

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

ANALYSE DES SAPONINES TRITERPÉNIQUES ET DES
COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES
FEUILLES D'*ARALIA NUDICAULIS L.*

PAR
JULIE PIERRA
B. SC. CHIMIE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

© JULIE PIERRA, 2020

« *IL N'EST GUERE DE PASSION SANS LUTTE.* »

- Albert CAMUS

RESUME

Depuis quelques années, les produits d'origine naturelle sont de plus en plus demandés dans le domaine de la cosmétologie et de la pharmacologie. Les chercheurs travaillent alors à valoriser la biomasse végétale en étudiant des plantes pouvant posséder différents effets thérapeutiques. La plupart d'entre elles sont déjà connues de la médecine traditionnelle, qui répertorie un bon nombre de plantes possédant des activités biologiques diverses. C'est le cas du genre *Aralia*, qui appartient à la famille des *Araliaceae*. Parmi les différentes espèces d'*Aralia*, trois seulement sont présentes au Québec : l'*Aralia racemosa*, l'*Aralia nudicaulis* et l'*Aralia hispida*. Malgré l'analogie entre l'*Aralia* et le *Panax ginseng*, ainsi qu'une connaissance des amérindiens et d'ethnies d'Asie de l'est pour l'utilisation de ce genre en médecine ancestrale, ces espèces sont peu connues au niveau de leur compositions chimiques et de leurs propriétés pharmacologiques. Le genre *Aralia* offre ainsi de bonnes opportunités pour l'identification de produits naturels bioactifs.

Dans ce contexte, le laboratoire LASEVE a entrepris l'étude de deux espèces d'*Aralia* présentes au Québec : l'*Aralia nudicaulis* et l'*Aralia hispida*. Après cette étude préliminaire, le présent projet a été orienté sur les feuilles d'*Aralia nudicaulis* qui se sont révélées être plus riches en saponines triterpéniques. Ces molécules sont en grande partie responsables de l'activité adaptogène du *Panax ginseng*, ainsi que d'autres activités connues chez plusieurs plantes. En plus des analyses effectuées sur différentes saponines, ce projet s'est également penché sur certaines fractions riches en polyphénols. Les travaux de fractionnement ont permis d'isoler et d'identifier dix saponines triterpéniques : sept connues (les araliasaponin I, III, IX et XII, l'hemsgiganoside B, la guaiacin B et la prosapogenin) et trois nouvelles, ainsi que six composés phénoliques. L'évaluation de différentes activités biologiques (antioxydante, anti-inflammatoire, cytotoxique et antifongique) a permis de démontrer une forte activité antioxydante des fractions phénoliques, ainsi que des activités modérées en test anti-inflammatoire et antioxydant respectivement pour les trois nouvelles molécules nudicauloside A-B et nudicauloside C.

REMERCIEMENTS

Je souhaite avant tout remercier mon directeur et mon co-directeur, les professeurs André Pichette et Jean Legault. En me permettant d'intégrer leur programme de maîtrise en ressources renouvelables, j'ai pu m'épanouir dans mon travail à travers un sujet d'étude passionnant, et ce durant toute ma période d'étude au Québec. J'ai également pu développer mon autonomie face aux diverses problématiques qu'ont soulevé ce projet, qualité essentielle à mon futur projet professionnel.

Je n'aurais pas pu atteindre mes objectifs sans l'appui de mon tuteur, le professeur Vakhtang Mshvildadze. Son écoute, sa pédagogie et ses connaissances en matière de criblage phytochimique et de techniques de séparation ont très largement contribué à l'aboutissement de ce projet. Je tiens également à remercier François Simard, Balla Sylla et Serge Lavoie pour leurs précieux conseils, leur soutien et leur aide dans l'analyse de mes produits par RMN. Un grand merci à Karl Lalancette, Catherine Dussault et Audrey Belanger pour leur travail sur les tests biologiques, ainsi que pour le temps qu'ils m'ont accordé afin d'affiner mes connaissances dans leur domaine.

Je remercie chaleureusement mes amies et collègues, Eloïse Derot, Diamondra Raminoson, Laurence Forget-Lacoursière et Clarinthe de Langie. Merci pour votre écoute les filles, votre soutien et vos conseils qui m'ont aidé bien au-delà du cadre professionnel. Un grand merci à Paul Gormand, Clément Viretto, Lorry Jean et mes autres collègues du laboratoire qui m'ont soutenu quotidiennement par leur présence. Un merci à Manon Castelbou, qui a été une stagiaire exemplaire.

Je souhaite ajouter un remerciement particulier à l'attention de Vincent Arnaud. Merci d'avoir été une oreille attentive et d'avoir partagé ton expérience d'expatrié avec moi. Merci pour tes coups de gueule de sudiste bourru qui ont contribué à me garder dans le droit chemin quand j'en ai eu le plus besoin.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis, qui m'ont soutenu durant ces deux années de travail malgré la distance et le décalage horaire. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi tout au long de mon parcours.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	I
Remerciements.....	II
Table des matières	III
Abréviations.....	VI
Liste des figures	IX
Liste des tableaux.....	XI
Chapitre I Introduction.....	1
Problématique	2
Objectif général	4
Objectifs spécifiques.....	4
Structure du mémoire	5
Chapitre II Revue de littérature	6
A. <i>Aralia nudicaulis</i> L.	7
1. Les Araliaceae	7
2. Le genre <i>Aralia</i>	11
3. L' <i>Aralia nudicaulis</i>	13
B. Molécules d'intérêt : les saponines triterpéniques	16
Chapitre III Article scientifique.....	23
Chapitre IV Partie expérimentale	41
A. Matériel végétal	42
B. Extractions	43
1. Extraction par solvant à reflux	43
2. Partition des composés par extraction liquide-liquide	43
C. Méthodes d'analyses chromatographiques	45
1. Chromatographie sur couche mince CCM.....	45
2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse HPLC-MS	45

D.	Méthodes chromatographiques préparatives.....	47
1.	Chromatographie liquide sur résine (DIAION HP-20).....	47
2.	Chromatographie liquide à basse pression sur gel de silice et sur silice greffée C18.....	47
3.	Chromatographie liquide préparative RP-HPLC-DAD/UV	48
E.	Méthodes physico-chimiques	49
1.	Spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI-MS	49
2.	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN	49
3.	Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme GC-FID	49
4.	Spectroscopie Infrarouge	50
5.	Pouvoir rotatoire.....	51
6.	Hydrolyse acide et acétylation de monosaccharides greffés aux saponines triterpéniques	51
F.	Méthodes biologiques	52
1.	Évaluation de l'activité cytotoxique.....	52
2.	Évaluation de l'activité antioxydante.....	53
3.	Évaluation de l'activité anti-inflammatoire	54
4.	Évaluation de l'activité antifongique	55
Chapitre V	Résultats	56
A.	Rendements et activités des extraits d' <i>Aralia</i>	57
B.	Fractionnement de l'extrait MEOH des feuilles d' <i>Aralia nudicaulis</i>	60
1.	Extrait AcOEt de l'extraction liquide-liquide des feuilles d' <i>Aralia nudicaulis</i>	60
2.	Extrait butanol de l'extraction liquide-liquide des feuilles d' <i>Aralia nudicaulis</i>	62
C.	Isolation des saponines triterpéniques par HPLC Préparative.....	66
1.	Fraction JP01036B.....	66
2.	Fraction JP01036C	69
3.	Fraction JP01036D.....	71
4.	Fraction JP01036E	73
D.	Caractérisation des molécules isolées	76
1.	Caractérisation des aglycones par RMN	76
2.	Informations supplémentaires sur la caractérisation de la portion sucre des saponines par RMN	77
E.	Identification des polyphénols.....	83

F. Résultats de l'activité biologique des composés.....	86
1. Propriétés anti-inflammatoires	86
2. Propriétés antioxydantes	87
3. Propriétés cytotoxiques	87
4. Propriétés antifongiques.....	88
Chapitre VI Conclusion	89
Références.....	92
Annexes I Organigrammes	100
Annexes II Chromatogrammes & Spectres de masse.....	108
Annexes III Spectres RMN.....	122
Annexes IV Spectres HR-ESI-MS.....	140
Annexes V Tests biologiques des extraits bruts	147
Annexes VI Article's supporting information	152

ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

1D : 1 dimension

2D : 2 dimensions

A549 : cellules du carcinome pulmonaire humain (cancer du poumon)

AAPH : 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride

AcOEt : acétate d'éthyle

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APG : Angiosperms Phylogeny Group

APT : « attached proton test »

Ara : Arabinose

B & H : Bosnia and Herzegovina

C : carbone

CCM : chromatographie sur couche mince

CHCl₃ : chloroforme

CMI : concentration minimale inhibitrice

CO₂ : dioxyde de carbone

CoA : Coenzyme A

COSY : « correlated spectroscopy »

DAD : détecteurs à barrettes de diodes (diode array detector)

DCFH-DA : 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate

DCM : dichlorométhane

DEPT : « distortionless enhancement by polarization transfer »

DLD-1 : cellules de l'adénocarcinome colorectal humain (cancer du côlon)

DMPP : dimethylallyl pyrophosphate

DMSO : diméthylsulfoxyde

FID : détecteur à ionisation de flamme (flame ionization detector)

FPP : farnesyl pyrophosphate

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transform InfraRed spectroscopy)

g : gramme
GC : chromatographie en phase gazeuse
Glc : glucose
GlcU : acide glucuronique
GPP : geranyl pyrophosphate
H : heure
H : hydrogène
H₂O : eau
H₂SO₄ : acide sulfurique
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HCl : acide chlorhydrique
HCOOH : acide formique
HMBC : « heteronuclear multiple bond correlation »
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance (high pressure liquid chromatography)
HR-ESI-MS : High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry
HSQC : « heteronuclear single quantum coherence »
Hz : hertz
IC₅₀ : concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire
IPP : isopentenyl pyrophosphate
IR : infrarouge
J : constante de couplage
L : litre
LASEVE : Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales
L-NAME : N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester
LPS : lipopolysaccharide
M : masse
MeCN : acétonitrile
MeOH : méthanol
MS : spectromètre de masse (mass spectrometry)
NA : non applicable
Na : sodium
NaHCO₃ : bicarbonate de sodium
NaNO₂ : nitrite de sodium
NO : oxyde nitrique

NOESY : « nuclear overhauser effect spectroscopy »

NP : 2-aminoethyl diphenylborinate

ORAC : « *Oxygen Radical Absorbance Capacity* »

PA : pression atmosphérique

PBS : solution tampon de phosphate salin

Peg : polyéthylèneglycol

ppm : parties par million

Prep. : préparative

r : rendement

Rha : Rhamnose

RMN : résonance magnétique nucléaire

RP : Reverse phase

SDS : sodium dodecyl sulfate

TA : température ambiante

t-BuOOH : *tert*-butylhydroperoxide

TE : Trolox équivalent

TLC : Thin layer chromatography (CCM)

TMS : tétraméthylsilane

TOCSY

TOF : « *Time of Flight* »

Tr : temps de rétention (rt)

URSS : Union des républiques socialistes soviétiques

UV : ultraviolet

v/v : rapport volumique

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

WS-1 : fibroblaste cutané humain

δ : déplacement chimique

λ : longueur d'onde

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte de la répartition géographique des Araliaceae	8
Figure 2. Exemples de ginsenosides majoritaires contenus dans l'extrait de <i>Panax ginseng</i>	10
Figure 3. Carte de la répartition géographique du genre <i>Aralia</i> L.....	11
Figure 4. Elatoside C : saponine triterpénique d' <i>Aralia elata</i> responsable des activités antiarythmique et cardioprotective	12
Figure 5. L' <i>Aralia nudicaulis</i> L.....	14
Figure 6. Structure des 2 molécules responsables de l'activité anti-mycobactériale de l' <i>Aralia nudicaulis</i> : le (3R)-falcarinol (1) et (3R,9R,10S)-panaxydol (2).....	15
Figure 7. Saponine triterpénique de type oleanane (acide oléanolique) (A) et saponine stéroïdique de type cholane (acide cholique) (B) où R, R ₁ et R ₂ sont des hydrogènes ou des saccharides	17
Figure 8. Schéma de biosynthèse des saponines dans le <i>Panax ginseng</i>	19
Figure 9. Spectre d'absorption UV d'une saponine triterpénique	20
Figure 10. Spectrométrie de masse de l'acide oléanolique en ionisation négative : fragment majoritaire	21
Figure 11. Spectrométrie de masse de l'acide oléanolique en ionisation négative : fragments secondaires	22
Figure 12. Structures des différents fragments hypothétiques de l'acide oléanolique après ionisation négative en Spectrométrie de masse.....	22
Figure 13. Organigrammes des extractions réalisées sur les feuilles et les racines de l' <i>A. nudicaulis</i> et l' <i>A. hispida</i>	44
Figure 14. CCM des extraits d' <i>A. nudicaulis</i> révélés au H ₂ SO ₄ dans le domaine du visible (légende tableau 8)	58
Figure 15. CCM des extraits d' <i>A. nudicaulis</i> révélés au H ₂ SO ₄ à 365 nm (légende tableau 8)	59
Figure 16. CCM du fractionnement de la fraction JP01025A (extrait AcOEt des feuilles d' <i>A. nudicaulis</i> extraites au méthanol) révélées au H ₂ SO ₄ (gauche) et au NPPeg (droite) à 365 nm (légende en annexe I - 1).....	60
Figure 17. CCM des fractions JP01031A, JP01031B et JP01031C révélées au H ₂ SO ₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite)	61

Figure 18. CCM du fractionnement de la fraction JP01031C révélée au H ₂ SO ₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite).....	61
Figure 19. CCM du fractionnement de la fraction JP01025B (extrait butanol des feuilles d' <i>A. nudicaulis</i> extraites au méthanol) révélée au H ₂ SO ₄ dans le visible (haut) et à 365 nm (bas) (légende en Annexe 2).....	62
Figure 20. Comparaison par CCM des fractions JP01032B et JP01034D (H ₂ SO ₄ à 365 nm).....	63
Figure 21. CCM du fractionnement de la fraction JP01034D révélée au H ₂ SO ₄ dans le visible (haut) et à 365 nm (bas)	64
Figure 22. Chromatogramme de la fraction JP01087F sur HPLC Préparative	67
Figure 23. Masses (m/z) des fragments correspondant au produit JP01087F-A en ionisation négative	68
Figure 24. CCM du fractionnement de la fraction JP01036C révélée au H ₂ SO ₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite).....	69
Figure 25. Chromatogrammes comparatifs des fractions JP01057H et JP01057I injectés dans les mêmes conditions	72
Figure 26. Chromatogramme du fractionnement par HPLC Préparative de la fraction JP01036E	74
Figure 27. Chromatogramme de la fraction JP01031B et des 6 polyphénols identifiés	83
Figure 28. Chromatogrammes des fractions JP01031A (gauche) et JP01034B (droite) superposés à l'acide chlorogénique (rouge).....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Différentes classifications de la famille des <i>Araliaceae</i>	7
Tableau 2. Principaux genres compris dans la famille des <i>Araliaceae</i> (Naturalis Biodiversity Center 2018).....	7
Tableau 3. Étude du genre <i>Aralia</i> : différentes applications et origines des espèces.....	13
Tableau 4. Paramètres du spectromètre de masse	46
Tableau 5. Paramètres et conditions d'utilisation du GC-FID.....	50
Tableau 6. Rendements des extractions à chaud des différentes parties de l' <i>A. nudicaulis</i> et de l' <i>A. hispida</i>	57
Tableau 7. Résultats des tests anti-inflammatoire et antioxydant sur les extraits des différentes parties de l' <i>A. nudicaulis</i> et de l' <i>A. hispida</i>	57
Tableau 8. Rendements des extractions liquide-liquide sur l'extrait MeOH de l' <i>A. nudicaulis</i>	58
Tableau 9. Conditions d'élution sur HPLC Préparative des échantillons issus de la fraction JP01036B	66
Tableau 10. Conditions d'élution sur HPLC préparative des échantillons JP01057B et JP01057D issus de la fraction JP01036D.....	71
Tableau 11. Masses des 13 saponines triterpéniques isolées à partir de l'extrait méthanolique des feuilles d' <i>Aralia nudicaulis</i>	75
Tableau 12. Caractéristiques des sept saponines triterpéniques connues isolées (4-10).....	78
Tableau 13. Données RMN ¹ H ¹³ C des sept saponines triterpéniques connues isolées (4-10)	80
Tableau 14. Caractéristiques des 6 polyphénols présents dans la fraction JP01031B	84
Tableau 15. Test antioxydant cellulaire sur les fractions enrichies en polyphénols.....	85
Tableau 16. Activité anti-inflammatoire des molécules isolées.....	86
Tableau 17. Activité antioxydante de la molécule (3) : nudicauloside C.....	87
Tableau 18. Activité anticytotoxique des molécules isolées	87
Tableau 19. Activité antifongique des molécules isolées.....	88

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Problématique

Depuis des temps ancestraux, l'Homme s'inspire de ce qui l'entoure pour tenter de soigner ses maux. La faune et la flore ont toujours été considérées comme étant les principales sources de remèdes. Au fil des années, l'Homme a pu accumuler et répertorier ses découvertes, donnant naissance aux pharmacopées. Ces ouvrages traditionnels ont servi de pilier pour le développement des médicaments d'aujourd'hui (produits naturels et produits de synthèse). Cependant, depuis quelques années les scientifiques ont observé une tendance au retour de l'usage des produits naturels. L'industrie pharmaceutique a en conséquence orienté ses recherches en se basant sur l'usage ancestral de la médecine traditionnelle. Ce phénomène basé sur l'extraction de principes actifs contenus dans les plantes médicinales a été surnommé par les ethnopharmacologues la « vague verte » (Chominot 2000). Cet intérêt pour les ingrédients botaniques s'est même élargi au domaine de la cosmétique, où la demande des consommateurs se tourne de plus en plus vers les produits d'origine biologique et naturels (Carvalho *et al.* 2016). Selon l'organisme Organic Monitor, qui suit l'évolution des produits naturels sur le marché planétaire, la part des ventes qu'ils occupent est en constante augmentation (Euromarketing-udes.com 2018). Dans un contexte plus ciblé, les canadiens sont de grands consommateurs des produits naturels puisqu'en 2012, plus de huit personnes sur dix en avaient déjà consommé, et 38% des canadiens affirmaient utiliser au moins un produit naturel tous les jours (Ministère de l'Économie de l'Innovation et des Exportations du Québec 2014).

Parmi les nombreuses espèces décrites dans les pharmacopées, l'une des plus étudiée est le *Panax ginseng*, appartenant à la famille des *Araliaceae*. Cette plante endémique d'Asie possède de très nombreuses propriétés auxquelles elle doit sa renommée (section II.A.1). Son potentiel adaptogène, peu commun aux plantes en général, a cependant été détecté chez d'autres espèces de la famille des *Araliaceae* (Ahumada *et al.* 1991; Panossian et Wikman 2010). Au Québec, on dénombre seulement trois espèces appartenant au genre *Aralia* : l'*A. racemosa*, l'*A. nudicaulis* et l'*A. hispida*

(Brouillet *et al.* 2010). Ces deux dernières espèces ont la particularité d'être décrites par de nombreux ouvrages, détaillant leurs usages thérapeutiques traditionnels à travers la culture amérindienne. Étonnamment, la littérature scientifique actuelle fait peu état de ces plantes, de leur composition et de leurs activités biologiques. L'*Aralia nudicaulis* et l'*Aralia hispida* offrent ainsi l'opportunité de découvrir de nouveaux actifs naturels, au potentiel analogue au *ginseng*.

Depuis plusieurs années, les scientifiques s'intéressent aux liens de cause à effet qui pourraient mettre en relation la composition phytochimique d'une plante et ses vertus vantées par la médecine traditionnelle. Ces études impliquent des étapes de purification d'extraits, de caractérisation des molécules isolées, ainsi que de tests afin de déterminer les propriétés biologiques de ces dernières. C'est en grande partie basé sur cette approche que le laboratoire LASEVE (Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales) a décidé d'orienter plusieurs de ses projets.

Tout comme d'autres projets inhérents au laboratoire (Mskhiladze *et al.* 2008), l'étude de la composition de l'*A. nudicaulis* s'est concentrée sur une famille de molécules responsable d'un grand nombre d'activités biologiques et connue dans la famille des *Araliaceae* : les saponines. Ces molécules, également responsables des activités biologiques du *ginseng*, représentent un véritable défi d'isolation du fait de leurs structures fortement similaires entre elles. En contrepartie, la diversité des sucres greffés et des parties aglycones offre la possibilité d'isoler et de caractériser de nouvelles structures et donc de potentiellement découvrir de nouvelles molécules (Oleszek et Bialy 2006). De plus, les fractions enrichies en saponines sont susceptibles de contenir des polyphénols, molécules bien connues pour leurs activités antioxydantes (Scalbert *et al.* 2005; Pandey et Rizvi 2009). Quelques composés phénoliques détectés lors des travaux d'isolation des saponines ont été identifiés dans le cadre de ce travail. La majeure partie des travaux de ce projet de maîtrise concerne l'isolation et la caractérisation des saponines triterpéniques contenues dans les extraits d'*Aralia nudicaulis*. Afin de limiter le sujet, les recherches présentées dans ce mémoire se focalisent sur les feuilles de la plante.

En effet, les feuilles contiennent des quantités plus importantes de saponines en comparaison aux autres parties de l'*A. nudicaulis* et de l'*A. hispida* (section V.A).

Objectif général

L'objectif principal de ce travail de recherche vise à caractériser le contenu en saponines triterpéniques et composés phénoliques des feuilles d'*Aralia nudicaulis* pour des applications pharmaceutique et cosmétique.

Objectifs spécifiques

- Réaliser une étude phytochimique des feuilles d'*Aralia nudicaulis* ;
- Isoler et caractériser les saponines triterpéniques potentiellement responsables des activités biologiques de l'*Aralia nudicaulis* ;
- Caractériser et identifier les polyphénols présents dans les feuilles d'*Aralia nudicaulis* ;
- Évaluer les activités biologiques antioxydante, anti-inflammatoire, cytotoxique, et antifongique des molécules isolées.

Structure du mémoire

Le chapitre suivant présente une revue de littérature détaillée sur la famille des *Araliaceae*, du genre et de l'espèce de l'*Aralia nudicaulis*, ainsi qu'une partie sur les saponines dans le but d'établir une base de connaissance du sujet. Le troisième chapitre est consacré à un article scientifique présentant les dix molécules isolées dans ce projet, dont trois d'entre elles sont caractérisées pour la première fois. Les chapitres quatre et cinq traitent respectivement des méthodes et résultats obtenus à travers les différents travaux d'extraction, d'isolation et de caractérisation de la plante. La conclusion des recherches menées ainsi que les perspectives envisagées pour la poursuite du projet sont présentées dans le sixième chapitre. Enfin, les annexes regroupent l'ensemble des organigrammes, analyses de caractérisation et résultats des tests biologiques sur les extraits bruts.

CHAPITRE II

REVUE DE LITTERATURE

A. *ARALIA NUDICAULIS L.*

1. Les *Araliaceae*

La famille des *Araliaceae* (Jussieu 1789) appartient à la classe des Magnoliopsida et à l'ordre des Apiales (Singh 2010; Naturalis Biodiversity Center 2018) (Tableau 1). On compte dans cette famille de plante pas moins de 54 genres, parmi lesquels on dénombre 1325 espèces différentes. Les genre les plus importants sont énumérés ci-dessous (Singh 2010; Naturalis Biodiversity Center 2018) (Tableau 2).

Tableau 1. Différentes classifications de la famille des *Araliaceae*

	B & H	Cronquist	Takhtajan	Dahlgren	Thorne	APG II / (Apweb)
Division		Magnoliophyta	Magnoliophyta			
Classe	Dicotyledons	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida	
Sous-classe	Polypetalae	Rosidae	Cornidae	Magnoliidae	Asteridae	
Series+/Super-ordre	Calyciflorae+		Aralianae	Aralianae	Aralianae	Euasterids II
Ordre	Umbellales	Apiales	Aralialales	Araliales	Araliales	Apiales

Tableau 2. Principaux genres compris dans la famille des *Araliaceae* (Naturalis Biodiversity Center 2018)

Genre	Nombre d'espèces
<i>Schefflera</i>	650
<i>Polyscias</i>	150
<i>Hydrocotyle</i>	130
<i>Oreopanax</i>	85
<i>Dendropanax</i>	70
<i>Aralia</i>	74
<i>Osmoxylon</i>	50
<i>Trachymene</i>	45
<i>Eleutherococcus</i>	38
<i>Hedera</i>	15

Les *Araliaceae* ont longtemps été réunies avec la famille des *Apiaceae* de par leurs nombreux caractères morphologiques (Judd *et al.* 1994) et anatomiques (Judd *et al.* 1994) communs (Wen *et al.* 2001; Botineau 2010).

Au niveau de leur répartition géographique, les *Araliaceae* se retrouvent sur l'ensemble du globe (Wen *et al.* 2001), avec une plus forte présence dans les régions tropicales et subtropicales (Singh 2010). Un travail effectué par le site mobot.org, étudiant la phylogénie des angiospermes, permet de visualiser la répartition de la famille des *Araliaceae* sur la carte du monde présentée à la figure 1 (Meusel *et al.* 1978; Hultén et Fries 1986; FloraBase 2006).

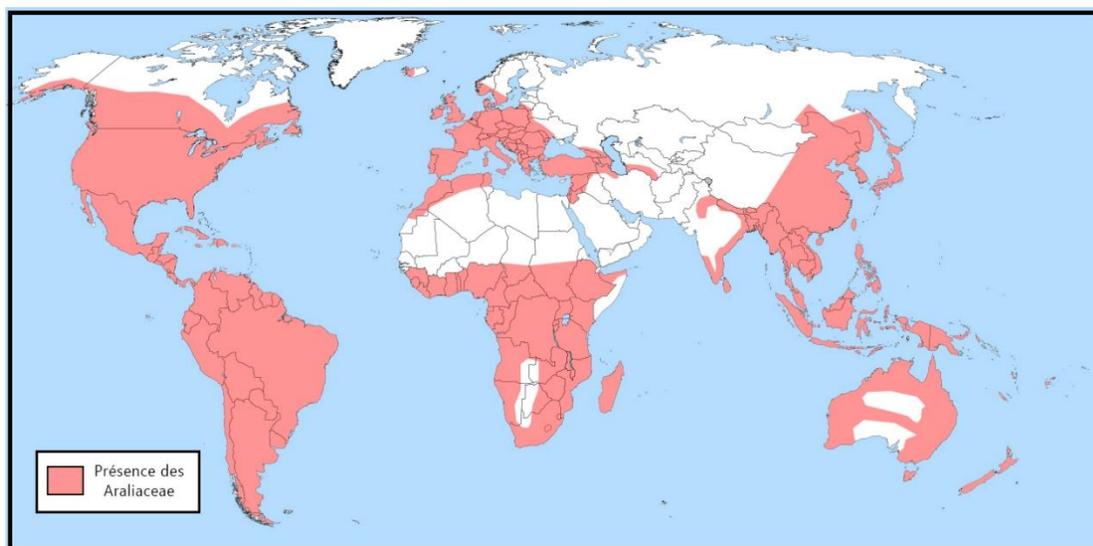


Figure 1. Carte de la répartition géographique des Araliaceae

La famille des *Araliaceae* est notamment connue pour ses utilisations en ornementation extérieure (Singh 2010). En effet, la majorité des plantes qui la compose sont des arbres, arbustes, plantes ligneuses et herbacées (Wen *et al.* 2001). En France, l'*Hedera helix*, plus connue sous le nom commun de lierre, est la plus répandue des espèces d'*Araliaceae*. Cette plante ligneuse grimpante est par exemple souvent retrouvée sur les façades des habitations. Sur un plan phytochimique, son bois et ses feuilles contiennent des saponosides, autrefois utilisés pour leurs propriétés antitussives. Ses

fruits sont en revanche toxiques après ingestion chez l'enfant et certaines espèces d'animaux (Botineau 2010).

L'*Hedera helix* n'est pas la seule espèce possédant des propriétés connues. Un grand nombre de plantes de la famille des *Araliaceae* ont été étudiées et certaines sont connues pour leurs usages médicaux. La plus connue d'entre elles est le *Panax ginseng*. Son nom dérive du grec « pan » et « axos », qui signifient respectivement « tout » et « traiter » (Leung et Wong 2010; Chen *et al.* 2015). Déjà décrite dans plus de 7000 articles sur la plateforme PUBMED (Chen *et al.* 2015), cette espèce est largement connue des usages traditionnels de la médecine chinoise et coréenne. En Amérique, on trouve son équivalent, le *Panax quinquefolia*, considéré comme substitut au vrai *ginseng* (Singh 2010). Depuis plus de 500 ans, le *Panax ginseng* est consommé dans le but d'améliorer la concentration et les processus de guérison, de réduire le stress, mais également sur le long terme pour améliorer l'état de santé général des personnes âgées (Nocerino *et al.* 2000; Singh 2010). Des études plus récentes répertorient les nombreux effets thérapeutiques du *P. ginseng*, comme sa capacité à améliorer les fonctions hépatiques, immunitaires et cérébrales. Elle possède en effet des activités analgésique, anticancéreuse, anti-inflammatoire, immunostimulante, hypoglycémique, antifatigue, anti-stress, anti-diabétique, aphrodisiaque, ou encore d'inhibition contre le VIH (Lee 2000; Choi 2008; Chen *et al.* 2015). Ses activités antioxydante et anti-âge justifient également son utilisation dans le domaine de la cosmétologie (Kitts et Hu 2000).

L'une des caractéristiques particulières de cette plante est son pouvoir adaptogène. Cette propriété se définit comme étant la capacité « à augmenter la résistance de l'organisme de manière non spécifique contre les agressions extérieures physiques, chimiques ou biologiques, et à avoir une influence normalisatrice tout en montrant une absence de toxicité » (Brekhman 1980).

Les molécules responsables de l'activité adaptogène du *ginseng* sont les ginsenosides. Ce sont des saponines triterpéniques dont la plupart sont de type dammarane avec des sucres greffés (Leung et Wong 2010; Johns et Chapman 2013) (Figure 2).

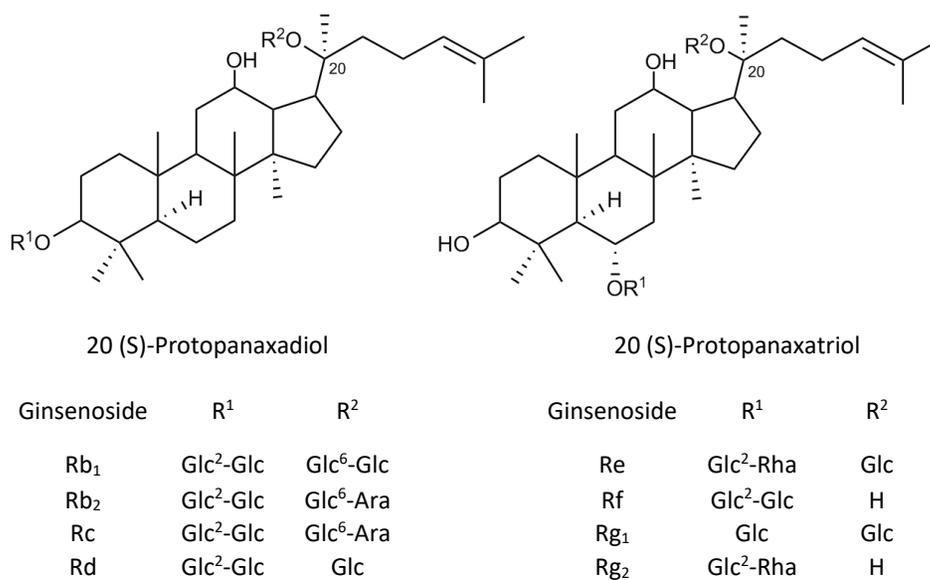


Figure 2. Exemples de ginsenosides majoritaires contenus dans l'extrait de *Panax ginseng*

Sur le plan médicinal, l'*Aralia* s'apparente aux effets biologiques du *ginseng*, descendant également des *Araliaceae* (Kitts et Hu 2000; Lee 2000; Chen *et al.* 2015; Jiang *et al.* 2016). On trouve d'ailleurs plusieurs espèces de cette famille avec des propriétés adaptogènes comparables, telles que l'*Aralia elata*, ou l'*Eleutherococcus senticosus* (Ahumada *et al.* 1991; Panossian et Wikman 2010; Johns et Chapman 2013).

2. Le genre *Aralia*

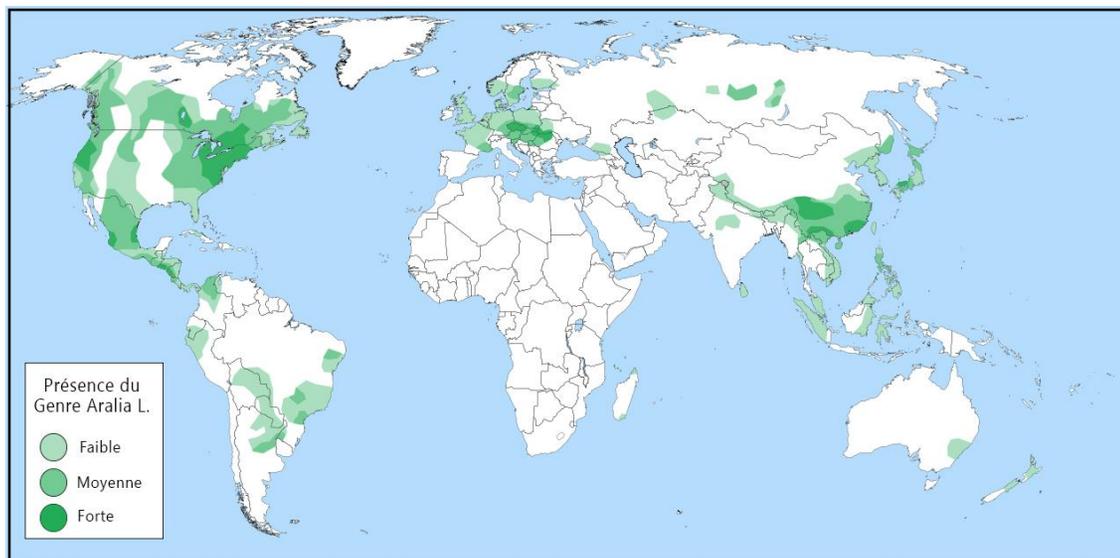


Figure 3. Carte de la répartition géographique du genre *Aralia L*

Sur les 74 espèces d'*Aralia* (Naturalis Biodiversity Center 2018), la plus étudiée à ce jour dans la littérature est l'*Aralia elata*. Elle est endémique de l'est de la Chine, de la Corée, du Japon et de la Russie. Elle est également présente en Ontario car elle y a été introduite par l'Homme (Brouillet *et al.* 2010; Global Biodiversity Information of Facility (GBIF) 2017) (Figure 3). De nombreuses vertus ont été attribuées aux diverses parties de cette plante. Depuis plus de 47 ans, la plante est utilisée comme remède (Shikov *et al.* 2016). Elle est connue en médecine traditionnelle pour soigner les rhumatismes, les spasmes d'estomac, les ulcères gastriques, l'arthrite, l'hépatite, la toux ou encore le diabète (Kang *et al.* 1999; Guo *et al.* 2009; Nishiumi *et al.* 2012; Wu *et al.* 2012; Kim *et al.* 2013b; Wang *et al.* 2015b). Une étude s'y consacrant vers le milieu du 20^e siècle, en URSS, a également montré une augmentation des capacités physiques des sujets animaux, une meilleure résistance au froid, aux radiations UV ainsi qu'aux baisses de pression atmosphérique. Ces résultats, en plus des usages traditionnels connus, ont amené à l'inscription de l'*Aralia elata* dans la Pharmacopée Russe

depuis 1967 (Shikov *et al.* 2016). Elle est également répertoriée dans le manuel des drogues médicinales du docteur Mashkovsky (Mashkovsky 2002).

Des études plus récentes ont permis de mettre en évidence les activités antiarythmique, cardioprotectrice (Wang *et al.* 2014, 2015a) et anticancéreuse (Kuang *et al.* 2013) de l'*A. elata* en tests *in vitro*. Des tests sur des animaux ont également démontré que cette espèce possède des propriétés adaptogène (Wojcicki *et al.* 1977; Yance et Tabachnik 2007), stimulantes des fonctions reproductives (Denisenko *et al.* 2000), du système immunitaire (Miroshnichenko *et al.* 1985) et de la coagulation sanguine (Kolxhir et Sokolov 1982). En synergie, l'espèce possède des effets protecteurs contre le stress (Markina et Markin 2008), les rayonnements ionisants (Fedorova *et al.* 1994), le diabète et l'obésité (Abidov *et al.* 2006; Liu *et al.* 2015; Shikov *et al.* 2016).

Les avancées technologiques dans le domaine de la science ont permis de mettre en évidence plusieurs molécules et familles de molécules, responsables d'un grand nombre d'activités biologiques attribuées à l'*Aralia elata* (Song *et al.* 2001; Lee *et al.* 2005; Nhiem *et al.* 2011; Wang *et al.* 2014, 2015a; Shikov *et al.* 2016). Parmi elles se trouvent les saponines triterpéniques de type oleanane (Figure 4), détaillés à la section II.B.

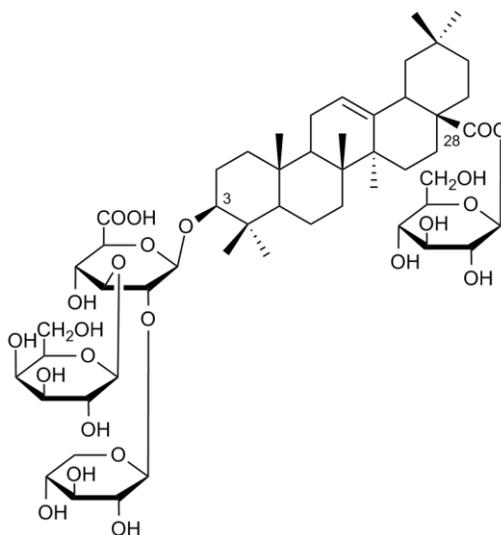


Figure 4. Elatoside C : saponine triterpénique d'*Aralia elata* responsable des activités antiarythmique et cardioprotective

Il existe de nombreuses autres espèces d'*Aralia*. Le tableau 3 en présente quelques-unes, leur répartition géographique ainsi que leurs effets thérapeutiques (Tableau 3).

Tableau 3. Étude du genre *Aralia* : différentes applications et origines des espèces

Espèce d' <i>Aralia</i>	Origine	Partie utilisée	Effet thérapeutique	Références
<i>A. decaisneana</i>	Sud de la Chine Nord du Vietnam	Racines	Contre les rhumatismes, lumbago, hépatite, ecchymose, néphrite, œdème, diabète	1
<i>A. continentalis</i>	Asie de l'Est, Chine, Corée	Racines	Névralgique, Analgésique, contre les rhumatismes, lumbago, anti-inflammatoire, anti-microbiale, anti-tumoral, anti caries dentaires	2 3 4
<i>A. spinifolia</i>	Chine	Racines	Stimulant neuronal	5
<i>A. dasphylla</i>	Chine	Racines	Tonifiant, contre diabète, hépatite, cytotoxique	6
<i>A. cordata</i>	Corée, Chine, Japon	Parties aériennes	Analgésique, anti-inflammatoire, cytotoxique, antibactérien, anti lipides, soin cosmétique (hydratant, meilleure circulation, contre eczéma)	7 8 9
<i>A. taibaiensis</i>	Nord-Est de la Chine	Racines	Antioxydant, antiglycation, anti diabète	10
<i>A. cachemirica</i>	Afghanistan, Tibet, Kashmir, Himachal, Pradesh, Uttarakhand, Sikkim	Racines	Hypoglycémique, antibactérien	11

1 (Miyase *et al.* 1996b), 2 (Lee *et al.* 2015), 3 (Kim *et al.* 2014), 4 (Lee *et al.* 2011), 5 (Yu *et al.* 1994), 6 (Xiao *et al.* 1999), 7 (Lee *et al.* 2006), 8 (Kim *et al.* 2013a), 9 (Teruo 1999), 10 (Hu *et al.* 1995), 11 (Bhat *et al.* 2015).

3. L'*Aralia nudicaulis*

L'*Aralia nudicaulis* est une plante endémique du Canada et du nord des Etats-Unis, que l'on retrouve communément dans les forêts boréales (Spencer C. H. Barrett 1981; Ellsworth *et al.* 2013). Elle doit son nom à Carl Von Linné qui la répertorie pour la première fois dans son ouvrage « Species

Plantarum » publié en 1753 (Linné 1753; Wen 1991). Autrefois appelée « Wild sarsaparilla » par les tribus amérindiennes, elle est décrite comme étant une herbacée vivace qui croît à partir d'un rhizome rampant, grandit sur une seule tige qui se divise par la suite en trois autres tiges. Chacune produit entre 3 et 5 folioles ovales, pointues et finement dentées. Ses fleurs sont verdâtres, proviennent d'une ombelle issue d'une tige sans feuilles et se développent en petites baies noires (Flanagan et Bain 1988; Marles *et al.* 2008) (Figure 5).

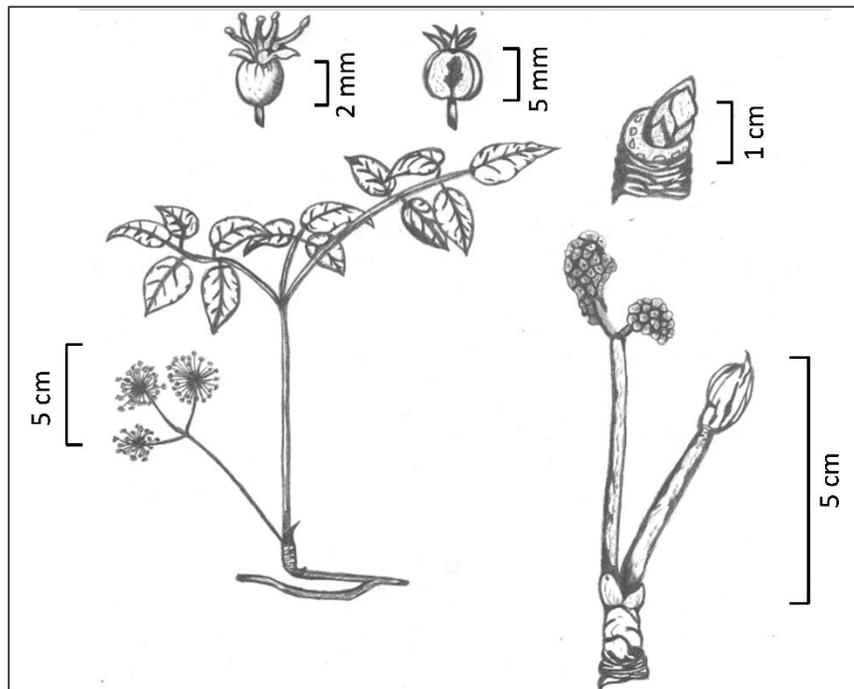


Figure 5. *L'Aralia nudicaulis* L.

L'Aralia nudicaulis a été consommée par de multiples tribus amérindiennes pour ses usages médicaux. La plante était utilisée en infusion, en décoction, en cataplasme, par ingestion, ou simplement en mâchant. Les racines connaissaient de très nombreuses applications. Elles étaient entre autres utilisées comme tonifiant, désinfectant, anti-inflammatoire ou encore purificateur. Les racines étaient également destinées à soigner les problèmes de foie, d'oreilles, d'estomac, de dents, de toux, d'ulcères, de fièvre, de diabète, de furoncles, ou encore stoppaient les périodes menstruelles. Les

fruits étaient consommés par décoction pour stimuler la lactation chez la femme, ou pour en extraire un vin aux propriétés tonifiantes. Des vertus anticonvulsives, stimulantes et bénéfiques au sang ont été attribuées aux feuilles infusées. L'intégralité de la plante, à l'exception des fruits, soignait quant à elle la pneumonie chez l'enfant (Wang *et al.* 2006; Li 2007; Moerman 2009).

Quelques publications font état de découvertes plus récentes sur les applications de cette plante, telles qu'une activité anticancéreuse d'une fraction non polaire d'un extrait de racines (Huang *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006). Une activité anti-mycobactériale a été rapportée pour un extrait de rhizomes (Li *et al.* 2012). Cette activité est due à la présence de deux molécules dans les rhizomes de la plante : le faltarinol et le panaxydol (Figure 6). La plante possède également une bonne synergie avec la *Symplocarpus foetidus*, qui ensemble ciblent certaines mycobactéries de la tuberculose (Webster *et al.* 2010). L'*Aralia nudicaulis* reste cependant une plante encore peu étudiée, aussi bien du point de vue de ses activités biologiques que de sa composition chimique.

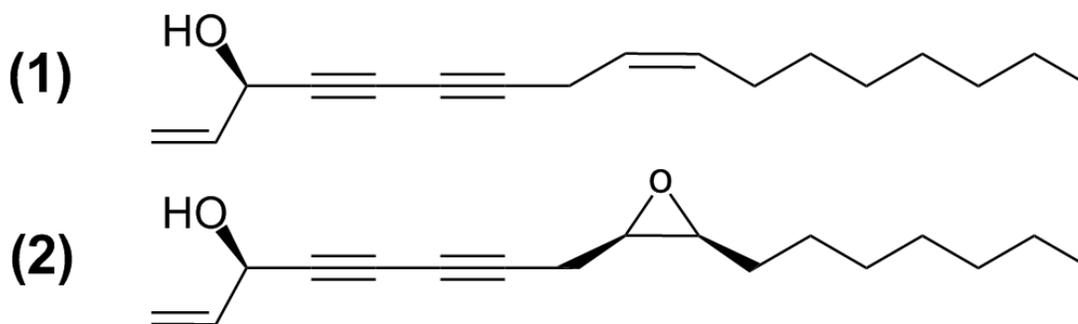


Figure 6. Structure des 2 molécules responsables de l'activité anti-mycobactériale de l'*Aralia nudicaulis* : le (3R)-faltarinol (1) et (3R,9R,10S)-panaxydol (2)

B. MOLECULES D'INTERET : LES SAPONINES

TRITERPENIQUES

Les saponines sont des métabolites secondaires fréquemment retrouvées dans les plantes et les organismes marins. Elles sont considérées comme des surfactants naturels, c'est-à-dire des molécules amphiphiles qui sont capables de diminuer la tension superficielle d'une solution aqueuse, ce qui en fait donc de bons composés moussants (Oleszek et Bialy 2006). Le nom saponine dérive d'ailleurs du latin « *sapo* », en anglais « *soap* », qui fait référence à cette propriété (Augustin *et al.* 2011). En Orient, certaines plantes dont l'écorce, les racines, les baies ou encore les graines contenaient des saponines, étaient utilisées pour la fabrication de savons (Hostettmann et Marston 1995). Les saponines trouvent aussi leur utilité à travers leur pouvoir antifongique (Papadopoulou *et al.* 1999), anti-insecte (Tava et Odoardi 1996), ainsi que dans les interactions chimiques impliquant une allélopathie (Hostettmann et Marston 1995; Lee *et al.* 2004).

Les saponines sont des molécules qui peuvent être présentes en faibles quantités dans certaines plantes. Cependant, d'autres espèces végétales contiennent des saponines en quantités suffisantes pour revendiquer des effets thérapeutiques. C'est le cas des écorces de *Quillaja saponaria* et des racines de réglisse (*Glycyrrhiza glabra*), qui sont les sources de saponines les plus utilisées dans le monde (Waller et Yamasaki 1996).

Les glycosides de saponine ont une place importante dans l'industrie pharmaceutique (Hostettmann et Marston 1995). Ils sont présents dans la composition de médicaments en tant qu'édulcorant, émulsifiant, adjuvant, modificateur de goût ou encore comme précurseur de synthèse hormonale (Waller et Yamasaki 1996). Un grand nombre de saponines ont également fait l'objet de tests biologiques *in vitro* et *in vivo*, mettant en évidence de nombreuses activités. Certaines de ces molécules, provenant de diverses espèces, ont montré des propriétés anti-coagulante, hépato-

protectrice, neuroprotectrice, hypoglycémique, immunomodulatrice, anti-inflammatoire, antioxydante, hypocholestérolémiante, anti-carcinogène (Rao et Gurfinkel 2000) et hémolytique (Vincken *et al.* 2007). Les saponines sont également présentes dans le domaine de la cosmétique (shampoings, dentifrices) ou encore dans les produits détergents (Waller et Yamasaki 1996).

Sur le plan structural, les saponines sont constituées d'un noyau aglycone lipophile, appelé génine ou sapogénine. Sur ce noyau sont généralement greffés un ou plusieurs saccharides hydrophiles, apportant une grande variété de structures (Rao et Gurfinkel 2000). C'est d'ailleurs à cette combinaison de groupements polaires et non polaires que l'on doit le caractère moussant en solution aqueuse des saponines (Vincken *et al.* 2007). Deux types de saponines sont majoritairement présentes dans les plantes : les saponines triterpéniques et les stéroïdiques (Figure 7). La structure finale de la molécule varie ensuite selon le nombre et le type de sucres greffés à ces squelettes aglycones. Le nombre moyen de monosaccharides sur une saponine varie entre 2 et 5, et sont reliés à l'aglycone par l'intermédiaire du carbone en position C-3 (Figure 7 - A & B). Pour les triterpènes, les sucres peuvent également se greffer au carbone en position C-28 (Figure 7 - A) (Augustin *et al.* 2011).

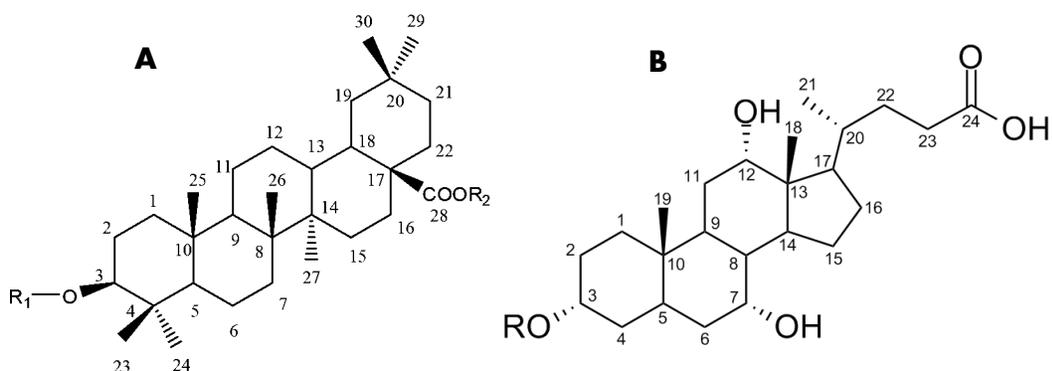


Figure 7. Saponine triterpénique de type oleanane (acide oléanolique) (A) et saponine stéroïdique de type cholane (acide cholique) (B) où R, R₁ et R₂ sont des hydrogènes ou des saccharides

Comme le montre la figure 8, la biosynthèse des saponines triterpéniques débute avec comme précurseur initial l'acetyl-CoA, qui se condense par la voie mévalonate en squalène puis en 2,3-oxidosqualène (Augustin *et al.* 2011). Dans le cycle de biosynthèse du *Panax ginseng*, le 2,3-oxidosqualène est ensuite catalysé par la dammarendiol synthase et la β -amyrin synthase pour donner respectivement les précurseurs des saponines de type dammarane et oléanane (Lee *et al.* 2004).

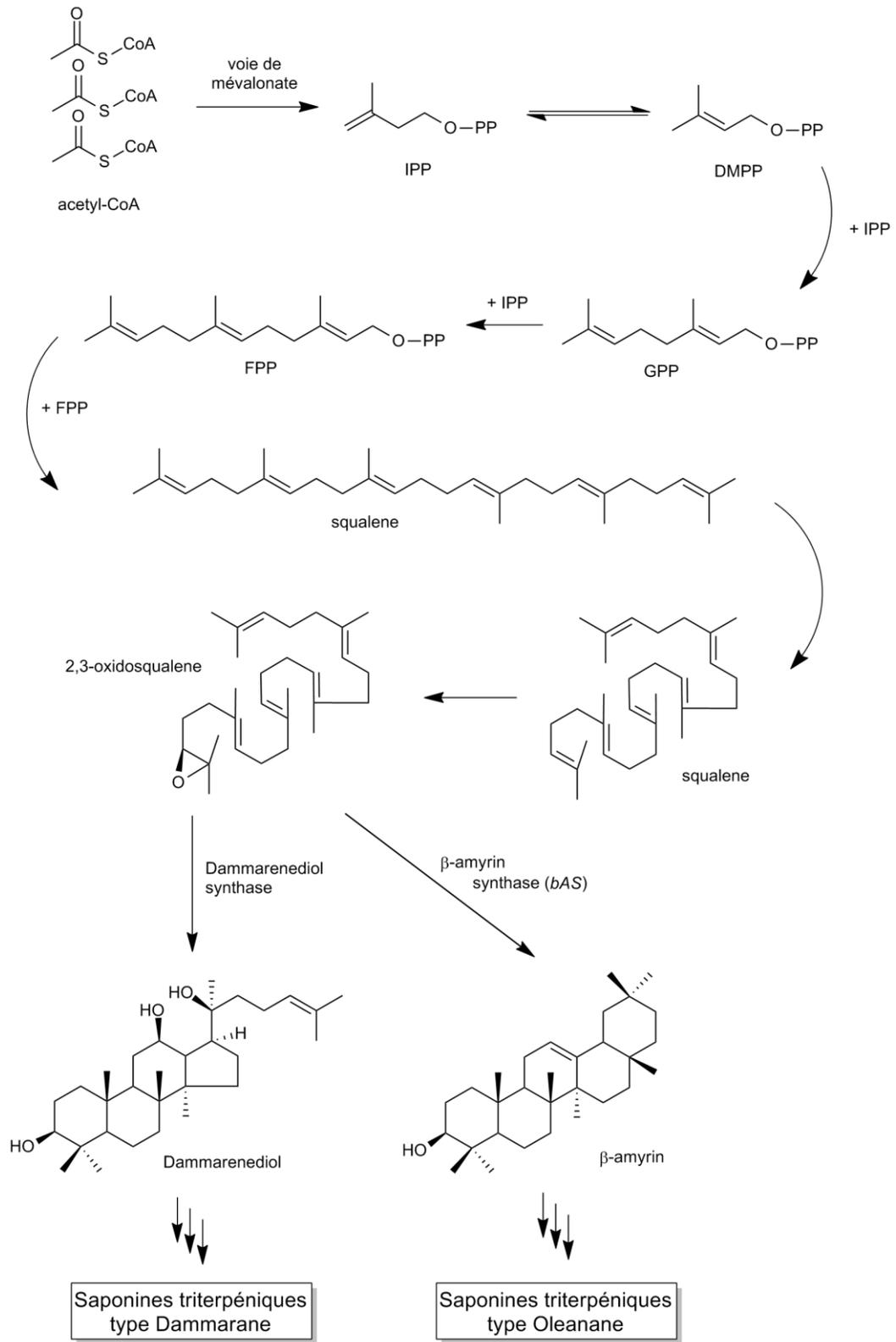


Figure 8. Schéma de biosynthèse des saponines dans le *Panax ginseng*

Différents exemples de saponines issues du *Panax ginseng* sont illustrés à la section II.1 (Figure 2). Plus particulièrement dans le genre *Aralia*, plusieurs araliasaponin de type triterpène ont été isolées à partir des racines de l'*Aralia elata* (Song *et al.* 2001). D'autres publications plus récentes mettent en évidence des activités spécifiques aux saponines triterpéniques isolées dans cette espèce, comme leurs propriétés anti-inflammatoire (Nhiem *et al.* 2011), anti-ulcère (Lee *et al.* 2005), antiarythmique ou encore cardioprotectrice (Wang *et al.* 2014, 2015a).

Dans une fraction enrichie, la séparation entre les différentes saponines est considérée comme délicate. Leurs structures sont souvent très similaires ainsi que leurs polarités (Oleszek et Bialy 2006). L'isolation de ces composés passe ainsi préalablement par plusieurs étapes d'affinage de gradient d'éluion avant de les séparer.

L'analyse des saponines en HPLC est également délicate. En effet, l'absence fréquente de chromophores sur les saponines entraîne une détection UV non spécifique à 205 ± 5 nm (Oleszek et Bialy 2006) (Figure 9). Leur détection aux courtes longueurs d'ondes peut également permettre leur distinction des glycosides de polyphénols, retrouvés dans la partie polaire des extraits de plante (Marston *et al.* 2000). Ces molécules possèdent des temps de rétention similaire à ceux des saponines triterpéniques, bien que leur détection se fasse aux longueurs d'ondes couramment utilisées en HPLC (254, 380, 320 et 365 nm). La distinction entre les deux familles de molécules s'appuie également sur la spectrométrie de masse (MS), ainsi que sur leur mise en évidence sur plaques CCM.

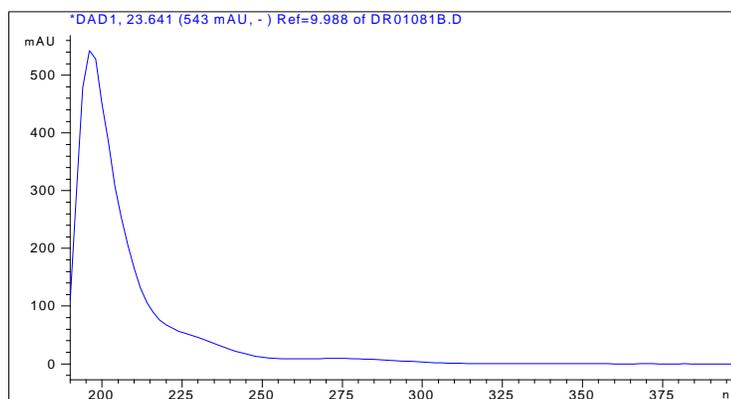


Figure 9. Spectre d'absorption UV d'une saponine triterpénique

En spectrométrie de masse, les saponines sont plus facilement détectables en ionisation négative car, lors de la fragmentation, l'aglycone de la molécule donne un pic majoritaire (Oleszek et Bialy 2006). À titre d'exemple, l'acide oléanolique possède un fragment majoritaire en mode négatif à m/z 455 (Figure 10) et plusieurs fragments minoritaires à m/z 391, 377 et 363 (Figure 11), dont les structures hypothétiques sont détaillées à la suite (Figure 12). En comparaison à l'ionisation positive, les signaux sont de meilleure qualité lorsqu'ils sont obtenus par déprotonation des ions moléculaires (Chen *et al.* 2011).

