

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

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

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN CHIMIE ET APPLICATIONS



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

POSTGRADUATE SCHOOLS OF
SCIENCE, TECHNOLOGY AND
GEOSCIENCES

DOCTORAL RESEARCH UNIT IN
CHEMISTRY AND APPLICATIONS

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE
DEPARTEMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

LABORATOIRE DES SUBSTANCES NATURELLES VEGETALES ET FONGIQUES

Etude chimique guidée par CL-SM et par l'activité antileishmaniale
de *Vernonia guineensis* Benth (Asteraceae) : Essai de
standardisation et pré-formulation de phytomédicaments

Thèse rédigée et soutenue publiquement le 13/07/2021, en vue de l'obtention du
diplôme de Doctorat/Ph.D. en Chimie Organique

Par:

WOUAMBA NJONTE Steven Collins
09Y160
Master en Chimie Organique

Devant le jury composé ainsi qu'il suit :

Président : PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel, Professeur ;

Rapporteur: KOUAM FOGUE Siméon, Professeur ;

Membres: DONGO Etienne, Professeur ;

FEKAM BOYOM Fabrice, Professeur ;

NDOM Jean Claude, Maître de Conférences ;

NGONO B. Dominique Serge, Maître de Conférences ;



Université de Yaoundé I

Université de Yaoundé I

Université de Yaoundé I

Université de Yaoundé I

Université de Yaoundé I

Université de Yaoundé I

Année académique : 2020/2021

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTE DES SCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

**ATTESTATION DE CORRECTION DE MEMOIRE DE THESE DE DOCTORAT/Ph.D
DE MONSIEUR WOUAMBA NJONTE STEVEN COLLINS**

Titre de thèse: Etude chimique guidée par CL-SM et par l'activité antileishmaniale de *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae): Essai de standardisation et pré-formulation de phyto-médicaments

Nous soussignés, enseignants ci-dessous nommés, Le jury de soutenance de thèse de Doctorat/Ph.D de Monsieur **WOUAMBA NJONTE Steven Collins**, Matricule **09Y160**, attestons que ce candidat a bel et bien pris en compte dans la mouture finale de sa thèse, toutes nos remarques et suggestions, puis a effectué les corrections conformément aux recommandations qui lui ont été faites au cours de sa soutenance en date du 13 Juillet 2021.

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

Fait à Yaoundé, le **04 AOUT** **2021**..

Le Jury :


Président :


Pagnyemb Dieudonné
Professeur

Rapporteur :


Siméon F. Kouam
Professeur

Membres


Fabrice J. Kouam, Sc.D
Professor of Biochemistry


Dr. Dominique S. Ngono Bikoko
Associate Professor, UYI

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

Division de la Programmation et du
Suivi des Activités Académiques

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

Division of Programming and Follow-up
of Academic Affairs

LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION : 19 Février 2020

ADMINISTRATION

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

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

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

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

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

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : MBAZE

MEVA' A Luc Léonard, *Professeur*

| 1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38) | | | |
|--|--------------------------------|-----------------------|--|
| N° | NOMS ET PRÉNOMS | GRADE | OBSERVATIONS |
| 1 | BIGOGA DIAGA Jude | Professeur | En poste |
| 2 | FEKAM BOYOM Fabrice | Professeur | En poste |
| 3 | FOKOU Elie | Professeur | En poste |
| 4 | KANSCI Germain | Professeur | En poste |
| 5 | MBACHAM FON Wilfried | Professeur | En poste |
| 6 | MOUNDIPA FEWOU Paul | Professeur | Chef de Département |
| 7 | NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG | Professeur | En poste |
| 8 | OBEN Julius ENYONG | Professeur | En poste |
| 9 | ACHU Merci BIH | Maître de Conférences | En poste |
| 10 | ATOGHO Barbara Mma | Maître de Conférences | En poste |
| 11 | AZANTSA KINGUE GABIN BORIS | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | BELINGA née NDOYE FOE M. C. F. | Maître de Conférences | Chef DAF/FS |
| 13 | BOUDJEKO Thaddée | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | EFFA NNOMO Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 16 | NANA Louise épouse WAKAM | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | NGONDI Judith Laure | Maître de Conférences | En poste |
| 18 | NGUEFACK Julienne | Maître de Conférences | En poste |
| 19 | NJAYOU Frédéric Nico | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | MOFOR née TEUGWA Clotilde | Maître de Conférences | <i>Inspecteur de Service MINESUP</i> |

| | | | |
|----|---------------------------------|-----------------------|----------|
| 21 | TCHANA KOUATCHOUA Angèle | Maître de Conférences | En poste |
| 22 | AKINDEH MBUH NJI | Chargée de Cours | En poste |
| 23 | BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie | Chargée de Cours | En poste |
| 24 | DAKOLE DABOY Charles | Chargée de Cours | En poste |
| 25 | DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane | Chargée de Cours | En poste |
| 26 | DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise | Chargé de Cours | En poste |
| 27 | EWANE Cécile Anne | Chargée de Cours | En poste |
| 28 | FONKOUA Martin | Chargé de Cours | En poste |
| 29 | BEBEE Fadimatou | Chargée de Cours | En poste |
| 30 | KOTUE KAPTUE Charles | Chargé de Cours | En poste |
| 31 | LUNGA Paul KEILAH | Chargé de Cours | En poste |
| 32 | MANANGA Marlyse Joséphine | Chargée de Cours | En poste |
| 33 | MBONG ANGIE M. Mary Anne | Chargée de Cours | En poste |
| 34 | PECHANGOU NSANGOU Sylvain | Chargé de Cours | En poste |
| 35 | Palmer MASUMBE NETONGO | Chargé de Cours | En poste |
| 36 | MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle | Assistante | En poste |
| 37 | OWONA AYISSI Vincent Brice | Assistant | En poste |
| 38 | WILFRIED ANGIE Abia | Assistante | En poste |

| 2- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48) | | | |
|--|------------------------------------|-----------------------|--|
| 1 | AJEAGAH Gideon AGHAINDUM | Professeur | Vice Doyen-DSSE/FS |
| 2 | BILONG BILONG Charles-Félix | Professeur | Chef de Département |
| 3 | DIMO Théophile | Professeur | En Poste |
| 4 | DJIETO LORDON Champlain | Professeur | En Poste |
| 5 | ESSOMBA née NTSAMA MBALA | Professeur | <i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i> |
| 6 | FOMENA Abraham | Professeur | En Poste |
| 7 | KAMTCHOING Pierre | Professeur | En poste |
| 8 | NJAMEN Dieudonné | Professeur | En poste |
| 9 | NJOKOU Flobert | Professeur | En Poste |
| 10 | NOLA Moïse | Professeur | En poste |
| 11 | TAN Paul VERNYUY | Professeur | En poste |
| 12 | TCHUEM TCHUENTE Louis Albert | Professeur | <i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i> |
| 13 | ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert | Professeur | En poste |
| 14 | BILANDA Danielle Claude | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | DJIOGUE Séfirin | Maître de Conférences | En poste |
| 16 | DZEUFUET DJOMENI Paul Désiré | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | JATSA BOUKENG Hermine | Maître de Conférences | En Poste |
| 18 | KEKEUNOU Sévilor | Maître de Conférences | En poste |
| 19 | MEGNEKOU Rosette | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | MONY Ruth épouse NTONE | Maître de Conférences | En Poste |
| 21 | NGUEGUIM TSOFAK Florence | Maître de Conférences | En poste |
| 22 | TOMBI Jeannette | Maître de Conférences | En poste |
| 23 | ALENE Désirée Chantal | Chargée de Cours | En poste |
| 26 | ATSAMO Albert Donatien | Chargé de Cours | En poste |
| 27 | BELLET EDIMO Oscar Roger | Chargé de Cours | En poste |
| 28 | DONFACK Mireille | Chargée de Cours | En poste |
| 29 | ETEME ENAMA Serge | Chargé de Cours | En poste |
| 30 | GOUNOUE KAMKUMO Raceline | Chargée de Cours | En poste |
| 31 | KANDEDA KAVAYE Antoine | Chargé de Cours | En poste |
| 32 | LEKEUFACK FOLEFACK Guy B. | Chargé de Cours | En poste |
| 33 | MAHOB Raymond Joseph | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|----|-------------------------------|------------------|---------------|
| 34 | MBENOUN MASSE Paul Serge | Chargé de Cours | En poste |
| 35 | MOUNGANG LucianeMarlyse | Chargée de Cours | En poste |
| 36 | MVEYO NDANKEU Yves Patrick | Chargé de Cours | En poste |
| 37 | NGOUATEU KENFACK Omer | Chargé de Cours | En poste |
| 38 | NGUEMBOK | Chargé de Cours | En poste |
| 39 | NJUA Clarisse Yafi | Chargée de Cours | Chef Div. UBA |
| 40 | NOAH EWOTI Olive Vivien | Chargée de Cours | En poste |
| 41 | TADU Zephyrin | Chargé de Cours | En poste |
| 42 | TAMSA ARFAO Antoine | Chargé de Cours | En poste |
| 43 | YEDE | Chargé de Cours | En poste |
| 44 | BASSOCK BAYIHA Etienne Didier | Assistant | En poste |
| 45 | ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine | Assistante | En poste |
| 46 | KOGA MANG DOBARA | Assistant | En poste |
| 47 | LEME BANOCK Lucie | Assistante | En poste |
| 48 | YOUNOUSSA LAME | Assistant | En poste |

| 3- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES (BPV) (32) | | | |
|---|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | AMBANG Zachée | Professeur | <i>Chef Division/UYII</i> |
| 2 | BELL Joseph Martin | Professeur | En poste |
| 3 | DJOCGOUE Pierre François | Professeur | En poste |
| 4 | MOSSEBO Dominique Claude | Professeur | En poste |
| 5 | YOUMBI Emmanuel | Professeur | Chef de Département |
| 6 | ZAPFACK Louis | Professeur | En poste |
| 7 | ANGONI Hyacinthe | Maître de Conférences | En poste |
| 8 | BIYE Elvire Hortense | Maître de Conférences | En poste |
| 9 | KENGNE NOUMSI Ives Magloire | Maître de Conférences | En poste |
| 10 | MALA Armand William | Maître de Conférences | En poste |
| 11 | MBARGA BINDZI Marie Alain | Maître de Conférences | <i>CT/ MINESUP</i> |
| 12 | MBOLO Marie | Maître de Conférences | En poste |
| 13 | NDONGO BEKOLO | Maître de Conférences | <i>CE / MINRESI</i> |
| 14 | NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L. | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | TSOATA Esaïe | Maître de Conférences | En poste |
| 16 | TONFACK Libert Brice | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | DJEUANI Astride Carole | Chargé de Cours | En poste |
| 18 | GOMANDJE Christelle | Chargée de Cours | En poste |
| 19 | MAFFO MAFFO Nicole Liliane | Chargé de Cours | En poste |
| 20 | MAHBOU SOMO Gabriel | Chargé de Cours | En poste |
| 21 | NGALLE Hermine BILLE | Chargée de Cours | En poste |
| 22 | NGOUO Lucas Vincent | Chargé de Cours | En poste |
| 23 | NNANGA MEBENGA Ruth Laure | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | NOUKEU KOUAKAM Armelle | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | ONANA JEAN MICHEL | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | GODSWILL NTSOMBAH | Assistant | En poste |
| 27 | KABELONG BANAHU Louis-Paul | Assistant | En poste |
| 28 | KONO Léon Dieudonné | Assistant | En poste |
| 29 | LIBALAH Moses BAKONCK | Assistant | En poste |
| 30 | LIKENG-LI-NGUE Benoit C | Assistant | En poste |
| 31 | TAEDOUNG Evariste Hermann | Assistant | En poste |
| 32 | TEMEGNE NONO Carine | Assistant | En poste |

| 4- DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35) | | | |
|---|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 1 | AGWARA ONDOH Moïse | Professeur | <i>Chef de Departement</i> |
| 2 | ELIMBI Antoine | Professeur | En poste |
| 3 | Florence UFI CHINJE épouse MELO | Professeur | <i>Recteur Univ. Ngaoundere</i> |
| 4 | GHOGOMU Paul MINGO | Professeur | <i>Ministre Chargé de Miss.PR</i> |
| 5 | NANSEU Njiki Charles Péguy | Professeur | En poste |
| 6 | NDIFON Peter TEKE | Professeur | <i>CT MINRESI</i> |
| 7 | NGOMO Horace MANGA | Professeur | <i>Vice Chancellor Univ. Bamenda</i> |
| 7 | NDIKONTAR Maurice KOR | Professeur | <i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i> |
| 8 | NENWA Justin | Professeur | En poste |
| 9 | NGAMENI Emmanuel | Professeur | <i>Doyen/FS/UDs</i> |
| 10 | BABALE née DJAM DOUDOU | Maître de Conférences | <i>C M/P.R.</i> |
| 11 | DJOUFAC WOUMFO Emmanuel | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | KAMGANG YOUBI Georges | Maître de Conférences | En poste |
| 13 | KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C. | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | KONG SAKEO | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | NDI NSAMI Julius | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | NJIOMOU C. épse DJANGANG | Maître de Conférences | En poste |
| 18 | NJOYA Dayirou | Maître de Conférences | En poste |
| 19 | YOUNANG Elie | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | ACAYANKA Elie | Chargé de Cours | En poste |
| 21 | BELIBI BELIBI Placide Désiré | Chargé de Cours | <i>CS/ ENS Bertoua</i> |
| 22 | CHEUMANI YONA Arnaud M. | Chargé de Cours | En poste |
| 23 | EMADACK Alphonse | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | KENNE DEDZO GUSTAVE | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | KOUOTOU DAOUDA | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | MAKON Thomas Beaugard | Chargé de Cours | En poste |
| 27 | MBEY Jean Aime | Chargé de Cours | En poste |
| 28 | NCHIMI NONO KATIA | Chargé de Cours | En poste |
| 29 | NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE | Chargée de Cours | <i>CT/ MINFEM</i> |
| 30 | NYAMEN Linda Dyorisse | Chargée de Cours | En poste |
| 31 | PABOUDAM GBAMBIE A. | Chargée de Cours | En poste |
| 32 | TCHAKOUTE KOUAMO Hervé | Chargé de Cours | En poste |
| 33 | NJANKWA NJABONG N. Eric | Assistant | En poste |
| 34 | PATOUOSSA ISSOFA | Assistant | En poste |
| 35 | SIEWE Jean Mermoz | Assistant | En Poste |

| 5- DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35) | | | |
|---|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | DONGO Etienne | Professeur | <i>Vice Doyen/FSE/UYI</i> |
| 2 | GHOGOMU TIH Robert Ralph | Professeur | Dir. IBAF/UDA |
| 3 | NGOUELA Silvère Augustin | Professeur | Chef de Departement UDS |
| 4 | NKENGFAK Augustin Ephrem | Professeur | Chef de Département |
| 5 | NYASSE Barthélemy | Professeur | En poste |
| 6 | PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel | Professeur | <i>Directeur/ MINESUP</i> |
| 7 | WANDJI Jean | Professeur | En poste |
| 8 | Alex de Théodore ATCHADE | Maître de Conférences | Vice Doyen/FS/UYI |

| | | | |
|----|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 9 | EYONG Kenneth OBEN | Maître de Conférences | Chef Service Progr. & Diplomes |
| 10 | FOLEFOC Gabriel NGOSONG | Maître de Conférences | En poste |
| 11 | FOTSO WABO Ghislain | Maître de Conférences | En poste |
| 12 | KEUMEDJIO Félix | Maître de Conférences | En poste |
| 13 | KEUMOGNE Marguerite | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | KOUAM Jacques | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | MBAZOA née DJAMA Céline | Maître de Conférences | En poste |
| 16 | MKOUNGA Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | NOTE LOUGBOT Olivier Placide | Maître de Conférences | <i>Chef Service/MINESUP</i> |
| 18 | NGO MBING Joséphine | Maître de Conférences | <i>Sous/Direct. MINERESI</i> |
| 19 | NGONO BIKOBO Dominique Serge | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | NOUNGOUE TCHAMO Diderot | Maître de Conférences | En poste |
| 21 | TABOPDA KUATE Turibio | Maître de Conférences | En poste |
| 22 | TCHOUANKEU Jean-Claude | Maître de Conférences | <i>Doyen /FS/UJI</i> |
| 23 | TIH née NGO BILONG E. Anastasie | Maître de Conférences | En poste |
| 24 | YANKEP Emmanuel | Maître de Conférences | En poste |
| 25 | AMBASSA Pantaléon | Maître de Conférences | En poste |
| 26 | TAGATSING FOTSING Maurice | Maître de Conférences | En poste |
| 27 | MVOT AKAK CARINE | Maître de Conférences | En poste |
| 28 | ZONDENDEGOUNBA Ernestine | Maître de Conférences | En poste |
| 29 | NGOMO Orléans | Chargée de Cours | En poste |
| 30 | OUAHOUE WACHE Blandine M. | Chargée de Cours | En poste |
| 31 | KAMTO Eutrophe Le Doux | Chargé de Cours | En poste |
| 32 | NGNINTEDO Dominique | Chargé de Cours | En poste |
| 33 | SIELINOUE TEDJON Valérie | Chargé de Cours | En poste |
| 34 | MESSI Angélique Nicolas | Assistant | En poste |
| 35 | TSEMEUGNE Joseph | Assistant | En poste |
| 36 | TCHAMGOUE Joseph | Assistant | En poste |
| 37 | TSAFACK Maurice | Assistant | En poste |
| 38 | TSAMO Armelle | Assistant | En poste |

| 6- DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (INF) (27) | | | |
|---|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 1 | ATSA ETOUNDI Roger | Professeur | <i>Chef Div.MINESUP</i> |
| 2 | FOUDA NDJODO Marcel Laurent | Professeur | <i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i> |
| 3 | NDOUNDAM René | Maître de Conférences | En poste |
| 4 | AMINOUE Halidou | Chargé de Cours | En poste |
| 5 | DJAM Xaviera YOUH - KIMBI | Chargé de Cours | En Poste |
| 6 | EBELE Serge Alain | Chargé de Cours | En poste |
| 7 | KOUOKAM KOUOKAM E. A. | Chargé de Cours | En poste |
| 8 | MELATAGIA YONTA Paulin | Chargé de Cours | En poste |
| 9 | MOTO MPONG Serge Alain | Chargé de Cours | En poste |
| 10 | TAPAMO Hyppolite | Chargé de Cours | En poste |
| 11 | ABESSOLO ALO'O Gislain | Chargé de Cours | En poste |
| 12 | KAMGUEU Patrick Olivier | Chargé de Cours | En poste |
| 13 | MONTHE DJIADEU Valery M. | Chargé de Cours | En poste |
| 14 | OLLE OLLE Daniel Claude Delort | Chargé de Cours | <i>C/D Enset. Ebolowa</i> |
| 15 | TINDO Gilbert | Chargé de Cours | En poste |
| 16 | TSOPZE Norbert | Chargé de Cours | En poste |
| 17 | WAKU KOUAMOU Jules | Chargé de Cours | En poste |
| 18 | BAYEM Jacques Narcisse | Assistant | En poste |

| | | | |
|----|-------------------------------|------------|----------|
| 19 | DOMGA KOMGUEM Rodrigue | Assistant | En poste |
| 20 | EKODECK Stéphane Gaël Raymond | Assistant | En poste |
| 21 | HAMZA Adamou | Assistant | En poste |
| 22 | JIOMEKONG AZANZI Fidel | Assistant | En poste |
| 23 | MAKEMBE. S . Oswald | Assistant | En poste |
| 24 | MESSI NGUELE Thomas | Assistant | En poste |
| 25 | MEYEMDOU Nadège Sylvianne | Assistante | En poste |
| 26 | NKONDOCK. MI. BAHANACK.N. | Assistant | En poste |

7- DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (30)

| | | | |
|----|-------------------------------|------------------------------|--|
| 1 | EMVUDU WONO Yves S. | Professeur | <i>CD Info/ Inspecteur MINESUP</i> |
| 2 | AYISSI Raoult Domingo | Maître de Conférences | Chef de Département |
| 3 | NKUIMI JUGNIA Célestin | Maître de Conférences | En poste |
| 4 | NOUNDJEU Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 5 | MBEHOU Mohamed | Maître de Conférences | En poste |
| 6 | TCHAPNDA NJABO Sophonie B. | Maître de Conférences | <i>Directeur/AIMS Rwanda</i> |
| 7 | AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard | Chargé de Cours | <i>Chef Cellule MINPLAMAT</i> |
| 8 | CHENDJOU Gilbert | Chargé de Cours | En poste |
| 9 | DJIADEU NGAHA Michel | Chargé de Cours | En poste |
| 10 | DOUANLA YONTA Herman | Chargé de Cours | En poste |
| 11 | FOMEKONG Christophe | Chargé de Cours | En poste |
| 12 | KIANPI Maurice | Chargé de Cours | En poste |
| 13 | KIKI Maxime Armand | Chargé de Cours | En poste |
| 14 | MBAKOP Guy Merlin | Chargé de Cours | En poste |
| 15 | MBANG Joseph | Chargé de Cours | En poste |
| 16 | MBELE BIDIMA Martin Ledoux | Chargé de Cours | En poste |
| 17 | MENGUE MENGUE David Joe | Chargé de Cours | En poste |
| 18 | NGUEFACK Bernard | Chargé de Cours | En poste |
| 19 | NIMPA PEFOUNKEU Romain | Chargée de Cours | En poste |
| 20 | POLA DOUNDOU Emmanuel | Chargé de Cours | En poste |
| 21 | TAKAM SOH Patrice | Chargé de Cours | En poste |
| 22 | TCHANGANG Roger Duclos | Chargé de Cours | En poste |
| 23 | TCHOUNDJA Edgar Landry | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | TETSADJIO TCHILEPECK M. E. | Chargée de Cours | En poste |
| 25 | TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie | Chargée de Cours | En poste |
| 26 | MBIAKOP Hilaire George | Assistant | En poste |
| 27 | BITYE MVONDO Esther Claudine | Assistante | En poste |
| 28 | MBATAKOU Salomon Joseph | Assistant | En poste |
| 29 | MEFENZA NOUNTU Thiery | Assistant | En poste |
| 30 | TCHEUTIA Daniel Duviol | Assistant | En poste |

8- DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

| | | | |
|---|-------------------------------|-----------------------|-----------------|
| 1 | ESSIA NGANG Jean Justin | Professeur | <i>DRV/IMPM</i> |
| 2 | BOYOMO ONANA | Maître de Conférences | En poste |
| 3 | NWAGA Dieudonné M. | Maître de Conférences | En poste |
| 4 | NYEGUE Maximilienne Ascension | Maître de Conférences | En poste |
| 5 | RIWOM Sara Honorine | Maître de Conférences | En poste |
| 6 | SADO KAMDEM Sylvain Leroy | Maître de Conférences | En poste |
| 7 | ASSAM ASSAM Jean Paul | Chargé de Cours | En poste |
| 8 | BODA Maurice | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|----|-----------------------------|------------------|----------|
| 9 | BOUGNOM Blaise Pascal | Chargé de Cours | En poste |
| 10 | ESSONO OBOUGOU Germain G. | Chargé de Cours | En poste |
| 11 | NJIKI BIKOÏ Jacky | Chargée de Cours | En poste |
| 12 | TCHIKOUA Roger | Chargé de Cours | En poste |
| 13 | ESSONO Damien Marie | Assistante | En poste |
| 14 | LAMYE Glory MOH | Assistant | En poste |
| 15 | MEYIN A EBONG Solange | Assistante | En poste |
| 16 | NKOUDOU ZE Nardis | Assistant | En poste |
| 17 | SAKE NGANE Carole Stéphanie | Assistante | En poste |
| 18 | TOBOLBAÏ Richard | Assistant | En poste |

| 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (42) | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------------|--|
| 1 | BEN- BOLIE Germain Hubert | Professeur | En poste |
| 2 | ESSIMBI ZOBO Bernard | Professeur | En poste |
| 3 | KOFANE Timoléon Crépin | Professeur | En poste |
| 4 | NANA ENGO Serge Guy | Professeur | En poste |
| 5 | NDJAKA Jean Marie Bienvenu | Professeur | Chef de Département |
| 6 | NOUAYOU Robert | Professeur | En poste |
| 7 | NJANDJOCK NOUCK Philippe | Professeur | <i>Sous-Directeur/ MINRESI</i> |
| 8 | PEMHA Elkana | Professeur | En poste |
| 9 | TABOD Charles TABOD | Professeur | Doyen Univ/Bda |
| 10 | TCHAWOUA Clément | Professeur | En poste |
| 11 | WOAFO Paul | Professeur | En poste |
| 12 | BIYA MOTTO Frédéric | Maître de Conférences | <i>DG/HYDRO Mekin</i> |
| 13 | BODO Bertrand | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | DJUIDJE KENMOE | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | EKOBENA FOU DA Henri Paul | Maître de Conférences | <i>Chef Division. UN</i> |
| 16 | EYEBE FOU DA Jean sire | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | FEWO Serge Ibraïd | Maître de Conférences | En poste |
| 18 | HONA Jacques | Maître de Conférences | En poste |
| 19 | MBANE BIOUELE César | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | NANA NBENDJO Blaise | Maître de Conférences | En poste |
| 21 | NDOP Joseph | Maître de Conférences | En poste |
| 22 | SAIDOU | Maître de Conférences | En poste |
| 23 | SIEWE SIEWE Martin | Maître de Conférences | En poste |
| 24 | SIMO Elie | Maître de Conférences | En poste |
| 25 | VONDOU Derbetini Appolinaire | Maître de Conférences | En poste |
| 26 | ZEKENG Serge Sylvain | Maître de Conférences | En poste |
| 27 | ABDOURAHIMI | Chargé de Cours | En poste |
| 28 | EDONGUE HERVAIS | Chargé de Cours | En poste |
| 29 | ENYEGUE A NYAM | Chargée de Cours | En poste |
| 30 | FOUEDJIO David | Chargé de Cours | <i>Chef Cell. MINADER</i> |
| 31 | MBINACK Clément | Chargé de Cours | En poste |
| 32 | MBONO SAMBA Yves Christian U. | Chargé de Cours | En poste |
| 33 | MEL'I Joelle Larissa | Chargée de Cours | En poste |
| 34 | MVOGO ALAIN | Chargé de Cours | En poste |
| 35 | OBOUNOU Marcel | Chargé de Cours | <i>DA/Univ Inter Etat/Sangmalima</i> |
| 38 | WOULACHE Rosalie Laure | Chargée de Cours | En poste |
| 39 | AYISSI EYEBE Guy François Valérie | Assistant | En poste |
| 40 | CHAMANI Roméo | Assistant | En poste |
| 41 | TEYOU NGOUPOU Ariel | Assistant | En poste |

| 10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43) | | | |
|--|------------------------------|-----------------------|---|
| 1 | BITOM Dieudonné | Professeur | <i>Doyen/FASA/UDs</i> |
| 2 | FOUATEU Rose épouse YONGUE | Professeur | En poste |
| 3 | KAMGANG Pierre | Professeur | En poste |
| 4 | NDJIGUI Paul Désiré | Professeur | Chef de Département |
| 5 | NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy | Professeur | En poste |
| 6 | NGOS III Simon | Professeur | DAAC/Uma |
| 7 | NKOUMBOU Charles | Professeur | En poste |
| 8 | NZENTI Jean-Paul | Professeur | En poste |
| 9 | ABOSSOLO née ANGUE Monique | Maître de Conférences | <i>Vice-Doyen/DRC</i> |
| 10 | GHOGOMU Richard TANWI | Maître de Conférences | <i>CD/Uma</i> |
| 11 | MOUNDI Amidou | Maître de Conférences | <i>CT/ MINIMDT</i> |
| 12 | NGUEUTCHOUA Gabriel | Maître de Conférences | CEA/MINRESI |
| 13 | NJILAH Isaac KONFOR | Maître de Conférences | En poste |
| 14 | ONANA Vincent Laurent | Maître de Conférences | En poste |
| 15 | BISSO Dieudonné | Maître de Conférences | <i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i> |
| 16 | EKOMANE Emile | Maître de Conférences | En poste |
| 17 | GANNO Sylvestre | Maître de Conférences | En poste |
| 18 | NYECK Bruno | Maître de Conférences | En poste |
| 19 | TCHOUANKOUE Jean-Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | TEM DJIM Robert | Maître de Conférences | En poste |
| 21 | YENE ATANGANA Joseph Q. | Maître de Conférences | <i>Chef Div. /MINTP</i> |
| 22 | ZO'O ZAME Philémon | Maître de Conférences | <i>DG/ART</i> |
| 23 | ANABA ONANA Achille Basile | Chargé de Cours | En poste |
| 24 | BEKOA Etienne | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | ELISE SABABA | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | ESSONO Jean | Chargé de Cours | En poste |
| 27 | EYONG JOHN TAKEM | Chargé de Cours | En poste |
| 28 | FUH Calistus Gentry | Chargé de Cours | <i>Sec. Etat/MINMIDT</i> |
| 29 | LAMILLEN BILLA Daniel | Chargé de Cours | En poste |
| 30 | MBESSE CECILE OLIVE | Chargée de Cours | En poste |
| 31 | MBIDA YEM | Chargé de Cours | En poste |
| 32 | METANG Victor | Chargé de Cours | En poste |
| 33 | MINYEM Dieudonné-Lucien | Chargé de Cours | <i>CD/Uma</i> |
| 34 | NGO BELNOUN Rose Noël | Chargée de Cours | En poste |
| 35 | NGO BIDJECK Louise Marie | Chargée de Cours | En poste |
| 36 | NOMO NEGUE Emmanuel | Chargé de Cours | En poste |
| 37 | NTSAMA ATANGANA Jacqueline | Chargé de Cours | En poste |
| 38 | TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM | Chargée de Cours | <i>Chef.cell / MINRESI</i> |
| 39 | TCHAPTCHET TCHATO De P. | Chargé de Cours | En poste |
| 40 | TEHNA Nathanaël | Chargé de Cours | En poste |
| 41 | TEMGA Jean Pierre | Chargé de Cours | En poste |
| 42 | FEUMBA Roger | Assistant | En poste |
| 43 | MBANGA NYOBE Jules | Assistant | En poste |

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

| NOMBRE D'ENSEIGNANTS | | | | | |
|----------------------|---------------|---------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| DÉPARTEMENT | Professeurs | Maîtres de Conférences | Chargés de Cours | Assistants | Total |
| BCH | 9 (1) | 13 (09) | 14 (05) | 3 (2) | 39 (16) |
| BPA | 13 (1) | 09 (06) | 19 (05) | 05 (2) | 46 (13) |
| BPV | 06 (0) | 10 (02) | 9 (04) | 07 (01) | 31 (9) |
| CI | 10 (1) | 09 (02) | 13 (02) | 02 (0) | 35 (5) |
| CO | 7 (0) | 17 (04) | 09 (03) | 05 (01) | 38(7) |
| INFO | 2 (0) | 1 (0) | 14 (01) | 10 (02) | 26 (3) |
| MAT | 1 (0) | 5 (0) | 19 (01) | 05 (01) | 30 (2) |
| MIB | 1 (0) | 5 (02) | 06 (01) | 06 (02) | 17 (5) |
| PHY | 11 (0) | 16 (01) | 10 (03) | 03 (0) | 40 (4) |
| ST | 8 (1) | 14 (01) | 19 (04) | 02 (0) | 43(6) |
| Total | 68 (4) | 99 (27) | 132 (29) | 45 (10) | 344 (70) |

() = Nombre de Femmes

CERTIFICATION

Je soussigné Pr **KOUAM FOGUE Siméon**, certifie que M. **WOUAMBA NJONTE Steven Collins** (matricule 09Y160), a effectué la présente thèse de Doctorat/Ph.D. au Laboratoire des substances naturelles d'origines végétales et fongiques de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé 1 (Cameroun) sous ma direction, avec la collaboration du laboratoire de phytobiochimie de la Faculté des sciences de l'Université de Yaoundé 1 et le Département de Chimie Organique et Bioorganique de la Faculté des sciences de l'Université de Bielefeld (Allemagne).

Ce travail, ayant pour titre « Etude chimique guidée par LC-MS et par l'activité antileishmaniale de *Vernonia guineensis* Benth (Asteraceae) : Essai de standardisation et Preformulation de phytomédicaments » est très original, digne d'intérêt pour le développement de la médecine alternative en Afrique et n'a jamais été présenté pour l'acquisition d'un quelconque diplôme ou titre académique.

Le Directeur de thèse



Siméon F. Kouam
Professeur

DEDICACE

A mes enfants :

- *MO'O WOUAMBA Ange Honora*

- *MO'O WOUAMBA Lynn Salomé*

- *WOUAMBA NJONTE Christ Mathéo*

REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus sincères vont tout d'abord à l'endroit de mon encadreur le Professeur **KOUAM Siméon**, enseignant à l'École Normale Supérieure (ENS) de l'Université de Yaoundé I, pour ses conseils judicieux, son jugement critique et l'appui qu'il m'a apporté tout au long de mon séjour au laboratoire. Votre compétence et votre sens du devoir m'ont énormément marqué. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

Ensuite au Professeur, **NKENGFACK Augustin**, Enseignant et Chef du Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de l'UYI qui, non seulement m'a marqué par le dynamisme avec lequel il manage le Département, mais aussi celui auprès de qui j'ai énormément appris et bénéficié d'énormes conseils. Plus qu'un maître, vous êtes pour moi un modèle.

Au Professeur **LENTA Bruno**, Enseignant à l'ENS de Yaoundé et Coordonnateur du projet *Yaounde-Bielefeld Graduate School of Natural Products with Antiparasite and Antibacterial activities* (YaBiNaPA) au Cameroun, pour les efforts qu'il a consentis à mettre à notre disposition, un équipement de pointe. Bien au-delà de votre rôle de coordonnateur votre posture en tant qu'enseignant et chercheur de haut vol est pour moi un modèle à copier. Vous vous êtes fait proche de moi et j'ai largement bénéficié de vos précieux conseils. Merci professeur.

Au Professeur **DONGO Etienne**, enseignant à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et Vice Doyen à la Faculté des Sciences de l'Education pour sa rigueur et son style scientifique qui m'ont énormément marqué, notamment dans la lecture et l'écriture des textes discursifs. Aussi, vos multiples conseils et encouragements m'ont grandement galvanisé. Professeur, trouvez ici ma reconnaissance.

Au Professeur **KAPCHE Deccaux**, enseignant à l'École Normale Supérieure de UYI, qui m'a toujours marqué par ses enseignements et qui n'a jamais hésité à m'accompagner en cas de besoin.

Mes remerciements s'adressent également à tous les enseignants du Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I pour la qualité de leurs enseignements, qui constitue pour moi le socle de mes connaissances en Chimie. Je tiens aussi à exprimer ma gratitude aux enseignants de l'École Normale Supérieure de Yaoundé et en particulier au Docteur **NGANSOP René** et au Professeur **WAFO Pascal** pour leurs multiples conseils et encouragements.

A tous mes aînés et camarades de laboratoire pour leurs multiples encouragements, leur aide scientifique et pour le travail en équipe unie et sincère au sein du laboratoire. Egalement à tous

mes amis et camarades de promotion pour leurs assistance et encouragements.

A Mes coéquipier, M. **POUOFO Michèle**, M. **NJAMPA Cyrille** et Mle. **DIZE Darline** pour le travail en équipe avec transfert de compétences. Recevez ici ma gratitude.

A une personne spéciale dans ma vie, mon amie, ma sœur, ma compagne, mon cœur, mon épouse, Mme **WOUAMBA Jocelyne née NONGNI** pour sa manière spéciale de me comprendre et pour son amour inconditionné. Cette thèse est une occasion nouvelle pour moi de te dire merci pour tout ce que tu m'offres.

A mon amour, une femme merveilleuse et spéciale : Ma tendre mère Mme **NJONTE Cecile** pour m'avoir donné la vie et légué l'amour en héritage. Ta chaleur, ton amour, ta tendresse, tes encouragements, ton aide financière et ta rigueur pour le travail bien fait ont constitué pour moi un atout majeur dans l'édification de ce chef d'œuvre. Maman, merci.

A mon oncle et tuteur le Professeur **KOUMETIO Fidèle** pour l'éducation qu'il m'a donnée. Ta rigueur, ton amour pour le travail bien fait, tes conseils précieux et tout ce que nous avons vécu ensemble m'ont permis de travailler avec abnégation. Cette thèse est pour moi, une occasion renouvelée de te dire un véritable merci et de te témoigner ma reconnaissance.

A mon petit frère **KAKEU Curtis**, mes merveilleuses grandes sœurs Dr **MANTO Juliette**, **MANGOUA Chimène** et **MADE Gwladys** pour toutes leurs attentions, leur affection, leurs multiples encouragements ; l'amour particulier dont vous me faites montre m'a permis de conduire cette thèse avec moins de stress. Vous vous êtes tous impliqués dans ce travail, chacun selon sa compétence. Cette cohésion et cette complémentarité sont une richesse dont j'ai largement bénéficié. Merci pour tout.

A ma belle-mère **NGODIA Honorine** pour sa manière spéciale de m'encourager. Comme une maman, tu as toujours su me relever le morale. Je te dis grandement merci.

A toute ma famille et à tous mes amis pour votre contribution à la réalisation de ce travail.

Je ne saurais terminer sans remercier très sincèrement l'Université de Bielefeld à travers le Professeur **SEWALD Norbert**, Coordonnateur du projet YaBiNaPA en Allemagne, pour son soutien inconditionné et ses encouragements dans les moments les plus difficiles.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit des organismes internationaux tels que la *Deutscher Akademischer Austausch Dienst* (DAAD), la *Third World Academic of Sciences* (TWAS) l'*International Foundation for Science* (IFS) et la fondation Alexander Humboldt pour leur soutien matériel et financier.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|--------|
| LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES | ii |
| CERTIFICATION..... | xi |
| DEDICACE..... | xii |
| REMERCIEMENTS | xiii |
| TABLE DES MATIERES | xv |
| ABREVIATIONS, ACRONYMES ET SYMBOLES | xviii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xx |
| LISTE DES FIGURES..... | xxii |
| LISTE DES SCHEMAS..... | xxvi |
| RESUME..... | xxvii |
| ABSTRACT | xxviii |
| INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
| PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE | 4 |
| I.1. Revue de la littérature en relation avec la plante <i>Vernonia guineensis</i> | 5 |
| I.1.1. Aperçu botanique sur la famille des Asteraceae..... | 5 |
| I.1.2. Aperçu botanique du genre <i>Vernonia</i> | 5 |
| I.1.3. Aperçu botanique de l'espèce <i>Vernonia guineensis</i> | 6 |
| I.1.4. Usages thérapeutiques et travaux pharmacologiques antérieurs sur des espèces du genre <i>Vernonia</i> | 8 |
| I.1.5. Travaux chimiques antérieurs sur des espèces du genre <i>Vernonia</i> | 11 |
| I.2. Revue de la littérature en relation avec les pathologies ciblées | 35 |
| I.2.1. Leishmaniose | 35 |
| I.2.2. Maladies entériques | 42 |
| I.3. Revue de la littérature en relation avec la formulation et standardisation des phytomédicaments | 44 |
| I.3.1. Généralité sur les phytomédicaments | 44 |
| I.3.2. Standardisation et normalisation des phytomédicaments | 45 |
| I.3.3. Classification des phytomédicaments en Afrique..... | 46 |
| I.3.4. Les lignes directrices de l'OMS relatives à l'élaboration de phytomédicaments standardisés..... | 48 |

| | |
|---|-----|
| PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION | 52 |
| II.1. Extraction et fractionnement des parties aériennes et racines de <i>V. guineensis</i> | 53 |
| II.1.1. Etude des parties aériennes de <i>V. guineensis</i> | 53 |
| II.1.2. Etude des racines de <i>V. guineensis</i> | 54 |
| II.2. Caractérisation des composés isolés | 55 |
| II.2.1. Caractérisation des céramides | 55 |
| II.2.2. Caractérisation des anthraquinones | 72 |
| II.2.3. Caractérisation des flavonoïdes | 84 |
| II.2.4. Caractérisation des esters de glycérol | 94 |
| II.2.5. Caractérisation des caroténoïdes | 104 |
| II.2.6. Caractérisation des sesquiterpénoïdes | 111 |
| II.2.7. Caractérisation des stéroïdes | 118 |
| II.2.8. Caractérisation des triterpénoïdes | 135 |
| II.2.9. Caractérisation des acides gras | 155 |
| II.2.10. Caractérisation des alcools gras | 160 |
| II.3. Hypothèse des liens biogénétiques entre les composés isolés | 165 |
| II.4. Contribution chimiotaxonomique | 166 |
| II.5. Activité biologique des extraits, fractions et composés isolés | 168 |
| II.5.1. Toxicité aigüe des extraits aqueux et hydroalcoolique des feuilles | 168 |
| II.5.2. Activité antileishmaniale | 169 |
| II.5.3. Activités antioxydantes | 176 |
| II.5.4. Activités antibactériennes | 179 |
| II.6. Formulation de quelques phytomédicaments | 182 |
| II.6.1. Lotion dermique et pommades à partir de l'extrait aqueux | 183 |
| II.6.2. Tisane à partir de la drogue pulvérisée des racines de <i>V. guineensis</i> | 183 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 184 |
| PARTIE III : MATERIELS ET METHODES | 187 |
| III.1. Généralités | 188 |
| III.1.1. Pesées, évaporation et mesure du point de fusion | 188 |
| III.1.2. Chromatographie, mesures spectrométriques et spectroscopiques | 188 |

| | |
|--|-----|
| III.1.3. Manipulation microbiologique..... | 189 |
| III.2. Etude phytochimique de <i>V. guineensis</i> Benth. | 190 |
| III.2.1. Les racines de <i>V. guineensis</i> Benth..... | 190 |
| III.2.2. Les parties aériennes de <i>V. guineensis</i> | 194 |
| III.2.3. Quelques transformations chimiques des composés isolés de <i>V. guineensis</i> | 199 |
| III.2.4. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des composés isolés de <i>V. guineensis</i> | 200 |
| III.3. Etude pharmacologique de <i>V. guineensis</i> Benth. | 208 |
| III.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne. | 208 |
| III.3.2. Evaluation de l'activité antileishmaniale. | 209 |
| III.3.3. Evaluation de l'activité cytotoxique. | 211 |
| III.3.4. Evaluation de l'activité antioxydante..... | 212 |
| III.3.5. Evaluation de Toxicité orale aiguë. | 215 |
| PARTIE IV: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 216 |
| ANNEXE | 232 |
| Publications issues de ce travail de thèse | 233 |

ABREVIATIONS, ACRONYMES ET SYMBOLES

| | | |
|-----------------------------|---|---|
| ABTS | : | 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) |
| ADN | : | Acide DésoxyriboNucléique |
| ATCC | : | American Type Culture Collection |
| ATP | : | Attached Proton Test |
| CC | : | Chromatographie sur Colonne |
| CC ₅₀ | : | Concentration Cytotoxique médiane |
| CCM | : | Chromatographie sur Couche Mince |
| CE ₅₀ | : | Concentration Efficace médiane |
| CHI | : | Chalcone-Isomerase |
| CHS | : | Chalcone-Synthetase |
| CI ₅₀ | : | Concentration Inhibitrice médiane |
| CID | : | Collision Induced Dissociation |
| CMB | : | Concentration Minimale Bactéricide |
| CMI | : | Concentration Minimale Inhibitrice |
| CoA | : | Coenzyme A |
| COSY | : | Correlation Spectroscopy |
| d | : | Doublet |
| DAD | : | Diode Array Detector |
| DCM | : | Dichlorométhane |
| dd | : | Doublet de doublets |
| ddd | : | Doublet de doublets dédoublé |
| DEPT | : | Distortionless Enhancement by polarization transfer |
| dl | : | Doublet large |
| DMSO | : | Diméthylsulfoxyde |
| DMSO- <i>d</i> ₆ | : | Diméthylsulfoxyde deutérié |
| DPPH | : | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle |
| ERO | : | Espèce Réactives de l'Oxygène |
| ESI | : | Electrospray Ionisation |
| ET | : | Ecart-Type |
| FBS | : | Foetal Bovin serum |
| FLS | : | 2-hydroxyisoflavane Synthase |
| FRAP | : | Ferric Reducing Antioxidant Power |
| Hex | : | Hexane |
| HMBC | : | Heteronuclear Multiple Bond Connectivity |
| HMQC | : | Heteronuclear Multiple Quantum Coherence |

| | | |
|----------------------|---|--|
| HNC | : | Herbier National du cameroun |
| HPLC | : | High Performance Liquid Chromatography |
| HR | : | Haute Résolution |
| IE | : | Impact Electronique |
| IS | : | Indice de Selectivité |
| <i>J</i> | : | Constante de couplage en Hertz |
| <i>L. donovani</i> | : | <i>Leishmania donovani</i> |
| <i>L. Major</i> | : | <i>Leishmania Major</i> |
| LC-MS | : | Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry |
| LOD | : | Limit Of Detection |
| LOQ | : | Limit Of Quantification |
| m | : | Multiplet |
| MHA | : | Mueller Hinton Agar |
| MHB | : | Mueller Hinton Broth |
| mult. | : | Multiplicité |
| N.A | : | Nutrient Agar |
| NOESY | : | Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy |
| OCDE | : | Organisation pour directives de Coopération et de Developpement Economique |
| OMS | : | Organisation mondiale de la Santé |
| P.F. | : | Point de Fusion |
| ppm | : | partie par million |
| q | : | Quadruplet |
| RMN ¹³ C | : | Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13 |
| RMN 1D | : | Résonance Magnétique Nucléaire à une Dimension |
| RMN ¹ H | : | Résonance Magnétique Nucléaire du Proton |
| RMN 2D | : | Résonance Magnétique Nucléaire à deux Dimensions |
| s | : | Singulet |
| SSA | : | <i>Salmonella Shigella</i> Agar |
| t | : | Triplet |
| TMS | : | Tetraméthylsilane |
| Tr. | : | Temps de Retention |
| UFC | : | Unité Formant colonie |
| UV | : | Ultra-Violet |
| <i>V. guineensis</i> | : | <i>Vernonia guineensis</i> |
| δ | : | Echelle de déplacement chimique |
| λ_{\max} | : | Longueur d'onde d'absorption maximale |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1: Lieux de récolte des plantes du genre <i>Vernonia</i> dans le monde | 6 |
| Tableau 2: Utilisations ethnopharmacologiques de quelques espèces du genre <i>Vernonia</i> | 9 |
| Tableau 3 : potentiel biologique de quelques composés isolés du genre <i>Vernonia</i> | 10 |
| Tableau 4: Céramides isolées des espèces appartenant à la famille des Asteraceae | 13 |
| Tableau 5: Différentes classes de flavonoïdes. | 17 |
| Tableau 6: Quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre <i>Vernonia</i> | 18 |
| Tableau 7: Gammes des longueurs d'onde d'absorption UV selon les classes de flavonoïdes.... | 22 |
| Tableau 8: Quelques déplacements chimiques en RMN ¹ H des noyaux A et B | 24 |
| Tableau 9: Quelques déplacements chimiques en RMN ¹³ C de divers types flavonoïdes | 24 |
| Tableau 10: Quelques acides gras et esters dérivés isolés des espèces du genre <i>Vernonia</i> | 26 |
| Tableau 11: Quelques métabolites secondaires isolés des espèces du genre <i>Vernonia</i> | 28 |
| Tableau 12: Rapport simplifié entre les syndromes, la distribution et les principales espèces de <i>Leishmania</i> | 37 |
| Tableau 13: Rendement d'extraction et activité antileishmaniale des extraits bruts issus des parties aériennes de <i>V. guineensis</i> | 53 |
| Tableau 14: Données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF75 (73) dans le CDCl ₃ /(CD ₃) ₂ SO | 65 |
| Tableau 15: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF53 dans la C ₅ D ₅ N avec celles de l'elasticamide (74) | 68 |
| Tableau 16: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF54 dans la C ₅ D ₅ N avec celles du composé (75) | 71 |
| Tableau 17: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF34 dans le CDCl ₃ avec celles de la physcion (76) | 76 |
| Tableau 18: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF35 dans le CDCl ₃ celles de l'erythroglaucin (77) | 79 |
| Tableau 19: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF33 dans CDCl ₃ avec celles de la revandchinone-3 (78) | 81 |
| Tableau 20: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF37 dans le CD ₃ OD avec celles de l'emodin (79) | 83 |
| Tableau 21: Données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF31 (80) dans CD ₃ OD | 89 |
| Tableau 22: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C dans le CDCl ₃ /CD ₃ OD de FVgF32 avec celles de la quercétine (11) | 92 |
| Tableau 23: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF32 dans le CDCl ₃ avec celles de la luteoline (14) | 94 |
| Tableau 24: Données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF22 (RVgF310) dans le CDCl ₃ | 99 |
| Tableau 25: Données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF25 (82) dans le CDCl ₃ | 103 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 26: Données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF26 (89) et celles de RMN ¹ H de FVgF11 (90) dans le CDCl ₃ | 110 |
| Tableau 27: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF42 dans le CDCl ₃ avec celles de la vernopicine (52) | 115 |
| Tableau 28: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF71 dans le DMSO- <i>d</i> ₆ avec celles de la vernoguinocide A (42) | 123 |
| Tableau 29: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF52 dans le CD ₃ OD avec celles de la vernoguinocide (44) | 127 |
| Tableau 30: Comparaison des données de RMN ¹ H (500MHz) des composé FVg F61 et RVgF73 avec celles du glucoside de β-sitostérol (83) et du glucoside de stigmastérol (84) .. | 131 |
| Tableau 31: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de RVgF36 dans le CDCl ₃ avec les valeurs de la hop-17(21)-en-3β-ol | 140 |
| Tableau 32: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF21 dans le CDCl ₃ avec les valeurs du lupeol | 143 |
| Tableau 33: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF21 dans le CDCl ₃ avec les valeurs de l'acide betulinique | 146 |
| Tableau 34: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF52 dans C ₅ D ₅ N avec les valeurs de l'acide oléanolique | 149 |
| Tableau 35: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C de FVgF34 dans CD ₃ OD avec les valeurs de l'acide ursolique | 154 |
| Tableau 36: Données RMN ¹ H et RMN ¹³ C de RVgF34 | 157 |
| Tableau 37: Activité antileishmaniale <i>In vitro</i> sur les promastigotes de <i>Leishmania donovani</i> et cytotoxicité des extraits bruts, fractions et composés de <i>V. guineensis</i> | 169 |
| Tableau 38: Principaux Sesquiterpènes détectés par UPLC-DAD-MS dans l'extrait brut et les fractions F3 et F4 des partie aérienne de <i>V. guineensis</i> | 174 |
| Tableau 39: Activité antileishmaniale <i>In vitro</i> sur les promastigotes de <i>Leishmania donovani</i> et cytotoxicité des extraits bruts, fractions et composés de <i>V. guineensis</i> | 176 |
| Tableau 40: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides minimales (MBC) d'extrait brut, de fractions et composés isolés en µg/mL | 179 |
| Tableau 41: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides minimales (MBC) d'extrait brut, de fractions et composés isolés en µg/mL | 181 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1: Appareil végétatif souterrain de <i>V. guineensis</i> : (a) Représentation, (b) Photos | 6 |
| Figure 2: Aspect général des organes aériens <i>V. guineensis</i> : (a) Représentation, (b) Photos..... | 7 |
| Figure 3: Aspect des racines <i>V. guineensis</i> (a) et <i>P. ginseng</i> (b) et (c) | 9 |
| Figure 4: Images agrandie de la mouche à sable (a), parasite sous forme promastigote (b) et du parasite sous forme amastigote (c) | 38 |
| Figure 5: Le cycle réplicatif de <i>Leishmania</i> | 39 |
| Figure 6 : Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF75 | 55 |
| Figure 7 : Spectre de masse (–) FAB du composé RVgF75 | 56 |
| Figure 8 : Spectre IR (KBr) du composé RVgF75..... | 56 |
| Figure 9 : Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD/(CD ₃) ₂ SO) du composé RVgF75..... | 57 |
| Figure 10 : Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ / (CD ₃) ₂ SO) du composé RVgF75 | 57 |
| Figure 11 : Spectre DEPT 135 (125MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD/(CD ₃) ₂ SO) du composé RVgF75..... | 58 |
| Figure 12 : Spectre HMQC du composé RVgF75 | 58 |
| Figure 13 : Spectre HMBC du composé RVgF75 | 59 |
| Figure 14 : Spectre COSY du composé RVgF75..... | 60 |
| Figure 15 : Spectre de masse (+) ESI de la phase organique du milieu réactionnel issue de la méthanolyse du composé RVgF75..... | 61 |
| Figure 16 : Spectre de masse (+) IE du composé RVgF75 | 62 |
| Figure 17 : Spectre de masse (+) IE élargi du composé RVgF75 | 63 |
| Figure 18 : Spectre de masse (+) HRESI du produit de réaction d'acétylation et d'époxydation de RVgF75 | 64 |
| Figure 19: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF53 | 66 |
| Figure 20: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) du composé RVgF53 | 66 |
| Figure 21: Spectre de masse (+) ESI de la phase organique du milieu réactionnel issue de la méthanolyse du composé RVgF53..... | 67 |
| Figure 22: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF54 | 69 |
| Figure 23: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) du composé RVgF54 | 70 |
| Figure 24: Spectre de masse (+) ESI de la phase organique du milieu réactionnel issue de la méthanolyse du composé RVgF54..... | 70 |
| Figure 25: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF34 | 72 |
| Figure 26: Spectre de RMN ¹ H (500 Mz, CDCl ₃) du composé RVgF34 | 73 |
| Figure 27: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé RVgF34 | 74 |
| Figure 28: Spectre HMQC du composé RVgF34 | 74 |
| Figure 29: Spectre HMBC du composé RVgF34 | 75 |
| Figure 30: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF35 | 77 |
| Figure 31: Spectre de RMN ¹ H (500 Mz, CDCl ₃) du composé RVgF35 | 78 |
| Figure 32: Spectre HMBC du composé RVgF35 | 78 |

| | |
|--|-----|
| Figure 33: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF33 | 80 |
| Figure 34: Spectre de RMN ¹ H (500Mz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) du composé RVgF33..... | 80 |
| Figure 35: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF37 | 82 |
| Figure 36: Spectre de RMN ¹ H (500 Mz, CD ₃ OD) du composé RVgF37 | 83 |
| Figure 37: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF31..... | 84 |
| Figure 38: Spectre IR-TF (KBr) du composé FVgF31 | 84 |
| Figure 39: Spectre UV (MeOH) du composé FVgF31 | 85 |
| Figure 40: Spectre de RMN ¹ H (600 Mz, CD ₃ OD) du composé FVgF31 | 85 |
| Figure 41: Spectre de RMN ¹³ C (150 Mz, CD ₃ OD) du composé FVgF31 | 85 |
| Figure 42: Spectre DEPT 135 (150 Mz, CD ₃ OD) du composé FVgF31 | 86 |
| Figure 43: Spectre COSY du composé FVgF31 | 86 |
| Figure 44: Spectre HMQC du composé FVgF31..... | 88 |
| Figure 45: Spectre HMBC du composé FVgF31 | 88 |
| Figure 46: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF32..... | 90 |
| Figure 47: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) du composé FVgF32 | 91 |
| Figure 48: spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) du composé FVgF32..... | 91 |
| Figure 49: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF33..... | 93 |
| Figure 50: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF33 | 93 |
| Figure 51: Spectre de masse (-) HRESI du composé FVgF22 (RVgF310)..... | 95 |
| Figure 52: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF22 (RVgF310)..... | 96 |
| Figure 53: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF22 (RVgF310) | 96 |
| Figure 54: Spectre COSY du composé FVgF22 (RVgF310)..... | 98 |
| Figure 55: Spectre HMQC du composé FVgF22 (RVgF310) | 98 |
| Figure 56: Spectre HMBCdu composé FVgF22 (RVgF310) | 99 |
| Figure 57: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF22..... | 100 |
| Figure 58: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF25 | 101 |
| Figure 59: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF25..... | 102 |
| Figure 60: Spectre HMQC du composé FVgF25..... | 102 |
| Figure 61: Spectre HMBC du composé FVgF25..... | 103 |
| Figure 62: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF26..... | 104 |
| Figure 63: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF26..... | 105 |
| Figure 64: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF26..... | 106 |
| Figure 65: Superposition du spectre DEPT 135 et du spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF26 | 106 |
| Figure 66: Spectre COSY élargi (0,50–2,50 ppm) du composé FVgF26 | 107 |
| Figure 67: Spectre COSY élargi (5,50–8,00 ppm) du composé FVgF26 | 107 |
| Figure 68: Spectre HMQC du composé FVgF26..... | 108 |
| Figure 69: Spectre HMBC du composé FVgF26..... | 108 |
| Figure 70: Spectre de masse (+)HRESI du composé FVgF11..... | 109 |

| | |
|---|-----|
| Figure 71: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé FVgF11 | 110 |
| Figure 72 : Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF42..... | 111 |
| Figure 73: Spectre de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) du composé FVgF42 | 112 |
| Figure 74: Spectre de RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) du composé FVgF42..... | 112 |
| Figure 75: Spectre COSY du composé FVgF42 | 113 |
| Figure 76: Spectre HMQC du composé FVgF42..... | 114 |
| Figure 77: Spectre HMBC du composé FVgF42..... | 114 |
| Figure 78: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF51..... | 116 |
| Figure 79: Spectre de masse Profil HPLC des composés FVgF51 et FVgF42..... | 116 |
| Figure 80: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé FVgF51 | 117 |
| Figure 81: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF71 | 118 |
| Figure 82: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé RVgF71 | 120 |
| Figure 83: Superposition du spectre DEPT et du spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé RVgF71 | 121 |
| Figure 84: Spectre HMQC du composé RVgF71 et illustration de quelques corrélations | 121 |
| Figure 85: Spectre HMBC du composé RVgF71 et illustration de quelques corrélations | 122 |
| Figure 86: Spectre COSY du composé RVgF71 et illustration de quelques corrélations | 122 |
| Figure 87: Spectre de masse (+)HRESI du composé RVgF52 | 124 |
| Figure 88: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du composé RVgF52..... | 125 |
| Figure 89: Spectre de RMN ^{13}C (125MHz, CD_3OD) du composé RVgF52 | 126 |
| Figure 90: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé FVgF61..... | 128 |
| Figure 91: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé FVgF61..... | 129 |
| Figure 92: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF73 | 130 |
| Figure 93: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé RVgF73 | 131 |
| Figure 94: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF32 | 132 |
| Figure 95: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé RVgF32..... | 133 |
| Figure 96: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé FVgF28..... | 134 |
| Figure 97: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé FVgF28..... | 134 |
| Figure 98: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF36 | 135 |
| Figure 99: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé RVgF36..... | 136 |
| Figure 100: Spectre de RMN ^{13}C (125 Mz, CDCl_3) du composé RVgF36 | 137 |
| Figure 101: Spectre DEPT 135 (125Mz, CDCl_3) du composé RVgF36..... | 137 |
| Figure 102: Spectre HMQC du composé RVgF36 | 138 |
| Figure 103: Spectre HMBC du composé RVgF36 | 139 |
| Figure 104: Spectre COSY du composé RVgF36..... | 139 |
| Figure 105: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF21..... | 141 |
| Figure 106: Spectre de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) du composé FVgF21 | 142 |
| Figure 107: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF51 | 144 |
| Figure 108: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé FVgF51 | 145 |

| | |
|--|-----|
| Figure 109: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF51 | 145 |
| Figure 110: Spectre de masse (-) HRESI du composé FVgF52..... | 147 |
| Figure 111: Spectre de RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) du composé FVgF52..... | 148 |
| Figure 112: Spectre de RMN ¹³ C (75 MHz, (C ₅ D ₅ N) du composé FVgF52 | 148 |
| Figure 113: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF27..... | 150 |
| Figure 114: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF27 | 151 |
| Figure 115: Spectre de masse (+)HRESI du composé FVgF34..... | 152 |
| Figure 116: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) du composé FVgF34 | 153 |
| Figure 117: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) du composé FVgF34..... | 153 |
| Figure 118: Spectre de masse (+) HRESI du composé RVgF38 | 155 |
| Figure 119: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) du composé RVgF38 | 156 |
| Figure 120: Spectre HMQC du composé RVgF38 et illustration des corrélations ¹ J _{C-H} | 156 |
| Figure 121: Spectre HMBC du composé RVgF38 | 157 |
| Figure 122: Spectre de masse (+)HRESI du composé RVgF39 | 158 |
| Figure 123: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé RVgF39..... | 158 |
| Figure 124: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF210..... | 159 |
| Figure 125: Spectre de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) du composé FVgF210 | 160 |
| Figure 126: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF23..... | 160 |
| Figure 127: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF23 | 161 |
| Figure 128: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF24 | 161 |
| Figure 129: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF24..... | 162 |
| Figure 130: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF24 | 163 |
| Figure 131: Spectre de masse (+) HRESI du composé FVgF29..... | 164 |
| Figure 132: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé FVgF20 | 164 |
| Figure 133: Effets des extraits de <i>V guineensis</i> sur l'évolution pondérale des rats | 168 |
| Figure 134: Activité antileishmaniale des Extraits bruts, fractions et quelques composés des parties aériennes de <i>V. guineensis</i> contre la forme promastigote de <i>L. donovani</i> | 170 |
| Figure 135: Chromatogramme des pics de base détectés par spectrométrie de Masse (<i>BPC+ All MS</i>) et UV de l'extrait brut et des fractions les plus actives F3 et F4 | 174 |
| Figure 136: Structure de quelques sesquiterpènes isolé et/ou détecté par LC/MS | 175 |
| Figure 137: Activité antioxydante des extraits bruts..... | 177 |
| Figure 138: Activité antioxydante des fractions | 178 |
| Figure 139: Activité antioxydante de quelques composés isolés..... | 178 |
| Figure 140: Lotion et pommades de <i>V. guineensis</i> | 183 |
| Figure 141: Tisane de <i>V. guineensis</i> | 183 |
| Figure 142: Profils chromatographiques de l'extrait brut, fractions issus des racines de <i>V. guineensis</i> | 191 |

LISTE DES SCHEMAS

| | |
|---|-----|
| Schéma 1: Origine biosynthétique des céramides | 14 |
| Schéma 2: Voies de biosynthèse des flavonoïdes | 19 |
| Schéma 3: Bandes d'absorption et formes limites des flavones et flavonols..... | 22 |
| Schéma 4: Elaboration d'un médicament à partir de plantes | 51 |
| Schéma 5: Equation chimique traduisant la réaction de méthanolyse du composé RVgF75 | 61 |
| Schéma 6: Mécanisme de fragmentation du composé RVgF75..... | 62 |
| Schéma 7: (a) Quelques corrélations HMBC et COSY (b) Quelques de fragmentations en SM-IE du composé RVgF75 | 63 |
| Schéma 8 : Réaction d'acétylation et d'époxydation du composé RVgF75 | 64 |
| Schéma 9: Equation chimique traduisant la réaction de méthanolyse du composé RVgF53 | 67 |
| Schéma 10: Equation chimique traduisant la réaction de méthanolyse du composé RVgF54 | 70 |
| Schéma 11: Quelques corrélations clés observées sur le spectre HMBC du composé RVgF34 .. | 75 |
| Schéma 12: Quelques corrélations clés observées sur les spectres HMBC et COSY du composé FVgF31 (80)..... | 89 |
| Schéma 13: Quelques corrélations clés observées sur les spectres HMBC et COSY du composé FVgF22 (RVgF310) | 97 |
| Schéma 14: Quelques corrélations clés observées sur les spectres HMBC et COSY de FVGF42 | 113 |
| Schéma 15: Quelques corrélations clés observées sur le spectre HMBC du composé RVgF36 | 138 |
| Schéma 16: Relations biogénétiques entre les composés isolés de <i>V. guineensis</i> | 166 |
| Schéma 17: Protocole d'extraction, fractionnement et isolement des constituants chimiques des racines de <i>V. guineensis</i> | 192 |
| Schéma 18: Protocole d'extraction, fractionnement et isolement des constituants chimiques des parties aériennes de <i>V. guineensis</i> | 198 |
| Schéma 19: Réaction d'acétylation—époxydation du composé RVgF75 | 199 |

RESUME

Une étude chimique et biologique intensive de *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) a conduit à l'isolement et la caractérisation de 34 composés dont 3 nouveaux, regroupés comme suit :

- 03 céramides : vernoguinamide (**73**) un dérivé nouveau, elasticamide (**74**) et (2 S, 3S, 4R)-2 -N- [(2'R) -hydroxyhexacosanoyl]-4-hydroxysphinganine (**75**) ;
- 04 anthraquinones : physcion (**76**), erythroglaucine (**77**), revandchinone-3 (**78**) et emodine (**79**) ;
- 03 flavonoïdes : vernoguinoïdine (**80**) dérivé nouveau, la quercétine (**11**) et la luteoline (**14**) ;
- 02 esters dérivés du glycérol : bisarachidicester (**81**), dérivé isolé de source naturelle pour la première fois et l'heptacosanoate de 2,3 -dihydroxypropyl (**82**) ;
- 02 sesquiterpènes : vernopicine (**52**) et vernomelitensine (**53**).
- 06 stéroïdes : vernoguinoside A (**42**) et vernoguinoside (**44**), 3-O- β -D-glucoside de β -sitostérol (**83**), 3-O- β -D-glucoside de stigmastérol (**84**), stigmastérol (**85**) et β -sitostérol (**86**) ;
- 06 triterpènes : acétate de hop-17 (21) -en-3b-yl (**87**), lupeol (**33**), acide betulinique (**88**), β -amyrin (**36**), acide oléanolique (**37**) et acide ursolique (**38**) ;
- 02 caroténoïdes, 13-*cis*- β -carotène (**89**) et β -carotène (**90**) ;
- 03 alcools et 03 acides gras : l'acide tetracosanoïque (**91**), l'acide tricosanoïque (**92**), l'acide pentacosanoïque (**93**), le docosan-1-ol (**94**), le triacontan-1-ol (**95**) et l'heptatriacontan-1-ol (**96**).

Les composés ont été isolés par chromatographie et les structures ont été déterminées par l'interprétation de leurs données physiques telles que la SM-ESI/IE, l'IR, l'UV, la RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT) et 2D (HMQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY, NOESY), puis par comparaison avec les données de la littérature et enfin par transformations chimiques. L'étude biologique a permis d'évaluer l'activité antileishmaniale sur la forme promastigote de *Leishmania donovani* (1 S (MHOM/SD/62/1S)). Les activités antibactérienne, antioxydante, cytotoxique et de toxicité aiguë ont également été évaluées. Les différents échantillons testés ont présenté des activités relativement importantes sur toutes les pathologies ciblées avec un faible seuil de toxicité (IS >2). En effet, les gammes d'activité antileishmaniales (évaluation de la CI_{50}) étaient comprises entre [50–0,33] $\mu\text{g/mL}$ contre 0,35 $\mu\text{g/mL}$ pour l'Amphotéricine B (contrôle positif). Les gammes d'activité antioxydante (évaluation de la CI_{50}) étaient comprises entre [250–1] $\mu\text{g/mL}$, contre [2–1] $\mu\text{g/mL}$ pour la vitamine C (contrôle positif). Concernant, les gammes d'activité antibactérienne (évaluation de la CMI), elles étaient comprises entre [2000–3,2] $\mu\text{g/mL}$, contre [7,8–1,56] $\mu\text{g/mL}$ pour la Ciprofloxacine (contrôle positif). A l'issue de travail, un essai de standardisation et preformulation de phytomédicaments a été réalisé.

Mots clés : *Vernonia guineensis*, vernoguinamide, bisarachidicester, vernoguinoïdine, vernopicine, toxicité, antimicrobien, antileishmanial, standardisation, phytomédicament.

ABSTRACT

An extensive chemical and biological study of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) led to isolation and characterization of 34 compounds with 3 new derivatives, viz:

- Three ceramides: vernoguinaimide (**73**) a new derivative, elasticamide (**74**) and (2S, 3S, 4R) -2-N - [(2'R) -hydroxyhexacosanoyl]-4-hydroxysphinganine (**75**);
- Four anthraquinones: physcion (**76**), erythroglaucon (**77**), revandchinone-3 (**78**) and emodin (**79**);
- Three flavonoids: vernoguinoiflavone (**80**) a new derivative, quercetin (**11**) and luteolin (**14**);
- Two glycerol ester derivatives: bisarachidic ester (**81**) a naturally isolated for the first and 2,3-dihydroxypropyl heptacosanoate (**82**);
- Two sesquiterpenes: vernopicrin (**52**) and vernomelitensin (**53**);
- Six steroids: vernoguinoside A (**42**) and vernoguinoside (**44**), β -sitosterol 3-O- β -D-glucoside (**83**), stigmasterol 3-O- β -D-glucoside (**84**), stigmastérol (**85**) and β -sitostérol (**86**);
- Six triterpenoids: hop-17(21)-en-3b-yl acetate (**87**) (isolated for the first time from the Asteraceae family), lupeol (**33**), betulinic acid (**88**), β -amyrin (**36**), oleanolic acid (**37**) and ursolic acid (**38**).
- Two carotenoids: 13-cis- β -carotène (**89**) and β -carotène (**90**);
- Three fatty acids: tricosanoic acid (**91**), tetracosanoic acid (**92**), and pentacosanoic acid (**93**).
- Three alcohol derivatives: docosan-1-ol (**94**), triacontan-1-ol (**95**) and heptatriacontan-1-ol (**96**).

The compounds were isolated by chromatography and their structures were determined by interpretation of their physical data such as MS-ESI/IE, IR, UV, 1D (^1H , ^{13}C , DEPT) and 2D (HMQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY, NOESY) NMR, then by comparison with literature data and finally by chemical transformations. The biological study allowed the evaluation of the antileishmanial activity on the promastigote form of *Leishmania donovani* (1 S (MHOM/SD/62/1S)). Antibacterial, antioxidant, cytotoxic and acute toxicity activities were also evaluated. The different samples tested showed relatively high activities on all targeted pathologies with a low toxicity threshold (IS >2). Indeed, the ranges of antileishmanial activity (IC₅₀ evaluation) were between [50–0.33] $\mu\text{g/mL}$ against 0.35 $\mu\text{g/mL}$ for Amphotericin B (positive control). The ranges of antioxidant activity (IC₅₀ evaluation) were [250-1] $\mu\text{g/mL}$, compared to [2–1] $\mu\text{g/mL}$ for vitamin C (positive control). The ranges of antibacterial activity (MIC evaluation) were [2000–3.2] $\mu\text{g/mL}$, compared to [7.8–1.56] $\mu\text{g/mL}$ for Ciprofloxacin (positive control). As a result of this work, a standardisation and preformulation trial of phytomedicines was carried out.

Key words: *Vernonia guineensis*, vernoguinaimide, bisarachidic ester, vernoguinoiflavone, vernopicrin, toxicity, antimicrobial, antileishmanial, standardization, phytomedicine.

INTRODUCTION GENERALE

Ce travail est effectué dans le cadre du projet *Yaoundé-Bielefeld Graduate School for Natural Products with Antiparasite and Antibacterial Activity* (YaBiNaPA) dont l'objectif général est de promouvoir la recherche scientifique en Afrique à travers la mise au point des phytomédicaments standardisés, efficaces, peu toxiques et disponibles en toutes saisons en vue d'améliorer les conditions de vie des populations. Dans cette logique, nous nous sommes intéressé à la leishmaniose, une maladie tropicale négligée¹ d'origines parasitaire, très répandues en Asie et en Afrique. Elles sont induites par un protozoaire appartenant au genre *Leishmania* et généralement transmises entre l'Homme lors d'un repas sanguin par le phlébotome femelle encore appelé mouche des sables. Cette maladie, endémique dans plus de 98 pays à travers le monde dont le Cameroun n'est pas en reste, (Ngouateu et al., 2012) se caractérise par une parasitisation incontrôlée des organes internes qui, lorsqu'elle n'est pas traitée, entraîne la mort. La leishmaniose est donc considérée comme un grave problème de santé publique et plus de 370 millions de personnes sont considérés à risque (Aubry et Gaüzère, 2020). Il n'existe pas de médicaments propres à la leishmaniose (Oliaee et al., 2020) mais la chimiothérapie actuellement disponible comprend les antimoniaux pentavalents (Arevalo et al., 2007) l'amphotéricine B, la pentamidine et la miltéfosine (Goto et Lindoso, 2012). Cependant, ces traitements sont associés à une toxicité élevée (Oliaee et al., 2020) et sont très coûteux pour les régions à faible niveau. A cela, s'ajoutent les maladies d'origine hydrique à l'instar de la dysenterie bacillaire et la typhoïde qui ne cessent de faire de nombreuses victimes et accroître le risque de survenue des formes graves de leishmanioses (El Safi et al., 2018). Dans ce contexte, il est urgent de rechercher des sources de traitements antileishmanial accessibles aux populations à faible niveau de vie (OMS, 2011). Un retour à la nature s'avère prometteur, car les plantes sont considérées comme un grand réservoir de substances à fort potentiel biologique et sont traditionnellement les principales sources de soins de santé primaires à travers le monde. Pour cette raison, nous avons entrepris l'étude de *Vernonia guineensis* Benth. une plante médicinale de la famille des Asteraceae. Les plantes du genre *Vernonia*, sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour soigner une trentaine de maladies. Ce potentiel est confirmé par de nombreuses études chimiques et pharmacologiques sur plusieurs espèces du genre *Vernonia*, qui ont démontré une bonne activité contre diverses formes de leishmanioses, salmonelloses et shigelloses. De plus, dans un criblage d'exploration que nous avons effectué sur vingt (20) plantes à usage antiparasitaire en médecine

¹ **Les maladies tropicales négligées** (MTN) sont des affections qui se rencontrent au niveau des Tropiques, c'est-à-dire dans les endroits avec un climat chaud et humide et intéressent peu la recherche. Elles sont de type infectieux et les thérapies coûtent cher, car elles nécessitent des soins à long terme (Calon, 2016).

traditionnelle, *V. guineensis* a démontré la meilleure activité contre *Leishmania donovani*, le parasite responsable de la leishmaniose viscérale. Aussi, certaines infections microbiennes comme les Shigelloses et Salmonelloses augmentent le risque de survenu de formes graves de leishmaniose viscérale (El Safi et al., 2018) or, les racines de *V. guineensis* sont très utilisées en médecine traditionnelle contre la dysenterie et la typhoïde. Par ailleurs, bien qu'ayant fait l'objet de plusieurs études chimiques et pharmacologiques, aucune d'entre elles n'a mis en lumière les constituants actifs confirmant cette activité de *V. guineensis*. Tous ces éléments ont fortement motivé le choix de *V. guineensis* dans cette étude. Après une revue de la littérature approfondie sur *Vernonia guineensis*, nous avons résumé notre problématique en une question de recherche énoncée comme suit : ***V. guineensis* peut-elle être repositionné dans le traitement des leishmanioses et co-infections (dysenterie et typhoïde) ?** En répondant par l'affirmative à cette question, nous énonçons deux hypothèses alternatives : la première hypothèse se fonde sur une considération empirique et stipule que les parties aériennes de *V. guineensis* contiennent des molécules à fort potentiel leishmanicide et peuvent servir pour l'élaboration de phytomédicaments. La deuxième hypothèse est liée aux infections associées qui augmentent le risque de létalité de la leishmaniose et stipule que : les racines de *V. guineensis* contiennent des métabolites secondaires non encore isolés ayant une activité biologique inhibitrice des shigelles et salmonelles. L'objectif général de ce travail est donc double : d'une part, il s'agit de rechercher les métabolites secondaires bioactifs de *V. guineensis* et d'autre part, mettre au point des phytomédicaments standardisés et efficaces. De manière plus spécifique, il s'agit de :

- récolter, extraire, isoler et caractériser les constituants chimiques de *V. guineensis* ;
- évaluer l'activité antileishmaniale, antioxydante et antibactérienne contre quelques souches de bactéries entériques (shigelles et salmonelles) ainsi que la cytotoxicité et la toxicité *in vivo*;
- formuler et standardiser des phytomédicaments dans diverses formes galéniques.

Le présent document résumant l'essentiel de nos travaux se subdivise en quatre parties :

La première partie, présente à une revue de la littérature non exhaustive sur la plante, les leishmanioses, les maladies entériques, le stress oxydatif et les règles directrices de l'OMS relatives à la formulation de phytomédicaments. La deuxième partie présente les résultats obtenus de nos investigations, suivis de la discussion de ceux-ci et d'une conclusion générale. La troisième partie, présente une description du matériel utilisé ainsi que la méthodologie de recherche, notamment les techniques d'isolement des composés et d'évaluation des différentes activités biologiques réalisées. Enfin, la quatrième partie présente toutes les références bibliographiques utilisées pour la rédaction de cette thèse.

*PARTIE I : REVUE DE LA
LITTÉRATURE*

I.1. Revue de la littérature en relation avec la plante *Vernonia guineensis*

I.1.1. Aperçu botanique sur la famille des Asteraceae

Les Asteraceae (encore appelée composeae), une famille appartenant aux Dicotylédones est la plus vaste famille de plantes à fleurs et l'une des plus importantes parmi les Angiospermes (Wagenitz, 1976). Cette famille est répartie dans le monde entier, et contient des espèces avec des aspects extrêmement variés. Le plus souvent des plantes herbacées et des arbustes ; on y rencontre également des arbres, des lianes herbacées grimpantes ou rampantes ; mais pour la majorité, ce sont plutôt des herbes annuelles, bisannuelles, ou plus ou moins pérennes (Biholong, 1986).

Les plantes de cette famille ont des feuilles sans stipules et sont soit alternes, soit opposées; grandes ou petites, elles sont simples, entières ou dentelées, ou au contraire divisées en plusieurs segments plus ou moins grands. Ces feuilles sont par conséquent très polymorphes et posent un certain nombre de difficultés dans l'identification botanique. L'aspect de l'appareil végétatif est trop variable pour caractériser les Asteraceae sur ce seul critère. En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques et les différents fleurons sont tantôt hermaphrodites tantôt unisexués ou même neutres (Biholong, 1986).

Cette renferme plus de 25 000 espèces décrites réparties en 1620 genres dont 750 endémiques, avec au moins 74 genres tributaires du Cameroun parmi lesquels les genres *Bidens*, *Conyza*, *Tithonia*, *Mikania*, *Emilia*, *Lactuca*, *Melanthera* et *Vernonia* qui fait l'objet de cette étude [(Noumi, 1984); (Kalanda and Lisowski, 1995); (Toyang and Verpoorte, 2013)].

I.1.2. Aperçu botanique du genre *Vernonia*

Le genre *Vernonia* est représenté dans presque toute l'Afrique et en Amérique du Sud en variété sauvage et cultivée. Ce sont des plantes herbacées, des arbustes, plus rarement de petits arbres. Les feuilles sont alternées, entières, dentelées. Les inflorescences sont en capitules paniculés rarement solitaires. La majorité des espèces du genre *Vernonia* produisent des fleurs pourpres, rougeâtres ou blanches. Le réceptacle est nu tandis que la corolle est tubulaire ou campanulée (Kalanda and Lisowski, 1995). C'est le genre le plus large de la tribu des *Vernonieae* avec environ 1600 espèces avec plus 600 espèces, tous propres aux régions tropicales et subtropicales ; l'Afrique étant tributaire d'au moins 300 espèces déjà décrites (Jeffrey, 1988; Kalanda and Lisowski, 1995). Sur ce nombre, environ une centaine est retrouvée sur l'île de Madagascar. Après l'Afrique c'est l'Amérique où l'on retrouve plus de 200 espèces. Une cinquantaine d'espèces appartient au continent asiatique. Il en existe un petit

nombre en Océanie. Le tableau 1 présente quelques lieux de récoltes des plantes du genre *Vernonia* dans le monde.

Tableau 1: Lieux de récolte des plantes du genre *Vernonia* dans le monde

| Lieux de récolte | Nombre moyen d'espèces décrites | Références |
|--------------------|--|------------------------------|
| Afrique | 300 dont 100 tributaires de Madagascar | (Burkill, 1985) |
| Amérique Centrale | 24 | (Folliard, 2008) |
| Amérique du Sud | 250 | |
| Mexique | 40 | (Toyang and Verpoorte, 2013) |
| Asie du Sud-Est | 100 | |
| Est des Etats-Unis | 17 | |
| Inde | 50 | |

I.1.3. Aperçu botanique de l'espèce *Vernonia guineensis*

Vernonia guineensis Benth. (Asteraceae) est une plante médicinale très utilisée au Cameroun et en Afrique de l'Ouest. Trivialement appelée « *Ginseng Africain* » au Cameroun, c'est une herbacée possédant une tige provenant d'une partie souterraine vivace (figure 1a) qui pousse dans les régions de savanes (Duviard, 1969). L'appareil végétatif souterrain (figure 1a) est composé d'une courte tige souterraine vivace portant une série de racines tubérisées tel des carottes (Duviard, 1969) ; la figure 1b présente une photo de celles-ci prise à Bangangté en octobre 2015. Par leurs abondantes réserves, ces racines assurent une croissance très rapide de l'appareil végétatif aérien (figure 2b).

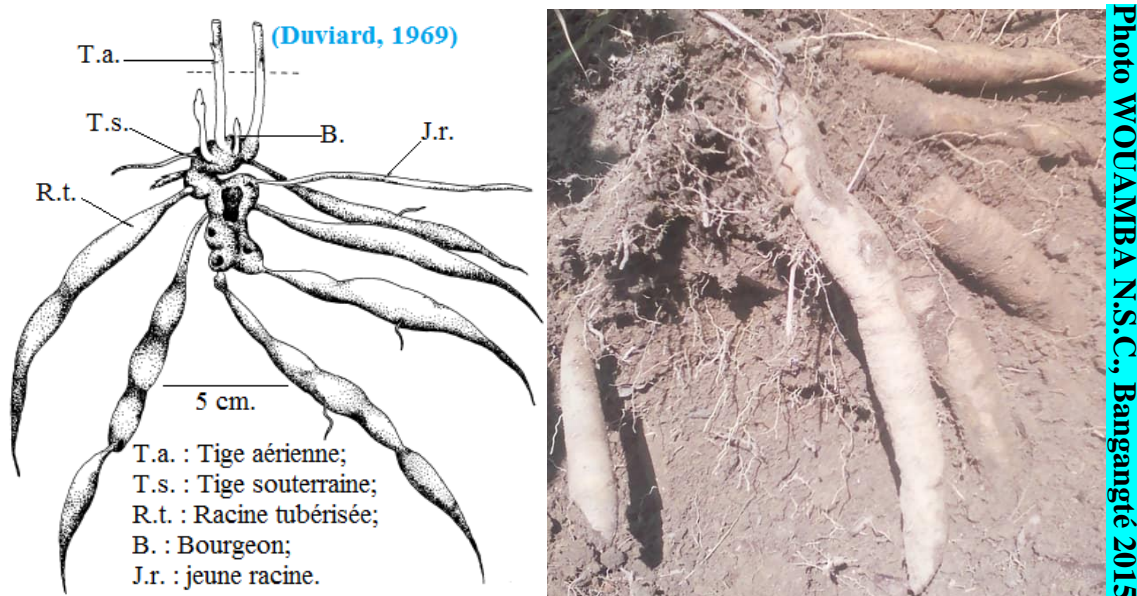


Figure 1: Appareil végétatif souterrain de *V. guineensis* : (a) Représentation, (b) Photos

V. guineensis Benth. est une espèce variable avec trois variétés (var. *guineensis*, var. *cameroonica*, var. *procera*) réparties à travers l'Afrique (Burkill, 1985). *V. guineensis* var. *guineensis* est un géophyte annuel rencontré au Cameroun à Fouban, à Bamenda, à Bafoussam, à Dschang, à Bangangté et à Ndikinimiki (Biholong, 1986). Ses feuilles sont alternes; lancéolées et grossièrement dentées (Jones, 1981). Le limbe est rétréci au niveau de la base tandis que les capitules sont campanulés et possèdent 20 à 30 fleurs (figure 2b).

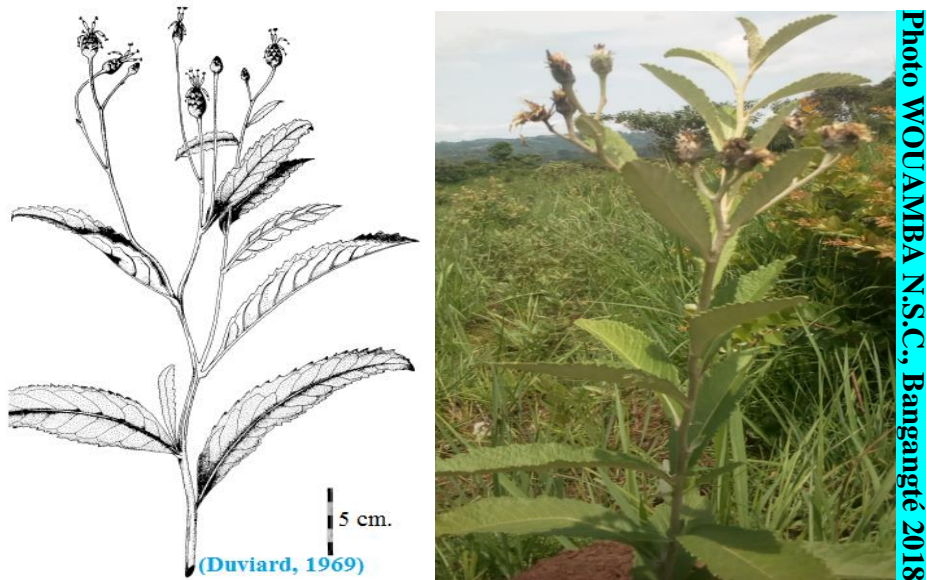


Figure 2: Aspect général des organes aériens *V. guineensis* : (a) Représentation, (b) Photos

Chaque plante est constituée d'une ou plusieurs tiges ramifiées et dressées, atteignant une hauteur qui dépasse rarement un mètre. Tige et rameaux sont couverts d'une abondante pilosité grise. Les feuilles sont ovalaires (figure 2b) de forme assez variable, mais toujours denticulées (Jones, 1981). Leur face supérieure est luisante et lisse ; leur face inférieure est recouverte d'un épais feutrage pileux. L'inflorescence, très caractéristique est typiquement celle des Composées Tubuliflores ; le capitule est constitué d'une quarantaine de fleurons insérés sur un réceptacle légèrement concave, protégés par 4 à 5 rangs de bractées écailleuses. La floraison est centripète; lorsque les fleurons centraux sont fanés, les bractées s'écartent, permettant la dissémination aérienne des graines mûres (Duviard, 1970).

Au vu des travaux récents sur cette espèce (Donfack et al., 2012; Tchinda et al., 2003; Toyang et al., 2013a; Toyang and Verpoorte, 2013; Toyang et al., 2012; Toyang et al., 2013b); et de l'intérêt que les populations en Afrique en générale et au Cameroun en particulier lui accordent, il convient d'examiner les travaux antérieurs sur quelques espèces du genre *Vernonia*, afin de mieux positionner notre problématique et justifier convenablement le choix de *V. guineensis* dans cette étude.

I.1.4. Usages thérapeutiques et travaux pharmacologiques antérieurs sur des espèces du genre *Vernonia*

Plusieurs espèces appartenant au genre *Vernonia* sont utilisées par les populations des zones tropicales et ont fait l'objet de plusieurs études pharmacologiques pour leurs vertus ethnothérapeutiques et leurs valeurs ajoutées sur le plan nutritionnel. Cette section dresse une revue détaillée de la littérature sur les usages ethnopharmacologiques de ces plantes. En effet il est important de s'y attarder pour justifier le choix de *V. guineensis* dans la perspective d'élaborer au terme de ce travail un ou plusieurs phytomédicaments améliorés à haute valeur ajoutée. [Toyang et Verpoorte \(2013\)](#) dresse dans une revue, une synoptique des usages ethnopharmacologiques d'une centaine d'espèces du genre *Vernonia*. Dans l'optique d'apporter un meilleur éclairage sur le choix de la plante étudiée, nous présenterons plus en détail dans cette section, les usages thérapeutiques et les travaux biologiques antérieurs sur quelques espèces du genre *Vernonia* que l'on retrouve au Cameroun, y compris *Vernonia guineensis* qui fait l'objet de cette étude.

I.1.4.1. Usages thérapeutiques de quelques espèce du genre *Vernonia*

En médecine naturelle, les plantes médicinales du genre *Vernonia* occupent une place de choix, tant pour le traitement des maladies infectieuses que pour soulager les maladies non infectieuses à l'instar du diabète et maladie génétique (tableau 2). Le paludisme figure en première ligne parmi les maladies infectieuses soignées par les espèces de plantes du genre *Vernonia* et on peut citer en guise d'exemple, l'infusion des feuilles de *V. adoensis*, *V. ambigua*, *V. amygdalina*, *V. cinerea*, et *V. guineensis* ([Stangeland et al., 2011](#)). *V. ambigua* est une espèce très utilisée au Cameroun et au Nigeria pour traiter les problèmes de reproduction, notamment les infections des voies urinaires ([Focho et al., 2009a](#)), la toux et le rhume ([Burkill, 1985](#)) ainsi que le paludisme ([Focho et al., 2009a](#)). *V. cinerea* quant à elle, est très utilisée en médecine naturelle en Orient et en Afrique de l'Ouest ainsi qu'en Inde et en Amérique du Sud (tableau 2). Il y a de grandes similitudes dans certaines des utilisations à travers les continents en particulier contre le paludisme, l'infertilité chez les femmes, les affections cutanées et vers intestinaux ([Moshi et al., 2012](#)). En médecine naturelle indienne, cette plante est utilisée antitussif, anti-inflammatoire ([Parekh et Chanda, 2007](#)). Les graines sont connues pour contenir de l'acide vernolique dont on pense qu'il contribue à l'activité antidiabétique de cette plante. *Vernonia guineensis* qui fait l'objet de notre étude, gagne progressivement en popularité comme l'une des espèces du genre *Vernonia* les plus utilisées en Afrique centrale et au Cameroun en particulier où il est communément appelé le *ginseng*

africain. Cela n'est pas surprenant, car la morphologie racinaire a une ressemblance frappante avec celle du *Panax ginseng* (Figure 3).



©Wouamba, 2020

©Toyang and Verpoorte, 2013

(a) *V. guineensis*

(b) *P. ginseng* (var. chinoise)

(c) *P. ginseng* (var. américaine)

Figure 3: Aspect des racines *V. guineensis* (a) et *P. ginseng* (b) et (c)

Plusieurs études indiquent l'utilisation de la plante dans le traitement de diverses maladies en médecine humaine et ethnovétérinaire, comme présenté dans le tableau 2. Étant donné que le paludisme et la trypanosomiase sont tous deux maladies d'origines protozoaires, l'utilisation de cette plante pour traiter le paludisme pourrait être liée aux mêmes composés avec une activité antitrypanosomiale identifiée par Tchinda *et al.* (2002). Le tableau 2 suivant dresse un aperçu synoptique des usages ethnopharmacologiques de quelques espèces.

Tableau 2: Utilisations ethnopharmacologiques de quelques espèces du genre *Vernonia*

| Espèces | Parties utilisées | Usages médicaux | Références |
|-----------------------|-------------------|---|--|
| <i>V. guineensis</i> | Feuilles | Facilite l'accouchement, mal de dent, Paludisme, dysenterie, hernie, vers intestinaux, troubles urogénitaux | Sobrinho <i>et al.</i> , 2015; Maroyi, 2020; |
| | Racines | Aphrodisiaque, antidote pour venins de serpents, épilepsie, syphilis, diarrhée, typhoïde, infections gastro-intestinales, dysménorrhée, cancer et inflammation de la prostate | Jiofack <i>et al.</i> , 2009; Noumi <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>V. ambigua</i> | Feuilles | Stérilité masculine/féminine (maladie inflammatoire pelvienne, faible nombre de spermatozoïdes), gonorrhée, impuissance, douleurs post-partum, dysménorrhée | Focho <i>et al.</i> , 2009 |
| | Racines | Toux et rhumes | |
| <i>V. scorpioides</i> | Feuilles | Troubles cutanés, y compris plaies et ulcères chroniques, aphrodisiaques, ensorcellement | Buskuhl <i>et al.</i> 2010 |
| <i>V. amygdalina</i> | Feuilles | Diarrhée, gale et hépatite, toux, rougeole, diabète et paludisme | Yineger <i>et al.</i> , 2007 |

I.1.4.2. Travaux biologiques antérieurs sur quelques espèces du genre *Vernonia*

Tenant compte de nombreux usages des plantes du genre *Vernonia*, plusieurs études biologiques ont été engagées dans le but de confirmer ou infirmer ces usages en médecine traditionnelle. Le tableau 3 ci-dessous réécense quelques activités biologiques déjà rapportées sur les espèces du genre *Vernonia*. On note entre autres l'évaluation des activités antiplasmodiale, antitrypanosomiale, analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antileishmaniale et cytotoxique sur les cellules cancéreuses (Pratheeshkumar and Kuttan, 2009; Pratheeshkumar and Kuttan, Girija, 2011a, b, c). En guise d'exemple, les travaux de Builders *et al.* (2011) confirme l'activité antiplasmodiale *in vitro* et *in vivo* de *V. ambigua*. Cette plante s'est révélée non toxique à 5000 mg/kg dans une étude de toxicité aiguë (Builders *et al.*, 2011). Plusieurs études *in vitro* ont jusqu'à présent été menées pour confirmer l'activité de *V. adoensis*. Les résultats les plus intéressants obtenus concernent l'activité antiplasmodiale dont une valeur $CI_{50}=2,14$ mg/mL a été rapportée.

Tableau 3 : potentiel biologique de quelques composés isolés du genre *Vernonia*

| Espèces | Activités biologiques évaluées | Références |
|-------------------------|--|---------------------------------|
| <i>V. guineensis</i> | Antitrypanosomiale, $CI_{50}= 3-5$ µg/mL | Tchinda <i>et al.</i> , 2015 |
| | Anticancéreuse, $CC_{50}= 67,3$ µg/mL | Toyang <i>et al.</i> , 2013b |
| | Anthelminthique, $CI_{50}= 2$ mg/mL | Toyang <i>et al.</i> , 2012 |
| | Antiplasmodiale, $CI_{50}= 2,4$ µg/mL | Toyang <i>et al.</i> , 2013a |
| <i>V. adoensis</i> | Antioxydante, $CI_{50}= 193,2$ µg/mL | Stangeland <i>et al.</i> , 2010 |
| | antibactérienne, CMI= 70 mg/mL | Kisangu <i>et al.</i> , 2007 |
| | antiplasmodiale, $CI_{50}= 2,14$ µg/mL | |
| <i>V. ambigua</i> | Antioxydante, $CI_{50}= 200$ µg/mL | Builders <i>et al.</i> , 2011 |
| | antibactérienne, CMI= 2,5 mg/mL | Aliyu <i>et al.</i> , 2011 |
| | antiplasmodiale, $CI_{50}= 31,62$ µg/mL | Builders <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>V. anthelmintica</i> | Anthelminthique, Rat : 3000 mg/Kg | Iqbal <i>et al.</i> , 2006 |
| | Antiinflammatoire, Rat : 500 mg/Kg | Otari <i>et al.</i> , 2010 |
| | Antidiabétique, Rat:100 mg/kg | Fatima <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>V. amygdalina</i> | Antioxydante, $CI_{50}= 100-300$ µg/mL | Anyasor <i>et al.</i> , 2010 |
| | antibactérienne, CMI= 0,47-1,25 µg/mL | Adetutu <i>et al.</i> , 2011 |
| | antiplasmodiale, $CI_{50}= 8,72-13,8$ µg/mL | Zofou <i>et al.</i> , 2011 |
| | Antidiabétique, $CI_{50}= 50$ µg/mL | Omoriegie <i>et al.</i> , 2010 |
| | Antiamibienne, $CI_{50}= 250$ µg/mL | Tadesse <i>et al.</i> , 2011 |
| | Antileishmaniale, $CI_{50}=13.3-18,5$ µg/mL Cytotoxicité (Vero cell.), $CC_{50}= 60,33$ µg/mL | Omoriegie <i>et al.</i> , 2010 |

I.1.5. Travaux chimiques antérieurs sur des espèces du genre *Vernonia*

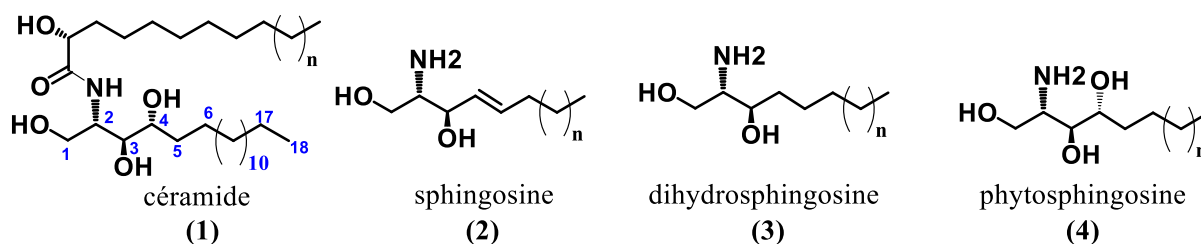
Depuis les années 1850, les chimistes ont étudié de manière approfondie les propriétés chimiques des composés isolés de plantes médicinales. Les études sur les substances naturelles ont stimulé le développement de techniques de séparation, d'approches spectroscopiques pour l'élucidation des structures et de méthodologies de synthèse qui constituent désormais le fondement de la chimie organique contemporaine. L'intérêt pour les substances naturelles a été suscité par leur immense utilité en tant que polymères, huiles, cires, agents aromatisants et médicaments. La reconnaissance des propriétés biologiques de nombreux produits naturels a alimenté l'orientation actuelle de ce domaine, à savoir la recherche de nouveaux médicaments, antibiotiques, insecticides et herbicides. Ainsi, plusieurs investigations phytochimiques ont été menées sur les plantes du genre *Vernonia* depuis le XX^e, et ont conduit à l'extraction, l'isolement et l'identification de plusieurs métabolites secondaires avec différents types structuraux appartenant à plusieurs classes de substances naturelles parmi lesquelles on distingue : les terpénoïdes (stéroïdes, sesquiterpénoïdes, triterpénoïdes, diterpénoïdes), de flavonoïdes, de coumarines et longue chaîne d'esters ou d'acides (Jisaka *et al.*, 1993; Igile *et al.*, 1994; Sanogo *et al.*, 1998; Tchinda *et al.*, 2002, 2003; Xia and Chen, 2004; Yeap *et al.*, 2010; Donfack *et al.*, 2012; Toyang *et al.*, 2012; Toyang *et al.*, 2013a,b; Turak *et al.*, 2015, 2017; Akber, 2017; Youn *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2020;). En raison de leur importance en tant que classe de composés majoritaires et traceurs chimiotaxonomiques des plantes de la famille des Asteraceae, une attention particulière sera accordée aux composés de la classe des céramides, des flavonoïdes, sesquiterpènes et stéroïdes stigmastane cyclisés sur la chaîne latérale.

I.1.5.1. Les Céramides

I.1.5.1.1. Définition

Les céramides ou sphingolipides sont une classe de lipides dont l'acide gras est lié à une longue chaîne de base ou encore sphingoïde par une fonction amide (1). Le terme « sphingo » a été adopté par Thudichum (1884) et le terme « sphingolipide » a été introduit par Carter *et al.* (1947). Il existe trois principaux types de sphingoïdes: les D-Erythro-sphingosines (2), qui sont des longues chaînes basiques présentes dans les cellules animales; les D-Erythrodihydrosphingosines (3) qui sont plus abondantes dans le règne fongique et les phytosphingosines (4) qui sont les principales bases trouvées chez les végétaux (Sandjo and Kuete, 2013). Les céramides dont la chaîne alkyle de la base à 18 atomes de carbone (1) sont prédominantes et cette chaîne varie entre 14 et 22 atomes de carbone. Le nombre de carbone

de l'acide gras varie généralement entre 14 et 30 avec la présence ou non d'un groupement hydroxyle sur le carbone en position α ou ω du carbonyle (Beckmann *et al.*, 2003).

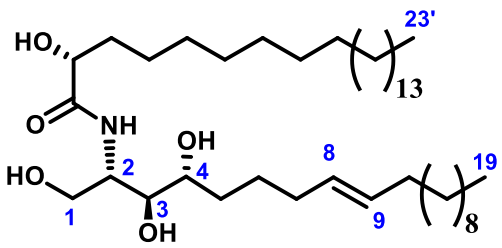
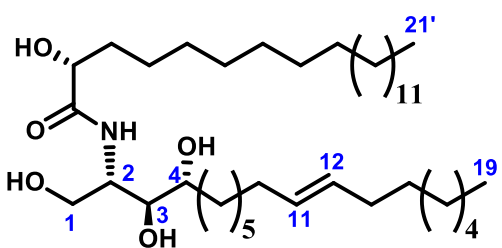
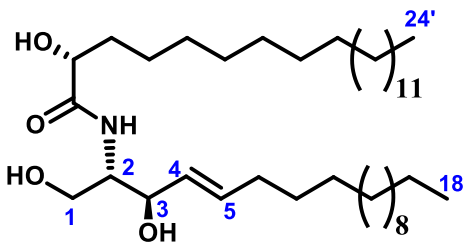


Les céramides sont donc des sphingoides *N*-acylés. Elles sont nommées en considérant la chaîne amino-alcool comme chaîne principale et celle de l'acide gras comme substituant. Par exemple une ceramide contenant la (2*R*)-2-hydroxyoctadécanoïque comme acide gras et la (2*S*,3*S*,4*R*)-2-amino-octadécane-1,3,4-triol comme sphinganine sera nommée (2*S*,3*S*,4*R*)-2[(2'*R*)-2'-hydroxyoctadécanoylamino]octadécane-1,3,4-triol ou encore (2*S*,3*S*,4*R*)-2*N*[(2'*R*)2'-hydroxyoctadécanoyl]octadécane-1,3,4-triol (Menaldino *et al.*, 2003).

1.1.5.1.2. Céramides isolés des espèces du genre *Vernonia*

En date du 03 Octobre 2019, la littérature consultée grâce à la base de données Scifinder, fait état d'une seule publication rapportant l'isolement des céramides dans une espèce appartenant au genre *Vernonia* ; il s'agit des travaux de Santos *et al* (2012) qui rapportent l'isolement de deux céramides dans *Vernonia cotoneaster*. Compte tenu de l'importance de cette classe de composés, et du fait que nous avons isolée plusieurs céramides de *Vernonia guineensis* pour la première fois, nous avons étendu cette recherche de la littérature aux céramides déjà isolées de la famille des Asteraceae. Il en ressort que très peu de céramides ont été isolées de cette vaste famille. Deux publications rapportent l'isolement des céramides dans la famille des Asteraceae (Santos *et al.*, 2012; Tabopda *et al.*, 2009). Le tableau 3 qui suit, présentes les structure des céramides isolées de *V. cotoneaster* et *Crassocephalum bialfrae* (Asteraceae).

Tableau 4: Céramides isolées des espèces appartenant à la famille des Asteraceae

| Structures et noms | Sources | Références |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
|  <p>(2S,3S,4R,8E)-2N-[(2'R)2'-hydroxytricosanoylamino] nonadec-8-ene-1,3,4-triol (5)</p> | <i>Vernonia cotoneaster</i> | (Santos <i>et al.</i> , 2012) |
|  <p>(2S,3S,4R,11E)-2N-[(2'R)2'-hydroxyheneicosanoylamino]nonadec-8-ene-1,3,4-triol (6)</p> | | |
|  <p>(2S,3R,4E)-2-N-[(2'R)2'-hydroxytetracosanoylamino]octadec-4-ene-1,3-diol (7)</p> | <i>Crassocephalum bialfrae</i> | (Tabopda <i>et al.</i> , 2009) |

I.1.5.1.3. Biosynthèse des céramides

La biosynthèse des céramides a fait l'objet de plusieurs travaux, parmi lesquels on peut citer ceux de Beckmann *et al.* (2003), Hanada (2005) complétés plus tard par les travaux de Beckmann *et al.*(2006) (Sandjo *et al.*, 2010). En fait, les céramides sont obtenues par deux voies :

- soit la *N*-acylation d'une sphingosine qui elle est synthétisée par la sérine et le palmitoyl-CoA via une enzyme spécifique (spécifique au règne végétale) ;
- soit par hydrolyse de la sphingomyéline, un dérivé phosphorylé des céramides que l'on

trouve en quantité importante dans le cerveau et dans tout le tissu nerveux (spécifique au règne animale ou fongique).

Le schéma ci-dessous traduit les étapes de biosynthèse des céramides par la voie de la N-acylation d'une sphingosine.

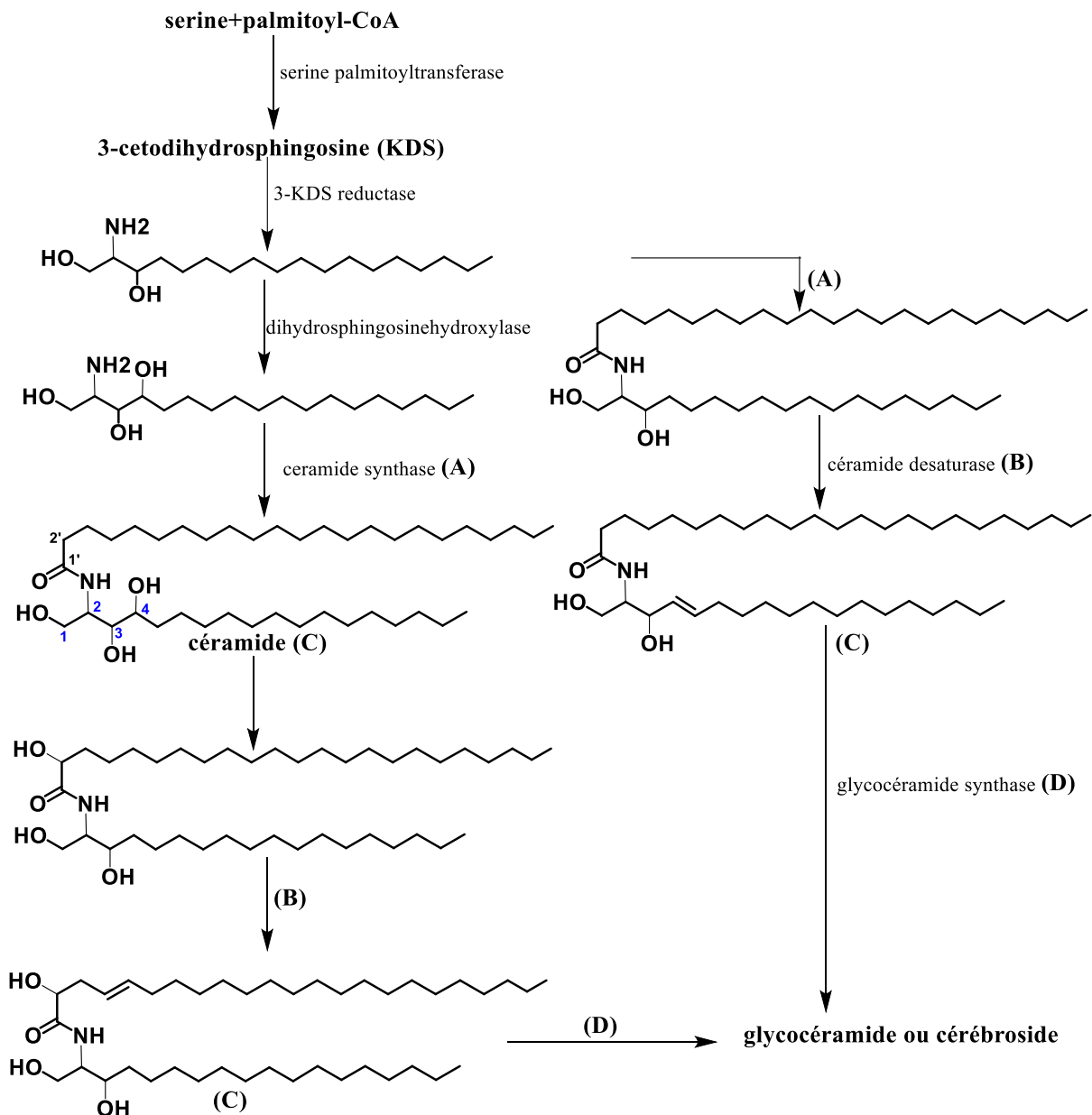


Schéma 1: Origine biosynthétique des céramides

I.1.5.1.4. Rôles biologiques des céramides

Les céramides ont une grande fonction biologique dans les cellules vivantes. Elles seraient responsables du déclenchement de l'apoptose cellulaire (mort programmée des cellules) et seraient aussi impliquées dans l'activation de la cascade de plusieurs protéines kinases (Sandjo, 2010). En effet, les céramides sont synthétisées dans les conditions de stress

cellulaire. L'apoptose est le processus par lequel la cellule active son suicide qui est une étape essentielle à son renouvellement (Ishii *et al.*, 2006). Ce processus est nécessaire pour l'homéostasie des tissus. L'arrêt de l'apoptose pourrait avoir de graves conséquences entraînant ainsi plusieurs maladies telles que le cancer, le diabète, la neuropathie, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose. Il est possible que la fonction biologique des céramides soit liée à la double liaison (*cis* ou *trans*) C(4)=C(5) de la sphingosine (Sandjo *et al.*, 2008; 2010).

I.1.5.1.5. Détermination structurale des céramides

Les céramides sont des molécules à structures simple constitué de deux longues chaînes (longue chaîne acide et longue chaîne base) avec en général une ou plusieurs doubles liaisons sur l'une des chaînes, voir même sur les deux chaînes. La complexité de l'analyse structurale des céramides réside donc dans la détermination de la longueur des chaînes ainsi que la localisation de la double liaison sur la chaîne correspondante (Santos *et al.*, 2012).

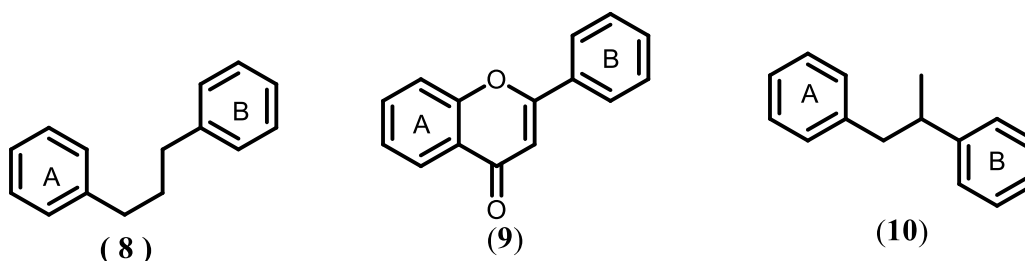
Le spectre de RMN du proton enregistré dans des solvants faiblement hygroscopiques, présente généralement un doublet intégrant pour un proton vers $\delta_{(H)}$ 8,70 ayant une constante de couplage de 8,8 Hz. Celui-ci est échangeable à l'eau lourde et correspond au proton porté par l'azote de l'amide. Ce spectre de RMN 1H présente également un triplet (t) vers δ_H 0,89 intégrant pour 6 protons qui sont attribuables aux méthyles terminaux ainsi qu'un singulet large entre δ_H 1,20 et 1,40 qui caractérise la séquence successive des méthylènes. Un multiplet entre δ_H 2,20 et 2,00 représentant le signal des protons en position allylique au cas où la molécule a des doubles liaisons ou en position β du carbonyle. Dans le cas où le composé a une double liaison de configuration *trans*, deux multiplets presque confondus sont observés autour de δ_H 5,40 mais très distincts autour δ_H 5,70 et 5,45 si elle est de configuration *cis*. Le spectre de RMN ^{13}C exhibe deux pics très voisins ou chevauchants vers δ_C 130,0 pour la double liaison *trans* et à δ_C 134,0 et 136,0 si elle est *Cis*. Ce même spectre montre les signaux caractéristiques de deux carbones autour de δ_C 54,0 et 175,5 correspondant au carbone aliphatique lié à l'azote et au carbonyle de la fonction amide. On observe également le signal caractéristique de la succession de méthylènes entre δ_C 29,0 et 33,0 ainsi qu'un signal à δ_C 14,4 attribuable aux méthyles terminal. Le spectre de RMN ^{13}C est très important pour la détermination de la configuration de la double liaison grâce au déplacement chimique des carbones allyliques. En effet, La configuration *trans* de la liaison C=C est évidente à partir des déplacements chimiques des

atomes de carbone allyliques qui résonne entre δ_C 34,7 et 32,5 mais qui sera inférieure à 29,0 ppm dans le cas de la configuration *cis* (Sandjo *et al.*, 2013; Simo *et al.*, 2008).

I.1.5.2. Les Flavonoïdes

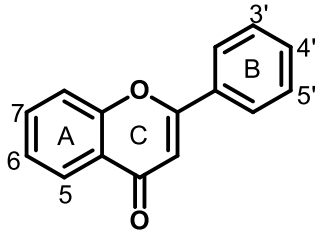
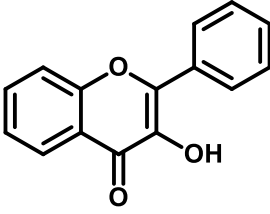
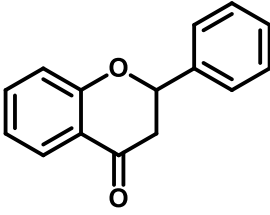
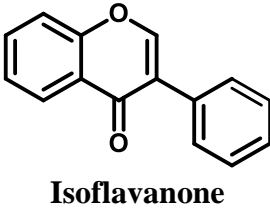
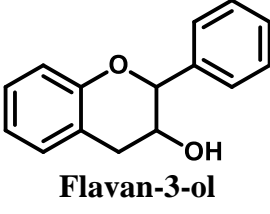
I.1.5.2.1. Définition

Les flavonoïdes, pigments quasiment universels des végétaux, constituent une vaste classe de substances naturelles très répandues dans le règne végétal. Elles sont des composés aromatiques dont le squelette carboné en C₁₅ est caractérisé par un enchaînement C₆-C₃-C₆ correspondant à un diphenylpropane (**8**), ou à un phénylchromanone (**9**). Le terme flavonoïde, pris dans son sens le plus large, s'applique à des structures très diverses. Selon la nature de son hétérocycle oxygéné, on peut aussi avoir les isoflavonoïdes dont le squelette de base est le même que celui du 1, 2-diphénylpropane (**10**) (Wagner *et al.*, 1970).



