

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix- Travail- Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

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

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN CHIMIE ET
APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace- Work- Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

POSTGRADUATE SCHOOL OF SCIENCE,
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES

DOCTORAL RESEARCH UNIT IN
CHEMISTRY AND APPLICATIONS

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOCHEMIE DES SUBSTANCES NATURELLES
LABORATORY OF PHARMACOCHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS

Etude chimique des fractions enrichies en saponines
de *Acacia polyacantha* Willd. (Fabaceae) et
Chytranthus macrobotrys Gilg Excell & Mendonça
(Sapindaceae) : évaluation de leur activité antifongique.

THESE

Présentée en vue de la soutenance publique pour l'obtention du diplôme de
Doctorat/Ph.D en Chimie Organique

Par

ATANGANA Jean Faustin

Matricule : 10T0029

MASTER en Chimie Organique

Sous la Co-direction de :

NOTE Olivier Placide

Maître de Conférences

PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel

Professeur



Année académique 2023-2024

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

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



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

POSTGRADUATE SCHOOL FOR SCIENCES,
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION

Titre de la thèse : **Etude chimique des fractions enrichies en saponines de *Acacia polyacantha* Willd. (Fabaceae) et *Chytranthus macrobotrys* Gilg Excell & Mendonça (Sapindaceae) : évaluation de leur activité antifongique.**

Nous soussignés, Professeurs NKENGFACK Augustin Ephrem, TAPONDJOU AZEFACK Léon, ATCHADE Alex de Théodore, DJIOGUE Sefirin, NOTE LOUGBOT Olivier Placide et PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel, attestons que le candidat **ATANGANA Jean Faustin**, matricule **10T0029**, après sa soutenance de thèse de Doctorat/ PhD le 21 Mai 2024, a bel et bien pris en compte dans la mouture finale de sa thèse toutes les corrections qui lui ont été faites conformément aux recommandations du jury.

En foi de quoi nous lui délivrons cette attestation de correction pour servir et valoir ce que de droit./-

Fait à Yaoundé, le **23 MAI 2024**

Président

**NKENGFACK Augustin
Ephrem,**
Professeur, UY1

Membres

**TAPONDJOU AZEFACK
Léon,**
Professeur, UDs

Rapporteurs

**PEGNYEMB Dieudonné
Emmanuel,**
Professeur, UY1

ATCHADE Alex de Théodore
Professeur, UY1

**NOTE LOUGBOT Olivier
Placide,**
Maître de Conférences, UY1

DJIOGUE Sefirin

Maître de Conférences, UY1

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

ANNÉE ACADEMIQUE 2022/2023

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 31 MAI 2023

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Professeur*

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

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal,
Maître de Conférences

Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS :
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (43)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	ATOUGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11.	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
15.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>

16.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
18.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
19.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
20.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
21.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
22.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
23.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

24.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
25.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
26.	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
27.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
31.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
32.	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
34.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35.	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
36.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

37.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
38.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
39.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
40.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Assistant	En Poste
41.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
42.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistant	En poste
43.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (52)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste

8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
22.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
23.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
24.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
25.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
26.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUNSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGOU Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
42.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
43.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
44.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
45.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
46.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
47.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
48.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

49.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
50.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
51.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
52.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (34)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
12.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	En poste
13.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
14.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
16.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

19.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
20.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
21.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
22.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
25.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
26.	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
27.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
28.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
29.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
30.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
31.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
32.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
33.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
34.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen FS Univ.Ngaoundere</i>
6.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
15.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
16.	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
17.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
18.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
19.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
20.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
21.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
22.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste

23.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
24.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
25.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
26.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
27.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
28.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (37)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Recteur Université de Bertoua</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13.	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14.	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
15.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
16.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
17.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>Chef Service / MINESUP</i>
18.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>Directeur ENS / Uté Bertoua</i>
19.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHOUANKEU Jean- Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23.	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
24.	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

25.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
26.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
27.	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
28.	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
29.	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
31.	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33.	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
34.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
35.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

36.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
37.	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général / MINESUP</i>

3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
15.	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
16.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
17.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur ENSET Ebolowa</i>
18.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

19.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
20.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21.	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
22.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	-----------------------	------------	----------------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste

8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
17.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
19.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
20.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
21.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
22.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
23.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
24.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
25.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
26.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste

27.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
30.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
31.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
32.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste
33.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>

3.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
4.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
5.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

10.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
11.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
12.	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
13.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste
14.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
15.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
16.	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
17.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

18.	NKOUÉ TONG Abraham	Assistant	En poste
19.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistant	En poste
20.	EZO'O MENGO Fabrice Téléstor	Assistant	En poste
21.	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23.	NGOUE NAM Romial Joël	Assistant	En poste
24.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	HONA Jacques	Professeur	En poste
6.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
9.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16.	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18.	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19.	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>
30.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférence	<i>En stage depuis février 2023</i>
31.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste

32.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
33.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
34.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
35.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
36.	FOUEJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
37.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
38.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	Directeur Unité de production des réactifs/IMPM
40.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
43.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA /UDs</i>
2.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
7.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
8.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

9.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
11.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
12.	Elisé SABABA	Maître de Conférences	En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. d'Etat/MINMIDT</i>
14.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
15.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i>
16.	MBIDA YEM	Maître de Conférences	En poste
17.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
19.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
20.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
21.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
23.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
25.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

26.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
27.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29.	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
31.	MBESSE Cécile Olive	Chargée de Cours	En poste
32.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef Serv./Uté Maroua</i>
34.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
37.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
40.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

41.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
43.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	15 (11)	13 (03)	7 (05)	43 (20)
BPA	14 (00)	16 (09)	18 (03)	4 (02)	52 (14)
BPV	6 (01)	12 (02)	13 (07)	3 (00)	34 (10)
CI	7 (01)	15 (04)	5 (01)	1 (00)	28 (06)
CO	6 (01)	18 (04)	11 (04)	2 (00)	37 (09)
IN	2 (00)	2 (00)	14 (01)	4 (00)	22 (01)
MAT	1 (00)	8 (00)	17 (00)	7 (01)	33 (01)
MIB	2 (01)	7 (03)	8 (04)	7 (00)	24 (08)
PHY	15 (00)	15 (04)	11 (01)	2 (00)	43 (05)
ST	8 (00)	17 (01)	15 (04)	3 (01)	43 (06)
Total	69 (05)	125 (38)	125 (28)	40 (09)	359 (80)

Soit un total de

359 (80) dont :

- Professeurs **69 (05)**
- Maîtres de Conférences **125 (38)**
- Chargés de Cours **125 (28)**
- Assistants **40 (09)**

() = Nombre de Femmes **80**



Je dédie cette thèse à mes parents :

Mme **BILOA ZANA Marie Sylvie** ;

M. MANDJECK MANDJECK Emmanuel et Mme **NLOMNGAN Thérèse Epse**
MANDJECK

REMERCIEMENTS

Ce travail s'est effectué sous la Co-direction de Dieudonné Emmanuel PEGNYEMB, *Professeur* et Olivier Placide NOTE, *Maître de Conférences*. Mes remerciements vont :

Au **Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles (LPSN)** du Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I, où plus de la moitié du travail a été réalisée. Je remercie également le Laboratoire des produits naturels de la « *International Centre for Chemical and Biological Sciences* » de l'Université de Karachi au Pakistan qui m'a accueilli pendant six mois pour une bourse de recherche et a grandement contribué à l'isolement des molécules ainsi que leurs analyses. Enfin, mes vifs remerciements à l'endroit du **Laboratoire Régional de Lutte Biologique et Microbiologie Appliquée de l'IRAD (Institut de Recherche Agricole pour le Développement)** à Yaoundé au Cameroun, où tout le travail biologique a été réalisé.

A l'organisme "*The World Academy of Sciences*", pour la bourse de recherche qui m'a été accordée dans le cadre du programme de bourse *TWAS-ICCBS Postgraduate Fellowships*.

Au **Pr. Dieudonné Emmanuel Pegnyemb**, Chef de Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I et Chef du Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles (LPSN) dans lequel ce travail a été réalisé. Merci Professeur d'avoir accepté de m'accueillir dans votre laboratoire depuis le cycle Master et de superviser ce travail de thèse.

Au **Pr. Olivier Placide Noté**, mon mentor et certainement l'un de mes plus grands modèles de recherche. Vous m'avez appris l'essentiel de tout ce que je connais dans la recherche et m'avez toujours soutenu même dans les domaines extra scolaires, notamment sur le plan personnel. Merci infiniment pour toute cette formation.

Au **Pr. Muhammad Iqbal Choudhary**, Directeur du centre de recherche ICCBS de l'Université de Karachi au Pakistan. A travers la bourse TWAS-ICCBS, vous m'avez permis de considérablement avancer dans mes travaux de recherche en m'accueillant dans votre laboratoire, m'offrant ainsi un meilleur cadre et des meilleures conditions scientifiques pour réaliser mes travaux.

Au **Dr. Mohamed Haddad**, Chargé de recherche à l'IRD et responsable de l'équipe de recherche PEPS au sein du laboratoire PHARMA-DEV de l'Université de Toulouse III Paul Sabatier (France). Vous m'avez apporté un soutien énorme grâce aux matériels et réactifs que vous m'avez accordé ainsi que la réalisation de certaines analyses chimiques.

Au **Dr Aimé-Didier Boyogueno Begoude**, Chef du Laboratoire Régional de Lutte Biologique et Microbiologie Appliquée de l'IRAD (Institut de Recherche Agricole pour le Développement) à Yaoundé au Cameroun, pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire durant un stage de recherche pour la réalisation des travaux biologiques de cette thèse.

Au **Dr. Lin Marcellin Messi**, Chargé de recherche à l'IRAD et mon encadreur lors du stage de recherche effectué dans cette institution. Merci infiniment pour votre constante disponibilité, votre dévouement et votre implication entière dans la réalisation de ce travail en acceptant de le tutorer. Vous m'avez tenu la main sur tous les aspects (chimique, biologique, personnel) et ce travail ne serait certainement pas arrivé à son terme sans votre aide.

A tous les **enseignants du Département de Chimie Organique** de l'Université de Yaoundé I. Merci chers enseignants pour la formation de qualité reçue depuis mon entrée à l'Université.

A **M. Cyril Antheaume**, du Laboratoire de Chimie Supra moléculaire de l'Université de Strasbourg (France), pour toutes les analyses chimiques effectuées et qui ont permis d'effectuer la détermination des structures des molécules chimiques.

A **M. Bolomigui Boyomo**, pour sa constante disponibilité dans la réalisation des travaux de biologie. Votre aide dans l'accomplissement de ce travail a été très précieuse.

A mes amies et camarades, **Gwladys Sime Djikam**, **Aurore Merveilles Bella** et **Raïssa Carelle Dzukoug** pour les connaissances partagées dans le cadre de nos travaux de recherche respectifs.

A mon aîné **Bertrand Tadjoutsap**, pour la mise en forme finale et l'aide apportée dans la production de ce document.

A mes nombreux camarades de laboratoire (ainés et cadets) dont je ne peux citer individuellement les noms dans ce document, pour toute l'aide que vous m'avez apportée tout au long de ma formation.

Aux grandes familles **ZANA** et **MANDJECK** pour le soutien moral nécessaire dans le bon accomplissement de ces travaux de recherche

A **Mlle Merveille Dongmo Momo**, pour son soutien sans faille, ses précieux conseils et son aide dans les analyses et les interprétations spectrales des composés.

A toutes mes connaissances qui ont aidé afin que je sois dans les meilleures conditions de travail et qui n'auront pas été mentionnés dans ce document.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE	xv
REMERCIEMENTS	xvi
LISTE DES SYMBOLES, ABREVIATIONS ET ACRONYMES	xxi
LISTE DES FIGURES	xxiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxviii
RESUME	xxx
ABSTRACT.....	xxxi
INTRODUCTION	1
Chapitre I : Revue de la littérature	5
I.1. Etude botanique	6
I.1.1. Ordre des Fabales	6
I.1.1.1. Famille des Fabaceae	7
I.1.1.2. Sous-famille des Mimosoideae.....	7
I.1.1.3. Genre <i>Acacia</i>	8
I.1.1.4. <i>Acacia (Senegalia) polyacantha</i> Willd.....	8
I.1.2. Ordre des Sapindales	10
I.1.2.1. Famille des Sapindaceae.....	10
I.1.2.2. Genre <i>Chytranthus</i>	11
I.1.2.3. <i>Chytranthus macrobotrys</i> Gilg Excell & Mendonça	11
I.2. Etude chimique des saponines	13
I.2.1. Généralités sur les saponines	13
I.2.2. Classification des saponines	14
I.2.3. Biosynthèse des aglycones triterpéniques et stéroïdiques	14
I.2.4. Les sucres	17
I.2.5. Les substituants organiques dans les saponines.....	18
I.3. Travaux phytochimiques antérieurs.....	20
I.3.1. Généralités sur les saponines de la famille des Mimosaceae.....	20
I.3.2. Saponines isolées des espèces du genre <i>Acacia</i>	20
I.3.2.1. Saponines triterpéniques	20
I.3.2.2. Autres saponines.....	24
I.3.4. Généralités sur les saponines de la famille des Sapindaceae.....	25
I.3.5. Saponines isolées des espèces du genre <i>Chytranthus</i>	25
I.4. Eléments spectroscopiques de base pour l'identification des saponines.....	29
I.4.1. Spectrométrie de masse	29
I.4.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	29

I.4.2.1. Spectroscopie RMN 1D	30
I.4.2.2. Spectroscopie RMN 2D	30
I.5. Proposition de nomenclature des saponines	32
I.6. Généralités sur les maladies fongiques et les champignons pathogènes	33
I.6.1. Maladies fongiques	33
I.5.2. Champignons pathogènes	34
I.5.3. Mode d'action (attaque) des phytopathogènes sur les plantes	38
I.5.4. Traitement existant contre les maladies fongiques	40
I.5.5. Activité antifongique des saponines	42
I.5.5.1. Mode d'action des saponines sur les phytopathogènes	42
I.5.5.2. Quelques saponines antifongiques	44
Chapitre II : Résultats et discussion	46
II.1. Etude phytochimique	47
II.1.1. Isolement des composés d' <i>Acacia polyacantha</i>	47
II.1.2. Isolement des composés de <i>Chytranthus macrobotrys</i>	50
II.1.3. Caractérisation des saponines	52
II.1.3.1. Détermination de la structure du composé APR411	52
II.1.3.2. Détermination de la structure du composé APR412	67
II.1.3.3. Détermination de la structure du composé APR421	75
II.1.3.4. Détermination de la structure du composé APR431	83
II.1.3.5. Détermination de la structure du composé APR441	91
II.1.3.6. Détermination de la structure du composé APR442	95
II.1.3.7. Identification du composé APTA1	100
II.1.3.8. Identification du composé CMT2	107
II.1.3.9. Identification du composé CMT1	115
II.1.4. Caractérisation des autres composés	119
II.1.4.1. Détermination de la structure du composé APTB	119
II.1.4.2. Identification du composé APT55	127
II.1.4.3. Identification du composé CMTA1	131
II.1.4.4. Identification du composé CMTA2	135
II.1.4.5. Identification du composé CMT21	139
II.1.4.6. Identification du composé CMT31	143
II.1.5. Discussion et conclusion partielles (partie chimique)	147
II.2. Etude biologique	149
II.2.1. Sélection et identification morphologique des champignons pathogènes	149

II.2.2. Evaluation de l'activité antifongique de la fraction enrichie en saponines codifiée APR issue d' <i>Acacia polyacantha</i>	149
II.2.2.1. Paramètres de Croissance Radiale (CR) et de Vitesse de Croissance des différents champignons	150
II.2.2.2. Paramètre de Pourcentage d'Inhibition Moyen	163
II.2.3. Evaluation de l'activité antifongique de la fraction enrichie CMT	164
II.2.3.1. Paramètres de Croissance Radiale (CR) et de Vitesse de Croissance (VC)	164
II.2.3.2. Paramètre de Pourcentage d'Inhibition Moyen	167
II.2.5. Discussion et conclusion partielles (partie biologique)	170
Influence de la concentration des fractions enrichies	171
Influence du temps sur la lutte contre les champignons pathogènes	172
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	173
Chapitre III : Matériel et méthodes	177
III.1. Méthodes chimiques	178
III.1.1. Matériel végétal	178
III.1.2. Extraction, fractionnement et isolement des composés	178
III.1.2.1. Extraction	178
III.1.2.2. Préparation des fractions enrichies en saponines	179
III.1.2.3. Isolement des composés	183
III.1.2.4. Lyophilisation	185
III.1.3. Méthodes d'analyses chimiques	186
III.1.3.1. Méthodes chromatographiques	186
III.1.3.2. Méthodes spectrométriques	187
III.1.3.3. Méthodes spectroscopiques	187
III.1.3.4. Hydrolyse acide	188
III.1.4. Caractéristiques des composés isolés	190
III.2. Méthodes biologiques	195
III.2.1. Culture des champignons pathogènes <i>in vitro</i>	195
III.2.2. Identification morphologique des champignons pathogènes	195
III.2.3. Tests antifongiques <i>in vitro</i> sur les fractions	196
III.2.4. Analyse des données	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	199
ANNEXES	210

LISTE DES SYMBOLES, ABREVIATIONS ET ACRONYMES

$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire
δ	Déplacement chimique
λ	Longueur d'onde
μm	Micromètre
$^{\circ}\text{C}$	Dégré Celcius
^{13}C	Carbone 13
<i>brd</i>	<i>Broad doublet</i>
<i>brs</i>	<i>Broad singulet</i>
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet dédoublé
cm	Centimètre
^1H	Proton
<i>J</i>	Constante de couplage mesurée en <i>Hz</i>
min	Minute
<i>MHz</i>	Méga Hertz
<i>m/z</i>	masse/charge d'un ion
(<i>p</i>)	<i>Para</i>
<i>s</i>	Singulet
<i>t</i>	Triplet
AcOEt	Acétate d'éthyle
CC	Chromatographie sur Colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DCM	Dichlorométhane
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EtOH	Ethanol
ESI	<i>Electro Spray Ionization</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
Gal	Galactopyranosyl
GC-MS	<i>Gaz Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i>
Glc	Glucopyranosyl
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>Hz</i>	Hertz
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
iPrOH	Isopropanol
IRAD	Institut de Recherche Agricole pour le Développement

LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i>
MeOH	Méthanol
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NHAcGlc	N-Acétyleglucosamine
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P.f.	Point de Fusion
<i>Pyr</i>	Pyridine
SM	Spectrométrie de Masse

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Tronc et feuilles d' <i>Acacia polyacantha</i> (Photo Atangana, 2018)	9
Figure 2: Feuilles et tronc de <i>Chytranthus macrobotrys</i> (https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Chytranthus_setosus-Jardin_botanique_Meise_(2).jpg)	12
Figure 3: Carte de répartition géographique de <i>Chytranthus macrobotrys</i> en Afrique (Heywood, 1978)	12
Figure 4: Voie biosynthétique des aglycones triterpéniques et stéroïdiques (Vincken et al., 2007)	16
Figure 5: Manifestations de quelques maladies fongiques sur les cultures (Dean et al., 2012)	33
Figure 6: Images d' <i>Aspergillus niger</i> à l'oeil nu (A), au microscope (A') et d' <i>Aspergillus</i> <i>flavus</i> à l'oeil nu (B) et au microscope (B')	35
Figure 7: Images de <i>Fusarium oxysporum</i> à l'oeil nu (A), au microscope (A') et de <i>Fusarium</i> <i>culmorum</i> à l'oeil nu (B) et au microscope (B')	36
Figure 8: Images de <i>Phytophthora infestans</i> à l'oeil nu (A) et au microscope (A')	37
Figure 9: Images de <i>Botrytis cinerea</i> à l'oeil nu (A) et au microscope (A')	38
Figure 10: Images de <i>Pythium myriotylum</i> à l'oeil nu (A) et au microscope (A')	38
Figure 11: Etapes d'une maladie fongique (Pérez-García et al., 2011)	39
Figure 12: Cycle d'une maladie fongique (cas du mildiou de la pomme de terre) (Pérez- García et al., 2011)	40
Figure 13: Structures de quelques principes actifs utilisés pour la formulation de certains fongicides commerciaux	42
Figure 14: Structures de quelques saponines à activité antifongique (Petit, 2020)	44
Figure 15: Protocole d'extraction, de fractionnement et de purification des composés des racines de <i>A. polyacantha</i>	48
Figure 16: Protocole d'extraction, de fractionnement et de purification des composés des écorces du tronc de <i>A. polyacantha</i>	49
Figure 17: Protocole d'extraction et d'isolement des composés du tronc de <i>C. macrobotrys</i>	51
Figure 18: Spectre de masse HR-ESIMS du composé APR411	52
Figure 19: Spectre de RMN ¹ H du composé APR411 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les zones caractéristiques d'une saponine triterpénique.	53
Figure 20: Spectre de RMN ¹ H du composé APR411 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les méthyles angulaires.	54
Figure 21: Spectre de RMN ¹ H élargi du composé APR411 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz)	55
Figure 22: Spectre de RMN ¹³ C du composé APR411 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) montrant certains signaux caractéristiques	56
Figure 23: Spectre DEPT 135 du composé APR411 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) montrant les méthyles angulaires.	56
Figure 24: Spectre HSQC élargi du composé APR411 (C ₅ D ₅ N) montrant les signaux caractéristiques.	57
Figure 25: Spectre RMN ¹ H du composé APR411 montrant les protons anomériques (C ₅ D ₅ N, 500 MHz)	59
Figure 26: Spectre HSQC du composé APR411 (C ₅ D ₅ N) montrant les signaux des anomères.	59
Figure 27: Corrélations HMBC et NOESY des unités osidiques du composé APR411	60

Figure 28: Spectre HMBC élargi du composé APR411 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de liaison des sucres.....	61
Figure 29: Spectre NOESY élargi du composé APR411 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de liaison des sucres.....	62
Figure 30: Corrélations HMBC de l'unité méthoxycinnamoyl du composé APR411	63
Figure 31: Spectre de RMN ¹³ C du composé APR411 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) montrant les carbones du cinnamoyle.....	64
Figure 32: Spectre HMBC du composé APR411 (C ₅ D ₅ N) montrant le point de fixation du cinnamoyle.....	65
Figure 33: Spectre HMBC du composé APR411 (C ₅ D ₅ N) montrant le groupement méthoxy.....	66
Figure 34: Spectre de masse HR-ESIMS du composé APR412.....	67
Figure 35: Spectre HSQC du composé APR412 (C ₅ D ₅ N) montrant les anomères.	69
Figure 36: Corrélations HMBC et NOESY des unités osidiques du composé APR412.	69
Figure 37: Spectre HMBC élargi du composé APR412 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de jonction des sucres.	70
Figure 38: Spectre NOESY élargi du composé APR412 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de jonction des sucres.	70
Figure 39: Corrélations HMBC de l'unité cinnamoyle du composé APR412.....	71
Figure 40: Spectres RMN ¹ H élargis des composés APR411 (a) et APR412 (b) montrant la différence du nombre de groupements OCH ₃ (C ₅ D ₅ N, 500 MHz).	73
Figure 41: Spectre HMBC élargi du composé APR412 (C ₅ D ₅ N)	74
Figure 42: Spectre HR-ESIMS du composé APR421	75
Figure 43: Spectre HSQC du composé APR421 (C ₅ D ₅ N) montrant les anomères.	76
Figure 44: Corrélations HMBC et NOESY du composé APR421 montrant les liaisons entre les unités osidiques.	77
Figure 45: Spectre HMBC élargi du composé APR421 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de jonction des sucres.	78
Figure 46: Spectre NOESY élargi du composé APR412 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de jonction des sucres.	79
Figure 47: Spectre RMN ¹ H du composé APR421 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les protons anomériques.	81
Figure 48: Spectre RMN ¹ H du composé APR421 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les protons anomériques.	82
Figure 49: Spectre de masse HR-ESIMS du composé APR431	83
Figure 50: Spectre de RMN ¹ H du composé APR431 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz)	84
Figure 51: Spectre de RMN ¹ H du composé APR431 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les méthyles angulaires.....	84
Figure 52: Spectre HSQC du composé APR431 (C ₅ D ₅ N) montrant les anomères.	86
Figure 53: Corrélations HMBC et NOESY des sucres du composé APR431	86
Figure 54: Spectre HMBC élargi du composé APR431 (C ₅ D ₅ N) montrant les jonctions des sucres.....	87
Figure 55: Spectre NOESY élargi du composé APR431 (C ₅ D ₅ N).....	88
Figure 56: Spectre de masse HR-ESIMS du composé APR441	91
Figure 57: Spectre RMN ¹ H composé APR441 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz)	92
Figure 58: Spectre HR-ESIMS du composé APR442	95

Figure 59: Spectre HSQC du composé APR442 (C ₅ D ₅ N) montrant les principales zones caractéristiques.....	96
Figure 60: Spectre HMBC élargi du composé APR442 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de jonction de l'unité cinnamoyle.....	98
Figure 61: Spectre de masse ESI-HR du composé APTA1	100
Figure 62: Spectre de RMN ¹ H du composé APTA1 (CDCl ₃ , 500 MHz)	101
Figure 63: Spectre HSQC (zone de l'aglycone) du composé APTA1 (CDCl ₃).....	102
Figure 64: Spectre HSQC du composé APTA1 (CDCl ₃) montrant les anomères.	103
Figure 65: Corrélations HMBC (partie des sucres) du composé APTA1 montrant les jonctions des unités osidiques.	104
Figure 66: Spectre HMBC du composé APTA1 (CDCl ₃) montrant les points de jonction des sucres.....	105
Figure 67: Spectre de masse HR-ESIMS du composé CMT2	107
Figure 68: Spectre de RMN ¹ H élargi du composé CMT2 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les protons des méthyles angulaires.	108
Figure 69: Spectre RMN ¹³ C (élargi) du composé CMT2 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) montrant les signaux de méthyles angulaires.	109
Figure 70: Spectre RMN ¹³ C élargi du composé CMT2 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) montrant les signaux de carbones caractéristiques.	109
Figure 71: Spectre HSQC du composé CMT2 (C ₅ D ₅ N) montrant les anomères.....	111
Figure 72: Corrélations HMBC et NOESY du composé CMT2 montrant les jonctions des unités osidiques.	112
Figure 73: Spectre HMBC élargi du composé CMT2 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de jonction des sucres	113
Figure 74: Spectre de masse HR-ESIMS du composé CMT1	115
Figure 75: Spectre de RMN ¹³ C du composé CMT1 (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) montrant les zones de caractéristiques.....	115
Figure 76: Corrélations HMBC du composé CMT1 montrant les jonctions des unités osidiques.	116
Figure 77: Spectre HMBC élargi du composé CMT1 (C ₅ D ₅ N) montrant les points de jonction des sucres.	117
Figure 78: Spectre HR-ESIMS du composé APTB	119
Figure 79: Spectre de RMN ¹ H du composé APTB (C ₅ D ₅ N, 500 MHz).....	120
Figure 80: Spectre de RMN ¹ H élargi du composé APTB (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les protons du noyau aromatique formant le système ABX.....	121
Figure 81: Spectre de RMN ¹ H élargi du composé APTB (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les protons anomériques et du méthoxy.	121
Figure 82: Spectre DEPT 135 du composé APTB (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) montrant les carbones caractéristiques.....	122
Figure 83: Corrélations HMBC du composé APTB	123
Figure 84: Spectre COSY élargi du composé APTB (C ₅ D ₅ N) montrant les corrélations du noyau aromatique.....	124
Figure 85: Spectre HMBC élargi du composé APTB (C ₅ D ₅ N) montrant les corrélations de l'unité d'acide vanillique.	124
Figure 86: Spectre HMBC élargi du composé APTB (C ₅ D ₅ N) montrant les points de jonction entre les unités d'acide vanillique et de glucose.	125

Figure 87: Spectre HR-ESIMS du composé APT55.....	127
Figure 88: Spectre RMN ¹ H du composé APT55 (CDCl ₃ , 500 MHz) montrant les zones et signaux caractéristiques.	128
Figure 89: Spectre de RMN ¹³ C du composé APT55 (CDCl ₃ , 125 MHz) montrant les signaux de carbones caractéristiques.	129
Figure 90: Spectre de masse HR-ESIMS du composé CMTA1	131
Figure 91: Spectres de RMN ¹ H (a) et ¹³ C (b) du composé CMTA1 (C ₅ D ₅ N, 500 et 125 MHz) montrant les signaux de pics caractéristiques.	133
Figure 92: Spectre de masse HR-ESIMS du composé CMTA2	135
Figure 93: Spectres RMN ¹ H (a) et ¹³ C (b) du composé CMTA2 (C ₅ D ₅ N, 500 et 125 MHz) montrant les signaux caractéristiques.	137
Figure 94: Spectre de masse ESI du composé CMT21.....	139
Figure 95: Spectre RMN ¹ H du composé CMT21 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les signaux de protons caractéristiques.....	140
Figure 96: Spectre RMN ¹ H du composé CMT21 (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) montrant les signaux de carbones caractéristiques.	141
Figure 97: Spectre de masse ESI du composé CMT31.....	143
Figure 98: Spectre RMN ¹ H (a) ¹³ C (b) du composé CMT31 (C ₅ D ₅ N, 500 et 125 MHz) montrant les signaux de protons et carbones caractéristiques.	145
Figure 99: Courbe (a) et diagramme (b) de croissance radiale de AN en fonction du temps et des traitements	151
Figure 100: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de AN en fonction des traitements.....	152
Figure 101: Courbe et diagramme d'évolution de la croissance radiale de AF en fonction du temps et des traitements.....	153
Figure 102: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de AF en fonction des traitements.....	154
Figure 103: Courbe et diagramme d'évolution de PT en fonction du temps et des traitements	155
Figure 104: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de PT en fonction des traitements.....	156
Figure 105: Courbe et diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de FO en fonction du temps et des traitements.....	157
Figure 106: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de FO en fonction des traitements.....	158
Figure 107: Courbe et diagramme d'évolution de la croissance radiale de FC en fonction du temps et des traitements.....	159
Figure 108: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de FC en fonction des traitements.....	160
Figure 109: Courbe et diagrammes des croissance radiale et vitesse de croissance de PI en fonction du temps et des traitements.....	161
Figure 110: Courbe et diagramme de la croissance radiale de BC en fonction du temps et des traitements.....	162
Figure 111: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de BC en fonction des traitements.....	163

Figure 112: Diagramme d'évolution des pourcentages d'inhibition de APR sur tous les champignons en fonction des traitements	164
Figure 113: Courbes d'évolution de la croissance radiale des différents champignons en fonction du temps (fraction CMT)	166
Figure 114: Diagramme d'évolution des pourcentages d'inhibition de CMT des différents champignons en fonction des traitements	167
Figure 115: Partition de partion à AcOEt (montage + CCM).....	180
Figure 116: Partition au n-BuOH saturé d'eau (montage + CCM)	181
Figure 117: Montage VLC sur RP18	182
Figure 118: CCM VLC sur silice de CMT	183
Figure 119: Appareil et CCM de MPLC sur APR et CMT	184
Figure 120: Appareil et CCM de HPLC sur A. polyacantha	185
Figure 121: Lyophilisateur et fractions d'A. polyacantha lyophilisées	186
Figure 122: Appareil de RMN 500 MHz	188
Figure 123: Microscope optique de marque OPTICA	Erreur ! Signet non défini.
Figure 124: Microscope optique de marque OPTICA	195

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les principaux sucres constitutifs rencontrés dans les saponines (Bruneton, 2009).	18
Tableau 2: Les principaux substituants organiques rencontrés dans les saponines (Bruneton, 2009).	19
Tableau 3: Activité antifongique de quelques saponines testées sur certaines souches de phytopathogènes	45
Tableau 4: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	57
Tableau 5: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	62
Tableau 6: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du méthoxycinnamoyle du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	64
Tableau 7: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR412 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	68
Tableau 8: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR412 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	71
Tableau 9: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du méthoxycinnamoyle du composé APR412 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	72
Tableau 10: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR421 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	76
Tableau 11: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR421 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	79
Tableau 12: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'unité cinnamoyl du composé APR421 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	81
Tableau 13: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone de APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	85
Tableau 14: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	89
Tableau 15: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'unité cinnamoyl du composé APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	90
Tableau 16: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR441 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	92
Tableau 17: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	93
Tableau 18: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	94
Tableau 19: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR442 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	96
Tableau 20: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR442 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	97
Tableau 21: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'unité cinnamoyl du composé APR442 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).	98
Tableau 22: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APTA1 (CDCl_3 , 500 et 125 MHz).	102

Tableau 23: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APTA1 (CDCl_3 , 500 et 125 MHz).....	104
Tableau 24: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMT2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	110
Tableau 25: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres de CMT2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	113
Tableau 26: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMT1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	116
Tableau 27: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé CMT1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	117
Tableau 28: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APTB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	126
Tableau 29: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé APT55 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	130
Tableau 30: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMTA1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	134
Tableau 31: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMTA2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	138
Tableau 32: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMT21 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	142
Tableau 33: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMT31 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).....	146
Tableau 34: Valeurs des pourcentages d'inhibition de APR et CMT sur les champignons pathogènes testés.....	168

RESUME

Ce travail porte sur l'étude chimique des fractions enrichies en saponines de deux plantes médicinales camerounaises, *Acacia polyacantha* Willd (Fabaceae) et *Chytranthus macrobotrys* Gilg. Excel & Mendoca (Sapindaceae), puis l'évaluation de leur activité antifongique. L'objectif final étant d'obtenir des fractions enrichies en saponines pouvant servir dans la recherche et la fabrication de nouveaux biofongicides utiles dans la lutte contre les maladies fongiques causées par les phytopathogènes sur les cultures. Ainsi, l'étude phytochimique des racines et des écorces du tronc de *A. polyacantha* a conduit, à l'aide des techniques d'isolement et d'extraction modernes (HPLC, MPLC, CC, VLC), à l'isolement de neuf composés purs tandis que celle des écorces du tronc de *C. macrobotrys* a permis d'isoler six composés purs. Ces composés ont été entièrement caractérisés et élucidés à l'aide de l'interprétation approfondie des analyses spectroscopiques RMN 1D (^1H , ^{13}C) puis 2D (COSY, HSQC, HMBC, TOCSY et NOESY) et spectrométriques de masse (HRESI-MS), permettant de ressortir neuf saponines triterpéniques notamment Polyacosides A-F (**45**, **46**, **48**, **49**, **50**, **51**), Rubelloside A (**53**), Elatoside E (**56**) et Kalinéanoside B (**57**) ; un composé phénolique dérivé d'acide vanillique, Acapolyoside (**59**); deux triterpènes, l'acide oléanolique (**61**) et le lup-20(29)-ene-3 α ,23-diol (**62**), un disaccharide, le Sucrose (**63**) et deux phytostérols, le le stigmastérol (**64**) et le stigmastérol 3-O- β -D-glucopyranoside (**65**). Parmi ces composés, il en ressort sept dérivés nouveaux parmi lesquels six saponines (Polyacosides A-F) et un composé phénolique (Acapolyoside) qui représentent un apport important sur le plan de la chimiotaxonomie des plantes du genre *Acacia* car, les dérivés nouveaux de saponines présentent tous la particularité d'avoir au sein de leur structure, un groupement méthoxycinnamoyle fixé en position C-21 de l'acide machaérinique ; tout comme le composé phénolique qui présente la particularité d'avoir deux sous-structures formant des liaisons de cyclisation entre elles. Evaluées pour leur activité antifongique selon la méthode de supplémentation du milieu en boîtes de Pétri sur sept (07) souches de champignons phytopathogènes responsables de graves dégâts sur plusieurs cultures camerounaises, la fraction enrichie en saponines de *A. polyacantha*, a montré une bonne activité sur les champignons du genre *Aspergillus* avec des CI_{50} de $27,38 \pm 2,01$ et $33,78 \pm 3,01$ $\mu\text{g/mL}$, ainsi qu'une activité modérée sur *Pythium myriotylum* (CI_{50} de $174,16 \pm 1,94$ $\mu\text{g/mL}$) ; tandis que la fraction enrichie en saponines de *C. macrobotrys*, n'a présenté aucune activité sur tous les champignons pathogènes testés.

Mots clés : *Acacia polyacantha*, *Chytranthus macrobotrys*, Saponines, RMN, Champignons pathogènes, Activité antifongique.

ABSTRACT

The present work focuses on the chemical study of saponins enriched fractions from two Cameroonian medicinal plants, namely *Acacia polyacantha* (Fabaceae) and *Chytranthus macrobotrys* (Sapindaceae), followed by the evaluation of their antifungal activity against seven phytopathogenic fungi. The phytochemical study of the roots and stem barks of *A. polyacantha* using modern chromatographic methods such as HPLC, MPLC, CC, VLC etc, led to the isolation of nine pure compounds, while the phytochemical study of the stem barks of *C. macrobotrys* led to the isolation of seven pure compounds. These compounds were fully characterized and elucidated through the interpretation of modern NMR spectroscopic and mass spectrometric analyses (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, TOCSY and NOESY, HRESI-MS) in comparison with literature data. This led to the discovery of nine triterpenoid saponins named Polyacoside A-F (**45**, **46**, **48**, **49**, **50**, **51**), Rubelloside A (**53**), Elatoside E (**56**) and Kalinéanoside B (**57**); one phenolic compound derived from vanillic acid, Acapolyoside (**59**); two terpenoids, oleanolic acid (**61**) and lup-20(29)-ene-3 α ,23-diol (**62**), one sugar, Sucrose (**63**) and two phytosterols, stigmastérol (**64**) and stigmastérol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**65**). From all the isolated compounds, seven are new derivatives among which six triterpenoids saponins, Polyacoside A-F and the phenolic compound, Acapolyoside. These new derivatives represent an important contribution to the chemotaxonomy of species of *Acacia* genus, since all the new saponins derivatives have the particularity of having a methoxycinnamoyl group attached to the C-21 position of machaerinic acid; furthermore, the phenolic compound also has the particularity of having two substructures forming cyclisation links between them. The two main saponins enriched fractions were evaluated for their antifungal activity using the Petri dish supplementation method against seven (07) phytopathogenic fungi strains. The saponins enriched fraction APR obtained from of *A. polyacantha* showed good activity against the *Aspergillus* fungi genus with IC₅₀ values of 27,38 \pm 2,01 and 33,78 \pm 3,01 $\mu\text{g/mL}$ as well as a moderate activity against *Pythium myriotylum* (IC₅₀ value 174,16 \pm 1,94 $\mu\text{g/mL}$), while the saponins enriched fraction CMT obtained from *C. macrobotrys* showed no activity against all the phytopathogenic fungi tested,.

Key words: *Acacia polyacantha*, *Chytranthus macrobotrys*, Saponins, NMR, Pathogenic fungi, Antifungal activity.

INTRODUCTION

L'agriculture constitue depuis l'existence de l'humanité, la principale voie de nutrition des populations et représente aujourd'hui, la principale base de l'économie dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne et même du monde. Au Cameroun, la banque mondiale estime à 17,4%, le taux de contribution de l'agriculture au PIB de l'Etat, avec une contribution à la croissance économique estimée à plus de 76,3% en 2017 selon le MINADER (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural) et une participation à plus de 50% aux besoins d'emploi des populations locales.

Cependant, l'apparition des dommages sur les plantes qui appauvrissent les récoltes, est devenue au fil des années un problème majeur pour la survie humaine : l'insécurité alimentaire pouvant affecter toute l'économie d'une nation et entraîner des conséquences graves telles que la famine, la pauvreté, le chômage, la destruction de la biodiversité etc. Ainsi, l'ONU à travers le FAO, estime que de nombreuses espèces parasitaires notamment les phytopathogènes, peuvent détruire jusqu'à 40 % des cultures chaque année, privant des millions de personnes de nourriture et portant ainsi un grave préjudice à l'agriculture, à la santé, à l'économie mondiale et même à l'environnement (FAO, 2020). Au premier trimestre de l'année 2023, l'ONU évaluait alors entre 10 et 23%, les pertes des récoltes dûes aux maladies fongiques avec en plus des pertes post-récolte évaluées de 10 à 20%. Une situation qui pourrait s'empirer au fil des années à venir, en raison du changement climatique qui favorise la propagation des champignons pathogènes vers les pôles dans toutes les régions du globe (FAO, 2023).

Les scientifiques au fil des dernières années, ont donc mis sur pied une multitude de fongicides synthétiques tels que Banko Plus, Bravo 720 SC, Monchamp 72 WP, Fongistar 72%, Mancozan Bleu, Jumper D et Kobichamp, des fongicides commerciaux fréquemment utilisés au Cameroun, pour lutter contre le mildiou, les helminthosporioses, les pourritures brunes et grises, les cercosporioses, l'oidium etc ; des maladies fongiques attaquant certaines cultures telles que la pomme de terre, la tomate, la banane plantain, les céréales, le cacao et le café entre autres.

Malheureusement, il se pose un problème lié à l'utilisation abusive des fongicides synthétiques par les populations. Ces fongicides à cause de leur toxicité, ne sont pas sans danger sur la santé des agriculteurs et des consommateurs, car leur utilisation entraîne très souvent de nombreux effets secondaires tels que certaines maladies opportunistes (tuberculose, infections bactériennes etc) qui peuvent s'avérer très dangereuses pour la santé de l'homme (Poulin-

Ouellette, 2023). De plus, les champignons pathogènes développent au fil du temps, des méthodes de résistance face à ces fongicides synthétiques, dûes notamment à leur grande viabilité et leur diversité génétique phénoménale, rendant ces derniers de moins en moins efficaces (Stukenbrock et Gurr, 2023). Il devient donc urgent et primordial, de rechercher de nouvelles solutions alternatives afin de lutter contre l'attaque de nos cultures par des agresseurs (champignons pathogènes principalement).

D'autre part, plusieurs travaux scientifiques récents ont mis en exergue des métabolites secondaires doués de bonnes activités antifongiques. Parmi ceux-ci, les saponines font l'objet d'un intérêt particulier car leur activité antifongique a été prouvée sur plusieurs champignons pathogènes, grâce notamment à leur mode d'action très intéressant qui consiste à inhiber la biosynthèse des stérols responsables du développement des phytopathogènes dans la plante. Les saponines agissent donc en tant qu'IBS (Inhibiteur de Biosynthèse des Stérols) sur plusieurs plantes contribuant grandement ainsi à la protection des cultures (Figen Mert-Turk, 2006). Ainsi, la fabrication des biofongicides à base des saponines serait donc une voie idéale dans la lutte contre les maladies fongiques. Les familles des Fabaceae et Sapindaceae, reconnues très riches en saponines triterpéniques, constitueraient donc de bonnes sources primaires pour la recherche de saponines pouvant présenter des activités antifongiques intéressantes (Petit, 2020 ; Njateng *et al.*, 2015 ; Voutquenne, 2001).

C'est dans ce contexte général, que le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles de l'Université de Yaoundé I, a choisi d'apporter sa contribution dans la recherche des molécules naturelles (métabolites secondaires), douées d'activité antifongique et pouvant servir dans l'élaboration de biofongicides afin de lutter de manière plus efficace et durable, contre les agressions que subissent les cultures par les champignons pathogènes. Ce travail s'est effectué en deux principales phases : une première phase chimique qui consistait globalement à extraire, isoler et caractériser les métabolites secondaires des plantes choisies ; puis une deuxième phase biologique, consistant à évaluer l'activité biocide des fractions enrichies en saponines (principale classe d'intérêt) contre certaines souches de champignons pathogènes attaquant une large gamme de cultures.

L'objectif général de ce travail est de caractériser et évaluer l'activité antifongiques des fractions enrichies en saponines de deux plantes médicinales au Cameroun (*Acacia polyacantha* et *Chytranthus macrobotrys*).

Plus spécifiquement, il s'agira de :

- Préparer les fractions enrichies en saponines à partir des extraits de ces deux plantes ;
- Isoler et caractériser les saponines ainsi que d'autres métabolites secondaires de ces fractions ;
- Evaluer l'activité antifongique des fractions enrichies en saponines et des composés isolés.

La présentation de cette étude dans le présent document est articulée autour de trois principaux chapitres, portant chacun sur deux parties (biologique et chimique) :

Le premier chapitre (Revue de la littérature), présente une synthèse bibliographique de tous les travaux scientifiques antérieurs effectués aussi bien sur le plan phytochimique que biologique.

En phytochimie, il est question de présenter des informations sur les aspects botaniques des deux plantes, sur les métabolites secondaires de la classe des saponines et sur les composés précédemment isolés des plantes des genres *Acacia* et *Chytranthus*. Sur le plan biologique, il est question de présenter les maladies fongiques et champignons pathogènes, les traitements existants contre ces maladies fongiques et les activités antifongiques des métabolites secondaires recensées dans les travaux pharmacologiques antérieurs menés sur les genres *Acacia* et *Chytranthus*.

Le deuxième chapitre (Résultats et discussion) quant à lui, est consacré à la présentation et interprétation des résultats obtenus au laboratoire, notamment le protocole d'isolement des différents composés, la détermination de leurs structures et les analyses biologiques effectuées. Tout ceci, accompagné des discussions partielles chimique et biologique.

Enfin, le dernier chapitre présente les techniques et méthodes de laboratoire utilisées pour la réalisation de nos travaux.

Chapitre I:

Revue de la littérature

I.1. Etude botanique

I.1.1. Ordre des Fabales

Les Fabales ou Leguminales, sont un ordre regroupant trois familles de plantes dicotylédones, parfois réunies dans une seule famille, les Fabaceae, ces trois familles (Faboideae, Mimosoideae et Caesalpinioideae) étant alors des sous-familles de cette super famille. Avec quelques 17000 espèces réparties en 750 genres environ, les Fabales sont, après les Asterales et les Orchidales, un des plus grands taxons d'angiospermes. La plupart sont des plantes ligneuses des régions tropicales ou méditerranéennes. Dans les régions tempérées, prédominent les Fabaceae herbacées dont certaines ont une valeur alimentaire (pois, haricots, fèves) ou fourragère (luzerne, trèfles). Les régions tropicales abritent majoritairement des espèces ligneuses, arbustives ou lianescentes, appartenant aux trois familles de l'ordre (APG III, 2009).

Les Fabales sont définies par cinq caractères essentiels :

- Le réceptacle est élargi en forme de cône, de plateau, de cupule ou d'urne ;
- Le gynécée, libre et supère, est sauf exceptions, réduit à un seul carpelle dont les bords sont suturés dorsalement. Ce caractère suffit à conférer à la fleur une symétrie bilatérale. Chez la plupart des Fabales, cette zygomorphie est étendue à l'ensemble de la fleur suivant des modalités facilement reconnaissables, propres à la famille ;
- Dans la graine, l'albumen est extrêmement réduit ou même, très généralement, fait défaut ;
- Les feuilles sont stipulées ;
- Les racines portent des galles noduleuses produites par une bactérie (*Rhizobium*) utilisant l'azote libre de l'air pour la synthèse d'acides aminés.

Selon Conquist (1981), l'ordre des Fabales comporte trois familles notamment les Caesalpinaceae, Mimosaceae et les Fabaceae tandis que la classification phylogénétique de 2009 mentionne quatre familles contenues dans cet ordre : Polygalaceae, Quillajaceae, Surianaceae et Fabaceae (qui regroupe désormais les plantes précédemment comprises dans les familles Caesalpinaceae, Mimosaceae et Fabaceae) (APG III, 2009).

I.1.1.1. Famille des Fabaceae

Les Fabaceae, encore appelées Leguminosae ou Papilionaceae, constituent l'une des plus importantes familles de plantes à fleurs, la troisième après les Orchidaceae et les Asteraceae par le nombre d'espèces. Cette famille est une importante source de protéines végétales indispensables pour l'alimentation humaine et est également très importante sur le plan économique (Spichiger et *al.*, 2002).

C'est une famille qui comprend environ 18000 espèces réparties dans trois sous-familles et plus de 760 genres (Spichiger et *al.*, 2002). Sa distribution géographique la rend cosmopolite car, présente dans toutes les régions du monde, allant des zones froides aux zones tropicales et subtropicales. Au sens large, ce sont des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. Plusieurs légumineuses sont d'importantes plantes cultivées, parmi lesquelles le soja, les haricots ou l'arachide. Grâce à leur aptitude à former des relations symbiotiques avec les bactéries fixatrices d'azote, de nombreuses plantes de cette famille sont riches en protéines (APG IV, 2016).

Du point de vue phytochimique, de nombreuses parties de l'appareil végétatif des plantes de cette famille, synthétisent des métabolites secondaires qui ont un rôle, de protection contre les herbivores ou phytophages et les micro-organismes, mais aussi d'attraction vis-à-vis des animaux pollinisateurs ou disperseurs de graines. Leurs organes de stockage produisent une très grande diversité de métabolites secondaires toxiques, qui participent à l'arsenal de défense chimique contre les herbivores. La famille des Fabaceae produit davantage de métabolites secondaires contenant de l'azote tels que les alcaloïdes et amines, les glucosides cyanogènes, les peptides, mais aussi beaucoup de métabolites secondaires sans azote tels que les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins, lignanes, coumarines), les polycétides (anthraquinones) et les terpénoïdes dont les saponines triterpéniques sont en abondance (Wink, 2013).

I.1.1.2. Sous-famille des Mimosoideae

Cette sous-famille est récente car elle n'existe pas dans la classification de Conquist (1981) mais existe dans la classification phylogénétique APG II (2003), APG III (2009) et sa révision APG IV (2016). C'est l'une des trois sous-familles de la grande famille des Fabaceae. Les plantes de cette sous-famille sont des arbres ou arbustes de tropique ou sous-tropique. Sur le continent Africain, les Mimosoideae sont plus retrouvées dans les savanes que dans les forêts denses. Cette sous-famille comporte environ 60 genres dont le plus important en nombre d'espèces est le genre *Acacia* avec plus de 1500 espèces dans le monde (dont près de 1000 en

Australie). En Afrique, les genres *Acacia*, *Albizia*, *Entada* et *Newtonia* sont les plus importantes en nombre d'espèces et les plus répandues (APG IV, 2016).

I.1.1.3. Genre *Acacia*

C'est un genre appartenant à la famille des Fabaceae et contenant le plus d'espèces par rapport aux autres genres de cette famille. Les espèces de ce genre sont des arbres et arbustes couramment appelés, selon les cas, acacia, cassier, mimosa, mulga ou encore tamarin.

Les acacias se rencontrent dans une grande variété de conditions écologiques, allant des zones littorales aux zones fortement arrosées ou aux régions sub-montagneuses ainsi que les zones arides où elles sont le plus rencontrées. Dans les zones arides, ces plantes (acacias) sont très importantes d'un point de vue écologique car elles fournissent de l'ombre, en plus de procurer de la nourriture aux animaux (chèvres, dromadaires, girafes) et d'être des foyers pour plusieurs oiseaux (Crété, 1965).

Plusieurs espèces (*Acacia senegal*, *Acacia arabica*) de ce genre, sont reconnues pour produire de la gomme, tandis que d'autres (*Acacia concinna*) sont utilisées pour les soins de cheveux. Ce genre est également utilisé comme bois de combustion et matériau de construction, ainsi que pour traiter plusieurs maladies en médecine traditionnelle. De nombreuses espèces de ce genre se défendent également contre les herbivores par des rameaux épineux, d'où d'ailleurs le nom « acacia » qui vient du mot grec « *akis* » signifiant « pointe ou épine » (Legesse et Van der Maarel, 1990).

En 2005, ce genre a été divisé en cinq genres distincts : *Senegalia*, *Acaciella*, *Mariosousa* et *Vachellia*.

I.1.1.4. *Acacia (Senegalia) polyacantha* Willd.

Senegalia polyacantha, plus connue sous son appellation synonyme *Acacia polyacantha*, était précédemment classée dans le grand genre *Acacia* mais appartient désormais au genre *Senegalia* issu de la division du genre *Acacia* en 2005. Aujourd'hui encore, l'existence du genre *Senegalia* est très peu connue.

❖ Description

A. polyacantha dont le tronc et les feuilles sont présentées à la **Figure 1**, est un arbre épineux pouvant atteindre 10 à 25 m de hauteur et 80 cm de diamètre. Son écorce est claire, grise-jaunâtre, écailleuse, devenant noirâtre et crevassée pour les vieux sujets. Les rameaux sont gris bruns et pubescents. Les épines sont disposées par deux à la base des feuilles, courbées en crochets, brunes à pointes noires de 1,3 cm de long. Les feuilles sont alternes, bipennées, de 7-16 cm de long, portant 13-60 paires de pinnules et 15-60 paires de foliolules par pinnule. Le pétiole est pubescent, épineux, muni d'une grosse glande ovoïde avant la première pinnule. L'inflorescence est un fascicule de 1 à 3 épis dense(s), de 4 à 13 cm de long, à l'aisselle des feuilles. La fleur est blanc crème. Le fruit est une gousse plate, oblongue, assez coriace, glabre, brune à maturité contenant 5-9 graines (Rojas-Sandoval et al., 2022).



Figure 1: Tronc et feuilles d'*Acacia polyacantha* (Photo Atangana, 2018)

❖ Répartition géographique

Cette espèce est retrouvée dans les régions sahéliennes et soudaniennes telles qu'au Sénégal, au Cameroun et au Soudan. On la trouve également dans certains pays asiatiques et aux Caraïbes. C'est une plante qui aime les stations humides et peut se retrouver en peuplement pure sur sols argileux temporairement inondés puis sec durant une longue partie de l'année (Rojas-Sandoval et al., 2022).

❖ Usages

Les racines de *A. polyacantha* sont utilisées en médecine traditionnelle contre les morsures de serpent et sont appliquées pour laver la peau des enfants agités la nuit. Elles sont également

utilisées pour traiter les maladies vénériennes, la dysenterie et les troubles gastro-intestinaux (Rojas-Sandoval et *al.*, 2022).

Son bois lourd et dense est très utilisé comme bois de chauffe et aussi pour produire du charbon de bois. Il produit une gomme de seconde qualité après la gomme arabique. Cette plante est également beaucoup utilisée en agroforesterie pour installer les haies vives et aussi pour enrichir les sols pauvres laissés en jachère (Van der Maesen et *al.*, 1996).

I.1.2. Ordre des Sapindales

Les Sapindales sont un ordre de plantes dicotylédones ayant des fleurs principalement pentacycliques, unisexuées et zygomorphes. Elles sont caractérisées par des feuilles pennées, deux verticilles d'étamines, un disque nectarifère en position variable, des fruits vésiculeux ou ailés et des graines exalbuminées. D'après la classification ancienne de Cronquist, cet ordre contenait 15 familles (Acéraceae, Akaniaceae, Anacardiaceae, Bretschneideraceae, Burseraceae, Cnéoraceae, Hippocastanaceae, Julianaceae, Meliaceae, Melianthaceae, Rutaceae, Sapindaceae, Simaroubaceae, Staphyleaceae et Zygophyllaceae) tandis que la classification phylogénétique de 2009 confère à cet ordre 9 familles (Anacardiaceae, Bretschneideraceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrariaceae, Rutaceae, Sapindaceae et Simaroubaceae) (APG III, 2009).

I.1.2.1. Famille des Sapindaceae

La famille des *Sapindaceae*, principalement distribuée dans les régions tropicales et subtropicales, comprend environ 2000 espèces réparties dans plus de 144 genres. L'Amérique du Sud, l'Amérique centrale, l'Afrique équatoriale ainsi que l'Asie du Sud-Est, sont les grandes aires géographiques les plus riches en Sapindaceae. Les plantes de cette famille sont des spermaphytes dicotylédones pouvant être des plantes herbacées, des arbres, arbustes ou des lianes. Ces plantes sont souvent exploitées pour leurs graines contenant des substances tonifiantes et stimulantes proches de la caféine (APG II, 2003).

Les plantes de cette famille sont caractérisées par des feuilles simples ou composées de trois folioles ou plus. Les fleurs sont de petite taille, actinomorphes (symétrie radiale) ou zygomorphes (symétrie bilatérale) et comportent essentiellement trois carpelles. Les étamines sont filamenteuses et le gynécée est constitué de trois carpelles chacune composée d'un style. Les fruits sont extrêmement variables en taille, forme et couleur, tandis que les pétales et les

sépales sont toujours au nombre de quatre ou cinq et partiellement fusionnés à leur base (Mostafa et al., 2016).

Les Sapindaceae sont reconnues comme des plantes d'intérêt économique dans divers secteurs notamment le secteur agroalimentaire, dans lequel elles s'illustrent par leurs fruits qui peuvent servir directement de nourriture ou bien être utilisés dans la confection de boissons, d'huiles et de plats divers. Les Sapindaceae sont également prisées pour la bonne qualité de leur bois et leur utilisation comme plantes ornementales telles que les espèces des genres *Koelreuteria*, *Ungnadia* et *Acer* (Buerki et al., 2016). En médecine traditionnelle asiatique, ces plantes sont utilisées pour le traitement des infections fongiques et bactériennes et parfois pour leurs propriétés antiprurigineuses et contraceptives (Mostafa et al., 2016).

I.1.2.2. Genre *Chytranthus*

C'est un genre de plantes à fleurs de la famille des Sapindaceae constitué d'arbres et arbustes. Les plantes de ce genre sont caractérisées par des feuilles présentant généralement trois à dix paires de folioles. Ayant une disposition opposée et une forme oblongue à elliptique, les espèces de ce genre n'excèdent pas 30 centimètres de long. Les fleurs présentent un calice enveloppant, velu, à peine divisé si ce n'est à l'extrémité apicale de la fleur. Les sépales sont de couleur variable et peuvent être, selon les espèces, blanchâtre, jaunâtre, verdâtre, marron foncé ou rouge sombre. Les pétales sont souvent blanchâtres et portent un appendice bilobé. Les étamines sont filamenteuses, au nombre de sept à quinze, arborant parfois des couleurs vives de rose et de violet. L'ovaire est trilobé. Le fruit est indéhiscent, lisse et présente plusieurs lobes selon les espèces. Celui-ci est vert puis devient coloré à maturité (Gojayev et al., 2013).

C'est un genre beaucoup plus rencontré en Afrique tropicale, occidentale et équatoriale et comporte 32 espèces reconnues pour être riches en plusieurs classes de métabolites secondaires bioactifs notamment les glycosides terpéniques douées de bonnes activités antifongiques.

I.1.2.3. *Chytranthus macrobotrys* Gilg Excell & Mendonça

❖ Description

Chytranthus macrobotrys est un petit arbre (**Figure 2**) ayant la forme de palmier et pouvant atteindre onze mètres de hauteur. La forme globale de la plante est typique d'un *Chytranthus* et caractérisée par un tronc peu ramifié surmonté de grandes feuilles composées. Les feuilles sont parfois imparipennées, composées de trois à six paires de folioles opposées et font 50 à 80 centimètres de longueur et présentent des pétioles de 16 à 25 centimètres. Les folioles sont

typiques de *Chytranthus*, glabres et vert foncé. Les inflorescences sont cauliflores très souvent retrouvées à la base du tronc ou sur le sol et sont hérissées de fleurs marron foncé, zygomorphes à quatre pétales. Les fruits sont comestibles et virent du vert au jaune intense lors de leur maturation (Faleye et *al.*, 2019).



Figure 2: Feuilles et tronc de *Chytranthus macrobotrys*
([https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Chytranthus_setosus-Jardin_botanique_Meise_\(2\).jpg](https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Chytranthus_setosus-Jardin_botanique_Meise_(2).jpg))

❖ Répartition géographique

Cette plante est principalement rencontrée dans les forêts humides et montagneuses d’Afrique (Bénin, Gabon, Cote d’ivoire, Cameroun) tel qu’observé à la **Figure 3** ci-dessous ; elle a deux noms synonymes très peu connus : *Glossolepsis macrobotrys* Gilg et *Chytranthus mayumbensis* Exell (Hauman, 1960).



Figure 3: Carte de répartition géographique de *Chytranthus macrobotrys* en Afrique
(Heywood, 1978)

❖ Usages

En dehors du caractère comestible du fruit de cette plante, très peu d'usages ont été reportés dans les travaux scientifiques antérieurs la concernant (Petit, 2020).

I.2. Etude chimique des saponines

I.2.1. Généralités sur les saponines

Les saponines ou saponosides sont des métabolites secondaires hétérosidiques non-volatils, largement répandus dans le règne végétal. Elles sont composées d'une partie lipophile, la génine (ou aglycone) et d'une partie hydrophile osidique. Ayant des propriétés tensioactives, elles se dissolvent dans de l'eau en formant des solutions moussantes. Leur utilisation traditionnelle, comme savon et lessive, à l'instar de la saponaire (*Saponaria officinalis* L.), est d'ailleurs basée sur cette propriété tensioactive (Bruneton, 2016 ; Hostettmann et Marston, 1995 ; Augustin et Kuzina, 2011). Le nom « saponine » est dérivé du mot latin « *sapo* », qui signifie « savon ». En effet, les molécules de saponines forment une solution moussante dans l'eau. C'est d'ailleurs sur leur tensioactivité qu'est fondée l'utilisation multiséculaire de certaines plantes qui renferment : la saponaire (*Saponaria officinalis* L.) (Bruneton, 2009). Il est intéressant de noter que des organismes marins comme le concombre de mer sont riches en saponines. C'est le cas de Frondoside A, Eximisoside A, Thyonosides A et B, et de Neothyonidioside, des saponines isolées de *Cucumaria frondosa*, *Psolus eximius*, *Thyone aurea* et de *Stichopus mollis* respectivement (Kalinin et al., 1997 ; Bonnard et Rinehart, 2004).

Comme d'autres métabolites secondaires tels que les flavonoïdes et les alcaloïdes, les saponines sont des composés qui servent également de défense à la plante. En effet, de nombreuses revues rapportent que les saponines existent dans les plantes sous forme biologiquement active et sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne (Hostettman et Marston, 1995 ; Osbourn, 1996 a,b). De plus, de nombreuses espèces végétales à forte teneur en saponines comme les racines de *Bupleurum falcatum* L. et de *Panax ginseng*, sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies humaines (Kim et al., 1998). Plusieurs plantes à saponines sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques, d'autres ont des applications en phytothérapie. Les saponines trouvent également de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie cosmétique en raison de leur propriété moussante et émulsifiante (Kobayashi et al., 2006 ; Wojciechowski, 2013). Les applications des saponines s'étendent à l'agriculture, avec

utilisation pour l'assainissement des sols et pesticides naturels (Chen et *al.*, 2008 ; Chapagain et *al.*, 2007).

I.2.2. Classification des saponines

Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine (Bruneton, 2009) :

- **Saponines stéroïdiques** : Elles sont constituées d'un aglycone stéroïdique et sont généralement retrouvées dans les angiospermes monocotylédones ;
- **Saponines triterpéniques** : Elles sont constituées d'un aglycone triterpénique, qui se compose d'un squelette en C-30, comprenant une structure pentacyclique. On les retrouve principalement dans les angiospermes dicotylédones, par exemple, *Rosaceae*, *Liliaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Primulaceae*, *Ranunculaceae*, et *Sapindaceae*. Les saponines à aglycone triterpénique, présentent une cyclisation de (3S)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène.

Les saponines sont également classées sur la base du nombre de chaînes osidiques. Pour cette raison, nous pouvons distinguer (Hostettmann & Marston, 1995):

- ◆ **Les saponines monodesmosidiques** : avec une seule chaîne oligosaccharidique généralement liée en position C₃ de la génine.
- ◆ **Les saponines bidesmosidiques** : qui possèdent deux chaînes oligosaccharidiques liées principalement aux positions C₃ et C₂₈ de la génine pour les triterpènes, et en C₃ et en C₂₆ pour les stéroïdes.
- ◆ **Les saponines tridesmosidiques** : elles sont très inhabituelles et possèdent trois chaînes oligosaccharidiques liées respectivement en C₃, C₂₁ et C₂₈ de la génine. Les fragments osidiques sont généralement des hexoses, pentoses, desoxy-hexoses, acides uroniques.

I.2.3. Biosynthèse des aglycones triterpéniques et stéroïdiques

Les saponines comme tous les métabolites secondaires sont synthétisées naturellement chez les plantes et s'accumulent dans diverses parties et organes. Toutes les différentes classes de saponines présentent une seule origine biosynthétique. La sapogénine ou l'aglycone tire son origine de la voie isoprénique dans laquelle trois unités de Coenzyme (CoA) (molécules contenant 2 atomes de Carbone) sont liées pour donner une unité à 5 C appelée diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) catalysée par des enzymes. Ce dernier se réarrange et

donne lieu à une unité précurseur des terpénoïdes : c'est l'Isoprénylpyrophosphate (IPP). L'IPP, caractérisé par une liaison « tête » et une autre « queue », va se condenser avec le DMAPP de manière « tête-queue » pour donner une molécule à 10 atomes de carbone appelée Géranyl pyrophosphate (GPP), qui à son tour se condense nouvellement avec l'IPP pour donner une unité à 15 carbones appelée farnésyl pyrophosphate (FPP). Deux molécules de farnésyl pyrophosphate, catalysées par l'ATP isomérase vont se condenser de manière « queue-queue » pour obtenir un composé à C-30 appelé squalène. Le squalène est oxydé en oxydosqualène, qui est le point commun de départ pour les réactions de cyclisation dans la biosynthèse de triterpénoïdes et des stéroïdes. L'oxydosqualène est converti en dérivés cycliques via la protonation et l'ouverture du cycle époxyde, ce qui laisse un carbocation stable, qui peut subir plusieurs types de réactions de cyclisation. Dans la littérature, le squelette préférentiel formé est fonction du type de cyclisation et du type d'enzyme (cyclase) qui catalyse la réaction. De nombreux types de cyclase (par exemple cycloarténol synthase, lanosterol synthase, β - amyrine synthase) ont été décrites, avec leurs mécanismes d'action (Wendt, 2005).

Ainsi, lorsque l'époxyqualène est maintenu dans une conformation chaise-bateau-chaise, la cyclisation conduit à un cation prostostonyle B, précurseur immédiat des aglycones de types stéroïdiques ; et si l'époxyqualène est maintenu dans une conformation chaise-chaise-chaise, la cyclisation conduit à un cation dammaryle A, précurseur des aglycones de types triterpéniques.

Le schéma biosynthétique des principaux triterpènes et stéroïdes constituant les principaux aglycones des saponines est présenté dans la **Figure 4** ci-dessous :

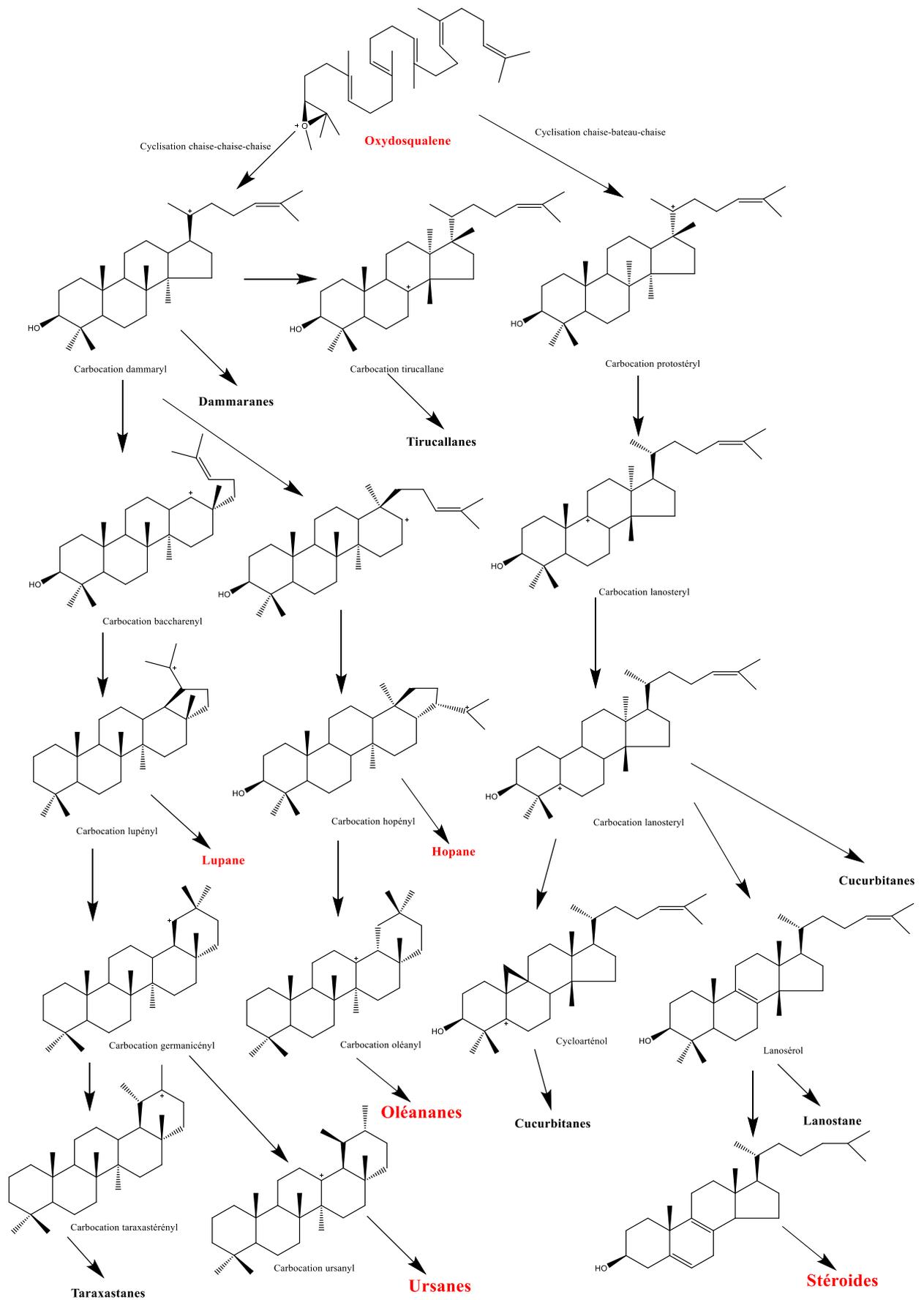


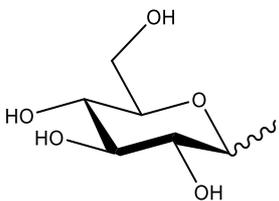
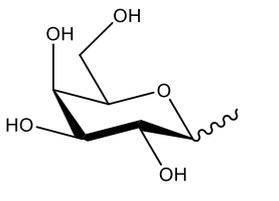
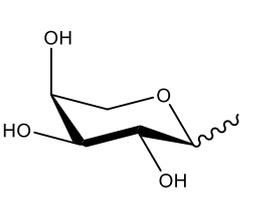
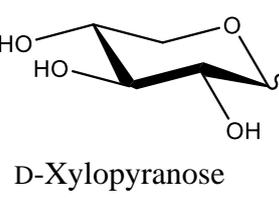
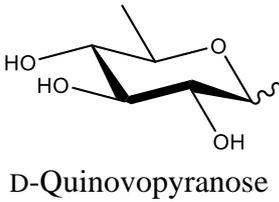
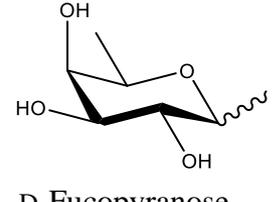
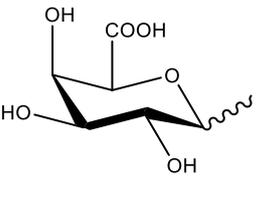
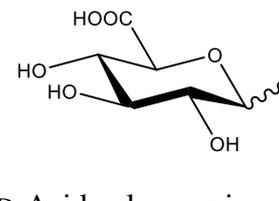
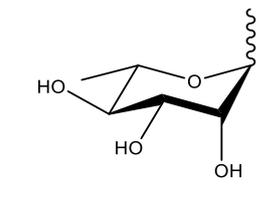
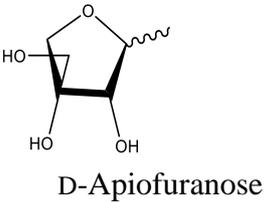
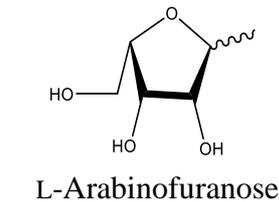
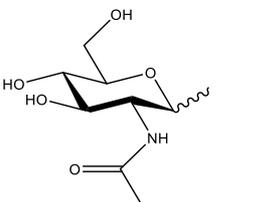
Figure 4: Voie biosynthétique des aglycones triterpéniques et stéroïdiques (Vincken et al., 2007)

I.2.4. Les sucres

Les sucres constituent la partie hydrophile des saponines. Elles peuvent être constituées d'une ou plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone. Les saponines stéroïdiques, ainsi que triterpéniques sont souvent des saponines monodesmosidiques généralement en C-3 par la fixation d'une chaîne unique de sucres. Les saponines bidesmosidiques se trouvent parmi les saponines triterpéniques de type oléane avec des liaisons osidiques en C-3 et C-28, pour les saponines stéroïdiques de type furostane avec une fixation en C-3 et C-26 (Bruneton, 2009). Parmi les saponines triterpéniques de type cycloartane on peut trouver des structures tridesmosidiques, les chaînes de sucres sont fixées en C-3, C-6, C-16, C-21, C-24 et C-25 dans la plupart des cas, et même des saponines tétradesmosidiques ont été décrites mais semblent être très rares (Linnek et al., 2011).

La différence entre les deux radicaux principaux constitutifs des sucres (furanose et pyranose) est au niveau de la chaîne carbonée principale. Les sucres sous forme furanose ont une structure chimique qui comprend un système cyclique à cinq (05) chaînons contenant quatre (04) atomes de carbones et un atome d'oxygène, tandis que les sucres sous forme pyranose ont une structure chimique qui comprend un cycle à six (06) chaînons composés de cinq (05) atomes de carbones et un (01) atome d'oxygène. Le **tableau 1** ci-dessous présente les structures des principaux sucres généralement retrouvés dans les saponines.

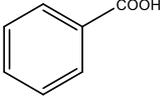
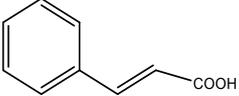
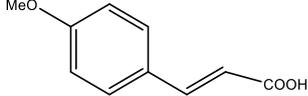
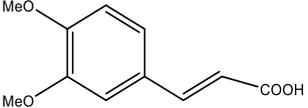
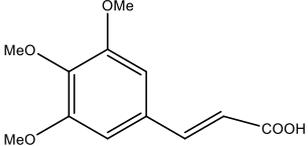
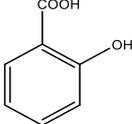
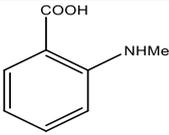
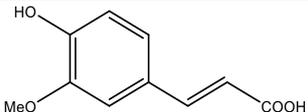
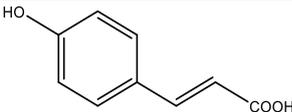
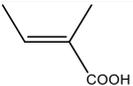
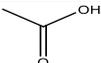
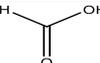
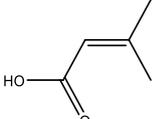
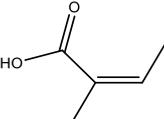
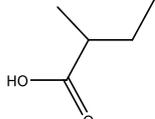
Tableau 1: Les principaux sucres constitutifs rencontrés dans les saponines (Bruneton, 2009).

 <p>D-Glucopyranose</p>	 <p>D-Galactopyranose</p>	 <p>L-Arabinopyranose</p>
 <p>D-Xylopyranose</p>	 <p>D-Quinovopyranose</p>	 <p>D-Fucopyranose</p>
 <p>D-Acide galacturonique</p>	 <p>D-Acide glucuronique</p>	 <p>L-Rhamnopyranose</p>
 <p>D-Apiofuranose</p>	 <p>L-Arabinofuranose</p>	 <p>N-acetylglucosamine</p>

I.2.5. Les substituants organiques dans les saponines

Plusieurs acides organiques peuvent estérifier les saponines au niveau des hydroxyles des sucres ou des aglycones. Les plus communs d'entre eux tels que présentés dans le **tableau 2** ci-dessous, sont notamment les acides acétique et formique. D'autres comme les acides benzoïque et cinnamique sont riches en doubles liaisons conjuguées, ce qui leur permet d'être facilement détectables en spectroscopie UV (Hostettmann et Marson, 1995).

Tableau 2: Les principaux substituants organiques rencontrés dans les saponines (Bruneton, 2009).

 <p>Acide benzoïque</p>	 <p>Acide cinnamique</p>	 <p>Acide <i>p</i>-méthoxycinnamique</p>
 <p>Acide 3,4-méthoxycinnamique</p>	 <p>Acide 3, 4,5-méthoxycinnamique</p>	 <p>Acide salicylique</p>
 <p>Acide N-méthylantranilique</p>	 <p>Acide férulique</p>	 <p>Acide <i>p</i>-coumarique</p>
 <p>Acide tiglique</p>	 <p>Acide acétique</p>	 <p>Acide formique</p>
 <p>Acide 3,3-diméthylacrylique</p>	 <p>Acide angélique</p>	 <p>Acide 2-méthylbutyrique</p>

I.3. Travaux phytochimiques antérieurs

I.3.1. Généralités sur les saponines de la famille des Mimosaceae

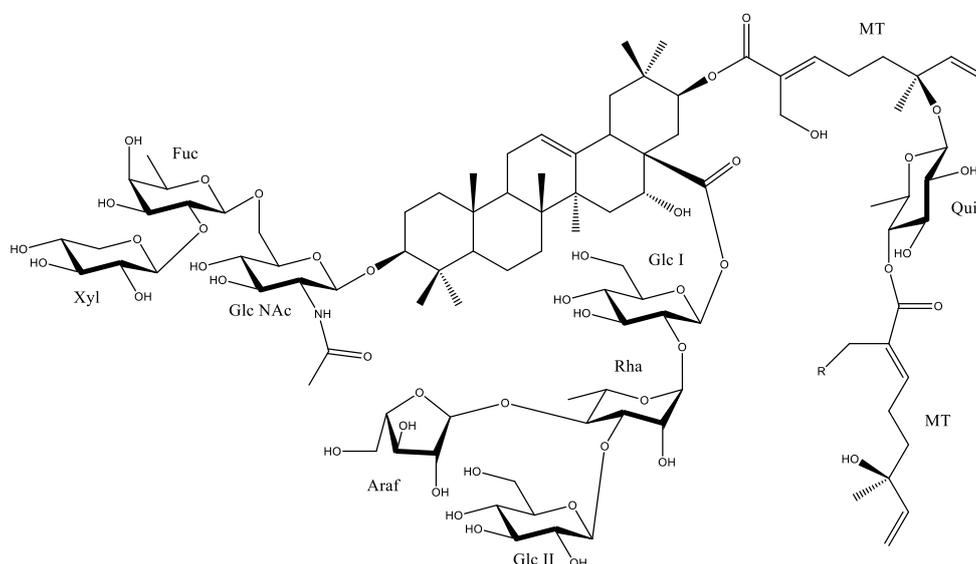
Dans cette famille appartenant à l'ordre des Fabales des plantes dicotylédones, les saponines rencontrées ont des structures de squelettes très variées. Cependant, le squelette de type oléane est le plus présent avec l'acide acacique comme principal aglycone des saponines des espèces de cette famille (Vincken *et al.*, 2007).

I.3.2. Saponines isolées des espèces du genre *Acacia*

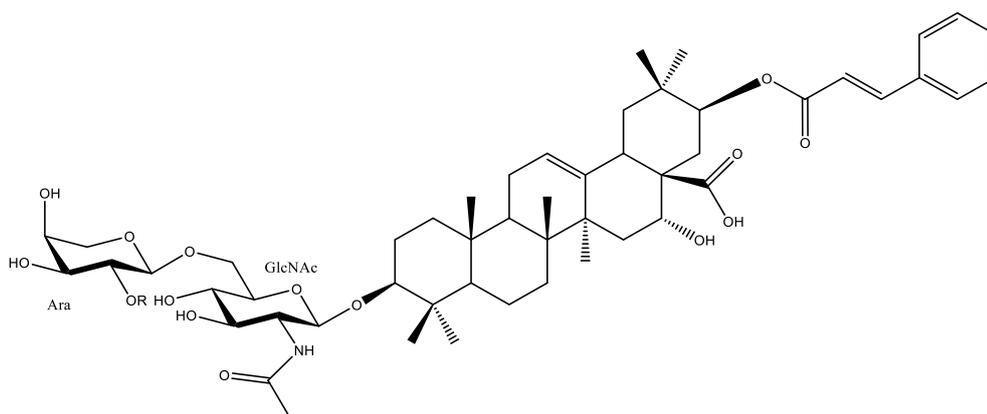
La quasi-totalité des saponines rencontrées dans les espèces du genre *Acacia* sont triterpéniques de type oléane. Les dérivés de l'acide acacique sont les plus répandus suivis de ceux de l'acide oléanolique, l'acide échynocystique et l'acide machaérinique. Cependant certaines espèces de ce genre connaissent une multitude d'aglycones dans leurs structures (Sparg *et al.*, 2004).

