁	R ₂
Cve10*	H	H
Cve12*	H	Glc
Cve20*	OH	H
Cve21*	OH	Glc

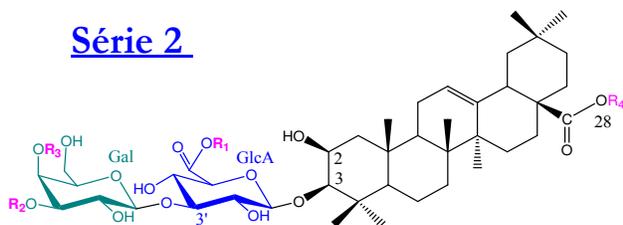


	R ₁	R ₂
Cve13*	H	Xyl
Cve15*	H	Gal
Cve16*	H	Xyl-(1→3)-Gal-
Cve22*	OH	Xyl
Cve23*	OH	Gal-
Cve24*	OH	Xyl-(1→3)-Gal-



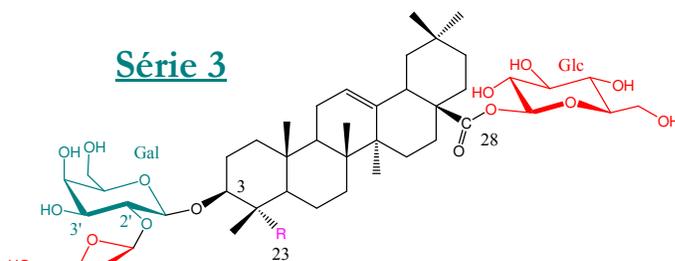
	R ₁	R ₂	R ₃
Cve17*	H	Xyl	Glc
Cve18*	H	Xyl-(1→3)-Gal-	Glc
Cve25*	OH	Xyl-(1→3)-Gal-	H
Cve26*	OH	Xyl-(1→3)-Gal-	Glc

Série 2



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cve2*	CH ₃	H	H	Glc
Cve3*	H	H	H	Glc
Cve4*	CH ₃	Xyl	H	Glc
Cve5*	H	Xyl	H	Glc
Cve6*	H	H	Xyl-(1→3)-Gal-	H
Cve7*	H	H	Xyl-(1→3)-Gal-(1→3)-Gal-	H
Cve8*	H	H	Xyl-(1→3)-Gal-(1→3)-Gal-	Glc

Série 3



Cve1 : R=H
Cve14 : R=CH₂OH

Figure 36 : Structures des saponides isolés des fruits de *Caryocar villosum*.

* Saponides de structures nouvelles

La principale difficulté rencontrée au niveau de l'élucidation structurale a résidé dans l'attribution des signaux des unités galactoses. En particulier, lorsque la chaîne osidique est constituée de quatre à cinq unités (tétra- et penta-saccharides), dont deux ou trois unités galactoses substituées en position 3 qui conduit à un recouvrement des signaux en RMN ^1H et ^{13}C , parfois même au niveau des protons ou carbones anomériques. Il devient alors difficile d'attribuer les paires de protons H-5 et H-6 pour chacun des galactoses. La position équatoriale du proton H-4 dans un galactose fait que le couplage entre le proton H-4 et le proton H-5 n'est pas observable sur le spectre COSY. L'expérience ROESY permet, à partir du proton anomérique H-1 ou du proton osidique H-3, de localiser le proton H-5 du galactose sur le spectre RMN ^1H . Le proton H-5 corrèle également avec le proton H-4 sur le spectre TOCSY. Une fois le proton H-5 attribué, l'analyse des spectres COSY et TOCSY permet de placer les protons géminés H-6.

Comme pour les saponosides de *C. glabrum*, nous exposerons pour chaque série les déterminations structurales des saponosides par ordre de complexité croissante, en fonction de la chaîne osidique en position 3 : di-, tri-, tétra- et penta-saccharides.

III. 3. 1. 1. Saponosides communs avec *C. glabrum* Cve3, Cve9, Cve10, Cve12, Cve20 et Cve21

Les saponosides **Cve3**, **Cve9**, **Cve10**, **Cve12**, **Cve20** et **Cve21** ont été identifiés par comparaison des spectres RMN et des spectres de masse à ceux précédemment obtenus pour les saponosides isolés des fruits de *C. glabrum* et décrits respectivement sous les appellations **Cgp1**, **Cgp4**, **Cgp5**, **Cgp10**, **Cgp11** et **Cgp23** (tableau 23).

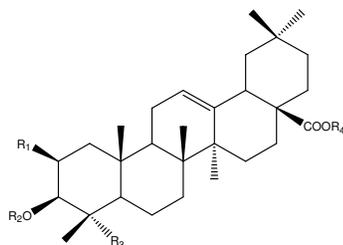


Tableau 23 : Saponosides communs entre les fruits de *C. villosum* et les fruits de *C. glabrum*.

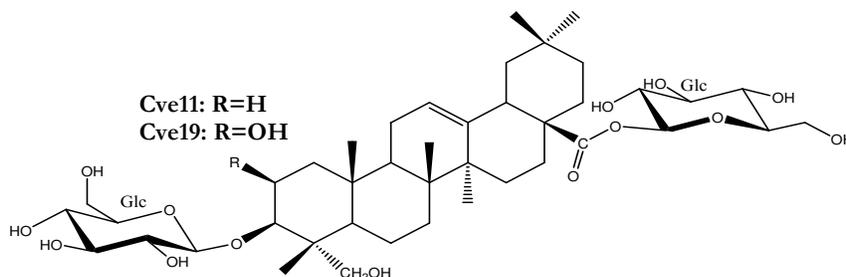
<i>C. villosum</i>	<i>C. glabrum</i>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cve9	Cgp1	H	β -D-Glc-	CH ₂ OH	H
Cve10	Cgp4	H	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Glc	CH ₂ OH	H
Cve20	Cgp5	OH	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Glc	CH ₂ OH	H
Cve12	Cgp10	H	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Glc	CH ₂ OH	β -D-Glc
Cve21	Cgp11	OH	β -D-Gal-(1→3)- β -D-Glc	CH ₂ OH	β -D-Glc
Cve3	Cgp23	OH	β -D-Gal-(1→3)- β -D-GlcA	H	β -D-Glc

III. 3. 1. 2. Saponosides de structures connues Cve1, Cve11, Cve14 et Cve19

Les saponosides **Cve1**, **Cve11**, **Cve14** et **Cve19** sont de structures connues. Leurs structures ont été élucidées selon la méthode précédemment décrite par analyse des spectres de RMN mono-(^1H et ^{13}C) et bi-dimensionnelles (COSY, TOCSY, ROESY, HMBC et HSQC) et des spectres de masse obtenus en ESI-MS, ainsi que par la comparaison des valeurs des déplacements chimiques obtenus pour ces saponosides (tableaux 24 et 25) avec les valeurs de la littérature.

Le saponoside **Cve11** est la 3-*O*- β -D-glucopyranosyl hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, préalablement isolé de *Lonicera bournei* (Caprifoliaceae)⁷⁸.

Le saponoside **Cve19** est la 3-*O*- β -D-glucopyranosyl bayogénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, identifié dans *Aster batangensis* (Asteraceae)⁷⁹.



Le saponoside **Cve1** est l'acide 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl] oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester. Il a été déjà isolé à partir des parties aériennes d'*Ilex dumosa* (Aquifoliaceae)⁸⁰

Le saponoside **Cve14** est la 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl] hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, isolé antérieurement à partir des racines de *Pulsatilla patens* (Ranunculaceae)⁸¹.

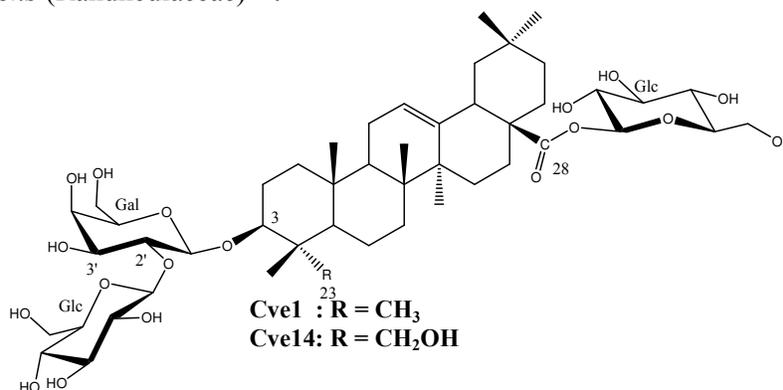


Tableau 24 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cve11** et **Cve19** CD₃OD.

	Cve11		Cve19	
	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}
Glc-en C-3				
1'	4,41 (<i>d</i> , 7,8)	105,7	4,44 (<i>d</i> , 7,8)	105,5
2'	3,19 (<i>dd</i> , 8,6-8,1)	75,6	3,28 (<i>dd</i> , 9-8)	75,4
3'	3,35 (<i>m</i>)	78,3	3,39 (<i>t</i> , 9)	78,3
4'	3,31 (<i>t</i> , 7,9)	71,5	3,37 (<i>m</i>)	71,1
5'	3,28 (<i>m</i>)	77,7	3,30 (<i>ddd</i> , 8,5-5,2-2,4)	77,7
6'a	3,69 (<i>dd</i> , 11,9-5)	62,7	3,71 (<i>dd</i> , 11,8-4,8)	62,2
6'b	3,86 (<i>dd</i> , 11,9-2,2)		3,82 (<i>dd</i> , 11,8-2,4)	
Glc'-ester				
1''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7
2''	3,34 (<i>m</i>)	73,9	3,34 (<i>m</i>)	73,9
3''	3,43 (<i>t</i> , 9,0)	78,3	3,43 (<i>t</i> , 8,8)	78,3
4''	3,40 (<i>m</i>)	71,1	3,39 (<i>t</i> , 8,8)	71,1
5''	3,37 (<i>m</i>)	78,7	3,37 (<i>m</i>)	78,7
6''a	3,70 (<i>dd</i> , 12,1-4,3)	62,4	3,70 (<i>dd</i> , 12-4,5)	62,4
6''b	3,84 (<i>dd</i> , 12,1-1,0)		3,84 (<i>dd</i> , 12-1,7)	

Tableau 25 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cve1** (CD₃OD) et **Cve14** (DMSO-*d*₆).

	Cve1		Cve14	
	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}
Gal-en C-3				
1'	4,42 (<i>d</i> , 7,8)	105,9	4,29 (<i>d</i> , 7,8)	104,5
2'	3,90 (<i>dd</i> , 9,6-7,8)	79,2	3,56 (<i>dd</i> , 9,4-7,8)	80,6
3'	3,69 (<i>dd</i> , 9,6-3,7)	75,4	3,47 (<i>dd</i> , 9,4-3,1)	74,7
4'	3,86 (<i>d</i> , 3,7)	70,4	3,65 (<i>d</i> , 3,1)	69,1
5'	3,51 (<i>dd</i> , 6,7-6,1)	76,2	3,29 (<i>tm</i> , 6,5)	75,9
6'a	3,72 (<i>dd</i> , 11,2-6,1)	62,4	3,42 (<i>dd</i> , 10,9-6,4)	61,5
6'b	3,75 (<i>dd</i> , 11,2-6,1)		3,50 (<i>dd</i> , 10,8-6,3)	
Glc-en C-3'				
1''	4,68 (<i>d</i> , 7,7)	104,6	4,41 (<i>d</i> , 7,8)	105,0
2''	3,24 (<i>dd</i> , 9-8)	76,3	3,00 (<i>dd</i> , 8,8-8,1)	76,2
3''	3,37 (<i>m</i>)	77,9	3,15 (<i>t</i> , 8,9)	77,3
4''	3,22 (<i>t</i> , 9,7)	71,9	3,10 (<i>t</i> , 9,1)	70,7
5''	3,28 (<i>ddd</i> , 9,7-6,1-2,3)	78,3	3,05 (<i>m</i>)	78,1
6''a	3,64 (<i>dd</i> , 11,9-6,1)	63,1	3,44 (<i>dd</i> , 12,2-4,3)	62,2
6''b	3,84 (<i>dd</i> , 11,9-2,6)		3,61 (<i>dl</i> , 10,7)	
Glc'-ester				
1'''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7	5,21 (<i>d</i> , 8,1)	95,4
2'''	3,34 (<i>dd</i> , 9,7-8,1)	73,9	3,10 (<i>m</i>)	73,5
3'''	3,43 (<i>t</i> , 9,1)	78,3	3,21 (<i>t</i> , 8,9)	77,7
4'''	3,38 (<i>m</i>)	71,1	3,07 (<i>m</i>)	71,1
5'''	3,37 (<i>m</i>)	78,7	3,17 (<i>m</i>)	78,9
6'''a	3,70 (<i>dd</i> , 12,1-5,2)	62,4	3,43 (<i>dd</i> , 12,2-5,1)	61,8
6'''b	3,84 (<i>dd</i> , 12,1-2)		3,61 (<i>dl</i> , 10,7)	

III. 3. 1. 3. Saponoside à chaîne disaccharidique de la 2^{ème} série, **Cve2**

L'analyse des spectres de RMN montre la présence de l'acide 2 β -hydroxyoléanolique et de trois unités osidiques. L'identification des trois unités osidiques indique la présence des mêmes sucres que ceux rencontrés dans le saponoside **Cgp23** (= **Cve3**): un acide β -D-glucuronique ($\delta_{H1'}$ 4,53 ppm), un β -D-galactose terminal ($\delta_{H1''}$ 4,56 ppm) et un β -D-glucose terminal ($\delta_{H1'''}$ 5,40 ppm) en position ester (tableau 26).

Le spectre de masse de **Cve2** obtenu en ESI-MS mode positif, montre un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 1009. Sa comparaison avec celui du saponoside **Cgp23** montre un gain de 14 *uma* correspondant à un méthyle supplémentaire. Celui-ci est visualisé sur le spectre RMN 1H sous la forme d'un singulet intégrant pour trois protons, déblindé à 3,79 ppm et sur le spectre ^{13}C J -modulé à 52,9 ppm. Les protons de ce méthyle corrélerent sur le spectre HMBC avec le carbonyle de l'acide glucuronique. Les corrélations $^3J_{H-C}$ entre H-1'' Gal/C-3' GlcA, entre H-1' GlcA/C-3 de la génine et entre H-1''' Glc/C-28 de la génine confirment la présence des deux enchaînements observés dans le saponoside **Cgp23**.

Le saponoside **Cve2** est l'ester méthylique du saponoside **Cgp23**, soit l'acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate]-2 β -hydroxyoléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

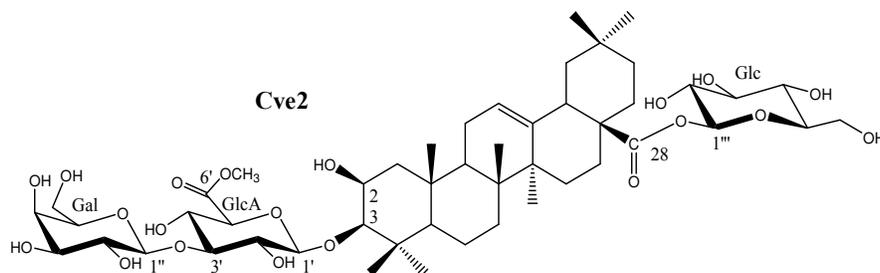


Tableau 26 : Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique du saponoside **Cve2** dans CD_3OD .

	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c		δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c		δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c
GlcA-en C-3			Gal-en C-3'			Glc-ester		
1'	4,53 (<i>d</i> , 7,8)	106,5	1''	4,56 (<i>d</i> , 7,8)	105,6	1'''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7
2'	3,57 (<i>dd</i> , 9,4-7,8)	74,5	2''	3,62 (<i>dd</i> , 9,7-7,8)	73,0	2'''	3,34 (<i>m</i>)	73,9
3'	3,63 (<i>t</i> , 9,4)	86,2	3''	3,52 (<i>dd</i> , 9,7-3,2)	74,7	3'''	3,43 (<i>t</i> , 8,9)	78,3
4'	3,64 (<i>t</i> , 9,4)	71,9	4''	3,82 (<i>d</i> , 3,1)	70,3	4'''	3,38 (<i>t</i> , 9,5)	71,1
5'	3,95 (<i>d</i> , 9,4)	76,1	5''	3,58 (<i>m</i>)	77,2	5'''	3,37 (<i>m</i>)	78,7
6'	-	171,2	6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,8-4,2)	62,6	6'''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,7-4,4)	62,4
-OCH₃	3,79 (<i>s</i>)	52,9	6''b	3,80 (<i>dd</i> , 11,5-7,8)		6'''b	3,84 (<i>dd</i> , 11,7-1,5)	

III. 3. 1. 4. Saponosides à chaîne trisaccharidique de la 2^{ème} série, **Cve5** et **Cve4**

Le spectre de masse du saponoside **Cve5**, obtenu en ESI-MS mode positif, montre un ion pseudomoléculaire $[M+K]^+$ à m/z 1143. La fragmentation MS^2 de cet ion conduit à la formation d'ions $[M+K-162]^+$, $[M+K-162-132]^+$, $[M+K-2 \times 162-132]^+$ indiquant la présence d'un pentose et de deux hexoses. En soustrayant la masse de la génine+ K^+ ($472+39 \text{ uma}$), il reste 176 uma soit l'équivalent d'un acide hexosuronique. Le saponoside **Cve5** est constitué de quatre unités osidiques : deux hexoses, un pentose et un acide hexosuronique, soit un pentose de plus comparativement au saponoside **Cgp23**.

Sur le spectre de RMN 1H de **Cve5**, quatre doublets anomériques sont observés à 4,52, 4,54, 4,64 et 5,40 ppm. Leurs carbones respectifs, obtenus par l'analyse du spectre HSQC J -modulé, résonnent à 106,3 (2C), 105,1 et 95,7 ppm (tableau 27).

L'analyse des spectres COSY, TOCSY et HSQC J -modulé permet d'identifier les trois sucres communs avec **Cgp23**, soit :

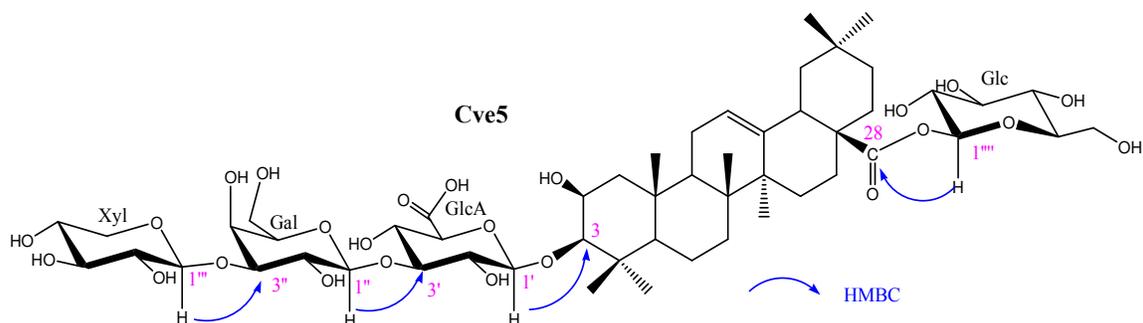
- un β -D-glucose ester ($\delta_{H-1''''}$ 5,40) en position terminale,
- un β -D-galactose ($\delta_{H-1''}$ 4,64) substitué en position C-3'' ($\delta_{C-3''}$ 84,0),
- un acide β -D-glucuronique ($\delta_{H-1'}$ 4,52) substitué en position C-3' ($\delta_{C-3'}$ 86,2).

Le pentose supplémentaire est identifié à partir du proton anomérique résonnant à 4,54 ppm. Les valeurs des constantes de couplage $J_{H1''''-H2''''}$, $J_{H2''''-H3''''}$, $J_{H3''''-H4''''}$ et $J_{H4''''-H5''''_{ax}}$ étant toutes supérieures ou égales à 7 Hz, traduisent leurs positions transdiaxiales et permettent d'identifier un β -D-xylose. La configuration anomérique β a été confirmée également par l'observation sur le spectre ROESY des effets rOe entre les protons axiaux H-1''''/H-3''' et H-1''''/H-5'''_{ax}. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de ce pentose sont en accord avec celles d'un xylose terminal^{56, 57}.

L'enchaînement osidique est établi après analyse du spectre HMBC sur lequel sont visualisées les corrélations $^3J_{H-C}$ suivantes :

- H-1'''' Xyl/C-3'' Gal,
- H-1'' Gal/ C-3' GlcA,
- H-1' GlcA/C-3 de la génine,
- H-1'''' Glc/C-28 de la génine.

Le saponoside **Cve5** est l'acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.



Le spectre de masse du saponoside **Cve4** obtenu en ESI-MS mode positif, montre un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 1141, soit un gain de 14 *uma* par rapport au saponoside **Cve5** révélant la présence d'un méthyle supplémentaire. La comparaison des spectres de RMN de la partie osidique des saponosides **Cve5** et **Cve4** montre qu'elles sont identiques à l'exception de l'apparition d'un méthyle supplémentaire à δ_H 3,79 ppm et δ_C 52,9 ppm (tableau 27). La corrélation $^3J_{H-C}$ observée sur le spectre HMBC entre les protons de ce méthyle et le carbonyle de l'acide glucuronique indique une estérification par le méthyle ($COOCH_3$). Les corrélations $^3J_{H-C}$ visualisées sur le spectre HMBC entre les protons et les carbones des liaisons interglycosidiques permettent d'identifier le saponoside **Cve4** comme étant l'ester méthylique de **Cve5**.

Le saponoside **Cve4** est l'acide 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate]-2 β -hydroxyléanolique-28-*O*- β -D- glucopyranosyl ester.

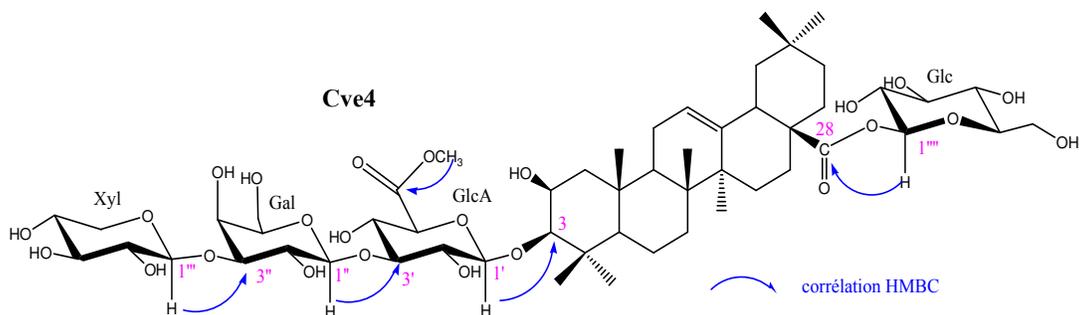


Tableau 27 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cve4** et **Cve5** dans CD₃OD.

	Cve4		Cve5	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
GlcA-				
1'	4,53 (d, 7,8)	106,5	4,52 (d, 7,6)	106,3
2'	3,57 (dd, 9,4-7,8)	74,3	3,58 (dd, 8,7-8,1)	74,5
3'	3,66 (m)	86,0	3,65 (m)	86,2
4'	3,66 (m)	71,8	3,65 (m)	71,8
5'	3,95 (d, 9,6)	76,1	3,89 (d, 7,3)	76,5
6'	-	172,0	-	173,0
-OCH₃	3,79 (s)	52,9	-	-
Gal-				
1''	4,64 (d, 7,8)	105,1	4,64 (d, 7,8)	105,1
2''	3,79 (m)	72,2	3,80 (dt, 7,6)	72,2
3''	3,66 (dd, 9,5-2,9)	84,0	3,67 (dd, 7,6-3,2)	84,0
4''	4,03 (d, 3,1)	69,8	4,03 (d, 3,3)	69,8
5''	3,60 (m)	76,7	3,61 (m)	76,7
6''a	3,69 (dd, 11,8-4,8)	62,5	3,79 (m)	62,6
6''b	3,79 (m)		3,80 (m)	
Xyl-				
1'''	4,53 (d, 7,2)	106,3	4,54 (d, 7,1)	106,3
2'''	3,32 (m)	75,2	3,32 (t, 9,3)	75,2
3'''	3,36 (m)	77,5	3,35 (m)	77,5
4'''	3,52 (ddd, 10,1-8,2-5,5)	71,0	3,52 (ddd, 10,2-8,5-5,2)	71,0
5ax'''	3,23 (dd, 11,3-10,6)	66,9	3,24 (t, 11,2)	66,9
5eq'''	3,87 (dd, 11,3-5,4)		3,88 (dd, 11,3-5,3)	
Glc-ester				
1''''	5,40 (d, 8,2)	95,7	5,40 (d, 8,1)	95,7
2''''	3,34 (m)	73,9	3,34 (m)	73,9
3''''	3,43 (t, 8,9)	78,3	3,43 (t, 8,8)	78,3
4''''	3,37 (t, 9,5)	71,0	3,38 (m)	71,1
5''''	3,36 (m)	78,7	3,37 (m)	78,7
6''''a	3,70 (dd, 12-4,4)	62,4	3,70 (dd, 12-4,4)	62,4
6''''b	3,83 (dd, 12-1,6)		3,83 (dl, 12)	

III. 3. 1. 5. Saponoside à chaîne tétrasaccharidique de la 2^{ème} série, **Cve6**

L'ion pseudomoléculaire [M-H]⁻ à *m/z* 1103 obtenu en ESI-MS mode négatif, montre que le saponoside **Cve6** possède la même masse moléculaire que le saponoside **Cve5**. La partie osidique du saponoside **Cve6** est donc constituée d'un acide hexosurorique, de deux hexoses et d'un pentose.

Le pentose est identifié à un β -D-xylose en position terminale ($\delta_{\text{H-1}''''}$ 4,51), l'acide hexosurorique ($\delta_{\text{H-1}'}$ 4,52) est identifié à un acide β -D-glucurorique substitué en position C-3', et l'un des hexoses est identifié à un β -D-galactose ($\delta_{\text{H-1}''}$ 4,55) substitué en position C-3'', caractérisé par la position équatoriale de son H-4''' à 4,02 ppm (*d*, *J*=2,9 Hz) (tableau 28).

L'analyse du système osidique dont l'anomère résonne à 4,59 ppm a été rendue plus difficile du fait d'un très fort recouvrement des signaux des protons H-2'', H-3'' et H-5'' résonnant à 3,63 ppm, sous la forme de multiplets. Le spectre COSY permet de repérer le

proton H-4'' (*dd*, $J = 2,9-0,5$ Hz) à 4,06 ppm, en position équatoriale. Le proton H-5'' est localisé du fait de sa corrélation avec les protons H-1'' et H-3'' sur le spectre ROESY. Les taches de corrélation observées sur le spectre HSQC *J*-modulé en face des protons superposés H-2'', H-3'' et H-5'' permettent de positionner les carbones C-2'', C-3'' et C-5'' qui sont alors attribués par comparaison avec les données de la littérature⁵⁷. Cet hexose est identifié à un second β -D-galactose dont le carbone C-4'' se trouve déblindé du fait d'une liaison osidique.

Le séquençage de la partie osidique est réalisé par l'analyse du spectre HMBC sur lequel, les corrélations $^3J_{H-C}$ suivantes sont observées :

- H-1'''' Xyl terminal/C-3''' Gal',
- C-1''' Gal'/ H-4'' Gal,
- H-1'' Gal/C-3' GlcA,
- H-1' GlcA/C-3 de la génine.

Le saponoside **Cve6** est l'acide 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique.

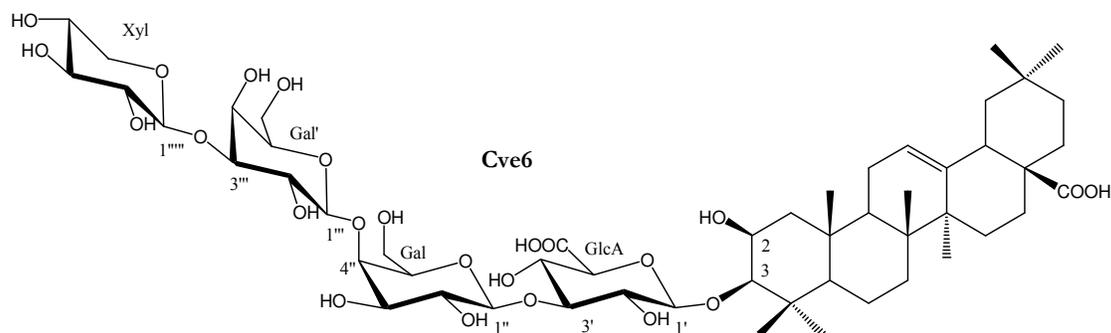


Tableau 28 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cve6**, **Cve7** et **Cve8** dans CD₃OD.

	Cve6		Cve7		Cve8	
	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}
GlcA-						
1'	4,52 (<i>d</i> , 7,5)	106,3	4,44 (<i>d</i> , 7,8)	106,0	4,51 (<i>d</i> , 7,6)	106,1
2'	3,57 (<i>dd</i> , 9,9-7,6)	74,5	3,56 (<i>dd</i> , 8,6-8)	74,7	3,57 (<i>t</i> , 7,6)	74,6
3'	3,62 (<i>m</i>)	86,6	3,63 (<i>t</i> , 8,3)	86,5	3,64 (<i>m</i>)	86,2
4'	3,64 (<i>m</i>)	71,8	3,58 (<i>t</i> , 8,5)	72,2	3,63 (<i>m</i>)	72,0
5'	3,88 (<i>d</i> , 9,3)	76,1	3,66 (<i>d</i> , 9,5)	76,8	3,85 (<i>m</i>)	76,2
6'	-	174,2	-	176,0	-	173,0
Gal-						
1''	4,59 (<i>d</i> , 7,5)	105,5	4,61 (<i>d</i> , 7,8)	105,3	4,59 (<i>d</i> , 7,7)	105,7
2''	3,63 (<i>m</i>)	73,8	3,68 (<i>dd</i> , 8,8-8)	73,6	3,64 (<i>m</i>)	73,8
3''	3,63 (<i>m</i>)	75,1	3,63 (<i>dd</i> , 8,8-3,6)	75,2	3,63 (<i>m</i>)	75,2
4''	4,06 (<i>dd</i> , 2,9-0,5)	79,9	4,06 (<i>dl</i> , 2,9)	80,0	4,07 (<i>sl</i>)	80,0
5''	3,63 (<i>m</i>)	76,6	3,63 (<i>m</i>)	76,3	3,63 (<i>m</i>)	76,4
6''a	3,76 (<i>dd</i> , 11,5-4,7)	62,0	3,78 (<i>dd</i> , 11,7-4,8)	62,0	3,76 (<i>dd</i> , 11,4-2,6)	62,0
6''b	3,85 (<i>dd</i> , 11,5-6,1)		3,86 (<i>dd</i> , 11,7-6,2)		3,88 (<i>dd</i> , 11,4-6)	
Gal'-						
1'''	4,55 (<i>d</i> , 7,9)	106,5	4,56 (<i>d</i> , 7,9)	106,5	4,56 (<i>d</i> , 7,9)	106,4
2'''	3,79 (<i>dd</i> , 9,5-7,9)	72,3	3,80 (<i>dd</i> , 9,4-7,9)	72,3	3,80 (<i>m</i>)	72,3
3'''	3,64 (<i>m</i>)	84,7	3,68 (<i>m</i>)	85,0	3,67 (<i>dd</i> , 8,9-3,4)	85,0
4'''	4,02 (<i>d</i> , 2,9)	69,9	4,11 (<i>d</i> , 3,5)	70,0	4,12 (<i>d</i> , 3,6)	70,0
5'''	3,57 (<i>m</i>)	76,7	3,59 (<i>m</i>)	76,6	3,59 (<i>m</i>)	76,7
6'''a	3,71 (<i>dd</i> , 11,2-4,7)	62,4	3,73 (<i>dd</i> , 11,2-4,6)	62,5	3,74 (<i>dd</i> , 11,2-7)	62,4
6'''b	3,78 (<i>dd</i> , 11,2-7,8)		3,81 (<i>dd</i> , 10,9-7,4)		3,80 (<i>m</i>)	
Gal''-						
1''''			4,59 (<i>d</i> , 7,7)	105,9	4,59 (<i>d</i> , 7,7)	105,8
2''''			3,82 (<i>dd</i> , 9,6-7,9)	72,1	3,82 (<i>dd</i> , 9,6-7,7)	72,1
3''''			3,66 (<i>m</i>)	83,9	3,66 (<i>dd</i> , 9,6-3,5)	83,9
4''''			4,05 (<i>d</i> , 4,6)	69,7	4,06 (<i>d</i> , 3,5)	69,7
5''''			3,58 (<i>m</i>)	76,4	3,59 (<i>m</i>)	76,6
6''''a			3,72 (<i>dd</i> , 11,3-6,5)	62,4	3,73 (<i>dd</i> , 11,3-7,8)	62,4
6''''b			3,79 (<i>dd</i> , 11,6-6,9)		3,79 (<i>dd</i> , 11,3-5,4)	
Xyl-						
1'''''	4,51 (<i>d</i> , 7)	106,4	4,53 (<i>d</i> , 7,2)	106,3	4,54 (<i>d</i> , 7,2)	106,2
2'''''	3,32 (<i>t</i> , 8,9)	75,2	3,32 (<i>m</i>)	75,2	3,32 (<i>m</i>)	75,2
3'''''	3,35 (<i>m</i>)	77,6	3,36 (<i>t</i> , 9)	77,5	3,36 (<i>m</i>)	77,5
4'''''	3,51 (<i>ddd</i> , 10,5-8,2-5,1)	71,0	3,52 (<i>ddd</i> , 9,9-8,6-5,5)	71,0	3,52 (<i>ddd</i> , 10,2-8,5-5,5)	71,0
5'''''a	3,23 (<i>tl</i> , 11)	66,9	3,24 (<i>dd</i> , 11,1-10,7)	66,9	3,24 (<i>dd</i> , 11,4-10,5)	66,9
5'''''b	3,87 (<i>dd</i> , 11,3-5,2)		3,88 (<i>dd</i> , 11,4-5,4)		3,89 (<i>dd</i> , 11,4-5,3)	
Glc - ester						
1''''''					5,40 (<i>d</i> , 7,7)	95,7
2''''''					3,34 (<i>m</i>)	73,9
3''''''					3,43 (<i>t</i> , 9,1)	78,3
4''''''					3,38 (<i>t</i> , 8,3)	71,1
5''''''					3,34 (<i>m</i>)	78,7
6''''''a					3,70 (<i>dd</i> , 11-3,7)	62,4
6''''''b					3,84 (<i>dd</i> , 12-1)	

III. 3. 1. 6. Saponosides à chaîne pentasaccharidique de la 2^{ème} série, Cve7 et Cve8

L'analyse des spectres de masse des saponosides **Cve7** et **Cve8** obtenus en ESI-MS mode positif, montre que la partie osidique du saponoside **Cve7** est constituée de cinq unités osidiques : un pentose terminal, trois hexoses et un acide hexosuronique, et que le saponoside **Cve8** possède un hexose supplémentaire par rapport à **Cve7** (tableau 29).

Tableau 29 : ESI-MS⁺ et ESI-MS-MS des saponosides **Cve7** et **Cve8**.

	[M-H+2Na] ⁺	ESI-MS-MS ([M-H+2Na] ⁺)
Cve7	1311	1179 [M-H+2Na-132] ⁺ , 1017[M-H+2Na-132-162] ⁺ , 855 [M-H+2Na-132-2x162] ⁺ , 693 [M-H+2Na-132-3x162] ⁺
Cve8	1473	1311 [M-H+2Na-162] ⁺ , 1017 [M-H+2Na-162-132-162] ⁺ , 855 [M-H+2Na-162-132-2x162] ⁺ , 693 [M-H+2Na-162-132-3x162] ⁺

Le déplacement chimique du carbonyle C-28 de la génine à 182,0 ppm dans **Cve7** et à 178,0 ppm dans **Cve8** suggère que le saponoside **Cve7** est un monodesmoside alors que le saponoside **Cve8** est un bidesmoside (tableau 66, partie expérimentale).

L'analyse des spectres COSY, TOCSY, ROESY et HSQC *J*-modulé permet comme précédemment d'attribuer les protons et carbones de chacune des unités osidiques.

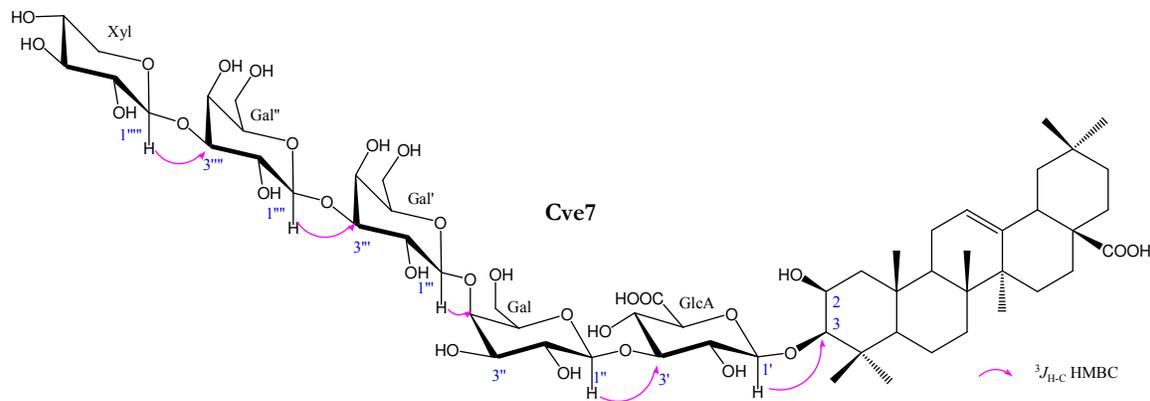
Pour le saponoside **Cve7**, ont été identifiés (tableau 28) :

- un acide β -D-glucuronique ($\delta_{H-1'}$ 4,44), substitué en position 3 ($\delta_{C-3'}$ 86,5 ppm).
- un β -D-galactose ($\delta_{H-1''}$ 4,61), substitué en position 4 ($\delta_{C-4''}$ 80,0).
- deux β -D-galactoses ($\delta_{H-1'''} 4,56$ (Gal') et $\delta_{H-1''''} 4,59$ (Gal'')) substitués en position 3 ($\delta_{C-3'''} 85,0$ et $\delta_{C-3''''} 83,9$),
- un β -D-xylose terminal ($\delta_{H-1'''''} 4,53$).

L'enchaînement osidique de **Cve7** est déterminé par l'analyse du spectre HMBC qui montre des taches de corrélations $^3J_{H-C}$ entre :

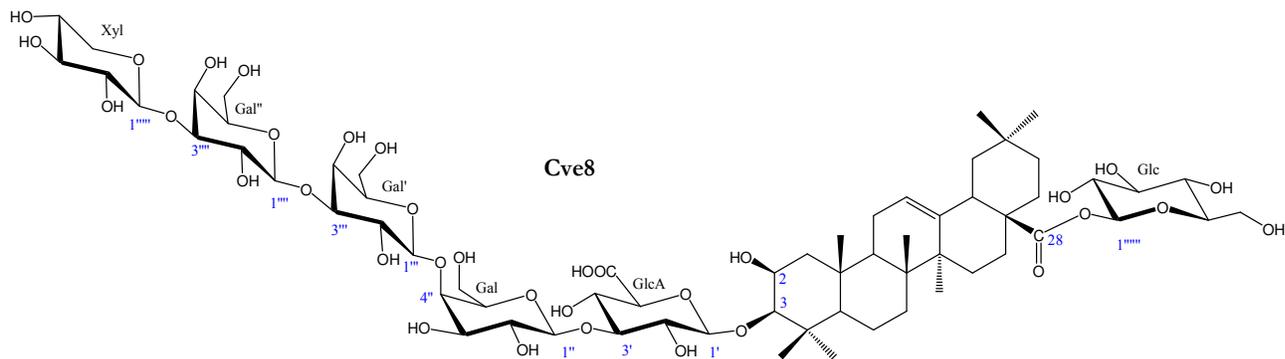
- H-1'''' Xyl terminal/C-3'''' Gal'',
- H-1'''' Gal''/ C-3'' Gal',
- H-1'''' Gal'/C-4'' Gal,
- H-1'' Gal/C-3' GlcA,
- H-1' GlcA/C-3 de l'acide 2 β -hydroxyoléanolique.

Le saponoside **Cve7** est l'acide 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyléanolique.



Pour le saponoside **Cve8**, comparativement au spectre de **Cve7**, un proton anomérique supplémentaire fortement déblindé, appartenant à un hexose, est détecté à 5,40 ppm (*d*, $J=7,7$ Hz). Le carbone anomérique correspondant résonne à 95,7 ppm. L'analyse des spectres COSY et TOCSY permet d'identifier cet hexose à un β -D-glucose (tableau 28). Ce sucre est lié au carbonyle C-28 de l'acide 2 β -hydroxyléanolique comme le montre la corrélation HMBC entre le proton anomérique de ce glucose et le carbone C-28 de la génine.

Le saponoside **Cve8** correspond au bidesmoside de **Cve7**, soit l'acide 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.



III. 3. 1. 7. Saponosides à chaîne trisaccharidique [β -D-Xyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-] de la 1^{ère} série, Cve13 et Cve22

L'ion moléculaire $[M-H]^-$ obtenu en ESI-MS mode négatif des saponosides **Cve13** et **Cve22**, respectivement à m/z 1089 et 1105, donne en fragmentation MS^2 les ions $[M-H-162]^-$, $[M-H-162-132]^-$ et $[M-H-162-132-2x162]^-$, correspondant à la perte de trois hexoses et d'un pentose avec au moins un hexose en position terminale (tableau 30).

Tableau 30 : ESI-MS et ESI-MS-MS des saponosides **Cve13** et **Cve22**.

	$[M-H]^-$	ESI-MS-MS
Cve13	1089	927 $[M-H-162]^-$, 795 $[M-H-162-132]^-$, 633 $[M-H-162-132-162]^-$, 471 $[M-H-162-132-2x162]^-$
Cve22	1105	943 $[M-H-162]^-$, 811 $[M-H-162-132]^-$, 649 $[M-H-162-132-162]^-$, 487 $[M-H-162-132-2x162]^-$

Sur le spectre RMN 1H de **Cve13**, quatre doublets anomériques sont localisés à 4,48, 4,60, 4,54 et 5,40 ppm. Leurs carbones respectifs, attribués par l'analyse du spectre HSQC J -modulé, résonnent à 105,3, 106,3, 105,2, et 95,7 ppm.

L'analyse des spectres COSY, TOCSY, ROESY et HSQC J -modulé permet d'identifier pour **Cve13** et **Cve22** (tableau 31) :

- un β -D-glucose substitué en position 3,
- un β -D-galactose, substitué en position 3,
- un β -D-xylose en position terminale,
- un β -D-glucose « ester » en position terminale.

L'analyse conjointe des spectres HMBC et ROESY permet d'identifier ces deux saponosides comme étant :

- pour le saponoside **Cve13** : la 3- O -[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28- O - β -D-glucopyranosyl ester.
- pour le saponoside **Cve22** : la 3- O -[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine-28- O - β -D-glucopyranosyl ester.

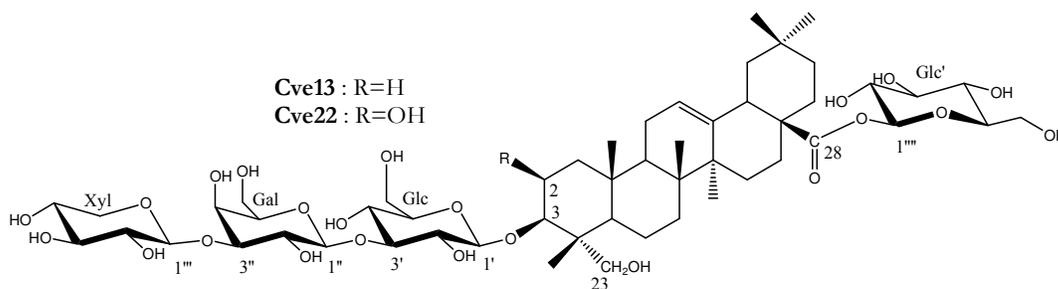


Tableau 31 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cve13** et **Cve22** dans CD₃OD.

	Cve13		Cve22	
	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}
Glc-				
1'	4,48 (<i>d</i> , 7,9)	105,3	4,51 (<i>d</i> , 7,9)	105,2
2'	3,40 (<i>dd</i> , 9,1-8,1)	74,9	3,50 (<i>dd</i> , 9-7,9)	74,7
3'	3,58 (<i>t</i> , 9,1)	87,9	3,61 (<i>t</i> , 8,9)	87,7
4'	3,44 (<i>t</i> , 9,6)	69,8	3,52 (<i>t</i> , 8,8)	69,5
5'	3,33 (<i>m</i>)	77,3	3,34 (<i>m</i>)	77,3
6'a	3,71 (<i>dd</i> , 11,8-4,8)	62,6	3,74 (<i>dd</i> , 12-4,6)	62,2
6'b	3,86 (<i>dd</i> , 11,8-2,2)		3,83 (<i>dd</i> , 12-2,7)	
Gal-				
1''	4,60 (<i>d</i> , 7,8)	105,2	4,62 (<i>d</i> , 7,8)	105,2
2''	3,80 (<i>dd</i> , 9,6-7,8)	72,2	3,81 (<i>dd</i> , 9,7-7,6)	72,2
3''	3,66 (<i>dd</i> , 9,6-3,3)	84,0	3,67 (<i>dd</i> , 9,6-3,4)	84,1
4''	4,03 (<i>d</i> , 3,3)	69,8	4,04 (<i>d</i> , 3,4)	69,8
5''	3,61 (<i>dd</i> , 7,8-5,3)	76,7	3,61 (<i>ddm</i> , 7,6-5,1)	76,7
6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,3-4,2)	62,5	3,70 (<i>dd</i> , 11,9-4,7)	62,5
6''b	3,80 (<i>dd</i> , 11,5-7,5)		3,83 (<i>dd</i> , 11,9-7,6)	
Xyl-				
1'''	4,54 (<i>d</i> , 7,1)	106,3	4,54 (<i>d</i> , 7,1)	106,3
2'''	3,32 (<i>m</i>)	75,2	3,32 (<i>m</i>)	75,2
3'''	3,36 (<i>t</i> , 8,3)	77,5	3,36 (<i>t</i> , 8,4)	77,5
4'''	3,53 (<i>ddd</i> , 10,2-8,3-5,4)	71,0	3,52 (<i>ddd</i> , 10,3-8,4-5,4)	71,0
5'''a	3,24 (<i>dd</i> , 11,4-10,3)	66,9	3,24 (<i>dd</i> , 11,4-10,3)	66,9
5'''b	3,88 (<i>dd</i> , 11,4-5,4)		3,89 (<i>dd</i> , 11,4-5,4)	
Glc' - ester				
1''''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7	5,41 (<i>d</i> , 8,1)	95,7
2''''	3,34 (<i>t</i> , 8,4)	73,9	3,34 (<i>m</i>)	73,9
3''''	3,43 (<i>t</i> , 9)	78,3	3,43 (<i>t</i> , 9)	78,3
4''''	3,38 (<i>t</i> , 9,3)	71,1	3,38 (<i>t</i> , 9)	71,1
5''''	3,37 (<i>m</i>)	78,7	3,37 (<i>m</i>)	78,7
6''''a	3,70 (<i>dd</i> , 12-4,7)	62,6	3,70 (<i>dd</i> , 11,9-4,5)	62,4
6''''b	3,83 (<i>m</i>)		3,84 (<i>dd</i> , 12,2-1,9)	

III. 3. 1. 8. Saponosides à chaîne trisaccharidique [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-] de la 1^{ère} série, Cve15 et Cve23

L'analyse des spectres de masse obtenus en ESI-MS mode positif des saponosides **Cve15** et **Cve23** (tableau 32), montre qu'un hexose remplace le pentose comparativement aux saponosides précédents **Cve13** et **Cve22**. La partie osidique est ici constituée de quatre hexoses.

Tableau 32 : ESI-MS⁺ et ESI-MS/MS des saponosides **Cve15** et **Cve23**.

	[M+Na] ⁺	ESI-MS-MS ([M+Na] ⁺)
Cve15	1143	981 [M+Na-162] ⁺ , 819 [M+Na-2x162] ⁺ , 657 [M+Na-3x162] ⁺
Cve23	1159	997 [M+Na-162] ⁺ , 835 [M+Na-2x162] ⁺ , 673 [M+Na-3x162] ⁺

La nature osidique des quatre systèmes de spins est identique pour les deux composés (tableau 33) et a été déterminée par l'analyse des spectres COSY, TOCSY et ROESY comme étant :

- un β -D-glucose « ester » en position terminale (Glc'),
- un β -D-glucose (Glc) substitué en position C-3',
- un β -D-galactose (Gal) substitué en position C-3'',
- un β -D-galactose (Gal') en position terminale.

Les enchaînements osidiques sont déterminés par l'analyse du spectre HMBC sur lequel sont visualisées des taches de corrélations entre :

- le C-3 de la génine et le H-1' du glucose interne (Glc),
- le C-28 de la génine et le H-1'''' du glucose ester (Glc'),
- le C-3' du glucose interne (Glc) et le H-1'' du galactose interne (Gal),
- le C-3'' du galactose interne (Gal) et le H-1'''' du galactose terminal (Gal').

Le saponoside **Cve15** est la 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Le saponoside **Cve23** est la 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

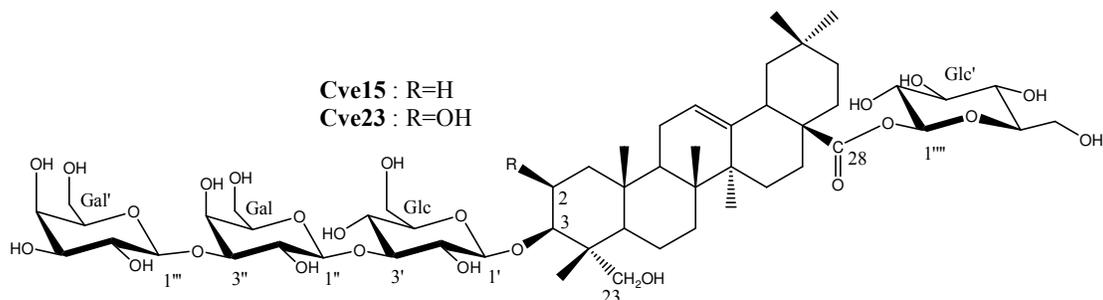


Tableau 33 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cve15** et **Cve23** dans CD₃OD.

	Cve15		Cve23	
	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>m</i> , J Hz)	δ_{C}
Glc-				
1'	4,48 (<i>d</i> , 7,9)	105,3	4,51 (<i>d</i> , 7,9)	105,2
2'	3,40 (<i>dd</i> , 9,1-7,8)	74,9	3,49 (<i>t</i> , 9,1)	74,8
3'	3,58 (<i>t</i> , 9,1)	87,9	3,61 (<i>t</i> , 8,7)	87,7
4'	3,45 (<i>t</i> , 9,5)	69,8	3,52 (<i>t</i> , 8,4)	69,5
5'	3,33 (<i>m</i>)	77,3	3,34 (<i>m</i>)	77,3
6'a	3,72 (<i>dd</i> , 11,4-4,5)	62,6	3,74 (<i>dd</i> , 11,4-5,1)	62,4
6'b	3,86 (<i>dd</i> , 11,4-2,5)		3,83 (<i>dl</i> , 11,4)	
Gal-				
1''	4,60 (<i>d</i> , 7,8)	105,2	4,63 (<i>d</i> , 7,8)	105,2
2''	3,80 (<i>dd</i> , 10,1-7,8)	72,2	3,81 (<i>dd</i> , 9,7-7,6)	72,2
3''	3,68 (<i>dd</i> , 9,8-3,3)	84,5	3,69 (<i>dd</i> , 9,7-3,6)	84,5
4''	4,13 (<i>d</i> , 3,3)	69,8	4,14 (<i>d</i> , 3)	69,8
5''	3,63 (<i>m</i>)	76,7	3,63 (<i>m</i>)	76,7
6''a	3,75 (<i>dd</i> , 11,6-7)	62,6	3,74 (<i>dd</i> , 11,5-5)	62,6
6''b	3,81 (<i>dd</i> , 11,4-7,7)		3,81 (<i>dd</i> , 11,5-7,8)	
Gal'-				
1'''	4,52 (<i>d</i> , 7,6)	106,3	5,53 (<i>d</i> , 7,5)	106,3
2'''	3,64 (<i>dd</i> , 9,6-7,7)	72,9	3,64 (<i>m</i>)	73,0
3'''	3,52 (<i>dd</i> , 9,6-3,4)	74,6	3,52 (<i>dd</i> , 9,5-3,5)	74,6
4'''	3,85 (<i>d</i> , 3,4)	70,2	3,84 (<i>d</i> , 3,7)	70,2
5'''	3,56 (<i>dd</i> , 7,1-5,1)	76,8	3,56 (<i>dd</i> , 7,8-5)	76,8
6'''a	3,71 (<i>m</i>)	62,6	3,73 (<i>dd</i> , 11,3-5)	62,6
6'''b	3,79 (<i>m</i>)		3,81 (<i>dd</i> , 11,3-7,8)	
Glc'-ester				
1''''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7
2''''	3,34 (<i>t</i> , 8,3)	73,9	3,34 (<i>m</i>)	73,9
3''''	3,43 (<i>t</i> , 9,2)	78,3	3,43 (<i>t</i> , 9,1)	78,3
4''''	3,38 (<i>t</i> , 9,4)	71,1	3,37 (<i>t</i> , 9,6)	71,1
5''''	3,37 (<i>m</i>)	78,7	3,36 (<i>m</i>)	78,7
6''''a	3,70 (<i>dd</i> , 12-3,3)	62,4	3,70 (<i>dd</i> , 11,8-5)	62,6
6''''b	3,85 (<i>dd</i> , 11,8-4,7)		3,84 (<i>dl</i> , 11,8)	

III. 3. 1. 9. Saponosides à chaîne tétrasaccharidique de la 1^{ère} série, Cve16, Cve17 et Cve24

L'analyse du spectre de masse obtenu en ESI-MS mode positif du saponoside **Cve24** montre un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 1291. La fragmentation MS^2 de cet ion conduit à la formation d'ions à m/z 1129 et 997 correspondant à $[M+Na-162]^+$ et $[M+Na-162-132]^+$, laissant supposer que ce saponoside possède un pentose supplémentaire comparativement au saponoside précédent **Cve23**.

L'analyse des spectres COSY, TOCSY, ROESY et HSQC J -modulé du saponoside **Cve24**, permet de déterminer la nature osidique des cinq systèmes de spins (tableau 34) :

- un β -D-glucose « ester » en position terminale (Glc'),
- un β -D-glucose (Glc) substitué en position C-3',
- un β -D-galactose (Gal) substitué en position C-3'',
- un β -D-galactose (Gal') substitué en position C-3''',
- un β -D-xylose terminal (Xyl) supplémentaire.

L'analyse du spectre HMBC montre des corrélations $^3J_{H-C}$ entre :

- H-1'''' Xyl terminal/C-3''' Gal',
- H-1''' Gal'/ C-3'' Gal,
- H-1'' Gal/C-3' Glc,
- H-1' Glc/C-3 de la génine,
- H-1'''' Glc'/C-28 de la génine.

Le saponoside **Cve24** est la 3- O -[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucofuranosyl] bayogénine-28- O - β -D-glucofuranosyl ester.

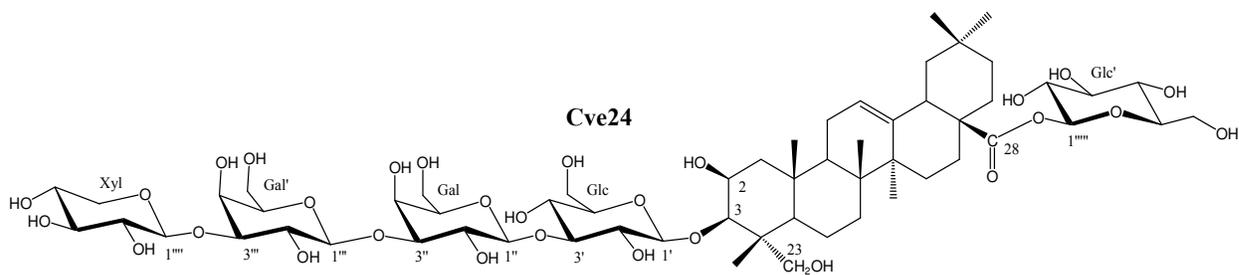


Tableau 34 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cve16**, **Cve17** et **Cve24** dans CD₃OD.

	Cve16		Cve17		Cve24	
	δ_1 (m, J Hz)	δ_c	δ_1 (m, J Hz)	δ_c	δ_1 (m, J Hz)	δ_c
Glc-						
1'	4,48 (d, 7,9)	105,3	4,47 (d, 7,9)	105,3	4,52 (d, 7,9)	105,2
2'	3,40 (dd, 9,1-7,9)	74,9	3,39 (dd, 9,1-7,9)	74,8	3,50 (dd, 9,1-7,2)	74,8
3'	3,59 (t, 8,9)	87,9	3,55 (t, 8,7)	88,2	3,62 (t, 9)	87,7
4'	3,45 (dd, 9,7-8,7)	69,8	3,43 (t, 8,7)	69,8	3,52 (t, 9,3)	69,5
5'	3,32 (m)	77,3	3,33 (m)	77,3	3,34 (m)	77,3
6'a	3,72 (dd, 11,3-5,2)	62,6	3,72 (dd, 11-5)	62,6	3,75 (dd, 12,1-5,1)	62,4
6'b	3,82 (dd, 11,7-2)		3,82 (dd, 11-1,6)		3,84 (dl, 12,0)	
Gal-						
1''	4,61 (d, 7,8)	105,2	4,55 (d, 7,7)	106,6	4,63 (d, 7,8)	105,2
2''	3,81 (dd, 9,4-7,8)	72,3	3,64 (m)	73,8	3,82 (dd, 9,7-8,0)	72,1
3''	3,70 (dd, 9,6-3,2)	84,4	3,62 (m)	75,1	3,71 (dd, 9,6-3,6)	84,4
4''	4,12 (dd, 3,2-1)	69,9	4,07 (sl)	79,9	4,13 (d, 3,6)	69,9
5''	3,64 (m)	76,2	3,64 (m)	76,7	3,63 (m)	76,7
6''a	3,74 (dd, 11,6-6,6)	61,9	3,75 (m)	62,4	3,72 (dd, 11,4-4,6)	62,6
6''b	3,83 (dd, 11,6-6,2)		3,81 (dd, 11,9-5,6)		3,83 (dd, 11,4-3,3)	
Gal'-						
1'''	4,60 (d, 7,7)	105,8	4,55 (d, 7,8)	106,5	4,61 (d, 7,7)	105,9
2'''	3,82 (dd, 9,7-7,7)	72,2	3,79 (dd, 9,6-7,8)	72,1	3,83 (dd, 9,5-7,5)	72,1
3'''	3,67 (dd, 9,6-3,3)	83,8	3,64 (dd, 9,5-3,3)	84,7	3,67 (dd, 9,6- 3,2)	83,9
4'''	4,05 (dd, 3,3-1)	69,6	4,02 (dd, 3,3-1)	69,8	4,05 (d, 3,2)	69,7
5'''	3,60 (m)	76,4	3,57 (m)	76,5	3,59 (m)	76,4
6'''a	3,72 (dd, 12,2-3)	62,4	3,76 (m)	62,4	3,75 (dd, 11,4-4,5)	62,4
6'''b	3,77 (m)		3,80 (m)		3,83 (m)	
Xyl-						
1''''	4,54 (d, 7,2)	106,2	4,51 (d, 7,3)	106,4	4,54 (d, 7,2)	106,3
2''''	3,32 (t, 7,6)	75,2	3,32 (m)	75,2	3,33 (m)	75,2
3''''	3,36 (t, 8,8)	77,5	3,36 (t, 8,9)	77,5	3,36 (t, 7,9)	77,5
4''''	3,52 (ddd, 10,2-8,3-5,5)	71,0	3,51 (ddd, 10,3-8,4-5,3)	71,0	3,52 (m)	71,1
5''''a	3,24 (dd, 11,5-10,3)	66,9	3,23 (dd, 11,5-10,3)	66,9	3,25 (t, 11,5)	66,9
5''''b	3,88 (dd, 11,5-5,4)		3,88 (dd, 11,5-5,4)		3,89 (dd, 11,5-5,3)	
Glc-ester						
1'''''	5,40 (d, 8,1)	95,7	5,40 (d, 8,1)	95,7	5,41 (d, 8,1)	95,7
2'''''	3,35 (m)	73,9	3,34 (m)	73,9	3,34 (m)	73,9
3'''''	3,43 (t, 8,7)	78,3	3,43 (t, 8,7)	78,3	3,43 (t, 8,9)	78,3
4'''''	3,38 (t, 9,5)	71,1	3,38 (t, 8,9)	71,1	3,38 (t, 9,4)	71,0
5'''''	3,37 (m)	78,7	3,37 (m)	78,7	3,37 (m)	78,7
6'''''a	3,71 (dd, 11,6-4,2)	62,5	3,71 (dd, 11,6-4,2)	62,5	3,70 (dd, 11,7-4,6)	62,4
6'''''b	3,81 (dd, 11,9-1,6)		3,81 (dd, 11,9-1,6)		3,84 (dd, 11,7-4,1)	

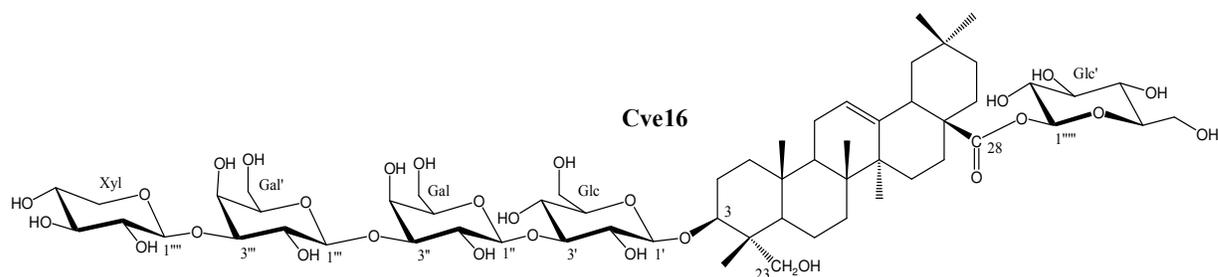
Les deux saponosides **Cve16** et **Cve17** sont isolés sous la forme d'un mélange 50:50 qu'il n'a pas été possible de séparer par CLHP. L'analyse structurale a été réalisée sur ce mélange. Ce sont des bidesmosides de l'hédéragénine.

L'analyse du spectre de masse ESI-MS mode positif du mélange présente un seul ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 1275 suggérant que ces deux composés sont des régioisomères. La partie osidique de chacun des saponosides **Cve16** et **Cve17** est constituée de cinq unités osidiques : quatre hexoses et un pentose, comme pour le saponoside **Cve24**.

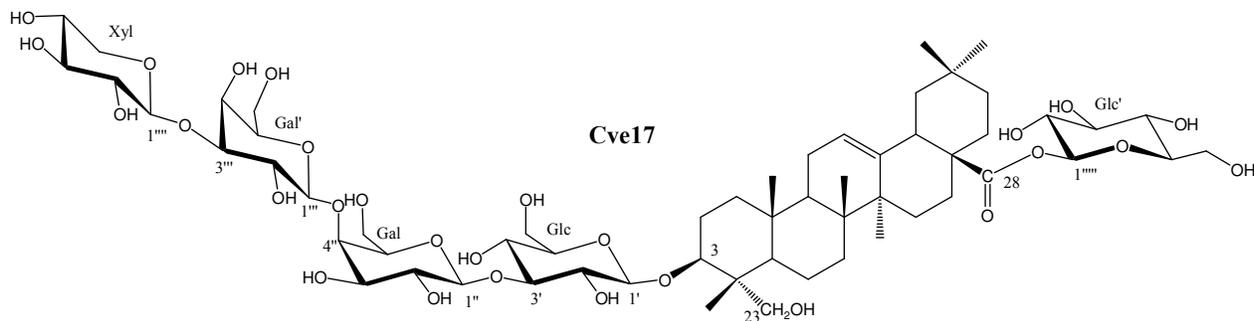
L'analyse des spectres de RMN montre que la partie osidique de **Cve16** est identique point par point à la partie osidique du saponoside **Cve24** (tableau 34). Les spectres COSY, TOCSY et ROESY donnent les mêmes taches de corrélations. Par contre, pour **Cve17**, la partie osidique diffère au niveau du premier galactose (Gal) qui est substitué en position 4'' ($\delta_{C-4''}$ 79,9) au lieu de la position 3''.

Les taches de corrélations observées sur le spectre HMBC du mélange **Cve16** et **Cve17** permettent de déterminer le séquençage des chaînes osidiques des deux saponosides **Cve16** et **Cve17**.

Le saponoside **Cve16** est la 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.



Le saponoside **Cve17** est la 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.



III. 3. 1. 10. Saponosides à chaîne pentasaccharidique de la 1^{ère} série, Cve18, Cve25 et Cve26

Les structures des saponosides **Cve18** et **Cve26**, avec celle du saponoside **Cve8**, sont les plus complexes que nous ayons eu à analyser, car constituées de 6 unités osidiques dont 3 galactoses ce qui engendre comme nous l'avons vu précédemment des superpositions de signaux et des difficultés dans l'analyse spectrale.

L'analyse du spectre de masse ESI-MS en mode négatif du saponoside **Cve18**, donne un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 1413 dont la fragmentation en MS^2 engendre des ions à m/z :

- 1251 $[M-H-162]^-$, correspondant à la perte d'un hexose terminal,
- 1119 $[M-H-162-132]^-$ dû à la perte d'un pentose,
- 957 $[M-H-162-132-162]^-$ dû à la perte d'un deuxième hexose,
- 795 $[M-H-162-132-2x162]^-$ du fait de la perte d'un troisième hexose,
- 633 $[M-H-162-132-3x162]^-$ dû à la perte d'un quatrième hexose et
- 471 $[M-H-162-132-4x162]^-$ du fait de la perte d'un cinquième hexose.

La partie osidique de ce saponoside est donc constituée de cinq hexoses dont un en position terminale et d'un pentose.

La présence des six unités osidiques est confirmée par la présence sur le spectre de RMN 1H de six protons anomériques à 4,47 (d , $J=7,8$ Hz), 4,54 (d , $J=7,6$ Hz), 4,54 (d , $J=7,2$ Hz), 4,55 (d , $J=7,8$ Hz), 4,59 (d , $J=7,7$ Hz) et 5,40 ppm (d , $J=8,1$ Hz) (figure 37). L'expérience HSQC J -modulé permet de détecter leurs carbones respectifs à 105,3, 106,3, 105,6, 106,5, 105,9 et 95,7 ppm (figure 38).

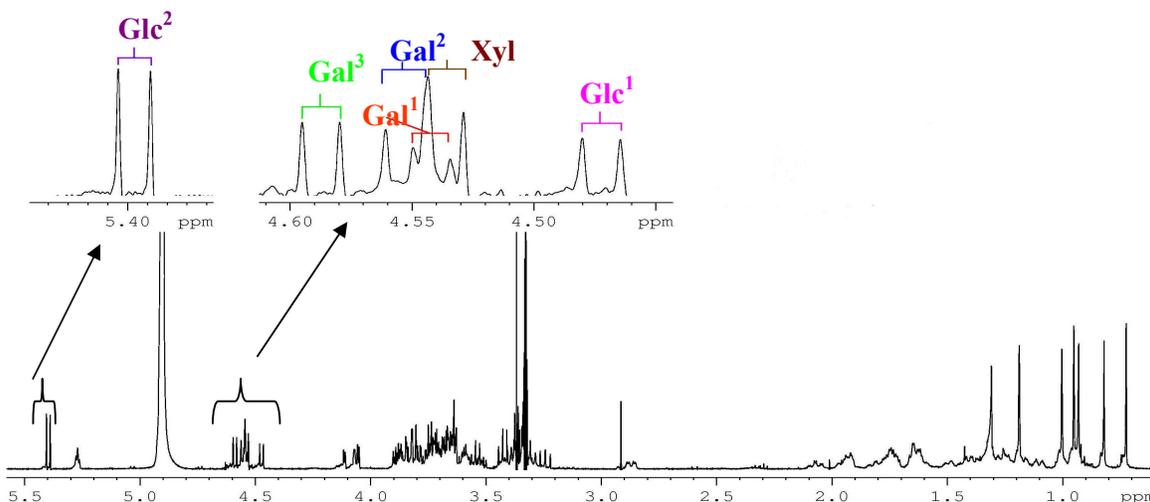


Figure 37 : Spectre RMN 1H du saponoside Cve18 dans CD_3OD

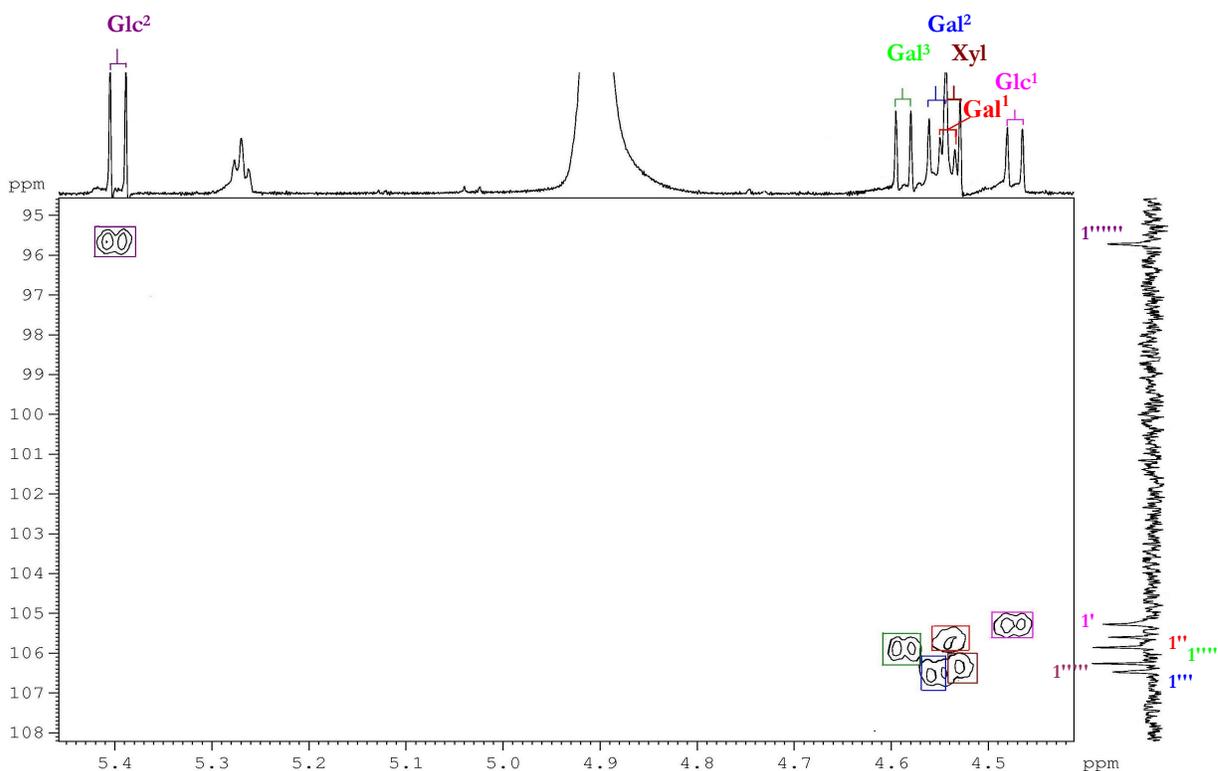


Figure 38 : Spectre HSQC *J*-modulé du saponoside Cve18 dans CD_3OD , zone des anomères.

L'analyse des spectres COSY, TOCSY, ROESY et HSQC *J*-modulé permet d'identifier les six systèmes de spins à :

- deux β -D-glucoses (Glc¹ et Glc²),
- trois β -D-galactoses (Gal¹, Gal², Gal³),
- un β -D-xylose (Xyl) (tableau 35, page 121).

Identification des glucoses :

▪ Identification de Glc¹ :

Le premier β -D-glucose (Glc¹) a été identifié par l'analyse du spectre COSY (figure 39), en partant du proton anomérique résonnant à 4,47 ppm (*d*, $J=7,8$ Hz). Le proton H-2' résonne à 3,39 ppm sous la forme d'un doublet de doublets ($J=9,2-7,9$ Hz) indiquant une position transdiaxiale des protons H-1', H-2' et H-3'. Le proton H-3' est localisé à 3,55 ppm (*t*, $J=9$ Hz). La valeur élevée de cette constante de couplage indique également une position transdiaxiale des protons H-3' et H-4' (3,43 ppm, *t*, $J=9$ Hz). Le proton H-5' (3,32 ppm, *m*) couple avec le proton H-4' et les deux protons H-6'.

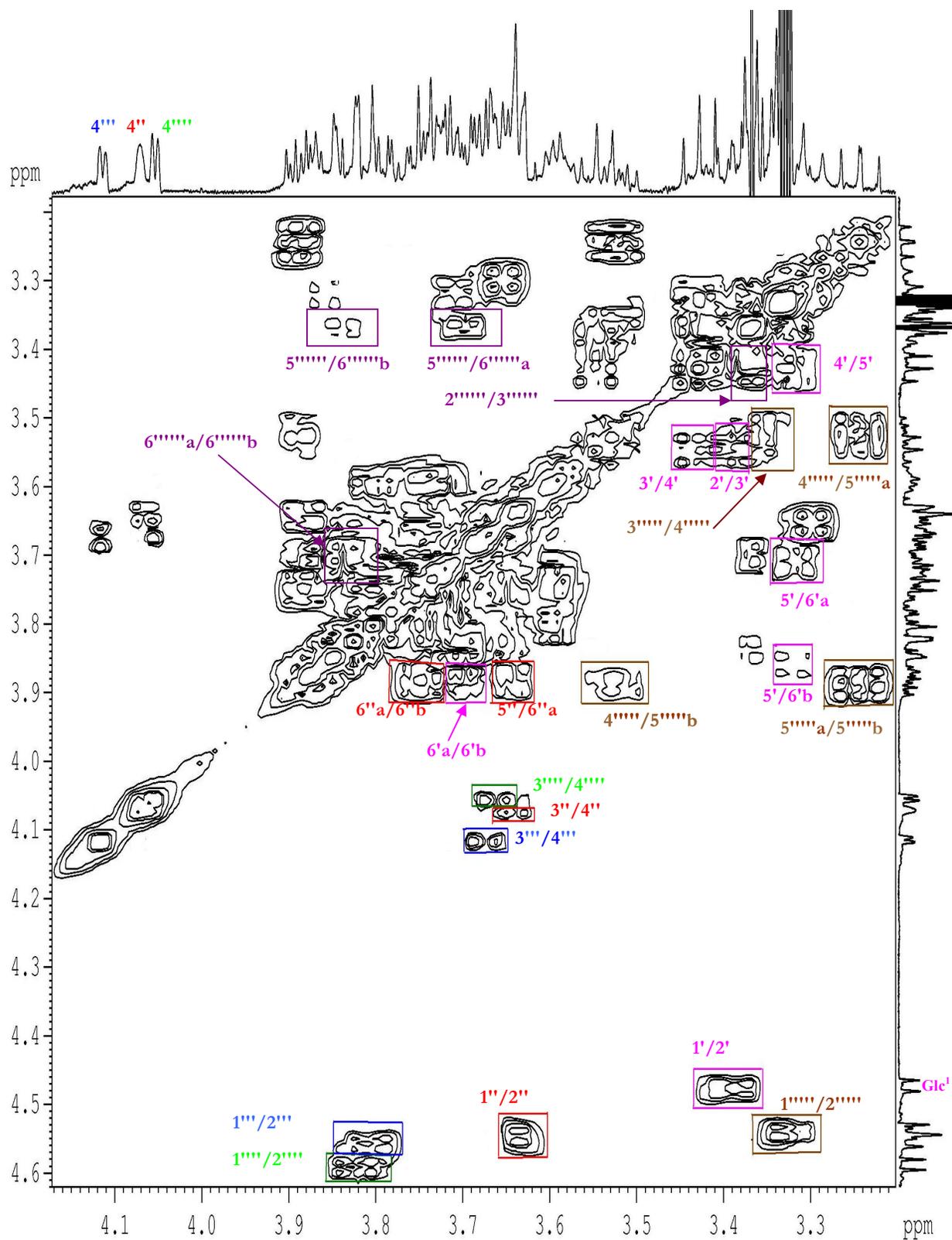


Figure 39 : Spectre COSY du saponide Cve18 dans CD₃OD, zone osidique.

Les déplacements chimiques des carbones attribués à partir de l'analyse du spectre HSQC *J*-modulé du glucose (Glc¹) (figure 40) et les grandes valeurs des constantes de couplage entre tous les protons indiquent qu'il s'agit d'un β -D-glucopyranose^{56, 57}. La grande constante de couplage du proton anomérique ($J=7.8$ Hz) et les effets rOe observés sur le spectre ROESY (figure 41) entre les protons H-1' et H-3' et entre H-1' et H-5' confirment la nature de cet hexose.

Le déblindage du carbone C-3' du glucose à 88,3 ppm suggère une substitution du glucose en cette position.

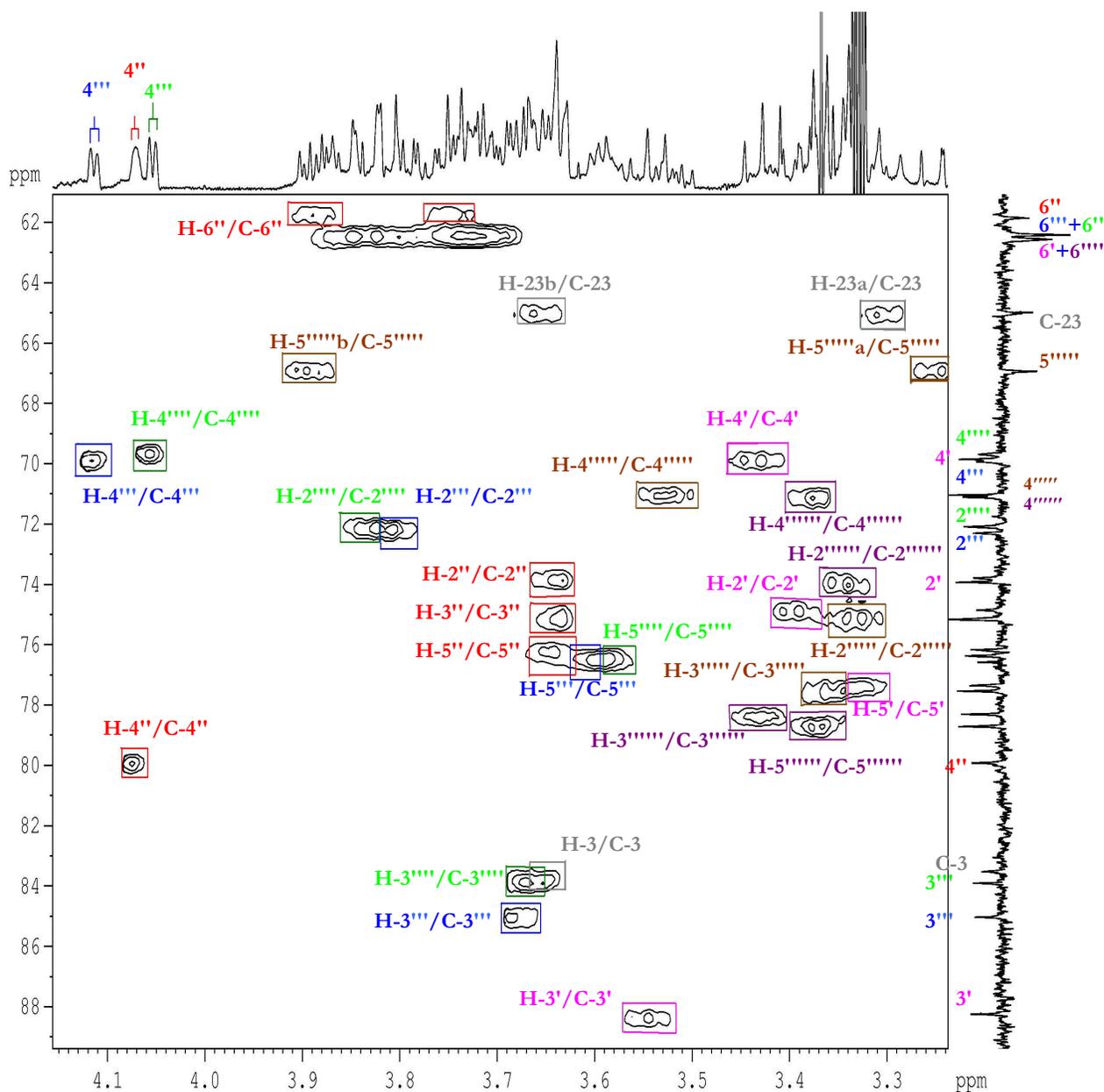


Figure 40 : Spectre HSQC *J*-modulé du saponoside Cve18 dans CD₃OD, zone osidique.

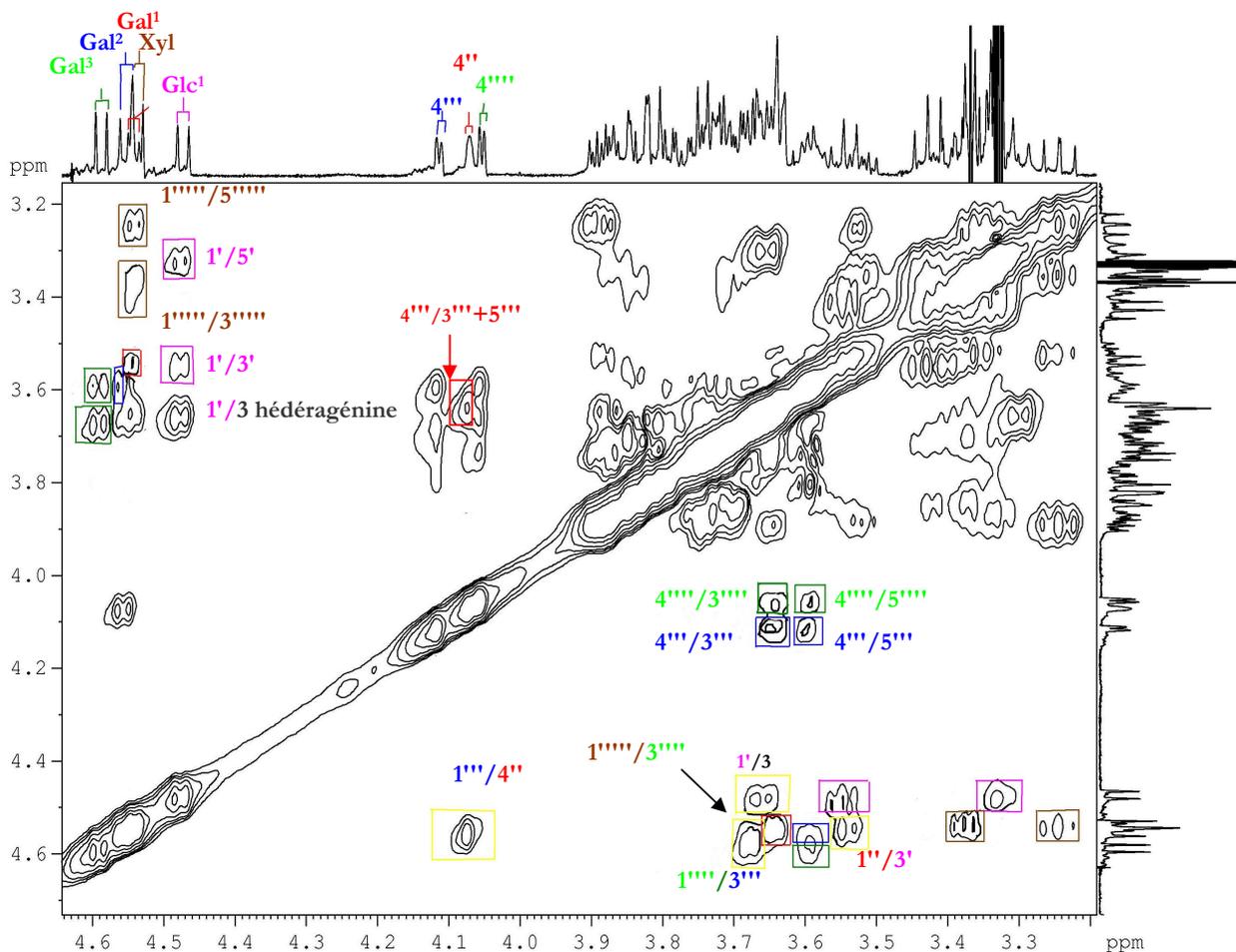


Figure 41 : Spectre ROESY du saponoside Cve18 dans CD₃OD, zone osidique.

■ Identification de Glc² :

Un deuxième β -D-glucose (Glc²) a été identifié en partant du proton anomérique déblindé à 5,40 ppm (d , $J=8,1$ Hz) dont le carbone anomérique correspondant résonne à 95,7 ppm (figures 37 et 38). Les valeurs déblindée du H-1'''' et blindée du C-1'''' sont caractéristiques d'une unité osidique impliquée dans une liaison ester⁶⁷. Ce sucre est lié au carbonyle C-28 de l'hédéragénine. L'analyse des spectres COSY et TOCSY révèle que ce proton anomérique appartient à un système de sept spins couplés (figures 39 et 42). Les constantes vicinales entre les protons H-1'''' (d , $J=8,1$ Hz), H-2'''' (dd , $J=9,2-8,1$ Hz), H-3'''' (t , $J=9,2$ Hz), H-4'''' (t , $J=9,4$ Hz) et H-5'''' , toutes supérieures à 8 Hz, révèlent des positions axiales, caractéristiques d'un β -D-glucose. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de ce sucre attribuées après analyse du spectre HSQC J -modulé (figure 40) sont en accord avec celles d'un β -D-glucose terminal (tableau 35)^{56,57}.

Identification des galactoses :▪ Identification de Gal¹ :

L'analyse du système osidique dont les anomères résonnent à $\delta_{H-1''}$ 4,54 ppm et $\delta_{C-1''}$ 106,3 ppm, a été plus difficile du fait d'un très fort recouvrement des signaux des protons H-2'' (3,63 ppm), H-3'' et H-5'' (3,64 ppm), résonant sous la forme de multiplets. L'analyse des spectres COSY et TOCSY (figures 39 et 42) permet de repérer les signaux des protons H-2'' et H-3'' superposés et le proton H-4'' (*sl*, $w_{1/2}=3$ Hz) résonant à 4,07 ppm en position équatoriale. Le proton H-5'' est localisé à partir de ses corrélations avec le proton H-4'' sur les spectres TOCSY et ROESY (figures 41 et 42) alors que les H-6'' sont localisés à partir de leurs corrélations avec le proton H-5'' sur le spectre COSY. Les taches de corrélation observées sur le spectre HSQC *J*-modulé (figure 40) en face des protons H-2'', H-3'' et H-5'' permettent de positionner les carbones C-2'', C-3'' et C-5'' qui sont alors comparés avec les données de la littérature⁵⁷. Cet hexose est identifié à un β -D-galactose dont le carbone C-4'' se trouve déblindé à 79,9 ppm du fait d'une liaison osidique.

