

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix-Travail-Patrie

.....  
UNIVERSITE DE YAOUNDE I

.....  
FACULTE DES SCIENCES

.....  
CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES, TECHNOLOGIES ET  
GEOSCIENCES

.....  
UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE CHIMIE  
ET APPLICATIONS

.....

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE  
*DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY*

LABORATOIRE DES SUBSTANCES NATURELLES ET VALORISATION  
*LABORATORY OF NATURAL PRODUCTS AND VALORIZATION*

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *VITELLARIA PARADOXA*  
C. F. GAERTN (SAPOTACEAE), TRANSFORMATIONS CHIMIQUES  
ET ACTIVITES BIOLOGIQUES CONTRE LES MALADIES  
NEURODEGENERATIVES ET LE CANCER**

Thèse présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du Diplôme  
de Doctorat/Ph.D en Chimie Organique

Option : Chimie des Substances Naturelles

Par :

**Guérisson BAIRY**

**Matricule : 12T0959**

*Master en Chimie Organique*

Sous la codirection de :

**Kenneth OBEN EYONG**  
Maître de Conférences  
Université de Yaoundé I

**Gabriel NGOSONG FOLEFOC**  
Maître de Conférences  
Université de Yaoundé I

Année 2020



REPUBLIC OF CAMEROON  
*Peace-Work-Fatherland*

.....  
*THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I*

.....  
*FACULTY OF SCIENCE*

.....  
*POSTGRADUATE SCHOOL OF  
SCIENCE, TECHNOLOGY AND  
GEOSCIENCES*

.....  
*RESEARCH AND POSTGRADUATE  
TRAINING UNIT FOR CHEMISTRY  
AND APPLICATIONS*

.....



# **INTRODUCTION GENERALE**

# **CHAPITRE I : APERÇU BOTANIQUE ET GENERALITES SUR L'INFLAMMATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES ET LE CANCER**

# **CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION**

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

# **CHAPITRE III : ETUDE EXPERIMENTALE**

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

# **ANNEXES**



## INTRODUCTION GENERALE

Les maladies neurodégénératives et les cancers sont les maladies qui causent chaque année à travers le monde, un nombre important de décès. Elles constituent avec les infections virales et les facteurs de risque un véritable problème de santé publique. Les ravages causés par ces maladies sont ressentis avec beaucoup plus d'acuité dans les pays industrialisés et les pays en voie de développement. Les statistiques cumulées pour ces maladies neurologiques sont inquiétantes. Selon Ferlay et ses collaborateurs (2004), des millions de personnes en souffrent aux Etats-Unis et plus d'un million de français sont soignés chaque année pour de telles maladies, 10 millions de cas de cancers ont été signalés avec 6,5 millions de décès en Afrique (OMS, 2018). Or, la dopamine isolée de *Mucuna repens* a été identifiée comme agent antineurodégénératif puissant. Tandis que le taxol isolé de l'écorce du tronc de *Taxus brevifolia* est actuellement l'un des agents thérapeutiques les plus utilisés en chimiothérapie anticancéreuse pour le traitement du cancer du sein, des poumons et des ovaires (Cragg *et al.*, 2005) avec des ventes plus onéreuses. Malgré les efforts consentis par la communauté scientifique, les traitements actuels ne sont pas efficaces sur les maladies neurologiques. Le manque de sensibilisation éducative à la santé et à l'hygiène de vie, ainsi que l'accès aux soins médicaux de qualité accentuent ces fléaux. La prise en charge vise uniquement à atténuer les symptômes généralement associés pendant une période de temps, de ralentir la progression de la maladie ou de détruire les cellules corrompues. Certains pays s'apprêtent à renier au remboursement des médicaments anti-Alzheimer comme la France sur l'assurance maladie. Et si on ajoute la communauté scientifique fataliste au cours des dix dernières années, la vie des patients se réduit à quelque chose de très négligeable.

Ces pathologies sont accentuées par le phénomène des chimiorésistances, multifactoriel pouvant impliquer de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires (Gottesman, 2002) qui suscitent la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives tant pour le traitement de cancer que pour les maladies neurodégénératives, efficaces, de moindre coûts, relativement non toxiques s'avère indispensable et surtout avec des mécanismes d'action différents de ceux qui sont sur le marché.

L'homme sait, depuis fort longtemps, que la nature est porteuse d'une richesse médicinale. Elle constitue une solution alternative. La population mondiale a tiré profit des propriétés biologiques des extraits végétaux pour se soigner (OMS, 2003). Pour inverser la tendance, une approche que nous avons appliquée dans la présente thèse consiste à faire l'étude phytochimique et pharmacologique de *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae).

L'objectif général de ce travail est de procéder à l'étude phytochimique des graines, racines et écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* de la famille des Sapotaceae, à l'évaluation d'activités antineurodégénérative et cytotoxique, et entrepris quelques transformations chimiques de certains composés isolés.

A cet égard, la diversité de la flore africaine représente une source prometteuse de nouveaux agents antipathologiques. *Vitellaria paradoxa* de la famille des Sapotaceae possède-t-elle des potentialités biologiques antineurodégénérative et cytotoxique ? La population mondiale utilise très longtemps *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn (arbre à beurre) en médecine traditionnelle pour traiter de diverses infections, y compris l'inflammation, les irritations cutanées, la dermatite, les coups de soleil, le rhumatisme, la diarrhée, les maux d'estomac, les ulcères, le mal de nerf, les maux de cœur et de dents, la stérilité et le cancer (Moore, 2008, Foyet *et al.*, 2015, Orwa *et al.*, 2009, Jiofack *et al.*, 2010). Toutes les parties de la plante sont sollicitées : les écorces de la racine, les écorces du tronc, les feuilles. Le mode de préparation est la décoction, l'infusion, la macération et l'extraction. Le mode d'administration que l'on peut citer : la boisson, l'application, le lavement et le massage avec différentes catégories d'utilisation comme les blessures, des troubles digestifs, musculosquelettiques, cutanés, respiratoires et de grossesse-naissance. Cependant, force est de constater que la méconnaissance des composés chimiques responsables d'activités biologiques des plantes médicinales utilisées cause d'énormes préjudices aux prescripteurs. Les doses administrées restent imprécises (Bruneton, 2009).

Ces dernières décennies, l'utilisation des produits naturels pour la découverte de médicaments a diminué au profit des méthodes combinatoires qui peuvent générer rapidement de grandes bibliothèques de composés potentiellement bioactifs. Dans leur perspective, Paterson et Anderson en 2005 suggèrent qu'il pourrait être temps pour revisiter le dogme dominant et examiner les façons dont les produits naturels peuvent continuer à inspirer le développement de nouveaux médicaments.

L'extrait au méthanol des écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* a été testé contre certains types de cancer (Tagne *et al.*, 2014) et les résultats ont été très concluants. Ces résultats des études préliminaires et l'absence d'enquête ethnopharmacologique, en particulier sur les racines et écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* nous contraignent d'exécuter des expériences plus complètes pour isoler et caractériser les composés bioactifs responsables des effets inflammatoire et cytotoxique observés.

Trois chapitres structurent cette thèse :

Le premier chapitre intitulé aperçu botanique et généralités sur l'inflammation dans les maladies neurodégénératives et le cancer ;

Le deuxième chapitre met en évidence les résultats expérimentaux obtenus au cours de ces études : extraction, activités biologiques des extraits et composés, isolement, caractérisations et quelques transformations chimiques des composés purs isolés ;

Le troisième chapitre rassemble le matériel et les méthodes utilisés pour la purification et l'évaluation des activités biologiques antineurodégénérative et cytotoxique des différents extraits et composés isolés de *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae).

Et enfin, une liste de la littérature consultée pour la rédaction de cette thèse est présentée à la fin de ce document, puis en annexe une liste de publications issues de cette thèse donnée.

# CHAPITRE I : APERÇU BOTANIQUE ET GENERALITES SUR L'INFLAMMATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES ET LE CANCER

Les progrès scientifiques, couplés à leurs applications technologiques dans le domaine des technologies médicales, bouleversent le monde que l'être humain pouvait imaginer. Les recherches médicales et scientifiques publiques ainsi que les progrès de l'éducation et des conditions de vie ont considérablement réduit le risque qu'une pandémie soit causée par un agent infectieux. Mais ce domaine de la santé connaît bien des défis. Les maladies neurodégénératives et le cancer ne cessent de bouleverser le monde. Elles sont deux problèmes importants de santé publique accrue (Abramson *et al.*, 2010 ; Herrinton *et al.*, 2007). Les causes de ces maladies sont inconnues et probablement multifactorielles associant le processus inflammatoire qu'une infection virale peut être la cause du début de ces maladies comme la sclérose latérale amyotrophique type 4 (ALS 4) et à la dégénérescence cancéreuse. Les maladies neurodégénératives sont le résultat d'accumulation de certaines protéines anormales dans le cerveau et la moelle épinière. Le cancer, lui, résulte d'un processus pathologique complexe par la multiplication incontrôlée des cellules dans l'organisme. La chronicité et l'incurabilité sont deux éléments caractéristiques et leur prise en charge nécessite un suivi à long terme. C'est ainsi que la population mondiale utilisait, par exemple, les décoctions d'écorces de karité afin de traiter les infections ou soigner les maladies neurologiques.

## I.1. APERÇU BOTANIQUE

### I.1.1. Aperçu sur les Sapotaceae

La famille des Sapotaceae est une famille de plantes dicotylédones numériquement dominante dans la flore et aussi bien dans la végétation (Emberger, 1960 ; Berhaut, 1967 ; Adjanohoun *et al.*, 1973). Chaque année, de nouvelles espèces sont explorées et estimées à plus de 800 espèces réparties en plus de 53 à 57 genres. Les Sapotaceae sont des arbres ou des arbustes, persistants ou caducs de taille moyenne de 6 à 12 mètres, au fût court et noueux, et, pour une espèce, une liane ligneuse. Les feuilles sont simples alternes, rarement sub-opposées, avec de latex blanc collant, sans stipules, aux marges entières ou très rarement dentées, fréquemment groupées à l'extrémité des rameaux. Le limbe, souvent coriace, a une nervation pennée (Vuillet, 1911). Les Sapotaceae sont aussi caractéristiques des plantes à fleurs, qui ont des fruits à baie à pulpe comestible. Dans les Sapotaceae, nous pouvons citer les quatre genres à distribution circumtropicale : *Manilkara*, *Sidéroxylon*, *Pouteria* et *Chrysophyllum* (Pennington, 1991).

Cette famille colonise des diverses classes de composés chimiques comme des saponines, des flavonoïdes, des composés polyphénoliques, des stéroïdes et des terpénoïdes. Ces importants métabolites secondaires sont des molécules naturelles potentiellement bioactives comme une alternative pour le traitement contre beaucoup de maladies infectieuses et autres.

### I.1.2. Aperçu sur le genre *Vitellaria*

*Vitellaria* est considéré comme un genre mono-spécifique (Bonkougou, 1987). Il n'existe donc pas d'espèce du même genre que le karité. C'est un arbre poussant dans les savanes arborées de l'Afrique de l'Ouest (Mali, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Ghana, Guinée, Nigeria, Bénin, Sénégal) mais aussi également en République du Congo, République Démocratique du Congo (RDC), République Centrafricaine (RCA), Soudan et en Ouganda (DFSC, 2000) (figure 4, couleur verte) ainsi qu'au Cameroun (Aubreville, 1950, 1960), principalement au nord où quelques individus sont présents sur les hauts plateaux de l'Adamaoua à 1200 m d'altitude et au-delà.



**Figure 1** : Aire en vert de répartition géographique du *Vitellaria paradoxa* en Afrique (Allal *et al.*, 2008).

### I.1.3. Aspects botaniques sur *Vitellaria paradoxa*

*Vitellaria paradoxa* décrit par Carl Friedrich Von Gaertner en 1805 (Ruysen, 1957) est communément appelé karité. Le nom « karité » signifie « arbre à beurre » en wolof (Sénégal). On l'appelle aussi *si yiri* (prononcer "shi yiri") en bambara (Mali) (d'où son nom anglais, « shea tree »). Au Bénin on l'appelle *Tangue* en Biali, *Balawa* en Sango (RCA) et *Di soro* en Mboum (RCA, Tchad et Cameroun). Le karité est un oléagineux non conventionnel appartenant à la famille de Sapotaceae.

#### I.1.3.1. Les aires de distribution

L'arbre à beurre, le karité sous son ancienne appellation *Butyrospermum parkii* est la seule et l'unique espèce de *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertner selon la classification phylogénétique appartenant au genre *Vitellaria* et à la famille des Sapotaceae (Hall *et al.*, 1996). Les aires écologiques du karité sont très étendues. Cet arbre sacré se trouve essentiellement en Afrique (Matig *et al.*, 2006) ; Sanou et Lamien 2011 ; Kassamba, 1997), en savane arborée et, dans la zone qui

s'étend de la frontière Sénégal-guinéenne pour s'enfoncer vers l'Afrique Centrale à travers le Mali, le Nord de la Côte d'Ivoire, le Burkina-Faso, le Nord du Ghana, du Togo, du Bénin puis du Nigeria ou du moins, les zones soudaniennes et sahéliennes au Nord de l'équateur (Pehaut, 1976 ; Chevalier, 1946) (figure 1).

Cette espèce est utilisée en alimentation humaine (exemples : graisse pour la cuisine, adjuvant en chocolaterie), en médecine traditionnelle (cicatrisant, gastrite, hémorroïde, céphalée, antivenimeux), pour l'affouragement du bétail, pour l'artisanat et pour couvrir les besoins énergétiques. Sur le plan thérapeutique, la plante *Vitellaria paradoxa* a aussi de nombreuses utilisations dans la médecine traditionnelle, en particulier la décoction des écorces, des racines et des feuilles.

#### I.1.3.2. Etude botanique et position systématique

D'après la nomenclature binomiale des espèces, on classe *Vitellaria paradoxa* dans le règne végétal, sous règne des *Angiospermes*, classe des *Magnoliopsida*, sous-classe des Gamopétales appartenant à la famille des Sapotaceae.



écorce du tronc



fruit-feuilles



arbre entier



récolte



racines

**Photographie 1** : Ecorce du tronc, fruit-feuilles et arbre entier de *Vitellaria Paradoxa* (BAIRY, 2012 et 2016).

#### I.1.3.3. Description botanique de *Vitellaria paradoxa*

*Vitellaria paradoxa* est un arbre de croissance lente qui peut atteindre une quinzaine de hauteur. Son écorce grise foncée profondément fissurée et découpée régulièrement (photographie 1), produit un peu de latex blanc peu collant lorsqu'elle est coupée (Adu-Ampomah *et al.*, 1995), ses feuilles sont simples et oblongues aux bords ondulés caractéristiques de 12 à 30 cm sur 4 à 10 cm (Matig *et al.*, 2006). Des fleurs blanches longues de 22 cm, à calice rouge à 8 lobes, corolle en cloche de 8 lobes. Ces fruits ovoïdes présentent une seule graine de forme variable, de couleur verte à jaune à la maturité, 4 à 5 cm de long et contient très souvent une seule graine noyée dans une pulpe sucrée et sa graine brune de 3 cm de long environ, à la coquille luisante, appelée la noix de karité. La récolte est réservée aux femmes d'où le qualificatif « *d'or des femmes* ». Les fruits de karité sont consommés directement et le beurre extrait de l'amande constitue la principale source de lipides végétaux en milieu rural (MEA, 2009 ; Carette *et al.*, 2009).

#### I.1.3.4. Données phytochimiques et pharmacologiques

Les essais chimiques des extraits de toutes les parties de *Vitellaria paradoxa* ont permis de caractériser la composition chimique du végétal. Ces résultats ont montré la présence : des alcaloïdes, des stéroïdes, des saponines, des tanins, de l'acide cinnamique, des tocophérols (vitamine E), des glucides et des sucres simples (Ndukwe *et al.*, 2007). Leurs activités biologiques (dépresseur ou stimulant, sympathomimétique) s'exercent dans les domaines les plus variés : anti-inflammatoires, antiarthritiques et anticancéreux (Tagne *et al.*, 2014 ; Orwa *et al.*, 2009 ; Moore, 2008 ; Foyet *et al.*, 2015 ; Jiofack *et al.*, 2010).

#### I.1.3.5. Aspects physiologiques et environnementaux

Les ressources naturelles en général et en particulier le karité de la zone des savanes guinéennes et soudaniennes connaissent une dégradation excessive et continue due au dérèglement climatique et aux activités anthropiques (Pontanier, *et al.*, 1995) ainsi qu'à la sécheresse, le parasitisme, l'attaque des insectes, les feux de brousse et à la dégradation des sols liée aux techniques culturales (Maïga, 1990 ; Boussim, 1991 ; Lamien, 2006). Un constat amer sur l'utilisation des pesticides comme les herbicides les plus utilisés au nord du Cameroun pour les cultures de maïs, du mil, de haricot et de l'arachide provoque la perte considérable de l'espèce. Cette mauvaise pratique s'étend jusqu'aux villages voisins faisant frontière entre la Centrafrique et le nord du Cameroun. L'association de certaines pratiques rudimentaires comme la coupe du bois de chauffe, le surpâturage (éleveurs peulhs), les longues phases de mise en culture permanente, la réduction de la durée des jachères (Oldeman, *et al.*, 1991) accentue la disparition massive de l'espèce *Vitellaria paradoxa*. Le karité s'adapte bien au sol sec et non argileux humide, siliceux, marécageux ou des zones d'inondations (Zerbo, 1987). Ces indices peuvent servir des pistes pour le reboisement du karité qui constitue aujourd'hui une importance économique mais également un grand intérêt pharmacologique. La

sylviculture pourrait être avantageuse malgré la croissance lente de cette espèce oléagineuse. Nombreux projets sont initiés sur la multiplication des jeunes plants mais demeurent peu exploitables.

#### I.1.4. Quelques usages de *Vitellaria paradoxa*

Des parties aériennes jusqu'aux racines de *Vitellaria paradoxa* ont été longtemps utilisées par la population rurale de l'Afrique tropicale et de l'Afrique sahélienne pour traiter les inflammations, le cancer et certaines pathologies. Sur le plan socioculturel et économique, le karité joue un rôle très important, surtout ses fruits font l'objet d'un commerce intense comme le troisième produit d'exportation dans l'économie Burkinabé. La période de production du karité est généralement de mai à août. Cette période coïncide avec la saison des pluies et après la récolte, les graines de karité sont transformées de façon traditionnelle en huiles végétales par des procédés simples à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Vu l'importance d'utilisations des graines, certains chercheurs se sont consacrés aux études de conservation en vue d'éviter les pertes pendant les périodes de production. Les connaissances scientifiques aussi bien sur cette plante comme les racines et les écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* restent hélas, encore mal élucidées.

L'expérience a toujours montré que de tels usages contribuent à la disparition progressive de l'espèce. De ce fait, ces essences à utilisations diverses et aux indices élevés d'utilisation méritent des regards particuliers dans les stratégies de gestion des espèces spontanées.

**Tableau 1** : Usages de *Vitellaria paradoxa* (Nafan *et al.*, 2001 ; UNIFEM, 1997 ; PAF 1999 ; Booth *et al.*, 1988 ; Adoum, 1996 ; Asubiojo *et al.*, 1982).

Propriétés Partie de la plante	Pharmaceutiques et médicales	Cosmétiques et autres usages
Noix (graine)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soins des entorses</li> <li>• Massage</li> <li>• Cicatrisant</li> <li>• Revitalisant (fatigue)</li> <li>• Adjuvant en chocolaterie</li> <li>• Collyre (soins des yeux)</li> <li>• Antivenimeux</li> <li>• Diarrhée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Huile de cuisine</li> <li>• Conservation des aliments (viandes en particulier)</li> <li>• Crème dermatologique</li> <li>• Défrisant</li> <li>• Pommade de beauté</li> <li>• Savonnerie traditionnelle</li> <li>• Combustible pour les lampes</li> <li>• Enduits pour les cérémonies traditionnelles</li> <li>• Etanchéité (habitations)</li> </ul>
Feuilles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antalgique (tête, ventre, yeux, ...)</li> <li>• Soins des œdèmes, baisse de la vue, ulcères de l'estomac</li> <li>• Rétablit les menstrues</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pratiques occultes (désenvoutement des maisons, cérémonies funestes)</li> <li>• Augmentation du rendement en huile de karité</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ictère, nausées, diarrhée, constipation</li> <li>• Céphalée, fièvre</li> <li>• Trachome, conjonctivite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Emballage alimentaire</li> <li>• Aliment du bétail</li> </ul>
Racines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soins de l'ictère, du rhumatisme, des maux de ventre, etc.</li> <li>• Rétablit les menstrues</li> <li>• Gastrite, stérilité</li> <li>• Cancer du foie</li> </ul>	
Guis (Tapinanthus sp.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lutte contre le cancer du sein</li> <li>• Antibiotique (dysenterie)</li> <li>• Antipyrétique infantile</li> <li>• Antalgique</li> <li>• Facilite les accouchements (psychoprophylactiques)</li> <li>• Soins de l'ictère</li> <li>• Soins des rhumatismes</li> <li>• Augmentation de la fertilité (humaine et animale)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisé pour le dressage des chiens</li> <li>• Augmente la fortune</li> <li>• Augmente la productivité des cultures</li> <li>• Séduction</li> </ul>
Ecorces et latex	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soigne des maux de cœur et de dents</li> <li>• Lutte contre le cancer du sein</li> <li>• Antitussif</li> <li>• Soigne l'ictère, les saignements de gencive, l'ulcère d'estomac, etc.</li> <li>• Désinfecte les plaies et guérit les morsures de scorpion</li> <li>• Dysenterie, toux</li> <li>• Hémorroïde</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teinturerie</li> </ul>
Bois		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biomasse (bois de chauffage, charbon, ...)</li> <li>• Bois d'œuvre</li> <li>• Sculpteurs et tambours</li> </ul>
Tourteaux et épicarpe		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Source de potasse pour les savonneries</li> <li>• Combustibles de cuisine</li> <li>• Lutte contre les termites</li> </ul>
Fleur		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apiculture</li> </ul>

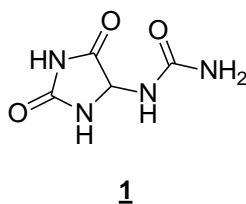


### I.1.5. Etudes phytochimiques antérieures et activités biologiques

Plusieurs études chimiques montrent que le karité est une source potentielle de lipides. En effet, le karité produit des fruits dont l'amande interne recèle une matière grasse (beurre) pour environ une moitié de son poids. Il est couramment utilisé en industries agroalimentaire et cosmétique (Wallace *et al.*, 1995 ; Goreja, 2004). Ces travaux presque axés sur le fruit de karité ont permis d'isoler un certain nombre considérable de métabolites secondaires comme les alcaloïdes (Warra, 2011), les polyphénoliques, les phytostérols, les tocophérols et les triterpènes (Zhang *et al.*, 2014).

#### I.1.5.1. L'alcaloïde isolé du fruit

Composés azotés, basiques, quasi totalement hétérocycliques dont les plantes sont considérées comme une source riche en alcaloïdes qui peut être utilisée pour le développement de médicaments. Incomparables vertus thérapeutiques qui sont jugées nécessaires de prévenir l'apparition de diverses maladies neurodégénératives, des radicaux libres ou le stress oxydatif. De nombreuses études ont été menées sur l'espèce *Vitellaria paradoxa*. Les tests biologiques des extraits ont révélé que le karité contient des alcaloïdes dont l'identification structurale est peu connue. Seuls les travaux de Warra en 2011 ont permis d'isoler et caractériser l'allantoin **1**.



**Schéma 1** : Structure chimique de l'allantoin

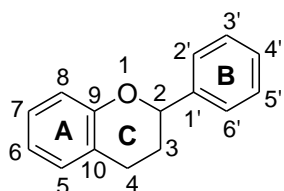
#### I.1.5.2. Les polyphénols

Les composés polyphénols ou phénoliques représentent tout un large spectre des substances naturelles. Généralement des dérivés benzoïques qui sont des dérivés simples de l'acide phénolique comme l'acide gallique (Qureshi *et al.*, 1981) et des dérivés de l'acide cinnamique, en plus, les flavonoïdes appartiennent aux polyphénols. Ils sont une source potentielle de l'alimentation humaine (Brat *et al.*, 2006). Ils sont présents dans des fruits et légumes ainsi que dans boissons à priori le vin, le jus de fruits, les raisins ou le maïs bleu. La teneur en flavonoïdes de la pulpe de fruits varie selon le degré de maturité et en fonction des critères génotypiques plus complexes. Du coup, ceci rend une diverse activité biologique des composés phénoliques telle que des propriétés antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires, antivirales et anticancéreuses, présents dans certaines cultures ou les fruits et, en raison de leurs propriétés, les plantes ont attiré l'attention des chercheurs. La présence notoire d'au moins un noyau benzénique dans la molécule est souvent greffé, relativement un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils possèdent des méthodes d'extraction spécifiques qui génèrent un certain nombre considérable des composés. L'étude des propriétés principales des

polyphénols, y compris les relations entre leur activité biologique et structure chimique ont permis de classer en deux grandes familles : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes. Leur origine biosynthétique mixte vient de l'acide shikimique et triacétate.

### 1.1.5.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes étant définis comme des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont presque toujours hydrosolubles et sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont caractérisés par un squelette de base à 15 carbones de structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Parmi les flavonoïdes, on trouve principalement en abondance : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les isoflavones, les anthocyanidines (Said *et al.*, 2009) (Schéma 8). Tandis que les dihydroflavonols, les chalcones, dihydrochalcones, les aurones ainsi que les coumarines sont présents à de faibles concentrations dans les céréales et les microorganismes.



Squelette de base de flavonoïde **2**

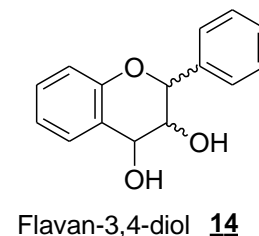
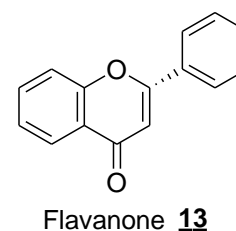
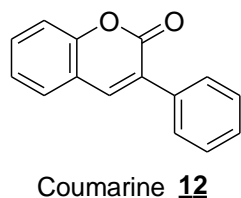
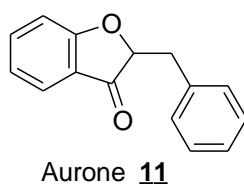
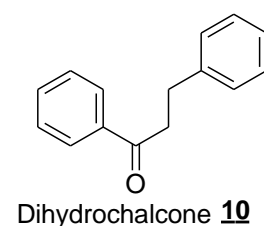
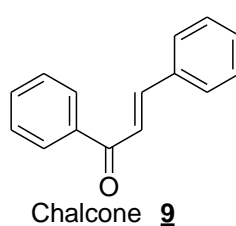
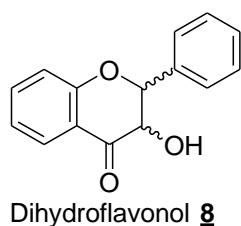
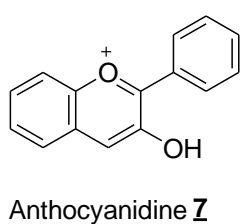
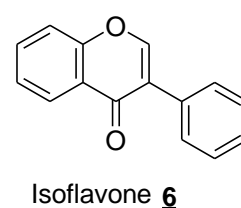
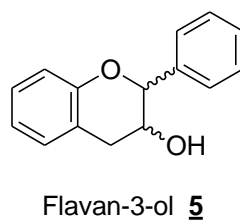
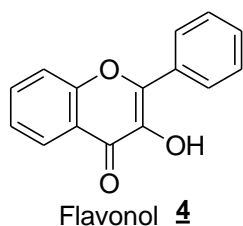
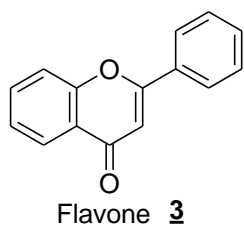
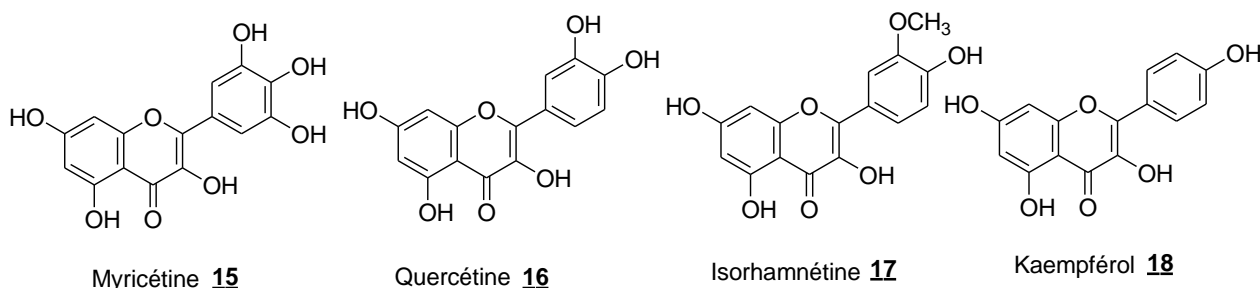


Schéma 2 : Les types squelettes des flavonoïdes.

### - Les flavonols

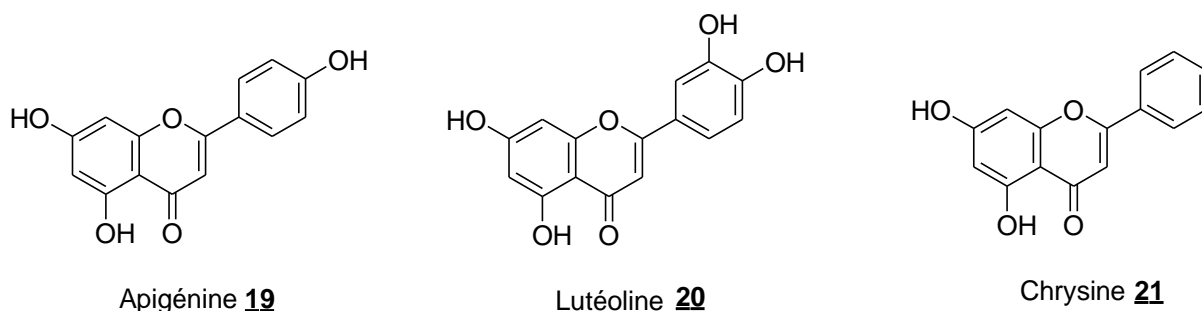
Les flavonols sont sans doute la molécule la plus répandue des flavonoïdes dans le règne végétal. Ils sont dispersés dans des végétaux à l'exception de champignons et d'algues. La distribution et la structurale des variations de flavonols sont vastes et ont été bien documentées. Les flavonols tels que la myricétine, l'isorhamnétine, la quercétine et le kaempférol (schéma 3) se trouvent habituellement sous formes des aglycones ou *O*-glycosides.



**Schéma 3** : Structures chimiques de myricétine, isorhamnétine, quercétine et kaempférol.

### - Les flavones

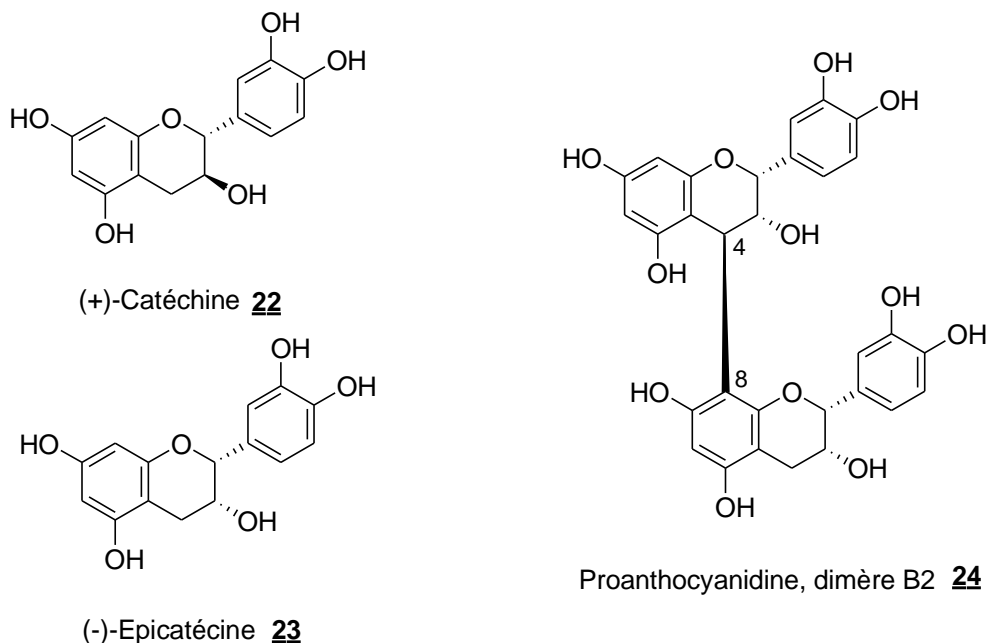
Les flavones ont une relation structurale très étroite aux flavonols (schéma 4). Ils sont très substitués par l'hydroxylation, la méthylation, *O*- et *C*-alkylation, ainsi que la glycosylation. Mais ils sont rarement distribués par rapport aux flavonols dans des végétaux.



**Schéma 4** : Les flavones : apigénine, lutéoline et chrysine (Zhang *et al.*, 2014).

### - Les flavan-3-ols

Les flavan-3-ols sont la sous-classe la plus complexe des flavonoïdes allant de monomères simples comme la catéchine et son isomère (-)-épicatéchine, pour les proanthocyanidines oligomères et polymères, qui sont aussi appelés tanins condensés (schéma 5). Au regard de la stéréochimie, ils sont des molécules planes, contrairement aux flavones, flavonols, isoflavones et anthocyanidines. La (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, sont très répandus dans la nature tandis que (-)-catéchine et (+)-épicatéchine sont relativement rares (Clifford, 1986). Eventuellement une possible transformation peut également se produire au cours de l'agroalimentaire (Seto *et al.*, 1997).

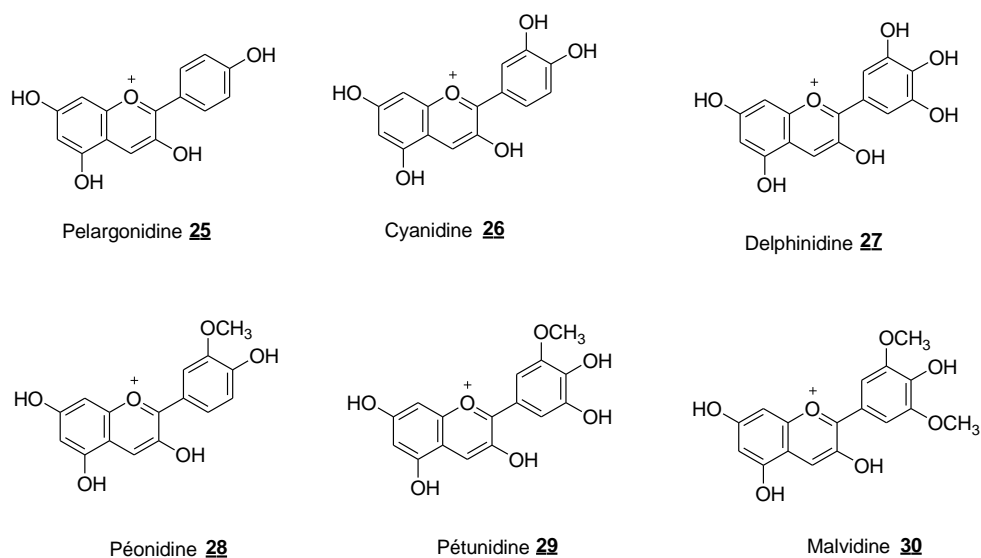


**Schéma 5** : Structures des flavan-3-ols.

- Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont aussi l'un des composés flavonoïdes les plus abondants. Ils sont principalement comme leurs dérivés conjugués, anthocyanes et sont dispersés dans toutes les parties du règne végétal, particulièrement évident dans les tissus de fruits et de fleurs où ils sont responsables des couleurs rouges, bleu et violets. Ces couleurs sont dues à l'absorption de la lumière.

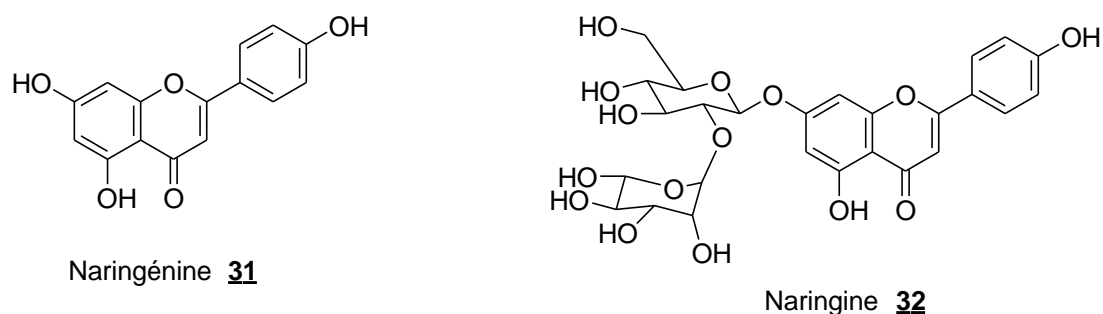
Plusieurs études supposent que les anthocyanidines ont des activités anticancérogènes, anti-inflammatoires, fournissent la prévention de maladies cardiovasculaires et autres. Les anthocyanidines plus courantes sont pélargonidine, cyanidine, delphinidine, péonidine, pétunidine et malvidine (schéma 6).



**Schéma 6** : Les principales structures des anthocyanidines.

- Les flavanones

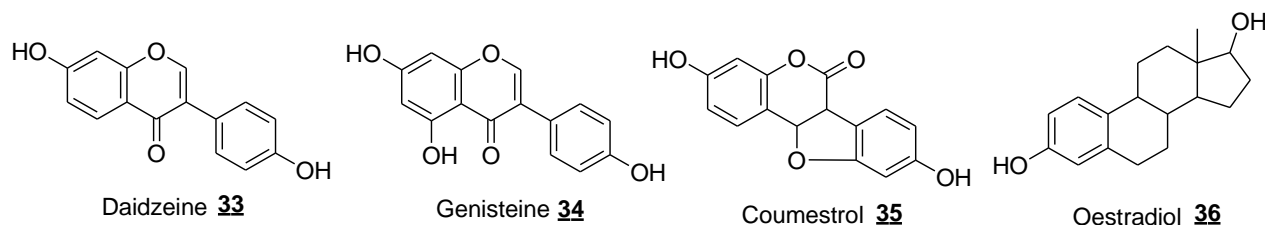
Les flavanones ont un centre chiral en C2. Dans la majorité des flavanones naturels, le cycle C est attaché au cycle B en  $\alpha$ -configuration à la position C2. L'édifice de flavanone est très réactif et permet de synthétiser très facilement les dérivés hydroxylés, glycosylés et *O*-méthylés.



**Schéma 7** : Structures des flavanones naringénine et naringine.

- Les isoflavones

Les isoflavones sont des isoflavonoïdes caractérisés par le cycle B attaché au carbone C3 plutôt que la position de carbone C2 par rapport aux flavanones. Cette particularité donne aux isoflavones une structure ressemblant aux œstrogènes d'où l'appellation phyto-œstrogènes. Elles se trouvent presque exclusivement dans les légumineuses avec les plus hautes concentrations que l'on retrouve chez le soja. Le schéma 14 suivant présente certaines structures des isoflavones.



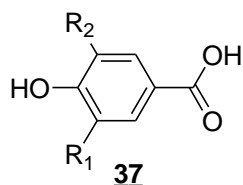
**Schéma 8** : Structures chimiques des isoflavones.

*1.1.5.2.2. Les non-flavonoïdes*

Les non-flavonoïdes sont presque divisés en trois groupes : les acides phénoliques C6-C1, plus particulièrement l'acide gallique, vanillique, ..., les hydroxycinnamates de structure C6-C3 et leurs dérivés conjugués, ainsi que les stilbènes caractérisés par un squelette de base à 14 carbones de structure C6-C2-C6.

- Les acides phénoliques

Ces acides phénoliques sont également connus sous le nom des dérivés benzoïques, ils sont des dérivés simples comme l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique et l'acide syringique. Le tableau 2 ci-après retrace la structure des acides phénoliques avec différents substituants.



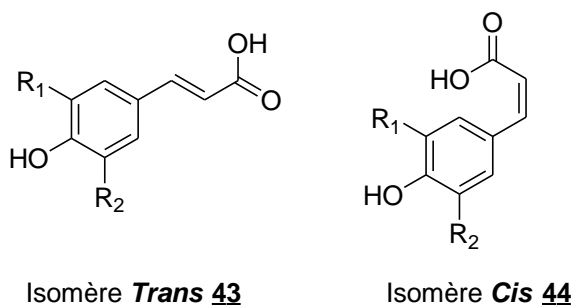
**Schéma 9** : La structure de base de l'acide benzoïque.

**Tableau 2** : Les dérivés de l'acide benzoïque

Structures de divers acides	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Composés	Références
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	H	<b>38</b>	Qureshi <i>et al.</i> , 1981
Acide protocatéchique	OH	H	<b>39</b>	
Acide vanillique	OCH <sub>3</sub>	H	<b>40</b>	
Acide syringique	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>41</b>	Qureshi <i>et al.</i> , 1981 ; Bruneton, 1993
Acide gallique	OH	OH	<b>42</b>	

- Les hydroxycinnamates

Appelés encore dérivés de l'acide cinnamique présentent un squelette carboné C6-C3 donc l'isomère *Trans* **43** prédomine sur celui de *Cis* **44**. L'acide cinnamique (tableau 5) est en principe complexé à une multitude de molécules (acides hydrocinnamiques) dans le but de diminuer ou éradiquer totalement sa toxicité accentuée.