I.3.2.1. Saponines triterpéniques

➤ Saponines dérivées de l'acide acacique

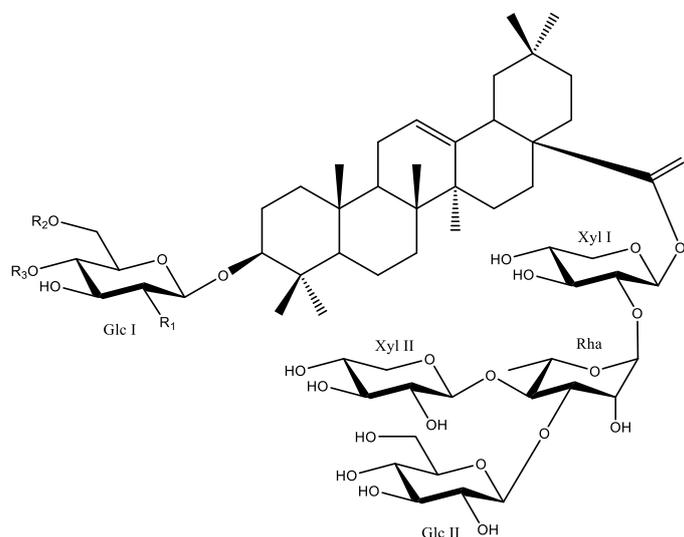


N° structure	Nom du composé	R	Plante	Référence
<u>1</u>	Avicin D	OH	<i>Acacia victoriae</i>	Haridas <i>et al.</i> ; 2000
<u>2</u>	Avicin G	H		

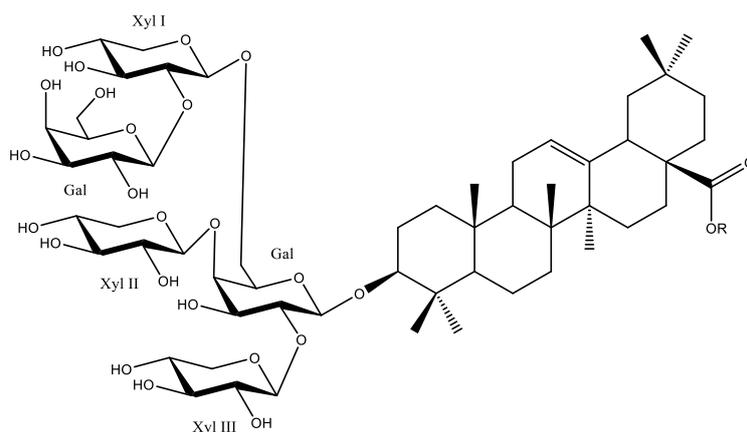


N°	Nom du composé	R	Plante	Référence
<u>3</u>	Acide 3- <i>O</i> -[α -L-arabinopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosyl-(1→6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl]-21- <i>O</i> -trans-cinnamoylacacique	Ara	<i>Acacia tenuifolia</i>	Seo et al., 2002
<u>4</u>	Acide 3- <i>O</i> -[β -D-xylopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranosyl-(1→6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl]-21- <i>O</i> -trans-cinnamoylacacique	Xyl		

➤ Saponines dérivées de l'acide oléanolique

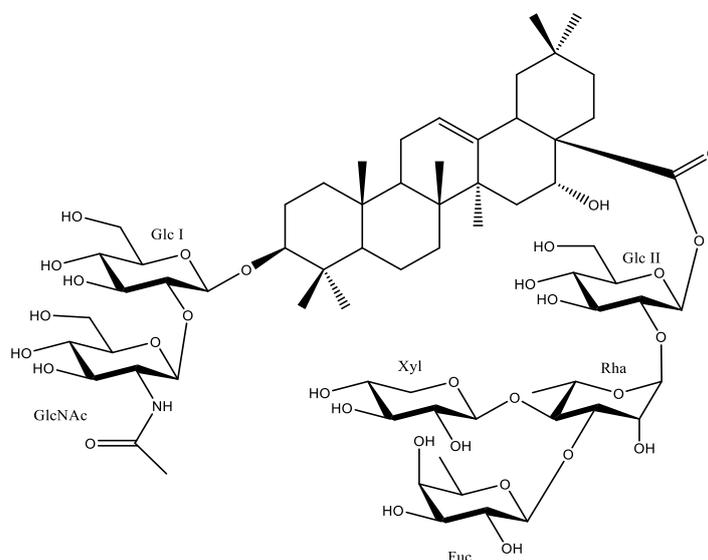


N°	Nom du composé	R ₁	R ₂	R ₃	Plante	Référence
<u>5</u>	Albidoside A	NHAc	H	H	<i>Acacia albida</i>	Tchoukoua et al., 2017a
<u>6</u>	Albidoside C	OGlc	H	H		
<u>7</u>	Albidoside D	NHAc	H	Glc		

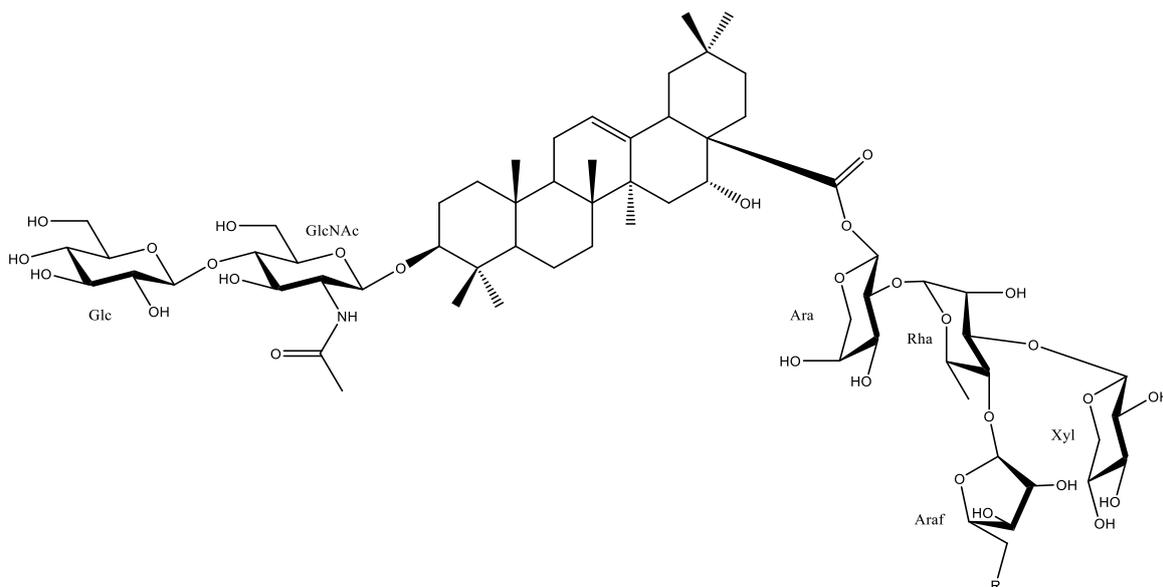


N°	Nom du composé	R	Plante	Référence
<u>8</u>	Polythoside A	H	<i>Acacia polyacantha</i>	Tchoukoua et <i>al.</i> , 2021b
<u>9</u>	Polythoside B	Glc		

➤ Saponines dérivées de l'acide échynocystique

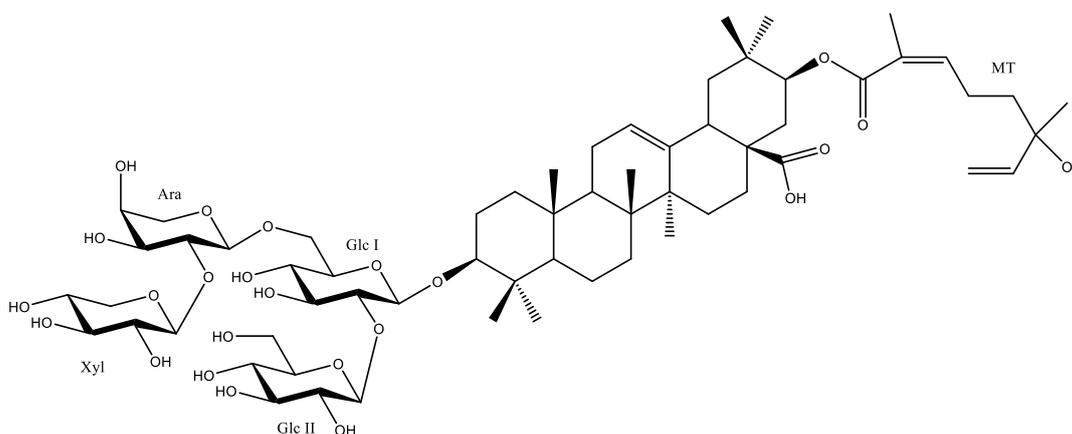


N°	Nom du composé	Plante	Référence
<u>10</u>	Albidoside E	<i>Acacia albida</i>	Tchoukoua et <i>al.</i> , 2017a

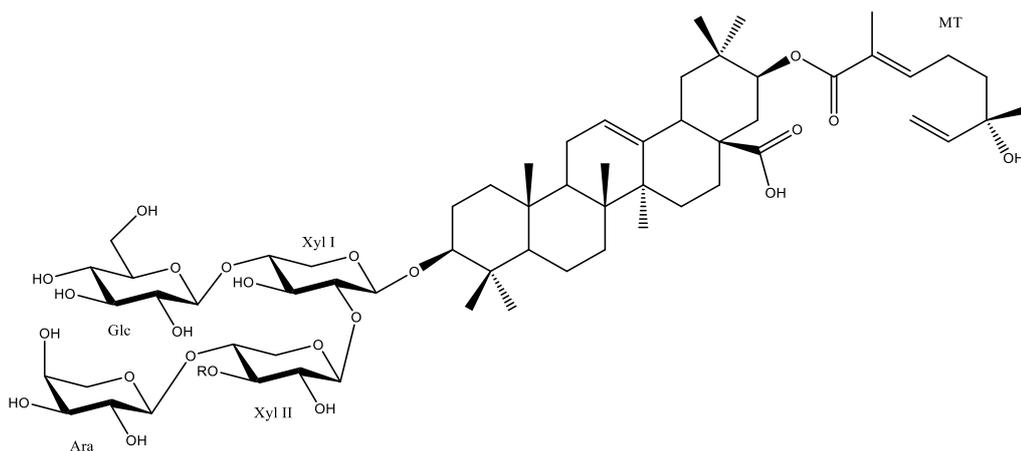


N°	Nom du composé	R	Plante	Référence
<u>11</u>	Ligulataside A	OCOCH ₃	<i>Acacia ligulata</i>	Jaeger et al., 2017
<u>12</u>	Ligulataside B	OH		

➤ Saponines dérivées de l'acide machaérinique

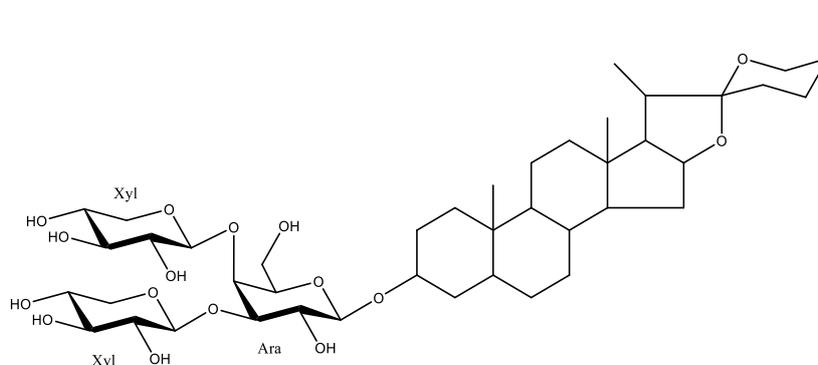


N°	Nom du composé	Plante	Reférence
<u>13</u>	21β-O-[(2E)-6-hydroxyl-2,6-dimethyl-2,7-octadienoyl] pitheduloside G	<i>Acacia pennata</i>	Nguyen et al., 2018



N°	Nom du composé	R ₁	Plante	Référence
<u>14</u>	Kamerunoside A	H	<i>Acacia kamerunensis</i>	Tchoukoua et al., 2018b
<u>15</u>	Kamerunoside B	Gal		
<u>16</u>	Kamerunoside C	Glc- ² Glc		

I.3.2.2. Autres saponines



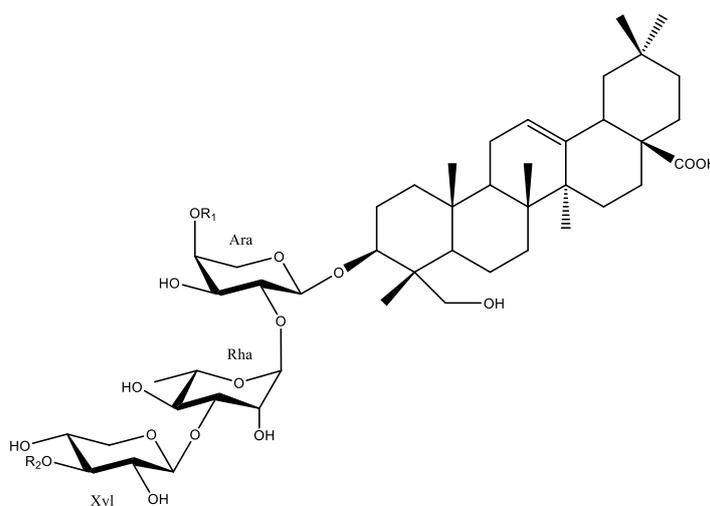
N°	Nom du composé	Plante	Référence
<u>17</u>	25S-5- β -spirostan-3- β -yl-3-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside	<i>Acacia saligna</i>	Gedara et Galala, 2013

I.3.4. Généralités sur les saponines de la famille des Sapindaceae

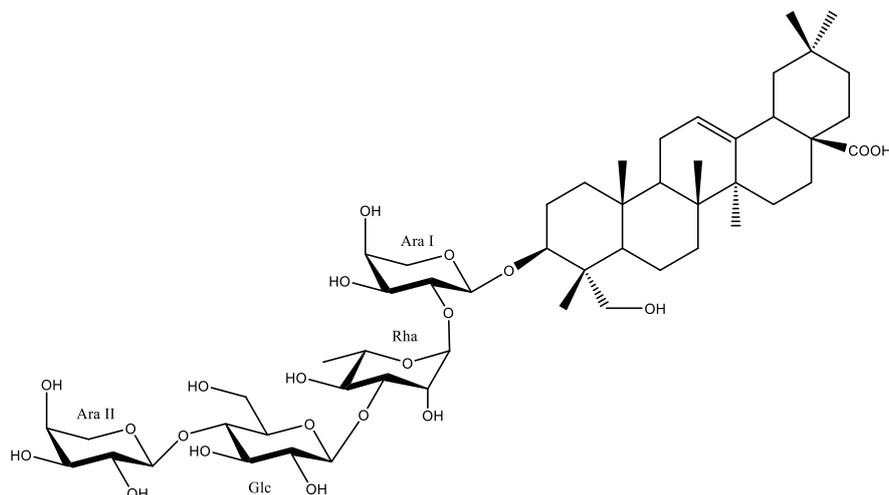
Plusieurs études s'accordent à séparer cette famille en deux grands groupes (c'est-à-dire en deux sous-familles) du fait de leurs différences macromorphologiques, génétiques et moléculaires. En effet, les espèces de la sous-famille des Sapindoideae produisent presque exclusivement des saponines à hédéragénine ou acide oléanolique tandis que la sous-famille des Dodonaeoideae, en revanche, concentre quasiment toutes sortes de génines basées sur le motif oléanane retrouvé dans les Sapindoideae. Ces génines comportent une multitude de fonctions annexes dérivées de l'oxygène, ce qui contribue à retrouver dans cette sous-famille des aglycones comportant quatre, cinq voir six hydroxyles, auxquels s'ajoutent parfois des fonctions acides carboxyliques et cétones. Les aglycones les plus répandus de la sous-famille des Dodonaeoideae sont donc le R1-barrigénol, le barringtogénol C, la saniculagénine C et la protoaescigénine (Delaude, 1993 ; Voutquenne, 2001 ; Petit, 2020).

I.3.5. Saponines isolées des espèces du genre *Chytranthus*

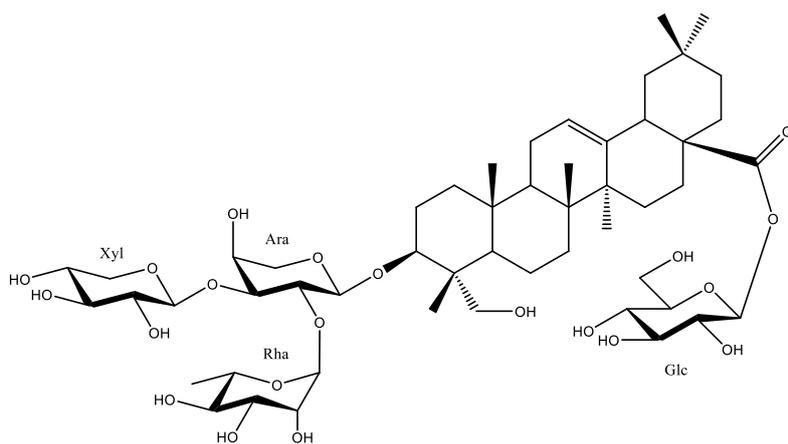
Très peu d'études phytochimiques ont été réalisées sur les espèces du genre *Chytranthus* jusqu'à nos jours. La grande majorité des composés isolés de ces espèces appartient à la classe des saponines triterpéniques. Les structures des saponines isolées de ces espèces révèlent qu'elles possèdent toutes l'hédéragénine comme aglycone, avec une séquence osidique ³Rha-²Ara-³Hédéragénine (comme motif structural) presque toujours directement liée en C-3 de l'aglycone (Petit et *al.*, 2021 ; Biang et *al.*, 2020).



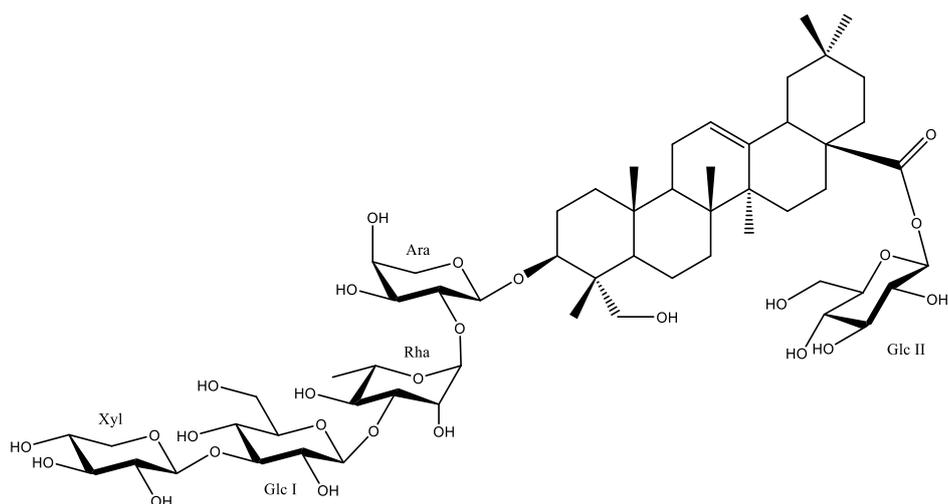
N°	Nom du composé	R ₁	R ₂	Plante	Référence
<u>18</u>	Klaineanoside A	Glc- ² Xyl	Xyl	<i>Chytranthus Klaineanus</i>	Biang et al., 2020
<u>19</u>	Klaineanoside B	H	Xyl		
<u>20</u>	Klaineanoside C	Glc- ² Xyl	H		



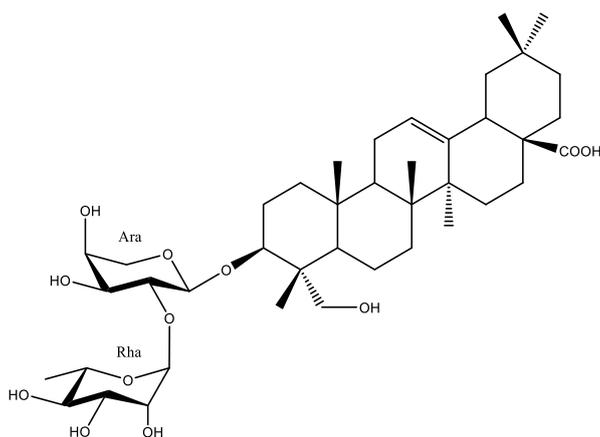
N°	Nom du composé	Plante	Référence
<u>21</u>	3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragnine	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	Petit et al., 2021



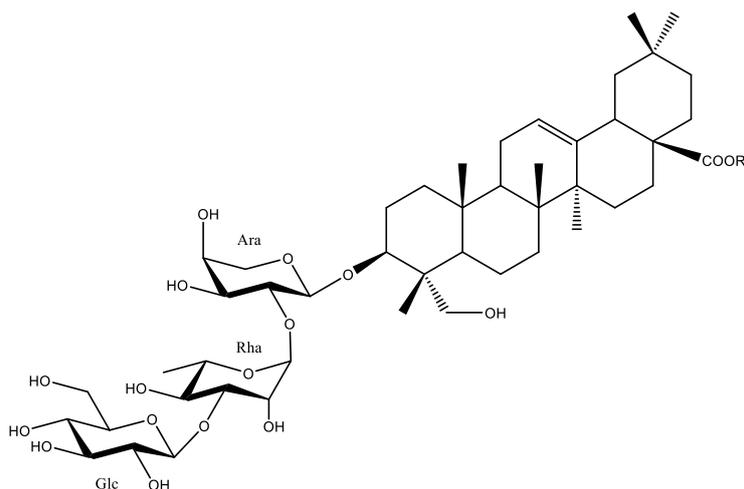
N°	Nom du composé	Plante	Référence
<u>22</u>	3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosylhédéragnine 28- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl ester	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	Petit et al., 2021



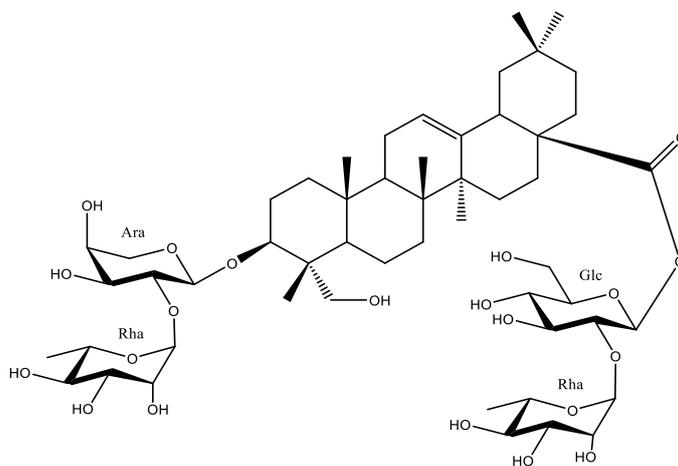
N°	Nom du composé	Plante	Référence
23	3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhederagenin 28-O-β-D-glucopyranosyl ester	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	Petit et al., 2021



N°	Nom du composé	Plante	Référence
24	α-hédérine	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	Petit et al., 2021



N°	Nom du composé	R	Plante	Référence
<u>25</u>	3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhédéragénine (macranthoside A)	H	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	Petit et al., 2021
<u>26</u>	3-O-β-D-glucopyranosyl- (1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhédéragénine 28-O-β-D-glucopyranosyl ester	Glc		



N°	Nom du composé	Plante	Référence
<u>27</u>	3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosylhédéragénine 28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl ester	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	Petit et al., 2021

I.4. Eléments spectroscopiques de base pour l'identification des saponines

I.4.1. Spectrométrie de masse

Elle donne les informations sur la masse molaire de la molécule (saponine) et est associée à d'autres techniques pour l'élucidation complète de celle-ci. Elle est basée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation, provenant de la molécule en cours d'analyse. Pour les méthodes d'ionisation douce, l'ion formé peut être consécutif à l'addition d'un ion (H^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+) ou d'un électron ou encore à la soustraction d'un électron ou d'un hydrogène ionisé à la molécule.

Il existe plusieurs modes d'ionisation en spectrométrie de masse. Les plus utilisés au fil des dernières années sont :

- **ESI (*ElectroSpray Ionisation*)** : Cette technique est devenue au fil des années, la plus efficace et la plus utilisée dans la détermination structurale des saponines. Elle consiste à pulvériser une solution d'une part, à ioniser les espèces qui y sont présentes d'autre part et à assurer l'évaporation de celles-ci, le tout en appliquant un champ électrique fort à une pression atmosphérique. Elle présente l'avantage d'être pratique pour tout type de molécule comparé à d'autres techniques.
- **FAB (*Fast Atom Bombardment*)** : Ici, l'ionisation de l'échantillon est obtenue par bombardement d'atomes généralement de l'argon ou de xénon préalablement ionisé, accéléré et neutralisé par collision avec d'autres atomes d'argon neutre. Cette technique produit des ions positifs par captation $[M+1]^+$ ou $[M+23]^+$ et des ions négatifs par déprotonation $[M-1]^-$.

I.4.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'élucidation structurale des métabolites secondaires en l'occurrence les saponines, fait recours à l'application des techniques de RMN permettant ainsi d'obtenir des structures chimiques fiables et d'assigner complètement tous les carbones et protons de la molécule, ceci avec l'aide de la littérature. Deux types d'expériences existent en RMN :

Les expériences monodimensionnelles (RMN 1D) : 1H et ^{13}C

Les expériences bidimensionnelles (RMN 2D) : HMBC, HSQC, COSY, NOESY, ROESY, TOCSY, HSQC-TOCSY

I.4.2.1. Spectroscopie RMN 1D

- RMN ^1H

Cette expérience permet d'avoir toutes les informations concernant les différentes familles de protons présentes dans la molécule. En fonction du solvant d'analyse utilisé pour dissoudre le composé, certaines informations concernant les protons peuvent exister sur le spectre ou pas.

- RMN ^{13}C

Le spectre de RMN ^{13}C fournit des informations sur la nature des carbones. Selon les différents modes d'enregistrement, des informations précises peuvent être obtenues :

Ainsi, le mode DEPT 135 permet de distinguer les familles des carbones primaires, secondaires et tertiaires. Ici, les carbones primaires et tertiaires apparaissent dans une même phase tandis que les carbones secondaires apparaissent en phase inverse sur le spectre.

Le mode DEPT 90 quant à lui permet d'avoir des informations uniquement sur les carbones tertiaires tandis que le mode DEPT 45 fournit des informations uniquement sur les carbones quaternaires (Massiot et Lavaud, 1995).

I.4.2.2. Spectroscopie RMN 2D

- COSY (*Correlated Spectroscopy*)

Cette expérience permet de connaître les déplacements chimiques des protons adjacents avec des couplages géminaux $^2J_{\text{H-H}}$ et les couplages vicinaux $^3J_{\text{H-H}}$. Elle permet également de retrouver l'enchaînement des protons dans un squelette de la molécule (Gunther, 1996 ; Massiot et Lavaud, 1995).

- NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)

C'est une expérience homonucléaire qui montre les corrélations entre tous les protons spatialement voisins situés dans un même plan. Elle permet également de confirmer la jonction entre deux structures et est très importante pour déterminer l'agencement des unités osidiques dans les molécules de saponines (Gunther, 1996).

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

Cette expérience fournit pratiquement les mêmes informations que le NOESY avec en plus un avantage considérable car ne dépend pas du champ magnétique appliqué. Le ROESY est surtout très pratique pour des molécules ayant un très grand nombre d'atomes d'hydrogènes.

Ceci est principalement dû à la suppression dans le ROESY, de certaines corrélations (notamment COSY) observables dans le NOESY.

- **TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)**

A partir de cette expérience, tous les protons d'une unité de fragment de molécule peuvent être identifiés, s'il y a au moins une résonance dans le système de spin. Elle est en réalité une expérience COSY longue distance permettant de confirmer les corrélations des protons établies par le COSY.

Le TOCSY est essentiel dans l'analyse des sucres. De façon plus pratique, pour un sucre, il suffit d'observer la résonance du proton anomérique pour identifier les autres protons de cette unité osidique (Agrawal, 1992).

- **HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)**

C'est une expérience qui permet d'observer le couplage hétéronucléaire (H-C) direct 1J entre un proton et le carbone qui le porte. Elle permet à partir du spectre proton, d'assigner sans doute la majorité des carbones protonés de la molécule (Massiot et Lavaud, 1995). La connaissance des déplacements chimiques des protons et carbones permet de soupçonner des substitutions par l'observation d'un blindage ou déblindage de ces protons et carbones.

Cette expérience permet également, en complément avec les spectres de RMN 1D, d'avoir une idée exacte sur le nombre de sucres présents dans la molécule de saponine.

- **HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)**

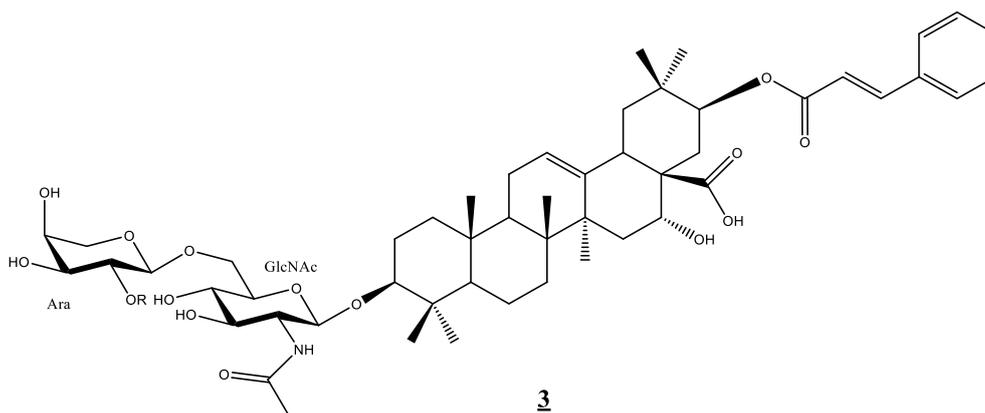
Cette expérience permet d'observer des corrélations hétéronucléaires à longue distance entre un proton et des carbones séparés de ce proton par 2, 3 et parfois 4 liaisons (2J , 3J et $^4J_{H-C}$). Elle est très complémentaire aux expériences COSY et HSQC, permet également de positionner les carbones quaternaires et d'établir l'enchaînement des différents fragments d'une molécule.

- **HSQC-TOCSY (*Heteronuclear Single Quantum Coherence-Total Correlation Spectroscopy*)**

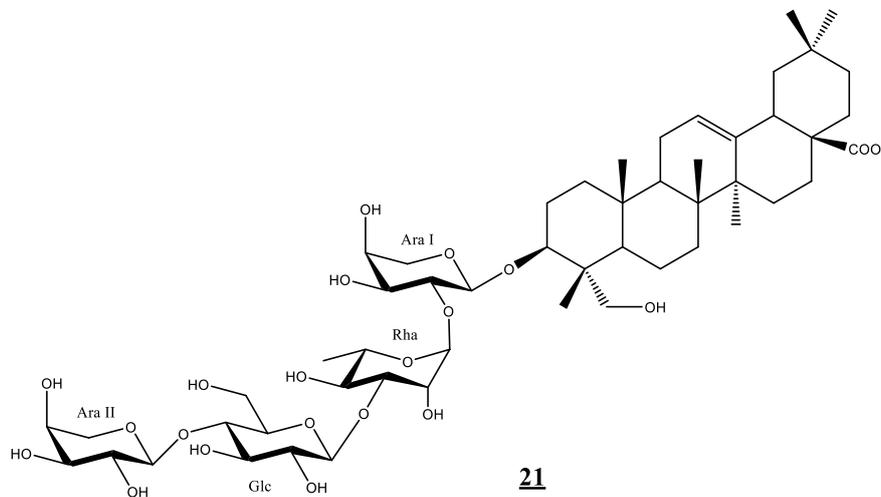
C'est une expérience hétéronucléaire (H-C) hybride permettant d'obtenir facilement et aisément d'un seul coup, les informations fournies par les expériences TOCSY et HSQC. Cette expérience est particulièrement utile lorsque le chevauchement des protons rend difficile l'interprétation du spectre TOCSY dans la recherche des autres protons d'une même unité de spin. Cette technique est alors très pratique dans la détermination structurale des sucres.

I.5. Proposition de nomenclature des saponines

La nomenclature des saponines ne repose pas sur les règles établies par l'UIPAC. Elle se fonde sur les travaux antérieurs. Ainsi, pour une saponine donnée : Acide 3-[chaîne en C-3 précédée de *O*]-21-[chaîne en C-21 précédée de *O*]-28-[chaîne en C-28 précédée de *O*] nom de l'aglycone. C'est le cas des saponines suivantes :



Acide 3-*O*-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl]-21-*O*-trans-cinnamoylacacique



3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédéragénine

I.6. Généralités sur les maladies fongiques et les champignons pathogènes

I.6.1. Maladies fongiques

Une maladie fongique ou cryptogamique est donc une maladie causée à une plante par un champignon microscopique ou un autre organisme filamenteux parasite. Lorsque c'est un animal qui est atteint, on parle plutôt de mycose (Fernandez-Acero et *al.*, 2014).

Il existe plusieurs maladies fongiques auxquelles on peut être confrontés. Les plus courantes sont le mildiou, la rouille, l'oïdium et l'helminthosporiose qui attaquent plusieurs cultures vivrières de grande consommation. Cependant, il existe également d'autres maladies fongiques rencontrées sur les plantes de grande culture telles que : l'alternariose, l'antracnose, la pourriture grise ou botrytis, le charbon du maïs, la cladosporiose, la cloque du pecher, la maladie criblée ou coryneum, l'entomosporiose, l'esca, l'eutypiose, le fil rouge, la fonte des semis, la fusariose, la gommose, la graphiose, la gravelle, l'helminthosporiose, le mal seco, le mildiou, la moniliose, l'oidium, le pied noir, la pyriculariose, la rouille, la septoriose, la sclérotiniose, la tavelure et la verticilliose (González-Fernández et *al.*, 2010).

Sous le nom de maladie fongique, se cache en réalité une kyrielle de champignons aérobies et anaérobies qui peuvent attaquer n'importe quelle plante telle que le maïs, la tomate, la pomme de terre (**Figure 5**) ; dès lors qu'elle est mal entretenue, mal exposée ou encore inadaptée au climat : c'est le cas des maladies que subissent certaines cultures.



Figure 5: Manifestation de quelques maladies fongiques sur les cultures (Dean et *al.*, 2012)

I.5.2. Champignons pathogènes

Historiquement, les champignons ainsi que d'autres organismes filamenteux étaient classés parmi les plantes cryptogames. Ce nom est resté chez les plantes pour les maladies causées par ces organismes dont les différentes formes des maladies fongiques (cryptogamiques) représentent environ 90% des maladies des végétaux de grande culture.

Les champignons phytopathogènes, c'est à dire parasites des plantes vasculaires, sont considérés comme les micros organismes ayant le plus d'impact économique sur les cultures. On les trouve partout dans le monde, sur tous types de culture et les dommages qu'ils causent peuvent mener à une perte totale de la production.

Ce sont des espèces de champignons parasites qui provoquent des maladies cryptogamiques chez les plantes. Ils appartiennent aux différents groupes du règne des eumycocètes ou « champignons vrais » : ascomycètes, basidiomycètes, chytridiomycètes, zygomycètes et deutéromycètes (champignons imparfaits). Les agents pathogènes responsables des maladies cryptogamiques comprennent aussi des protistes : plasmodiophoromycètes, dont les genres les plus importants sont *Plasmodiophora* et *Spongospora*, et des oomycètes, qui comprennent notamment la famille des Peronosporaceae (agents des mildious) (Garrido et al., 2012).

On estime entre dix mille et quinze mille espèces, le nombre d'organismes du type champignons ou pseudo-champignons susceptibles d'infecter les plantes (contre une cinquantaine susceptible d'infecter l'homme).

Selon les maladies fongiques causées sur les plantes, on distingue deux types de champignons :

- Les champignons telluriques qui causent les maladies telles que la fusariose, la verticilliose, le pithium ;
- Les champignons foliaires qui peuvent causer l'oïdium, le mildiou, l'alternariose et la pourriture grise.

En tenant compte tant des aspects scientifiques qu'économiques, une liste non exhaustive des espèces ou genres de champignons phytopathogènes les plus importants peut être répertoriée : *Pythium*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pyricularia*, *Gaeumannomyces*, *Xylella*, *Phaeomoniella*, *Eutypa*, *Aspergillus*, *Phytophthora infestans*, *Trichoderma* etc (Dean et al., 2012).

➤ **Cas des champignons du genre *Aspergillus***

Pour ce genre contenant plus de 185 espèces, la grande majorité des espèces appartient à la famille des « champignons imparfaits » (deutéromycètes). Ce sont des champignons filamenteux, de type moisissure dont le thalle présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores qui sont terminés en vésicule et dans lesquels on trouve 1 à 20 spores par mètre cube. Ce genre a une répartition mondiale et se développe abondamment sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales ainsi que dans l'environnement humain. Ces champignons se distinguent également par leur teinte qui diffère selon les espèces : c'est le cas de *Aspergillus niger* qui est noir (**Figure 6A,A'**) tandis que *Aspergillus flavus* est vert (**Figure 6B,B'**) .

Les *Aspergillus* ont une grande importance car sont utilisés dans plusieurs domaines tels que l'industrie agroalimentaire et biotechnologique pour la fermentation des boissons, la production d'antimicrobiens (*Aspergillus flavus*), d'enzymes et d'acides organiques (*Aspergillus niger*).

Ces champignons peuvent cependant être toxiques et néfastes pour l'homme à cause de leur grande production de toxines (mycotoxines et aflatoxines). Cependant, la plupart sont des saprophytes classiques qui attaquent les plantes à partir des blessures et dont la virulence est accentuée par les conditions climatiques (temps chaud et humide). Sur l'homme, l'inhalation des spores d'*Aspergillus* est responsable d'infection fongique communément appelée « Aspergillose » qui touche généralement les poumons et peut entraîner plusieurs formes de cancer lorsque ces spores inhalées trouvent un système immunitaire affaibli (Rocher, 2002).



Figure 6: Images d'*Aspergillus niger* à l'oeil nu (**A**), au microscope (**A'**) et d'*Aspergillus flavus* à l'oeil nu (**B**) et au microscope (**B'**)

➤ **Cas des champignons du genre *Fusarium***

Ce sont également des champignons deutéromycètes (imparfaits) qui se caractérisent principalement par la présence de macronidies fusiformes et cloisonnées. Ces champignons sont à l'origine de plusieurs maladies des plantes couramment appelées « fusarioses » et sont également impliquées dans des infections opportunistes chez l'homme à cause de leur grande production de mycotoxines. Chez les plantes, les *Fusarium* peuvent attaquer les céréales, les graminées et survivent généralement dans les graines, les racines, les gaines foliaires et dans le sol. Leur développement est favorisé par des sols trop secs ou humides, la forte concentration d'engrais entraînant ainsi la pourriture des semences, des racines et des tiges. La fusariose peut attaquer comme plante : le blé, le maïs, l'avoine, la tomate, le melon, le concombre, le piment, la pomme de terre, la patate douce, la pastèque, l'ail, l'oignon, le chou, le gingembre, la banane, le manioc etc. C'est le cas de la fusariose du bananier qui est principalement causée par *Fusarium oxysporum* (**Figure 7A,A'**) tandis que la fonte des semis chez les céréales et la pourriture sèche du tubercule de la pomme de terre est causée principalement par *Fusarium culmorum* (**Figure 7B,B'**)

Chez les hommes et les animaux, l'inhalation des spores des *Fusarium* peut provoquer de la fièvre, l'asthme, la mycose des ongles et d'autres maladies dont les symptômes peuvent inclure la nausée, les vomissements, la diarrhée etc (Jean Chevaugnon, 1957).



Figure 7: Images de *Fusarium oxysporum* à l'œil nu (**A**), au microscope (**A'**) et de *Fusarium culmorum* à l'œil nu (**B**) et au microscope (**B'**)

➤ **Champignons du genre *Phytophthora* : *Phytophthora infestans***

Les *phytophthoras* sont des champignons de la famille des Oomycètes infectant un grand nombre de végétaux parmi lesquels se trouvent plusieurs plantes ou arbres cultivés tels la pomme de terre, la vigne, le châtaignier ou le pommier. Ils sont diploïdes à l'état végétatif et

présentent des cycles de reproduction asexuée et sexuée. Le cycle de reproduction asexuée se réalise à l'aide de sporanges et de zoospores ainsi que de chlamydospores pour certaines espèces. Ce sont des parasites qui ont des modes d'infection de type biotrophe, nécrotrophe et hémibiotrophe. Selon l'espèce considérée, une souche peut être pas, peu ou très pathogène et plus ou moins virulente selon les conditions de l'environnement et l'espèce hôte infectée (Jean Chevaugnon, 1957).

Ce genre comporte plus de 98 espèces de champignons dont les plus connues et dangereuses sont :

- *Phytophthora infestans* (**Figure 8A,A'**), responsable du mildiou chez la pomme de terre et la tomate ;
- *Phytophthora cactorum*, responsable d'une maladie du pommier ;
- *Phytophthora cinnamomi*, responsable de maladies racinaires sur Rhododendron, de la maladie de l'encre du châtaignier et ;
- *Phytophthora ramorum*, responsable de maladies foliaires sur Rhododendron et diverses plantes ornementales ainsi que de la maladie de la mort subite du chêne.

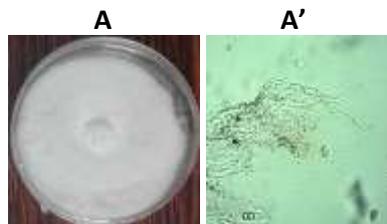


Figure 8: Images de *Phytophthora infestans* à l'oeil nu (A) et au microscope (A')

➤ Champignons du genre *Botrytis* : *Botrytis cinerea*

Botrytis est un genre de champignons ascomycètes de la famille des Sclerotiniaceae très proche du genre *Sclerotinia* et donc appartient également à la classe des champignons imparfaits. Ce sont des parasites nécrotrophes de plantes et, certaines espèces ont une phase sexuée (téleomorphe) très discrète ou inexistante. Très peu d'espèces ont été recensées dans ce genre dont le plus important reste *Botrytis cinerea* (**Figure 9A,A'**).

Cette espèce est responsable de la pourriture grise, maladie cryptogamique qui sévit sur plusieurs cultures d'intérêt agronomique majeur comme la vigne, la tomate, le tournesol,

la fraise. C'est un champignon également responsable de la pourriture noble qui permet d'obtenir certains vins liquoreux, comme le sauternes ou le tokay (Jean Chevaugeon, 1957).

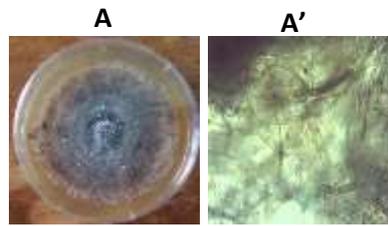


Figure 9: Images de *Botrytis cinerea* à l'oeil nu (A) et au microscope (A')

➤ **Champignons du genre *Pythium* : *Pythium myriotylum***

Pythium est un genre de micro-organismes classés parmi les oomycètes. Ces champignons, autrefois classés parmi les *Fungi*, sont aujourd'hui rattachés aux straménopiles et comprend de nombreuses espèces parasites de plantes et quelques parasites d'animaux tel que *Pythium myriotylum* (Figure 10A,A'). Ces espèces font partie des microorganismes à l'origine de la pourriture pythienne communément appelée « fonte des semis », très souvent dûe aux températures humides, qui attaque plusieurs cultures à l'instar des aubergines, carottes, choux, concombres haricot, oignons, salades, tomates (Jean Chevaugeon, 1957).

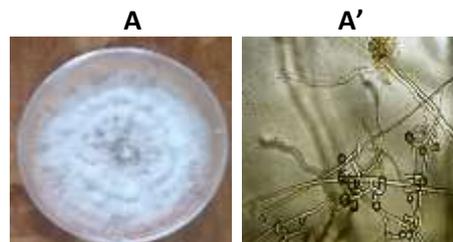


Figure 10: Images de *Pythium myriotylum* à l'oeil nu (A) et au microscope (A')

I.5.3. Mode d'action (attaque) des phytopathogènes sur les plantes

L'infection des plantes par un champignon phytopathogène se déroule selon un processus, appelé « cycle de la maladie » (Figure 11 et 12), dont la complexité varie selon les espèces. Les champignons phytopathogènes sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de croissance de la plante, en suivant un cycle biologique complexe qui peut comporter des stades de reproduction sexuée ou asexuée.

Les champignons phytopathogènes attaquent surtout les parties aériennes des plantes, mais certains champignons présents dans le sol infectent les racines, ou s'introduisent par les parties souterraines des plantes dans les systèmes vasculaires, et colonisent donc toute la plante en remontant les vaisseaux du xylème, provoquant des maladies telles que la fonte des semis, la pourriture vasculaire ou la pourriture des racines (Kohl *et al.*, 2019).

Les dégâts causés sont le plus souvent observables sous forme de nécroses localisées, avec développement des mycéliums en surface ou non, production intense de spores, et des signes caractéristiques de carences observables sur toute la plante (Pérez-García *et al.*, 2011).

L'évolution d'une maladie fongique sur une plante se fait généralement par :

- La contamination : les spores des champignons se déposent sur les plantes (transportées par le vent par exemple), germent et pénètrent à l'intérieur des tissus. Le champignon passe par les orifices naturels (stomates, lenticelles) ou pénètre par des blessures (notamment celles provoquées par des insectes ou par des tailles de branches) ou encore il est capable de traverser la cuticule ;
- La période d'incubation : le champignon se ramifie et envahit les cellules des tissus ou les espaces intercellulaires ;
- L'apparition et développement des symptômes, accompagnée de la fructification du champignon.

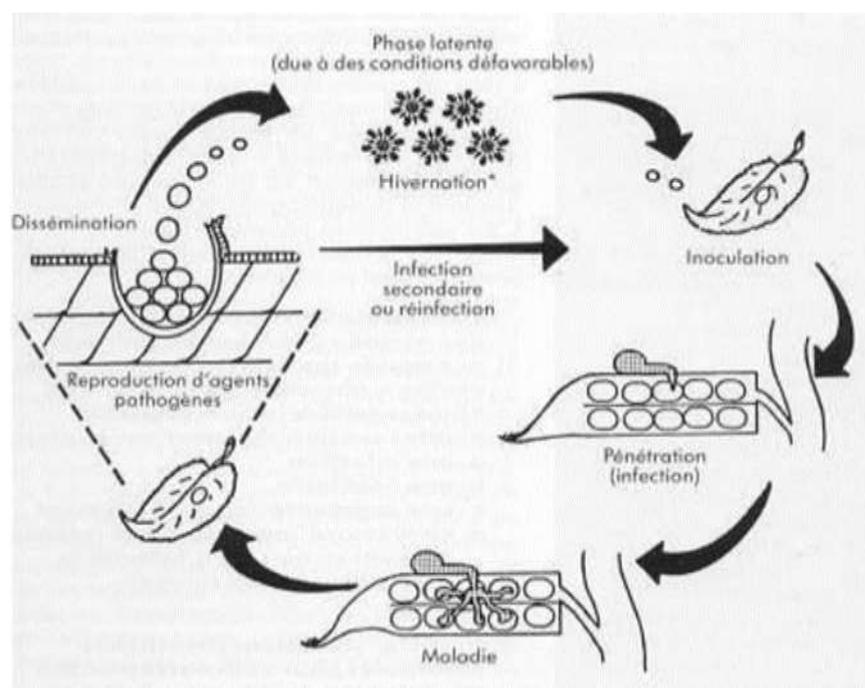


Figure 11: Etapes d'une maladie fongique (Pérez-García *et al.*, 2011)

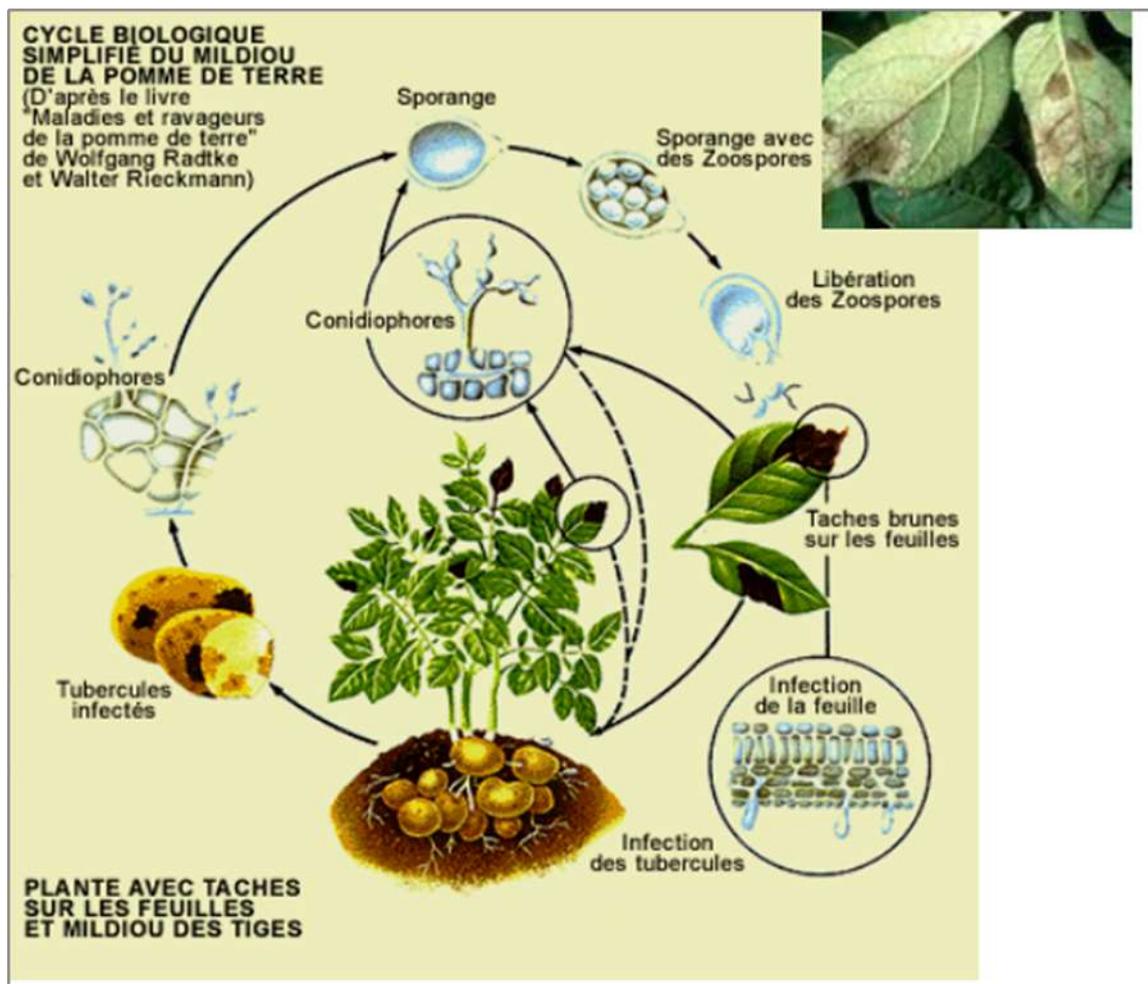


Figure 12: Cycle d'une maladie fongique (cas du mildiou de la pomme de terre) (Pérez-García et *al.*, 2011)

I.5.4. Traitement existant contre les maladies fongiques

Le traitement des maladies fongiques nécessite une étape préalable importante à savoir, l'identification du champignon en cause de la maladie, avant d'acheter un produit de traitement couramment appelé fongicide (qui entre dans la catégorie des pesticides). Une fois le diagnostic établi, le traitement chimique opère de différentes façons pour éradiquer le champignon nuisible.

Plusieurs stratégies chimiques permettent de lutter contre l'invasion d'une plante par un champignon, de façon directe ou indirecte. En effet, certains fongicides agissent sur le système énergétique des cellules fongiques en inhibant les processus respiratoires. D'autres agissent sur la synthèse des constituants du champignon. D'autres substances ont encore pour but de désorganiser les cellules et leurs divisions au sein des tissus fongiques (Stracquadanio et *al.*, 2020).

Un fongicide peut être capable d'inhiber la croissance d'un champignon pathogène mais aussi de le détruire s'il agit sur l'activité métabolique vitale au développement du champignon responsable de la maladie. Il existe deux principaux types de fongicides selon le mode d'action (Rocher, 2002) :

- Les fongicides systémiques qui sont absorbés par les feuilles puis véhiculés par la sève de la plante. Un fongicide systémique permet, grâce à son mode de dispersion sur la plante, une pulvérisation plus légère et une action plus globale. La systémie des fongicides se limite uniquement à une systémie xylémienne : le produit diffuse de la sémence (zone d'application) vers le sol environnant puis est absorbé par les racines au moment de la germination pour migrer vers les parties aériennes
- Les fongicides non systémiques (agissant par contact) sont ceux qui demeurent au niveau du point d'application sur la plante. Ils sont dits de surface s'ils restent à l'extérieur du végétal, à la surface des feuilles dans le cas d'une application foliaire. Lorsque ces fongicides sont suffisamment lipophiles, ils sont piégés au niveau de la cuticule des feuilles ; on les appelle alors cuticulaires. Ils peuvent aussi franchir la cuticule et diffuser dans les parois des premières couches cellulaires : dans ce cas, il s'agit de fongicides pénétrants. Les fongicides non systémiques tuent le champignon dès qu'ils le touchent et dépendent d'une parfaite pulvérisation sur toutes les parties touchées de la plante.

Les principes actifs des fongicides chimiques présents sur le marché sont constitués de métabolites secondaires appartenant à plusieurs classes : les composés phénoliques, les alcaloïdes, les saponines etc tel que présenté à la (**Figure 13**)

Cependant, plusieurs études récentes effectuées sur les saponines ont montré que ces composés pourraient être de bons candidats dans l'élaboration de nouveaux fongicides chimiques et biofongicides (Petit, 2020 ; Njateng et al., 2015 ; Figen Mert-Türk, 2006).

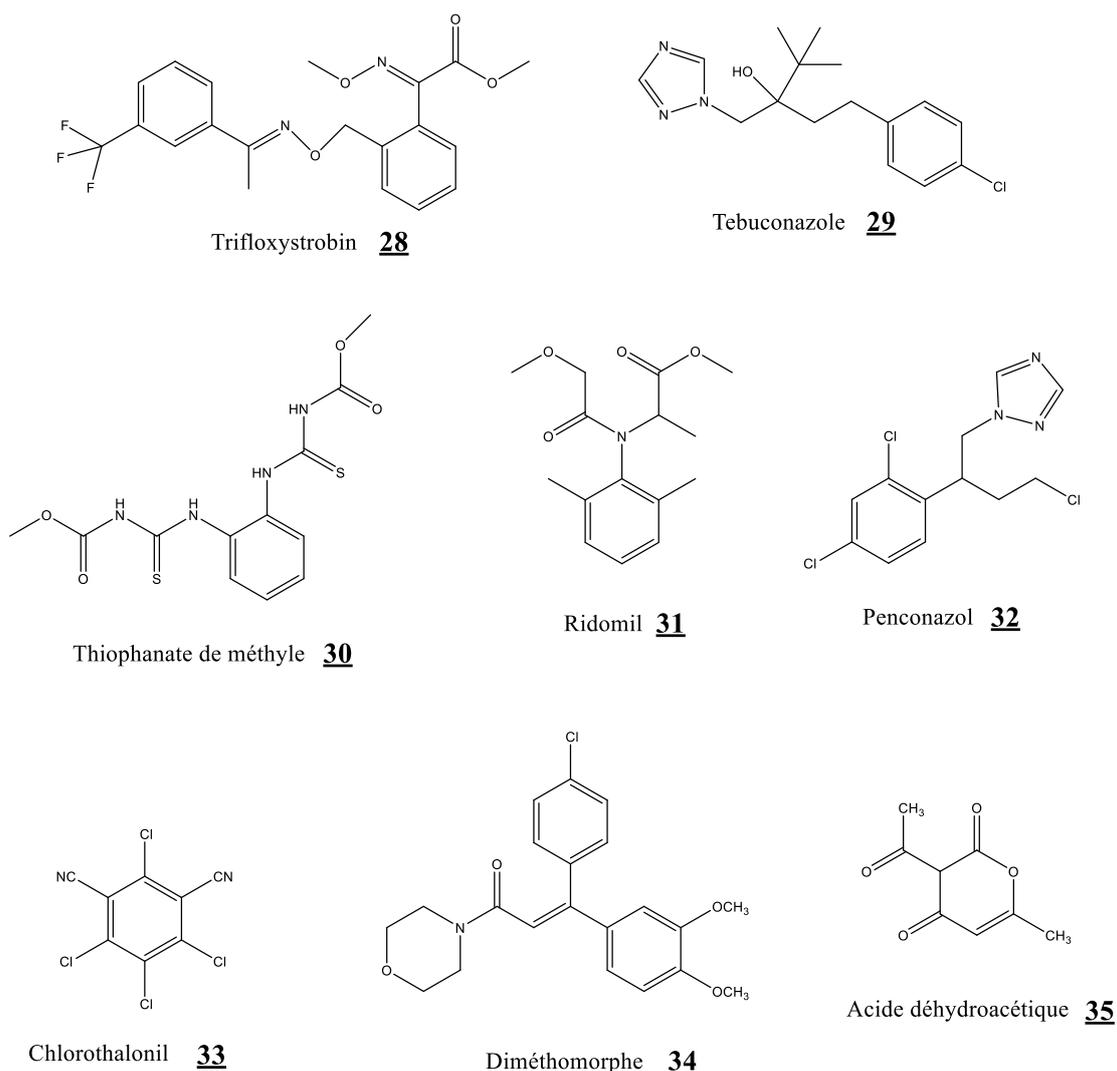


Figure 13: Structures de quelques principes actifs utilisés pour la formulation de certains fongicides commerciaux

I.5.5. Activité antifongique des saponines

I.5.5.1. Mode d'action des saponines sur les phytopathogènes

Les fongicides peuvent être classés en fonction de leurs modes d'action biologique (exemple : préventif/curatif), de leurs comportements dans les plantes (exemple : contact, pénétrant, systémique) ou de leurs structures chimiques (Figen Mert-Türk, 2006 ; Pierre Leroux, 2003).

Ainsi donc, selon le mode d'action biochimique des principes actifs constitutifs des différents fongicides, on distingue :

- Les fongicides inhibiteurs respiratoires : ils réduisent la production d'énergie cellulaire, suite généralement à un effet sur les processus respiratoires. Ces derniers,

correspondant au catabolisme oxydatif de molécules organiques comme des glucides, des lipides ou des protéines, sont la source d'énergie biodisponible sous forme d'ATP. Les fongicides de cette catégorie ont en commun la propriété d'inhiber la germination des spores des champignons et aussi d'immobiliser les zoospores des Oomycota. En conséquence, ils se caractérisent tous par une forte activité préventive ;

- Les fongicides antimicrotubules : les microtubules sont des constituants majeurs du cytosquelette et du fuseau achromatique. Certains fongicides interfèrent avec la formation et/ou le fonctionnement de ces microtubules et bloque donc les divisions cellulaires et l'élongation des hyphes mycéliens ;
- Les fongicides inducteurs de résistance des plantes aux parasites : les principes actifs de ces fongicides sont susceptibles de stimuler les réactions de défense naturelle des plantes.
- Les fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols : ils affectent la biosynthèse de composants majeurs des champignons pathogènes tels que les stérols. Les stérols fongiques, qui sont synthétisés dans le cytoplasme et les phases terminales qui vont du squalène à l'ergostérol, sont catalysées par des enzymes microsomales. Ces fongicides IBS, qui sont pénétrants ou systémiques, ont en commun un large spectre d'activité et un bon effet curatif.

C'est principalement à cette dernière catégorie de fongicides, que peuvent être classés la majorité de ceux élaborés à partir des saponines car, l'activité antifongique avérée des saponines, s'explique notamment par leur capacité à inhiber la formation des stérols produits par le champignon pathogène, dans la membrane de celui-ci entraînant ainsi la formation des pores et la perte de l'intégrité membranaire. Le champignon pathogène est donc dans l'incapacité de se développer (Figen Mert-Türk, 2006).

I.5.5.2. Quelques saponines antifongiques

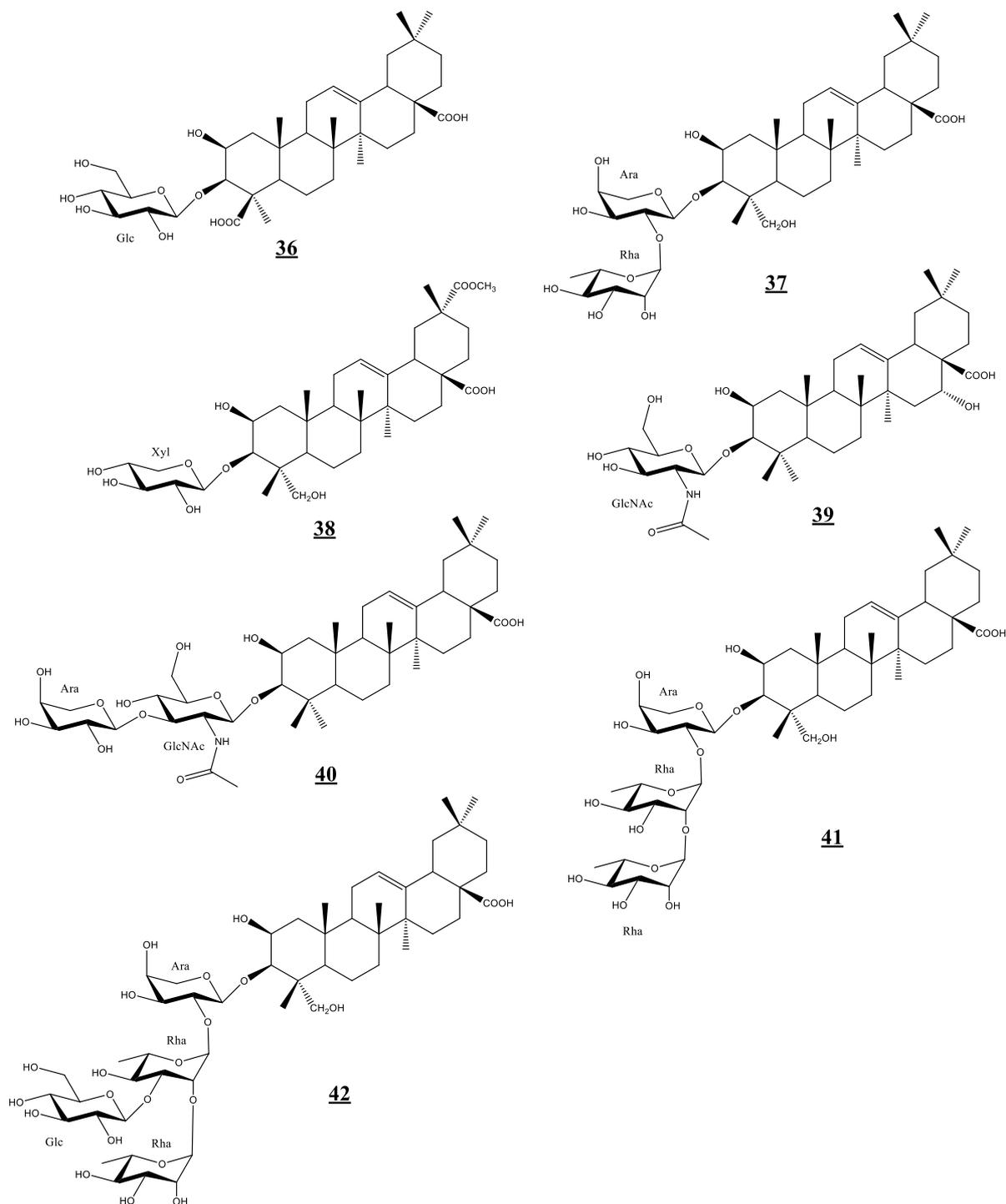


Figure 14: Structures de quelques saponines à activité antifongique (Petit, 2020)

Tableau 3: Activité antifongique de quelques saponines testées sur certaines souches de phytopathogènes

Test (activité)	Souche / phytopathogène	Nom du Composé testé	Type (aglycone)	Plante	CMI	Références
Anti-fongique	- <i>Aspergillus ochraceus</i> - <i>Curvularia lunata</i> - <i>Bacillus megaterium</i> - <i>Salmonella typhimurium</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acaciaside A	Acide acacique	<i>Acacia auriculiformis</i>	- 250 $\mu\text{g/mL}$ - 250 $\mu\text{g/mL}$ - 700 $\mu\text{g/mL}$ - 700 $\mu\text{g/mL}$ - 700 $\mu\text{g/mL}$	Mandal et al., 2005
	- <i>Aspergillus ochraceus</i> - <i>Curvularia lunata</i> - <i>Bacillus megaterium</i> - <i>Salmonella typhimurium</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acaciaside B	Acide acacique	<i>Acacia auriculiformis</i>	- 300 $\mu\text{g/mL}$ - 300 $\mu\text{g/mL}$ - 700 $\mu\text{g/mL}$ - 700 $\mu\text{g/mL}$ - 700 $\mu\text{g/mL}$	Mandal et al., 2005
	- <i>Pyricularia oryzae</i> - <i>Gaeumannomyces graminis</i>	3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosylhédérágénine	Hédérágénine	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	- 15 \pm 0,9 $\mu\text{g/mL}$ - 15 \pm 1,5 $\mu\text{g/mL}$	Petit et al., 2020
	<i>Pyricularia oryzae</i>	α -hederin	Hédérágénine	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	- 15 \pm 2,1 $\mu\text{g/mL}$	Petit et al., 2020
	<i>Trichoderma</i> spp.	Macranthoside A	Hédérágénine	<i>Chytranthus macrobotrys</i>	- 15 \pm 4,2 $\mu\text{g/mL}$	Petit et al., 2020

Chapitre II :

Résultats et discussion

II.1. Etude phytochimique

II.1.1. Isolement des composés d'*Acacia polyacantha*

❖ *Acacia polyacantha*

L'étude phytochimique d'*A. polyacantha* a constitué en l'investigation chimique des racines et du tronc, grâce non seulement à l'utilisation des techniques chromatographiques modernes de laboratoire, mais aussi à l'exploitation et l'interprétation des analyses chimiques effectuées permettant ainsi d'établir les structures complètes de tous les composés isolés. Au total, six (06) composés purs ont été obtenus des racines tel que présenté à la **Figure 15** et trois (03) autres composés purs des écorces du tronc (**Figure 16**).

❖ Les racines de *A. polyacantha*

Après extraction des racines de *A. polyacantha* et préparation des fractions enrichies en saponines, l'investigation de la fraction butanolique a conduit à l'obtention de six (06) dérivés nouveaux de saponines. Les composés obtenus ont été indexés APR411, APR412, APR421, APR431, APR441 et APR442 et leurs structures ont été complètement élucidées.

❖ Les écorces du tronc de *A. polyacantha*

L'investigation de la fraction butanolique des écorces du tronc de *A. polyacantha*, par des Chromatographies Liquides Moyenne Pression (CLMP) sur silice à phase normale et des Chromatographies Liquide Haute Pression (CLHP) sur silice à phase inverse, a permis d'obtenir trois (03) composés purs codifiés APTB, APT55 et APTA1.

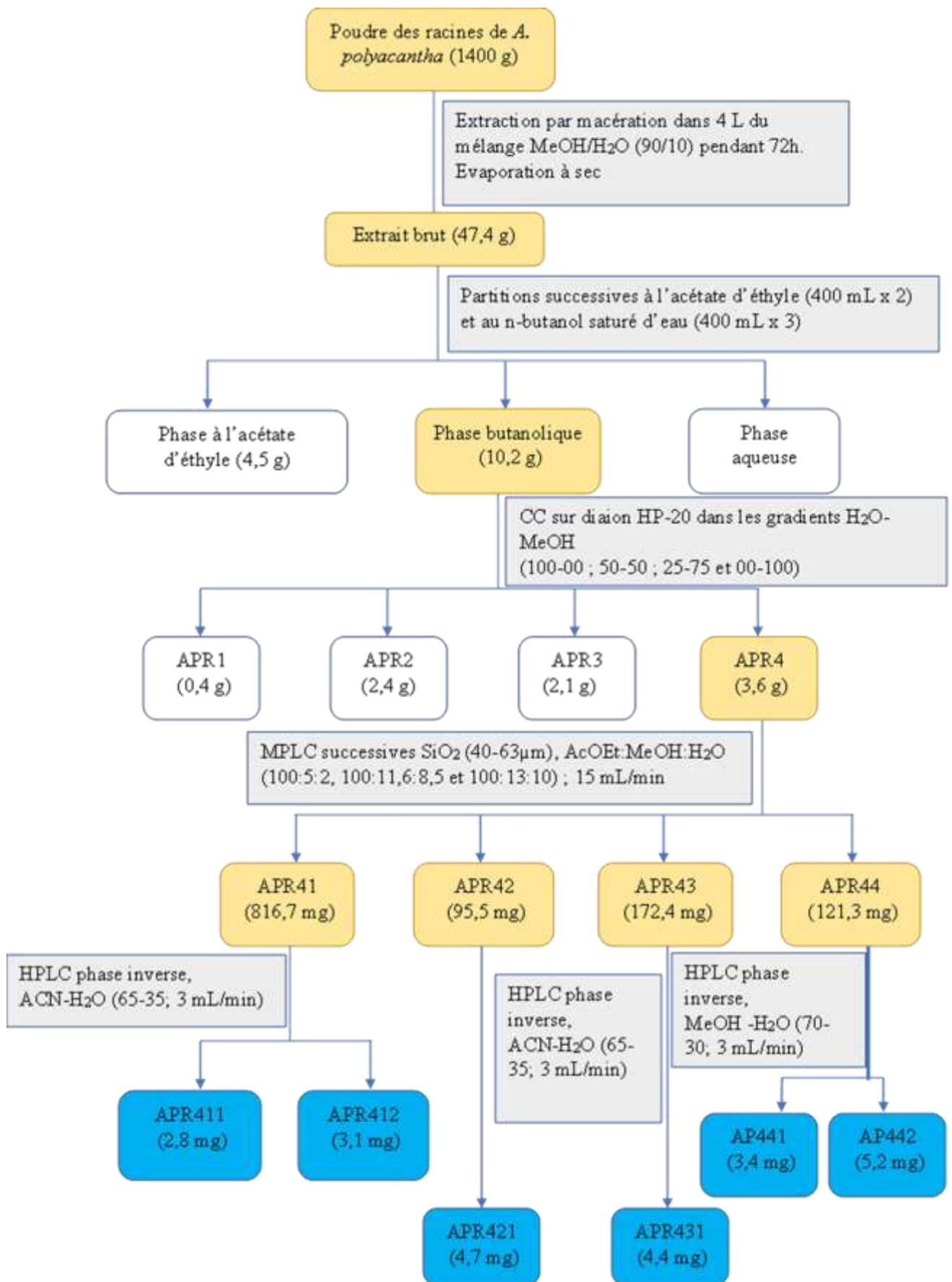


Figure 15: Protocole d'extraction, de fractionnement et de purification des composés des racines de *A. polyacantha*

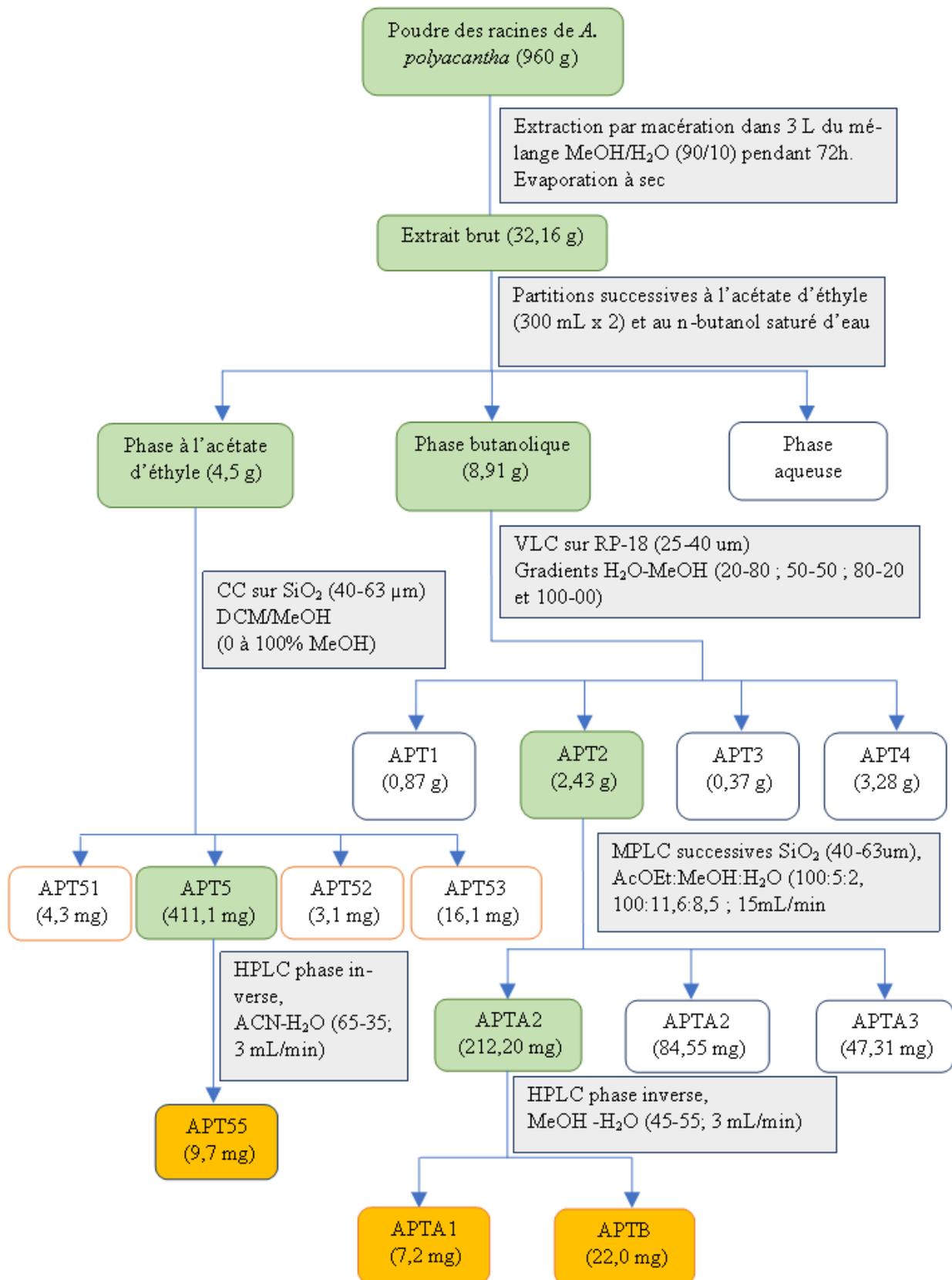


Figure 16: Protocole d'extraction, de fractionnement et de purification des composés des écorces du tronc de *A. polyacantha*

II.1.2. Isolement des composés de *Chytranthus macrobotrys*

L'étude phytochimique de *C. macrobotrys* s'est faite suivant le même protocole adopté pour la première plante (*A. polyacantha*). Cela a conduit à l'isolement de sept (06) composés purs dont, deux (CMTA1 et CMTA2) issus de la fraction à l'acétate d'éthyle après des colonnes chromatographiques sur silice éluées à l'aide des solvants à polarité croissante, et quatre (CMT1, CMT2, CMT21 et CMT31) obtenus de la fraction butanolique après plusieurs CLMP sur silice en phase normale (**Figure 17**).

Les structures complètes des composés obtenus ont été élucidées à l'aide des techniques spectroscopiques (RMN 1D et 2D) et spectrométriques (LCMS-HR, ESI-HR), complétées par l'hydrolyse acide, le tout en comparaison avec les données de la littérature. Après analyse et interprétation, nous avons obtenu : deux saponines (CMT1 et CMT2), deux phytostérols (CMT21 et CMT31), un triterpène (CMTA1) et un sucre (CMTA2).

Les structures des composés entièrement analysés seront présentées dans la suite de ce document.

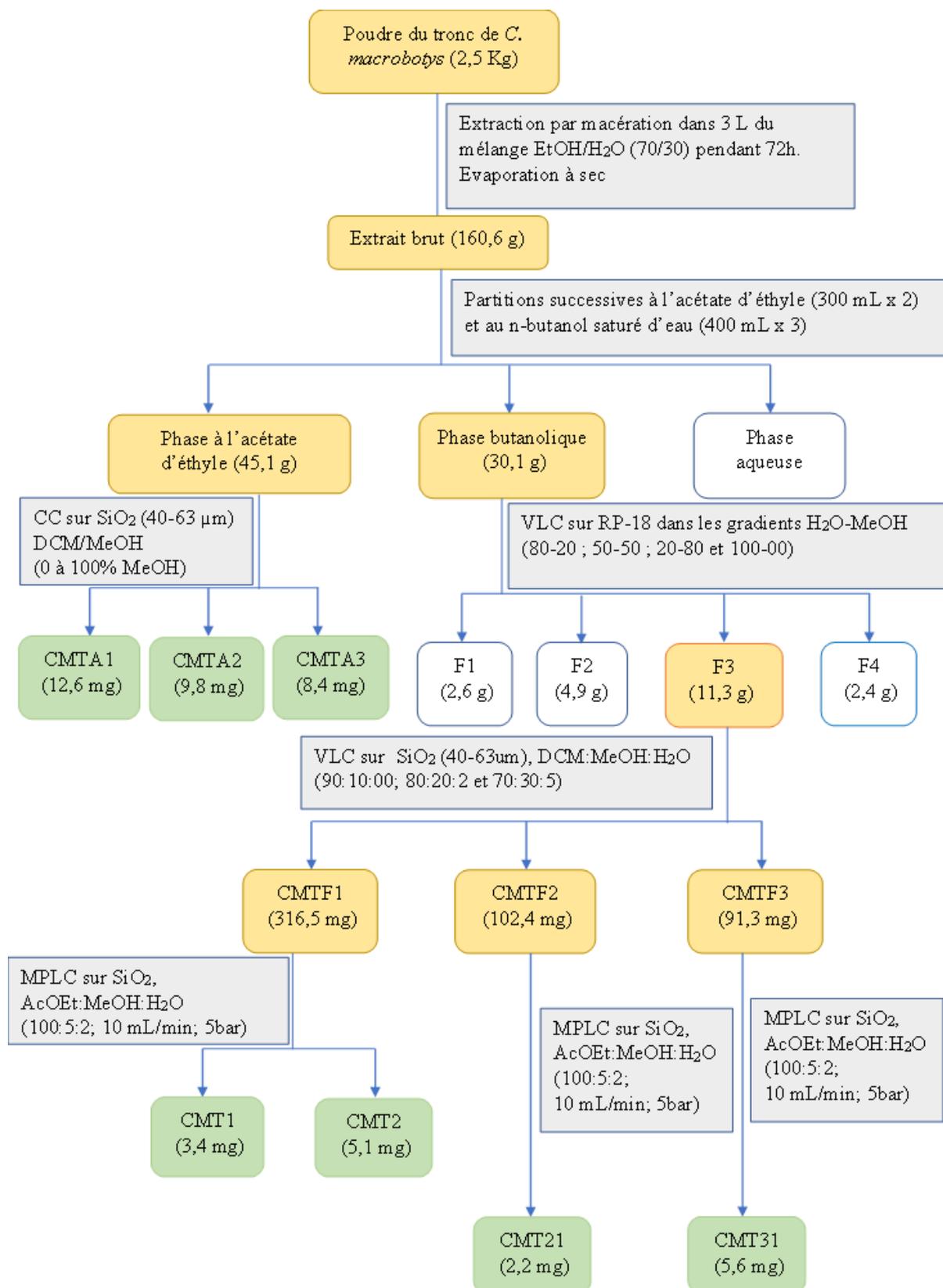


Figure 17: Protocole d'extraction et d'isolement des composés du tronc de *C. macrobotrys*

II.1.3. Caractérisation des saponines

L'ensemble des structures des saponines obtenues de *A. polyacantha* ont été élucidées à l'aide des techniques d'analyses chimiques modernes, notamment la spectrométrie de masse, la spectroscopie RMN (1D et 2D) et l'hydrolyse acide le tout en comparaison avec les données de la littérature.

II.1.3.1. Détermination de la structure du composé APR411

APR411 a été obtenu sous forme de poudre blanche amorphe après lyophilisation. Il est soluble dans les solvants polaires tels que le méthanol et la pyridine dans laquelle il a été analysé.

L'analyse du spectre de masse à haute résolution obtenu par ionisation (HR-ESIMS) du composé APR411 en mode positif (**Figure 18**), permet d'observer le pic de l'ion moléculaire protoné apparaissant à m/z : 1191,5903 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute $C_{61}H_{90}O_{23}$ (calculée 1191,5951) et renfermant 17 degrés d'insaturation.

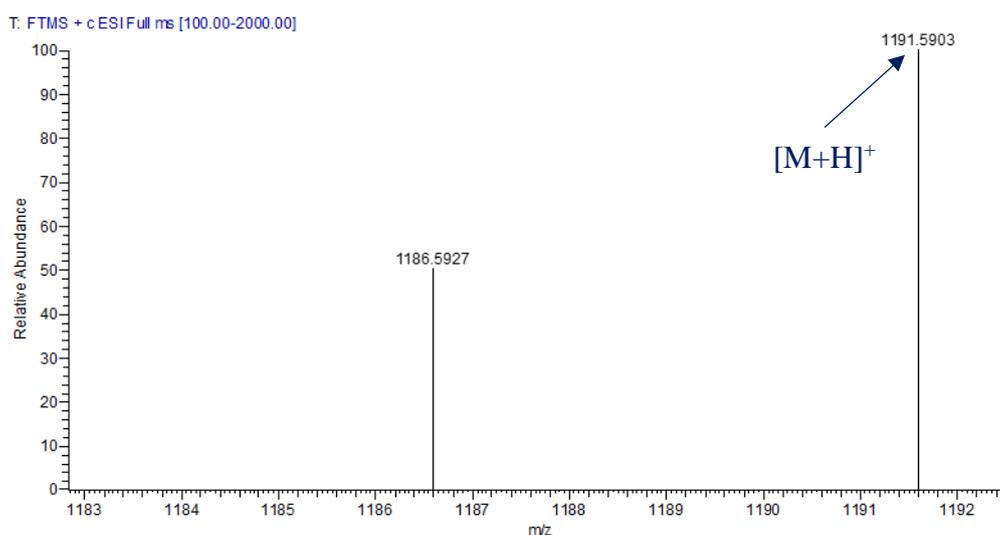


Figure 18: Spectre de masse HR-ESIMS du composé APR411

Sur les spectres de RMN 1D (1H et ^{13}C) du composé APR411, trois (03) principales zones caractéristiques des saponines triterpéniques sont observées (**Figure 19**): Une première zone dans le spectre de RMN 1H allant de δ_H 0 à 2,5 ppm où apparaît la majorité des pics des protons de l'aglycone, une deuxième zone de δ_H 3 à 6 ppm où apparaissent les pics des protons des unités osidiques (sucres) et une troisième zone correspondant aux pics des protons des substituants organiques et apparaissant pour la majorité entre δ_H 6 et 8,5 ppm.

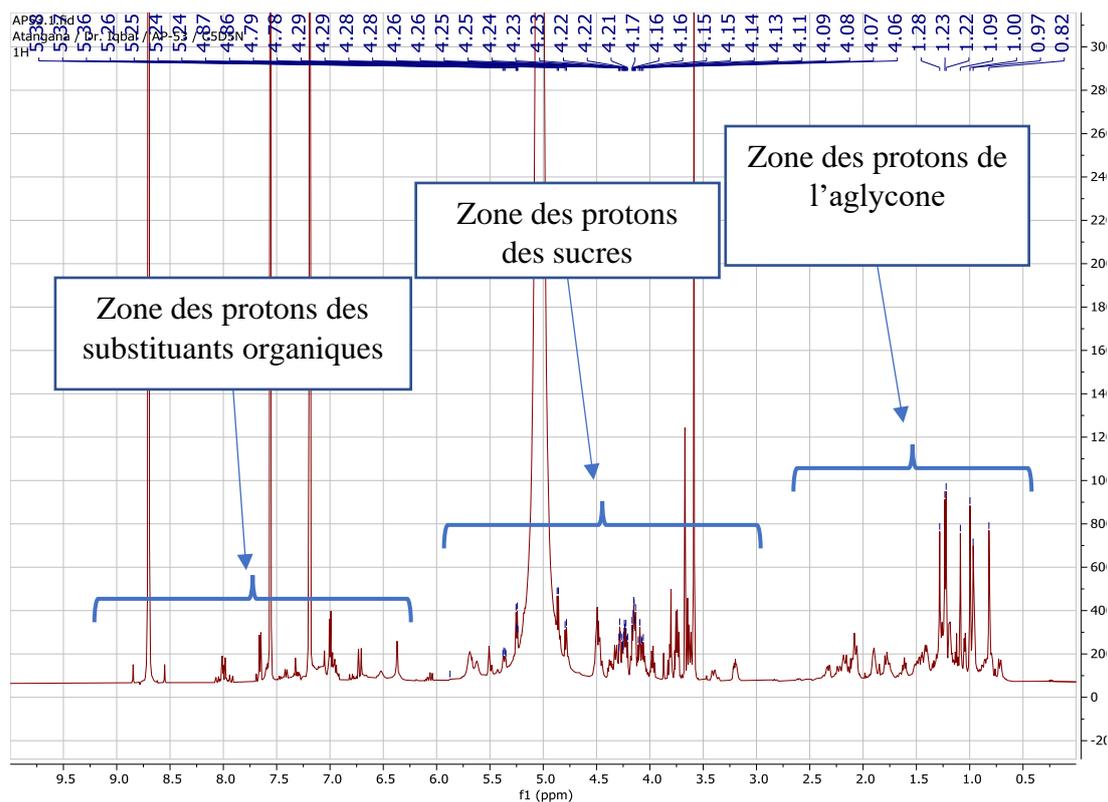
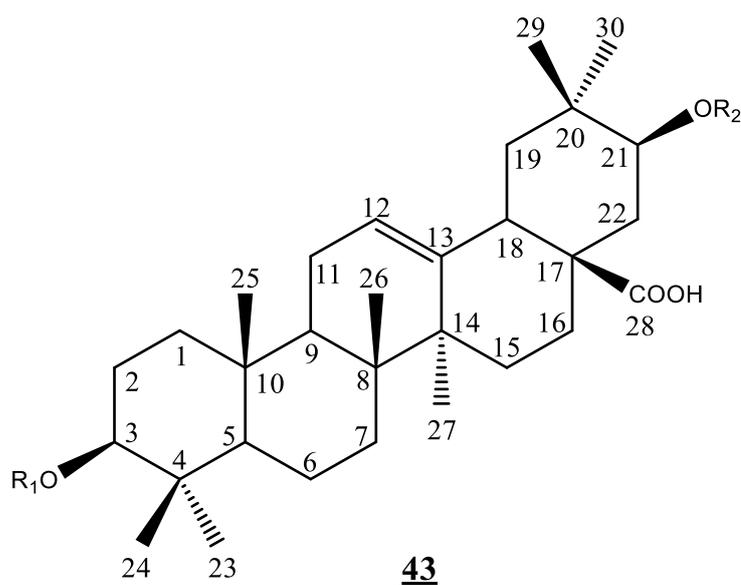


Figure 19: Spectre de RMN ^1H du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les zones caractéristiques d'une saponine triterpénique.

L'analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D a permis d'établir la structure de l'aglycone du composé APR411 qui a été identifiée comme étant l'acide machaérinique **43** (acide $3\beta,21\beta$ -dihydroxyoléanolique) (Tchoukoua et *al.*, 2017b).



En effet, sur le spectre de RMN ^1H (**Figure 20**) de ce composé, la zone de l'aglycone présente sept (07) pics caractéristiques correspondant aux signaux des méthyles angulaires qui résonnent à δ_{H} 0,82 (s, H-25); 0,97 (s, H-26); 1,00 (s, H-24); 1,09 (s, H-29); 1,22 (s, H-30); 1,23 (s, H-23) et 1,28 ppm (s, H-27) respectivement.

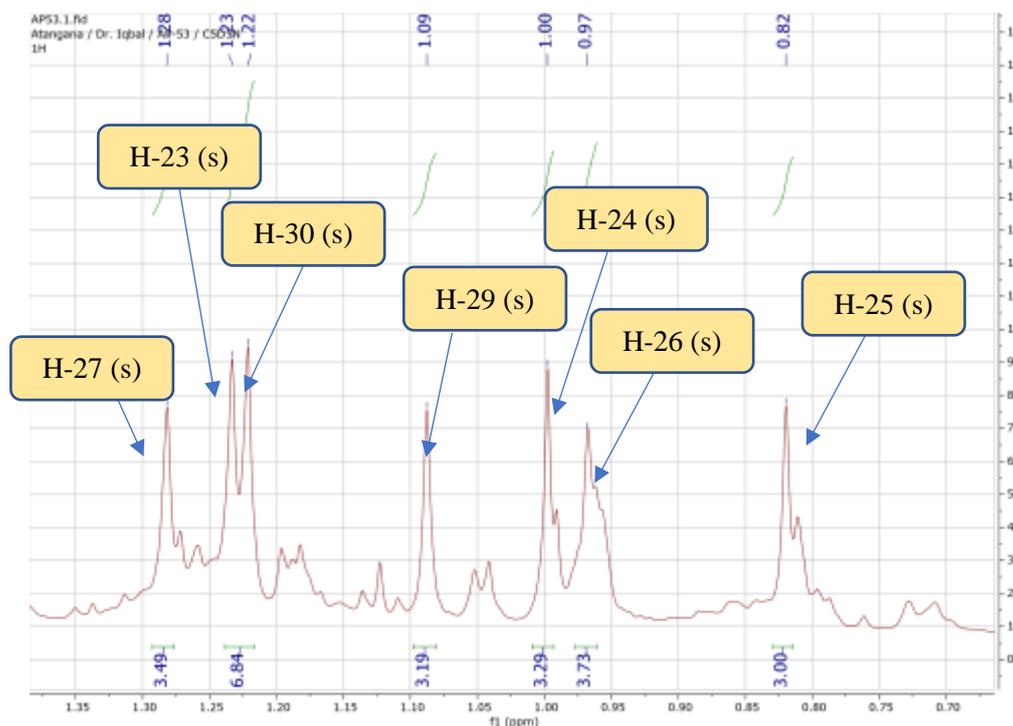


Figure 20: Spectre de RMN ^1H du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les méthyles angulaires.