▪ Identification de Gal² :

À partir de l'anomère résonant à δ_H 4,55 ppm et δ_C 106,5 ppm, sont attribués les sept protons d'un deuxième galactose (Gal²). La faible valeur de la constante de couplage entre H3''' et H4''' ($^3J_{H3'''-H4'''}=3,3$ Hz) met en évidence une position équatoriale du proton H-4'''. Le déblindage du carbone C-3''' ($\delta_{C-3'''}=85,0$ ppm) est en faveur d'une substitution en cette position.

▪ Identification de Gal³ :

Un troisième β -D-galactose (Gal³) est identifié en partant de l'anomère situé à $\delta_{H-1''''}$ 4,59 ppm et $\delta_{C-1''''}$ 105,9 ppm. Les déplacements chimiques des protons H-2''''', H-3'''' et H-4'''' sont facilement identifiables à partir des spectres COSY et TOCSY (figures 39 et 42). Comme précédemment, l'attribution des protons H-5'''' et H-6'''' se fait à partir des spectres ROESY et TOCSY (figures 41 et 42). La valeur du déplacement chimique du carbone C-3''''', déblindée à 83,9 ppm, suggère une substitution en cette position (tableau 35).

Identification du xylose :

À partir du dernier proton anomérique résonant à 4,54 ppm ($\delta_{C-1''''}$ 105,6), on dénombre un système de six spins couplés correspondant à un pentose. Le proton H-2'''''' (3,32

ppm, *m*) couple sur le spectre COSY avec le proton H-3'''' (3,35 ppm, *t*, $J=8,2$ Hz). Le proton H-4'''' résonant sous la forme d'un doublet de doublets de doublets à 3,52 ppm, couple avec le proton H-3'''' ($J_{H-4''''-H-3''''}=8,3$ Hz), avec les protons H-5''''ax ($J_{4-5ax}=10,4$ Hz) et H-5''''eq ($J_{4-5eq}=5,4$ Hz) (figure 39). Les valeurs des constantes de couplage $J_{H-1''''-H-2''''}$, $J_{H-2''''-H-3''''}$, $J_{H-3''''-H-4''''}$ et $J_{H-4''''-H-5''''ax}$ sont toutes supérieures ou égales à 7 Hz indiquant une position transdiaxiale de ces protons. Ce pentose est un β -D-xylose, la configuration anomérique β a été confirmée également par l'observation sur le spectre ROESY (figure 41) des effets rOe entre les protons H-1''''/H-3'''' et H-1''''/H-5''''ax. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de ce pentose, attribuées par analyse du spectre HSQC *J*-modulé (figure 40) sont en accord avec celles d'un xylose terminal^{56,57}.

Séquençage des chaînes osidiques :

L'analyse du spectre HMBC de **Cve18** (figure 43), montre des corrélations $^3J_{H-C}$ entre:

- H-1'''' Xyl terminal/C-3'''' Gal³,
- H-1'''' Gal³/C-3'''' Gal²,
- H-1''' Gal²/C-4'' Gal¹,
- H-1'' Gal¹/C-3' Glc¹,
- H-1' Glc¹/C-3 de l'hédéragénine,
- H-1'''''' Glc²/C-28 de l'hédéragénine.

Ces corrélations montrent que la séquence de la chaîne « éther » liée en C-3 de la génine est [β -D-Xyl-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-Glc-] et que la chaîne ester en C-28 est constituée d'une seule unité de β -D-glucose.

La séquence de la chaîne osidique liée en C-3 de la génine est confortée par l'observation des effets rOe sur le spectre ROESY entre les protons (figure 41) :

- H-1' Glc¹/H-3 de l'hédéragénine,
- H-1'' Gal¹/H-3' Glc¹,
- H-1''' Gal²/H-4'' Gal¹,
- H-1'''' Gal³/H-3'''' Gal²,
- H-1'''''' Xyl/H-3'''' Gal³.

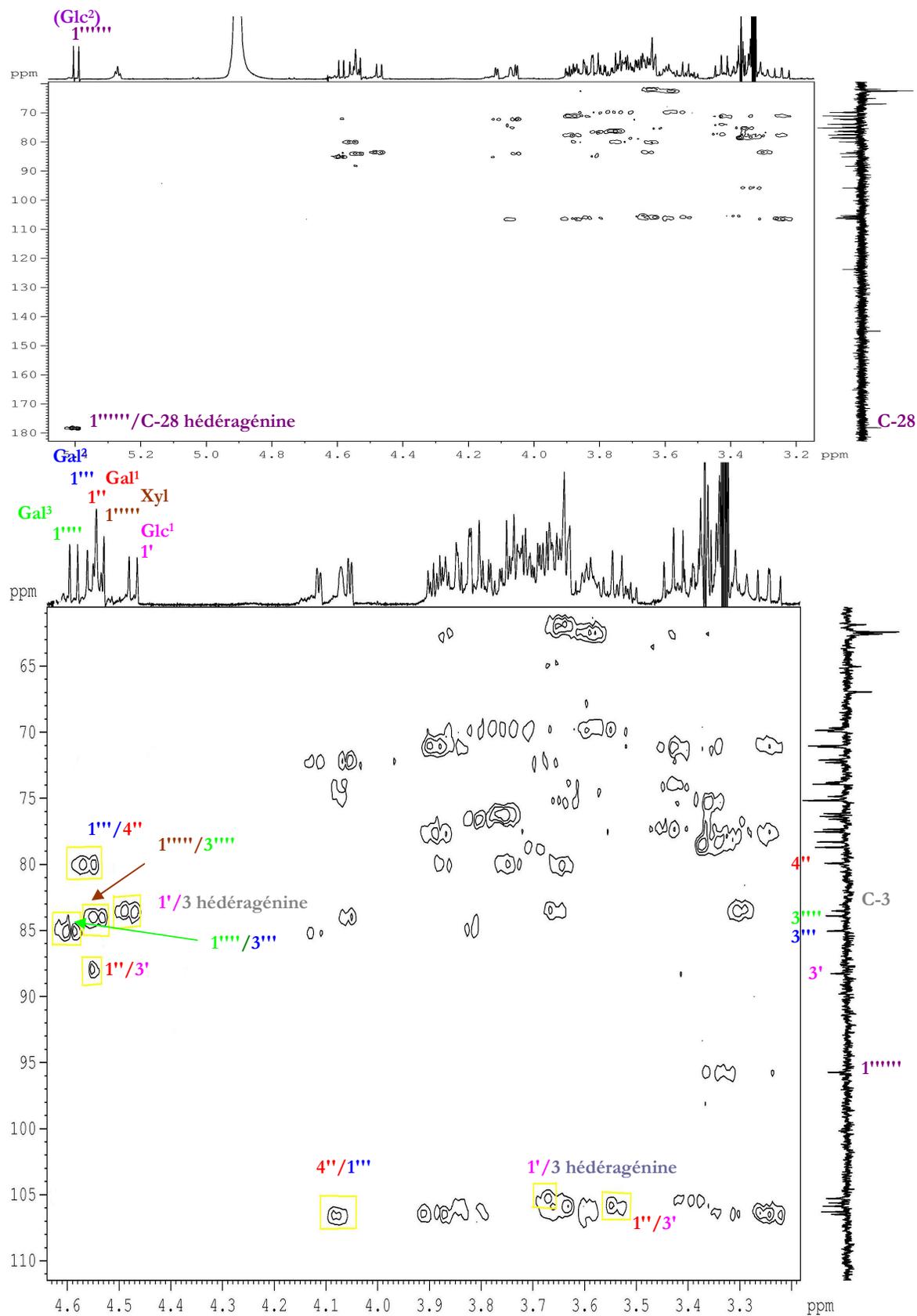
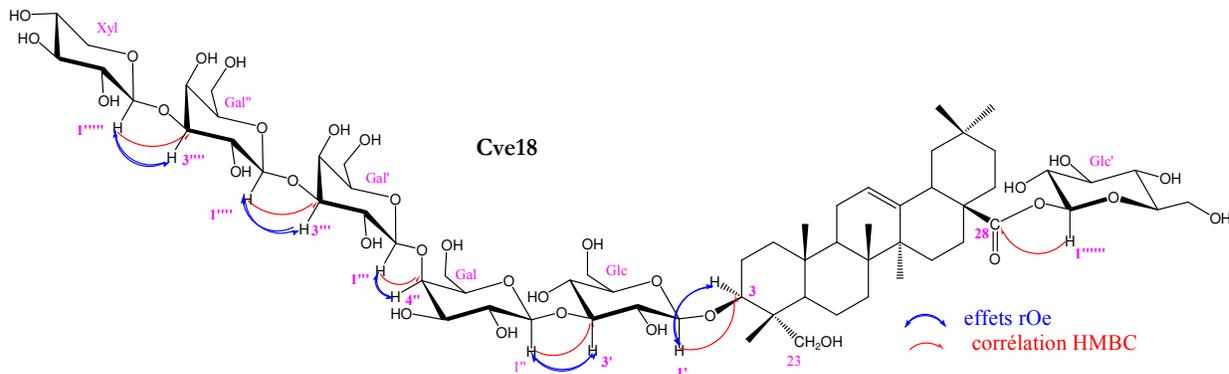


Figure 43 : Spectre HMBC du saponoside Cve18 dans CD₃OD, zone osidique.

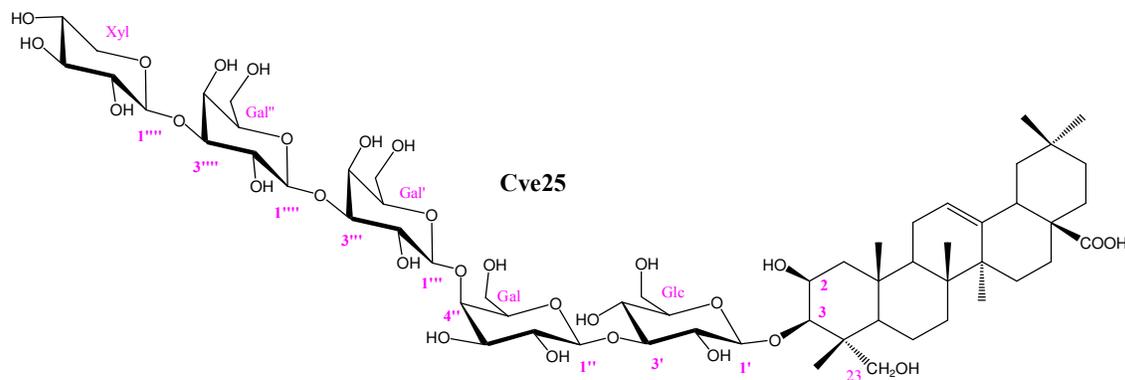
Le saponoside **Cve18** est la 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.



L'analyse des spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif des saponosides à bayogénine **Cve25** et **Cve26** montre respectivement, un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 1267 et 1429, soit une différence de 162 *uma* correspondant à un hexose. La comparaison des spectres de masse et de RMN de ces deux saponosides avec ceux de **Cve18** montre que la chaîne osidique attachée au C-3 de la bayogénine est identique point par point à la partie osidique du saponoside **Cve18** (tableau 35). Le saponoside **Cve25** ne possède pas de glucose ester en position C-28 de la bayogénine.

Les taches de corrélation observées sur les spectres HMBC de **Cve25** et **Cve26** sont identiques à celles décrites pour le séquençage des chaînes osidiques de **Cve18**.

Le saponoside **Cve25** est la 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine.



Le saponoside **Cve26** est la 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

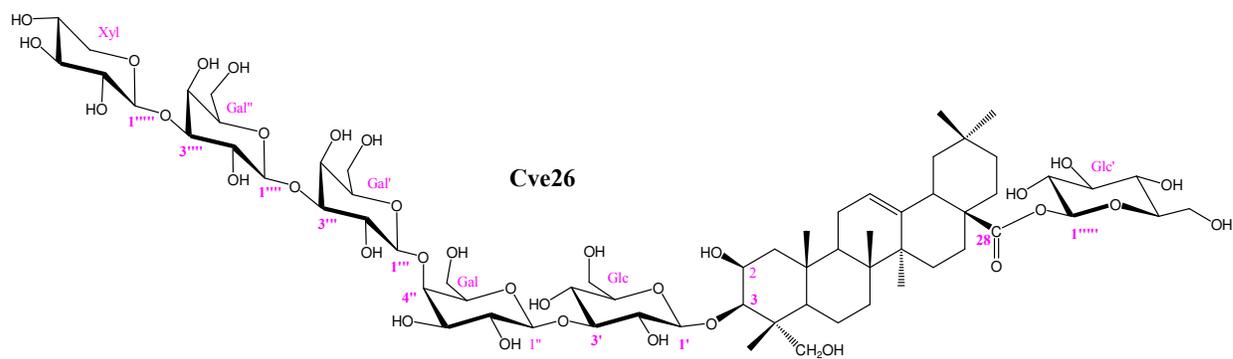


Tableau 35 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cve18**, **Cve25** et **Cve26** dans CD₃OD.

	Cve18		Cve25		Cve26	
	δ_H (<i>m</i> , J Hz)	δ_C	δ_H (<i>m</i> , J Hz)	δ_C	δ_H (<i>m</i> , J Hz)	δ_C
Glc¹-						
1'	4,47 (<i>d</i> , 7,8)	105,3	4,51 (<i>d</i> , 7,8)	105,2	4,51 (<i>d</i> , 7,7)	105,1
2'	3,39 (<i>dd</i> , 9,2-7,9)	74,8	3,49 (<i>dd</i> , 8,8-7,8)	74,7	3,50 (<i>m</i>)	74,7
3'	3,55 (<i>t</i> , 9)	88,3	3,57 (<i>t</i> , 8,9)	88,0	3,57 (<i>t</i> , 8,9)	88,0
4'	3,43 (<i>t</i> , 9)	69,8	3,49 (<i>t</i> , 8,4)	69,4	3,50 (<i>m</i>)	69,5
5'	3,32 (<i>m</i>)	77,3	3,33 (<i>m</i>)	77,3	3,33 (<i>m</i>)	77,3
6'a	3,71 (<i>dd</i> , 12-5)	62,6	3,73 (<i>m</i>)	62,1	3,74 (<i>dd</i> , 11,8-2,9)	62,4
6'b	3,84 (<i>dl</i> , 12)		3,82 (<i>dl</i> , 11,6)		3,83 (<i>dd</i> , 11,8-2,1)	
Gal¹-						
1''	4,54 (<i>d</i> , 7,6)	106,3	4,55 (<i>d</i> , 7,8)	105,6	4,56 (<i>d</i> , 7,8)	105,6
2''	3,63 (<i>m</i>)	73,8	3,63 (<i>m</i>)	73,8	3,64 (<i>m</i>)	73,8
3''	3,64 (<i>m</i>)	75,1	3,63 (<i>m</i>)	75,2	3,63	75,2
4''	4,07 (<i>sl</i> , W _{1/2} =3 Hz)	79,9	4,07 (<i>sl</i> , W _{1/2} =3 Hz))	80,0	4,08 (<i>sl</i> , W _{1/2} =3 Hz)	79,9
5''	3,64 (<i>m</i>)	76,2	3,64 (<i>m</i>)	76,2	3,64 (<i>m</i>)	76,2
6''a	3,75 (<i>dd</i> , 11,6-6,6)	61,8	3,73 (<i>m</i>)	61,8	3,75 (<i>dd</i> , 11,4-6,8)	61,8
6''b	3,88 (<i>dd</i> , 11,6-6,2)		3,88 (<i>dd</i> , 11,4-5,7)		3,89 (<i>dd</i> , 11,4-6,9)	
Gal²-						
1'''	4,55 (<i>d</i> , 7,8)	106,5	4,55 (<i>d</i> , 7,8)	106,5	4,56 (<i>d</i> , 7,7)	106,5
2'''	3,80 (<i>dd</i> , 9,1-7,8)	72,3	3,80 (<i>dd</i> , 9,5-7,8)	72,3	3,81 (<i>dd</i> , 9,5-7,7)	72,3
3'''	3,68 (<i>dd</i> , 9-3)	85,0	3,67 (<i>dd</i> , 9,5-3)	85,0	3,68 (<i>dd</i> , 9,5-3)	85,1
4'''	4,11 (<i>d</i> , 3,3)	69,9	4,10 (<i>dl</i> , 2,7)	69,9	4,12 (<i>d</i> , 2,9)	69,9
5'''	3,59 (<i>m</i>)	76,4	3,59 (<i>m</i>)	76,6	3,60 (<i>m</i>)	76,4
6'''a	3,75 (<i>m</i>)	62,6	3,75 (<i>dd</i> , 12,1-3,6)	62,4	3,74 (<i>m</i>)	62,5
6'''b	3,80 (<i>m</i>)		3,80 (<i>dd</i> , 11,4-4,6)		3,80 (<i>dd</i> , 12,5-5,6)	
Gal³-						
1''''	4,59 (<i>d</i> , 7,7)	105,9	4,58 (<i>d</i> , 7,7)	105,9	4,59 (<i>d</i> , 7,7)	105,9
2''''	3,82 (<i>dd</i> , 9,4-7,8)	72,1	3,82 (<i>dd</i> , 9,2-7,7)	72,1	3,82 (<i>dd</i> , 9,4-7,7)	72,1
3''''	3,62 (<i>dd</i> , 9,7-3,1)	83,9	3,66 (<i>dd</i> , 9,2-3,4)	83,9	3,66 (<i>dd</i> , 9,8-3,3)	83,9
4''''	4,05 (<i>d</i> , 3,2)	69,7	4,05 (<i>d</i> , 2,6)	69,7	4,06 (<i>d</i> , 3)	69,7
5''''	3,59 (<i>ddm</i> , 7,5-5,1)	76,6	3,58 (<i>m</i>)	76,6	3,59 (<i>m</i>)	76,6
6''''a	3,71 (<i>dd</i> , 11,5-5,1)	62,4	3,71 (<i>m</i>)	62,4	3,71 (<i>dd</i> , 11,8-6,6)	62,4
6''''b	3,83 (<i>m</i>)		3,82 (<i>m</i>)		3,82 (<i>dd</i> , 11,8-5,9)	
Xyl-						
1'''''	4,54 (<i>d</i> , 7,2)	105,6	4,53 (<i>d</i> , 7,3)	106,3	4,54 (<i>d</i> , 7,1)	106,3
2'''''	3,32 (<i>m</i>)	75,1	3,33 (<i>m</i>)	75,2	3,33 (<i>m</i>)	75,2
3'''''	3,36 (<i>t</i> , 8,2)	77,5	3,36 (<i>m</i>)	77,5	3,36 (<i>t</i> , 8,5)	77,5
4'''''	3,52 (<i>ddd</i> , 10,4-8,3-5,4)	71,0	3,53 (<i>m</i>)	71,0	3,52 (<i>m</i>)	71,0
5'''''a	3,24 (<i>dd</i> , 11,4-10,4)	66,9	3,24 (<i>dd</i> , 11,4-10,3)	66,9	3,24 (<i>dd</i> , 11,3-10,1)	66,9
5'''''b	3,89 (<i>dd</i> , 11,4-5,2)		3,89 (<i>dd</i> , 11,4-5,5)		3,89 (<i>dd</i> , 11,4-5,2)	
Glc²-						
1''''''	5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7			5,40 (<i>d</i> , 8,1)	95,7
2''''''	3,34 (<i>dd</i> , 9,2-8,1)	73,9			3,34 (<i>t</i> , 8,2)	73,9
3''''''	3,43 (<i>t</i> , 9,2)	78,3			3,43 (<i>dd</i> , 9,1-8,7)	78,3
4''''''	3,38 (<i>t</i> , 9,4)	71,1			3,38 (<i>t</i> , 9,3)	71,1
5''''''	3,37 (<i>m</i>)	78,7			3,36 (<i>m</i>)	78,7
6''''''a	3,71 (<i>dd</i> , 11,9-4,5)	62,4			3,71 (<i>dd</i> , 12,2-3,1)	62,4
6''''''b	3,83 (<i>dd</i> , 12,5-1,6)				3,81 (<i>dd</i> , 12,5-1,6)	

III. 3. 2. Saponosides des écorces de tronc (Cvt)

Onze composés ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique des écorces de tronc de *C. villosum*, cinq dérivés de l'acide ellagique (Cvt1 à Cvt5) et six saponosides (Cvt6 à Cvt11) possédant la bayogénine et l'hédéragénine comme génines (figure 44). Les saponosides Cvt9 et Cvt10 sont de structures nouvelles alors que les autres sont communs avec *Caryocar glabrum*, Cvt6 (=Cgp14) et Cvt7 (=Cgp18) isolés des fruits et Cvt8 (=Cgt10) et Cvt11 (=Cgt11) isolés des écorces de tronc.

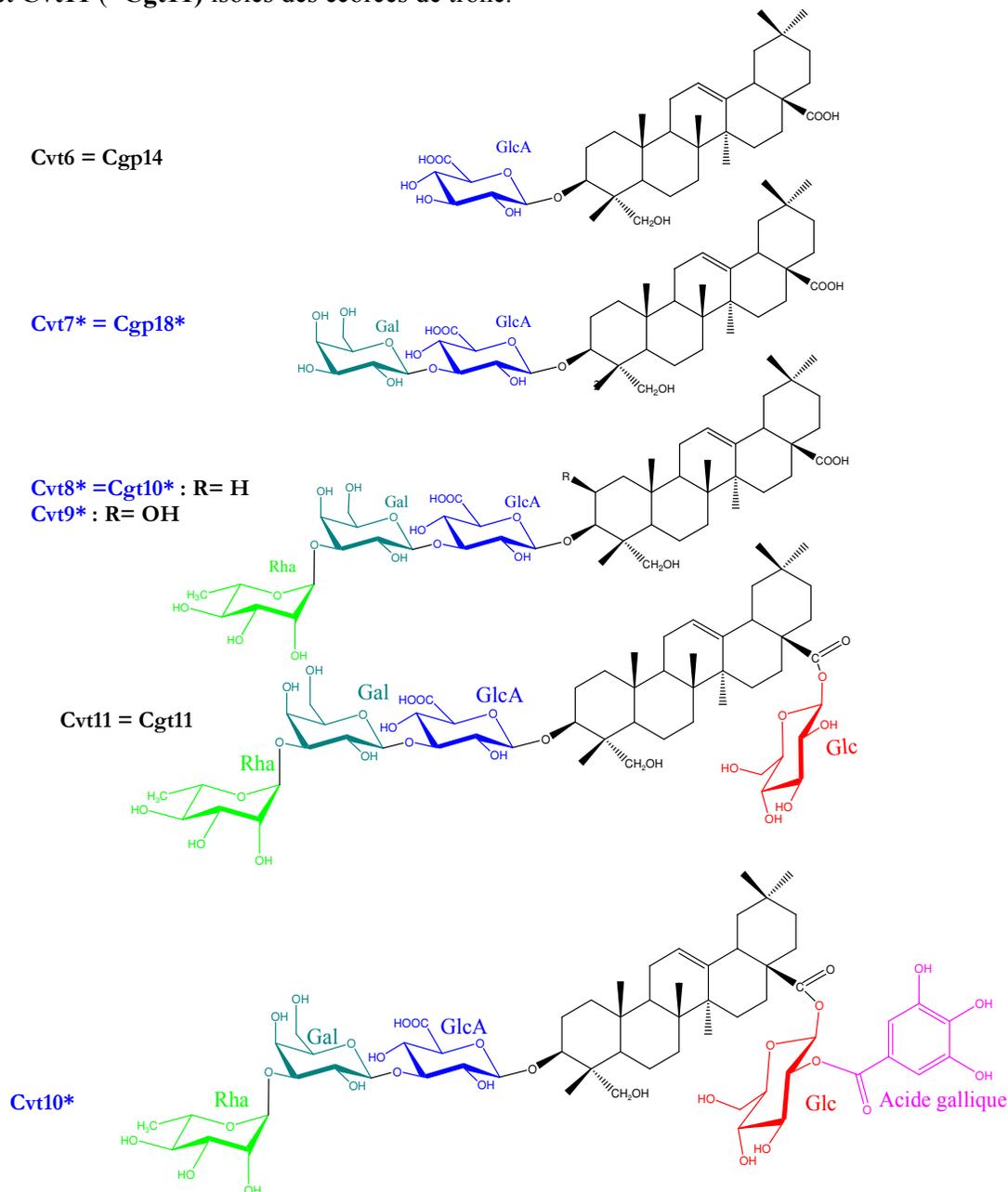
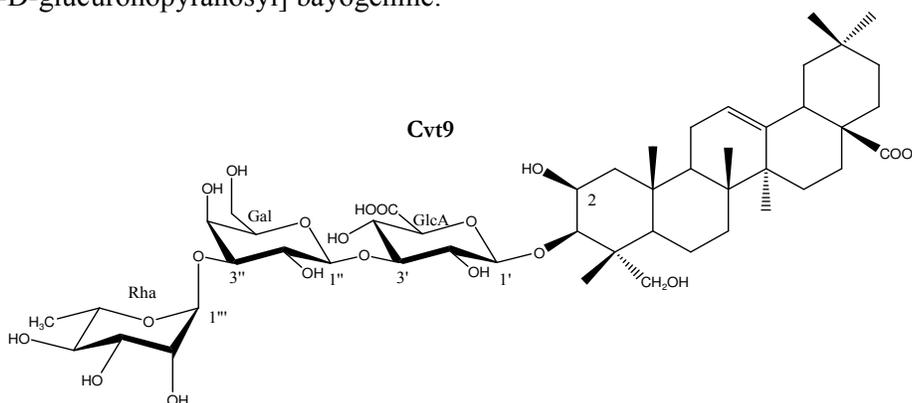


Figure 44 : Structures des saponosides isolés des écorces de tronc de *Caryocar villosum*.
* Saponosides nouvellement décrits.

III. 3. 2. 1. Saponoside Cvt9

L'analyse des spectres de RMN (tableau 36) et de masse, comme elle a été décrite et illustrée précédemment pour les autres saponosides, a permis de déterminer la structure du saponoside **Cvt9** comme étant la 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] bayogénine.



III. 3. 2. 2. Saponoside Cvt10

Le spectre de masse obtenu en ESI-MS mode positif du saponoside **Cvt10** montre un ion pseudomoléculaire $[M-H+2Na]^+$ à m/z 1315.

Sur le spectre RMN 1H du saponoside **Cvt10**, sont repérés, hormis les signaux caractéristiques de l'hédéragénine, quatre protons anomériques résonant à 4,52 (d , $J=7,9$ Hz), 4,58 (d , $J=7,8$ Hz), 5,08 (d , $J=1,4$ Hz) et 5,61 ppm (d , $J=8,4$ Hz), ainsi qu'un singulet intégrant pour deux protons à 7,11 ppm dans la zone des protons aromatiques.

L'analyse des spectres COSY, TOCSY, ROESY et HSQC J -modulé permet d'identifier (tableau 36) :

- un acide β -D-glucuronique (δ_H 4,52) substitué en position C-3',
- un β -D-galactose (δ_H 4,58) substitué en position C-3'',
- un α -L-rhamnose (δ_H 5,08) en position terminale,
- un β -D-glucose engagé dans une liaison ester avec le carbonyle C-28 de l'hédéragénine (δ_H 5,61 ppm, δ_C 93,6 ppm). Le fort déblindage du proton H-2''' (δ_H 5,11 ppm) et le blindage des deux carbones voisins C-1''' et C-3''' (effet γ blindant) suggèrent que l'hydroxyle en position 2 est engagé dans une liaison ester (tableau 36).

Sur le spectre HSQC J -modulé, le singulet intégrant pour deux protons aromatiques résonant à 7,11 ppm corrèle avec deux carbones aromatiques (CH) superposés à 110,6 ppm.

Sur le spectre HMBC, les deux protons aromatiques corrèlent avec sept carbones (figure 45) :

- un carbonyle d'ester à 165,4 ppm (C-7'''''),
- un carbone aromatique quaternaire à 120,8 ppm (C-1'''''),
- trois carbones aromatiques quaternaires oxygénés à 140,2, 140,3 et 146,5 ppm (C-3''''', C-5''''', et C-4'''''),
- et les deux CH aromatiques repérés à l'aide du spectre HSQC *J*-modulé (C-2''''', C-6''''').

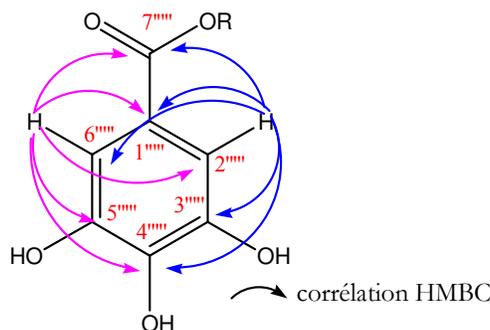


Figure 45 : Corrélations HMBC de l'acide gallique dans le saponoside Cvt10.

Nous sommes en présence d'un acide benzoïque possédant trois fonctions hydroxyles. Le fait que les deux CH et les deux carbones quaternaires oxygénés soient équivalents deux à deux, indique une symétrie sur le cycle aromatique. Les deux protons aromatiques résonants à 7,11 ppm peuvent être positionnés sur le noyau aromatique en positions 2'''' et 6'''' ou en 3'''' et 5'''''. La corrélation observée sur le spectre HMBC, entre les deux protons aromatiques et le carbonyle à 165,4 ppm font placer ces protons en position 2'''' et 6'''' de l'acide benzoïque. Cet acide est l'acide gallique.

Sur le spectre HMBC, sont visualisées également des corrélations $^3J_{H-C}$ entre:

- H-1''' Rha/C-3'' Gal,
- H-1'' Gal/C-3' GlcA,
- H-1' GlcA/C-3 hédéragénine,
- H-1'''' Glc/C-28 hédéragénine,
- H-2''' du glucose et le carbonyle C-7'''' de l'acide gallique.

Sur le spectre ROESY, des effets rOe ont été visualisés entre les protons H-1''' Rha/H-3'' Gal, H-1'' Gal/H-3' GlcA et H-1' GlcA/H-3 de la génine.

La structure du saponoside **Cvt10** est la 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine-28-*O*-[2-galloyl- β -D-glucopyranosyl] ester.

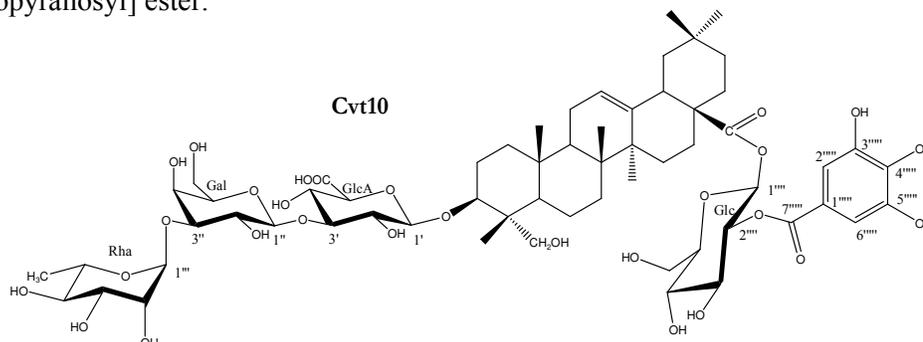


Tableau 36 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cvt9** et **Cvt10** dans CD_3OD .

	Cvt9		Cvt10	
	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c	δ_1 (<i>m</i> , J Hz)	δ_c
GlcA-				
1'	4,59 (<i>d</i> , 7,8)	105,5	4,52 (<i>d</i> , 7,9)	105,6
2'	3,55 (<i>dd</i> , 8,5-7,7)	74,5	3,43 (<i>t</i> , 8)	74,6
3'	3,68 (<i>t</i> , 8,3)	86,5	3,63 (<i>m</i>)	86,7
4'	3,65 (<i>m</i>)	71,8	3,62 (<i>t</i> , 9)	71,8
5'	3,96 (<i>d</i> , 9,5)	76,2	3,86 (<i>m</i>)	77,1
6'	-	172,0	-	172,5
Gal-				
1''	4,60 (<i>d</i> , 7,8)	105,6	4,58 (<i>d</i> , 7,8)	105,5
2''	3,76 (<i>dd</i> , 9,8-7,8)	72,7	3,74 (<i>dd</i> , 9,8-7,8)	72,6
3''	3,61 (<i>dd</i> , 9,8-3,1)	81,2	3,60 (<i>dd</i> , 9,8-3,1)	81,2
4''	3,91 (<i>d</i> , 3,1)	70,1	3,91 (<i>d</i> , 3,1)	70,1
5''	3,60 (<i>m</i>)	77,1	3,60 (<i>m</i>)	77,1
6''a	3,70 (<i>dd</i> , 11,5-4,7)	62,5	3,69 (<i>dd</i> , 11,4-4,4)	62,5
6''b	3,79 (<i>dd</i> , 11,5-7,5)		3,79 (<i>dd</i> , 11,4-5,8)	
Rha-				
1'''	5,08 (<i>d</i> , 1,7)	103,8	5,08 (<i>d</i> , 1,4)	103,8
2'''	3,99 (<i>dd</i> , 3,4-1,7)	72,1	3,99 (<i>dd</i> , 2,9-1,4)	72,1
3'''	3,79 (<i>dd</i> , 9,5-3,4)	72,1	3,79 (<i>dd</i> , 9,3-3,3)	72,1
4'''	3,42 (<i>t</i> , 9,5)	74,0	3,42 (<i>t</i> , 9,4)	74,0
5'''	3,78 (<i>m</i>)	70,2	3,78 (<i>m</i>)	70,2
6'''	1,28 (<i>d</i> , 6,3)	18,0	1,28 (<i>d</i> , 6,2)	18,0
Glc-ester				
1''''			5,61 (<i>d</i> , 8,4)	93,6
2''''			5,11 (<i>t</i> , 8,4)	73,6
3''''			3,74 (<i>t</i> , 9,2)	76,1
4''''			3,51 (<i>d</i> , 9,2)	71,2
5''''			3,47 (<i>ddd</i> , 8,7-5,1-1,9)	78,9
6''''a			3,76 (<i>dd</i> , 12,2-5,1)	62,2
6''''b			3,89 (<i>dd</i> , 12,2-1,9)	
Acide gallique				
1'''''			-	120,8
2'''''			7,11 (<i>s</i>)	110,6
3'''''			-	146,5
4'''''			-	140,3
5'''''			-	146,5
6'''''			7,11 (<i>s</i>)	110,6
7'''''			-	165,4

III. 4. Conclusion

Les fruits des deux espèces de *Caryocar* étudiées sont plus riches en saponosides que les écorces de tronc. La composition chimique de la pulpe et de l'enveloppe des fruits des deux espèces a été analysée par CLHP analytique et par CCM. Cette analyse montre que la pulpe et l'enveloppe des fruits de chaque espèce sont qualitativement identiques mais quantitativement différentes.

L'extrait méthanolique de la **pulpe des fruits de *Caryocar glabrum*** s'est avéré être un mélange complexe de glycosides de l'acide oléanolique, de l'acide 2 β -hydroxyoléanolique, de l'hédéragénine, de la bayogénine et de l'acide gypsogénique.

La purification de ce mélange complexe a pu être possible grâce à l'utilisation en alternance des chromatographies sur gel de silice en phase normale et sur silice greffé C₁₈. En effet, une filtration sur silice greffée C₁₈ permet une première séparation en fonction de la polarité de la génine, puis une seconde purification cette fois sur silice normale permet de séparer les saponosides en fonction du nombre et de la nature des sucres, les saponosides à acide glucuronique étant les plus polaires.

Trente saponosides ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits de *C. glabrum* dont vingt-trois monodesmosides et seulement sept bidesmosides. Parmi les saponosides isolés, vingt-et-un possèdent des structures nouvelles. L'analyse structurale de ces saponosides n'a pas présenté de difficultés car ce sont des molécules de structures peu complexes dont la chaîne osidique liée en position 3 de la génine comporte de une à trois unités, disposées de façon linéaire. La chaîne en position 28, lorsqu'elle existe, est constituée d'une seule unité osidique. Ainsi, neuf enchaînements osidiques ont été identifiés dont sept monodesmosidiques et deux bidesmosidiques.

Ces saponosides peuvent être classés en deux séries selon la nature du sucre directement lié en position 3 de la génine : un β -D-glucose (série **1**) ou un acide β -D-glucuronique (série **2**). Chacune des deux séries comprend des mono-, di- ou tri-glycosides. Pour les saponosides di-saccharidiques, le second sucre de la chaîne est toujours un β -D-galactose. Pour les saponosides tri-saccharidiques, le dernier sucre de la chaîne est soit un second β -D-galactose, soit un β -D-xylose. Dans tous les saponosides, les liaisons interosidiques ont lieu avec les hydroxyles osidiques en position 3.

Cinq saponosides de la série **2** (**Cgp26** à **Cgp30**) possèdent un acide glucuronique estérifié par un méthyle. Ceux-ci sont présents dans l'extrait méthanolique de départ et ne sont pas des artéfacts formés au cours des étapes de purification.

Les **écorces de tronc de *Caryocar glabrum*** sont beaucoup moins riches en saponosides que les fruits. Seulement deux saponosides sont présents dans l'extrait, **Cgt10** renfermant une chaîne triosidique [α -L-Rha-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-GlcA-] en position 3 de l'hédéragénine, et son bidesmoside correspondant **Cgt11** avec un β -D-glucose en C-28 de la génine.

Les **fruits de *Caryocar villosum*** sont beaucoup moins riches en saponosides que les fruits de *C. glabrum* (rdt : 0,5% contre 57%). Vingt-six saponosides ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique de l'enveloppe des fruits de *C. villosum* dont vingt-et-un sont de structures nouvelles. Quatre des cinq génines caractérisées chez *C. glabrum* sont retrouvées : l'acide oléanolique, l'acide 2 β -hydroxyoléanolique, l'hédéragénine et la bayogénine.

Ce sont des saponosides essentiellement bidesmosidiques à l'inverse des saponosides isolés des fruits de *C. glabrum*. Seulement six parmi les vingt-six saponosides isolés sont des monodesmosides. Six saponosides sont communs entre les deux espèces : **Cve3=Cgp23**, **Cve9=Cgp1**, **Cve10=Cgp4**, **Cve12=Cgp10**, **Cve20=Cgp5** et **Cve21=Cgp11**.

Contrairement aux saponosides de *Caryocar glabrum*, l'analyse structurale a été plus délicate puisque les saponosides sont ici de structures plus complexes avec une chaîne osidique liée à la génine en position 3 comportant de une à cinq unités osidiques, disposées de façon linéaire. Comme pour les saponosides bidesmosidiques de *C. glabrum*, la chaîne osidique en C-28 ne comporte qu'un seul sucre, un β -D-glucose.

Ainsi, 16 enchaînements osidiques ont été élucidés, 5 monodesmosidiques et 11 bidesmosidiques. Les deux séries d'enchaînements rencontrés chez *C. glabrum*, les glucosides (série **1**) et les glucuronides (série **2**), sont retrouvés, mais seuls les saponosides à acide 2 β -hydroxyoléanolique sont des glucuronides (série **2**). Les glucosides (série **1**) sont retrouvés uniquement dans les saponosides à hédéragénine et bayogénine. En plus de ces deux séries, un nouvel enchaînement est rencontré dans lequel un galactose est lié en position 3 de la génine (série **3**). Ces galactosides sont substitués en position 2 par un glucose [β -D-Glc-(1→2)- β -D-Gal-].

La purification de l'ensemble de ces saponosides a posé plus de difficultés à cause de leurs polarités voisines et surtout pour les saponosides régioisomères qui ne diffèrent que par le type d'enchaînement [...-Gal-(1→3)-Gal-(1→3)-Glc- ou ...-Gal-(1→4)-Gal-(1→3)-Glc-]. La séparation des deux saponosides bidesmosidiques **Cve16** et **Cve17** possédant ce type d'enchaînement n'a pu être finalisée et l'élucidation structurale a été effectuée sur le mélange.

La principale difficulté rencontrée au niveau de l'élucidation structurale a résidé dans l'attribution des signaux des unités galactoses. En effet, lorsque les chaînes (tétra- et pentasaccharides) renferment deux à trois unités galactoses successives dont deux au moins sont substitués en position 3, il devient difficile d'attribuer les paires de protons H-5 et H-6 pour chacun des galactoses, mais cependant les expériences TOCSY et ROESY permettent de résoudre ce problème.

L'étude des **écorces de tronc de *Caryocar villosum*** a conduit à l'isolement de six saponosides possédant la bayogénine et l'hédéragénine comme génine. Les saponosides **Cvt9** et **Cvt10** sont de structures nouvelles alors que les autres sont communs avec *C. glabrum*, **Cvt6=Cgp14**, **Cvt7=Cgp18**, **Cvt8=Cgt10** et **Cvt11=Cgt11**. L'enchaînement [α -L-Rha-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-GlcA-] mis en évidence dans les saponosides des écorces de tronc de *Caryocar glabrum* est retrouvé.

Dans les saponosides des **fruits de *C. glabrum***, la formation biogénétique de la chaîne saccharidique en position 3 de la génine serait probablement réalisée par l'addition séquentielle d'unité osidique à la génine. La première étape serait la glycosylation en C-3 de la génine par un glucose ou un acide glucuronique pour donner les monoglucosides (**série 1**) ou les monoglucuronides (**série 2**) (schéma 1). La glycosylation, par un galactose, en C-3' de cette unité osidique conduit à la formation des saponosides disaccharidiques. A ce stade de la biogénèse, une glycosylation peut se produire soit par une estérification du carbonyle C-28 par un glucose pour donner les bidesmosides correspondants, soit par une prolongation de la chaîne osidique en ajoutant un galactose ou un xylose en C-3'' du galactose pour donner les trisaccharides.

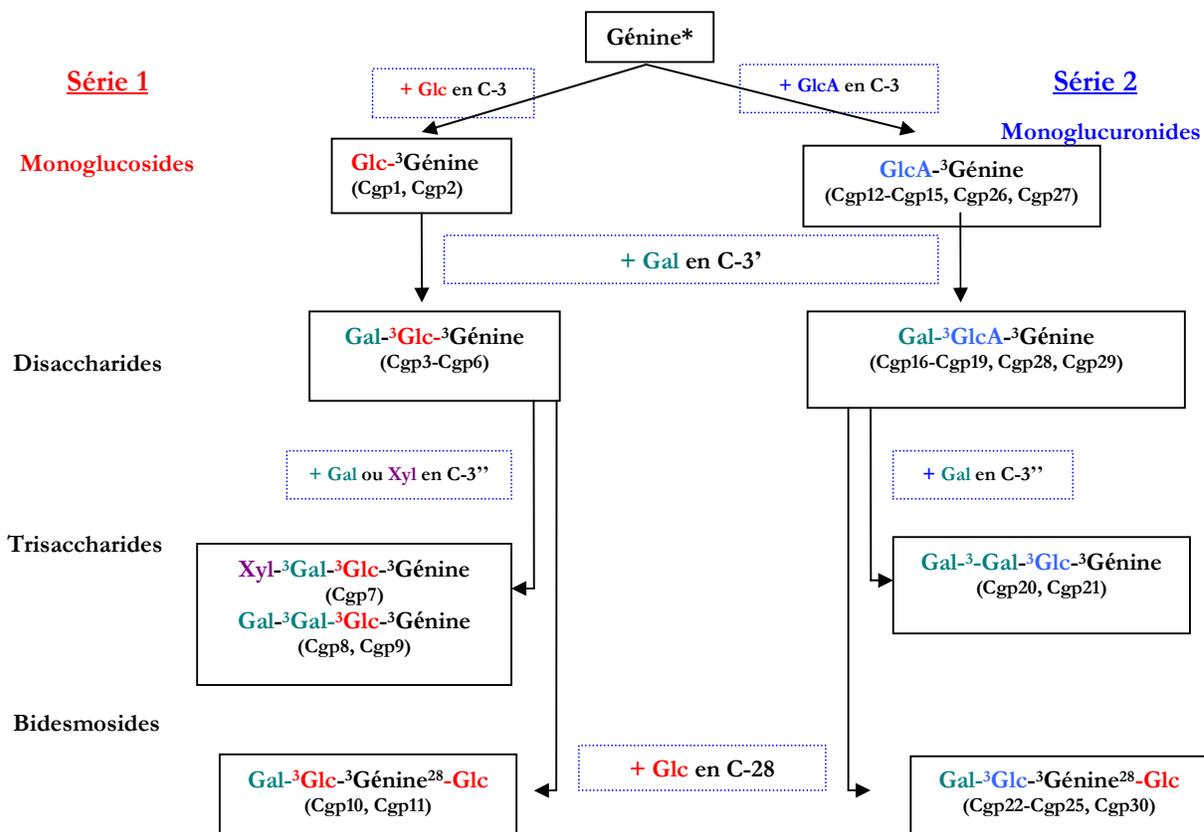


Schéma 1

* Génine = acide oléanolique, 2 β -hydroxyoléanolique, hédéragénine, bayogénine ou acide gypsogénique.

Les mêmes voies biogénétiques de glycosylation sont transposables aux saponosides des **fruits de *C. villosum*** et ce, bien que le monoglucoside ou le monoglucuronide de départ n'ait pas été toujours détecté. Le xylose est toujours en position terminale dans les chaînes tri- à penta-saccharidiques (à l'exception de **Cve15** et **Cve23**), laissant supposer que l'incorporation des unités osidiques se fait de façon progressive en terminant par le xylose. Les glucosides à hédéragénine (**série 1**), ont comme précurseur biogénétique le monoglucoside **Cve9** (schéma 2). Une glycosylation peut se produire soit par une estérification du carbonyle C-28 par un glucose pour donner le bidesmoside **Cve11**, soit par une prolongation de la chaîne osidique en C-3 en ajoutant un galactose en C-3' du glucose pour donner le disaccharide **Cve10**. Le bidesmoside **Cve12**, correspondant au disaccharide **Cve10** est le résultat soit d'une glycosylation par un galactose du bidesmoside **Cve11**, soit d'une esterification par un glucose de **Cve10** (schéma 2). A ce stade de la biogénèse, deux

voies sont possibles : soit la prolongation à nouveau de cette chaîne en C-3'' (voie A), soit en C-4'' (voie B) du galactose terminal.

Voie A :

Cette voie consiste en l'addition successive de une, deux et trois unités osidiques en C-3'' du galactose. Ainsi, l'addition d'un xylose donne **Cve13** alors que l'addition d'un galactose donne **Cve15**. L'addition d'un xylose en C-3''' du dernier galactose de **Cve15** donne **Cve16** (schéma 2).

Voie B :

L'addition d'un disaccharide (Xyl-³Gal-) donne le saponoside **Cve17** alors que l'addition d'un trisaccharide (Xyl-³Gal-³Gal-) en C-4'' donne **Cve18** (schéma 2).

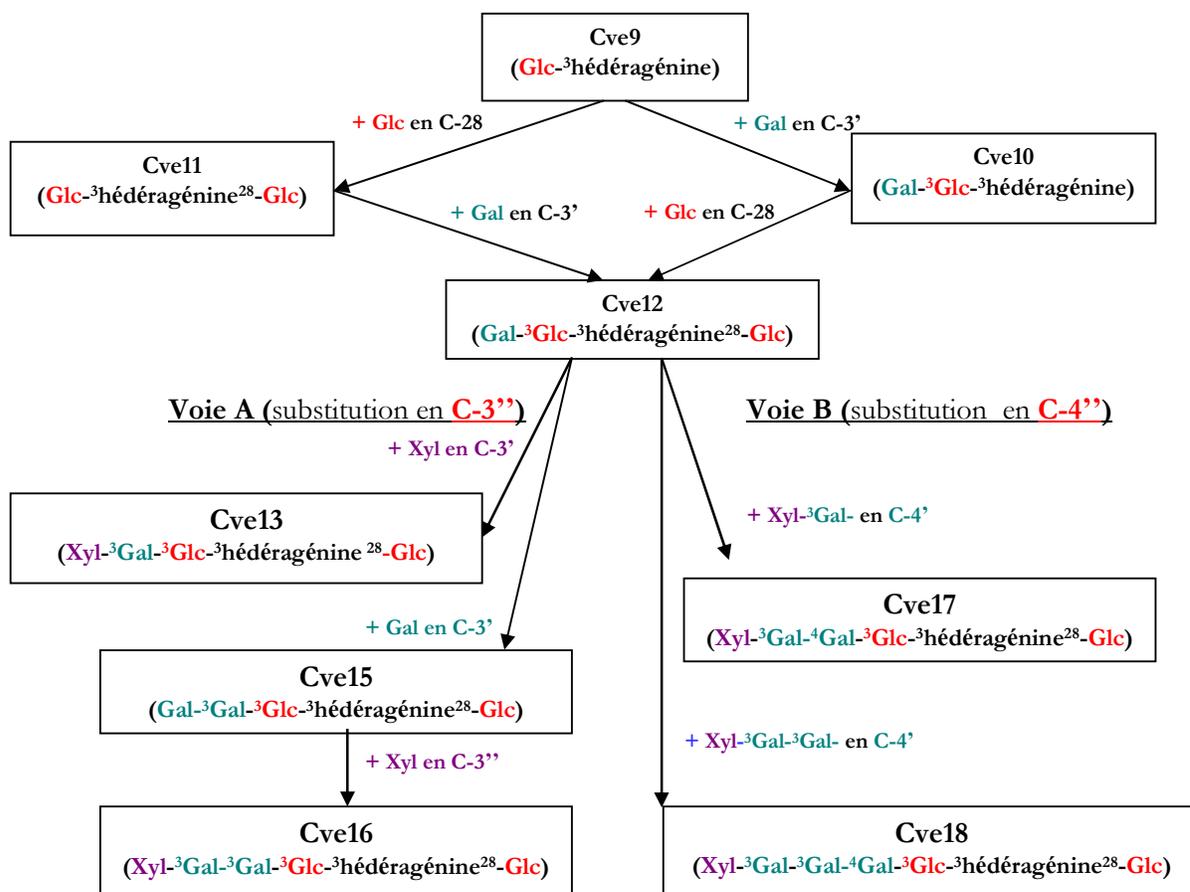


Schéma 2

Les mêmes voies de glycosylation sont transposables aux saponosides à 2 β -hydroxyléanolique (**Cve2** à **Cve8**) ou à bayogénine (**Cve19** à **Cve26**) bien que le monoglucoside et le monoglucuronide de départ, similaire à **Cve9** en série hédéragénine, n'aient pas été isolés.

Les sept saponosides (**Cve6-Cve8**, **Cve17**, **Cve18**, **Cve25**, **Cve26**) possédant une liaison [Gal-(1'''→4'')-Gal-] sont minoritaires, laissant supposer que cette voie biogénétique (voie B) n'est pas prioritaire par rapport à la voie A où la prolongation de la chaîne osidique se fait en position 3'' du premier galactose. Les saponosides à chaîne en C-3 trisaccharidique (Gal-⁴Gal-³GlcA-³génine²⁸-Glc) et tetrasaccharidique (Gal-³Gal-⁴Gal-³Glc-³génine²⁸-Glc) censés être les précurseurs des tétra- et penta-saccharides dans la voie B n'ont pas été isolés. Cela peut s'expliquer de deux façons :

- I. les tri- et tetra-saccharides contenant un galactose terminal ne sont pas formés, dans ce cas la prolongation de la chaîne osidique se fait par l'addition d'un di- ou trisaccharides préformés (Xyl-³Gal- ou Xyl-³Gal-³Gal-) en position 4'' du premier galactose (schéma 2),
- II. ces composés sont formés mais en trop faible quantité pour être isolés et ainsi, la prolongation de la chaîne osidique se fait par l'addition successive d'unité osidique à chaque étape comme dans la voie A.

Quelques uns des saponosides de structures connues sont décrits dans la littérature pour posséder des activités biologiques. C'est le cas du monoglucoside **Cgp1** qui possède :

- une activité antifongique à la concentration de 100 µg/ml (CMF : concentration minimale fongicide) contre *Candida glabrata*⁵⁹,
- une activité antiprotozoaire contre *Trichomonas vaginalis* (DL₁₀₀ à 5µg/ml) et *Leishmania infantum* (IC₅₀ à 35 µg/ml)⁵⁹,
- une activité inhibitrice sur des lignées 1138, 1140 et 1353 de levures *Streptomyces cerevisiae* (IC₁₂ à 125 µg/ml, 200 µg/ml et 280 µg/ml, respectivement)⁶¹.

Les monoglucosides **Cgp1** et **Cgp2** développent une activité molluscicide contre *Biomphalaria glabrata* à la concentration de 15,0 et 7,5 µg/ml, respectivement et une activité antifongique à la concentration de 5,0 et 2,5 µg/ml contre *Cladosporium cucumerinum*⁶².

Le saponoside **Cgp3** a montré une activité antimutagénique contre l'effet mutagène du benzo[*a*]pyrane⁷⁶.

Les monoglucuronides **Cgp12** et **Cgp14** ont montré une activité molluscicide contre *Biomphalaria glabrata*⁶⁹.

IV. Polyphénols de *Caryocar glabrum* et de *Caryocar villosum*

IV. 1. Présentation générale des polyphénols

Les polyphénols constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal, localisées depuis les racines jusqu'aux fruits.

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagnèse. La voie la plus courante est celle qui, *via* l'acide shikimique, conduit aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines... La deuxième voie est celle de l'acétate qui engendre par cyclisation des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthones, quinones...

La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate pour l'élaboration des composés tels que les flavonoïdes, les stilbènes, les pyrones, les xanthones... La participation de la voie du mévalonate est moins fréquente mais possible, comme certaines quinones ou comme les furano- et pyranocoumarines⁴⁸.

Les composés polyphénoliques possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques : antiradicalaires, antioxydantes, anticholestérolémiantes, antimicrobiennes, antivirales, antihelminthiques, inhibiteurs *in vitro* des systèmes enzymatiques tels que la collagénase, l'élastase, la hyaluronidase, la trypsine, l'histidine décarboxylase, activités antipepsique et antiulcéreuse chez la souris, réduction de l'uricémie chez le rat, ou effet anti-inflammatoire et antiallergique des tanins.

L'emploi en thérapeutique des polyphénols reste limité à leurs actions vasculoprotectrices et vise principalement à améliorer les symptômes en rapport avec l'insuffisance veino-lymphatique (Endotélon[®]; Flavan[®]). Quelques applications en cosmétologie sont également développées, sur la base de leurs propriétés antiradicalaires, mais aucune preuve de leur efficacité n'a jusqu'à présent été mise en évidence *in vivo*.^{82- 91}

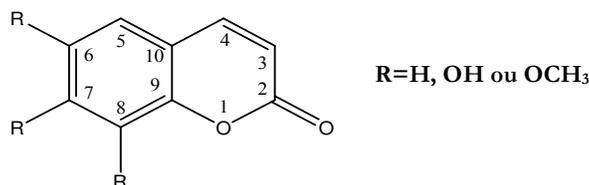
Bien qu'intéressants sur le plan nutritionnel (café, thé, pomme, raisin, cacao, etc...), ces composés polyphénoliques sont souvent source "d'ennuis technologiques" dans

l'industrie alimentaire : trouble au froid de la bière, brunissement des jus de fruit (pomme, raisin, etc...), apparition de précipités et décoloration des vieux vins, complexation et copigmentation.

IV. 1. 1. Coumarines

IV. 1. 1. 1. Coumarines simples

Elles sont considérées comme des lactones de l'acide *o*-hydroxy-*Z*-cinnamique. En dehors de quelques rares cas, dont la coumarine elle-même, toutes les coumarines sont substituées en position 7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone, est le précurseur des coumarines 6,7-di- et 6,7,8-tri-hydroxylées. Les hydroxyles de ces coumarines simples peuvent être méthylés ou l'un d'eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique.



Comme les autres dérivés phénylpropaniques, les coumarines sont issues du métabolisme de la phénylalanine *via* un acide cinnamique, l'acide *p*-coumarique. Une isomérisation photocatalysée de la double liaison (*E* → *Z*) conduit à une lactonisation. Dans quelques cas, la glycosylation de l'acide cinnamique, empêche la lactonisation⁴⁸.

IV. 1. 1. 2. 3,4-dihydroisocoumarines

Les 3,4-dihydroisocoumarines possèdent une activité antibactérienne et sont considérées comme des phytoalexines. Ces composés sont biosynthétisés par les plantes supérieures et par les champignons. La voie de biosynthèse proposée est la voie de l'acétate⁹², ce qui signifie qu'ils sont toujours hydroxylés en position 6 et 8 (figure 46).

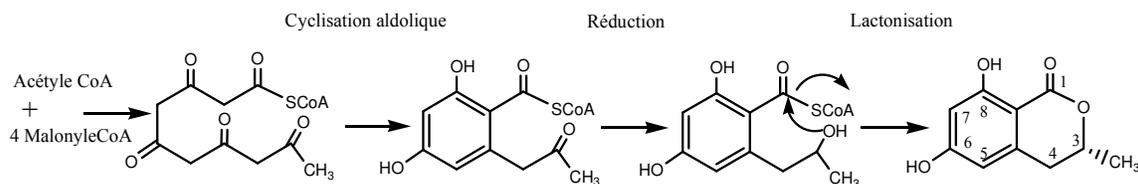


Figure 46 : Biosynthèse des isocoumarines.

IV. 1. 2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent l'un des plus grands groupes de produits naturels phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs, la protection des plantes contre les radiations UV de type B et dans leur défense contre les herbivores et les attaques microbiennes. Certains flavonoïdes ont parallèlement une activité antioxydante, anti-inflammatoire, vasculaire, oestrogénique et antitumorale, pour ne citer que leurs principales propriétés pharmacologiques⁸³⁻⁹⁰. Ces composés se divisent en différents types : flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavanes, chalcones, anthocyanidines, catéchines, aurones (figure 47).

Tous les flavonoïdes - environ 3000 - ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même noyau de base, l'enchaînement 2-phénylchromane. Ils sont issus de la condensation d'un «triacétate» (noyau A) et d'un acide cinnamique (noyau B), la cyclisation engendrant le cycle pyranique central (noyau C).

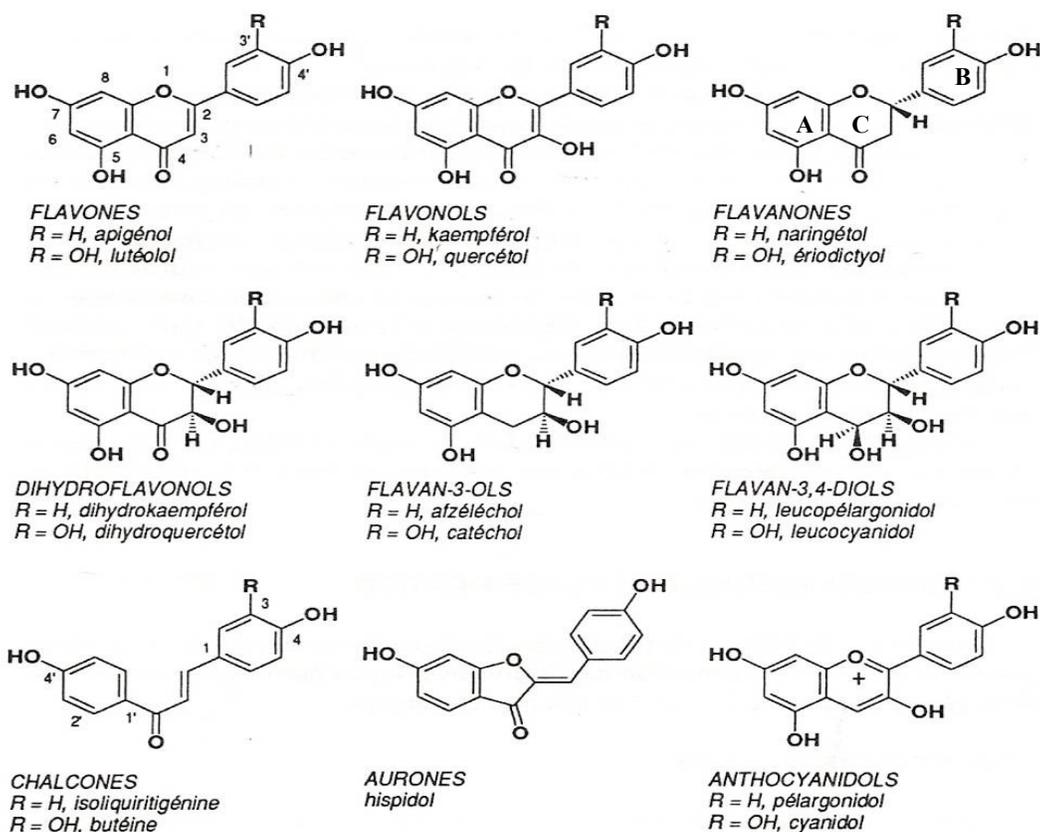


Figure 47 : Structures chimiques et classification des flavonoïdes⁴⁸.

IV. 1. 3. Tanins ^{82, 84, 85, 93}

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Mais récemment, un autre classement a été proposé. Sur la base de leurs caractéristiques structurales, il est possible de diviser les tanins en quatre groupes principaux (figure 48) ⁹³:

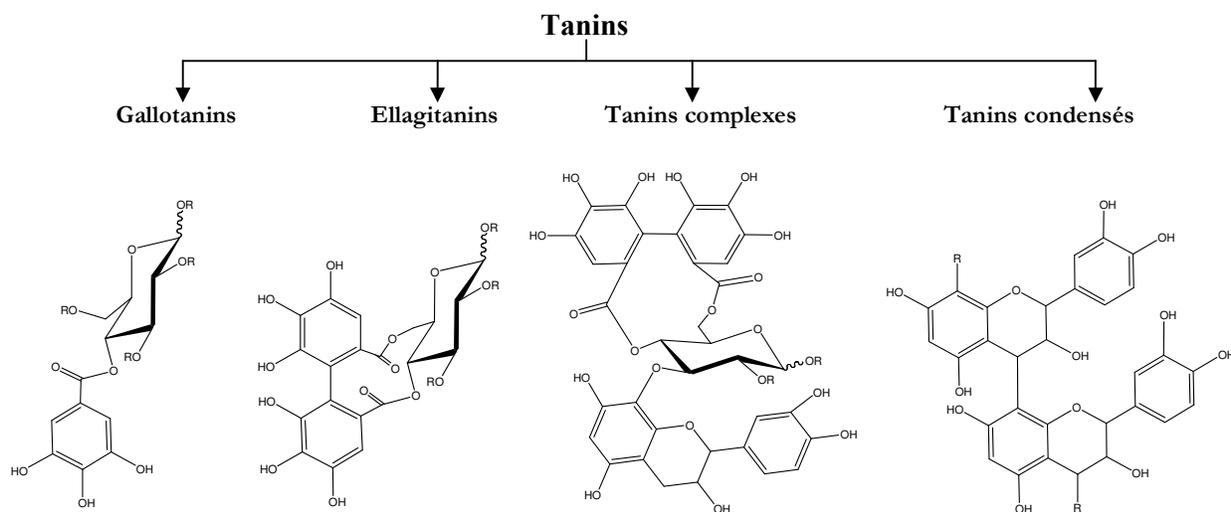


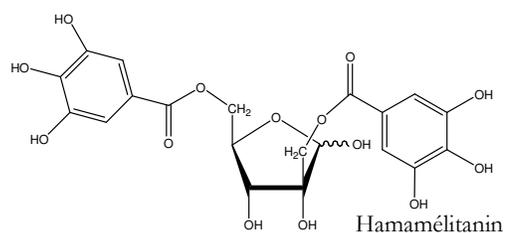
Figure 48 : Structures chimiques et classification des tanins ⁹³.

IV. 1. 3. 1. Gallotanins

En général, les gallotanins sont des esters de l'acide gallique et du glucose. Il faut cependant remarquer que les mono- et les digalloylglucoses ne présentent pas les propriétés classiques des tanins, leur masse moléculaire étant trop faible.

Toutes ou seulement une partie des fonctions hydroxyles des polyols (glucose) peuvent être substituées par des unités de galloyle ou ses dérivés. La structure des tanins est encore enrichie par la capacité du centre anomérique de l'unité osidique de former des liaisons *C*- et/ou *O*-glycosidiques, des liaisons ester ou acétal, dans la forme α ou β .

Les composés construits autour d'un autre polyol que le glucose sont rares. C'est le cas des **galloylhamaméloses** comme l'hamamélitanin (2,5-digalloyl-D-hamamélose) qui du fait de sa faible masse moléculaire ne peut être considéré comme un tanin.



IV. 1. 3. 2. Ellagitanins

Ce sont des tanins chez lesquels au moins deux unités de galloyle sont liées entre elles par une liaison C-C et qui ne contiennent pas de catéchines (figure 49).

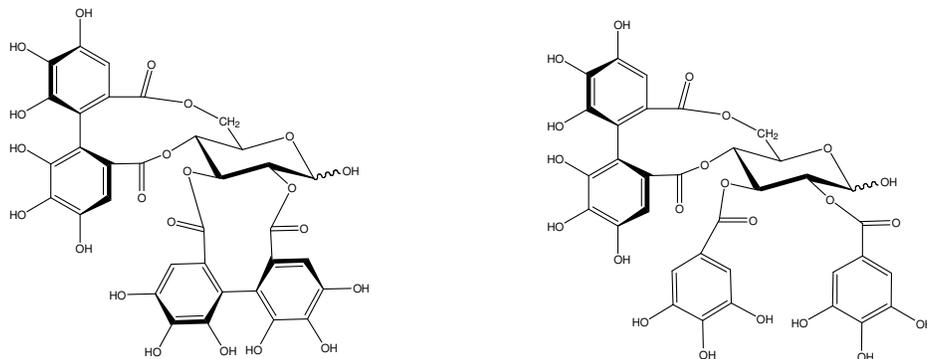


Figure 49 : Exemples de structures d'ellagitanins.

IV. 1. 3. 3. Tanins complexes

Ces molécules sont constituées d'une unité de catéchine liée, à travers un sucre, à un gallotanin ou à un ellagitanin. Ce sont des ellagitanins modifiés, résultant de l'addition d'un dérivé phényl-chromanique sur une molécule d'ester hexahydroxydiphénique du glucose : flavanol (flavano-ellagitanin) (acutissimine A, figure 50), procyanidol (procyanidino-ellagitanin), flavonol (flavono-ellagitanin). Le sucre peut être sous la forme linéaire ou cyclique.

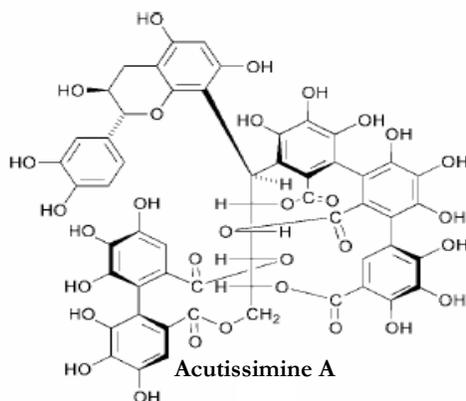
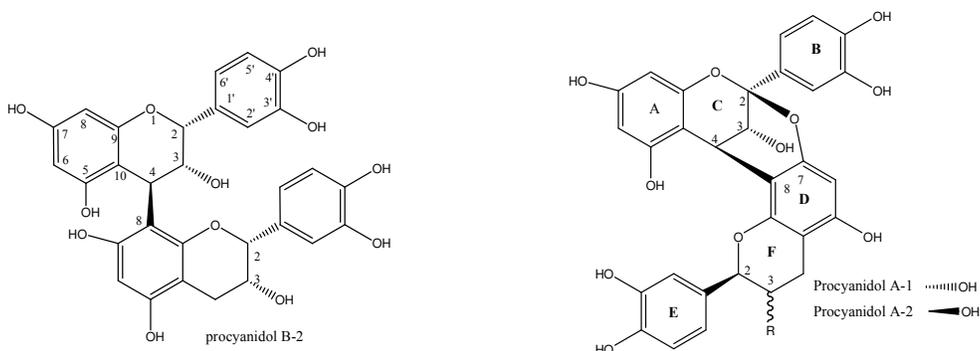


Figure 50 : Exemple de tanins complexes : Acutissimine A⁴⁸.

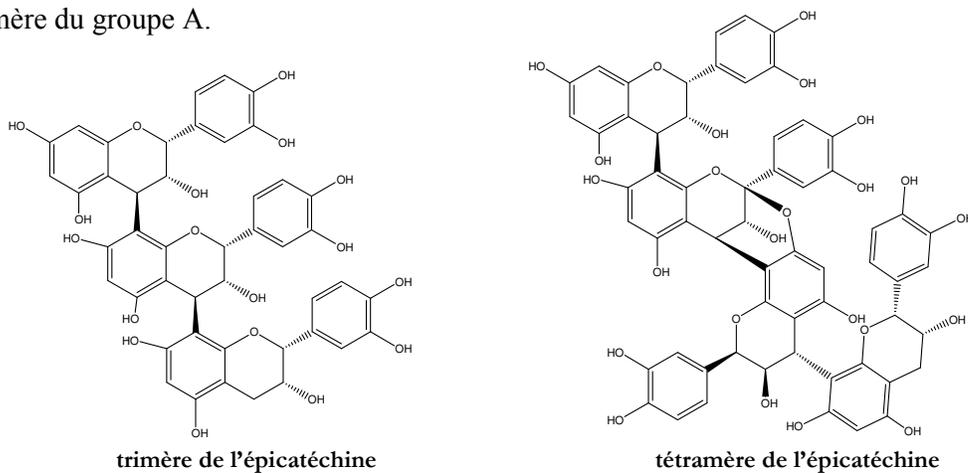
IV. 1. 3. 4. Tanins condensés

Nommés aussi proanthocyanidols, ce sont des oligomères et des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols (catéchine et/ou épicatechine) liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent $C_4 \rightarrow C_8$ ou $C_4 \rightarrow C_6$.

Les dimères les plus simples sont les procyanidols B-1, B-2, B-3 et B-4, constitués de deux unités de catéchine et/ou d'épicatéchine liés en $C_4 \rightarrow C_8$ selon une configuration α (B-3 et B-4) ou β (B-1 et B-2). Un autre groupe important de procyanidols est constitué par des dimères ayant une liaison interflavanique double : $C_4 \rightarrow C_8$ et $C_2 \rightarrow O \rightarrow C_7$ (procyanidols du groupe A). Dans le groupe A comme dans le groupe B, la liaison $C_4 \rightarrow C_8$ peut être remplacée par une liaison $C_4 \rightarrow C_6$.



Les oligomères se forment par additions successives d'unités flavaniques. De nombreuses structures sont maintenant connues : les trimères C-1 (trois épicatechines liées en $4\beta \rightarrow 8$) et C-2 (trois catéchines liées en $4\beta \rightarrow 8$) et les oligomères correspondants mais aussi les trimères et oligomères formés par addition d'une ou plusieurs unités flavaniques sur un dimère du groupe A.



Les polymères peuvent compter jusqu'à cinquante unités élémentaires. Les plus largement répandus sont des poly-épicatechols et des co-polymères procyanidol-prodelphinidol. La liaison interflavanique est majoritairement de type $C_4 \rightarrow C_8$ et est toujours *trans* par rapport à l'hydroxyle en 3.

IV. 2. Détermination structurale des polyphénols des écorces de tronc de *C. glabrum*

Les écorces de tronc de *Caryocar glabrum* se sont révélées très riches en composés polyphénoliques. En plus des deux saponosides précédemment décrits, dix hétérosides polyphénoliques dont cinq de structures nouvelles ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique (figure 51) :

- un glycoside de l'alcool 3,4,5-triméthoxybenzylique (**Cgt1**),
- trois glycosides du 3,4,5-triméthoxyphenol (**Cgt2**, **Cgt3**, **Cgt4**),
- trois galloylhamaméloses (**Cgt5**, **Cgt6**, **Cgt7**),
- deux glycosides de 3,4-dihydroisocoumarine phénylée (**Cgt8**, **Cgt9**),
- un glycoside de l'acide ellagique (**Cgt12**).

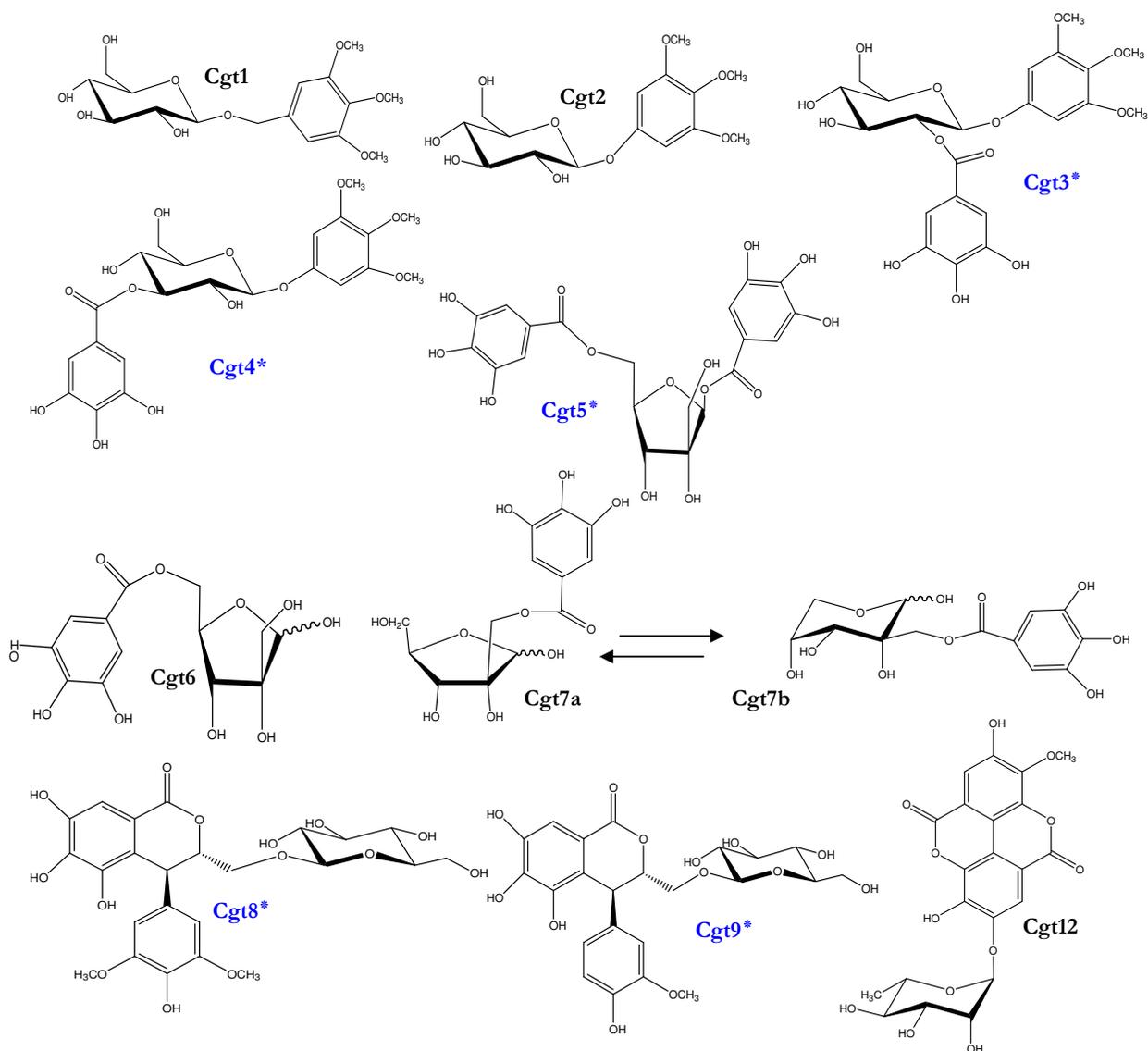


Figure 51 : Structures des composés polyphénoliques isolés des écorces de tronc de *C. glabrum*. (* = composé de structure nouvelle)

IV. 2. 1. Glucosides phénoliques

IV. 2. 1. 1. Glucosides connus Cgt1 et Cgt2

Le spectre de masse de **Cgt1** obtenu en ESI mode positif, montre un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 361.

Son spectre de RMN 1H présente les signaux suivants (tableau 37) :

- un singulet intégrant pour deux protons aromatiques à 6,78 ppm,
- deux singulets, l'un à 3,76 ppm, intégrant pour trois protons et l'autre à 3,86 ppm intégrant pour six protons, correspondant à trois groupements méthoxyles,
- deux doublets à 4,67 et 4,87 ppm ($J=12,1$ Hz), correspondant à un CH_2OR ,
- les signaux d'un hexose caractérisé par le proton anomérique à 4,35 ppm (d , $J=7,7$ Hz) (figure 52).

L'analyse du spectre COSY et la mesure des constantes de couplage permettent d'identifier l'hexose comme étant un β -D-glucopyranose. Celui-ci est en position terminale comme l'indiquent les déplacements chimiques des carbones en RMN (tableau 37) ^{56, 57}.

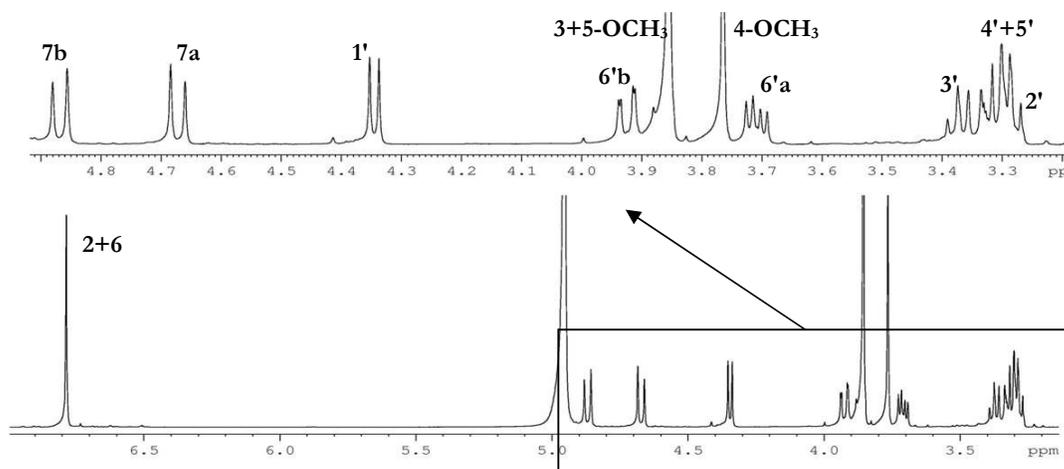


Figure 52 : Spectre de RMN 1H de Cgt1 (CD_3OD).

Le spectre de RMN ^{13}C J -modulé montre en plus des six carbones du glucose, la présence de quatre carbones aromatiques à 135,1, 106,3 (2 CH), 154,4 (2 C oxygénés) et 138,3 ppm (1 C oxygéné), suggérant la présence d'un noyau aromatique tétrasubstitué. Ce spectre montre également la présence d'un carbone aliphatique à 71,5 ppm (CH_2O^-), et de trois carbones de méthoxyles à 56,6 (2 C) et 61,1 ppm.

Le fait que les deux CH aromatiques et les deux carbones quaternaires oxygénés soient équivalents deux à deux, suggère une symétrie dans le cycle aromatique.

Les taches de corrélation observées sur le spectre HMBC entre les deux protons aromatiques à 6,78 ppm et les six carbones du noyau aromatique ainsi que le carbone aliphatique à 71,5 ppm (C-7) permettent d'identifier la génine à l'alcool 3,4,5-trihydroxybenzylique.

Les corrélations HMBC entre les protons des méthoxyles et les trois carbones aromatiques quaternaires oxygénés (C-3, C-4 et C-5) permettent de placer les groupements méthoxyles sur le noyau aromatique (figure 53).

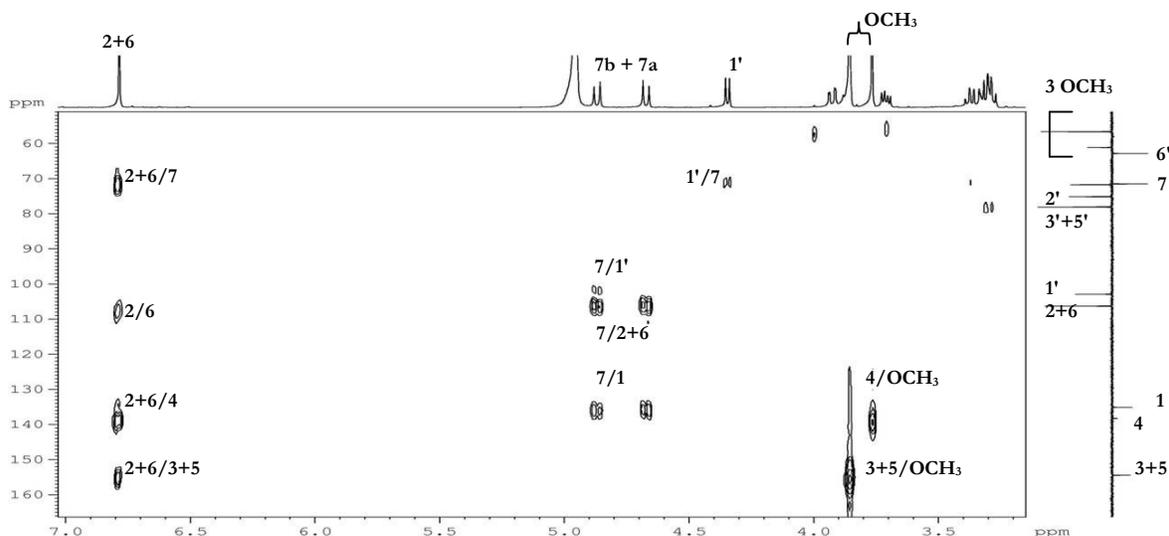
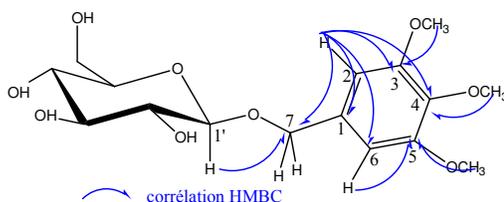


Figure 53 : Spectre HMBC du composé Cgt1 (CD₃OD).

Sur ce même spectre, la corrélation HMBC observée entre le proton anomérique du glucose et le carbone benzylique à 71,5 ppm montre que le composé **Cgt1** est le 3,4,5-triméthoxybenzyl-*O*-β-D-glucopyranoside.



Cette structure est confirmée par les effets NOE observés sur le spectre NOESY entre :

- le proton H-1' du glucose et l'un des deux protons H-7,
- les protons H-7 et les protons H-2 et H-6,
- les protons H-2 et H-6 avec les deux méthoxyles en position 3 et 5.

Ce composé a précédemment été isolé sous le nom de nikoenoside des écorces de tronc d'une plante médicinale japonaise, *Acer nikoense*⁹⁴.

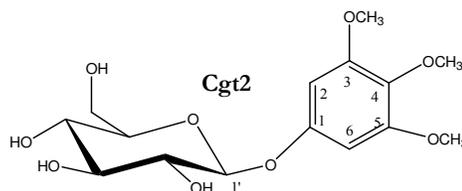
Le spectre de masse du composé **Cgt2**, obtenu en ESI mode positif, montre un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 347, soit une perte de 14 *uma* par rapport à **Cgt1**. Ce spectre montre également des fragments à m/z 317 $[M+H-OCH_3]^+$ et 185 $[M+H-162]^+$ indiquant la présence d'un hexose et au moins d'un méthoxyle.

La comparaison des données spectrales en RMN 1H et ^{13}C *J*-modulé de **Cgt2** avec celles du composé **Cgt1**, indique la présence d'un β -D-glucopyranose ($\delta_{H-1'}$ 5,41 ppm et $\delta_{C-1'}$ 103,8), celle des quatre carbones quaternaires aromatiques oxygénés et des deux CH aromatiques à 96,2 ppm mais la disparition du carbone benzylique à 71,5 ppm (tableau 37).

Le noyau aromatique de **Cgt2** est identifié comme étant le 3,4,5-triméthoxyphénol grâce aux corrélations HMBC visualisées entre les protons aromatiques et les quatre autres carbones du cycle. Celui-ci est triméthoxylé en position 3, 4 et 5 comme le démontrent les corrélations HMBC entre les protons des méthoxyles et les carbones aromatiques à 134,7 (C-4) et 155,1 ppm (C-3 et C-5). L'attribution des méthoxyles en position 3 et 5 est effectuée grâce aux effets NOE observés entre les protons des méthoxyles à 3,53 ppm et les protons H-2 et H-6 à 6,60 ppm.

Le proton anomérique du glucose résonne sous la forme d'un faux triplet car les deux protons H-2 et H-3 sont superposés vers 4,20 ppm. Cela indique un couplage de deuxième ordre entre ces trois protons. L'effet NOE observé sur le spectre NOESY entre H-1 et H-3 et le déplacement chimique du carbone anomérique à 103,8 ppm confirment la configuration β de ce glucose.

La corrélation observée sur le spectre HMBC, entre le proton anomérique du glucose et le carbone C-1 du phénol atteste que le composé **Cgt2** est le 3,4,5-triméthoxyphényl-*O*- β -D-glucopyranoside.



Ce composé a déjà été isolé à partir des écorces de tronc de *Parabenzoin praecox* (Lauraceae)⁹⁵ et de *Quillaja saponaria* (Rosaceae)⁹⁶.

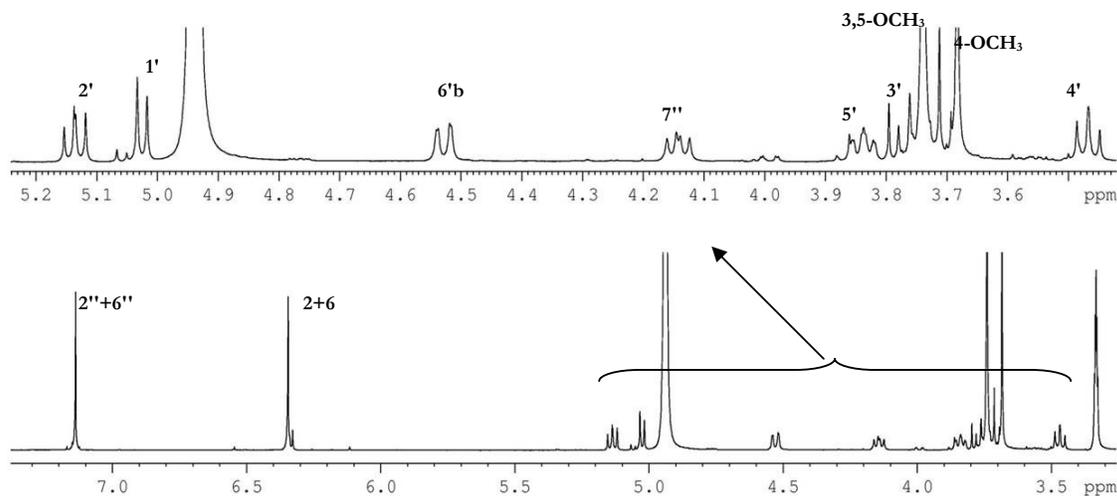
Tableau 37 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) des composés **Cgt1**, **Cgt3** et **Cgt4** dans CD_3OD et **Cgt2** dans la pyridine *d*.