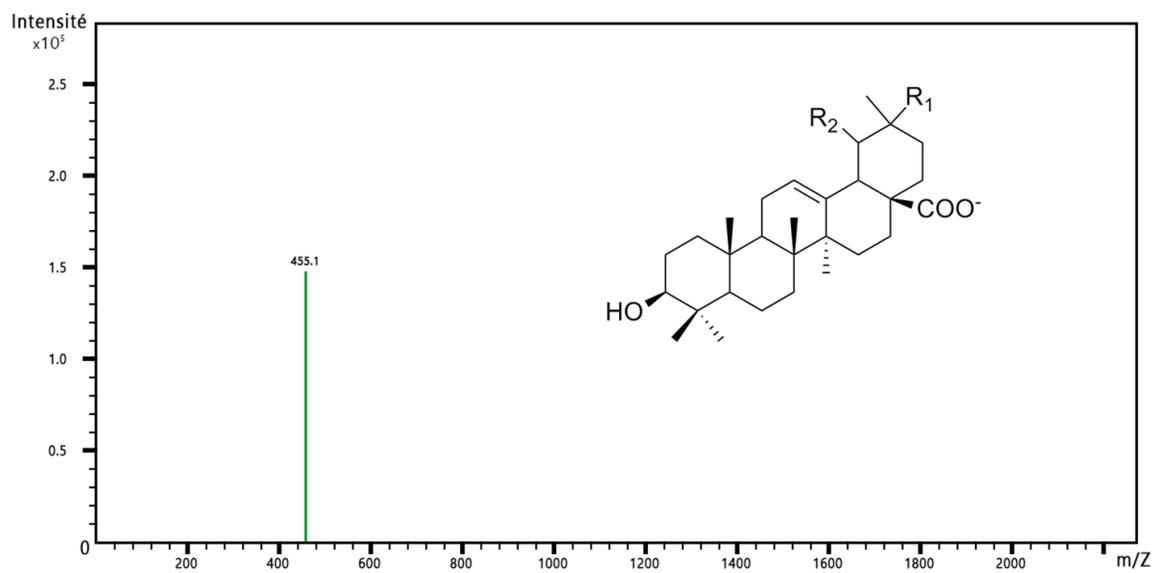
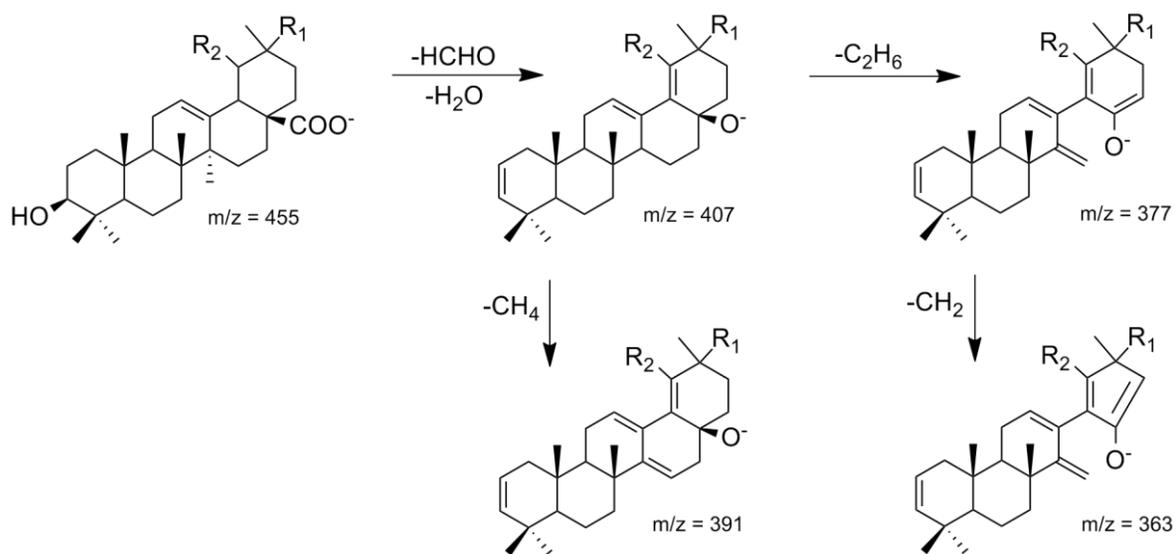
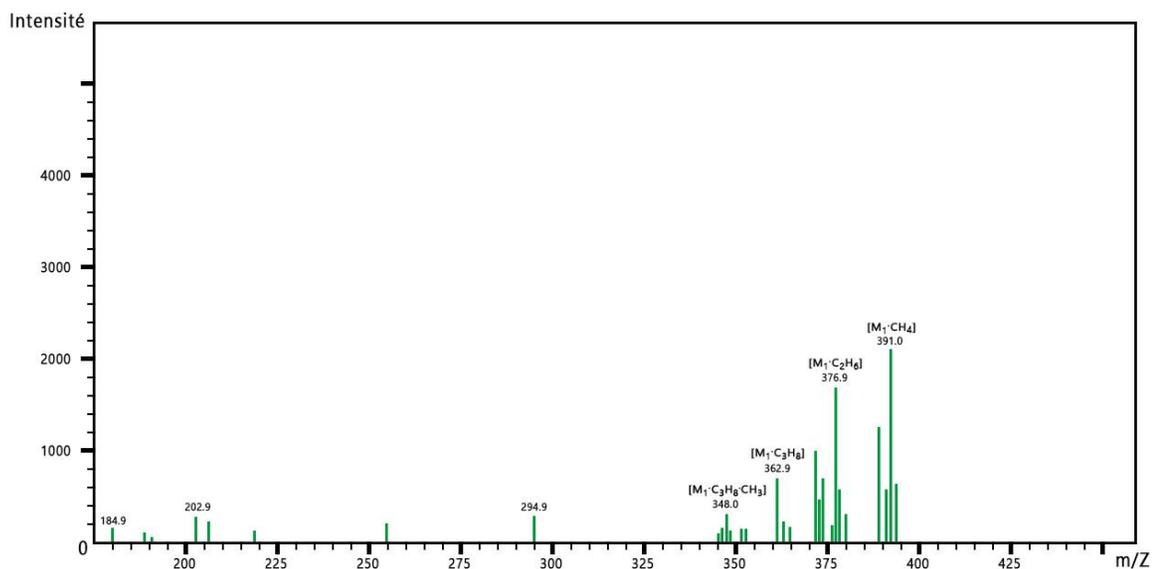


Figure 10. Spectrométrie de masse de l'acide oléanolique en ionisation négative : fragment majoritaire



CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Ce chapitre présente un article scientifique détaillant l'isolation et la caractérisation de dix saponines triterpéniques, dont trois nouvelles, contenues dans les feuilles d'*Aralia nudicaulis*. Il contient également des données sur leur activité anti-inflammatoire. La publication incluse dans ce mémoire est cependant en cours de soumission. Ainsi, le travail présenté n'est pas une version définitive et pourra être sujet à des modifications mineures de la part des auteurs avant publication.

Trois nouveaux glycosides oléanoliques, ainsi que sept saponines connues dans différentes variétés de plantes ont été isolées pour la première fois dans les feuilles d'*Aralia nudicaulis*. Leurs structures ont été élucidées sur la base de preuves spectroscopiques, incluant la RMN 1D et 2D, et la HRESIMS. Deux de ces composés isolés ont montré une activité anti-inflammatoire modérée, mesurée par l'inhibition de la production d'oxyde nitrique synthétisé par des macrophages de souris (RAW 264.7).

Isolation and Characterization of triterpenoid saponins from leaves of *Aralia nudicaulis* L.

Serge Lavoie^a, Julie Pierra^b, Jean Legault^a, Diamondra Raminoson^b, Quentin Lion^b, Vakhtang Mshvildadze^b, André Pichette^{a*}

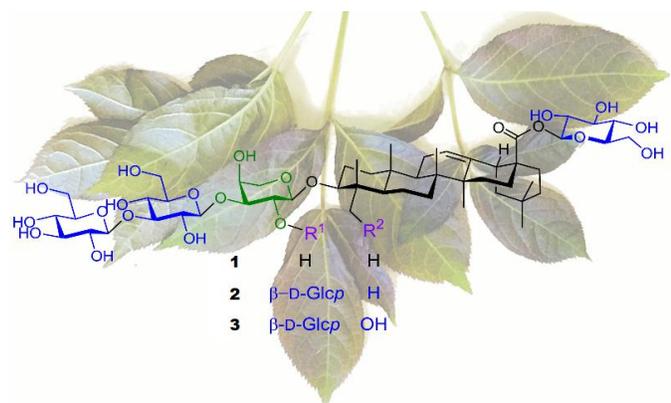
^aCentre de recherche sur la boréale (CREB), Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE), Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi (Québec), Canada, G7H 2B1.

^bLaboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE), Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, Québec G7H 2B1, Canada.

*Corresponding author. E-mail address: andre.pichette@uqac.ca; Tel.: +1-418-545-5011; Fax: +1-418-545-5012.

Keywords: *Aralia nudicaulis*, saponins, NMR spectroscopy, arabinose, pharmacological activities, anti-inflammatory, nudicauloside.

Graphical Abstract



Research Highlights

- Ten oleanolic glycosides, including three new compounds, were isolated from *Aralia nudicaulis* L.
- The chemical structures of these three new molecules were elucidated by spectroscopic evidence.
- The biological potential of the compounds was assessed.

Abstract

Three new oleanolic glycosides (**1–3**), along with seven known saponins from various plants (**4–10**) were isolated for the first time from the leaves of *Aralia nudicaulis*. Their structures were elucidated on the basis of spectroscopic evidence, including 1D and 2D NMR, and HRESIMS. Two of those isolated compounds have shown moderate anti-inflammatory activity, as demonstrated by inhibition of LPS-induced NO production in raw 264.7 murine macrophages.

Introduction

Saponins are ubiquitous in plants. Some families have been studied for centuries for their rich saponin composition, like Caryophyllaceae, Leguminosae and Araliaceae (Sparg et al., 2004). The latter comprise species of the genus *Panax* (ginseng) which were shown to contain several bioactive saponins (Jia and Zhao, 2009). Several species of the genus *Aralia*, especially *A. elata* (Table 1), also contain bioactive saponins which explain their broad usage as an herbal remedy in Russia, Korea, Japan and China (Shikov et al., 2016). In the province of Québec in Canada, three species of *Aralia* are indigeneous: *A. racemosa*, *A. hispida* and *A. nudicaulis*. The latter was used by aboriginal peoples of Québec as root infusion or decoction to treat several health problems such as stomach pain, kidney disorder, cold, and cough (Moerman, 1998). More recently, polyacetylenes with bioactivity against *Mycobacterium tuberculosis* were isolated from the roots of *A. nudicaulis* (Li et al., 2012). However, the saponin content of *A. nudicaulis* was never reported.

Table 1. Species of *Aralia* known for their saponin content.

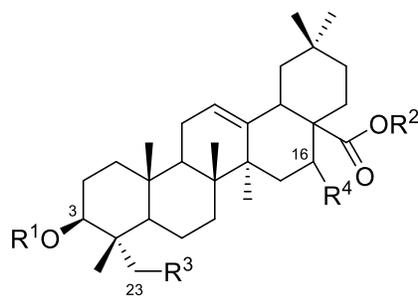
Species	Part	Reference
<i>elata</i>	leaf	(Zhang et al., 2013)
	root bark	(Song et al., 2001),(Lee et al., 2005)
	bark	(Nhiem et al., 2011)
<i>cordata</i>	aerial	(Kawai et al., 1989),(Ik et al., 2006)
<i>spinifolia</i>	root	(Yu et al., 1994)
<i>armata</i>	root bark	(Hu et al., 1995)
<i>continentalis</i>	aerial	(Kim and Kang, 1998)
<i>taibaiensis</i>	root bark	(Bi et al., 2012)
<i>subcapitata</i>	root	(Zou et al., 2001)
<i>dasyphylla</i>	root bark	(Xiao et al., 1999)
	root	(Miyase et al., 1996a)
<i>decaisneana</i>	bark	(Tian et al., 2006)
	root	(Li et al., 2016)
<i>chinensis</i>	root	(Miyase et al., 1996b)

In the last 15 years, we dedicated some of our research effort toward the synthesis of glycosides with molecular scaffold obtained from plant material (Gauthier et al., 2009; Piochon et al., 2009). For this reason, we have a strong interest for plants containing glycosides. In this study, we report the isolation and structural elucidation of three new saponins, Nudicauloside A–C (**1–3**), from an *Aralia nudicaulis* leaves extract. Furthermore, their anticancer, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities were evaluated *in vitro*.

Results and discussion

Known and new compounds

The methanolic extract from leaves of *Aralia nudicaulis* was subjected to a number of MS-guided separation steps using Diaion HP-20, silica gel and reversed phase C₁₈. The final purification of the saponin compounds was realized using semi-preparative HPLC, yielding three new (**1–3**) and seven known compounds (**4–10**) identified for the first time on this specie (Fig. 1). By comparison of NMR spectroscopic data with literature values, the known compounds were identified as hemsgiganoside B (**4**) (Chen et al., 2003), guaiacin B (**5**) (Shaker et al., 1999), araliasaponin I (**6**) (Song et al., 2000), 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopyranosyl hederagenin (**7**) (also known as prosapogenin) (Chen et al., 1997), araliasaponin XII (**8**) (Ahmad et al., 1990), araliasaponin IX (**9**) (Song et al., 2001), and araliasaponin III (**10**) (Song et al., 2000).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$	$\beta\text{-D-Glc}$	H	H
2	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$ $\begin{array}{c} 2 \\ \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glc} \end{array}$	$\beta\text{-D-Glc}$	H	H
3	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$ $\begin{array}{c} 2 \\ \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glc} \end{array}$	$\beta\text{-D-Glc}$	OH	H
4	$\beta\text{-D-GlcA}$	$\beta\text{-D-Glc}$ $\begin{array}{c} 6 \\ \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glc} \end{array}$	H	H
5	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$	$\beta\text{-D-Glc}$	H	H
6	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$	$\beta\text{-D-Glc}$	H	OH
7	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$ $\begin{array}{c} 2 \\ \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glc} \end{array}$	H	OH	H
8	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$ $\begin{array}{c} 2 \\ \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glc} \end{array}$	$\beta\text{-D-Glc}$	H	H
9	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$ $\begin{array}{c} 2 \\ \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glc} \end{array}$	$\beta\text{-D-Glc}$	OH	H
10	$\beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \beta\text{-D-Glc} \xrightarrow{1\ 3} \alpha\text{-L-Arap}$	$\beta\text{-D-Glc}$	H	H

Fig. 1. Structure of compounds **1–10** from *Aralia nudicaulis*.

Compound **1** was isolated as a white amorphous powder with a molecular formula determined as C₅₃H₈₆O₂₂ based on a HRESIMS sodiated adduct at *m/z* 1097.5503. The ¹H NMR spectrum shows typical resonances for saponins with four anomeric protons at δ_{H} 5.38 (d, *J* = 8.1 Hz, H-1^{IV}), 4.62 (d, *J* = 7.7 Hz, H-1^{II}), 4.57 (d, *J* = 7.8 Hz, H-1^{III}) and 4.28 (d, *J* = 7.3 Hz, H-1^I), one olefinic proton at δ_{H} 5.25 (t, *J* =

3.7 Hz, H-12), and seven methyl groups at δ_{H} 1.16 (s, H₃-27), 1.05 (s, H₃-23), 0.95 (s, H₃-25), 0.93 (s, H₃-30), 0.91 (s, H₃-29), 0.84 (s, H₃-24), 0.80 (s, H₃-26) (Table 2). The ¹³C NMR spectrum indicated one carbonyl carbon at δ_{C} 178.0 (C-28) and a pair of *sp*² carbon at δ_{C} 144.9 (C-13) and 123.8 (C-12). After careful examination of COSY, HSQC and HMBC 2D NMR spectra, the aglycone of **1** could be identified as an oleanolic acid, typical of most saponin isolated from *Aralia* (Ma et al., 2013; Zhang et al., 2013). The remaining 23 carbon signals accounted for three hexoses and one pentose. The ¹H and ¹³C chemical shifts were assigned for each sugar using HSQC, COSY, and a series of 1D TOCSY spectra obtained by selectively exciting the anomeric protons and using an increasing mixing time (Table 3). With the help of literature data (Agrawal, 1992), and considering that all anomeric signals were doublets with *J* values > 7.5 Hz, three β -glucopyranoside and one α -arabinopyranoside could be identified. To further confirm this conclusion, an acid hydrolysis of **1** was performed and the sugars were acetylated and analyzed by chiral GC-FID. The retention time of the sugars matched those for D-glucose and L-arabinose. Finally, the linkage was elucidated with HMBC correlations from H-1^I to δ_{C} 90.5 (C-3), from H-1^{II} to δ_{C} 83.9 (C-3^I), from H-1^{III} to δ_{C} 87.4 (C-3^{II}), and from H-1^{IV} to δ_{C} 178.0 (C-28). From all the above evidence, compound **1**, named nudicauloside A, was identified as β -D-glucopyranosyl 3 β -O-[[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl]-olean-12-en-28-oate.

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for the aglycone part of **1–3**^a.

position	1 ^b		2 ^c		3 ^c	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	39.9 t	1.62 m 0.98 m	38.8 t	1.47 m 0.88 m	39.2 t	1.52 m 1.01 m
2	27.1 t	1.83 m 1.70 m	26.6 t	2.04 m 1.80 m	26.4 t	2.13 m 1.94 m
3	90.5 d	3.15 dd (11.7, 4.3)	89.0 d	3.23 m	82.7 d	4.16 m
4	40.2 s	–	39.7 s	–	43.9 s	–
5	57.1 d	0.78 m	55.9 d	0.74 d (11.4)	48.2 d	1.60 m
6	19.3 t	1.54 m 1.41 m	18.5 t	1.48 m 1.31 m	18.5 t	1.68 m 1.36 m
7	34.0 t	1.48 m 1.32 m	33.2 t	1.43 m 1.32 m	33.2 t	1.57 m 1.30 m
8	40.7 s	–	39.9 s	–	40.3 s	–
9	49.0 d	1.58 m	48.1 d	1.61 m	48.5 d	1.73 m
10	37.9 s	–	37.0 s	–	37.2 s	–
11	24.6 t	1.89 m	23.8 t	1.88 m	24.2 t	1.91 m
12	123.8 d	5.25 t (3.7)	122.9 d	5.44 t (3.5)	123.3 d	5.42 br s
13	144.9 s	–	144.1 s	–	144.4 s	–
14	42.9 s	–	42.1 s	–	42.5 s	–
15	28.9 t	1.80 m 1.08 m	28.3 t	2.35 m 1.18 m	28.6 t	2.33 m 1.10 m
16	24.0 t	2.05 m 1.72 m	23.4 t	2.08 m 1.97 m	23.7 t	2.04 m 1.93 m
17	48.0 s	–	47.0 s	–	47.3 s	–
18	42.6 d	2.85 dd (13.6, 4.8)	41.8 d	3.21 m	42.1 d	3.19 dd (13.9, 4.9)
19	47.2 t	1.70 m 1.15 m	46.2 t	1.77 m 1.26 m	46.5 t	1.73 m 1.24 m
20	31.5 s	–	30.8 s	–	31.1 s	–
21	34.9 t	1.40 m 1.22 m	34.0 t	1.36 m 1.10 m	34.3 t	1.33 m 1.08 m
22	33.1 t	1.74 m 1.61 m	32.6 t	1.83 m 1.76 m	32.9 t	1.82 m 1.74 m
23	28.5 q	1.05 s	28.1 q	1.25 s	65.0 t	4.29 m 3.70 d (10.5)
24	17.0 q	0.84 s	16.7 q	1.08 s	13.7 q	1.06 s
25	16.0 q	0.95 s	15.6 q	0.83 s	16.5 q	0.93 s
26	17.7 q	0.80 s	17.5 q	1.10 s	17.9 q	1.12 s
27	26.3 q	1.16 s	26.1 q	1.25 s	26.4 q	1.18 s
28	178.0 s	–	176.4 s	–	176.8 s	–
29	33.5 q	0.91 s	23.7 q	0.89 s	24.0 q	0.88 s
30	24.0 q	0.93 s	33.2 q	0.92 s	33.5 q	0.90 s

^aMeasured at 400 MHz for **1–2**, or 800 MHz for **3**. ^bRecorded in CD_3OD . ^cRecorded in pyridine- d_5 .

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for the sugar moieties of **1–3**^a.

position	1 ^b ^{13}C	^1H	2 ^c ^{13}C	^1H	3 ^c ^{13}C	^1H
3- <i>O</i> - α -L-Arap						
1 ^I	107.1 d	4.28 d (7.3)	105.4 d	4.77 m	104.7 d	5.00 d (6.8)
2 ^I	72.1 d	3.71 m	77.3 d	4.74 m	77.7 d	4.70 t (7.8)
3 ^I	83.9 d	3.66 m	83.3 d	4.32 m	83.8 d	4.15 m
4 ^I	69.6 d	4.03 m	68.8 d	4.48 m	69.0 d	4.41 m
5 ^I	66.7 t	3.86 m	66.0 t	4.16 m	66.2 t	4.11 m
		3.55 m		3.65 m		3.52 d (11.2)
β -D-Glc at <i>O</i> -3 of α -L-Arap						
1 ^{II}	105.0 d	4.62 d (7.7)	104.6 d	5.32 d (7.8)	104.8 d	5.24 d (7.7)
2 ^{II}	74.8 d	3.51 m	73.9 d	4.01 m	74.3 d	4.01 m
3 ^{II}	87.4 d	3.59 m	87.9 d	4.22 m	88.2 d	4.25 m
4 ^{II}	69.7 d	3.47 m	69.7 d	4.11 m	70.0 d	4.11 m
5 ^{II}	78.2 d	3.32 m	78.1 d	3.90 m	78.4 d	3.90 m
6 ^{II}	62.3 t	3.85 m	62.2 t	4.41 m	62.5 t	4.41 m
		3.69 m		4.24 m		4.25 m
β -D-Glc at <i>O</i> -3 of β -D-Glc						
1 ^{III}	105.3 d	4.57 d (7.8)	105.5 d	5.20 d (7.8)	105.9 d	5.21 d (7.9)
2 ^{III}	75.6 d	3.28 m	75.4 d	4.05 m	75.7 d	4.06 m
3 ^{III}	77.8 d	3.39 m	78.1 d	4.19 m	78.4 d	4.21 m
4 ^{III}	71.6 d	3.28 m	71.5 d	4.19 m	71.8 d	4.19 m
5 ^{III}	78.7 d	3.35 m	78.6 d	3.96 m	78.9 d	3.97 m
6 ^{III}	62.7 t	3.89 m	62.4 t	4.53 m	62.8 t	4.53 d (10.3)
		3.64 m		4.31 m		4.31 m
28- <i>O</i> - β -D-Glc						
1 ^{IV}	95.7 d	5.38 d (8.1)	95.8 d	6.37 d (8.0)	96.1 d	6.34 d (8.0)
2 ^{IV}	73.9 d	3.32 m	74.2 d	4.22 m	74.5 d	4.21 m
3 ^{IV}	78.3 d	3.41 m	78.9 d	4.30 m	79.3 d	4.30 m
4 ^{IV}	71.1 d	3.37 m	71.1 d	4.38 m	71.4 d	4.38 m
5 ^{IV}	77.6 d	3.33 m	79.4 d	4.05 m	79.7 d	4.04 m
6 ^{IV}	62.4 t	3.82 m	62.2 t	4.48 m	62.5 t	4.48 d (10.2)
		3.68 m		4.42 m		4.42 m
β -D-Glc at <i>O</i> -2 of α -L-Arap						
1 ^V			104.3 d	5.50 d (7.7)	104.6 d	5.48 d (7.8)
2 ^V			76.2 d	4.06 m	76.5 d	4.08 m
3 ^V			78.6 d	4.19 m	78.9 d	4.18 m
4 ^V			72.4 d	4.18 m	72.3 d	4.18 m
5 ^V			77.4 d	3.70 m	77.8 d	3.67 m
6 ^V			63.2 t	4.36 m	63.3 t	4.36 m
				4.30 m		4.29 m

^aMeasured at 400 MHz for **1–2**, or 800 MHz for **3**. ^bRecorded in CD_3OD . ^cRecorded in pyridine-*d*₅.

Compound **2**, obtained as a white amorphous powder, exhibited a pseudo-molecular sodium adduct in its HRESIMS spectrum at m/z 1275.5978, indicative of the molecular formula $C_{59}H_{96}O_{27}$. The 1H NMR spectra revealed only four anomeric proton signals at δ_H 6.37 (d, $J = 8.0$ Hz, H-1^{IV}), 5.50 (d, $J = 7.7$ Hz, H-1^V), 5.32 (d, $J = 7.8$ Hz, H-1^{II}) and 5.20 (d, $J = 7.8$ Hz, H-1^{III}), along with an olefinic protons at δ_H 5.44 (t, $J = 3.5$ Hz, H-1). The HSQC spectrum showed a correlation at δ_H 4.77 (m, H-1^I) and δ_C 105.8 which was assigned to the anomeric proton of an additional sugar moiety. Analysis of the 2D NMR spectra revealed that the aglycone of **2** was also an oleanolic acid. Literature data and chemical degradation allowed the identification of four D-glucopyranosyl and one L-arabinopyranoside moieties with linkage established from HMBC correlations between H-1^I and δ_C 89.3 (C-3), H-1^{II} and δ_C 83.6 (C-3^I), H-1^{III} and δ_C 88.3 (C-3^{II}), H-1^{IV} and δ_C 176.8 (C-28), and H-1^V and δ_C 77.6 (C-2^I). Therefore, compound **2**, named nudicauloside B, was identified as 3 β -O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl]-olean-12-en-28-oate.

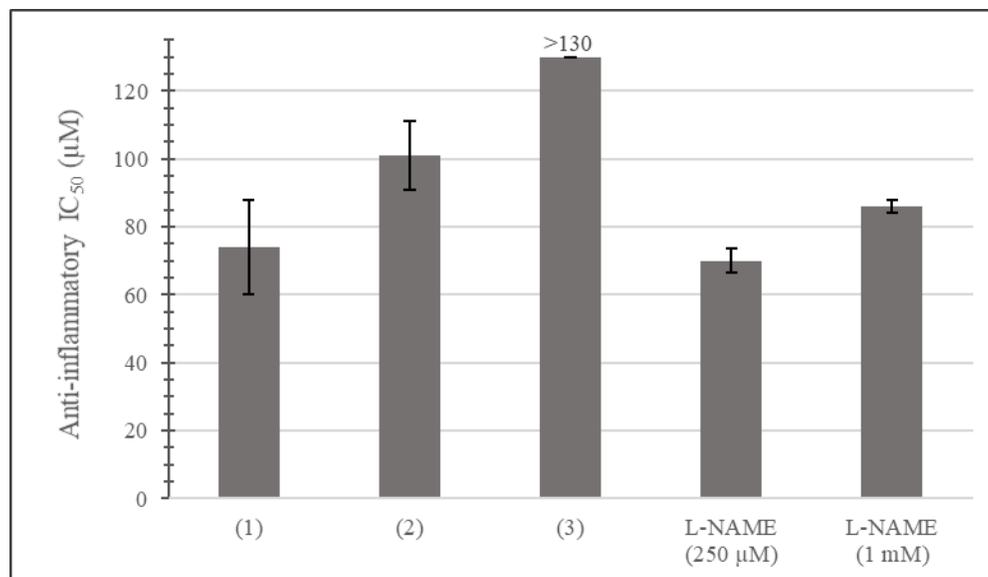
Compound **3** was obtained as a white amorphous solid, and its molecular formula was established as $C_{59}H_{96}O_{28}$ based on a pseudo-molecular sodiated ion in its HRESIMS spectrum at m/z 1275.5980. A close inspection of the 2D NMR spectra revealed the same sugar pattern as for **2**, with almost the same chemical shifts for 1H and ^{13}C . The largest difference was observed for the anomeric proton of arabinose, which was suspected of being linked to a different aglycone. The latter was identified as hederagenin, based on a methylene carbon at δ_C 65.0 (C-23), and HMBC correlations from δ_H 4.29 (m, H₂-23), 3.70 (d, $J = 10.5$ Hz, H₂-23) and 1.06 (s, H₃-24) to δ_C 82.5 (C-3). From all the above evidence, nudicauloside C (**3**) was identified as 3 β -O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl]-23-hydroxyolean-12-en-28-oate.

Evaluation of biological activities

Nudicauloside A–C (**1–3**) were subjected to several biological assays to evaluate their pharmaceutical and cosmeceutical potential (Table 4). At first, we have evaluated the biological activities of isolated compounds (**1–10**) including cytotoxicity against human cancer cell lines 549, DLD-1 and healthy human skin fibroblast (WS1); antimicrobial activities against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. The result show that all compounds tested are inactive at the highest concentration of 160 μ M. Kuang et al. (2013) found cytotoxicity against A549 with analogs of **1–3** having a β -D-glucopyranosyl in place of the α -L-arabinopyranosyl at C-3, suggesting that the arabinose moiety is detrimental for this activity. However, these results are not supported by other reports (Cioffi et al., 2008;

Zhang et al., 2012). The anti-inflammatory activity of *Aralia* extracts was already reported (Lee et al., 2009; Suh et al., 2007). For this reason, the inhibition of LPS-induced NO production by **1–3** in raw 264.7 murine macrophages was studied (Table 4). Moderate activities were obtained for **1** and **2** with IC_{50} values of $74 \pm 28 \mu\text{M}$ and $101 \pm 20 \mu\text{M}$ respectively.

Table 4. Anti-inflammatory activity of **1–3** with L-NAME as a positive control.



Experimental

General experimental procedures

Styrene-divinylbenzene polymer (Diaion HP-20, Sigma-Aldrich) and silica gel (Silicycle, 40–63 μm) adsorbents were used for column chromatography. Low-pressure liquid chromatography was achieved using a Sepacore flash system (Buchi) equipped with two pumps, a UV-detector and a fraction collector. Since saponin rarely have chromophore, the fraction collector was set in time-mode. TLC analyses were performed on precoated silica gel plates (Kieselgel 60F₂₅₄, Merck) using a $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (26:14:3) solvent systems. Spots were detected by spraying the plates with 20 % H_2SO_4 in MeOH, followed by heating at 110 °C for 10 min. Saponin content was monitored by LC-MS using an 1100 LC unit and a G1946 VL MS instrument (Agilent Technologies). A dual ESI and APCI ionization source ran in negative mode was used. A Kinetex XB-C18 HPLC column (Phenomenex, 250 \times 4.6 mm, 5 μm particle size) was used with 1 mL/min of H_2O and MeCN, both acidified with 0.1 % HCOOH . Semi-preparative HPLC purification were performed on an Agilent 1100 Series equipped with two pumps, an autosampler,

a UV-detector, and a fraction collector. The column used for separations was a Kinetex XB-C18 (Phenomenex, 250 × 21.2 mm, 5 µm particle size). Solutions of HCOOH 0.1 % in H₂O (solvent A) and HCOOH 0.1 % in MeCN (solvent B) were used as eluents with a flow rate of 20 mL/min. Optical rotations were measured in methanol at 589 nm using an Autopol IV polarimeter (Rudolph Research Analytical). FTIR spectra were recorded from a thin film of compounds deposited on a NaCl windows, and using a Cary 630 instrument (Agilent Technologies). Chiral separations of acetylated monosaccharides were performed on a 7890A GC-FID instrument (Agilent Technologies) using a Chiramix column (GL Sciences, 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm), and helium as the carrier gas (flow 1 mL/min). The injector temperature was maintained at 230 °C, while the GC oven was kept at 120 °C for 1 min and raised at a rate of 4 °C/min up to 180 °C, which was held constant for 120 min. NMR spectra (¹H, ¹³C, DEPT-135, DQF-COSY, edited-HSQC, HMBC and NOESY) were recorded on a 9.4 T instrument (400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C), equipped with a QNP 5 mm probe (Bruker) or a 18.8 T instrument (800 MHz for ¹H and 200 MHz for ¹³C), equipped with a 5 mm triple resonance broadband cryoprobe (Bruker). Spectra were acquired in pyridine-d₅ or methanol-d₄, and chemical shifts were reported in ppm (δ) relative to the residual solvent peaks (Gottlieb et al., 1997). All spectra were processed using MestReNova 12.0. High resolution mass spectrometry was conducted on a 6210 Q-TOF spectrometer (Agilent Technologies) equipped with an electrospray source operating in the positive ion mode.

Plant material

The leaves of *Aralia nudicaulis* L. were collected in June and July 2016, near Laterrière, Québec, Canada (48°23'07" N, 71°25'07" W), and dried in the shade. The plant was authenticated by Mr Patrick Nadeau (Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi). A voucher specimen (No. QFA0297432) has been deposited at the Louis-Marie herbarium of Laval University (Québec).

Extraction and isolation

Dried and powdered leaves from *A. nudicaulis* (1.1 kg) were refluxed sequentially in DCM (3 × 5 L), and MeOH (3 × 5 L), each time for 90 min. The solutions were filtered and concentrated under vacuum yielding two fractions (DCM, 41.4 g; MeOH, 168 g). An aliquot from the MeOH extract (45.3 g) was suspended in 500 mL H₂O and partitioned using 3 L of EtOAc (A, 4.5 g), then 3 L of *n*-BuOH (B, 9.2 g). An aliquot of the BuOH extract (8.5 g) was separated by CC using Diaion HP-20 and a step gradient of

H₂O/MeOH (1:0 → 0:1) yielding five fractions (B1–B5). Fraction B4 (3.0 g) was subjected to flash chromatography on silica gel and eluting isocratically with CHCl₃/MeOH/H₂O 26:14:3 to afford five fractions (B4.1–B4.5). Fraction B4.2 was separated on CC using silica gel and CHCl₃/MeOH/H₂O 50:15:1 as eluent yielding nine fractions (B4.2.1–B4.2.9). Fraction B4.2.4 was purified by HPLC with 40 %B to afford pure **5** (21.7 mg). Compounds **6** (17.2 mg) and **7** (5.8 mg) were obtained after purification of fraction B4.2.5 by HPLC using 40 %B as the eluent. Fraction B4.2.6 was purified by HPLC using 40 %B as the eluent to afford compound **1** (39.3 mg). Fraction B4.2.7 was subjected to HPLC purification with 40 %B as the eluent yielding pure **10** (17.9 mg). Compound **8** (21.5 mg) was obtained from fraction B4.2.8 following HPLC purification with 40 %B as the eluent. Fraction B4.4 was separated by CC on silica gel using CHCl₃/MeOH/H₂O 48:20:3 as the eluent yielding five fractions (B4.4.1–B4.4.5), along with pure **4** (158.2 mg) and **3** (69.9 mg). Fraction B4.4.4 was subjected to HPLC separation with 36 %B as the eluent to afford compounds **2** (25.7 mg) and **9** (21.7 mg). Fraction B4.5 was purified by HPLC using a gradient of 20 %B → 37 %B in 30 min to afford more **4** (83.6 mg).

Nudicauloside A (1)

White amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +25.7^\circ$ (*c* 0.19, MeOH); IR (film) ν_{\max} : 3307, 2942, 2831, 1449, 1416, 1113, 1021 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2 and Table 3; HRESIMS *m/z* 1097.5560 [M + Na]⁺ (calcd for C₅₃H₈₆O₂₂Na⁺ 1097.5503).

Nudicauloside B (2)

White amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +16.4$ (*c* 0.23, MeOH); IR (film) ν_{\max} 3354, 2941, 2878, 1745, 1160, 1073, 1028 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2 and Table 3; HRESIMS *m/z* 1259.6013 [M + Na]⁺ (calcd for C₅₉H₉₆O₂₇Na⁺ 1259.6031).

Nudicauloside C (3)

White amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +15.9^\circ$ (*c* 0.41, MeOH); IR (film) ν_{\max} 3370, 2942, 2361, 1747, 1625, 1074, 1030 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2 and Table 3; HRESIMS *m/z* 1275.5978 [M + Na]⁺ (calcd for C₅₉H₉₆O₂₈Na⁺ 1275.5980).

Acid hydrolysis

Compounds **1–3** (3 mg of each) were refluxed in aqueous HCl (10 % v/v, 10 mL) during 4 h. Aglycons were recovered with CHCl₃ and the aqueous layers were neutralized with *N,N*-dioctylmethylamine (10 % in CHCl₃). The sugar residues were acetylated with pyridine/acetic anhydride (1:1, 2 mL) under agitation

during 24 h. The monosaccharide acetates were extracted with EtOAc (3 mL), and the organic fraction was washed successively with sat. aqueous NaHCO₃ (3 × 2 mL), H₂SO₄ 20 % (3 × 2 mL) and water (3 × 1 mL). The samples were subjected to chiral GC-FID analysis and compared to retention times of monosaccharide acetates synthesized from authentic samples.

Evaluation of biological activities

Cell culture

Human skin fibroblasts (WS1, ATCC CRL-1502), human lung carcinoma (A549, ATCC CCL-185), human colon adenocarcinoma (DLD-1, ATCC CCL-221), and RAW 264.7 murine macrophage (ATCC TIB-71) were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) with Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgro), to which were added vitamins, sodium pyruvate and non-essential amino acids (all at a 1:100 v/v dilution of supplied solutions), 10 % fetal bovine serum (Hyclone), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 mg/mL). Cells were maintained at 37 °C in a humidified environment containing 5 % CO₂.

Cytotoxic assay

Exponentially growing cells (WS1, A549 and DLD-1) were transferred in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells/well in 100 μL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in DMSO were diluted with culture medium and added to the wells (100 μL/well). The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5 % to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed after incubation for 48 h and using resazurin (λ_{ex} 530nm, λ_{em} 590 nm) (O'Brien et al., 2000) on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1 plate reader (Labsystems). Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentages were defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Cytotoxicity results were expressed as means ± standard deviation and represent the concentration inhibiting 50 % of cell growth (IC₅₀). The values were compared to etoposide, used as a positive control.

Anti-inflammatory activity

Exponentially growing RAW 264.7 murine macrophages were transferred in 96-well microplates (Falcon, BD) at a density of 7.5×10^4 cells/well in 100 μL of culture medium and were allowed to adhere overnight. Cells were then incubated for 24 h with either culture medium (blank), L-NAME (positive

control, 250 μ M) or increasing concentrations of **1–3** dissolved in DMSO. The final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.25 %. Cells were then stimulated with 100 ng/mL LPS and incubated for 24 hours. Cell-free supernatants were collected, and the NO concentration was immediately determined using the Griess reaction (Green et al., 1990) with minor modifications (Legault et al., 2010).

Antioxidant activity

The procedure was modified from the method described by Ou et al. (2001). Briefly, the ORAC assay was carried out with a Fluoroskan Ascent FI™ plate reader (Labsystems). Trolox was used as a control standard. The experiment was conducted at 37.5 °C and pH 7.4, with a blank sample in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence of fluorescein every 1 min after addition of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). The final results were calculated by comparing the net areas under the fluorescein decay curves between the blank and the samples. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram (μ mol TE/mg). The cell-based assay was evaluated using the DCFH-DA, as described by Girard- Lalancette (Coté et al., 2017; Girard-Lalancette et al., 2009). Human skin fibroblasts WS1 were incubated with compounds dissolved in DMSO at different concentrations. Quercetin was used as a positive control and expressed with the IC₅₀ values.

Antibacterial and antifungal activities

Antibacterial and antifungal tests were performed following the same method described by Banfi with some modifications (Banfi et al., 2003; Georges et al., 2012). The compounds were incubated with different strains depending on the kind of test. Antibacterial activity was measured comparing *E. coli* and *S. aureus* results with gentamycin as reference. Instead of the antifungal activity, which one is evaluated on *C. albicans* and compared to amphotericin B. Results are all expressed at the IC₅₀.

Conclusion

In summary, two of the oleanolic glycosides isolated from *Aralia nudicaulis* have been shown to possess moderate anti-inflammatory activity. The antioxidant capacity of **3** was evaluated from its oxygen radical absorption capacity (ORAC, expressed in Trolox equivalent per unit mass), and the concentration inhibiting 50 % of cellular oxidation (IC₅₀), as monitored by the fluorochrome DCFH-DA (Girard-Lalancette et al., 2009). Because of the lack of mass, only the compound **3** exhibited weak antioxidant

activities, with an ORAC value of 0.35 ± 0.09 $\mu\text{mol TE/mg}$ and an IC_{50} of 74 ± 18 μM . The results were compared to the quercetin as a positive control, with an ORAC value of 24 ± 3 $\mu\text{mol TE/mg}$ and an IC_{50} of 0.268 ± 0.017 μM . Weak antioxidant activities were also reported for saponin from *A. taibaiensis* (Xi et al., 2010). Saponin are not expected to be strong chemical antioxidant, but a few triterpenoids showed *in vivo* protective effects in rats (Somova et al., 2003).

Acknowledgments

The authors thank Mr. Patrick Nadeau for plant identification. Also, Julia Kubanek and Les Gelbaum (Georgia Institute of Technology) are kindly acknowledged for the high-field NMR spectroscopy experiments. Finally, we thank Karl Girard-Lalancette and Audrey Bélanger for the pharmacological assays.

Authors' contributions

JP, DR and QL carried out this study. SL, VM, JL and AP designed the experiments and supervised the work. SL, JP, JL and AP wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Agrawal, P.K., 1992. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307-3330.
- Ahmad, V.U., Perveen, S., Bano, S., 1990. Saponins from the leaves of *Guaiacum officinale*. *Phytochemistry* 29, 3287-3290.
- Banfi, E., Scialino, G., Monti-Bragadin, C., 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 796-800.
- Bi, L., Tian, X., Dou, F., Hong, L., Tang, H., Wang, S., 2012. New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of *Aralia taibaiensis*. *Fitoterapia* 83, 234-240.
- Chen, M., Wu, W.W., Nanz, D., Sticher, O., 1997. Leonticins D-H, five triterpene saponins from *Leontice kiangnanensis*. *Phytochemistry* 44, 497-504.
- Chen, Y., Chiu, M.H., Gu, K., Li, Z.R., 2003. Cucurbitacin and triterpenoid glycosides from *Hemsleya giganthy*. *Chin. Chem. Lett.* 14, 475-478.
- Cioffi, G., Dal Piaz, F., Vassallo, A., Venturella, F., De Caprariis, P., De Simone, F., De Tommasi, N., 2008. Antiproliferative Oleanane Saponins from *Meryta denhamii*. *J. Nat. Prod.* 71, 1000-1004.

- Coté, H., Boucher, M.A., Pichette, A., Legault, J., 2017. Anti-inflammatory, antioxidant, antibiotic, and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and its constituents. *Medicines* 4.
- Gauthier, C., Legault, J., Rondeau, S., Pichette, A., 2009. Synthesis of betulinic acid acyl glucuronide for application in anticancer prodrug monotherapy. *Tetrahedron Lett.* 50, 988-991.
- Georges, P., Legault, J., Lavoie, S., Grenon, C., Pichette, A., 2012. Diterpenoids from the buds of *Pinus banksiana* Lamb. *Molecules* 17, 9716-9727.
- Girard-Lalancette, K., Pichette, A., Legault, J., 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chem.* 115, 720-726.
- Gottlieb, H.E., Kotlyar, V., Nudelman, A., 1997. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* 62, 7512-7515.
- Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs Jr, J.B., Nacy, C.A., 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 144, 278-283.
- Hu, M., Ogawa, K., Sashida, Y., Xiao, P.-G., 1995. Triterpenoid glucuronide saponins from root bark of *Aralia armata*. *Phytochemistry* 39, 179-184.
- Ik, S.L., Jin, W., Zhang, X., Tran, M.H., Kyung, S.S., Yeon, H.S., Bae, K., 2006. Cytotoxic and COX-2 inhibitory constituents from the aerial parts of *Aralia cordata*. *Arch. Pharmacol. Res.* 29, 548-555.
- Jia, L., Zhao, Y., 2009. Current evaluation of the millennium phytochemistry- Ginseng (I): Etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations. *Curr. Med. Chem.* 16, 2475-2484.
- Kawai, H., Nishida, M., Tashiro, Y., Kuroyanagi, M., Ueno, A., Satake, M., 1989. Studies on the structures of udosaponins A,B,C,D,E, and F from *Aralia cordata* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 2318-2321.
- Kim, J.S., Kang, S.S., 1998. Saponins from the aerial parts of *Aralia continentalis*. *Nat. Prod. Sci.* 4, 45-50.
- Kuang, H.X., Wang, Z.B., Wang, Q.H., Yang, B.Y., Xiao, H.B., Okada, Y., Okuyama, T., 2013. Triterpene glucosides from the leaves of *aralia elata* and their cytotoxic activities. *Chem. Biodiversity* 10, 703-710.
- Lee, E.B., Kim, O.J., Kang, S.S., Jeong, C., 2005. Araloside A, an antiulcer constituent from the root bark of *Aralia elata*. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 523-526.
- Lee, J.H., Ha, Y.W., Jeong, C.S., Kim, Y.S., Park, Y., 2009. Isolation and tandem mass fragmentations of an anti-inflammatory compound from *aralia elata*. *Arch. Pharmacol. Res.* 32, 831-840.
- Legault, J., Girard-Lalancette, K., Grenon, C., Dussault, C., Pichette, A., 2010. Antioxidant activity, inhibition of nitric oxide overproduction, and in vitro antiproliferative effect of maple sap and syrup from *Acer saccharum*. *Journal of medicinal food* 13, 460-468.
- Li, H., O'Neill, T., Webster, D., Johnson, J.A., Gray, C.A., 2012. Anti-mycobacterial diynes from the Canadian medicinal plant *Aralia nudicaulis*. *J. Ethnopharmacol.* 140, 141-144.
- Li, Y., Yue, R., Liu, R., Zhang, L., Wang, M., 2016. Secondary metabolites from the root of *Aralia echinocaulis* Hand. -Mazz. *Records of Natural Products* 10, 639-644.
- Ma, Z.Q., Zhang, Y., Cai, C.K., Li, Q., Ni, J., 2013. Two new triterpenoid saponins from the leaves of *Aralia elata*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 15, 849-854.
- Miyase, T., Shiokawa, K.-I., Zhang, D.M., Ueno, A., 1996a. Araliasaponins I-IX, triterpene saponins from the roots of *Aralia decaisneana*. *Phytochemistry* 41, 1411-1418.
- Miyase, T., Sutoh, N., Zhang, D.M., Ueno, A., 1996b. Araliasaponins XII-XVIII, triterpene saponins from the roots of *Aralia chinensis*. *Phytochemistry* 42, 1123-1130.
- Moerman, D.E., 1998. Native american ethnobotany. Timber Press Inc.

- Nhiem, N.X., Lim, H.Y., Kiem, P.V., Minh, C.V., Thu, V.K., Tai, B.H., Quang, T.H., Song, S.B., Kim, Y.H., 2011. Oleanane-type triterpene saponins from the bark of *Aralia elata* and their NF- κ B inhibition and PPAR activation signal pathway. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 6143-6147.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421-5426.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food. Chem.* 49, 4619-4626.
- Piochon, M., Legault, J., Gauthier, C., Pichette, A., 2009. Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural a-bisabolol b-d-fucopyranoside and analogues. *Phytochemistry* 70, 228-236.
- Shaker, K.H., Bernhardt, M., Elgamal, M.H.A., Seifert, K., 1999. Triterpenoid saponins from *Fagonia indica*. *Phytochemistry* 51, 1049-1053.
- Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., 2016. *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J.Wen: An overview of pharmacological studies. *Phytomedicine* 23, 1409-1421.
- Somova, L.O., Nadar, A., Rammanan, P., Shode, F.O., 2003. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine* 10, 115-121.
- Song, S.J., Nakamura, N., Ma, C.M., Hattori, M., Xu, S.X., 2000. Four new saponins from the root bark of *Aralia elata*. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 838-842.
- Song, S.J., Nakamura, N., Ma, C.M., Hattori, M., Xu, S.X., 2001. Five saponins from the root bark of *Aralia elata*. *Phytochemistry* 56, 491-497.
- Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94, 219-243.
- Suh, S.-J., Jin, U.-H., Kim, K.-W., Son, J.-K., Lee, S.H., Son, K.-H., Chang, H.W., Lee, Y.-C., Kim, C.-H., 2007. Triterpenoid saponin, oleanolic acid 3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (OA) from *Aralia elata* inhibits LPS-induced nitric oxide production by down-regulated NF- κ B in raw 264.7 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 467, 227-233.
- Tian, Z., Lin, G., Zheng, R.X., Huang, F., Yang, M.S., Xiao, P.G., 2006. Anti-hepatoma activity and mechanism of ursolic acid and its derivatives isolates from *Aralia decaisneana*. *World Journal of Gastroenterology* 12, 874-879.
- Xi, M., Hai, C., Tang, H., Wen, A., Chen, H., Liu, R., Liang, X., Chen, M., 2010. Antioxidant and antiglycation properties of triterpenoid saponins from *Aralia taibaiensis* traditionally used for treating diabetes mellitus. *Redox Rep.* 15, 20-28.
- Xiao, K., Yi, Y.H., Wang, Z.Z., Tang, H.F., Li, Y.Q., Lin, H.W., 1999. A cytotoxic triterpene saponin from the root bark of *Aralia dasycphylla*. *J. Nat. Prod.* 62, 1030-1032.
- Yu, S.-S., Yu, D.-Q., Liang, X.-T., 1994. Triterpenoid saponins from the roots of *Aralia spinifolia*. *J. Nat. Prod.* 57, 978-982.
- Zhang, Y., Ma, Z., Hu, C., Wang, L., Li, L., Song, S., 2012. Cytotoxic triterpene saponins from the leaves of *Aralia elata*. *Fitoterapia* 83, 806-811.
- Zhang, Y., Peng, Y., Li, L., Zhao, L., Hu, Y., Hu, C., Song, S., 2013. Studies on cytotoxic triterpene saponins from the leaves of *Aralia elata*. *Food Chem.* 138, 208-213.
- Zou, M.-L., Mao, S.-L., Sang, S.-M., Xia, Z.-H., Lao, A.-N., 2001. Two new triterpenoid saponins from *Aralia subcapitata*. *Nat. Prod. Lett.* 15, 157-161.

CHAPITRE IV

PARTIE EXPERIMENTALE

Ce chapitre présente l'ensemble des travaux effectués durant ce projet de maîtrise, ainsi que les détails non abordés dans l'article scientifique. En effet, bien que le projet fût principalement concentré sur l'*Aralia nudicaulis*, des traitements ont également été effectués parallèlement sur l'*Aralia hispida*. Les influences biologiques des deux plantes ainsi que leurs criblages phytochimiques ont alors été comparés respectivement par test biologique et CCM, afin de déterminer l'espèce possédant le meilleur potentiel d'étude. Les méthodes employées jusqu'à l'obtention et la caractérisation de la phase butanol de l'*Aralia nudicaulis* sont détaillées à la section IV.B, et les résultats obtenus à la section V.

A. MATERIEL VEGETAL

La récolte des deux espèces, l'*Aralia nudicaulis* et l'*Aralia hispida*, s'est effectuée en forêt dans le secteur du lac Simoncouche, près de Laterrière au Québec (Latitude : 48°23'07'' ; Longitude : -71°25'07''). Cueillies durant l'été 2016 entre juin et juillet, les racines et les feuilles ont été récoltées séparément. Les matières végétales ont été mises à sécher pendant plusieurs semaines avant d'être broyées finement.

B. EXTRACTIONS

1. Extraction par solvant à reflux

Chaque partie (racines et feuilles) de l'*Aralia nudicaulis* a subi une extraction reflux dans 3 solvants successifs : le dichlorométhane (DCM), le méthanol (MeOH), et un mélange eau/méthanol en proportions 70:30 (v/v). Chaque extraction a nécessité un volume de 5 L de solvant, d'une durée d'extraction d'1 h 30, et a été répétée 3 fois pour maximiser le rendement. Etant donné les masses conséquentes disponibles pour chaque partie de la plante (1,6 kg de chaque environ), les expériences ont toutes été répétées 2 fois sur des masses d'environ 500 g.

Concernant l'*Aralia hispida*, de plus petites masses d'environ 30 g (racines et feuilles de chaque) ont été extraites à l'aide d'un montage de type Soxhlet. Chaque partie broyée a été déposée dans une cartouche de cellulose à double épaisseur de 60 mm de diamètre et 120 mm de hauteur. De la même façon que pour l'*Aralia nudicaulis*, les solvants d'extraction, le DCM, le MeOH et un mélange eau/MeOH (70:30 v/v) ont été utilisés successivement, avec pour chacun un volume de 700 mL. Les manipulations ont été lancées sur 10 heures pour les feuilles et 5 heures pour les racines (Figure 13).

2. Partition des composés par extraction liquide-liquide

Tel que montré à la Figure 13, les extraits méthanoliques de chaque partie d'*Aralia nudicaulis* ont été traités par extraction liquide-liquide dans une ampoule de 2 L. Des extraits d'environ 50 g

ont été pesés, puis dissous dans 500 mL d'eau. Chacune des phases aqueuses a été traitée avec 500 mL d'acétate d'éthyle (AcOEt) puis 500 mL de butanol. Les extractions ont été effectuées entre 4 et 6 fois par solvant selon le stade d'épuisement en composés de la phase aqueuse. Avant d'être utilisé pour l'extraction, le butanol a été saturé en eau puis laissé à décanter pendant une nuit. Le rapport des volumes pour la préparation du butanol saturé est de (3:2) (v/v) (Butanol : Eau).

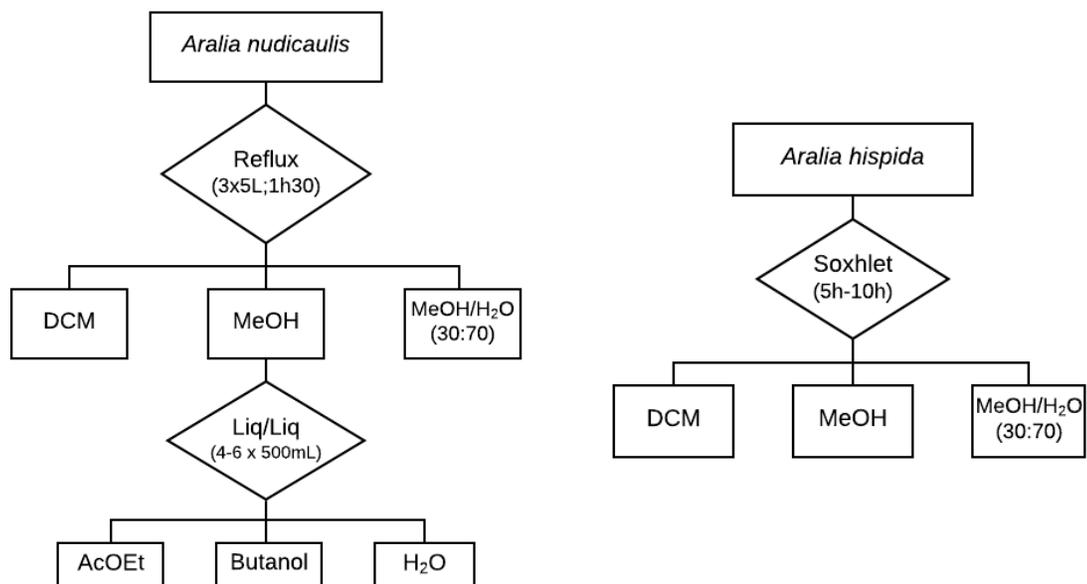


Figure 13. Organigrammes des extractions réalisées sur les feuilles et les racines de l'*A. nudicaulis* et l'*A. hispida*

C. METHODES D'ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES

1. Chromatographie sur couche mince CCM

Les extractions ont été accompagnées d'un suivi par chromatographie sur couche mince (CCM). Les dépôts ont été effectués sur des plaques d'aluminium recouvertes de silice et de C18, d'épaisseur de 200 μm et d'un indicateur UV à $\lambda = 254 \text{ nm}$. Le milieu d'élution utilisé a été un mélange $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ dans les proportions 26:14:3 (v/v/v). Les plaques ont été révélées par 2 révélateurs différents selon la famille de molécules ciblée. Pour les saponines triterpéniques, une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 20 % dans du méthanol a été pulvérisée sur celles-ci. Concernant les flavonoïdes et autres composés phénoliques, le réactif de Neu a été privilégié. Il consiste en l'application successive de 2 solutions : l'une de 2-aminoethyl diphenylborinate dissous à 1 % dans du méthanol (NP), et l'autre de polyéthylèneglycol dissous à 5 % dans de l'éthanol (PEG). Après révélation, les plaques ont été chauffées dans une étuve à 100 °C pendant 3 à 5 minutes. Enfin, elles ont été observées en UV à 365 nm et dans le visible pour les saponines triterpéniques, et pour les composés phénoliques seulement à 365 nm.

2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse HPLC-MS

L'ensemble des fractions ont été analysées par un système de chromatographie liquide haute performance, couplé à un spectromètre de masse (RP-HPLC-DAD/UV-ESI-APCI-MS). Les analyses

ont été lancées avec trois objectifs distincts : la composition chimique des fractions, l'optimisation des méthodes d'isolation effectuées sur HPLC préparative et l'identification de polyphénols par comparaison avec des témoins. Les produits ont été élués sur une colonne C18 de chez Phenomenex (Kinetex 5 μ XB-C18 100A 250 x 4.6 mm). Les éluions ont suivi différents gradients de MeOH ou d'acétonitrile (MeCN) dans l'H₂O, où chacun a été acidifié avec 0,1 % d'acide formique (HCOOH). Certaines éluions ont également été effectuées en isocratique. Les volumes d'injections ont été de 10 μ L, le débit de 1 mL/min et les longueurs d'onde d'analyse de λ (DAD): 365 ; 320 ; 280 ; 254 ; 210 nm. Le spectromètre de masse a été réglé sur le mode d'ionisation négative, les autres paramètres sont détaillés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). Il est à noter que tous les échantillons injectés ont été préalablement filtrés sur des membranes avec des pores de 0,45 μ m.