Il faut noter qu'une grande variété de structures des classes de flavonoïde est due à certaines réactions chimiques et enzymatiques sur la 2-phénylbenzopyran-4-one (**9**) tels que : l'hydroxylation, la méthylation, l'isoprénylation, la réduction, etc. (Hernández, 2009). Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones. Il en découle donc un grand nombre de classe de flavonoïdes donc quelques-unes sont présentées dans le tableau 5 (Bruneton, 2009). Les flavonoïdes constituent donc le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents (Hernández, 2009) et distribués de manière générale, dans toutes les plantes vasculaires. Le tableau 5 présente quelques classes de flavonoïdes isolées du genre *Vernonia*. Ces différentes classes de flavonoïdes varient d'une espèce à l'autre, selon le milieu écologique (Hernández, 2009).

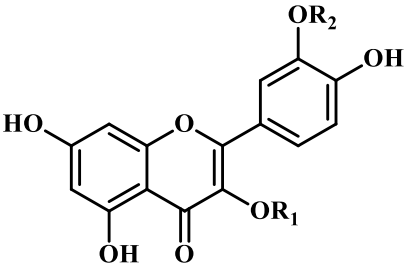
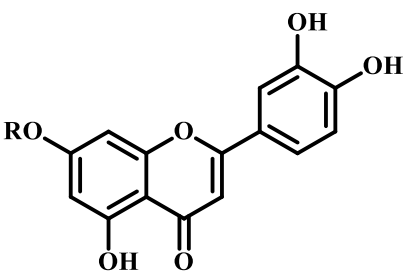
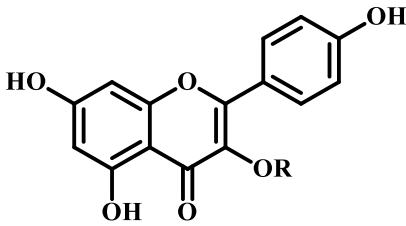
Tableau 5: Différentes classes de flavonoïdes isolées du genre *Vernonia*.

| Structure des différentes classes de flavonoïdes | Exemples | Substitutions en positions : | | | | | |
|--|--|------------------------------|---|----|----|-----|----|
| | | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
|  <p>Flavone</p> | <p>Chryisine (9a)</p> <p>Apigénine (9b)</p> | OH | H | OH | H | H | H |
|  <p>Flavonol</p> | <p>Kaempférol (9c)</p> <p>Myricétine (9d)</p> | OH | H | OH | H | OH | H |
|  <p>Flavanone</p> | <p>Hespéridine (9f)</p> <p>Naringénine (9g)</p> | OH | H | OH | OH | OMe | H |
|  <p>Isoflavanone</p> | <p>Daidézéine (10a)</p> <p>Génistéine (10b)</p> | OH | H | OH | OH | OH | H |
|  <p>Flavan-3-ol</p> | <p>Catéchine (9h)</p> <p>Gallocatéchine (9i)</p> | H | H | OH | H | OH | H |

I.1.5.2.2. Flavonoïdes isolés des espèces du genre *Vernonia*

Quelques flavonoïdes ont été isolés des plantes du genre *Vernonia*. Mais en date du 10 mai, 2020 aucun flavonoïde n'a été rapporté de l'espèce *V. guineensis* qui est l'espèce étudiée dans cette thèse. Le tableau 6 suivant présente quelques flavonoïdes issus des plantes du genre *Vernonia*.

Tableau 6: Quelques flavonoïdes isolés des espèces du genre *Vernonia*

| Structures et noms | Sources | Références |
|---|--------------------------|-----------------------------------|
|  <p>R1= H; R2= H: Quercetine (11) R1= CH₃; R2= H: 3-Methoxyluteoline (12) R1= H; R2= CH₃ : 3'-O-Methylquercetine (13)</p> | <i>V. pectoralis</i> Bak | (Bézanger et al.,1981) |
|  <p>R=H: Luteoline (14) R=Glc: Luteoline-7-O-β-D-glucopyranoside (15)</p> | <i>V. amygdalina</i> | (Igile et al., 1995) |
|  <p>R= H: Kaempferol (16) R= Glc:Kaempferol 3-O-β-D-galactoside (17)</p> | <i>V. elaeagnifolia</i> | (Subramanian et Nagarajan, 1981) |

I.1.5.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes a fait l'objet de plusieurs travaux, parmi lesquels on peut citer ceux de [Birsch et donovan \(1953\)](#), [Robinson \(155\)](#). Il est aujourd'hui largement accepté l'hypothèse d'une origine biosynthétique mixte des flavonoïdes : La voie shikimique et la voie acétate polymalonique. La structure d'un flavonoïde s'organise toujours autour d'un squelette 1,3-diphénylpropane C₆-C₃-C₆, décrit par une nomenclature spécifique. La biosynthèse des flavonoïdes fait intervenir la voie shikimique grâce à la phénylalanine ammonialyase (PAL) ([Vogt, 2009](#)), et la voie acétate grâce à la chalcone synthase (CHS)

(Dixon *et al.*,1999). La PAL permet la synthèse de l'acide *p*-coumarique et de l'acide cinnamique. L'élaboration des composés phénoliques réside dans la condensation de trois unités de malonyl-CoA avec l'acide para-coumarique, conduisant aux deux noyaux aromatiques A et B reliés par l'hétérocycle C. Ces condensations sont catalysées par la chalcone synthase (CHS), enzyme clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, une chalcone (schéma 2). La chalcone néoformée donne une flavanone, une transformation catalysée par une chalcone-isomérase (CHI) (Fowler *et al.*, 2009). Le schéma 2 traduit les étapes clés de biosynthèse des flavonoïdes (Schijlen *et al.*, 2004).

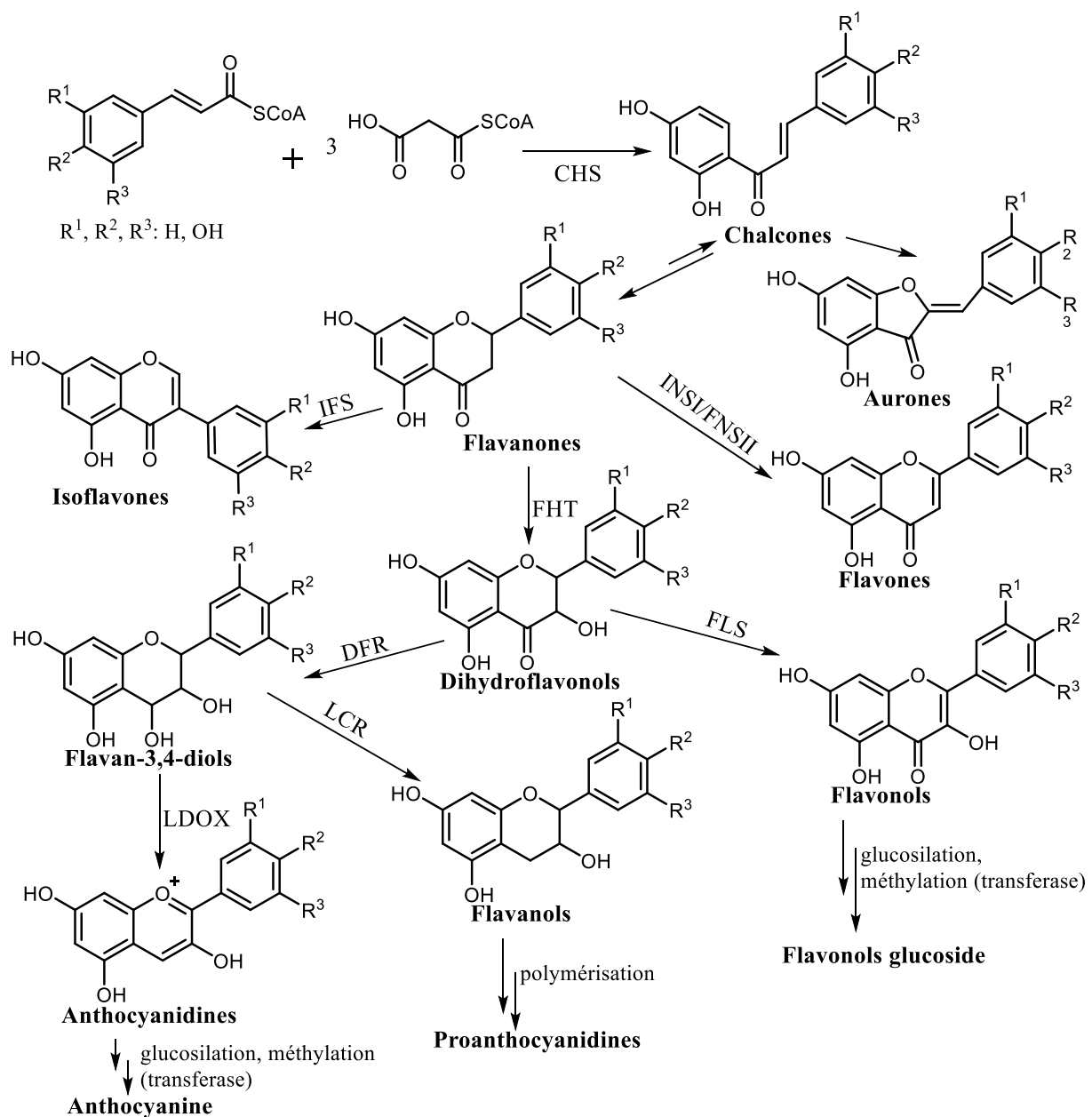


Schéma 2: Voies de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel-Shirley, 2002).

I.1.5.2.4. Rôles biologiques des flavonoïdes

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur la question du rôle biologique des flavonoïdes et la littérature abonde à ce sujet. [Ghedira \(2005\)](#) dresse une revue importante sur l'intérêt pharmacologique et les usages thérapeutiques des flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, antiparasitaires, antimicrobiennes vasculo-protectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-ulcéreuses et même antitumorales significatives ([Ghedira, 2005](#)). En effet, le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes réabsorbés ([Walle, 2004](#)). La muqueuse intestinale et le rein interviennent accessoirement dans ce métabolisme. Une fois réabsorbés, les flavonoïdes vont influencer plusieurs fonctions biologiques dont la synthèse protéique, la différenciation de la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, apportant des effets bénéfiques dans différentes pathologies chez l'Homme ([Hollman et Katan, 1997](#) ; [Scalbert et al., 2002](#) ; [Blaut et al., 2003](#)). L'ingestion de flavonoïdes d'origine alimentaire a été associée à une réduction considérable de la mortalité liée aux maladies cardio-vasculaires. En effet, une étude menée aux Pays-Bas (Zulphen Elderly Study) auprès de 805 sujets de sexe masculin a mis en évidence une corrélation inverse entre la prise de flavonoïdes d'origine alimentaire (thé, oignons, pommes) et les maladies cardio-vasculaires ([Hertog et al., 1993](#)). D'autres études se sont focalisées sur l'impact de la consommation du thé, boisson riche en flavonoïdes, notamment en quercétine (de 10 à 25 mg/L). Ce dernier composé exerce des effets antioxydants, antiagrégants et vasodilatateurs pouvant expliquer ses effets cardioprophylactiques ([Nair et Gupta, 1996](#)). En outre, il a été démontré que la consommation de quercétine dans les oignons (0,3 mg/g de masse fraîche) et les pommes (1 mg/g de masse fraîche de la peau de pommes) est inversement corrélée au risque de cancer du poumon ([Knekt et al., 1997](#)). Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase ([Chaudhry et al., 1983](#) ; [Fernández et al., 2005](#)), de la phospholipase A2 ([Kim et al., 2001](#)) et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase ([Yeon et al., 2001](#)). Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence ([Jassim et Naji, 2003](#) ; [Taguri et al., 2004](#) ; [Takahashi et al., 2004](#) ; [Sokmen et al., 2005](#)). Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire.

I.1.5.2.5. Détermination structurale des flavonoïdes

Afin d'arriver à identifier les produits isolés, une série de méthodes est utilisée et appliquée en fonction de la nature de ces produits. Ainsi, pour les flavonoïdes, la fluorescence du produit en question permet d'avoir une première approche structurale qui facilitera énormément la suite des opérations. D'une manière générale, la caractérisation des flavonoïdes se fait essentiellement par analyse spectroscopique. Dans la pratique, cela requière l'interprétation des données d'absorption ultraviolette (UV), l'Infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire de proton (^1H -RMN) et du carbone (^{13}C -RMN) incluent les analyses à une dimension (RMN 1D) et à deux dimensions (RMN 2D) ainsi que les données de spectrométrie de masse (SM). Toutefois, il existe dans la littérature une quantité importante d'articles traitant des flavonoïdes. La majorité de ces publications ont trait à l'aspect pharmacologique, synthèse, extraction, purification et identification de ces composés, mais peu d'études d'ordre physico-chimique ont été réalisées. On trouve cependant quelques travaux relatifs à la spectroscopie de ces molécules, même si ces derniers sont souvent partiels et utilisés généralement à des fins analytiques.

I.1.5.2.5.1. Interprétation des données Infrarouge (IR)

Le spectre IR des flavonoïdes fournit des informations sur la présence des grandes fonctions. Une dizaine de travaux concernant l'étude des propriétés spectrales infrarouge des flavonoïdes ont été réalisés dans les années 50, 60 et 70. Ils abordent principalement le comportement de la fréquence d'élongation carbonyle (C=O) et la position des fréquences d'élongation des groupements hydroxyles (OH) pour diverses flavones et hydroxyflavones. Ainsi, la présence d'un groupe carbonyle α,β -insaturé est caractérisée par une bande située vers 1650 cm^{-1} résultant de l'absorption (C=C) alors que l'absorption (C=O) apparaît vers 1620 cm^{-1} lorsqu'il y a un hydroxyle chélaté en position 5 et vers 1620 cm^{-1} en absence hydroxyle chélaté en position 5 ou 3. D'après les ouvrages d'analyse systématique sur des séries de composés flavoniques, il s'avère quasi impossible à partir des seules données infrarouge de déterminer des structures surtout lorsque le degré de substitution sur les cycles est élevé. L'intérêt de la technique infrarouge se réduit pour ainsi dire à une utilisation analytique d'identification par comparaison avec des produits de référence (Markham et Marbry, 1975).

I.1.5.2.5.2. Interprétation des données de spectrophotométrie UV

La spectrophotométrie ultraviolette est l'une des techniques très utilisée pour la caractérisation des flavonoïdes car elle nécessite une faible quantité de matière. De plus, l'utilisation de réactifs spécifiques pouvant réagir avec un ou plusieurs groupes

fonctionnels, entraînant ainsi des modifications sur le spectre peuvent fournir des informations structurales convenables. En effet, la plupart des flavonoïdes présentent deux extremums d'absorption maximale entre 240—295 nm et 300—400 nm correspondant respectivement à la bande Benzoyle (bande II-cycle A) et à la bande cinnamoyle (bande I-cycle B). Ces deux bandes sont attribuables au fait que les flavones et flavonols présentent des formes limites de type cinnamoyle ou benzoyle (schéma 3) (Markham et Marbry, 1975).

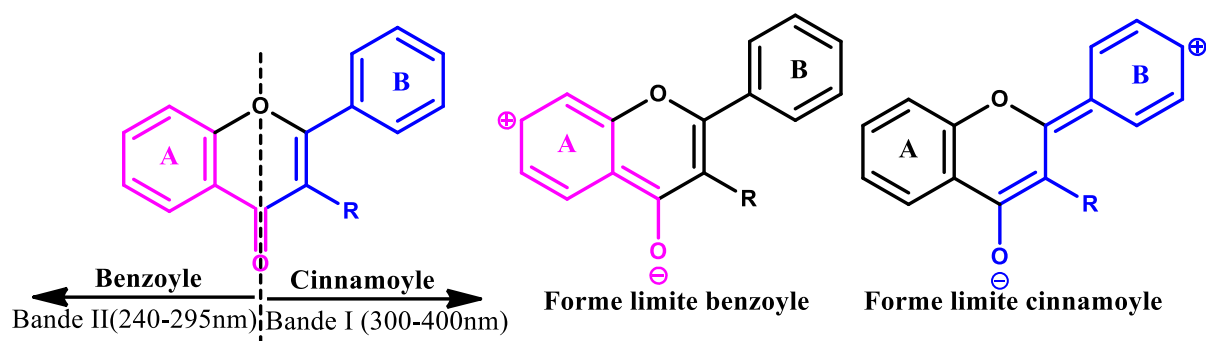


Schéma 3: Bandes d'absorption et formes limites des flavones et flavonols

La position précise et les intensités relatives des maximums d'absorption fournissent des renseignements précieux sur la nature du flavonoïde et de sa substitution (tableau 7). En règle générale l'addition d'un hydroxyle libre provoque un effet bathochrome, pour une méthylation ou glycosylation des groupements 3, 5 et 4' hydroxylés, un déplacement hypsochrome est noté pour la bande I (Marbry *et al.*, 1970).

Tableau 7: Gammes des longueurs d'onde d'absorption UV selon les classes de flavonoïdes

| Bande II | Bande I | Type de flavonoïdes |
|-----------------------------|---------------------------------|--|
| $\lambda_{\max}(\text{nm})$ | | |
| 250—280 | 310—350 | Flavonol (3-OH substitué) |
| 250—280 | 330—360 | Flavonol (3-OH libre) |
| 245—275 | 310—350 épaulement pic à 320 | Isoflavone Isoflavone (5-deoxy66,7-dioxygéné) |
| 245—295 | 310—350 épaulement | Flavone et dihydroflavonol |
| 230—270 intensité faible | 340—490 380—430 | Chalcone Aurone |
| 270—280 | 460—560 | Anthocyane et anthocyanidine |

I.1.5.2.5.3. Interprétation des données de RMN ^1H et ^{13}C

➤ L'analyse des données de RMN ^1H est une pratique efficace pour l'élucidation structurale des flavonoïdes. Elle permet en outre l'identification des protons des cycles A, B, C et éventuellement les protons des substituants sur ces cycles (Markam, 1982).

Les protons du cycle A apparaissent généralement dans la région des champs plus forts que ceux du cycle B. En effet, de manière biogénétique, la plupart des flavonoïdes naturels sont oxygénés en position C-5 et C-7 sur le cycle A. De ce fait, l'identification des protons fixés en C-6 et C-8 des 5,7 -dihydroxyflavonoïdes et parfois du proton fixé en C-5 des 7-dihydroxyflavonoïdes fortement déblindés par le groupe Ceto en C-4 se fait très aisément. Ainsi, dans les flavones avec le motif 5,7 -dioxygénés, les protons fixés en C-6 et C-8 apparaissent sous forme de doublet ($J = 2,3\text{--}2,5$ Hz) avec des déplacements chimiques variant entre $\delta_{\text{H}} 5,80\text{--}6,50$ pour le proton en C-8 et entre $\delta_{\text{H}} 6,30\text{--}7,10$ facilement différenciables du proton en C-3 qui apparaît sous forme de singulet. Cependant, la tâche n'est plus aisée pour des noyaux 5, 7, 8 ou 5, 6, 7 -trioxygénés où, le proton C-3 sous forme de singulet peut se confondre avec les protons en C-6 ou en C-8 qui apparaissent aussi sous forme de singulet. Ce problème est facilement résolu lorsqu'on fait le spectre du flavonoïde triméthylsilylé en position 7,8 ou 6,7. Dans ce cas, le proton fixé en C-3 apparaît dans les champs plus faibles, le proton en C-8 apparaît dans les champs plus forts tandis que le proton en C-6 reste inchangé.

En somme, le spectre de RMN ^1H permet d'identifier :

- Le nombre de sucres liés à l'aglycone et la nature de leur liaison (α ou β)
- la position et le nombre de substituants méthoxyles sur le squelette flavonique

Concernant ces données, quelques déplacements chimiques des protons des noyaux A et B sont reportés dans le tableau 8 qui suit (Markham et Geiger, 1993).

➤ L'analyse des données de RMN ^{13}C , vient compléter celle de RMN ^1H . Combinée aussi à la RMN 2D, elle constitue une arme puissante entre les mains du chimiste. (Markam, 1982). Sa résonance se produit principalement dans la plage 0–200 ppm avec le TMS comme référence interne. Chaque carbone différent étant représenté par un signal singulet lorsqu'il est complètement découplé du proton. Le déplacement chimique d'un carbone est un bon guide quant au type de carbone représenté. Ce déplacement chimique est fortement affecté par les substituants voisins du carbone considéré. La plage de déplacement chimique en RMN ^{13}C des carbones de divers types flavonoïdes est présentée dans le tableau 9 (Levy and Nelson, 1972).

Tableau 8: Quelques déplacements chimiques en RMN ¹H des noyaux A et B

| Proton du noyau A Nature du flavonoïde | H-5 | H-6 | H-8 |
|---|---------------------------------|----------------------|------------------|
| | δ_H (ppm) (Mult., J(Hz)) | | |
| 5,7-OH | — | 6,0–6,2 (d, 2,5) | 6,3–6,5 (d, 2,5) |
| 5-OH; 7-OGlc | — | 6,2–6,4 (d, 2,5) | 6,5–6,9 (d, 2,5) |
| 7-OR (R=H, sucre) | 8,0 (d, 9,0) | 6,7–7,1 (d, 2,5–9,0) | 6,7–7,0 (d, 2,5) |
| 5, 6, 7-OR (R=H, sucre) | — | 6,3 (s) | 6,3 (s) |
| 5, 7, 8-OR | | | |
| Proton du noyau B | H-2', H-6' | H-3', H-5' | — |
| Flavone (4'-OR) | 7,7–7,9 (d, 8,5) | — | — |
| Flavonol (4'-OR) | 7,9–8,1 (d, 8,5) | — | — |

Tableau 9: Quelques déplacements chimiques en RMN ¹³C de divers types flavonoïdes

| Plage de déplacement chimique δ_C (ppm) | Type de carbone |
|---|---|
| 210–170 | Carbonyl (C-4) |
| Carbones aromatiques et/ou oléfiniques | |
| 165–155 | Carbones oxygénés |
| 150–130 (<i>Ortho/para</i> oxygénés) | |
| 135–125 | Carbones non oxygénés |
| 125–90 (<i>Ortho/para</i> oxygénés) | |
| Carbones aliphatiques | |
| 83–69 (C-1, <i>O</i> -Glc, δ_C vers 101 ppm) | Carbones oxygénés (sucre) |
| 80–40 (C-4, épichatechin, δ_C vers 28 ppm) | C-2 et C-3 non oxygénés des flavanones |
| 99–103 | Méthylendioxy (O–CH ₂ –O) |
| 55–63 | Méthoxy (O–CH ₃) |
| 17–21 | C–CH ₃ ; H ₃ C–CO |
| 21 (CH ₂), 122 (CH), 131 (C), 18 (CH ₃) | Isopropenyl [–CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂] |

I.1.5.3. Les glycérides, alcools et acides gras

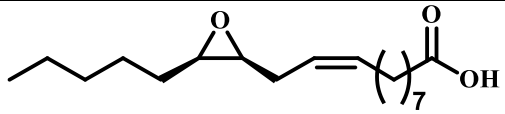
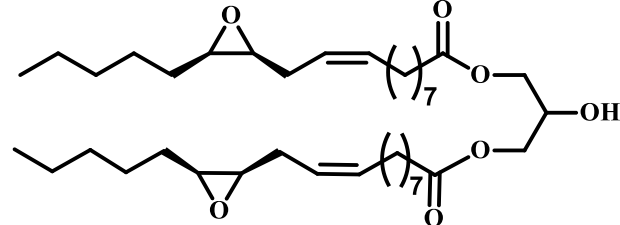
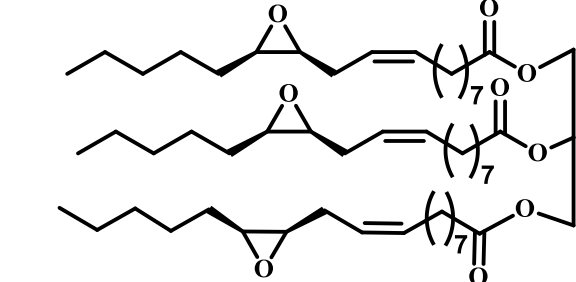
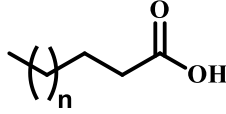
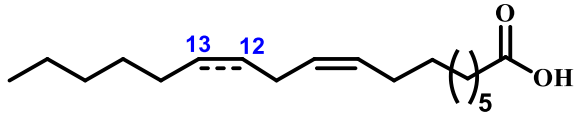
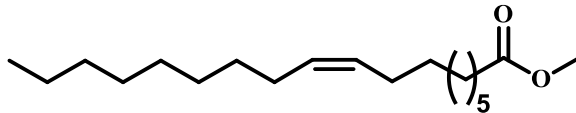
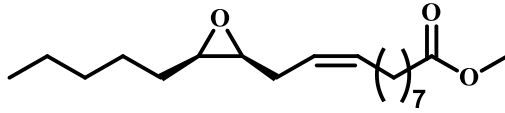
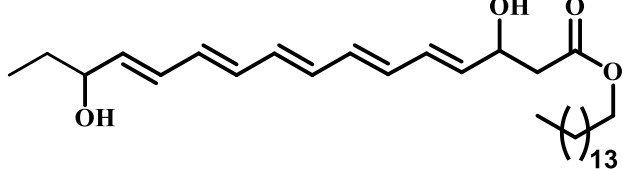
I.1.5.3.1. Définition

Les alcools, acides gras et glycérides dérivés sont des biomolécules insolubles dans l'eau. Les alcools gras sont formés d'une longue chaîne carbonée saturée ou insaturée avec un plusieurs groupes hydroxyles. Tandis que les acides gras dérivent d'une oxydation enzymatique d'un seul hydroxyle terminal conduisant à la formation des mono-carboxyliques. Ces acides gras sont catégorisés et on distingue ainsi : Acides gras à chaîne courte (acides gras composés de trois à sept atomes de carbone) ; acides gras à chaîne moyenne (acides gras composés de huit à treize atomes de carbone) ; acides gras à longue chaîne (acides gras composés de quatorze à vingt atomes de carbone) ; acides gras à très longue chaîne (acides gras composés de plus de vingt atomes de carbone) (Nishida et Uauy, 2009). Une mono ou une polyestérification enzymatique intervient généralement entre ces acides gras et le glycérol pour donner des mono- ou polyglycérides stockés dans le cytoplasme et jouant un rôle énergétique ou hormonal de signalisation, responsable de l'activation de nombreux récepteurs membranaires (Gillet et al., 1998). Lorsqu'une molécule de glycérol est liée à 3 molécules d'un même acide gras ($R = R' = R''$), le triglycéride formé est dit homogène. Dans le cas contraire, le triglycéride est dit mixte. Si 2 molécules d'acides gras seulement sont présentes, 2 isomères de position existent, selon que les 2 molécules du même acide gras sont liées aux 2 fonctions alcools primaires (glycéride symétrique) ou qu'elles le sont à une fonction alcool primaire et à la fonction alcool secondaire (glycéride asymétrique). Dans ce dernier cas, 2 stéréo-isomères sont possibles. Si la molécule de glycérol est estérifiée par 3 molécules d'acides gras différents, 3 isomères de position, chacun dédoublable en 2 stéréo-isomères, sont possibles. (Pioch et al., 2006).

I.1.5.3.2. Glycérides, et acides gras isolés des espèces du genre *Vernonia*

Les dérivés estérifiés du glycérol sont rarement rapportés comme composé isolé d'une espèce du genre *Vernonia*. Toutefois, les premiers travaux rapportant l'isolement des glycoacides de *Vernonia* remontent à en 1993 par Neff et al., puis Singh et al., qui signalent la présence d'ester de glycérole dans *Vernonia galamensis*. Ces travaux seront poursuivis en 1998 par Ncube et al., qui rapportent l'isolement des di et triacylglycérols dans l'huile de graines de *V. galamensis* (Ncube et al., 1998). Ces glycoacides, dérivent tous de l'estérification du glycérol et de l'acide vernolique, un acide gras largement majoritaire *Vernonia galamensis* (Yu et al., 2008 ; Singh and Kaul 1993 ; Li et al 2010). Par contre, les alcools et acides gras sont largement identifiés dans les plantes du genre *Vernonia*. Le tableau 10 présente un aperçu synoptique, de ces classes de composés isolés des *Vernonia*.

Tableau 10: Quelques acides gras et esters dérivés isolés des espèces du genre *Vernonia*

| Structures et noms | Classe | Sources/Références |
|--|-----------------------|---|
|  <p>Acide vernolique (18)</p> | Acide gras | <i>V. galamensis</i> (Ologunde et al., 1990) |
|  <p>Divernoate de glycerol(19)</p> | Diglyceride | |
|  <p>Tivernoate de glycerol(20)</p> | Tiglyceride | <i>V. galamensis</i> (Ncube et al., 1998) |
|  <p>n= 12: Acide hexadecanoïque (21) n= 14: Acide octadecanoïque(22) n= 16: Acide aracidique (23)</p> | Acides gras saturés | <i>V. colorata</i> (Senatore et al., 2004) <i>V. lasiopus</i> (Singh et Kaul 2001) |
|  <p>Acide oleique (24) $\Delta^{12,13}$:Acide linoléique (25)</p> | Acides gras insaturés | <i>V. amygdalina</i> (Erasto et al., 2007) <i>V. galamensis</i> (Singh et al., 1993) |
|  <p>Ester méthylique d'acide oleique (26)</p> | Ester d'acides gras | <i>V. nigritiana</i> (Senatore et al., 2004) |
|  <p>Vernolate de méthyle (27)</p> | | <i>V. anthelmintica</i> (Rao et Rao, 1972) |
|  <p>Urticifolene (28)</p> | | <i>V. urticifolia</i> (Kiplimo et al., 2011b) |

I.1.5.4. Autres classes de composés isolés des espèces du genre *Vernonia*

Les travaux phytochimiques déjà effectués sur les plantes du genre *Vernonia* ont conduit à l'isolement de plusieurs autres classes de composés tels que les coumarines, les triterpènes, les stéroïdes et les sesquiterpènes. Parmi ces classes de composés, les stéroïdes de types stigmastane et les sesquiterpènes lactoniques sont les plus représentatifs. Ces sesquiterpènes parmi les terpénoïdes du genre *Vernonia*, sont les plus intéressants de par leur potentiel biologique et ils constituent par leur nombre le second groupe des métabolites secondaires les plus isolés aux côtés des stéroïdes de type stigmastane. Ils présentent dans leurs structures un cycle lactonique et divers groupes fonctionnels tels que les alcools, les acides, les aldéhydes et les cétones. Le tableau 11 présente de façon synoptique les autres composés isolés du genre *Vernonia*.

Tableau 11: Quelques métabolites secondaires isolés des espèces du genre *Vernonia*

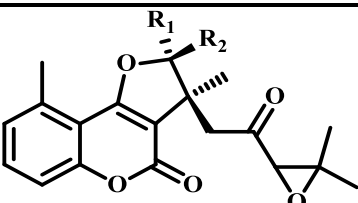
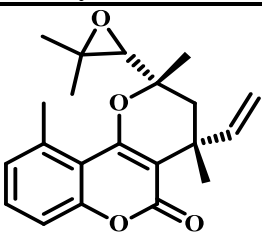
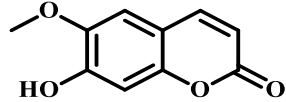
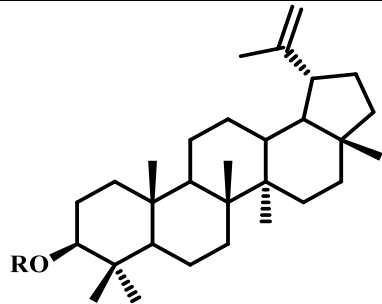
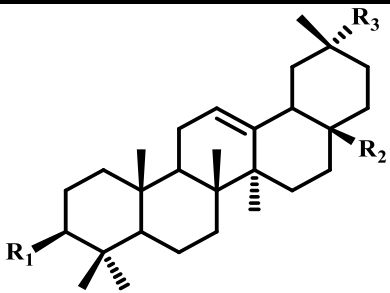
| Structures et noms | Classe | Sources/Références |
|---|------------|---|
|  <p>$R_1 = CH_3, R_2 = H$: Isobrachycoumarinone (29) $R_1 = H, R_2 = CH_3$: 2'-epicycloisobrachycoumarinone (30)</p> | | <p><i>V. brachycalyx</i> (Oketch et al., 1998)</p> |
|  <p>Ethuliacoumarin A (31)</p> | Coumarine | <p><i>V. brachycalyx</i> (Keige et al., 1998)</p> |
|  <p>6-O-Methylesculetin(32)</p> | | <p><i>V. galamensis</i> (Awaad et al., 2000)</p> |
|  <p>$R = H$: Lupeol (33) $R_1 = Ac$: Acetate de lupenyl (34)</p> | | <p><i>V. brasiliana</i> <i>V. auriculifera</i> (Kiplimo et al., 2011 ; De Ameida et al., 1997)</p> |
|  <p>$R_1 = OH, R_2 = CH_3, R_3 = H$: α-amyrin (35) $R_1 = OH, R_2 = CH_3, R_3 = CH_3$: β-amyrin (36) $R_1 = OH, R_2 = COOH, R_3 = CH_3$: Acide oleanolique (37) $R_1 = OH, R_2 = COOH, R_3 = H$: Acide ursolique (38) $R_1 = OAc, R_2 = CH_3, R_3 = CH_3$: Acetate de β- amyrin (39)</p> | Triterpene | <p><i>V. auriculifera</i> (Kiplimo et al., 2011)</p> |

Tableau 11: Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Vernonia* (suite)

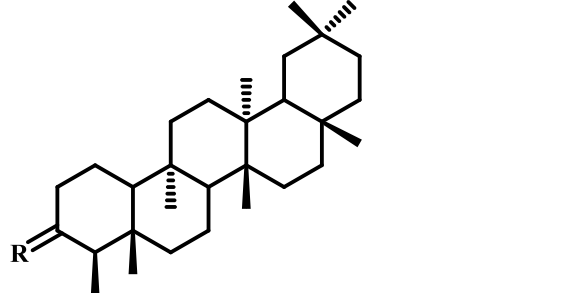
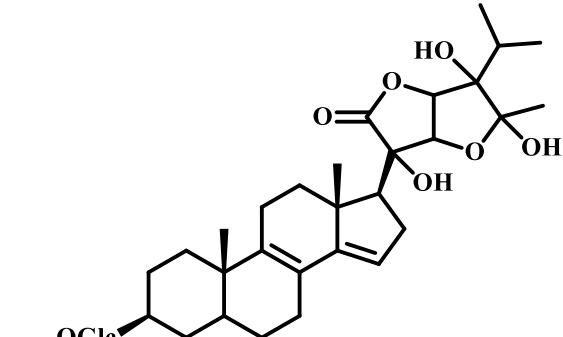
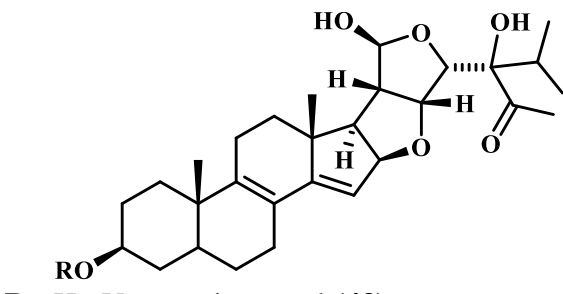
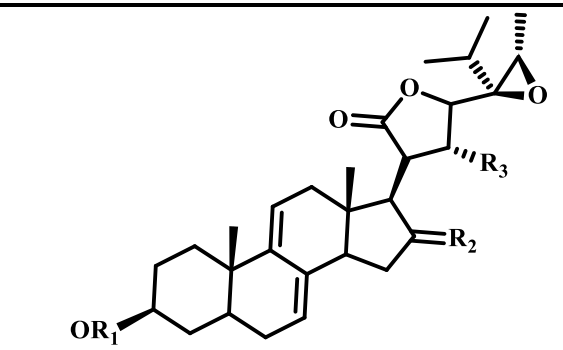
| Structures et noms | Classe | Sources/Références |
|--|------------|--|
|  <p>R= O: Friedelanone (40) R= H, OAc: Acetate de friedeline (41)</p> | Triterpene | <i>V. brasiliiana</i> (Kiplimo et al., 2011) |
|  <p>Vernoguinoside A (42)</p> | | <i>V. guineensis</i> (Donfack et al., 2012 ; Tchinda et al., 2002) |
|  <p>R= H : Vernoguinsterol (43) R= Glc: Vernoguinoside (44)</p> | Stéroïdes | |
|  <p>R₁= Glc; R₂= O; R₃= H: Vernonioside A₃ (45) R₁= Glc; R₂= H, H; R₃= OH: Vernonioside B₁ (46)</p> | | <i>V. amygdalina</i> (Jisaka et al., 1992) |

Tableau 11: Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Vernonia* (suite)

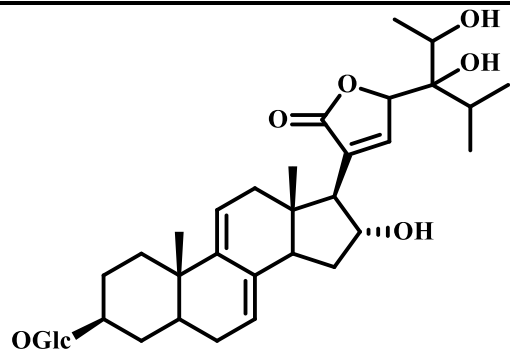
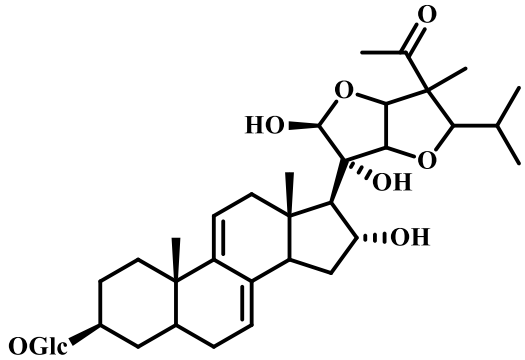
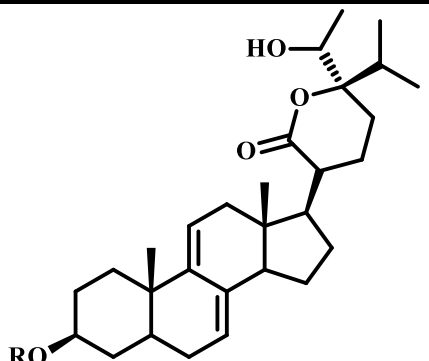
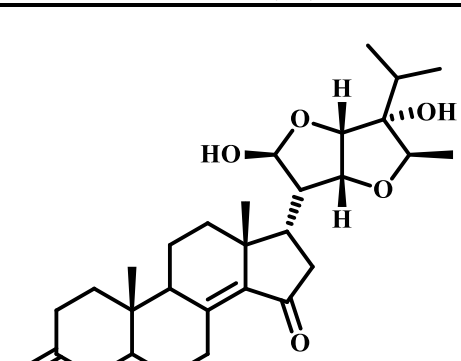
| Structures et noms | Classe | Sources/Références |
|---|------------------|--|
|  <p>Vernonioside A4 (47)</p> | | <p><i>V. amygdalina</i> (Jisaka <i>et al.</i>, 1992)</p> |
|  <p>Vernonioside B2 (48)</p> | | <p><i>V. condensata</i> (Valverde <i>et al.</i>, 2001)</p> |
|  <p>R= B-D-Gal-(1→2)-B-D-Glc</p> <p>Vernocuminoside B (49)</p> | <p>Stéroïdes</p> | <p><i>V. cumingiana</i> (Liu <i>et al.</i>, 2009)</p> |
|  <p>Vernoanthelesterone A (50)</p> | | <p><i>V. anthelmintica</i> (Awaad <i>et al.</i>, 2000)</p> |

Tableau 11: Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Vernonia* (suite)

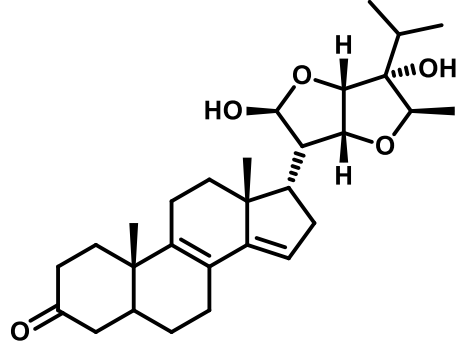
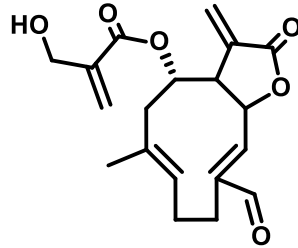
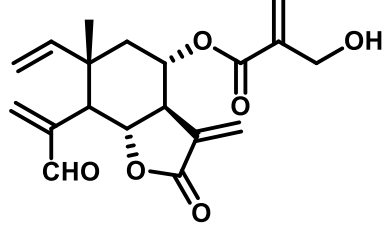
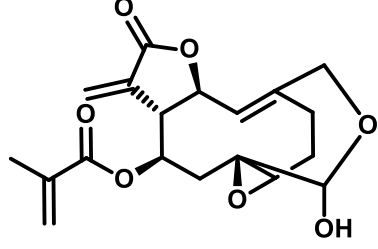
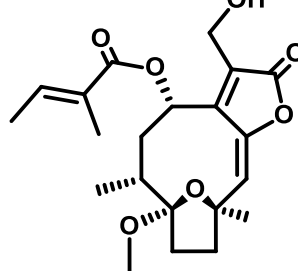
| Structures et noms | Classe | Sources/Références |
|--|---------------|--|
|  <p>Vernioanthelcin (51)</p> | Stéroïde | <i>V. anthelmintica</i> (Awaad et al., 2000) |
|  <p>Vernopicrine (52)</p> | | |
|  <p>Vernomelitensine (53)</p> | Sesquiterpène | <i>V. guineensis</i> (Tchinda et al., 2002 ; 2013) |
|  <p>Vernolide (54)</p> | | |
|  <p>Vernolide A (55)</p> | | |

Tableau 11: Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Vernonia* (suite)

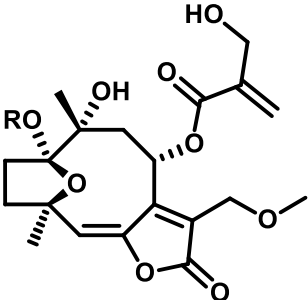
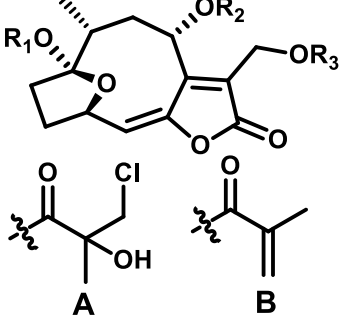
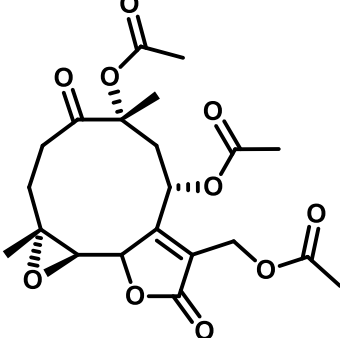
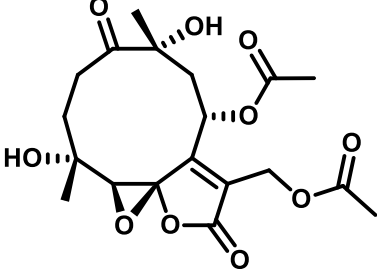
| Structures et noms | Classe | Sources/Références |
|--|---------------|--|
|  <p>R=H: 8α-methacryloyloxy-10α-hydroxy-13-methoxyhirsutinolide (56) R=CH₃: 8α-(4-hydroxymethacryloyloxy)-10α-hydroxy-13-methoxy-hirsutinolide (57)</p> | | <p><i>V. triflosculosa</i> (Kos et al., 2006)</p> |
|  <p>R₁=H, R₂=A, R₃=Ac: Vernchinilide A (58) R₁=H, R₂=B, R₃=Ac: Vernchinilide B (59)</p> | Sesquiterpène | <p><i>V. chinensis</i> (Chen et al., 2005)</p> |
|  <p>Glaucolide B (60)</p> | | <p><i>V. eremophila</i> Burim et al.(1999)</p> |
|  <p>Glaucolide (61)</p> | | <p><i>V. scorpioides</i> Buskuhl et al.(2010)</p> |

Tableau 11: Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Vernonia* (suite)

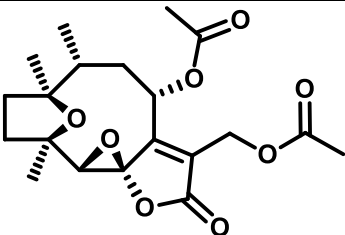
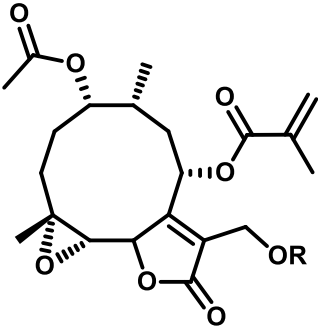
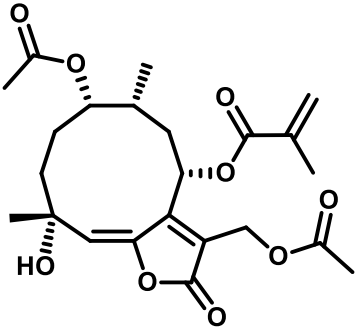
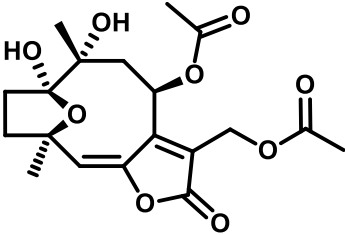
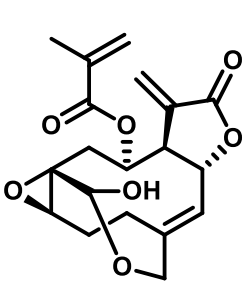
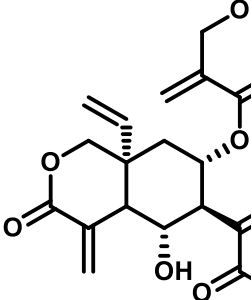
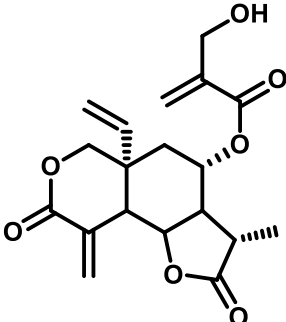
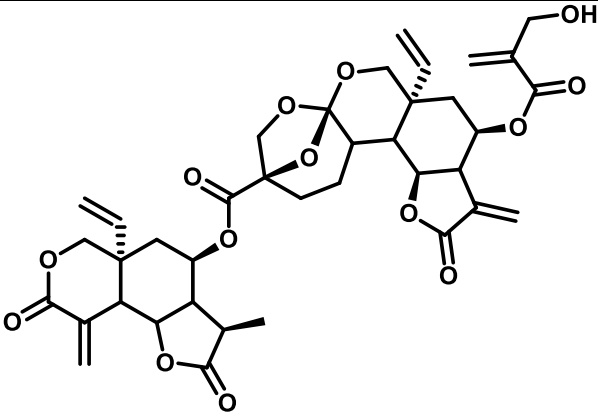
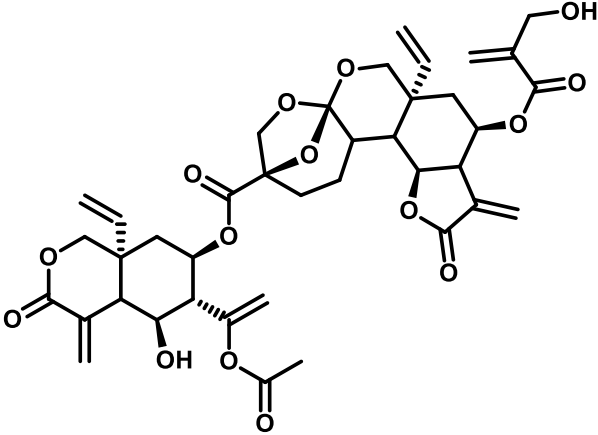
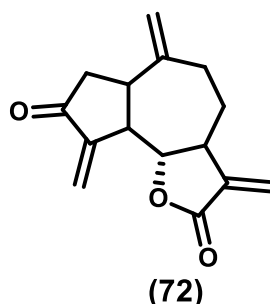
| Structures et noms | Classe | Sources/Références |
|---|----------------------|---|
|  <p>Hirsutinolide (62)</p> | | <p><i>V. scorpioides</i> (Buskuhl et al., 2010)</p> |
|  <p>R= Ac: Glaucolide K (63) R= H: Glaucolide L (64)</p> | | |
|  <p>Glaucolide M (65)</p> | <p>Sesquiterpène</p> | <p><i>V. pachyclada</i> (Williams et al., 2005)</p> |
|  <p>Hirsutolide(66)</p> | | <p><i>V. bockiana</i> (Huo et al., 2008)</p> |
|  <p>Vernolide (67)</p> | | <p><i>V. amygdalina</i> (Erasto et al., 2006)</p> |

Tableau 11: Quelques métabolites secondaires isolés du genre *Vernonia* (suite)

| Structures et noms | Classe | Sources/Références |
|---|---------------|---|
|  | | |
| Vernodalol (68) | | <i>V. amygdalina</i> (Erasto et al., 2006) |
|  | | |
| 11β, 13 -dihydrovernodalol (69) | | |
|  | Sesquiterpène | |
| Vernodalidimer A (70) | | <i>V. anthelmintica</i> Liu et al., (2010) |
|  | | |
| Vernodalidimer B (71) | | |

Les travaux chimiques antérieurs sur le genre *Vernonia*, révèlent la présence majoritaire des sesquiterpènes lactoniques, classe de composés particulièrement active sur des parasites, car elles sont des molécules électrophiles ayant dans leur structure un motif accepteur de Michael (AM) capable d'inhiber certains systèmes enzymatiques indispensables à la survie des parasites, mais aussi de moduler la réponse immunitaire de l'hôte parasité, leur conférant ainsi des propriétés antiparasitaires (Girardi, 2015). C'est l'exemple de la Déhydrozaluzanine C (72), une lactone sesquiterpénique isolée de *Munnozia maronii* (Asteraceae) en Bolivie. Cette molécule présente une bonne activité sur les promastigotes de 10 espèces différentes de *Leishmania* (Fournet et al., 1993).



La grande teneur en sesquiterpène dans les espèces du genre *Vernonia* ajouté aux résultats de Girardi, (2015) a fortement motivé le choix de *Vernonia guineensis* dans cette étude dont l'un des objectifs est de caractériser son potentiel antileishmanial. Nous présentons dans la section suivante, une revue de la littérature non exhaustive sur les leishmanioses et d'autres pathologies associées aux risques de survenus de formes graves de leishmanioses.

I.2. Revue de la littérature en relation avec les pathologies ciblées

I.2.1. Leishmaniose

I.2.1.1. Généralité sur les leishmanioses

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des protozoaires du genre *Leishmania*, famille des Trypanosomatidae (Lightburn et al., 2002). La famille des Trypanosomatidae regroupe deux principaux genres de parasites. Le premier genre est *Trypanosoma*, un parasite unicellulaire incluant les espèces responsables des trypanosomiasés africaines et américaines (Lightburn et al., 2002). Le deuxième genre *Leishmania* cause la leishmaniose, une maladie tropicale négligée, endémique dans toutes les Régions de l'OMS (Aubry et Gaüzère, 2020). Les leishmanioses ont plusieurs phénotypes et diverses formes cliniques ayant en commun l'épidémiologie (transmission par un diptère, le phlébotome), la physiopathologie (les leishmanies infectent les macrophages de l'hôte) et la thérapeutique (les mêmes médicaments

sont actifs). Les formes cliniques les plus courantes sont :

- les leishmanioses viscérales (LV) ou Kala-azar, mortelles en l'absence de traitement
 - les leishmanioses cutanées localisées (LCL) ou diffuses (LCD),
 - les leishmanioses cutanéomuqueuses (LCM).
- une quatrième forme clinique, la leishmaniose dermique post-kala-azar- est une séquelle de la leishmaniose viscérale.

La leishmaniose peut être anthroponosique ou zoonotique, selon que l'homme ou l'animal constitue le réservoir naturel du parasite. La transmission est faite par les piqûres de petits diptères hématophagiques appelés phlébotomes. Le parasite infecte de nombreux sites physiologiques tels que la rate, le foie, la muqueuse transintestinale, les cellules lymphatiques et la moelle osseuse (Zhang et Kima, 2016).

I.2.1.2. Rappel épidémiologique

I.2.1.2.1. Répartition géographique

Largement répandues à la surface de la terre, les leishmanioses possèdent une aire de répartition globalement circumterrestre. Les différentes formes, viscérales, cutanées ou cutanéomuqueuses, ont des territoires dont la délimitation dépend de facteurs intrinsèques liés aux espèces de parasite. L'étude de la chorologie et de l'éthologie des différents hôtes permet de mieux comprendre la répartition des différentes formes et leur écologie (Dedet, 2001). Les leishmanioses sont distribuées le long des régions tropicales et subtropicales touchant 87 pays et réparties en foyers dans le monde entier (Aubry et Gaüzère, 2020) :

- leishmaniose viscérale (LV) en cinq foyers : indien, Méditerranéen, chinois, américain, africain.
- leishmaniose cutanée (LC) en trois foyers : Méditerranéen, américain, africain.
- leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) : un seul foyer américain.

Selon les estimations, il y aurait chaque année entre 50 000 et 90 000 nouveaux cas /an de leishmaniose viscérale causant près 20 000 à 30 000 décès. La leishmaniose cutanée quant à elle fait entre 700 000 et 1 000 000 nouveaux cas/an (Aubry et Gaüzère, 2020). Au Cameroun, la leishmaniose cutanée est principalement localisée dans la région du nord plus précisément à Mokolo, une ville frontalière avec le Tchad. La leishmaniose viscérale quant à elle est présente dans la ville de Koussérie (Ngouateu et al., 2012).

I.2.1.2.2. Le parasite

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés (figure 4 b) avec différentes espèces de morphologie identique appartenant au genre *Leishmania* (Mendoza et al., 2020). Les

leishmanies présentent au cours de leur cycle évolutif deux grands stades successifs : le stade promastigote extracellulaire dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré. Les promastigotes peuvent se multiplier dans les milieux artificiels de culture à la température ambiante (22–26°C), alors que la forme amastigote s'adapte à la température corporelle et aux milieux acides (pH 4–4,5) des macrophages où il réside. Bien que les Leishmanies soient toutes morphologiquement similaires, elles causent une panoplie de manifestations cliniques allant d'affections cutanées qui se résorbent d'elles même à des infections viscérales engendrant des inflammations responsables de graves déformations pouvant être fatales (Bailey et Lockword, 2007). Les parasites du genre *Leishmania* sont le plus souvent regroupés en fonction du syndrome, de la distribution et du groupe d'espèces. Le tableau 12 présente un rapport simplifié entre syndromes, distribution et du groupe des 13 espèces les plus diagnostiquées (Bailey et Lockword, 2007).

Tableau 12: Rapport simplifié entre les syndromes, la distribution et les principales espèces de *Leishmania*

| Syndromes | Distribution | Espèce | |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|---|
| Leishmaniose viscérale | Ancien Monde* | <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> | |
| | Nouveau Monde# | <i>L. chagasi</i> | |
| | Ancien Monde | <i>L. Major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> | |
| Leishmaniose cutanée | Nouveau Monde | <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i> | |
| | Nouveau Monde | <i>L. braziensis</i> <i>L. colombiensis</i> | |
| | Leishmaniose cutanéomuqueuse | Nouveau Monde | <i>L. guianensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i> |

* : Partie du monde connue depuis l'Antiquité, avant les voyages de Christophe Colomb : l'Europe, l'Asie et l'Afrique

: Terme désignant les Amériques et l'Océanie

I.2.1.2.3. L'agent vecteur

Les vecteurs de la transmission de la leishmaniose sont des insectes appelés phlébotome ou mouche des sables, un petit diptère de 2 à 5 mm (figure 4a), capable de passer les mailles d'une moustiquaire. La femelle hématophage pique aussi bien l'Homme que les animaux. Elle a besoin de sang pour le développement de ses œufs. Les phlébotomes se mettent le jour à l'abri de la lumière et du vent et deviennent actifs la nuit à des températures

extérieures supérieures à 19° C. Il en existe plus de 700 espèces parmi lesquelles seule une trentaine serait des vecteurs potentiels. Seules les femelles (figure 4a) sont hémato-phages et responsables de la transmission de la maladie (Sacks, 2001). Le Phlébotome femelle porte en elle le parasite sous forme de promastigotes (parasite effilé et flagellé mesurant entre 20–25 µm). Les promastigotes se transforment en la forme amastigotes du parasite (arrondies et non flagellée) chez l’hôte et infecte les cellules microphagiques.

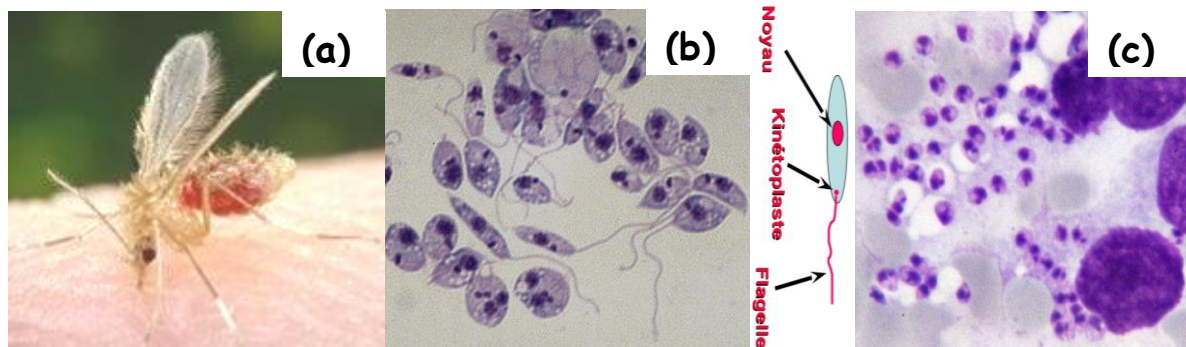


Figure 4: Images agrandie de la mouche à sable (a), parasite sous forme promastigote (b) et du parasite sous forme amastigote (c)

I.2.1.3. Cycle de reproduction et physiopathologie

Le cycle répliatif de *Leishmania* est complexe et implique plusieurs intervenants. De plus, dépendamment de son hôte, le parasite peut changer de forme (promastigote ou amastigote) pour mieux s’adapter à son environnement (pH, stress oxydatif, température) (figure 5). Le cycle de vie du parasite comporte deux étapes : le stade d’insecte promastigote et le stade vertébré amastigote. Les promastigotes se répliquent et se différencient dans l’intestin des femelles vectrices de mouches des sables hémato-phages qui inoculent des promastigotes métacycliques dans le derme de l’hôte mammifère lors du repas sanguin (Zilberstein et al., 1994). Les parasites *Leishmania* infectent les cellules immunitaires, en particulier les phagocytes, tels que les neutrophiles, les cellules dendritiques et en particulier les macrophages lors de la phagocytose. Ainsi, les promastigotes se transforment en amastigotes, qui se multiplient à l’intérieur des vacuoles parasitophores des phagocytes (Desjardins et Descoteaux, 1998). En effet, les promastigotes sont phagocytés par les macrophages et se retrouvent dans le phagosome. Ce dernier fusionne avec le lysosome pour former le phagolysosome dans lequel les promastigotes se transforment en amastigotes qui prolifèrent rapidement jusqu’à la rupture du macrophage pour se propager. Les parasites ainsi libérés sont phagocytés à nouveau par les cellules mitoyennes où le processus se poursuit. La prolifération intracellulaire des amastigotes reste en général localisée aux macrophages et aux cellules dendritiques du site d’inoculation entraînant le développement d’une lésion cutanée

localisée (LC). Il arrive cependant que les parasites diffusent à l'ensemble des organes du système des phagocytes mononucléés, donnant lieu à la leishmaniose viscérale (LV). Ce cycle recommence lorsqu'un phlébotome pique une personne infectée (Zilberstein *et al.*, 1994).

Par régurgitation, le phlébotome libère le promastigote au site de piqûre. Une réaction inflammatoire se déclenche et entraîne l'activation des protéines de l'inflammation ainsi que la phagocytose des parasites par les macrophages. Les macrophages envahis induisent la production de facteurs chimiotactiques et de cytokines (TNF α , Interleukines). Le métabolisme oxydatif produit des dérivés de l'oxygène et du monoxyde d'azote, toxiques pour les protozoaires. Malheureusement, les parasites possèdent des systèmes de résistance à tous les niveaux des systèmes immunitaires de défense mis en place par le vertébré infecté (Oliaee *et al.*, 2020). Dans le cas des leishmanioses viscérales, les parasites sous forme amastigote diffusent dans l'ensemble des organes du système des phagocytes mononucléés, donnant lieu à l'altération des viscères. En effet, lors de l'anamnèse, on ne retrouve que très rarement la notion de lésion cutanée initiale. Pourtant, c'est à partir des macrophages issus de la zone d'inoculation que les amastigotes sont transportés via le système des phagocytes mononucléés à travers l'organisme (foie, rate, ganglions, moelle osseuse).

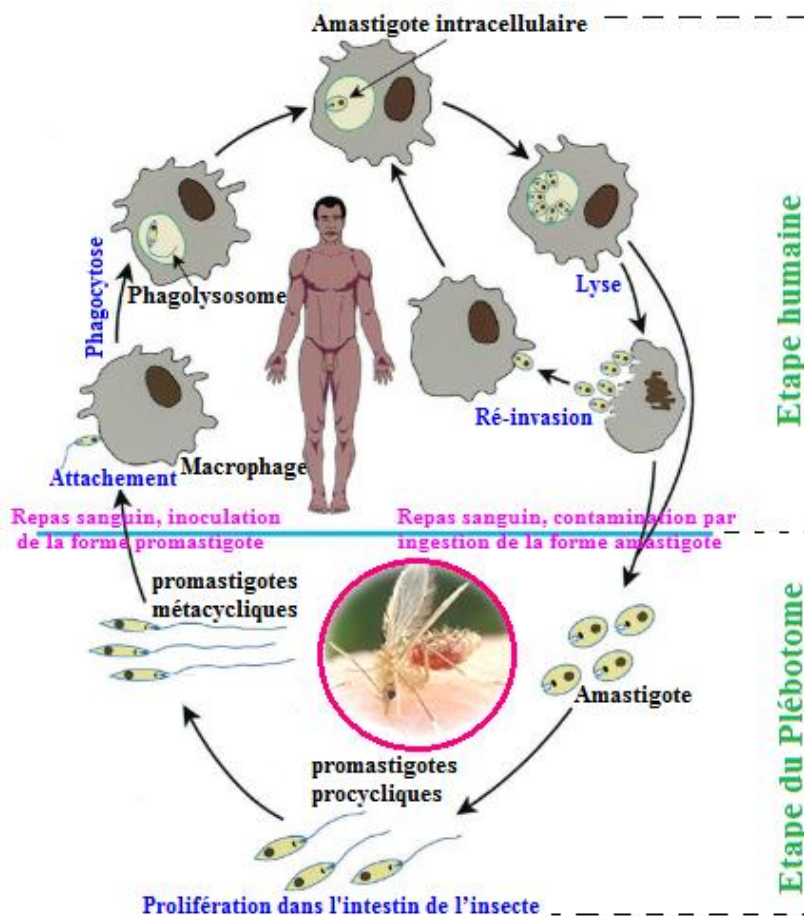


Figure 5: Le cycle répliatif de *Leishmania*.

Les amastigotes peuvent survivre à l'intérieur des macrophages non activés. Le déclenchement et l'expression de la maladie dépendent de la virulence du parasite et de l'immunité du sujet. (Biezunski, 2014) Toutefois, la réponse immunitaire innée étant contournée par le parasite, le contrôle de l'infection nécessite le développement d'une réponse adaptative par une thérapie. Un traitement complet doit être administré rapidement à tous les patients chez qui la leishmaniose viscérale a été diagnostiquée (OMS, 2014).

I.2.1.5. Traitements

I.2.1.5.1. Généralité sur le traitement des leishmanioses

À ce jour, il n'existe encore aucun médicament propre à la leishmaniose mais plusieurs chimiothérapies permettant la guérison. Parmi elles, on retrouve en première ligne de défense, l'antimoine pentavalent et ses dérivés. Ce traitement est utilisé depuis plusieurs années pour traiter toutes les formes de *Leishmania*. Cependant, des problèmes de résistance grandissants sont associés à ce traitement. L'antimoine et ses dérivés (stibogluconate de sodium ou antimoniate de meglumine) agissent en exposant le parasite au stress oxydatif de la cellule hôte (Gangneux, 2015), mais les effets secondaires de cette thérapie à l'antimoine (la dose moyenne peut atteindre 1 g/j pendant 10 jours) comprennent les douleurs abdominales, des vomissements, une diarrhée, une déshydratation, l'hépatite et la néphrite (Zauli et al., 2010). De plus, on a observé de graves symptômes myocardiques et des convulsions avec des doses aiguës d'antimoniés et on a attribué des décès à une nécrose du foie. Pour réduire cette toxicité et accroître l'efficacité de l'antimoniate de meglumine (AM), la nicotinamide (NAM) a été évaluée en combinaison avec l'antimoniate de meglumine sur l'inhibition de *Leishmania tropica*. Ces résultats indiquent une efficacité plus élevée de Nam/AM dans la réduction de la croissance du parasite avec une quasi disparition des effets secondaire (Oliaee et al., 2020). Cette association pourrait être considérée comme un schéma thérapeutique potentiel pour le traitement de patients volontaires atteints de leishmaniose cutanée, mais de nombreuses études de validations restent encore à faire. Face à cette situation, les traitements de deuxième intentions demeurent les solutions de l'heure. La pentamidine constitue le traitement de deuxième choix le plus répandu. Son mode d'action exact n'est pas encore connu, mais il a été rapporté qu'elle s'accumulait dans la mitochondrie du parasite en inhibant la topoisomérase mitochondriale (Filippi et al., 2001 and Singh et al., 2014). Mais en raison de sa forte toxicité, on n'utilise ce médicament qu'en cas de résistance à l'antimoine. L'amphotéricine B agit en formant des pores au niveau de la membrane plasmique, créant ainsi un déséquilibre ionique. Ce médicament est le plus utilisé pour le traitement des leishmanioses en co-infection avec le VIH-1 (Monge et López, 2013) cependant, un

mécanisme de résistance a été rapporté par [Purkait et al. \(2012\)](#). Finalement, la miltéfosine est le premier traitement administré par voie orale ([Sundar et Chakravarty, 2013](#)). Elle agit sur la membrane du parasite en causant son apoptose. Ce médicament possède un effet leishmanicide autant sur les souches viscérales que sur les souches cutanées. Par contre, la miltéfosine possède des effets tératogènes empêchant ainsi son administration chez les femmes enceintes et chez les enfants.

I.2.1.5.2. Cas spécifique à la leishmaniose viscérale et controverses médicamenteuses

L'amphotéricine B, notamment sous sa forme liposomale (15-20 mg / kg répartis en 2 à 4 doses quotidiennes), a remplacé les traitements systémiques d'antimoine pour les cas de LV du pourtour de la Méditerranée et jusqu'en Inde (taux de succès de 99 % chez plus de 8749 patients) où le niveau de résistance à l'antimoine c'est avéré très élevé ([Copeland et al., 2015](#)). En revanche, pour l'Afrique la résistance à l'antimoine est basse et les résultats sont moins bons sous traitement d'amphotéricine B. Le traitement antimonié constitue en pareil cas le traitement de choix ([Copeland et al., 2015](#)).

Au niveau des limitations et effets secondaires de ces traitements, l'insuffisance rénale est le phénomène le plus souvent constaté sous amphotéricine B ([Goto et Lindoso, 2012](#)). S'agissant de l'antimoine, il présente les inconvénients suivants : traitement intraveineux de longue durée (injections / perfusions quotidiennes sur 28 jours), contre-indication pendant la grossesse et toxicité en cas d'insuffisance rénale, hépatique ou cardiaque. Pour l'amphotéricine B, la dose est plus élevée et le traitement plus long.

Faisant face à la limite de tous ces traitements, l'OMS dans son plan de riposte faisant avancer la recherche sur les moyens de combattre efficacement les leishmanioses, y compris au moyen de médicaments, outils diagnostiques et vaccins sûrs, efficaces et d'un prix abordable ; facilite la diffusion des résultats des travaux de recherche et recommande l'usage des plantes médicinales tout en encourageant des recherches visant à développer des thérapies plus nobles ([OMS, 2014](#)). Depuis lors plusieurs études effectuées sur les plantes médicinales rapportent le potentiel leishmanicide de ces dernières. Les Asteraceae occupent près de 40 % des plantes étudiées ayant démontré des activités prometteuses dans le traitement des leishmanioses ([Chibli et al., 2019](#) ; [Da-Silva et al., 2019](#), etc.). Dans cette thèse, compte tenu de la littérature constituée sur les plantes du genre *Vernonia* en général et *Vernonia guineensis* en particulier, nous évaluons l'activité antileishmaniale d'extraits bruts issus de différents types d'extractions, des fractions et composés de *Vernonia guineensis*, dans le but d'apporter notre contribution à ce vaste champ de recherche de nouveaux agents thérapeutiques contre les leishmanioses. Le stress oxydatif et l'inflammation étant associés au mécanisme

pathogénique des leishmanies, nous avons jugé intéressants d'évaluer l'effet antioxydant et anti-inflammatoire intrinsèque des échantillons testés positifs sur l'inhibition du parasite *L. donovani*.

I.2.2. Maladies entériques

I.2.2.1. Généralité sur les maladies entériques microbiennes

Les maladies entériques sont causées par des micro-organismes tels que les virus, les bactéries et les parasites qui provoquent des maladies intestinales. Ces maladies sont le plus souvent causées par la consommation d'aliments ou d'eaux contaminés et certaines peuvent se transmettre d'une personne à l'autre représentant ainsi un fardeau significatif parmi l'ensemble des maladies infectieuses. Notre microbiote intestinal est composé de plus de 100 000 milliards (10^{14}) de micro-organismes (bactéries, virus), soit 10 fois plus que le nombre de cellules qui nous composent. (Rahmouni et al, 2016). Ces micro-organismes contribuent au bon fonctionnement de l'organisme et sont associés à diverses fonctions clés comme la fonction digestive et immunitaire. Cependant, parfois, des micro-organismes pathogènes, comme *Salmonella*, *E. Coli* ou *Shigella*, peuvent venir coloniser ce système pourtant très sélectif (beaucoup de flores endogènes en plus du pH acide de l'estomac qu'il faut passer). L'OMS estime qu'approximativement 1,9 million de personnes sont victimes de ces maladies, dans le monde, chaque année et environ 1/3 de ces infections sont transmises par l'eau et la nourriture. Cependant, les pays en développement sont plus touchés que les pays développés, où les conditions d'hygiène sont moins propices au développement bactérien.

Parmi les micro-organismes impliqués dans ces maladies, on retrouve *E. coli* entérotoxigénique avec 241 millions de cas, *Shigella spp* pour 190 millions, *Giardia spp* dans 183 millions des cas et *Salmonella spp* avec 180 millions de cas. Cependant, un nombre important de décès (41 % de toutes les morts associées à une maladie diarrhéique dans le monde) peut être attribué à *Salmonella spp* (Besser, 2018). Dans cette thèse nous nous intéressons particulièrement aux *Shigella spp*, *Salmonella spp* et *E. coli*.

I.2.2.2. Epidémiologie et physiopathologie

Les shigelloses sont des maladies du péril fécal, présentent dans tous les pays à bas niveau d'hygiène. Elles sont très contagieuses : un très faible inoculum (10 à 200 micro-organismes) suffit pour entraîner une infection. Le réservoir est principalement humain et transmission interhumaine le plus souvent directe parfois indirecte par une alimentation souillée par les agents infectieux dont le plus virulent au Cameroun est *Shigella flexneri*,

responsable d'épidémies avec un taux de létalité de 5 à 15 % (Besser, 2018). Les shigelles produisent une toxine responsable de l'invasion de la muqueuse colique, à l'origine du syndrome dysentérique. L'invasion reste localisée à la muqueuse digestive ; les bactériémies sont possibles, mais rares. Quant aux salmonelloses, elles sont présentes tous les pays en développement (PED) à faible niveau d'hygiène avec, en 2010, dans le monde, un nombre de cas estimé à 26,9 millions de cas avec une incidence > 100 cas /100 000 dans les PED versus < 1 cas /100 000 dans les pays développés. La transmission peut être directe interhumaine, mais le plus souvent indirecte à partir d'aliments (ou d'eau) contaminés : coquillages, fruits de mer, légumes crus contaminés ; aliments manipulés par un porteur de bactéries. La seule espèce (99,5 % des cas) de salmonelle pathogène pour l'homme est *Salmonella enterica* : la fièvre typhoïde est due aux sérotypes *Typhi* (*S. Typhi*), et Paratyphi A, B, C. La mortalité est de l'ordre de 1 % si la maladie est bien traitée ; 10 à 25 % en l'absence de traitement antibiotique approprié. Après ingestion d'un inoculum de l'ordre de 10⁶ bactéries, les salmonelles franchissent la muqueuse digestive et vont se multiplier dans les macrophages des ganglions lymphatiques mésentériques avant d'essaimer dans le sang via le canal thoracique : phases d'incubation (7 à 21 jours) puis septicémiques d'invasion. L'acquisition d'une immunité T-dépendante va permettre l'activation des macrophages avec comme conséquences la négativation des hémocultures et la libération de l'endotoxine (LPS), correspondant à la phase d'état. Au cours de la phase septicémique, des germes peuvent ensemençer des foyers profonds à l'origine des « viscérotyphus » et des complications suppuratives tardives (ostéite, cholécystite...).

I.2.2.3. Traitements

La prise en charge de la plupart des maladies entériques se fait par l'antibiothérapie. Pour la dysenterie, le traitement est compliqué par l'émergence de souches multirésistantes, particulièrement de *S. flexneri* et *S. dysenteriae*. Ces espèces sont fréquemment résistantes à tous les antibiotiques dits de 1^{re} ligne (ampicilline, tétracycline, sulfaméthoxazole-triméthoprim), obligeant à l'usage d'antibiotiques comme fluoroquinolones, céphalosporines de 3^e génération ou azithromycine. La ciprofloxacine est en règle générale active vis-à-vis de *Shigella spp*, *Salmonella spp* et *E. coli*. La durée de traitement va de trois jours (formes modérées) à 15 jours (formes sévères). Les anti-diarrhéiques sont contre-indiqués en cas de dysenterie et fièvre typhoïde ; la réhydratation s'impose comme dans toute diarrhée. Toutefois, ces espèces bactériennes deviennent résistantes à la ciprofloxacine et autres fluoroquinolones, qui restent à ce jour les plus actives. Face à cette situation, la découverte de

nouveaux antibiotiques s'impose, et la nature est une fois de plus convoquée pour la mise au point de nouveaux médicaments naturels.

I.3. Revue de la littérature en relation avec la formulation et standardisation des phytomédicaments

Les médicaments à base de plantes sont très utilisés dans le monde pour la prise en charge thérapeutique. La reconnaissance de leur valeur pharmacologique, clinique, pharmaceutique et économique continue de croître, bien que cela varie fortement selon les pays et les contrôles législatifs relatifs aux plantes médicinales n'ont pas évolué autour d'un modèle de contrôle structuré. Les pays définissent de différentes manières les plantes médicinales ou les produits qui en sont tirés, et ils ont adopté plusieurs approches pour la préparation, la fabrication, l'octroi de licences et la commercialisation.

I.3.1. Généralité sur les phytomédicaments

L'utilisation des plantes médicinales pour les soins de santé primaires dans les pays africains est très répandue et répond à des exigences tant culturelles qu'économiques. Pour permettre une meilleure intégration de la médecine traditionnelle dans le système sanitaire de nos pays, il s'avère de plus en plus important de bien caractériser les médicaments dérivés de plantes sur le plan chimique, pharmacologique et toxicologique (Dotsé et al., 1997). Ces médicaments dérivés de plantes sont appelés des phytomédicaments, et définis à l'article premier de la directive de l'OMS (2002) des principes généraux de la médecine traditionnelle comme étant, « tout médicament dont les substances actives sont exclusivement une ou plusieurs substances végétales ou préparation à base de plantes ou une association d'une ou de plusieurs substances végétales ». Les substances végétales sont précisément définies par la partie de la plante utilisée et la dénomination botanique (genre, espèce, variété et auteur) ». Les préparations à base de plantes comprennent « les préparations obtenues par traitement de substances végétales » et se présentent en extraits, teintures, huiles grasses ou essentielles, fragments de plantes, poudres pulvérisées, les jus et sucs obtenus par pression... Leur production met en œuvre des opérations d'extraction, de concentration, de distillation, de fermentation, de fractionnement ou de purification (Lehmann, 2013). Cependant, les constituants isolés et caractérisés ne sont pas considérés comme des phytomédicaments. Des substances telles que des solvants, des diluants, des conservateurs peuvent entrer dans la composition des préparations à base de plantes mais, la présence de ces substances doit être indiquée. A noter qu'il existe différents types d'extraits selon leur consistance (liquide, semi-solide ou solide), ces extraits sont parfois incorporés à des supports pour en faire des

médicaments qui se conservent sur la durée. Le défi actuel réside dans la reproductibilité de ces préparations et la détermination de la dose thérapeutique (Chabrier, 2010). En effet, la production de Phytomédicaments éthiques semble être une étape indispensable dans les pays en développement et particulièrement ceux d’Afrique pour assurer une meilleure couverture sanitaire de la population. Toutefois, la posologie imprécise les connaissances difficiles des effets secondaires, augmentent le risque d’empoisonnement ; le manque des textes légaux bien définis pour la compréhension du fonctionnement de l’exercice de cette médecine en fait le principal inconvénient. Le contrôle de qualité des produits dérivés de plantes est donc une exigence avant leur mise sur le marché comme médicaments. Ce contrôle de qualité et la standardisation sont donc un nouveau défi pour les scientifiques des pays concernés.

I.3.2. Standardisation et normalisation des phytomédicaments

Les phytomédicaments sont parfois des préparations de mélanges complexes regroupant de nombreux constituants. Ainsi, selon le lot de matières premières et les modalités de fabrication de l’extrait (nature du solvant, proportions, durée et température d’extraction...), il est presque impossible d’obtenir des extraits de composition totalement similaire en dépit de l’utilisation de drogues présentant des teneurs initiales identiques en principes actifs ainsi que des procédés de fabrication précis (Chabrier, 2010). Lorsque des phytomédicaments sont commercialisés sous une forme galénique et présentés comme ayant des propriétés curatives ou préventives à l’égard des maladies humaines, alors ils peuvent répondre à la définition du médicament traditionnel amélioré (MTA) (Chabrier, 2010). Elles doivent alors se plier à certains critères de qualité, d’innocuité et d’intérêts thérapeutiques parfaitement définis (Lehmann, 2013). Ceux-ci doivent être établis en vue du dossier de demande d’autorisation de mise sur le marché (AMM). Au Cameroun, c’est le MINSANTE qui, après vérification des exigences, donne son accord pour la mise en vente ultérieure du produit. Afin de satisfaire à toutes ces requêtes et pour éviter toute dérive sur la qualité, l’efficacité et les indications thérapeutiques, une réglementation visant à normaliser l’usage des plantes médicinales et des préparations à base de plantes comme médicament est généralement établie dans les pays développés. Au Cameroun, les textes ne sont pas bien définis et cette réglementation (procédures à suivre, normes de fabrication à respecter, contrôles devant être effectués...) peine à voir le jour.

I.3.2.1. La standardisation

Elle consiste à garantir une qualité pharmaceutique et pharmacologique constante pour un phytomédicament. Standardiser consiste donc à uniformiser les procédures de qualité à

toutes les étapes de fabrication depuis la collecte et le séchage du matériel végétal de départ jusqu'à l'extrait, afin d'aboutir à un standard spécifique. Tous les paramètres influant sur la qualité du produit (extrait, produit formulé sous une forme galénique bien précise) doivent être définis et respectés (Chabrier, 2010). Concernent la plante (son origine, ses procédés de culture, la partie de la plante, son identité, sa pureté, sa teneur en eau), la nature et la quantification de certains constituants chimiques majoritaires, ainsi que le procédé de fabrication (macération/percolation/infusion, température, durée, pression lors de la fabrication, procédé de séchage, contrôle en cours de fabrication) doivent être bien définis dans une monographie (Lehmann, 2013).

I.3.2.2. La normalisation

Si l'ensemble des constituants participant à l'activité thérapeutique est connu, la standardisation peut être renforcée d'une normalisation. Normaliser consiste à créer une norme. Dans le cas d'une drogue ou d'un extrait, il faut préciser à la fois une teneur minimale et une teneur maximale rapportée à la substance ou à un groupe de substances, déterminant pour l'activité pharmacologique. L'étiquetage d'un tel phytomédicament doit se présenter également de manière à indiquer des informations précises quant aux principes actifs.

I.3.3. Classification des phytomédicaments en Afrique

Les phytomédicaments disponibles sur le marché africain varient énormément, depuis les matières premières améliorées à base de plantes et bien conditionnées jusqu'aux produits importés à base de plantes médicinales. Il est difficile d'homologuer tous les phytomédicaments dans la région africaine sans une classification appropriée. Mais, depuis 2001, un comité régional d'experts de l'OMS-Afrique (OMS/AFRO) sur la médecine traditionnelle a établi une classification en quatre catégories des médicaments à base de plantes. La classification est fondée sur le mode de préparation, l'indication et le degré d'innovation du phytomédicament en comparaison au médicament traditionnellement utilisé. En effet, les approches de recherche doivent faire la différence entre les médicaments à base de plantes ayant une longue expérience documentée et celles dont l'utilisation « traditionnelle n'a pas encore été établie. Conformément aux Lignes directrices concernant l'évaluation des médicaments à base de plantes de l'OMS (WHO/TRM/91.4), la règle générale de recherche est qu'il faut tenir compte de l'expérience traditionnelle de la préparation concernée qui comprend l'utilisation à long terme ainsi que le contexte historico-médical et ethnopharmacologique.

I.3.3.1. Phytomédicaments de la catégorie 1

Le médicament est préparé par le tradipraticien de santé pour un patient et répond aux caractéristiques suivantes :

- Il est préparé de manière extemporanée
- Il est préparé suivant les méthodes traditionnelles de fabrication ;
- Son innocuité et son efficacité sont garanties par la longue expérience de son utilisation (plus de 3 générations) ;
- Les matières premières sont bien connues du tradipraticien et peuvent être fraîches ou sèches ;
- Sa conservation est généralement de courte durée ;

I.3.3.2. Phytomédicaments de la catégorie 2

Ce phytomédicament est issu de la pharmacopée traditionnelle et est couramment utilisé dans la communauté. C'est un médicament traditionnel amélioré qui répond aux caractéristiques suivantes :

- Il est préparé à l'avance, conditionné avec un numéro de lot ;
- Les matières premières entrant dans sa composition sont très bien connues ;
- Sa fabrication est réalisée suivant des méthodes qui garantissent sa stabilité et sa standardisation, sa production est semi-industrielle ;
- Son innocuité et son efficacité sont garanties par l'évidence ethnomédicale d'une longue expérience d'utilisation ou par des essais cliniques ouverts si cela est jugé nécessaire par l'autorité compétente ;
- Les principes actifs qui le composent sont des matières premières brutes, les principaux groupes chimiques des matières premières sont connus, la durée de sa conservation est fixée par des essais de stabilité.

I.3.3.3. Phytomédicaments de la catégorie 3

Ce phytomédicament est issu des instituts de recherche et répond aux caractéristiques suivantes :

- Il est préparé à l'avance, conditionné avec un numéro de lot ;
- Sa production est semi-industrielle ou industrielle et la durée de sa conservation est fixée par des essais de stabilité ;
- Les principes actifs sont des fractions ou des extraits standardisés ;
- Il prend en considération les propriétés biologiques des matières premières, de nouvelles indications thérapeutiques, une formulation galénique avec une spécification

- du dosage, une connaissance des molécules biologiquement actives ;
- Il est produit suivant les normes de bonnes pratiques de fabrication ;
- Son efficacité et son innocuité sont prouvées par des essais précliniques et observations cliniques conduits suivant les protocoles standards.

I.3.3.4. Phytomédicaments de la catégorie 4

Ce phytomédicament est issu des instituts de recherche et répond aux caractéristiques suivantes :

- Il est préparé à l'avance, conditionné avec un Numéro de lot ;
- Sa production est semi-industrielle ou industrielle ;
- La durée de sa conservation est fixée par des essais de stabilité ;
- Les principes actifs sont des molécules semi-purifiées et quantifiées ;
- Il prend en considération les propriétés biologiques des matières premières, de nouvelles indications thérapeutiques, une formulation galénique avec une spécification du dosage, une connaissance des molécules biologiquement actives ; il est standardisé et produit suivant les normes de bonnes pratiques de fabrication ;
- Son efficacité et son innocuité sont prouvées par des essais précliniques et cliniques conduits suivant les protocoles standards.

I.3.4. Les lignes directrices de l'OMS relatives à l'élaboration de phytomédicaments standardisés

Une consultation de l'OMS tenue à Munich (Allemagne) en juin 1991 a élaboré des lignes directrices concernant la fabrication des phytomédicaments standardisés. Ces lignes directrices (WHO/TRM/91.4) définissent les critères de base de l'évaluation de la qualité pharmaceutique, l'innocuité et de l'efficacité thérapeutique des phytomédicaments afin d'aider les autorités nationales de réglementation, les organisations scientifiques et les fabricants à évaluer la documentation, les soumissions et/ou les dossiers relatifs à ces produits. Une règle générale de cette évaluation est qu'il faut tenir compte de l'expérience traditionnelle acquise dans l'utilisation de ces produits et de leur contexte médical historique (Campos, 2003). Cette évaluation porte sur les différents aspects suivants: Données bibliographiques ou monographies, qualité pharmaceutique, sécurité d'utilisation (innocuité et tolérance biologique) et efficacité thérapeutique (OMS, 1998).

I.3.4.1. Données des enquêtes ethnobotaniques et ethnopharmacologiques : Monographie

Il faut rédiger les données des enquêtes auprès des acteurs de la médecine traditionnelle sur les usages thérapeutiques traditionnels. Une étude de la littérature sur les

plantes et drogues végétales devra être effectuée et des copies d'articles originaux ou des références de ces articles doivent être bien répertoriées.

I.3.4.2. Qualité pharmaceutique

L'assurance d'une constance de qualité d'un phytomédicament ne peut être obtenue que si cette qualité se trouve préalablement définie au niveau de la matière première de manière rigoureuse et approfondie notamment au plan botanique. Il importe également de connaître parfaitement les conditions d'obtention de la plante, ces facteurs étant déterminants pour assurer un suivi de la standardisation (OMS, 2001). Les conditions de récolte affectent la qualité du produit fini dans la mesure où la composition qualitative et quantitative peut se trouver affectée au cours des opérations effectuées (OMS, 2001). Quant à l'étude biologique, elle va consister à identifier, évaluer et si possible doser divers constituants et paramètres à partir desquels le produit sera défini et qui serviront de références pour les contrôles qualité de routine. Cette étude permettra de définir le profil chimique type du phytomédicament encore appelé « empreinte digitale » (Bony, 2019).

I.3.4.3. Formes galéniques et stabilité du phytomédicament

La bonne connaissance de ces formes est de première importance, car en phytothérapie, il ne suffit pas de choisir une ou des plantes adaptées à une maladie, mais aussi la meilleure forme d'utilisation en fonction de l'effet attendu. Chaque phytomédicament possédera une forme galénique préférentielle pour une affection donnée et pour un niveau d'activité donnée (symptomatique, drainage, rééquilibrage énergétique...) (Bony, 2019). Une technique de fabrication appropriée et le procédé de standardisation successif garantissent un produit final de haute qualité, reproductible et contenant toujours la même quantité de principes actifs, reproduisant les mêmes caractéristiques physiques et chimiques pour chaque lot de produit. La standardisation est le seul moyen pour que chaque dose individuelle d'un phytomédicament fournisse ponctuellement le même degré connu et garanti d'activité et d'efficacité (Bony, 2004). Pour les plantes très utilisées en médecine traditionnelle, c'est la façon dont la plante est utilisée dans la tradition qui guide le chercheur sur le choix des méthodes de fabrication ou de préparation. Dans le cas contraire, il est alors important de réaliser et documenter des études de stabilité. Ces études de stabilité permettent de maîtriser la variabilité de la qualité du phytomédicament sous l'action du temps et d'agents extérieurs (OMS, 2001). Les études de stabilité sont réalisées dans des conditions de dégradation forcée et aussi en temps réel dans des conditions normales de conservation. Ces essais portant sur

trois lots au minimum doivent prendre en compte les aspects suivants : stabilité des principes actifs, stabilité des caractéristiques essentielles conditionnements et organoleptiques.

I.3.4.4. Profil d'innocuité et sécurité d'utilisation

Cette évaluation doit couvrir tous les aspects relatifs à la sécurité d'utilisation du produit (son innocuité et sa tolérance biologique). L'étude de la littérature et l'examen de la documentation attestant une utilisation traditionnelle prolongée et apparemment inoffensive du médicament sont généralement la preuve de son innocuité. On précisera la durée d'utilisation, la nature des troubles traités, le nombre d'utilisateurs et les pays ayant une expérience du produit (Flahaut, 2002). Si une utilisation traditionnelle prolongée ne peut être attestée ou s'il subsiste des doutes quant à la sécurité du produit, des études toxicopharmacologiques et des observations cliniques devront être effectuées. Classiquement, la première étape dans la recherche de phytomédicament à partir des plantes déjà très utilisées en médecine traditionnelle débute par l'étude de la toxicité et en particulier par l'évaluation de la dose létale 50 (DL₅₀) dans un essai de toxicité aiguë (Lehmann, 2013). Il faut réaliser aussi une étude de la toxicité par administration répétée jusqu'à trois mois (toxicité subaiguë) et la toxicité chronique (au-delà de trois mois) chez ces mêmes animaux pour des plantes utilisées sur moins de 3 décennies (OMS, 2001). L'élaboration de phytomédicaments est régie par l'OMS (le schéma 4 en donne un aperçu synoptique), mais leur mise sur le marché dépend de la législation en vigueur dans chaque pays.

Au Cameroun, les textes d'homologations de phytomédicaments sont assez rares et peu structurés. Néanmoins, le décret N°98-405/PM du 22 octobre 1998 fixant les modalités d'homologation et de mise sur le marché des produits pharmaceutiques signée par le 1^{er} ministre en donne quelques précisions en son chapitre 2.

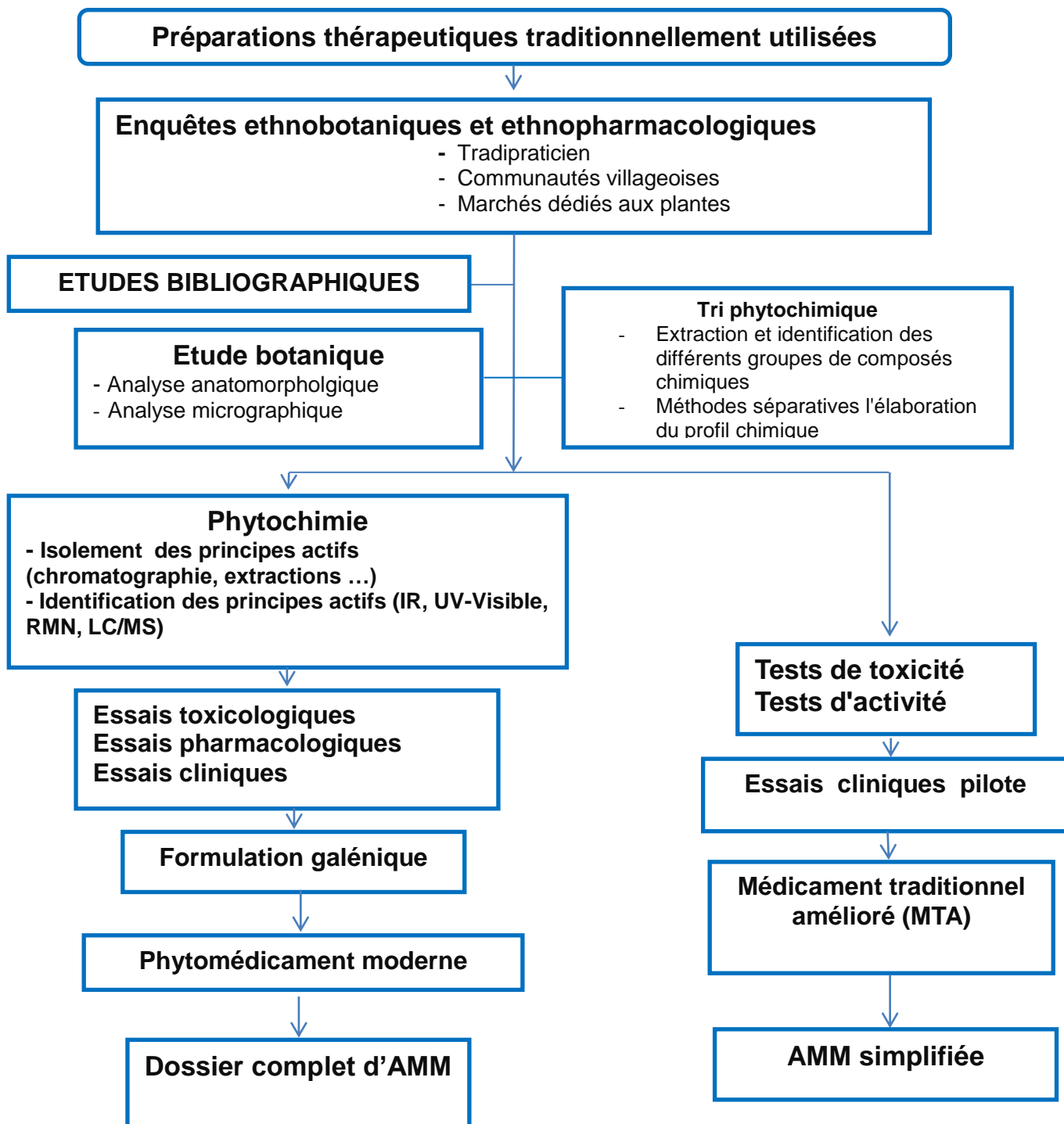


Schéma 4: Elaboration d'un médicament à partir de plantes

Dans la section suivante, nous présentons les résultats issus de nos travaux de recherche, portant sur l'étude chimique guidée par UPLC-DAD-MS et l'activité biologique de *Vernonia guineensis* Benth (Asteraceae), une plante médicinale camerounaise très utilisée en médecine traditionnelle pour soigner a dysenterie et plusieurs parasitoses.

*PARTIE II : RESULTATS ET
DISCUSSION*

II.1. Extraction et fractionnement des parties aériennes et racines de *V. guineensis*

II.1.1. Etude des parties aériennes de *V. guineensis*

L'étude chimique des parties aériennes de *V. guineensis* a été réalisée sur la base d'une méthodologie bioguidée dans l'optique de rechercher les constituants antileishmaniales. En effet, le matériel végétal a été séché à l'abri de la lumière du soleil à la température ambiante du laboratoire et réduit en poudre. Plusieurs types d'extractions avec différents systèmes de solvants ont été réalisés sur 100 g de matériel végétal. Cela incluait une infusion pendant 15 minutes dans de l'eau portée à 85°C et la macération pendant 72 h dans cinq systèmes de solvants [*n*-hexane, AcOEt, CH₂Cl₂/MeOH (1:1), EtOH/H₂O (7:3) et CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1)]. Le tableau 13 donne les rendements d'extraction, l'activité antileishmaniale et l'indice de sélectivité des différents extraits obtenus.

Tableau 13: Rendement d'extraction et activité antileishmaniale des extraits bruts issus des parties aériennes de *V. guineensis*

| Extrait | Rendement | Activité antileishmaniale CI ₅₀ (µg/mL) ± SD | Activité cytotoxique CC ₅₀ (µg/mL) ± SD | Indice de sélectivité |
|-----------------|--------------------------------------|--|---|------------------------------------|
| | m _{extrait} /m ₀ | <i>L. donovani</i> | Vero cell line | CC ₅₀ /CI ₅₀ |
| Extrait 1 | 0,6% | 45,77 ±0,04 | >100 | >2 |
| Extrait 2 | 1,2% | 9,19 ±0,19 | 9,24 ±0,20 | 1 |
| Extrait 3 | 2,2% | 5,17 ±0,06 | 16,23 ±4,14 | 3 |
| Extrait 4 | 3,4% | 0,33 ±0,07 | 15,76 ±4,36 | 48 |
| Extrait 5 | 4% | 50,20 ±0,28 | >100 | >2 |
| Extrait 6 | 1,8% | 15,68 ±0,03 | 70,47 ±6,35 | 4 |
| Amphotéricine B | | 0,33 ± 0,21 | | |

CI₅₀<10 µg/mL=très bonne activité ; 10 µg/mL<CI₅₀<50 µg/mL=bonne activité ; 50 µg/mL<CI₅₀<100 µg/mL=activité modérée, **Extrait 1** (solvant = *n*-hexane), **Extrait 2** (solvant = EtOAc), **Extrait 3** (solvant = CH₂Cl₂/MeOH (1:1)), **Extrait 4** (solvant = CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1)), **Extrait 5** (solvant = EtOH/H₂O (7:3)), **Extrait 6** (Infusion H₂O à 85°C), Amphotéricine B =contrôle positif test antileishmanial.

L'extrait obtenu par macération dans le système de solvant CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1) s'est révélé être le plus actif sur les promastigotes de *L. donovani* avec une valeur de CI₅₀=0,33 µg/mL comparable au contrôle positif. Fort de ce résultat, une extraction à grande échelle a été réalisée avec ce système de solvant sur 4 000 g de matériel végétal pour 280,2 g d'extrait brut obtenu. Une partie d'extrait (170,2 g) a été traitée par chromatographie sur colonne de gel de silice. Sur la base d'une CCM analytique, les fractions obtenues ont été regroupées en sept (07) séries ou fractions principales "indexées de F1 à F7". Chaque série a été soumise à une évaluation de l'activité antileishmaniale, afin d'orienter sur le choix des fractions à étudier préférentiellement. Les résultats sont consignés dans le tableau 37 présenté dans la partie dédiée à la discussion des résultats d'activités biologiques. Parmi ces séries,

deux d'entre elles (F3 et F4), ont démontré une activité antileishmaniale prometteuse avec des valeurs de $CI_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$. De ces deux séries, huit (08) composés ont été isolés et évalués pour leurs activités antileishmaniale, antioxydante, antibactérienne et cytotoxique (tableau 37, 38 et 39). Les autres fractions ont été également purifiées sur la base de leurs profils LC/MS dans le but d'étendre la connaissance chimiotaxonomique de *V. guineensis*. De ces fractions, 12 composés ont été isolés, caractérisés et mis en relation par des liens biogénétiques (schéma 16). Les structures de tous les composés ont été établies par l'analyse de leurs données spectroscopiques et spectrométriques, suivie d'une comparaison avec les données de la littérature.

II.1.2. Etude des racines de *V. guineensis*

L'étude chimique des racines de *V. guineensis* a été réalisée sur la base d'une méthodologie guidée par l'analyse UPLC-DAD-MS dans pour rechercher les composés non encore isolés du genre *Vernonia* puis vérifier s'ils sont responsables des propriétés de *V. guineensis* contre la dysenterie et la typhoïde. En effet, les racines de *V. guineensis*, ont été très étudiées sur le plan chimique et pharmacologique (Scifinder fait référence à plus de 81 publications en date du 10 mai 2020). Mais aucune de ces études n'a rapporté les activités contre la dysenterie et la typhoïde sur les composés isolés de cette plante. A partir de ces données de la littérature, nous avons postulé en hypothèse que les racines de cette plante possèdent des composés minoritaires non encore isolés pouvant démontrer ces activités. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait usage de la technique UPLC-DAD-MS qui est très sensible et permet de détecter les composés minoritaires d'un mélange complexe (détection des composés de concentration $< 1 \mu\text{g/mL}$). En somme, l'étude chimique des racines a abouti à l'isolement de 22 composés, incluant des anthraquinones, une classe de composés isolés du genre *Vernonia* pour la première fois. Les composés isolés ont été testés pour leur activité antibactérienne (voir section **II.3**) et leurs structures ont été établies par l'analyse de leurs données spectroscopiques, spectrométriques et quelques transformations chimiques, suivies d'une comparaison avec les données de la littérature (voir section **II.2**).

II.2. Caractérisation des composés isolés

II.2.1. Caractérisation des céramides

II.2.1.1. Elucidation structurale du composé RVgF75 (73)

Le composé **RVgF75** a été isolé des racines de *V. guineensis* et se présente sous forme de poudre amorphe blanche soluble dans le DMSO. Sa formule moléculaire brute $C_{43}H_{85}NO_5$ a été établie à partir du pic d'un ion pseudo-moléculaire observé sur son spectre de masse ESI à haute résolution en mode positif à m/z 696,6502 ($[M + H]^+$; $C_{43}H_{86}NO_5$; calc. 696,6501; $\Delta=0,2$ ppm), renfermant deux (02) degrés d'insaturations (figure 6). Cette masse est confirmée par l'expérience FAB en mode négatif, où l'on observe le pic de l'anion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 694,6 (figure 7).

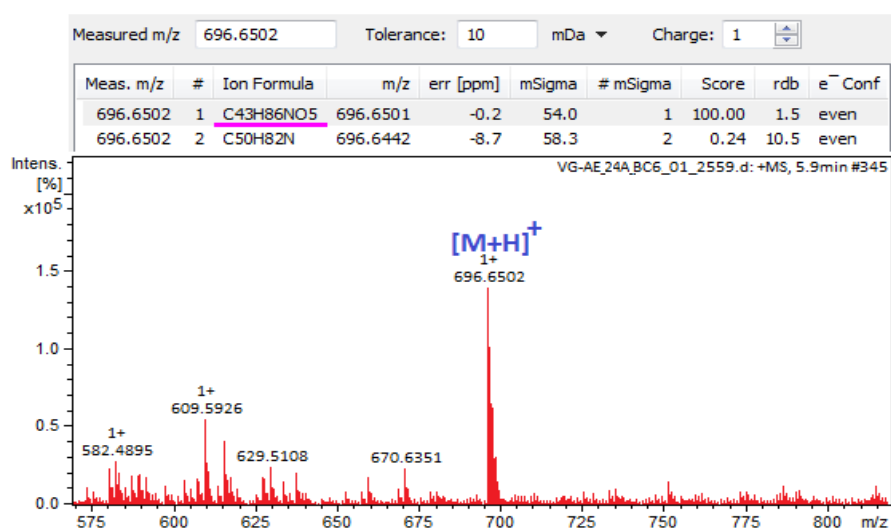


Figure 6 : Spectre de masse (+) —HRESI du composé **RVgF75**

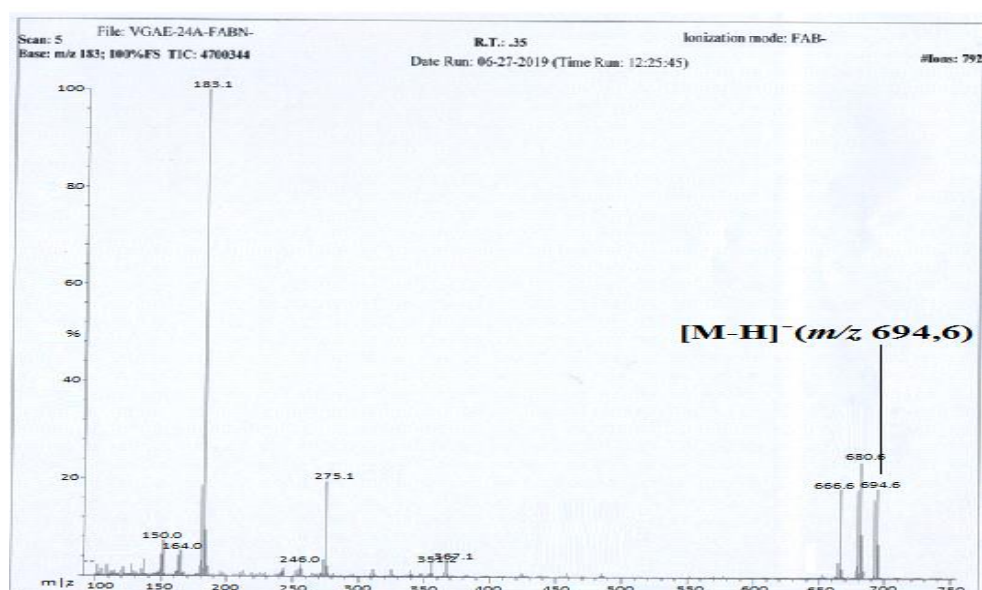


Figure 7 : Spectre de masse (–) FAB du composé **RVgF75**

Le spectre IR à transformée de Fourier (figure 8) de **RVgF75** montre des bandes de vibrations caractéristiques à des groupes hydroxyles à ν_{\max} 3329 cm^{-1} (OH), amine ν_{\max} 3219 cm^{-1} (N-H) et amide à ν_{\max} 1645 cm^{-1} (N-C=O) (Yue *et al.*, 2001)

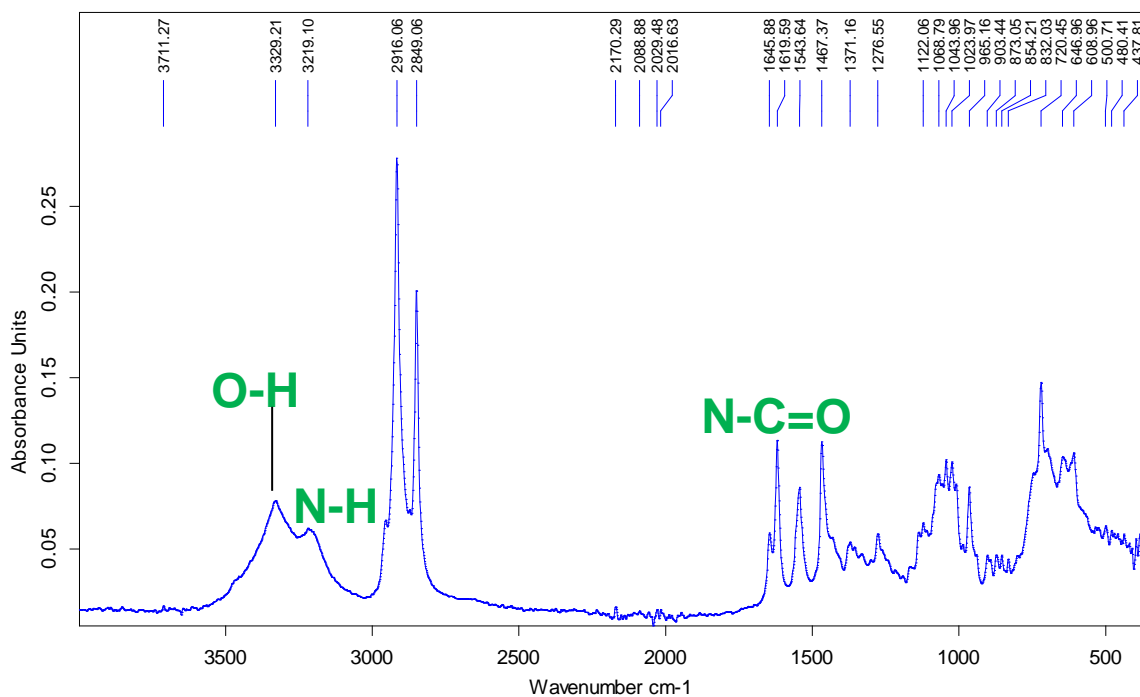


Figure 8 : Spectre IR (KBr) du composé **RVgF75**

L'analyse de son spectre de RMN ^1H (figure 9) indique la présence des signaux caractéristiques, dont :

- le signal d'un proton du groupe NH à δ_{H} 7,42 (d, $J = 8,9$),
- deux signaux sous forme de singulets larges raisonnants respectivement à δ_{H} 5,32 et 5,37 suggèrent la présence des protons oléfiniques dans la structure de **RVgF75**,
- un singulet large, centré à δ_{H} 1,23, attribuable à n ($-\text{CH}_2-$) des longues chaînes aliphatiques,
- un triplet intégrant pour six protons à δ_{H} 0,82 (t, $J = 6,9$) est caractéristique des méthyles terminaux suggérant la présence de deux chaînes aliphatiques,
- le signal de deux protons géminés à un hétéroatome respectivement à δ_{H} 3,64 (dd, $J = 10,7 ; 5,0$) et 3,56 (dd, $J = 10,7 ; 4,5$) est attribuable aux protons diastéréotopiques d'un oxyméthylène.

L'ensemble de ces informations plaide en faveur d'une céramide (Simo *et al.*, 2008). La présence du signal à δ_{C} 51,5 sur le spectre de RMN ^{13}C (figure 10) est caractéristique d'une liaison C–N confirme d'ailleurs cette hypothèse.

En outre, le spectre de RMN ^{13}C (figure 10) exhibe d'autres signaux caractéristiques tels que : les signaux de deux carbones oléfiniques à δ_{C} 130,1 et 130,3, d'un carbonyle

d'amide à δ_C 174,4 et un ensemble de pics dans l'intervalle 22,5–31,6 attribuable aux méthylènes des deux longues chaînes aliphatiques. De plus, l'interprétation combinée des données HMQC, DEPT 135, RMN 1H et ^{13}C révèle la présence des signaux de trois protons d'oxyméthines raisonnant respectivement à δ_H/δ_C 3,38/71,7 ; 3,40/75,3 et 3,86/71,8 caractéristiques d'une céramide dont la chaîne basique est une phytosphingosine (4) (Sandjo et Kuete, 2013).