	Cgt1		Cgt2		Cgt3		Cgt4	
	δH (m, J/Hz)	δC						
1	-	135,1	-	156,1	-	156,0	-	156,0
2	6,78 (s)	106,3	6,60 (s)	96,2	6,33 (d, 2,1)	96,6	6,54 (s)	96,1
3	-	154,4	-	155,1	-	154,8	-	154,8
4	-	138,3	-	134,7	-	134,8	-	134,4
5	-	154,4	-	155,1	-	154,8	-	154,8
6	6,78 (s)	106,3	6,60 (s)	96,2	6,33 (d, 2,1)	96,6	6,54 (s)	96,1
7a	4,67 (d, 12,1)	71,5	-	-	-	-	-	-
7b	4,87 (d, 12,1)	-	-	-	-	-	-	-
3-OCH ₃	3,86 (s)	56,6	3,53 (s)	56,8	3,71 (s)	56,4	3,86 (s)	56,8
4-OCH ₃	3,76 (s)	61,1	3,65 (s)	61,5	3,68 (s)	61,2	3,73 (s)	61,2
5-OCH ₃	3,86 (s)	56,6	3,53 (s)	56,8	3,71 (s)	56,4	3,86 (s)	56,8
Glc-								
1'	4,35 (d, 7,7)	102,9	5,41 (d, 6,6)	103,8	5,06 (d, 8,1)	102,6	4,94 (d, 7,8)	103,2
2'	3,29 (dd, 9,1-7,7)	75,1	4,19 (dd, 9,3-7,5)	75,8	5,13 (dd, 9,4-8,1)	75,5	3,71 (dd, 9,4-7,8)	73,4
3'	3,37 (t, 9)	78,0	4,21 (dd, 9,3-9)	79,5	3,76 (t, 9,2)	76,2	5,26 (t, 9,4)	78,7
4'	3,32 (t, 9,4)	71,7	4,08 (t, 9)	72,4	3,48 (dd, 9,7-9)	71,8	3,65 (t, 9,5)	70,1
5'	3,31 (m)	78,0	3,99(ddd, 9-5,5-2,7)	80,0	3,56 (ddd, 9,7-6,6-2,1)	78,7	3,87 (m)	76,1
6'a	3,71 (dd, 11,9-5,5)	62,8	4,16 (dd, 11,9-5,5)	63,3	3,75 (dd, 12,1-6,6)	62,7	4,15 (dd, 10,7-7,2)	68,4
6'b	3,92 (dd, 11,9-2,1)	-	4,44 (dd, 11,9-2,7)	-	3,99 (dd, 12,1-2,1)	-	4,44 (dl, 10,2)	-
Ac. gallique								
1''	-	-	-	-	-	121,5	-	121,7
2''	-	-	-	-	7,13 (s)	110,3	7,17 (s)	110,3
3''	-	-	-	-	-	146,6	-	146,4
4''	-	-	-	-	-	140,0	-	139,7
5''	-	-	-	-	-	146,6	-	146,4
6''	-	-	-	-	7,13 (s)	110,3	7,17 (s)	110,3
7''	-	-	-	-	-	167,7	-	168,1

IV. 2. 1. 2. Glucosides nouveaux Cgt3 et Cgt4

L'ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ observé à m/z 521 sur le spectre de masse obtenu en ESI mode positif du composé **Cgt3**, indique une masse moléculaire de 498 Da, soit un gain de 152 *uma* par rapport à **Cgt2**.

Sur le spectre RMN ^1H de **Cgt3** apparaît un seul signal supplémentaire, un singulet intégrant pour deux protons aromatiques à 7,13 ppm (figure 54).

Figure 54 : Spectre de RMN ^1H du composé **Cgt3** (CD_3OD).

Les autres signaux correspondent à ceux observés pour **Cgt2** avec des différences dans les déplacements chimiques ($\delta_{\text{H}} \pm 0,30$ ppm), dues aux solvants utilisés différemment (tableau 37).

Le spectre de RMN ^{13}C *J*-modulé montre la présence supplémentaire d'un noyau aromatique, constitué de deux carbones CH aromatiques équivalents à 110,3 ppm, d'un carbone aromatique quaternaire à 121,5 ppm et de trois carbones aromatiques quaternaires oxygénés à 146,6 (2 C) et 140,0 ppm, dont deux sont équivalents. Un second carbonyle est détecté à 167,7 ppm.

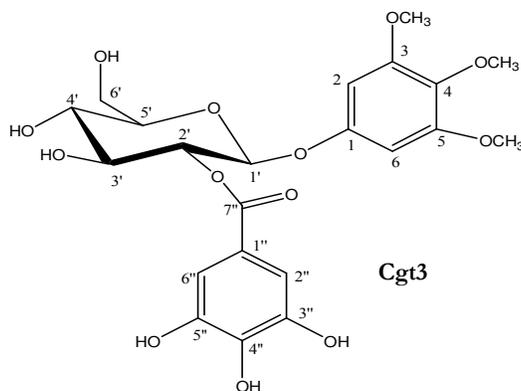
Les valeurs des déplacements chimiques en RMN de ce noyau aromatique supplémentaire sont caractéristiques d'un acide gallique estérifié ($\delta_{\text{C-7''}} 167,7$) dont les carbones C-2'', C-6'' et C-3'', C-5'' sont équivalents deux à deux ⁹⁷.

Cette structure est confirmée par les corrélations observées sur le spectre HMBC entre les protons H-2'' et H-6'' avec le carbonyle C-7'' et les cinq carbones aromatiques du cycle (figure 55).

Le composé **Cgt3** possède comme structure de base celle du composé **Cgt2** sur laquelle se greffe un acide gallique. Le proton H-2' du glucose est fortement déblindé à 5,13 ppm. Cela suggère que l'hydroxyle en position 2' est estérifié par l'acide gallique. Sur le spectre HMBC, des corrélations $^3J_{\text{H-C}}$ sont observées entre le proton anomérique H-1' du glucose et le carbone C-1 du groupement 3,4,5-triméthoxyphényle et entre H-2' du glucose et C-7'' de l'acide gallique (figure 55).

Des effets NOE sont également observés sur le spectre NOESY, entre le proton anomérique H-1' et les deux protons H-2 et H-6.

Le composé **Cgt3** est le 3,4,5-triméthoxyphényl-(2'-*O*-galloyl)-*O*- β -D-glucopyranoside.



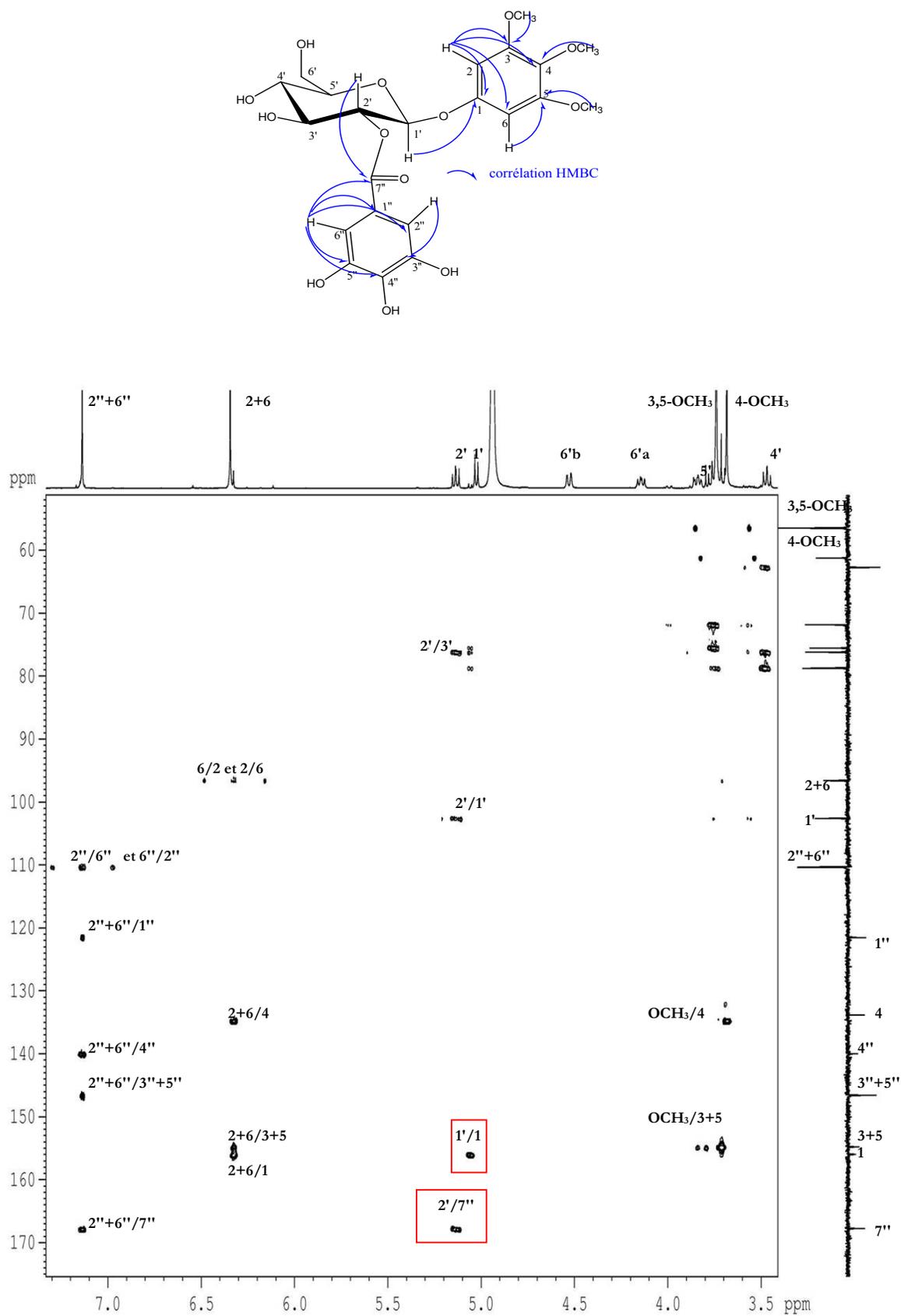
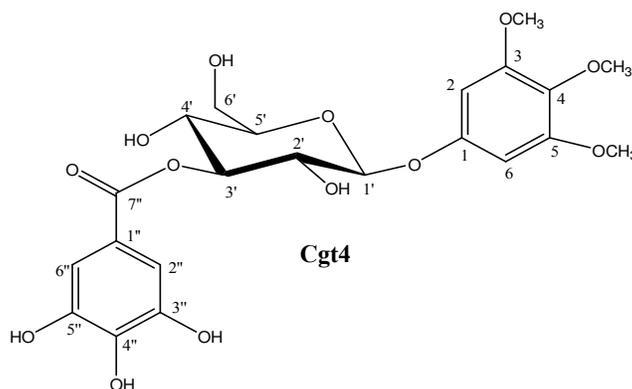


Figure 55 : Spectre HMBC de Cgt3 (CD₃OD).

L'analyse des spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé et la présence du même ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 521 obtenu en ESI mode positif indiquent que les composés **Cgt3** et **Cgt4** sont des régioisomères (tableau 37).

La corrélation $^3J_{\text{H-C}}$ entre le proton H-3' du glucose, déblindé à 5,26 ppm et le carbonyle de l'acide gallique à 168,1 ppm, sur le spectre HMBC, indique que l'acide gallique estérifie l'hydroxyle en position 3' du glucose. L'autre corrélation HMBC entre le proton H-1' du glucose et le C-1 du groupement 3,4,5-triméthoxyphényle permet l'identification du composé **Cgt4** au 3,4,5-triméthoxyphényl-(3'-*O*-galloyl)-*O*- β -D-glucopyranoside.



Les deux composés **Cgt3** et **Cgt4** sont de structures nouvelles. Un produit de structure similaire a été isolé à partir des écorces de tronc de *Tristanopsis calobuxus*, le 3,4,5-triméthoxyphényl-(6'-*O*-galloyl)-*O*- β -D-glucopyranoside, dans lequel l'acide gallique est en position 6 du glucose ⁹⁷. Une autre molécule similaire, le 3,4,5-triméthoxyphényl-(6'-*O*-vanilloyl)-*O*- β -D-glucopyranoside (tetracentronside A), a été isolée à partir des écorces de tronc de *Tetracentron sinense* (Magnoliaceae) ⁹⁸.

IV. 2. 2. Galloylhamaméloses

IV. 2. 2. 1. Composé Cgt5

Sur le spectre de RMN ^1H de **Cgt5** sont visualisés les signaux suivants :

- un singulet intégrant pour quatre protons aromatiques à 7,04 ppm,
- sept protons dans la zone des protons osidiques :
 - un singulet intégrant pour un proton à 6,19 ppm (proton anomérique),
 - deux doublets à 3,78 et 3,90 ppm ($J=11,6$ Hz),
 - un doublet à 4,11 ppm (d , $J=7,8$ Hz),
 - deux doublets de doublets à 4,22 ($J=11,7-7,2$ Hz) et 4,58 ppm ($J=11,7-3,3$ Hz),
 - un triplet de doublets ($J=7,5-3,3$ Hz) à 4,33 ppm.

Sur le spectre de RMN ^{13}C J -modulé de **Cgt5** sont visualisés 15 signaux correspondants à 20 carbones :

- deux carbonyles à 166,6 et 168,2 ppm,
- six carbones quaternaires aromatiques oxygénés à 146,4 (2 C), 146,5 (2 C), 140,2 et 139,9 ppm,
- deux carbones aromatiques quaternaires à 121,1 et 121,0 ppm,
- quatre CH aromatiques à 110,2 ppm (4 C), corrélant en HSQC J -modulé avec les quatre protons à 7,04 ppm,
- six carbones osidiques (δ_{C} de 66,9 à 101,4 ppm) dont un $-\text{CH}_2-$ à 66,9 ppm et un carbone hémiacétalique à 101,4 ppm suggérant la présence d'un hexose.

Sur le spectre HMBC (figure 58), les quatre protons aromatiques (δ_{H} 7,04 ppm), montrent les taches de corrélations illustrées par la figure 56 :

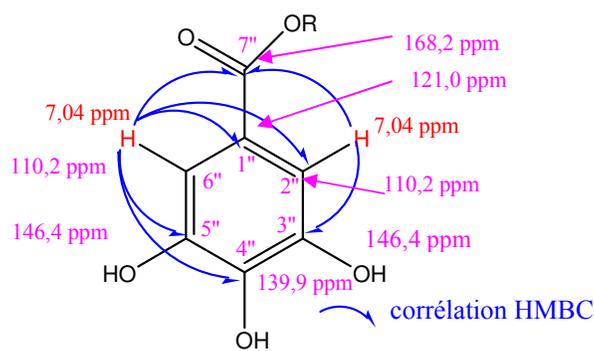


Figure 56 : Corrélations HMBC des deux protons de l'acide gallique dans le composé Cgt5.

L'analyse de ces signaux nous a conduit à attribuer deux molécules d'acide gallique (tableau 38).

L'analyse du spectre HSQC *J*-modulé de la partie osidique nous montre la présence de trois CHOH, de deux CH₂OH et d'un quaternaire CR₂OH.

Le proton anomérique résonant à 6,19 ppm ne couple avec aucun proton sur le spectre COSY, son carbone vicinal C-2 est donc le carbone quaternaire à 82,1 ppm (figure 57).

L'analyse du spectre COSY relie quatre protons couplés (H-3, H-4 et 2xH-5) correspondant à un enchaînement CHOH-CHOH-CH₂OH (figure 57). Ce spectre confirme le couplage entre les protons géminés H-2'a et H-2'b à 3,78 et 3,90 ppm appartenant au deuxième groupement méthylène. Ce groupement isolé est porté par le carbone quaternaire C-2.

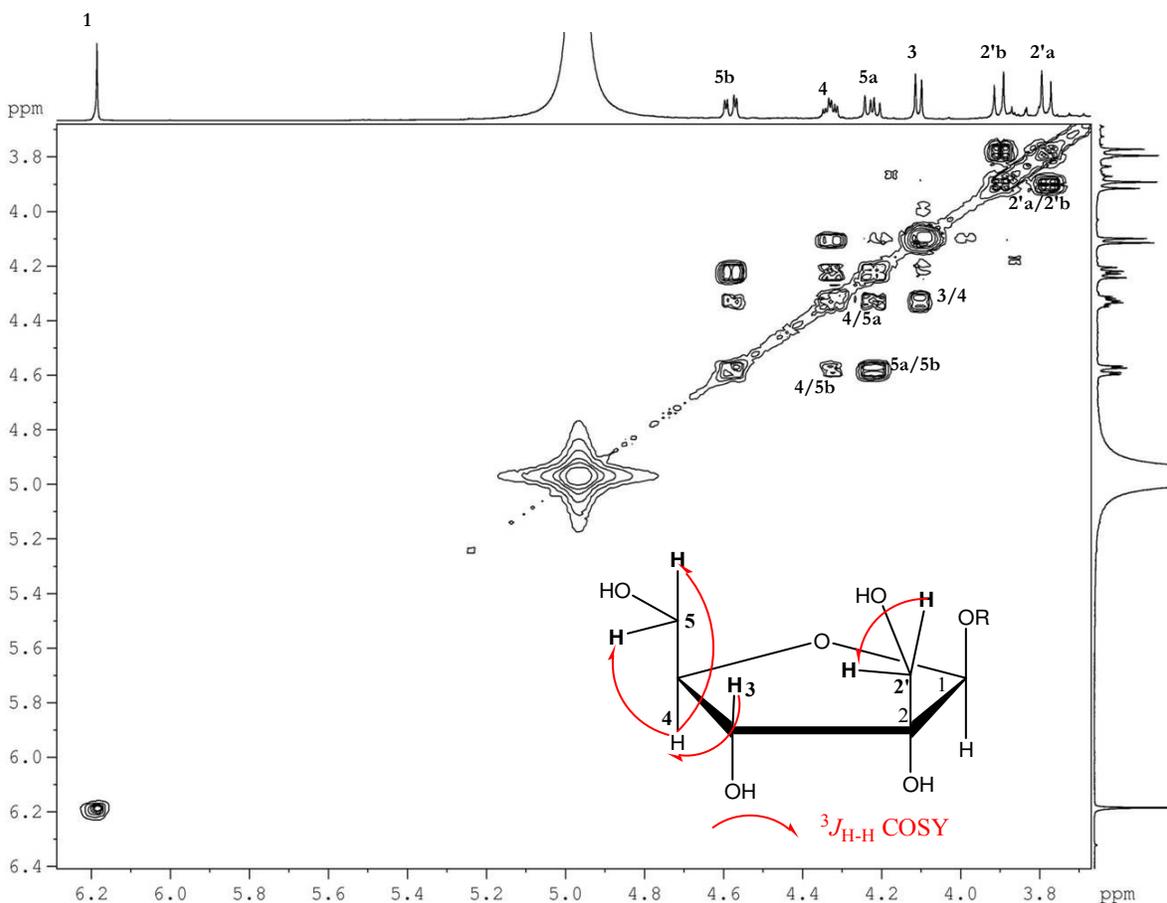


Figure 57 : Spectre COSY de Cgt5 (CD₃OD).

Le proton anomérique corrèle sur le spectre HMBC avec trois carbones déjà placés résonant à 74,2 (C-3), 83,0 (C-4) et 82,1 ppm (C-2). Le carbone anomérique

corrèle sur ce même spectre avec le proton H-4 et les deux protons H-2', confirmant un cycle furanique pour cet hexose (figure 58). Ce sucre correspond à un hamamelofuranose

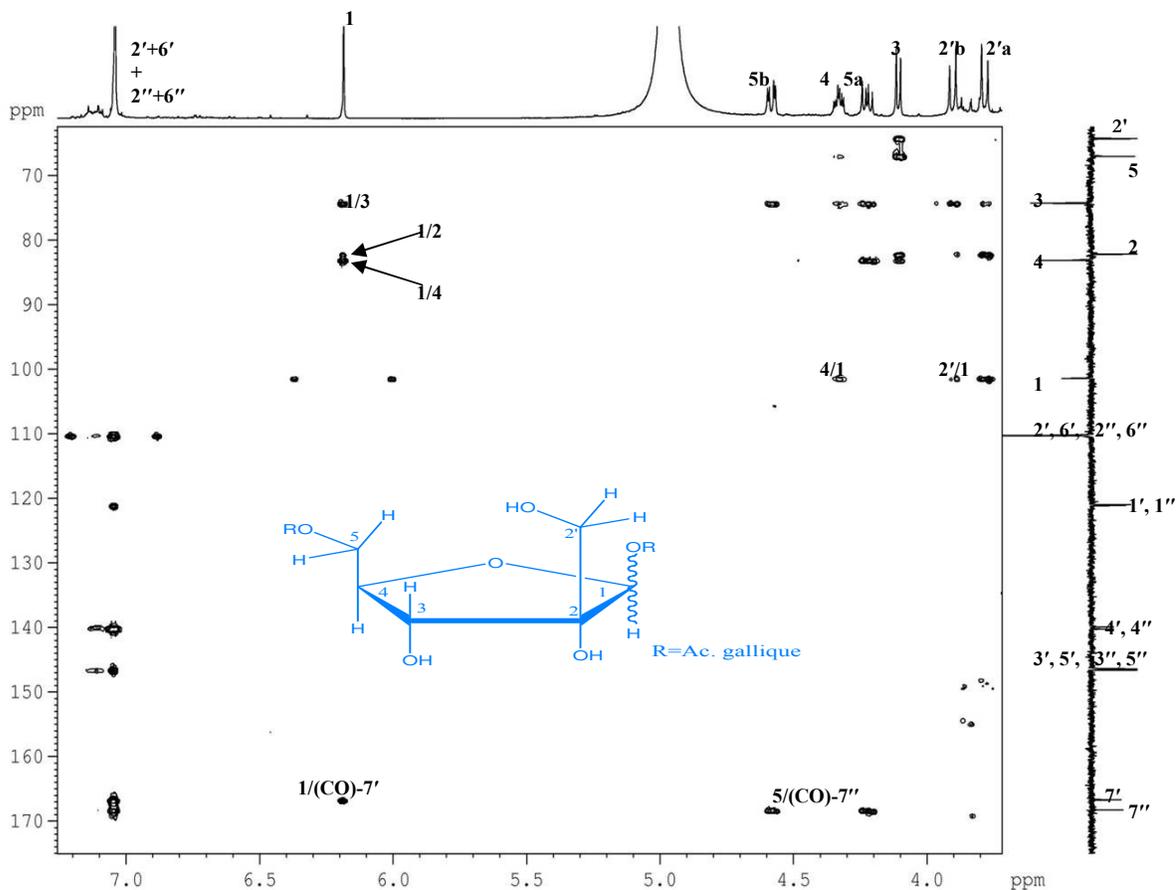


Figure 58 : Spectre HMBC de Cgt5 (CD₃OD).

L'observation sur le spectre NOESY des effets NOE (figure 59) entre H-3/H-2' et H-3/H-5 indique une configuration α pour les hydroxyles en position 2, 3 et pour les protons H-1 et H-4 et une configuration anomérique β .

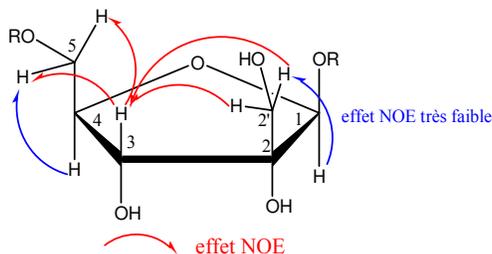
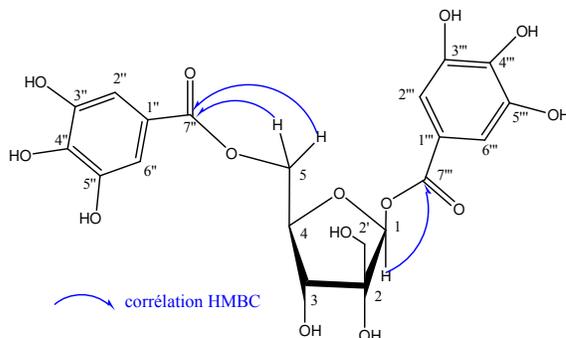


Figure 59 : effets NOE observés pour Cgt5 (CD₃OD).

La mesure du pouvoir rotatoire de cet hamamélose, après une hydrolyse alcaline indique qu'il s'agit d'un D-hamamélose. Il s'agit d'un β -D-hamamelofuranose.

Les déplacements chimiques des carbones de cet hexose sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature pour un β -D-hamamelofuranose⁹⁹⁻¹⁰¹.

Le composé **Cgt5** est attribué au 1,5-di-*O*-galloyl- β -D-hamamelofuranose, puisque sur le spectre HMBC, des corrélations $^3J_{H-C}$ sont observées entre le proton anomérique H-1 et le carbonyle à 168,2 ppm, et entre les protons H-5 et le carbonyle à 166,6 ppm (figure 58).



L'analyse du spectre de masse obtenu en ESI mode positif confirme la structure de ce composé par la présence d'un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 507.

IV. 2. 2. 2. Composé Cgt6

Le spectre de masse du composé **Cgt6**, obtenu en ESI mode positif montre un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 333 et un ion fragment à m/z 315 $[M+H-H_2O]^+$, indiquant une perte de 154 *uma* comparativement au composé **Cgt5**, soit la perte d'un acide gallique.

L'analyse des spectres COSY et HSQC *J*-modulé révèle la présence de deux unités de D-hamamélose identifiées à partir de leurs protons anomériques à 5,13 (*s*) et 5,25 ppm (*s*). Ces deux protons sont blindés d'environ 1 ppm par rapport au composé **Cgt5**, indiquant l'absence d'estérfication en cette position (tableau 38).

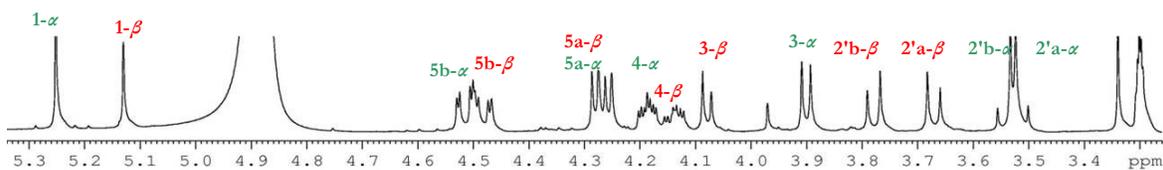


Figure 60 : Spectre de RMN 1H de Cgt6 (CD_3OD), partie osidique.

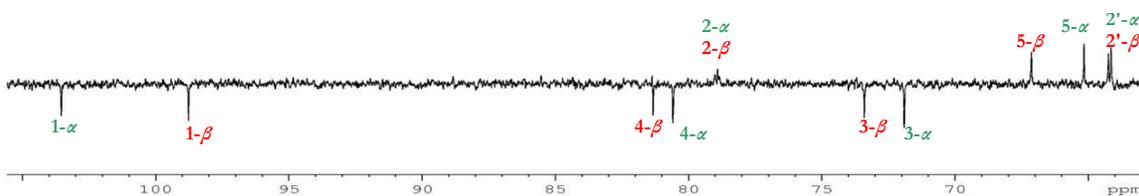


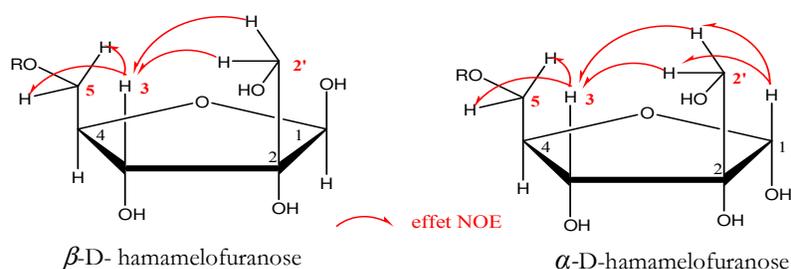
Figure 61 : Spectre de RMN ^{13}C de Cgt6 (CD_3OD), partie osidique.

Le dédoublement de tous les signaux ^1H et ^{13}C (figures 60 et 61) et l'absence des taches de corrélation sur le spectre HMBC entre les protons osidiques et des éventuels substituants, évoquent la présence de deux molécules isomères en équilibre, les formes α et β de l'hamamélose. Les proportions relatives des deux isomères α et β dans le mélange, sont de 5:4 d'après l'intégration en RMN ^1H des signaux anomériques.

Pour la forme β , les mêmes effets NOE que ceux observés dans le composé **Cgt5**, sont retrouvés sur le spectre NOESY entre :

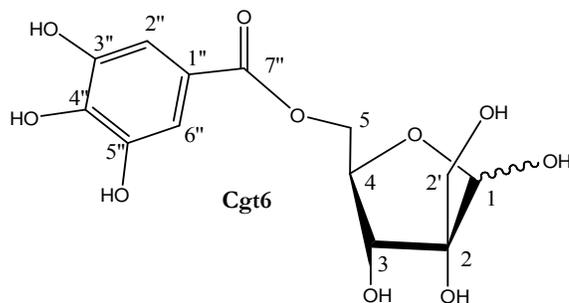
- le proton H-3 et les deux protons H-2' (a et b),
- le proton H-3 et les deux protons H-5 (a et b),

Pour la forme α est observé en plus un effet NOE entre le proton H-1 et les deux protons H-2'.



Sur les spectres de RMN ^1H et ^{13}C *J*-modulé de ce composé, sont présents les signaux précédemment décrits pour un acide gallique (figure 61 et tableau 38), dédoublés du fait de la présence du mélange α et β -D-hamaméloses. Le site de l'estérification est déterminé par les corrélations observées sur le spectre HMBC entre les protons H-5 de l'hamamélose et les carbonyles des acides galliques.

Le composé **Cgt6** est le 5-*O*-galloyl-D-hamamelofuranose, en équilibre entre les formes α et β .



Ce composé a déjà été isolé à partir des écorces de tronc de *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae)⁹⁹, des feuilles de *Castanopsis cuspidata* (Fagaceae)¹⁰², des écorces de tronc de *Castanea sativa* (Fagaceae)¹⁰¹. Les déplacements chimiques en RMN ¹H et ¹³C sont en accord avec ceux de la littérature^{99, 101}.

Tableau 38 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) des composés **Cgt5** et **Cgt6** dans CD₃OD.

Cgt5			Cgt6			
β		δ_C	α		β	
δ_H (m, J Hz)			δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
Hamamélose						
1	6,19 (s)	101,4	5,25 (s)	98,8	5,13 (s)	103,5
2	-	82,1	-	78,9	-	78,9
2'a	3,78 (d, 11,6)	64,2	3,51 (d, 11,4)	64,1	3,67 (d, 11,5)	64,2
2'b	3,90 (d, 11,6)	-	3,55 (d, 11,4)	-	3,78 (d, 11,5)	-
3	4,11 (d, 7,8)	74,2	3,90 (d, 7,9)	71,9	4,08 (d, 7,8)	73,4
4	4,33 (td, 7,5-3,3)	83,0	4,19 (ddd, 7,9-5,4-2,6)	80,6	4,14 (ddd, 7,8-6,4-3)	81,3
5a	4,22 (dd, 11,7-7,2)	66,9	4,27 (dd, 12,5-5,4)	65,2	4,27 (dd, 11,7-6,4)	67,1
5b	4,58 (dd, 11,7-3,3)	-	4,55 (dd, 12-2,6)	-	4,48 (dd, 11,7-3,3)	-
Acide gallique en 5						
1''	-	121,0 ^a	-	121,3	-	121,3
2''	7,04 (s)	110,2	7,06 (s)	110,1	7,09 (s)	110,2
3''	-	146,4 ^b	-	146,1	-	146,5
4''	-	139,9 ^c	-	139,9	-	139,9
5''	-	146,4 ^b	-	146,1	-	146,5
6''	7,04 (s)	110,2	7,06 (s)	110,1	7,09 (s)	110,2
7''	-	168,2	-	168,2	-	168,4
Acide gallique en 1						
1'''	-	121,1 ^a	-	-	-	-
2'''	7,04 (s)	110,2	-	-	-	-
3'''	-	146,5 ^b	-	-	-	-
4'''	-	140,2 ^c	-	-	-	-
5'''	-	146,5 ^b	-	-	-	-
6'''	7,04 (s)	110,2	-	-	-	-
7'''	-	166,6	-	-	-	-

a, b, c= carbones interchangeable.

IV. 2. 2. 3. Composé Cgt7

L'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 333 et l'ion fragment à m/z 315 $[M+H-H_2O]^+$ obtenus en ESI mode positif, suggèrent que les composés **Cgt6** et **Cgt7** sont des isomères.

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C *J*-modulé de **Cgt7** montrent la présence de quatre composés en mélange inséparable.

Sont identifiés, les signaux correspondants à la présence d'acides galliques : quatre singulets intégrant pour deux protons sont observés sur le spectre de RMN ¹H à 7,08, 7,10, 7,11 et 7,13 ppm confirmant la présence de quatre unités d'acide gallique (tableau 39). De la même façon, les signaux de quatre hamaméloses sont observés (figure 62). L'analyse des spectres COSY et HSQC révèle la présence, comme dans **Cgt6** de deux unités de D-hamamelofuranose (α et β) identifiés à partir de leurs protons anomériques à 5,32 ppm (s) et 5,22 ppm (s). Les deux autres unités de D-hamamélose, dont les protons anomériques sont à

5,25 ppm (s) et 4,78 ppm (s), sont identifiées comme les formes pyranoses α et β caractérisées par le blindage des protons et carbones C-3 et C-4.

Les faibles valeurs des constantes de couplage entre les protons H-4 et H-5 (entre 0 et 2,6 Hz), dans la forme pyranose confirment la position équatoriale du proton H-4 (tableau 39). Les valeurs des déplacements chimiques des carbones des quatre conformères de ce sucre sont en accord avec les valeurs reportées dans la littérature^{99, 102, 103}.

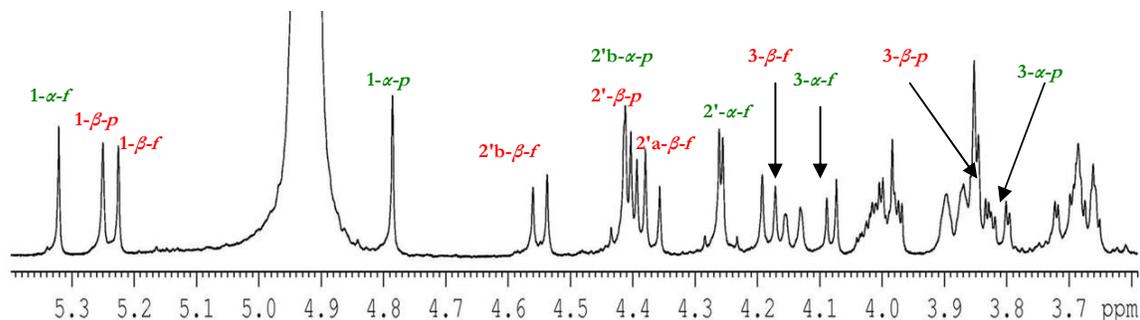
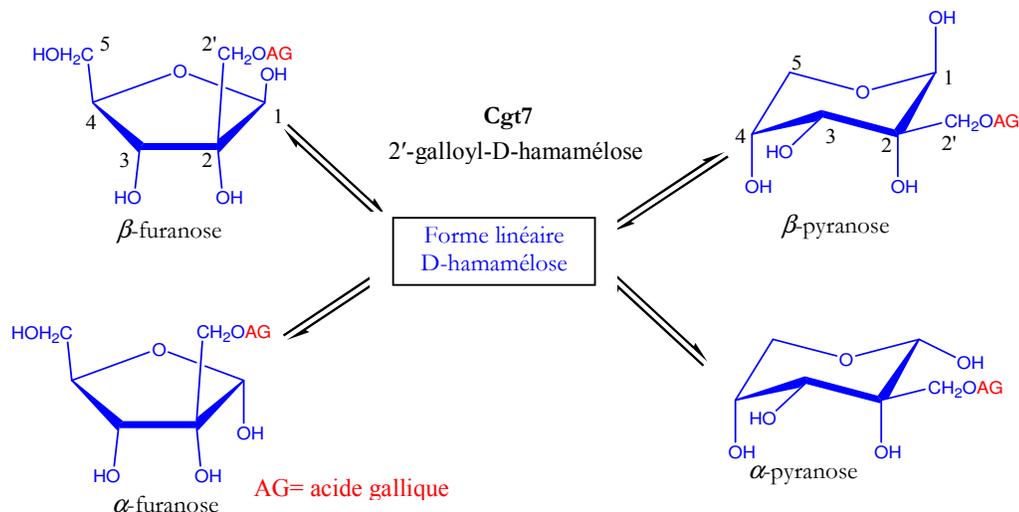


Figure 62 : Spectre RMN ^1H de Cgt7 (CD_3OD), partie osidique. (p =pyranose, f =furanose)

Le déblindage du carbone C-2' dans les quatre formes suggère le site de substitution par l'acide gallique. Ceci est confirmé par la corrélation visualisée sur le spectre HMBC entre les protons H-2' des quatre conformères avec les carbonyles des acides galliques.

Le composé **Cgt7** est le 2'-*O*-galloyl-D-hamamélose. En l'absence d'un substituant en position 5, ce composé se trouve en équilibre entre quatre conformations : α -hamamelofuranose, β -hamamelofuranose, α -hamamelopyranose et β -hamamelopyranose. Les formes pyranoses se trouvent en conformation $^1\text{C}_4$ ⁹⁹. Il faut noter que même à l'état solide (cristaux), l'hamamélose se trouve en équilibre entre ces quatre conformations avec la forme furanose majoritaire^{103, 104}.



Le composé **Cgt7** a déjà été isolé à partir des écorces de tronc de *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae)⁹⁹.

Les composés **Cgt5**, **Cgt6** et **Cgt7** sont des di- et des mono-galloylhamaméloses dérivés de l'hamamelitanin ou (2',5-di-*O*-galloyl-*D*-hamamélose) isolé de *Hamamelis virginiana*⁹⁹ et des écorces de plusieurs Fagaceae (*Castanea sativa*¹⁰¹, *Castanopsis cupidata*¹⁰²)

Tableau 39 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) du composé **Cgt7** dans CD₃OD.

<i>α</i> -furanose		<i>β</i> -furanose		<i>α</i> -pyranose		<i>β</i> -pyranose		
δ_H (m, J Hz)	δ_C							
Hamamélose								
1	5,32 (s)	98,8	5,22 (s)	102,6	4,78 (s)	96,0	5,25 (s)	96,0
2	-	77,9	-	81,0	-	76,4	-	76,4
2'a	4,24 (d, 11,4)	66,0	4,39 (d, 11,4)	67,4	4,18 (d, 10,7)	67,9	4,36 (d, 11,4)	67,9
2'b	4,27 (d, 11,4)	-	4,42 (d, 11,4)	-	4,40 (d, 10,7)	-	4,55 (d, 11,4)	-
3	3,97 (d, 7,8)	71,7	4,08 (d, 7,6)	73,2	3,85 (m)	69,1	3,84 (m)	67,4
4	4,02 (m)	83,1	3,99 (m)	84,5	3,90 (m)	71,1	3,87 (m)	71,1
5a	3,67 (dd, 11,8-1,9)	62,4	3,66 (dd, 11,8-2,6)	64,2	3,67 (m)	64,2	3,70 (dd, 12,3-2,5)	64,2
5b	3,84 (dd, 11,8-2,5)	-	3,81 (dd, 11,8-2,8)	-	3,98 (dd, 12,3-2,6)	-	4,14 (dl, 12)	-
Acide gallique								
1''	-	121,1	-	121,5	-	121,1	-	121,5
2''	7,10 (s)	110,2	7,13 (s)	110,3	7,08 (s)	110,4	7,11 (s)	110,3
3''	-	146,5	-	146,5	-	146,5	-	146,5
4''	-	140,0	-	140,0	-	140,0	-	140,0
5''	-	146,5	-	146,5	-	146,5	-	146,5
6''	7,10 (s)	110,2	7,13 (s)	110,3	7,08 (s)	110,4	7,11 (s)	110,3
7''	-	168,4	-	168,5	-	168,2	-	168,5

IV. 2. 3. 3,4-dihydroisocoumarines

IV. 2. 3. 1. Structure plane de **Cgt8** et **Cgt9**

Les spectres UV des composés **Cgt8** et **Cgt9** montrent deux maxima d'absorption à 233 et 283 nm supposant la présence d'un système aromatique.

L'analyse des spectres IR met en évidence la présence d'un noyau aromatique (1618, 1519 et 1459 cm⁻¹). La bande d'absorption à 1680 cm⁻¹ caractérise un carbonyle d'ester conjugué, alors que la large bande d'absorption à 3429 cm⁻¹ indique la présence de nombreux groupements hydroxyles.

Les spectres de masse des composés **Cgt8** et **Cgt9** obtenus en ESI mode positif, présentent deux ions pseudomoléculaires à m/z 541 [M+H]⁺ et 563 [M+Na]⁺ pour **Cgt8** et 511 [M+H]⁺ et 533 [M+Na]⁺ pour **Cgt9**. Ces spectres montrent également des ions fragments [M+Na-162]⁺ et [M+H-162]⁺ du fait de la perte d'un hexose.

L'analyse des spectres de RMN ^1H et HSQC du composé **Cgt8** indique (tableau 40) :

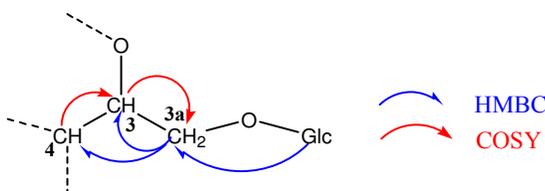
- trois protons à δ_{H} 6,44 (*s*, 2H) et 7,17 ppm (*s*, 1H) portés par trois CH aromatiques à δ_{C} 106,2 (2C) et 108,8 ppm (1C).
- deux méthoxyyles à δ_{H} 3,76 ppm (*s*, 6H) et δ_{C} 56,7 ppm,
- onze protons entre 3,22 et 4,90 ppm :
 - un proton à 4,59 ppm (*sl*), porté par un CH saturé en α d'un cycle aromatique (δ_{C} 38,9 ppm),
 - quatre protons de deux oxyméthylènes, l'un (CH_2OR) à 3,82 et 3,95 ppm (δ_{C} 71,0 ppm) et l'autre (CH_2OH) à 3,67 et 3,85 ppm (δ_{C} 62,6 ppm),
 - un proton anomérique à 4,32 ppm (*d*, $J=7,8$ Hz),
 - cinq protons portés par des carbones oxygénés (CHOR).

Sur le spectre de RMN ^{13}C *J*-modulé, 20 signaux, comptant pour 24 atomes de carbones, sont détectés (tableau 40) :

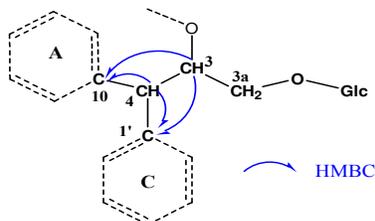
- un carbonyle de lactone à 167,1 ppm,
- six carbones aromatiques oxygénés entre 135,4 et 149,2 ppm,
- trois carbones aromatiques quaternaires non oxygénés à 115,9, 120,9 et 133,8 ppm,
- trois CH aromatiques dont deux équivalents à 106,2 ppm et un à 108,8 ppm,
- cinq CHOR, deux CH_2OR et un carbone anomérique à 104,6 ppm,
- deux méthoxyyles équivalents à 56,7 ppm,
- un CH aliphatique à 38,9 ppm en α d'un cycle aromatique.

Ces données indiquent la présence d'au moins deux noyaux aromatiques tri-oxygénés et d'un hexose. L'hexose a été identifié à un β -D-glucopyranose en position terminale.

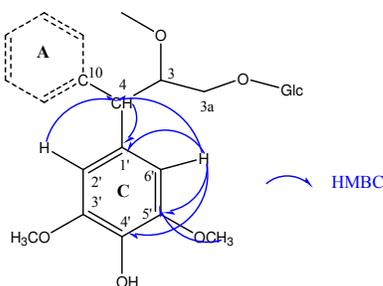
Dans la zone des protons osidiques, il reste quatre protons non attribués. Le singulet à 4,59 ppm (H-4) est couplé, sur le spectre COSY, au proton résonant à 4,90 ppm (H-3) (*td*, $J=6,6-1,1$ Hz), lui-même couplé aux deux protons d'un méthylène (CH_2OR) à 3,82 (H-3a) (*dd*, $J=10,9-6,3$ Hz) et 3,95 ppm (*dd*, $J=10,9-6,8$ Hz). Ce méthylène (CH_2OR) résonant à 71,0 ppm corrèle sur le spectre HMBC avec le proton anomérique du glucose (et inversement) et avec les protons à 4,59 et 4,90 ppm (figure 63). Ces résultats permettent d'établir le fragment suivant :



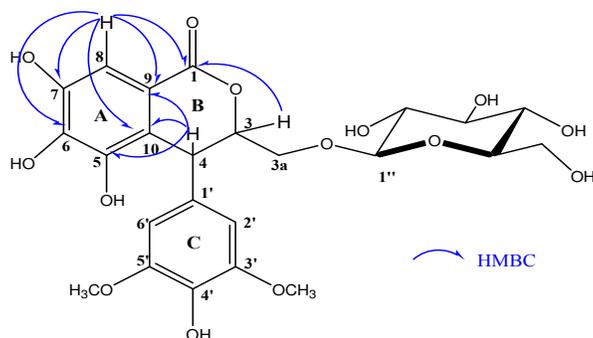
Les deux protons H-3 et H-4 corrélient sur le spectre HMBC avec les deux carbones aromatiques quaternaires à 133,8 (C-1') et 120,9 ppm (C-10), suggérant une disubstitution par les deux cycles aromatiques en position terminale de la chaîne tricarbonée (C-4).



Dans l'expérience HMBC, le carbone C-1' est corrélé aux deux protons aromatiques équivalents résonants à 6,44 ppm (H-2' et H-6'). Ces deux protons corrélient sur le spectre HMBC avec trois carbones aromatiques oxygénés dont deux porteurs de méthoxyles (C-3' + C-5') (figure 63).



Le dernier proton aromatique résonant à 7,17 ppm (H-8) corrélie, sur le spectre HMBC, avec le carbonyle à 167,1 ppm (C-1). Lui-même corrélie avec le proton H-3. Ces deux corrélations indiquent la présence d'un groupement isocoumarinique (cycles A et B). Le proton H-8 corrélie en plus avec quatre carbones quaternaires dont deux non oxygénés montrant des corrélations $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ avec le proton H-4, il s'agit du C-10 déjà attribué et du C-9. Les deux autres quaternaires sont oxygénés et attribués aux C-6 et C-7. Le dernier carbone oxygéné (C-5) est attribué par sa corrélation $^3J_{H-C}$ avec le proton H-4 (figure 63).



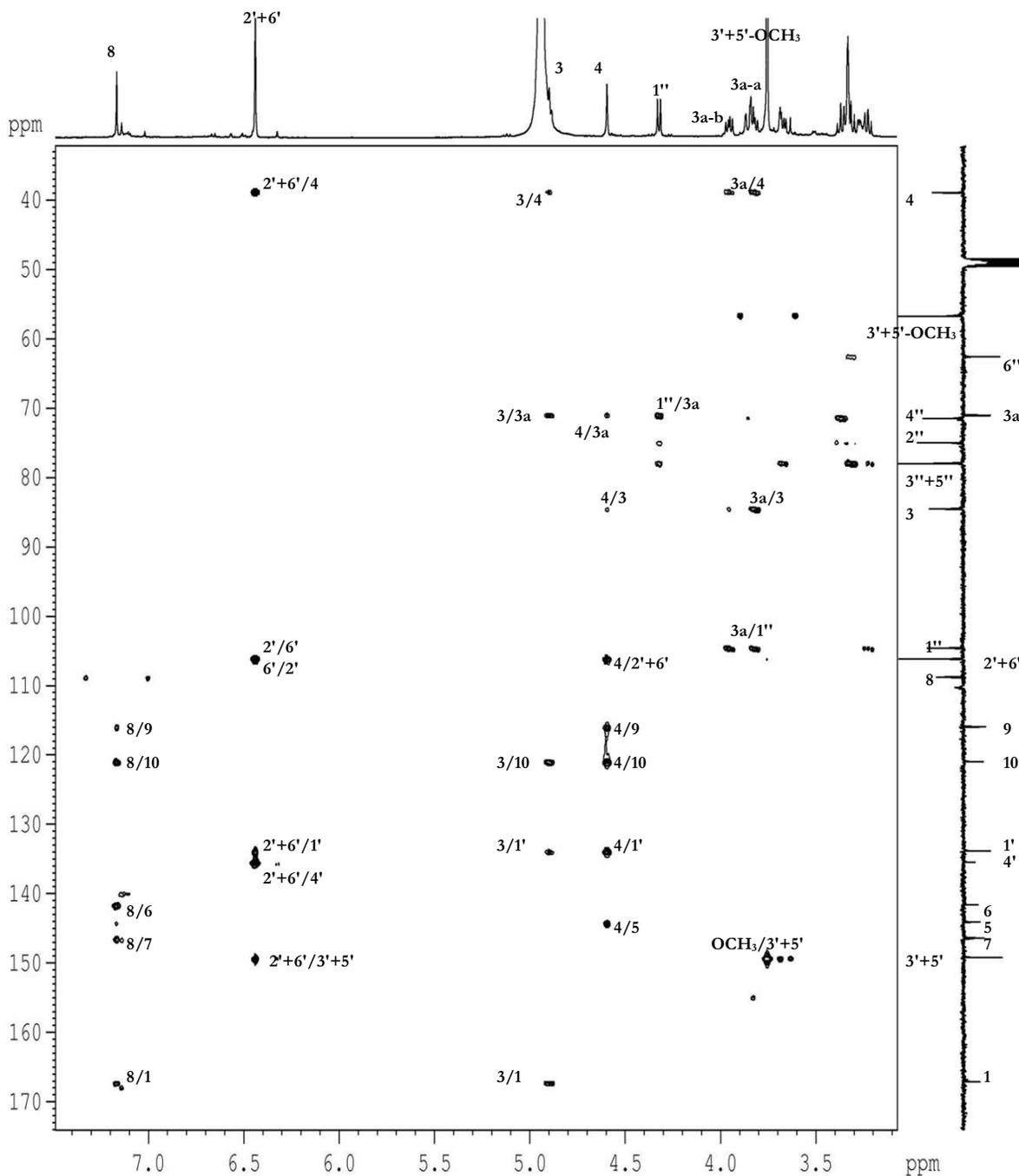


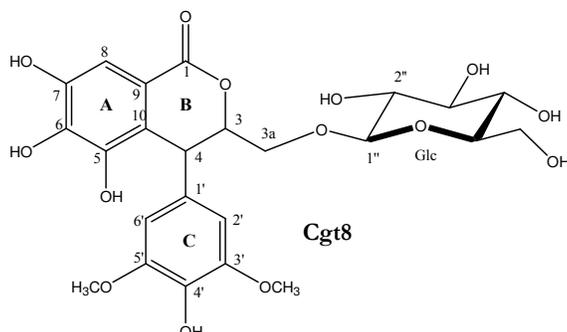
Figure 63 : Spectre HMBC de Cgt8 (CD₃OD).

Le spectre NOESY confirme cette structure par l'observation des effets NOE entre :

- les protons des deux méthoxyles en position 3' et 5' et les deux protons aromatiques H-2' et H-6',
- le proton anomérique H-1'' du glucose et les deux protons H-3a,

- les protons H-3 et H-4, et les deux protons H-2' et H-6'.

Le composé **Cgt8** est la 3,4-dihydro-5,6,7-trihydroxy-3-(β -D-glucopyranosyl-oxyméthyl)-4-(4'-hydroxy-3',5'-diméthoxy-phenyl)-isocoumarine.



La configuration absolue des carbones 3 et 4 sera discutée en même temps que celle du composé **Cgt9**.

Le composé **Cgt9** se différencie du composé **Cgt8** seulement par le mode de substitution du cycle **C**. Celui-ci présente, en RMN ^1H , trois protons caractéristiques d'un cycle aromatique « *ortho-para* » trisubstitué, résonant à 6,81 (H-2') (*d*, 1,9), 6,70 (H-5') (*d*, 8,2) et 6,50 ppm (H-6') (*dd*, 8,2-1,9) et un seul méthoxyle (δ_{H} 3,79 ppm et δ_{C} 56,3 ppm).

La corrélation visualisée sur le spectre HMBC, entre le carbone C-3' (δ_{C} 149,0 ppm) et les protons du groupement méthoxyle ainsi que l'effet NOE observé sur le spectre NOESY entre le méthoxyle et le proton H-2' indique que le groupement méthoxyle substitue le cycle **C** en position 3'.

Les signaux en RMN ^1H et ^{13}C *J*-modulé des cycles **A** et **B** sont comparables à ceux du composé **Cgt8** (tableau 40). Le β -D-glucose substitue l'hydroxyle en position 3a comme le confirme la tache de corrélation HMBC entre le proton H-1'' du glucose et le carbone 3a.

Le composé **Cgt9** est la 3,4-dihydro-5,6,7-trihydroxy-3-(β -D-glucopyranosyl-oxyméthyl)-4-(4'-hydroxy-3'-méthoxy-phenyl)-isocoumarine.

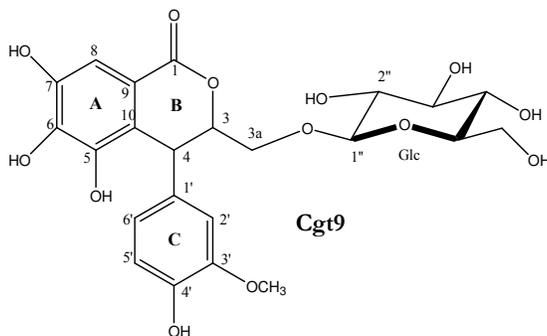
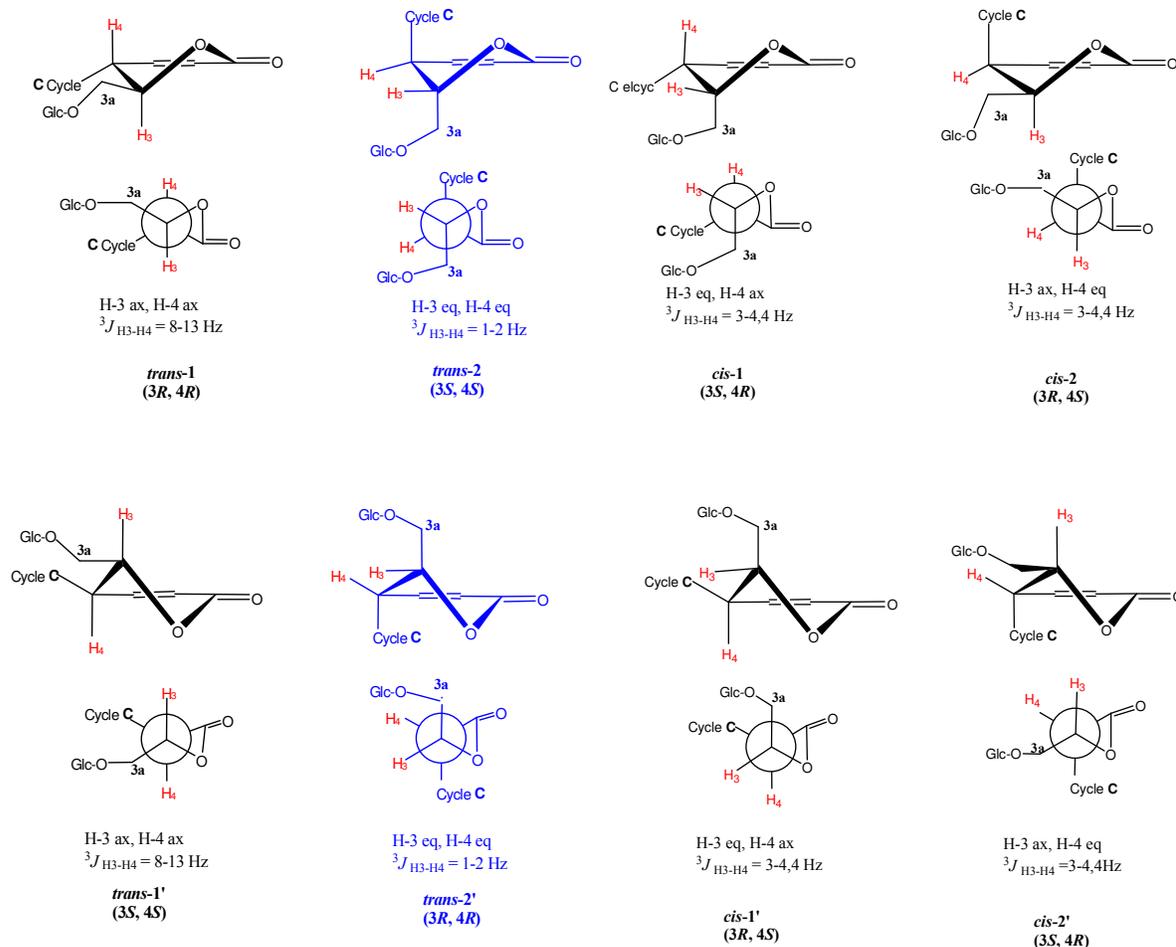


Tableau 40 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) des composés **Cgt8** et **Cgt9** dans CD_3OD .

	Cgt8		Cgt9	
	δ_{H} (m, J/Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J/Hz)	δ_{C}
Isocoumarine (cycles A et B)				
1	-	167,1	-	167,1
3	4,90 (<i>td</i> , 6,6-1,1)	84,5	4,89 (<i>td</i> , 6,6-1)	84,5
3a-a	3,82 (<i>dd</i> , 10,9-6,3)	71,0	3,83 (<i>dd</i> , 10,8-6,5)	71,1
3a-b	3,95 (<i>dd</i> , 10,9-6,8)		3,97 (<i>dd</i> , 10,8-6,6)	
4	4,59 (<i>s</i>)	38,9	4,58 (<i>s</i>)	38,6
5	-	144,1	-	144,0
6	-	141,6	-	141,6
7	-	146,4	-	146,3
8	7,17 (<i>s</i>)	108,8	7,16 (<i>s</i>)	108,8
9	-	115,9	-	115,9
10	-	120,9	-	121,2
Cycle C				
1'	-	133,8	-	134,5
2'	6,44 (<i>s</i>)	106,2	6,81 (<i>d</i> , 1,9)	112,6
3'	-	149,2	-	149,0
4'	-	135,4	-	146,3
5'	-	149,2	6,70 (<i>d</i> , 8,2)	116,0
6'	6,44 (<i>s</i>)	106,2	6,50 (<i>dd</i> , 8,2-1,9)	121,2
3'-OCH₃	3,76 (<i>s</i>)	56,7	3,79 (<i>s</i>)	56,3
5'- OCH₃	3,76 (<i>s</i>)	56,7	-	-
β-D-glucopyranose				
1''	4,32 (<i>d</i> , 7,8)	104,6	4,32 (<i>d</i> , 7,8)	104,6
2''	3,22 (<i>dd</i> , 8,9-7,8)	75,0	3,22 (<i>dd</i> , 8,8-7,8)	75,0
3''	3,37 (<i>t</i> , 8,9)	77,9	3,37 (<i>t</i> , 8,8)	77,9
4''	3,31 (<i>t</i> , 8,6)	71,4	3,32 (<i>t</i> , 8,7)	71,4
5''	3,27 (<i>ddd</i> , 8,6-5,4-2,2)	77,9	3,26 (<i>ddd</i> , 8,7-5,4-2,2)	77,9
6''a	3,67 (<i>dd</i> , 11,9-5,4)	62,6	3,67 (<i>dd</i> , 12,5-5,4)	62,6
6''b	3,85 (<i>dd</i> , 12-2,2)		3,85 (<i>dd</i> , 12-2,2)	

IV. 2. 3. 2. Détermination de la configuration absolue

Les conformations et configurations possibles pour ces composés sont représentées dans la figure 64. Selon Karplus, lorsque les protons H-3 et H-4 sont en position antipériplanaire (angle dièdre de 180°C), la constante de couplage $^3J_{\text{H3-H4}}$ doit être de l'ordre de 10 à 13 Hz (conformation *trans*-1 et *trans*-1'). À l'inverse, lorsque les protons H-3 et H-4 sont en position synclinale ou conformation gauche (angle dièdre de 60°C)¹⁰⁵, la valeur de cette constante sera moins élevée, 3-4 Hz^{105, 106}. En général, la valeur d'une constante de couplage $J_{\text{eq-eq}}$ (1-2 Hz) est moins élevée que celle d'une constante $J_{\text{eq-ax}}$ (2-4 Hz)¹⁰⁶. Ces deux valeurs étant très proches, il est impossible de distinguer les conformations *trans*-2 (ou 2'), *cis*-1 (ou 1') et *cis*-2 (ou 2') par la simple mesure de la constante de couplage.



Les liaisons pseudo-axiales et équatoriales sont considérées comme axiales et équatoriales pour simplifier la représentation.

Figure 64 : Conformations et configurations possibles pour les composés Cgt8 et Cgt9.

➤ La valeur très faible de $^3J_{H3-H4}$ (1,1 Hz) et l'effet NOE observé sur le spectre NOESY entre les protons H-3 et H-4 (figure 65) confirment l'élimination des deux énantiomères *trans-1* et *trans-1'*.

➤ Les effets NOE observés sur le spectre NOESY, entre les protons H-4 et les deux protons H-3a permettent d'éliminer les deux énantiomères *cis-1* et *cis-1'*.

➤ Les effets NOE entre le proton H-3 et les protons H-2' et H-6' du cycle C permettent d'éliminer les deux énantiomères *cis-2* et *cis-2'*.

Il apparaît d'après les effets NOE observés que les composés **Cgt8** et **Cgt9** sont donc en configuration *trans-2* ou *trans-2'*, soit une configuration absolue 3*S*,4*S* ou 3*R*,4*R*.

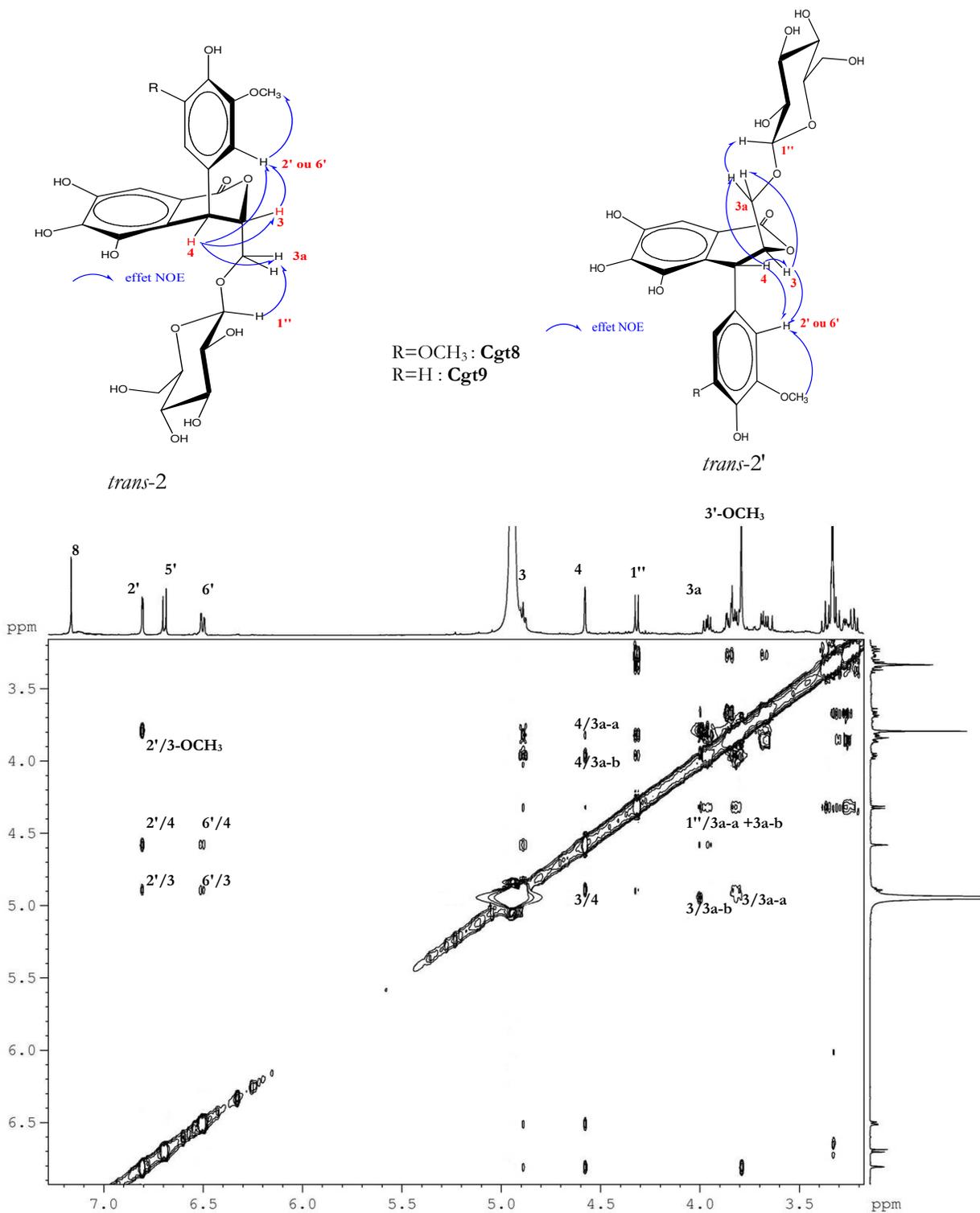


Figure 65 : Spectre NOESY de **Cgt9** (CD₃OD).

Les spectres de dichroïsme circulaire (DC) entre 200 et 300 nm des composés **Cgt8** et **Cgt9**, mesurés dans le méthanol, montrent trois pics d'absorption à 235 (positif), 246 (négatif) et 290 nm (positif) (figure 66). La bande à 246 nm est caractéristique du chromophore conjugué (C=C-C=O) ^{107, 108}.

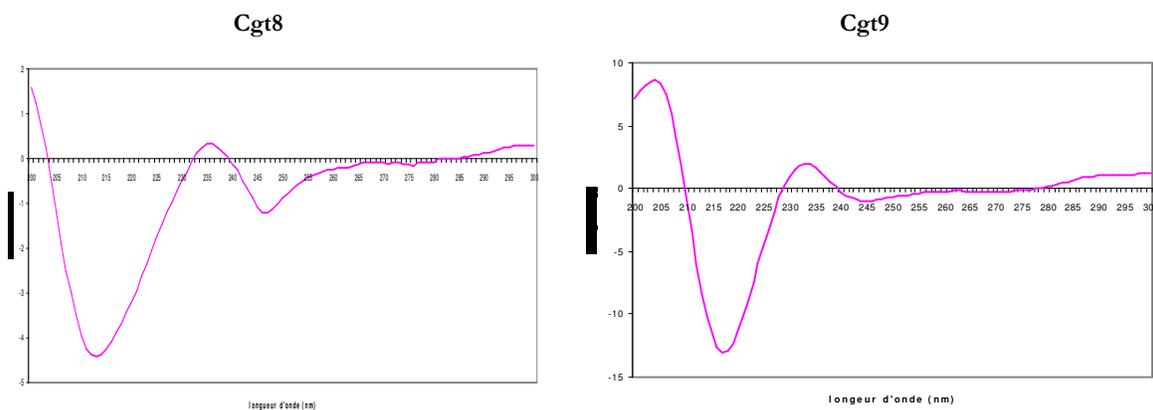


Figure 66 : Spectres de dichroïsme circulaire des composés Cgt8 et Cgt9 dans le méthanol.

Le signe de l'effet Cotton de la bande $n \rightarrow \pi^*$ du chromophore isochromanone **B** (entre 240 et 270 nm) est indicatif de l'angle de torsion de la liaison O=C-C(C=C). Ce signe sera négatif si le substituant en position 3 est α et il sera positif si le substituant en position 3 est β ^{107, 108}. Il est indépendant du substituant en position 4 et de ceux sur le noyau aromatique A ^{109, 110}.

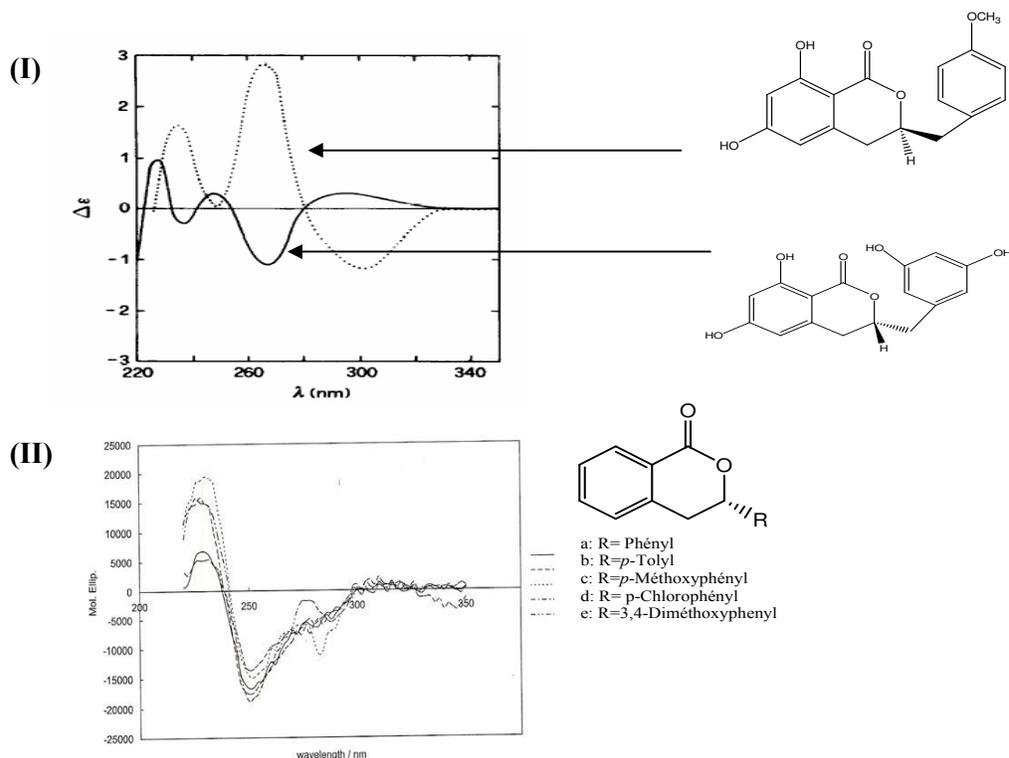
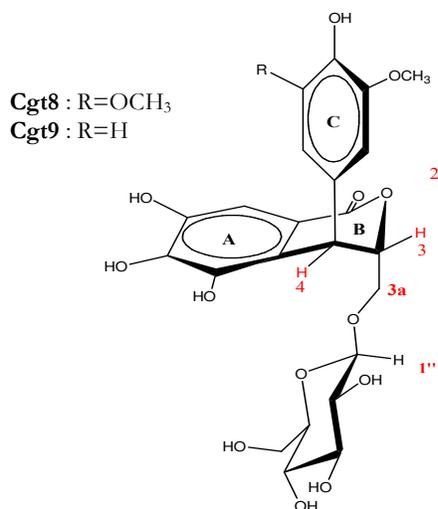


Figure 77 : Spectres de dichroïsme circulaire de différents composés à squelette isocoumarinique, (I) ¹⁰⁸, (II)

L'effet Cotton négatif observé à 246 nm permet de déterminer avec certitude la configuration absolue pour le carbone 3 des composés **Cgt8** et **Cgt9**, avec le groupement portant le glucose en position α ¹⁰⁷⁻¹¹². Selon les données RMN, les deux substituants en 3 et 4 du cycle **B** sont en position transdiaxiale (configuration *trans*-2 ou *trans*-2'), et selon le DC, le groupement portant le glucose est en position α -axiale et le cycle **C** est en position β -axiale (configuration *trans*-2), ce qui correspond à la configuration absolue 3*S*,4*S* pour **Cgt8** et **Cgt9**.



Les deux composés **Cgt8** et **Cgt9** montrent un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D \approx +15^\circ$ et sont identifiés comme étant :

- pour **Cgt8** : le (3*S*,4*S*) (+), 3,4-dihydro-5,6,7-trihydroxy-3-(β -D-glucopyranosyl-oxyméthyl)-4-(4'-hydroxy-3',5'-diméthoxy-phenyl)- 1*H*-[2]-benzopyrane-1-one.
- pour **Cgt9** : le (3*S*,4*S*) (+), 3,4-dihydro-5,6,7-trihydroxy-3-(β -D-glucopyranosyl-oxyméthyl)-4-(4'-hydroxy-3'-méthoxy-phenyl)- 1*H*-[2]-benzopyrane-1-one.

IV. 2. 3. 3. Origine biogénétique

Le squelette 3,4-dihydro-1*H*-[2]-benzopyrane-1-one correspond au squelette 3,4-dihydroisocoumarine, or les composés **Cgt8** et **Cgt9** n'appartiennent pas à la classe des « vraies » isocoumarines car ils ne possèdent pas d'hydroxyle en position 8 (figure 46)^{92, 113}.

Ces deux composés sont très probablement le résultat d'une condensation entre un acide gallique et un alcool phénolique en C-6-C-3, l'alcool sinapique pour **Cgt8** et l'alcool férulique pour **Cgt9** (figure 68).

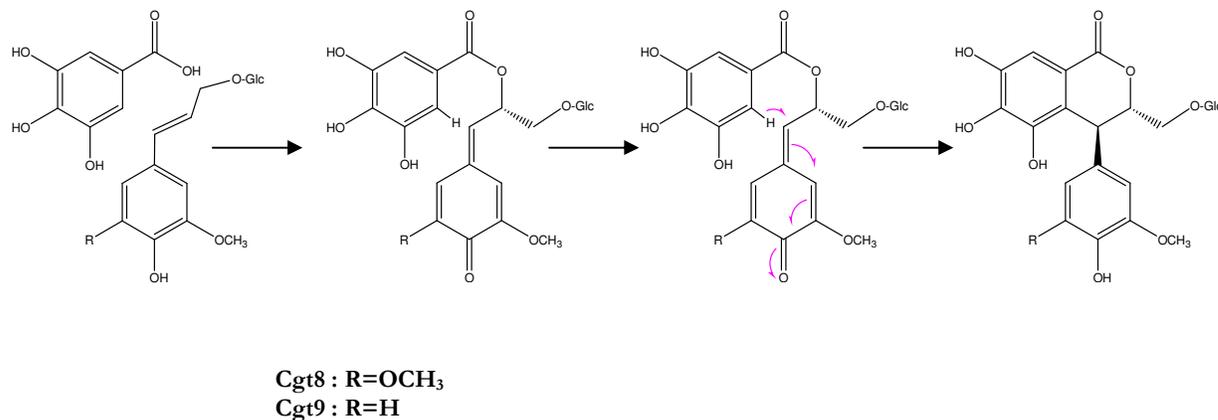
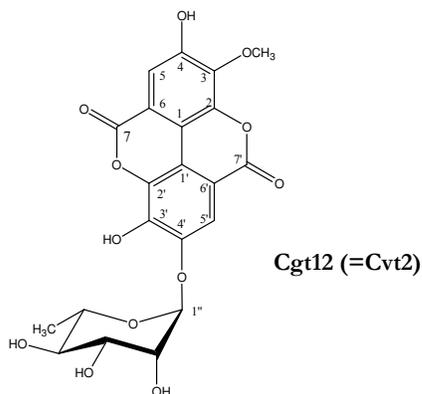


Figure 68 : Biosynthèse possible des composés Cgt8 et Cgt9.

IV. 2. 4. Ellagitanin Cgt12

Le composé **Cgt12** a été identifié par comparaison des spectres en RMN ¹H, COSY et ESI-MS à l'acide 3-*O*-méthyl ellagique 4'-*O*- α -L-rhamnopyranoside, isolé des écorces de tronc de *C. villosum* qui sera décrit sous le nom de **Cvt2**.



IV. 3. Détermination structurale des ellagitanins des écorces de tronc de *C. villosum*

À partir des écorces de tronc de *Caryocar villosum*, nous avons isolé à côté des saponosides, cinq polyphénols (**Cvt1** à **Cvt5**) : l'acide ellagique et quatre de ses rhamnosides dont trois nouveaux, acétylés en position 2, 3 ou 4 (**Cvt3** à **Cvt5**) (figure 69).

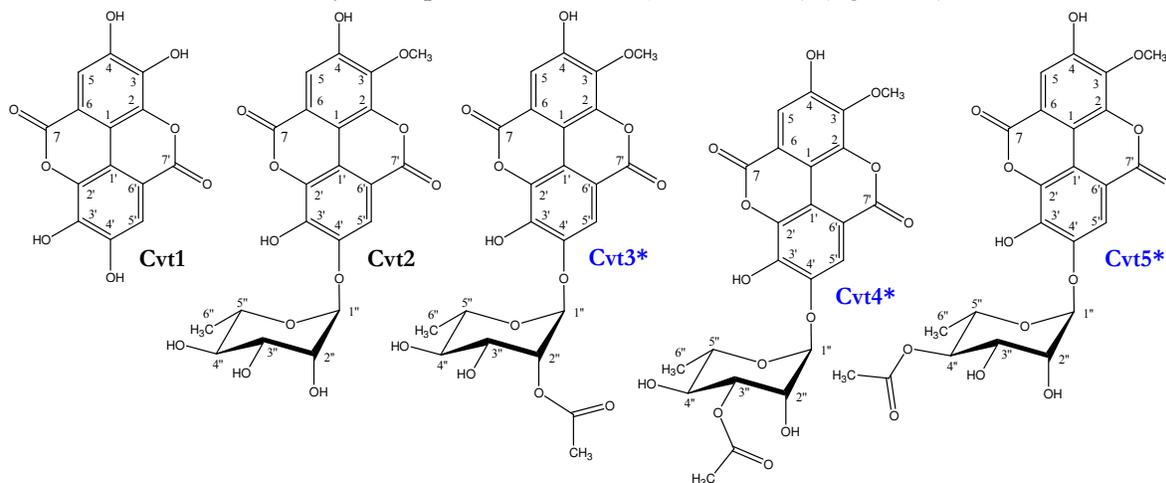


Figure 69 : Structures des ellagitanins isolés des écorces de tronc de *C. villosum*.
 (* = composé de structure nouvelle)

IV. 3. 1. Acide ellagique Cvt1

Sur le spectre de masse obtenu en ESI mode négatif de **Cvt1**, est repéré un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 301, traduisant une masse moléculaire de 302 Da.

Le spectre de RMN 1H ne représente qu'un seul singulet à 7,40 ppm, intégrant pour deux protons aromatiques correspondant aux protons H-5 et H-5' (tableau 41).

Le spectre de RMN ^{13}C J -modulé renferme six signaux pour 14 carbones (tableau 42) :

- les deux carbonyles des lactones aromatiques C-7 et C-7' à 160,1 et 160,4 ppm,
- un signal à 113,4 ppm pour les quatre carbones C-1, C-1', C-6 et C-6',
- les six carbones C-2 à C-4 et C-2' à C-4' à 136,5 (4 C) et 148,9 ppm (2 C),
- les deux méthines aromatiques C-5 et C-5' à 109,2 ppm.

Les attributions des carbones qui figurent ci-dessous ont été obtenues par l'analyse des spectres HMBC et HSQC J -modulé et la comparaison avec les données de la littérature pour l'acide ellagique ¹¹⁴.



IV. 3. 2. Composé connu Cvt2

Le spectre UV de **Cvt2** (=Cgt12) montre des absorptions maximales à 253, 276 et 352 nm, caractéristiques d'un acide ellagique.

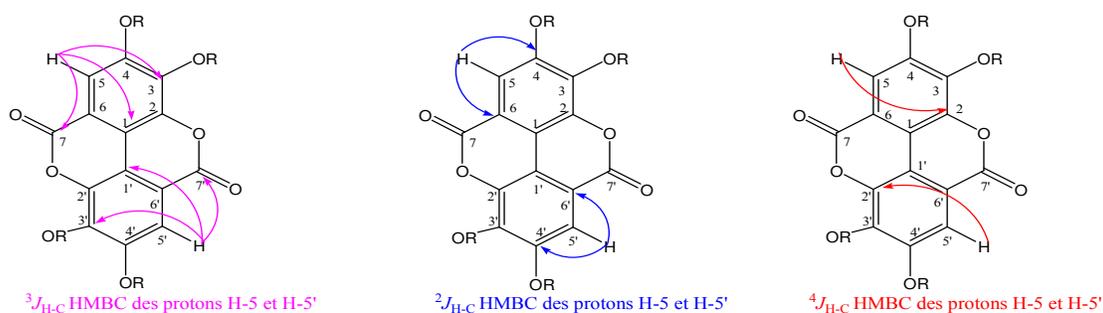
Sur son spectre de masse obtenu en ESI-MS mode négatif, **Cvt2** développe un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 461. La fragmentation MS^2 de cet ion engendre des ions fragments à m/z 315 $[M-H-146]^-$ et 300 $[M-H-146-15]^-$, correspondant à la perte d'un désoxyhexose et d'un méthyle. Cela indique que le composé **Cvt2** est un glycoside d'acide ellagique substitué par un méthyle.

Le spectre de RMN 1H montre les signaux de l'acide ellagique (tableau 41) : deux singulets aromatiques à 8,14 et 8,58 ppm (H-5 et H-5'), un singulet intégrant pour trois protons à 4,28 ppm (un méthoxyle) et les signaux d'une unité osidique (δ_{H-1} 6,53 ppm).

Le spectre de RMN ^{13}C J -modulé renferme (tableau 42) : les douze carbones aromatiques entre 108,5 et 155,1 ppm, dont six sont porteurs d'oxygène et les deux carbonyles lactoniques à 160,3 et 160,7 ppm de l'acide ellagique, un méthoxyle aromatique à 62,1 ppm et les six carbones d'un désoxyhexose (δ_{C-1} 103,0 ppm).

L'analyse des spectres COSY et HSQC J -modulé permet d'identifier sans ambiguïté le désoxyhexose à un α -L-rhamnose en position terminale.

L'expérience HMBC permet d'attribuer la totalité des carbones de l'acide ellagique à partir des deux protons aromatiques H-5 et H-5'. Les taches correspondant aux corrélations $^3J_{H-C}$, sont plus intenses que celles correspondant aux corrélations $^2J_{H-C}$. Les faibles taches qui correspondent aux corrélations $^4J_{H-C}$ sont détectées et permettent l'attribution des carbones C-2 et C-2' (figure 70).



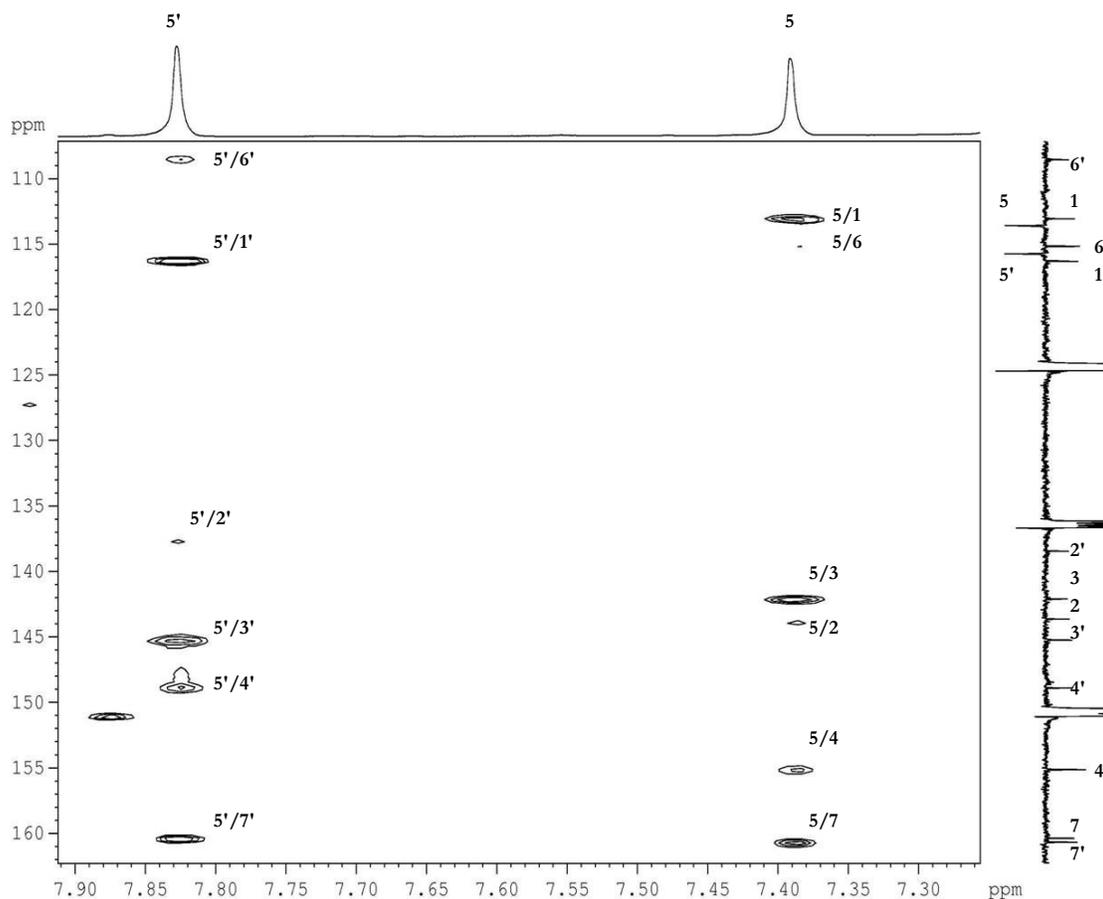


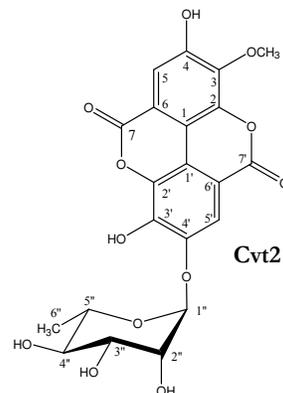
Figure 70 : Spectre HMBC de Cvt2, zone aromatique (pyridine- d_6).

Les corrélations observées pour le composé **Cvt2** sur le spectre HMBC montrent que l'acide ellagique est substitué diamitralement par un méthyle sur l'hydroxyle en position 3 (ou 4) d'un côté, et par un rhamnose sur l'hydroxyle en position 3' (ou 4') de l'autre. Ces corrélations ne permettent pas de positionner ces deux substituants.

La présence sur le spectre NOESY d'un effet NOE entre le proton anomérique du rhamnose et le proton H-5' et l'absence de cet effet entre les protons du méthoxyle et le proton H-5 permettent de placer le méthyle en position 3 et le rhamnose en position 4'.

Le composé **Cvt2** est l'acide 3-*O*-méthyl 4'-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-ellagique.

Ce composé a déjà été isolé à partir du bois et des écorces d'*Eucalyptus globulus*, *E. regnas* et *E. deglupta* (Myrtaceae)¹¹⁴ et des feuilles d'*Alangium ridleiyi* (Alangiaceae)¹¹⁵ et *Rubus imperialis* (Rosaceae)¹¹⁶. Les données spectrales UV et RMN sont en accord avec celles reportées dans la littérature¹¹⁵.



IV. 3. 3. Ellagitanins nouveaux

L'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 503 observé sur les spectres de masse obtenus en ESI-MS mode négatif pour les trois composés **Cvt3**, **Cvt4** et **Cvt5** indique que ces molécules sont des isomères de masse moléculaire 504 Da, soit 42 *uma* de plus par rapport au composé **Cvt2**. Ceci sous-entend la présence supplémentaire d'un acétate. La fragmentation MS^2 de l'ion $[M-H]^-$ engendre des ions fragments à m/z 443 $[M-H-60]^-$, 428 $[M-H-60-15]^-$ et 315 $[M-H-146-42]^-$ correspondant à la perte de l'acétate sous la forme d'acide acétique (CH_3COOH), d'un méthyle et d'un désoxyhexose acétylé (146+42).

Comparativement au spectre de **Cvt2**, les spectres de RMN 1H de ces composés montrent un signal supplémentaire caractéristique des protons méthyliques d'un groupement acétate. Il s'agit d'un singulet intégrant pour trois protons, déblindés à 2,12 ppm pour **Cvt3** et 2,14 ppm pour **Cvt4** et **Cvt5** (figure 71, tableau 41).