On observe également sur ce même spectre de RMN ^1H , trois signaux de pics caractéristiques résonnant à δ_{H} 3,20 (1H; dd, $J=11,2; 4,9$); 5,36 (1H; d, $J=5,1$) et 5,51 (1H; brd) et attribuables aux protons méthyniques oxygénés H-3, H-21 et au proton oléfinique H-12 respectivement (**Figure 21**).

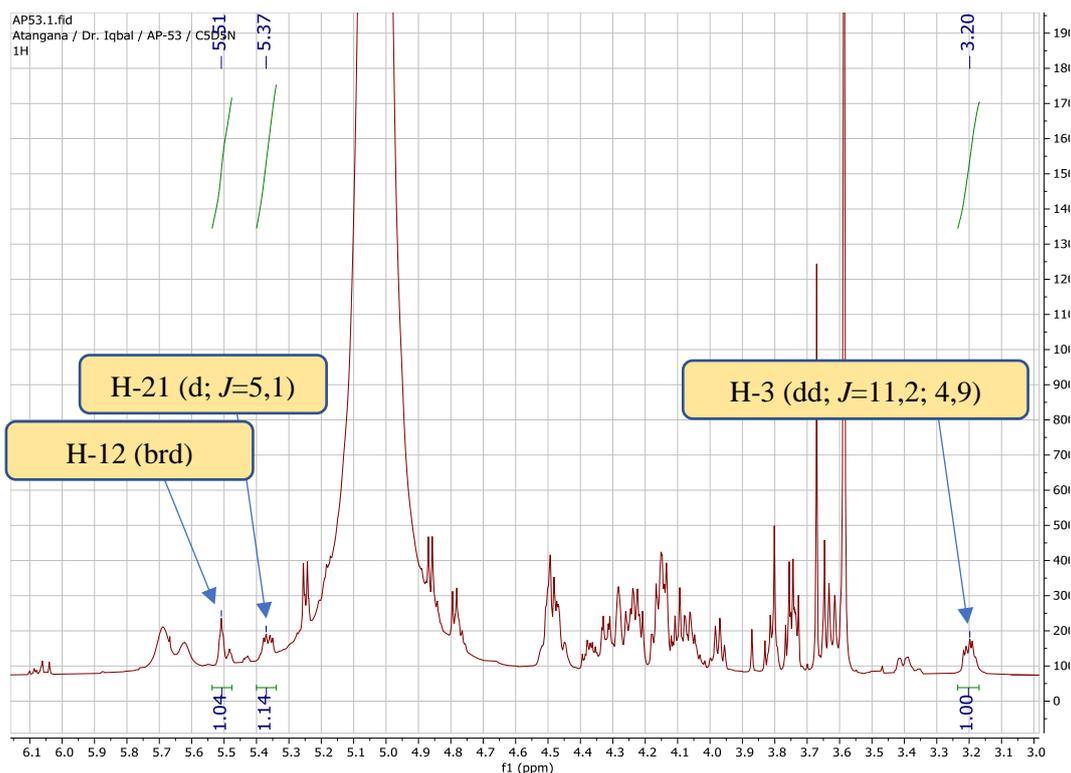


Figure 21: Spectre de RMN ^1H élargi du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

Sur ses spectres de RMN ^{13}C et DEPT 135 (**Figure 22** et **23**), en plus des signaux des carbones des méthyles angulaires (**Figure 23**), on observe d'autres signaux remarquables à δ_{C} 89,1 (C-3) et 75,7 (C-21) correspondant aux carbones méthyniques ainsi que deux signaux de carbones oléfiniques à δ_{C} 123,1 (C-12) et 143,5 (C-13) respectivement (**Figure 22**). Dans les champs faibles, on observe un signal à δ_{C} 178,6 (C-28) correspondant au carbonyl de la fonction acide carboxylique.

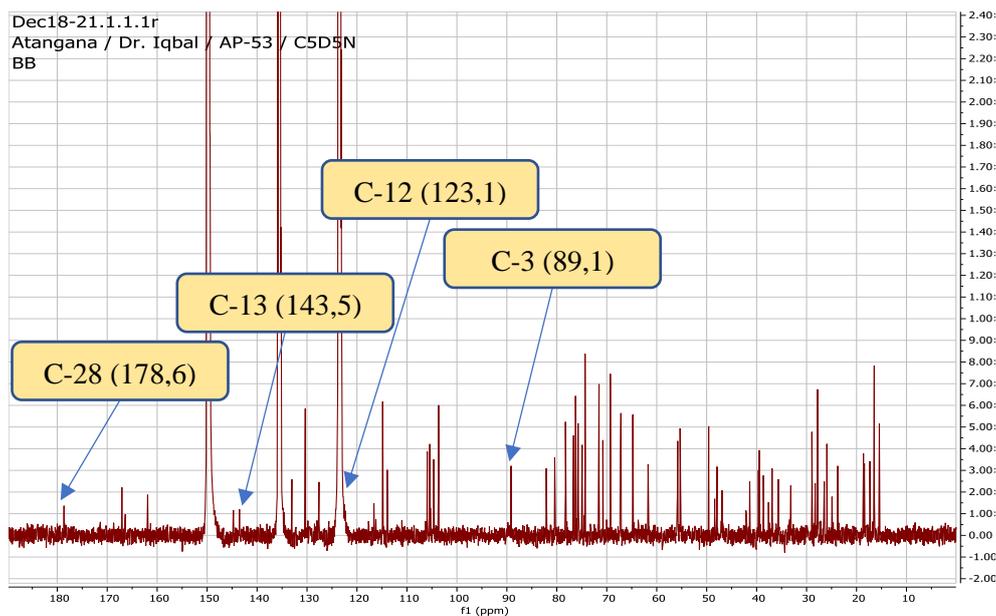


Figure 22: Spectre de RMN ^{13}C du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) montrant certains signaux caractéristiques

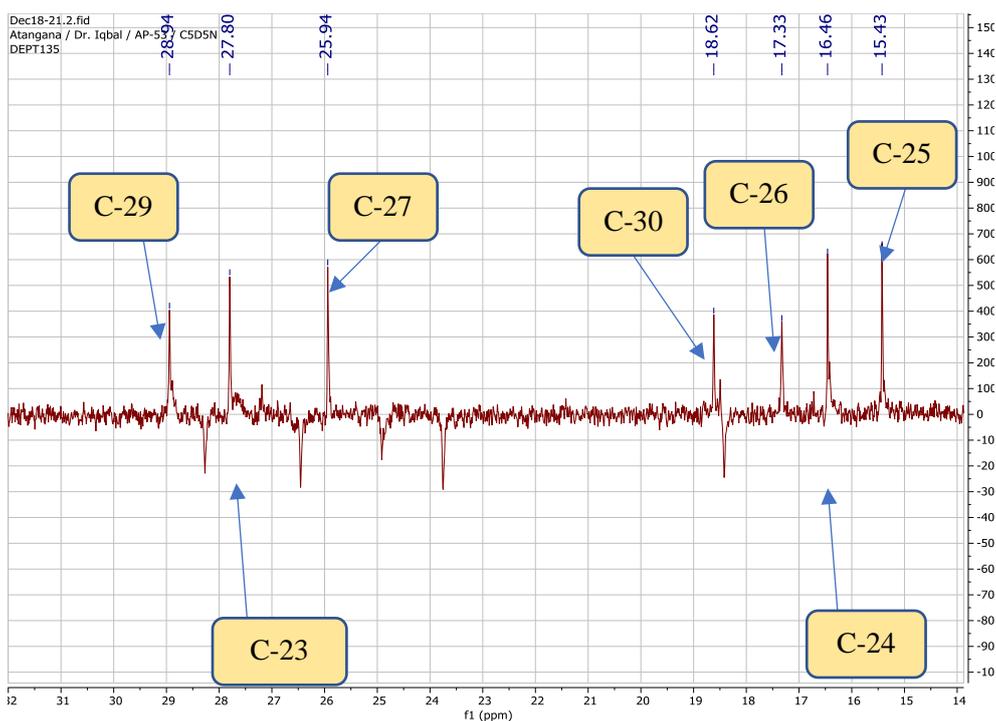


Figure 23: Spectre DEPT 135 du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) montrant les méthyles angulaires.

Les tâches de corrélation entre ces protons et carbones caractéristiques sont également observables sur le spectre HSQC présentés dans la **Figure 24**.

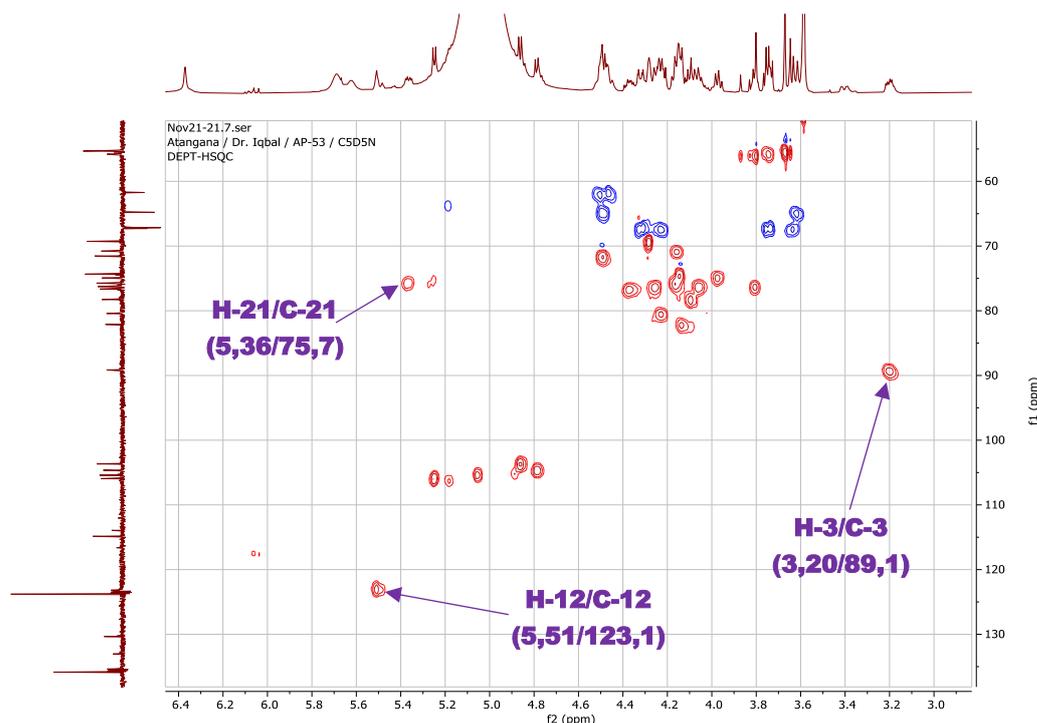


Figure 24: Spectre HSQC élargi du composé APR411 (C_5D_5N) montrant les signaux caractéristiques.

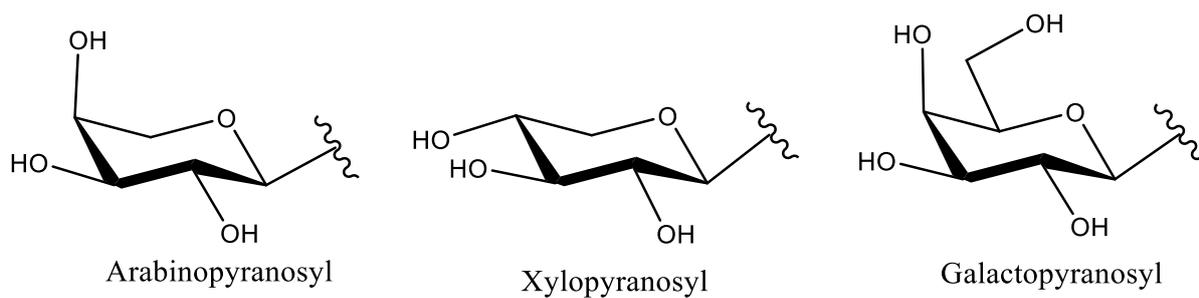
Ainsi, les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de l'aglycone du composé APR411 ont été entièrement attribuées. Ces données présentées dans le **tableau 4** suivant, sont en accord avec celles de la littérature (Delgado *et al.*, 1984 ; Tchoukoua *et al.*, 2017b).

Tableau 4: Valeurs des déplacements chimiques (1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR411 (C_5D_5N , 500 et 125 MHz).

APR411 (Aglycone)							
N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)	N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)
1	CH ₂	38,6	1,40; 0,87	16	CH ₂	24,9	2,20; 1,89
2	CH ₂	26,4	2,20; 1,78	17	C	48,3	/
3	CH	89,1	3,20 (dd, J=11,2; 4,9)	18	CH	41,3	3,39
4	C	39,4	/	19	CH ₂	46,9	2,08; 1,45
5	C	55,8	0,72 (brd, J=12,1)	20	C	35,6	/
6	CH ₂	18,4	1,49; nd	21	CH	75,7	5,36 (d, J=5,1)
7	CH ₂	33,1	1,25; 1,47	22	CH ₂	37,6	2,31; 2,15
8	C	39,6	/	23	CH ₃	27,8	1,22 (s)
9	CH	47,9	1,60	24	CH ₃	16,4	0,99 (s)
10	C	36,9	/	25	CH ₃	15,4	0,81 (s)
11	CH ₂	23,7	1,80; nd	26	CH ₃	17,3	0,96 (s)
12	CH	123,1	5,51 (brd)	27	CH ₃	25,9	1,28 (s)
13	C	143,5	/	28	C	178,6	/
14	C	42,1	/	29	CH ₃	28,9	1,08 (s)
15	CH ₂	28,2	2,07; 1,16	30	CH ₃	18,6	1,19 (s)

Les déplacements chimiques du carbone oxygéné C-3 (δ_C 89,1 ppm) et son proton à δ_H 3,20 ppm (dd, $J=11,2$; 4,9) permettent de dire que le composé APR411 est une saponine monodesmosique dérivée de l'acide machaérinique ayant une chaîne osidique en position C-3. De plus, le déblindage du carbone C-21 (δ_C 75,7) et son proton H-21 (δ_H 5,36) confirme la substitution de ce composé en cette position par un acide organique (Delgado *et al.*, 1984 ; Tchoukoua *et al.*, 2017b).

En ce qui concerne les unités osidiques fixées sur cet aglycone, leur nature a été identifiée à l'aide des spectres de RMN 1D et 2D couplées à la spectrométrie de masse haute résolution (HR-ESIMS) et en comparaison avec les données de la littérature, puis confirmée par l'hydrolyse acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire. Ainsi, les unités osidiques présentes dans le composé APR411 ont été identifiées comme étant : α -L-arabinopyranosyl, β -D-xylopyranosyl et β -D-galactopyranosyl **44**.



44

En effet, l'analyse du spectre de RMN 1H du composé APR411 révèle la présence de quatre (04) signaux de protons anomériques (**Figure 25**) apparaissant à δ_H 4,79 (1H ; d ; $J=7,6$) ; 5,25 (1H ; d ; $J=7,4$) ; 5,05 (1H ; d ; $J=8,2$) et 4,85 ppm (1H ; d ; $J=7,1$) et qui corrént avec les carbones anomériques à δ_C 104,6 ; 105,9 ; 105,4 et 103,6 ppm respectivement (**Figure 26**). Tout ceci permet de dire que APR411 contient dans sa structure quatre (04) sucres dont les différentes configurations ont été déterminées à partir des valeurs de constante de couplage de leurs protons anomériques.

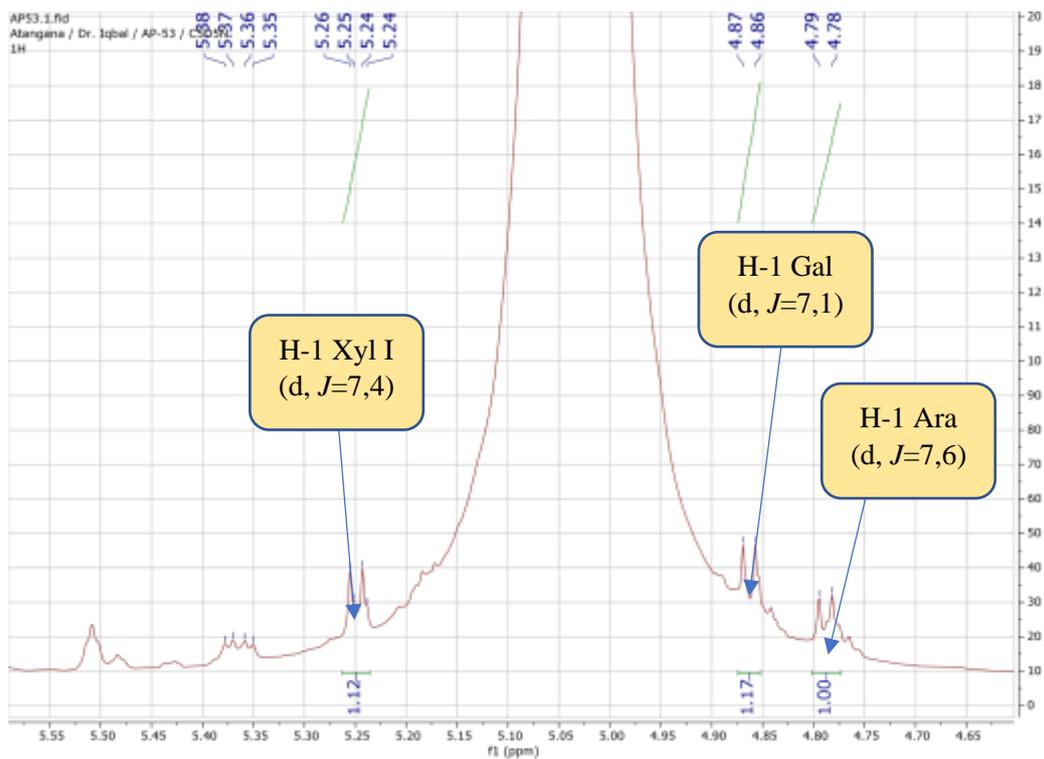


Figure 25: Spectre RMN ^1H du composé APR411 montrant les protons anomériques ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

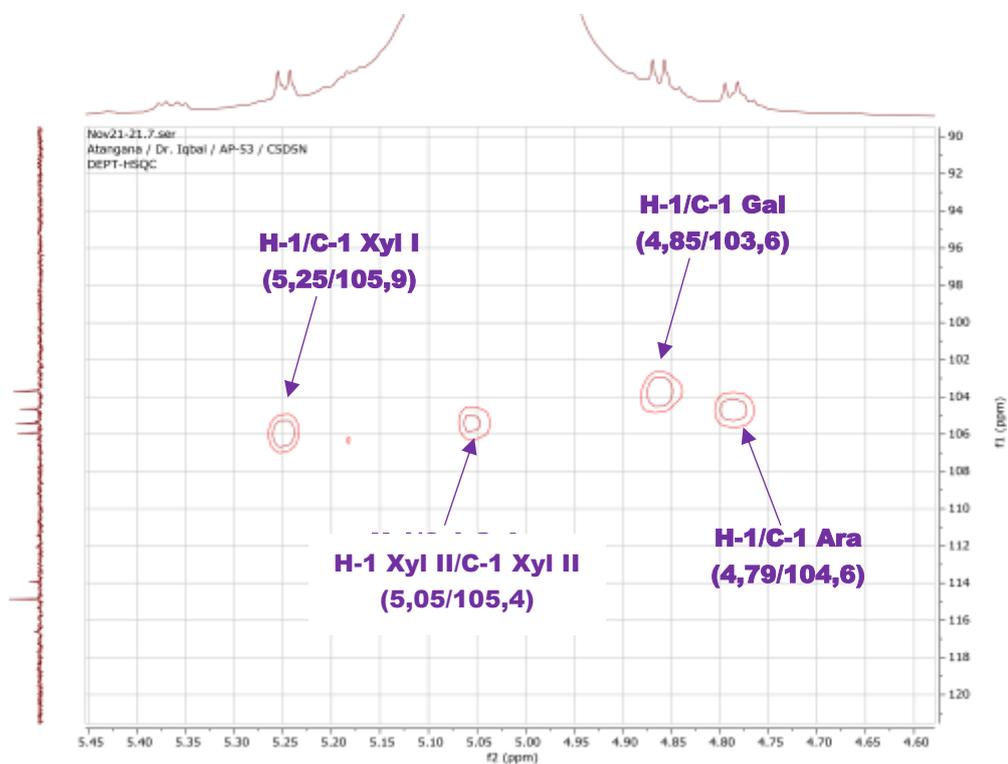


Figure 26: Spectre HSQC du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) montrant les signaux des anomères.

L'interprétation des spectres de RMN 2D permet d'établir la séquence des sucres du composé APR411 comme ainsi représentée dans la **Figure 27**. Ainsi, la chaîne osidique liée en C-3 de l'aglycone a été établie comme le 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranoside.

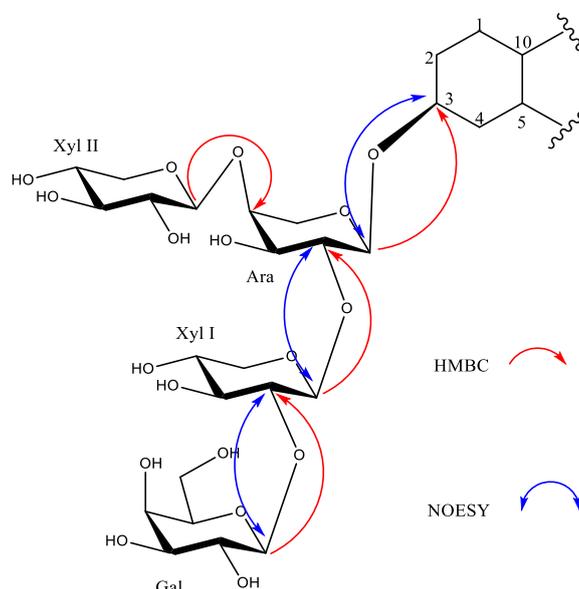


Figure 27: Corrélations HMBC et NOESY des unités osidiques du composé APR411

En effet, la jonction entre les différents sucres du composé APR411 et leur fixation sur l'aglycone s'est faite à l'aide de l'analyse minutieuse des spectres HMBC et NOESY (**Figures 28 et 29**). Sur le spectre HMBC, on observe clairement :

- La corrélation entre H-1 de Ara apparaissant à δ_H 4,79 ppm (d ; $J=7,6$) et C-3 de Agly à δ_C 89,1 ppm montrant que l'arabinose est directement lié à l'aglycone en position C-3. Cette liaison a été confirmée par le spectre NOESY où une corrélation est observable entre H-1 de Ara à δ_H 4,79 ppm et H-3 de Agly à δ_C 3,20 ppm ;
- La corrélation entre H-1 de Xyl I résonant à δ_H 5,25 ppm (d ; $J=7,4$) et C-2 de Ara résonant à δ_C 82,1 ppm montre que Xyl I est fixé au carbone 2 de l'arabinose. Cette jonction Xyl I \rightarrow 2Ara a été confirmée par la corrélation observée dans le spectre NOESY entre H-1 de Xyl I à δ_H 5,25 ppm et H-2 de Ara à δ_H 4,13 ppm ;
- La corrélation entre H-1 de Gal apparaissant à δ_H 4,85 ppm (d ; $J=7,1$) et C-2 de Xyl I apparaissant à δ_C 76,6 ppm permettant de lier le galactose au carbone 2 du xylose I. Ladite jonction a été confirmée par le spectre NOESY où on observe une corrélation entre H-1 de gal à δ_H 4,85 ppm et H-2 de Xyl I à δ_H 4,09 ppm ;

- Enfin, la corrélation observée entre H-1 de Xyl II résonnant à δ_H 5,05 ppm et C-4 de Ara résonnant à δ_C 80,4 ppm permet de fixer Xyl II au niveau du carbone 4 de l'arabinose. Cette jonction Xyl II \rightarrow^4 Ara a été confirmée par le spectre NOESY qui montre la corrélation entre H-1 de Xyl II à δ_H 5,05 ppm et H-1 de Ara à δ_H 4,79 ppm.

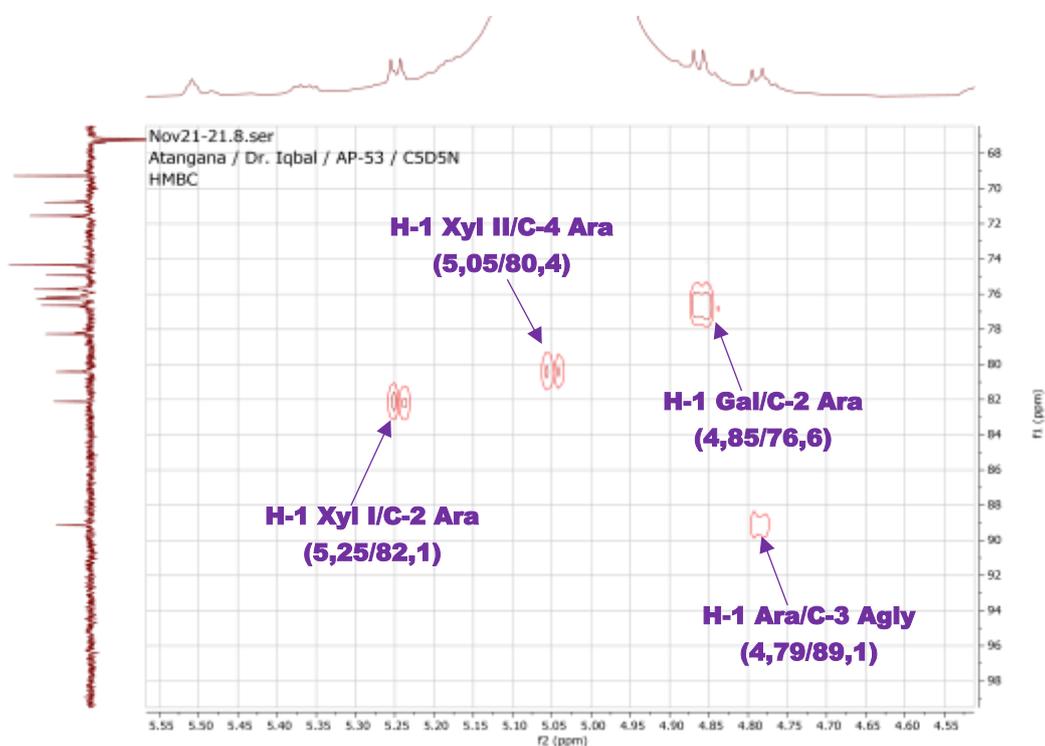


Figure 28: Spectre HMBC élargi du composé APR411 (C_5D_5N) montrant les points de liaison des sucres.

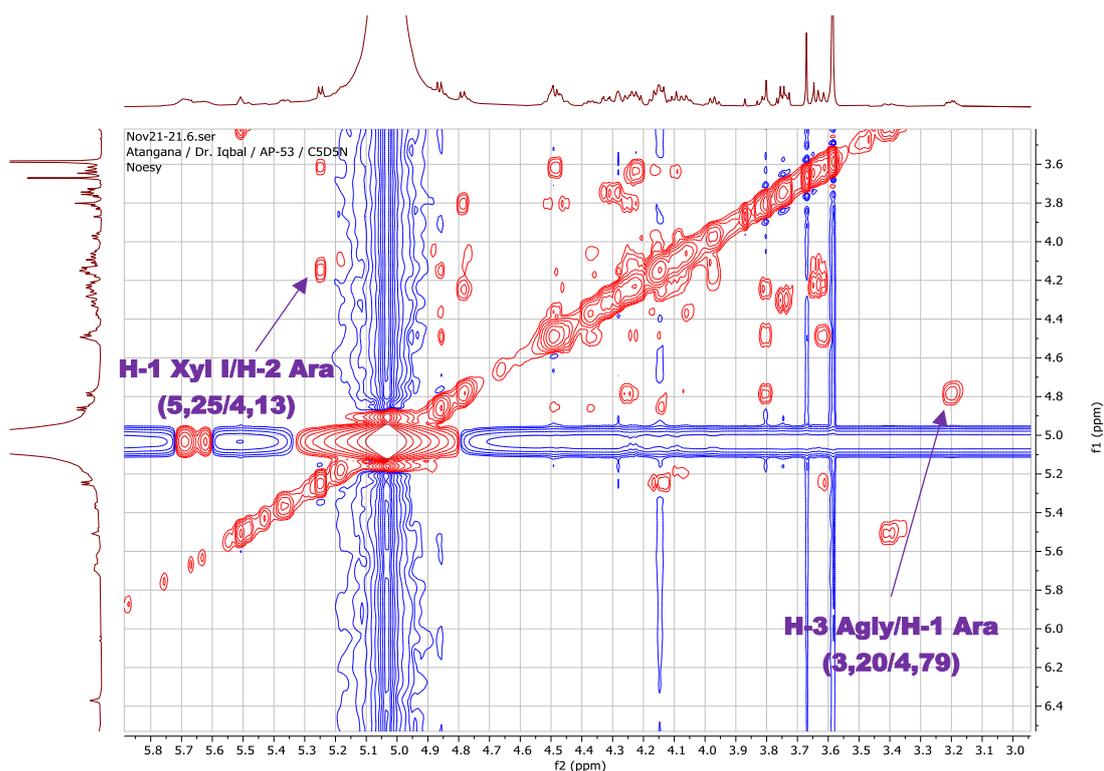


Figure 29: Spectre NOESY élargi du composé APR411 (C_5D_5N) montrant les points de liaison des sucres.

L'ensemble des déplacements chimiques des protons et carbones des sucres du composé APR411 sont présentés dans le **tableau 5** suivant:

Tableau 5: Valeurs des déplacements chimiques (1H et ^{13}C) des sucres du composé APR411 (C_5D_5N , 500 et 125 MHz).

Sucres	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Sucres	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
Ara			Gal		
1	104,6	4,79 (d, $J=7,6$)	1	103,6	4,85 (d, $J=7,1$)
2	82,1	4,13	2	71,5	4,48
3	76,2	3,80	3	74,3	4,37
4	80,4	4,23	4	69,2	4,28
5	64,9	3,75 (brd, $J=7,0$) 3,63 (brd, $J=10,8$)	5	76,3	4,11
			6	61,7	4,50 (m) 4,49 (m)

Xyl I			Xyl II		
1	105,9	5,25 (d, $J=7,4$)	1	105,4	5,05 (d, $J=8,2$)
2	76,6	4,09	2	74,9	3,97
3	78,2	4,06	3	76,1	4,15
4	70,6	4,16	4	70,7	4,16
5	67,2	3,62 (brd, $J=10,8$) nd	5	67,1	4,30 (brd, $J=2,0$) 4,22 (brd, $J=3,9$)

De plus, le spectre de RMN ^1H du composé APR411 met en évidence les signaux de protons à δ_{H} 6,72 ; 6,95 ; 6,99 ; 7,66 ; 7,98 et 8,00 ppm tandis que le spectre RMN ^{13}C (**Figure 31**) présente 10 pics à δ_{C} 113,9 ; 114,8 ; 116,6 ; 127,6 ; 130,3 ; 133,0 ; 144,7 ; 161,9 et 167,0 ppm respectivement. Ces valeurs de protons et carbones sont caractéristiques d'un groupement cinnamoyle (**Figure 30**) (Haddad et al., 2003). De plus, le déblindage des proton et carbone en position 21 de l'aglycone du composé APR411 dont les signaux sont observés à δ_{H} 5,36 / δ_{C} 75,7 ppm confirme que cet aglycone est substitué au carbone C-21 par un groupement organique.

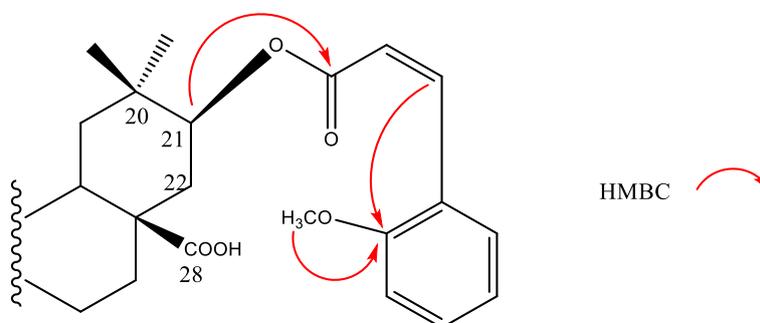


Figure 30: Corrélations HMBC de l'unité méthoxycinnamoyle du composé APR411

La faible constante de couplage ($J=4,1 \text{ Hz}$) des deux protons oléfiniques du cinnamoyle nous a permis de déterminer la configuration (*Z*) de ce fragment. D'autre part, la corrélation δ_{H} 3,67/ δ_{C} 55,8 ppm observée dans le spectre HSQC montre que le composé APR411 comporte en son sein un groupement méthoxy (OCH_3) fixé sur le noyau aromatique du cinnamoyle.

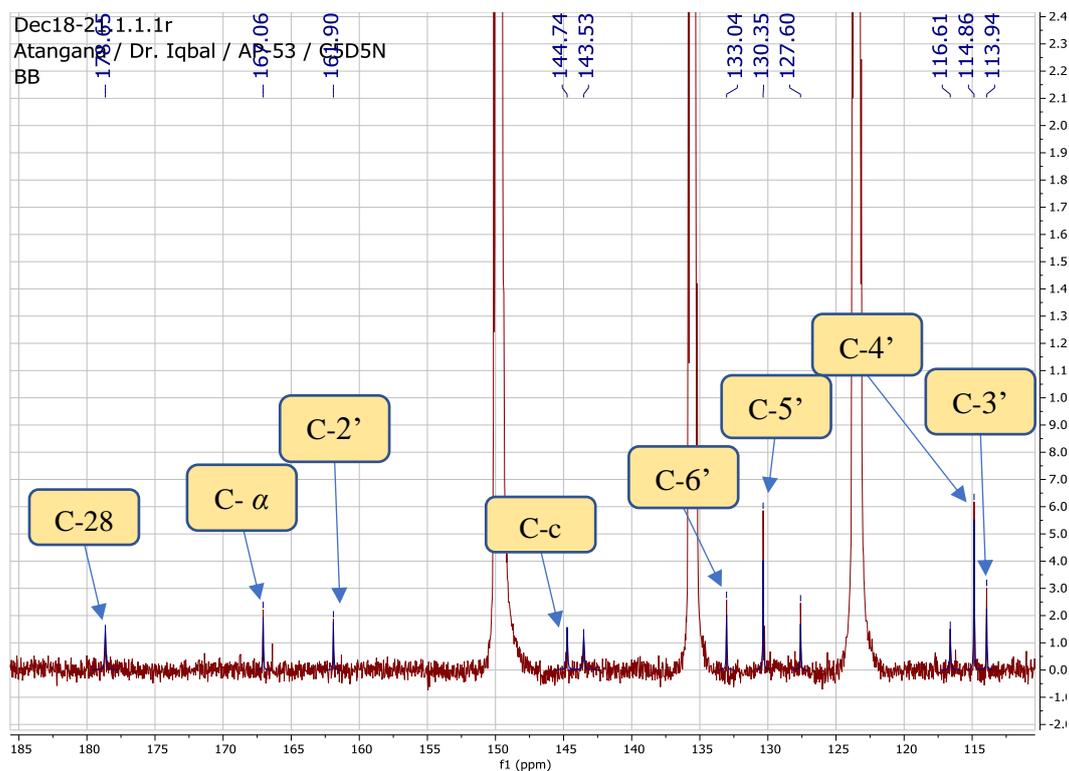


Figure 31: Spectre de RMN ^{13}C du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) montrant les carbones du cinnamoyle.

Toutes les valeurs de protons et carbones sont présentées dans le **tableau 6** ci-après :

Tableau 6: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du méthoxycinnamoyle du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR411 ((Z)-2-méthoxycinnamoyl)			
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
α	C	167,0	/
β	CH	116,6	6,72 (d, $J=4,1$)
c	CH	144,7	8,00 (d, $J=4,1$)
1'	C	127,6	/
2'	C	161,9	/
3'	CH	113,9	6,95 (brs)
4'	CH	114,8	6,99 (brs)
5'	CH	130,3	7,66 (d, $J=8,6$)
6'	CH	133,0	7,98 (brs)
7'	CH ₃	55,8	3,67 (s)

L'analyse du spectre HMBC permet de déterminer les points de fixation du méthoxy et du groupement cinnamoyle du composé APR411. Ainsi, on observe clairement dans ce spectre à

la **Figure 32**, une corrélation entre H-21 de Agly apparaissant à δ_H 5,36 ppm et le carbonyl du cinnamoyle résonant à δ_C 167,0 ppm montrant que l'unité cinnamoyle est liée à l'aglycone du composé APR411 en position C-21. Une corrélation est également observée entre l'un des protons oléfiniques du cinnamoyle apparaissant à δ_H 8,00 ppm et le carbone quaternaire du noyau aromatique portant le méthoxy à δ_C 161,2 ppm (**Figure 32**) ce qui permet de dire que le méthoxy est situé en position *Ortho* sur le noyau aromatique du cinnamoyle. Le substituant organique lié à l'aglycone de APR411 a donc été identifiée comme étant le (*Z*)-2-méthoxycinnamoyl (Haddad et al., 2003).

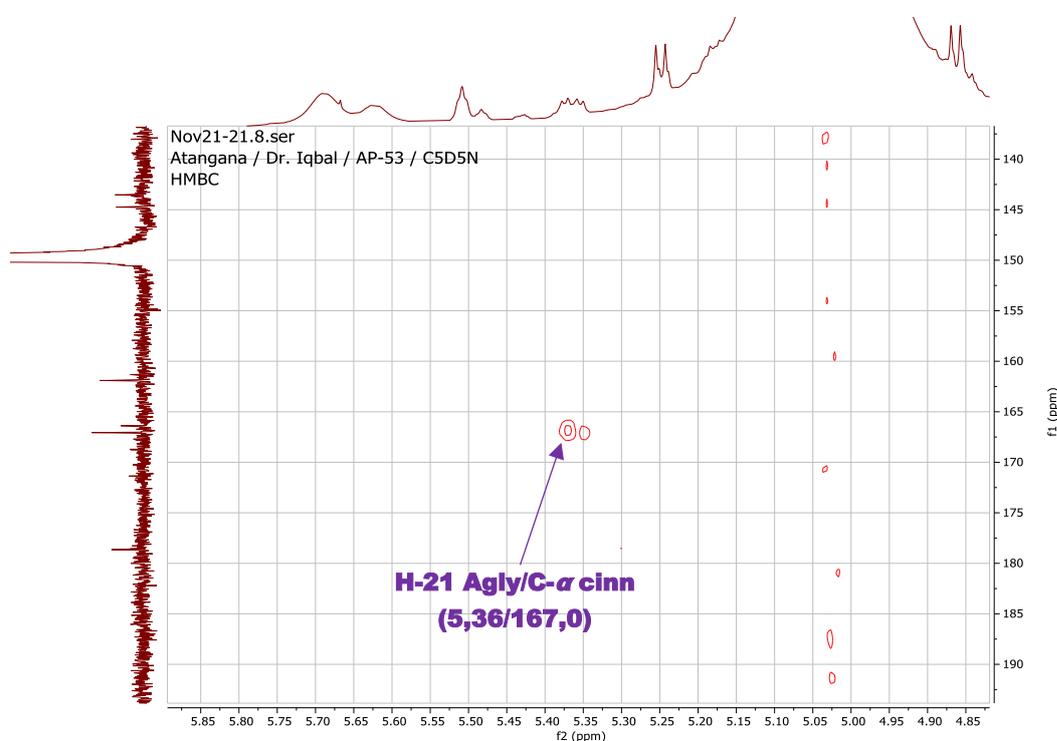


Figure 32: Spectre HMBC du composé APR411 (C_5D_5N) montrant le point de fixation du cinnamoyle.

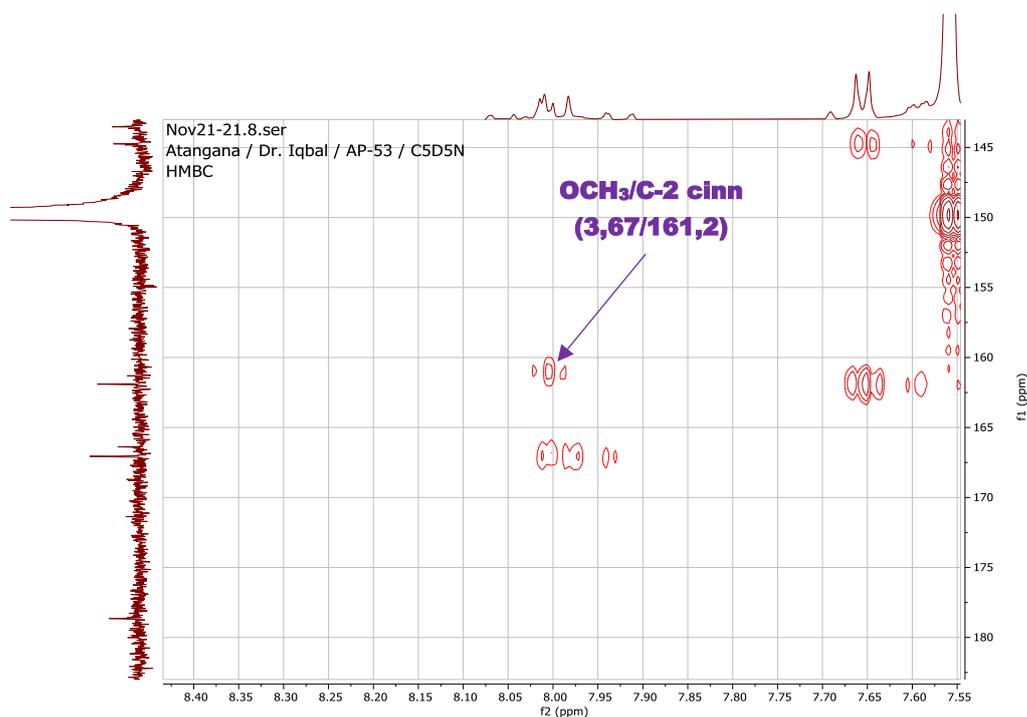
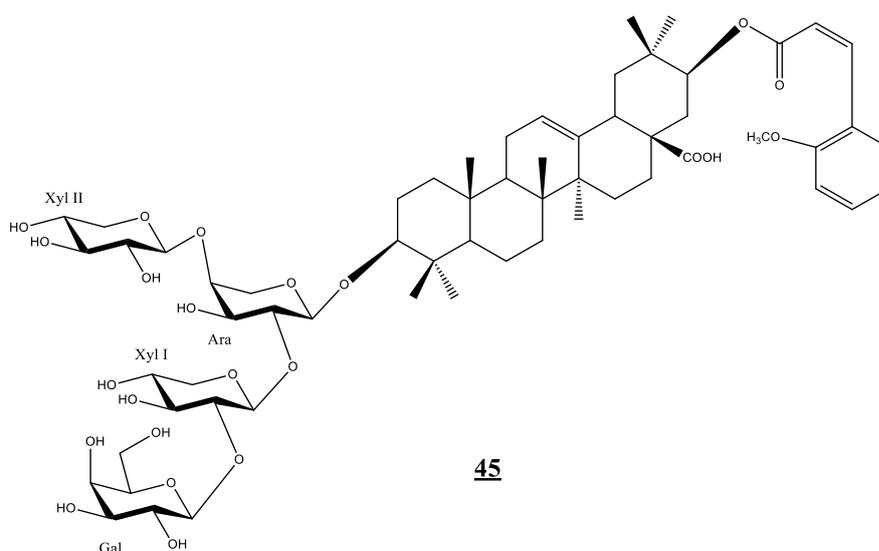


Figure 33: Spectre HMBC du composé APR411 (C_5D_5N) montrant le groupement méthoxy.

Sur la base des résultats obtenus après interprétation complète de tous les spectres et par comparaison avec les valeurs de la littérature, la structure du composé APR411 **45** a été établie comme étant l'acide 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl]-21-*O*-[(*Z*)-2-méthoxycinnamoyl] machaérinique, dérivé nouveau auquel nous avons donné le nom trivial de **Polyacosome A**.



II.1.3.2. Détermination de la structure du composé APR412

Le composé APR412 a été obtenu sous forme de poudre blanche amorphe après lyophilisation et est soluble dans les solvants polaires tels que le méthanol et la pyridine.

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESIMS (**Figure 34**) obtenu par ionisation du composé APR412 en mode positif, présente un signal correspondant au pic de l'ion protoné apparaissant à m/z : 1221, 6007 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{62}H_{92}O_{24}$ (calculé 1221,6056) et renfermant 17 degrés d'insaturation soit une différence de 31 uma avec le composé APR411.

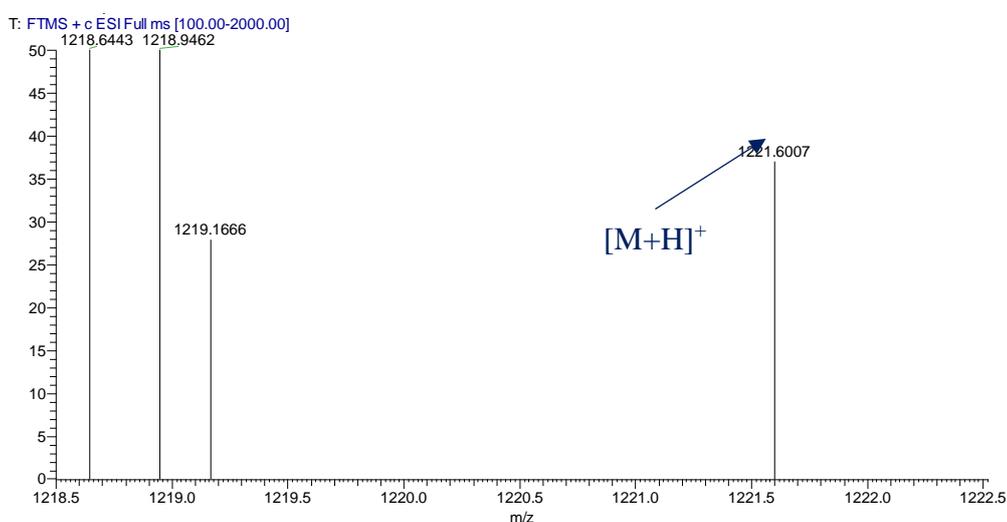


Figure 34: Spectre de masse HR-ESIMS du composé APR412

L'interprétation complète des analyses RMN 1D et 2D, en comparaison avec celles du composé APR411, montre que ces deux composés ont le même aglycone à savoir l'acide machaérinique (acide $3\beta,21\beta$ -dihydroxyoléanolique) **43** (Delgado et *al.*, 1984 ; Tchoukoua et *al.*, 2017b).

L'analyse approfondie de tous les spectres de RMN 1D et 2D du composé APR412 a permis d'assigner tous les protons et carbones de son aglycone tel que présenté dans le **tableau 7**.

Tableau 7: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR412 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR412 (Aglycone)							
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)	N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
1	CH ₂	38,9	1,40; 0,85	16	CH ₂	24,2	1,88; 1,27
2	CH ₂	26,5	2,07; 1,77	17	C	48,5	/
3	CH	89,3	3,20 (dd, J=11,4; 4,4)	18	CH	41,5	3,40
4	C	39,0	/	19	CH ₂	47,4	2,06; 1,45
5	C	56,0	0,71 (brd, J=11,6)	20	C	35,3	/
6	CH ₂	17,8	1,19; nd	21	CH	75,9	5,37 (d, J=4,7)
7	CH ₂	33,3	1,40; 1,23	22	CH ₂	37,8	2,31; 2,15
8	C	39,2	/	23	CH ₃	27,9	1,22 (s)
9	CH	48,5	1,60	24	CH ₃	16,9	0,98 (s)
10	C	36,4	/	25	CH ₃	15,3	0,80 (s)
11	CH ₂	24,2	1,87; nd	26	CH ₃	17,6	0,95 (s)
12	CH	123,2	5,50 (brd)	27	CH ₃	26,3	1,27 (s)
13	C	143,6	/	28	C	178,4	/
14	C	42,0	/	29	CH ₃	29,3	1,07 (s)
15	CH ₂	28,2	2,08; 1,15	30	CH ₃	19,5	1,19 (s)

Les spectres de RMN ^1H , HSQC et HMBC associé à l'hydrolyse acide du composé APR412 ont permis d'identifier quatre sucres **44** identiques à ceux du composé APR411 précédemment décrits résonant à δ_{H} 4,78 (1H ; d ; J=7,8) ; 5,24 (1H ; d ; J=7,4) ; 5,04 (1H ; d ; J=8,4) et 4,85 ppm (1H ; d ; J=7,1) pour les protons anomériques et à δ_{C} 104,6 ; 105,8 ; 105,3 et 103,6 ppm pour les carbones anomériques respectivement. Le spectre HSQC du composé APR412 (**Figure 35**) dans sa zone des anomères met en évidence le nombre d'unités osidiques présentes dans ce composé.

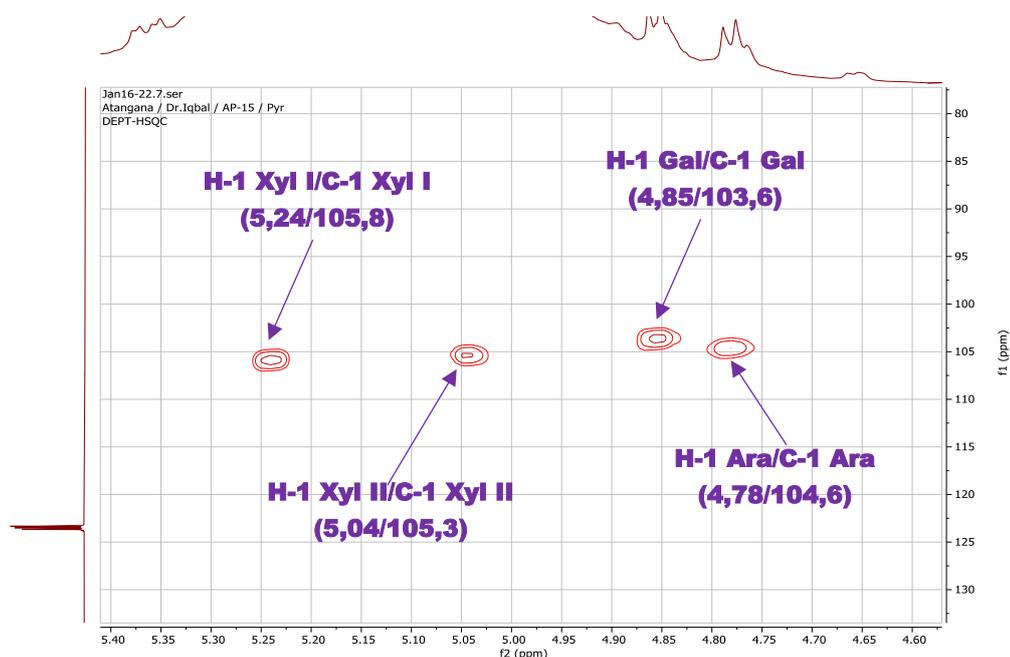


Figure 35: Spectre HSQC du composé APR412 (C_5D_5N) montrant les anomères.

L'analyse minutieuse des spectres HMBC et NOESY (**Figure 37** et **38**) permet de dire que les sucres du composé APR412 sont enchainés exactement de la même façon que dans le composé APR411. Ainsi, la chaîne osidique fixée en C-3 de l'aglycone est la même que celle précédemment décrite dans le premier composé à savoir le 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranoside (**Figure 36**).

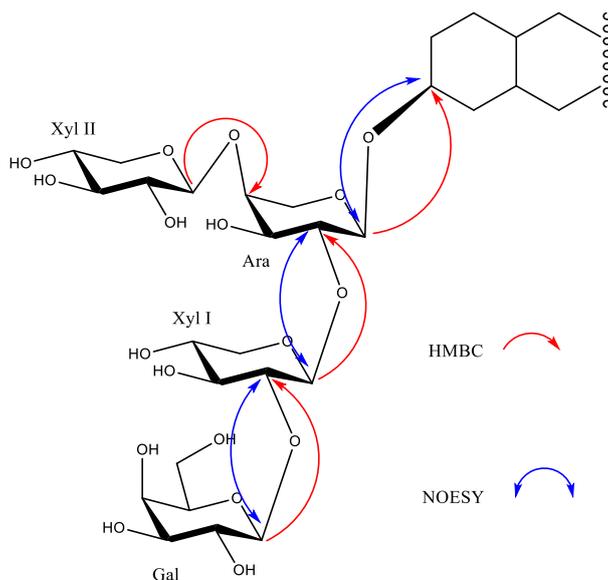


Figure 36: Corrélations HMBC et NOESY des unités osidiques du composé APR412.

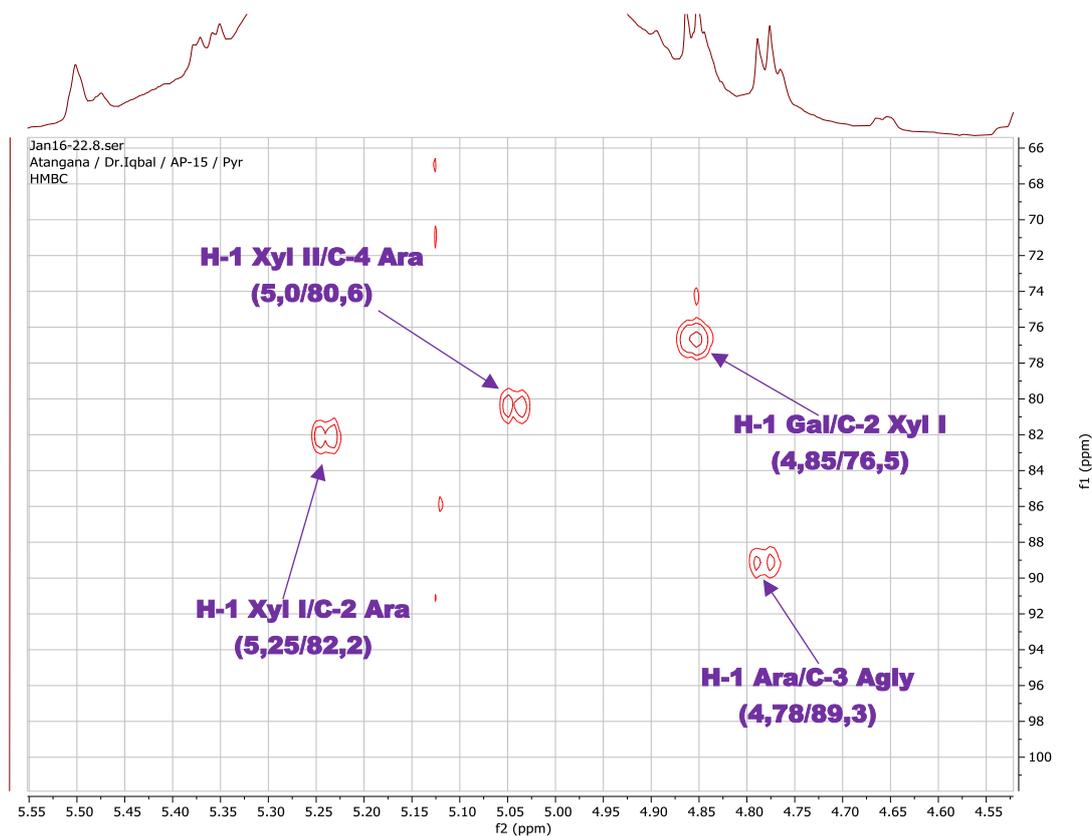


Figure 37: Spectre HMBC élargi du composé APR412 (C_5D_5N) montrant les points de jonction des sucres.

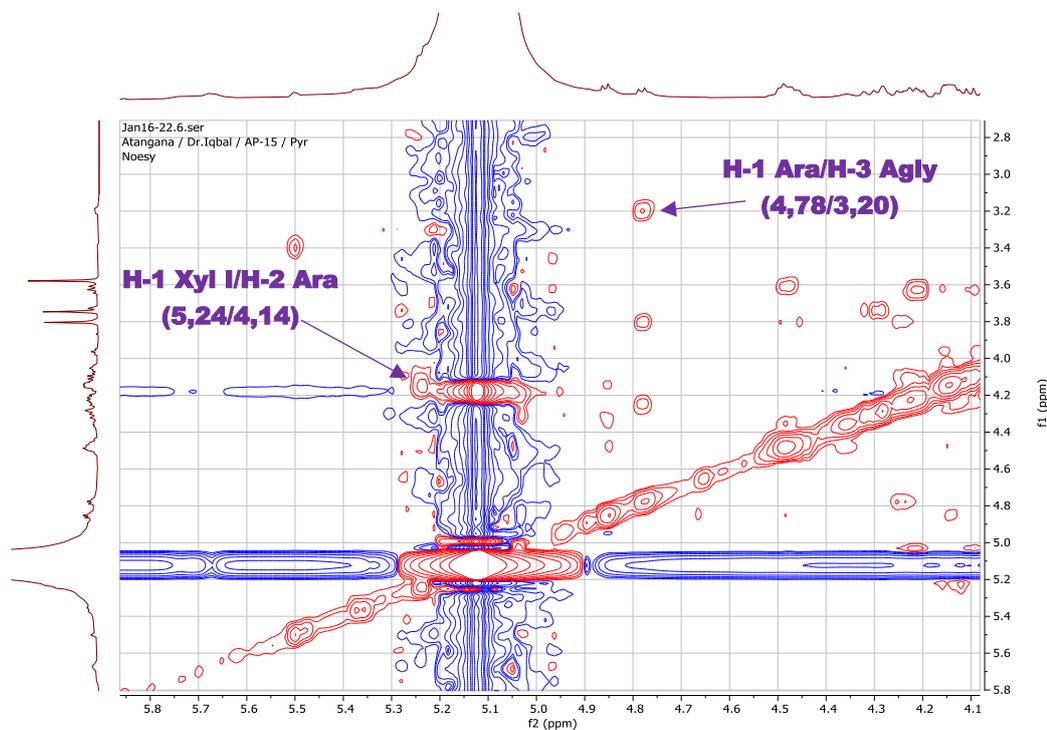


Figure 38: Spectre NOESY élargi du composé APR412 (C_5D_5N) montrant les points de jonction des sucres.

L'analyse approfondie des spectres de RMN 1D (^1H) et 2D (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC et HMBC) en comparaison avec les valeurs de la littérature, a permis d'assigner complètement tous les protons et carbones des sucres du composé APR412 (**Tableau 8**).

Tableau 8: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR412 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

Sucres	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Sucres	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
Ara			Gal		
1	104,6	4,78 (d, $J=7,8$)	1	103,6	4,85 (d, $J=7,1$)
2	82,2	4,14	2	71,8	4,48
3	76,2	3,80	3	75,2	4,14
4	80,6	4,21	4	69,4	4,28
5	65,1	3,60 nd	5	76,1	4,13
			6	61,7	4,50 (d, $J=1,8$) 4,48 (d, $J=1,7$)
Xyl I			Xyl II		
1	105,8	5,24 (d, $J=7,4$)	1	105,3	5,04 (d, $J=8,4$)
2	76,5	4,05	2	74,9	3,98
3	78,3	4,10	3	76,7	4,35
4	70,8	4,14	4	70,7	4,15
5	67,2	3,73 (brd, $J=2,6$) nd	5	67,0	4,31 (brd, $J=3,4$) 4,20 (brd, $J=2,1$)

Le substituant organique fixé en position C-21 de l'aglycone de APR412 a été identifié comme étant le (Z)-3',4'-diméthoxycinnamoyle (**Figure 39**).

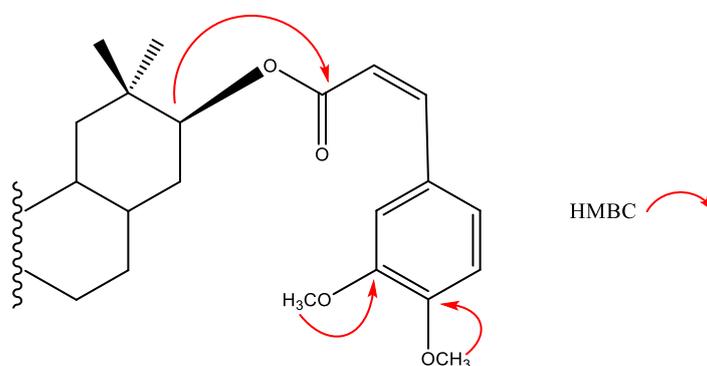


Figure 39: Corrélations HMBC de l'unité cinnamoyle du composé APR412

La comparaison des valeurs de déplacements chimiques observés pour le cinnamoyle du composé APR412 avec celles obtenues pour le composé APR411, montre que ces deux unités sont identiques à la différence d'un groupement méthoxy (OCH₃) en plus pour APR412 tel que présenté dans le **tableau 9**. Ainsi, en plus des signaux caractéristiques du cinnamoyle observables sur les différents spectres du composé APR412, on observe également deux (02) pics de méthoxy (**Figures 40 et 41**) liés au noyau aromatique apparaissant à δ_H 3,75 (δ_C 56,1 ppm) et δ_H 3,80 (δ_C 56,2 ppm). Cela est confirmé par la comparaison des spectres de masse ESI haute résolution des deux composés (**Figures 18 et 34**), qui révèle une différence de masse de 31 uma correspondant à la masse d'un groupement méthoxy (OCH₃).

La faible constante de couplage ($J = 4,8 \text{ Hz}$) des deux protons oléfiniques de ce cinnamoyle permet également de déterminer la configuration (*Z*) de ce fragment tandis que les déplacements chimiques des carbones quaternaires apparaissant à δ_C 150,2 et 152,4 portant les méthoxy permettent de dire que ces derniers sont positionnés en position *Méta* et *Para* du noyau aromatique (Haddad et *al.*, 2004).

Tableau 9: Valeurs des déplacements chimiques (¹H et ¹³C) du méthoxycinnamoyle du composé APR412 (C₅D₅N, 500 et 125 MHz).

APR412 ((<i>Z</i>)-3,4-diméthoxycinnamoyl)			
N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; <i>J</i>)
α	C	167,0	/
β	CH	116,6	6,79 (d, <i>J</i> =4,8)
c	CH	144,9	8,01 (d, <i>J</i> =4,8)
1'	C	127,9	/
2'	C	112,1	7,40 (d, <i>J</i> =2,0)
3'	CH	152,4	/
4'	CH	150,2	/
5'	CH	111,0	6,95 (m)
6'	CH	123,2	7,30 (d, <i>J</i> =2,0)
7'	CH ₃	56,1	3,75 (s)
8'	CH ₃	56,2	3,80 (s)

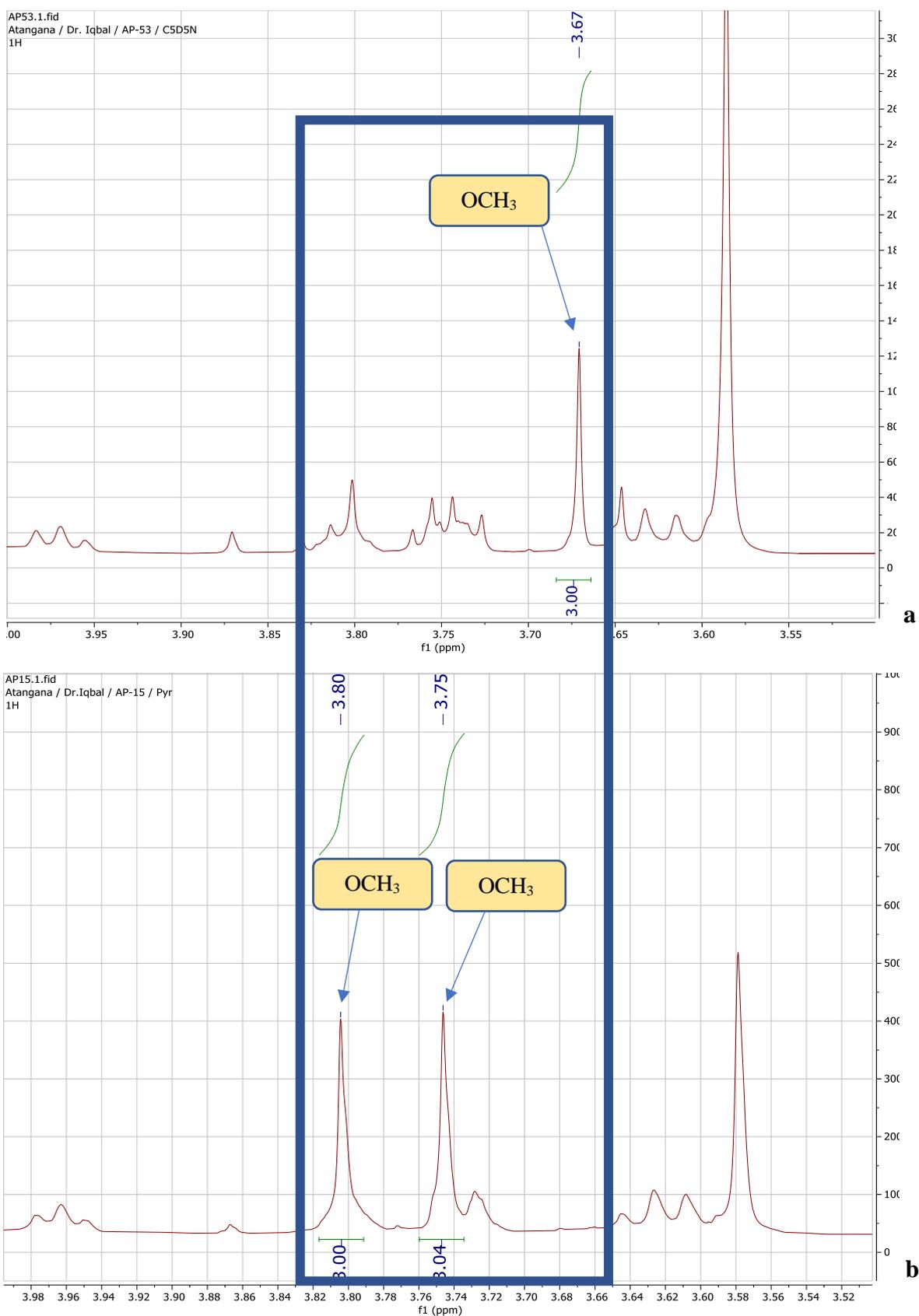


Figure 40: Spectres RMN ^1H élargis des composés APR411 (a) et APR412 (b) montrant la différence du nombre de groupements OCH_3 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz).

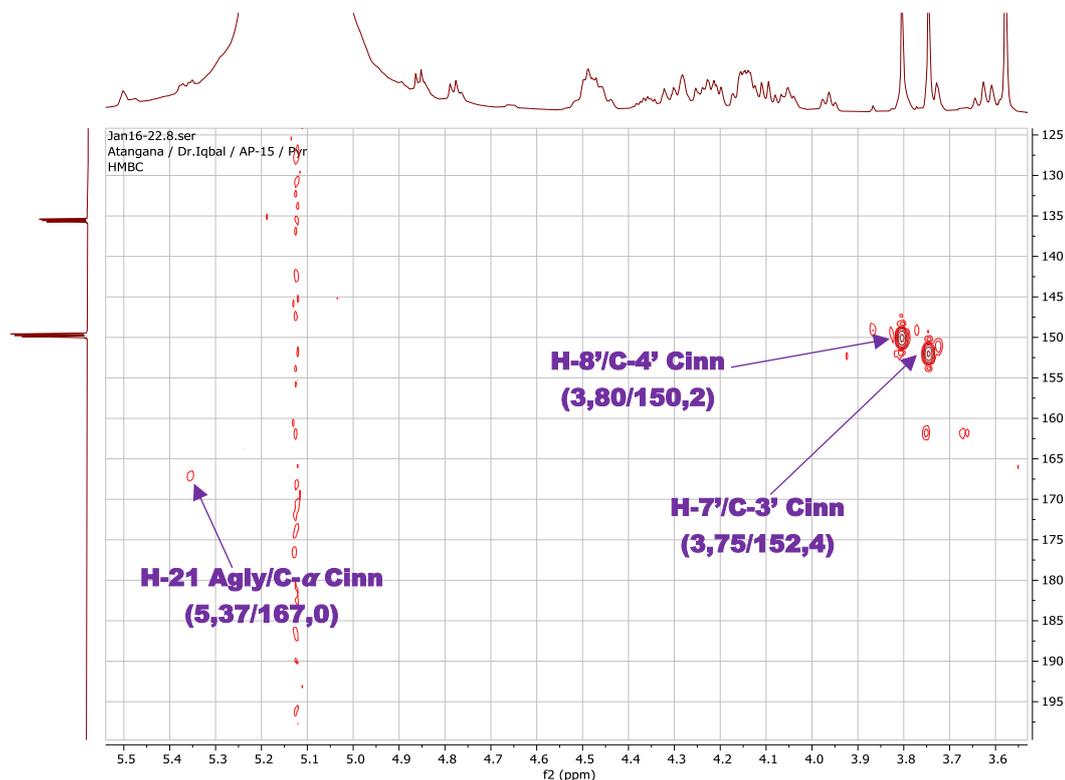
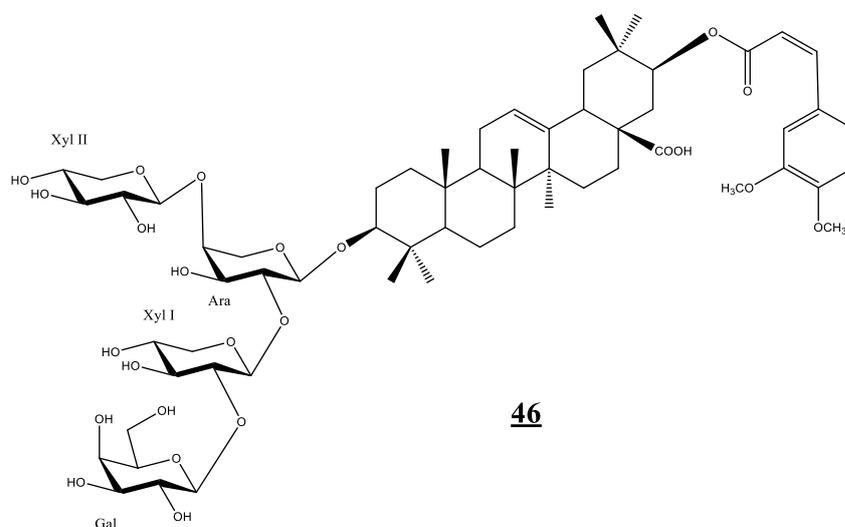


Figure 41: Spectre HMBC élargi du composé APR412 (C₅D₅N)

L'ensemble des résultats obtenus après interprétation complète des spectres de RMN (1D et 2D) et en comparaison avec les données de la littérature, nous ont permis de déterminer la structure complète de APR412 **46** comme étant l'acide 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl]-21-*O*-[(*Z*)-3,4-dimethoxycinnamoyl] machaerinique, dérivé nouveau auquel nous avons donné le nom trivial de **Polyacosome B**.



II.1.3.3. Détermination de la structure du composé APR421

Le composé APR421 a été obtenu sous forme de poudre amorphe blanche, soluble dans les solvants polaires tels que le méthanol et la pyridine dans laquelle il a été analysé.

Sur le spectre de masse ESI à haute résolution en mode positif du composé APR421 (**Figure 42**), on observe un pic correspondant au pic de l'ion moléculaire protoné et apparaissant à m/z : 1059,5458 $[M+H]^+$, correspondant à la formule brute $C_{56}H_{83}O_{19}$ (calculée 1059,5528) et renfermant 16 degrés d'insaturation soit une insaturation de moins que les composés APR411 et APR412.

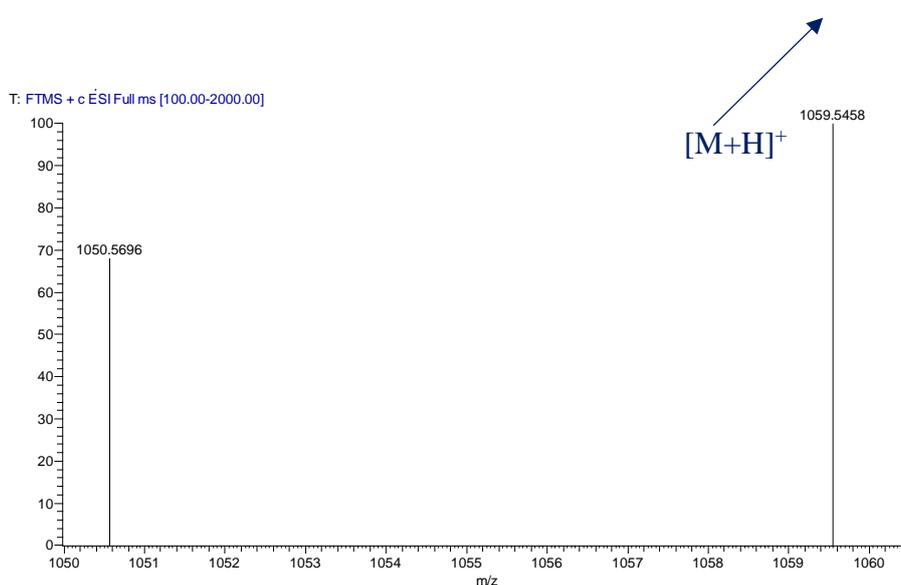


Figure 42: Spectre HR-ESIMS du composé APR421

Après interprétation des spectres de RMN 1D et 2D de APR421, la comparaison des valeurs de déplacements chimiques obtenus avec celles du premier composé décrit (APR411) permet de dire que ces composés ont le même aglycone : l'acide machaérinique **43** (acide $3\beta,21\beta$ -dihydroxyoléanolique) (Delgado *et al.*, 1984 ; Tchoukoua *et al.*, 2017b). L'ensemble des protons et carbones de l'aglycone de APR421 ont ainsi pu être assignés (**Tableau 10**).

Tableau 10: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR421 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR421 (Aglycone)							
N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)	N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)
1	CH ₂	38,7	1,40; nd	16	CH ₂	24,9	2,11; 1,80
2	CH ₂	26,6	2,19; 1,81	17	C	48,4	/
3	CH	89,0	3,30 (dd, J=11,0; 4,7)	18	CH	41,1	3,41
4	C	39,5	/	19	CH ₂	46,9	1,46; nd
5	C	55,8	0,74 (d, J=11,6)	20	C	35,6	/
6	CH ₂	18,6	1,53; 1,22	21	CH	75,8	5,37 (d, J=4,7)
7	CH ₂	33,2	1,42; 1,25	22	CH ₂	38,1	2,33 ; nd
8	C	39,6	/	23	CH ₃	27,8	1,23 (s)
9	CH	47,9	1,62	24	CH ₃	16,4	1,03 (s)
10	C	36,9	/	25	CH ₃	15,4	0,83 (s)
11	CH ₂	23,7	1,90; nd	26	CH ₃	17,3	0,99 (s)
12	CH	123,2	5,51 (brd)	27	CH ₃	25,9	1,28 (s)
13	C	143,5	/	28	C	180,0	/
14	C	42,2	/	29	CH ₃	29,9	1,09 (s)
15	CH ₂	29,0	1,38; 1,25	30	CH ₃	18,4	1,19 (s)

L'interprétation des spectres de RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (HSQC, TOCSY, NOESY et HMBC) a permis de mettre en évidence la présence de trois (03) sucres présents dans le composé APR421 dont les protons anomériques résonnent dans le spectre de RMN ^1H à δ_H 4,90 (d ; $J=7,6$) ; 5,15 (d ; $J=8,1$) et 4,85 (d ; $J=7,2$) et les carbones anomériques résonnent à δ_C 104,8 ; 106,8 et 103,8 respectivement tel que présenté dans le spectre HSQC de la **Figure 43**.



Figure 43: Spectre HSQC du composé APR421 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) montrant les anomères.

L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D associée à l'hydrolyse acide de APR421 permet d'identifier la nature de ces sucres comme étant : α -L-arabinopyranosyl, β -D-xylopyranosyl et β -D-galactopyranosyl.

La liaison entre les différents sucres du composé APR421 et leur fixation sur l'aglycone s'est faite à l'aide de l'analyse des spectres HMBC et NOESY. Cette analyse permet de montrer que la chaîne osidique (**Figure 44**) fixée en C-3 de l'aglycone du composé APR421 est presque identique à celle fixée en C-3 de l'aglycone du composé APR411. La différence ici se situant sur l'absence du deuxième xylose (fixé en C-4 de Ara chez APR411) sur le composé APR421. Ainsi, le trisaccharide lié à l'aglycone est β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside.

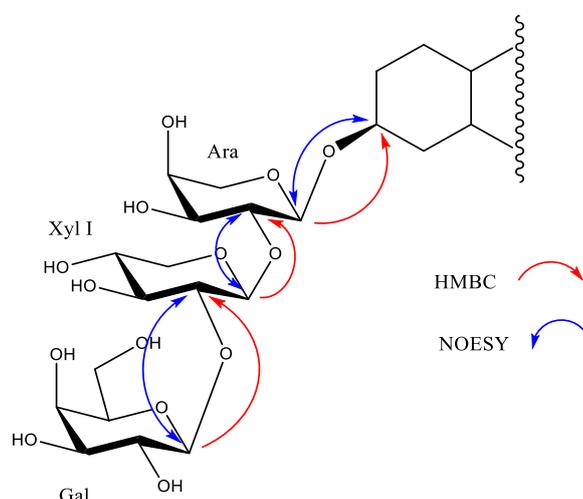


Figure 44: Corrélations HMBC et NOESY du composé APR421 montrant les liaisons entre les unités osidiques.

Cette absence d'une unité de xylose est confirmée par le spectre de masse qui révèle une masse inférieure de 131 uma pour APR421 (m/z : 1059,5458) comparée à celle de APR411 (m/z : 1191,5903). Sur la base des spectres HMBC et NOESY (**Figures 45 et 46**), on observe clairement :

- La corrélation entre H-1 de Ara apparaissant à δ_H 4,90 (d ; $J=7,6$) et C-3 de Agly à δ_C 89,0 montrant que l'arabinose est directement lié à l'aglycone en position 3. Cette liaison a été confirmée par le spectre NOESY où une corrélation est observable entre H-1 de Ara à δ_H 4,90 et H-3 de Agly à δ_C 3,30 ;
- La corrélation entre H-1 de Xyl résonant à δ_H 5,15 (d ; $J=8,1$) et C-2 de Ara résonant à δ_C 84,4 montrant que Xyl est fixé au carbone 2 de l'arabinose. Cette jonction Xyl I \rightarrow 2Ara a

été confirmée par la corrélation observée dans le spectre NOESY entre H-1 de Xyl à δ_H 5,15 et H-2 de Ara à δ_H 4,07 ;

- Enfin, la corrélation entre H-1 de Gal apparaissant à δ_H 4,85 (d ; $J=7,2$) et C-2 de Xyl apparaissant à δ_C 76,8 permettant de lier le galactose au carbone 2 de la xylose. Ladite jonction a été confirmée par le spectre NOESY où on observe une corrélation entre H-1 de gal à δ_H 4,85 et H-2 de Xyl à δ_H 4,09.

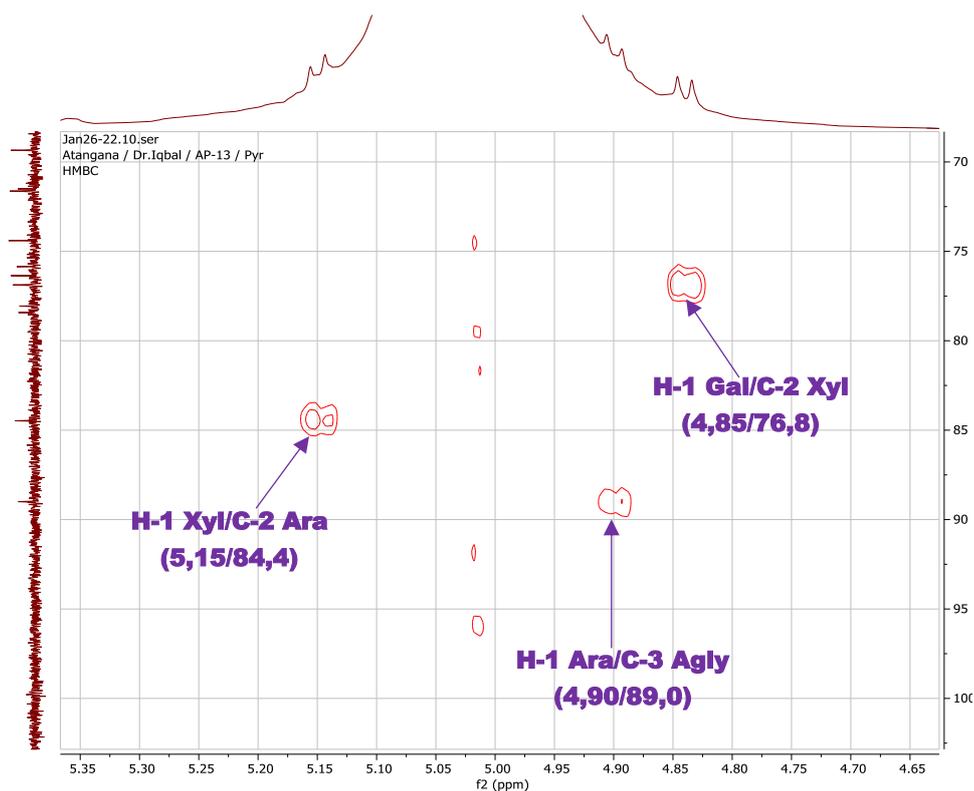


Figure 45: Spectre HMBC élargi du composé APR421 (C_5D_5N) montrant les points de jonction des sucres.

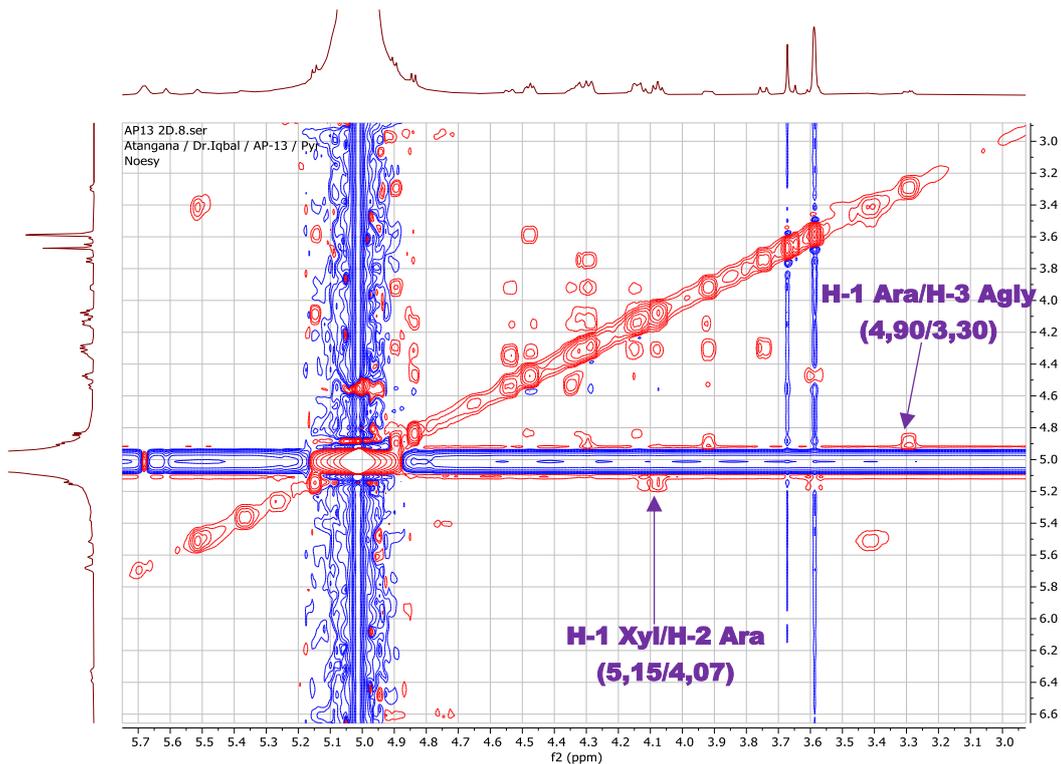


Figure 46: Spectre NOESY élargi du composé APR412 (C_5D_5N) montrant les points de jonction des sucres.

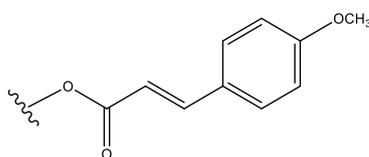
Le **tableau 11** suivant présente toutes les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones du composé APR421.

Tableau 11: Valeurs des déplacements chimiques (1H et ^{13}C) des sucres du composé APR421 (C_5D_5N , 500 et 125 MHz).

Sucres	δ_C	δ_H	Sucres	δ_C	δ_H
Ara			Gal		
1	104,8	4,90 (d, $J=7,6$)	1	103,8	4,85 (d, $J=7,2$)
2	84,4	4,07	2	71,6	4,48
3	74,4	4,13	3	74,3	4,12
4	69,4	4,29 (d, $J=7,0$)	4	69,3	4,28
5	64,9	4,48 (d, $J=4,1$)	5	75,8	4,05
			6	62,7	4,53 (d, $J=2,5$) 4,35 (d, $J=2,3$)

Xyl		
1	106,8	5,15 (d, $J=8,1$)
2	76,8	4,09
3	76,3	4,37
4	71,5	4,13
5	67,2	4,32 (d, $J=2,7$) 4,30 (d, $J=2,3$)

L'analyse de tous les spectres de APR421 met également en évidence la présence d'un groupement cinnamoyle **47**.