**Schéma 10** : Les structures des isomères de l'acide cinnamique.

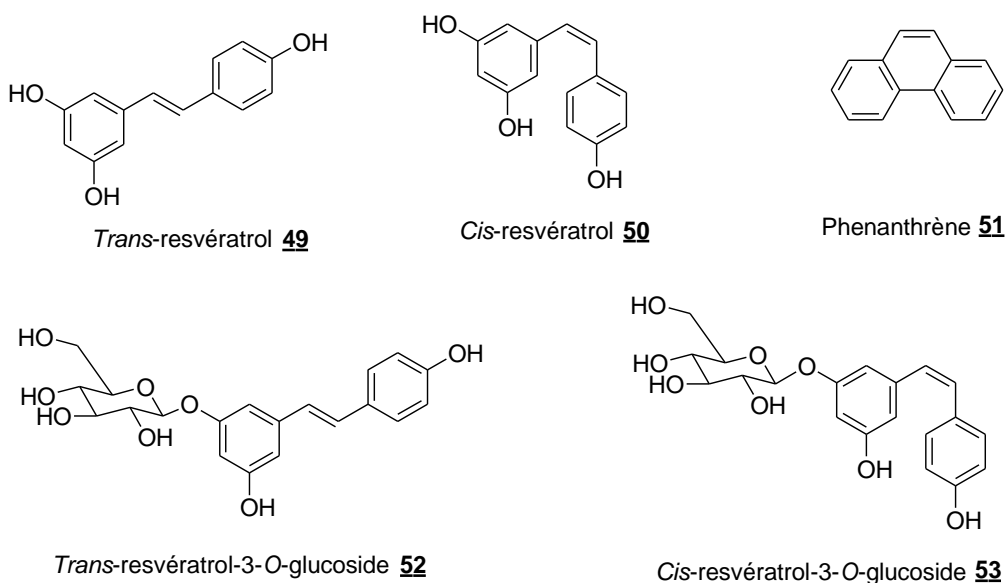
**Tableau 3** : Les dérivés de l'acide cinnamique

Diverses molécules	R1	R2	Composés	Références
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H	<b>45</b>	(Crozier <i>et al.</i> , 2006)
Acide caféique	OH	H	<b>46</b>	
Acide ferulique	OCH <sub>3</sub>	H	<b>47</b>	
Acide sinapique	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>48</b>	

- Les Stilbènes

Les stilbènes ont également la structure à C6-C2-C6 comme les flavonoïdes. Les membres de cette famille constituent une diversité de molécules des composés polyphénoliques. Le resvératrol est la plus courante stilbène, de la configuration stérique (*trans* ou *cis*). Ces isomères sont présents dans les tissus végétaux principalement comme *trans*-resvératrol-3-O-glucoside. Ils sont produits dans des nombreuses familles de plantes et sont souvent impliqués dans leurs mécanismes de défense. Leurs

effets anti-inflammatoires ont un impact sur les fonctions cognitives chez l'homme et ne permettent pas de définir les mécanismes d'actions de ces molécules sur le vieillissement du cerveau tant normal que pathologique.

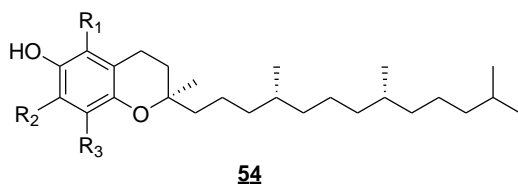


**Schéma 11** : Les structures des stilbènes *trans*- et *cis*-resvératrol et leurs dérivés glycosylés et, phénanthrènes.

### I.1.5.3. Les tocophérols

Appelés encore Vitamines E, les tocophérols sont des vitamines liposolubles dont l'intérêt bat le record tant dans les industries médicales et de la beauté. Ils jouent principalement le rôle d'antioxydant dans les membranes biologiques. En plus, les tocophérols évitent les thromboses et assurent la protection des globules rouges. Ils pourraient prévenir certaines maladies comme le cancer. Mais l'excès des tocophérols est aussi dangereux en complément de traitements antidépresseurs (Steven *et al.*, 2003 ; Badifu *et al.*, 1999).

Le terme vitamine E a vu le jour grâce aux travaux d'Herbert Evans et Katharine Bishop en 1924. Il recouvre un ensemble de huit molécules organiques dont quatre tocophérols et quatre tocotriénols. De ces huit formes naturelles, les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois (3) doubles liaisons sur la chaîne latérale à 16 atomes de carbone, substituée à un noyau chromanol (schéma 12). Le tableau 6 ci-dessous donne les tocophérols isolés des fruits de *Vitellaria paradoxa*.



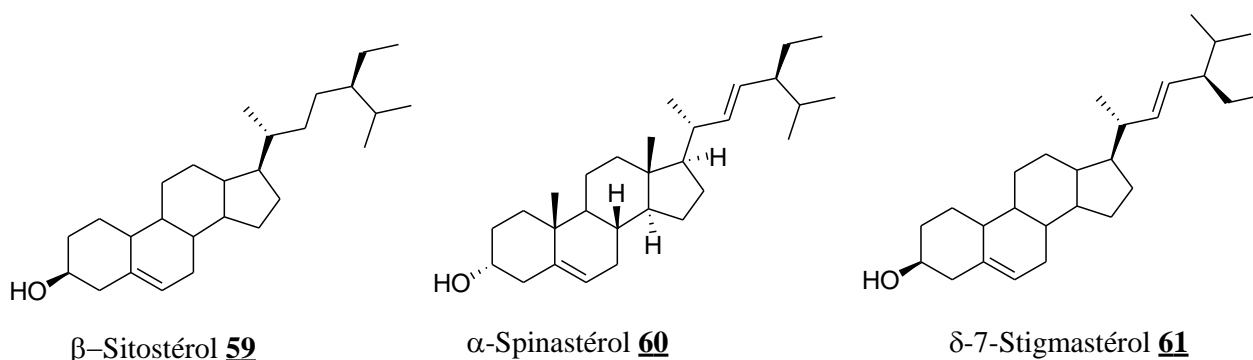
**Schéma 12** : Squelette de base d'un tocophérol.

**Tableau 4 :** Tocophérols isolés des fruits de *Vitellaria paradoxa*.

Noms	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Composés
$\alpha$ -tocophérol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	<u>55</u>
$\beta$ -tocophérol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	<u>56</u>
$\gamma$ -tocophérol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	<u>57</u>
$\delta$ -tocophérol	H	H	CH <sub>3</sub>	<u>58</u>

#### I.1.5.4. Les phytostérols

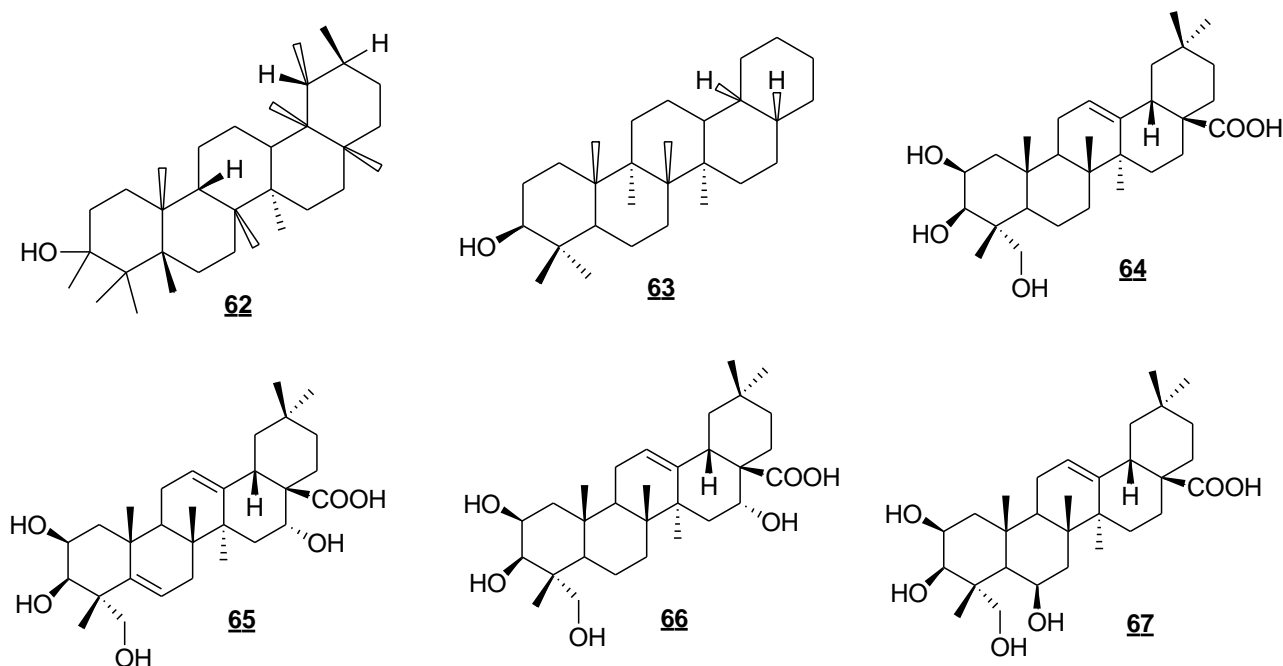
Les stérols dérivent essentiellement des terpènes. Chez les végétaux, ils sont identifiés aux phytostérols, ceux des animaux sont appelés zoostérols. Ces composés naturels sont semblables aux triterpènes tétracycliques en tirant leur précurseur biogénétique de squalène. Ils ont des propriétés cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires et analgésiques très marquées. Les stérols isolés (Steven *et al.*, 2003 ; Badifu, 1999) des fruits de *Vitellaria paradoxa* sont représentés dans le schéma 18 ci-après.

**Schéma 13 :** Quelques phytostérols isolés des fruits de *Vitellaria paradoxa*.

#### I.1.5.5. Les terpènes

Les terpénoïdes constituent un ensemble de métabolites secondaires issus des végétaux. Nombreuses études suggèrent qu'ils sont des ingrédients biologiquement actifs. Des triterpènes sont les composés principaux de certains fruits comme le butyrospermol 62 isolé de beurre de karité tandis que la  $\beta$ -Amyrine 63 de la feuille (Steven *et al.*, 2003), l'acide 5,6-dihydrobassique 64, l'acide 16 $\alpha$ -hydroxybassique 65, l'acide 5,6-dihydro-16 $\alpha$ -hydroxybassique 66 et l'acide 16 $\alpha$ -hydroxyprotobassique 67 isolés par Zhang et collaborateurs (Zhang *et al.*, 2014). La plupart des terpènes isolés du genre *Vitellaria* appartiennent au groupe des triterpènes.





**Schéma 14** : Quelques triterpènes isolés des fruits de *Vitellaria paradoxa* (Zhang *et al.*, 2014).

Il ressort d'une étude récente que les triterpènes pentacycliques sont majoritairement abondants dans *Vitellaria paradoxa* d'où ils méritent une attention particulière. Les triterpènes pentacycliques sont abordés dans les pages suivantes.

## I.2. APERÇU SUR LES TRITERPENES PENTACYCLIQUES

Les triterpènes constituent un groupe large et biologiquement intéressant de terpénoïdes et incluent une grande diversité structurale des métabolites secondaires avec un certain nombre de squelettes de carbone identifiés des organismes vivants terrestres et marins. Les triterpénoïdes regroupent des triterpènes, des stéroïdes, limonoïdes, quassinoides, et saponines triterpenoidales et stéroïdales. Plus de 30 000 composés sont dérivés de cette classe des produits naturels. Ces composés ont attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la chimie des produits naturels.

### I.2.1. Généralités sur les triterpènes

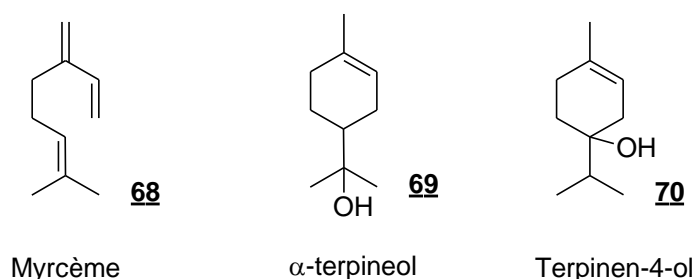
D'abord le terme terpène est en référence à la térébenthine qui, en plus des acides résiniques, contient aussi des hydrocarbures (Stradonitz, 1865 ; Wallach, 1910 et Ruzicka, 1945). Les règles de numérotation des carbones et dénomination des cycles des triterpènes pentacycliques requièrent la section F des recommandations de nomenclature de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) (Giles, 1999). Les clés de cette nomenclature ont longtemps été formulées par Allard et Ourisson (1957).

Les terpènes sont biosynthétisés à la suite du couplage de 2 entités au moins à 5 carbones dont la structure est celle de l'isoprène ou 2-méthylbuta-1,3-diène. Selon le nombre de ces unités, les

terpènes sont classés en monoterpènes à 10 atomes de carbone, diterpènes à 20 atomes de carbone, triterpènes à 30 atomes de carbone, tétra, etc. (Qureshi *et al.*, 1981 et Bruneton, 1993).

### I.2.2. Les monoterpènes

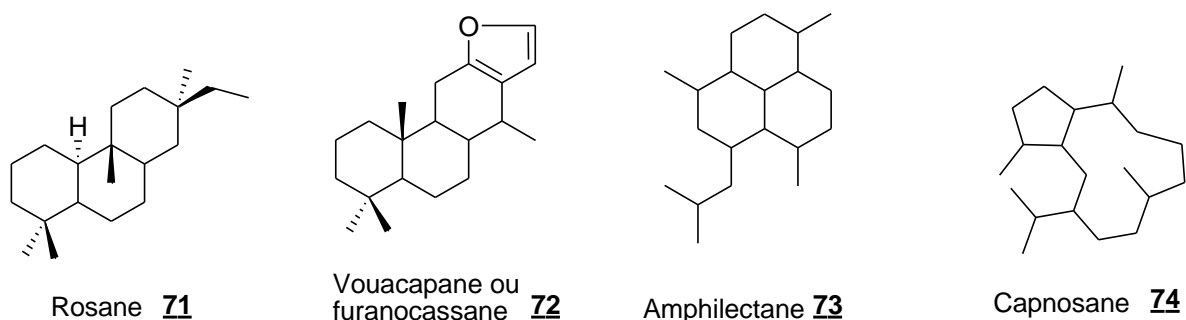
Les monoterpènes sont une classe des terpènes qui se composent de deux unités d'isoprène et ont la formule moléculaire C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>. Ils sont principalement des produits du métabolisme secondaire des plantes, bien que les classes spécialisées se produisent dans certains animaux et micro-organismes, et sont habituellement isolés dans les huiles essentielles obtenues par distillation par la vapeur ou extraction par solvants des feuilles, fruits, quelques duramens mais rarement dans les racines et écorces. Ils sont connus pour leurs activités biologiques telles que le cancer, et anticandidal, antimicrobiens, hypotendus, anti-inflammatoires, antiplasmodiques, etc.



**Schéma 15** : Les monoterpènes myrcène, α-terpinéol et terpinen-4-ol.

### I.2.3. Les diterpènes

Métabolites secondaires contenant 20 atomes de carbone qui dérivent de la condensation de quatre unités d'isoprényle. Biosynthétiquement le diphosphate de geranylgeranyl forme les diterpènes acycliques, bicycliques, tricycliques, tétracycliques et macrocycliques. On observe des activités allelopathique et cytotoxique chez les diterpènes.

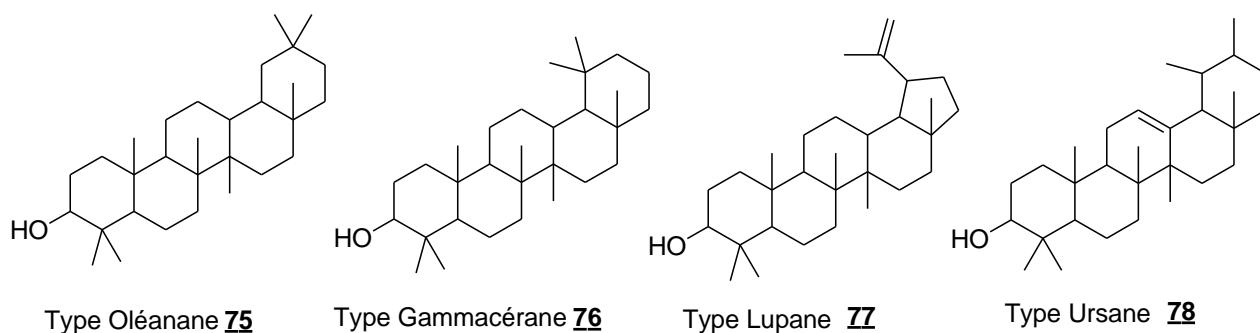


**Schéma 16** : Quelques diterpènes (Kuete, 2013).

### I.2.4. Les triterpènes

Les triterpénoïdes foisonnent les plantes comestibles et médicinales. On les retrouve également dans n'importe quels animaux et organismes marins. Ces substances naturelles sont structurellement diverses et complexes, elles sont caractérisées par un squelette de base de 30 atomes de carbone.

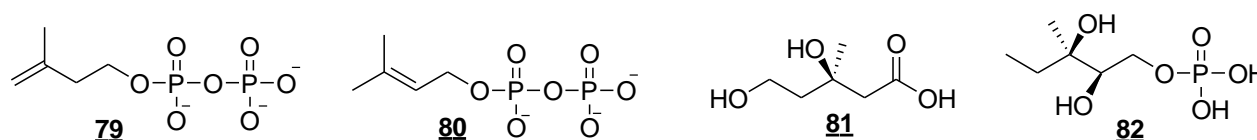
Dans les végétaux, les triterpénoïdes sont synthétisés par la voie d'acétate mévalonate. Selon les résultats de l'examen biologique des triterpénoïdes, il ressort que les triterpènes sont un groupe important de métabolites secondaires d'intérêts potentiels, présentant des activités pharmacologiques telles que antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, antivirale, hépatoprotecteur, immunorégulateur cardioprotective, hypolipidénique, gastroprotective, anticancéreuse jouent ainsi un rôle dans la prévention du cancer. Les enquêtes documentaires révèlent que les propriétés biologiques et pharmacologiques des triterpénoïdes et ses dérivés ont conduit à leur utilisation extensive de nos jours.



**Schéma 17** : Les principaux types de squelettes des triterpénoïdes pentacycliques.

#### I.2.4.1. Voies de biosynthèse des triterpènes diphosphonate d'isopentényle

Seuls le diphosphate d'isopentényle (IPP) **79** et le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) **80** (Schéma 23), demeurent et représentent les équivalents biologiques de l'isoprène. Cependant, il existe deux voies de biosynthèse, tout à fait différentes, aboutissant à l'IPP : la voie du mévalonate **81** et la voie du méthylérythritol phosphate **82**. Ils sont formés par condensation de 6 unités isopréniques, appelée squalène pour donner une structure carbonée à 30 atomes de carbone. Selon la biogénèse, ces triterpènes sont presque toujours hydroxylés en C<sub>3</sub> (carbone 3) et se subdivisent en trois (3) grandes classes des triterpènes à savoir : les triterpènes tricycliques, les triterpènes tétracycliques et les triterpènes pentacycliques.

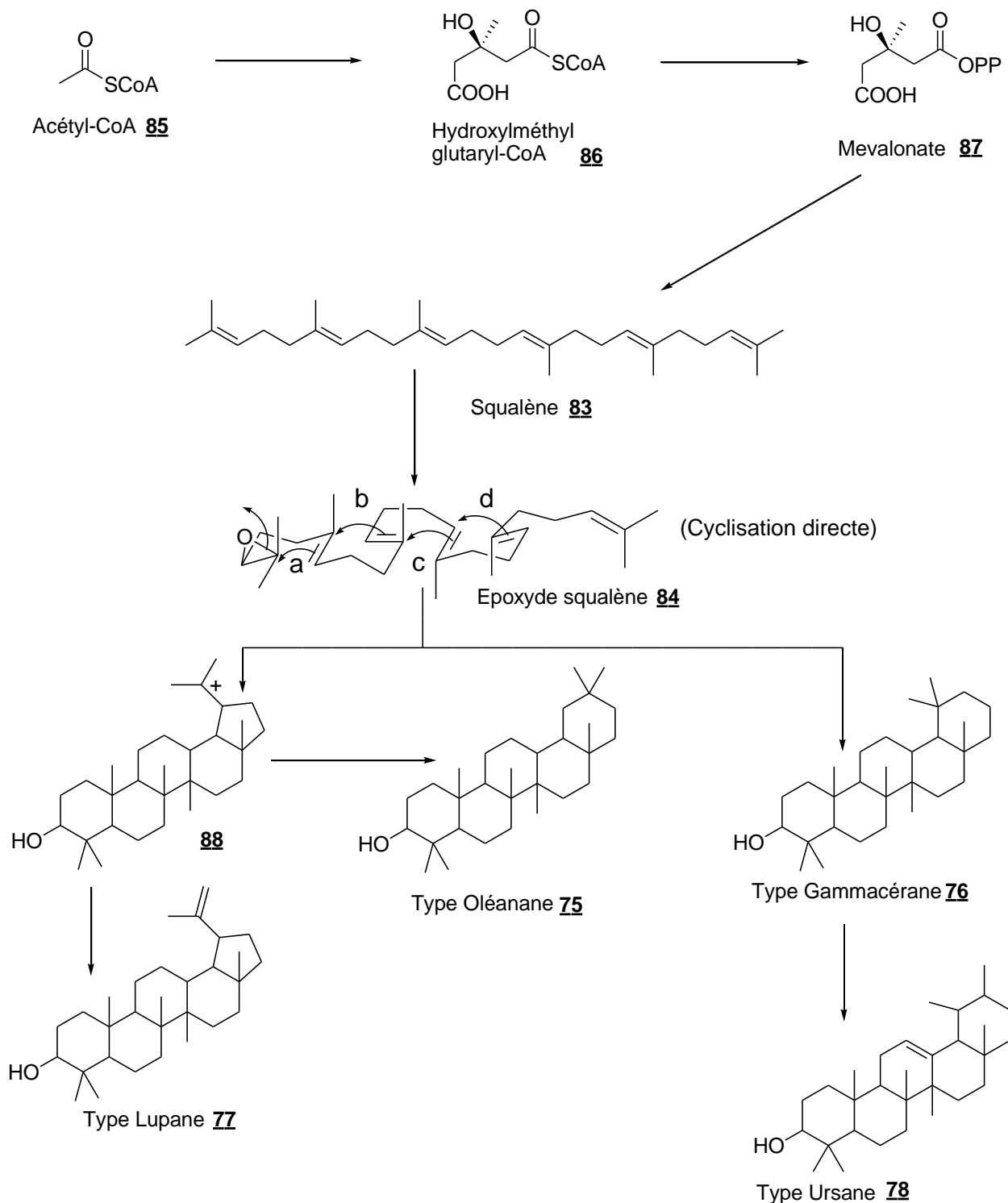


**Schéma 18** : Structures planes de précurseurs biosynthétiques des triterpénoïdes pentacycliques.

#### I.2.4.2. Origine des triterpènes pentacycliques

Selon les travaux de Ruzicka sur les mécanismes (Ruzicka, 1959) et l'éclairage des critères stéréo électroniques, en particulier à propos des cyclisations du squalène **83** ou de l'époxyde squalène **84** conduisent aux différents squelettes triterpéniques (Kuete, 2013 ; Abe *et al.*, 1993) ; Wendt et Schulz, 1998 ; Giles, 1999). La diversité des structures tridimensionnelles connues, par extension, sont issues

de chacune de ces familles ci-après (Schéma 19). Très souvent, les oses sont greffés sur une fonction alcool de ces structures de stéroïdes ou triterpénoïdes pentacycliques appelées l'aglycone.



**Schéma 19** : Voie de biosynthèse des structures de base des triterpènes pentacycliques.

### I.2.5. Quelques exemples des types de triterpènes pentacycliques

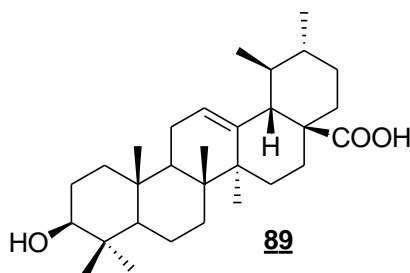
Les triterpènes pentacycliques sont généralement des acides carboxyliques très difficiles à volatiliser ou à entraîner par la vapeur d'eau. Leur solubilité dans l'eau, s'ils sont associés aux sucres (saponosides). Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires fréquemment rencontrés chez les végétaux. Ils tirent leur nom du latin *sapo* signifiant savon en raison de leur

propriété à former des solutions moussantes en présence d'eau. Ce phénomène est souvent observé en évaporation sous pression réduite dans le ballon à concentrer. Du point de vue pharmacocinétiques, les saponosides peuvent dans certains cas, restreindre ou inhiber la diffusion de la molécule à travers la membrane cellulaire. Autres conséquences, ils influencent fortement le transport à travers les barrières biologiques importantes comme la barrière hémato-encéphalique et bloquent ainsi l'entrée de plusieurs composés essentiels à l'intérieur du tissu cervical. Cependant, les triterpènes pentacycliques simples sont pratiquement insolubles dans l'eau (Jäger *et al.*, 2009). Ils sont extractibles par des solvants organiques comme méthanol, n-butanol, chloroforme, éther, acétate d'éthyle et benzène, par leur distribution sur tous les organes végétatifs.

Parmi ces triterpénoïdes pentacycliques, nous pouvons souligner les faits marquants de l'acide ursolique, l'acide oléanolique et l'acide bétulinique.

#### I.2.5.1. Le type ursane (l'acide ursolique)

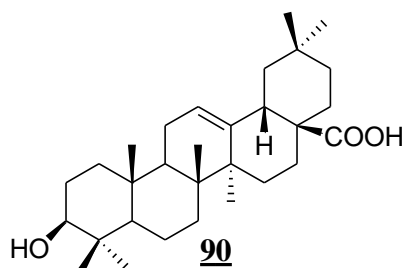
L'acide ursolique **87** est un exemple le plus courant de type ursane, connu sur le nom de l'acide 3 $\beta$ -hydroxyurs-12-en-28-oïque a été extrait pour la première fois par Trommsdorff en 1854 à partir des feuilles d'*Arctostaphylos uva-ursi* (Busserole ou Raisin d'ours, arbuste de la famille des Éricacées) ; lui donna le nom d'urson (Gintl, 1893). Les Plantes aromatiques ou des plantes utilisées en ethnopharmacologie en regorgent. Les recherches scientifiques ont révélé et confirmé plusieurs effets pharmacologiques à savoir : les effets anti-infectieux de cette molécule : antibactérien (Setzer *et al.*, 2006), antiviral (Xu *et al.*, 1996), antifongique, antiparasitaire (Germonprez *et al.*, 2005), antitumoral (Bishayee *et al.*, 2011 ; Kwon *et al.*, 2010), hépatoprotecteur (Wu *et al.*, 2011), antioxydant (Ismaili *et al.*, 2004), antiulcéreux, anti-hypertenseur (Somova *et al.*, 2003), antidiabétique (Ramirez-Espinosa *et al.*, 2011), hypolipémiant (Somova *et al.*, 2003), anti-inflammatoire (Baricevic *et al.*, 2001), etc. Récemment une activité potentielle thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer a été décrite (Wilkinson *et al.*, 2011). Tout ceci se résume par la capacité de l'acide ursolique à interagir avec les systèmes enzymatiques (Ali *et al.*, 2006), les acides nucléiques ou les membranes biologiques (Han *et al.*, 1997).



**Schéma 20** : Structure plane de l'acide ursolique.

### I.2.5.2. L'acide oléanolique

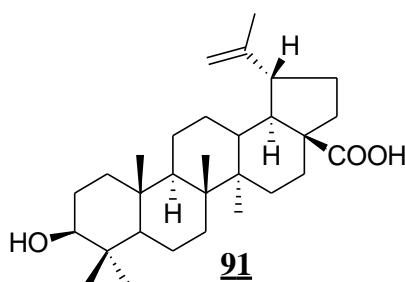
L'acide 3 $\beta$ -hydroxyolean-12-en-28-oïque **90** selon la nomenclature de l'IUPAC comme l'acide ursolique est le terme plus fréquent de type Oléane. L'acide oléanolique est très répandu dans plusieurs familles de Myrtacées et Oléacées. Il présente un point similaire avec l'acide ursolique vis-à-vis des activités biologiques. Il a de nombreux phénomènes biologiquement actifs comme antipaludéen (He *et al.*, 2005) et antibactérien (Liu, 2005), etc.



**Schéma 21** : Structure plane de l'acide oléanolique.

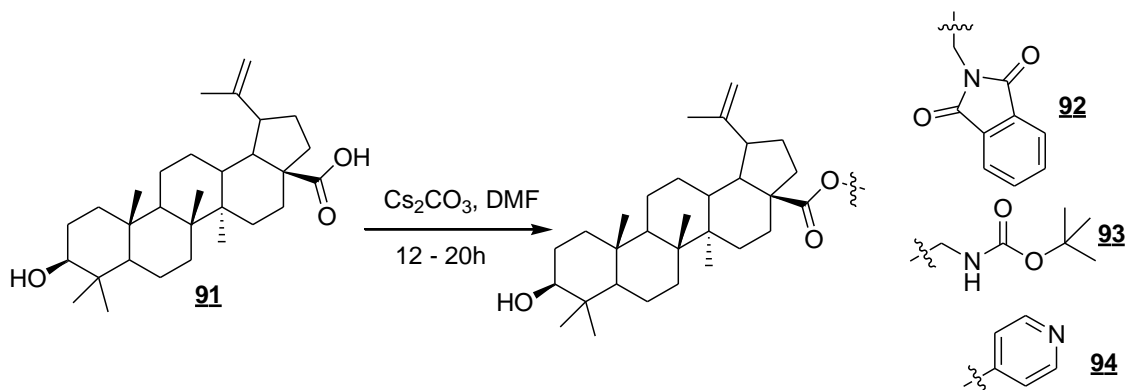
### I.1.5.3. L'acide bétulinique

L'acide bétulinique **91**, de la famille des triterpènes pentacycliques du lupane fut découvert par Soliman durant ses travaux de thèse sous le nom d'acide cornoliic et rebaptisé la même année par Robertson et ses collaborateurs, l'acide bétulinique (Robertson *et al.*, 1939). Désormais ce dernier lui convient et lui reste familier de divers dérivés comme l'acide lup-20(29)-en-28-oïque et 3 $\alpha$ H-cyclopenta[ $\alpha$ ]chrysène. Comme ses voisins de ces types de composés précédemment amorcés, il semblerait englober toutes les activités biologiques : inducteur d'apoptose (Thurnher *et al.*, 2003), immunomodulateur (Yi *et al.*, 2010 ; Yun *et al.*, 2003), antidiabétique (Genet *et al.*, 2010 ) et bien d'autres comme l'antibactérien (Setzer *et al.*, 2000). L'acide bétulinique et ses analogues structuraux ont fait l'objet de plusieurs études concernant leurs propriétés médicinales variées. L'acide bétulinique est la molécule la plus étudiée de cette série et possède une activité anticancéreuse *in vitro* sur un large éventail de tumeurs. Il est peu toxique et possède une sélectivité vis-à-vis des mélanomes. Toutefois, sa faible hydrosolubilité est un obstacle majeur pour le développement des études de phase préclinique.

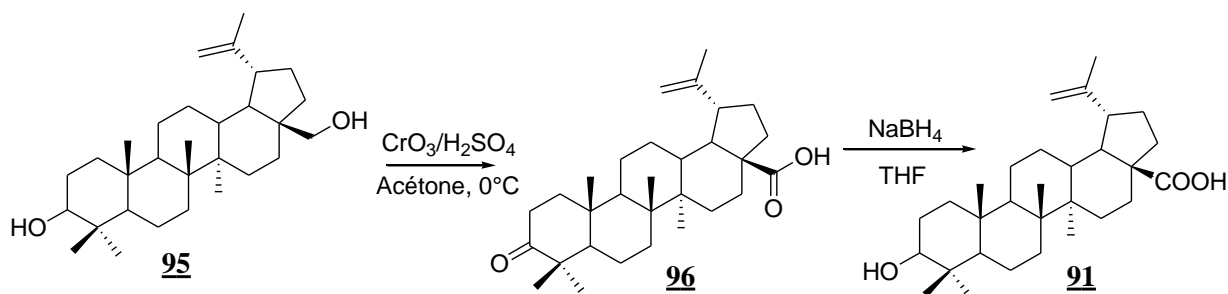


**Schéma 22** : Structure plane de l'acide bétulinique.

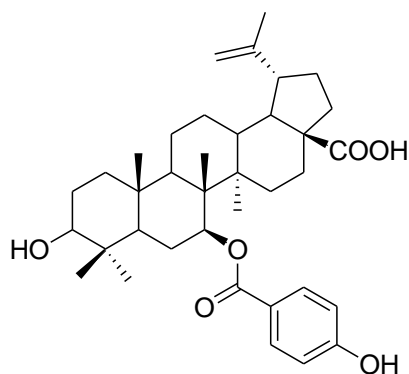
Vu d'importants intérêts potentiels des activités biologiques et pharmacologiques que présente l'acide bétulinique a suscité l'intérêt des chercheurs à se lancer dans des différentes méthodes de synthèse ou de relation structure-activité pour augmenter sa biodisponibilité et/ou l'obtention des dérivés plus actifs (Kim *et al.*, 1998) ; Genet *et al.*, 2010 ) (schéma 28). Comme le bétulinol, une molécule très proche de la même famille, extraite de l'écorce du bouleau blanc (*betula papyrifera*), peut être transformée relativement et facilement en acide bétulinique **91** (Schéma 23). Ce dernier montre une sélectivité très forte envers les mélanomes, par rapport à d'autres lignées de cellules cancéreuses. Le tableau 6 de la page suivante présente les activités antitumorales *in vitro* de l'acide bétulinique.



**Schéma 23** : Exemples des dérivés de l'acide bétulinique effectués par Genet *et al.* en 2010.



**Schéma 24** : Synthèse de l'acide bétulinique à partir du bétulinol par oxydation non-sélective (Kim *et al.*, 1997).



Acide 7b-(4-hydroxybenzoyloxy)-bétulinique **97**

**Schéma 25** : Structure de l'antibactérien (Setzer *et al.*, 2000).

**Tableau 5** : Activité antitumorale *in vitro* de l'acide bétulinique **91**

Tissus	Lignée cellulaire	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Référence
Cerveau	XF498	3,8	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Colon	COL-2	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	HT-29	> 100	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
	HCT15	3,7	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Epithélium	KB	> 20	(Miles <i>et al.</i> , 1974) (Pisha <i>et al.</i> , 1995) (Jeong <i>et al.</i> , 1999)
Fibrosarcome	HT-80	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
Foie	Hep-G2	15,5	(Setzer <i>et al.</i> , 2000)
Glioblastomes	U373	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	A172, U118MG, U138MG, U251MG, U343, U373, SK14, SK17, SK19, SK22, SK37, SK49, SK51, SK55, SK60.	5-16	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
	T98G	11,4	(Wick <i>et al.</i> , 1999)
Medulloblastome	Daoy, D283 Med, D341 Med, MHH1, MHH3, MHH4, MEB1.	3-15	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
Neuroblastome	SHEP, IMR-32, Kelly, LAN5.	3-10	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
Ovaire	SK-OV-3	3,8	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Peau	MEL1, MEL2, MEL3, MEL4	1,1-4,8	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	SK-MEL-3	2,5	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
	A431	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
Poumon	LU-1	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	H-146	> 100	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
	A549	2,0	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Prostate	LNCaP	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
Sarcomes d'Ewing	A17/95, TC83	2-7	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
Sein	BC-1	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	MCF-7	> 100	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
	MDA-MB-231	4,4	(Setzer <i>et al.</i> , 2000)

L'épineuse question à élucider reste d'actualité sur le mécanisme d'action malgré de nombreuses études dans ce sens et nous permet d'aborder dans la section qui suit, quelques-unes des méthodes qui sont aujourd'hui indispensables à la détermination structurale des composés triterpéniques.

### I.2.6. Quelques méthodes de détermination des structures des terpènes

Les méthodes couramment utilisées dans l'identification sont des méthodes chimiques et spectroscopiques.

Les méthodes chimiques sont actuellement dépassées dans la détermination de la structure d'une molécule organique comme les terpènes. Ces méthodes sont lentes, parce qu'elles exigent des séries des réactions avec toutes les séparations et les analyses qu'elles nécessitent telles que la dégradation



oxydante, la déshydratation, la bromation (halogénéation), l'hydrolyse, l'hydratation, l'acétylation et la méthylation pour mettre en évidence certains groupements et squelettes de la molécule à identifier.

Seules les méthodes spectroscopiques sont considérablement envisagées et peuvent accélérer la détermination des structures, des groupements fonctionnels et mêmes des radicaux présents dans une molécule. Des élucidations complètes des structures chimiques sont, à priori, basées sur le proton ( $^1\text{H}$ ) et le carbone ( $^{13}\text{C}$ ) des expériences Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à une dimension (1-D) et à deux dimensions (2-D) telles que DEPT 135, COSY, NOESY, HSQC, HMBC et TOCSY sont rigoureusement appliquées. Cette technique efficace permet de lever certaines ambiguïtés des corrélations (signaux : multiplet, singulet, doublet, triplet, complexe, etc.) entre les différents atomes présents dans la molécule et de déterminer ainsi la position de chaque substituant. La 2-D demeure complémentaire. Toutefois, l'association de certaines techniques est une évidence dans la détermination structurale d'un composé organique comme la Spectrométrie de Masse (SM), la Rotation Moléculaire, la Cristallographie aux Rayons X, les Spectrométries Infrarouge (IR) et Ultra-violet (UV), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Les études phytochimiques axées dans la littérature portent sur les fruits du genre *Vitellaria*. Nous orientons la présente étude sur les racines et écorces de tronc de plante *Vitellaria paradoxa*, afin de déceler les compositions chimiques responsables des activités antineurodégénératives et anticancéreuses.

### **I.3. GENERALITES SUR L'INFLAMMATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES**

#### **I.3.1. L'inflammation**

##### **I.3.1.1. Définition de l'inflammation**

L'inflammation est une réponse biologique complexe des tissus vasculaires aux stimuli nocifs. On le considère généralement comme la réponse des organismes à la présence des dommages d'agents pathogènes, chimiques ou mécaniques. Les divers composants de la réaction inflammatoire qui peuvent contribuer aux symptômes associés et aux effets préjudiciables de tissu (Maldini *et al.*, 2009). Autrement dit, l'inflammation est une réaction localisée d'un tissu, consécutive à une agression. Elle se manifeste par quatre signes principaux à savoir : rougeur, chaleur, tuméfaction (œdème) et douleur. Cette dernière est un symptôme fréquent appartenant à bon nombre de pathologies. La douleur se rencontre à tout âge et peut se manifester sous forme de crampes, de sensations de brûlures, de tiraillements, de coups de poignard ou encore être progressive, intermittente, constante, lancinante, sourde, légère, intense, récurrente, aiguë (la réponse immédiate et précoce à l'agression), chronique (stimulation persistante), etc. La douleur est associée à des

besoins tissulaires réels ou potentiels, ou décrite comme si les lésions y existaient. Différents symptômes peuvent l'accompagner comme la nausée, les vomissements, la fièvre, la diarrhée, le ballonnement abdominal ou la difficulté à uriner.

#### I.3.1.2. La douleur dans les maladies neurodégénératives

La douleur constitue une caractéristique essentielle ou fréquente dans les maladies neurodégénératives à n'importe quel stade évolutif de la maladie. Il existe deux grands types de douleurs : les douleurs nociceptives et les douleurs neuropathiques à savoir :

- les douleurs nociceptives (système immunitaire inné), d'évolution aiguë correspondent à l'accumulation de cellules gliales, passive, notamment de la microglie et d'astrocytes, immédiatement après l'agression, chronique si la persistance de l'agression aboutit à l'accumulation des cellules mononuclées (brûlures, traumatismes, infections, tumeurs, intervention chirurgicale).
- Les douleurs neuropathiques (système immunitaire adaptatif ou acquis) qui sont des douleurs secondaires à des lésions cérébrales du système nerveux périphérique ou central telles que : zona, sida, lésions traumatiques, accident vasculaire cérébral (AVC), neuropathies périphériques du diabète, etc. sont de nature très chronique, de longue durée, des mois voire des années.

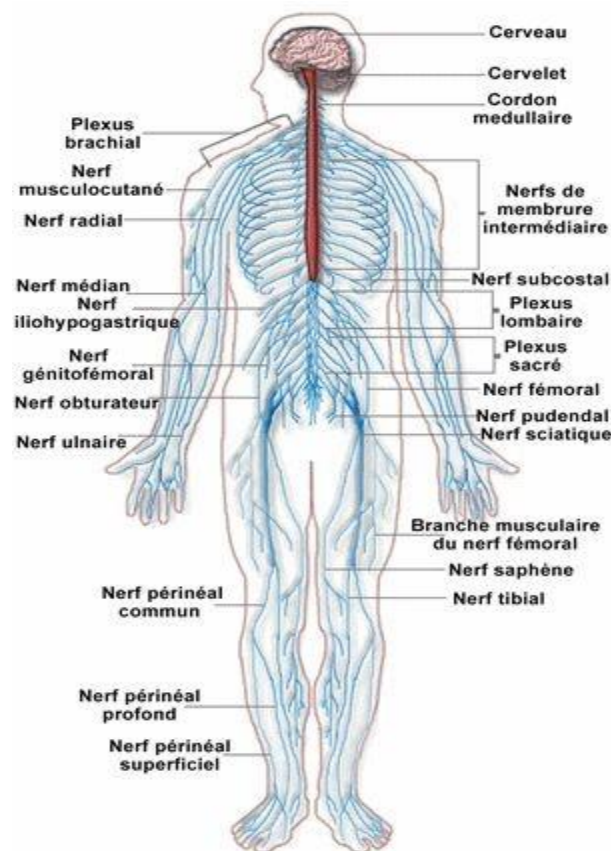
Pour combattre cette inflammation, des médicaments symptomatiques qui n'agissent pas sur les causes de l'inflammation sont utilisés tels que : les anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens. Ces anti-inflammatoires sont indiqués quand l'inflammation, le processus normal de défense contre les agressions devient gênante, notamment à cause de la douleur que l'inflammation provoque. Les anti-inflammatoires s'administrent par voie orale, injectable ou locale. En plus, quelques plantes qui en possèdent par rapport à leurs activités pharmacologiques significatives et variées sont consommées (Bruneton, 1993). Les maladies neurodégénératives affectent principalement le cerveau et la moelle épinière, par conséquent, il est judicieux de faire un bref aperçu sur le système nerveux.

#### I.3.1.3. Rappel sur le système nerveux central

Le système nerveux central renferme les centres nerveux : l'encéphale et la moelle épinière qui se trouvent à l'intérieur de la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Les deux parties capitales du système nerveux central sont dotées d'énormes organes capables d'interagir entre eux pour contrôler, réguler et coordonner toutes les fonctions de l'organisme. Il assure le bon fonctionnement des activités végétatives et motrices (systèmes nerveux périphériques) comme la barrière hémato-encéphalique qui est la barrière de diffusion essentielle pour la fonction normale du système nerveux central. Cette distinction est arbitraire car le système nerveux forme un tout qui, chez l'homme, n'est pas découpé en organes séparés (figure 2). Comme toute sensation, la douleur cutanée nécessite pour

se manifester des récepteurs sensitifs périphériques excités de façon adéquate ; des fibres nerveuses transmettent cette excitation vers les centres nerveux, enfin, des centres spéciaux dans le cerveau où les informations circulent sous forme des messages électriques, appelés influx nerveux. Les synapses constituent les zones d'échanges d'information, sous forme de messages chimiques, entre les neurones vont s'interpréter et utiliser ce message, donnant naissance aux signes organiques et à la sensation consciente de la douleur (Chaudard *et al.*, 1981). Ces substances chimiques, appelées neurotransmetteurs (la sérotonine ou la noradrénaline) sont libérées par les neurones récepteurs comme réponse immunitaire.

Les maladies liées au système nerveux central sont : la migraine (crises récidivantes chroniques, hémicrâniennes), les céphalées (mal de tête, AVC, traumatisme crânien), les syndromes méningés (infection virale, bactérienne, ...), la maladie d'Alzheimer (détérioration progressive et durable des fonctions cognitives), la sclérose en plaque (destruction de la gaine de myéline) et bien d'autres maladies apparentées. Si le vieillissement cérébral est un phénomène normal de la vieillesse plus qu'une réalité médicale ou bien les maladies neurodégénératives touchent principalement les personnes âgées, il est essentiel de prendre soin du cerveau face aux pathologies qui portent considérablement atteintes à son bon fonctionnement.