Sur les spectres de RMN ^{13}C *J*-modulé, sont localisés effectivement, deux signaux supplémentaires correspondant à un carbonyle à 172,6 ppm pour **Cvt3** et **Cvt4** et 171,1 ppm pour **Cvt5**, et à un méthyle à 20,4 ppm pour **Cvt3** et **Cvt4** et 19,6 ppm pour **Cvt5** (tableau 42).

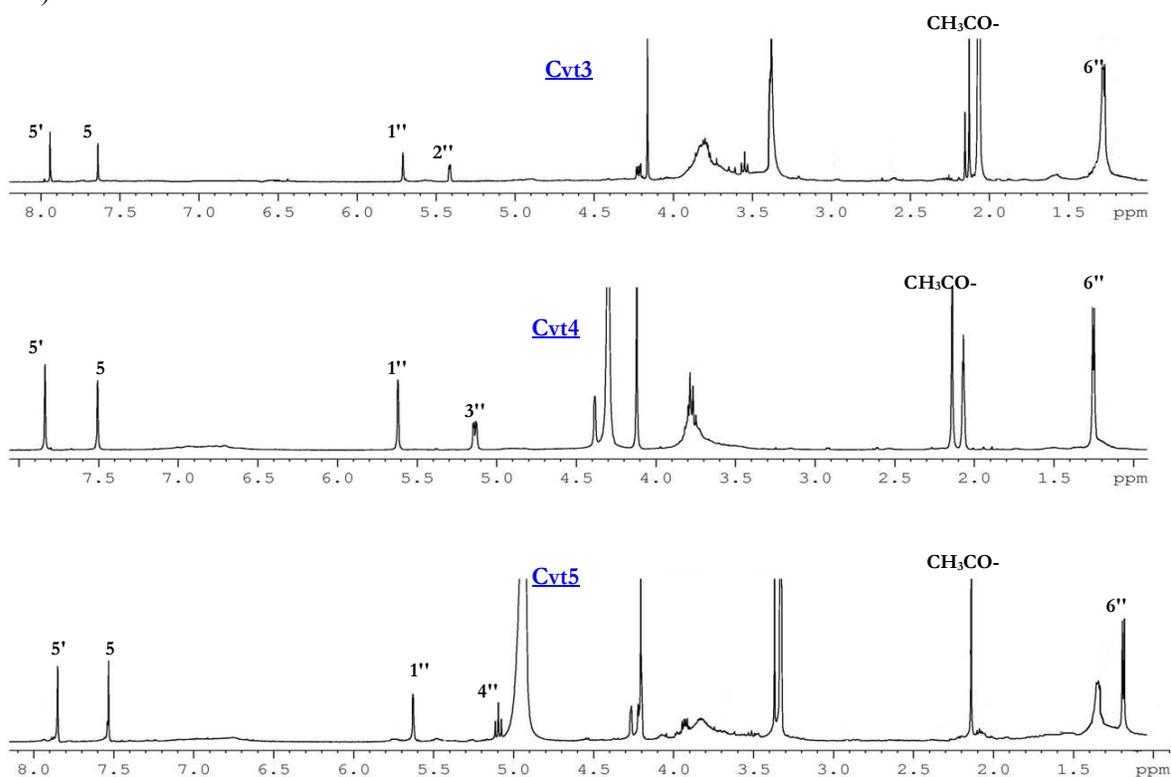


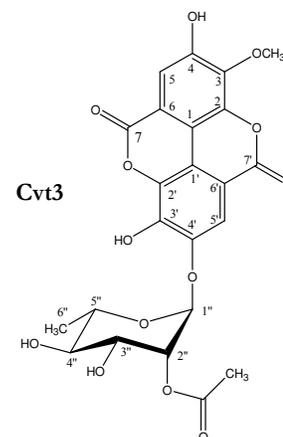
Figure 71 : Spectre de RMN 1H des composés **Cvt3**, **Cvt4** et **Cvt5**.

IV. 3. 3. 1. Composé Cvt3

Comme précédemment observé pour **Cvt2**, l'identification d'un α -L-rhamnose est réalisée aisément de l'analyse des spectres COSY, TOCSY et HSQC *J*-modulé (tableaux 41 et 42). Le déblindage ($\Delta \delta_{\text{H}} = +0,39$ ppm) du proton H-2'' du rhamnose (figure 71) et le blindage des carbones adjacents C-1'' à 98,1 ppm ($\Delta \delta_{\text{C}} = -4,9$ ppm) et C-3'' à 69,6 ppm ($\Delta \delta_{\text{C}} = 3,8$ ppm), suite à un effet β blindant du groupement acétate sont en faveur d'une acétylation de l'hydroxyle en position 2'' du rhamnose (tableau 42).

L'acétylation en position 2'' du rhamnose est confirmée par l'observation sur le spectre HMBC d'une corrélation $^3J_{\text{H-C}}$ entre le proton H-2'' et le carbonyle de l'acétate.

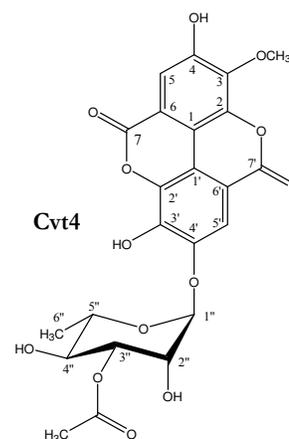
Le composé **Cvt3** est l'acide 3-*O*-méthyl-4'-*O*-(2''-*O*-acétyl- α -L-rhamnopyranosyl) ellagique.



IV. 3. 3. 2. Composé Cvt4

La structure du régioisomère **Cvt4** a été élucidée de la même manière que pour **Cvt3** puisqu'il ne diffère de **Cvt3** que par la position de l'acétate sur le rhamnose.

Le proton H-3'' du rhamnose est particulièrement déblindé à 5,13 ppm (figure 71) ce qui laisse supposer une estérification de la fonction hydroxyle en cette position. Ceci est confirmé par la corrélation HMBC observée entre le proton H-3'' et le carbonyle de l'acétate.

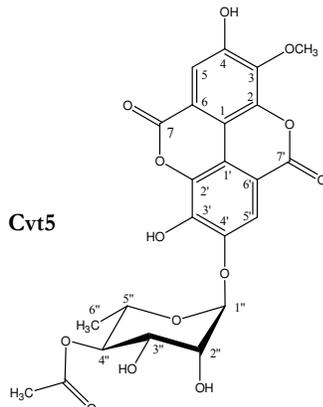


Le composé **Cvt4** est l'acide 3-*O*-méthyl 4'-*O*-(3''-*O*-acétyl- α -L-rhamnopyranosyl) ellagique.

IV. 3. 3. 3. Composé Cvt5

De la même manière, le déblindage du proton H-4'' du rhamnose à 5,09 ppm (figure 71) et le blindage des carbones C-3'' et C-5'' suite à un effet β blindant du groupement acétate ainsi qu'une corrélation $^3J_{\text{H-C}}$ HMBC entre le proton H-4'' et le carbonyle de l'acétate permettent de localiser celui-ci en position C-4'' du rhamnose.

Le composé **Cvt5** est l'acide 3-*O*-méthyl-4'-*O*-(4''-*O*-acétyle- α -L-rhamnopyranosyl) ellagique.



La présence sur le spectre NOESY de ces trois dérivés acylés d'un effet NOE entre le proton anomérique du rhamnose et le proton H-5' de l'acide ellagique et l'absence de cet effet entre les protons du méthoxyle et le proton H-5 confirment les positions de substitution en 3 pour le méthyle et en 4' pour le rhamnose.

Les composés acétylés **Cvt3**, **Cvt4** et **Cvt5** sont de structures nouvelles. Des composés de structure très proche possédant un rhamnose en position 3 de l'acide ellagique et substitué par un acétate en position 2, 3 ou 4, ont été isolés à partir des écorces de tronc d'*Eucalyptus globulus* (Myrtaceae)¹¹⁴. Des autres composés de structure très proche ont également été isolés à partir des écorces de tronc d'*Elaeocarpus parvifolius* (Elaeocarpaceae)¹⁹². L'acide ellagique dans ces composés est substitué par un méthyl en position 4 et par un rhamnose en position 3', ce rhamnose dans ces composés est substitué par un acétate en position 2, 3 ou 4. Un dérivé diacétylé a été isolé d'*Elaeocarpus mastersii* (Elaeocarpaceae)¹¹⁷.

Tableau 41 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) des composés **Cvt1**, **Cvt2**, **Cvt3**, **Cvt4** et **Cvt5**.

	Cvt1 (DMSO- <i>d</i> ₆)	Cvt2 (pyridine- <i>d</i> ₅)	Cvt3 (acétone- <i>d</i> ₆)	Cvt4 (CD ₃ OD)	Cvt5 (CD ₃ OD)
Acide ellagique					
5	7,40(s)	8,14(<i>s</i>)	7,63 (<i>s</i>)	7,50 (<i>s</i>)	7,54 (<i>s</i>)
5'	7,40(s)	8,58 (<i>s</i>)	7,93 (<i>s</i>)	7,83 (<i>s</i>)	7,85 (<i>s</i>)
-OCH₃	-	4,28 (<i>s</i>)	4,16 (<i>s</i>)	4,12 (<i>s</i>)	4,20 (<i>s</i>)
α-L-rhamnose					
1''	-	6,53 (<i>s</i>)	5,70 (<i>d</i> , 1,6)	5,62 (<i>d</i> , 1,6)	5,63 (<i>s</i>)
2''	-	5,02 (<i>m</i>)	5,41 (<i>dd</i> , 3,6-1,6)	4,38 (<i>dd</i> , 3,6-1,6)	4,26 (<i>m</i>)
3''	-	4,87 (<i>dd</i> , 9,2-2,8)	4,22 (<i>dd</i> , 9,7-3,6)	5,13 (<i>dd</i> , 9-3,6)	4,21(<i>dd</i> , 9,1-3,4)
4''	-	4,52 (<i>t</i> , 9,2)	3,55 (<i>t</i> , 9,6)	3,78 (<i>t</i> , 9,5)	5,09 (<i>t</i> , 9,7)
5''	-	4,69 (<i>dq</i> , 9,3-6,3)	3,79 (<i>m</i>)	3,78 (<i>m</i>)	3,93 (<i>dq</i> , 9,5-6,3)
6''	-	1,76 (<i>d</i> , 6,1)	1,25 (<i>d</i> , 6,3)	1,25 (<i>d</i> , 6,3)	1,19 (<i>d</i> , 6,2)
Acétate					
CH₃-C=O	-	-	2,12 (<i>s</i>)	2,14 (<i>s</i>)	2,14 (<i>s</i>)

Tableau 42 : Déplacements chimiques en RMN ¹³C (125 MHz) des composés **Cvt1**, **Cvt2**, **Cvt3**, **Cvt4** et **Cvt5**.

	Cvt1 (DMSO- <i>d</i> ₆)	Cvt2 (pyridine- <i>d</i> ₅)	Cvt3 (acétone- <i>d</i> ₆)	Cvt4 (CD ₃ OD)	Cvt5 (CD ₃ OD)
Acide ellagique					
1	113,4	113,0	111,6	111,5	111,5
2	136,5	143,6	141,8	141,5	141,1
3	136,5	142,9	140,4	140,4	140,1
4	148,9	155,1	152,9	152,5	152,6
5	109,2	113,6	111,7	111,6	111,5
6	113,4	115,1	113,1	113,0	113,0
7	160,1	160,7	158,8	159,2	159,1
1'	113,4	116,3	115,0	114,6	114,6
2'	136,5	138,4	136,2	136,0	136,1
3'	136,5	145,2	140,9	141,3	141,2
4'	148,9	148,9	146,1	146,3	146,2
5'	109,2	115,7	111,7	111,6	112,1
6'	113,4	108,5	108,0	107,3	107,4
7'	160,4	160,3	158,8	159,1	159,1
-OCH₃	-	62,1	61,1	61,1	60,6
α-L-rhamnose					
1''	-	103,0	98,1	99,7	100,0
2''	-	72,7	72,4	67,7	70,3
3''	-	73,4	69,6	74,2	68,6
4''	-	74,5	73,7	69,9	73,7
5''	-	72,3	70,8	69,0	67,6
6''	-	19,4	17,1	17,1	16,4
Acétate					
CO	-	-	172,6	172,6	171,1
CH₃	-	-	20,4	20,4	19,6

IV. 4. Conclusion

Les écorces de tronc de *Caryocar glabrum* se sont révélées très riches en composés polyphénoliques. En plus des deux saponosides, dix hétérosides polyphénoliques dont cinq de structures nouvelles ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique :

- un glycoside de l'alcool 3,4,5-triméthoxybenzylique (**Cgt1**),
- trois glycosides du 3,4,5-triméthoxyphénol (**Cgt2**, **Cgt3**, **Cgt4**),
- trois galloylhamaméloses (**Cgt5**, **Cgt6**, **Cgt7**),
- deux glycosides de 3,4-dihydroisocoumarine phénylée (**Cgt8**, **Cgt9**),
- un glycoside de l'acide ellagique (**Cgt12**).

Les glycosides d'alcool benzylique ou phénolique sont rencontrés dans les écorces de tronc de plusieurs espèces⁹⁴⁻⁹⁸. Les glycosides phénoliques **Cgt3** et **Cgt4** sont de structures nouvelles mais un composé de structure similaire dans lequel l'acide gallique est en position 6 du glucose a montré une activité antipaludique avec une CI_{50} à 3,2 μ M contre des souches de *Plasmodium falciparum* (chloroquino-résistantes et chloroquino-sensibles). Ce composé ne montre pas d'activité cytotoxique sur des cellules mammaires à la concentration maximale de 100 μ M suggérant une activité sélective pour le parasite⁹⁷.

Les galloylhamaméloses **Cgt5**, **Cgt6** et **Cgt7** sont des di- et des mono-galloylhamaméloses dérivés de l'hamamelitanin ou 2',5-di-O-galloyl-D-hamamélose. Le composé **Cgt5** est de structure nouvelle et les composés **Cgt6** et **Cgt7** ont déjà été isolés des écorces de tronc d'une espèce d'Hamamelidaceae (*Hamamelis virginiana*)⁹⁹ et de deux espèces de Fagaceae (*Castanea sativa*¹⁰¹, *Castanopsis cupidata*¹⁰²) mais ils sont nouvellement isolés dans la famille des Caryocaraceae.

Les galloylhamaméloses sont considérés comme des agents d'anti-vieillessement cutané¹¹⁹. Ils montrent une très forte propriété antioxydante, supérieure à celle de l' α -tocopherol et de l'acide ascorbique¹¹⁸. Ce sont des piègeurs des radicaux libres ou superoxydes, et des protecteurs contre les irradiations par des lampes ultra violet-B (UV-B)¹¹⁸⁻¹²⁰. Ils possèdent une activité inhibitrice contre l'effet toxique du TNF- α (tumeur necrosis factor- α),¹¹⁹ et un effet antimutagène¹²¹.

Les deux composés **Cgt8** et **Cgt9** appartiennent à une nouvelle classe de dihydroisocoumarines. Ils sont très probablement le résultat d'une condensation entre un acide gallique et un alcool phénolique en C-6-C-3, l'alcool sinapique pour **Cgt8** et l'alcool férulique pour **Cgt9**.

L'étude chimique des écorces de tronc de *Caryocar villosum* a conduit à l'isolement de cinq polyphénols possédant l'acide ellagique comme génine : l'acide ellagique et quatre de ses rhamnosides dont trois de structures nouvelles, acétylés en position 2, 3 ou 4 du rhamnose.

L'acide ellagique possède une activité antimicrobienne observée sur plusieurs souches ¹²² (en µg/ml):

	CMI	CMB
- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9538	0,63	2,50
- <i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 11047	0,31	0,63
- <i>Micrococcus luteus</i> NCTC 9341	0,31	0,63
- <i>Micrococcus coli</i> NCTC 8196	2,50	>2,50
- <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,63	0,63
- <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,25	2,50

Un examen rapide par RMN de la fraction éluée avec le mélange MeOH:H₂O 40:60 lors de la première étape de purification par VLC sur silice greffé C₁₈ de l'extrait méthanolique des écorces de tronc de *C. villosum* a confirmé la présence des galloylhamaméloses et les glycosides de 3,4,5-triméthoxyphénol. Le travail de purification de cette fraction est en cours de réalisation et nous avons déjà isolé les galloylhamaméloses et les triméthoxyphénols. Nous cherchons maintenant la présence (ou l'absence) des composés dihydroisocoumariniques dans cette fraction.

Deuxième partie

Étude chimique de *Guioa crenulata*

- I. Présentation des Sapindaceae
- II. Botanique et travaux antérieurs de *Guioa crenulata*
- III. Chimie extractive
- IV. Chimie structurale
- V. Conclusion

I. Présentation des Sapindaceae

I. 1. Rappel botanique ¹²³⁻¹²⁵

La famille des Sapindaceae est importante par son nombre de genres et de représentants. Ce sont des plantes ligneuses, arbres, arbustes ou plantes grimpantes, poussant exclusivement dans les zones intertropicales et subtropicales. Ces végétaux ont été utilisés traditionnellement comme savons, comme poisons de pêche et comme expectorants du fait de leur forte teneur en saponosides. Leurs fruits sont souvent comestibles, l'un des plus connus est le litchi (*Litchi chinensis*). Les graines de *Paullinia sorbilis* et de *Paullinia cupana* sont utilisées écrasées et mélangées avec d'autres ingrédients dans une boisson stimulante connue au Brésil sous le nom de "Guarana".

D'un point de vue botanique, la famille des Sapindaceae appartient à l'ordre des Sapindales, superordre des Rutiflorae, sous-classe des Rosidae, classe des Dicotylédones, sous-embranchement des Angiospermes (figure 72).

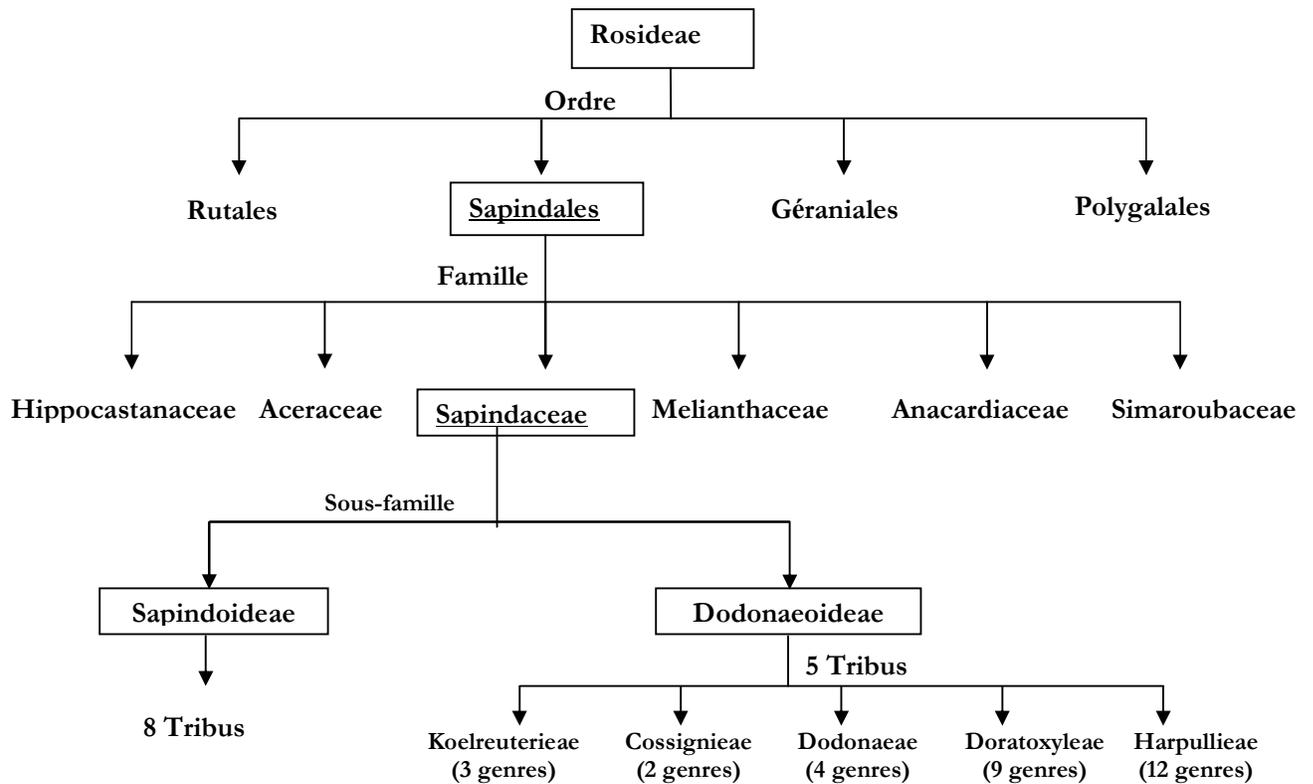


Figure 72 : Classification botanique de la famille des Sapindaceae ¹²³.

Cette famille a été divisée par Radlkofer en deux sous-familles en fonction de la morphologie de l'ovule :

- les Sapindoideae qui ne comptent qu'un seul ovule dressé dans chaque loge carpellaire et un micropyle descendant droit,
- les Dodonaeoideae à plusieurs ovules dans chaque loculé avec un micropyle ascendant droit.

Ces deux sous-familles sont elles-mêmes subdivisées en 13 tribus, comprenant 137 genres et quelques 2000 espèces.

Les plantes les plus réputées sont les espèces du genre *Sapindus* de la sous-famille des Sapindoideae. Ces arbres dénommés "Savonniers" sont riches en saponosides localisés dans toutes les parties de la plante, en particulier les racines et la pulpe des fruits. Ils sont utilisés comme succédanés du savon en Chine, au Japon, en Inde et aux Antilles. Les fruits des *Sapindus* étaient déjà utilisés dans l'ancienne Egypte (noix de savon). Au Japon, le péricarpe des fruits de *Sapindus mukurossi*, détergent naturel, est utilisé comme émulsionnant dans les extincteurs.

I. 2. Travaux antérieurs sur les Sapindaceae

Cette famille botanique est subdivisée en deux sous familles selon des caractères botaniques mais aussi chimiotauxonomiques au regard des structures des flavonoïdes et des sapogénines que l'on y rencontre.

I. 2. 1. Saponosides

Les saponosides sont isolés des pulpes de fruits, feuilles, graines, écorces de tronc ou de racines. Ce sont des saponosides triterpéniques généralement dérivés de la β amyryne.

La sous-famille des Sapindoideae, la plus importante en nombre de représentants, est répartie en 8 tribus (figure 83, page 182). Plusieurs genres de tribus différentes ont déjà été étudiés pour leurs saponosides ¹²³. *Thouinia* (Thouinieae), *Sapindus* (Sapindeae), *Serjania* (Paullineae), *Pometia*, *Smelophyllum* (Nephelieae), *Lecaniodiscus* (Schleichereae), *Blighia* et *Elattostachys* (Cupanieae).

Parmi celles-ci, trois espèces ont été travaillées au laboratoire, *Smelophyllum capense*²⁵, *Pometia ridleyi*³⁰ et *Elattostachys apetala*²⁸. Les sapogénines rencontrées sont peu hydroxylées comme l'acide oléanolique ou l'hédéragénine. Les chaînes osidiques sont formées d'unités glucose, galactose, rhamnose, arabinose ou encore xylose. Il est à noter que l'enchaînement osidique [rhamnose -(1→2)- arabinose] est relativement fréquent dans cette sous-famille^{28, 30}. La présence d'apiose dans la chaîne osidique n'a été trouvée que dans le genre *Pometia*³⁰.

La sous-famille des Dodonaeoideae quant à elle se caractérise par des génines triterpéniques polyhydroxylées comme la caméliagénine A et le R₁-barrigénol, ou possédant deux fonctions acides comme l'acide médicagénique et l'acide zanhique (figure 73). Les sucres rencontrés sont comme précédemment : glucose, galactose, arabinose, xylose et rhamnose, mais aussi fucose et acide glucuronique. Les récents travaux réalisés au laboratoire sur plusieurs espèces de Dodonaeoideae ont permis d'affiner les critères chimiotaxonomiques décrits dans la littérature¹²³ en mettant en évidence des différences structurales selon les tribus^{123,126} :

- une génine diacide (acide médicagénique ou zanhique) chez les Doratoxyleae (*Filicium decipiens*)⁵⁵, un acide organique (acide angélique, acide nilique) estérifiant l'un des sucres de la chaîne osidique ester, un glucose ou un acide glucuronique lié en position 3 de la génine.

- une génine polyhydroxylée sur les cycles D et E dont l'un des hydroxyles au moins est estérifié par un acide organique chez les *Harpullieae* (*Harpullia ramiflora*¹²⁵, *H. cupanioides*²⁷, *H. austro-caledonica*^{29, 129}) et les *Dodonaeae* et avec un acide glucuronique lié en position 3 de la génine.

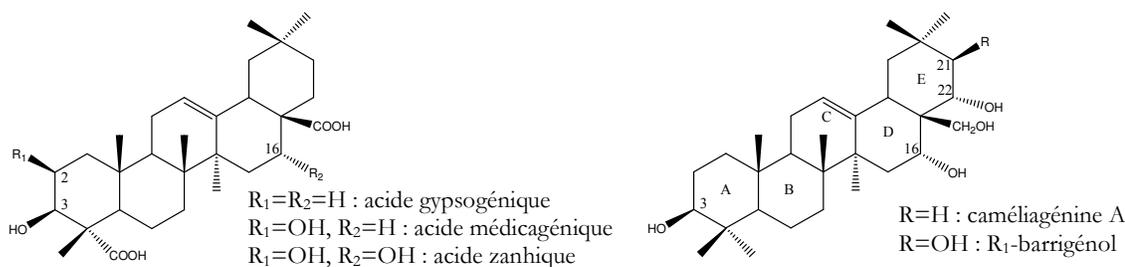


Figure 73 : Structures des sapogénines isolées de la sous-famille des Dodonaeoideae.

I. 2. 2. Terpènes et dérivés

Toutes les espèces des Sapindaceae ne contiennent pas de saponosides, d'autres molécules issues du métabolisme des terpènes ont été isolées comme des sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes ou encore des polyisoprènes.

I. 2. 2. 1. Sesquiterpènes glycosylés

Des sesquiterpènes acycliques ont été isolés de plusieurs espèces du genre *Sapindus*. Ce sont des farnésols ou des 12-hydroxyfarnésols mono- (en C-1) ou di-desmosidiques (en C-1 et C-12). Ces composés ont été isolés de trois espèces du genre *Sapindus*, *S. mukurossi*¹³⁰, *S. delavayi*¹³¹ et *S. trifoliatius*¹³². Les chaînes osidiques sont presque identiques dans les trois espèces : un glucose substitué par au moins un rhamnose et par un xylose ou un arabinose (figure 74).

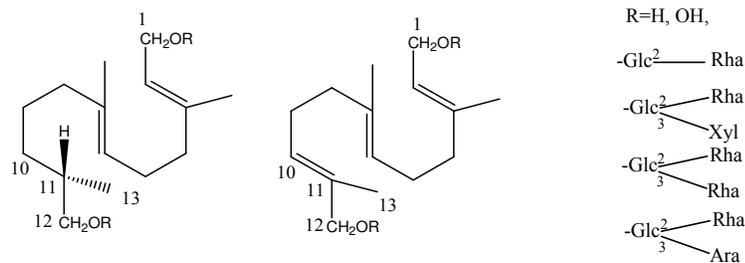
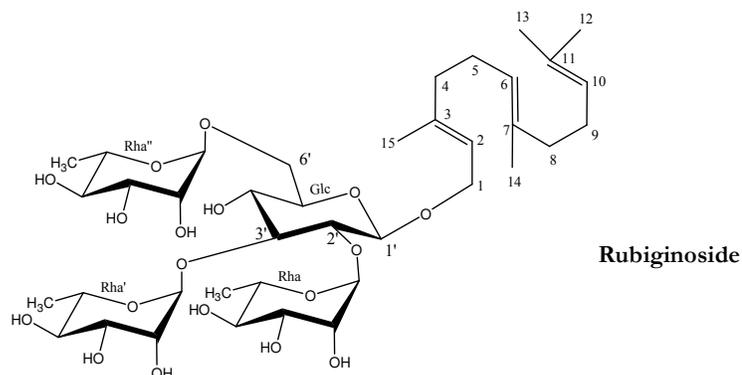


Figure 74 : Structures des sesquiterpènes glycosylés isolés de la sous-famille des Sapindoideae¹³⁰.

Des écorces de tronc de *Lepisanthes rubiginosa*, a été isolé un tétraglycoside de farnésol, le rubiginoside constitué d'une unité glucose trisubstituée en position 2', 3', 6' par des rhamnoses¹³³.



I. 2. 2. 2. Diterpènes

Chez de nombreuses espèces du genre *Dodonaea* ont été isolés des diterpènes cycliques en particulier chez *Dodonaea boroniaefolia*, *D. petiolaris*, *D. lobulata* et *D. attenuata* (figure 75)²⁶.

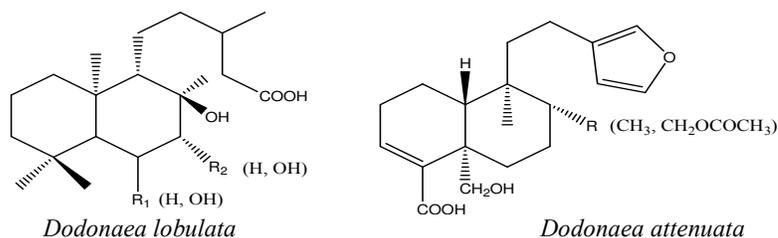


Figure 75 : Structures de diterpènes isolés des Sapindaceae.

I. 2. 2. 3. Triterpènes libres et Stérols

La friedeline et l'epifriedelinol ont été isolés de *Alectryon excelsus* et *Euphoria longana*; l' α -amyrine et la β -amyrine ont été isolées de *Sapindus saponaria*; le β -sitostérol a été isolé en particulier chez *Serjania sp.*, *Cardiospermum halicacabum*, *Sapindus saponaria* et *Dimocarpus fumatus*; le stigmastérol fut isolé des feuilles de *Dodonaea viscosa* et de *Blighia sapida*²⁶.

Des triterpènes linéaires ont été isolés des écorces de tronc de trois espèces du genre *Cupaniopsis* : *C. trigonocarpa*, *C. azantha* et *C. phalacrocarpa*¹³⁴ (figure 76).

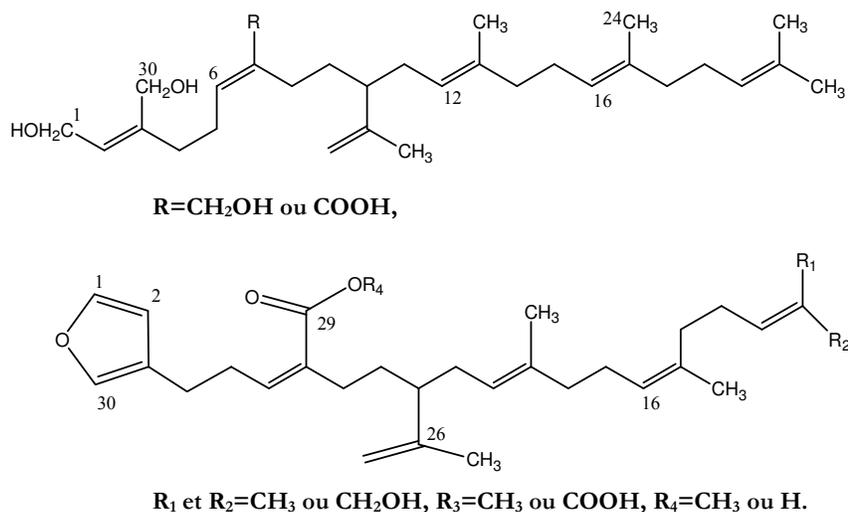


Figure 76 : Structures des triterpènes linéaires isolés des Sapindaceae¹³⁴.

I. 2. 2. 4. Polyisoprènes

Deux dérivés polyisopréniques, la sargaquinone, une tétraisoprénylquinone et le sargaol, un tri-isoprénylchromène (figure 77) ont été isolés des écorces de tronc de *Dimocarpus fumatus*¹³⁵.

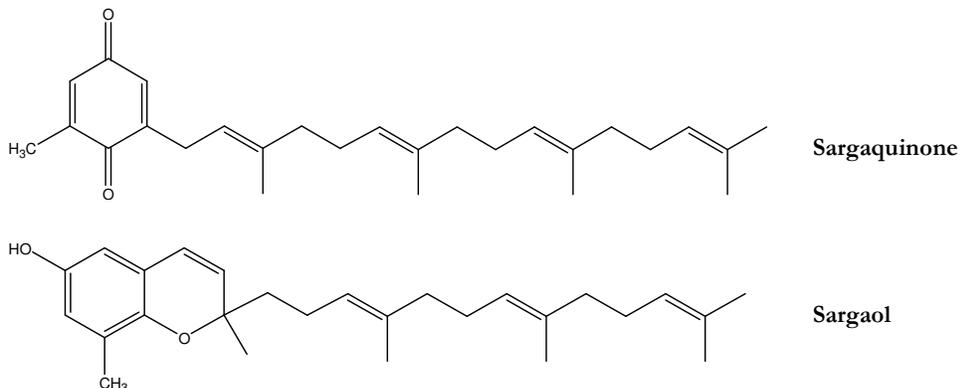


Figure 77 : Structures des dérivés polyisopréniques isolés des Sapindaceae.

I. 2. 3. Hétérosides d'alcool à longue chaîne

Des hétérosides à longue chaîne (hexadécanol) ont été isolés des écorces de tronc de *Dimocarpus fumatus*¹³⁵ (figure 78-c), *Matayba guianensis*¹³⁶ (figure 78-a) et *Cupania glabra*¹²⁷ (figure 78-b).

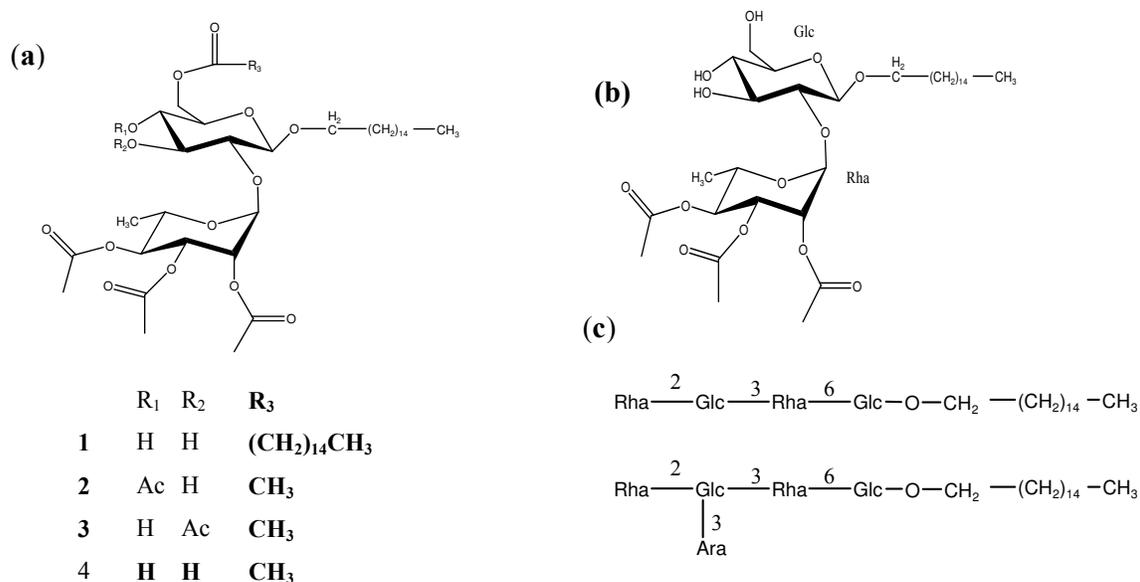


Figure 78 : Structures des hétérosides à longue chaîne isolés des Sapindaceae.

I. 2. 4. Flavonoïdes

Des flavonols tels que le kaempferol, la quercétine, l'isorhamnétine, le 4'-méthoxykaempferol, le 3',4'-diméthoxyquercétine (figure 79-a), et des flavones comme l'apigénine, l'acacétine, la lutéoline, la vitexine et l'orientine et leurs dérivés méthoxylés (figure 79-b) sont isolés dans un grand nombre d'espèces de Sapindaceae. Comme pour les saponosides, la structure des flavonoïdes diffère entre les deux sous-familles et seule la sous-famille des Sapindoïdeae élabore des flavones et glycoflavones^{26,121}.

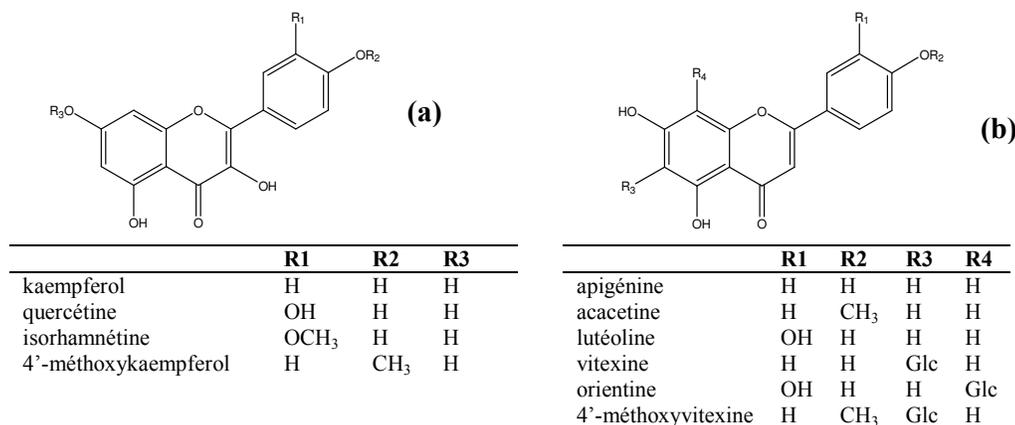


Figure 79 : Structures des flavonols (a) et flavones (b) isolés des Sapindaceae.

I. 2. 5. Proanthocyanidines

Ils sont présents dans les feuilles d'un grand nombre d'espèces comme le *Litchi chinensis* qui contient des tanins de type A et B (figure 80)¹³⁷.

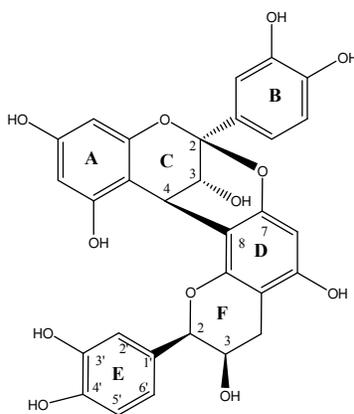


Figure 80 : Structure du procyanidine A2 isolé du *Litchi chinensis*.

I. 2. 6. Divers

Trois diacylglycérylglucosides et le soyacérobroside I ont été isolés des écorces de tronc de *Dimocarpus fumatus* (figure 81) ¹³⁵.

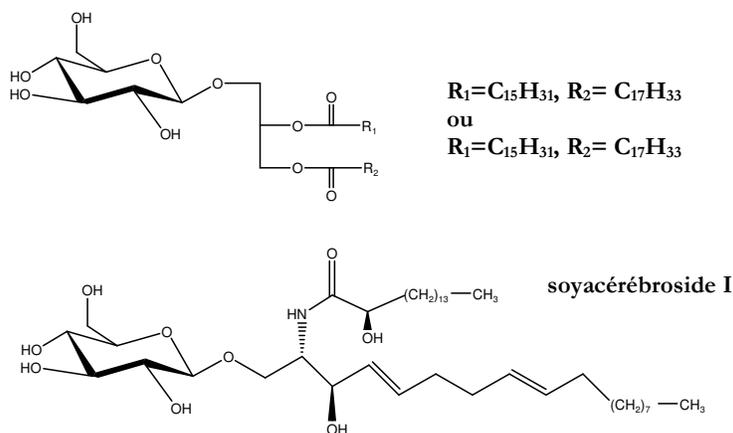


Figure 81 : Structure des hétérosides isolés de *Dimocarpus fumatus*.

Une quinone et un 2-méthylcyclopropylalanine (l'hypoglycine A) ont été isolés de *Blighia sapida* (figure 82) ²⁶.

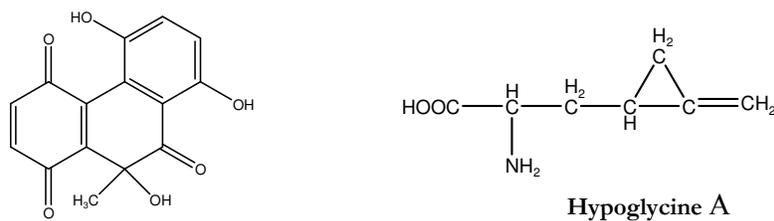


Figure 82 : Structure des composés isolés de *Blighia sapida*.

D'autres composés sont également présents dans cette famille comme des acides phénols (acide caféique, acide paracoumarique), des acides aminés cyclopropanoïques, des inositols et des acides gras ²⁶.

II. Botanique et travaux antérieurs de *Guioa crenulata* Radlk.

Guioa crenulata Radlk. présente la systématique suivante :

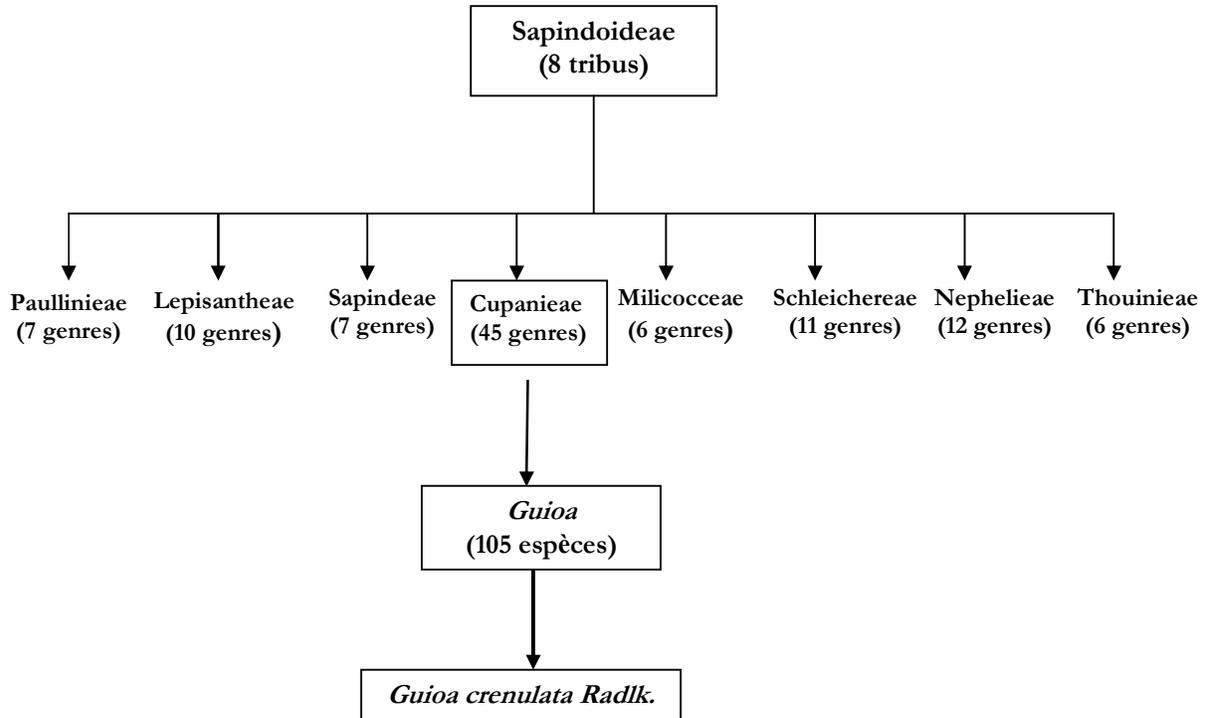


Figure 83 : Classification botanique de *Guioa crenulata*^{123, 138}.

Les *Guioa* sont des arbres ou plus rarement des arbustes à feuillage spiralé. Les feuilles sont coriaces, composées pennées dépourvues de foliole terminale. Les folioles sont alternes ou opposés. Les pétioles sont stipulés.

Les fleurs sont généralement hermaphrodites, parfois les fleurs sont unisexuées. Dans ce cas, les deux types de fleurs sont présents sur la même plante. Elles forment une inflorescence terminale ou axillaire. Le fruit non charnu contient trois graines de moins de 5 mm de diamètre.

Ce genre compte 105 espèces dont la distribution géographique va de l'Indomalaisie à l'Australie^{123, 138} et dont 8 espèces sont endémiques à la Nouvelle Calédonie : *Guioa crenulata*, *G. microsepala*, *G. fusca*, *G. gracillis*, *G. pectinata*, *G. ovalis*, *G. villosa*, *G. glauca*¹³⁹.

Guioa crenulata Radlk. est un arbuste de 5 mètres de haut. Les feuilles sont composées alternes dressées. Le rachis ailé est de 3 à 10 centimètres de longueur. Il porte 7 à 9 folioles alternes à subopposés, asymétriques, elliptiques, glabres, papyracés, fortement discolores. Le limbe est crénelé. L'inflorescence a une longueur de 4 cm disposée en grappe axillaire ou terminale. Les fleurs sont petites, à quatre ou cinq pétales blancs, quatre ou cinq sépales verdâtres et huit étamines à filets velus et anthères rosés.

Très peu d'études chimiques ont été réalisées sur ce genre. Seul le miel des fleurs de *Guioa semiglauc*a, une espèce d'origine australienne, a été analysé par CLHP et montre la présence de flavonoides (3,28 mg/100g de miel) dont les majoritaires sont la myricétine, la tricétine, la quercétine et la lutéoline ¹⁴⁰. Le miel contient également des acides phénoliques (9,28 mg/100 g de miel) dont les majoritaires sont l'acide gallique (42,8%) et l'acide *trans*-abscisique ¹⁴¹.

Les *Guioa* de Nouvelle Calédonie ne font l'objet d'aucune utilisation traditionnelle, cependant un brevet a été déposé par les laboratoires Christian Dior mentionnant l'utilisation de la « plante *Guioa* » et plus particulièrement les feuilles de *Guioa gracillis* dans des préparations cosmétiques et pharmaceutiques pour le traitement du vieillissement cutané, d'irritation, d'inflammation et d'hyperpigmentation cutanée et de surcharge grasseuse sous-cutanée.

En effet, des extraits de *Guioa gracillis* obtenus par plusieurs solvants d'extraction montrent une activité inhibitrice de plusieurs enzymes : l'élastase, la phospholipase A₂, la 5'-lipoxygénase, la tyrosinase et la 3',5'-AMP_C-phosphodiesterase ¹⁴².

L'élastase est l'enzyme de dégradation de l'élastine. Par dégradation des fibres d'élastine, l'action de l'élastase a pour conséquence une perte de l'élasticité cutanée, un relâchement de la peau et l'apparition de rides. La quantité et l'activité de l'élastase augmentent au cours du processus de vieillissement cutané. La phospholipase A₂ (PLA₂) est une enzyme qui prédomine dans les cellules liées aux phénomènes d'inflammation, telles que les mastocytes. Par son action, elle libère l'acide arachidonique lié aux phospholipides membranaires. Cet acide se métabolise ensuite en différents médiateurs lipidiques de l'inflammation et de l'allergie, tels que les leucotriènes et les prostaglandines. La 5'-lipoxygénase est, comme la PLA₂, une enzyme intervenant dans la "cascade de l'inflammation" en aval de la libération de l'acide arachidonique par la PLA₂. La 3',5'-AMP_C-phosphodiesterase (PDE) est l'enzyme qui transforme l'AMP_C, en AMP inactif. L'inhibition

de la PDE par un agent inhibiteur permet par conséquence de maintenir un taux intracellulaire élevé d'AMPc, ce qui a pour effet notamment de favoriser la dégradation des lipides, conduisant ainsi à une action amincissante. Il est également connu que l'AMPc intervient pour contrer certains processus inflammatoires et que la phosphodiesterase augmente avec l'âge. De ce fait, son inhibition contribuera à lutter contre les effets du vieillissement, en particulier au niveau cutané. La tyrosinase est l'enzyme clé de la synthèse de la mélanine et donc du métabolisme de la pigmentation cutanée. En cosmétique, son inhibition trouve des applications dans le traitement local des hyperpigmentations cutanées, telles que les tâches pigmentaires de sénescence.

Grâce à ces effets inhibiteurs sur ces enzymes, l'extrait méthanolique des feuilles de *G. gracillis* est incorporé dans un gel ou une crème cosmétique anti-rides, en préservant ou améliorant les qualités biomécaniques de la peau, en particulier son élasticité en retardant l'apparition des rides ou en diminuant leur profondeur et en améliorant la fermeté cutanée. Ce même extrait est incorporé dans une crème pour peau sensible utilisée pour le raffermissment de la peau. Cet extrait méthanolique est également exploité dans une crème amincissante.

L'extrait aqueux des feuilles de *G. gracillis*, par son action inhibitrice de la tyrosinase est utilisé en association avec un extrait d'écorces de mûrier dans un gel dépigmentant.

Les concentrations en extrait sec (méthanolique ou aqueux) utilisés dans ces compositions cosmétiques est de 0,02% à 1% en poids.

III. Chimie extractive

III. 1. Extraction et purification des composés des feuilles

L'échantillon des feuilles étudiées provient du mont Mandjélia dans la région de Koumac en Nouvelle Calédonie et a été récolté le 15 décembre 1999 par le Dr. Marc Litaudon (ISCN- Gif-sur-Yvette).

Les feuilles séchées sont extraites à l'hexane pour éliminer la chlorophylle et les matières grasses (extrait A), puis au méthanol aqueux 80% (extrait B). Après filtration, le filtrat est concentré puis soumis à un partage liquide-liquide entre de l'eau et de l'acétate d'éthyle pour obtenir un extrait acétate d'éthyle (extrait-B₂) et une phase aqueuse (extrait-B₁) (figure 84).

Une partie de l'extrait acétate d'éthyle est purifiée successivement par VLC sur C₁₈, chromatographie sur colonne de silice normale et finalement par CLHP pour donner 4 glycosides du farnésol (**Gc5** à **Gc8**). L'extrait aqueux est purifié par chromatographie d'exclusion sur Sephadex LH-20, chromatographie sur colonne de silice normale et par CLHP pour fournir 3 flavonoïdes (**Gc1** à **Gc3**) et un proanthocyanidine trimère (**Gc4**).

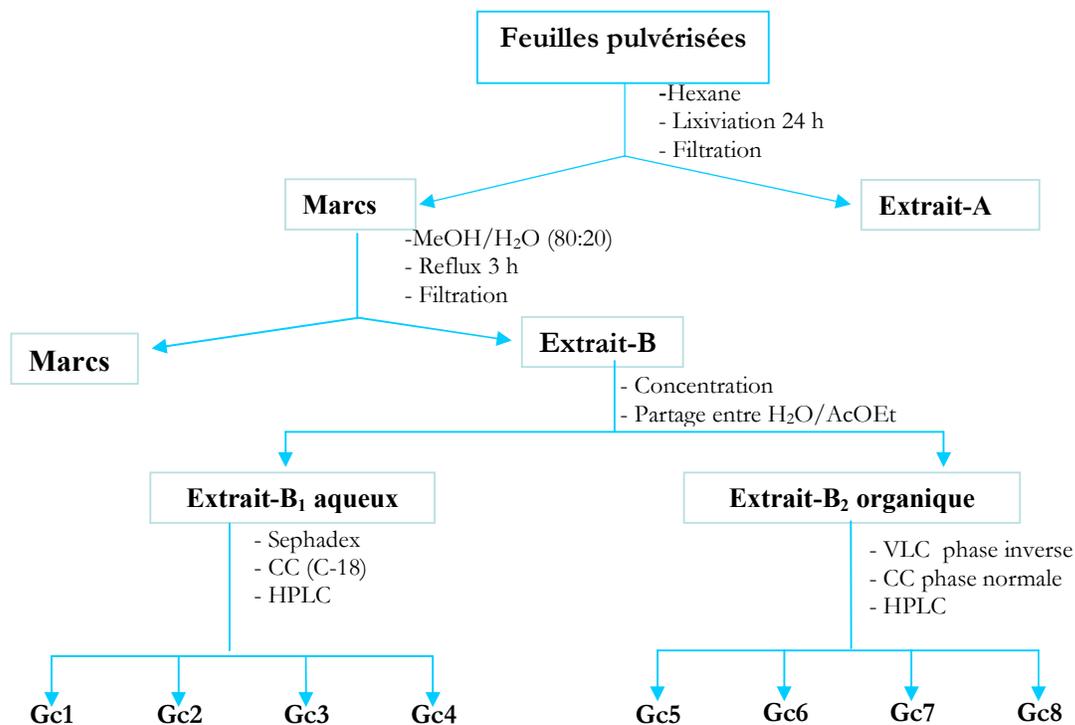


Figure 84 : Schéma d'extraction et de purification des composés des feuilles de *Guioa crenulata*.

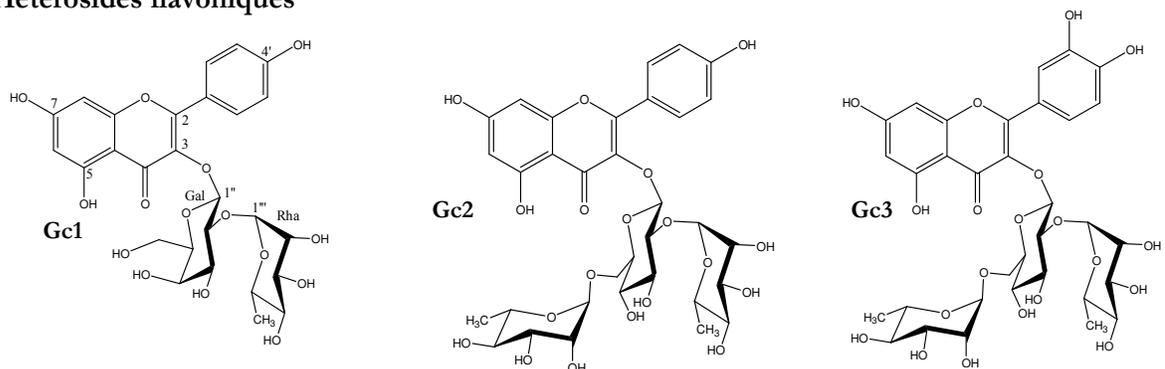
III.2. Hydrolyse acide totale

L'hydrolyse acide de l'extrait méthanolique réalisée dans HCl 2N à reflux a permis d'identifier, après purification par CCP et mesure de leur pouvoir rotatoire, le D-glucose, le D-galactose et le L-rhamnose.

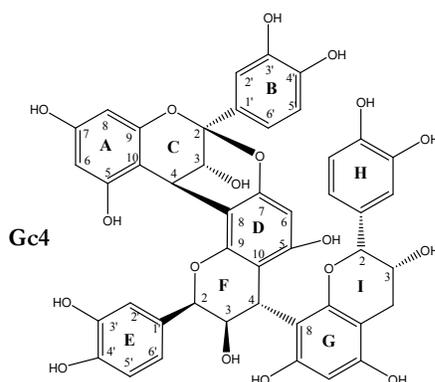
IV. Chimie structurale

La purification de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Guioa crenulata* par partage liquide-liquide entre de l'eau et de l'acétate d'éthyle nous a permis de séparer les composés polyphénoliques de structures connues, trois flavonoïdes (**Gc1-Gc3**) et un tanin trimère (**Gc4**) présents dans la phase aqueuse, des quatre nouveaux glycosides de farnésol (**Gc5-Gc8**) présents dans la phase acétate d'éthyle (figures 84 et 85). Nous présenterons tout d'abord les structures des composés polyphénoliques puis celles des sesquiterpènes.

Hétérosides flavoniques



Proanthocyanidine de type A



Sesquiterpènes glycosylés

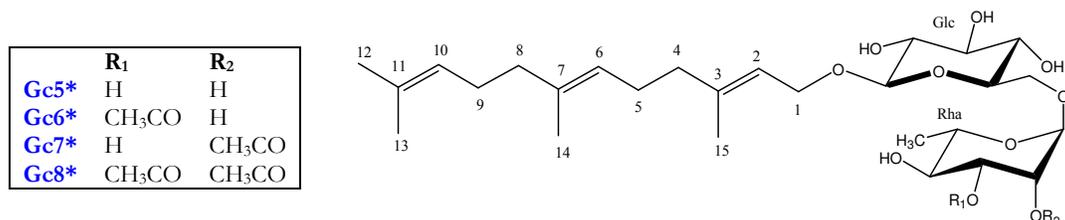


Figure 85 : Structures des composés isolés des feuilles de *Guioa crenulata*.

* Composé de structure nouvelle

IV. 1. Polyphénols isolés

IV. 1. 1. Hétérosides flavoniques

L'analyse par CCM de la fraction aqueuse de *Guioa crenulata* révèle la présence des trois composés colorés en jaune qui absorbent sous UV à 254 nm. Parmi ces composés, deux (**Gc1** et **Gc2**) présentent une fluorescence jaune sous lumière UV ($\lambda=366\text{nm}$) tandis que le troisième (**Gc3**) montre une absorbance violette sombre, sous les mêmes conditions. Le composé **Gc2** est nettement majoritaire représentant plus de 90 % des flavonoïdes.

IV. 1. 1. 1. Composés Gc1 et Gc2

Les spectres UV des flavonoïdes **Gc1** et **Gc2** présentent dans le méthanol un profil identique avec deux maxima d'absorption : la bande **I** vers 350 nm correspondant au cycle B et la bande **II** vers 270 nm correspondant au cycle A (tableau 43).

En présence de méthanolate de sodium (NaOMe) qui ionise les fonctions phénols, la bande **I** subit un fort déplacement bathochromique d'environ 50 nm, sans diminution de l'intensité des pics suggérant un hydroxyle libre en position 4'. L'apparition d'une bande supplémentaire à environ 320 nm indique un groupe OH libre en position 7^{82, 83, 143-145}.

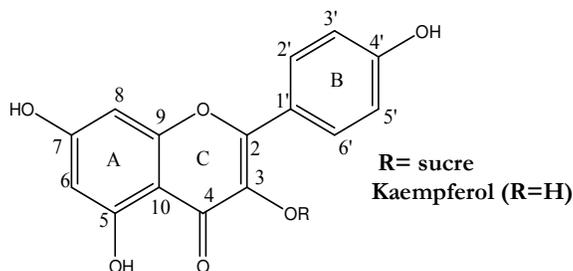
Tableau 43 : Spectres UV des composés **Gc1** et **Gc2**.

Solvants - réactifs	λ max			
	Bande II (nm) [cycle A]		Bande I (nm) [cycle B]	
	Gc1	Gc2	Gc1	Gc2
MeOH	267	270	351	347
+ NaOMe	275	282	323 (- 28) 396 (+ 45)	320 (-27) 396 (+ 49)
MeOH + AlCl ₃	276 305 (+ 38)	280 305 (+ 35)	352 401 (+ 50)	352 398 (+ 51)
MeOH + AlCl ₃ + HCl	276 303 (+ 36)	280 305 (+ 35)	349 401 (+ 50)	352 398 (+ 51)

L'addition du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) provoque un déplacement bathochromique de 38 nm pour la bande **II** et de 50 nm pour la bande **I**. Ce déplacement est stable en milieu acide ce qui traduit la formation de complexes d'AlCl₃ entre la fonction carbonyle en C-4 et l'hydroxyle en C-5 du cycle A, et l'absence de groupements *ortho* diphénols. La bande **I** étant inférieure à 435 nm, indique également que nous n'avons pas d'hydroxyle en C-8^{143, 145}.

D'après l'analyse des spectres UV, nous pouvons établir que la génine des flavonoïdes **Gc1** et **Gc2** comporte un seul hydroxyle en position 4' (sur le cycle B), deux hydroxyles libres en positions 5 et 7 (sur le cycle A) et un hydroxyle glycosylé en position 3 (sur le cycle C)^{143, 145}.

Ces données sont en accord avec celles reportées dans la littérature pour le kaempferol glycosylé en position 3^{146, 147}.



Le spectre de RMN ¹H du composé **Gc1** montre les quatre signaux des six protons aromatiques caractéristiques du kaempferol (tableau 46) :

- deux doublets (couplage *ortho* : $J=8,9$ Hz), intégrant chacun pour deux protons à 6,92 (H-3' et H-5') et 8,10 ppm (H-2' et H-6'),
- deux doublets (couplage *métra* : $J=2,1$ Hz), intégrant chacun pour un proton à 6,21 (H-6) et 6,41 (H-8) ppm.

L'analyse conjointe des spectres HSQC J -modulé et HMBC de **Gc1** et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer sur le spectre RMN ¹³C J -modulé tous les carbones correspondant au kaempferol (tableau 46)^{146, 148-150}. La même démarche appliquée à la partie génine du composé **Gc2** permet également d'identifier le kaempferol^{146, 148-150}.

L'analyse du spectre de masse effectué en ESI mode positif, révèle pour le flavonoïde **Gc1** un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z à 595 et un ion fragment à m/z 449 $[M+H-146]^+$ correspondant à la perte d'un désoxyhexose. Si on soustrait la masse du kaempferol (287), il reste 162 *uma*, soit un hexose. Tandis que pour le flavonoïde **Gc2**, l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 741 et les deux ions fragments à m/z 595 $[M+H-146]^+$ et 431 $[M+H-2x146-H_2O]^+$ révèlent la présence de deux désoxyhexoses dans la molécule, en plus de l'hexose.

Le spectre de RMN ¹H de **Gc1** montre, en plus des signaux du kaempferol, deux protons anomériques à 5,73 (d , $J=7,7$ Hz) et 5,24 ppm (d , $J=1,3$ Hz) révélant la présence de deux unités osidiques comme la spectrométrie de masse l'indiquait.

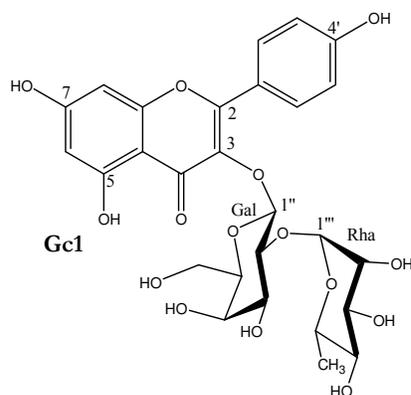
L'analyse des spectres COSY, ROESY et HSQC J -modulé permet l'identification d'un β -D-galactose à partir de l'anomère résonant à 5,73 ppm et d'un α -L-rhamnose en position terminale à partir du proton anomérique résonant à 5,24 ppm (tableau 46). Le

déblindage du carbone C-2 du galactose à 77,7 ppm (+ 6 ppm)⁵⁶ suggère une substitution en cette position.

L'enchaînement osidique est établi d'après l'analyse des corrélations observées sur le spectre HMBC entre :

- le proton H-1''' du rhamnose et le carbone C-2'' du galactose,
- le proton H-1'' du galactose et le carbone C-3 du kaempferol.

Le composé **Gc1** est le 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl kaempferol, déjà isolé de *Lysimachia mauritiana*¹⁴⁹ et *L. fortunei* (Primulaceae)¹⁵¹.



L'analyse combinée des spectres COSY, TOCSY, ROESY et HSQC *J*-modulé de **Gc2** permet l'identification :

- d'un β -D-galactose ($\delta_{H-1''}$ 5,63 ppm, $\delta_{C-1''}$ 100,8 ppm)
- d'un α -L-rhamnose terminal ($\delta_{H-1'''}$ 5,24 ppm, $\delta_{C-1'''}$ 102,6 ppm),
- d'un second α -L-rhamnose terminal ($\delta_{H-1''''}$ 4,55 ppm, $\delta_{C-1''''}$ 101,8 ppm) (tableau 46).

Le déplacement chimique du proton anomérique du second rhamnose à 4,55 ppm très blindé par rapport à celui du premier rhamnose à 5,24 ppm, pourrait laisser penser à la présence d'un β -L-rhamnose (tableau 44). La constante de couplage J_{H1-H2} ne permet pas de distinguer un α d'un β -L-rhamnose, car tous les deux montrent une constante J_{H1-H2} de 1 à 2 Hz⁵⁶.

Sur le spectre ROESY, l'effet rOe observé entre H-1'''' et H-2'''' et l'absence des effets rOe entre le proton H-1'''' et les protons H-3'''' et H-5'''' , indiquent une configuration α pour l'anomère. Cela est vérifié par les déplacements chimiques en RMN ¹³C des carbones C-3''''

et C-5''', qui sont en accord avec un α -L-rhamnose en position terminale (tableau 44)^{56, 57, 152, 153}.

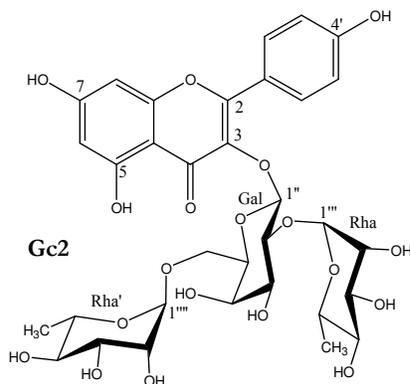
Tableau 44 : Déplacements chimiques RMN ¹H et RMN ¹³C du L-Rhamnopyranose.

	(réf. 153)		(réf. 152)		(réf. 56)		Gc2
	α -Rha	β -Rha	α -Rha	β -Rha	α -Rha	β -Rha	
	δ_H	δ_H			δ_H	δ_H	δ_H
1	5,04	4,55			5,12	4,85	4,55
	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C
1	102,6	102,6	102,3	102,4	102,1	102,4	101,8
2	72,7	72,1	71,4	71,8	71,2	71,8	72,0
3	72,1	75,3	71,7	74,1	71,5	74,1	72,2
4	73,8	73,7	73,4	73,4	73,3	73,4	73,8
5	69,5	73,4	69,6	73,4	69,5	73,4	69,7
6	18,6	18,5	18,0	17,9	17,9	17,9	17,9

Dans la littérature, ce phénomène de blindage du proton anomérique du rhamnose est souvent rencontré lorsque celui-ci est relié en position 6 d'un hexose [Rha-(1→6)-Gal] ou [Rha-(1→6)-Glc] et ce quelque soit la génine. Ce n'est pas l'effet d'anisotropie du carbonyle en C-4 du flavonoïde qui est la cause de la différence de δ_H de ce rhamnose mais vraisemblablement le fait qu'il soit attaché en position 6 d'un glucose ou d'un galactose¹³³.

Les déblindages des carbones C-2'' et C-6'' du galactose permettent de supposer une chaîne triosidique [2,6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranosyl] en position 3 du kaempferol (tableau 46). Cet enchaînement est confirmé par la présence sur le spectre HMBC des corrélations ³J_{H-C} entre : H-1'' Gal/C-3 kaempferol, H-1''' Rha/C-2'' Gal et H-1'''' Rha/C-6'' Gal.

Le composé **Gc2** est le 3-O-(2, 6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranosyl) kaempferol.



Ce glycoside du kaempferol a déjà été isolé de *Lysimachia mauritiana*¹⁴⁹ et *L. nummularia* (Primulaceae)¹⁵⁰, de *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae)^{146, 148} et de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae)¹⁴⁷.

IV. 1. 1. 2. Composé Gc3

Le spectre UV de **Gc3** dans le méthanol présente deux bandes d'absorbance maximales : la bande **I** à 356 nm et la bande **II** à 257 nm, caractéristiques d'un chromophore de type flavonol ou flavone.

L'ajout de réactifs chimiques à une solution méthanolique de **Gc3** engendre des déplacements caractéristiques des bandes d'absorption (tableau 45).

Tableau 45 : Spectres UV de **Gc3**.

Solvants - réactifs	λ max	
	Bande II (nm) [cycle A]	Bande I (nm) [cycle B]
MeOH	257	356
+ NaOMe	260	320 (- 36) Ib 400 (+ 44) Ia
MeOH + AlCl ₃	275 (+ 18) 299 (+ 42)	430 (+ 74)
MeOH + AlCl ₃ + HCl	272 299	361 404 (+ 48)

Les effets observés avec NaOMe, identiques à ceux observés pour **Gc1** et **Gc2**, indiquent la présence d'un hydroxyle libre en position 4', d'un hydroxyle en position 7 et d'une glycosylation en position 3.

La variation du déplacement bathochromique après l'addition du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) suivi par HCl traduit un complexe stable entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en 4 et un complexe labile entre deux hydroxyles en *ortho* (en 3' et 4'). La génine du flavonoïde **Gc3** est identifiée comme étant la quercétine (schéma 3).

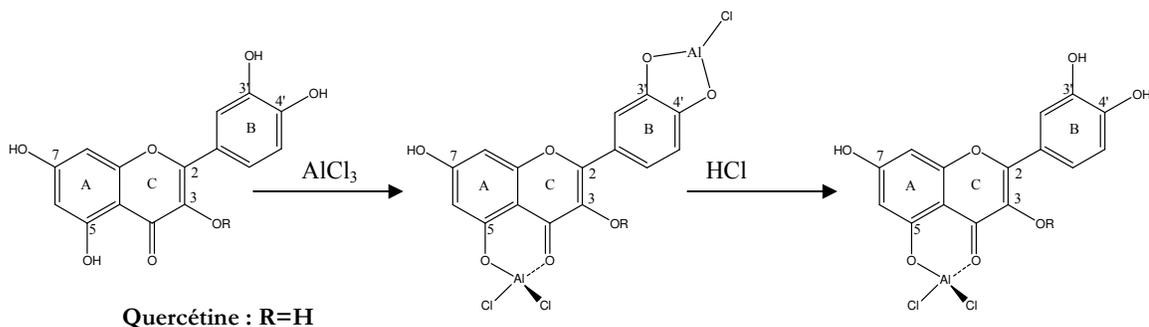


Schéma 3

La présence d'un hydroxyle supplémentaire sur la génine est confirmée par l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de **Gc3** à m/z 757, obtenu en ESI mode positif, correspondant à un gain de 16 *uma* par rapport à **Gc2**.

Les cinq protons aromatiques localisés sur le spectre de RMN 1H forment deux systèmes de spins couplés caractéristiques de la quercétine (tableau 46) :

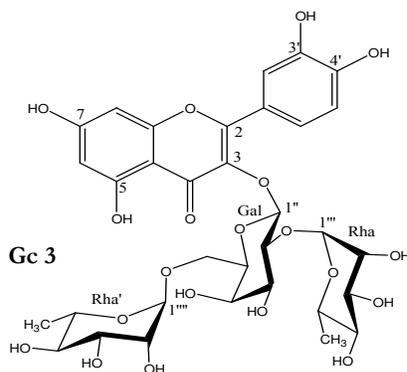
- les protons H-6 et H-8 (couplage *métra* : d , $J=2$ Hz) du cycle A à 6,20 et 6,40 ppm,
- les protons H-5', H-6' et H-2' du cycle B à 6,90 (d , $J=8,5$ Hz), 7,59 (dd , $J=8,5-2,2$ Hz) et 7,72 (d , $J=2,2$ Hz).

Comme pour les composés **Gc1** et **Gc2**, l'analyse des spectres HSQC J -modulé et HMBC permet l'attribution de tous les carbones de la quercétine. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones sont comparables à celles données dans la littérature (tableau 46) ^{147, 148}.

L'analyse combinée des spectres de RMN COSY, TOCSY, ROESY et HSQC J -modulé de **Gc3** permet de retrouver les mêmes signaux osidiques décrits pour la partie osidique du flavonoïde **Gc2** (tableau 46).

L'enchaînement triosidique [2,6-di-*O*- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranosyl] en position 3 de la génine, a été établi comme précédemment pour le composé **Gc2** d'après l'expérience HMBC.

Le flavonoïde **Gc3** est le 3-*O*-(2,6-di-*O*- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranosyl) quercétine.



Ce composé a déjà été isolé de *Lysimachia nummularia* ¹⁵⁰ et *L. fortunei* ¹⁵¹ (Primulaceae), de *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae) ^{146, 148}, et de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) ¹⁴⁷.

Tableau 46 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) des flavonoïdes **Gc1**, **Gc2** et **Gc3** dans CD₃OD.

	Gc1		Gc2		Gc3	
	δ_1 (m, J Hz)	δ_c	δ_1 (m, J Hz)	δ_c	δ_1 (m, J Hz)	δ_c
Aglycone						
2	-	158,4	-	158,6	-	158,4
3	-	134,5	-	134,4	-	134,5
4	-	179,5	-	179,4	-	179,3
5	-	163,2	-	163,1	-	163,1
6	6,21 (d, 2,1)	99,7	6,21 (d, 1,9)	99,7	6,20 (d, 2)	99,7
7	-	165,7	-	165,6	-	165,6
8	6,41 (d, 2,1)	94,5	6,40 (d, 2)	94,6	6,40 (d, 2)	94,6
9	-	158,4	-	158,4	-	158,3
10	-	105,8	-	105,8	-	105,9
1'	-	123,0	-	123,0	-	123,1
2'	8,10 (d, 9)	132,2	8,09 (d, 8,9)	132,2	7,72 (d, 2,2)	117,3
3'	6,92 (d, 9)	116,2	6,92 (d, 8,9)	116,2	-	145,8
4'	-	161,3	-	161,3	-	149,6
5'	6,92 (d, 9)	116,2	6,92 (d, 8,9)	116,2	6,90 (d, 8,5)	116,1
6'	8,10 (d, 9)	132,2	8,09 (d, 8,9)	132,2	7,59 (dd, 8,5-2,2)	123,0
β-D-Galactose						
1''	5,73 (d, 7,7)	100,6	5,63 (d, 7,8)	100,8	5,70 (d, 7,8)	101,0
2''	3,96 (dd, 9,6-7,7)	77,7	3,95 (dd, 9,5-7,8)	77,5	3,98 (dd, 9,6-7,8)	77,4
3''	3,72 (dd, 9,6-3,4)	75,8	3,73 (dd, 9,5-3,4)	75,7	3,75 (dd, 9,6-3,5)	75,7
4''	3,85 (dl, 3,4)	70,8	3,80 (dl, 3,2)	70,7	3,84 (dl, 3,5)	70,8
5''	3,50 (tl, 6,1)	77,0	3,67 (tl, 6,2)	75,2	3,70 (tm, 6,3)	75,2
6''a	3,61 (dd, 10,7-6,3)	62,2	3,47 (dd, 10,2-6,7)	67,0	3,50 (dd, 10,2-6,3)	66,9
6''b	3,75 (dd, 10,7-5,7)	-	3,75 (dd, 10,2-5,8)	-	3,78 (dd, 10,4-6,2)	-
α-L-Rhamnose (en 2'' de Gal)						
1'''	5,24 (d, 1,3)	102,6	5,24 (d, 1,2)	102,6	5,24 (d, 1,4)	102,6
2'''	4,01 (dd, 3,3-1,5)	72,4	4,02 (dd, 3,3-1,6)	72,4	4,02 (dd, 3,3-1,5)	72,4
3'''	3,80 (dd, 9,6-3,3)	72,3	3,82 (dd, 9,6-3,3)	72,3	3,81 (dd, 9,5-3,3)	72,3
4'''	3,35 (t, 9,6)	74,1	3,37 (t, 9,6)	74,0	3,36 (t, 9,5)	74,0
5'''	4,05 (dq, 9,6-6,3)	69,8	4,09 (dq, 9,6-6,2)	69,8	4,07 (dq, 9,6-6,2)	69,8
6'''	0,95 (d, 6,2)	17,5	1,00 (d, 6,2)	17,5	0,97 (d, 6,2)	17,4
α-L-Rhamnose (en 6'' de Gal)						
1''''			4,55 (d, 1,1)	101,8	4,57 (d, 1,6)	101,8
2''''			3,59 (dd, 3,3-1,6)	72,0	3,61 (dd, 3,4-1,6)	72,1
3''''			3,53 (dd, 9,1-3,3)	72,2	3,54 (dd, 9,5-3,4)	72,2
4''''			3,29 (t, 9,5)	73,8	3,30 (t, 9,5)	73,9
5''''			3,55 (dq, 9,5-6,2)	69,7	3,56 (dq, 9,5-6,2)	69,7
6''''			1,20 (d, 6,2)	17,9	1,21 (d, 6,2)	18,0

IV. 1. 2. Proanthocyanidine **Gc4**

En chauffant une petite quantité du composé **Gc4** dans une solution butanolique acide (n-BuOH/HCl : 4/1), nous observons une coloration rose, caractéristique de la présence de composés polyphénoliques comportant au moins une liaison interflavanolique (selon la réaction de Bate-Smith), traduisant la présence d'un tanin condensé ¹⁵⁴.

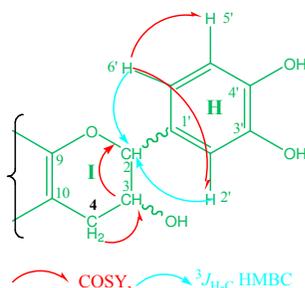
Le spectre UV de **Gc4** présente un seul maximum d'absorption à 280 nm caractéristique d'un flavan-3-ol ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Cette valeur indique que le cycle **B** des unités flavanoliques est 3',4'- ou 3',4',5'-hydroxylés ¹⁵⁵.

Le spectre de masse de **Gc4** effectué en ESI mode positif, révèle un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 865, correspondant à une masse moléculaire de 864 Da. La masse moléculaire de **Gc4** correspond à la condensation de trois unités pentahydroxyflavanes et sous-entend l'existence d'une liaison de type A (liaison interflavanique double) ¹⁵⁷. En effet, la masse moléculaire de trois unités pentahydroxyflavanes avec des liaisons

Sur le spectre COSY, sont repérés facilement les deux protons géminés $H_{I-4\alpha}$ et $H_{I-4\beta}$ à 2,84 (*dd*, $J=16,5-2,8$ Hz) et 2,88 ppm (*dd*, $J=16,5-3,5$ Hz). Ils corrént ensemble et avec un proton déblindé à 3,88 ppm (*t*, $J=3,2$ Hz), le proton H_{I-3} qui corrént avec le proton H_{I-2} résonant à 4,41 ppm sous la forme d'un singulet. À l'aide du spectre HSQC J -modulé, sont attribués les carbones correspondant C_{I-2} (δ 78,8) et C_{I-3} (δ 66,1).

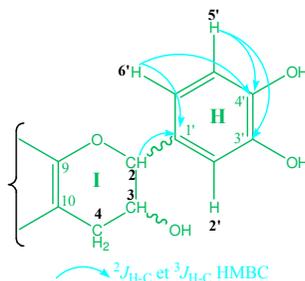
Le carbone C_{I-2} corrént sur le spectre HMBC avec deux protons aromatiques à 6,87 et 6,75 ppm. Ces deux protons corrént, sur le spectre COSY, avec un troisième proton à 6,77 ppm. Leurs multiplicités et leurs constantes de couplage permettent de préciser leurs positions relatives sur le cycle H (schéma 5) :

- le proton à 6,87 ppm (*d*, $J=1,8$ Hz) correspond au $H_{H-2'}$,
- le proton à 6,77 ppm (*d*, $J=8,2$ Hz) correspond au $H_{H-5'}$,
- le proton à 6,75 ppm (*dd*, $J=8,2-1,8$ Hz) correspond au $H_{H-6'}$.



Leurs carbones respectifs sont attribués à l'aide du spectre HSQC J -modulé (tableau 47). Il reste maintenant à attribuer les carbones quaternaires du cycle H.

Le proton H_{I-2} corrént avec le carbone quaternaire non oxygéné $C_{H-1'}$ à 131,7 ppm. Les protons $H_{H-2'}$, $H_{H-5'}$ et $H_{H-6'}$ corrént avec ce même carbone et avec un carbone quaternaire oxygéné à 144,3 ppm, le $C_{H-4'}$. Les protons $H_{H-2'}$ et $H_{H-5'}$ corrént aussi avec un second carbone quaternaire oxygéné à 143,7 ppm, le $C_{H-3'}$ (schéma 6).



Les corrélations HMBC des protons H_{I-3} et H_{I-4} nous permettent d'attribuer trois des six carbones du cycle **G**. Les corrélations $^2J_{H-C}$ du proton H_{I-4} et $^3J_{H-C}$ du proton H_{I-3} avec un carbone aromatique quaternaire à 98,6 ppm permettent d'attribuer ce carbone à C_{G-10} .

Le proton H_{I-4} corrèle en plus avec deux autres carbones oxygénés du cycle **G**, C_{G-5} et C_{G-9} (schéma 7).

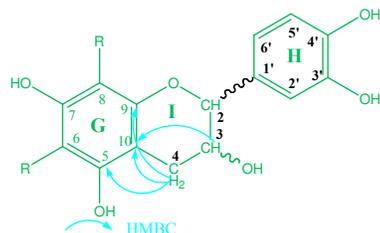


Schéma 7

Le proton aromatique à 6,12 ppm (H_{G-6} ou H_{G-8}) corrèle avec l'un des carbones C_{G-5} ou C_{G-9} , le carbone C_{G-7} à 154,1 ppm et un carbone à 107,4 ppm, C_{G-6} ou C_{G-8} , indiquant une substitution du noyau **G** en position 6 ou 8. Les déplacements chimiques du proton aromatique du cycle **G** à 6,12 ppm et de son carbone correspondant à 95,1 ppm ne sont pas suffisants pour distinguer les deux positions 6 et 8. C'est le déplacement chimique du carbone portant la substitution à 107,4 ppm qui va nous permettre de faire la différence par comparaison aux données de la littérature. Il correspond à un carbone 8 substitué¹⁵⁹ (schéma 8).

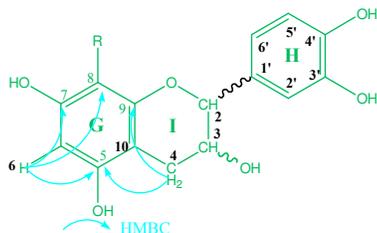


Schéma 8

La faible constante de couplage entre les protons H_{I-2} (δ_H 4,41, *s*) et H_{I-3} (δ_H 3,88, *t*, $J=3,2$ Hz) indique une configuration 2,3-*cis*-flavan-3-ol. L'unité terminale est donc une épicatechine puisque cette constante de couplage est environ 7-10 Hz dans la catéchine^{155, 159, 160}.

Cela est confirmé par la valeur du déplacement chimique du carbone C_{I-2} observée à 78,8 ppm. Il est connu que, dans l'épicatechine, le déplacement chimique du carbone C_2 est légèrement inférieur à 80 ppm alors que ce carbone résonne légèrement au dessus de 80 ppm dans la catéchine^{155, 159, 161, 162}.

Les effets rOe observés sur le spectre ROESY entre H_{I-2}/H_{I-3} confirment la stéréochimie de l'unité épicatechine terminale (figure 86). Dans la catéchine, les deux protons du cycle pyranique sont en position transdiaxiale et ils ne montrent pas d'effets rOe entre eux^{160, 163}.

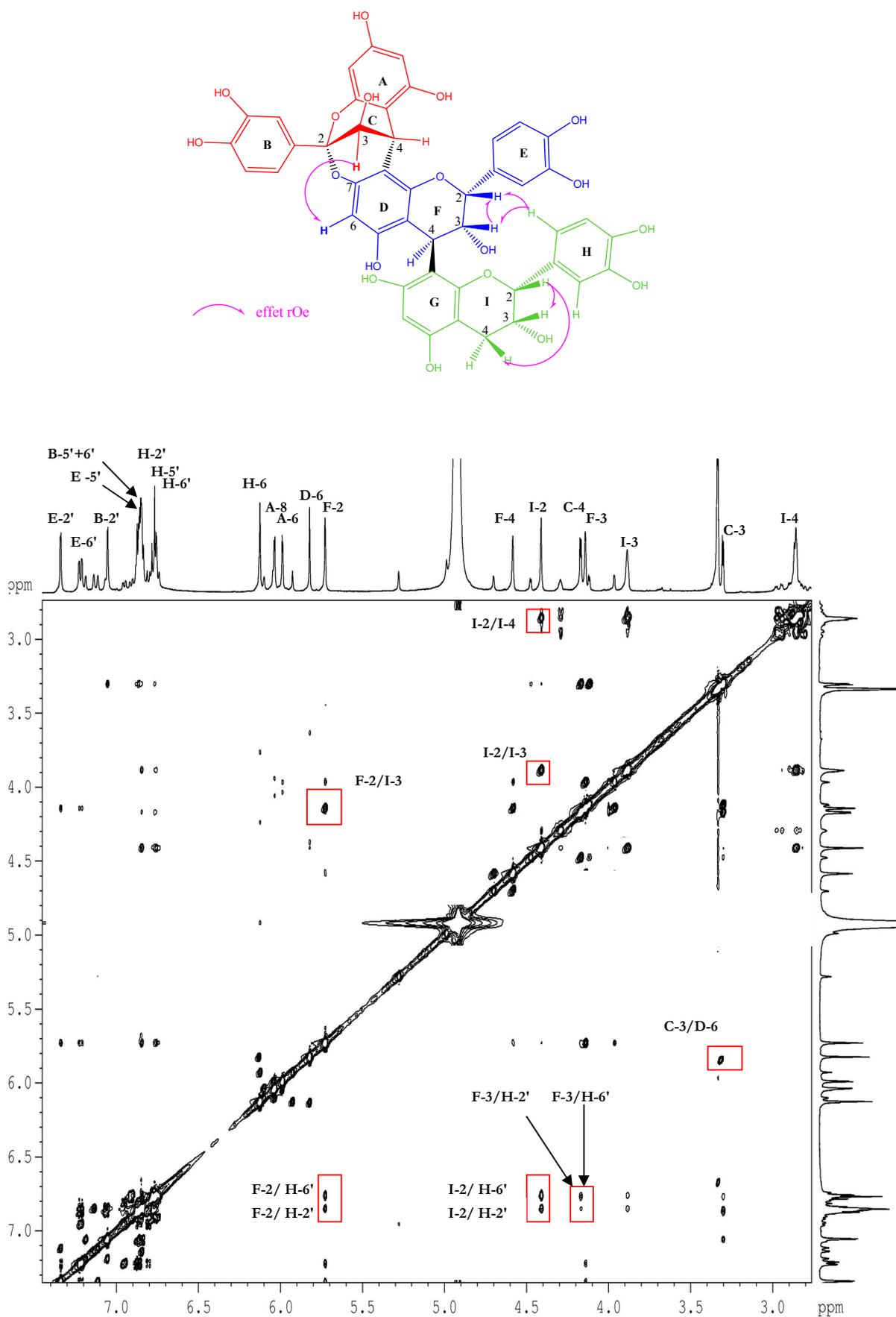


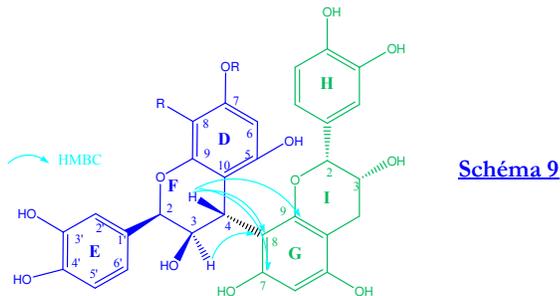
Figure 86 : Spectre ROESY de Gc4 (CD₃OD).

IV. 1. 2. 2. Identification de l'unité centrale

Le carbone C_{G-8} de l'unité « terminale » corrèle sur le spectre HMBC, avec le proton H_{F-4} (δ_H 4,58 ppm) appartenant à l'unité « centrale » (figure 87). Le carbone C_{F-4} (δ_C 36,8 ppm) est déblindé d'environ 10 ppm comparativement au C_{I-4} de l'unité terminale, suite à sa substitution par un noyau aromatique (cycle **G**).