47

En effet, on observe sur les spectres de RMN ^1H et ^{13}C (**Figure 47**), la présence de deux familles de protons formant un système AA'BB' apparaissant à δ_{H} 7,00 et 7,65 ppm dans le spectre de RMN ^1H et dont les valeurs de carbones résonent à δ_{C} 114,8 et 130,1 ppm. On observe également un pic caractéristique du groupement méthoxy apparaissant à δ_{H} 3,67 (δ_{C} 55,8). Le système AA'BB' du noyau aromatique de l'unité cinnamoyle, permet de dire que le méthoxy lié à ce cinnamoyle est fixé en position *Para* du noyau aromatique. De plus, la grande constante de couplage ($J=14,5$) des deux protons oléfiniques H_b (δ_{H} 6,72) et H_c (δ_{H} 7,99) de l'unité cinnamoyle, permet de déterminer la configuration (*E*) de celle-ci et toutes les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de cette unité sont contenues dans le **tableau 12**.

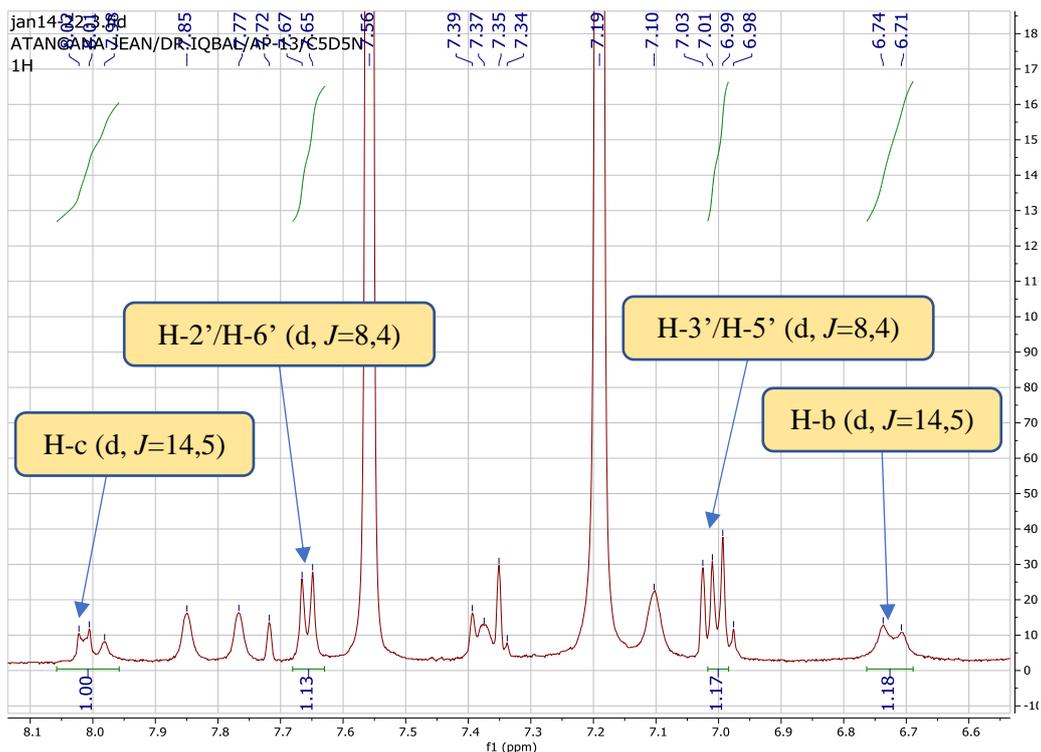


Figure 47: Spectre RMN ^1H du composé APR421 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les protons anomériques.

Tableau 12: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'unité cinnamoyl du composé APR421 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR421 ((E)-4-méthoxycinnamoyl)			
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
α	C	167,2	/
β	CH	116,5	6,72 (d, J=14,5)
c	CH	144,7	7,99 (d, J=14,5)
1'	C	127,3	/
2'	C	130,1	7,65 (d, J=8,4)
3'	CH	114,8	7,00 (d, J=8,4)
4'	CH	161,9	/
5'	CH	114,8	7,00 (d, J=8,4)
6'	CH	130,1	7,65 (d, J=8,4)
7'	CH ₃	55,8	3,67 (s)

La corrélation observée dans le spectre HMBC (**Figure 48**) entre le proton H-21 de l'aglycone apparaissant à δ_{H} 5,37 et le carbonyl de l'unité cinnamoyl apparaissant à δ_{C} 167,2 permet de dire que le *trans*-méthoxycinnamoyl est lié à l'aglycone en position C-21 comme précédemment décrit dans les deux premiers composés.

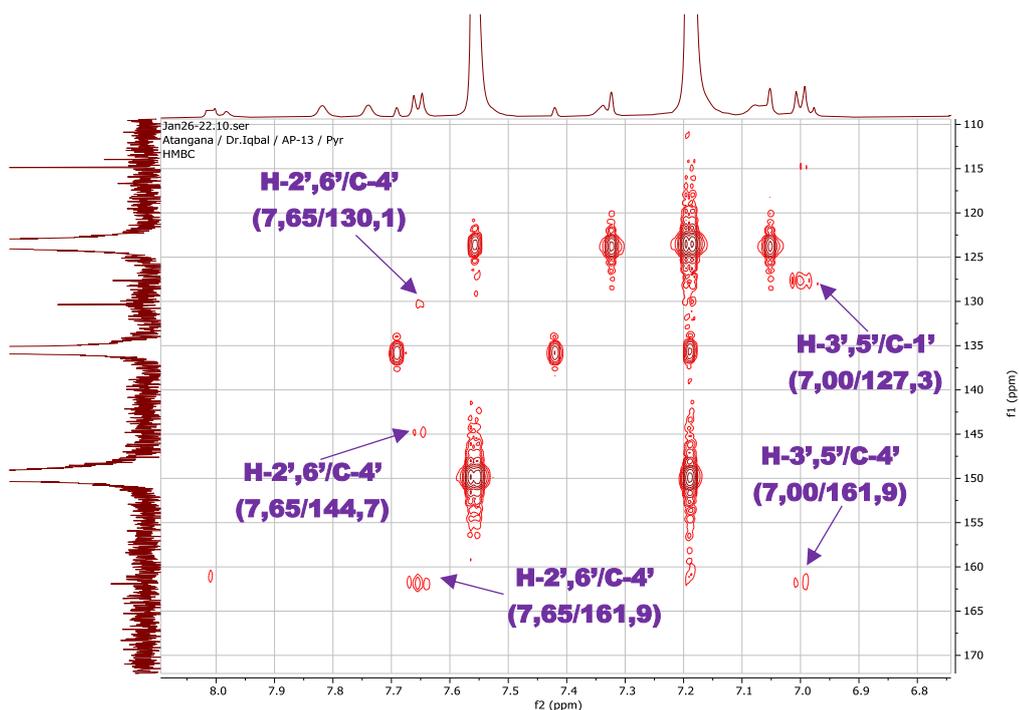
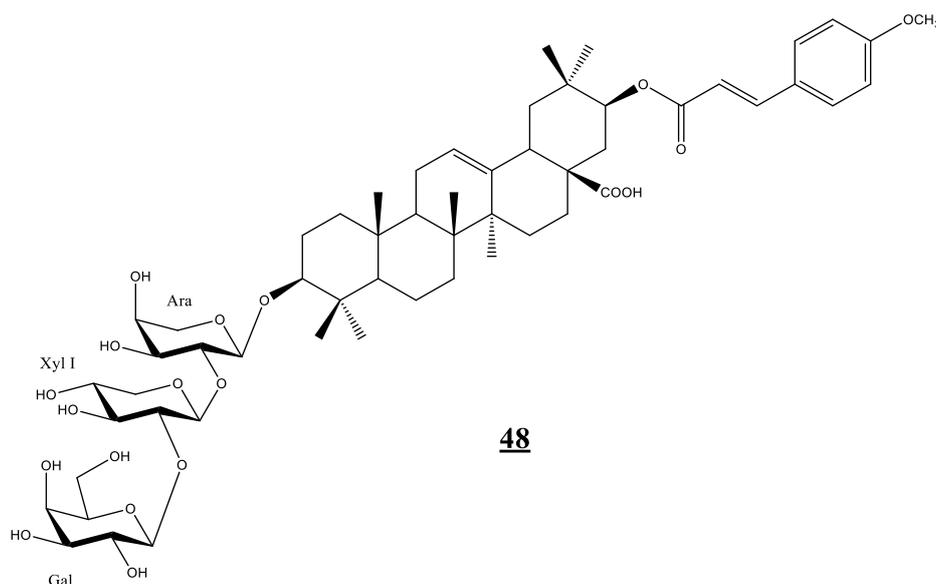


Figure 48: Spectre RMN ^1H du composé APR421 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les protons anomériques.

Toutes ces données en comparaison avec celles présentes dans la littérature ont permis d'élucider la structure complète **48** du composé APR421 comme étant l'acide 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl]-21-*O*-[(*E*)-4-methoxycinnamoyl] machaérinique, composé naturel isolé pour la première fois auquel nous avons donné le nom de **Polyacoside C**.



II.1.3.4. Détermination de la structure du composé APR431

APR431 est une saponine triterpénique obtenue sous forme de poudre amorphe blanche ayant une très bonne solubilité dans les solvants polaires tels que la pyridine dans laquelle il a été analysé.

Le spectre de masse ESI à haute résolution en mode positif de ce composé (**Figure 49**) permet de mettre en évidence le pic de l'ion protoné apparaissant à m/z : 987,5249 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{53}H_{78}O_{17}$ (calculée 987,5317) et renfermant et renfermant 15 degrés d'insaturation, soit une insaturation de moins que le composé APR421.

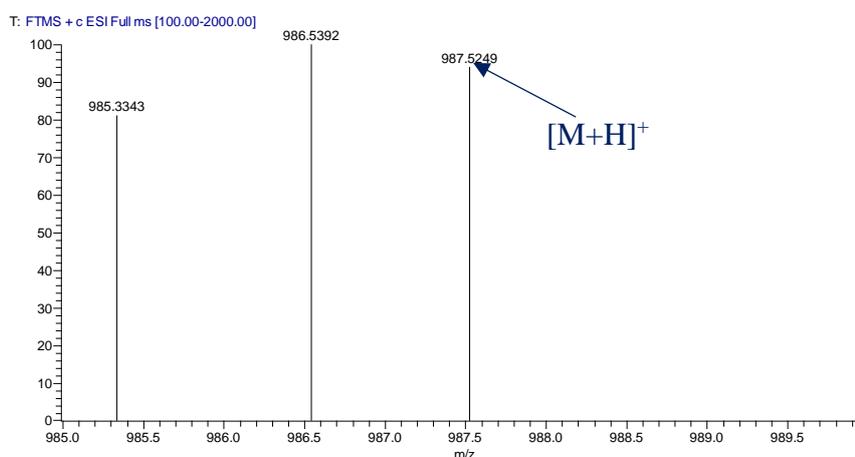


Figure 49: Spectre de masse HR-ESIMS du composé APR431

L'interprétation de tous les spectres RMN du composé APR431 et la comparaison des valeurs de déplacements chimiques obtenus avec celles des autres composés décrits, permet de dire que le composé APR431 possède le même aglycone qui est l'acide machaérinique (acide $3\beta,21\beta$ -dihydroxyoléanolique) **43** tel qu'observé dans le spectre de RMN 1H (**Figures 50 et 51**) (Delgado et *al.*, 1984 ; Tchoukoua et *al.*, 2017b). Tous les protons et carbones de l'aglycone de ce composé APR431 ont été assignés à l'aide des spectres de RMN 1D et 2D et leurs valeurs sont données dans le **tableau 13**.

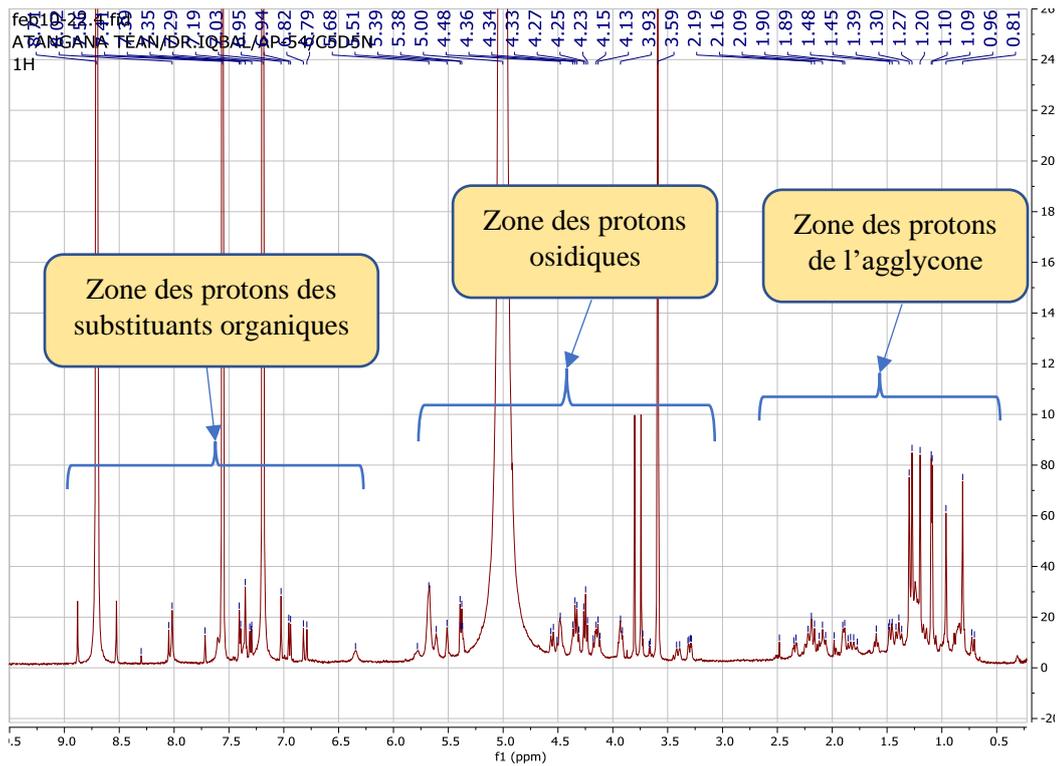


Figure 50: Spectre de RMN ^1H du composé APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

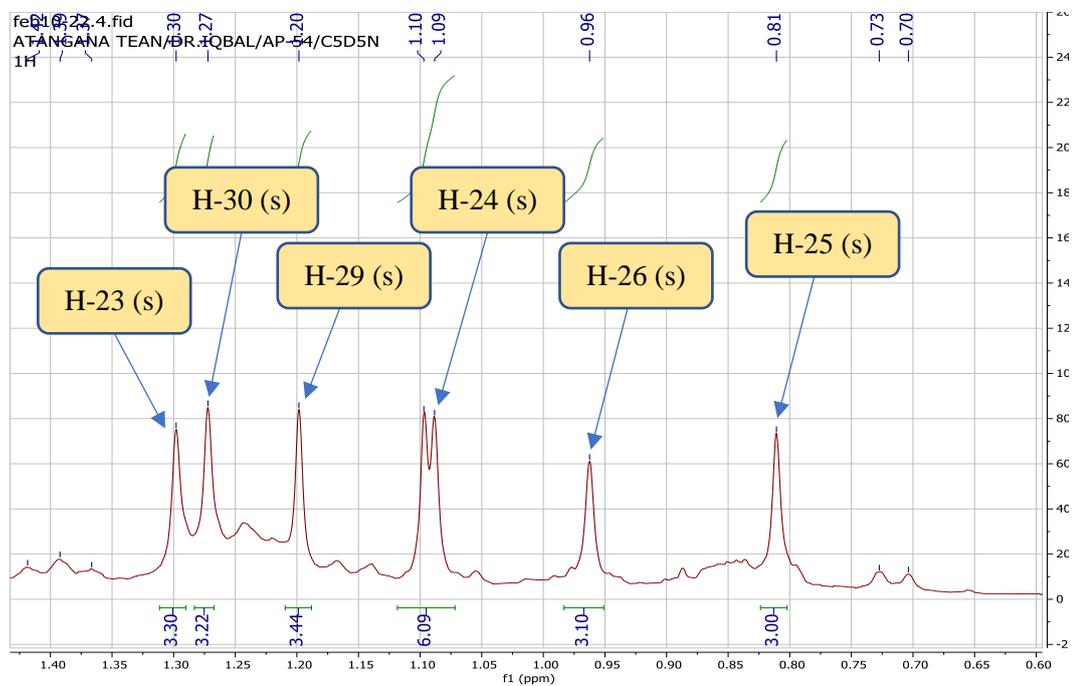


Figure 51: Spectre de RMN ^1H du composé APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les méthyles angulaires.

Tableau 13: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone de APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR431 (Aglycone)							
N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)	N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)
1	CH ₂	38,6	1,39; 0,84	16	CH ₂	24,9	1,89; nd
2	CH ₂	26,5	1,27; 1,16	17	C	48,4	/
3	CH	88,9	3,30 (dd, J=11,1; 4,4)	18	CH	41,4	3,40
4	C	39,3	/	19	CH ₂	47,0	2,07; 1,45
5	C	55,7	0,71 (d, J=11,8)	20	C	35,6	/
6	CH ₂	18,4	1,53; 1,22	21	CH	75,6	5,37 (d, J=4,7)
7	CH ₂	33,2	1,35; 1,21	22	CH ₂	38,7	2,32; 1,40
8	C	39,6	/	23	CH ₃	28,2	1,23 (s)
9	CH	47,9	1,60	24	CH ₃	16,8	1,08 (s)
10	C	36,9	/	25	CH ₃	15,4	0,81 (s)
11	CH ₂	23,7	1,23; nd	26	CH ₃	17,3	0,96 (s)
12	CH	123,2	5,51 (brd)	27	CH ₃	25,9	1,29 (s)
13	C	143,5	/	28	C	179,5	/
14	C	42,1	/	29	CH ₃	28,9	1,09 (s)
15	CH ₂	29,3	1,24; nd	30	CH ₃	18,6	1,20 (s)

Le nombre et la nature des sucres que comporte le composé APR431 ont été déterminés par la même méthode précédemment décrite pour le composé APR411. Ainsi, sur les spectres de RMN ^1H et ^{13}C , on observe la présence de deux signaux apparaissant à δ_H 4,91 (d ; J=7,5) et 5,38 (d ; J=8,3) pour les protons anomériques et à δ_C 105,0 et 106,0 pour les carbones anomériques. L'ensemble des données fournies par les spectres de RMN 1D et 2D notamment l'expérience HSQC (**Figure 52**) en association avec les valeurs de la littérature, ont permis d'identifier la nature des deux (02) sucres comme étant le β -D-Glucopyranosyl chacun.

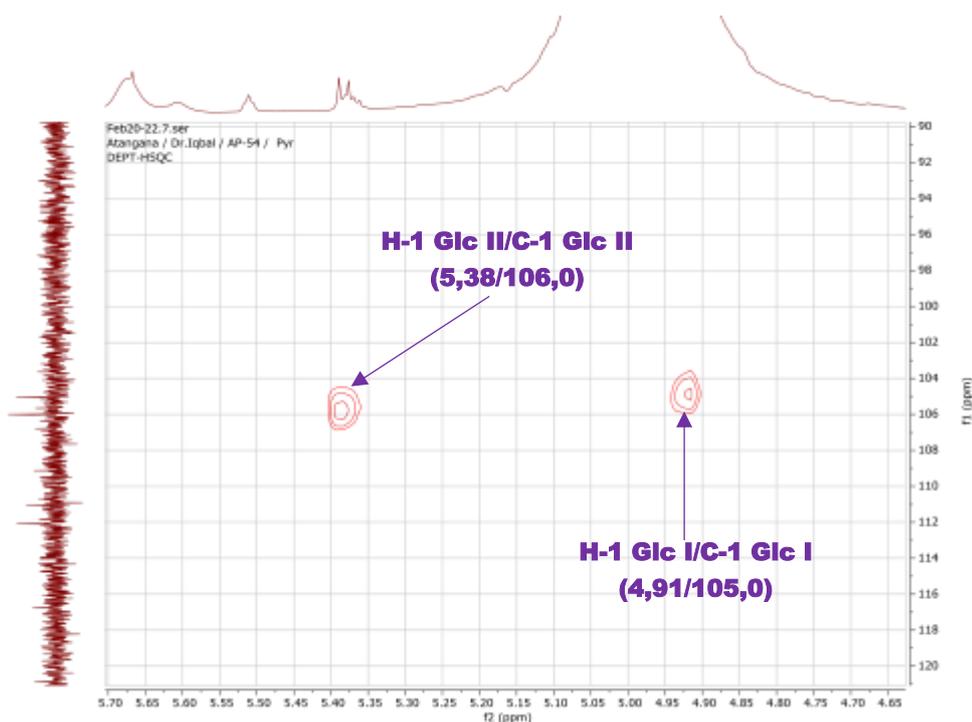


Figure 52: Spectre HSQC du composé APR431 (C_5D_5N) montrant les anomères.

L'agencement de la chaîne osidique du composé APR421 et sa fixation sur l'aglycone s'est faite et cette chaîne a été identifiée comme étant le disaccharide β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside présenté sur la **Figure 53** ci-contre :

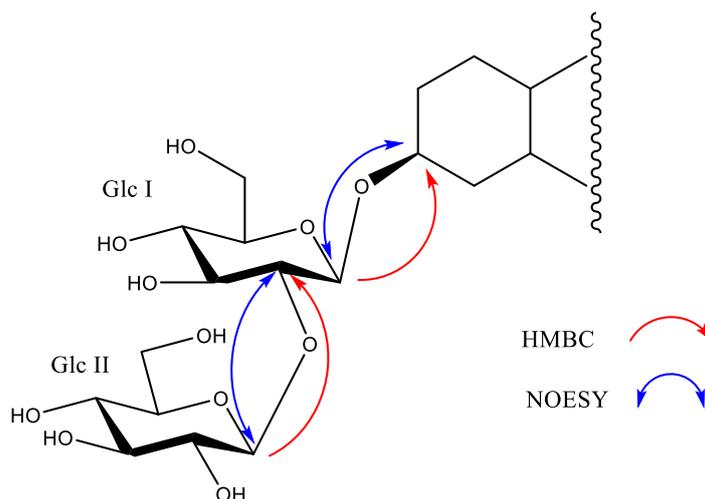


Figure 53: Corrélations HMBC et NOESY des sucres du composé APR431

Cet agencement s'est fait principalement à l'aide des spectres HMBC et NOESY (Figure 54). En effet, sur ces spectres on observe clairement :

- La corrélation entre H-1 de Glc I apparaissant à δ_H 4,91 (d ; $J=7,3$) et C-3 de Agly à δ_C 88,9 montrant que le glucose I est le sucre directement lié à l'aglycone en position 3. Cette liaison a été confirmée par le spectre NOESY où une corrélation est observable entre H-1 de Glc I à δ_H 4,91 et H-3 de Agly à δ_C 3,30 ;
- Et la corrélation entre H-1 de Glc II résonant à δ_H 5,38 (d ; $J=8,3$) et C-2 de Glc I résonant à δ_C 83,4 montrant que Glc II est fixé au carbone 2 de Glc I. Cette jonction a été confirmée par la corrélation observée dans le spectre NOESY entre H-1 de Glc II à δ_H 5,38 et H-2 de Glc I à δ_H 4,25.

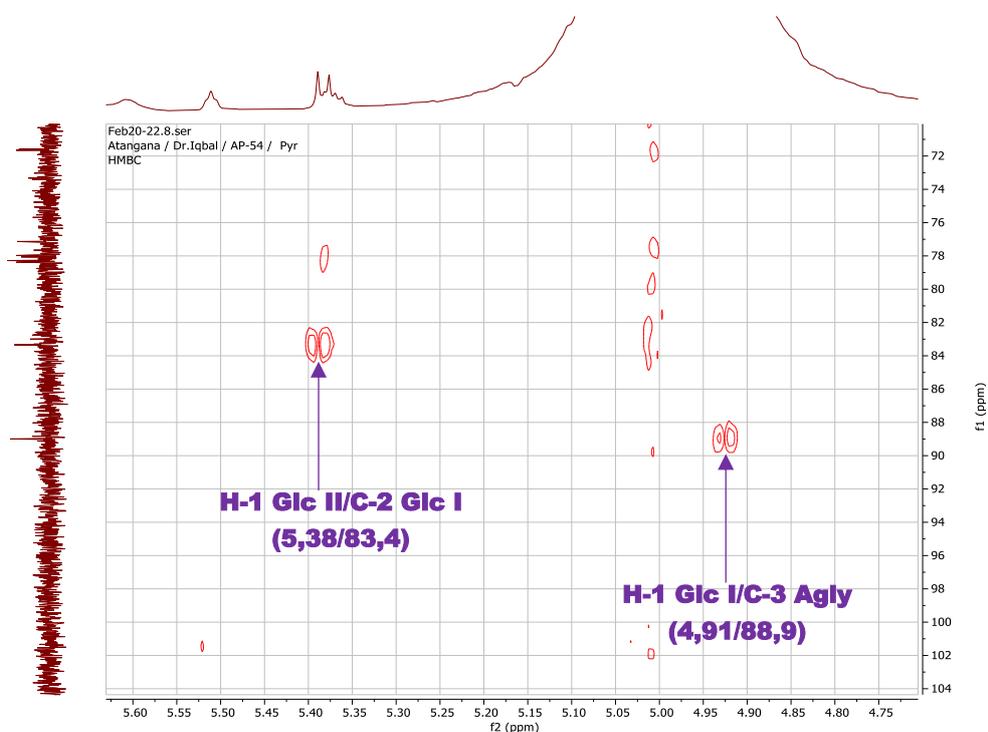


Figure 54: Spectre HMBC élargi du composé APR431 (C_5D_5N) montrant les jonctions des sucres

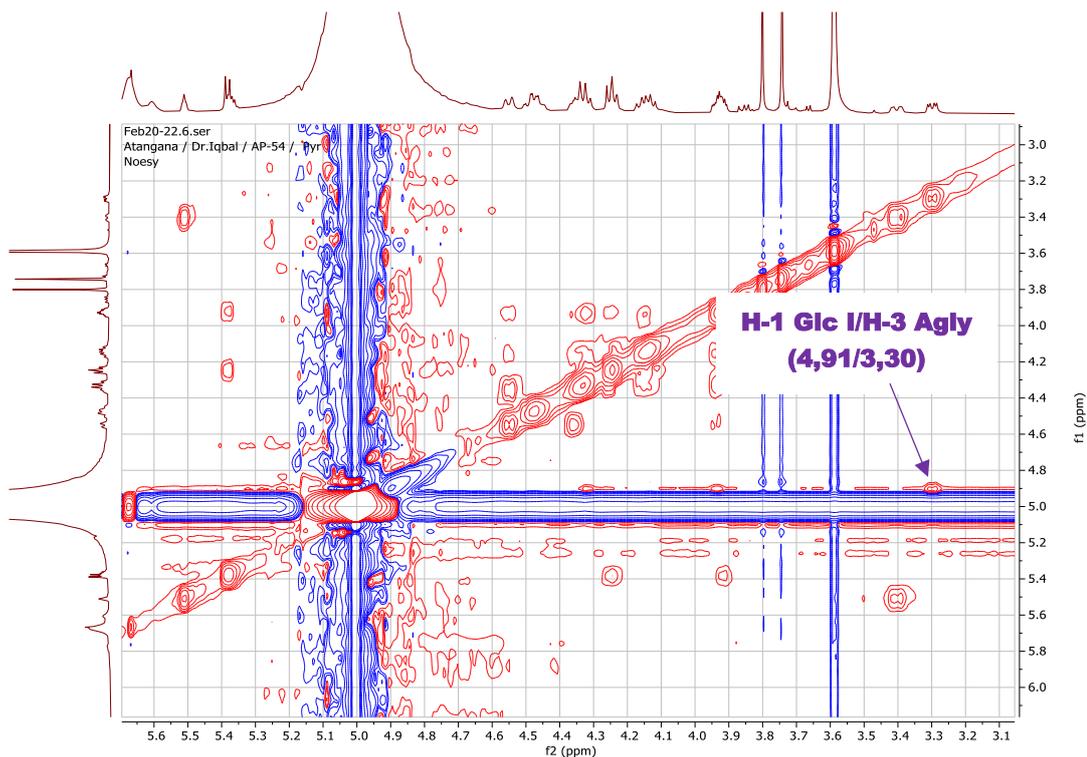


Figure 55: Spectre NOESY élargi du composé APR431 (C₅D₅N)

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones de ce disaccharide fixé en position C-3 du composé APR431 sont présentées dans le **tableau 14** ci-contre.

Tableau 14: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

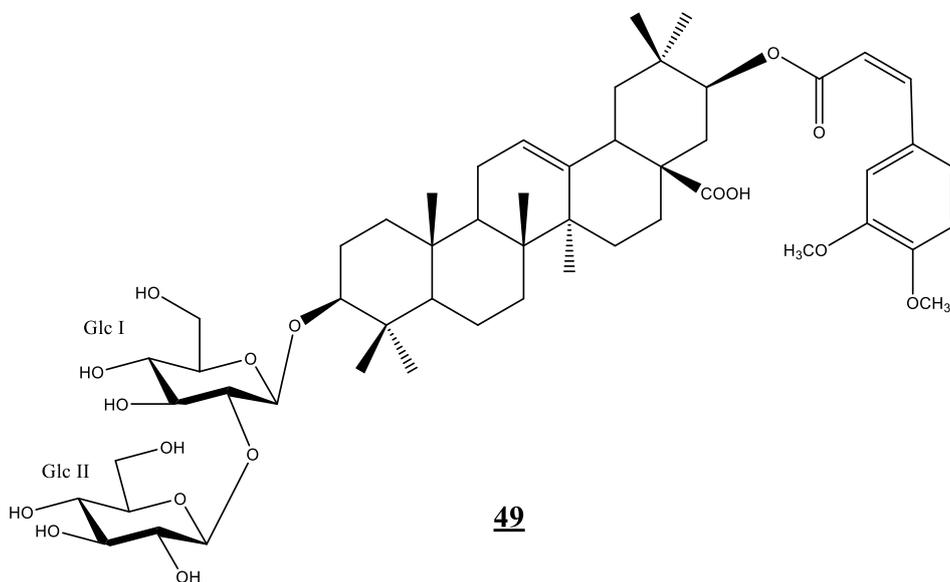
Sucres	δ_{C}	δ_{H}
Glc I		
1	105,0	4,91 (d, $J=7,5$)
2	83,4	4,25
3	78,2	3,91
4	71,5	4,31
5	78,0	4,23
6	62,8	4,53 (d, $J=11,4$); 4,35 (d, $J=8,9$)
Glc II		
1	106,0	5,38 (d, $J=8,3$)
2	77,1	4,13
3	78,3	4,32
4	71,6	4,30
5	77,9	4,25
6	62,8	4,55 (d, $J=11,4$); 4,37 (d, $J=8,9$)

L'interprétation des spectres de RMN 1D et 2D du composé APR431 permet de constater que le substituant organique fixé en position C-21 de l'aglycone est l'unité cinnamoyle identique à celle présente dans la structure de APR412. Il s'agit donc du (*Z*)-3,4-diméthoxycinnamoyle. Cela est confirmé par les valeurs présentées dans le **tableau 15** montrant les déplacements chimiques des protons et carbones du groupement méthoxycinnamoyle du composé APR431.

Tableau 15: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'unité cinnamoyl du composé APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR431 ((Z)-4-méthoxycinnamoyl)			
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
α	C	167,4	/
β	CH	116,8	6,80 (d, $J=3,8$)
c	CH	145,2	8,03 (d, $J=3,8$)
1'	C	128,2	/
2'	C	110,8	6,95 (d, $J=8,3$)
3'	CH	152,5	/
4'	CH	150,5	/
5'	CH	112,1	7,40 (brd, $J=6,5$)
6'	CH	123,4	7,29 (m)
7'	CH ₃	55,7	3,74 (s)
8'	CH ₃	55,7	3,80 (s)

Sur la base de ces données spectroscopiques et en comparaison avec les valeurs de la littérature, la structure complète de APR431 **49** a été déterminée comme étant l'acide 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl]-21-*O*-[(*Z*)-3,4-diméthoxycinnamoyl] machaérinique, composé naturel isolé pour la première fois auquel nous avons donné le nom de **Polyacocide D**.



II.1.3.5. Détermination de la structure du composé APR441

Le composé APR441 a été obtenu sous forme de poudre blanche amorphe et est soluble dans les solvants polaires tels que la pyridine.

Ce composé présente sur son spectre de masse obtenu en mode positif à haute résolution (**Figure 56**), un pic correspondant à l'ion protoné à m/z : 957,5208 $[M+H]^+$. Cette valeur est en accord avec la formule brute $C_{52}H_{76}O_{16}$ (calculé 957,5211) et renfermant 15 degrés d'insaturation:

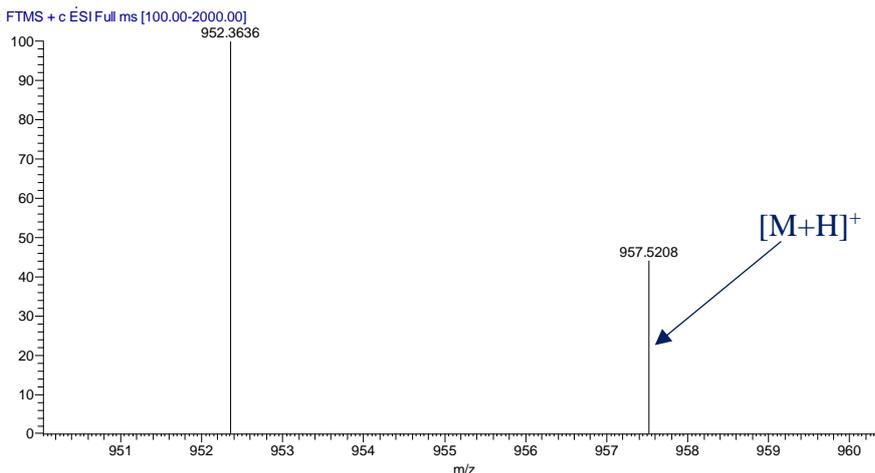


Figure 56: Spectre de masse HR-ESIMS du composé APR441

Les spectres de RMN 1D et 2D (**Figure 57**) du composé APR441 révèlent que ce composé possède le même aglycone que tous les autres composés précédemment décrits : il s'agit de l'acide machaérinique (acide $3\beta,21\beta$ -dihydroxyoléanolique) **43** (Delgado et *al.*, 1984 ; Tchoukoua et *al.*, 2017b). L'ensemble des protons et carbones de cet aglycone ont été entièrement assignés (**Tableau 16**).

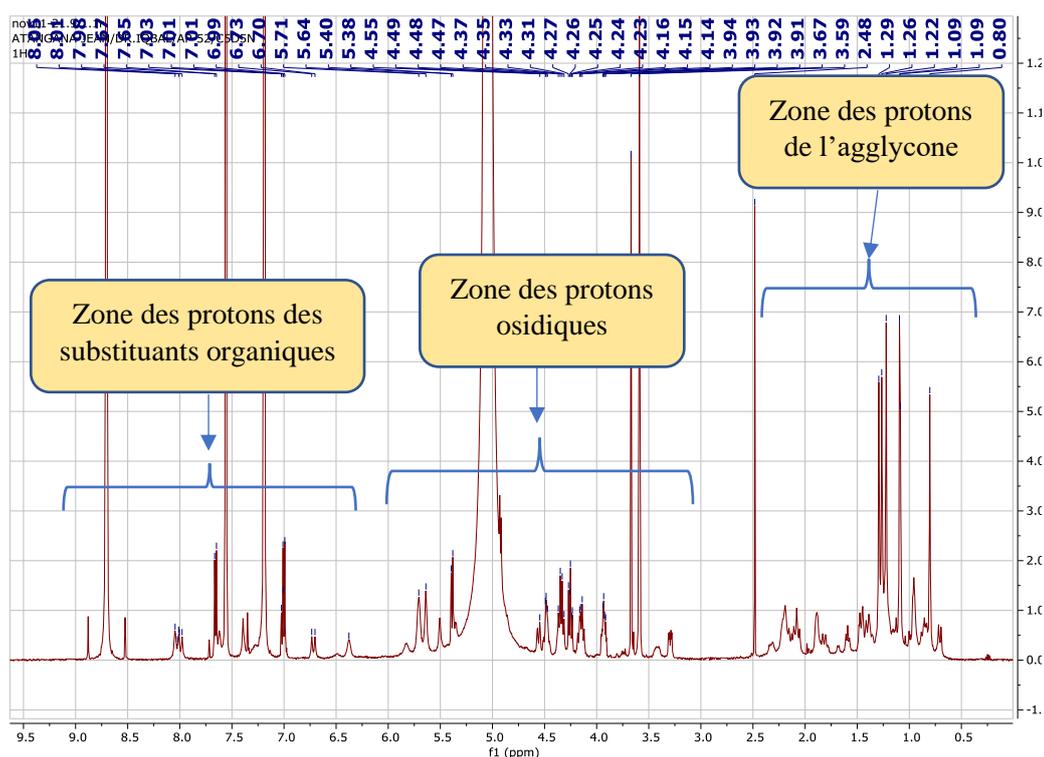


Figure 57: Spectre RMN ^1H composé APR441 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

Tableau 16: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR441 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR441 (Aglycone)							
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)	N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
1	CH ₂	37,7	1,40; 0,83	16	CH ₂	25,4	2,17; nd
2	CH ₂	27,1	1,28; 1,16	17	C	48,3	/
3	CH	88,9	3,30 (dd, J=11,7; 4,5)	18	CH	41,7	3,39
4	C	39,3	/	19	CH ₂	47,1	2,07; 1,45
5	C	55,8	0,71 (d, J=11,5)	20	C	35,8	/
6	CH ₂	18,8	1,25; 1,35	21	CH	75,8	5,37 (d, J=5,6)
7	CH ₂	33,3	1,22; 1,36	22	CH ₂	39,5	2,32; 1,40
8	C	39,8	/	23	CH ₃	28,4	1,23 (s)
9	CH	47,9	1,58	24	CH ₃	16,5	1,08 (s)
10	C	37,0	/	25	CH ₃	15,6	0,81 (s)
11	CH ₂	23,7	1,28; nd	26	CH ₃	17,3	0,96 (s)
12	CH	123,1	5,51 (brd)	27	CH ₃	26,1	1,29 (s)
13	C	143,4	/	28	C	179,5	/
14	C	42,0	/	29	CH ₃	29,0	1,09 (s)
15	CH ₂	30,0	1,37; 1,19	30	CH ₃	18,8	1,20 (s)

L'analyse approfondie des spectres HMBC, TOCSY et NOESY de APR441 associée à l'hydrolyse acide de ce dernier montre que la chaise osidique fixée en C-3 de l'aglycone de notre composé est la même que celle que comporte le composé APR431. Il s'agit du disaccharide β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (**tableau 17**).

Tableau 17: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR431 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

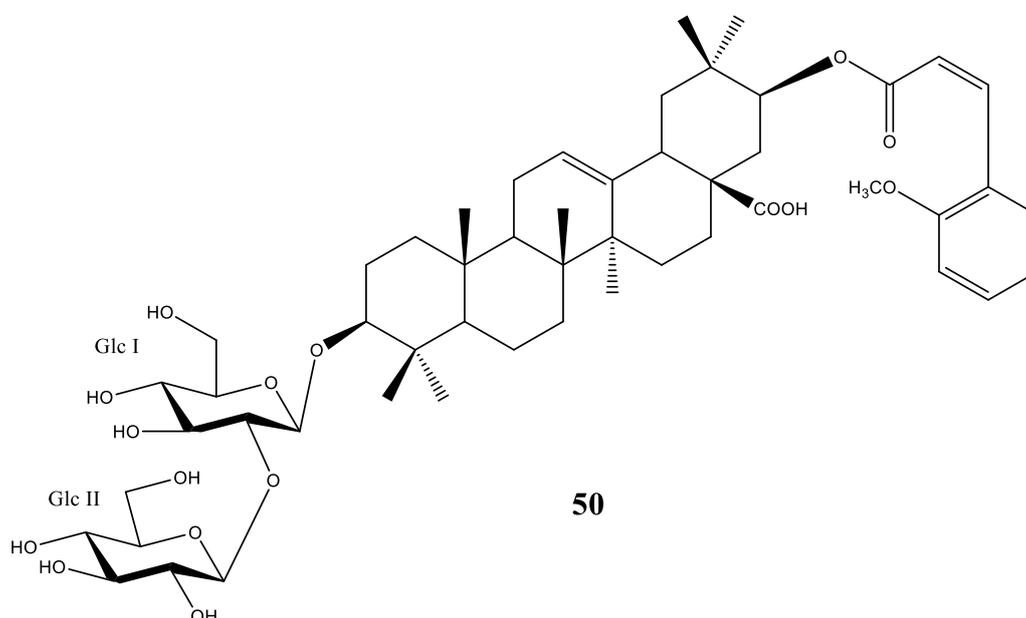
Sucres	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
Glc I		
1	105,3	4,91 (d, $J=7,5$)
2	83,5	4,25
3	78,6	3,93
4	71,3	4,15
5	78,0	4,26
6	62,7	4,54 (d, $J=11,4$); 4,32 (d, $J=3,6$)
Glc II		
1	105,4	5,39 (d, $J=7,6$)
2	76,9	4,13
3	78,1	4,22
4	71,5	4,34
5	78,0	4,25
6	62,7	4,54 (d, $J=11,4$); 4,48 (d, $J=9,0$)

Après interprétation complète de tous les spectres de RMN 1D et 2 D du composé APR441, il ressort que ce dernier comporte en son sein le même substituant organique que celui du composé APR411 : (*Z*)-2-méthoxycinnamoyle (**tableau 18**).

Tableau 18: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APR411 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR441 ((Z)-2-diméthoxycinnamoyl)			
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
α	C	167,1	/
β	CH	116,7	6,71 (d, $J=3,9$)
c	CH	144,9	8,00 (d, $J=3,9$)
1'	C	127,4	/
2'	C	162,0	/
3'	CH	113,8	6,98 (brd, $J=8,6$)
4'	CH	114,9	7,00 (m)
5'	CH	130,2	7,65 (brd, $J=8,6$)
6'	CH	133,0	7,98 (brd, $J=15,9$)
7'	CH_3	55,4	3,67 (s)

Ainsi donc, la structure complète de APR441 a été établie à l'aide de l'interprétation complète de toutes les analyses spectroscopiques en comparaison avec les données de la littérature. Ce composé a été déterminé comme étant l'acide 3-O- [β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl] -21-O- [(Z)-2-méthoxycinnamoyl] machaérinique **43**, dérivé nouveau dont le nom trivial est **Polyacosite E**.



II.1.3.6. Détermination de la structure du composé APR442

Ce composé APR442 a été obtenu sous forme de poudre amorphe blanche et est soluble dans les solvants polaires tels que la pyridine et le méthanol.

Le spectre de masse ESI à haute résolution en mode positif du composé APR442 (**Figure 58**) met en évidence le pic de l'ion protoné apparaissant à m/z : 957,5052 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{52}H_{76}O_{16}$ (calculée 957,5211). Cette masse est donc égale à celle de APR441 suggérant que les deux composés sont isomères.

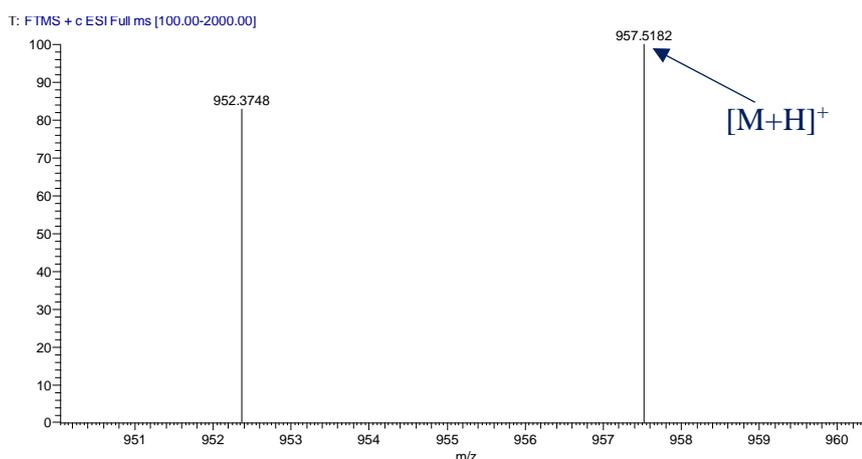


Figure 58: Spectre HR-ESIMS du composé APR442

L'analyse de tous les spectres de RMN 1D et 2D de APR442, en comparaison avec les valeurs des autres composés décrits, révèle que ce composé est une saponine triterpénique dérivée de l'acide machaérinique **43** tel que confirmé par les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones de l'aglycone du **tableau 19** ainsi que dans le spectre HSQC de ce même composé (**Figure 59**).

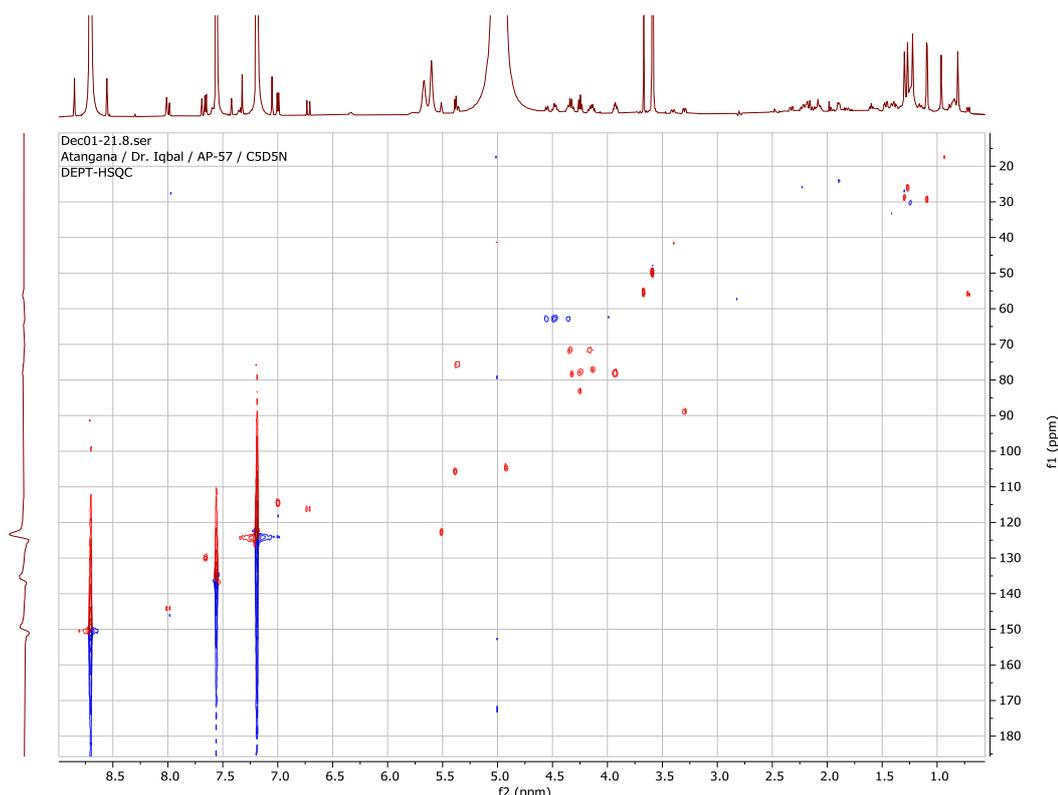


Figure 59: Spectre HSQC du composé APR442 (C₅D₅N) montrant les principales zones caractéristiques.

Tableau 19: Valeurs des déplacements chimiques (¹H et ¹³C) de l'aglycone du composé APR442 (C₅D₅N, 500 et 125 MHz).

APR442 (Aglycone)							
N ^o C	DEPT	δ _C	δ _H (mult; J)	N ^o C	DEPT	δ _C	δ _H (mult; J)
1	CH ₂	37,7	1,40; 0,83	16	CH ₂	25,4	2,17; nd
2	CH ₂	27,1	1,28; 1,16	17	C	48,3	/
3	CH	88,9	3,30 (dd, J=11,6; 4,4)	18	CH	41,7	3,39
4	C	39,3	/	19	CH ₂	47,1	2,07; 1,45
5	C	55,8	0,71 (d, J=11,6)	20	C	35,8	/
6	CH ₂	18,8	1,35; 1,25	21	CH	75,8	5,37 (d, J=4,7)
7	CH ₂	33,3	1,36; 1,22	22	CH ₂	39,5	2,32; 1,40
8	C	39,8	/	23	CH ₃	28,4	1,23 (s)
9	CH	47,9	1,58	24	CH ₃	16,5	1,08 (s)
10	C	37,0	/	25	CH ₃	15,6	0,81 (s)
11	CH ₂	23,7	1,28; nd	26	CH ₃	17,3	0,96 (s)
12	CH	123,1	5,51 (brd)	27	CH ₃	26,1	1,29 (s)
13	C	143,4	/	28	C	179,5	/
14	C	42,0	/	29	CH ₃	29,0	1,09 (s)
15	CH ₂	30,0	1,37; 1,19	30	CH ₃	18,8	1,20 (s)

L'interprétation approfondie des spectres HMBC, TOCSY et NOESY de ce composé, associée à l'hydrolyse acide effectuée sur ce dernier, montrent que le composé APR442 possède le même disaccharide (**Figure 27**) comme chaîne osidique en C-3 de l'aglycone que celui retrouvé dans le composé APR441 : (β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside) et dont les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont contenues dans le **tableau 20**.

Tableau 20: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APR442 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

Sucres	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
Glc I		
1	104,9	4,93 (d, $J=7,6$)
2	83,2	4,24
3	78,6	3,92
4	71,4	4,16
5	77,2	4,25
6	62,7	4,55 (d, $J=11,3$); 4,47 (d, $J=2,9$)
Glc II		
1	105,7	5,38 (d, $J=7,4$)
2	77,1	4,13
3	78,0	4,32
4	71,6	4,33
5	78,1	4,24
6	62,7	4,54 (d, $J=11,0$); 4,47 (d, $J=2,9$)

L'analyse des différents spectres de RMN 1D et 2D (**Figure 60**) permet de constater que le composé APR442 possède en son sein une unité cinnamoyle tel qu'observé dans toutes les saponines précédemment décrites. La présence d'un groupement méthoxy (OCH_3) fixé sur cette unité cinnamoyle est mise en évidence à l'aide des spectres de RMN ^1H et ^{13}C . D'autre part, la configuration (*E*) de l'unité cinnamoyle s'est faite principalement à l'aide des constantes de couplage élevées ($J=15,8 \text{ Hz}$) des protons méthyléniques H_β et H_γ du composé APR442. Le substituant organique fixé en C-21 du composé APR442 dont les valeurs de

déplacements chimiques des protons et carbones sont présentés dans le **tableau 21**, s'est donc révélé être identique à celui du composé APR421 ((*E*)-4-méthoxycinnamoyle **47**).

Tableau 21: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'unité cinnamoyle du composé APR442 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

APR441 ((<i>E</i>)-2-diméthoxycinnamoyle)			
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; <i>J</i>)
α	C	167,1	/
β	CH	116,3	6,72 (d, <i>J</i> =15,8)
c	CH	144,4	8,00 (d, <i>J</i> =15,8)
1'	C	127,8	/
2'	C	130,3	7,65 (d, <i>J</i> =8,7)
3'	CH	114,5	7,00 (d, <i>J</i> =8,7)
4'	CH	162,0	/
5'	CH	114,5	7,00 (d, <i>J</i> =8,7)
6'	CH	130,3	7,65 (d, <i>J</i> =8,7)
7'	CH ₃	55,5	3,66 (s)

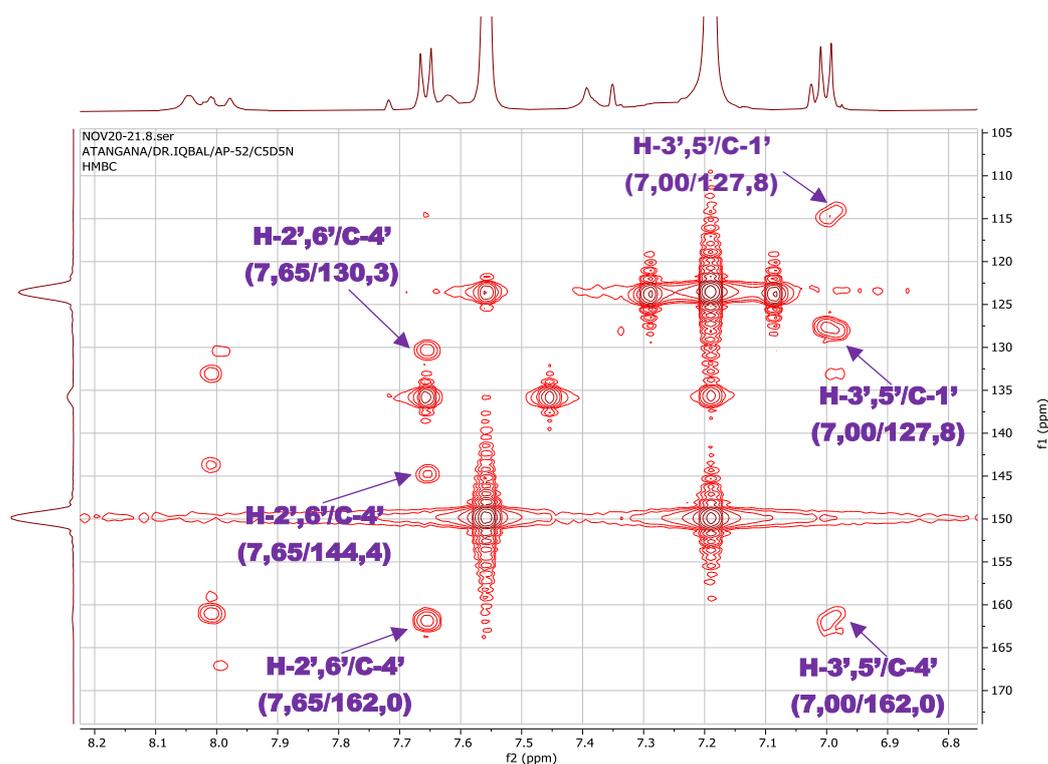
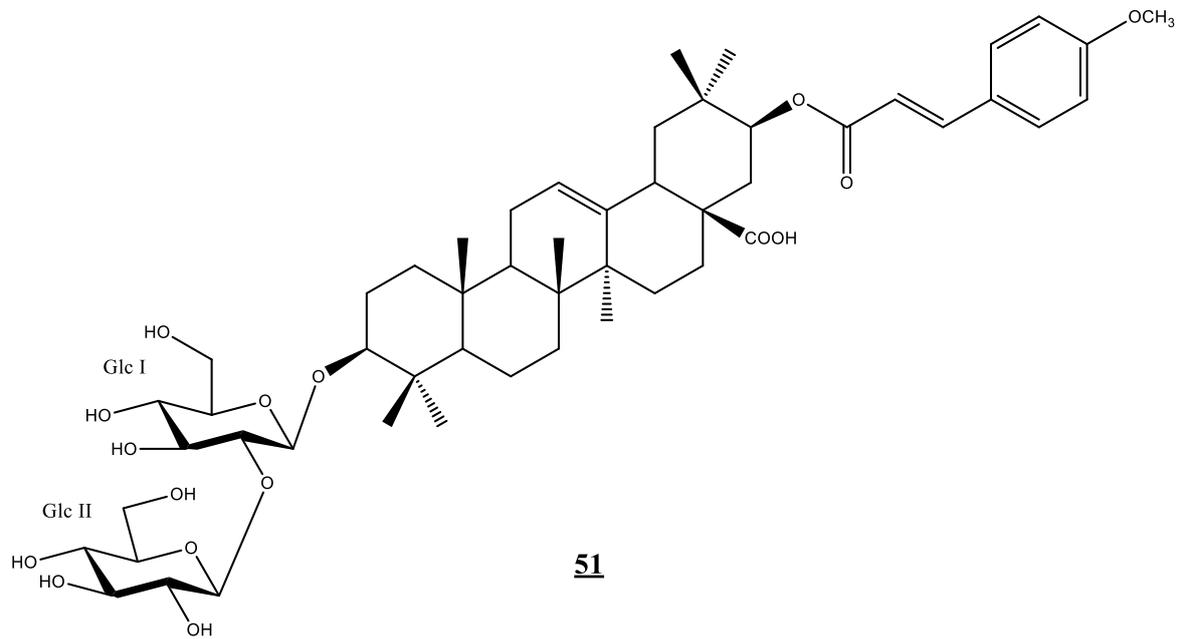


Figure 60: Spectre HMBC élargi du composé APR442 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) montrant les points de jonction de l'unité cinnamoyle.

La structure complète du composé APR442 **51** a donc été établie comme étant : 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl]-21-*O*-[(*E*)-4-méthoxycinnamoyle]

machaérinique, dérivé naturel isolé pour la première fois auquel nous avons donné le nom trivial de **Polyacoside F**.



II.1.3.7. Identification du composé APTA1

Le composé APTA1 soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane, a été obtenu sous forme de poudre blanche.

L'analyse du spectre de masse ESI à haute résolution (**Figure 61**) du composé APTA1 en mode négatif, permet d'observer un pic correspondant au pic de l'ion protoné apparaissant à m/z : 793,6849 $[M-H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{42}H_{65}O_{14}$ (calculée 793,4374) et renfermant 10 degrés d'insaturation.

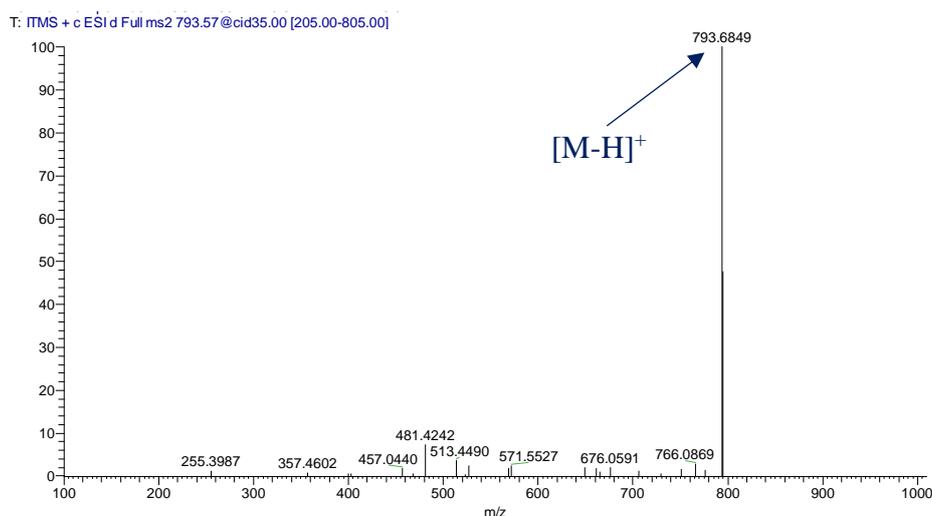
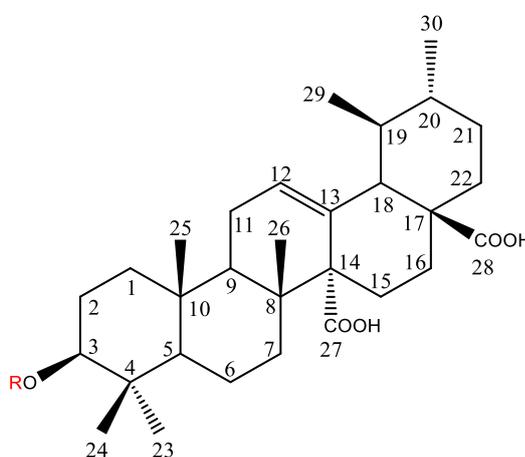


Figure 61: Spectre de masse ESI-HR du composé APTA1

Les spectres de RMN 1D et 2D du composé APTA1 permettent de distinguer deux (02) principales zones caractéristiques des saponines triterpéniques. L'analyse approfondie des spectres de RMN 1D et 2D a permis d'établir la structure de l'aglycone du composé APTA1 identifiée comme étant l'acide quinovique 52 (Fang et *al.*, 1995).



52

Sur les spectres de RMN ^1H (**Figure 62**) et HSQC (**Figure 63**), on observe clairement la présence de 06 méthyles angulaires résonnant à $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 0,90/28,9 ; 0,97/17,1 ; 0,77/17,7 ; 0,92/21,6 ; 0,89/18,5 et 0,88/21,7 ppm attribuables aux méthyles 23, 24, 25, 26, 29 et 30 respectivement. On observe également la présence des pics de protons et carbones oléfiniques à δ_{H} 5,60 (d ; $J=5,0$ Hz) ppm et δ_{C} 129,8 ; 134,9 correspondants au proton H-12 et aux carbones C-12, C-13 respectivement. De plus, deux (02) valeurs de protons et carbones méthyniques, dont l'un est oxygéné, sont visibles à $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,05 (dd ; $J=11,5$; 4,7 Hz)/90,6 ; 2,26 (t ; $J=6,4$ Hz)/55,9 ppm et attribuables aux protons et carbones 3 et 18 respectivement. L'analyse minutieuse de tous ces spectres, permet également de ressortir la présence de deux (02) signaux de carbonyles d'acide carboxylique à δ_{C} 177,6 et 179,6 ppm. Toutes ces valeurs sont caractéristiques d'un triterpène de type Ursane. La comparaison de l'ensemble de ces données spectrales avec celles de la littérature, ont permis de confirmer et d'identifier la nature de l'aglycone du composé APTA1, comme étant l'acide quinovique (Fang *et al.*, 1995).

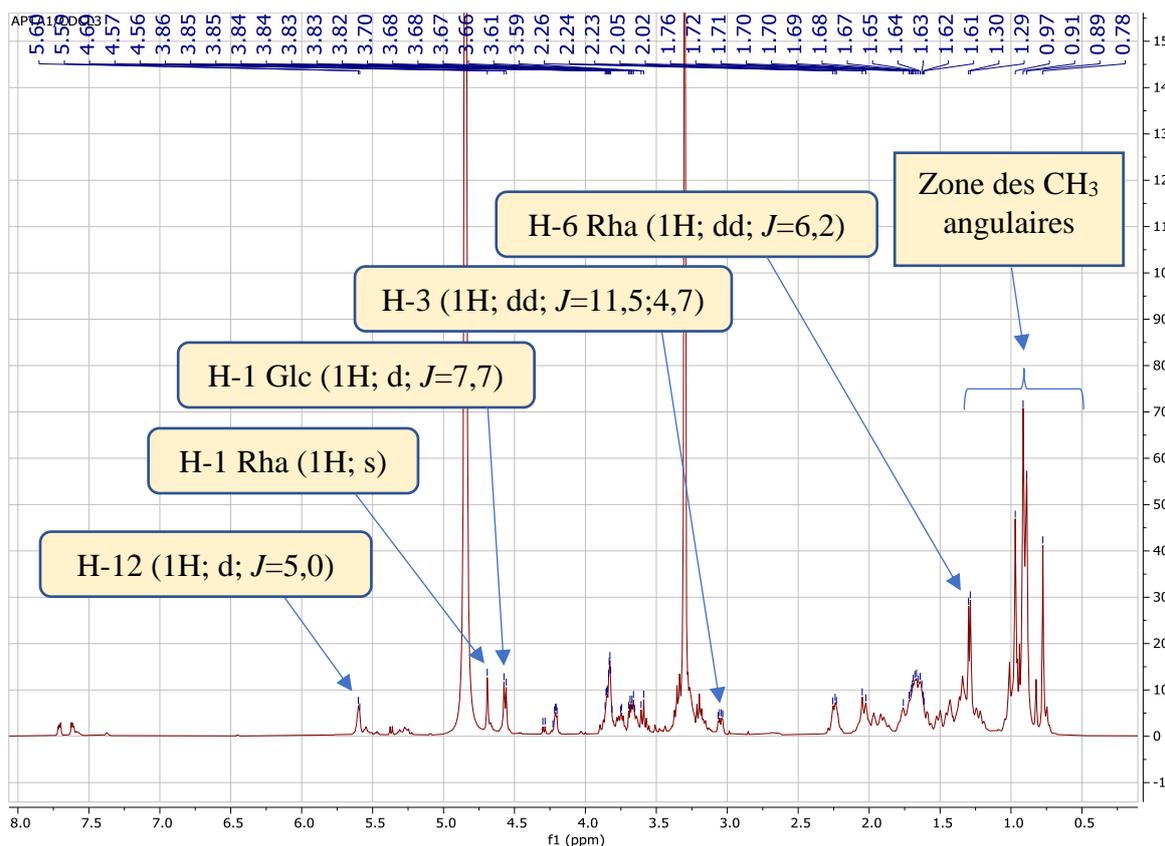


Figure 62: Spectre de RMN ^1H du composé APTA1 (CDCl_3 , 500 MHz)

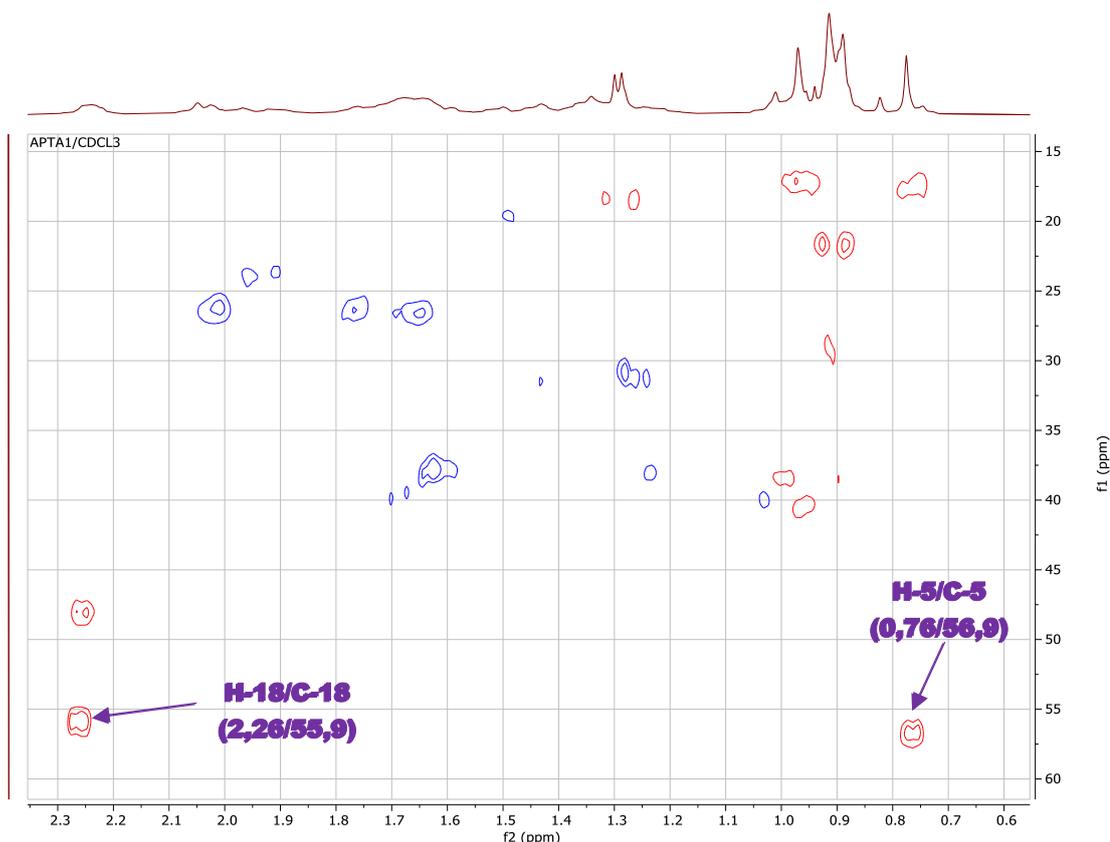


Figure 63: Spectre HSQC (zone de l'aglycone) du composé APTA1 (CDCl_3)

Les déplacements chimiques du carbone oxygéné C-3 (δ_C 90,6 ppm) et son proton à δ_H 3,05 ppm observés dans le **tableau 22** permettent de dire que le composé APTA1 est une saponine dérivée de l'acide quinovique ayant une chaîne osidique en cette position.

Tableau 22: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APTA1 (CDCl_3 , 500 et 125 MHz).

APTA1 (Aglycone)							
N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)	N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)
1	CH ₂	39,9	1,70; 1,03	16	CH ₂	26,2	2,01; 1,76
2	CH ₂	26,4	1,76; nd	17	C	48,3	/
3	CH	90,6	3,05 (dd, J=11,5; 4,7)	18	CH	55,9	2,26
4	C	39,3	/	19	CH	38,5	0,99
5	C	56,9	0,76	20	CH	40,6	0,96
6	CH ₂	19,5	1,49; nd	21	CH ₂	30,6	1,28 ; nd
7	CH ₂	39,3	1,67; nd	22	CH ₂	37,9	1,64 ; 1,23
8	C	40,0	/	23	CH ₃	28,9	0,90 (s)
9	CH	47,9	2,25	24	CH ₃	17,1	0,97 (s)
10	C	37,7	/	25	CH ₃	17,7	0,77 (s)
11	CH ₂	24,0	1,95; nd	26	CH ₃	21,6	0,92 (s)
12	CH	129,8	5,60 (d, J=5,0)	27	C	177,6	/
13	C	134,9	/	28	C	179,8	/
14	C	57,0	/	29	CH ₃	18,5	0,89 (s)
15	CH ₂	26,7	1,69; 1,65	30	CH ₃	21,7	0,88 (s)

L'interprétation complète de tous les spectres de RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (HSQC, NOESY et HMBC) a permis de mettre en évidence la présence de deux (02) sucres présents dans le composé APTA1, dont les protons et carbones anomériques résonnent à $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 4,57 (d ; $J=7,7$) / 105,7 et 4,69 (s) / 104,1 ppm tel qu'observé sur la **Figure 64**.

L'analyse rigoureuse de tous les spectres, a permis d'identifier la nature de ces sucres comme étant : α -L-Rhamnopyranosyl (Rha), et β -D-Glucopyranosyl (Glc).

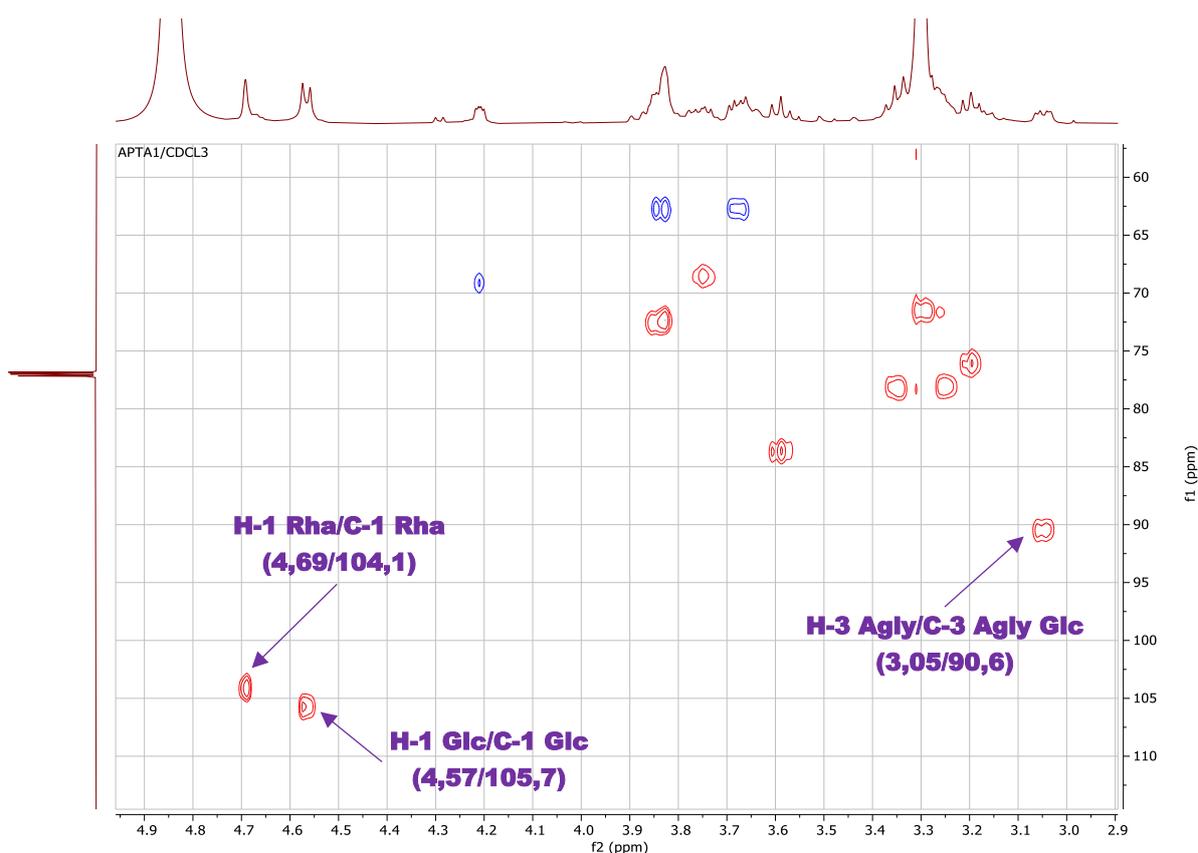


Figure 64: Spectre HSQC du composé APTA1 (CDCl_3) montrant les anomères.

L'analyse approfondie des spectres de RMN 1D (^1H) et 2D (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC et HMBC) en comparaison avec les valeurs de la littérature, a permis d'assigner complètement tous les protons et carbones des sucres du composé APTA1 dont les valeurs sont contenues dans le **tableau 23**.

Tableau 23: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) des sucres du composé APTA1 (CDCl_3 , 500 et 125 MHz).

Sucres	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
Rha		
1	104,1	4,69 (s)
2	72,5	3,84
3	71,6	3,26
4	83,8	4,16
5	68,5	3,75
6	18,4	1,29 (d, $J=6,2$)
Glc		
1	105,7	4,57 (d, $J=7,7$)
2	76,0	3,20
3	78,1	3,35
4	71,4	3,29
5	78,0	3,25
6	62,7	3,83; 3,68

Le séquençage des sucres s'est fait à l'aide du spectre HMBC et confirmé par le spectre NOESY. Ainsi, le disaccharide fixé en C-3 de l'aglycone a donc été identifié comme étant : 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranoside (**Figure 65**).

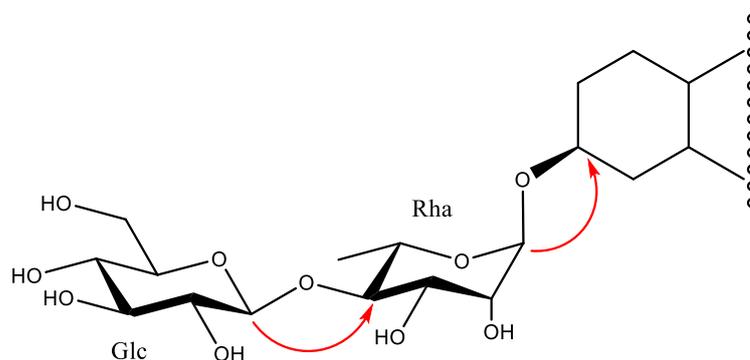


Figure 65: Corrélations HMBC (partie des sucres) du composé APTA1 montrant les jonctions des unités osidiques.

Nous observons notamment dans le spectre HMBC (**Figure 66**), une corrélation entre le proton H-1 du rhamnose apparaissant à δ_H 4,69 ppm et le carbone N°3 de l'aglycone de APTA1 à 90,6 ppm montrant que le sucre directement lié à l'aglycone est le rhamnose.

Les corrélations observées entre H-1 Glc à δ_H 4,30 ppm et C-4 Rha à δ_C 83,8 ppm toujours dans le spectre HMBC, ont permis d'établir l'agencement des deux sucres, le Glucose étant fixé au carbone C-4 du Rhamnose.

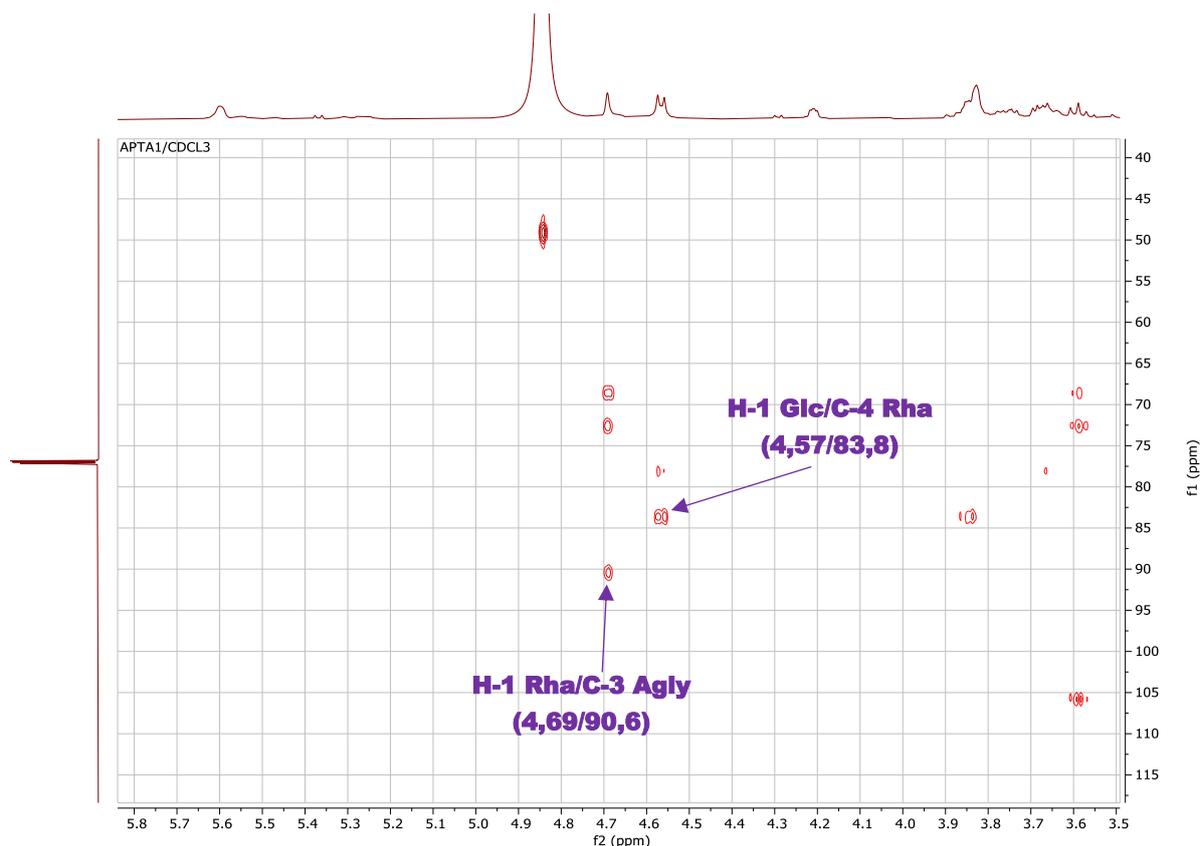
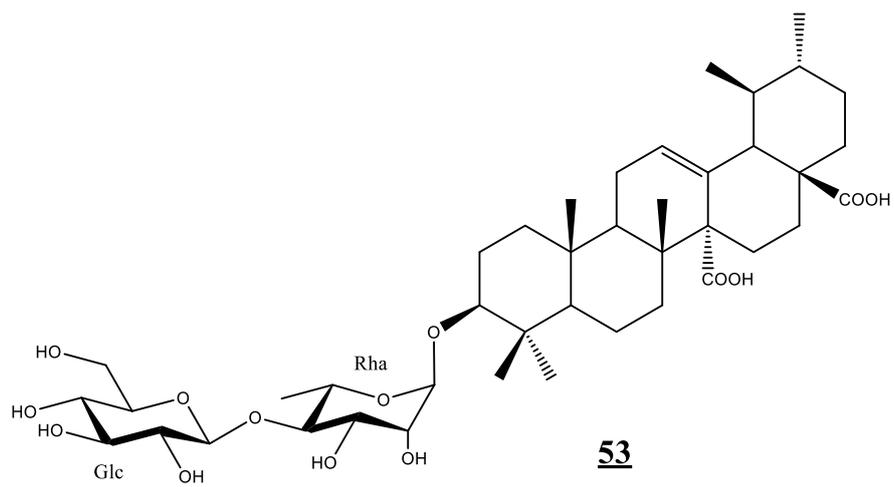


Figure 66: Spectre HMBC du composé APTA1 ($CDCl_3$) montrant les points de jonction des sucres.

L'ensemble de ces données en comparaison avec celles présentes dans la littérature a permis d'élucider la structure complète du composé APTA1 **53** et de l'identifier comme étant la Rubelloside A, composé précédemment isolé de *Adina rubella* (Fang et al., 1995) et obtenu du genre *Acacia* pour la première fois.



II.1.3.8. Identification du composé CMT2

Le composé CMT2 isolé des écorces du tronc de *Chytranthus macrobotrys*, a été obtenu sous forme de poudre amorphe blanche et est soluble dans les solvants polaires tels que le méthanol et la pyridine.

Sur son spectre de masse à haute résolution obtenu par ionisation en mode positif (Figure 67), on observe la présence d'un pic correspondant à celui de l'ion protoné apparaissant à m/z : 883,5030 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{46}H_{74}O_{16}$ (calculée 883,5055) et renfermant 10 degrés d'insaturation.

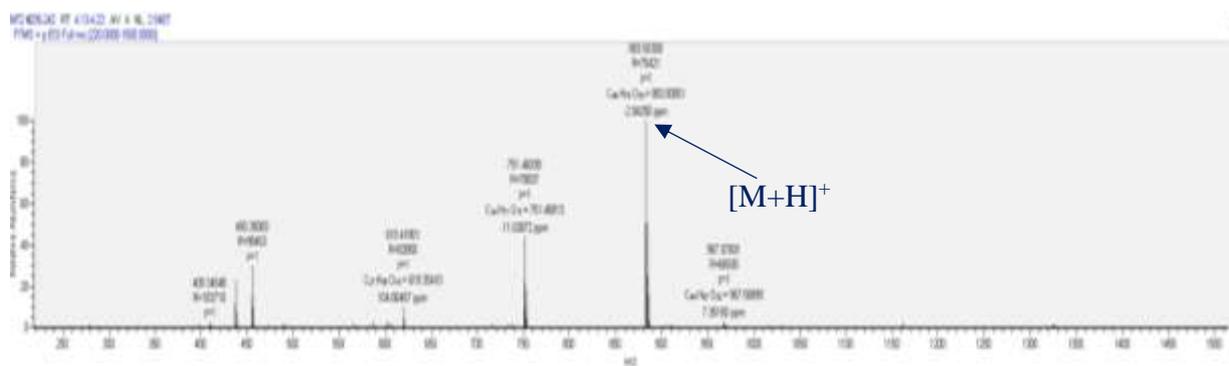
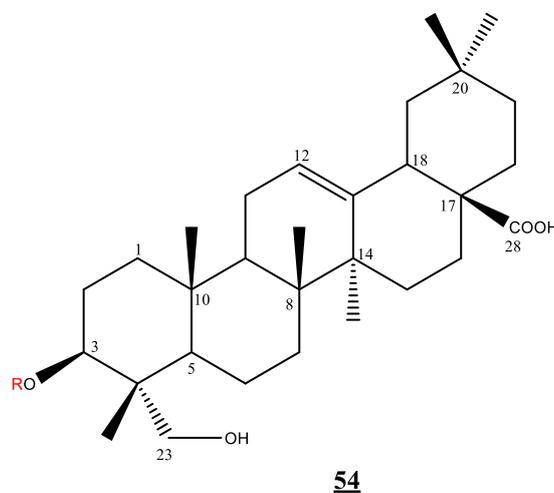


Figure 67: Spectre de masse HR-ESIMS du composé CMT2

Les spectres de RMN 1D (1H et ^{13}C) du composé CMT2 présente trois principales zones caractéristiques des saponines triterpéniques. L'aglycone de ce composé CMT2 a été identifié comme étant l'Hédéragénine (acide 3β -3,23-dihydroxy-olean-12-en-28-oïque) **54** (Rezgui et *al.*, 2016).



Sur le spectre de RMN ^1H notamment (**Figure 68**), on observe la présence de six (06) signaux correspondants aux signaux des méthyles angulaires d'un triterpène et résonnant à δ_{H} 0,90 ; 0,92 ; 0,97 ; 1,01 ; 1,12 et 1,21 ppm et attribuables aux protons des méthyles (CH_3) 24, 25, 26, 27, 29 et 30 respectivement. On observe également la présence d'un pic de proton oléfinique résonnant à δ_{H} 5,44 ppm attribuable au proton en position 12 du triterpène ainsi qu'un proton méthynique oxygéné apparaissant à δ_{H} 4,27 ppm correspondant au proton 3. De plus, le pic d'un proton de méthylène oxygéné terminal, attribuable au CH_2 N°23 est également observé à δ_{H} 4,27 ppm.