Tableau 4. Paramètres du spectromètre de masse

Set up MSD (english)	Paramètres du MSD (français)	Paramétrages
Mode ionization	Mode d'ionisation	Scan MM-ES+APCI
Polarity	Polarité	Négative
Mass Range (m/z)	Echelle de masse (m/z)	100.00 - 1000.00
Fragmentor	Fragmenteur	70
Gain	Gain	1
Threshold	Seuil	150
Step Size	Pas de mesure	0.10
Drying Gas Flow (L/min)	Débit du gaz (L/min)	5.0
Nebulizer Pressure (psig)	Pression du nébuliseur (psig)	40
Drying Gas Temperature (°C)	Température du gaz (°C)	350
Vaporizer Temperature (°C)	Température de vaporiseur (°C)	250
Capillary Voltage (V)	Tension du capillaire (V)	2000
Corona Current (μ A)	Courant d'effluve (μ A)	4
Charging Voltage (V)	Tension de charge (V)	2000

D. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES PREPARATIVES

1. Chromatographie liquide sur résine (DIAION HP-20)

Les extraits acétate d'éthyle (AcOEt) et butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* ont chacun été soumis à une séparation sur colonne ouverte, remplie d'un polymère de styrene-divinylbenzene (DIAION HP-20). Cette matrice se présente sous la forme de particules poreuses, de la taille de 250 à 850 μm , avec des pores moyens de 26 nm selon le fournisseur Sigma-Aldrich. Les fractionnements ont été effectués sur une colonne en verre de 48 cm de hauteur et de 6,5 cm de diamètre. Les différentes éluions ont respecté un gradient de solvant allant du (100:0) à (0:100) ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$), suivies d'un lavage de la colonne à l'AcOEt. Le nombre de paliers a été adapté selon l'épuisement de l'extrait au gradient considéré. Les volumes récoltés à chacun d'entre eux étaient de l'ordre de 4 L en moyenne.

2. Chromatographie liquide à basse pression sur gel de silice et sur silice greffée C18

Les fractions obtenues des feuilles d'*Aralia nudicaulis* ont été traitées par un système de chromatographie liquide à basse pression, composé de deux modules de pompes à solvant, d'un détecteur UV et d'un collecteur de fractions. Les systèmes d'éluion ont été adaptés à chaque fraction après plusieurs tests sur CCM. Les éluants optimaux utilisés ont été des mélanges de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ à différentes proportions, en éluion soit isocratique, soit par pallier de gradient.

Différentes colonnes ont alors été utilisées selon les quantités d'extraits engagées, allant de 0,4 g à 3 g : des cartouches SiliaSep Flash Cartidge Silicia de chez SiliCycle d'une capacité de 80 g ; une colonne en verre de 5 cm de diamètre et 46 cm de longueur remplie avec 400 g de silice ZEOprep 60 ECO 40-63 μm ; et une cartouche à phase inverse SiliaSep Cartidge C18 de chez SiliCycle d'une capacité de 120 g.

3. Chromatographie liquide préparative RP-HPLC-DAD/UV

Afin d'isoler les saponines triterpéniques contenues dans les feuilles d'*Aralia nudicaulis*, les fractions enrichies ont été purifiées par chromatographie liquide haute performance à l'échelle préparative (HPLC-Prep.). Le matériel utilisé comprend deux pompes à solvants équipées d'unités de dégazage, d'un collecteur de fractions, d'un détecteur à barrette de diode (DAD) et d'un logiciel d'ordinateur. Les méthodes d'élution ont été développées sur HPLC-MS analytique afin de les optimiser selon le temps de rétention de chaque molécule isolée. Les éluants utilisés ont été des mélanges d'acétonitrile et d'eau, chacun acidifié avec 0,1 % d'une solution d'acide formique (HCOOH). Les purifications ont été effectuées sur une colonne Kinetex 5 μm XB-C18 (100 Å 250 x 21,20 mm) de chez Phenomenex. Le débit était de 20 mL/min, les volumes d'injection de 50 μL et les longueurs d'onde d'analyse allaient de 200 à 600 nm. Les chromatogrammes sont présentés à 207 \pm 4 nm, car cette longueur d'onde est la plus optimale pour observer les saponines triterpéniques (Chominot 2000; Marston *et al.* 2000; Oleszek et Bialy 2006).

E. METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

1. Spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI-MS

Des analyses de spectroscopie de masse à haute résolution (HR-MS) ont été lancées sur l'ensemble des molécules isolées afin d'en déterminer la masse exacte. En collaboration avec NanoQAM, l'appareil qui a été utilisé est un spectromètre de modèle 6210 TOF-MS (Agilent Technologies), en mode d'ionisation par électronébulisateur (ESI).

2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN

Les caractérisations structurales des 13 molécules isolées ont été réalisées par un spectromètre de résonance magnétique nucléaire 400 MHz Bruker. L'appareil a permis l'acquisition de spectres 1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135, APT, TOCSY) et 2D (^1H - ^1H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC). Les déplacements chimiques (δ) sont rapportés en ppm et calibrés sur le pic du TMS. Les analyses des données ont été réalisées sur le logiciel MestReNova.

3. Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme GC-FID

Afin de déterminer la nature et la stéréochimie des sucres greffés aux aglycones triterpéniques isolés, des injections comparatives à des témoins de monosaccharides ont été injectées sur une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). Les conditions d'utilisation et les paramètres de l'appareil sont détaillés au tableau ci-dessous (Tableau 5). Avant d'analyser les sucres, les saponines sont soumises à une hydrolyse en milieu acide, suivi d'une acétylation des monosaccharides obtenus, dont les protocoles sont détaillés dans la section IV.E.6.

Tableau 5. Paramètres et conditions d'utilisation du GC-FID

Chromatogramme :	Agilent Technologies 7890A GC System
Colonne :	Chirale CHIRAMIX
Longueur :	30 m
Diamètre interne :	0,25 mm
Film :	0,25 μm
Numéro de série :	CM090502
Volume d'injection :	1 μL
Détecteur :	FID
T° Injecteur :	230 °C
T° Détecteur :	250 °C
T° Colonne initiale :	120 °C (1 minute)
T° Colonne gradient :	4 °C/min
T° Colonne finale :	180 (120 minutes)

4. Spectroscopie Infrarouge

Des analyses complémentaires ont été lancées pour caractériser les nouvelles molécules isolées, comme l'analyse infrarouge. Elle a été effectuée sur un appareil de spectroscopie à transformée de Fourier (FTIR), de modèle Cary 630 FTIR de chez Agilent Technologies. Les solutions ont préalablement été préparées à des concentrations d'environ 6 mg/mL puis déposées sur une pastille de NaCl pour l'analyse.

5. Pouvoir rotatoire

L'activité optique a été déterminée par un polarimètre automatique Autopol IV Rudolph Research Analytical, dans une cellule d'un volume de 6,4 mL. Les résultats ont été obtenus par le calcul de la moyenne de trois réplicats.

6. Hydrolyse acide et acétylation de monosaccharides greffés aux saponines triterpéniques

Les nouvelles saponines ont été soumises successivement aux procédés d'hydrolyse en milieu acide et d'acétylation, effectuées selon la procédure de Mskhiladze et al. (Mskhiladze *et al.* 2015). Des masses de l'ordre de 5 mg de produit ont été solubilisées dans 10 mL d'une solution d'HCl à 10 %, et mis à l'étuve à 100 °C pendant 4 h à pression atmosphérique. La phase aqueuse enrichie a été neutralisée avec une solution basique de N,N-dioctylmethylamine à 10 % dans du CHCl₃, puis lavée une dernière fois avec du CHCl₃ pur. Les monosaccharides ont par la suite été acétylés avec 1 mL d'anhydride acétique dans 1 mL de pyridine, et placés sous agitation à température ambiante et pression atmosphérique pendant 24 heures. Un volume de 3 mL d'AcOEt a été ajouté, puis la phase organique a été lavée plusieurs fois successivement à l'eau, une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée (NaHCO₃), une solution d'acide sulfurique à 20 % (H₂SO₄ 20 %) et à l'eau à nouveau. Les monosaccharides acétylés ont par la suite été séchés par un sel de sulfate de magnésium et filtrés sur un montage de type Büchner.

F. METHODES BIOLOGIQUES

L'activité biologique des fractions jugées potentiellement intéressantes ont été évaluées. Les tests utilisés ont permis d'évaluer les activités cytotoxique, antioxydante, anti-inflammatoire et antifongique des extraits, fractions et composés. Tous les échantillons ont été solubilisés dans du DMSO, avec une concentration en plaque inférieure à 0,5 % afin d'éviter que sa toxicité interfère avec les tests.

1. Évaluation de l'activité cytotoxique

La cytotoxicité a été évaluée sur deux lignées de cellules cancéreuses (de poumons A549, et colorectales DLD-1), ainsi que sur une lignée de cellules fibroblastes saines (WS-1) pour déterminer la sélectivité des échantillons. Selon le principe de ce test (O'Brien *et al.* 2000), les échantillons ont d'abord été solubilisés à différentes concentrations, puis incubés avec 5000 cellules de chaque lignée pendant 48 heures sous atmosphère humidifiée en présence de 5 % de CO₂. Deux sondes ont été utilisées pour quantifier le nombre de cellules. La première sonde, la résazurine, permet de mesurer l'activité métabolique des cellules. Ce composé est réduit en résorufine, un fluorochrome dont la fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FLTM en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 530 nm et une longueur d'onde d'émission à 590 nm. Une deuxième sonde, le réactif de Hoechst, a également été utilisée pour évaluer la cytotoxicité. Les cellules ont été lysées avec le sodium dodecyl sulfate (SDS) à 0,01 % afin d'en libérer le contenu, puis le réactif de Hoechst a ensuite été ajouté. Cette sonde interagit avec les brins d'ADN pour créer un complexe fluorescent. La

quantification de cette fluorescence est effectuée par un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FL™, en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 355 nm et une longueur d'onde d'émission à 460 nm. À l'aide des courbes obtenues, la concentration qui inhibe 50 % de la croissance cellulaire (IC₅₀) a été déterminée. L'étoposide, un agent cytotoxique connu, a été utilisé comme témoin positif.

2. Évaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de deux tests: cellulaire et ORAC. Les modes opératoires sont décrits dans l'article de K. Lalancette (Girard-Lalancette *et al.* 2009) avec quelques modifications.

Le test antioxydant cellulaire mesure la capacité antioxydante d'une substance sur des cellules fibroblastes saines (WS-1). Pour cela, des plaques de 96 puits comprenant 10 000 cellules par puit sontensemencées et incubées à 37 °C en présence de 5 % de CO₂ sous atmosphère humidifiée. Après 24 heures, les cellules sont lavées avec 150 µL d'une solution tampon de phosphate salin (PBS) à un pH de 7,4, puis remises à incuber durant 30 min avec une solution saline isotonique (Hank's Balanced Salt Solution HBSS) contenant 5 µM de 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). Ce dernier composé est un fluorochrome permettant de déterminer l'oxydation intra-cellulaire. Les cellules sont ensuite à nouveau lavées avec 150 µL de PBS. Pour obtenir l'activité antioxydante, elles sont ensuite incubées pendant 1 heure avec des concentrations croissantes des composés testés en absence ou présence de 200 µM de *tert*-butylhydroperoxide (t-BuOOH). La fluorescence des puits est alors mesurée immédiatement après l'ajout du t-BuOOH, et à nouveau après 90 minutes par un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FL™, dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 485 nm et 538 nm (Ou *et al.* 2001). Les résultats sont exprimés en IC₅₀, et comparés à trois témoins positifs : la quercétine, le Trolox et la catéchine.

Le test ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) détermine, quant à lui, la capacité des composés à neutraliser les radicaux peroxy de la fluorescéine, une sonde fluorescente désactivée après oxydation (Ou *et al.* 2001). Un gradient de 16 concentrations d'échantillons est préparé sans réplication. Les expériences se déroulent à 37,5 °C dans une solution de tampon phosphate 75 mM à pH 7,4, avec un blanc en parallèle. La fluorescence est mesurée par un lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FLTM toutes les minutes après ajout d'une solution oxydante à 375 µM, le 2,2'-azobis(2-méthylpropionamide) dihydrochloride (AAPH). L'appareil est réglé avec les mêmes conditions d'utilisation que pour le test antioxydant cellulaire. La cinétique dure au total 60 minutes, puis les résultats sont calculés en comparant les aires sous les courbes de diminution de la fluorescence entre les échantillons et le blanc. Les résultats sont comparés au Trolox comme témoin positif, et exprimés en micromoles d'équivalents de Trolox (TE) par milligramme d'échantillon (µmol TE/mg).

3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Le test anti-inflammatoire consiste à mesurer l'inhibition de la production d'oxyde nitrique (NO) synthétisé par des macrophages de souris (RAW 264.7) (Green *et al.* 1990). Le mode opératoire est décrit dans l'article de D. Dufour (Dufour *et al.* 2007) avec quelques modifications. Des plaques de 96 puits sontensemencées avec $7,5 \times 10^5$ cellules et 100 µL de milieu de culture, puis incubées pendant une nuit à 37 °C en présence de 5 % de CO₂ sous atmosphère humidifiée. Les cellules sont ensuite traitées ou non avec des concentrations croissantes d'échantillons, ou un contrôle positif de N(ω)-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME). La plaque est mise à incuber dans les mêmes conditions que précédemment pendant 24 heures, avant que les cellules soient stimulées avec une solution à 100 ng/mL de lipopolysaccharide (LPS), dans le but de provoquer une réaction inflammatoire chez les macrophages et de stimuler la production de NO. Après 24 heures

d'incubation, les surnageants sont récoltés puis mis au contact du réactif de Griess (Green *et al.* 1990) qui permet de mettre en évidence la présence de NO par dosage colorimétrique. L'absorbance des puits est alors mesurée par un lecteur de plaque Varioskan réglé à 540 nm, en comparaison à des standards de nitrite de sodium (NaNO₂).

4. Évaluation de l'activité antifongique

Le test antifongique consiste à la mise en contact des échantillons testés avec la levure *Candida albicans*. Le protocole employé est le même que celui décrit par Banfi pour les tests antibactériens avec quelques modifications (Banfi *et al.* 2003). Une mesure d'absorbance est effectuée à l'aide d'un appareil de lecture de plaque Varioskan, réglé à la longueur d'onde de 540 nm. La diminution de l'absorbance permet de déterminer l'inhibition de la croissance de *C. albican* induite par les extraits et composés. Les plaques sont incubées de 18 à 24 heures à une température de 37 °C, et les résultats sont exprimés en concentration inhibant 50 % de la croissance de *C. albican* (IC₅₀).

CHAPITRE V

RESULTATS

A. RENDEMENTS ET ACTIVITES DES EXTRAITS D'ARALIA

L'évaluation de l'activité biologique et l'analyse phytochimique des deux différentes espèces, l'*Aralia nudicaulis* et l'*Aralia hispida*, ont été réalisées. Chaque partie des plantes a été extraite successivement par des solvants de polarité croissante (DCM, MeOH, MeOH:H₂O (30:70) (v/v)). Les rendements obtenus et les meilleurs résultats aux tests biologiques sont détaillés dans les tableaux ci-dessous (Tableau 6 et 7). Les autres résultats (antifongique, antioxydant et cytotoxique) sont détaillés en Annexe III - 2. Spectre ¹H RMN de l'hémigiganoside B (4)

Annexe III - 3.

Tableau 6. Rendements des extractions à chaud des différentes parties de l'*A. nudicaulis* et de l'*A. hispida*

Espèces	Parties	Masses sèches traitées (g)	Rendement d'extraction à chaud (%)		
			DCM	MeOH	MeOH:H ₂ O (30:70)
<i>Aralia hispida</i>	Feuilles	26,0	6,15	18,08	9,23
<i>Aralia hispida</i>	Racines	35,9	2,51	10,03	3,62
<i>Aralia nudicaulis</i>	Feuilles	1095,9	3,78	15,34	4,74
<i>Aralia nudicaulis</i>	Racines	1084,8	3,74	8,51	2,58

Tableau 7. Résultats des tests anti-inflammatoire et antioxydant sur les extraits des différentes parties de l'*A. nudicaulis* et de l'*A. hispida*

Espèces	Parties	IC ₅₀ anti-inflammatoire (µg.mL ⁻¹)			IC ₅₀ antioxydant (µg.mL ⁻¹)		
		DCM	MeOH	MeOH:H ₂ O (30:70)	DCM	MeOH	MeOH:H ₂ O (30:70)
<i>Aralia hispida</i>	Feuilles	>160	>160	>160	-	3 ± 0,6	10 ± 2
<i>Aralia hispida</i>	Racines	3,4 ± 0,7	>160	>160	8 ± 2	8,7 ± 0,8	4,2 ± 0,7
<i>Aralia nudicaulis</i>	Feuilles	20 ± 3	>160	>160	3 ± 2	6 ± 2	0,07 ± 0,03
<i>Aralia nudicaulis</i>	Racines	>160	31 ± 11	>160	2,7 ± 0,4	0,38 ± 0,09	0,28 ± 0,03
Trolox		-			0,22 ± 0,03		
Quercetin		-			0,047 ± 0,009		
Catechin		-			0,31 ± 0,04		

Les extraits présentant une IC₅₀ la plus faible en test anti-inflammatoire sont les racines d'*Aralia hispida* au DCM, ainsi que les feuilles et racines d'*Aralia nudicaulis*, respectivement

extraites au DCM et au MeOH. Concernant les tests antioxydant cellulaire, les extraits ayant montré un meilleur potentiel sont issus de l'*Aralia nudicaulis*. Avec des valeurs d'IC₅₀ proches de celles des témoins, les extraits MeOH:H₂O (30:70) des feuilles et des racines, ainsi que l'extrait des racines au MeOH présentent les meilleurs résultats. La suite du projet a donc été orientée sur les deux parties de la plante de l'espèce *Aralia nudicaulis*.

Les extraits méthanoliques des deux parties de la plante ont été traités par extraction liquide-liquide. Les extractions ont été faites successivement avec de l'acétate d'éthyle et du butanol saturé, choisis pour leur polarité et leur affinité avec les molécules d'intérêt et leur non miscibilité avec la phase aqueuse. Les rendements obtenus sont détaillés au Tableau 8. Des analyses sur CCM ont été effectuées sur chaque fraction issue des extractions liquide-liquide afin d'étudier sommairement leurs compositions phytochimiques.

Tableau 8. Rendements des extractions liquide-liquide sur l'extrait MeOH de l'*A. nudicaulis*

Espèce	Parties	Masses extrait MeOH engagées (g)	Rendement d'extraction liquide-liquide (%)		
			AcOEt	Butanol	H ₂ O
<i>Aralia nudicaulis</i>	Feuilles	45,3 (a)	9,93 (b)	20,35 (c)	43,49 (d)
<i>Aralia nudicaulis</i>	Racines	45,5 (e)	7,65 (f)	19,34 (g)	69,89 (h)

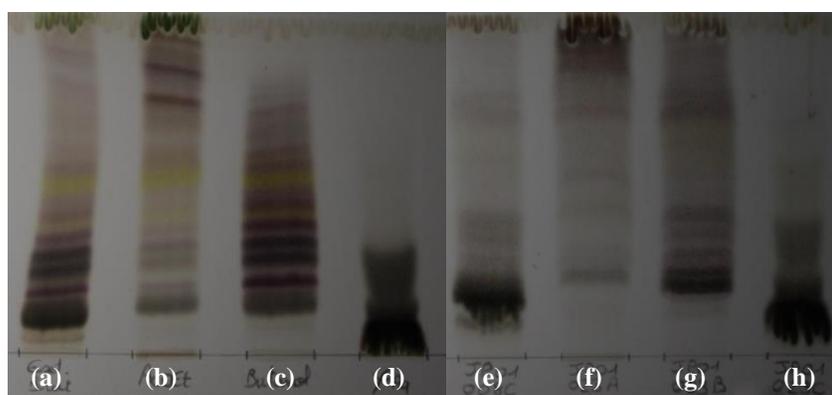


Figure 14. CCM des extraits d'*A. nudicaulis* révélés au H₂SO₄ dans le domaine du visible (légende tableau 8)

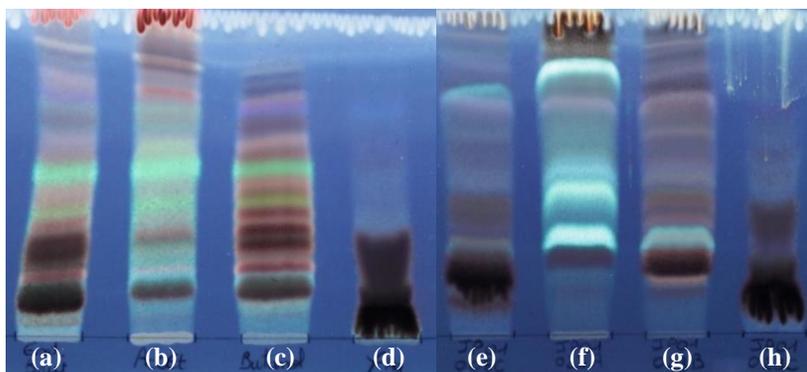


Figure 15. CCM des extraits d'*A. nudicaulis* révélés au H_2SO_4 à 365 nm (légende tableau 8)

Comme en témoignent les figures Figure 14 et Figure 15, la composition des feuilles d'*Aralia nudicaulis* est plus complexe que celle des racines. La comparaison des photos prises dans le visible et dans l'UV après révélation ont permis de mettre en évidence les différentes familles de molécules présente dans chaque partie. Les feuilles sont ainsi plus riches en polyphénols (jaune dans le visible) et en saponines triterpéniques (violet), tandis que les racines sont plus riches en sucres (bleu à 365 nm). On note également la présence de chlorophylles (vert dans le visible) et de lipides (marron) dans la partie moins polaire des extraits (Wagner et Bladt 1996).

La suite du projet a ainsi été orientée exclusivement sur les feuilles d'*Aralia nudicaulis*, afin d'en étudier la composition plus en détail.

B. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT MEOH DES FEUILLES D'ARALIA NUDICAULIS

Les travaux de fractionnement ont débuté sur l'extrait à l'AcOEt, car son élution sur CCM présentait des composés bien séparés et donc plus facilement isolables (voir bande d'élution (b) sur Figure 15).

1. Extrait AcOEt de l'extraction liquide-liquide des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Une masse de 3,2569 g d'extrait sec a été séparée grossièrement une première fois sur colonne en verre ouverte, remplie d'une résine de polymère DIAION HP-20. Le gradient d'élution qui a été utilisé est un mélange H₂O:MeOH allant du plus polaire au moins polaire, avec sept paliers de pourcentage détaillés dans l'organigramme en Annexe I - 2. Organigramme du fractionnement de l'extrait AcOEt des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Annexe I - 3. Organigramme du fractionnement de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* Annexe I - 4. Afin d'évaluer la séparation des composés, les fractions ont été éluées sur

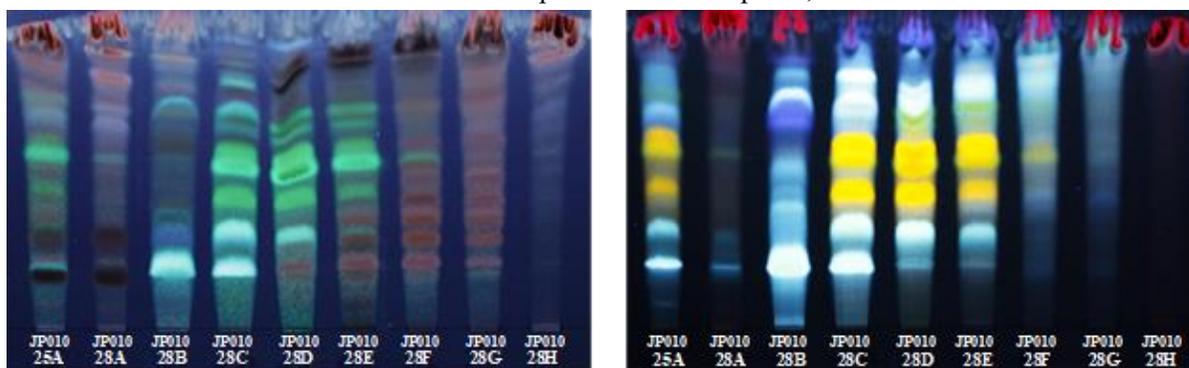


Figure 16. CCM du fractionnement de la fraction JP01025A (extrait AcOEt des feuilles d'*A. nudicaulis* extraites au méthanol) révélées au H₂SO₄ (gauche) et au NPPEG (droite) à 365 nm (légende en annexe I - 1)

CCM (Figure 16).

Les fractions JP01028C, JP01028D et JP01028E enrichies en polyphénols ont par la suite été réunies pour une séparation plus optimale. Cette dernière s'est à nouveau effectuée sur colonne en verre ouverte DIAION HP-20, avec un gradient MeOH:H₂O allant de 20 à 100 % en MeOH. Les fractions ont par la suite été réunies en fonction de leurs similitudes des tâches sur CCM, pour conduire à trois fractions : la JP01031A, la JP01031B et la JP01031C, présentées à la Figure 17.

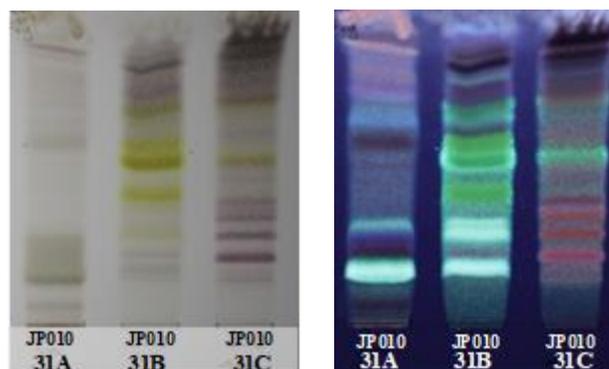


Figure 17. CCM des fractions JP01031A, JP01031B et JP01031C révélées au H₂SO₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite)

La fraction JP01031C, enrichie en saponines, a quant à elle été traitée par un système de séparation sur colonne de silice sous basse pression. L'éluion s'est faite en conditions isocratiques avec un gradient CHCl₃:MeOH (5:1), de manière à isoler les dernières traces présentes de polyphénols dans la fraction JP01032A, comme le montre la Figure 18.

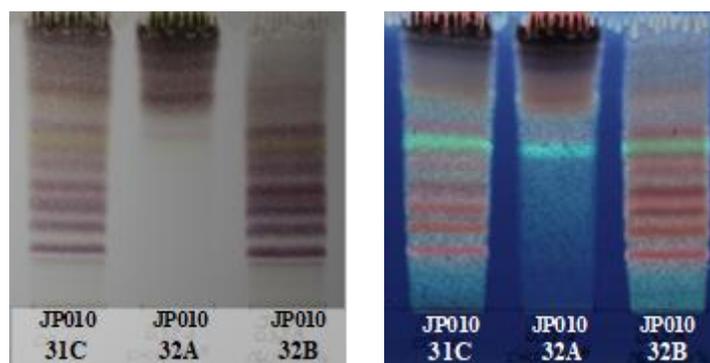


Figure 18. CCM du fractionnement de la fraction JP01031C révélée au H₂SO₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite)

2. Extrait butanol de l'extraction liquide-liquide des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

La masse de 8,4889 g d'extrait sec au butanol saturé a été séparée une première fois sur une colonne en verre ouverte, remplie d'une résine de polymère DIAION HP-20. De la même façon que précédemment, le gradient d'éluion utilisé a été un mélange H₂O:MeOH, avec quatre paliers de pourcentage détaillés dans l'organigramme en Annexe I - 5. Organigramme du fractionnement de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Annexe I - 6. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036B issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées) Annexe I - 7.

La composition des fractions obtenues a été évaluée par CCM comme le montre la Figure 19.

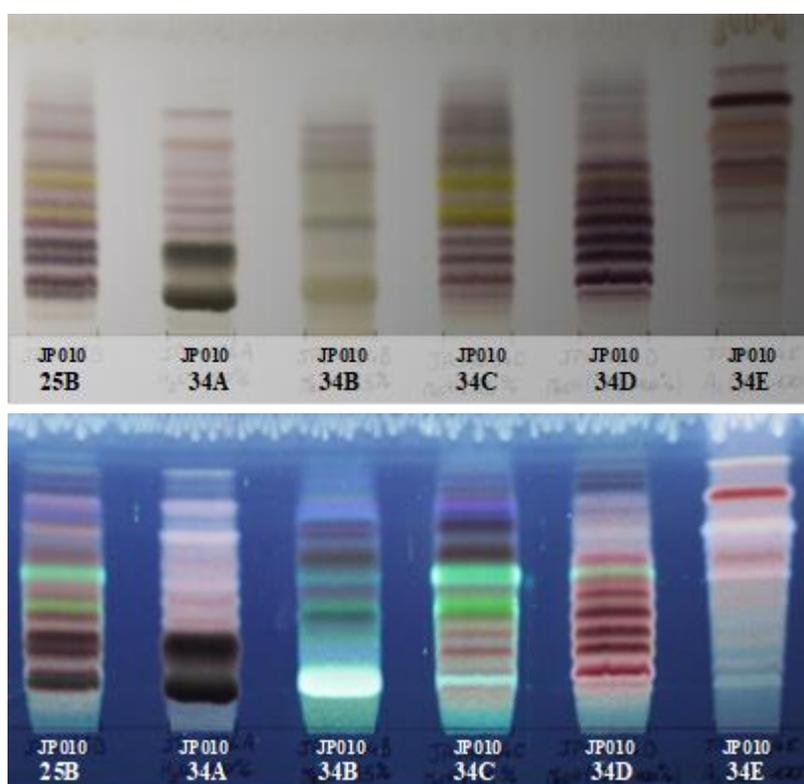


Figure 19. CCM du fractionnement de la fraction JP01025B (extrait butanol des feuilles d'*A. nudicaulis* extraites au méthanol) révélée au H₂SO₄ dans le visible (haut) et à 365 nm (bas) (légende en Annexe 2)

Etant donné la richesse en saponines triterpéniques ainsi que la masse de la fraction JP01034D (m = 3,0468 g), le projet s'est poursuivi sur cette dernière. De plus, une étude visant à comparer la

composition de la fraction JP01034D avec la JP01032B (précédemment isolée de la phase AcOEt) a permis de réunir les deux fractions afin de traiter une plus grande masse de produit par la suite (Figure 20).

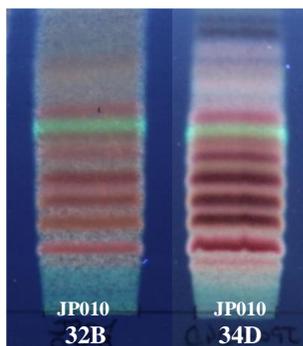


Figure 20. Comparaison par CCM des fractions JP01032B et JP01034D (H_2SO_4 à 365 nm)

Comme présenté à la Figure 21. CCM du fractionnement de la fraction JP01034D révélée au H_2SO_4 dans le visible (haut) et à 365 nm (bas)

Tableau 9. Conditions d'élution sur HPLC Préparative des échantillons issus de la fraction JP01036B. Figure 22, la fraction JP01034D résultante a été séparée sur une colonne en verre, remplie par une phase stationnaire de 400 g de silice, avec un écoulement à basse pression. L'élution s'est faite en conditions isocratiques, avec un mélange $CHCl_3:MeOH:H_2O$ (26:14:3). Les cinq fractions obtenues ont été éluées sur plaques CCM.

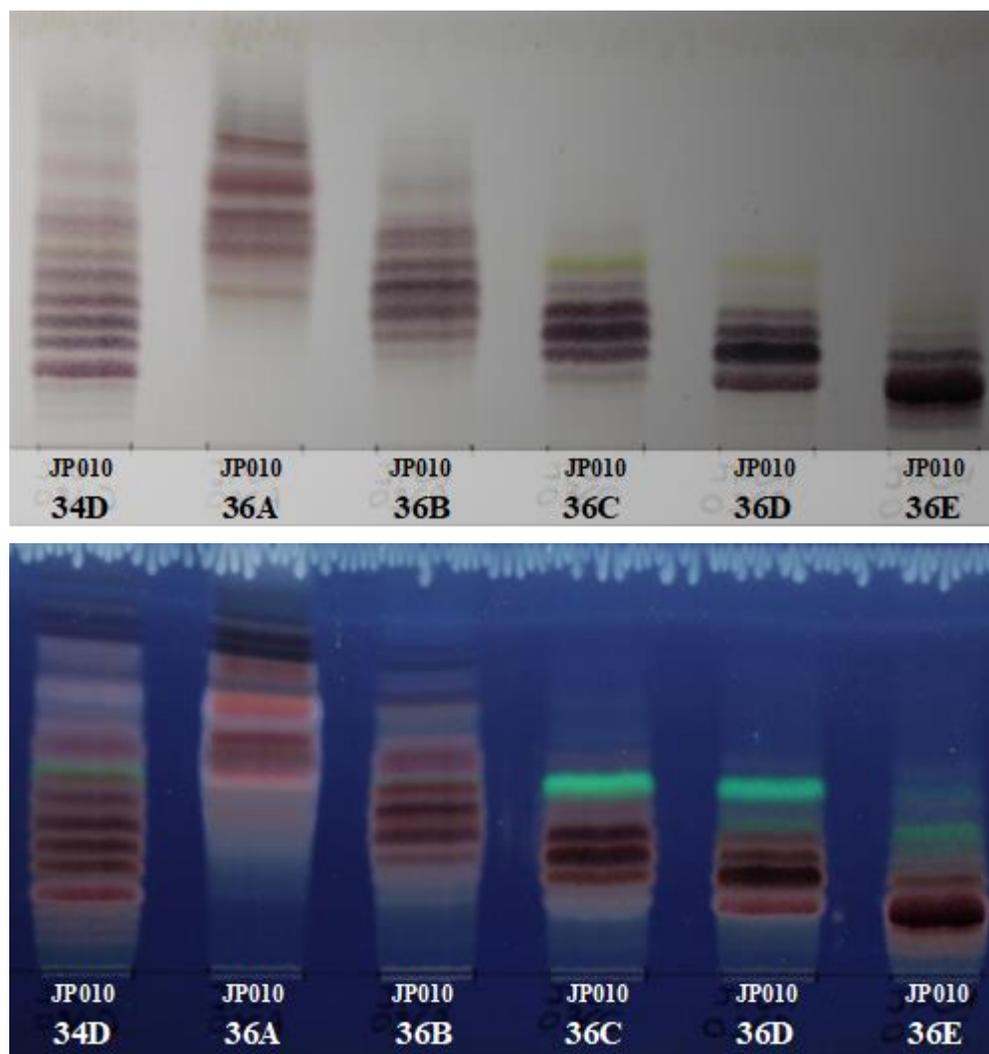


Figure 21. CCM du fractionnement de la fraction JP01034D révélée au H_2SO_4 dans le visible (haut) et à 365 nm (bas)

Tableau 9. Conditions d'éluion sur HPLC Préparative des échantillons issus de la fraction JP01036B Figure 22. CCM du fractionnement de la fraction JP01034D révélée au H_2SO_4 dans le visible (haut) et à 365 nm (bas)

Les fractions JP01036B, JP01036C, JP01036D et JP01036E sont fortement enrichies en saponines triterpéniques. À ce stade, la suite du projet s'est orientée sur des étapes d'isolations des différentes molécules contenues dans ces quatre fractions.

C. ISOLATION DES SAPONINES TRITERPENIQUES PAR HPLC PREPARATIVE

1. Fraction JP01036B

La fraction JP01036B a préalablement été fractionnée sur une colonne de 80 g de silice à basse pression. Après plusieurs essais préliminaires sur CCM, l'élution a été effectuée dans des conditions isocratiques avec un mélange CHCl_3 :MeOH:H₂O en proportions (50:15:1) (Annexe I - 8. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036B issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)

Annexe I - 9. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036C issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (Annexe I - 10). Les produits obtenus (JP01087A à JP01087I) ont par la suite été analysés par HPLC-MS afin d'identifier les fractions contenant des saponines triterpéniques. Les analyses ont également permis d'optimiser les conditions d'élution afin d'isoler chaque molécule d'intérêt par HPLC préparative. Les conditions correspondant à chaque fraction sont détaillées dans le Tableau 10. Conditions d'élution sur HPLC Préparative des échantillons issus de la fraction JP01036B

Figure 23. Chromatogramme de la fraction JP01087F sur HPLC Préparative (Tableau 11).

Echantillon	Masse engagée	% MeCN acidifié	% MeCN acidifié	Temps d'élution
Tableau 10. Conditions d'élution sur HPLC Préparative des échantillons issus de la fraction JP01036B				
JP01087D	51,4	39	41	1,33
JP01087E	91,8	39	45	10
JP01087F	120,2	39	41	7,33
JP01087G	93,0	38	39	5,33
JP01087H	91,9	39	41	7,33

Le chromatogramme présenté à la Figure 24. Chromatogramme de la fraction JP01087F sur HPLC Préparative

Figure 25. Masses (m/z) des fragments correspondant au produit JP01087F-A en ionisation négative (Figure 26 illustre l'isolation par HPLC préparative de la molécule contenue dans la fraction JP01087F. À la suite, la Figure 27. Masses (m/z) des fragments correspondant au produit JP01087F-A en ionisation négative

Figure 28. CCM du fractionnement de la fraction JP01036C révélée au H₂SO₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite)Figure 29 montre son analyse MS. Les chromatogrammes des autres molécules sont présentés en Annexe II - 2. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01087D-A

Annexe II - 3 à 9.

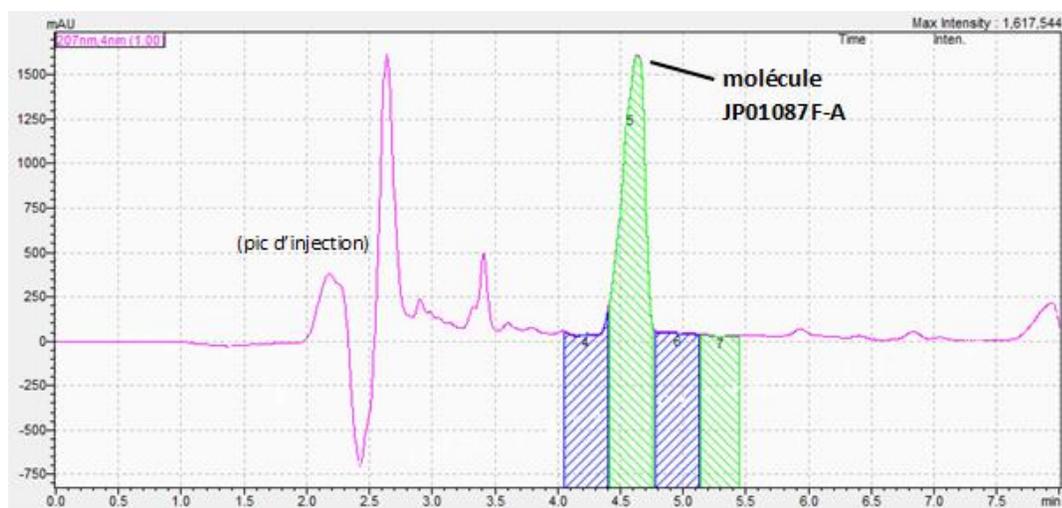
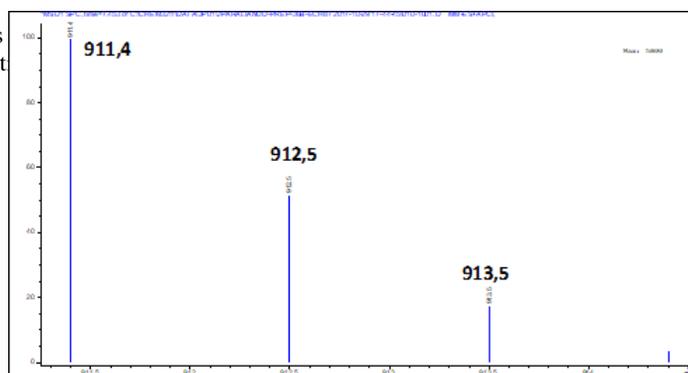


Figure 24. Chromatogramme de la fraction JP01087F sur HPLC Préparative

Figure 25. Masses
Chromatogramme de la fract



on négativeFigure 26.

Figure 27. Masses (m/z) des fragments correspondant au produit JP01087F-A en ionisation négative

Figure 28. CCM du fractionnement de la fraction JP01036C révélée au H₂SO₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite) Figure 29. Masses (m/z) des fragments correspondant au produit JP01087F-A en ionisation négative

Six molécules ont ainsi pu être isolées dans les fractions JP01087D-A, JP01087E-A, JP01087E-B, JP01087F-A, JP01087G-A et JP01087H-A à travers le travail effectué sur la fraction JP01036B (en jaune dans l'organigramme en Annexe I - 8. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036B issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)

Annexe I - 9. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036C issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* Annexe I - 10).

2. Fraction JP01036C

Après plusieurs essais de gradients d'éluion sur CCM, la fraction JP01036C a été séparée en phase inverse sur une colonne de type C-18 de 120 g. L'éluant utilisé a été un mélange MeOH:H₂O allant de 35 à 100% en MeOH (Annexe I - 11. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036C issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Annexe I - 12. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036D issue de l'extrait

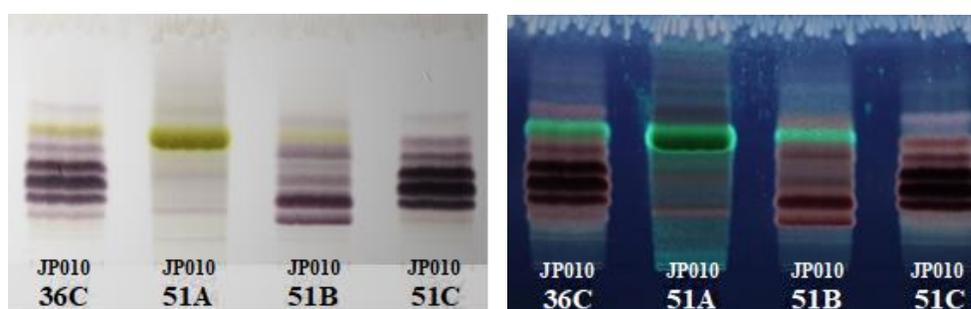


Figure 30. CCM du fractionnement de la fraction JP01036C révélée au H₂SO₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite)

Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)Annexe I - 13).

Les trois fractions obtenues ont été déposées sur plaques CCM comme le montre la Figure 30. CCM du fractionnement de la fraction JP01036C révélée au H₂SO₄ dans le visible (gauche) et à 365 nm (droite)

Tableau 12. Conditions d'éluion sur HPLC préparative des échantillons JP01057B et JP01057D issus de la fraction JP01036DFigure 31.

La CCM a révélé la présence de 2 saponines triterpéniques majoritaires et facilement isolables dans la fraction JP01051B. Cette dernière a donc été fractionnée par HPLC préparative, dont les conditions sont détaillées dans l'organigramme présenté à l'Annexe I - 11. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036C issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Annexe I - 12. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036D issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)Annexe I - 13. Malheureusement, les deux molécules issues de ce fractionnement ont été isolées en trop faibles quantités pour être identifiées. En revanche, la fraction JP01051C a été utilisée pour enrichir la fraction JP01036D en masse de produit potentiellement isolable.

3. Fraction JP01036D

La fraction JP01036D a préalablement été fractionnée sur une colonne de 80 g de silice à basse pression. L'élution a été effectuée dans des conditions isocratiques avec un mélange CHCl₃:MeOH:H₂O en proportions (48:20:3) (Annexe I - 14. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036D issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)

Annexe I - 15. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036E issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (Annexe I - 16). Les produits obtenus (JP01057A à JP01057I) ont par la suite été analysés par HPLC-MS afin de déterminer les fractions comportant des saponines triterpéniques. Les analyses ont également permis d'optimiser les conditions d'isolation sur HPLC préparative des fractions JP01057B et JP01057D, qui ont chacune révélé contenir deux molécules majoritaires isolables. Leurs conditions de fractionnement respectives sont détaillées au Tableau 13.

Tableau 13. Conditions d'élution sur HPLC préparative des échantillons JP01057B et JP01057D issus de la fraction JP01036D

Echantillon	Masse engagée sur HPLC Prep. (mg)	% MeCN acidifié de départ	% MeCN acidifié d'arrivée	Temps d'élution (min)
JP01057B	81,2	34	39	12
JP01057D	89,4	34	37,5	12

Conditions d'élution sur HPLC préparative des échantillons JP01057B et JP01057D issus de la fraction JP01036D

Figure 32. Chromatogrammes comparatifs des fractions JP01057H et JP01057I injectés dans les mêmes conditions (Tableau 14, donnant suite à l'isolation de quatre molécules dont les chromatogrammes et analyses MS sont détaillées aux Annexes II - 12. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments correspondant aux produits JP01057B-A (milieu) et JP01057B-B (bas)

Annexe II - 13. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments correspondant aux produits JP01057D-A (milieu) et JP01057D-B (bas)Annexe II - 14 et 6.

De plus, trois fractions issues directement de la basse pression sur JP01036D contiennent chacune une molécule pure : les fractions JP01057F, JP01057H et JP01057I (Annexe II - 18. Chromatogramme d'HPLC (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01057F

Annexe II - 19. Chromatogramme d'HPLC (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01057HAnnexe II - 20 et 8). Après comparaison des

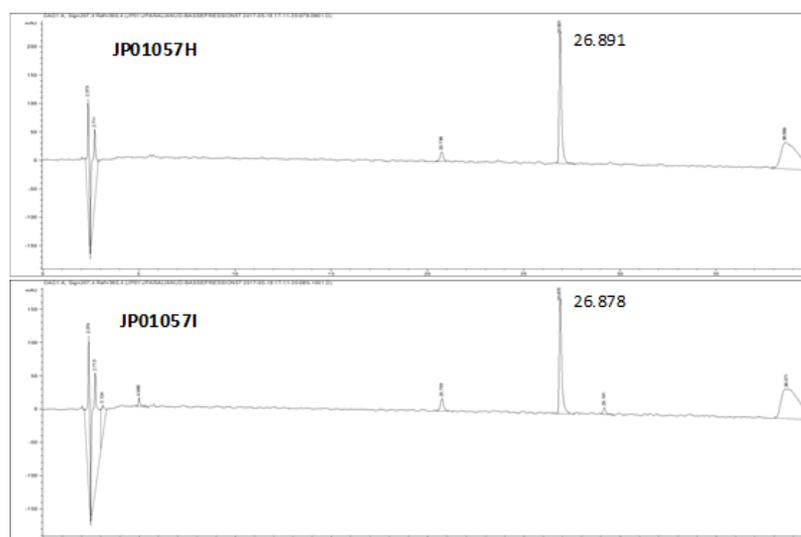


Figure 33. Chromatogrammes comparatifs des fractions JP01057H et JP01057I injectés dans les mêmes conditions temps de rétention sur HPLC et des masses sur MS, il s'est avéré que les fractions JP01057H et JP01057I contenaient la même molécule (Figure 33. Chromatogrammes comparatifs des fractions JP01057H et JP01057I injectés dans les mêmes conditions

Figure 34. Chromatogramme du fractionnement par HPLC Préparative de la fraction JP01036E (Figure 35). Ces deux fractions ont donc été réunies afin d'enrichir la masse en produit final.

Le fractionnement de la fraction JP01036D a ainsi conduit à l'isolation de six autres saponines triterpéniques, contenues dans les feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune dans l'organigramme en Annexe I - 14. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036D issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)

Annexe I - 15. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036E issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* Annexe I - 16).

4. Fraction JP01036E

La fraction JP01036E a été traitée par HPLC préparative, sur une colonne de type C-18 avec un gradient en MeCN acidifié allant de 20 à 37% pendant 30 minutes (Annexe I - 17. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036E issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Annexe II - 1. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01087D-A Annexe I - 18). Les différentes fractions ont été récoltées comme détaillé dans le chromatogramme de la Figure 36. Chromatogramme du fractionnement par HPLC Préparative de la fraction JP01036E

Tableau 15. Masses des 13 saponines triterpéniques isolées à partir de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Aralia nudicaulis* Figure 37.

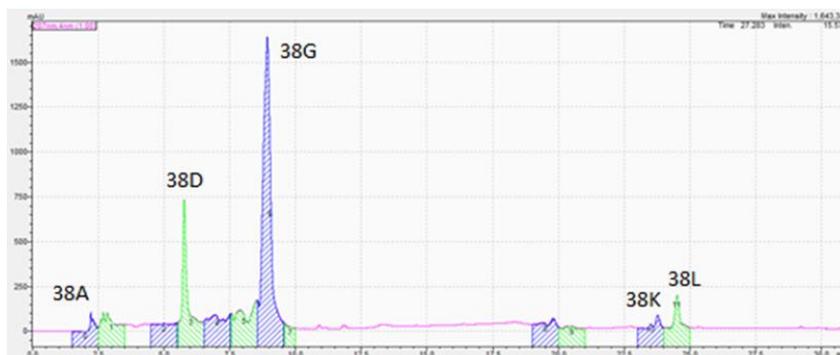


Figure 36. Chromatogramme du fractionnement par HPLC Préparative de la fraction JP01036E

Comme observé préalablement sur la CCM (Figure 21. CCM du fractionnement de la fraction JP01034D révélée au H₂SO₄ dans le visible (haut) et à 365 nm (bas)

Tableau 9. Conditions d'élution sur HPLC Préparative des échantillons issus de la fraction JP01036B (Figure 22), la tache majoritaire correspond à la fraction JP01038G (Annexe II - 24. Chromatogramme d'HPLC préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01038G

Annexe II - 25. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'acide chlorogénique (bas) (Annexe II - 26) ainsi qu'au pic majoritaire du chromatogramme. C'est également la seule fraction dont les quantités sont suffisamment conséquentes pour poursuivre les étapes de caractérisation.

Au total, le fractionnement de l'extrait MeOH des feuilles d'*Aralia nudicaulis* a conduit à l'isolation de 13 saponines triterpéniques, dont les quantités obtenues sont résumées dans le tableau (Tableau 16. Masses des 13 saponines triterpéniques isolées à partir de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Tableau 17. Données RMN ¹H ¹³C des sept saponines triterpéniques connues isolées (4-10) (Tableau 18).

Tableau 16. Masses des 13 saponines triterpéniques isolées à partir de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Nom échantillon	Masse (g)
JP01038G	0,0836
JP01057B-A	0,0273
JP01057B-B	0,0116
JP01057D-A	0,0217
JP01057D-B	0,0257
JP01057F	0,1582
JP01057HI	0,0699
JP01087D-A	0,0123
JP01087E-A	0,0172
JP01087E-B	0,0058
JP01087F-A	0,0393
JP01087G-A	0,0179
JP01087H-A	0,0215

D. CARACTERISATION DES MOLECULES ISOLEES

Afin de déterminer la structure des molécules, des analyses 1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135, APT, TOCSY) et 2D (^1H - ^1H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC) ont été effectuées par RMN. Des échantillons d'environ 10 mg ont été dissous dans différents solvants, et analysés dans celui où chaque produit était le mieux solubilisé. Les spectres ^1H et ^{13}C des molécules sont présentes aux Annexe III - 2. Spectre ^1H RMN de l'hemsgiganoside B (4)

Annexe III - 3 à 14.

1. Caractérisation des aglycones par RMN

Les saponines de type oléanane possèdent un squelette de 30 carbones, avec une insaturation entre les carbones 12 et 13, une fonction alcool sur le carbone 3 et un acide carboxylique sur le carbone 28. Ces structures ont pour conséquence de marquer un fort déblindage des carbones 28, 12 et 3, qui ont pour déplacement approximatif respectif 177, 123, et 88 ppm. De plus, le proton en position C-18 a la caractéristique de se présenter sous la forme d'un doublet dédoublé aux constantes de couplages d'environ $J=3.5$ et 13.5 Hz. Ce dédoublement et ces constantes sont souvent révélateurs de protons en couplage vicinal avec deux autres protons portés par le même carbone. Lorsque les analyses le permettent, il est d'ailleurs possible d'observer ces mêmes caractéristiques pour les protons en position C-3 et C-12.

Les analyses ont permis de mettre en évidence trois sous-types d'aglycones différents : l'acide oléanolique, l'acide échinocystique et l'hédéragénine. Ces deux derniers sont des dérivés de l'acide oléanolique, avec une fonction alcool supplémentaire respectivement sur le carbone en position 16 ou 23. Les spectres ^1H et ^{13}C montrent alors des déplacements chimiques spécifiques à

4.41 ppm (δ C-16: 75.2 ppm) dans le méthanol- d_4 pour l'acide échinocystique, et à 4.30 et 3.74 (d, $J=10.7$ Hz) ppm (δ C-23: 64.8 ppm) dans la pyridine- d_5 pour l'hédéragénine.

2. Informations supplémentaires sur la caractérisation de la portion sucre des saponines par RMN

L'hémisgiganoside B (**4**) a été solubilisée dans le DMSO. Son spectre ^1H a démontré la présence de trois protons anomériques aux déplacements chimiques δ de 5.22 ppm (d, $J=7.9$ Hz, 28-O-Glc), 4.19 ppm (d, $J=7.7$ Hz, Glc-6^{IV}-Glc), et 4.12 ppm (d, $J=5.3$ Hz, 3-O-GlcU). Le spectre ^{13}C a révélé un carbone à un δ de 173.6 ppm qui n'est couplé à aucun proton. Ce dernier est caractéristique du groupement acide carboxylique présent sur la position C-6 de l'acide glucuronique.

La guaiacin B (**5**) et l'araliasaponin I (**6**) et l'araliasaponin III (**10**) ont quant à elles été solubilisées dans le méthanol- d_4 . Les spectres ^1H de ces trois molécules ont démontré la présence de trois protons anomériques aux déplacements chimiques δ de 5.23 ppm (d, $J=8.1$ Hz, 28-O-Glc), 4.16 ppm (d, $J=7.3$ Hz, 3-O-Ara), et de (4.43-4.50) ppm (d, $J=7.6$ Hz, 3^I-O-Glc). L'araliasaponin III (**10**) possède un glucose supplémentaire en position 3^{II} de la chaîne de sucre arabinose-glucose, avec un déplacement chimique δ de 4.45 ppm (d, $J=7.8$ Hz, 3^{II}-O-Glc).

Enfin, la prosapogénin (**7**), l'araliasaponin XII (**8**), et IX (**9**) ont toutes les trois été solubilisées dans la pyridine- d_6 . Leurs spectres ^1H ont démontré la présence de trois protons anomériques aux déplacements chimiques δ de (4.79-5.04) ppm (d, $J=6.8$ Hz, 3-O-Ara), 5.30 ppm (d, $J=7.8$ Hz, 2^I-O-Glc), et de 5.55 ppm (d, $J=7.7$ Hz, 3^I-O-Glc). L'araliasaponin XII (**8**) et IX (**9**) possèdent un glucose supplémentaire en position C-28 de la génine, avec un déplacement chimique δ de 6.35 ppm (d, $J=8.0$ Hz, 28-O-Glc).

Certaines molécules similaires ont été isolées dans différentes fractions. Des analyses RMN ^1H ont été effectuées dans le même solvant, puis les spectres ont été superposés afin de confirmer les similitudes. Les spectres des fractions JP01038G/JP01057H, JP01057B-A/JP01087G-A et JP01057B-B/JP01087H-A sont ainsi détaillés en Annexe III - 31. Comparaison des spectres ^1H RMN des fractions JP01038G (rouge) et JP01057H (bleu) correspondant à la molécule du hemsgiganoside B

Annexe III - 32 à 17.

Les caractéristiques RMN de l'ensemble des molécules isolées et connues ont été comparées aux données de la littérature (Tableau 20. Données RMN ^1H ^{13}C des sept saponines triterpéniques connues isolées (4-10)

(Tableau 21). Afin de confirmer les structures de ces dernières, des analyses HR-MS ont également été lancées et les masses comparées aux données scientifiques (Annexe IV - 2. Analyse HR-MS du produit hemsgiganoside B (4)

Annexe IV - 3 à 7). Les molécules connues isolées sont détaillées selon leurs caractéristiques (Tableau 19) et leur structure au chapitre III à la fig.1 (4-10).

Les trois autres fractions non décrites dans cette section (JP01057D-B, JP01057F et JP01087F-A) correspondent aux nouvelles molécules détaillées plus haut dans l'article scientifique (chapitre III). Ces dernières ont suivi le même cheminement scientifique d'élucidation structurale, en complément d'analyses supplémentaires (infra-rouge, pouvoir rotatoire, GC-MS).