Les corrélations entre le proton H_{F-4} et les carbones C_{G-7} et C_{G-9} , confirment la nature de la liaison (4→8) entre les deux unités flavanoliques (schéma 9).

Le proton H_{F-4} fait partie d'un système de spin de trois protons non aromatiques, facilement identifiable sur le spectre COSY. Ce proton couple avec le proton H_{F-3} (δ_H 4,14, *d*, $J=2,2$ Hz) lui-même couplé avec le proton H_{F-2} (δ_H 5,72 ppm, *s*). Le spectre HSQC *J*-modulé permet l'attribution de leurs carbones à 77,4 (C_{F-2}) et 71,1 ppm (C_{F-3}).



Le carbone C_{F-2} corrèle sur le spectre HMBC avec deux protons aromatiques à 7,34 ($H_{E-2'}$) et 6,72 ppm ($H_{E-6'}$). Ces deux protons permettent d'attribuer les autres protons et carbones du cycle **E**, comme nous l'avons vu précédemment pour le cycle **H** de l'unité terminale.

Les corrélations $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ du proton H_{F-4} , observées sur le spectre HMBC, permettent d'attribuer les carbones C_{D-5} , C_{D-9} et C_{D-10} . Ces carbones corrèlent au proton aromatique H_{D-6} du cycle **D**, ce qui permet l'attribution des derniers carbones C_{D-6} , C_{D-7} et C_{D-8} (figure 87).

Comme pour l'unité terminale, la faible constante de couplage entre les protons H_{F-2} et H_{F-3} ($J_{H2-H3}=2,2$ Hz) et le déplacement chimique du carbone C_{F-2} à 77,4 ppm (< 80 ppm) montrent que l'unité centrale est une épicatechine (tableau 47).

Les effets rOe observés sur le spectre ROESY entre les deux protons H_{F-2}/H_{F-3} confirment la stéréochimie de l'unité centrale. L'absence d'un effet rOe entre les protons H_{F-2}

et H_{F-4} et la petite constante de couplage $J_{3,4} = 2,2$ Hz suggèrent une stéréochimie 3,4-*trans* soit une liaison ($4\beta \rightarrow 8$) avec l'unité terminale ¹⁵⁹. Cela a été confirmé également par les effets rOe entre les protons $H_{F-2}/H_{H-2+6'}$ et entre $H_{F-3}/H_{H-2+6'}$ (figure 86).

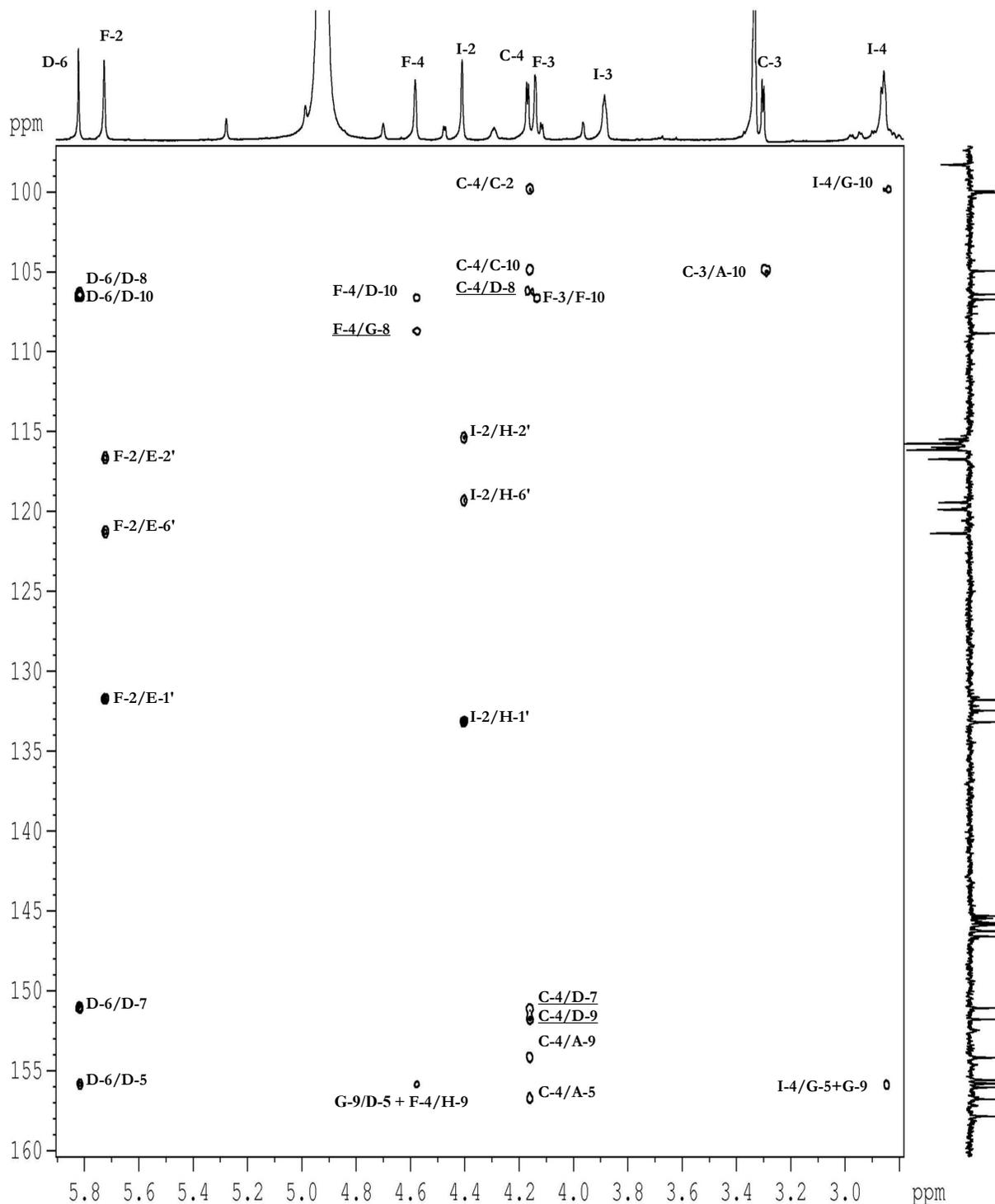


Figure 87 : Spectre HMBC de Gc4, partie hétérocycle (CD₃OD).

IV. 1. 2. 3. Identification de l'unité supérieure

Le carbone C_{D-8} de l'unité « centrale » corrèle en HMBC avec le proton H_{C-4} de l'unité « supérieure » résonant à 4,17 ppm (*d*, $J = 3,5$ Hz), lui-même corrélé avec les carbones C_{D-7} et C_{D-9} (figure 87). Sur le spectre COSY, le proton H_{C-4} couple avec le proton H_{C-3} résonant à 3,30 ppm (*d*, $J=3,5$ Hz). Comparativement aux deux unités flavanoliques précédentes, le proton H_{C-2} est absent. Les corrélations $^3J_{H-C}$ de H_{C-4} et $^2J_{H-C}$ de H_{C-3} permettent de repérer le carbone C_{C-2} à 98,5 ppm (schéma 10).

Comme précédemment, le carbone C_{C-2} montre, sur le spectre HMBC, des corrélations $^3J_{H-C}$ avec les protons $H_{B-2'}$ (δ_H 7,05, *d*, $J=2$ Hz) et $H_{B-6'}$ (δ_H 6,87, *dd*, $J=8,3-2$ Hz). Ces deux derniers permettent l'attribution du reste des carbones et des protons du cycle **B** (schéma 10).

Sur le spectre de RMN 1H , les deux doublets résonant à 5,99 et 6,04 ppm, intégrant chacun pour un proton et couplés entre eux avec une constante de couplage *métra* ($J=2,4$ Hz), correspondent aux deux protons aromatiques du cycle **A** de l'unité « supérieure ». La comparaison des déplacements chimiques des protons H-6 et H-8 avec les valeurs de la littérature permet de distinguer le proton H_{A-6} du H_{A-8} , ainsi que les carbones quaternaires oxygénés C_{A-5} et C_{A-9} auxquels ils corrélaient respectivement ¹⁵⁹. Comme pour les deux autres unités, l'analyse du spectre HMBC permet d'attribuer l'ensemble des carbones du cycle **A**.

Le déblindage du carbone C_{C-2} à 98,5 ppm suppose que ce carbone est lié à deux oxygènes. Le blindage du C_{D-7} (environ 7 ppm) par rapport au C_{A-7} et C_{G-7} suppose que l'unité supérieure est reliée à l'unité centrale avec une deuxième liaison de type (2→O→7) ^{156,159} (schéma 10).

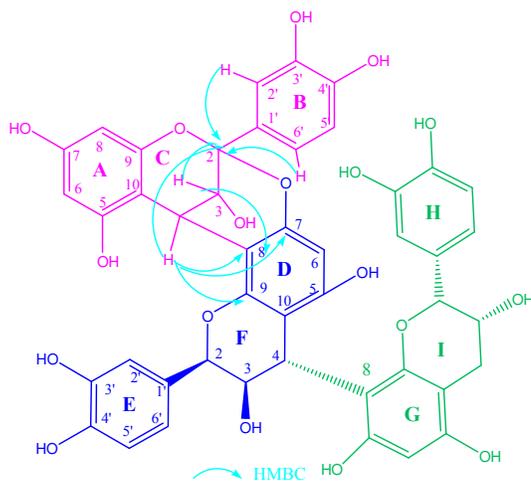


Schéma 10

Le déblindage du carbone C_{C-2} et l'absence de proton H_{C-2} ne permet pas de définir comme précédemment la nature de cette unité, épicatechine ou catéchine.

Le spectre de dichroïsme circulaire du composé **Gc4** détermine la nature β de la liaison entre l'unité « supérieure » et l'unité « centrale ». Une valeur positive entre 220 et 230 de l'effet Cotton (figure 88) indique une liaison interflavanique (4 \rightarrow 8) de type β (2*R*, 3*R*, 4*S*)-2,3-*cis* entre l'unité « supérieure » et l'unité « centrale », cet effet serait négatif dans les liaisons de type α (2*R*, 3*R*, 4*R*)^{112, 155, 157, 159, 160, 163, 164}.

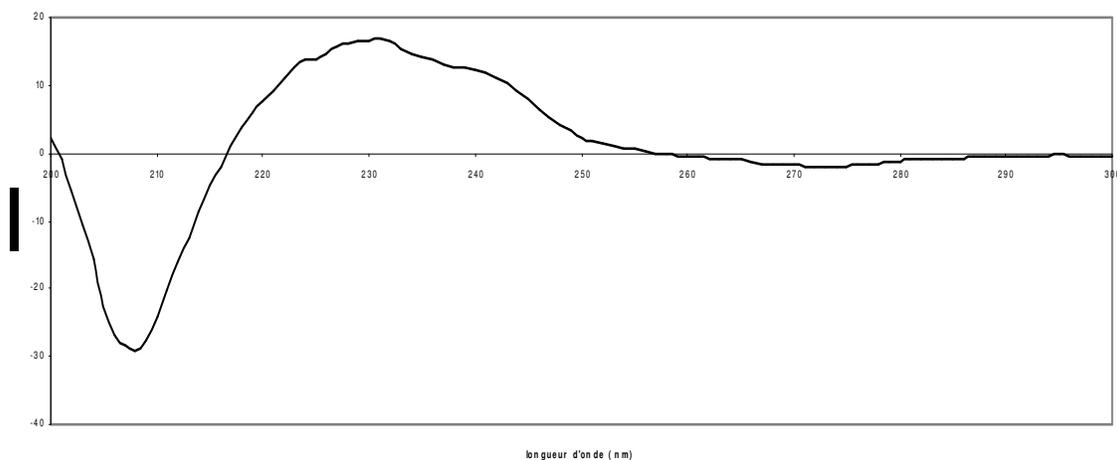


Figure 88 : Spectre de dichroïsme circulaire (DC) de Gc4 (méthanol).

Il reste maintenant à déterminer la stéréochimie du carbone C_{C-3} . En général, les liaisons interflavaniques sont en position *trans* par rapport à l'hydroxyle en position 3 (3,4-*trans*)^{155, 165}. La présence sur le spectre ROESY, d'un effet rOe entre les protons H_{C-3} et H_{D-6} (figure 88 et schéma 11) confirme la configuration 3,4-*trans* du cycle C. Cet effet ne peut être observé que si le groupement hydroxyle se trouve en position α , l'unité supérieure est donc une épicatechine.

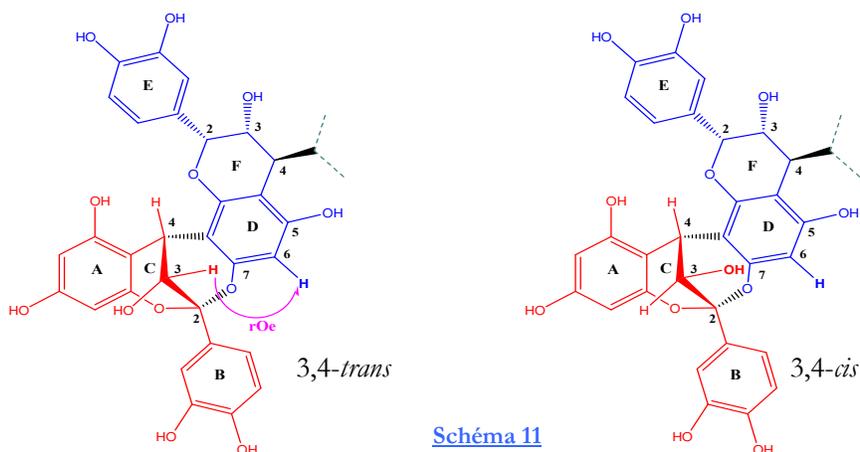
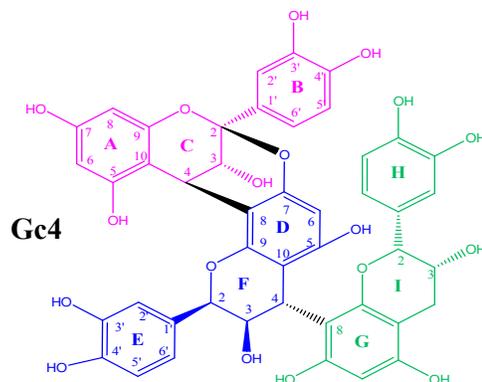


Schéma 11

Le composé **Gc4** est identifié au cinnamtannin B1¹⁶⁶ : épicatechine-(4 β →8, 2 β →O→7)-épicatechine-(4 β →8)-épicatechine.



Ce composé a été isolé pour la première fois en 1983 dans la cannelle de Ceylan, *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae)¹⁶⁶. Il a été identifié également dans *Parameria laevigata* (Apocynaceae)¹⁶⁷ et *Pavetta owariensis* (Rubiaceae)^{168, 169}.

L'ensemble des données spectrales RMN, UV, CD et $[\alpha]_D$ sont en accord avec celles de la littérature¹⁶⁶.

Tableau 47 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) du composé **Gc4** dans CD₃OD.

Position	Unité supérieure		Position	Unité centrale		Position	Unité terminale	
	δ_H (m, J/Hz)	δ_C		δ_H (m, J/Hz)	δ_C		δ_H (m, J/Hz)	δ_C
C-2	-	98,5	F-2	5,72 (j)	77,4	I-2	4,41 (j)	78,8
C-3	3,30 (d, 3,5)	65,7	F-3	4,14 (d, 2,2)	71,1	I-3	3,88 (t, 3,2)	66,1
C-4	4,17 (d, 3,5)	27,4	F-4	4,58 (m)	36,8	I-4	2,84 (dd, 16,5-2,8)	28,0
							2,88 (dd, 16,5-3,5)	
A-5	-	155,3	D-5	-	154,4	G-5	-	154,6
A-6	5,99 (d, 2,4)	96,8	D-6	5,82 (j)	94,6	G-6	6,12 (j)	95,1
A-7	-	156,4	D-7	-	149,6	G-7	-	154,1
A-8	6,04 (d, 2,4)	95,0	D-8	-	104,9	G-8	-	107,4
A-9	-	152,7	D-9	-	150,3	G-9	-	154,1
A-10	-	103,5	D-10	-	105,3	G-10	-	98,6
B-1'	-	131,0	E-1'	-	130,3	H-1'	-	131,7
B-2'	7,05 (d, 2)	114,3	E-2'	7,34 (d, 2,1)	115,3	H-2'	6,87 (d, 1,8)	114,0
B-3'	-	144,0	E-3'	-	144,4	H-3'	-	143,7
B-4'	-	145,1	E-4'	-	144,8	H-4'	-	144,3
B-5'	6,85 (d, 8,4)	114,3	E-5'	6,86 (d, 8,3)	114,7	H-5'	6,77 (d, 8,2)	114,5
B-6'	6,87 (dd, 8,3-2)	118,4	E-6'	6,72 (dd, 8,3-2)	119,9	H-6'	6,75 (dd, 8,2-1,8)	118,0

IV. 2. Détermination structurale des hétérosides sesquiterpéniques

Les sesquiterpènes sont des molécules en C-15 dérivés d'un précurseur commun, le pyrophosphate de farnésyle (FPP). Le 2*E*,6*E*-FPP, résulte de l'addition d'une molécule de pyrophosphate d'isopentényle (IPP) sur le pyrophosphate de géranyle (GPP), lui-même issu de la condensation de deux molécules d'IPP.

IV. 2. 1. Composé Gc5

Le spectre de masse de **Gc5** obtenu en ESI mode positif, donne un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 531 correspondant à une masse de 530 Da.

Le spectre de RMN ^{13}C J -modulé de ce composé montre la présence de deux unités osidiques caractérisées par deux carbones anomériques à 102,2 et 102,4 ppm corrélés respectivement sur le spectre HSQC J -modulé à deux protons anomériques à 4,77 et 4,29 ppm. Ces deux unités sont identifiées par analyse des spectres COSY et HSQC J -modulé à :

- un β -D-glucose ($\delta_{\text{H-1}'}$ 4,29, d , $J_{1-2}=7,8$ Hz) substitué en position 6 ($\delta_{\text{C-6}'}$ 68,0 ppm),
- un α -L-rhamnose ($\delta_{\text{H-1}''}$ 4,77, d , $J_{1-2}=1,7$ Hz) en position terminale.

Comme nous l'avons observé pour le rhamnose lié en C-6 du galactose dans les hétérosides flavoniques **Gc2** et **Gc3**, le proton anomérique est blindé de - 0,27 ppm. Les déplacements chimiques des carbones C-3 (72,3 ppm) et C-5 (69,8 ppm) et l'absence d'effets NOE entre les protons H-1/H-3 et H-1/H-5 confirment la configuration anomérique α du rhamnose.

L'enchaînement des deux unités osidiques [Rha-(1 \rightarrow 6)-Glc-] est déterminé par l'observation des corrélations $^3J_{\text{H-C}}$ sur le spectre HMBC entre le proton H-1'' du rhamnose et le carbone C-6' du glucose (δ_{C} 68,0 ppm) et par les effets NOE entre les protons de la liaison glycosidique.

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C J -modulé montre également la présence de :

- trois méthines oléfiniques à 121,3, 125,1 et 125,4 ppm qui corrélerent, sur le spectre HSQC J -modulé, avec trois protons à 5,39 (ddq , $J=7,8-6,4-1,3$), 5,14 (ddq , $J=8,3-6,4-1,3$) et 5,11 ppm (tm , $J=7$), respectivement.
- quatre méthyles à 25,9, 17,8, 16,1 et 16,6 ppm, corrélant sur le spectre HSQC J -modulé avec leurs protons respectifs à 1,69 (d , $J=1,2$), 1,62 (d , $J=0,7$), 1,63 (d , $J=1,1$) et 1,73 ppm (d , $J=1,1$).

- quatre méthylènes à 40,7, 27,4, 40,9 et 27,8 ppm, corrélant sur le spectre HSQC J -modulé avec leurs protons respectifs à 2,09 (m), 2,16 (tm , $J=6,4$), 2,00 (ddm , $J=8,1-7$) et 2,09 ppm (m).
- un oxyméthylène à 66,0 ppm corrélant sur le spectre HSQC J -modulé avec deux protons à 4,25 ppm (dd , $J=11,9-7,8$) et 4,31 (dd , $J=11,9-6,4$).

L'expérience COSY analysée en partant des protons H-1 de l'oxyméthylène, visualise les corrélations vicinales $^3J_{H-H}$ et celles à longue distance $^4J_{H-H}$ à travers la double liaison, entre tous les protons d'une chaîne isoprényle en C-15 (figure 89).

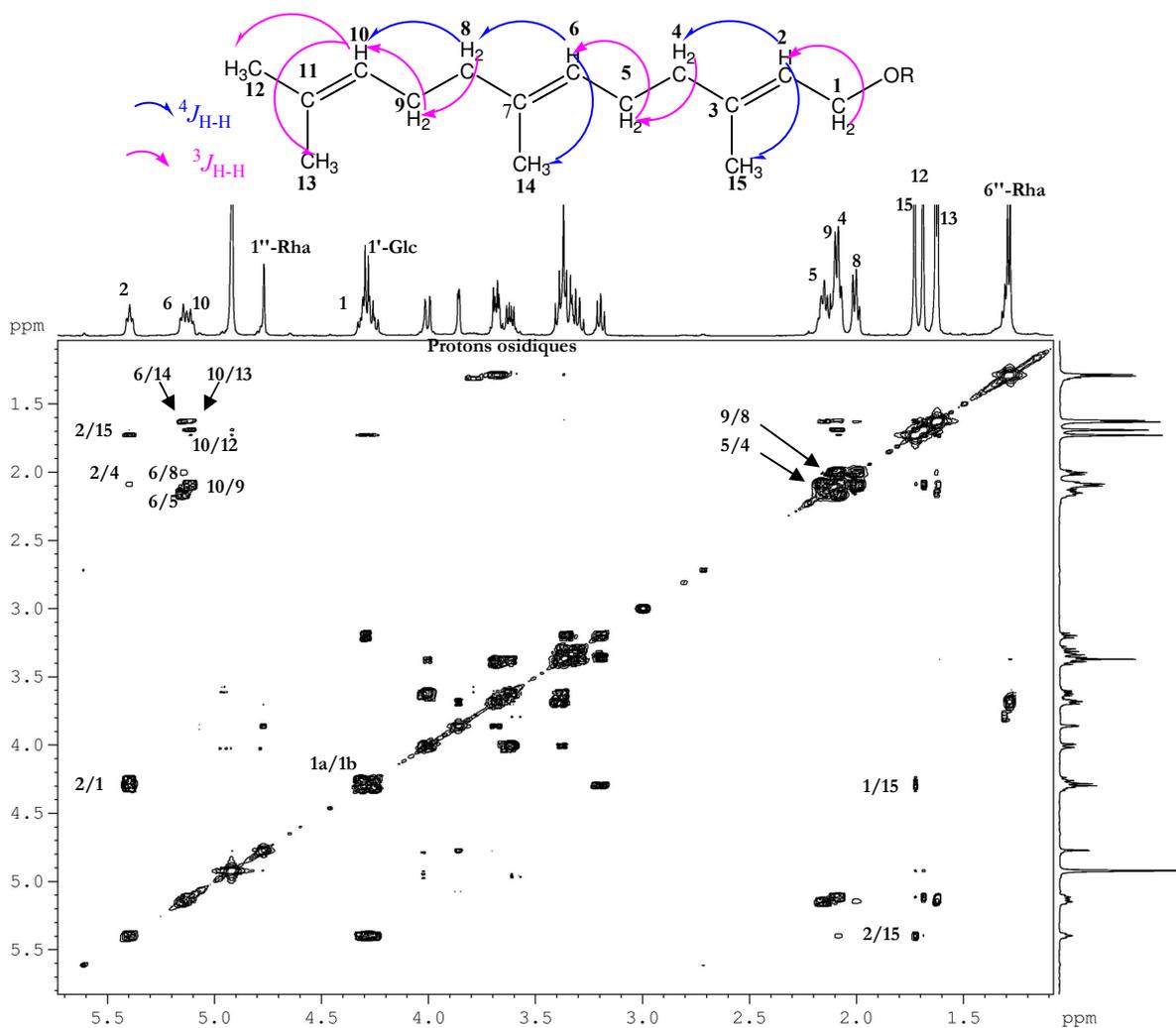


Figure 89 : Spectre COSY de Gc5 (CD_3OD).

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones méthyliques C-14 (δ_C 16,1 ppm) et C-15 (δ_C 17,8 ppm) et des carbones C-4 (δ_C 40,7 ppm) et C-8 (δ_C 40,9 ppm), obtenus sur le spectre HSQC J -modulé, sont très proches des valeurs observées pour le (2*E*, 6*E*)-farnésol¹⁷⁰.

Les déplacements chimiques des carbones quaternaires éthyléniques C-3, C-7 et C-11 sont attribués par l'analyse de l'expérience HMBC. Les protons H-1 et les protons du méthyle en position 15, corrént avec les carbones éthyléniques C-3 et C-2, et les protons du méthyle en position 14 corrént avec les carbones éthyléniques C-6 et C-7 (figure 90). Les méthyles terminaux 12 et 13 corrént entre eux et avec les carbones éthyléniques C-11 (quaternaire) et C-10 (CH). Le carbone C-12, en position *trans*, est le plus déblindé (δ_C 25,9 ppm). L'effet NOE, observé sur le spectre NOESY, entre les protons du méthyle 12 et le proton en position 10, confirme l'attribution des deux méthyles 12 et 13.

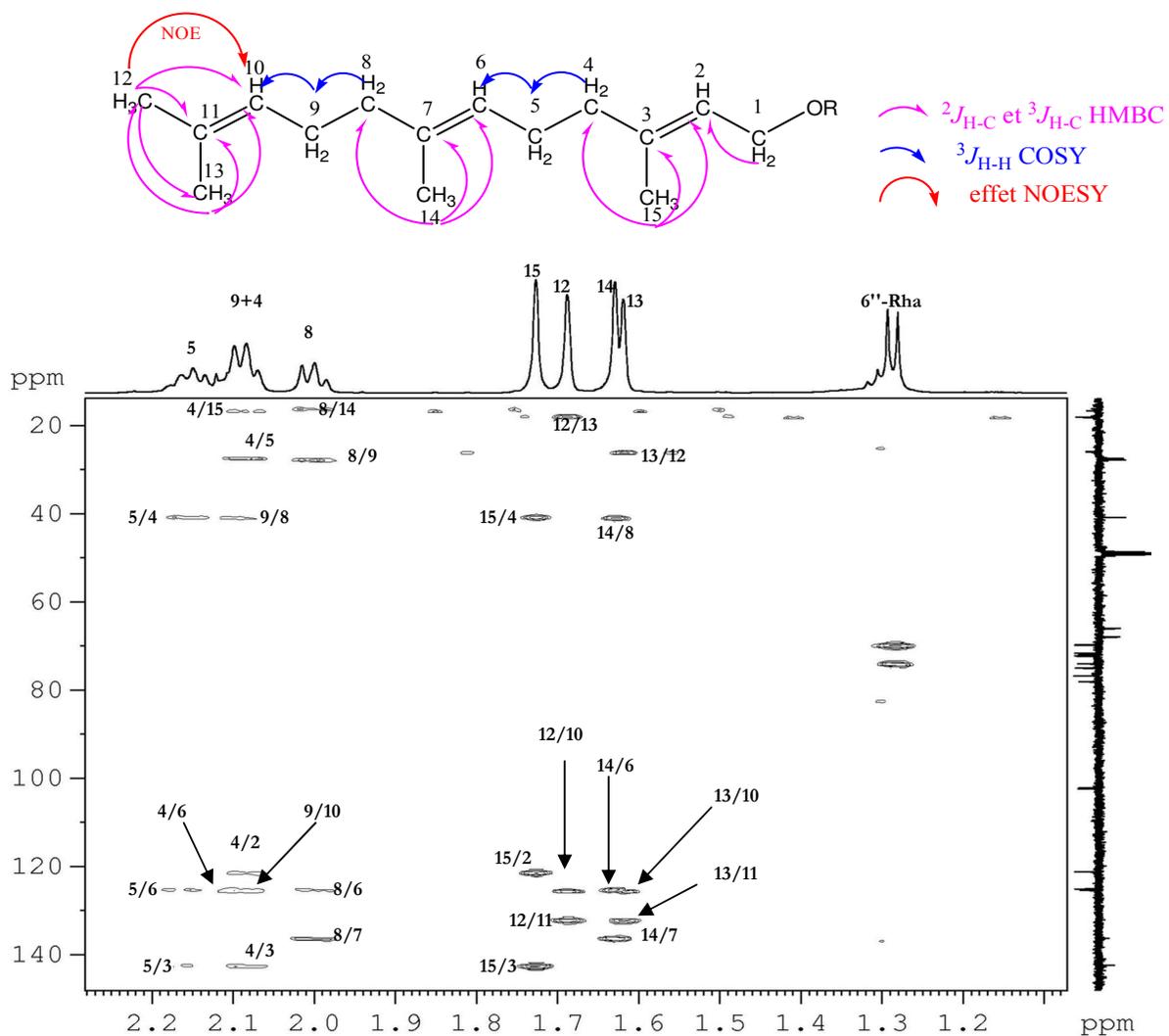


Figure 90 : Spectre HMBC de Gc5 (CD₃OD).

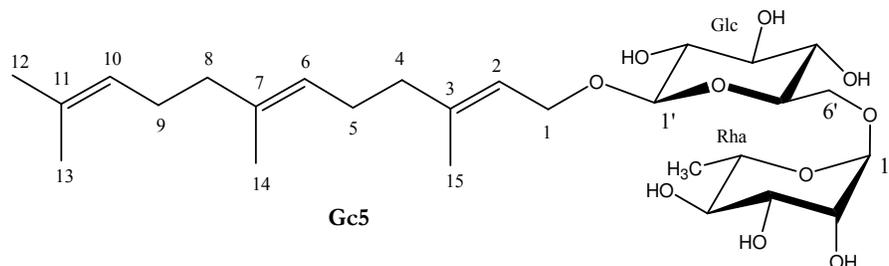
Les déplacements chimiques des carbones méthyliques C-13, C-14 et C-15 inférieures à 20 ppm sont significatifs d'une stéréochimie *E* de toutes les doubles liaisons du farnésol¹⁷⁰. L'absence de signaux CH₂ dans la zone δ 30-33 élimine les autres configurations possibles du farnésol, (*2E 6Z*), (*2Z 6Z*) ou (*2Z, 6E*)¹⁷⁰.

Tableau 48 : Déplacements chimiques en RMN ¹³C des liaisons polyisopréniques Z-1,4 et E-1,4 dans CD₃OD¹⁷⁰.

Configuration <i>trans</i>	Carbone	$\delta^{13}\text{C}$	Configuration <i>cis</i>	Carbone	$\delta^{13}\text{C}$
 (<i>E</i>) <i>trans</i> -1,4	-CH ₃ (5)	15,87	 (<i>Z</i>) <i>cis</i> -1,4	-CH ₃ (5)	23,25
	>CH ₂ (4)	26,69		>CH ₂ (4)	26,36
	>CH ₂ (1)	39,91		>CH ₂ (1)	32,01
	=CH- (3)	123,87		=CH- (3)	124,65
	=C- (2)	134,28		=C- (2)	134,85

Le site de glycosylation est déterminé par les corrélations ³J_{H-C} visualisées sur le spectre HMBC entre le proton H-1'' du glucose (δ_{H} 4,29 ppm) et le carbone C-1 du farnésol (δ_{C} 66,0 ppm).

Le composé **Gc5** est le 1-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-(*2E,6E*)-farnésol.



IV. 2. 2. Composé Gc6

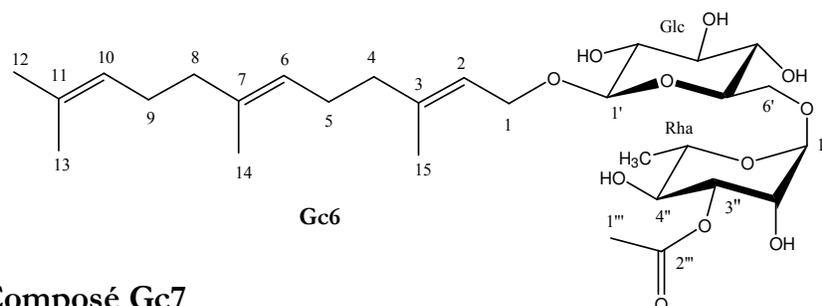
Le spectre de masse du composé **Gc6** obtenu en ESI mode positif, montre un ion pseudomoléculaire [M+Na]⁺ à *m/z* 595, correspondant à une masse moléculaire de 572 Da, soit un gain de 42 *uma* comparativement à **Gc5** suggérant la présence supplémentaire d'un groupement acétate.

En effet, sur les spectres de RMN de **Gc6** sont visualisés les signaux d'un groupement acétate à δ_{H} 2,12 ppm (3H, *s*) et δ_{C} 21,1 (CH₃) et 172,5 ppm (CO).

L'attribution des autres signaux détectés en RMN ^1H et ^{13}C J -modulé indique la présence d'un $2E,6E$ farnésol, d'un β -D-glucose et d'un α -L-rhamnose. Seuls les signaux de l' α -L-rhamnose diffèrent par rapport au composé **Gc5** (tableau 49). Le proton H-3'' de ce rhamnose est fortement déblindé à 4,96 ppm ($\Delta \delta_{\text{H}}=1,1$ ppm), alors que les carbones C-2'' et C-4'' sont blindés. Le rhamnose est donc acétylé en position 3''.

Sur le spectre HMBC des corrélations $^3J_{\text{H-C}}$ sont observées entre le carbone C-1 (δ_{C} 66,1 ppm) du farnésol et le proton H-1' du glucose (δ_{H} 4,30 ppm), entre le carbone C-6' (δ_{C} 68,1 ppm) du glucose et le proton H-1'' du rhamnose (δ_{H} 4,78 ppm), et entre le proton H-3'' (δ_{H} 4,96 ppm) de ce rhamnose et le carbonyle de l'acétate (δ_{C} 172,5).

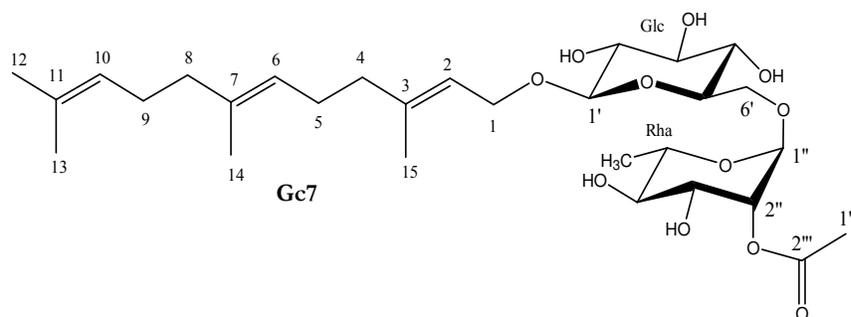
Le composé **Gc6** est le 1- O -[(3- O -acétyl)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-($2E,6E$)-farnésol.



IV. 2. 3. Composé Gc7

Les données spectrales obtenues en ESI mode positif (m/z 595 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) et RMN ^1H et ^{13}C J -modulé sont presque identiques à celles du composé **Gc6**. Cela suppose que **Gc6** et **Gc7** sont des régioisomères avec un ($2E, 6E$)-farnésol comme aglycone (tableau 49).

Sur le spectre HMBC, la corrélation $^3J_{\text{H-C}}$ entre le proton H-2'' du rhamnose déblindé à 5,07 ppm et le carbonyle de l'acétate à 172,9 ppm indique que le groupement acétyle estérifie cette fois le rhamnose en position 2''. Les autres corrélations permettent l'identification du composé **Gc7** au 1- O -[(2- O -acétyl)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-($2E,6E$)-farnésol.



IV. 2. 4. Composé Gc8

Le spectre de masse du composé **Gc8** obtenu en ESI mode positif, montre un ion pseudomoléculaire $[M+2Na]^+$ à m/z 661, supposant la présence de deux groupements acétates supplémentaires comparativement à **Gc5**.

Sur les spectres de RMN 1H et ^{13}C J -modulé de **Gc8**, sont retrouvés les signaux du β -D-glucose, de l' α -L-rhamnose et du (2*E*,6*E*)-farnésol, ainsi que les signaux de deux méthyles de groupement acétate (δ_H 2,03 et 2,11 ppm et δ_C 20,8 et 20,7 ppm) (tableau 49). Le déblindage des protons H-2'' et H-3'' de l' α -L-rhamnose à 5,26 et 5,09 ppm, indique les positions des acétates.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC confirment la structure 1-*O*-[(2,3-di-*O*-acétyl)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-(2*E*,6*E*)-farnésol pour le composé **Gc8**.

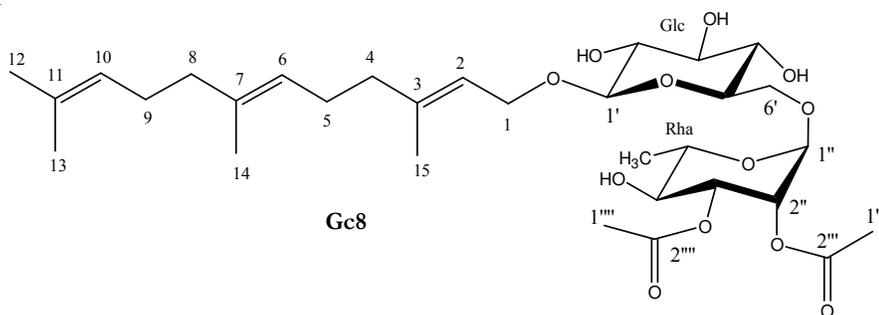


Tableau 49 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des composés **Gc5**, **Gc6**, **Gc7** et **Gc8** dans (CD₃OD).

	Gc5		Gc6		Gc7		Gc8	
	δ_i (m, J Hz)	δ_c	δ_i (m, J Hz)	δ_c	δ_i (m, J Hz)	δ_c	δ_i (m, J Hz)	δ_c
Farnésol								
1	4,25 (<i>dd</i> , 11,9-7,8)	66,0	4,26 (<i>dd</i> , 11,9-7,9)	66,0	4,25 (<i>dd</i> , 11,8-7,9)	66,1	4,26 (<i>dd</i> , 11,7-7,6)	66,1
	4,31 (<i>dd</i> , 11,9-6,4)	-	4,31 (<i>dd</i> , 11,9-6,3)	-	4,30 (<i>dd</i> , 11,8-7,3)	-	4,30 (<i>dd</i> , 11,7-6)	-
2	5,39 (<i>ddq</i> , 7,8-6,4-1,3)	121,3	5,39 (<i>iq</i> , 6,4-1,3)	121,2	5,39 (<i>tm</i> , 6,4)	121,4	5,39 (<i>tm</i> , 6,3)	121,3
3	-	142,4	-	142,6	-	142,4	-	142,5
4	2,09 (<i>m</i>)	40,7	2,08 (<i>tm</i> , 6,4)	40,7	2,09 (<i>m</i>)	40,7	2,09 (<i>m</i>)	40,7
5	2,16 (<i>tm</i> , 6,4)	27,4	2,15 (<i>tm</i> , 7,4)	27,4	2,15 (<i>tm</i> , 7,3)	27,4	2,15 (<i>tm</i> , 6,8)	27,4
6	5,14 (<i>ddq</i> , 8,3-6,4-1,3)	125,1	5,15 (<i>iq</i> , 6,9-1,2)	125,2	5,15 (<i>tm</i> , 6,9)	125,1	5,15 (<i>iq</i> , 6,7-1,1)	125,2
7	-	136,3	-	136,3	-	136,3	-	136,3
8	2,00 (<i>ddm</i> , 8,1-7)	40,9	2,00 (<i>tm</i> , 8,1)	40,9	2,00 (<i>ddm</i> , 7,9-7)	40,9	2,01 (<i>tm</i> , 7,3)	40,9
9	2,09 (<i>m</i>)	27,8	2,10 (<i>m</i>)	27,8	2,10 (<i>m</i>)	27,8	2,10 (<i>m</i>)	27,8
10	5,11 (<i>tm</i> , 7)	125,4	5,11 (<i>tm</i> , 7,1)	125,4	5,11 (<i>tm</i> , 7,1)	125,4	5,12 (<i>tm</i> , 7)	125,4
11	-	132,1	-	132,1	-	132,1	-	132,1
12	1,69 (<i>d</i> , 1,2)	25,9	1,69 (<i>d</i> , 1,1)	25,9	1,69 (<i>st</i>)	25,9	1,69 (<i>st</i>)	25,9
13	1,62 (<i>d</i> , 0,7)	17,8	1,62 (<i>st</i>)	17,8	1,62 (<i>st</i>)	17,8	1,62 (<i>st</i>)	17,8
14	1,63 (<i>d</i> , 1,1)	16,1	1,63 (<i>d</i> , 1)	16,1	1,63 (<i>st</i>)	16,1	1,63 (<i>st</i>)	16,1
15	1,73 (<i>d</i> , 1,1)	16,6	1,73 (<i>d</i> , 1)	16,6	1,73 (<i>st</i>)	16,6	1,73 (<i>st</i>)	16,6
β-D-glucopyranose								
1'	4,29 (<i>d</i> , 7,8)	102,4	4,30 (<i>d</i> , 7,8)	102,3	4,29 (<i>d</i> , 7,8)	102,5	4,31 (<i>d</i> , 7,8)	102,5
2'	3,19 (<i>dd</i> , 9-7,8)	75,0	3,20 (<i>dd</i> , 9-7,8)	75,0	3,19 (<i>dd</i> , 9-7,9)	75,0	3,21 (<i>dd</i> , 8,9-7,9)	75,0
3'	3,36 (<i>t</i> , 9)	78,1	3,36 (<i>t</i> , 9)	78,1	3,35 (<i>t</i> , 9)	78,1	3,36 (<i>t</i> , 8,9)	78,1
4'	3,29 (<i>dd</i> , 9,6-8,9)	71,6	3,30 (<i>dd</i> , 9,4-9)	71,7	3,29 (<i>dd</i> , 9,4-9)	71,6	3,30 (<i>t</i> , 8,9)	71,7
5'	3,37 (<i>ddd</i> , 9,6-6-1,8)	76,8	3,40 (<i>ddd</i> , 9,6-6,3-1,8)	76,9	3,38 (<i>ddd</i> , 9,2-6,2-1,7)	77,0	3,37 (<i>ddd</i> , 9,6-6,3-1,7)	76,9
6'a	3,62 (<i>dd</i> , 11,1-6)	68,0	3,63 (<i>dd</i> , 11,2-6,3)	68,1	3,65 (<i>dd</i> , 11,3-6,2)	67,8	3,67 (<i>dd</i> , 11,3-6,4)	68,2
6'b	4,00 (<i>dd</i> , 11,1-1,8)	-	4,03 (<i>dd</i> , 11,2-1,8)	-	3,99 (<i>dd</i> , 11,3-1,6)	-	4,03 (<i>dd</i> , 11,3-1,7)	-
α-L-rhamnopyranose								
1''	4,77 (<i>d</i> , 1,7)	102,2	4,78 (<i>d</i> , 1,8)	102,0	4,80 (<i>d</i> , 1,3)	99,2	4,82 (<i>d</i> , 1,6)	99,4
2''	3,86 (<i>dd</i> , 3,4-1,7)	72,2	4,02 (<i>dd</i> , 3,4-1,8)	69,8	5,07 (<i>dd</i> , 3,6-1,6)	74,0	5,26 (<i>dd</i> , 3,4-1,7)	71,2
3''	3,68 (<i>dd</i> , 9,5-3,4)	72,3	4,96 (<i>dd</i> , 9,8-3,4)	75,7	3,86 (<i>dd</i> , 9,6-3,6)	70,5	5,09 (<i>dd</i> , 9,9-3,4)	73,2
4''	3,39 (<i>t</i> , 9,5)	74,0	3,59 (<i>t</i> , 9,7)	71,3	3,36 (<i>t</i> , 9,6)	74,2	3,51 (<i>t</i> , 9,8)	71,4
5''	3,68 (<i>m</i>)	69,8	3,79 (<i>dq</i> , 9,6-6,2)	69,9	3,72 (<i>dq</i> , 9,5-6,2)	69,8	3,85 (<i>dq</i> , 9,5-6,2)	69,8
6''	1,29 (<i>d</i> , 6,3)	18,1	1,31 (<i>d</i> , 6,2)	18,1	1,29 (<i>d</i> , 6,2)	18,1	1,32 (<i>d</i> , 6,2)	18,0
2''acétate								
CH₃-					2,10 (<i>s</i>)	20,9	2,03 (<i>s</i>)	20,8
C=O					-	172,9	-	171,7
3''acétate								
CH₃-			2,12 (<i>s</i>)	21,1			2,11 (<i>s</i>)	20,7
C=O			-	172,5			-	172,1

V. Conclusion

L'étude des feuilles de *Guioa crenulata* a conduit à l'isolement de huit composés dont :

- trois flavonoïdes (**Gc1-Gc3**) de structures connues, possédant le kaempferoll et la quercétine comme génine avec une chaîne osidique di- ou tri-saccharidique attachée en position 3 de la génine. Ces flavonoïdes sont très répandus et ils ont été isolés des plantes de plusieurs familles comme les Primulaceae^{149,151}, les Chenopodiaceae^{146, 148} et les Apocynaceae¹⁴⁷.
- un tanin trimère de type A (**Gc4**) constitué de trois unités d'épicatéchine dont deux sont doublement liées, l'unité supérieure et l'unité centrale (liaison $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7$ et $4\beta \rightarrow 8$), alors que l'unité centrale et l'unité terminale sont reliées par une liaison simple ($4\beta \rightarrow 8$). Ce composé est également de structure connue mais il est nouvellement isolé dans la famille des Sapindaceae.

Contrairement aux composés précédents, les quatre glycosides de farnésol (**Gc5-Gc8**) sont de structures nouvelles. La distribution de ce type d'hétérosides est assez restreinte et presque spécifique à la famille des Sapindaceae puisque ces composés ont été mis en évidence dans quatre espèces de Sapindaceae. Des écorces de tronc de *Lepisanthes rubiginosa* a été isolé un tétraglycoside de farnésol, le rubiginoside, constitué d'une unité glucose trisubstituée en position 2', 3' et 4' par des rhamnoses¹³³. Des triglycosides du 12-hydroxy-(2E,6E)-farnésol ont été isolés du péricarpe de divers *Sapindus*, *Sapindus mukurossi*¹³⁰, *Sapindus trifoliatus*¹³² et *S. delavayi*¹³¹, la chaîne osidique comporte là aussi un glucose substitué par au moins un rhamnose en position 2'.

Des monoglucosides de 5,12-dihydroxy-(2E,6E)-farnésol ont été isolés des parties aériennes d'une Asteraceae, *Asteriscus pygmaeus*¹⁷¹. A notre connaissance, les diglycosides de farnésol (**Gc5 à Gc8**) sont les premiers décrits chez les plantes supérieures. Un brevet japonais mentionne l'isolement et l'activité des diglycosides de farnésol d'un corail mou du genre *Sinularia*^{172, 173}. Ces diglycosides constitués de deux unités arabinoses augmentent l'absorption du glucose et peuvent être utilisés pour le traitement et la prévention du diabète.

Troisième partie
Étude des activités biologiques

- | |
|---|
| <p>I. <i>Activité hémolytique des saponosides</i>
II. <i>Autres activités biologiques</i></p> |
|---|

I. Activité hémolytique des saponosides

I. 1. Travaux antérieurs

Les saponosides sont connus depuis très longtemps pour leur capacité à lyser les globules rouges (hémolyse). Cette propriété peut être utilisée comme moyen de détection au sein des plantes, bien que les saponosides, ne possèdent pas tous une activité hémolytique puisque cette activité est reliée à leur structure.

Notre laboratoire s'intéresse à établir des relations structure-activité hémolytique afin de mieux comprendre les effets des saponosides au niveau des membranes cellulaires, essentiellement pour les saponosides à squelette triterpénique. Ce travail a débuté, il y a une dizaine d'années, par la mesure de l'activité hémolytique de plusieurs saponosides isolés de différents végétaux, de saponosides commerciaux, de composés partiellement modifiés et de saponosides hémisynthétisés au laboratoire. Depuis, nous continuons à mesurer l'activité des extraits bruts des plantes étudiées et des saponosides purs isolés lorsque ceux-ci sont obtenus en quantité suffisante.

I. 1. 1. Mécanismes de l'hémolyse par les saponosides ^{126, 174}

Le phénomène d'hémolyse fait intervenir trois étapes pour lesquelles la structure du saponoside et des différents éléments qui le composent jouent des rôles encore mal connus :

- une adsorption très rapide du saponoside sur la membrane érythrocytaire : cette adsorption se ferait par complexation du saponoside avec les stérols membranaires.
- une organisation du complexe stérol/saponoside en "micelle" aboutissant à la formation de puits et/ou de trous transmembranaires.
- le complexe micellaire favoriserait le passage des ions et/ou de molécules du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, aboutissant à la rupture de la membrane cellulaire.

Ce mécanisme par complexation aux stérols membranaires n'est vraisemblablement pas unique et certains saponosides doivent aussi être adsorbés sur la membrane par l'intermédiaire des lipides ou posséder des interactions spécifiques avec des protéines membranaires telles que l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase favorisant l'hémolyse.

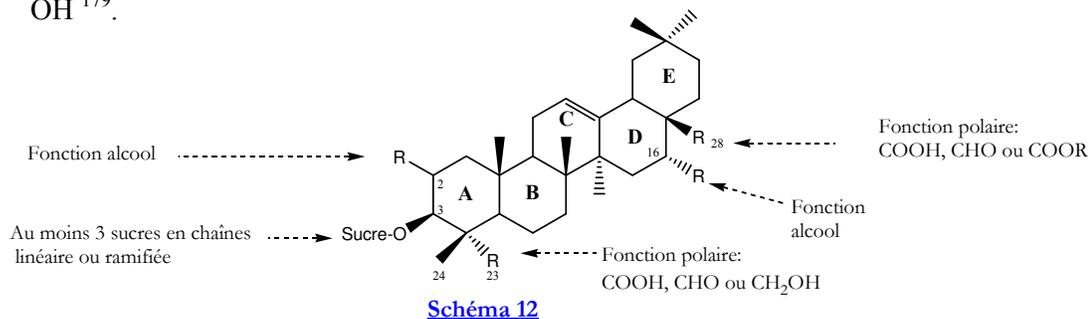
I. 1. 2. Relations structure-activité hémolytique ^{126, 174}

Les travaux décrits dans la littérature et ceux réalisés au laboratoire montrent que la génine et la partie osidique sont à prendre en considération dans l'évaluation de l'activité hémolytique.

I. 1. 2. 1. Influence de la génine

Les résultats des relations structure-activité recueillis au laboratoire ont permis de confirmer l'importance de certains éléments structuraux qui renforcent l'activité hémolytique des saponosides triterpéniques de type β -amyrine (schéma 12) ¹²⁶. Ces éléments sont :

- une fonction polaire sur le cycle A (hydroxyle en position 2, alcool, aldéhyde ou acide en position C-23 ou C-24),
- un hydroxyle en position 16α ¹⁷⁵,
- un acide carboxylique en position C-28 ou un cycle époxy 13β -28, par rapport à un alcool primaire en position 28 ¹⁷⁶,
- l'estérification d'au moins deux hydroxyles des cycle D et E des génines polyhydroxylées ¹⁷⁴,
- la méthylation des fonctions acides en C-28 ou C-30 augmente légèrement l'activité hémolytique ^{175, 177, 178}.
- une jonction de cycle A/B *trans* > A/B *cis* et l'hydroxyle en position 3β -OH > 3α -OH ¹⁷⁹.



I. 1. 2. 2. Influence de la chaîne osidique

L'activité hémolytique des saponosides dépend du nombre de chaînes osidiques et au sein de chaque chaîne, du nombre, de la nature et de la séquence des unités osidiques.

Les saponosides monodesmosidiques possédant leur chaîne osidique en position 3 sont généralement plus hémolytiques que les bidesmosidiques ^{126, 174, 176, 180}. En revanche, les saponosides monodesmosidiques dont la chaîne osidique est située sur la fonction acide en position 28 ne sont quant à eux pas hémolytiques ¹²⁶.

Pour les saponosides monodesmosidiques dont la chaîne osidique est en position 3, l'activité hémolytique augmente avec le nombre de sucres et est maximale pour quatre unités osidiques.^{126, 181} Toutefois, certains auteurs ont observé une diminution de l'activité hémolytique lorsque le glucose terminal de l'acide 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] oléanolique est substitué par un autre sucre¹⁸².

Pour les saponosides bidesmosidiques, il semble exister une balance de polarité entre les chaînes osidiques. La glycosylation de la fonction acide carboxylique en 28 d'un saponoside hémolytique (à chaîne osidique de 3 ou 4 sucres en position 3) diminue fortement son activité hémolytique. En revanche, lorsque la chaîne osidique en 28 s'allonge, il est nécessaire pour avoir une activité hémolytique de diminuer la partie osidique en position 3 pour ne conserver qu'un seul sucre. Les saponosides bidesmosidiques les plus actifs testés au laboratoire possédaient une chaîne osidique en 28 composée de 4 sucres en chaîne ramifiée¹²⁶.

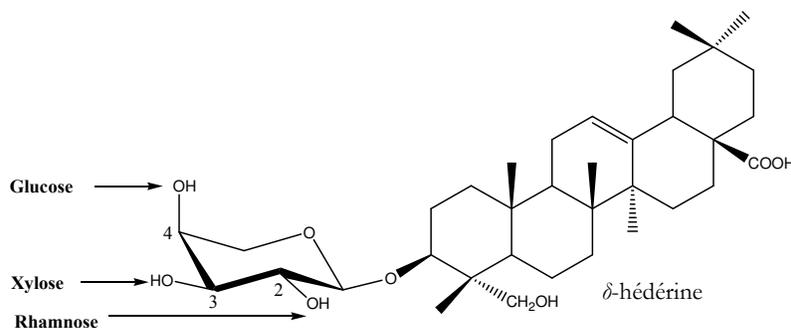
Certains auteurs ont montré que l'effet d'une chaîne osidique n'est pas transférable d'une génine à une autre. Les relations de structure-activité hémolytique concernant l'enchaînement et la nature des sucres doivent donc être établies en fonction de la structure de l'aglycone^{183, 184}.

Pour étudier l'influence de l'enchaînement et de la nature des sucres, l'activité hémolytique de saponosides à hédéragénine synthétisés au laboratoire a été mesurée. Les tests ont été réalisés avec des saponosides sous forme d'acide carboxylique libre et d'ester méthylique puisque la présence de cet ester est connue pour renforcer l'activité hémolytique. Un premier groupe de 12 saponosides synthétisés à partir de disaccharides commerciaux de type di-glucoside et galactosyl-glucoside ont été testés. Les résultats obtenus montrent que la liaison interglycosidique (1 \rightarrow 4) et la configuration anomérique de type β -D sont favorables par rapport à la liaison interglycosidique (1 \rightarrow 6) et à la configuration anomérique α -D et que l'influence de la nature du sucre terminal varie selon que le carbonyle en 28 soit libre ou estérifié par un méthyle. En effet, pour les dérivés à acide carboxylique libre, un D-glucopyranose terminal est favorable par rapport à un D-galactopyranose, alors que l'inverse a été observé pour les saponosides à ester méthylique¹⁸⁵.

L'activité hémolytique des dérivés hémisynthétisés de la δ -hédérine (3-*O*- α -L-arabinopyranosyl hédéragénine) dont le L-arabinopyranose est substitué en position 2, 3 ou 4 par un second sucre a été mesurée (schéma 13). L'absence d'activité hémolytique des dérivés

non naturels possédant un β -L-arabinose montre que la configuration anomérique α est préférable par rapport à la β . Pour les saponosides sous forme d'acide carboxylique libre, il existe pour chaque sucre une position de substitution favorable sur le α -L-arabinopyranose. L'ordre décroissant d'activité est :

- pour un α -L-rhamnopyranose : 2, 3, 4,
- pour un β -D-xylopyranose : 3, 2, 4,
- pour un β -D-glucopyranose : 4, 3, 2.



[Schéma 13](#)

Pour les saponosides à ester méthylique, l'ordre décroissant d'activité est :

- pour un α -L-rhamnopyranose ou un β -D-glucopyranose : 2, 4, 3,
- pour un β -D-xylopyranose : 2, 3, 4.

Ces résultats montrent que la méthylation augmente généralement l'activité hémolytique et qu'aucune des trois positions de substitution de l' α -L-arabinose n'est réellement plus active par rapport à une autre, chaque sucre possédant une position préférentielle de substitution. Ils confirment que, selon la génine, la partie osidique influence différemment l'activité hémolytique. Il apparaît délicat d'établir des relations structure-activité hémolytique générales en fonction de la nature et du mode d'enchaînement des unités osidiques. Cependant cela confirme que ces deux parties sont à prendre en considération pour évaluer l'activité hémolytique et interviennent vraisemblablement au niveau des différentes étapes de l'hémolyse¹⁸⁶.

I. 2. Activité hémolytique des saponosides de *Caryocar*

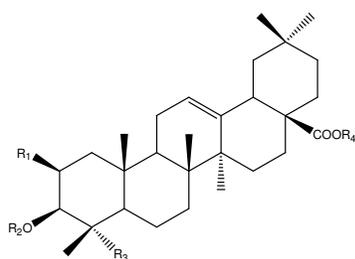
Afin de compléter les travaux de relation structure-activité hémolytique précédemment énoncés, nous avons mesuré l'activité hémolytique de 10 saponosides purs isolés des fruits de *C. glabrum*. Les extraits bruts des pulpes (**Cgp**) et des enveloppes (**Cge**) de *C. glabrum*, ainsi que les saponosides bruts des enveloppes des fruits de *C. villosum* (**Cve**) ont également été testés (tableau 50).

Nous avons vu qu'il existait, deux séries selon la nature du sucre lié à la position 3 de l'aglycone : les glucuronides et les glucosides, qui vont nous permettre de comparer l'influence d'un acide glucuronique sur l'activité hémolytique comparée à celle du glucose. La présence dans ces composés de chaînes osidiques communes liées à des triterpènes de structure différente mais proche, va nous permettre de vérifier l'influence des groupements fonctionnels sur la génine pour un même enchaînement osidique. Enfin, l'isolement de saponosides bidesmosidiques correspondants à des 28-*O*-glucosides de monodesmosides va nous permettre de comparer l'activité des mono- et bidesmosides.

Les tests d'activité hémolytique des échantillons ont été effectués selon le protocole utilisé au laboratoire^{126,174} sur une suspension à 10% d'érythrocytes de mouton dans du PBS (tampon phosphate). Un mélange de saponosides commercialisé par la société Sigma[®], extrait du Bois de Panama (*Quillaja saponaria*) a été utilisé comme référence. Cet extrait préalablement dialysé afin d'en améliorer le pouvoir hémolytique possède une DH₁₀₀ de 25 µg/ml.

I. 2. 1. Résultats

Les résultats sont exprimés par une courbe représentant le pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration en saponoside (µg/ml) (figures 93-94). Les valeurs des concentrations correspondantes aux DH₁₀₀ et DH₅₀ (concentrations nécessaires pour obtenir respectivement 100% et 50% d'hémolyse) sont présentées dans le tableau 50.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	DH ₅₀		DH ₁₀₀	
					μM	μg/ml	μM	μg/ml
Cgp4	H	Gal-(1→3)-Glc-	CH ₂ OH	H	56	45	94	75
Cgp5	OH	Gal-(1→3)-Glc-	CH₂OH	H	18	15	24	25
Cgp11	OH	Gal-(1→3)-Glc-	CH ₂ OH	Glc	-	-	>513	>500 [10%]
Cgp14	H	GlcA-	CH ₂ OH	H	93	60	116	75
Cgp16	H	Gal-(1→3)-GlcA-	CH₃	H	19	15	31	25
Cgp17	OH	Gal-(1→3)-GlcA-	CH ₃	H	32	26	49	40
Cgp18	H	Gal-(1→3)-GlcA-	CH ₂ OH	H	45	37	93	75
Cgp19	OH	Gal-(1→3)-GlcA-	CH ₂ OH	H	66	55	121	100
Cgp24	H	Gal-(1→3)-GlcA-	CH ₂ OH	Glc	309	300	514	500
Cgp29	OH	Gal-(1→3)-méthyl-6-O-GlcA-	CH ₃	H	157	130	303	250
Cgp	-	-	-	-	-	20	-	75
Cge	-	-	-	-	-	25	-	75
Cve	-	-	-	-	-	68	-	100
Sigma®	-	-	-	-	-	7,5	-	25

Tableau 50 : Structures des saponosides testés et résultats de l'activité hémolytique.

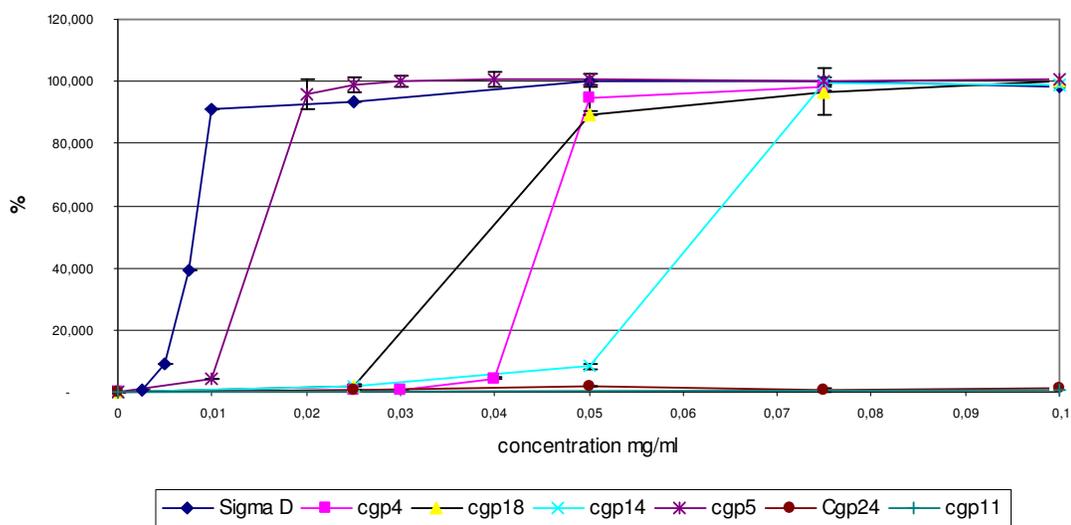


Figure 91 : Comparaison du pouvoir hémolytique des saponosides Cgp4, Cgp5, Cgp11, Cgp14, Cgp18 et Cgp24.

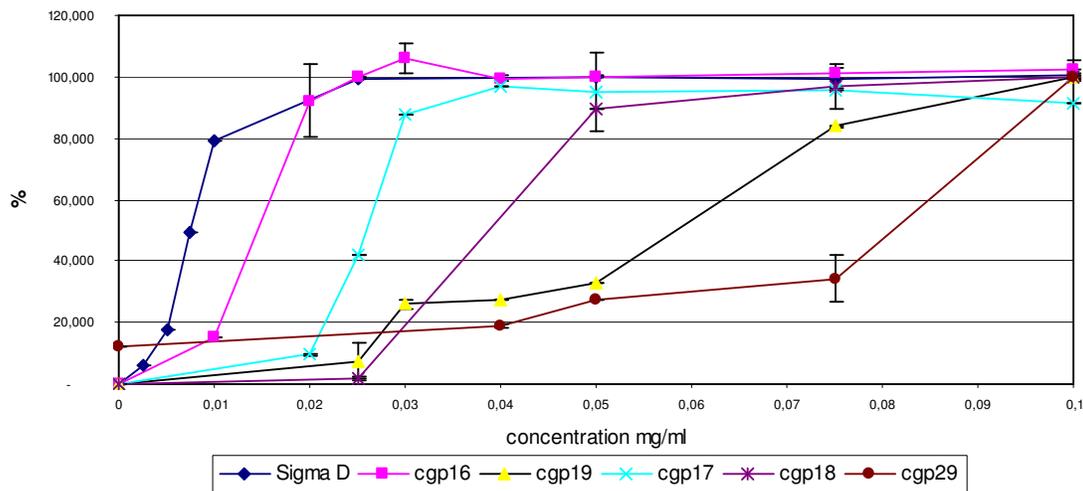


Figure 92 : Comparaison du pouvoir hémolytique des saponosides Cgp16, Cgp17, Cgp18, Cgp19 et Cgp29.

I. 2. 2. Discussion

La comparaison de l'activité hémolytique des extraits bruts enrichis en saponosides montre que les pulpes (**Cgp**) et enveloppes (**Cge**) des fruits de *C. glabrum* ont une activité hémolytique similaire, avec une DH_{50} de 20 à 25 $\mu\text{g/ml}$. La fraction enrichie en saponosides des enveloppes des fruits de *C. villosum* (**Cve**) est moins active que celle des fruits de *C. glabrum* (DH_{50} à 68 $\mu\text{g/ml}$). Ceci s'explique par la présence dans cet extrait, en majorité de saponosides bidesmosidiques dont les composés majoritaires sont constitués d'une chaîne trisidique en position 3 de la génine avec un seul glucose en position 28. Hors il est établi que la glycosylation en C-28 diminue fortement l'activité hémolytique et qu'il est nécessaire d'avoir une chaîne ester à 4 sucres pour être hémolytique.

La comparaison de l'activité hémolytique des saponosides monodesmosidiques **Cgp5** et **Cgp18** avec leur bidesmosides correspondants **Cgp11** et **Cgp24** confirme que les monodesmosides sont plus actifs que les bidesmosides (tableau 50 et figure 91). Les saponosides bidesmosidiques (**Cgp11** et **Cgp24**) n'ont pas ou peu d'activité hémolytique (10% pour **Cgp11** et 90% pour **Cgp24** à 513 μM) (tableau 50).

L'activité comparée des saponosides **Cgp14** et **Cgp18** montre que lorsque le nombre de sucres composant la chaîne osidique en position 3 augmente, l'activité hémolytique est plus importante (figure 91). Ceci confirme les résultats précédemment énoncés dans la littérature où une chaîne à deux ou trois sucres est plus favorable qu'une à un sucre pour les monodesmosides^{126, 174}.

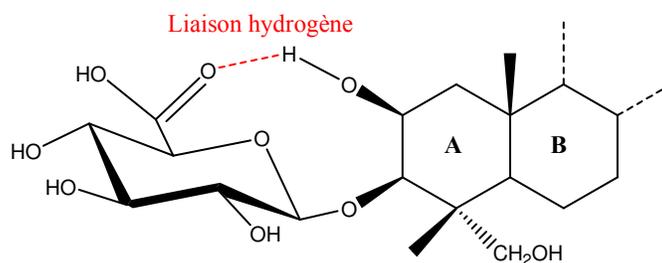
La comparaison du pouvoir hémolytique entre les saponosides **Cgp4** et **Cgp5** confirme que la présence de fonctions polaires sur le cycle A améliore l'activité hémolytique^{126, 174}. Le saponoside **Cgp5** à bayogénine (= 2 β -hydroxy hédéragénine) est 4 fois plus actif que **Cgp4** à hédéragénine (tableau 50 et figure 91).

En revanche si on compare l'activité des glucuronides **Cgp16** à **Cgp19** pour lesquels un acide β -D-glucuronique est directement lié à la génine en position 3, nous constatons l'effet inverse : l'augmentation de la polarité du cycle A provoque une diminution de l'activité hémolytique (figure 92). Le saponoside **Cgp16** à acide oléanolique est 1,7 fois plus actif que le saponoside **Cgp17** à acide 2 β -hydroxyoléanolique, 2,5 fois plus actif que **Cgp18** à hédéragénine et 3,5 fois plus actif que **Cgp19** à bayogénine (tableau 50).

Le glucuronide **Cgp16** à acide glucuronique et acide oléanolique est aussi actif que le glucoside **Cgp5** à glucose et bayogénine. Cela suggère que la présence de la fonction acide de

l'acide glucuronique apporte la polarité suffisante à l'activité hémolytique au niveau du cycle A de la génine.

Si l'on compare l'activité des glucosides **Cgp4** et **Cgp5**, respectivement à hédéragénine et à bayogénine, avec leur glucuronides correspondants **Cgp18** et **Cgp19**, le glucuronide **Cgp18** est légèrement plus hémolytique que son homologue **Cgp4**. En revanche, le glucuronide **Cgp19** est 3 fois moins actif que **Cgp5**. Ceci peut être interprété par la formation de liaison hydrogène entre le carbonyle de l'acide glucuronique et l'hydroxyle en position 2 de la bayogénine ce qui diminue l'activité hémolytique (schéma 14). La formation de liaisons hydrogène entre le carbonyle de l'acide glucuronique et les hydroxyles en position 2 et 23 peut expliquer le fait que l'activité hémolytique diminue lorsque l'on augmente le nombre d'hydroxyle sur le cycle A.



[Schéma 14](#)

L'estérification de l'acide glucuronique par un méthyle comme dans le saponoside **Cgp29** entraîne une forte chute de l'activité hémolytique comparativement au saponoside **Cgp17** non estérifié (figure 92). Cela peut s'expliquer également par une baisse importante de la polarité aux environs du cycle A.

I. 2. 3. Conclusion

L'analyse de ces résultats nous a permis de confirmer l'importance de la polarité sur le cycle A de la partie aglycone (augmentation/diminution de l'activité hémolytique), que l'augmentation du nombre de sucres augmente l'activité hémolytique et que les bidesmosides possédant un seul sucre en C-28 sont moins actifs que leurs monodesmosides correspondants.

II. Autres activités biologiques

II. 1. Toxicité sur *Artemia salina*¹⁸⁷

Les saponosides sont connus pour être toxiques à très faible dose pour les animaux à sang froid tels que les poissons. De nombreuses plantes à saponosides sont utilisées comme poisons de pêche depuis l'antiquité, comme les deux espèces étudiées, *C. glabrum* et *C. villosum*, utilisées dans ce but par la population locale en Guyane.

La toxicité des saponosides varie considérablement d'une classe animale à une autre. Les crustacés sont beaucoup moins sensibles que les poissons aux effets des saponosides¹⁸⁷. Ils peuvent vivre ou survivre longtemps dans un milieu à concentration en saponosides très supérieure à celle qui provoquerait la mort des poissons. Cette observation couplée à la simplicité et la rapidité avec lesquelles les crevettes d'eau salée (*Artemia salina*) sont élevées, ont conduit à utiliser ces animaux pour un test d'activité biologique des saponosides.

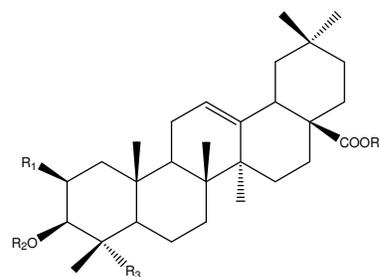
La méthode consiste à déterminer le pourcentage de mortalité de l'espèce *Artemia salina*, placée 24 heures en présence des saponosides ou d'extraits méthanoliques aux doses de 1000, 100 et 10 µg/ml dans le milieu aquatique normal d'entretien de ces animaux.

II. 1. 1. Saponosides de *Caryocar glabrum*

L'activité toxique de l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits (**Cgp**), de l'enveloppe des fruits (**Cge**) et des écorces de tronc (**Cgt**) de *Caryocar glabrum* ainsi que des fractions (**A**, **B** et **C**) contenant des mélanges de saponosides issus de la pulpe des fruits a été mesurée. La fraction **A** est un mélange des deux glucosides majoritaires **Cgp4** et **Cgp5**, la fraction **B** est un mélange de glucuronides dont les saponosides **Cgp18** et **Cgp19** sont les constituants majoritaires et la fraction **C** est un mélange de mono- et de bi-desmosides (**Cgp20** à **Cgp25**) (figures 93 et 94).

Figure 93 : Composition des fractions testées **A**, **B** et **C**.

		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Fraction A	Cgp4 et Cgp5	H/OH	Gal-(1→3)-Glc-	CH ₂ OH	H
Fraction B	Cgp16 à Cgp19	H/OH	Gal-(1→3)-GlcA-	CH ₃ / CH ₂ OH	H
	Cgp20-Cgp21	OH/OH	Gal-(1→3)-Gal- (1→3)-GlcA-	CH ₃ / CH ₂ OH	H
Fraction C	Cgp22 à Cgp25	H/OH	Gal-(1→3)-GlcA-	CH ₃ / CH ₂ OH	Glc



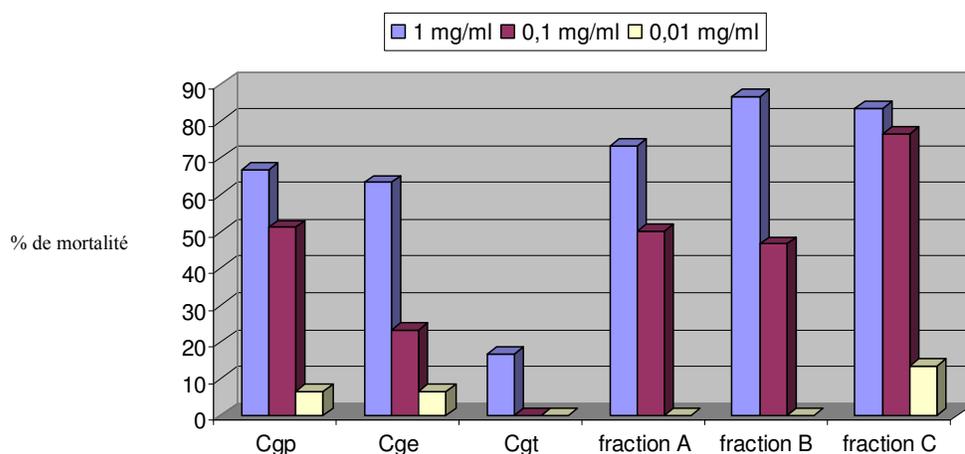


Figure 94 : Moyenne du pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia salina* pour les extraits et fractions de *C. glabrum*.

La comparaison de l'activité toxique des trois extraits méthanoliques montre que celui de la pulpe (**Cgp**) est le plus toxique ($LC_{50} = 100 \mu\text{g/ml}$) suivi par l'extrait de l'enveloppe (**Cge**) (LC_{50} entre 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$). L'extrait des écorces de tronc n'est pas toxique, avec seulement 16% de mortalité à la concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$. Cela montre que l'activité toxique est due à la présence des saponosides puisque l'activité diminue avec la teneur en saponosides dans les trois extraits.

Les fractions **A**, **B** et **C** sont plus actives que l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits (**Cgp**) dont elles sont issues. La fraction la plus active est la fraction **C** riche en bidesmosides, avec 77% de mortalité à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ (figure 94). C'est la seule fraction qui montre une toxicité à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ (13% de mortalité). Ce résultat explique pourquoi on observe une activité légèrement supérieure de l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits, par rapport à l'enveloppe, vraisemblablement due à la présence en quantité plus importante de saponosides bidesmosidiques dans la pulpe.

La fraction **A**, contenant les deux saponosides monodesmosidiques **Cgp4** et **Cgp5** de type « glucosides » est légèrement moins active que la fraction **B** contenant également des saponosides monodesmosidiques **Cgp16** à **Cgp19** mais de type « glucuronide ».

II. 1. 2. Extraits de *Caryocar villosum*

L'activité toxique de l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits (**Cvp**), de l'enveloppe des fruits (**Cve**) et des écorces de tronc (**Cvt**) de *Caryocar villosum* ainsi que de la fraction enrichie en saponosides des enveloppes des fruits « **sapo-bruts** » a été évaluée (figure 95).

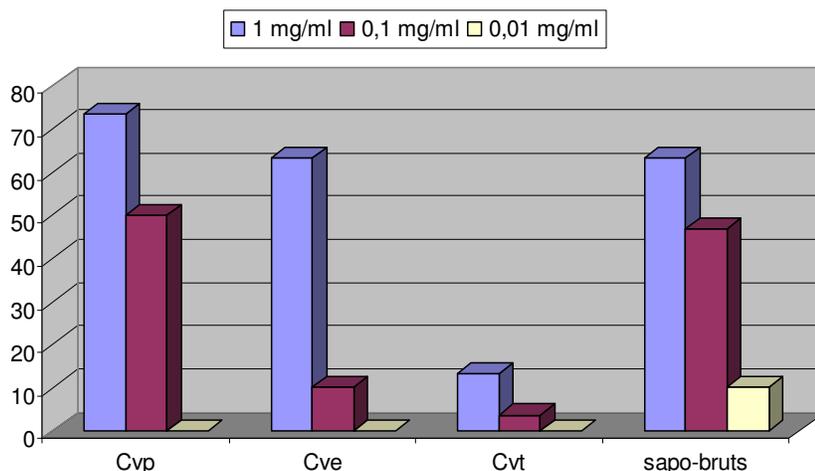


Figure 95 : Moyenne du pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia salina* pour les extraits et saponosides de *C. villosum*.

La comparaison de l'activité toxique des trois extraits méthanoliques montre que celui de la pulpe (**Cvp**) est le plus toxique ($LC_{50} = 100 \mu\text{g/ml}$) suivi par l'extrait de l'enveloppe (**Cve**), ne possédant que 10% de mortalité à $100 \mu\text{g/ml}$. L'extrait des écorces de tronc (**Cvt**) qui sont beaucoup moins riches en saponosides, possède un très faible pourcentage de mortalité, 13% à la concentration de $1000 \mu\text{g/ml}$. La toxicité d'un représentant des polyphénols de **Cvt**, un rhamnoside de l'acide ellagique (**Cvt2**) a été mesurée sur les crevettes d'eau salée *A. salina* et il n'a montré aucune toxicité à la dose maximale de $1000 \mu\text{g/ml}$ ¹¹⁵. Cela suggère que l'activité toxique est bien liée à la présence des saponosides : 0,5% dans la pulpe et l'enveloppe des fruits, contre 0,21% dans les écorces de tronc.

Ceci est confirmé par l'activité toxique plus importante de la fraction enrichie en saponosides des enveloppes « **sapo-bruts** » par rapport à l'extrait **Cve** de départ. Cette fraction conserve une légère toxicité avec 11% de mortalité dès la concentration de $10 \mu\text{g/ml}$.

Cette même fraction « **sapo-bruts** » de *C. villosum* possède une activité toxique comparable à celle de l'extrait de la pulpe des fruits de *C. glabrum* (**Cgp**). Les extraits méthanoliques des pulpes des fruits de *C. glabrum* (**Cgp**) et *C. villosum* (**Cvp**) sont responsables de 50% de mortalité à $100 \mu\text{g/ml}$, bien que l'extrait **Cgp** contienne 100% de

saponosides alors que l'extrait **Cvp** n'en contient que 0,5%. Ces observations peuvent s'expliquer par une activité toxique de saponosides de **Cvp** (essentiellement bidesmosides) plus élevée que celle des saponosides de **Cgp** (essentiellement monodesmosides) comme nous l'avions vu pour les fractions **A**, **B** et **C** des pulpes des fruits de *C. glabrum*.

II. 2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de 26 composés a été évaluée sur des souches d'*Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Mycobacterium smegmatis* et d'*Enterococcus faecalis*. Il s'agit des saponosides isolés des fruits de *C. glabrum* : **Cgp2**, **Cgp4**, **Cgp5**, **Cgp9**, **Cgp11**, **Cgp16**, **Cgp17**, **Cgp18**, **Cgp14**, **Cgp23** et **Cgp24**, des polyphénols purifiés des écorces de tronc de *C. glabrum* : **Cgt4**, **Cgt7**, **Cgt8** et **Cgt9**, des saponosides des fruits de *C. villosum* : **Cve7** et **Cve14**, des polyphénols des écorces de tronc de *C. villosum* : **Cvt1**, **Cvt2**, **Cvt3**, **Cvt6** et **Cvt8** et des hétérosides sesquiterpéniques des feuilles de *Guioa crenulata* : **Gc5**, **Gc6**, **Gc7** et **Gc8**.

Des disques de papier buvard stérilisés et imprégnés avec 50 µg de produit à tester sont déposés à la surface de gélose de Muller-Hintonensemencée avec le germe ciblé dans une boîte de Pétri. Après 24 h d'incubation à 37 °C, le diamètre d'inhibition de la culture microbienne est mesuré. Un témoin de référence est réalisé avec la streptomycine.

Aucune des molécules testées n'a montré d'activité antibactérienne à la dose de 50 µg.

II. 3. Activité antipaludique

L'activité antipaludique de divers extraits de *Caryocar* a été mesurée à l'UMR 152-IRD Toulouse par le Dr. M. Sauvain (IRD). Seuls les extraits AcOEt des fruits de *C. villosum* et des écorces de tronc de *C. glabrum* ont montré une activité antiplasmodiale sur *P. falciparum in vitro*.

II. 3. 1. Test *in vitro* sur *Plasmodium*

Ce test permet de déterminer la sensibilité des parasites aux molécules testées. Il consiste à cultiver les parasites en présence de différentes concentrations d'antipaludiques et de mesurer le taux d'inhibition de la maturation des parasites jeunes en forme adulte. Il permet ainsi de déterminer la concentration des molécules testées induisant 50% d'inhibition de maturation (CI₅₀).

La concentration inhibitrice (CI₅₀) de l'extrait acétate d'éthyle de la pulpe des fruits de *Caryocar villosum* et des écorces de tronc de *Caryocar glabrum* est de 10 µg/ml (tableau 51).

II. 3. 2. Inhibition de la Protéine kinase

Cette enzyme est une cible thérapeutique potentielle puisqu'elle est indispensable à la maturation de *Plasmodium falciparum*. Le criblage sur des Protéines kinases plasmodiales montre que les extraits possèdent une activité inhibitrice contre la Protéine Kinase. L'extrait acétate d'éthyle de la pulpe des fruits de *C. villosum* est légèrement plus actif que celui des écorces de tronc de *C. glabrum*, 93% d'inhibition à 10674 cpm pour le premier contre 82% d'inhibition à 35906 cpm pour le deuxième.

Tableau 51 : Activité antipaludique de l'extrait acétate d'éthyle de la pulpe des fruits de *C. villosum* et des écorces de tronc de *C. glabrum*.

	Protéine kinase		Activité antipaludique <i>in vitro</i>
	cpm*	% inhibition	Activité Plasmodium (10 µg/ml)
<i>Caryocar villosum</i> (pulpe des fruits)	10674	93	52%
<i>Caryocar glabrum</i> (écorces de tronc)	35906	82	47%

* cpm : nombre de coups par minute.

L'activité hémolytique des deux extraits a été mesurée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les tests sur *Plasmodium* (tableau 52). Ces deux extraits possèdent une activité hémolytique qui n'est pas dose dépendante. Cela suggère que l'activité antipaludique n'est pas due à une activité inhibitrice spécifique de la Protéine Kinase mais, plutôt à une lyse des parasites.

Il est peu probable que cette activité hémolytique soit due à la présence des saponosides puisqu'il s'agit des extraits acétate d'éthyle exempts de saponosides.

Tableau 52 : Résultats des tests d'activité hémolytique des extraits acétate d'éthyle de **Cgt** et de **Cvp**.

	Hémolyse en %		
	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml
Cgt (extrait AcOEt)	45	43	37
Cvp (extrait AcOEt)	41	58	39
Saponin Sigma®	-	94	-

II. 4. Activité dermocosmétique

Dans le cadre d'une collaboration entre l'IRD et les laboratoires Christian Dior, l'activité dermatocosmétique des saponosides disaccharidiques **Cgp4**, **Cgp18** et trisaccharidique **Cgt10** ainsi que la fraction C de **Cgp** enrichie en bidesmosides et une fraction contenant les galloylhamaméloses (**Cgt5**, **Cgt6** et **Cgt7**) a été évaluée.

La limite de cytotoxicité (100% de viabilité) a été déterminée sur cellule HaCat (lignée kératinocytaire). Le saponoside **Cgp4** présente une cytotoxicité importante, avec une concentration minimale conduisant à une inhibition de croissance de 50% (CI_{50}) de 2,34 $\mu\text{g/ml}$.

Les résultats sont les suivants :

Composé	Limite de cytotoxicité en mg/ml	CI_{50} en $\mu\text{g/ml}$	CI_{50} en μM	DH_{50} en $\mu\text{g/ml}$	DH_{50} en μM
Cgp4	0,78	2,34	2,9	45	56
Cgp18	6,25	18,75	23	37	45
Fraction C	3,12	9,38	-	-	-
Cgt10	12,5	20,0	20,9	-	-
Cgt5+Cgt6+Cgt7	50	nd	-	-	-

La comparaison des CI_{50} et DH_{50} des saponosides **Cgp4**, **Cgp18** montre que la CI_{50} pour **Cgp4** est 20 fois inférieure à la DH_{50} , alors que pour **Cgp18** la CI_{50} est 3 fois inférieure à sa DH_{50} . La fraction C enrichie en bidesmosides est plus active que les monodesmosides **Cgp18** et **Cgt10**. Ces résultats suggèrent que l'activité cytotoxique est due à un mécanisme autre que la lyse cellulaire comme l'hémolyse. Il serait ainsi intéressant de tester l'activité cytotoxique de ces composés sur des cellules cancéreuses.

L'activité inhibitrice de la DOPA oxydase (enzyme impliquée dans la pigmentation) sur l'épiderme séparé a été recherché et aucune des fractions n'a montré d'activité.

L'activité lipolytique sur explants de tissus adipeux *ex vivo* a été mesurée. Aucune activité n'a été observée dans les fractions. Une nécrose est apparue avec le saponoside **Cgp4** due vraisemblablement à sa grande cytotoxicité.

III. Activités biologiques des extraits de *Guioa crenulata*

Cette espèce a été sélectionnée par l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN à Gif-sur-Yvette) dans le cadre d'un programme d'étude d'activité cytotoxique des plantes de Nouvelle Calédonie. L'extrait ethanologique ainsi que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles n'ont pas montré d'activité cytotoxique *in vitro* sur les cellules P388 ni d'activité inhibitrice de la topoisomérase I et l'acétylcholinestérase.

IV. Conclusion

L'activité hémolytique mesurée sur les saponosides de *C. glabrum* montre que pour les saponosides de la série **1** (glucosides), l'activité hémolytique augmente avec la polarité du cycle A alors que pour les glucuronides (**Cgp16** à **Cgp19**) de la série **2**, l'augmentation de la polarité du cycle A provoque une diminution de l'activité hémolytique. L'ordre de l'activité croissante est inversé : acide oléanolique > acide 2 β -hydroxyoléanolique > hédéragnine > bayogénine. Ceci peut être interprété par la formation de liaison hydrogène entre le carbonyle de l'acide glucuronique et l'hydroxyle en position 2 de la bayogénine ce qui diminue l'activité hémolytique. L'existence de liaison hydrogène possible entre le carbonyle de l'acide glucuronique et les hydroxyles en position 2 et 23 peut expliquer le fait que l'activité hémolytique diminue lorsque l'on augmente le nombre d'hydroxyle sur le cycle A. L'estérification de l'acide glucuronique par un méthyle entraîne une forte chute de l'activité hémolytique. Cela peut s'expliquer également par une baisse importante de la polarité aux environs du cycle A.

Les résultats des tests de toxicité sur *A. salina* montre que l'extrait méthanolique des pulpes des fruits de *C. glabrum* et de *C. villosum* (**Cgp**, **Cvp**) et les saponosides bruts des fruits de *C. villosum* sont les plus toxiques (LC₅₀ = 100 μ g/ml), suivis par l'extrait de l'enveloppe des fruits de *C. glabrum* (**Cge**) (LC₅₀ entre 100 et 1000 μ g/ml). L'extrait des enveloppes des fruits de *C. villosum* (**Cve**) ainsi que des écorces de tronc des deux espèces ne sont pas toxiques à la concentration de 1000 μ g/ml. À l'exception de **Cvp**, l'activité diminue avec la concentration en saponosides dans les trois extraits, l'activité toxique est donc due à la présence des saponosides.