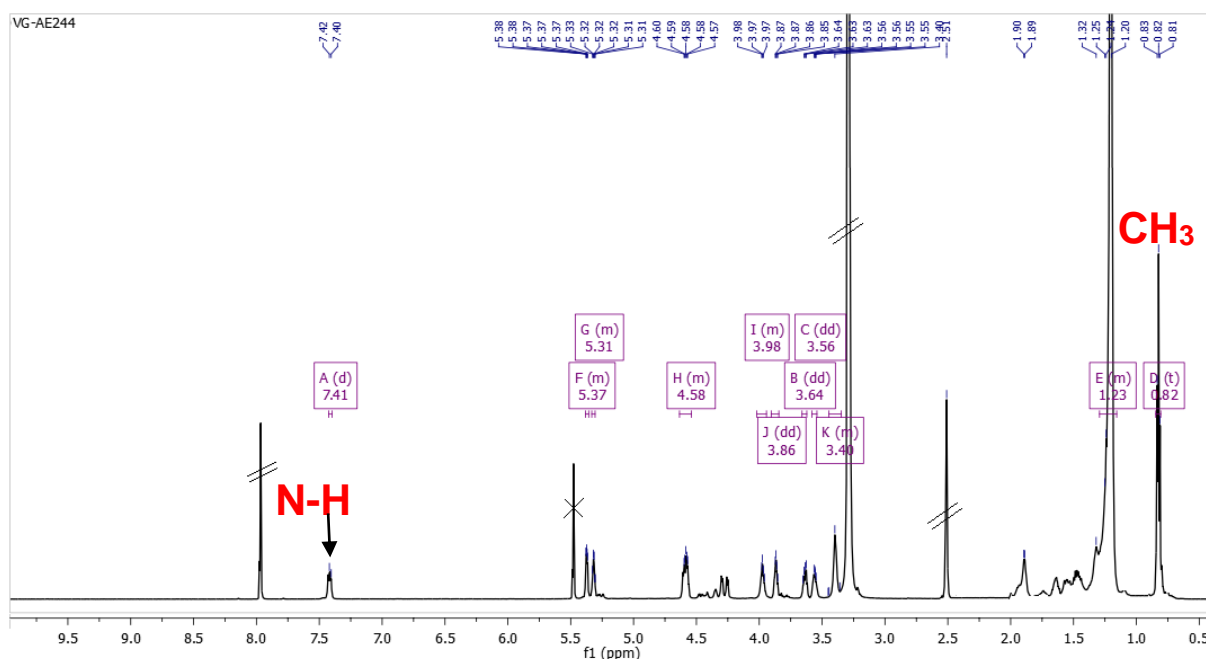


Figure 9 : Spectre de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD/(CD_3)_2SO$) du composé **RVgF75**

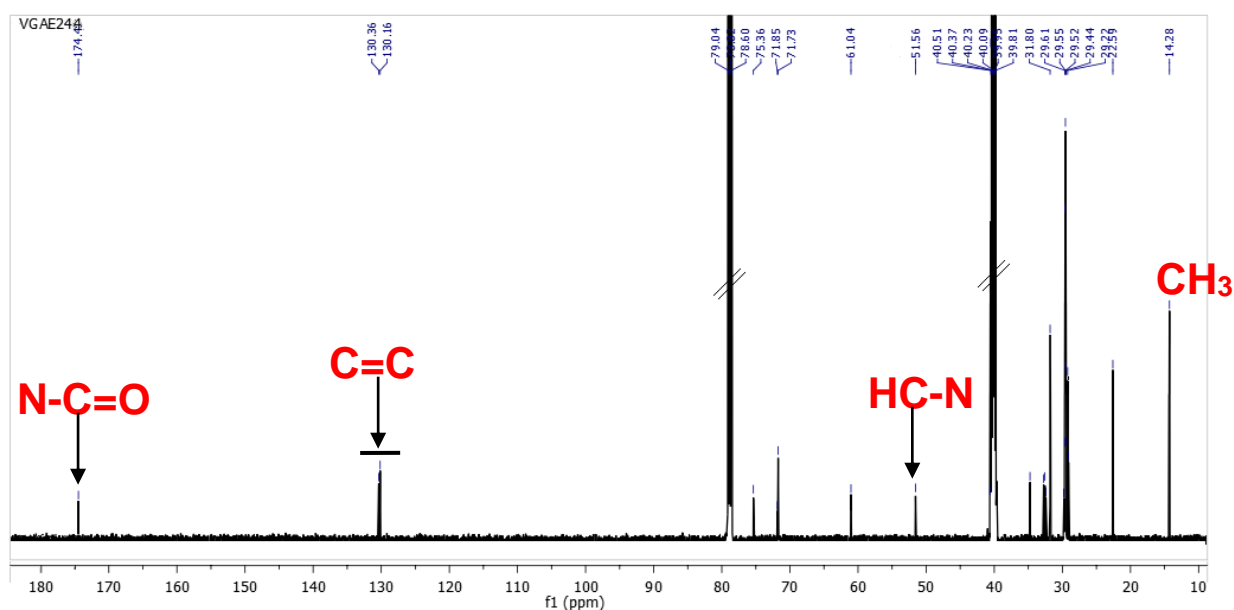


Figure 10 : Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/ (CD_3)_2SO$) du composé **RVgF75**

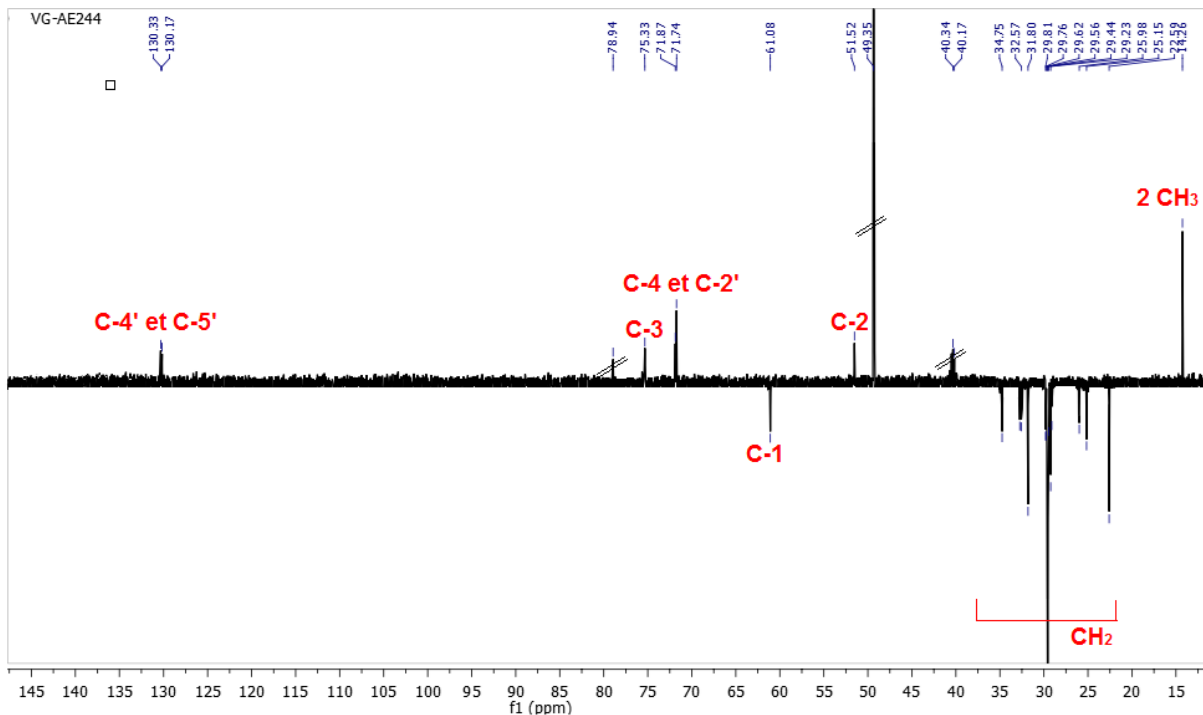


Figure 11 : Spectre DEPT 135 (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé **RVgF75**

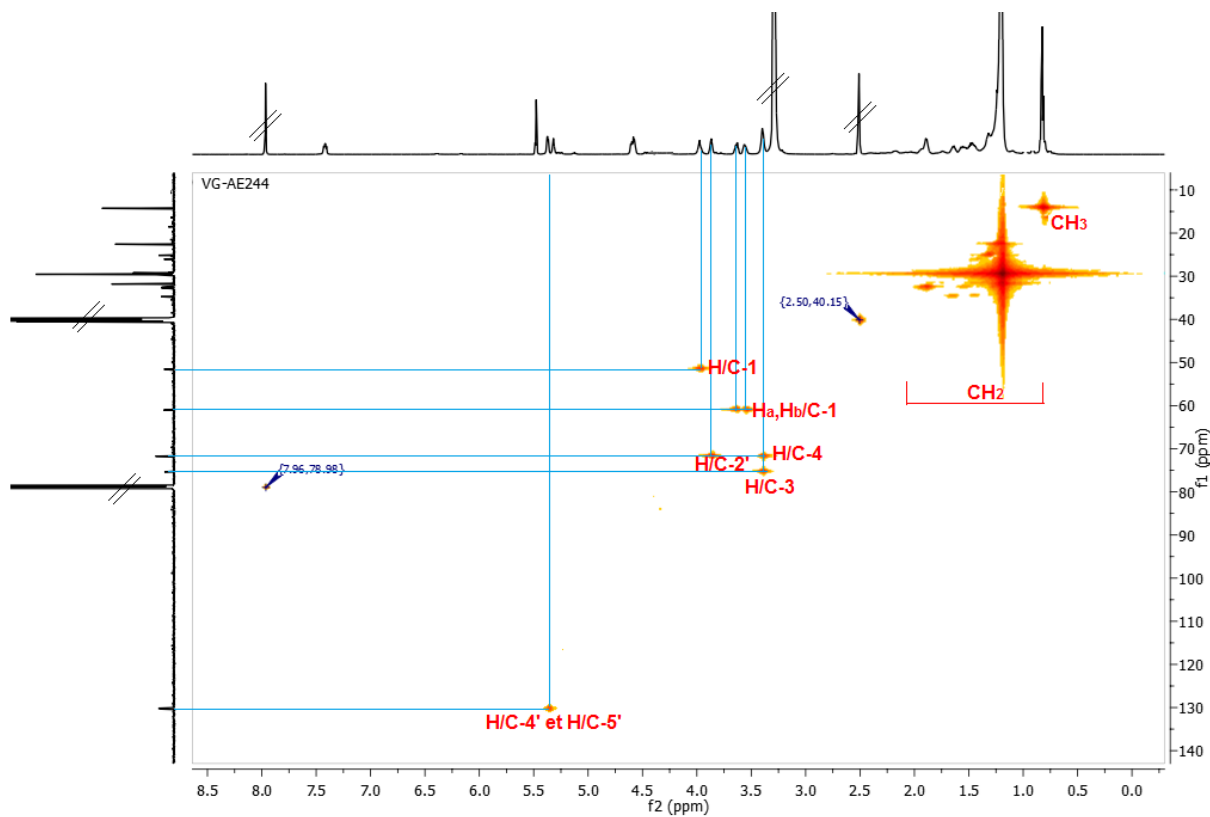


Figure 12 : Spectre HMQC du composé **RVgF75**

RVgF75 peut être considéré comme une céramide ayant une double liaison C=C de configuration *trans*. En effet, cette configuration a été établie sur la base des déplacements chimiques des atomes de carbones allyliques raisonnant respectivement à δ_C 34,7 et 32,5. Ces valeurs seraient inférieures à 29 ppm si la configuration était *cis* (Simo *et al.*, 2008.).

L'analyse du spectre de HMBC (figure 13) nous a permis de positionner l'un des groupes OH sur le carbone C-2' et de localiser la double liaison en positions 4'. En effet la localisation d'un groupement hydroxyle sur le carbone C-2' s'est faite grâce aux couplages 2J caractérisés par une tache de corrélation entre le proton du groupe oxyméthine δ_H 3,86 (dd, $J = 7,9 ; 4,1$) avec le carbonyle (δ_C 174,4). La présence des taches de corrélations entre le proton oléfinique H-C-4' (δ_H 5,32) avec le méthylène allylique (C-3' ; δ_C 34,7), l'oxyméthine (C-2' ; δ_C 71,8) et le carbonyle (C-1' ; δ_C 174,4), justifie la position de la double liaison C=C sur la longue chaîne d'acide gras en C-4'. D'autres corrélations HMBC ont été observées entre le proton de l'amide H-NCO (δ_H 7,42) et le carbonyle (C-1' ; δ_C 174,4), entre le proton de l'azométhine H-C-2 (HCN ; δ_H 3,97) avec le groupe carbinol (C-1 ; δ_C 61,0) et deux méthines oxygénés (C-3 ; δ_C 75,3 et C-4 ; δ_C 71,7), confirmant l'emplacement de deux autres groupements hydroxyles en C-3 et C-4.

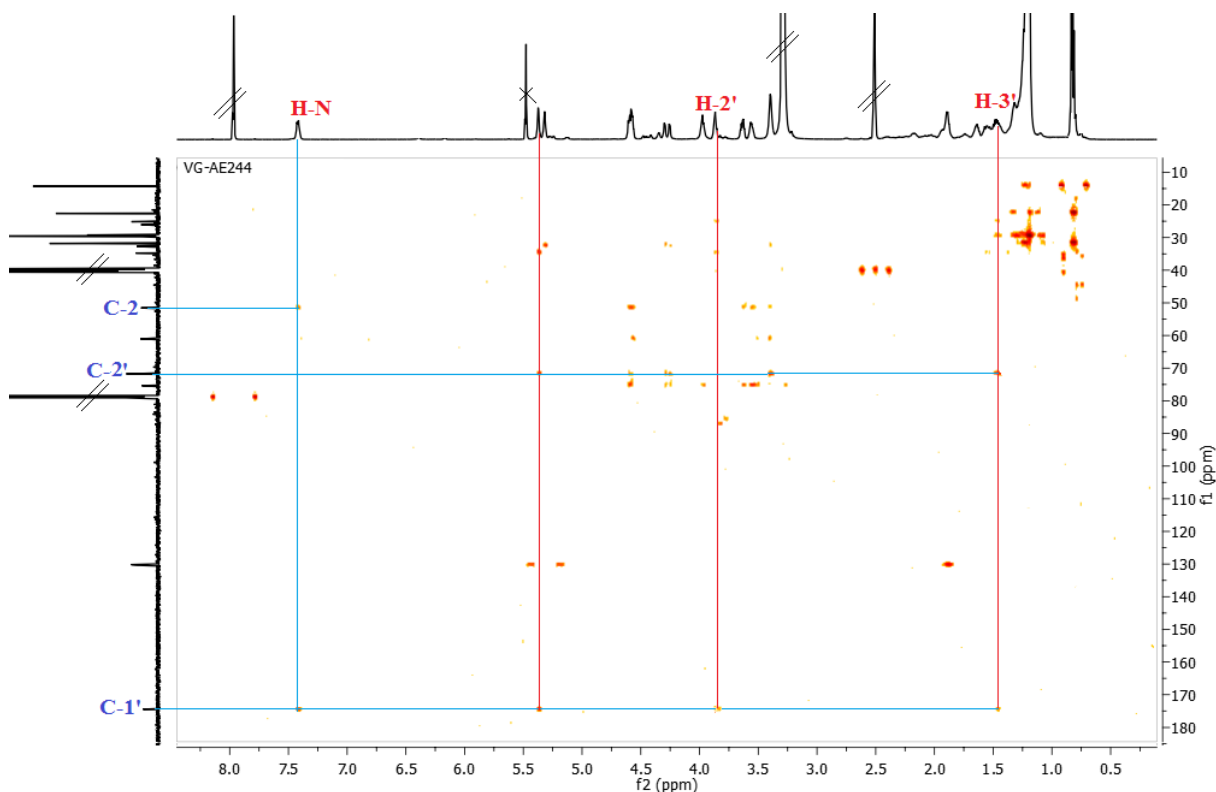


Figure 13 : Spectre HMBC du composé **RVgF75**

En plus du spectre de HMBC, le spectre COSY (figure 14) donne des informations qui renforcent les données permettant de positionner la double liaison. On observe notamment des

taches de corrélations formant deux carrés qui indique le couplage du proton H-3' à δ_H 1,64 (ddd, $J = 7,9 ; 10,8 ; 12,3$) avec les protons de l'oxyméthine H-2' à δ_H 3,86 (dd, $J = 4,1 ; 7,9$) et le proton oléfinique H-4' à δ_H 5,32 (m).

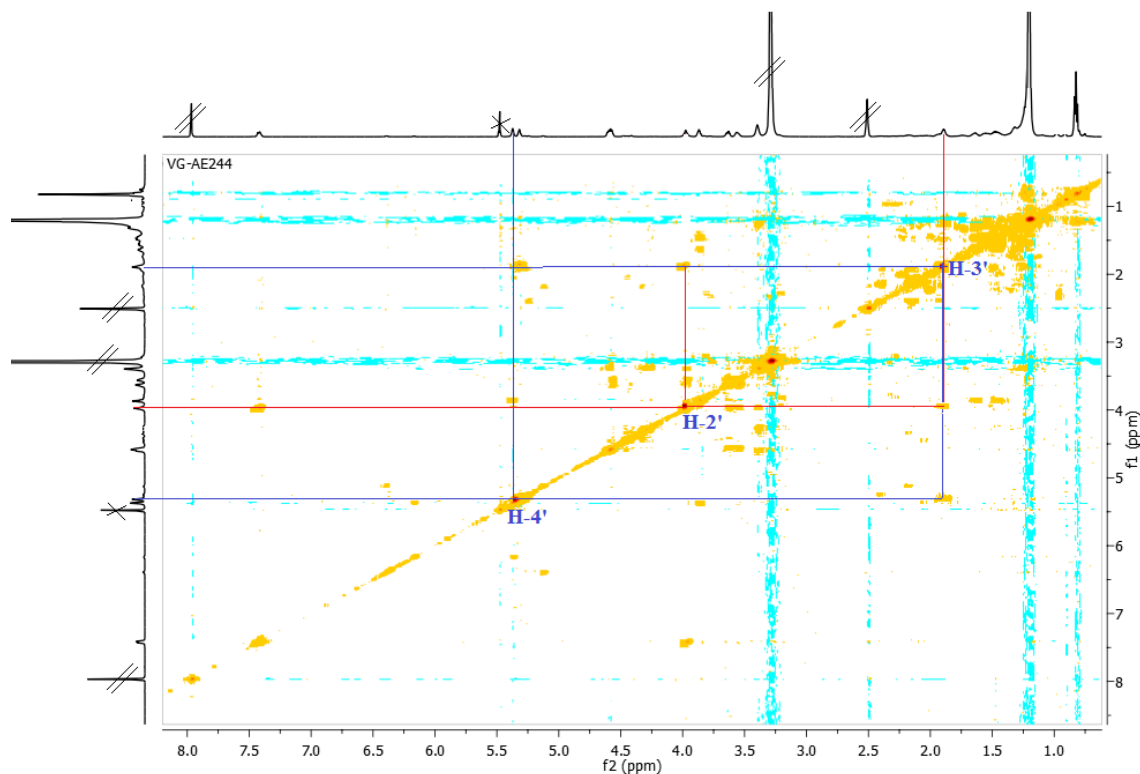


Figure 14 : Spectre COSY du composé **RVgF75**

Les données ainsi décrites nous ont permis d'attribuer sans ambages au composé **RVgF75**, la nature sphingolipidique et les configurations absolues autour des carbones C(2), C(3), C(4) et C(2') a été déterminée comme étant (*S*), (*S*), (*R*) et (*R*), respectivement, par comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C avec celles obtenues dans la littérature ([Simo et al., 2008](#)) et en considérant l'origine biosynthétique des céramides de type phytosphingosine. En effet, le composé **RVgF75** présente les signaux caractéristiques des céramides de type phytosphingosine dont la biogenèse favorise principalement la formation des acides gras avec un groupement hydroxyle en position 2 orienté en alpha, conférant donc au carbone C(2') la configuration (*R*) ([Ishii et al., 2006](#)).

Pour parachever cette caractérisation, la longueur de chaînes acide (LCA) et celle de la chaîne basique (LCB) ont été déterminées en effectuant la méthanolyse (0.9N HCl-MeOH/70°C/24h) de **RVgF75** (schéma 5). Cette réaction a conduit au mélange de l'ester méthylique d'acide gras et de la longue chaîne basique (amino-alcool). L'analyse par spectrométrie de masse en ionisation ESI, mode positif du milieu réactionnel extrait avec le

chloroforme a permis de détecter (figure 15) le pic de la longue chaîne basique à m/z 396,3(100%) correspondants à $[LCB+Na]^+$ identifié au 2-aminodocosan-1,3,4-triol et de déduire l'ester d'acide gras au 2-hydroxyhenicos-4-énoate de méthyle.

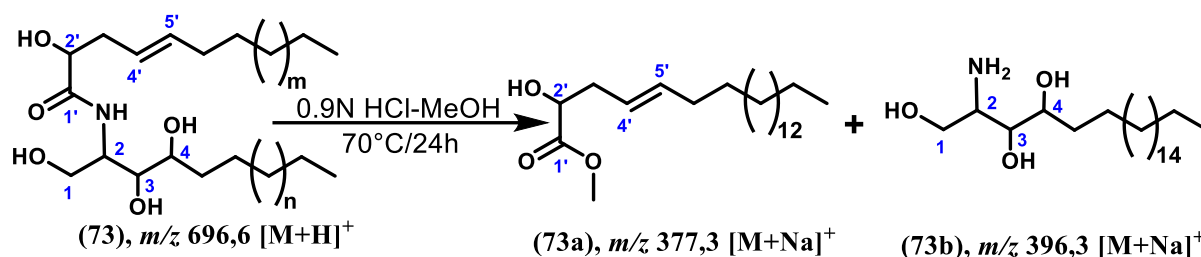


Schéma 5: Equation chimique traduisant la réaction de méthanolyse du composé **RVgF75**

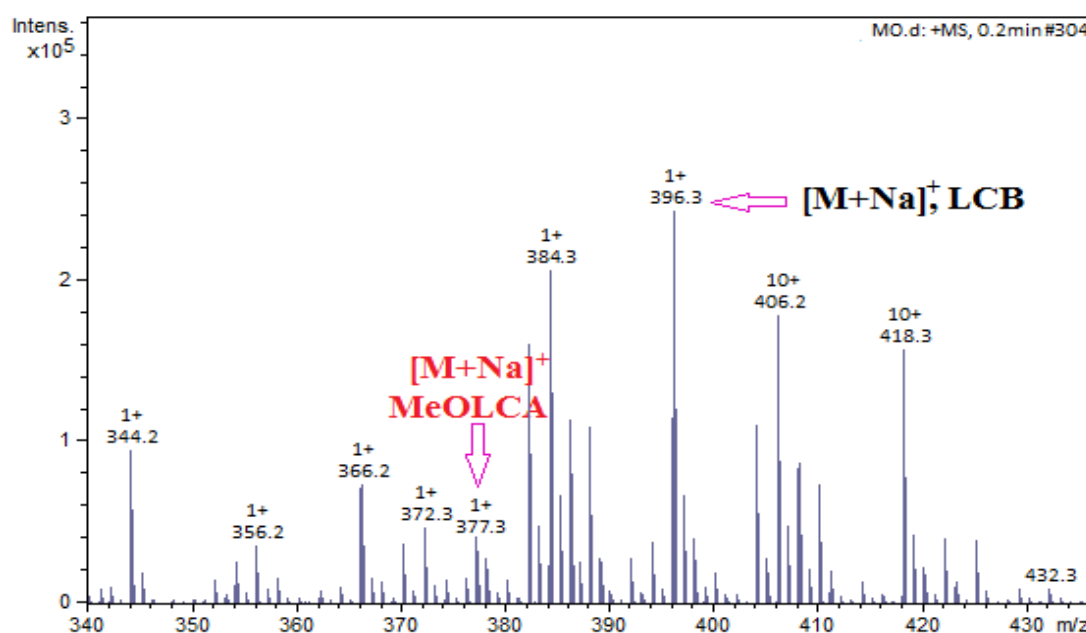
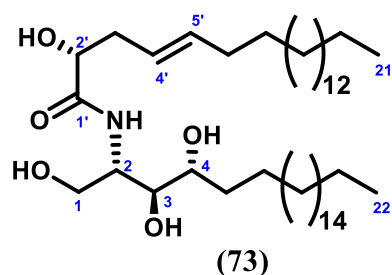


Figure 15 : Spectre de masse (+) ESI de la phase organique du milieu réactionnel issue de la méthanolyse du composé **RVgF75**

L'ensemble des données spectroscopiques et spectrométriques ont conduit à l'attribution sans ambiguïté de la structure (73) au composé **RVgF75** qui est celle de la (2'*R*, 4'*E*)-2-hydroxy-*N*-((2*S*, 3*S*, 4*R*)-1, 3, 4-trihydroxydocosan-yl) henicos-4-énamide, un dérivé nouveau que nous avons trivialement nommé vernoguinamide.



L'analyse du spectre de masse en Impact électronique (figure 16) a permis de confirmer à posteriori la structure de cette molécule. En effet, ce spectre exhibe des pics caractéristiques, dont le signal de l'ion le plus abondant (pic de base) à m/z 339 (100%), attribuable au fragment d'amide ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{OH})-\text{CONH}_2$), ce qui confirme la longueur de la chaîne du fragment acide. Outre le signal le plus intense, le pic à m/z 281 (25%) est attribuable au fragment ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{CO}$) obtenu par application du mécanisme de fragmentation des céramides proposé par Hsu et Turk (2001) (Schéma 6) et confirme ainsi la longueur de la chaîne basique et de la chaîne acide.

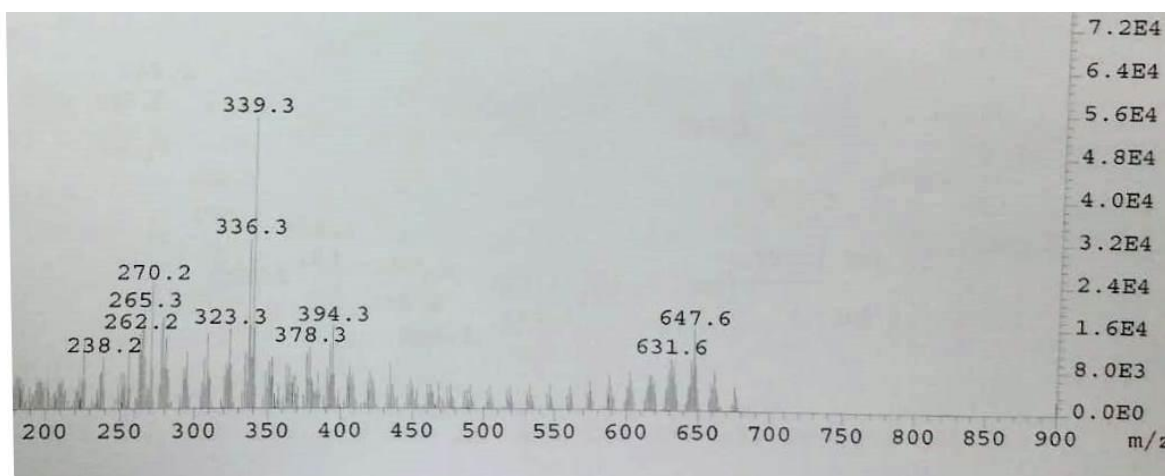


Figure 16 : Spectre de masse (+) IE du composé **RVgF75**

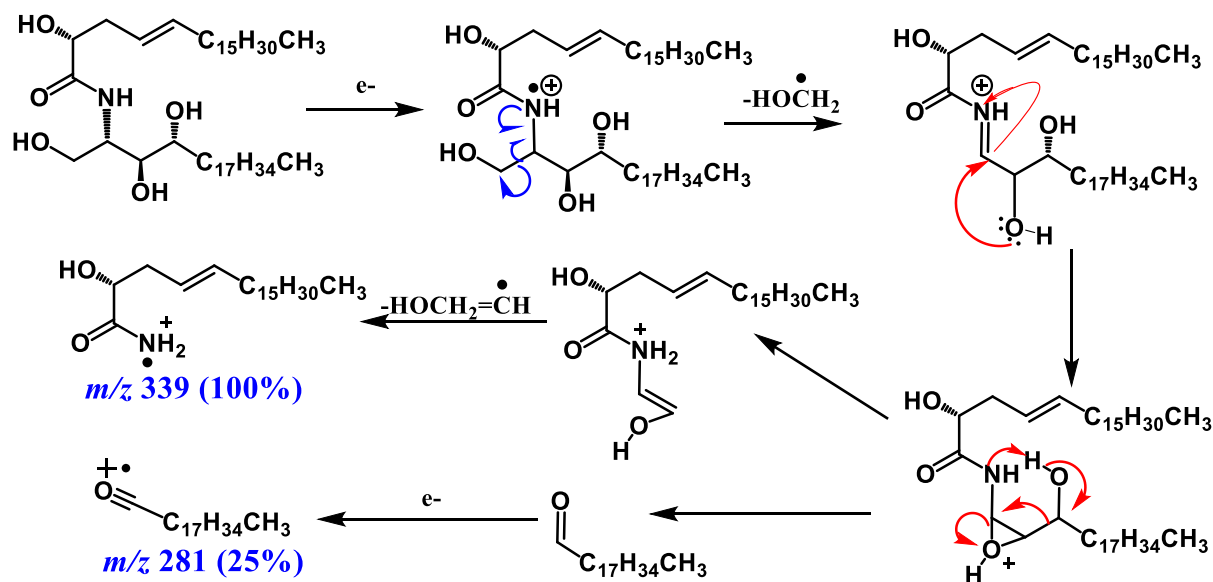


Schéma 6: Mécanisme de fragmentation du composé **RVgF75**

Sur le spectre de masse en Impact électronique élargi (figure 17), d'autres pic important à m/z 225 (35%) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}$) et m/z 250 (15%) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}=\text{CH}$) confirment la

localisation de la double liaison sur les carbones C-4' et C-5'. En plus de ces ions fragments clés qui ont confirmés la longueur des chaines et la position de la double liaison, d'autres ions fragments importants ont été identifiés et nous les avons matérialisés par le schéma 7.

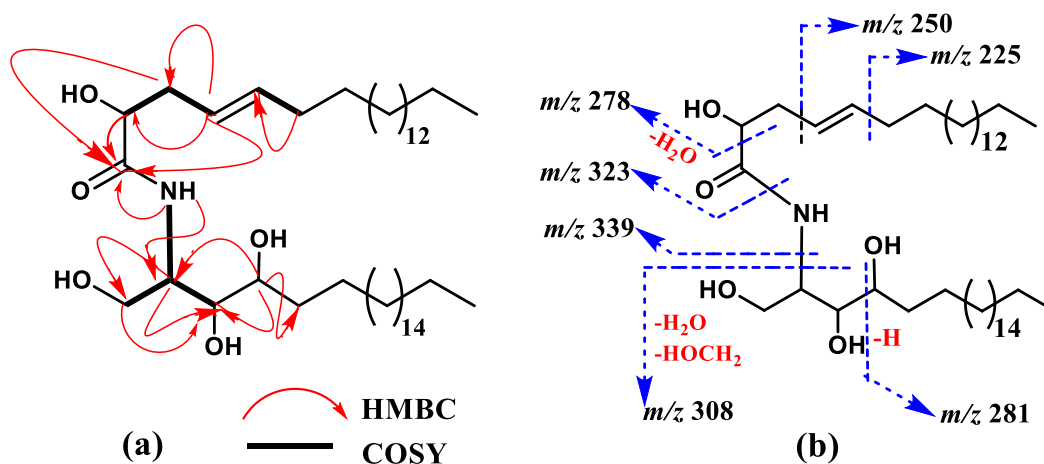


Schéma 7: (a) Quelques corrélations HMBC et COSY (b) Quelques de fragmentations en SM-IE du composé RVgF75

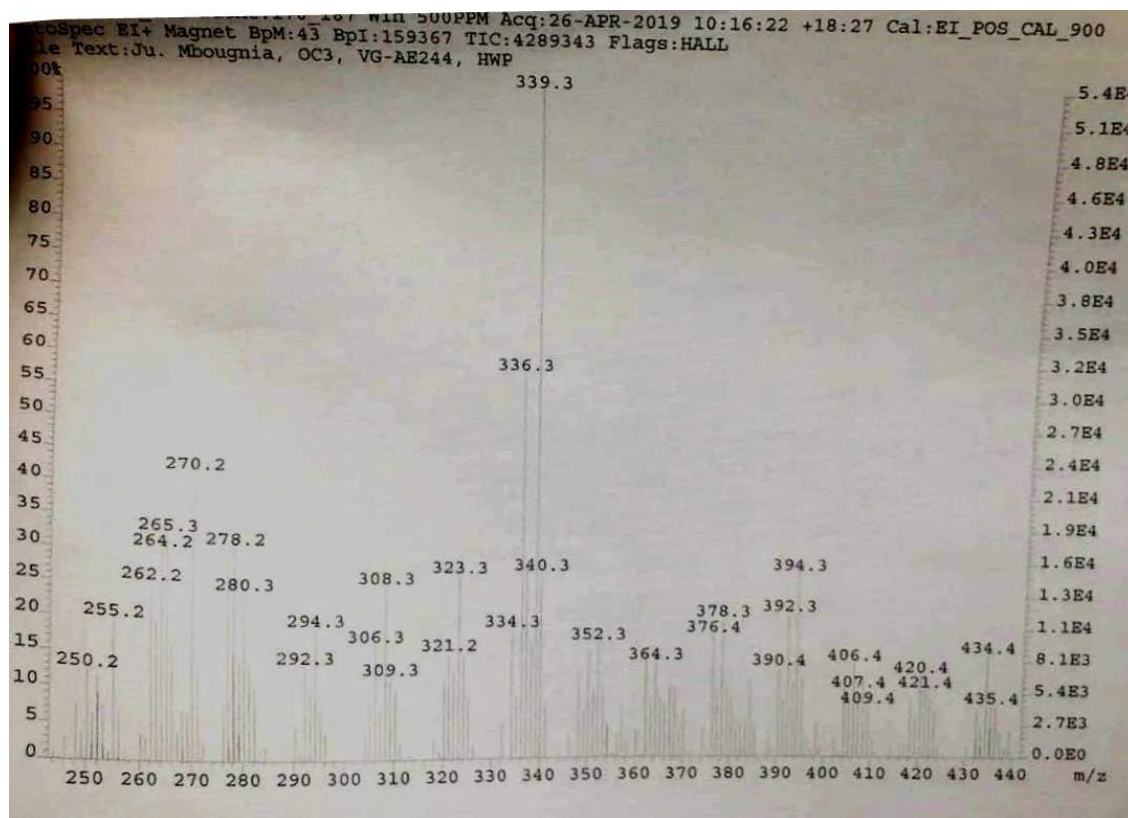


Figure 17 : Spectre de masse (+) IE élargi du composé RVgF75

L'identification de la masse étant la clé, pour une bonne élucidation structurale des céramides, nous avons entrepris de vérifier cette masse en opérant des transformations chimiques, qui nous permettront de confirmer la masse moléculaire, mais également de

confirmer le nombre de groupements hydroxyles et le nombre de doubles liaisons. Il s'agit d'une acétylation suivie d'une époxydation. En effet, 4 mg du composé **RVgF75** a été agité à température ambiante dans le mélange Pyridine/anhydride acétique [6 eq] (2:3), après 8 h d'agitation, le milieu réactionnel a été séché par évaporation et solubilisé dans 10 mL de chloroforme. A cette phase chloroformique, a été ajoutée 1.5 eq d'acide méta-chloroperbenzoïque (m-CPBA) et agitée à température ambiante pendant 3 h (schéma 8).

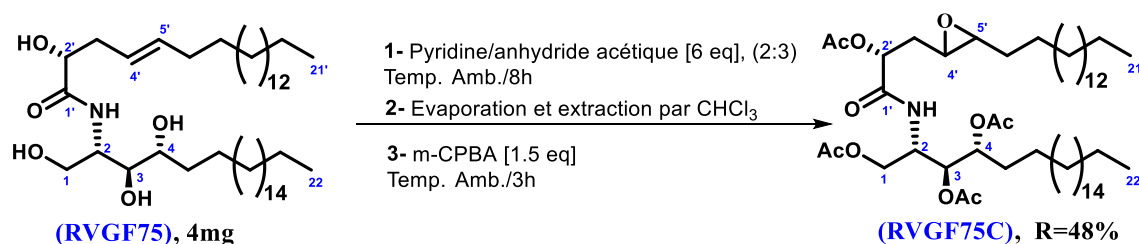


Schéma 8 : Réaction d'acétylation et d'époxydation du composé RVgF75

Après analyse du mélange réactionnel par spectrométrie de masse (figure 18) en ionisation ESI à haute résolution en mode positif, le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M + H]^+$ du produit de réaction **RVgF75C**, a été identifié à m/z 880,6829 ($[M + H]^+$; C₅₁H₉₃NO₁₀; calc. 880,6872), renfermant six (06) degrés d'insaturations.

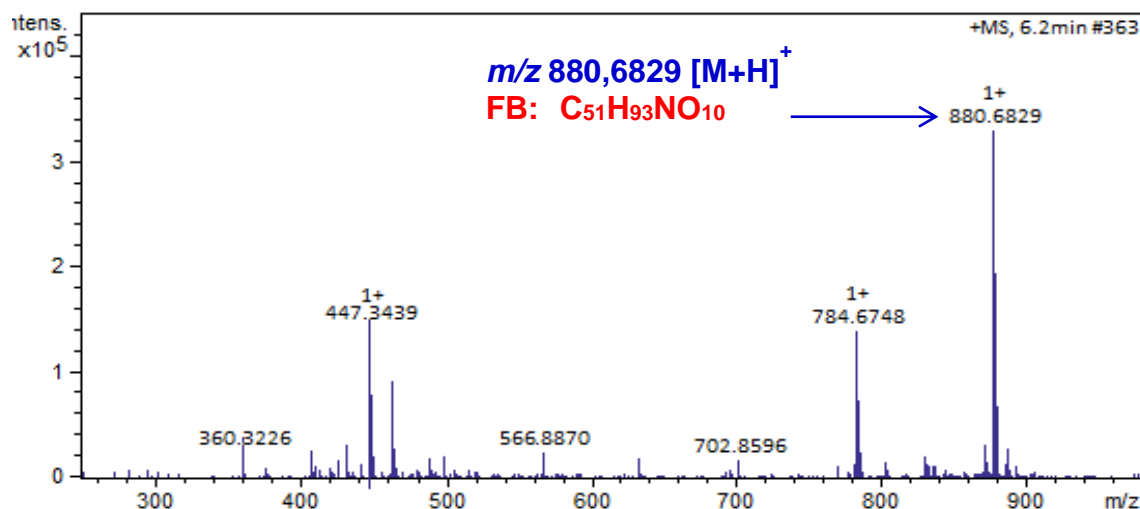


Figure 18 : Spectre de masse (+) HRESI du produit de réaction d'acétylation et d'époxydation de RVgF75

Les deux réactions ayant un double objectif, celle de confirmer le nombre de fonction alcool (acétylation) et de double liaison (époxydation) dans la molécule. C'est ainsi que le calcul va nous mener à 4 fonctions alcool et une double liaison ; sachant qu'après acétylation chaque groupement acétate contribue pour m/z 42 et que l'époxydation a une contribution de m/z 16 on aura donc $(4 \times 42) + (1 \times 16) + 695 = 879$. Ces résultats confirment très bien la structure (**73**) que nous avons attribuée au composé RVgF75 dont l'ensemble des données RMN sont résumées dans tableau 14 de la page suivante.

Tableau 14: Données de RMN ¹H et ¹³C de RVgF75 (73) dans le CDCl₃/(CD₃)₂SO

| Position | ¹³ C (125 MHz) | ¹ H (500 MHz) |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | δ _C ^a | δ _H ^a (Mult., J(Hz)) |
| LCB | | |
| 1a, 1b | 61,0 | 3,64 (dd, <i>J</i> = 5,0 ; 10,7) 3,56 (dd, <i>J</i> = 4,5 ; 10,7) |
| 2 | 51,5 | 3,97 (m) |
| 3 | 75,3 | 3,40 (m) |
| 4 | 71,7 | 3,38 (m) |
| 5a, 5b | 29,6 | 1,89 (m), 1,55 (m) |
| 6 | 22,5 | 1,32 (m) |
| 7—20 (n CH ₂) | 25,1—31,6 | 1,23 (s l) |
| 22 | 14,3 | 0,82 (t, <i>J</i> = 6,9) |
| NH | — | 7,42 (d, <i>J</i> = 8,9) |
| R-N-acyle | | |
| 1' | 174,4 | — |
| 2' | 71,8 | 3,86 (dd, <i>J</i> = 4,1 ; 7,9) |
| 3'a, 3'b | 34,7 | 1,64 (ddd, <i>J</i> = 7,9;10,8; 12,3) 1,46 (ddd, <i>J</i> = 4,1; 7,9; 12,3) |
| 4' | 130,1 | 5,32 ^γ (m) |
| 5' | 130,3 | 5,37 ^γ (m) |
| 6' | 32,5 | 1,89 (m) |
| 7'—20' (n CH ₂) | 25,1—31,6 | 1,23 (s l) |
| 21' | 14,3 | 0,82 (t, <i>J</i> = 6,9) |

^γ Les deux signaux peuvent être permutés ; ^a Déplacements chimiques exprimés en ppm, Réf. Int. TMS

II.2.1.2. Identification du composé RVgF53 (74)

Le composé **RVgF53** a été isolé des racines de *V. guineensis* et se présente sous forme de poudre cristalline blanche soluble dans la pyridine. Il fond entre 120-125°C et sa formule moléculaire brute C₄₂H₈₅NO₅ a été établie à partir du pic d'un ion pseudo-moléculaire observé sur son spectre de masse ESI à haute résolution en mode positif à *m/z* 684,6524 ([M + H]⁺ ; C₄₂H₈₆NO₅; calc. 684,6501 ; Δ=3,4 ppm), renfermant un (01) degré d'insaturation (figure 19). L'interprétation des données spectroscopiques de **RVgF53** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Mbosso *et al.* 2016) a permis de l'identifier à l'élasticamide (**74**).

En effet, son spectre de RMN ¹H (figure 20) indique la présence d'un large signal dans la gamme de δ_H 1,25-1,36 (s l, groupe CH₂) et un triplet intégrant pour six (06) protons à δ_H 0,85 (t, *J* = 6,3) caractéristiques de deux groupes CH₃ terminaux, assignés à deux longues chaînes aliphatiques. Enfin, on observe, la présence des signaux de deux protons

diastérotiques d'un groupe de carbinol à δ_H 4,42 (dd, $J = 4,8 ; 10,6$, H-1a) et 4,53 (dd, $J = 4,5, 10,6$, H-1b), d'un proton du groupe NH à δ_H 8,60 (d, $J = 8,9$) et trois (03) oxyméthynes à δ_H 4,63 (m, H-2'), 4,37 (m, H-3) et 4,30 (m, H-4). L'ensemble de ces informations nous permet de suggérer la structure d'une céramide (Mbosso *et al.* 2016), renfermant une seule insaturation attribuable au carbonyle de l'amide.

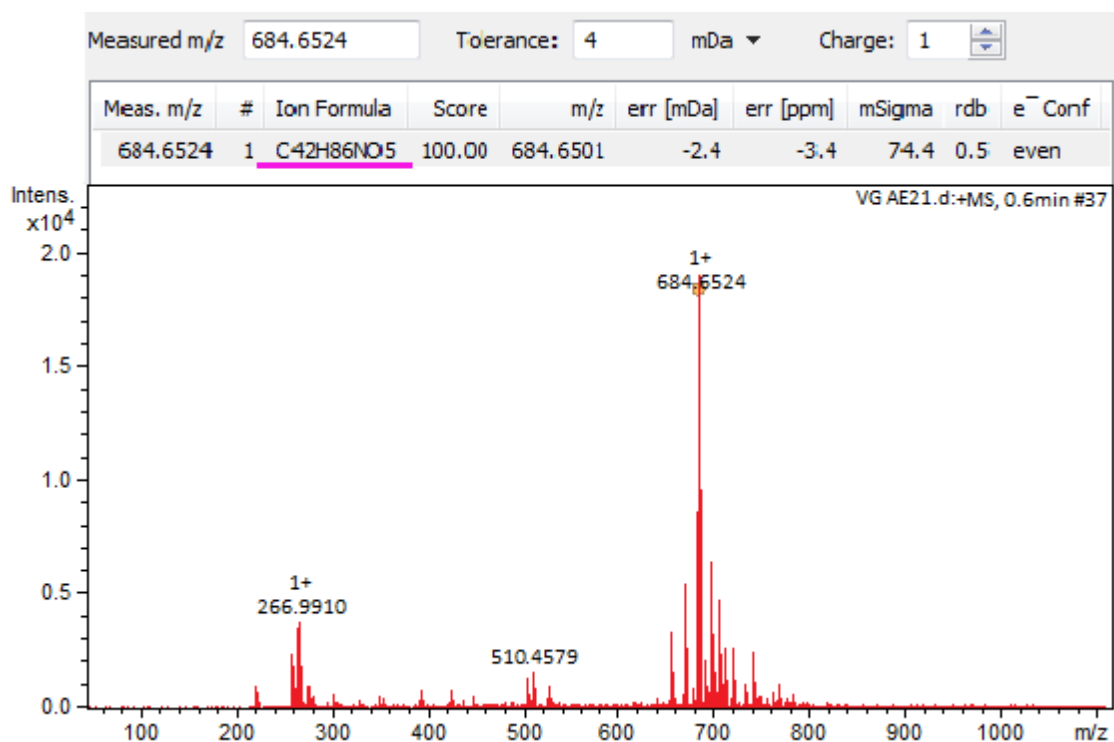


Figure 19: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF53**

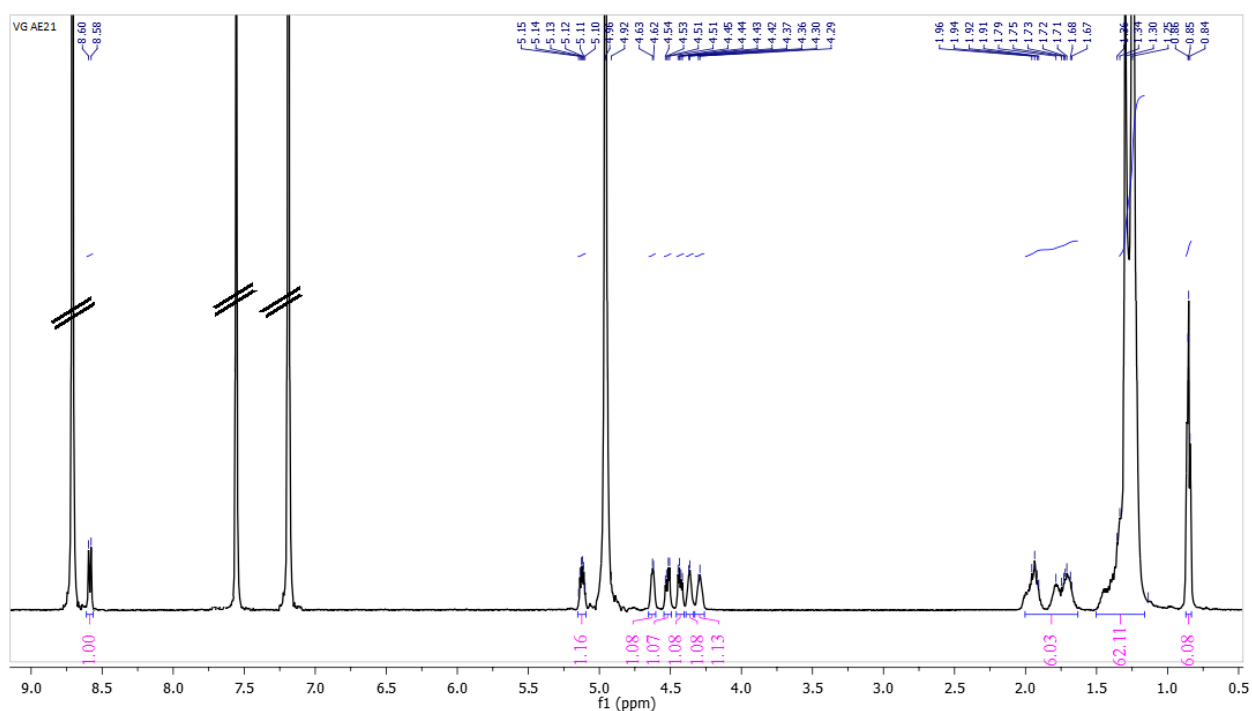


Figure 20: Spectre de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) du composé **RVgF53**

La longueur de chaque chaîne a été déterminée par la réaction de méthanolyse (0.9N HCl-MeOH/70°C/24h) de **RVgF53** (schéma 9). Cette réaction a conduit au mélange de méthyle ester d'acide gras et de la longue chaîne basique (amino-alcool). L'analyse par spectrométrie de masse en ionisation ESI mode positif (figure 21), du milieu réactionnel extrait avec le chloroforme a permis de détecter le pic de la longue chaîne basique (LCB) à m/z 318,3053(100%) attribuable à l'ion pseudo moléculaire $[LCB+H]^+$ de formule brute $C_{18}H_{39}NO_3$ identifiée à la 2-amino-octadécane-1,3,4-triole et d'en déduire l'ester méthylique d'acide gras au 2-hydroxytétracosanoate de méthyle.

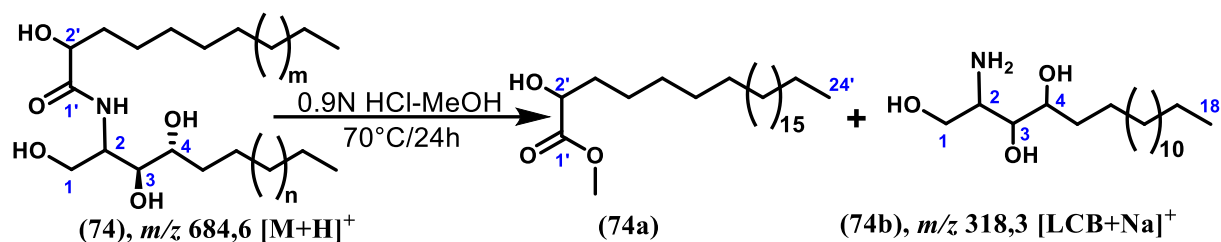


Schéma 9: Equation chimique traduisant la réaction de méthanolyse du composé **RVgF53**

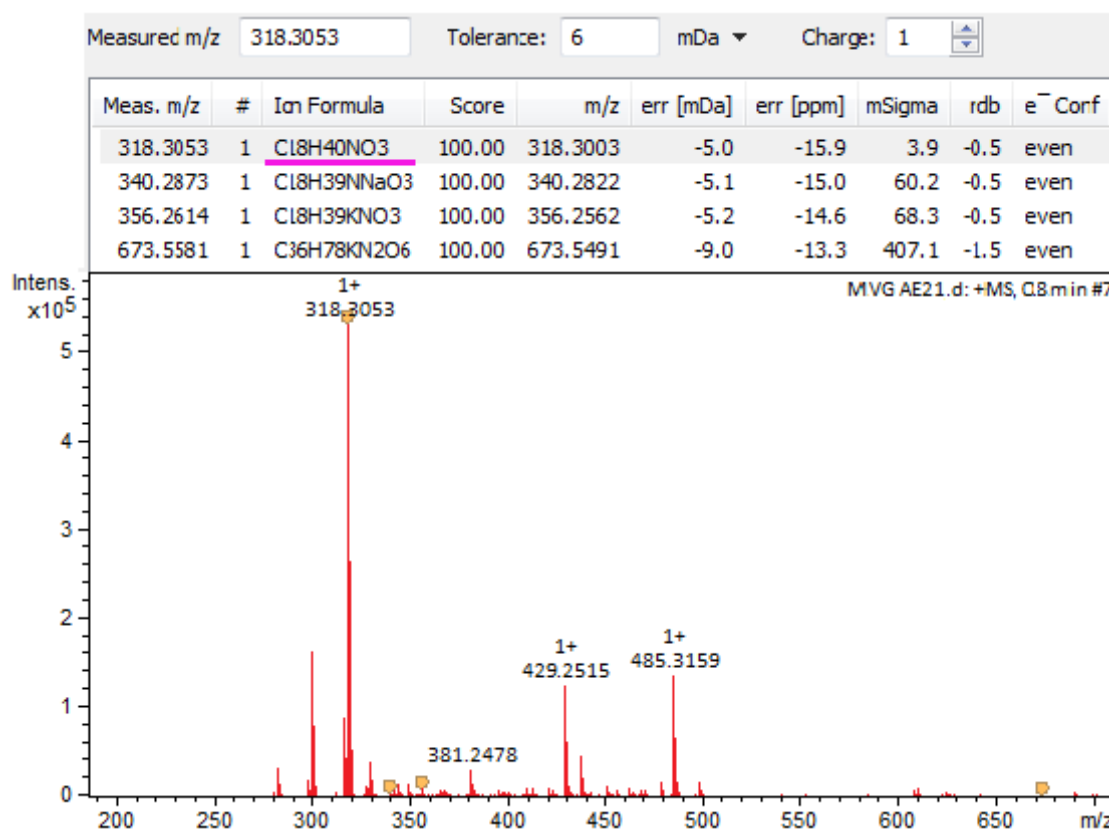


Figure 21: Spectre de masse (+) ESI de la phase organique du milieu réactionnel issue de la méthanolyse du composé **RVgF53**

Toutes ces données (tableau 15, figures 19 et 20), en comparaison avec celles de la littérature ont permis d'identifier le composé **RVgF53** à l'élasticamide (74), précédemment isolé de *Ficus elastica* par [Mbosso et al. \(2016\)](#)

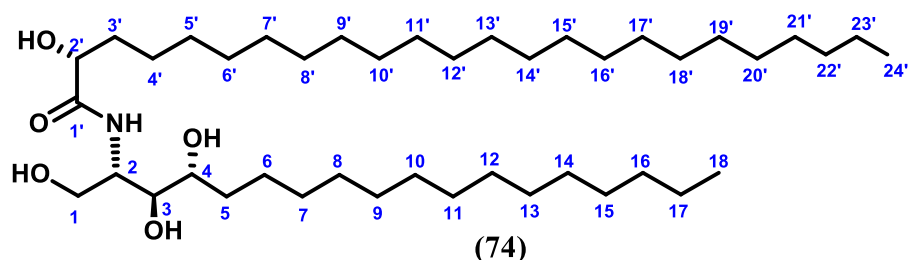


Tableau 15: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de RVgF53 dans la $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ avec celles de l'elasticamide (74), rapportée par Mbosso *et al.* (2016)

| Pos. | Expérimentales (RVgF53) | Elasticamide (74), $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ |
|-----------|--|--|
| | ^1H (500 MHz) δ_{H} (Mult., $J(\text{Hz})$) | ^1H (200 MHz) δ_{H} (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| LCB | | |
| 1a | 4,53 (dd, $J = 4,5; 10,6$) | 3,79 (dd, $J = 4,4; 12,6$) |
| 1b | 4,42(dd, $J = 4,8; 10,6$) | 3,73 (dd, $J = 4,4; 12,6$) |
| 2 | 5,10 (m) | 4,13 (m) |
| 3 | 4,30(m) | 3,53 (m) |
| 4 | 4,37(m) | 4,02 (m) |
| 5—16 | 1,25—1,36 (s l) | 1,22—1,35 (s l) |
| 17 | 1,25—1,36 (s l) | 1,22—1,35 (s l) |
| 18 | 0,85 (t, $J = 6,3$) | 0,86 (t, $J = 6,7$) |
| NH | 8,60 (d, $J = 8,9$) | — |
| R-N-acyle | | |
| 1' | — | — |
| 2' | 3,53 (m) | 3,53 (m) |
| 3' | 1,91 (m) | 1,75 (m) |
| 4' | 1,67 (m) | 1,40 (m) |
| 5'—22' | 1,25-1,36 (s l) | 1,22—1,35 (s l) |
| 23' | 1,25-1,36 (s l) | 1,22—1,35 (s l) |
| 24' | 0,85 (t, $J = 6,3$) | 0,86 (t, $J = 6,7$) |

II.2.1.3. Identification du composé RVgF54 (75)

Le composé **RVgF54** a été isolé des racines de *V. guineensis* et se présente sous forme de poudre amorphe blanche, soluble dans la pyridine. Sa formule moléculaire brute $\text{C}_{44}\text{H}_{89}\text{NO}_5$ a été établie à partir du pic d'un ion pseudo-moléculaire observé sur son spectre de masse ESI à haute résolution en mode positif à m/z 712,6849 ($[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{44}\text{H}_{90}\text{NO}_5$; calc. 712,6814; $\Delta=4,9$ ppm), renfermant un (01) degré d'insaturation (figure 22).

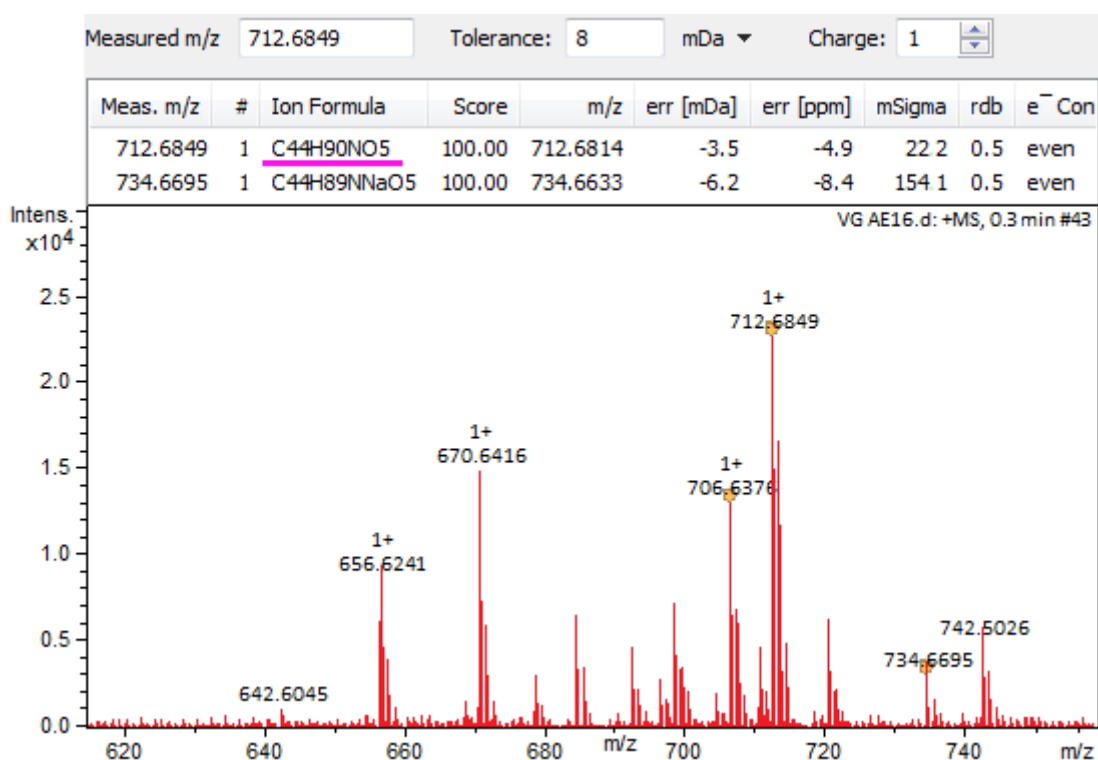


Figure 22: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF54**

L'interprétation des données spectroscopiques de **RVgF54** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Yaoita *et al.* 2000) a permis de l'identifier à la (2S,3S,4R)-2-N-[(2'R)-hydroxyhexacosanoyl]-4-hydroxysphinganine (**75**)

En effet, son spectre de RMN ¹H (figure 23) est presque identique à celui du composé **RVgF53**(**74**) précédemment décrit. L'analyse de ces données fait ressortir des signaux caractéristiques d'une céramide à savoir :

- le signal d'un triplet intégrant pour six (06) protons à δ_H 0,86 (t, $J = 6,9$) caractéristique des deux groupes CH₃ terminaux,
- le signal d'une succession de méthylènes des chaînes aliphatique sous forme de pseudo-doublet large raisonnant entre δ_H 1,25-1,36 (sd 1, groupe CH₂),
- le signal du proton du groupe NH à δ_H 8,59 (d, $J = 8,9$) échangeable à l'eau lourde
- le signal du proton de l'azométhine à δ_H 5,12 (m, H-1),
- les signaux de deux protons diastérotopique d'un groupe de carbinol à δ_H 4,43 (dd, $J = 4,6 ; 10,5$, H-1a) et 4,53 (dd, $J = 4,4 ; 10,5$, H-1b),
- les signaux des trois groupes d'oxyméthines raisonnant respectivement à δ_H 4,62 (m, H-2'), 4,37 (m, H-3) et 4,27 (m, H-4).

L'ensemble de ces informations confirme sans ambiguïté la structure d'une céramide (Simo *et al.* 2008), renfermant une seule insaturation attribuable au carbonyle de l'amide.

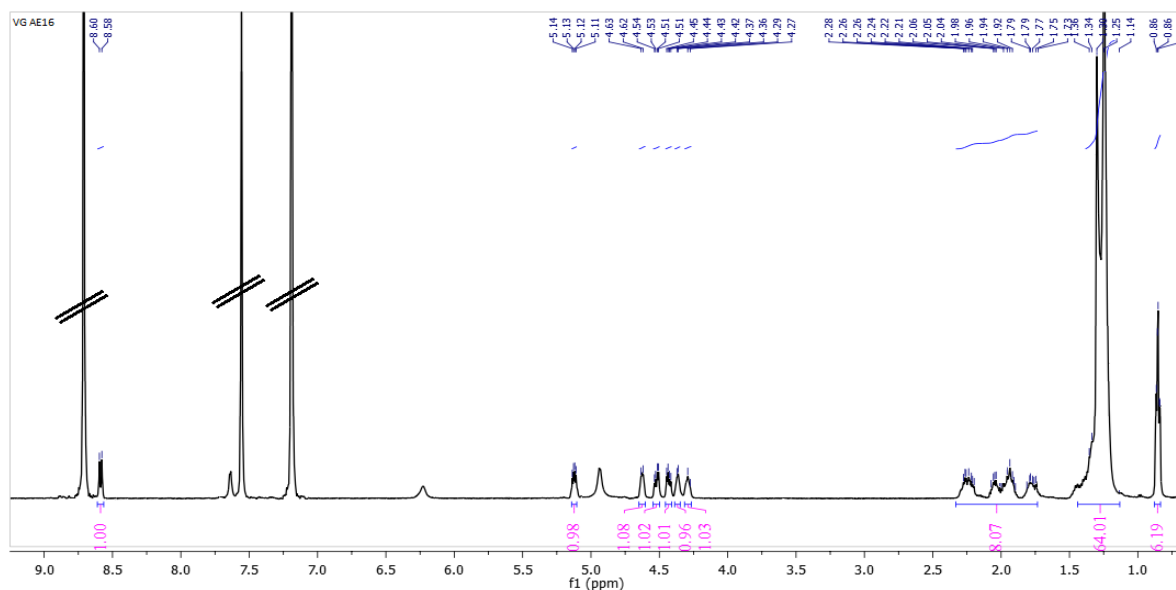


Figure 23: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) du composé **RVgF54**

La longueur de chaque chaîne a été déterminée par la réaction de méthanolyse (0.9N HCl-MeOH/70°C/24h) de **RVgF54** (schéma 10). Cette réaction a conduit au mélange de méthyle ester d'acide gras et de la longue chaîne basique (amino-alcool).

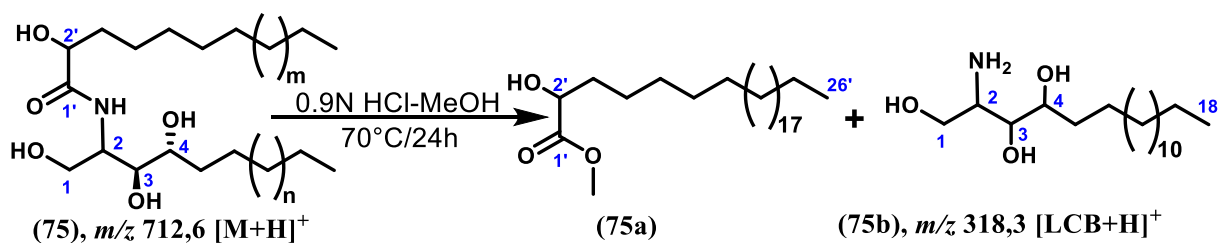


Schéma 10: Equation chimique traduisant la réaction de méthanolyse du composé **RVgF54**

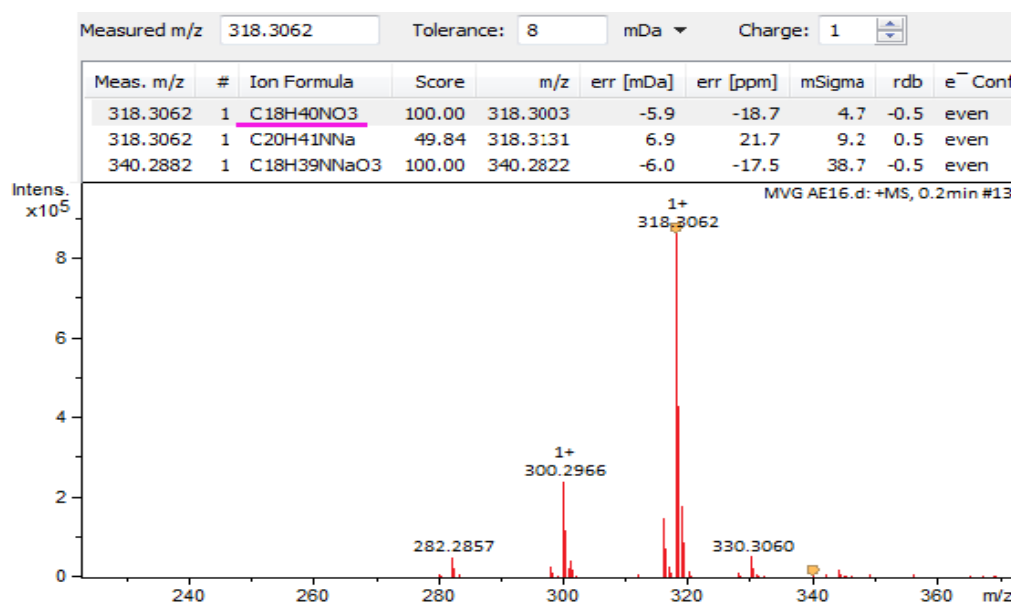


Figure 24: Spectre de masse (+) ESI de la phase organique du milieu réactionnel issue de la méthanolyse du composé **RVgF54**

L'analyse par spectrométrie de masse en ionisation ESI, mode positif du milieu réactionnel extrait avec le chloroforme (figure 24) a permis de détecter le pic de la longue chaîne basique à m/z 318,3053(100%) correspondant à $[LCB+H]^+$ de formule brute $C_{18}H_{39}NO_3$ identifiée à la 2-amino-octadécane-1,3,4-triole et de déduire l'ester d'acide gras au 2-hydroxyhexacosanoate de méthyle.

Toutes ces données (tableau 16, figures 23 et 24), en comparaison avec celles de la littérature ont permis d'identifier le composé **RVgF54** l'identifier à la (2S,3S,4R)-2-N-[(2'R)-hydroxyhexacosanoyl]-4-hydroxysphinganine (**75**), précédemment isolé de *Grifola frondosa* par Yaoita *et al.* (2000)

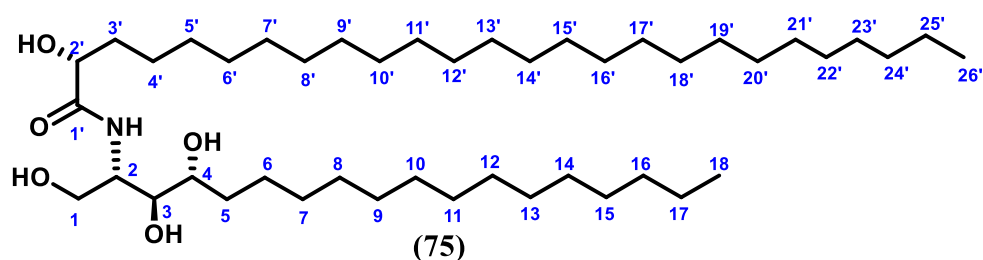


Tableau 16: Comparaison des données de RMN 1H et ^{13}C de RVgF54 dans la C_5D_5N avec celles du composé (75), rapporté par Yaoita *et al.* (2000)

| Pos. | Expérimentales (RVgF53), | Composé (75), C_5D_5N |
|-----------|--|--|
| | 1H (500 MHz) δ_H (Mult., J(Hz)) | 1H (200 MHz) δ_H (Mult., J(Hz)) |
| LCB | | |
| 1a | 4,53 (dd, $J = 4,5; 10,6$) | 4,52 (m) |
| 1b | 4,42 (dd, $J = 4,8; 10,6$) | 4,43 (m) |
| 2 | 5,12 (m) | 5,12 (m) |
| 3 | 4,37 (m) | 4,38 (dd, $J = 4,8; 6,6$) |
| 4 | 4,27 | 4,30 (m) |
| 5a, 5b | 2,25 | 2,25 (m), 1,94 (m) |
| 6—16 | 1,25—1,36 (s l) | 1,25 (s l) |
| 17 | 1,25-1,36 (s l) | 1,25 (s l) |
| 18 | 0,85 (t, $J = 6,3$) | 0,86 (t, $J = 6,7$) |
| NH | 8,59 (d, $J = 8,9$) | 8,60 (d, $J = 9,2$) |
| R-N-acyle | | |
| 1' | — | — |
| 2' | 4,62 (m) | 4,63 (dd, $J = 3,7; 7,7$) |
| 3'a, 3'b | 2,26 (m); 2,05 (m) | 2,25 (m); 2,05 (m) |
| 4' | 1,75 (m) | 1,70 (m) |
| 5'—24' | 1,25-1,36 (s l) | 1,25 (s l) |
| 25' | 1,25-1,36 (s l) | 1,25 (s l) |
| 26' | 0,86 (t, $J = 6,9$) | 0,86 (t, $J = 7,0$) |

II.2.2. Caractérisation des anthraquinones

II.2.2.1. Identification du composé RVgF34 (76)

Le composé **RVgF34** précipite sous forme de poudre cristalline orange, soluble dans le chloroforme. Il fond entre 207–210°C et donne un précipité violet dans le chlorure ferrique, indiquant la présence d'hydroxyles phénoliques dans la molécule. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de **RVgF34** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Manojlovic et al. 2000) a permis de l'identifier à la physcion (**76**).

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 25), l'on observe le pic de l'ion quasi moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 285,0756 compatible avec la formule moléculaire $C_{16}H_{12}O_5$ (Calc. $C_{16}H_{13}O_5$, 285,0757 ; $\Delta=0,5$ ppm) renfermant 11 degrés d'insaturations.

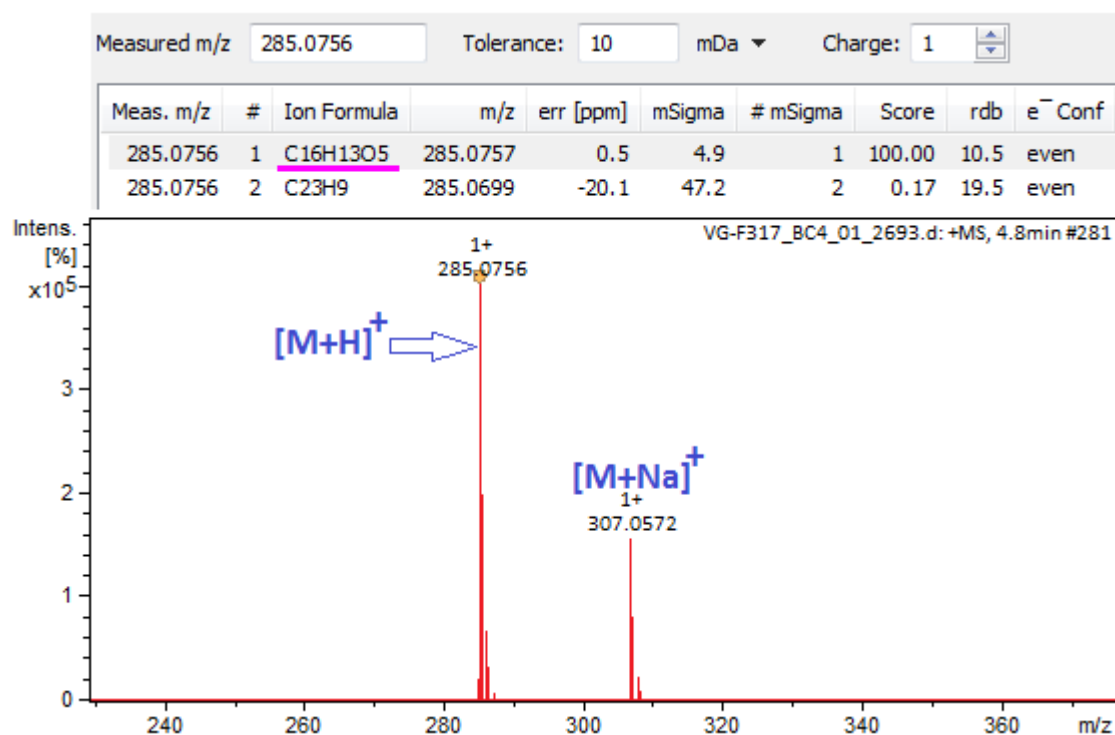


Figure 25: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF34**

L'analyse de son spectre de RMN 1H (figure 26) indique la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule caractérisée par signal à δ_H 3,87 (s, 3H). En outre, on observe des signaux caractéristiques de deux systèmes de protons aromatiques méta-couplés à δ_H 7,31 (d, $J = 2,5$, 1H) et δ_H 6,62 (d, $J = 2,5$, 1H) d'une part et δ_H 7,56 (d, $J = 1,1$, 1H) et δ_H 7,02 (d, $J = 1,0$, 1H) d'autre part. De plus, les signaux caractéristiques d'un groupe méthyle attaché au un noyau aromatique à δ_H 2,38 (s, 3H) intégrant pour trois protons, et deux groupes hydroxyles

chélatés à δ_H 12,25 et 12,05 plaident en faveur d'un 1,8-dihydroxyl-6-méthyl-9,10-dihydro-9,10-anthracènedione.

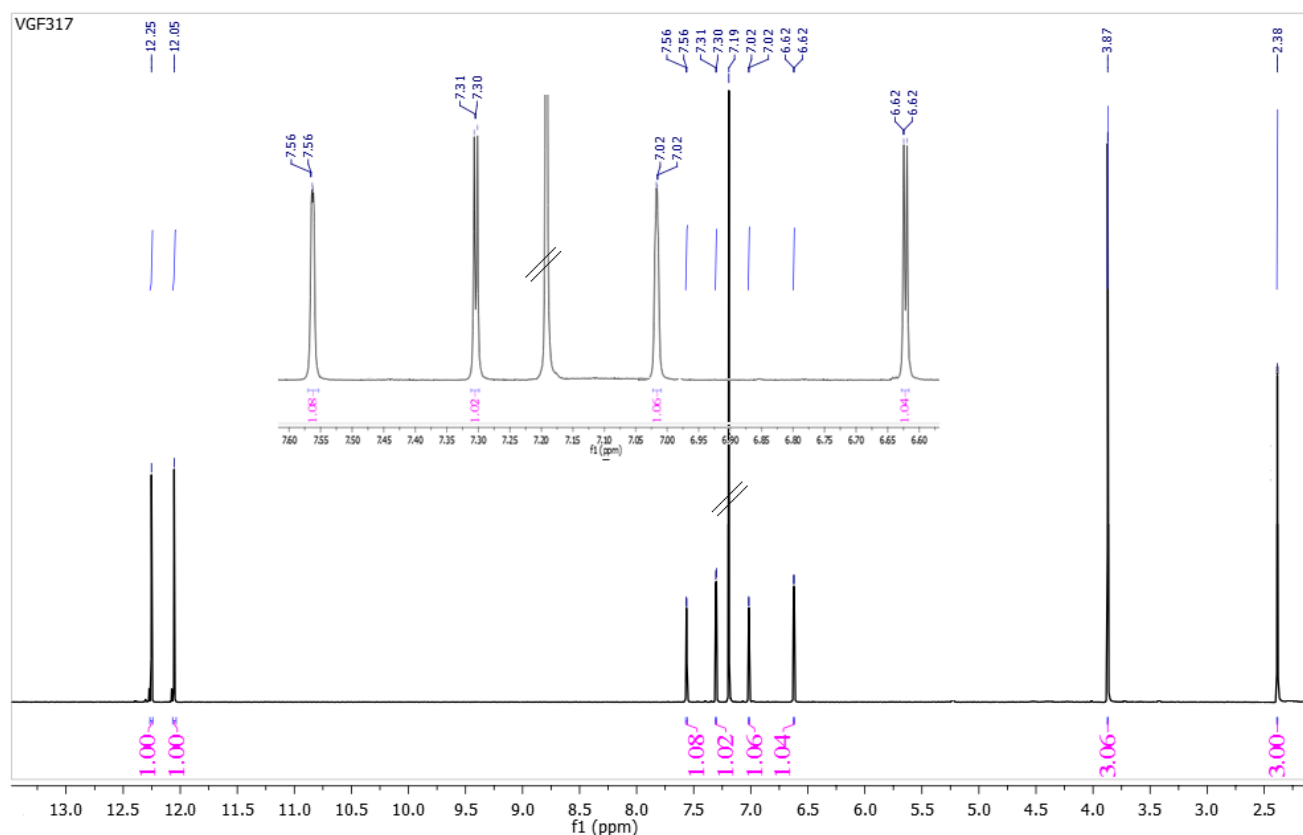


Figure 26: Spectre de RMN ^1H (500 Mz, CDCl_3) du composé **RVgF34**

Le spectre de RMN ^{13}C (figure 27) du composé **RVgF34** indique la présence de 16 carbones dans la molécule, dont 14 carbones aromatiques raisonnant respectivement à δ_C 165,2 (C-1), 108,2 (C-2), 166,5 (C-3), 106,7 (C-4), 121,3 (C-5), 148,7 (C-6), 124,5 (C-7), 162,5 (C-8), 190,8 (C-9), 182,0 (C-10), 113,9 (C-11), 133,2 (C-12), 110,2 (C-13), 135,2 (C-14) et deux carbones sp^3 raisonnant respectivement à δ_C 22,0 (6-Me) et 56,1 (C-1'). Les signaux à δ_C 190,8 (C-9) et 182,0 (C-10) sont caractéristiques des carbonyles typiques d'un squelette d'anthraquinone.

Le spectre HMQC (figure 28) a permis d'assigner les carbones et protons directement liés grâce aux taches de corrélations entre carbones et protons respectivement à δ_C/δ_H . 108,2/7,31(d, $J = 2,5\text{Hz}$) ; 106,7/6,74 (d, $J = 2,5\text{Hz}$), 121,3/7,56 (d, $J = 1,1\text{Hz}$) et 124,5/7,02(d, $J = 1,1$).

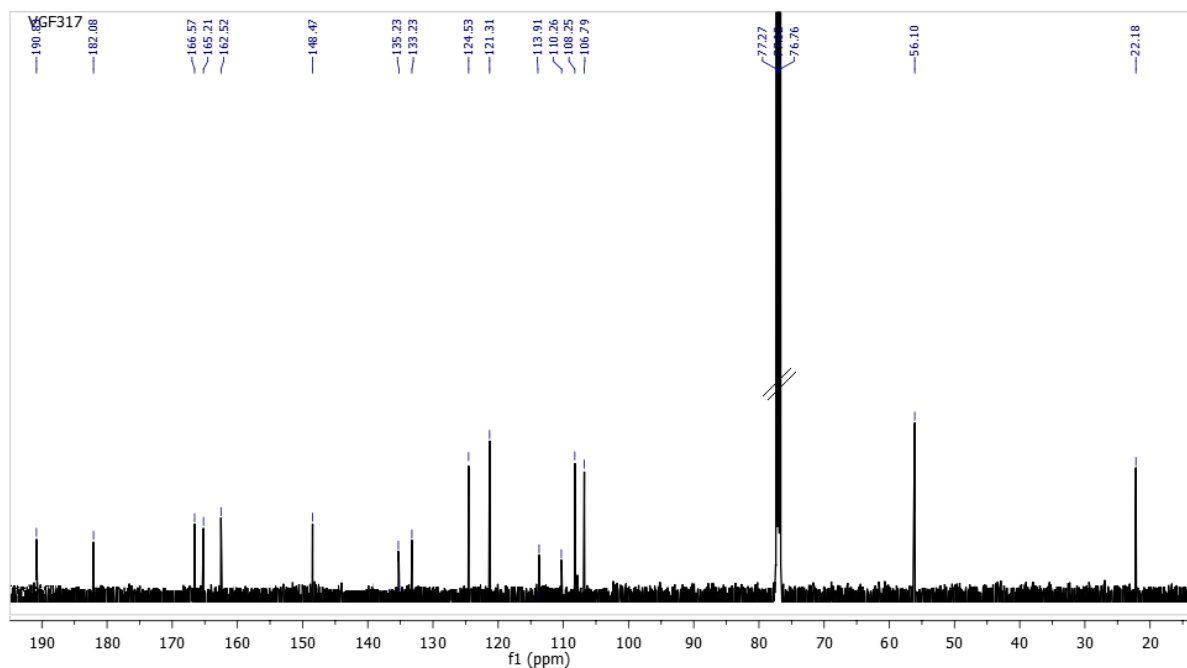


Figure 27: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé **RVgF34**

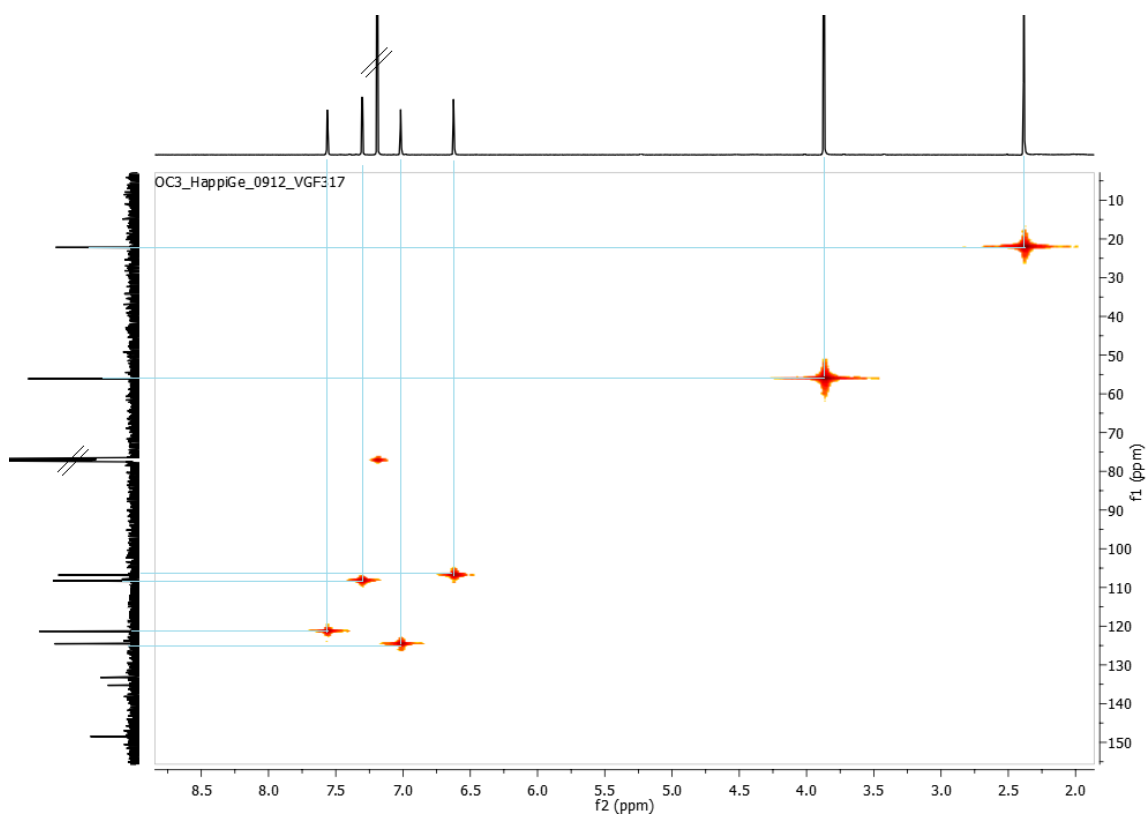


Figure 28: Spectre HMBC du composé **RVgF34**

Le spectre HMBC (figure 29, schéma 11) a permis de faire l'assignation complète de la molécule, et justifier les positions des différents systèmes de protons méta-couplés. En effet, des taches de corrélation sont observées entre le méthoxyle à δ_{C} 56,1 (C-1') et les

protons du premier système méta-couplé à δ_H 7,31 (d, $J = 2,5$, 1H) et δ_H 6,62 (d, $J = 2,5$, 1H) d'une part et le méthyle à δ_C 22,0 (6-CH₃) et les protons du second système méta-couplé à δ_H 7,56 (d, $J = 1,0$, 1H) et δ_H 7,02 (d, $J = 1,0$, 1H). Les groupements hydroxyles présents dans cette molécule ont été également assignés par le même procédé, car des taches de corrélation sont observées entre le carbone à δ_C 124,5 (C-7), et le proton à δ_H 12,25 (s) puis entre le carbone à δ_C 108,2 (C-2) et proton a δ_H 12,05 (s)

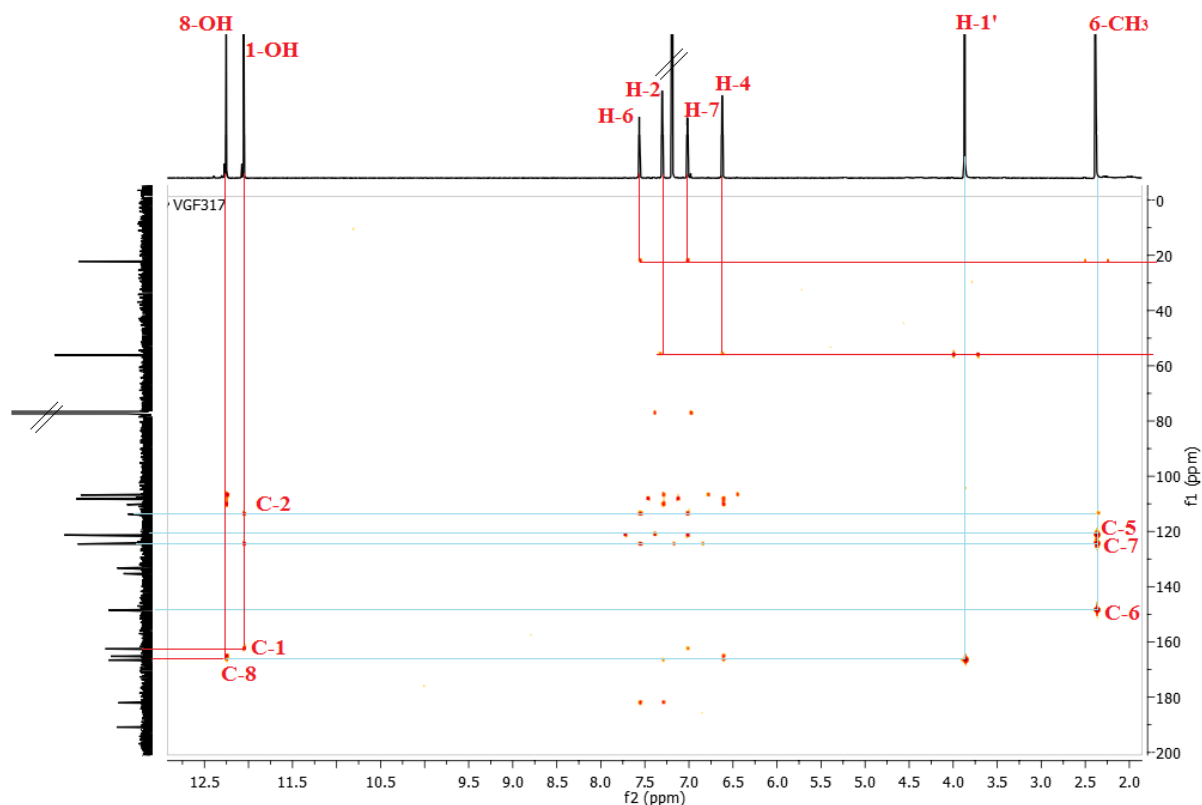


Figure 29: Spectre HMBC du composé **RVgF34**

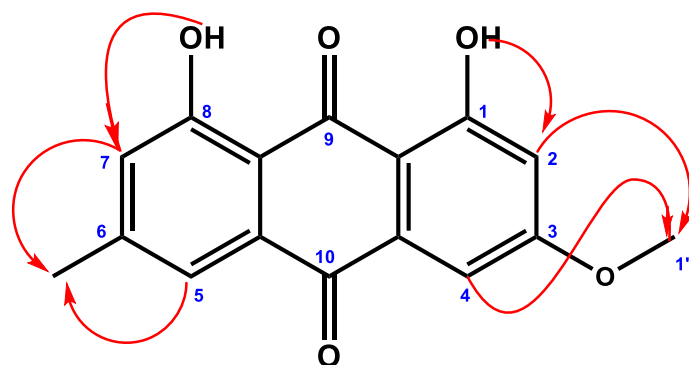


Schéma 11: Quelques corrélations clés observées sur le spectre HMBC du composé **RVgF34**

Toutes ces données (tableau 17, figures 25–28), ont permis d'identifier le composé **RVgF34** à la physcion (**76**), précédemment isolé de *Xanthoria polycarpa* par Manojlovic *et al.* (2000).

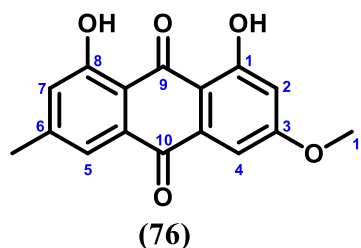


Tableau 17: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de RVgF34 dans le CDCl_3 avec celles de la physcion (76) rapportées par Manojlovic *et al.* (2000)

| Pos. | Expérimentales (RVgF34) | | Physcion (76), CDCl_3 | |
|------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|---|
| | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | ^{13}C (50MHz) | ^1H (200 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| 1 | 165,2 | — | 164,9 | — |
| 2 | 108,2 | 7,31(d, $J = 2,5$) | 108,0 | 7,35 (d, $J = 2,5$) |
| 3 | 166,5 | — | 166,5 | — |
| 4 | 106,7 | 6,74 (d, $J = 2,5$) | 106,7 | 6,68(d, $J = 2,5$) |
| 5 | 121,3 | 7,56 (d, $J = 1,1$) | 121,3 | 7,63 (d, $J = 1,0$) |
| 6 | 148,7 | — | 147,7 | — |
| 7 | 124,5 | 7,02(d, $J = 1,1$) | 124,1 | 7,09 (d, $J = 1,0$) |
| 8 | 162,5 | — | 162,0 | — |
| 9 | 190,8 | — | 189,2 | — |
| 10 | 182,0 | — | 182,1 | — |
| 11(9a) | 113,9 | — | 113,9 | — |
| 12(4a) | 133,2 | — | 133,4 | — |
| 13(8a) | 110,2 | — | 111,9 | — |
| 14(10a) | 135,2 | — | 135,8 | — |
| 6- CH_3 | 22,0 | 2,38 (s) | 22,1 | 2,45 (s) |
| 1-OH | — | 12,05 (s) | — | 12,12 (s) |
| 8-OH | — | 12,25 (s) | — | 12,32 (s) |
| 1' | 56,1 | 3,87 (s) | 56,0 | 3,94 (s) |

II.2.2.2. Identification du composé RVgF35 (77)

Le composé **RVgF35** précipite sous forme d'aiguille jaune-orangé soluble dans le chloroforme. Il fond entre 203–206°C et répond positivement au test de Bornträger caractéristique des anthraquinones, ce composé donne un précipité violet dans le chlorure ferrique, indiquant la présence d'hydroxyles phénoliques dans la molécule. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de **RVgF35** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Manojlovic *et al.* 2000) a permis de l'identifier à l'erythroglaucine (77).

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 30), l'on observe le pic de l'ion quasi moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 301,0714 compatible avec la

formule moléculaire $C_{16}H_{12}O_6$ (Calc. $C_{16}H_{13}O_6$, 301,0707 ; $\Delta = 2,3$ ppm) renfermant 11 degrés d'insaturations.

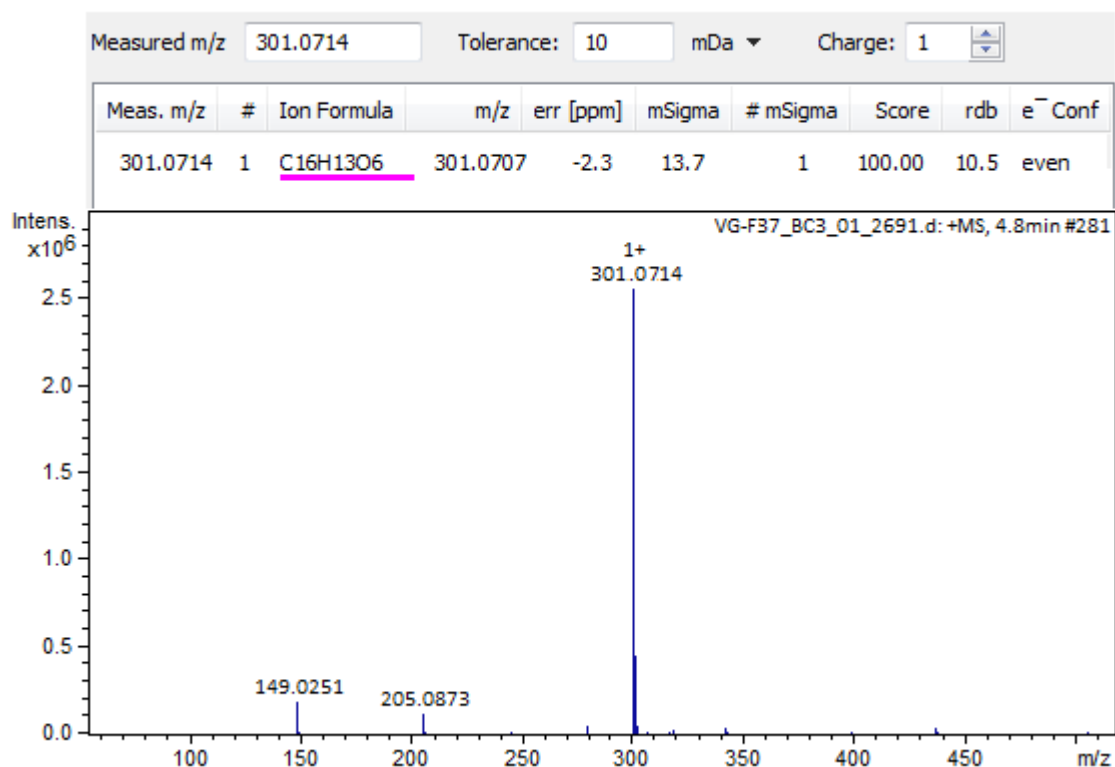


Figure 30: Spectre de masse (+) —HRESI du composé **RVgF35**

L'analyse de son spectre de RMN 1H (figure 31) en comparaison avec le spectre de RMN 1H de la physcion (figure 26) précédemment décrite, indique la présence d'un groupement hydroxyle chélaté supplémentaire dans la structure de **RVgF35 (77)** raisonnant à δ_H 13,41 (s, 1H). Ce groupement hydroxyle peut donc substituer le proton en position 4 ou en position 5. Toutefois l'examen du système de spin des deux groupes de protons méta-couplés révèle que le méta-couplage des noyaux à δ_H 7,31 (d, $J = 2,5$, 1H) et 6,62 (d, $J = 2,5$, 1H) n'a pas été modifié, par contre on note la disparition du signal aromatique δ_H 7,56 (d, $J = 1,0$, 1H) alors que le signal à δ_H 7,02 (d, $J = 1,0$, 1H) est légèrement déblindé et résonne maintenant sous forme de singulet large à δ_H 7,14 (sl) suggérant ainsi la substitution en position 5. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse du spectre HMBC (figure 32). Le signal du carbone en position 5 à δ_C 121,3 (C-5) dans le spectre de RMN ^{13}C de la physcion (**76**) est déplacé vers les champs faibles à δ_C 158,6 (C-5) dans celui de **RVgF35**. En outre, on observe une tache de corrélation entre ce carbone à δ_C 158,6 (C-5) et les protons du méthyle fixé en C-6 à δ_H 2,39 (s, 3H) confirmant la substitution du proton en position 5 par le groupement hydroxyle dont le proton résonne δ_H 13,41 (s, 1H).

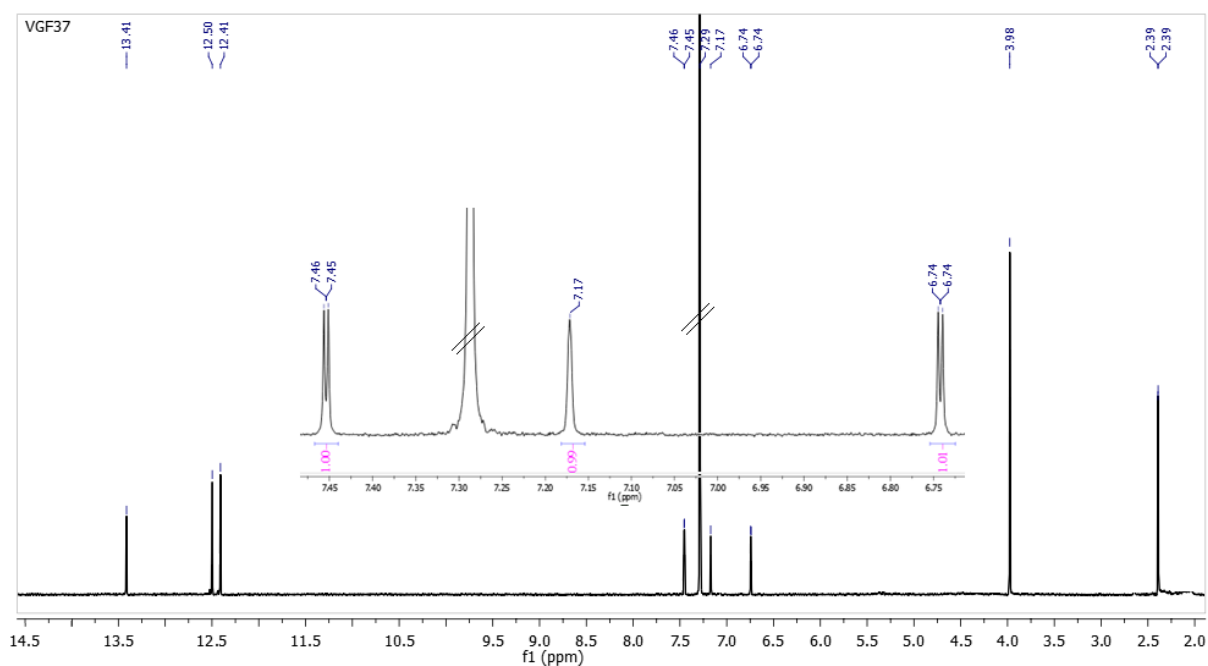


Figure 31: Spectre de RMN ^1H (500 Mz, CDCl_3) du composé **RVgF35**

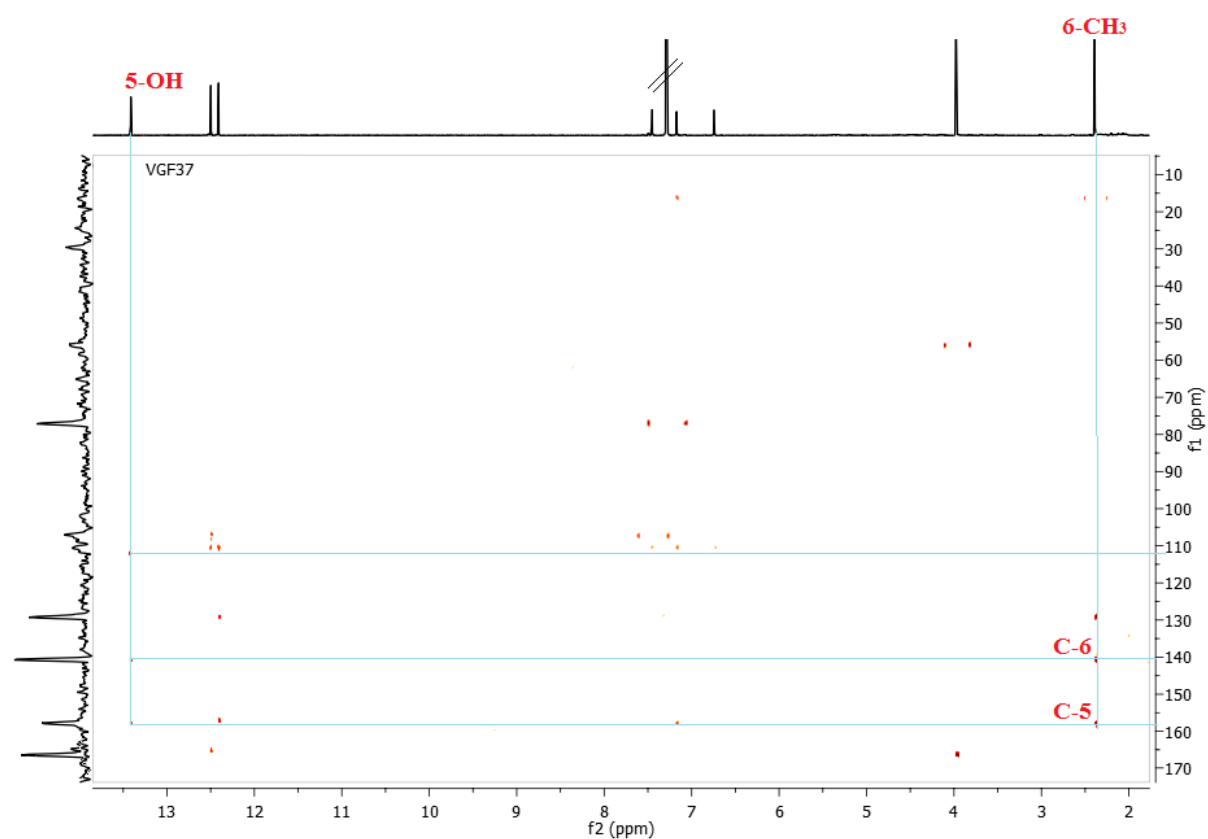


Figure 32: Spectre HMBC du composé **RVgF35**

Toutes ces données (tableau 18, figures 29–31), ont permis d'identifier le composé **RVgF35** à l'erythroglaucine (**77**), précédemment isolé de *Xanthoria elegans* par Manojlovic *et al.* (2000).

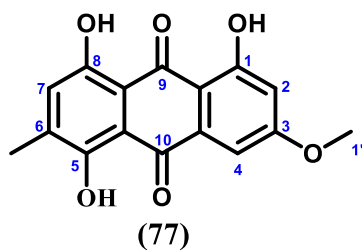


Tableau 18: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de RVgF35 dans le CDCl_3 celles de l'erythroglaucon (77) rapportées par Manojlovic *et al.* (2000)

| Pos. | Expérimentales (RVgF35) | | Erythroglaucon (77), CDCl_3 | |
|------------------|--------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | ^{13}C (50 MHz) | ^1H (200 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult, $J(\text{Hz})$) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult, $J(\text{Hz})$) |
| 1 | 165,2 | — | 164,9 | — |
| 2 | 108,0 | 7,46 (d, $J= 2,5$) | 108,0 | 7,41 (d, $J= 2,6$) |
| 3 | 166,6 | — | 166,5 | — |
| 4 | 106,7 | 6,74 (d, $J= 2,5$) | 106,9 | 6,71(d, $J= 2,6$) |
| 5 | 158,6 | — | 158,4 | — |
| 6 | 140,9 | — | 140,5 | — |
| 7 | 124,5 | 7,17 (sl) | 125,3 | 7,14 (sl) |
| 8 | 157,6 | — | 155,0 | — |
| 9 | 188,8 | — | 184,3 | — |
| 10 | 182,0 | — | 182,4 | — |
| 11(9a) | 110,5 | — | 111,3 | — |
| 12(4a) | 130,2 | — | 129,8 | — |
| 13(8a) | 110,5 | — | 123,9 | — |
| 14(10a) | 135,2 | — | 136,3 | — |
| 6- CH_3 | 22,0 | 2,39 (s) | 22,3 | 2,45 (s) |
| 1-OH | — | 12,41 (s) | — | 12,37 (s) |
| 5-OH | — | 13,41 (s) | — | 13,36 (s) |
| 8-OH | — | 12,50 (s) | — | 12,46 (s) |
| 1' | 56,1 | 3,98 (s) | 56,2 | 3,95 (s) |

II.2.2.3. Identification du composé RVgF33 (78)

Le composé **RVgF33** précipite sous forme d'aiguille jaune soluble dans le DMSO. Il fond entre 219–222°C et répond positivement au test de Borträger caractéristique des anthraquinones, ce composé donne un précipité violet dans le chlorure ferrique, indiquant la présence d'hydroxyles phénoliques dans la molécule. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de **RVgF33** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Babu *et al.* 2003) a permis de l'identifier à revandchinone-3 (**78**).

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 33), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 617,3806 compatible

avec la formule moléculaire $C_{37}H_{54}O_6$ (Calc. $C_{37}H_{54}O_6Na$, 617,3813 ; $\Delta=1,1$ ppm) renfermant 11 degrés d'insaturations.

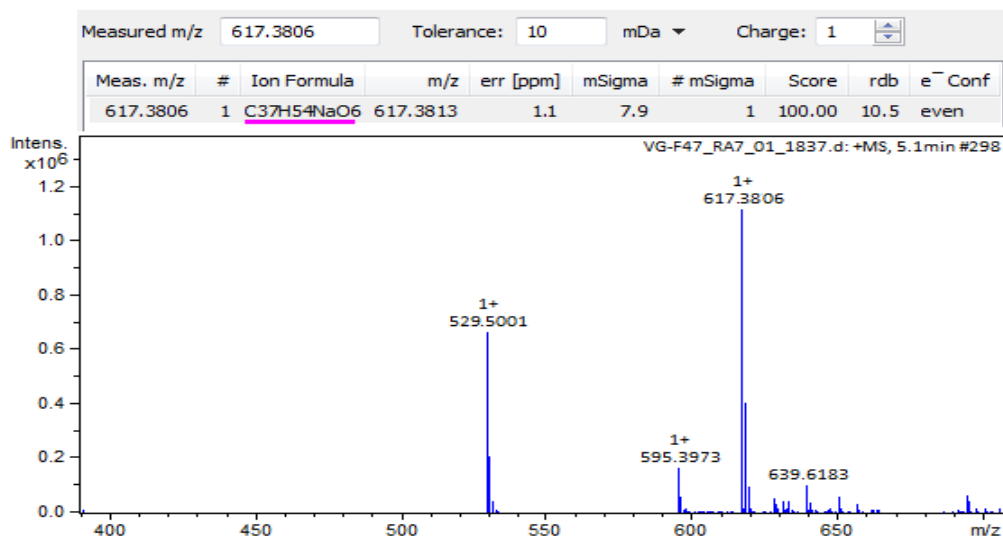


Figure 33: Spectre de masse (+) —HRESI du composé **RVgF33**

L'analyse de son spectre de RMN 1H (figure 34) indique la présence des signaux d'un système de proton aromatique méta-couplés à δ_H 7,46 (d, $J = 2,5$, 1H) et δ_H 6,74 (d, $J = 2,5$, 1H), un singulet à δ_H 7,17 ressemblant au squelette l'erythroglaucin (**77**) (Manojlovic *et al.* 2000).

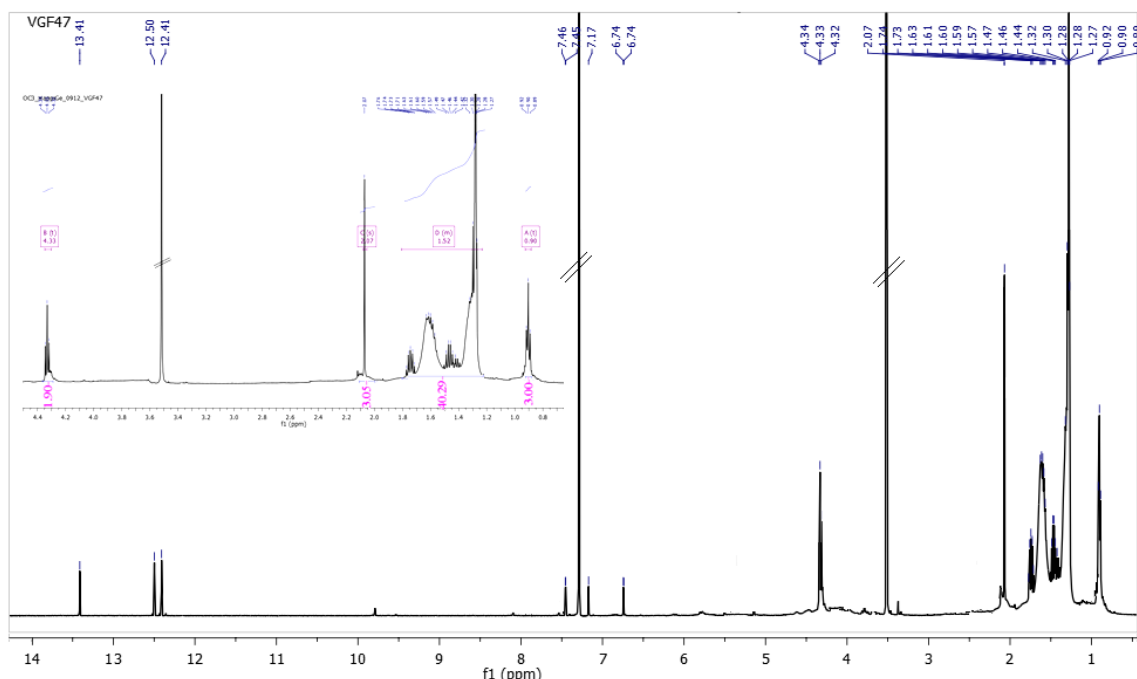


Figure 34: Spectre de RMN 1H (500 Mz, $CDCl_3/CD_3OD$) du composé **RVgF33**

De plus, on observe un singulet à δ_H 2,07 (s, 3H) intégrant pour trois protons, caractéristique d'un groupement méthyle attaché au un noyau aromatique. Les signaux constitués du triplet à δ_H 0,90 (t, $J=6.9$, 3H), intégrant pour trois protons et du singulet large

entre $\delta_{\text{H}} 1,27\text{--}1,74$ (sl, 40H) couplés à un triplet à $\delta_{\text{H}} 4,33$ (t, $J = 6,7$, 2H) attribuable à un oxyléthylène (O-CH₂-) indique la présence d'une chaîne latérale aliphatique avec une liaison éther. La présence des signaux caractéristiques de trois groupes hydroxyles chélatés à $\delta_{\text{H}} 13,14$; 12,50 et 12,41 suggèrent clairement que la chaîne aliphatique est attachée à l'oxygène fixé en C-3 dans l'erythroglaucine (77). Toutes ces données ont permis d'identifier **RVgF33** à la revandchinone-3 (78) et précédemment isolé par Babu *et al.* (2003) dans les racines de *Rheum emodi*.

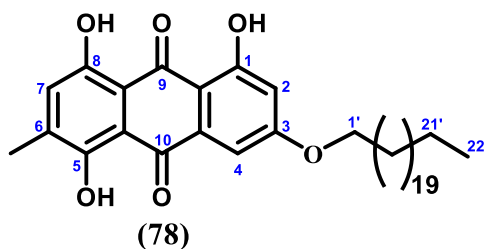


Tableau 19: Comparaison des données de RMN ¹H et ¹³C de RVgF33 dans CDCl₃ avec celles de la revandchinone-3 (78) rapportées par Babu *et al.* (2003)

| Pos. | Expérimentales (RVgF33) | | Revandchinone-3 (78), DMSO-d ₆ | |
|-------------------|---|--|--|--|
| | ¹³ C (125 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ¹ H (500 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., J (Hz)) | ¹³ C (75 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ¹ H (300 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., J (Hz)) |
| 1 | 161,8 | — | 164,2 | — |
| 2 | 124,6 | 7,46 (d, $J = 2,5$) | 120,3 | 7,52 (d, $J = 2,0$) |
| 3 | 148,7 | — | 148,0 | — |
| 4 | 121,0 | 6,74 (d, $J = 2,5$) | 124,0 | 6,98 (d, $J = 2,0$) |
| 5 | 108,4 | — | 162,7 | — |
| 6 | 166,2 | — | 165,2 | — |
| 7 | 109,5 | 7,17 (s) | 129,3 | 7,18 (s) |
| 8 | 164,9 | — | 162,5 | — |
| 9 | 190,7 | — | 189,9 | — |
| 10 | 182,2 | — | 186,4 | — |
| 11(9a) | 113,9 | — | 113,1 | — |
| 12(4a) | 133,4 | — | 132,6 | — |
| 13(8a) | 108,5 | — | 108,5 | — |
| 14(10a) | 135,7 | — | 134,9 | — |
| 6-CH ₃ | 22,0 | 2,07 (s) | 22,2 | 2,03 (s) |
| 1-OH | — | 12,50 (s) | — | 12,47 (s) |
| 5-OH | — | 13,14 (s) | — | 13,36 (s) |
| 8-OH | — | 12,41 (s) | — | 12,40 (s) |
| 1' | 65,0 | 4,33 (t, $J = 6,7$) | — | 4,15 (t, $J = 6,5$) |
| 2'—2' | — | 1,27–1,76 (s l) | 22,6–29,3 | 1,20–1,60 (s l) |
| 22' | — | 0,90 (t, $J = 6,9$) | 14,3 | 0,88 (t, $J = 6,8$) |

II.2.2.4. Identification du composé RVgF37 (79)

Le composé **RVgF37** précipite sous forme de poudre cristalline jaune rougeâtre soluble dans le méthanol. Il fond entre 253- 256 °C et répond positivement au test de Bornträger caractéristique des anthraquinones. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de **RVgF37** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Tchamgoue *et al.*, 2016) a permis de l'identifier à l'emodine (**79**).

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 35), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 271,0606 compatible avec la formule moléculaire $C_{15}H_{10}O_5$ (Calc. $C_{15}H_{11}O_5$, 271,0601 ; $\Delta=1,8$ ppm) renfermant 11 degrés d'insaturations.

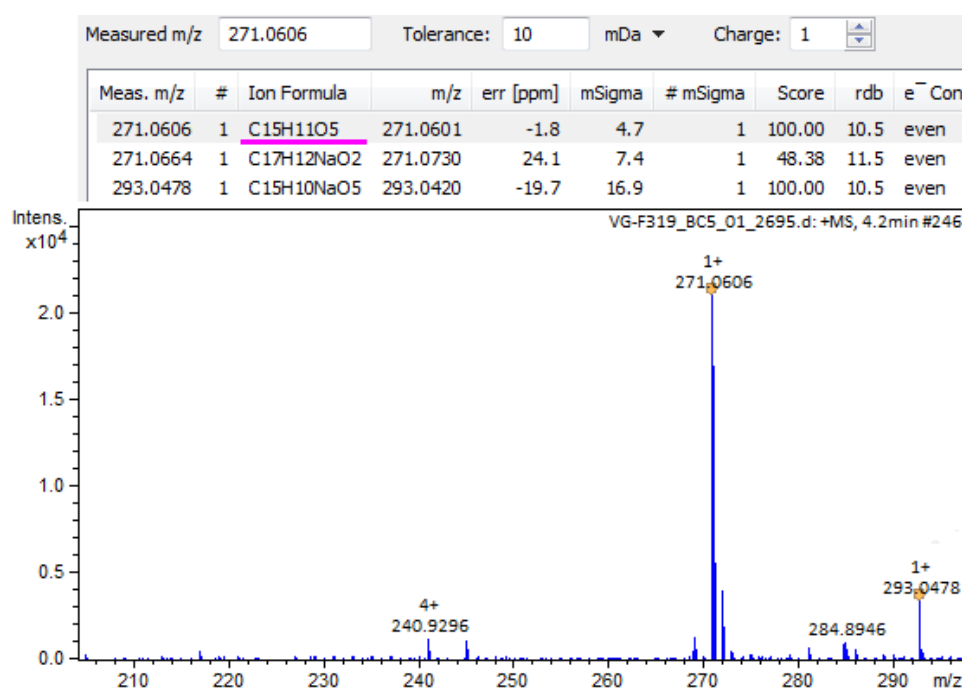


Figure 35: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF37**

L'analyse de son spectre de RMN 1H (figure 36) indique la présence des signaux caractéristiques de deux systèmes de protons aromatiques méta-couplés à δ_H 7,21 (d, $J = 2,4$) et δ_H 6,58 (d, $J = 2,4$) d'une part et δ_H 7,61 (d, $J = 1,0$, 1H) et δ_H 7,13 (d, $J = 1,0$) d'autre part. De plus, on observe le signal caractéristique d'un groupe méthyle attaché au un noyau aromatique à δ_H 2,46 (s) intégrant pour trois protons, et rappelant le squelette de la physcion précédemment décrit. L'absence de signal caractéristique du méthoxyle en position C-3 plaide en faveur d'un 1,3,8-tihydroxyl-6-méthyl-9,10-dihydro-9,10-anthracènedione. Toutes ces données (tableau 20, figures 34 et 35), ont permis d'identifier le composé **RVgF37** à l'emodine (**79**), précédemment isolé de *Pseudarthria hookeri* par Tchamgoue *et al.*, (2016).