Tableau 19. Caractéristiques des sept saponines triterpéniques connues isolées (4-10)

N°	Nom échantillon	Etat	Nom molécule	Formule brute	Masse m/z HR-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$	Référence	CAS
(4)	JP01038G JP01057H	Poudre blanche	Hemsgiganoside B	$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$	979.4862	(Chen <i>et al.</i> 2003)	203514-06-1
(5)	JP01087D-A	Poudre blanche	Guaiacin B	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{17}$	935.4971	(Shaker <i>et al.</i> 1999; Dini <i>et al.</i> 2001)	101021-02-7
(6)	JP01087E-A	Poudre blanche	Araliasaponin I	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$	951.4939	(Song <i>et al.</i> 2000)	289649-54-3
(7)	JP01087E-B	Poudre blanche	Prosapogenin	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$	951.4917	(Chen <i>et al.</i> 1997)	50647-08-0

(8)	JP01057B-B JP01087H-A	Poudre blanche	Araliasaponin XII	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	1097.5531	(Ahmad <i>et al.</i> 1990; Miyase <i>et</i> <i>al.</i> 1996a)	132284- 03-8
(9)	JP01057D-A	Poudre blanche	Araliasaponin IX	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1113.5429	(Song <i>et al.</i> 2001)	340982- 24-3
(10)	JP01057B-A JP01087G-A	Poudre blanche	Araliasaponin III	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1113.5492	(Song <i>et al.</i> 2000)	289649- 66-7

Tableau 20. Données RMN ¹H ¹³C des sept saponines triterpéniques connues isolées (4-10)

No.	(4) (DMSO)		(5) (MeOD)		(6) (MeOD)		(7) (Pyr)		(8) (Pyr)	
	δ (¹ H)	δ (¹³ C)	δ (¹ H)	δ (¹³ C)	δ (¹ H)	δ (¹³ C)	δ (¹ H)	δ (¹³ C)	δ (¹ H)	δ (¹³ C)
aglycon										
3	3.00 (m)	88.2	3.02 (dd, J=4.0, 11.5 Hz)	90.90	3.03 (dd, J= 4.1, 11.6 Hz)	90.92	4.19 (m)	82.43	3.24 (m)	89.3
12	5.16 (br s)	122.2	5.13 (dd)	124.42	5.20 (dd)	124.23	5.47 (dd)	122.87	5.43 (br s)	123.2
16	1.58 (m)	22.9	1.76* (br s)	24.56	4.41 (br s)	75.22	2.08 (m)	23.53	*	24.1
	1.94 (m)						1.92 (m)			
18	2.73 (d, J=12.0 Hz)	40.7	2.73 (dd, J=3.8, 13.8 Hz)	42.72	2.87 (dd, J=3.7, 14.1 Hz)	42.22	3.30 (dd, J=3.4, 13.7 Hz)	41.76	3.20 (m)	42.1
23	0.95 (s)	27.6	0.92 (s)	28.54	0.93 (s)	28.56	4.33 (m)	64.73	1.27 (s)	28.4
							3.74 (d, J=10.7 Hz)			
24	0.67 (s)	16.4	0.67 (s)	17.69	0.72 (s)	16.97	1.08 (s)	13.00	1.10 (s)	17.1
25	0.84 (s)	15.1	0.83 (s)	15.97	0.83 (s)	16.11	0.90 (s)	15.68	0.83 (s)	15.9
26	0.74 (s)	16.6	0.72 (s)	16.95	0.66 (s)	17.75	1.00 (s)	17.08	1.10 (s)	17.8
27	1.07 (s)	25.4	1.03 (s)	26.31	1.24 (s)	27.32	1.22 (s)	25.84	1.25 (s)	26.4
28	-	176.1	-	178.98	-	178.11	-	180.80	-	176.8
29	0.86 (s)	32.7	0.78 (s)	33.55	0.76 (s)	33.41	0.93 (s)	32.99	0.92 (s)	33.5
30	0.85 (s)	23.3	0.80 (s)	23.95	0.83 (s)	25.03	1.01 (s)	23.45	0.90 (s)	24.0
3-O-Sugar	GlcU		Ara		Ara		Ara		Ara	
1 ^I	4.12 (d, J=5.3 Hz)	105.7	4.15 (d, J=7.2 Hz)	107.61	4.17 (d, J=7.4 Hz)	107.59	5.04 (d, J=6.8 Hz)	104.53	4.79 (br s)	105.8
2 ^I	2.94 (m)	73.7	3.58 (d, J=6.0 Hz)	72.39	3.59 (d, J=4.3 Hz)	72.38	4.75(dd, J=7.0, 8.7 Hz)	77.55	4.78 (br s)	77.8
3 ^I	3.10 (m)	72.4	3.51 (m)	84.20	3.51 (m)	84.21	4.18 (m)	83.46	4.36 (m)	83.6
4 ^I	3.02 (m)	70.1	3.90 (s)	69.81	3.90 (br s)	69.80	4.44 (br s)	68.62	4.53 (m)	69.1
5 ^I	3.21 (m)	76.7	3.42 (d, J=12.2 Hz)	66.91	3.43 (d, J=12.5 Hz)	66.92	3.54 (d, J=11.0 Hz)	65.76	3.69 (d, J=12.2 Hz)	66.3
			3.72 (m)		3.73 (m)		4.15 (m)		4.20 (m)	
6 ^I	-	173.6								
2 ^I -O-Glc	-		-		-					
1 ^V							5.30 (d, J=7.8 Hz)	105.12	5.34 (d, J=7.6 Hz)	105.3
2 ^V							4.02 (br s)	75.29	4.03 (m)	75.6
3 ^V							4.26 (br s)	78.36	4.26 (m)	78.7
4 ^V							4.24 (br s)	71.53	4.25 (m)	71.8
5 ^V							3.97 (m)	78.76	3.97 (br s)	78.9
6 ^V							4.51* (dd, J=2.2, 11.8 Hz)	62.48	4.38 (m)	62.8
									4.52 (br s)	

Tableau 13. Données RMN ^1H ^{13}C des sept saponines triterpéniques connues isolées (4-10) (suite)

No.	(9)		(10)	
	δ (^1H)	δ (^{13}C) (Pyr)	δ (^1H)	δ (^{13}C) (MeOD)
aglycon				
3	4.18 (m)	82.66	3.03 (dd, $J=4.0, 11.7$ Hz)	90.1
12	5.42 (br s)	123.24	5.19 (br s)	124.2
16	*	23.70	4.41 (br s)	75.2
18	3.18 (dd, $J=3.0, 13.2$ Hz)	42.04	2.87 (dd, $J=3.4, 14.1$ Hz)	42.2
23	4.30* (m)	64.98	0.93 (s)	28.6
24	1.07 (s)	13.69	0.72 (s)	17.0
25	0.91 (s)	16.46	0.83 (s)	16.1
26	1.11 (s)	17.85	0.66 (s)	17.7
27	1.17 (s)	26.38	1.25 (s)	27.3
28	-	176.78	-	178.1
29	0.88 (s)	33.43	0.76 (s)	33.4
30	0.87 (s)	23.98	0.83 (s)	25.0
3-O-Sugar	Ara		Ara	
1 ^I	5.04 (d, $J=6.7$ Hz)	104.64	4.16 (d, $J=7.3$ Hz)	107.6
2 ^I	4.73 (t, $J=7.6$ Hz)	77.77	3.58 (m)	72.4
3 ^I	4.19 (m)	83.76	3.54 (m)	84.2
4 ^I	4.45 (br s)	68.97	3.90 (br s)	69.9
5 ^I	4.15* (m)	66.14	3.43 (m)	67.0
6 ^I			3.73 (m)	
2 ^I -O-Glc			-	
1 ^V	5.28 (d, $J=7.8$ Hz)	105.24		
2 ^V	4.02 (m)	75.59		
3 ^V	4.26 (m)	78.61		
4 ^V	4.24 (m)	71.80		
5 ^V	3.97 (m)	78.86		
6 ^V	4.37 (m)	62.80		
	4.51 (m)			

No.	(9)		(10)	
	δ (^1H)	δ (^{13}C) (Pyr)	δ (^1H)	δ (^{13}C) (MeOD)
3 ^I -O-Glc				
1 ^{II}	5.55 (d, $J=7.7$ Hz)	104.64	4.50 (d, $J=7.7$ Hz)	105.5
2 ^{II}	4.10 (m)	76.40	3.38 (m)	75.1
3 ^{II}	4.22 (m)	79.04	3.45 (m)	87.7
4 ^{II}	4.22 (m)	72.32	3.34 (m)	70.0
5 ^{II}	3.68 (m)	77.93	3.20 (m)	77.9
6 ^{II}	4.32 (m)	63.28	3.58 (m)	62.6
	4.38 (m)		3.69 (d, $J=12.6$ Hz)	
3 ^{II} -O-Glc	-			
1 ^{III}			4.45 (d, $J=7.8$ Hz)	105.7
2 ^{III}			3.15 (m)	75.9
3 ^{III}			3.18 (br s)	78.5
4 ^{III}			3.14 (m)	71.8
5 ^{III}			3.27 (m)	78.1
6 ^{III}			3.50 (m)	62.9
			3.76 (m)	
28-O-Glc				
1 ^{IV}	6.35 (d, $J=8.1$ Hz)	96.07	5.23 (d, $J=8.1$ Hz)	96.1
2 ^{IV}	4.22 (m)	74.47	3.16 (m)	74.3
3 ^{IV}	4.31 (m)	79.22	3.21 (m)	79.0
4 ^{IV}	4.39 (m)	71.39	3.21 (m)	71.4
5 ^{IV}	4.06 (m)	79.67	3.24 (m)	78.6
6 ^{IV}	4.44 (m)	62.49	3.58 (m)	62.5
	4.48 (m)		3.72 (dd, $J=1.9, 12.0$ Hz)	

* pic(s) non visibles sur les spectres RMN

E. IDENTIFICATION DES POLYPHENOLS

Une partie des travaux de ce mémoire a parallèlement été consacrée à l'identification des polyphénols contenus dans les extraits de feuilles d'*Aralia nudicaulis*. Une des fractions les plus enrichies est la fraction JP01031B, étudiée au chapitre V, section B.1. Une analyse de l'échantillon par HPLC-MS et DAD a été effectuée afin d'évaluer les proportions de chaque polyphénol. Cette dernière a été réalisée avec un gradient de 10 à 50 % en méthanol acidifié dans de l'eau acidifiée, sur une durée de 45 minutes. L'éluion s'est effectuée sur une colonne de type C-18, la détection du DAD à 280 nm, et la spectrométrie de masse en mode d'ionisation positive. Les masses de chacun des pics a été comparée avec la littérature, puis les témoins disponibles au laboratoire ont été injectés dans les mêmes conditions (Annexe II - 27. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'acide chlorogénique (bas)

Annexe II - 28 à 15). Les temps de rétentions et les masses similaires ont permis de confirmer la structure de six polyphénols présents dans la fraction JP01031B (Figure 39. Chromatogramme de la fraction JP01031B et des 6 polyphénols identifiés

Tableau 22. Caractéristiques des 6 polyphénols présents dans la fraction JP01031B Figure 40 et Tableau 23. Caractéristiques des 6 polyphénols présents dans la fraction JP01031B

Figure 41. Chromatogrammes des fractions JP01031A (gauche) et JP01034B (droite) superposés à l'acide chlorogénique (rouge) Tableau 24).

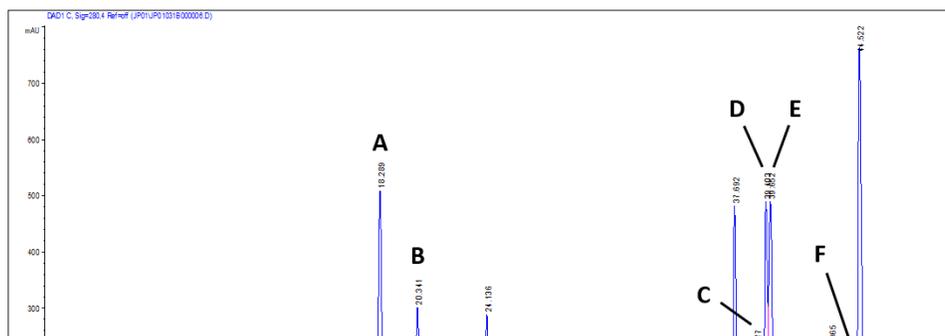
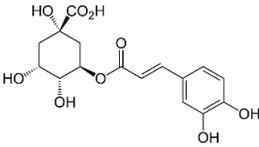
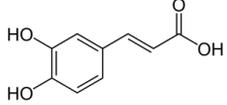
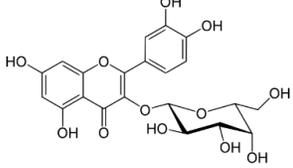
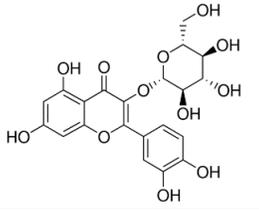
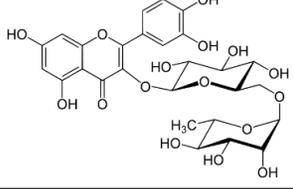
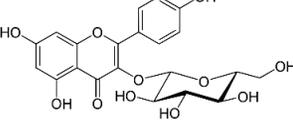


Figure 39. Chromatogramme de la fraction JP01031B et des 6 polyphénols identifiés

Tableau 22. Caractéristiques des 6 polyphénols présents dans la fraction JP01031B Figure 40. Chromatogramme de la fraction JP01031B et des 6 polyphénols identifiés

Tableau 23. Caractéristiques des 6 polyphénols présents dans la fraction JP01031B

No.	Molécule	Tr (min)	Rapport m/z (MS positive mode)	Structure
A	Acide chlorogénique	18.289	355 (100), 163, 195, 356, 377	
B	Acide caféique	20.341	195 (100), 179, 163, 181, 196, 180, 135	
C	Hyperoside	38.877	303 (100), 465, 487, 466, 304, 503	
D	Isoquercitrine	39.403	303 (100), 465, 304, 466, 488	
E	Rutine	39.652	303 (100), 465, 611, 304, 466, 612, 633	
F	Kaempferol-3-glucose (Astragaline)	44.164	287 (100), 449, 471, 450, 288, 487	

À la suite des manipulations, deux autres fractions se sont révélées intéressantes en raison de la présence d'un polyphénol majoritaire : les fractions JP01031A et JP01034B. Après analyses par HPLC-MS et selon la même méthode que pour la fraction JP01031B, les chromatogrammes ont pu être superposés à l'acide chlorogénique (Figure 42. Chromatogrammes des fractions JP01031A (gauche) et JP01034B (droite) superposés à l'acide chlorogénique (rouge)

Tableau 25. Test antioxydant cellulaire sur les fractions enrichies en polyphénols (Figure 43). De plus, les trois fractions se sont révélées avoir des activités antioxydante intéressantes, puisque leurs IC₅₀ sont relativement proches de celle de la quercétine (Tableau 26. Test antioxydant cellulaire sur les fractions enrichies en polyphénols

Tableau 27. Activité anti-inflammatoire des molécules isolées (Tableau 28). Il est à noter que d'autres composés polyphénoliques sont présents dans différentes fractions, mais que leur identité n'a pu être précisée dans le cadre de cette maîtrise par manque de temps.

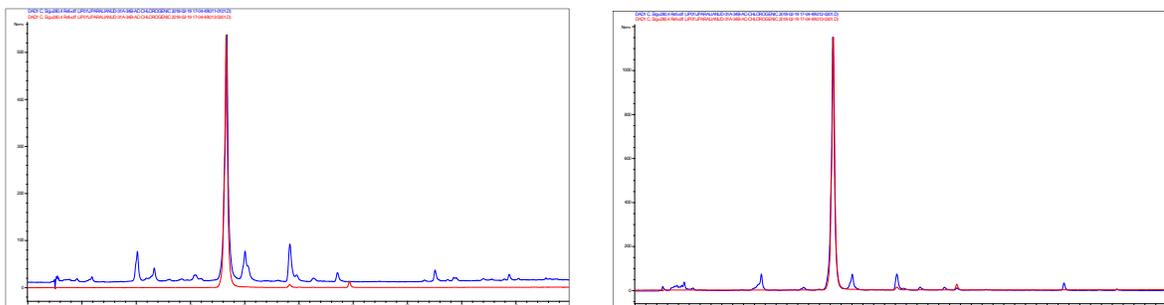


Figure 42. Chromatogrammes des fractions JP01031A (gauche) et JP01034B (droite) superposés à l'acide chlorogénique (rouge)

Tableau 26. Test antioxydant cellulaire sur les fractions enrichies en polyphénols

Échantillons	Antioxydant cellulaire
	IC ₅₀ (µg/mL)
	DCFH-DA sur WS-1
JP01031B	0,31 ± 0,02
JP01031A	3,8 ± 0,5
JP01034B	0,8 ± 0,2
Quercétine	0,17 ± 0,02
Trolox	0,041 ± 0,004
Catéchine	0,09 ± 0,01

F. RESULTATS DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES COMPOSES

Les tests biologiques ont uniquement été effectués sur les fractions dont les quantités disponibles étaient suffisantes. Les valeurs manquantes correspondent aux échantillons qui n'ont pas pu être testés par manque de masse.

1. Propriétés anti-inflammatoires

Tableau 29. Activité anti-inflammatoire des molécules isolées

Échantillon	Molécule	IC ₅₀ (μM)	% inhibition @ (μM)	Toxique à partir de
JP01057B-A	(10)	48 ± 11	62% @ 73 μM	147 μM
JP01057B-B	(8)	-	-	-
JP01057D-A	(9)	-	-	-
JP01057D-B	(2)	102 ± 8	59% @ 129 μM	NA
JP01057F	(3)	>130	10% @ 130 μM	NA
JP01057H	(4)	>160	30% @ 160 μM	NA
JP01087D-A	(5)	-	-	-
JP01087E-A	(6)	73 ± 6	56% @ 86 μM	172 μM
JP01087E-B	(7)	-	-	-
JP01087F-A	(1)	75 ± 11	62% @ 149 μM	NA
L-NAME (250 μM)	-	-	70 ± 7%	-
L-NAME (1 mM)	-	-	86 ± 4%	-

Les tests anti-inflammatoires ont révélé quelques activités modérées. Une partie des molécules n'ont pu être testées par manque de masse des produits. Les plus faibles IC₅₀ sont celles présentées par les molécules 1 et 2, comme exposé dans l'article scientifique au chapitre III. Deux autres molécules possèdent des valeurs d'IC₅₀ faibles, les molécules 6 et 10. Cependant elles possèdent également un seuil de toxicité à respectivement 172 et 147 μM.

2. Propriétés antioxydantes

Tableau 32. Activité antioxydante de la molécule (3) : nudicauloside C

Échantillon	Molécule	Test cellulaire IC ₅₀ (μM)	ORAC (μmol Trolox/mg)
JP01057F	(3)	74 ± 18	0,35 ± 0,09
Quercétine	-	0,268 ± 0,017	23,69 ± 3,03

Les faibles quantités disponibles n'ont malheureusement permis de tester que l'échantillon JP01057F, contenant la nouvelle molécule nudicauloside C (3). En comparaison aux valeurs obtenues avec la quercétine, l'échantillon présente une faible activité antioxydante.

3. Propriétés cytotoxiques

Tableau 35. Activité anticytotoxique des molécules isolées							
Échantillon	Molécule	Résazurine			Hoechst		
		A549D	DLD-1	WS-1	A549D	DLD-1	WS-1
JP01057B-A	(10)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
JP01057B-B	(8)	>200	151 ± 7	110 ± 7	>200	139 ± 12	134 ± 8
JP01057D-A	(9)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
JP01057D-B	(2)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
JP01057F	(3)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
JP01057H	(4)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
JP01087D-A	(5)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
JP01087E-A	(6)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
JP01087E-B	(7)	>200	>200	>200	>200	183 ± 16	>200
JP01087F-A	(1)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Étoposide	-	13 ± 2	6,2 ± 0,8	6 ± 2	7,1 ± 1	5,1 ± 0,7	10 ± 2

Les tests cytotoxiques ne montrent pas de résultat significatif avec des IC₅₀ supérieures à 200 µM sur l'ensemble des échantillons. En utilisant l'étoposide comme référence, aucune molécule isolée dans ce projet ne présente d'activité anti-cancéreuse.

4. Propriétés antifongiques

Tableau 38. Activité antifongique des molécules isolées

Échantillon	Molécule	<i>C. albicans</i>	
		IC ₅₀ (µM)	CI ₉₀ (µM)
JP01057F	(3)	>200	>200
JP01057H	(4)	>200	>200
JP01087F-A	(1)	>200	>200
Amphotericine B	-	1,15 ± 0,05	1,44

Les tests antifongiques ne montrent pas de résultats significatifs avec des IC₅₀ supérieures à 200 µM. La comparaison des valeurs d'IC₅₀ entre les échantillons et la référence montre que les molécules testées ne présentent aucune activité antifongique.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

L'objectif principal du projet consistait à analyser la composition en saponines triterpéniques et polyphénols des feuilles d'*Aralia nudicaulis*, et d'en évaluer sommairement les activités antioxydante, anti-inflammatoire, cytotoxique et antifongique. Le fractionnement de l'extrait méthanolique a permis d'isoler dix saponines triterpéniques, connues ou inconnues. Parmi les sept connues, les araliasaponin I, III, IX et XII, l'hemsgiganoside B, la guaiacin B et la prosapogenin ont été identifiées. Les trois autres saponines ont été caractérisées comme de nouvelles molécules encore jamais rapportées dans la littérature. Elles ont respectivement été nommées nudicauloside A, B et C, et l'élucidation de leurs structures est détaillée dans l'article scientifique (chapitre III).

En parallèle, le fractionnement de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Aralia nudicaulis* a également permis d'identifier six polyphénols, dont deux acides phénoliques : l'acide chlorogénique et l'acide caféique ; et quatre flavonoïdes : la rutine, l'hyperoside, l'isoquercitrine et l'astragaline. L'objectif d'évaluer sommairement la composition en saponines et en polyphénols a donc été atteint. Cependant, plusieurs composés analysés par HPLC-MS dans les fractions enrichies en polyphénols restent encore inconnus. La caractérisation approfondie de ces molécules pourrait donc être une perspective de future recherche.

Les mesures d'activité biologique qui ont pu être effectués sur différentes saponines triterpéniques n'ont pas montré de résultats particulièrement intéressants. Seules deux saponines possèdent une activité anti-inflammatoire modérée (molécules 1 et 2), ainsi qu'une troisième ayant une faible activité antioxydante (3). En revanche, les fractions les plus enrichies en polyphénols ont montrés d'intéressantes activités antioxydante sur les cellules saines. Bien que les résultats aux tests biologiques n'aient été que peu concluants sur les principales molécules d'intérêts, l'objectif d'évaluation des activités a été atteint. La détermination du potentiel pharmacologique et cosmétologique des fractions enrichies en polyphénols pourrait également être une perspective de recherche à approfondir.

Enfin, ce projet a globalement permis d'améliorer les connaissances phytochimiques de l'*Aralia nudicaulis* en s'attardant sur les métabolites secondaires contenues dans ses feuilles. Cependant certaines fractions ont volontairement été écartées des travaux afin de limiter le sujet aux molécules polaires dominantes. Ainsi, il reste passablement des composés à identifier dans l'extrait méthanolique. En somme, cette étude ne présente qu'une partie infime de la composition phytochimique des feuilles d'*Aralia nudicaulis*, ce qui laisse place à d'autres perspectives de recherches.

REFERENCES

Abidov MT, Rio MJ del, Ramazanov TZ, Klimenov AL, Dzhamirze S et Kalyuzhin O V. 2006. Effects of *Aralia mandshurica* and *Engelhardtia chrysolepis* extracts on some parameters of lipid metabolism in women with nondiabetic obesity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 141 : 343–346.

Ahmad VU, Perveen S et Bano S. 1990. Saponins from the leaves of *Guaiacum officinale*. *Phytochemistry*, 29 : 3287–3290.

Ahumada F, Trincado MA et Arellano JA. 1991. Effect of Certain Adaptogenic Plant Extracts on Drug-induced Narcosis in Female and Male Mice. *Phytotherapy Research*, 5 : 29–31.

Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB et Bak S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72 : 435–457.

Banfi E, Scialino G et Monti-bragadin C. 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 : 796–800.

Bhat ZA, Ali M, Ansari SH et Naquvi KJ. 2015. New phytoconstituents from the roots of *Aralia cachemirica* Decne. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19 : 287–291.

Botineau M. 2010. *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. 1108–1115 p.

Brekhman I. 1980. *Man and Biologically active Substances - The Effects of Drugs, Diet and Pollution on Health*.

Brouillet L, Coursol F, Meades SJ, Favreau M, Anions M, Bélisle P et Desmet P. 2010. VASCAN, the database of vascular plants of Canada.

Carvalho IT, Estevinho BN et Santos L. 2016. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38 : 109–119.

Chen M, Wu W et Nanz D. 1997. Leonticins D-H, Five Triterpene saponins from *Leontice kiangnanensis*. *Phytochemistry*, 44 : 497–504.

Chen Q, Zhang Y, Zhang W et Chen Z. 2011. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography – ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 1381–1388.

Chen X, Lin Y, Hu Y, Liu C, Lan K et Jia W. 2015. *Phytochemistry, Metabolism, and Metabolomics of Ginseng*. *Chinese Herbal Medicines*, 7 : 98–108.

Chen Y, Chiu MH, Gu K et Li ZR. 2003. Cucurbitacin and triterpenoid glycosides from *Hemsleya giganthy*. *Section Title: Plant Biochemistry*, 14 : 475–478.

Choi KT. 2008. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C A Meyer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29 : 1109–1118.

Chominot A. 2000. *Valorisation Des Plantes Médicinales Par L'Industrie Pharmaceutique Complémentarités Et Contradictions*.

Denisenko PP, Zhigalov SA et Korkov V V. 2000. Search for vegetable means stimulating reproduction function. *Psychoneuroendocrinology*, 25 : S57.

Dini I, Schettino O, Simioli T et Dini A. 2001. Studies on the Constituents of *Chenopodium quinoa* Seeds: Isolation and Characterization of New Triterpene Saponins. *Journal of Agricultural*

and Food Chemistry, 49 : 741–746.

Dufour D, Lavoie S, Laprise C et Legault J. 2007. Antioxidant , anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology*, 111 : 22–28.

Ellsworth KT, Clark TN, Gray CA et Johnson JA. 2013. Isolation and bioassay screening of medicinal plant endophytes from eastern Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 59 : 761–765.

Euromarketing-udes.com. 2018. <http://euromarketing-udes.com/en-2018-on-passe-au-naturel/>. <http://euromarketing-udes.com/en-2018-on-passe-au-naturel/>

Fedorova M V., Laricheva IP, Milovanov AP, Zhilenko MI et Vitushko, S. A. Alexandrova A V. 1994. Correction of fetoplacental functional disorders in pregnant women living in a radionuclide contaminated zone and assessment of the efficacy of therapeutic and prophylactic measures. *Rossijskij Vestnik Perinatologii I Pediatrii*, 39 : 13–15.

Flanagan LB et Bain JF. 1988. The Biological Flora of Canada 8. *Aralia nudicaulis* L., Wild Sarsaparilla. Dans : *The Canadian Field-Naturalist*. THE OTTAWA FIELD-NATURALISTS CLUB, Ottawa, Canada, p. 46.

FloraBase. 2006. The West Australian Flora. <http://florabase.calm.wa.gov.au>

Girard-Lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures : Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 115 : 720–726.

Global Biodiversity Information of Facility (GBIF). 2017. *Aralia* L. <https://www.gbif.org/species/3036858>

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB et Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *The Journal of Immunology*, 144 : 278 LP – 283.

Guo M, Zhang L et Liu Z. 2009. Analysis of saponins from leaves of *Aralia elata* by liquid chromatography and multi-stage tandem mass spectrometry. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 25 : 753–758.

Hostettmann K et Marston A. 1995. Saponins. *Chemistry and pharmacology of natural products*, University .

Hu M, Ogawa K, Sashida Y et Pei-Gen X. 1995. Triterpenoid glucuronide saponins from root bark of *aralia armata*. *Phytochemistry*, 39 : 179–184.

Huang YG, Li QZ, Ivanochko G et Wang R. 2006. Novel selective cytotoxicity of wild sarsaparilla rhizome extract. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 1399–1403.

Hultén E et Fries M. 1986. *Atlas of North European Vascular Plants North of the Tropic of Cancer*, 2 vols. Könistein.

Jiang P, Shi F-X, Li Y-L, Liu B et Li L-F. 2016. Development of Highly Transferable Microsatellites for *Panax ginseng* (Araliaceae) Using Whole-Genome Data. *Applications in Plant Sciences*, 4 : 1600075.

Johns T et Chapman L. 2013. *Phytochemistry of Medicinal Plants - Phytochemicals Ingested in Traditional Diets and Medicines as Modulators of Energy Metabolism*. 168–182 p.

Judd WS, Sanders RW et Donoghue MJ. 1994. Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analysis. *Harvard Papers in Botany*, 1 : 1–51.

Jussieu AL de. 1789. *Genera Plantarum*. 217 .

Kang SS, Kim JS, Xu YN et Kim YH. 1999. Isolation of a new cerebroside from the root bark of *Aralia elata*. *Journal of Natural Products*, 62 : 1059–1060.

Kim HS eon, Lee AY, Jo JE un, Moon BC heol, Ji Y et Kim HK young. 2014. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of continentalic acid from the root of *Aralia continentalis* by using the response surface methodology. *Archives of pharmacal research*, 37 : 1437–1444.

Kim M, Lee SH, Seo JH, Kim IS, Han AR, Moon DO, Cho S, Cui L, Kim J et Lee HS. 2013a. *Aralia cordata* Inhibits Triacylglycerol Biosynthesis in HepG2 Cells. *Journal of Medicinal Food*, 16 : 1108–1114.

Kim MH, Kim JM et Yoon KY. 2013b. Effects of blanching on antioxidant activity and total phenolic content according to type of medicinal plants. *Food Science and Biotechnology*, 22 : 817–823.

Kitts D et Hu C. 2000. Efficacy and safety of ginseng. *Public health nutrition*, 3 : 473–85.

Kolkhir VK et Sokolov SY. 1982. Effects of Triterpenoid Glycoside Preparations on Blood Coagulation. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 16 : 335–340.

Kuang H-X, Wang Z-B, Wang Q-H, Yang B-Y, Xiao H-B, Okada Y et Okuyama T. 2013. Triterpene Glucosides from the Leaves of *Aralia elata* and Their Cytotoxic Activities. *Chemistry & Biodiversity*, 10 : 703–710.

Lee DH, Seo BR, Kim HY, Gum GC, Yu HH, You HK, Kang TH et You YO. 2011. Inhibitory effect of *Aralia continentalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 : 978–984.

Lee EB, Kim OJ, Kang SS et Jeong C. 2005. Araloside A, an antiulcer constituent from the root bark of *Aralia elata*. *Biol Pharm Bull*, 28 : 523–6.

Lee IS, Jin W, Zhang X, Hung TM, Song KS, Seong YH et Bae K. 2006. Cytotoxic and COX-2 inhibitory constituents from the aerial parts of *Aralia cordata*. *Archives of pharmacal research*, 29 : 548–555.

Lee K. 2000. Research and future trends in the pharmaceutical development of medicinal herbs from Chinese medicine. *Public Health Nutrition*, 3 : 515–522.

Lee KJ, Song KH, Choi W et Kim YS. 2015. A strategy for the separation of diterpenoid isomers from the root of *Aralia continentalis* by countercurrent chromatography: The distribution ratio as a substitute for the partition coefficient and a three-phase solvent system. *Journal of Chromatography A*, 1406 : 224–230.

Lee MH, Jeong JH, Seo JW, Shin CG, Kim YS, In JG, Yang DC, Yi JS et Choi YE. 2004. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant and Cell Physiology*, 45 : 976–984.

Leung KW et Wong AS. 2010. Pharmacology of ginsenosides: a literature review. *Chinese Medicine*, 5 : 1–7.

Li H. 2007. Screening for Bioactive natural products from two traditional used medicinal

plants: *Aralia nudicaulis* and *Nuphar lutea*.

Li H, O'Neill T, Webster D, Johnson JA et Gray CA. 2012. Anti-mycobacterial diynes from the Canadian medicinal plant *Aralia nudicaulis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 140 : 141–144.

Linné C von. 1753. *Species plantarum*. t.1 (1753) : 273–274.

Liu X-H, Li X-M, Han C-C, Fang X-F et Ma L. 2015. Effects of combined therapy with glipizide and *Aralia* root bark extract on glycemic control and lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 : 739–744.

Markina LD et Markin V V. 2008. Forecasting of the development of dysadaptable conditions and algorithm of their effective correction. *Pacific Medical Journal*, 3 : 30–36.

Marles RJ, Clavelle C, Monteleone L, Tays N et Burns D. 2008. Aboriginal plant use in Canada's northwest boreal forest. Her Majesty the Queen in Right of Canada; Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Vancouver Toronto, 256 p.

Marston A, Wolfender JL et Hostettmann K. 2000. Analysis and Isolation of saponins from Plant Material. 1–12.

Mashkovsky M. 2002. *Medicinal Drugs-Manual on Pharmacotherapy four Doctors*. New Wave Publishing House, Moscow, 135–136 p.

Meusel H, Jäger E, Rauschert S et Weinert E. 1978. *Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora - Band II*. Jena.

Ministère de l'Économie de l'Innovation et des Exportations du Québec 1. 2014. Microprofil: L'industrie des produits de santé naturels 2014. Dans : Ministère de l'Économie de l'Innovation et des Exportations du Québec.

Miroshnichenko I V., Yarin AA, Aknazarova RK et Trofimchik SM. 1985. Different effects of tonics on the immune response. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 19 : 85–87.

Miyase T, Melek FR et El-Gindi OD. 1996a. Saponins from *Fagonia Arabica*. *Phytochemistry*, 41 : 1175–1179.

Miyase T, Shiokawa K, Zhanc DM et Ueno A. 1996b. Araliasaponins i-xi, triterpene saponins. *Phytochemistry*, 41 : 1411–1418.

Moerman DE. 2009. *Native American Medicinal Plants*. Timber Press, Portland London, 72–75 p.

Mskhiladze L, Legault J, Lavoie S, Mshvildadze V, Kuchukhidze J, Elias R et Pichette A. 2008. Cytotoxic steroidal saponins from the flowers of *Allium leucanthum*. *Molecules*, 13 : 2925–2934.

Mskhiladze L, Chinchradze D, Mshvildadze V, Pichette A, Frederich M, Ollivier E et Elias R. 2015. STEROIDAL GLYCOSIDES FROM THE FLOWERS OF *Allium leucanthum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51 : 772–775.

Naturalis Biodiversity Center. 2018. Catalogue of Life. <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree/id/b58a0879fa229ec07df6db8446f22e6c>

Nhiem NX, Lim HY, Kiem P Van, Minh C Van, Thu VK, Tai BH, Quang TH, Song SB et Kim YH. 2011. Oleanane-type triterpene saponins from the bark of *Aralia elata* and their NF-κB inhibition and PPAR activation signal pathway. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21 :

6143–6147.

Nishiumi S, Hosokawa K, Anetai M, Shibata T, Mukai R, Yoshida K ichi et Ashida H. 2012. Antagonistic Effect of the Ainu-Selected Traditional Beneficial Plants on the Transformation of an Aryl Hydrocarbon Receptor. *Journal of Food Science*, 77 .

Nocerino E, Amato M et Izzo AA. 2000. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. *Fitoterapia*, 71 : 1–5.

O'Brien J, Wilson I, Orton T et Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 5426 : 5421–5426.

Oleszek W et Bialy Z. 2006. Chromatographic determination of plant saponins — An update (2002 – 2005). *Journal of Chromatography A*, 1112 : 78–91.

Ou B, Hampsch-woodill M, Prior RL, Laboratories B et Lane T. 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4619–4626.

Pandey KB et Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 : 270–278.

Panosian A et Wikman G. 2010. Effects of adaptogens on the central nervous system and the molecular mechanisms associated with their stress - Protective activity. *Pharmaceuticals*, 3 : 188–224.

Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ et Osbourn AE. 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 : 12923–12928.

Rao A V. et Gurfinkel DM. 2000. The bioactivity of saponins: Triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17 : 211–235.

Scalbert A, Johnson IT et Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81 : 215–217.

Shaker KH, Bernhardt M, Elgamal MHA et Seifert K. 1999. Triterpenoid saponins from *Fagonia indica*. *Phytochemistry*, 51 : 1049–1053.

Shikov AN, Pozharitskaya ON et Makarov VG. 2016. *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J.Wen: An overview of pharmacological studies. *Phytomedicine*, 23 : 1409–1421.

Singh G. 2010. *Plant Systematics*. Science Publishers, 646–648 p.

Song S-J, Nakamura N, Ma C, Hattori M et Xu S-X. 2001. Five saponins from the root bark of *Aralia elata*. *Phytochemistry*, 56 : 491–497.

Song S, Nakamura N, Ma C-M, Hattori M et Xu S-X. 2000. Four New Saponins from the Root Bark of *Aralia elata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 48 : 838–842.

Spencer C. H. Barrett KH. 1981. Floral Sex Ratios and Life History in *Aralia nudicaulis* (Araliaceae). *Evolution*, 35 : 752–762.

Tava A et Odoardi M. 1996. Saponins from *Medicago* spp.: chemical characterization and biological activity against insects. In *Saponins Used in food and Agriculture*. MA., Boston, 97–109 p.

Teruo HRFHF. 1999. Cosmetic/Use of udo as cosmetic material for improving moisture retention of skin, alleviating skin disease and suppressing halitosis. Jpn Kokai Tokkyo Koho.

Vincken JP, Heng L, Groot A de et Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68 : 275–297.

Wagner H et Bladt S. 1996. *Plant drug analysis : a thing layer analysis atlas*.

Waller GR et Yamasaki K. 1996. *Saponins Used in Food and Agriculture*. New York.

Wang J, Li Q, Ivanochko G et Huang Y. 2006. Anticancer effect of extracts from a North American medicinal plant--wild sarsaparilla. *Anticancer Res*, 26 : 2157–2164.

Wang M, Meng XB, Yu YL, Sun GB, Xu XD, Zhang XP, Dong X, Ye JX, Xu HB, Sun YF et Sun XB. 2014. Elatoside C protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes through the reduction of endoplasmic reticulum stress partially depending on STAT3 activation. *Apoptosis*, 19 : 1727–1735.

Wang M, Sun GB, Zhang JY, Luo Y, Yu YL, Xu XD, Meng XB, Zhang M Di, Lin W Bin et Sun XB. 2015a. Elatoside C protects the heart from ischaemia/reperfusion injury through the modulation of oxidative stress and intracellular Ca^{2+} homeostasis. *International Journal of Cardiology*, 185 : 167–176.

Wang Z, Wu Q, Meng Y, Sun Y, Wang Q, Yang C, Wang Q, Yang B et Kuang H. 2015b. Determination and pharmacokinetic study of two triterpenoid saponins in rat plasma after oral administration of the extract of *Aralia elata* leaves by UHPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 985 : 164–171.

Webster D, Lee TDG, Moore J, Manning T, Kunimoto D, LeBlanc D, Johnson J a et Gray C a. 2010. Antimycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. *Canadian journal of microbiology*, 56 : 487–494.

Wen J. 1991. *Systematics of Aralia (Araliaceae)*. Ohio State University, 4–7 p.

Wen J, Plunkett GM, Mitchell AD et Wagstaff SJ. 2001. The evolution of Araliaceae : A phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Systematic Biology*, 26 : 144–167.

Wojcicki J, Samochowiec, L. Kadlubowska D et Lutomski J. 1977. STUDIES ON SAPONIN FRACTION FROM ROOT OF ARALIA-MANDSHURICA RUPR. ET MAXIM. 4. INFLUENCE OF SAPONOSIDES ON CONTENT OF LIPIDS IN BLOOD-SERUM AND LIVER IN EXPERIMENTAL HYPERLIPEMIA. *Herba Polonica*, 23 : 285–288.

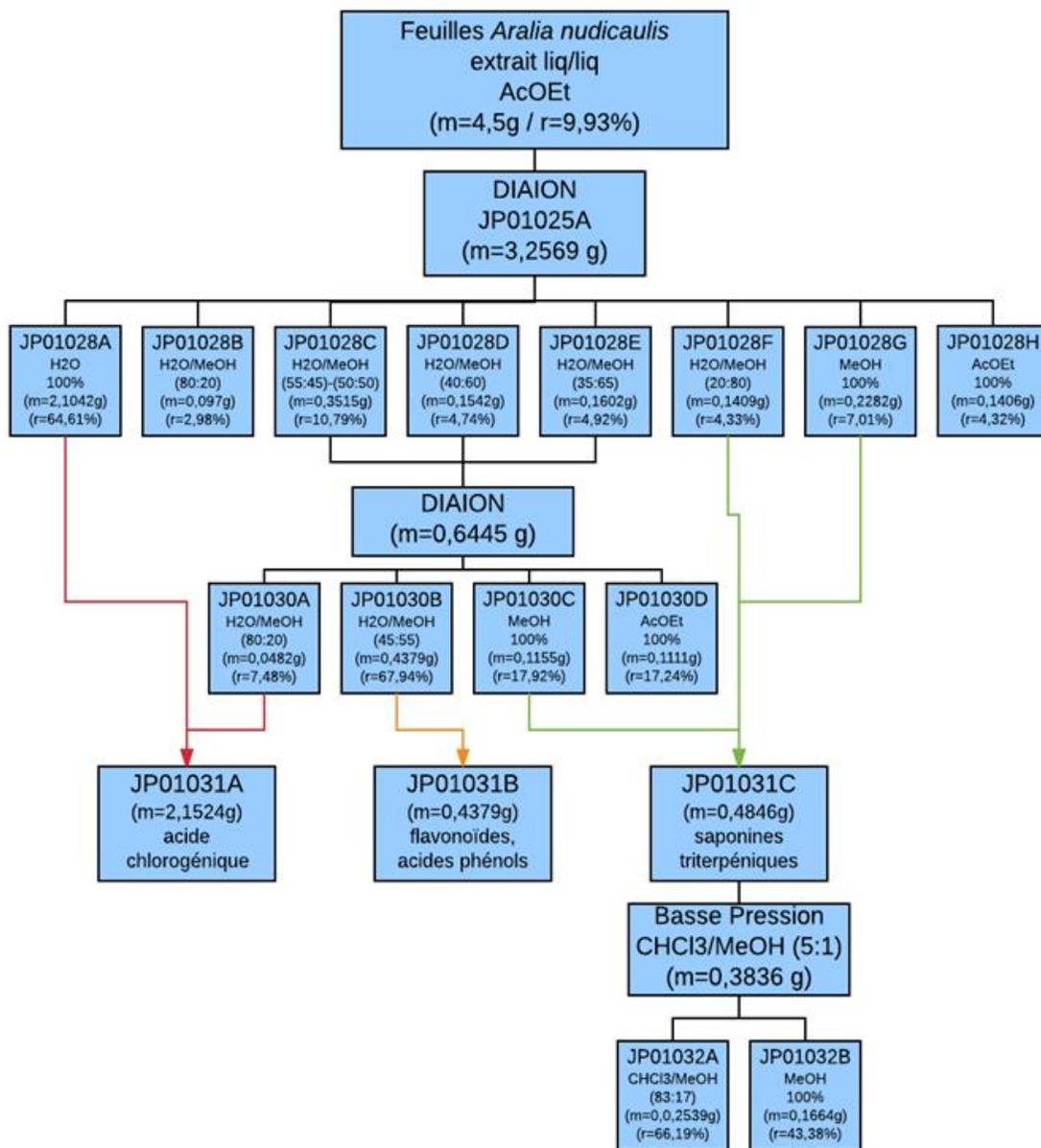
Wu Y, Zou HD, Cheng H, Zhao CY, Sun LF, Su SZ, Li SP et Yuan YP. 2012. Cloning and characterization of a β -amyrin synthase gene from the medicinal tree *Aralia elata* (Araliaceae). *Genetics and molecular research : GMR*, 11 : 2301–2314.

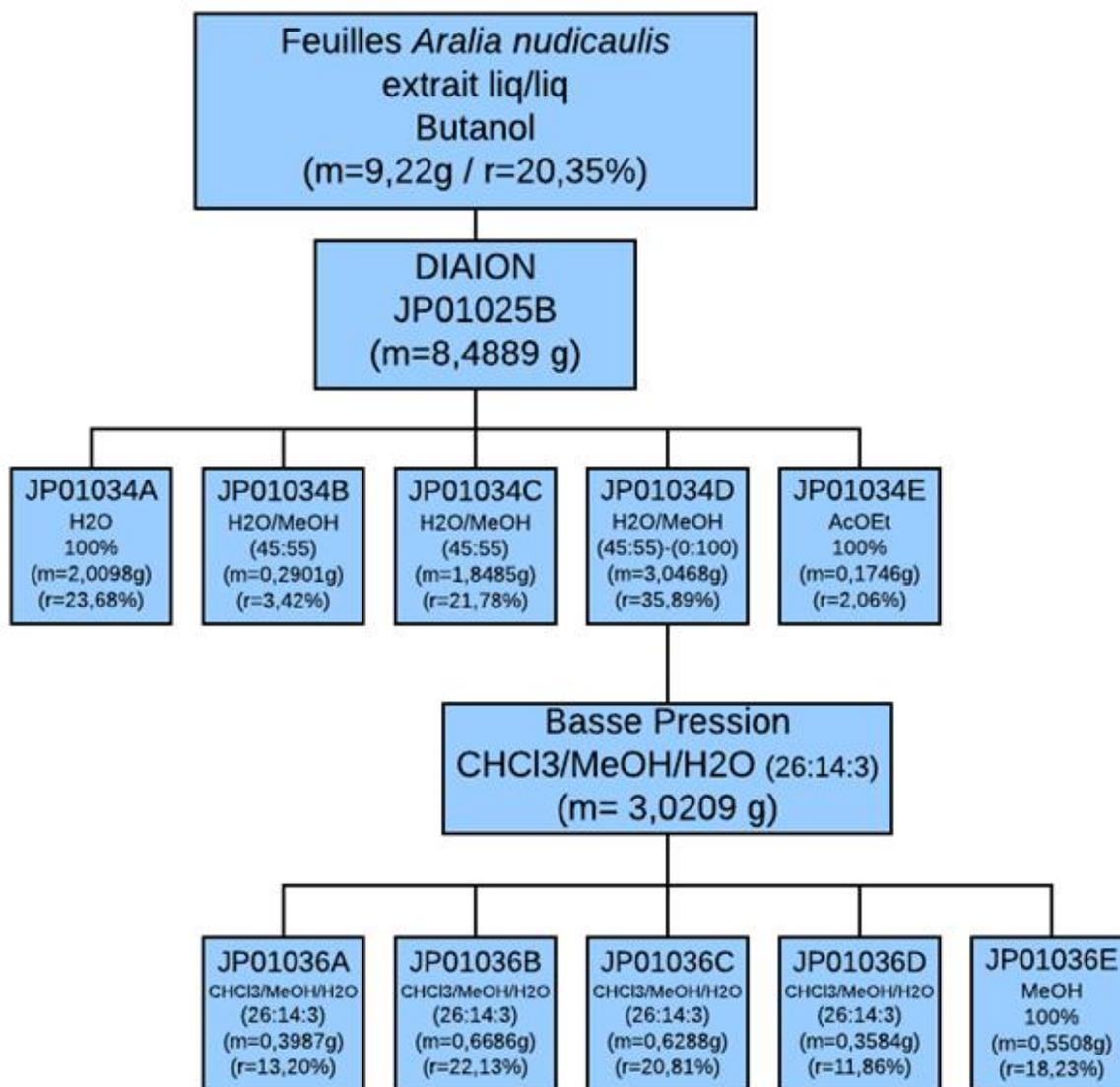
Xiao K, Yi YH, Wang ZZ, Tang HF, Li YQ et Lin HW. 1999. A cytotoxic triterpene saponin from the root bark of *Aralia dasyphylla*. *Journal of Natural Products*, 62 : 1030–1032.

Yance DR et Tabachnik B. 2007. Breakthrough Solutions in herbal medicine adaptogenic formulas: the way to vitality. *Townsend Letter: The Examiner of Alternative Medicine*, 86–90.

Yu S-S, Yu D-Q et Liang X-T. 1994. Triterpenoid saponins from the roots of *Aralia spinifolia*. Section Title: *Plant Biochemistry*, 57 : 978–982.

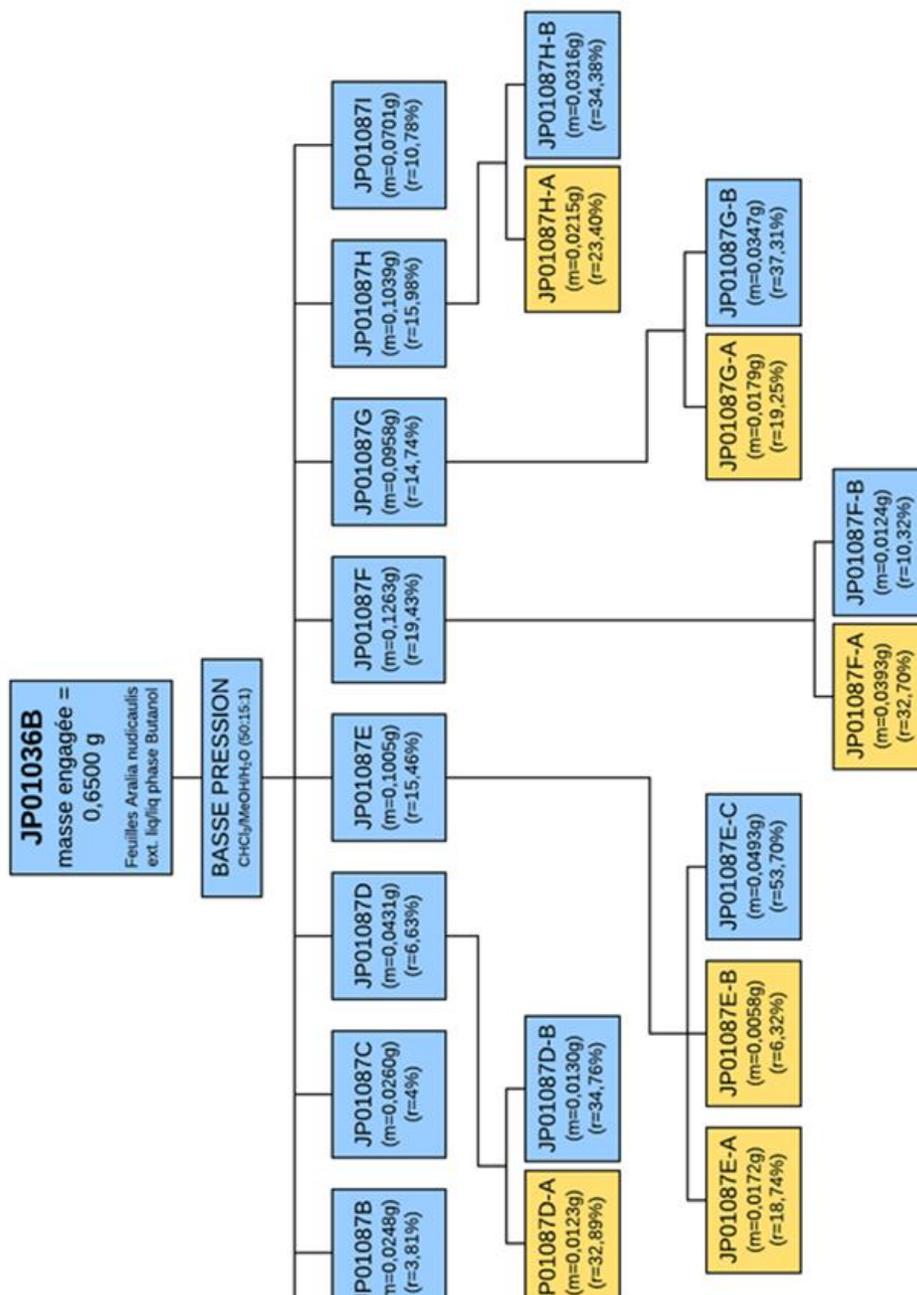
ANNEXES I
ORGANIGRAMMES

Annexe I - 2. Organigramme du fractionnement de l'extrait AcOEt des feuilles d'*Aralia nudicaulis*Annexe I - 3. Organigramme du fractionnement de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* Annexe I - 4. Organigramme du fractionnement de l'extrait AcOEt des feuilles d'*Aralia nudicaulis*



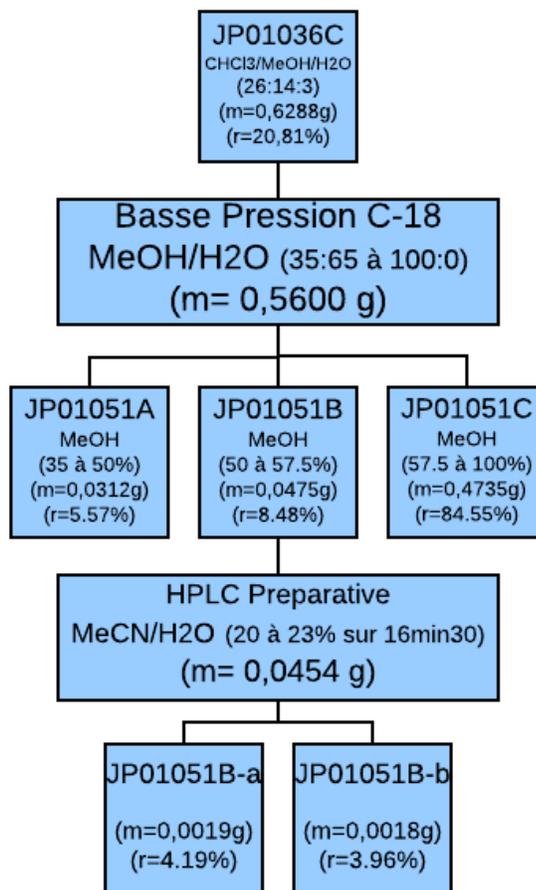
Annexe I - 5. Organigramme du fractionnement de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

Annexe I - 6. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036B issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées) Annexe I - 7. Organigramme du fractionnement de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

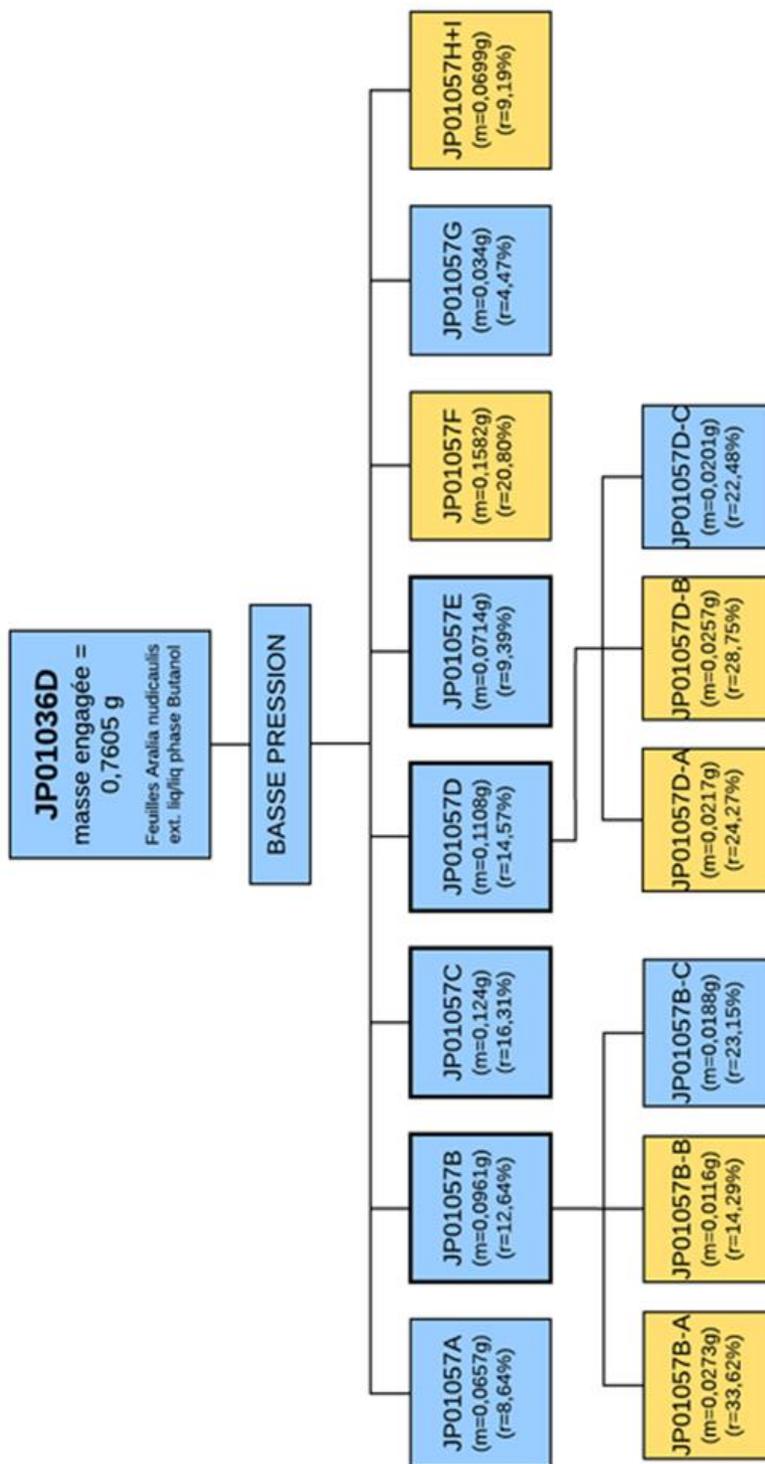


Annexe I - 8. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036B issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)

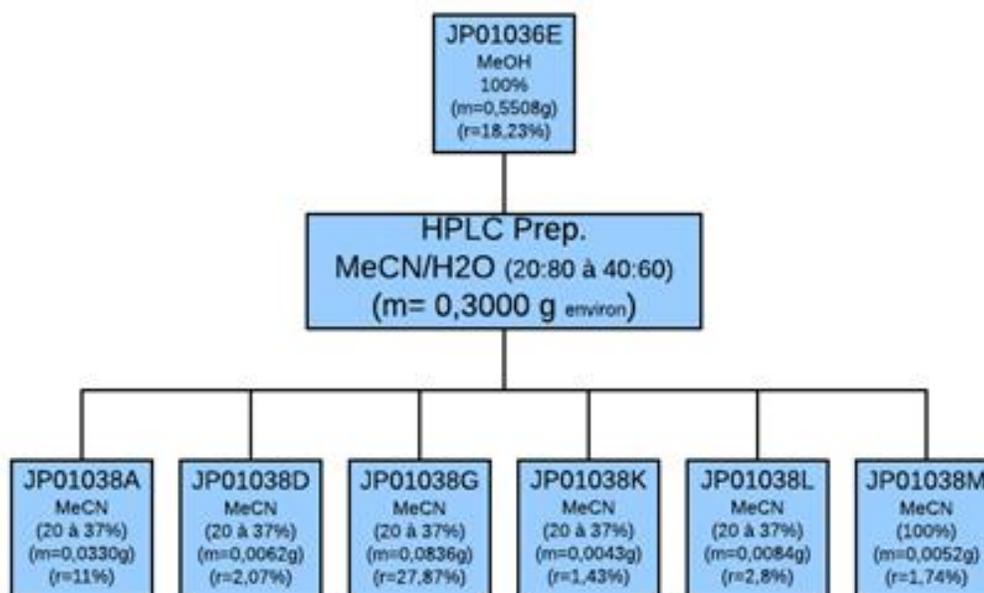
Annexe I - 9. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036C issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*
Annexe I - 10. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036B issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)



Annexe I - 11. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036C issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*