**Figure 2** : Système nerveux.

(<http://www.actea-sante.fr/wp-content/uploads/1-SNC.pdf>)

#### I.3.1.4. Le vieillissement cérébral

Le vieillissement représente les processus physiologique et psychologique modifiant les structures organiques et leurs fonctions. Le vieillissement cérébral est aussi souvent présenté comme une catastrophe, et un ticket d'entrée presque obligé pour la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, il est crucial d'établir la frontière entre le déclin naturel lié au vieillissement de l'organisme et l'état pathologique dû aux démences.

Comme tous les organes, le cerveau qui vieillit, se traduit par une diminution du poids du cerveau d'environ 2% par décennie. Le vieillissement normal présente les symptômes des troubles intellectuels, émotionnels, moteurs et autres (cécité, incontinence urinaire) tandis que le vieillissement pathologique résulte des altérations aberrantes des capacités cognitives intellectuelles ou neuropsychologiques, émotionnelles et motrices. Si la cause de cette pathologie n'est pas encore connue, la cascade des événements biologiques à son origine constitue le cœur de cible de la recherche thérapeutique. Du point de vue des interventions thérapeutiques, elles se résument aux anti-inflammatoires et certains médicaments (Aricept, Ebixa, Exelon, Reminyl) ainsi que quelques plantes susceptibles de traiter les symptômes.

#### I.3.1.5. Les cellules microgliales et l'inflammation-médiateur neurodégénération

Les microgliales sont des principales cellules immunitaires du système nerveux central comme les astrocytes les plus abondantes, des oligodendrocytes dites petites cellules de la formation de gaine de myéline et les péricytes, cellules ramifiées intégrées dans la membrane basale des capillaires et des veinules postcapillaires. Ces cellules ne sont autres que des cellules gliales qui représentent environ 50% du volume cérébral et les cellules nerveuses (neurones) représentatives des différents types de cellules présentes dans le système nerveux central. Les fonctions des cellules microgliales ne sont pas à démontrer, elles permettent le lien entre les vaisseaux sanguins et les neurones, et ravitaillent les cellules du système nerveux central des nutriments essentiels et leur fonctionnement métabolique.

Les cellules microgliales semblent impliquées fortement dans l'inflammation-médiateur neurodégénération. Elles se situent dans la matière grise du cerveau et beaucoup plus concentrées dans l'hippocampe, le télencéphale olfactif et les noyaux gris centraux (Graeber *et al.*, 1994 ; Block *et al.*, 2007). Le système immunitaire permet à l'organisme de se défendre contre les pathogènes et les cellules cancéreuses constituant des composantes naturelle (ou innée) et acquise (ou adaptative). Une réaction immunitaire est donc complexe, impliquant plusieurs types cellulaires différents qui interagissent en synergie afin d'éliminer les pathogènes de l'organisme.

#### I.3.1.6. Les activations des cellules microgliales

Les cellules de la microglie sont une caractéristique essentielle d'activation immédiate en réponse aux événements pathologiques mineurs intracérébraux dans le but du nettoyage et fondamentalement dans les processus de réparation et régénération neuronaux. Il est possible que des populations particulières de neurones soient plus sensibles aux molécules inflammatoires et que les cellules microgliales et les facteurs qu'elles sécrètent soient néfastes pour certaines cellules neuronales, par exemple la production des substances cytotoxiques comme du monoxyde d'azote (NO), les radicaux libres oxygénés, des protéases, etc. Suite à une agression du tissu nerveux, les cytokines sont produites immédiatement par les cellules microgliales comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , deux principales cytokines de la microglie du parenchyme cérébral adjacent au site lésionnel. Ces cytokines ainsi produites pourraient proliférer et exprimer plusieurs marqueurs moléculaires facilitant les processus de neurodégénérescence (Adle-Biassette *et al.*, 1999 ; Buttini *et al.*, 1996 ; Sippy *et al.*, 1995) par rapport à leurs effets dans les processus de demyélinisation et remyélinisation qui sont très complexes (Pouly *et al.*, 2000).

#### I.3.1.7. L'activation des cellules microgliales dans la maladie d'Alzheimer

Bien que l'activation des cellules microgliales pour lutter contre l'agression, a un rôle essentiel dans son contrôle et la réparation lésionnelle (l'homéostasie), et la défense des tissus contre les pathogènes. Les éléments libérés par la microglie peuvent se révéler rapidement délétères et contribuer au dysfonctionnement cérébral et aux dommages. Dans certains cas physiopathologiques, les cytokines sont à l'origine des dommages secondaires dans le cerveau (Ross *et al.*, 1994) aboutissant à des lésions neurotoxiques et neurodégénératives, comme l'expression du TNF- $\alpha$  très élevé au cours de processus dégénératif, en particulier, l'augmentation de la sensibilité aux infections secondaires mais également celle de l'expression du précurseur de la protéine amyloïde et du dépôt de la protéine  $\beta$ -amyloïde qui joue un rôle potentiel dans la maladie d'Alzheimer.

#### I.3.1.8. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

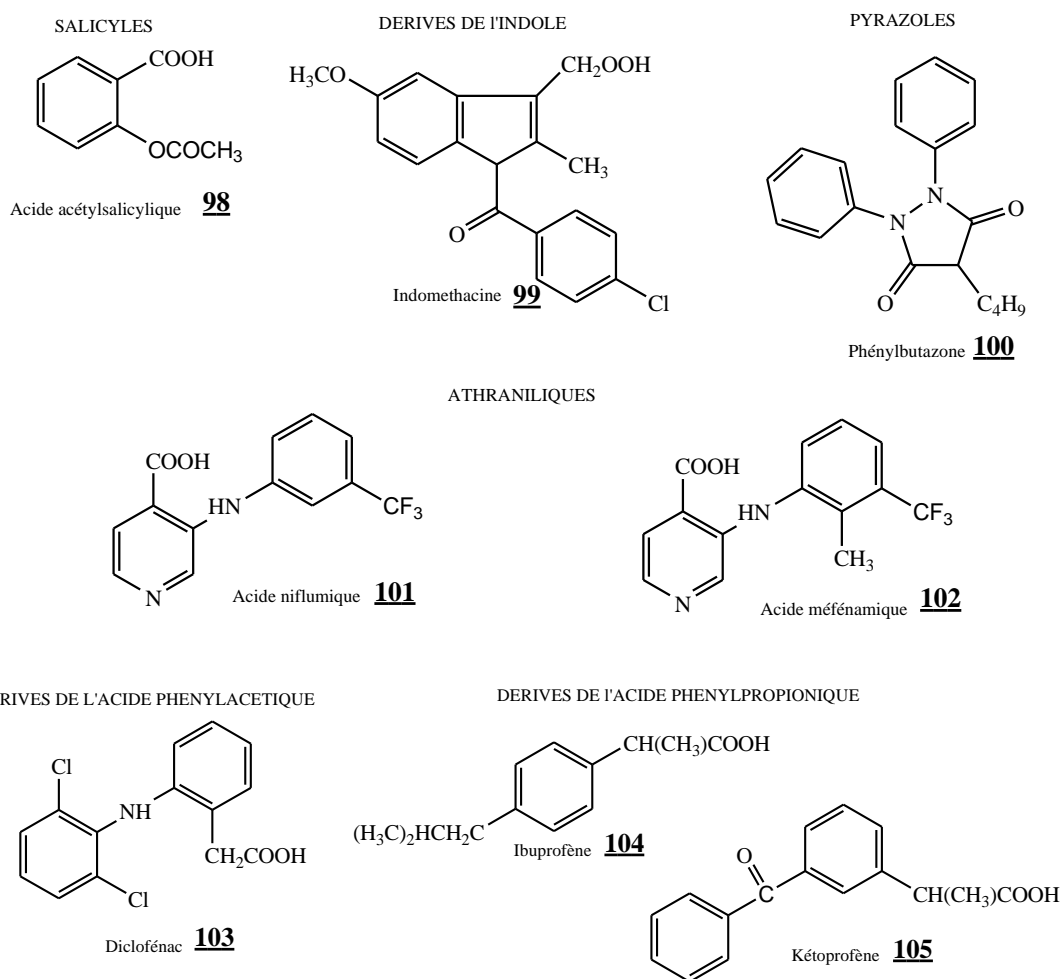
Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que : la phénylbutazone, l'indométhacine, le diclofénac dérivés de l'acide propionique, les oxicams, appartiennent tous à diverses catégories mais sont tous capables de bloquer la formation de certaines substances comme les prostaglandines, médiateurs chimiques nécessaires au développement de l'inflammation aiguë. Les AINS sont la plupart des acides organiques faibles (pk 3-5). Tous présentent des propriétés pharmacocinétiques similaires.

Un grand nombre d'AINS, appartenant à huit principales classes chimiques est actuellement commercialisé. Ces AINS possèdent approximativement les mêmes effets indésirables. Concernant la demi-vie plasmatique, les AINS peuvent être divisés en trois groupes souvent administrés : les produits à demi-vie courte (4 heures ou moins : diclofénac, kétoprofène), ceux à demi-vie plus longue

(12 heures ou plus : tenoxicam) et les AINS à demi-vie intermédiaire (entre 5 et 12 heures : kétorolac, indométhacine). Le tableau 6 ci-après donne les principales classes d'AINS ainsi que le schéma 1 qui en présente quelques principales structures chimiques.

**Tableau 6 :** Principales classes d'anti-inflammatoires non stéroïdiens

Famille chimique	DCI	Nom commercial	Posologies (adultes)
Salicylés	-Acide acétyle salicylique <b>98</b>	-Aspirine®	6 mg
Pyrazolés	-Phénylbutazone <b>100</b> -Phénylbu-piperzine	-Butazolidine® -Carudol	600mg 750mg
Indoles	-Indométhacine <b>99</b> -Sulindac	-Indocid® -Arthrocline®	150mg 400mg
Propionique	-Kétoprofène <b>105</b> -Naproxène -Ibuprofène <b>104</b>	-Profenid® -Naprosyne®	300mg 1g
Oxicams	-Piroxicam -Tenoxicam	-Feldene® -Tilcotil®	30mg 20mg
Aryl acétates	-Diclofénac <b>103</b> -Fentiazac	-Voltarene® -Fentac®	150mg 900mg
Fenamates	-Acide niflumique <b>101</b> -Acide méfénamique <b>102</b>	-Nifluril® -Ponstyl®	1500mg 1500mg
Sulfamide	-Nimesulide	-Nexen®	

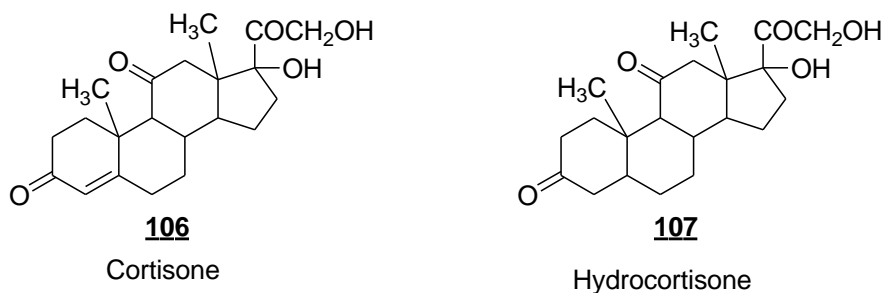


**Schéma 26 :** Structures chimiques de quelques anti-inflammatoires non stéroïdiens.

### I.3.1.9. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) également appelés corticostéroïdes : la prednisone, la prednisolone, la bétaméthasone, sont des dérivés des corticostéroïdes naturels, hormones secrétées par les glandes surrénales. Ils sont très puissants et permettent de contrôler l'inflammation quand elle devient sévère ou lorsqu'elle se déclenche sans les maladies apparentes, comme dans les maladies dites inflammatoires : les polyarthrites, les rhumatoïdes, les allergies, etc.

Ils sont des glucocorticoïdes naturels. La cortisone **106** est transformée dans le foie en un dérivé hydroxylé, le cortisol ou l'hydrocortisone **107**.



**Schéma 27** : Quelques dérivés des corticostéroïdes naturels

### I.3.1.10. Quelques plantes utilisées en médecine traditionnelle contenant des activités anti-inflammatoires

Important patrimoine culturel, les plantes médicinales sont beaucoup sollicitées pour corriger une activité génétique défaillante, à visée non curative, dans le traitement des maladies inflammatoires ou neurodégénératives. Le tableau 7 ci-après ressort quelques plantes utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires.

**Tableau 7** : Exemples de plantes médicinales à activités anti-inflammatoires

Noms scientifiques	Familles	Parties utilisées	Noms communs	Remèdes
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Gingembre	Arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Helleborus orientalis</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	Cédèmes, douleurs rhumatismales
<i>Urticadioica</i>	Urticaceae	Feuilles Racines	Ortie	Rhinite allergique, eczéma goutte. Douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis R</i>	Rosaceae	Feuilles	Laurier	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Curcuma	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
<i>Nertum oleander L.</i>	Apocynaceae	Fleurs	Laurier rose	Douleurs, maux de tête
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pedaliaceae	Tubercule	Griffe du diable	Arthrose, lombalgie, névralgie, maux de tête, fièvre
<i>Rhododendron ponticum L.</i>	Ericaceae	Feuilles	Rhododendron pontique	Cédèmes, états grippaux, mal de dents
<i>Juglansregia L.</i>	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Noyer commun	Douleurs rhumatismales, eczéma, fièvre, malaria
<i>Oenother abiennis</i>	Onagraceae	Graines	Onagre bisannuelle	Douleurs rhumatismales
<i>Arnica montana</i>	Asteraceae	Feuilles, fleurs	Quinquina des pauvres	Traumatismes, douleurs musculaires, troubles cardiaques et respiratoires
<i>Phyllanthus emblica</i>	Euphorbiaceae	Feuilles, fruits, racines	Amla, groseille indienne	Maux de gorge et ventre
<i>Cassia occidentalis</i>	Caesalpiniaceae	Plante entière	Balambala, café nègre	Rhumatisme, maux de ventre et tête, œdèmes
<i>Colchicum autumnale</i>	Liliaceae	Plante entière	Colchicum, safran des prés	Arthrose, douleurs, névralgie, fièvre
<i>Vitellaria paradoxa</i>	Sapotaceae	Guis, écorces, racines, fruits, feuilles	Karité, balawa, tangué, shea tree, di-soro	Ulcères, rhumatisme, maux de ventre et tête, œdèmes, dysenterie

Dès 1992, McGeer et Rogers ont posé comme hypothèse que des traitements anti-inflammatoires peuvent être une cible thérapeutique potentielle de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, *Vitellaria paradoxa* a été choisie en raison de son utilisation en médecine traditionnelle pour baisser les inflammations, calmer la douleur et bien d'autres maladies, telles que : les ulcères de l'estomac, le cancer et les maladies neurodégénératives que nous allons explorer un peu plus loin.



### **I.3.2. Les maladies neurodégénératives**

#### **I.3.2.1. Définition et types des maladies neurodégénératives**

Une maladie neurodégénérative est une affection du cerveau, du fait qu'elle entraîne une disparition progressive des neurones, qui a pour conséquence l'altération des facultés cognitives : la perte de la reconnaissance des visages connus, mémoire ou raisonnement (agnosie), déficit du langage (aphasie), déficit du comportement ou l'habileté gestuelle (apraxie). L'ensemble de façon variable entraîne une perte de l'autonomie physique ou intellectuelle dans la vie quotidienne et sociale. Autrement dit, ce sont des pathologies neurologiques des dysfonctionnements génétiques et/ou métaboliques qui conduisent à la mort de groupes de neurones spécifiques. A ce stade, le patient nie ses troubles ou les minimise. Généralement, les maladies neurodégénératives apparaissent plus souvent chez les personnes âgées, mais elles ne sont pas une conséquence normale du vieillissement (à partir de 60 ans).

Il importe de noter que ces maladies neurodégénératives génétiques ou acquises de révélation tardive ou de très longue durée demeurent comme un mystère. Le système immunitaire échappe à son contexte protecteur et réparateur pour occasionner d'importants dommages tissulaires caractéristiques de la gravité de ces maladies. Jusqu'à présent, elles sont difficiles à classer, seule une nouvelle approche nosologique semble performante et mieux adaptée (Goldbach-Mansky *et al.*, 2006 ; Kanzler *et al.*, 2007). Les plus fréquentes sont subdivisées en amyloïdopathies (maladie d'Alzheimer, maladies à prions) (De la Monte *et al.*, 2005 ; MacRaid *et al.*, 2004), en alpha-synucléinopathies (maladie de parkinson, maladie à corps de Lewy, atrophie multisystématisée) (Lavestone *et al.*, 2002 ; Wenning *et al.*, 2004) et en tauopathies (démence fronto-temporale, paralysie supra-nucléaire progressive, dégénérescence cortico-basale) (Ritchie *et al.*, 2002 ; Goedert *et al.*, 2005).

Parmi les maladies neurodégénératives, la maladie d'Alzheimer affiche le plus fort taux d'incidence ou de progression. Pour mieux les cerner en profondeur, la maladie d'Alzheimer va être abordée dans les paragraphes suivants.

#### **I.3.2.2. La maladie d'Alzheimer et son historique**

La maladie d'Alzheimer est considérée, à l'heure actuelle comme un véritable problème de santé publique souvent rapporté au vieillissement de la population. Sa prévalence croît d'une manière exponentielle avec l'âge. Le souci crucial actuel du clinicien est de mettre en place une méthode de détection précoce permettant une prise en charge rapide et adaptée, au pire des cas, il doit limiter la propagation de cette maladie dans l'organisme.

Cette maladie porte le nom de maladie d'Alzheimer, à l'initiative du père fondateur de la psychiatrie scientifique qu'on peut le dire, Emil Kraepelin, suite à la publication en 1907 d'Alois Alzheimer

(Maurer *et al.*, 1997). Tant d'autres chercheurs se sont lancés dans cette voie pendant la période gréco-romaine tels que : le physicien grec Pythagore, qui attribuait cela au déclin mental relatif à l'âge (Berchtold *et al.*, 1998), Hippocrate (460-377 avant Jésus-Christ) et le Moine Franciscain Frère Roger Bacon (1214-1294), pour ne citer que ceux-là. Ils ont aussi exploré ce domaine sous différentes appellations : la démence sénile ou les désordres mentaux. Dans cette optique, Alzheimer donna la définition des dégénérescences neurofibrillaires associées, qui plus est, sur une personne aussi jeune. C'est ainsi dans la nuit des temps, le diagnostic des maladies neurologiques montre que la maladie d'Alzheimer devient alors l'une des plus fréquentes maladies neurologiques. Pour faire face à ce fléau, les chercheurs ont mis sur pied des molécules antineurodégénératives : la tacrine, le donépézil, la mémantine et même la voie de prévention par le moyen de la vaccination ont été envisagés. Hélas ! Ces voies furent vite stoppées à cause d'effets indésirables (Wilkinson, 1999 ; Schenk *et al.*, 1999 ; Orgogozo *et al.*, 2003).

### I.3.2.3. L'épidémiologie, les facteurs de risque et le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

#### I.3.2.3.1. L'épidémiologie de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la première cause de mortalité à l'âge de 60 ans et plus (Alzheimer Disease International, 2013). Les lésions neuropathologiques, extracellulaires (peptides beta-amyloïdes) et intracellulaires (protéine Tau) mais aussi les plaques séniles constituent les marqueurs histologiques des démences neurofibrillaires de la maladie. C'est une caractéristique grave du cortex cérébral. Cette démence est la plus fréquente et elle serait responsable de nombreux cas de décès dans les pays en voie de développement et des pays industrialisés. Il est très difficile d'avoir des données exactes sur la prévalence mondiale d'un pays.

#### I.3.2.3.2. Les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

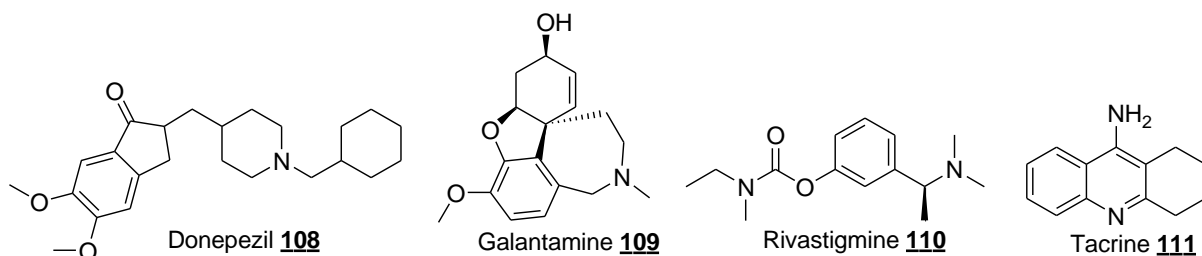
L'identification des causes de cette maladie demeure méconnue mais les circonstances atténuantes favorisant le développement de la maladie semblent épluchées. C'est ce qu'on appelle « *facteurs de risques* » ou facteurs environnementaux et génétiques (Maldini *et al.*, 2009) y contribuent comme l'âge, le sexe, les facteurs de risques vasculaires, les traumatismes crâniens, les antécédents familiaux, l'allèle de l'apolipoprotéine E et le manque d'activité physique ou sportive. Tous ces facteurs sont non négligeables. Et il n'est pas de solution préventive « *miracle* », par conséquent, il suffit de suivre les recommandations des médecins pour enfin réduire le risque de développer la maladie. Il n'existe pas actuellement de traitement efficace permettant de guérir les maladies ou de stopper leur évolution. Seule une prise en charge pluridisciplinaire reste efficace au détriment des soins curatifs des patients. A ce titre, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimerait qu'en 2050, les plus de 60 ans de la population mondiale seront victimes des dégénérescences neurofibrillaires (OMS, 2014).

### I.3.2.3.3. Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

L'examen anatomopathologique reste le diagnostic approprié. Il est souvent associé aux examens complémentaires biologiques et d'imagerie par résonance magnétique qui permettent généralement d'éliminer d'autres causes de démence. De nombreux critères de classification de types de maladie d'Alzheimer ont été proposés (Amieva *et al.*, 2007). Les données sur les pathologies et les causes de décès ont été codifiées selon la « *Classification Statistique Internationale des maladies et des problèmes de santé connexes, 10<sup>ème</sup> révision* » : maladie d'Alzheimer (code G30), maladie de Parkinson (code G20), Sclérose en plaques (code G35), maladies du motoneurones (code G12.2) et Chorée de Huntington (code G10) (OMS, 2010).

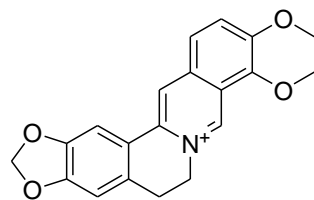
### I.3.2.4. Le traitement ou molécules disponibles

Nombreuses molécules disponibles sont pour des traitements symptomatiques. Ces traitements médicamenteux spécifiques agissent sur les conséquences des lésions, mais non sur leurs causes. Ils sont prescrits pour limiter le déficit en neurotransmetteurs et/ou stopper l'évolution progressive de la maladie. Quatre médicaments sont actuellement disponibles sur le marché : le chlorhydrate de donépézil **108** (Aricept<sup>®</sup>), la galanthamine **109** (Reminyl<sup>®</sup> ou Razadyne<sup>®</sup>), la rivastigmine **110** (Exelon<sup>®</sup>) et la tacrine **111** (Cognex<sup>®</sup>) en voie de disparition sur le marché par rapport aux effets hépatotoxiques. Le schéma 3 suivant présente ces anticholinestérasiques administrés à l'heure actuelle.

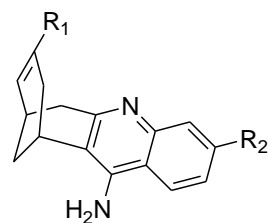


**Schéma 28** : Les structures des différents anticholinestérasiques (Silva *et al.*, 2014)

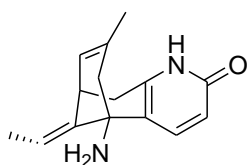
En plus de ces composés naturels, certains composés comme dimères ou hybrides des anticholinestérasiques sont utilisés pour combattre cette maladie (schéma 29). Ajoutons à cela, une nouvelle classe thérapeutique commercialisée comme des antiglutamatergiques. Ces traitements à visée symptomatique, sont réservés aux formes modérément sévères et sévères de la maladie.



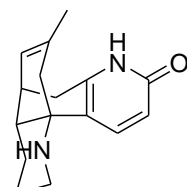
Berberine **112**



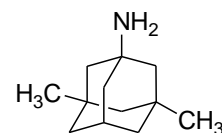
Structure générale des huprines **113**



Huperzine A **114**



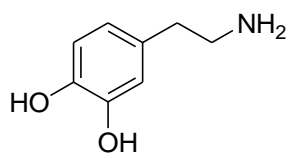
Huperzine B **115**



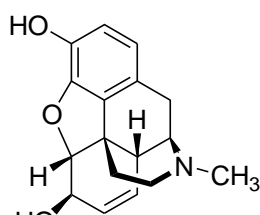
Mémantine **116**

**Schéma 29** : Structures des dimères ou hybrides des anticholinestérasiques et l'antagoniste du glutamate (Silva *et al.*, 2014)

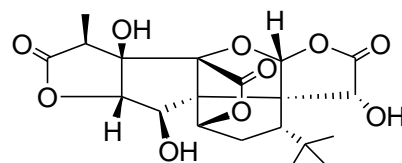
Malgré cet arsenal pharmaceutique pour la prise en charge de ces maladies, la lutte continue. Certaines études en cours devront déterminer dans l'avenir des traitements efficaces, non seulement sur les symptômes mais aussi des traitements préventifs et curatifs de la maladie d'Alzheimer (Clinical Trials.gov.). Dans cette optique, certaines plantes médicinales sont consommées par des patients en bonification des antioxydants (mitoquinone), le *Ginkgo biloba* et certains polyphénols naturels présents dans le thé, le vin rouge comme palliatifs à l'hypothèse inflammatoire. Ces substances médicamenteuses sont susceptibles de retarder l'évolution de la maladie telles que les corticoïdes et d'autres dérivés (la dopamine **117**, la morphine **118**, le ginkgolibe B **119**) qui sont tous capables de bloquer la formation de certaines substances présentant des propriétés pharmacocinétiques similaires impliquant dans la réaction des médiateurs chimiques nécessaires (les prostaglandines) au développement de l'inflammation aiguë.



Dopamine **117**



Morphine **118**



Ginkgolibe B **119**

**Schéma 30**: Structures chimiques de quelques produits pharmaceutiques palliatifs aux maladies neurodégénératives.

## **I.4. LE CANCER**

Le cancer se réfère à l'un d'un groupe de plus de 100 maladies distinctes qui sont caractérisées par la prolifération incontrôlée de cellules anormales dans le corps. La diversité génotypique et phénotypique entre tumeurs provenant des organes distincts et par le biais des mutations distinctes nécessitent la poursuite du développement de nouvelles molécules cytotoxiques, ainsi que la caractérisation de produits naturels avec propriétés cytotoxiques. Malgré une attention réduite sur les produits naturels, récemment, isolé à l'origine de sources naturelles rendent une importante contribution au paysage d'agents pharmaceutiques (Harvey *et al* 2015 ; Gennari *et al.*, 2007) approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis. En outre, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que 25 % des produits pharmaceutiques sont dérivés de plantes connues pour efficacité chez les praticiens de médecine traditionnelle (OMS, 2003).

### **I.4.1. Historique du cancer**

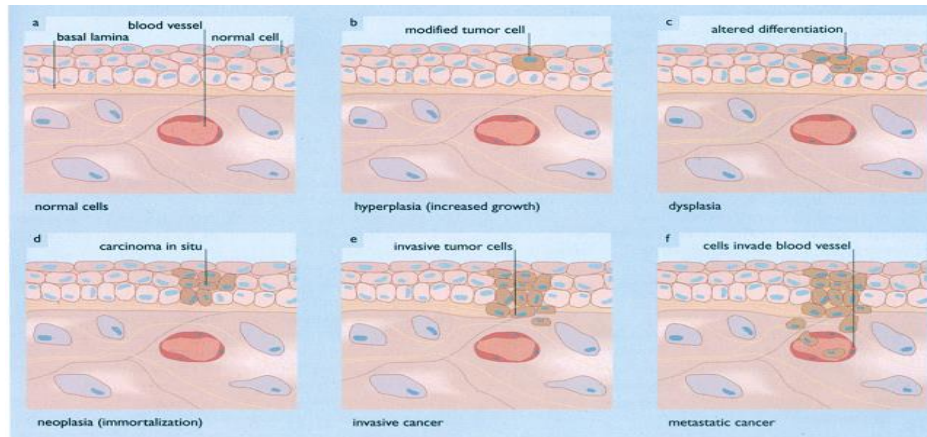
Le cancer, aussi vieux qu'on le pensait, fut découvert à l'âge de la pierre taillée. La maladie du cancer est aussi ancienne que l'humanité, elle existe bien chez les plantes que chez les animaux (Olson, 1989). Le cancer n'est pas une maladie contagieuse mais plonge le monde scientifique dans l'impuissance d'apporter une solution alternative. Il présente un point similaire avec les maladies neurodégénératives par rapport à leur mode de développement et une inefficacité de l'apoptose, de quelques semaines à plusieurs années. Les maladies neurodégénératives se manifestent par une réaction localisée d'un tissu, consécutive à une agression. Cependant, le cancer est un dérèglement des mécanismes (canaux lymphatiques) qui régissent le comportement normal de la cellule entraînant une prolifération cellulaire anarchique ininterrompue, l'invasion et la métastase des cellules (Harvey *et al.*, 2015 ; Gennari *et al.*, 2007) à savoir :

- la cellule va devenir immortelle ;
- résister à l'apoptose ou la mort cellulaire programmée ;
- perdre le contrôle de son cycle cellulaire, le renouvellement des cellules filles ;
- diminuer ses besoins nutritifs ;
- avoir des altérations géniques.

### **I.4.2. Définition du cancer**

L'organe d'un humain est composé de milliards de cellules dont les informations nécessaires se situent dans le code génétique propre. Chaque jour, le système de régulation du fonctionnement normal de l'organisme s'active de manière automatique, l'état homéostatique des tissus. Ce qu'on appelle cycle cellulaire qui se déclenche de façon adéquate et permanente, le résultat d'un déséquilibre entre la mort des cellules et leur renouvellement. Le code génétique est recopié pour être transmis aux cellules filles. Autrement dit, des mutations du matériel génétique, peuvent avoir des conséquences délétères sur l'organisme. Ces mutations peuvent être germinales ou somatiques. Ces

dernières sont une cause importante de cancers. Le plus souvent, le gène muté est réparé ou détruit. C'est un phénomène de vieillissement qui permettrait au fur et à mesure de corriger les erreurs produites et de déclencher automatiquement le processus de réparation. L'initiation du processus cancéreux surgit lorsqu'une erreur échappe aux systèmes de régulation de cellules de manière irrémédiable. Le cancer apparaît et puise sa source dans la nature biologique précise de cellule d'où le clone et non de l'organe. L'invasion destructive et proliférative des tissus voisins de la tumeur donne naissance aux métastases (figure 3).



**Figure 3** : Phénomène invasif du cancer en image.

<http://www.usamvcluj.ro/fiziopatologie/images/franceza/curs/Cours%2012-13%20-%20Physiopathologie%20I%20-%202016-2017.pdf>

#### **I.4.3. Définition et caractère d'une tumeur**

Le terme « *tumeur* » désignait autrefois le « *gonflement* » pathologique localisé déformant un organe ou une partie de l'organisme. Ce terme évolue actuellement à la prolifération cellulaire excessive provoquée par une ou plusieurs cellules anormales. C'est la notion de clonalité. On appelle *poly*, *oligo* et *monoclonale* respectivement, une tumeur qui se développe à partir de plusieurs cellules, de quelques cellules et une seule cellule. Il est plus judicieux de rappeler que le corps humain est constitué d'innombrables organes et que ces organes renferment des différents tissus dans lesquels abrite une kyrielle de cellules. Cette cellule est le siège des maladies. Il existe donc deux types de tumeurs à savoir :

- la tumeur bénigne qui est sans gravité, d'évolution favorable ;
- et la tumeur dite maligne qui est formée par la multiplication désordonnée des cellules d'un tissu ou d'un organe.

#### **I.4.4. Les agents promoteurs de carcinogénèse**

Le cancer représente un facteur croissant de morbidité et de mortalité accru dans le monde entier. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la consommation de tabac est la première cause de décès inévitable dans le monde (Wald *et al.*, 1996) ; Word, 2014) et l'interaction avec d'autres facteurs de risques comme la nutrition, la consommation d'alcool, les agents hormonaux, les facteurs de risque professionnels comme l'exposition à l'amiante et aux rayonnements ionisants (pesticides, silice, pollutions chimiques, champs vibratoires et programmes psychiques) sont des agents promoteurs de carcinogénèse (Levi, 1999) et aussi des infections virales tels que les virus du papillome humain (VPH), les virus d'hépatite B (VHB) et C (VHC) sont les principaux agents infectieux associés au cancer. Le processus tumoral prend naissance lorsque le pathogène cause des modifications aberrantes de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou pour donner suite à la production de protéines interagissant avec les protéines de contrôle de la multiplication cellulaire (exemple des papillomavirus produisant des protéines anormales peuvent détruire la protéine p53). En 2008, le cancer est la cause immédiate de mortalité estimée à environ 7,6 millions (OMS, 2013) et 13,1 millions de personnes en décèderont à l'horizon 2030 (GLOBOCAN, 2008 ; IARC, 2010, 2013). Un constat : le nombre de nouveaux cas de cancer continue de croître de façon soutenue à mesure que la population augmente et vieillit (Rastogi *et al.*, 2004).

Le sujet sera traité ici uniquement par rapport au cancer, de savoir identifier les principales classes des composés antineurodégénératifs et anticancéreux, bien que le tabagisme entraîne un grand nombre de maladies cardiovasculaires et respiratoires.

Il convient tout de même de préciser les formes du cancer les plus fréquentes. Toutefois, on peut retenir par ordre décroissant les cancers les plus répandus : le cancer du sein (MCF7), le cancer de la prostate (PC3), le cancer du poumon (NCI-H460), le cancer colorectal (CCR) et le cancer du foie (Tulkens, 2008).

#### **I.4.5. La prise en charge du cancer**

##### **I.4.5.1. Les médicaments anticancéreux**

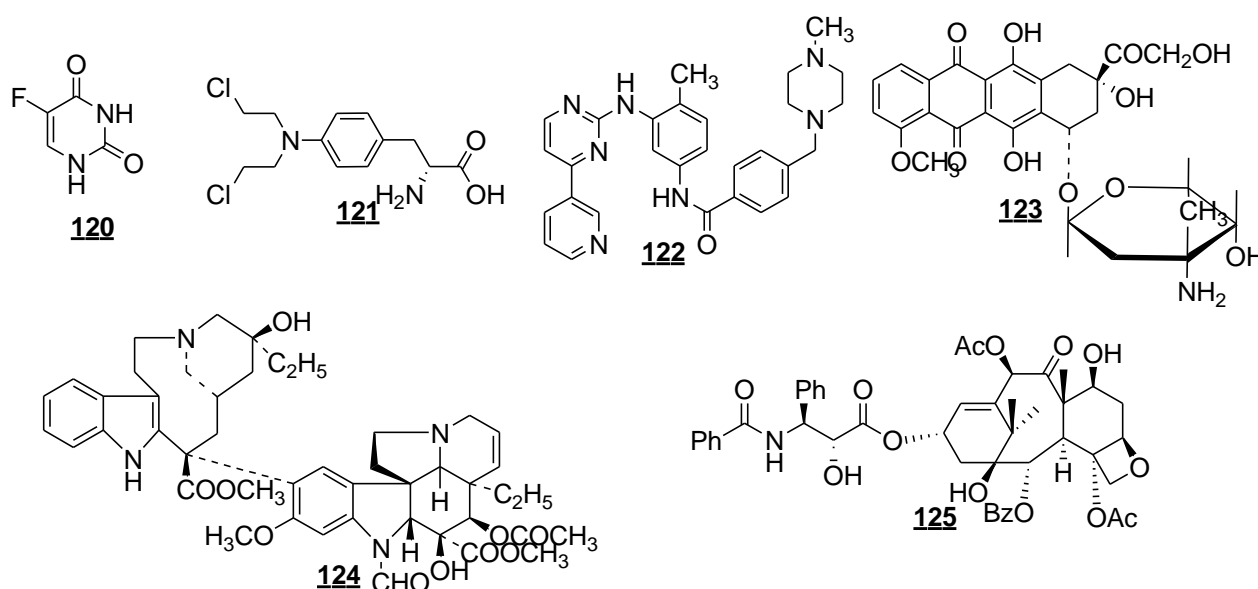
Comprendre la maladie pour mieux la traiter, on peut traiter un cancer si le diagnostic s'avère important et dans de nombreux cas des découvertes du cancer, le dépistage reste et demeure le seul outil indispensable d'indexer la maladie. Au nom du dépistage, la plupart des cancers sont découverts grâce au dépistage. On peut argumenter que le dépistage détermine l'évolution des patients si le traitement serait bénéfique, efficace ou inutile comme pour certains patients. S'ils n'avaient pas été traités, leur état n'aurait rien changé. Ceci amène à décrypter l'ensemble des mécanismes par lesquels les cancers résistent aux traitements : une étude extrêmement difficile à mener. Généralement, on se focalise sur le type histologique correspondant à la cellule normale dont la tumeur semble dérivée. L'examen anatomopathologique d'une tumeur a pour objectif d'établir le type, le grade histologique

et le stade et d'évaluer le pronostic ; ce qui contribue favorablement à déterminer le traitement le plus approprié pour un patient donné. Compte tenu de l'intérêt considérable porté à l'amélioration de l'impact des maladies sur la population, une gamme variée de médicaments est explorée à visée palliative.

Les médicaments anticancéreux constituent une vaste famille dont l'administration reste historique. Ces anticancéreux sont utilisés seuls ou en association, dans le traitement de certains cancers. Il n'existe pas de traitement spécifique mais très souvent, on adopte un traitement plus adapté au type de cancers. Mais non seulement, fort de constater qu'il existe plusieurs cas d'un type de cancer comme le cancer du sein. Ces agents anticancéreux ont des actions différentes sur l'ADN et sont classés selon leurs actions sur le cycle cellulaire. On distingue plusieurs types d'agents (Le Pecq, 1978) :

- les agents alkylants ;
- les antimétabolites ;
- les inhibiteurs de topoisomérase 1 et 2 et autres ;
- les poisons du fuseau ;
- les immunosuppresseurs et ;
- les antiœstrogènes et antiandrogènes.

Parmi ces anticancéreux, nous pouvons citer, entre autres : le 5-fluorouracil **120**, gemzar, melphelan **121**, vincristine **122**, doxorubicin **123**, gleevec **124** et le taxol **125**.



**Schéma 31** : Structures de quelques médicaments anticancéreux.



#### I.4.5.2. Les principales méthodes de traitement des cancers

Devant des obstacles difficiles à surmonter ou du moins à contourner, les chercheurs proposent de très nombreuses possibilités permettant de traiter le cancer. On distingue ainsi deux types ou groupes de méthodes de traitement de cancer à savoir : les méthodes classiques et alternatives.

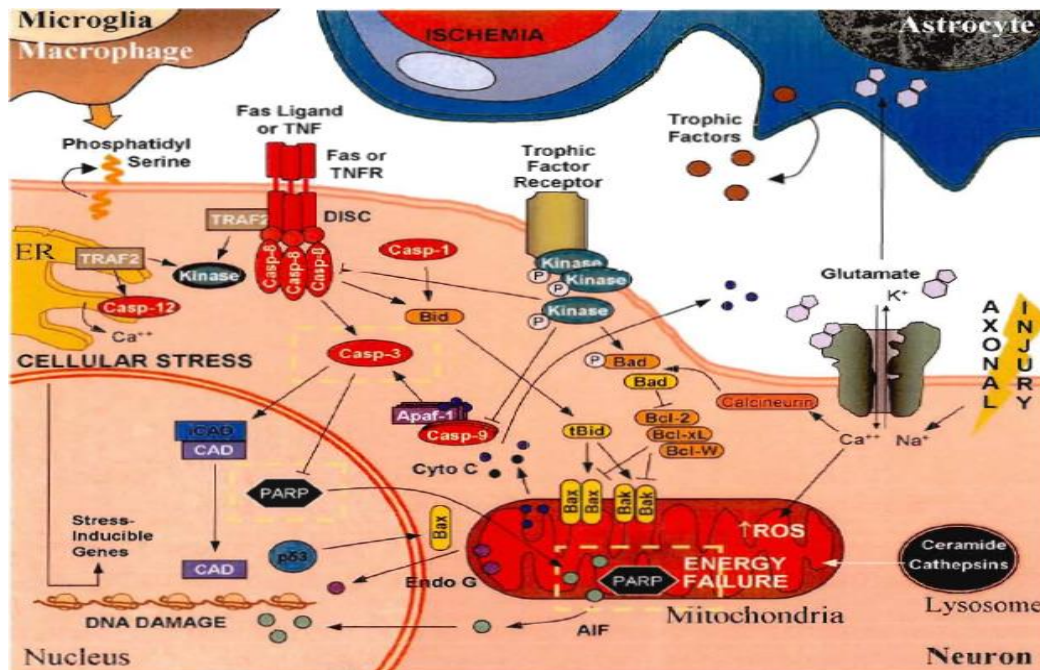
- Les méthodes classiques telles que :
  - la chirurgie qui consiste à l'excision de la tumeur (ganglion) ou l'ablation pour empêcher le phénomène d'invasion et de la métastase cellulaire (Lefferts *et al.*, 2008), l'intervention chirurgicale souvent, à la suite, aux traitements complémentaires ;
  - la chimiothérapie réside sur l'administration des métabolites chimiques, cytotoxiques pour stopper, bloquer, diminuer et/ou réduire l'évolution de la prolifération des cellules cancéreuses ;
  - la radiothérapie est sans doute l'utilisation d'un appareil capable de détruire la tumeur par des rayonnements ionisants. Elle peut être curative, palliative ou symptomatique après la chirurgie ;
  - l'immunothérapie existe sous trois formes : passive, active et adoptive. Il sert à renforcer les défenses naturelles, spécifiques ou non, du patient contre la tumeur (Old, 1996);
  - l'hormonothérapie qui consiste à agir sur la synthèse des hormones de la multiplication des cellules tumorales.
  
- Les méthodes alternatives comme :
  - l'enzymothérapie, il s'agit notamment de l'utilisation couplée des enzymes protéolytiques dans le traitement biologique du cancer ;
  - la thérapie génique est de modifier les séquences de l'ADN en introduisant de cellule cible, des gènes impliqués dans la prolifération tumorale par exemple le gène p53.

A ces méthodes alternatives, on peut toutefois citer sommairement l'orthomoléculaire, l'hyperthermie et autres méthodes qui sont des thérapies complémentaires.

Chaque méthode peut être curative ou palliative, conservatrice ou radicale avec réparation. Parfois le traitement exige l'association de deux méthodes dans le but d'éviter la contamination de l'organisme ou pour un soin adapté à un patient. Dans d'autres cas, le couplage des méthodes permet, soit de diminuer la dose du traitement et la cellule volumineuse, soit pour corriger les effets secondaires et améliorer les résultats.

#### I.4.6. Le mode d'action des cibles moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose

On appelle voie de signalisation un ensemble complexe de molécules qui interagissent les unes avec les autres pour assurer le transport de l'information d'une région de cellule vers une autre région, ce qui permet des modifications de la fonction cellulaire. Il n'est pas à démontrer que de nos jours, plusieurs voies sont explorées et documentées mettant en jeu la mitochondrie. Elle occupe une place centrale dans les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire (figure 4).