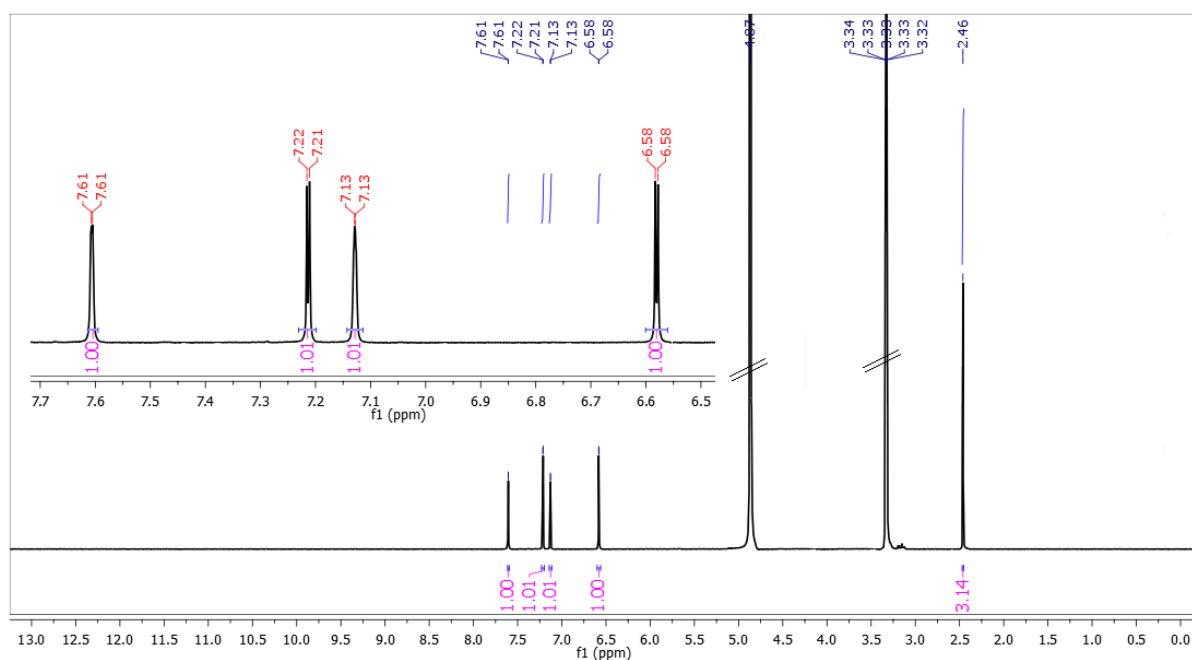


Figure 36: Spectre de RMN ^1H (500 Mz, CD_3OD) du composé **RVgF37**

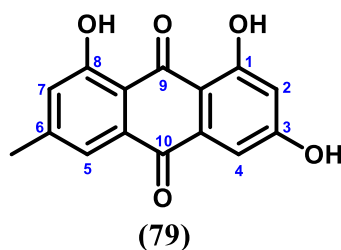


Tableau 20: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de RVgF37 dans le CD_3OD avec celles de l'émodyne (79) rapportées par Tchamgoue *et al.*, (2016)

| Pos. | Expérimentales (RVgF37) | | Emodyne (79), CD_3OD | |
|------------------|--------------------------------|---|--------------------------------------|---|
| | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| 1 | 165,2 | — | 165,4 | — |
| 2 | 108,2 | 7,21(d, $J = 2,4$) | 108,8 | 6,29 (d, $J = 2,5$) |
| 3 | 164,5 | — | 164,3 | — |
| 4 | 106,7 | 6,58 (d, $J = 2,4$) | 106,6 | 7,05 (d, $J = 2,5$) |
| 5 | 121,3 | 7,61 (d, $J = 1,0$) | 121,1 | 7,51 (d, $J = 1,0$) |
| 6 | 148,7 | — | 148,2 | — |
| 7 | 124,5 | 7,13 (d, $J = 1,0$) | 124,8 | 7,02 (d, $J = 1,0$) |
| 8 | 162,5 | — | 161,2 | — |
| 9 | 190,8 | — | 189,4 | — |
| 10 | 182,0 | — | 181,5 | — |
| 11(9a) | 113,9 | — | 108,9 | — |
| 12(4a) | 133,2 | — | 136,4 | — |
| 13(8a) | 110,2 | — | 113,3 | — |
| 14(10a) | 135,2 | — | 133,3 | — |
| 6- CH_3 | 22,0 | 2,46 (s) | 21,9 | 2,40 (s) |

II.2.3. Caractérisation des flavonoïdes

II.2.3.1. Elucidation structurale du composé FVgF31(80)

Le composé **FVgF3** a été isolé des parties aériennes de *V. guineensis* et se présente sous forme de poudre amorphe jaune soluble dans le méthanol. Il donne un résultat positif au test de Shinoda indiquant la nature flavonoïdique de la molécule. Sa formule moléculaire brute $C_{16}H_{12}O_6$ a été établie à partir du pic de l'ion pseudo-moléculaire observé sur son spectre HRESI en mode positif à m/z 301,0705 ($[M+H]^+$; $C_{16}H_{13}O_6$; calc. 301,0707 ; $\Delta=0,6$ ppm), renfermant onze (11) degrés d'insaturations (figure 37).

Le spectre IR (figure 38) présente des bandes de vibrations caractéristiques à ν_{max} 3019 cm^{-1} (OH), 1658 cm^{-1} (carbonyle conjugué) et 2208 cm^{-1} (C=C) tandis que son spectre UV (figure 39) présente des bandes d'absorption maximales à λ_{max} 335, 282 et 206 nm suggérant que le squelette d'un flavone (Markham et Marbry, 1975 ; Markham, 1982).

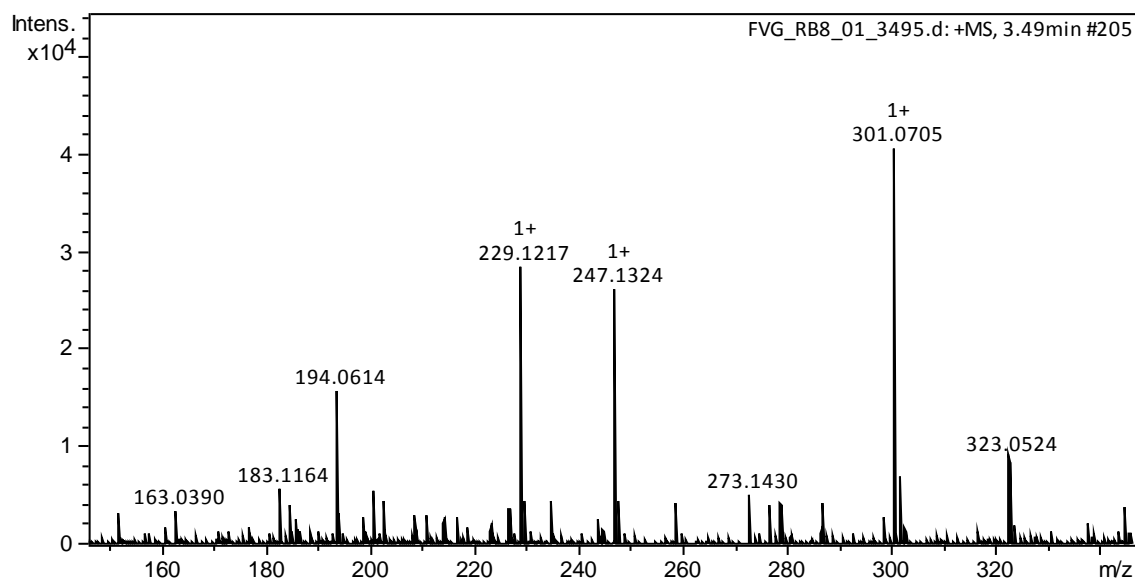


Figure 37: Spectre de masse (+)-HRESI du composé **FVgF31**

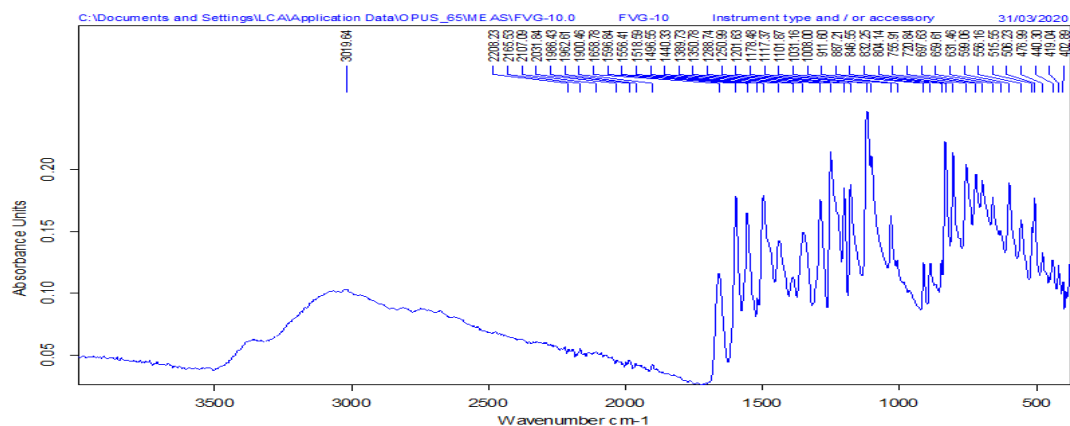


Figure 38: Spectre IR-TF (KBr) du composé **FVgF31**

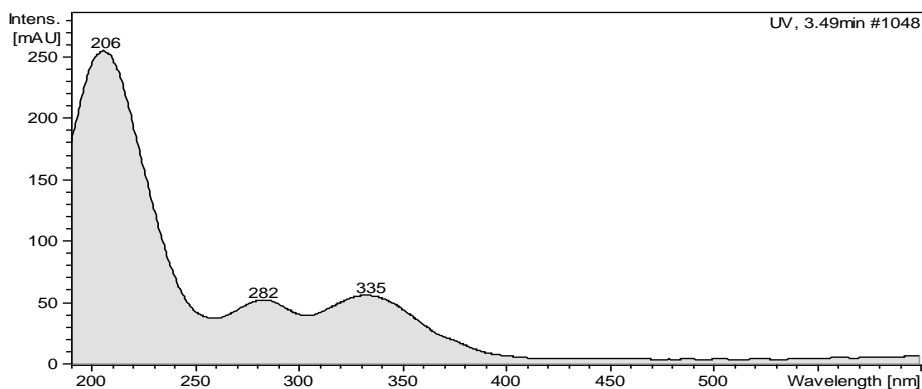


Figure 39: Spectre UV (MeOH) du composé **FVgF31**

L'interprétation des spectres de RMN ^1H et ^{13}C (figures 40 et 41) de **FVgF31** indique un signal à $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 102,1/6,66 (s) fréquemment observé dans la série des flavones et caractéristique du méthine en position 3 (Tchamgoue *et al.*, 2016). Ces spectres présentent également des signaux typiques du système AA'BB' caractéristique d'un cycle aromatique 1,4-disubstitué à $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 128,0/7,91 (d, $J = 8,8$, H-2', H-6') et 115,6/6,91 (d, $J = 8,8$, H-3', H-5').

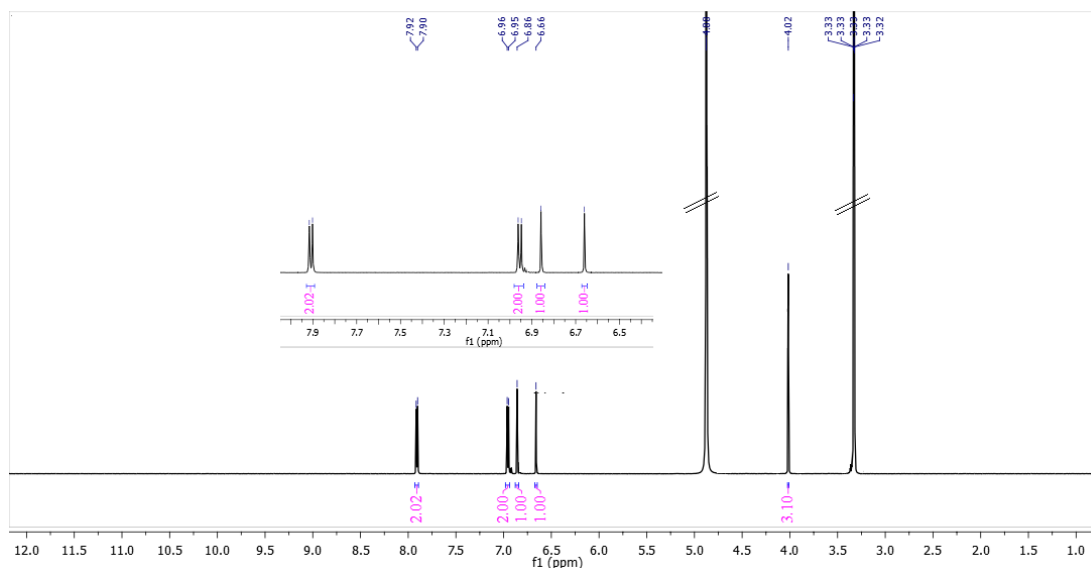


Figure 40: Spectre de RMN ^1H (600 Mz, CD_3OD) du composé **FVgF31**

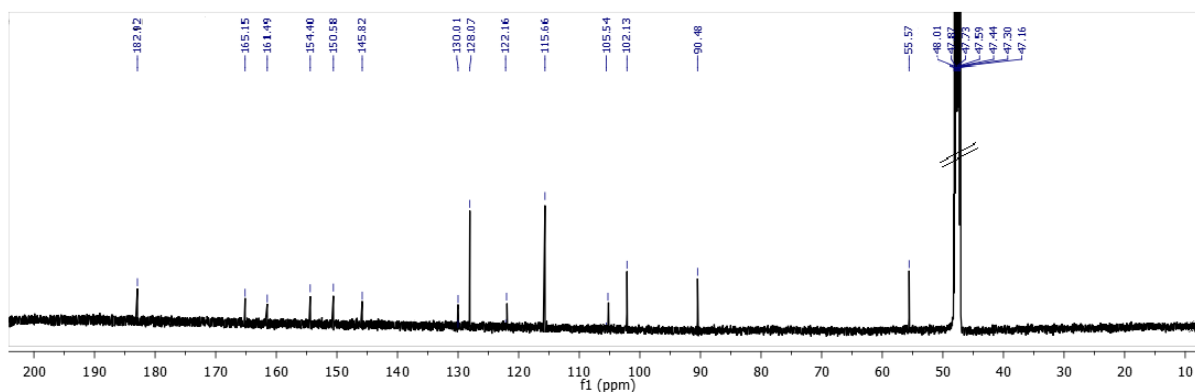


Figure 41: Spectre de RMN ^{13}C (150 Mz, CD_3OD) du composé **FVgF31**

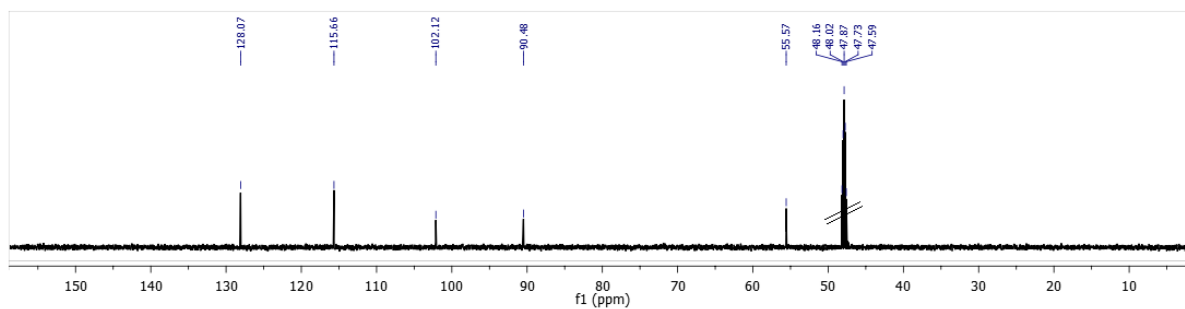


Figure 42: Spectre DEPT 135 (150 Mz, CD₃OD) du composé **FVgF31**

La présence de ce système AA'BB' est confirmée par l'analyse du spectre COSY (figure 43) qui fait apparaître des taches de corrélations homonucléaires entre les signaux de protons à δ_H 7,91 et 6,96. La présence du signal à δ_C 161,5 caractéristique d'un carbinol (=C–OH) et corrélant en HMBC (Figure 45) avec les protons suscités à δ_H 7,91 et 6,96 nous a permis d'établir la sous-structure **SS1** représentée à la page suivante et correspondant au cycle B para hydroxylé des flavones (Markham and Geiger, 1993).

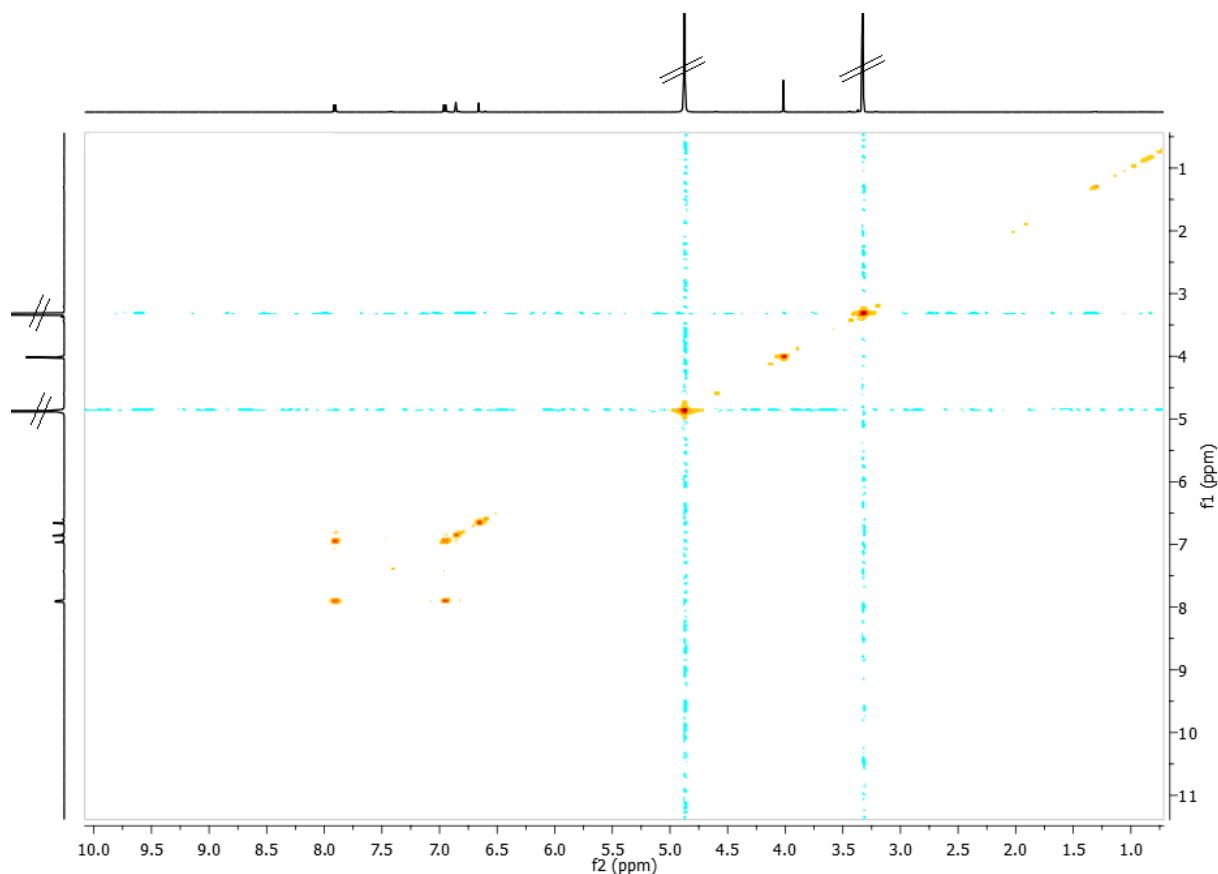
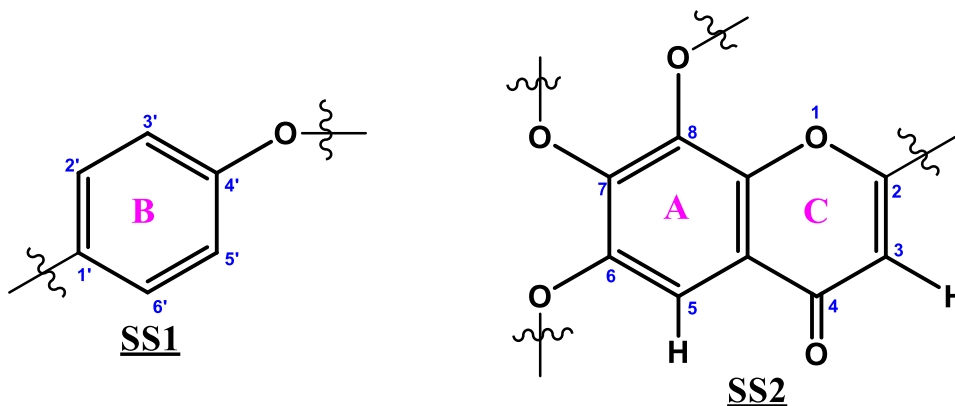


Figure 43: Spectre COSY du composé **FVgF31**

De plus, aucun singulet large n'a été observé sur le spectre de RMN ^1H dans la plage δ_{H} 10–14, ce qui suggère l'absence de l'hydroxyle chélaté (5-OH) généralement observée dans les flavonoïdes. Cette hypothèse structurale a été confirmée par le signal observé à $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 90,5/6,86 (s) qui est apparu comme un méthine sur les spectres DEPT 135 (figure 42) et localisé en position 5 grâce au spectre HMQC (figure 44) et HMBC (figure 45). Le spectre de RMN ^{13}C exhibe 13 pics correspondant à 16 signaux de carbone suggérant une symétrie partielle dans la molécule. C'est d'ailleurs en concordance avec le système AA'BB' caractérisé dans la sous-structure **SS1**. Ces carbones ont été différenciés en utilisant des expériences DEPT et HMQC comme un méthyle, six méthines et neuf carbones quaternaires. Ces signaux comprenant un groupe carbonyle flavone caractéristique à δ_{C} 183,0 (Markham, 1982), un groupement méthoxyle à δ_{C} 55,5 et cinq (05) carbones phénoliques respectivement à δ_{H} 154,4 (C-6), 150,5 (C-7), 145,8 (C-8), 130,0 (C-8a) et 161,5 (C-4') nous a permis d'établir la sous-structure **SS2**, correspondant au cycle A et C des flavones.



Les taches corrélations HMBC observées (figure 45) entre le proton du groupe méthoxyle à 55,5/4,02 (s) et le signal de carbone à δ_{C} 154,4 d'une part, puis le signal du proton à δ_{H} 6.86 (s) et les carbones à δ_{C} 183,0 (C-4), 130,0 (C-8a) et 154,4 (C-6) ont permis de positionner le groupe méthoxyle en position 6 sur le cycle A, tandis que les taches entre le proton H-3 et le carbone C-1' d'une part puis le proton H-2' et le carbone C-2 a permis de joindre les deux sous structures par une jonction C-2—C-1'. Le schéma 12 présente quelques corrélations HMBC et COSY. L'analyse combinée de toutes ces données spectroscopiques a conduit à caractériser sans ambiguïté du composé **FVgF31** comme la 6,7,8-trihydroxy-2-(4-hydroxyphényl)-4 *H*-1-benzopyran-4-one (**80**), un dérivé nouveau à qui nous avons donné le nom trivial vernoguiflavone.

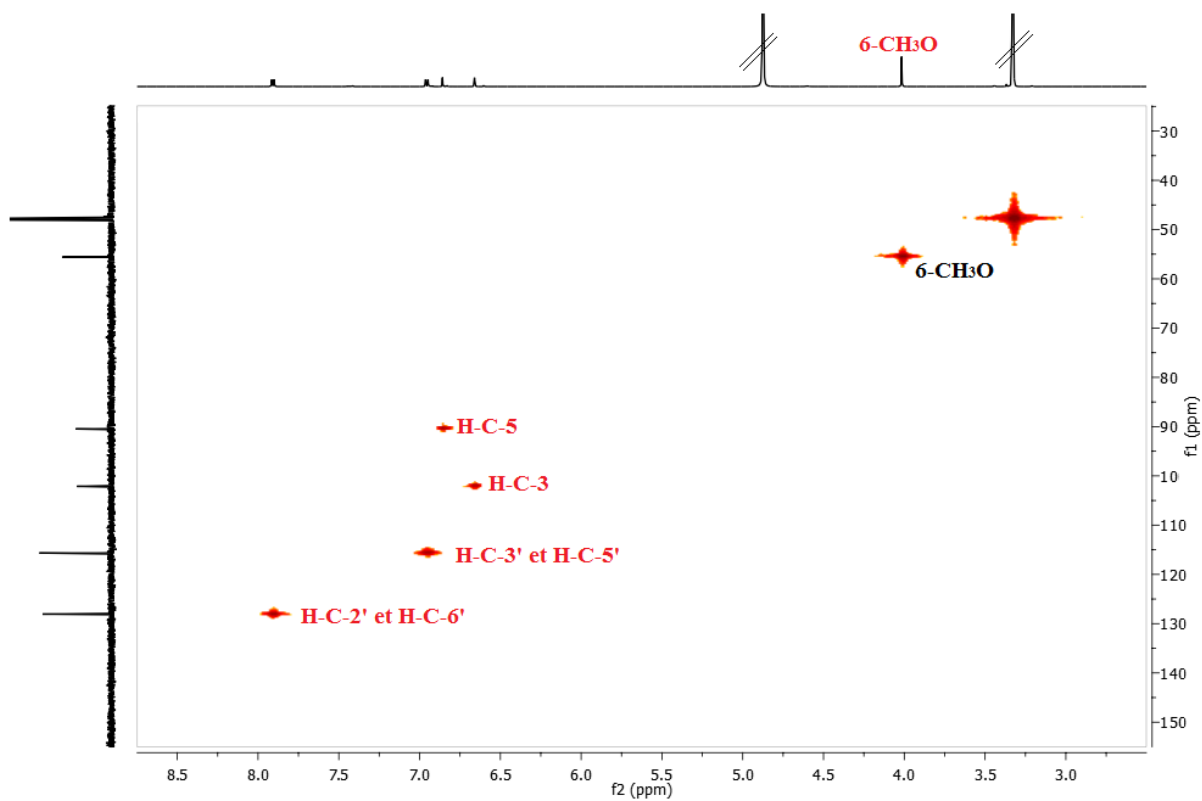


Figure 44: Spectre HMBC du composé FVgF31

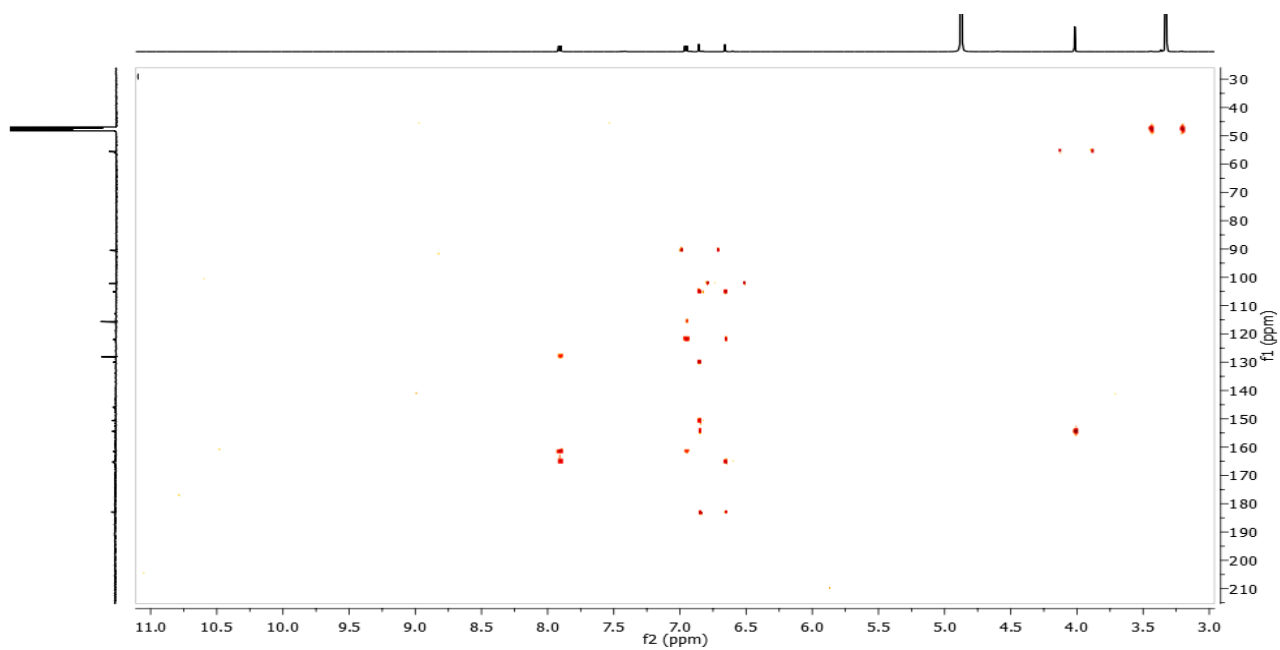


Figure 45: Spectre HMBC du composé FVgF31

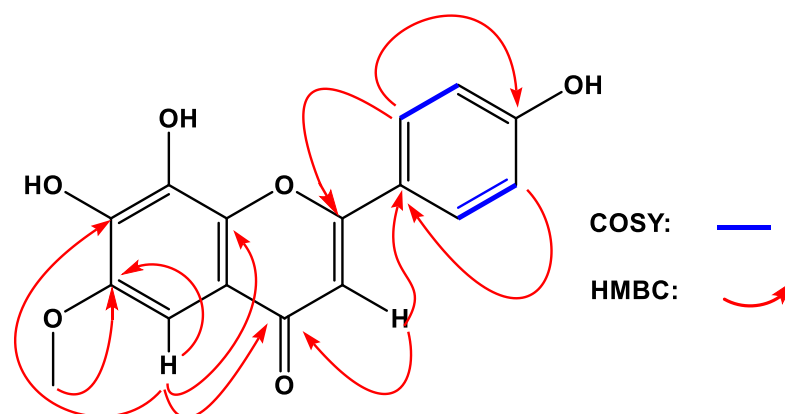


Schéma 12: Quelques corrélations clés observées sur les spectres HMBC et COSY du composé **FVgF31 (80)**

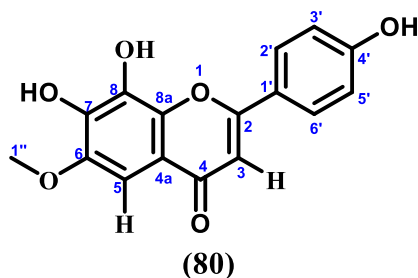


Tableau 21: Données de RMN ^1H et ^{13}C de FVgF31 (80) dans CD_3OD

| Position | ^{13}C (150 MHz) | ^1H (600 MHz) |
|----------|--------------------------------|--|
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., J (Hz)) |
| 1 | — | — |
| 2 | 165,1 | — |
| 3 | 102,1 | 6,66 (s) |
| 4 | 183,0 | — |
| 4a | 105,1 | — |
| 5 | 90,5 | 6,86 (s) |
| 6 | 154,4 | — |
| 7 | 150,5 | — |
| 8 | 145,8 | — |
| 8a | 130,0 | — |
| 1' | 122,0 | — |
| 2' | 128,0 | 7,91 (d, $J = 8,8$) |
| 3' | 115,6 | 6,96 (d, $J = 8,8$) |
| 4' | 161,5 | — |
| 5' | 115,6 | 6,96 (d, $J = 8,8$) |
| 6' | 128,0 | 7,91 (d, $J = 8,8$) |
| 1'' | 55,5 | 4,02 (s) |

II.2.3.2. Identification du composé FVgF32 (11)

Le composé **FVgF32** est isolé des parties aériennes de *V. guineensis* sous forme de fins cristaux jaunes solubles dans l'acétone. Il fond entre 315–317°C et répond positivement au test de Shinoda caractéristique des flavonoïdes et forme un précipité avec le chlorure ferrique, indiquant la présence d'hydroxyles phénoliques dans la molécule. L'interprétation de ses données de RMN et SM en comparaison à celles décrites dans la littérature (Bézanger et al., 1981) a permis de l'identifier à quercétine (11).

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 46), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 303,0498 compatible avec la formule moléculaire $C_{15}H_{10}O_7$ (Calc. $C_{15}H_{11}O_7$, 303,0499 ; $\Delta=0,6$ ppm) renfermant onze (11) degrés d'insaturations.

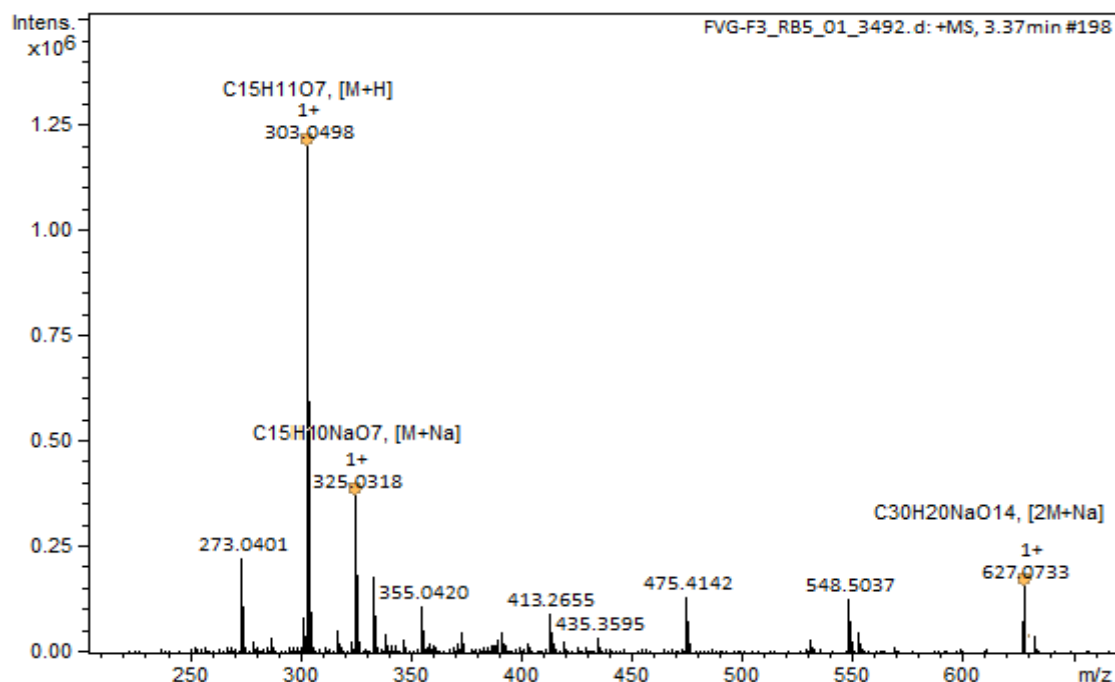


Figure 46: Spectre de masse (+)-HRESI du composé **FVgF32**

Son spectre de RMN ^{13}C (figure 48) exhibe quinze (15) signaux de carbones, donc les signaux à δ_C 175,6, 135,6 et 147,2 sont respectivement attribuables aux carbones centraux C-4, C-3 et C-2 caractéristiques des flavonoïdes de type flavonol (Markam, 1982 ; Lui et al., 2008). L'analyse de son spectre de RMN 1H (figure 47) combiné aux autres spectres RMN, met en évidence :

- Des signaux caractéristiques d'un système AB constitué de deux protons aromatiques appartenant au cycle A d'un squelette de flavonoïde résonnant à δ_C/δ_H 98,4/6,23 (d ; $J = 2,0$) et δ_C/δ_H 93,7/6,39 (d ; $J = 2,0$) et attribuable respectivement aux protons en position C-6 et C-8
- Des signaux caractéristiques d'un système ABX de trois protons aromatiques appartenant au

cycle B d'un squelette de flavonoïde résonnant à δ_C/δ_H 146,5/6,91 (d ; $J = 8,5$), 114,7/7,64(dd, $J = 8,5 ; 2,1$) et 120,7/7,74 (d, $J = 2,1$) attribuables respectivement aux protons en position 5', 6' et 2'. Toutes ces données (tableau 22, figures 46 et 47) ont permis d'identifier ce composé à la quercétine (**11**) précédemment isolé de *Vernonia pectoralis* Bak par Bézanger *et al.* (1981). Nous rapportons ici, l'isolement de la quercétine pour la première fois de *V. guineensis*.

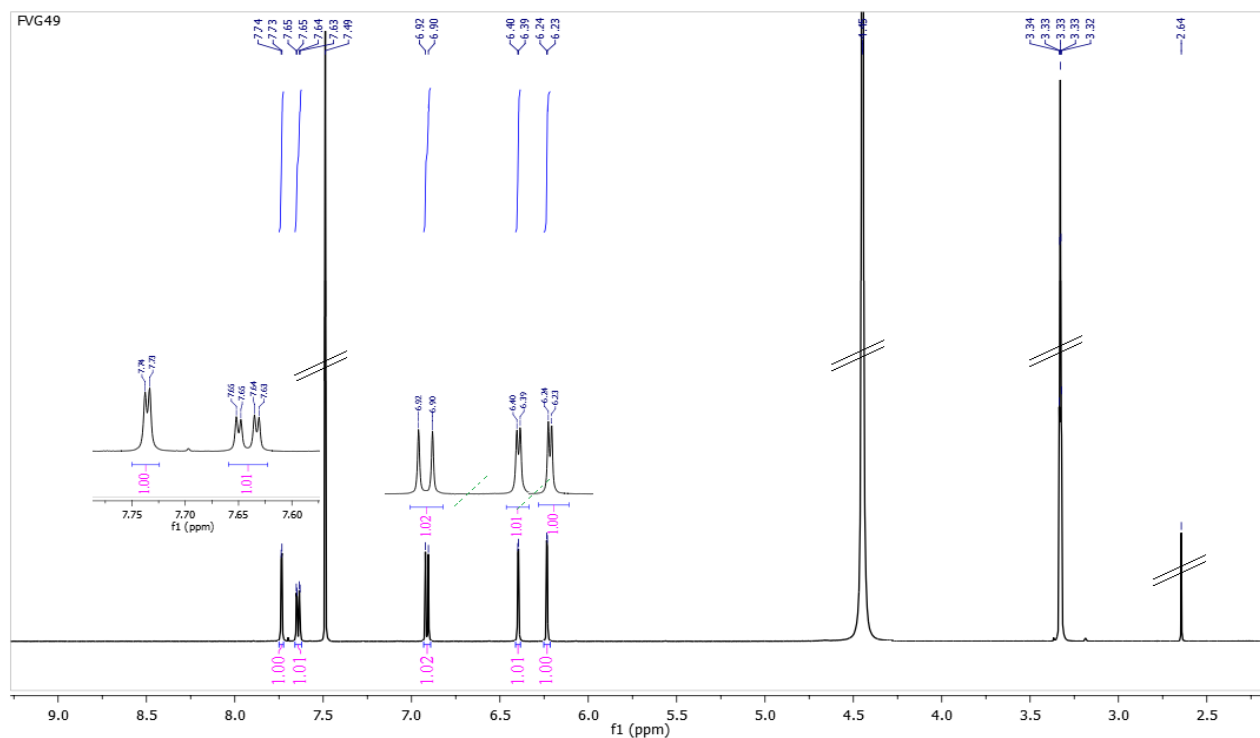


Figure 47: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) du composé **FVgF32**

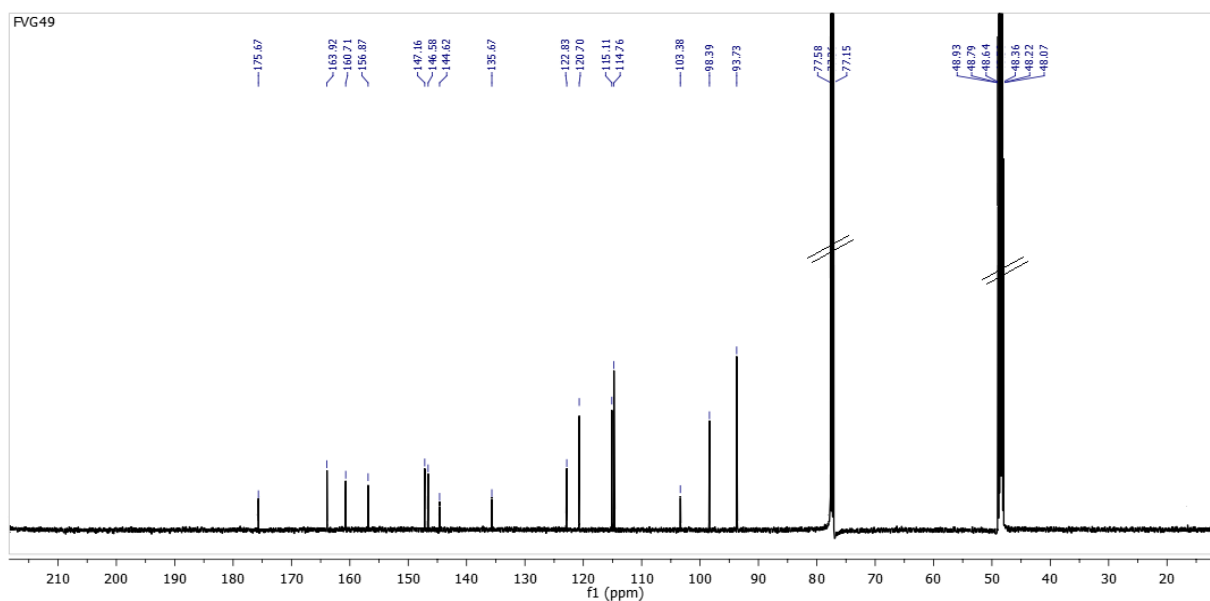


Figure 48: spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) du composé **FVgF32**

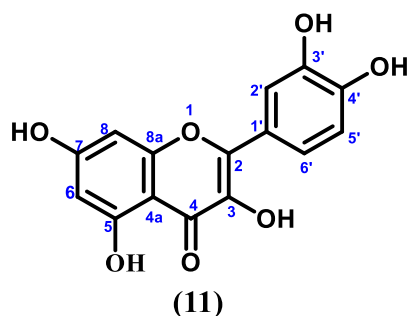


Tableau 22: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C dans le $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ de FVgF32 avec celles de la quercétine (11) rapportées par Bézanger *et al.* (1981)

| Pos. | Expérimentales (FVgF32) | | Quercétine (11), CD_3OD | |
|------|--------------------------------|---|---|---|
| | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| 1 | — | — | — | — |
| 2 | 147,1 | — | 147,7 | — |
| 3 | 135,6 | — | 135,6 | — |
| 4 | 175,6 | — | 175,9 | — |
| 4a | 103,3 | — | 103,0 | — |
| 5 | 160,7 | — | 160,7 | — |
| 6 | 98,4 | 6,23 (d; $J = 2,0$) | 98,2 | 6,17 (d; $J = 2,0$) |
| 7 | 163,9 | — | 163,9 | — |
| 8 | 93,7 | 6,39 (d; $J = 2,0$) | 93,4 | 6,34 (d; $J = 2,0$) |
| 8a | 156,8 | — | 156,9 | — |
| 1' | 122,8 | — | 122,0 | — |
| 2' | 120,7 | 7,74 (d, $J = 2,1$) | 120,0 | 7,68 (d, $J = 2,4$) |
| 3' | 144,6 | — | 145,1 | — |
| 4' | 146,5 | — | 146,8 | — |
| 5' | 115,1 | 6,91 (d; $J = 8,5$) | 115,6 | 6,84 (d; $J = 8,4$) |
| 6' | 114,7 | 7,64 (dd, $J = 8,5 ; 2,1$) | 115,0 | 7,52(dd, $J = 8,4 ; 2,4$) |

II.2.3.3. Identification du composé FVgF33 (14)

Le composé **FVgF33** est isolé des parties aériennes de *V. guinneensis* sous forme de poudre amorphe jaune soluble dans l'acétone et répond positivement au test de Shinoda caractéristique des flavonoïdes. Il donne un précipité violet avec le chlorure ferrique, indiquant la présence d'hydroxyles phénoliques dans la molécule. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques en comparaison à celles décrites dans la littérature (Lin *et al.*, 2015) a permis de l'identifier à la luteoline (14).

En effet, sur son spectre de masse HRESI (figure 49) en mode positif l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 287,0551 compatible avec la formule moléculaire $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ (Calc. $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6$, 287,0550 ; $\Delta=0,3$ ppm) renfermant 11 degrés

d'insaturations.

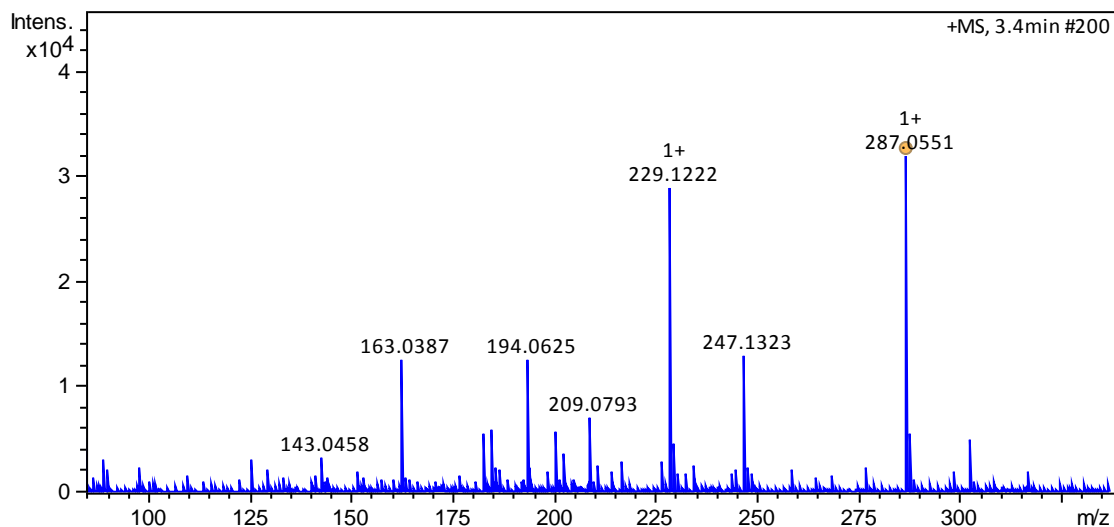


Figure 49: Spectre de masse (+)–HRESI du composé **FVgF33**

L'analyse de ses données de RMN, sont quasi similaire à ceux de la quercetine (**11**) susdécrite. La différence est faite sur le spectre de RMN ^1H (figure 50) par la présence d'un singulet à δ_{H} 6,68 attribuable au proton en position 3 du cycle C d'un squelette de flavone (Lui *et al.*, 2008). En outre, on observe sur ce spectre :

- Deux doublets intégrant pour un proton chacun à δ_{H} 6,22 (d ; $J = 2,1$) et δ_{H} 6,40 (d ; $J = 2,1$) et attribuables respectivement aux protons en position C-6 et C-8 localisés sur le cycle A.
- Les signaux caractéristiques d'un système ABX de trois protons appartenant au cycle B d'un squelette de flavonoïde résonnant à δ_{H} 6,91 (d ; $J = 8,7$), 7,66 (dd, $J = 8,7 ; 2,1$) et 7,74 (d, $J = 2,1$) attribuables respectivement aux protons portés par les carbones C-5', C-6' et C-2'.

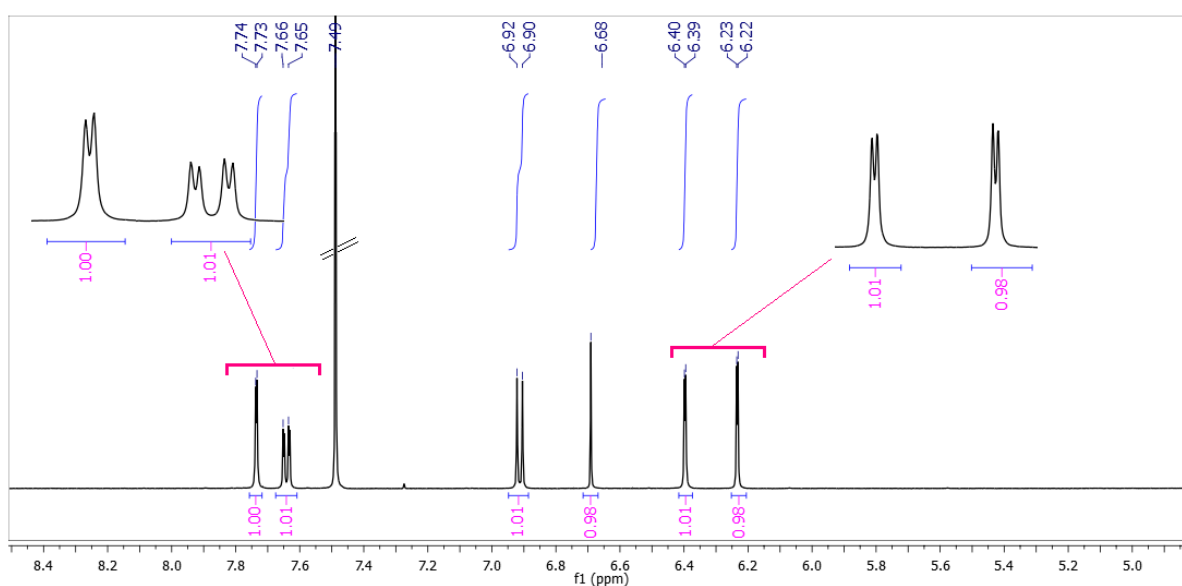


Figure 50: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF33**

Toutes ces données (tableau 23, figures 50), ont permis d'identifier ce composé à la luteoline (14) précédemment isolée de *Vernonia amygdalina* par [Igile et al. \(1995\)](#). Nous rapportons ici, l'isolement de la luteoline pour la première fois de *V. guineensis*.

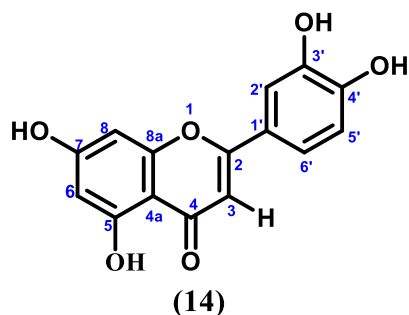


Tableau 23: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de FVgF32 dans le CDCl_3 avec celles de la luteoline (14) rapportées par [Lin \(2015\)](#)

| Pos. | Expérimentales (FVgF32) | | Luteoline (14), CD_3OD | |
|------|--------------------------------|---|--|---|
| | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | ^{13}C (100 MHz) | ^1H (400 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| 1 | — | — | — | — |
| 2 | 164,3 | — | 163,9 | — |
| 3 | 103,3 | 6,68 (s) | 102,8 | — |
| 4 | 181,6 | — | 181,5 | — |
| 4a | 103,6 | — | 103,6 | — |
| 5 | 161,5 | — | 161,1 | — |
| 6 | 98,4 | 6,22 (d; $J = 2,1$) | 98,6 | 6,21 (d; $J = 2,2$) |
| 7 | 164,0 | — | 163,8 | — |
| 8 | 93,9 | 6,40 (d; $J = 2,1$) | 93,9 | 6,47(d; $J = 2,2$) |
| 8a | 157,0 | — | 157,4 | — |
| 1' | 122,8 | — | 121,5 | — |
| 2' | 114,7 | 7,74 (d, $J = 2,1$) | 113,1 | 7,41 (d, $J = 2,2$) |
| 3' | 144,6 | — | 145,5 | — |
| 4' | 149,5 | — | 149,4 | — |
| 5' | 116,0 | 6,91 (d; $J = 8,7$) | 115,8 | 6,92 (d; $J = 7,8$) |
| 6' | 120,7 | 7,66 (dd, $J = 8,7 ; 2,1$) | 118,8 | 7,43 (dd, $J = 7,8 ; 2,4$) |

II.2.4. Caractérisation des esters de glycérol

II.2.4.1. Elucidation structurale du composé RVgF310 ou FVgF22 (81)

Le composé **RVgF310** a été isolé des racines et a présenté les mêmes caractéristiques physiques et spectroscopiques que le composé **FVgF22** isolé des parties aériennes de *V. guineensis*. Ces deux échantillons ont été caractérisés comme une seule et même molécule. Cette molécule se présente sous forme de poudre amorphe blanche soluble dans le

chloroforme. Sa formule moléculaire brute $C_{43}H_{84}O_5$ a été établie à partir du pic de l'adduit chloré observé sur son spectre de masse ESI à haute résolution, enregistré en mode négatif à m/z 715,6055 ($[M + Cl]^-$; $C_{43}H_{84}O_5Cl$; calc. 715,6013; $\Delta=5,8$ ppm), renfermant deux (02) degrés d'insaturations (figure 51).

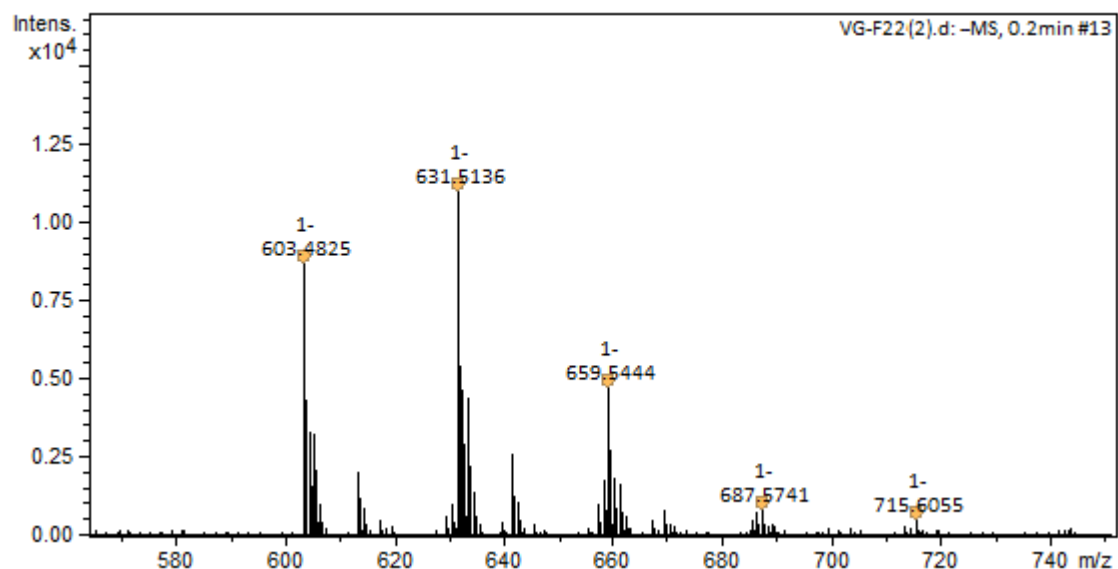


Figure 51: Spectre de masse (-)HRESI du composé **FVgF22 (RVgF310)**

Les signaux des ions fragments à m/z 687 ; 659 ; 631 ; 603 indique la perte successive de deux méthyles (CH_3) à chaque fragmentation suggérant une symétrie à longue chaîne dans la molécule (Medeiros et al. 2009).

L'interprétation des spectres de RMN 1H , ^{13}C et HMQC, (figures 52–56) de **FVgF22** indique :

- d'une part la présence d'un signal intégrant pour un proton à δ_C/δ_H 68,4/4,01 (m) caractéristiques d'un oxyméthine,
- Deux signaux intégrant chacun pour deux protons et résonants respectivement à δ_C/δ_H 65,0/4,07 (dd, $J = 5,9 ; 11,5$) et 65,0/4,12 (dd, $J = 4,3 ; 11,5$) caractéristiques de d'un oxyméthylène dans la molécule.

Ces données suggèrent l'existence d'un fragment dérivé du glycérol dans la molécule (Ebessa et al., 2018 ; Siddique et al., 2017). Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée sur le spectre HMBC (figure 56) et sur le spectre COSY (figure 54). En effet, sur le spectre HMBC, l'on observe des taches de corrélations entre les protons des deux (02) oxyméthylènes à δ_H 4,12 et 4,07 et le carbone de l'oxyméthine à δ_C 68.4 tandis que sur le spectre COSY l'on observe des taches de corrélation entre les protons de chaque oxyméthylène à δ_H 4,12 et 4,07 et le proton de l'oxyméthine à δ_H 4,01. Ces informations nous ont permis de construire la sous-

structure **SS3** dérivée du glycérol.

D'autre part les spectres de RMN ^1H et ^{13}C (figures 52 et 53) exhibent les signaux d'un méthyle terminal sous forme de triplet à $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 14,1/0,81 (t, $J = 7,0$), d'une longue chaîne de méthylènes sous forme de singulet large à $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 29,1—31,9/1,22 et d'un carbonyle à δ_{C} 173,9. Le signal apparaissant sous forme de triplet à $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 34,1/2,28 (t, $J = 7,6$) est attribuable au méthylène en alpha du carbonyle. Ces données nous ont permis de construire la sous-structure **SS4** qui dérive d'un acide gras.

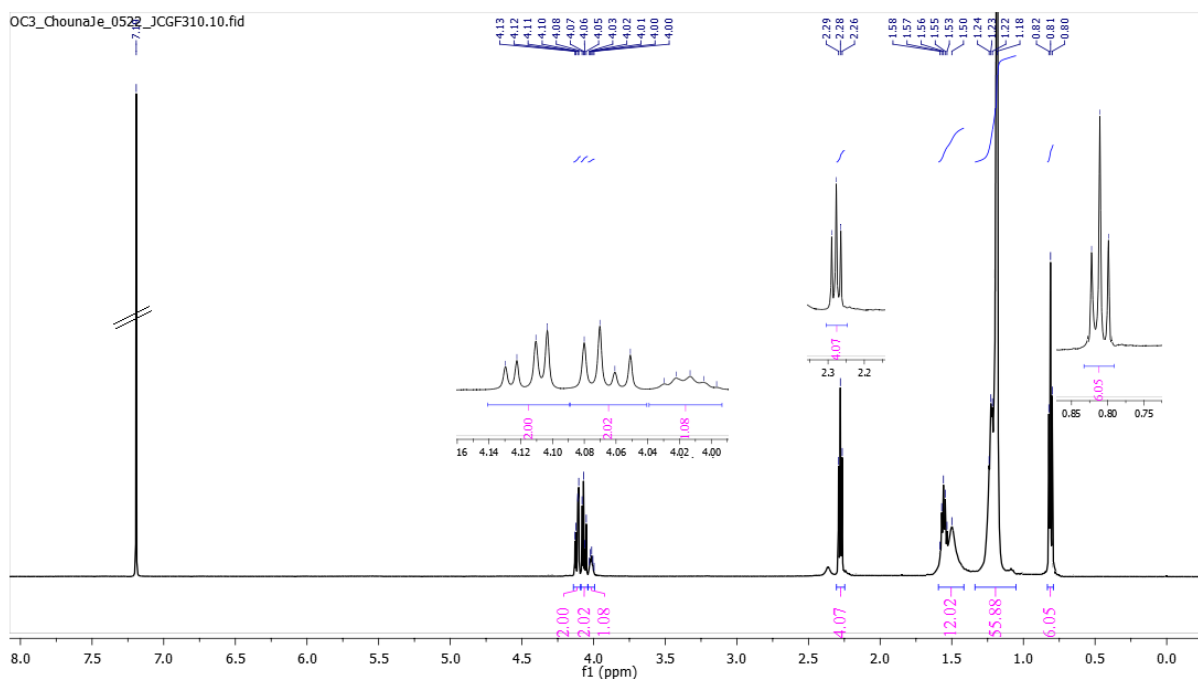


Figure 52: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF22 (RVgF310)**

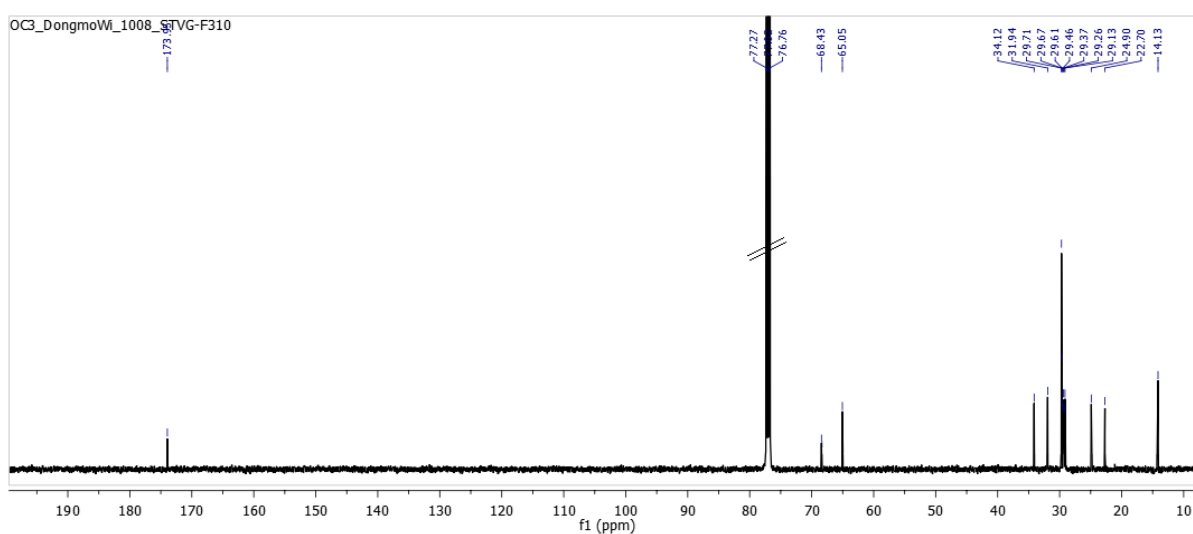
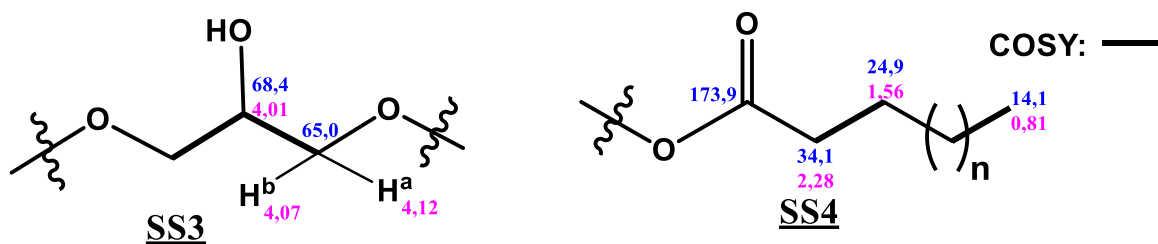


Figure 53: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF22 (RVgF310)**



Sur le spectre HMBC (figure 56), on observe des taches de corrélations entre les protons à δ_H 4,12 et 4,07 et le carbonyle à δ_C 173,9, confirmant la présence de deux fragments d'acide gras symétriques dans la molécule. Cette information conforte l'observation précédemment faite sur le spectre de masse qui a permis de faire un traçage de la dynamique moléculaire, indiquant alors la présence de deux chaînes aliphatiques symétriques perdant successivement sur chaque chaîne les méthyles terminaux. De ce fait, nous avons attaché chaque fragment d'acide gras sur les oxyméthylènes terminaux de la sous structure **SS3**. La longueur de la chaîne aliphatique a été déduite à partir du spectre de masse (figure 51).

Le schéma 13 ci-dessous présente quelques corrélations COSY et HMBC, observées sur les spectres respectifs présentés par les figures 54 et 56.

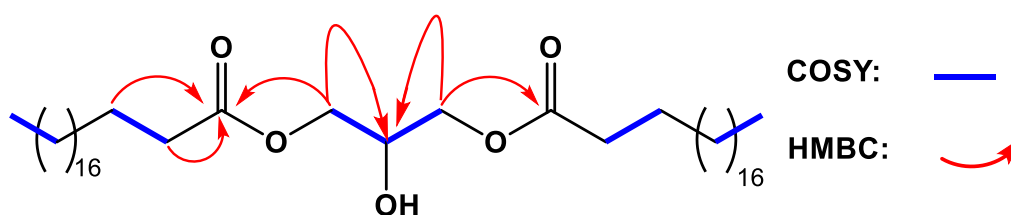


Schéma 13: Quelques corrélations clés observées sur les spectres HMBC et COSY du composé **FVgF22 (RVgF310)**

L'analyse combinée de toutes ces données spectroscopiques a permis de caractériser sans ambiguïté le composé **FVgF22 (RVgF310)** comme l'eicosanoate de 1,1'-(2-hydroxy-1,3-propanediyl) et dont nous avons trivialement nommé bisarachidicester (**81**). Ce composé fut synthétisé en 1980 par *paris et al.*, puis détecté par GC-MS en 2000 par *Paganuzzi et Malerba* mais aucune donnée spectroscopique n'a été rapportée. Nous rapportons donc ici l'isolement et la caractérisation spectroscopique de ce composé pour la première fois.

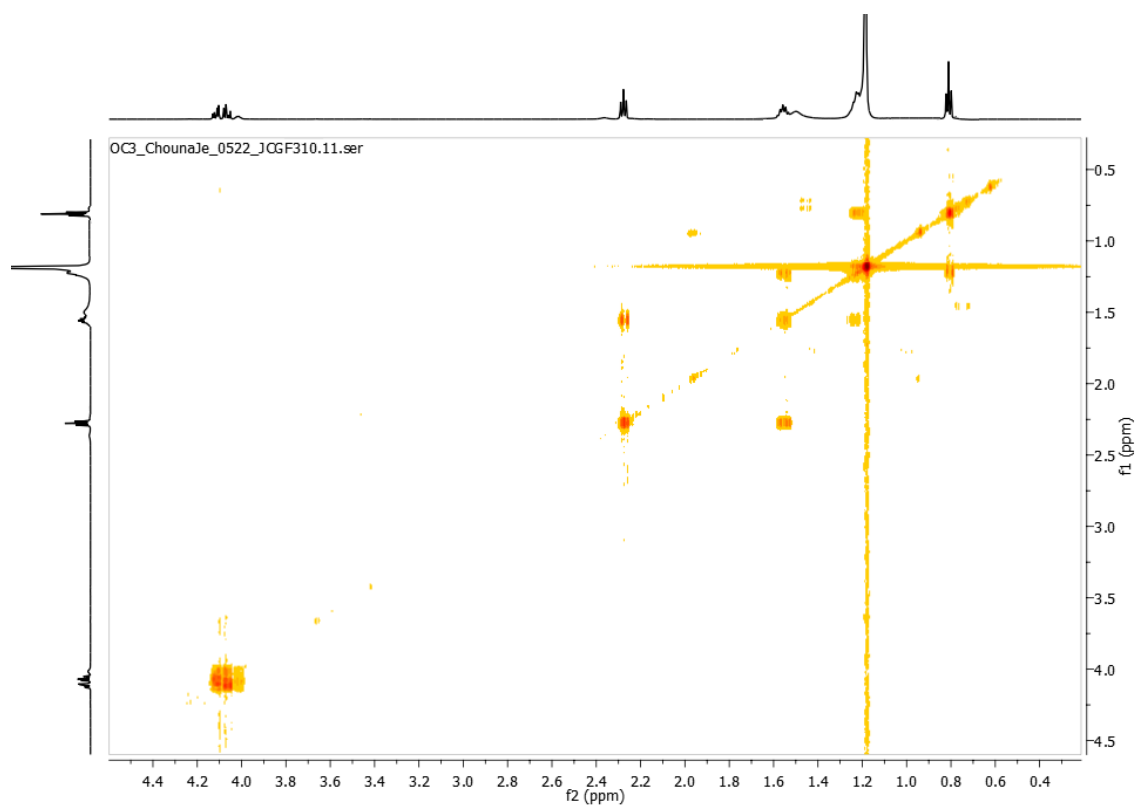


Figure 54: Spectre COSY du composé FVgF22 (RVgF310)

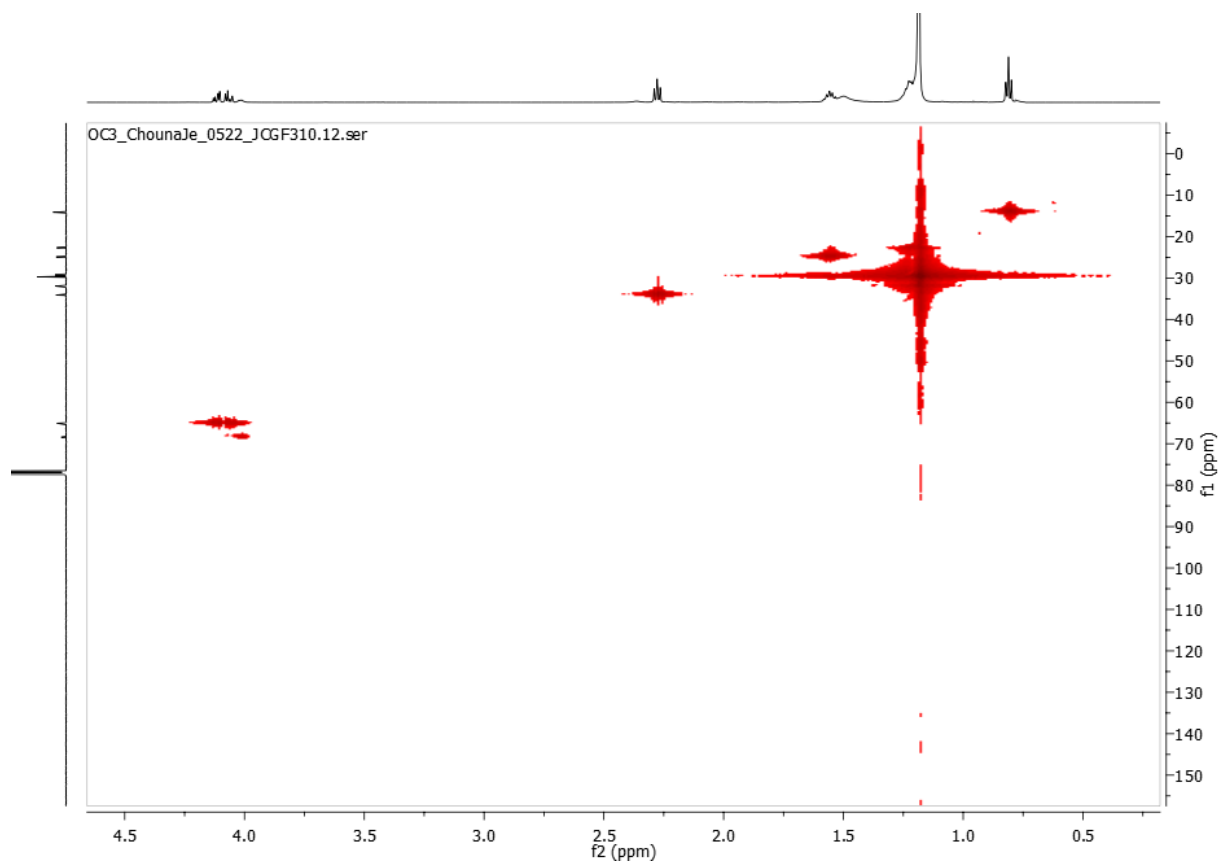


Figure 55: Spectre HMQC du composé FVgF22 (RVgF310)

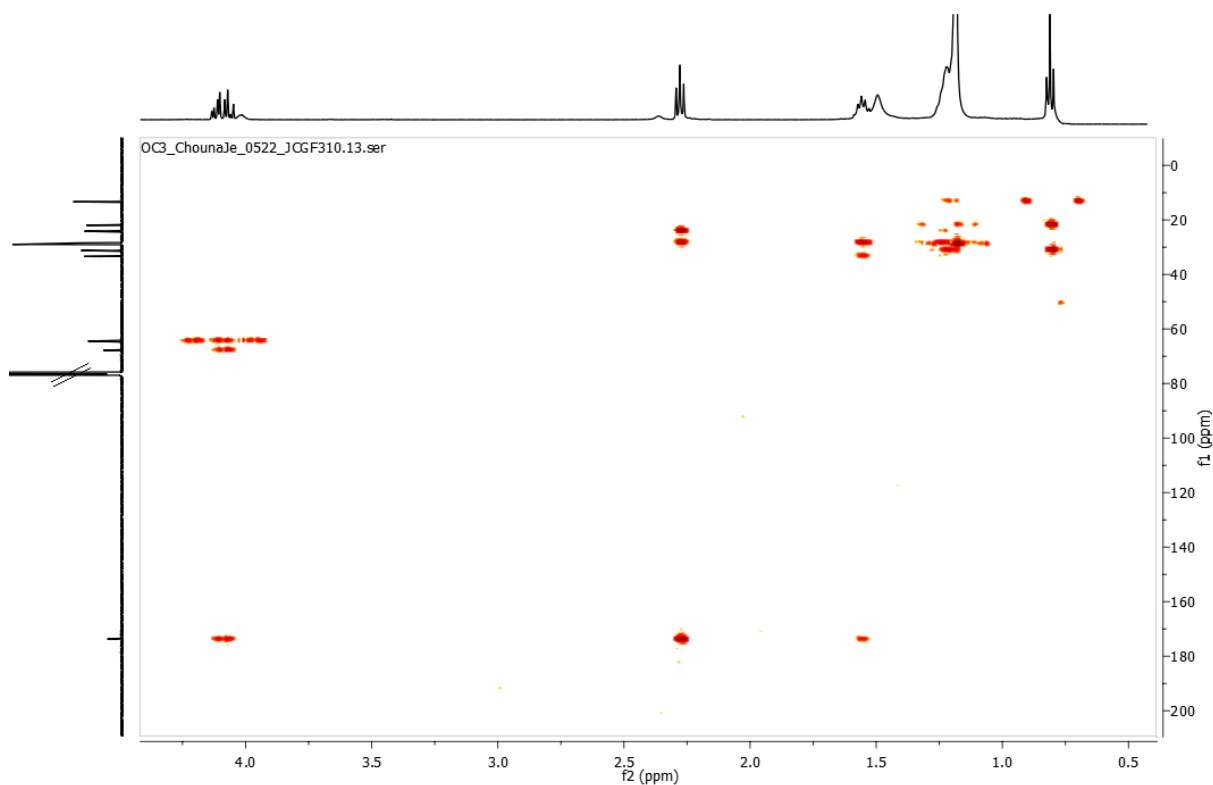


Figure 56: Spectre HMBC du composé **FVgF22 (RVgF310)**

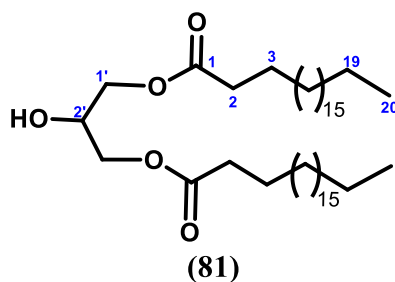


Tableau 24: Données de RMN ^1H et ^{13}C de **FVgF22 (RVgF310)** dans le CDCl_3

| Position | ^{13}C (150 MHz) | ^1H (600 MHz) |
|----------|--------------------------------|--|
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., J (Hz)) |
| 1 | 173,9 | — |
| 2 | 34,1 | 2,28 (t, $J = 7,6$) |
| 3 | 24,9 | 1,56 (m) |
| 4 | 22,7 | 1,33 (m) |
| 5–19 | 29,1–31,9 | 1,22 (br. s) |
| 20 | 14,1 | 0,81 (t, $J = 7,0$) |
| 1' | 65,0 | 4,12 (dd, $J = 11,5 ; 4,3$) 4,07 (dd, $J = 11,5 ; 5,9$) |
| 2' | 68,4 | 4,01 (m) |

II.2.4.2. Identification du composé FVgF25 (82)

Le composé **FVgF25** isolé des parties aériennes de *V. guineensis*, se présente sous forme de poudre amorphe blanche, soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de le caractériser et l'identifier à l'heptacosanoate de 2,3-dihydroxypropyle (**82**). Son spectre de masse à haute résolution ESI enregistré en mode positif (figure 57), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 485,4587 compatible avec la formule moléculaire $C_{30}H_{60}O_4$ (Calc. $C_{30}H_{61}O_4$, 485,4564; $\Delta=4,7$ ppm) renfermant un (01) degré d'insaturation.

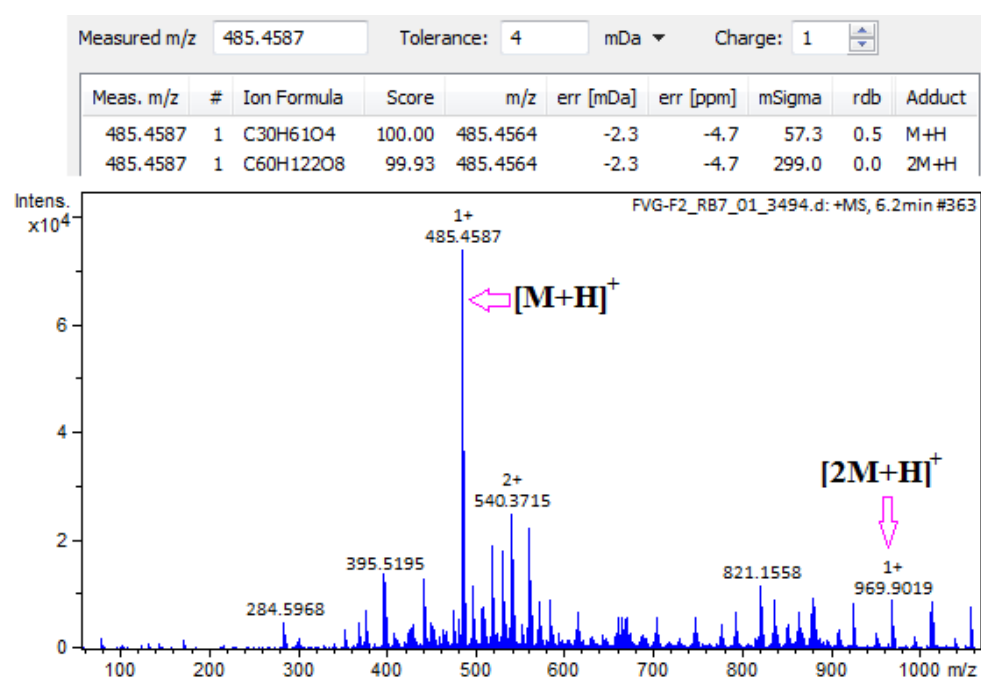


Figure 57: Spectre de masse (+)-HRESI du composé **FVgF22**

L'analyse de son spectre de RMN ¹H (figure 58), indique la présence de signaux quasi identiques à ceux observés sur le spectre de RMN ¹H (figure 52) du composé **FVgF22** (**81**). Toutefois l'absence de symétrie fait la différence, et cela suggère l'estérification d'un seul groupe hydroxyle sur le glycérol. En effet, les signaux à δ_H 4,23 (dd, $J = 11,7, 4,6$; 1H), 4,18 (dd, $J = 11,7$; 6,2, 1H), 3,96 (d, $J = 3,2$), 3,72 (d, $J = 11,3$), 3,63 (d 1, $J = 15,6$) sont respectivement attribuables aux protons diastéréotopiques de l'oxyméthylène en C-1', au proton de l'oxyméthine en C-2' et à ceux de l'oxyméthylène en C-3' caractéristique du fragment de glycérol dans la molécule.

En plus, on observe sur ce même spectre, des signaux caractéristiques de la partie lipidique, à savoir :

- un triplet de trois protons à δ_H 0,90 (t, $J = 7,0$), attribuable au méthyle terminal ;

- un singulet très large de plusieurs protons centrés à δ_H 1,28, caractéristique de l'enchainement de méthylènes de la longue chaîne aliphatique du glycolipide ;
- un triplet de deux protons à δ_H 2,37 (t, $J = 7,6$), attribuable aux protons du méthylène en α d'un carbonyle.

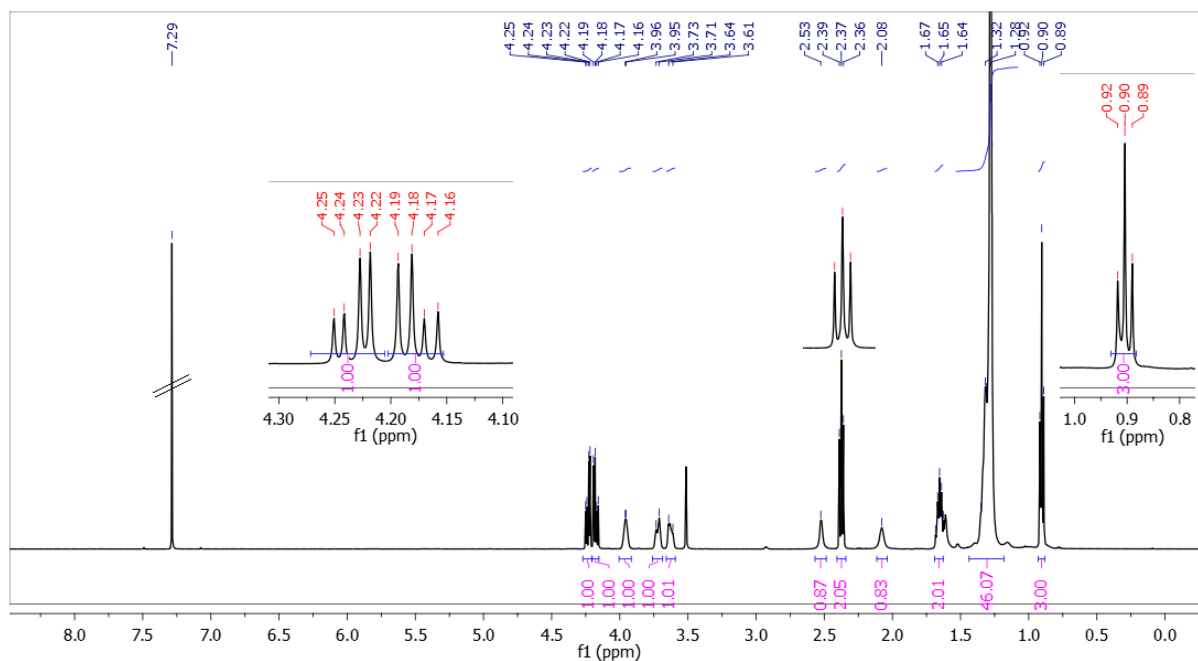


Figure 58: Spectre de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) du composé **FVgF25**

L'analyse des spectres de RMN ^{13}C (figures 59) et HMQC (figures 60) a permis d'identifier les carbones auxquels sont liés les protons précédemment identifiés et confirme l'hypothèse de l'existence d'un carbonyle dans la molécule. En effet on observe sur le spectre de RMN ^{13}C (figures 59) des signaux caractéristique d'un glycolipide, à savoir :

- le méthyle terminal du fragment lipidique dont le signal apparaît à δ_C 14,1 ;
- une succession de méthylènes dont les signaux apparaissent entre 29,1—31,9 ppm ;
- un carbone hybridé Sp^2 à δ_C 174,3 caractéristique d'un carbonyle d'ester ;
- le signal à δ_C 65,1 est attribuable à l'oxyméthylène en C-1' ;
- le signal à δ_C 70,2 est attribuable à l'oxyméthine en C-2' ;
- le signal à δ_C 63,3 est attribuable à l'oxyméthylène en C-3'.

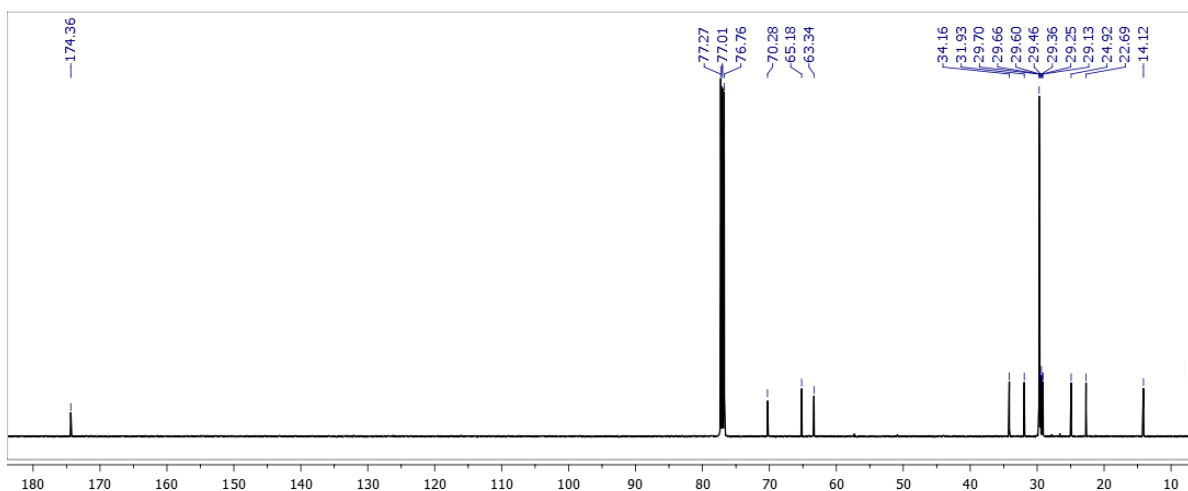


Figure 59: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF25**

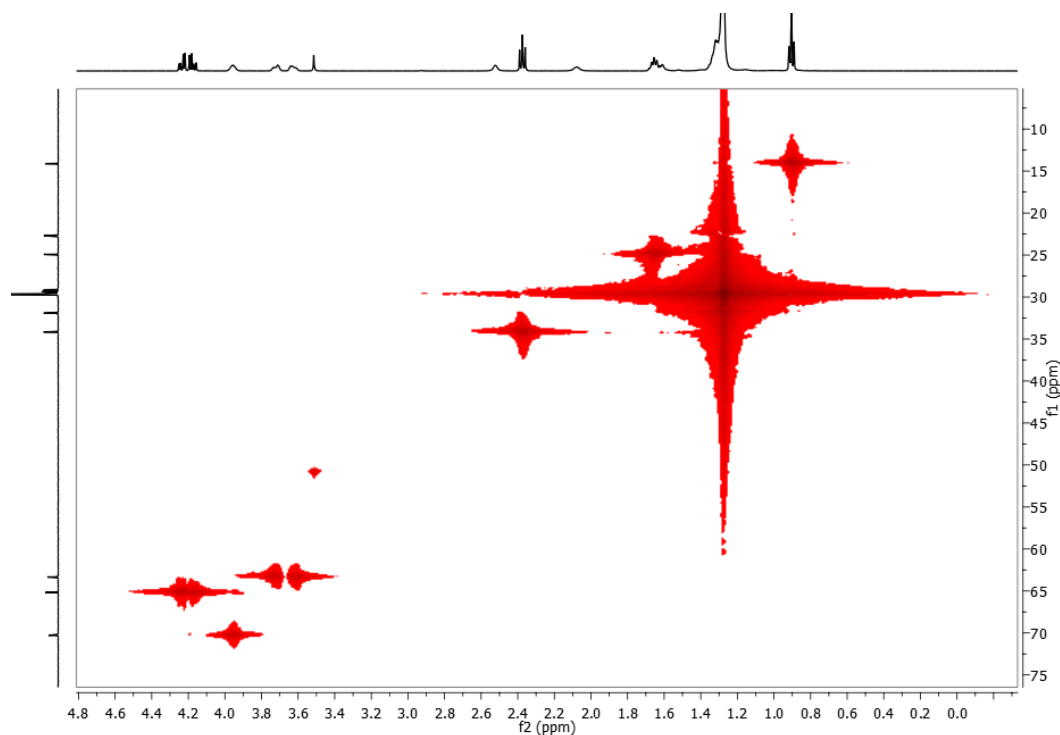


Figure 60: Spectre HMQC du composé **FVgF25**

L'analyse du spectre HMBC (figures 61) a permis d'établir quelques corrélations hétéronucléaires J^2 et J^3 . La plus importante est la tache de corrélation entre le carbone δ_{C} 174,3(carbonyle) et les protons à δ_{H} 4,23 (dd, $J = 11,7, 4,6$), 4,18 (dd, $J = 11,7, 6.2$), qui nous a permis d'attacher par une liaison ester, la longue chaîne lipidique fixée sur l'oxygène en position C-1'.

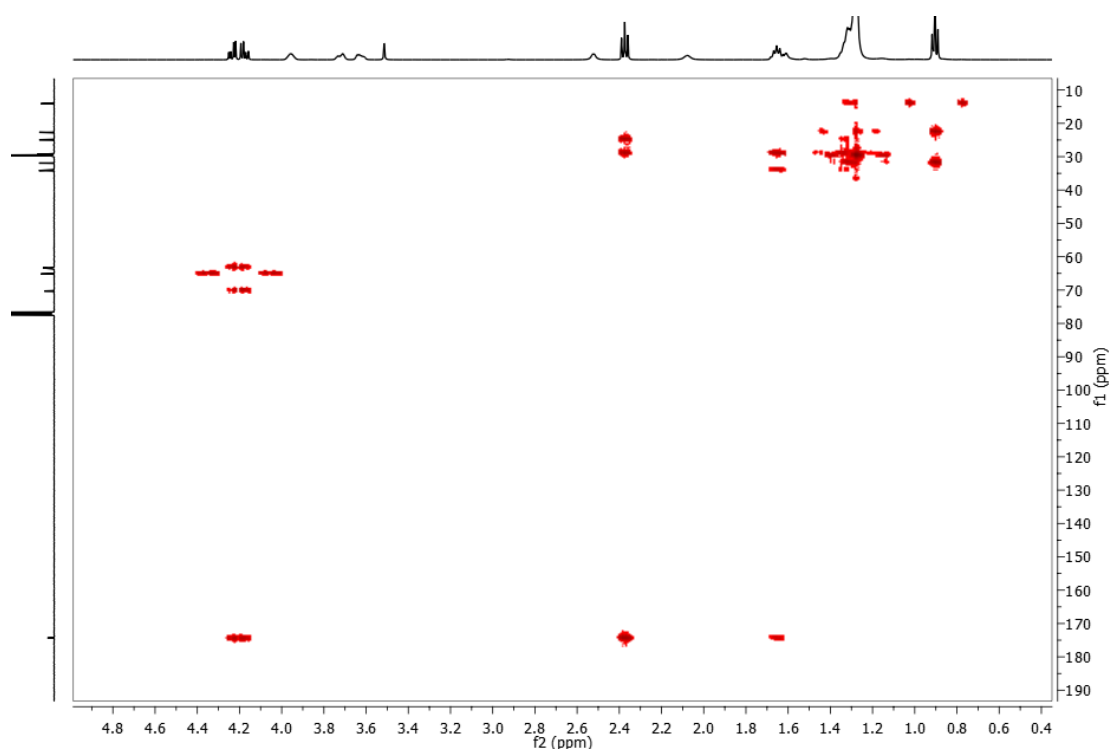


Figure 61: Spectre HMBC du composé **FVgF25**

La longueur de la chaîne a été déduite du spectre de masse (figure 57). Ainsi, l'ensemble de ces données (Spectre de masse, RMN, 1D et 2D) décrites dans cette thèse pour la première fois, nous a permis d'attribuer à **FVgF25**, la structure ci-dessous qui est celle de l'heptacosanoate de 2,3-dihydroxypropyle (**82**), isolé du genre *Vernonia* pour la première fois.

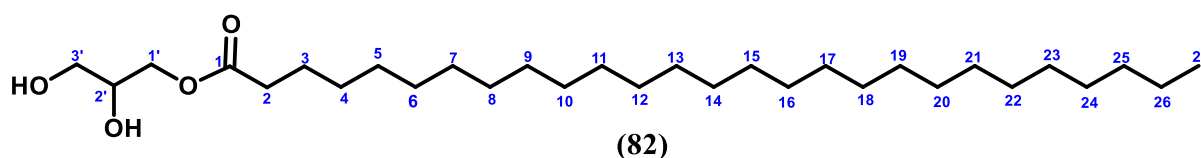


Tableau 25: Données de RMN ^1H et ^{13}C de **FVgF25 (82)** dans le CDCl_3

| | ^{13}C (150 MHz) | ^1H (600 MHz) | HMBC |
|------|--------------------------------|--|------------------------|
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., J (Hz)) | |
| 1 | 174,3 | | |
| 2 | 34,1 | 2,37 (t, $J = 7,6$) | C-1, C-3, C-4 |
| 3 | 24,9 | 1,65 (dt, $J = 14,9 ; 7,6$) | C-1, C-2 |
| 4 | 29,7 | 1,35 (m) | |
| 5–25 | 29,1–31,9 | 1,28 (s l) | |
| 26 | 31,9 | 1,31 (m) | |
| 27 | 14,1 | 0,90 (t, $J = 7,0$) | C-26 |
| 1' | 65,1 | 4,23 (dd, $J = 11,7 ; 4,6$) 4,18 (dd, $J = 11,7 ; 6,2$) | C-2', C-1 C-2', C-1 |
| 2' | 70,2 | 3,96 (d l, $J = 3,2$) | C-3', |
| 3' | 63,3 | 3,63 (d l, $J = 15,6$) | |

II.2.5. Caractérisation des caroténoïdes

II.2.5.1. Identification structurale du composé FVgF26 (89)

Le composé **FVgF26** se présente sous forme de poudre amorphe rouge orangé, soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de le caractériser et l'identifier à la 13-*cis*- β -carotène (**89**).

En effet, sur son spectre de masse (figure 62) ESI à haute résolution enregistré en mode positif, l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 537,4472 compatible avec la formule brute $C_{40}H_{56}$ (Calc. $C_{40}H_{57}$, 537,4455; $\Delta=3,3$ ppm) renfermant treize (13) degrés d'insaturations. L'absorption dans le visible et la décoloration de l'eau de brome justifie la présence d'une série de doubles liaisons carbone-carbone conjuguées.

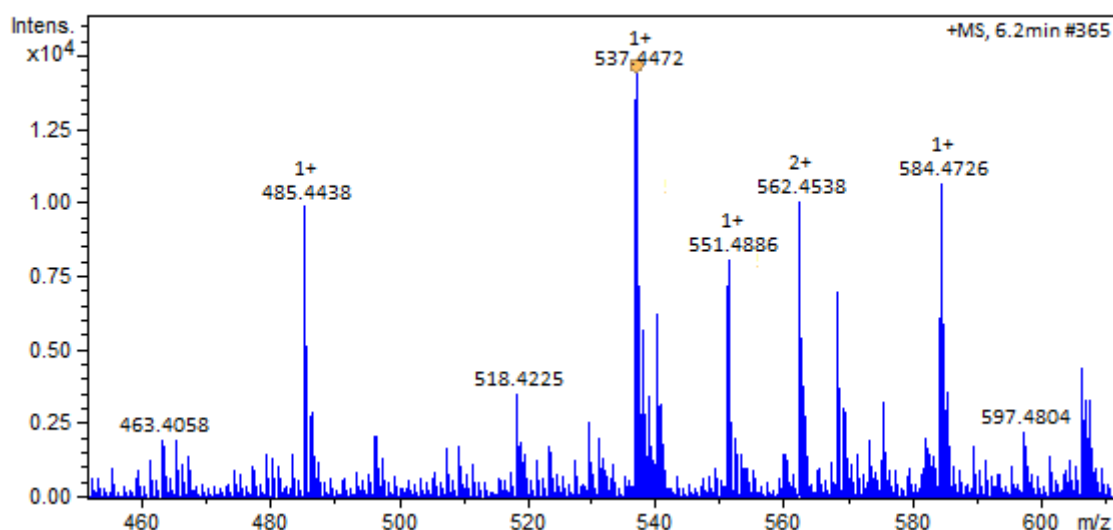


Figure 62: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **FVgF26**

L'analyse de son spectre de RMN 1H (figure 63) met en évidence deux zones bien distinctes :

- La première zone, dans la région des champs forts, présente un ensemble de signaux entre δ_H 1,05–2,05, parmi lesquels deux singulets intenses intégrant chacun pour six (06) protons et raisonnant respectivement à δ_H 1,05 et 2,00 sont attribuables aux méthyles angulaires Me-16,17 et Me-19,20. Parmi les signaux précédemment cités, on observe un autre singulet moins intense, intégrant pour trois protons à δ_H 1,74 attribuable au méthyle Me-18. Une série de signaux raisonnant sous forme de multiplet à δ_H 1,50, 1,63, 2,05 sont respectivement attribuables aux protons des méthylènes en C-2, C-3 et C-4. Cet arrangement a été déduit du spectre COSY (figure 66) par des carrés de corrélations entre le proton H-3 (δ_H 1,63) et les protons H-2 (δ_H 1,50) et H-4 (δ_H 2,05).
- La deuxième zone, dans la région des champs faibles, exhibe également plusieurs

signaux qui se chevauchent entre δ_H 6,17–6,69 attribuables aux protons éthyléniques.

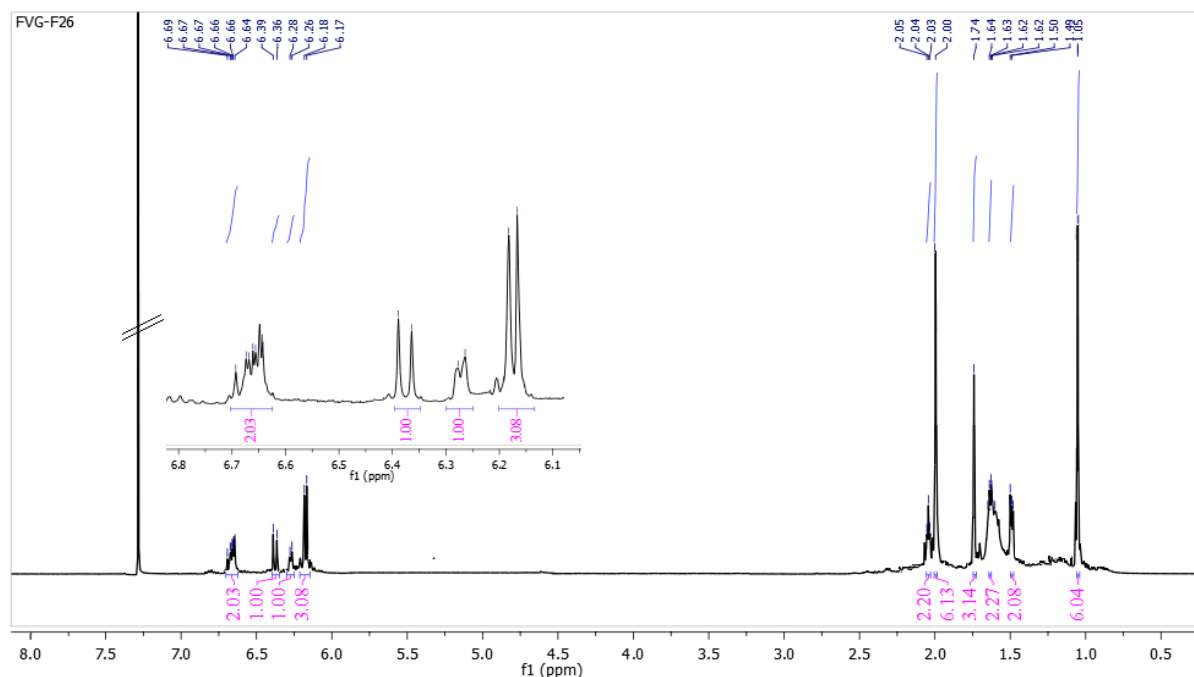


Figure 63: Spectre de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) du composé **FVgF26**

L'exploitation du spectre de RMN ^{13}C (figure 64) et du spectre DEPT 135 (figure 65) a conforté l'hypothèse d'une série de doubles liaisons conjuguées dans la molécule et son caractère visible serait dû à cette conjugaison. En effet, la même distribution de signaux est observée sur le spectre de RMN ^{13}C et présente dans la région des champs faible un amas de signaux entre δ_C 125,0–137,7 dont l'élargi fait ressortir 11 pics bien distincts. La multiplicité de ces carbones a été différenciée par la superposition du spectre de RMN ^{13}C découplée large bande (figure 64) et du spectre DEPT 135 en sept (07) signaux des méthines raisonnant respectivement à δ_C 125,0 (C-11), 126,6 (C-7), 130,0 (C-15), 130,8 (C-10), 132,4 (C-14), 137,25 (C-12) et 137,8 (C-8). Les quatre (04) signaux restants sont ceux des carbones quaternaires raisonnant respectivement à δ_C 129,4 (C-5), 137,9 (C-6), 136,0 (C-9) et 136,5 (C-13). Dans la zone des noyaux blindés, on observe des signaux bien distincts (8 pics) entre δ_C 12,7–39,6 différenciables sur la figure 65 en cinq (05) méthyles à δ_C 12,7 (C-19), 12,8 (C-20), 21,7 (C-18) et 28,9 (intense) (C-16 et C-17) ; trois (03) méthylènes à δ_C 39,6 (C-2), 19,2 (C-3), 31,1 (C-4) ; et un (01) carbone quaternaire à δ_C 34,2 (C-1) qui présente sur le spectre HMBC (figure 69) des taches de corrélations avec les protons H-2, H-3 et H-4. L'ensemble des signaux ici décrit sont compatibles à la formule brute $C_{20}H_{28}$. Or la formule brute de **FVgF26** étant $C_{40}H_{56}$, nous avons déduit l'existence d'une symétrie parfaite dans la molécule. Les spectres COSY (figures 66 et 67), HMQC (figure 68) et HMBC (figure 69) ont quant à eux permis de faire l'assignation complète de cette molécule et d'attribuer à ce composé la

structure (89) ci-dessous qui est celle de la 13-*cis*- β -carotène, isolé du genre *Vernonia* pour la première fois. La configuration de la double liaison en position 13 (13') a été déterminée grâce à la constante de couplage du proton H-14 à δ_H 6,27 (d, $J = 8,0$ Hz).

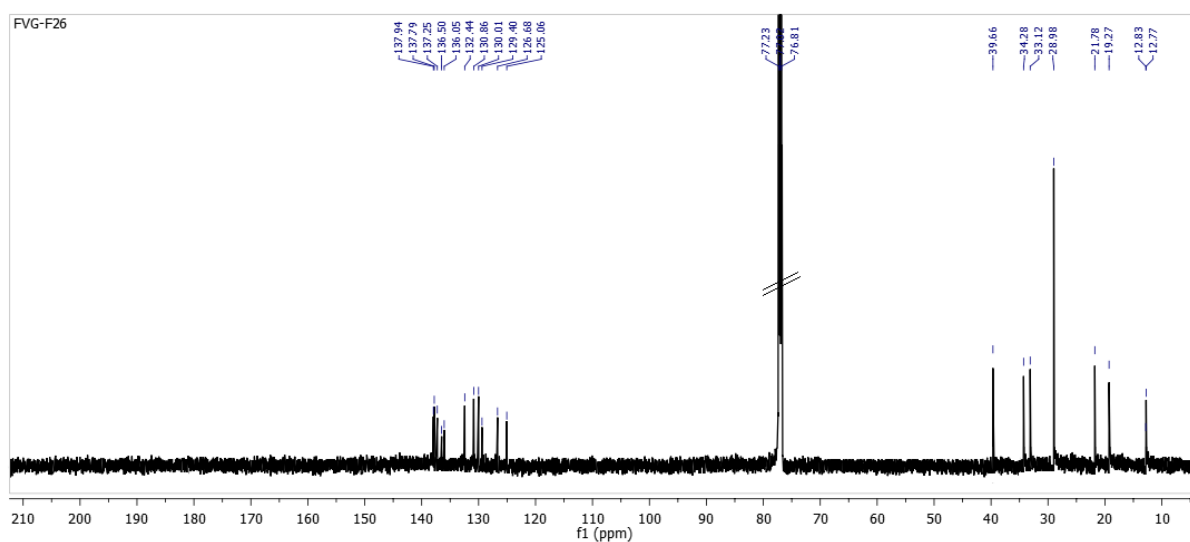
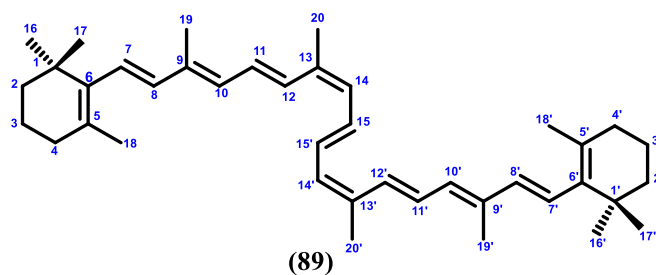


Figure 64: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé FVgF26

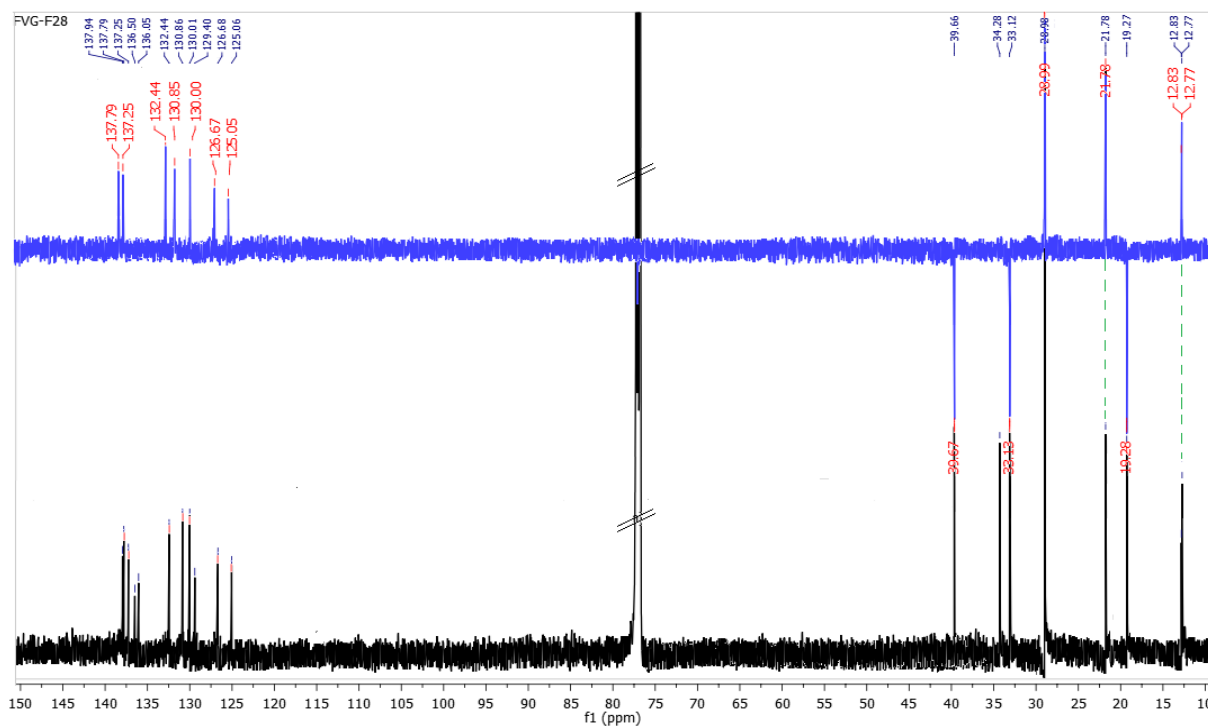


Figure 65: Superposition du spectre DEPT 135 et du spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé FVgF26

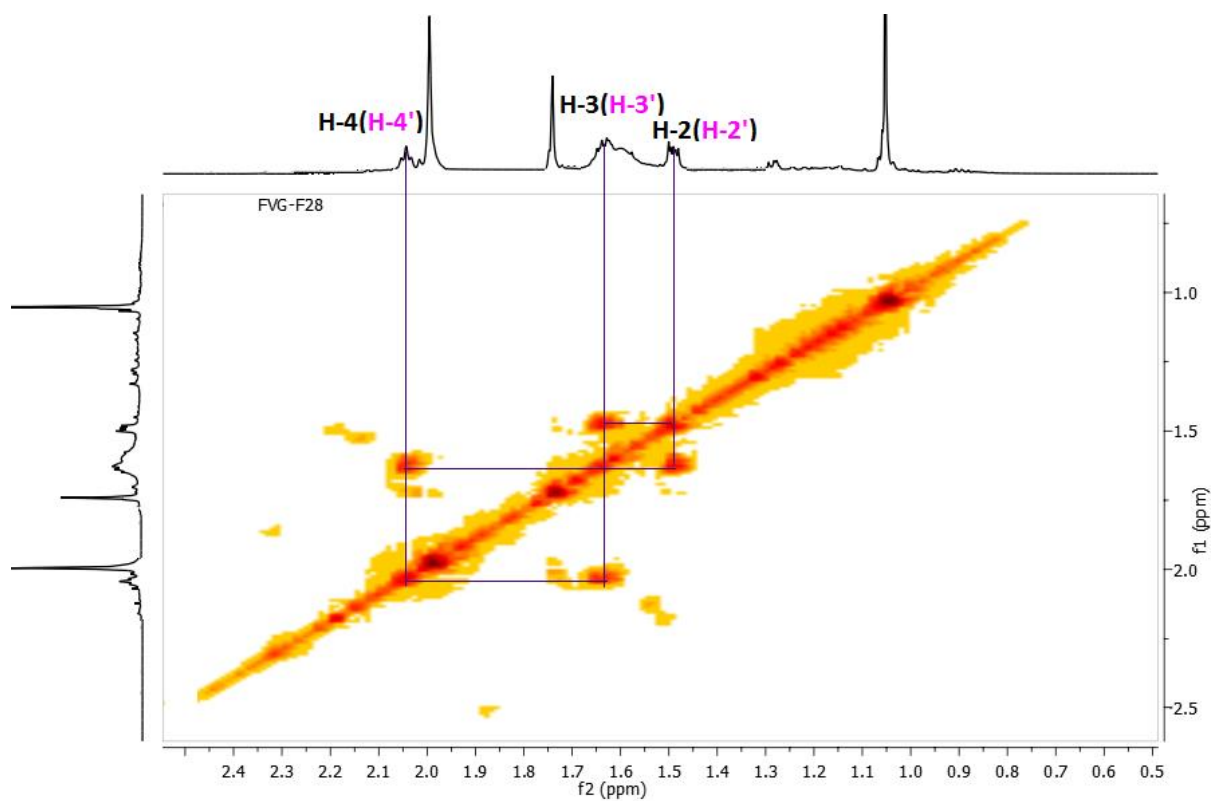


Figure 66: Spectre COSY élargi (0,50–2,50 ppm) du composé **FVgF26**

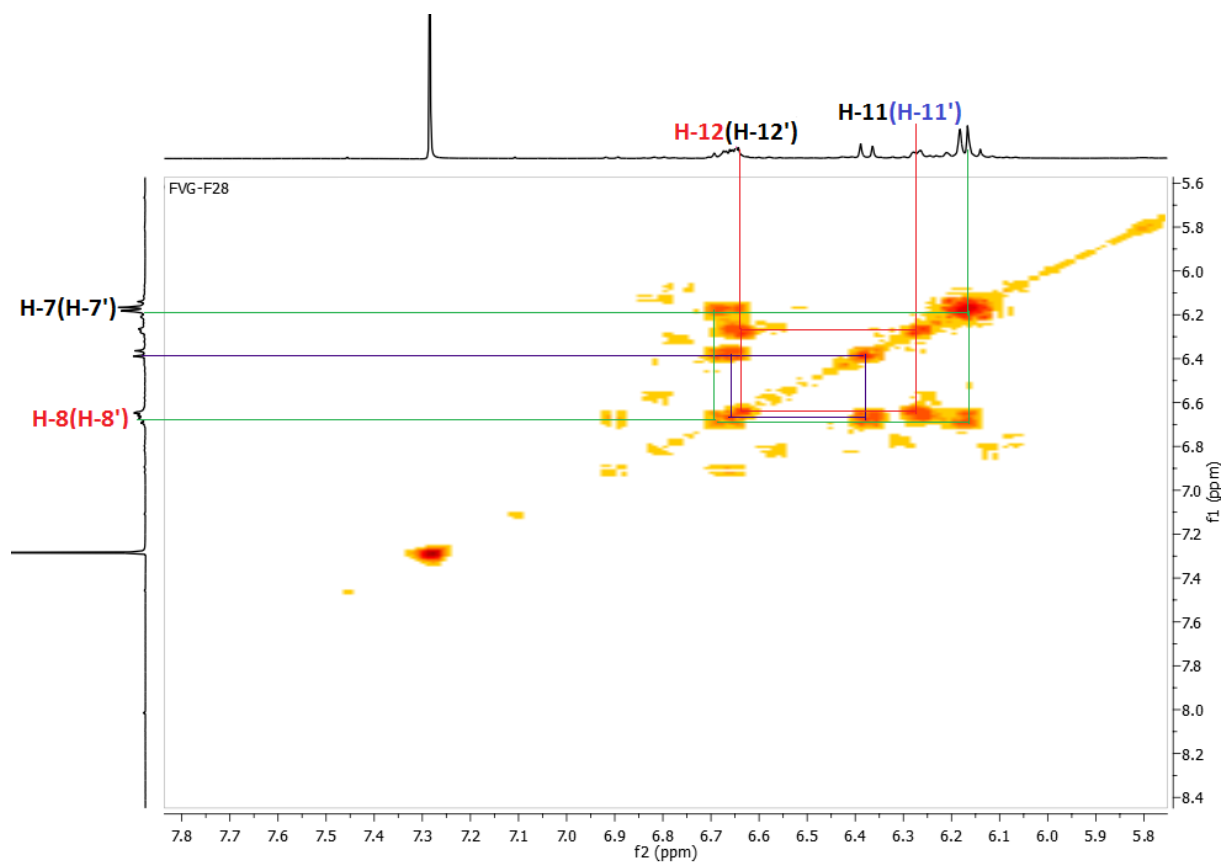


Figure 67: Spectre COSY élargi (5,50–8,00 ppm) du composé **FVgF26**

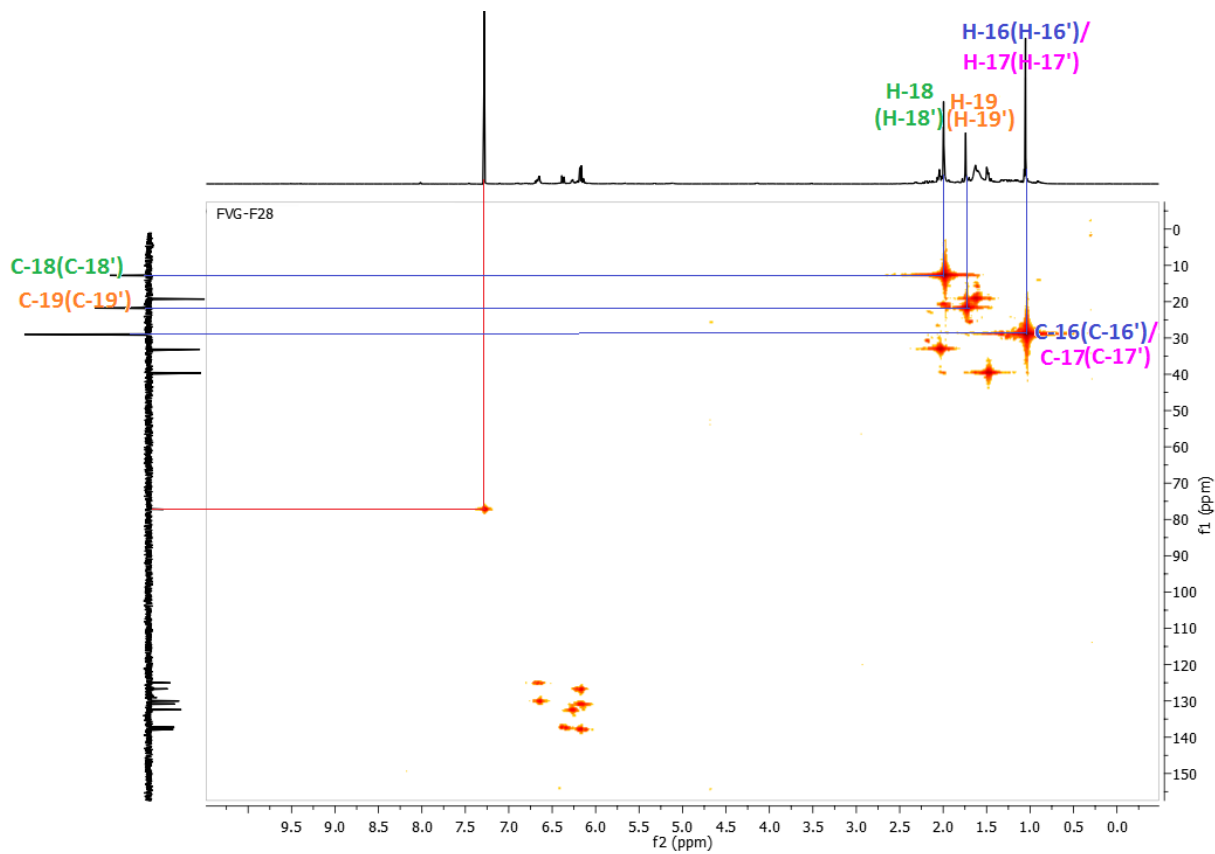


Figure 68: Spectre HMQC du composé FVgF26

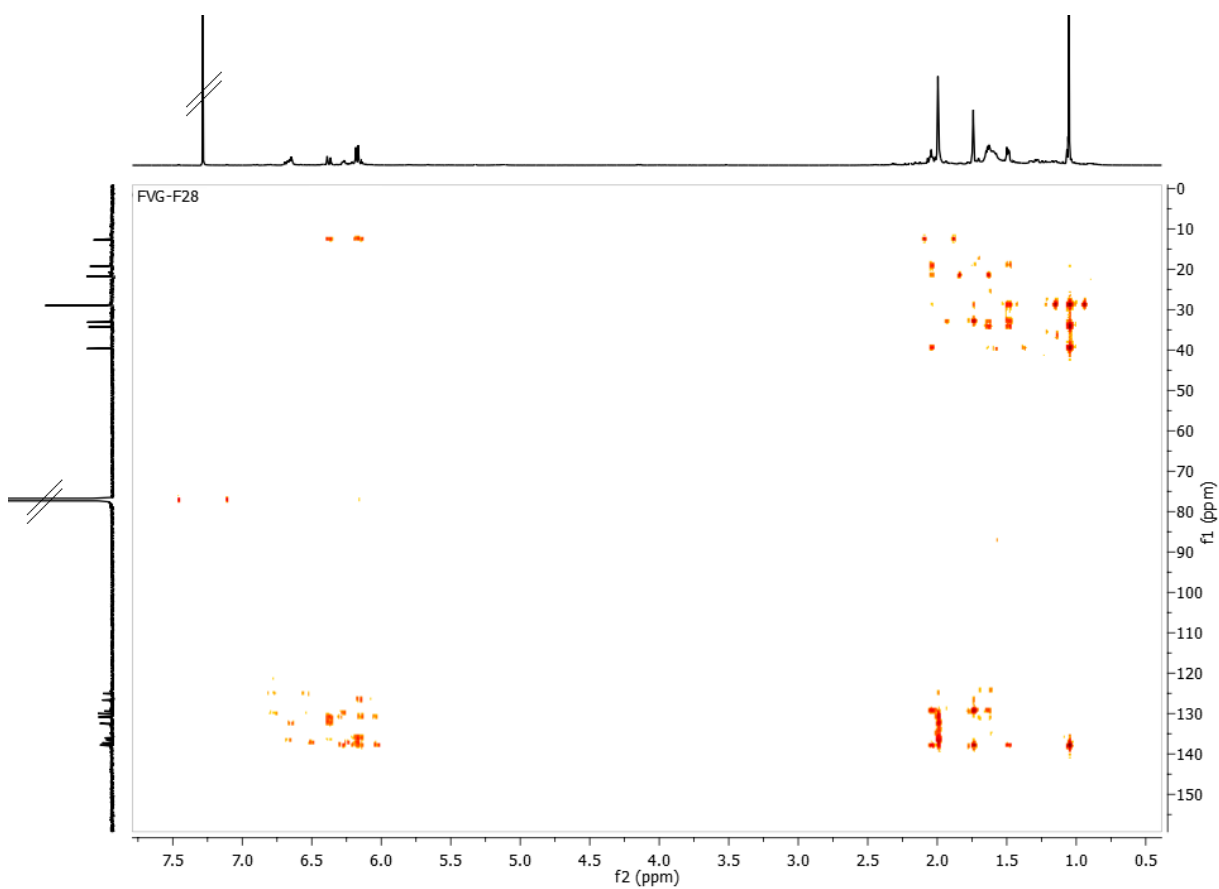


Figure 69: Spectre HMBC du composé FVgF26

II.2.5.2. Identification structurale du composé FVgF11 (90)

Le composé **FVgF11** se présente sous forme de poudre amorphe rouge, soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de le caractériser et l'identifier à la β -carotène (**90**).