Annexe I - 14. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036D issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis* (en jaune les saponines triterpéniques isolées)

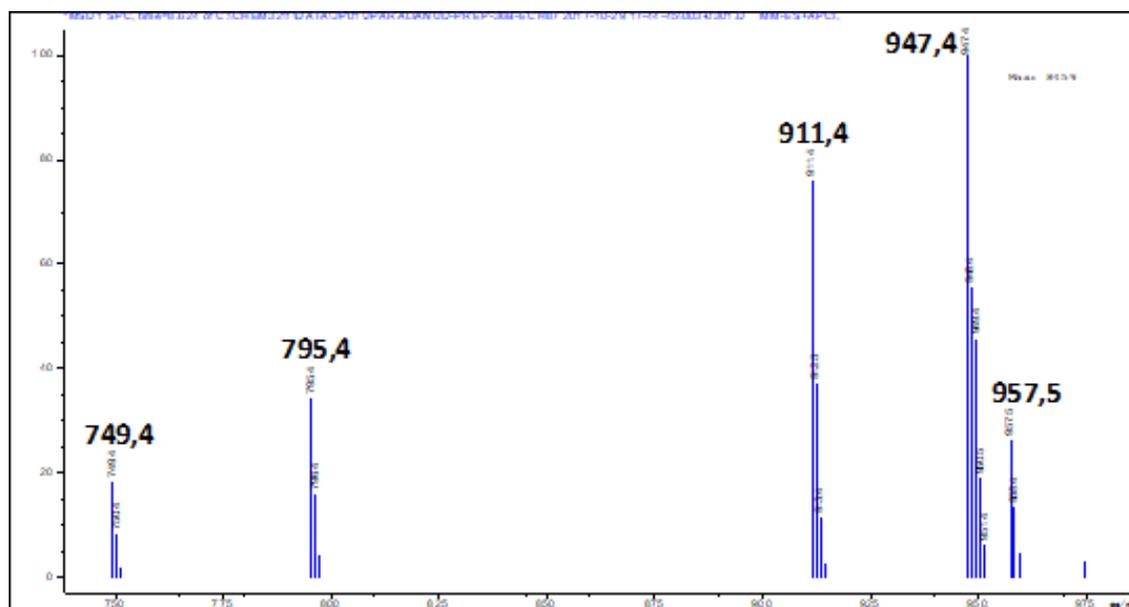
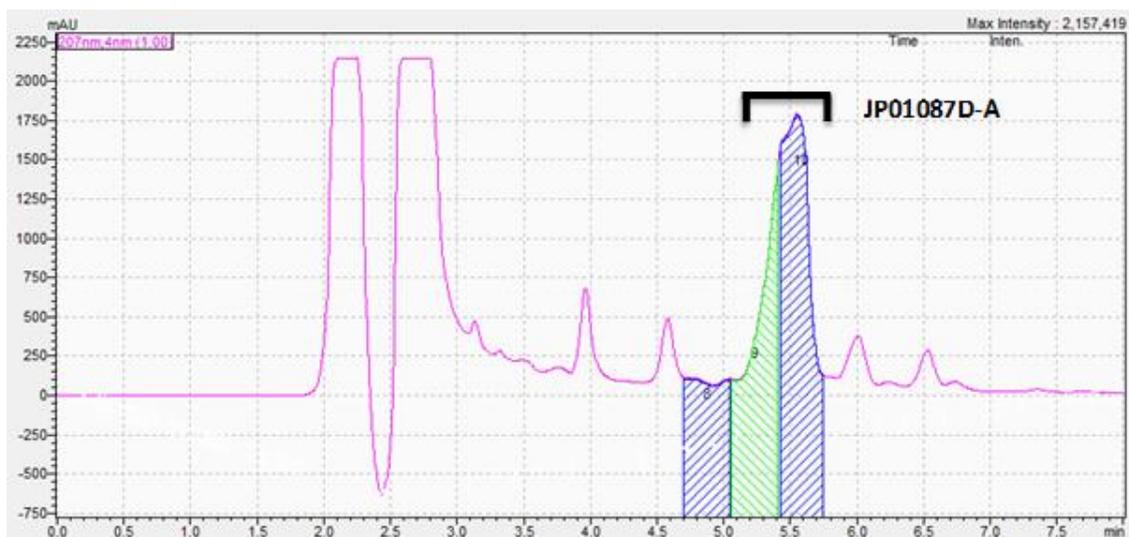


Annexe I - 17. Organigramme du fractionnement de la fraction JP01036E issue de l'extrait Butanol des feuilles d'*Aralia nudicaulis*

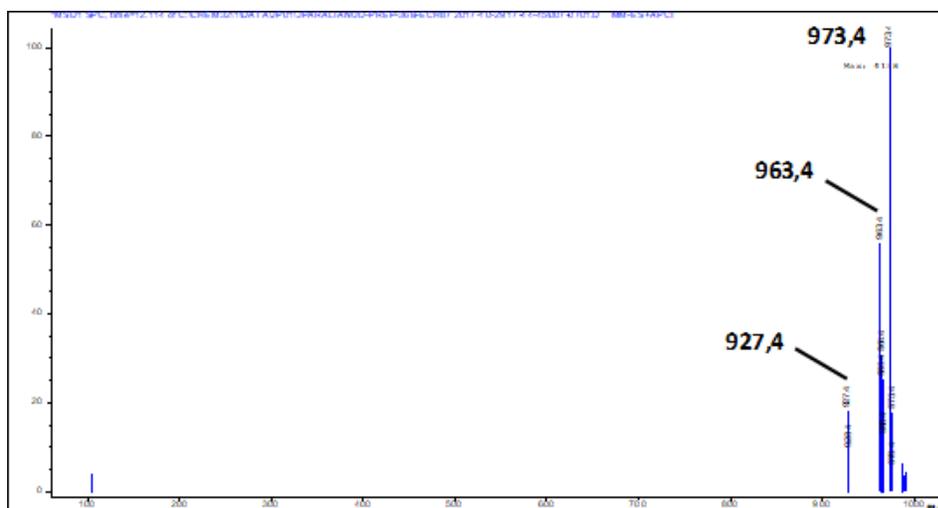
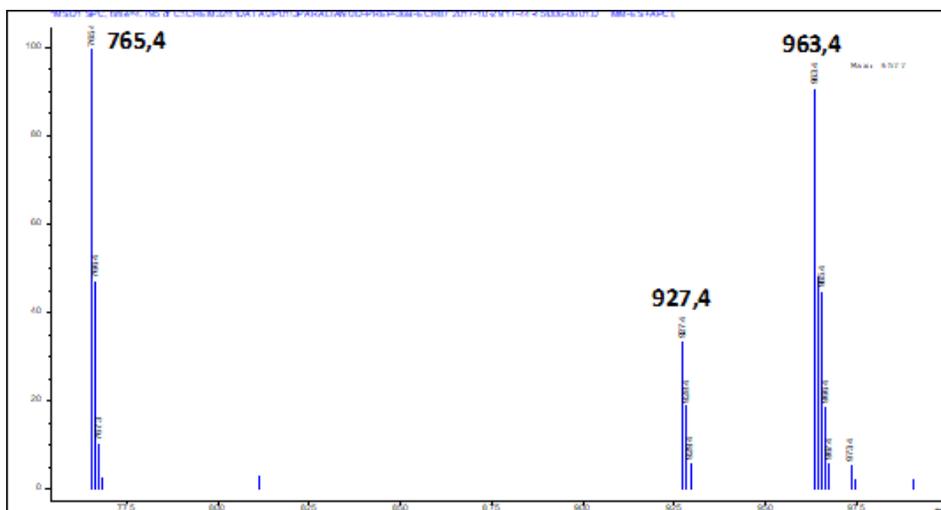
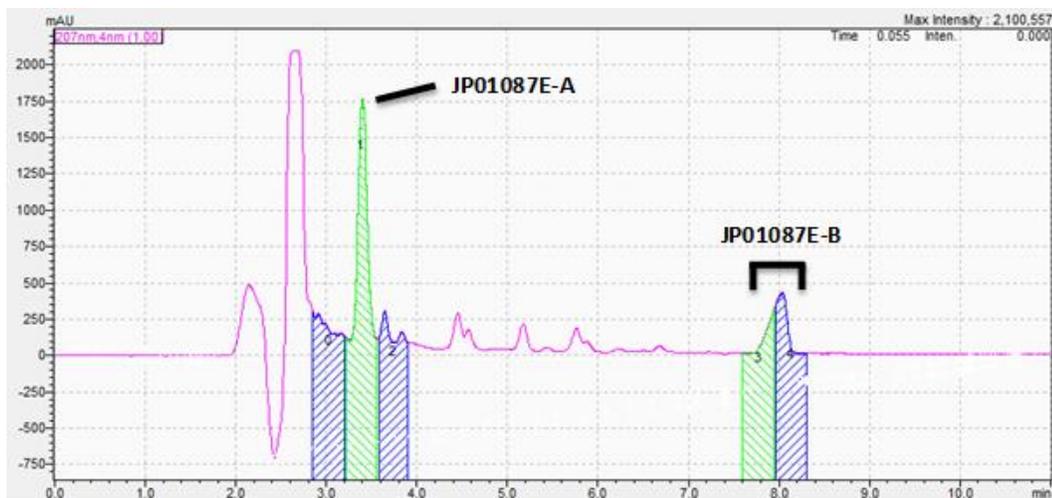
ANNEXES II

CHROMATOGRAMMES &

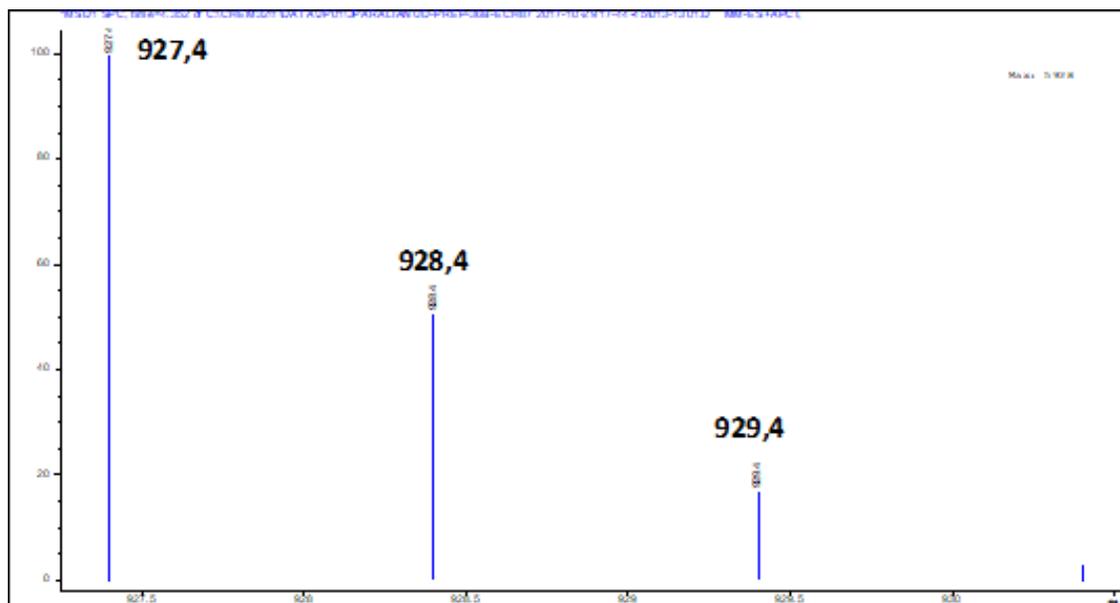
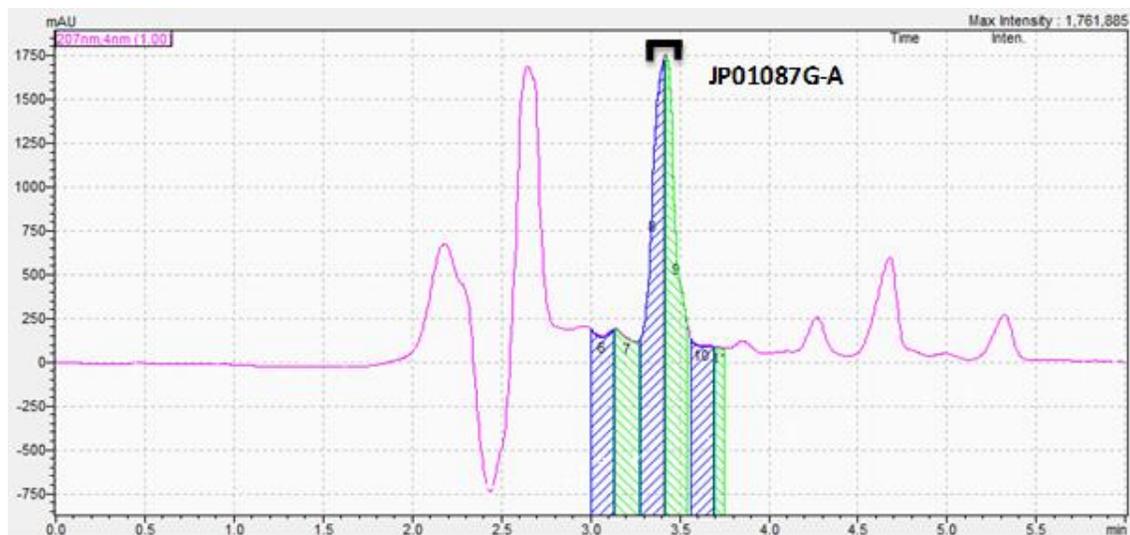
SPECTRES DE MASSE



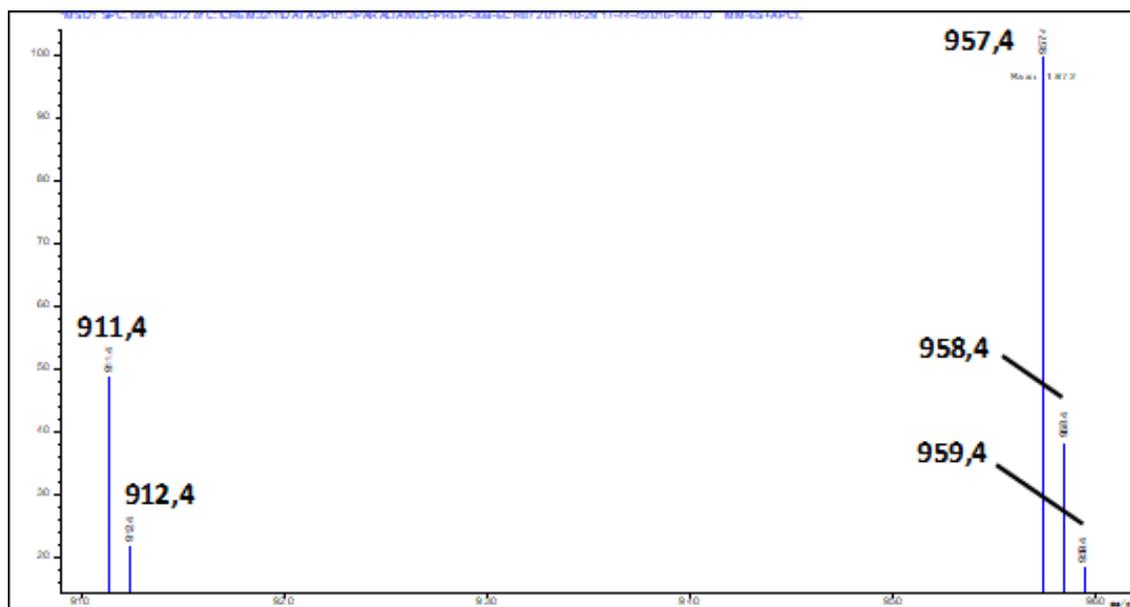
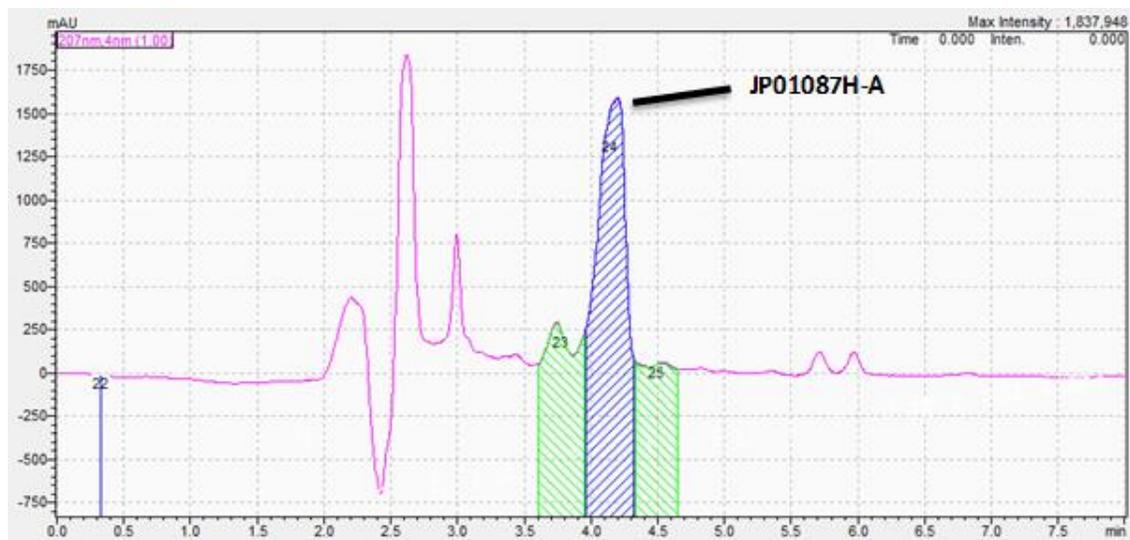
Annexe II - 2. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01087D-A



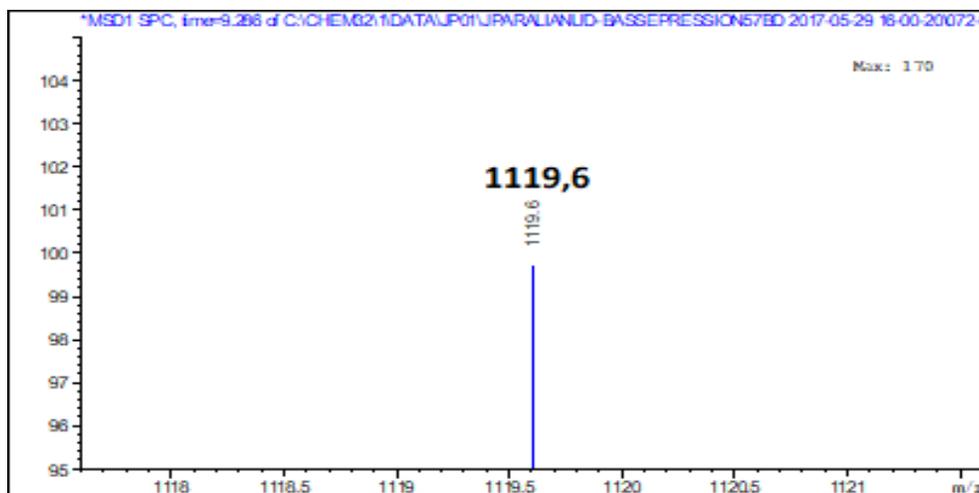
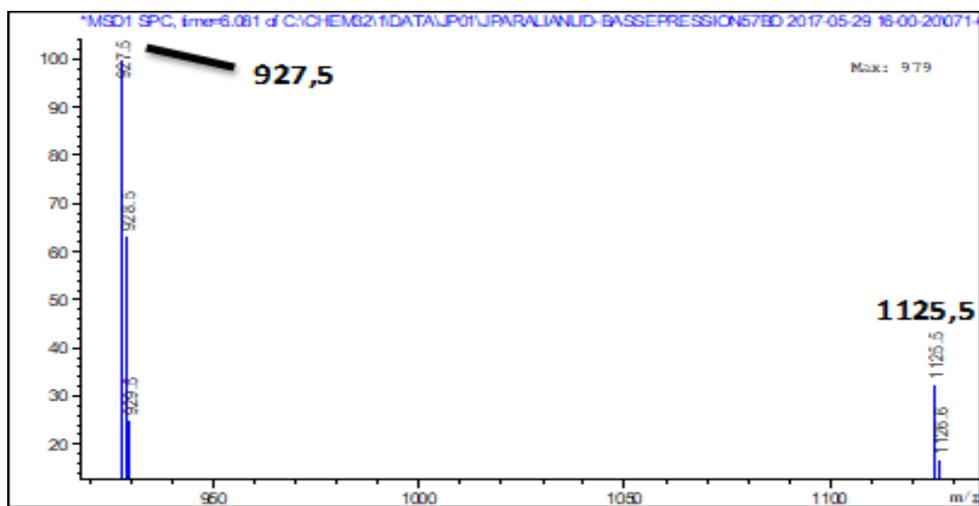
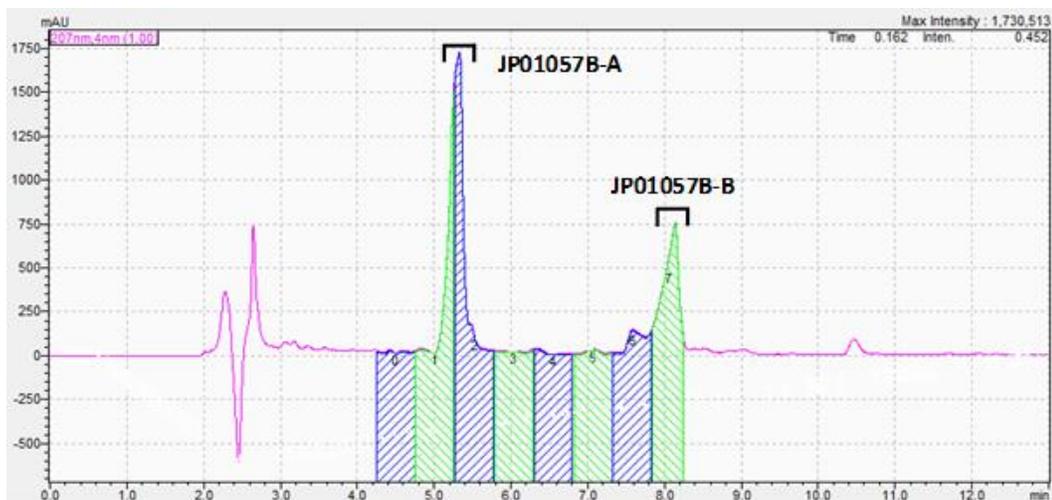
Annexe II - 4. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments correspondant aux produits JP01087E-A (milieu) et JP01087E-B (bas)



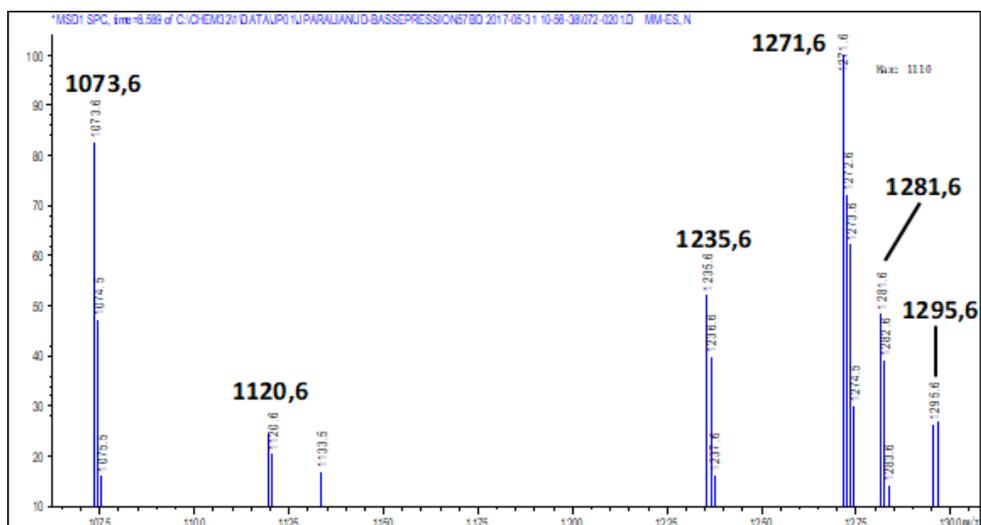
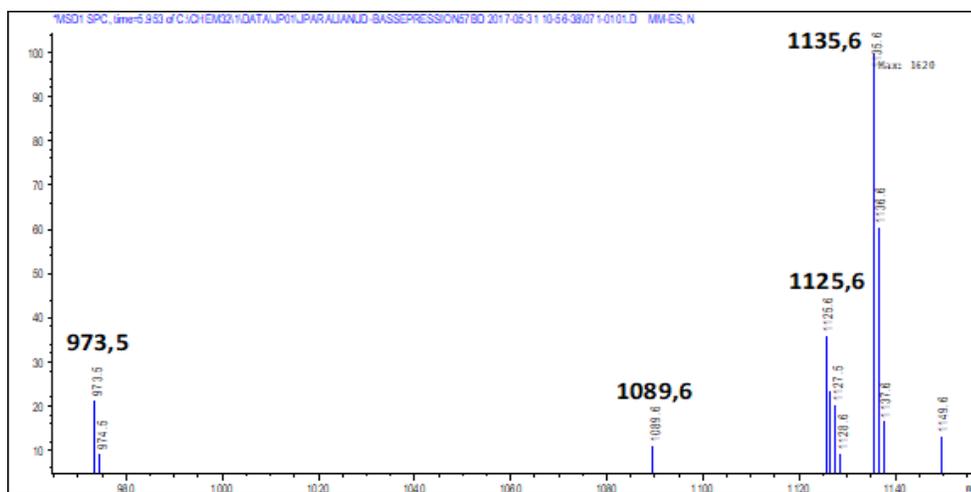
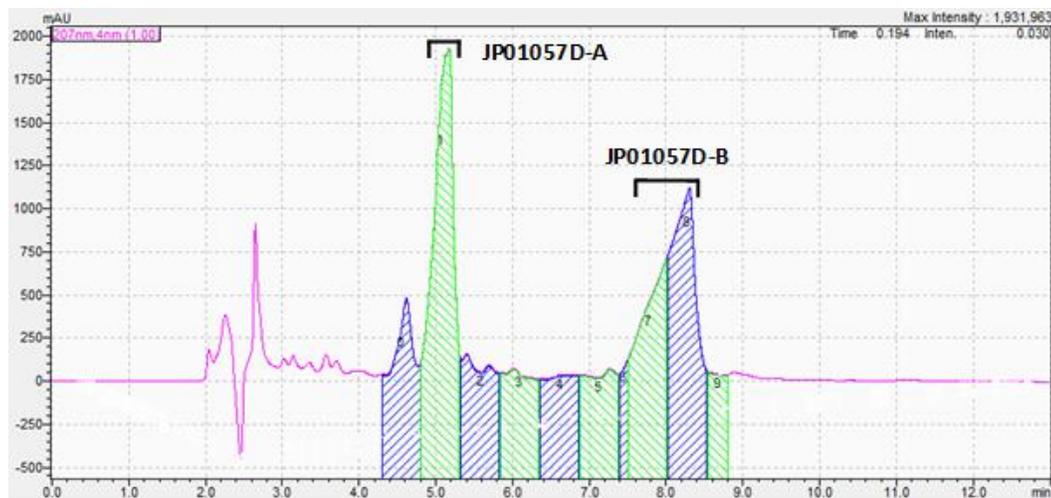
Annexe II - 6. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01087G-A



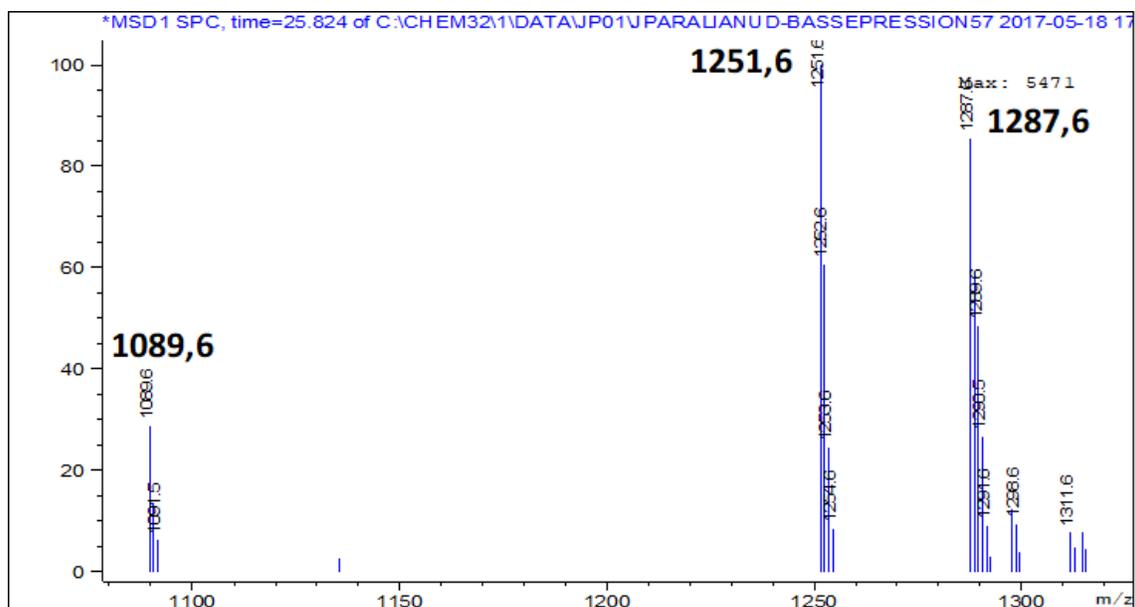
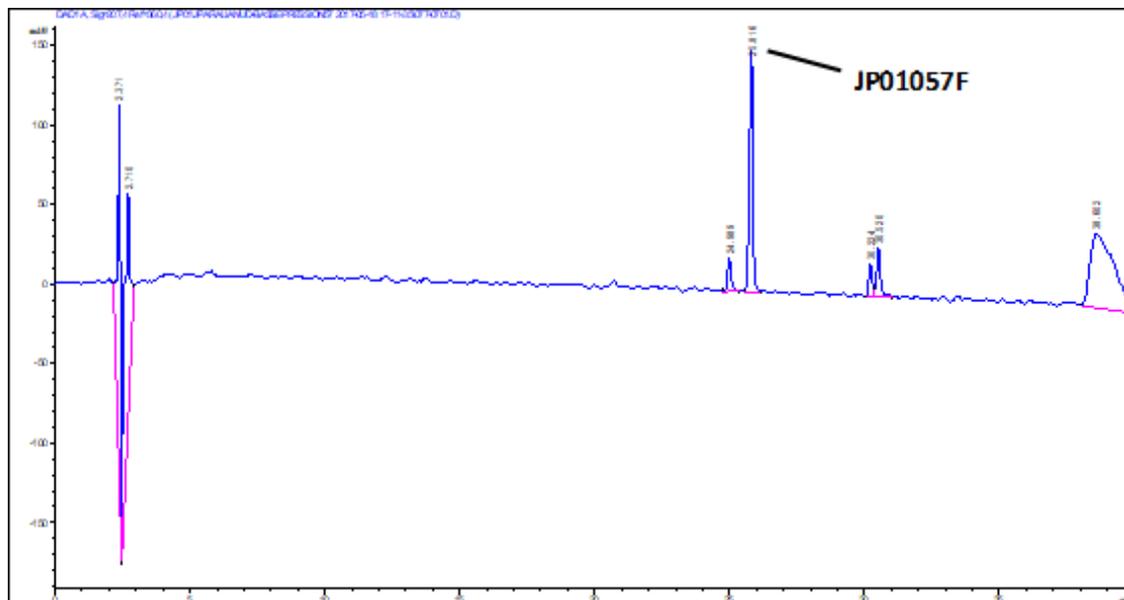
Annexe II - 9. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01087H-A



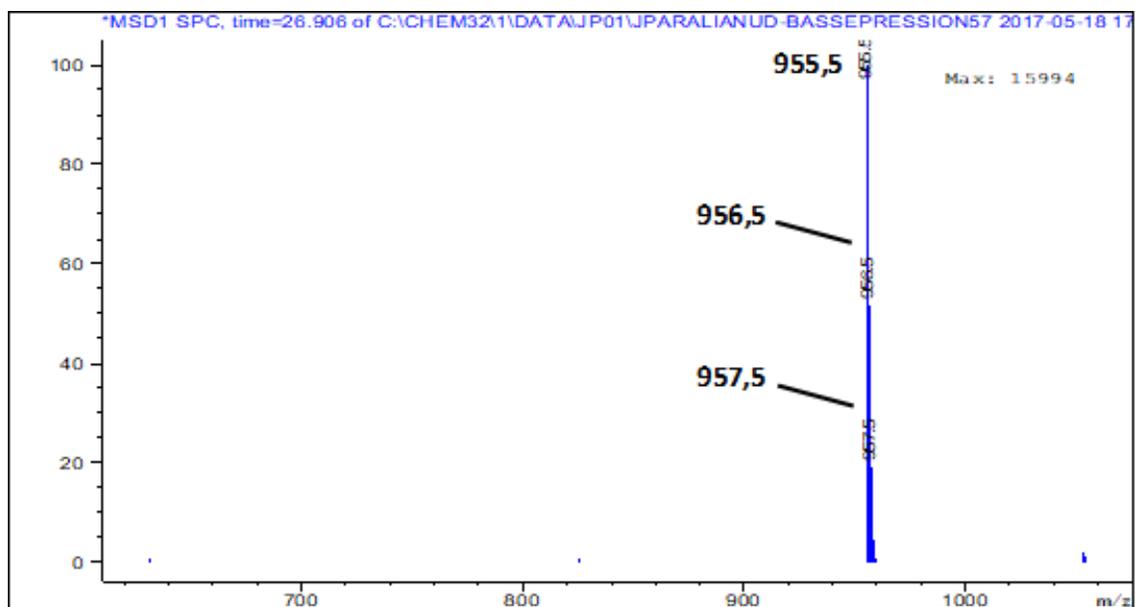
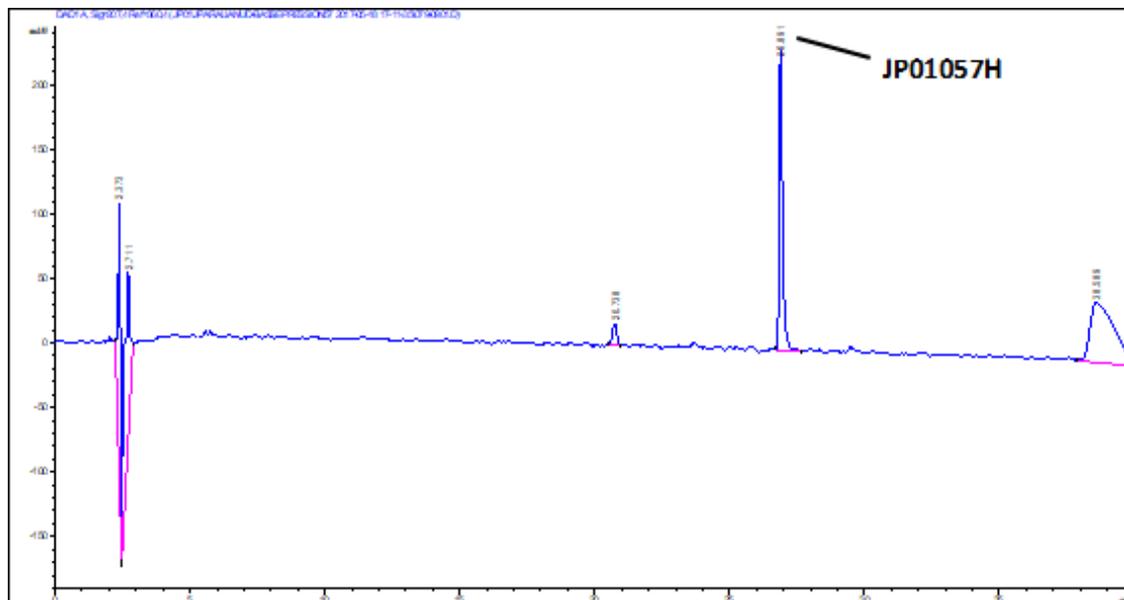
Annexe II - 12. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments correspondant aux produits JP01057B-A (milieu) et JP01057B-B (bas)



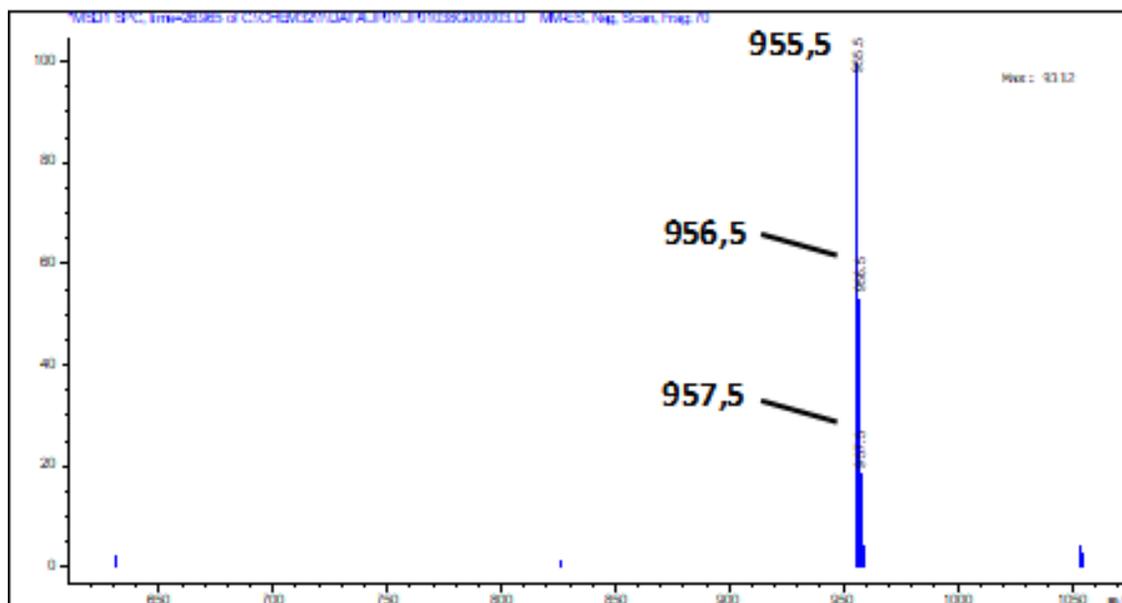
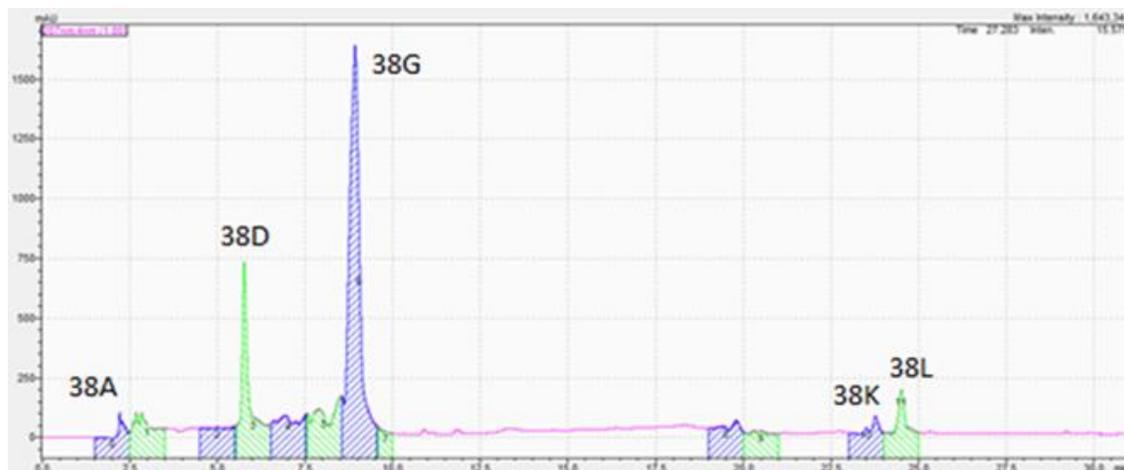
Annexe II - 15. Chromatogramme d'HPLC Préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments correspondant aux produits JP01057D-A (milieu) et JP01057D-B (bas)



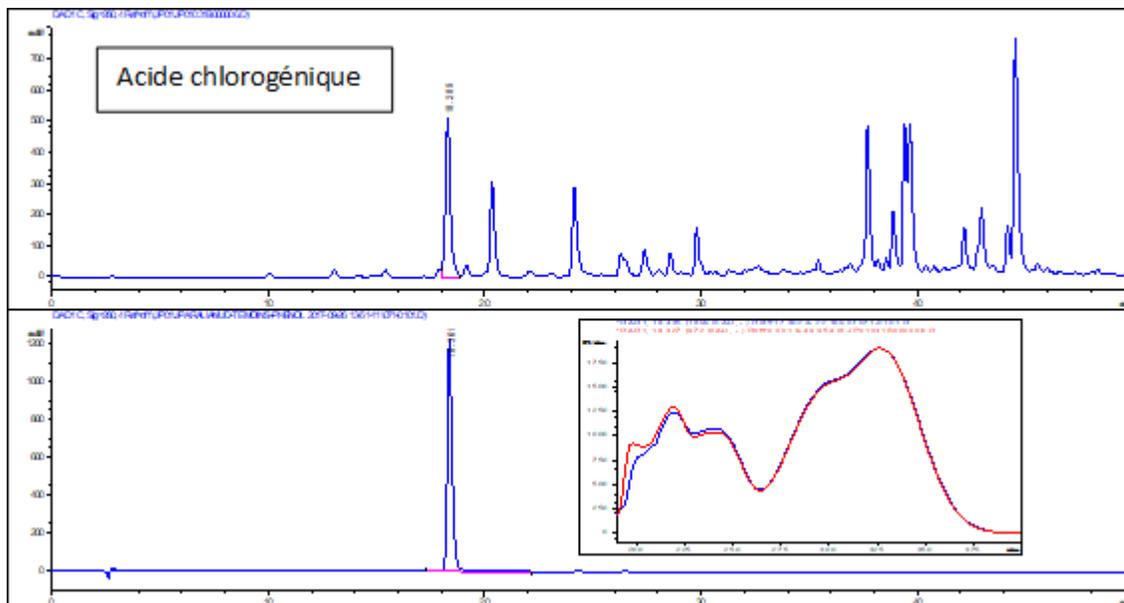
Annexe II - 18. Chromatogramme d'HPLC (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01057F



Annexe II - 21. Chromatogramme d'HPLC (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01057H

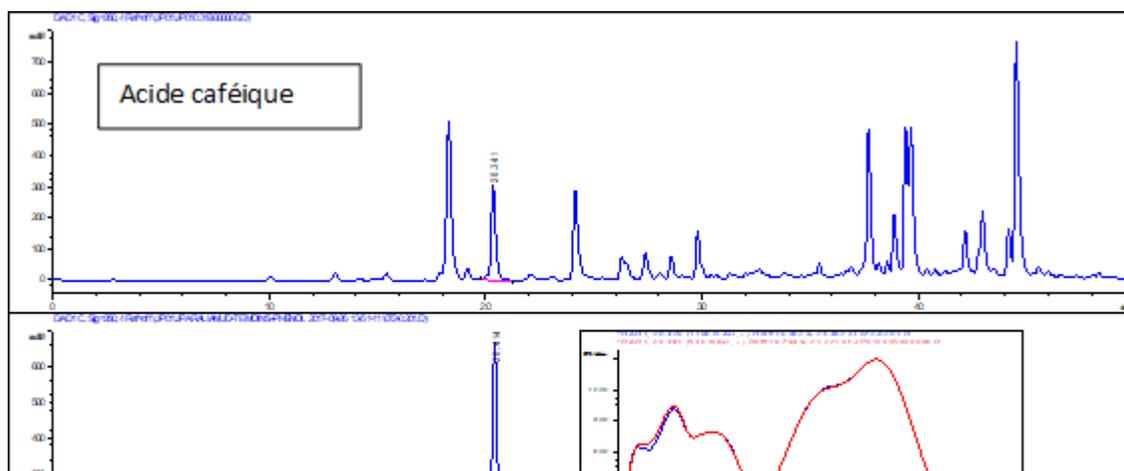


Annexe II - 24. Chromatogramme d'HPLC préparative (haut) et masses (m/z) en ionisation négative des fragments (bas) correspondant au produit JP01038G



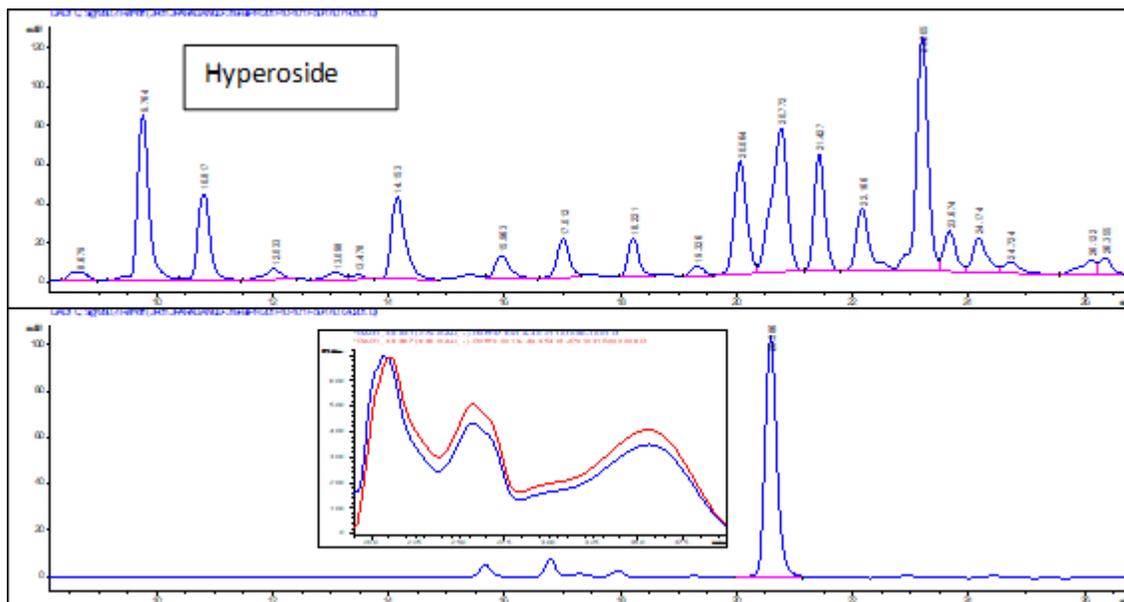
Annexe II - 27. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'acide chlorogénique (bas)

Annexe II - 28. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'acide chlorogénique (bas)



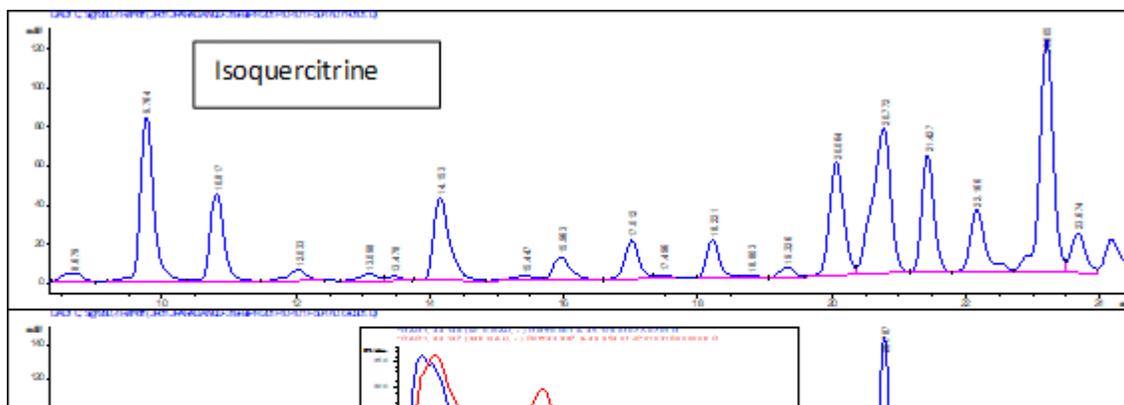
Annexe II - 29. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'acide caféique (bas)

Annexe II - 30. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'acide caféique (bas)



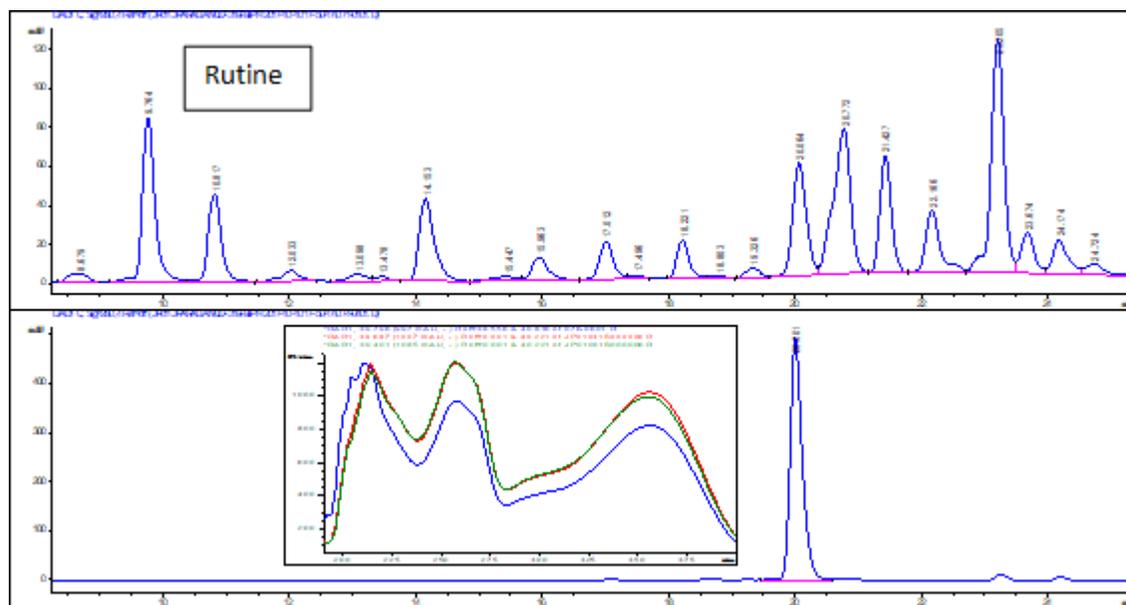
Annexe II - 31. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'hyperoside (bas)

Annexe II - 32. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'hyperoside (bas)



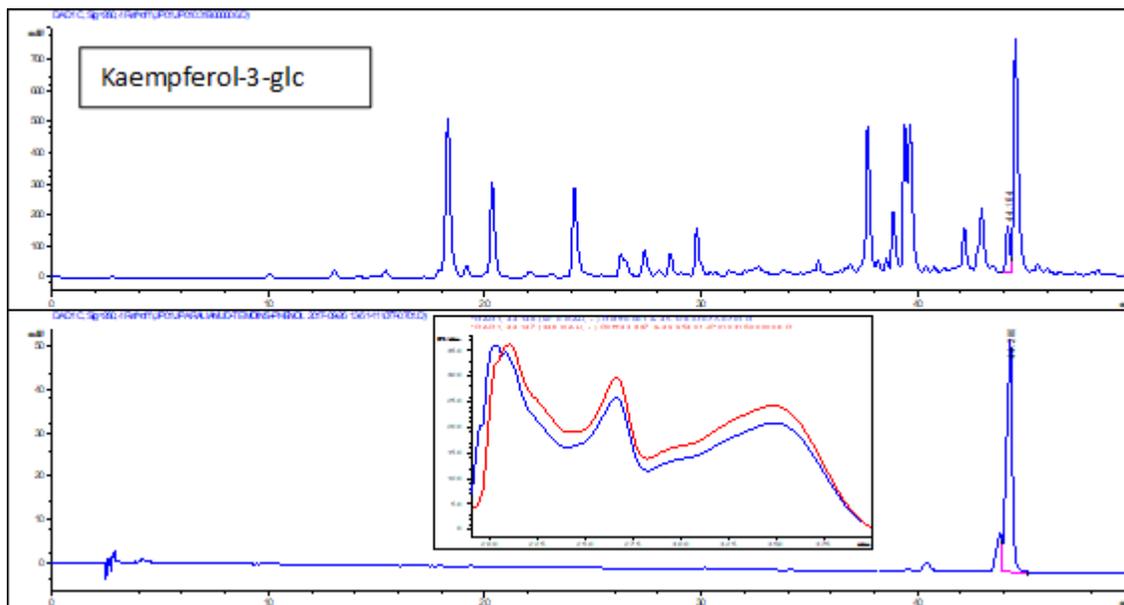
Annexe II - 33. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'isoquercitrine (bas)

Annexe II - 34. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin d'isoquercitrine (bas)



Annexe II - 35. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin de rutine (bas)

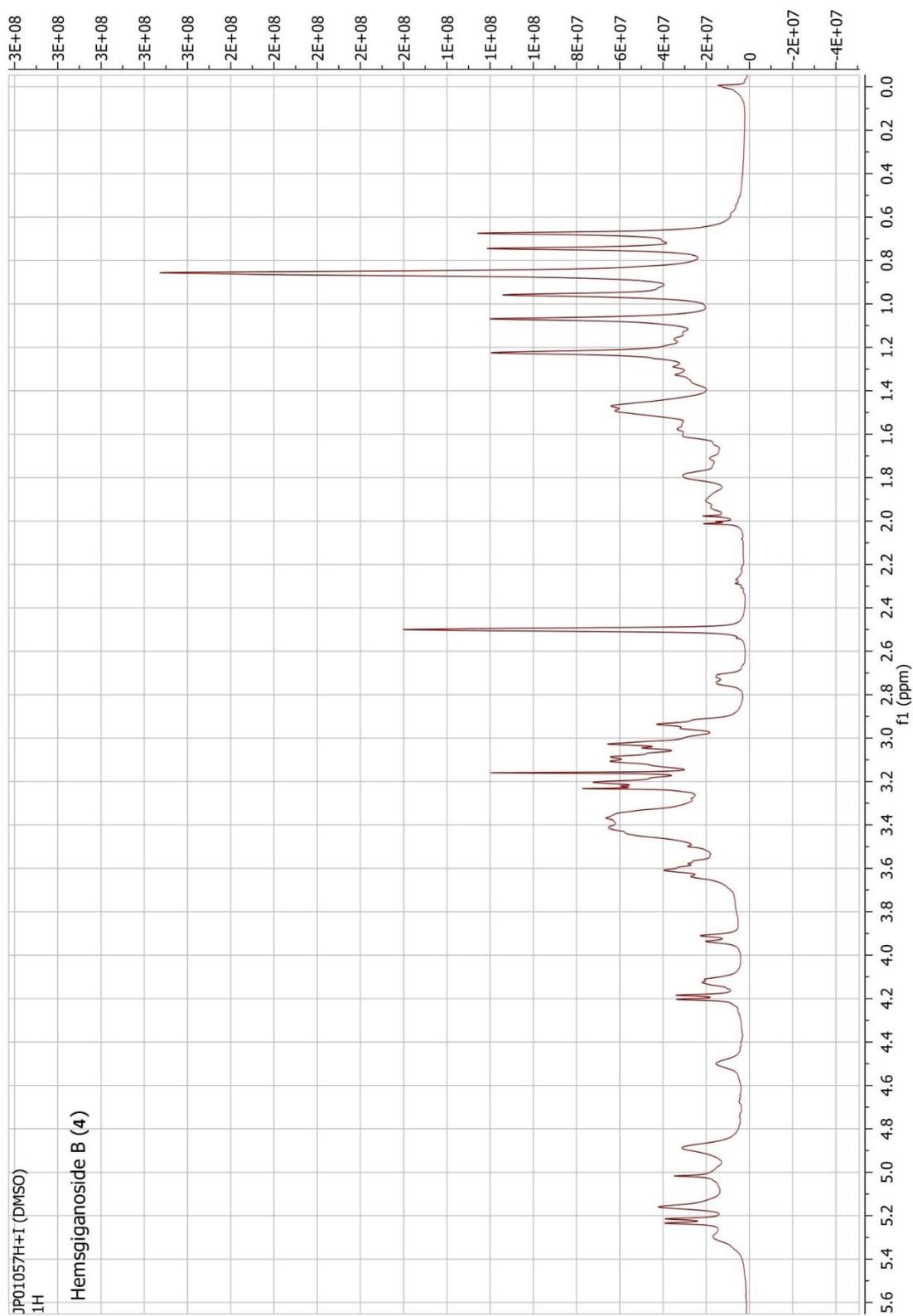
Annexe II - 36. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin de kaempferol-3-glucose (bas)
 Annexe II - 37. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin de rutine (bas)