**Figure 4 :** Représentation schématique des différentes voies moléculaires de l'apoptose (Zhang *et al.*, 2005).

La signalisation cellulaire conduisant à l'apoptose fait intervenir des mécanismes complexes. La mitochondrie, le réticulum endoplasmique et les récepteurs du signal de mort cellulaire sont les trois principales voies de signalisation conduisant à l'apoptose pour donner suite à l'activation des caspases initiatrices : la caspase 8 et la caspase 10 pour la voie extrinsèque et la caspase 9 activée via l'apoptosome pour la voie intrinsèque. Les caspases initiatrices activent alors des caspases dites d'exécution (caspase 3), qui vont cliver divers substrats (ICAD, PARP, etc.). Dans le cas du réticulum endoplasmique (RE), l'activation de la caspase 12 pourrait survenir à la suite de l'activation de la caspase 7. Il peut y avoir interaction entre ces trois voies, par le clivage de BID (membre de la famille Bcl2), qui va activer la voie mitochondriale et amplifier le signal apoptotique : figure adaptée par Zhang et ses collaborateurs.

#### I.4.7. L'implication du génome mitochondrial dans les maladies communes

Le lien entre ces deux maladies neurologiques est un sujet tabou car il est difficile de mettre en évidence l'origine qui peut impliquer les mécanismes des mutations des gènes. Dans les deux cas, un dysfonctionnement mitochondrial est rapporté, une caractéristique pouvant être le siège capital commun aux maladies neurodégénératives et au cancer comme la protéine kinase mitochondriale

PINK1 responsable, lorsqu'elle est mutée. Cette mutation destructive est la résultante des facteurs environnementaux, mitochondriaux et nucléaires par la production des radicaux libres. Ces derniers engendrent le stress oxydatif chronique qui provoque relativement le dysfonctionnement mitochondrial. A ce stade, l'évidence s'avère sur la susceptibilité de la maladie.

#### **I.4.8. Le lien entre les cancers et les maladies neurodégénératives**

##### **I.4.8.1. Les données épidémiologiques**

Il est très difficile de préciser avec exactitude le lien possible entre les patients atteints de maladies neurodégénératives pouvant développer un cancer peu importe l'âge. Certains patients atteints de la maladie de Parkinson développent aussi moins de cancers non liés au tabac comme le cancer colorectal mais une incidence plus élevée du cancer de la peau. Malgré qu'ils puisent leur origine commune dans la crête neurale.

Quant à la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées, de nombreuses questions restent à élucider.

##### **I.4.8.2. La maladie de Huntington et le cancer du sein**

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire causée par la protéine huntingtine mutée mais également impliquée dans la progression et l'agressivité des tumeurs mammaires. A l'intérieur de la cellule, la protéine huntingtine mutée, la forme anormale ou le récepteur particulier empêche généralement le bon fonctionnement du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) ou en anglais : human epidermal growth factor receptor 2 dans les cellules de cancer du sein (EGF). La huntingtine se retrouve presque dans toutes les cellules et tissus. Mais leur surexpression conduit à une multiplication des cellules tumorales et à une survenue plus fréquente des métastases (Liu *et al.*, 2001).

Il existe différents types de cancers mammaires et selon la classification proposée par Pierre Denoix (Bieche *et al.*, 1999), on peut sommairement classer le cancer du sein selon l'état des récepteurs qu'on appelle les cancers à récepteurs hormonaux positifs (RH+) qui, sont les récepteurs :

- aux œstrogènes (ER+) ;
- à la progestérone (PR+) ;
- aux ostéogènes et à la progestérone.

Lorsque ces récepteurs sont présents, les hormones femelles vont encourager le développement rapide du cancer (Slamon *et al.*, 1987 ; 1989). Cela nous apprend aussi que l'hormonothérapie est indispensable pour ce genre de cancers.

#### **I.4.9. Les mécanismes d'oncogenèse des glioblastomes**

L'étude des mécanismes de l'oncogenèse (*oncos* signifie « tumeur » en grec), l'évolution d'une cellule normale en cellule anormale. Les glioblastomes ont des propriétés invasives. Ils sont des tumeurs cérébrales les plus courantes et les plus agressives des grades III et IV, selon l'OMS tout comme les gliomes : astrocytomes anaplasiques et oligodendrogliomes anaplasiques du système nerveux central (le cerveau et la moelle épinière) issues des cellules gliales (Behin *et al.*, 2003). Les glioblastomes surviennent à tout âge mais dans 70% des cas entre 45 et 70 ans avec un pic à 58 ans (Ohgaki et Kleihues, 2005). Leurs causes possibles sont inconnues et le traitement de ce cancer associe la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie respectivement selon la gravité de la maladie. Malgré un traitement chirurgical et autres traitements bien menés, il n'est pas rare que des rechutes surviennent.

L'utilisation des méthodes de la biologie et de la génétique moléculaires montrent que dans la majorité des glioblastomes, leurs mutations affectent deux (2) gènes : le gène du rétinoblastome RB et le gène TERT (Telomerase reverse transcriptase) ou la sous-unité protéique. Mais aussi ces glioblastomes sont fortement marqués par une mutation ou délétion du gène suppresseur de tumeur p53, une protéine qui joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire (Furnari *et al.*, 2007).

Bien qu'on suspecte les glioblastomes d'être à l'origine de la perturbation de manières considérables des cellules gliales mais il existe aussi des mutations des cellules nerveuses dues aux deux pathologies de Parkinson et d'Alzheimer altérant également les mêmes voies de signalisation. Un constat amer est la présence des cellules souches dans les gliomes qui pourraient être les causes directes de la chimiorésistance.

#### **I.4.10. Les cellules souches cancéreuses du gliome humain**

Au cours des dernières années, de nombreuses recherches ont été menées sur l'existence des cellules souches tumorales au sein des glioblastomes. Il est possible que des mutations liées à la tumorigénèse activent le potentiel migratoire des cellules souches cancéreuses (CSC), comme ayant la capacité proliférative d'auto-renouvellement de ces cellules et la résistance tumorales ainsi responsables des rechutes. Ces cellules souches cancéreuses se situent préférentiellement à la surface cellulaire, confèrent une imperméabilité face aux médicaments d'atteindre le milieu extracellulaire. Elles influencent donc directement le pronostic clinique. La stratégie thérapeutique actuelle serait d'adopter des futures modalités de traitements de ces cellules souches tumorales ce qui les rendraient sensibles à la chimiothérapie dans le but de les éradiquer afin de mettre fin à leurs propriétés de cellules souches saines, d'auto-renouvellement et de protection. Toutefois, même dans les cellules souches saines, ces gènes de cellules souches sont encore mal connus et associent l'excès en oligoéléments ou éléments traces par exemples : le fer, le zinc et le sélénium à l'ensemble des

pathologies, la gravité est évidente. Même des études récentes ont indexé le récepteur à dépendance TkrC, l'implication dans le neurodéveloppement et la tumorigénèse du neuroblastome.

Malgré l'arsenal pharmaceutique pour lutter contre ces différentes maladies, les produits pharmaceutiques n'ont pas démontré leur efficacité. La recherche biologique indépendante pour reconstituer les cellules endommagées ou une analyse digitale des cellules tumorales permet d'améliorer l'accès à des soins novateurs et de répondre à des questions de santé publique. Ceci échappe, le plus souvent, à la logique de l'industrie pharmaceutique. Mais les laboratoires travaillent en ce sens depuis des décennies. On pourrait y parvenir à vaincre les maladies neurodégénératives et le cancer par des possibles technologies médicales comme la thérapie génétique voire même la phytothérapie.

Dans les pages qui suivent sont développés nos résultats des études phytochimiques entreprises et réalisées sur les racines et écorces de tronc de l'espèce *Vitellaria paradoxa*.

## CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

### II.1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE

#### II.1.1. Les extractions et la purification

Les écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* ont été récoltées à Garoua dans la région du Nord Cameroun, en juillet 2012. La plante a été identifiée par Monsieur Jean Paul BAMBA, Taxonomiste à l'Herbier de l'Ecole de Faune de Garoua, en comparaison avec un échantillon enregistré sous le numéro HEFGN 6276. Quant aux racines, graines et aussi bien que les écorces, elles ont été récoltées en République Centrafricaine en octobre 2016 et juillet 2018 dans des localités bien différentes. Identifiées et enregistrées au Centre d'Etudes et de Recherche sur la Pharmacopée et la Médecine Traditionnelles Africaines (CERPHAMETA) à l'Université de Bangui sous le numéro N°054/UB/CER/D.16.

Les différentes parties de *Vitellaria paradoxa* ont été extraites séquentiellement et successivement aux solvants à polarité croissante (hexane, acétate d'éthyle, méthanol et eau) à l'aide des méthodes suivantes : la macération à température ambiante, la macération avec agitateur mécanique, le Soxhlet et le sonicateur (tableau 8).

**Tableau 8** : Bilan d'extraction

Parties de la plante	Poudre	Macération (MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 : 1) 72h (25°C)	Soxhlet (MeOH à chaud)	Macération (Agitateur mécanique) 1,5 Kg, 2h, 25°C			Sonicateur (Extraction séquentielle à polarité croissante)			
				Hexane	AcOEt	Aqueux	Hexane	AcOEt	MeOH	Eau
Ecorces de tronc du VP	3,5 Kg	192,3 g	512,2 g	19,2 g	16,4 g	30,7 g	120 g	140 g	530,4 g	80 g

Il ressort de ce tableau que le bain ultrason (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1) extrait mieux que la macération et le Soxhlet, avec un rendement de 24,17% pour 3,5 Kg de poudre. Beaucoup plus avantageux avec l'extraction séquentielle à polarité croissante, un rendement global de 24,55%.

Ces différents extraits ont fait l'objet d'analyse LCMS et au screening contre l'inflammation et la cytotoxicité pour la recherche des extraits actifs. L'extrait hexanique n'a pas été testé pour son insolubilité au méthanol utilisé.

## II.1.2. La LC-MS des extraits bruts et fractionnés

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a révélé que les extraits sont riches en composés polyphénoliques ainsi que des composés triterpéniques (Figures 5 et 6).

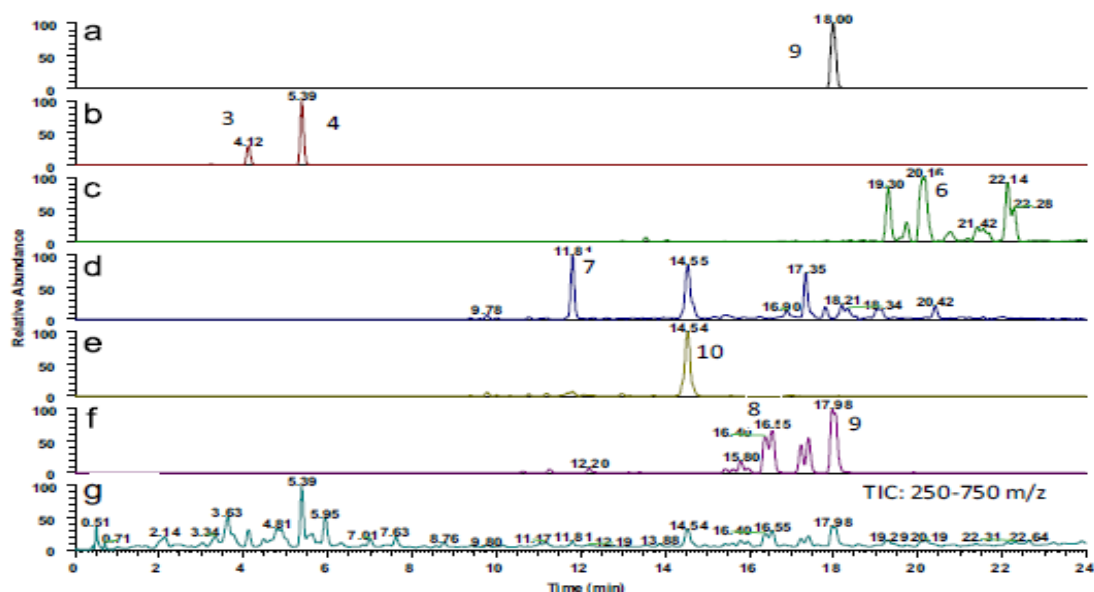


Figure 5 : Chromatogramme de l'extrait d'acétate d'éthyle (250-750 m/z).

Le chromatogramme ionique extrait (a) du composé 9 isolé et le chromatogramme ionique extrait (b)-(f) des composés (3, 4, 6, 7, 8, 9) identifiés dans *Vitellaria paradoxa* extrait AcOEt (VPEE) de leurs ions quasi moléculaires  $[M+H]^+$  avec déviation de 2 ppm et chromatogramme à balayage complet (g) (250-750 m/z) de VPEE. Et il ressort que beaucoup sont des triterpènes (Figure 6).

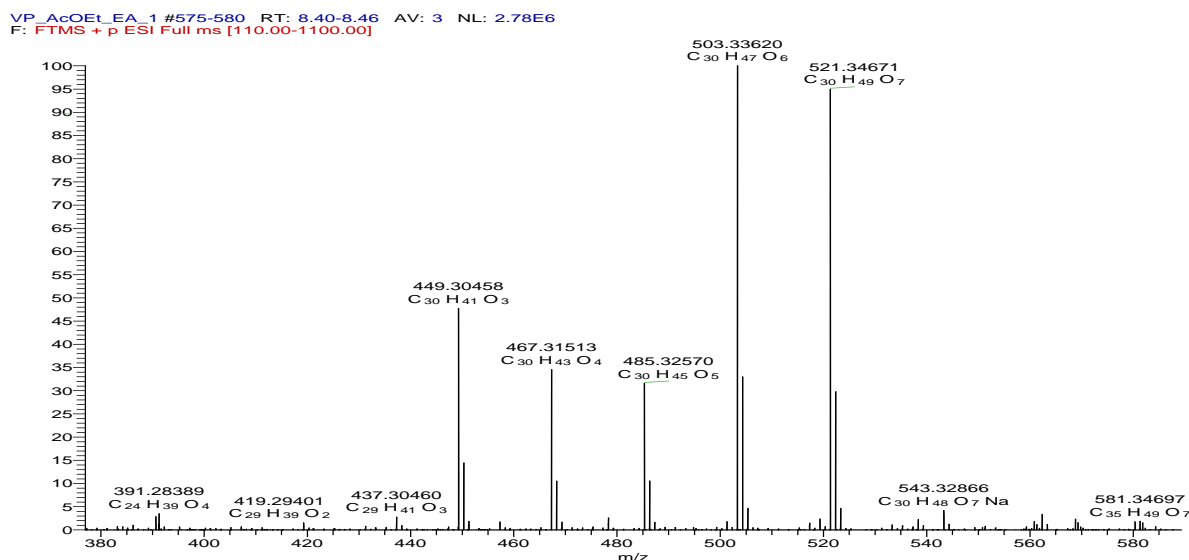


Figure 6 : Spectre de masse de l'extrait d'acétate d'éthyle.

## II.1.3. Etude des propriétés anti-inflammatoires des extraits des racines, écorces de tronc et graines de *Vitellaria paradoxa*

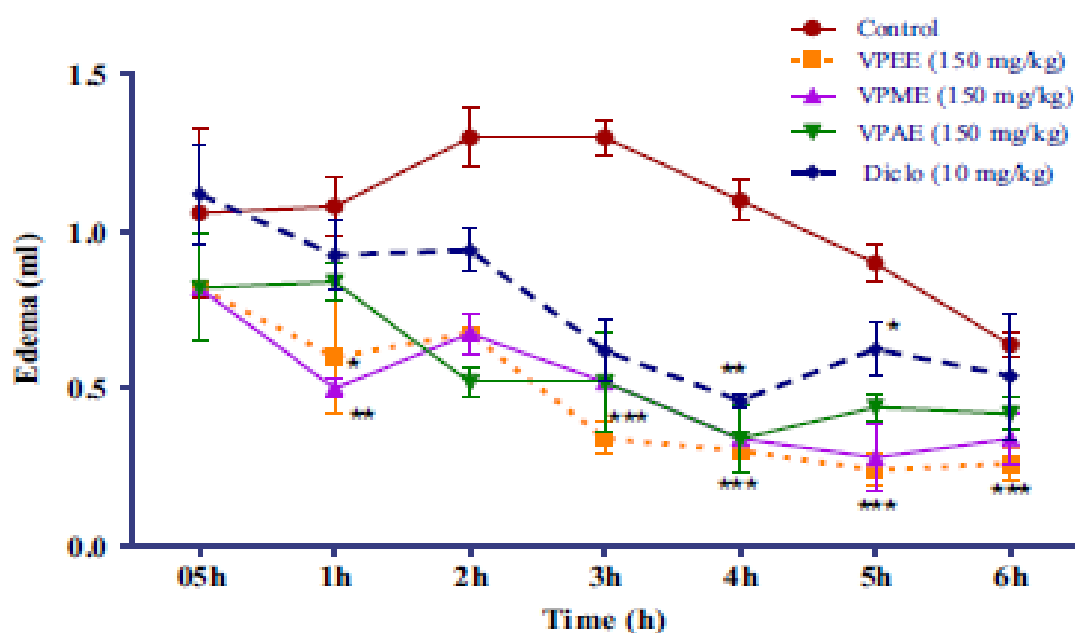
Pour rechercher l'activité spécifique, 3,5 Kg de la poudre des écorces du tronc ont été extraits à l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol et l'eau donnant respectivement 120 g, 140 g, 530,4 g et

80 g. Les extraits méthanolique brut, à l'acétate d'éthyle et aqueux ont été soumis aux tests anti-inflammatoires. Cette analyse biologique a montré une activité anti-inflammatoire intéressante.

Nous avons évalué les effets de l'extrait au méthanol de l'écorce de *Vitellaria paradoxa* sur l'inflammation aiguë induite par la carragénine et sur l'inflammation chronique induite par l'adjuvant complet de Freund (ACF). Nous avons également évalué l'effet analgésique de ces extraits sur la douleur induite par la plaque chauffante et enfin nous avons réalisé des coupes histologiques afin d'évaluer l'effet des extraits sur quelques tissus arthritiques des animaux.

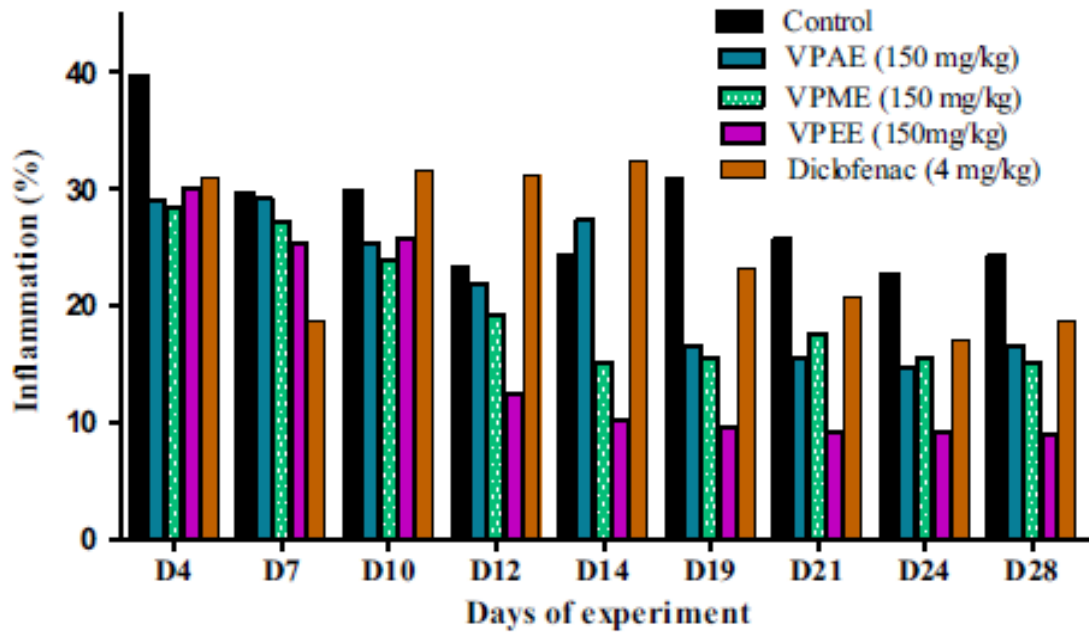
Les analyses statistiques des données ont été réalisées par le test de l'analyse de la variance à une voie suivi du post test à comparaison multiple de Newman-Keuls. Nous avons utilisé le logiciel Graph Pad Prism version 5.00 for Windows, Graph Pad Software, San Diego California USA (www.graphpad.com).

Les différences entre les groupes d'animaux étaient considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ . Dans le modèle d'inflammation aiguë induite par la carragénine, les groupes ont été comparés par rapport au lot témoin négatif et dans le modèle d'inflammation chronique induite par l'ACF les groupes ont été comparés par rapport au lot témoin négatif et au lot normal. La dose de 150 mg /Kg des extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol des écorces réduits significativement l'œdème de la patte de la souris induit par la carragénine et la plaque chauffante par une diminution de l'inflammation par rapport au diclofénac respectivement. Les résultats de tous les tests biologiques sont représentés dans les figures 8 à 13 et tableau 8.

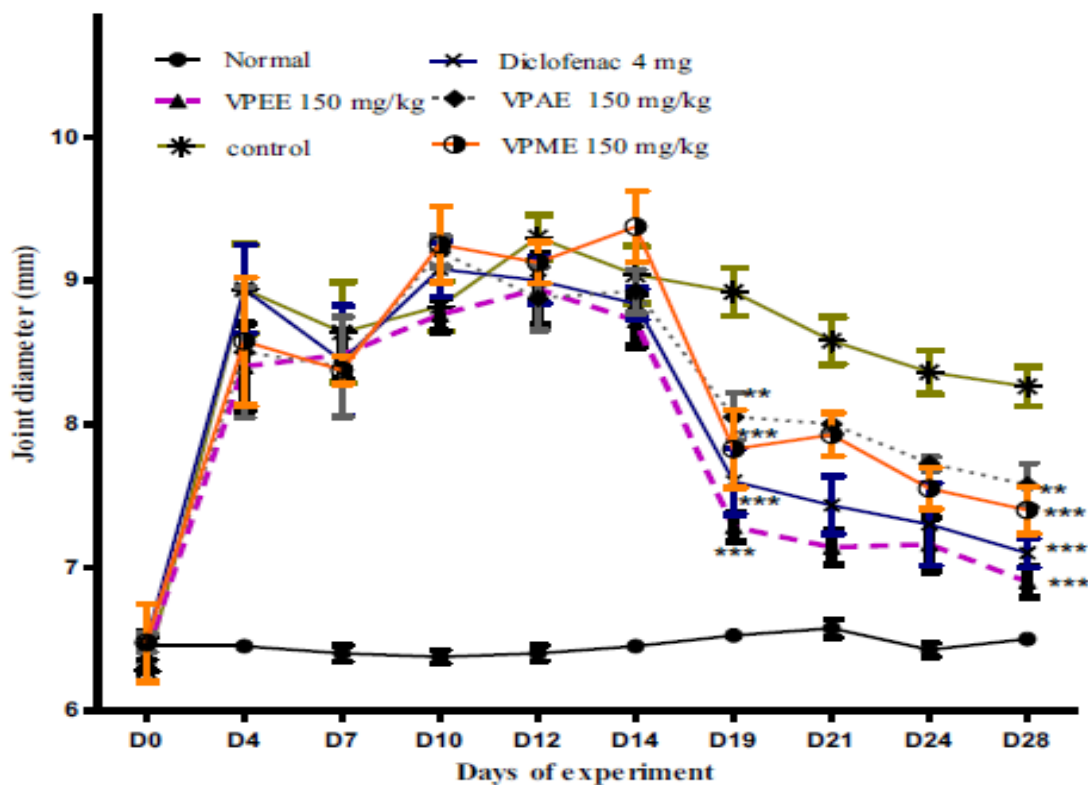


**Figure 7** : Effets des extraits aqueux, à l'acétate d'éthyle et au méthanol sur l'inflammation induite par la carragénine.





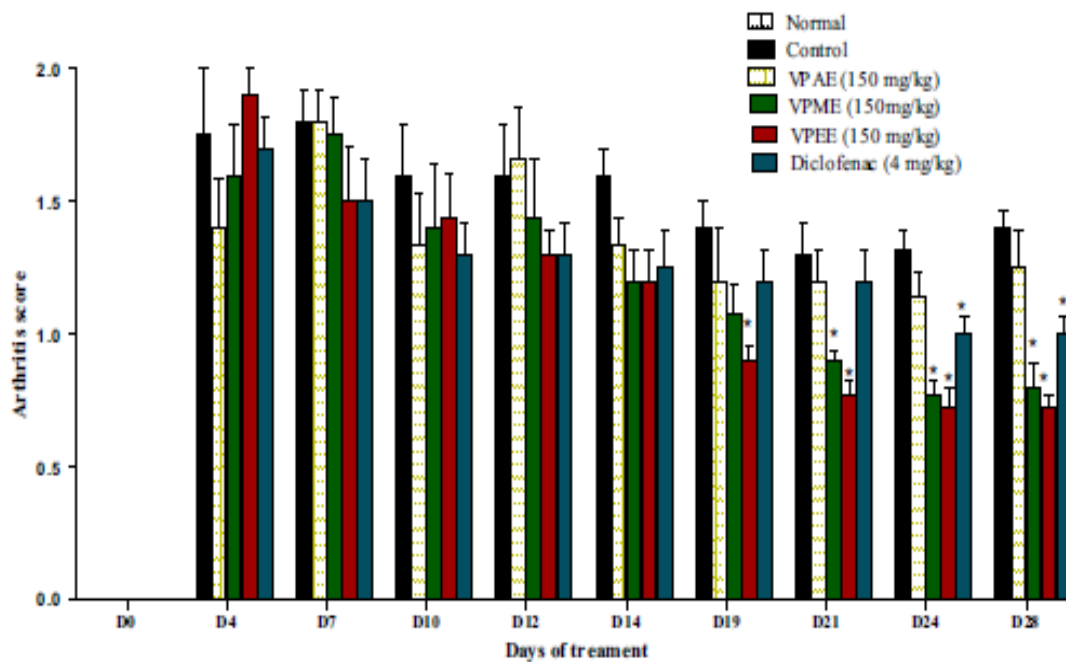
**Figure 8** : Effets des extraits aqueux, à l'acétate d'éthyle, au méthanol et au diclofénac sur l'inflammation induite par l'Adjuvant Complet de Freud.



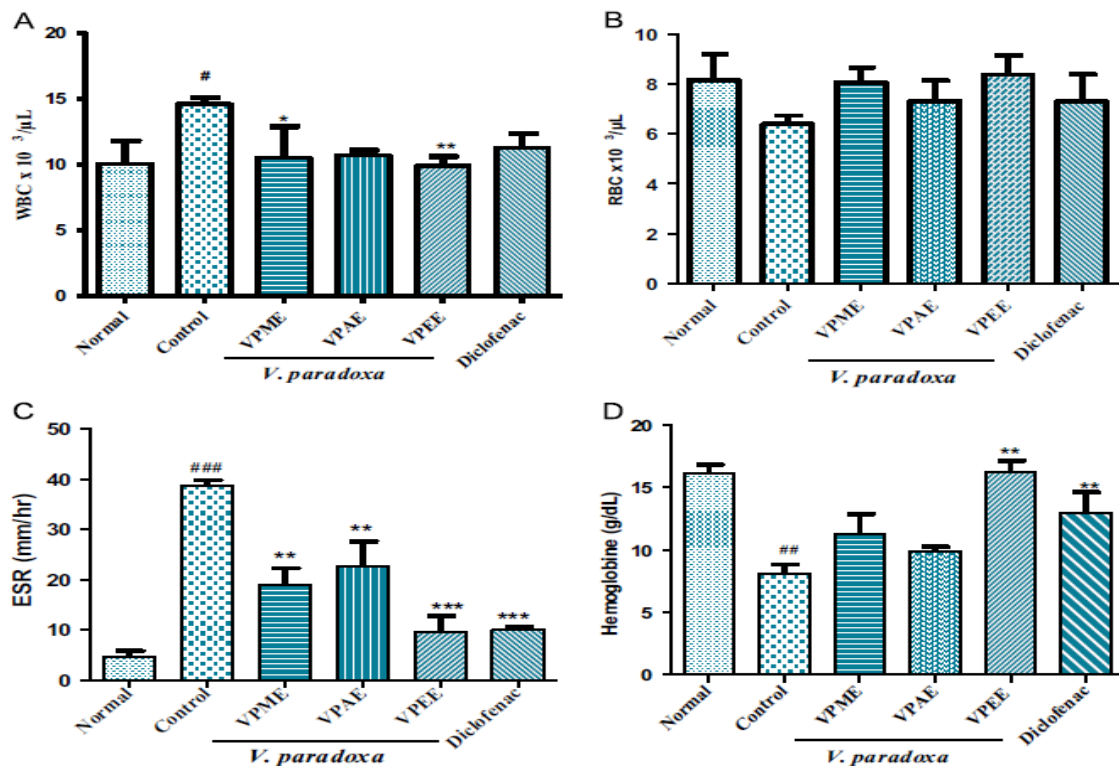
**Figure 9** : Effets des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur le diamètre des articulations des rats après 14 jours de traitement.

**Tableau 9** : Effets des extraits aqueux (VP AE), à l'acétate d'éthyle (VP EE), au méthanol (VP ME) et au diclofénac sur le poids de la rate, le poids du foie et le poids du thymus après 14 jours de traitement.

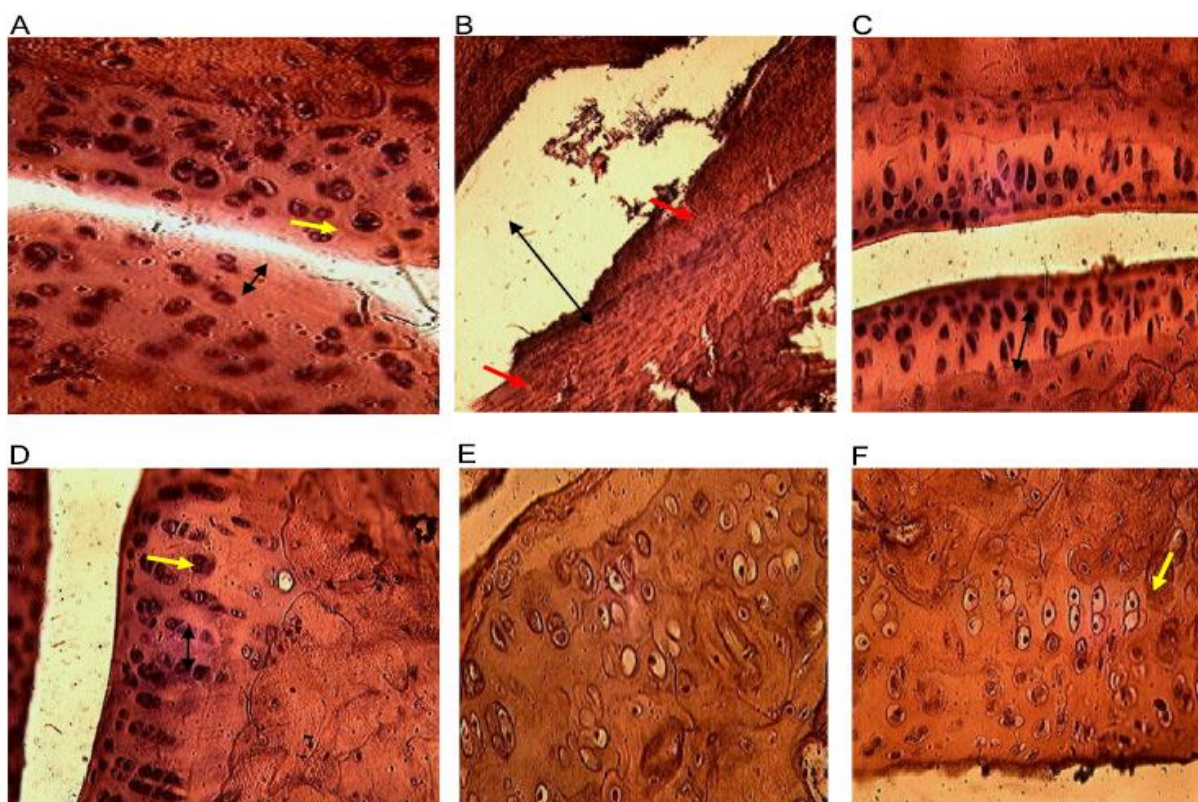
Traitements	Doses (mg/Kg)	Poids des organes (g)		
		Rate	Foie	Thymus
Normal	-	0.65 ± 0.12	6.85 ± 0.64	0.63 ± 0.09
Contrôle	-	1.70 ± 0.40*	7.67 ± 1.20	0.41 ± 0.05**
Extrait aqueux	150	0.98 ± 0.52	7.58 ± 0.51	0.53 ± 0.27 <sup>#</sup>
Extrait MeOH	150	0.93 ± 0.24	6.93 ± 0.50	0.45 ± 0.07
Extrait AcOEt	150	0.73 ± 0.86 <sup>#</sup>	6.97 ± 0.67	0.60 ± 0.02 <sup>##</sup>
Diclofénac	4	0.82 ± 0.16 <sup>#</sup>	6.54 ± 1.97	0.53 ± 0.09 <sup>#</sup>



**Figure 10** : Effets des extraits aqueux (VP AE), à l'acétate d'éthyle (VP EE), au méthanol (VP ME) et au diclofénac sur le score arthritique après 14 jours de traitement.



**Figure 11** : Effet traitement chronique des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPAAE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur WBC (A), RBC (B), ESR (C) et hémoglobine (D) après 14 jours de traitement.



**Figure 12** : Structures histologiques des articulations et du cartilage de rats traités et non-traités.

Ces coupes histologiques précédentes montrent que chez les animaux souffrants de polyarthrite, les cellules cartilagineuses ont bien été détruites (diminution). On peut y remarquer qu'il n'y a absence d'activité mitotique (mitose). Les anomalies observées chez les animaux malades ont été corrigées chez le sujet traité à l'extrait brut au méthanol (C) de l'écorce de *Vitellaria paradoxa*. On remarque une prolifération des cellules cartilagineuses notamment des chondrocytes bien différenciées chez le rat normal (A), et le rat traité à l'extrait au méthanol (C). Chez ceux traités aux extraits d'acétate d'éthyle (D) et aqueux (E), ces cellules sont présentes mais moins abondantes. On peut y noter un processus mitotique destiné à leur régénération.

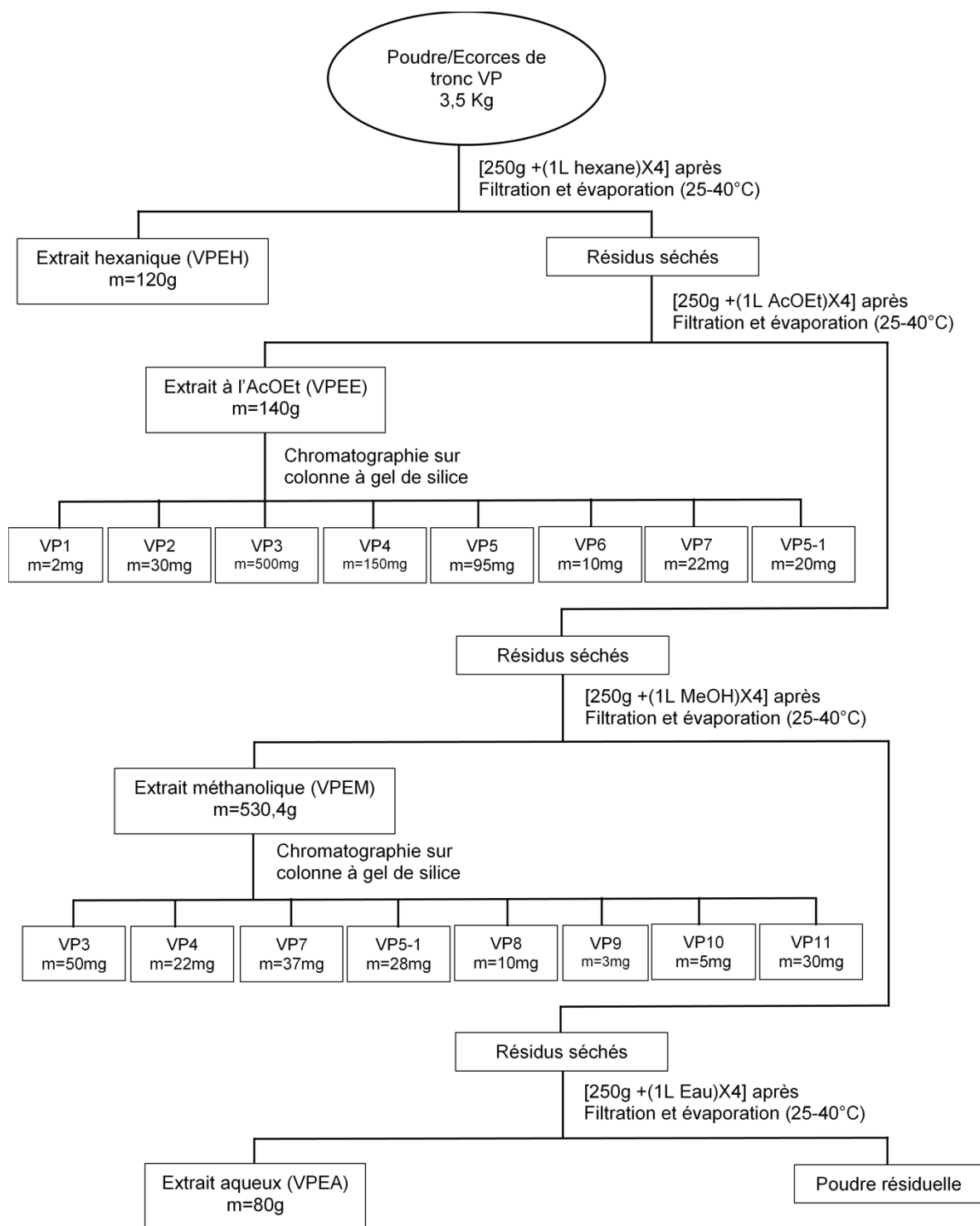
#### **II.1.4. Etude de l'activité antiproliférative des extraits des racines, écorces de tronc et graines de *Vitellaria Paradoxa***

Les travaux de Tagne et ses collaborateurs en 2014 ont montré que l'activité antiproliférative de l'extrait au méthanol des écorces du tronc de *Vitellaria paradoxa* sur différentes cellules donnent les résultats suivants avec concentration à 50% d'inhibition de la croissance des cellules ( $GI_{50}$ ) : NCI-H460 (27,00  $\mu\text{g/mL}$ ), MCF-7 (24,00  $\mu\text{g/mL}$ ), PC3 (67,00  $\mu\text{g/mL}$ ) et Hela (66,46  $\mu\text{g/mL}$ ). De même, ceux effectués (Zhang et al., 2014) sur les noyaux des graines ont montré que ces extraits des noyaux de graines de *Vitellaria paradoxa* présentent de potentielles activités anti-inflammatoires et anticancéreuses.

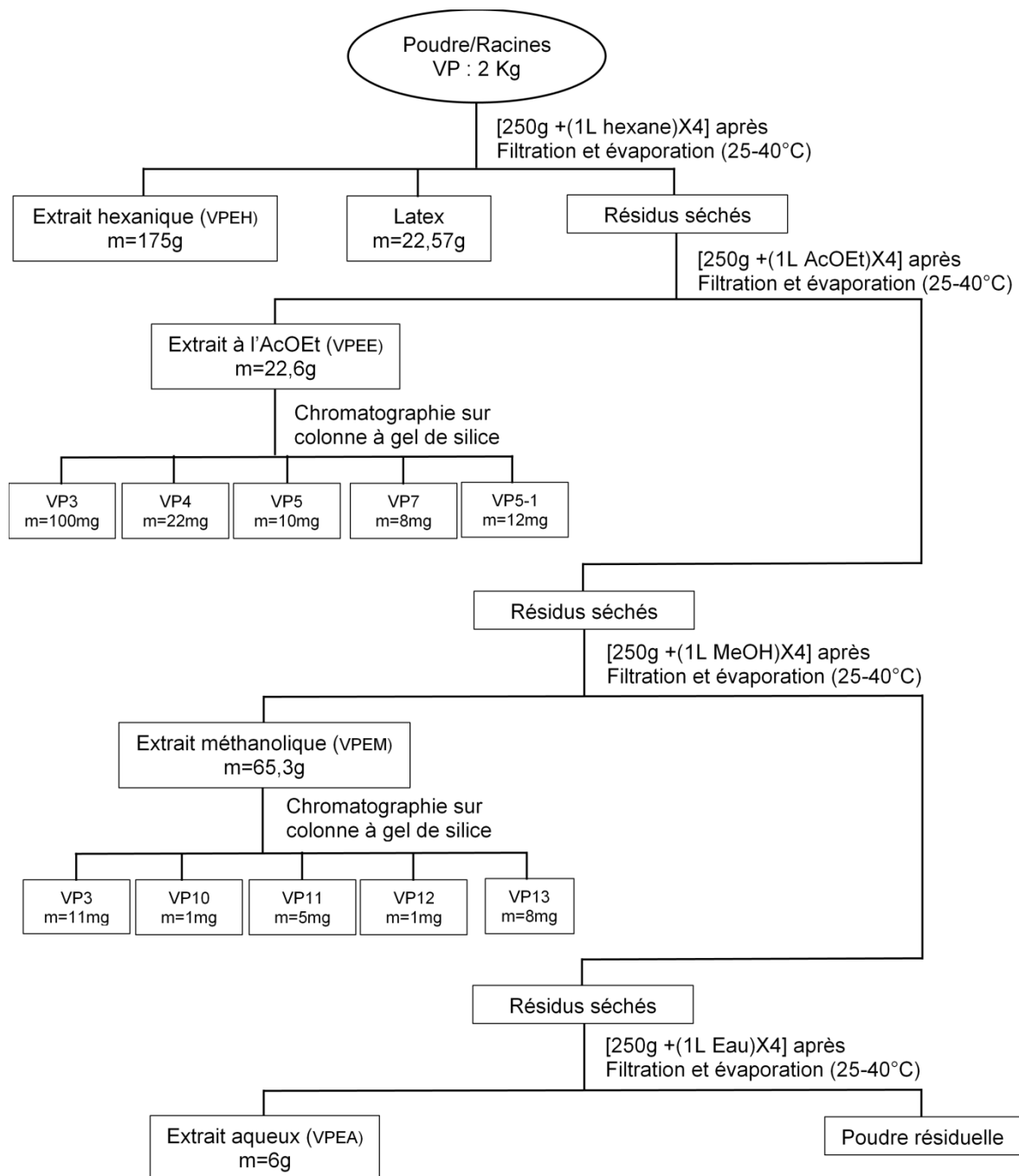
La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse des différents extraits révèle que l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines et des écorces du tronc est riche en composés triterpéniques ainsi que polyphénoliques. Le screening préliminaire sur les extraits au méthanol, à l'acétate d'éthyle et aqueux a montré une activité anti-inflammatoire intéressante notamment l'extrait à l'acétate d'éthyle. L'activité anti-inflammatoire (*in vivo*) des extraits (acétate d'éthyle, méthanolique et aqueux) a été évalué sur l'inflammation aiguë induite par la carragénine et sur l'inflammation chronique induite par l'adjuvant complet de Freund à la même dose de 150 mg/kg.