L'extrait **Cgp** contient 100% de saponosides alors que l'extrait **Cvp** n'en contient que 0,5% et cependant ils possèdent la même activité toxique. Cela peut s'expliquer soit par une

activité toxique des saponosides de **Cvp** de 200 fois plus importante que celle des saponosides de **Cgp**, soit par une activité toxique due à d'autres molécules présentes dans l'extrait.

Les fractions **A**, **B** et **C** sont plus actives que l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits (**Cgp**). La fraction la plus active est la fraction **C** riche en bidesmosides, avec 77% de mortalité à la concentration de 100 µg/ml. C'est la seule fraction qui montre une activité à la concentration de 10 µg/ml (13% de mortalité).

L'activité antibactérienne de 26 composés a été évaluée sur des souches d'*Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Mycobacterium smegmatis* et d'*Enterococcus faecalis*. Aucune des molécules testées n'a montré d'activité antibactérienne à la dose de 50 µg.

L'extrait AcOEt des fruits de *C. villosum* et des écorces de tronc de *C. glabrum* ont montré une activité antiplasmodiale sur *P. falciparum in vitro* à la concentration de 10 µg/ml (CI₅₀). Le criblage sur des Protéines kinases plasmodiales montre que l'extrait acétate d'éthyle de la pulpe des fruits de *C. villosum* est légèrement plus actif que celui des écorces de tronc de *C. glabrum*, 93% d'inhibition pour le premier contre 82% pour le deuxième. Le fait que ces deux extraits possèdent une activité hémolytique à la dose active (10 µg/ml), suggère que l'activité antipaludique est non spécifique car due à une lyse des parasites. Il est peu probable que cette activité hémolytique soit due à la présence des saponosides puisqu'il s'agit des extraits acétate d'éthyle exempts de saponosides.

L'activité dermatocosmétique des saponosides à hédéragénine disaccharidiques **Cgp4** (série 1), **Cgp18** (série 2) et trisaccharidique **Cgt10** (série 2) ainsi que la fraction **C** de **Cgp** enrichie en bidesmosides (série 2) et une fraction contenant les galloylhamaméloses (**Cgt5**, **Cgt6** et **Cgt7**) a été évaluée. L'activité inhibitrice de la DOPA oxydase (enzyme impliquée dans la pigmentation) sur épiderme séparé a été recherché et aucune des fractions n'a montré d'activité.

L'activité lipolytique sur explants de tissus adipeux *ex vivo* a été recherchée. Aucune activité n'a été observée dans les fractions. Une nécrose est apparue avec le saponoside **Cgp4** due vraisemblablement à sa grande cytotoxicité.

La limite de cytotoxicité (100% de viabilité) a été déterminée sur cellule Hacat (lignée kératinocytaire). Le saponoside **Cgp4** présente une cytotoxicité importante, il possède une

concentration minimale conduisant à une inhibition de croissance de 50% (CI₅₀) de 2,34 µg/ml.

La comparaison entre l'activité hémolytique et l'activité cytotoxique des saponosides **Cgp4** et **Cgp18** montre que la CI₅₀ pour **Cgp4** est 20 fois inférieure à la DH₅₀ alors que pour **Cgp18**, la CI₅₀ est 3 fois inférieure à la DH₅₀. La fraction **C** enrichie en bidesmosides (non hémolytique) est plus cytotoxique que les monodesmosides **Cgp18** et **Cgt10**. Cette fraction a également montré une activité toxique sur *A. salina* plus importante que les fractions contenant des monodesmosides. Ces résultats suggèrent que l'activité cytotoxique est peut-être due à un mécanisme autre que l'hémolyse. Il serait intéressant de tester l'activité cytotoxique du composé **Cgp4** et des saponosides de la fraction **C** sur des cellules cancéreuses.

L'extrait éthanolique ainsi que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Guioa crenulata* n'a pas montré d'activité cytotoxique *in vitro* sur les cellules P388. Ils n'ont pas montré d'activité contre la topoisomérase I et l'acétylcholinestérase.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'étude chimique des fruits et des écorces de tronc de *Caryocar glabrum* et *Caryocar villosum*, ainsi que celle des feuilles de *Guioa crenulata* a permis d'identifier **76** composés dont **53** correspondant à des structures nouvellement décrites. La détermination de structure de ces composés est réalisée à l'aide des méthodes spectroscopiques de RMN mono- et bidimensionnelles, homo- et hétéronucléaires et de spectrométrie de masse ESI- (MS)ⁿ. Pour certains composés (**Cgt8**, **Cgt9** et **Gc4**), les configurations des carbones asymétriques ont été déterminées par l'analyse des spectres de dichroïsme circulaire.

Les composés isolés appartiennent à huit familles de métabolites secondaires différentes :

- ✚ **54** saponosides dont **41** nouveaux,
- ✚ **4** glycosides d'alcool benzylique ou phénolique dont **2** de structures nouvelles,
- ✚ **3** galloylhamameloses dont **1** nouveau,
- ✚ **2** glycosides de 3,4-dihydroisocoumarine phénylée originaux,
- ✚ **5** dérivés de l'acide ellagique dont **3** de structures nouvelles,
- ✚ **3** flavonoïdes,
- ✚ **1** tanin trimère constitué de trois unités d'épicatéchine,
- ✚ **4** glycosides de farnésol de structures nouvelles.

Les saponosides ont été isolés des fruits (56 composés) et des écorces de tronc (8 composés) des deux *Caryocar*. Les fruits de ces deux espèces sont plus riches en saponosides que les écorces de tronc. La composition chimique de la pulpe et de l'enveloppe des fruits des deux espèces étudiées est qualitativement identique mais quantitativement différente. Les fruits de *C. glabrum* sont beaucoup plus riches en saponosides que les fruits de *C. villosum* (57% contre 0,5%).

Ce sont des glycosides de l'acide oléanolique et de ses dérivés oxydés : l'acide 2 β -hydroxyoléanolique, l'hédéragénine, la bayogénine et l'acide gypsogénique. La majorité des saponosides isolés (43) possèdent l'hédéragénine ou la bayogénine, qui sont, avec l'acide oléanolique, les aglycones de type β -amyrine les plus fréquemment rencontrées dans les saponosides triterpéniques d'origine végétale. Bien que ces génines composent de nombreux saponosides décrits antérieurement, la majorité des saponosides isolés sont de structures nouvelles et ce malgré le faible nombre d'unités osidiques en présence. Tous les glycosides de l'acide 2 β -hydroxyoléanolique sont des composés nouveaux car cette génine est encore peu

décrite dans la littérature. Les saponosides de *C. glabrum* sont majoritairement monodesmosidiques alors que ceux de *C. villosum* sont bidesmosidiques. Dans les deux espèces, la chaîne osidique « ester » des bidesmosides est réduite à une seule unité de β -D-glucose.

Trois types d'enchaînements osidiques sont rencontrés dans les saponosides, selon la nature du sucre directement lié en position 3 de la génine :

- série **1** : un glucose substitué en 3 par un galactose $[\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Glc-}]$,
- série **2** : un acide glucuronique substitué en 3 par un galactose $[\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcA-}]$,
- série **3** : un galactose substitué en 2 par un glucose $[\beta\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Gal-}]$.

La chaîne osidique attachée en C-3 de la génine est constituée de 1 à 3 unités chez *C. glabrum* et jusqu'à cinq unités chez *C. villosum*, disposées d'une façon linéaire. Les liaisons interosidiques se font majoritairement avec les hydroxyles osidiques en position 3 (1 \rightarrow 3). L'unité terminale dans les chaînes tri-, tétra- et pentasaccharidiques est souvent le xylose.

Les enchaînements des séries **1** et **2** sont majoritaires. Ils sont peu décrits dans la littérature et ont été retrouvés antérieurement dans les saponosides du Souci, *Calendula officinalis*, et de *C. arvensis* de la famille des Asteraceae. La série **3** est très minoritaire puisque seuls deux saponosides isolés des fruits de *C. villosum* possèdent cet enchaînement.

Seulement deux génines sont présentes dans les saponosides isolés des écorces de tronc des deux espèces de *Caryocar*, l'hédéragénine et la bayogénine. Les huit saponosides isolés possèdent l'enchaînement de la série **2**. La chaîne osidique attachée en position 3 de la génine est constituée de 1 à 3 unités liées entre elles par des liaisons de type (1 \rightarrow 3). La principale différence de structure entre les saponosides des écorces de tronc et des fruits réside dans la nature de l'unité terminale des trisaccharides, le xylose ou galactose dans les fruits et le rhamnose dans les écorces de tronc.

La présence des deux séries d'enchaînements : série **1** (glucuronides) et série **2** (glucosides) dans les saponosides de *Caryocar*, a permis d'en étudier l'influence sur l'activité hémolytique. Pour les glucosides, l'activité hémolytique augmente avec la polarité sur le cycle A alors que pour les glucuronides cette activité diminue avec la polarité du cycle A de la partie aglycone. La présence dans ces composés de chaînes osidiques communes liées à des triterpènes de structures différentes mais proches, nous a permis de vérifier l'influence des groupements fonctionnels sur la génine pour un même enchaînement osidique. Les résultats

obtenus confirment l'importance de la polarité sur le cycle A du triterpène, et que l'augmentation du nombre de sucres augmente l'activité hémolytique. Enfin, l'isolement de saponosides bidesmosidiques a permis de confirmer que les bidesmosides possédant un seul sucre en C-28 sont moins actifs que leurs monodesmosides correspondants.

L'activité toxique des extraits méthanoliques de la pulpe des fruits, de l'enveloppe des fruits et des écorces de tronc des deux espèces ainsi que celle de la fraction brute enrichie en saponosides des fruits de *C. villosum* et de fractions contenant des saponosides issus de la pulpe des fruits de *C. glabrum* a été évaluée sur les crevettes d'eau salée *Artemia salina*. Les saponosides des fruits sont toxiques puisque les fractions enrichies en saponosides possèdent une CI_{50} de 100 $\mu\text{g/ml}$. La présence d'une teneur élevée en saponosides dans les fruits des deux espèces de *Caryocar* et leur forte toxicité, expliquent l'usage traditionnel comme poison de pêche de ces plantes.

La limite de la toxicité (100% de viabilité), mesurée sur cellules Hakat (lignée kératinocytaire), montre que les saponosides ont une certaine toxicité et que le saponoside **Cgp4** est fortement cytotoxique ($CI_{50} = 2,34 \mu\text{g/ml}$). La comparaison des concentrations toxiques avec celles produisant une hémolyse laisse supposer que la forte cytotoxicité de **Cgp4** et des saponosides bidesmosidiques est due à un autre phénomène. Ces molécules pourraient être testées sur des cellules cancéreuses. La forte toxicité des saponosides s'oppose à l'usage alimentaire des pulpes des fruits des *Caryocar*. Il semble que cette toxicité disparaisse lors de la cuisson de la pulpe. Les saponosides doivent être dégradés puisque l'amertume liée à ces composés, laisse la place à une saveur agréable après cuisson.

L'activité antibactérienne de 11 saponosides a été évaluée sur plusieurs souches de microorganisme. Aucun n'a montré d'activité antibactérienne à la dose de 50 μg .

L'activité dermatocosmétique de certains saponosides disaccharidiques et trisaccharidiques à hédéragénine ainsi qu'une fraction enrichie en bidesmosides a été évaluée. Aucune activité inhibitrice de la DOPA oxydase (enzyme impliquée dans la pigmentation) ou lipolytique sur explants de tissus adipeux *ex vivo* n'a été observée.

L'extrait AcOEt des fruits de *C. villosum* et des écorces de tronc de *C. glabrum* ont montré une activité antiplasmodiale sur *P. falciparum in vitro* à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ (CI_{50}) et une activité hémolytique à la même concentration. Ainsi, l'activité antipaludique semble non spécifique, car due à une lyse des parasites. Il est peu probable que ces activités soient dues à la présence des saponosides puisqu'il s'agit des extraits à l'acétate d'éthyle

exempts de saponosides. Le criblage sur des Protéines kinases plasmodiales montre que ces extraits sont très actifs avec un taux d'inhibition supérieur à 80%.

À part les deux composés isocoumariniques, la présence des composés polyphénoliques dans les écorces de tronc de *C. glabrum* et de *C. villosum* n'est pas surprenante dans la mesure où ces composés sont fréquemment isolés des écorces de tronc d'autres sources végétales. L'utilisation en médecine traditionnelle des écorces de tronc de *C. glabrum* contre les tumeurs externes peut être expliquée par la présence des galloylhamaméloses qui ont montré des propriétés antioxydantes¹¹⁸, une activité inhibitrice contre l'effet toxique du TNF- α (tumeur necrosis factor- α)¹¹⁹, et un effet antimutagène¹²¹ et par la présence de glycosides d'acide ellagiques qui possèdent des activités antiproliférative et antioxydante¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Bien que les plantes de la famille des Sapindaceae soient connues pour leur richesse en saponosides, aucun saponoside n'a été isolé des feuilles de *Guioa crenulata*. Les trois glycosides du kœmpférol et de la quercétine isolés, et la procyanidine trimère de type A, sont de structures connues et plusieurs fois isolés de plantes de différentes familles. Les quatre diglycosides de farnésol, isolés de *G. crenulata*, appartiennent à un type de composés peu décrits dans la littérature. Ces glycosides sont présents dans d'autres espèces de la sous-famille des Sapindoideae.

L'extrait éthanolique ainsi que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Guioa crenulata* n'a pas montré d'activité cytotoxique *in vitro* sur les cellules P388. Ils n'ont pas montré d'activité contre la topoisomérase I et l'acétylcholinestérase.

L'ensemble de ces résultats obtenus sur ces trois plantes associés à la recherche bibliographique démontrent l'intérêt de ces études et permettent de dégager quelques perspectives :

- pour compléter ce travail, l'étude des polyphénols des écorces de tronc de *C. villosum* devrait être approfondie pour isoler les galloylhamaméloses.
- il serait également intéressant de tester l'activité biologique des polyphénols isolés dans les écorces de tronc de *C. glabrum* et *C. villosum* puisqu'ils appartiennent à des familles de métabolites secondaires possédant des activités cosmétiques comme les galloylhamaméloses.
- il serait intéressant de faire une étude chimique approfondie sur d'autres espèces du genre *Caryocar* et du genre *Anthodiscus* de la famille des Caryocaraceae pour connaître si les

mêmes types de structures de polyphénols et/ou de saponosides sont retrouvés. L'espèce *Caryocar microcarpum* a montré contenir des saponosides constitués des mêmes génines que celles des *Caryocar* étudiés. Celui-ci est utilisé en médecine traditionnelle en Guyane contre les mycoses et les micro-filaires. Les saponosides qu'il renferme n'ont pas encore été étudiés, et devraient être isolés et identifiés afin de vérifier leurs activités biologiques. L'espèce *C. brasiliense* est utilisée en médecine traditionnelle au Brésil. Plusieurs études portant sur l'activité biologique de l'huile des fruits, les huiles essentielles des feuilles ainsi que les extraits alcooliques des fruits et des feuilles ont été menées. Les composants de l'huile et des huiles essentielles ont été identifiés mais aucune étude chimique n'a été réalisée sur les extraits alcooliques. La présence des saponosides devrait être étudiée pour éventuellement tester leur activité biologique.

- pour compléter le travail sur *Guioa crenulata*, il serait intéressant de tester les molécules isolées sur les enzymes : élastase, phospholipase A₂, 5'-lipoxygénase, tyrosinase et 3',5'-AMP_C-phosphodiesterase pour lesquels les extraits de *G. gracillis* sont actifs, pour savoir si elles possèdent les mêmes activités cosmétiques¹⁴².

- les glycosides de farnésol pourraient être de bons marqueurs chimiotaxonomiques de la sous-famille des Sapindoidaeae. Aussi, il s'avérerait intéressant de rechercher leur présence dans les autres espèces de *Guioa* ainsi que dans d'autres espèces de la sous-famille des Sapindoideae comme leur présence ou absence dans l'autre sous-famille, les Dodonaeoideae.

Quatrième partie

Partie expérimentale

- I. Matériel et appareillage
- II. Extraction, purification et hydrolyse
- III. Caractéristiques des composés isolés

I. Matériels et appareillage

I. 1. Chimie extractive

I. 1. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies par CCM analytique sont réalisées sur des plaques (en verre ou en aluminium) recouvertes de silice.

Support aluminium :

- en phase normale, Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck[®], 250 µm (20x20 cm),
- en phase inverse, PKLC18F, 200 µm Whatman[®] (50x100 cm).

Support verre:

- en phase normale, Kieselgel 60F₂₅₄ Merck[®], 250 µm (5x10, 5x20, 10x20, 20x20 cm),
- en phase inverse, MKC18F, 200 µm Whatman[®] (2,5x7,5, 5x20 cm), ou RP-18 F_{254s}, 200 µm Merck[®] (5x10, 10x20 cm).

Les révélateurs utilisés sont les suivants :

- acide sulfurique dilué à 50% dans l'eau,
- vanilline sulfurique préparée avec 6 g de vanilline dilués dans 100 ml d'éthanol avec ajout de 1 ml d'acide sulfurique concentré.

Les purifications par CCM préparative sont réalisées sur des plaques en verre recouvertes de silice Kieselgel 60F₂₅₄ Merck[®], 250 µm (20 x 20 cm).

I. 1. 2. Chromatographie à pression réduite (VLC).

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier des extraits bruts. Elle est rapide et nécessite moins de solvants que les techniques classiques. La silice Kieselgel Merck[®] (70-230 mesh, 63-200 µm) est conditionnée dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n°4 en phase normale ou avec de la silice greffée Lichroprep RP-18 Merck[®] (40-63 µm) en phase inverse.

I. 1. 3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

L'élution peut être effectuée à pression atmosphérique ou bien à l'aide d'air comprimé dans le cas d'utilisation de silice greffée RP-18. Les phases stationnaires utilisées sont :

- en phase normale, une silice Kieselgel Merck[®] (70-230 mesh), en utilisant 40 fois le poids de l'échantillon à purifier,
- en phase inverse, une silice greffée Lichroprep RP-18 Merck[®] (40-63 µm), en utilisant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier,
- Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech AB[®]), pour la chromatographie

d'exclusion/diffusion sur colonne. Dans le dernier cas, il est nécessaire de faire « gonfler » le Sephadex dans le solvant d'élution et sous agitation au minimum 4 heures avant utilisation.

I. 1. 4. Résine échangeuse d'ions

Les filtrations sur résine sont effectuées sur une colonne de résine échangeuse d'ions cationiques Amberlite® IRN 77, en utilisant 10 fois le poids de l'échantillon à échanger.

I. 1. 5. La chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'appareillage utilisé au laboratoire est constitué d'une chaîne chromatographique Dionex®, pilotée par le logiciel Chromeleon version 6.01. La chaîne est constituée d'une pompe P580 A, quaternaire, à gradient basse pression avec dégazeur intégré, d'un passeur d'échantillon ASI 100, d'un détecteur UV/Visible à barrette de diodes UVD 170S/340S et d'une colonne thermostatée par un four STH 585. Les colonnes utilisées sont :

- en CLHP analytique :

Colonne Dionex C₁₈ 201 SPTM, 4,6x50 mm, de granulométrie 5μ et de porosité 90 Å.

- en CLHP semi-préparative :

Colonne Dionex C₁₈ 201 SPTM, 10x250 mm, de granulométrie 5μ et de porosité 90 Å.

- en CLHP préparative :

Colonne Thermo Electron corporation hyperprep HS C18, 21,2x250 mm, de granulométrie 10μ.

Les conditions d'élution en CLHP semi-préparative sont :

- mode : gradient ou isocratique,

- système de solvant :

- éluant A = H₂O /TFA (v/v = 0,025 %, soit 25 μl TFA/litre d'eau),

- éluant B = MeCN/H₂O,

- éluant C = MeOH/H₂O.

- débit = 3 ml/min (sauf indication contraire),

- température = 25 °C,

- détection : λ = 205 et 215 nm (sauf indication contraire).

I. 2. Chimie structurale

I. 2. 1. Spectroscopie de RMN

Les spectres de RMN sont enregistrés sur un appareil BRUKER Avance DRX-500. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données (XWIN-NMR 2.6) sont

utilisés. Les solvants deutériés dans lesquels sont enregistrés les spectres sont précisés à chaque fois, la référence pour les déplacements chimiques est celle du solvant :

- CD₃OD à $\delta_{\text{H}} = 3,31$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 49,0$ ppm,
- DMSO-*d*₆ (à $\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39,52$ ppm,
- Me₂CO-*d*₆ à $\delta_{\text{H}} = 2,05$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 29,84$ et 206,26 ppm.

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C sont enregistrés à 500 et 125 MHz respectivement. La sonde est une sonde gradient de type BBI-z-5 mm.

I. 2. 2. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse obtenus par électronébulisation ou électrospray (ESI) et en ESI-MSⁿ (l'échantillon en solution méthanolique) sont enregistrés sur :

- un spectromètre Bruker[®] Esquire LC-MS,
- un spectromètre Micromasse[®] Q-TOF.micro (Manchester, UK),
- un spectromètre Thermofinnigan[®] MS-Q instrument.

I. 2. 3. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer[®] 241 à 20°C en utilisant la raie D du sodium (589 nm) comme source lumineuse. Nous avons utilisé une cuve d'1 ml ayant une longueur de 10 cm. Le solvant et la concentration sont précisés dans chaque cas.

I. 2. 4. Spectrométrie UV-visible

Les spectres UV-visible des composés sont enregistrés sur un spectrophotomètre Philips[®] PU 8720. Le solvant est précisé dans chaque cas. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz contenant 2 ml de solution. Nous avons utilisé les réactifs chimiques de déplacement suivants pour les flavonoïdes :

- une solution d'AlCl₃ 5% dans le méthanol,
- une solution d'HCl 50% dans le méthanol,
- une solution de NaOMe 2,5% dans le méthanol.

I. 2. 5. Dichroïsme circulaire (DC)

Les spectres de dichroïsme circulaire (DC) sont enregistrés dans le méthanol (concentration : 1 mg/100 ml) sur un appareil Jasco® J-810 spectropolarimètre.

I. 2. 6. Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Les spectres IR sont enregistrés en pastille de KBr sur un appareil à transformée de Fourier Nicolet® Avatar 320 FT-IR piloté par un logiciel E₂ Ommic ESP 5.2a.

I. 3. Tests biologiques

I. 3. 1. Test hémolytique

Les tests d'activité hémolytique sont effectués sur une suspension à 10% d'érythrocytes de mouton dans du PBS (tampon phosphate). Un mélange de saponosides commercialisé par la société Sigma®, extrait du Bois de Panama (*Quillaja saponaria*) a été utilisé comme référence. Cet extrait est préalablement dialysé afin d'en améliorer le pouvoir hémolytique.

I. 3. 1. 1. Préparation des solutions

- PBS : NaCl 145 mM (8 500 mg/l), KCl 5 mM (373 mg/l), Na₂HPO₄.12 H₂O 4 mM (1 433 mg/l), NaH₂PO₄.2H₂O 1 mM (156 mg/l).
- Une solution mère à 500 µg/ml de saponoside dans du PBS est préparée. Une solution à 50 µg/ml est obtenue par dilution de la solution mère dans du PBS. Une solution à 5 µg/ml est ensuite obtenue à partir de la solution à 50 µg/ml par dilution dans du PBS.
- La suspension d'érythrocytes à 10% (hématocrite de 10) est obtenue par dilution dans du PBS de la solution commerciale à 50% provenant des laboratoires Biomérieux®.

I.3. 1. 2. Préparation de la gamme d'échantillons

La gamme de concentration en saponosides est comprise entre 10 et 100 µg/ml. Les dilutions sont effectuées avec du PBS. Chaque gamme de concentration est réalisée en triple et trois blancs sont préparés avec du PBS. Les trois gammes de concentration de témoin sont réalisées entre 2,5 et 100 µg/ml.

Tube (µg/ml)	2,5	5,0	7,5	10	20	25	30	40	50	75	100
Solution 500 µg/ml (µl)										150	200
Solution 50 µg/ml (µl)			150	200	400	500	600	800	1000		
Solution 5 µg/ml (µl)	500	1000									
PBS (µl)	500		850	800	600	500	400	200		850	800

Chaque tube est agité vigoureusement pour avoir une solution homogène.

I. 3. 1. 3. Mesures

25 µl de la suspension d'érythrocytes à 10% sont ajoutés dans chaque tube et la solution est mélangée. Les tubes sont mis à l'étuve pendant 1h à 37°C en les agitant 2 fois à intervalles réguliers pour homogénéiser la suspension.

Après centrifugation à 3000 tr.min⁻¹, le surnageant est prélevé et son absorbance (DO) est mesurée à 540 nm. Le pourcentage d'hémolyse est calculé par rapport à l'hémolyse obtenue avec l'extrait de saponoside dialysé Sigma® à une concentration de 50 µg/ml, correspondant à 100% d'hémolyse.

I. 3. 2. Toxicité sur les crevettes d'eau salée (*Artemia salina*)

I. 3. 2. 1. Préparation du milieu de culture et des larves

Le milieu de culture est préparé par dissolution de sel marin commercialisé par Weigandt GMBH & CO KG, D -4150 Krefeld, Germany (33 g de sel par litre d'eau) auquel on ajoute une quantité convenable d'aliments pour *Artemia* (Liquizel). Des oeufs d'*A. salina* (Dohne aquaristik Bonn) sont éclos dans un aquarium rectangulaire (23 cm x 33 cm) rempli d'eau salée oxygénée en permanence. L'aquarium est divisé par une paroi transparente percée de nombreux trous de passages de 2 mm, pour former deux compartiments de volumes inégaux, l'un étant le double de l'autre. Le plus grand des compartiments est rendu obscur et reçoit les oeufs des crevettes (50 mg). Le plus petit fortement éclairé attire les larves des crevettes qui y sont prélevées à la pipette 48 heures après le dépôt des oeufs.

I. 3. 2. 2. Préparation des échantillons

50 mg de saponosides sont dissous dans 5 ml de CH₃OH (c10 mg/ml). Des prises de 500, 50 et 5 µl de solution méthanolique sont déposés respectivement sur des disques de papier buvard de 9 mm de diamètre. Les disques imprégnés sont séchés à l'air libre pendant 48 heures. Les disques séchés sont déposés au fond de tubes à essai (10 mm x 100 mm) puis sont recouverts de 5 ml de milieu de culture salé. Les concentrations finales en échantillons sont de 1000, 100 et 10 µg/ml.

I. 3. 2. 3. Mesures

La méthode consiste à déterminer le pourcentage de mortalité des crevettes, après 24 heures en présence des saponosides ou d'extraits méthanoliques. Les essais sont répétés trois fois, sur des groupes de 10 larves d'*Artemia* évoluant dans le tube à essai. On compte à l'œil le nombre de larves survivantes dans chaque tube. Des témoins de larves vivantes sont constitués par deux séries de trois groupes de 10 représentants, l'une placée dans 5 ml de milieu d'entretien

et l'autre placée dans 5 ml de milieu d'entretien contenant une pastille de papier buvard dépourvue de charge en saponosides.

I. 3. 3. Activité antibactérienne

Une gélose de Muller-Hinton est uniformémentensemencée avec le germe ciblé (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* et *Enterococcus faecalis*) dans une boîte de Pétri. Des disques de papier buvard stérilisés de 9 mm de diamètre sont imprégnés avec 50 µg de produit à tester dissout dans le méthanol. Chaque disque est séché puis déposé à la surface de la géloseensemencée. On laisse diffuser les extraits pendant 30 min à température ambiante. Après 24 h d'incubation à 37°, le diamètre d'inhibition de la culture microbienne est mesuré. Un témoin positif a été réalisé avec la streptomycine et un témoin négatif avec un disque imprégné uniquement de solvant puis séché. Chaque test est reproduit 3 fois.

II. Extraction, purification et hydrolyse

II. 1. Saponosides et composés polyphénoliques de *Caryocar glabrum*

II. 1. 1. À partir de la pulpe des fruits (Cgp)

Après pulvérisation, les pulpes (35 g) desséchées sont mélangées avec 1 l de MeOH, puis chauffées à reflux pendant trois heures. Après refroidissement et filtration, la solution méthanolique est mise à sec pour donner 20 g de résidu sec soit un rendement de 57%. Selon le profil CCM en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5), l'extrait méthanolique ne contient que des saponosides.

6 g de saponosides bruts (extrait méthanolique) sont chromatographiés sur une colonne de 240 g de silice avec un gradient d'éluion CHCl₃-MeOH-H₂O (100:0:0 à 60:40:7). Les 6 g de saponosides bruts sont déposés après empâtage avec de la silice. Des fractions de 250 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans les solvants CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5) puis (60:40:7) (tableau 53).

Tableau 53 : Fractionnement des pulpes de fruit de *C. glabrum*.

CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O	Fractions	Masse (mg)	Saponosides purifiés
100:0:0	1-7	128	
99:1:0	8-16	5	
98:2:0	17-23	20	
95:5:0	24-36	13	
90:10:0	37-52	22	
80:20:0	53	5	
	54-55	35	Cgp1
	56-58	26	Cgp1
	59	35	
	60-62	258	Cgp4
	63	103	Cgp4
	64-69	1051	Cgp3, Cg5
	70-76	271	
	77-82	153	
70:30:0	83-86	349	Cgp7, Cgp10
	87-90	260	Cgp7, Cgp11
70:30:1	91-96	220	
	97-98	145	Cgp8, Cgp9, Cgp27
	99-100	76	
	101-105	216	Cgp6, Cgp12, Cgp13, Cgp14, Cgp18,
	106-112	284	
	113-118	107	
	119-121	125	Cgp15, Cgp16, Cgp17, Cgp18
	122-124	107	
70:30:2	125-137	480	Cgp16, Cgp18, Cgp19, Cgp26, Cgp28, Cgp29, Cgp30
70:30:3	138-145	194	
70:30:5	146-151	136	
	152-155	66	Cgp22, Cgp23, Cgp24
	156-170	191	Cgp20, Cgp21, Cgp24, Cgp25
60:40:7	171-179	150	Cgp 25
MeOH	180-191	272	

Les fractions [54-55] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec l'éluant CHCl_3 -MeOH en gradient (98:2 à 95:5) pour fournir le saponoside **Cgp1** (12 mg).

Les fractions [56-58] sont purifiées par CCM préparative en phase normale dans le solvant CHCl_3 -MeOH (75:25). Les saponosides **Cgp1** (9 mg) et **Cgp2** (11 mg) sont ainsi purifiés.

Les fractions [60-62] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec un gradient d'éluant CHCl_3 -MeOH (9:1 à 7:3) pour isoler le saponoside **Cgp4** (60 mg).

La fraction [63] contient 103 mg du saponoside **Cgp4** pur.

Les fractions [64-69] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale avec un gradient d'éluant CHCl_3 -MeOH (9:1 à 7:3) puis purifiées par CCM préparative en phase normale dans le solvant CHCl_3 -MeOH- H_2O (70:30:3) pour donner **Cgp5** (28 mg). Les fractions éluées avec le solvant CHCl_3 -MeOH 9:1 provenant des trois colonnes précédentes (fractions 54-55, 60-62 et 64-69) sont réunies puis purifiées par CCM préparative en phase normale dans le solvant CHCl_3 -MeOH- H_2O (70:30:3) pour donner 6 mg de **Cgp3**.

Les fractions [83-86] sont percolées sur 3 g de résine échangeuse cationique Amberlite[®] IRN 77. La solution échangée est purifiée par chromatographie sur colonne de silice en phase normale (11 g) avec l'éluant CHCl_3 -MeOH (87:13 à 7:3). Des fractions de 10 ml sont recueillies. Les fractions [60-75] et [76-82] éluées avec le mélange CHCl_3 -MeOH (85:15) sont réunies et purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C_{18} , avec le gradient d'éluant MeOH- H_2O (5:5 à 7:3). 11 mg du saponoside **Cgp10** sont obtenus. Les fractions éluées avec le mélange MeOH- H_2O 6:4 sont purifiées par CCM préparative en phase normale dans le solvant CHCl_3 -MeOH- H_2O (70:30:5) pour donner 5 mg du saponoside **Cgp7**.

Les fractions [87-90] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C_{18} (11 g) avec l'éluant MeOH: H_2O (5:5 à 7:3) pour donner 29 mg du saponoside **Cgp11**. Les fractions éluées à 65:35 sont réunies et chromatographiées sur une colonne de silice en phase normale, puis purifiées par CCM préparative en phase normale, dans le solvant CHCl_3 -MeOH- H_2O (70:30:5) pour donner 5 mg du saponoside **Cgp7**.

Les fractions [91-96], [97-98] et [99-100] sont réunies et échangées sur 2,5 g de résine Amberlite[®] IRN 77. La fraction résultante échangée (250 mg) est chromatographiée sur une colonne de silice greffée C_{18} (11 g), avec l'éluant MeOH- H_2O (5:5 à 8:2), on obtient 11 mg du

saponoside **Cgp27**. Les fractions éluées avec le mélange MeOH-H₂O (65:35) sont réunies et purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale puis en CCM préparative en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (60:40:7) pour donner 13 mg du saponoside **Cgp9** et 5 mg du saponoside **Cgp8**.

Les fractions [101-105] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈ (9 g), avec l'éluant MeOH-H₂O (5:5 à 8:2). Des fractions de 5 ml sont recueillies. Deux saponosides sont obtenus purs, 30 mg du saponoside **Cgp14** et 12 mg du saponoside **Cgp12**. Les fractions [6-21] et [22-29] éluées avec le solvant MeOH-H₂O (5:5) sont réunies et purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 2 mg du saponoside **Cgp6** (*t_r*=12,4) et 7 mg du saponoside **Cgp13** (*t_r*=20), éluant B : de 40% à 55% durant 15 min. Les fractions [69-70] éluées avec le mélange MeOH-H₂O (8:2) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 7 mg du saponoside **Cgp13** (*t_r*=12,4) et 7 mg du saponoside **Cgp18** (*t_r*=13,9), éluant B (CH₃CN/H₂O) : de 35% à 41% pendant 5 min, puis 20 min à 41%.

Les fractions [119-121] et [122-124] sont réunies et purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈ (12 g), avec l'éluant MeOH-H₂O (45:55 à 8:2). Des fractions de 5 ml sont recueillies. Trois saponosides purs sont obtenus, 58 mg du saponoside **Cgp18**, 11 mg du saponoside **Cgp17** et 21 mg du saponoside **Cgp16**. Les fractions [4-7] éluées avec le solvant MeOH-H₂O (45:55) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 4 mg du saponoside **Cgp15** (*t_r*=10,5) et 7 mg du **Cgp18** (*t_r*=13,9), éluant B : de 35% à 41% pendant 5 min, puis 20 min à 41%.

Les fractions [125-137] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈ (18 g), avec l'éluant MeOH-H₂O (35:65 à 8:2). Des fractions de 10 ml sont recueillies. 11 mg du saponoside **Cgp28** pur sont obtenus. Les fractions [50-53] éluées avec le solvant MeOH-H₂O (7:3) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 8 mg du saponoside **Cgp19** (*t_r*=23,6) et 2 mg du saponoside **Cgp30** (*t_r*=19,9), éluant B : de 30% à 43% durant 30 min. Les fractions [56-57] éluées au MeOH-H₂O (7:3) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 8 mg du saponoside **Cgp18** (*t_r*=14,7), éluant B : de 30% à 43% pendant 30 min. Les fractions [82-86] éluées avec le solvant MeOH-H₂O (8:2) sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale avec l'éluant CHCl₃-MeOH-H₂O (9:1:0 à 70:30:5) pour conduire à 6 mg du saponoside **Cgp16**, 18 mg du saponoside **Cgp29** et 2 mg du saponoside **Cgp26**.

Les fractions [152-155] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈, avec l'éluant MeOH-H₂O (3:7 à 8:2) pour donner 18 mg du saponoside **Cgp24** et 3

mg du saponoside **Cgp23**. Les fractions [41-47] éluées avec le mélange MeOH-H₂O (6:4) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 3 mg du saponoside **Cgp22** ($t_r=25,9$), éluant B: de 30% à 38% pendant 30 min.

Les fractions [156-170] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈, avec l'éluant MeOH-H₂O (3:7 à 8:2), des fractions de 20 ml ont été collectées. La fraction [5] éluée avec le mélange MeOH-H₂O (3:7) est purifiée par CLHP semi-préparative pour donner 4 mg du saponoside **Cgp25** ($t_r=12,9$) et 7 mg du saponoside **Cgp24** ($t_r=17,5$), éluant B : de 30% à 35% durant 20 min. La fraction [7] éluée avec le mélange MeOH-H₂O (3:7) est purifiée par CLHP semi-préparative pour donner 5 mg du saponoside **Cgp21** ($t_r=22,5$), éluant B : de 35% à 45% durant 30 min. Les fractions [13-24] éluées avec le mélange MeOH-H₂O (4:6) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 4 mg du saponoside **Cgp20** ($t_r=15,5$), éluant B : de 40% à 50% durant 20 min.

Les fractions [171-179] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈, avec l'éluant MeOH-H₂O (3:7 à 8:2). Les fractions [15-25] éluées avec le mélange MeOH-H₂O (3:7) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 12 mg de saponoside **Cgp25** ($t_r=14,5$), éluant B : de 30% à 33% durant 20 min.

II. 1. 2. À partir de l'enveloppe des fruits (Cge)

Après pulvérisation, les enveloppes séchées (84 g) sont mélangées avec 1 l de MeOH, le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures. Après refroidissement et filtration, la solution méthanolique est mise à sec pour donner 26 g de résidu sec, soit un rendement de 31%. Comme pour la pulpe de *C. glabrum*, l'extrait méthanolique de l'enveloppe ne renferme que des saponosides.

II. 1. 3. À partir des écorces de tronc (Cgt)

Les écorces de tronc séchées et broyées (396 g) sont mélangées avec 1 l de méthanol puis, le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures. Après refroidissement et filtration, la solution méthanolique est mise à sec pour conduire à 29 g de résidu sec (**Cgt**), soit un rendement de 7,3%.

28,5 g de l'extrait sec méthanolique sont solubilisés dans 200 ml d'eau et soumis à un partage liquide-liquide, d'abord contre l'hexane (3x200 ml) et ensuite contre l'acétate d'éthyle (3x200 ml). Les phases organiques sont évaporées à sec pour donner 190 mg de résidu hexane et 13 g de résidu acétate d'éthyle. La phase aqueuse est concentrée sous vide puis congelée et lyophilisée (15 g).

14 g de l'extrait aqueux sont fractionnés sur gel de Sephadex LH-20 (2,7x70 cm). L'éluion est réalisée avec l'eau, le mélange MeOH:H₂O 5:5 puis 8:2 et finalement avec le méthanol. Des fractions de 100 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM, réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5). Après regroupement, huit groupes de fractions sont obtenus (tableau 54).

Tableau 54 : Fractionnement de la phase aqueuse de l'extrait méthanolique des écorces de tronc de *C. glabrum* sur gel de Sephadex LH20.

MeOH -H ₂ O	Fractions	Masse (mg)	Composés purifiés
0 :100	1-2	6000	
	3-4	1080	Cgt1, Cgt2, Cgt12
	5	195	
	6-7	255	Cgt3, Cgt4
50 :50	8-9	121	Cgt6, Cgt7
	10-13	800	Cgt3, Cgt4, Cgt5, Cgt6, Cgt7, Cgt8, Cgt9
80 :20	14-17	1940	Cgt10, Cgt11
100 :0	18-25	1900	

Les fractions [3-4] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (2,2x18 cm), avec l'éluant CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0 à 60:40:7). Des fractions de 25 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5). Les fractions [6-9] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0) sont purifiées par CLHP préparative pour donner 21 mg du composé **Cgt1** ($t_r=22,1$) et 15 mg du composé **Cgt2** ($t_r=19,9$), éluant B : 20% pendant 15 min puis de 20% à 50% pendant 25 min, débit : 4,5 ml/min, détection : $\lambda = 220, 280$ nm. Les fractions [17-20] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0) sont purifiées par CLHP préparative pour donner 9 mg du composé **Cgt12** ($t_r=21,7$), éluant B : de 20% à 50% pendant 20 min, débit : 4,5 ml/min, détection : $\lambda = 230, 300$ nm.

Les fractions [6-7], enrichies en deux composés, sont chromatographiées sur une colonne de silice en phase normale (1,5x16 cm), avec l'éluant CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:0 à 70:30:5). Des fractions de 15 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5). Les fractions [7-8] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:1) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 14 mg du composé **Cgt4** ($t_r=23$), éluant B : de 10% à 20% pendant 25 min puis 10 min à 40%, débit : 3 ml/min, détection : $\lambda = 254$ nm. Les fractions [9-15] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:2) sont purifiées par CLHP préparative pour donner 12 mg du composé **Cgt3** ($t_r=22$) et 13 mg du composé **Cgt4** ($t_r=20,7$), éluant C : mode isocratique à 28%, débit : 5 ml/min, détection : $\lambda = 250$ nm.

Une partie des fractions [8-9] a été purifiée par CLHP semi-préparative pour donner 60 mg du composé **Cgt7** ($t_r=18$) et 34 mg du composé **Cgt6** ($t_r=14,5$), éluant C : mode isocratique à 5%, débit : 3 ml/min, détection $\lambda = 254$ et 312 nm.

Les fractions [10-13] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice C₁₈ (2x17cm), avec l'éluant MeOH-H₂O (3:7 à 8:2). Des fractions de 20 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5). Les fractions [1-2] éluées avec le mélange MeOH-H₂O (3:7) sont purifiées par CLHP préparative pour donner 17 mg du composé **Cgt9** ($t_r=46$), 25 mg du composé **Cgt8** ($t_r=39$), 8 mg du composé **Cgt5** ($t_r=24,9$), 60 mg du composé **Cgt7** ($t_r=20,9$) et 8 mg du composé **Cgt6** ($t_r=18$), éluant B : mode isocratique à 10%, débit : 4,5 ml/min, détection : $\lambda = 254, 330$ nm. Les fractions [9-15] éluées avec le solvant MeOH-H₂O (7:3) sont purifiées par CLHP préparative pour donner 12 mg du composé **Cgt3** ($t_r=22$) et 60 mg du composé **Cgt4** ($t_r=20,7$), mode éluant C : mode isocratique à 28 %, débit : 5 ml/min, détection : $\lambda = 250$ nm.

Une partie des fractions [14-17] est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice C₁₈ (2x17 cm), avec le gradient d'éluant MeOH-H₂O (3:7 à 8:2). Des fractions de 20 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5). Les fractions [25-31] éluées avec le solvant MeOH-H₂O (8:2) sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice avec l'éluant CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2 à 70:30:5) pour donner 5 mg du composé **Cgt10** et 6 mg du composé **Cgt11**.

II. 2. Saponosides et composés polyphénoliques de *Caryocar villosum*

II. 2. 1. A partir de l'enveloppe des fruits (Cve)

Après pulvérisation, les enveloppes des fruits sèches (450 g) sont mélangées avec 1,5 l de MeOH puis le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures. Après refroidissement et filtration, la solution méthanolique est mise à sec pour fournir 182 g d'extrait méthanolique, soit un rendement de 40 %.

Une partie de l'extrait méthanolique (60 g) est fractionnée en six fois 10 g. Chaque fraction de 10 g est soumise à une VLC en phase inverse C₁₈ avec l'éluant MeOH-H₂O (4:6 à 100:0). Le suivi de la VLC est effectué par CCM dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (60:40:5). Des fractions de 600 ml sont réunies en fonction de leur profil en CCM. Six VLC sont ainsi réalisées. Les saponosides bruts sont élués avec le mélange MeOH-H₂O (8:2). Après regroupement, 2,2 g de saponosides bruts sont obtenus soit un rendement de 0,5 % (tableau 55).

Tableau 55 : VLC sur C₁₈ de l'extrait méthanolique de l'enveloppe des fruits de *Caryocar villosum*.

MeOH:H ₂ O	Masse (mg)
40:60	5200
60:40	2280
80:20	2200
100	1900

Les 2,2 g de saponosides bruts sont purifiés par chromatographie sur 70 g de silice greffée C₁₈ avec le gradient d'élution MeOH:H₂O (5:5 à 8:2). Des fractions de 40 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM, réalisée en phase normale dans les solvants CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5) puis (60:40:7) et sur silice greffée C₁₈ avec le solvant MeOH:H₂O (6:4) (tableau 56).

Tableau 56 : Fractionnement des saponosides bruts des fruits de *C. villosum*.

MeOH -H ₂ O	Fractions	Masse (mg)	Saponosides purifiés
50:50	1-3	479	
55:45	4-17	100	
60:40	18-25	70	
	26	30	} Cve24, Cve25
	27	50	
	28-29	75	Cve21, Cve22, Cve23
65-35	30	38	Cve19
	31-32	270	Cve14, Cve16, Cve17, Cve18
	33-34	190	Cve12, Cve13, Cve15
	35-36	55	
	37-39	50	Cve8, Cve11
	40-42	68	Cve3, Cve5
	43-46	70	
70:30	47-49	80	Cve1
	5-51	42	
	52-53	40	} Cve2, Cve4, Cve26
	54	12	
	55-62	50	} Cve6, Cve7, Cve9, Cve10, Cve20
80:20	63-66	93	
	67-73	84	
MeOH	74	155	

Les fractions [26] et [27] sont réunies et purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec le gradient d'élution CHCl₃-MeOH-H₂O (9:1:0 à 60:40:7) pour donner 11 mg du saponoside **Cve24**. Les fractions [31-55] et [56-62] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:0 et 70:30:5) sont purifiées par CCM préparative en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (50:50:7). Le saponoside **Cve25** (7 mg) est ainsi purifié.

Les fractions [28-29] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (7 g), avec le gradient d'élution CHCl₃-MeOH-H₂O (85:15:0 à 60:40:7), des fractions de 5 ml ont été collectées. Les fractions [21-26], [27-29] et [30-34] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH (75:25) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 8 mg du saponoside **Cve22** ($t_r=10,3$) et 8 mg du saponoside **Cve21** ($t_r=11,3$), éluant B : de 31% à 33% pendant 15 min. Les fractions [35-44] et [45-55] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH (7:3) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 7 mg du saponoside **Cve23** ($t_r=25,3$), éluant B : de 26% à 30% pendant 30 min.

La fraction [30] est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec le gradient d'éluion $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (9:1:0 à 60:40:7) pour donner 4 mg du saponoside **Cve19**.

Les fractions [31-32] sont échangées sur 2,5 g de résine Amberlite® IRN 77, puis purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (11 g) avec le gradient d'éluion $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (9:1:0 à 70:30:5), des fractions de 8 ml sont recueillies. 33 mg du saponoside **Cve14** pur sont obtenus. Les fractions [41-47] éluées avec le mélange $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (70:30:1) sont réunies et purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 15 mg d'un mélange de deux saponosides **Cve16** et **Cve17** ($t_r=14,6$), éluant B : mode isocratique à 31%. Les fractions [64-67] et [68-72] éluées avec le solvant $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (70:30:2) sont réunies et purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 9 mg du saponoside **Cve18** ($t_r=20,6$), éluant B : de 29% à 30% pendant 30 min.

Les fractions [33-34] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (8 g), avec le gradient d'éluion $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (8:2:0 à 70:30:3). Des fractions de 5 ml ont été collectées, 11 mg du saponoside **Cve12** sont obtenus. La fraction [15] éluée avec le mélange $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (70:30:1) est purifiée par CLHP semi-préparative pour donner 11 mg du saponoside **Cve13** ($t_r=18,5$), éluant B : de 31% à 32% pendant 20 min. Les fractions [30-50] éluées avec le solvant $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (70:30:1) sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale puis par CLHP semi-préparative pour donner 10 mg du saponoside **Cve15** ($t_r=16,6$), éluant B : mode isocratique à 31%.

Les fractions [37-39] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec l'éluant $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (9:1:0 à 70:30:5). 9 mg du saponoside **Cve11** sont obtenus. La fraction [43] éluée avec le solvant $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (60:40:7) est purifiée par CLHP semi-préparative pour donner 7 mg du saponoside **Cve8** ($t_r=19,1$), éluant B : de 31% à 33% pendant 20 min.

Les fractions [40-42] sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 6 mg de saponoside **Cve5** ($t_r=14$) et 8 mg du saponoside **Cve3** ($t_r=15,8$), éluant B : de 32% à 34% pendant 20 min.

Les fractions [47-49] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec le gradient d'éluion $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (9:1:0 à 70:30:5). 36 mg du saponoside **Cve1** sont obtenus.

Les fractions [52-53] et [54] sont réunies et purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec le gradient d'éluion $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (8:2:0 à

70:30:5) pour donner 3 mg du saponoside **Cve26**. Les fractions [11-20] éluées avec le solvant CHCl₃-MeOH (8:2) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 2 mg du saponoside **Cve2** ($t_r=28,5$) et 3 mg du saponoside **Cve4** ($t_r=26,5$), éluant B : de 35% à 39% pendant 20 min.

Les fractions [55-62] et [63-66] sont réunies et purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (6 g), avec le gradient d'éluion CHCl₃-MeOH-H₂O (9:1:0 à 70:30:5), des fractions de 4 ml ont été collectées. 2 mg du saponoside **Cve9**, 6 mg du saponoside **Cve10** et 14 mg du saponoside **Cve7** sont obtenus. Les fractions [65-69] éluées avec le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:1) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 4 mg du saponoside **Cve6** ($t_r=21,6$), éluant B: de 35% à 42% pendant 22 min. Les fractions [14-15] et [16-20] éluées avec le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0) sont réunies et purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 2 mg du saponoside **Cve20** ($t_r=27,2$), éluant B : de 34% à 40% pendant 30 min.

II. 2. 2. À partir de la pulpe des fruits (Cvp)

Après pulvérisation, les pulpes séchées (440 g) sont mélangées à 1,5 l de MeOH puis, chauffé à reflux pendant trois heures. Après refroidissement et filtration, la solution est mise à sec pour donner 230 g d'extrait méthanolique, soit un rendement de 52 %.

II. 2. 3. À partir des écorces de tronc (Cvt)

Après pulvérisation, les écorces de tronc séchées (400 g) sont mélangées à 3,5 l de MeOH puis le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures. Après refroidissement et filtration, la solution méthanolique est mise à sec, conduisant à 37,5 g d'extrait méthanolique, soit un rendement de 9,3%.

Une partie de l'extrait méthanolique (32 g) est soumise en deux fois à une VLC sur silice griffée C₁₈ avec le gradient d'éluion MeOH-H₂O (4:6, 6:4, 8:2, 10:0) pour donner quatre fractions, **I** à **IV**. Le suivi de la VLC est effectué par CCM dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (60:40:5). Les fractions de 500 ml sont réunies en fonction de leur profil en CCM. Les saponosides bruts sont élués avec le mélange MeOH-H₂O (8:2), 870 mg de saponosides bruts sont obtenus soit un rendement de 0,21 % (tableau 57).

Tableau 57 : VLC sur C₁₈ de l'extrait méthanolique des écorces de tronc de *Caryocar villosum*.

MeOH:H ₂ O	Fraction	Masse (mg)	Composés purifiés
4:6	I	18000	Tanins condensés
6:4	II	2830	Dérivés de l'acide éllagique (Cvt2-Cvt5)
8:2	III	870	Saponosides (Cvt6-Cvt11)
100	IV	2000	Composés peu polaires (Cvt1)

Une partie de la fraction [II] éluée avec le mélange MeOH-H₂O (6:4) est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale, avec le gradient d'éluion CHCl₃-MeOH-H₂O (de 95:5:0 à 70:30:5). Des fractions de 30 ml sont collectées.

Les fractions [13-22] et [23-29] éluées au CHCl₃-MeOH (8:2) et (7:3) respectivement, sont réunies et purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (1,5x14 cm), avec l'éluant CHCl₃-MeOH (9:1 à 7:3). Les fractions [15-21] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH (8:2) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 8 mg du composé **Cvt2** (*t_r*=13,2), 8 mg du composé **Cvt4** (*t_r*=16,8) et 6 mg du composé **Cvt3** (*t_r*=17,9), éluant B : de 25% à 30% en 20 min, détection : λ= 280 et 360 nm. Les fractions [22-27] éluées à 75:25 sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 9 mg du composé **Cvt5** (*t_r*= 11,1), éluant B : de 30% à 33% en 15 min, détection : λ= 280 et 360 nm.

La fraction [III] contenant les saponosides bruts est échangée sur 7g de résine Amberlite® IRN 77 puis purifiée par chromatographie sur 35 g de silice normale (2,2x19 cm), avec le gradient d'éluion CHCl₃-MeOH-H₂O (95:5:0 à 60:40:7). Des fractions de 20 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM, réalisée en phase normale dans les solvants CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5) puis (65:35:5) (tableau 58).

Tableau 58 : Fractionnement des saponosides bruts des écorces de tronc de *C. villosum*

CHCl ₃ -MeOH -H ₂ O	Fractions	Masse (mg)	Saponosides purifiés
95:5:0	1-16	34	
90:10:0	17-30	12	
80:20:0	31-43	71	
70:30:0	44-52	53	
	53-69	93	Cvt-8
	70-80	16	Cvt-8
70:30:1	81-89	32	} Cvt-6, Cvt-7, Cvt-8, Cvt-9
	90-100	37	
70:30:2	101-108	37	
70:30:3	109-121	53	
70:30:5	122-147	120	Cvt-10, Cvt-11
60:40:7	148-149	35	
	150-162	38	
50:50	163	271	
MeOH	164	153	

Les fractions [53-69] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (1x9 cm), avec le gradient d'éluion CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0 à 70:30:2). Les fractions [38-60] éluées au CHCl₃-MeOH-H₂O 70:30:2 sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 12 mg du saponoside **Cvt8** (*t_r*=14), éluant B : de 40% à 45% pendant 20 min.

Les fractions [70-80] contiennent 16 mg du saponoside **Cvt8** pur.

Les fractions [81 à 121] sont réunies et purifiées par chromatographie sur une colonne de silice greffée C₁₈ (1,5x14 cm), avec le gradient d'éluant MeOH-H₂O (4:6 à 9:1). Les fractions [34-37] éluées avec le mélange MeOH-H₂O (8:2) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 4 mg du saponoside **Cvt9** ($t_r=15,4$) et 12 mg du saponoside **Cvt8** ($t_r=19,4$), éluant B : de 37 % à 42 % pendant 20 min. Les fractions [38-41] éluées au MeOH-H₂O (8:2) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 3 mg du saponoside **Cvt6** ($t_r= 24,9$), 3 mg du saponoside **Cvt7** ($t_r = 20,7$) et 19 mg du saponoside **Cvt8** ($t_r= 19,6$), éluant B : de 40% à 43% pendant 25 min.

Les fractions [122-147] sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 16 mg du saponoside **Cvt11** ($t_r=13,3$) et 3 mg du saponoside **Cvt10** ($t_r=15$), éluant B : de 32% à 35% pendant 15 min.

La fraction [IV] éluée avec le méthanol est chromatographiée sur une colonne de silice en phase normale (2,5x26 cm) avec l'éluant CHCl₃-MeOH (99:1 à 5:5). Des fractions de 100 ml ont été collectées et réunies en fonction de leur profil en CCM réalisée dans le solvant CHCl₃-MeOH (8:2). La fraction [33] éluée avec le mélange MeOH-H₂O (5:5) contient 128 mg du composé **Cvt1**.

II. 3. Composés des feuilles de *Guioa crenulata*

Les feuilles séchées et broyées (72 g) sont mises à macérer pendant une nuit dans 500 ml d'hexane. Après filtration, l'extrait hexanique est évaporé à sec (710 mg). Les marcs séchés sont de nouveau mis à macérer pendant trois heures dans 700 ml de méthanol aqueux à 80 % puis le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures. Après filtration, le filtrat est concentré au maximum (50 ml) puis solubilisé dans 100 ml d'eau. La phase aqueuse (150 ml) est soumise à un partage liquide-liquide contre l'acétate d'éthyle (3x150 ml). Les phases organiques sont réunies et évaporées à sec (7,3 g). La phase aqueuse est concentrée sous vide puis congelée et lyophilisée (12,1 g).

II. 3. 1. Purification de l'extrait aqueux

12 g de l'extrait aqueux sont filtrés sur une colonne de Sephadex LH-20 (3x75 cm). L'éluant est réalisé avec un mélange de MeOH:H₂O (0:10, 5:5 et 10:0). Des fractions de 250 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM, réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5). Après regroupement, sept groupes de fractions sont obtenus (tableau 59).

Tableau 59 : Purification des composés isolés de l'extrait aqueux de *G. crenulata*.

MeOH -H ₂ O	Fractions	Masse (mg)	Composés purifiés
0:10	1	1500	Gc4
	2-4	4225	
5:5	5	121	Gc2, Gc3
	6	1050	
	7	261	
	8-9	240	
10:0	10-22	3278	Gc1

La fraction [1] est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (2,7x27 cm), avec l'éluant CHCl₃-MeOH-H₂O (95:5:0 à 60:40:7). Des fractions de 100 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O-HCOOH (70:30:5:1). Les fractions [22-27] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:0) et les fractions [28-32] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:1) contiennent 214 mg du composé Gc4.

La fraction [6], enrichie en deux composés, est purifiée par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (2,5x25 cm), avec le gradient d'éluant CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0 à 60:40:7). Des fractions de 50 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:5). Les fractions [16-32] éluées avec le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:0) contiennent 500 mg du composé **Gc2**. Les fractions [52-55] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (60:40:7) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 8 mg du composé **Gc3** ($t_r=7,8$) et 14 mg du composé **Gc2** ($t_r=9,4$), éluant B : mode isocratique à 21 %.

Les fractions [8-9] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (1,5x16cm), avec le gradient d'éluant CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0 à 70:30:5), des fractions de 5 ml sont recueillies. Les fractions [13-39] éluées avec le solvant CHCl₃-MeOH (75:25) sont purifiées par CLHP semi-préparative sous les mêmes conditions que ci-dessus, pour donner 3 mg du composé **Gc1** ($t_r= 11,1$).

II. 3. 2. Purification de l'extrait d'acétate d'éthyle

Une partie de l'extrait acétate d'éthyle (5 g) est soumise à une VLC en phase inverse sur silice greffé C₁₈ avec l'éluant MeOH-H₂O (4:6, 8:2 et 100:0) pour donner trois fractions (**I-III**) de 250 ml. Le suivi de la VLC est effectué par CCM dans le solvant CHCl₃-MeOH (8:2) (tableau 60).

Tableau 60 : VLC sur C₁₈ de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Guioa crenulata*.

MeOH:H ₂ O	Fraction	Masse (mg)
40:60	I	19500
80:20	II	1340
100:0	III	1500

Une partie de la fraction **II** est purifiée par chromatographie sur 30 g de silice greffée C₁₈ (2,2x18 cm) avec le gradient d'éluion MeOH:H₂O (6:4 à 9:1). Des fractions de 10 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM, réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH-H₂O (80:20:1) (tableau 61).

Tableau 61 : Purification des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle de *G. crenulata*.

MeOH-H ₂ O	Fractions	Masse (mg)	Composés purifiés
6:4	1-7	66	
	8-18	142	
7:3	19-25	160	
	26-33	173	Gc5, Gc6, Gc7
	34-36	26	
	37-41	30	Gc8
8:2	42-49	58	Gc8
9:1	50-55	5	
MeOH	56-58	10	

Les fractions [26-33] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (1,5x13 cm), avec le gradient d'éluion CHCl₃-MeOH (95:5 à 7:3), des fractions de 5 ml sont recueillies. Les fractions [24-27] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH (85:15) sont purifiées par CLHP semi-préparative pour donner 6 mg du composé **Gc5** (*t_r*=21,9), 14 mg du composé **Gc6** (*t_r*=26,4) et 6 mg du composé **Gc7** (*t_r*=27,3), éluant B : de 35% à 50% pendant 30 min. Les fractions [28-32] éluées avec le mélange CHCl₃-MeOH (8:2) contiennent 26 mg du composé **Gc5**.

Les fractions [37-41] et [42-49] sont purifiées par chromatographie sur une colonne de silice en phase normale (1x7 cm), avec l'éluant CHCl₃-MeOH (10:0 à 99:1), des fractions de 5 ml sont recueillies. Les fractions [1-4] éluées au CHCl₃ contiennent 4 mg du composé **Gc8**.

II. 4. Hydrolyse

II. 4. 1. Hydrolyse acide des extraits

II. 4. 1. 1. Protocole

Une quantité de saponosides bruts (tableau 62) est dissoute dans 20 à 30 ml de HCl 2N. La solution est mise à reflux en maintenant l'ébullition pendant 4 heures. L'évolution de l'hydrolyse est suivie par CCM dans les deux systèmes :

- solvant des hétérosides : CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5),
- solvant des génines : CHCl₃-MeOH (98:2).

Après refroidissement, le mélange réactionnel est soumis à une extraction liquide-liquide contre l'acétate d'éthyle (3x15ml). La phase aqueuse renfermant les sucres libres est neutralisée par KOH 0,5N puis la solution est congelée et lyophilisée. Le mélange est analysé par CCM avec des témoins de monosaccharides, dans le solvant :

MeCOEt-isoPrOH-Me₂CO-H₂O (20:10:7:6).

La phase organique contenant les génines est lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralisation du pH de l'eau de lavage puis mise à sec. Ces génines sont analysées par CCM dans le solvant CHCl_3 - CMeOH (98:2) avec des témoins disponibles au laboratoire (acide oléanolique, hédéragénine).

II. 4. 1. 2. Résultats

Les sucres sont purifiés par CPP, solvant d'éluion : MeCOEt - isoPrOH - Me_2CO - H_2O (20:10:7:6) et leur pouvoir rotatoire est mesuré dans H_2O . Les résultats de l'hydrolyse acide sont représentés dans le tableau 62.

Tableau 62 : Résultats d'hydrolyse acide des extraits et pouvoirs rotatoires des sucres isolés mesurés dans H_2O .

Extrait	Cgp	Cgt	Cve	Cvt	Gc
Quantité hydrolysée	1 g	100 mg	200 mg	100 mg	100 mg
	$[\alpha]_D$ (c)	$[\alpha]_D$ (c)	$[\alpha]_D$ (c)	$[\alpha]_D$ (c)	$[\alpha]_D$ (c)
Acide D-glucuronique	+ 7° (c 0,18)	+ 6° (c 0,15)	+ 8° (c 0,25)	+ 7° (c 0,2)	-
D-galactose	+ 35° (c 1)	+ 54° (c 0,13)	+ 35° (c 1)	+ 45° (c 0,13)	+ 35° (c 0,2)
D-glucose	+ 13° (c 1)	+ 9° (c 0,12)	+ 15° (c 1)	+ 11° (c 0,12)	+ 9° (c 0,14)
D-xylose	+ 10° (c 0,8, 24h)	-	+ 11° (c 0,8, 24h)	-	-
L-rhamnose	-	+ 3° (c 0,01)	-	+ 10° (c 0,1)	+ 9° (c 0,15)

Pulpe des fruits de *C. glabrum* (Cgp), Ecorces de tronc de *C. glabrum* (Cgt), Enveloppe des fruits de *C. villosum* (Cve), Ecorces de tronc de *C. villosum* (Cvt), Feuilles de *Guioa crenulata* (Gc)
 c = concentration de chaque sucre en g/100ml.

II. 4. 2. Hydrolyse alcaline

50 mg d'une fraction enrichie en galloylhamaméloses sont solubilisés dans 5 ml d'une solution méthanolique de KOH à 5%. Le mélange est mis sous agitation pendant six heures à température ambiante. La solution est neutralisée par une filtration sur une résine échangeuse cationique H^+ de type Amberlite® IRN 77 (éluion par méthanol). Après évaporation du méthanol, une partie du résidu est purifiée par CPP dans le solvant MeCOEt - isoPrOH - Me_2CO - H_2O (20:10:7:6). L'hamamélose a été identifié par RMN. Après mesure du pouvoir rotatoire, il s'agit du D-hamamélose ($[\alpha]_D + 1^\circ$, (H_2O , c 0,8, 24h)).

III. Caractéristiques des composés isolés

Tableau 63 : Récapitulatif des composés isolés des trois espèces étudiées.

	<i>C. glabrum</i> Pulpe (Cgp)	<i>C. glabrum</i> Tronc (Cgt)	<i>C. villosum</i> Enveloppe (Cve)	<i>C. villosum</i> Tronc (Cvt)	<i>G. crenulata</i> Feuilles (Gc)	Nouveau
Saponosides						
Cgp1 = Cve9	+	-	+	-	-	-
Cgp2	+	-	-	-	-	-
Cgp3	+	-	-	-	-	-
Cgp4 = Cve10	+	-	+	-	-	+
Cgp5 = Cve20	+	-	+	-	-	+
Cgp6	+	-	-	-	-	+
Cgp7	+	-	-	-	-	+
Cgp8	+	-	-	-	-	+
Cgp9	+	-	-	-	-	+
Cgp10= Cve12	+	-	+	-	-	+
Cgp11= Cve21	+	-	+	-	-	+
Cgp12	+	-	-	-	-	-
Cgp13	+	-	-	-	-	+
Cgp14= Cvt10	+	-	-	+	-	-
Cgp15	+	-	-	-	-	+
Cgp16	+	-	-	-	-	-
Cgp17	+	-	-	-	-	+
Cgp18= Cvt7	+	-	-	+	-	+
Cgp19	+	-	-	-	-	+
Cgp20	+	-	-	-	-	+
Cgp21	+	-	-	-	-	+
Cgp22	+	-	-	-	-	-
Cgp23= Cve3	+	-	+	-	-	+
Cgp24	+	-	-	-	-	+
Cgp25	+	-	-	-	-	+
Cgp26	+	-	-	-	-	-
Cgp27	+	-	-	-	-	-
Cgp28	+	-	-	-	-	+
Cgp29	+	-	-	-	-	+
Cgp30	+	-	-	-	-	+
Cgt10= Cvt8	-	+	-	+	-	+
Cgt11= Cvt11	-	+	-	+	-	+
Cve1	-	-	+	-	-	-
Cve2	-	-	+	-	-	+
Cve4	-	-	+	-	-	+
Cve5	-	-	+	-	-	+
Cve6	-	-	+	-	-	+
Cve7	-	-	+	-	-	+
Cve8	-	-	+	-	-	+
Cve11	-	-	+	-	-	-
Cve13	-	-	+	-	-	+
Cve14	-	-	+	-	-	-
Cve15	-	-	+	-	-	+
Cve16	-	-	+	-	-	+
Cve17	-	-	+	-	-	+
Cve18	-	-	+	-	-	+
Cve19	-	-	+	-	-	-
Cve22	-	-	+	-	-	+
Cve23	-	-	+	-	-	+
Cve24	-	-	+	-	-	+
Cve25	-	-	+	-	-	+
Cve26	-	-	+	-	-	+
Cvt9	-	-	+	+	-	+
Cvt10	-	-	+	+	-	+

	<i>C. glabrum</i> Pulpe (Cgp)	<i>C. glabrum</i> Tronc (Cgt)	<i>C. villosum</i> Enveloppe (Cve)	<i>C. villosum</i> Tronc (Cvt)	<i>G. crenulata</i> Fouilles (Gc)	Nouveau
Polyphénols						
Cgt1	-	+	-	-	-	-
Cgt2	-	+	-	-	-	-
Cgt3	-	+	-	-	-	+
Cgt4	-	+	-	-	-	+
Cgt5	-	+	-	-	-	+
Cgt6	-	+	-	-	-	-
Cgt7	-	+	-	-	-	-
Cgt8	-	+	-	-	-	+
Cgt9	-	+	-	-	-	+
Cvt1	-	-	-	+	-	-
Cvt2 = Cgt12	-	+	-	+	-	-
Cvt3	-	-	-	+	-	+
Cvt4	-	-	-	+	-	+
Cvt5	-	-	-	+	-	+
Gc1	-	-	-	-	+	-
Gc2	-	-	-	-	+	-
Gc3	-	-	-	-	+	-
Gc4	-	-	-	-	+	-
Hétérosides sesquiterpéniques						
Gc5	-	-	-	-	+	+
Gc6	-	-	-	-	+	+
Gc7	-	-	-	-	+	+
Gc8	-	-	-	-	+	+

Cgp : Composés isolés de la pulpe des fruits de *C. glabrum*,

Cgt : Composés isolés des écorces de tronc de *C. glabrum*,

Cve : Composés isolés des enveloppes des fruits de *C. villosum*,

Cvt : Composés isolés des écorces de tronc de *C. villosum*,

Gc : Composés isolés des feuilles de *Guioa crenulata*.

III. 1. Saponosides des *Caryocar*

III. 1. 1. Saponoside Cgp1 = Cve9

3-*O*- β -D-glucopyranosyl hédéragénine.

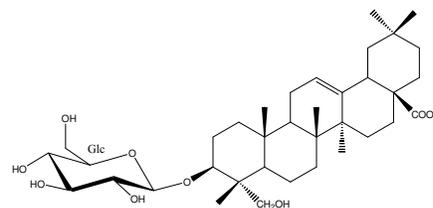
Formule brute : $C_{36}H_{58}O_9$

$[\alpha]_D + 23^{\circ}2$ (c 1, MeOH)

SM : ESI (mode négatif) m/z : 633 [M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 8, page 68).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 67, page 280).



III. 1. 2. Saponoside Cgp2

3-*O*- β -D-glucopyranosyl bayogénine.

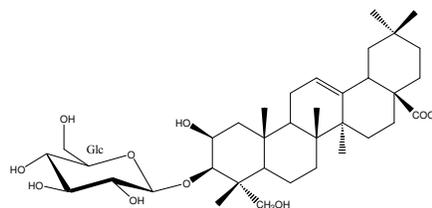
Formule brute : $C_{36}H_{58}O_{10}$

$[\alpha]_D + 6^{\circ}6$ (c 0,83, MeOH)

SM : ESI (mode négatif) m/z : 649 [M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 8, page 68).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 71, page 284).



III. 1. 3. Saponoside Cgp3

Acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] oléanolique.

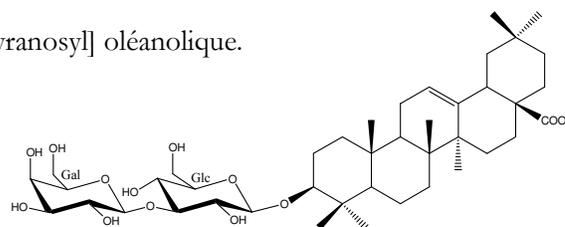
Formule brute : $C_{42}H_{68}O_{13}$

$[\alpha]_D + 13^{\circ}7$ (c 0,28, MeOH)

SM : ESI (mode négatif) m/z : 779 [M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 9, page 57).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 78, page 277).



III. 1. 4. Saponoside Cgp4 = Cve10

3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-(β -D-glucopyranosyl)] hédéragénine.

Formule brute : $C_{42}H_{68}O_{14}$

$[\alpha]_D + 31^{\circ}9$ (c 0,83, MeOH)

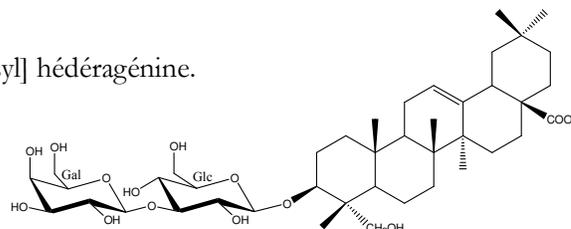
MS :

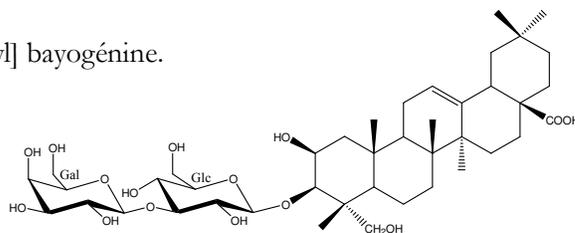
- mode positif : ESI m/z : 835 [M+K]⁺, 819 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (819) m/z : 775 [M+Na-CO₂]⁺, 657 [M+Na-Gal]⁺

- mode négatif : ESI m/z : 795 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (795) m/z : 633 [M-H-Gal]⁻, 615 [M-H-Gal-H₂O]⁻, 471 [M-H-Gal-Glc]⁻

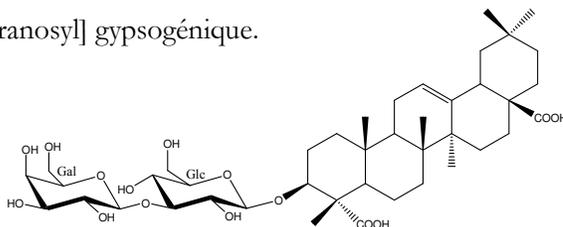
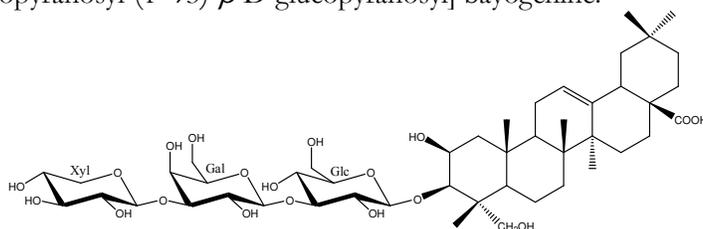
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 9, page 71).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 67, page 280).



III. 1. 5. Saponoside Cgp5 = Cve213-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine.**Formule brute** : C₄₂H₆₈O₁₅**[α]_D** + 24°9 (*c* 1, MeOH)**SM** :

- **mode positif** : ESI *m/z* : 835 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (835) *m/z* : 791 [M+Na-CO₂]⁺, 673 [M+Na-Gal]⁺
- **mode négatif** : ESI *m/z* : 811 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (811) *m/z* : 649 [M-H-Gal]⁻, 631 [M-H-Gal-H₂O]⁻, 487 [M-H-Gal-Glc]⁻

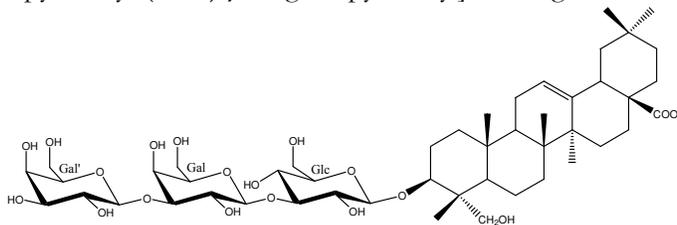
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 9, page 71).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 71, page 284).**III. 1. 6. Saponoside Cgp6**Acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] gypsogénique.**Formule brute** : C₄₂H₆₆O₁₅**[α]_D** + 16°7 (*c* 0,17, MeOH)**SM** : ESI (mode positif) *m/z* : 833 [M+Na]⁺, 811 [M+H]⁺, 509 [M+Na-Glc-Gal]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 9, page 71).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 70, page 283).**III. 1. 7. Saponoside Cgp7**3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine.**Formule brute** : C₄₇H₇₆O₁₉**[α]_D** + 17°5 (*c* 0,42, MeOH)**SM** :

- **mode positif** : ESI *m/z* : 967 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (967) *m/z* : 835 [M+Na-Xyl]⁺, 673 [M+Na-Xyl-Gal]⁺
- **mode négatif** : ESI *m/z* : 943 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (943) *m/z* : 811 [M-H-Xyl]⁻, 649 [M-H-Xyl-Gal]⁻, 487 [M-H-Xyl-Gal-Glc]⁻

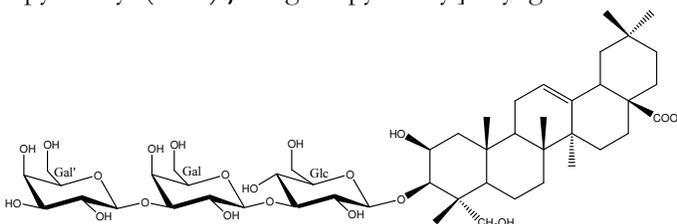
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 11, page 74).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 71, page 284).

III. 1. 8. Saponoside Cgp83-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine.Formule brute : C₄₈H₇₈O₁₉[α]_D + 15°6 (ϵ 0,42, MeOH)

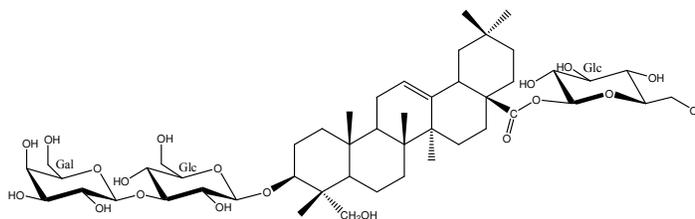
SM :

ESI (mode négatif) *m/z* : 957 [M-H]⁻ESI-MS/MS (957) *m/z* : 795 [M-H-Gal]⁻, 633 [M-H-Gal-Gal]⁻,ESI-MS/MS : MS³ (633) *m/z* : 471 [M-H-2Gal-Glc]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 11, page 74).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 67, page 280).**III. 1. 9. Saponoside Cgp9**3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine.Formule brute : C₄₈H₇₈O₂₀[α]_D + 15° (ϵ 0,42, MeOH)

SM :

ESI (mode négatif) *m/z* : 973 [M-H]⁻ESI-MS/MS (973) *m/z* : 811 [M-H-Gal]⁻, 649 [M-H-Gal-Gal]⁻, 487 [M-H-2Gal-Glc]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 11, page 74).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 71, page 284).**III. 1. 10. Saponoside Cgp10 = Cve12**3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.Formule brute : C₄₈H₇₈O₁₉[α]_D + 20°7 (ϵ 0,75, MeOH)

SM :

- mode positif: ESI *m/z* : 997 [M+K]⁺, 981 [M+Na]⁺ESI-MS/MS (981) *m/z* : 819 [M+Na-(Glc ou Gal)]⁺ESI-MS/MS:MS² (819) *m/z* : 775 [M+Na-Glc-CO₂]⁺, 613 [M+Na-Glc-CO₂-Gal]⁺- mode négatif: ESI *m/z* : 957 [M-H]⁻ESI-MS/MS (957) *m/z* : 795 [M-H-(Glc ou Gal)]⁻, 634 [M-H-Glc-Gal]⁻,: 471 [M-H-Glc-Gal-Glc]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 10, page 72).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 67, page 280).

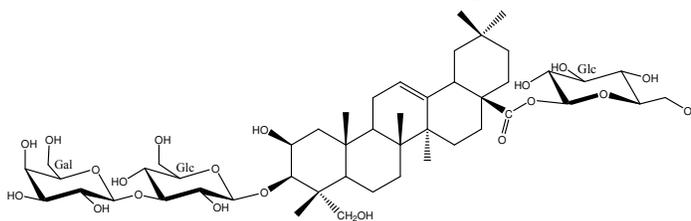
III. 1. 11. Saponoside Cgp11 = Cve21

3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₈O₂₀

[α]_D + 28°8 (*c* 1, MeOH)

SM :



- mode positif:** ESI *m/z* : 1013 [M+K]⁺, 997 [M+Na]⁺
 ESI-MS/MS (1013) *m/z* : 835 [M+Na-(Glc ou Gal)]⁺
 ESI-MS/MS:MS² (835) *m/z* : 673 [M+Na-Glc-Gal]⁺, 629 [M+Na-Glc-Gal-CO₂]⁺
- mode négatif:** ESI *m/z* : 973 [M-H]⁻
 ESI-MS/MS (973) *m/z* : 811 [M-H-(Glc ou Gal)]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 10, page 72).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 71, page 284).

III. 1. 12. Saponoside Cgp12

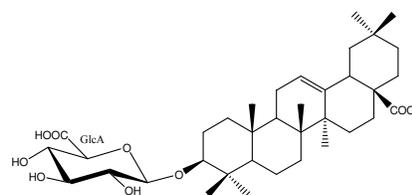
Acide 3-*O*- β -D-glucuronopyranosyl oléanolique.

Formule brute : C₃₆H₅₆O₉

[α]_D + 12°1 (*c* 0,75, MeOH)

MS :

ESI (mode négatif) *m/z* : 631 [M-H]⁻, 455 [M-H-GlcA]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 13, page 78).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 64, page 277).

III. 1. 13. Saponoside Cgp13

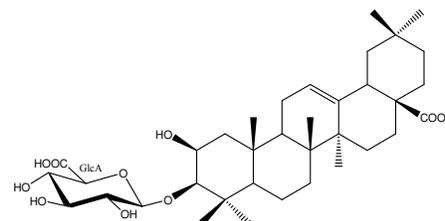
Acide 3-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-2 β -hydroxyoléanolique.

Formule brute : C₃₆H₅₆O₁₀

[α]_D + 26°2 (*c* 0,58, MeOH)

SM :

- mode positif:** ESI *m/z* : 687 [M+K]⁺, 671 [M+Na]⁺
 ESI-MS/MS (687) *m/z* : 495 [M+Na-GlcA]⁺, 451 [M+Na-GlcA-CO₂]⁺
- mode négatif:** ESI *m/z* : 647 [M-H]⁻
 ESI-MS/MS (647) *m/z* : 471 [M-GlcA]⁻



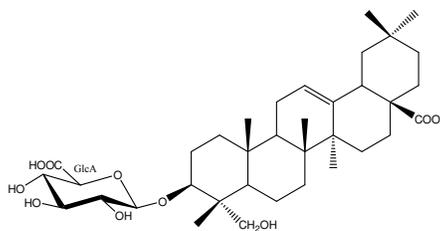
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 13, page 78).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 65, page 278).

III. 1. 14. Saponoside Cgp14 = Cvt63-*O*- β -D-glucuronopyranosyl hédéragénine.Formule brute : $C_{36}H_{56}O_{10}$ $[\alpha]_D + 11^{\circ}5$ (c 0,83, MeOH)

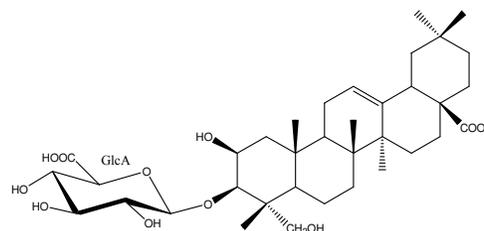
SM :

- *mode positif*: ESI m/z : 685 $[M+K-2H]^+$
ESI-MS/MS (685) m/z : 641 $[M+K-2H-CO_2]^+$
- *mode négatif*: ESI m/z : 647 $[M-H]^-$
ESI-MS/MS (647) m/z : 471 $[M-H-GlcA]^-$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique (CD_3OD) (tableau 13, page 78).RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la génine (CD_3OD) (tableau 67, page 280).**III. 1. 15. Saponoside Cgp15**3-*O*- β -D-glucuronopyranosyl bayogénine.Formule brute : $C_{36}H_{56}O_{11}$ $[\alpha]_D + 16^{\circ}8$ (c 0,25 g, MeOH)

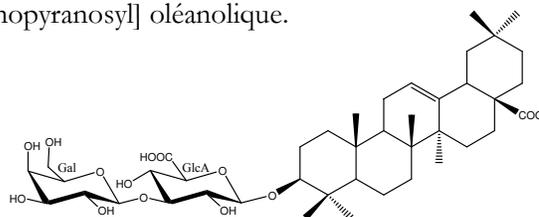
SM :

- *mode positif*: ESI m/z : 709 $[M-H+2Na]^+$
ESI-MS/MS (709) m/z : 691 $[M-H+2 Na-H_2O]^+$, 533 $[M-H+2Na-GlcA]^+$
- *mode négatif*: ESI m/z : 663 $[M-H]^-$
ESI-MS/MS (647) m/z : 487 $[M-H-GlcA]^-$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique (CD_3OD) (tableau 13, page 78).RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la génine (CD_3OD) (tableau 68, page 284).**III. 1. 16. Saponoside Cgp16**Acide 3-*O*- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] oléanolique.Formule brute : $C_{42}H_{66}O_{14}$ $[\alpha]_D + 22^{\circ}1$ (c 1, MeOH)

SM :

- *mode positif*: ESI m/z : 817 $[M+Na]^+$
- *mode négatif*: ESI m/z : 793 $[M-H]^-$
ESI-MS/MS (793) m/z : 631 $[M-H-Gal]^-$, 455 $[M-H-Gal-GlcA]^-$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique (CD_3OD) (tableau 16, page 80).RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la génine (CD_3OD) (tableau 64, page 277).

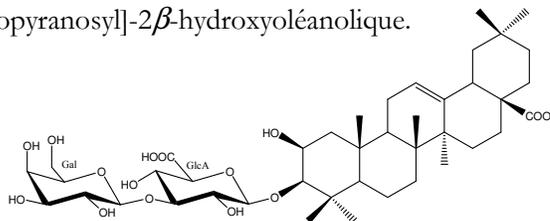
III. 1. 17. Saponoside Cgp17

Acide 3-O- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique.

Formule brute : $C_{42}H_{66}O_{15}$

$[\alpha]_D + 8^\circ 4$ (c 0,17, MeOH)

SM :



- *mode positif*: ESI m/z : 855 $[M-H+2Na]^+$
ESI-MS/MS (871) m/z : 693 $[M-H+2Na-Gal]^+$, 517 $[M-H+2Na-Gal-GlcA]^+$
- *mode négatif*: ESI m/z : 809 $[M-H]^-$
ESI-MS/MS (809) m/z : 647 $[M-H-Gal]^-$, 471 $[M-H-Gal-GlcA]^-$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique (CD_3OD) (tableau 16, page 80).

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la génine (CD_3OD) (tableau 65, page 278).

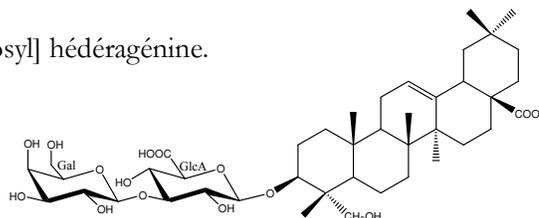
III. 1. 18. Saponoside Cgp18 = Cvt7

3-O- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine.

Formule brute : $C_{42}H_{66}O_{15}$

$[\alpha]_D + 11^\circ 4$ (c 0,44, MeOH)

SM :



- *mode positif*: ESI m/z : 847 $[M+K]^+$
ESI-MS/MS (847) m/z : 803 $[M+K-CO_2]^+$, 685 $[M+K-Gal]^+$
- *mode négatif*: ESI m/z : 809 $[M-H]^-$
ESI-MS/MS (809) m/z : 647 $[M-H-Gal]^-$, 471 $[M-H-Gal-GlcA]^-$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique ($DMSO-d_6$) (tableau 16, page 80).

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la génine ($DMSO-d_6$) (tableau 67, page 274).

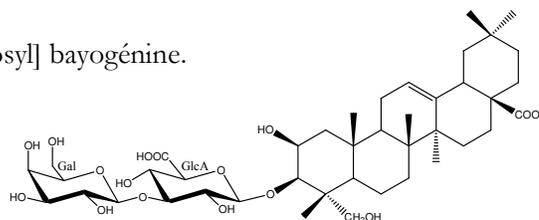
III. 1. 19. Saponoside Cgp19

3-O- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] bayogénine.

Formule brute : $C_{42}H_{66}O_{16}$

$[\alpha]_D + 26^\circ 2$ (c 0,67, MeOH)

SM :



- *mode positif*: ESI m/z : 871 $[M-H+2Na]^+$, 849 $[M+Na]^+$
ESI-MS/MS (871) m/z : 709 $[M-H+2Na-Gal]^+$, 533 $[M-H+2Na-Gal-GlcA]^+$
- *mode négatif*: ESI m/z : 825 $[M-H]^-$
ESI-MS/MS (825) m/z : 663 $[M-H-Gal]^-$, 487 $[M-H-Gal-GlcA]^-$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique (CD_3OD) (tableau 16, page 80).