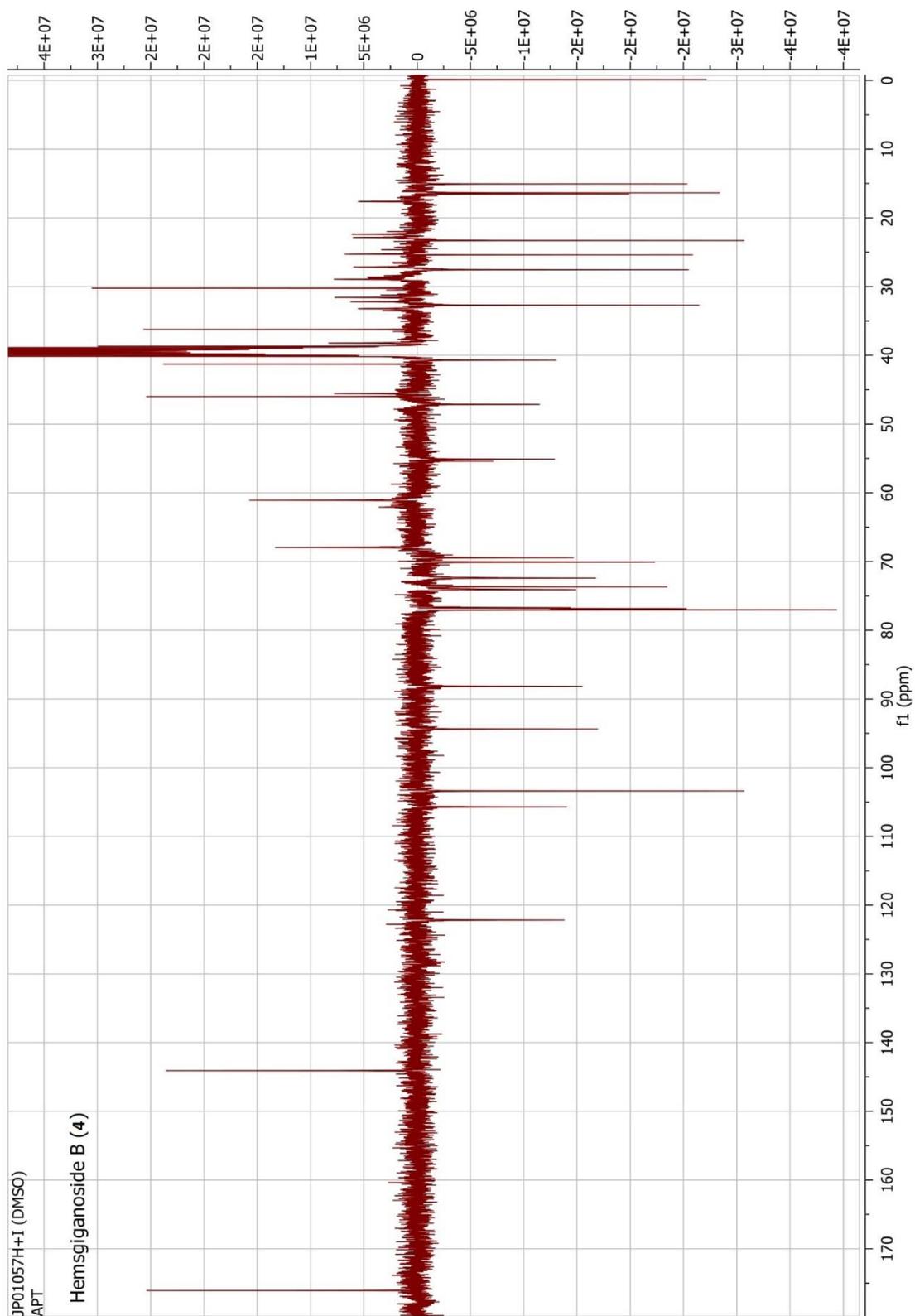


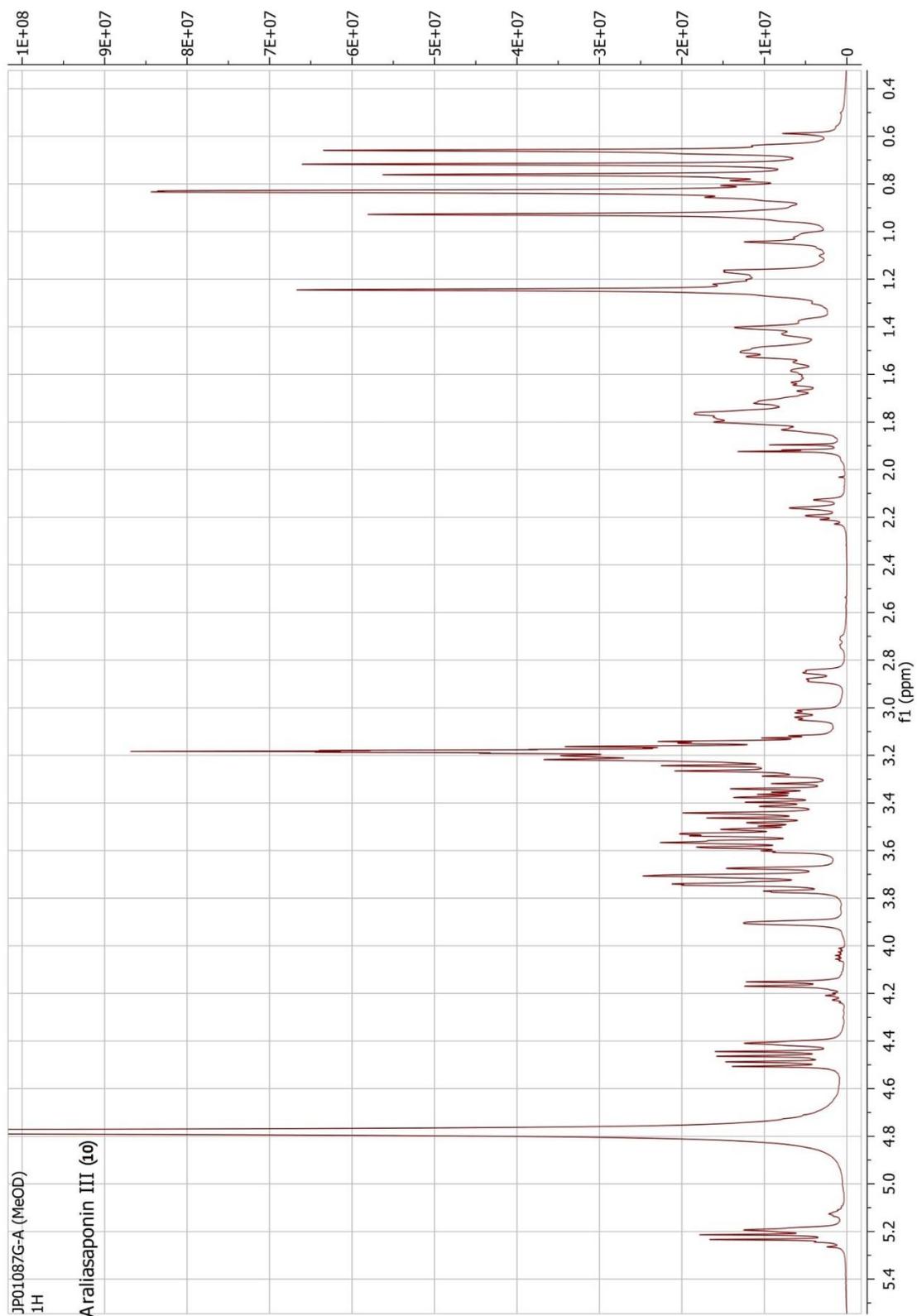
Annexe II - 38. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin de kaempferol-3-glucose (bas)

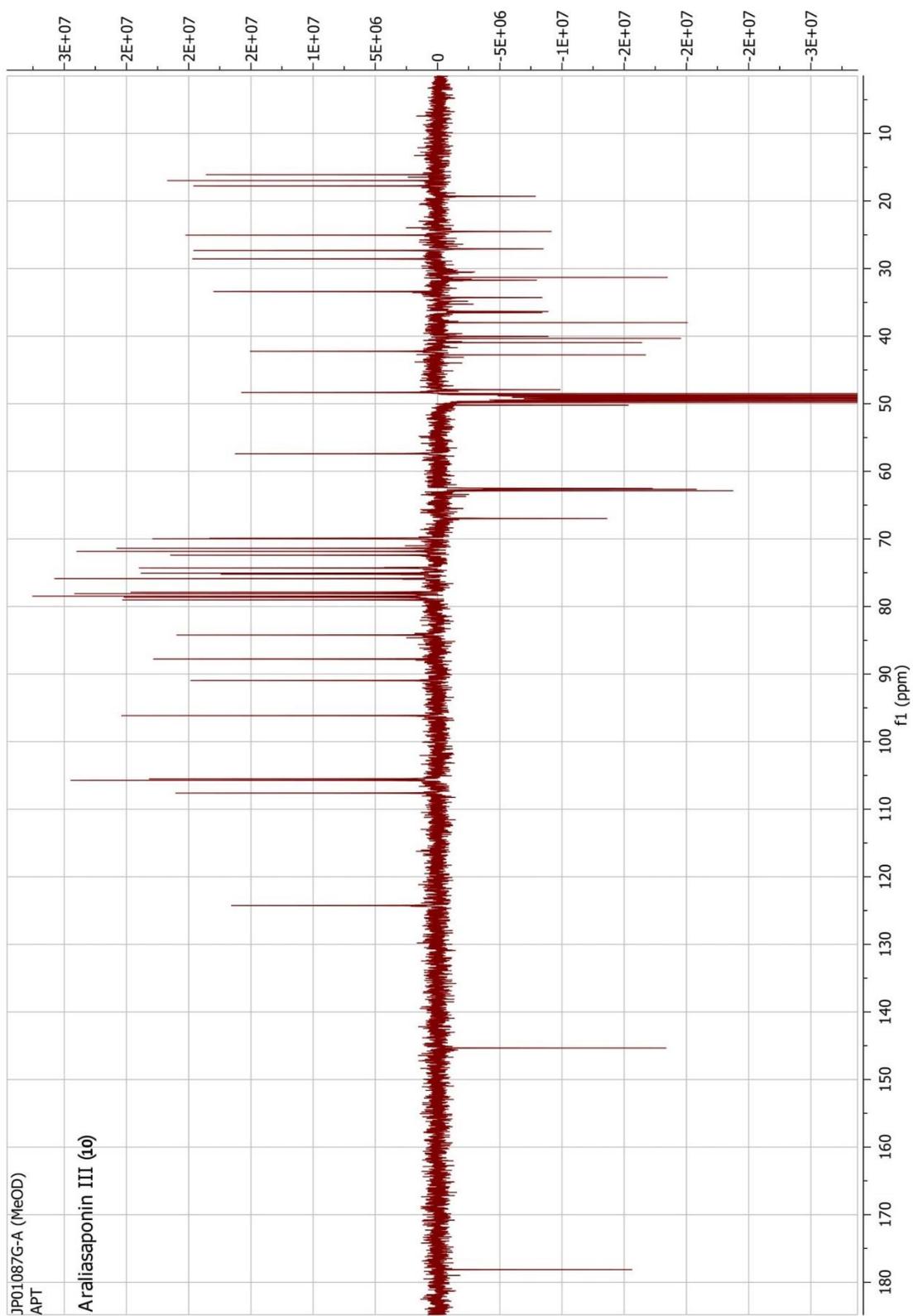
Annexe III - 1. Spectre ^1H RMN de l'hemsgiganoside B (4)Annexe II - 39. Comparaison des chromatogrammes de la fraction JP01031B (haut) et du témoin de kaempferol-3-glucose (bas)

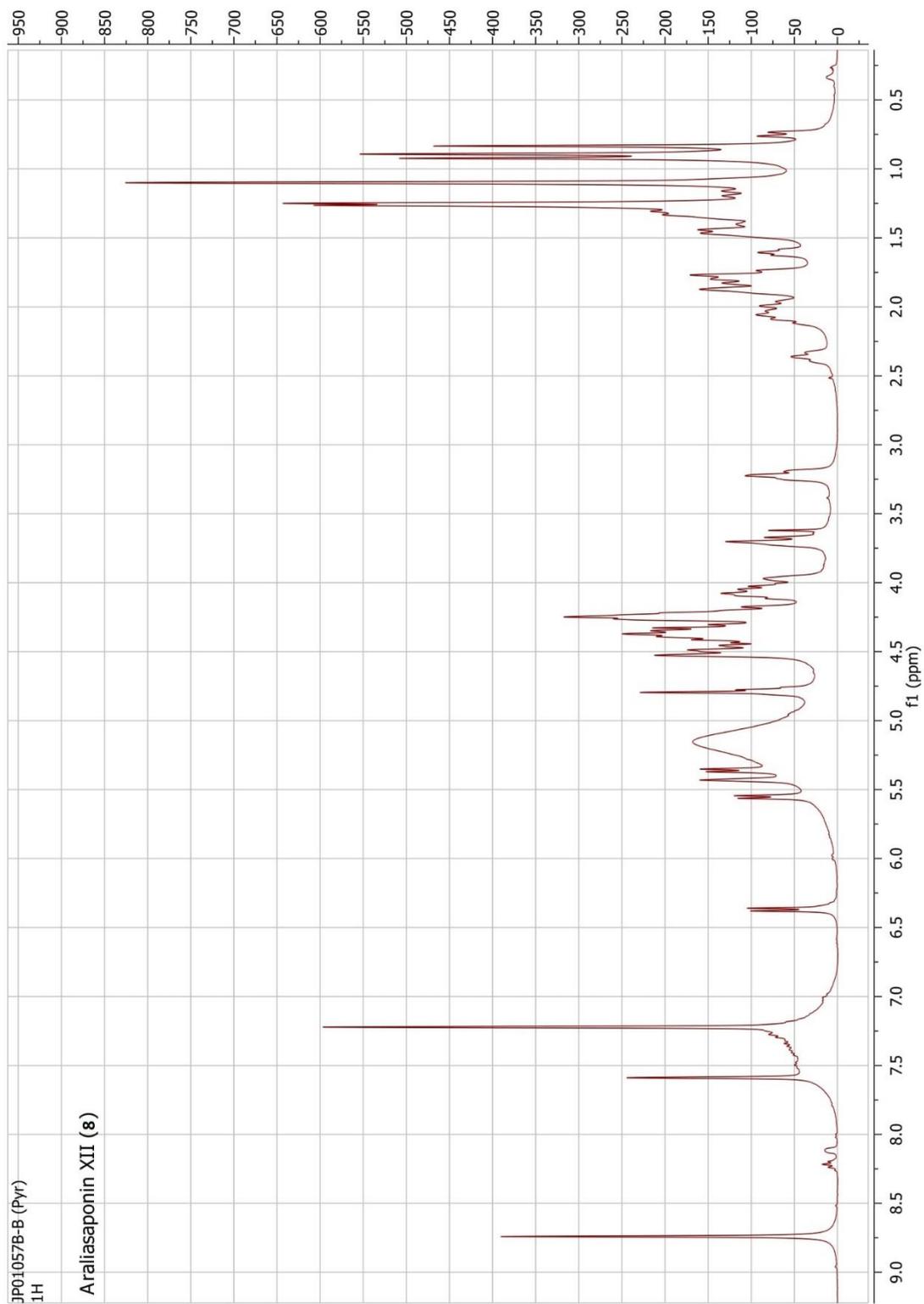
ANNEXES III
SPECTRES RMN

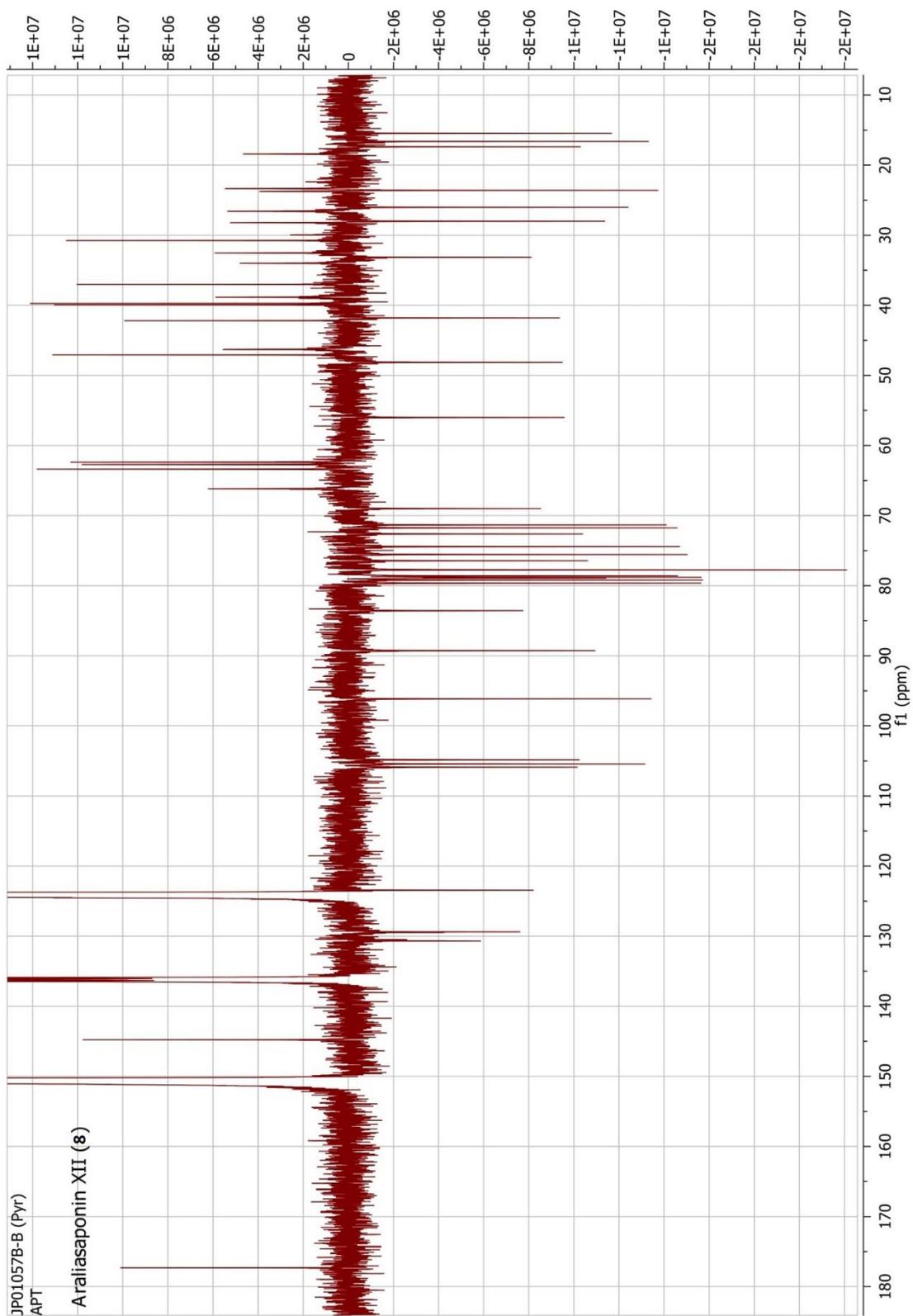
Annexe III - 2. Spectre ^1H RMN de l'hemsgiganoside B (4)Annexe III - 3. Spectre ^1H RMN de l'hemsgiganoside B (4)

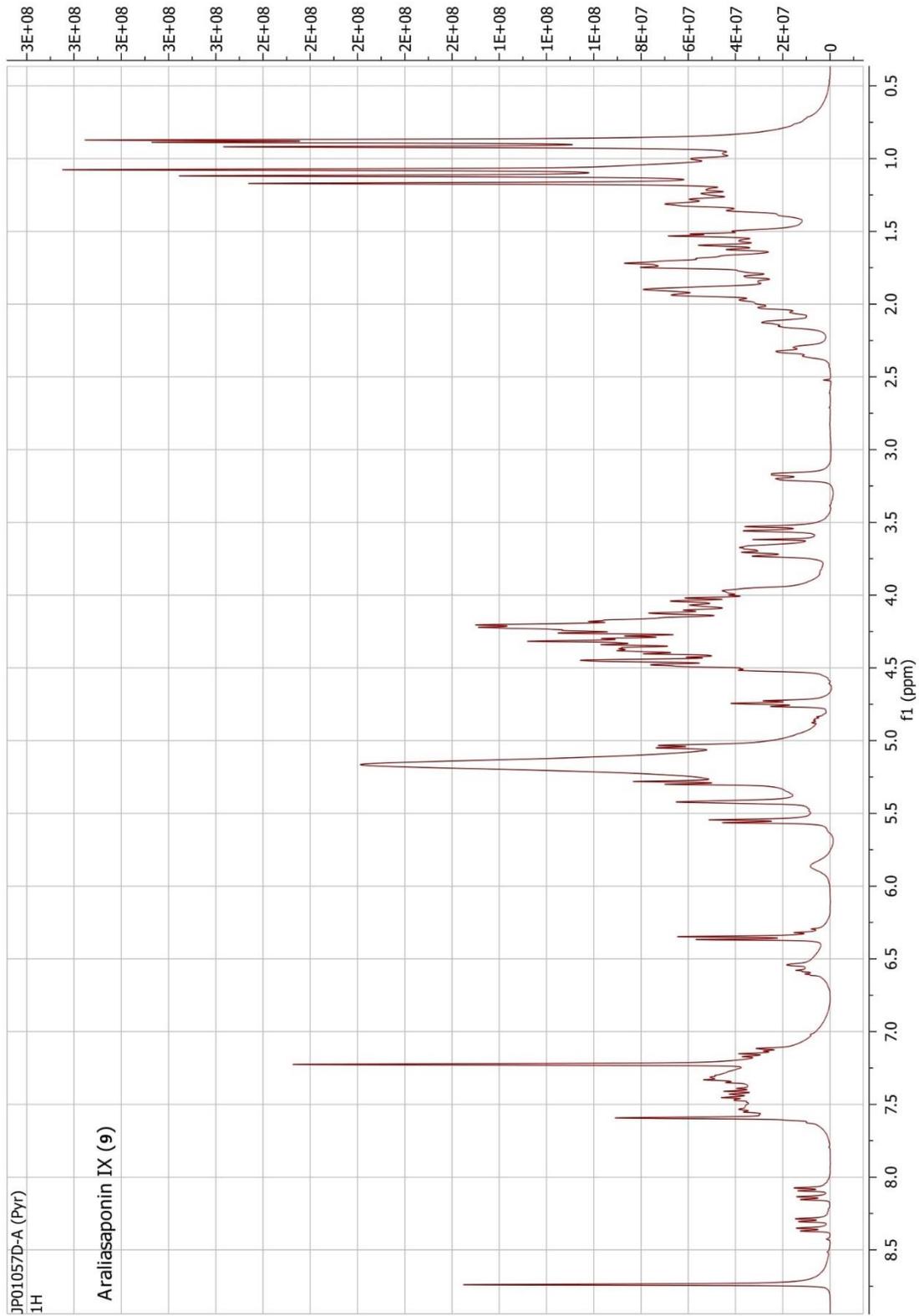
Annexe III - 4. Spectre ^{13}C RMN de l'hemsgiganoside B (4)

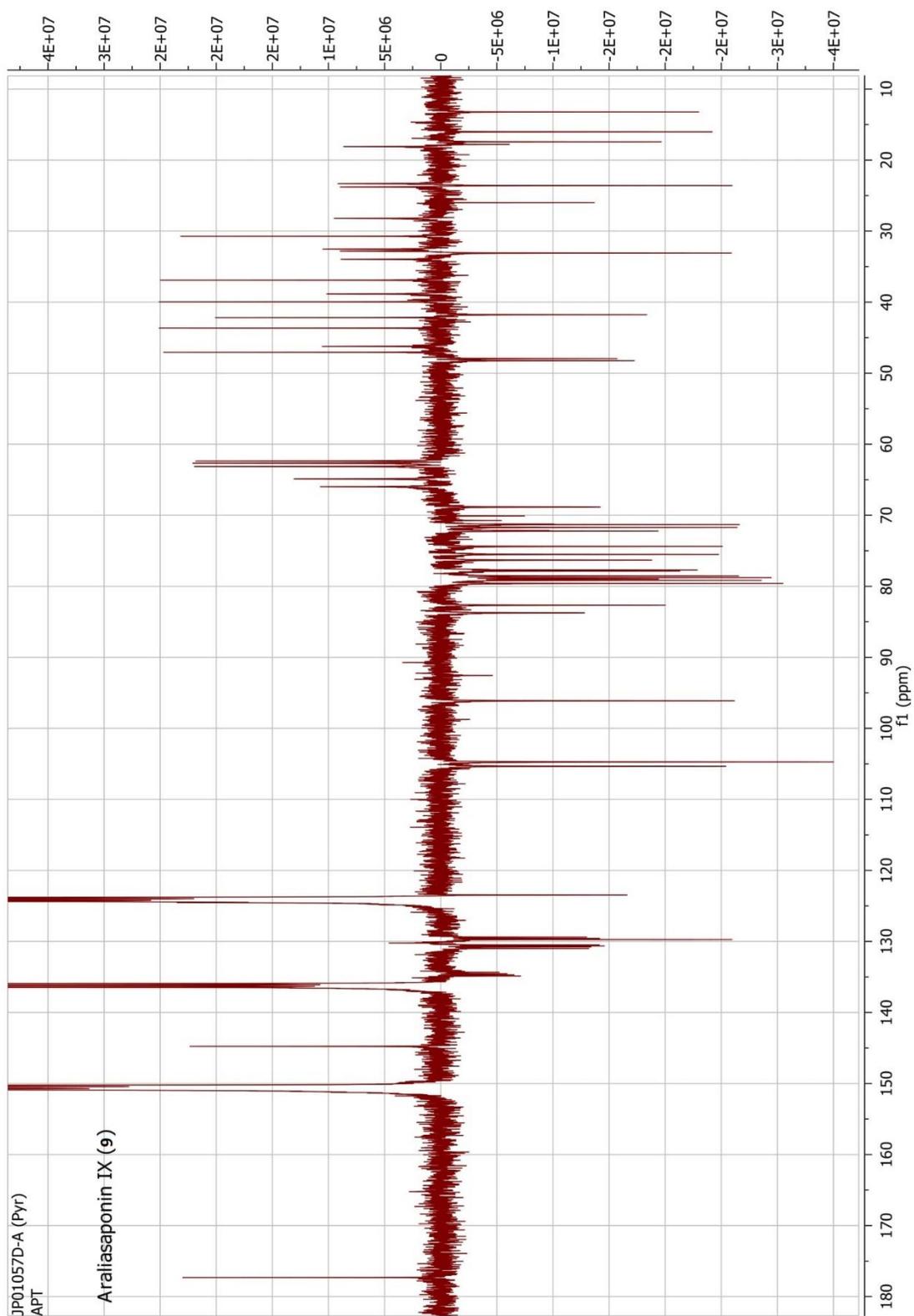
Annexe III - 6. Spectre ^1H RMN de l'araliasaponin III (10)

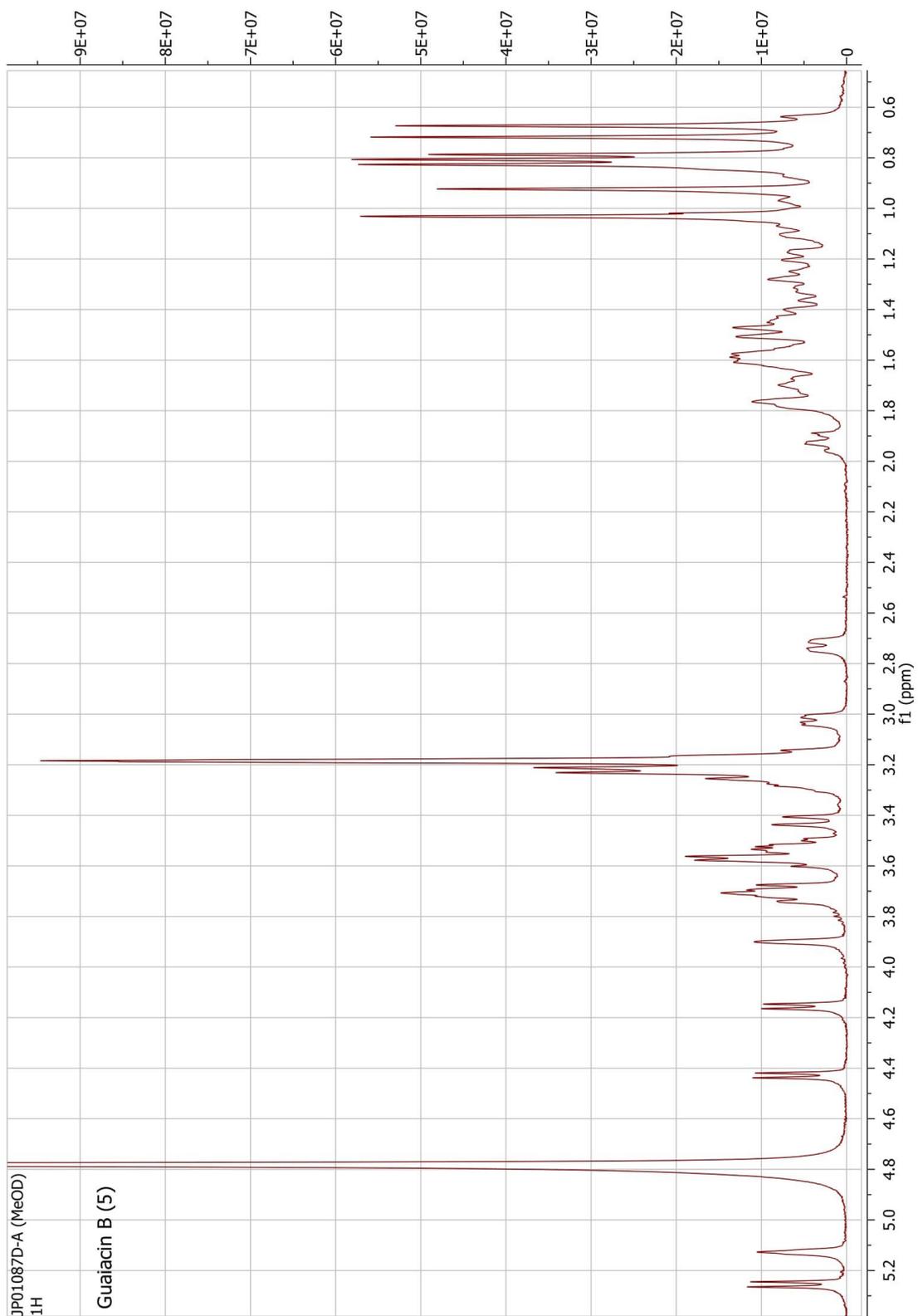
Annexe III - 8. Spectre ^{13}C RMN de l'araliasaponin III (10)Annexe III - 9. Spectre ^{13}C RMN de l'araliasaponin III (10)

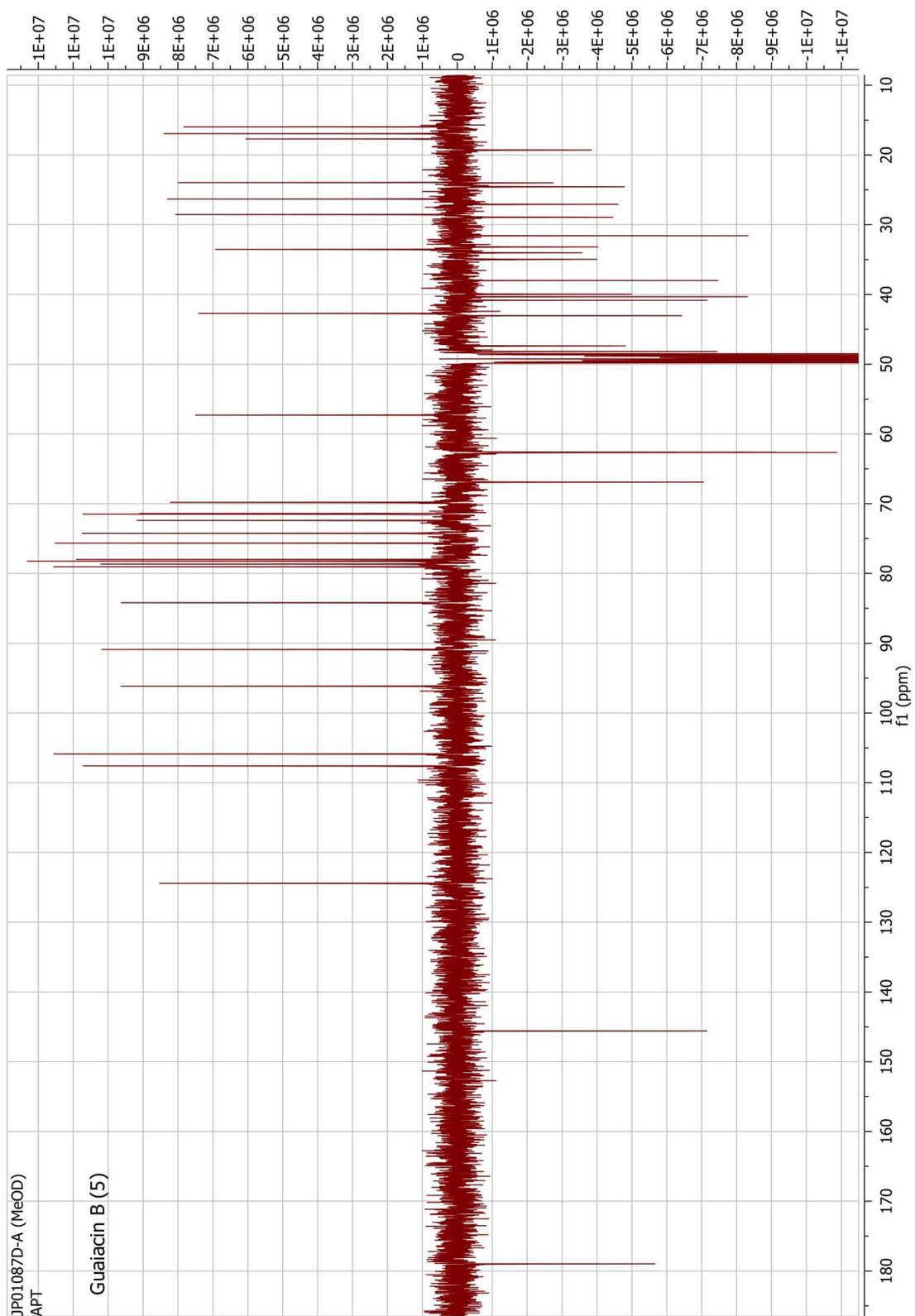
Annexe III - 10. Spectre ^1H RMN de l'araliasaponin XII (8)Annexe III - 11. Spectre ^1H RMN de l'araliasaponin XII (8)

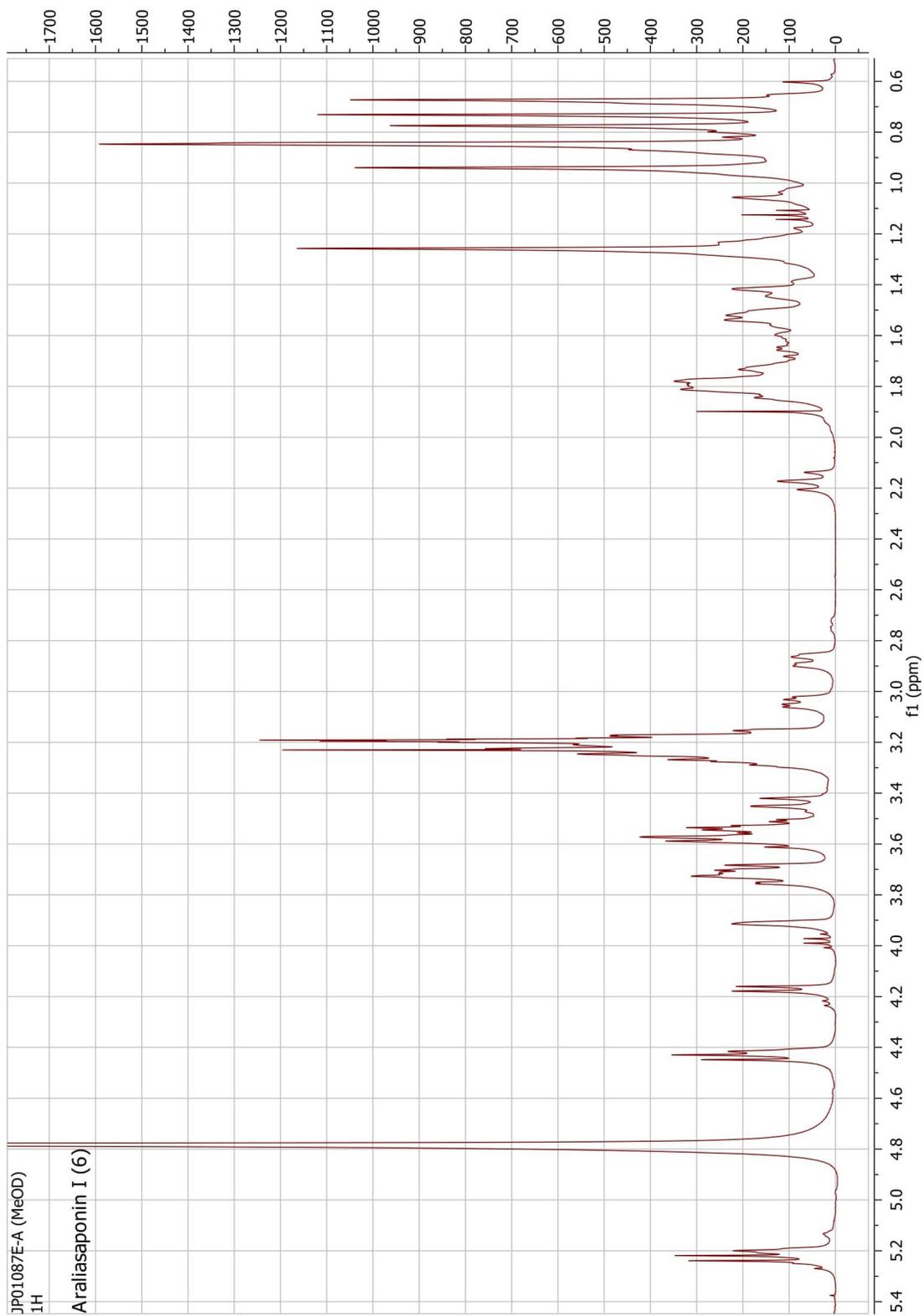
Annexe III - 12. Spectre ^{13}C RMN de l'araliasaponin XII (8)Annexe III - 13. Spectre ^{13}C RMN de l'araliasaponin XII (8)

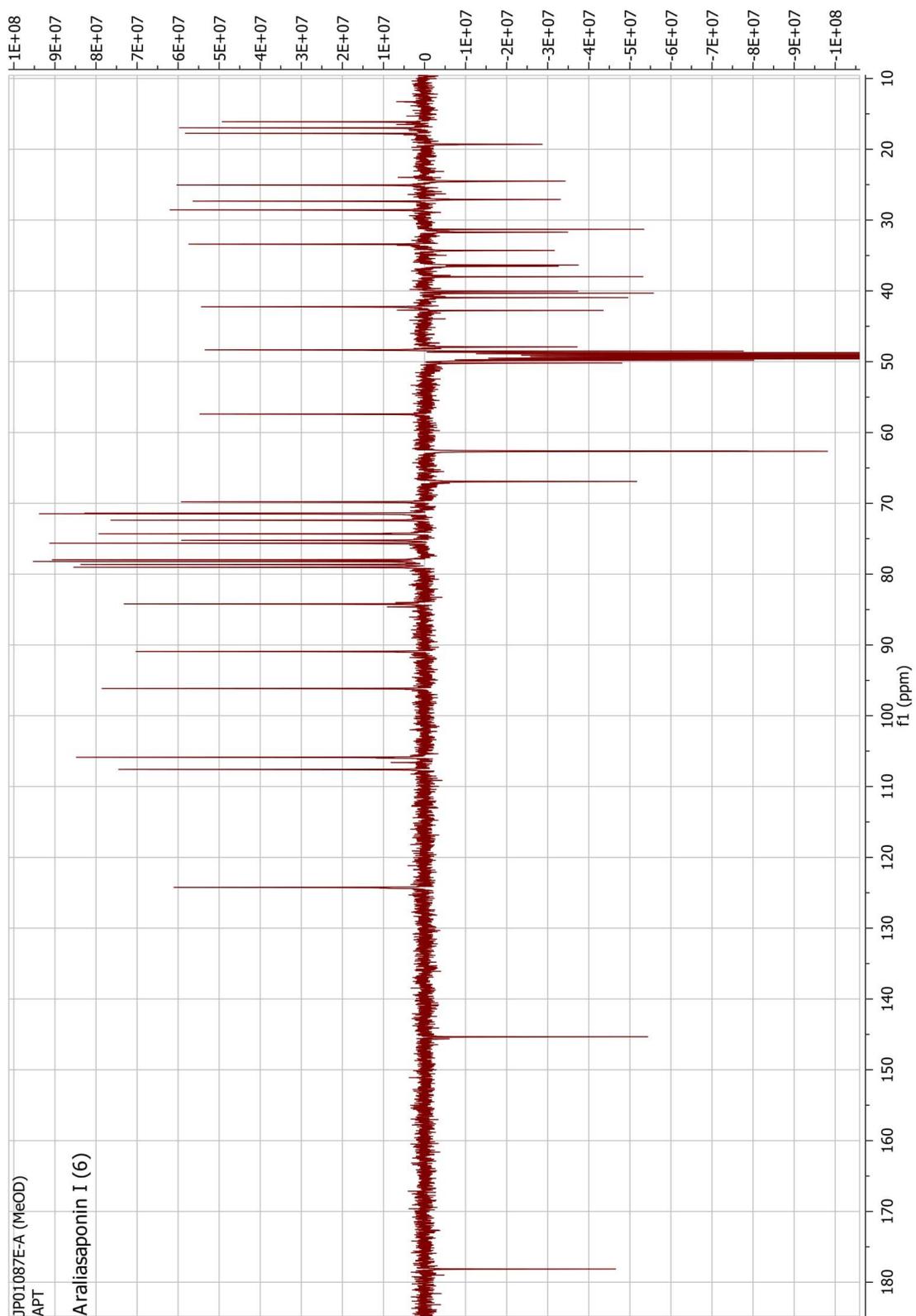
Annexe III - 14. Spectre ^1H RMN de l'araliasaponin IX (9)Annexe III - 15. Spectre ^1H RMN de l'araliasaponin IX (9)

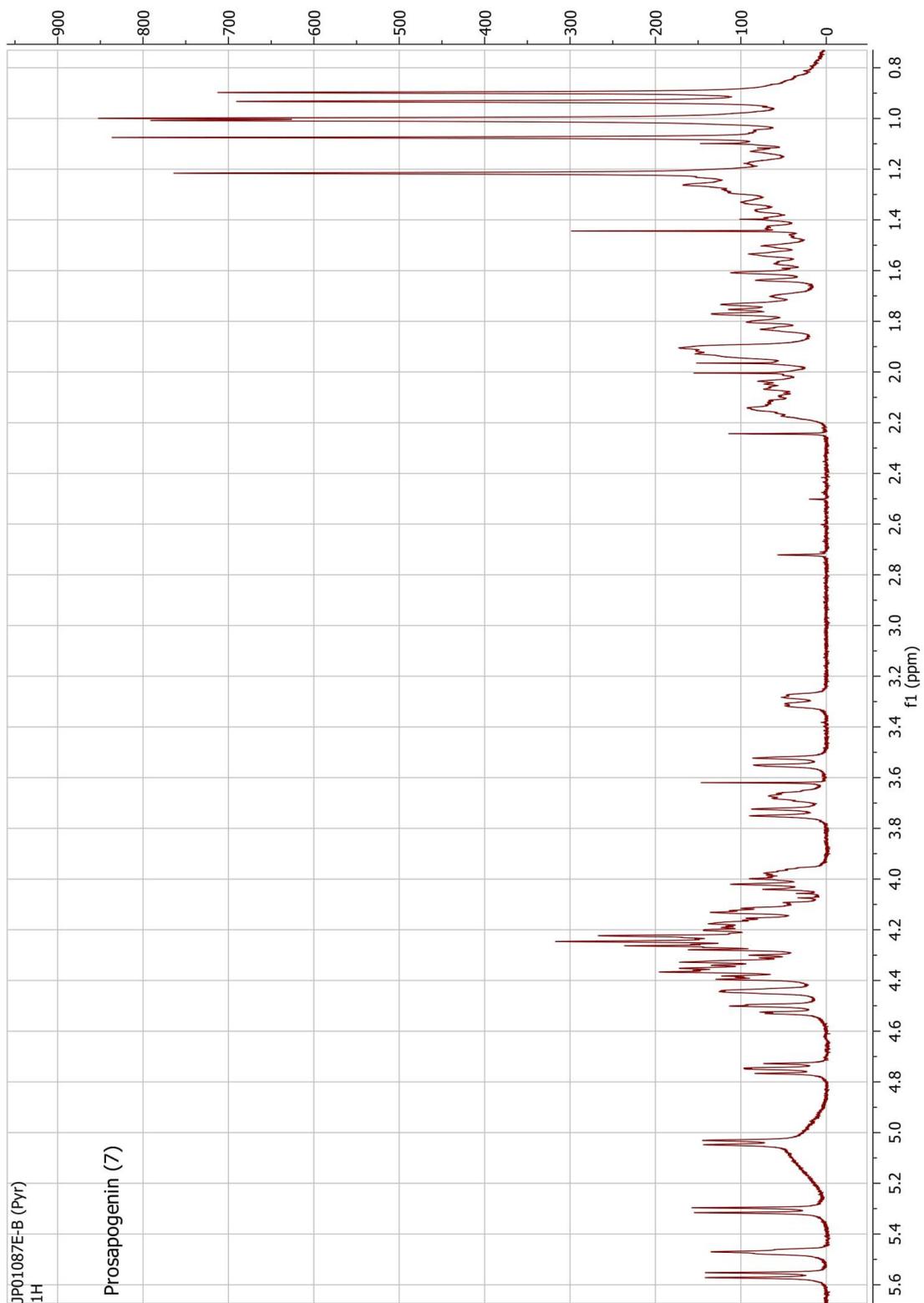
Annexe III - 16. Spectre ^{13}C RMN de l'araliasaponin IX (9)Annexe III - 17. Spectre ^{13}C RMN de l'araliasaponin IX (9)

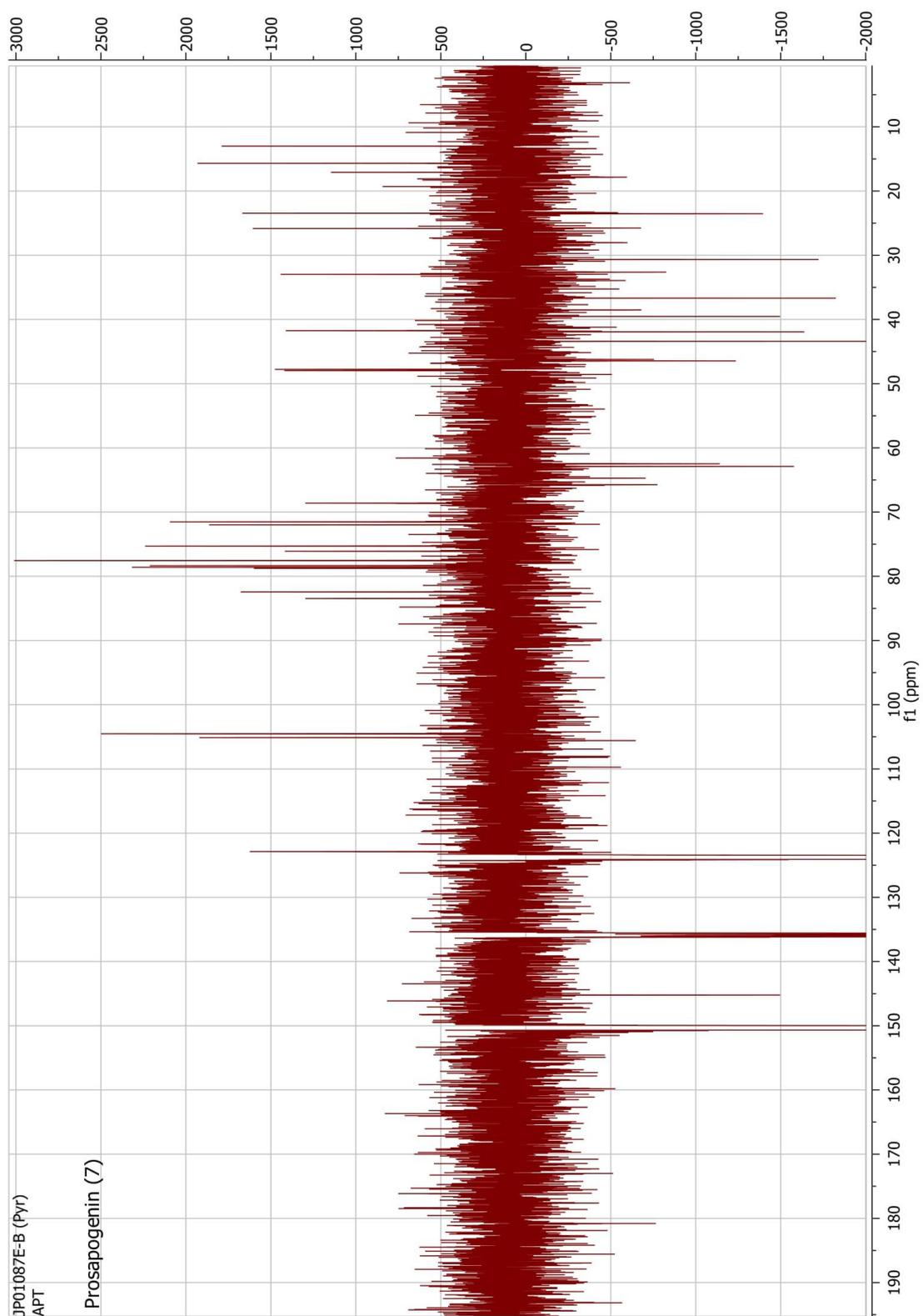
Annexe III - 18. Spectre ^1H RMN de la guaiacin B (5)Annexe III - 19. Spectre ^1H RMN de la guaiacin B (5)

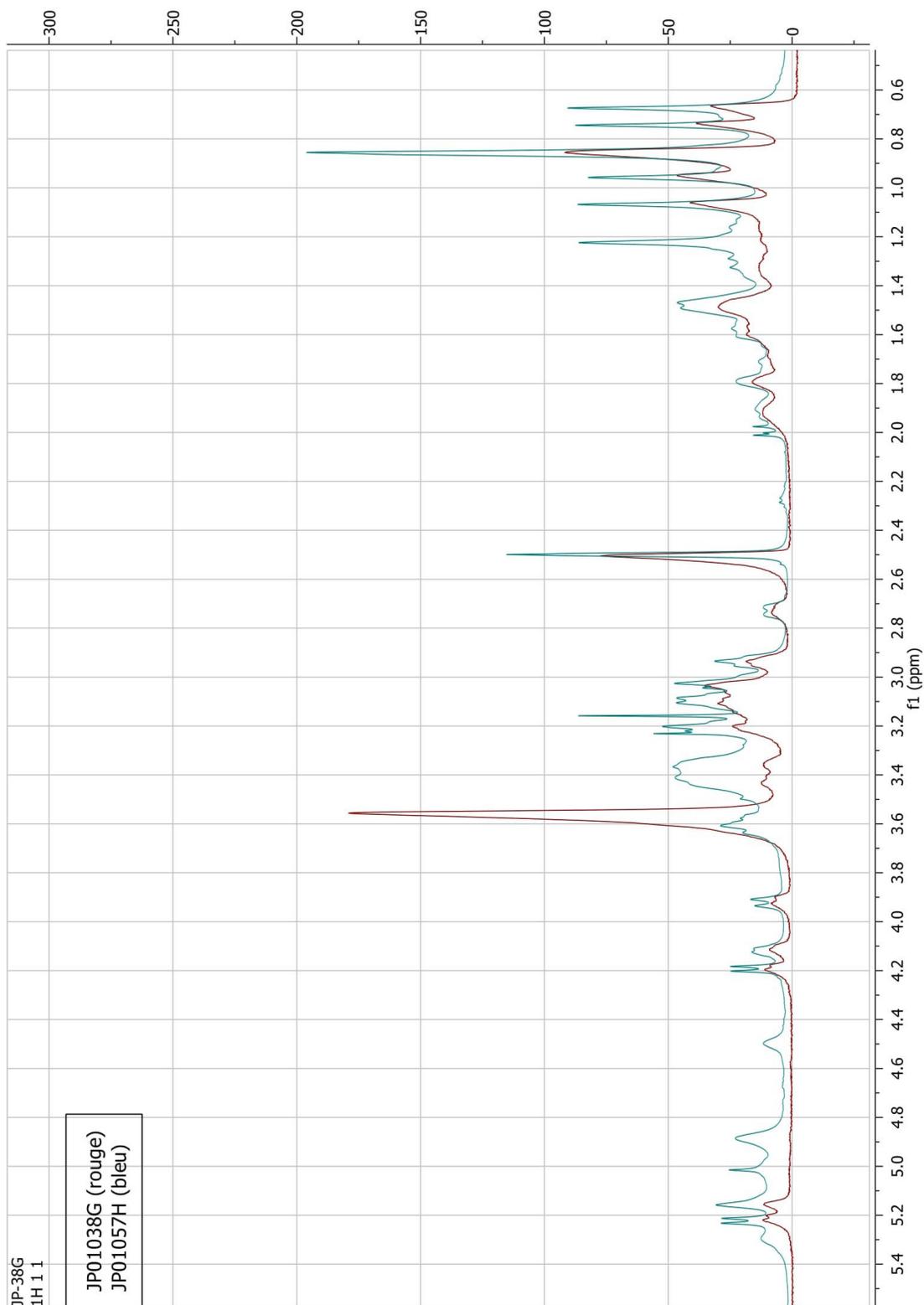
Annexe III - 20. Spectre ^{13}C RMN de la guaiacin B (5)Annexe III - 21. Spectre ^{13}C RMN de la guaiacin B (5)

Annexe III - 22. Spectre ^1H RMN de l'araliasaponin I (6)Annexe III - 23. Spectre ^1H RMN de l'araliasaponin I (6)

Annexe III - 24. Spectre ^{13}C RMN de l'araliasaponin I (6)Annexe III - 25. Spectre ^{13}C RMN de l'araliasaponin I (6)

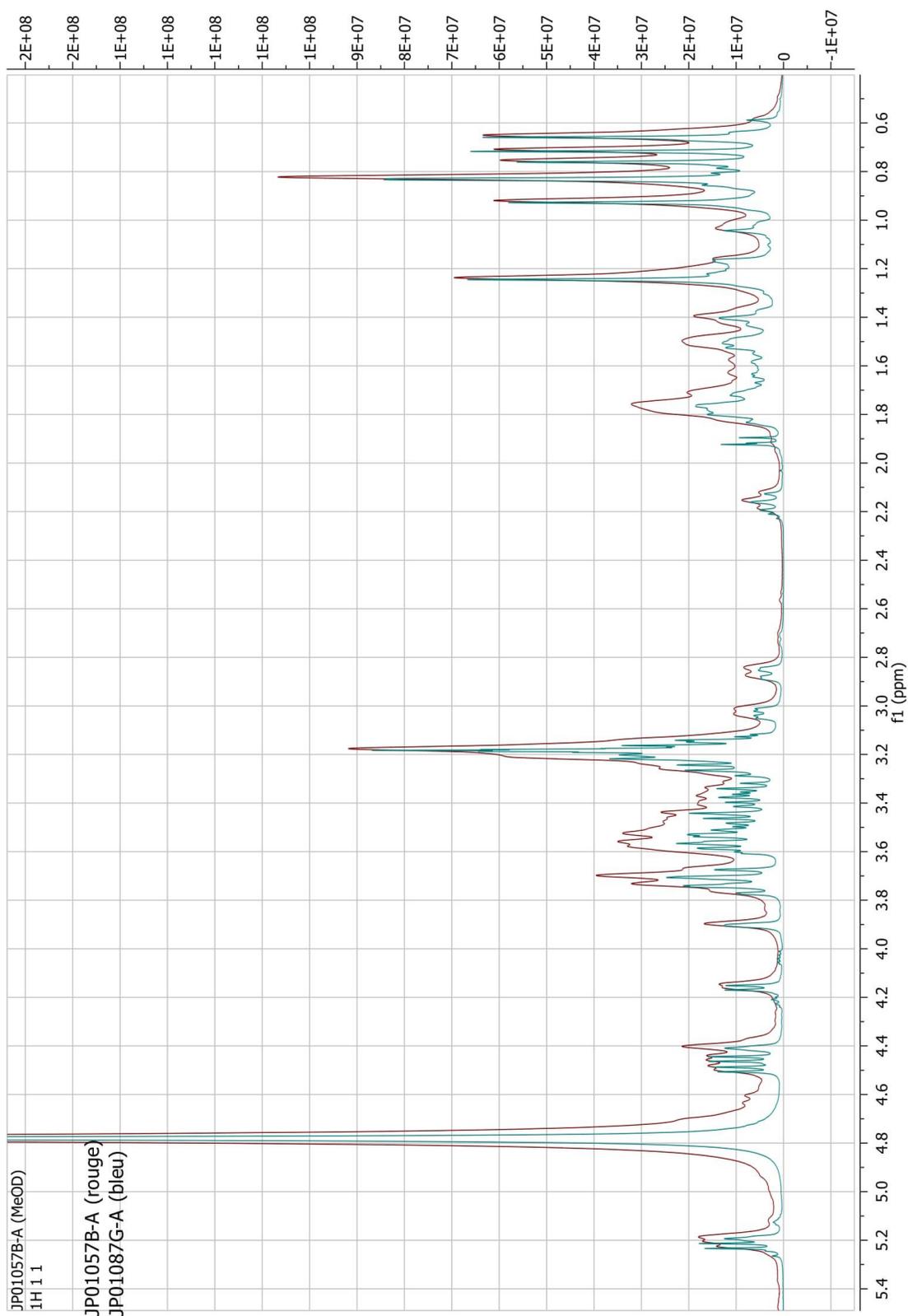
Annexe III - 26. Spectre ^1H RMN de la prosapogenin (7)Annexe III - 27. Spectre ^1H RMN de la prosapogenin (7)

Annexe III - 28. Spectre ^{13}C RMN de la prosapogenin (7)Annexe III - 29. Spectre ^{13}C RMN de la prosapogenin (7)



Annexe III - 31. Comparaison des spectres ¹H RMN des fractions JP01038G (rouge) et JP01057H (bleu) correspondant à la molécule du hemsgiganoside B