#### **II.1.5. La purification**

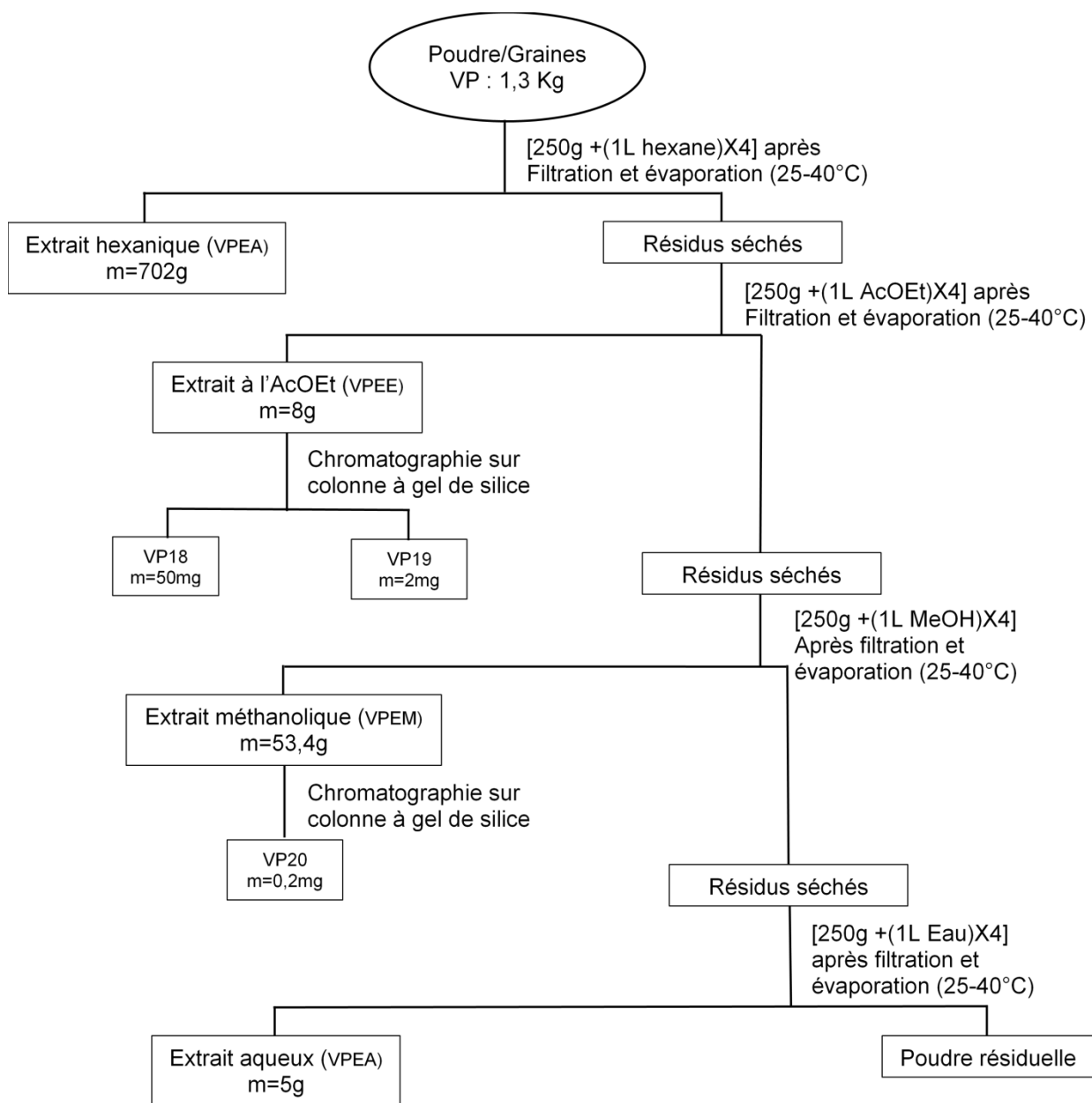
Les différents extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol ou butanol ont été soumis à des chromatographies sur colonne au gel de silice, éluées, soit au mélange hexane-acétate d'éthyle, soit au mélange acétate d'éthyle-méthanol ou encore au mélange chlorure de méthylène-méthanol, tous de polarité croissante. Le mélange des composés est purifié sur sephadex avec un système chlorure-méthanol et/ou sur les plaques préparatives au total 23 composés ont été isolés des racines, des écorces du tronc et des graines. Après analyses des spectres de ces composés, nous avons constaté sur la base de la CCM, des données physiques et spectroscopiques, que 7 couples de composés étaient identiques : VP2, VP3, VP4, VP5-1, VP7, VP10, VP11. Les figures 13, 14 et 15 résument les différents protocoles d'extraction et de purification des extraits actifs.



**Figure 13** : Protocole d'extraction et isolement des composés obtenus des écorces du tronc de *Vitellaria paradoxa*.



**Figure 14** : Protocole d'extraction et isolement des composés obtenus des racines de *Vitellaria paradoxa*.



**Figure 15** : Protocole d'extraction et d'isolement des composés obtenus des graines de VP.

Après purification, seize (16) composés ont été obtenus dont dix (10) ont été caractérisés grâce aux méthodes spectroscopiques modernes. Ces composés appartiennent à plusieurs classes de substances naturelles parmi lesquelles, on distingue cinq triterpènes comme produits majoritaires, trois composés polyphénoliques (flavonoïdes), un cycloalcane et un acide gras. Parmi ces différents composés, onze (11) ont été obtenus des écorces de tronc, neuf (9) des racines et trois (3) des graines que nous allons décrire dans les pages suivantes.

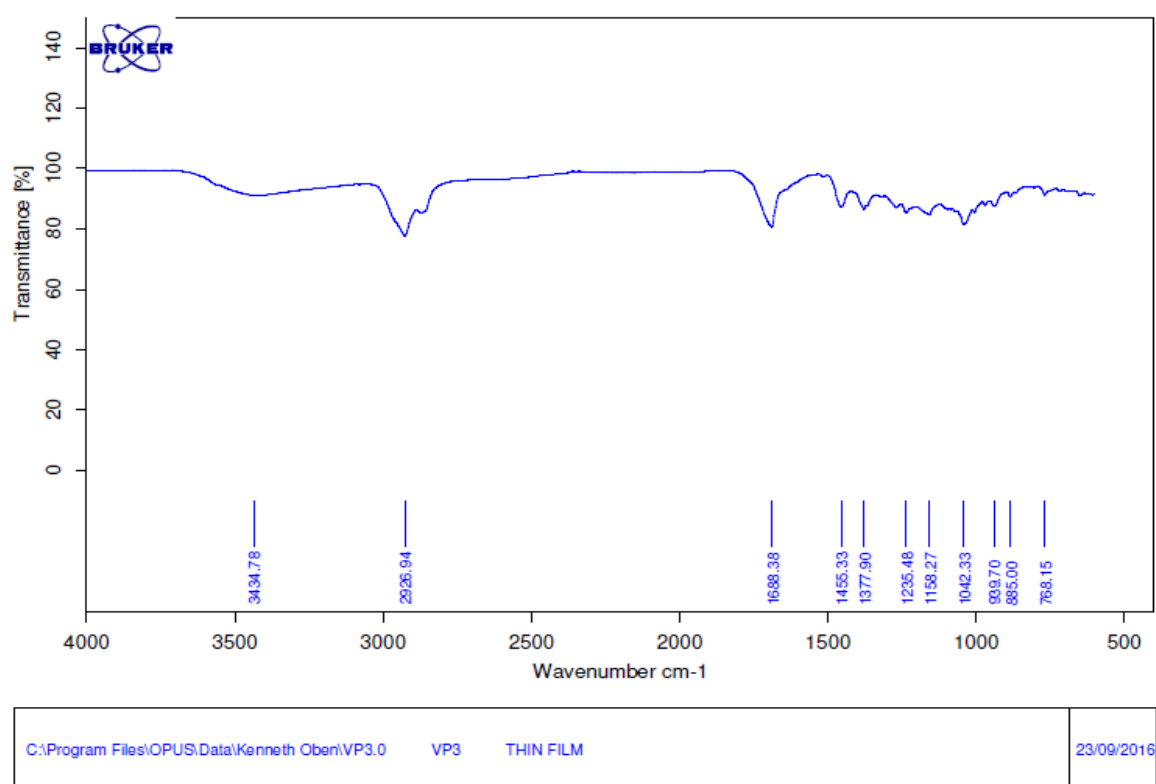
## II.2. CARACTERISATIONS DES COMPOSES ISOLES DES RACINES, ECORCES DE TRONC ET GRAINES DE *VITELLARIA PARADOXA*

### A. COMPOSES ISOLES

#### II.2.1. Elucidation structurale des triterpènes isolés

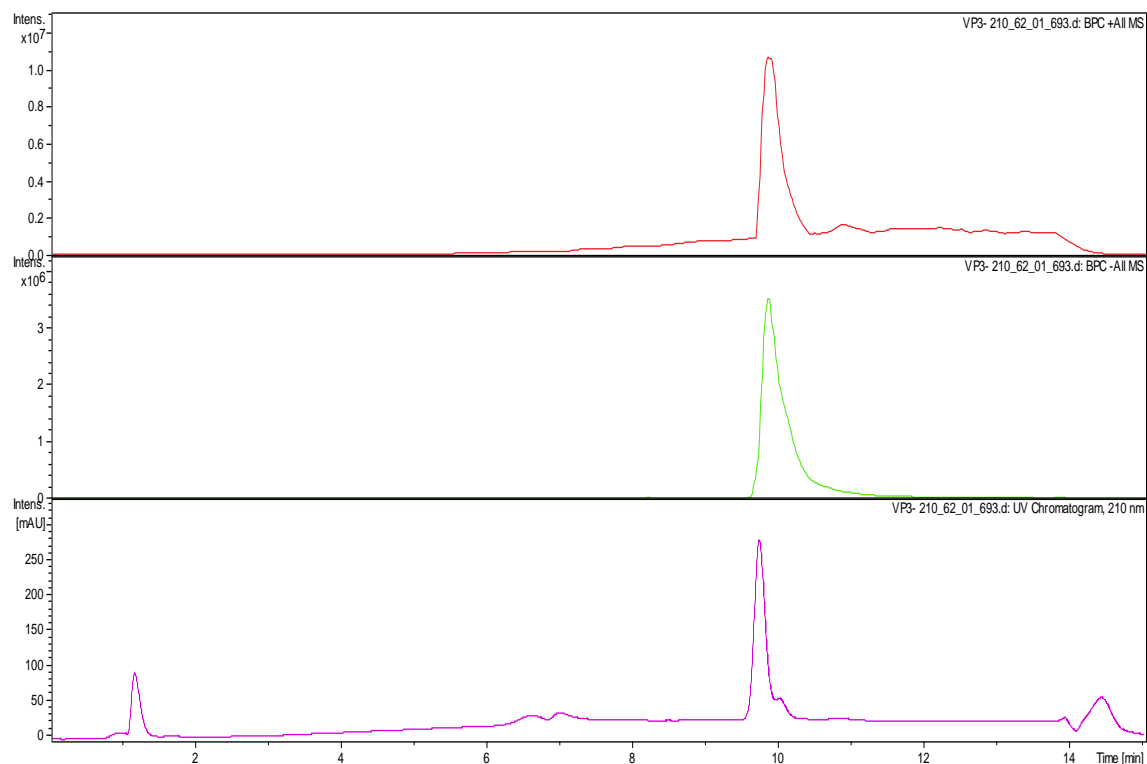
##### II.2.1.1. Identification et caractérisation du composé VP3

Isolé de racines et écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa*, il a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (25-27,5 %). Il est soluble dans le méthanol et fond entre 282-285°C. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption à  $\nu_{\max}$  : 3435  $\text{cm}^{-1}$  (O-H), 2927  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1688  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) et 1455 et 1378  $\text{cm}^{-1}$  de diméthyle géminé (figure 16) et ses spectres LCMS et de masse respectivement figure 17 et figure 18, tandis que ce dernier donne un pic pseudomoléculaire  $[\text{M}-\text{H}]^+$  à 455,3 nous permet d'attribuer une formule brute correspond à  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_3$ .

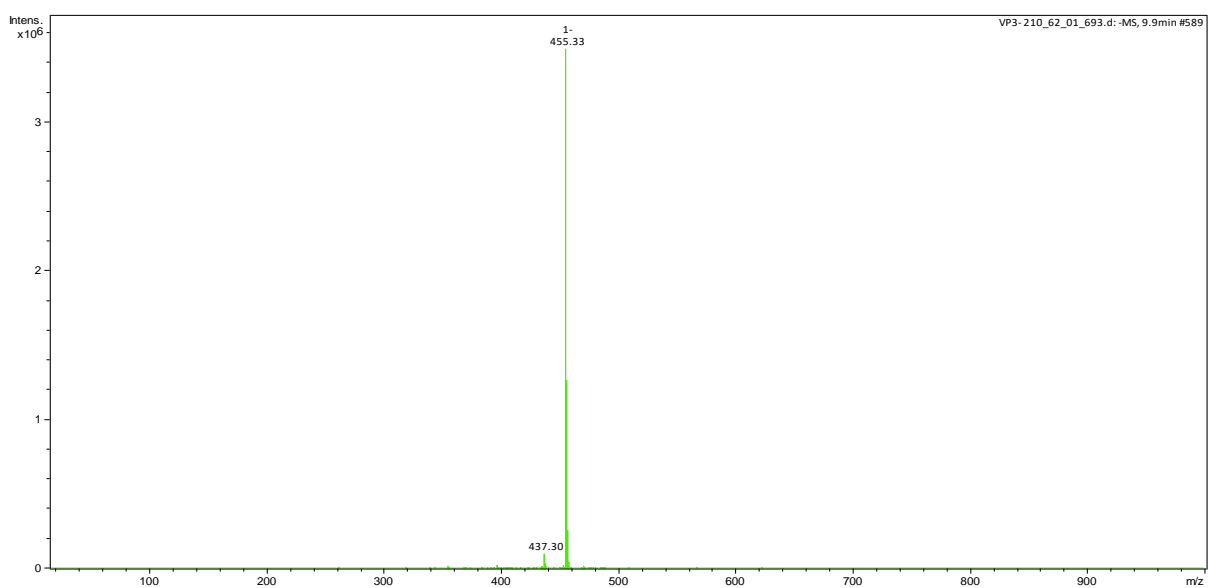


**Figure 16** : Spectre IR du composé VP3.



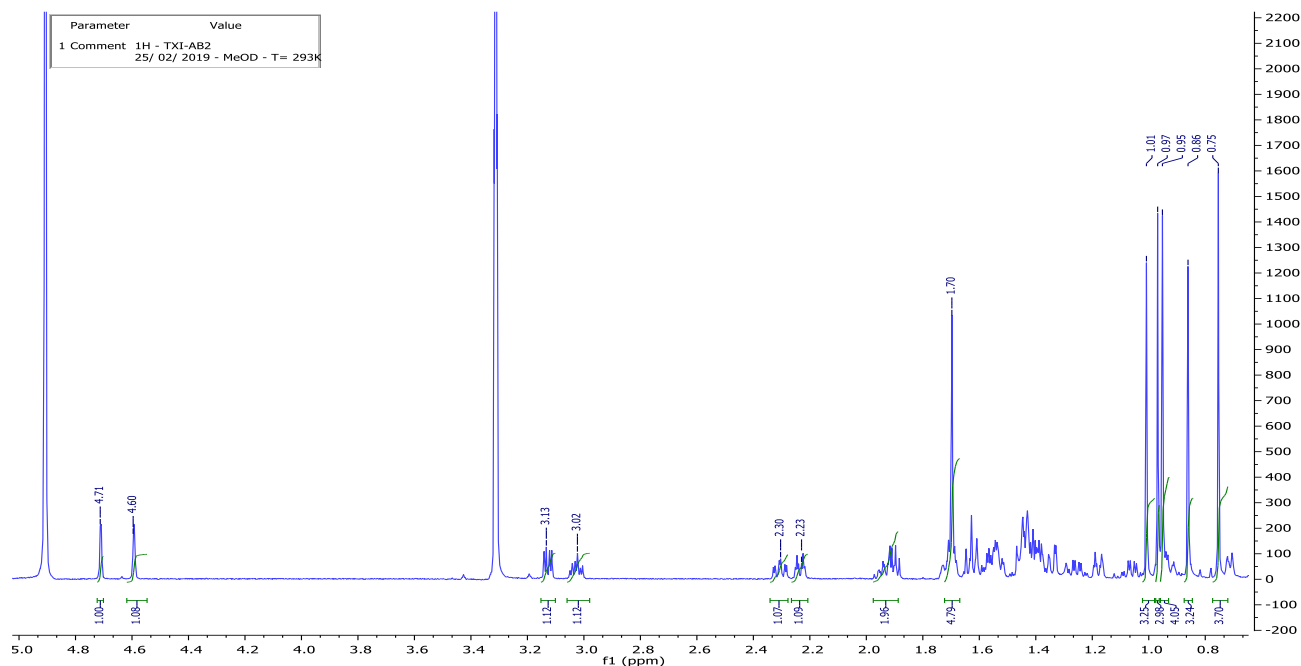


**Figure 17** : Spectre LCMS du composé VP3.



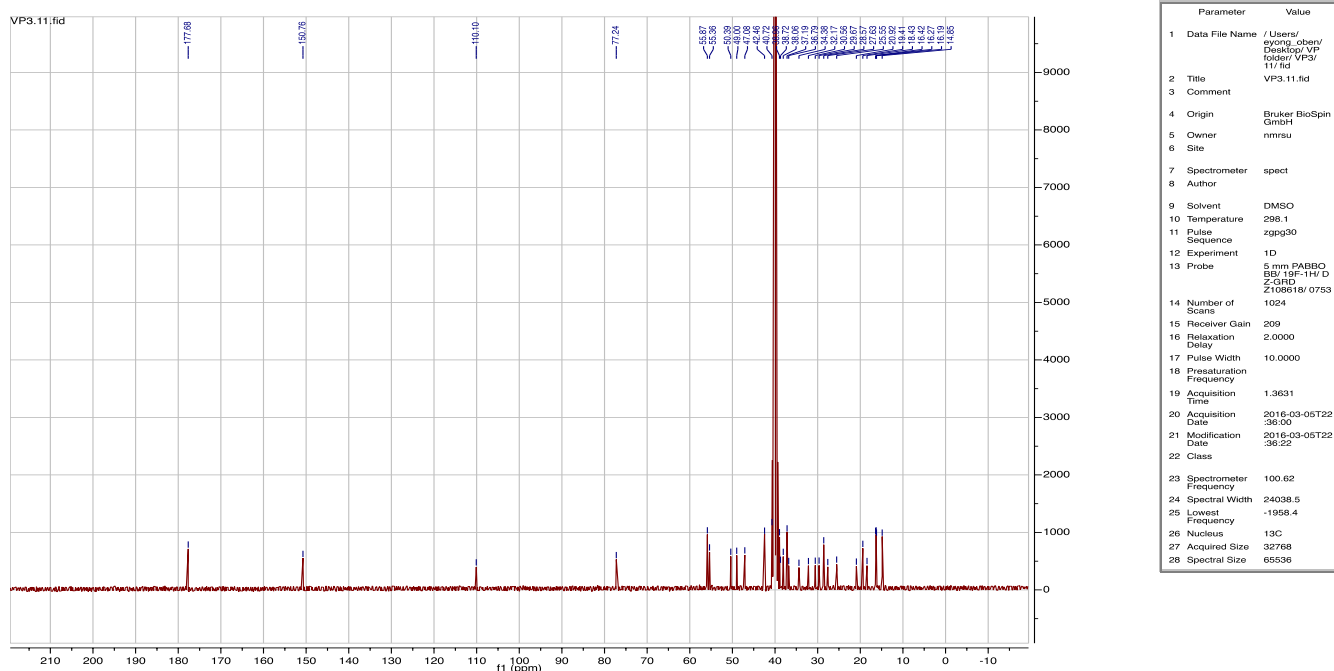
**Figure 18** : Spectre de masse (APCI) du composé VP3.

Sur son spectre de RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) (figures 19), on observe des signaux de proton à  $\delta$  4,71 (1H, d, 4,0 Hz, H-29a), 4,60 (1H, d, 4,0 Hz, H-29b), 3,13 (1H, m, H-19) et 3,02 (1H, m, H-3).

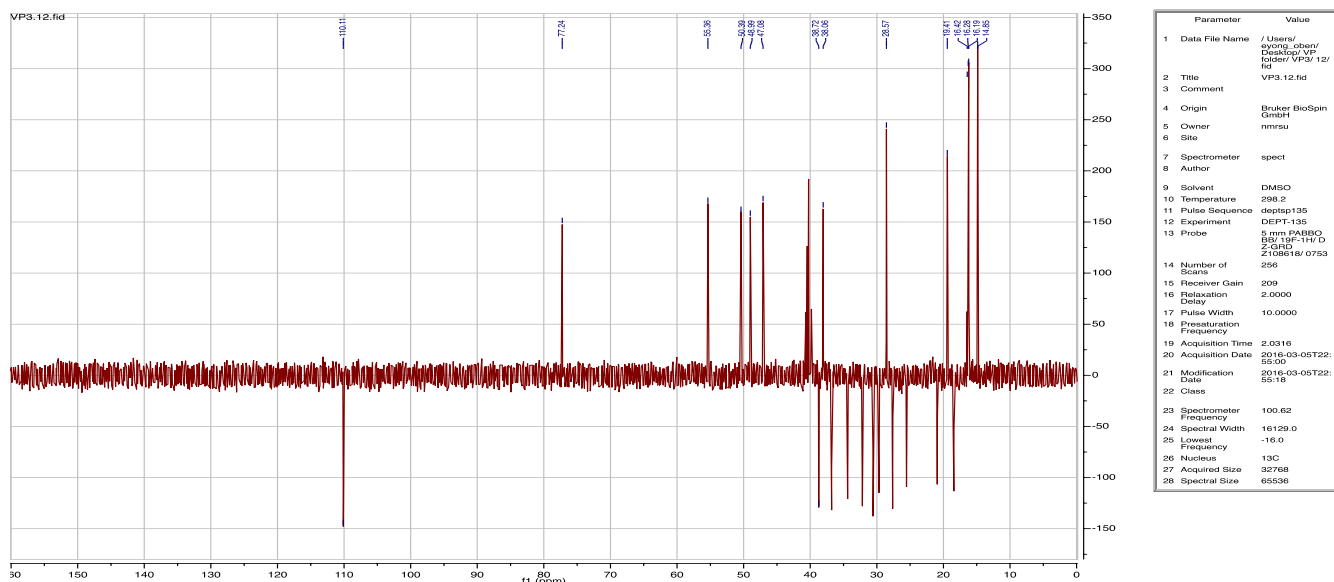


**Figure 19** : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé VP3.

Ses spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) (figure 20, tableau 9) et DEPT-135 (figure 21), présentent les signaux de 30 atomes de carbones dont 6 groupements méthyles à  $\delta$  14,9 (C-27) ; 16,2 (C-24) ; 16,3 (C-25) ; 16,4 (C-26) ; 19,4 (C-30) et 28,6 (C-23). Le signal d'un méthine oxygéné à  $\delta$  77,2 (C-3) ; deux carbones oléfiniques à  $\delta$  110,1 (C-29) et à 150,8 (C-20) caractéristiques d'un triterpène de la famille du lupane (Pisha *et al.*, 1995) et un groupement C=O d'acide carboxylique à  $\delta$  177,7 (C-28).



**Figure 20** : Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) du composé VP3.



**Figure 21** : Spectre de DEPT-135 (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) du composé VP3.

Son spectre COSY (figure 22) montre les différentes corrélations entre :

- le proton déblindé à 4,70 ppm (H-29a) et un proton à 4,57 ppm (H-29b).
- le proton déblindé à 4,57 ppm (H-29b) et trois protons à 1,65 ppm (H-30).

Le spectre HSQC (figure 23) montre les corrélations  $J^1\ ^{13}\text{C}-^1\text{H}$ . Sur ce spectre, on observe une série de corrélations entre :

- les protons respectivement à 4,70 et 4,57 ppm (H-29a, H-29b) et le carbone à 110,1 (C-29) ppm.
- le proton à 3,00 ppm (H-19) et le carbone (C-19) à 47,1 ppm.
- le proton à 2,98 ppm (H-3) et le carbone (C-3) à 77,2 ppm.
- le proton à 0,65 ppm (H-5) et le carbone à 55,4 ppm (C-5).

Le spectre HMBC (figure 24) présente les corrélations en  $J^{2-3}\ ^{13}\text{C}-^1\text{H}$ . Sur ce spectre :

- les protons respectivement à 4,70 et 4,57 ppm (H-29a, H-29b) corrélient avec les carbones à 47,1 et 19,4 ppm (C-19 et C-30).

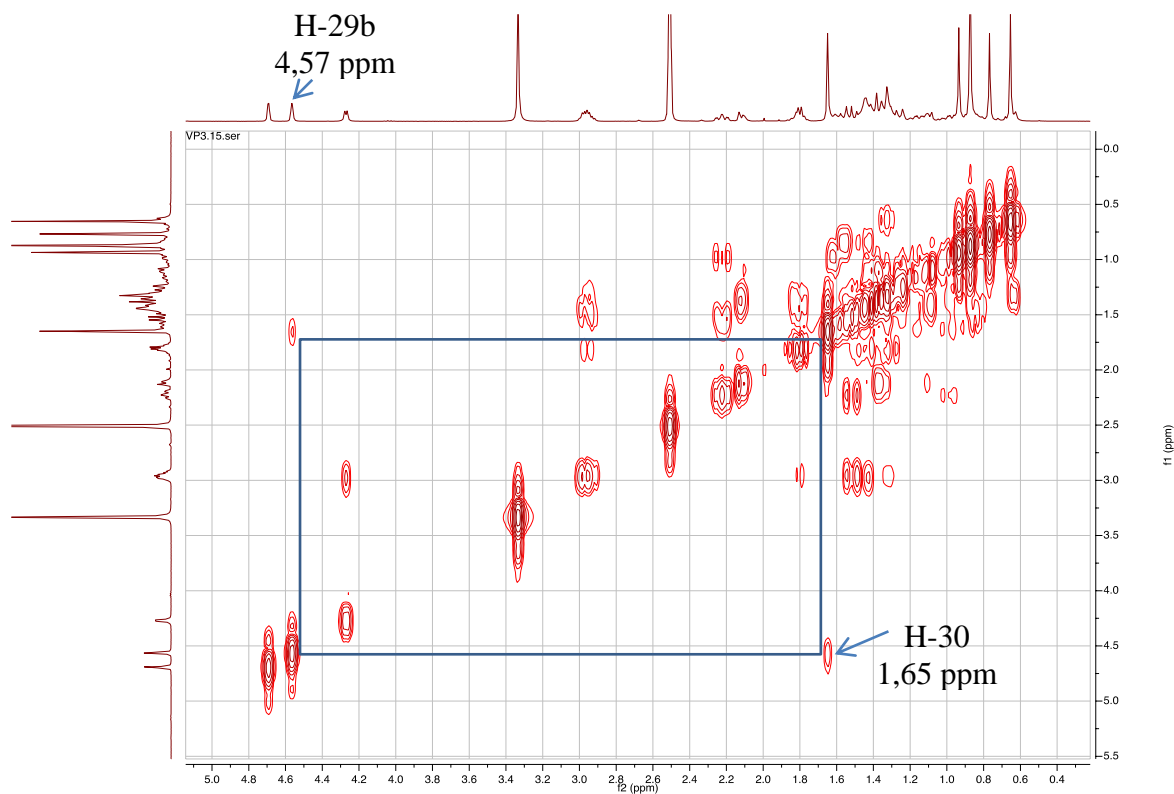


Figure 22 : Spectre COSY du composé du composé VP3.

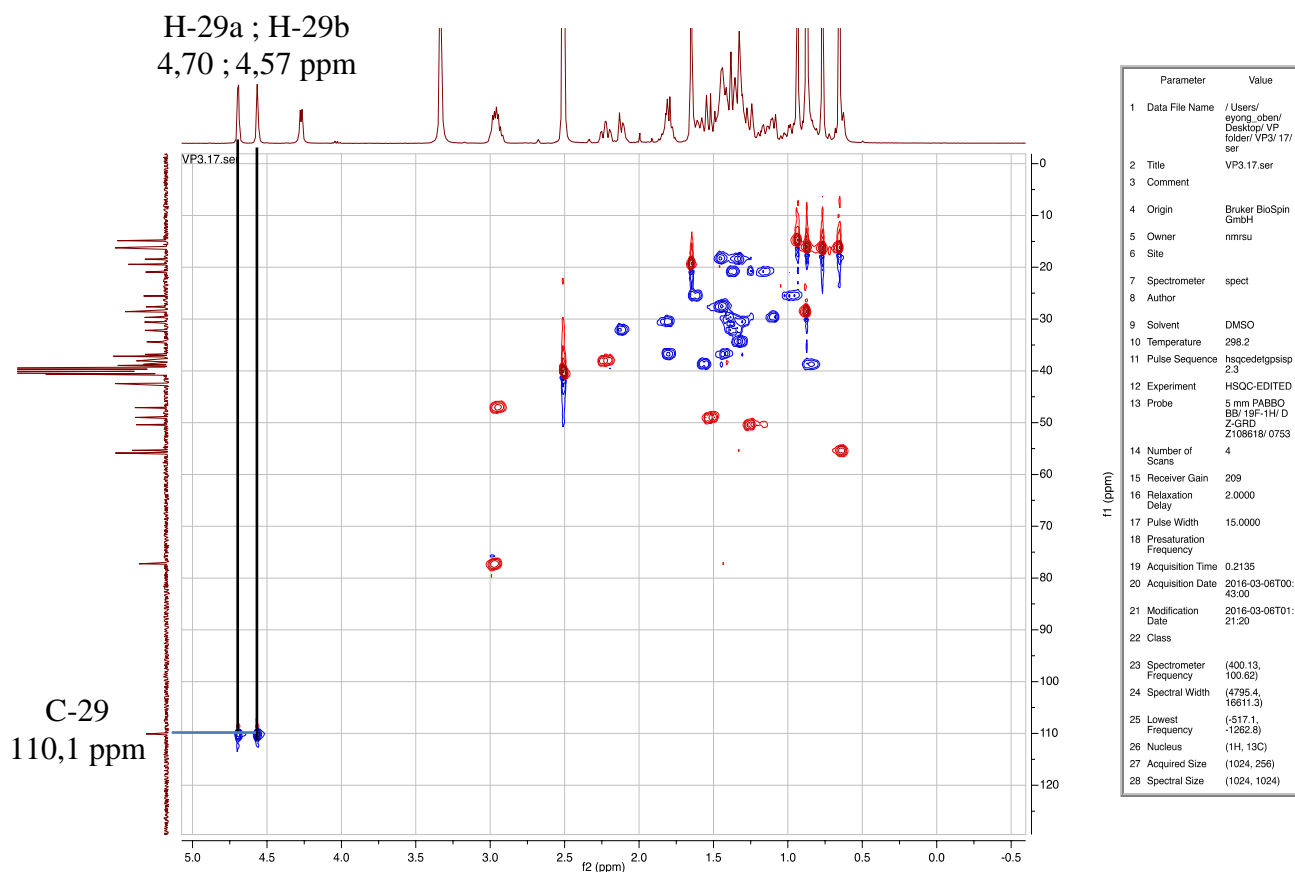
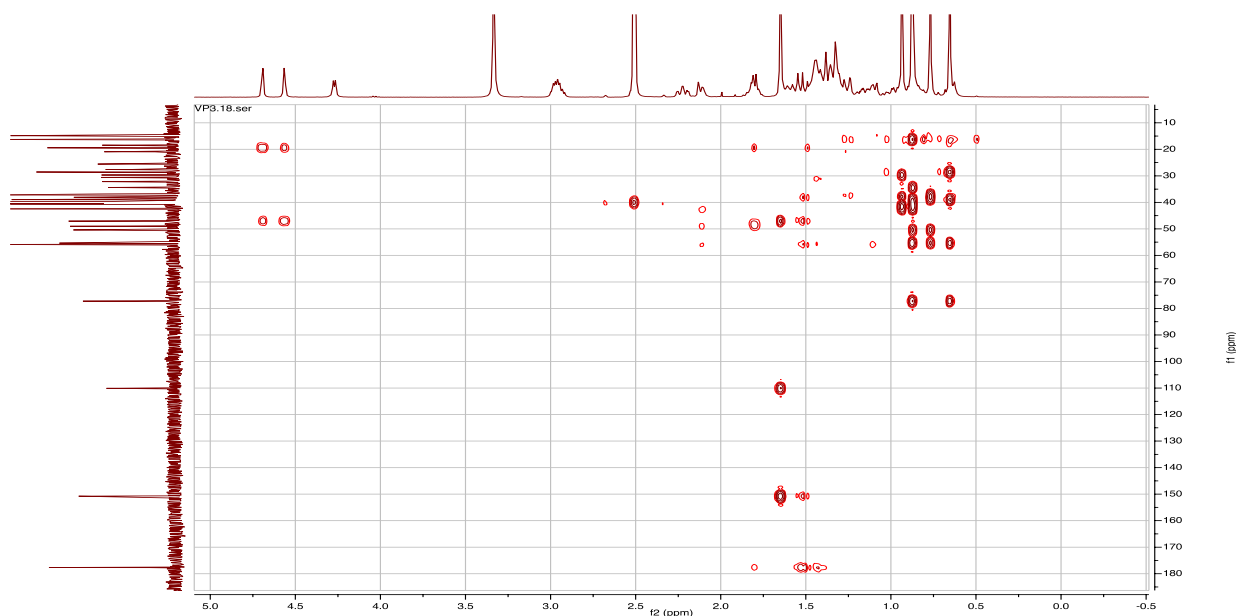
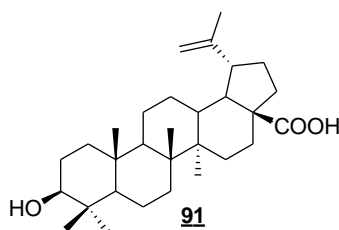


Figure 23 : Spectre HSQC du composé VP3.



**Figure 24** : Spectre HMBC du composé VP3.

L'ensemble de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites de la littérature (Peng *et al.*, 1998) ont permis d'identifier VP3 à la structure **91**, qui est celle de l'acide (3 $\beta$ )-3-Hydroxy-lup-20(29)-en-28-oïque ou l'acide bétulinique, première fois isolé des racines et des écorces du tronc de *Vitellaria paradoxa* et précédemment isolé par Soliman de l'écorce du bouleau blanc (*Betula papyrifera*) (Robertson *et al.*, 1939).



**Schéma 32** : Structure du composé **91** (acide bétulinique).

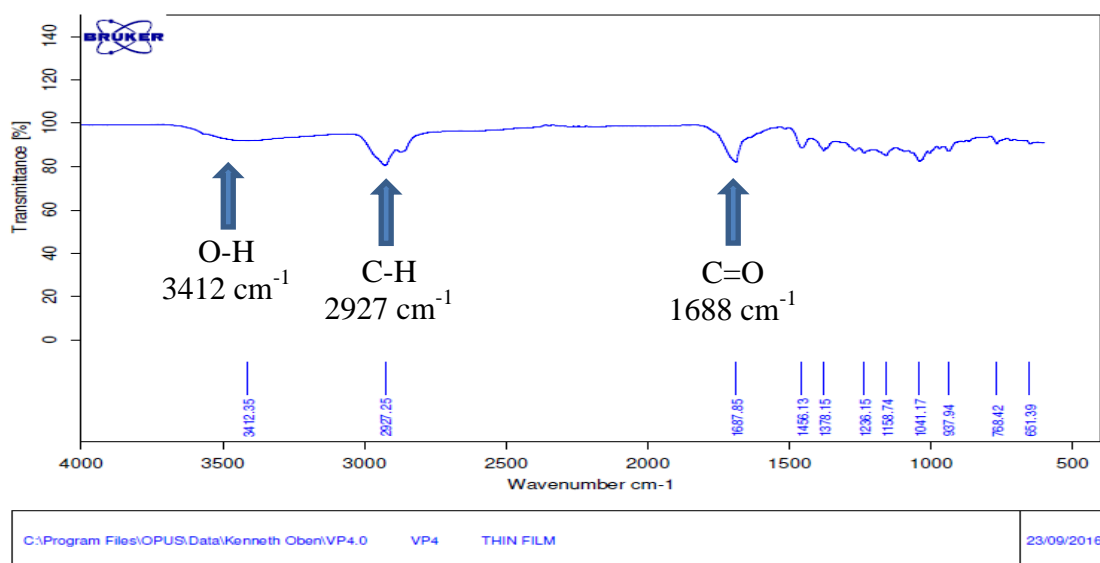
**Tableau 10** : Données spectrales RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 et 150 MHz) du composé VP3.

N°	Composé <b>91</b>		Acide bétulinique (Mahato <i>et al.</i> , 1997)
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
1	0,88 (1H, m) 1,55 (1H, m)	38,7	38,7
2	1,75 (2H, m)	27,6	27,4
3	3,13 (1H, m)	77,2	78,9
4	-	39,0	38,8
5	0,65 (1H, m)	55,4	55,3
6	1,45 (1H, m) 1,40 (1H, m)	18,4	18,3
7	1,40 (2H, m)	34,4	34,3
8	-	40,7	40,7
9	1,33 (1H, m)	50,4	50,5
10	-	37,2	37,2
11	1,42 (1H, m) 1,21 (1H, m)	20,9	20,8
12	1,00 (1H, m) 1,89 (1H, m)	25,6	25,5
13	2,26 (1H, td, 4,0, 12,0)	38,1	38,4
14	-	42,5	42,4
15	1,26 (1H, m) 1,85 (1H, m)	30,6	30,5
16	1,55 (1H, m) 2,19 (1H, m)	32,2	32,1
17	-	55,9	56,3
18	1,55 (1H, m)	49,0	46,8
19	3,00 (1H, m)	47,1	49,2
20	-	150,8	150,3
21	1,22 (1H, m) 1,45 (1H, m)	29,7	29,7
22	1,45 (1H, m) 1,82 (1H, m)	36,8	37,0
23	0,94 (3H, s)	28,6	27,9
24	0,77 (3H, s)	16,2	15,3
25	0,65 (3H, s)	16,3	16,0
26	0,87 (3H, s)	16,4	16,1
27	0,88 (3H, s)	14,9	14,7
28	-	177,7	180,5
29	4,70 (1H, d, 4,0 Hz) 4,57 (1H, d, 4,0 Hz)	110,1	119,6
30	1,65 (3H, s)	19,4	19,4

Le karité constitue une source beaucoup plus profitable pour s'approvisionner en acide bétulinique. Avec 1,5 Kg d'écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa*, on obtient 200 mg d'acide bétulinique.

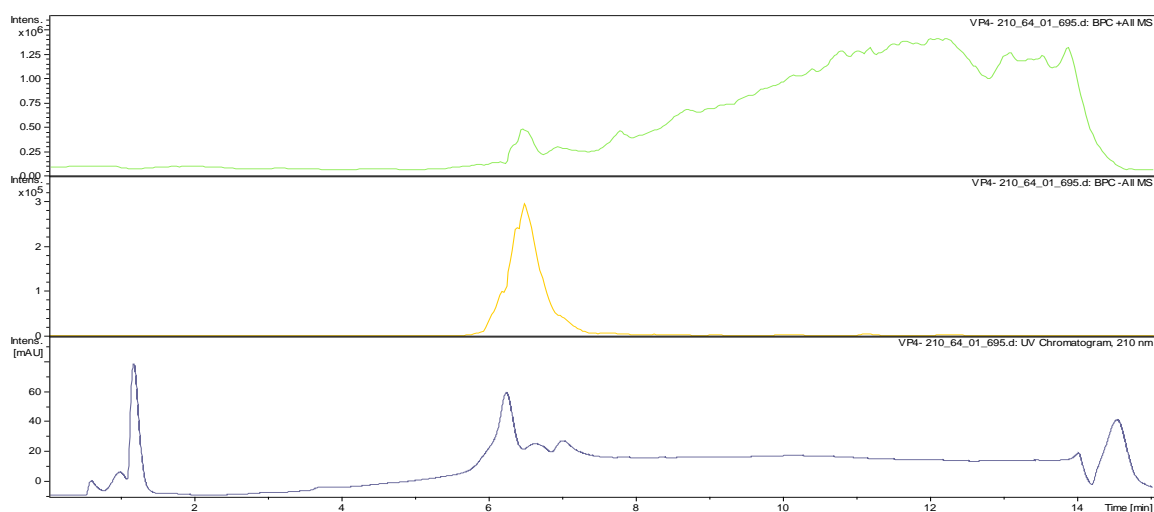
### II.2.1.2. Identification et caractérisation du composé VP4 (nouveau dérivé)

Le composé VP4 cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (60 : 40) et fond entre 238-239°C. Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'Iode. Ses spectres IR et LCMS présentent entre autres des bandes d'absorption respectivement figure 23 et figure 24. Celui d'IR donne à  $\nu_{\max}$  :  $3412\text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $2927\text{ cm}^{-1}$  (C-H) et  $1688\text{ cm}^{-1}$  (C=O) et sur son spectre de masse en ESI (figure 27) présente le pic de l'ion moléculaire à  $m/z$  503,35084 dont l'analyse à haute résolution  $m/z$  503,4 permet de lui attribuer la formule brute  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_6$  (calc. 503,3) renfermant sept degrés d'insaturation.

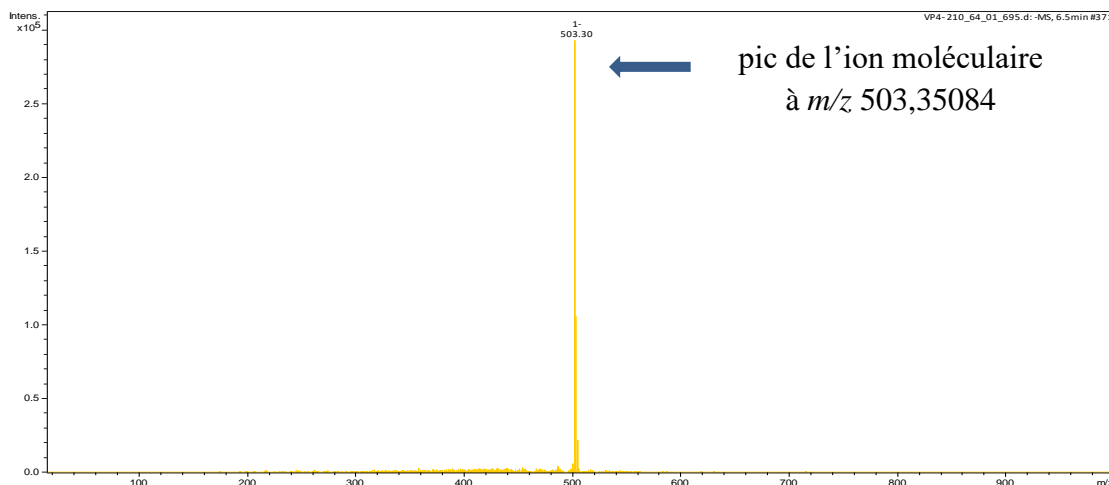


**Figure 25** : Spectre IR du composé VP4.

Son chromatogramme du spectre LCMS enregistré à différentes longueurs d'onde permet d'apprécier le degré de pureté.