En effet, sur son spectre de masse (figure 62) ESI à haute résolution enregistré en mode positif, l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 537,4458 compatible avec la formule brute $C_{40}H_{56}$ (Calc. $C_{40}H_{57}$, 537,4455 ; $\Delta=0,5$ ppm) renfermant treize (13) degrés d'insaturations.

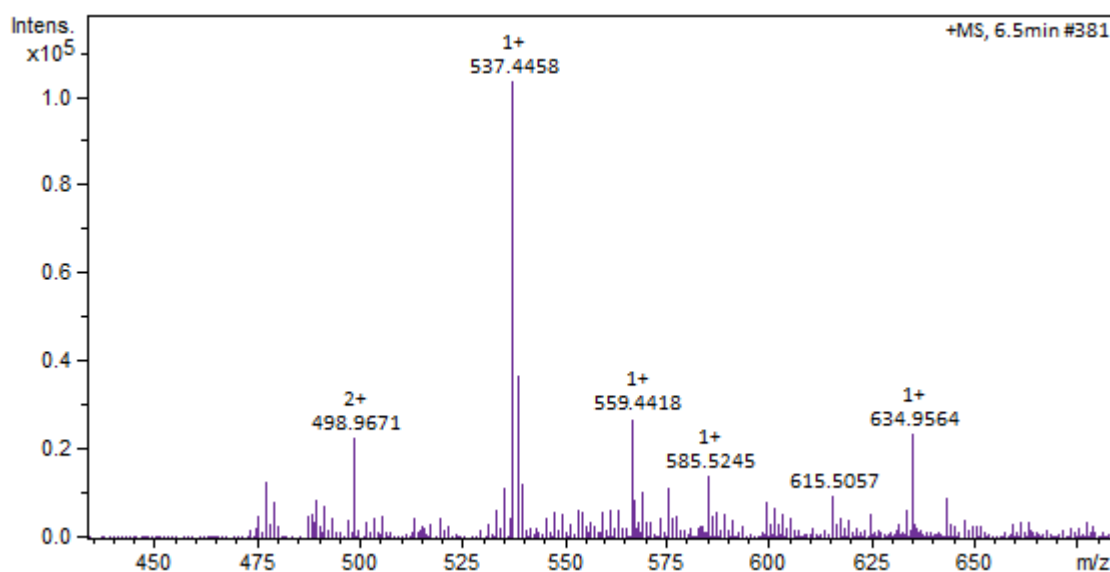
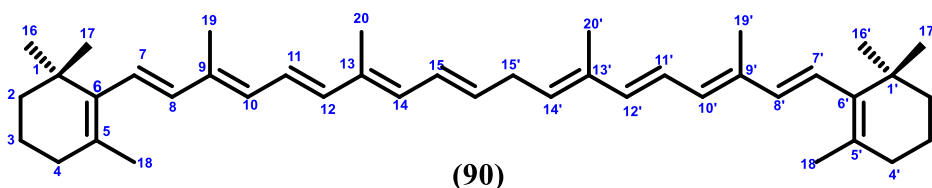


Figure 70: Spectre de masse (+)HRESI du composé **FVgF11**

Son spectre de RMN 1H (figure 71) est quasi identique à celui du composé (**89**) précédemment décrit. Mais les constantes de couplage de tous les systèmes de protons couplés se situent au-delà de 14 Hz (tableau 26) contrairement à la 13-*cis*- β -carotène (**89**) dont la constante de couplage du proton H-14 à δ_H 6,27 est à 8,0 Hz. Cette information plaide en faveur de la structure (**90**) pour FVgF11, qui est celle de la β -carotène. La différence entre ces deux composés est d'ailleurs confirmée par le profil LC/MS caractérisé par la différence des temps de retentions, respectivement 6,5 min pour la β -carotène (**90**) et 6,2 min pour 13-*cis*- β -carotène (**89**).



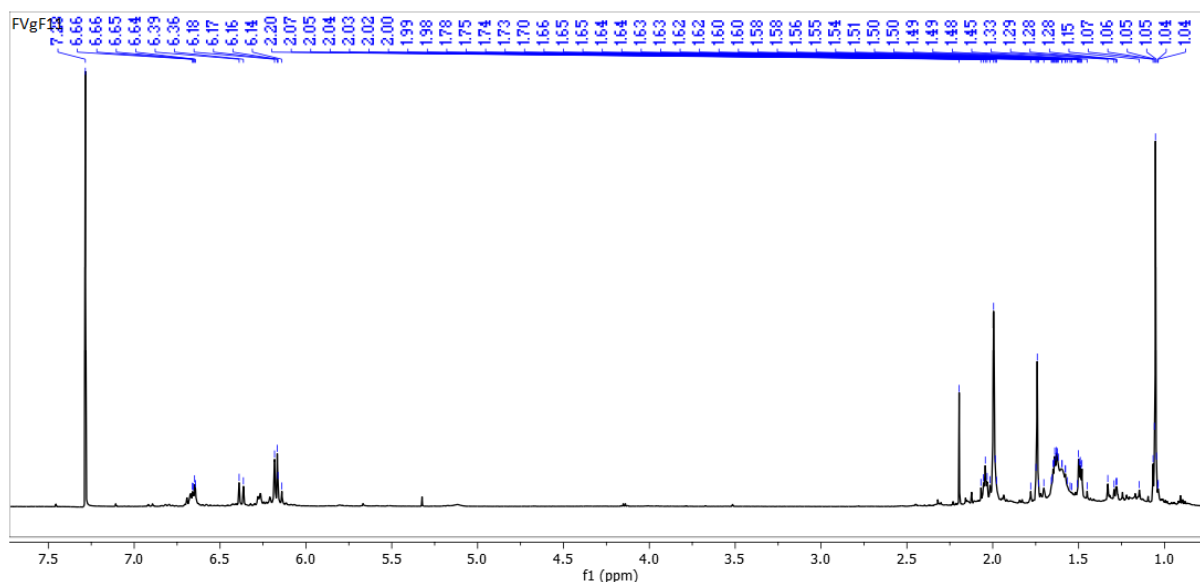


Figure 71: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF11**

Tableau 26: Données de RMN ^1H et ^{13}C de **FVgF26 (89)** et celles de RMN ^1H de **FVgF11 (90)** dans le CDCl_3

| Pos. | ^1H (500 MHz) | | HMBC | COSY |
|------|--|-----------------------|----------------------|------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., J (Hz)) | | | |
| | FVgF26 (89) | FVgF11 (90) | | |
| 1 | — | — | — | — |
| 2 | 1,50 (m) | 1,50 (m) | C-1, C-3, C-4 | H-3 |
| 3 | 1,63 (m) | 1,63 (m) | C-1, C-2, C-4, C-5 | H-2, H-4 |
| 4 | 2,05 (m) | 2,03 (m) | C-2, C-3, C-5, C-6 | H-3 |
| 5 | — | — | — | — |
| 6 | — | — | — | — |
| 7 | 6,17 (d, $J = 16,1$) | 6,16 (d, $J = 16,0$) | C-5, C-6, C-8, C-9 | H-8 |
| 8 | 6,20 (d, $J = 16,1$) | 6,18 (d, $J = 16,0$) | C-6, C-7, C-9, C-10 | H-7 |
| 9 | — | — | — | — |
| 10 | 6,15 (d, $J = 15,9$) | 6,14 (d, $J = 15,9$) | C-8, C-9, C-11, C-12 | H-11 |
| 11 | 6,66 (m) | 6,66 (m) | C-9, C-10, C-13 | H-10, H-12 |
| 12 | 6,38 (d, $J = 14,9$) | 6,39 (d, $J = 14,9$) | C-9, C-13, C-14 | H-11 |
| 13 | — | — | — | — |
| 14 | 6,27 (d, $J = 8,0$) | 6,36 (d, $J = 8,0$) | C-12, C-15 | H-15 |
| 15 | 6,66 (m) | 6,64 (m) | C-12, C-14 | H-14 |
| 16 | 1,05 (s) | 1,05 (s) | C-1, C-2, C-6 | — |
| 17 | 1,05 (s) | 1,05 (s) | C-1, C-2, C-6 | — |
| 18 | 1,74 (s) | 1,74 (s) | C-4, C-5, C-6 | — |
| 19 | 2,12 (s) | 2,20 (s) | C-8, C-9, C-10 | — |
| 20 | 2,12 (s) | 2,20 (s) | C-12, C-13, C-14 | — |

⁷ Les deux signaux peuvent être permutés ; ^a Déplacements chimiques exprimés en ppm, Réf. Int. TMS

II.2.6. Caractérisation des sesquiterpénoïdes

II.2.6.1. Identification structurale du composé FVgF42 (52)

Le composé **FVgF42** se présente sous forme de poudre blanche, soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de le caractériser et l'identifier à la vernopicroïne (**52**).

En effet, sur son spectre de masse (figure 72) ESI à haute résolution enregistré en mode positif, l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[M+Na]^+$ à m/z 369,1291 compatible avec la formule brute $C_{19}H_{22}O_6$ (Calc. $C_{19}H_{22}O_6Na$, 369,1309 ; $\Delta=4,9$ ppm) renfermant neuf (09) degrés d'insaturations.

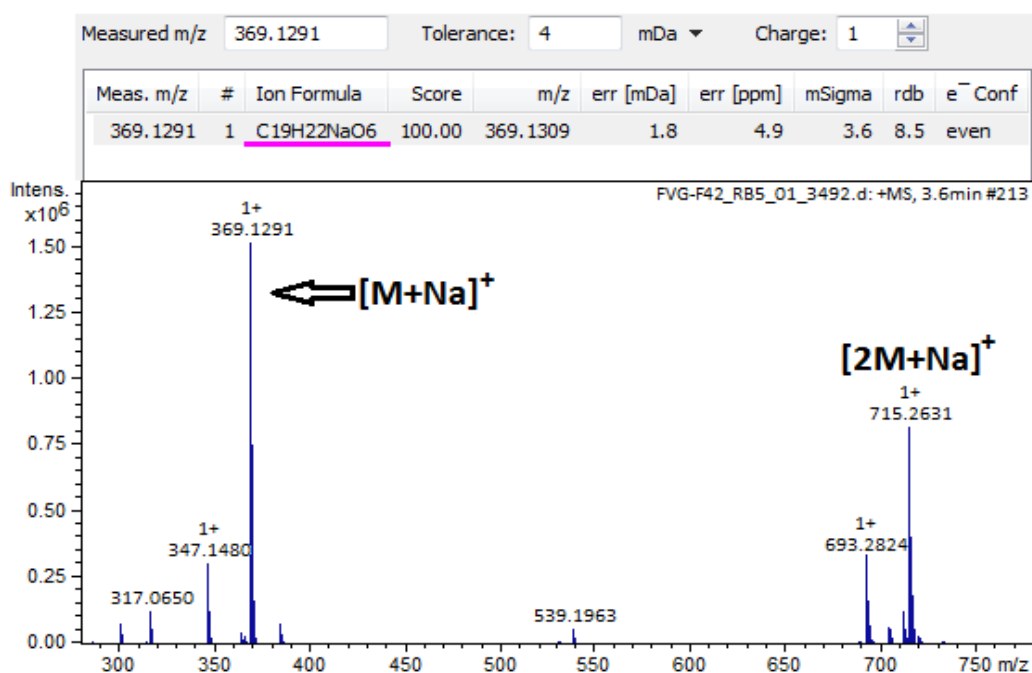


Figure 72 : Spectre de masse (+)—HRESI du composé **FVgF42**

Son spectre de RMN 1H (figure 73) montre des signaux d'un proton d'aldéhyde à δ_H 9,46 (s, H-15), six protons oléfiniques raisonnants respectivement à δ_H 5,30 (t, $J = 8,9$, H-1), 5,81 (d, $J = 1,9$, H-13b), 5,92 (d, $J = 1,4$, H-3'b), 6,25 (d, $J = 1,4$, H-3'a), 6,26 (d, $J = 10,2$, H-5) et 6,43 (d, $J = 1,9$, H-13b). Ce spectre montre également des signaux de deux protons d'oxyméthine à δ_H 4,96 (dd, $J = 10,2, 6,9$, H-6) et 5,10 (m, H-8), deux protons hydroxyméthylène, raisonnant sous forme de singulet à δ_H 4,33 (s, H-4') et trois protons δ_H 1,89 (s, H-14) attribuables au méthyle angulaire lié à un carbone oléfinique.

Le spectre de RMN ^{13}C (figure 74) présente 19 signaux de carbone attribuables à un squelette sesquiterpénique portant un groupe 4-hydroxyméthacryloxy (Fortuna et al., 2001) très présent dans les molécules isolées des plantes appartenant à la famille des Asteraceae. Les signaux à δ_C 193,8, 168,7 et 164,0 sont respectivement attribuables à aux carbonyles

d'aldéhyde (C-15), de lactone (C-12) et d'ester (C-10). Ce spectre présente également des signaux de carbones oléfiniques à δ_C 126,0 (C-3'), 128,4 (C-13), 128,6 (C-1), 131,8 (C-10), 133,9 (C-11), 139,2(C-2'), 142,4 (C-4) et 146,8 (C-5). Les signaux à δ_C 69,1 (C-8) et 75,5 (C-6) sont attribuables aux carbones d'oxyméthine ; alors que le signal du carbone oxyméthylène est observé à δ_C 59,3 (C-4').

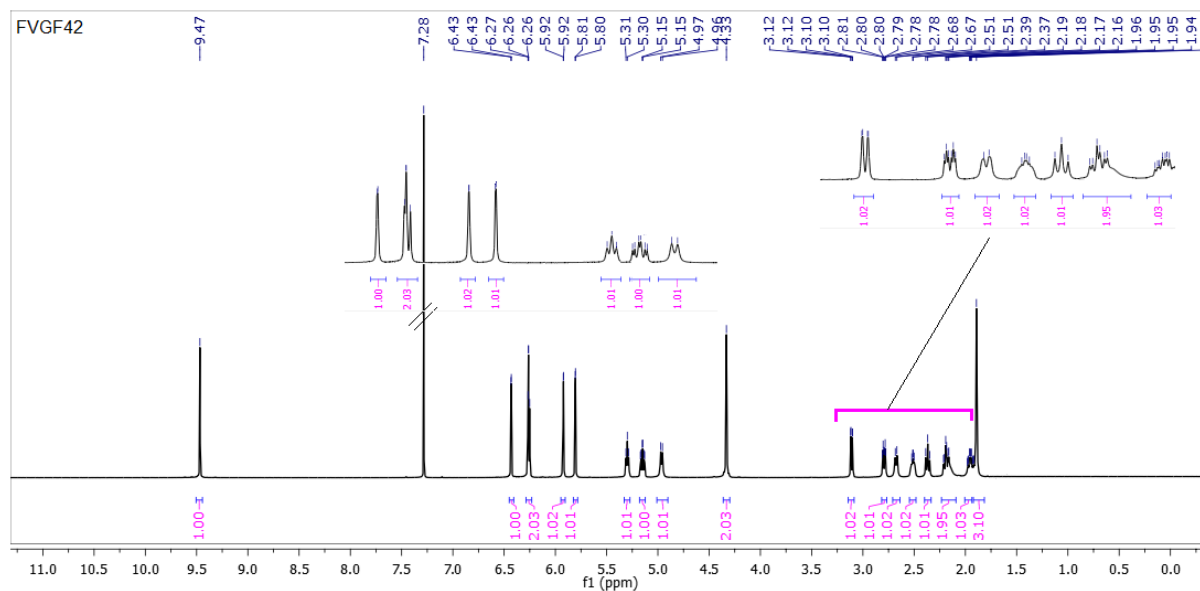


Figure 73: Spectre de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) du composé **FVGf42**

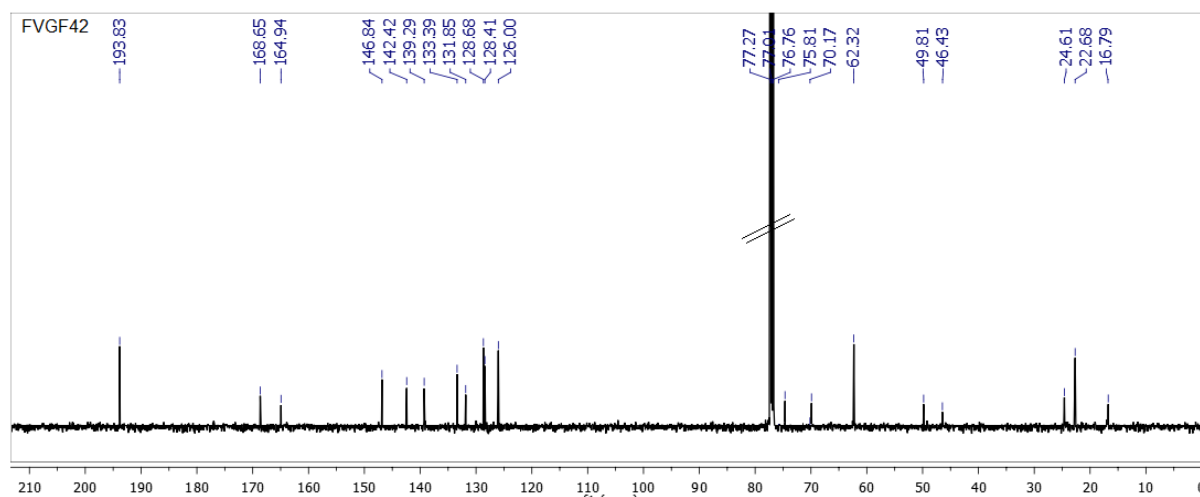


Figure 74: Spectre de RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) du composé **FVGf42**

Le spectre de ^1H - ^1H COSY (Figure 75) a montré la présence de deux systèmes de spin principaux : une unité $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ d'une part et une unité $=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2$ d'autre part. Cet ensemble de corrélation COSY a permis de suggérer un squelette sesquiterpénique de type germacranolide en accord avec les données décrites par [Marco et al. \(2005\)](#).

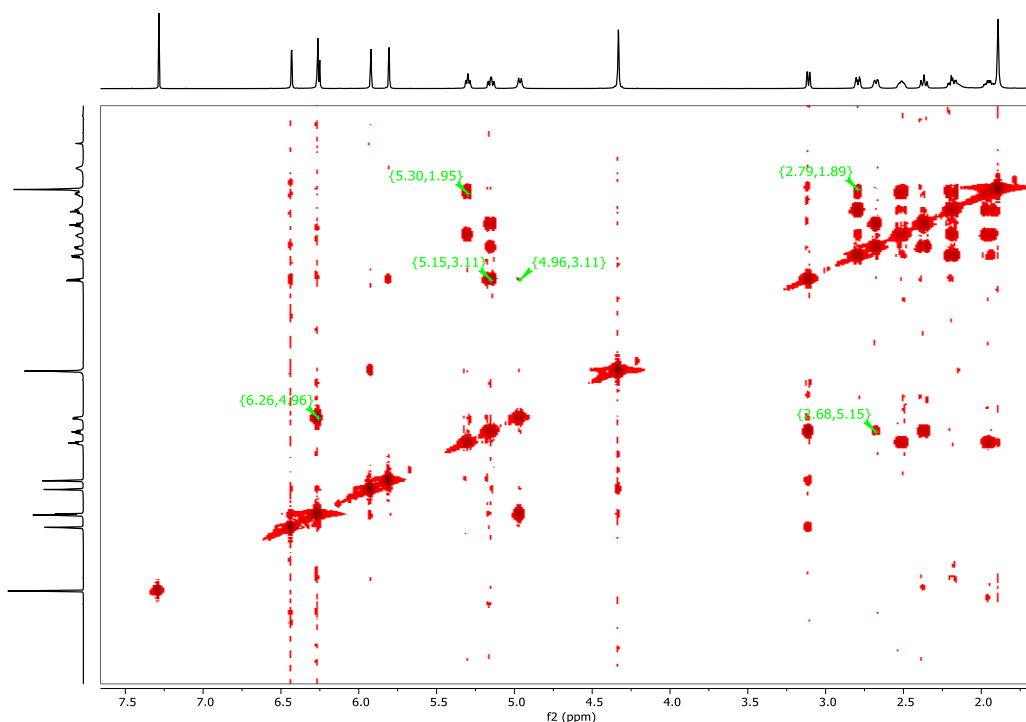


Figure 75: Spectre COSY du composé **FVgF42**

Le spectre de HMBC (figure 77) quant à lui, nous a permis de positionner le groupe de 4-hydroxyméthacryloxy sur le carbone C-8 du squelette du germacranolide grâce aux corrélations observées entre H-8 (δ_H 5,10,) et C-1' (δ_C 164,9). Le spectre HMQC (figure 76) couplé au HMBC a permis de faire l'attribution complète de la molécule (Tableau 27) et le composé **FVGF42** a ainsi été identifié comme (6S, 7R, 8S)-8-(40-hydroxyméthacryloxy)-15-oxogerma-cra-1(10),4,11(13)-trien-6,12-olide, précédemment isolé de *Centaurea tweediei* (Fortuna et al., 2001) et de *V. guineensis* par Toyang et al. (2002) qu'ils ont trivialement appelé vernopicine. Ce composé avait été préparé par Rustaiyan et al. (1979) par oxydation partielle d'onopordopicrin, un sesquiterpène lactonique, précédemment isolé *Onopordon leptolepis* et que nous avons détecté par LC/MS dans la fraction contenant FVGF42. L'onopordopicrin serait donc un précurseur biosynthétique de la vernopicinee (**52**).

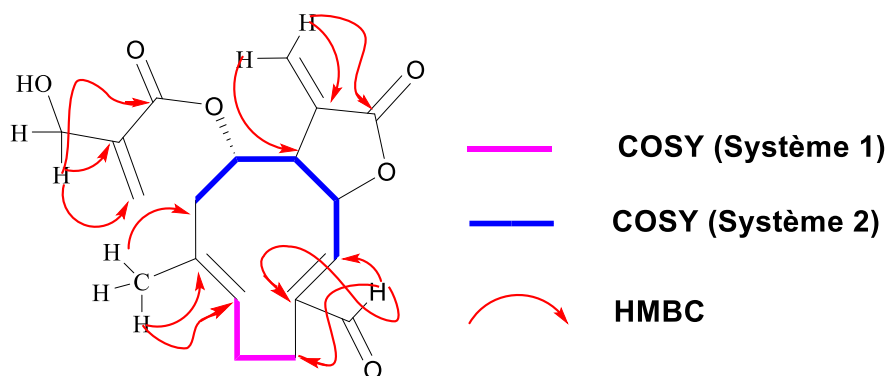


Schéma 14: Quelques corrélations clés observées sur les spectres HMBC et COSY de **FVGF42**

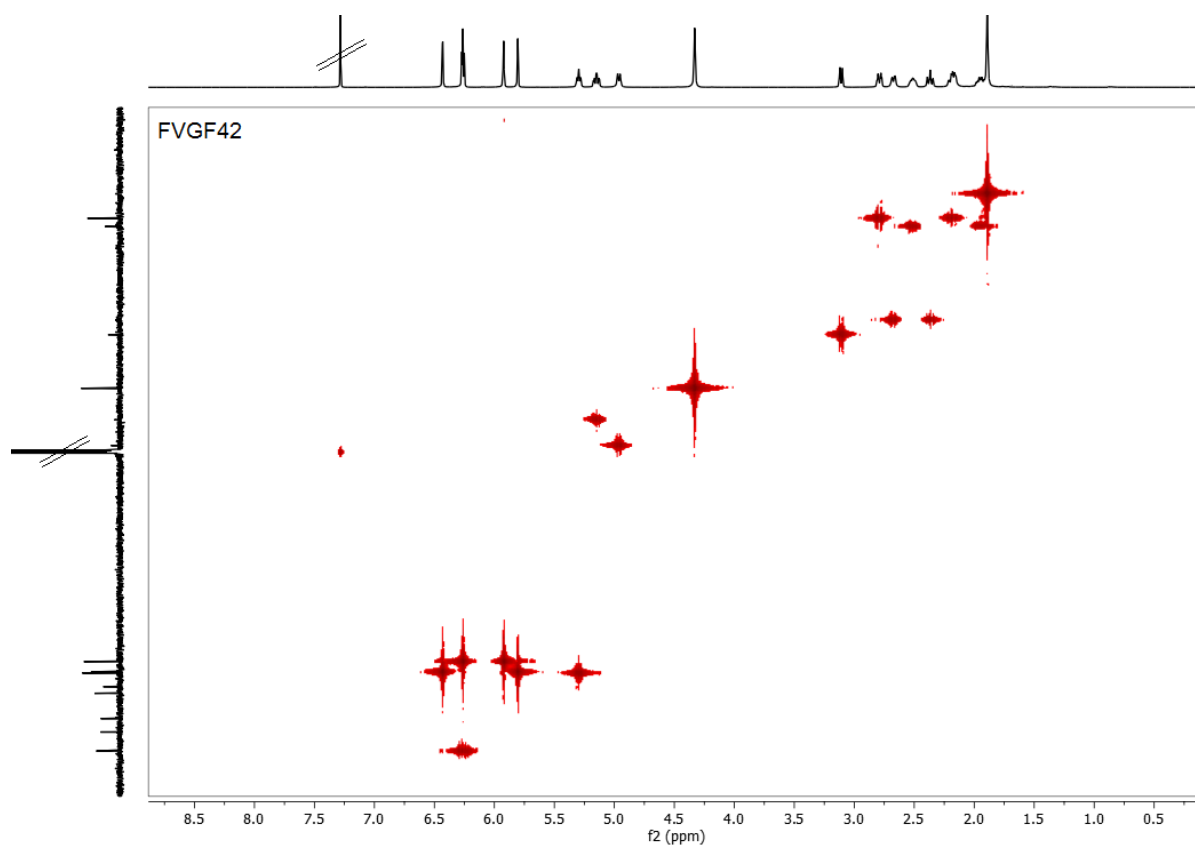


Figure 76: Spectre HMQC du composé **FVgF42**

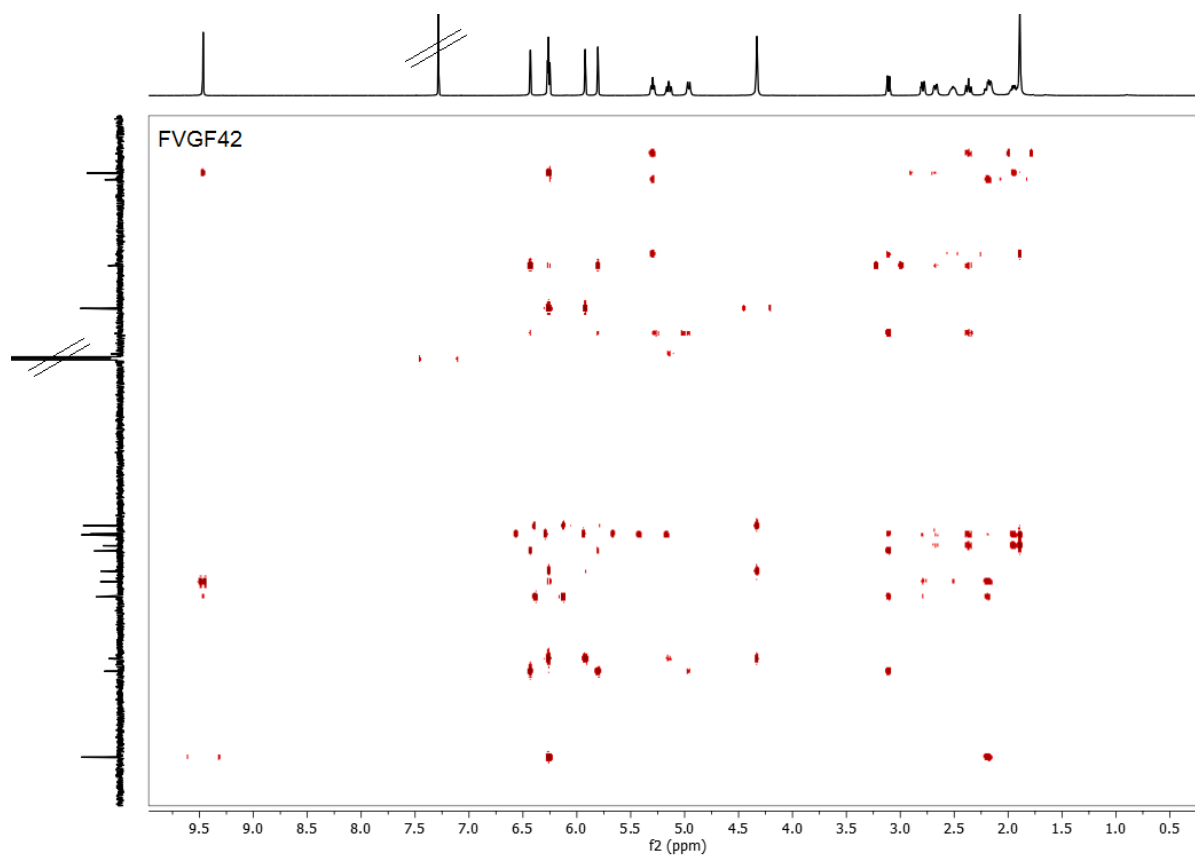


Figure 77: Spectre HMBC du composé **FVgF42**

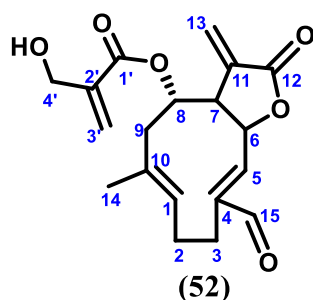


Tableau 27: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de RVgF42 dans le CDCl_3 avec celles de la vernopicine (52) rapportées par [Manojlovic et al. \(2000\)](#)

| Pos. | Expérimentales (RVgF34) | | Vernopicine (52), CDCl_3 | |
|------|---|---|---|---|
| | ^{13}C (150 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ^1H (600 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) | ^{13}C (50MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ^1H (200 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| 1 | 128,6 | 5,30 (t, $J = 8,9$) | 127,8 | 5,33 (t, $J = 8,9$) |
| 2 | 24,6 | 2,51 (ddd, $J = 12,5; 8,9; 4,8$) 1,95 (tdd, $J = 13,5; 7,4; 4,8$) | 23,9 | |
| 3 | 22,5 | 2,79 (dt, $J = 13,5; 4,8; 3,0$) | 21,8 | — |
| 4 | 142,4 | — | 141,3 | — |
| 5 | 146,8 | 6,26 (d, $J = 10,2$) | 145,8 | 6,58 (d, $J = 10,3$) |
| 6 | 75,5 | 4,96 (dd, $J = 10,2, 6,9$) | 75,7 | 5,01 (m) |
| 7 | 49,8 | 3,11 (dd, $J = 9,9, 6,9$) | 50,0 | |
| 8 | 70,2 | 5,10 (m) | 69,0 | 5,10 (m) |
| 9 | 46,4 | 2,68 (dd, $J = 12,3, 3,8$) | 45,7 | |
| 10 | 131,8 | — | 131,9 | — |
| 11 | 133,9 | — | 133,9 | — |
| 12 | 168,7 | — | 168,7 | — |
| 13 | 128,4 | 6,43 (d, $J = 1,9$) 5,81 (d, $J = 1,9$) | 127,6 | 6,21 (s l) 5,82 (s l) |
| 14 | 16,8 | 1,89 (s) | 16,9 | 1,81 (s) |
| 15 | 193,8 | 9,47 (s) | 195,2 | 9,46 (s) |
| 1' | 164,9 | — | 164,5 | — |
| 2' | 139,2 | — | 140,6 | — |
| 3' | 126,0 | 6,25 (d, $J = 1,4$) 5,92 (d, $J = 1,4$) | 124,0 | 6,25 (s l) 5,86 (s l) |
| 4' | 62,2 | 4,33 (s) | 59,3 | 4,11 (m) |

II.2.6.2. Identification structurale du composé FVgF51 (53)

Le composé **FVgF51** se présente sous forme de poudre blanche, soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de le caractériser et l'identifier à la vernomelitensine (**53**).

En effet, sur son spectre de masse (figure 72) ESI à haute résolution enregistré en mode positif, l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 369,1301 compatible avec la formule brute $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$ (Calc. $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$, 369,1309 ;

$\Delta=2,2$ ppm) renfermant neuf (09) degrés d'insaturations.

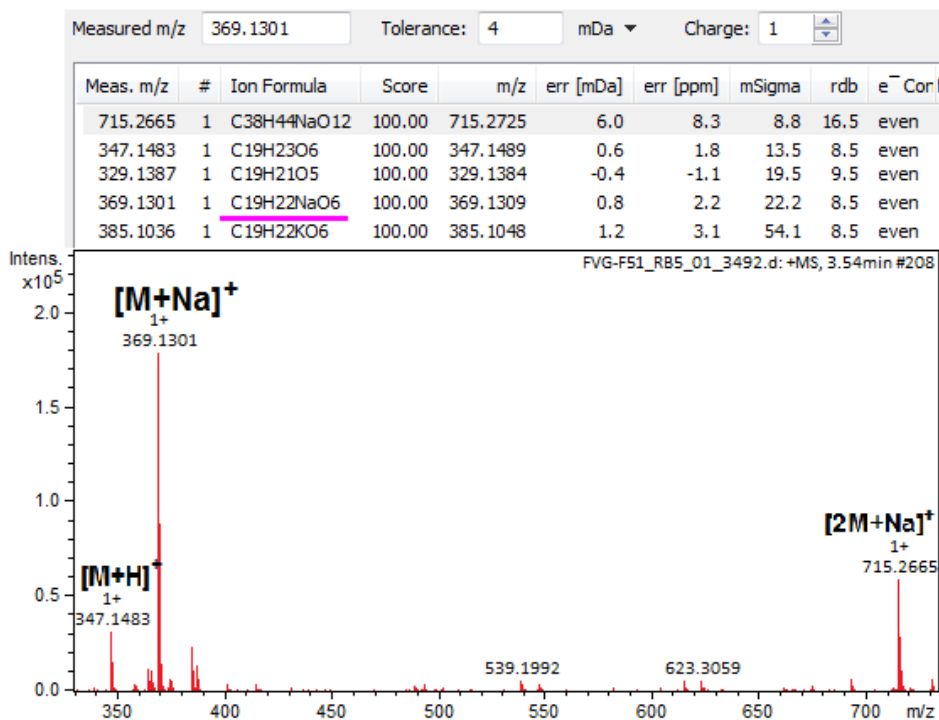


Figure 78: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **FVgF51**

Ce composé ayant le même aspect physique et CCM, la même masse et la même formule brute que le composé (**52**) précédemment décrit, nous avons dans un premier temps pensé qu'il était identique. Mais l'analyse minutieuse de leur profil chromatographique LC/MS a permis de voir s'agissait de composés différents, car présentait des temps de rétentions différents, 3,5min et 3,6 min respectivement pour **FVgF51** et **FVgF42** (figure 19).

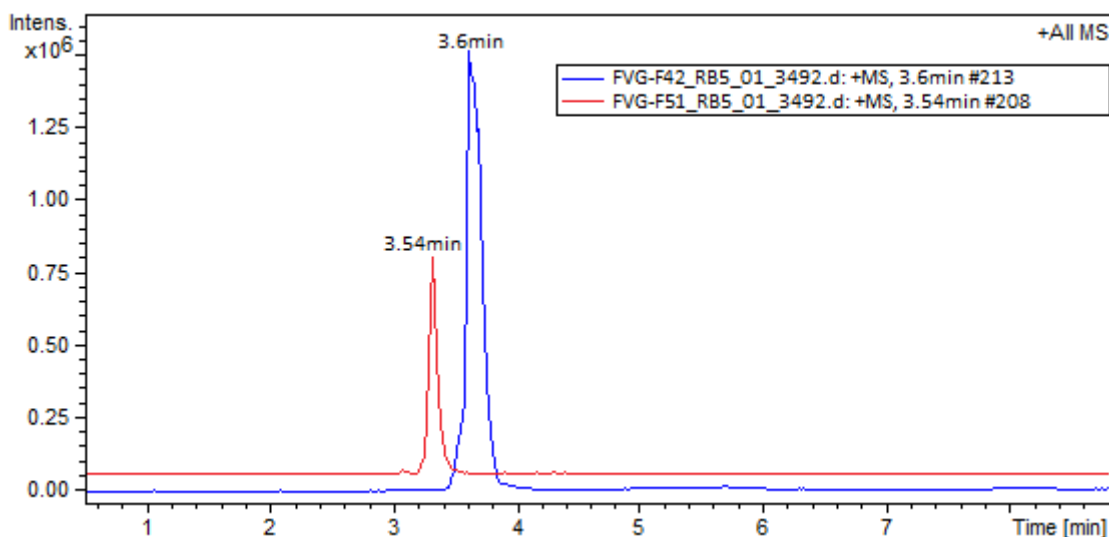


Figure 79: Spectre de masse Profil HPLC des composés **FVgF51** et **FVgF42**

L'analyse du spectre de RMN ¹H du composé **FVgF51** confirme qu'il est différent du composé (**52**). Le spectre RMN ¹H du composé **FVgF51** exhibe neuf signaux de protons

oléfiniques au lieu de sept signaux comme le spectre de RMN ^1H du composé (**52**). En outre, on observe également des signaux typiques d'un sesquiterpène lactonique de type élemané (Rustaiyan *et al.*, 1979), incluant les neuf signaux de protons à δ_{H} 4,93 (2H, m, H-2), 5,50 (1H, s l, H-13a), 5,79 (1H, dd, $J=16,6 ; 11,1$, H-1), 5,70 (1H, d, $J=1,6$, H-3'a), 6,27 (1H, s l, H-13b), 5,82 (1H, d, $J=1,6$, H-3'b), 6,03 (1H, s, H-3) et 6,32 (1H, s, H-3b).

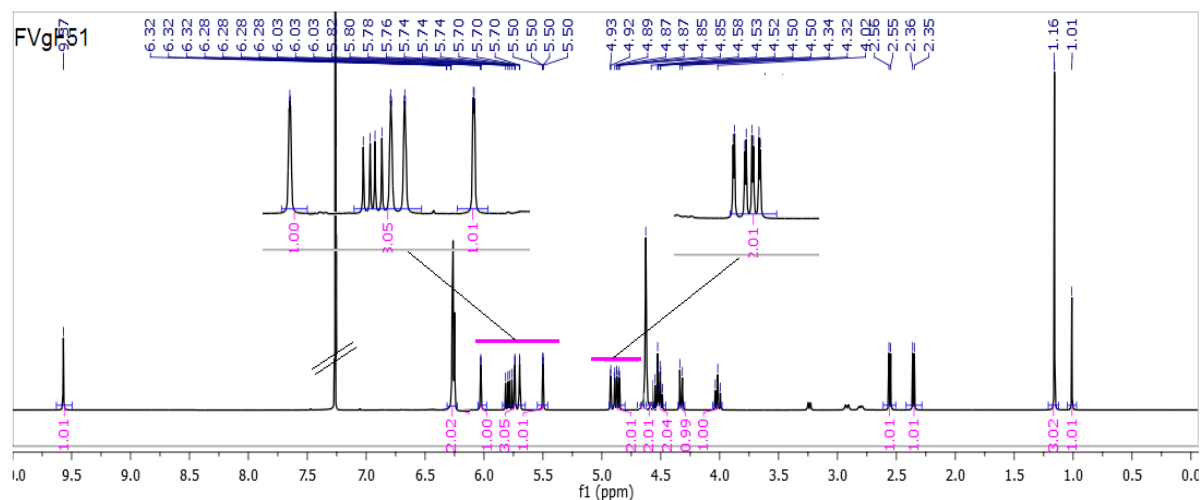
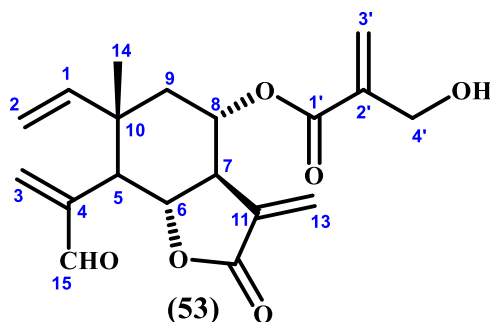


Figure 80: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF51**

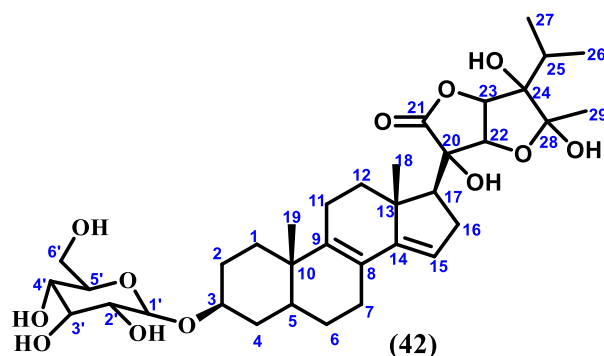
Ce spectre montre également des signaux de deux protons d'oxyméthine à δ_{H} 4,64 (dd, $J = 10,2, 6,9$, H-8) et 4,94 (m, H-6), deux protons d'hydroxyméthylène, raisonnant sous forme de singulet à δ_{H} 4,32 (s, H-4'). Les signaux des protons liés aux carbones hybridés sp^3 sont également observés, à savoir les signaux de trois protons à δ_{H} 1,16 (s, H-14) attribuables au méthyle angulaire et de deux autres protons à δ_{H} 2,35 (dl, $J = 2,5$, H-9a) et 2,56 (dl, $J = 2,9$, H-9b). L'ensemble de ces données ont permis d'identifier ce composé à la vernomelitensin (**53**), trivialement nommé (5R, 6S, 7R, 8S, 10S)-8-(40-hydroxymethacryloxy)-15-oxoeleman-1,3,11(13)-trien-6,12-olide, précédemment isolé de *Onopordon leptolepis* par Rustaiyan *et al.* (1979) et de *Vernonia guineensis* par Toyang *et al.* (2013). Plusieurs sesquiterpènes du type élemané ont été rapportés des feuilles de *Vernonia guineensis* (Toubiana *et al.*, 1975).



II.2.7. Caractérisation des stéroïdes

II.2.7.1. Identification structurale du composé RVgF71 (42)

Le composé **RVgF71** se présente sous forme de poudre amorphe de couleur beige soluble dans le DMSO. Il répond positivement au test de Libermann-Burchard, donnant une coloration bleue qui vire rapidement au vert foncé, caractéristique des stéroïdes (Jinming *et al.*, 2001) et au test de Molish caractéristique des sucres. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de **RVgF71** en comparaison à celles décrites dans la littérature a permis de l'identifier à de la vernoguinoside A (42) précédemment isolé des racines de *V. guineensis* par Donfack *et al.* (2012).



En effet, son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 81) exhibe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 665,3541 compatible avec la formule moléculaire $C_{35}H_{52}O_{12}$ (Calc. $C_{35}H_{53}O_{12}$, 665,3532 ; $\Delta=1,4$ ppm) renfermant 10 degrés d'insaturations.

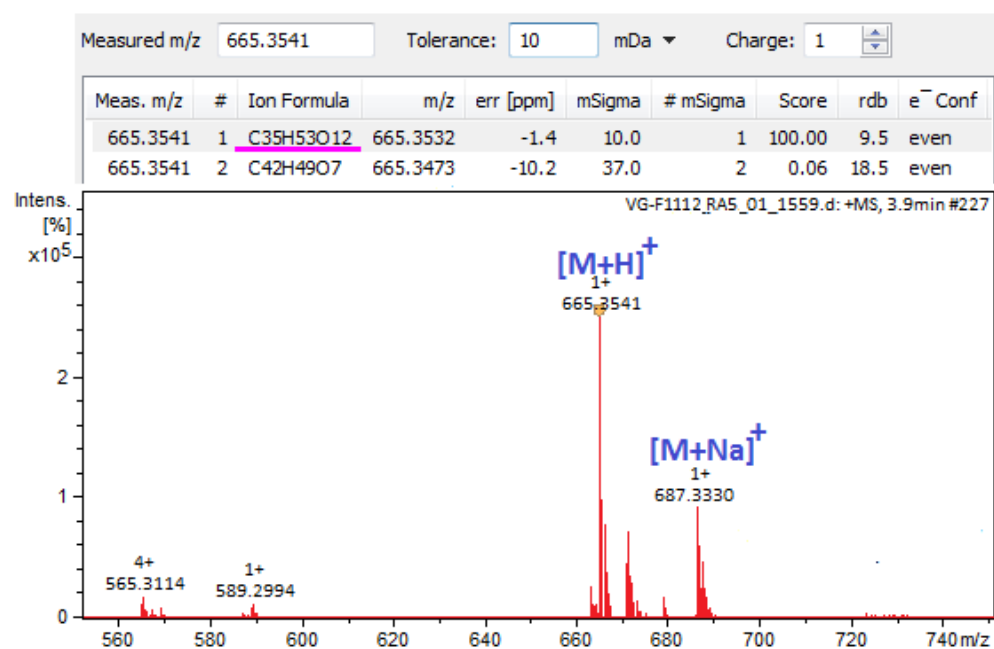


Figure 81: Spectre de masse (+)-HRESI du composé **RVgF71**

L'analyse du spectre de RMN¹H (figure 82, Tableau 28) confirme la nature de stéroïde osidique du composé **RVgF71**. Ce spectre exhibe dans la région des champs forts, les signaux de cinq (05) groupes méthyles, dont :

- deux singulets de trois protons chacun à δ_H 0,96 (s, CH₃-18) et à δ_H 1,05 (s, CH₃-19) attribuables aux méthyles tertiaires des stéroïdes (Jinming *et al.*, 2001),
- deux doublets ayant trois protons également à δ_H 0,87 (d, $J = 7,2$, CH₃-26), et δ_H 0,95 (d, $J = 7,2$, CH₃-27) caractéristique des méthyles du groupement isopropyle dont le proton du méthine qui les porte résonne à δ_H 2,06 (m, C-25),
- un singulet caractéristique du méthyle quaternaire C-29 à δ_H 1,34 (s, CH₃-29). Le fort déblindage de ce signal comparé au méthyle C-29 du stigmastérol qui résonne généralement au tour de 0,67 ppm (Donfack *et al.*, 2012) suggère une oxydation en C-28.

En plus, la présence de cinq (05) signaux de méthyles au lieu de 6 signaux traduit l'oxydation du méthyle en position C-21, information confirmée à posté théorie par l'analyse des spectres de RMN ¹³C (figure 83) et HMBC (figure 86).

L'examen de ce spectre RMN ¹H (figure 82) dans la région des champs faible, couplé à l'analyse des corrélations observées en COSY (figure 87) a permis de différencier les signaux du sucre et ceux de la partie aglycone. Toutefois, cette zone présente un ensemble de signaux qui se chevauchent avec les signaux osidiques, faisant référence à une cyclisation oxydative de la chaîne latérale des stéroïdes de type stigmastane (Donfack *et al.*, 2012). En effet, on distingue :

- le signal de l'oxyméthine en C-3 sous forme de multiplet à δ_H 3,60
- les signaux de deux méthines oxygénés raisonnant sous forme de doublet à δ_H 4,62 (d, $J = 4,8$) et δ_H 4,34 (d, $J = 4,8$) attribuable respectivement aux protons H-22 et H-23.
- le signal du proton nanométrique sous forme de doublet à δ_H 4,25 (d, $J = 7,7$, H-1'). La valeur de la constante de couplage $J = 7,7$ Hz suggère la configuration β du sucre, qui serait de l'ordre de $J = 15,4$ Hz dans si l'orientation était α (Jisaka *et al.*, 1993).

Sur ce même spectre, on observe le signal d'un proton oléfinique sous forme de doublet large à δ_H 5,32 (dl, $J = 7,6$, H-15).

L'existence de plusieurs signaux entre 3 et 4 ppm témoigne de la présence d'hétéroatomes de type osidique dans la structure du composé. La prise en compte des données du spectre de RMN ¹H et celles du spectre HMQC (figure 85) et DEPT 135 (figure 84) indique la présence des protons méthyléniques du carbone C-6' sous forme de doublet de doublets à δ_H 3,67 (d, $J = 3,2, 12,4$, H-6'b) et 3,43 (d, $J = 4,4, 12,4$, H-6'b) et des oxyméthines en C-2', C-3', C-4' et C-5' raisonnant respectivement à δ_H 2,90 (m, H-2'), 3,07 (m, H-3'), 3,12

(m, H-4') et 3,42 (m, H-5'). Le spectre COSY (figure 87) a permis d'établir l'enchaînement de ces portons appartenant au système osidique de proche en proche en partant du proton anomérique δ_H 4,25 jusqu'aux protons de l'hydroxyméthylène δ_H 3,67 et 3,43 ($-C^1'H-C^2'H-C^3'H-C^4'H-C^5'H-C^6'H_2-$). L'ensemble de ces données ont permis d'identifier sans ambiguïté la partie osidique au D-glucoside.

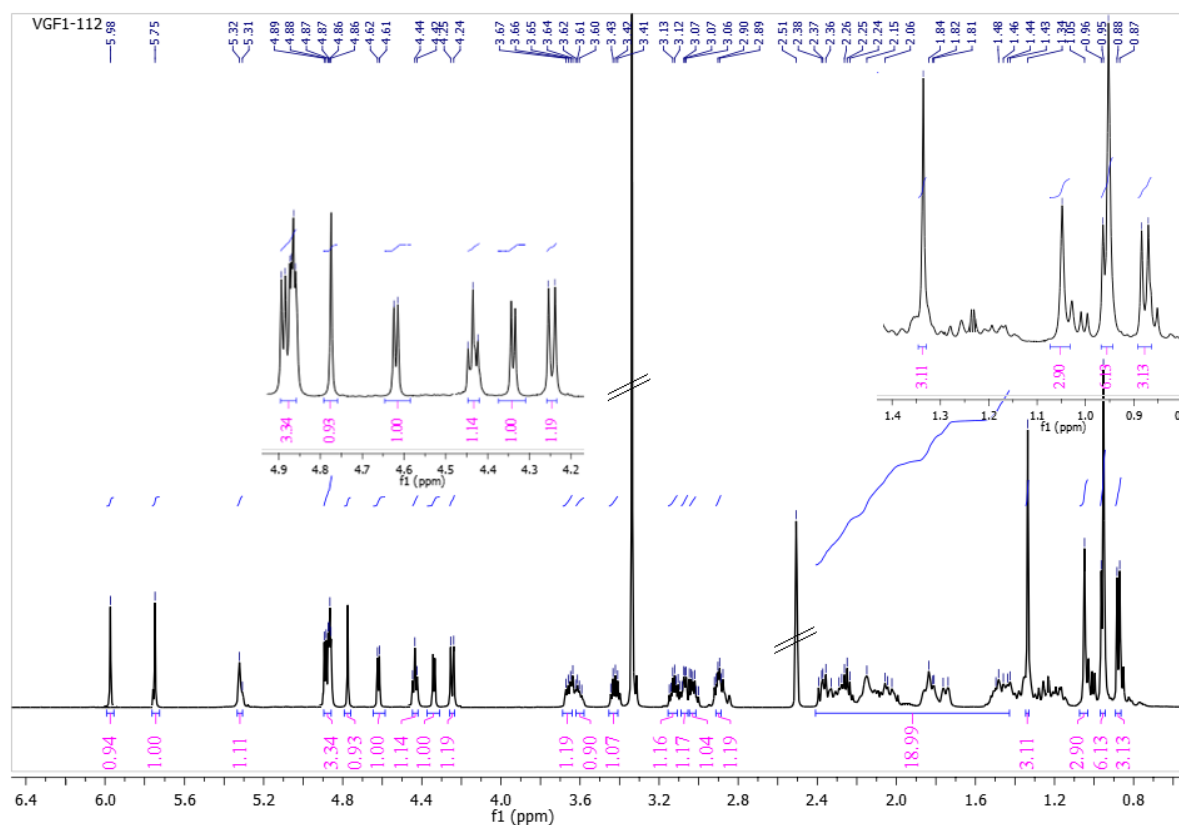


Figure 82: Spectre de RMN 1H (500 MHz, $(CD_3)_2SO$) du composé **RVgF71**

Les données fournies par les spectres de RMN ^{13}C (125 MHz, $(CD_3)_2SO$) (figure 83; tableau 28) et DEPT 135 (figure 83) indique la présence des signaux de 35 atomes de carbone sur le spectre découplé-large bande et 24 signaux sur le spectre DEPT 135 nous permettant de différencier les signaux de neuf (09) carbones quaternaires raisonnants à δ_C 122,6, 141,1, 36,7, 45,2, 150,1, 78,0, 175,9, 82,7 et 108,2 respectivement attribuables aux carbones C-8, C-9, C-10, C-13, C-14, C-20, C-21, C-24 et C-28 et cinq (05) méthyles à δ_C 18,7, 18,6, 18,3, 16,2, et 23,7 respectivement attribuables aux carbones C-18, C-19, C-26, C-27 et C-29. En outre, on dénombre également neuf (09) méthylènes et douze (12) méthines. La présence dans la molécule d'un système diénique conjuguée est mise en évidence par des signaux observés à δ_C 117,3 (C-15), 122,6 (C-8), 141,1 (C-9) et 150,1 (C-14). Cette information est confirmée par l'analyse du spectre HMBC (figure 85) qui présente des taches de corrélation entre le proton H-15 (δ_H 5,32) et les carbones C-8, C-13, C-14 et C-17. D'autres taches de corrélations

observées sur ce même spectre entre le proton H-3 (δ_H 3,60) et le carbone anomérique à C-1' (δ_C 101,1) confirme l'attachement de l'unité osidique en position C-3.

L'analyse du spectre COSY (figure 86) a permis d'identifier les protons voisins liés par un couplage scalaire 3J , dont les plus importants ont été les couplages des protons osidiques et ceux entre les protons H-22 et H-23, entre H-15 et H-16 puis entre H-16 et H-17.

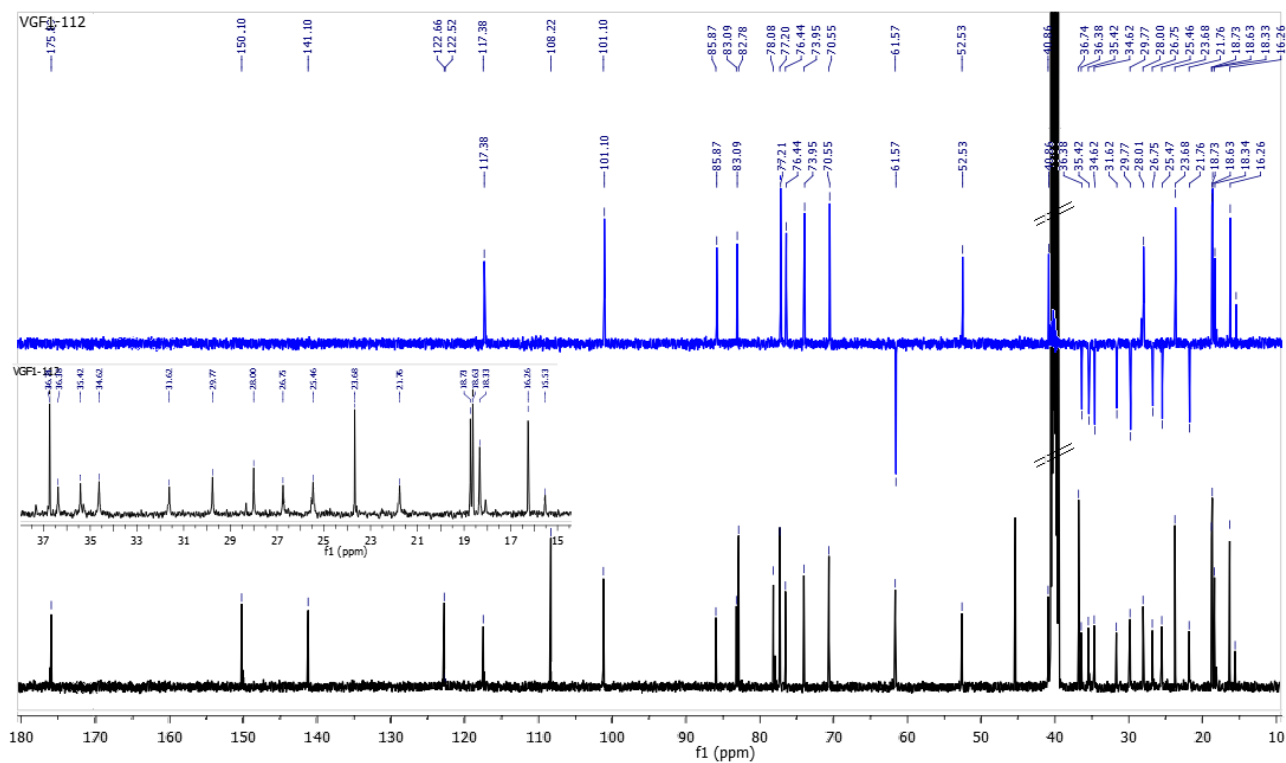


Figure 83: Superposition du spectre DEPT et du spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $(CD_3)_2SO$) du composé **RVgF71**

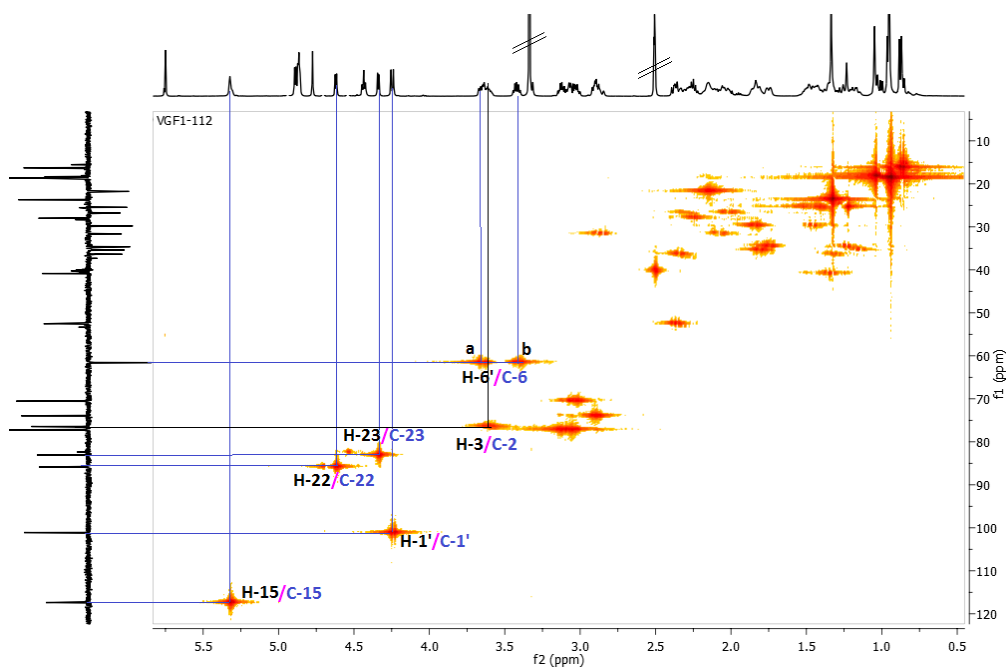


Figure 84: Spectre HMQC du composé **RVgF71** et illustration de quelques corrélations

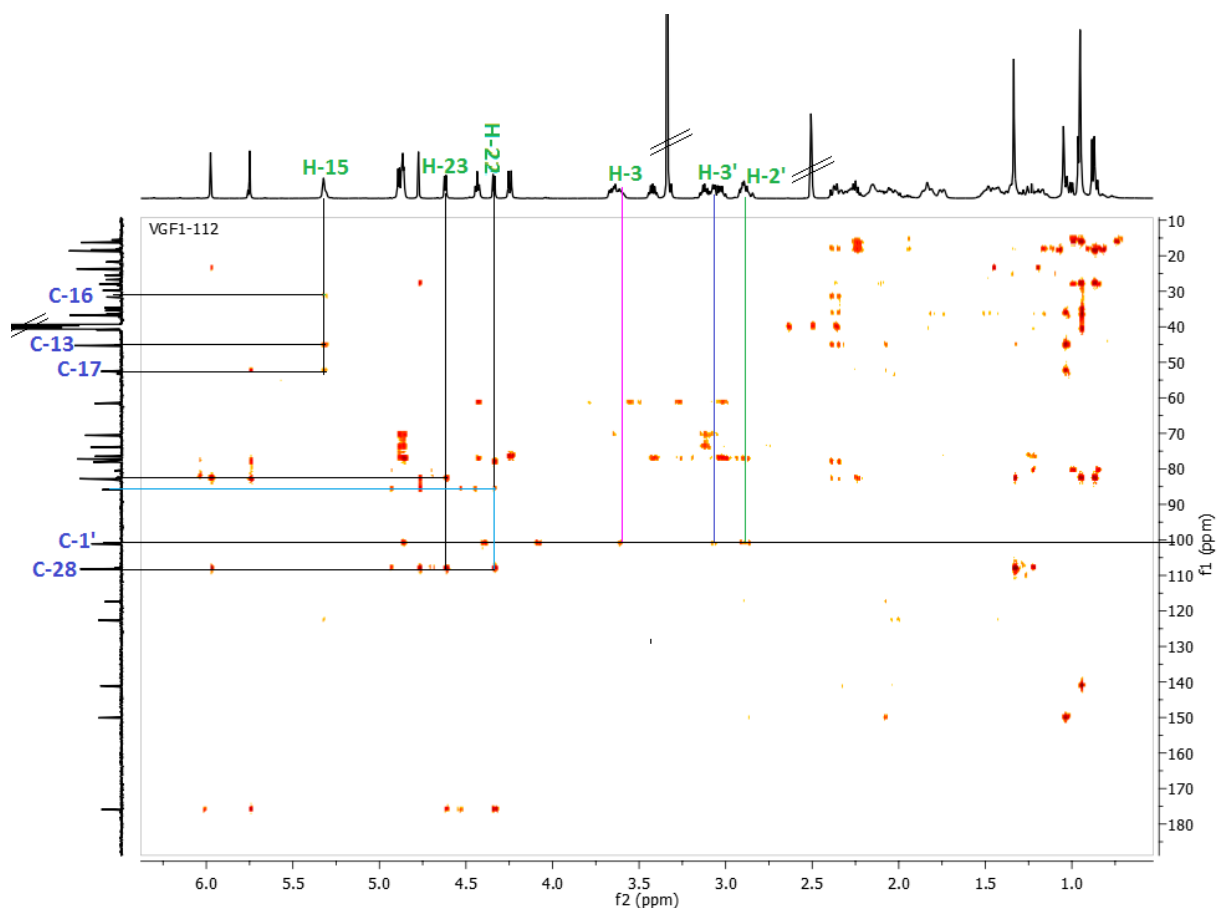


Figure 85: Spectre HMBC du composé **RVgF71** et illustration de quelques corrélations

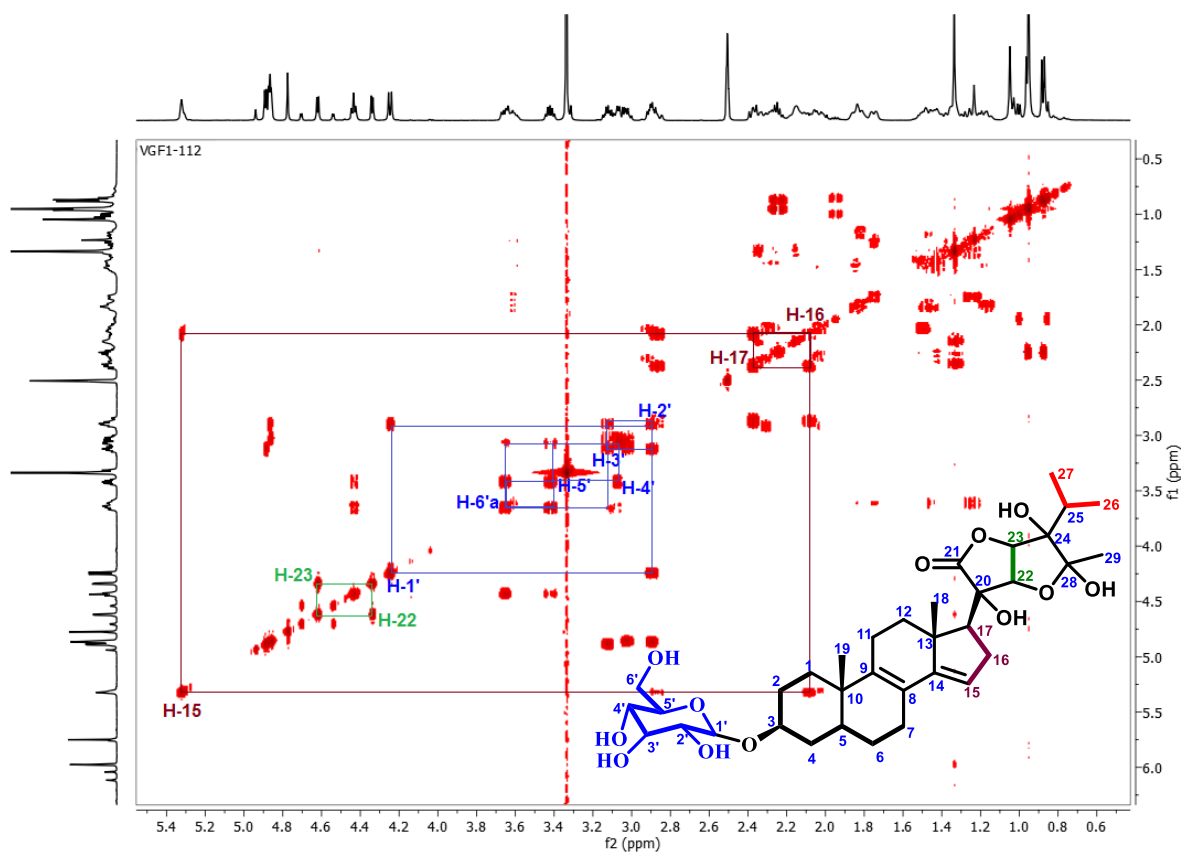


Figure 86: Spectre COSY du composé **RVgF71** et illustration de quelques corrélations

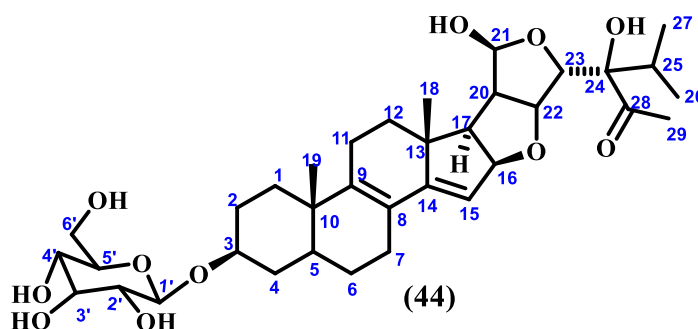
La stéréochimie sur la chaîne latérale n'a pas été déterminée à cause de l'absence de taches de corrélation sur le spectre NOESY en raison de l'existence d'un équilibre sur le fragment hémiacétal. Une tentative de cristallisation de ce composé par les méthodes classiques (dissolution à chaud dans un solvant organique et précipitation par vaporisation lente du solvant) a été un échec. L'interprétation de toutes ces données spectroscopiques et spectrométriques a permis d'attribuer au composé **RVgF71** la structure (**42**) qui est celle de la vernoguinoside A isolé des racines de *V. guineensis* en 2012 par [Donfack et al.](#)

Tableau 28: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de RVgF71 dans le DMSO- d_6 avec celles de la vernoguinoside A (42**) rapportées par [Donfack et al., \(2012\)](#)**

| Pos. | Expérimental (RVgF71), | | Vernoguinoside A, CDCl_3 | |
|------|--------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | ^{13}C (150 MHz) | ^1H (600 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| 1 | 34,6 | 1,75 (m); 1,21 (m) | 34,6 | 1,79 (m); 1,37 (m) |
| 2 | 29,7 | 1,84 (m); 1,42 (m) | 29,7 | 1,94 (m) ; 1,61 (m) |
| 3 | 76,4 | 3,60 (m) | 78,5 | 3.18 (dd, $J=9,6; 6,2$) |
| 4 | 35,4 | 1,82 (m); 1,17 (m) | 35,4 | 1,87 (m) ; 1,22 (m) |
| 5 | 40,9 | 1,46 (m) | 41,0 | 1,48 (m) |
| 6 | 25,5 | 1,34 (m); 1,23 (m) | 25,5 | 1,37 (m) |
| 7 | 26,7 | 2,34 (m); 2,06 (m) | 26,7 | 2,36 (m) ; 2,07 (m) |
| 8 | 122,6 | — | 122,9 | — |
| 9 | 141,1 | — | 140,9 | — |
| 10 | 36,7 | — | 36,7 | — |
| 11 | 21,8 | 2,15 (m) | 22,0 | 2,22 (m) |
| 12 | 31,6 | 2,90 (m); 2,11 (m) | 31,6 | 2,96 (m) ; 2,22 (m) |
| 13 | 45,2 | — | 45,6 | — |
| 14 | 150,1 | — | 149,6 | — |
| 15 | 117,3 | 5,32 (dl, $J=7,6$) | 117,3 | 5,35 (m) |
| 16 | 36,4 | 2,34(m); 1,40 (m) | 37,5 | 2,36 (m); 2,30 (m) |
| 17 | 52,5 | 2,40 (m) | 53,4 | 2,44 (m) |
| 18 | 18,7 | 0,96 (s) | 18,3 | 0,98 (s) |
| 19 | 18,6 | 1,05 (s) | 17,6 | 1,16 (s) |
| 20 | 78,0 | — | 78,6 | — |
| 21 | 175,8 | — | 176,6 | — |
| 22 | 83,0 | 4,34 (d, $J = 4,8$) | 82,6 | 4,72 (d, $J = 4,9$) |
| 23 | 85,8 | 4,62 (d, $J = 4,8$) | 82,2 | 4,82 (d, $J = 4,9$) |
| 24 | 82,8 | — | 81,2 | — |
| 25 | 28,1 | 1,01 (m) | 28,6 | 1,03 (m) |
| 26 | 18,3 | 0,87 (d, $J = 7,2$) | 17,8 | 0,89 (d, $J = 6,7$) |
| 27 | 16,2 | 0,95 (d, $J = 7,2$) | 14,9 | 0,95 (d, $J = 6,7$) |
| 28 | 108,2 | — | 107,8 | — |
| 29 | 23,7 | 1,34 (s) | 24,7 | 1,37 (s) |
| 1' | 101,1 | 4,25 (d, $J=7,7$) | 101,1 | 4,44 (d, $J=7,4$) |
| 2' | 74,0 | 2,90 (m) | 73,7 | 3,23 (m) |
| 3' | 70,5 | 3,07 (m) | 70,3 | 3,42 (m) |
| 4' | 77,3 | 3,12 (m) | 76,5 | 3,45 (m) |
| 5' | 76,4 | 3,42 (m) | 75,9 | 3,30 (m) |
| 6' | 61,6 | 3,67 (d, $J= 3,2 ; 12,4$) | 62,0 | 3,85 (dd, $J = 3,2;12,0$) |
| | | 3,43 (d, $J= 4,4, 12,4$) | | 3,76 (dd, $J = 4,2; 12,0$) |

II.2.7.2. Identification structurale du composé RVgF52 (44)

Le composé **RVgF52** se présente sous forme de fine poudre cristalline jaune. Soluble dans le méthanol, il fond entre 183-186°C et répond positivement au test de Libermann-Burchard, donnant une coloration bleue qui vire rapidement au vert foncé, caractéristique des stéroïls (Jinming *et al.*, 2001) et au test de Molish caractéristique des sucres. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de **RVgF52** en comparaison à celles décrites dans la littérature a permis de l'identifier à de la vernoguinoside (44) précédemment isolée des racines de *V. guineensis* par Tchinda *et al.* (2003)



En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 87), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 649,3598 compatible avec la formule moléculaire $C_{35}H_{52}O_{11}$ (Calc. $C_{35}H_{53}O_{12}$, 649,3582 ; $\Delta=4,9$ ppm) renfermant 10 degrés d'insaturations.

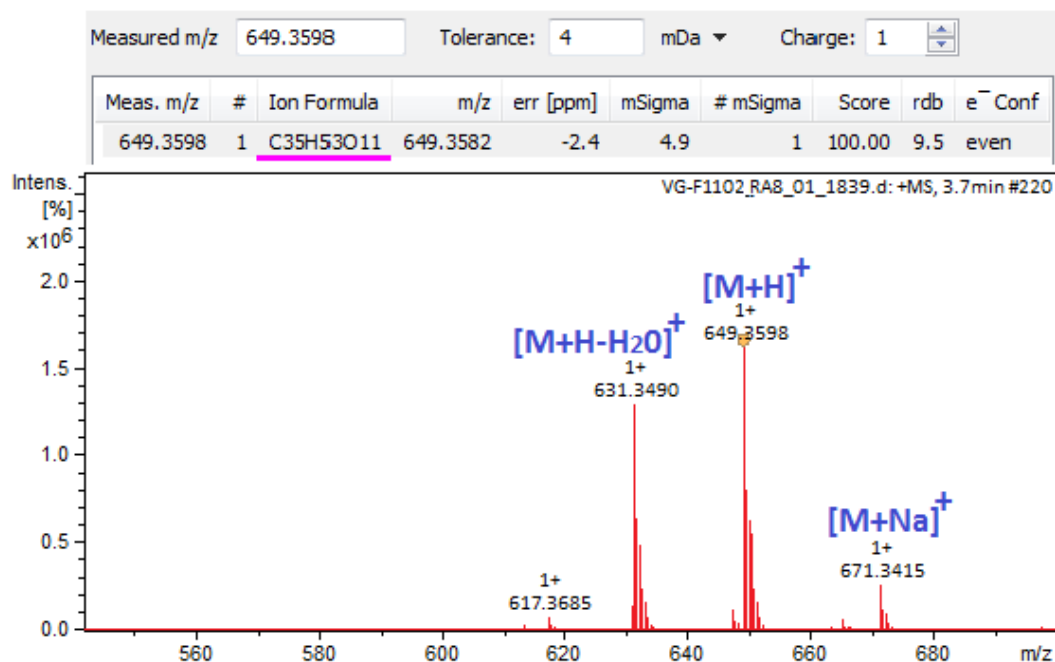


Figure 87: Spectre de masse (+)-HRESI du composé **RVgF52**

L'analyse du spectre de RMN ^1H (figure 88, tableau 29), permet de distinguer les signaux de l'aglycone, en particulier les protons des deux méthyles secondaires Me-26 et Me-27 du groupement isopropyle raisonnants sous forme de doublet respectivement à δ_{H} 1,04 (d, $J= 6,8$) et 0,74 (d, $J= 6,8$). On distingue également les signaux des protons des méthyles angulaires Me-18 et Me-19 raisonnant sous forme de singulet respectivement à δ_{H} 0,89 (s) et 1,04 (s). Outre ses signaux, la nature fortement oxydée de la chaîne latérale est déduite par la présence des signaux à δ_{H} 5,23 (d, $J= 1,5$, H-21), 4,67 (dd, $J= 5,6 ; 2,5$, H-22), 4,28 (d, $J= 2,5$, H-23), et 4,80 (dd, $J= 6,7 ; 2,3$, H-16). En plus des signaux caractérisant l'aglycone, on distingue également les signaux de la partie osidique quasiment similaire à ceux observés sur le spectre de RMN ^1H du composé (42) précédemment décrit. En effet, le proton anomérique est caractérisé le signal à δ_{H} 4,47 (d, $J= 7,8$) dont la valeur de la constante de couplage suggère l'orientation β du centre anomérique. Les autres signaux raisonnant entre δ_{H} 3,10– 3,80 sont attribuables aux d'hydroxyméthines et hydroxyméthylène du sucre. Sur ce même spectre, on observe le signal d'un proton oléfinique sous forme de doublet large à δ_{H} 5,42 (d, $J= 2,7$, H-15).

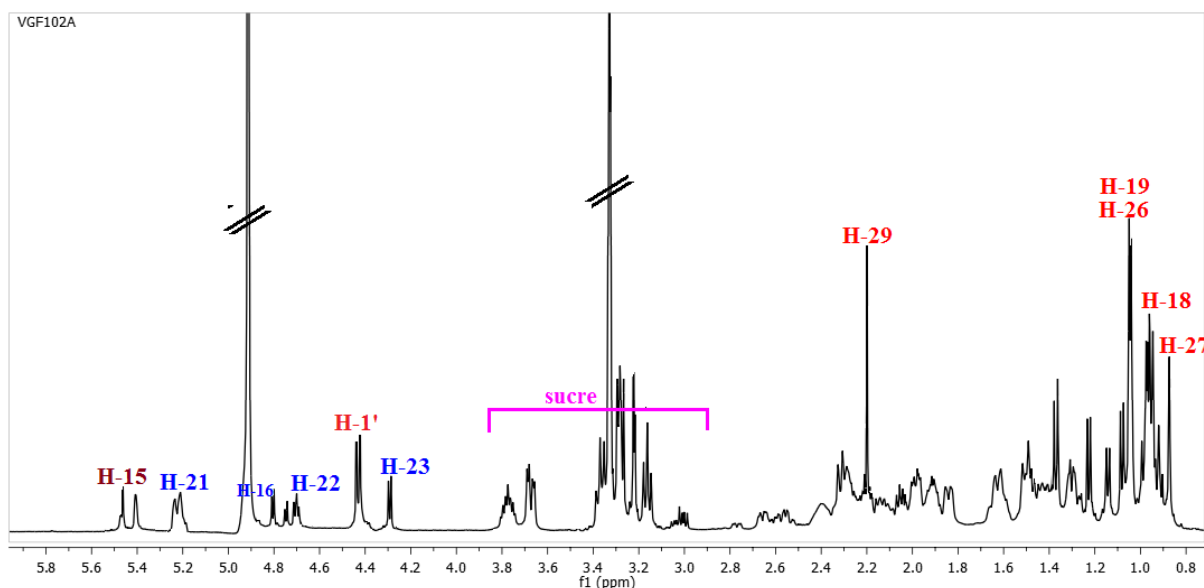


Figure 88: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du composé **RVgF52**

Les données fournies par le spectre de RMN ^{13}C (figure 89 ; Tableau 29) indiquent la présence des signaux de 35 atomes de carbone dont 29 sont attribuables à la partie aglycone d'un squelette de stéroïde de type stigmastane tandis que les 6 autres restants sont attribuables au D-glucose. Le signal observé à δ_{C} 200,09 est attribuable au carbonyle cétonique en position C-20 tandis que le signal à δ_{C} 29,2 est attribuable au méthyle Me-29 directement fixé sur ce carbonyle. La présence des diènes conjugués distribués entre les carbones C-8, C-9, C-14 et

C-15 est indiquée par les signaux à δ_C 111,7 (C-15) attribuable à un carbone oléfinique monosubstitué, 151,2 (C-14), 140,6 (C-9) et 122,9 (C-8) attribuables aux carbones oléfiniques disubstitués. Par ailleurs, d'autres signaux caractéristiques de l'aglycone sont également observés, notamment :

- les signaux des deux méthyles angulaires Me-18 et Me-19 raisonnants respectivement à δ_C 21,6 et 17,3 ;
- les signaux des deux méthyles secondaires Me-26 et Me-27 raisonnants respectivement à δ_C 16,8 et 15,9 ;
- les signaux des oxyméthines en position C-16, C-21, C-22 et C-23 raisonnants respectivement à δ_C 90,4, 98,9, 81,5 et 82,0
- Le signal à δ_C 80,2 est attribuable au carbone quaternaire en position C-24;

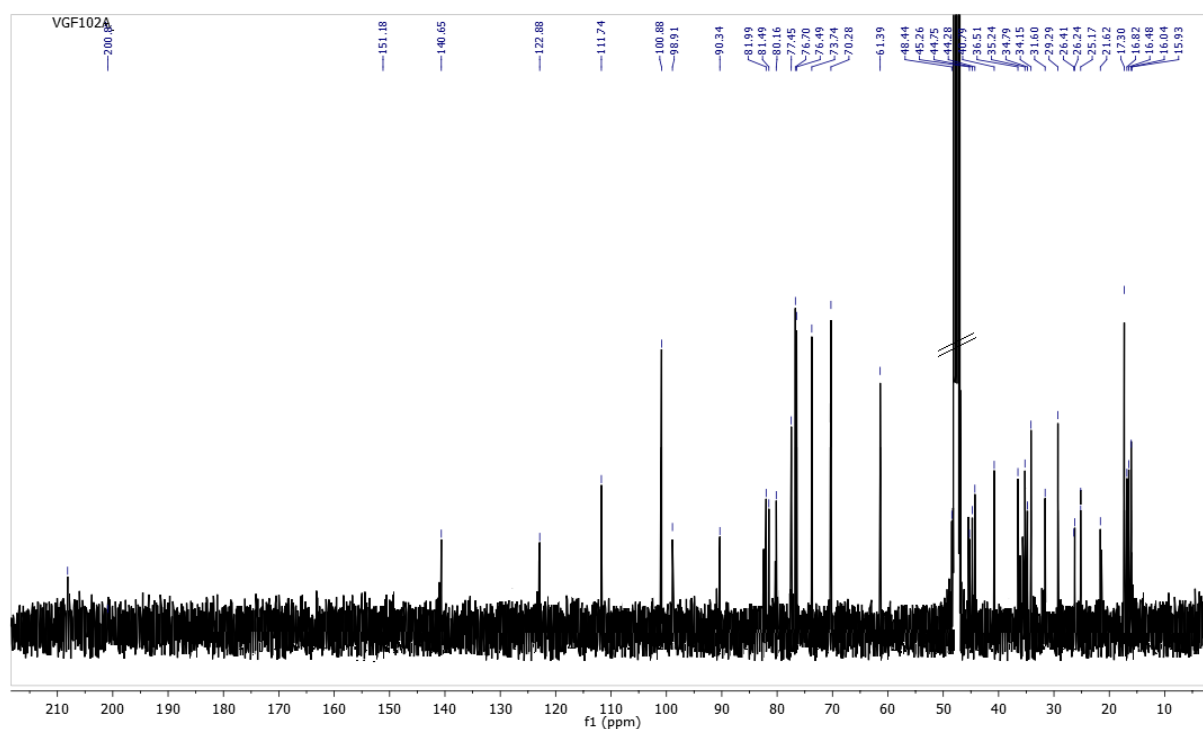


Figure 89: Spectre de RMN ^{13}C (125MHz, CD_3OD) du composé **RVgF52**

Toutes ces données spectrales sont compatibles à celle décrite dans la littérature et ont permis d'attribuer à **RVgF52** la structure **(44)** qui est celle de la vernoguinoside précédemment isolée des racines de *V. guineensis* par [Tchinda et al. \(2003\)](#) et par [Donfack et al. \(2012\)](#). La vernoguinoside A **(42)** et la vernoguinoside **(44)** sont des stéroïdes de type stigmastane, très répandu dans les plantes du genre *Vernonia*, notamment dans les rhizomes. L'isolement de ces deux composés dans les racines de *V. guineensis*, apporte donc une contribution significative dans le rôle puissant des marqueurs chimiotaxonomiques au service de la systématique des espèces végétales.

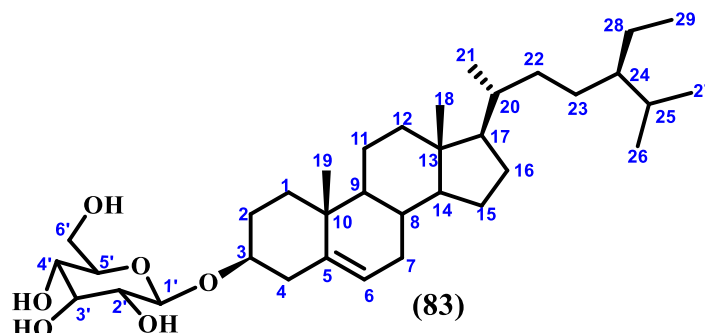
Tableau 29: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de RVgF52 dans le CD_3OD avec celles de la vernoguinoside (44) rapportées par Tchinda *et al.*, (2003)

| Pos. | Expérimental (RVgF52), | | Vernoguinoside (CD_3OD) | |
|------|--------------------------------|---|---|---|
| | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | ^{13}C (150 MHz) | ^1H (600 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| 1 | 35,2 | 1,75 (m); 1,34 (m) | 36,7 | 1,88 (m); 1,42 (m) |
| 2 | 29,2 | 1,95 (m); 1,30 (m) | 30,9 | 1,95 (m) ; 1,31 (m) |
| 3 | 76,4 | 3,78 (m) | 71,1 | 3,72 (dd, $J=9,6; 6,2$) |
| 4 | 34,5 | 1,82 (m); 1,27 (m) | 35,8 | 1,85 (m) ; 1,32 (m) |
| 5 | 40,8 | 1,45 (m) | 42,6 | 1,42 (m) |
| 6 | 26,4 | 1,34 (m); 1,23 (m) | 30,9 | 2,09 (m) ; 1,97 (m) |
| 7 | 25,2 | 1,66 (m); 2,06 (m) | 26,7 | 1,59 (m) ; 1,49 (m) |
| 8 | 122,9 | — | 124,7 | — |
| 9 | 140,6 | — | 145,5 | — |
| 10 | 37,1 | — | 38,4 | — |
| 11 | 21,6 | 2,30(m); 1,40 (m) | 23,5 | 2,30 (m) ; 1,35 (m) |
| 12 | 36,6 | 1,50 (m); 1,30 (m) | 37,7 | 1,85 (m) ; 1,38 (m) |
| 13 | 40,7 | — | 46,5 | — |
| 14 | 151,2 | — | 155,6 | — |
| 15 | 111,7 | 5,42 (d, $J=2,7$) | 117,2 | 5,36 (d, $J=2,6$) |
| 16 | 90,4 | 4,80 (dd, $J=6,7; 2,3$) | 90,0 | 4,71 (dd, $J=6,2; 2,6$) |
| 17 | 61,4 | 2,40 (sl) | 61,8 | 2,48 (d, $J=6,2$) |
| 18 | 21,6 | 0,89 (s) | 21,2 | 0,98 (s) |
| 19 | 17,3 | 1,04 (s) | 19,1 | 1,04 (s) |
| 20 | 48,4 | 2,74 (d, $J=5,6$) | 50,4 | 2,74 (d, $J=5,6$) |
| 21 | 98,9 | 5,23 (d, $J = 1,5$) | 99,8 | 5,28 (d, $J = 1,3$) |
| 22 | 81,5 | 4,67 (m) | 87,8 | 4,74 (dd, $J=5,6; 2,5$) |
| 23 | 82,0 | 4,28 (d, $J = 2,5$) | 85,6 | 4,23 (d, $J = 2,5$) |
| 24 | 80,2 | — | 83,6 | — |
| 25 | 31,7 | 2,22 (m) | 33,6 | 2,20 (m) |
| 26 | 16,8 | 1,04(d, $J = 6,9$) | 17,2 | 1,04 (d, $J = 6,8$) |
| 27 | 15,9 | 0,74 (d, $J = 6,9$) | 16,9 | 0,72 (d, $J = 6,8$) |
| 28 | 200,1 | — | 200,6 | — |
| 29 | 29,2 | 2,20 (s) | 28,0 | 2,25 (s) |
| 1' | 101,0 | 4,47 (d, $J=7,8$) | 102,1 | 4,41 (d, $J=7,7$) |
| 2' | 73,7 | 3,00 (m) | 73,7 | 3,14 (m) |
| 3' | 70,2 | 3,38 (m) | 70,3 | 3,37 (m) |
| 4' | 77,4 | 3,23 (m) | 76,5 | 3,25 (m) |
| 5' | 76,7 | 3,15 (m) | 75,9 | 3,30 (m) |
| 6' | 61,3 | 3,67 (dd, $J= 3,2 ; 12,4$) 3,37 (sl) | 63,2 | 3,85 (dd, $J = 4,8;12,2$) 3,65 (dd, $J = 3,2; 12,2$) |

II.2.7.3. Identification structurale du composé RVgF72 ou FVg61 (83)

Le composé **RVgF72** isolé des racines et le composé **FVg61** isolé des feuilles se présentent chacun sous forme de poudre blanche soluble dans la pyridine. Ils donnent une coloration bleu verdâtre au test de Liebermann-Burchard et une couronne violette au test de Molish caractéristique des stéroïdes glucosides. Sur une plaque CCM analytique, ils donnent une tache identique à celle d'un échantillon authentique de 3-*O*-D-glucopyranoside de β -

sitostérol. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de ce composé en comparaison à celles décrites dans la littérature a permis de l'identifier au 3-O- β -D-glucoside de β -sitostérol (**83**) précédemment isolé des racines de *V. guineensis* par Donfack *et al.* (2012)



En effet, sur son spectre de RMN¹H (figure 90), on observe un ensemble de signaux caractéristiques des phytostérols glucosides. En outre, l'on observe les signaux des protons de deux (02) méthyles angulaires résonnants δ_H 0,65 et 0,96 et attribuables respectivement aux protons des méthyles angulaires H-18 et H-19; de trois (03) méthyles secondaires résonnants à δ_H 0,91 (H-21), 0,84 (H-26) et 0,80 (H-27), d'un (01) méthyle primaire résonnant à δ_H 0,79 (H-29), d'un doublet large à δ_H 5,34 (H-6) caractéristique du proton oléfinique des stéroïdes dérivé du β -sitostérol (Luhata et Munkombwe, 2015) et d'un multiplet raisonnant à δ_H 3,21 attribuable à l'oxyméthine H-3. En plus, ce spectre présente également le signal d'un proton anomérique à δ_H 4,22 (d, $J=7,8$, H-1') et un ensemble de signaux caractéristique d'une unité de β -D-glucose (figure 90).

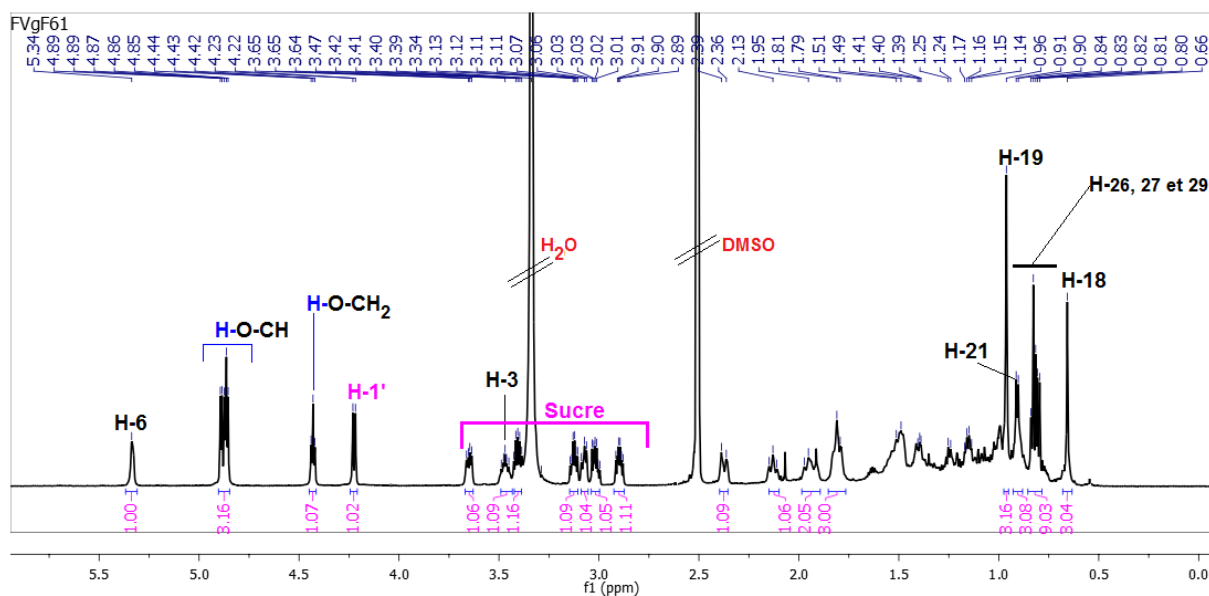


Figure 90: Spectre de RMN ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO) du composé **FVgF61**

Le spectre de RMN ^{13}C présente 29 signaux de carbones en excluant celui du solvant d'analyse, compatible avec la formule brute $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{NaO}_6$ obtenue en combinant cette information avec celles fournies par le spectre de RMN ^1H . Parmi ces signaux, on distingue, ceux de la double liaison Δ^5 à δ_{C} 140,9 (C-5) et 121,5 (C-6), de l'oxyméthine à δ_{C} 77,3 (C-3), des méthyles angulaires à δ_{C} des méthyles secondaires à et du méthyle primaire à δ_{C} . On observe également des signaux confirmant que le composé est un oside; notamment les signaux du carbone anomérique à δ_{C} 101,2 (C-1'), de l'hydroxyméthylène à δ_{C} 61,5(C-6'), et les oxyméthines C-4', C-2', C-5' et C-3', raisonnant respectivement à δ_{C} 70,5, 73,9, 77,1 et 77,2.

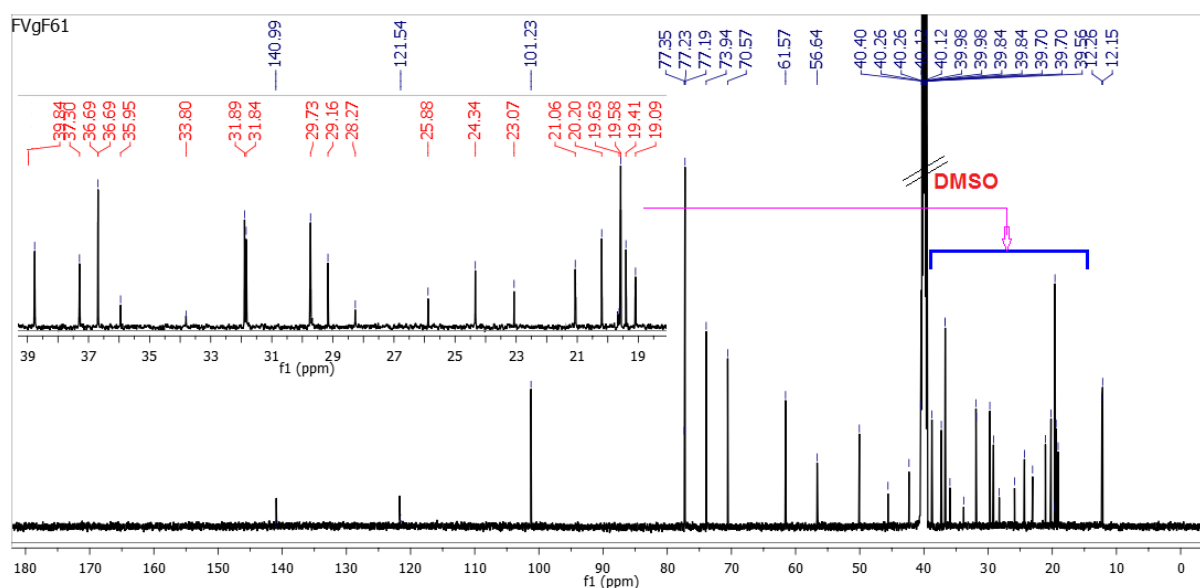
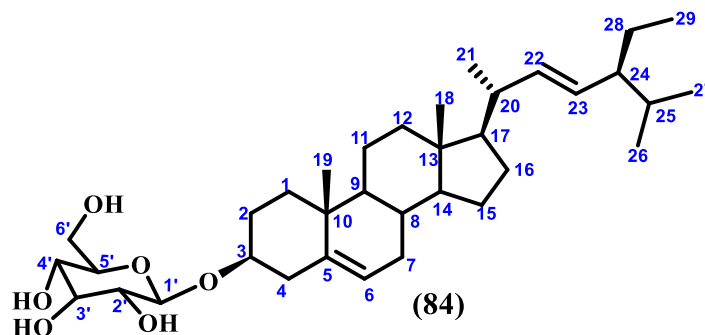


Figure 91: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé **FVgF61**

Toutes ces valeurs nous permettent de suggérer que ce composé est un glucoside stéroïdique identifié à la 3-*O*-D-glucopyranoside de β -sitostérol (**83**) en comparaison avec les données de la littérature (Ramiarantsoa *et al.*, 2008). Ce composé précédemment isolé des racines de *V. guineensis* par Donfack *et al.* (2012).

II.2.7.4. Identification structurale du composé **RVgF73** (**84**)

Le composé **RVgF72** a se présente sous forme de poudre blanche soluble dans la pyridine. Il donne une coloration bleu verdâtre au test de Liebermann-Burchard et une couronne violette au test de Molish caractéristique des stéroïdes glucosides. Sur une plaque CCM analytique, il donne une tache identique à celle d'un échantillon authentique de 3-*O*-D-glucopyranoside de β -sitostérol mais son spectre de masse et de RMN plaide en faveur de la 3-*O*- β -D-glucopyranoside de stigmastérol (**84**) précédemment isolé des racines de *V. guineensis* par Donfack *et al.* (2012)



En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 92), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 597,4121 compatible avec la formule moléculaire $C_{35}H_{58}O_6$ (Calc. $C_{35}H_{58}NaO_6$, 597,4126 ; $\Delta=0,8$ ppm) renfermant 7 degrés d'insaturations.

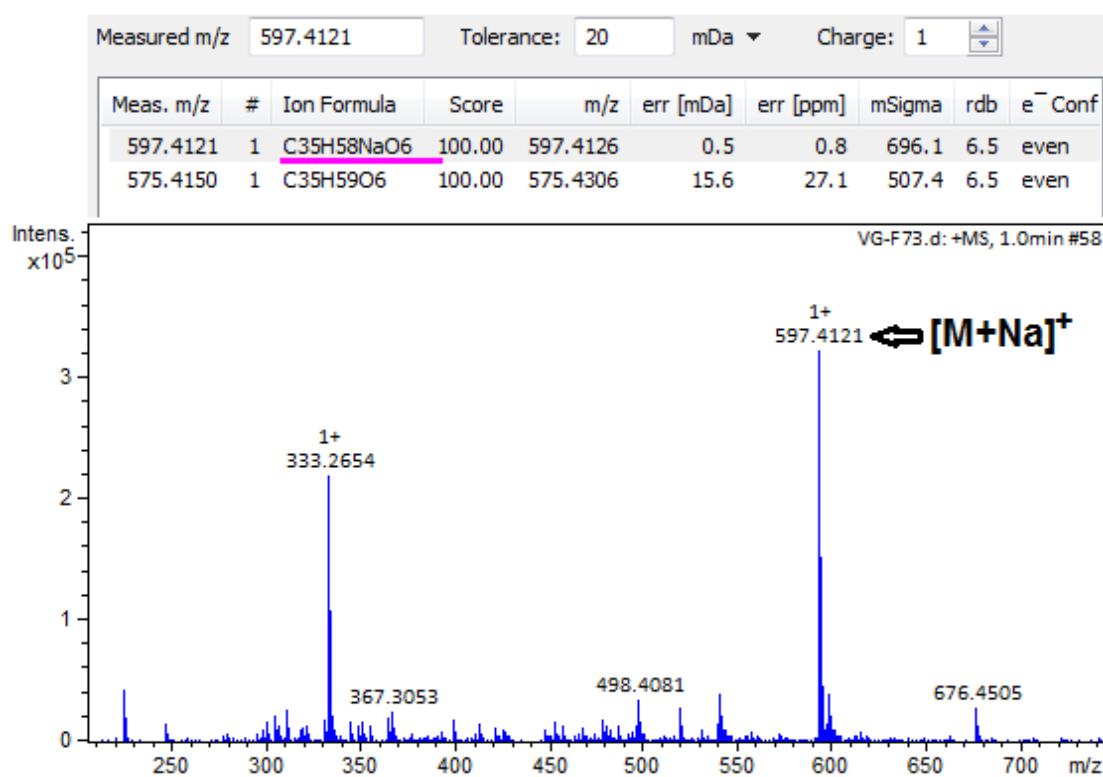


Figure 92: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF73**

Son spectre de RMN¹H (figure 93), est quasiment similaire à celui de la 3-*O*-D-glucopyranoside de β -sitostérol (**83**) (figure 91), à la différence qu'on y observe des signaux supplémentaires caractéristiques des protons oléfiniques H-23 et H-22 raisonnant respectivement à δ_H 5,01 (dd, $J=15,1, 8,8$) et 5,15 (dd, $J=15,2, 8,7$).

L'interprétation de toutes ces données (figure 92 et 93) comparées à celles de la littérature (Kang *et al.*, 2003) a permis d'identifier sans ambiguïté le composé **RVgF73** à la 3-*O*- β -D-glucopyranoside de stigmastérol (**84**).

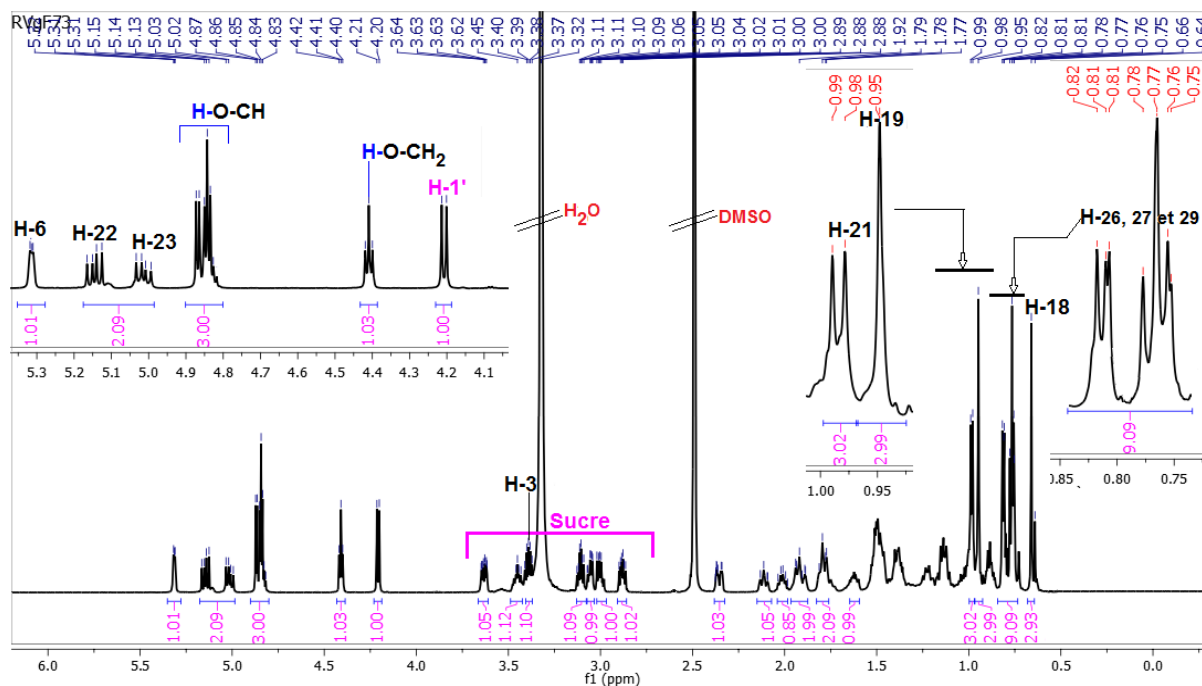


Figure 93: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du composé **RVgF73**

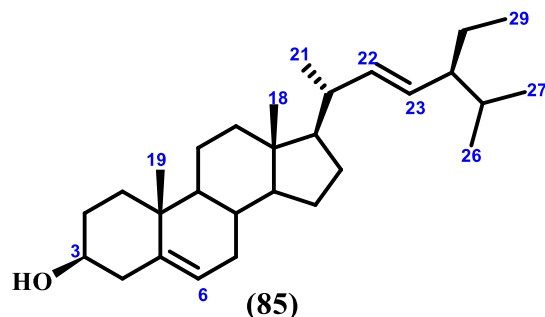
Tableau 30: Comparaison des données de RMN ^1H (500MHz) des composé **FVg F61** et **RVgF73** avec celles du glucoside de β -sitostérol (**83**) et du glucoside de stigmastérol (**84**)

| Pos. | Ref.(83)* ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) (Mult.;J(Hz)) | Ref. (84)§ ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Mult.;J(Hz)) | FVgF61 (83) ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) (Mult.;J(Hz)) | RVgF73 ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) (Mult.;J(Hz)) |
|------|---|--|---|--|
| 3 | 3,51 (m) | 3,38 (m) | 3,42 (dt, $J=11,8, 6$) | 3,41 (m) |
| 6 | 5,35 (m) | 5,30 (t, $J=4,6$) | 5,33 (dl, $J=5,0$) | 5,31 (dl, $J=5,2$) |
| 18 | 0,70 (s) | 0,65 (s) | 0,68 (s) | 0,66 (s) |
| 19 | 0,97 (s) | 0,93 (s) | 0,96 (s) | 0,95 (s) |
| 21 | 0,91 (d, $J=6,7$) | 0,91 (d, $J=6,5$) | 0,88 (d, $J=6,6$) | 0,98 (d, $J=6,6$) |
| 22 | 1,33 (m) | 5,16 (m) | 1,25 (m) | 5,15 (dd, $J=15,2, 8,7$) |
| 23 | 1,13 (m) | 5,06 (m) | 1,14 (m) | 5,01 (dd, $J=15,2, 8,8$) |
| 26 | 0,76 (d, $J=6,2$) | 0,83 (d, $J=6,6$) | 0,76 (m) | 0,81 (d, $J=6,7$) |
| 27 | 0,80 (d, $J=5,1$) | 0,81 (d, $J=6,5$) | 0,80 (m) | 0,79 (d, $J=7,0$) |
| 29 | 0,81 (t, $J=7,7$) | 0,70 (t, $J=7,5$) | 0,79 (m) | 0,77 (t, $J=7,9$) |
| 1' | 4,36 (d, $J=7,6$) | 4,41 (d, $J=7,8$) | 4,22 (d, $J=7,8$) | 4,22 (d, $J=7,8$) |

Ref. (83)* =glucoside de β -sitostérol (Ramiarantsoa et al., 2008), Ref. (84) § =glucoside de stigmastérol (Khatun et al., 2012)

II.2.7.5. Identification structurale du composé **RVgF32 (85)**

Le composé **RVgF32** se présente sous forme d'aiguille blanche soluble dans le chloroforme et fond entre 138 et 141°C. Il donne une coloration bleu verdâtre au test de Liebermann-Burchard caractéristique des stéroïdes. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de ce composé en comparaison à celles décrites dans la littérature a permis de l'identifier au stigmastérol (**85**) précédemment isolé des racines de *V. guineensis* par Donfack et al. (2012).