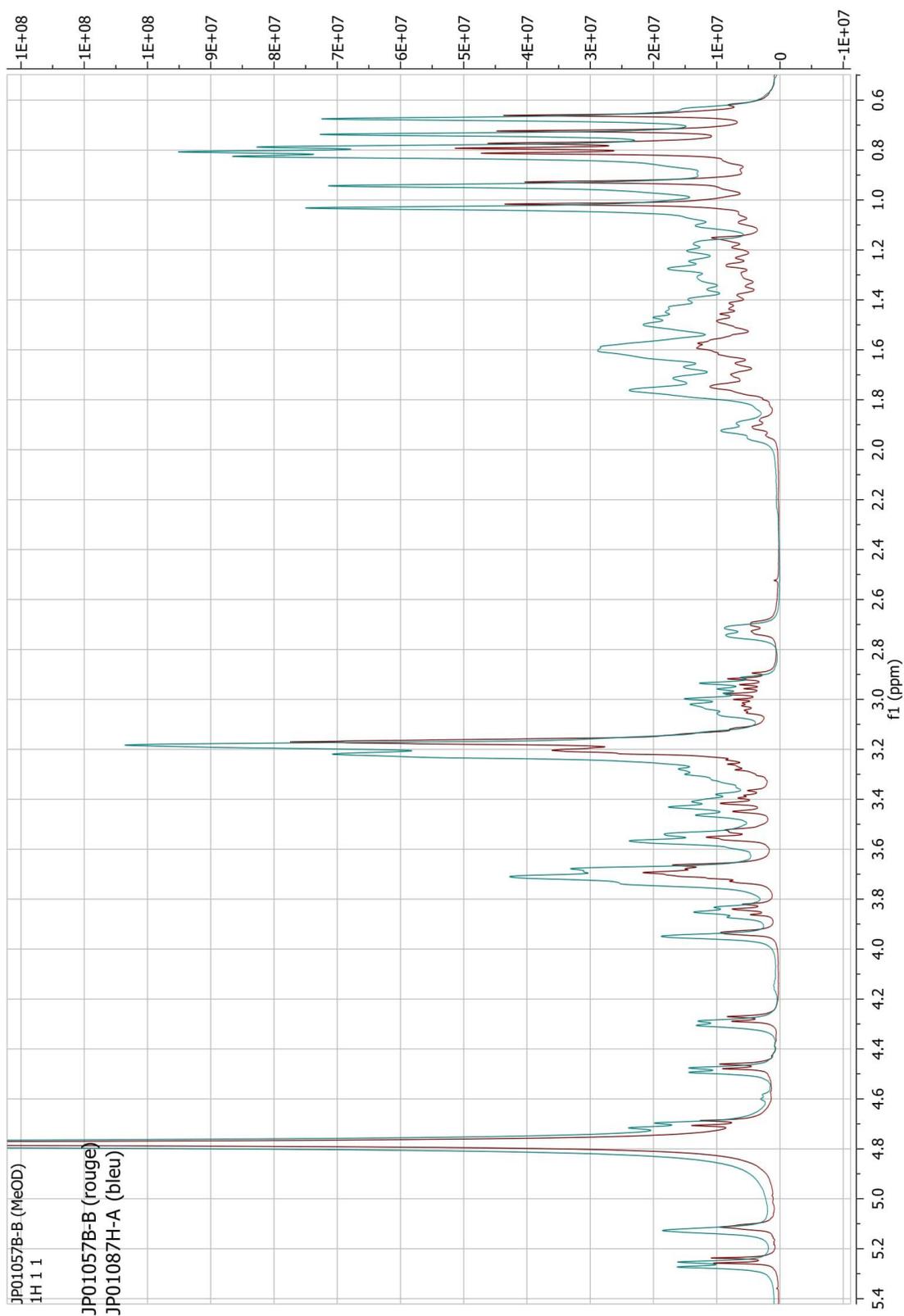
Annexe III - 32. Comparaison des spectres ¹H RMN des fractions JP01038G (rouge) et JP01057H (bleu) correspondant à la molécule du hemsgiganoside B



Annexe III - 33. Comparaison des spectres ¹H RMN des fractions JP01057B-A (rouge) et JP01087G-A (bleu) correspondant à la molécule de l'araliasaponin III

Annexe III - 34. Comparaison des spectres ¹H RMN des fractions JP01057B-B (rouge) et JP01087H-A (bleu) correspondant à la molécule de l'araliasaponin XII

Annexe III - 35. Comparaison des spectres ¹H RMN des fractions JP01057B-C (rouge) et JP01087I-A (bleu) correspondant à la molécule de l'araliasaponin XIII

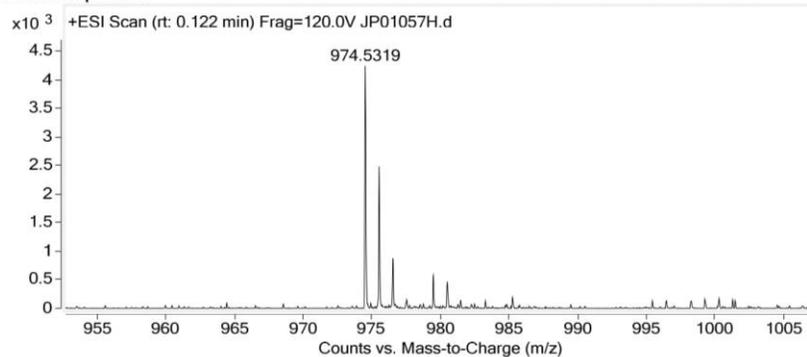


Annexe III - 36. Comparaison des spectres ^1H RMN des fractions JP01057B-B (rouge) et JP01087H-A (bleu) correspondant à la molécule de l'araliasaponin XII

ANNEXES IV

SPECTRES HR-ESI-MS

MS zoomed spectrum

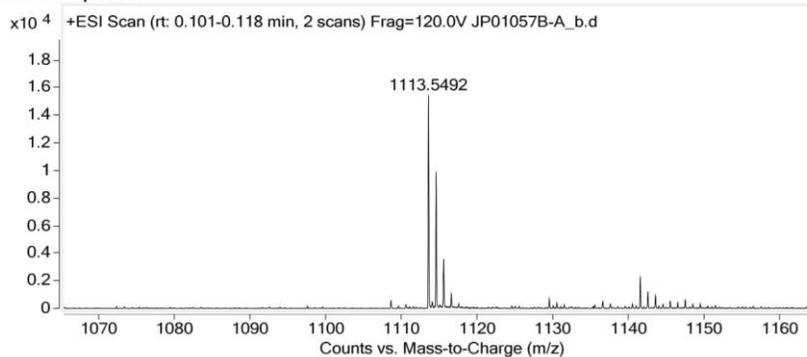


Ion	Formula	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff (mDa)
[M+NH ₄] ⁺	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	974.5319	974.5319	0

Annexe IV - 2. Analyse HR-MS du produit hemsgiganoside B (4)

Annexe IV - 3. Analyse HR-MS du produit hemsgiganoside B (4)

MS zoomed spectrum

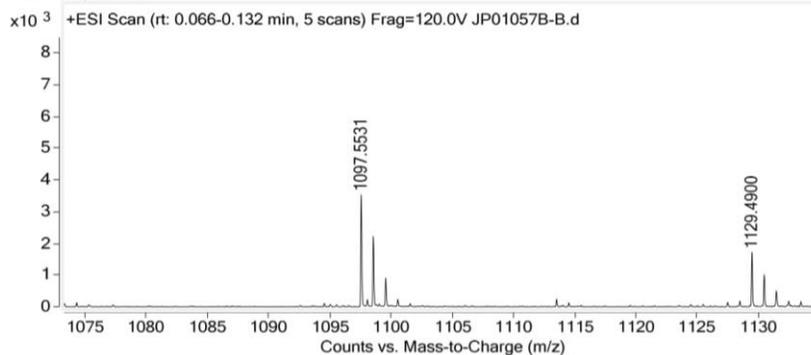


Ion	Formula	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff (mDa)
[M+Na] ⁺	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1113.5492	1113.5452	-3.99

Annexe IV - 4. Analyse HR-MS du produit araliasaponin III (10)

Annexe IV - 5. Analyse HR-MS du produit araliasaponin III (10)

MS zoomed spectrum

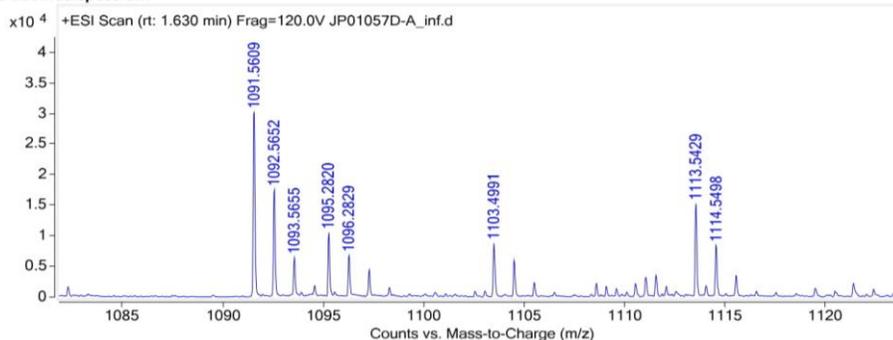


Ion	Formula	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff (mDa)
[M+Na] ⁺	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	1097.5531	1097.5503	-2.8

Annexe IV - 6. Analyse HR-MS du produit araliasaponin XII (8)

Annexe IV - 7. Analyse HR-MS du produit araliasaponin XII (8)

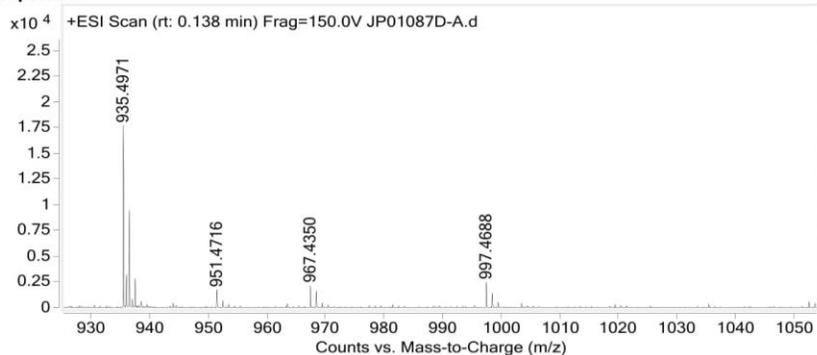
MS zoomed spectrum



Ion	Formula	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff (mDa)
[M+H] ⁺	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1091.5609	1091.5633	2.37
[M+Na] ⁺	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1116.5429	1113.5452	2.31

Annexe IV - 8. Analyse HR-MS du produit araliasaponin IX (9)

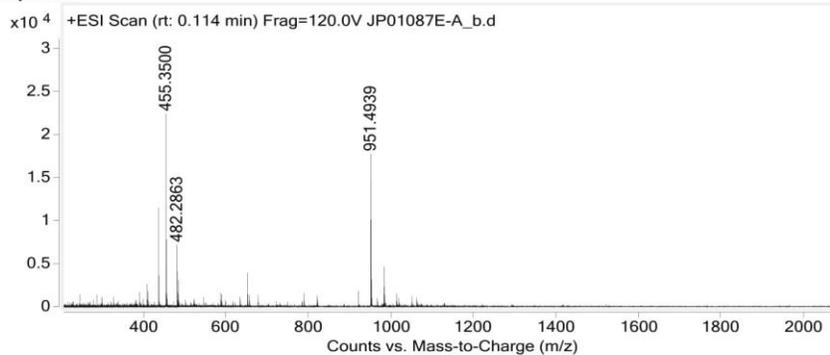
Annexe IV - 9. Analyse HR-MS du produit araliasaponin IX (9)

MS spectrum**Possible compositions for m/z 935.4971**

Ion Formula	m/z (Calc)	Diff (ppm)	Diff (mDa)	DBE
C ₅₆ H ₇₁ O ₁₂	935.494	-3.31	-3.1	22
▶ C ₄₇ H ₇₆ NaO ₁₇	935.4975	0.4	0.37	10
C ₄₉ H ₇₅ O ₁₇	935.4999	2.97	2.78	13
C ₆₅ H ₆₈ NaO ₄	935.501	4.15	3.88	32

Annexe IV - 10. Analyse HR-MS du produit guaiacin B (5)

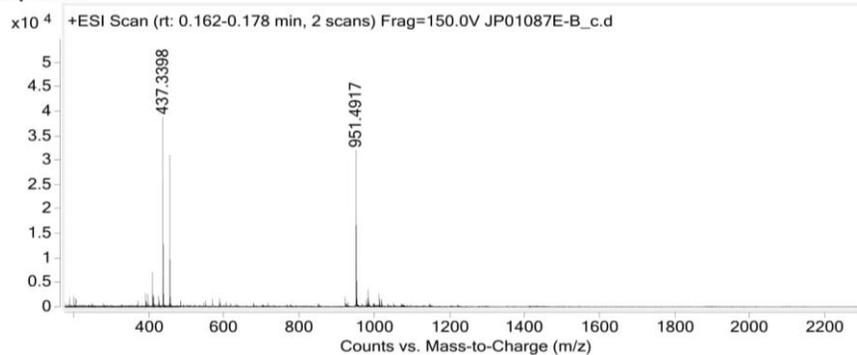
Annexe IV - 11. Analyse HR-MS du produit guaiacin B (5)

MS spectrum**Possible species for m/z 951.4963**

Ion Formula	m/z (Calc)	Diff (ppm)	Diff (mDa)	DBE
▶ C ₄₇ H ₇₆ NaO ₁₈	951.4924	-1.63	-1.51	10
C ₆₅ H ₆₈ NaO ₅	951.4959	3.15	3	27

Annexe IV - 12. Analyse HR-MS du produit araliasaponin I (6)

Annexe IV - 13. Analyse HR-MS du produit araliasaponin I (6)

MS spectrum**Possible compositions for m/z 951.4917**

	Ion Formula	m/z (Calc)	Diff (ppm)	Diff (mDa)	DBE
	C ₅₆ H ₇₁ O ₁₃	951.4889	-2.93	-2.78	22
	C ₇₂ H ₆₄ Na	951.49	-1.76	-1.68	41
▶	C ₄₇ H ₇₆ NaO ₁₈	951.4924	0.72	0.69	10
	C ₇₄ H ₆₃	951.4924	0.77	0.73	44
	C ₄₉ H ₇₅ O ₁₈	951.4948	3.25	3.09	13
	C ₆₅ H ₆₈ NaO ₅	951.4959	4.41	4.2	32

Annexe IV - 14. Analyse HR-MS du produit prosapogenin (7)

Annexe IV - 15. Analyse HR-MS du produit prosapogenin (7)

ANNEXES V

TESTS BIOLOGIQUES

DES EXTRAITS BRUTS

Anti-inflammatoire	
Échantillons	IC50
F.A.nud. DCM	20 ± 3
F.A.nud. MeOH	> 160
F.A.n. MeOH/H2O	> 160
F.A.hisp. MeOH	> 160
F.A.h. MeOH/H2O	> 160
R.A.nud. DCM	(pas de valeur)
R.A.nud. MeOH	31 ± 11
R.A.n. MeOH/H2O	> 160
R.A.hisp. DCM	3,4 ± 0,7
R.A.hisp. MeOH	> 160
R.A.h. MeOH/H2O	> 160

Annexe V - 1. Tests anti-inflammatoires sur les feuilles (F.) et racines (R.) d'*Aralia nudicaulis* (A.n.) et *hispida* (A.h.)

Annexe V - 2. Tests antifongiques sur les feuilles (F.) et racines (R.) d'*Aralia nudicaulis* (A.n.) et *hispida* (A.h.)
Annexe V - 3. Tests anti-inflammatoires sur les feuilles (F.) et racines (R.) d'*Aralia nudicaulis* (A.n.) et *hispida* (A.h.)

F.A.hisp. MeOH	>200 µg/ml	>200 µg/ml
F.A.h. MeOH/H2O	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.nud. DCM	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.nud. MeOH	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.n. MeOH/H2O	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.hisp. DCM	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.hisp. MeOH	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.h. MeOH/H2O	>200 µg/ml	>200 µg/ml
AmphotericinB	0,21 ± 0,03 µM	0,36 µM

Test Antioxydant Cellulaire sur WS-1	DCFH-DA
Échantillons	IC50 antiox
JPO1005A (feuilles d'A. nudicaulis CH2Cl2)	3 ± 2 µg/ml (81%) R2:0,8544
JPO1006A (feuilles d'A. nudicaulis MeOH)	6 ± 2 µg/ml (36%) R2:0,9302
JPO1007A (feuilles d'A. nudicaulis MeOH/H2O (70:30))	0,07 ± 0,03 µg/ml (43%) R2:0,7967
JPO1007B (feuilles d'A. hispida MEOH)	3,0 ± 0,6 µg/ml (19%) R2:0,8522
JPO1008B (feuilles d'A. hispida MEOH/H2O (70:30))	10 ± 2 µg/ml (15%) R2:0,8747
JPO1008A (racines d'A. nudicaulis CH2Cl2)	2,7 ± 0,4 µg/ml (15%) R2:0,972
JPO1008C (racines d'A. nudicaulis MEOH)	0,38 ± 0,09 µg/ml (25%) R2:0,8568

Annexe V - 4. Tests antifongiques sur les feuilles (F.) et racines (R.) d'*Aralia nudicaulis* (A.n.) et *hispida* (A.h.)

JPO1009A (racines d'A. hispida MEOH)	8,7 ± 0,8 µg/ml (10%) R2:0,7985
JPO1010A (racines d'A. hispida MEOH/H2O (70:30))	4,2 ± 0,7 µg/ml (18%) R2:0,8544
Trolox	0,22 ± 0,03 µg/ml (12%) R2:0,9865
Quercetin	0,047 ± 0,009 µg/ml (19%) R2:0,9428
Catechin	0,31 ± 0,04 µg/ml (13%) R2:0,9834

Annexe V - 6. Tests antioxydant cellulaire sur les feuilles et racines d'*Aralia nudicaulis* et *hispida*

ORAC 384 puits													
	Produits	MW	(mM)	(mg/ml)	µmol Trolox / ml		µmol Trolox / mg		µmol Trolox / µmol		SE	R2	n
1	JP01005A (feuilles d'A. nud. CH2Cl2)			16	5,80	±0,95	0,36	±0,06			16%	0,8301	9
20	JP01005A (feuilles d'A. nud. CH2Cl2)			16	3,44	±0,59	0,22	±0,04			17%	0,7969	10
2	JP01006A (feuilles d'A. nud. MeOH)			16	13,42	±1,64	0,84	±0,10			12%	0,8989	9
3	JP01007A (f. d'A. nud. MeOH/H2O (70:30))			16	24,41	±3,08	1,53	±0,19			13%	0,9053	8
4	JP01007B (feuilles d'A. hisp. MEOH)			16	50,74	±5,84	3,17	±0,36			12%	0,9312	7
5	JP01008B (f. d'A. hisp. MEOH/H2O (70:30))			16	89,05	±9,53	5,57	±0,60			11%	0,9500	6
6	JP01008A (racines d'A. nud. CH2Cl2)			16	5,41	±0,87	0,34	±0,05			16%	0,8153	10
15	JP01008C (racines d'A. nud. MEOH)			16	19,32	±5,09	1,21	±0,32			26%	0,7091	7
16	JP01009C (r. d'A. nud. MEOH/H2O (70:30))			16	24,50	±3,29	1,53	±0,21			13%	0,8933	8
17	JP01009A (racines d'A. hisp. CH2Cl2)			16	4,33	±0,63	0,27	±0,04			15%	0,8454	10
18	JP01009B (racines d'A. hisp. MEOH)			16	40,15	±5,12	2,51	±0,32			13%	0,9159	7
19	JP01010A (r. d'A. hisp. MEOH/H2O (70:30))			16	42,40	±5,12	2,65	±0,32			12%	0,9244	7
7	Trolox	250,29	19,97683	5	19,19	±2,41	3,84	±0,48	0,96	±0,12	13%	0,8943	9
8	Quercetin	338,26	14,78153	5	106,31	±17,49	21,26	±3,50	7,19	±1,18	16%	0,8845	6
9	Catechin	290,27	17,22534	5	116,92	±18,91	23,38	±3,78	6,79	±1,10	16%	0,9084	5
10	Quercetin	338,26	14,78153	5	102,97	±18,26	20,59	±3,65	6,97	±1,24	18%	0,8676	6
11	Quercetin	338,26	3,695382	1,25	25,16	±3,01	20,13	±2,41	6,81	±0,82	12%	0,9142	8
12	Trolox	250,29	4,994207	1,25	6,89	±0,76	5,51	±0,60	1,38	±0,15	11%	0,9091	10
13	Quercetin	338,26	3,695382	1,25	25,22	±2,86	20,18	±2,29	6,82	±0,77	11%	0,9228	8
14	Catechin	290,27	4,306335	1,25	28,61	±3,97	22,89	±3,18	6,64	±0,92	14%	0,8862	8

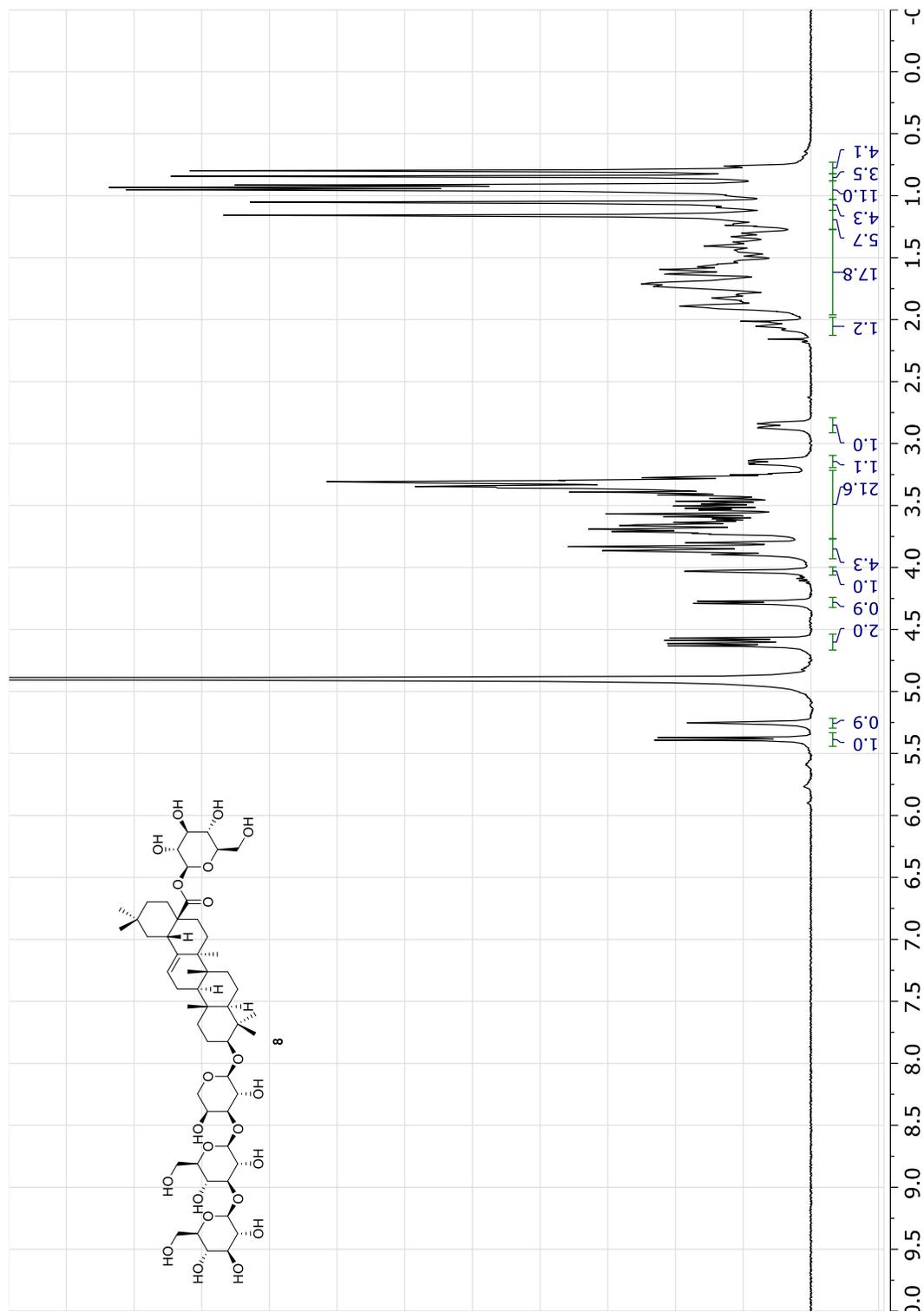
Annexe V - 8. Tests antioxydant ORAC sur les feuilles et racines d'*Aralia nudicaulis* et *hispida*

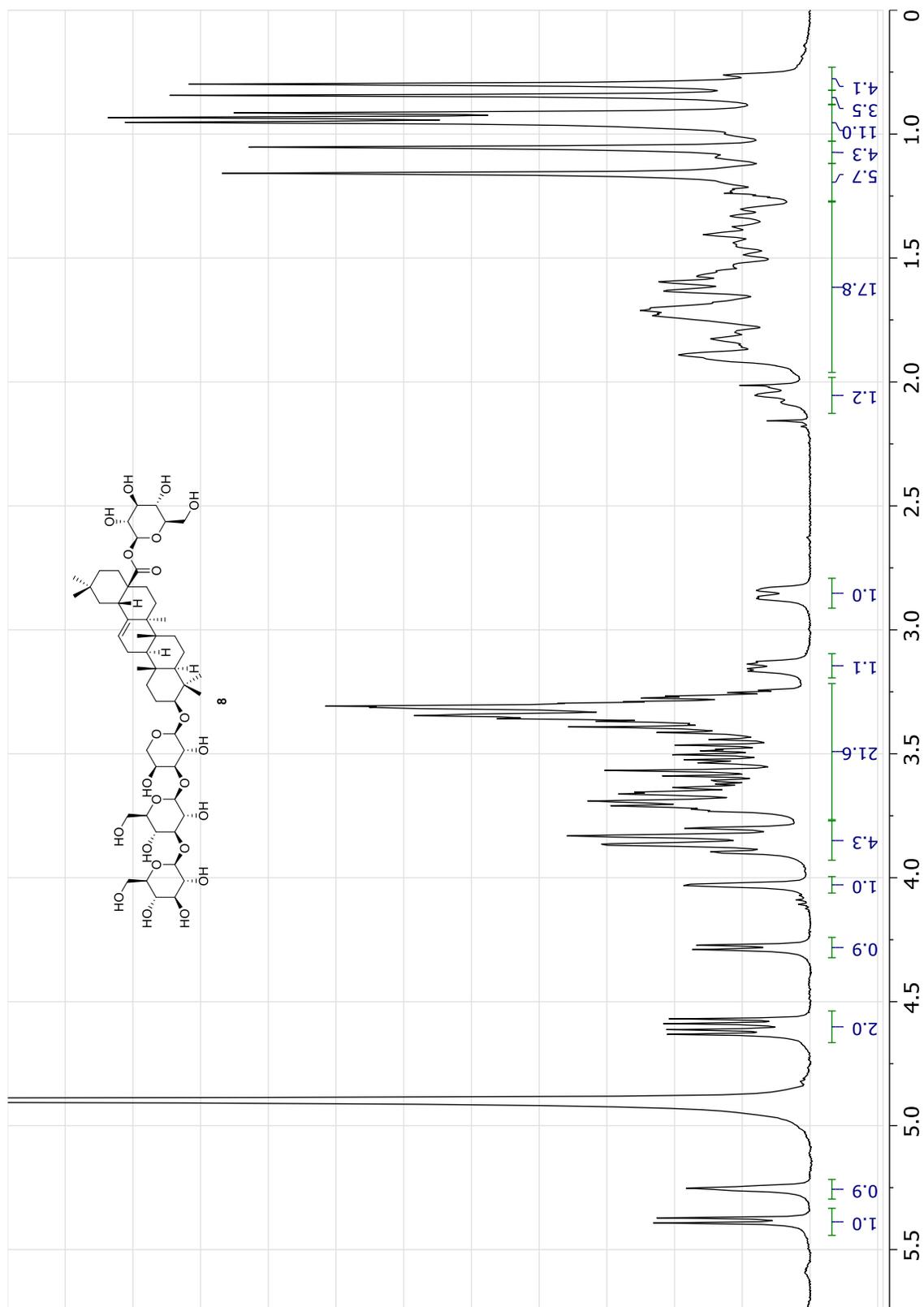
cytotoxique		Resazurine	Resazurine	Resazurine	Hoechst	Hoechst	Hoechst
	Échantillons	A-549	DLD-1	WS-1	A-549	DLD-1	WS-1
F.A.nud. DCM	JP01005A	90 ± 14 µg/ml	>200 µg/ml	35 ± 4 µg/ml	67 ± 5 µg/ml	159 ± 13 µg/ml	29 ± 1 µg/ml
F.A.nud. MeOH	JP01006A	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
F.A.n. MeOH/H2O	JP01007A	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
F.A.hisp. MeOH	JP01007B	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
F.A.h. MeOH/H2O	JP01008B	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.nud. DCM	JP01008A	88 ± 4 µg/ml	20 ± 2 µg/ml	58 ± 3 µg/ml	53 ± 2 µg/ml	11,8 ± 0,5 µg/ml	41 ± 6 µg/ml
R.A.nud. MeOH	JP01008C	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.n. MeOH/H2O	JP01009C	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.hisp. DCM	JP01009A	121 ± 8 µg/ml	61 ± 3 µg/ml	61 ± 4 µg/ml	89 ± 4 µg/ml	49 ± 6 µg/ml	102 ± 7 µg/ml
R.A.hisp. MeOH	JP01009B	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
R.A.h. MeOH/H2O	JP01010A	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml	>200 µg/ml
	Etoposide				0,4 ± 0,2 µM	1,5 ± 0,2 µM	>50 µM

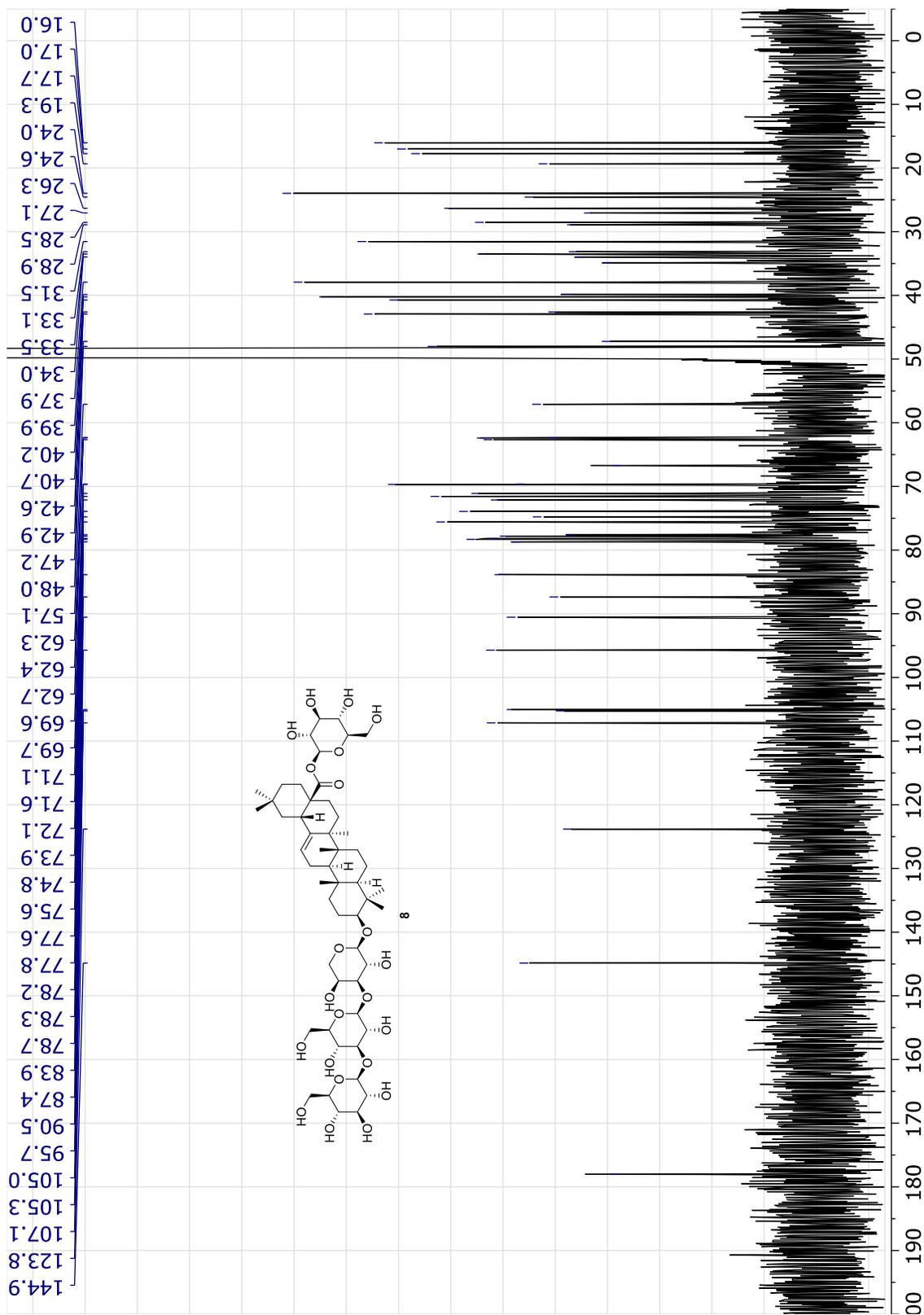
Annexe V - 11. Tests cytotoxiques sur les feuilles (F.) et racines (R.) d'*Aralia nudicaulis* (A.n.) et *hispida* (A.h.)

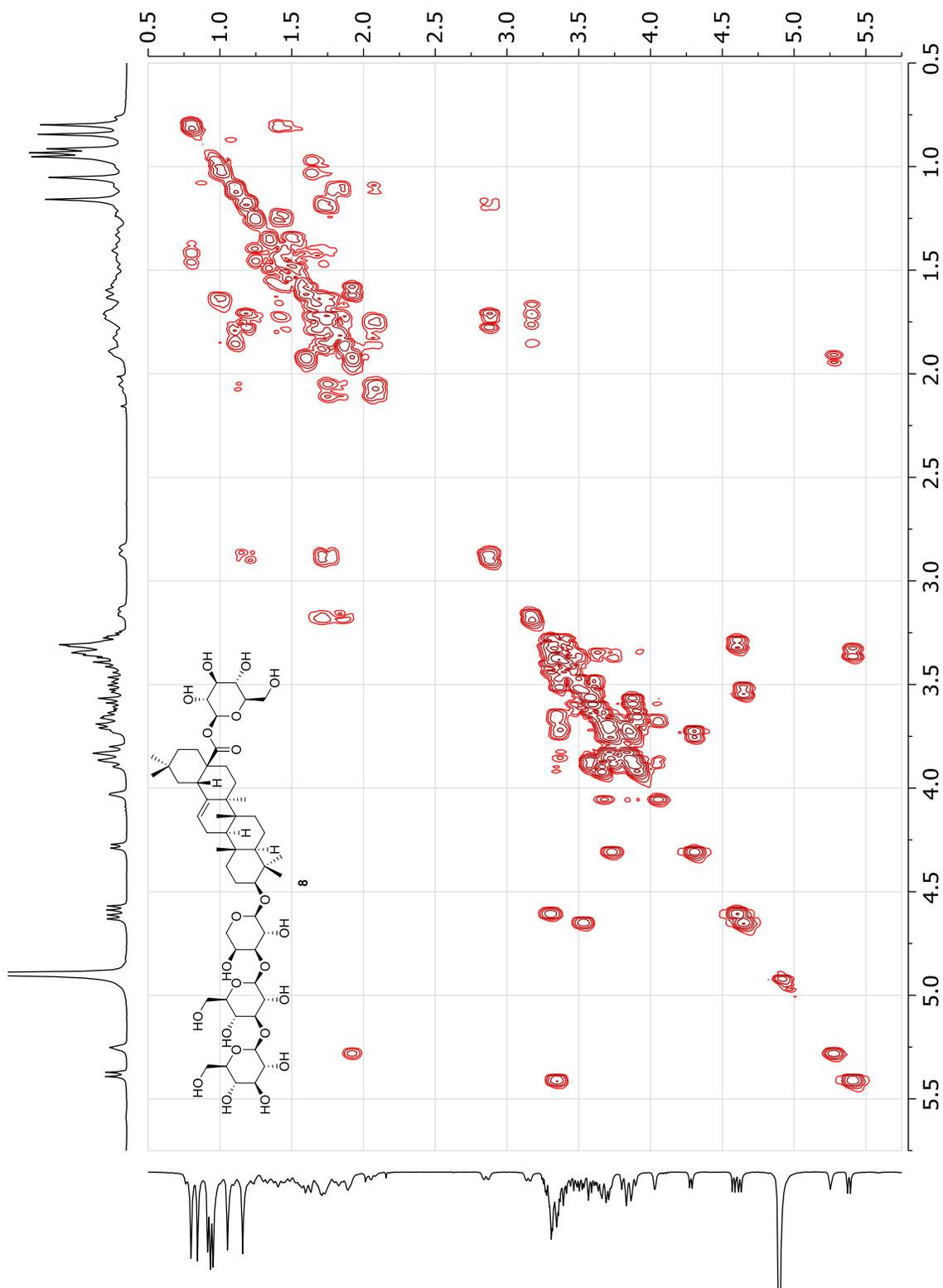
ANNEXES VI

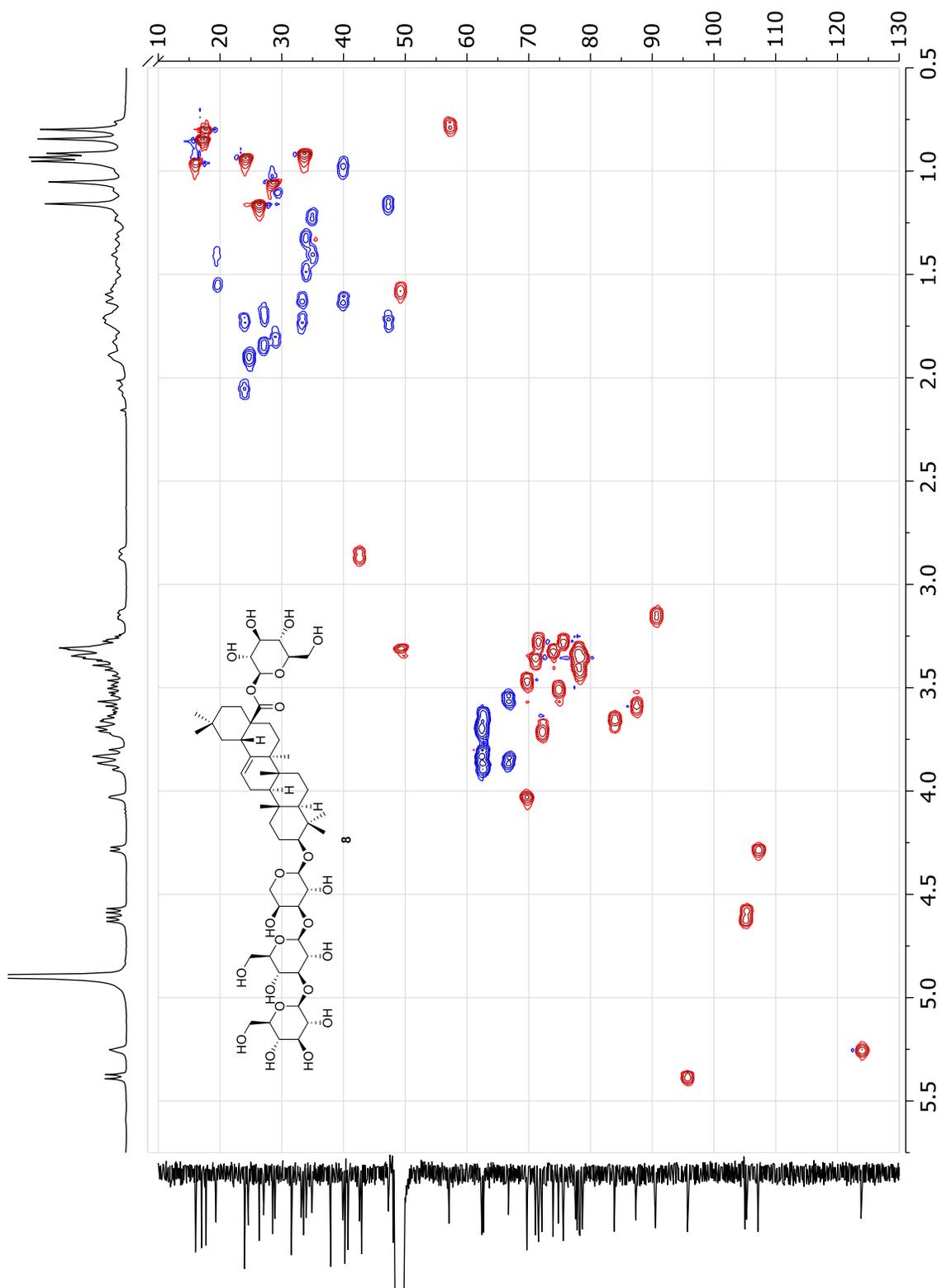
ARTICLE'S SUPPORTING INFORMATION

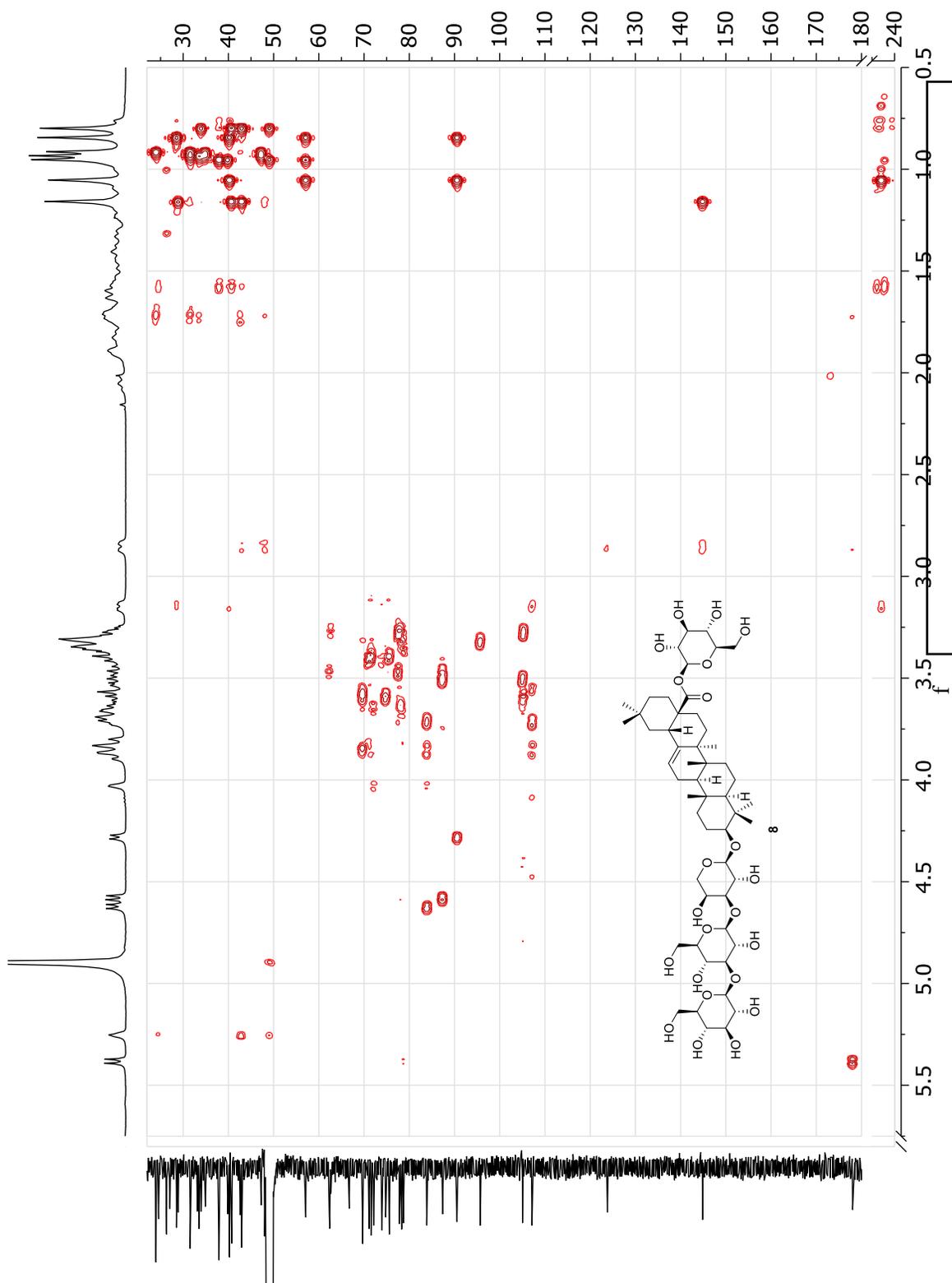
Spectroscopic data of compound **1** : Nudicauloside AAnnexe VI - 1. ¹H NMR spectrum of **1** (400 MHz, CD₃OD)

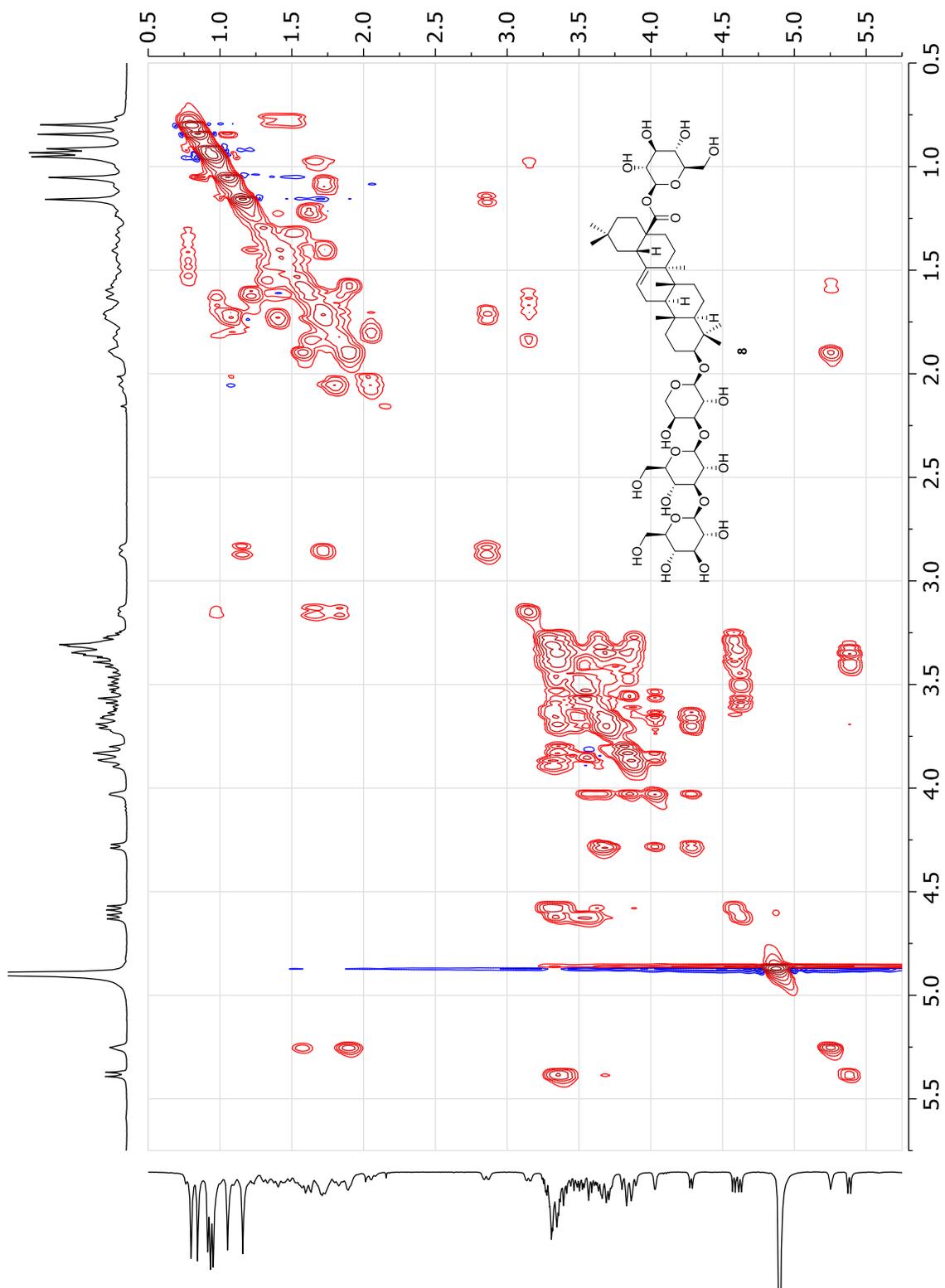
Annexe VI - 2. Expanded ¹H NMR spectrum of **1** (400 MHz, CD₃OD)

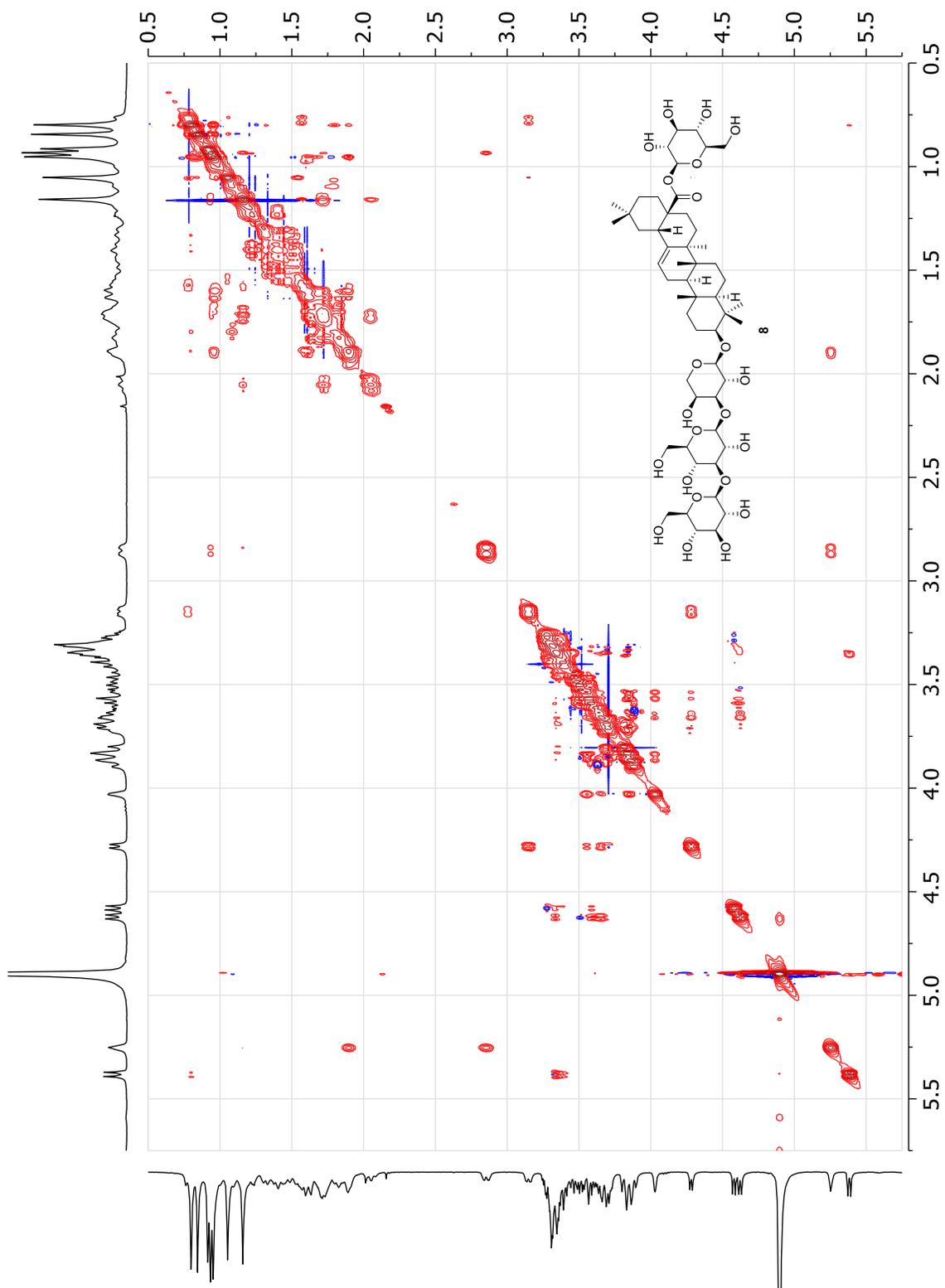
Annexe VI - 3. ^{13}C NMR spectrum of **1** (100 MHz, CD_3OD)

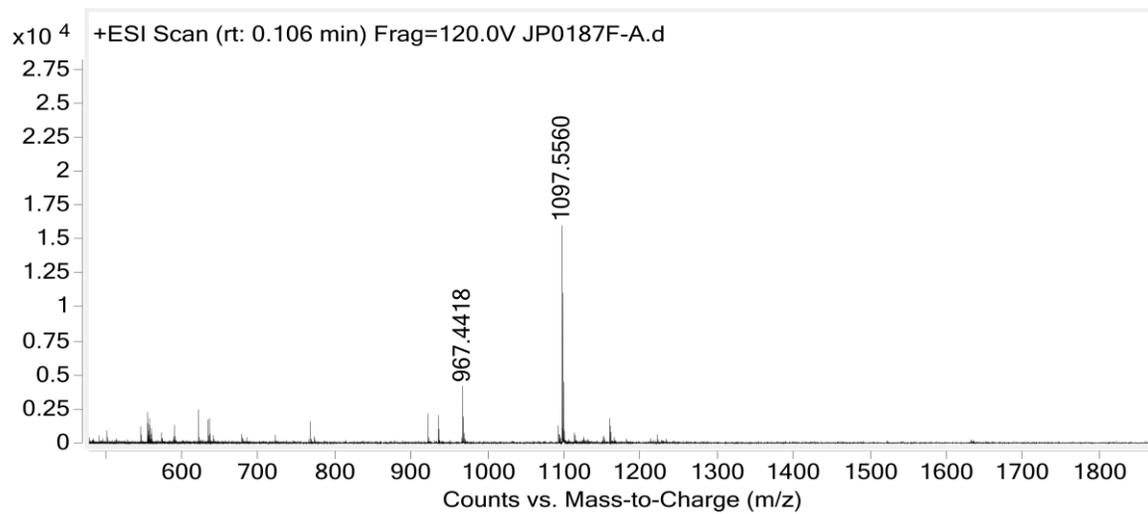
Annexe VI - 4. DQF-COSY spectrum of **1** (400 MHz, CD₃OD)

Annexe VI - 5. Edited HSQC spectrum of **1** (400 MHz, CD_3OD)

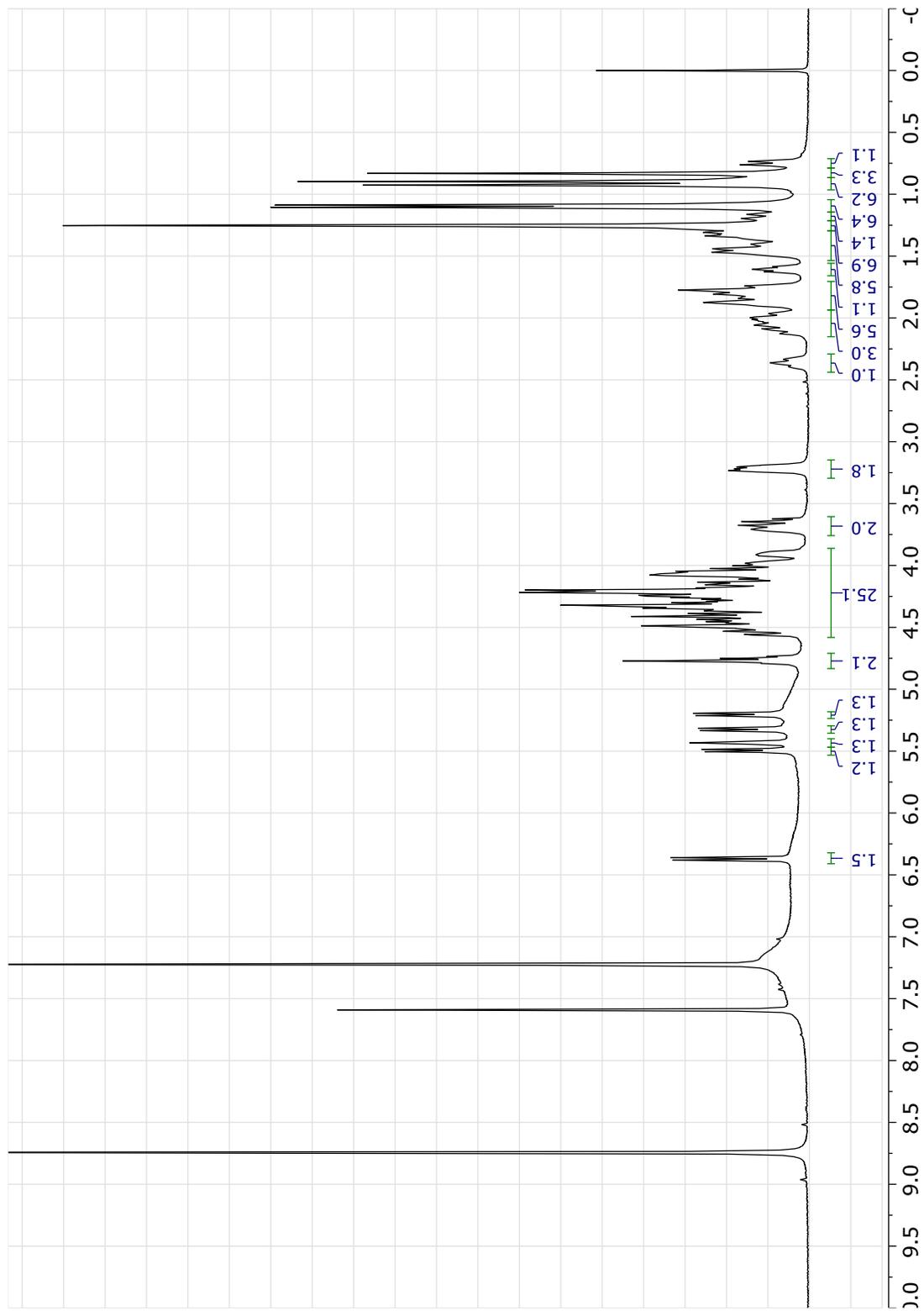
Annexe VI - 6. HMBC spectrum of 1 (400 MHz, CD_3OD)