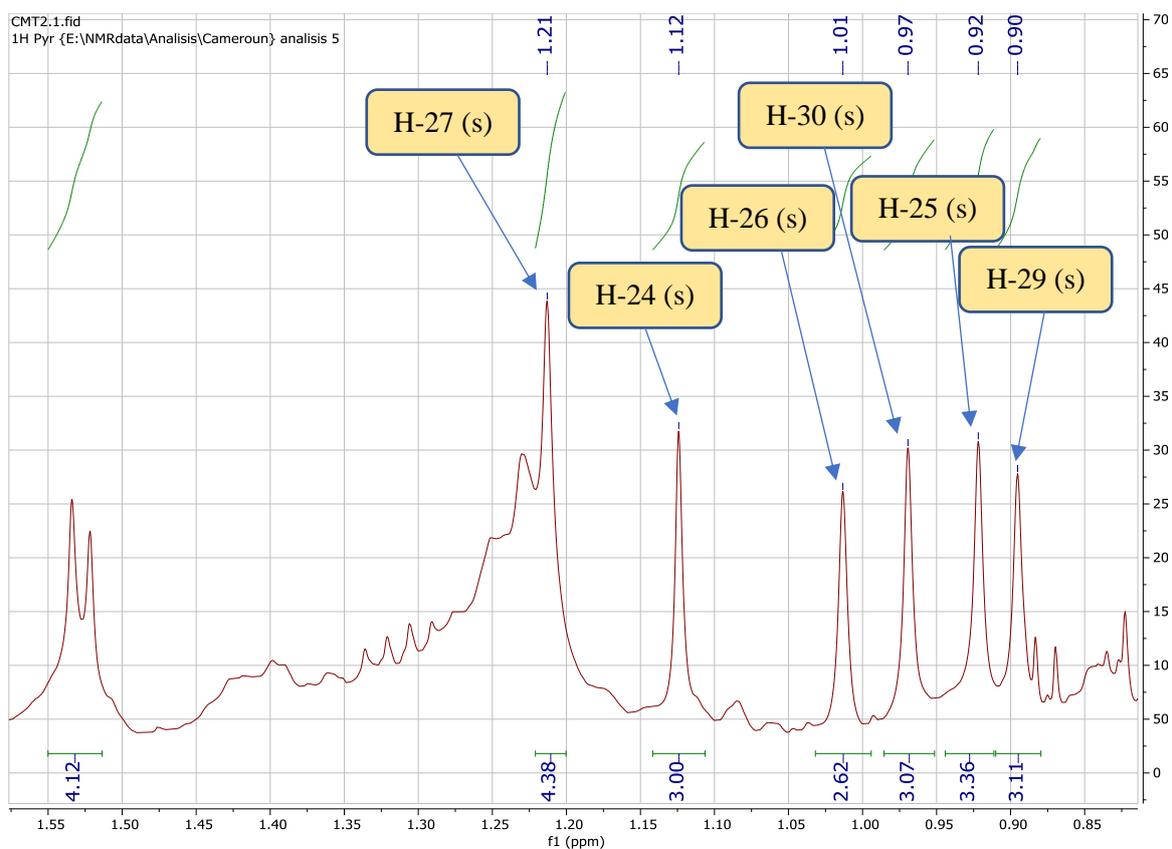


Figure 68: Spectre de RMN ^1H élargi du composé CMT2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les protons des méthyles angulaires.

Tous ces signaux caractéristiques sont également observables sur les spectres carbonés (^{13}C , DEPT 135 et DEPT 90) (**Figures 69** et **70**).

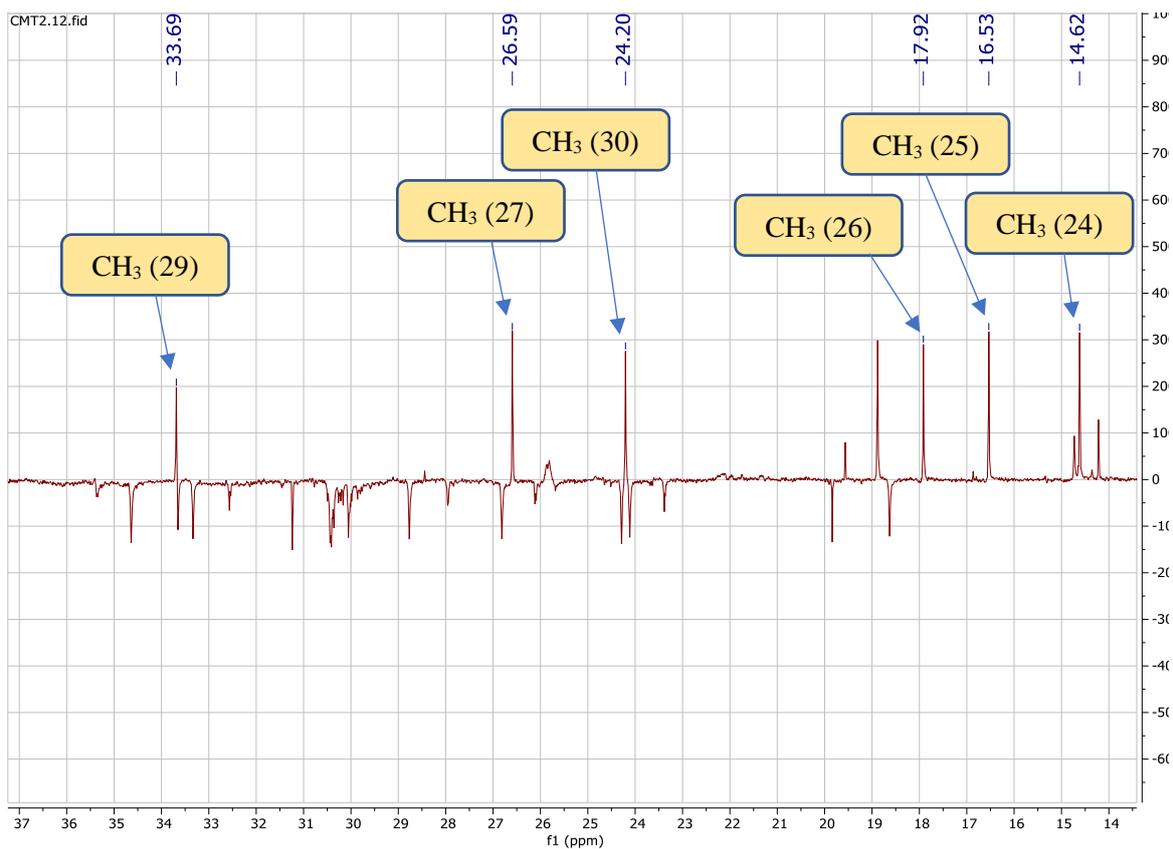


Figure 69: Spectre RMN ^{13}C (élargi) du composé CMT2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) montrant les signaux de méthyles angulaires.

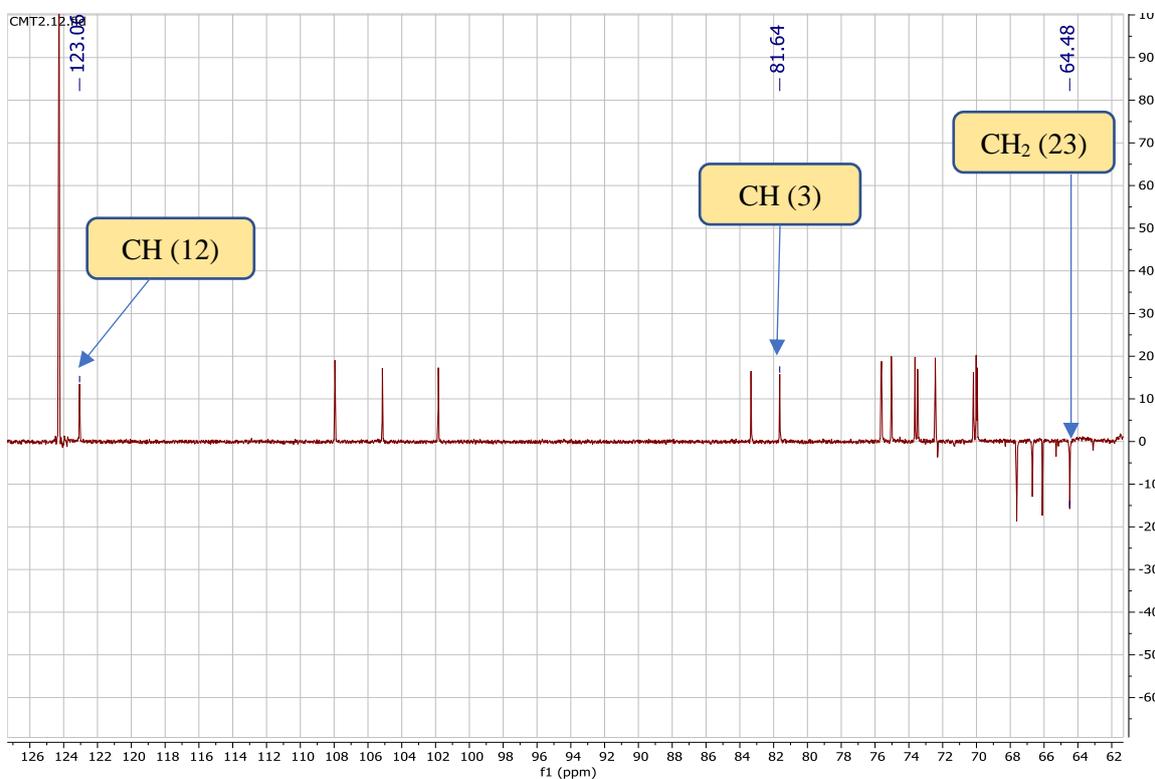


Figure 70: Spectre RMN ^{13}C élargi du composé CMT2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) montrant les signaux de carbones caractéristiques.

Après interprétation de toutes les données obtenues après analyse complète de tous les spectres de RMN 1D et 2D, et en comparaison avec les données de la littérature, tous les protons et carbones de l'aglycone de notre saponine triterpénique CMT2 ont été complètement assignés (**Tableau 24**).

Tableau 24: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMT2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

CMT2 (Aglycone)							
N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)	N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)
1	CH ₂	39,4	1,05; nd	16	CH ₂	24,1	2,05; 1,91
2	CH ₂	26,1	1,74; nd	17	C	47,1	/
3	CH	81,6	4,27 (brd)	18	CH	42,4	3,26 (dd; J=13,8; 4,6)
4	C	44,1	/	19	CH ₂	46,8	1,75; 1,24
5	C	48,1	1,78 (d ; J=11,3)	20	C	31,1	/
6	CH ₂	18,6	1,36; 1,76	21	CH ₂	34,6	1,65; 1,26
7	CH ₂	33,3	1,63; 1,26	22	CH ₂	32,5	1,22 ; nd
8	C	39,6	/	23	CH ₂	64,4	3,92 (d ; J=10,6)
9	CH	48,6	1,76	24	CH ₃	14,6	1,12 (s)
10	C	37,3	/	25	CH ₃	16,5	0,92 (s)
11	CH ₂	23,3	1,23; nd	26	CH ₃	17,9	1,01 (s)
12	CH	123,0	5,44 (brt)	27	CH ₃	26,5	1,21 (s)
13	C	145,1	/	28	C	180,7	/
14	C	42,6	/	29	CH ₃	33,6	0,90 (s)
15	CH ₂	28,7	2,12; 1,10	30	CH ₃	24,2	0,97 (s)

Le déblindage du carbone oxygéné C-3 dont les déplacements chimiques du carbone et du proton résonnent respectivement à δ_C 81,6 ppm et δ_H 4,27 ppm, permet de dire que le composé CMT2 est une saponine monodesmosique contenant une chaîne osidique en cette position.

L'analyse du spectre RMN ^1H du composé CMT2 révèle la présence de quatre (04) signaux apparaissant à δ_H 5,04 (1H ; d ; J=7,6) ; 5,29 (1H ; d ; J=7,3) et 6,36 ppm (1H ; d ; J=1,5) correspondants aux signaux des protons anomériques des sucres. Ces protons anomériques corrélaient parfaitement avec leurs carbones dans le spectre HSQC (**Figure 71**) ; tandis que le spectre RMN ^{13}C met également en évidence les signaux desdits carbones anomériques à δ_C

105,1 ; 107,9 ; et 101,8 ppm respectivement. Tout ceci permet de dire que APR411 contient dans sa structure trois (03) sucres.

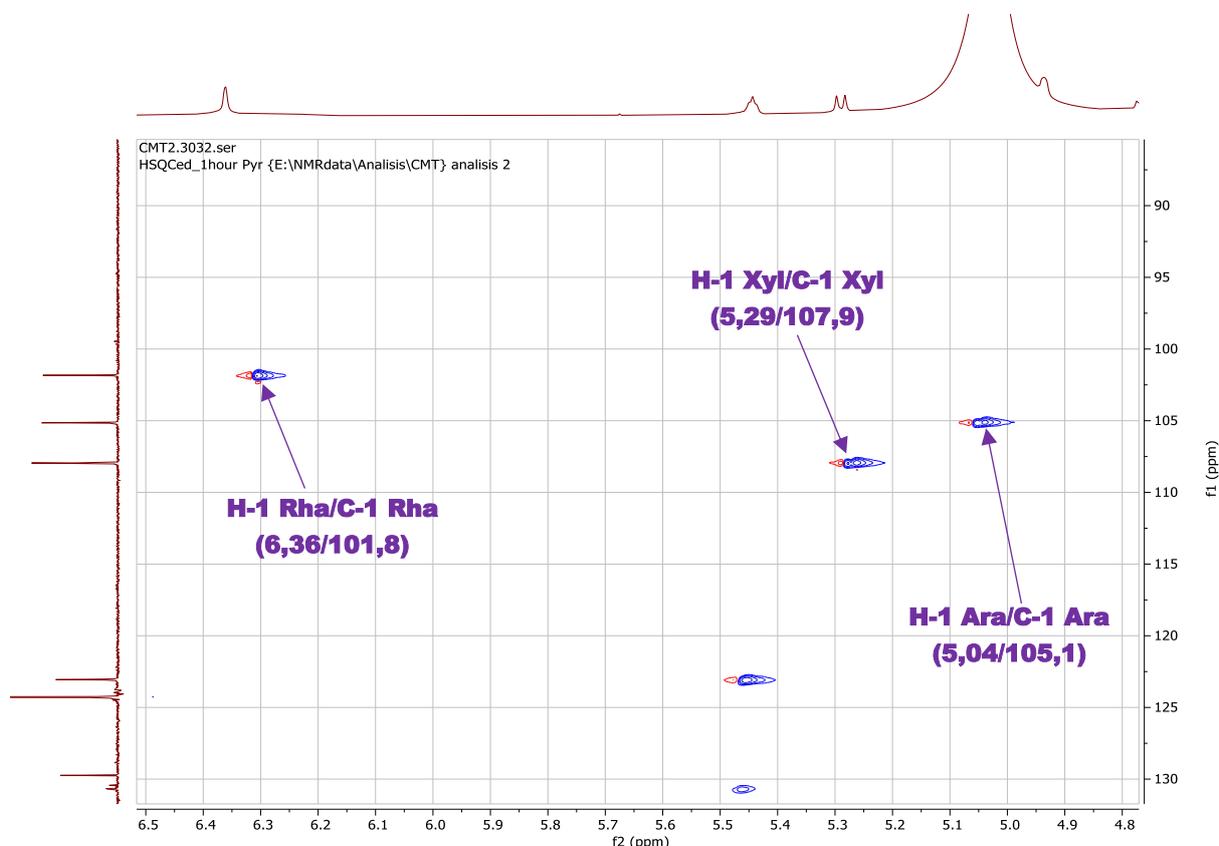
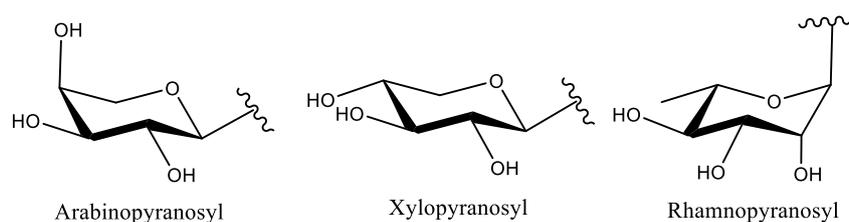


Figure 71: Spectre HSQC du composé CMT2 (C_5D_5N) montrant les anomères.

La nature de ces sucres a été déterminée à l'aide de l'analyse complète de tous les spectres RMN 1D et 2D couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESIMS) et en comparaison avec les données de la littérature. Cela a été confirmée par l'hydrolyse acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les échantillons authentiques du laboratoire. Les différentes configurations de ces sucres ont été déterminées à partir des valeurs de constante de couplage de leurs protons anomériques.

Ainsi, les sucres présents dans le composé CMT2 ont été déterminés comme étant : α -L-arabinopyranosyl, β -D-xylopyranosyl et α -L-rhamnopyranosyl 55.



L'enchaînement des sucres s'est fait à l'aide du spectre HMBC (**Figure 73**) et confirmé par le spectre NOESY. Le trisaccharide (**Figure 72**) fixé en C-3 de l'aglycone a donc été identifié comme étant : 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside.

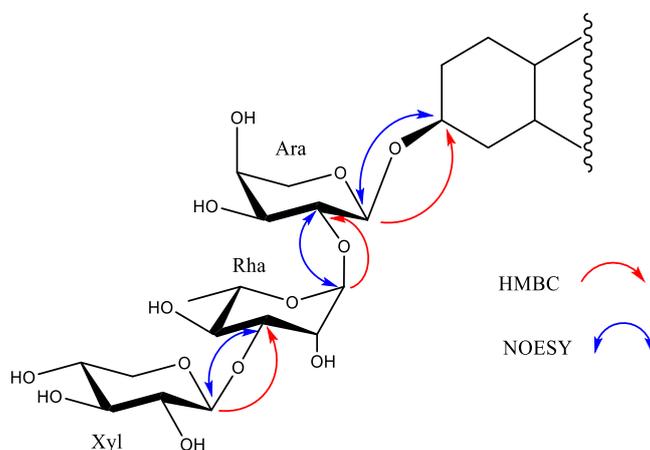


Figure 72: Corrélations HMBC et NOESY du composé CMT2 montrant les jonctions des unités osidiques.

En effet, nous observons notamment une corrélation entre le proton H-1 de l'arabinose apparaissant à δ_H 5,04 ppm et le carbone C-3 de l'aglycone de CMT2. Les corrélations observées à δ_H 6,30 / δ_C 75,6 (H-1 Rha / C-2 Ara) et δ_H 5,29 / δ_C 83,3 (H-1 Xyl / C-3 Rha) dans le spectre HMBC, ont permis d'établir l'enchaînement des trois sucres dont les valeurs des protons et carbones sont données dans le **tableau 25**.

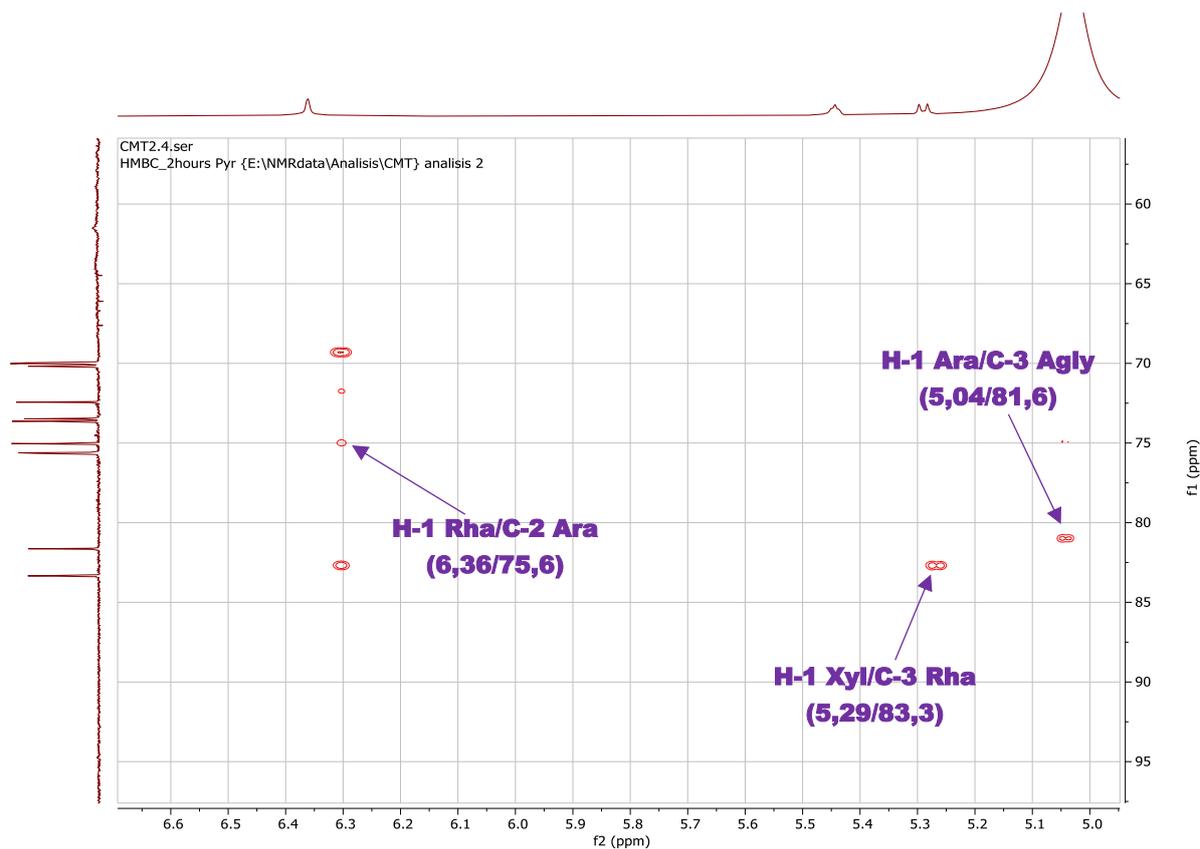
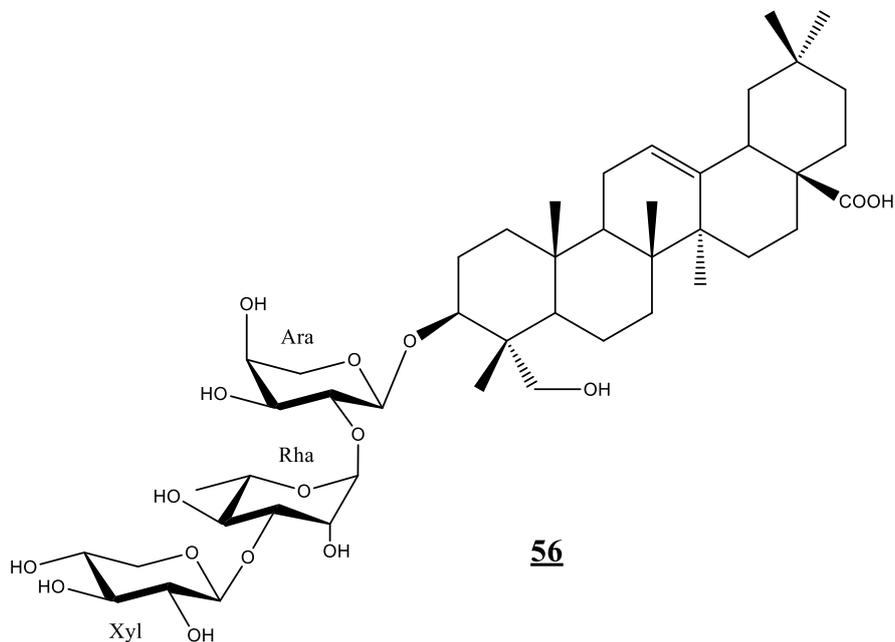


Figure 73: Spectre HMBC élargi du composé CMT2 (C_5D_5N) montrant les points de jonction des sucres

Tableau 25: Valeurs des déplacements chimiques (1H et ^{13}C) des sucres de CMT2 (C_5D_5N , 500 et 125 MHz).

Sucres	δ_C	δ_H	Sucres	δ_C	δ_H
Ara			Xyl		
1	105,1	5,04 (d, $J=7,6$)	1	107,9	5,29 (d, $J=7,3$)
2	75,6	4,57	2	75,6	4,01
3	75,0	3,97	3		4,12
4	70,1	4,11	4	69,9	4,20
5	64,4	4,28; 3,91	5	66,7	4,22; 3,63
Rha					
1	101,8	6,30 (d, $J=1,5$)			
2	72,4	4,93			
3	83,3	4,75			
4	73,6	4,51			
5	70,0	4,71			
6	18,8	1,53 ; nd			

L'ensemble de ces données en comparaison avec celles présentes dans la littérature a permis d'élucider la structure complète de CMT2 et de l'identifier comme étant l'Elatoside E **56** (Encarnacion et *al.*, 1981).



II.1.3.9. Identification du composé CMT1

Le composé CMT1 se présentant sous forme de poudre amorphe blanche, est soluble dans les solvants polaires tels que le méthanol et la pyridine.

Son spectre de masse à haute résolution obtenu par ionisation en mode positif (**Figure 74**), révèle la présence d'un pic correspondant à celui de l'ion protoné apparaissant à m/z : 1045,5573 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{52}H_{84}O_{21}$ (calculée 1045,5583) et renfermant 11 degrés d'insaturation.

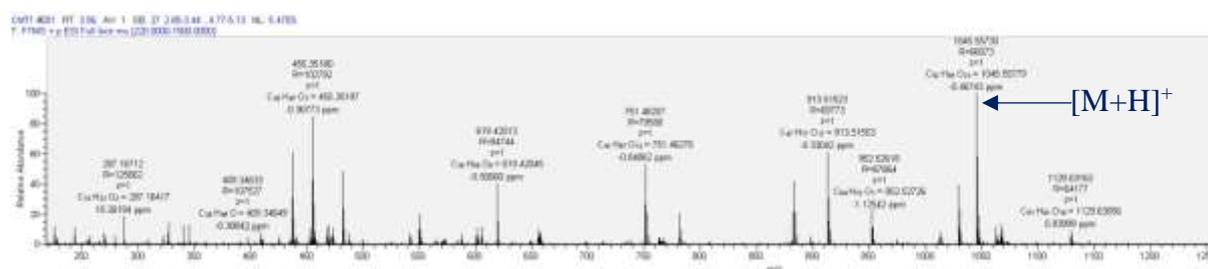


Figure 74: Spectre de masse HR-ESIMS du composé CMT1

L'analyse rigoureuse de tous les spectres du composé CMT1 parmi lesquels le spectre de RMN 1H (**Figure 75**), tel qu'observé à travers les valeurs des protons et carbones du **tableau 26**, permet de remarquer que l'aglycone de cette molécule est identique à celui de CMT2 précédemment décrit notamment l'Hédéragénine **54**.

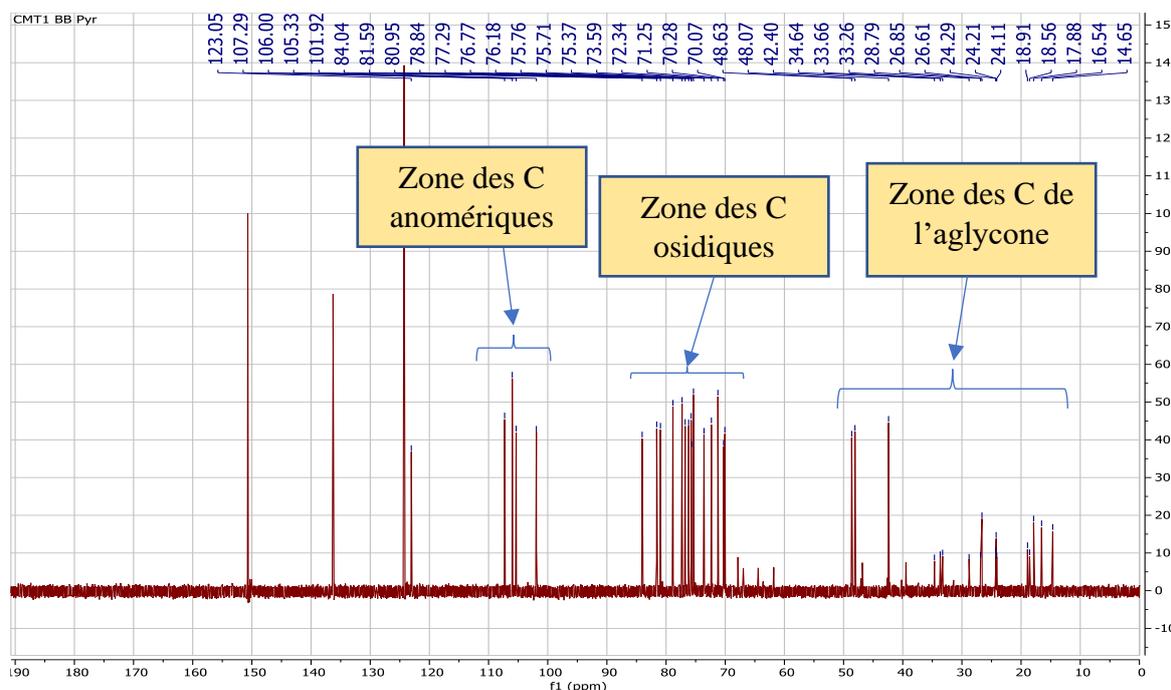


Figure 75: Spectre de RMN ^{13}C du composé CMT1 (C_5D_5N , 125 MHz) montrant les zones de caractéristiques.

Tableau 26: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMT1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

CMT1 (Aglycone)							
N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)	N°C	DEPT	δ_C	δ_H (mult; J)
1	CH ₂	39,3	2,07; 1,42	16	CH ₂	24,4	2,02; 1,87
2	CH ₂	26,7	1,74; 1,23	17	C	47,0	/
3	CH	81,6	4,23 (brd)	18	CH	42,5	3.25 (dd; J=13,7; 4,5)
4	C	44,1	/	19	CH ₂	46,8	1,29; 1,70
5	C	48,1	1,78 (d ; J=11,3)	20	C	31,3	/
6	CH ₂	18,5	1,76; 1,33	21	CH ₂	34,7	1,86 ; 1,54
7	CH ₂	33,0	1,63; 1,12	22	CH ₂	32,9	1,40 ; nd
8	C	39,9	/	23	CH ₂	64,2	3,91 (d ; J=10,6)
9	CH	48,5	2,01	24	CH ₃	14,5	1,12 (s)
10	C	37,3	/	25	CH ₃	16,5	0,93 (s)
11	CH ₂	24,0	1,20; 1,18	26	CH ₃	18,0	0,99 (s)
12	CH	123,0	5,45 (brt)	27	CH ₃	26,4	1,22 (s)
13	C	145,2	/	28	C	180,5	/
14	C	42,6	/	29	CH ₃	33,6	0,90 (s)
15	CH ₂	28,7	2,32; 1,10	30	CH ₃	24,2	0,98 (s)

L'interprétation minutieuse de tous les spectres de RMN 1D et 2D en comparaison avec les données de la littérature, révèle que le composé CMT1 possède les mêmes sucres que ceux de CMT2, avec un sucre en plus (une unité de glucose) apparaissant dans la structure de CMT1 et absent dans celle de CMT2 tel qu'observé sur les **Figures 67** et **74**. Le tétrasaccharide fixé en C-3 de l'aglycone a donc été identifié comme étant : 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside.

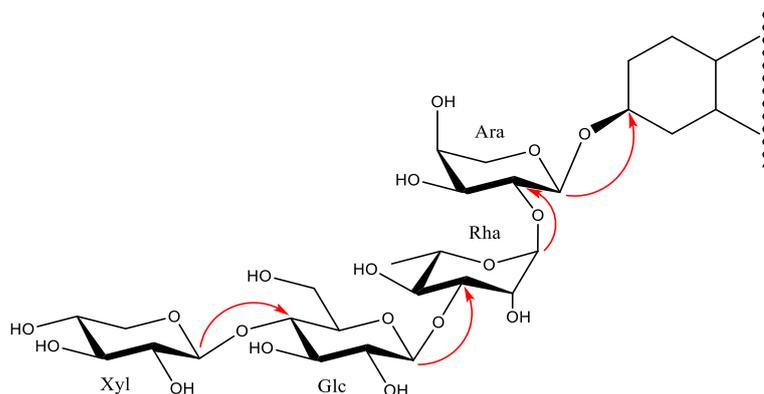


Figure 76: Corrélations HMBC du composé CMT1 montrant les jonctions des unités osidiques.

Ceci a été confirmé, après comparaison des spectres de masse haute résolution ESI de CMT1 et CMT2, où il ressort une différence de 163 uma, correspondant à la masse d'une unité de glucose ; ainsi que dans le spectre HMBC du composé CMT1 (**Figure 77**) où les tâches de corrélation montrant les jonctions entre les différentes unités osidiques sont clairement visibles. Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones de tous les sucres de cette molécule sont présentés dans le **tableau 27**.

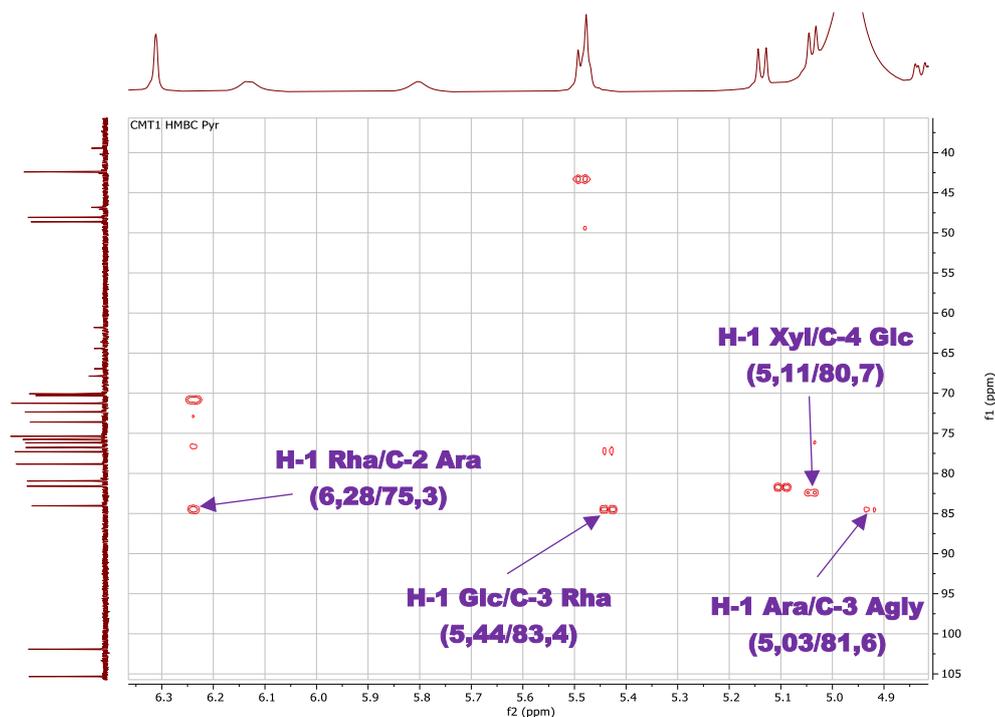
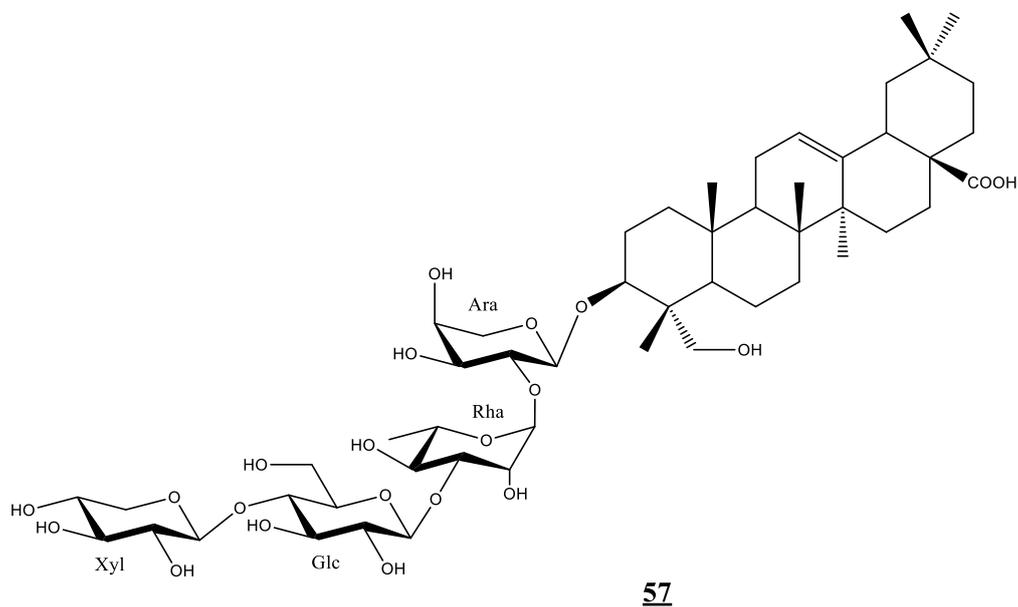


Figure 77: Spectre HMBC élargi du composé CMT1 (C₅D₅N) montrant les points de jonction des sucres.

Tableau 27: Valeurs des déplacements chimiques (¹H et ¹³C) des sucres du composé CMT1 (C₅D₅N, 500 et 125 MHz).

Sucres	δ_C	δ_H	Sucres	δ_C	δ_H
Ara			Glc		
1	105,4	5,03 (brs)	1	107,0	5,44 (d, $J=7,7$)
2	75,3	4,55	2	75,6	4,01
3	74,6	3,99	3	76,5	4,22
4	70,0	4,10	4	80,7	4,30
5	65,8	4,25; 3,76	5	77,2	3,88
			6	61,7	4,27 ; nd
Rha			Xyl		
1	101,6	6,28 (brs)	1	105,8	5,11 (d, $J=7,6$)
2	71,8	4,93	2	75,2	3,97
3	83,4	4,80	3	78,6	4,10
4	73,6	4,54	4	71,3	4,15
5	69,8	4,71	5	67,1	3,60 ; nd
6	18,6	1,56			

L'ensemble de ces données en comparaison avec celles présentes dans la littérature a permis d'établir la structure complète du composé CMT1 **57** et de l'identifier comme étant Klainéanoside B (Biang et *al.*, 2020).



II.1.4. Caractérisation des autres composés

II.1.4.1. Détermination de la structure du composé APTB

Le composé APTB isolé des écorces du tronc de *A. polyacantha* se présente sous forme de précipité blanc et est soluble dans le DMSO.

Ce composé présente sur son spectre de masse à haute résolution obtenu en mode positif (**Figure 78**), un pic correspondant à celui de l'ion protoné à m/z : 313,1196 $[M+H]^+$. Cette valeur est en accord avec la formule brute $C_{14}H_{16}O_8$ (calculée 313,0923) et renfermant 7 degrés d'insaturation.

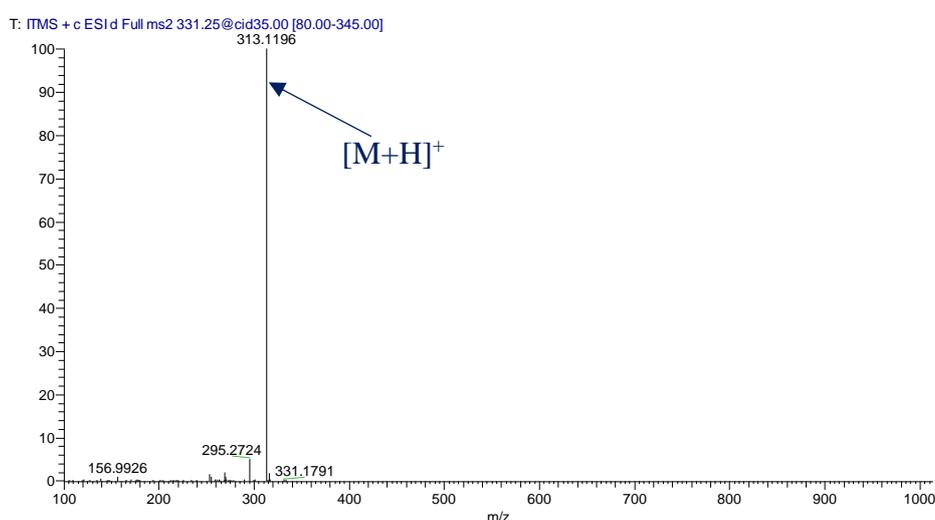
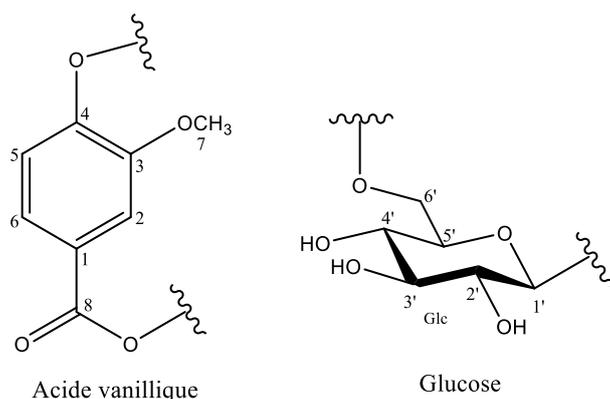


Figure 78: Spectre HR-ESIMS du composé APTB

La structure complète de APTB a été déterminée grâce à l'analyse des différents spectres RMN 1D (1H , ^{13}C , DEPT) et 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) et en comparaison avec les données de la littérature. Cette structure présente en son sein deux sous-structures à savoir une unité dérivée de l'acide vanillique (Ingole et *al.*, 2021) et une unité osidique correspondant au glucose **58**.



58

Son spectre de RMN ^1H (Figures 79, 80 et 81) présente plusieurs signaux dont des pics caractéristiques d'un noyau aromatique formant un système ABX et résonant respectivement à δ_{H} 7,36 (1H ; d ; $J=8,8$) ; 7,40 (1H ; d ; $J=2,0$) et 7,74 ppm (1H ; dd ; $J=8,8$; 2,0). On observe également sur ce spectre, un pic apparaissant à δ_{H} 3,78 ppm (1H ; s) caractéristique d'un méthoxy (OCH_3) lié à un noyau aromatique et le signal d'un proton anomérique de sucre résonant à δ_{H} 5,23 ppm (1H ; d ; $J=6,4$).

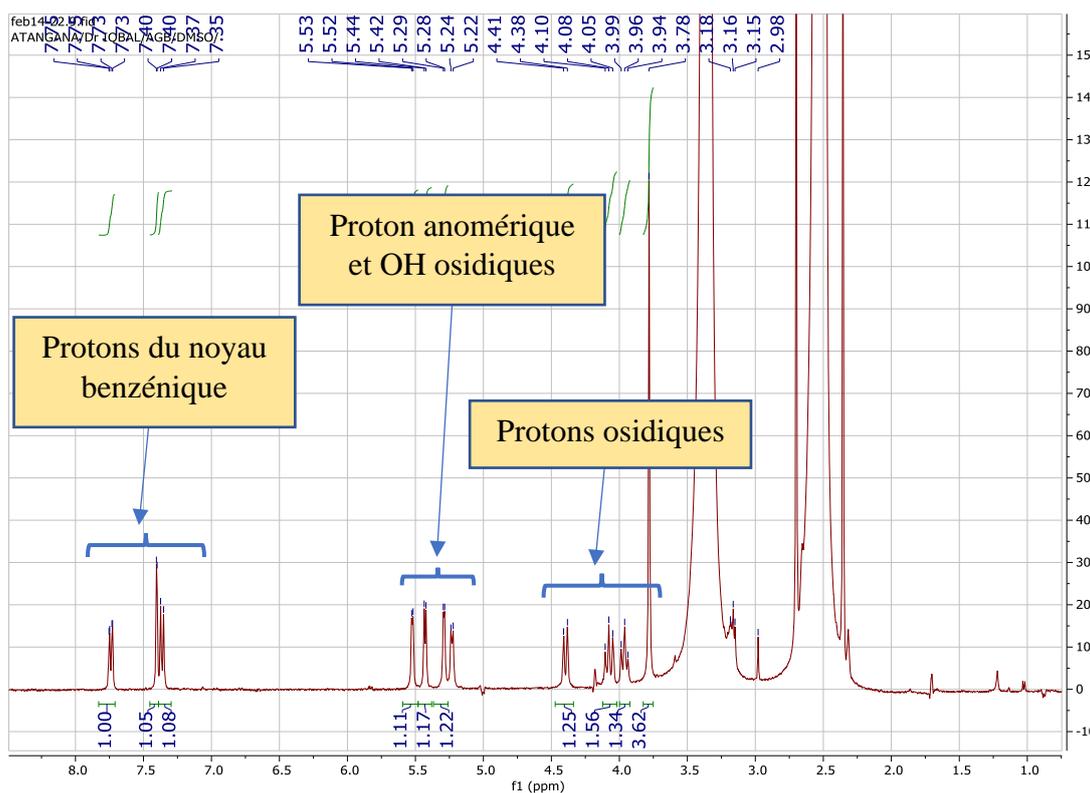


Figure 79: Spectre de RMN ^1H du composé APTB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

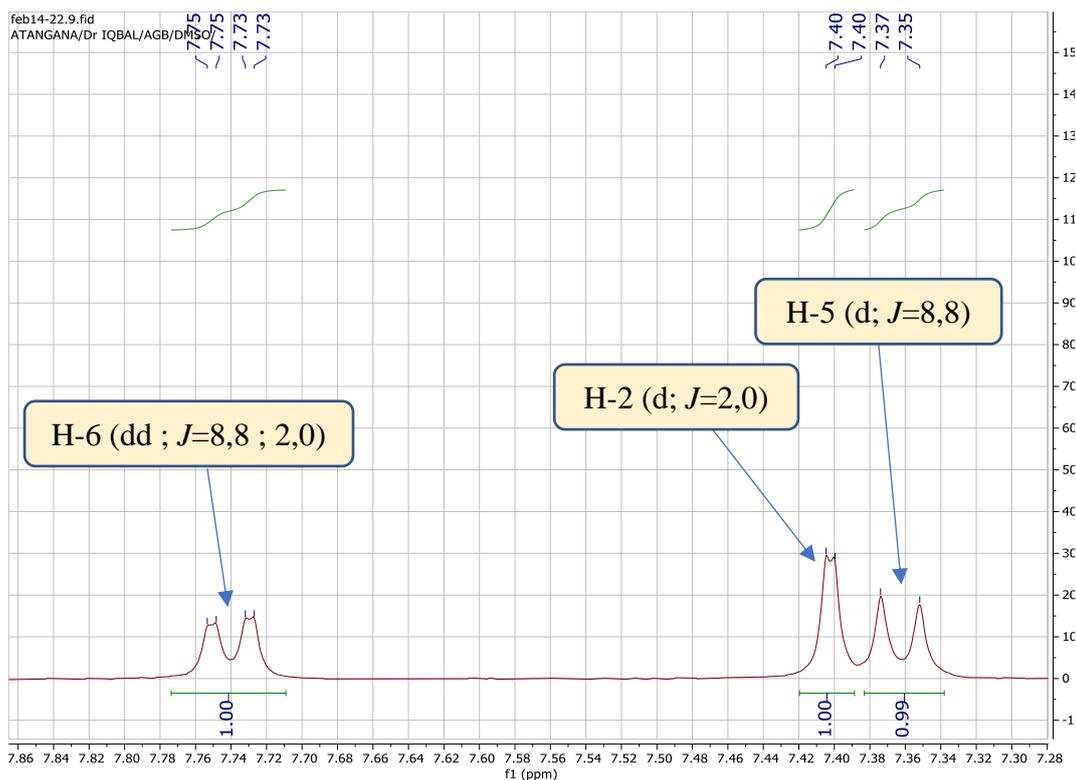


Figure 80: Spectre de RMN ^1H élargi du composé APTB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les protons du noyau aromatique formant le système ABX.

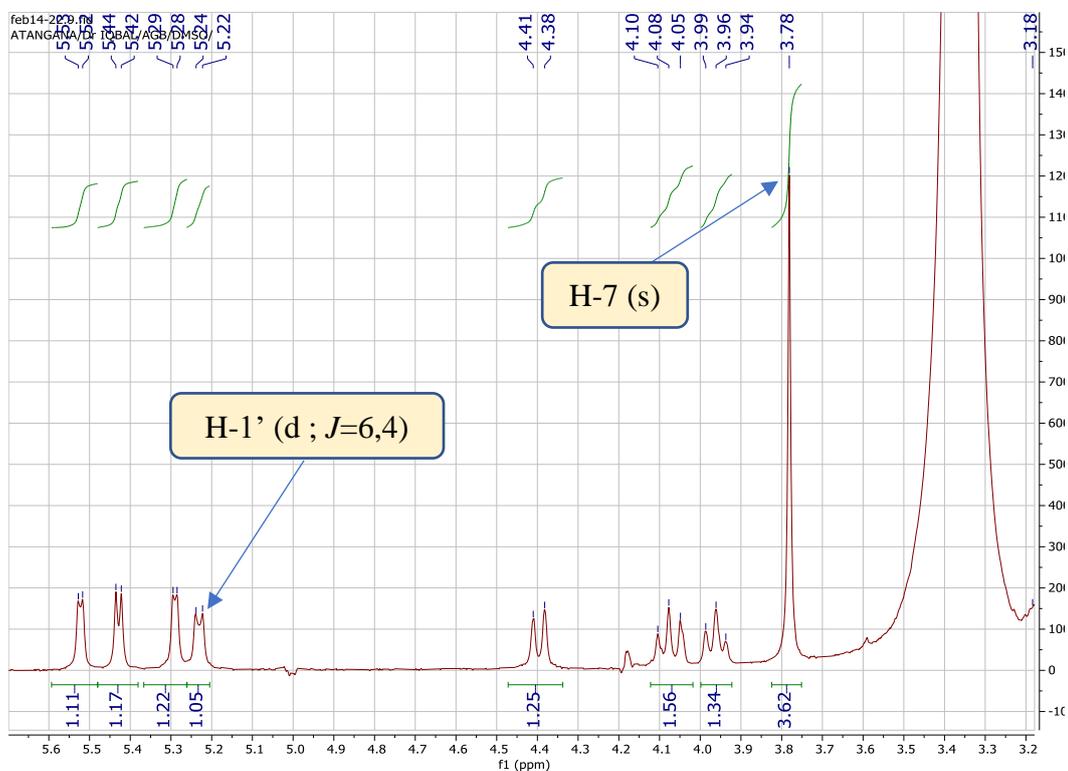


Figure 81: Spectre de RMN ^1H élargi du composé APTB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les protons anomériques et du méthoxy.

Sur les spectres de RMN ^{13}C et DEPT (135 et 90) du composé APTB (**Figure 82**), on peut dénombrer aisément 14 familles de carbones dont quatre (04) carbones quaternaires, huit (08) carbones tertiaires, un (01) carbone secondaire et un (01) carbone primaire. On y retrouve notamment un signal caractéristique d'un groupement méthoxy apparaissant à δ_{C} 55,8 ppm et deux carbones quaternaires d'un noyau benzénique portant des hétéroatomes résonants à δ_{C} 148,4 et 149,8 ppm. On note également la présence d'un signal d'un carbonyle d'ester à δ_{C} 165,2 ppm ainsi que le pic d'un carbone anomérique résonant à δ_{C} 98,3 ppm.

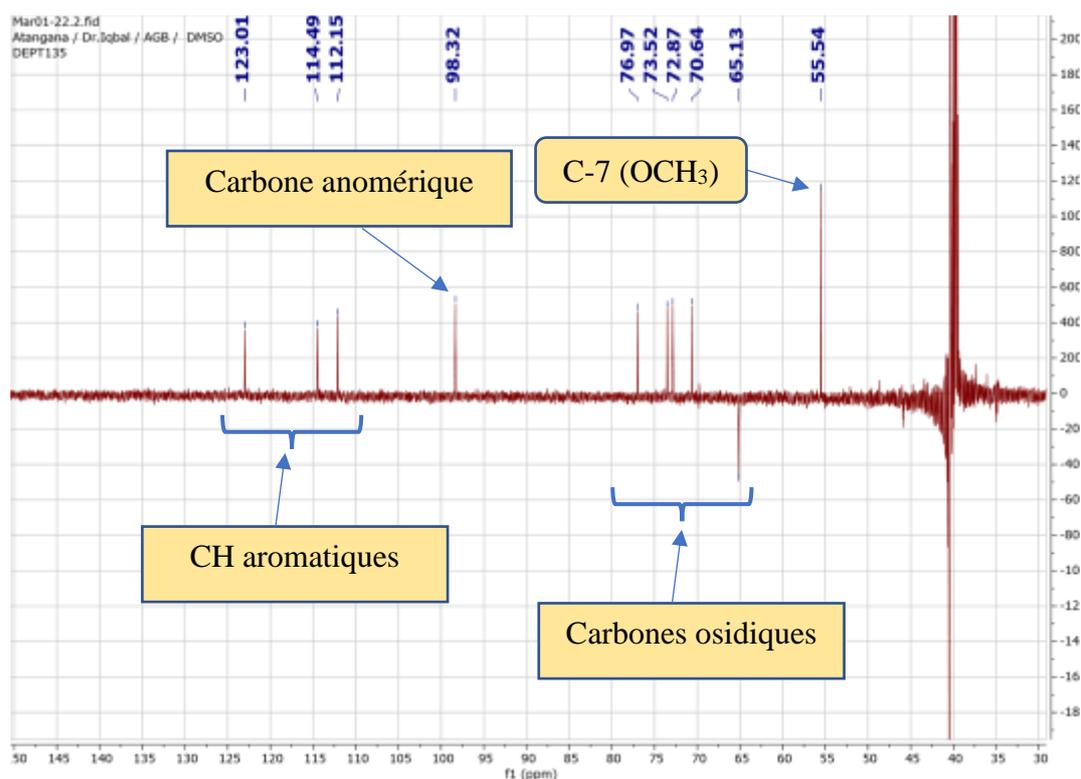


Figure 82: Spectre DEPT 135 du composé APTB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) montrant les carbones caractéristiques.

L'interprétation complète de tous les spectres de RMN 1D et 2D du composé APTB a permis d'établir que les deux sous-structures sont liées entre elles par deux liaisons créant ainsi une cyclisation de la molécule telle qu'observée dans la **Figure 83** ci-après présentant les corrélations HMBC importantes.

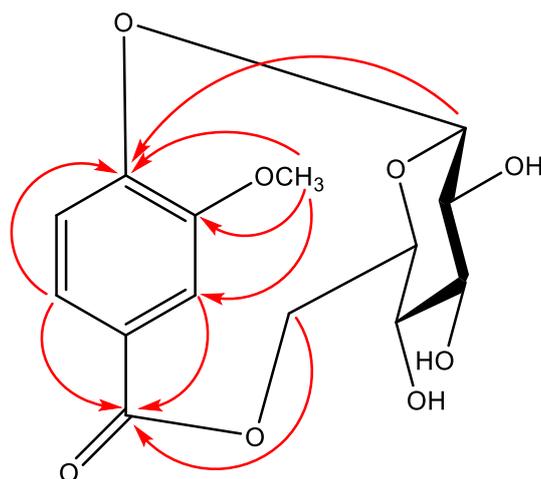


Figure 83: Corrélations HMBC du composé APTB

En effet, le spectre COSY (**Figure 84**) permet de confirmer la présence d'un système AA'BB' du noyau aromatique ; tandis que sur le spectre HMBC du composé APTB (**Figure 85**), on observe clairement des corrélations entre les protons H-2 (δ_H 7,40), H-6 (δ_H 7,74) et le carbonyle de l'ester (δ_C 165,2) de l'unité acide vanillique. Une corrélation est également observée entre les protons H-6'a,b de l'unité osidique à δ_H 4,08 - 4,39 ppm et le carbonyle de l'acide vanillique à δ_C 165,2 ppm. Cette dernière corrélation est confirmée par le déplacement chimique déblindé du carbone C-6' de l'unité osidique qui sort à δ_C 65,2 ppm prouvant que cette position est substituée. De plus, une autre corrélation est observée entre le proton du groupement méthoxy à δ_H 3,78 ppm et le carbone quaternaire oxygéné du noyau aromatique C-4 à δ_C 149,8 ppm.

Une corrélation importante est également observée entre le proton anomérique du sucre résonant à δ_H 5,23 ppm et le carbone quaternaire oxygéné du noyau aromatique C-4 à δ_C 149,8 ppm montrant qu'il existe une cyclisation entre l'unité osidique (carbones 1 et 6 du sucre) et l'unité acide vanillique (carbones 1 et 4 du benzène).

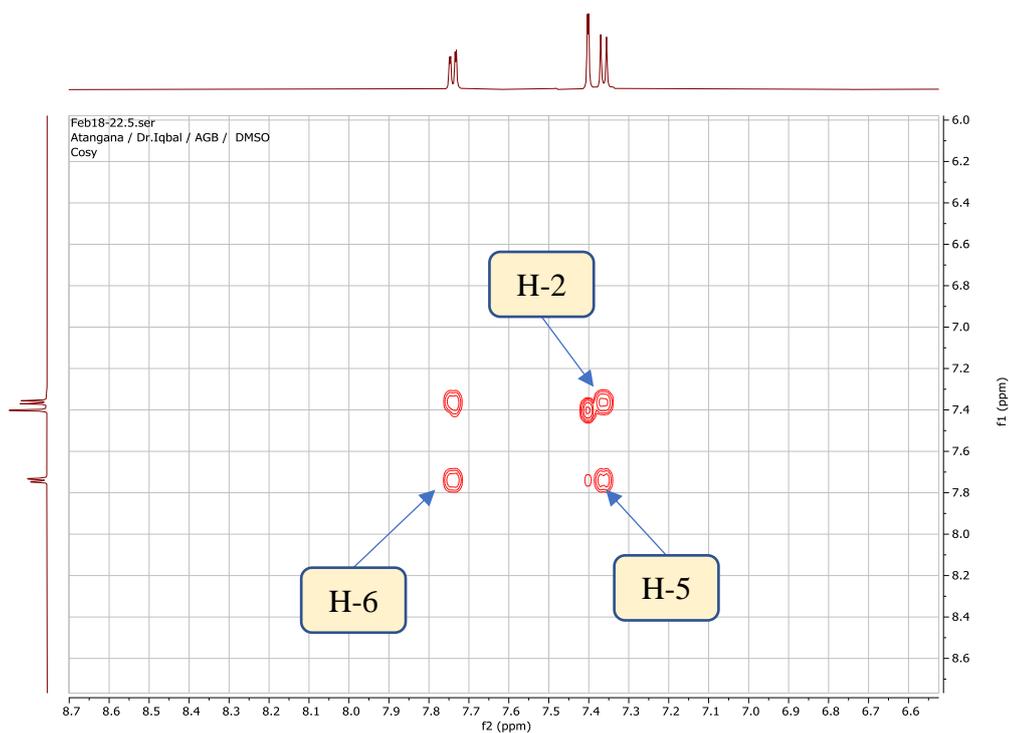


Figure 84: Spectre COSY élargi du composé APTB (C_5D_5N) montrant les corrélations du noyau aromatique.

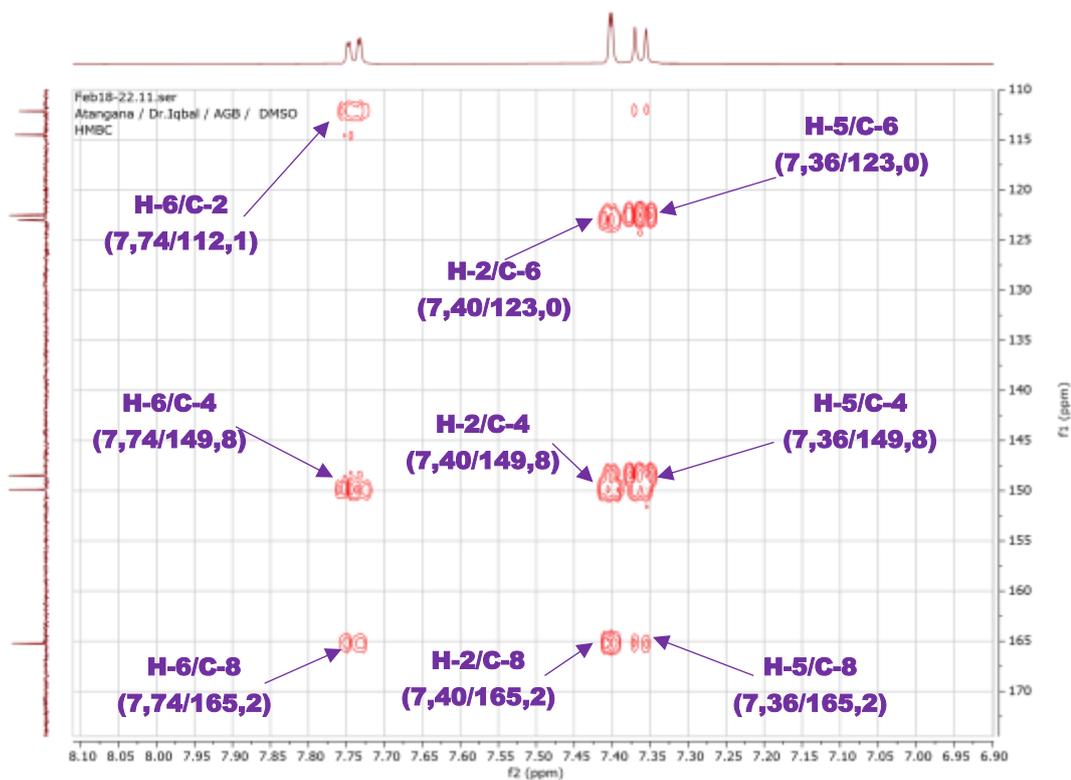


Figure 85: Spectre HMBC élargi du composé APTB (C_5D_5N) montrant les corrélations de l'unité d'acide vanillique.

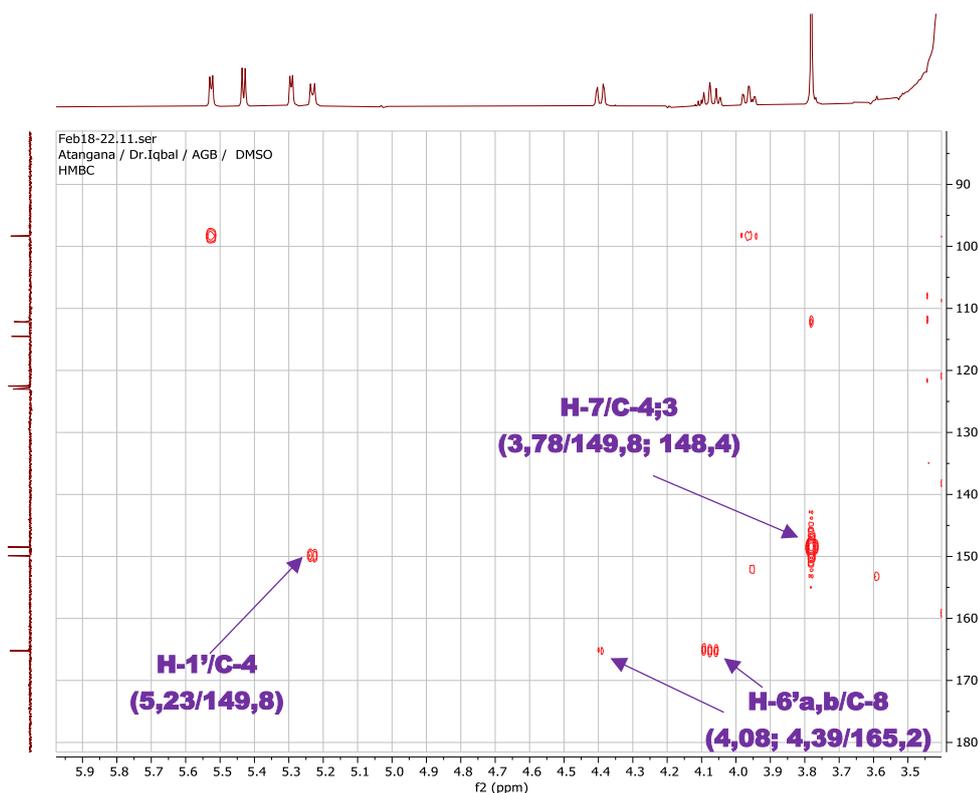


Figure 86: Spectre HMBC élargi du composé APTB (C_5D_5N) montrant les points de jonction entre les unités d'acide vanillique et de glucose.

Sur la base de l'interprétation de toutes les analyses spectrales et en comparaison avec les données recueillies dans la littérature, la structure du composé APTB a été déterminée comme étant un dérivé naturel nouveau de la classe des composés phénoliques auquel nous avons donné le nom trivial de **Acapolyoside 59** et tous les protons et carbones de ces deux sous-structures ont été assignés et les valeurs de déplacements chimiques sont contenues dans le **tableau 28**.

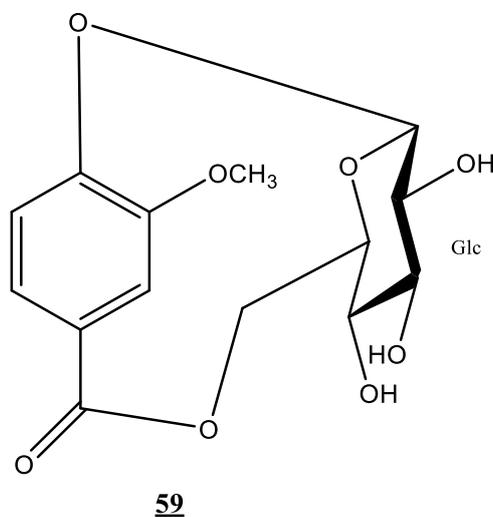


Tableau 28: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) de l'aglycone du composé APTB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

		δ_{C}	δ_{H}
1	C	122,5	/
2	CH	112,1	7,40 (d; $J=2,0$)
3	C	148,4	/
4	C	149,8	/
5	CH	114,4	7,36 (d; $J=8,8$)
6	CH	123,0	7,74 (dd; $J=8,8; 2,0$)
7	CH_3	55,8	3,78
8	C	165,2	/
1'	CH	98,3	5,23 (d; $J=6,4$)
2'	CH	72,8	3,37
3'	CH	76,9	3,38
4'	CH	70,6	3,18
5'	CH	73,5	3,96
6'	CH_2	65,2	4,39; 4,08 (dd; $J=11,4; 1,9$)

II.1.4.2. Identification du composé APT55

APT55 a été obtenu sous forme de poudre blanche et se solubilise dans les solvants tels que le dichlorométhane et le chloroforme.

Son spectre de masse obtenu en mode positif à haute résolution (ESI-HR) de la (**Figure 87**), présente un pic correspondant à celui l'ion moléculaire protoné à m/z : 459,6074 $[M+H]^+$. Cette valeur est en accord avec la formule brute $C_{30}H_{50}O_3$ (calculée 459,3838).

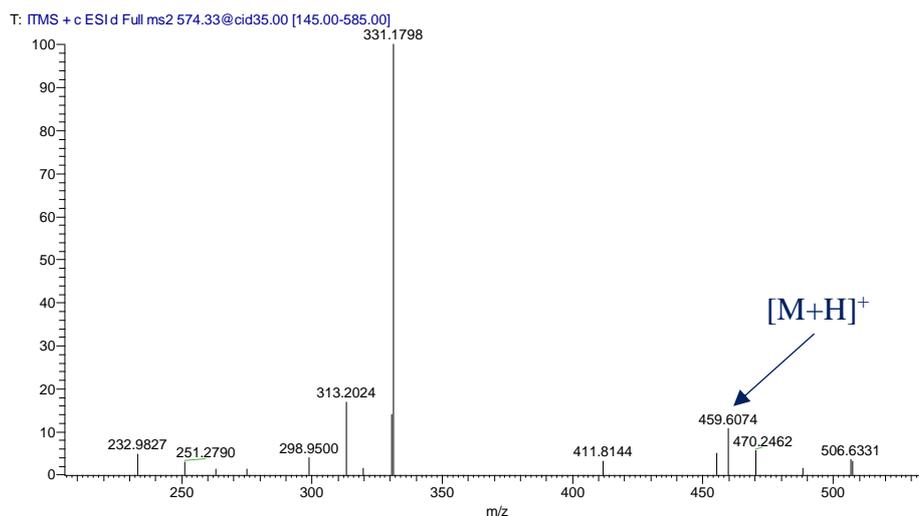
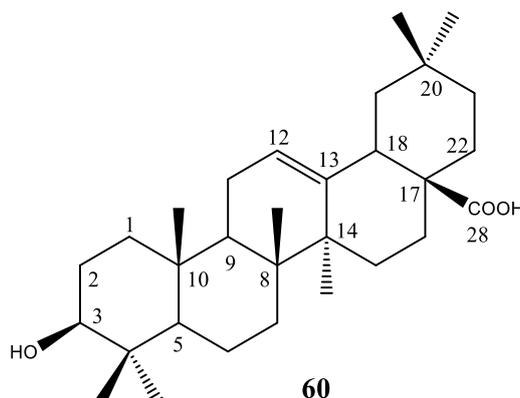


Figure 87: Spectre HR-ESIMS du composé APT55

Après interprétation complète de toutes les spectres de RMN 1D et 2D et en comparaison avec les données de la littérature, la structure du composé APT55 **60** a été identifiée comme étant celle de l'acide oléanolique (Mahato, 1996).



En effet, le spectre de RMN ^1H de APT55 (**Figure 88**) révèle la présence de sept (07) pics de méthyles caractéristiques des triterpènes de type oléanane et résonant respectivement à δ_{H} 0,73 (3H, s) ; 0,75 (3H, s) ; 0,88 (3H, s) ; 0,89 (3H, s) ; 0,91 (3H, s) ; 0,96 (3H, s) et 1,11 ppm (3H, s) correspondant aux méthyles N°25, H-25, H-24, H-23, H-26, H-29, H-27 et H-30 respectivement.

Ce spectre révèle également la présence d'un (01) proton oléfinique résonant à δ_{H} 5,26 (1H, brd) attribuable au proton H-12. On observe aussi la présence d'un pic caractéristique de proton méthynique oxygéné apparaissant à δ_{H} 3,20 (1H, dd, $J=11,3$; 4,4).

L'ensemble de ces protons caractéristiques corrélient parfaitement dans avec leurs carbones respectifs dans le spectre HSQC. Le spectres ^{13}C présenté à la **Figure 89** permet également de mettre en évidence les carbones caractéristiques a δ_{C} 78,5 (C-3) ; 122,2 (C-12) ; 143,8 (C-13) ; et 180,7 ppm (C-28).

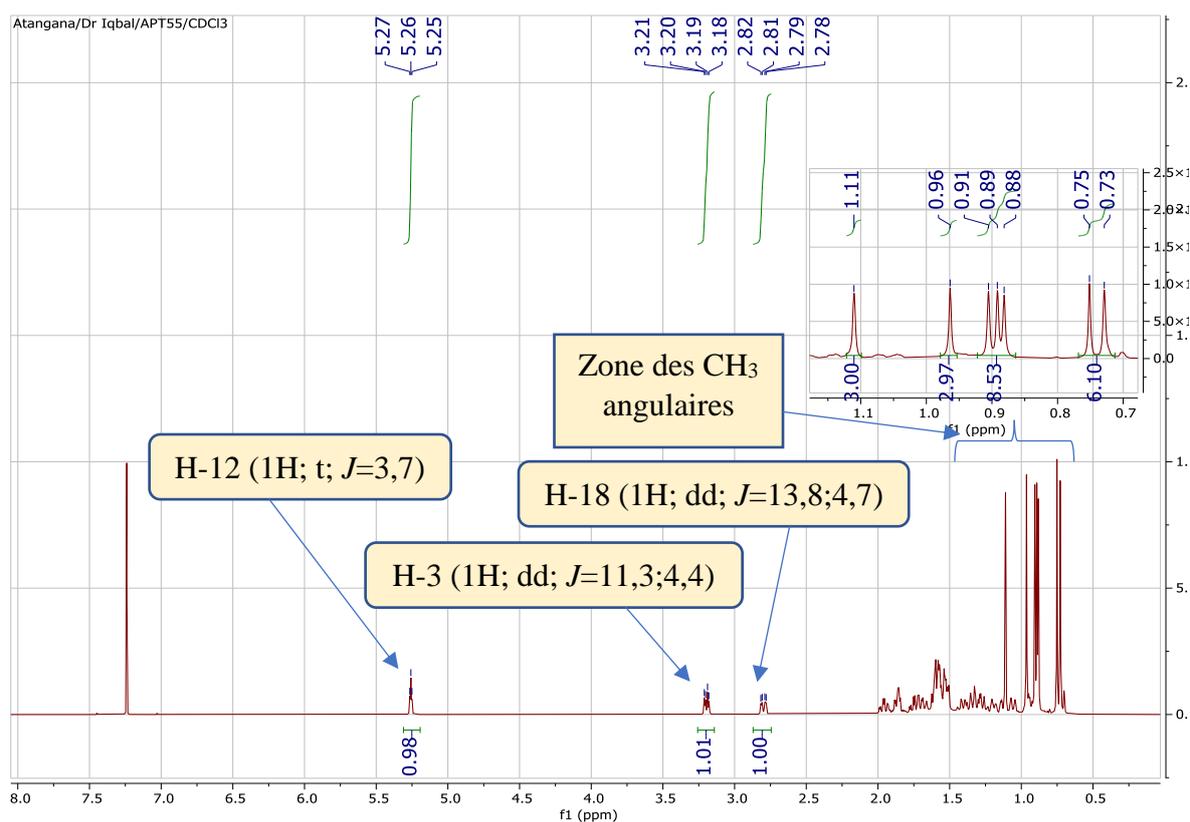


Figure 88: Spectre RMN ^1H du composé APT55 (CDCl_3 , 500 MHz) montrant les zones et signaux caractéristiques.

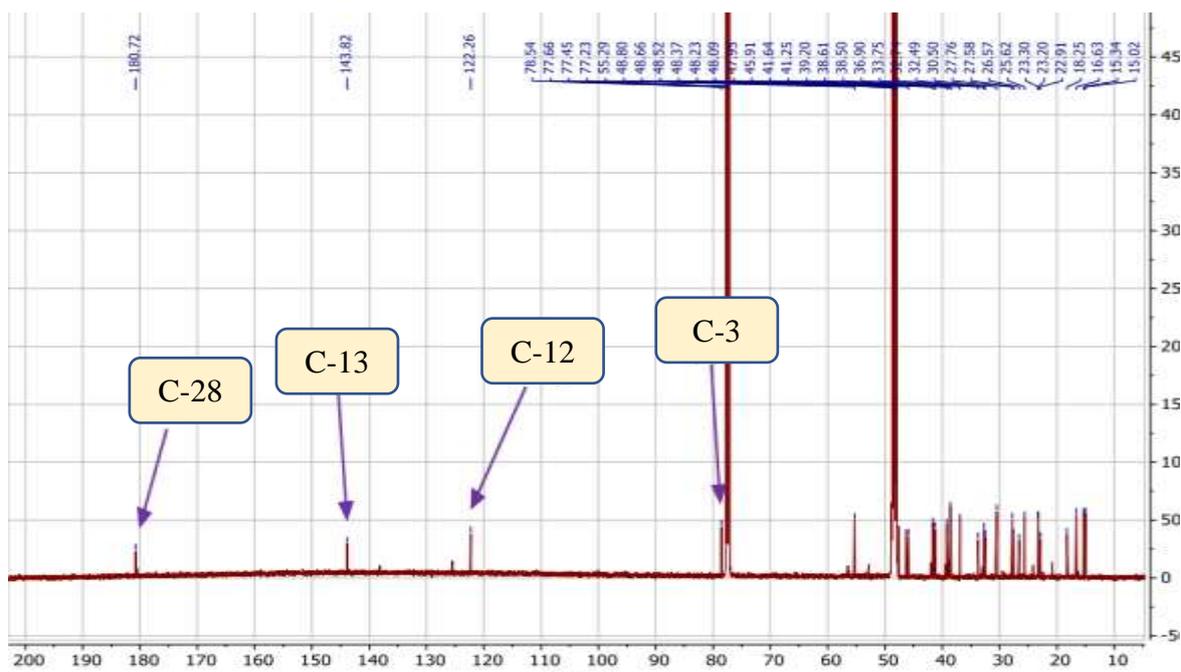


Figure 89: Spectre de RMN ^{13}C du composé APT55 (CDCl_3 , 125 MHz) montrant les signaux de carbones caractéristiques.

L'ensemble des valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones de cette structure **61** sont présentées dans le **tableau 29** ci-dessous.

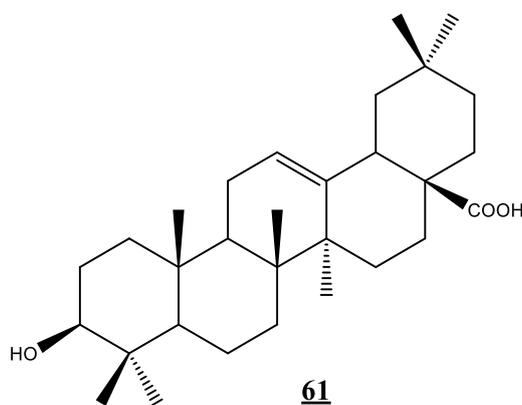


Tableau 29: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé APT55 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

N°C	APT55			Acide oléanolique (litt)	
	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
1	CH ₂	38,8	1,40; 0,87	38,5	1,56; 1,31
2	CH ₂	27,9	2,20; 1,78	27,4	1,72; 1,47
3	CH	78,5	3,28 (dd, J=11,2; 4,9)	78,7	3,34
4	C	39,3	/	38,7	/
5	CH	55,7	1,05	55,2	0,90
6	CH ₂	18,7	1,58; 1,22	18,3	1,63 ; nd
7	CH ₂	33,2	1,60; nd	32,6	1,56 ; 1,31
8	C	39,6	/	39,3	/
9	CH	48,0	1,10	47,6	1,07
10	C	37,3	/	37,0	/
11	CH ₂	23,7	2,42; 2,07	23,1	2,19 ; 1,97
12	CH	122,2	5,21	122,1	5,18
13	C	143,8	/	143,4	/
14	C	42,1	/	41,6	/
15	CH ₂	28,2	2,30; 1,62	27,7	1,31 ; nd
16	CH ₂	23,7	1,87; nd	23,4	1,54 ; 1,29
17	C	46,6	/	46,6	/
18	CH	41,9	2,37	41,3	2,34
19	CH ₂	46,4	1,74; 1,16	45,8	1,45 ; 1,20
20	C	30,8	/	30,6	/
21	CH ₂	34,1	1,41; nd	33,8	1,56 ; 1,31
22	CH ₂	33,2	1,91; 1,25	32,3	1,90 ; 1,65
23	CH ₃	28,2	0,88	28,1	0,88
24	CH ₃	16,4	0,75	15,6	0,89
25	CH ₃	15,4	0,73	15,3	0,84
26	CH ₃	17,3	0,89	16,8	0,91
27	CH ₃	26,1	0,96	26,0	1,01
28	C	180,7	/	181,0	/
29	CH ₃	32,2	0,91	33,1	0,86
30	CH ₃	23,7	1,11	23,6	1,23

II.1.4.3. Identification du composé CMTA1

Le composé CMTA1 se présente sous forme de poudre blanche et a été isolé des écorces du tronc de *C. macrobotrys*. Il est soluble dans les solvants tels que le chloroforme dans lequel il a été analysé.

Sur son spectre de masse à haute résolution (HR-ESIMS) en mode positif (**Figure 90**), la présence d'un pic correspondant à celui de l'ion moléculaire protoné est mise en évidence et apparaît à m/z : 443,3358 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{30}H_{50}O_2$ (calculée 443,3889).

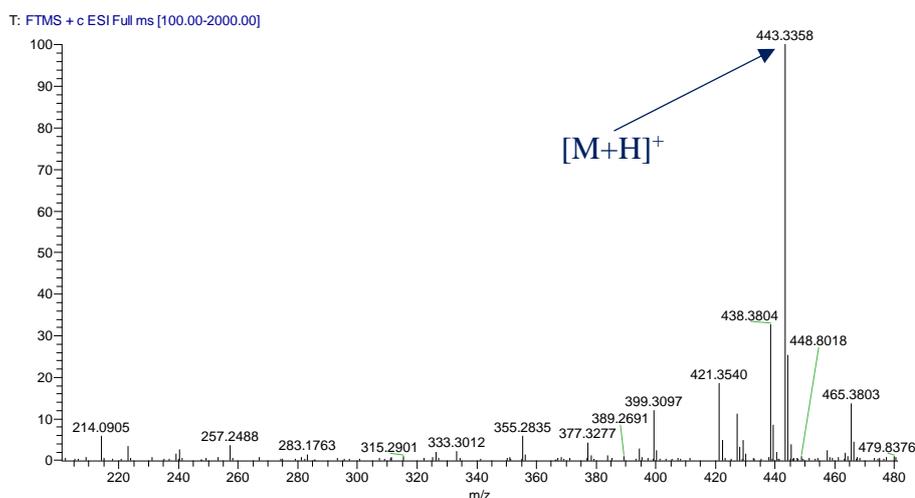
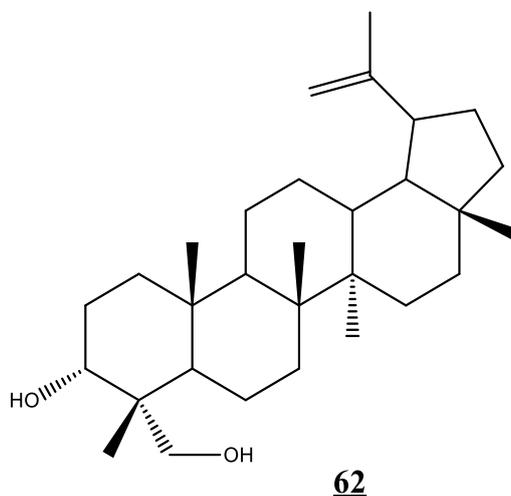


Figure 90: Spectre de masse HR-ESIMS du composé CMTA1

L'analyse complète des différents spectres de RMN 1D et 2D comparée aux données de la littérature, a permis d'établir la structure complète du composé CMTA1 **62** et de l'identifier comme étant le Lup-20(29)-ène-3a,23-diol (Puapairoj et *al.*, 2005), composé isolé des espèces du genre *Chytranthus* pour la première fois.



Ainsi, sur les spectres de RMN 1D (^1H et ^{13}C) du composé CMTA1 présentés dans les (**Figure 91**), on observe clairement la présence de six signaux intenses correspondants aux signaux de méthyles angulaires d'un triterpène et résonnant à $\delta_{\text{H}} 1,20 / \delta_{\text{C}} 22,3$; $\delta_{\text{H}} 0,76 / \delta_{\text{C}} 16,5$; $\delta_{\text{H}} 0,98 / \delta_{\text{C}} 15,8$; $\delta_{\text{H}} 0,92 / \delta_{\text{C}} 14,5$; $\delta_{\text{H}} 0,75 / \delta_{\text{C}} 17,9$ et $\delta_{\text{H}} 1,69 / \delta_{\text{C}} 19,2$ ppm. On observe également la présence d'un pic de méthyne oxygéné à $\delta_{\text{H}} 3,40$ (dd, $J=11,8$; $4,3$) / $\delta_{\text{C}} 80,9$ ppm et un signal de carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} 150,9$ ppm. De plus, on remarque la présence de deux signaux de méthylènes dont l'un apparaissant à $\delta_{\text{H}} 3,30$; $4,15 / \delta_{\text{C}} 64,4$ ppm est caractéristique des méthylènes oxygénés et le deuxième apparaissant à $\delta_{\text{H}} 4,55$; $4,66 / \delta_{\text{C}} 109,3$ ppm est caractéristique des méthylènes oléfiniques.

Toutes ces données nous ont permis de dire que le composé CMTA1 est un dérivé du Lupéol. L'ensemble de toutes ces valeurs en comparaison avec celles de la littérature sont présentées dans le **tableau 30**.