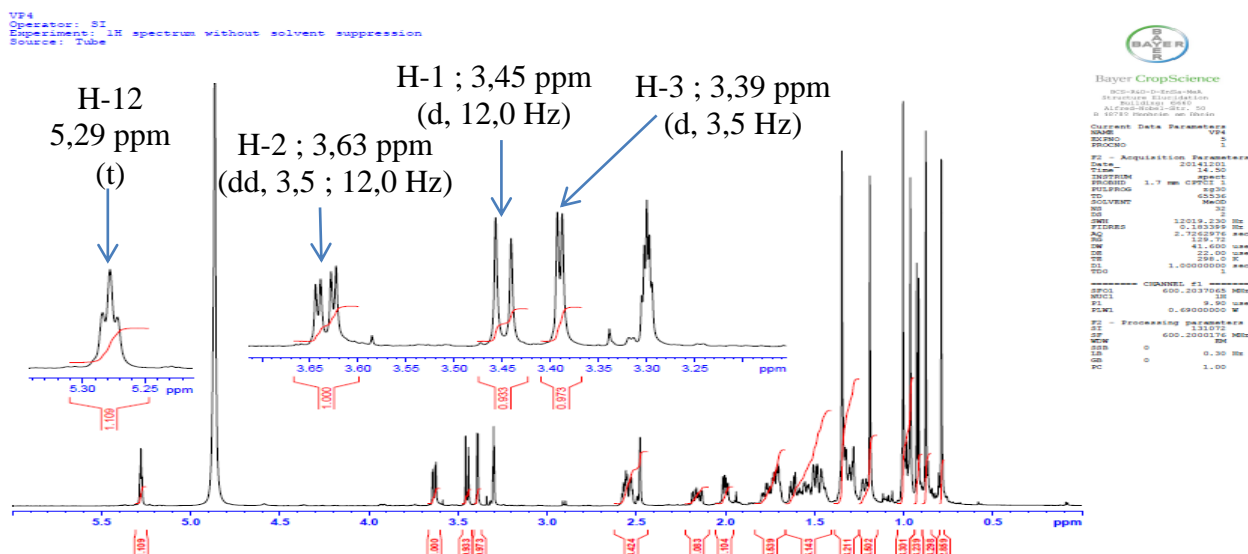
**Figure 26** : Spectre LCMS du composé VP4.



**Figure 27** : Spectre de masse (ESI) du composé VP4.

Sur ses spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  élargi respectivement figures 28 et 29 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz), on observe :

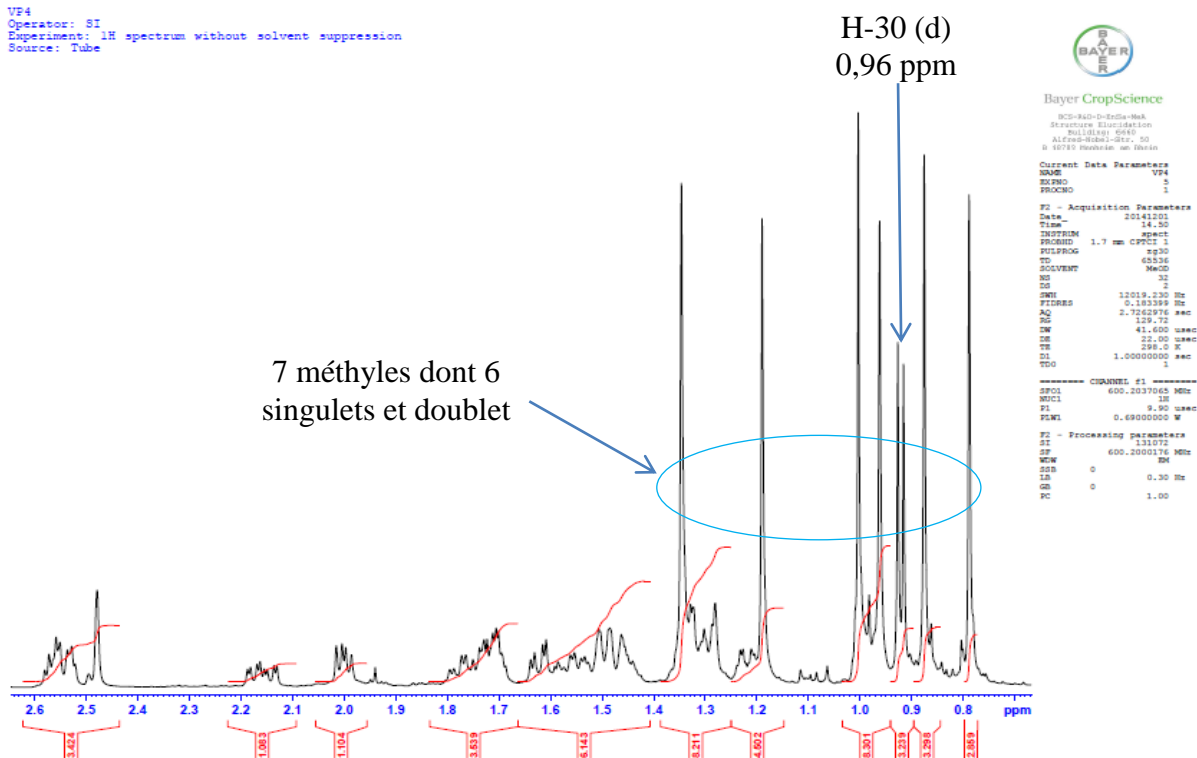
- un ensemble de pics des protons entre  $\delta$  2,5 et 0,77 correspondant aux groupements méthyles déblindés et méthylènes caractéristiques des triterpènes de type ursane.
- un doublet de doublets d'un proton à  $\delta$  3,63 (1H, dd, 3,5 ; 12,0 Hz) correspondant au proton H-2, un doublet d'un proton à  $\delta$  3,45 (1H, d, 12,0 Hz) et 3,39 (1H, d, 3,5 Hz) correspondant aux trois groupes hydroxyles attachés au noyau A en l'occurrence les protons méthines respectivement H-1 et H-3.
- un multiplet d'un proton à  $\delta$  5,29 caractéristique au proton oléfinique H-12 des triterpènes.



**Figure 28** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) de composé VP4.



VP4  
 Operator: ST  
 Experiment: 1H spectrum without solvent suppression  
 Source: Tube



**Figure 29** : Spectre RMN 1H élargi (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) de composé VP4.

Ses spectres RMN <sup>13</sup>C et DEPT-135 élargis des figures 30 à 31 (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) montrent trente pics et confirment la présence des groupements de carbones. Ces pics apparaissent à des fréquences caractéristiques suivantes :

- à  $\delta$  182,5 indiquant la présence d'un carbone carbonyle.
- les signaux à  $\delta$  138,9 et 130,8 correspondant aux carbones oléfiniques.
- les signaux à  $\delta$  81,4 ; 80,9 ; 73,6 et 71,9 sont attribuables aux carbones  $sp^3$  portant un atome d'oxygène.
- les signaux entre  $\delta$  54,9 et 13,1 attribuables aux carbones méthines, méthylènes et méthyles.

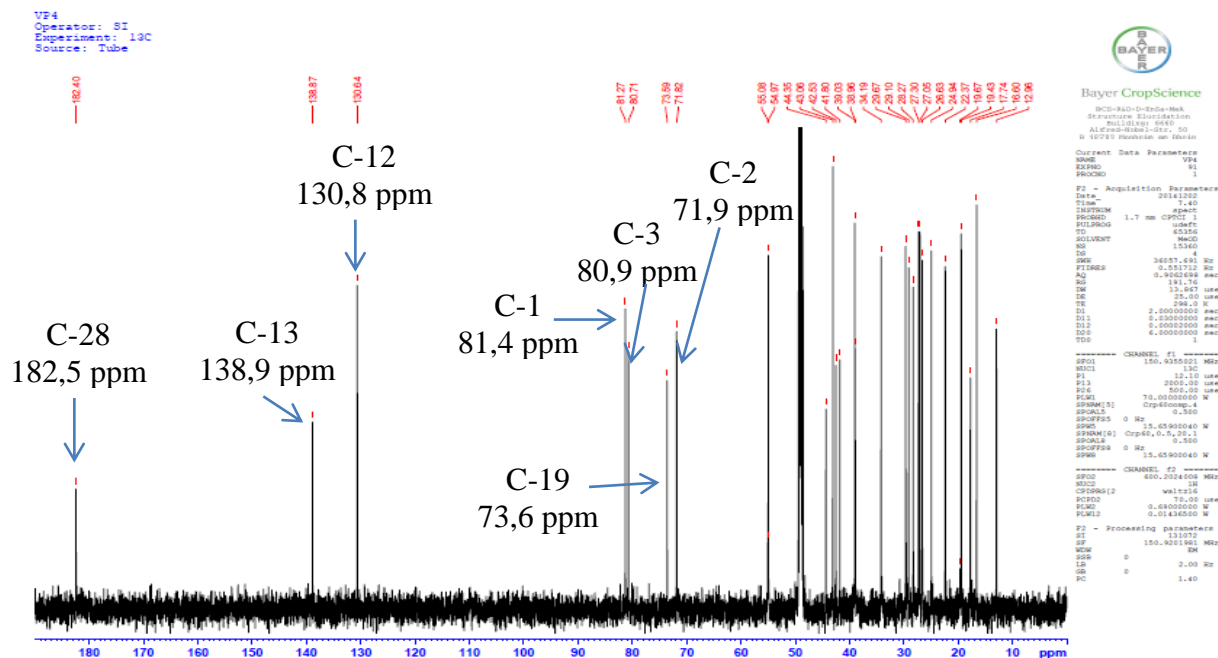


Figure 30 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) du composé VP4.

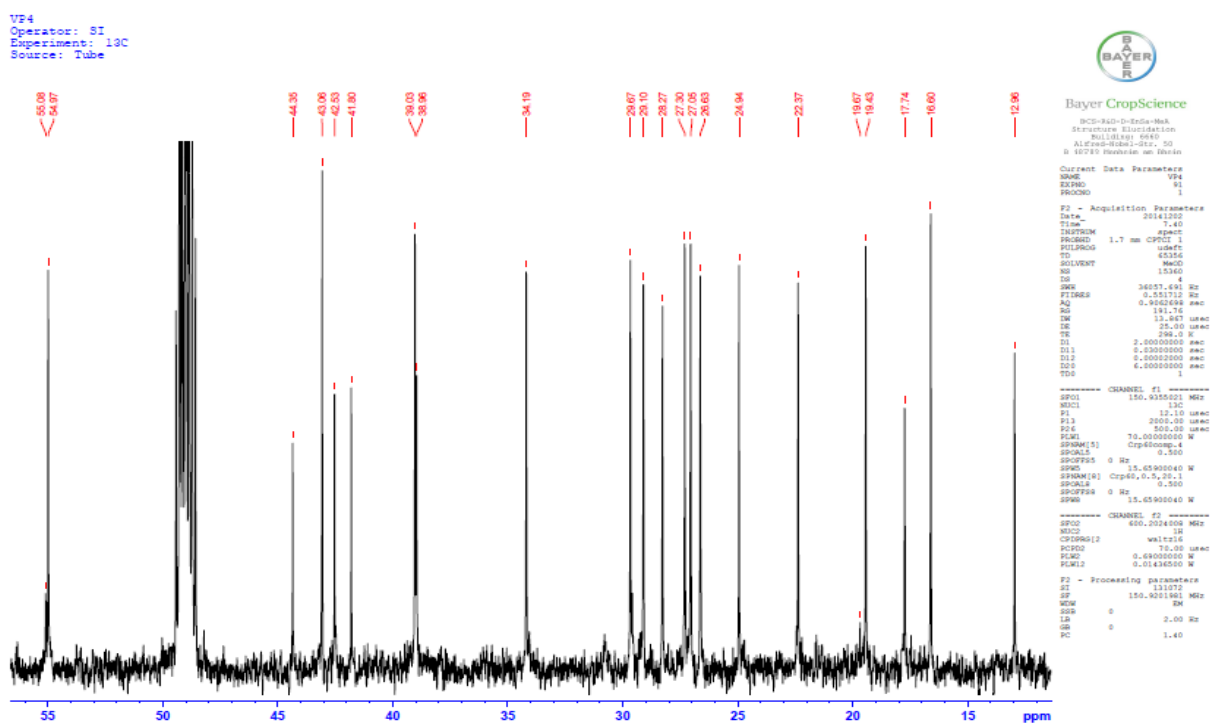


Figure 31 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  élargi ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) du composé VP4.

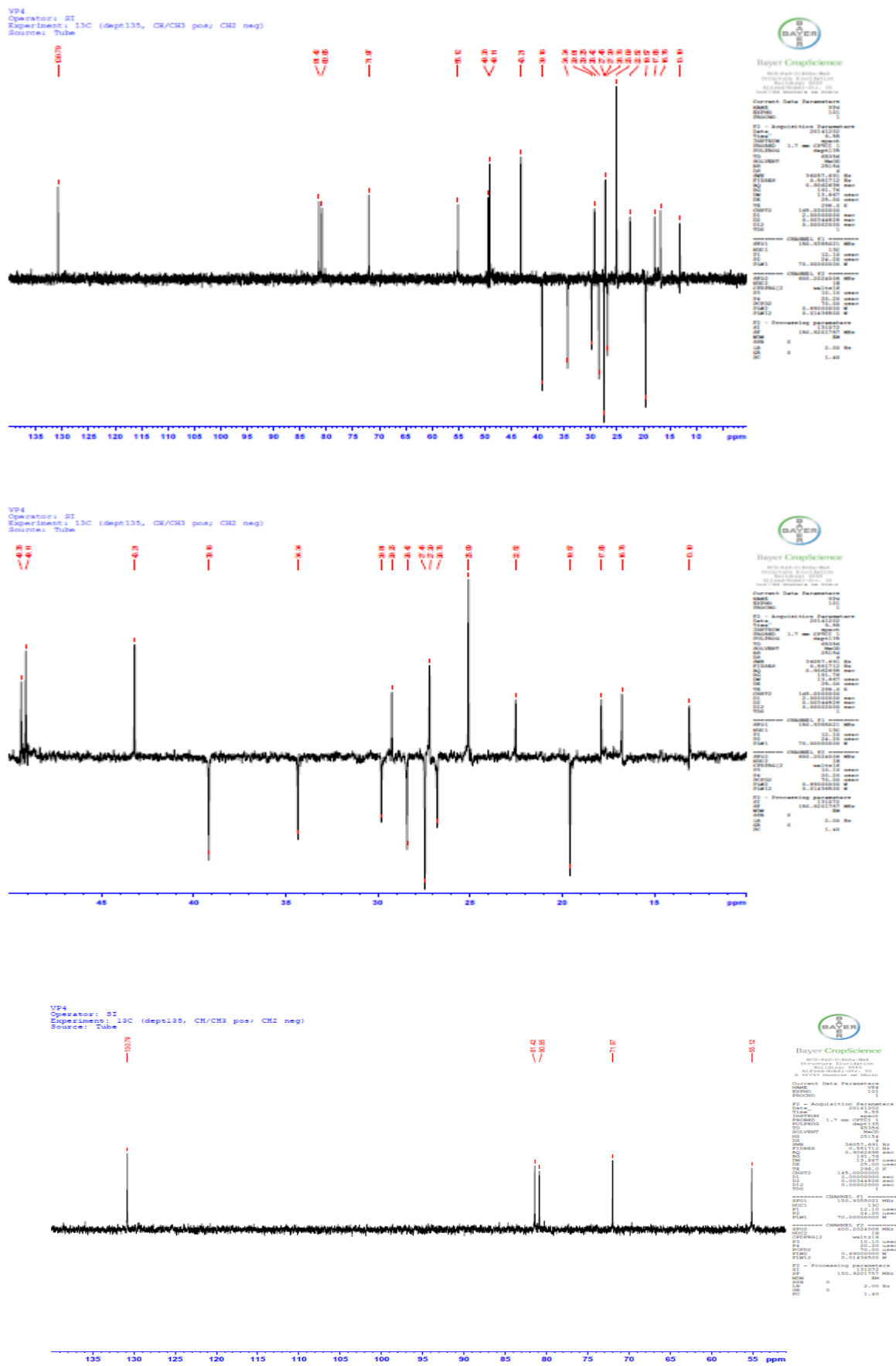


Figure 32 : Spectres DEPT-135 et élargis (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) du composé VP4.

Son spectre COSY, la figure 33 montre les différentes corrélations :

- une corrélation entre le proton déblindé à 5,29 ppm (H-12) et les protons à 2,55 et 2,17 ppm respectivement H-11a et H-11b.
- une corrélation entre le proton à 2,50 ppm (H-16a) ; 1,51 ppm (H-16b) et 1,77 ppm (H-15a) ; 1,00 ppm (H-15b).

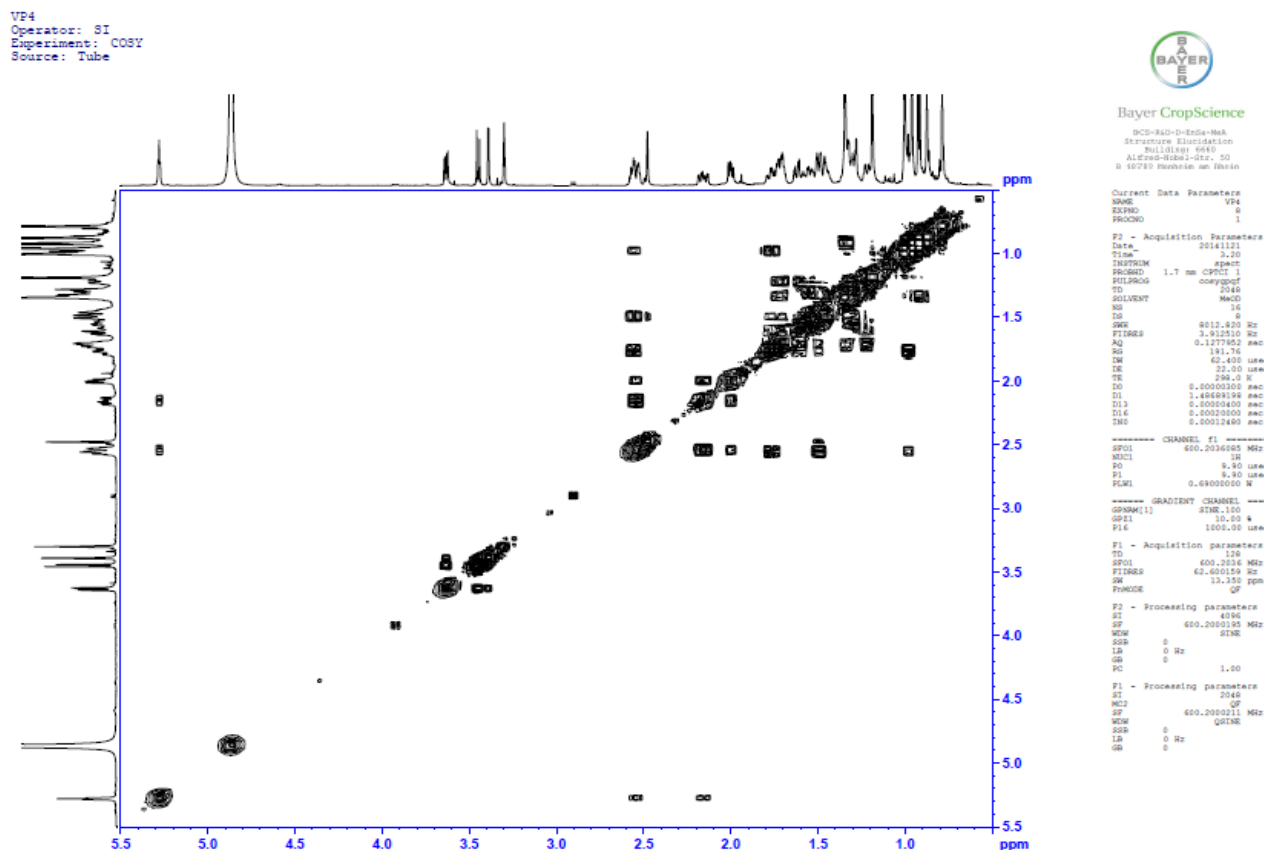


Figure 33 : Spectre COSY du composé VP4.

Les spectres HSQC (figures 34 et 35) montrent les corrélations  $J^1 \text{ }^{13}\text{C}-^1\text{H}$ . Sans ambiguïté sur ces spectres, on observe des corrélations suivantes entre les protons et les carbones à  $\delta$  : 5,29 (H-12) et 130,8 (C-12) ; 3,63 (H-2) et 71,7 (C-2) ; 3,39 (H-3) et 80,9 (C-3) ; 3,43 (H-1) et 81,4 (C-1) ; 2,55 et 2,17 respectivement (H-11a, H-11b) et, 28,4 (C-11) ; 2,50 et 1,51 respectivement (H-16a, H-16b) et, 26,8 (C-16) et 2,48 (H-18) et 55,1 (C-18).

VP4  
Operator: SI  
Experiment: HSQC  
Source: Tube



Bayer CropScience

BCS-942-D-Enda-Mak  
Structure Elucidation  
NMR/MS/MS  
Alfrod-1001-01r\_01  
D 10773 Structure au Brésil

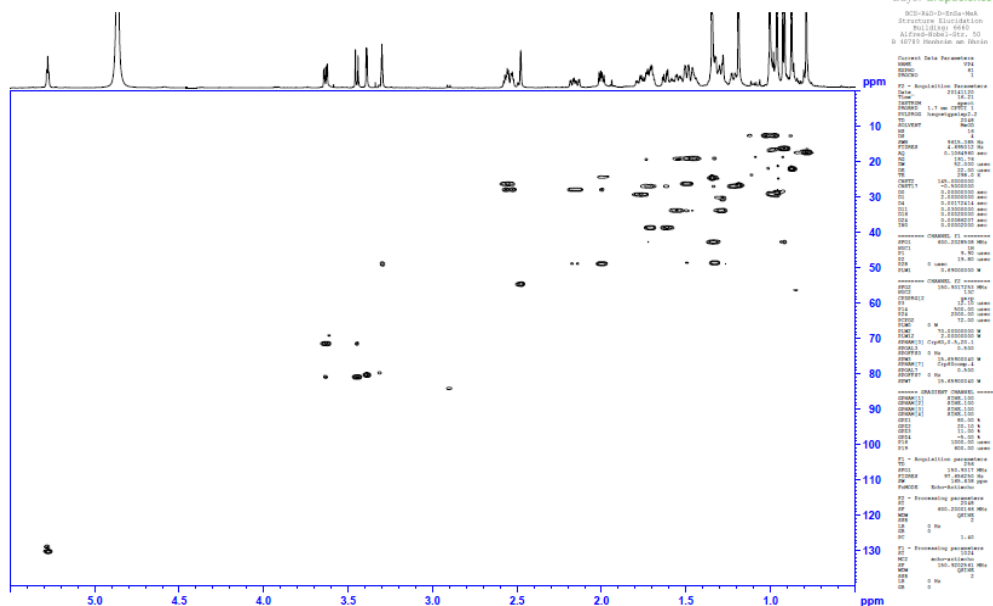


Figure 34 : Spectre HSQC du composé VP4.

VP4  
Operator: SI  
Experiment: HSQC  
Source: Tube



Bayer CropScience

BCS-942-D-Enda-Mak  
Structure Elucidation  
NMR/MS/MS  
Alfrod-1001-01r\_01  
D 10773 Structure au Brésil

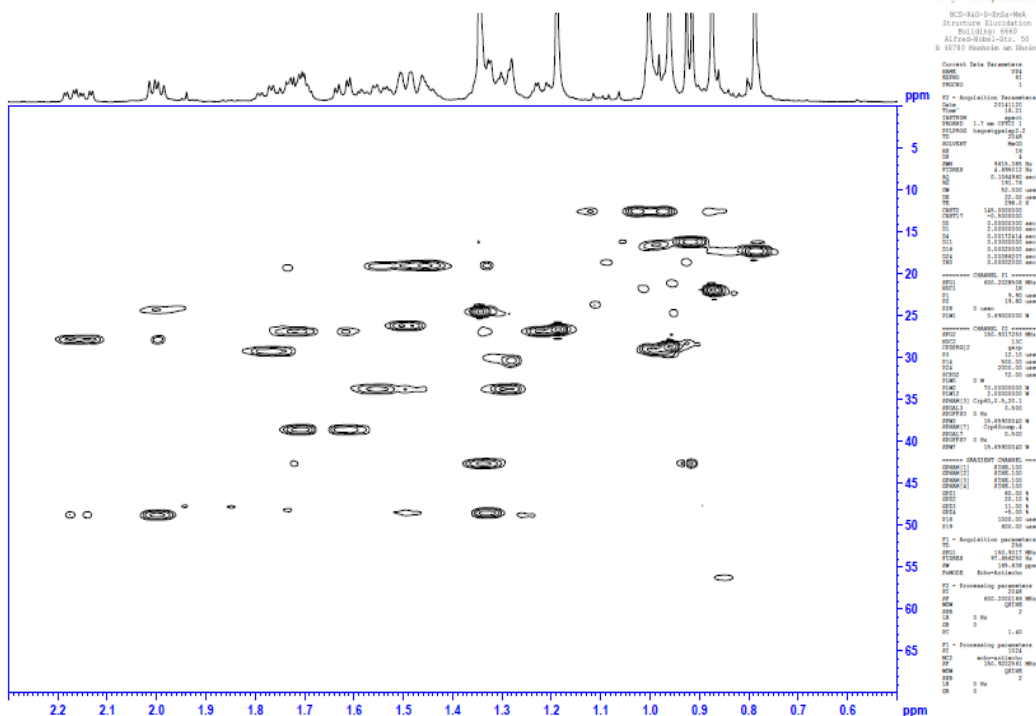
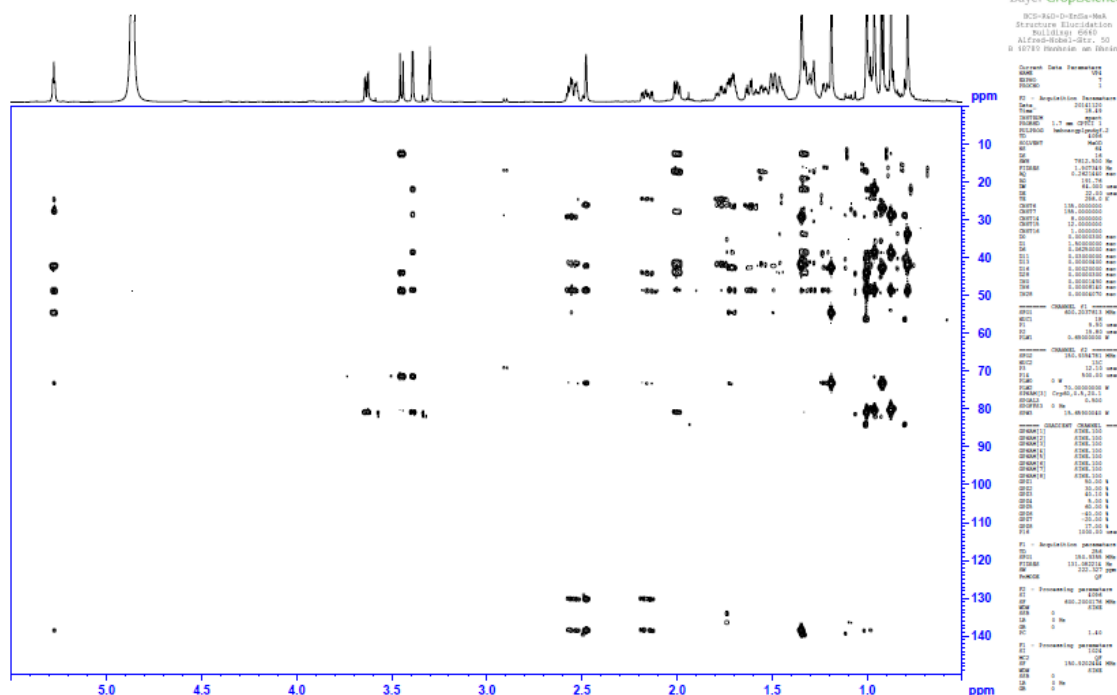


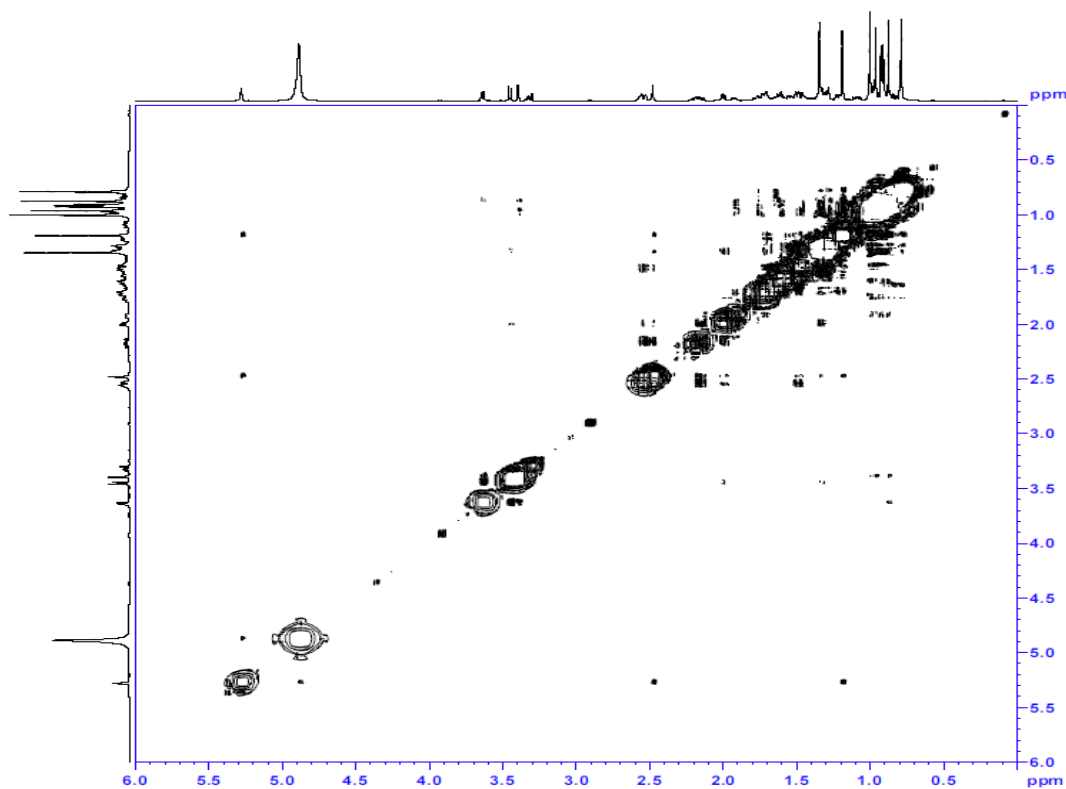
Figure 35 : Spectre HSQC élargi du composé VP4.

Sur son spectre HMBC (figure 36 et tableau 11) présente des corrélations en  $J^{2-3}$  entre les protons et les carbones comme le proton H-12 à  $\delta$  5,29 et les carbones à  $\delta$  138,9 (C-13) ; 73,6 (C-19) ; 55,1 (C-18) ; 49,4 (C-9) ; 38,9 (C-14) et 28,4 (C-11).



**Figure 36** : Spectre HMBC de composé VP4.

Le spectre proton-proton bidimensionnel (NOESY) (Figure 37) montre que les paires de protons suivantes sont proches l'un de l'autre dans l'espace : H-2 (3,63 ppm) et H-3 (3,39 ppm) ; H de méthyle-29 (0,97 ppm) et H-20 (1,34 ppm) suggérant des orientations cis.



**Figure 37** : Spectre NOESY de composé VP4

Toutes ces données physiques et spectroscopiques nous ont permis d'assigner au composé VP4, la structure **126** qui est celle de l'acide  $1\alpha,2\beta,3\beta,19\alpha$ -tetrahydroxyurs-12-en-28-oïque pour la première fois isolé des racines et des écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* et caractérisé.

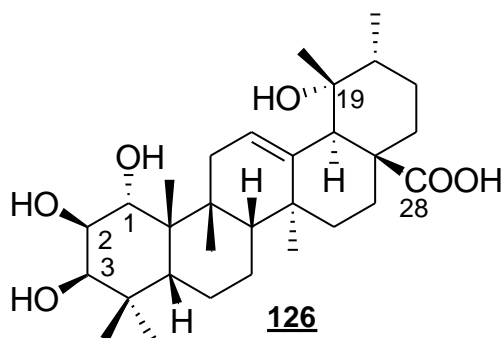


Schéma 33 : La structure du composé **126**.

**Tableau 11** : Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HMBC du composé VP4.

Position	Composé VP4 (126) (CD <sub>3</sub> OD, 600 et 150 MHz)			Kouno <i>et al.</i> , 1988
	$^1\text{H}$ (J en Hz)	$^{13}\text{C}$	Corrélations HMBC	$^{13}\text{C}$
1	3,45 (1H, d, 12,0)	81,4	13,1 ; 44,4 ; 49,1 ; 71,9	74,7
2	3,63 (1H, dd, 3,5, 12,0)	71,7	80,9	77,0
3	3,39 (1H, d, 3,5)	80,9	22,5 ; 29,3 ; 49,1 ; 71,9 ; 81,4	79,9
4	-	42,5		40,6
5	1,34 (1H, br, d)	49,1	13,1 ; 19,6 ; 22,5 ; 29,3 ; 34,3 ; 42,5	53,2
6	1,78 (1H, m) 0,94 (1H, br)	19,6	43,2 ; 49,1	17,9
7	1,58 (1H, m) 1,29 (1H, m)	34,3	19,6 ; 41,8	32,8
8	-	41,8		41,2
9	2,00 (1H, m)	49,4	13,1 ; 17,8 ; 28,4 ; 41,8 ; 44,4 ; 81,4	48,0
10	-	44,4		37,4
11	2,55 (1H, m) 2,17 (1H, dd, 4, 12)	28,4	49,4 ; 130,8 ; 138,9	24,6
12	5,29 (1H, m)	130,8	28,4 ; 41,8 ; 49,4 ; 55,1 ; 73,6 ; 138,9	130,1
13	-	138,9		137,2
14	-	38,9		41,2
15	1,00 (1H, m) 1,77 (1H, m)	29,8	26,8 ; 38,9	29,8
16	1,51 (1H, m) 2,50 (1H, m)	26,8	29,8 ; 49,0	26,1
17	-	49,0		48,5
18	2,48 (1H, s)	55,1	26,8 ; 43,2 ; 49,0 ; 73,6 ; 130,8 ; 138,9	52,6
19	-	73,6		73,2
20	1,34 (1H, m)	43,2	27,5 ; 73,6	42,9
21	1,51 (1H, m) 1,48 (1H, m)	27,5	39,2 ; 43,2	26,9
22	1,72 (1H, m) 1,62 (1H, m)	39,2	27,5 ; 49,0	38,1
23	1,17 (3H, s)	29,3	42,5 ; 49,1 ; 80,9	28,3
24	0,86 (3H, s)	22,5	42,5 ; 49,1 ; 80,9	16,1
25	1,00 (3H, s)	13,1	44,4 ; 49,4 ; 81,4	11,4
26	0,77 (3H, s)	17,8	34,3 ; 41,8 ; 49,4	16,9
27	1,33 (3H, s)	25,1	29,8 ; 38,9 ; 41,8 ; 138,9	25,6
28	-	182,4		174,4
29	0,97 (3H, s)	27,2	43,2, 55,1, 73,6	27,4
30	0,92 (3H, d, 8,0)	16,8	27,5, 43,2, 73,6	17,1



### II.2.1.3. Identification et caractérisation du composé VP5 (nouveau dérivé)

Isolé des racines et des écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa*, il a été obtenu sous forme de poudre blanche de chromatographie sur colonne au gel de silice dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (45 : 55). Il est soluble dans le méthanol et fond entre 260-262°C. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption caractéristiques à  $\nu_{\max}$  3413  $\text{cm}^{-1}$  (O-H), 2929  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1688  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) (figure 38). Son spectre LCMS corrobore avec celui de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) respectivement les figures 38 et 39 ont donné un pic pseudomoléculaire  $[\text{M}-\text{H}]^+$  à 489,17. Ceci nous a permis d'attribuer une formule brute correspondant à  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$  avec sept degrés d'insaturation.

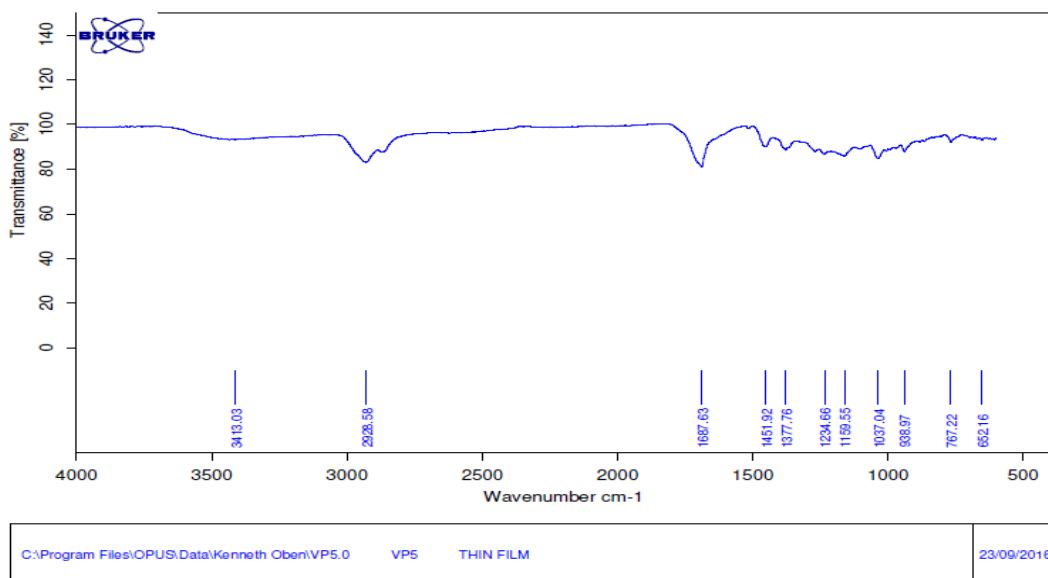


Figure 38 : Spectre IR du composé VP5.

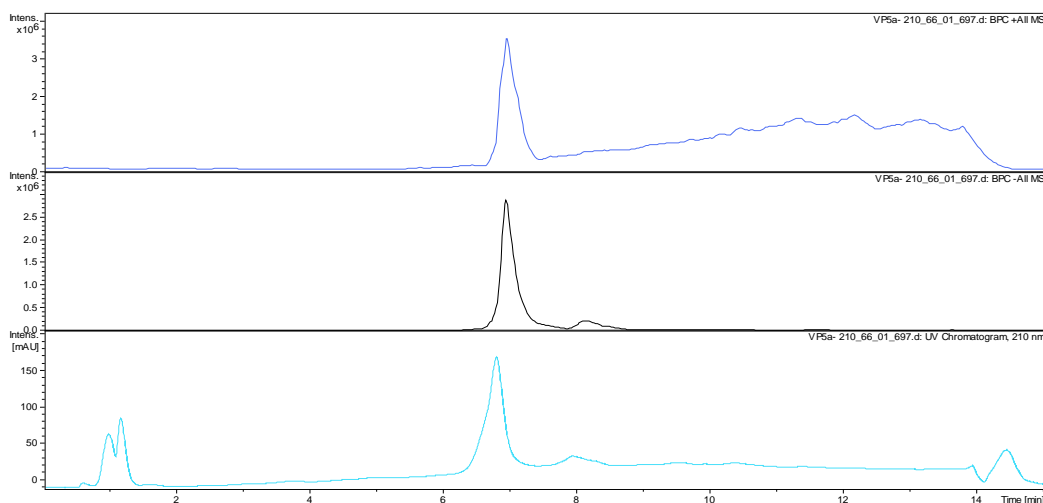
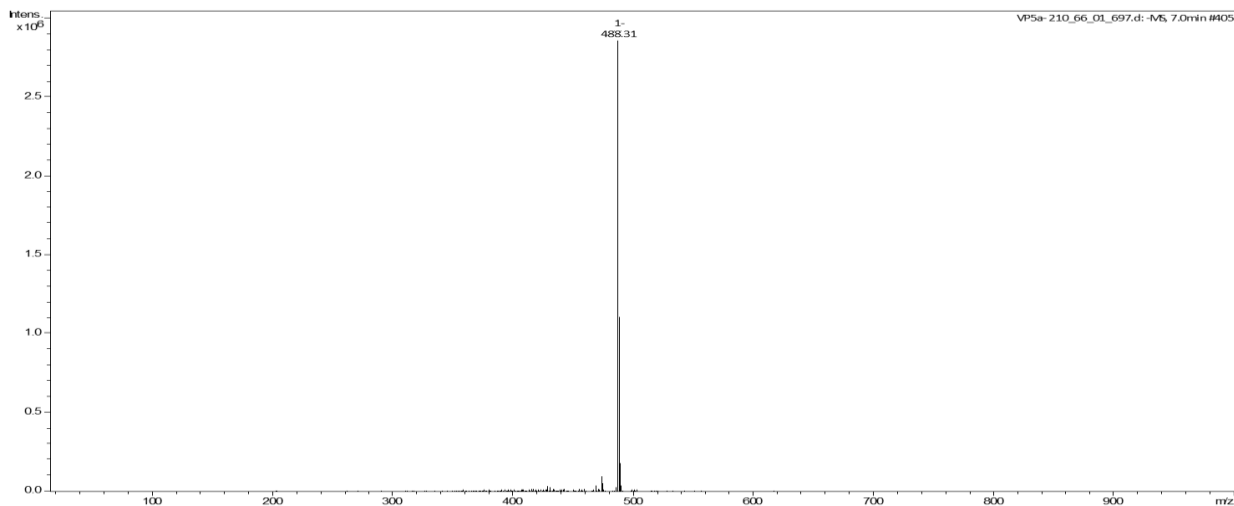


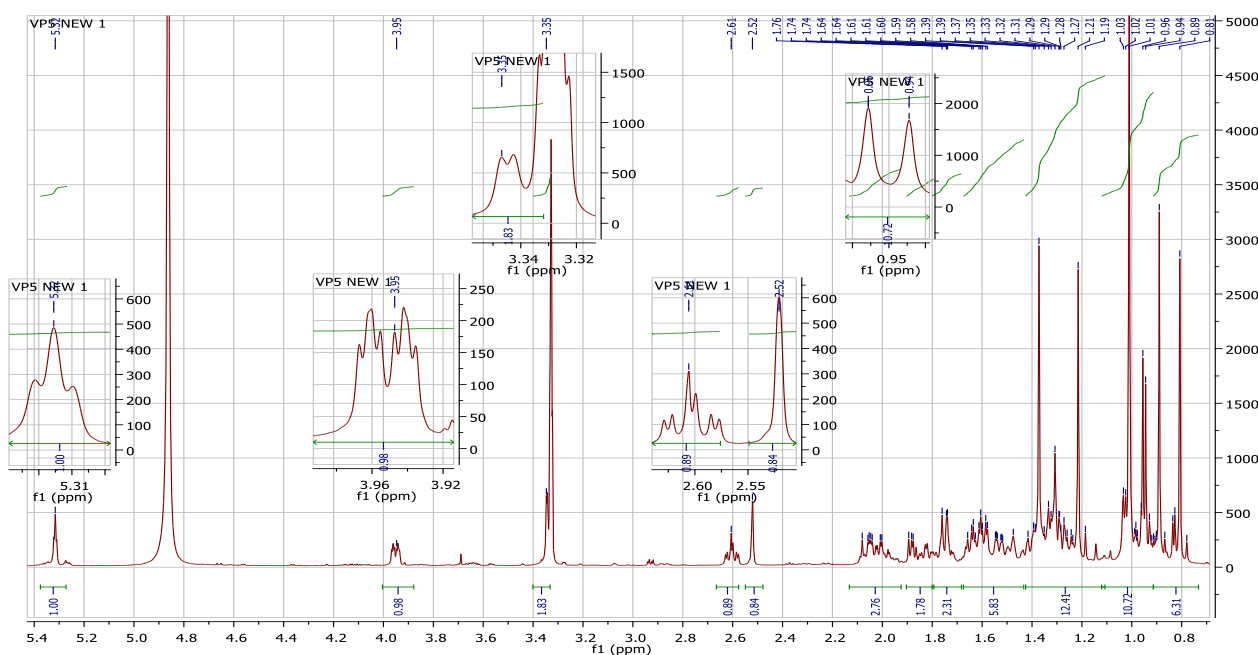
Figure 39 : Chromatogramme LC-MS du composé VP5.