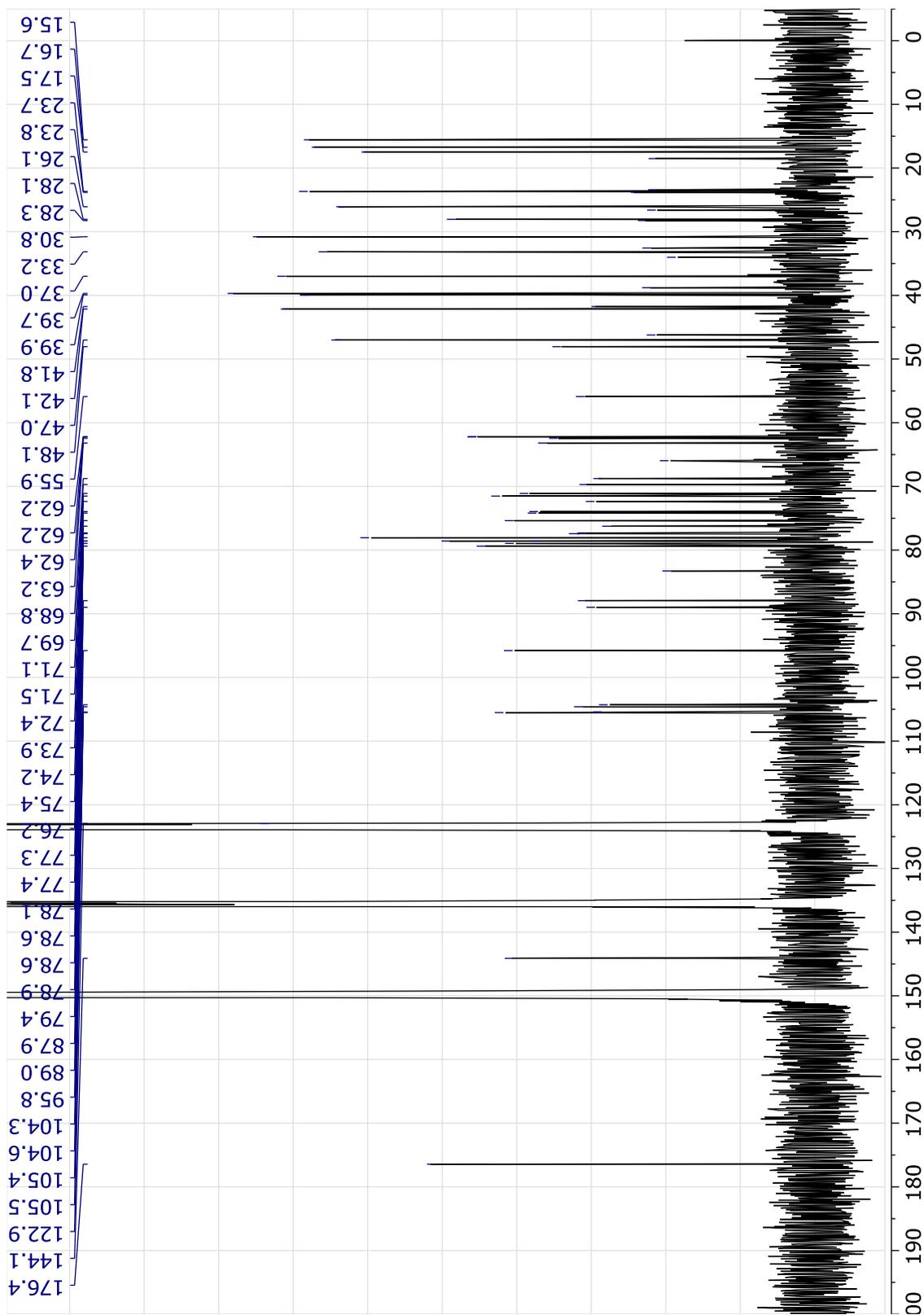
Annexe VI - 7. TOCSY spectrum of **1** (400 MHz, CD₃OD)

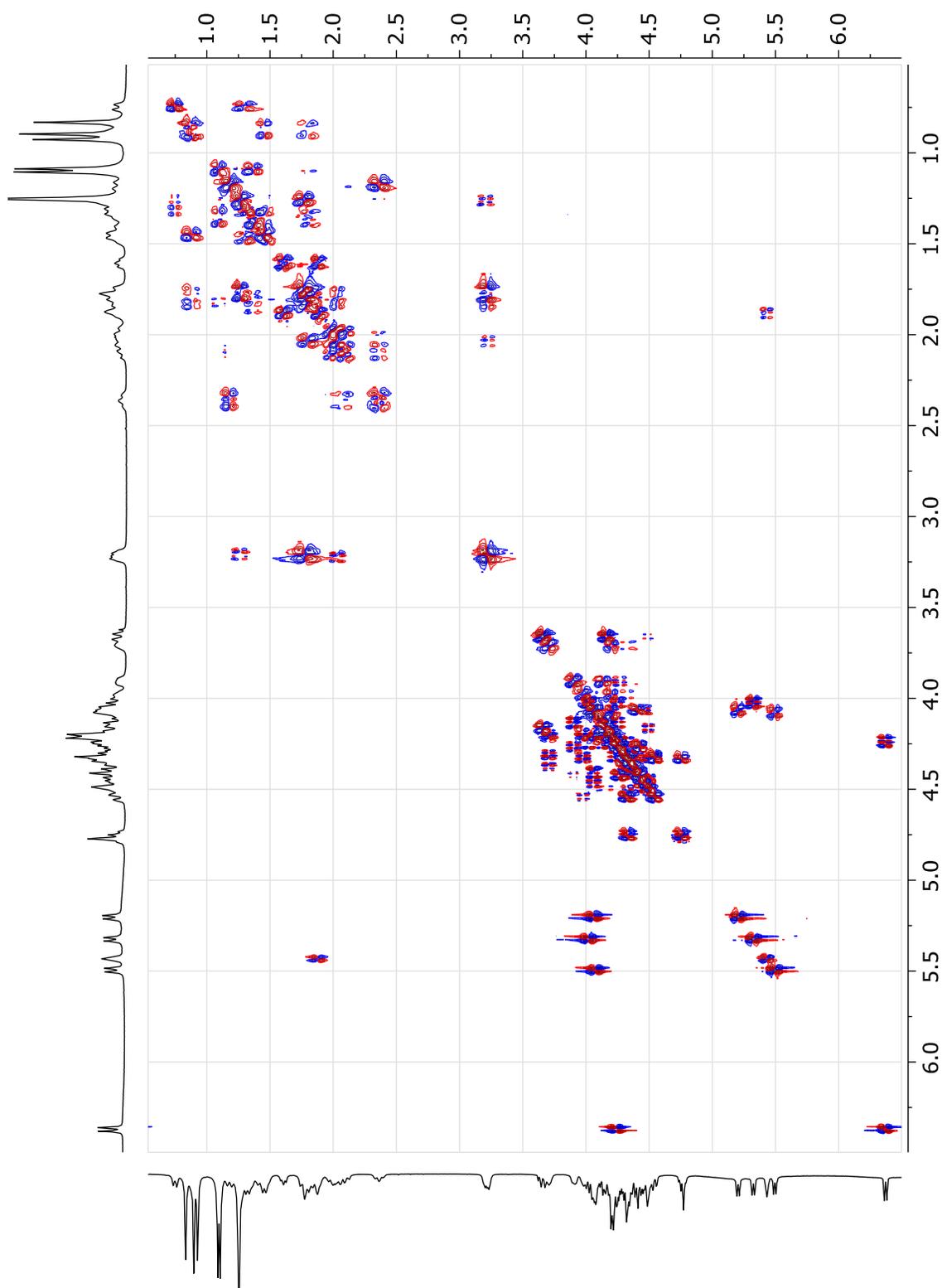
Annexe VI - 8. NOESY spectrum of **1** (400 MHz, CD₃OD)

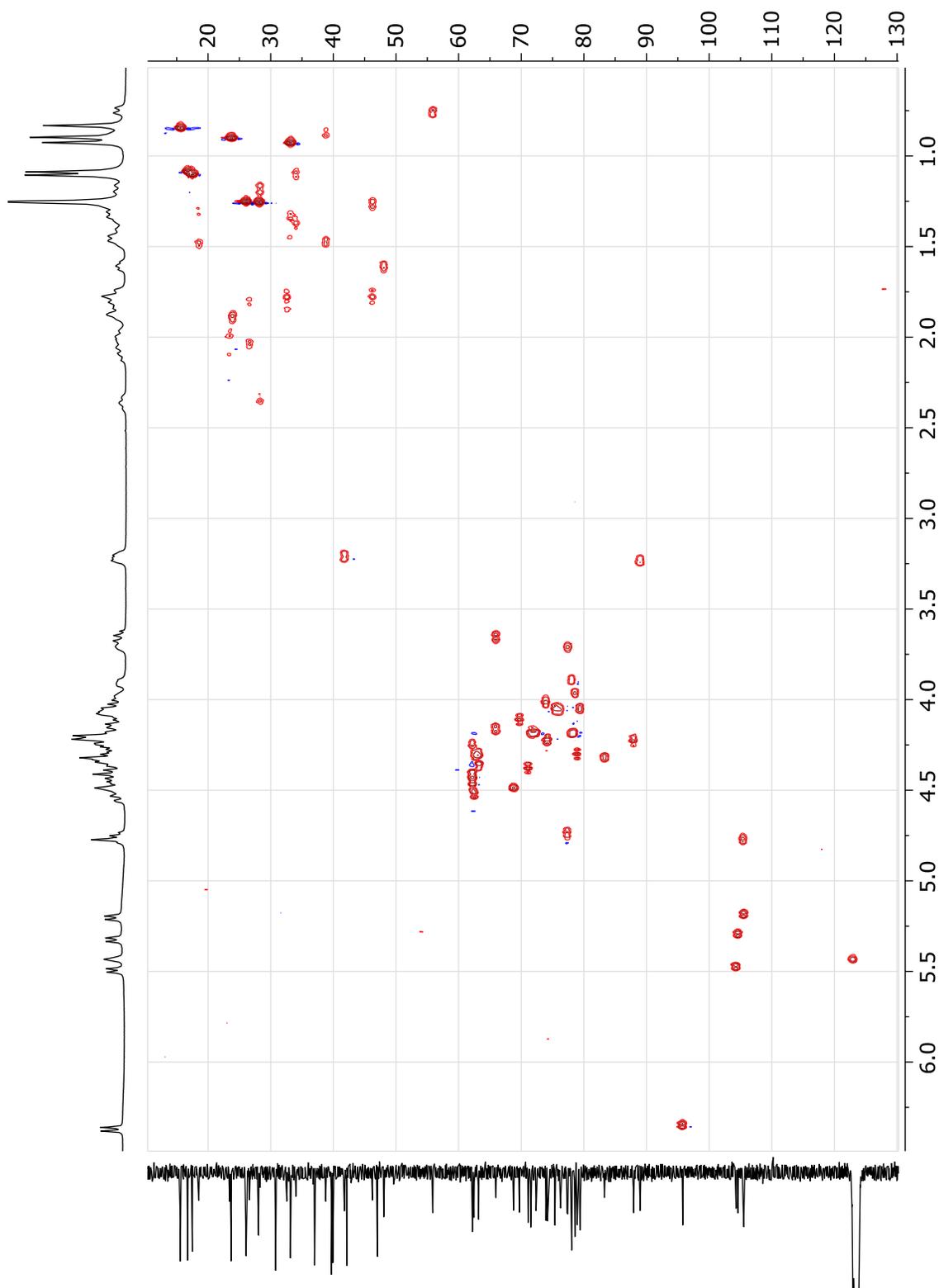


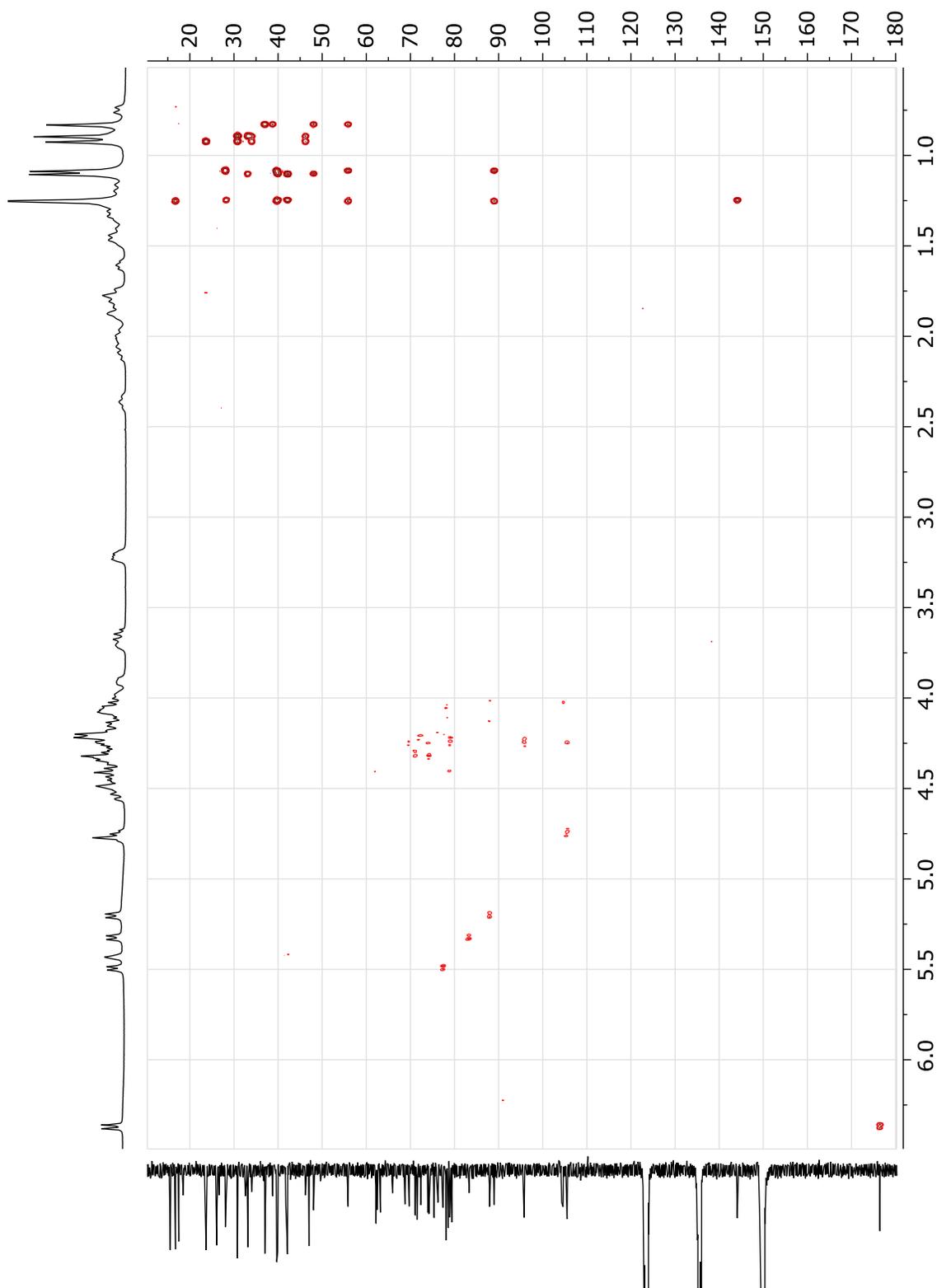
Annexe VI - 9. High-resolution mass spectrum of **1** (ESI, positive mode)

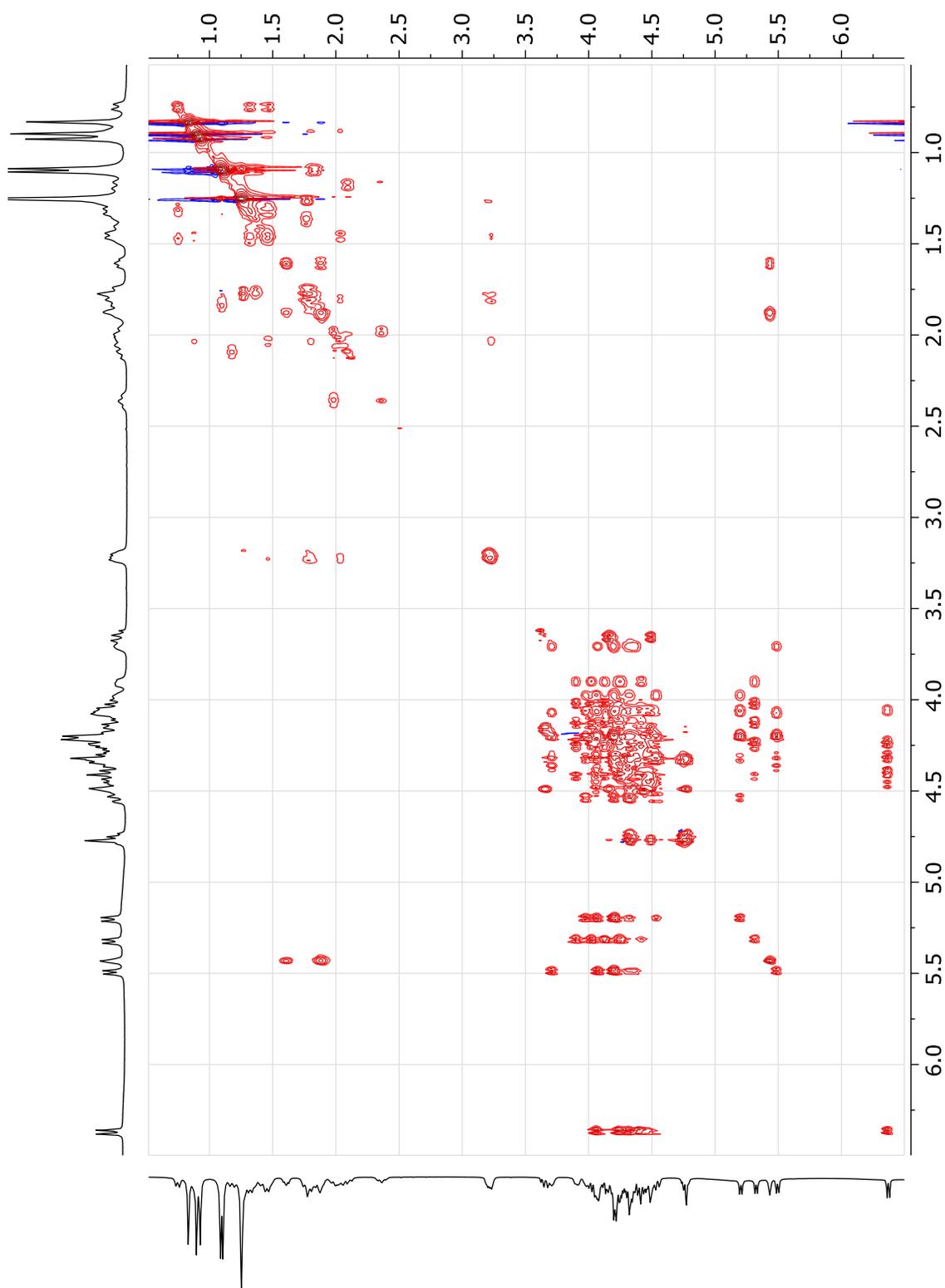
Spectroscopic data of compound 2 : Nudicauloside BAnnexe VI - 10. ¹H NMR spectrum of 2 (400 MHz, Pyridine-d₅)

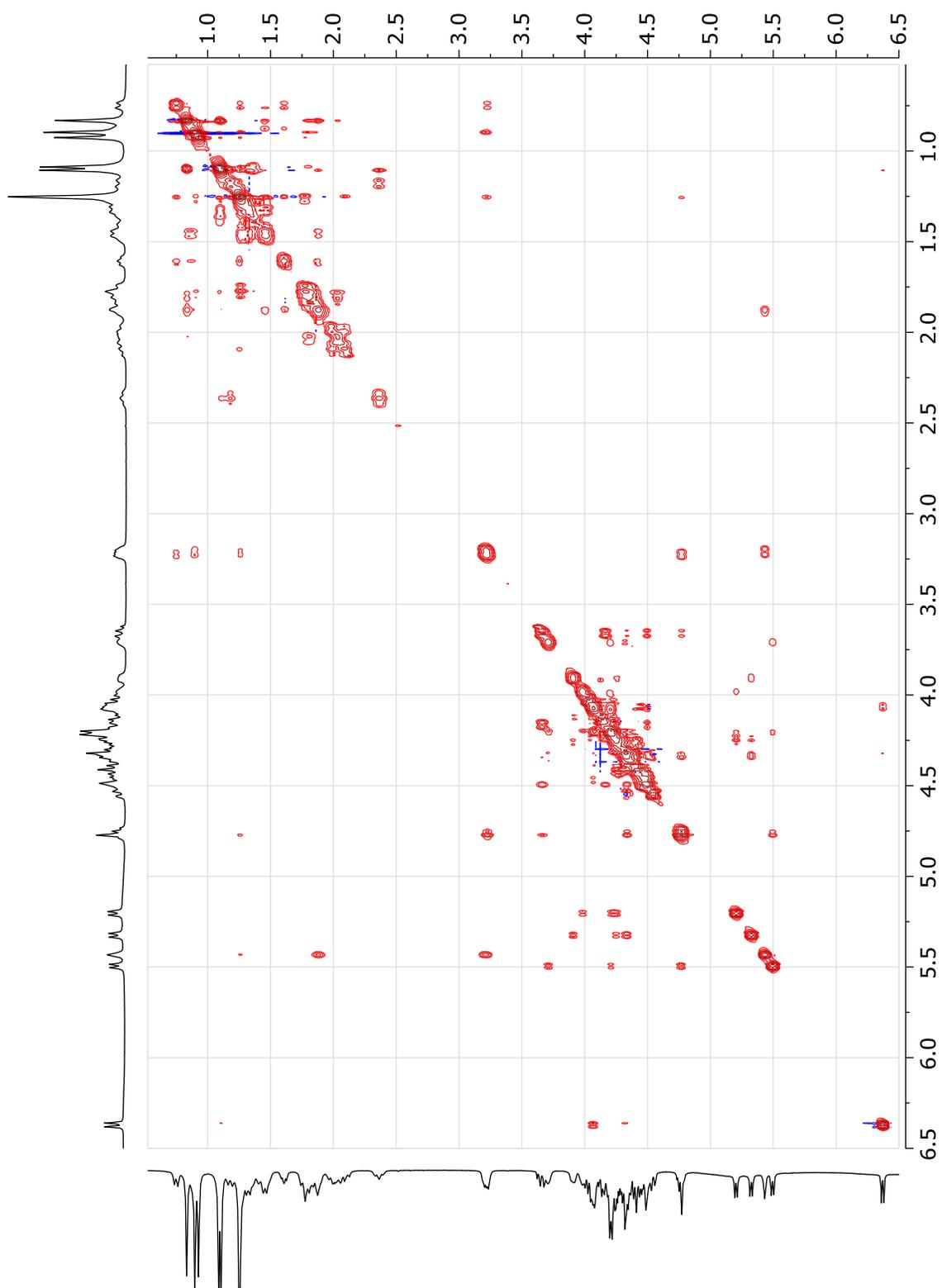
Annexe VI - 12. ^{13}C NMR spectrum of **2** (100 MHz, Pyridine- d_5)

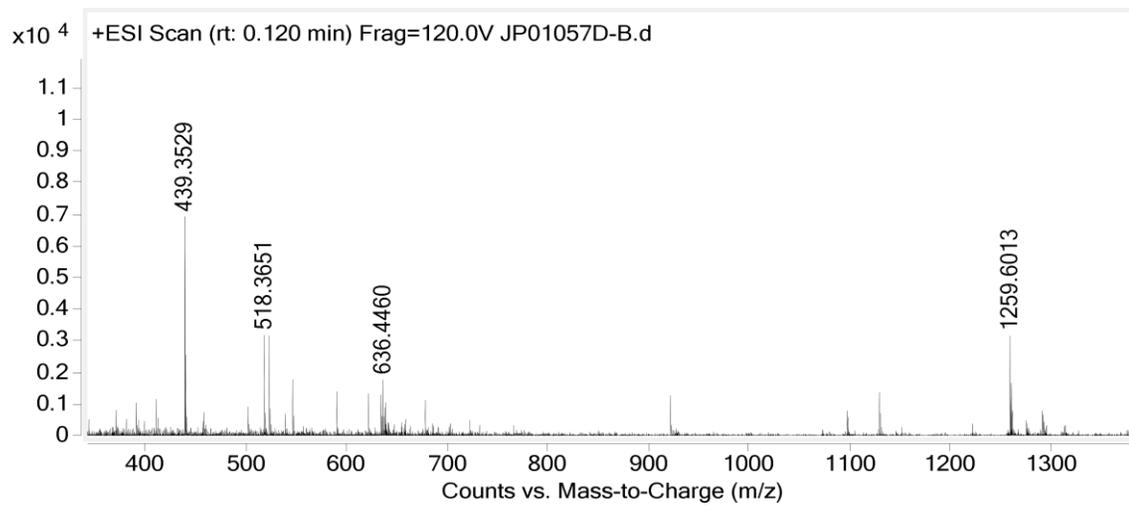
Annexe VI - 13. DQF-COSY spectrum of **2** (400 MHz, Pyridine-d₅)

Annexe VI - 14. HSQC spectrum of **2** (400 MHz, Pyridine- d_5)

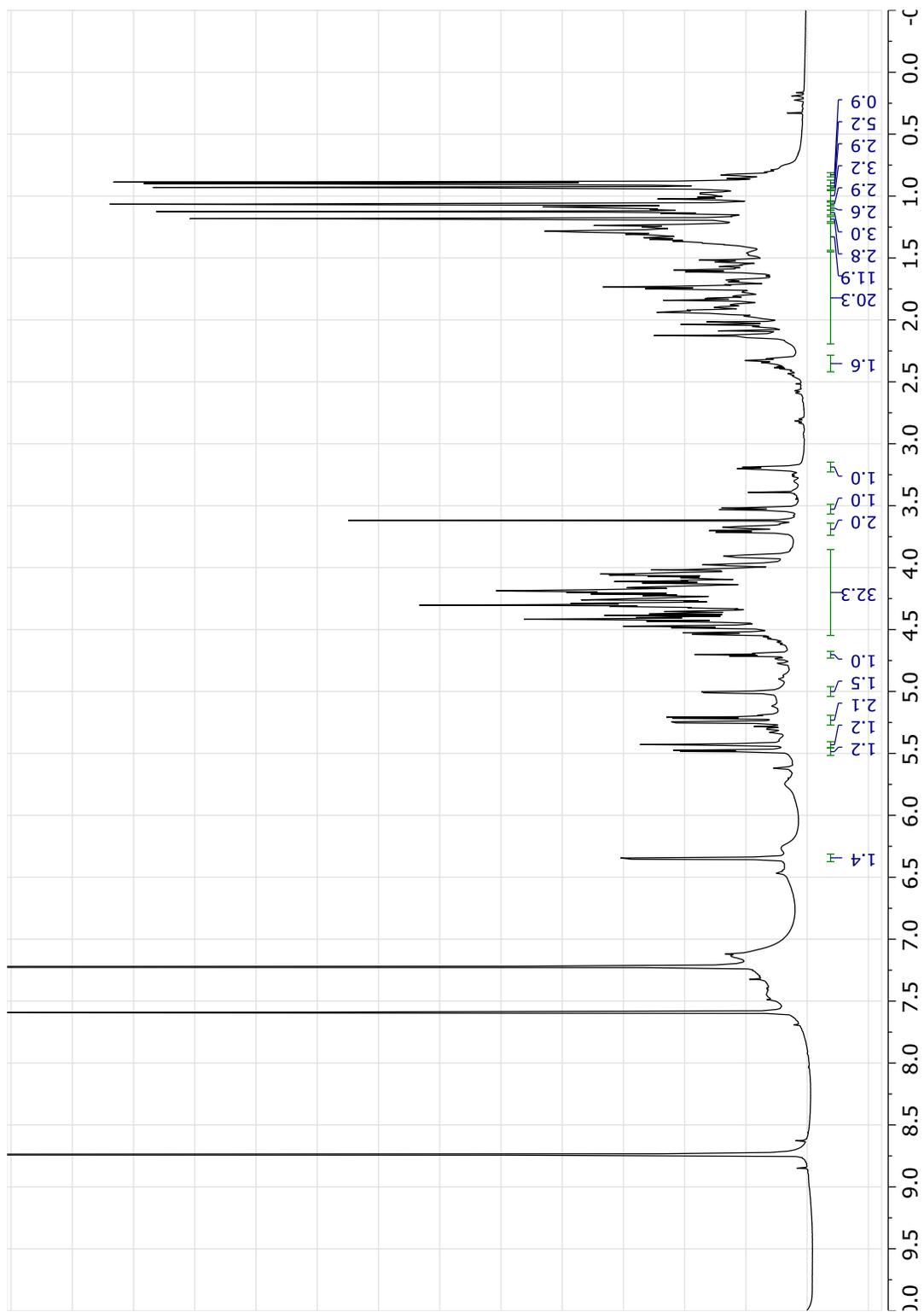
Annexe VI - 15. HMBC spectrum of **2** (400 MHz, Pyridine- d_5)

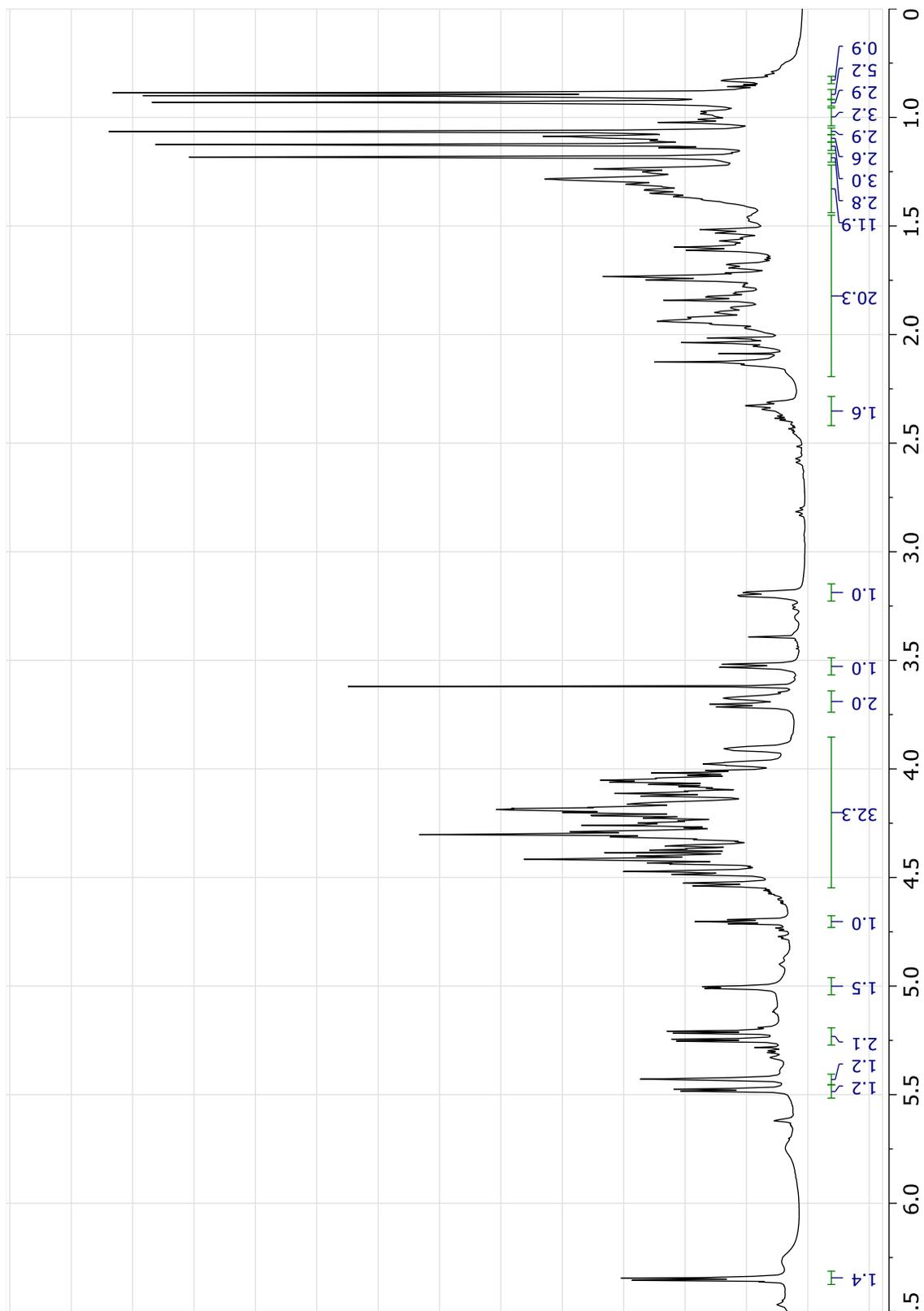
Annexe VI - 16. TOCSY spectrum of **2** (400 MHz, Pyridine-d₅)

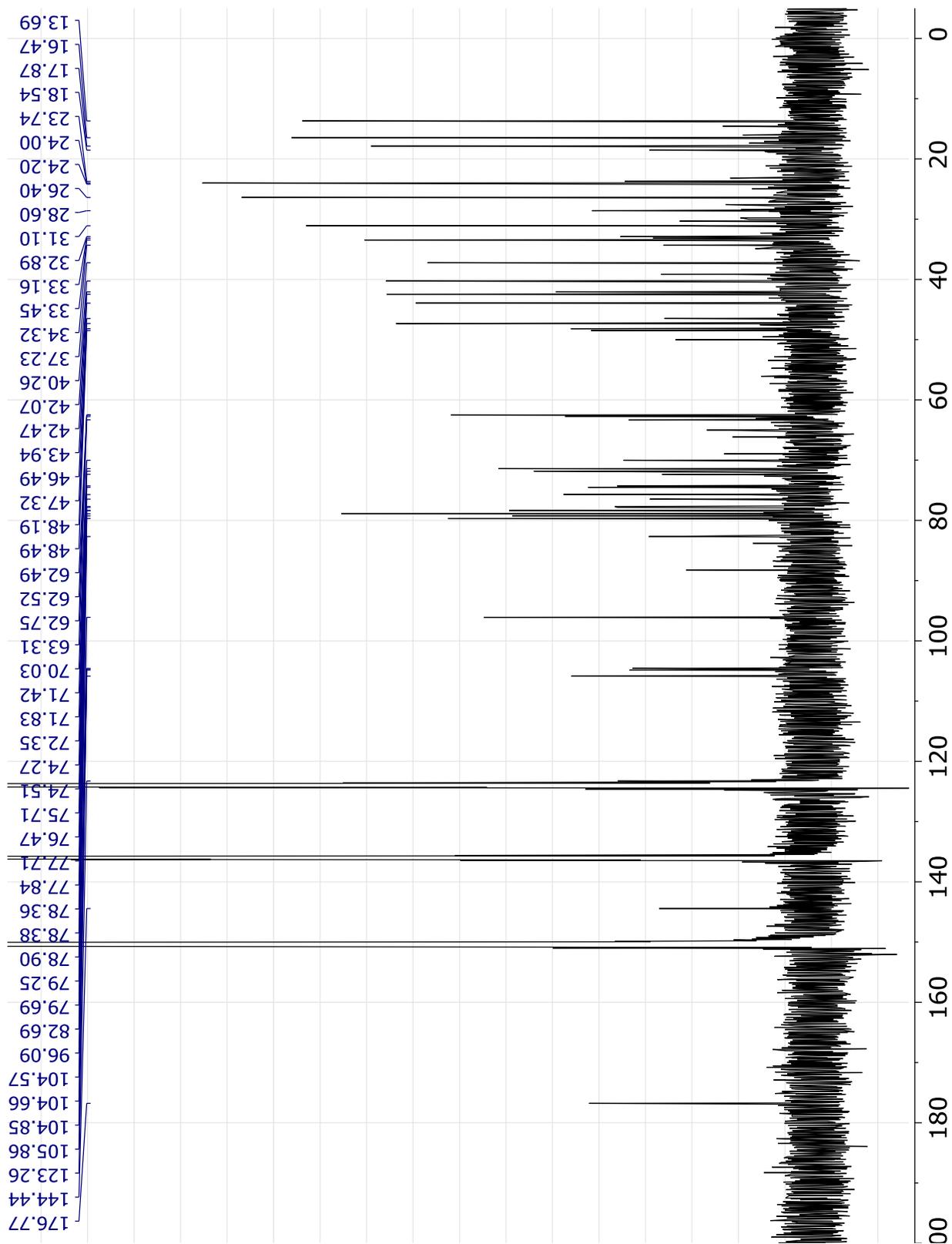
Annexe VI - 17. NOESY spectrum of **2** (400 MHz, Pyridine- d_5)

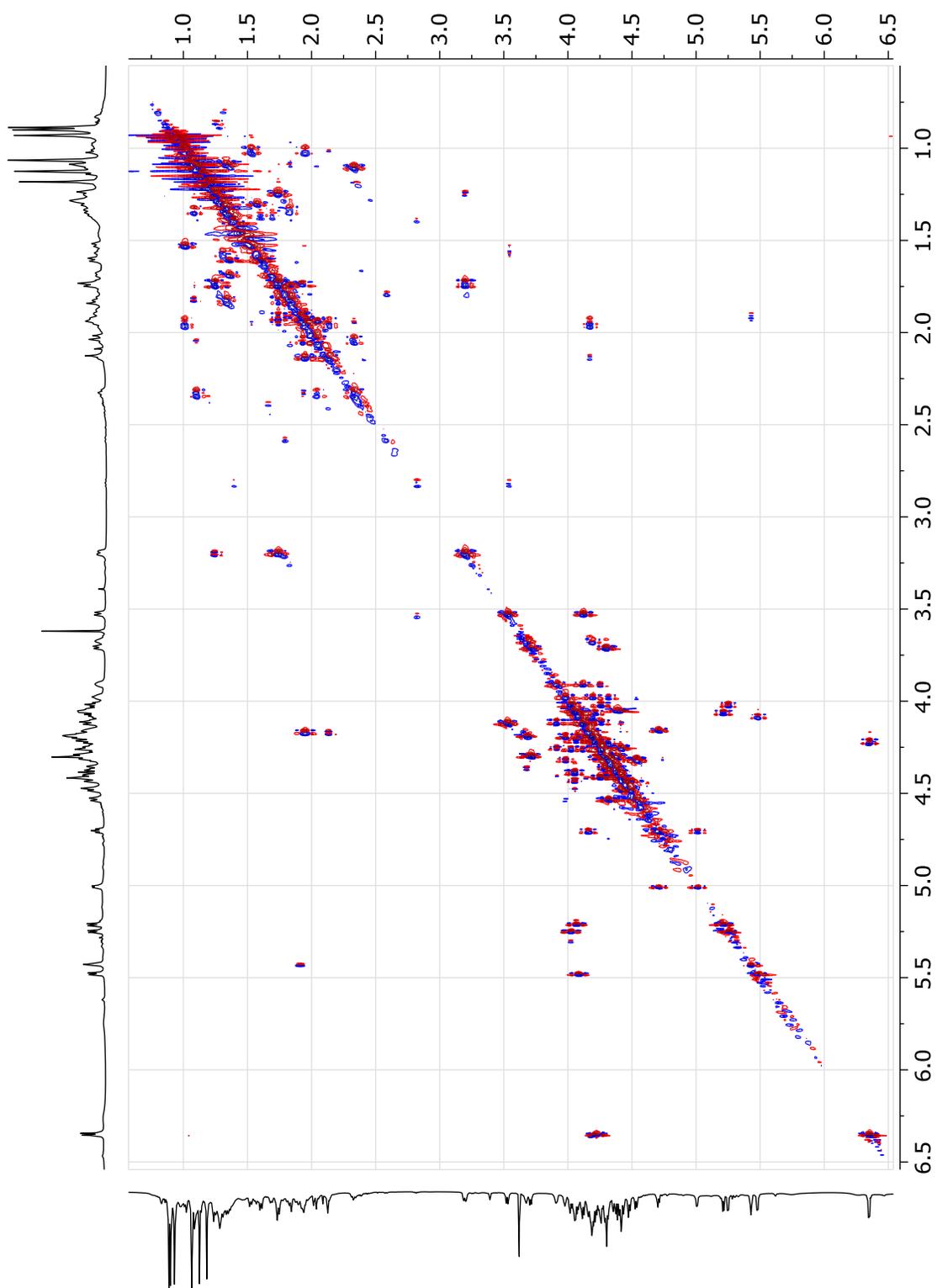


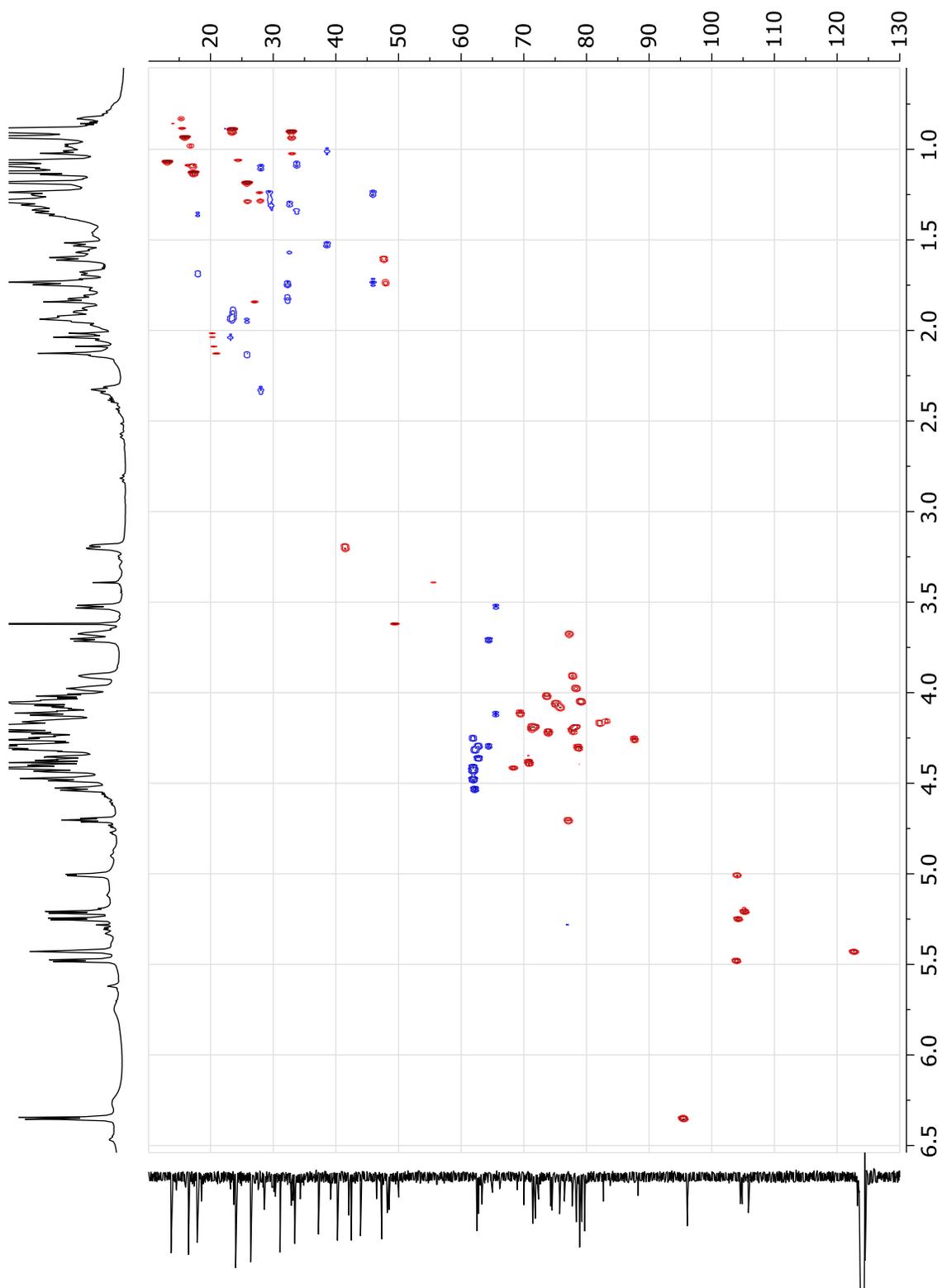
Annexe VI - 18. High-resolution mass spectrum of **2** (ESI, positive mode)

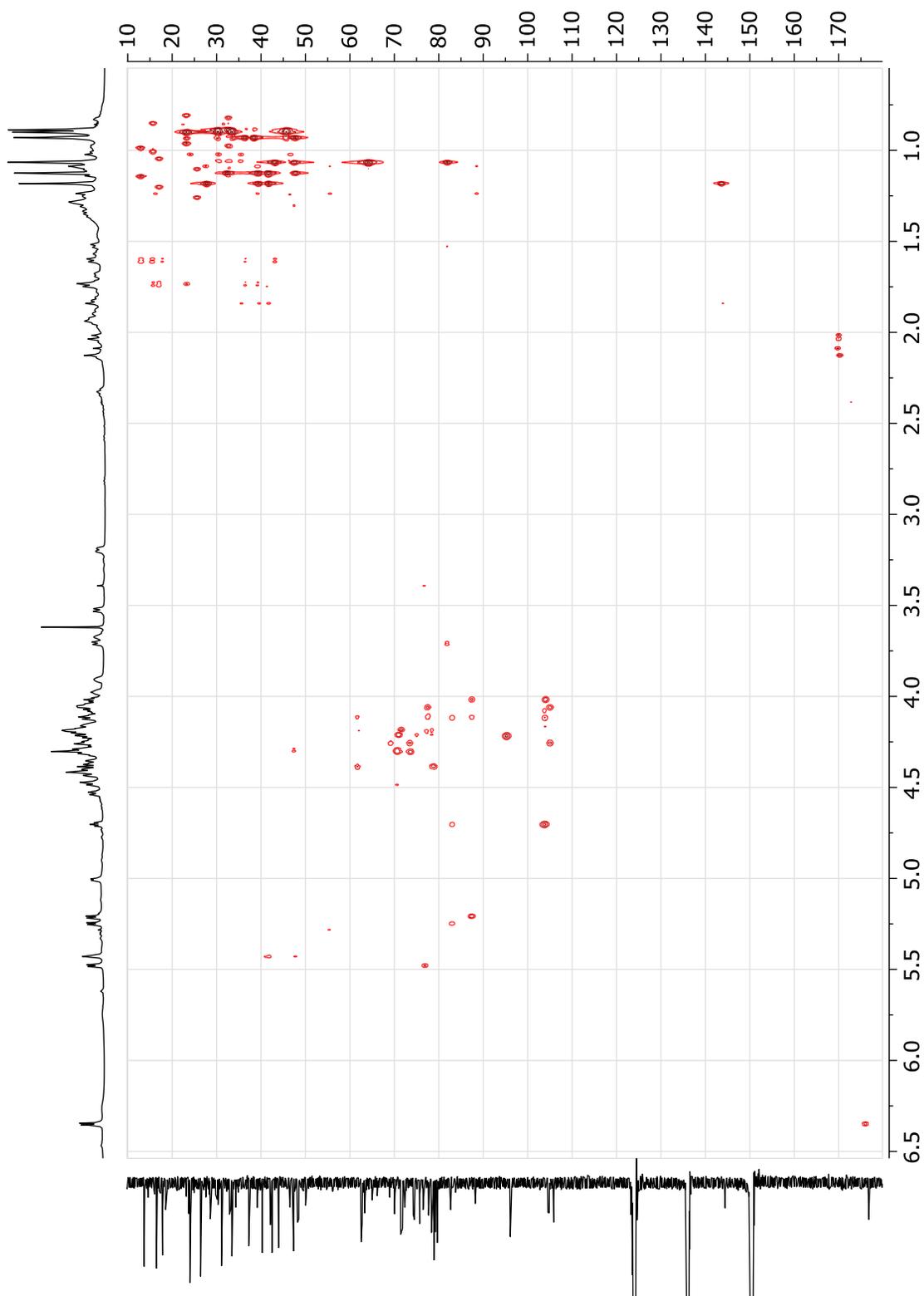
Spectroscopic data of compound **3** : Nudicauloside CAnnexe VI - 19. ^1H NMR spectrum of **3** (800 MHz, Pyridine- d_5)

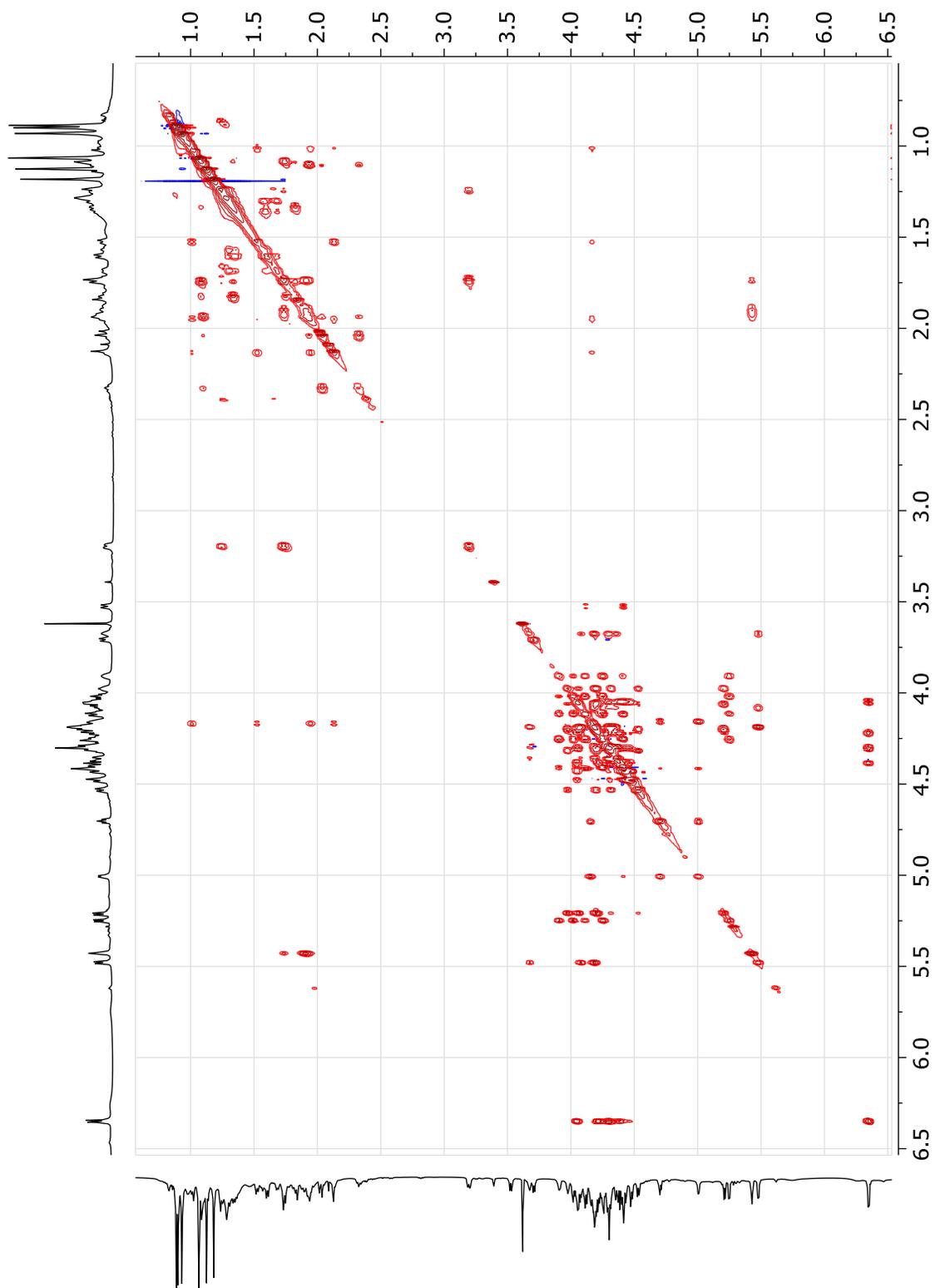
Annexe VI - 20. Expanded ^1H NMR spectrum of **3** (800 MHz, Pyridine- d_5)

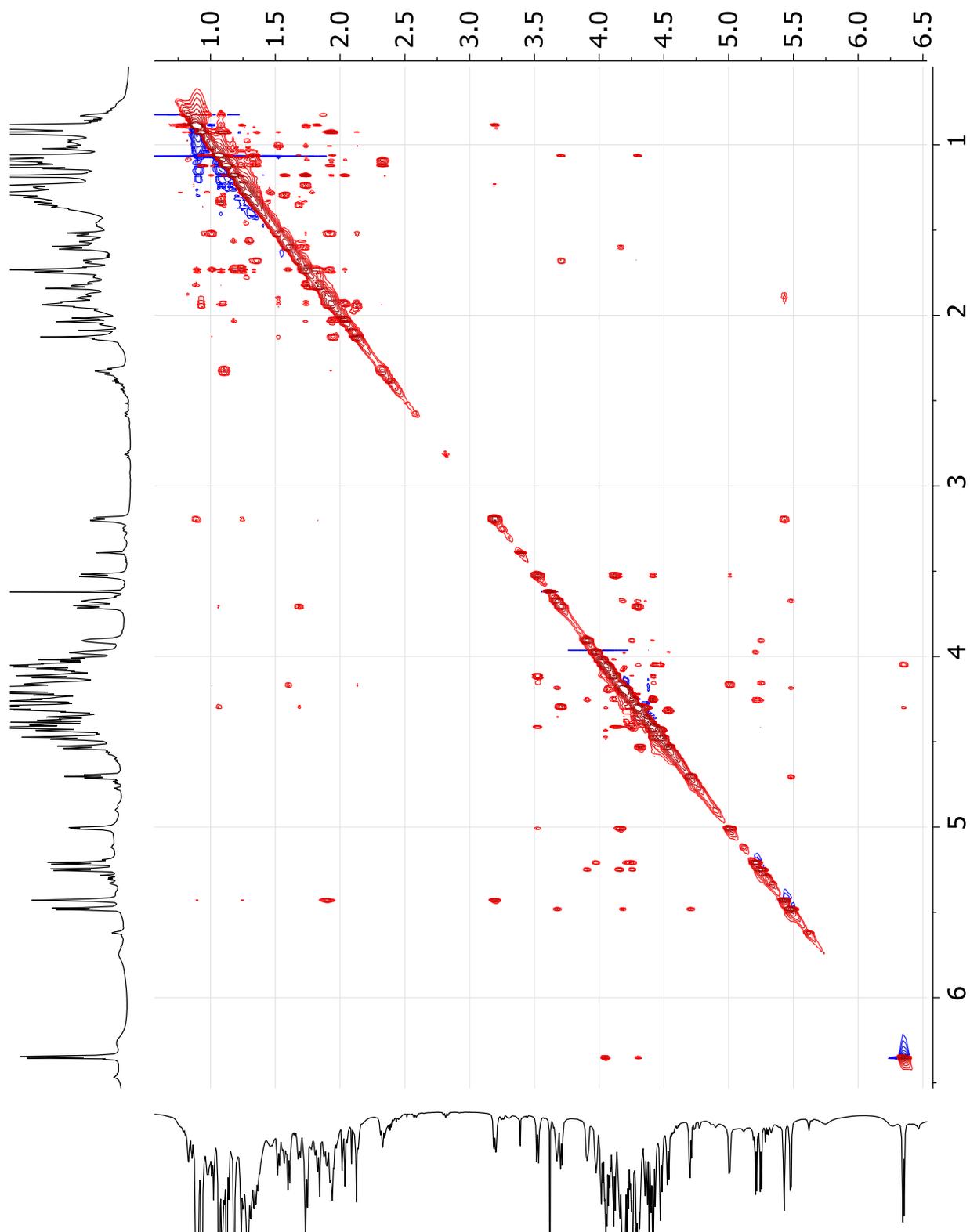
Annexe VI - 21. ^{13}C NMR spectrum of **3** (200 MHz, Pyridine- d_5)

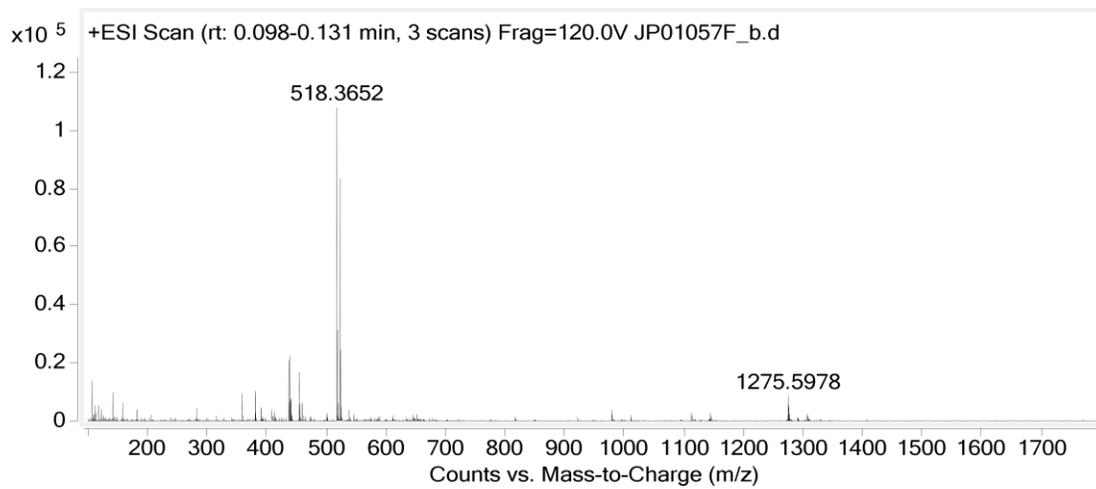
Annexe VI - 22. DQF-COSY spectrum of **3** (800 MHz, Pyridine- d_5)

Annexe VI - 23. Edited HSQC spectrum of **3** (800 MHz, Pyridine- d_5)

Annexe VI - 24. HMBC spectrum of **3** (800 MHz, Pyridine- d_5)

Annexe VI - 25. TOCSY spectrum of **3** (800 MHz, Pyridine-d₅)

Annexe VI - 26. NOESY spectrum of **3** (800 MHz, Pyridine-d₅)



Annexe VI - 27. High-resolution mass spectrum of **3** (ESI, positive mode)