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) de la génine (CD_3OD) (tableau 72, page 285).

III. 1. 20. Saponoside Cgp20

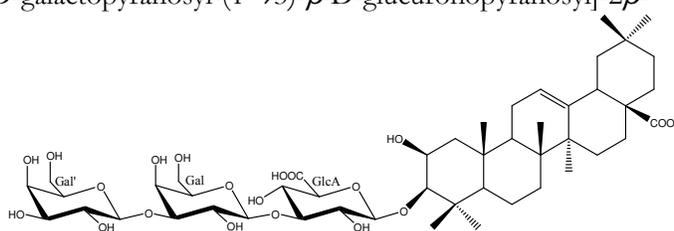
Acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₂₀

[α]_D + 12° (c 0.29, MeOH)

SM :

- **mode positif**: 1017 [M-H+2Na]⁺
 - **mode négatif**: ESI m/z : 971 [M-H]⁻
 ESI-MS/MS (971) m/z : 809 [M-H-Gal]⁻, 647 [M-H-Gal-Gal]⁻
 ESI-MS/MS :MS³ (647) m/z : 471 [M-H-Gal-Gal-GlcA]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 21, page 86).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 65, page 278).

III. 1. 21. Saponoside Cgp21

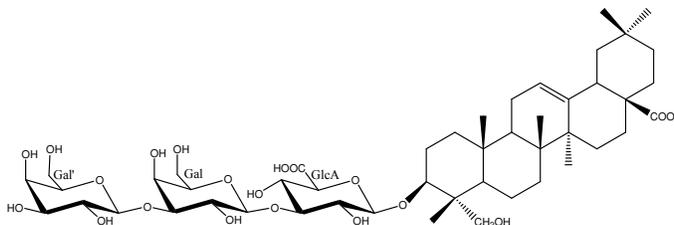
3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₂₀

[α]_D +11°5 (c 0,42, MeOH)

SM :

- **mode négatif**: ESI m/z : 971 [M-H]⁻
 ESI-MS/MS (971) m/z : 809 [M-H-Gal]⁻
 ESI-MS/MS : MS³ (809) m/z : 647 [M-H-Gal-Gal]⁻, 471 [M-H-Gal-Gal-GlcA]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 21, page 86).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 68, page 281).

III. 1. 22. Saponoside Cgp22

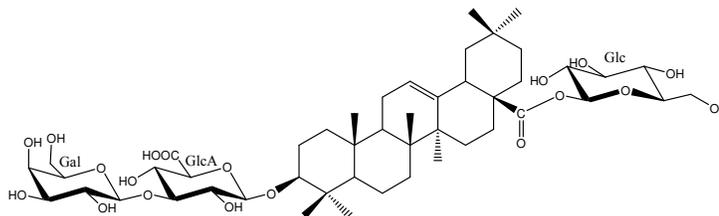
Acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] oléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₁₉

[α]_D + 8°4 (c 0,17, MeOH)

SM :

- **mode négatif**: ESI m/z : 955 [M-H]⁻
 ESI-MS/MS (955) m/z : 793 [M-H-Glc]⁻, 455 [M-H-Gal-Gal-GlcA]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 18, page 82).

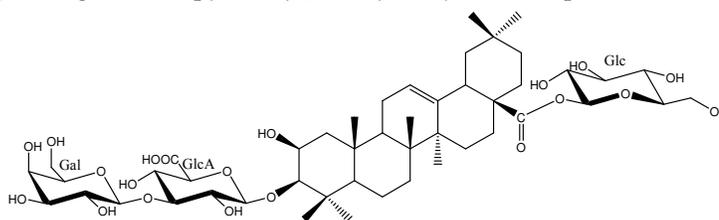
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 64, page 277).

III. 1. 23 Saponoside Cgp23 = Cve3

Acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxy-oléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₂₀

[α]_D + 12° (ϵ 0,5, MeOH)



SM :

- mode positif :** ESI *m/z* : 1017 [M-H+2Na]⁺
ESI-MS/MS (1017) *m/z* : 855 [M-H+2Na-(Glc ou Gal)]⁺, 693 [M-H+2Na-Gal-Glc]⁺,
517 [M-H+2Na-Glc-Gal-GlcA]⁺
- mode négatif :** ESI *m/z* : 971 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (971) *m/z* : 809 [M-H-(Glc ou Gal)]⁻, 647 [M-Glc-Gal]⁻,
471 [M-Glc-Gal-GlcA]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 18, page 82).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 65, page 278).

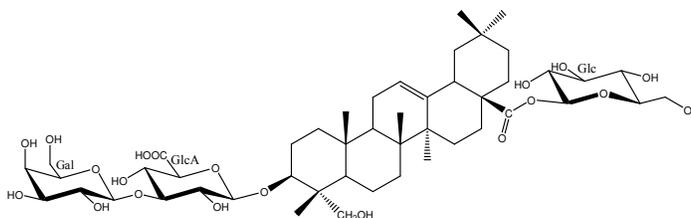
III. 1. 24. Saponoside Cgp24

3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₂₀

[α]_D + 11°9 (ϵ 1, MeOH)

SM :



- mode positif :** ESI *m/z* : 1009 [M+K]⁺
ESI-MS/MS (1009) *m/z* : 847 [M+K-(Glc ou Gal)]⁺, 803 [M+K-Glc-CO₂]⁺,
685 [M+K-Gal-Glc]⁺
- mode négatif :** ESI *m/z* : 971 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (971) *m/z* : 809 [M-H-(Glc ou Gal)]⁻, 647 [M-Glc-Gal]⁻,
471 [M-Glc-Gal-GlcA]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 18, page 82).

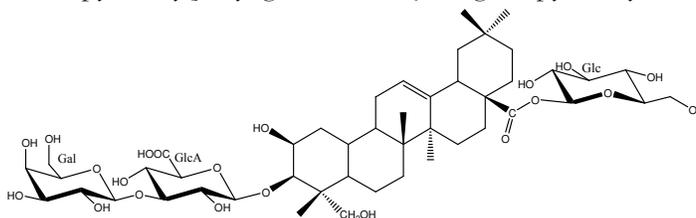
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 68, page 281).

III. 1. 25. Saponoside Cgp25

3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] bayogénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₂₁

[α]_D + 15°6 (ϵ 1, MeOH)



SM :

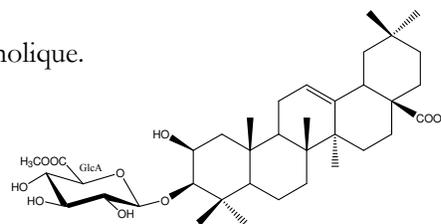
- mode positif :** ESI *m/z* : 1025 [M+K]⁺, 1011 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1025) *m/z* : 863 [M+K-(Glc ou Gal)]⁺, 701 [M+K-Glc-Gal]⁺
- mode négatif :** ESI *m/z* : 987 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (987) *m/z* : 825 [M-H-(Glc ou Gal)]⁻
ESI-MS/MS : MS³ (825) *m/z* : 487 [M-H-Glc-Gal-GlcA]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 18, page 82).

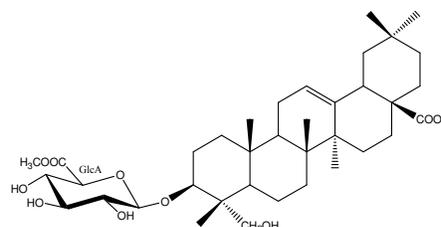
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 72, page 285).

III. 1. 26. Saponoside Cgp26Acide 3-O-[méthyl- β -D-glucopyranosiduronate]-2 β -hydroxyoléanolique.**Formule brute** : C₃₇H₅₈O₁₀**[α]_D** + 12° (ϵ 0,17, MeOH)**SM** :

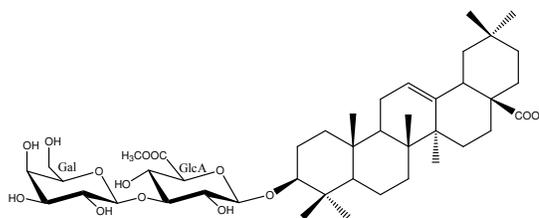
- **mode positif**: ESI *m/z* : 701 [M+K]⁺, 685 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (701) *m/z* : 641 [M+Na-CO₂]⁺
- **mode négatif**: ESI *m/z* : 661 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (661) *m/z* : 647 [M-H-CH₃]⁻, 471 [M-H-(CH₃-GlcA)]⁻*

*CH₃-GlcA=méthyl glucuronateRMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 14, page 79).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 65, page 278).**III. 1. 27. Saponoside Cgp27**3-O-[méthyl- β -D-glucopyranosiduronate] hédéragénine.**Formule brute** : C₃₇H₅₈O₁₀**[α]_D** + 21° (ϵ 0,83, MeOH)**MS** :

- **mode positif**: ESI *m/z* : 701 [M+K]⁺, 685 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (701) *m/z* : 641 [M+Na-CO₂]⁺
- **mode négatif**: ESI *m/z* : 661 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (661) *m/z* : 647 [M-H-CH₃]⁻, 471 [M-H-(CH₃-GlcA)]⁻*

*CH₃-GlcA=méthyl glucuronateRMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 14, page 79).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 68, page 281).**III. 1. 28. Saponoside Cgp28**Acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate] oléanolique.**Formule brute** : C₄₃H₆₈O₁₄**[α]_D** + 20°3 (ϵ 0,83, MeOH)**SM** :

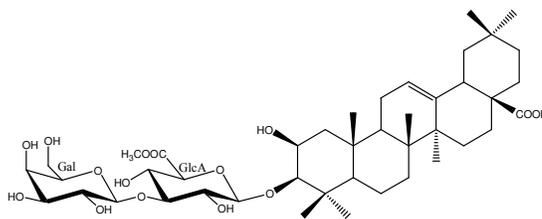
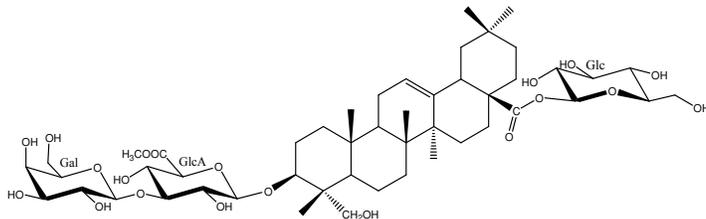
- **mode positif**: ESI *m/z* : 831 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (831) *m/z* : 787 [M+Na-CO₂]⁺, 625 [M+Na-CO₂-Gal]⁺
- **mode négatif**: ESI *m/z* : 807 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (807) *m/z* : 775 [M-H-OCH₃]⁻, 455 [M-H-Gal-(CH₃-GlcA)]⁻*

*CH₃-GlcA=méthyl glucuronateRMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 17, page 82).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 64, page 277).

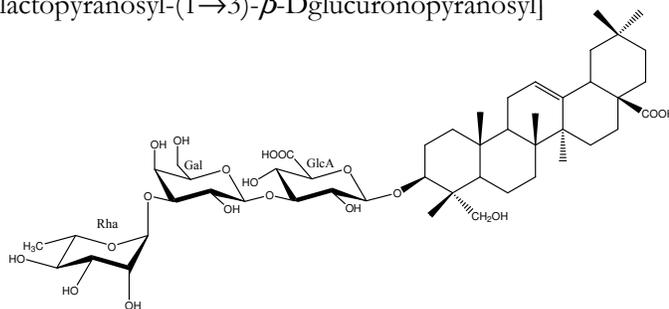
III. 1. 29. Saponoside Cgp29Acide 3-O- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate]-2 β -hydroxyoléanolique.**Formule brute** : C₄₃H₆₈O₁₅**[α]_D** + 30°6 (*c* 1, MeOH)**SM** :

- **mode positif**: ESI *m/z* : 863 [M+K]⁺, 847 [M+Na]⁺,
ESI-MS/MS (863) *m/z* : 803 [M+Na-CO₂]⁺, 685 [M+Na-Gal]⁺,
641 [M+Na-Gal-CO₂]⁺

- **mode négatif**: ESI *m/z* : 823 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (823) *m/z* : 791 [M-H-CH₃OH]⁻, 471 [M-H-Gal-(CH₃GlcA)]⁻

*CH₃-GlcA=méthyl glucuronateRMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 17, page 82).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 65, page 278).**III. 1. 30. Saponoside Cgp30**3-O- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.**Formule brute** : C₄₉H₇₈O₂₀**[α]_D** + 10°8 (*c* 0,17, MeOH)**SM** : ESI (mode positif) *m/z* : 1009 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 20, page 84).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 68, page 281).**III. 1. 31. Saponoside Cgt10 = Cvt10**3-O- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -Dglucuronopyranosyl] hédéragénine.**Formule brute** : C₄₈H₇₆O₁₉**[α]_D** + 8°5 (*c* 1, MeOH)**SM** :

- **mode positif**: ESI *m/z* : 1001 [M-H+2Na]⁺, 957 [M+H]⁺,
ESI-MS/MS (979) *m/z* : 855 [M-H+2Na-Rha]⁺,
693 [M-H+2Na-Rha-Gal]⁺,
517 [M-H+2Na-Rha-Gal-GlcA]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 22, page 89).RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 68, page 281).

III. 1. 32. Saponoside Cgt11 = Cvt11

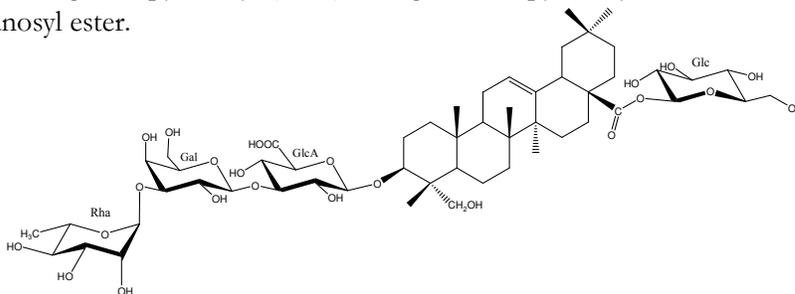
3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₄H₈₆O₂₄

[α]_D + 15°7 (*c* 0,66, MeOH)

SM :

- **mode positif:** ESI *m/z* : 1163 [M-H+2Na]⁺
ESI-MS/MS (1163) *m/z* : 1001 [M-H+2Na-Glc]⁺, 855 [M-H+2Na-Glc-Rha]⁺,
693 [M-H+2Na-Glc-Rha-Gal]⁺,
517 [M-H+2Na-Glc-Rha-Gal-GlcA]⁺
- **mode négatif:** ESI *m/z* : 1117 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1117) *m/z* : 955 [M-H-Glc]⁻, 809 [M-H-Glc-Rha]⁻,
471 [M-H-Glc-Rha-Gal-GlcA]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 22, page 89).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 68, page 281).

III. 1. 33. Saponoside Cve1

Acide 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl] oléanolique 28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₈O₁₈

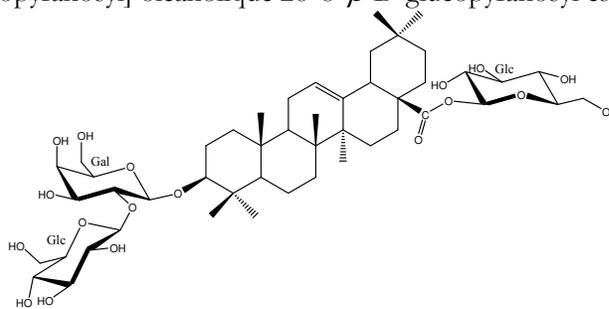
[α]_D + 12° (*c* 1, MeOH)

SM :

- **mode positif:** ESI *m/z* : 965 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (965) *m/z* : 803 [M+Na-Glc]⁺, 641 [M+Na-2Glc]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 25, page 94).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 64, page 277).

**III. 1. 34. Saponoside Cve2**

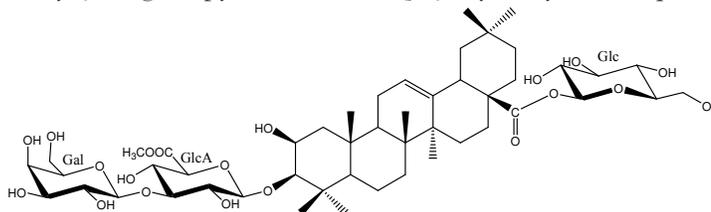
Acide 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate]-2 β -hydroxyoléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₉H₇₈O₂₀

[α]_D + 12° (*c* 0,5, MeOH)

SM :

- **mode positif:** ESI *m/z* : 1009 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1009) *m/z* : 847 [M+Na-(Glc ou Gal)]⁺, 685 [M+Na-Glc-Gal]⁺,
495 [M+Na-Glc-Gal-CH₃-GlcA]⁺
- **mode négatif:** ESI *m/z* : 985 [M-H]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 26, page 95).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 66, page 279).

III. 1. 35. Saponoside Cve4

Acide 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-méthyl- β -D-glucopyranosiduronate]-2 β -hydroxyoléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

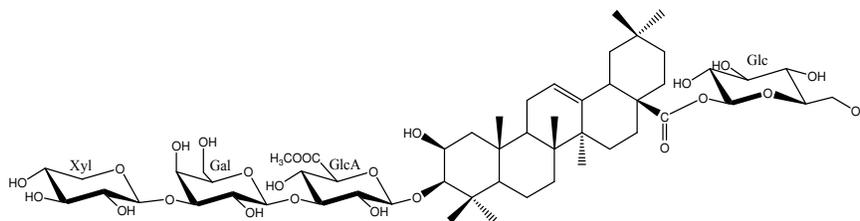
Formule brute : C₅₄H₈₆O₂₄

[α]_D + 17° (c 0,5, MeOH)

SM :

- **mode positif:** ESI *m/z* : 1141 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1141) *m/z* : 979 [M+Na-Glc]⁺, 847 [M+Na-Glc-Xyl]⁺,
685 [M+Na-Glc-Xyl-Gal]⁺

- **mode négatif:** ESI *m/z* : 1117 [M-H]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 27, page 98).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 66, page 279).

III. 1. 36. Saponoside Cve5

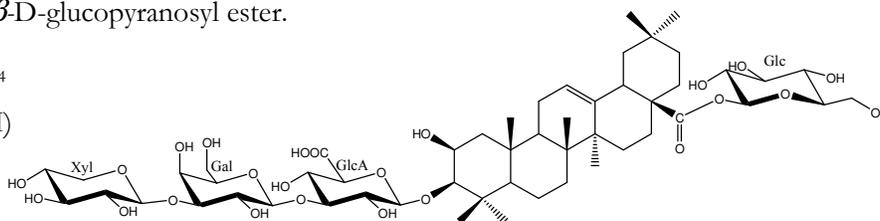
Acide 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique 28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₃H₈₄O₂₄

[α]_D + 17° (c 0,5, MeOH)

SM :

- **mode positif:** ESI *m/z* : 1143 [M+K]⁺
ESI-MS/MS (1143) *m/z* : 981 [M+K-Glc]⁺, 849 [M+K-Glc-Xyl]⁺,
687 [M+K-Glc-Xyl-Gal]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 27, page 98).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 66, page 279).

III. 1. 37. Saponoside Cve6

Acide 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

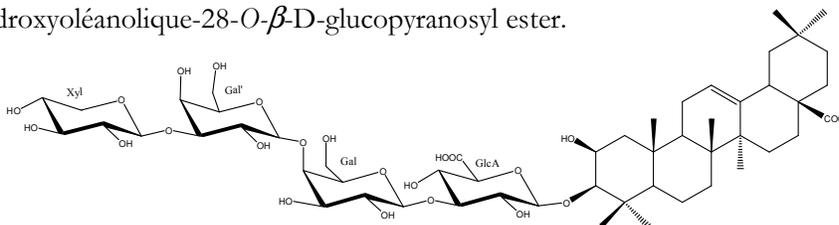
Formule brute : C₅₃H₈₄O₂₄

[α]_D + 5°2 (c 0,29, MeOH)

SM :

- **mode positif:** ESI *m/z* : 1143 [M+K]⁺
ESI-MS/MS (1143) *m/z* : 1011 [M+K-Xyl]⁺, 849 [M+K-Xyl-Gal]⁺,
687 [M+K-Xyl-2xGal]⁺

- **mode négatif:** ESI *m/z* : 1103 [M-H]⁻

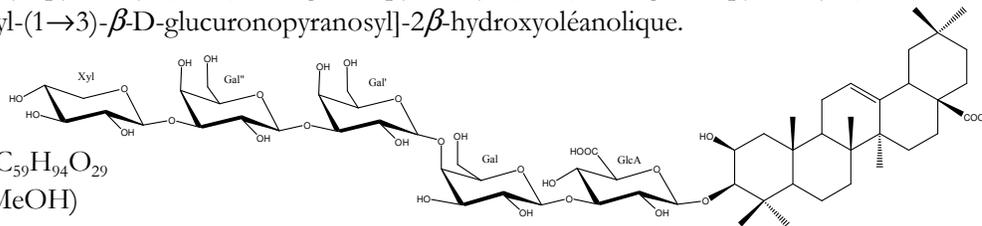


RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 28, page 100).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 67, page 279).

II. 1. 38. Saponoside Cve7

Acide 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique.



Formule brute : C₅₉H₉₄O₂₉

[α]_D +13° (c 1, MeOH)

SM :

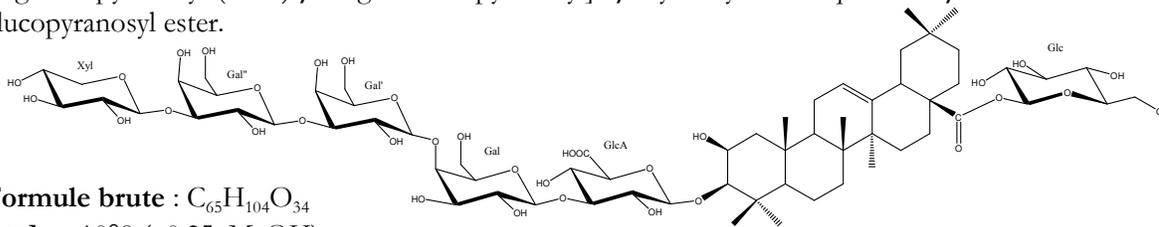
- **mode positif :** ESI *m/z* : 1311 [M-H+2Na]⁺
ESI-MS/MS (1311) *m/z* : 1179 [M-H+2Na-Xyl]⁺, 1017 [M-H+2Na-Xyl-Gal]⁺,
855 [M-H+2Na-Xyl-Gal-Gal]⁺, 693 [M-H+2Na-Xyl-3Gal]⁺
- **mode négatif :** ESI *m/z* : 1265 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1265) *m/z* : 1247 [M-H-H₂O]⁻, 1203 [M-H-H₂O-CO₂]⁻,
1071 [M-H-H₂O-CO₂-Xyl]⁻, 855 [M-H-H₂O-CO₂-Xyl-Gal]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 28, page 100).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 66, page 279).

III. 1. 39. Saponoside Cve8

Acide 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl]-2 β -hydroxyoléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.



Formule brute : C₆₅H₁₀₄O₃₄

[α]_D +10°8 (c 0,25, MeOH)

SM :

- **mode positif :** ESI *m/z* : 1473 [M-H+2Na]⁺
ESI-MS/MS (1473) *m/z* : 1311 [M-H+2Na-Glc]⁺, 1017 [M-H+2Na-Glc-Xyl-Gal]⁺,
855 [M-H+2Na-Glc-Xyl-2Gal]⁺,
693 [M-H+2Na-Glc-Xyl-3Gal]⁺
- **mode négatif :** ESI *m/z* : 1427 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1427) *m/z* : 1265 [M-H-Glc]⁻, 1071 [M-H-Glc-H₂O-CO₂-Xyl]⁻,
908 [M-H-Glc-H₂O-CO₂-Xyl-Gal]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 28, page 100).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 66, page 279).

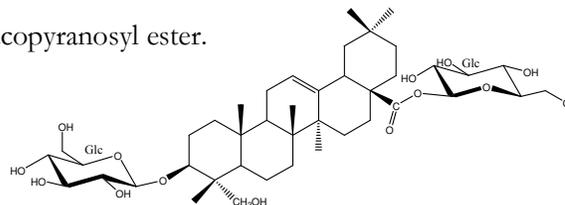
III. 1. 40. Saponoside Cve11

3-O- β -D-glucopyranosyl hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₂H₆₈O₁₄

[α]_D + 14°1 (c 0,33, MeOH)

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 797 [M+H]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 24, page 94).

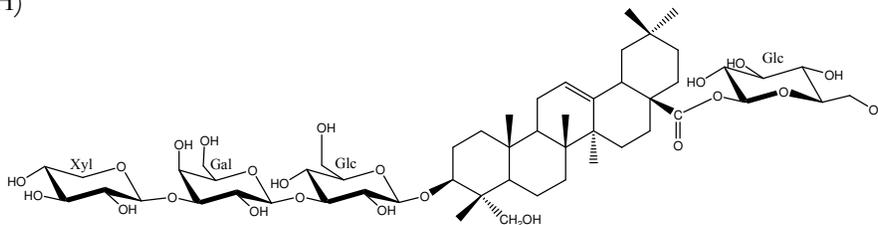
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 69, page 282).

III. 1. 41. Saponoside Cve13

3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₃H₈₆O₂₃

[α]_D +12°7 (*c* 0,83, MeOH)

**SM :**

- *mode positif*: ESI *m/z* : 1113 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1113) *m/z* : 951 [M+Na-Glc]⁺, 819 [M+Na-Glc-Xyl]⁺,
657 [M+Na-Glc-Xyl-Gal]⁺,
495 [M+Na-Glc-Xyl-Gal-Glc]⁺

- *mode négatif*: ESI *m/z* : 1089 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1089) *m/z* : 927 [M-H-Glc]⁻, 795 [M-H-Glc-Xyl]⁻, 633 [M-H-Glc-Xyl-Gal]⁻,
471 [M-H-162-132-2x162]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 31, 104).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 69, page 282).

III. 1. 42. Saponoside Cve14

3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

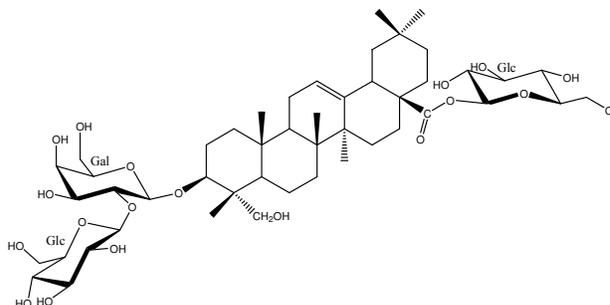
Formule brute : C₄₈H₇₈O₁₉

[α]_D + 20°8 (*c* 1, MeOH)

SM :

- *mode positif*: ESI *m/z* : 997 [M+K]⁺, 981 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (997) *m/z* : 819 [M+Na-Glc]⁺, 775 [M+Na-Glc-CO₂]⁺,
657 [M+Na-Glc-Glc]⁺

- *mode négatif*: ESI *m/z* : 957 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (957) *m/z* : 795 [M-H-Glc]⁻, 633 [M-H-Glc-Glc]⁻, 471 [M-H-Glc-Glc-Gal]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 25, page 94).

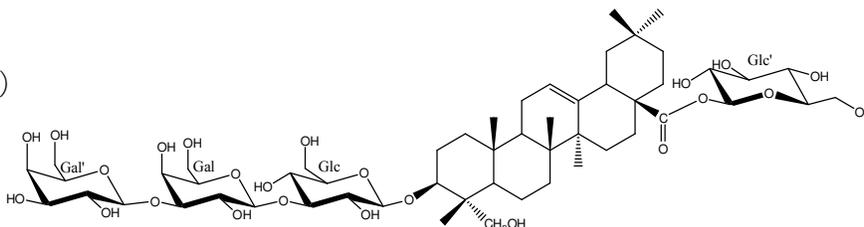
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 69, page 282).

III. 1. 43. Saponoside Cve15

3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₄H₈₈O₂₄

[α]_D +16°3 (c 0,83, MeOH)



SM :

- **mode positif:** ESI *m/z* : 1143 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1143) *m/z* : 981 [M+Na-(Glc ou Gal)]⁺, 819 [M+Na-Glc-Gal]⁺,
657 [M+Na-Glc-2Gal]⁺

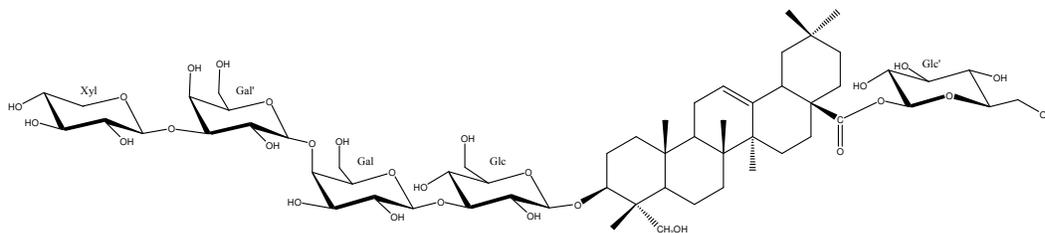
- **mode négatif:** ESI *m/z* : 1119 [M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 33, page 106).

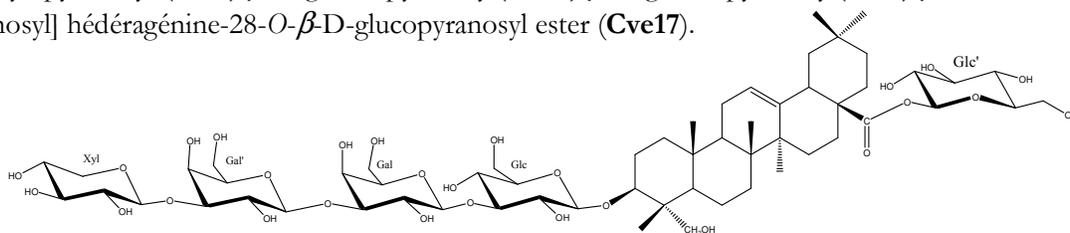
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 69, page 282).

III. 1. 44 Saponosides Cve16 et 17

3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester (**Cve16**).



3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester (**Cve17**).



Formule brute : C₅₉H₉₆O₂₈

SM :

- **mode positif:** ESI *m/z* : 1275 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1275) *m/z* : 1113 [M+Na-Glc]⁺, 981 [M+Na-Glc-Xyl]⁺,
819 [M+Na-Glc-Xyl-Gal]⁺, 775 [M+Na-Glc-Xyl-Gal-CO₂]⁺,
613 [M+Na-Glc-Xyl-Gal-CO₂-Gal]⁺

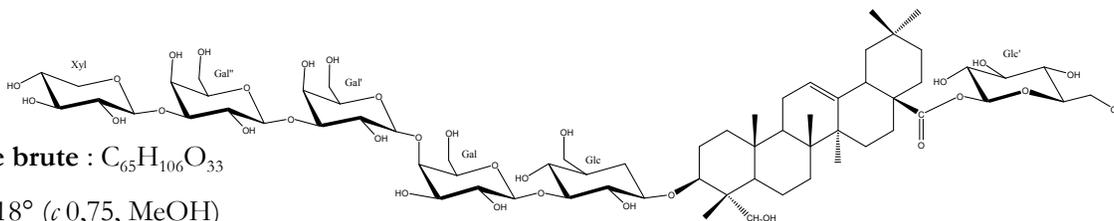
- **mode négatif:** ESI *m/z* : 1251 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1251) *m/z* : 1089 [M-H-Glc]⁻, 957 [M-H-Glc-Xyl]⁻,
795 [M-H-Glc-Xyl-Gal]⁻,
632 [M-H-Glc-Xyl-2Gal]⁻, 471 [M-H-Glc-Xyl-3Gal]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 34, page 108).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 69, page 282).

III. 1. 45. Saponoside Cve18

3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] hédéragénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.



Formule brute : C₆₅H₁₀₆O₃₃

[α]_D +18° (c 0,75, MeOH)

SM :

- **mode positif :** ESI m/z : 1437 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1437) m/z : 1275 [M+Na-Glc]⁺, 981 [M+Na-Glc-Xyl-Gal]⁺,
819 [M+Na-Glc-Xyl-Gal-Gal]⁺
- **mode négatif :** ESI m/z : 1413 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1413) m/z : 1251 [M-H-Glc]⁻, 1119 [M-H-Glc-Xyl]⁻,
957 [M-H-Glc-Xyl-Gal]⁻,
795 [M-H-Glc-Xyl-2Gal]⁻, 633 [M-H-Glc-Xyl-3Gal]⁻,
471 [M-H-Glc-Xyl-3Gal-Glc]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 35, page 121).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 70, page 283).

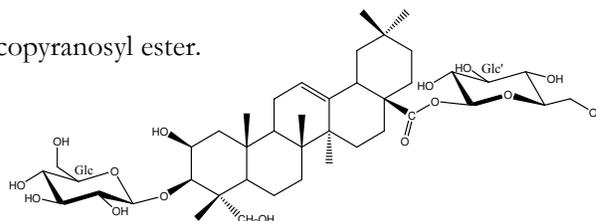
III. 1. 46. Saponoside Cve19

3-O- β -D-glucopyranosyl bayogénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₂H₆₈O₁₅

[α]_D + 18° (c 0,33, MeOH)

SM : ESI (mode positif) m/z : 813 [M+H]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 24, page 94).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 72, page 285).

III. 1. 47 Saponoside Cve22

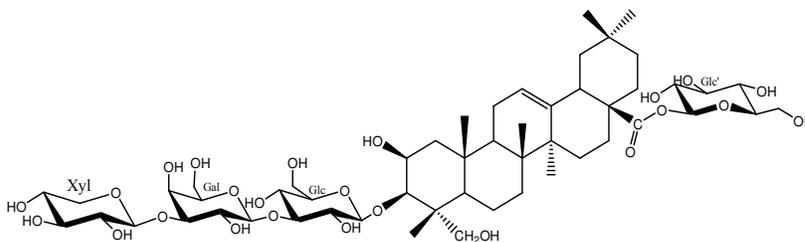
3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₃H₈₆O₂₄

[α]_D +23,7 (c 0,59, MeOH)

SM :

- **mode positif :** ESI m/z : 1129 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1129) m/z : 967 [M+Na-Glc]⁺, 835 [M+Na-Glc-Xyl]⁺,
673 [M+Na-Glc-Xyl-Gal]⁺
- **mode négatif :** ESI m/z : 1105 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1105) m/z : 943[M-H-Glc]⁻, 811 [M-H-Glc-Xyl]⁻, 649 [M-H-Glc-Xyl-Gal]⁻,
487 [M-H-Glc-Xyl-Gal-Glc]⁻



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 31, page 104).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 72, page 285).

III. 1. 48 Saponoside Cve23

3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₄H₈₈O₂₅

[α]_D +23° (*c* 0,5, MeOH)

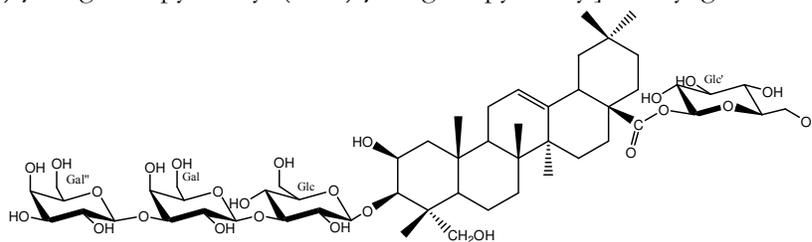
SM :

- **mode positif :** ESI *m/z* : 1159 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1159) *m/z* : 997 [M+Na-Glc]⁺, 835 [M+Na-Glc-Gal]⁺,
673 [M+Na-Glc-2Gal]⁺

- **mode négatif :** ESI *m/z* : 1135 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1135) *m/z* : 973 [M-H-(Glc ou Gal)]⁻, 811 [M-H-Glc-Gal]⁻,
649 [M+Na-Glc-2Gal]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 33, page 106).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 72, page 285).



III. 1. 49. Saponoside Cve24

3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₉H₉₆O₂₉

[α]_D +19°9 (*c* 0,83, MeOH)

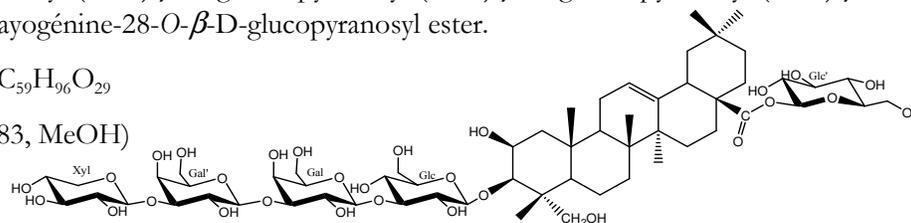
SM :

- **mode positif :** ESI *m/z* : 1291 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1291) *m/z* : 1129 [M+Na-Glc]⁺, 997 [M+Na-Glc-Xyl]⁺,
835 [M+Na-Glc-Xyl-Gal]⁺, 673 [M+Na-Glc-Xyl-2Gal]⁺

- **mode négatif :** ESI *m/z* : 1267 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1267) *m/z* : 1105 [M-H-Glc]⁻, 973 [M-H-Glc-Xyl]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 34, page 108).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 72, page 285).



III. 1. 50. Saponoside Cve25

3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine.

Formule brute : C₅₉H₉₆O₂₉

[α]_D +30° (*c* 0,25, MeOH)

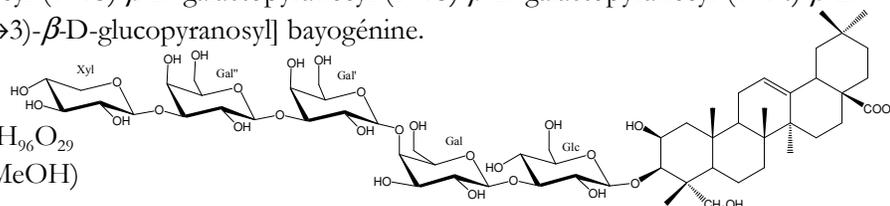
SM :

- **mode positif :** ESI *m/z* : 1291 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1291) *m/z* : 1159 [M+Na-Xyl]⁺, 997 [M+Na-Xyl-Gal]⁺,
835 [M+Na-Xyl-2Gal]⁺, 673 [M+Na-Xyl-3Gal]⁺

- **mode négatif :** ESI *m/z* : 1267 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1267) *m/z* : 1135 [M-H-Xyl]⁻, 973 [M-H-Xyl-Gal]⁻, 811 [M-H-Xyl-2Gal]⁻,
649 [M-H-Xyl-3-Gal]⁻, 487 [M-H-Xyl-3Gal-Glc]⁻

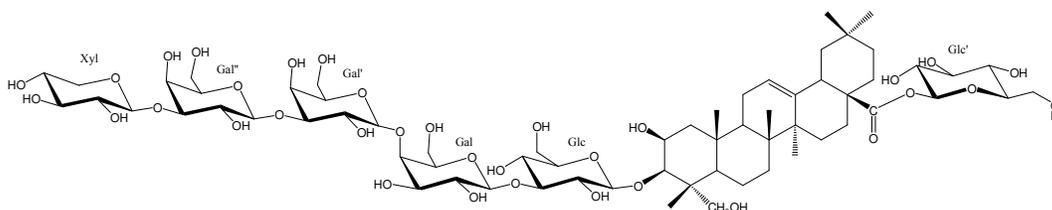
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 35, page 121).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 73, page 286).



III. 1. 51. Saponoside Cve26

3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] bayogénine 28-O- β -D-glucopyranosyl ester.



Formule brute : $C_{65}H_{106}O_{34}$

[α]_D +17°3 (c 0,37, MeOH)

SM :

- **mode positif:** ESI m/z : 1453 [M+Na]⁺
ESI-MS/MS (1453) m/z : 1291 [M+Na-Glc]⁺, 1159 [M+Na-Glc-Xyl]⁺,
997 [M+Na-Glc-Xyl-Gal]⁺, 835 [M+Na-Glc-Xyl-2Gal]⁺
- **mode négatif:** ESI m/z : 1429 [M-H]⁻
ESI-MS/MS (1429) m/z : 1267 [M-H-Glc]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 35, page 121).

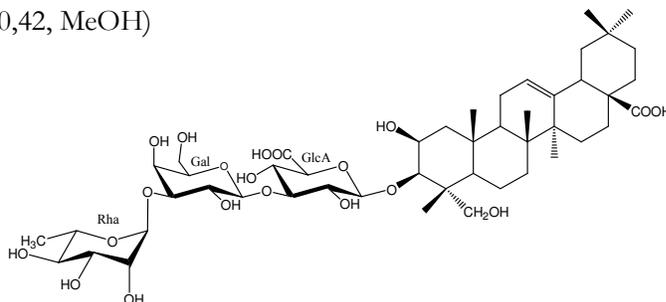
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 73, page 286).

III. 1. 52. Saponoside Cvt9

3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] bayogénine.

Formule brute : $C_{48}H_{76}O_{20}$

[α]_D + 9°6 (c 0,42, MeOH)



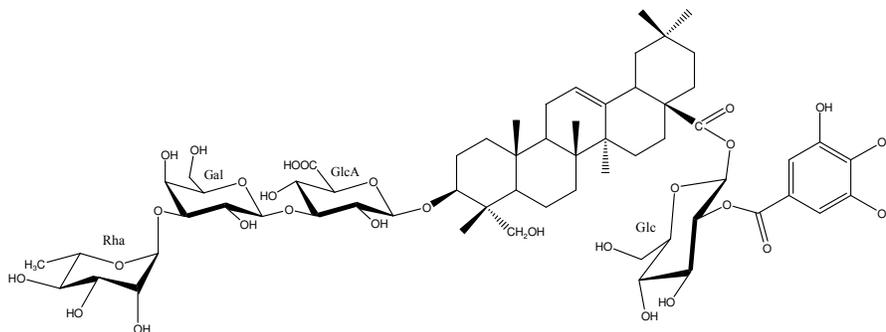
SM : ESI (mode positif) m/z : 995 [M+Na]⁺, 973 [M+H]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 36, page 125).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 73, page 286).

III. 1. 53. Saponoside Cvt10

3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl] hédéragénine-28-O-[2-O-galloyl- β -D- glucopyranosyl] ester.



Formule brute : $C_{61}H_{90}O_{28}$

$[\alpha]_D + 18^\circ$ (c 0,25, MeOH)

SM :

- *mode positif*: ESI m/z : 1315 [M-H+2Na]⁺

- *mode négatif*: ESI m/z : 1269 [M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau 36, page 125).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau 70, page 283).

Tableau 64 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de l'acide oléanolique dans les saponosides Cgp3, Cgp12, Cgp16, Cgp22, Cgp28 et Cve1 dans CD₃OD.

	Cgp3		Cgp12		Cgp16		Cgp22		Cgp28		Cve1	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	0,98 (m)	39,2	1,00 (m)	39,7	1,01 (td, 13,2-3,4)	39,7	1,00 (tm, 14,1)	41,7	0,98 (m)	39,7	1,01 (m)	39,9
1	1,63 (m)		1,63 (m)		1,66 (m)		1,64 (dm, 14,1)		1,63 (m)		1,64 (m)	-
2	1,69 (m)	26,44	1,72 (m)	27,0	1,72 (ddt, 13,7-11,6-4)	27,0	1,70 (m)	27,0	1,69 (m)	27,0	1,72 (m)	27,1
2	1,88 (m)		1,90 (dd, 10,2 -3,8)		1,87 (dq, 13,7 -4)		1,85 (dm, 13,8)		1,88 (m)		1,95 (dt, 13,7-3,9)	-
3	3,21 (dd, 12-4,2)	91,0	3,19 (dd, 11,7-4,4)	91,0	3,20 (dd, 11,8-4,5)	91,3	3,20 (dd, 11,7-4,6)	91,2	3,21 (dd, 12-4,2)	91,2	3,20 (dd, 11,7-5,1)	91,4
4	-	39,8	-	40,2	-	42,0	-	40,2	-	40,2	-	40,4
5	0,76 (m)	56,5	0,82 (dm, 11,9)	57,0	0,82 (d, 11,4)	57,0	0,81 (m)	57,0	0,76 (m)	57,0	0,79 (dm, 11,7)	57,1
6	1,37 (m)	18,9	1,44 (td, 11,9-3,9)	19,3	1,42 (td, 11,7-3,6)	19,3	1,41 (m)	19,2	1,37 (m)	19,3	1,42 (td, 13-3,7)	19,3
6	1,53 (m)		1,59 (m)		1,62 (dm, 11,7)		1,56 (m)		1,53 (m)		1,56 (dm, 13)	-
7	1,31 (m)	33,7	1,33 (dt, 13,6-3,5)	34,0	1,56 (dt, 13,4-3,4)	33,8	1,34 (m)	33,9	1,31 (m)	33,8	1,33 (dm, 13)	34,0
7	1,47 (m)		1,54 (td, 13,6-3,5)		1,77 (td, 13,9-4,2)		1,51 (tm, 12,5)		1,47 (m)		1,50 (tm, 13)	-
8	-	40,0	-	40,6	-	40,6	-	40,8	-	40,6	-	40,7
9	1,56 (m)	49,0	1,62 (m)	49,0	1,62 (m)	49,0	1,60 (m)	49,0	1,56 (m)	49,0	1,60 (m)	49,0
10	-	37,5	-	37,9	-	37,9	-	38,0	-	37,9	-	37,9
11	1,86 (m)	24,2	1,92 (m)	24,5	1,92 (dd, 9-3,6)	24,5	1,92 (m)	25,3	1,86 (m)	24,5	1,92 (m)	24,6
12	5,21 (t, 3,5)	121,8	5,26 (t, 3,6)	123,7	5,26 (t, 3,6)	123,7	5,27 (t, 3,6)	123,8	5,26 (t, 3,6)	123,6	5,27 (t, 3,5)	123,8
13	-	146,3	-	145,1	-	145,1	-	145	-	145,3	-	144,8
14	-	42,6	-	42,9	-	42,9	-	42,9	-	42,9	-	42,9
15	0,98 (m)	28,6	1,10 (dm, 13,9)	28,8	1,10 (dt, 14,1-3,4)	28,8	1,10 (dm, 13,8)	28,9	1,10 (dm, 13,9)	28,9	1,10 (m)	28,9
15	1,86 (m)		1,79 (td, 13,9-4,3)		1,79 (td, 14,1-4,5)		1,80 (tm, 13,8)		1,79 (td, 13,9-4,3)		1,82 (td, 13,6-3,5)	-
16	1,57 (m)	24,2	1,63 (m)	24	1,64 (dt, 13,5-3,3)	24,1	1,74 (m)	24,5	1,63 (m)	24,1	1,74 (m)	24,0
16	1,87 (m)		2,04 (td, 13,4-3,9)		2,04 (td, 13,5-3,9)		2,08 (td, 13,2-3,6)		2,04 (td, 13,4-3,9)		2,07 (td, 13,6-3,5)	-
17	-	48	-	47,6	-	47,6	-	48,0	-	47,7	-	48,0
18	2,88 (dd, 14-4)	43,0	2,87 (dd, 13,5-4,9)	42,7	2,87 (dd, 13,7-4,1)	42,7	2,87 (dd, 14-4)	42,6	2,87 (dd, 13,5-4,9)	42,8	2,87 (dd, 13,4-4,1)	42,6
19	0,99 (dm, 14)	47,7	1,15(ddd,13,7-4,9-2,2)	47,2	1,15 (ddd,13,7-4,6-3)	47,2	1,17 (m)	47,1	1,15(ddd,13,7-4,9-2,2)	47,3	1,17 (m)	47,2
19	1,62 (t, 14)		1,72 (t, 13,7)		1,71 (t, 13)		1,73 (t, 13,6)		1,72 (t, 13,7)		1,73 (t, 13,6)	-
20	-	31,5	-	31,6	-	31,6	-	31,5	-	31,6	-	31,5
21	1,12 (m)	35,1	1,23 (ddd, 13,4-4-2,5)	34,9	1,23 (dm, 13)	34,9	1,24 (dm, 13,6)	35,0	1,23 (ddd, 13,4-4-2,5)	34,9	1,23 (dm, 13,3)	34,9
21	1,32 (m)		1,42 (td, 13,4-3,9)		1,42 (td, 13-3,6)		1,45 (tm, 13,5)		1,42 (td, 13,4-3,9)		1,42 (tm, 13,3)	-
22	1,50 (m)	33,9	1,56 (dm, 13,6)	33,8	1,33 (dt, 12,5-3)	34,0	1,64 (dm, 14,1)	33,0	1,56 (dm, 13,6)	34,0	1,63 (m)	33,1
22	1,69 (m)		1,77 (td, 13,6-4,3)		1,55 (td, 12,5-3,6)		1,75 (m)		1,77 (td, 13,6-4,3)		1,75 (m)	-
23	1,05 (s)	28,3	1,08 (s)	28,5	1,08 (s)	28,5	1,07 (s)	28,4	1,08 (s)	28,4	1,10 (s)	28,5
24	0,83 (s)	16,9	0,88 (s)	17,0	0,87 (s)	17,0	0,86 (s)	17,0	0,86 (s)	17,0	0,87 (s)	16,9
25	0,93 (s)	15,8	0,98 (s)	15,9	0,97 (s)	15,9	0,97 (s)	16,0	0,97 (s)	15,9	0,97 (s)	16,0
26	0,84 (s)	17,8	0,83 (s)	17,7	0,83 (s)	17,7	0,82 (s)	17,7	0,82 (s)	17,7	0,82 (s)	17,7
27	1,13 (s)	26,4	1,19 (s)	26,4	1,19 (s)	26,5	1,18 (s)	26,3	1,19 (s)	26,4	1,17 (s)	26,3
28	-	179,9	-	182,0	-	181,8	-	178,0	-	182,0	-	178,1
29	0,88 (s)	33,8	0,93 (s)	33,6	0,93 (s)	33,6	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,6	0,93 (s)	33,5
30	0,99 (s)	24,2	0,97 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0	0,95 (s)	23,9	0,97 (s)	24,0	0,95 (s)	24,0

Tableau 65 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de l'acide 2β-hydroxyoléanolique dans les saponosides Cgp13, Cgp20, Cgp23 = Cve3, Cgp26 et Cgp29 dans CD₃OD et Cgp17 dans DMSO-*d*₆.

	Cgp13		Cgp17		Cgp20		Cgp23= Cve3		Cgp26		Cgp29	
	δ _H , (m, J Hz)	δ	δ _H , (m, J Hz)	δ	δ _H , (m, J Hz)	δ	δ _H , (m, J Hz)	δ	δ _H , (m, J Hz)	δ	δ _H , (m, J Hz)	δ
1	1,20 (<i>dd</i> , 14-3,3)	44,5	1,06 (<i>m</i>)	44,8	1,21 (<i>dm</i> , 12,5)	44,5	1,20 (<i>dm</i> , 14,3)	44,7	1,20 (<i>dd</i> , 14-3,3)	44,5	1,21 (<i>dm</i> , 12,5)	43,1
1	2,07 (<i>dd</i> , 14-3,3)		1,88 (<i>dm</i> , 13,9)		2,07 (<i>dm</i> , 12,5)		2,07 (<i>dd</i> , 14,3-3,7)		2,07 (<i>dd</i> , 14-3,3)		2,07 (<i>dm</i> , 12,5)	
2	4,22 (<i>q</i> , 3,3)	71,2	4,08 (<i>d</i> , 3,7)	69,6	4,22 (<i>m</i>)	70,9	4,21 (<i>q</i> , 3,7)	71,3	4,22 (<i>q</i> , 3,3)	71,2	4,22 (<i>m</i>)	69,9
2	-		-		-		-		-		-	
3	3,20 (<i>d</i> , 3,7)	91,1	3,04 (<i>d</i> , 2,2)	90,0	3,22 (<i>d</i> , 3,3)	91,2	3,22 (<i>d</i> , 3,7)	91,2	3,20 (<i>d</i> , 3,7)	91,0	3,22 (<i>d</i> , 3,7)	89,6
4	-	39,4	-	39,3	-	39,4	-	39,5	-	39,5	-	38,0
5	0,92 (<i>m</i>)	57,0	0,79 (<i>m</i>)	52,0	0,92 (<i>dd</i> , 7-2)	57,0	0,91 (<i>m</i>)	57,1	0,92 (<i>m</i>)	57,0	0,91 (<i>m</i>)	55,5
6	1,54 (<i>m</i>)	19,1	1,49 (<i>m</i>)	19,2	1,55 (<i>m</i>)	19,1	1,53 (<i>m</i>)	19,1	1,54 (<i>m</i>)	19,2	1,53 (<i>m</i>)	17,6
6	1,62 (<i>m</i>)				1,62 (<i>m</i>)		1,59 (<i>dm</i> , 8,3)		1,62 (<i>m</i>)		1,59 (<i>dm</i> , 8,3)	
7	1,54 (<i>m</i>)	34,0	1,23 (<i>m</i>)	34,0	1,55 (<i>m</i>)	34,0	1,35 (<i>dm</i> , 9,9)	34,0	1,54 (<i>m</i>)	34,0	1,35 (<i>dm</i> , 9,9)	32,2
7	1,34 (<i>dq</i> , 9,8-2,1)		1,40 (<i>m</i>)		1,34 (<i>m</i>)		1,53 (<i>m</i>)		1,34 (<i>dq</i> , 9,8-2,1)		1,53 (<i>m</i>)	
8	-	40,6	-	40,3	-	40,7	-	40,8	-	40,6	-	39,2
9	1,56 (<i>m</i>)	49,3	1,41 (<i>m</i>)	49,0	1,56 (<i>m</i>)	49,3	1,56 (<i>m</i>)	49,2	1,56 (<i>m</i>)	49,2	1,56 (<i>m</i>)	49,0
10	-	37,7	-	37,7	-	37,7	-	37,7	-	37,7	-	36,2
11	1,96 (<i>tdd</i> , 13,6-6,2-4,3)	24,5	1,82 (<i>m</i>)	24,5	1,93 (<i>m</i>)	24,1	1,93 (<i>m</i>)	24,7	1,96 (<i>tdd</i> , 13,6-6,2-4,3)	24,6	1,93 (<i>m</i>)	23,2
11	2,02 (<i>m</i>)		2,02 (<i>m</i>)		1,98 (<i>m</i>)		2,01 (<i>m</i>)		2,02 (<i>m</i>)		2,01 (<i>m</i>)	
12	5,28 (<i>t</i> , 3,6)	123,9	5,12 (<i>sl</i> , w _{1/2} = 8,3)	123,0	5,28 (<i>t</i> , 3,4)	124,0	5,28 (<i>t</i> , 3,8)	123,9	5,12 (<i>sl</i> , w _{1/2} = 8,3)	123,6	5,28 (<i>t</i> , 3,8)	122,2
13	-	145,2	-	146,0	-	145,2	-	144,9	-	145,4	-	143,8
14	-	43,0	-	43,0	-	43,0	-	43,1	-	43,1	-	41,6
15	1,10 (<i>dm</i> , 14,2)	28,7	0,91 (<i>dm</i> , 11,7)	28,8	1,09 (<i>m</i>)	28,9	1,09 (<i>m</i>)	28,9	0,91 (<i>dm</i> , 11,7)	28,9	1,09 (<i>m</i>)	27,3
15	1,80 (<i>td</i> , 14,3-4,4)		1,71 (<i>tm</i> , 11,7)		1,80 (<i>td</i> , 14,1-4,1)		1,82 (<i>td</i> , 13,9-4,8)		1,71 (<i>tm</i> , 11,7)		1,82 (<i>td</i> , 13,9-4,8)	
16	1,62 (<i>m</i>)	24,0	1,49 (<i>m</i>)	23,6	1,62 (<i>m</i>)	24,8	1,74 (<i>dm</i> , 13,4)	24,0	1,49 (<i>m</i>)	24,1	1,74 (<i>dm</i> , 13,4)	22,5
16	2,03 (<i>td</i> , 13,6-4)		1,77 (<i>m</i>)		2,03 (<i>td</i> , 14-4)		2,07 (<i>td</i> , 13,4-4)		1,77 (<i>m</i>)		2,05 (<i>td</i> , 13,4-4)	
17	-	47,6	-	47,2	-	47,6	-	48,0	-	47,8	-	46,2
18	2,87 (<i>ddm</i> , 14-3)	42,7	2,87 (<i>dd</i> , 13,4-3)	42,6	2,87 (<i>dd</i> , 14-3)	42,7	2,88 (<i>dd</i> , 14-4,9)	42,6	2,87 (<i>dd</i> , 13,4-3)	42,9	2,88 (<i>dd</i> , 14-4,9)	41,3
19	1,15 (<i>ddd</i> , 13,6-4,8-2,5)	47,2	1,02 (<i>dm</i> , 13,4)	47,7	1,15 (<i>ddd</i> , 13,5-4,1-2,2)	47,2	1,17 (<i>m</i>)	47,2	1,02 (<i>dm</i> , 13,4)	47,3	1,15 (<i>m</i>)	45,8
19	1,71 (<i>t</i> , 13,8)		1,56 (<i>t</i> , 13,4)		1,71 (<i>t</i> , 13,9)		1,73 (<i>t</i> , 13,4)		1,56 (<i>t</i> , 13,4)		1,71 (<i>t</i> , 13,4)	
20	-	31,6	-	31,9	-	31,6	-	31,5	-	31,6	-	30,2
21	1,23 (<i>dm</i> , 13,9)	34,9	1,09 (<i>m</i>)	35,2	1,23 (<i>dm</i> , 14)	34,9	1,24 (<i>dm</i> , 13,8)	34,9	1,09 (<i>m</i>)	35,0	1,24 (<i>dm</i> , 13,8)	33,5
21	1,42 (<i>td</i> , 13,9-4,2)		1,27 (<i>tm</i> , 13,2)		1,42 (<i>td</i> , 14-4)		1,43 (<i>td</i> , 13,8-3,5)		1,27 (<i>tm</i> , 13,2)		1,432 (<i>td</i> , 13,8-3,5)	
22	1,56 (<i>m</i>)	33,8	1,40 (<i>m</i>)	34,0	1,56 (<i>m</i>)	33,6	1,64 (<i>dt</i> , 14-3,6)	33,2	1,40 (<i>m</i>)	33,9	1,64 (<i>dt</i> , 14-3,6)	32,4
22	1,77 (<i>td</i> , 13,8-3,4)		1,60 (<i>tm</i> , 13,2)		1,77 (<i>td</i> , 13,9-4)		1,75 (<i>dt</i> , 14-4)		1,60 (<i>tm</i> , 13,2)		1,70 (<i>dt</i> , 14-4)	
23	1,10	29,9	0,99 (<i>s</i>)	30,6	1,10 (<i>s</i>)	29,9	1,09 (<i>s</i>)	29,8	0,99 (<i>s</i>)	29,9	1,05 (<i>s</i>)	28,4
24	1,10 (<i>s</i>)	18,5	0,97 (<i>s</i>)	19,5	1,10 (<i>s</i>)	18,6	1,09 (<i>s</i>)	18,5	1,10 (<i>s</i>)	18,5	1,10 (<i>s</i>)	17,1
25	1,27 (<i>s</i>)	16,8	1,16 (<i>s</i>)	17,2	1,10 (<i>s</i>)	16,8	1,27 (<i>s</i>)	16,9	1,10 (<i>s</i>)	16,8	1,27 (<i>s</i>)	15,4
26	0,85 (<i>s</i>)	17,8	0,74 (<i>s</i>)	18,7	1,27 (<i>s</i>)	17,8	0,83 (<i>s</i>)	17,8	1,27 (<i>s</i>)	17,8	0,85 (<i>s</i>)	16,4
27	1,18 (<i>s</i>)	26,4	1,06 (<i>s</i>)	27,0	0,85 (<i>s</i>)	26,4	1,18 (<i>s</i>)	26,3	0,85 (<i>s</i>)	26,4	1,18 (<i>s</i>)	25,1
28	-	181,9	-	179,7	-	181,9	-	178,0	-	181,8	-	181,0
29	0,93 (<i>s</i>)	33,4	0,84 (<i>s</i>)	34,4	0,93 (<i>s</i>)	33,6	0,93 (<i>s</i>)	33,5	0,93 (<i>s</i>)	33,6	0,93 (<i>s</i>)	32,1
30	0,97 (<i>s</i>)	24,0	0,80 (<i>s</i>)	24,9	0,97 (<i>s</i>)	24,0	0,96 (<i>s</i>)	24,0	0,97 (<i>s</i>)	24,0	0,97 (<i>s</i>)	22,5

Tableau 66 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) l'acide 2β-hydroxyoléanolique dans les saponosides Cve2, Cve3, Cve4, Cve5, Cve6, Cve7 et Cve8 dans CD₃OD.

	Cve2		Cve4		Cve5		Cve6		Cve7		Cve8	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C										
1	1,20 (m)	44,6	1,20 (m)	44,5	1,20 (m)	44,5	1,20 (m)	44,5	1,19 (m)	44,6	1,20 (m)	44,6
1	2,07 (m)	-	2,06 (m)	-	2,07 (m)	-	2,06 (m)	-	2,05 (m)	-	2,06 (m)	-
2	4,21 (q, 3,2)	71,3	4,21 (m)	71,1	4,21 (q, 3,2)	71,3	4,21 (m)	71,2	4,26 (q, 3,5)	70,9	4,22 (q, 2,6)	71,1
2	3,21 (d, 3)	-	3,21 (d, 4,2)	91,1	3,21 (d, 3)	91,2	3,21 (d, 4,2)	91,2	3,20 (d, 3,6)	91,1	3,21 (d, 3)	91,2
3	-	91,1	-	39,5	-	39,5	-	39,5	-	39,5	-	39,5
4	0,91 (m)	39,5	0,91 (m)	57,0	0,91 (m)	57,0	0,91 (m)	56,9	0,92 (m)	57,1	0,91 (m)	57,1
5	1,52 (m)	57,0	1,54 (m)	19,1	1,52 (m)	19,1	1,54 (m)	19,1	1,54 (m)	19,1	1,52 (m)	19,1
6	1,59 (m)	19,1	1,61 (m)	-	1,59 (m)	-	1,61 (m)	-	1,61 (m)	-	1,59 (m)	-
6	1,34 (m, 10,2)	-	1,33 (m)	33,9	1,34 (m, 10,2)	33,9	1,33 (m)	34,1	1,34 (m)	34,1	1,34 (m)	33,7
7	1,52 (m)	34,0	1,54 (m)	-	1,52 (m)	-	1,54 (m)	-	1,54	-	1,53 (m)	-
7	-	-	-	40,8	-	40,8	-	40,7	-	40,7	-	40,8
8	1,55 (m)	40,8	1,57 (m)	49,5	1,55 (m)	49,5	1,57 (m)	49,0	1,56 (m)	49,0	1,55 (m)	49,0
9	-	49,2	-	37,7	-	37,7	-	37,7	-	37,7	-	37,8
10	1,93 (m)	37,7	1,95 (m)	24,7	1,93 (m)	24,7	1,95 (m)	24,6	1,93 (dm, 17)	24,6	1,93 (m)	24,8
11	2,00 (m)	24,7	2,01 (m)	-	2,00 (m)	-	2,01 (m)	-	2,00 (m)	-	2,01 (m)	-
12	5,29 (t, 3,6)	123,9	5,27 (t, 43,5)	123,9	5,29 (t, 3,6)	123,9	5,27 (t, 43,5)	123,8	5,28 (t, 3,6)	123,8	5,29 (t, 3,5)	123,8
13	-	144,9	-	144,9	-	144,9	-	145,2	-	145,2	-	145,2
14	-	43,1	-	43,1	-	43,1	-	43,0	-	43,0	-	43,1
15	1,11 (m)	28,9	1,09 (m)	28,8	1,11 (m)	28,8	1,09 (m)	28,7	1,09 (m)	28,8	1,09 (m)	28,9
15	1,81 (td, 14-4,0)	-	1,79	-	1,81 (td, 14-4,0)	-	1,79	-	1,80 (td, 13,3-4,5)	-	1,81 (m)	-
16	1,74 (m)	24,0	1,61 (m)	24,0	1,74 (m)	24,0	1,61 (m)	24,0	1,61 (m)	24,1	1,74 (m)	23,8
16	2,07 (td, 11,3-3,9)	-	2,03	-	2,07 (td, 11,3-3,9)	-	2,03	-	2,04 (td, 14,5-4,1)	-	2,07 (m)	-
17	-	48,0	-	48,0	-	48,0	-	47,6	-	47,7	-	48,0
18	2,87 (dd, 13,9-4,2)	42,6	2,87 (dd, 14-4,5)	42,6	2,87 (dd, 13,9-4,2)	42,6	2,87 (dd, 14-4,5)	42,7	2,87 (dd, 14,6-4,6)	42,8	2,87 (dd, 13,2-4,2)	42,7
19	1,17 (m)	47,2	1,14 (m)	47,2	1,17 (m)	47,2	1,14 (m)	47,2	1,15	47,2	1,16 (m)	47,2
19	1,73 (t, 13,3)	-	1,71 (t, 14)	-	1,73 (t, 13,3)	-	1,71 (t, 14)	-	1,71 (t, 13,5)	-	1,73 (t, 13,2)	-
20	-	31,5	-	31,5	-	31,5	-	31,6	-	31,6	-	31,5
21	1,23 (m)	34,9	1,23 (dm, 12)	34,9	1,23 (m)	34,9	1,23 (dm, 12)	34,9	1,22 (dm, 13,5)	34,9	1,23 (m)	34,9
21	1,42 (td, 13,7-3,6)	-	1,41 (td, 13-4)	-	1,42 (td, 13,7-3,6)	-	1,41 (td, 13-4)	-	1,41 (dt, 13,5-3,8)	-	1,42 (m)	-
22	1,63 (dt, 13,7-3,0)	33,2	1,56 (m)	33,1	1,63 (dt, 13,7-3,0)	33,1	1,56 (m)	33,8	1,54	33,9	1,63 (dm, 13,6)	33,3
22	1,75 (m)	-	1,74 (tm, 14)	-	1,75 (m)	-	1,74 (tm, 14)	-	1,77 (td, 14,8-4,4)	-	1,75 (m)	-
23	1,09 (s)	29,8	1,09 (s)	26,3	1,09 (s)	29,8	1,09 (s)	29,8	1,09 (s)	29,9	1,09 (s)	29,9
24	1,09 (s)	18,5	1,09 (s)	18,6	1,09 (s)	18,9						
25	1,26 (s)	16,9	1,26 (s)	16,9	1,26 (s)	16,9	1,26 (s)	16,8	1,26 (s)	16,8	1,27 (s)	16,8
26	0,83 (s)	17,8	0,84 (s)	17,8	0,83 (s)	17,8						
27	1,20 (m)	26,3	1,18 (s)	26,3	1,20 (m)	44,5	1,18 (s)	26,4	1,18 (s)	26,5	1,18 (s)	26,3
28	2,07 (m)	178,0	-	178,1	2,07 (m)	-	-	180,7	-	182,0	-	178,0
29	4,21 (q, 3,2)	33,5	0,93 (s)	33,5	4,21 (q, 3,2)	71,3	0,93 (s)	33,6	0,93 (s)	33,6	0,93 (s)	33,5
30	3,21 (d, 3)	24,0	0,96 (s)	24,0	3,21 (d, 3)	91,2	0,96 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0

Tableau 67 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de l'hédéragénine dans les saponosides Cgp1 = Cve9, Cgp4 = Cve10, Cgp8 et Cgp10 dans CD₃OD, et Cgp14 = Cvt6 et Cgp18 = Cvt7 dans DMSO-*d*₆.

	Cgp1 = Cve9		Cgp4 = Cve10		Cgp8		Cgp10		Cgp14 = Cvt6		Cgp18 = Cvt7	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}										
1	0,97 (m)	39,3	1,00 (m)	39,3	0,99 (m)	39,5	1,02 (m)	39,5	0,83 (m)	39,6	0,86 (m)	39,5
1	1,62 (m)	-	1,63 (m)	-	1,63 (m)	-	1,64 (m)	-	1,47 (m)	-	1,49 (m)	-
2	1,74 (m)	25,6	1,77 (m)	25,2	1,77 (td, 14-4)	26,4	1,78 (m)	26,3	1,56 (m)	26,5	1,59 (m)	26,4
2	1,91 (d, 11)	-	1,94 (dq, 13,5-4,4)	-	1,95 (m)	-	1,96 (dq, 14,1-3,8)	-	1,78 (m)	-	1,78 (m)	-
3	3,63 (dd, 11-2,7)	84,8	3,67 (dd, 8,5-4,7)	83,7	3,65 (m)	83,6	3,67 (dd, 12,2-4)	83,5	3,54 (dd, 11,7-4)	79,3	3,58 (dd 13,3-4)	79,6
4		43,2		43,7		43,9		43,9		43,9		43,8
5	1,20 (m)	47,9	1,24 (dm, 11,9)	48,2	1,24 (dm, 11,5)	48,3	1,25 (dd, 11,5-2)	48,2	1,16 (m)	47,6	1,20 (m)	47,5
6	1,37 (m)	18,5	1,39 (dm, 12,9)	18,8	1,40 (m)	19,0	1,50 (dm, 12,9)	18,8	1,20 (m)	18,9	1,21 (m)	18,7
6	1,48 (dm, 12,4)	-	1,52 (dm, 12,9)	-	1,49 (m)	-	1,40 (m)	-	1,41 (m)	-	1,43 (m)	-
7	1,27 (m)	32,9	1,29 (m)	33,3	1,31 (m)	33,7	1,64 (m)	33,3	1,16 (m)	33,6	1,44 (m)	33,6
7	1,57 (m)	-	1,63 (m)	-	1,62	-	1,75 (td, 13,5-3,7)	-	1,43 (m)	-	1,18 (m)	-
8		39,9		40,4		40,6		40,7		40,6		40,4
9	1,63 (m)	48,3	1,65 (m)	48,8	1,64 (m)	49,4	1,64 (m)	49,0	1,49 (m)	48,7	1,53 (m)	48,6
10		37,2		37,6		37,7		37,7		37,6		37,5
11	1,89 (m)	24,1	1,92 (m)	24,5	1,91 (m)	24,6	1,92 (m)	24,5	1,79 (m)	24,6	1,81 (m)	24,4
12	5,25 (t, 3,6)	122,9	5,26 (t, 3,6)	123,4	5,27 (t, 3,3)	122,3	5,27 (t, 3,7)	123,8	5,13 (t, 3,5)	123,1	5,16 (t, 3,5)	123,0
13		144,6		145,2		146,0		144,9		145,5		145,4
14		40,3		42,9		43,1		43,0		42,9		42,8
15	1,08 (dm, 13,3)	28,3	1,09 (dt, 13,5-4)	28,7	1,00 (m)	29,3	1,10 (dt, 13,8-2,3)	28,9	0,97 (dm, 13,4)	28,8	0,99 (m)	28,7
15	1,74 (td, 13,6-4,4)	-	1,78 (td, 13,5-4)	-	1,91 (m)	-	1,81 (td, 14,2-3,5)	-	1,63 (dm, 13)	-	1,67 (m)	-
16	1,61 (m)	23,6	1,61 (dm, 13)	24,0	1,62 (m)	24,6	1,76 (m)	24,0	1,47 (tm, 13)	24,2	1,49 (m)	24,1
16	1,98 (td, 13,5-3,9)	-	2,02 (td, 13,5-4)	-	1,88 (m)	-	2,08 (td, 13,1-3,4)	-	1,89 (dm, 13,2)	-	1,90 (m)	-
17		47,1		47,6		49,0		48,0		47,1		47,0
18	2,83 (dd, 13-3,7)	43,0	2,86 (dd, 13,7-4,2)	42,6	2,93 (dd, 13,6-3,2)	42,6	2,88 (dd, 13,1-3,4)	42,6	2,73 (dd, 13, 2-3,3)	42,4	2,76 (dd, 12,1-3)	42,4
19	1,15 (dm, 13,8)	46,6	1,15 (t, 13,7)	47,2	1,00 (dm, 13,7)	48,3	1,74 (t, 13,5)	47,2	1,59 (t, 13,2)	47,7	1,61 (m)	47,2
19	1,67 (t, 13,8)	-	1,7 (ddd, 13,7-4,6-2,2)	-	1,67 (t, 14)	-	1,24 (m)	-	1,12 (m)	-	1,13 (m)	-
20		31,2		31,5		31,8		31,5		32,0		31,8
21	1,20 (m)	33,2	1,41 (td, 13,5-3,3)	34,9	1,15 (m)	35,2	1,42 (m)	34,9	1,29 (m)	34,9	1,32 (m)	34,8
21	1,37 (m)	-	1,22 (m)	-	1,37 (m)	-	1,30 (td, 13,6-3,6)	-	1,44 (m)	-	1,43 (m)	-
22	1,54 (m)	33,2	1,76 (td, 13,5-3,3)	33,7	1,52 (dm, 13,7)	34,4	1,62 (m)	33,1	1,59 (m)	33,8	1,61 (m)	33,5
22	1,74 (dm, 11)	-	1,55 (dt, 13,5-3,3)	-	1,76 (td, 13,7-4,1)	-	1,74 (dm, 11)	-	1,55 (dt, 13,5-3,3)	-	1,76 (td, 13,7-4,1)	-
23	3,31 (d, 12,5)	65,1	3,65 (d, 11,4)	65,1	3,31 (d, 11,1)	65,0	3,30 (d, 11,3)	65,0	3,02 (d, 11,2)	64,2	3,04 (d, 10,5)	63,9
23	3,61 (d, 12,5)	-	3,31 (d, 11,4)	-	3,63 (d, 11,1)	-	3,66 (d, 11,8)	-	3,43 (d, 11,2)	-	3,48 (d, 11,1)	-
24	0,73 (s)	13,1	0,73 (s)	13,4	0,73 (s)	13,4	1,01 (s)	13,4	0,55 (s)	14,6	0,57 (s)	14,3
25	0,96 (s)	16,3	1,00 (s)	16,4	1,00 (s)	16,5	0,82 (s)	16,5	0,87 (s)	17,2	0,89 (s)	17,0
26	0,80 (s)	17,4	0,83 (s)	17,7	0,92 (s)	18,3	1,19 (s)	17,8	0,70 (s)	18,5	0,73 (s)	18,4
27	1,16 (s)	26,3	1,19 (s)	26,5	1,17 (s)	26,6	0,93 (s)	26,3	1,08 (s)	27,2	1,10 (s)	27,0
28		181,1		182,2		168		178,1		nd		nd
29	0,90 (s)	33,4	0,92 (s)	33,9	0,90 (s)	34,0	0,96 (s)	33,5	0,86 (s)	34,4	0,87 (s)	33,5
30	0,93 (s)	23,9	0,96 (s)	24,0	0,98 (s)	24,4	0,96 (s)	24,0	0,86 (s)	25,0	0,87 (s)	24,0

Tableau 68 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de l'hédéragénine dans les saponosides Cgp21, Cgp24, Cgp27, Cgp30, Cgt10 = Cvt8 et Cgt11 = Cvt11 dans CD₃OD.

	Cgp21		Cgp24		Cgp27		Cgp30		Cgt10 = Cvt8		Cgt11 = Cvt11	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}										
1	0,99 (m)	39,5	0,99 (m)	39,6	0,97 (m)	39,4	1,02 (m)	39,5	0,99 (m)	39,5	0,99 (m)	39,6
1	1,63 (m)		1,62 (m)		1,62 (m)		1,64 (m)		1,63 (m)		1,62 (m)	
2	1,77 (m)	26,4	1,77 (m)	26,2	1,75 (m)	26,4	1,78 (m)	26,4	1,77 (m)	26,4	1,77 (m)	26,2
2	1,89 (ddd, 13,4-2,9-1,3)		1,97 (m)		1,84 (dq, 13,9-4,2)		1,96 (dq, 14,1-3,8)		1,89 (ddd, 13,4-2,9-1,3)		1,97 (m)	
3	3,68 (dd, 9,7-3,3)	83,2	3,70 (dd, 1-2,7)	82,2	3,64 (dd, 11,8-5)	83,4	3,67 (dd, 12,2-4)	83,5	3,68 (dd, 9,7-3,3)	83,2	3,70 (dd, 1-2,7)	82,2
4	-	43,9	-	43,9	-	43,9	-	43,9	-	43,9	-	43,9
5	1,27 (dd, 11,7-2,6)	48,1	1,26 (m)	48,2	1,26 (dm, 13)	48,0	1,25 (dd, 11,5-2)	48,1	1,27 (dd, 11,7-2,6)	48,1	1,26 (m)	48,2
6	1,40 (m)	18,9	1,37	18,9	1,41 (m)	18,8	1,50 (dm, 12,9)	18,8	1,40 (m)	18,9	1,37	18,9
6	1,52 (m)		1,50 (dm, 12,8)		1,51 (dm, 13)		1,40 (m)		1,52 (m)		1,50 (dm, 12,8)	
7	1,29 (dm, 11,7)	33,5	1,29 (m)	33,4	1,29 (dm, 9,6)	33,4	1,64 (m)	33,5	1,29 (dm, 11,7)	33,5	1,29 (m)	33,4
7	1,65 (m, 11,7)		1,62 (m)		1,63 (m)		1,75 (td, 13,5-3,7)		1,65 (m, 11,7)		1,62 (m)	
8	-	40,5	-	40,7	-	40,5	-	40,7	-	40,5	-	40,7
9	1,66 (m)	49,0	1,65 (m)	49,3	1,66 (t, 7,9)	49,0	1,64 (m)	49,0	1,66 (m)	49,0	1,65 (m)	49,3
10		37,7		37,7		37,6		37,7		37,7		37,7
11	1,92 (m)	24,5	1,92 (m)	24,6	1,92 (m)	24,5	1,92 (m)	24,6	1,92 (m)	24,5	1,92 (m)	24,6
12	5,26 (t, 3,5)	123,8	5,27 (t, 3,6)	123,8	5,26 (t, 3,1)	123,6	5,27 (t, 3,7)	123,8	5,26 (t, 3,5)	123,8	5,27 (t, 3,6)	123,8
13	-	145,0	-	144,9	-	145,2	-	144,9	-	145,0	-	144,9
14	-	43,0	-	43,0	-	43,0	-	43,0	-	43,0	-	43,0
15	1,10 (dm, 13)	28,9	1,10 (dm, 13)	28,9	1,10 (dm, 10,3)	28,8	1,10 (dt, 13,8-2,3)	28,9	1,10 (dm, 13)	28,9	1,10 (dm, 13)	28,9
15	1,79 (td, 13,5-4)		1,81 (td, 13,1-3,1)		1,80 (m)		1,81 (td, 14,2-3,5)		1,79 (td, 13,5-4)		1,81 (td, 13,1-3,1)	
16	1,62 (m)	24,0	1,73 (m)	24,0	1,62 (dm, 13,5)	24,1	1,76 (m)	24,0	1,62 (m)	24,0	1,73 (m)	24,0
16	2,04 (td, 13-4)		2,08 (td, 13-4)		2,04 (td, 13,5-3,9)		2,08 (td, 13,1-3,4)		2,04 (td, 13-4)		2,08 (td, 13-4)	
17	2,87 (dd, 13,6-4,2)	47,6	2,87 (dd, 13,4-4,3)	48,0	2,87 (dd, 13,8-4,5)	47,6	2,88 (dd, 13,1-3,4)	48,0	2,87 (dd, 13,6-4,2)	47,6	2,87 (dd, 13,4-4,3)	48,0
18	1,72 (t, 14)	42,8	1,18 (m)	42,6	1,15 (ddd, 13,8-4,5-2,2)	42,7	1,17 (m)	42,6	1,72 (t, 14)	42,8	1,18 (m)	42,6
19	1,23 (dm, 14)	47,3	1,77 (t, 13,5)	47,2	1,72 (t, 13,8)	47,2	1,74 (t, 13,5)	47,2	1,23 (dm, 14)	47,3	1,77 (t, 13,5)	47,2
19	1,42 (td, 13,5-4,7)		1,23 (dm, 12,5)		1,22 (dm, 13,6)		1,24 (m)		1,42 (td, 13,5-4,7)		1,23 (dm, 12,5)	
20	-	31,6	-	31,5	-	31,6	-	31,5	-	31,6	-	31,5
21	1,32 (m)	34,9	1,43 (m)	34,9	1,42 (td, 13,6-4)	34,9	1,42 (m)	34,9	1,32 (m)	34,9	1,43 (m)	34,9
21	1,56 (dt, 13,5-3,6)		1,63 (m)		1,56 (dt, 13,6-4,3)		1,30 (td, 13,6-3,6)		1,56 (dt, 13,5-3,6)		1,63 (m)	
22	1,76 (td, 13,5-4,7)	33,8	1,75 (m)	33,1	1,76 (td, 13,8-4,3)	33,8	1,62 (m)	33,2	1,76 (td, 13,5-4,7)	33,8	1,75 (m)	33,1
22	1,74 (dm, 11)		1,55 (dt, 13,5-3,3)		1,76 (td, 13,7-4,1)		1,74 (dm, 11)		1,74 (dm, 11)		1,55 (dt, 13,5-3,3)	
23	3,27 (d, 11,4)	64,9	3,27 (d, 11,4)	64,9	3,30 (d, 11,4)	64,6	3,30 (d, 11,3)	64,7	3,27 (d, 11,4)	64,9	3,27 (d, 11,4)	64,9
23	3,66 (d, 11,4)		3,66 (d, 11,4)		3,63 (d, 11,4)		3,66 (d, 11,8)		3,66 (d, 11,4)		3,66 (d, 11,4)	
24	0,72 (s)	13,4	0,72 (s)	13,4	0,73 (s)	13,4	0,73 (s)	13,3	0,72 (s)	13,4	0,72 (s)	13,4
25	1,00 (s)	16,5	1,00 (s)	16,5	1,00 (s)	16,4	1,00 (s)	16,5	1,00 (s)	16,5	1,00 (s)	16,5
26	0,82 (s)	17,8	0,82 (s)	17,8	0,84 (s)	17,8	0,84 (s)	17,8	0,82 (s)	17,8	0,82 (s)	17,8
27	1,19 (s)	26,3	1,19 (s)	26,3	1,20 (s)	26,5	1,20 (s)	26,4	1,19 (s)	26,3	1,19 (s)	26,3
28	-	178,1	-	178,1	-	181,9	-	178,1	-	178,1	-	178,1
29	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,6	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5
30	0,96 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0	0,97 (s)	24,0	0,97 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0

Tableau 69 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de l'hédéragénine dans les saponosides Cve11, Cve13, Cve14, Cve15, Cve16, et Cve17 dans CD₃OD.

	Cve11		Cve13		Cve14		Cve15		Cve16		Cve17	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	0,98 (m)	39,5	1,00 (m)	39,5	0,83 (m)	39,5	1,01 (m)	39,5	0,99 (m)	39,5	0,99 (m)	39,5
1	1,63 (m)	-	1,64 (m)	-	1,48 (m)	-	1,63 (m)	-	1,64 (m)	-	1,64 (m)	-
2	1,76 (m)	26,3	1,78 (m)	26,3	1,58 (m)	26,6	1,78 (m)	26,3	1,77 (m)	26,4	1,77 (m)	26,4
2	1,96 (m)	-	1,95 (m)	-	1,76 (m)	-	1,95 (m)	-	1,96 (m)	-	1,96 (m)	-
3	3,64 (dd, 11,8-4)	83,4	3,66 (dd, 12-3,4)	83,5	3,47 (m)	81,8	3,67 (dd, 9,1-2,8)	83,5	3,66 (dd, 9,1-3)	83,5	3,66 (dd, 9,1-3)	83,5
4	-	43,9	-	43,9	-	43,7	-	43,9	-	43,9	-	43,9
5	1,25 (dm, 10,3)	48,1	1,25 (m)	48,2	1,11 (m)	47,6	1,24 (dm, 10,7)	48,2	1,24 (dm, 12,2)	48,2	1,24 (dm, 12,2)	48,2
6	1,49 (dm, 12,3)	18,9	1,40 (m)	18,9	1,20 (dm, 12,4)	18,8	1,38 (m)	18,9	1,38 (m)	18,9	1,38 (m)	18,9
6	1,40 (m)	-	1,50 (dm, 12,56)	-	1,40 (tm, 12,4)	-	1,50 (dm, 13)	-	1,49 (dm, 12,1)	-	1,49 (dm, 12,2)	-
7	1,29 (m)	33,4	1,30 (m)	33,4	1,14 (m)	33,2	1,30 (m)	33,4	1,29 (m)	33,4	1,29 (m)	33,4
7	1,62 (tm, 12,8)	-	1,62 (m)	-	1,45 (m)	-	1,61 (m)	-	1,61 (m)	-	1,61 (m)	-
8	-	40,7	-	40,7	-	40,7	-	40,7	-	40,7	-	40,7
9	1,65 (m)	48,8	1,64 (m)	49,0	1,48 (m)	48,5	1,64 (m)	49,3	1,65 (m)	49,0	1,65 (m)	49,0
10	-	37,7	-	37,7	-	37,3	-	37,7	-	37,7	-	37,7
11	1,92 (m)	24,6	1,93 (m)	24,6	1,78 (m)	25,0	1,93 (m)	24,6	1,93 (m)	24,6	1,93 (m)	24,6
12	5,27 (t, 3,5)	123,8	5,27 (t, 3,6)	123,7	5,15 (tl, 3,5)	123,1	5,27 (t, 3,6)	123,8	5,27 (t, 3,8)	123,8	5,27 (t, 3,8)	123,8
13	-	144,9	-	144,9	-	144,8	-	144,9	-	144,9	-	144,9
14	-	43,0	-	43,0	-	42,6	-	43,0	-	43,0	-	43,0
15	1,10 (dm, 14)	28,9	1,10 (dm, 14,6)	28,9	0,94 (dm, 11,9)	28,5	1,10 (dt, 13,9-2,8)	28,9	1,10 (dt, 13,7-3)	28,9	1,10 (dt, 13,7-3)	28,9
15	1,81 (td, 14-4)	-	1,82 (td, 14-3,9)	-	1,68 (m)	-	1,82 (td, 13,9-3,8)	-	1,81 (td, 13,3-4)	-	1,81 (td, 13,3-4)	-
16	1,73 (m)	23,8	1,73 (dm, 13,6)	24,0	1,60 (m)	24,3	1,74 (dm, 13,8)	24,0	1,72 (dd, 13,8-4,2)	24,0	1,72 (dd, 13,8-4,2)	24,0
16	2,07 (td, 13-3,7)	-	2,07 (td, 13-3,9)	-	1,94 (tm, 13,7)	-	2,07 (td, 13,5-3,8)	-	2,07 (td, 13,3-4)	-	2,07 (td, 13,3-4)	-
17	-	49,0	-	48,0	-	47,3	-	48,0	-	48,0	-	48,0
18	2,87 (dd, 13,7-4,3)	42,6	2,87 (dd, 13,7-4,3)	42,6	2,72 (dd, 12,8-4,3)	42,1	2,87 (dd, 14-4,3)	42,6	2,87 (dd, 13,1-3,8)	42,6	2,87 (td, 13,1-3,8)	42,6
19	1,17 (m)	47,2	1,18 (m)	47,2	1,05 (m)	47,0	1,17 (ddd, 14-4,6-2,1)	47,2	1,17 (m)	47,2	1,17 (m)	47,2
19	1,73 (t, 13,7)	-	1,74 (t, 13,6)	-	1,61 (t, 13,6)	-	1,74 (t, 13,6)	-	1,74 (m)	-	1,74 (m)	-
20	-	31,5	-	31,5	-	31,6	-	31,5	-	31,5	-	31,5
21	1,24 (m)	34,9	1,23 (m)	34,9	1,15 (m)	34,6	1,23 (m)	34,9	1,23 (m)	34,9	1,23 (m)	34,9
21	1,42 (td, 13,8-4,1)	-	1,42 (td, 13,7-3,9)	-	1,32 (td, 13,4-3,6)	-	1,42 (td, 13,7-4)	-	1,42 (td, 13-3)	-	1,42 (td, 13-3)	-
22	1,29 (m)	33,1	1,63 (m)	33,1	1,49 (m)	32,9	1,30 (dm, 13,5)	33,1	1,63 (dm, 13,4)	33,1	1,63 (dm, 13,4)	33,1
22	1,75 (m)	-	1,75 (m)	-	1,55 (m)	-	1,75 (m)	-	1,75 (m)	-	1,75 (m)	-
23	3,29 (d, 11,5)	64,8	3,31 (d, 11,5)	65,0	3,05 (d, 11,5)	65,2	3,30 (d, 11,2)	65,0	3,30 (d, 11,4)	65,0	3,30 (d, 11,4)	65,0
23	3,65 (d, 11,5)	-	3,65 (d, 11,5)	-	3,53 (d, 11,5)	-	3,66 (d, 11,3)	-	3,66 (d, 11,4)	-	3,66 (d, 11,4)	-
24	0,73 (s)	13,4	0,73 (s)	13,4	0,58 (s)	13,9	0,73 (s)	13,4	0,72 (s)	13,4	0,72 (s)	13,4
25	1,00 (s)	16,5	1,01 (s)	16,5	0,86 (s)	16,9	1,01 (s)	16,5	1,00 (s)	16,5	1,00 (s)	16,5
26	0,82 (s)	17,8	0,83 (s)	17,8	0,66 (s)	18,1	0,82 (s)	17,8	0,82 (s)	17,8	0,82 (s)	17,8
27	1,19 (s)	26,3	1,19 (s)	26,3	1,06 (s)	26,9	1,19 (s)	26,3	1,19 (s)	26,3	1,19 (s)	26,3
28	-	178,1	-	178,1	-	176,9	-	178,1	-	178,1	-	178,1
29	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5	0,85 (s)	34,1	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5
30	0,95 (s)	24,0	0,95 (s)	24,0	0,85 (s)	24,7	0,95 (s)	24,0	0,95 (s)	24,0	0,95 (s)	24,0

Tableau 70 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de l'hédéragénine dans les saponosides Cve18, Cvt10 et de l'acide gypsogénique dans le saponoside Cgp6 dans CD₃OD.