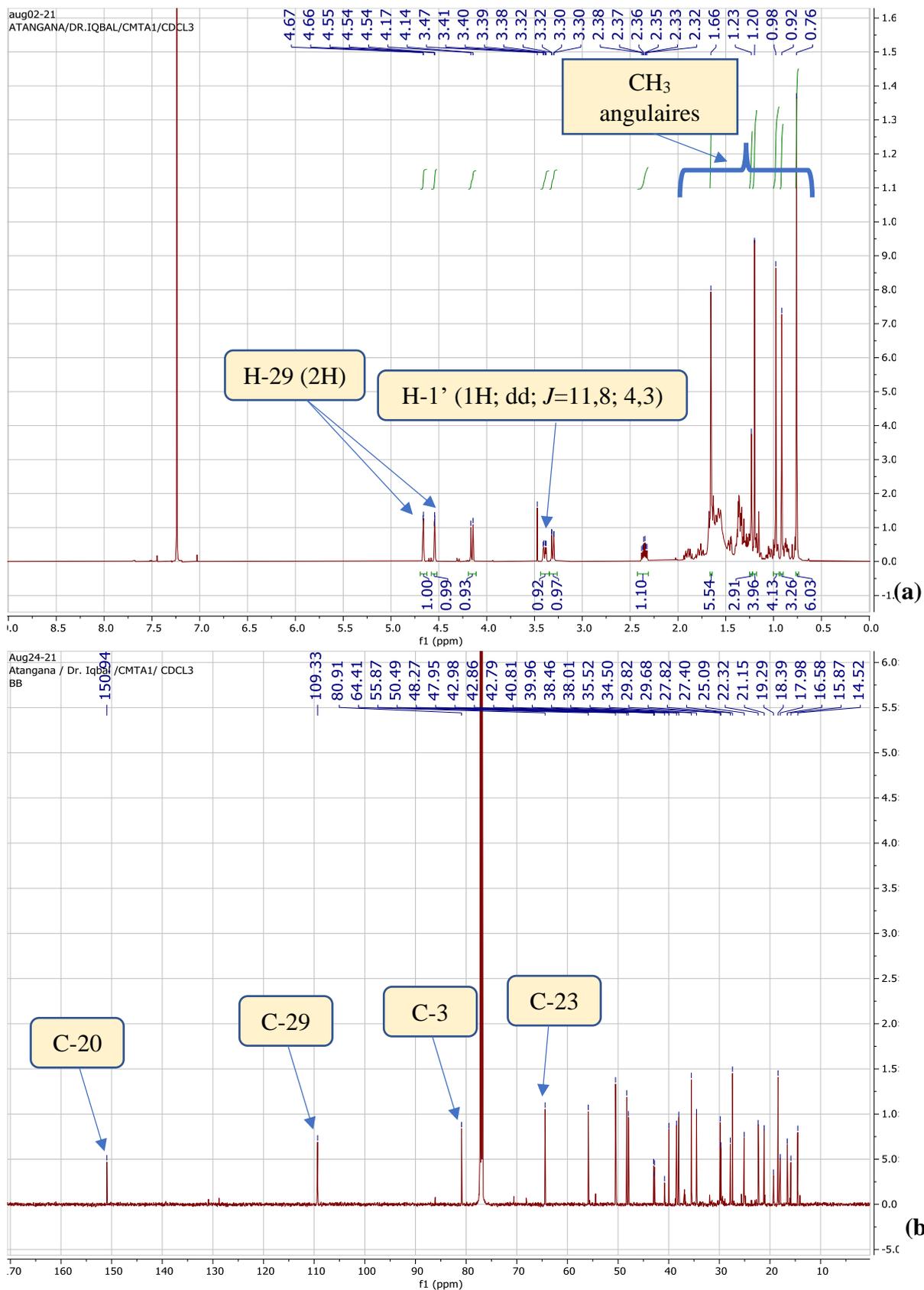


Figure 91: Spectres de RMN 1H (a) et 13C (b) du composé CMTA1 (C₅D₅N, 500 et 125 MHz) montrant les signaux de pics caractéristiques.

Tableau 30: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMTA1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

N°C	CMTA1			Lup-20(29)-ène-3a,23-diol (litt)	
	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
1	CH ₂	34,4	1,36; nd	32,9	1,46; 1,31
2	CH ₂	25,0	1,66; 1,03	26,4	1,72; 1,47
3	CH	80,9	3,40 (dd, J=11,8; 4,3)	76,7	3,34 (dd, J=11,6; 4,2)
4	C	42,9	/	40,4	/
5	CH	55,8	0,76	55,3	0,94
6	CH ₂	18,3	1,59; nd	18,0	1,59; nd
7	CH ₂	35,4	1,46; 1,34	33,7	1,63; 1,38
8	C	40,8	/	40,9	/
9	CH	50,4	1,23	50,2	0,92
10	C	40,8	/	37,0	/
11	CH ₂	21,1	1,39; 1,18	20,8	1,63; 1,39
12	CH ₂	27,8	1,79; 0,95	25,0	1,66 ; 1,30
13	CH	38,0	1,63	37,9	1,04
14	C	42,7	/	43,0	/
15	CH ₂	27,4	1,76; 0,98	27,3	1,56; 1,29
16	CH ₂	35,5	1,46; 1,34	35,5	1,24; nd
17	C	42,8	/	42,9	/
18	CH	48,2	1,35	48,2	1,07
19	CH	47,9	1,33	48,0	2,01
20	C	150,9	/	151,0	/
21	CH ₂	29,8	1,91; 1,30	29,8	1,55; 1,28
22	CH ₂	39,9	1,36; 1,15	39,9	1,50; 1,25
23	CH ₂	64,4	4,15; 3,30	71,3	3,54; 3,99
24	CH ₃	22,3	1,20 (s)	17,7	0,99 (s)
25	CH ₃	16,5	0,76 (s)	16,1	0,91 (s)
26	CH ₃	15,8	0,98 (s)	15,9	0,90 (s)
27	CH ₃	14,5	0,92 (s)	14,6	0,92 (s)
28	CH ₃	17,9	0,75 (s)	17,9	0,70 (s)
29	CH ₂	109,3	4,66; 4,55	109,2	5,11; 4,92
30	CH ₃	19,2	1,69 (s)	19,2	1,74 (s)

II.1.4.4. Identification du composé CMTA2

CMTA2 est un composé isolé des écorces du tronc de *C. macrobotrys* ayant une forme physique cristalline de couleur blanche soluble dans des solvants tels que l'eau et le DMSO.

Sur son spectre de masse ESI à haute résolution en mode positif (**Figure 92**), on observe la présence d'un pic correspondant à celui de l'ion moléculaire protoné et apparaissant à m/z : 343,2979 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{12}H_{21}O_{11}$ (calculée 342,1162).

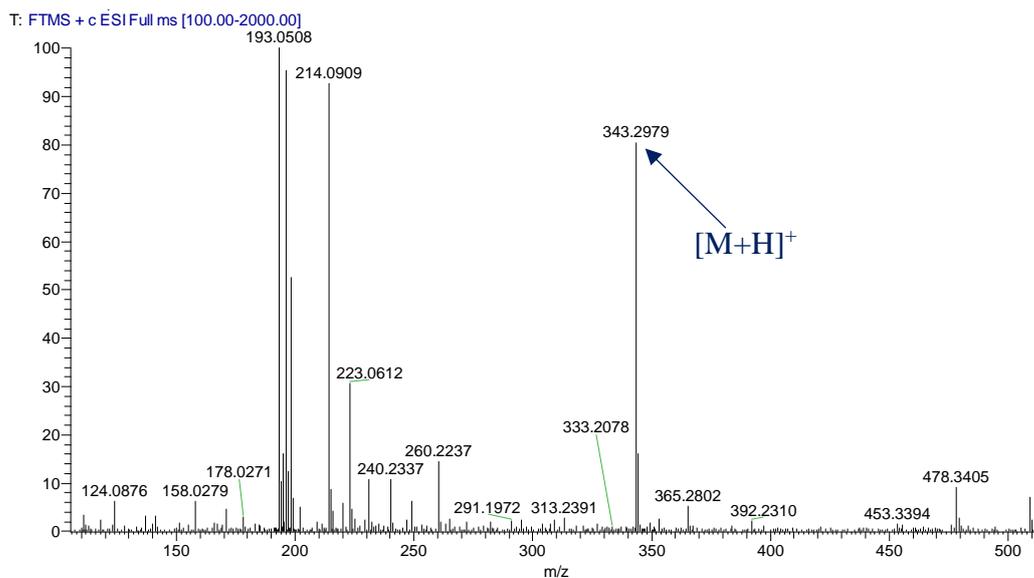
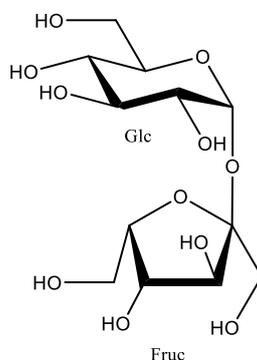


Figure 92: Spectre de masse HR-ESIMS du composé CMTA2

L'interprétation des spectres de RMN du composé CMTA2 en comparaison avec les données de la littérature permet d'identifier ce composé au β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside, disaccharide précédemment décrit par Yamamori en 2017 et isolé de cette espèce pour la première fois.



63

En effet, sur les spectres de RMN ^1H et ^{13}C (**Figure 93**) de CMTA2, on peut observer la présence de six (06) signaux de méthynes résonnant entre δ_C 70 et 95 ppm. On observe également la présence de trois (03) signaux de méthylènes oxygénés terminaux apparaissant entre δ_C 60 et 63 ppm ainsi que la présence d'un carbone quaternaire résonnant à δ_C 104,3 ppm. Ces valeurs caractéristiques de deux unités osidiques notamment le glucose et le fructose ainsi que toutes les autres valeurs de protons et carbones sont consignées dans le **tableau 31**.

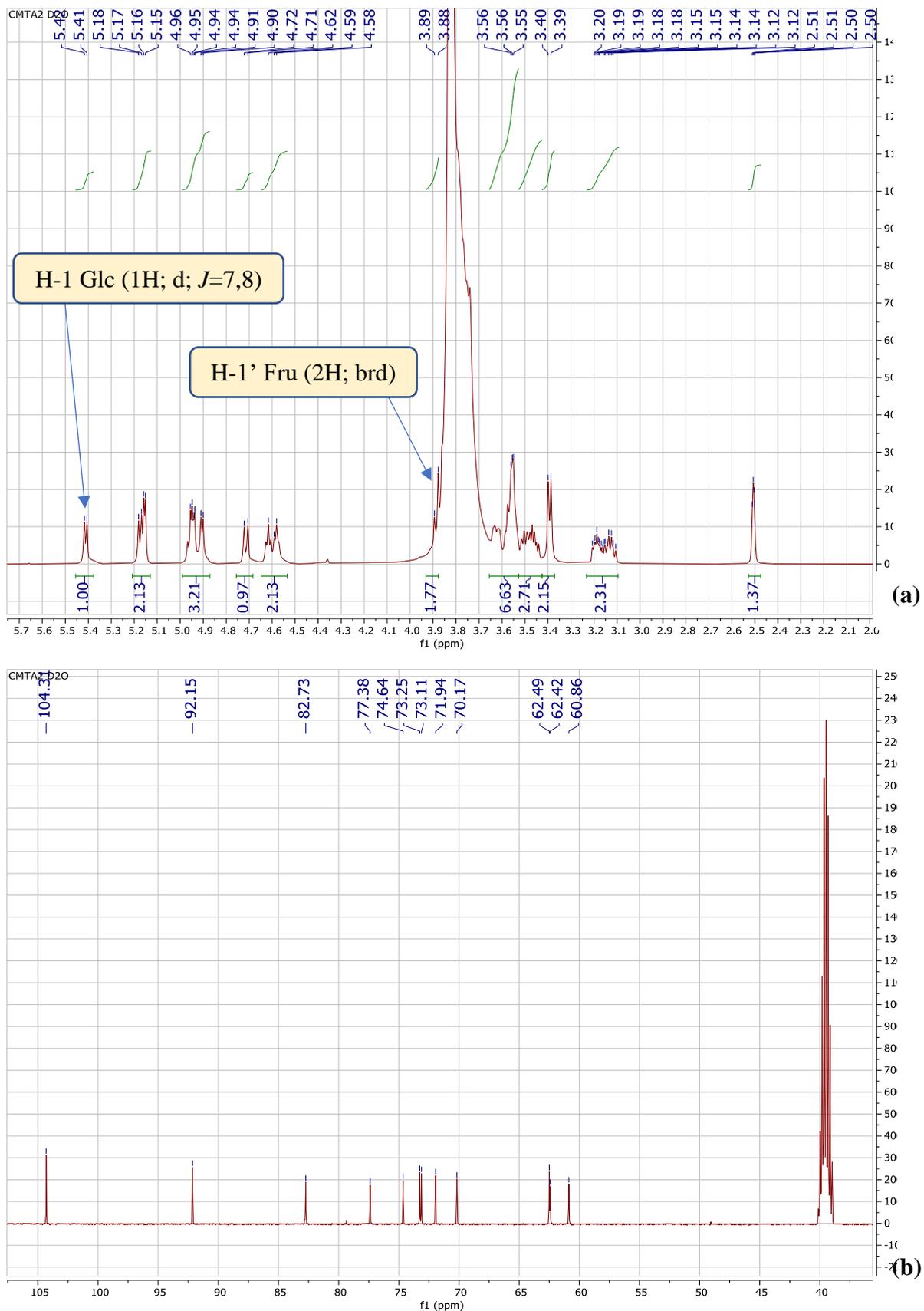


Figure 93: Spectres RMN ^1H (a) et ^{13}C (b) du composé CMTA2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz) montrant les signaux caractéristiques.

Tableau 31: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMTA2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

CMTA2				β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside			
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)	N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
α-Glc				α-Glc			
1	CH	92,1	5,41	1	CH	95,4	4,87
2	CH	71,9	3,40	2	CH	73,6	3,35
3	CH	73,2	3,56	3	CH	76,6	3,54
4	CH	70,1	3,54	4	CH	70,4	3,41
5	CH	73,1	3,88	5	CH	76,5	3,47
6	CH ₂	60,8	3,39; nd	6	CH ₂	61,3	3,89 ; 3,71
β-Fru				β-Fru			
1'	CH ₂	62,3	3,89; nd	1'	CH ₂	62,0	3,79 ; ,68
2'	C	104,3	/	2'	C	105,4	/
3'	CH	77,3	4,83	3'	CH	76,6	4,28
4'	CH	74,6	4,15	4'	CH	74,5	4,15
5'	CH	82,7	3,78	5'	CH	82,5	3,93
6'	CH ₂	62,4	4,62 ; nd	6'	CH ₂	63,0	3,83 ; 3,78

II.1.4.5. Identification du composé CMT21

L'isolement du composé CMT21 s'est faite à partir des écorces de *C. macrobotrys* où il a été obtenu sous forme de poudre blanche soluble dans le dichlorométhane.

Le spectre de masse à haute résolution de ce composé obtenu par ionisation en mode positif (**Figure 94**), met en évidence la présence d'un pic correspondant à celui de l'ion moléculaire protoné apparaissant à m/z : 575,4149 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{35}H_{59}O_6$ (calculée 575,4233).

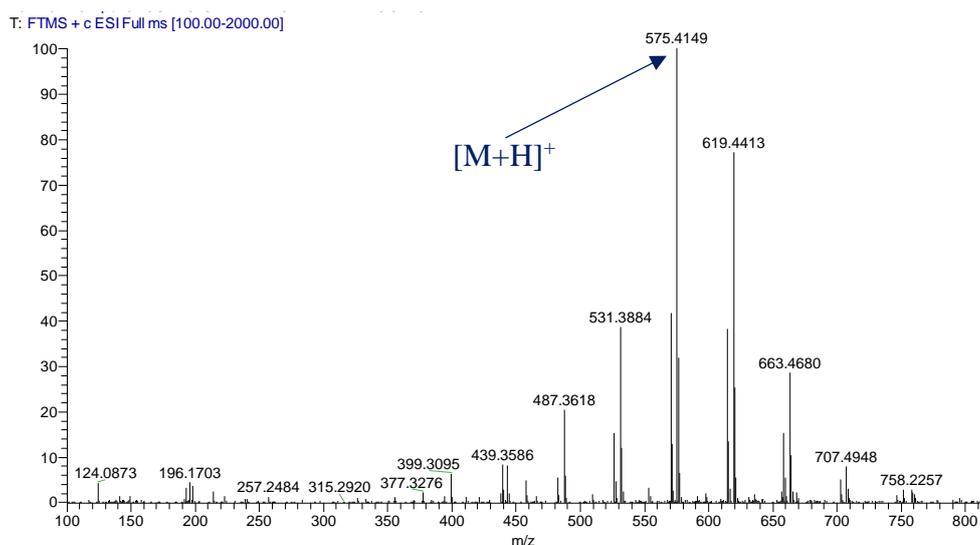
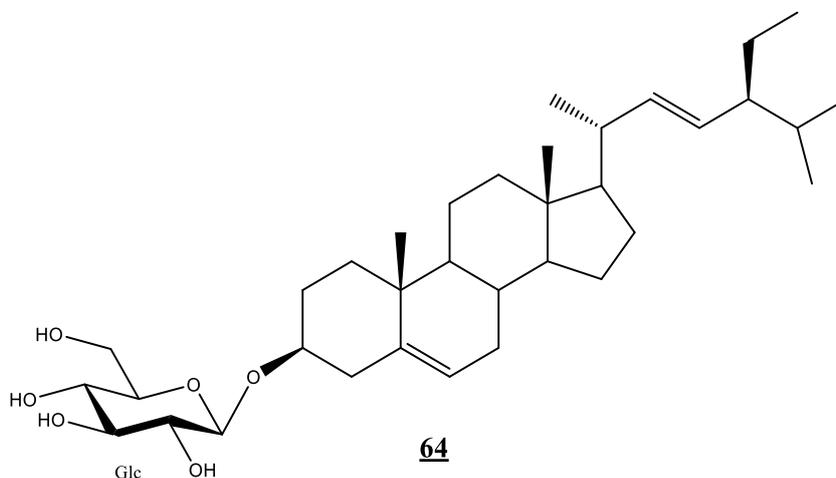


Figure 94: Spectre de masse ESI du composé CMT21

Les données de la spectrométrie de masse associées à celles des expériences de la spectroscopie de RMN 1D et 2D ont permis d'identifier le composé CMT21 au stigmastérol 3-*O*- β -D-glucopyranoside **64** (Chaturvedula et Prakash, 2012) dont la structure est représentée ci-contre.



Le spectre de RMN ^1H (**Figure 95**) révèle la présence de six (06) pics de méthyles caractéristiques des stéroïdes tétracycliques et résonant respectivement à δ_{H} 0,65 (3H, d, $J=8,8$) ; 0,66 (3H, brs) ; 0,75 (3H, brs) ; 0,81 (3H, brs) ; 0,93 (3H, s) et 0,97 ppm (3H, d, $J=7,0$) correspondant aux protons des méthyles H-18, H-19, H-29, H-26, H-27 et H-21 respectivement.

On observe également sur ce spectre, la présence de trois (03) protons oléfiniques résonant à δ_{H} 5,21 (1H, d, $J=5,0$) ; 5,12 (1H, dd, $J=15,2$; 8,7) et 4,98 ppm (1H, dd, $J=15,1$; 8,7) attribuables aux protons H-6, H-22 et H-23 respectivement. Un pic caractéristique de proton méthynique oxygéné est également observé à δ_{H} 3,47 ppm (1H, dd, $J=11,6$; 4,6) correspondant au H-3 ainsi que le pic d'un proton anomérique à δ_{H} 4,22 ppm (1H, d, $J=7,8$) suggérant la présence d'un sucre.

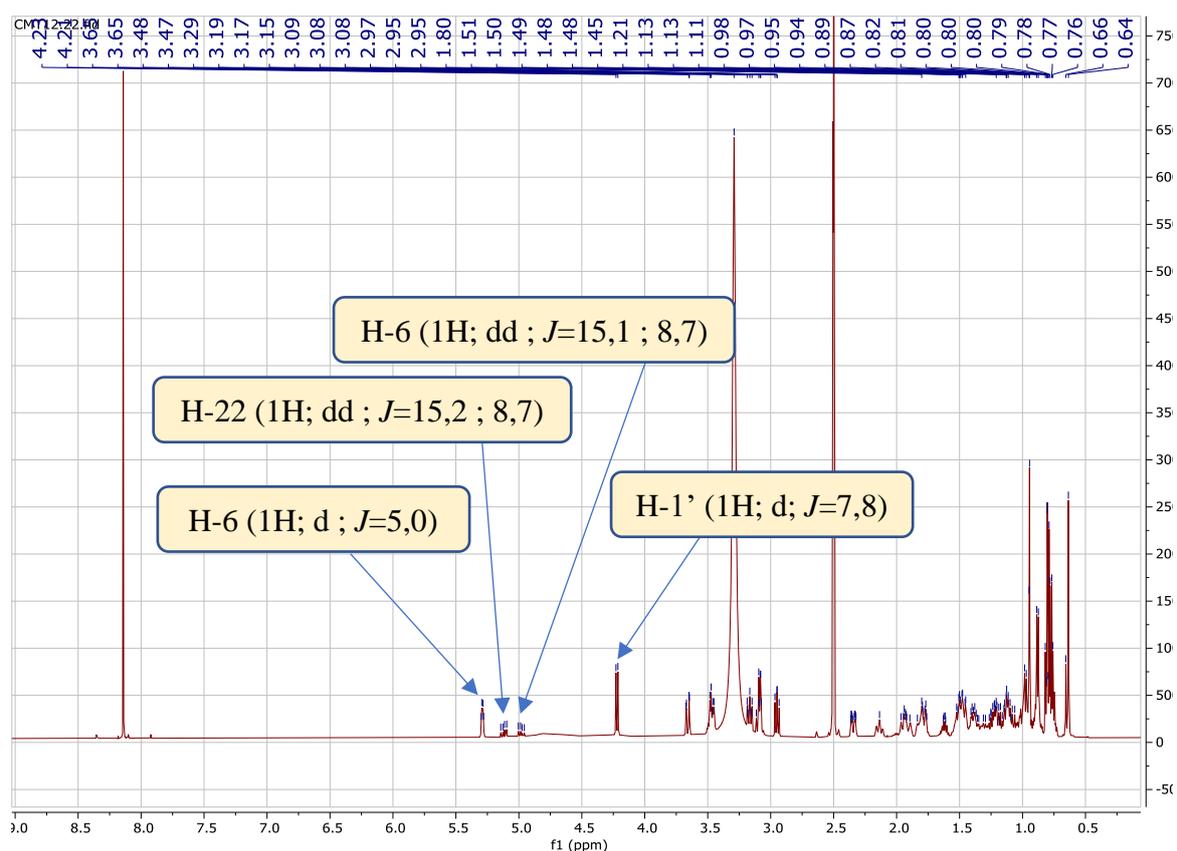


Figure 95: Spectre RMN ^1H du composé CMT21 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les signaux de protons caractéristiques.

Les spectres de RMN ^{13}C (**Figure 96**), DEPT 135 et DEPT 90 quant à eux révèlent la présence de 35 familles de carbones dont six (06) attribuables au sucre présent dans la molécule et 29 appartenant à l'aglycone (stéroïde).

Des 29 signaux de carbones de l'aglycone, on distingue clairement 06 CH_3 , 09 CH_2 , 11 CH (dont 03 CH sp^2) et 03 C quaternaires (dont 01 $\text{C}_q \text{ sp}^2$ et 02 $\text{C}_q \text{ sp}^3$).

Dans la zone osidique, on observe la présence d'un pic correspondant au carbone anomérique résonnant à δ_{C} 100,7 ppm ainsi qu'un carbone de méthylène CH_2 apparaissant à δ_{C} 61,0 ppm. Les différentes valeurs des déplacements chimiques de ce sucre en comparaison avec les données de la littérature sont similaires à celles du β -D-glucopyranosyl.

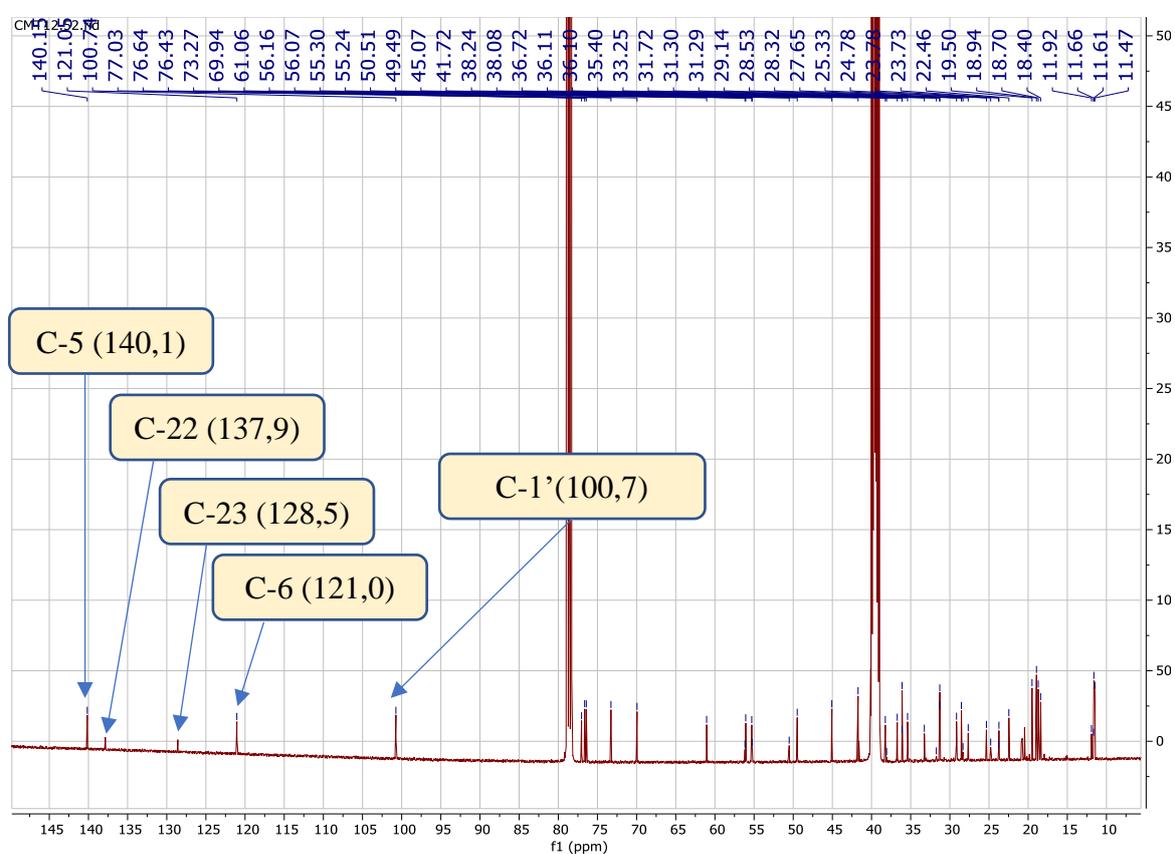


Figure 96: Spectre RMN ^{13}C du composé CMT21 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) montrant les signaux de carbones caractéristiques.

Toutes ces valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé CMT21 sont présentées dans le **tableau 32** ci-dessous.

Tableau 32: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMT21 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

CMT21				stigmasterol-3-O- β -D-glucoside (litt)	
N°C	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
1	CH ₂	38,2	2,35; 2,13	36,9	2,06; 1,31
2	CH ₂	33,2	1,27; 0,98	30,6	1,27; nd
3	CH	77,0	3,47 (dd, J=11,6; 4,6)	83,2	3,53
4	CH ₂	40,1	1,94; 1,12	34,1	1,96; nd
5	C	140,1	/	141,1	/
6	CH	121,1	5,29	121,8	5,27
7	CH ₂	33,2	1,13; nd	117,6	2,19 ; 1,94
8	CH	31,3	1,90; 1,47	139,2	1,37
9	CH	50,5	1,49	49,5	1,17
10	C	36,1	/	34,4	/
11	CH ₂	20,4	1,46; 1,39	21,2	1,53 ; 1,38
12	CH ₂	39,1	1,14 ; nd	39,5	1,56 ; 1,11
13	C	41,7	/	43,5	/
14	CH	56,0	0,97	55,1	1,04
15	CH ₂	25,3	1,11;	23,8	1,90 ; 1,66
16	CH ₂	27,6	1,22; nd	27,5	1,91 ; 1,15
17	CH	55,3	1,09	56,5	1,24
18	CH ₃	11,4	0,63	14,3	0,80
19	CH ₃	18,7	0,76	14,2	0,91
20	CH	39,9	2,00	40,2	2,08
21	CH ₃	19,5	0,94	20,2	0,88
22	CH	137,8	5,12	138,3	5,48
23	CH	128,5	4,97	129,5	5,28
24	CH	49,4	0,88	52,2	1,63
25	CH	28,5	1,60	31,9	1,62
26	CH ₃	18,9	0,79	21,1	0,86
27	CH ₃	18,4	0,87	21,1	0,95
28	CH ₂	24,7	1,37	25,4	1,44
29	CH ₃	11,6	0,77	12,3	1,03
1'	CH	100,7	4,22 (d, J=7,7)	101,2	4,20
2'	CH	76,4	3,09	75,6	3,14
3'	CH	78,6	3,47	78,0	3,52
4'	CH	73,2	2,95	71,8	3,07
5'	CH	76,6	3,16	77,2	3,23
6'	CH ₂	61,0	3,66; 3,45	62,0	3,58; 3,43

II.1.4.6. Identification du composé CMT31

Le composé CMT31 isolé des écorces du tronc de *C. macrobotrys*, a été obtenu sous forme de poudre blanche soluble dans les solvants tels que le DMSO et le dichlorométhane.

Sur son spectre de masse à haute résolution obtenu par ionisation en mode positif (**Figure 97**), on observe la présence d'un pic correspondant à celui de l'ion moléculaire protoné apparaissant à m/z : 413,3252 $[M+H]^+$, en accord avec la formule brute du composé $C_{29}H_{49}O$ (calculée 413,3783).

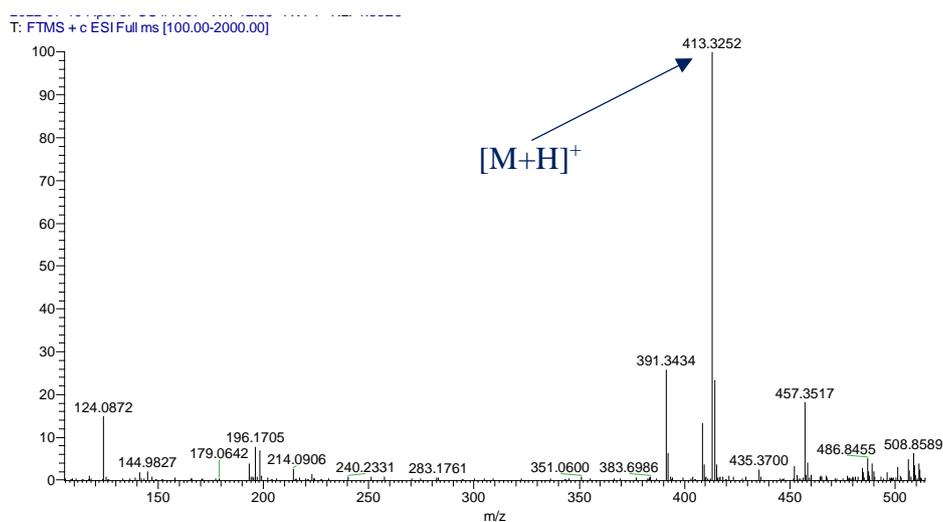
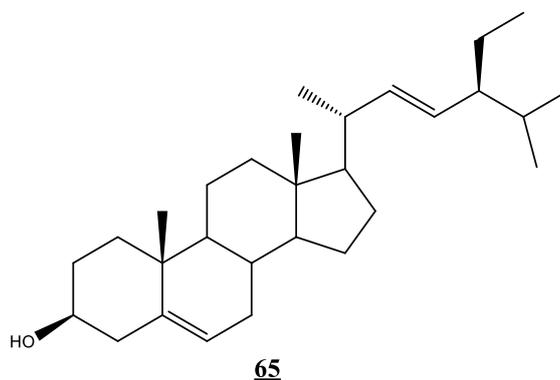


Figure 97: Spectre de masse ESI du composé CMT31

Le composé CMT31 a été identifié comme étant le stigmastérol **65** (Chaturvedula et Prakash, 2012).



En effet, l'interprétation complète des différentes analyses de RMN 1D et 2D (**Figure 98**) comparées à celles du composé CMT21 montre que ces deux composés sont similaires avec une différence se situant uniquement sur la zone osidique absente dans les spectres de CMT31. Ce dernier correspondrait donc au même composé que CMT21 dépourvu du sucre en position 3 du stéroïde. Cela a été confirmé tout d'abord par les valeurs des déplacements chimiques de H-3 (δ_H 3,25 ppm) et C-3 (δ_C 71,1 ppm), mais surtout par le spectre de de masse de CMT31 qui diffère de celui de CMT21 de 162 uma correspondant à la masse d'une unité de glucose.

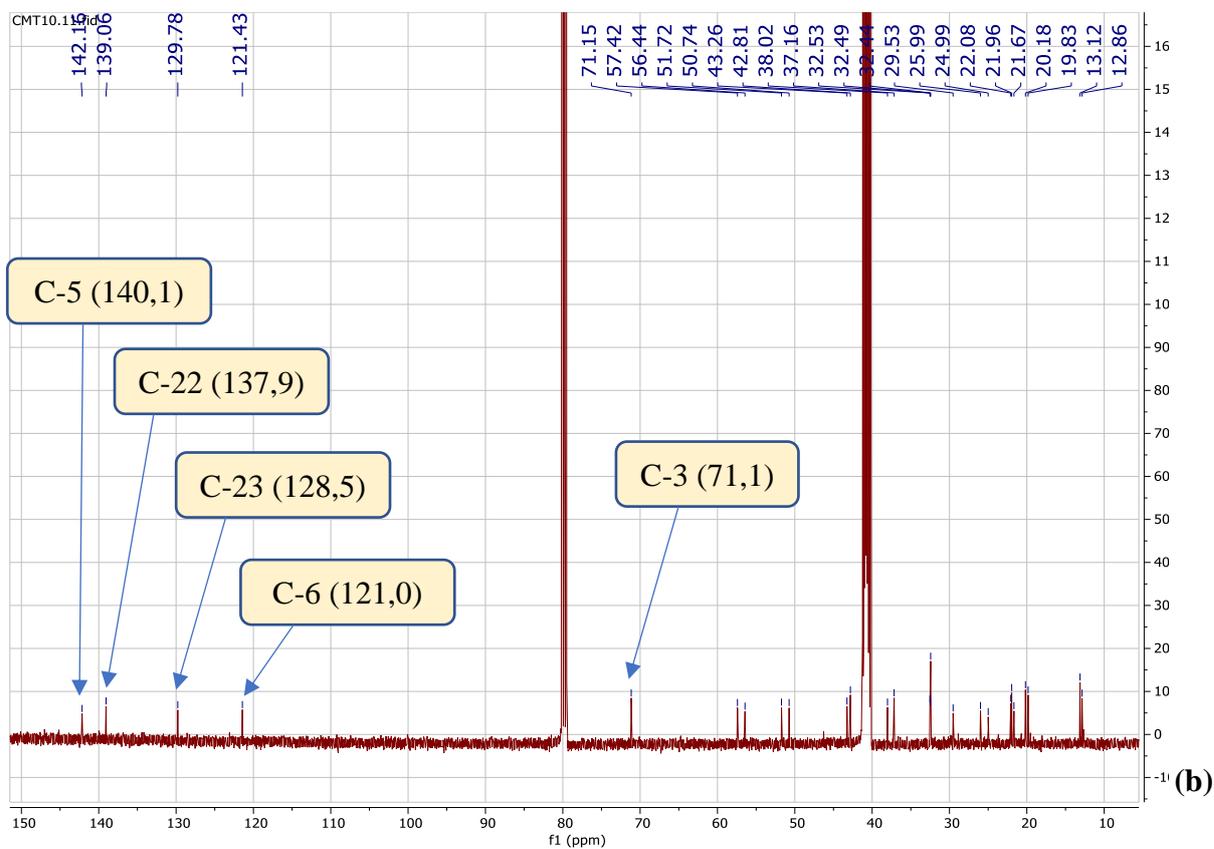
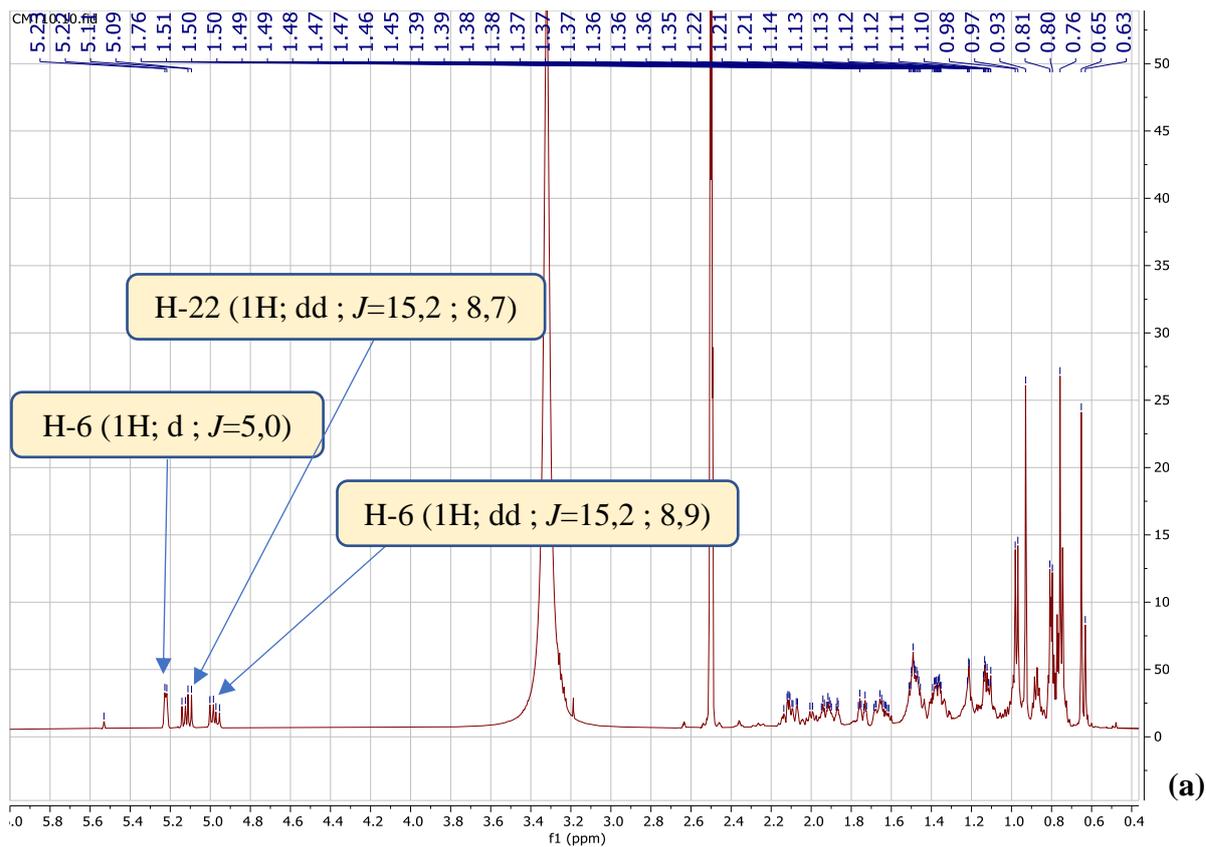


Figure 98: Spectre RMN ^1H (a) ^{13}C (b) du composé CMT31 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz) montrant les signaux de protons et carbones caractéristiques.

Le **tableau 33** ci-dessous présente les valeurs de tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé CMT31.

Tableau 33: Valeurs des déplacements chimiques (^1H et ^{13}C) du composé CMT31 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 et 125 MHz).

N°C	CMT31			stigmastérol (litt)	
	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)	δ_{C}	δ_{H} (mult; J)
1	CH ₂	38,0	1,92; 1,11	37,6	2,06; 1,31
2	CH ₂	32,5	1,87; 1,66	32,1	1,27; nd
3	CH	71,1	3,19 (brd)	72,1	3,53
4	CH ₂	43,2	2,10; nd	42,4	1,96; nd
5	C	142,1	/	141,1	/
6	CH ₂	121,4	5,21	121,8	5,27
7	CH	32,4	1,44; 1,31	31,8	2,19 ; 1,94
8	C	32,4	1,36	31,8	1,37
9	CH	50,7	1,49	50,2	1,17
10	C	37,1	/	36,6	/
11	CH ₂	21,6	1,20; nd	21,5	1,53 ; 1,38
12	CH ₂	42,8	2,08	39,9	1,56 ; 1,11
13	C	42,9	/	42,4	/
14	CH	57,4	0,96	56,8	1,04
15	CH ₂	25,9	1,78; 1,19	24,4	1,90 ; 1,66
16	CH ₂	29,5	1,12	29,3	1,91 ; 1,15
17	CH	56,4	1,10	56,2	1,24
18	CH ₃	11,6	0,65	12,1	0,80
19	CH ₃	18,9	0,93	18,9	0,91
20	CH	41,3	2,08	40,6	2,08
21	CH ₃	20,8	0,97	21,7	0,88
22	CH	137,9	5,12	138,7	5,48
23	CH	128,5	4,98	129,6	5,28
24	CH	50,5	1,50	46,1	1,63
25	CH	32,4	1,28; 0,99	29,6	1,62
26	CH ₃	20,7	0,81	12,1	0,86
27	CH ₃	18,6	0,75	20,2	0,95
28	CH ₂	24,9	1,35; 1,13	25,4	1,44
29	CH ₃	11,9	0,76	12,2	2,06; 1,31

II.1.5. Discussion et conclusion partielles (partie chimique)

Les travaux phytochimiques de cette étude ont conduit à l'isolement de quinze (15) composés entièrement caractérisés et élucidés. De ces composés isolés, douze (12) sont des glycosides (dont 09 saponines triterpéniques, 01 composé phénolique glycosylé, 01 phytostérol glycosylé et 01 disaccharide) car possédant en leur sein au moins une unité osidique. Des trois autres composés non glycosylés, nous avons 02 triterpènes et 01 phytostérol.

D'autre part, parmi les neuf (09) saponines triterpéniques obtenues (principale classe de composés recherchés) six (06) sont des dérivés nouveaux (Polyacosides A, B, C, D, E et F) issus des racines de *A. polyacantha* et trois (03) sont des dérivés précédemment décrits dans la littérature, obtenus des troncs de *C. macrobotrys* (02) et de *A. polyacantha* (01).

Les saponines triterpéniques nouvelles obtenues de *A. polyacantha* (Fabaceae), présentent toutes la particularité de posséder au sein de leurs structures, un groupement méthoxycinnamoylé fixé en position C-21 de l'acide machaérinique (aglycone triterpénique). Ceci est d'autant plus particulier que cette séquence « ²¹Acide machaérinique-cinnamoyloxy » n'avait jamais été rencontrée dans les saponines triterpéniques de cette famille des Fabaceae, reconnue pourtant très riche en saponines triterpéniques avec des structures variées. Cependant, les séquences ²¹Acide machaérinique-¹monoterpène et ²¹Acide acacique-cinnamoyloxy sont couramment rencontrées dans les saponines du genre *Acacia* (Tchoukoua et *al.*, 2021a ; Tchoukoua et *al.*, 2018a,b ; Tchoukoua et *al.*, 2017a,b ; Seo et *al.*, 2001). Dans ce sens, ces travaux représentent donc une contribution importante sur le plan chimio taxonomique des saponines du genre *Acacia*. De plus, le composé phénolique APTB (Acapolyoside) obtenu de la même plante, dérivé nouveau d'acide salicylique ayant une structure cyclisée avec un sucre et dont des structures similaires n'ont jamais été obtenues des espèces du genre *Acacia*, contribue également à enrichir la chimiothèque des plantes de ce genre. Cependant, le dimère de ce composé (Berchemolide), a été précédemment décrit dans les travaux antérieurs effectués sur *Berchemia racemosa* (Sakurai et *al.*, 1992).

Quant aux composés obtenus de *C. macrobotrys*, les travaux phytochimiques de cette étude corroborent ceux de la littérature (Petit et *al.*, 2020 ; Biang et *al.*, 2020 ; Voutquenne et *al.*, 2001), qui montrent que les saponines issues de la famille des Sapindaceae sont majoritairement des dérivés de l'Hédéragénine et possédant en leur sein, la séquence ³Hédéragénine-¹Ara-³Rha comme marqueur chimio taxonomique. Cependant, d'autres composés, bien qu'abondamment décrits dans la littérature et appartenant à d'autres classes de

métabolites secondaires, ont été obtenus de cette espèce pour la première fois (Lup-20(29)-ène-3 α ,23-diol, β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside, stigmastérol 3-*O*- β -D-glucopyranoside et stigmastérol), ce qui contribue également à l'enrichissement de la chimiothèque des composés rencontrés dans cette espèce en particulier et dans les espèces du genre *Chytranthus* en général.

II.2. Etude biologique

II.2.1. Sélection et identification morphologique des champignons pathogènes

Pour cette étude, les champignons pathogènes ont été sélectionnés sur la base de leur disponibilité et en fonction de leur importance en pathologie végétale, selon les conséquences désastreuses qu'ils causent sur les cultures de grande consommation au Cameroun et en Afrique sub-saharienne.

Ainsi, sept (07) phytopathogènes attaquant diverses variétés de cultures ont été ciblés, notamment :

Aspergillus niger spp, *Aspergillus flavus spp*, *Phytophthora infestans spp*, *Fusarium oxysporum spp*, *Fusarium culmorum spp*, *Botrytis cinerea spp*, et *Pythium myriotylum spp*.

II.2.2. Evaluation de l'activité antifongique de la fraction enrichie en saponines codifiée APR issue d'*Acacia polyacantha*

Des tests antifongiques ont été réalisés sur la fraction enrichie en saponines APR ayant conduit à l'isolement des saponines nouvelles obtenues des racines d'*A. polyacantha*. Ces tests ont été réalisés sur l'ensemble des sept (07) champignons pathogènes sélectionnés, à des concentrations différentes de APR. Ainsi, au total six (06) traitements ont été effectués sur chacun des sept champignons dont notamment quatre (04) concentrations de APR (C1= 500 µg/mL ; C2= 250 µg/mL ; C3= 125 µg/mL et C4= 62,5 µg/mL) correspondant aux traitements T1, T2, T3 et T4 respectivement et deux témoins dont un contrôle positif T+ correspondant au milieu de culture du champignon avec 2% de méthanol (solvant de solubilisation de la fraction) sans ajout de fraction et un témoin négatif T- correspondant au traitement du champignon associé au fongicide commercial JUMPER D (Chlorothalonil **33** et Diméthomorphe **34**).

Pour chaque test antifongique réalisé sur chaque phytopathogène, trois paramètres principaux ont été étudiés : la croissance radiale (CR) du champignon en fonction du temps et des traitements, la vitesse de croissance (VC) du champignon en fonction des différents traitements et le pourcentage d'inhibition moyen (PIM) de la fraction enrichie en saponines sur le phytopathogène en fonction des traitements.

II.2.2.1. Paramètres de Croissance Radiale (CR) et de Vitesse de Croissance des différents champignons

❖ *Aspergillus niger spp (AN)*

La **Figure 99a** ci-dessous présente l'évolution de la croissance radiale de *A. niger* en fonction du temps aux jours 3, 5 et 8 et en fonction des traitements. Cette figure permet d'observer une augmentation très modérée et faible de la croissance radiale de *A. niger* avec le temps, comparativement aux témoins où l'on observe particulièrement une augmentation très poussée de la croissance radiale sur le traitement T+ (témoin positif). L'évolution de cette croissance radiale est cependant constante avec le temps et n'est pas significativement différente selon les traitements appliqués.

Les résultats de cette figure montrent qu'après 8 jours d'observation du test, la fraction enrichie en saponines APR a un effet considérable sur le ralentissement de l'évolution du champignon, effet similaire à celui du fongicide commercial utilisé comme référence.

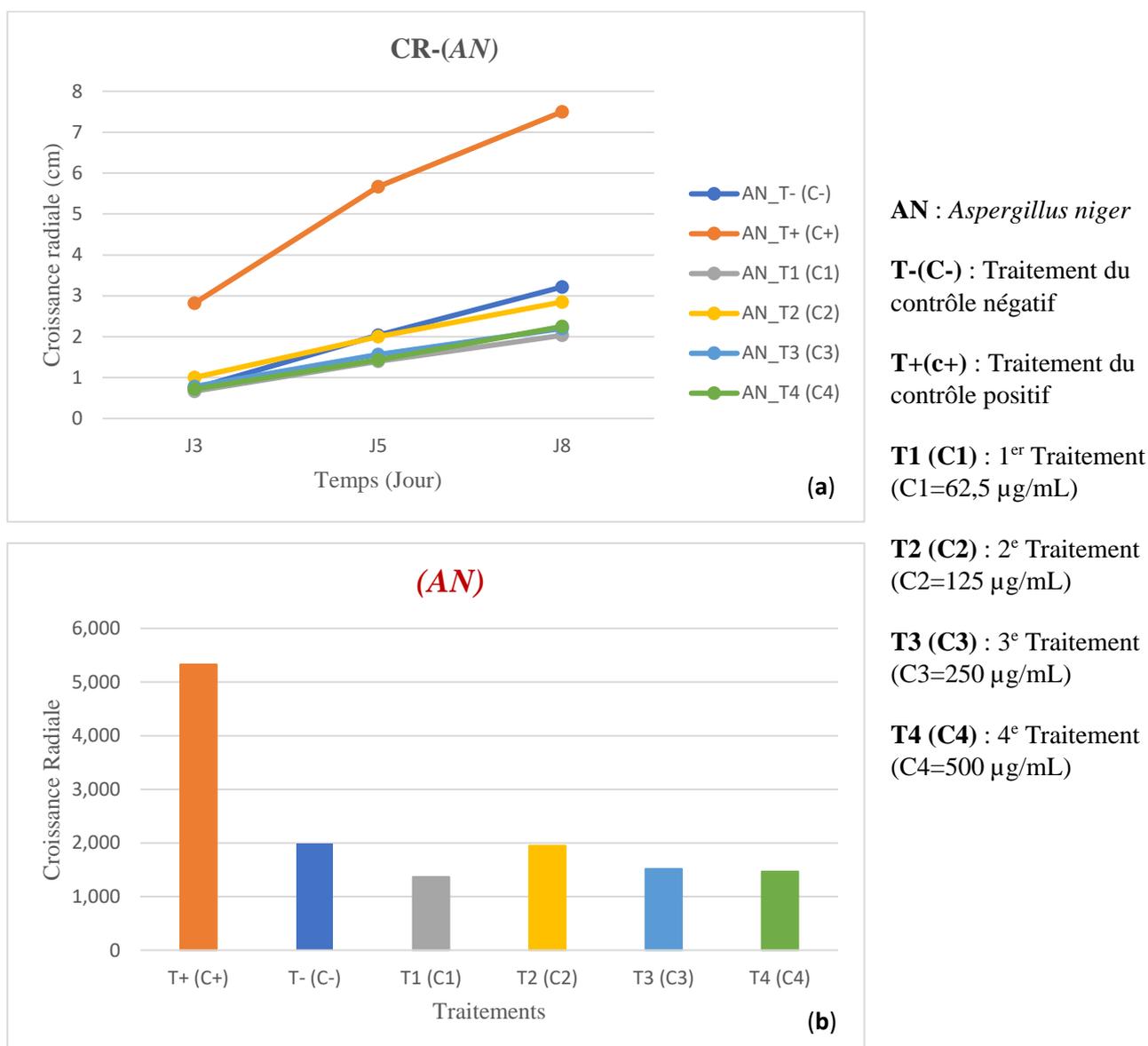


Figure 99: Courbe (a) et diagramme (b) de croissance radiale cumulative de AN en fonction du temps et des traitements

L'évolution de la vitesse de croissance (VC) observée sur le diagramme présenté dans la **figure 100**, permet de dire que le champignon *A. niger* croit à une vitesse constante et relativement faible dans la quasi-totalité des traitements appliqués, à l'exception du témoin positif (traitement T+), ce qui permet de confirmer l'influence de la fraction enrichie APR sur la croissance du champignon *A. niger* tel qu'observé dans l'étude du paramètre CR.

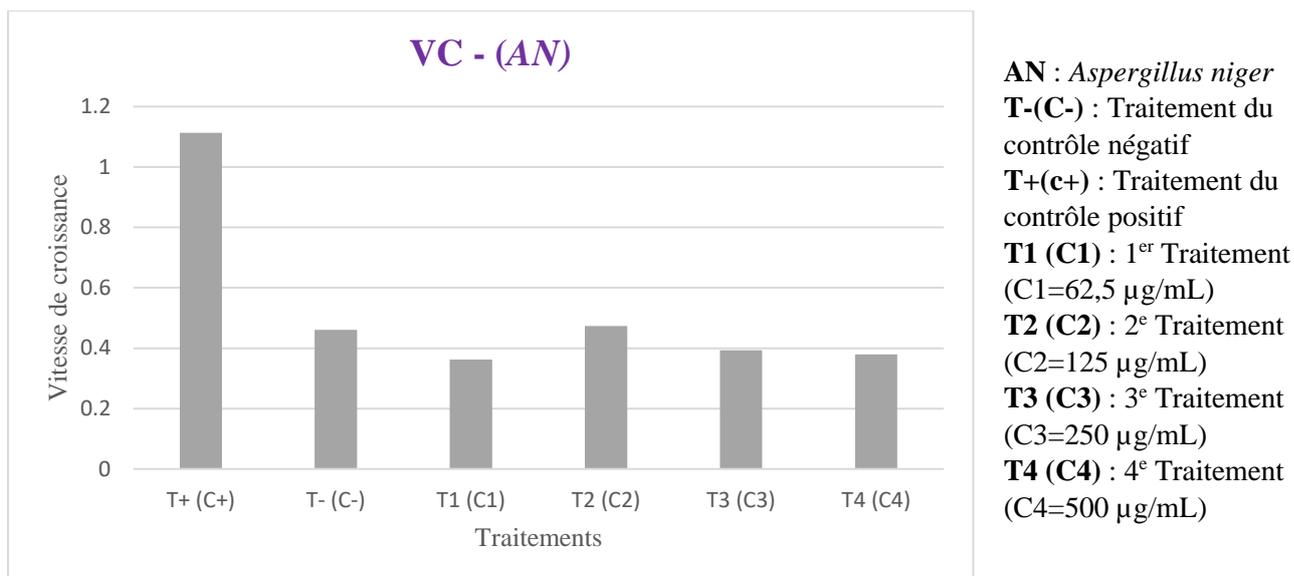
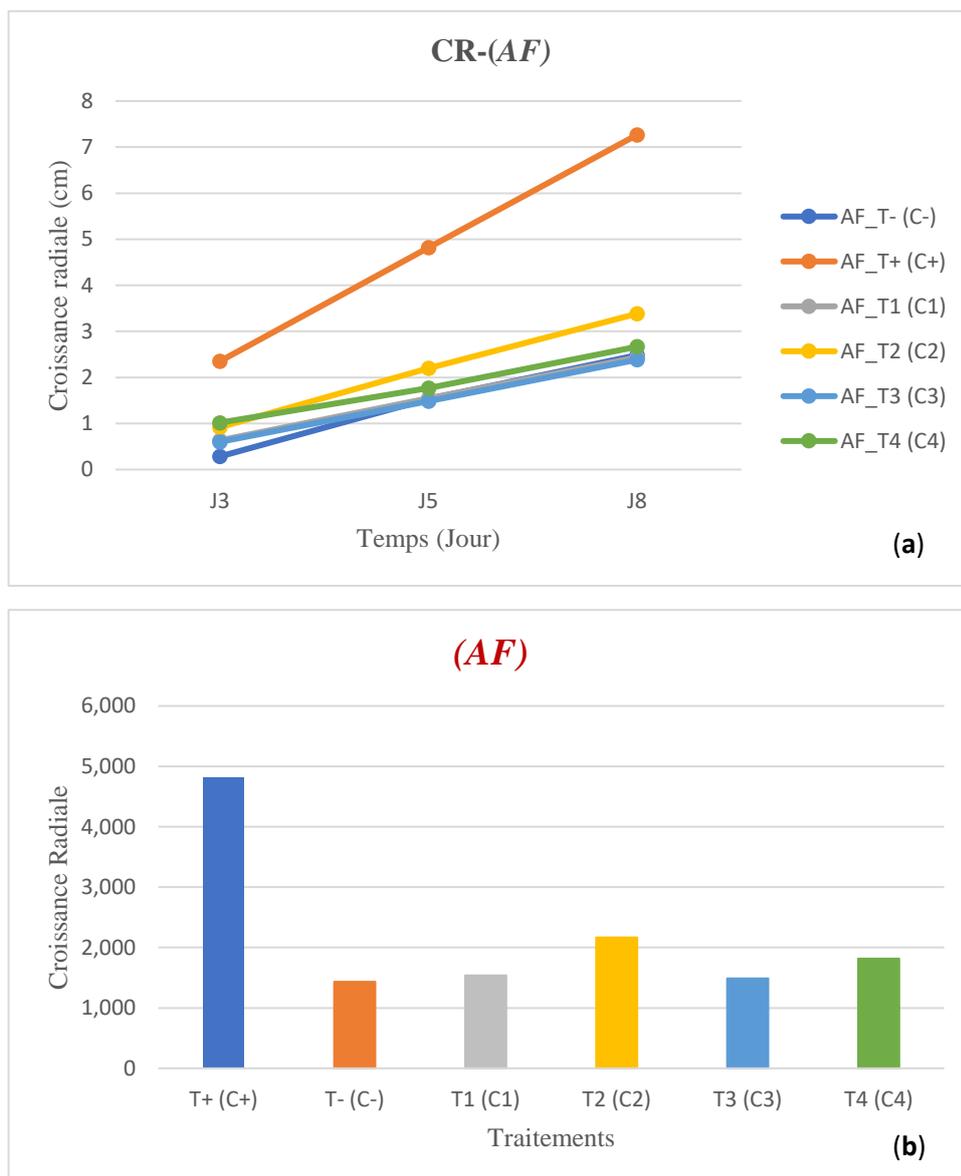


Figure 100: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de AN en fonction des traitements

❖ *Aspergillus flavus* spp (AF)

Le test antifongique réalisé sur la fraction enrichie en saponines APR contre le champignon pathogène *A. flavus* et dont l'évolution de la croissance radiale est présentée dans la **figure 101**, permet de dire que cette fraction enrichie a le même effet sur *A. flavus* que sur *A. niger*. En effet, l'on peut remarquer la faible croissance radiale du champignon au fil des jours et une croissance faible du mycélium pour les différentes concentrations de APR, données similaires à celles du traitement (T-) du fongicide commercial de référence.

La tendance de l'évolution de la vitesse de croissance en fonction des différents traitements tel qu'observé dans la **figure 102**, permet de confirmer l'effet de la fraction enrichie en saponines APR sur ce champignon, effet qui contribue à ralentir considérablement la croissance de ce dernier.



AN : *Aspergillus niger*

T-(C-) : Traitement du contrôle négatif

T+(c+) : Traitement du contrôle positif

T1 (C1) : 1^{er} Traitement (C1=62,5 µg/mL)

T2 (C2) : 2^e Traitement (C2=125 µg/mL)

T3 (C3) : 3^e Traitement (C3=250 µg/mL)

T4 (C4) : 4^e Traitement (C4=500 µg/mL)

Figure 101: Courbe et diagramme d'évolution de la croissance radiale de *AF* en fonction du temps et des traitements

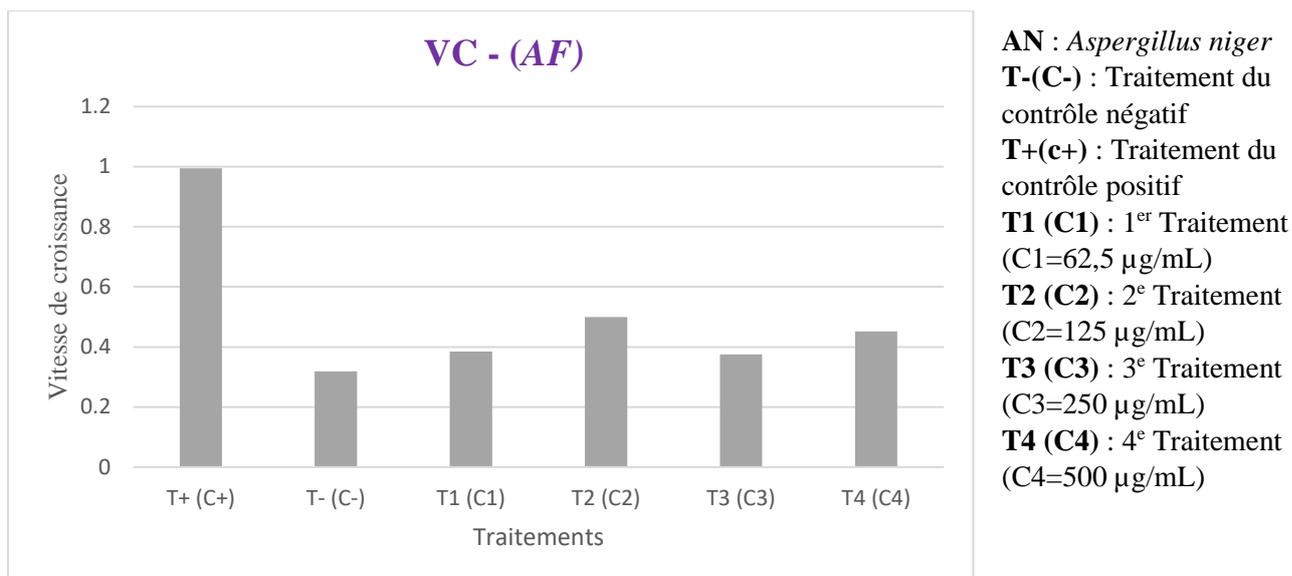
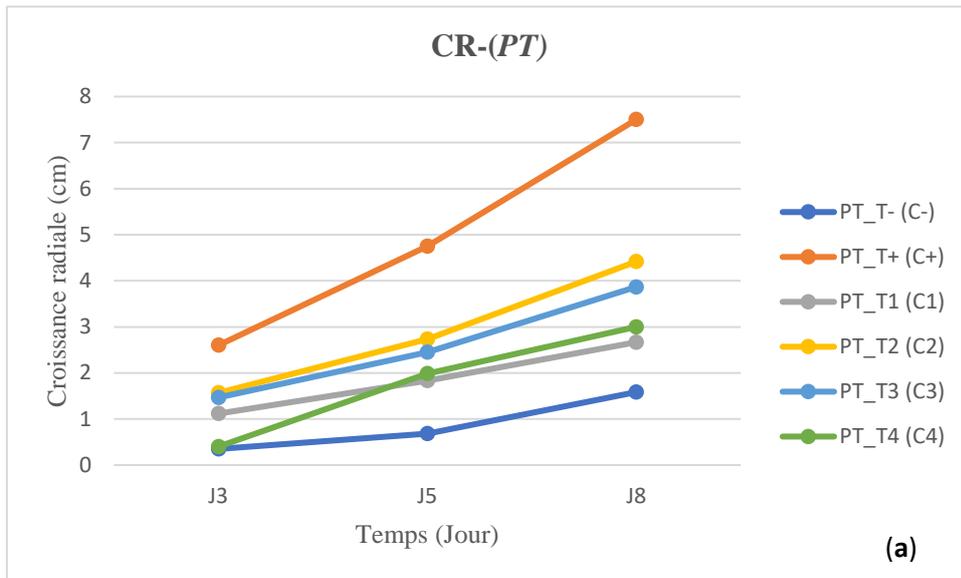


Figure 102: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de AF en fonction des traitements

❖ *Pithium myriotylum spp (PT)*

Sur la **figure 103** présentant l'évolution de la croissance radiale de *PT* en fonction du temps aux jours 3, 5 et 8 après incubation du champignon pathogène, on observe une croissance bien plus faible que celle observée dans le traitement T+ (ne contenant pas de fraction APR) et plus élevée que la croissance du champignon observée dans le traitement T- du fongicide de référence. Ceci révèle un ralentissement de croissance du champignon provoqué par la fraction enrichie d'intérêt et suggérant une activité antifongique intéressante de cette fraction.



AN : *Aspergillus niger*

T-(C-) : Traitement du contrôle négatif

T+(c+) : Traitement du contrôle positif

T1 (C1) : 1^{er} Traitement (C1=62,5 µg/mL)

T2 (C2) : 2^e Traitement (C2=125 µg/mL)

T3 (C3) : 3^e Traitement (C3=250 µg/mL)

T4 (C4) : 4^e Traitement (C4=500 µg/mL)

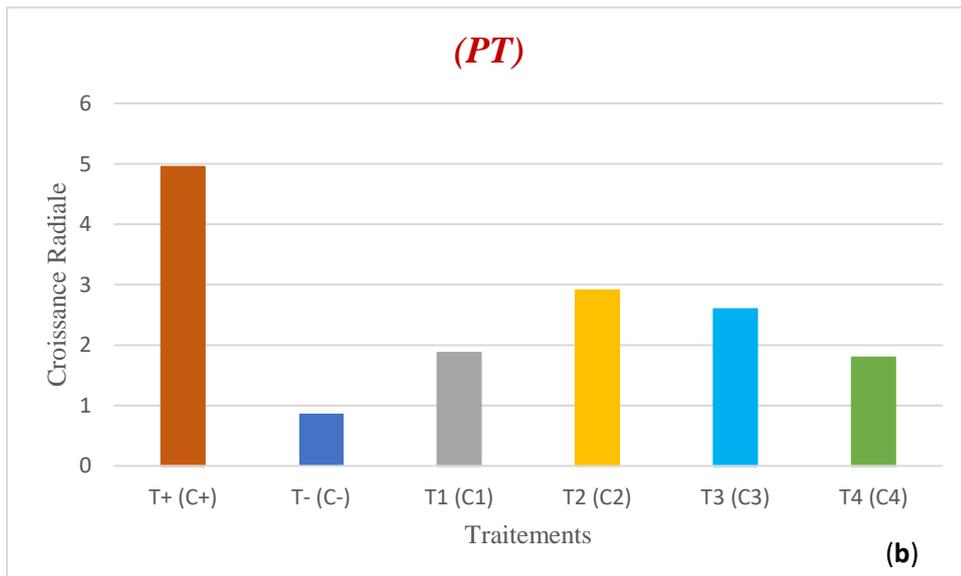


Figure 103: Courbe et diagramme d'évolution de PT en fonction du temps et des traitements

Le diagramme d'évolution de la vitesse de croissance en fonction des traitements présenté dans la **figure 104**, permet de remarquer une augmentation de cette vitesse de croissance au fur et à mesure que l'on diminue la concentration de la fraction enrichie APR. La fraction enrichie en saponines APR agirait donc plus efficacement aux concentrations élevées sur le phytopathogène *PT*.

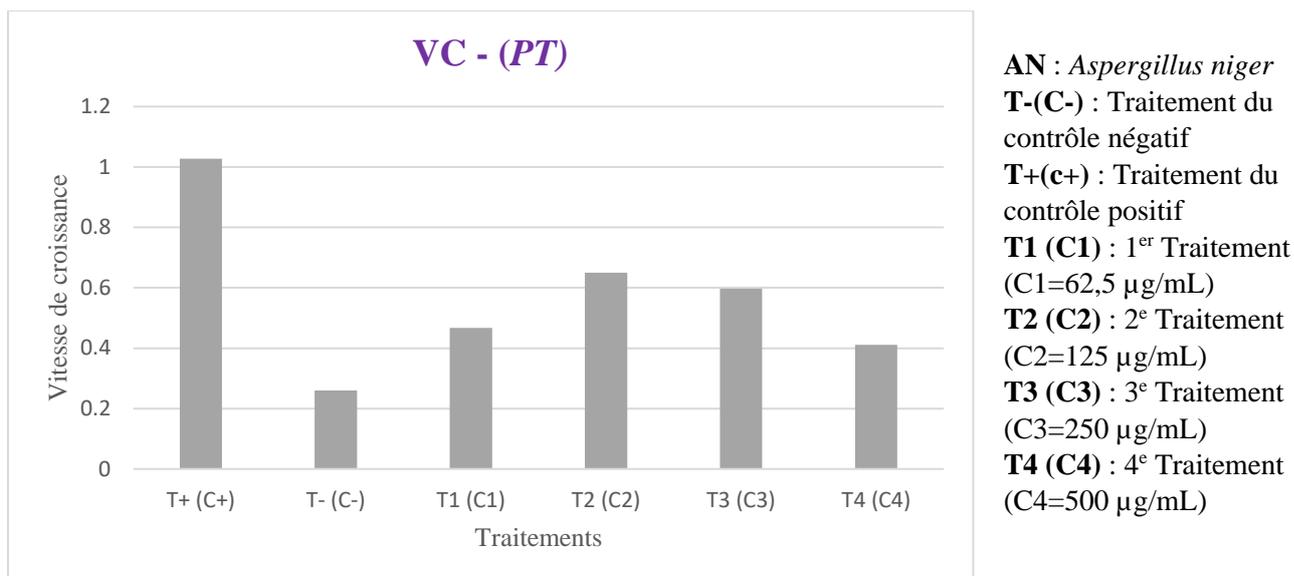


Figure 104: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de *PT* en fonction des traitements

❖ *Fusarium Oxysporum spp (FO)*

L'observation de la **figure 105** présentant l'évolution de la croissance radiale du champignon *FO* en fonction du temps et des traitements, permet de remarquer la forte croissance du champignon avec le temps, peu importe la concentration de la fraction enrichie utilisée. Cette croissance du phytopathogène connaît cependant un léger ralentissement à partir du 3^e jour, ce qui permet de soupçonner une virulence plus poussée du champignon *FO* entre le 1^{er} et le 3^e jour d'apparition des symptômes, ou encore une légère activité de la fraction enrichie APR sur le champignon *FO* au fur et à mesure que le temps augmente.

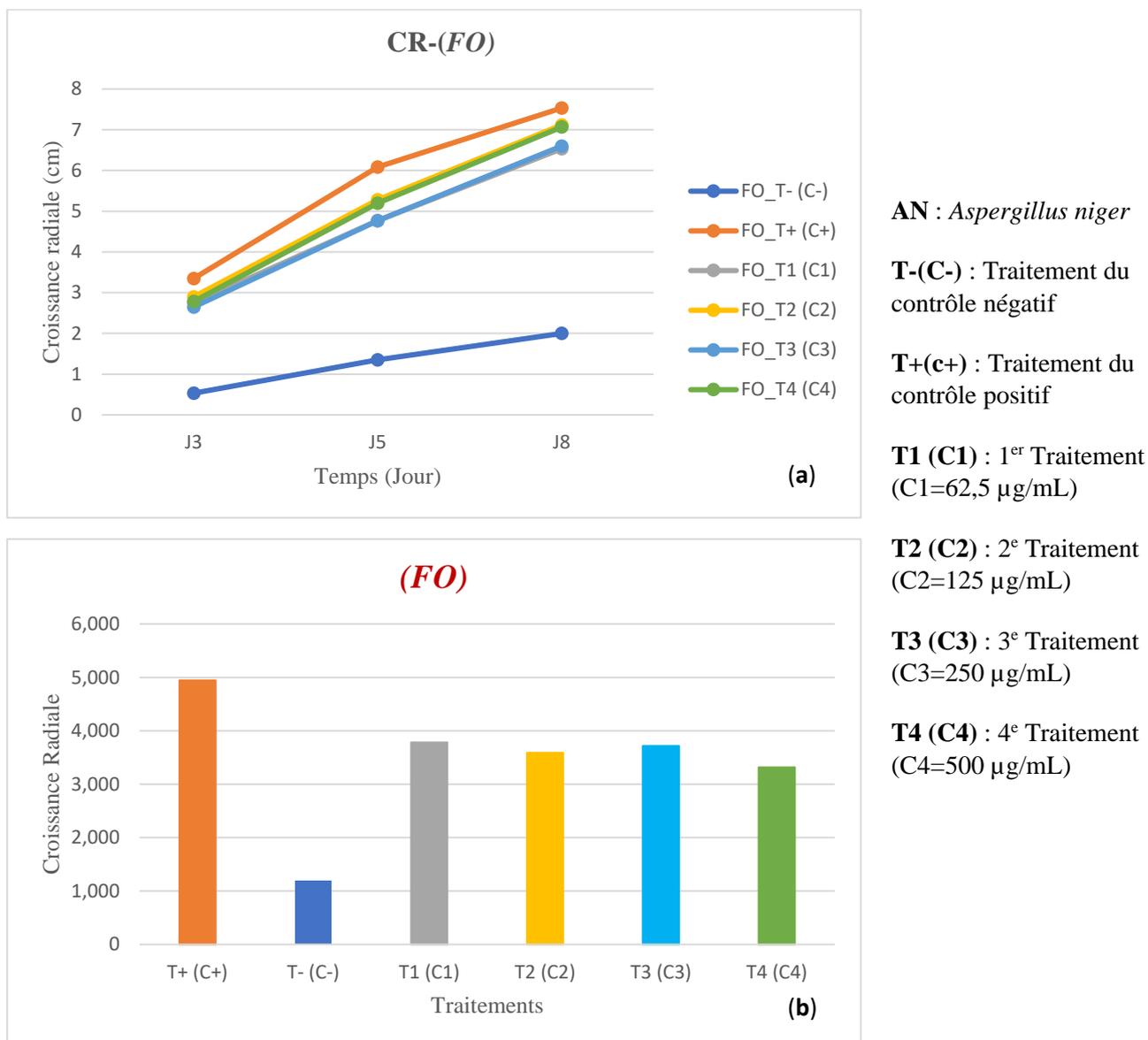


Figure 105: Courbe et diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de FO en fonction du temps et des traitements

Les différentes concentrations de la fraction enrichie APR appliquées sur FO n'ont cependant aucune influence sur la vitesse de croissance dudit champignon tel qu'observé sur le diagramme de la **figure 106**.

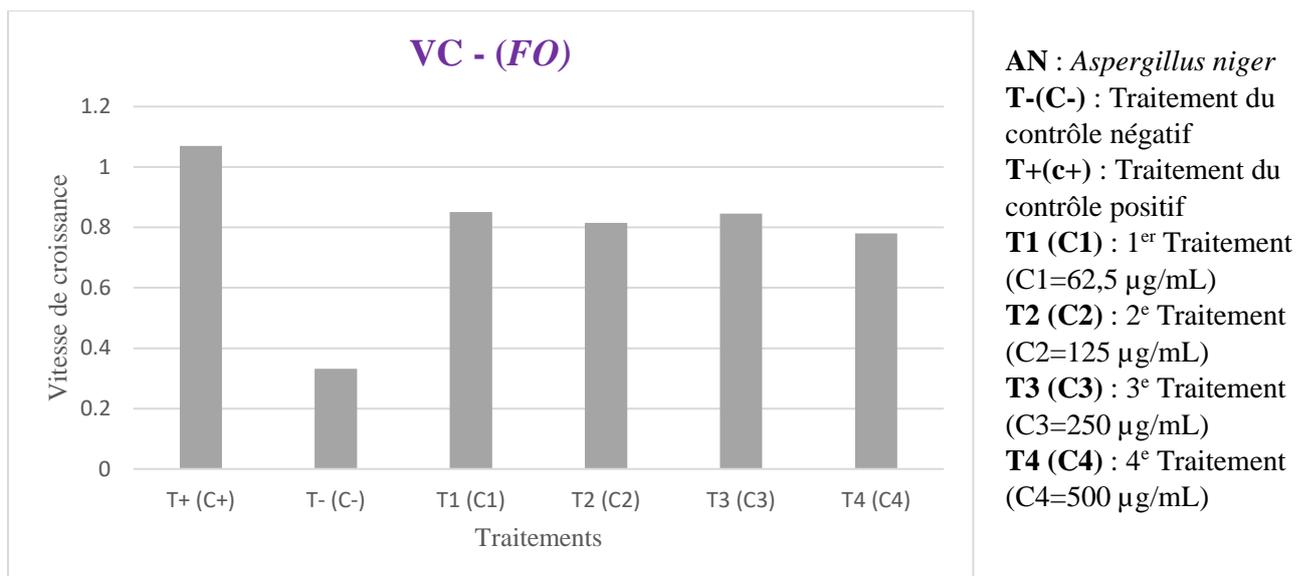
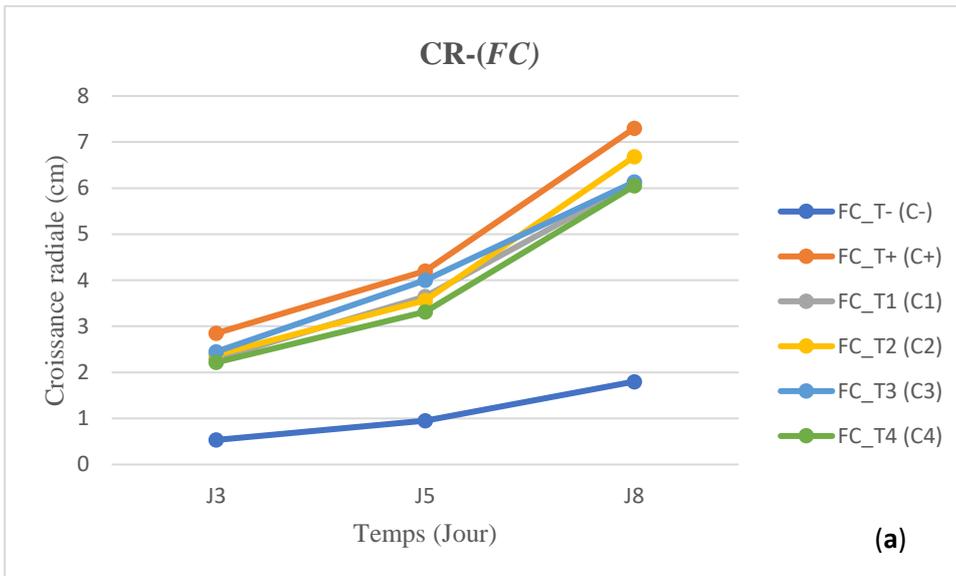


Figure 106: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de FO en fonction des traitements

❖ *Fusarium culmorum* spp (*FC*)

L'observation de la **figure 107** permet de dire que les différentes concentrations de la fraction enrichie APR n'ont aucune influence sur la croissance radiale du champignon *FC*. Cette forte croissance radiale similaire à celle observée dans le traitement T+ (contenant uniquement le milieu de culture) est cependant plus accentuée à partir du 3^e jour d'incubation, suggérant ainsi une plus grande virulence de ce champignon au fil du temps. La fraction enrichie APR n'aurait donc aucune influence sur le champignon *FC*.



AN : *Aspergillus niger*

T-(C-) : Traitement du contrôle négatif

T+(c+) : Traitement du contrôle positif

T1 (C1) : 1^{er} Traitement (C1=62,5 µg/mL)

T2 (C2) : 2^e Traitement (C2=125 µg/mL)

T3 (C3) : 3^e Traitement (C3=250 µg/mL)

T4 (C4) : 4^e Traitement (C4=500 µg/mL)

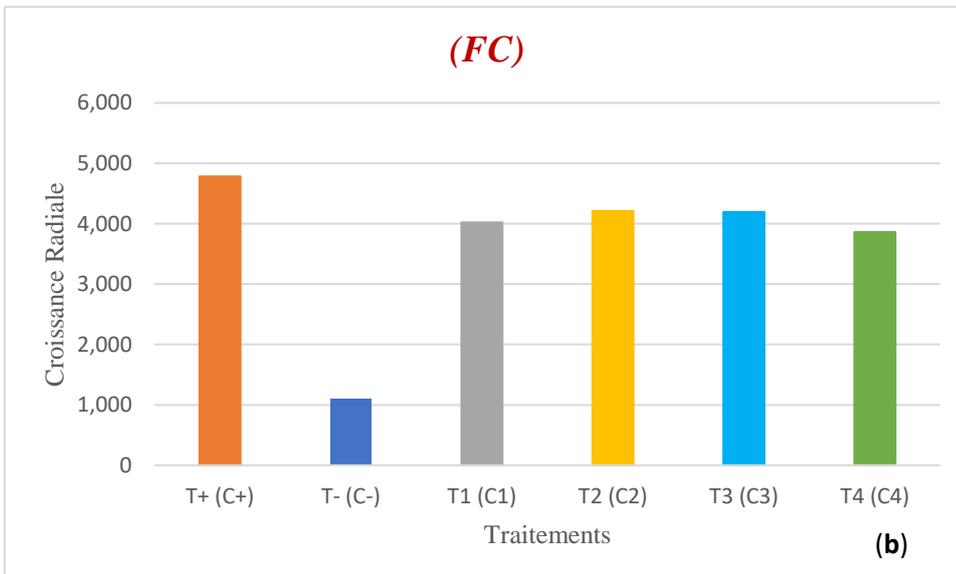


Figure 107: Courbe et diagramme d'évolution de la croissance radiale de *FC* en fonction du temps et des traitements

La vitesse de croissance de *FC* dont la tendance est observée dans le diagramme de la **figure 108** vient ainsi corroborer les remarques faites sur l'évolution de la croissance radiale, suggérant qu'il n'y a aucune activité antifongique de APR sur ce champignon en comparaison avec les observations du traitement du fongicide commercial.

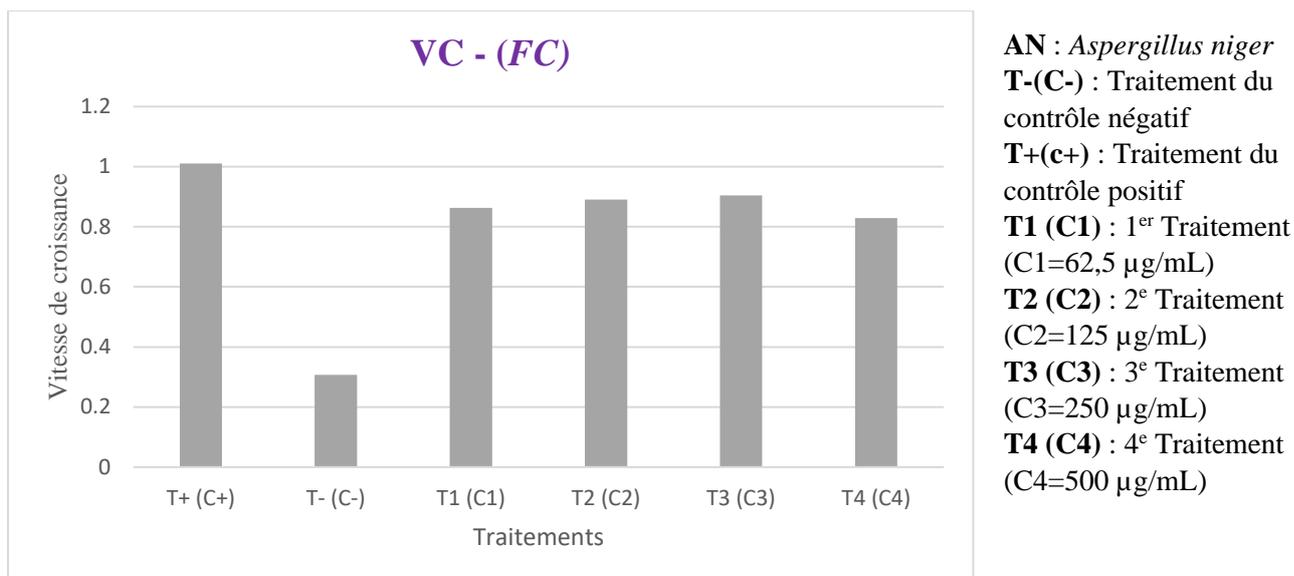
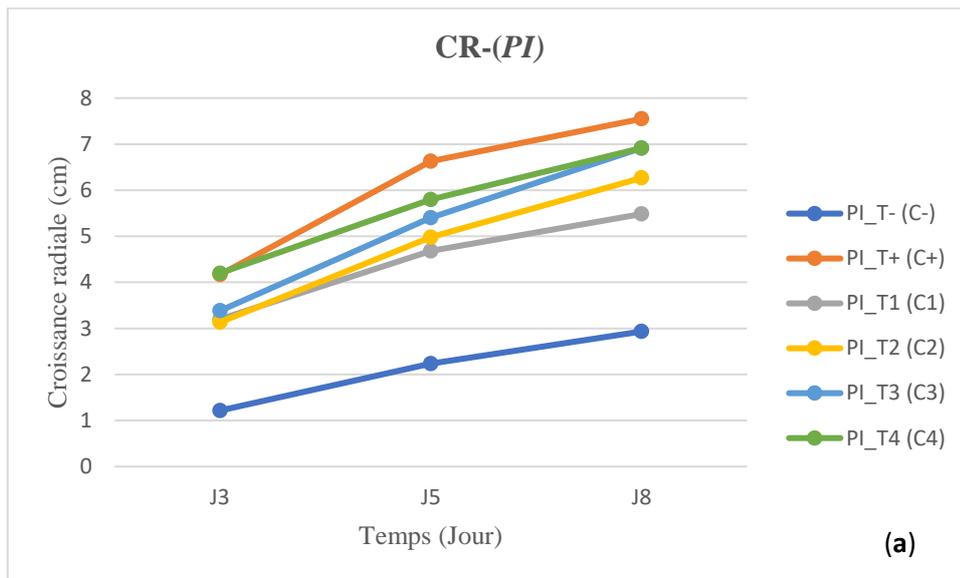


Figure 108: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de FC en fonction des traitements

❖ *Phytophthora Infestans* spp (*PI*)

Les croissance radiale et vitesse de croissance de *PI* dont les courbes et diagrammes sont présentés dans la **figure 109**, montrent que la fraction enrichie en saponines APR n'a pratiquement aucune influence sur ce champignon pathogène.

Cependant, l'on observe tout de même un léger ralentissement de ces paramètres (croissance radiale et vitesse de croissance) au fil du temps et en fonction des concentrations. *P. infestans* serait donc moins virulent à partir du 3^e jour, ce qui augmenterait de manière faible, l'action antifongique de la fraction enrichie APR sur ce phytopathogène.