En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 94), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 413,3770 compatible avec la formule moléculaire $C_{29}H_{48}O$ (Calc. $C_{29}H_{49}O$, 413,3778 ; $\Delta=1,9$ ppm) renfermant 6 degrés d'insaturations.

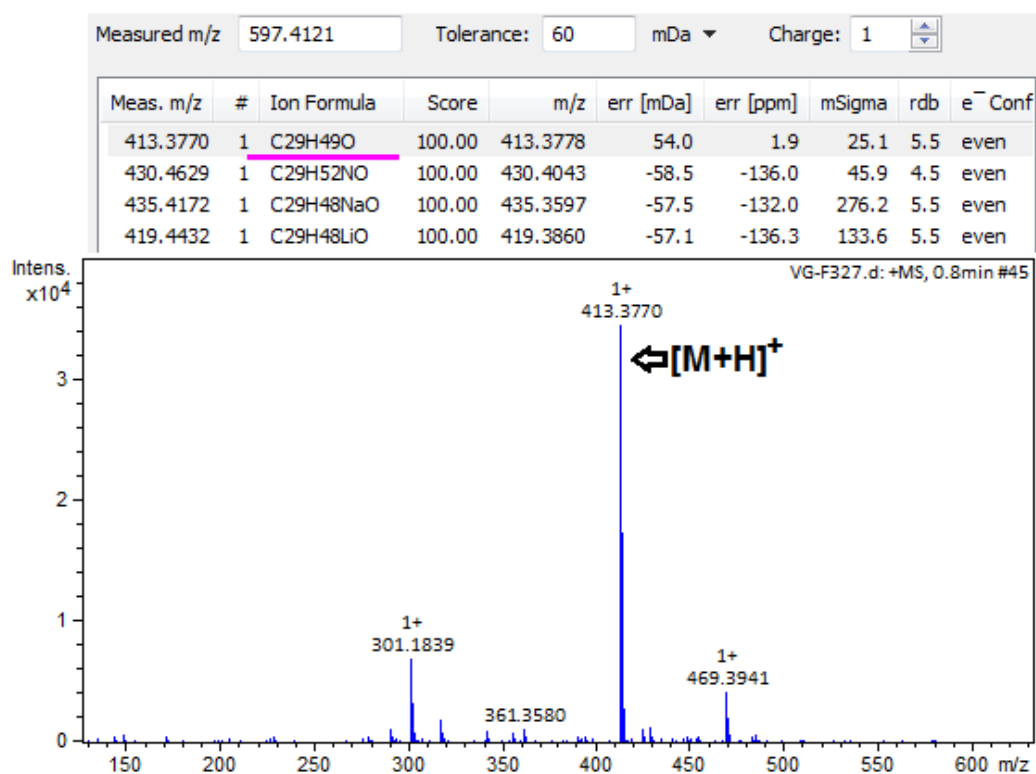


Figure 94: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF32**

Son spectre de RMN ¹H est quasiment similaire à celui du 3-*O*-β-D-glucoside de stigmastérol (**84**) susdécrit. La différence étant l'absence des signaux caractéristique du sucre. Par ailleurs, l'on observe un ensemble de signaux caractérisés, à l'instar des signaux à δ_H 5,37 (d, $J = 5,2$, H-6), 5,17 (dd, $J = 15,2, 8,7$, H-22), 5,04 (dd, $J = 15,1, 8,7$ H-23) attribuable aux protons oléfiniques en position 6, 22 et 23. Le signal à δ_H 3,55 (m, H-3) est attribuable à l'oxyméthine en position 3. En outre, dans la région des champs forts, on distingue les signaux des méthyles dont, 2 méthyles angulaires résonnants à 0,72 et 1,03 ppm attribuables respectivement aux protons H-18 et H-19 ; 3 méthyles secondaires résonnants à δ_H 1,04 ; 0,87

et 0,84 attribuables respectivement aux protons H-21, H-26 et H-27 et un méthyle primaire résonant à δ_H 0,84 attribuables au proton H-29. L'interprétation de toutes ces données (figure 94 et 95) comparées à celles de la littérature (Khatun *et al.*, 2012) a permis d'identifier sans ambiguïté le composé **RVgF32** au stigmasterol (**85**).

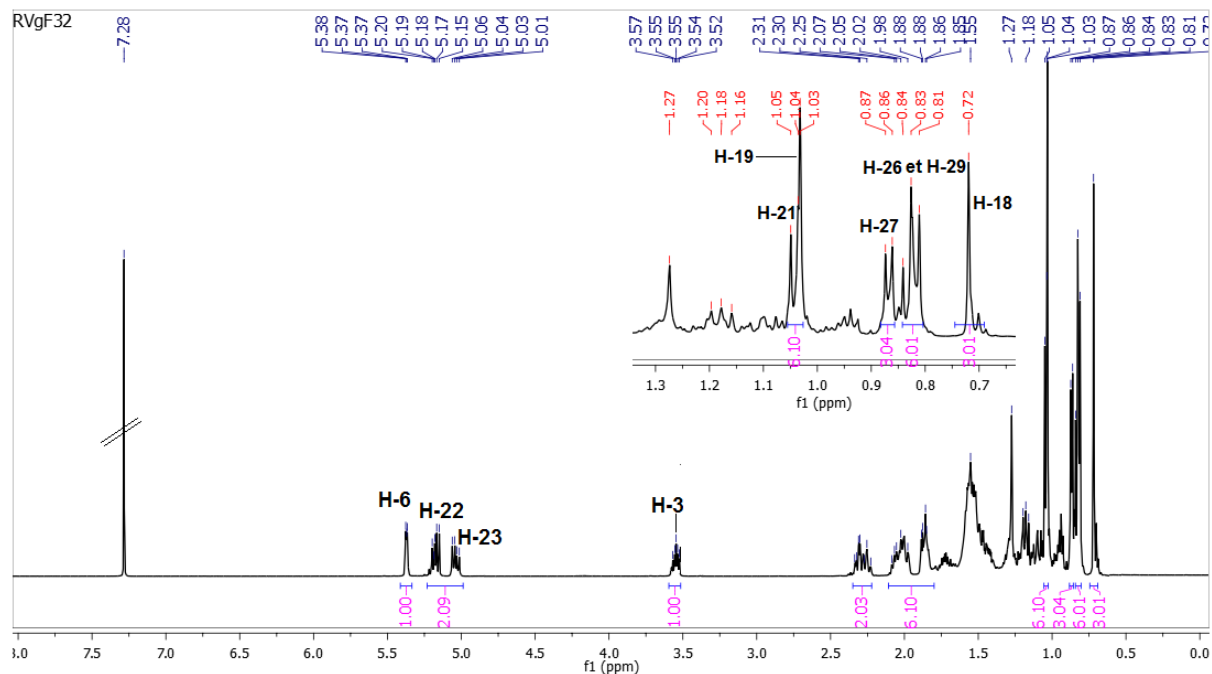
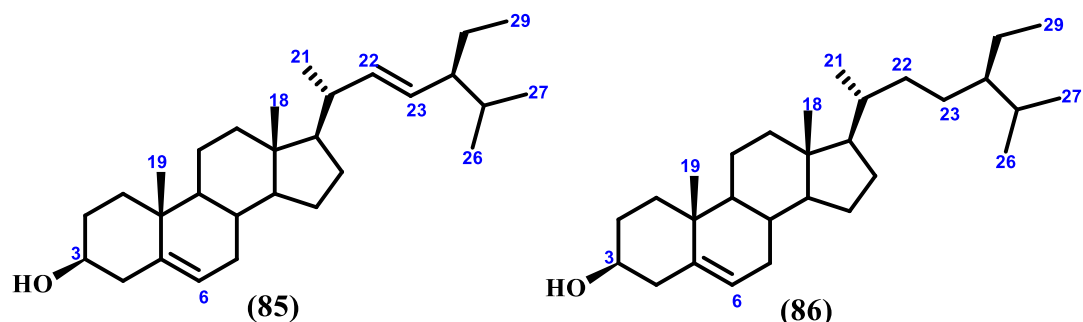


Figure 95: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **RVgF32**

II.2.7.6. Identification structurale du composé **RVgF22** ou **FVgF28** (mélange (**85**)/(**86**))

Le **RVgF22** a été isolé des racines tandis que **FVgF28** a été isolé des feuilles. Ils se présentent tous deux, sous forme d'aiguilles blanches solubles dans le chloroforme et fondent entre 122–126°C. Ils sont identiques sur une plaque CCM analytique mais, l'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) en comparaison à celles décrites dans la littérature a permis de les identifier au mélange de β -sitostérol (**86**) et de stigmasterol (**85**) précédemment isolé des racines de *V. guineensis* par Tchinda *et al.* (2003).



En effet, le spectre de RMN ^1H de **FVgF28** (figure 96) montre la présence des signaux caractéristiques quasiment identiques à celui du composé (**85**) susdécrit. Entre autre nous

pouvons citer le multiplet à δ_H 3,53, attribuable au proton H-3 de l'oxyméthine des stérols (Luhata and Munkombwe, 2015); un doublet large à δ_H 5,34 (dl, $J=4,0$), attribuable au proton oléfinique H-6. Les signaux à δ_H 5,14 (dd, 15,0, 8,5) et 5,00 (dd, 15,0, 8,5z) sont caractéristiques des protons oléfiniques H-22 et H-23, du stigmastérol (Khatun et al., 2012).

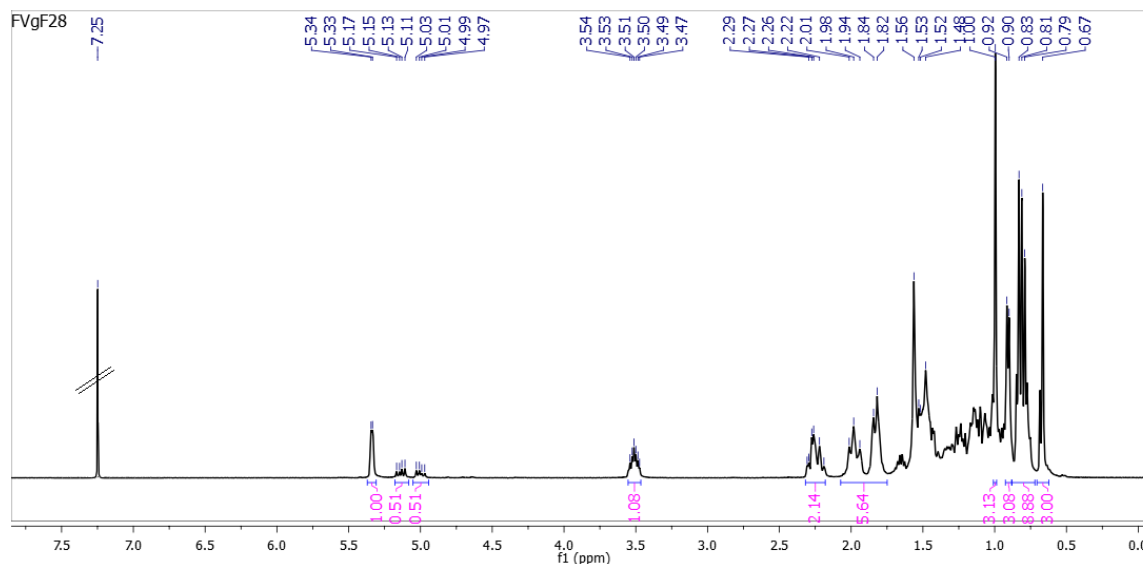


Figure 96: Spectre de RMN 1H (500 MHz, $(CD_3)_2SO$) du composé **FVgF28**

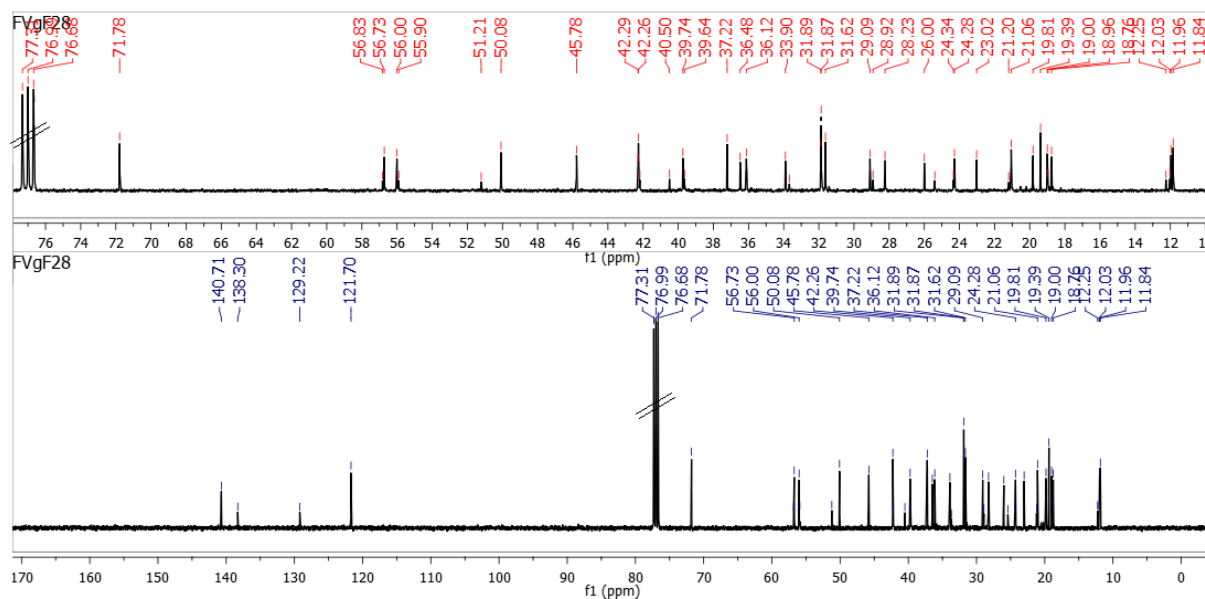


Figure 97: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé **FVgF28**

La principale différence avec le composé (85) susdécrit, apparait au niveau de l'intégration des protons H-22 et H-23 qui intègre pour 0,5 chacun au lieu de 01 comme dans le spectre de RMN 1H de **RVgF32**. Ce constat permet de suggérer que **FVgF28** est un mélange de du β -sitostérol (86) et du stigmastérol (85). Cette information confirmée sur le spectre de RMN ^{13}C **FVgF28** qui présente plus d'une cinquantaine de signaux permis lesquels de 4 carbones oléfiniques à δ_H 121,7, 140,7, 129,2 et 138,3

correspondant respectivement aux signaux, des carbones oléfiniques en C-6, C-5, C-22 et C-23. L'intensité des signaux à δ_H 121,7 (C-6) et 140,7 (C-6) étant le double de ceux à δ_H 129,2 (C-22) et 138,3 (C-22) confirme bien qu'il s'agit d'un mélange de stéroïdes qui ne diffère que par les carbones oléfiniques en C-22 et C-23. Les autres valeurs comparées à celles trouvées dans la littérature ont conduit à l'identification dans le mélange, des structures **(85)** et **(86)** respectivement attribuables à celle du stigmastérol et du β -sitostérol.

II.2.8. Caractérisation des triterpénoïdes

II.2.8.1. Identification structurale du composé indexé RVgF36 (87)

Le composé **RVgF36** se présente sous forme de fines aiguilles blanches. Il fond entre 263 et 266°C et est soluble dans le chloroforme. Il répond positivement au test de Libermann-Burchard, donnant une coloration rouge violacé, caractéristique des triterpènes. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de **RVgF36** en comparaison à celles de hop-17(21)-en-3 β -ol décrites dans la littérature (Chakravarty *et al.*, 1994) a permis de l'identifier à l'acétate de hop-17(21)-en-3 β -yl (**87**), donc les données spectroscopiques sont décrites ici pour la première fois.

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 98), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[M+Na]^+$ à m/z 469,3994 compatible avec la formule moléculaire $C_{32}H_{52}O_2$ (Calc. $C_{32}H_{52}O_2Na$, 469,4040 ; $\Delta=9,9$ ppm) renfermant 7 degrés d'insaturations.

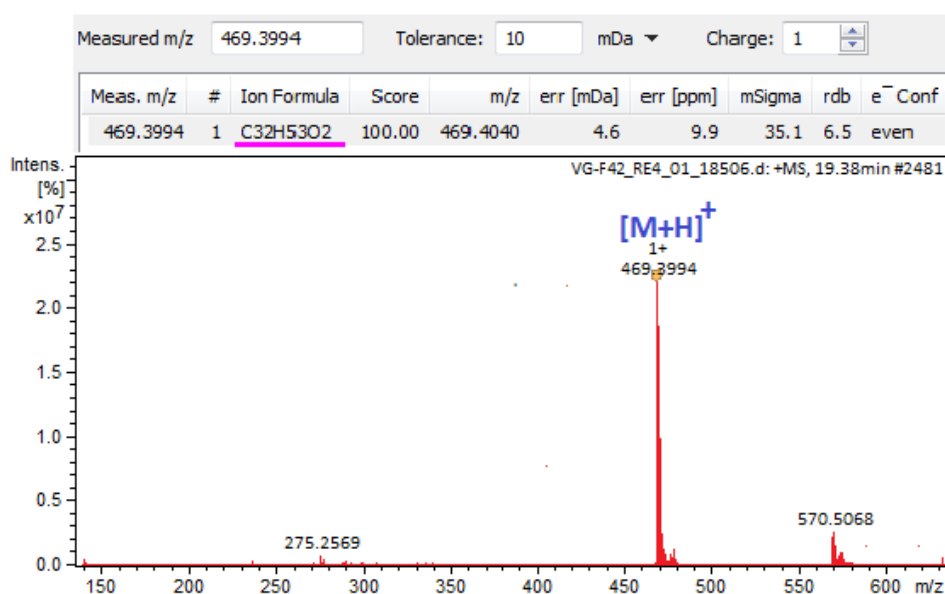


Figure 98: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF36**

L'analyse du spectre de RMN 1H (figure 99, tableau 31), laisse transparaître :

- Dans la région des champs forts, les signaux des six méthyles angulaires à δ_H 0,88 (s, CH₃-23), 0,86 (s, CH₃-24), 0,95 (s, CH₃-25), 0,88 (s, CH₃-26), 1,05 (s, CH₃-27), 0,86 (s, CH₃-28) et les signaux des deux méthyles secondaires caractéristiques du groupement isopropyle à δ_H 0,94 (d, $J = 6,9$ CH₃-29) et 1,00 (d, $J = 6,9$ CH₃-30).
- On observe également un signal légèrement déblindé à δ_H 4,51 (dd, $J = 10,9 ; 5,6$ Hz, H-3) caractéristique du proton de l'oxyméthine dont l'hydroxyle a été acétylé. Ceci se justifie sur le spectre HMQC (figure 102) où on observe une tache de corrélation entre ce proton et le carbone résonnant à δ_C 80,7. En effet, l'acétylation de l'hydroxyle en position 3 des triterpènes induit un déblindage du carbone en position 3 qui, non acétylé résonne autour de δ_C 70,0. Ainsi, la présence du singulet à δ_H 2,06 (s, 3H) sur le spectre de RMN ¹H, corrélant en HMBC (figure 103) avec le carbone résonnant à δ_C 170,9 et attribuable au proton du méthyle lié au carbonyle confirme l'hypothèse de la présence d'un fragment acétate dans la structure de **RVgF36**.

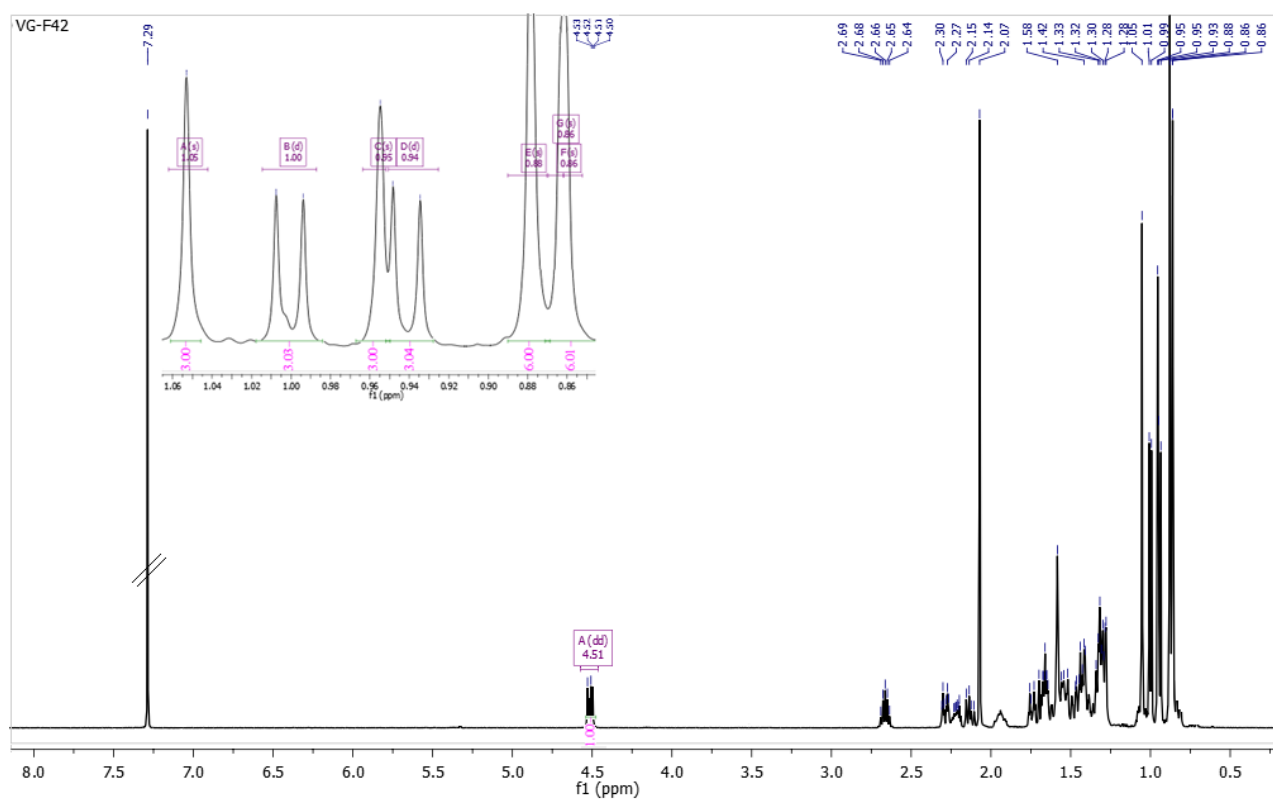


Figure 99: Spectre de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) du composé **RVgF36**

Les données fournies par les spectres de RMN ¹³C (figure 99) et DEPT 135 (figure 101) indiquent la présence des signaux de 32 atomes de carbone sur le spectre découplé-large bande et 24 signaux sur le spectre DEPT 135 nous permettant de différencier les signaux de 8 carbones quaternaires des autres carbones dans la molécule. En effet, le spectre de RMN ¹³C découplé-large bande (figure 100) présente tous les signaux des atomes de carbone de la

molécule, tandis que le spectre DEPT 135 (figure 101) présente en phase négative les signaux des méthylènes et en phase positive les signaux de méthyles et méthynes. La superposition de ces deux spectres permet alors d'identifier les signaux de carbones quaternaires hybridés sp^2 à δ_c 136,0 et 139,7 attribuables respectivement aux carbones C-17 et C-21 caractéristiques du squelette des hop-17(21)-enes (Chakravarty, 1994). Le signal apparaissant à δ_c 170,9 est attribuable au groupement acétate fixé en position 3. En outre, on distingue également les signaux à δ_c 16,5 et 27,8 caractéristiques des méthyles angulaires C-24 et C-23 des triterpènes qui corrélient en HMBC avec le proton de l'oxyméthine à δ_H 4,51. En plus, quatre autres signaux des méthyles angulaires à δ_c 16,2 (C-25), 16,2 (C-26), 14,8 (C-27), 19,9 (C-28) et les signaux de deux méthyles secondaires à δ_c 21,3 (C-29), et 21,8 (C-30) sont également observés.

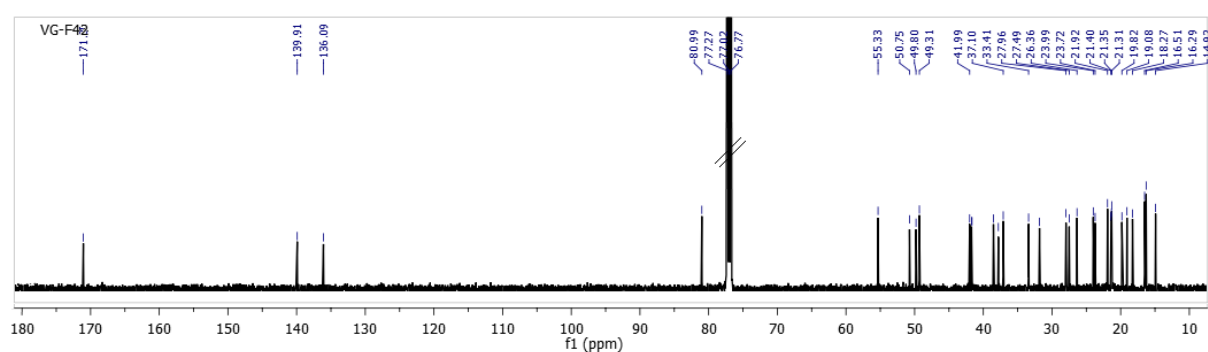


Figure 100: Spectre de RMN ^{13}C (125 Mz, $CDCl_3$) du composé **RVgF36**

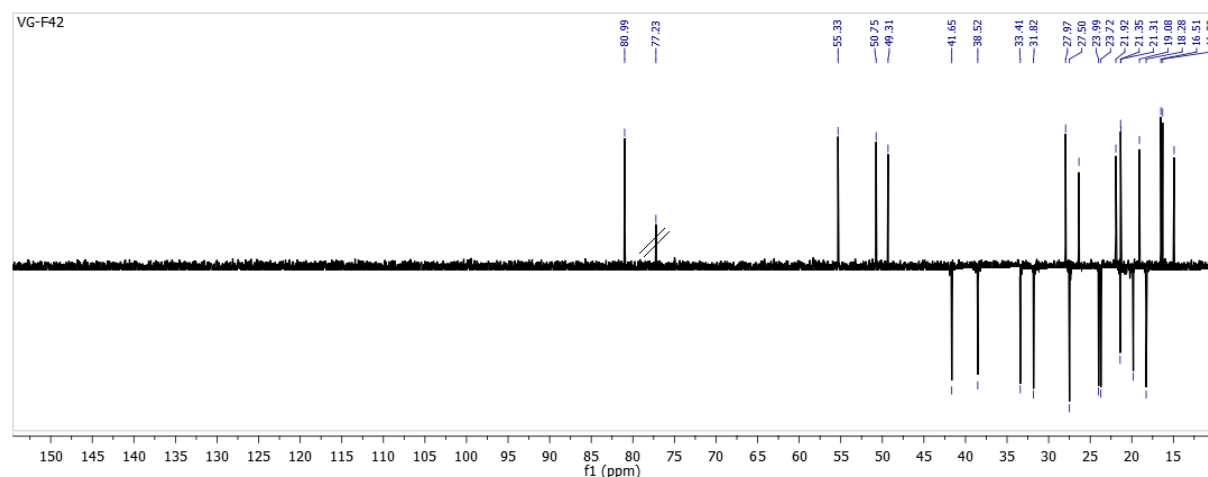


Figure 101: Spectre DEPT 135 (125Mz, $CDCl_3$) du composé **RVgF36**

Par ailleurs le spectre HMQC (figure 102) a permis grâce aux taches de corrélations entre carbone et protons directement liés d'attribuer à chaque proton et carbone les valeurs des déplacements chimiques correspondants.

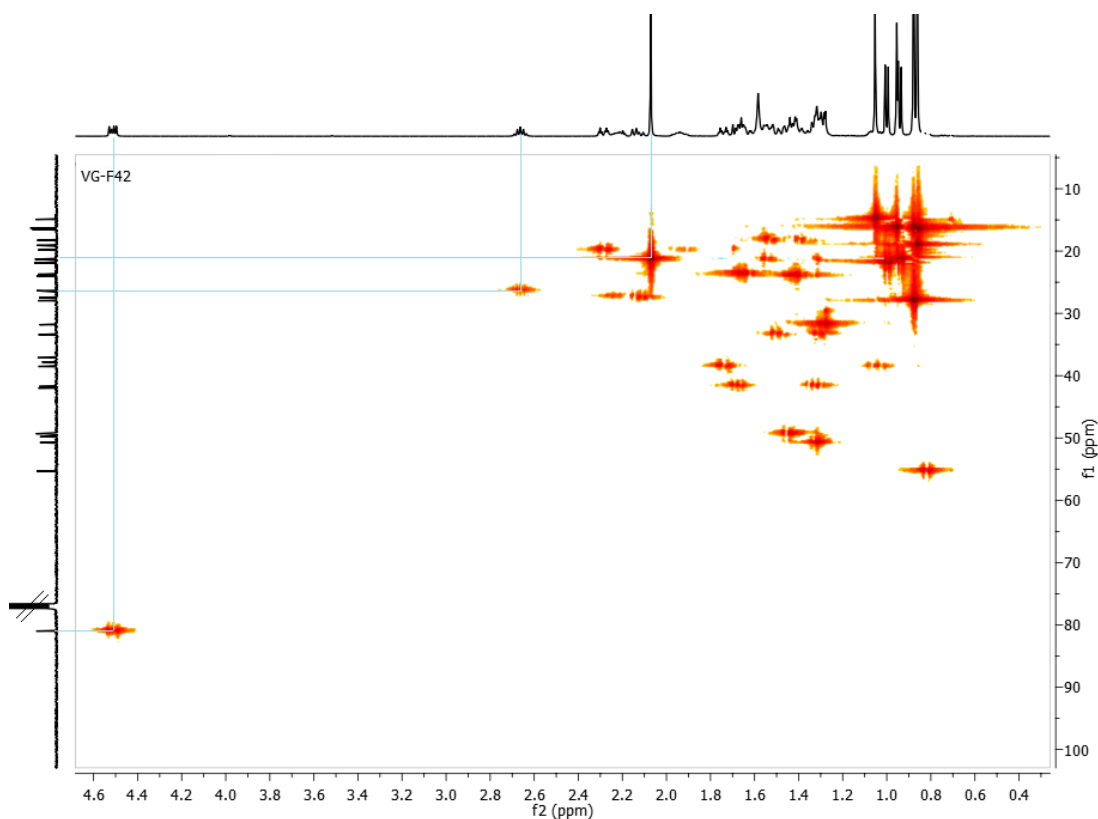


Figure 102: Spectre HMQC du composé **RVgF36**

L'analyse du spectre HMBC (figure 103) et du spectre COSY (figure 104) a été d'une grande importance pour l'assignation complète de la molécule et plus particulièrement pour positionner la double liaison et les différents méthyles sur le squelette des hopanes. Ainsi les taches de corrélations intenses observées en HMBC d'une part entre le carbone à δ_C 136,0 (C-21) et les protons à δ_H 0,94 (d, $J = 6,9$, CH₃-29), 1,00 (d, $J = 6,9$ CH₃-30) et 2,66 (m, CH-22) et d'autre part entre le carbone à δ_C 139,9 (C-17) et les protons à δ_H 0,86 (s, CH₃-28), 1,44 (dd, $J = 10,9, 5,6$ Hz, CH-13) et 2,66 (m, CH-22) confirme le squelette $\Delta^{17(21)}$ attribué à **RVgF36**. Sur le spectre COSY (figure 104), sont illustrées quelques corrélations homonucléaires importantes, tandis que la figure 84 et le schéma 14 illustrent quelques corrélations majeures observées sur le spectre HMBC.

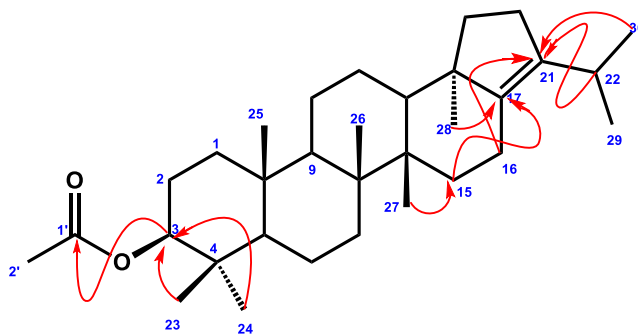


Schéma 15: Quelques corrélations clés observées sur le spectre HMBC du composé **RVgF36**

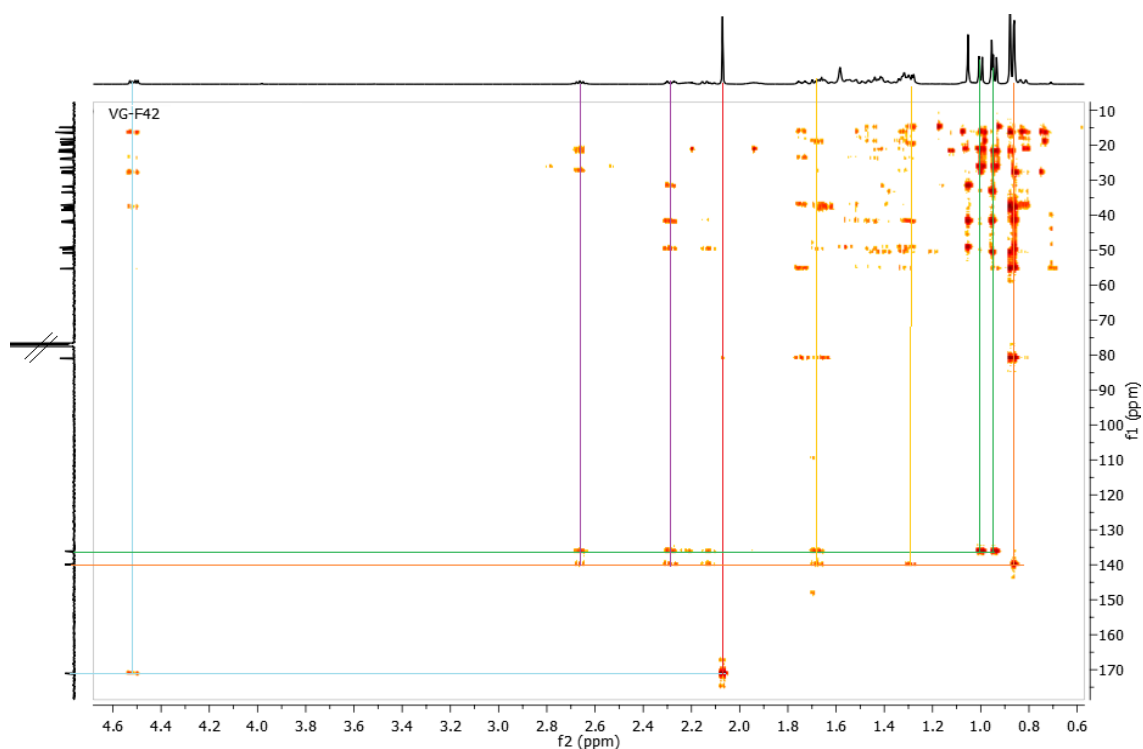


Figure 103: Spectre HMBC du composé **RVgF36**

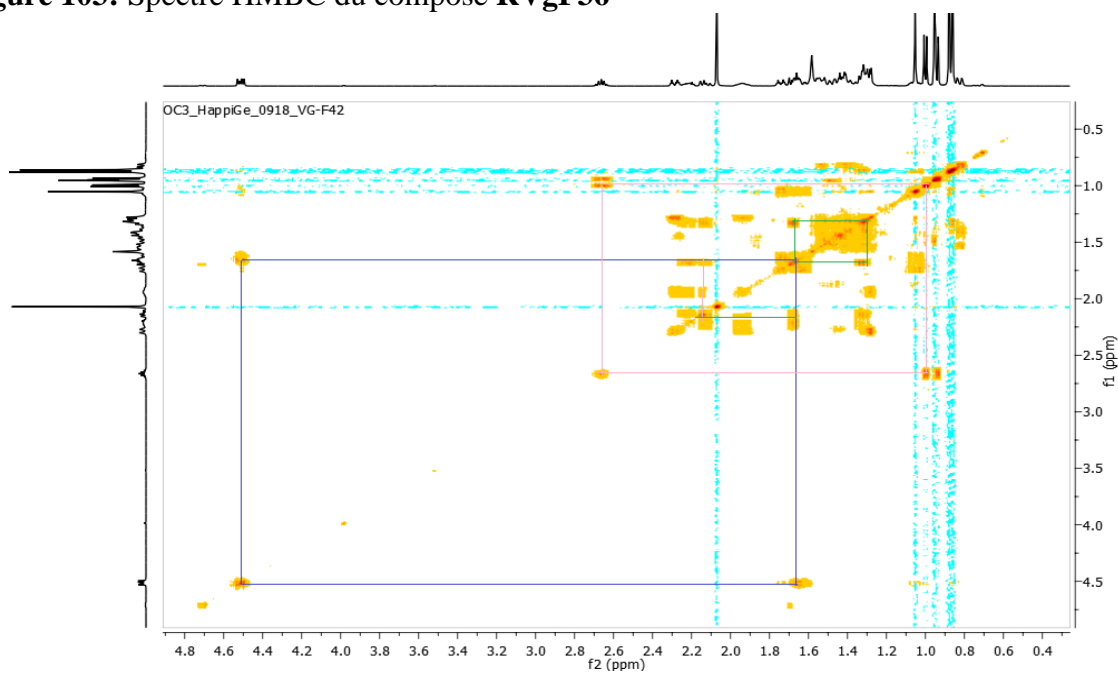


Figure 104: Spectre COSY du composé **RVgF36**

L'analyse de ces données de RMN, incluant la RMN-1D et RMN-2D couplée aux informations fournies par le spectre de masse nous a permis d'identifier **RVgF36** à la l'acétate de hop-17(21)-en-3 β -yl (**87**), isolée du genre *Vernonia* pour la première fois mais précédemment isolée en 2000 de *Pluchea pteropoda* Hemsl. (Asteraceae) et caractérisé par diffractométrie aux rayons X (Luger *et al.*, 2000). Les données de SM et RMN de ce composé sont donc décrites ici pour la première fois.

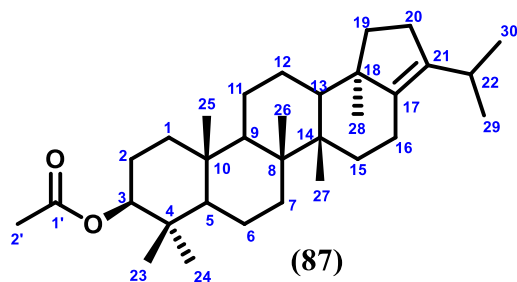


Tableau 31: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de RVgF36 dans le CDCl_3 avec les valeurs de la hop-17(21)-en-3 β -ol rapportées par Chakravarty *et al.*, (1994)

| Pos. | Expérimental (RVgF37) | | Hop-17(21)-en-3 β -ol |
|------|--------------------------------|--|--------------------------------|
| | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | ^{13}C (75 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult.;J(Hz)) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ |
| 1 | 38,5 | 1,74 (dd, $J=7,3 ; 3,7$) 1,08(dd, $J=9,3 ; 3,7$) | 38,5 |
| 2 | 23,7 | 1,66 (m) | 23,7 |
| 3 | 80,7 | 4,52 (dd, $J = 10,9 ; 5,6$) | 70,9 |
| 4 | 37,8 | — | 37,8 |
| 5 | 55,3 | 0,82 (m) | 55,3 |
| 6 | 18,3 | 1,53 (m) ; 1,40 (m) | 18,2 |
| 7 | 33,3 | 1,51(m) ; 1,29(m) | 33,4 |
| 8 | 41,7 | — | 41,7 |
| 9 | 50,7 | 1,31(dd, $J = 7,1 ; 3,0$) | 50,7 |
| 10 | 37,1 | — | 37,1 |
| 11 | 21,3 | 1,55 (m) ; 1,31 (m) | 21,4 |
| 12 | 23,9 | 1,54 (m) ; 1,31 (m) | 23,9 |
| 13 | 49,3 | 1,44 (m) | 49,3 |
| 14 | 42,0 | — | 41,9 |
| 15 | 31,7 | 1,28 (m) | 31,8 |
| 16 | 19,6 | 1,69 (m) | 19,8 |
| 17 | 139,9 | — | 139,9 |
| 18 | 49,8 | — | 49,8 |
| 19 | 19,8 | 2,28 (m) | 19,9 |
| 20 | 27,6 | 2,21 (m) | 27,5 |
| 21 | 136,0 | — | 136,0 |
| 22 | 26,3 | 2,66 (dq, $J = 13,5 ; 6,8$) | 26,3 |
| 23 | 27,8 | 0,88 (s) | 27,9 |
| 24 | 16,5 | 0,86 (s) | 16,5 |
| 25 | 16,2 | 0,95 (s) | 16,2 |
| 26 | 16,2 | 0,98 (s) | 16,2 |
| 27 | 14,8 | 1,05 (s) | 14,9 |
| 28 | 19,1 | 0,86 (s) | 19,0 |
| 29 | 21,3 | 0,94 (d, $J=6,9$) | 21,3 |
| 30 | 21,8 | 1,00 (d, $J=6,9$) | 21,9 |
| 1' | 170,9 | — | — |
| 2' | 21,3 | 2,06 (s) | — |

II.2.8.2. Identification structurale du composé RVgF21 ou FVgF21 (33)

Le composé indexé **RVgF21** isolé des racines et **FVgF21** isolé des feuilles, présentent les mêmes caractéristiques physiques et spectroscopiques. Nous les avons donc assimilées à une seule et même molécule. Cette molécule précipite sous forme de paillette blanche dans système n-hexane-AcOEt (95:5, v/v). Soluble dans le chloroforme, elle répond positivement au test de Libermann-Burchard, donnant une coloration rouge violacé, caractéristique des triterpènes. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de RVgF21 ou FVgF21 en comparaison à celles décrites dans la littérature (Mahato et Kundu, 1994) a permis de l'identifier à la lup20(29)-en-3-ol (**33**).

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 105), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[M+Na]^+$ à m/z 449,3797 compatible avec la formule moléculaire $C_{30}H_{50}O$ (Calc. $C_{30}H_{50}ONa$, 449,3754 ; $\Delta=9,6$ ppm) renfermant 6 degrés d'insaturations.

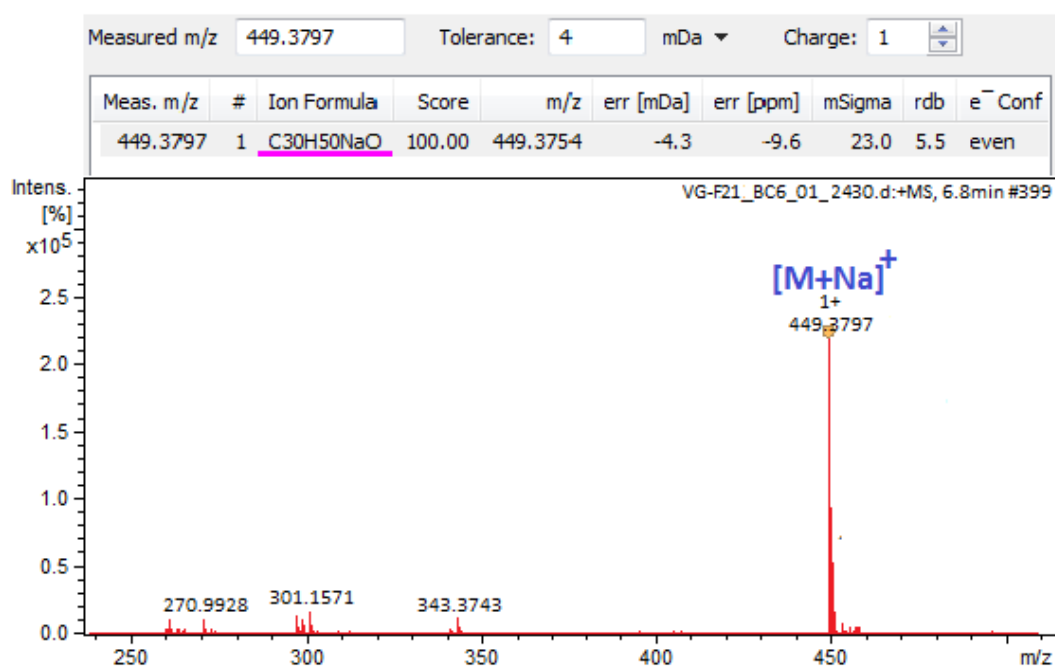


Figure 105: Spectre de masse (+) –HRESI du composé **FVgF21**

L'analyse du spectre de RMN 1H (figure 106) et du spectre de RMN ^{13}C (figure 107) révèle la présence des signaux à δ_H/δ_C 4,71(d, $J = 2,0$)/109,3, 4,59 (d, $J = 2,0$)/109,3 et le signal à δ_H/δ_C 3,22 (dd, $J = 11,4 ; 4,9$)/79,0 correspondent respectivement aux déplacements chimiques des protons et carbone du méthylène terminal C–29 et à l'oxyméthine en position C–3. Le signal à δ_C 151,0 justifie la présence du carbone quaternaire hybridé Sp^2 en position C–20 des composés de la classe de lup20(29)-en-3-ol (Mahato et Kundu, 1994). De plus sur le spectre de RMN 1H (figure 106), on observe sept signaux sous forme de singulets

correspondant aux méthyles angulaires, dont l'un résonne δ_H 1,71 et les six autres résonnent dans la région des champs fort respectivement à δ_H 0,79, 0,81, 0,85, 0,97, 0,99 et 1,06 (Me-28, Me-23, Me-24, Me-25, Me-26, Me-27). Toutes ces données (tableau 32), ont permis d'identifier ce composé au lupéol (**33**) précédemment isolé de *Vernonia brasiliensis* par [De-Almeida et al. \(1997\)](#) mais rapporté ici pour la première fois de l'espèce *Vernonia guineensis*.

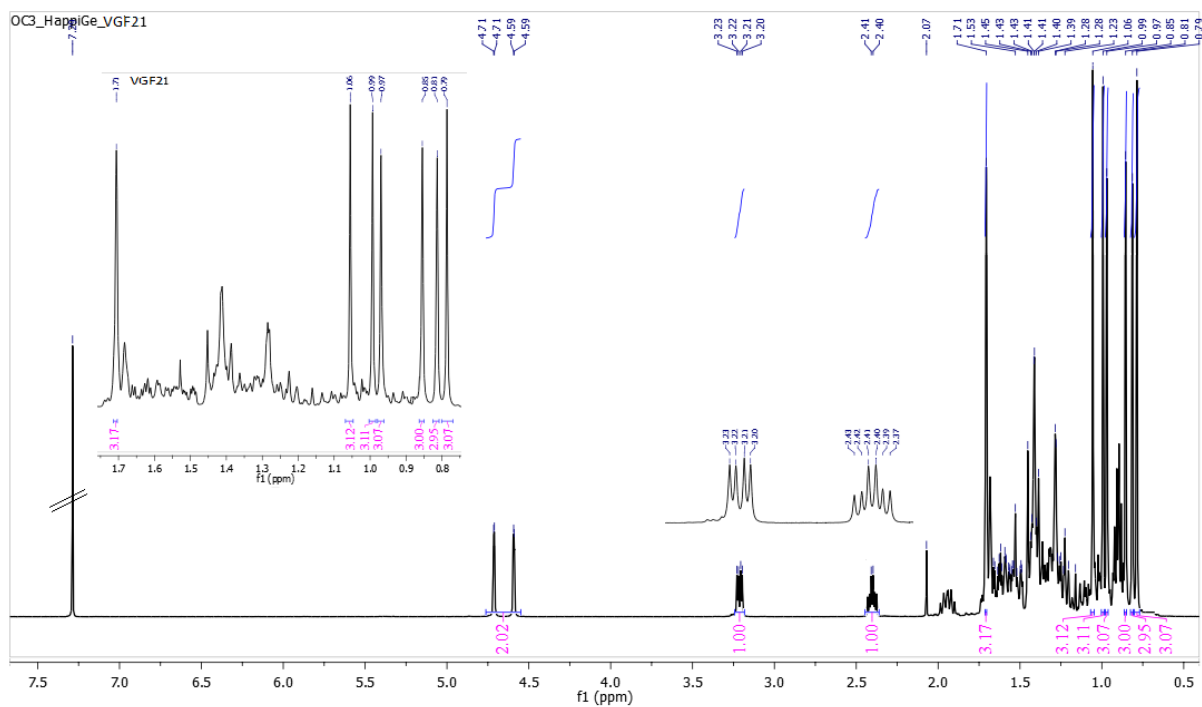


Figure 106: Spectre de RMN 1H (500MHz, $CDCl_3$) du composé **FVgF21**

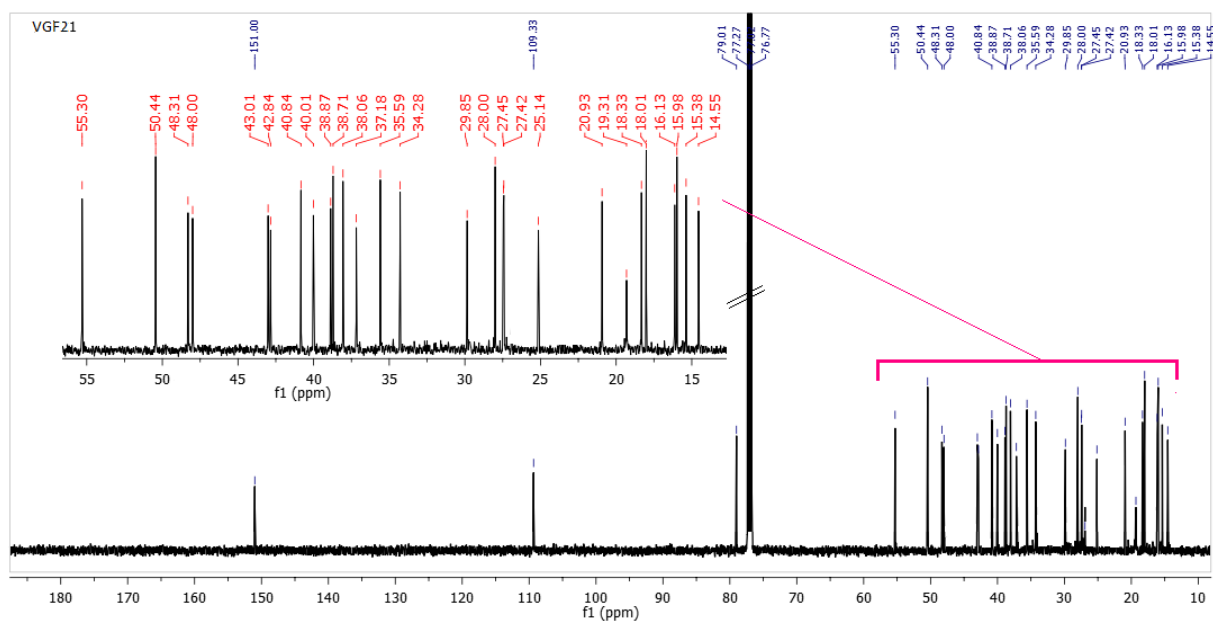


Figure x : Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé **FVgF21**

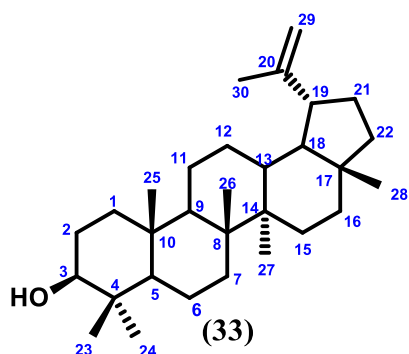


Tableau 32: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de FVgF21 dans le CDCl_3 avec les valeurs du lupeol rapportées par Haque et al., (2007)

| Pos. | Expérimental (FVgF21) | | Liter. (Lupeol), CDCl_3 | |
|------|---|---|--|---|
| | ^{13}C (125 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ^1H (500 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) | ^{13}C (50 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ^1H (200 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$) |
| 1 | 38,7 | 1,43 (m) ; 1,23 (m) | 38,0 | |
| 2 | 27,4 | 1,53 (m) | 27,4 | |
| 3 | 79,0 | 3,22 (dd, $J= 11,4 ; 4,9$) | 79,0 | 3,18 (dd, $J=9,6; 6,2$) |
| 4 | 38,8 | — | 38,7 | — |
| 5 | 55,3 | 0,71 (sd, $J= 9,3$) | 55,3 | |
| 6 | 18,3 | 1,41 (m) | 18,3 | |
| 7 | 34,2 | 1,39 (m) | 34,2 | |
| 8 | 40,8 | — | 40,1 | — |
| 9 | 50,4 | 1,27 (dd, $J= 13,9 ; 3,6$) | 50,4 | |
| 10 | 37,1 | — | 37,7 | — |
| 11 | 20,9 | 1,43 (m); 1,28 (m) | 20,9 | |
| 12 | 25,1 | 1,14 (m) | 25,1 | |
| 13 | 38,0 | 1,40 (dd, $J= 10,1; 4,0$) | 38,0 | |
| 14 | 42,8 | — | 42,8 | — |
| 15 | 27,4 | 1,53 (m) | 27,4 | |
| 16 | 35,5 | 1,49 (m) | 35,5 | |
| 17 | 48,0 | — | 48,0 | — |
| 18 | 48,3 | 2,40 (dd, $J= 11,1; 5,3$) | 48,2 | |
| 19 | 43,0 | 1,45 (m) | 48,0 | |
| 20 | 151,0 | — | 151,0 | — |
| 21 | 29,8 | 1,28 (m) | 29,8 | |
| 22 | 40,0 | 1,41(m); 1,21 (m) | 40,0 | |
| 23 | 28,0 | 0,81 (s) | 28,0 | 0,78 (s) |
| 24 | 15,9 | 0,85 (s) | 16,0 | 0,81 (s) |
| 25 | 16,1 | 0,97 (s) | 16,1 | 0,92 (s) |
| 26 | 15,3 | 0,99 (s) | 16,0 | 0,94 (s) |
| 27 | 14,5 | 1,06 (s) | 16,0 | 1,02 (s) |
| 28 | 18,1 | 0,79 (s) | 18,0 | 0,75 (s) |
| 29 | 109,3 | 4,71(d, $J= 2,0$) 4,59 (d, $J= 2,0$) | 109,3 | 4,67 (d, $J=1,4$) 4,56 (d, $J=\text{et},4$) |
| 30 | 19,3 | 1,76 (s l) | 19,4 | 1,67 (d, $J=0,5$) |

II.2.8.3. Identification structurale du composé RVgF51 ou FVgF41 (88)

Le composé indexé **RVgF51** isolé des racines et **FVgF41** isolé des feuilles, présentent les mêmes caractéristiques physiques et spectroscopiques. Nous les avons donc assimilées à une seule et même molécule. Cette molécule se précipite sous forme de poudre blanche amorphe dans système n-hexane–AcOEt (8:2, v/v). Soluble dans le chloroforme, elle répond positivement au test de Libermann-Burchard, donnant une coloration rouge violacé, caractéristique des triterpènes. L'interprétation des données expérimentales (spectrométriques et spectroscopiques) de **RVgF51** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Mahato et Kundu, 1994) a permis de l'identifier à l'acide 3 β -hydroxylup-20(29)-énoïque (**88**).

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 107), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[M+Na]^+$ à m/z 479,3497 compatible avec la formule moléculaire $C_{30}H_{48}O_3$ (Calc. $C_{30}H_{48}O_3Na$, 479,3496 ; $\Delta=0,1$ ppm) renfermant 7 degrés d'insaturations.

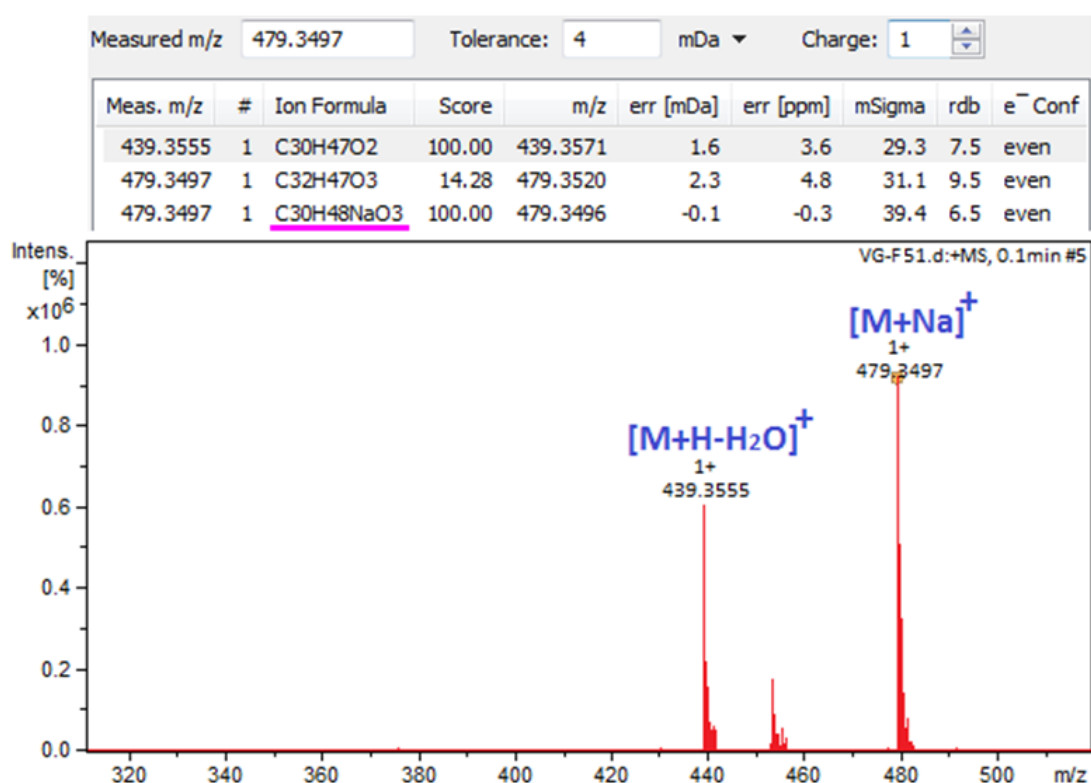


Figure 107: Spectre de masse (+)-HRESI du composé **RVgF51**

L'analyse du spectre de RMN 1H (figure 108) et du spectre de RMN ^{13}C (figure 109) révèle une similitude avec ceux du lupeol (**33**) expectation faite par le spectre de RMN ^{13}C où l'on l'observe la disparition du signal δ_C 18,1 et l'apparition du signal à δ_C 180,4, suggérant l'oxydation en acide carboxylique, du méthyle en position C-28 du lupeol. De plus le spectre de RMN 1H exhibe des signaux de 6 méthyles angulaires au lieu de 7 comme relevé sur le

spectre de RMN ^1H du lupeol (**11**) confirmant les observations relevées sur le spectre carbone. Toutes ces données (tableau 33), a permis d'identifier ce composé à l'acide betulinique précédemment isolé de *Vernonia chunii* par Yuan *et al.* (2006) mais rapporté ici pour la première fois de *V. guineensis*.

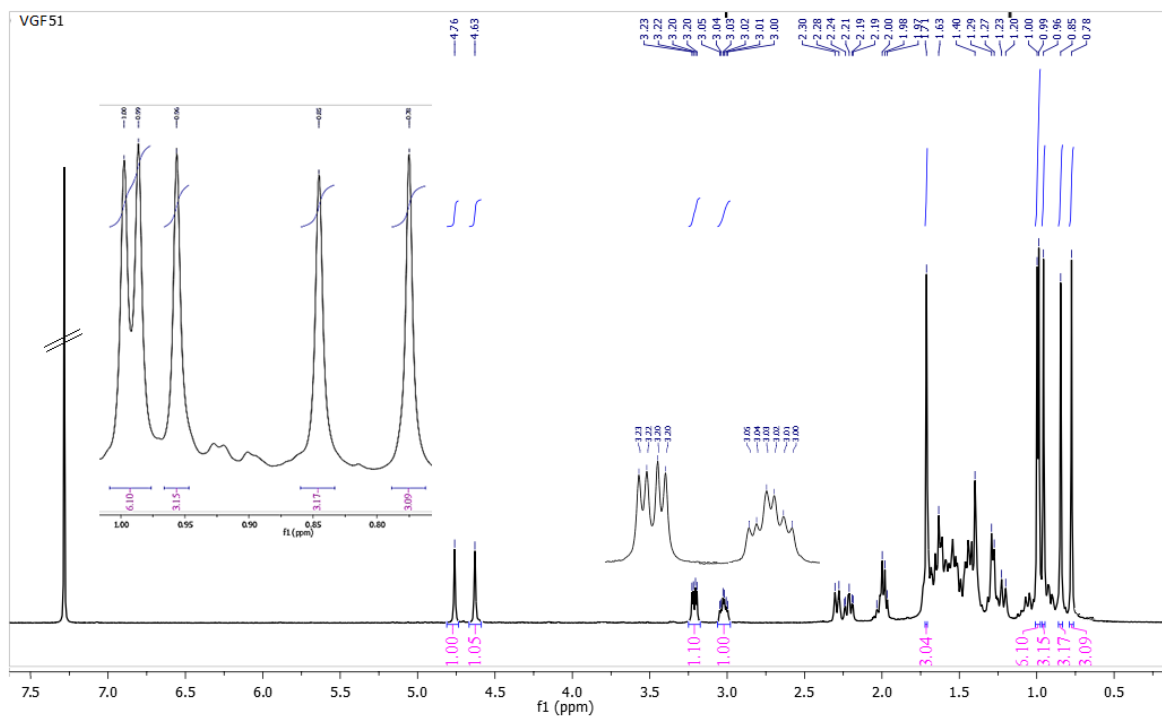


Figure 108 : Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF51**

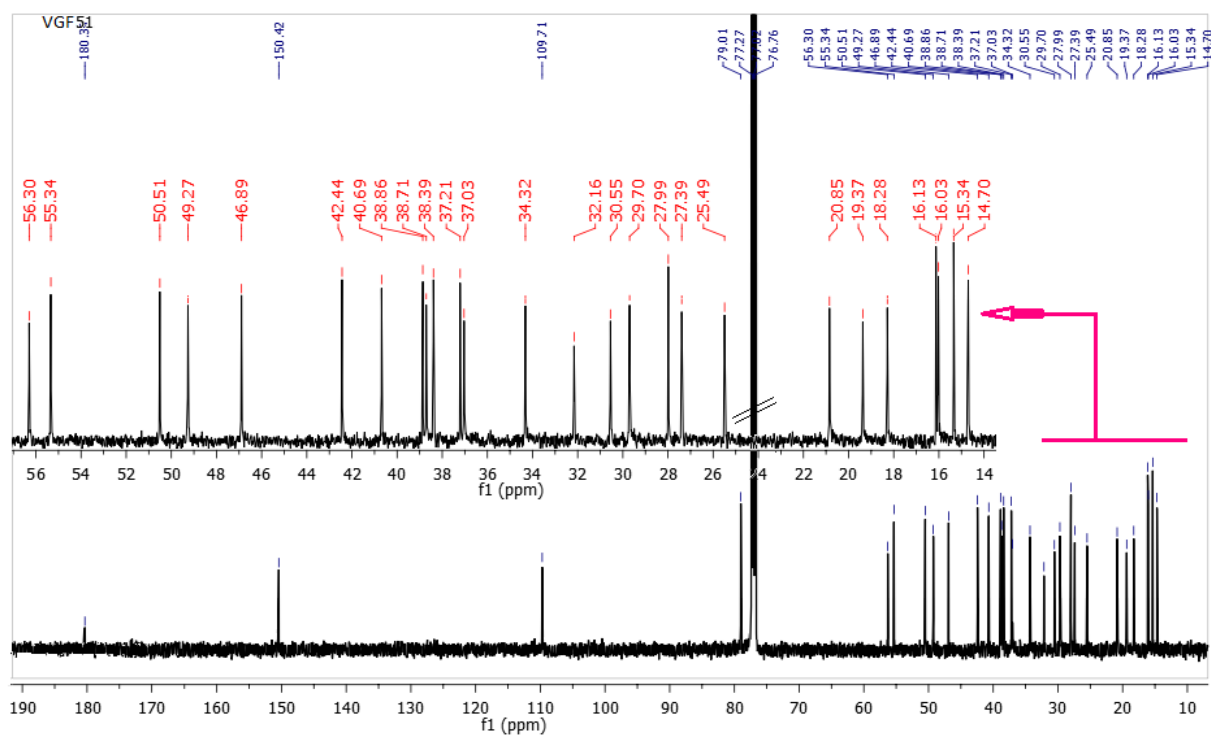


Figure 109 : Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF51**

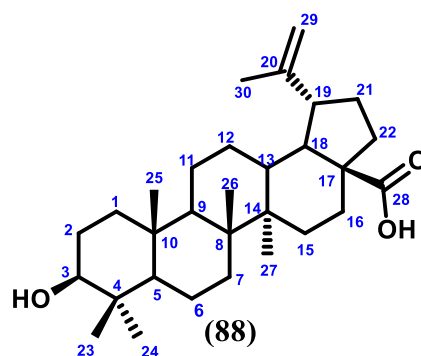


Tableau 33: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de FVgF21 dans le CDCl_3 avec les valeurs de l'acide betulinique rapportées par [Haque et al., \(2007\)](#)

| Pos. | Expérimental (FVgF51) | | Acide betulinique (CDCl_3) | |
|------|---|--|--|--|
| | ^{13}C (125 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ^1H (500 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult.;J(Hz)) | ^{13}C (62,5 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ^1H (250 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult.;J(Hz)) |
| 1 | 38,7 | 1,43 (m) ; 1,23 (m) | 39,0 | |
| 2 | 27,3 | 1,53 (m) | 27,6 | |
| 3 | 79,0 | 3,22 (dd, $J= 11,4 ; 4,9$) | 78,2 | 3.16 (dd, $J=9,5; 6,0$) |
| 4 | 38,8 | — | 39,0 | — |
| 5 | 55,3 | 0,71 (sd, $J= 9,3$) | 55,5 | |
| 6 | 18,2 | 1,41 (m) | 18,4 | |
| 7 | 34,3 | 1,39 (m) | 34,5 | |
| 8 | 40,6 | — | 40,8 | — |
| 9 | 50,5 | 1,27 (dd, $J= 13,9 ; 3,6$) | 50,7 | |
| 10 | 37,0 | — | 37,3 | — |
| 11 | 20,8 | 1,43 (m); 1,28 (m) | 21,0 | |
| 12 | 25,4 | 1,14 (m) | 25,6 | |
| 13 | 38,3 | 1,40 (dd, $J= 10,1; 4,0$) | 38,2 | |
| 14 | 42,4 | — | 42,4 | — |
| 15 | 30,5 | 1,53 (m) | 30,4 | |
| 16 | 32,1 | 1,49 (m) | 32,6 | |
| 17 | 56,3 | — | 56,3 | — |
| 18 | 46,8 | 2,40 (dd, $J= 11,1; 5,3$) | 47,1 | 2.95 (dd, $J= 9,5; 6,0$) |
| 19 | 49,2 | 1,45 (m) | 49,4 | |
| 20 | 151,0 | — | 150,0 | — |
| 21 | 29,7 | 1,28 (m) | 29,9 | |
| 22 | 37,2 | 1,41(m); 1,21 (m) | 37,3 | |
| 23 | 27,9 | 0,81 (s) | 27,9 | 0,65 (s) |
| 24 | 16,0 | 0,85 (s) | 15,4 | 0,75 (s) |
| 25 | 16,1 | 0,97 (s) | 16,2 | 0,90 (s) |
| 26 | 15,3 | 0,99 (s) | 16,3 | 0,96(s) |
| 27 | 14,7 | 1,06 (s) | 14,6 | 0,98 (s) |
| 28 | 180,3 | — | 180,6 | — |
| 29 | 109,7 | 4,71(d, $J= 2,0$) 4,59 (d, $J= 2,0$) | 108,8 | 4,65 (d, $J=1,4$) 4,55 (d, $J=1,4$) |
| 30 | 19,3 | 1,76 (s l) | 19,6 | 1,65(d, $J=0,5$) |

II.2.8.4. Identification structurale du composé FVgF52 ou FVgF43 (37)

Le composé **FVgF52** ou **FVgF43** se présente sous forme de poudre blanche et est soluble dans la pyridine. Il répond positivement au test de Libermann-Burchard caractéristique des triterpènes. L'interprétation des données spectrométriques de **FVgF52** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Mahato et Kundu, 1994 ; Ragasa et al., 2014) a permis de l'identifier à l'acide oléanolique (**37**), isolé ici pour la première fois de *V. guineensis*.

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode négatif (figure 110), l'on observe le pic de l'anion pseudo-moléculaire sodique $[M-H]^-$ à m/z 455,3530 compatible avec la formule moléculaire $C_{30}H_{48}O_3$ (Calc. $C_{30}H_{47}O_3$, 455,3531 ; $\Delta=0,1$ ppm) renfermant 7 degrés d'insaturations.

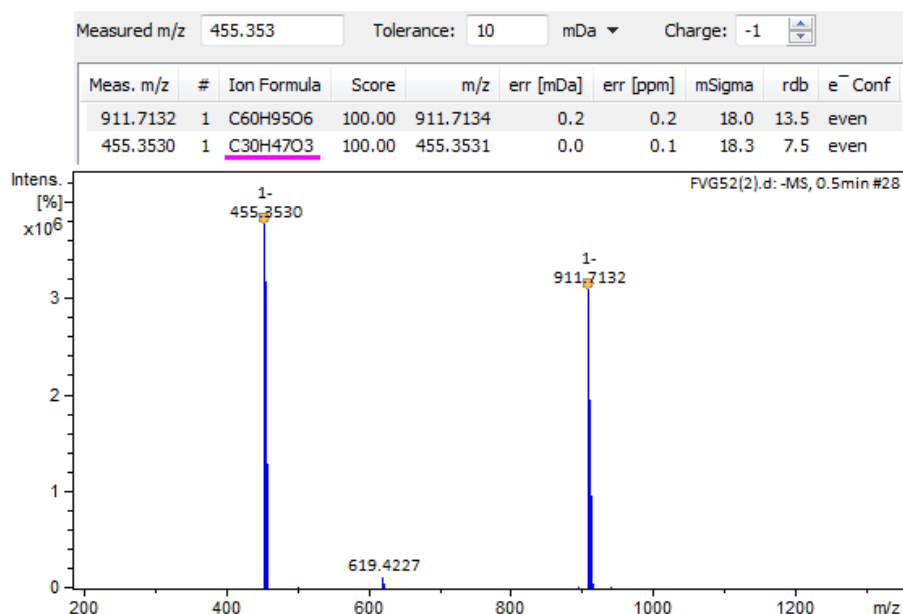


Figure 110: Spectre de masse (-)-HRESI du composé **FVgF52**

L'analyse du spectre de RMN 1H (figure 111) révèle un ensemble de signaux à δ_H 5,10 (t, $J = 3,0$, H-12), 3,44 (m, H-3) et 3,30 (dd, $J = 13,8 ; 4,0$, H-18) attribuables respectivement au proton Δ^{12} des triterpènes pentacycliques, celui de l'oxyméthine en C-3 et le méthine en C-18 (Mahato et Kundu, 1994). De plus, on observe sept signaux sous forme de singulets raisonnant dans la région des champs fort respectivement à δ_H 0,88, 0,94, 1,00, 1,02, 1,02, 1,23 et 1,27 (Me-26, Me-24, Me-24, Me-29, Me-30, Me-25, Me-23 et Me-27), attribuables aux méthyles angulaires des triterpènes pentacycliques de type olean-12-ene (Mahato et Kundu, 1994). Le squelette de base de ce type de composé (celui de la β -amyrin) renferme 8 méthyles angulaires, mais l'observation de 7 indique que l'un d'eux a été oxydé. Cette information est confirmée par la présence sur le spectre de RMN ^{13}C (figure 112) d'un carbonyle des acides à

δ_C 183.3 pouvant être celle en position C-28 (Mahato et Kundu, 1994).

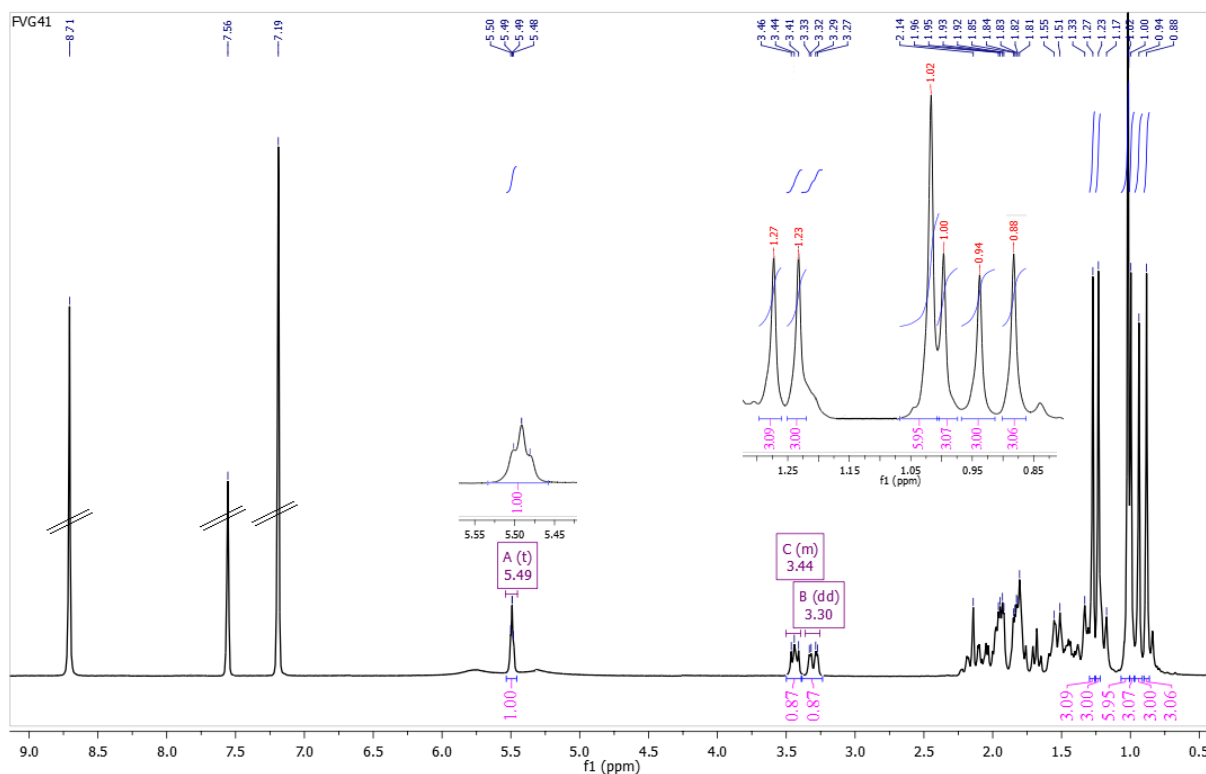


Figure 111: Spectre de RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) du composé **FVgF52**

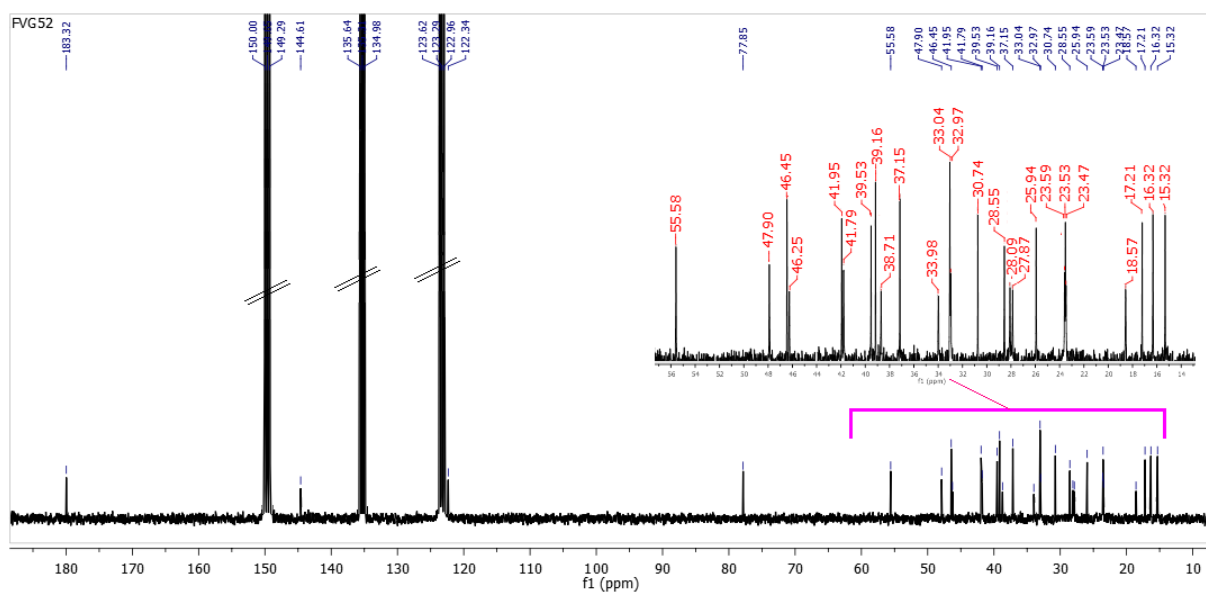


Figure 112: Spectre de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) du composé **FVgF52**

Nous observons également sur ce spectre de RMN ^{13}C les signaux à δ_C 77,8, 122,3 et 144,6 attribuables respectivement aux carbones C-3, C-12 et C-13. L'ensemble de toutes ces données (tableau 34), a permis d'identifier le composé **FVgF52** à l'acide oléanolique (**37**) précédemment isolé de *V. auriculifera* par Kiplimo *et al.* 2011a, mais rapporté ici pour la première fois de *V. guineensis*.

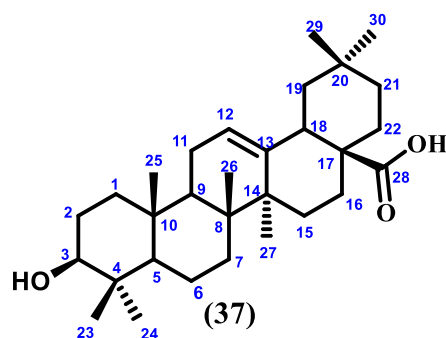
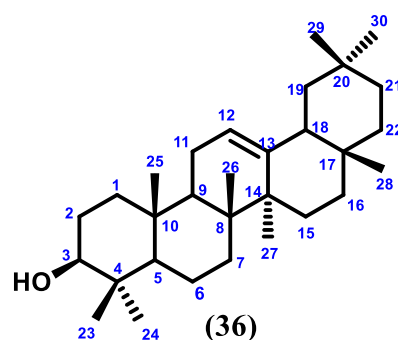


Tableau 34: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de FVgF52 dans $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ avec les valeurs de l'acide oléanolique rapportées par Ragasa *et al.*, (2014)

| Pos. | Expérimental (FVgF52 ou FVgF43) | | Acide oléanolique (CDCl_3) | |
|------|---------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| | ^{13}C (75 MHz) | ^1H (300 MHz) | ^{13}C (150 MHz) | ^1H (600 MHz) |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult.; J (Hz)) | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult.; J (Hz)) |
| 1 | 38,7 | 0,94 (m) | 38.3 | |
| 2 | 27,8 | 1,81 (m); 2,14 (m) | 27.1 | |
| 3 | 77,8 | 3.44 (m) | 77.0 | 3.20 (dd, $J = 4,2 ; 11,4$) |
| 4 | 39,1 | — | 38.7 | — |
| 5 | 55,5 | 0,84 (s large) | 55.2 | |
| 6 | 18,5 | 6,23 (d; $J=2,0$) | 18.2 | |
| 7 | 33,1 | 1,33 (m) | 32.5 | |
| 8 | 39,5 | — | 39.2 | — |
| 9 | 47,9 | 1,55 (m) | 47.6 | |
| 10 | 37,1 | — | 37.0 | |
| 11 | 23,4 | 1,94 (m); 2,18 (m) | 23.0 | |
| 12 | 122,3 | 5,49 (t, $J=3,0$) | 122.6 | 5,26 (t, $J = 3,6$) |
| 13 | 144,6 | — | 143.5 | — |
| 14 | 41,9 | — | 41.5 | — |
| 15 | 28,0 | 1,17 (m) | 27.6 | |
| 16 | 23,5 | 1,92 (m); 2,23 (m) | 23,0 | |
| 17 | 46,1 | — | 46,5 | — |
| 18 | 41,7 | 3,30(dd, $J = 13,8 ; 4,0$) | 41,0 | 2.81 (dd, $J= 13,8 ; 4,2$) |
| 19 | 46,4 | 1,33 (m); 1,69 (m) | 45,8 | |
| 20 | 30,7 | — | 30,6 | — |
| 21 | 34,0 | 1,33 (m); 1,51 (m) | 38,7 | |
| 22 | 32,9 | 1,79 (m); 2,05 (m) | 32,4 | |
| 23 | 28,5 | 1,23(s) | 28,0 | 0,96 (s) |
| 24 | 16,3 | 0,94(s) | 15,8 | 0,73 (s) |
| 25 | 15,3 | 1,02(s) | 15,3 | 0,89 (s) |
| 26 | 17,2 | 0,88(s) | 17,1 | 0,75 (s) |
| 27 | 25,9 | 1,27(s) | 25,9 | 1,11 (s) |
| 28 | 183,3 | — | 183.2 | — |
| 29 | 32,9 | 1,00(s) | 33,0 | 0,91 (s) |
| 30 | 23,6 | 1,02(s) | 23.5 | 0,88 (s) |

II.2.8.5. Identification structurale du composé FVgF27 (36)

Le composé **FVgF27** se présente sous forme de poudre blanche et est soluble dans le chloroforme. Il répond positivement au test de Libermann-Burchard caractéristique des triterpènes. L'interprétation des données spectrométriques de **FVgF27** en comparaison à celles décrites dans la littérature (Mahato et Kundu, 1994 ; Ragasa *et al.*, 2014) a permis de l'identifier à la β -amyrin (**36**), isolé ici pour la première fois de *V. guineensis*.



En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 113), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[M+Na]^+$ à m/z 449,3757 compatible avec la formule moléculaire $C_{30}H_{50}O$ (Calc. $C_{30}H_{50}ONa$, 449,3754 ; $\Delta=9,6$ ppm) renfermant 6 degrés d'insaturations.

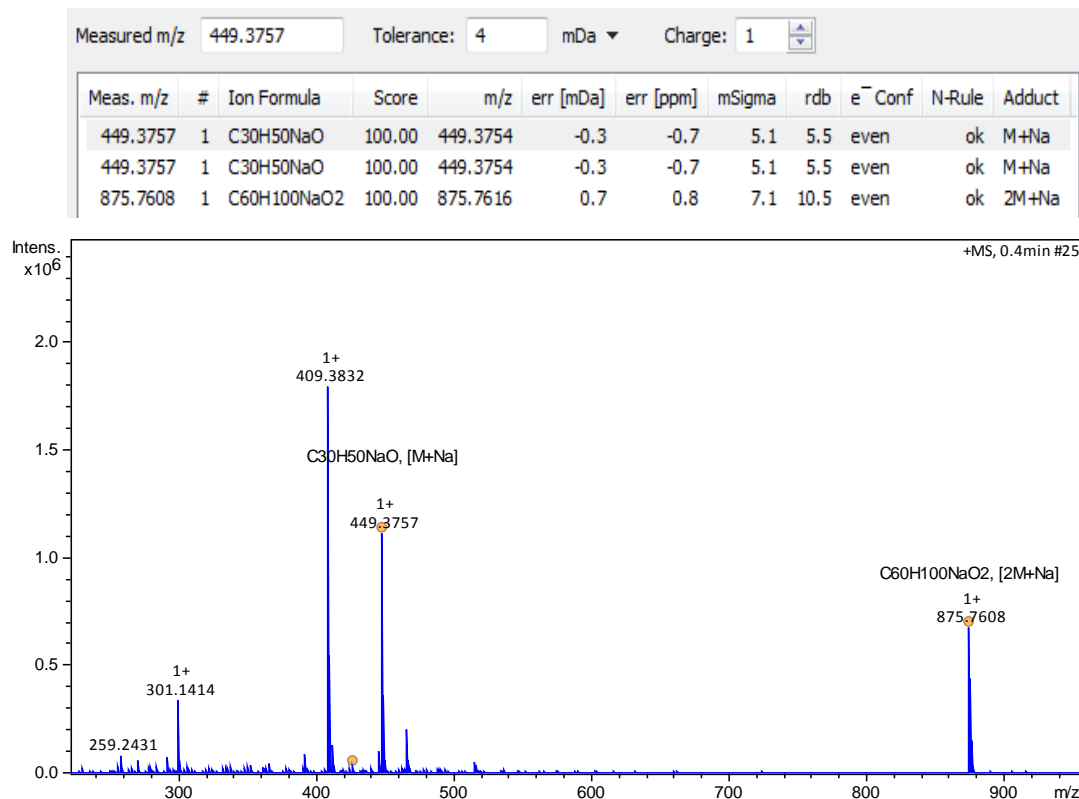


Figure 113: Spectre de masse (+) –HRESI du composé **FVgF27**

Ses données de RMN, sont quasi similaires à ceux de l'acide oléanolique sudécrit. La différence est faite sur le spectre de RMN ^1H (figure 114), par la présence de 8 singulets dans la région des champs fort caractéristiques de 8 méthyles angulaires raisonnants à δ_{H} 0,83, 0,85, 0,93, 0,94, 0,95, 0,98, 1,00, et 1,12 (Me-26, Me-28, Me-24, Me-24, Me-29, Me-30, Me-25, Me-23 et Me-27) au lieu de 7 comme dans le cas de l'acide oléanolique. En outre, on observe sur ce spectre le signal d'un proton oléfinique à δ_{H} 5,56 (dd, $J = 8,2, 3,2$) attribuable au proton en position 12 des triterpènes encyclique. Le signal à δ_{H} 3,22 (dd, $J = 11,3, 3,2$) est caractéristique de l'oxyméthine en position C-3. L'ensemble de toutes ces données, a permis d'attribuer au composé **FVgF27** la structure ci-dessous correspondante à la β -amyrin (**36**) précédemment isolé de *V. auriculifera* par [Kiplimo et al. 2011a](#), mais rapporté ici pour la première fois de *V. guineensis*.

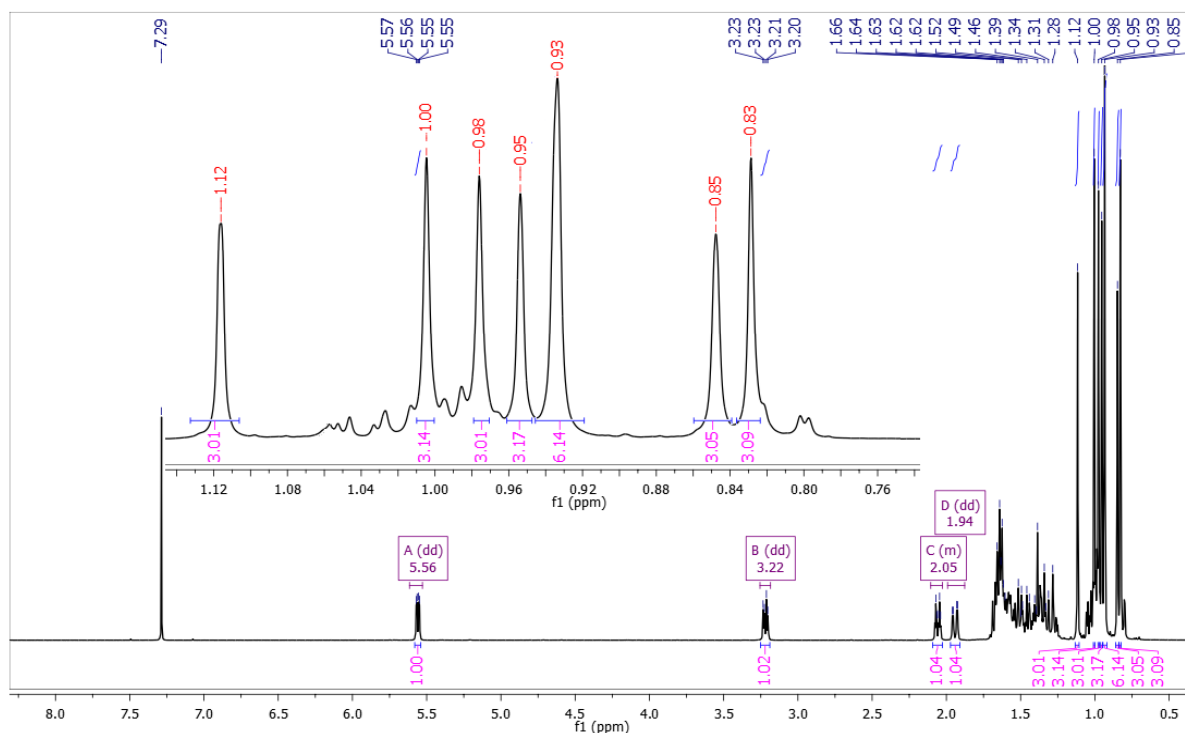


Figure 114: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF27**

II.2.8.6. Identification structurale du composé indexé **FVgF34** (**36**)

Le composé **FVgF34** se présente sous forme de poudre amorphe blanche et est soluble dans la pyridine. Il répond positivement au test de Libermann-Burchard caractéristique des triterpènes. L'interprétation des données spectrométriques de **FVgF34** et celles décrites dans la littérature ([Mahato et Kundu, 1994](#) ; [Seebacher et al., 2003](#)) a permis de l'identifier à l'acide ursolique (**36**), isolé ici pour la première fois de *V. guineensis*.

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 115), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 457,3673 compatible avec la formule moléculaire $C_{30}H_{48}O_3$ (Calc. $C_{30}H_{49}O_3$, 457,3681 ; $\Delta=1,7$ ppm) renfermant 8 degrés d'insaturations.

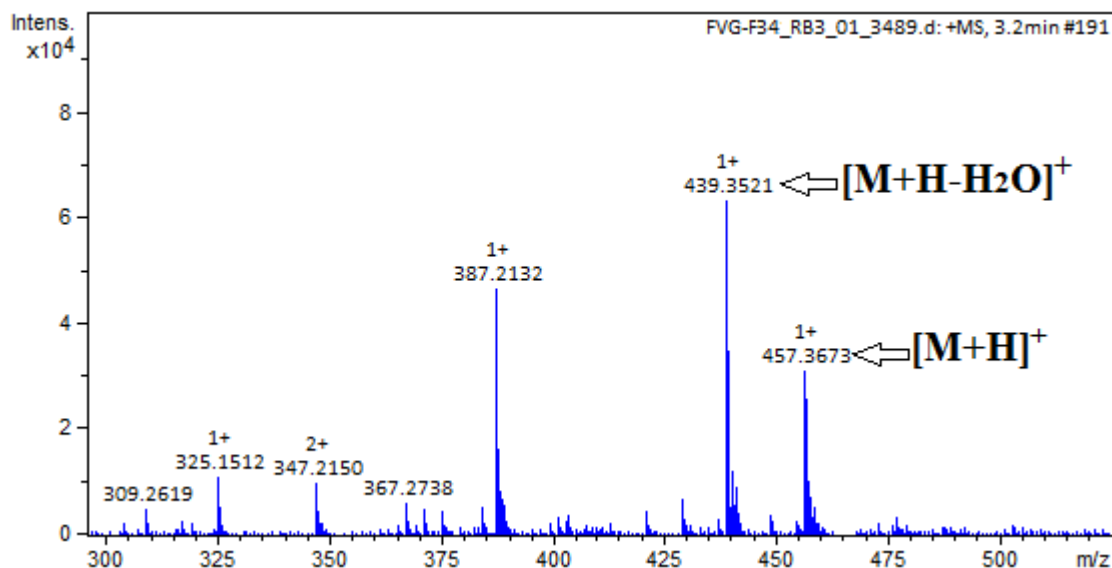


Figure 115: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **FVgF34**

Les spectres de RMN 1H (figure 116) et RMN ^{13}C (figure 117) de ce composé présentent dans la zone des champs forts, des signaux raisonnant respectivement à δ_C/δ_H 29,5/1,27 (s), 17,2/0,87 (s), 15,4/0,80 (s), 17,3/1,00 (s), 24,6/1,14 (s), 16,3/0,98 (d, $J=6.0$) et 21,1/0,91 (d, $J=6.5$) attribuables aux méthyles angulaires (Me-23, Me-24, Me-25, Me-26, Me-27, Me-8 et Me-3). En outre, on note la présence des signaux à δ_C/δ_H 125,4/5,49 (t, $J=3,3$) et 138,2 représentant la double liaison Δ^{12} (13). De plus, parmi les méthyles deux apparaissent sous forme de doublet, ce qui plaide en faveur d'un triterpène de la classe des urs-12-ene ([Mahato and Kundu](#)). On observe également le signal de l'oxyméthine C(3 β) à δ_C/δ_H 78,2/3,45 (dd, $J=10,1$; 5,8), ainsi qu'un carbone quaternaire à δ_C 180,6 attribuable à un carbonyle d'acide. La présence sur le spectre de RMN 1H de sept (7) méthyles angulaires au lieu de huit (8) suggère que l'un des méthyles c'est oxydé en acide carboxylique. Ce méthyle à oxyder a été localisé en position C-28 grâce à l'interprétation des autres spectres et spécialement le spectre HMBC. L'ensemble de ces données spectrales comparé à celles de la littérature a permis d'attribuer à **FVgF34** la structure ci-dessous qui est celle de l'acide ursolique, isolé des feuilles de *V. auriculifera* par [Kiplimo et al. \(2011\)](#).

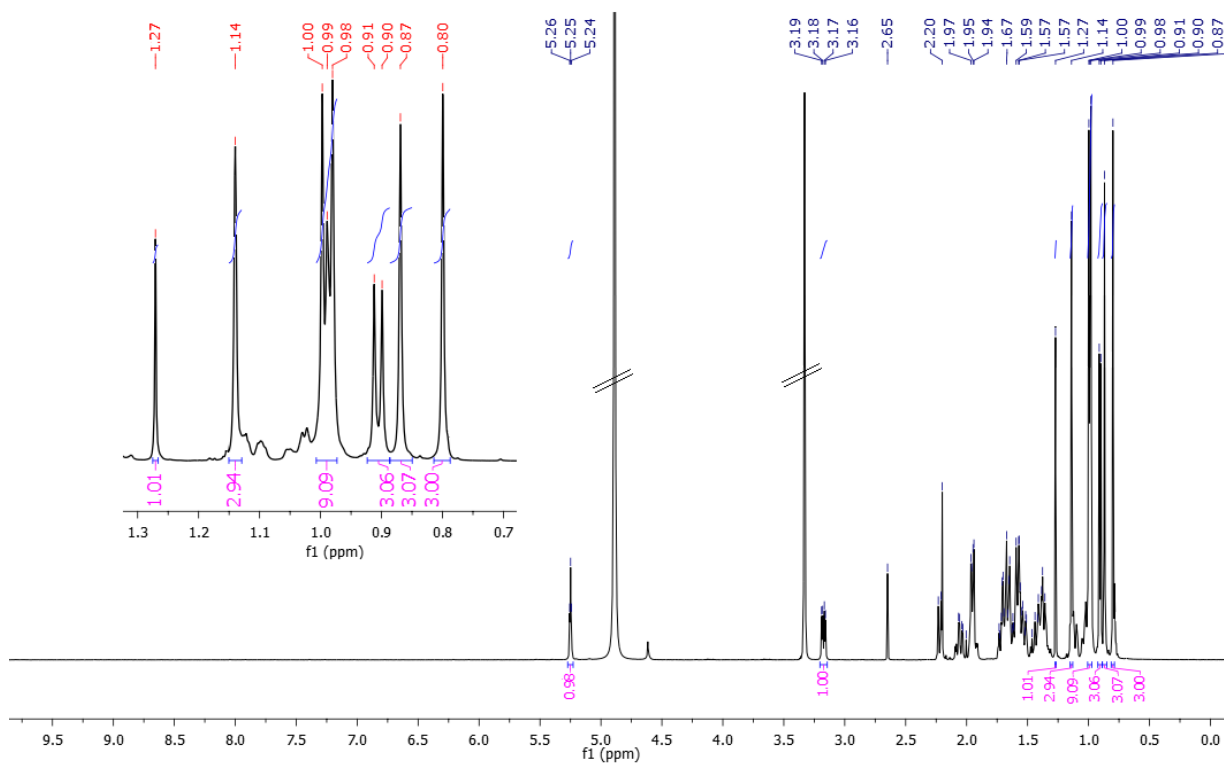


Figure 116: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du composé **FVgF34**

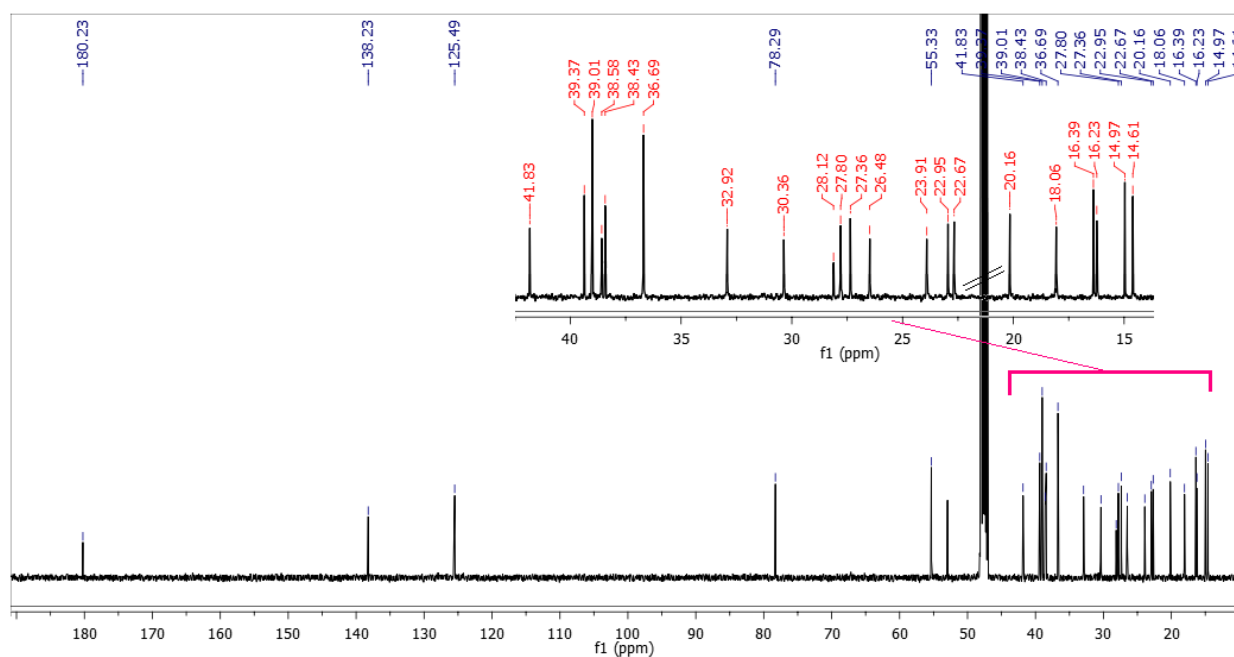


Figure 117: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé **FVgF34**

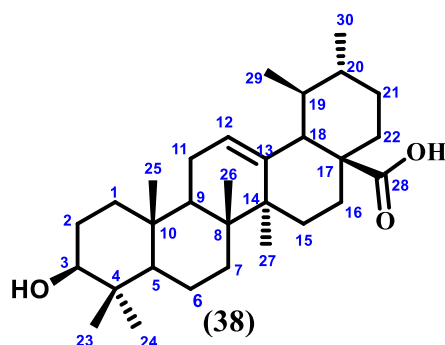


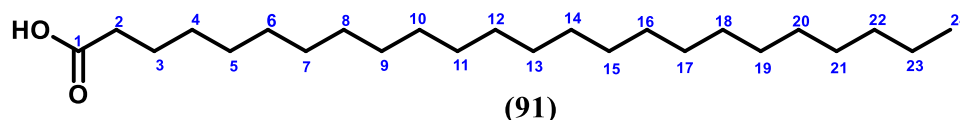
Tableau 35: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C de FVgF34 dans CD_3OD avec les valeurs de l'acide ursolique rapportées par Seebacher *et al.*, (2003)

| Pos. | Experimental (RVgF34) | | Acide ursolique ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) | |
|------|---|--|---|--|
| | ^{13}C (125 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ^1H (500 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult.;J(Hz)) | ^{13}C (125 MHz) $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | ^1H (500 MHz) $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult.;J(Hz)) |
| 1 | 39,8 | 0,94 (m) | 40,3 | |
| 2 | 28,4 | 1,73 (m) | 29,4 | |
| 3 | 78,2 | 3,45 (dd, $J=10,1$; 5,8) | 79,4 | 3,44 (dd, $J=10,0$; 5,5) |
| 4 | 38,4 | — | 40,6 | — |
| 5 | 55,3 | 2,20 (s l) | 56,1 | |
| 6 | 18,8 | 1,59 (m) | 19,9 | |
| 7 | 30,3 | 1,38 m | 31,8 | |
| 8 | 36,6 | — | 37,2 | — |
| 9 | 41,8 | 1,55 m | 42,3 | |
| 10 | 37,0 | — | 38,5 | — |
| 11 | 23,4 | 2,00 (m); 1,67 (m) | 24,9 | |
| 12 | 125,4 | 5,49 (t, $J=3,3$) | 126,9 | 5,47(s l) |
| 13 | 138,2 | — | 139,5 | — |
| 14 | 39,0 | — | 40,7 | — |
| 15 | 28,6 | 2,23 (m) | 29,9 | 2,31 (td, $J = 13,0$; 3,5) |
| 16 | 25,6 | 2,06 (m) | 26,2 | 2,10 (td, $J= 13,5$; 4,0) |
| 17 | 39,3 | — | 40,3 | — |
| 18 | 55,3 | 2,22 (d, $J=11,0$) | 54,8 | 2, 26 (d, $J=11,0$) |
| 19 | 40,1 | 1,59 (m) | 40,7 | |
| 20 | 36,6 | — | 38,6 | — |
| 21 | 31,8 | 1,33 (m); 1,51 (m) | 32,3 | |
| 22 | 37,2 | 1,79 (m); 2,05 (m) | 38,7 | |
| 23 | 29,5 | 1,27 (s) | 30,1 | 1,23 (s) |
| 24 | 17,2 | 0,87 (s) | 17,5 | 1,01 (s) |
| 25 | 15,4 | 0,80 (s) | 16,4 | 0,87 (s) |
| 26 | 17,3 | 1,00 (s) | 18,5 | 1,03 (s) |
| 27 | 24,6 | 1,14 (s) | 25,2 | 1,21 (s) |
| 28 | 180,6 | — | 181,2 | — |
| 29 | 16,3 | 0,98 (d, $J=6,0$) | 18,6 | 0,98 (d, $J= 6,0$) |
| 30 | 21,1 | 0,91 (d, $J=6,5$) | 22,3 | 0,95 (3Hd, $J= 6,0$) |

II.2.9. Caractérisation des acides gras

II.2.9.1. Identification structurale du composé RVgF38 (91)

Le composé **RVgF38** se présente sous forme de poudre amorphe blanche et est soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de l'identifier à l'acide tétracosanoïque (**91**).



En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 118), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[M+Na]^+$ à m/z 391,3563 compatible avec la formule moléculaire $C_{24}H_{48}O_2$ (Calc. $C_{24}H_{48}O_2Na$, 391,3547 ; $\Delta=1,7$ ppm) renfermant un degré d'insaturation. La perte du CO_2 , observé sur le spectre de masse (figure 118) est caractéristique des acides carboxyliques aliphatiques.

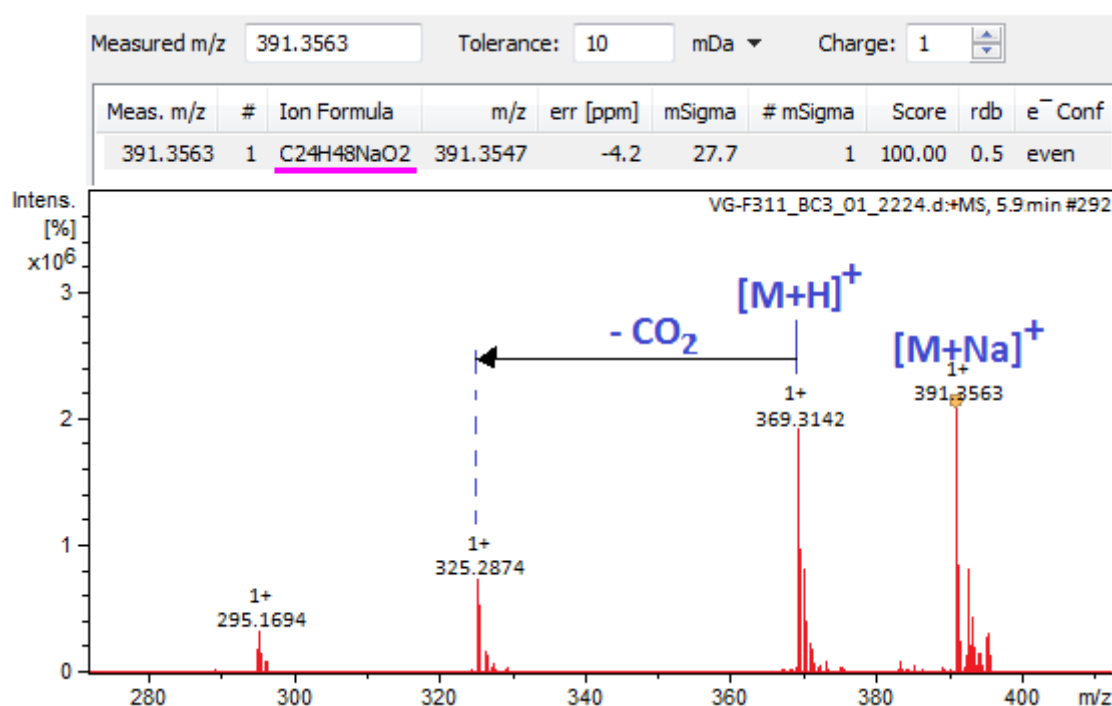


Figure 118: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF38**

L'analyse des spectres de RMN 1H (figure 119) et HMQC (figure 120) révèle la présence des signaux caractéristiques d'un squelette d'acide gras. On observe un ensemble de signaux à δ_H/δ_C 0,87 (t, $J=6,9$) /12,8 correspondant au méthyle terminal, un large singulet intégrant pour 38 protons à δ_H/δ_C 1,29–1,41/29,8 représentant la succession des méthylènes de la longue chaîne aliphatique. Les deux méthylènes en Position alpha et Beta du carbonyle apparaissent respectivement à δ_H/δ_C 2,54 (t, $J=7,5$ Hz) /35,2 et 1,81 (m)/27,4. Les

corrélations observées sur son spectre HMBC (figure 121) entre le carbone à δ_C 175,6 et les protons à δ_H 2,54 et 1,81 confirme bien la présence d'un carbonyle d'acide dans la molécule. L'ensemble des données a permis d'identifier **RVgF38** à l'acide tetracosanoïque (**91**) précédemment isolé par Erasto *et al.* (2007), mais isolé ici pour la première fois du genre *Vernonia*.

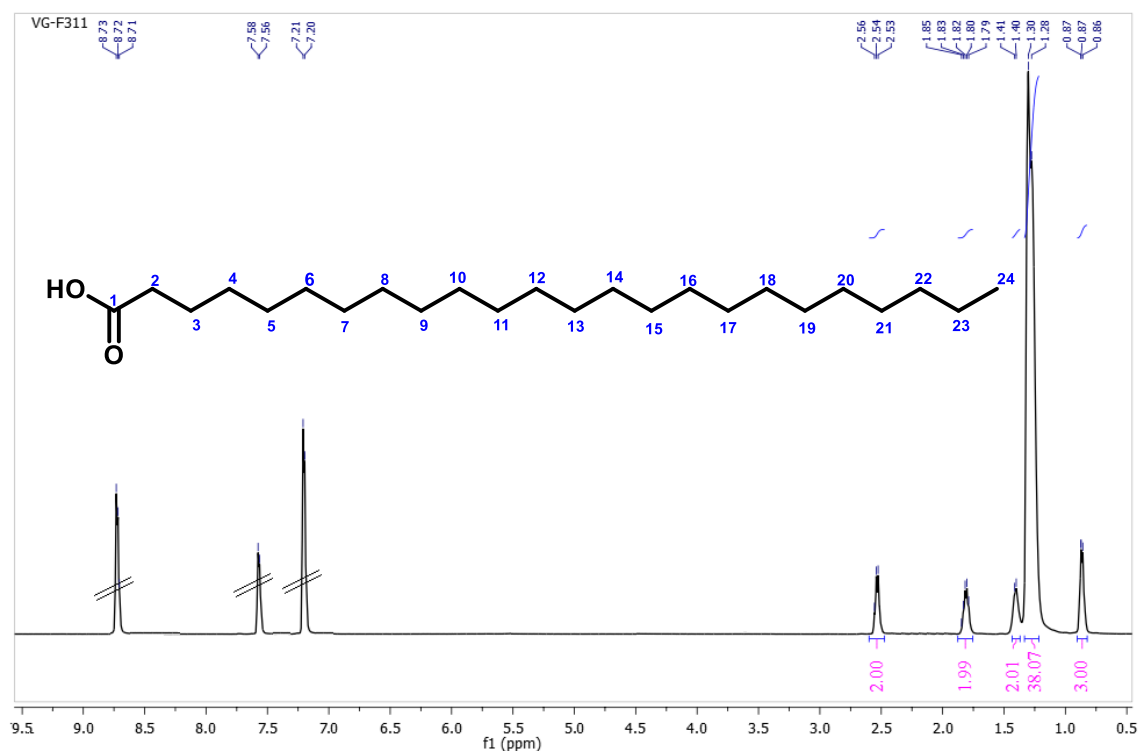


Figure 119: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) du composé **RVgF38**

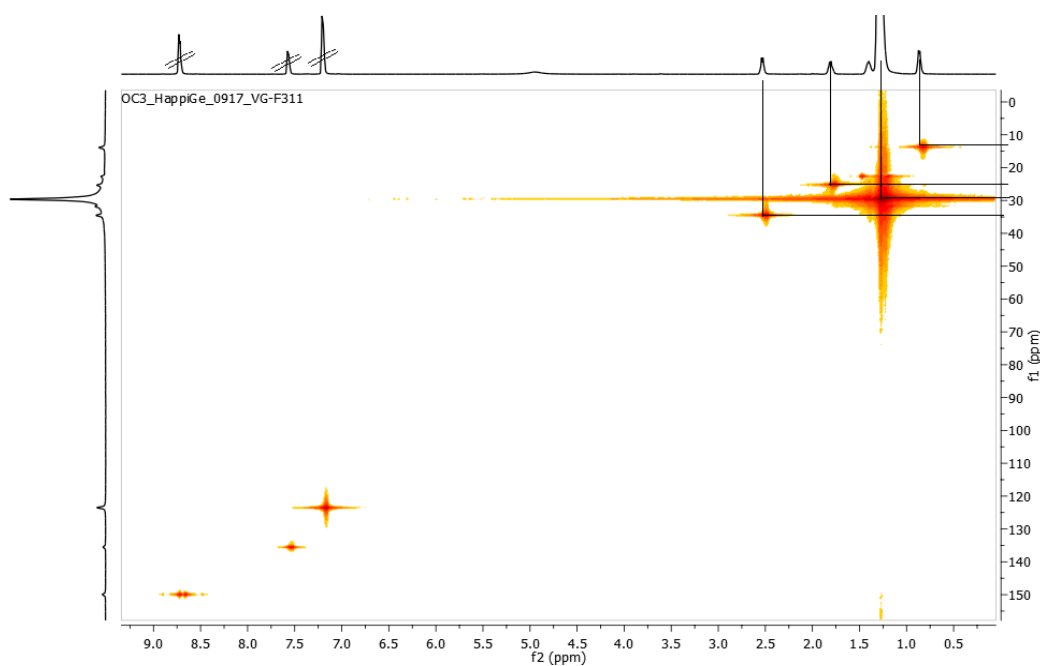


Figure 120: Spectre HMQC du composé **RVgF38** et illustration des corrélations $^1J_{\text{C-H}}$

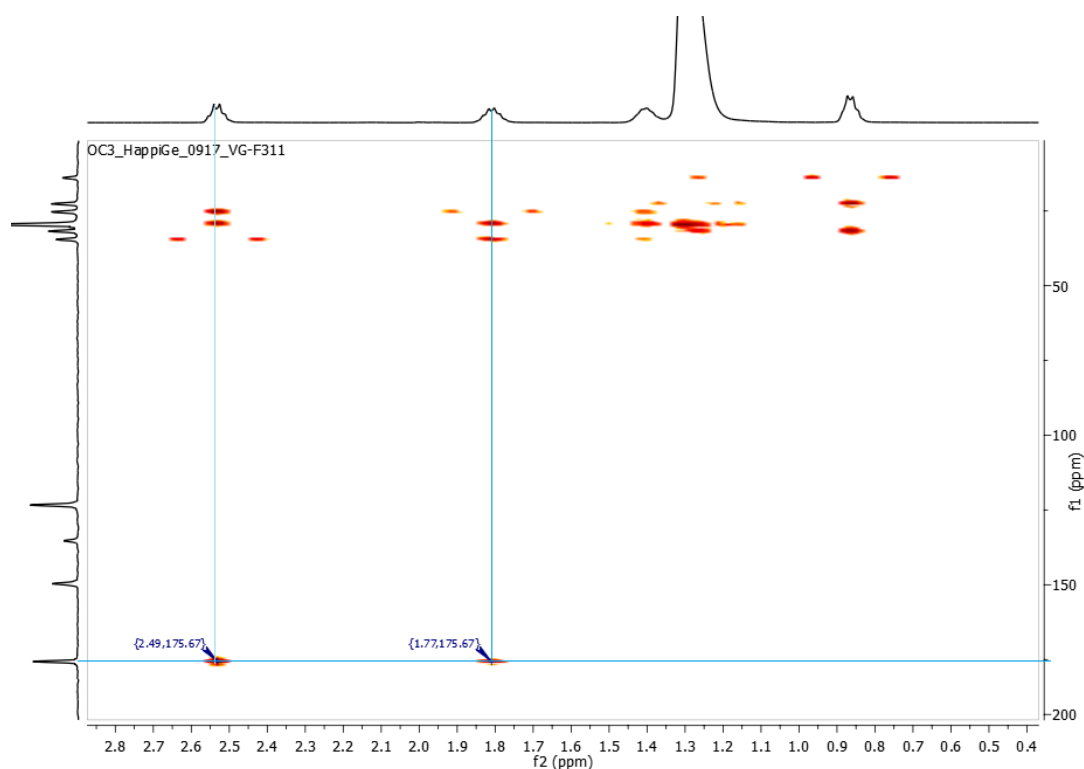


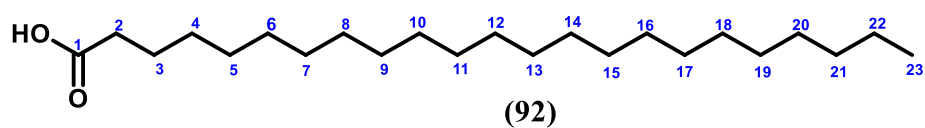
Figure 121: Spectre HMBC du composé **RVgF38**

Tableau 36: Données RMN ^1H et RMN ^{13}C de **RVgF34**

| Expérimental (RVgF34), Pyridine- d_5 | | | |
|---|--------------------------------|--|-------------------|
| Pos. | ^{13}C (125 MHz) | ^1H (500 MHz) | HMBC |
| | $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (Mult.; J (Hz)) | $J_{\text{H-C}}$ |
| 1 | 175,6 | — | — |
| 2 | 35,2 | 2,54 (t, $J = 7,5$ Hz)/ | C-1, C-3 |
| 3 | 27,4 | 1,81 (m) | C-1, C-2 |
| 4–23 | 22,1–29,8 | 1,29–1,41(s l) | C-2, C-3, C-24 |
| 24 | 12,8 | 0,87 (t, $J = 6,9$) | C-23 |

II.2.9.2. Identification structurale du composé **RVgF39** (**92**)

Le composé **RVgF39** se présente sous forme de poudre amorphe blanche soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de l'identifier à l'acide tricosanoïque (**92**).