**Figure 40** : Spectre de masse (APCI) du composé VP5.

Son spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure 41) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) présente des séries de protons à savoir :

- à 5,32 ppm un triplet d'un proton attribuable à un proton oléfinique (H-12) des triterpènes.
- à 3,95 ppm un doublet de triplet d'un proton attribuable à un groupement méthine lié à un hétéroatome (H-2).
- à 3,35 ppm un doublet également un proton attribuable à un groupement méthine lié à un hétéroatome (H-3).
- entre 0,81 et 1,40 ppm, on observe des signaux caractéristiques de protons méthyles à  $\delta$  1,37 (3H, s), 1,22 (3H, s), 1,04 (3H, s), 1,01 (3H, s), 0,96 (3H, d, 12,0 Hz), 0,89 (3H, s) et 0,81 (3H, s) dans la région des champs forts.



**Figure 41** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé VP5.

Sur son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) (figure 42) et DEPT-135 (figure 43), présentent les signaux de 30 atomes de carbones assignés aux :

- sept (7) groupements méthyles à  $\delta$  27,6 ; 25,7 ; 23,5 ; 21,1 ; 16,1 ; 15,5 ; 15,2.
- huit (8) méthylènes à  $\delta$  44,1 ; 37,6 ; 32,7 ; 28,2 ; 26,0 ; 25,2 ; 23,3 ; 17,9.
- sept (7) méthines parmi lesquels, on dénombre : deux (2) méthines oxygénés à  $\delta$  78,7 ; 65.8 ( $-\text{CH}(\text{OH})$ ), quatre (4) méthines à  $\delta$  53,7 ; 48,0 ; 46,8 ; 41,7 ( $-\text{CH}$ ) et un méthine oléfinique à  $\delta$  128,0 ( $=\text{CH}$ ).
- huit (8) carbones quaternaires parmi lesquels, les carbones hybridés  $sp^2$  à  $\delta$  180,8 ; 138,7 et 72,2 correspondent respectivement aux carbones porteurs des groupes carbonyle ( $\text{C}=\text{O}$ ) ; alcène ( $\text{C}=\text{C}$ ) et un carbone oxygéné ( $\text{C}-\text{OH}$ ).

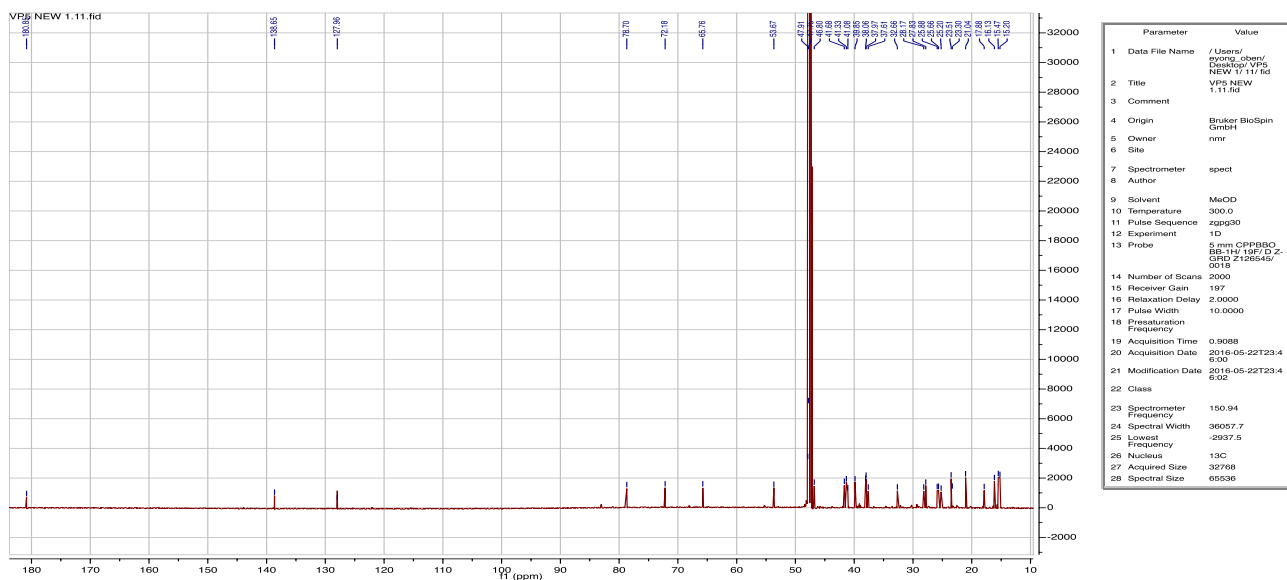


Figure 42 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) du composé VP5.

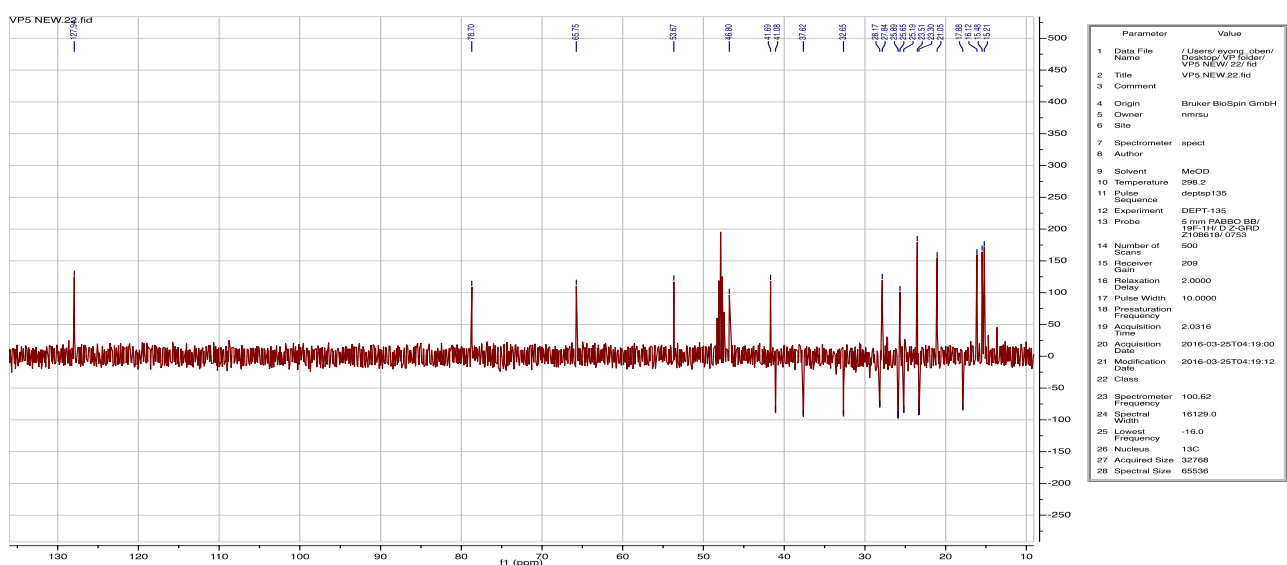


Figure 43 : Spectre DEPT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) du composé VP5.

L'analyse de ses spectres COSY (figure 43) et TOCSY (figure 45) montrent les différentes corrélations :

- entre le proton H-2 ( $\delta$  3,95, dt,  $J = 6,0, 12,0$  Hz) et H-3 ( $\delta$  3,35, d,  $J = 6,0$  Hz) avec une constante de couplage  $^3J_{H2,H-3} = 6,0$  Hz suggérant un couplage *CIS* (Minch 1994).
- une corrélation entre les protons H-12 ( $\delta$  5,32, t, 6,0 Hz) et H-11 ( $\delta$  2,00, m, 2H) avec une constante de couplage 6,0 Hz.

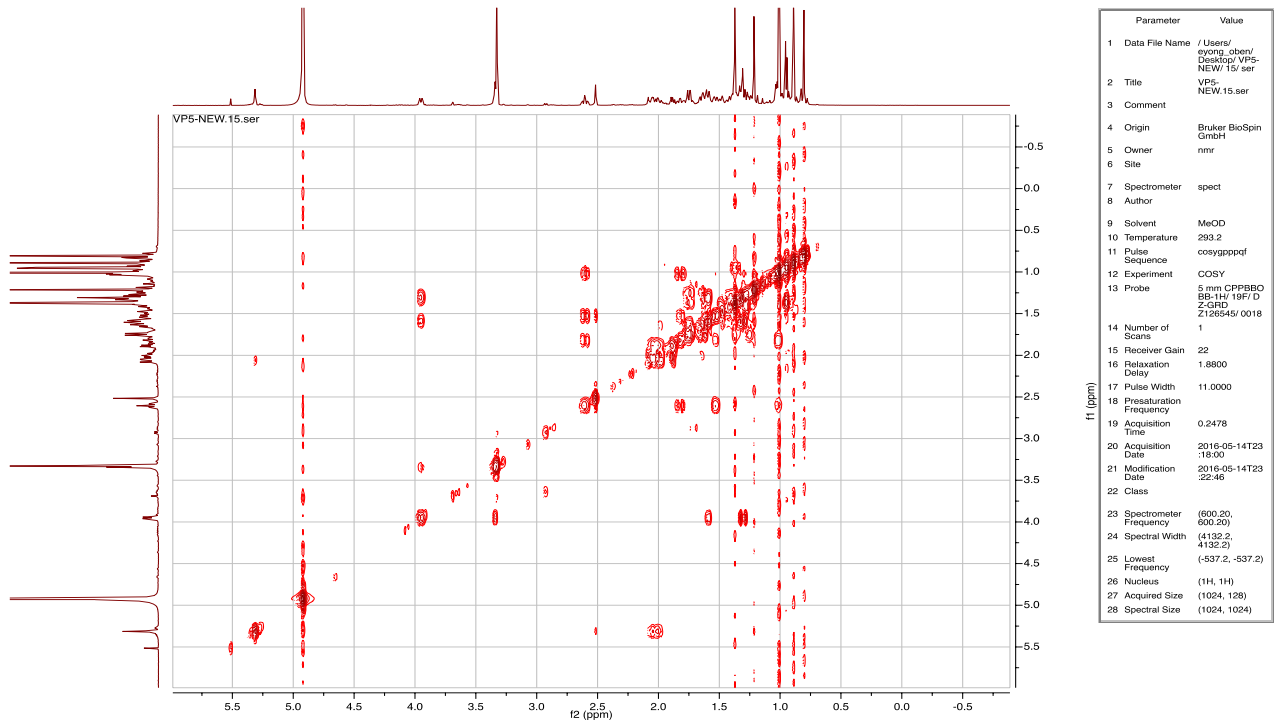


Figure 44 : Spectre COSY du composé VP5.

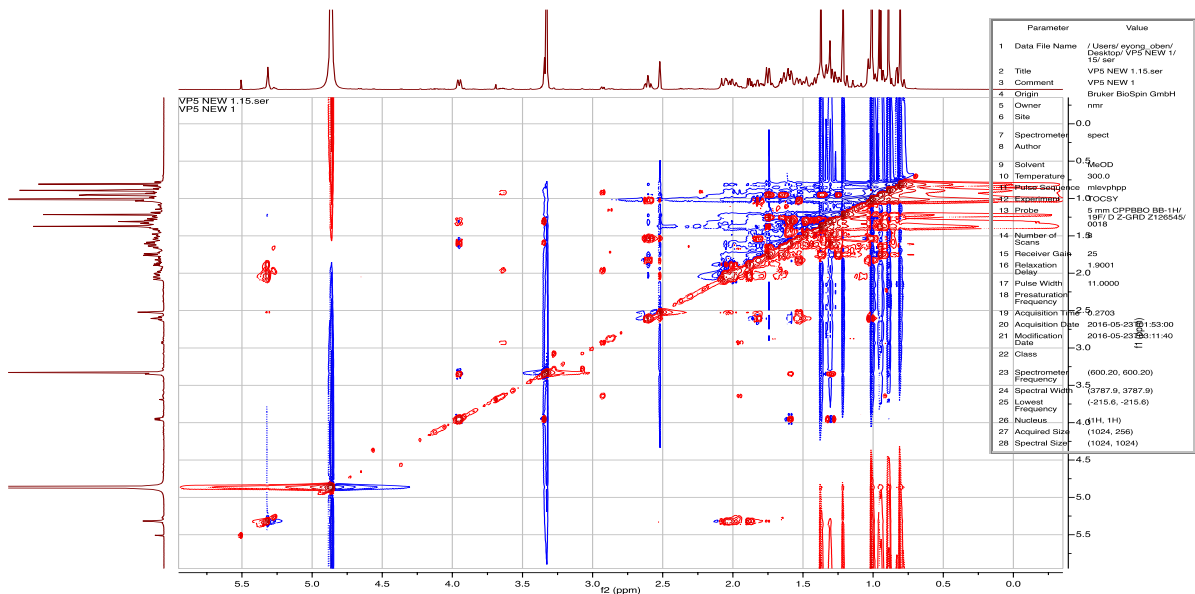
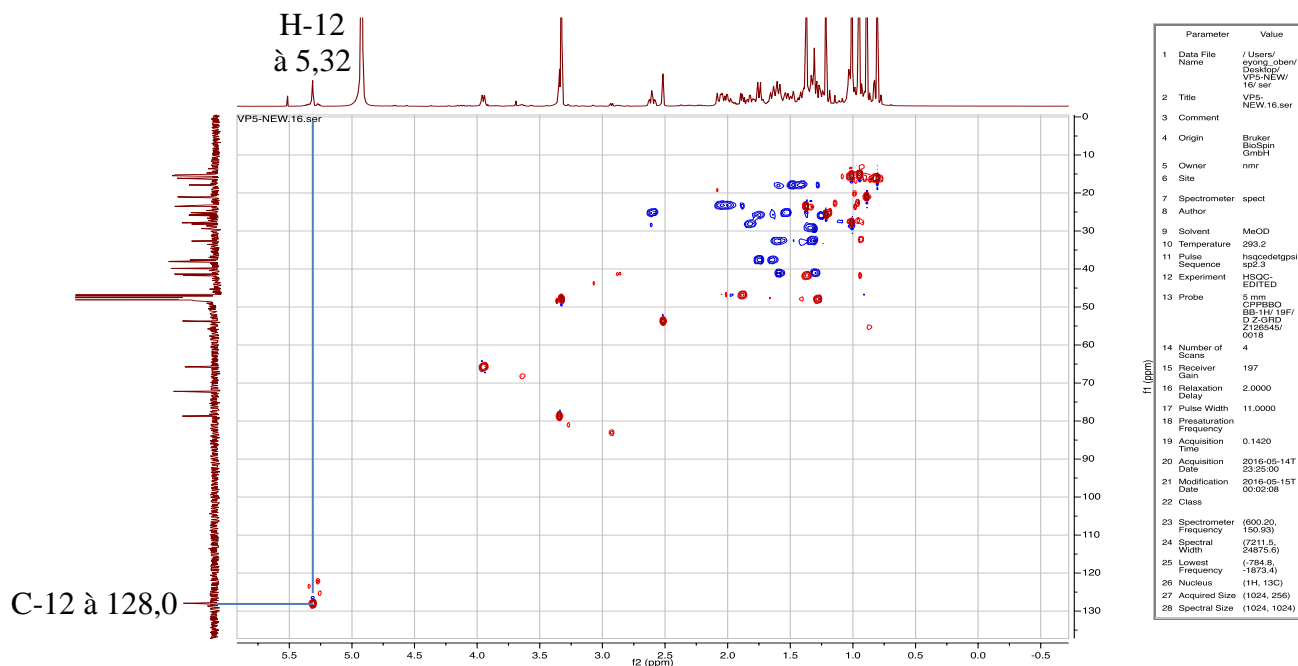


Figure 45 : Spectre TOCSY du composé VP5.

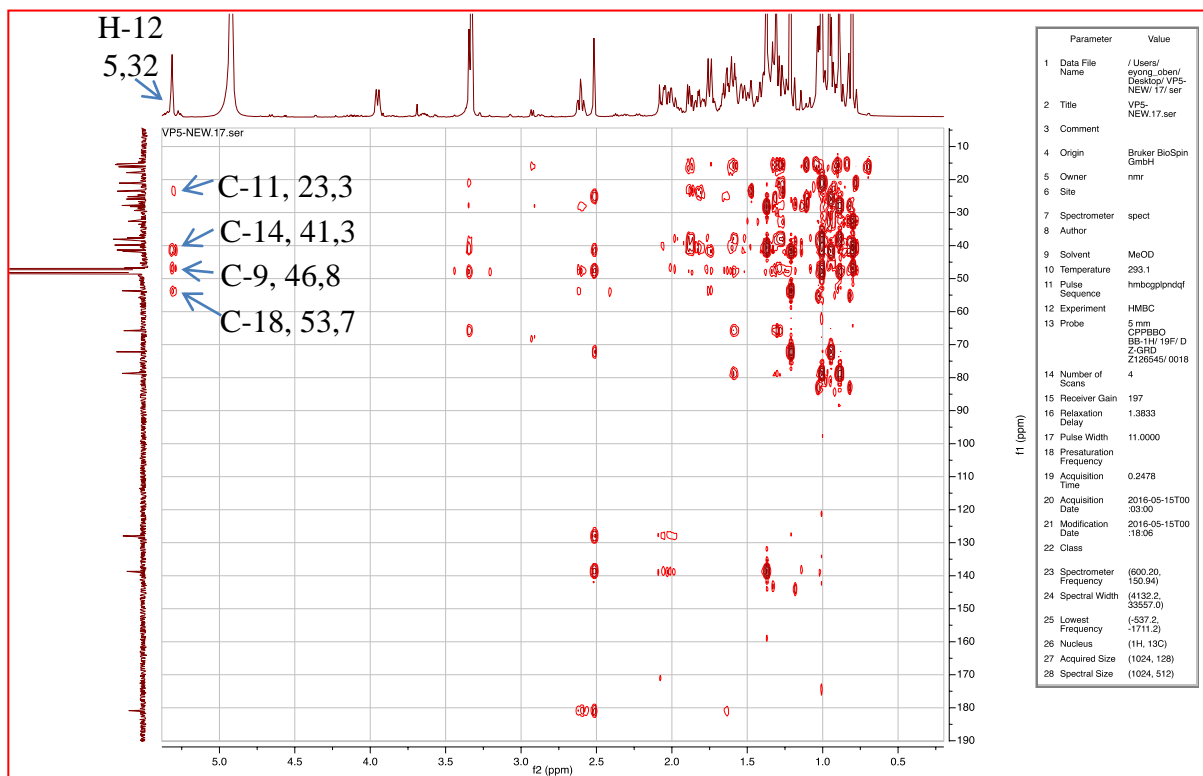
Sur son spectre HSQC (Figure 46) présente les corrélations en  $J'$   $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  entre carbone et proton à savoir :

- H-12 à 5,32 ppm et C-12 à 128,0 ppm.
- H-2 à 3,95 ppm et C-2 à 65,8 ppm.
- H-3 à 3,35 ppm et C-3 à 78,9 ppm.
- H-18 à 2,52 ppm et C-18 à 53,7 ppm.
- H-16a et H-16b respectivement à 2,62 et 1,52 ppm et C-11 à 25,9 ppm.



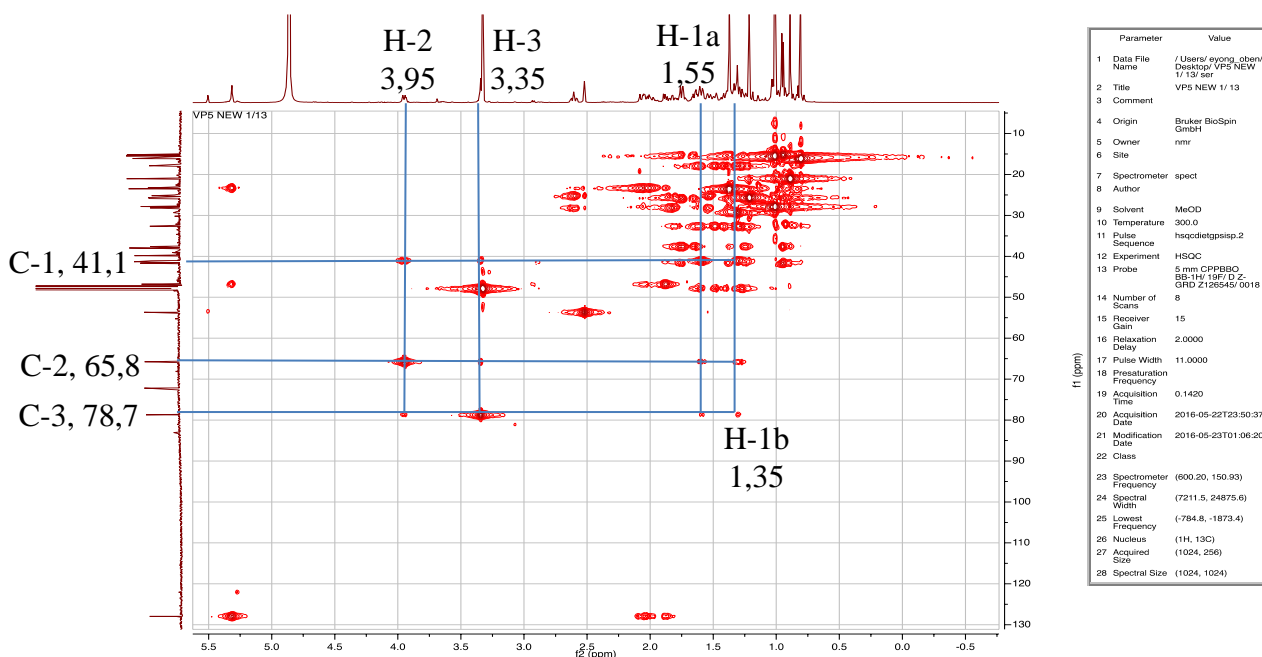
**Figure 46** : Spectre HSQC du composé VP5.

Son spectre HMBC (figure 47) a permis d'assigner les corrélations entre H-12 ( $\delta$  5,32) avec C-11 ( $\delta$  23,3), C-14 ( $\delta$  41,3), C-9 ( $\delta$  46,8), C-18 ( $\delta$  53,7). On observe également sur spectre HMBC des corrélations entre H-16b ( $\delta$  2,62) avec C-15 ( $\delta$  28,2), C-17 ( $\delta$  47,91), C-18 ( $\delta$  53,7) et C-28 ( $\delta$  180,8).



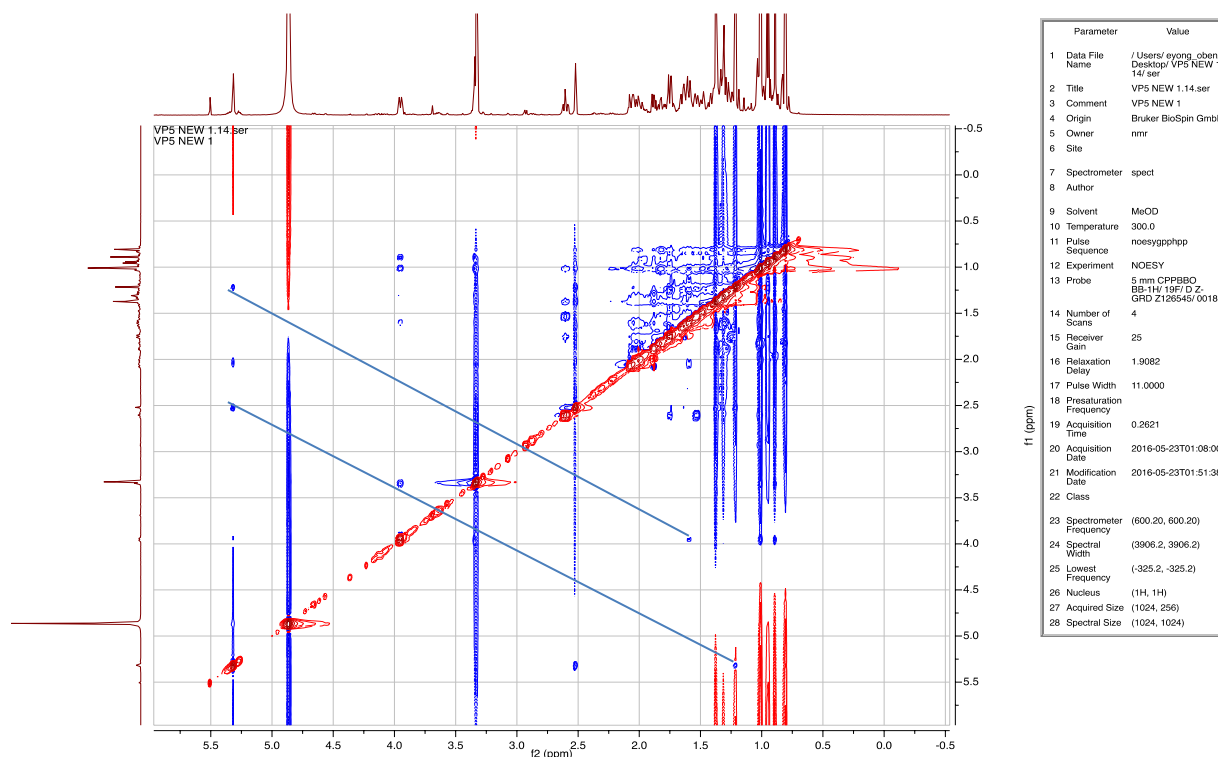
**Figure 47** : Spectre HMBC du composé VP5.

Son spectre HSQC-TOCSY (Figure 48) présente des corrélations entre proton et carbone dans un même système de spin par transfert de polarisation comme les corrélations des noyaux A et B. Sur le noyau A, on observe des corrélations entre le proton H-2 ( $\delta$  3,95) et les carbones C-1 ( $\delta$  41,1), C-2 ( $\delta$  65,8) et C-3 ( $\delta$  78,7). Tandis que le noyau B présente des corrélations similaires entre H-7a ( $\delta$  1,65) et C-6 ( $\delta$  17,9), C-7 ( $\delta$  32,7) et C-5 ( $\delta$  48,7).



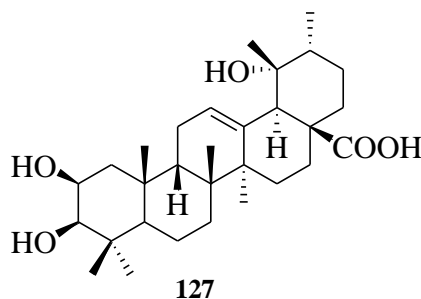
**Figure 48** : Spectre HSQC-TOCSY du composé VP5.

Cependant, le spectre NOESY présente des corrélations entre H-18 ( $\delta$  2,52) avec H-27 ( $\delta$  1,21); H-2 ( $\delta$  3,95) avec H-3 ( $\delta$  3,35) et H-5 ( $\delta$  1,23) avec H-9 ( $\delta$  1,85) qui confirment la configuration relative des carbones C-2, C-3, C-5, C-9 et C-18 (figure 49).



**Figure 49** : Spectre NOESY de composé VP5.

L'ensemble de toutes ces données spectrales nous a permis d'identifier le composé VP5 à la structure **127** comme l'acide 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oïque pour la première fois, isolé et caractérisé entièrement.



**Schéma 34** : Structure du composé **127**.

#### II.2.1.4. Elucidation du composé VP11

Le composé VP11 cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (80-90 %). Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'Iode. Les analyses spectrales rigoureuses en comparaison avec les spectres proton, COSY et HSQC de composé VP11 permettent de lui attribuer la formule brute C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>7</sub> (calc. 535,3) renfermant huit degrés d'insaturation. Le

signal d'un singulet observé à 2,58 ppm sur le spectre du proton fait suggérer au groupe méthyle substitué à un carbonyle.

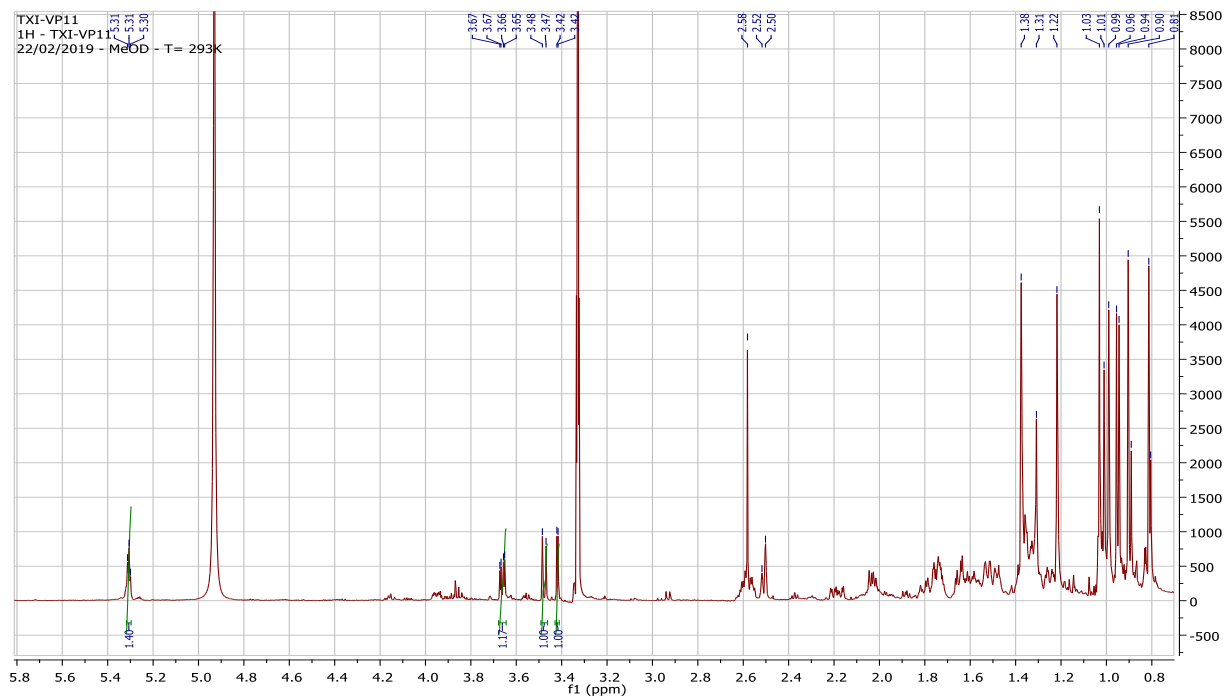


Figure 50 : Spectre proton du composé VP11.

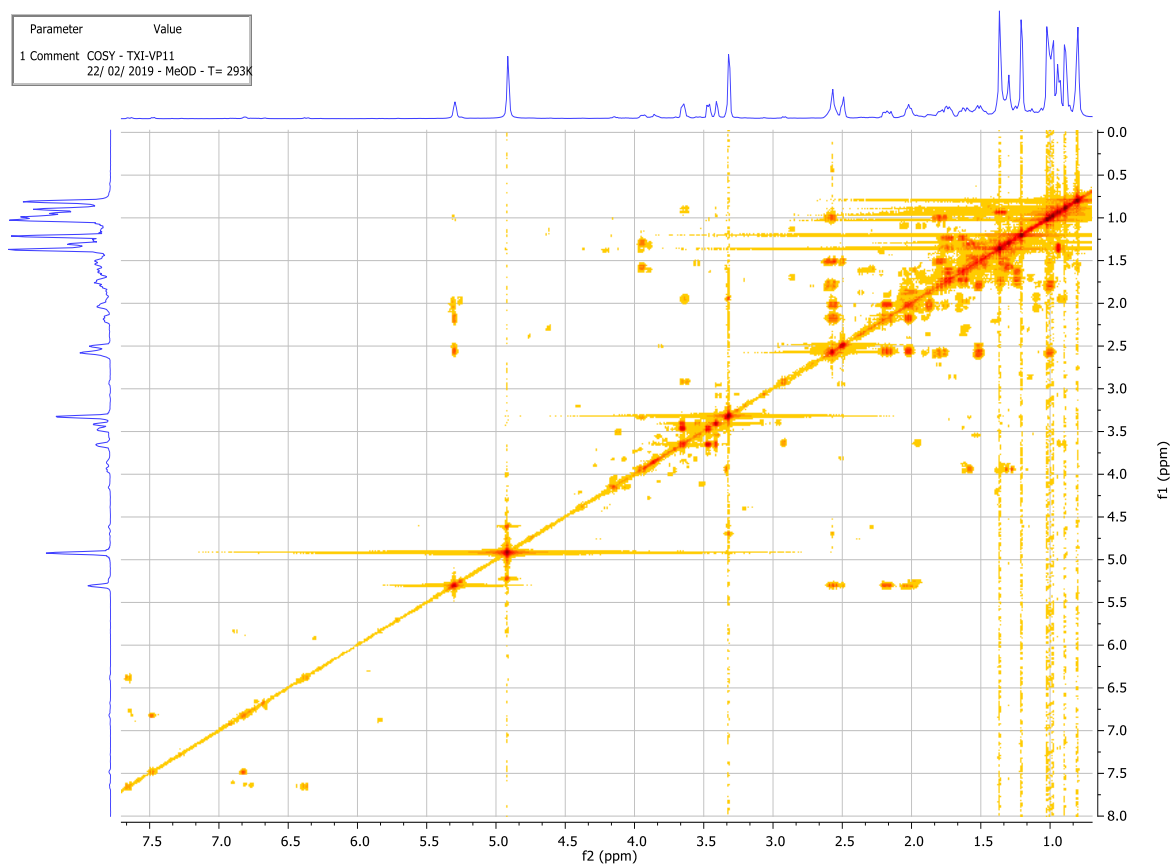
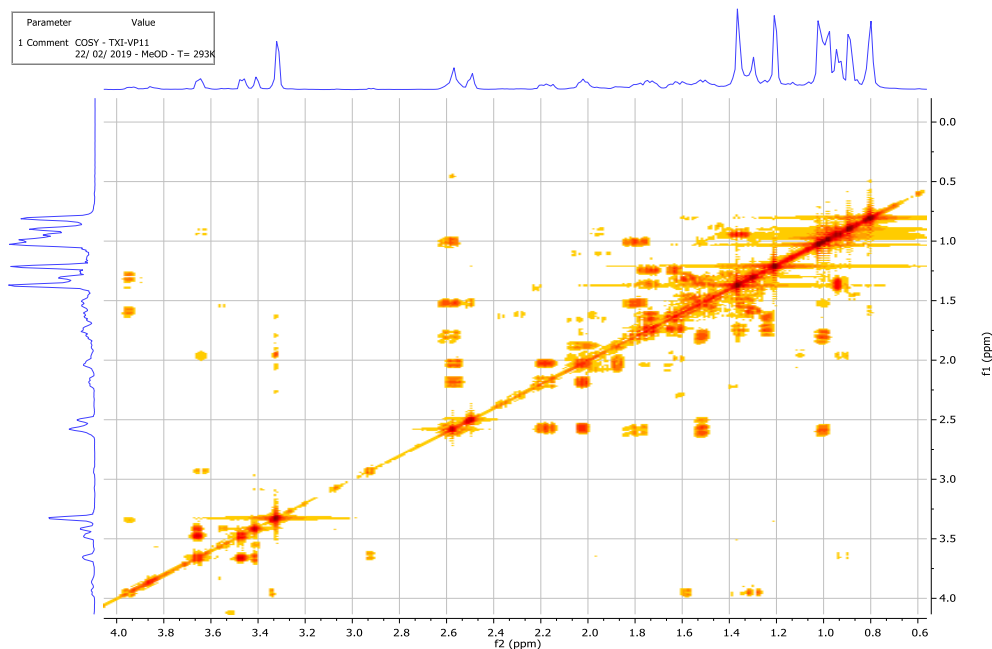
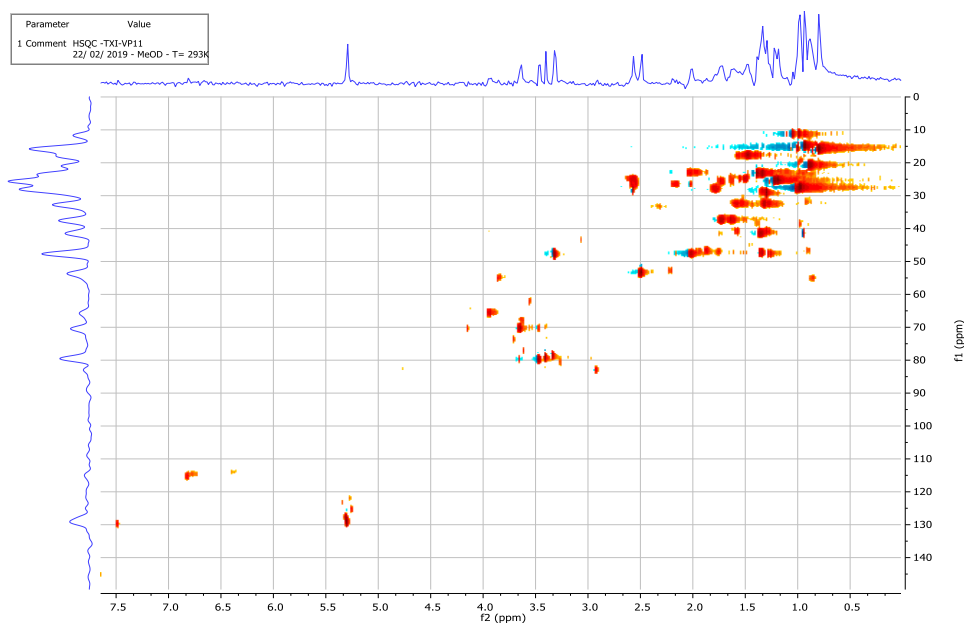


Figure 51 : Spectre COSY du composé VP11.



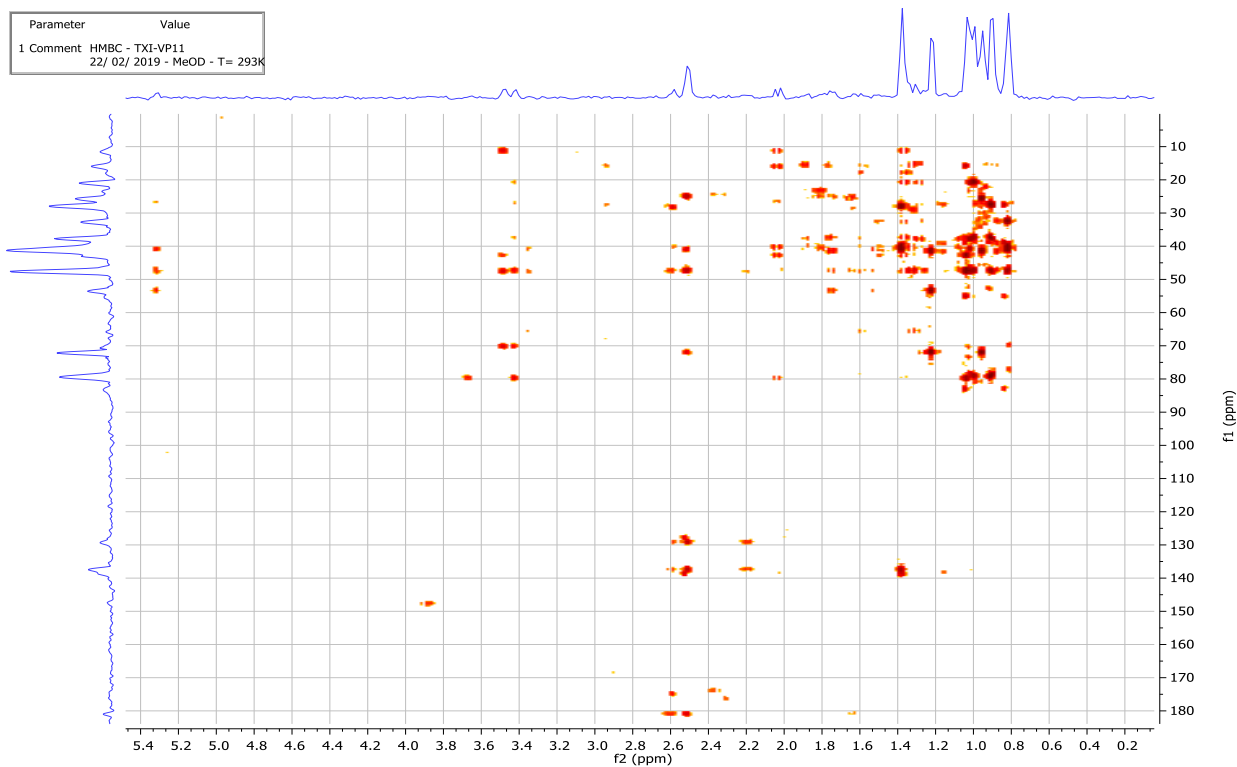


**Figure 52** : Spectre COSY élargi du composé VP11.

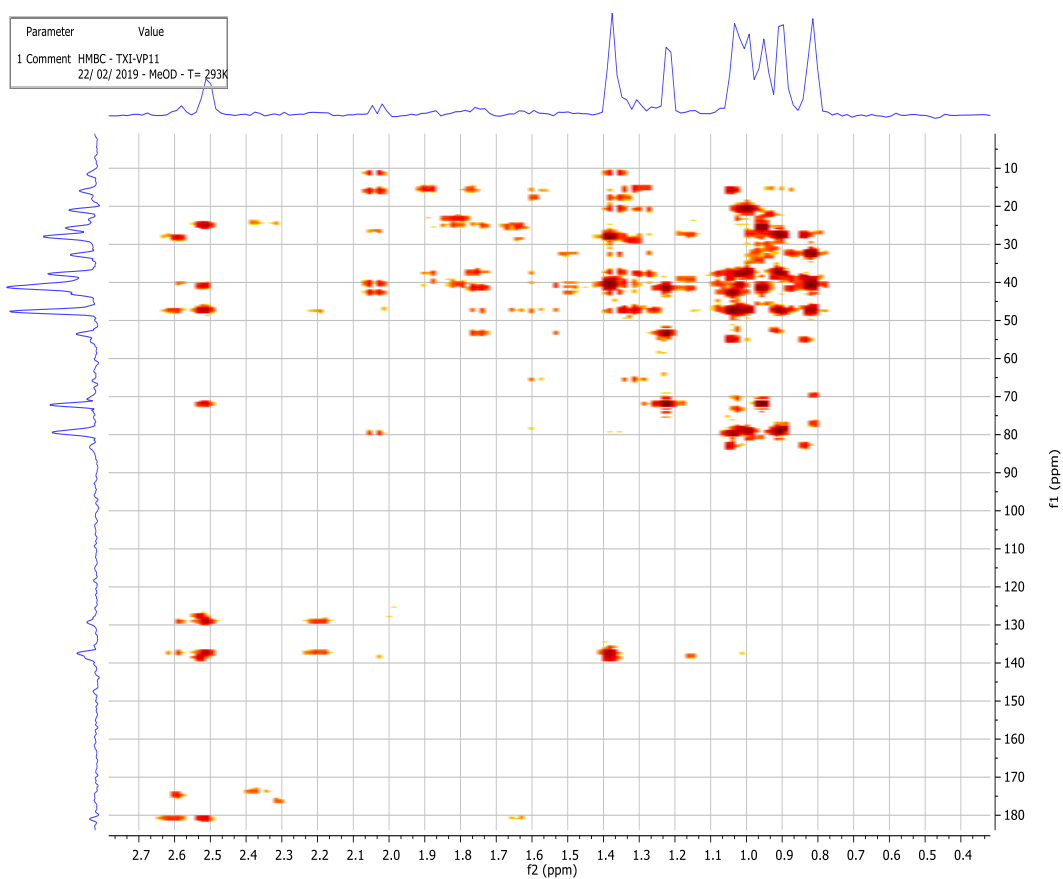


**Figure 53** : Spectre HMQC du composé VP11.

Sur son spectre HMBC (figure 54 et tableau 12) présente des corrélations en  $J^{2-3}$  entre les protons et les carbones comme le proton H-12 à  $\delta$  5,25 et les carbones à  $\delta$  139,0 (C-13) ; 71,0 (C-19) ; 54,5 (C-18) ; 49,1 (C-9) ; 38,5 (C-14) et 28,0 (C-11). L'analyse complète des spectres en comparaison avec les données spectrales du composé permet d'attribuer le composé VP11 au dérivé de composé VP4, la structure **128** : acide 3 $\beta$ -acétoxy-1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ),19 $\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oïque (Schéma 35).