AN : *Aspergillus niger*

T-(C-) : Traitement du contrôle négatif

T+(c+) : Traitement du contrôle positif

T1 (C1) : 1^{er} Traitement (C1=62,5 µg/mL)

T2 (C2) : 2^e Traitement (C2=125 µg/mL)

T3 (C3) : 3^e Traitement (C3=250 µg/mL)

T4 (C4) : 4^e Traitement (C4=500 µg/mL)

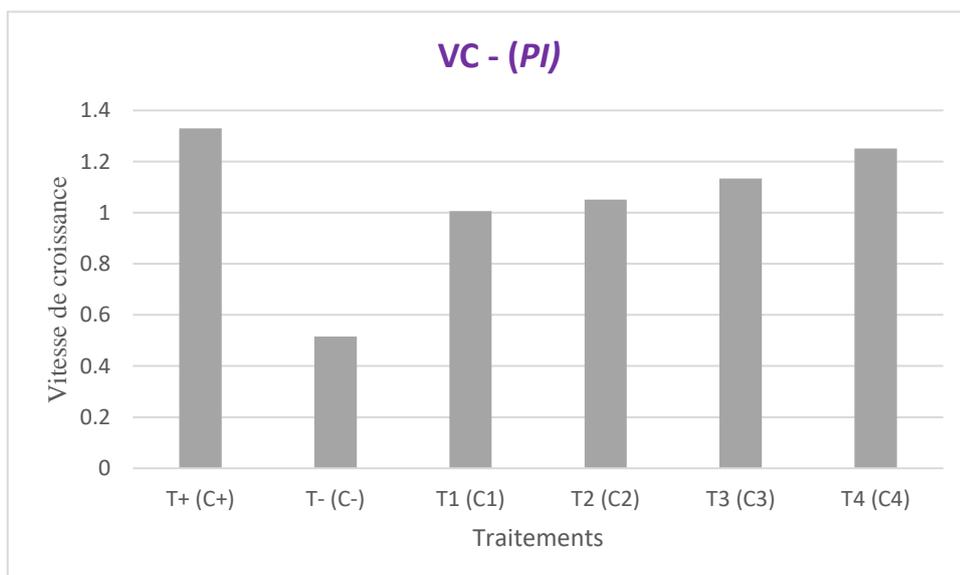
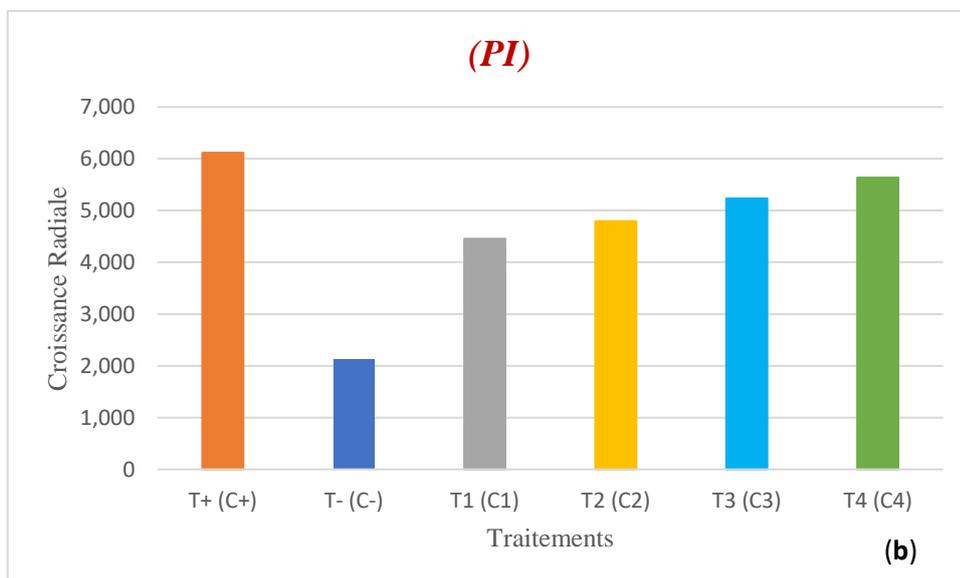


Figure 109: Courbe et diagrammes des croissance radiale et vitesse de croissance de *PI* en fonction du temps et des traitements.

❖ *Botrytis cinerea* spp (BC)

L'interprétation des **figures 110** et **111** en comparaison avec les données de la fraction APR sur *P. infestans*, permet de dire que cette fraction a un comportement semblable sur le champignon *B. cinerea*, à la différence que ce dernier a une croissance radiale constante et continue avec le temps.

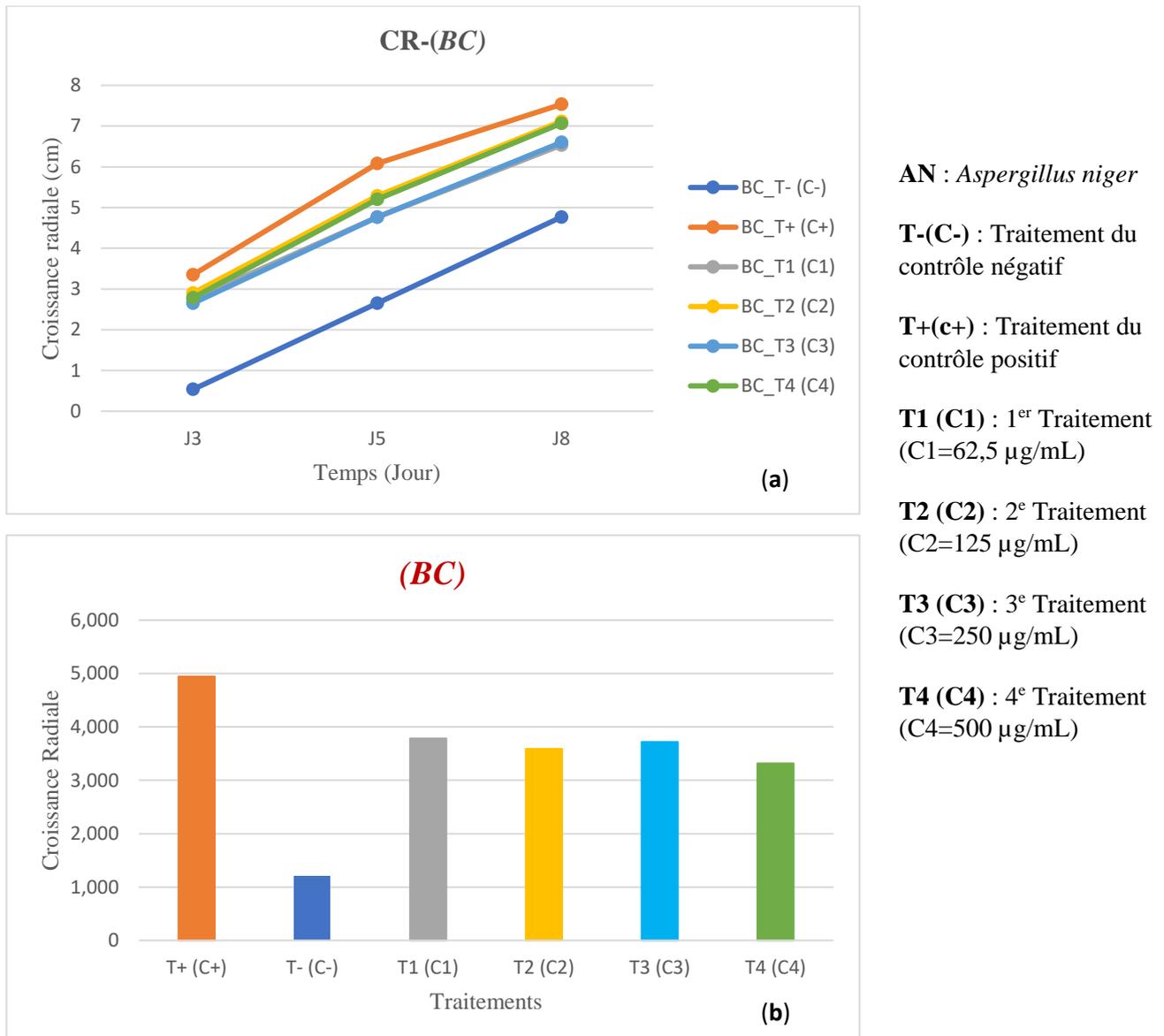


Figure 110: Courbe et diagramme de la croissance radiale de BC en fonction du temps et des traitements

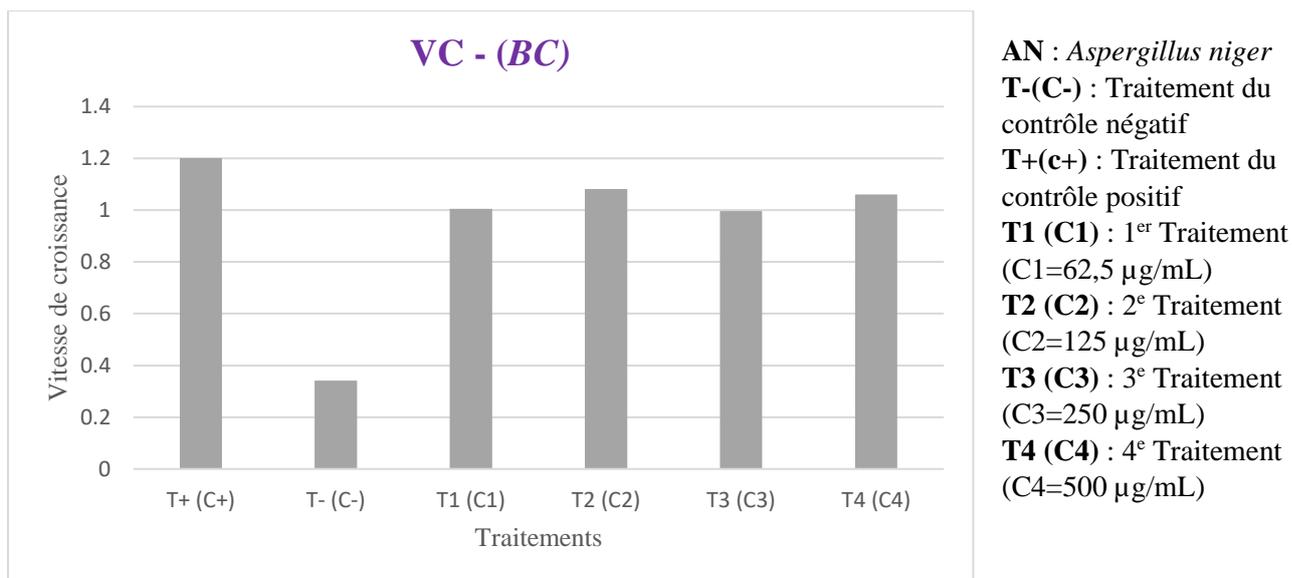


Figure 111: Diagramme d'évolution de la vitesse de croissance de *BC* en fonction des traitements

II.2.2.2. Paramètre de Pourcentage d'Inhibition Moyen

L'interprétation du **tableau 34** dont les données ont été représentées sous-forme de diagramme dans la **figure 112**, permet de ressortir une bonne activité antifongique de la fraction APR sur les deux champignons du genre *Aspergillus* (*niger* et *flavus*), avec des valeurs de pourcentage d'inhibition supérieures à 60% (PIM > 60%) pour presque toutes les concentrations utilisées, à l'exception du traitement T4 (C4) qui révèle une activité modérée avec des valeurs de pourcentage d'inhibition moyen (PIM) comprises entre 50 et 60% selon l'échelle de Abdellatif et *al.*, 2011. Ces valeurs de PIM sur les champignons *A. niger* et *A. flavus*, sont supérieures à celles du fongicide commercial utilisé comme référence, suggérant ainsi une meilleure activité de la fraction enrichie en saponines APR par rapport celle du fongicide de référence. Ces données sont en accord avec celles des paramètres CR et VC précédemment décrits dans ce document.

Cette bonne activité antifongique de la fraction APR est également observée sur le champignon *PT*, pour des concentrations de fractions élevées (≥ 500 µg/L), contrairement aux faibles concentrations de la fraction enrichie APR (< 500 µg/L) où l'on observe globalement aucune inhibition du champignon.

En ce qui concerne les autres champignons pathogènes, ceux du genre *Fusarium* (*F. culmorum* et *F. oxysporum*) ainsi que *Phytophthora infestans* et *Botrytis cinerea*, aucune inhibition n'a été observée pour toutes les concentrations de la fraction APR appliquée. Ceci conduit à dire que

la fraction enrichie en saponines APR n'a présenté aucune activité antifongique sur ces champignons pathogènes.

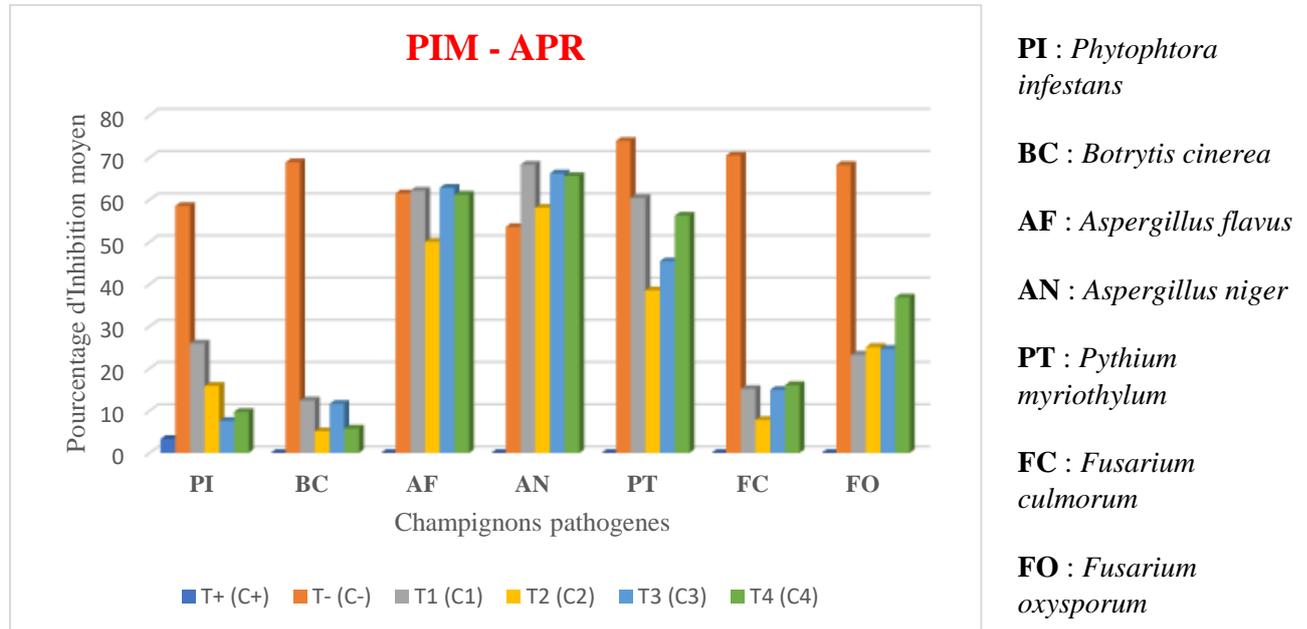


Figure 112: Diagramme d'évolution des pourcentages d'inhibition de APR sur tous les champignons en fonction des traitements

II.2.3. Evaluation de l'activité antifongique de la fraction enrichie CMT

Les tests identiques, réalisés sur la fraction enrichie en saponines précédente, ont été réalisés également sur la fraction enrichie en saponines de la deuxième plante CMT.

II.2.3.1. Paramètres de Croissance Radiale (CR) et de Vitesse de Croissance (VC)

L'interprétation des courbes et diagrammes des **figures 113** et **114**, présentant l'évolution des croissance radiale et vitesse de croissance en fonction du temps et des concentrations, permet d'observer une augmentation continue de la vitesse de croissance des champignons *AN*, *AF*, *PT*, *PI* et *BC* avec le temps pour toutes les concentrations. Ce qui permet de dire la fraction CMT, peu importe la concentration, n'a aucune influence sur la vitesse de croissance de ces champignons.

Cependant, on observe clairement sur cette figure, une diminution de la vitesse de croissance pour les deux champignons du genre *Fusarium* (*FC* et *FO*), au fur et à mesure que l'on augmente la concentration de la fraction CMT.

La croissance radiale des champignons *PT*, *FO* et *FC* observée aux jours 3,5 et 8 à différentes concentrations de CMT, permet de remarquer une augmentation de celle-ci lors des premiers jours d'incubation et un ralentissement à partir du 3^e jour. Comparée à la courbe du fongicide commercial (T-), cela révèle une virulence de ces champignons aux premiers jours d'apparition des symptômes faisant de cette période (3 premiers jours), la plus sensible lors de laquelle les cultures attaquées par ces champignons nécessitent un traitement poussé.

Cette tendance est inversée pour le champignon *PI*, où l'on observe une faible croissance entre le premier et le 3^e jour, et une accélération de croissance à partir du 3^e jour. Tandis que pour les phytopathogènes du genre *Aspergillus* (*AN* et *AF*), la croissance radiale de leurs mycéliums reste constante et accélérée avec l'évolution du temps.

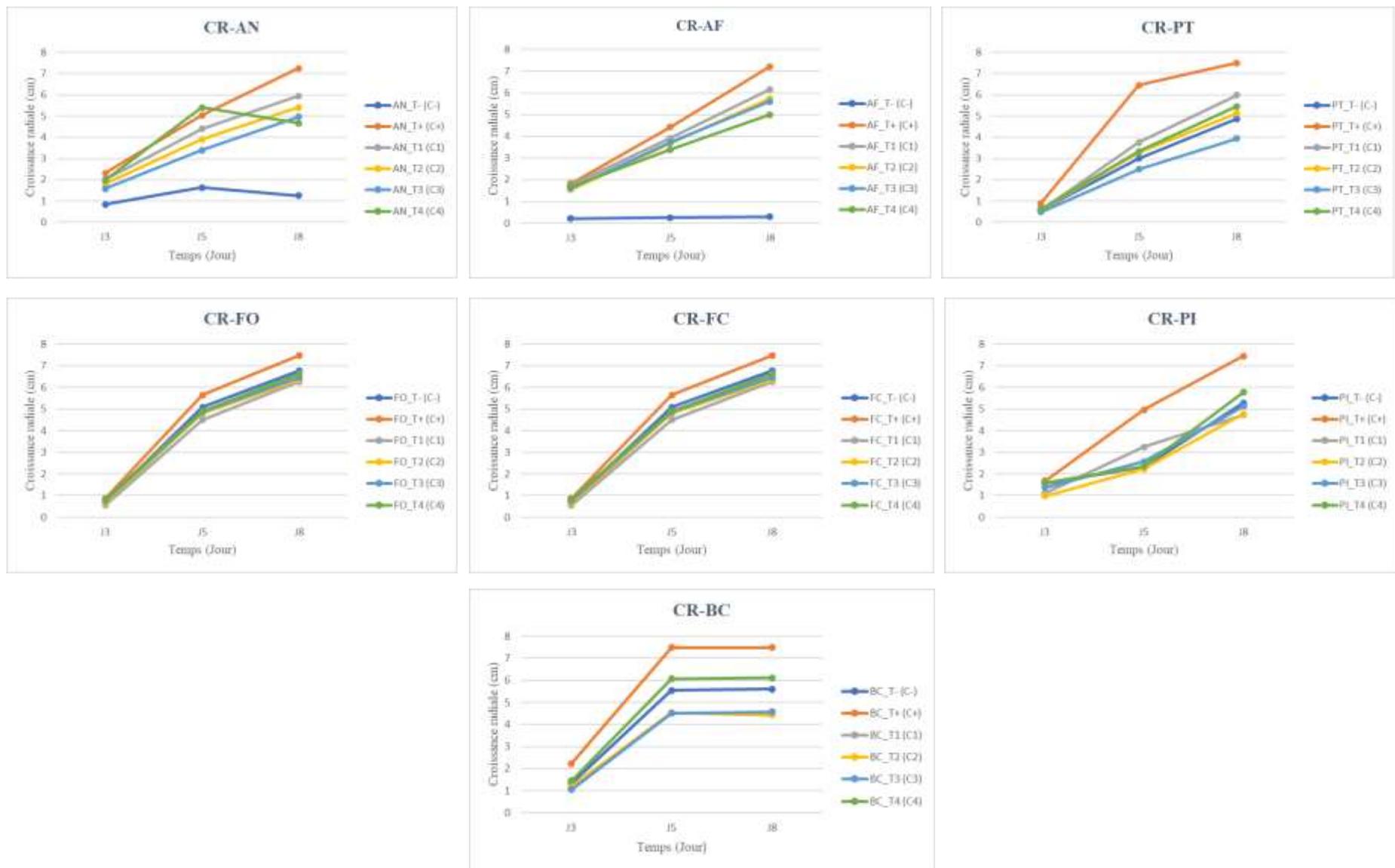


Figure 113: Courbes d'évolution de la croissance radiale des différents champignons en fonction du temps (fraction CMT)

II.2.3.2. Paramètre de Pourcentage d’Inhibition Moyen

L’ensemble des pourcentages moyens de la fraction enrichie en saponines CMT représentés dans le diagramme de la **figure 114** et compilés dans le **tableau 34**, montre que cette fraction enrichie testée à différentes concentrations, ne présente aucune inhibition significative sur tous les champignons choisis. La fraction enrichie en saponines CMT, aux concentrations inférieures à 500 µg/mL, ne présenterait donc aucune activité antifongique sur les sept champignons pathogènes utilisés.

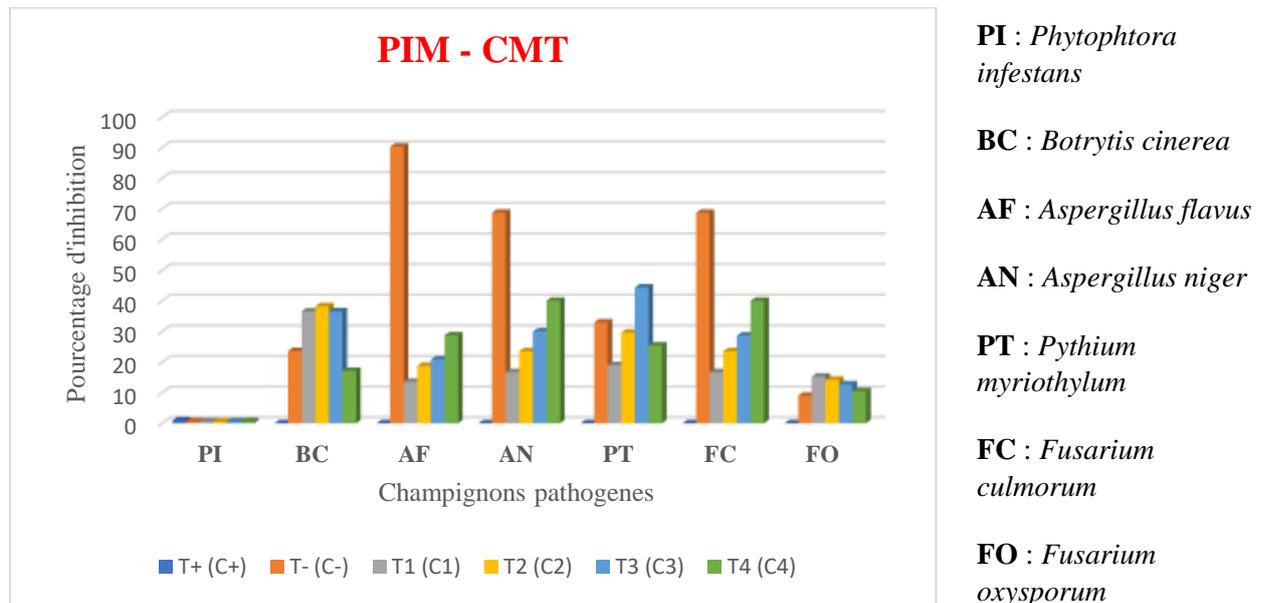


Figure 114: Diagramme d’évolution des pourcentages d’inhibition de CMT des différents champignons en fonction des traitements

Tableau 34: Valeurs des pourcentages d'inhibition de APR et CMT sur les champignons pathogènes testés.

Fractions	Traitements	Pourcentage d'inhibition (Moyenne ± écart-type)						
		PI	BC	AF	AN	PT	FC	FO
APR	T+	3,33 ± 0,08 a	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a
	T-	58,60 ± 0,71 d	68,90 ± 0,71 d	62,00 ± 4,01 d	54,00 ± 2,01 b	74,00 ± 15,01 e	71,00 ± 2,01 e	68,25 ± 4,61 c
	T1	26,00 ± 6,01 c	13,00 ± 7,01 c	63,00 ± 8,01 d	68,00 ± 3,01 c	60,00 ± 2,01 d	15,00 ± 5,01 cd	36,84 ± 1,91 b
	T2	16,00 ± 7,01 c	5,14 ± 5,12 bc	63,00 ± 4,01 d	66,25 ± 0,01 c	56,25 ± 4,89 d	16,08 ± 4,76 c	26,00 ± 14,01 b
	T3	8,00 ± 2,01 b	12,00 ± 6,01 c	61,00 ± 5,01 c	65,62 ± 0,01 c	39,00 ± 8,01 c	15,00 ± 3,01 bc	25,00 ± 20,01 b
	T4	10,00 ± 7,01 ab	6,00 ± 3,01 bc	50,00 ± 3,01 c	58,00 ± 5,01 b	45,00 ± 9,01 c	8,00 ± 5,01 bc	23,00 ± 5,01 b
CMT	T+	0,94 ± 0,01 a	0,99 ± 0,01 a	0,96 ± 0,04 a	0,97 ± 0,06 a	1,00 ± 0,01 a	0,99 ± 0,05 a	0,99 ± 0,01 a
	T-	0,66 ± 0,07 b	23,60 ± 0,05 c	90,30 ± 0,04 d	68,70 ± 0,41 a	32,92 ± 0,12 bc	68,70 ± 0,05 a	8,97 ± 0,04 b
	T1	0,65 ± 0,03 b	36,54 ± 0,04 d	13,50 ± 0,21 abc	16,69 ± 0,06 a	18,97 ± 0,21 b	16,69 ± 0,03 a	15,24 ± 0,03 c
	T2	0,57 ± 0,04 b	38,20 ± 0,04 d	18,73 ± 0,12 bc	23,60 ± 0,31 a	29,60 ± 0,21 bc	23,57 ± 0,05 a	14,20 ± 0,41 bc
	T3	0,60 ± 0,21 b	36,55 ± 0,09 d	20,85 ± 0,07 bc	30,00 ± 0,41 a	44,38 ± 0,08 c	28,60 ± 0,31 a	12,73 ± 0,01 bc
	T4	0,70 ± 0,21 b	17,12 ± 0,01 b	28,71 ± 0,03 c	40,00 ± 1,01 a	25,40 ± 0,21 bc	40,00 ± 0,04 a	10,43 ± 0,03 bc

T+ : PDA + antibiotique + méthanol + phytopathogène

T1 : PDA + antibiotique + méthanol + phytopathogène + C1 fraction enrichie en saponines (C1 = 500 µg/mL)

T2 : PDA + antibiotique + méthanol + phytopathogène + C2 fraction enrichie en saponines
(C2 = 250 µg/mL)

T3 : PDA + antibiotique + méthanol + phytopathogène + C3 fraction enrichie en saponines
(C3 = 125 µg/mL)

T4 : PDA + antibiotique + méthanol + phytopathogène + C4 fraction enrichie en saponines
(C4 = 62,5 µg/mL)

T- : PDA + antibiotique + méthanol + phytopathogène + fongicide synthétique de référence

II.2.5. Discussion et conclusion partielles (partie biologique)

L'ensemble des tests antifongiques réalisés sur les deux principales fractions enrichies en saponines d'intérêt (APR et CMT) des deux plantes étudiées, contre sept champignons pathogènes responsables de graves maladies fongiques sur les cultures, a révélé des activités intéressantes. Ainsi, de manière générale, la fraction enrichie APR à faible concentration ($C \geq 62,5 \mu\text{g/mL}$), a présenté une bonne activité antifongique sur les champignons du genre *Aspergillus* ainsi qu'une bonne activité également sur *Pythium myriotylum* pour des concentrations de fraction élevées ($C \geq 500 \mu\text{g/mL}$). Cette fraction n'a cependant présenté aucune activité sur *B. cinerea*, *P. infestans* et les *Fusarium* (*F. oxysporum* et *F. culmorum*).

Quant à la fraction enrichie en saponines de la deuxième plante *C. macrobotrys*, aucune activité antifongique n'a été décelée sur tous les champignons testés.

❖ Effet du squelette de saponines triterpéniques

Toutes les saponines isolées de la fraction enrichie en saponines APR (Polyacoside A-F) possèdent le même squelette (acide machaérinique-²¹méthoxycinnamoyl) avec comme différence la nature des sucres d'une part et le nombre de groupements méthoxy fixés sur le noyau aromatique du cinnamoyle d'autre part. Ces saponines sont donc structurellement différentes de celles contenues dans la fraction enrichie CMT, qui sont toutes constituées d'un squelette Rha-Ara-³Hédéragénine, marqueur caractéristique des saponines des Sapindaceae. Cette différence structurelle entre les saponines triterpéniques des deux fractions enrichies APR et CMT, pourrait donc expliquer la différence d'activité antifongique observée sur les mêmes champignons pathogènes testés.

En effet, la bonne activité de la fraction enrichie APR observée sur les *Aspergillus*, pourrait être due au type de saponines triterpéniques rencontrées dans cette fraction et plus particulièrement au groupement méthoxycinnamoyl lié en position C-21 de l'acide machaérinique, rencontré dans cette étude pour la première fois. La présence de ce groupement méthoxycinnamoyl en cette position de cet aglycone, diminuerait donc la résistance des *Aspergillus*.

De plus, l'extrait brut de *C. macrobotrys* ainsi que les saponines pures (de type Hédéragénine et ayant le même squelette que celles de la fraction CMT) isolées de cette plante, ont eu à présenter une inactivité face à une large gamme de champignons testés dans la littérature tels

que *Pyricularia oryzae*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Pythium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Rhizoctonia solani* etc. Ces données sont alors semblables à celles obtenues dans le présent travail sur la fraction enrichie en saponines de la même plante, *C. macrobotrys*. La très faible activité antifongique de la fraction CMT de cette plante sur d'autres champignons, confirme ainsi les travaux de la littérature qui montrent que, bien que douées de bonnes activités antifongiques, les saponines triterpéniques de certaines espèces de la famille des Sapindaceae à l'instar de *C. macrobotrys*, font face à une résistance de plusieurs champignons lors des tests antifongiques (Petit et *al.*, 2021 ; Porsche et *al.*, 2018 ; Saha et *al.*, 2010).

❖ Sensibilité du genre de champignons sur les saponines

Parmi les champignons utilisés pour les tests, ceux ayant montré une bonne activité appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Pythium*. Cette bonne activité pourrait donc également s'expliquer par une plus grande sensibilité de ce genre de champignons face aux saponines triterpéniques présentes dans la fraction APR, contrairement aux autres champignons qui seraient plus résistants face au même type de saponines.

De plus, il a été prouvé que certains champignons notamment ceux des genres *Fusarium*, *Botrytis* et *Pythium*, sont très résistants face aux saponines isolées des espèces de la famille des Sapindaceae. Contrairement aux champignons des genres *Pyricularia*, *Gaeumannomyces*, *Zymoseptoria*, *Fomitiporia*, *Phaeoacremonium*, *Eutypa*, *Trichoderma* etc, qui sont plus sensibles à ces saponines (Yu et *al.*, 2007). Sur la base du présent travail, on pourrait donc ajouter les champignons des genres *Phytophthora* et *Aspergillus*, sur la liste des champignons résistants face aux saponines des espèces des Sapindaceae.

Influence de la concentration des fractions enrichies

L'analyse des résultats obtenus après les tests réalisés sur les deux fractions enrichies, montre que certains champignons tels que *Pythium myriotylum*, nécessitent des concentrations élevées pour des fractions appropriées, afin d'augmenter la sensibilité de ce champignon. Ce qui n'est pas le cas pour d'autres champignons tels que les *Aspergillus* qui, même à faible concentration de fraction active, restent sensibles à ces dernières.

Influence du temps sur la lutte contre les champignons pathogènes

L'étude de la croissance radiale de tous les champignons sur lesquels ont été effectués les tests, montre globalement que plusieurs champignons ont des périodes de virulence accrues et des périodes où la virulence du champignon est faible. Ainsi, on remarque que pour la quasi-totalité des sept champignons exploités, la période la plus virulente correspond entre le jour 3 et le jour 5. Ce qui signifie donc que l'utilisation des fractions enrichies actives contre ces champignons, serait plus efficace dès les premiers jours suivant l'incubation ou le développement des phytopathogènes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du vaste projet de recherche « *One Health* » visant la santé pour tous, non seulement pour les hommes et les animaux, mais également pour les plantes. Ce projet qui fait partie de plusieurs autres du Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles de l'Université de Yaoundé I, intègre l'axe de recherche sur « la protection des cultures », ces dernières connaissant de plus en plus de problèmes dûs principalement aux multiples attaques de divers organismes. Les travaux de recherche de cette thèse de doctorat, visaient donc à rechercher des produits naturels notamment les saponines, à fort potentiel antifongique, pouvant entrer dans la fabrication de nouveaux biofongicides afin de lutter contre les nombreux champignons pathogènes attaquant les plantes et de contourner les problèmes d'effets secondaires causés par les fongicides synthétiques classiques, ainsi que la résistance dont fait de plus en plus face ces derniers face aux phytopathogènes. Cela nous a conduit à explorer l'étude chimique des fractions enrichies en saponines de deux plantes médicinales camerounaises, *Acacia polyacantha* (Fabaceae) et *Chytranthus macrobotrys* (Sapindaceae), reconnues riches en saponines triterpéniques et dont les travaux scientifiques antérieurs ont montré de bonnes activités antifongiques sur plusieurs espèces de phytopathogènes. Cette étude a donc conduit à l'isolement de quinze composés purs qui ont été entièrement caractérisés, ainsi que deux fractions enrichies en saponines testées sur une variété de sept champignons pathogènes.

A. polyacantha a conduit à l'isolement et la caractérisation de neuf (09) composés purs dont sept saponines triterpéniques, un composé phénolique et un triterpène. De ces composés analysés, sept (07) se sont avérés être des dérivés nouveaux à savoir six (06) saponines (Polyacosides A-F) et le dérivé de composé phénolique (Acapolyoside). Les six dérivés nouveaux de saponines, présentent tous la particularité de posséder un acide machaérinique lié en position C-3 par des sucres et en C-21 par un groupement méthoxycinnamoyl. Ce groupement méthoxycinnamoyl fixé en C-21 de cet aglycone, constitue une spécificité jamais rencontrée dans les travaux antérieurs, conférant ainsi à nos travaux, une importance capitale sur le plan de la connaissance chimio taxonomique des plantes de la famille des Fabaceae en général, et du genre *Acacia* en particulier. Par contre, des séquences Acide acacique-²¹méthoxycinnamoyl et Acide machaérinique-²¹monoterpène, ont souvent été rencontrées dans ces plantes (Seo et *al.*, 2001 ; Tchoukoua et *al.*, 2018a). De plus, cette contribution chimio taxonomique des plantes du genre *Acacia*, est relevée dans ces travaux par l'obtention du composé phénolique Acapolyoside, qui présente une structure originale jamais rencontrée dans

ce genre, avec notamment un sucre cyclisé (lié à deux positions) sur le squelette d'acide vanillique. Ce type de cyclisation a souvent été rencontré dans les plantes d'autres familles (Atiya et al., 2022).

En plus de ces composés purs isolés, quatre fractions enrichies en saponines ont également été obtenues de cette plante, parmi lesquelles la fraction ayant conduit à l'isolement de tous les dérivés nouveaux de saponines.

L'étude chimique des fractions enrichies en saponines de la seconde plante *C. macrobotrys* quant à elle, a conduit à l'isolement et la caractérisation complète de six (06) composés purs dont deux saponines triterpéniques, un triterpène de type Lupane, un disaccharide (saccharose) et deux phytostérols (stigmastérol et 3-O- β -D glucoside de stigmastérol). Cette étude, bien que n'ayant conduit à l'obtention d'aucun dérivé nouveau de cette plante, a permis de consolider les données des travaux scientifiques antérieurs sur les plantes de la famille des Sapindaceae, qui révèlent que, les saponines des plantes de cette famille partagent le même fragment de la séquence oligosaccharidique en C-3 de l'hédéragénine (Rha (1 \rightarrow 2) Ara-) (Petit et al., 2020). De plus, les autres composés tels que le Lup-20(29)-ène-3a,23-diol et le saccharose, bien qu'abondamment retrouvés dans d'autres espèces, ont été isolés de celle-ci pour la première fois. De cette plante, trois fractions enrichies en saponines ont également été obtenues.

Après la première étape portant sur l'étude chimique des fractions enrichies en saponines des deux plantes sélectionnées, la seconde étape consistait à réaliser des tests antifongiques tout d'abord sur des fractions enrichies en saponines, puis sur les composés purs isolés de ces fractions enrichies afin de faire une étude comparative et de déterminer le type d'action de ces composés : effet synergie ou antagonie.

Deux principales fractions enrichies en saponines (APR et CMT), desquelles sont issues les saponines isolées de chaque plante, ont été choisies pour la réalisation des tests antifongiques sur une gamme de sept (07) champignons pathogènes (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans* et *Botrytis cinerea*) néfastes pour plusieurs cultures au Cameroun et dans la sous-région. Trois de ces champignons, notamment *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Pythium myriotylum*, ont montré une grande sensibilité sur la fraction enrichie APR avec des pourcentages d'inhibition compris entre 58 et 68 %, tandis que les autres champignons n'ont pas été influencés par cette même fraction. La deuxième fraction quant à elle, n'a présenté aucune activité sur

tous les champignons testés, rejoignant ainsi les travaux scientifiques antérieurs ayant montré que, plusieurs champignons pathogènes sont résistants face aux saponines isolées de l'espèce *C. macrobotrys*, comparées à celles (saponines) isolées des autres espèces des Sapindaceae (Njateng *et al.*, 2015). Cette différence d'activité entre les deux fractions enrichies, pourrait également trouver justification dans la différence structurale des saponines contenues dans ces deux fractions, avec pour la fraction enrichie APR des saponines triterpéniques ayant un squelette acide machaérinique-²¹méthoxycinnamoyl et pour CMT, des saponines triterpéniques avec le fragment Ara-²Rha-³Hédéragénine comme squelette marqueur chimio taxonomique.

Au terme de ce travail de thèse, l'objectif général qui consistait à préformuler un biofongicide à base de fractions enrichies en saponines n'a pas été atteint et fera l'objet par la suite en perspectives, de la continuité de ces travaux tout comme l'évaluation des tests antifongiques sur les saponines pures, ce qui aboutira à une meilleure compréhension du mode d'action de ces composés sur les phytopathogènes.

➤ Perspectives

Pour la suite de nos travaux, nous envisageons de :

- ✓ Effectuer les tests antifongiques sur les saponines pures isolées des deux plantes ainsi que sur les pro-sapogénines obtenues après hydrolyse ;
- ✓ Effectuer des tests antifongiques *in-vivo* sur les fractions et composés ayant montré de bons résultats *in-vitro* ;
- ✓ Préformuler un biofongicide à base de saponines ;
- ✓ Poursuivre la purification des composés des autres fractions.

Chapitre III :

Matériel et méthodes

III.1. Méthodes chimiques

III.1.1. Matériel végétal

❖ Sélection

La sélection des plantes s'est faite suivant l'approche chimio taxonomique, permettant d'établir des rapports entre la composition chimique des espèces vivantes et leur classification systématique (taxonomie) avec l'appui des travaux antérieurs. Ainsi, deux principaux critères ont guidé le choix des deux plantes pour cette étude, notamment la richesse en saponines des plantes sélectionnées et leur disponibilité au Cameroun. Sur la base de ces critères, deux plantes médicinales ont été choisies :

Acacia polyacantha, plante très riche en saponines triterpéniques (dont les aglycones triterpéniques sont suffisamment variés) et largement répandue dans la région du nord Cameroun ;

Chytranthus macrobotrys, de la famille des Sapindaceae, reconnue très riches en saponines triterpéniques dérivées de l'hédéragénine et localisée dans plusieurs régions du Cameroun.

❖ Récolte

Acacia polyacantha a été récoltée en octobre 2018 à Touboro dans la région du Nord-Cameroun. Cette plante a ensuite été identifiée à l'Herbier National du Cameroun par le botaniste M. NANA Victor, ou un échantillon de référence s'y trouvait déjà sous le numéro HNC/51435.

Chytranthus macrobotrys a été récoltée en Mai 2020 à Mbalmayo, localité située dans la région du centre Cameroun. Après identification à l'herbier national du Cameroun par le botaniste M. NANA Victor, un échantillon de référence y a été déposé sous le numéro HNC/48515

III.1.2. Extraction, fractionnement et isolement des composés

III.1.2.1. Extraction

❖ Extraction de *Acacia polyacantha*

Dans un premier temps, 1,5 Kg des racines de *A. polyacantha* ont été trempées dans un mélange de solvants polaires MeOH/H₂O (90/10), pendant 72h à température ambiante, afin de

recupérer le maximum de composés polaires parmi lesquels les saponines. Au bout des 72h, le liquide d'extraction a été filtré par la méthode de filtration simple, puis concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'un extrait sec et le processus a été répété cinq fois afin d'augmenter le rendement d'extraction. A la fin du processus, 47,47 g d'extrait brut ont été obtenus des racines de cette plante.

Le même procédé a été appliqué sur 960 g de poudre du tronc de la même plante conduisant ainsi à un extrait brut de 32,16 g.

❖ **Extraction de *Chytranthus macrobotrys***

La poudre des écorces du tronc de *C. macrobotrys* (2,5 Kg) a été extraite par macération pendant 72h à température ambiante, en utilisant cette fois le mélange EtOH/H₂O (70/30) comme solvant d'extraction. Après répétition du processus cinq fois, 160,6 g d'extrait brut ont été obtenus et utilisés pour la suite des travaux.

III.1.2.2. Préparation des fractions enrichies en saponines

Elle s'est faite en plusieurs notamment les partitions, la colonne chromatographique sur diaion, la VLC sur RP18 et la VLC sur silice

❖ **Partition à l'acétate d'éthyle (AcOEt)**

Les saponines étant des molécules polaires, une partition à l'acétate d'éthyle a été faite afin de séparer les composés apolaires et moyennement polaires des composés polaires. Le même protocole a été appliqué sur tous les extraits bruts.

▪ **Mode opératoire**

Après extractions, les extraits bruts obtenus ont été chacun dissous dans 200 mL d'eau constituant la phase aqueuse. 300 mL d'acétate d'éthyle ont ensuite été introduits dans une ampoule à décanter de 1L, puis la phase aqueuse contenant l'extrait y a été ajoutée. L'ensemble a été agité lentement en dégazant, puis laissé au repos afin de séparer les deux phases (organique et aqueuse). Le processus a été répété 3 fois pour l'extrait brut des racines de *A. polyacantha* et 2 fois pour les extraits bruts des troncs de *A. polyacantha* et *C. macrobotrys* conduisant ainsi à l'obtention de 4,5 g et 45,1 g comme phases à l'acétate d'éthyle des troncs

de *A. polyacantha* et *C. macrobotrys* respectivement. La **figure 115** ci-dessous présente la partition à l'acétate d'éthyle de l'extrait de *A. polyacantha* ainsi que la CCM résultante.



Figure 115: Partition de partition à AcOEt (montage + CCM)

❖ Partition au *n*-butanol saturé d'eau

La phase aqueuse issue de la première partition (à AcOEt) a été soumise à une partition au *n*-butanol saturé d'eau, dans le but de récupérer le maximum de composés glycosylés et de discriminer les composés très polaires tels que les monosaccharides, polysaccharides et tanins.

▪ Mode opératoire

❖ Préparation du *n*-butanol saturé d'eau.

Dans une ampoule à décanter, on introduit un mélange de *n*-butanol et d'eau distillée dans les proportions 4:1. Ensuite, on agite vigoureusement en prenant soin de dégazer, puis on laisse au repos pendant 45 minutes, deux phases sont formées : une phase inférieure dite aqueuse et une phase supérieure dite organique contenant le *n*-butanol saturé d'eau.

❖ Protocole de la partition.

Le *n*-butanol saturé d'eau (400 mL) a été introduit dans l'ampoule à décanter, puis la phase aqueuse issue de la première partition y a été ajoutée. L'ensemble a été agité lentement en prenant soin de dégazer puis, après avoir été laissé au repos pendant 20 min, les deux phases (aqueuse et butanolique) ont été recueillies dans des contenants différents. Le processus a été répété trois fois et le même procédé a été appliqué pour les trois matières végétales permettant ainsi d'obtenir des phases butanoliques de 10,29 g ; 8,91 g et 30,1 g pour les racines de *A. polyacantha*, le tronc de *A. polyacantha* et le tronc de *C. macrobotrys* respectivement.

L'ensemble de ce protocole effectué sur *A. polyacantha* ainsi que la CCM résultante est présentée dans la **figure 116**.



Figure 116: Partition au *n*-BuOH saturé d'eau (montage + CCM)

❖ Colonne de DIAION

Cette technique nous a permis d'avoir une fraction enrichie en saponines débarrassée au maximum des autres classes de composés. Son principe repose sur une séparation des composés par ordre décroissant de leur polarité en utilisant comme éluant, des solvants polaires (H₂O et MeOH) et comme phase stationnaire, une résine phase inverse (DIAION HP20) avec comme support, une colonne chromatographique. Cette technique a été appliquée sur la fraction butanolique des racines de la première plante (*A. polyacantha*).

▪ Mode opératoire

La première étape consiste à monter la colonne de diaion en préparant la bouillie de diaion (mélange eau distillée + résine de diaion) que l'on introduit dans une colonne chromatographique. Une fois la résine de diaion tassée, chaque fraction butanolique obtenue après partition de la première plante a été dissoute dans de 100 mL d'eau distillée puis introduite dans la colonne de diaion (dépôt liquide). L'élution a été faite à l'aide de quatre gradients du système de solvants H₂O:MeOH (100:00 ; 50:50 ; 25:75 et 00:100) et a conduit, sur la base du profil CCM, à l'obtention de 04 fractions indexées APR1 (0,47 g), APR2 (2,4 mg), APR3 (2,1 mg) et APR4 (3,62 g).

❖ VLC sur RP 18

Son principe est quasiment le même que celui de la colonne de diaion, la différence entre les deux techniques ici se situant principalement au niveau de la taille de la résine (granulométrie de la RP18 étant plus fine que celle de la diaion) et de la méthode d'élution utilisée (colonne

de gravité pour la diaion et utilisation d'une pompe sous-vide pour la RP18). Cette technique a été utilisée pour la seconde plante (*C. macrobotrys*) tel que présenté à la **figure 117** ainsi que pour le tronc de la première plante.

- **Mode opératoire**

L'élution, pour les deux fractions butanoliques des troncs de *A. polyacantha* et de *C. macrobotrys*, s'est faite en utilisant les gradients H₂O:MeOH (80:20 ; 50:50 ; 25:75 et 00:100). Sur la base des profils CCM, 04 fractions ont été obtenues de la fraction butanolique du tronc de *A. polyacantha* et codifiées APT1 (0,87 g), APT2 (2,43 g), APT3 (0,37 g) et APT4 (3,28 g). Le même nombre de fractions a été obtenu de la fraction butanolique de tronc de *C. macrobotrys* et ces dernières ont été codifiées F1 (2,6 g), F2 (4,9 g), F3 (11,3 g) et F4 (2,4g).



Figure 117: Montage VLC sur RP18

- ❖ **VLC sur silice**

Elle a été effectuée sur la fraction enrichie en saponines F3 obtenue du tronc de *C. macrobotrys*, afin d'avoir des sous-fractions enrichies en saponines décongestionnées et simplifiées, qui pourront être purifiées plus facilement tel qu'observé sur la CCM issue de cette technique à la **figure 118** Son principe repose sur la séparation des composés par ordre de polarité croissante en utilisant une résine phase normale (silice) et une pompe à vide.

- **Mode opératoire**

Après avoir préparé l'amalgame de notre fraction F3, la colonne de VLC a été montée puis tassée et conditionnée à l'aide du premier système de solvant en utilisant comme phase stationnaire, la silice (SiO₂ 63-200 µm). L'amalgame a par la suite été introduit dans la colonne

(dépôt solide) et l'élution s'est faite à l'aide de trois gradients de système de solvants DCM:MeOH:H₂O (90:10:0 ; 80:20:2 et 70:30:5) en recueillant des volumes de 100 mL.



Figure 118: CCM VLC sur silice de CMT

III.1.2.3. Isolement des composés

L'isolement des différents composés obtenus s'est fait à l'aide de trois techniques principales notamment la MPLC (Chromatographie Liquide à Moyenne Pression), la HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Pression) et la CC (Chromatographie sur Colonne).

❖ MPLC

C'est une technique chromatographique utilisée pour le fractionnement et la purification des constituants d'un mélange supportant des pressions modérées, permettant ainsi de modifier les débits. Avant la HPLC, elle était la technique la plus indiquée pour la séparation des molécules.

Elle a été principalement utilisée dans ces travaux, pour l'isolement des saponines de *C. macrobotrys* mais aussi pour le dégrossissement des fractions enrichies en saponines de *A. polyacantha* (**Figure 119**).

▪ Mode opératoire :

L'appareil utilisé était une MPLC de marque BUCHI avec pompe intégrée permettant de contrôler le débit et la pression du solvant d'élution. La phase stationnaire a été la silice 63-200 µm préchargée dans des colonnes en plastique MERCK.

L'isolement des saponines de *C. macrobotrys* s'est faite en purifiant chacune des sous-fractions enrichies CMTF1, CMTF2 et CMTF3 par un système de solvant ternaire isocratique AcOEt:MeOH:H₂O (100:5:2) ce qui a permis d'obtenir quatre composés purs codifiés CMT1 (3,4 mg), CMT2 (5,1 mg), CMT21 (2,2 mg) et CMT31 (5,6 mg).

Par contre, les MPLC successives effectuées sur les sous-fractions APR4 des racines et APT2 du tronc de *A. polyacantha*, à l'aide des gradients de solvants ternaires AcOEt:MeOH:H₂O (100:13:10 ; 100:8:5 et 100:5:2 ; 25 mL/min ; 5 bars), ont conduit à l'obtention de sous-fractions mieux nettoyées indexées APR41 (816,7 mg), APR42 (95,5 mg), APR43 (172,4 mg) et APR44 (121,3 mg) pour APR4 et aux sous-fractions APT21 (212,2 mg), APT22 (84,5 mg) et APT23 (47,3 mg) pour APT2.



Figure 119: Appareil et CCM de MPLC sur APR et CMT

❖ HPLC

Cette technique est devenue au fil des années, la plus appropriée et la plus efficace pour la séparation et l'isolement des molécules. Elle repose sur le même principe que celui de la MPLC. Pour nos travaux, cette technique a été principalement utilisée pour la purification des molécules de *A. polyacantha* (**Figure 120**).

▪ Mode opératoire :

Pour l'isolement des composés de *A. polyacantha*, chaque sous-fraction à purifier a été dissoute dans une petite quantité du premier système de solvant utilisé pour l'élution. La solution obtenue est ensuite filtrée puis injectée dans la colonne de HPLC plusieurs fois à l'aide d'une seringue.

Tous les composés obtenus par cette technique, l'ont été grâce à la méthode HPLC phase inverse adaptée pour les échantillons polaires. Ainsi, les composés obtenus des racines de *A. polyacantha*, APR411 (2,8 mg) et APR412 (3,1 mg) ont été obtenus après élution de la sous-fraction APR41 dans un solvant isocratique ACN-H₂O (65-35 ; 3 mL/mn) tandis que APR421 (2,4 mg) a été obtenu dans les mêmes conditions après purification de APR42. Les composés APR441 (2,4 mg), APR442 (2,2 mg) et APR431 (2,7 mg) quant à eux ont été obtenus après purification des sous-fractions APR44 et APR43 dans un système de solvant isocratique MeOH (70-30 ; 3 mL/mn).

En ce qui concerne les composés du tronc de *A. polyacantha*, APTA21 (33,2 mg) et APT22 (21,0 mg) ont été obtenus après purification de la sous-fraction APTA2 dans un système de solvant MeOH-H₂O (45-55, 3 mL/mn) tandis que APTB a été obtenu après purification de APTA dans le système ACN-H₂O (65-35 3mL/mn).



Figure 120: Appareil et CCM de HPLC sur *A. polyacantha*

❖ Colonne chromatographique (CC)

Cette technique est l'une des plus anciennes et l'une des plus courantes. Elle peut faire intervenir différentes phases stationnaires dont notamment la résine de silice et le sephadex LH20. Elle a été utilisée pour l'isolement de certains composés des troncs de *A. polyacantha* et *C. macrobotrys*.

▪ Mode opératoire

Pour chaque fraction à purifier, l'amalgame de la fraction a été préparé puis introduit dans une colonne chromatographique dont la silice 63-200 μm a été préalablement tassée avec du DCM (100%) et l'élution a été faite avec un mélange de solvants à polarité croissante DCM-MeOH (de 0 à 100%). Ainsi, les composés APT55 (14,6 mg), APTA1 (3,1 mg) et APTA2 (16,1 mg) ont été obtenus après purification de la fraction à l'acétate d'éthyle du tronc de *A. polyacantha* tandis que CMTA1 (12,6 mg), CMTA2 (9,8 mg) et CMTA3 (8,4 mg) ont été obtenus de la fraction à l'acétate d'éthyle de *C. macrobotrys*.

III.1.2.4. Lyophilisation

C'est un procédé permettant d'éliminer l'eau d'un échantillon par sublimation. Cette technique est très appréciée car elle permet d'obtenir des poudres sèches de matériel végétal ou de molécules permettant de les peser, de les stocker et d'en caractériser les aspects macroscopiques. L'avantage de cette technique réside essentiellement sur le fait qu'elle utilise des températures et pressions extrêmement basses ce qui permet de préserver les constituants

des échantillons, comparé à l'évaporation de l'eau qui, en plus d'être extrêmement difficile, nécessite des températures élevées pouvant parfois dénaturer les constituants chimiques de l'échantillon à lyophiliser.

Cette technique a été appliquée sur toutes les saponines isolées ainsi que tous les autres composés amorphes (**Figure 121**).

▪ **Mode opératoire :**

Chaque composé a été dissout dans une petite quantité d'eau distillée, puis parfaitement homogénéiser à l'aide d'un sonicateur. L'ensemble a ensuite été congelé à -20°C pendant 2h et le processus de lyophilisation a eu lieu pendant 48h.



Figure 121: Lyophilisateur et fractions d'*A. polyacantha* lyophilisées

III.1.3. Méthodes d'analyses chimiques

III.1.3.1. Méthodes chromatographiques

❖ CCM

C'est la méthode la plus utilisée pour le suivi et le contrôle des autres techniques de laboratoires en chimie organique. Elle a été utilisée tout au long de ces travaux afin de vérifier la pureté des composés isolés et l'effectivité des techniques effectuées.

La phase stationnaire des plaques CCM utilisées était de la silice (60A, F254, Silicycle) et l'élution de ces plaques s'est faite à l'aide de plusieurs systèmes de solvants à polarité variée, selon la polarité du composé ou de la fraction d'intérêt.

❖ Chromatographie Liquide en Phase Gazeuse GCMS

Cette technique a été utilisée principalement pour confirmer les structures exactes des différents sucres présents dans les molécules obtenues. Ceci a été possible par comparaison de ces derniers avec les sucres des bases de données Wiley et NIST, du spectromètre de masse CPG/SM et de la base de données spectrale Adams.

L'appareil utilisé était de type Finnigan SSQ 7000 muni d'un détecteur de masse couplé du type thermo trace GC 2000 et équipé d'une colonne de silice. Les analyses se sont faites à une température programmée de 40 °C (3 min) et à une vitesse de 3 °C/min lorsque la température atteint 250 °C.

❖ Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse LCMS

Elle a été appliquée sur les fractions enrichies en saponines afin de confirmer la présence des molécules isolées dans ces extraits.

Les analyses ont été réalisées sur une chaîne équipée d'une pompe quaternaire (Ultimate 3000), d'un dégazeur, d'un four thermostaté à l'intérieur duquel se trouve une colonne Acquity BEH C18 et d'un passeur d'échantillons thermostaté couplé à 3 détecteurs. Les analyses ont été réalisées en mode ionisation positive (IP) et négative (IN).

III.1.3.2. Méthodes spectrométriques

Tous les composés isolés ont été analysés en spectrométrie de masse par la méthode ESI-HR. Ces spectres ont été enregistrés en utilisant un spectromètre Brucker JEOL JMS-60H.

III.1.3.3. Méthodes spectroscopiques

L'enregistrement des spectres RMN de tous les composés isolés s'est fait à l'aide d'un spectromètre Brucker Avance 500 et Avance 600 MHz en utilisant le TMS comme standard interne, avec les déplacements chimiques enregistrés comme valeurs δ en ppm et les constantes de couplage sont en Hz.



Figure 122: Appareil de RMN 500 MHz

III.1.3.4. Hydrolyse acide

Cette méthode permet de rompre toutes les liaisons *O*-glycosidiques présentes dans une molécule contenant des sucres, afin de permettre l'identification de ces derniers par comparaison avec ceux de références. Elle a été appliquée à tous les composés contenant en leur sein au moins une unité osidique.

Cette technique peut se faire selon 2 méthodes ;

Méthode 1 : Chaque composé glycosylé (2 mg) est hydrolysé avec 2 mL d'une solution de HCl (2 M à 85 °C) pendant 2h. Après refroidissement, le solvant est éliminé sous pression réduite et le mélange de sucres est extrait de la phase aqueuse (10 mL) puis lavé avec du DCM (3 x 5 mL) par la technique d'extraction liquide-liquide. Les fractions au DCM combinées sont ensuite lavées avec de l'eau distillée pour donner après évaporation, l'aglycone de la molécule. Les sucres obtenus sont d'abord analysés par CCM sur gel de silice (CHCl₃-MeOH-H₂O, 8-5-1) par comparaison avec des échantillons standards présents au laboratoire. La configuration absolue de chaque sucre est par la suite déterminée à partir d'une analyse GCMS de leurs dérivés triméthylsilés par comparaison avec des échantillons authentiques selon la méthode décrite par Chaabi et *al.*, 2010.

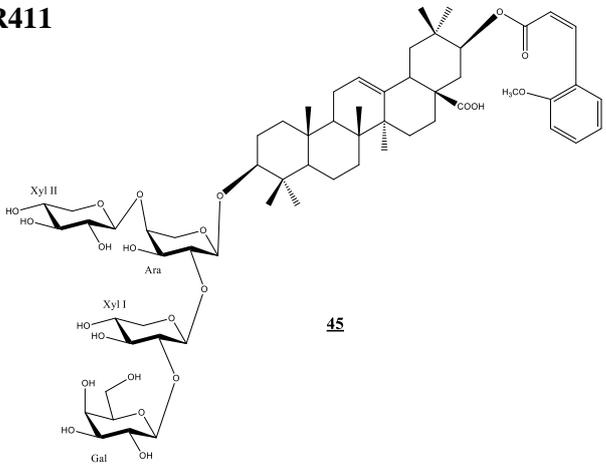
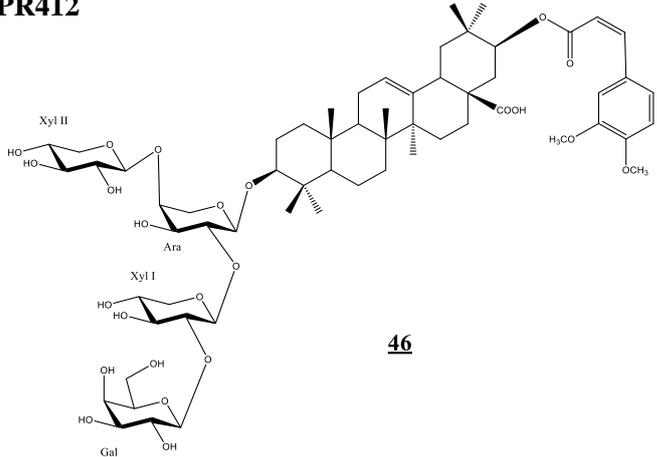
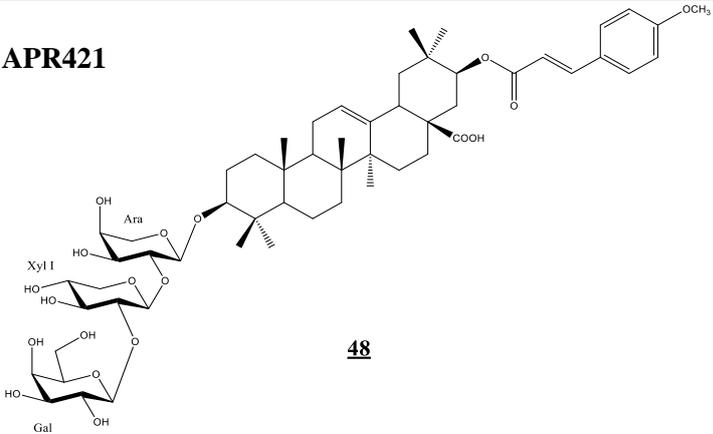
Méthode 2 : Chaque composé glycosylé (2 mg) est chauffé à reflux dans du CF₃COOH aqueux (2N, 3 mL) pendant 2h à 100 °C. Le mélange est ensuite dilué avec de l'eau (10 mL) et extrait avec du DCM (3 x 5 mL). Après extraction, la phase aqueuse est évaporée à plusieurs reprises jusqu'à obtention d'un pH neutre. Les sucres sont par la suite analysés par CCM sur gel de silice (CHCl₃-MeOH-H₂O, 8-5-1) par comparaison avec des échantillons de référence. Par la

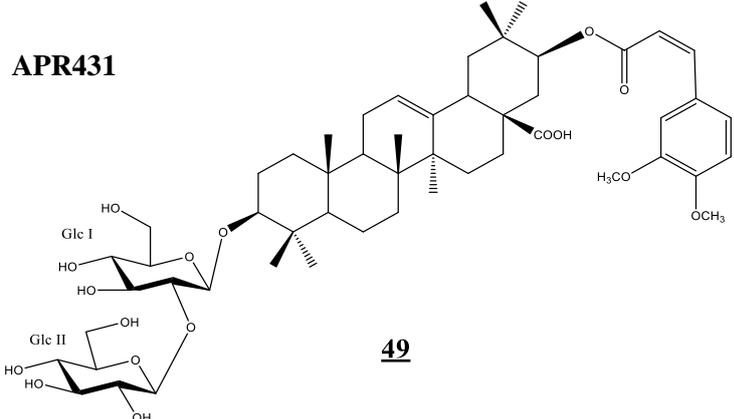
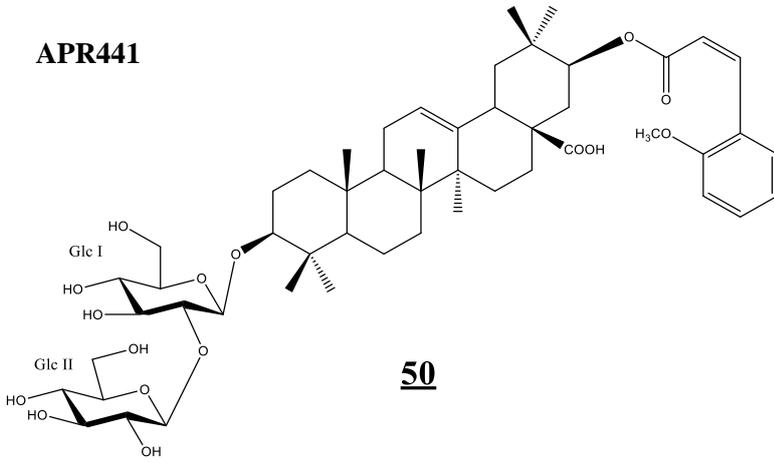
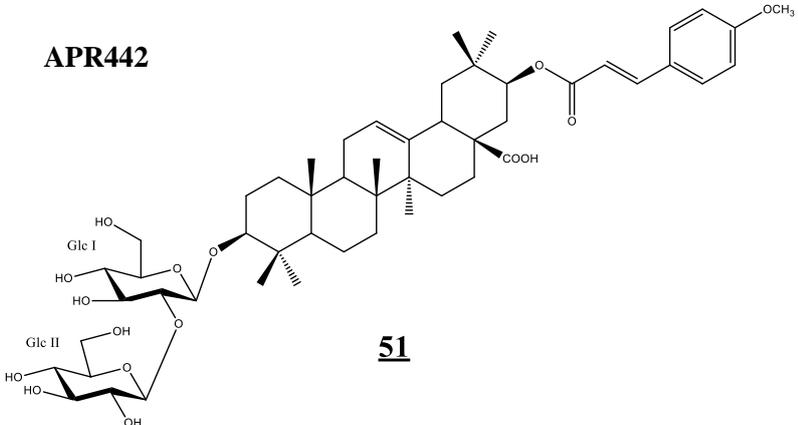
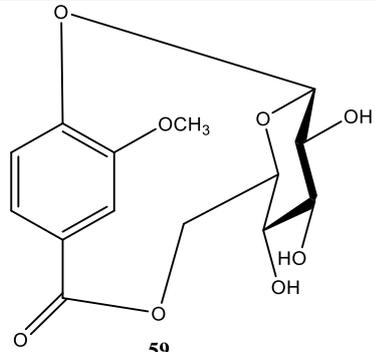
suite, la dérivation des énantiomères monosaccharidiques avec l'ester méthylique de la L-cystéine et 10-phénylthiocyanate les convertis en arylthiocarbamates diastéréoisomères, qui ont été séparés et détectés par analyse UPLC/MS.

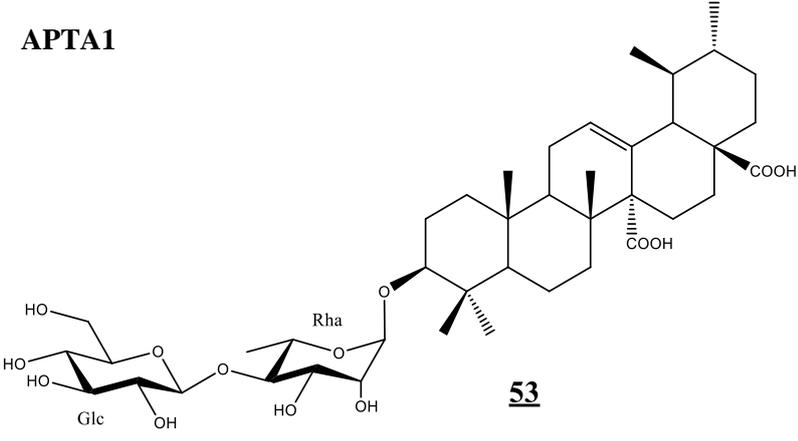
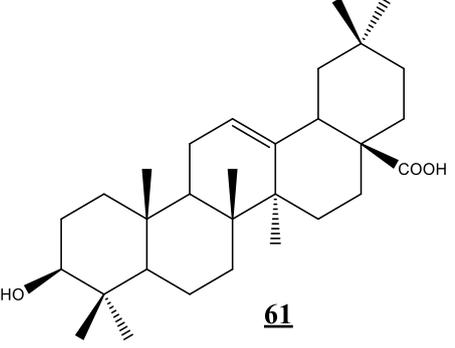
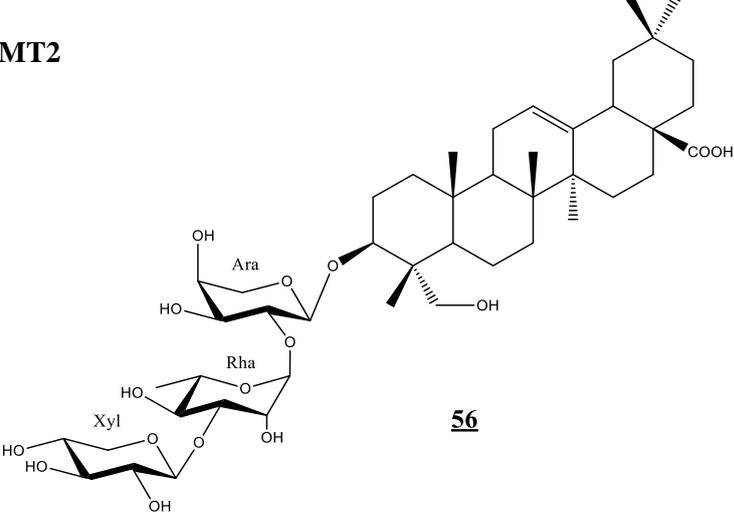
Cette technique a été celle utilisée pour nos travaux. Les composés hydrolysés ont été dissous dans 120 μL d'une solution d'ester méthylique de L-cystéine dans la pyridine (0,3 M) et incubés pendant 1h à 90 °C. Ensuite, 160 μL d'une solution d'isothiocyanate de phényle dans la pyridine (0,69 M) ont été ajoutés et incubés pendant 1h à 90 °C. Le mélange réactionnel a été refroidi et dilué 20 fois avec du CH_3CN et filtré avant analyse UHPLC/MS. Le volume d'injection était de 4 μL et chaque étalon de sucre a été soumis au même protocole avec 240 μL de la solution d'ester méthylique de L-cystéine et 320 μL de la solution de d'isothiocyanate de phényle. La température de la colonne était de 35 °C et le débit de 0,3 mL/min. Le premier éluant était un mélange d'eau et d'acide formique (0,05%) tandis que le deuxième éluant était un mélange de CH_3CN , MeOH et iPrOH (50/25/25 v/v) avec 0,05% d'acide formique. Le gradient quant à lui était un mélange linéaire de A et B avec 14% d'éluant B à t=0, atteignant 30% à t=22 min et 90% à t= 25 min. Le retour aux conditions initiales a été réalisé à t=28 min et maintenu pendant 2 min avant l'injection suivante.

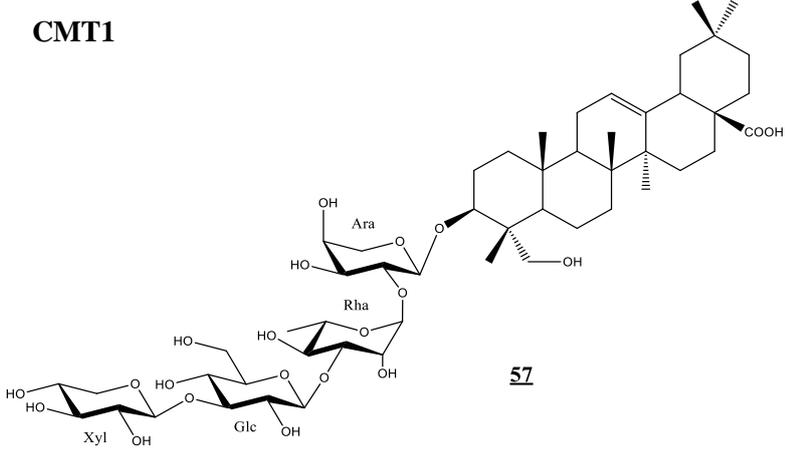
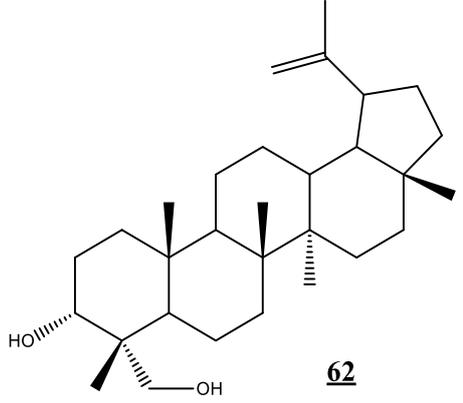
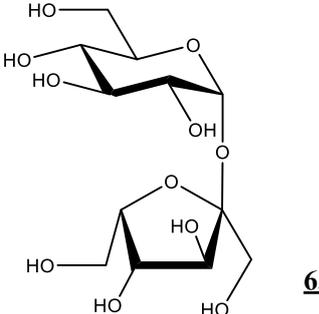
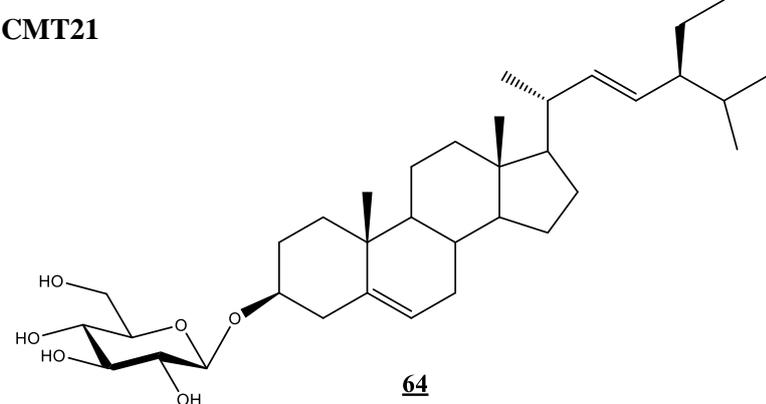
A la fin, les temps de rétention suivants 11,63 ; 12,56 ; 12,76 ; 13,92 et 15,16 ont été observés pour les sucres Glucopyranosyl, Galactopyranosyl, Arabionpyranosyl, Xylopyranosyl et Rhamnopyranosyl respectivement ceci étant en accord avec ceux de références qui apparaissent à 11,67 ; 12,58 ; 12,75 ; 13,93 et 15,19 respectivement.

III.1.4. Caractéristiques des composés isolés

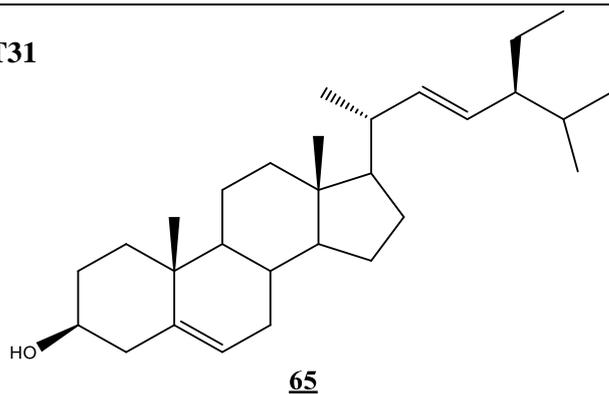
Composés isolés	Caractéristiques
<p>APR411</p>  <p style="text-align: center;">45</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 1191,5903 - Formule brute : C₆₁H₉₀O₂₃ - RMN ¹H et ¹³C : pyridine-d₅ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche - Tests de Liberman Buchard et Molish : positif
<p>APR412</p>  <p style="text-align: center;">46</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 1221,6007 - Formule brute : C₆₂H₉₂O₂₄ - RMN ¹H et ¹³C : pyridine-d₅ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche - Tests de Liberman Buchard et Molish : positif
<p>APR421</p>  <p style="text-align: center;">48</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 1059,5458 - Formule brute : C₅₆H₈₃O₁₉ - RMN ¹H et ¹³C : pyridine-d₅ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche - Tests de Liberman Buchard et Molish : positif

<p>APR431</p>  <p style="text-align: center;">49</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 987,5249 - Formule brute : C₅₃H₇₉O₁₇ - RMN ¹H et ¹³C : pyridine-d₅ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche - Tests de Liberman Buchard et Molish : positif
<p>APR441</p>  <p style="text-align: center;">50</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 957,5208 - Formule brute : C₅₂H₇₇O₁₆ - RMN ¹H et ¹³C : pyridine-d₅ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche - Tests de Liberman Buchard et Molish : positif
<p>APR442</p>  <p style="text-align: center;">51</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 957,5052 - Formule brute : C₅₂H₇₇O₁₆ - RMN ¹H et ¹³C : pyridine-d₅ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche - Tests de Liberman Buchard et Molish : positif
<p>APTb</p>  <p style="text-align: center;">59</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 313,1196 - Formule brute : C₁₄H₁₆O₈ - RMN ¹H et ¹³C : DMSO (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre blanche

<p>APTA1</p>  <p style="text-align: center;">53</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 793,6849 - Formule brute : C₄₂H₆₆O₁₄ - RMN ¹H et ¹³C : CDCl₃ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche
<p>APT55</p>  <p style="text-align: center;">61</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 459,6074 - Formule brute : C₃₀H₅₀O₃ - RMN ¹H et ¹³C : CDCl₃ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre blanche
<p>CMT2</p>  <p style="text-align: center;">56</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 883,5030 - Formule brute : C₄₆H₇₄O₁₆ - RMN ¹H et ¹³C : pyridine-d₅ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche - Tests de Liberman Buchard et Molish : positif

<p>CMT1</p>  <p style="text-align: center;">57</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 1045,5573 - Formule brute : C₅₂H₈₄O₂₁ - RMN ¹H et ¹³C : pyridine-d₅ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre amorphe blanche - Tests de Liberman Buchard et Molish : positif
<p>CMTA1</p>  <p style="text-align: center;">62</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 443,3358 - Formule brute : C₃₀H₅₀O₂ - RMN ¹H et ¹³C : CDCl₃ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre blanche
<p>CMTA2</p>  <p style="text-align: center;">63</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 343,2979 - Formule brute : C₁₂H₂₁O₂ - RMN ¹H et ¹³C : CDCl₃ (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre blanche
<p>CMT21</p>  <p style="text-align: center;">64</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ESIMS-HR : m/z 575,4149 - Formule brute : C₃₅H₅₇O₆ - RMN ¹H et ¹³C : CDCl₃+DMSO (500 et 125 MHz) - Aspect physique : poudre blanche

CMT31



- ESIMS-HR : m/z 413,3252
- Formule brute : $C_{29}H_{48}O$
- RMN 1H et ^{13}C : $CDCl_3$ (500 et 125 MHz)
- Aspect physique : poudre blanche

III.2. Méthodes biologiques

III.2.1. Culture des champignons pathogènes in vitro

Les différents champignons pathogènes utilisés dans cette étude ont été pris au laboratoire de lutte biologique et de microbiologie appliquée de l'IRAD. Ceux-ci ayant été prélevés après une descente sur le terrain, dans divers champs de plusieurs régions du Cameroun, ou les parties malades de diverses cultures ont été recueillies, conservées, puis amenées au laboratoire. Chaque champignon pathogène a ensuite été cultivé au laboratoire sur milieu PDA dans des boîtes de Pétri et mis dans des eppendorfs pour être conservé dans des congélateurs à -80 °C.

III.2.2. Identification morphologique des champignons pathogènes

Elle s'est faite en deux étapes notamment l'identification macroscopique et microscopique. Cette dernière s'est faite à l'aide d'un microscope optique de marque OPTICA (**Figure 123**) permettant ainsi de distinguer les caractéristiques physiques des mycéliums et des spores de chaque champignon. Cela a permis de confirmer le genre d'appartenance de chaque phytopathogène conduisant ainsi au recensement de sept champignons pathogènes différents.



Figure 124: Microscope optique de marque OPTICA

Figure 125: Microscope optique de marque OPTICA

III.2.3. Tests antifongiques *in vitro* sur les fractions

Les tests réalisés sur les fractions ont été faits selon la méthode de diffusion sur milieu solide décrite par Bautista-Baños, et *al.*, (2002). Pour chaque champignon choisi et par fraction à tester, plusieurs étapes ont eu lieu :

❖ Préparation du milieu de culture du champignon

Le milieu de culture a été préparé à base de décoction végétale notamment le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) constitué essentiellement d'eau, de jus de pommes de terre, de dextrose et d'agar. Concernant la préparation proprement dite, pour 1L de milieu de culture à préparer, on a besoin de : 800 mL d'eau, 200 g de pommes de terre, 20 g de sucre et 15 g d'agar. Le PDA obtenu a ensuite été stérilisé pendant 15 min dans une autoclave à 121°C suivant la méthode décrite par Smith et *al.*, 2008.

❖ Préparation des différentes solutions de la fraction à tester à diverses concentrations

Pour chaque fraction enrichie en saponines (APR et CMT), quatre (04) solutions de différentes concentrations ont été préparées notamment 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL et 62,5 µg/mL. Pour préparer ces solutions, 10 mg de fraction ont été dissouts dans 10 mL de méthanol, ce qui a permis d'avoir une solution mère de concentration 1 mg/mL. La solution mère a ensuite subit des dilutions (04) en cascade au ½ dans des tubes à essai, contenant chacun au préalable 5 mL de méthanol.

❖ Tests d'inhibition des souches de champignons pathogènes aux différentes fractions enrichies en saponines

Après les 2 premières étapes, chaque solution préparée a ensuite été mélangée séparément à 200 mL de milieu de culture (PDA) préparé, avec une spatule de streptomycine comme antibiotique (afin d'éviter la contamination par les bactéries). Les différentes solutions obtenues ont par la suite été coulées dans des boîtes de pétri à une température comprise entre 38 °C et 40 °C selon la méthode de Ahon et *al.*, (2011). Après refroidissement pendant 30 min sous une hotte pour permettre la solidification de la gélose, un explant de 5 mm de diamètre du phytopathogène (champignon) âgé de 7 jours, a été recueilli à l'aide d'un emporte-pièce et déposé au centre géométrique de la boîte de Pétri pour inoculation. Les boîtes de Pétri

ensemencées, ont ensuite été scellées avec du film adhésif et mises en incubation à 25 ± 2 °C pendant 6 à 8 jours, dépendant de la durée de croissance de chaque phytopathogène.

Pour l'ensemble de ces tests, deux témoins ont été utilisés dont le fongicide synthétique de référence (sous le nom commercial Jumper D) comme témoin positif et le méthanol (2 %) comme témoin négatif. Au total, six traitements (1 traitement pour chaque concentration de solution et 1 traitement par témoin) ont été effectués par champignon et chaque traitement a été répété 3 fois conduisant à l'obtention des résultats similaires.

III.2.4. Analyse des données

❖ Mesure de la croissance radiale des champignons ensemencés

La croissance de chaque champignon a été observée quotidiennement et la croissance radiale moyenne du mycélium a été mesurée chaque 2 jours à la même heure. Cette mesure a été faite en centimètres à partir de deux axes perpendiculaires tracés au revers de la boîte de Pétri et les paramètres ont arrêté d'être pris après que les champignons du témoin négatif aient rempli les boîtes de Pétri. Les données relevées ont été exploitées en utilisant la formule suivante :

$$CR = \frac{D1 - D2}{2} - D0$$

Avec : CR= croissance radiale ; D1 et D2 = diamètre de la culture mesurée sur les deux axes perpendiculaires ; D0 = diamètre de l'explant mycélien.

❖ Détermination des pourcentages d'inhibition

Les pourcentages d'inhibition (PI) de chaque fraction à diverses concentrations, ont par la suite été obtenus, à partir des données sur la croissance radiale, suivant la formule proposée par Dohou et *al.* (2004) et les appréciations ont été faites suivant l'échelle de Abdellatif et *al.* (2011).

$$P = \frac{Dt - d}{Dt} * 100$$

P : taux d'inhibition ou pourcentage d'inhibition ; Dt : croissance mycélienne dans les boîtes témoins ; d : croissance mycélienne dans les boîtes essais

Ainsi, selon Abdellatif et *al.* (2011) :

- Si $30 \% < P < 40 \%$, alors on a une activité faible ;
- Si $50 \% < P < 60 \%$, alors on a une activité modérée ;
- Si $60 \% < P < 70 \%$, alors on a une bonne activité ;
- Si $P > 70 \%$ alors on a une excellente activité.

❖ **Evaluation de la toxicité**

L'évaluation de la toxicité permet de voir si l'inhibition de la croissance mycélienne observée est accompagnée d'un effet fongicide ou fongistatique de la fraction. Pour cela, des explants de mycélium recueillis dans des boîtes à essai, ont été déposés aseptiquement sur milieu PDA sans fraction, à proximité d'une flamme de bec Bunsen et sous une hotte à flux laminaire. Après 7 jours d'incubation à une température comprise entre 22 et 25°C, l'activité de la fraction a été considérée comme fongistatique s'il y a eu reprise de la croissance de la souche fongique et fongicide dans le cas contraire. La nature de la toxicité des différentes fractions (APR et CMT), a permis de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicide (CMF).

❖ **Analyses statistiques**

Les données obtenues ont subi une analyse statistique à l'aide du logiciel XLSTATS (version 4.1.3) et celles-ci ont également fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA). Le test de Student Newman Keuls au seuil de significativité de 5% a permis de faire des comparaisons entre les traitements et en fonction des jours. La présentation des résultats sous forme graphique a été possible grâce à l'exploitation du logiciel Microsoft Office Excel 2016.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdellatif, M & Sayed D. (2011). MicroRNAs in development and disease. *Physiological reviews* 91, 827-887.
- Agrawal, P.K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307–30.
- Ahon, M.G., Akapo-Akue, J.M., Kra, M.A., Ackah, J.B., Zirihi, N.G. & Djaman, J.A. (2011). Antifungal activity of the aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Terminalia superba* Engl. on the in vitro growth of clinical isolates of pathogenic fungi. *Agriculture and Biology Journal of North America* 2, 250 -257.
- Atiya, A, Taghreed M., Safia A, Arshad A.K, Afnan, M.S.A, Hanan, J.A.-Z, Raghad, S.A, Sara, A.A, Taef, A, Zainah, A.F, Shimaa, A.M.A & Shahad, S. (2022). The value of Genus *Acacia* in arid and semi-arid environments for the treatment of chronic inflammatory diseases. *Phytomedicine Plus* 2, 100315.
- Augustin J.M. & Kuzina V. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72, 435-457.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Díaz-Pérez, J.C. & Cano-Ochoa, C.F. (2000). Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of ‘ciruela’ (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology* 18, 67-73.
- Biang, A.E.M., Kamto, E.L.D., Simo, L.M., Antheaume, C., Lavedan, P., Vedrenne, M., Note, O.P., Pegnyemb, D.E., Ngo Mbing, J. & Haddad, M. (2020). Triterpenoid saponins from the stem barks of *Chytranthus klaineanus* Radlk. Ex Engl. *Phytochemistry letters* 37, 37-41.
- Bonnard, I. & Rinehart, K.L. (2004). Thyonosides A and B, two new saponins isolated from the holothurian *Thyone aurea*. *Tetrahedron* 60, 2987–92.
- Bruneton, J. (2016). *Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales*, 5ème édition. Eds Lavoisier Technology and Document 1487 p.
- Bruneton, J., (2009). *Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales*. Edition Technology and Document Lavoisier Publishing, Paris. Lavoisier, 538–44.