En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 122), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire sodique $[M+Na]^+$ à m/z 377,3376 compatible avec la formule moléculaire $C_{23}H_{46}O_2$ (Calc. $C_{23}H_{46}O_2Na$, 377,3390 ; $\Delta=3,8$ ppm) renfermant un degré d'insaturation.

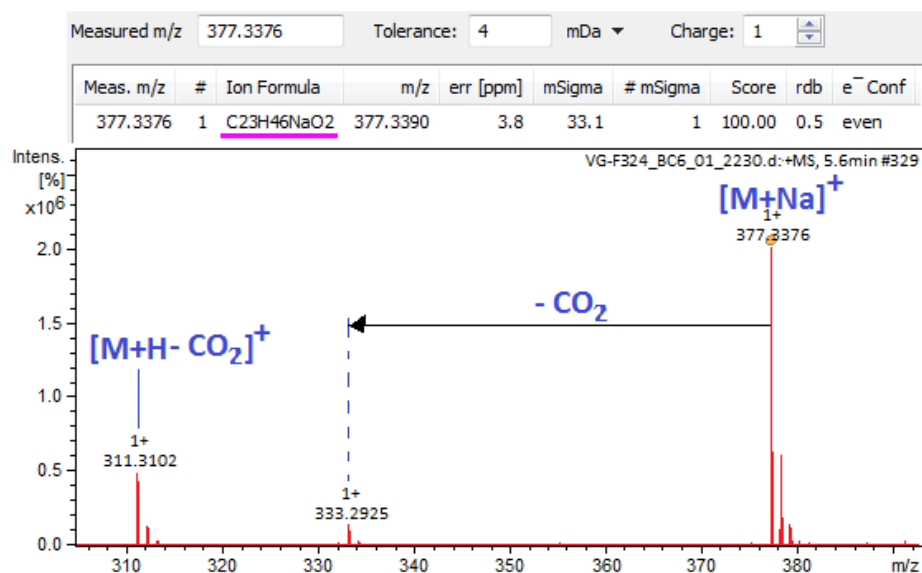


Figure 122: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **RVgF39**

Le spectre de RMN 1H (figure 123) montre les pics caractéristiques d'un acide gras en exhibant un ensemble de signaux à δ_H 0,81 (t, $J = 6,9$), attribuable au méthyle terminal, un large singulet de 38 protons centré à δ_H 1,21 représentant la succession des méthylènes de la longue chaîne carbonée. Le signal à δ_H 2,28 (t, $J= 7,5$) est attribuable au méthylène en alpha du carbonyle. L'ensemble de ces données a permis d'identifier **RVgF39** à l'acide tricosanoïque (**92**) précédemment isolé par [Marchyshyn et al. \(2018\)](#).

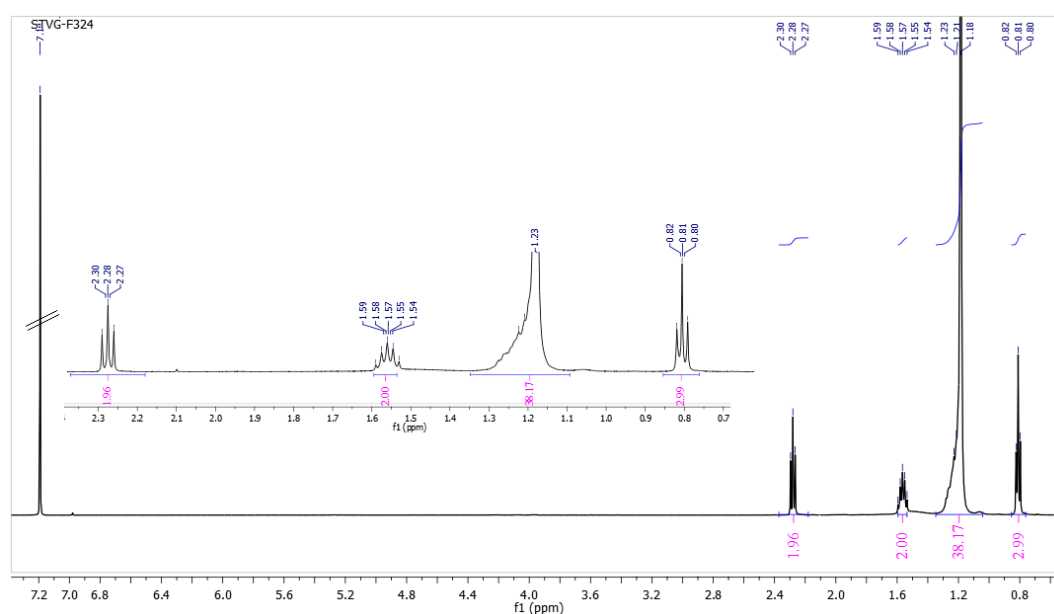
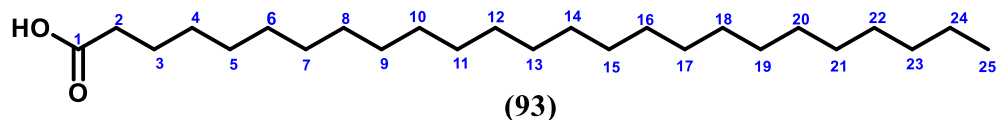


Figure 123: Spectre de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) du composé **RVgF39**

II.2.9.3. Identification structurale du composé FVgF210 (93)

Le composé **FVgF210** se présente sous forme de poudre amorphe blanche soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de l'identifier à l'acide pentacosanoïque (**93**).



En effet, ses données de RMN sont quasi similaires à celui du composé **RVgF39**. En outre, l'on observe à δ_H 0,81 (t, $J = 6,9$) un triplet de trois protons caractéristiques du méthyle terminal des longues chaînes aliphatiques, un singulet large de 42 protons entre δ_H 1,18—1,26 et de pour deux protons δ_H 2,28 (t, $J = 7,5$).

Mais la différence est observée sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 124), où l'on observe le pic du dimer cationique quasi-moléculaire $[2M+Na]^+$ à m/z 787,7515 compatible avec la formule moléculaire $C_{25}H_{50}O_2$ (Calc. $C_{50}H_{100}O_4Na$, 787, 7514; $\Delta=0,1$ ppm) renfermant un degré d'insaturation. La perte de CO_2 , observé sur ce spectre de masse, est caractéristique des acides carboxyliques aliphatiques. L'ensemble de ces données a permis d'attribuer à **FVgF210** la structure (**93**) qui est celle de l'acide pentacosanoïque précédemment isolé par [Ali et al. \(2015\)](#), mais isolé ici pour la première fois du genre *Vernonia*.

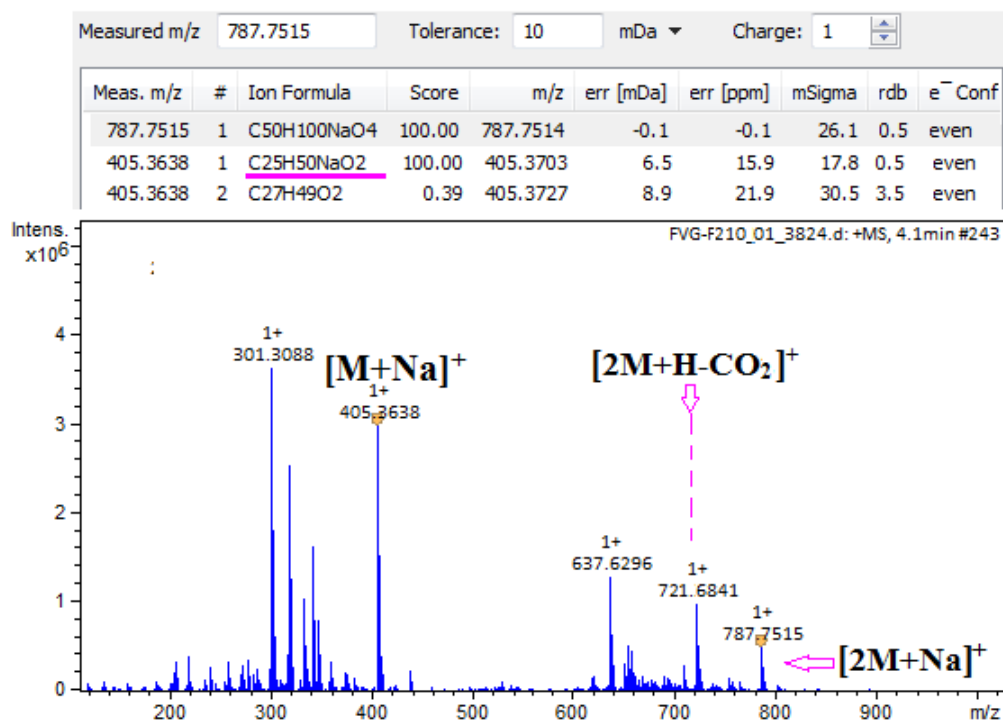


Figure 124: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **FVgF210**

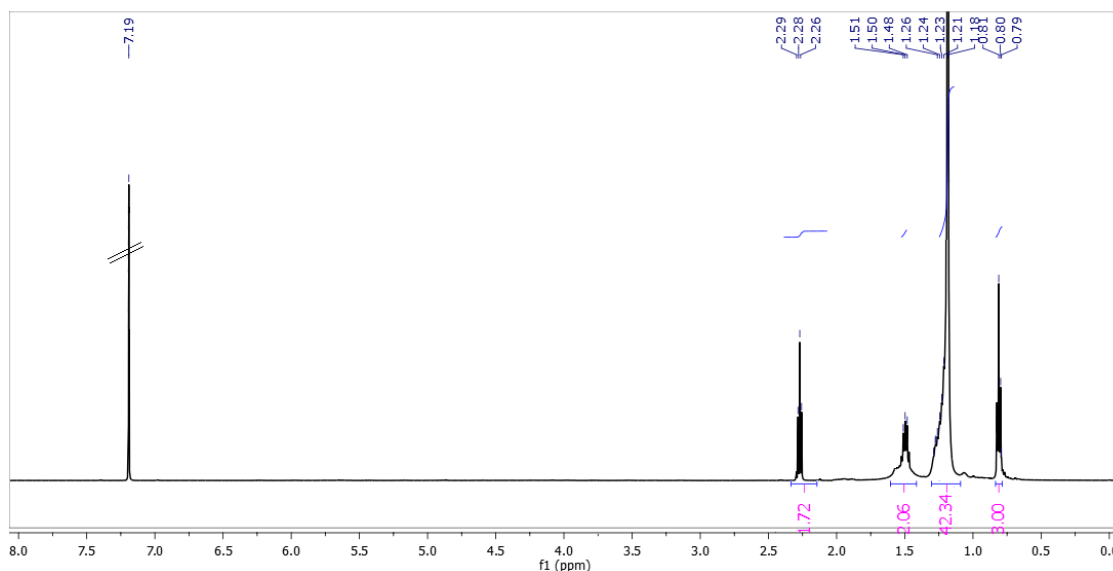


Figure 125 : Spectre de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) du composé **FVgF210**

II.2.10. Caractérisation des alcools gras

II.2.10.1. Identification structurale du composé **FVgF23** (**94**)

Le composé **FVgF23** se présente sous forme de poudre amorphe blanche et est soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de l'identifier à la tritriacontan-1-ol (**94**).

En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 126), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 481,5320 compatible avec la formule moléculaire $\text{C}_{33}\text{H}_{68}\text{O}$ (Calc. $\text{C}_{33}\text{H}_{69}\text{O}$, 481,5348 ; $\Delta=5,8$ ppm).

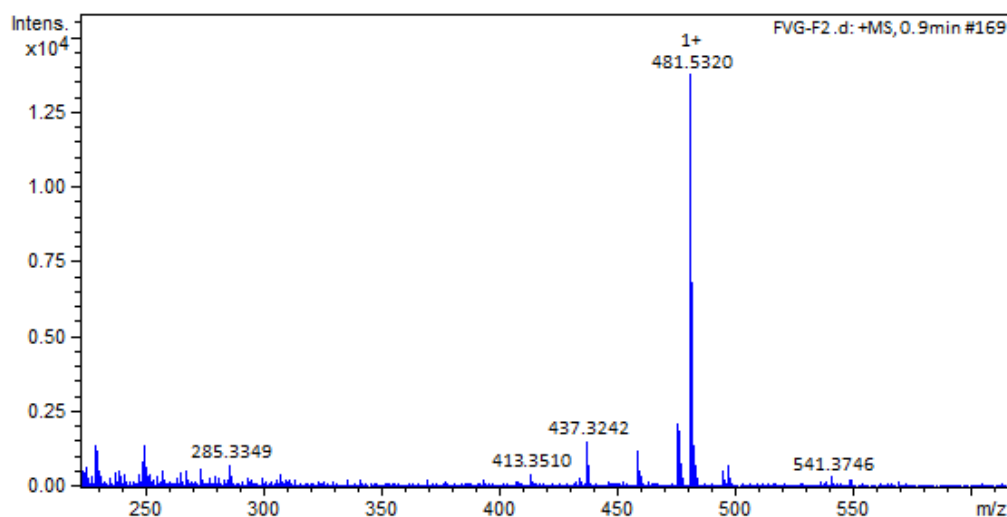


Figure 126: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **FVgF23**

Les analyses de ses spectres de RMN ^1H (figure 127) et RMN ^{13}C (figure 128) révèlent la présence des signaux caractéristiques d'un squelette d'alcool gras. On observe à

cet effet :

- un triplet à δ_H 0,81 (t, $J = 6,9$, 3H) / δ_C 14,1 attribuable au méthyle terminal d'une longue chaîne aliphatique ;
- un large singulet intégrant pour 58 protons à δ_H 1,18–1,29 / δ_C 22,6–31,9, attribuable à une série de méthylènes constituant la longue chaîne aliphatique ;
- un signal sous forme de triplet à δ_H 3,57 (t, $J = 6,6$, 2H) / δ_C 63,1 attribuable à l'hydroxyméthylène en position C-1 des alcools gras (Gohar, 2001) ;
- le signal à δ_H 1,52 (dt, $J = 14,4$; 6,6, 2H) / δ_C 32,8 est attribuable au méthylène en alpha de l'hydroxyméthylène (Gohar, 2001).

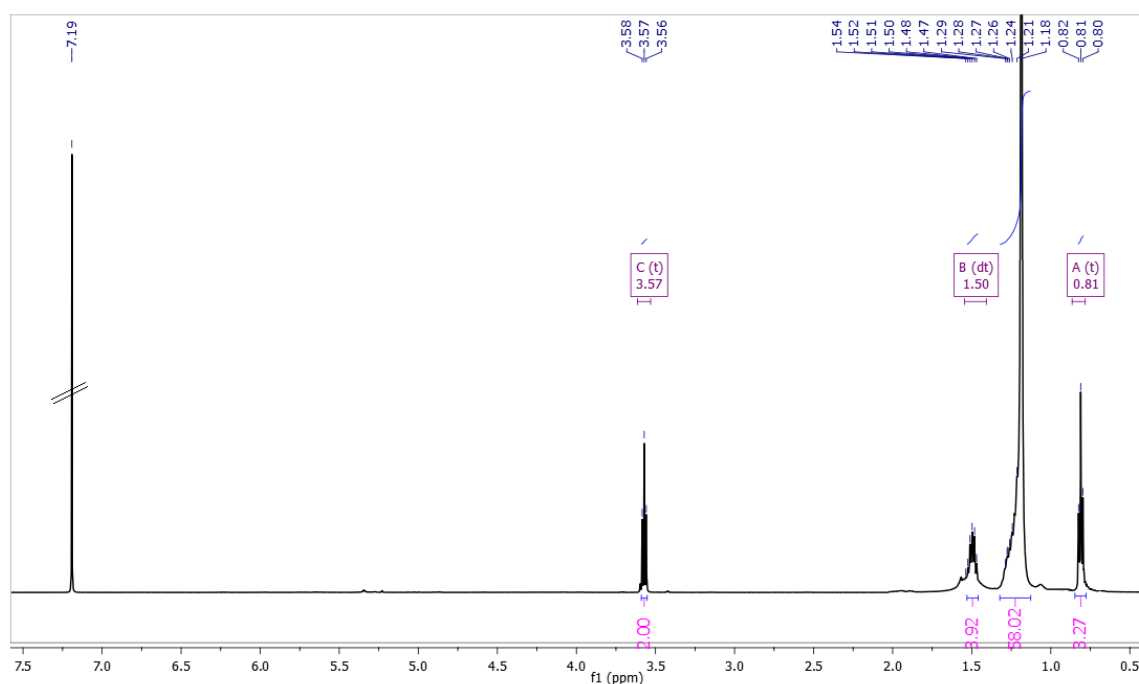


Figure 127: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF23**

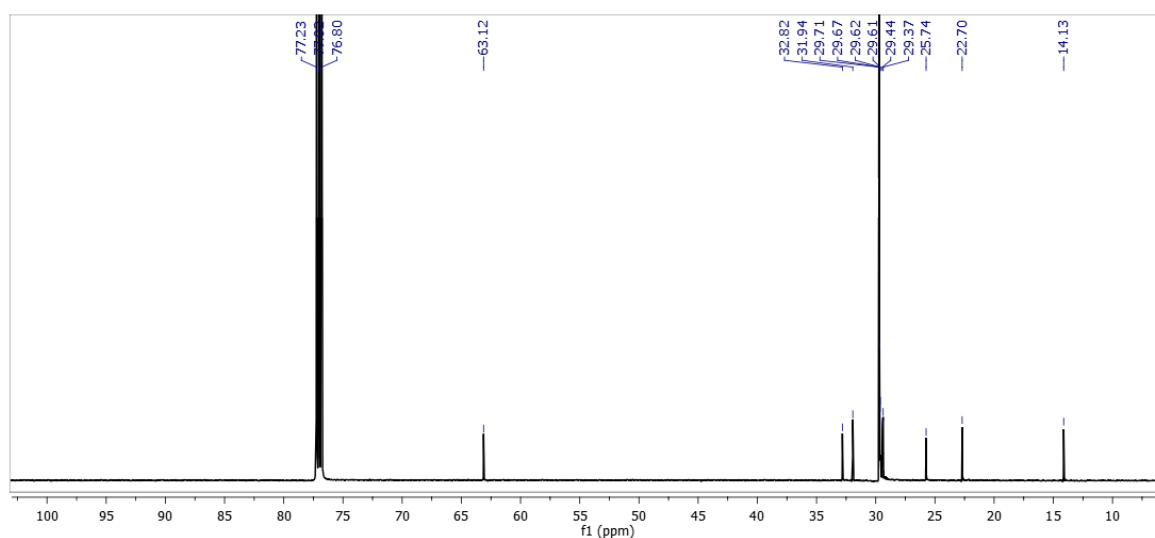
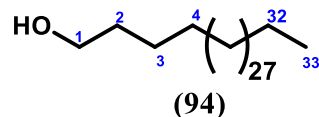


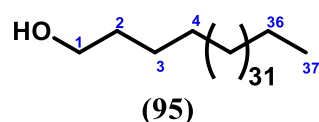
Figure 128: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF24**

L'ensemble de ces données plaide sans ambiguïté en faveur d'un alcool à longue chaîne aliphatique. La spectrométrie de masse a été très importante pour déterminer la longueur de cette chaîne aliphatique. L'interprétation de toutes ses données combinées à ceux de la littérature (Gohar, 2001) a permis d'identifier le composé **FVgF23** à la tritriacontan-1-ol (**94**), un alcool isolé du genre *Vernonia* pour la première fois.



II.2.10.2. Identification structurale du composé FVgF24 (95)

Le composé **FVgF24** se présente sous forme de poudre amorphe blanche et est soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de l'identifier à l'heptatriacontan-1-ol (**95**).



En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 129), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 537,5988 compatible avec la formule moléculaire $C_{37}H_{76}O$ (Calc. $C_{37}H_{77}O$, 537,5974 ; $\Delta=2,6$ ppm).

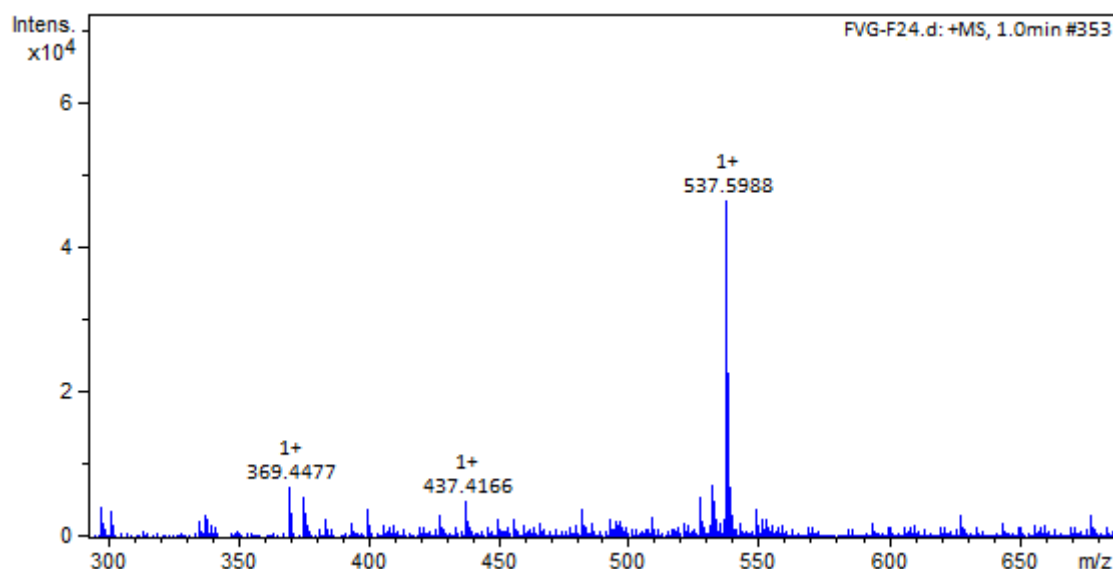


Figure 129: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **FVgF24**

L'analyse de son spectre de RMN 1H (figure 130) révèle la présence des signaux quasiment similaire à ceux observés sur le spectre du composé **FVgF24**. On observe à cet effet les signaux à δ_H 0,90 (t, $J = 7,0$, H-37), 1,28-1,37 (m, nCH_2), 3,66 (t, $J = 6,7$, H-1)

caractéristiques des alcools gras (Gohar, 2001). La principale différence avec le composé (93) précédemment décrit réside sur l'intégration des protons de la longue chaîne aliphatique et sur le spectre de masse qui nous a permis d'identifier sans ambiguïté, le composé FVgF24 à l'heptatriacontan-1-ol (95).

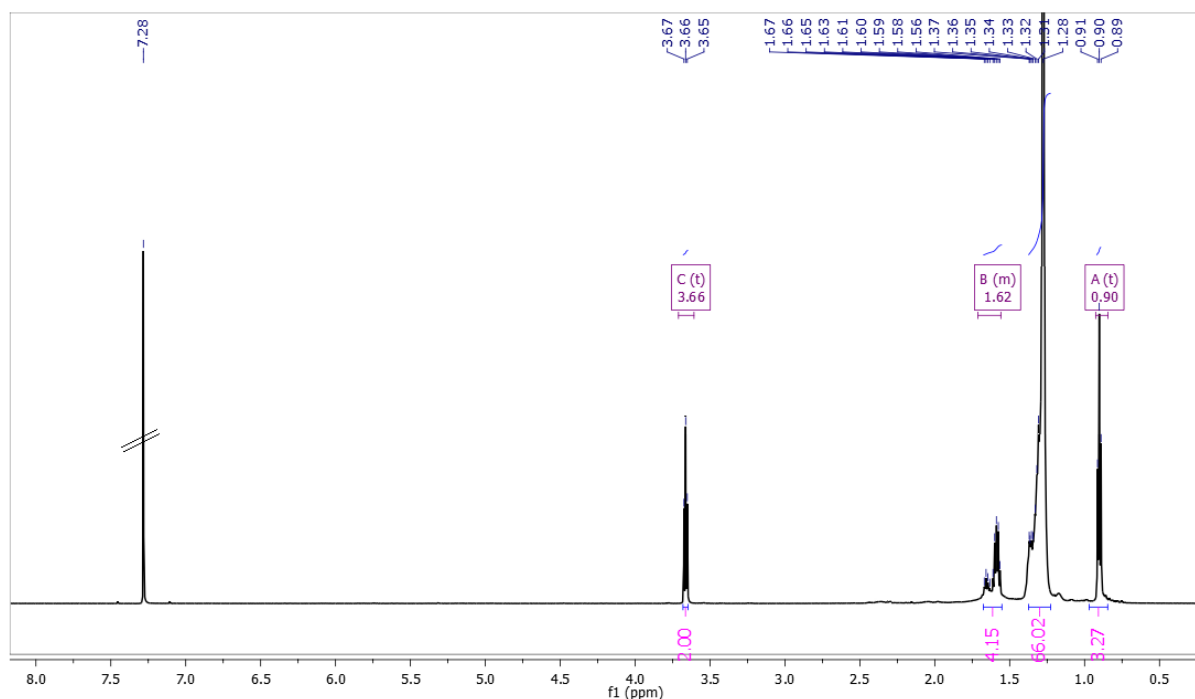
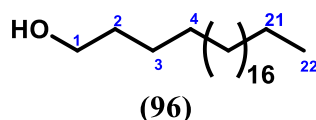


Figure 130: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF24**

II.2.10.3. Identification structurale du composé FVgF29 (96)

Le composé **FVgF29** se présente sous forme de poudre amorphe blanche et est soluble dans le chloroforme. L'interprétation de ses données spectrométriques et spectroscopiques a permis de l'identifier à la docosan-1-ol (96).



En effet, sur son spectre de masse à haute résolution ESI en mode positif (figure 131), l'on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 327,3681 compatible avec la formule moléculaire $\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{O}$ (Calc. $\text{C}_{22}\text{H}_{47}\text{O}$, 327,3627 ; $\Delta=16,5$ ppm).

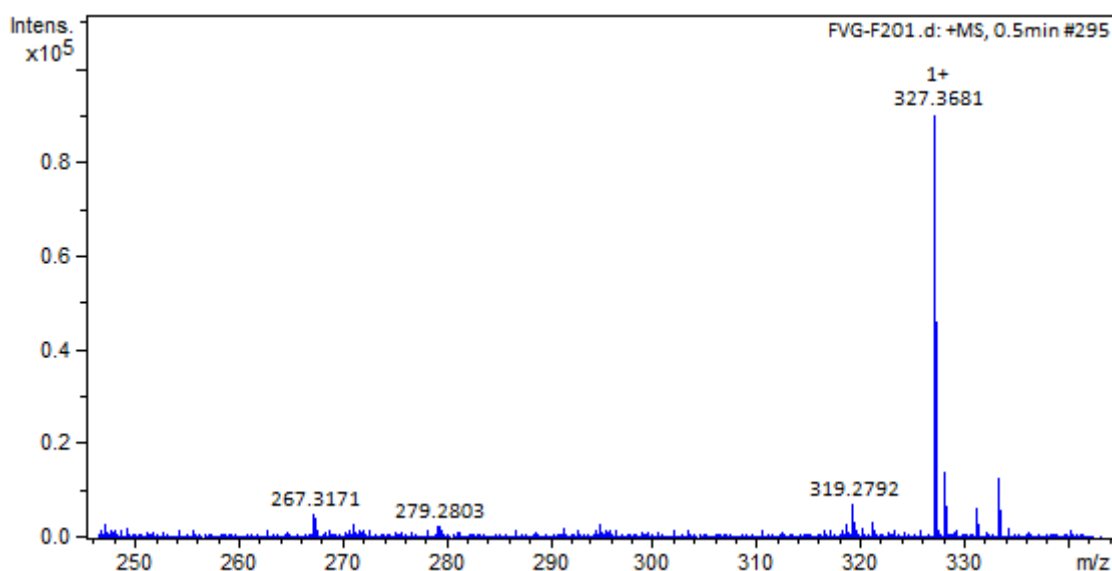


Figure 131: Spectre de masse (+)—HRESI du composé **FVgF29**

L'analyse de son spectre de RMN ^1H (figure 132) révèle la présence des signaux quasiment similaires à ceux observés sur le spectre du composé **FVgF24**. On observe à cet effet les signaux à δ_{H} 0,81 (t, $J = 6,9$, H-22), 1,18-1,35 (m, nCH₂), 3,98 (t, $J = 6,7$, H-1) caractéristiques des alcools gras (Gohar, 2001). La principale différence avec le composé (**93**) précédemment décrit réside sur l'intégration des protons de la longue chaîne aliphatique et sur le spectre de masse qui nous a permis d'identifier sans ambiguïté, le composé **FVgF29** à la docosan-1-ol (**96**).

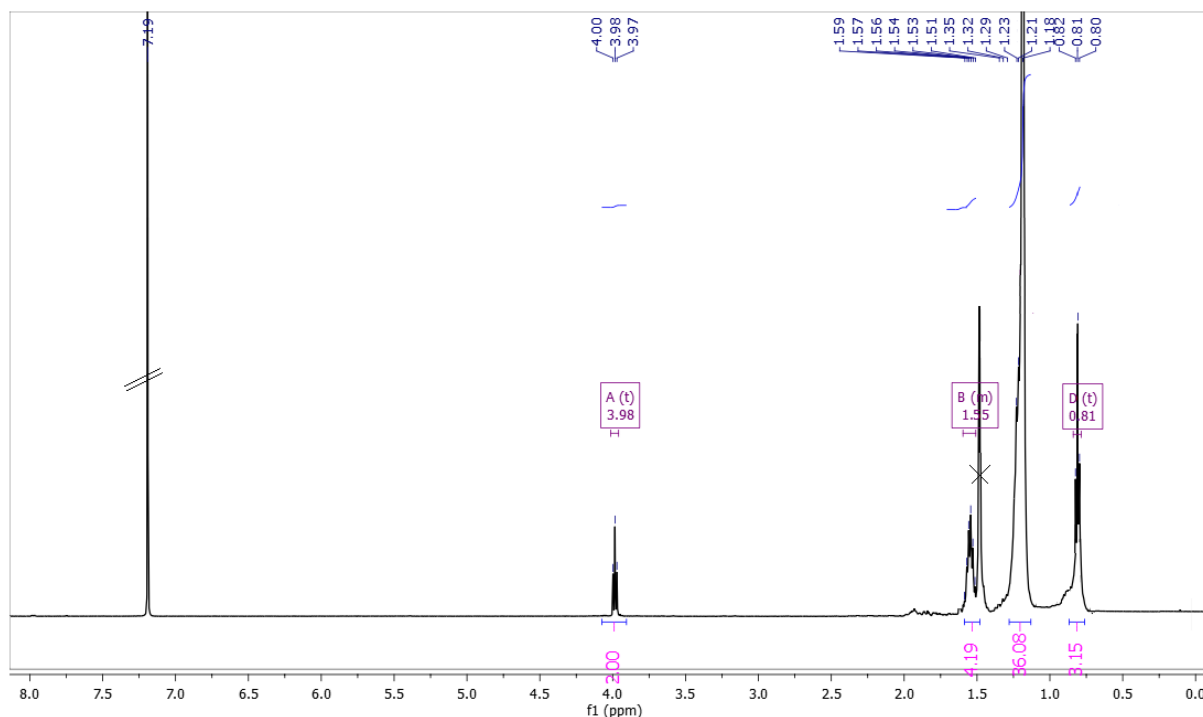


Figure 132: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **FVgF20**

II.3. Hypothèse des liens biogénétiques entre les composés isolés

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés des racines et parties aériennes de *V. guineensis* montre, que ces composés appartiennent principalement à trois grands groupes de métabolites secondaires ayant un unique précurseur, l'acétyl-coenzyme A. Il s'agit des terpénoïdes (sesquiterpènes, stéroïdes, triterpènes, tetraterpènes), des composés phénoliques (Flavonoïde et anthraquinones) et des longues chaînes aliphatiques (céramides, glycérides, alcools et acides gras). Tout débute par l'activation de l'acide acétique grâce au coenzyme A par une condensation aldolique pour former l'acétyl-CoA.

Dans une première voie, l'acétyl-CoA par polycondensation, réduction et phosphorylation enzymatique conduira à la formation de l'isopenténylpyrophosphate (IPP) à l'origine des sesquiterpènes, stéroïdes, triterpènes et tetraterpènes isolés.

Dans une deuxième voie polyorientée (voie acétique polymalonique, voie Schikimique, voie Malonyle), l'acétyl-CoA se condense par l'une de ces voies et s'additionne à un dérivé d'acide cinnamique pour former une chalcone qui est le point de départ des flavonoïdes isolés. La voie polymalonique pourra conduire à la formation d'un polycétoester à partir de la condensation de huit (08) unités l'acétyl-CoA. Ce polycétoester par énoylation, cyclisation et une décarboxylation conduira à la formation de la chrysophanol qui est le point de départ des anthraquinones isolées.

Dans la troisième voie, l'acétyl-CoA se condense avec l'acide acétique pour former le malonyl-CoA qui, dans une polycondensation de type Claisen catalysée par une thioesterase, formera la palmitoyl-CoA. Ce dernier est à l'origine des alcools et acides gras. Lorsqu'il est additionné à la sérine (acide aminé), il conduit à la formation des différentes céramides isolées (voir schéma 1, chapitre 1). En outre, lorsque la palmitoyl-CoA est additionnée au glycérol, cela conduit à la formation de différents glycérides d'acides gras que nous avons isolés.

Le schéma 16 présente une hypothèse plausible de la voie biosynthétique des composés isolés des racines et parties aériennes de *V. guineensis*.

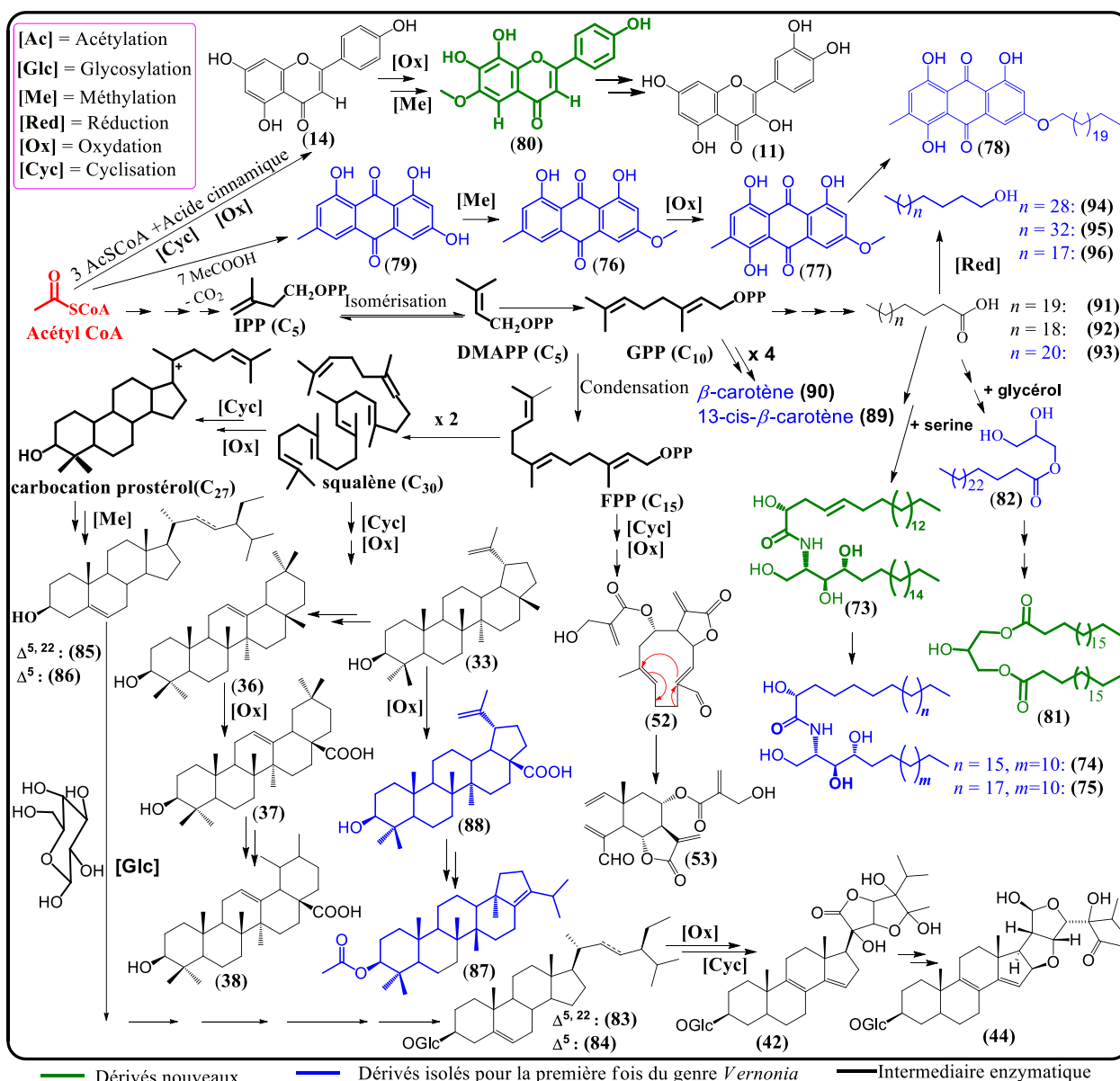


Schéma 16: Relations biogénétiques entre les composés isolés de *V. guineensis*

II.4. Contribution chimiotaxonomique

Trente-quatre (34) composés ont été isolés et caractérisés au cours des investigations chimiques des racines et des parties aériennes de *V. guineensis* dont trois dérivés nouveaux incluent une céramide (73), un flavone (80) et un diglycéride d'acide gras (81). Outre ces trois dérivés nouveaux, nous avons également isolé deux autres céramides (74 et 75), deux autres flavonoïdes (11 et 14), un monoglycéride (82), quatre anthraquinones (76–79), deux sesquiterpènes (52 et 53), six triterpénoïdes (33, 36–38, 87 et 88), deux caroténoïdes (89 et 90), six stéroïdes (42, 44, 83–86), trois acides gras (91–93) et trois alcools gras (94–96). Les composés (73–90) et (93–96) sont rapportés pour la première fois à partir du genre *Vernonia* mais dérivent des classes de composés déjà isolés dans ce genre, à l'exception des

anthraquinones qui constituent une classe isolée pour la première fois du genre *Vernonia*. Cependant, les anthraquinones (**76**, **78** et **79**), ont été préalablement isolées des rhizomes de *Petasites japonicus* (Asteraceae) (Yaoita et Kikuchi, 1993) tandis que l'érythroglaucine (**77**) est nouvellement isolée de la famille des Asteraceae. Notons que les céramides sont assez rares chez les Asteraceae, mais la présence de la vernoguinamide (**73**) et des deux autres céramides (**74** et **75**) dans cette plante n'est pas une surprise puisque les céramides du même type ont déjà été isolées dans le genre *Vernonia*, plus précisément de l'espèce *V. cotoneaster* (Willd. Ex Spreng.) (Santos et al., 2012). Il en est de même pour les flavonoïdes isolés qui, outre la vernoguinoïdine (**80**) qui est un dérivé nouveau, ont déjà été rapportés du genre *Vernonia*, plus précisément dans les espèces *V. pectoralis*, *V. cinerascens* et *V. amygdalina* (Igile et al., 1995 ; Bézanger et al., 1981 ; Ahmad et al., 2011).

Ce travail a renforcé l'étude chimiothématique des *Vernonia* car ces résultats fournissent de nouvelles informations quant à la présence d'anthraquinones dans ce genre et de nouveaux dérivés dans la famille des Asteraceae. Ces derniers pourraient représenter de nouveaux marqueurs chimiotaxonomiques significatifs pour différencier les plantes du genre *Vernonia*. Les six dérivés stéroïdiens isolés ici (**42**, **44**, **83—86**) ont déjà été obtenus lors des études précédentes de *V. guineensis* Benth. (Donfack et al., 2012; Tchinda et al., 2002) . En effet, les stéroïdes en général, et les glucosides de stigmastane en particulier, pourraient être considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques pour ce genre car la vernoguinoside A (**42**) et le vernoguinoside (**44**) isolés de *V. guineensis* Benth. ont également été rapportés chez trois autres espèces, dont *V. kotschyana* (Sanogo et al., 1998), *V. amygdalina* (Jisaka et al., 1992) et *V. anthelmintica* (Hua et al., 2012). Le lupéol (**33**), la β -amyri (**36**), l'acide oléanolique (**37**) et l'acide ursolique (**38**) ont été précédemment isolés de *V. glaberrima* (Alhassan et al., 2018), *V. cinerea* (Asha et al., 2016), *V. phosphorea* (Valente et al., 2014) et *V. auriculifera* (Kiplimo et al., 2011). Ce résultat indique que les triterpénoïdes de type lupane pourraient aussi être des marqueurs taxonomiques du genre *Vernonia*. De plus, l'acétate de hop-17 (21) -en-3b-yl (**87**) est rapporté ici pour la première fois dans les Asteraceae et peut être un indicateur important dans l'identification du marqueur taxonomique différentiel parmi les triterpénoïdes de *V. guineensis* Benth. Les alcools et acides gras sont omniprésents dans les fractions non polaires des extraits végétaux. Toutefois, ce travail est le premier rapport de ces alcools et acides gras de *V. guineensis* Benth., certainement parce que les fractions non polaires n'ont pas été étudiées en profondeur dans les travaux chimiques précédents.

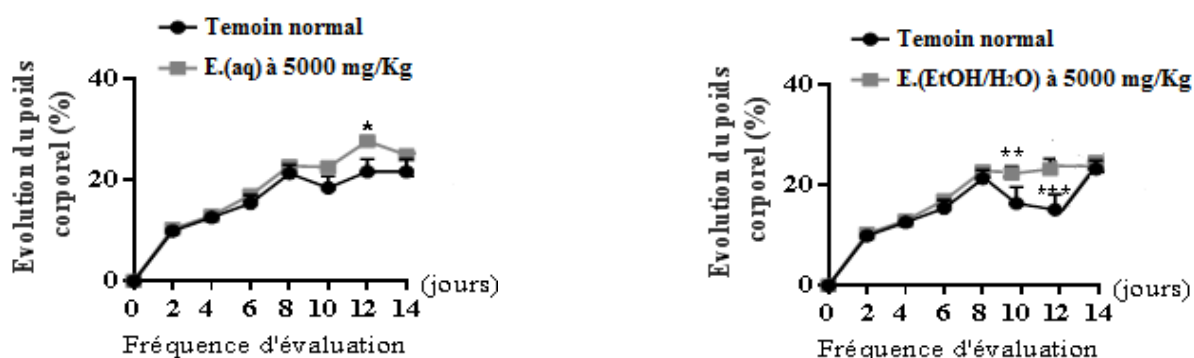
En conclusion, l'étude de *Vernonia guineensis* Benth. a conduit à l'isolement de composés qui enrichissent les connaissances sur la phytochimie de la plante et apportent des

informations complémentaires sur les éventuels marqueurs chimiotaxonomiques présents dans cette espèce, le genre *Vernonia*, ainsi que la famille des Asteraceae. Il est à noter que les composés anthraquinones n'ont jamais été signalés dans le genre *Vernonia* et ceci constitue une nouvelle découverte sur les données chimiophénèques du genre *Vernonia*.

II.5. Activité biologique des extraits, fractions et composés isolés

II.5.1. Toxicité aigüe des extraits aqueux et hydroalcoolique des feuilles

Ce test biologique a eu pour objectif d'estimer la toxicité aigüe et d'évaluer les effets des extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *V. guineensis* sur des rats femelles de souche *Wistar*. L'administration orale d'une dose unique de 5000 mg/kg de chaque extrait n'a provoqué aucun signe apparent de toxicité aussi bien durant les 4 premières heures d'administration que pendant les 14 jours d'expérimentation chez les rats sains. En effet, l'administration de ces extraits n'a entraîné aucune modification visible sur l'aspect du pelage, l'agressivité, la mobilité, la sensibilité au bruit et au toucher, et sur l'aspect des yeux des animaux tests en comparaison au groupe témoin normal. Il n'a été observé aucun décès. La figure 133 ci-dessous illustre les effets des extraits suscités sur l'évolution pondérale des rats. Aucune modification sur l'évolution du poids des animaux n'a été observée. L'absence de signes de toxicité et de mortalité chez les rats sains traités en dose unique élevée d'extrait de 5000 mg/kg indique que la dose létale 50 (DL₅₀) (dose qui tue 50 % d'animaux traités) est supérieure à 5000 mg/kg. Ce résultat permet de classer les extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles de *V. guineensis* dans la catégorie des substances peu ou pas toxiques selon le Système de classification global harmonisé (SCGH) (OCDE, 2001).



Chaque point représente la moyenne \pm ESM, n = 3 ; témoin normal = rats traités à l'eau distillée (10 mL/kg) , E.(aq) à 5000 mg/kg = rats traités à l'extrait aqueux des parties aériennes de *V. guineensis* à la dose de 5000 mg/kg, E.(EtOH/H₂O) à 5000 mg/kg = rats traités à l'extrait EtOH/H₂O (7 :3) des parties aériennes de *V. guineensis* à la dose de 5000 mg/kg ; * = p < 0,05, ** = p < 0,01 et *** = p < 0,001 différence significative par rapport au témoin normal.

Figure 133: Effets des extraits de *V. guineensis* sur l'évolution pondérale des rats

Nos résultats confirment l'innocuité de *V. guineensis*, qui est consommée en médecine traditionnelle depuis plus de 3 générations (Maroyi et al., 2020). En effet, l'innocuité des

racines de cette plante a été mise en évidence par [Toyan et al. \(2012\)](#). Leurs travaux rapportent que le test de toxicité aiguë a été effectué sur des rats mâles et femelles de 150 à 200 g de poids corporel et l'extrait aqueux des racines de *V. guineensis* a été administré en 4 doses de 500, 1000, 2000 et 4000 mg/kg par groupe (n=6) respectivement, et le groupe témoin a reçu de l'eau distillée. Les résultats de cette étude révèlent que *V. guineensis* n'a produit aucun signe de toxicité ou de mort à la concentration maximale de 4000 mg/kg. Cette absence de toxicité aiguë à la plus forte concentration testée indique que la décoction de thé de l'extrait de *V. guineensis* est sans danger à des concentrations ≤ 4000 mg/kg pour les racines et ≤ 5000 mg/kg pour les feuilles.

II.5.2. Activité antileishmaniale

Le criblage antileishmanial a été effectué sur les extraits hydroéthanolique des racines et feuilles de *V. guineensis*. L'extrait des racines n'a pas démontré un effet antileishmanial à la concentration maximale de 100 $\mu\text{g/mL}$ tandis que celui des feuilles a présenté une inhibition de 100% à 100 $\mu\text{g/mL}$. De ce résultat, seule l'étude des feuilles a été orchestrée suivant une méthodologie guidée par l'activité antileishmaniale *in vitro* sur les promastigotes de *L. donovani* afin de rechercher les constituants responsables de l'activité observée. En effet, plusieurs types d'extractions ont été réalisés sur les feuilles et l'extrait le plus actif a été choisi pour une étude chimique approfondie. Les tests de toxicité *in vitro* sur la lignée Vero des cellules épithéliales du rein de singe ont également été évalués afin de déterminer l'indice de sélectivité (SI) des échantillons testés. Les résultats sont consignés dans le tableau 37 et le potentiel antileishmanial est également représenté en diagramme sur la figure 134.

Tableau 37: Activité antileishmaniale *in vitro* sur les promastigotes de *Leishmania donovani* et cytotoxicité des extraits bruts, fractions et composés de *V. guineensis*

| Test biologique | Échantillons | Activité Antileishmaniale | Activité cytotoxique | Indice de sélectivité (IS) |
|---------------------------|---|---|---|----------------------------|
| | | CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm ET | CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm ET | CC_{50}/CI_{50} |
| Infusion (~ 85 °C) | | | | |
| | H ₂ O | 15,68 \pm 0,03 | 70,47 \pm 6,35 | 5,5 |
| Macération | | | | |
| | EtOH/H ₂ O (7:3) | 45,77 \pm 0,04 | >100 | >2 |
| Extraits bruts | CH ₂ Cl ₂ /EtOH/H ₂ O (10:9:1) | 0,33 \pm 0,07 | 15,76 \pm 4,36 | 48 |
| | CH ₂ Cl ₂ /MeOH (1:1) | 5,17 \pm 0,06 | 16,23 \pm 4,14 | 3 |
| | AcOEt | 9,19 \pm 0,19 | 9,24 \pm 0,20 | 1 |
| | <i>n</i> -hexane | 50,20 \pm 0,28 | >100 | >2 |

Tableau 37 (suite) : Activité antileishmaniale *in vitro* sur les promastigotes de *Leishmania donovani* et cytotoxicité des extraits bruts, fractions et composés de *V. guineensis*

| | Test biologique | Activité Antileishmaniale | Activité cytotoxique | Indice de sélectivité (IS) |
|--|-------------------------|---|---|----------------------------|
| | Échantillons | CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm ET | CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm ET | CC_{50}/CI_{50} |
| Fractions de l'extrait au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10:9:1) | F1 | 13,45 \pm 0,81 | 9,24 \pm 0,20 | 0,7 |
| | F2 | 13,05 \pm 0,87 | 15,40 \pm 0,09 | 1,1 |
| | F3 | 0,78 \pm 0,21 | 14,60 \pm 6,25 | 19 |
| | F4 | 0,39 \pm 0,08 | 17,32 \pm 2,39 | 45 |
| | F5 | >50 | >100 | na |
| | F6 | 36,95 \pm 0,04 | 94,46 \pm 4,85 | 2,5 |
| Composés isolés de F3 et F4 | Lupéol (33) | 9,91 \pm 0,08 | 8,28 \pm 0,11 | 0,84 |
| | Vernoguino flavone (80) | 8,26 \pm 0,13 | >100 | >12 |
| | Quercétine (11) | 3,22 \pm 0,16 | >100 | >31 |
| | Luteoline (14) | 15,20 \pm 0,02 | >100 | >6,6 |
| | Acide betulinique (89) | 6,21 \pm 0,07 | 37,59 \pm 1,87 | 6 |
| | Vernopicrine (52) | 0,68 \pm 0,11 | 24,02 \pm 1,87 | 35 |
| | Acide ursolique (38) | 0,94 \pm 0,11 | 6,07 \pm 0,21 | 6 |
| | Acide oléanolique (37) | 1,55 \pm 0,17 | 7,30 \pm 0,40 | 4,7 |
| Témoin positif | Amphotericine B | 0,33 \pm 0,21 | nd | na |

[CI_{50} : 0–5 $\mu\text{g/mL}$]=Activité prometteuse [CI_{50} : 5–10 $\mu\text{g/mL}$]=Très bonne activité [CI_{50} : 10–25 $\mu\text{g/mL}$]= bonne activité [CI_{50} : 25–50 $\mu\text{g/mL}$]= Activité modérée [CI_{50} : 50–100 $\mu\text{g/mL}$]= Activité faible [CI_{50} : >100 $\mu\text{g/mL}$]= pas actif, SI= indice de sélectivité [SI : > 1]= échantillons sélectifs supposés non cytotoxiques [SI : < 1]= échantillons non sélectifs supposés cytotoxiques, nd= non déterminée, na= non applicable

Activité antileishmaniale (promastigotes-*Leishmania donovani*)

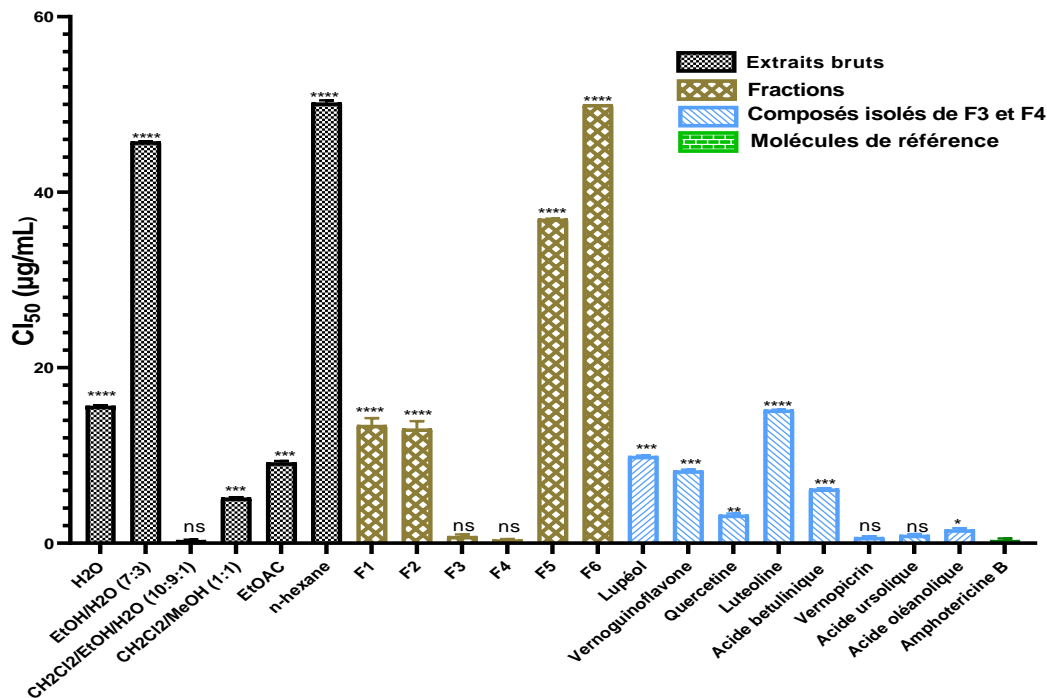


Figure 134: Activité antileishmaniale des Extraits bruts, fractions et quelques composés des parties aériennes de *V. guineensis* contre la forme promastigote de *L. donovani*.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM, n = 3 ; Molécule de référence fixée pour la comparaison = Amphotericine B, **** = p < 0,001 différence très significative, *** = p < 0,01 différence significative, ** = p < 0,05 différence peu significative, * = p < 0,1 différence très peu significative, ns= non significative, Test statistique= ANOVA (Tukey test)

L'analyse des résultats présentés par le tableau 37 et la figure 134 indiquent que les différentes techniques d'extraction utilisées ont un impact significatif sur le pouvoir antileishmanial. Alors que l'extrait obtenu par macération à l'hexane ($CI_{50}=50,2 \mu\text{g/mL}$) s'est avéré inactif, l'extrait à EtOH/H₂O (7:3) a présenté une activité modérée ($CI_{50}=45,7 \mu\text{g/mL}$) et l'extrait obtenu par infusion aqueuse a démontré une bonne activité ($CI_{50}=15,6 \mu\text{g/mL}$). Par ailleurs, les extraits obtenus par macération à l'AcOEt ($CI_{50}=9,1 \mu\text{g/mL}$) et au CH₂Cl₂/MeOH (1:1) ($CI_{50}=5,1 \mu\text{g/mL}$) ont démontré une très bonne activité tandis que l'extrait au CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1) ($CI_{50}=0,33 \mu\text{g/mL}$), a démontré la meilleure activité antileishmaniale avec une différence non significative à celle de l'Amphotéricine B, utilisée comme molécule de référence. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Girardi \(2015\)](#).

Dans l'essai *in vitro* de cytotoxicité, tous ces extraits ont été peu cytotoxiques. En combinant ce résultat à celui de l'activité antileishmaniale, on peut conclure que ces extraits agissent préférentiellement sur les parasites que sur les cellules normales ($IS > 1$).

L'extrait au CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1) ($CI_{50}=0,33 \mu\text{g/mL}$), sur la base de son activité antileishmaniale prometteuse, a été sélectionné pour un fractionnement bioguidé. Cette opération a donné lieu à 6 fractions classées en 3 groupes. Le premier groupe est constitué des fractions F5 et F6 ($CI_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$) considérées comme moins actives que l'extrait de départ ($p < 0,001$). Le deuxième groupe est constitué des fractions F1 et F2 ($CI_{50} > 13,1 \mu\text{g/mL}$) considérées comme étant moins actives ($p < 0,01$) que l'extrait de départ bien que démontrant une très bonne activité antileishmaniale. Le troisième groupe est constitué des fractions F3 ($CI_{50}=0,7 \mu\text{g/mL}$), et F4 ($CI_{50}=0,3 \mu\text{g/mL}$) considérées comme des fractions prometteuses avec une différence non significative comparée à l'extrait de départ. Seules les fractions de ce groupe 3 ont été sélectionnées pour poursuivre l'étude bioguidée. Les fractions du groupe 3 n'ont pas été étudiées, car bien que présentant de bonnes activités antileishmaniale, elles n'ont pas été très sélectives ($IS < 1$). Dans l'ensemble, l'extrait au CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1) reste plus prometteur que les fractions sélectionnées pour la suite de l'étude car il présente la sélectivité la plus élevée contre les promastigotes de *L. donovani* ($SI=48$) comparée à une sélectivité de 19 et 45 respectivement pour F3 et F4. La purification de ces deux fractions (F3 et F4) a conduit à l'isolement de 8 composés (Schéma 17) qui ont également été testés pour leur activité contre les formes promastigotes de *L. donovani*. Les résultats obtenus et présentés dans le tableau 37 et par la figure 134 indiquent que la vernopicine (**52**) est le composé le plus actif ($CI_{50}=0,68 \mu\text{g/mL}$) et le plus sélectif ($IS=35$), avec une différence non significative à l'activité de l'amphotéricine B. La vernopicine (**52**) est un sesquiterpène lactonique de type germacranolide portant un groupe hydroxyméthacryloxy très présent chez les Asteraceae et

particulièrement les plantes du genre *Vernonia*. La vernopicine (**52**) n'a jamais été évaluée pour son potentiel antileishmanial, et ce travail en est le premier rapport. Toutefois ce très bon potentiel de la vernopicine (**52**) contre les formes promastigotes de *L. donovani* n'est pas surprenant car dans les études antérieures, elle a démontré une très bonne activité contre les lignées Hb3 sensibles à la chloroquine (CQ) et Dd2 résistantes à la CQ de *Palmodium falciparum* avec des valeurs de CI₅₀ 0,614 µg/mL (1774 nM) de 0,807 µg/mL (569 nM) (Toyang et al., 2013). En plus, cette molécule possède dans sa structure plusieurs motifs accepteurs de Michael (AM) capables d'inhiber certains systèmes enzymatiques assurant la survie des parasites et aussi de moduler la réponse immunitaire de l'hôte parasité, leur conférant ainsi des propriétés antiparasitaires remarquables (Girardi, 2015).

Après la vernopicine (**52**), l'acide ursolique (**38**) arrive en 2^e position suivi de l'acide oléanolique (**37**) avec des valeurs de CI₅₀ 0,94 et 1,55 µg/mL respectivement. Elles ont été classées parmi les composés présentant un potentiel prometteur pour le développement des médicaments contre la leishmaniose. Ce résultat est en accord avec plusieurs travaux antérieurs (Yamamoto et al., 2015, Torres-Santos et al., 2004) qui rapportent l'activité antileishmaniale des acides ursolique et oléanolique. Dans l'étude conduite par Yamamoto et al. (2015), l'efficacité de l'acide ursolique (**38**), un triterpénoïde multifonctionnel avec des effets antitumoraux, antioxydants et antimicrobiens bien connus a été évalué *in vitro* et *in vivo* sur différentes souches de *Leishmania*. L'activité antileishmaniale *in vitro* contre les formes intracellulaires était six et trois fois plus élevée que les formes extracellulaires de *L. amazonensis* et *L. infantum*, respectivement. L'acide ursolique (**38**), s'est également avéré être un médicament antileishmanial puissant contre les manifestations de la leishmaniose viscérale et de la leishmaniose cutanée dans des modèles expérimentaux. Cette molécule administrée par voie parentérale à 5 mg/kg pendant sept jours a considérablement réduit la charge parasitaire dans le foie et la rate non seulement dans l'infection aiguë, mais aussi dans le modèle d'infection chronique contre *L. infantum*. De plus, la pommade à l'acide ursolique (0,2%) administrée par voie topique pendant quatre semaines a diminué (50%) la progression de la taille des lésions dans un modèle d'infection chronique de leishmaniose cutanée causée par *L. amazonensis*. L'acide ursolique (**38**) peut être une thérapie prometteuse contre la leishmaniose viscérale et de la leishmaniose cutanée. En outre L'acide betulinique (**89**) et le lupéol (**33**) ont également démontré de très bonnes activités avec des valeurs de CI₅₀ 6,21 et 9,91 µg/mL respectivement. Ses résultats contre les promastigotes de *L. donovani*, corroborent avec les résultats précédents. En effet, l'activité antileishmaniale du lupéol contre les promastigotes et les amastigotes de *L. donovani* a été démontrée dans la littérature (Das et

al., 2017). D'autres études tentant d'établir le mécanisme d'action du lupéol avaient été menées par Ramos *et al.* (1996) et ont montré que ce composé est un médiateur de la dépolarisation accrue de la membrane cytoplasmique qui peut favoriser une détérioration de la membrane cellulaire. Ils ont également suggéré que l'activité leishmanicide pourrait être due à une perturbation de la membrane cytoplasmique des promastigotes de *L. donovani*, comme en témoigne l'analyse fluorométrique. De même que le lupéol pourrait induire une réduction de la charge parasitaire intracellulaire, il a été constaté qu'il s'exécutait par l'induction d'une réponse cytokine pro-inflammatoire et la génération d'oxyde de nitrite (NO) dans les macrophages infectés par *L. donovani* (Das *et al.*, 2017).

L'acide betulinique (**89**) et le lupéol (**33**) appartiennent à la classe des terpénoïdes comme les acides ursolique et oléanolique. En fait, un certain nombre de terpènes sont réputés posséder une activité antileishmaniale. Différents auteurs ont suggéré que l'activité antileishmaniale de ces composés pourrait être liée à l'inhibition de la synthèse des protéines et des acides nucléiques ou à une pompe à ATPase dépendante du calcium associé à la membrane (Mishina *et al.*, 2007). En effet, des études antérieures ont suggéré que les composés lipophiles, tels que les triterpènes, agissent par un mécanisme particulier. Ces composés peuvent facilement traverser les membranes cytoplasmiques, affectant les structures de leurs différentes couches de polysaccharides, d'acides gras et de phospholipides, les rendant ainsi perméables (Di *et al.*, 2007). Une fois qu'ils ont traversé la membrane, la coagulation du cytoplasme peut se produire. Ces événements sont capables de favoriser l'interruption de voies métaboliques spécifiques des lipides et des protéines (Di *et al.*, 2007).

Les formes promastigotes de *L. donovani* ont également été sensibles aux flavonoïdes isolés dans cette étude. En effet la quercétine (**11**) a démontré une activité prometteuse et une faible cytotoxicité ($CI_{50}=3,22 \mu\text{g/mL}$, $SI>31$). La vernoguinoïflavone, isolée ici pour la première fois a démontré une très bonne activité et une faible cytotoxicité ($CI_{50}=8,26 \mu\text{g/mL}$, $SI>12$) tandis que la luteoline a exhibé une bonne activité et a également démontré une faible cytotoxicité ($CI_{50}=15,2 \mu\text{g/mL}$, $SI>6$). Il convient de remarquer dans cette étude que parmi les composés isolés des fractions les plus actives, aucun n'a démontré un potentiel antileishmanial supérieur à celui de l'extrait brut ($CI_{50}=0,33 \mu\text{g/mL}$). Ce résultat permet de suggérer à posthérie une synergie d'action des différents constituants chimiques de l'extrait brut ($CI_{50}=0,33 \mu\text{g/mL}$). Pour avoir d'amples explications, nous avons examiné plus en profondeur le profil UPLC-DAD-(HRESI)MS (figure 135, tableau 38) de l'extrait brut étudié ainsi que ceux des deux fractions les plus actives (F3 et F4). L'analyse de ces résultats fait ressortir un fait intéressant : l'extrait brut et les fractions F3 et F4 contiennent en commun en

plus de la vernopicine, d'autres sesquiterpènes lactoniques électrophiles ayant dans leurs structures un motif accepteur de Michael (AM) (figure 136). En effet, certains AM sont des inhibiteurs irréversibles de la cystéine protéase, enzyme intervenant dans la dégradation des protéines indispensables aux parasites. Ces enzymes possèdent un résidu cystéine au sein de leurs sites actifs et sont donc de bons nucléophiles. Elles constituent des cibles thérapeutiques intéressantes du fait de leur présence ubiquitaire au sein des protozoaires (Santos et Moreira, 2007). Le mécanisme d'action passe par une addition de Michael (1—4) au niveau du site actif cystéine de l'enzyme tel qu'illustré ci-dessous (Santos et Moreira, 2007).

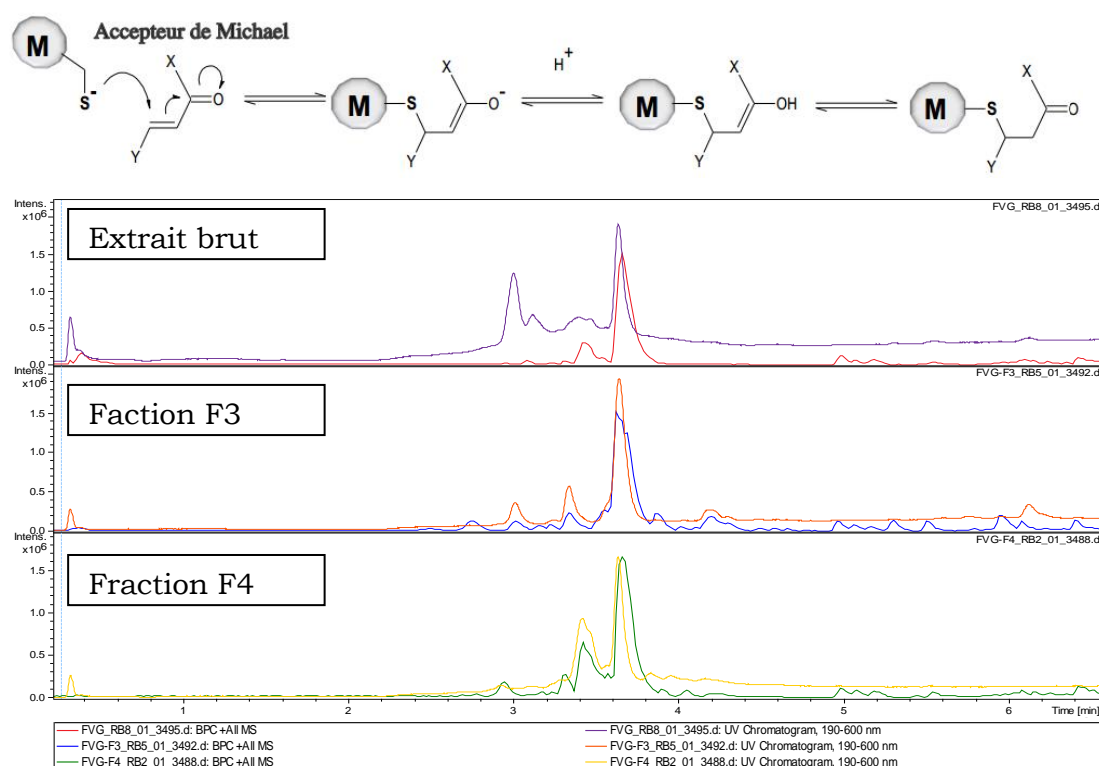


Figure 135: Chromatogramme des pics de base détectés par spectrométrie de Masse (BPC+ All MS) et UV de l'extrait brut et des fractions les plus actives F3 et F4

Tableau 38: Principaux sesquiterpènes détectés par UPLC-DAD-MS dans l'extrait brut et les fractions F3 et F4 des parties aériennes de *V. guineensis*.

| N° | Tr (min) | Masse exp. | Masse calc. | Formule brute | Masse des ions fragments | Identification du composé [#] |
|----|----------|------------|-------------|---|--------------------------|--|
| 1 | 4,05 | 369,1294 | 369,1309 | C ₁₉ H ₂₂ O ₆ Na | 284, 108, 301 | Onopordopicein (97) |
| 2 | 3,75 | 369,1285 | 369,1309 | C ₁₉ H ₂₂ O ₆ Na | 284, 108 | Vernopicine (52). |
| 3 | 3,61 | 415,1706 | 415,1727 | C ₂₁ H ₂₈ O ₇ Na | 384, 375, 106, | Vernolide A (55) |
| 4 | 3,59 | 369,1300 | 369,1309 | C ₁₉ H ₂₂ O ₆ Na | 284, 108 | Vernomelitensine (53). |
| 5 | 3,43 | 371,1454 | 369,1465 | C ₁₉ H ₂₄ O ₆ Na | 287, 108, 330 | Vernonilide A(98) |
| 6 | 2,95 | 385,1244 | 385,1258 | C ₁₉ H ₂₂ O ₇ Na | 331, 293, 69 | Vernolide (67) |

[#]L'identification de tous les constituants a été réalisée par analyse UPLC-DAD-MS et en comparant les spectres UV, MS et la fragmentation des molécules avec ceux des composés rapportés dans la littérature du genre *Vernonia* grâce aux bases de données (Scifinder, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 14) et MassBank of North America (MoNA))

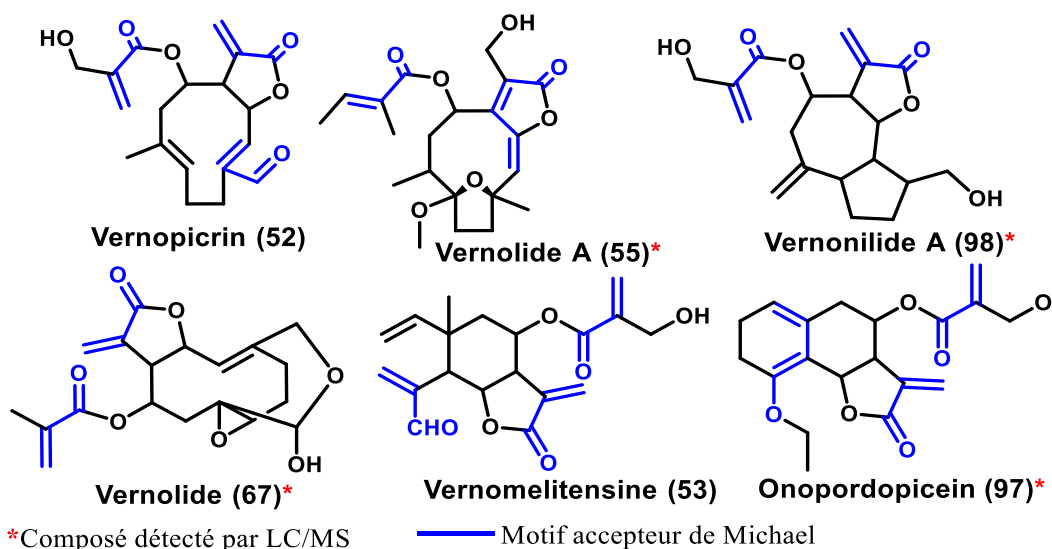


Figure 136: Structure de quelques sesquiterpènes isolé et/ou détecté par LC/MS

Les Tavaux de [Sülsen et al., \(2016\)](#) permettent d'émettre d'autres hypothèses quant au puissant potentiel antileishmanial de nos extraits et fractions. En effet, la figure 136 présente quelques sesquiterpènes isolés ou détectés dans nos échantillons ; ceux-ci possèdent tous un cycle lactonique qui pourrait en partie être à l'origine de l'activité antileishmaniale observé. Ils ont démontré que les lactones sesquiterpéniques ont la capacité d'induire la mort du parasite par apoptose en se liant à l'hème intracellulaire. C'est par ce mécanisme que l'artémisinine, actuellement utilisée comme médicament antipaludique exerce son activité antiprotozoaire ([Schmidt et al., 2012](#)). À cette d'hypothèse, s'ajoute celle de la Trypanothion réductase comme cible thérapeutique (TryR). En effet, tout comme la Cystéine protéase (CP), les TryR ne sont présentes que chez les trypanosomatides et sont absentes des cellules de mammifères. Tandis que CP est une cystéine protéase, importante pour le métabolisme des parasites et considérée comme un candidat important pour le développement de nouveaux médicaments trypanocides ([Duschak et Couto 2009](#)), TryR est une oxydoréductase, également spécifiques des trypanosomatides. Considérée comme une cible potentielle pour la conception des médicaments antileishmanials, elle est particulièrement intéressante pour son rôle critique dans le contrôle de l'homéostasie redox de la leishmania. Un mécanisme possible de l'action des sesquiterpènes lactoniques (STL) en tant qu'agents trypanocides pourrait impliquer le système redox du trypanothion, puisque les STL contiennent un fragment α , β -insaturée- γ -lactone dans leur structure. En tenant compte de ces considérations, nos résultats démontrent que TryR serait une cible des sesquiterpènes présents dans *V. guinéensis*.

II.5.3. Activités antioxydantes

L'activité antioxydante est la capacité d'un échantillon à empêcher ou ralentir l'oxydation en neutralisant des radicaux libres. Ces radicaux libres sont impliqués dans la pathogenèse des maladies à l'instar de la leishmaniose, aux modifications cellulaires qui peuvent éventuellement conduire au dérèglement de l'organisme et à son vieillissement accéléré. Ainsi, la découverte de composés multiefficaces au lieu des molécules de ciblage uniques est essentielle. Ces antioxydants réduisent les dommages produits par les radicaux libres chez les malades (Shah *et al.*, 2016). C'est dans cette optique que nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits, fractions et composés ayant démontrés un potentiel antileishmanial plus ou moins élevé. Les résultats sont consignés dans le tableau 39.

Tableau 39: Activité antileishmaniale *in vitro* sur les promastigotes de *Leishmania donovani* et cytotoxicité des extraits bruts, fractions et composés de *V. guineensis*

| Tests antioxydants | | Activité au FRAP CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm ET | Activité au DPPH CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm ET | Activité a l'ABTS CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm ET |
|---------------------------|-------------------------|---|---|--|
| Extraits bruts | E1 | 500 | 471,55 \pm 27,79 | 33,50 \pm 5,30 |
| | E2 | 192,90 \pm 7,21 | 81,24 \pm 8,23 | 23,99 \pm 4,61 |
| | E3 | 206,60 \pm 10,18 | 434,20 \pm 18,81 | 67,19 \pm 1,76 |
| | E4 | 212,00 \pm 3,96 | 134,90 \pm 10,04 | 4,03 \pm 0,44 |
| | E5 | 500 | 500 | 40,81 \pm 0,10 |
| | E6 | 500 | 500 | 116,40 \pm 3,95 |
| Fractions de l'extrait E3 | F1 | 127,4 \pm 0,14 | 60,65 \pm 1,58 | 60,39 \pm 2,90 |
| | F2 | 147,55 \pm 5,86 | 85,56 \pm 6,15 | 30,03 \pm 1,77 |
| | F3 | 203,75 \pm 5,44 | 116,8 \pm 5,79 | 95,29 \pm 5,76 |
| | F4 | 500 | 500 | 39,44 \pm 3,21 |
| | Vernoguino flavone (81) | 23,23 \pm 0,42 | 4,93 \pm 0,34 | 4,95 \pm 0,30 |
| | Quercetine (11) | 11,01 \pm 0,96 | 1,75 \pm 0,42 | 3,01 \pm 0,47 |
| | Acide betulinique (89) | 500 | 500 | 500 |
| | Vernopicine (52) | 500 | 500 | 500 |
| | Acide ursolique (38) | 1,50 \pm 0,10 | 3,02 \pm 1,20 | 7,50 \pm 1,30 |
| CP | Acide ascorbique | 2,03 \pm 0,11 | 3,43 \pm 0,06 | 4,15 \pm 0,06 |

[CI_{50} : 0–10 $\mu\text{g/mL}$] = Très bonne activité [CI_{50} : 10–50 $\mu\text{g/mL}$] = Bonne activité [CI_{50} : 50–100 $\mu\text{g/mL}$] = Activité modérée [CI_{50} : 100–250 $\mu\text{g/mL}$] = Activité faible [CI_{50} : 250–500 $\mu\text{g/mL}$] = Activité très faible [CI_{50} : >500 $\mu\text{g/mL}$] = pas actif, E1=extrait par infusion à l'eau, E2= extrait par macération à EtOH/H₂O (7:3), E3= extrait par macération à CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1), E4= extrait par macération à CH₂Cl₂/MeOH (1:1), E5= extrait par macération à l' AcOEt, E6= extrait par macération à l'hexane, CP= Témoin positif

D'une façon générale, à l'exception de la vernopicine et de l'acide betulinique, il en ressort du tableau 39 que les composés isolés présentent de très bonnes activités antioxydantes, avec des différences peu significatives par rapport à la vitamine C (acide ascorbique) pris comme contrôle positif. Il convient alors de comparer les échantillons de mêmes natures telles que présentées par les figure 137, 138 et 139 pour avoir une meilleure visibilité des résultats obtenus.

Il en ressort de la figure 137 que tous les extraits obtenus procèdent un fort potentiel à piéger les radicaux. Par contre, seuls les extraits E2 et E4 présentent des effets antioxydants avérés tant sur leurs capacités à réduire le fer (III) que sur leurs capacités à piéger les radicaux libres DPPH et ABTS. L'extrait E3 qui a présenté la meilleure activité antileishmaniale, exhibe ici une faible activité antioxydante (tableau 39, figure 137), ce qui suggère que cet extrait agirait directement sur la forme extracellulaire de *L. donovani*, ce qui est en accord avec les résultats fournis par l'analyse du profil chromatographique de l'extrait brut.

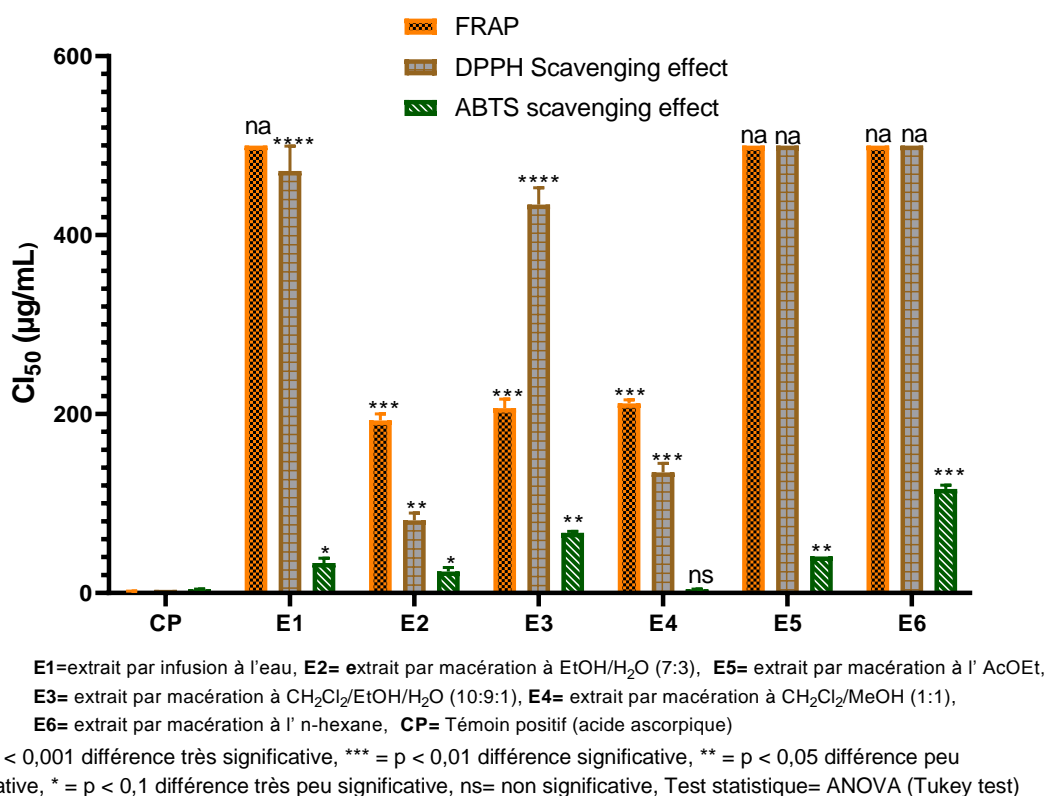


Figure 137: Activité antioxydante des extraits bruts

La figure 138 présente les résultats des fractions issus de l'extrait E3. Contrairement à E3 qui présentait une très faible activité de réduction du fer(III) et de capture du radical DPPH, les fractions qui y sont issues présentent des activités plus significatives. Ceci peut être dû au fait que ces derniers contiennent des flavonoïdes en plus grande concentration. Le même constat observé avec les extraits bruts est observé avec les fractions. Les fractions les plus actives sur la forme extracellulaire de *L. donovani* exhibent un moins bon potentiel, ce qui suppose que dans un modèle *in vivo*, cet extrait agirait directement sur le parasite.

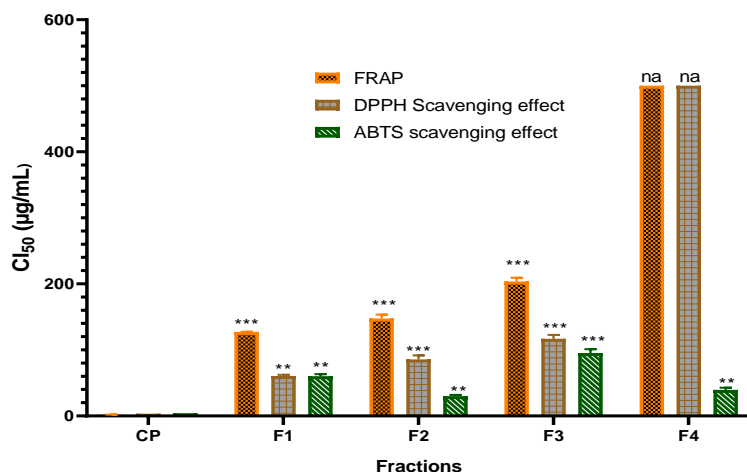


Figure 138: Activité antioxydante des fractions

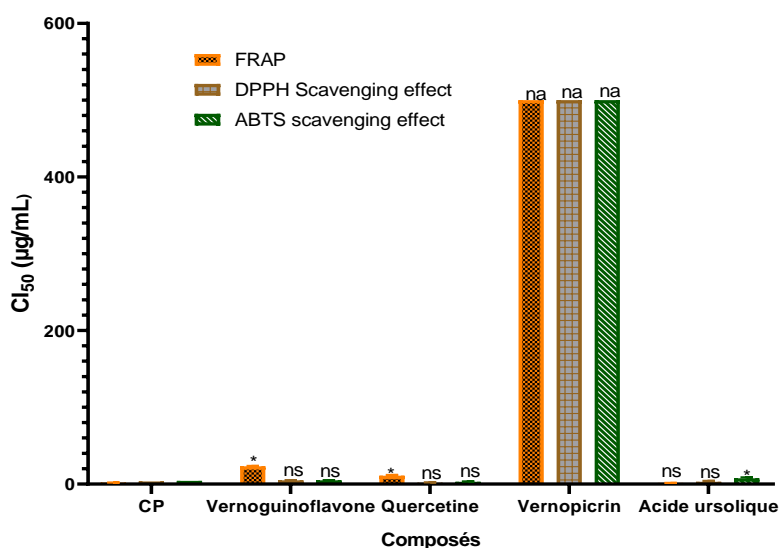


Figure 139: Activité antioxydante de quelques composés isolés

La quercetine (**11**), la vernoguinoflavone (**80**) et l'acide ursolique (**38**) isolé des fractions F3 et F4 exhibent une activité antioxydante supérieure à ceux des fractions dont ils sont issus, et comparables avec l'acide ascorbique utilisé ici comme contrôle positif. Ce résultat soutient à post théorie l'hypothèse formulée avec les extraits et fractions quant à l'action des échantillons étudiés sur *L. donovani*. Ces métabolites agiraient sur les parasites *Leishmania* en favorisant la formation Des espèces réactives de l'oxygène (ERO), ce qui entrainerait la mort de ceux-ci par apoptose cellulaires (Koide et al., 1997). En plus on peut également émettre l'hypothèse d'une action antioxydante antagoniste des différents constituants chimiques des parties aériennes de *V. guineensis* sous réserve de l'évaluation de l'activité de tous les composés isolés. Ces résultats apportent une contribution significative dans la recherche de sources médicamenteuses alternatives multifonctionnelles. En effet, le stress oxydatif est impliqué dans la physiopathologie de plusieurs maladies par la

peroxydation lipidique (Ahmed et al., 2012). Par conséquent, les antioxydants jouent un rôle bénéfique dans la santé humaine et préviennent des maladies telles que les troubles inflammatoires, le cancer et le diabète. Les résultats obtenus dans cette étude peuvent expliquer en partie l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle au Cameroun pour le traitement la typhoïde, la dysenterie et les troubles pathologiques comme la diarrhée. Il faut également noter que ce fort potentiel antioxydant des extraits, fractions et composés testés renforce l'hypothèse selon laquelle ils agiraient sur les parasites en favorisant la formation des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Ce qui entraîne la mort du parasite par apoptose.

II.5.4. Activités antibactériennes

L'activité antibactérienne a porté spécifiquement sur les bactéries entériques. En effet, les maladies d'origine entériques à l'instar de la typhoïde et la dysenterie augmentent le risque de létalité des patients atteints de leishmaniose viscérale (El Safi et al., 2018). Pour cette raison, nous avons entrepris évaluer le potentiel intrinsèque des parties aériennes de *V. guineensis* à inhiber la croissance de certaines souches bactériennes et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 40.

Tableau 40: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides minimales (MBC) d'extrait brut, de fractions et composés isolés en µg/mL

| Echantillons | <i>E. Coli</i> (ATCC 25922) | | | <i>S. Flexineri</i> (NR 518) | | | <i>S. Muenchen</i> (Isolat clin.) | | | <i>S. Typhimurium</i> (Isolat clin.) | | | <i>S. Typhi</i> (ATCC 19430) | | |
|---------------------------|--------------------------------|------|----|---------------------------------|-----------------|---|--------------------------------------|------|---|---|-----------------|---|---------------------------------|-----------------|---|
| | CMI | CMB | R | CMI | CMB | R | CMI | CMB | R | CMI | CMB | R | CMI | CMB | R |
| Extrait brut | 500 | / | / | 10 ³ | / | / | 500 | / | / | 500 | / | / | 500 | / | / |
| FA2 | 250 | 500 | 2 | 500 | / | / | 500 | / | / | / | / | / | 10 ³ | 10 ³ | 1 |
| FA3 | 125 | 125 | 1 | 250 | 10 ³ | 4 | 250 | 250 | 1 | 10 ³ | 10 ³ | 1 | 10 ³ | 10 ³ | 1 |
| FA4 | 500 | 500 | 1 | 500 | 10 ³ | 2 | 500 | 500 | 1 | 10 ³ | 10 ³ | 1 | / | / | / |
| FA5 | 500 | / | / | / | / | / | 10 ³ | / | / | / | / | / | / | / | / |
| FA6 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| Vernoguiniiflavone | 25 | 100 | 4 | 100 | / | / | 25 | 100 | 2 | 25 | 100 | 4 | 50 | 100 | 2 |
| Bisarachidicester | 50 | 100 | 2 | 100 | / | / | 50 | / | / | 25 | 100 | 4 | 100 | / | / |
| Quercetine | 25 | 100 | 4 | 50 | / | / | 6.25 | 25 | 4 | 25 | 100 | 4 | 50 | 100 | 2 |
| Luteolin | 3.12 | 100 | 32 | 50 | / | / | 6.25 | 25 | 4 | 6.25 | 100 | 1 | 50 | 100 | 2 |
| Vernopicrine | 50 | 50 | 1 | 25 | / | / | 12.5 | 100 | 8 | 50 | / | / | 25 | / | / |
| Vernomelitensin | 25 | 50 | 2 | 25 | / | / | 12.5 | 100 | 8 | 50 | / | / | 25 | / | / |
| Acide ursolique | 50 | 100 | 2 | 25 | 100 | 4 | 12.5 | 25 | 2 | 100 | 100 | 1 | 50 | 100 | 2 |
| 13-cis-β-carotene | 12.5 | 25 | 2 | 25 | 100 | 4 | 25 | 50 | 2 | 12.5 | 12.5 | 1 | 25 | / | / |
| Docosan-1-ol | 50 | 50 | 1 | 100 | / | / | 50 | 50 | 1 | 25 | / | / | / | / | / |
| Tritriacontan-1-ol | 50 | 100 | 2 | 100 | / | / | 50 | 100 | 2 | 25 | 100 | 4 | / | / | / |
| Ciprofloxacine* | 1.56 | 1.56 | 1 | 1.56 | 1.56 | 1 | 1.56 | 1.56 | 1 | 1.56 | 1.56 | 1 | 1.56 | 1.56 | 1 |

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice (µg/ml), CMB: Concentration Minimale Bactéricide (µg/ml). /: Non déterminée, R=CMB/CMI, R<4 (Effet bactéricide), R > 4 (Effet bactériostatique, *Control positif, = flavonoïdes = témoin positif


Ainsi, l'extrait brut E3, ses fractions et certains composés isolés ont été évalués pour leur activité antibactérienne contre les bactéries à Gram négatif incluent des souches de référence telles qu'*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella flexneri* (NR 518), *Salmonella typhi* (ATCC 19430) et des isolats cliniques tels que *Salmonella muenchen*, *Salmonella typhimurium*. Les résultats obtenus dans le tableau 40 indique que, l'extrait brut a démontré une activité modérée sur les souches testées avec des valeurs CMI allant de 500 à 1000 µg/mL, tandis que les fractions évaluées (F2–F6) ont montré différents niveaux d'activité antibactérienne ($125 \leq \text{CMI} \leq 1000$ µg/mL) et la valeur la plus basse a été observée pour la fraction F3 sur *E. coli* (tableau 40). Dans la littérature, plusieurs échelles ont été utilisées pour classer les activités antibactériennes des substances naturelles. Dans cette étude, nous avons utilisé l'échelle élaborée par Kuete (2010), qui définit l'activité d'un composé comme significatif si la CMI est inférieure à 10 µg/mL, modérée si la CMI est comprise entre 10 µg/ml et 100 µg/mL, faible si la CMI est comprise entre 100 et 250 µg/mL et non actif si la CMI est supérieure à 250 µg/mL. Par conséquent, la quercétine (**3**) a démontré une activité antibactérienne significative sur *S. muenchen* (CMI=6,25 µg/mL) et de la lutéoline (**14**) sur *E. coli*, *S. muenchen* et *S. typhimurium* avec des valeurs CMI de 3,12, 6,25 et 6,25 µg/mL, respectivement. Les autres composés évalués, y compris la vernoguinoïflavone (**80**), ont exhibé des activités modérées contre les souches bactériennes testées (tableau 40). Dans cette étude, les flavonoïdes (**11**, **14** et **80**) ont été étaient isolés de la fraction la plus active et leurs potentiels bactéricides (CMB/CMI \leq 4) observés est en accord avec données précédemment rapportées dans la littérature (Joung et al., 2016, Pistelli et al., 2005). En plus, plusieurs auteurs ont démontré l'efficacité antibactérienne des flavonoïdes naturels qui corrobore avec les présents résultats (Woźnicka et al., 2013, Brahmachari et al., 2011). Bien que la quercétine (**11**) et la lutéoline (**14**) ont été évaluées contre *E. coli*, *S. flexneri* et *S. typhimurium* (Hirudkar et al., 2020, Lee et al., 2010), nous évaluons dans cette thèse leurs activités antibactériennes contre *S. muenchen* et *S. typhi* pour la première fois. Dans une étude comparative, Woźnicka et al. (2013) a montré que le la présence de deux groupes hydroxyles sur le cycle B augmente l'activité par rapport aux analogues mono-hydroxylés. Cela pourrait justifier la variation d'activités observée entre les flavonoïdes isolés. L'activité antibactérienne des composés (**80**), (**81**), (**52**) et (**53**) est rapportée ici pour la première fois et apporte une contribution significative à la recherche des substances bioactives.

Les échantillons issus des racines de *V. guineensis* ont également été évalués pour leur activité antibactérienne afin de valider ou infirmer l'usage de ces racines en médecine traditionnelle pour soigner la typhoïde et la dysenterie. Ainsi, les extraits, fractions et

composés isolés ont été testés pour leur activité antibactérienne contre les trois souches de bactéries entériques à notre disposition, à savoir, *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enterica* (NR4294), *Shigella flexneri* (NR518) en utilisant la méthode de micro-dilution en bouillon telle que rapportée par Balouiri et al. (2016). Les concentrations testées variaient entre 7,8 et 500 µg/mL pour les composés et 31,2–2000 µg/mL pour le brut extrait et fractions. La ciprofloxacine a été utilisée comme témoin positif à la concentration de 7,8 µg/mL. Les résultats sont consignés dans le tableau 41.

Tableau 41: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides minimales (CMB) d'extrait brut, de fractions et composés isolés en µg/mL

| Echantillons | CMI (µg/mL) | | |
|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | <i>E. coli</i> (ATCC25922) | <i>S. flexneri</i> (NR518) | <i>S. enterica</i> (NR4294) |
| Extrait brut | > 2000 | 1000 | 2000 |
| Fraction soluble à EtOAc | 500 | 250 | 62,5 |
| Fraction soluble au <i>n</i> -butanol | 2000 | 500 | 500 |
| Vernoguinaïde (73) | > 500 | 125 | 250 |
| Physson (76) | > 500 | > 500 | > 500 |
| Erythroglaucone (77) | 62,5 | 31,2 | 250 |
| Emodine (79) | > 500 | 500 | 500 |
| Hopane (87) | 250 | 500 | > 500 |
| Lupéol (33) | 250 | 250 | > 500 |
| Acide betulinique (89) | > 500 | 500 | 500 |
| Vernoguinoside A (42) | 125 | 125 | > 500 |
| Vernoguinoside (44) | 125 | 125 | 500 |
| Acide tétracosanoïque (91) | 500 | > 500 | 500 |
| Acide tricosanoïque (92) | 500 | > 500 | 500 |
| Ciprofloxacine ^a | 07,8 | 07,8 | 07,8 |

^a Contrôle positif, testé à 7,8 µg/mL,  = Anthraquinones, classe isolée pour la première fois du genre *Vernonia*

Les valeurs de CMI pour les composés purs testés variaient de 31,0 µg/mL à 500 µg/mL selon les micro-organismes testés. Le métabolite le plus actif est une anthraquinone isolée du genre *Vernonia* pour la première fois, l'érythroglaucone (77) contre *E. coli* et *S. flexneri* avec des valeurs de CMI de 62,5 µg/mL et 31 µg/mL respectivement. Le dérivé nouveau de céramide (73) était peu actif contre *Shigella flexneri* et *Salmonella enterica* et inactif contre *E. coli* à la même concentration de 500 µg/mL. Les composés (76), (79) et (89) étaient les composés les moins actifs contre les trois souches de bactéries étudiées. En ce qui concerne l'érythroglaucone (77) le groupement hydroxyle présent dans sa structure en position 5 peut être responsable de son activité antibactérienne, car son analogue structural la phasions (76), qui ne possède pas cet hydroxyle en position 5 c'est révélé être moins actif que l'érythroglaucone (77), voir même inactif contre *E. coli* à 500 µg/mL.

Les propriétés biologiques des céramides, des anthraquinones et stéroïdes ont été mises en évidence pour les maladies infectieuses, le cancer et les troubles fonctionnels

intestinaux (Santos *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2019) et la présence de ces classes de composés dans cette espèce pourrait renforcer l'explication de la valeur médicinale de cette plante et ainsi confirmer son utilisation en médecine traditionnelle.

Notons également que ces résultats renforcent l'idée d'un repositionnement de *V. guineensis* dans le traitement des leishmanioses. Ainsi son potentiel antibactérien, combiné à son action antileishmaniale permettra de réduire efficacement le risque de létalité humaine, lié à la co-infection leishmaniose-typhoïde/dysenterie.

II.6. Formulation de quelques phytomédicaments

A l'issue de ce travail, nous avons réalisé des essais de formulation galéniques. Il s'agit ici des préformulations, car les médicaments obtenus doivent encore subir plusieurs tests, notamment les tests de stabilité, les essais *in vivo* sur les pathologies ciblées et les études thermodynamique et thermocinétique pour rendre compte de la biodisponibilité des principes actifs dans l'organisme. Toutefois, *Vernonia guineensis*, étant utilisée en médecine traditionnelle depuis plus de trois décennies (Duviard, 1969), et en l'état, nos formulations sont consommables et classées dans la catégorie 2 selon le rapport du comité régional d'expert de l'OMS-Afrique (OMS/AFRO) sur la médecine traditionnelle qui a établi une classification en quatre catégories des médicaments à base de plantes (voir section I.3.3). En effet, les phytomédicaments préparés dans ce travail sont issus de la pharmacopée traditionnelle et la plante est couramment utilisée dans la communauté. Ce sont donc des médicaments traditionnels améliorés qui répondent aux caractéristiques suivantes :

- les matières premières entrant dans leurs compositions sont très bien connues ;
- leurs fabrications sont réalisées suivant des méthodes qui garantissent sa standardisation, et sa production à l'échelle semi-industrielle ;
- l'innocuité et l'efficacité sont garanties par l'évidence ethnomédicale d'une longue expérience d'utilisation;
- les principes actifs qui le composent sont des matières premières brutes les principaux groupes chimiques des matières premières sont connus.

Après réévaluation leurs efficacités et innocuités par des essais précliniques, étude stabilité et observations cliniques, nos préformulations pourront passer dans la catégorie 3. En fin, après les études de pharmacodynamiques, de pharmacocinétiques et les essais cliniques randomisés sur les malades, nous pourrions alors aspirer à la formulation des phytomédicaments de catégorie 4, semblable à ceux des médicaments conventionnels, vendus en officine. Dans les lignes suivantes, nous présentons nos différentes préparations.

II.6.1. Lotion dermique et pommades à partir de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux des parties aériennes de *V. guineensis* a été lyophilisé et 100 g de la poudre obtenue a été triturée dans un mortier en porcelaine avec 100 g de glycérine jusqu'à dispersion complète de la poudre. 100 mg d'éthanol distillé a été ajouté par petite portion à cette dispersion puis 700 mL d'eau distillée a été ajouté par intermittence de 100 mL. L'ensemble a été homogénéisé par agitation magnétique et le pH a été ajusté à 5,5 grâce à l'acide benzoïque. La photo ci-dessous donne un aperçu du produit fini que nous avons appelé lotion vernoguïnomicine 10%.

De même une pommade lipophile a été fabriquée à partir de cet extrait lyophilisé en triturant 5 mg de poudre avec 65 mg de vaseline. Nous avons fait dissoudre 15 mg d'acide stéarique, 5 mg d'acide laurique, 9 mL d'eau distillée et 1 mg d'acide benzoïque à de 65°C. Le mélange a été agité à chaud jusqu'à obtention d'une solution homogène. L'ensemble a été refroidi et mélangé à la première pâte par trituration. L'on obtient alors une pommade (figure 140) que nous avons appelé pommade vernoguïnomicine 2%.



Figure 140: Lotion et pommades de *V. guineensis*

II.6.2. Tisane à partir de la drogue pulvérisée des racines de *V. guineensis*

Une Tisane a été proposée à partir de la drogue végétale pulvérisée des racines de *V. guineensis*. Des conditions optimales ont été obtenues après plusieurs essais pour une valeur en eau de 7,3% correspondant à un taux de séchage de 65%.



Figure 141: Tisane de *V. guineensis*

CONCLUSION ET

PERSPECTIVES

Au terme de cette étude qui avait pour but de rechercher les composés bioactifs de *Vernonia guineensis* Benth. et d'élaborer des phytomédicaments standardisés contre les leishmanioses et autres pathologies associées (shigelloses et salmonelloses), les résultats obtenus ont permis de repositionner *V. guineensis* pour le traitement efficace de la leishmaniose viscérale et des comorbidités leishmaniose-typhoïde et leishmaniose-dysenterie. En effet l'investigation chimique des racines et parties aériennes de *V. guineensis* a conduit à l'isolement et la caractérisation de 34 composés, dont 3 dérivés nouveaux. Cinq autres composés appartenant à la classe des sesquiterpènes laconiques précédemment isolés des plantes du genre *Vernonia* ont été détectés par dérégulation UPLC-DAD-MS. Les molécules isolées et décrites sont regroupées comme suit :

- Trois céramides à savoir la vernoguïnamide (**73**), un dérivé nouveau, l'elasticamide (**74**) et la (2S, 3S, 4R)-2-N-[(2'R)-hydroxyhexacosanoyl]-4-hydroxysphinganine (**75**), tous isolés pour la première fois de la famille des Asteraceae.
- Quatre anthraquinones à savoir la physcion (**76**), l'erythroglaucine (**77**), la revandchinone-3 (**78**) et l'emodine (**79**), isolés ici pour la première fois du genre *Vernonia*.
- Trois flavonoïdes, incluant la vernoguïnoflavone (**80**), un dérivé nouveau, la quercétine (**11**) et la luteoline (**14**), tous isolés pour la première fois de l'espèce *V. guineensis*.
- Deux esters dérivés du glycérol isolés pour la première fois de la famille des Asteraceae incluent la bisarachidicester (**81**), un dérivé nouveau et l'heptacosanoate de 2,3-dihydroxypropyl (**82**).
- Deux sesquiterpènes à savoir la vernopicine (**52**) et la vernomelitensine (**53**).
- Six stéroïdes dont la vernoguïnoside A (**42**) et la vernoguïnoside (**44**), qui sont des marqueurs taxonomiques du genre *Vernonia*. La 3-O-β-D-glucoside de β-sitostérol (**83**), la 3-O-β-D-glucoside de stigmastérol (**84**), la stigmastérol (**85**) et la β-sitostérol (**86**) ont également été isolés.
- Six triterpènes à savoir l'acétate de hop-17 (21)-en-3b-yl (**87**), isolée pour la première fois de la famille des Asteraceae, la lupeol (**33**), l'acide betulinique (**88**), la β-amyrin (**36**), l'acide oléanolique (**37**) et l'acide ursolique (**38**).
- Deux caroténoïdes, 13-cis-β-carotène (**89**) et β-carotène (**90**) isolées du genre *Vernonia* pour la première fois.
- Trois alcools et trois acides gras, dont l'acide tetracosanoïque (**91**), l'acide tricosanoïque (**92**) et l'acide pentacosanoïque (**93**), la docosan-1-ol (**94**), la triacontan-1-ol (**95**) et l'heptatriacontan-1-ol (**96**).

Ces métabolites secondaires malgré leurs diversités, sont pour la plupart en Accord avec la

chimiotaxonomie des espèces appartenant à la famille des Astéraceae et plus encore au genre *Vernonia*. L'isolement des anthraquinones actifs sur les *Shigella* et les *Salmonella* permet de confirmer l'usage des racines de cette plante dans le traitement de la typhoïde et de la dysenterie et apporte également une contribution significative à la chimiotaxonomie de ce genre car les anthraquinones n'avaient jamais été isolées au paravent dans le genre *Vernonia*. Ce résultat confirme bien notre hypothèse selon laquelle l'activité biologique contre les shigelles et les salmonelles est due aux métabolites secondaires non encore rapportés dans la littérature du genre *Vernonia*. L'étude des parties aériennes a été réalisée suivant une méthodologie bioguidée par l'activité antileishmaniale. Cependant, d'autres tests biologiques ciblant l'effet des extraits, fractions et composés sur les pathologies associées et le seuil de toxicité ont également été évalués. Ceci inclut l'activité cytotoxique, antioxydante, antibactérienne, et la toxicité aiguë. Il en ressort que l'extrait au CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1) a démontré une activité antileishmaniale prometteuse (CI₅₀= 0,33±0,07µg/mL) presque identique à l'activité de l'Amphotéricine B (CI₅₀= 0,30±0,21µg/mL), aujourd'hui utilisé comme médicament de choix dans le traitement de la leishmaniose viscérale. Plusieurs composés également très actifs ont été isolés (0,68<CI₅₀<15,20 µg/mL), mais la vernopicine a été la plus sélective dans l'essai de cytotoxicité sur les cellules normales. Ayant un indice de sélectivité de 35, elle a exhibé la meilleure activité (CI₅₀= 0,60±0,11µg/mL) avec une différence non significative à celle de l'Amphotéricine B. Les flavonoïdes isolés ont démontré les meilleures activités antioxydantes et antimicrobiennes, renforçant le repositionnement de *Vernonia guineensis* dans le traitement des leishmanioses et pathologies associées à l'instar du stress oxydatif, de la dysenterie basilaire et de la typhoïde confirmant notre deuxième hypothèse. Cette étude encourage donc l'usage de *V. guineensis* en médecine naturelle camerounaise, car outre son potentiel biologique remarquable, la plante s'est révélée non toxique dans un essai de toxicité aiguë. Sur la base de ces résultats, nous avons effectué des préformulations de phytomédicament, dans diverses formes galéniques (pommades, lotion dermique, tisane).

Parvenu à ce niveau, nous pouvons dire que nos objectifs ont été globalement atteints, mais la science étant dynamique, nous entrevoyons parachever la caractérisation des préformulations effectuées, afin d'aboutir aux formules stables de catégorie 4 tout en conservant leurs efficacités. Il s'avère également important de développer des projets visant à approfondir cette étude sur d'autres plantes et sur des modèles « animaux » incluant des essais précliniques et des observations cliniques à base des différentes formules de phytomédicaments développées.

*PARTIE III : MATÉRIELS ET
MÉTODES*

III.1. Généralités

III.1.1. Pesées, évaporation et mesure du point de fusion

Les différentes masses nécessaires ont été mesurées à l'aide des balances de marque « COBOS », modèle « D-6000-SX » et « SARTORIUS WERKER»; type 242; fabrication N° 401088; précision 0,001 et 0,0001 respectivement. Les filtrats issus de l'extraction et les fractions provenant de la colonne de chromatographie ont été successivement concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif de type « HEIDOLPH » connecté à un conduit d'eau du fabricant LAUDA type WKL 230 et une pompe à vide Vacuum brand GMBH/CVC 3000/PC500. Le point de fusion des composés cristallisés isolés a été mesuré à l'aide d'un appareil de marque « MELTING POINT METER » type MPM-H2 ; fabrication N° 0310148.

III.1.2. Chromatographie, mesures spectrométriques et spectroscopiques.

La purification des composés a été faite essentiellement par chromatographie. Nous avons effectué des chromatographies d'adsorption et d'exclusion sur colonnes ouvertes, des chromatographies préparatives sur couches minces. Le gel de silice de granulométrie 70-230 μm et 230-400 μm (Merck) et le gel de Sephadex LH-20 ont été utilisés comme phase stationnaire. Les dimensions des colonnes ont été choisies en fonction de la quantité du mélange à séparer. Les différents solvants utilisés ont été adaptés à la phase stationnaire en fonction de la polarité des composés à séparer. Les chromatographies analytiques sur couches minces ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F254 (Merck, 20 cm \times 20 cm) sur feuilles d'aluminium de 0,2 mm d'épaisseur. Les plaques de verre (5 cm \times 20 cm), (10 cm \times 20 cm) et (20cm \times 20 cm) ont été utilisées pour les chromatographies préparatives. Ces plaques, ont été préparées en utilisant 55 g de silice P/UV254 (Macherey-Nagel et Co.) qui, mélangés à 120 mL d'eau distillée, ont été homogénéisés pendant 15 minutes. 60 mL du gel obtenu sont déposés sous forme d'une couche mince sur une plaque en verre (20 cm \times 20 cm). Les plaques CCM ont été révélées, soit par utilisation de la lumière ultraviolette (254 et 365 nm), soit après pulvérisation à l'aide d'une solution d'acide sulfurique dilué à 50 % suivie d'une calcination à 95°C dans une étuve du type « Advantage-Lab ».

Des spectres de masse haute résolution ont été obtenus avec un spectromètre OTOF (Bruker, Allemagne) équipé d'une source HRESI et d'un détecteur d'absorbance UV-vis. Le spectromètre fonctionnait en mode positif (plage de masse : 100-1500, avec une vitesse de balayage de 1,00 Hz) et un contrôle automatique pour fournir des mesures de masse de haute précision dans un écart de 2 ppm en utilisant le méthanoate de sodium comme calibrant. Les

spectres de masse ont été acquis simultanément en utilisant l'ionisation par électrospray en mode d'ionisation positive et négative. Les paramètres suivants ont été utilisés pour les expériences : tension de pulvérisation de 4,5 kV, température capillaire de 200 °C. L'azote a été utilisé comme gaz de gaine (10 L/min). Le spectromètre a été fixé à un système *UHPLC Ultimate 3000* (Thermo Fisher, USA) équipé d'un détecteur UV de type Diode Array Detector— (DAD). Les traces UV ont été mesurées à 215, 218, 254, 280 et 330 nm et les spectres UV ont été enregistrés entre 190 et 600 nm. Les séparations ont été effectuées en utilisant un gradient Synergi MAX-RP 100A (50x2 mm, taille de particule 2,5 μ) avec un gradient H₂O (+0,1% HCOOH) (A) / acétonitrile (+0,1% HCOOH) (B) (débit 500 μ L / min). Les échantillons ont été analysés en utilisant un programme de gradient comme suit : 95% A isocratique pendant 1,5 min, gradient linéaire à 100% B pendant 6 min, après 100% B isocratique pendant 2 min, le système est revenu à son état initial (90% A) dans les 1 min, et a été équilibré pendant 1 min. Le spectre de masse des différents échantillons analysé a été obtenu soit par infusion directe soit par analyse couplée UHPLC/MS permettant d'avoir des résultats mieux résolus avec évaluation du degré de pureté de l'échantillon analysé.

Les spectres IR ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Bruker à transformateur de Fourier (ATR) sur pastille de KBr. Les positions des bandes d'absorption sont exprimées en cm^{-1} .

Les spectres de RMN 1D et 2D ont été enregistrés sur des spectromètres RMN Bruker de type Bruker ARX 500 ou de type AVANCE DMX 600 (Bruker Corporation, Germany) dans des solvants deutérés. Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en partie par million (ppm) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme étalon interne, et les constantes de couplage (J) sont donnés en Hertz (Hz).

Les solvants de grade analytique ont été utilisés pour les analyses HPLC/MS. Pour le reste des manipulations effectuées, tous les solvants utilisés ont été.

III.1.3. Manipulation microbiologique.