	Cve18		Cvt10		Cgp6	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	0,99 (m)	39,6	1,00 (m)	39,5	1,13 (m)	39,7
1	1,64 (m)	-	1,64 (m)	-	1,71 (m)	-
2	1,76 (m)	26,3	1,78 (m)	26,3	1,71 (m)	26,4
2	1,96 (m)	-	1,95 (m)	-	1,99 (m)	-
3	3,66 (m)	83,5	3,66 (dd, 12-3,4)	83,5	4,11 (dd, 11,8-4,5)	85,8
4	-	43,9	-	43,9	-	54,2
5	1,25 (dm, 11,4)	48,2	1,25 (m)	48,2	1,53 (d, 11,6)	52,9
6	1,49 (dm, 13,5)	18,9	1,40 (m)	18,9	1,16 (m)	21,9
6	1,34 (m)	-	1,50 (dm, 12,56)	-	1,57 (m)	-
7	1,29 (m)	33,5	1,30 (m)	33,4	1,56 (m)	33,8
7	1,61 (m)	-	1,62 (m)	-	1,31 (m)	-
8	-	40,7	-	40,7	-	40,8
9	1,64 (m)	49,0	1,64 (m)	49,0	1,68 (m)	49,0
10	-	37,7	-	37,7	-	37,4
11	1,93 (m)	24,6	1,93 (m)	24,6	1,95 (m)	24,5
12	5,27 (t, 3,5)	123,8	5,27 (t, 3,6)	123,7	5,27 (t, 3,6)	123,4
13	-	144,9	-	144,9	-	145,2
14	-	43,0	-	43,0	-	42,9
15	1,10 (dm, 13,5)	28,9	1,10 (dm, 14,6)	28,9	1,09 (dd, 12,1-4)	28,9
15	1,81	-	1,82 (td, 13,9-3,9)	-	1,77 (m)	-
16	1,73 (m)	24,0	1,73 (dm, 13,6)	24,0	1,61 (dm, 13,5)	24,0
16	2,07 (td, 13,3-4)	-	2,07 (td, 13,6-3,9)	-	2,04 (td, 13,7-4)	-
17	-	48,0	-	48,0	-	47,6
18	2,87 (td, 14-4)	42,6	2,87 (dd, 13,7-4,3)	42,6	2,87 (dd, 14,2-4)	42,7
19	1,17 (m)	47,2	1,18 (m)	47,2	1,15 (m)	47,2
19	1,74 (t, 14)	-	1,74 (t, 13,6)	-	1,72 (t, 14,1)	-
20	-	31,5	-	31,5	-	31,6
21	1,23 (m)	34,9	1,23 (m)	34,9	1,23 (dm, 13,7)	35,0
21	1,42 (td, 13,5-3,7)	-	1,42 (td, 13,7-3,9)	-	1,42 (td, 13,7-4,3)	-
22	1,63 (m)	33,1	1,63 (m)	33,1	1,56 (m)	34,0
22	1,75 (m)	-	1,75 (m)	-	1,76 (m)	-
23	3,30 (d, 10,9)	65,0	3,31 (d, 11,5)	65,0	-	181,9
23	3,65 (m)	-	3,65 (d, 11,5)	-	-	-
24	0,72 (s)	13,4	0,73 (s)	13,4	1,17 (s)	12,0
25	1,00 (s)	16,5	1,01 (s)	16,5	1,00 (s)	16,2
26	0,82 (s)	17,8	0,83 (s)	17,8	0,83 (s)	17,6
27	1,19 (s)	26,3	1,19 (s)	26,3	1,19 (s)	26,4
28	-	178,1	-	178,1	-	182,0
29	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,6
30	0,95 (s)	24,0	0,95 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0

Tableau 71 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la bayogénine dans les saponosides Cgp2 et Cgp5 = Cve20, Cgp7, Cgp9, Cgp11 et Cgp15 = Cve21 dans CD₃OD.

	Cgp2		Cgp5 = Cve20		Cgp7		Cgp9		Cgp11 = Cve21		Cgp15	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}										
1	1,18 (dm, 14,6)	44,1	1,18 (dd, 14,5-3,4)	44,4	1,18 (m)	44,4	1,18 (m)	44,4	1,18 (m)	44,1	1,18 (m)	44,5
1	2,08 (dd, 14,6-2,4)		2,08 (dd, 14,5-2,7)		2,08 (dm, 3,5)		2,02 (m)		2,06 (dd, 15-2)		2,07 (dd, 14,9-3)	
2	4,32 (q, 3,4)	70,9	4,34 (q, 3,1)	71,2	4,34 (q, 3,5)	71,2	4,34 (q, 3,5)	71,1	4,32 (q, 2,9)	70,7	4,32 (q, 3,4)	71,1
2	-		-		-		-		-		-	
3	3,62 (d, 3,4)	83,9	3,64 (d, 3,8)	84,0	3,64 (d, 3,5)	84,0	3,64 (d, 3,5)	84,0	3,52 (d, 3,6)	84,1	3,63 (d, 3,5)	83,8
4		43,1		43,0		43,1		43,1		42,9		43,2
5	1,30 (m)	48,2	1,33 (dm, 8,3)	48,2	1,33 (m)	48,2	1,30 (m)	48,2	1,29 (m)	48,0	1,34 (dd, 11,3-3,1)	48,1
6	1,48 (m)	18,5	1,51 (m)	18,7	1,50 (m)	18,7	1,49 (m)	18,7	1,48 (m)	18,4	1,53 (m)	18,0
6	1,33 (m)		1,32 (m)		1,35 (m)		1,52 (m)		1,40 (m)		1,32 (m)	
7	1,30 (m)	33,4	1,62 (m)	33,6	1,32 (m)	33,6	1,31 (m)	33,6	1,62 (dt, 13,8-4)	32,8	1,30 (m)	33,4
7	1,58 (m)		1,60 (m)		1,62 (m)		1,61 (m)		1,73 (m)		1,65 (m)	
8	-	40,9	-	40,6	-	40,6	-	40,6	-	40,4	-	40,6
9	1,58 (m)	48,0	1,60 (m)	49,4	1,59 (m)	49,5	1,61 (m)	49,4	1,58 (m)	49,0	1,61 (m)	49,2
10	1,99 (m)	37,3	2,02 (dd, 11,8-3,6)	37,6	2,02 (m)	37,6	1,91 (m)	37,6	2,01 (dm, 3,1)	37,2	1,94 (m)	37,5
11	1,91 (dd, 11,1-2,8)	24,4	1,91 (dm, 11,8)	24,7	1,91 (m)	24,4	1,91 (m)	24,4	1,92 (dt, 13,1-4)	24,4	2,01 (m)	24,7
12	5,24 (t, 3,4)	122,2	5,25 (t, 3,6)	122,5	5,25 (t, 3,6)	122,4	5,25 (t, 3,5)	122,4	5,30 (t, 3,7)	123,5	5,28 (t, 3,7)	123,7
13	-	146,7	-	146,8	-	146,9	-	146,9	-	144,6	-	145,3
14	-	40,3	-	43,3	-	43,3	-	43,3	-	42,9	-	43,2
15	0,99 (ddd, 10,2-4,7-2)	28,9	1,01 (dm, 11,8)	29,2	0,99 (m)	29,2	1,00 (m)	29,2	1,08 (dm, 12,7)	28,5	1,10 (dm, 13,5)	28,7
15	1,87 (d, 9,1)		1,90 (m)		1,90 (m)		1,91 (m)		1,77 (tm, 12,7)		1,80 (td, 13,5-3,5)	
16	1,59 (dd, 10,2-4,7)	24,3	1,59 (m)	24,5	1,60 (m)	24,6	1,61 (m)	24,4	1,72 (m)	23,8	1,62 (m)	24,0
16	1,87 (d, 9,1)		1,90 (m)		1,90 (m)		2,07 (tm, 12,2)		2,01 (td, 12,7-4)		2,01 (dm, 9,1)	
17	-	47,5	-	47,5	-	47,5	-	47,6	-	47,7	-	47,6
18	2,91 (dd, 13,6-3,5)	43,3	2,93 (dd, 13,7-4,5)	43,5	2,94 (dm, 13)	43,5	2,93 (dd, 13,1-3,5)	43,5	2,87 (dd, 13,7-4,2)	42,3	2,87 (dd, 13,4-4,4)	42,8
19	1,10 (dm, 13,6)	48,2	1,67 (t, 13,7)	48,1	1,10 (dm, 13,5)	48,2	1,10 (m)	48,3	1,18 (m)	46,9	1,15 (ddd, 13,4-4,4-2, 3)	47,2
19	1,64 (t, 13,6)		1,11 (ddd, 13,7-4,5-2,2)		1,67 (t, 13,5)		1,67 (t, 13,7)		1,69 (t, 14,1)		1,72 (t, 13,7)	
20	-	31,7	-	31,8	-	31,8	-	31,8	-	31,3	-	31,6
21	1,13 (dm, 14)	35,4	1,15 (dm, 13)	35,5	1,15 (m)	35,6	1,13 (m)	35,6	1,29 (m)	34,7	1,23 (dm, 13,5)	34,9
21	1,34 (td, 14-3,8)		1,37 (td, 13-4,2)		1,36 (m)		1,37 (td, 14,2-4,2)		1,58 (m)		1,42 (td, 13,5-4,4)	
22	1,50 (dt, 14-3,3)	34,2	1,75 (dt, 13,7-3,2)	34,4	1,52 (m)	34,4	1,50 (m)	34,4	1,52 (m)	33,1	1,56 (td, 13,8-3,5)	33,9
22	1,72 (td, 14-4,2)		1,56 (m)		1,75 (tm, 11,5)		1,75 (td, 14,2-4,2)		1,75 (tm, 11,5)		1,77 (dt, 13,8-4,2)	
23	3,26 (d, 11,4)	65,5	3,26 (d, 11,3)	65,7	3,26 (d, 11,5)	65,8	3,26 (d, 12,2)	65,7	3,25 (d, 11,3)	65,8	3,24 (d, 11,3)	65,3
23	3,61 (d, 11,4)		3,64 (d, 11,3)		3,64 (d, 11,5)		3,64 (d, 12)		3,61 (d, 11,4)		3,64 (d, 11,4)	
24	0,94 (s)	14,2	0,96 (s)	14,7	0,96 (s)	14,7	0,96 (s)	14,7	0,95 (s)	14,5	0,97 (s)	14,6
25	1,28 (s)	17,4	1,30 (s)	17,5	1,29 (s)	17,5	1,30 (s)	17,5	1,28 (s)	17,4	1,30 (s)	17,4
26	0,89 (s)	18,2	0,91 (s)	18,3	0,92 (s)	18,3	0,92 (s)	18,7	0,81 (s)	17,6	0,85 (s)	17,8
27	1,15 (s)	26,6	1,17 (s)	26,6	1,17 (s)	26,6	1,17 (s)	26,6	1,16 (s)	26,4	1,17 (s)	26,5
28	-	186	-	185,9	-	180,2	-	186,3	-	178,0	-	182,0
29	0,88 (s)	33,9	0,90 (s)	34,0	0,90 (s)	34,0	0,90 (s)	34,0	0,91 (s)	33,5	0,93 (s)	33,6
30	0,95 (s)	24,3	0,98 (s)	24,4	0,98 (s)	24,4	0,98 (s)	24,6	0,94 (s)	23,9	0,97 (s)	24,0

Tableau 72 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la bayogénine dans les saponosides Cgp19, Cgp25, Cve19, Cve22, Cve23 et Cve24 dans CD₃OD.

	Cgp19		Cgp25		Cve19		Cve22		Cve23		Cve24	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,17 (d, 14,4)	44,4	1,17 (m)	44,4	2,08 (dd, 14,5-3,8)	44,4	1,18 (m)	44,4	1,18 (m)	44,4	1,18 (m)	44,4
1	2,07 (dd, 14,4-2,7)		2,08 (m)		1,17 (td, 14,5-3,8)	-	2,09 (m)	-	2,08 (dm, 13,9)	-	2,09 (dd, 14,3-3)	-
2	4,28 (q, 3,3)	71,5	4,28 (q, 3,1)	71,5	4,34 (q, 3,8)	71,1	4,35 (q, 3,8)	71,1	4,34 (m)	71,2	4,35 (q, 3,2)	71,2
2					3,62 (d, 3,9)	83,8	3,64 (d, 4)	83,9	3,63 (d, 3,8)	83,9	3,64 (d, 3,5)	84,0
3	3,66 (d, 3,3)	83,9	3,65 (d, 3,4)	83,9								
4		43,2		43,2	-	43,1	-	43,1	-	43,1	-	43,1
5	1,34 (dd, 10,8-2,4)	48,0	1,33 (m)	48,1	1,33 (m)	48,1	1,33 (m)	48,1	1,33 (m)	48,1	1,33 (m)	48,2
6	1,50 (m)	18,6	1,44 (m)	18,5	1,48 (m)	18,6	1,49 (m)	18,6	1,50 (m)	18,7	1,50 (m)	18,6
6	1,52 (m)		1,50 (m)		1,30 (m)	33,3	1,62 (td, 13,9-3)	33,4	1,61 (m)	33,4	1,31 (m)	33,5
7	1,31 (m)	33,4	1,30 (m)	33,5	1,62 (m)	-	1,75 (m)	-	1,30 (m)	-	1,63 (m)	-
7	1,65 (m)		1,62 (m)		-	40,7	-	40,8	-	40,7	-	40,8
8		40,7		40,7	1,60 (m)	49,4	1,60 (m)	49,3	1,59 (m)	49,3	1,60 (m)	49,5
9	1,62 (m)	49,1	1,59 (t, 6,1)	49,3	-	37,5	-	37,5	-	37,5	-	37,5
11	1,95 (m)	37,5	1,94 (m)	37,5	1,94 (ddd, 13,1-6,9-4,7)	24,7	1,94 (ddd, 18,7-6,4-3,9)	24,7	1,94 (m)	24,7	1,94 (m)	24,7
11	2,02 (m)	24,7	2,01 (m)	24,7	2,04 (dd, 13,1-3,4)	-	2,03 (dm, 18,7)	-	2,02 (m)	-	2,02 (dm, 11,5)	-
12	5,27 (t, 3,4)	123,7	5,28 (t, 3,5)	123,8	5,29 (t, 3,5)	123,8	5,29 (t, 3,6)	123,8	5,29 (t, 3,6)	123,8	5,29 (t, 3,7)	123,9
13		145,3		144,9	-	145,0	-	145,0	-	145,0	-	145,0
16		40,6		43,2	-	43,1	-	43,2	-	43,2	-	43,2
15	1,10 (dm, 13,6)	28,7	1,10 (dm, 13,7)	28,8	1,10 (dt, 11,1-3,1)	29,0	1,10 (dm, 13,7)	28,8	1,10 (dm, 14,1)	28,8	1,10 (dm, 14)	28,8
15	1,80 (dt, 14-3,8)		1,82 (tm, 13,7)		1,81 (td, 13,8-3,5)	-	1,82 (td, 13,7-3,9)	-	1,82 (td, 14-3,8)	-	1,82 (td, 14-3,6)	-
16	1,62 (m)	24,0	1,74 (dm, 10,5)	24,0	1,74 (dm, 14)	23,8	1,74	24,0	1,73 (m)	24,0	1,74 (dd, 13,6-4)	24,0
16	2,04 (m)		2,07 (m)		2,07 (tm, 14)	-	2,07 (td, 14-3,2)	-	2,07 (m)	-	2,07 (td, 14-4)	-
17		47,2		48,0	-	48,0	-	48,0	-	48,0	-	48,0
18	2,87 (dd, 14,4-4,1)	42,7	2,87 (dd, 13,5-4,2)	42,6	2,87 (dd, 14,1-4)	42,6	2,88 (dd, 14-4,6)	42,6	2,88 (dd, 13,7-4)	42,6	2,88 (dd, 13,7-4,3)	42,6
19	1,15 (m)	47,6	1,17 (m)	47,2	1,17 (m)	47,2	1,17 (m)	47,2	1,17 (m)	47,2	1,18 (m)	47,2
19	1,72 (t, 13,8)		1,73 (t, 13,6)		1,73 (t, 13,7)	-	1,74	-	1,74 (t, 13,4)	-	1,74 (t, 13,7)	-
20		31,6		31,5	-	31,5	-	31,5	-	31,5	-	31,5
21	1,23 (dm, 13,7)	34,9	1,23 (dm, 13,5)	34,9	1,24 (dm, 13,8)	34,9	1,24 (dm, 13,6)	34,9	1,23 (dm, 14,7)	34,9	1,24 (dm, 13,6)	34,9
21	1,42 (td, 13,7-4)		1,42 (td, 13,8-3,4)		1,42 (td, 13,8-4)	-	1,42 (td, 13,5-3,8)	-	1,42 (td, 13,3-3,8)	-	1,43 (td, 13,6-4,1)	-
22	1,56 (dt, 13,6-3,2)	33,8	1,53 (dm, 13)	33,1	1,32	33,1	1,75 (m)	33,1	1,63 (dm, 13,7)	33,1	1,64 (dt, 13,7-3,2)	33,2
22	1,77 (td, 13,9-4,5)		1,74 (m)		1,63 (dt, 13,3-3,2)	-	1,64 (dt, 13,7-3,5)	-	1,75 (m)	-	1,76 (dt, 13,7-4,9)	-
23	3,25 (d, 11,3)	65,3	3,25 (d, 11,3)	65,3	3,24 (d, 11,3)	65,5	3,25 (d, 11,5)	65,7	3,24 (d, 11,4)	65,7	3,24 (d, 11,1)	65,7
23	3,64 (d, 11,3)		3,63 (d, 11,3)		3,64 (d, 11,3)	-	3,64 (d, 11,5)	-	3,64 (d, 11,4)	-	3,64 (d, 11,1)	-
24	0,97 (s)	14,6	0,96 (s)	14,7	0,95 (s)	14,7	0,96 (s)	14,7	0,96 (s)	14,7	0,96 (s)	14,7
25	1,30 (s)	17,4	1,30 (s)	17,5	1,31 (s)	17,5	1,31 (s)	17,5	1,31 (s)	17,5	1,31 (s)	17,5
26	0,85 (s)	17,8	0,83 (s)	17,8	0,83 (s)	17,8	0,83 (s)	17,8	0,83 (s)	17,8	0,83 (s)	17,8
27	1,20 (s)	26,5	1,19 (s)	26,4	1,19 (s)	26,4	1,19 (s)	26,4	1,19 (s)	26,4	1,19 (s)	26,4
28		182,0		178,1	-	178,1	-	178,1	-	178,1	-	178,2
29	0,93 (s)	33,6	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,5
30	0,97 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0	0,95 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0	0,96 (s)	24,0

Tableau 73 : Déplacements chimiques (ppm) RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la bayogénine dans les saponosides Cve25, Cve26 et Cvt9 dans CD₃OD.

	Cve25		Cve26		Cvt9	
	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,17 (m)	44,4	1,18 (m)	44,4	1,17 (d, 14,4)	44,4
1	2,08 (dm, 13,6)		2,08 (dm, 13,8)		2,07 (dd, 14,4-2,7)	
2	4,34 (q, 2,9)	71,2	4,34 (m)	71,1	4,28 (q, 3,3)	71,5
3	3,64 (m)	83,9	3,64 (m)	83,9	3,66 (d, 3,3)	83,9
4	-	43,1	-	43,1	-	43,2
5	1,33 (m)	48,1	1,33 (m)	48,1	1,34 (dd, 10,8-2,4)	48,0
6	1,51 (m)	18,6	1,49 (m)	18,6	1,52 (m)	18,6
7	1,31 (m)	33,5	1,30 (m)	33,2	1,31 (m)	33,4
7	1,62 (m)		1,69 (m)		1,65 (m)	
8	-	40,6	-	40,8	-	40,7
9	1,60 (m)	49,9	1,60 (m)	49,4	1,62 (m)	49,1
10	-	37,5	-	37,5	1,95 (m)	37,5
11	1,94 (m)	24,7	1,94 (m)	24,7	2,02 (m)	24,7
11	2,02 (m)		2,02 (m)		-	
12	5,27 (t, 3,6)	123,3	5,29 (t, 3,6)	123,9	5,27 (t, 3,4)	123,7
13	-	145,8	-	145,0	-	145,3
14	-	43,2	-	43,2	-	40,6
15	1,07 (dm, 14,5)	28,9	1,10 (dm, 14)	28,8	1,10 (dm, 13,6)	28,7
15	1,83 (m)		1,82 (m)		1,80 (dt, 14-3,8)	
16	1,62 (m)	24,1	1,74 (m)	24,0	1,62 (m)	24,0
16	1,98 (dm, 14,4)		2,07 (m)		2,04 (m)	
17	-	48,0	-	48,0	-	47,2
18	2,89 (dd, 13,9-4)	43,0	2,88 (dd, 13,8-4,3)	42,6	2,87 (dd, 14,4-4,1)	42,7
19	1,13 (dm, 14,2)	47,5	1,17 (m)	47,2	1,15 (m)	47,6
19	1,70 (t, 14,2)	-	1,74 (t, 13,7)	-	1,72 (t, 13,8)	-
20	-	31,7	-	31,5	-	31,6
21	1,20 (m)	35,1	1,23 (dm, 13,4)	34,9	1,23 (dm, 13,7)	34,9
21	1,40 (td, 13,6-3,3)		1,42 (dm, 14)		1,42 (td, 13,7-4)	
22	1,54 (m)	34,0	1,64 (m)	33,2	1,56 (dt, 13,6-3,2)	33,8
22	1,76 (dt, 14-4)		1,75 (m)		1,77 (td, 13,9-4,5)	
23	3,25 (d, 11,4)	65,6	3,24 (d, 11,4)	65,7	3,25 (d, 11,3)	65,3
23	3,64 (d, 11,4)	-	3,64 (d, 11,4)	-	3,64 (d, 11,3)	-
24	0,96 (s)	14,7	0,96 (s)	14,7	0,97 (s)	14,6
25	1,31 (s)	17,5	1,31 (s)	17,5	1,30 (s)	17,4
26	0,85 (s)	18,0	0,84 (s)	17,8	0,85 (s)	17,8
27	1,18 (s)	26,5	1,19 (s)	26,4	1,20 (s)	26,5
28	-	nd	-	178,1	-	182,0
29	0,92 (s)	33,7	0,93 (s)	33,5	0,93 (s)	33,6
30	0,97 (s)	24,1	0,96 (s)	24,0	0,97 (s)	24,0

III. 2. Polyphénols des *Caryocars*

III. 2. 1. Composé Cgt1

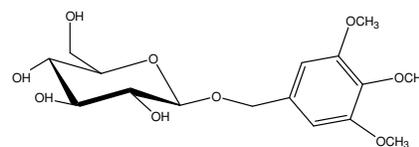
3,4,5-trimethoxybenzyl β -D-glucopyranoside.

Formule brute : $C_{16}H_{24}O_9$

$[\alpha]_D -30^\circ$ (c 0,5, MeOH)

SM : ESI (mode positif) m/z : 361 $[M+H]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans CD_3OD (tableau 37, page 142).



III. 2. 2. Composé Cgt2

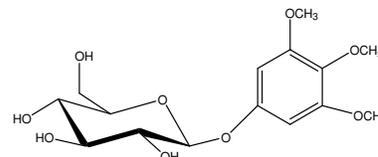
3,4,5-trimethoxyphenyl β -D-glucopyranoside

Formule brute: $C_{15}H_{22}O_9$

$[\alpha]_D -78^\circ$ (c 0,5, MeOH)

SM : ESI (mode positif) m/z : 347 $[M+H]^+$, 317 $[M+H-OCH_3]^+$, 185 $[M+H-Glc]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans la pyridine d_6 (tableau 37, page 142).



III. 2. 3. Composé Cgt3

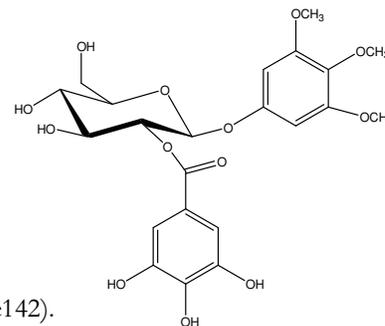
3,4,5-trimethoxyphenyl-(2-O-galloyl)-O- β -D-glucopyranoside.

Formule brute : $C_{22}H_{26}O_{13}$

$[\alpha]_D -30^\circ$ (c 0,57, MeOH)

SM : ESI (mode positif) m/z : 521 $[M+Na]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans CD_3OD (tableau 37, page 142).



III. 2. 4 Composé Cgt4

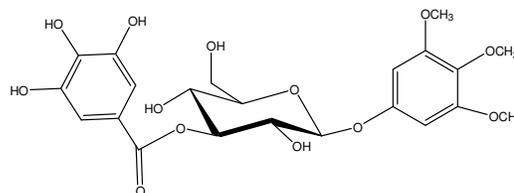
3, 4, 5-trimethoxyphenyl-(3-O-galloyl)-O- β -D-glucopyranoside.

Formule brute : $C_{22}H_{26}O_{13}$

$[\alpha]_D -20^\circ$ (c 0,57, MeOH)

SM : ESI (mode positif) m/z : 521 $[M+Na]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans CD_3OD (tableau 37, page 142).



III. 2. 5. Composé Cgt5

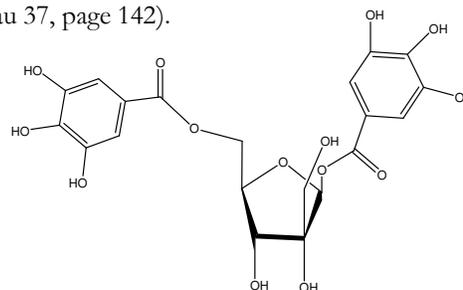
1,5-di-O-galloyl- β -D-hamamelofuranose.

Formule brute : $C_{20}H_{20}O_{14}$

$[\alpha]_D + 8^\circ$ (c 0,5, MeOH)

SM : ESI (mode positif) m/z : 507 $[M+Na]^+$, 487 $[M+3H]^+$, 467 $[M+H-H_2O]^+$, 315 $[M+H-acide\ gallique]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans CD_3OD (tableau 38, page 151).



III. 2. 6. Composé Cgt6

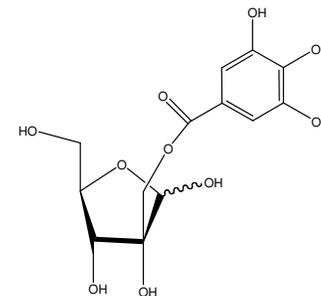
2-*O*-galloyl-D-hamamelofuranose.

Formule brute : C₁₃H₁₆O₁₀

[α]_D -13°3 (c 0,75, MeOH)

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 371 [M+K]⁺, 333 [M+H]⁺, 315 [M+H-H₂O]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans CD₃OD (tableau 38, page 153).



III. 2. 7. Composé Cgt7

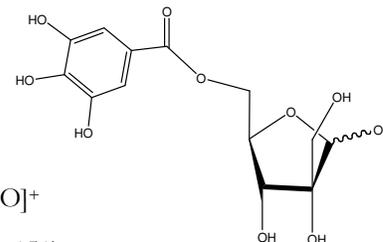
5-*O*-galloyl-D-hamamelofuranose.

Formule brute : C₁₃H₁₆O₁₀

[α]_D + 20° (c 0,25, MeOH)

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 371 [M+K]⁺, 333 [M+H]⁺, 315 [M+H-H₂O]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans CD₃OD (tableau 39, page 151).



III. 2. 8. Composé Cgt8

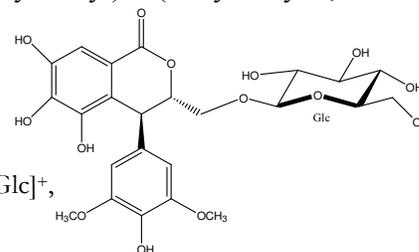
(3*S*,4*S*) (+) 3,4-dihydro-5,6,7-trihydroxy-3-(β-D-glucopyranosyl-oxyméthyl)-4-(4'-hydroxy-3',5'-diméthoxy-phenyl)-1*H*-[2]-benzopyrane-1-one.

Formule brute : C₂₄H₂₈O₁₄

[α]_D + 15°6 (c 0,57, MeOH)

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 563 [M+Na]⁺, 541 [M+H]⁺, 402 [M+Na-Glc]⁺,
379 [M+H-Glc]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans CD₃OD (tableau 40, page 158).



III. 2. 9. Composé Cgt9

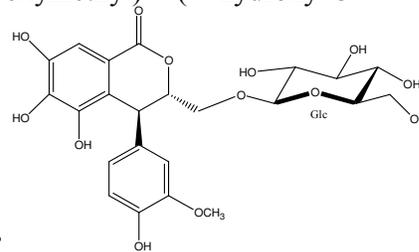
(3*S*,4*S*) (+) 3,4-dihydro-5,6,7-trihydroxy-3-(β-D-glucopyranosyl-oxyméthyl)-4-(4'-hydroxy 3'-méthoxyphenyl)-1*H*-[2]-benzopyrane-1-one.

Formule brute : C₂₃H₂₆O₁₃

[α]_D + 15° (c 0,57, MeOH)

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 549 [M+K]⁺, 533 [M+Na]⁺, 511 [M+H]⁺,
372 [M+Na-Glc]⁺, 349 [M+H-Glc]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans CD₃OD (tableau 40, page 158).



III. 2. 12. Composé Cgt12 = Cvt2

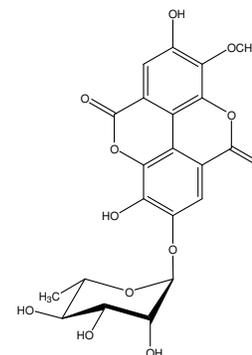
Acide 3-*O*-méthyl ellagique 4'-*O*-α-L-rhamnopyranoside.

Formule brute : C₂₁H₁₈O₁₂

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 461 [M-H]⁻

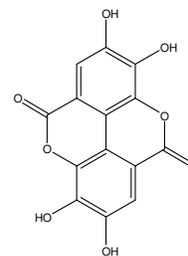
ESI-MS/MS (461) *m/z* : 315[M-H-Rha]⁻, 301 [M-H-Rha-CH₃]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans pyridine-*d*₆ (tableaux 41 et 42, page 170).



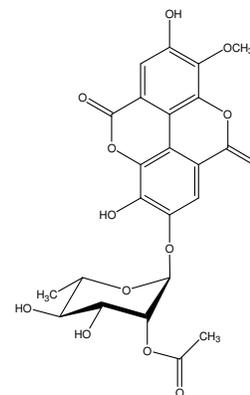
III. 2. 13. Composé Cvt1

Acide ellagique.

Formule brute : $C_{14}H_6O_8$ SM : ESI (mode négatif) m/z : 301 [M-H]⁻, 272 [M-H-HCO]⁻, 243 [M-H-2xHCO]⁻,
214 [M-H-3xHCO]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (DMSO-*d*₆) (tableaux 41 et 42, page 170).**III. 2. 14. Composé Cvt3**Acide 3-*O*-méthyl-4'-*O*-(2''-*O*-acétyl- α -L-rhamnopyranosyl) ellagique.Formule brute : $C_{23}H_{20}O_{13}$

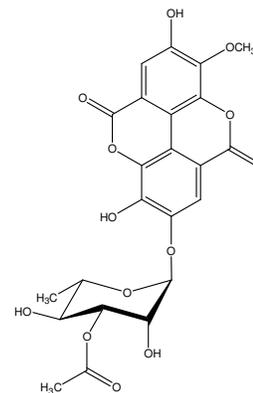
SM :

- mode positif: ESI m/z : 549 [M-H+2Na]⁺, 527 [M+Na]⁺,
 - mode négatif: ESI m/z : 503 [M-H]⁻
 ESI-MS/MS (503) m/z : 443 [M-H-CH₃COO]⁻,
 428 [M-H-CH₃COO-CH₃]⁻,
 315 [M-H-(Rha-OCOCH₃)]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (acétone-*d*₆) (tableaux 41 et 42, page 170).**III. 2. 15. Composé Cvt4**Acide 3-*O*-méthyl 4'-*O*-(3''-*O*-acétyl- α -L-rhamnopyranosyl) ellagique.Formule brute : $C_{23}H_{20}O_{13}$

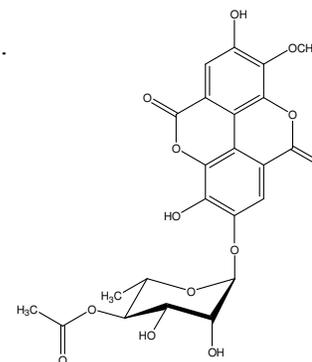
SM :

- mode positif: ESI m/z : 549 [M-H+2Na]⁺, 527 [M+Na]⁺,
 - mode négatif: ESI m/z : 503 [M-H]⁻
 ESI-MS/MS (503) m/z : 443 [M-H-CH₃COO]⁻,
 428 [M-H-CH₃COO-CH₃]⁻,
 315 [M-H-(Rha-OCOCH₃)]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CD₃OD) (tableaux 41 et 42, page 170).**III. 2. 16. Composé Cvt5**Acide 3-*O*-méthyl 4'-*O*-(4''-*O*-acétyl- α -L-rhamnopyranosyl) ellagique.Formule brute : $C_{23}H_{20}O_{13}$

SM :

- mode positif: ESI m/z : 549 [M-H+2Na]⁺,
 527 [M+Na]⁺,
 - mode négatif: ESI m/z : 503 [M-H]⁻
 ESI-MS/MS (503) m/z : 443 [M-H-CH₃COO]⁻,
 428 [M-H-CH₃COO-CH₃]⁻,
 315 [M-H-(Rha-OCOCH₃)]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CD₃OD) (tableaux 41 et 42, page 170).

III. 3. Polyphénols de *Guioa crenulata*

III. 3. 1. Flavonoïde Gc1

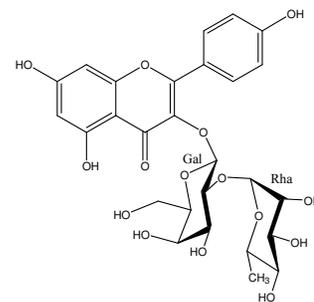
3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl] kaempferol.

Formule brute : $C_{27}H_{30}O_{15}$

$[\alpha]_D -50^\circ$ (c 0,13, MeOH)

MS : ESI (mode positif) m/z : 595 $[M+H]^+$, 449 $[M+H-Rha]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans (CD_3OD) (tableau 46, page 193).



III. 3. 2. Flavonoïde Gc2

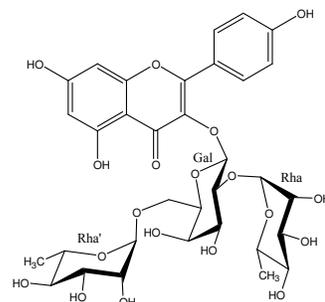
3-O-[2, 6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranosyl] kaempferol.

Formule brute : $C_{33}H_{40}O_{19}$

$[\alpha]_D -104^\circ$ (c 0,166, MeOH)

SM : ESI (mode positif) m/z : 741 $[M+H]^+$, 595 $[M+H-Rha]^+$,
431 $[M+H-Rha-Rha-H_2O]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans (CD_3OD) (tableau 46, page 193).



III. 3. 3. Flavonoïde Gc3

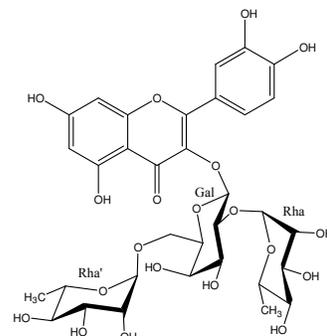
3-O-[2, 6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranosyl] quercétine.

Formule brute : $C_{33}H_{40}O_{20}$

$[\alpha]_D -79^\circ$ (c 0,2, MeOH)

SM : ESI (mode positif) m/z : 779 $[M+Na]^+$, 757 $[M+H]^+$,
611 $[M+H-Rha]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans (CD_3OD) (tableau 46, page 193).



III. 5. 4. Procyanidol Gc4

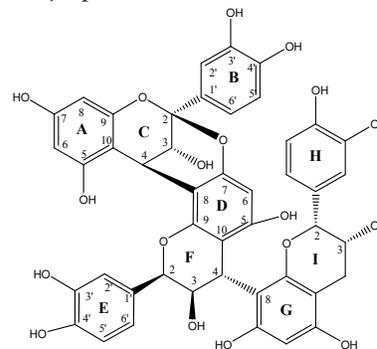
cinnamtannin B1 : épicatechine-(4 β \rightarrow 8, 2 β \rightarrow O \rightarrow 7)-épicatechine-(4 β \rightarrow 8)-épicatechine.

Formule brute : $C_{45}H_{36}O_{18}$

$[\alpha]_D +65,5^\circ$ (c 0,2, MeOH)

SM : ESI $^+$ m/z : 865 $[M+H]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) dans (CD_3OD) (tableau 47, page 202).



III. 4. Hétérosides sesquiterpéniques de *G. crenulata*

III. 4. 1. Composé Gc5

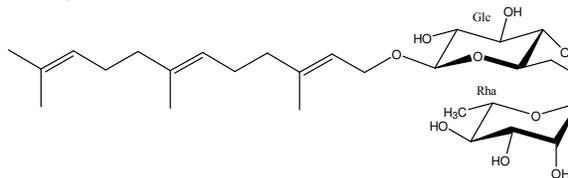
1-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-2*E*,6*E*-farnesol.

Formule brute : C₂₇H₄₆O₁₀

[α]_D - 44,1° (*c* 1, MeOH)

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 531 [M+H]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CD₃OD) (tableau 49, page 209).



III. 4. 2. Composé Gc6

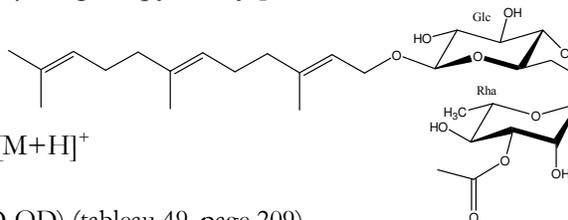
1-*O*-[(3''-*O*-acétyl)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-2*E*,6*E*-farnesol.

Formule brute : C₂₉H₄₈O₁₁

[α]_D - 28°5 (*c* 1, MeOH)

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 595 [M+Na]⁺, 573 [M+H]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CD₃OD) (tableau 49, page 209).



III. 4. 3. Composé Gc7

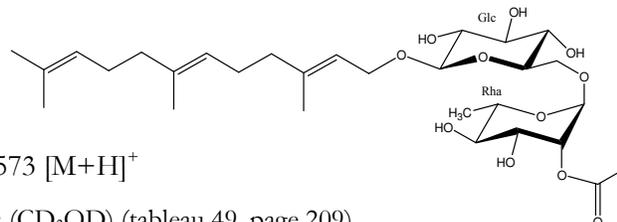
1-*O*-[(2''-*O*-acétyl)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-2*E*,6*E*-farnesol.

Formule brute : C₂₉H₄₈O₁₁

[α]_D - 24,3 (*c* 0,58, MeOH)

SM : ESI (mode positif) *m/z* : 595 [M+Na]⁺, 573 [M+H]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CD₃OD) (tableau 49, page 209).



III. 4. 4. Composé Gc8

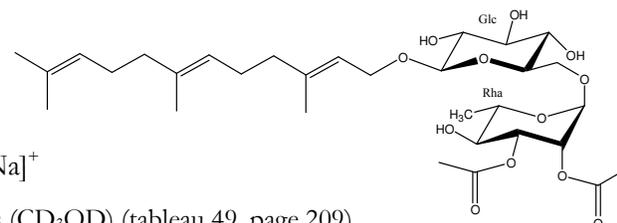
1-*O*-[(2'',3''-*O*-diacétyl)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-2*E*,6*E*-farnesol.

Formule brute : C₃₁H₅₀O₁₂

[α]_D - 31,5, (*c* 0,33, MeOH)

SM : ESI-MS (mode positif) *m/z* : 661 [M+2Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) dans (CD₃OD) (tableau 49, page 209).



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1 - MABBERLEY D J.
The plant-book.
Cambridge : University press ; 1987 : 103-104.
- 2- PRANCE G T.
An update on the taxonomy and distribution of the Caryocaraceae.
Opera Bot 1987 ; 92 : 179-184.
- 3- WATSON L, DALLWITZ M J.
The Families of Flowering Plants : Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval.
Caryocaraceae Szyszyl. [consulté le 29/07/2005].
Disponible à partir de : URL :
<http://biodiversity.uno.edu/angio/www/caryocar.htm>
- 4 - MARX F, ANDRADE E H-A, MAIA J G.
Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*.
Z Lebensm Unters Forsch A 1997 ; 204 : 442-444.
- 5 - DRESEN H, PRASAD R B N, GÜLZ P-G.
Composition of lipids of Piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.) Seed and Pulp Oil.
Naturforsch 1989 ; 44 : 739-742.
- 6 - PASSOS X S, CASTRO A C M, PIRES J S, GARCIA A. C-F, CAMPOS F-C, FERNANDES O F L et al.
Composition and antifungal activity of the essential Oils of *Caryocar brasiliense*. Pharm Biol 2003 ; 41 : 319-324.
- 7 - KAWANISHI K, RAFFAUF R-F.
Caryocar microcarpum : an ant repellent and fish poison of the northwest amazon.
J Nat Prod 1986 ; 49 : 1167-1168.
- 8 - DE OLIVEIRA M M, GILBERT B, MORS W B.
Triterpenes in *Caryocar brasiliense*.
An Aca Bras de Cier 1968 ; 40 (4) : 451-452.
- 9 - AZEVEDO-MELEIRO C H, RODRIGUEZ-D B.
Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS.
J food compos anal 2004 ; 17 : 385-396.
- 10 - GRENAND P, MORETTI C, JAQUEMIN H, PREVOST M F.
Pharmacopées traditionnelles en Guyane, créoles, Wayãsi, Palikur.
Paris : IRD Editions 2004; 293-298.
- 11 - BEZERA J C B, SILVA I A, FERREIRA H D, FERRI P H, SANTOS S C.
Molluscicidal activity against biomphalaria glabrata of brazilian Cerrado medicinal plants.
Fitoterapia 2002 ; 73 : 428-430.
- 12 - KELLY D, BESSIERE J, CRIMMINS J, RENARD S.
Anti-inflammatory properties of Amazonian oils.
SÖFW J 2003 ; 129 (4) : 12-16.
- 13 - Clarins.
Péqui (*Caryocar coriaceum*) [consulté le 30/07/2005].
Disponible à partir de : URL :
<http://fr.clarins.net/main.cfm.PlanteID>
- 14 - Noveon.
The specialty chemical innovator®.[consulté le 3/08/2005].
Disponible à partir de : URL :
http://www.noveon.com/Noveon_search/caryocaroveon

- 15 - HIROYUKI S, CHIYOKO U.
External compositions containing Xylopiia or other plants.
Lion Corp.
Japon.
BREVET, 2001, JP 20011064145 A2 20010313.
- 16 - DE ALMEIDA A. T M, SILVA A F, BRANDAO M, GRANDI T S M, SMANIA E D F A, SMANIA JUNIOR A et al.
Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants.
Mem Inst Oswaldo Cruz 2000 ; 95 (3) : 367-373.
- 17 - SOUZA L K H E, ALVES DE OLIVEIRA C M, FERRI P H, SANTOS S C, DE OLIVEIRA JUNIOR J G, MIRANDA A T B et al.
Antifungal proprties of Brazilian cerrado plants.
Bra J Microbiol 2002 ; 33 : 247-249.
- 18 - FOUQUE A.
Espèces fruitières d'Amérique tropicale.
In :
Documentation analytique de l'Institut français de recherches fruitières Outre-mer.
Paris : Institut français de recherches fruitières outre mer edition 1972 ; 62-72.
- 19 - The New York Botanical Garden.
Caryocar glabrum. [consulté le 30/07/2005].
Disponible à partir de : URL :
http://www.nybg.org/bsci/french_guiana/carglab.jpg
- 20 - Centro intrenacional de agricultura tropical.
Caryocar glabrum. [consulté le 3/08/2005].
Disponible à partir de : URL :
<http://www.ciat.cgiar.org/Ficha%20Caryocar%20glabrum>.
- 21 - Sistemade informacion de la diversidad biologica y imbeintal de la Amazonia Peruana.[consulté le 30/07/2005].
Disponible à partir de : URL :
<http://www.siamazonia.org.pe/Fotos/Flora/almendra/frutos.jpg>
- 22 - Madeireira Guimaraes.
Pequiarana. [consulté le 30/07/2005].
Disponible à partir de : URL :
<http://www.madguimaraes.com.br/pequiaarvoregr.gif>
- 23 - Missouri Botanical garden.
Caryocar. [consulté le 30/07/2005].
Disponible à partir de : URL :
<http://www.mobot.org/manual.plantas/foto/Caryocar.jpg>
- 24 - IP C, LISK D.
Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance.
Nutr Cancer 1994 ; 21 (3) : 203-212.
- 25 - LAVAUD C, VOUTQUENNE L, MASSIOT G, LE MEN-OLIVIER L, DELAUDE C.
Saponines triterpéniques de *Smelophyllum capense* (Sapindaceae).
Bull Soc r sci Liège 1994 ; 63 : 455-463.
- 26 - VOUTQUENNE L.
Saponines et activité hémolytique. Saponines et glycosides de cinq espèces de Sapindaceae.
Th 3 cycle : Pharm : Reims : 1997 ; 208.
- 27 - VOUTQUENNE L, LAVAUD C, MASSIOT G, DELAUDE C.
Saponins from *Harpullia cupanioides*.
Phytochemistry 1998 ; 49 (7) : 2081-2085.

- 28 - LAVAUD C, CRUBLET M-L, POUNY I, LITAUDON M, SEVENET T.
Triterpenoid saponins from the stem bark of *Elattostachys apetala*.
Phytochemistry 2001 ;57 (3) : 469-478.
- 29 - VOUTQUENNE L, KOKOUGAN C, LAVAUD C, POUNY I, LITAUDON M.
Triterpenoid saponins and acylated prosapogenins from *Harpullia austro-caledonica*
Phytochemistry 2002 ; 59 (8) : 825-832.
- 30 - VOUTQUENNE L, GUINOT P, THOISON O, SEVENET T, LAVAUD C.
Oleanolic glycosides from *Pometia ridleyi*.
Phytochemistry 2003 ; 64 (3) : 781-789.
- 31 - PRICE K R, JOHNSON I T, FENWICK G R.
The chemistry and biological significance of saponins foods and feedingstuffs.
Crit Rev Food Sci Nutr 1987 ; 26 (1) : 27-135.
- 32 - LACAILLE-DUBOIS M A, WAGNER H.
A review of the biological and pharmacological activities of saponins.
Phytomedicine 1996 ; 2 (4) : 363-386.
- 33 - SPARG S G, LIGHT M E, VAN STADEN J.
Biological activities and distribution of plant saponins.
J Ethnopharmacol 2004 ; 94 (2-3) : 219-243.
- 34 - LACAILLE-DUBOIS M A, WAGNER H.
Bioactive saponins from plants : an update.
In:
Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 21.
ED. Atta-ur-Rahman,
Amsterdam: Elsevier Science B. V ; 2000 : 633-645.
- 35 - SUTTISRI R, CHUNG M S, KINGHORN A D, STICHER O, HASHIMOTO Y.
Periandrin v, a further sweet triterpene glycoside from *Periandra dulcis*.
Phytochemistry 1993; 34 (2): 405-408
- 36 - TANAKA O, TAMURA Y, MASUDA H, MIZUTANI K.
Application of saponins in foods and cosmetics: Saponins of Mohave Yucca and *Sapindus mukurossi*.
In:
Saponins used in food and agriculture, Vol. 405.
ED. Walter G R, Yamasaki K,
London : Plenum press ; 1996 : 1-11.
- 37 - BALANDRIN M F.
Commercial utilization of plant-derived saponins: An overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications.
In:
Saponins used in traditional and modern medicine, Vol. 404.
ED. Walter G R, Yamasaki K,
London : Plenum press ; 1996 : 1-14.
- 38 - KENNELLY E J, SUTTISRI R, KINGHORN D.
Nouvel sweet-tasting saponins of the cycloartane, oleanane, secodammarane, and steroidal types.
In:
Saponins used in food and agriculture, Vol. 405.
ED. Walter G R, Yamasaki K,
London : Plenum press ; 1996 : 13-23.
- 39 - CHEEKE P R..
Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition.
J Anim Sci 1999 ; 1-10.

- 40 - CHEEKE P R.
The Linus Pauling Institute.
Saponins : Surprising benefits of desert plants. [consulté le 15/02/2005].
Disponible à partir de l'URL :
<http://lpi.oregonstate.edu/sp-su98/saponins.html>
- 41 - CHEEKE P R.
Applications of Yucca and Quillaja saponins animal production.
In:
International Conference on Saponins (2004 : Pulawy, Poland).
Phytochemistry and Application of Plant Saponins.
Pulawy : Institute of soil science and plant cultivation ; 2004: 25.
- 42 - SAN MARTIN R M, OTERO A F, FIGUEROA M, ESCOBAR M, CRUZ A.
Use of Quillaja saponins (*Quillaja saponaria* Molina) to control acid mist in copper electrowinning processes. Part 1. Laboratory scale evaluation.
Hydrometallurgy 2005 ; 77 : 163-170.
- 43 - BONTE F, NOLLENT V.
Les plantes: un moyen efficace pour lutter contre les rides.
La Phytothérapie Européenne 2004 ; Juillet-Août : 20-26.
- 44 - MOREINA B, HUB K F, ABUSUGRAB I.
Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine.
Adv Drug Deliv Rev 2004; 56:1367-1382.
- 45 - SAN MARTIN R M, OTERO A F, CRUZ A.
Use of Quillaja saponins (*Quillaja saponaria* Molina) to control acid mist in copper electrowinning processes. Part 2: pilot plant and industrial scale evaluation.
Hydrometallurgy 2005 ; 77 : 171-181.
- 46 - AREGHEORE E M..
Effect of *Yucca schidigera* saponins on the nutritive value of urea-ammoniated maize stover and its feeding value when supplemented with forage legume (*Calliandra calothyrsus*) for goats.
Small Rumin Res 2005 ; 56 : 95-102.
- 47 - HU K F, REGNER M, SIERGRIST C A, LAMBERT P, CHEN M, BENGTTSSON K L et al.
The immunomodulating properties of human respiratory syncytial virus and immunostimulating complexes containing Quillaja saponins components QH-1, QH-C and ISCOPREP™ 703.
FEMS Immunol Med Microbiol 2005 ; 43 : 269-276.
- 48 - BRUNETON J.
Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales, 3^{ème} Ed.
Paris : Tec et Doc ; 1999 ; 661-719.
- 49 - HOSTETTMANN K, MARSTON A..
Saponins. Chemistry and pharmacology of Natural Products.
Cambridge : University Press ; 1995.
- 50 - KAIPNAZAROV T N, UTENIYAZOV K K, SAATOV Z.
The structure of the cyclostepuloside E from *tragacantha stipulosa* Boriss..
In:
International Conference on Saponins (2004 : Pulawy, Poland).
Phytochemistry and Application of Plant Saponins.
Pulawy : Institute of soil science and plant cultivation ; 2004: 82.
- 51 - MASSIOT G, LAVAUD C.
Structural Elucidation of Saponins.
In:
Studies in Natural Products Chemistry, vol 15.
Ed. Atta-ur-Rahman
Amsterdam : Elsevier Science B.V; 1995 : 187-224.

- 52 - MAHATO S B, KUNDU A P.
¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features.
Phytochemistry 1994 ; 35 : 1319-1324.
- 53 - THILBORG S T, CHRISTINSEN S B, CORNETT C, OLSEN C E, LEMMICH E.
Molluscicidal saponins from a Zimbabwean strain of *Phytolacca dodecandra*.
Phytochemistry 1994 ; 36 : 753-759.
- 54 - BIALY Z, JURZYSTA M, MELLA M, TAVA A..
Triterpene Saponins from Aerial Parts of *Medicago arabica* L.
J Agric Food Chem 2004 ; 52 : 1095-1099.
- 55 - LAVAUD C, VOUTQUENNE L, MASSIOT G, LE MEN-OLIVIER L, DAS B C, LAPREVOTE O et al.
Saponins from the stem bark of *Filicium decipiens*.
Phytochemistry 1998 ; 47 (3) : 441-449.
- 56 - AGRAWAL P K.
NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides.
Phytochemistry 1992 ; 31 (10) : 3307-30
- 57 - BOCK K, PEDERSEN C.
Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of monosaccharides
Adv Carbohydr Chem Biochem 1983 ; 41 : 27-49
- 58 - MSHVILDADZE V, ELIAS R, FAURE R., DEBRAUWER L, DEKANOSIDZE G,
KEMERTELIDZE E et al.
Triterpenoid Saponins from Berries of *Hedera colchica*.
Chem Pharm Bull 2001 ; 49 : 752-754.
- 59 - MSHVILDADZE V, FAVEL A, DELMAS F, ELIAS R, FAURE R., DECANOSIDZE G et al.
Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*.
Pharmazie 2000 ; 55 : 325-326.
- 60 - KIZU H, KITAYAMA S, NAKATANI F, TOMIMORI T, NAMBA T.
Studies on Nepalese Crude Drugs. III. On the Saponins of *Hedera nepalensis* K. KOCH.
Chem Pharm Bull 1985 ; 33 : 3324-3329.
- 61 - ABDEL-KADER M S, BAHLER B D, MALONE S, WERKHOVEN M C M, WISSE J H,
NEDDERMANN K M et al.
Bioactive Saponins from *Swartzia schomburgkii* from the Suriname Rainforest.
J Nat Prod 2000 ; 63 : 923-926.
- 62 - MARSTON A, GAFNER F, DOSSAJI S F, HOSTETTMANN K.
Fungicidal and molluscicidal saponins from *Dolichos kilimandscharicus*.
Phytochemistry 1988 ; 27 : 1325-1326.
- 63 - CHEMLI R, BABADJAMIAN A, FAURE R, BOUKEF K, BALANSARD G, VIDAL E.
Arvensoside A and B, triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*.
Phytochemistry 1987 ; 26 : 1785-1788.
- 64 - PIZZA C, ZHONG-LIANG Z, DE TOMMASSI N.
Plant metabolites. triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*.
J Nat Prod 1987 ; 50 : 927-931.
- 65 - YOSHIKAWA M, MURAKAMI T, KISHI A, KAGEURA T, MATSUDA H.
Medicinal Flowers. III. Marigold. (1): Hypoglycemic, Gastric Emptying Inhibitory and Gastroprotective Principles and New Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Calendulasaponins A, B, C and D, from Egyptian *Calendula officinalis*.
Chem Pharm Bull 2001 ; 49 : 863-870.
- 66 - ABDEL-SATTAR E.
Saponin glycosides from *Osteospermum vaillantii*.
Pharm Biol 2001 ; 39 : 440-444.

- 67 - TAN N, ZHOU J, ZHAO S.
Advances in structural elucidation of glucuronides oleanane-type triterpene carboxylic acid 3,28-O-bidesmosides (1962-1997).
Phytochemistry 1999 ; 52 : 153-192.
- 68 - GÜNTHER H.
La spectroscopie de RMN.
Paris : Masson : 1994.
- 69 - DOMON B, HOSTETTMANN K.
Saponins with Molluscicidal Properties from *Lonicera nigra* L.
Helv Chim Acta 1983 ; 66 : 422-428.
- 70 - VIDAL-OLIVIER E, BALANSARD G, FAURE R., BABADJAMIAN A.
Revised structures of triterpenoid saponins from the flowers of *Calendula officinalis*.
J Nat Prod 1989 ; 52 : 1156-1159.
- 71 - PAPHASSARANG S, RAYNAUD J, LUSSIGNOL M, BECCHI M.
Triterpenic glycosides from *Polyscias scutellaria*.
Phytochemistry 1989 ; 28 : 1539-1541.
- 72 - RIDOUT C L, PRICE K R, DIJOUX M-G, LAVAUD C.
Saponins from Sugar Beet and the floc Problem.
J Agric food Chem 1994 ; 42 : 279-282.
- 73 - LAVAUD C, BEAUVIERE S, MASSIOT G, LE MEN-OLIVIER L, BOURDY G.
Saponins from *Pisonia umbellifera*.
Phytochemistry 1996 ; 43 : 189-194.
- 74 - ZHU N, SHENG S, SANG S, JHOO J-W, BAI N, KARWE M V e al.
Triterpene Saponins from Debittered Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Seeds.
J Agric food Chem 2002 ; 50 : 865-867.
- 75 - SRIVASTAVA S K, JAIN D C.
Triterpenoid saponins from plants of Araliaceae.
Phytochemistry 1989 ; 28 (2) : 644-647.
- 76 - ELIAS R, DE MEO M, VIDAL-OLIVIER E, LAGET M, BALANSARD G, DUMENIL G.
Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L.
Mutagenesis 1990 ; 5 (4) : 327-331.
- 77 - SAKAI S, KATSUMATA M, SATOH Y, NAGASAO M, MIYAKOSHI M, IDA Y et al.
Oleanolic acid saponins from root bark of *Aralia elata*.
Phytochemistry 1994 ; 35 : 1319-1324.
- 78 - XIANG T, TEZUKA Y, WU L J, BANSKOTA A. H, KADOTA S.
Saponins from *Lonicera bournei*.
Pharm Biol 2000 ; 54 : 795-799.
- 79 - SHAO Y, LI Y L, ZHOU B N.
Phenolic and triterpenoid glycosides from *Aster batangensis*.
Phytochemistry 1996 ; 41 : 1593-1598.
- 80 - HEINZMANN B M, PAULO SCHENEKL E.
Saponins from *Ilex dumosa*.
J Nat Prod 1995 ; 58 (9) : 1419-1422.
- 81 - YE W, PAN G, ZHANG Q, CHE C T, WU H, ZHAO S.
Five New Triterpene Saponins from *Pulsatilla patens* var. *multifida*.
J Nat Prod 1999 ; 62 : 233-237.
- 82 - HASLAM E.
Plant polyphénols.
Cambridge ; Ed. Cambridge university press; 1989.

- 83 - HARBORNE J B, WILLIAMS C A.
Advances in flavonoid research since 1992.
Phytochemistry 2000 ; 55 : 481-504.
- 84 - BEECHER G R.
Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with human Health.
Pharm Biol 2004 ; 42 : 2-20.
- 85- LI Y, KIM J, Li J, LIU F, LIU X, HIMMELDIRK K et al.
Natural anti-diabetic compound 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-D-glucopyranose binds to insulin receptor and activates insulin-mediated glucose transport signaling pathway.
Biochem Biophys Res Commun 2005 ; 336 (2) : 430-437.
- 86 - GROSS M.
Flavonoids and Cardiovascular Disease.
Pharm Biol 2004 ; 42 : 21-35.
- 87 - NEUHOUSER M L.
Flavonoids and Cancer Prevention: What Is the Evidence.
Pharm Biol 2004 ; 42 : 36-45.
- 88 - KONDRATYUK T P, PEZZUTO J M.
Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health.
Pharm Biol 2004 ; 42 : 46-63.
- 89 - OKUDA T.
Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants.
Phytochemistry 2005 ; 66 (17) : 2012-2031.
- 90 - QUINN J, KAYE J, MONTINE T, STACKMAN R.
Phytochemicals in Alzheimer Disease: The Development of Clinical Trials.
Pharm Biol 2004 ; 42 : 64-73.
- 91 - JEONG W S, KONG A N T.
Biological Properties of Monomeric and Polymeric Catechins: Green Tea Catechins and Procyanidins.
Pharm Biol 2004 ; 42 : 84-93.
- 92 - KUROSAKI F, KIZAWA Y, NISHI A.
Biosynthesis of dihydroisocoumarin by extracts of elicitor-treated Carrot root.
Phytochemistry 1989 ; 28 (7) : 1843-1845.
- 93 - KHANBABAEE K, VAN REE T.
Tannins : Classification and Definition.
Nat Prod Rep 2001 ; 18 : 641-649.
- 94 - MORIKAWA T, TAO J, UEDA K, MATSUDA H, YOSHIKAWA M.
Medicinal Foodstuffs. XXXI. Structures of New Aromatic Constituents and Inhibitors of Degranulation in RBL-2H3 Cells from a Japanese Folk Medicine, the Stem Bark of *Acer nikoense*.
Chem Pharm Bull 2003 ; 51 : 62-67.
- 95 - SHIMOMURA H, SASHIDA Y, OHARA M., TENMA H.
Phenolic glucosides from parabenzoïn *praecox*.
Phytochemistry 1988 ; 27 (2) : 645-646.
- 96 - STEINBECK C, SCHNEIDER C, ROTSCHEIDT C, BREITMAIER E.
A 4-methyl-7-hydroxyphthalide glycoside and other constituents from *Quillaja saponaria* Molina.
Phytochemistry 1995 ; 40 (4) : 1313-1315.
- 97 - VEROTTA L, DELL'AGLI M, GIOLITO A, GUERRINI M, CABALION P, BOSISIO E.
In Vitro Antiplasmodial activity of Extracts of *Tristaniopsis* Species and Identification of the Active Constituents: Ellagic Acid and 3,4,5-trimethoxyphenyl-(6'-*O*-galloyl)-*O*- β -D-glucopyranoside.
J Nat Prod 2001 ; 64 : 603-607.

- 98 - YI J H, ZHANG G L, LI B G, CHEN Y Z.
Two glycosides from the stem bark of *Tetracentron sinense*.
Phytochemistry 2000 ; 53 : 1001-1003.
- 99 - SCHILLING G, KELLER A.
Monogalloylhamamelose aus *Hamamelis virginiana*.
Z Naturforsch 1986 ; 41 : 253-257.
- 100 - HARTISCH C, KOLODZIEJ H.
Galloylhamameloses and proanthocyanidins from *Hamamelis virginiana*.
Phytochemistry 1996 ; 42 (1) : 191-198.
- 101 - LAMPIRE O, MILA I, RAMINOSOA M, MICHON V, HENRY DU PENHOAT C, FAUCHEUR N et al.
Polyphenols isolated from the bark of *Castanea sativa* Mill. Chemical structures and auto-association.
Phytochemistry 1998 ; 49 (2) : 623-631.
- 102 - NONAKA G I, AGETA M, NISHIOKA I.
Tannins and Related Compounds. XXV. A New Class of Gallotannins Possessing a (-)-Shikimic Acid Core from *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* NAKAI.
Chem Pharm Bull 1985 ; 33 (1) : 96-101.
- 103 - HRICOVINIOVA Z, LAMBA D, HRICOVINI M.
Structure of 2-C-(hydroxymethyl)-D-ribose (hamamélose) in the solid-state analyzed by CP MAS NMR and X-ray crystallography.
Carbohydr Res 2005 ; 340 : 455-458.
- 104 - HRICOVINIOVA-BILIKOVA Z, HRICOVINI M, PETRUSOVA M, SERIANNI A S, PETRUS L.
Stereospecific molybdic acid-catalyzed isomerization of 2-hexuloses to branched-chain aldoses
Carbohydr Res 1999 ; 319 : 38-46.
- 105 - BOGDANOV M G, TODOROV I S, MANOLOVA P G, CHESHMEDZHIEVA D V, PALAMAREVA M. D.
Configuration and conformational equilibrium of (\pm)-*trans*-1-oxo-3-thiophen-2-yl-isochroman-4-carboxylic acid methyl ester.
Tetrahedron Lett 2004 ; 45 : 8383–8386.
- 106 - HUTCHINGS M G, CHIPPENDALE A M, SHUKLA R, MPARTLIN M.
Alkoxide-induced ring-opening of methoxymethylidene-substituted homophthalic anhydride part 2. Structure and conformational analysis of the dihydroisocoumarin products.
Tetrahedron 1991; 47 (37):7869-7874.
- 107 - KUROSAKI Y, FUKUDA T, IWAO M.
Asymmetric synthesis of 3-substituted 3,4-dihydroisocoumarins via stereoselective addition of laterally lithiated chiral 2-(*O*-tolyl) oxazolines to aldehydes followed by diastereomer-selective lactonization.
Tetrahedron 2005 ; 61 : 3289–3303.
- 108 - SPERANZA G, MANITTO P, CASSARA P, MONTI D.
Feralolide, a dihydroisocoumarin from cape aloe.
Phytochemistry 1993 ; 33 (1) : 175-178.
- 109 - WANG H M, SHI W, XU Y K, LIU Y, LÜ M J, PAN J Q.
Spectral study of a new dihydroisocoumarin.
Magn Reson Chem 2003 ; 41 : 718-720.
- 110 - KROHN K, BAHRAMSARI R, FLÖRKE U, LUDEWIG K, KLICHE-SPORY C, MICHEL A et al.
Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity.
Phytochemistry 1997 ; 45 (2) : 313-320.
- 111 - ITO C, MISHINA Y, LITAUDON M, COSSON J P, FURUKAWA H.
Xanthone and dihydroisocoumarin from *Montrouzieria sphaeroidea*.
Phytochemistry 2000 ; 53 : 043-1046.

- 112 - SLADE D, FER.EIRA D, MARAIS J P J.
Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoïdes.
Phytochemistry 2005 ; 66 (18) : 2177-2215.
- 113 - CONNOLY J D.
Natural products from around the world.
Pure Appl Chem 2001 ; 73 (3) :567-571.
- 114 - KIM J-P, LEE I K, YUN B-S, CHUNG S H, SHIM G-S, KOSHINO H, YOO I D.
Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globulus*.
Phytochemistry 2001 ; 57 (1) : 587–591.
- 115 - NG A-S.
3-O-Methylellagic Acid-4'-O- α -Rhamnoside From *Alangium ridleyi*.
Bull Singapore Nat Inst Chem 1994; 22: 53-56.
- 116 - KANEGUSUKU M, BENASSI J C, PEDROSA R. C, YUNES R. A, FILHO V C, MAIA A A et al.
Cytotoxic, Hypoglycemic Activity and Phytochemical Analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae).
Z Naturforsch 2002 ; 57 : 272-276.
- 117 - ITO A, CHAI H-B, LEE D, KARDONO L B-S, RISWAN S, FARNSWORTH N R et al.
Ellagic acid derivatives and cytotoxic cucurbitacins from *Elaeocarpus mastersii*.
Phytochemistry 2002 ; 61 : 171–174.
- 118 - MASAKI H, ATSUMI T, SAKURAIB H.
Protective activity of hamamelitannin on cell damage of murine skin fibroblasts induced by UVB irradiation.
J Dermatol Sc 1995; 10 : 25-34.
- 119 - HABTEMARIAM S.
Hamamelitannin from *Hamamelis virginiana* inhibits the tumour necrosis factor- α (TNF)-induced endothelial cell death *in vitro*.
Toxicol 2002 ; 40 : 83-88.
- 120 - MASAKI H, ATSUMI T, SAKURAI H.
Hamamelitannin as a new potent active oxygen scavenger.
Phytochemistry 1994 ; 37 (2) : 337-343.
- 121 - DAUER A, HENSEL A., LHOSTE E, KNASMÜLLER S, MERSCH-SUNDERMANN.
Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis.
Phytochemistry 2003 ; 63 : 199-207.
- 122 - THIEM B, GOSLINSKA O.
Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves.
Fitoterapia 2004 ; 75 : 93-95.
- 123 - DELAUDE C.
Les Sapindaceae et leurs saponines.
Bull Soc r sci Liège 1993 ; 62 : 93-120.
- 124 - UMADEVI I, DANIEL M.
Chemosystematics of the Sapindaceae.
Feddes Repert 1991 ; 102 : 607-612.
- 125 - HEGNAUER R.
Sapindaceae.
In:
Chemotaxonomie der Pflanzen, Vol 9
Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag, 1990, 486-496.
- 126 - VOUTQUENNE L.
Saponines et activités hémolytiques. Saponines et glycosides de cinq espèces de Sapindaceae.
Ann Pharm Fr 2001 ; 59 : 407-414.

- 127 - SETZER W N, VOGLER B, SCHMIDT J M, PETTY J L, HABER W A.
Isolation of Cupanoside, a novel cytotoxic and antibacterial long-chain fatty alcohol glycoside from the bark of *Cupania glabra*.
Planta Med 2005 ; 71 : 686-688.
- 128 - DIZES C, GERALD F, LAVAUD C, ELIAS R, FAURE R, MASSIOT G et al.
Harpuloside a triterpenoid saponin from *Harpullia ramiflora*.
Phytochemistry 1998 ; 48 (7) : 1229-1232.
- 129 - VOUTQUENNE L, GUINOT P, FROISSARD C, THOISON O, LITAUDON M, LAVAUD C.
Haemolytic acylated triterpenoid saponins from *Harpullia-austro-caledonica*.
Phytochemistry 2005 ; 66 : 825-835.
- 130 - KASAI R, FUJINO H, KUZUKI T, WONG W-H, GOTO C, YATA N et al.
Acyclic sesquiterpene oligoglycosides from pericarps of *Sapindus mukurossi*.
Phytochemistry 1986 ; 25 (4) : 871-876.
- 131 - WONG W-H, KASAI R, CHOSHI W, NAKAGAWA Y, MIZUTANI K, OHTANI K et al.
sesquiterpene oligoglycosides from pericarps of *Sapindus delavayi*.
Phytochemistry 1991 ; 30 (8) : 2699-2702.
- 132 - KASAI R, NISHI M, MIZUTANI K, MIYAHARA I, MORIYA T, MIYHARA K et al.
Trifolioside II, an acyclic sesquiterpene oligoglycoside from pericarps of *Sapindus trifoliatus*.
Phytochemistry 1988 ; 27 (7) : 2209-2211.
- 133 - ADESANYA S A, MARTIN M T, HILL B, DUMONTET V, TRI M V, SEVENET T et al.
Rubiginoside, a farnesyl glycoside from *Lepisanthes rubiginosa*.
Phytochemistry 1999 ; 51 : 1039-1041.
- 134 - BOUSSEROUEL H, LITAUDON M, MORELO B, MARTIN M-T, THOISON O, NOSJEAN O et al.
New biologically active linear triterpenes from the bark of three new-caledonian *Cupaniopsis* species.
Tetrahedron 2005 ; 61 : 845-851.
- 135 - VOUTQUENNE L, LAVAUD C, MASSIOT G, SEVENET T, HADI A H.
Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*.
Phytochemistry 1999 ; 50 : 63-69.
- 136 - LAUNDRY DE MESQUITA M, GRELLIER P, BLOND A, BROUARD J-P, DE PAULA J E, SALMEN ESPINDOLA L ET AL.
New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity .
Bioorg Med Chem 2005 ; 13 (14) : 4499-4506.
- 137 - LE ROUX E, DOCO T, SARNI-MANCHADO P, LOZANO Y, CHEYNIER V.
A-type proanthocyanidins from pericarp of *Litchi chinensis*.
Phytochemistry 1998 ;48 (7) : 1251-1258.
- 138 - Taxonomy
Les Sapindaceae. [consulté le 30/07/2005].
Disponible à partir de : URL :
<http://sn2000.taxonomy.nl/main/classification/100856.htm>
- 139 - DE KOK R.
Are plant adaptations to growing on serpentine soil rare or common? A few case studies from New Caledonia.
Adanosonia 2002 ; 24 : 229-238.
- 140 - YAO L, JIANG Y, SINGANUSONG R, D'ARCY B, DATTA N, CAFFIN N et al.
Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication..
Food Res Internat 2004 ; 37 (2) : 166-174.

- 141 - YAO L, JIANG Y, SINGANUSONG R, D'ARCY B, DATTA N, CAFFIN N et al.
Phenolic acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication.
Food Res Internat 2005; 38 (6): 651-658.
- 142 - RENIMEL I, OLIVIER M, ANDRE P.
Use of *Guioa* plant extract in cosmetic and pharmaceutical compositions for the treatment of skin aging.
Parfum Christian Dior S. A.
France
BREVET, 1998, FR 2757394.
- 143 - MARKHAM K.
Plant Phenolics; 1
In :
Methods in plant biochemistry.
Ed. Dey, Harborne
London : Academic Press Inc ; 1993 : 197-235.
- 144 - VOIRIN B.
UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri (3', 4', 5')-substituted B rings.
Phytochemistry 1983 ; 22 (10) : 2107-45.
- 145 - WILLIAMS C, HARBORNE J.
Flavone and flavonol glycosides.
In :
The flavonoids. Advances in research since 1986
Ed. Harborne
London : Chapman and Hall ; 1994 : 337-70
- 146 - DE SIMONE F, DINI A, PIZZA C, SATURNINO P, SCETTINO O.
Two flavonol glycosides from *Chenopodium quinoa*.
Phytochemistry 1990 ; 29 (11) : 3690-3692.
- 147 - BRUN G, DIJOUX M G, DAVID B, MARIOTTE A M.
A new flavonol glycoside from *Catharanthus roseus*.
Phytochemistry 1999 ; 50 : 167-169.
- 148 - DINI I, TENORE G C, DINI A.
Phenolic constituents of *Kancolla* seeds.
Food Chem 2004 ; 84 : 163-168.
- 149 - YASUKAWA K., TAKIDO M.
A flavonol glycoside from *Lysimachia mauritiana*.
Phytochemistry 1987 ; 26 (4) : 1224-1226.
- 150 - YASUKAWA K., OGAWA H, TAKIDO M.
Two flavonol glycosides from *Lysimachia nummularia*.
Phytochemistry 1990 ; 29 (5) : 1707-1708.
- 151 - YASUKAWA K., SEKINE H, TAKIDO M.
Two flavonol glycosides from *Lysimachia fortunei*.
Phytochemistry 1989 ; 28 (8) : 2215-2216.
- 152 - BACKINOWSKY L, BALAN N F, SHASHKOV A. S, KOCHETKOV N K.
Synthesis and ¹³C-NMR spectra of β -L-rhamnopyranosides.
Carbohydr Res 1980 ; 84 : 225-235.
- 153 - KASAI R, OKIHARA M, ASAKAWA J, MIZUTANI K, TANAKA O.
¹³C NMR study of α and β -anomeric pairs of D-mannopyranosides and L-rhamnopyranosides
Tetrahedron 1979 ; 35 : 1427-1432.

- 154 - ROHR G E, MEIER B, STICHER O.
Studies in Natural Products Chemistry. Vol. 21.
ED. Atta-ur-Rahman,
Amsterdam: Elsevier Science B. V; 2000: 497-570.
- 155 - PORTER L J.
Plant Phenolics
In:
Methods in plant biochemistry
Ed. Dey, Harborne
London : Academic Press Inc ; 1993 : 411-417
- 156 - LE ROUX E, DOCO T, SARNI-MANCHADO P, LOZANO Y, CHEYNIER V.
A-type proanthocyanidins from pericarp of *Lichi chinensis*.
Phytochemistry 1998 ; 48 (7) : 1251-1258.
- 157 - SANTOS-BUELGA C, KOLODZIEJ H, TREUTTER D.
Procyanidins trimers possessing a doubly linked structure from *Aesculus hippocastanum*.
Phytochemistry 1994 ; 38 : 499-504.
- 158 - DE FREITAS V A P, GLORIES Y, BOURGOIS G, VITRY C.
Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquide secondary ion mass spectrometry.
Phytochemistry 1998 ; 49 (5) : 1435-1441.
- 159 - LOU H, YAMAZAKI Y, SASAKI T, UCHIDA M, TANAKA H, OKA S.
A-type proanthocyanidins from peanut skins
Phytochemistry 1999 ; 51 : 297-308.
- 160 - LOKVAM J, COLEY P D, KURSAR T A.
Cinnamoyl glucosides of Catechin and dimeric procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae).
Phytochemistry 2004 ; 65 : 351-358.
- 161 - BALDE A M, PIETERS L A., GERGELY A., KOLODZIEJ H, CLAEYS M, VLIETINCK A. J.
A-type proanthocyanidins from stem-bark of *Pavetta owariensis*.
Phytochemistry 1991 ; 30 (1) : 337-342.
- 162 - FOO L Y, KARCHESY J J.
Procyanidin polymers of Douglas fir bark: structure from degradation with phloroglucinol.
Phytochemistry 1989 ; 28 (11) : 3185-3190.
- 163 - CRONJE A, BURGER J F W, BRANDT E V, KOLODZIEJ H, FERREIRA D.
Assesment of 3,4-*trans* and 3,4-*cis* relative configurations in the A-series of (4,8)-linked proanthocyanidins.
Tetrahedron Lett 1990 ; 31 (26) : 3789-3792.
- 164 - KOLODZIEJ H.
Occurrence of procyanidins in *Nelia meyrei*.
Phytochemistry 1984 ; 23 (8) : 1745-1752.
- 165 - SVEDSTRÖM U, VUORELA H, KOSTIAINEN R, TUOMINEN J, KOKKONEN J, RAUHA J P et al.
Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers..
Phytochemistry 2002 ; 60 : 821-825.
- 166 - KAMIYA K, WATANABE C, ENDONG H, UMAR M, SATAKE T.
Studies on the Constituents of Bark of *Parameria laevigata* Moldenke.
Chem Pharm Bull 2001 ; 49 (5) : 551-557.
- 167 - NONKA G I, MORIMOTO S, NISHIOKA I.
Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and Structures of Trimeric, Tetrameric, and pentameric Proanthocyanidins from Cinnamon.
J Chem Soc Perkin Trans I 1983 ; 19 : 2139-2145.

- 168 - BALDE A M, DE BRUYNE T, PIETERS L, CLAEYS M, VANDEN BEERGHE D, VLIETINCK A et al.
Proanthocyanidins from stem bark of *Pavetta owariensis*, 3. NMR study of acetylated trimeric proanthocyanidins possessing a doubly-linked structure.
J Nat Prod 1993 ; 56 (7) :1087-1088.
- 169 - BALDE A M, PIETERS L A, WRAY V, KOLODZIEJ H, VANDEN BERGHE D A, CLAEYS M et al.
Dimeric and trimeric proanthocyanidins possessing a doubly linked structure from *Pavetta owariensis*.
Phytochemistry 1991 ; 30 (12) : 4129-4135.
- 170 - TANAKA Y.
Rubber and related Polyprenols.
In:
Methods in plant biochemistry vol. 7 (terpenoids)
ED. Dey, P. M., Harborne, J. B.,
London : Academic Press Limited ; 1991 : 519-536.
- 171 - AHMED A H.
Farnesol and thymol derivatives from *Asteriscus pygmaeus*.
J Nat Prod 1992 ; 55 (6) : 824-827.
- 172 - SATO A, SHINDO T, HORIKOSHI H, KUWANO H, KINOSHITA T.
Farnesol glycosides to enhance glucose absorption by insulin target celles.
Sankyo Co., Ltd.
Japon
BREVET, 1988, JP 63203694 A2 19880823.
- 173 - SHINDO T, SATO A, HORIKOSHI H, KUWANO H.
A Farnesyl arabinoside as an enhancer of glucose absorption in rat adipocytes from a soft coral, *Sinularia* sp.
Experientia 1992 ; 48 (7) : 688-690.
- 174 - VOUTQUENNE L, LAVAUD C, MASSIOT G, LE MEN-OLIVIER L.
Structure-activity relationships of haemolytic saponins.
Pharm Biol 2002 ; 40 : 253-262.
- 175 - SCHLOSSER E, WULFF G.
Über die strukturspezifität der saponinhämolyse. I: Triterpensaponine und –aglykone.
Z Naturforschg 1969 ; 24b : 1284-1290.
- 176 - NOSE M, AMAGAYA S, OGIHARA Y.
Effects of saikosaponin metabolites on the hemolysis of red blood cells and their adsorbality on the cell membrane.
Chem Pharm Bull 1989 ; 37 (12) : 3306-3310.
- 177 - SEGAL R, MANSOUR M, ZAITSCHEK DV.
Effect of ester groups on the haemolytic action of some saponins and sapogenins.
Biochem Pharmacol 1966 ; 15 : 1411-1416.
- 178 - SEGAL R, MILO-GOLDZWEIG I, SCHUPPER H, ZAITSCHEK D. V.
Effect of ester groups on the haemolytic action of sapogenins-II: esterification with bifunctional acids.
Biochem Pharmacol 1970 ; 19 : 2501-2507.
- 179 - SEGAL R, MILO-GOLDZWEIG I.
On the similarity of hemolysis induced by plant sapogenins and by neutral steroids.
Biochem Pharmacol 1971 ; 20 : 2163-2167.
- 180 - OLESZEK W.
Structural specificity of alfalfa (*Medicago sativa*). Saponin haemolysis and its impact on two haemolysis-based quantification methods.
J Sci Food Agric 1990 ; 53 : 477-485.
- 181 - TAKECHI M, TANAKA Y.
Structure-activity relationships of synthetic methyl oleanolate glycosides.
Phytochemistry 1992 ; 31 : 3789-3791.

- 182 - SEEBACHER W, WEIS R, JURENITSCH J, RAUCHENSTEINER K, HASLINGER E.
Synthesis and haemolytic activity of oleanolic acid trisaccharides.
Monatsh Chem 1999 ; 130 : 1383-1391.
- 183 - TAKECHI M, UNO C, TANAKA Y.
Structure-activity relationships of synthetic saponins.
Phytochemistry 1996 ; 41 (1) : 121-123.
- 184 - ULLAH N, SEEBACHER W, WEIS R, JURENITSCH J, RAUCHENSTEINER K, HASLINGER E.
Synthesis and hemolytic properties of glycyrrhetic acid glycosides.
Monatsh Chem 2000 ; 131 : 787-794.
- 185 - CHWALEK M, PLE K, VOUTQUENNE L.
Synthesis and haemolytic activity of some hederagenin diglycosides.
Chem Pharm Bull 2004 ; 52 (8) : 965-971.
- 186 - CHWALEK M.
Hémisynthèse de saponosides à hédéragénine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique.
Th 3 cycle : Pharm : Reims : 2004 ; 204.
- 187 - CARON C, DELAUDE C.
Effet d'une série de saponines extraites de végétaux de l'Afrique tropicale sur les larves d'*Artemia salina* Leach (Crustaceae Branchiopoda).
Bull Soc r sci Liège 1989 ; 6 : 445-451.
- 188- JURANIC Z, ZIZAK Z, TASIC Z, PETROVIC S, NIDZOVIC S, LEPOSAVIC A et al.
Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars.
Food Chem 2005; 93 (1) : 39-45.
189. SOONG Y-Y, BARLOW P-J.
Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity.
Food Chem 2005.
- 190- SEERAM N P, ADAMS L S, HENNING S M, NIU Y, ZHANG Y, NAIR M G et al.
In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice.
J Nutr Biochem 2005; 16 (6) : 360-367.
- 191 – TAVA A, MELLA M, BIALY Z, JURZYSTA M.
Stability of Saponins in Alcoholic Solutions: Ester formation as Artifact.
J Agric Food Chem 2003 ; 51 : 1797-1800.
- 192 – ELKHATEEB A, SUBEKI K, TAKAHASHI H, MATSUURA M, YAMATO O et al.
Structure-activity relationships of synthetic saponins.
Phytochemistry 2005 ; 66 (21) : 2577-2580.

Abdulmagid ALABDUL MAGID

Étude chimique de deux *Caryocar* de Guyane et d'un *Guioa* de Nouvelle Calédonie.

Th.Pharm.Univ. : REIMS : 2005

Rubrique : PHARMACIE-Pharmacognosie

Résumé :

L'étude chimique des fruits et des écorces de tronc de *Caryocar glabrum* et *Caryocar villosum*, ainsi que celle des feuilles de *Guioa crenulata* a permis d'identifier 76 composés dont 53 correspondent à de nouvelles structures. Les composés isolés appartiennent à huit classes de métabolites secondaires : 54 saponosides, 4 glycosides d'alcool benzylique ou phénolique, 3 galloylhamameloses, 2 glycosides de 3,4-dihydroisocoumarine phénylée, 5 dérivés de l'acide ellagique, 3 flavonoïdes, 1 tanin trimère et 4 glycosides de farnésol. La détermination de structure de ces différents composés a été réalisée à l'aide des méthodes spectroscopiques de RMN et de spectrométrie de masse ESI-(MS)ⁿ. Dans certains cas, un recours au dichroïsme circulaire s'est avéré nécessaire afin de déterminer la configuration des carbones asymétriques.

Les activités biologiques des différents extraits et de certains composés isolés purs ont été étudiées. Pour l'activité hémolytique des saponosides, l'influence d'un acide glucuronique par rapport à un glucose a été comparée et montre une inversion d'activité lorsque l'on augmente la polarité sur le cycle A de la génine. L'activité toxique des extraits et fractions enrichies en saponosides a été testée sur *Artemia salina* et montre que les saponosides des fruits sont toxiques avec une CI₅₀ de 100 µg/ml. L'activité antibactérienne de certains composés a été mesurée sans donner de composés actifs. Les extraits acétate d'éthyle des fruits de *C. villosum* et des écorces de tronc de *C. glabrum* ont montré une activité antipaludique (CI₅₀=10 µg/ml) sur *P. falciparum*. Aucune activité dermatocosmétique (inhibition de la DOPA oxydase et lipolyse) n'a été observée chez les composés testés. Seul un saponoside présente une cytotoxicité importante sur cellules HaCat.

Mots Clés : Saponine, Tanins, flavonoïdes, hémolyse, Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire, Spectrométrie de masse, ionisation electrospray.

Jury :

Pr. Monique ZECHES-HANROT	Président
Pr. Guy BALANSARD	Rapporteur
Dr. Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA	Rapporteur
Pr. Joseph Donald CONNOLLY	Examineur
Pr. Catherine LAVAUD	Directeur de thèse
Dr. Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO	Co-directeur de

Adresse de l'auteur : M. Abdulmagid ALBDULMAGID
2 place Auguste Rodin
51100 Reims