- Buerki, S., Forest, F., Acevero-Rorríguez, P., Callmand, M. W., Nylander, J.A.A., Harrington, M., Sammartin, I., Kupfer, P. & Alvarez, N. (2016). Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51, 238-258.
- Chaabi, M., Chabert, P., Vonthron-Sénécheau, C., Weniger, B., Ouattara, M., Corstjens, H., Sente, I., Declercq, L. & Lobstein, A. (2010). Acylated flavonol pentaglycosides from *Baphia nitida* leaves. *Phytochemistry Letters* 3, 70-74.
- Chapagain, B. P., Wiesman, Z. & Tsrör (Lahkim), L. (2007). In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 26, 109–115.
- Chaturvedula, V.S.P. & Prakash, I. (2012). Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal* 1, 239-242.
- Chen, W.J., Hsiao, L.C. & Chen, K.K. (2008). Metal desorption from copper (II)/nickel(II)-spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponin biosurfactant. *Process Biochemistry* 43, 488–498.
- Crété, P. (1965). Précis de botanique, Systematique des angiospermes. Masson (Eds.), Lyon. 425pp.
- Dean, R., Jan, A.L., Van Kan., Zacharias A.P., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. & Foster, G.D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414–430.
- Delaude, C. (1993). Les Sapindaceae et leurs saponines. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. Liège 62, 93–120.
- Delgado, M.C.C., Da Silva, M.S. & Fot, R.B. (1984). 3β -hydroxy-21- β -E-cinnamoyloxyolean-12-en-28-oic acid, a triterpenoid from *Enterolobium contortisiliquum*. *Phytochemistry* 23, 2288-2292.

- Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassan L. M., Badoc A. & Gmira N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro marocaine, *Thmelaea itroides*. Bulletin of Society of Pharmacy 142, 61- 67
- Encarnacion, R., Kenne, L., Samuelson, G. & Sandberg, F. (1981). Structural studies on some saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*. Phytochemistry 20, 1939-1942.
- Faleye, F.J., Ajayi, C.B., Akinwumi, O.A. & Popoola, O.K. (2019). Evolution of methanolic extract of *Pancovia* for antibacterial α -glucosylase and α -amylase inhibitory activities. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 10, 678-85.
- Fang, S.-Y., HE, Z.-S., GAO J.-H. & Ping Wang. (1995). Triterpenoid glycosides from *Adina Rubella*. Phytochemistry 39, 1241-1243.
- FAO., FIDA., OMS., PAM. & UNICEF. (2023). Résumé de l'état de la sécurité alimentaire et de la nutrition dans le monde 2023. Urbanisation, transformation des systèmes agroalimentaires et accès à une alimentation saine le long du continuum rural-urbain. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc6550fr>
- FAO. (2020). La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture 2020. Rélever le défi de l'eau dans l'agriculture. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb1447fr>
- Fernandez-Acero, F.J., Carbu, M., Garrido, C., Vallejo I. & Cantoral, J.M. (2014). Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. Current Proteomics 4, 79-88.
- Figen Mert-Türk. (2006). Saponins versus plant fungal pathogens. Journal of Cell and Molecular Biology 5, 13-17.
- Garrido, C., Fernández-Acero, F.J., Carbú, M., González-Rodríguez, V.E., Liñeiro, E. & Cantoral, J.M. (2012). Molecular Microbiology Applied to the Study of Phytopathogenic Fungi. Sameh Magdeldin, Gel Electrophoresis - Advanced Techniques, (ISBN 978-953-51-0457-5, DOI 10.5772/38194).
- Gedara., S.R. & Galala, A.A. (2013). New cytotoxic spirostane saponin and biflavonoid glycoside from the leaves of *Acacia saligna* (Labill.) H.L. Wendl. Natural Product Research. 238, 66-77.
- Gojayevev, A.S., Bankeu, J.J.K., Awantu, A.F., Nkanwen, E.R.S., Ali, M.S., Lenta, B.N., Guliyevev, A.A., Nougoué, D.T., Ngouela, S.A. & Tsamo, E. (2013). Xanthine oxidase

- inhibitory activity of compounds from *Chytrantus claneianus*. Bangladesh Journal of Pharmacology 8, 78–83.
- González-Fernández, R., Prats, E. & Jorrín-Novo, J.V. (2010). Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. Journal of Biomedicine and Biotechnology 20, 493-502.
- Günther, H. (1996). La spectroscopie de RMN : Principes de bases, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétiques nucléaires du carbone 13 en chimie. Elsevier Masson (Eds.), Siegen. 557pp.
- Haddad, M., Miyamoto, T., Delaude, C. & Lacaille-Dubois, M.A. (2003). New Acylated Saponins from *Polygala myrtifolia*. Helvetica Chimica Acta 86, 1070-1075.
- Haridas, V., Higuchi, M., Jayatilake, G.S., Bailey, D., Mujoo, K., Blake, M.E., Arntzen, C.J. & Gutterman, J.U. (2000). Avicins: Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. Medical Sciences 98, 5821–5826.
- Hauman, L. (1960). Sapindaceae dans la flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi, spermatophytes. Boutique R 9, 349-350.
- Heywood, V.H. (1978). Flowering plants of the world. New York: Mayflower Books. 335 pp.
- Hostettmann, K. & Marson, A. (1995). Chemistry and Pharmacology of Natural products: saponins. Cambridge University. Cambridge Press.17, 440-88.
- Ingole, A., Kadam, M.P., Dalu, A.P., Kute, S.M., Mange, P.R., Theng, V.D., Lahane, O.R., Nikas, A.P., Kawal, Y.V., Nagrik, S.U. & Patil, P.A. (2021). A review of the pharmacological characteristics of vanillic acid. Journal of Drug Delivery and Therapeutics 11, 200-204.
- Jæger, D., Ndi, C.P., Crocoll, C., Simpson, B.S., Khakimov, B., Guzman-Genuino, R.M., Hayball, J.D., Xing, X., Bulone, V., Weinstein, P., Møller, B.L. & Semple, S.J. (2017). Isolation and Structural Characterization of Echinocystic Acid Triterpenoid Saponins from the Australian Medicinal and Food Plant *Acacia ligulate*. Journal of Natural Products. 80, 2692–2698.
- Jean Chevaugéon. (1957). Mode d'action des Champignons parasites. Bulletin de la Société Botanique de France. Paris 104, 1-2, 57-101.

- Kalinin, V. I., Avilov, S. A., Kalinina, E. Y., Korolkova, O. G., Kalinovskiy, A. I., Stonik, V. A., Rigüera, R. & Jiménez, C. (1997). Structure of Eximisoside A, a novel triterpene glycoside from the far-Eastern sea cucumber *Psolus eximius*. *Journal of Natural Products* 60, 817–819.
- Kim, D.H., Jung, J.S., Suh, H.W., Huh., S.O., Min, S.K., Son, B.K., Park, J.H., Kim, N.D., Kim, Y.H. & Song, D.K. (1998). Inhibition of stress induced plasma corticosterone levels by ginsenosides in mice: involvement of nitric oxide. *NeuroReport* 9, 2261-2264.
- Kobayashi, K., Teruya, T., Suenaga, K., Matsui, Y., Masuda, H. & Kigoshi, H. (2006). Isotheasaponins B1–B3 from *Camellia sinensis* var. *sinensis* tea leaves. *Phytochemistry* 67, 1385–9.
- Köhl, J., Kolnaar, R. & Ravensberg, W.J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents against Plant Diseases: Relevance beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10, 845.
- Legesse, K. & Van der Maarel, E. (1990). Population Ecology of *Acacia tortilis* in the semi-arid region of the Sudan. *Journal of vegetation science* 1, 419-424.
- Linnek, J., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Paululat, T., Avunduk, S., Alankus-Caliskan, O. & Lacaille-Dubois, M.-A. (2011). Cycloartane glycosides from three species of *Astragalus* (Fabaceae). *Helvetica Chimica Acta* 94, 230-237.
- Mahato, S.B. (1996). Saponins with antifilarial activity from *Acacia auriculiformis*. In: Waller, G.R., Yamasaki, K. (eds) *Saponins used in traditional and modern medicine. Advances in experimental medicine and biology*. 404, 4899-1367-8_16.
- Mandal, P., Sinha Babu, S.P. & Mandal, N.C., (2005). Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. *Fitoterapia* 76, 462–465.
- Massiot, G. & Lavaud, C. (1995). Structural elucidation of saponins, Atta-Ur- Rahman (Eds.), *Structure and chemistry (Part 3): Studies in natural products chemistry*. Elsevier. Amsterdam, pp 187–224.
- Mostafa, A.E., El-Hela, A.A., Mohammad, A.E.I., Cutler, S.J. & Ross, S.A. (2016). New triterpenoidal saponins from *Koelreuteria paniculata*. *Phytochemistry Letters* 17, 213–218.

- Nguyen, V.-D., Nguyen, H.-L.T., Do, L.-C., Tuan, V.V., Thuong, P.T. & Phan., T.-N. (2018). A new saponin with anti-hiv-1 protease activity from *Acacia pennata*. *Natural Products Communications* 13, 18.
- Njateng, G.S.S., Du, Z., Gatsing, D., Nanfack, D.A.R., Feussi, T.M., Kamdem, W.H., Tane, P., Mouokeu, R.S., Luo, X. & Kuate, J.-R. (2015). Antifungal properties of a new terpenoid saponin and other compounds from the stem bark of *Polyscias fulva* Hiern (Araliaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15, 25.
- Osbourn, A.E. (1996a). Saponins and plant defence - a soap story. *Trends in Plant Science* 1, 4-9.
- Osbourn, A.E. (1996b). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defence against fungal Attack. *The plant cell* 8, 1821-31.
- Pérez-García A., Romero D. & De Vicente A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 187-193.
- Petit, B., Mitaine-Offer, A.-C., Fischer, J., Schöffler, A., Delaude, C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Thines, E. & Lacaille-Dubois, M.-A. (2021). Anti-phytopathogen terpenoid glycosides from the root bark of *Chytranthus macrobotrys* and *Radlkofera calodendron*. *Phytochemistry* 188, 112797-112800.
- Petit, B. (2020). Valorisation des produits naturels glycosylés pour la santé et l'environnement : du diagnostic de maladies auto-immunes à la protection des cultures (Thèse de Doctorat). Université Bourgogne Franche-Comté, Ecole doctorale E2S, Reims. 371pp
- Pierre Leroux. (2003). Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus Biologies, Paris* 326, 9–21.
- Porsche, F.F., Molitor, D., Beyer, M., Charton, S., André, C. & Kollar, A. (2018). Antifungal activity of saponins from the fruit Pericarp of *Sapindus mukorossi* against *Venturia inaequalis* and *Botrytis cinerea*. *Plant disease* 102, 991-1000.
- Poulin-Ouellette, M. (2023). Résistance aux fongicides, agressivité et agents causaux : Implications pour la gestion de la maladie de la brûlure de la feuille de l'oignon (Mémoire de Master). Faculté des Sciences - Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

- Puapairoj, P., Naengchomnong, W., Kijjoa, A., Pinto, M.M., Pedro, M., Nascimento, M.S.J., Silva, A.M.S. & Herz, W. (2005). Cytotoxic activity of Lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. *Planta Medica* 71, 208-213.
- Rezgui, A., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutartre, P. & Lacaille-Dubois, M.-A. (2016). Oleanolic acid and hederagenin glycosides from *Weigela stelzneri*. *Phytochemistry* 123, 40–47.
- Rocher, F. (2002). Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : Évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d’activateurs de réactions de défense (Thèse de Doctorat). Université De Poitiers - Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, Poitiers. 151 pp.
- Rojas-Sandoval, J. (2022). *Acacia polyacantha* (White thorn). CABI COMPENDIUM. <https://cabidigitallibrary.org>
- Saha, I., Ghosh, N., Maity, D., Sharma, N. & Mitra, K. (2020). Inferring the genetic variability in Indian SARS-CoV2 genomes using consensus of multiple sequence alignment techniques. *Infection, Genetics and Evolution* 85, 104522.
- Sakurai, N., Kobayashi, M., Shigihara, A. & Inoue, T. (1992). Berchemolide, a novel dimeric vanillic acid glucoside from *Berchemia racemosa*. *Chemistry Pharmaceutics Bulletin*. 40, 851-853.
- Seo, Y., Jeannine, H., Abdel-Kader, M., Malone, S., Derveld, I., Hermus, A., Werkhoven, M.C.M., Wisse, J.H., Mamber, S.W., Dalton, J.M. & Kingston, D.G.I. (2002). Bioactive saponins from *Acacia tenuifolia* from the suriname rainforest. *Journal of Natural Products* 65, 170-174.
- Smith, L.J., Smith, M.K., Tree, D., O’keefe, D. & Galea, V.J. (2008). Development of a small-plant bioassay to assess banana grown from culture for consistent infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Australasian Plant Pathology* 37, 171-179.
- Sparg, S.G., Light, M.E. & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 219–243.

- Spichiger, R.-E., Figeat-Hug, M. & Jeanmonod, D. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. PPUR presses polytechniques. 112pp.
- Stracquadano, C., Quiles, J.M., Meca, G. & Cacciola, S.O. (2020). Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. *Journal of Fungi* 6, 263.
- Stukenbrock, E. & Gurr, S. (2023). Address the growing urgency of fungal disease in crops. *Nature* 23, 617.
- Tchoukoua, A., Douanla, M.H., Arieffa, N.R., Yoshida, J., Ito, Y.D., Ngadjui, B.T. & Shiono, Y. (2021a). Triterpene saponins from the roots of *Acacia Senegal* (L.) Willd. *Fitoterapia* 151, 104859.
- Tchoukoua, A., Nganou, S.C.T., Dabole, B.A., Yoshida, J., Ito, Y.D., Ngadjui, B.T. & Shiono, Y. (2021b). Polythosides A and B, two new triterpenoid saponins from the roots of *Acacia polyacantha* Willd. (Mimosaceae). *Phytochemistry Letters* 43, 190–195.
- Tchoukoua, A., Tabopda, T.K., Usukhbayar, N., Ken-Ichi, K., Kwon, E., Momma, H., Koseki, T., Shiono, Y. & Ngadjui, B.T. (2018a). New Triterpene saponins from the stem of *Acacia kamerunensis* (Mimosaceae). *Phytochemistry Letters* 23, 21–25.
- Tchoukoua, A., Tabopda, T.K., Simo, I.K., Uesugi, S., Ohno, M., Ken-Ichi K., Kwon, E., Momma, H., Shiono, Y. & Ngadjui, B.T. (2018b). Albidosides H and I, two new triterpene saponins from the barks of *Acacia albida* Del. (Mimosaceae). *Natural Products Research* 32, 924-932.
- Tchoukoua, A., Tabopda, T.K., Uesugi, S., Ohno, M., Ken-Ichi, K., Kwon, E., Momma, H., Horo, I., Alankus, O., Kan, Ç., Shiono, Y. & Ngadjui, B.T. (2017a). Triterpene saponins from the roots of *Acacia albida* Del. (Mimosaceae). *Phytochemistry* 1-8.
- Tchoukoua, A. Tabopda, T.K., Usukhbayar, N., Kimura, K., Kwon, E., Momma, H., Koseki, T., Shiono, Y. & Ngadjui, B.T. (2017b). New triterpene saponins from the roots of *Acacia macrostachya* (Mimosaceae). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 0916-8451, 1347-6947.

- The Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141, 399– 436.
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 105– 121.
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181, 1– 20.
- Van der Maesen, L.J.G., Van der Burgt, X.M. & Van Medenbach de Rooy, J.M. (1996). The Biodiversity of African Plants. *Science Business Media*, 254.
- Vincken, J. P., Heng, L., Groot, A. & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 275-297.
- Voutquenne, L. (2001). Saponines et activités hémolytiques. Saponines et glycosides de cinq espèces de Sapindaceae. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 59, 407–414.
- Wendt, K.U. (2005). Enzyme mechanisms for triterpene cyclization: new pieces of the puzzle. *Angewandte Chemie International Edition* 44, 3966–3971.
- Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 89, 164-175.
- Wojciechowski, K. (2013). Surface activity of saponin from *Quillaja* bark at the air/water and oil/water interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 108, 95–102.
- Yamamori A., Takata Y., Fukushi E., Kawabata J., Okada H., Kawazoe Naoki., Ueno K., Onodera S. & Shiomi N. (2017). Structural analysis of novel Low-Digestible Sucrose Isomers synthesized from D-Glucose and D-Fructose by Thermal Treatment, *Journal of Applied Glycoscience* 64, 15-19.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I. & Thomson, J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

<https://www.investiraucameroun.com/agriculture/2208-11237-la-contribution-de-l-agriculture-a-la-croissance-economique-du-cameroun-a-ete-de-76-38-en-2017> consulté le 23 juillet 2023 à 14h23 min.

www.ildis.org/LegumeWeb/?sciname=Acacia+polyacantha consulté le 18 juillet 2023 à 11h42 min.

www.plantzafrica.com/plantab/acaciapoly.html consulté le 18 juillet 2023 à 13h28 min.

<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Sapindaceae/Chytranthus/> consulté le 12 juin 2023 à 16h46 min.

[https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Chytranthus_setosus-Jardin_botanique_Meise_\(2\).jpg](https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Chytranthus_setosus-Jardin_botanique_Meise_(2).jpg) consulté le 08 Mai 2024 à 14h17.

ANNEXES



New acylated triterpenoid saponins from the roots of *Acacia polyacantha* Willd. (Fabaceae)

Jean Faustin Atangana^{a,b,c}, Lin Marcellin Messi^{a,c,*}, Mohamed Haddad^d,
 Joséphine Ngo Mbing^a, Aime-Didier Boyogueno Begoude^c, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb^a,
 Muhammad Iqbal Choudhary^b, Olivier Placide Noté^{a,**}

^a Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, Département de Chimie Organique, Faculté de Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812, Yaoundé, Cameroon

^b H.E.J Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS), University of Karachi, Karachi, 75270, Pakistan

^c Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD), BP 2067, Yaoundé, Cameroon

^d UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Fabaceae
Acacia polyacantha
 Acylated triterpenoid saponins
 Polyacosides
 NMR

ABSTRACT

In our continuing search of saponins from the plants of Fabaceae family, phytochemical investigation of the roots of *Acacia polyacantha*, led to the isolation and structural characterization of six undescribed triterpenoid saponins, named polyacosides A-F (1–6). Their structures were established, using extensive analysis by NMR techniques, mainly 1D NMR (¹H, ¹³C, and DEPT) and 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC, TOCSY and HMBC) experiments, HRESIMS and by comparison with the literature data, as 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 → 4)- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 → 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 → 2)]- α -L-arabinopyranosyl]-21-O- $[\text{Cis-2-methoxycinnamoyl}]$ machaerinic acid (1), 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 → 4)- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 → 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 → 2)]- α -L-arabinopyranosyl]-21-O- $[\text{Cis-3,4-dimethoxycinnamoyl}]$ machaerinic acid (2), 3-O- $[\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 → 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 → 2)- α -L-arabinopyranosyl]-21-O- $[\text{Trans-4-methoxycinnamoyl}]$ machaerinic acid (3), 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 → 2)- β -D-glucopyranosyl]-21-O- $[\text{Cis-3,4-dimethoxycinnamoyl}]$ machaerinic acid (4), 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 → 2)- β -D-glucopyranosyl]-21-O- $[\text{Cis-2-methoxycinnamoyl}]$ machaerinic acid (5) and 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 → 2)- β -D-glucopyranosyl]-21-O- $[\text{Trans-4-methoxycinnamoyl}]$ machaerinic acid (6). Our findings highlight the presence of methoxycinnamoyl group linked to C-21 of the machaerinic acid aglycone moiety as first report of 21-methoxycinnamoyl-machaerinic acid derivative from the plants of *Acacia* genus (Fabaceae). This represents therefore a valuable contribution to the chemotaxonomy of the *Acacia* genus of Fabaceae family, which is known to be a rich source of triterpenoid saponins.

1. Introduction

The Fabaceae family, mostly distributed in tropical and subtropical regions, are trees, shrubs and herbaceous plants, containing about 3200 species divided into 82 genera including *Acacia* genus [1]. Plants of *Acacia* genus are trees up to 15 m high with a trunk of 0.6 m diameter and spikes up to 3–12 cm long [2]. In India and Africa, especially in Cameroon, Senegal, South Africa, they are used in traditional medicine to fight tuberculosis, leprosy, livestock, gastrointestinal infections, dysentery, cough, toothache, aphrodisiac and cancer [3,4]. Many

secondary metabolites have been described in *Acacia* genus, including terpenoids, flavonoids [5] and saponins [6–12] as major components. *Acacia polyacantha* Willd. (synonym of *Senegalia polyacantha* (Willd.) Seigler & Ebinger), which is found in Cameroon, is endowed with interesting biological properties such as antibacterial, antibiotic and antistaphylococcal activities [13,14]. Previous phytochemical studies of *A. polyacantha*, led to the isolation of several triterpenoid saponins with good cytotoxic activities [5,9]. As part of our continuing search of saponins from Cameroonian's Fabaceae family [15–18], we have investigated the saponins content of the roots of *A. polyacantha* (see Figs. 2–7).

* Corresponding author. Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, Département de Chimie Organique, Faculté de Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812, Yaoundé, Cameroon.

** Corresponding author.

E-mail addresses: linmarcellinmessi@yahoo.fr (L.M. Messi), Oliviernote1@yahoo.fr (O.P. Noté).

<https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108725>

Received 30 August 2022; Received in revised form 31 October 2022; Accepted 14 November 2022

Available online 17 November 2022

0008-6215/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

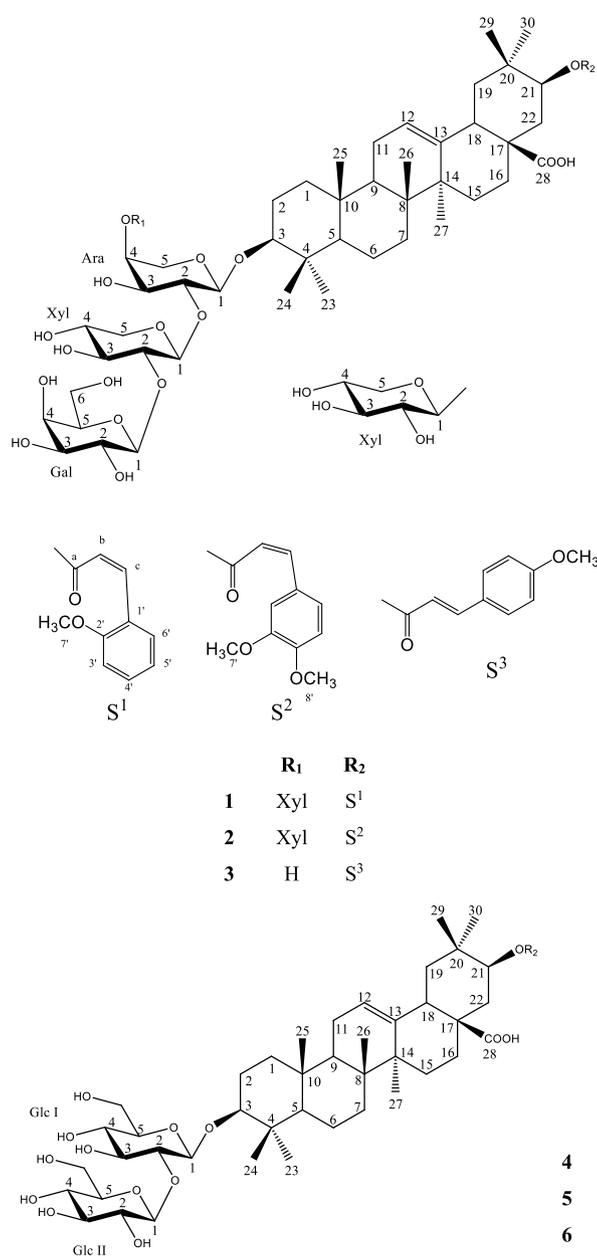


Fig. 1. Structures of isolated compounds 1–6.

In this paper, we report the isolation and structural characterization of six new triterpenoid saponins (1–6) having a methoxycinnamoyl group linked to the C-21 position of the machaerinic acid. This is the first report on this 21-methoxycinnamoyl-machaerinic acid derivative from the plant of *Acacia* genus (Fabaceae).

2. Results and discussion

The air-dried powdered roots of *A. polyacantha* were extracted with a mixture of water and methanol (90%) by maceration during 3 days. After evaporation of the solvent, the resulting dark residue was suspended in 200 mL of water and partitioned successively with ethyl acetate and *n*-BuOH sat. H₂O. The *n*-BuOH phase was then evaporated to dryness affording a gum which was submitted to column chromatography (CC) using Diaion HP-20 resin yielding enriched saponins fractions which were submitted to successive MPLC afforded 4 main others subfractions. The purification of the four previous subfractions by

Semiprep-HPLC reverse phase led to the isolation of six new acylated triterpenoid saponins (1–6) (Fig. 1).

All the isolated compounds 1–6 were obtained as white amorphous powders. Upon acid hydrolysis with 1 N aqueous CF₃COOH (1.5 mL) for 2 h at 100 °C, all the compounds afforded machaerinic acid unit, which was identified with an authentic sample, together with arabinose, xylose, galactose and glucose, which were identified by comparison on TLC with authentic samples. The absolute configurations of these sugar residues, determined by UHPLC/MS analysis after derivatization with an L-cysteine methyl ester followed by phenyl isothiocyanate, were characterized as D for Glucose, Xylose and Galactose and L for Arabinose.

HR-ESIMS of **Polyacoside A** (1), indicated a C₆₁H₉₀O₂₃ molecular formula, as deduced from the protonated molecular peak at *m/z* 1191.5903 [M + H]⁺ (calcd for C₆₁H₉₁O₂₃ 1191.5951).

The ¹H spectrum of compound 1 showed seven angular methyl groups as singlets at δ_H 0.81, 0.96, 0.99, 1.08, 1.19, 1.22 and 1.28, one olefinic proton at δ_H 5.51 and four anomeric protons at δ_H 4.79, 4.85, 5.05 and 5.25. Its ¹³C NMR spectrum showed two olefinic carbon signals at δ_C 123.1 and δ_C 143.5 with seven methyl singlet signals at δ_C 15.4, 16.4, 17.3, 18.6, 25.9, 27.8 and 28.9 and four anomeric carbons at δ_C 103.6, 104.6, 105.4 and 105.9 suggesting that compound 1 was an oleanane type triterpenoid saponin. In addition, substitution at C-3 was evidenced by the observed signal at δ_H 3.20 in the proton spectrum appearing as dd (with coupling constant 11.2; 4.1) and the glycosylation-induced shift at δ_C 89.1 in the ¹³C NMR spectrum. Furthermore, the substitution at C-21 was ascertained from the observed signal in the proton spectrum at δ_H 5.36 appearing as doublet (with coupling constant 5.1) and the acylation-induced shift observed for C-21 at δ_C 75.7. The coupling constants showed that these carbons are oxygenated methyn in β configuration. The aglycone of compound 1 was thus recognized to be machaerinic acid (3β,21β-dihydroxyoleanolic acid) by comparison of its NMR data with published data [19].

All these data established that 1 is a 21-acyl 3-monodesmosidic machaerinic acid derivative with sugar chain linked to C-3 through an ether bond.

The ¹H and ¹³C NMR data (Table 2) of each monosaccharide residues were assigned starting from the readily identifiable anomeric proton of each hexosyl or pentosyl unit, by means of COSY, HSQC, TOCSY, NOESY and HMBC spectra. Data indicated that all the sugar residues were in their pyranose form. Based on the coupling constants of the anomeric protons and the chemical shifts of the anomeric carbons, the anomeric configuration of the sugar moieties was determined as β for the galactose, glucose and xylose moieties and α for the arabinose moiety.

The sequence of the oligosaccharide chain attached at C-3 was established from the HMBC and NOESY experiments.

The correlations observed in the HMBC spectrum of compound 1 between H-1 of Ara (δ_H 4.79) and C-3 of the aglycone (δ_C 89.1), and in the NOESY spectrum between H-1 of Ara (δ_H 4.79) and H-3 of the machaerinic acid moiety (δ_H 3.20), suggested that Ara was directly attached to the C-3 of the aglycone. Furthermore, in the HMBC spectrum of 1, long-range correlation observed between H-1 (δ_H 5.25) of Xyl I and C-2 (δ_C 82.1) of Ara revealed the 1–2 linkage between the two sugars. Moreover, the HMBC correlation observed between H-1 of Gal (δ_H 4.85) and C-2 of Xyl I (δ_C 76.6) confirmed by the NOESY correlation between H-1 of Gal (δ_H 4.85) and H-2 of Xyl I (δ_H 4.09) allowed us to locate Gal at C-2 of Xyl I. In addition, the HMBC correlation observed between H-1 of Xyl II (δ_H 5.05) and C-4 of Ara (δ_C 80.4) established the connectivity between the two sugar units, which was confirmed by the NOESY correlation observed between H-1 of Xyl II (δ_H 5.05) and H-4 of Ara (δ_H 4.23). Detailed analysis of the ¹H, ¹³C, TOCSY, HSQC, HMBC and NOESY data indicated that Gal and Xyl II were terminal sugars. Hence, the oligosaccharide chain of 1 was elucidated as β-D-xylopyranosyl-(1 → 4)-[β-D-galactopyranosyl-(1 → 2)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 2)] -α-L-arabinopyranoside moiety and was established to be linked at C-3 of the aglycone.

In addition, the ¹H NMR spectrum of compound 1 showed signals at

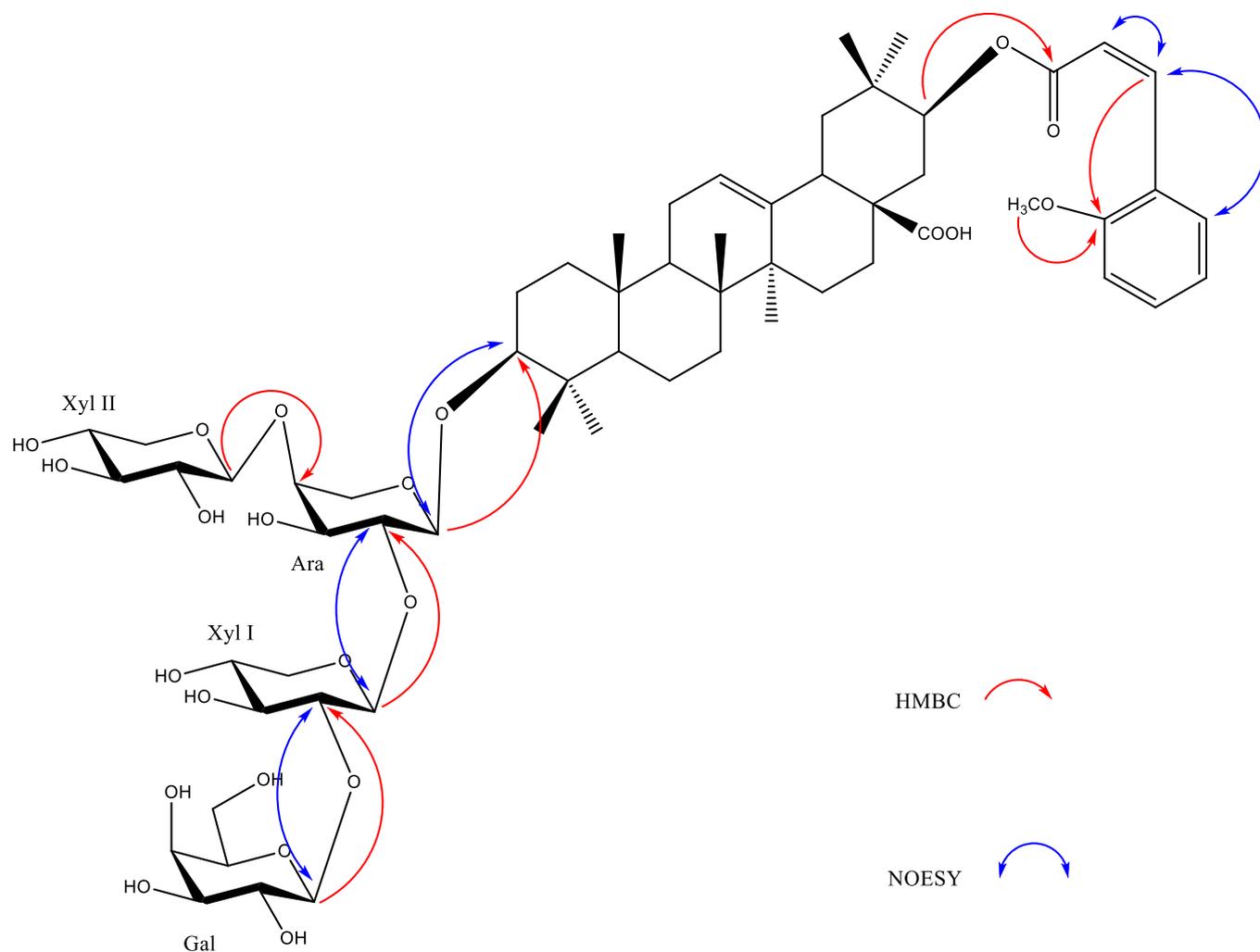


Fig. 2. Key HMBC and NOESY correlations observed for compound 1.

δ_{H} 6.72, 6.95, 6.99, 7.66, 7.98 and 8.00 ppm and the ^{13}C NMR spectrum, indicated the presence of 10 signals at δ_{C} 113.9, 114.8, 116.6, 127.6, 130.3, 133.0, 144.7, 161.9 and 167.0 ppm which are characteristic of cinnamoyl group [20]. Another signal was observed in the ^1H NMR spectrum at δ_{H} 3.67 which correlate perfectly in HSQC spectrum with its carbon signal at δ_{C} 55.8 suggesting that compound 1 has one methoxy group. The attachment of this methoxy group to the cinnamoyl moiety was supported by the HMBC correlation observed between the proton of the methoxy group (δ_{H} 3.67) and one carbon of the benzene group (δ_{C} 161.9). The *Ortho*-position of this methoxy group was ascertained, firstly by the HMBC correlation observed between one olefinic proton of the cinnamoyl moiety at δ_{H} 8.00 and the quaternary carbon atom signal of the benzene unit at δ_{C} 161.9. Secondly, by the absence of the NOESY correlation between the methoxy proton signals (δ_{H} 3.67) and the cinnamoyl proton signal (δ_{H} 8.00). Moreover, the small coupling constant ($J = 4.1$ Hz) of the two olefinic protons at δ_{H} 6.72 and δ_{H} 8.00 allowed us to establish the *Cis*-configuration of the methoxycinnamoyl unit. This was confirmed by the NOESY correlation observed between these two olefinic protons. The attachment of this methoxycinnamoyl moiety to the aglycone unit was supported by the HMBC correlation observed between H-21 at δ_{H} 5.36 of the aglycone and the carbonyl at δ_{C} 167.0 of the cinnamoyl unit. This was confirmed by the observation of acylation-induced shifts in the ^{13}C NMR spectrum at δ_{C} 75.7 of the aglycone. Hence, the structure of polyacoside A (1) was determined to be 3-*O*-[β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- [β -*D*-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*L*-arabinopyranosyl]-21-*O*-

[*Cis*-2-methoxycinnamoyl] machaerinic acid.

HR-ESIMS of Polyacoside B (2), indicated a $\text{C}_{62}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$ molecular formula, as deduced from the protonated molecular peak at m/z 1221.6007 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{93}\text{O}_{24}$ 1221.6056).

Further analysis of 1D and 2D NMR spectra of 2, revealed that the sugar chain attached to the C-3 of the aglycone was identical to the sugar chain attached to the C-3 of compound 1. By comparing the ^1H and ^{13}C NMR spectra of 2 with those of 1, it was found that the spectra of the two compounds 1 and 2 were almost superimposable except for the signals of one additional methoxy group in compound 2 in comparison to compound 1. This was confirmed by the HR-ESIMS of 2 which evidenced 31 mass unit more than the mass of 1 accounting for the mass of one methoxy group. In addition, the absence of HMBC correlation between δ_{H} 8.01 of cinnamoyl unit and neither of the two aromatic carbons substituted by the methoxy groups at δ_{C} 150.2 and δ_{C} 152.4 indicated that the two methoxy groups were not fixed at the *Ortho*-position of the benzene group. Furthermore, the close signals data of the two methoxy in the ^{13}C NMR spectrum showed that these two methoxy are in the *Meta*- and *Para*-position at the benzene group of the cinnamoyl unit [21]. This was supported by the NOESY correlation observed between δ_{H} 8.01 of the cinnamoyl and δ_{H} 7.30 of the benzene moiety, and the absence of the NOESY correlation between δ_{H} 7.30 and the methoxy proton groups signals at δ_{H} 3.75 and 3.80. Hence, the structure of 2 was established as 3-*O*-[β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- [β -*D*-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*L*-arabinopyranosyl]-21-*O*- [*Cis*-3,

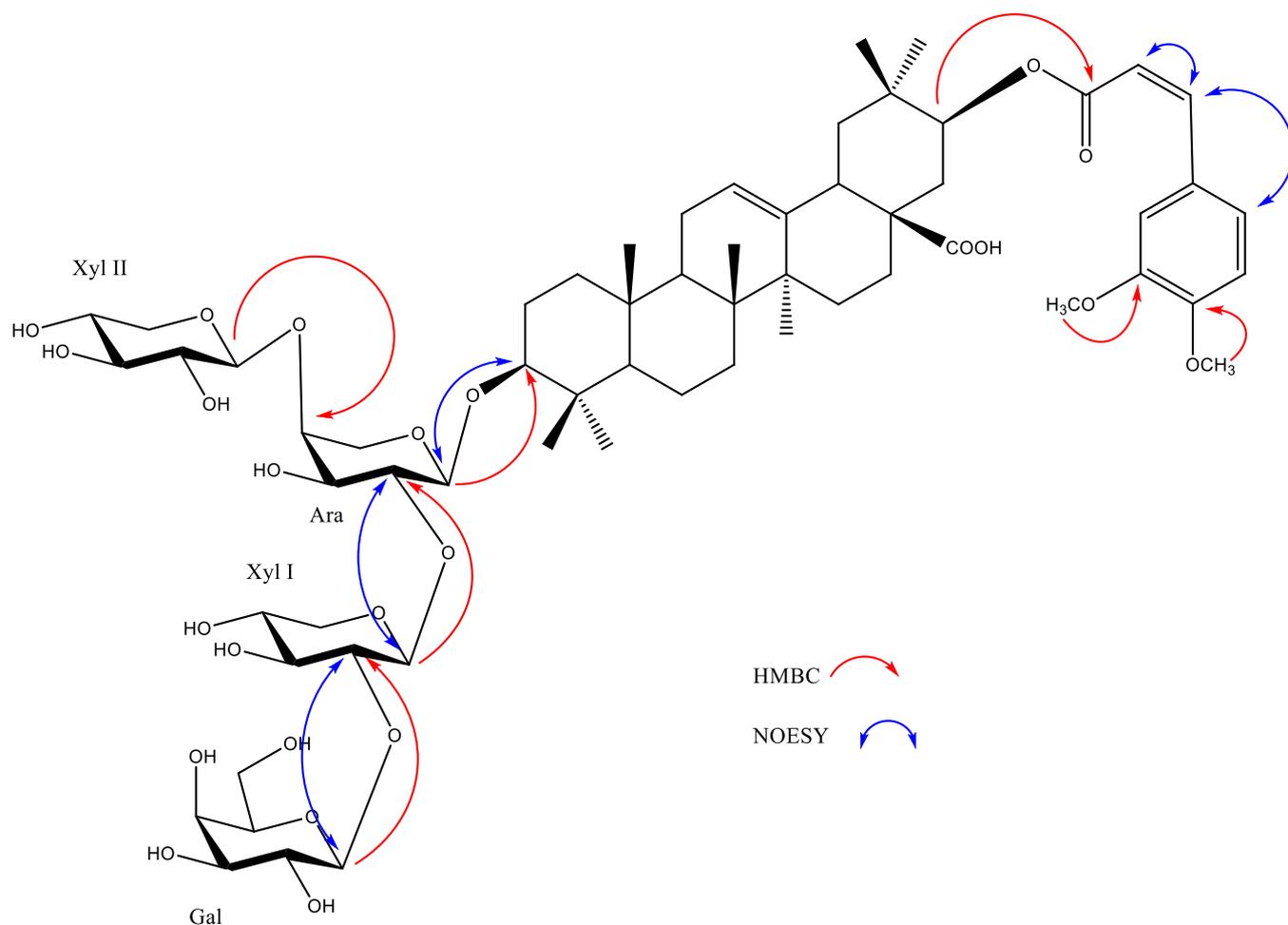


Fig. 3. Key HMBC and NOESY correlations observed for compound 2.

4-dimethoxycinnamoyl] machaerinic acid.

HR-ESIMS of **Polyacoside C** (3), indicated a $C_{56}H_{82}O_{19}$ molecular formula, as deduced from the protonated molecular peak at m/z 1059.5458 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{56}H_{83}O_{19}$ 1059.5528).

Further analysis of 1D and 2D NMR spectra of 3 differs to the spectra of 1 by the loss of one Xylose unit attached at C-4 of Ara at the sugar chain fixed to the C-3 of the aglycone. The disappearance of the signal of the xylopyranosyl unit previously attached at C-4 of Ara (δ_C 80.4) in compound 1 was evidenced from the observation of the shielded signal (-11 ppm) of C-4 of Ara (δ_C 69.4) in compound 3 in comparison to C-4 of Ara (δ_C 80.4) in compound 1. This was confirmed by the HR-ESIMS of compound 3, which evidenced the loss of 132.0 mass unit accounting for the xylose unit in comparison to compound 1. In another hand, the large coupling constant ($J = 14.5$ Hz) of the two olefinic protons at δ_H 6.72 and δ_H 7.99 of the cinnamoyl unit showed that this moiety was in the *Trans*-configuration in compound 3. This was confirmed by the absence of the NOESY correlation between these two olefinic protons. In addition, the 1H and ^{13}C NMR spectra revealed the presence of only two families of protons and carbons at δ_H 7.00, 7.65 and δ_C 114.8, 130.1 respectively for the benzene group of cinnamoyl unit, which indicated that the methoxy group was attached to the *Para*-position of the benzene group of cinnamoyl unit [20]. Hence, compound 3 was determined as 3-*O*- [β -*D*-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-arabinopyranosyl]-21-*O*- [trans-4-methoxycinnamoyl] machaerinic acid.

HR-ESIMS of **Polyacoside D** (4), indicated a $C_{53}H_{78}O_{17}$ molecular formula, as deduced from the protonated molecular peak at m/z

987.5249 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{53}H_{79}O_{17}$ 987.5317).

The 1H NMR spectrum of compound 4 showed the presence of two anomeric protons at δ_H 4.91, 5.38 and its ^{13}C NMR spectrum showed two anomeric carbons at δ_C 105.0, 106.0 which indicated that compound 4 had only two sugar moieties. The acid hydrolysis of 4 combined with the extensive analysis of 1D and 2D NMR spectra of the two sugar moieties indicated that these sugar moieties were in their pyranose form and were identified, as glucosyl units.

The correlations observed in the HMBC spectrum of compound 4 between H-1 of Glc I at δ_H 4.91 and C-3 of the aglycone at δ_C 88.9, indicated that this sugar moiety was attached directly to the C-3 of the aglycone. This was supported by the NOESY correlation observed between H-1 of Glc I at δ_H 4.91 and H-3 of the machaerinic acid moiety at δ_H 3.30. Furthermore, in the HMBC spectrum of 4, long-range correlation observed between H-1 of Glc II at δ_H 5.38 and C-2 of Glc I at δ_H 83.4 revealed the 1–2 linkage between the two sugars. The detailed analysis of the 1H , ^{13}C , TOCSY, HSQC, HMBC and NOESY data indicated that Glc II was terminal sugar. Hence, the oligosaccharide chain attached to the C-3 of the aglycone of compound 4 was elucidated as β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-glucopyranoside. Further analysis of the 1D and 2D NMR spectra indicated that the methoxycinnamoyl unit attached to the C-21 of the aglycone of compound 4 was identical to the methoxycinnamoyl unit attached to the C-21 of the aglycone of compound 2. Hence, the structure of 4 was determined as 3-*O*- [β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-glucopyranosyl]-21-*O*- [Cis-3,4-dimethoxycinnamoyl] machaerinic acid.

HR-ESIMS of **Polyacoside E** (5), indicated a $C_{52}H_{76}O_{16}$ molecular

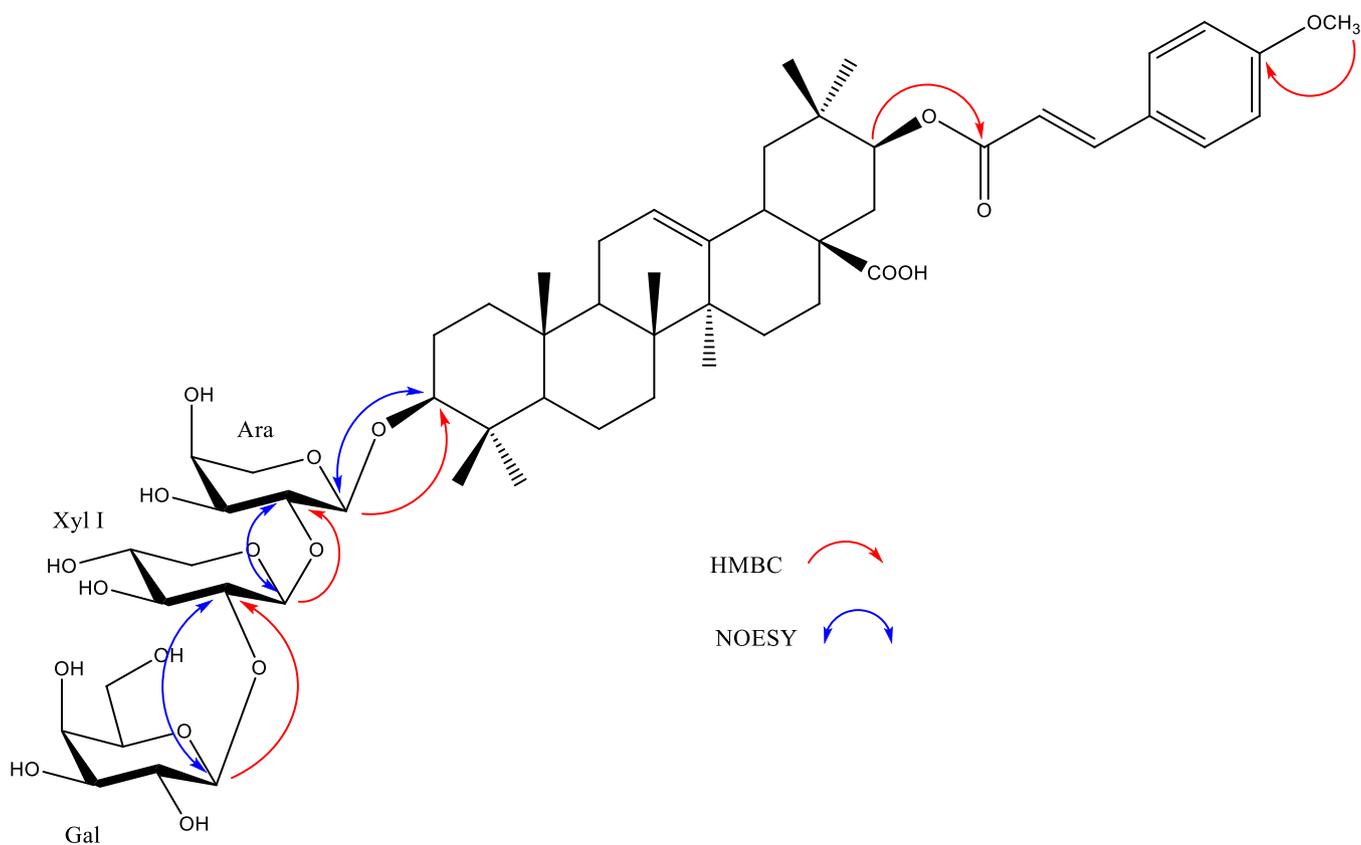


Fig. 4. Key HMBC and NOESY correlations observed for compound 3.

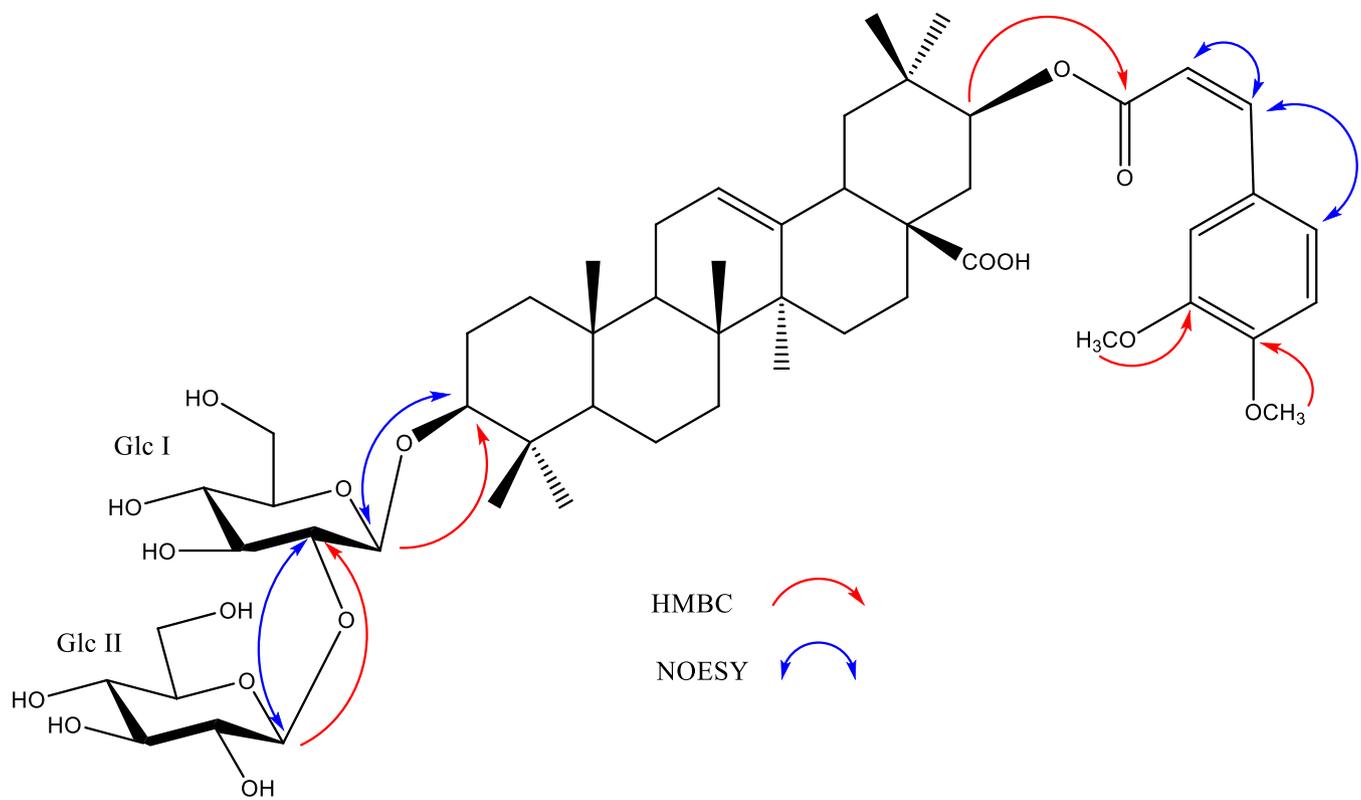


Fig. 5. Key HMBC and NOESY correlations observed for compound 4.

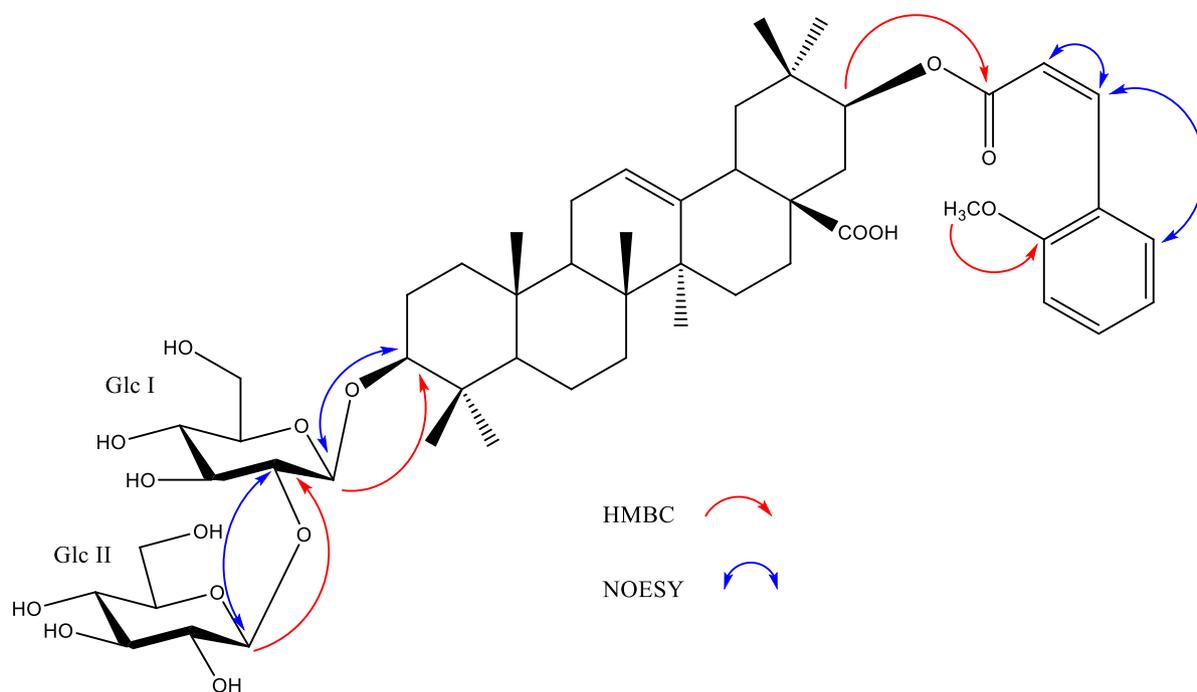


Fig. 6. Key HMBC and NOESY correlations observed for compound 5.

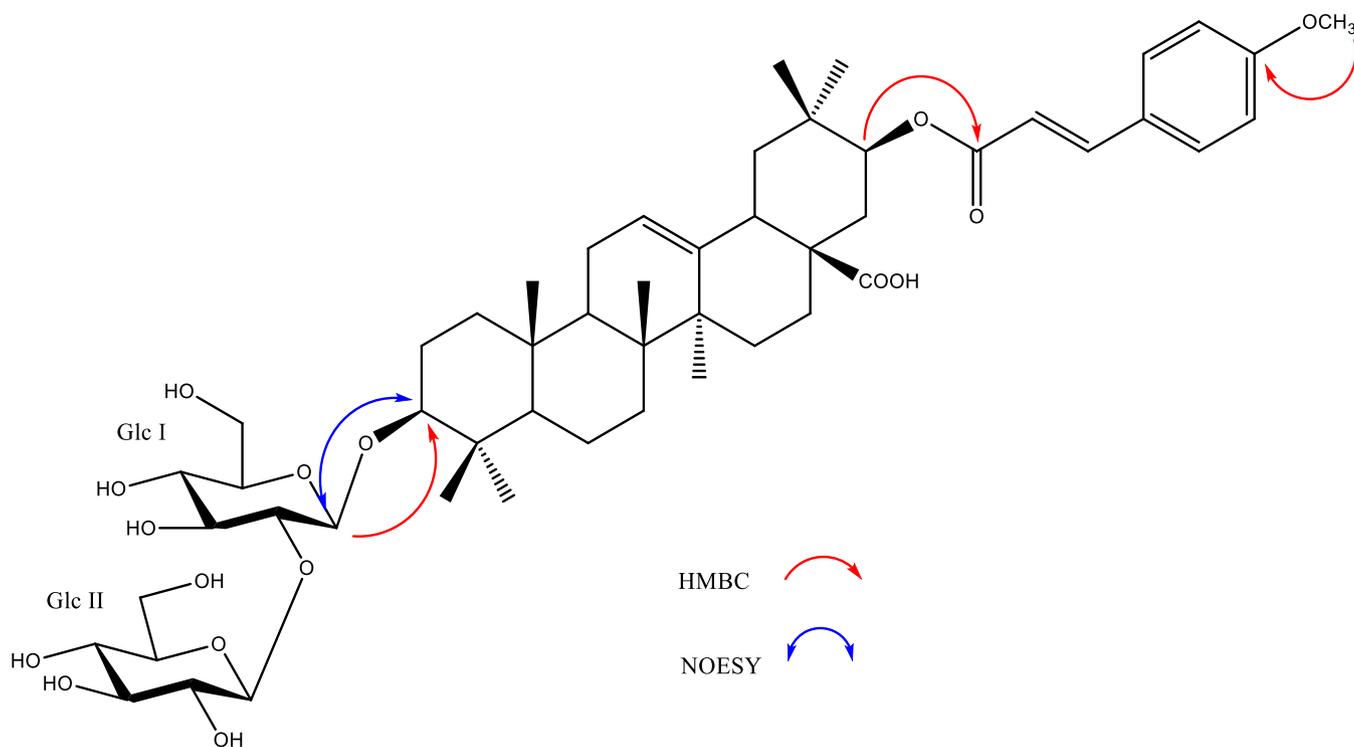


Fig. 7. Key HMBC and NOESY correlations observed for compound 6.

formula, as deduced from the protonated molecular peak at m/z 957.5208 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{52}H_{77}O_{16}$ 957.5211).

Further analysis of 1D and 2D NMR spectra of compound 5 allowed us to identify the sugar chain attached to the C-3 of the aglycone to be the same as the sugar chain attached to the aglycone of compound 4. The methoxycinnamoyl unit attached to the C-21 of the aglycone of compound 5 was identical to the methoxycinnamoyl unit attached to the

aglycone of compound 1. This was confirmed by the HR-ESIMS analysis of compound 5 which displayed 31 mass units less than that of compound 4, accounting for the mass of one methoxy group. Hence, the structure of compound 5 was determined as 3-*O*- [β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-glucopyranosyl] -21-*O*- [Cis-2-methoxycinnamoyl] machaerinic acid.

HR-ESIMS of Polyacoside F (6), indicated a $C_{52}H_{76}O_{16}$ molecular

Table 1

NMR spectroscopic data (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C) for the aglycone moieties of compounds 1–6 (δ in ppm and J in Hz)^a.

		1		2		3		4		5		6	
		δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}								
1	CH ₂	38.6	0.87, 1.40	38.9	0.85 1.40	38.7	1.40 nd	38.6	0.84 1.39	37.7	0.83 1.40	37.7	0.83 1.40
2	CH	26.4	1.78 2.20	26.5	1.77 2.07	26.6	1.81 2.19	26.5	1.16 1.27	27.1	1.16 1.28	27.1	1.16 1.28
3	CH	89.1	3.20 (dd, $J = 11.2; 4.9$)	89.3	3.20 (dd, $J = 11.4; 4.4$)	89.0	3.30 (dd, $J = 11.0; 4.7$)	88.9	3.30 (dd, $J = 11.1; 4.4$)	88.9	3.30 (dd, $J = 11.7; 4.5$)	88.9	3.30 (dd, $J = 11.6; 4.4$)
4	C	39.4	/	39.0	/	39.5	/	39.3	/	39.3	/	39.3	/
5	CH	55.8	0.72 (brd, $J = 12.1$)	56.0	0.71 (d, $J = 11.6$)	55.8	0.74 (d, $J = 11.6$)	55.7	0.71 (d, $J = 11.8$)	55.8	0.71 (brd, $J = 11.5$)	55.8	0.71 (brd, $J = 11.6$)
6	CH ₂	18.4	1.49 nd	17.8	1.19 nd	18.6	1.22 1.53	18.4	1.25 1.35	18.8	1.25 1.35	18.8	1.25 1.35
7	CH ₂	33.1	1.25 1.47	33.3	1.23 1.40	33.2	1.25 1.42	33.2	1.21 1.35	33.3	1.22 1.36	33.3	1.22 1.36
8	C	39.6	/	39.2	/	39.6	/	39.6	/	39.8	/	39.8	/
9	CH	47.9	1.60	48.5	1.60	47.9	1.62	47.9	1.60	47.9	1.58	47.9	1.58
10	C	36.9	/	36.4	/	36.9	/	36.9	/	37.0	/	37.0	/
11	CH ₂	23.7	1.80 nd	24.2	1.87 nd	23.7	1.90 nd	23.7	1.23 nd	23.7	1.28 nd	23.7	1.28 nd
12	CH	123.1	5.51 (brd)	123.2	5.50 (brd)	123.2	5.51 (brd)	123.2	5.51 (brd)	123.1	5.51 (brd)	123.1	5.51 (brd)
13	C	143.5	/	143.6	/	143.5	/	143.5	/	143.4	/	143.4	/
14	C	42.1	/	42.0	/	42.2	/	42.1	/	42.0	/	42.0	/
15	CH ₂	28.2	1.16 2.07	28.2	1.15 2.08	29.0	1.25 1.38	29.3	1.24 nd	30.0	1.19 1.37	30.0	1.19 1.37
16	CH ₂	24.9	1.89 2.20	24.2	1.27 1.88	24.9	1.80 2.11	24.9	1.89 nd	25.4	2.17 nd	25.4	2.17 nd
17	C	48.3	/	48.5	/	48.4	/	48.4	/	48.3	/	48.3	/
18	CH	41.3	3.39	41.7	3.40	41.1	3.41	41.4	3.40	41.7	3.39	41.7	3.39
19	CH ₂	46.9	1.45 2.08	47.4	1.45 2.06	46.9	1.46 nd	47.0	1.45 2.08	47.1	1.45 2.07	47.1	1.45 2.07
20	C	35.6	/	35.3	/	35.6	/	35.6	/	35.8	/	35.8	/
21	CH	75.7	5.36 (d, $J = 5.1$)	75.9	5.37 (d, $J = 4.7$)	75.8	5.37 (d, $J = 4.7$)	75.6	5.38 (d, $J = 4.7$)	75.8	5.37 (d, $J = 5.6$)	75.8	5.37 (d, $J = 4.7$)
22	CH ₂	37.6	2.15 2.31	37.8	2.15 2.31	38.1	2.33 nd	38.7	1.39 2.32	39.5	1.40 2.32	39.5	1.40 2.32
23	CH ₃	27.8	1.22 (s)	27.9	1.22 (s)	27.8	1.23 (s)	28.2	1.23 (s)	28.4	1.23 (s)	28.4	1.23 (s)
24	CH ₃	16.4	0.99 (s)	16.9	0.98 (s)	16.4	1.03 (s)	16.8	1.08 (s)	16.5	1.08 (s)	16.5	1.08 (s)
25	CH ₃	15.4	0.81 (s)	15.3	0.80 (s)	15.4	0.83 (s)	15.4	0.81 (s)	15.6	0.81 (s)	15.6	0.81 (s)
26	CH ₃	17.3	0.96 (s)	17.6	0.95 (s)	17.3	0.99 (s)	17.3	0.96 (s)	17.3	0.96 (s)	17.3	0.96 (s)
27	CH ₃	25.9	1.28 (s)	26.3	1.27 (s)	25.9	1.28 (s)	25.9	1.27 (s)	26.1	1.29 (s)	26.1	1.29 (s)
28	C	178.6	/	178.4	/	180.0	/	179.5	/	179.5	/	179.5	/
29	CH ₃	28.9	1.08 (s)	29.3	1.07 (s)	29.9	1.09 (s)	28.9	1.09 (s)	29.0	1.09 (s)	29.0	1.09 (s)
30	CH ₃	18.6	1.19 (s)	19.5	1.19 (s)	18.4	1.19 (s)	18.6	1.20 (s)	18.8	1.20 (s)	18.8	1.20 (s)

formula, as deduced from the protonated molecular peak at m/z 957.5052 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{77}\text{O}_{16}$ 957.5211), identical to that of compound 5. This indicates that both compounds are isomers. Further analysis of the 1D and 2D NMR spectra of 6 allowed us to identify the sugar chain attached to the C-3 of the aglycone to be the same as the sugar chain attached to the aglycone of compound 5. The methoxycinnamoyl unit attached to the C-21 of the aglycone of 6 was identical to the methoxycinnamoyl unit attached to the aglycone of compound 3. The only difference between compounds 5 and 6 stands only for the position of the methoxy group on the benzene unit. As in compound 3, the methoxy group is in *Para*-position in compound 6, whereas, the methoxy group is in *Ortho*-position in compound 5, as already established in compound 1. Hence, the structure of compound 6 has been determined to be 3-*O*- [β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -*D*-glucopyranosyl]-21-*O*- [*Trans*-4-methoxycinnamoyl] machaerinic acid.

3. Conclusion

Our findings highlight the presence of six previously undescribed saponins from Fabaceae family, with methoxycinnamoyl groups attached to the C-21 of machaerinic acid unit, as aglycone. This is the first report on this 21-methoxycinnamoyl-machaerinic acid derivative from the plant of *Acacia* genus. In addition, it is worthy to note that 21- β -*E*-cinnamoyloxy machaerinic acid were isolated from *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae) [22], *Parkia bicolor* (Fabaceae) [23] and 21-

β -cinnamoyloxy acacic acid derivatives were described from *A. tenuiflora* [6]. According to these previous scientific works, the monosaccharides saponins isolated from *P. bicolor* exhibited a moderate antiproliferative activity against the chronic myeloid leukemia (K562) cell line. Furthermore, Contortisiliosides A, B and C isolated from *E. contortisiliquum* showed good cytotoxic activities against BAC1.2 F 5 mouse macrophages and EL-4 cells. These results imply that the cinnamoyl group at C-21 of the aglycone is essential for the cytotoxicities against cancer cell lines [22–24]. Our findings represent therefore a valuable contribution to the chemotaxonomy of *Acacia* genus of the Fabaceae family, known to be a rich source of triterpenoid saponins and the six isolated compounds could then show interesting biological properties especially for cytotoxicity.

4. Experimental section

4.1. General experimental procedures

Optical rotations were measured on a Jasco P-2000 polarimeter. NMR experiments were performed at 298 K in pyridine- d_5 on a Bruker AVANCE 500 spectrometer equipped with a 5-mm Z-gradient TCI cryoprobe. Chemical shifts are given in δ (ppm) value relative to TMS as internal standard. HRESIMS spectra were recorded on a micro TOF-ESI-TOF mass spectrometer (Agilent) operating in positive mode. Semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) was

Table 2

NMR spectroscopic data (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C) for the sugar moieties of compounds 1–6 (δ in ppm and J in Hz)^a.

	1		2		3		4		5		6	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
3-O-Sugars												
Ara I												
1	CH	104.6	4.79 (d, $J = 7.6$)	104.6	4.78 (d, $J = 7.8$)	104.8	4.90 (d, $J = 7.6$)					
2	CH	82.1	4.13	82.2	4.14	84.4	4.07					
3	CH	76.2	3.80	76.2	3.80	74.4	4.13					
4	CH	80.4	4.23	80.6	4.21	69.4	4.29 (d, $J = 7.0$)					
5	CH ₂	64.9	3.75 (brd, $J = 7.0$) 3.63 (brd, $J = 10.8$)	65.1	3.60 nd	64.9	4.48 (d, $J = 4.1$)					
Xyl I												
1	CH	105.9	5.25 (d, $J = 7.4$)	105.8	5.24 (d, $J = 7.4$)	106.8	5.15 (d, $J = 8.1$)					
2	CH	76.6	4.09	76.5	4.05	76.8	4.09					
3	CH	78.2	4.06	78.3	4.10	76.3	4.37					
4	CH	70.6	4.16	70.8	4.14	71.5	4.13					
5	CH ₂	67.2	3.62 (d, $J = 10.8$) nd	67.2	3.73 (brd, $J = 2.6$) nd	67.2	4.30 (d, $J = 2.3$) 4.32 (d, $J = 2.7$)					
Xyl II												
1	CH	105.4	5.05 (d, $J = 8.2$)	105.3	5.04 (d, $J = 8.4$)							
2	CH	74.9	3.97	74.9	3.98							
3	CH	76.1	4.15	76.7	4.35							
4	CH	70.7	4.16	70.7	4.15							
5	CH ₂	67.1	4.22 (brd, $J = 2.0$) 4.30 (brd, $J = 3.9$)	67.0	4.20 (brd, $J = 2.1$) 4.31 (brd, $J = 3.4$)							
Gal												
1	CH	103.6	4.85 (d, $J = 7.1$)	103.6	4.85 (d, $J = 7.1$)	103.8	4.85 (d, $J = 7.2$)					
2	CH	71.5	4.48	71.8	4.48	71.6	4.48					
3	CH	74.3	4.37	75.2	4.14	74.3	4.12					
4	CH	69.2	4.28	69.4	4.28	69.3	4.28					
5	CH	76.3	4.11	76.1	4.13	75.8	4.05					
6	CH ₂	61.7	4.49 (m) 4.50 (m)	61.7	4.48 (d, $J = 1.7$) 4.50 (d, $J = 1.8$)	62.7	4.35 (d, $J = 2.3$) 4.53 (d, $J = 2.5$)					
Glc I												
1	CH					105.0	4.91 (d, $J = 7.5$)	105.3	4.91 (d, $J = 7.5$)	104.9	4.93 (d, $J = 7.6$)	
2	CH						4.25	83.5	4.25	83.2	4.24	
3	CH					78.2	3.91	78.6	3.93	78.6	3.92	
4	CH					71.5	4.31	71.3	4.15	71.4	4.16	
5	CH					78.0	4.23	78.0	4.26	77.2	4.25	
6	CH ₂					62.8	4.35 (d, $J = 8.9$) 4.53 (d, $J = 11.4$)	62.7	4.32 (d, $J = 3.6$) 4.54 (d, $J = 11.4$)	62.7	4.47 (d, $J = 2.9$) 4.55 (d, $J = 11.3$)	
Glc II												
1	CH					106.0	5.38 (d, $J = 8.3$)	105.4	5.39 (d, $J = 7.6$)	105.7	5.38 (d, $J = 7.4$)	
2	CH					77.1	4.13	76.9	4.13	77.1	4.13	
3	CH					78.3	4.32	78.1	4.22	78.0	4.32	
4	CH					71.6	4.30	71.5	4.34	71.6	4.33	
5	CH					77.9	4.25	78.0	4.25	78.1	4.24	
6	CH ₂					62.8	4.37 (d, $J = 8.9$) 4.55 (d, $J = 11.4$)	62.7	4.48 (d, $J = 9.0$) 4.54 (d, $J = 11.4$)	62.7	4.47 (d, $J = 2.9$) 4.54 (d, $J = 11.0$)	

carried out using a LaChrom Merck Hitachi system consisting of a LaChrom L-7100 pump, an L-7455 DAD, and a D-7000 interface and employing a Phenomenex Luna 5 μm C18 (2) 100 \AA , 250 \times 10 mm² column. Medium Pressure Liquid chromatography (MPLC), system [Buchi Pump manager C-615, Buchi Pump module C605, Column Buchi, borosilikat (460 \times 25 mm and 460 \times 15 mm)] was carried out using silica gel 63 (40–63 μm). Analytical thin-layer chromatography (TLC)

was achieved on precoated silica gel plates (Merck, Kieselgel 60 F254, 0.25 mm) using UV 254 nm and a 1% vanillin/10% H₂SO₄ reagent in EtOH for visualization.

4.2. Plant material

The roots of *Acacia polyacantha* Willd. Which is the second name of

Table 3NMR spectroscopic data (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C) for the methoxycinnamoyl unit of compounds 1–6 (δ in ppm and J in Hz)^a.

	1		2		3		4		5		6	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
21-O-Cinnamoyl												
a	167.0	/	167.0	/	167.2	/	167.4	/	167.1	/	167.1	/
b	116.6	6.72 (d, $J = 4.1$)	116.6	6.79 (d, $J = 4.8$)	116.5	6.72 (d, $J = 14.5$)	116.8	6.80 (d, $J = 3.8$)	116.7	6.71 (d, $J = 3.9$)	116.3	6.72 (d, $J = 15.8$)
c	144.7	8.00 (d, $J = 4.1$)	144.9	8.01 (d, $J = 4.8$)	144.7	7.99 (d, $J = 14.5$)	145.2	8.03 (d, $J = 3.8$)	144.9	8.00 (d, $J = 3.9$)	144.4	8.00 (d, $J = 15.8$)
1'	127.6	/	127.9	/	127.3	/	128.2	/	127.4	/	127.8	/
2'	161.9	/	112.1	7.40 (d, $J = 2.0$)	130.1	7.65 (d, $J = 8.4$)	110.8	6.95 (d, $J = 8.3$)	162.0	/	130.3	7.65 (d, $J = 8.7$)
3'	113.9	6.95 (brs)	152.4	/	114.8	7.00 (d, $J = 8.4$)	152.5	/	113.8	6.98 (brd, $J = 8.6$)	114.5	7.00 (d, $J = 8.7$)
4'	114.8	6.99 (brs)	150.2	/	161.9	/	150.5	/	114.9	7.00 (m)	162.0	/
5'	130.3	7.66 (d, $J = 8.6$)	111.0	6.95 (m)	114.8	7.00 (d, $J = 8.4$)	112.1	7.40 (brd, $J = 6.5$)	130.2	7.65 (brd, $J = 8.6$)	114.5	7.00 (d, $J = 8.7$)
6'	133.0	7.98 (brs)	123.2	7.30 (d, $J = 2.0$)	130.1	7.65 (d, $J = 8.4$)	123.4	7.29 (m)	133.0	7.98 (brd, $J = 15.9$)	130.3	7.65 (d, $J = 8.7$)
7'	55.8	3.67 (s)	56.1	3.75 (s)	55.8	3.67 (s)	55.7	3.74 (s)	55.4	3.67 (s)	55.5	3.66 (s)
8'			56.2	3.80 (s)			55.7	3.80 (s)				

Senegalia polyacantha (Willd.) Seigler & Ebinger, were harvested at Touboro, at 483 km to Garoua, northern region, in Cameroon in October 2018 under the guidance of Mr. Victor Nana, botanist of the National Herbarium of Cameroon (NHC), where a voucher specimen (HNC/51435) was deposited.

4.3. Extraction and isolation

The air-dried, powdered roots of *Acacia polyacantha* (1500 g) were extracted with a mixture of Methanol and water (90%) during three days by maceration at room temperature. The resulting solution was then evaporated to dryness under reduce pressure to yield brown residue (47.47 g). This residue was dissolved in water and partitioned successively with ethyl acetate (300 mL x 3) and *n*-BuOH sat. H₂O (300 mL x 3). The *n*-BuOH soluble phase was evaporated to dryness affording 10.29 g of gum residue. 6.29 g was suspended in 100 mL of water and then submitted to column chromatography (CC) using Diaion HP-20 resin, eluting with 100% H₂O, 50% MeOH, 80% MeOH and 100% MeOH, successively giving four main fractions (APR1-APR4) after TLC monitoring. The 80%–100% MeOH fraction (APR4) was evaporated to dryness yielding a crude saponin mixture (3.62 g) that was then submitted to successive MPLC eluted with EtOAc-MeOH-H₂O (100:5:2, 100:11.6:8.5 and 100:13:10) (15 mL/min) to yield four other sub-fractions APR41 (816.7 mg), APR42 (95.5 mg), APR43 (172.4 mg) and APR44 (121.3 mg). The purifications of the first subfraction APR41 (816.7 mg) have been done using Semiprep-HPLC reverse phase eluted with an isocratic system ACN- H₂O (65–35) (3 mL/min) to yield compounds 1 ($t_{\text{R}} = 14.1$ min, 2.8 mg) and 2 ($t_{\text{R}} = 13.5$ min, 3.1 mg), while the purification of the third subfraction APR43 (172.4 mg) by HPLC reverse phase using the same isocratic system ACN- H₂O (65–35) led to the isolation of compound 3 ($t_{\text{R}} = 11.2$ min, 2.7 mg). Compound 4 ($t_{\text{R}} = 12.1$ min, 2.4 mg) was isolated after the purification of the second subfraction APR42 (95.5 mg) using HPLC reverse phase eluted with an isocratic system MeOH- H₂O (70–30) (3 mL/min) while compounds 5 ($t_{\text{R}} = 10.4$ min, 2.4 mg) and 6 ($t_{\text{R}} = 10.2$ min, 2.2 mg) was isolated in the same previous isocratic system (70–30) (3 mL/min) in HPLC reverse phase after the purification of subfraction APR44 (121.3 mg).

4.3.1. Polyacoside A (1)

White amorphous powder, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +16.4$ (c 0.01, MeOH), ^1H NMR (C₅D₅N, 500 MHz) and ^{13}C NMR (C₅D₅N, 125 MHz) data, see Tables 1–3; HRESIMS m/z : 1191.5903 [M + H]⁺ (calcd for C₆₁H₉₁O₂₃ 1191.5951).

4.3.2. Polyacoside B (2)

White amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +17.5$ (c 0.01, MeOH); ^1H NMR (C₅D₅N, 500 MHz) and ^{13}C NMR (C₅D₅N, 125 MHz) data, see Tables 1–3; HRESIMS m/z : 1221.6007 [M + H]⁺ (calcd for C₆₂H₉₃O₂₄ 1221.6056).

4.3.3. Polyacoside C (3)

White amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -21.2$ (c 0.01, MeOH); ^1H NMR (C₅D₅N, 500 MHz) and ^{13}C NMR (C₅D₅N, 125 MHz) data, see Tables 1–3; HRESIMS m/z : 1059.5458 [M + H]⁺ (calcd for C₅₆H₈₃O₁₉ 1059.5528).

4.3.4. Polyacoside D (4)

White amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -21.2$ (c 0.01, MeOH); ^1H NMR (C₅D₅N, 500 MHz) and ^{13}C NMR (C₅D₅N, 125 MHz) data, see Tables 1–3; HRESIMS m/z : 987.5249 [M + H]⁺ (calcd for C₅₃H₇₉O₁₇ 987.5317).

4.3.5. Polyacoside E (5)

White amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -21.2$ (c 0.01, MeOH); ^1H NMR (C₅D₅N, 500 MHz) and ^{13}C NMR (C₅D₅N, 125 MHz) data, see Tables 1–3; HRESIMS m/z : 957.5208 [M + H]⁺ (calcd for C₅₂H₇₇O₁₆ 957.5211).

4.3.6. Polyacoside F (6)

White amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -21.2$ (c 0.01, MeOH); ^1H NMR (C₅D₅N, 500 MHz) and ^{13}C NMR (C₅D₅N, 125 MHz) data, see Tables 1–3; HRESIMS m/z : 957.5052 [M + H]⁺ (calcd for C₅₂H₇₇O₁₆ 957.5211).

4.4. Acid hydrolysis of isolated compounds

Each compound (1 mg) was refluxed in 1 N aqueous CF₃COOH (1.5 mL) for 2 h at 100 °C. The reaction mixture was diluted with H₂O (10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). The combined CH₂Cl₂ extracts were washed with water to give after evaporation the aglycon moiety. After extraction, the aqueous layer was repeatedly evaporated to dryness with MeOH until it reached a neutral pH. The sugars were first analyzed by TLC over silica gel (CHCl₃-MeOH-H₂O, 8:5:1) by comparison with standard samples. The following sugars were detected: glucose, arabinose, xylose and galactose. Furthermore, the absolute configuration of the sugar moiety was determined as previously described by Messi [25]. Briefly, the residue of sugars was dissolved in 120 μL of a solution of L-cysteine methyl ester in pyridine (0.3 M) and incubated for 1 h at 90 °C. Then 160 μL of a solution of phenyl isothiocyanate in pyridine (0.69 M) was added, and incubated for 1 h at 90 °C. The reaction mixture was allowed to cool and diluted 20-fold with CH₃CN and filtered before UHPLC/MS analysis. Each sugar standard (2 mg of L-glucose, D-glucose, L-xylose, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose,

L-galactose and D-galactose) was subjected to the same protocol, with 240 µL of the L-cysteine methyl ester solution and 320 µL of the phenyl isothiocyanate solution. The reaction mixtures were diluted 60-fold with CH₃CN and filtered before UHPLC/MS analysis. The observed retention times were 12.56, 13.92 and 12.76 min for the samples obtained from 1–3 and 11.63 for the sample obtained from 4–6, respectively. These retention times were similar with those observed for D-galactose (12.58), D-glucose (11.67), D-xylose (13.93 min) and L-arabinose (12.75 min).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

The authors thank The World Academy of Sciences (TWAS) for the financial support funded through the Postgraduate Fellowship No 3240311208 granted to Atangana Jean Faustin and the International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS), University of Karachi, Karachi, Pakistan for the technical and bench facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108725>.

References

- [1] III. Apg, *Bot. J. Linn. Soc.* 161 (2009) 105–121.
- [2] IV. Apg, *Bot. J. Linn. Soc.* 181 (2016) 1–20.
- [3] K. Tom, [PhD Thesis], Graduate School, Bogor agricultural University, 2009, pp. 1–59.
- [4] Y.A. Koudoro, D.C.P. Agbangnan, B. Yèhouénoù, F.P. Tchobo, G.A. Alitonou, F. Avlessi, A. Akoègninou, K.C.D. Sohounhoulou, *J. Pharmacogn. Phytochem.* 3 (2015) 91–96.
- [5] G.W. Fotso, J. Na-Iya, A.T. Mbaveng, P.Y. Anjo, I. Demirtas, V. Kuete, S. Yeboah, B. Ngameni, T. Efferth, B.T. Ngadjui, *Nat. Prod. Res.* 32 (2018) 571–576.
- [6] S. Youngwan, H. Jeannine, M. Abdel-Kader, S. Malone, I. Derveld, A. Hermus, M.C. M. Werkhoven, J.H. Wisse, S.W. Mamber, J.M. Dalton, D.G.I. Kingston, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 170–174.
- [7] G.S. Jayatilake, D.R. Freeberg, Z. Liu, S.L. Richeimer, M.E.N. Blake, D.T. Bailey, V. Haridas, J.U. Gutterman, *J. Nat. Prod.* 66 (2003) 779–783.
- [8] A. Tchoukoua, T.K. Tabopda, S. Uesugi, M. Ohno, K. Ken-Ichi, E. Kwon, H. Momma, I. Horo, O. AlankusÇ. Kan, Y. Shiono, B.T. Ngadjui, *Phytochemistry (Oxf.)* (2017) 1–8.
- [9] A. Tchoukoua, T.K. Tabopda, I.K. Simo, S. Uesugi, M. Ohno, K. Ken-Ichi, E. Kwon, H. Momma, Y. Shiono, B.T. Ngadjui, *Nat. Prod. Res.* 32 (2018) 924–932.
- [10] A. Tchoukoua, T.K. Tabopda, N. Usukhbayar, K. Ken-Ichi, E. Kwon, H. Momma, T. Koseki, Y. Shiono, B.T. Ngadjui, *Phytochem. Lett.* 23 (2018) 21–25.
- [11] A. Tchoukoua, S.C.T. Nganou, B.A. Dabole, J. Yoshida, Y.D. Ito, B.T. Ngadjui, Y. Shiono, *Phytochem. Lett.* 43 (2021) 190–195.
- [12] A. Tchoukoua, M.H. Douanla, N.R. Ariefta, J. Yoshida, Y.D. Ito, B.T. Ngadjui, Y. Shiono, *Fitoterapia* 151 (2021), 104859.
- [13] F.T. Mambe, J. Na-Iya, G.W. Fotso, F. Ashu, B. Ngameni, B.T. Ngadjui, V.P. Beng, V. Kuete, *Hindawi* (2019) 1–13.
- [14] F.A. Ashu, J. Na-Iya, B.E.N. Wamba, J. Kamga, P. Nayim, B. Ngameni, V.P. Beng, B. T. Ngadjui, V. Kuete, *Hindawi* (2020) 1–13.
- [15] L.M. Messi, O.P. Noté, J.N. Mbing, P. Lavedan, M. Vedrenne, N. Ouedraogo, M. Carraz, S. Bourgeade-Delmas, D.E. Pegnyemb, M. Haddad, *Fitoterapia* 146 (2020), 104669.
- [16] O.P. Noté, L.M. Messi, J.N. Mbing, S.A. Azouaou, M. Sarr, D. Guillaume, C. D. Muller, D.E. Pegnyemb, A. Lobstein, *Phytochem. Lett.* 22 (2017) 95–101.
- [17] O.P. Noté, L.M. Simo, J.N. Mbing, D. Guillaume, C.D. Muller, D.E. Pegnyemb, A. Lobstein, *Nat. Prod. Res.* 32 (2018) 972–996.
- [18] L.M. Simo, O.P. Noté, J.N. Mbing, S.A. Aouazou, D. Guillaume, C.D. Muller, D. E. Pegnyemb, A. Lobstein, *Chem. Biodivers.* 14 (2017), e1700260.
- [19] M.C.C. Delgado, M.S. Da Silva, R.B. Fo, *Phytochemistry (Oxf.)* 23 (1984) 2288–2292.
- [20] M. Haddad, T. Miyamoto, C. Delaude, M.A. Lacaille-Dubois, *Helv. Chim. Acta* 86 (2003) 1070–1075.
- [21] T. Kuribayashi, N. Ohkawa, S. Satoh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 3307–3314.
- [22] Y. Mimaki, H. Harada, C. Sakuma, M. Haraguchi, S. Yui, T. Kudo, M. Yamazaki, Y. Sashida, *Helv. Chim. Acta* 87 (2004) 851–865.
- [23] M. Bitchi, A. Magid, C. Sakuma, P. Yao-Kouassi, F. Kabran, D. Harakat, A. Martinez, H. Morjani, F. Tonzibo, L. Voutquenne-Nazabadioko, *Fitoterapia* 137 (2019), 104264.
- [24] Y. Mimaki, H. Harada, C. Sakuma, M. Haraguchi, S. Yui, T. Kudo, M. Yamazaki, Y. Sashida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 623–627.
- [25] L.M. Messi, O.P. Note, J.N. Mbing, M. Vansteelandt, P. Lavedan, M. Vedrenne, D. E. Pegnyemb, M. Haddad, *Carbohydr. Res.* 495 (2020) 1080.