Les échantillons pour tests biologiques ont été stockés et conservés dans un congélateur de marque « LIEBHERR ». Une anse microbiologique communément appelée « loupe stérile » a été utilisée pour les prélèvements des microorganismes ainsi que pour leur transfert dans les différents milieux de culture utilisés; la surface utilisée pour toutes les manipulations des micro-organismes a été assurée par le « Clean-bench » muni d'une lampe UV assurant la stérilisation de la surface de travail, c'est une hotte biologique de type «MSC 1.2», dont l'espace de travail a un volume 1200x780x465 mm; connecté à une bouteille à gaz

au propane/butane 33/35 kg. Les souches microbiennes ont été maintenues à leur température de croissance et à l'abri des contaminations dans un incubateur de type « modell 100-800 ».

L'autoclave de type VB-55, de volume 60 L a servi non seulement à la préparation des milieux de culture, mais aussi pour stériliser tous les matériels utilisés.

III.2. Etude phytochimique de *V. guineensis* Benth.

III.2.1. Les racines de *V. guineensis* Benth.

III.2.1.1. Collecte du matériel

Les racines tubérisées de *V. guineensis* Benth ont été récoltées à Bangangté (coordonnées GPS : Latitude 5° 09'00" N, Longitude 10° 31'00 " E), dans la région de l'Ouest du Cameroun, en octobre 2015. Le matériel végétal a été identifié par M. Victor Nana, et authentifié à l'Herbier National du Cameroun par comparaison avec un spécimen de référence déposé sous le numéro 11133SRF/Cam. Ces racines ont été découpées et séchées à la température du laboratoire à l'abri de la lumière intense.

III.2.1.2. Extraction et Fractionnement

Comme nous l'avons précédemment fait remarquer, les racines de cette plante ont fait l'objet de nombreuses études sous la houlette du professeur Tané de regretté mémoire. Les résultats obtenus ont conduit à un brevet d'invention par [Toyang et al. \(2013\)](#) et à une thèse rédigée et soutenue publiquement par [Donfack \(2014\)](#). Au total, 81 publications y sont recensées sur cette plante en mars 2015. Fort des résultats obtenus par nos prédécesseurs, il était important de repenser la méthode de travail afin de valider nos hypothèses selon lesquels *V. guineensis* Benth contient des nouveaux taxons moléculaires actifs sur les bactéries entériques dans la mesure où cette plante est utilisée en médecine naturelle pour le traitement de la dysenterie, typhoïdes et autres symptômes liés à une infection bactérienne du tractus digestif. Cependant, les résultats de nos prédécesseurs ne rapportent pas l'isolement des composés ayant démontré cette propriété biologique.

De ce fait, nous avons entrepris une extraction hydroéthanolique, car les racines de cette plante sont extraites en médecine naturelle avec du whisky.

En effet, les racines séchées à l'air et finement broyées de *V. guineensis* Benth (3800,0 g) ont été macérées trois fois à température ambiante avec de l'éthanol à 70% (15L x 3). Le solvant a été évaporé sous pression réduite. L'extrait obtenu a été séché sous ventilation à 30°C, conduisant à 300,2 g d'extrait brut sous forme de poudre finement divisée.

200g de cet extrait brut, a été mis en suspension dans l'eau contenant 10% de méthanol et

successivement partitionné par extraction liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt) et du n-butanol (*n*-BuOH) (schéma 17).

L'extrait brut, la fraction soluble dans l'AcOEt, et la fraction soluble dans le *n*-BuOH ont été soumis au test anti bactérien contre *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enterica* (NR4294), et *Shigella flexineri* (NR518), les bactéries responsables de quelques infections entériques. La fraction soluble dans AcOEt ayant démontré la meilleure activité en réalisant une moyenne sur toutes les souches testées, a été sélectionnée pour une étude chimique plus approfondie guidée par l'exploitation des données UPLC-DAD-(HRESI) MS.

Ainsi, 70,5 g de la fraction soluble dans AcOEt, a été soumise à un fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice avec une élution en mode gradient dans le système de solvants, n-hexane–AcOEt suivi du système AcOEt–MeOH. 86 sous-fractions obtenues, ont été combinées sous la base de leur profil CCM en 8 principales fractions indexées de F1–F8 (Schéma 17).

Les Fractions F1–F8 ont été soumises à une analyse UPLC-DAD-(HRESI) MS, afin de cibler les fractions contenant des molécules non rapportées dans la littérature des plantes du genre *Vernonia*. L'analyse des profils UPLC-DAD-(HR-ESI)MS (figure 141), a permis de sélectionner 4 fractions (F2, F3, F5 et F7) pour une étude chimique plus approfondie.

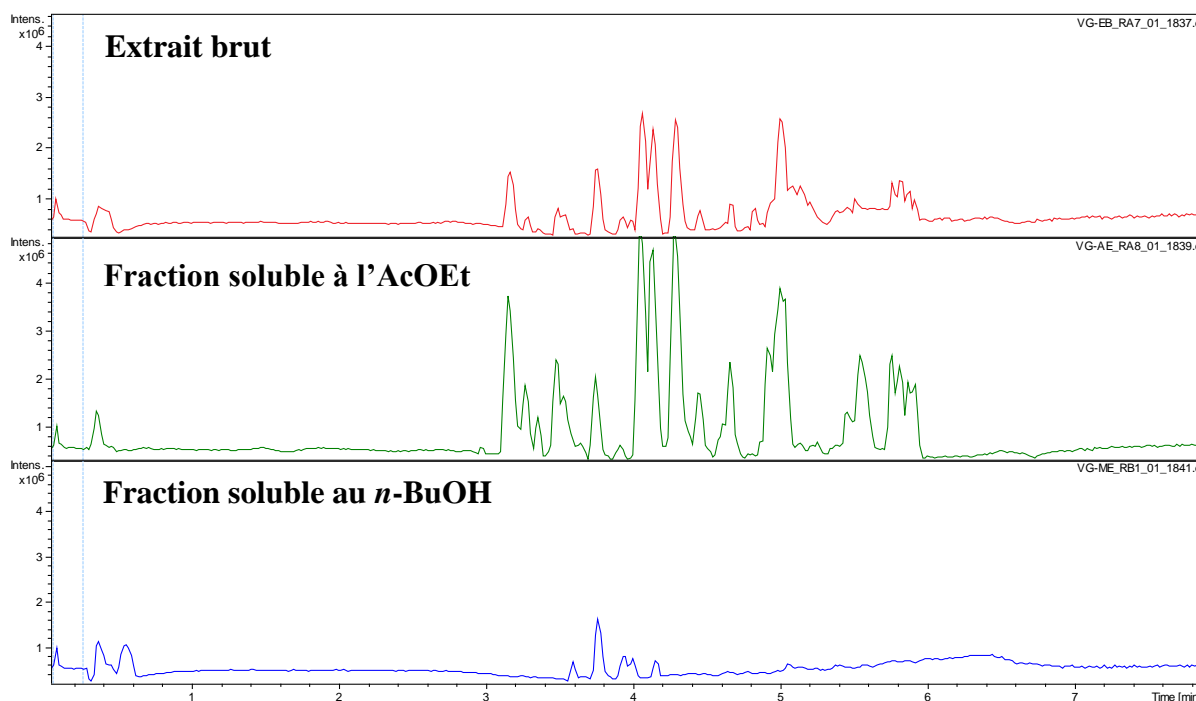


Figure 142: Profils chromatographiques de l'extrait brut et quelques fractions issus des racines de *V. guineensis*.

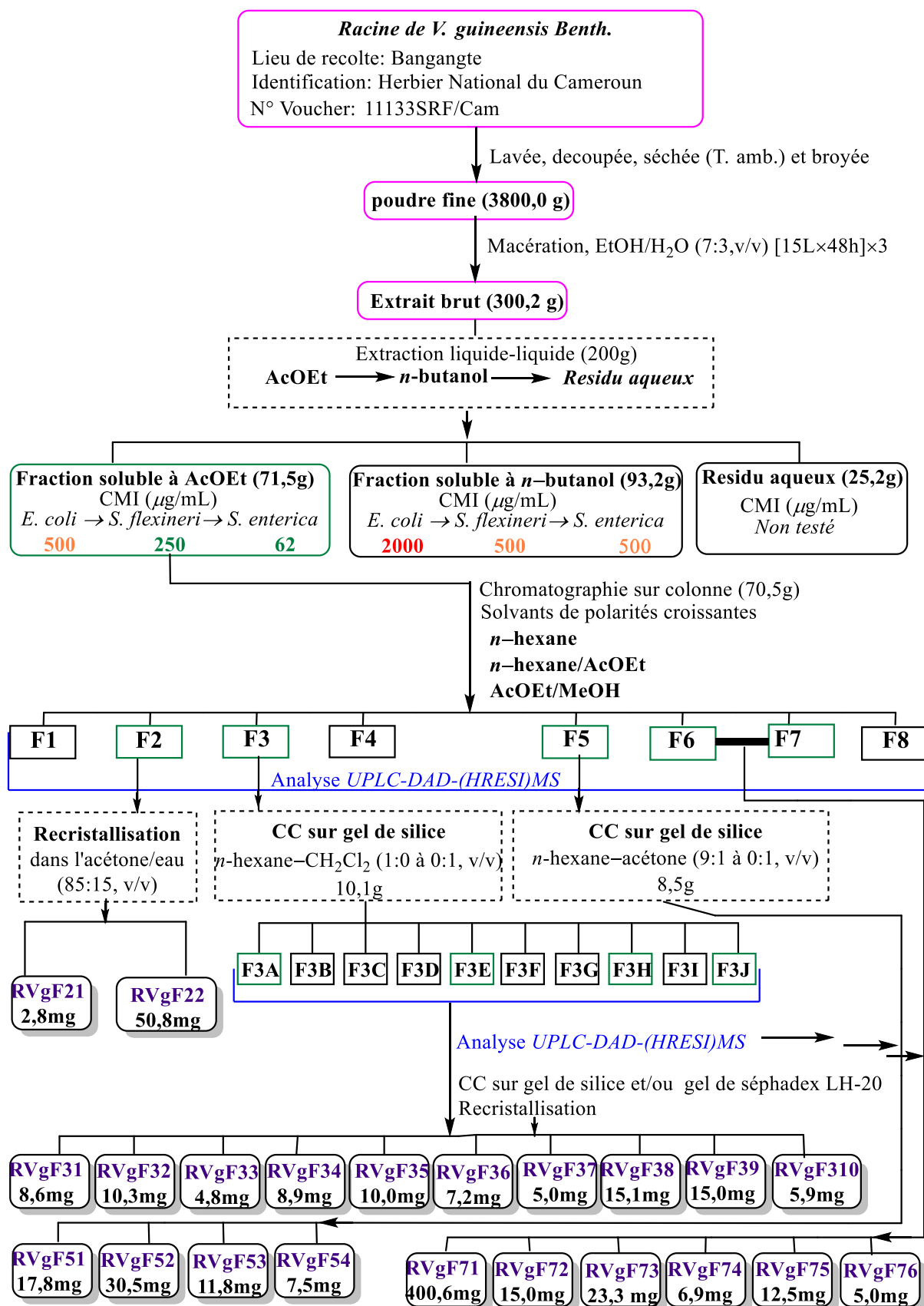


Schéma 17: Protocole d'extraction, fractionnement et isolement des constituants chimiques des racines de *V. guineensis*

III.2.1.3. Purification des fractions F2, F3, F5 et F6/F7

La fraction F2 (*n*-hexane–EtOAc, 95:5) a été recristallisée de manière répétitive dans l'acétone/eau (85 :15, v/v). Le composé **RVgF21** (2,8 mg, lupeol (**33**)) a précipité sous forme de poudre blanche. De même **RVgF22** (50,8 mg), identifié au mélange de stigmastérol (**85**) et de β -sitostérol (**86**) a précipité sous forme aiguillée de couleurs blanches.

La fraction F3 (10,1 g; *n*-hexane–EtOAc, 85:15) a été soumise à une chromatographie adsorption dans une colonne ouverte de gel de silice éluée avec le système de solvants *n*-hexane–CH₂Cl₂ (1:0—0:1, v/v) pour obtenir 10 sous-fractions (F3A– F3J), tous soumises à une analyse UPLC-DAD-(HRESI) MS.

La sous fraction F3A (0,8g) a été étudiée par chromatographie dans une colonne de gel de séphadex LH-20. Cette étude a conduit à l'isolement du composé **RVgF31** (8,6 mg), identique sur CCM à **RVgF21** (lupeol) et **RVgF32** (10,3 mg) identifié au stigmastérol (**85**)

La sous fraction F3E (3,4 g), a subi un traitement par chromatographie répétée sur colonne ouverte de gel de silice avec un système de solvant isocratique constitué du *n*-hexane–AcOEt (95:5) et sur colonne de gel de séphadex LH-20 pour conduire à l'isolement de quatre composés : **RVgF33** (4,8mg), **RVgF34** (8,9 mg), **RVgF35** (10,0mg) et **RVgF36** (7,2 mg) respectivement identifié à la revandchinone-3 (**78**), la physcion (**76**), l'érythroglaucine (**77**), et à l'acétate de hop-17(21)-en-3b-yl (**87**).

La sous-fraction F3H (2,1 g) a été purifiée sur une colonne de sephadex LH-20 élué par le système CH₂Cl₂–MeOH (4:6). Deux composés ont été obtenus **RVgF37** (5,0 mg) et **RVgF38** (15,1 mg) respectivement identifié à l'emodin (**79**) et à l'acide tétracosanoïque (**91**). En utilisant la même procédure, l'étude de la sous-fraction F3J (1,8 g) a conduit à l'isolement de deux les composés **RVgF39** (15,0 mg) et **RVgF310** (5,9 mg) respectivement identifié à l'acide tricosanique (**90**) et la bisarachidicester (**80**).

La fraction F5 (8,5 g, *n*-hexane–AcOEt, 1:1) a été davantage purifiée sur une colonne en éluant avec du *n*-hexane-acétone (9:1 à 0:1, v/v) pour donner 12 sous-fractions (F5A - F5L).

La sous-fraction F5A (2,8 g) a subi à un traitement par chromatographie répétée avec un système de solvant isocratique constitué de *n*-hexane–EtOAc (8:2) pour donner le composé **RVgF51** (17,8 mg) identifié à l'acide betulinique (**88**).

Le composé **RVgF52** (30,5 mg), la vernoguinoside (**44**) a été obtenu sous forme de précipité blanc dans la sous-fraction F5G (1,3 g) puis lavé à l'AcOEt. Le reste a été purifié sur une colonne de séphadex LH-20 éluée par du MeOH pour conduire à l'isolement des composés **RVgF53** (11,8mg) et **RVgF54** (7,5mg) respectivement identifiés à l'elasticamide

(74) et la ((2S, 3S, 4R)-2-N-[(2'R)-hydroxyhexacosanoyl]-4-hydroxysphinganine (75).

Les fraction F6 (8,9 g, *n*-hexane—EtOAc, 3 :7) F7 (18,6 g, EtOAc) ont été combinées et traitées par chromatographie sur colonne de gel de silice et éluées avec AcOEt—MeOH (1:0 à 4:1, v/v) pour donner **RVgF71** (400,6 mg, vernoguinoside A (**42**)), **RVgF72** (15,0 mg, β -sitostérol 3-O- β -D-glucoside (**83**)), **RVgF73** (23,3 mg, stigmastérol 3-O- β -D-glucoside (**84**)), **RVgF74** (6,0 mg, non identifié), **RVgF75** (12,5 mg, vernoguinaamide (**73**), isolé et caractérisé pour la première fois) et **RVgF76** (5,5 mg, non identifié).

III.2.2. Les parties aériennes de *V. guineensis*

III.2.2.1. Collecte du matériel

Les parties aériennes de *V. guineensis* Benth ont été récoltées à Bangangté (coordonnées GPS: Latitude 5° 09'00 " N, Longitude 10° 31'00 " E), dans la région de l'Ouest du Cameroun, en septembre 2018 et traité dans les mêmes conditions que les racines.

III.2.2.2. Extraction et Fractionnement

Malgré les nombreuses vertus thérapeutiques de *V. guineensis*, son usage en médecine, traditionnelle pour le traitement des leishmanioses n'est pas connu. Fort de ce constat, nous avons implémenté une méthodologie visant à rechercher dans un premier temps le système de solvant donnant une meilleure activité antileishmaniale puis rechercher par un fractionnement bioguidé les molécules actives.

Ainsi, les parties aériennes de *V. guineensis* Benth. ont été séchées à l'ombre, réduite en poudre et extraits. 1,2 Kg de poudre séchée, a été distribuée dans 6 vases d'extraction à raison de 200g, puis extrait par infusion aqueuse (H₂O) à environ 85°C pendant 15 min et par macération à température ambiante pendant 72 h avec de l'hexane, de l'AcOEt, le mélange CH₂Cl₂/MeOH (1: 1), le mélange EtOH/H₂O (7: 3) et le mélange CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1) respectivement. Les pourcentages de rendement ont été calculés en se référant à la poudre sèche (200 g) (tableau 13) et les extraits bruts ont été conservés dans des récipients bien fermés dans le réfrigérateur à 4°C pour évaluation ultérieure des activités biologiques. L'extrait le plus actif (extrait obtenu avec le CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1)) sur *L. donovani* a été répété à grande échelle pour une étude chimique plus intensifiée.

De ce fait les parties aériennes de *V. guineensis* Benth pulvérisées (4 Kg) ont été extraites avec le mélange CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (10:9:1) (20 L x 72 h x 3) à température ambiante. Le solvant a été évaporé sous vide pour obtenir 280,2 g d'extrait brut. 250 g de cet extrait ont été soumis à une chromatographie flash sur gel de silice (CC) et élués avec les

systèmes Hex/AcOEt et AcOEt/MeOH en mode gradient pour donner 95 sous-fractions (environ 250 ml chacune) qui ont été combinées en 7 séries (F1–7) en fonction de leurs profils CCM et soumises à l'évaluation de leurs potentiels antileishmanial.

III.2.2.3. Purification des fractions actives

L'amphotéricine B, molécule de référence présente une CI_{50} inférieure à $0,3\mu\text{g/mL}$ dans les trois modèles de *leishmania* (Callahan et al., 1997). Pour l'isolement d'une molécule pure, le seuil du $\mu\text{g/mL}$ est donc un critère d'excellente efficacité. Sans qu'il n'y ait de règle fixe, le rendement de l'isolement d'une molécule active *in vitro* peut avoisiner 1%. Théoriquement, si l'activité d'un extrait était liée à une molécule unique, une CI_{50} inférieure à $30\mu\text{g/mL}$ devrait mener à un composé plus actif que l'amphotericine B. Mais la présence potentielle de plusieurs molécules actives dans un même extrait, et les phénomènes de synergie font qu'il est plus raisonnable de sélectionner des extraits dont la CI_{50} est plus basse. Sur la base des résultats obtenus, combinés aux travaux de Camacho et al. (2003), nous avons établi des critères de sélection suivant l'échelle ci-dessous.

- [CI_{50} : 0—5 $\mu\text{g/mL}$]=Activité prometteuse,
- [CI_{50} : 5—10 $\mu\text{g/mL}$]=Très bonne activité,
- [CI_{50} : 10—25 $\mu\text{g/mL}$]= Bonne activité,
- [CI_{50} : 25—50 $\mu\text{g/mL}$]= Activité modérée,
- [CI_{50} : 50—100 $\mu\text{g/mL}$]= Activité faible,
- [CI_{50} : >100 $\mu\text{g/mL}$]= pas actif.

La purification des fractions suscitées s'est donc préférentiellement effectuée sur les fractions ayant une très bonne activité avec des valeurs de $CI_{50} < 10\mu\text{g/mL}$: F3 (24 g, Hex/AcOEt 7:3–3:2, v/v ; $CI_{50} = 0,78\pm 0,21\mu\text{g/mL}$) et F4 (28 g, Hex/ AcOEt 3:2–1:1, v/v ; $CI_{50} = 0,39\pm 0,08$).

Une partie de F3 (2,3 g) a été soumise à une chromatographie de gel de silice sur colonne ouverte en utilisant une élution en mode gradient de Hex/AcOEt pour donner 8 sous-fractions (F3A–F3H). Chaque sous-fraction a finalement été purifiée par Sephadex LH-20 CC en éluant avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (3:7) pour donner quatre composés respectivement indexés **FVgF31** (23 mg), caractérisés ici pour la première fois et trivialement nommés vernoguino flavone (**80**), **FVgF32** (22 mg) identifié à la quercétine (**11**), **FVgF33** (2,7 mg) identifié à la lutéoline (**14**) et **FVgF34** (3,7 mg) identifié à l'acide ursolique (**38**).

La fraction F4 (25 g) a été étudiée sur colonne ouverte gel de silice avec une élution en mode gradient de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0–1:1, v/v) conduisant à 6 sous-fractions (F4A–F4F). Chaque sous-fraction a été purifiée sur colonne de gel de silice. Deux composés ont été

obtenus : **FVgF41** (35 mg, acide betulinique (**88**)) et **FVgF42** (200 mg, vernopicine (**52**)).

III.2.2.3. Purification des autres fractions

Dans le but d'enrichir la connaissance chimiotaxonomique de la plante, nous avons étendu l'étude chimique aux autres fractions.

La fraction huileuse F1 (20g, Hex/AcOEt 100:1–9:1, v/v), était principalement constituée d'acides gras et n'a pas été étudiée. Toutefois le composé **FVgF11** (5 mg) a été isolé sous forme d'huile rouge orangé pendant le fractionnement par chromatographie flash à l'hexane pure et identifié à la β -carotène (**90**).

La fraction F2 (17,7 g, Hex/AcOEt 9:1–7:3, v/v), a été soumise à une colonne de Sephadex LH-20 et éluée avec CH₂Cl₂/MeOH (3:7) pour donner 5 sous-fractions F2A–F2E qui en outre ont été purifiées par chromatographie sur colonne de gel de silice. Le composé **FVgF21** (17,7 mg, lupeol) a précipité sous forme de paillettes blanches dans la sous-fraction F2A. La sous fraction F2B, éluée avec de l'hexane en mode isocratique a conduit à l'isolement de quatre composés : **FVgF22** (6 mg), isolé et caractérisé ici pour la première fois à qui nous avons attribué le nom de bisarachidicester (**81**) ; **FVgF23** (20 mg) et **FVgF24** (16,8 mg) respectivement identifiés à la tritriacontan-1-ol (**94**) et l'heptatriacontan-1-ol (**95**). La sous-fraction F2C a été traitée de la même façon que F2B et a conduit à l'isolement de **FVgF25** (20 mg, l'heptacosanoate de 2,3-dihydroxypropyl (**82**)) et **FVgF26** (25 mg, 13-*cis*- β -carotène (**89**)). Des sous-fractions F2D et F2E ont respectivement précipité le composé **FVgF27** (4 mg, β -amyrin (**36**)) et le mélange **FVgF28** (30 mg, stigmasterol (**85**) et β -sitosterol (**86**)). La sous-fraction F2E a été purifiée par chromatographie sur gel de silice avec le système Hex/CH₂Cl₂ de polarité croissante pour donner les composés **FVgF29** (22 mg, docosan-1-ol) et **FVgF210** (8 mg, acide pentacosanoïque) qui précipitent sous forme de poudre blanche.

La fraction F5 (18 g, Hex/AcOEt 1:1–0:1, v/v) a été mélangée avec la sous-fraction F4F (4,6 g, Hex/AcOEt 1:4–0:1, v/v) et Chromatographiée sur colonne de gel de silice avec le système CH₂Cl₂/MeOH de polarité croissante pour donner 6 sous-fractions F5A – F5F. Le **FVgF51** a précipité sous forme de mélange avec **FVgF42** dans du F5A. Ce mélange a été traité par CCM préparative pour conduire à **FVgF51** pur (8 mg, vernomelitensine (**53**)). La sous-fraction F5B a été purifiée par chromatographie de gel de silice sur colonne ouverte avec le système CH₂Cl₂/MeOH de polarité croissante, conduisant à l'isolement de deux composés **FVgF52** (5 mg, acide oléanolique (**37**)) et **FVgF53** (8 mg) qui n'a pas encore été identifié.

La fraction F6 (10 g, AcOEt/MeOH 100:0–9:1, v/v), étudiée sur colonne de gel de

silice avec le système AcOEt/MeOH a conduit à l'isolement de **FVgF61** (36,4 mg, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucoside) et à un mélange de composés huileux, s'oxydant rapidement.

La fraction F7 (30 g, AcOEt/MeOH 9:1–0:1, v / v), une fraction très polaire n'a pas été étudiée, car son profil LC/MS a présenté des signaux caractéristiques de tanins et glucosides complexes de polarités très voisines, nécessitant une méthode chromatographique plus évoluée que la chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice.

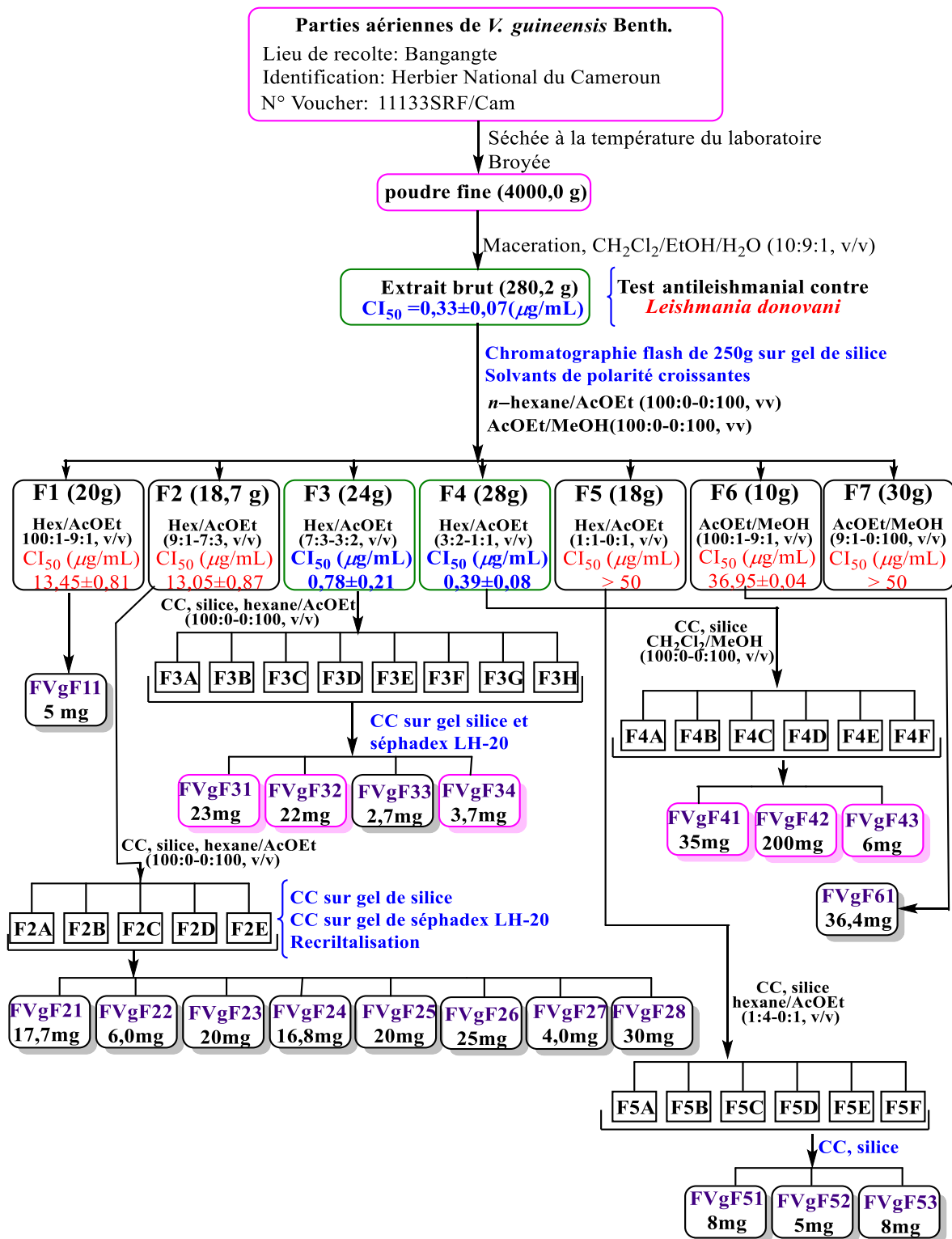


Schéma 18: Protocole d'extraction, fractionnement et isolement des constituants chimiques des parties aériennes de *V. guineensis*

III.2.3. Quelques transformations chimiques des composés isolés de *V. guineensis*

III.2.2.1. Réaction de méthanolyse des céramides

Le composé **RVgF75** (3 mg) a été porté à reflux à 70°C pendant 20h dans 5 mL de méthanol contenant 2 ml d'acide chlorhydrique à 0.9 N sous agitation magnétique. Le milieu réactionnel a été ensuite neutralisé avec une solution aqueuse de sodium carbonate à 0,9 N et extrait au chloroforme. L'analyse ESI-MS par infusion directe de l'extrait chloroformique a permis d'identifier les constituants du mélange comme étant la 2-aminodocosan-1,3,4-triol correspondant à la longue chaîne basique à m/z 396,3(100%) [LCB+Na]⁺ et l'ester méthylique de l'acide 2-hydroxyhenicos-4-énoïque m/z 377,3(25%) [MeO-LCA+Na]⁺.

Cette réaction a été réalisée dans le but de déterminer les longueurs des chaînes acides et basiques des céramides isolées.

III.2.2.2. Réaction d'acétylation—époxydation du composé **RVgF75**

4 mg du composé **RVgF75** a été dissout dans le mélange pyridine/anhydride acétique (2 :3) renfermant 6 équivalents d'anhydride acétique dans un ballon de 50 mL. L'ensemble est ensuite placé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 8 h. Ensuite, 10 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique a été ajoutée au milieu réactionnel, puis agiter pendant 30 min et extrait avec le chloroforme jusqu'à épuisement. La solution chloroformique obtenue contenant le produit d'acétylation a été concentrée sous pression réduite jusqu'à élimination complète du solvant. Le produit formé, se présentant sous forme de pâte blanche a été dissout avec 10 mL de chloroforme et supplémenté d'acide *m*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) [1,5eq]. L'ensemble a ensuite été placé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 3 h. Après agitation, 10 mL d'une solution bicarbonate de sodium (NaHCO₃) [1,5eq] a été ajoutée au mélange et extrait de nouveau avec le chloroforme jusqu'à épuisement. Le Solvant a été évaporé et le produit de réaction, se présentant sous forme de poudre blanche, a été récupéré et soumis à une analyse LC/MS.

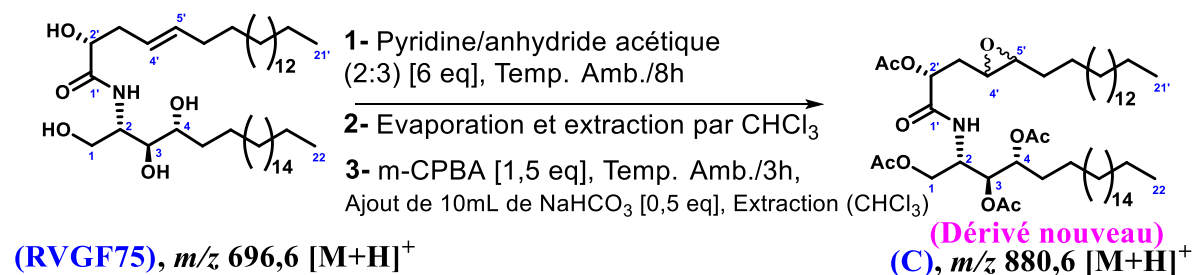


Schéma 19: Réaction d'acétylation—époxydation du composé **RVgF75**

III.2.4. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des composés isolés de *V. guineensis*

III.2.3.1. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des céramides

❖ Vernoguinaamide (RVgF75),

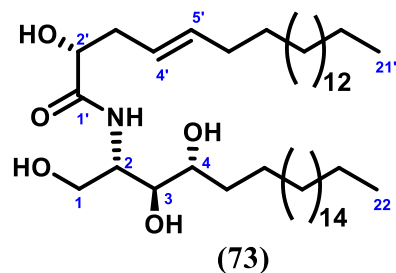
Aspect physique : Poudre amorphe blanche, soluble dans le DMSO

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 696,6502 (calc. 696,6501; $C_{43}H_{86}NO_5$)

UV (MeOH) λ_{max} (nm): 210, 220

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3329, 3219, 1645

RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) dans, $CDCl_3/(CD_3)_2SO$ (Tableau 14)



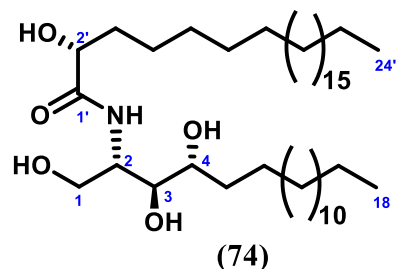
❖ Elasticamide (RVgF53),

Aspect physique : fin cristaux blanc, soluble dans la pyridine

Point de fusion : 120–125°C

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 684,6524 (calc. 684,6501 ; $C_{42}H_{86}NO_5$)

RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) dans, C_5D_5N (Tableau 15)

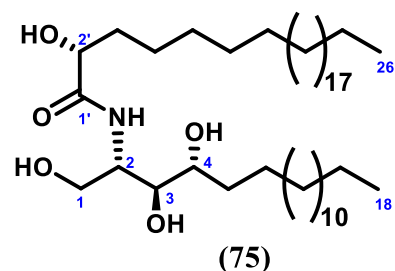


❖ (2S,3S,4R)-2-N-[(2'R)-hydroxyhexacosanoyl]-4-hydroxysphinganine (RVgF54),

Aspect physique : Poudre blanche amorphe, soluble dans la pyridine

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 712,6849 (calc. 712,6816; $C_{44}H_{90}NO_5$)

RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) dans, C_5D_5N (Tableau 16)



III.2.3.2. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des anthraquinones

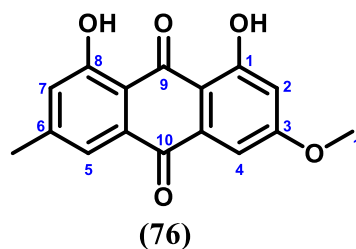
❖ Physcion (RVgF34)

Aspect physique : Poudre cristalline orange, soluble dans le chloroforme.

Point de fusion : 207–210°C

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 285,0756 (calc. 285,0757 ; $C_{16}H_{13}O_5$)

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans le $CDCl_3$: (Tableau 17)



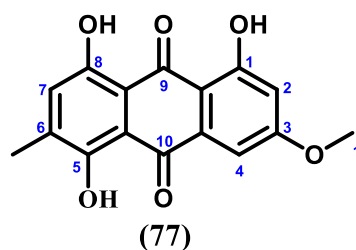
❖ Erythroglaucin (RVgF35)

Aspect physique : Aiguille jaune-orangé soluble dans le chloroforme

Point de fusion : 203–206°C

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 301,0714 (calc. 301,0707 ; $C_{16}H_{13}O_6$)

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans, le $CDCl_3$ (Tableau 18)



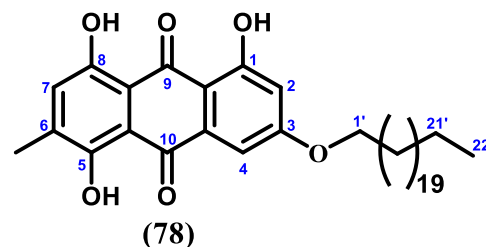
❖ Revandchinone-3 (RVgF33)

Aspect physique : Aiguille jaune soluble dans le DMSO

Point de fusion : 219–222°C

HRESIMS $[M+Na]^+$: m/z 617,3806 (calc. 617,3813 ; $C_{37}H_{54}O_6Na$)

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans le DMSO (Tableau 19)

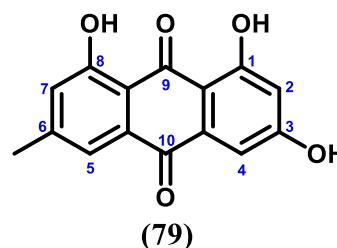


❖ Emodin (RVgF37),

Aspect physique : Poudre cristalline jaune rougeâtre soluble dans le méthanol Point de fusion : 253–256°C

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 271,0606 (calc. 271,0601 ; $C_{15}H_{11}O_5$)

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans le CD_3OD



III.2.3.3. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des flavonoïdes

❖ Vernoguinoïdine (FVgF31),

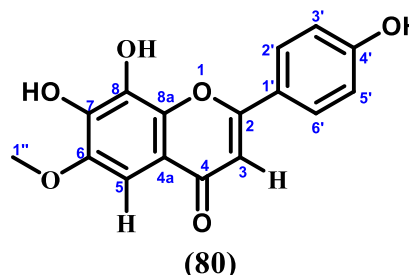
Aspect physique : Poudre amorphe jaune soluble dans le méthanol

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 301,0705 (calc. 301,0707 ; $C_{16}H_{13}O_6$)

UV (MeOH) λ_{max} (nm): 335, 282, 206

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3019, 2208, 1658

RMN 1H (600MHz) et **^{13}C** (150 MHz) dans, le CD_3OD (Tableau 21)



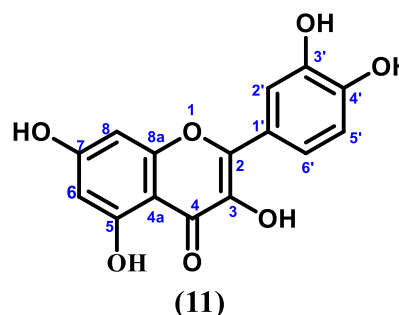
❖ Quercétine (FVgF32),

Aspect physique : Cristaux jaune solubles dans l'acétone

Point de fusion : 315–317°C

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 303,0498 (calc. 303,0499 ; $C_{15}H_{11}O_7$)

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans, $CDCl_3/CD_3OD$ (Tableau 22)

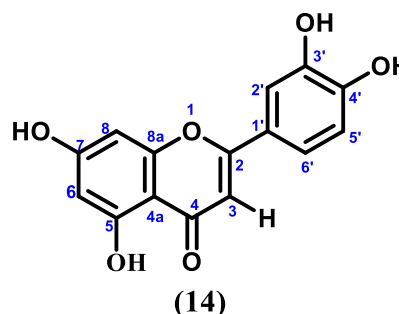


❖ Luteoline (FVgF33),

Aspect physique : Poudre amorphe jaune, soluble dans l'acétone

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 287,0551 (calc. 287,0550; $C_{15}H_{11}NO_5$)

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans le $CDCl_3$ (Tableau 23)



III.2.3.4. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des esters de glycérol

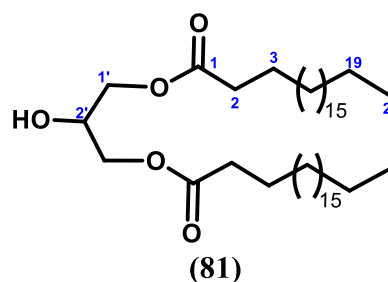
❖ Bisarachidicéster (FVgF22),

Aspect physique : Poudre blanche, soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+Cl]^-$: m/z 715,6055 (calc. 715,6013; $C_{43}H_{84}O_5Cl$)

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3221, 1615

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans le $CDCl_3$ (Tableau 24)

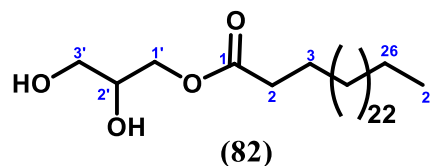


❖ **Heptacosanoate de 2,3-dihydroxypropyle (FVgF25),**

Aspect physique : poudre amorphe blanche, soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 485,4587 (calc. 485,4564; $C_{30}H_{61}O_4$)

RMN 1H (600MHz) et **^{13}C** (150 MHz) dans, $CDCl_3$ (Tableau 25)



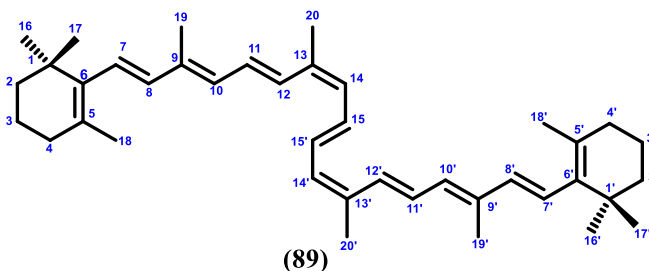
III.2.3.5. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des caroténoïdes

❖ **13-cis- β -carotène (FVgF26),**

Aspect physique : Poudre amorphe rouge orangée, soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 537,4472, (calc. 537,4455; $C_{40}H_{57}$)

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans le $CDCl_3$ (Tableau 26)

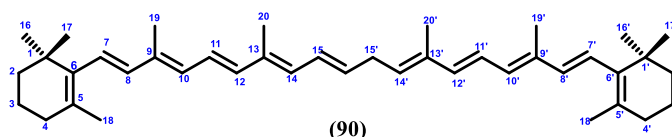


❖ **β -carotène (FVgF11),**

Aspect physique : Poudre amorphe rouge orangée, soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 537,4458, (calc. 537,4455 ; $C_{40}H_{57}$)

RMN 1H (500 MHz) dans le $CDCl_3$ (Tableau 26)



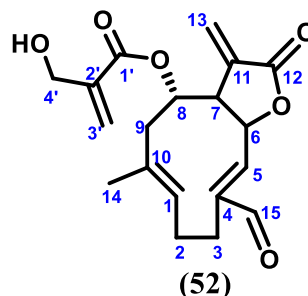
III.2.3.6. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des sesquiterpénoïdes

❖ **Vernopicine (FVgF42),**

Aspect physique : Fine poudre cristalline blanche, soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+Na]^+$: m/z 369,1291 (calc. 369,1309; 369,1309)

RMN 1H (500 MHz) et **^{13}C** (125 MHz) dans, $CDCl_3$ (Tableau 27)

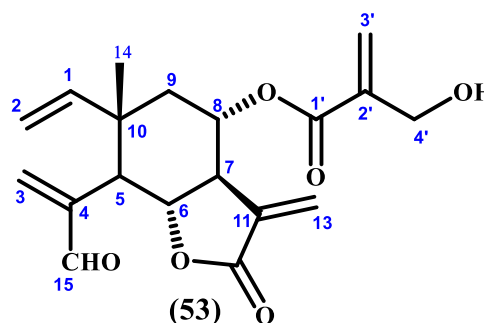


❖ Vernomelitensine (FVgF51),

Aspect physique : Fine poudre cristalline blanche, soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+Na]^+$: m/z 369,1301 (calc. 369,1309; 369,1309)

RMN 1H (500 MHz) (tableau 27)



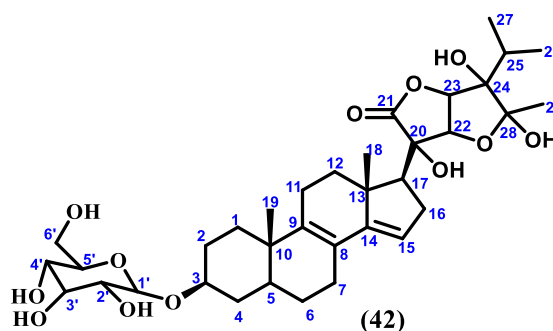
III.2.3.7. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des stéroïdes

❖ Vernoguinoside A (RVgF71),

Aspect physique : Poudre beige, soluble dans le DMSO

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 665,3541 (calc. 665,3532; $C_{35}H_{53}O_{12}$)

RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) dans le $(CD_3)_2SO$ (Tableau 28)



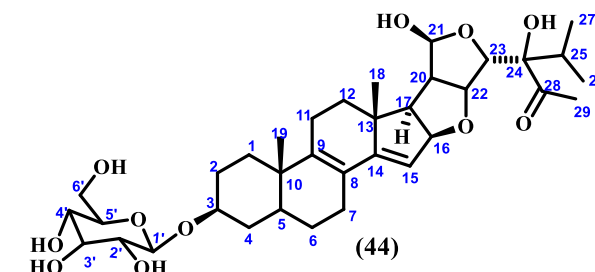
❖ Vernoguinoside (RVgF52),

Aspect physique : Poudre cristalline jaune. Soluble dans le méthanol

Point de fusion : 183–186°C

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 649,3598 (calc. 649,3582; $C_{35}H_{53}O_{12}$)

RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) dans le CD_3OD (Tableau 29)

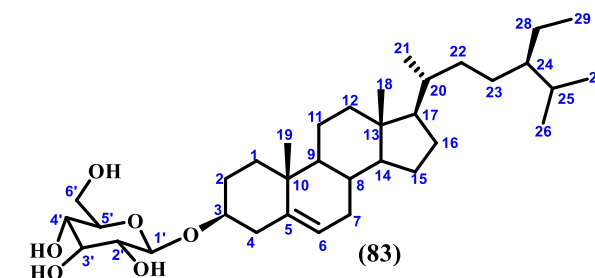


❖ 3-O-D-glucopyranoside de β -sitostérol (FVg61),

Aspect physique : Poudre blanche soluble dans la pyridine

RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N) (Tableau 30)

RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) (Figure 91)

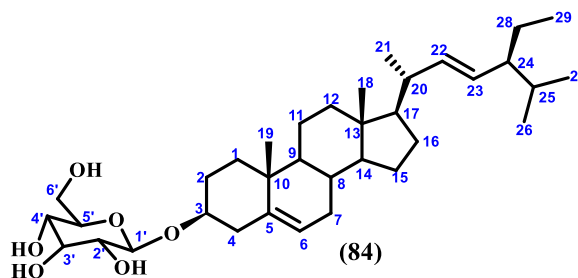


❖ **3-O-β-D-glucopyranoside de stigmastérol (RVgF73),**

Aspect physique : Poudre blanche soluble dans la pyridine

HRESIMS [M+Na]⁺: *m/z* 597,4121 (calc. 597,4126; C₃₅H₅₈NaO₆)

RMN ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO) Tableau 30

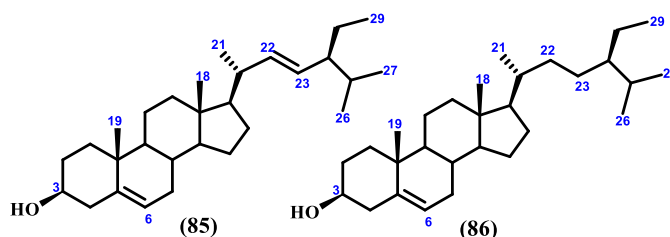


❖ **Mélange de β-sitostérol (86) et de stigmastérol (85) (RVgF22),**

Aspect physique : Aiguilles blanches solubles dans le chloroforme,
Point de fusion : 122–126°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) (figure 96)

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) (figure 97)



III.2.3.8. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des triterpénoïdes

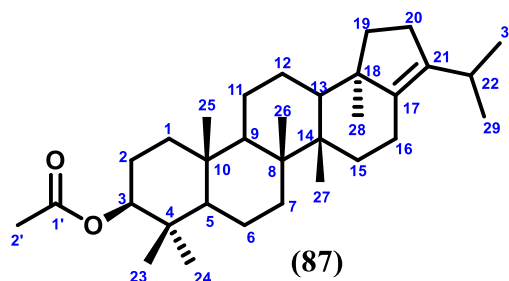
❖ **Acétate de hop-17(21)-en-3β-yl (RVgF36),**

Aspect physique : Fines aiguilles blanches, soluble dans le chloroforme

Point de fusion : 263–266°C

HRESIMS [M+Na]⁺: *m/z* 469,3994 (calc. 469,4040 ; C₃₂H₅₂O₂Na)

RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) dans, CDCl₃ (Tableau 31)

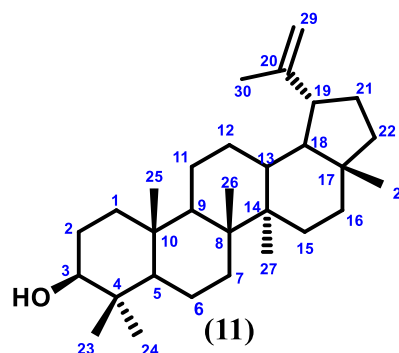


❖ **Lup20(29)-en-3-ol (RVgF21),**

Aspect physique : Poudre blanche, soluble dans le chloroforme

HRESIMS [M+Na]⁺: *m/z* 449,3797 (calc. 449,3754 ; C₃₀H₅₀ONa)

RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125MHz) dans, CDCl₃ (Tableau 32)

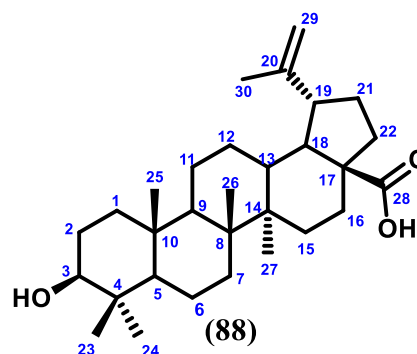


❖ **Acide 3β-hydroxylup-20(29)-enoïque (FVgF41),**

Aspect physique : Poudre blanche amorphe,
soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+Na]^+$: m/z 479,3497 (calc.
479,3496 ; $C_{30}H_{48}O_3Na$)

RMN 1H (500MHz) et ^{13}C (125MHz) dans le
 $CDCl_3$ (Tableau 33)

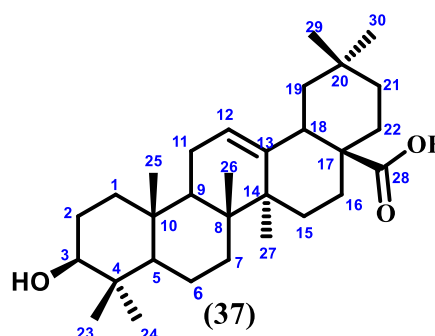


❖ **Acide oléanolique (FVgF52 ou FVgF43),**

Aspect physique : Poudre blanche et est
soluble dans la pyridine

HRESIMS $[M-H]^-$: m/z 455,3530 (calc.
455,3531 ; $C_{30}H_{47}O_3$)

RMN 1H (500MHz) et ^{13}C (125MHz) dans la
 C_5D_5N (Tableau 34)

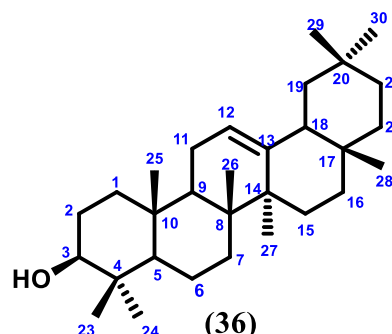


❖ **β-amyrin (FVgF27),**

Aspect physique : Poudre blanche, soluble
dans le chloroforme

HRESIMS $[M+Na]^+$: m/z 449,3757 (calc.
449,3754 ; $C_{30}H_{50}ONa$)

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) (figure 114)

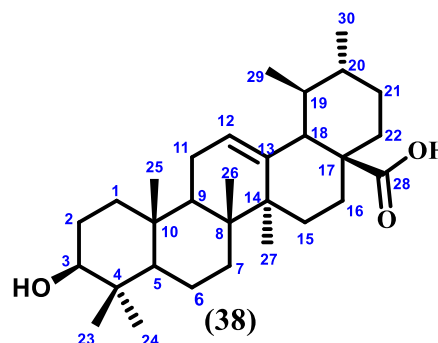


❖ **Acide ursolique(FVgF34),**

Aspect physique : Poudre blanche amorphe,
soluble dans la pyridine

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 457,3673 (calc.
457,3681 ; $C_{30}H_{49}O_3$)

RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) dans,
 C_5D_5N (Tableau 35)



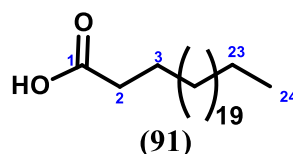
III.2.3.9. Caractéristiques physiques et spectroscopiques des alcools et acides gras

❖ Acide tetracosanoïque (RVgF38),

Aspect physique : Poudre blanche, soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+Na]^+$: m/z 391,3563 (calc. 391,3547 ; $C_{24}H_{48}O_2Na$)

RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N) et ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) (tableau 36)



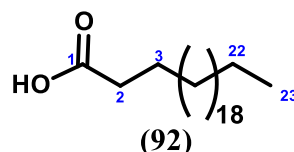
❖ Acide tricosanoïque (RVgF39),

Aspect physique : Poudre amorphe blanche soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+Na]^+$: m/z 377,3376 (calc. 377,3390 ; $C_{23}H_{46}O_2Na$)

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$)

δ_H 0,81 (t, $J=6,9$; H-23), 1,21 (sl, $21CH_2$), 2,28 (t, $J=7,5$, H-2)



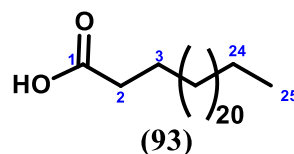
❖ Acide pentacosanoïque (FVgF210),

Aspect physique : Poudre amorphe blanche soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[2M+Na]^+$: m/z 787,7515 (calc. 787,7514; $C_{50}H_{100}O_4Na$)

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$)

δ_H 0,81 (t, $J=6,9$; H-23), 1,18—1,26 (sl, $23CH_2$), 2,28 (t, $J=7,5$, H-2)



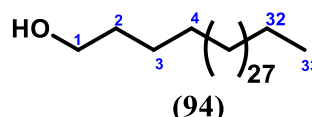
❖ Tritriacontan-1-ol (FVgF23),

Aspect physique : Poudre blanche, soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 481,5320 (calc. 481,5348 ; $C_{33}H_{69}O$)

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) et ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$)

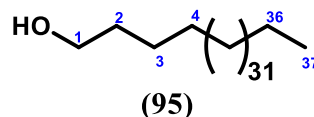
δ_H 0,81 (t, $J=6,9$, 3H)/ δ_C 14,1 (C-33), δ_H 1,18—1,29 (dl, 58H)/ δ_C 22,6-31,9 (C-3—C-32), δ_H 1,52(dt, $J=14,4$; 6,6, 2H)/ δ_C 32,8 (C-2) ; δ_H 3,57(t, $J=6,6$, 2H)/ δ_C 63,1 (C-1),



❖ Heptatriacontan-1-ol (FVgF24),

Aspect physique : Poudre amorphe blanche soluble dans le chloroforme

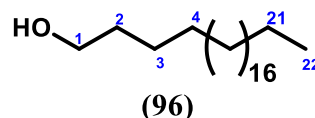
HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 537,5988 (calc. 537,5974 ; $C_{37}H_{77}O$)



❖ Docosan-1-ol (FVgF29),

Aspect physique : Poudre amorphe blanche soluble dans le chloroforme

HRESIMS $[M+H]^+$: m/z 327,3681 (calc. 327,3627 ; $C_{22}H_{47}O$)



III.3. Etude pharmacologique de *V. guineensis* Benth.

III.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne.

III.3.1.1. Microorganismes et milieux de cultures

Les extraits bruts, les fractions et les composés isolés ont été testés pour leur activité antibactérienne contre certaines souches de bactéries entériques. Les souches de références utilisées ont été obtenues auprès de *BEI Resources* (<https://www.beiresources.org/>) tandis que les isolats cliniques ont été obtenus au «Centre Pasteur» du Cameroun. Ces bactéries comprenaient *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella flexneri* (NR 518), *Salmonella muenchen*, *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* (ATCC 19430). Tous les milieux de culture utilisés (*Shigella* Agar (SS, Biolab Zrt), Mueller Hinton Broth (MHB, Conda), Nutrien Agar (NA)) ont été préparés selon la méthode décrite par le fabricant. Chaque bactérie a d'abord été inoculée sur le milieu (SS, Biolab Zrt), un milieu sélectif et différentiel pour l'isolement de micro-organismes entériques à Gram négatif en particulier *Salmonella Spp.* et certains *Shigella spp* incluant *Shigella flexneri*. Le test lui-même a été effectué en utilisant la méthode de microdilution sur microplaques à 96 puits dans le Muller Hinton Broth (MHB, Conda) au «laboratoire de substances naturelles d'origine végétales et fongiques» de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé 1.

III.3.1.2. Détermination des CMI et CMB

La CMI est la plus petite concentration de l'échantillon testé qui inhibe la croissance des bactéries. La CMI de chaque échantillon a été déterminée en utilisant la méthode de microdilution comme décrite par le «*Clinical and Laboratory Standard Institute*»; ligne M7-A10 (CLSI, 2015). En bref, les solutions Stocks d'extraits bruts et fractions ont été solubilisées dans du DMSO (Sigma Aldrich) à une concentration 100 mg/mL tandis que les solutions stocks des composés purs isolés étaient préparées à 10 mg/mL et conservées à 4°C. À partir des différentes solutions intermédiaires, nous avons effectué une série arithmétique de microdilution de raison 0,5 dans le milieu de culture. La plage de concentrations finales testées pour les extraits bruts et les fractions, variaient entre 2000–7,81 µg/mL. Concernant les composés purs, les concentrations finales testées variaient d'une part, entre 500–7,81 µg/mL pour des composés issus des fractions ayant des valeurs de CMI=500 µg/mL et d'autre part entre 100–1,56 µg/mL pour les composés issus des fractions ayant des valeurs de CMI<500 µg/mL. La concentration finale en DMSO dans chaque cupule était inférieure à 0,5 %. La ciprofloxacine a été utilisée comme témoin positif à la concentration

finale de 1,56 µg/mL tandis que le contrôle de stérilité et le contrôle négatif ont été respectivement assurés par des cupules contenant uniquement le milieu de culture (MHB) et des cupules contenant l'inoculum bactérien dans le milieu de culture traité avec le DMSO de manière à avoir une concentration finale de 0,5 % en DMSO. La charge de bactéries dans chaque puits de la microplaque a été fixée à 10⁶ UFC/mL. En effet, 100 µL de l'inoculum bactérien (calibré à 2x10⁶ CFU/mL par une solution de McFarland 0,5) ont été introduits dans chaque puits contenant déjà 100 µL de l'échantillon à tester à une concentration correspondant au double de la concentration désirée. Le volume final dans chaque puits était de 200 µL et tous les tests ont été effectués en trois fois dans des conditions stériles sous une hotte microbiologique et les valeurs mesurées correspondent à la moyenne des trois tests. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. À la fin de cette période, 20 µL de solution aqueuse de résazurine à 0,015 % (Sigma Aldrich) ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été incubées pendant 30 minutes supplémentaires. La résazurine est un indicateur coloré bleu faiblement fluorescent qui est réduit en un complexe rose de résorufine en présence de l'enzyme NADPH déshydrogénase ou NADH déshydrogénase, présente chez les cellules bactériennes en quantité dépendant du niveau de croissance microbienne. Ainsi, après ces 30 min d'incubation, les cupules qui restent bleues traduisent l'absence de croissance bactérienne et ceux virent au rose indiquent une croissance bactérienne. La concentration la plus faible qui n'induit aucun virement de coloration (reste bleu) a été considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La CMI ne renseigne pas sur l'action réelle de l'échantillon testé. Ainsi, pour évaluer l'effet bactéricide ou bactériostatique, la CMB a été mesurée. Elle correspond à la plus petite concentration qui entraîne la mort du microbe. Ainsi, la CMB des échantillons dont la CMI a pu être caractérisée a été déterminée en inoculant (repiquage) sur un nouveau milieu SS, le contenu des puits sans croissance visuelle. L'ensemble a été incubé à 37°C pendant une période de 20 heures. La concentration la plus faible sans croissance sur le milieu solide a été considérée comme la concentration minimale bactéricide (CMB).

III.3.2. Evaluation de l'activité antileishmaniale.

III.3.2.1. Culture et entretien des parasite

La forme promastigote cryoconservée de *Leishmania donovani* (1S (MHOM / SD / 62 / 1S) a été obtenue auprès de *BEI Resources* (<https://www.beiresources.org/>) et est régulièrement cultivée dans le milieu M-199,10%HIFBS (milieu M199 modifié), au laboratoire de Phytobiochimie et étude des Plantes Médicinales de la Faculté des Sciences de

l'Université de Yaoundé 1. Les cultures sont maintenues dans les flacons de cultures de 25 cm² puis incubés pendant 72 heures à 28°C. La croissance est vérifiée après six jours de la première culture, la détermination de la concentration parasitaire se fait par comptage sur cellules de Neubauer en vue de la réalisation du test d'activité antileishmaniale. Ce test est effectué sur les promastigotes en phase exponentielle.

III.3.2.2. Préparation du milieu de culture (M-199, 10% HIFBS)

Le milieu de culture M-199, 10% HIFBS, idéale pour la croissance optimale des promastigotes de *Leishmania donovani* a été préparé selon les instructions du fabricant. Dans une bouteille d'un litre en verre stérile, les constituants suivants seront progressivement introduits :

- 445 mL de M-199 ;
- 5 mL d'antibiotique Pénicilline/Streptomycine, concentré chacun à 100 µg/mL ;
- 50 mL de fœtal bovin inactivé par la chaleur au bain-marie à 56°C pendant 30 minutes (HIFBS)

Le mélange a été bien homogénéisé puis stérilisé à l'aide d'un filtre de 0,22 µm et conservé à 4°C pour usage ultérieure.

III.3.2.3. Préparation des échantillons à tester

Les solutions stocks d'extrait ont été préparé à 100 mg/mL dans le DMSO 100% pour les extrait et fractions et à 10 mg/mL pour les composés. Chaque préparation a été stérilisée à l'aide d'une seringue de 0,22µm puis conservé à 4°C pour usage ultérieure. Afin d'avoir une concentration finale inférieure à 1% en DMSO, concentration à laquelle le DMSO n'est pas toxique et ne modifie pas la croissance parasitaire, les plaques intermédiaires ont été préparées à la concentration de 1mg/ml pour les extraits et fractions et à 0,5mg/mL pour les composés. Pour cela, 198 µL de milieu M199 ont été introduits d'une part dans les puits A1 à H1, puis A7 à H7 d'une microplaque de 96puits. D'autre part 160 µL de ce milieu ont été introduits dans les puits restants ; ensuite, 2 µl de la solution stock de chaque extrait ont été introduits dans les puits A1-H1 puis de A7 à H7. Une série de 5 dilutions géométriques d'ordre 5 a été effectuée de la colonne 1 à la colonne 5 de même que de la colonne 7 à la colonne 11. Les concentrations d'extraits et fraction dans les puits variaient donc de 1000µg/mL à 1,6 µg/mL tandis que ceux des composés variaient donc de 500µg/mL à 0,8 µg/mL. La colonne 6 ne contenant que le milieu de culture a servi au contrôle de la stérilité du milieu de culture utilisé. Les plaques ont été scellées puis conservées à 4°C pour usage ultérieur.

III.3.2.3. Détermination l'activité antileishmaniale par un essai inhibiteur contre les promastigotes de *L. donovani*

L'activité antileishmaniale des extraits bruts, fractions et composés isolés de *V. guineensis* contre les promastigotes de *L. donovani* cultivés a été évaluée en utilisant le dosage colorimétrique à la résazurine tel que décrit par [Siqueira-Neto et al., \(2010\)](#). À cet effet, 4×10^5 promastigotes/mL/puits ont étéensemencés dans une plaque de microtitrage à 96 puits et traités avec des concentrations d'échantillons à tester pendant 72 h à 28 ° C. Le taux de viabilité des promastigotes était positivement corrélé avec la quantité de résorufine rose produite par la réduction de la résazurine bleue par l'enzyme déshydrogénase dans la membrane mitochondriale interne des parasites vivants. En bref, les promastigotes d'une culture en phase exponentielle (4×10^5 cellules/mL ; 90µl/puit) ont étéensemencés dans des plaques de microtitrage à 96 puits et ont été traités en supplémentant 10 µl de l'échantillon à tester à différentes concentrations. Les concentrations finales testées variaient de 100–1,6 µg/ml pour les extraits et les fractions puis de 50–0,08 µg/ml pour les composés purs. Toutes les expériences sont répétées trois fois.

Les plaques ont été incubées pendant 28 heures à 28°C, suivies de l'addition de 1mg/ml de résazurine. Les contrôles négatifs et positifs étaient respectivement 0,1% de DMSO et amphotéricine B (10–0,016 µg/ml). Après une incubation supplémentaire de 44 heures, les plaques ont ensuite été lues sur un lecteur de plaques à puits multiples à fluorescence Magellan Infinite M200 (Tecan) à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. Pour chaque échantillon.

Les pourcentages de croissance ont été calculés par la formule ci-dessous et les courbes dose-réponse ont été construites pour déterminer la concentration qui inhibe 50% des cellules viables (CI₅₀) à l'aide du logiciel GraphPad Prism-version 5.0.

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{\text{DO Contrôle négatif} - \text{DO test}}{\text{DO contrôle négatif}} \times 100$$

III.3.3. Evaluation de l'activité cytotoxique.

Le profil de cytotoxicité des extraits, des fractions et des composés isolés de *V. guineensis* a été évalué par la méthode colorimétrique au MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Promega) en utilisant le dosage du bleu Alamar ([Mosman, 1983](#)) contre des cellules vero cultivées dans le milieu Dulbecco modifié Eagle (DMEM) contenant 13,5 g/L de DMEM (Sigma Aldrich), 10% foetal

Sérum bovin (Sigma Aldrich), 0,2% de bicarbonate de sodium (p/v) (Sigma Aldrich) et 50 µg/mL de gentamycine (Sigma Aldrich).

Globalement, les cellules ont été ensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 96 puits à une densité de 10^4 cellules dans 100 µL de milieu/puits complet et incubés pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pour permettre une bonne l'adhésion cellulaire. 10 µL de chaque solution d'échantillons d'essai dilués en série ont été ajoutés et les plaques d'essai ont ensuite été incubées pendant 48 h dans les mêmes conditions expérimentales. Un contrôle de croissance (0,1% de DMSO-100% de croissance) et des puits de contrôle positif (podophyllotoxine à 20 µM) ont été inclus dans les plaques d'expérience. La prolifération cellulaire a été vérifiée en ajoutant 10 µL d'une solution mère de résazurine (0,15 mg/ml dans du PBS stérile) à chaque puits, suivie d'une incubation des plaques pendant 4 h. La fluorescence a ensuite été lue sur un lecteur de plaque à puits multiples à fluorescence Tecan Infinite M200 (Tecan) à une excitation/émission de 530/590 nm. Les résultats ont été exprimés sous forme de concentrations cytotoxiques à 50% (CC₅₀) et des indices de sélectivité (CC₅₀ vero cell/CI₅₀ *Leishmania donovani*) ont été calculés pour chaque échantillon testé.

III.3.4. Evaluation de l'activité antioxydante.

Les radicaux libres étant impliqués dans la genèse de plusieurs maladies, l'intérêt porté à la recherche d'antioxydants naturels a considérablement augmenté ces dernières années. L'objectif de cette partie de notre travail était d'évaluer l'activité antioxydante des extraits, fractions et composés isolés, afin de jauger la capacité intrinsèque de *V. guineensis* à réguler le stress oxydatif associé à la leishmaniose viscérale. Ainsi, cette activité antioxydante a été évaluée par différentes méthodes de piégeage de radicaux libre (ABTS et DPPH), réduction du fer (III) et chélation complexométrique du fer(II).

III.3.4.1. Test ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid))

L'activité antiradicalaire a évaluée par le test de piégeage du radical cation ABTS selon la technique décoloration utilisée par [Etoundi et al. \(2010\)](#). En effet, le radical cationique ABTS^{•+} est formé par perte d'un électron (e⁻) sur le doublet non liant de l'atome d'azote de l'ABTS en présence du permanganate de potassium (KMnO₄) ou le persulfate de potassium (K₂S₂O₈). Cette méthode est basée sur la capacité de l'échantillon à piéger le radical cationique ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonique) de coloration bleu-verte en donnant son H, le transformant en ainsi en ABTS⁺ incolore ([Khan et al., 2012](#)). La décoloration du radical, mesurée par spectrométrie à 734 nm,

est proportionnelle à la concentration en d'antioxydants de l'échantillon testé.

La solution du radical cation ABTS^{•+} a été obtenue en dissolvant à volume égal une solution de 4,9 mM de KMnO₄ et une solution stock d'ABTS à 7 mM. L'ensemble a été incubé à la température ambiante à l'abri de la lumière pendant 15h avant utilisation. La solution obtenue a été diluée 20 fois avec de l'éthanol jusqu'à obtention d'une absorbance de 0,7 à 734 nm avant l'utilisation.

Le dosage des radicaux libre s'est fait par spectrophotométrie UV. En effet, Pour le à 75 µL de cette solution d'ABTS^{•+} fraîchement préparée sont ajoutées 25µL des solutions d'échantillons à tester ou du contrôle positif (acide ascorbique) à différentes concentrations. Les concentrations testées variaient de 500—3,90 µg/mL. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration d'échantillon testé dans des microplaques à 96 puits. Les absorbances ont été mesurées à 734 nm grâce au lecteur de plaque Elisa (Biotek EL800, USA) après une incubation de 30 minutes à l'obscurité et à la température ambiante.

L'activité antioxydante liée à l'effet de piégeage du radical ABTS^{•+} est exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) à l'aide de la formule ci-après et les courbes dose-réponse ont été construites pour déterminer la concentration qui inhibe 50% des du radicaux ABTS^{•+} (CI₅₀) à l'aide du logiciel GraphPad Prism-version 5.0.

$$PI = 100 \times \frac{A_0 - A_i}{A_0}$$

A₀ : absorbance de la solution ABTS^{•+} sans échantillon à tester ;

A_i: absorbance solution ABTS^{•+} avec échantillon à tester à une concentration C_i

III.3.4.2. Test DPPH (2,2-diphényl-2-picrilhydrazyl)

La détermination de l'activité antiradicalaire a également été évalué par le test de piégeage du radical DPPH[•] en utilisant la méthode décrite par [Rusli et al. \(2020\)](#) légèrement modifiée. En effet, La méthode est basée sur la capacité d'un l'antioxydant (AH) à donner un électron singulet au radical synthétique DPPH[•] de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune pâle. A cet effet, la solution contenant 0,002% du radical DPPH[•] a été préparée en dissolvant 2 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol. Ensuite, à 25 µL d'extrait à une concentration donnée sont ajoutés 75 µL de la solution DPPH[•]. Les extraits fractions et composés isolés, ainsi que le contrôle positif (acide ascorbique) ont été testés à différentes concentrations de 500—3,90 µg/mL ; puis les absorbances ont été mesurées à 517 nm grâce au lecteur de plaque Elisa (Biotek EL800, USA) après 30 minutes d'incubation à l'obscurité. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de d'échantillons testés dans des

microplaques à 96 puits. Les résultats exprimés en Pourcentage d'Inhibition (PI) et en concentration de l'échantillon nécessaire pour neutraliser 50% des radicaux libres (CI_{50}) comme précédemment décrits pour le test à l'ABTS.

III.3.4.3. Test de réduction du fer (III) ou FRAP (Ferric Reducing antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé par la méthode de FRAP (Da, 2014). En effet, cette méthode est basée sur la capacité d'une substance antioxydante à réduire les ions Fer (III) en ions Fer (II) qui forment un complexe rouge-orange en présence de l'ortho-phénanthroline. La densité optique du mélange mesurée à 490nm est proportionnelle à la quantité de complexe formé ou encore proportionnelle à la quantité d'ions Fe^{3+} convertis par l'échantillon à tester.

Ainsi, pour évaluer ce pouvoir antioxydant, solution contenant les ions Fe^{3+} a été préparée à 1,2 mg/mL en dissolvant 12mg de poudre de $FeCl_3$ dans 10mL d'eau distillée.

La solution d'ortho-Phénantroline utilisée pour doser la quantité d'ion Fe^{2+} a été préparée à 0,2% en dissolvant 200mg de poudre d'ortho-Phénantroline dans pour 100 mL d'éthanol.

Les solutions stock des échantillons à tester ont été préparées à 2 mg/mL et le test a été réalisé dans des microplaques de 96 puits, 60 μ L de solvant (eau ou éthanol selon les cas) ont été introduits dans toutes les cupules exceptées celles de la première ligne où on introduisait 120 μ L de chaque échantillon à tester. Après une série de dilution d'ordre 2, 60 μ L de la solution de Fe^{3+} ont été ajoutés puis les plaques ont été incubées pendant 15 min à température ambiante. Par la suite, 60 μ L de la solution d'orthophénantroline ont été ajoutés et les plaques ont été incubées à nouveau pendant 15 min dans les mêmes conditions. Les extraits fractions et composés isolés, ainsi que le contrôle positif (acide ascorbique) ont été testés à différentes concentrations de 500—3,90 μ g/mL. La densité optique du contenu des cupules a été mesurée à 490 nm grâce au lecteur de plaque Elisa (Biotek EL800, USA).

Le test a été effectué en triplicate et le blanc était constitué de 60 μ L eau distillée, 60 μ L éthanol et 60 μ L éthanol. Le contrôle négatif correspondant à 0% de réduction était constitué 60 μ L solvant, 60 μ L éthanol et 60 μ L ortho-phénantroline. Une forte coloration témoigne d'une forte réduction d'ions Fe^{3+} . Les résultats exprimés en Pourcentage d'Inhibition (PI) et en concentration de l'échantillon nécessaire pour neutraliser 50% des radicaux libres (CI_{50}) comme précédemment décrits pour le test à l'ABTS.

III.3.5. Evaluation de Toxicité orale aiguë.

Le test de toxicité aiguë a été réalisé sur des jeunes rats femelles non gravides de souche *Wistar*. Le protocole d'étude était celui de l'OCDE (2001) suivant la ligne directrice 425.

Le principe de ce test repose sur l'observation des effets néfastes apparaissant après administration per os, d'une dose unique élevée d'une substance ou de fraction de la dose durant une période de 14 jours.

Pour cette expérimentation, 6 rats sains âgés de 8–10 semaines, de masses comprises entre 110-150 g ont été utilisés. Ils ont été acclimatés pendant 3 jours, puis randomisés en 2 lots, un lot témoin et un lot test de 5 animaux chacun. Les animaux ont ensuite été soumis à un jeun non hydrique de 12 h précédant l'essai. Ils ont été pesés, puis la substance d'essai a été administrée par gavage, en dose unique de 5000 mg/kg de poids corporel aux animaux du lot test à l'aide d'une sonde œsophagienne pour rat. Les animaux du lot témoin ont reçu de l'eau distillée à la dose de 10 mL/kg de poids corporel. Après administration des substances, les animaux ont été à nouveau soumis à un jeun de 4 h au cours duquel ils ont été minutieusement observés afin de déterminer les éventuels signes de toxicité immédiate. Ils ont ensuite été observés toutes les 24 h pendant les 14 jours d'expérimentation. Les paramètres évalués durant les observations étaient : le poids corporel, l'aspect du pelage, l'agressivité, la mobilité, la sensibilité (au bruit et au toucher), l'aspect des yeux, le nombre de décès. Ces paramètres étaient enregistrés par rapport au témoin normal.

PARTIE IV: REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed, D., Baig, H., Zara, S., **2012**. Seasonal variation of phenolics, flavonoids, antioxidant and lipid peroxidation inhibitory activity of methanolic extract of *Melilotus indicus* and its sub-fractions in different solvents. *International Journal of Phytomedicine*, **4**(3), 326–332.
- Akber, H., **2017**. Two new compounds from the seeds of *Vernonia anthelmintica*. *Journal of Asian natural products research*, **19**(9), 862–868
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., **2016**. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, **10**(3), e0004349
- Alhassan, A. M., Ahmed, Q. U., Latip, J., Shah, S. A. A., Sarian, M. N., Wahab, R. A., Khatib, A., **2018**. Phytoconstituents from *Vernonia glaberrima* Welw. Ex O. Hoffm. leaves and their cytotoxic activities on a panel of human cancer cell lines. *South African Journal of Botany*, **116**, 16–24.
- Arevalo, J., Ramirez, L., Adauí, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., Chappuis, F., **2007**. Influence of *Leishmania* (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, **195**(12), 1846–1851.
- Aubry, P., Gaüzère, B. A., **2020**. Leishmanioses. Actualités 2019. Centre René Labusquière, Institut de médecine tropicale, *Université de Bordeaux*. <http://medecinetropicale.free.fr/cours/leishmanioses.pdf>
- Awaad, A. S., Sokkar, N. M., Khafaga, H. S., **2000**. Pharmacognostical studies and biological activity for *Vernonia galamensis* sub-species *galamensis* var. *petitiana* (A. Rich.) M. Gilbert. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, **8**, 107–113.
- Babu, K. S., Srinivas, P. V., Praveen, B., Kishore, K. H., Murty, U. S., Rao, J. M., **2003**. Antimicrobial constituents from the rhizomes of *Rheum emodi*. *Phytochemistry*, **62**(2), 203–207.
- Bailey, M. S., Lockwood, D. N., **2007**. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in dermatology*, **25**(2), 203–211.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K., **2016**. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, **6**(2), 71–79.
- Beckmann, C., Rattke, J., Sperling, P., Heinz, E., Boland, W., **2003**. Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide Δ^4 -desaturase/hydroxylase from *Candida albicans*; a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Organic and biomolecular chemistry*, **1**(14), 2448–2454.
- Besser, J. M., **2018**. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food microbiology*, **71**, 55–59.

- Biholong, M., **1986**. Contribution to the study of the flora of Cameroon: The Asteraceae (Doctoral dissertation). *University of Bordeaux*, Bordeaux.
- Brahmachari, G., Mandal, N. C., Jash, S. K., Roy, R., Mandal, L. C., Mukhopadhyay, A., Gangopadhyay, A., **2011**. Evaluation of the antimicrobial potential of two flavonoids isolated from *Limnophila* plants. *Chemistry et biodiversity*, **8**(6), 1139–1151.
- Builders, M. I., Wannang, N. N., Ajoku, G. A., Builders, P. F., Orisadipe, A., Aguiyi, J. C., **2011**. Evaluation of the antimalarial potential of *Vernonia ambigua* Kotschy and Peyr (Asteraceae). *International journal of pharmacology*, **7**(2), 238–247.
- Burim, R. V., Canalle, R., Lopes, J. L. C., Takahashi, C. S., **1999**. Genotoxic action of the sesquiterpene lactone glaucolide B on mammalian cells in vitro and in vivo. *Genetics and Molecular Biology*, **22**(3), 401–406.
- Burkill, H.M., **1985**. The useful plants of West Tropical Africa, Families AD, Ed.2 ed. *Royal Botanic Gardens*.
- Buskuhl, H., de Oliveira, F. L., Blind, L. Z., de Freitas, R. A., Barison, A., Campos, F. R., Biavatti, M. W. **2010**., Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their *in vitro* cytotoxicity. *Phytochemistry*, **71**(13), 1539–1544.
- Callahan, H. L., Portal, A. C., Devereaux, R., Groggl, M. A. X., **1997**. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **41**(4), 818–822.
- Calon, J. **2016**. La lutte contre les maladies tropicales négligées (Doctoral dissertation, Université de Picardie Jules Verne).
- Camacho, M. D. R., Phillipson, J. D., Croft, S. L., Solis, P. N., Marshall, S. J., Ghazanfar, S. A., **2003**. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of ethnopharmacology*, **89**(2), 185–191.
- Campos, D. S., **2003**. Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales. *fármacos*, **16**(2), 13–20.
- Chabrier, J. Y., **2010**. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie (Doctoral dissertation). *Université Henri Poincaré*, Nancy 1.
- Chakravarty, A. K., Masuda, K., Suzuki, H., Ageta, H., **1994**. Unambiguous assignment of ¹³C chemical shifts of some hopane and migrated hopane derivatives by 2D NMR. *Tetrahedron*, **50**(9), 2865–2876.
- Chea, A., Hout, S., Long, C., Marcourt, L., Faure, R., Azas, N., Elias, R., **2006**. Antimalarial activity of sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **54**(10), 1437–1439.
- Chibli, L. A., Rosa, A. L., Nonato, M. C., Da Costa, F. B., **2019**. Untargeted LC–MS metabolomic studies of Asteraceae species to discover inhibitors of *Leishmania major*

- dihydroorotate dehydrogenase. *Metabolomics*, **15**(4), 59.
- Chimponda, T., Mukanganyama, S., **2010**. Antimycobacterial activities of selected medicinal plants from Zimbabwe against *Mycobacterium aurum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Tropical biomedicine*, **27**(3), 595–610.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, **2015**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 10th ed., 2015. Approved standard M7-A10 Wayne, PA.
- Copeland, N. K., Aronson, N. E., **2015**. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. *Current opinion in infectious diseases*, **28**(5), 426–437.
- Croft, S. L., Coombs, G. H., **2003**. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in parasitology*, **19**(11), 502–508.
- Da, O., **2014**. Antiplasmodial and Antioxidant Activities of Saye: A traditional Herbal remedy for Malaria. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **4**(4), 155–166.
- Das, A., Jawed, J. J., Das, M. C., Sandhu, P., De, U. C., Dinda, B., Bhattacharjee, S., **2017**. Antileishmanial and immunomodulatory activities of lupeol, a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. *International journal of antimicrobial agents*, **50**(4), 512–522.
- De-Almeida, A. T. M., Nagem, T. J., de Carvalho, L. H., Krettli, A. U., Zani, C. L., **1997**. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliana*. *Planta Medica*, **63**(06), 554–555.
- Dedet, J. P., **2001**. Répartition géographique des leishmanioses. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **31**, 178–183.
- Desjardins, M., Descoteaux, A., **1998**. Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages. *Research in immunology*, **149**(8), 689–692.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G., **2007**. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, **55**(12), 4863-4870.
- Dixon, R. A., Steele, C. L., **1999**. Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends in plant science*, **4**(10), 394–400.
- Donfack, A.R., **2014**. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne de deux plantes médicinales du Cameroun : *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) et *Pentas schimperi* Hook. (Rubiaceae) (Doctoral dissertation). *Université Dschang*, Dschang.
- Donfack, A.R., Toyang, N.J., Wabo, H.K., Tane, P., Awouafack, M.D., Kikuchi, H., Tamokou, J.D., Kuate, J.R., Oshima, Y., **2012**. Stigmastane derivatives from the roots of *Vernonia guineensis* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters*, **5**(3),

596–599.

- Dotsé, K., Assagbui, R., Koumaglo, K., Arnason, J., **1997**. La standardisation des phytomédicaments par la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, **9**,40–47.
- Duschak, V. G., Couto, A. S. **2009**. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. *Current medicinal chemistry*, **16**(24), 3174–3202.
- Duviard, D., **1969**. Importance de *Vernonia guineensis* Benth. dans l'alimentation de quelques Fourmis de savane. *Insectes Sociaux*, **16**(2), 115–133.
- Duviard, D., **1970**. L'entomocoenose de *Vernonia guineensis* Benth.(composées). *La Terre et la vie*, **1**(5), 62–79.
- Ebessa, V., Tiani, G. L. M., Tchamgoue, J., Kouam, S. F., Ngadjui, B. T., Green, I. R., Tane, P., **2018**. Alchornoic acid derivatives from the fruits of *Alchornea cordifolia* (Schumach. et Thonn.) Muell. Arg. (Euphorbiaceae). *Phytochemistry Letters*, **23**, 62–65.
- El Safi, S., Elshikh, H., El Sanousi, E., El Amin, N., Mohammed, A., Verdonck, K., Chappuis, F., **2018**. Case report: visceral leishmaniasis with *Salmonella paratyphi* and *Brucella melitensis* coinfection as a cause of persistent fever in a patient from Sudan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **99**(5), 1150–1152.
- Erasto, P., Grierson, D. S., Afolayan, A. J., **2006**. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Journal of ethnopharmacology*, **106**(1), 117–120.
- Erasto, P., Grierson, D. S., Afolayan, A. J., **2007**. Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of *Vernonia amygdalina* growing in South Africa. *Food chemistry*, **104**(2), 636–642.
- Etoundi, C. B., Kuate, D., Ngondi, J. L., Oben, J., **2010**. Anti-amylase, anti-lipase and antioxidant effects of aqueous extracts of some Cameroonian spices. *Journal of Natural Products*, **3**(2010), 165–171.
- Fatima, S. S., Rajasekhar, M. D., Kumar, K. V., Kumar, M. T. S., Babu, K. R., Rao, C. A., **2010**. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of ethyl acetate: isopropanol (1:1) fraction of *Vernonia anthelmintica* seeds in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and chemical toxicology*, **48**(2), 495–501.
- Flahaut, E., **2002**. Comment développer la production locale des médicaments traditionnels. Table ronde Remed-JPIP.
- Focho, D., Ndam, W., Fonge, B., **2009**. Medicinal plants of Aguambu-Bamumbu in the Lebiale highlands, southwest province of Cameroon. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **3**(1), 1–13.

- Folliard, T., **2008**. Phytothérapie externe en Amérique du Sud et en Amérique centrale-Mexique et Guatemala (partie 1). *Phytothérapie*, **6**(3), 175–183.
- Fortuna, A. M., de Riscalá, E. C., Catalan, C. A., Gedris, T. E., Herz, W., **2001**. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**(9), 967–971.
- Fournet, A., Barrios, A. A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Cavé, A., **1993**. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American *Leishmania* sp. in BALB/c mice. *Phytotherapy Research*, **7**(4), 281–284.
- Gangneux, J. P., Belaz, S., Robert-Gangneux, F., **2015**. Mise au point et actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *Journal des Anti-infectieux*, **17**(1), 25–28.
- Ghedira, K., **2005**. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **3**(4), 162–169.
- Girardi, C., **2015**. Recherche d'accepteurs de Michael à visées antiparasitaires à partir d'une Asteraceae: *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist (Doctoral dissertation). *Université de Toulouse III-Paul Sabatier*, Toulouse.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., **2006**. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary parasitology*, **139**(4), 308–320.
- Gohar, A. A., **2001**. Heptatriacontanol and phenolic compounds from *Halochris hispida*. *Journal of Biological Sciences*, **1**(9), 843–845.
- Goto, H., Lindoso, J. A. L., **2012**. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics*, **26**(2), 293–307.
- Hanada, K., **2010**. Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, **86**(4), 426–437.
- Haque, A. N., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., **2007**. Cytosine methylation is associated with RNA silencing in silenced plants but not with systemic and transitive RNA silencing through grafting. *Gene*, **396**(2), 321–331.
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., Munné-Bosch, S., **2009**. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in plant science*, **14**(3), 125–132.
- Hirudkar, J. R., Parmar, K. M., Prasad, R. S., Sinha, S. K., Jogi, M. S., Itankar, P. R., Prasad, S. K., **2020**. Quercetin a major biomarker of *Psidium guajava* L. inhibits SepA protease activity of *Shigella flexneri* in treatment of infectious diarrhoea. *Microbial Pathogenesis*, **138**, 103807.
- Hsu, F. F., Turk, J., **2001**. Structural determination of glycosphingolipids as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisional-activated

- dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **12**(1), 61–79.
- Huo, J., Yang, S. P., Xie, B. J., Liao, S. G., Lin, L. P., Ding, J., Yue, J. M., **2008**. Cytotoxic sesquiterpenoids from *Vernonia bockiana*. *Journal of Asian natural products research*, **10**(6), 571–575.
- Hussain, A., Khan, M.N., Iqbal, Z., Sajid, M.S., **2008**. An account of the botanical anthelmintics used in traditional veterinary practices in Sahiwal district of Punjab, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**(1), 185–190.
- Igile, G.O., Oleszek, W., Jurzysta, M., Burda, S., Fafunso, M., Fasanmade, A.A., **1994**. Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**(11), 2445–2448.
- Ijeh, I.I., Ejike, C., **2011**. Current perspectives on the medicinal potentials of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of medicinal plants research*, **5**(7), 1051–1061.
- Iqbal, Z., Lateef, M., Jabbar, A., Akhtar, M. S., Khan, M. N., **2006**. Anthelmintic Activity of *Vernonia anthelmintica*. Seeds against Trichostrongylid Nematodes of Sheep. *Pharmaceutical Biology*, **44**(8), 563–567.
- Ishii, T., Okino, T., Mino, Y., **2006**. A ceramide and cerebroside from the starfish *Asterias murensis lütken* and their plant-growth promotion activities. *Journal of natural products*, **69**(7), 1080–1082.
- Ito, T., Aimaiti, S., Win, N.N., Kodama, T., Morita, H., **2016**. New sesquiterpene lactones, vernonilides A and B, from the seeds of *Vernonia anthelmintica* in Uyghur and their antiproliferative activities. *Bioorganic et medicinal chemistry letters* **26**(15), 3608–3611.
- Jeffrey, C., **1988**. The Vernonieae in east tropical Africa: notes on Compositae. *Kew Bulletin* **43**(2), 195–277.
- Jinming, G., Lin, H., Jikai, L., **2001**. A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*. *Steroids*, **66**(10), 771–775.
- Jiofack, T., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V., **2009**. Ethnobotany and phytomedicine of the upper Nyong valley forest in Cameroon. *African Journal of Pharmacy and pharmacology*, **3**(4), 144–150.
- Jisaka, M., Ohigashi, H., Takagaki, T., Nozaki, H., Tada, T., Hirota, M., Irie, R., Huffman, M.A., Nishida, T., Kaji, M., **1992**. Bitter steroid glucosides, vernoniosides A1, A2, and A3, and related B1 from a possible medicinal plant, *Vernonia amygdalina*, used by wild chimpanzees. *Tetrahedron* **48**(4), 625–632.
- Jisaka, M., Ohigashi, H., Takegawa, K., Hirota, M., Irie, R., Huffman, M.A., Koshimizu, K., **1993**. Steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, a possible chimpanzee medicinal

- plant. *Phytochemistry* **34**(2), 409–413.
- Jones, S.B., **1981**. Synoptic classification and pollen morphology of *Vernonia* (compositae: *vernonieae*) in the old world. *Rhodora* **83**(833), 59–75.
- Joung, D. K., Lee, Y. S., Han, S. H., Lee, S. W., Cha, S. W., Mun, S. H., Kwon, D. Y., **2016**. Potentiating activity of luteolin on membrane permeabilizing agent and ATPase inhibitor against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, **9**(1), 19–22.
- Kalanda, K., Lisowski, S., **1995**. Le genre *Vernonia* (Asteraceae) dans la flore d’Afrique centrale (Zaire, Rwanda, Burundi). *Fragmenta floristica et geobotanica*, **40** édition 2.
- Keige, A., Maxwell, S. R. J., Vogler, B., Klaiber, I., Kraus, W., **1998**. Novel coumarins and sesquiterpene lactones from *Vernonia brachycalyx*. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, **8**(1), 43–45.
- Khan, R. A., Khan, M. R., Sahreen, S., Ahmed, M., **2012**. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. *Chemistry Central Journal*, **6**(12), <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-12>
- Khatun, M., Billah, M., Quader, M. A., **2012**. Sterols and sterol glucoside from *Phyllanthus* species. *Dhaka University Journal of Science*, **60**(1), 5–10.
- Kiplimo, J. J., Koorbanally, N. A., et Chenia, H., **2011**. Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **5**(8), 1150–1156.
- Kiplimo, J. J., Koorbanally, N. A., Chenia, H., **2011**. Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **5**(8), 1150–1156.
- Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., & Terabe, K., **1997**. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, **12**(4), 277–280.
- Kos, O., Castro, V., Murillo, R., Poveda, L., Merfort, I., **2006**. Ent-kaurane glycosides and sesquiterpene lactones of the hirsutinolide type from *Vernonia triflosculosa*. *Phytochemistry*, **67**(1), 62–69.
- Lamorde, M., Tabuti, J. R., Obua, C., Kukunda-Byobona, C., Lanyero, H., Byakika-Kibwika, P., Waako, P. J., **2010**. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. *Journal of ethnopharmacology*, **130**(1), 43–53.
- Lee, K. A., Moon, S. H., Kim, K. T., Mendonca, A. F., Paik, H. D., **2010**. Antimicrobial effects of various flavonoids on *Escherichia coli* O157: H7 cell growth and lipopolysaccharide production. *Food Science and Biotechnology*, **19**(1), 257–261.

- Lehmann, H., 2013. Le médicament à base de plantes en Europe: statut, enregistrement, contrôles (Doctoral dissertation). *Université de Strasbourg*, Strasbourg.
- Li, R., Yu, K., Hatanaka, T., Hildebrand, D. F., **2010**. *Vernonia* DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotechnology Journal*, **8**(2), 184–195.
- Lightburn, E., Morand, J. J., Garnotel, E., Kraemer, P., Meynard, J. B., Hovette, P., Patte, J. H., **2002**. Clinical update on tegumentary leishmaniasis in the Americas. *Médecine Tropicale*, **62**(6), 637–656.
- Lin, L. C., Pai, Y. F., Tsai, T. H., **2015**. Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, **63**(35), 7700–7706.
- Liu, X., Aisa, H. A., Xin, X., **2019**. A new fatty acid ester from *Nigella sativa* var. hispidula Boiss showing potent anti-protein tyrosine phosphatase 1B activity. *Natural product research*, **33**(4), 472–476.
- Liu, Y., Nugroho, A. E., Hirasawa, Y., Nakata, A., Kaneda, T., Uchiyama, N., Aisa, H. A., **2010**. Vernodalidimers A and B, novel orthoester elemanolide dimers from seeds of *Vernonia anthelmintica*. *Tetrahedron Letters*, **51**(50), 6584–6587.
- Luger, P., Weber, M., Dung, N. X., Ngoc, P. H., Tuong, D. T., Rang, D. D., **2000**. The Crystal Structure of Hop-17 (21)-en-3 β -yl acetate of *Pluchea pteropoda* Hemsl. from Vietnam. *Crystal Research and Technology: Journal of Experimental and Industrial Crystallography*, **35**(3), 355–362.
- Luhata L.P., Munkombwe N.M. **2015**. Isolation and Characterisation of Stigmasterol and β -Sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). *JIPBS*, **2**, 88–95.
- Mahato, S. B., Kundu, A. P., **1994**. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37**(6), 1517–1575.
- Manojlović, N., Solujić, S., Sukdolak, S., Krstić, L. J., **2000**. Isolation and antimicrobial activity of anthraquinones from some species of the lichen genus *Xanthoria*. *Journal of the serbian chemical Society*, **65**(8), 555–650.
- Marchyshyn, S., Parashchuk, E., Dakhym, I., Husak, L., **2018**. Phenolic compounds from *Pimpinella saxifraga* L. *The Pharma Innovation Journal*, **7**(6), 600–602.
- Marco, J. A., Sanz-Cervera, J. F., Yuste, A., Sancenón, F., Carda, M., **2005**. Sesquiterpenes from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry*, **66**(14), 1644–1650.
- Maroyi, A., **2020**. Evaluation of pharmacological properties, phytochemistry, and medicinal uses of *Baccharoides guineensis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **10**(6), 142–50.

- Mbosso Teinkela, J. E., Assob Nguedia, J. C., Meyer, F., Vouffo Donfack, E., Lenta Ndjakou, B., Ngouela, S., Wintjens, R., **2016**. *In vitro* antimicrobial and anti-proliferative activities of plant extracts from *Spathodea campanulata*, *Ficus bubu*, and *Carica papaya*. *Pharmaceutical biology*, **54**(6), 1086–1095.
- Medeiros, M. A., Araujo, M. H., Augusti, R., de Oliveira, L. C., Lago, R. M., **2009**. Acid-catalyzed oligomerization of glycerol investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **20**(9), 1667–1673.
- Menaldino, D.S., Bushnev, A., Sun, A., Liotta, D.C., Symolon, H., Desai, K., Dillehay, D.L., Peng, Q., Wang, E., Allegood, J., **2003**. Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacological research* **47**(5), 373–381.
- Mendoza, R. J., Benelli, G., Panarese, R., Iatta, R., Furlanello, T., Beugnet, F., Otranto, D., **2020**. *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* infections in Italy, 2009–2019: changing distribution patterns. *Parasites et vectors*, **13**(1), 1–8.
- Mishina, Y. V., Krishna, S., Haynes, R. K., Meade, J. C., **2007**. Artemisinins inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro growth. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**(5), 1852–1854.
- Monge, M. B., López-Vélez, R., **2013**. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*, **73**(17), 1889–1920.
- Moshi, M. J., Otieno, D.F., Weisheit, A., **2012**. Ethnomedicine of the Kagera Region, north western Tanzania. Part 3: plants used in traditional medicine in Kikuku village, Muleba District. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine* **8**(1), 14.
- Mosmann, T., **1983**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, **65**(1-2), 55–63.
- Ncube, I., Read, J. S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., **1998**. Triacylglycerols of *Vernonia galamensis* seed oil. *Phytochemistry*, **47**(5), 723–727.
- Ngouateu, O. B., Kollo, P., Ravel, C., Dereure, J., Kamtchouing, P., Same-Ekobo, A., Dondji, B., **2012**. Clinical features and epidemiology of cutaneous leishmaniasis and *Leishmania major*/HIV co-infection in Cameroon: results of a large cross-sectional study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **106**(3), 137–142.
- Noumi, E., **1984**. Les plantes à épices, à condiments et à aromates du Cameroun (Thèse doctorat 3eme cycle). *Université de Yaoundé I*, Yaoundé.
- Noumi, E., **2010**. Ethno medicines used for treatment of prostatic disease in Fouban,

Cameroon. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **4**(11), 793–805.

OCDE, **2001**, Toxicité orale aiguë-Méthode par classe de toxicité aiguë. In Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Ligne directrice 423, 1–14.

Oketch, R. H. A., Christensen, S. B., Frydenvang, K., Dossaji, S. F., Theander, T. G., Cornett, C., Lemmich, E., **1998**. Antiprotozoal properties of 16, 17-dihydroxybrachycalixolide from *Vernonia brachycalyx*. *Planta Medica*, **64**(6), 559–562.

Oliaee, R. T., Sharifi, I., Bamorovat, M., Keyhani, A., Babaei, Z., Salarkia, E., Mousavi, S. M., **2020**. The potential role of nicotinamide on *Leishmania tropica*: An assessment of inhibitory effect, cytokines gene expression and arginase profiling. *International Immunopharmacology*, **86**, 106704.

Ologunde, M. O., Ayorinde, F. O., Shepard, R. L., **1990**. Chemical evaluation of defatted *Vernonia galamensis* meal. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **67**(2), 92–95.

Omoriegie, E., Pal, A., Sisodia, B., **2011**. *In vitro* antimalarial and cytotoxic activities of leaf extracts of *Vernonia amygdalina* (Del.). *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences* **19**(1), 121–126.

OMS, **2011**. La lutte contre les leishmanioses: rapport de la réunion du comité OMS de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 22-26 mars 2010.

OMS, **2014**. Manuel pour la prise en charge de la leishmaniose cutanée dans la Région OMS de la Méditerranée orientale.

OMS., **1998**. Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques. Recueil de directives et autres documents. Genève, **1**, 1268 Pages

OMS., **2002**. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle. Genève: *Organisation mondiale de la Santé*, No. WHO/EDM/TRM/2002.1.

Oueslati, M. H., Mighri, Z., Jannet, H. B., Abreu, P. M., **2005**. New ceramides from *Rantherium suaveolens*. *Lipids*, **40**(10), 1075–1079.

Paganuzzi, V., Malerba, A., **2000**. Composition of Acacia salicina Lindl seed oil Comparison with seed oils of other Acacias species. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **77**, 597–607.

Parekh, J., Chanda, S., **2007**. *In vitro* screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various Indian plant species against selected pathogens from Enterobacteriaceae. *African Journal of Microbiology Research* **1**(6), 92–99.

Paris, G. Y., Garmaise, D. L., Cimon, D. G., Swett, L., Carter, G. W., Young, P., **1980**. Glycerides as prodrugs. 3. Synthesis and antiinflammatory activity of [1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetyl] glycerides (indomethacin

- glycerides). *Journal of medicinal chemistry*, **23**(1), 9–13.
- Pistelli, L., Bertoli, A., Morelli, I., Menichini, F., Musmanno, R. A., Maggio, T. D., et Coratza, G., **2005**. Chemical and antibacterial evaluation of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, **19**(9), 787–791.
- Pratheesh Kumar, P., Kuttan, G., **2009**. *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **31**(1), 94–102.
- Pratheesh-kumar, P., Kuttan, G., **2011a**. Modulation of immune response by *Vernonia cinerea* L. inhibits the proinflammatory cytokine profile, iNOS, and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **33**(1), 73–83.
- Pratheesh-kumar, P., Kuttan, G., **2011b**. Vernolide-A, a sesquiterpene lactone from *Vernonia cinerea*, induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by modulating p53 and caspase-3 gene expressions and regulating NF- κ B-mediated bcl-2 activation. *Drug and Chemical Toxicology* **34**(3), 261–270.
- Pratheesh-kumar, P., Kuttan, G., **2011c**. Effect of vernolide-A, a sesquiterpene lactone from *Vernonia cinerea* L., on cell-mediated immune response in B16F-10 metastatic melanoma-bearing mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **33**(3), 533–538.
- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A. H., Das, S., Kumar, S., Singh, D., **2012**. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **56**(2), 1031–1041.
- Ragasa, C. Y., Caro, J. L., Shen, C. C., **2014**. Triterpenes and sterol from *Artocarpus ovatus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **4**(10), 7–11.
- Rahmouni, O., Dubuquoy, L., Desreumaux, P., Neut, C. **2016**. Microbiote intestinale et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *médecine/sciences*, **32**(11), 968–973.
- Ramiarantsoa, H., Attioua, B. K., Kouamé, M. A., Djakouré, L. A., **2008**. 3-O- β -D-glucoside du β -sitostérol. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, **26**, 99–103.
- Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., Dagger, F., Cohen, B. E., **1996**. Amphotericin B kills unicellular *leishmania* by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *The Journal of membrane biology*, **152**(1), 65–75.
- Rusli, Z., Sari, B. L., Utami, N. F., Sabila, S., **2020**. Optimization Of Microwave-Assisted Extraction Of Flavonoids From Binahong (*Anredera cordifolia*) Leaves Using Respon Surface Methodology. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, **7**(3), 10–19.
- Rustaiyan, A., Nazarians, L., Bohlmann, F., **1979**. Two new elemanolides from Onopordon

- leptolepis. *Phytochemistry*, **18**(5), 879–880.
- Rustaiyan, A., Nazarians, L., Bohlmann, F., **1979**. Two new elemanolides from *Onopordon leptolepis*. *Phytochemistry*, **18**(5), 879–880.
- Sacks, D., Kamhawi, S., **2001**. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual reviews in microbiology*, **55**(1), 453–483.
- Sandjo, L. P., Tchoukoua, A., Ntede, H.N., Yemloul, M., Perspicace, E., Keumedjio, F., Ngadjui, B.T., **2010**. New norriterpenoid and ceramides from stems and leaves of cultivated *Triumfetta cordifolia* A Rich (Tiliaceae). *Journal of the American Oil Chemists' Society* **87**(10), 1167–1177.
- Sandjo, L.P., Kuete, V., **2013**. Ceramides, cerebrosides, and related long chains containing derivatives from the medicinal plants of Africa, *Medicinal Plant Research in Africa*. Elsevier, 607–620.
- Sanogo, R., Germano, M. P., De Tommasi, N., Pizza, C., Aquino, R., **1998**. Vernoniosides and an androstane glycoside from *Vernonia kotschyana*. *Phytochemistry* **47**(1), 73–78.
- Santos, E. D., Meira, M., Vale, A. E., David, J. M., de Queiróz, L. P., David, J. P., **2012**. Isolation and characterization of new ceramides from aerial parts of *Lepidaploa cotoneaster*. *Natural product communications* **7**(6), 781–783.
- Santos, E. O. D., Meira, M., Vale, A. E. D., David, J. M., de Queiróz, L. P., David, J. P., **2012**. Isolation and characterization of new ceramides from aerial parts of *Lepidaploa cotoneaster*. *Natural Product Communications*, **7**(6), 781–783.
- Santos, M. M., et Moreira, R., **2007**. Michael acceptors as cysteine protease inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **7**(10), 1040–1050.
- Schmidt, T., Khalid, S., Romanha, A., Ma Alves, T., Biavatti, M., Brun, R., Tempone, A., **2012**. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-part II. *Current medicinal chemistry*, **19**(14), 2176–2228.
- Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., Kunert, O., **2003**. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **41**(8), 636–638.
- Senatore, F., Formisano, C., Sanogo, R., **2004**. Essential oil from aerial parts of *Vernonia colorata* Drake and *Vernonia nigritiana* Oliver et Hiern. (Asteraceae) growing wild in Mali. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **7**(3), 267–274.
- Shah, B. R., Zhang, C., Li, Y., et Li, B., **2016**. Bioaccessibility and antioxidant activity of curcumin after encapsulated by nano and Pickering emulsion based on chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Food Research International*, **89**, 399–407.
- Siddique, A. R. M., Mahmud, S., Van Heyst, B., **2017**. A review of the state of the science on

- wearable thermoelectric power generators (TEGs) and their existing challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **73**, 730–744.
- Simo, C.C., Kouam, S.F., Poumale, H.M., Simo, I.K., Ngadjui, B.T., Green, I.R., Krohn, K., **2008**. Benjaminamide: a new ceramide and other compounds from the twigs of *Ficus benjamina* (Moraceae). *Biochemical Systematic and Ecology* **36**(3), 238–243.
- Singh, C., Kaul, B. L., **1993**. *Vernonia-galamensis* (cass)-a potent new plant source of industrial oil. *Research and Industry*, **38**(1), 1–2.
- Siqueira-Neto, J. L., Song, O. R., Oh, H., Sohn, J. H., Yang, G., Nam, J., Genovesio, A., **2010**. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**(5), e675.
- Sobrinho, A. C. N., de Souza, E. B., dos Santos Fontenelle, R. O., **2015**. A review on antimicrobial potential of species of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of medicinal plants research*, **9**(31), 838–850.
- Stangeland, T., Alele, P.E., Katuura, E., Lye, K.A., **2011**. Plants used to treat malaria in Nyakayojo sub-county, western Uganda. *Journal of ethnopharmacology* **137**(1), 154–166.
- Stangeland, T., Wangensteen, H., Katuura, E., Lye, K.A., Paulsen, B.S., **2010**. Antioxidant and anti-plasmodial activity of extracts from three Ugandan medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research* **4**(18), 1916–1923.
- Sundar, S., Chakravarty, J., **2013**. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert opinion on pharmacotherapy*, **14**(1), 53–63.
- Sülßen, V. P., Puente, V., Papademetrio, D., Battle, A., Martino, V. S., Frank, F. M., Lombardo, M. E., **2016**. Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, **11**(3), e0150526.
- Tabopda, T.K., Fotso, G.W., Ngoupayo, J., Mitaine, A.C., Ngadjui, B.T., Lacaille, M.A., **2009**. Antimicrobial dihydroisocoumarins from *Crassocephalum bialafrae*. *Planta medica* **75**(11), 1258–1261.
- Tchamgoue, J., Hafizur, R. M., Tchouankeu, J. C., Kouam, S. F., Adhikari, A., Hameed, A., Choudhary, M. I., **2016**. Flavonoids and other constituents with insulin secretion activity from *Pseudarthria hookeri*. *Phytochemistry Letters*, **17**, 181–186.
- Tchinda, A.T., Tane, P., Ayafor, J.F., Connolly, J.D., **2003**. Stigmastane derivatives and isovaleryl sucrose esters from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). *Phytochemistry* **63**(7), 841–846.
- Tchinda, A.T., Tsopmo, A., Tane, P., Ayafor, J.F., Connolly, J.D., Sterner, O., **2002**. Vernoguinsterol and vernoguinoside, trypanocidal stigmastane derivatives from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). *Phytochemistry* **59**(4), 371–374.

- Torres-Santos, E. C., Lopes, D., Oliveira, R. R., Carauta, J. P. P., Falcao, C. B., Kaplan, M. A. C., et Rossi-Bergmann, B. (2004). Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, *11*(2), 114–120.
- Toubiana, R., Mompon, B., Ho, C. M., Toubiana, M. J., **1975**. Isolement du vernodalin et du vernolepin a partir de *Vernonia guineensis*: Authenticite du squelette elemene. *Phytochemistry*, *14*(3), 775–778.
- Toyang, N. J., Ateh, E. N., Keiser, J., Vargas, M., Bach, H., Tane, P., Verpoorte, R., **2012**. Toxicity, antimicrobial and anthelmintic activities of *Vernonia guineensis* Benth.(Asteraceae) crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, *144*(3), 700–704.
- Toyang, N. J., Verpoorte, R., **2013**. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *146*(3), 681–723.
- Toyang, N.J., Krause, M.A., Fairhurst, R.M., Tane, P., Bryant, J., Verpoorte, R., **2013a**. Antiplasmodial activity of sesquiterpene lactones and a sucrose ester from *Vernonia guineensis* Benth.(Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology* *147*(3), 618–621.
- Toyang, N.J., Wabo, H.K., Ateh, E.N., Davis, H., Tane, P., Kimbu, S.F., Sondengam, L.B., Bryant, J., **2012**. In vitro anti-prostate cancer and ex vivo antiangiogenic activity of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) tuber extracts. *Journal of ethnopharmacology* *141*(3), 866–871.
- Toyang, N.J., Wabo, H.K., Ateh, E.N., Davis, H., Tane, P., Sondengam, L.B., Bryant, J., Verpoorte, R., **2013b**. Cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia guineensis* Benth.(Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology* *146*(2), 552–556.
- Turak, A., Liu, Y., Aisa, H.A., **2015**. Elemanolide dimers from seeds of *Vernonia anthelmintica*. *Fitoterapia* *104*, 23–30.
- Valente, P. P., Amorim, J. M., Castilho, R. O., Leite, R. C., Ribeiro, M. F. B., **2014**. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, *113*(1), 417–423.
- Wagenitz, G., **1976**. Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* *125*(1), 29–46.
- Williams, R. B., Norris, A., Slobodnick, C., Merola, J., Miller, J. S., Andriantsiferana, R., Kingston, D. G., **2005**. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia pachyclada* from the Madagascar rainforest. *Journal of natural products*, *68*(9), 1371–1374.
- Woźnicka, E., Kuźniar, A., Nowak, D., Nykiel, E., Kopacz, M., Gruszecka, J., Golec, K.; **2013**. Comparative study on the antibacterial activity of some flavonoids and their sulfonic derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, *70*(3), 567–571.
- Xia, W., Chen, X., **2004**. Isolation of β -carotène from discarded tobacco leaves. *Chinese journal of chromatography* *22*(1), 54–56.

- Xiao, Y., Zhu, S., Wu, G., ul Hassan, S.S., Xie, Y., Ishaq, M., Sun, Y., Yan, S.-k., Qian, X.-p., Jin, H.-z., **2020**. Chemical Constituents of *Vernonia parishii*. *Chemistry of Natural Compounds* **56**(1), 134–136.
- Yamamoto, E. S., Campos, B. L., Jesus, J. A., Laurenti, M. D., Ribeiro, S. P., Kallás, E. G., Lago, J. H., **2015**. The effect of ursolic acid on *Leishmania amazonensis* is related to programmed cell death and presents therapeutic potential in experimental cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*, **10**(12), e0144946.
- Yaoita, Y., Ishizuka, T., Kakuda, R., Machida, K., et Kikuchi, M. **2000**. Structures of New Ceramides from the Fruit Bodies of *Grifola frondosa*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **48**(9), 1356–1358.
- Yaoita, Y., Kikuchi, M., **1993**. Studies on the constituents of the rhizomes of *Petasites japonicus* Maxim. II. On the triterpenoids and anthraquinones. *Annual Report of Tohoku College of Pharmacy*, **40**, 111–114.
- Yeap, S.K., Ho, W.Y., Beh, B.K., Liang, W.S., Ky, H., Yousr, A.H.N., Alitheen, N.B., **2010**. *Vernonia amygdalina*, an ethnoveterinary and ethnomedical used green vegetable with multiple bioactivities. *Journal of medicinal plants research* **4**(25), 2787–2812.
- Yineger, H., Kelbessa, E., Bekele, T., Lulekal, E., **2007**. Ethnoveterinary medicinal plants at bale mountains national park, Ethiopia. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**(1), 55–70.
- Youn, U.J., Wongwiwatthanakul, S., Songsak, T., Chang, L.C., **2018**. Sesquiterpene Lactones from *Vernonia cinerea*. *Chemistry of Natural Compounds*, **54**(2), 235–237.
- Yu, K., Li, R., Hatanaka, T., Hildebrand, D., **2008**. Cloning and functional analysis of two type 1 diacylglycerol acyltransferases from *Vernonia galamensis*. *Phytochemistry*, **69**(5), 1119–1127.
- Yuan, K., Jia, A., Zhang, A., **2006**. Studies on chemical constituents of *Vernonia chunii* (I). *chinese Pharmaceutical journal-beijing*, **41**(19), 1458.
- Yue, J. M., Fan, C. Q., Xu, J., Sun, H. D., **2001**. Novel ceramides from the fungus *Lactarium volemus*. *Journal of natural products*, **64**(9), 1246–1248.
- Zauli-Nascimento, R. C., Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Pereira, L. I., Pelli de Oliveira, M. A., Ribeiro-Dias, F., Uliana, S. R., **2010**. *In vitro* sensitivity of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine et International Health*, **15**(1), 68–76.
- Zhang, N., Kima, P. E., **2016**. *Leishmania* infection engages non-receptor protein kinases differentially to persist in infected hosts. *Frontiers in Immunology*, **7**(146) 1–5.
- Zilberstein, D., Shapira, M., **1994**. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annual review of microbiology*, **48**, 449–471.

ANNEXE

Publications issues de ce travail de thèse

1. **Wouamba, S. C. N.**, Happi, G. M., Lenta, B. N., Sewald, N., et Kouam, S. F., **2020**. Vernoguinaamide: A new ceramide and other compounds from the root of *Vernonia guineensis* Benth. and their chemophenetic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, **88**, 103988.
2. **Wouamba, S. C. N.**, Happi, G. M., Poufo M. N., Tchamgoue, J., Jouda, J. B., Longo, F., Lenta, B. N., Sewald, N., Kouam, S. F., **2020**. Antibacterial flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae). *Chemistry et Biodiversity*, **17**(9), e2000296
3. **Wouamba, S. C. N.**, Njanpa, C. A. N., Dize, D., Tchamgoue, J., Fiorillo, A., Lenta, B. N., Sewald, N., Kouam, S. F., **2021**. Bioguided isolation of antileishmanial compounds from *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) and their molecular docking to potential *Leishmania* protein targets. *Phytotherapy*, **En revision**.