**Figure 54** : Spectre HMBC du composé VP11.



**Figure 55** : Spectre HMBC élargi du composé VP11.

Tableau 12 : Données spectrales de **128**

Position	<b>128</b> (CD <sub>3</sub> OD, 600 et 150 Hz)			<b>126</b>
	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$	Corrélations HMBC	$\delta_C$
<b>1</b>	3,42 (1H, d, 6,0)	70,0	80,0	81,4
<b>2</b>	3,66 (1H, dd, 6,0)	80,0	80,0 ; 70,0 ; 48,0	71,7
<b>3</b>	3,48 (1H, d, 6,0)	80,0	70,0 ; 48,0	80,9
<b>4</b>		48,0		42,5
<b>5</b>	1,54 (1H, m, 6,0 et 12,0 Hz)	48,2		49,1
<b>6</b>	1,40 (1H, m), 1,35 (1H, m)	17,6		19,6
<b>7</b>	1,50 (1H, m), 1,23 (1H, m)	33,2		34,3
<b>8</b>		39,9		41,8
<b>9</b>	1,80 (1H, m)	49,1		49,4
<b>10</b>		41,0		44,4
<b>11</b>	2,20 (1H, m), 1,39 (1H, m)	28,0	129,0 ; 139,0 ; 41	28,4
<b>12</b>	5,25 (1H, t)	129,0	28,0 ; 38,5 ; 49,1 ; 54,5 ; 71,0 ; 139,0	130,8
<b>13</b>		139,0		138,9
<b>14</b>		38,5		38,9
<b>15</b>	1,90 (1H, m), 1,04 (1H, m)	29,1		29,8
<b>16</b>	1,50 (1H, m), 2,59 (1H, m)	24,5	181,0 ; 139,0 ; 129,0 ; 71,0 ; 48,0 ; 41,0 ; 29,0	26,8
<b>17</b>		48,0		49,0
<b>18</b>	2,50 (1H, s)	54,5	181,0 ; 139,0 ; 129,0 ; 71,0 ; 48,0 ; 41,0 ; 25,0	55,1
<b>19</b>	1,65 (1H, br)	71,0		73,6
<b>20</b>	1,34 (1H, br)	41,0		43,2
<b>21</b>	1,45 (1H, m), 1,01 (1H, m)	25,0		27,5
<b>22</b>	1,03 (1H, m), 0,98 (1H, m)	41,0		39,2
<b>23</b>	1,22 (3H, s)	29,0		29,3
<b>24</b>	0,92 (3H, s)	21,0		22,5
<b>25</b>	1,03 (3H, s)	12,4		13,1
<b>26</b>	0,81 (3H, s)	15,0		17,8
<b>27</b>	1,38 (3H, s)	26,1		25,1
<b>28</b>		181,0		182,4
<b>29</b>	0,99 (3H, s)	25,0		27,2
<b>30</b>	0,95 (3H, d, 12)	15,1		16,8
<b>1'</b>		173,0		-
<b>2'</b>	2,58 (3H, s)	25,2		-

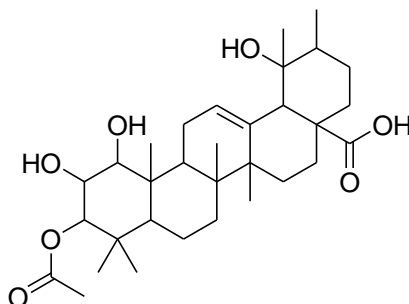


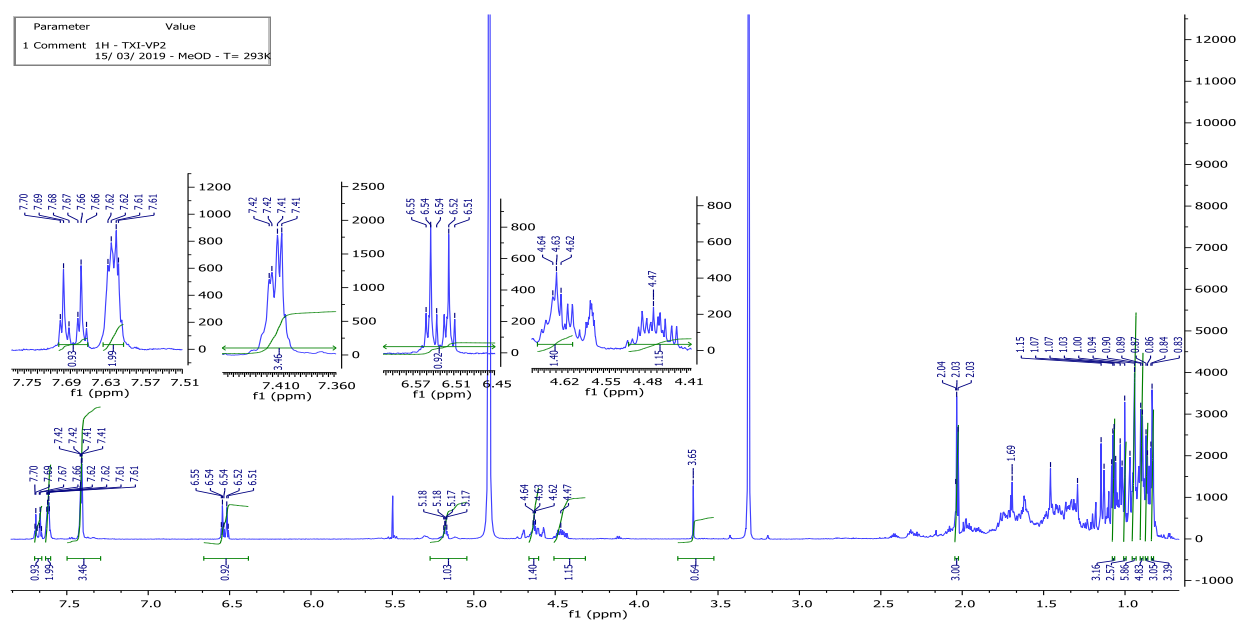
Schéma 35 : Structure du composé **128** (acide 3 $\beta$ -acétoxy-1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,19 $\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oïque)

### II.2.1.5. Elucidation du composé VP2

Le composé VP2 cristallise sous forme de cristaux blancs dans l'acétate d'éthyle (100 %). Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'Iode.

Son spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure 55) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) donne des séries de protons à savoir :

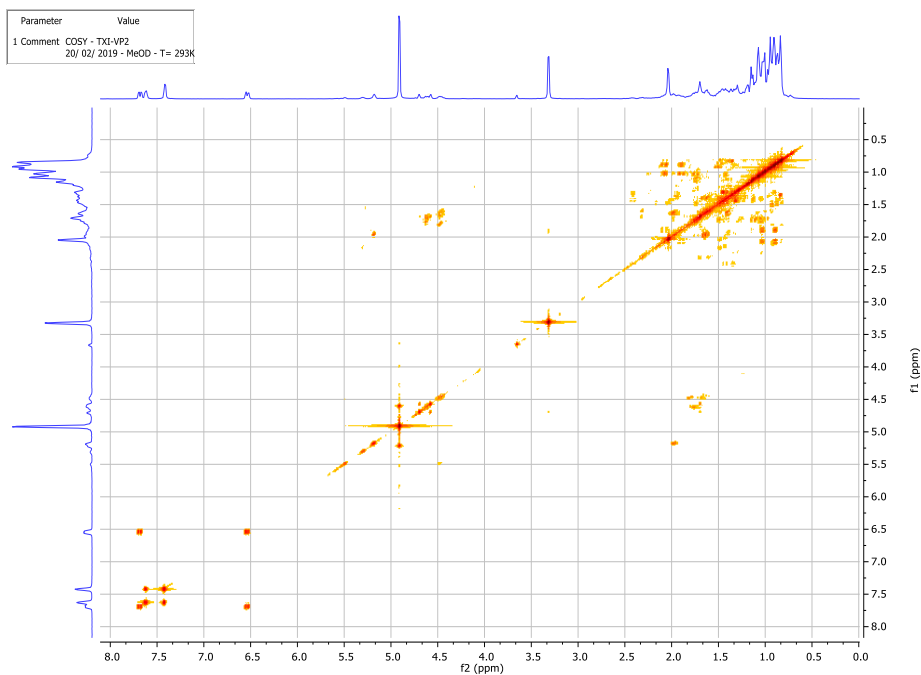
- deux signaux  $\delta_{\text{H}}$  6,55 et 7,71 avec chacun une constante  $J = 16,2$  Hz attribuable aux protons oléfiniques de couplage *Trans*.
- entre  $\delta_{\text{H}}$  6,42 et 7,63, cinq signaux caractéristiques de protons aromatiques qui font suggérer la présence d'un noyau benzénique au sein de la structure.
- à  $\delta_{\text{H}}$  5,19 un triplet d'un proton attribuable à un proton oléfinique (H-12) des triterpènes.
- à  $\delta_{\text{H}}$  4,45 un amas des signaux d'un proton attribuable à un proton H-3 des triterpènes.
- à  $\delta_{\text{H}}$  3,67 un doublet également un proton attribuable à un groupement méthine lié à un hétéroatome (H-11).
- entre  $\delta_{\text{H}}$  0,85 et 1,18, on observe sept signaux caractéristiques de protons de méthyles dans la région des champs forts.



**Figure 56** : Spectre RMN proton du composé VP2.

L'analyse de son spectre COSY (figure 57) montre les différentes corrélations :

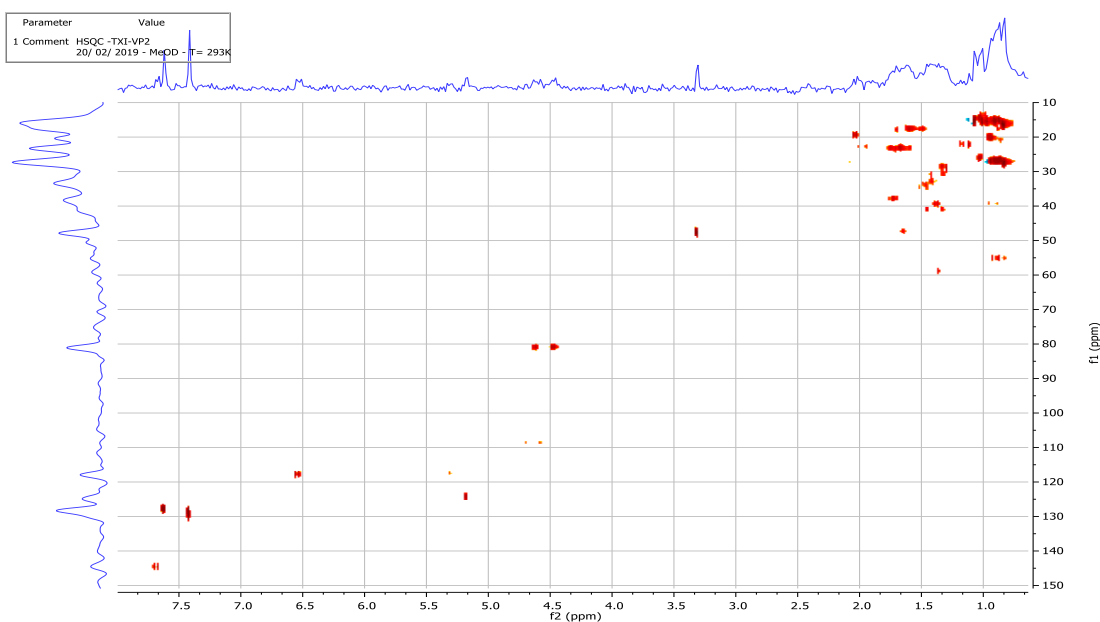
- entre le proton H-3 ( $\delta$  4,45, br) et H-1, H-2 ( $\delta$  1,54, 1,52, m).
- on peut également observer les différentes corrélations entre les protons aromatiques ( $\delta$  6,42 à 7,63).
- une corrélation entre les protons H-7' ( $\delta$  7,71, t, 12,0 Hz) et H-8' ( $\delta$  6,55, dt, 12,0 Hz). Cette analyse suppose qu'une double liaison est liée au noyau benzénique.
- une corrélation entre le proton H-29 ( $\delta$  1,18) et le proton méthylique H-30 est une caractéristique directe de triterpène de type ursane.



**Figure 57** : Spectre COSY du composé VP2.

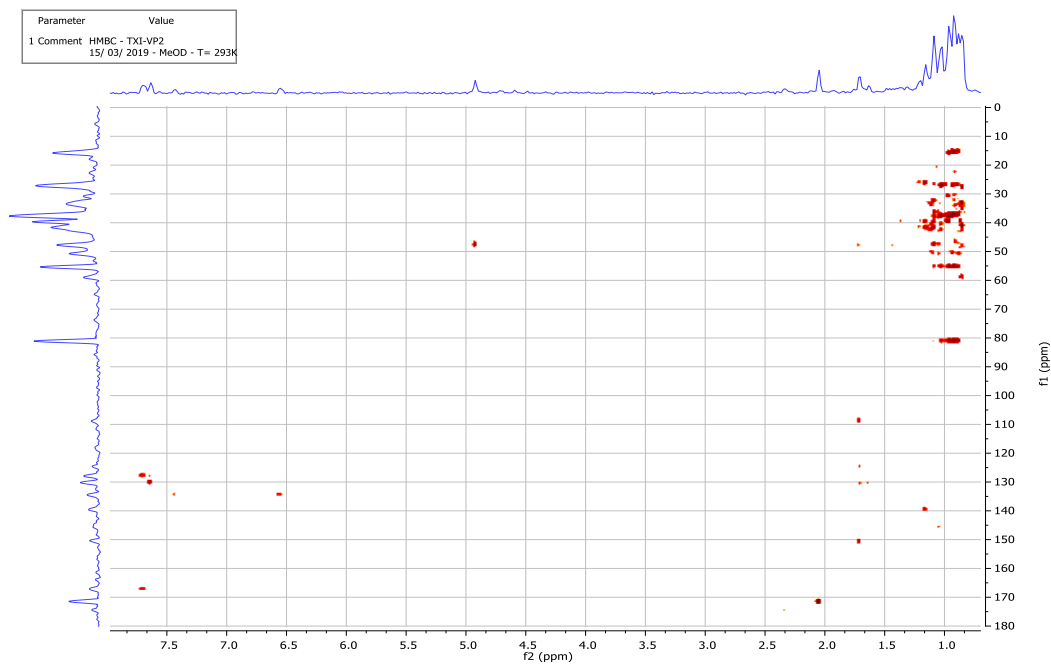
Son spectre HSQC (Figure 58) présente les corrélations peu similaires comme le composé VP5. Mais on constate les corrélations supplémentaires  $J^I$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  entre carbone et proton :

- les protons (H-2', H-6') à 7,63 ppm et les carbones (C-2', C-6') à 128,3 ppm.
- le proton (H-3', H-5') à 7,42 ppm et les carbones (C-3', C-5') à 130,0 ppm.
- le proton (H-4') à 7,43 ppm et le carbone (C-4') à 128,9 ppm.



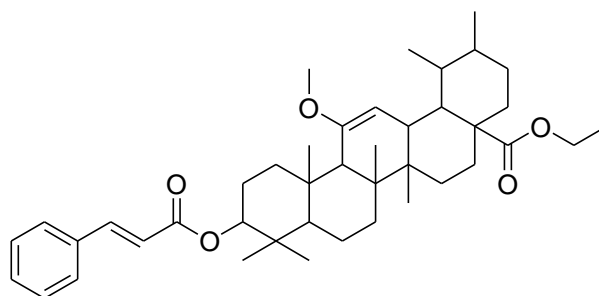
**Figure 58** : Spectre HSQC du composé VP2.

Le spectre HMBC (figure 59) a permis d'assigner et de confirmer la position de la double liaison sur le noyau benzénique, les corrélations entre H-7' ( $\delta$ 7,71) avec C-2', C-6' ( $\delta$ 128,3) et C-9' ( $\delta$ 166,8) ; H-8' ( $\delta$ 6,55) avec C-1' ( $\delta$ 134,5).



**Figure 59** : Spectre HMBC du composé VP2.

L'analyse rigoureuse des données spectrales comparées à la littérature permet d'assigner au composé VP2, la structure chimique relative **129** (ester 3 $\beta$ -(cinnamoyloxy)-11-méthoxy-urs-11,12-énoate d'éthyle) suivante.



**Schéma 36** : Structure chimique du composé **129**.

**Tableau 13** : Récapitulatif des données spectrales VP2

Position	VP2 <b>129</b> (CD <sub>3</sub> OD, 600 Hz)		
	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$	Corrélations HMBC
Partie triterpénique (Ursane)			
<b>1</b>	1,54 (1H, m), 1,52 (1H, m)	48,2	
<b>2</b>	1,54 (1H, m), 1,52 (1H, m)	24,8	
<b>3</b>	4,45 (1H, br)	81,4	47,8 ; 19,0
<b>4</b>		47,8	
<b>5</b>	1,54 (1H, m, 6,0 et 12,0 Hz)	48,2	
<b>6</b>	1,40 (1H, m), 1,35 (1H, m)	17,6	
<b>7</b>	1,61 (1H, m) 1,33 (1H, m)	34,6	
<b>8</b>		39,9	
<b>9</b>	1,80 (1H, m)	49,1	
<b>10</b>		37,8	
<b>11</b>		149,5	
<b>12</b>	5,19 (1H, m)	128,3	
<b>13</b>	3,67 (1H, d)	49,9	128,3 ; 149,5
<b>14</b>		47,8	
<b>15</b>	1,9 (1H, m), 1,04 (1H, m)	27,1	
<b>16</b>		40,5	
<b>17</b>		48,4	
<b>18</b>	2,02 (1H, br s)	51,0	15,0 ; 40,5 ; 48,4 ; 128,3 ; 171,0
<b>19</b>	1,65 (1H, br)	39,0	
<b>20</b>	1,34 (1H, br)	38,0	
<b>21</b>	1,45 (1H, m), 1,01 (1H, m)	28,0	
<b>22</b>	1,03 (1H, m), 0,98 (1H, m)	32,5	
<b>23</b>	1,18 (3H, s)	26,6	
<b>24</b>	0,95 (3H, s)	21,0	
<b>25</b>	1,01 (3H, s)	16,1	
<b>26</b>	0,85 (3H, s)	16,1	
<b>27</b>	1,09 (3H, s)	26,1	
<b>28</b>		171,0	
<b>29</b>	1,08 (3H, d)	15,0	
<b>30</b>	0,92 (3H, d, 12,0 Hz)	15,1	
Partie cinnamique			
<b>1'</b>		134,5	
<b>2'</b>	7,63 (1H, br)	128,3	
<b>3'</b>	7,42 (1H, br)	130,0	
<b>4'</b>	7,43 (1H, br)	128,9	
<b>5'</b>	7,42 (1H, br)	130,0	
<b>6'</b>	7,63 (1H, br)	128,3	
<b>7'</b>	7,71 (1H, t, $J=16,2$ Hz)	145,0	128,0 ; 166,8
<b>8'</b>	6,55 (1H, dt, 16,2 Hz)	118,9	134,5
<b>9'</b>		166,8	
Partie acétylique			
<b>1''</b>	4,45 (1H, br), 4,47 (1H, br)	81,4	
<b>2''</b>	1,80 (1H, m), 1,65 (1H, m), 1,64 (1H, m)	19,5	

## II.2.2. Les composés polyphénoliques

### II.2.2.1. Caractérisation structurale du composé VP5-1

Le composé VP5-1 précipite sous forme de cristaux jaunes dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (1 : 1) et fond entre 212-214°C. Il est soluble dans le MeOH et visible à l'UV ( $\lambda = 254$  et 366 nm). Il répond positivement au test caractéristique des flavonoïdes. Son spectre de masse exploité (Figure 60) donne un pic pseudo moléculaire  $[M-H]^+$ ,  $m/z$  à 291,09.

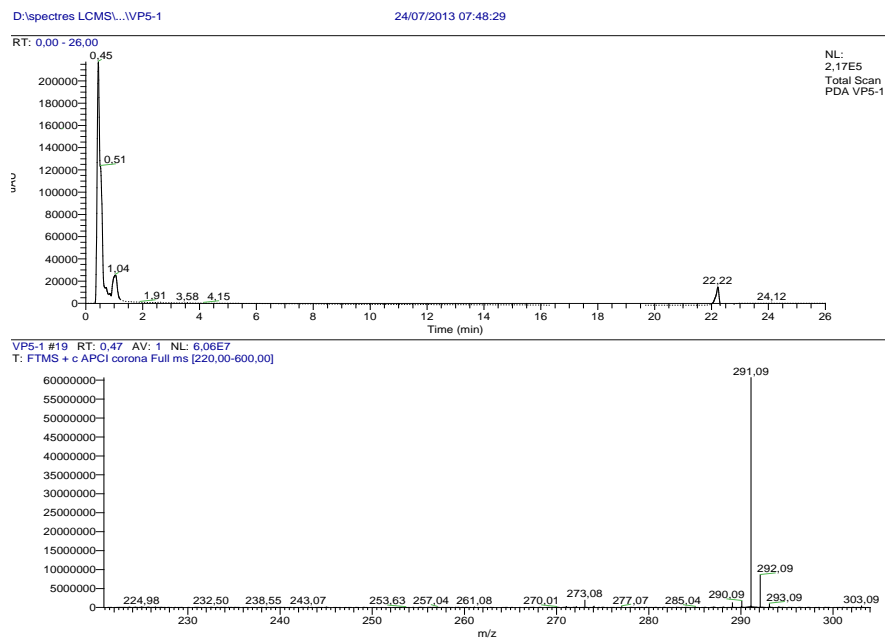
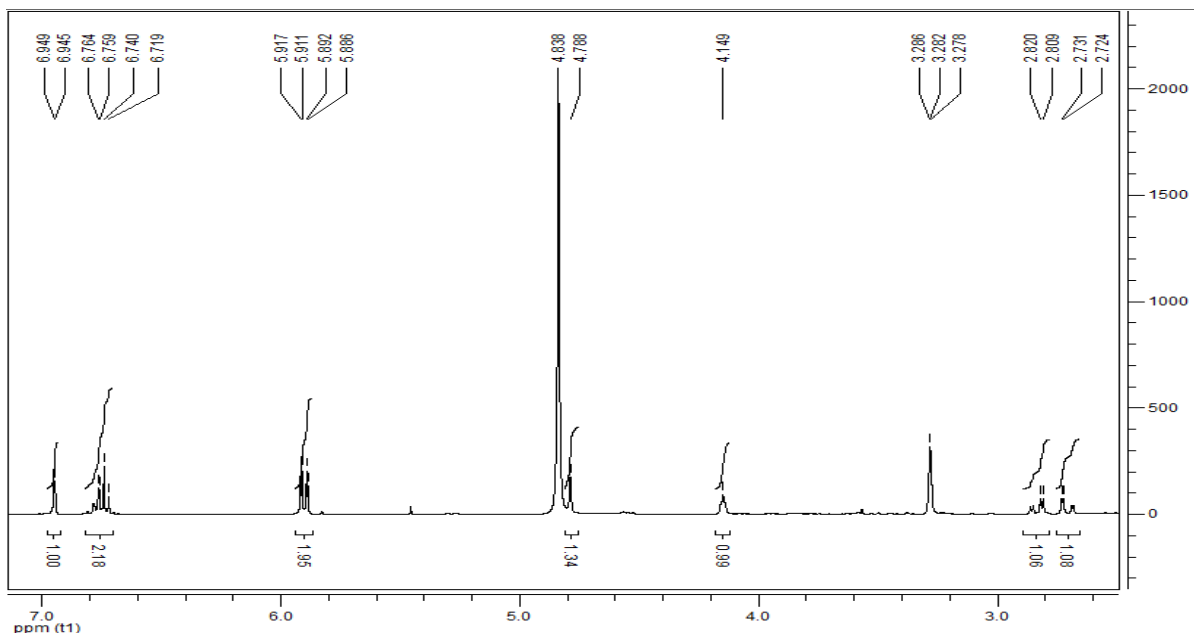


Figure 60 : Spectre de masse (APCI) du composé VP5-1

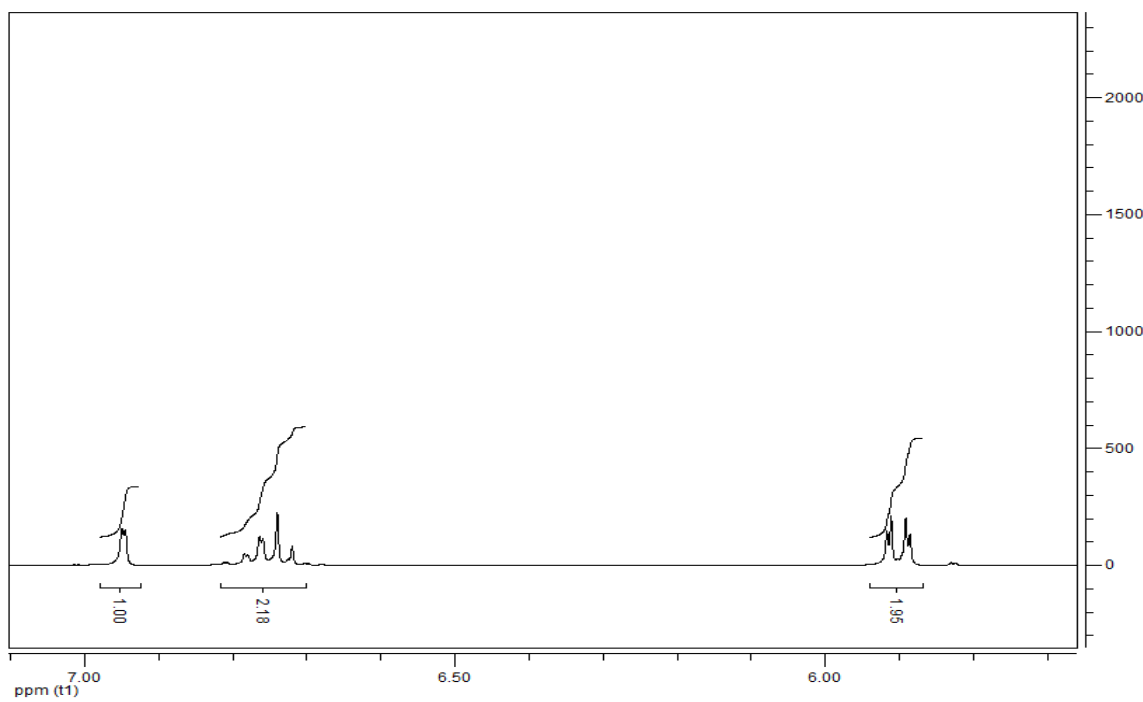
Sur son spectre RMN<sup>1</sup>H et élargi (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) respectivement figures 61 et 62, on observe 9 séries de protons à savoir comme entre  $\delta$  2,73 (H-4a, dd) et  $\delta$  2,81 (H-4b, dd), dans la région des champs forts, des protons caractéristiques de deux protons aliphatiques  $sp^3$  liés à un carbone déblindé (C-4). Ensuite à  $\delta$  4,79 et  $\delta$  4,15 un triplet des protons H-3 et H-2 liés au groupement méthine des flavonoïdes. Et nous remarquons respectivement à  $\delta$  5,88 (2H, m), 6,95 (2H, m) et 6,99 (1H, s) qui correspondent aux signaux des protons d'un système benzénique.

L'analyse de ces données spectrales avec cinq protons aromatiques nous suggèrent la présence des noyaux aromatiques.





**Figure 61** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) du composé VP5-1.



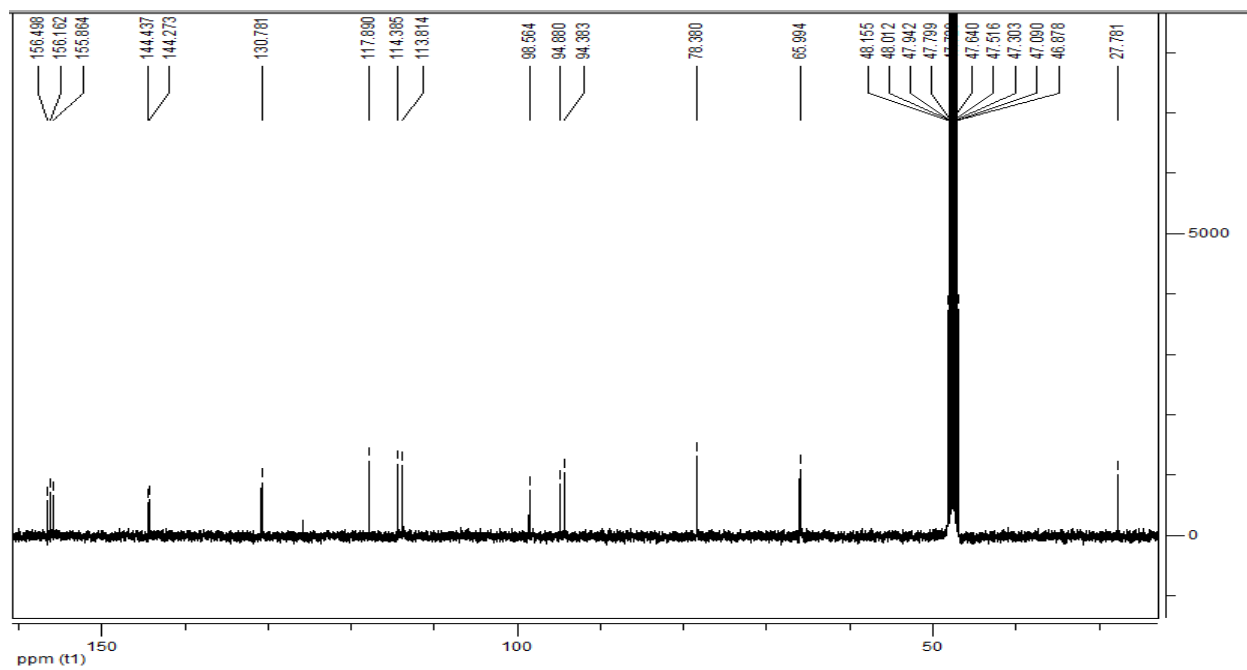
**Figure 62** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  élargi ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) du composé VP5-1.

Son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) (figure 63) montre quinze atomes de carbones  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  27,8 ; 65,9 ; 78,4 ; 94,4 ; 94,9 ; 98,6 ; 113,8 ; 114,4 ; 117,9 ; 130,8 ; 144,3 ; 144,4 ; 155,9 ; 156,2 et 156,5.

L'analyse spectrale du carbone montre 12 carbones  $sp^2$  entre  $\delta$  94,0 et 156,0 attribuables aux deux noyaux aromatiques A et B caractéristiques principales d'un squelette de type  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$  des flavonoïdes.

Deux signaux de carbones à  $\delta$  65,9 (C-3) et 78,4 (C-2) confirment la présence de deux carbones  $sp^3$  liés au groupement hydroxyle.

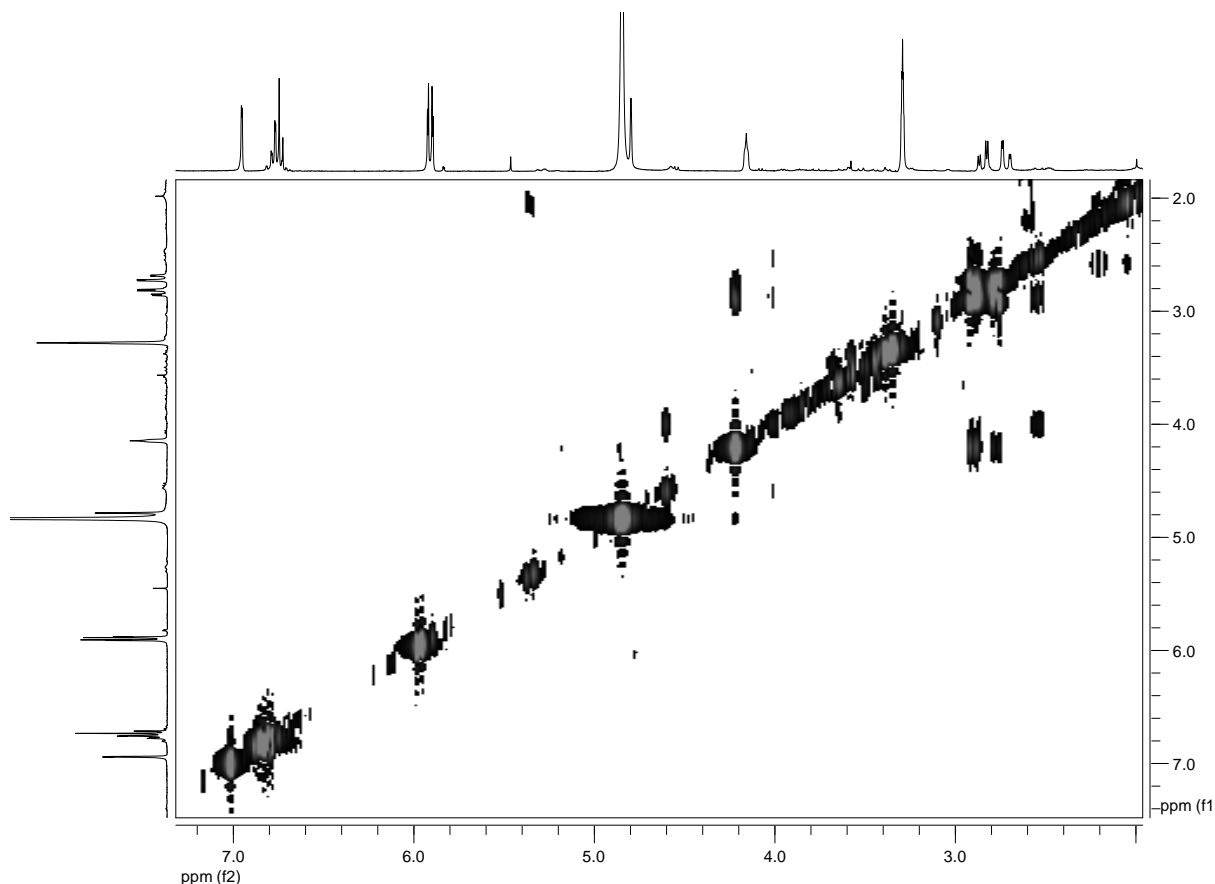
La présence d'un seul carbone aliphatique à  $\delta$  27,8 (C-4) au sein de notre molécule nous suggère que les deux protons à  $\delta$  2,73 et 2,81, sont portés par ce même carbone. Ils sont de nature diastéréotopique (un  $CH_2$  lié au moins à un centre asymétrique).



**Figure 63** : Spectre RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 125 MHz) du composé VP5-1.

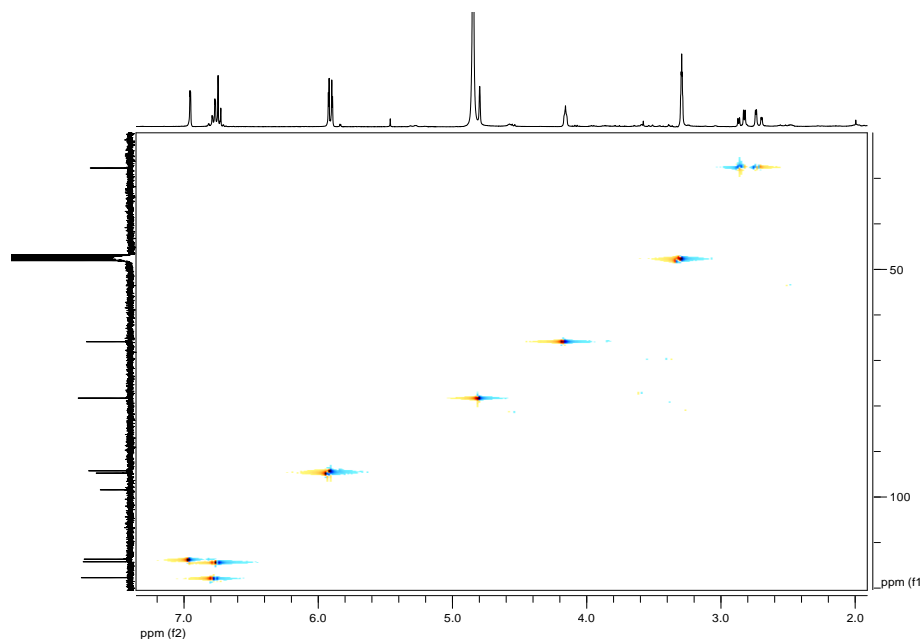
L'interprétation de spectres de  $^1H$  et  $^{13}C$  corroborés avec son spectre de masse à haute résolution nous permet d'attribuer une formule brute correspond à  $C_{15}H_{14}O_6$  renfermant neuf degrés d'insaturation.

Son spectre COSY (Figure 64) montre les différentes corrélations entre H-2 ( $\delta$  4,79, m) et H-3 ( $\delta$  4,15, d) déblindés. Le proton déblindé à  $\delta$  4,15 (H-3) et deux protons de méthylène de nature diastéréotopique à  $\delta$  2,81 (H-4a) et  $\delta$  2,73 (H-4b), confirment les caractéristiques du noyau C des flavonoïdes.



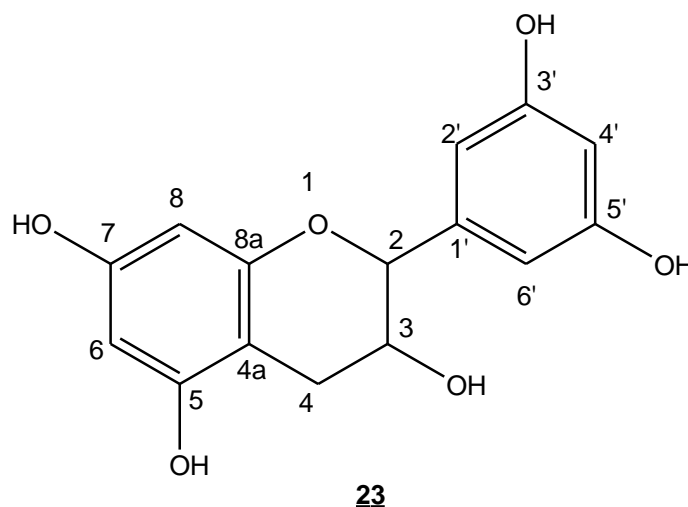
**Figure 64** : Spectre COSY du composé VP5-1.

Le spectre HSQC (Figure 65) montre les corrélations  $J^I$   $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ . Sur ce spectre se présentent des corrélations entre les protons à  $\delta$  2,81 (H-4a) et à  $\delta$  2,73 et le carbone à  $\delta$  27,8 ; le proton à  $\delta$  4,15 (H-3) et le carbone (C-3) à  $\delta$  65,9 ; le proton (H-2) à  $\delta$  4,79 ppm et le carbone (C-2) à  $\delta$  78,4 ; les protons à  $\delta$  5,88 et 5,91 et les carbones à  $\delta$  94,4 et 94,9 respectivement et également ceux des protons à  $\delta$  6,75 ; 6,82 ; 6,95 et les carbones respectivement à  $\delta$  114,4 ; 117,9 ; 113,8.



**Figure 65** : Spectre HSQC du composé VP5-1.

L'ensemble de toutes ces données spectrales nous permet d'identifier le composé VP5-1 à la structure **23** comme le 3,4-dihydro-2-(3',5'-dihydroxyphenyl)-2-chromène-3,5,7-triol ou épicatechine.

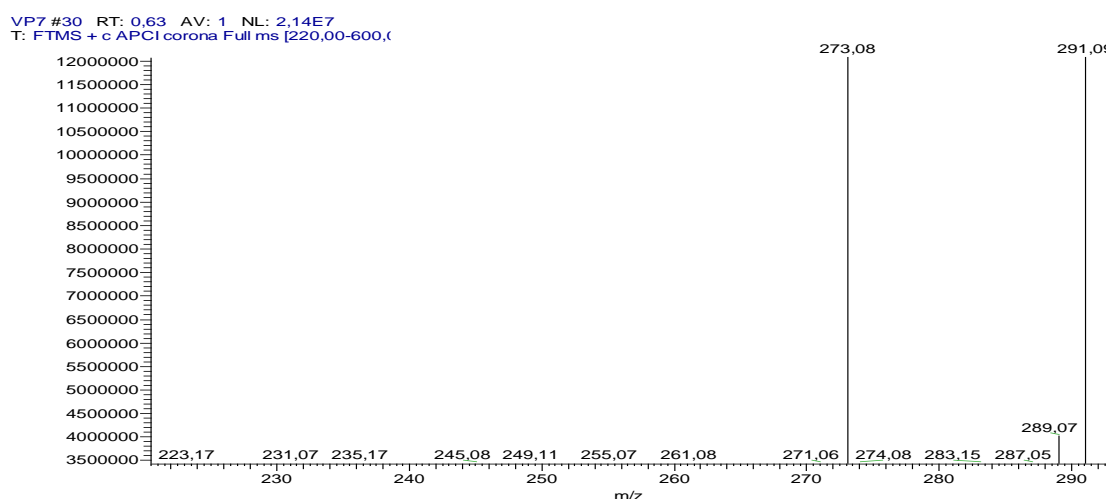


**Schéma 37** : Structure du composé **23**.

#### II.2.2.2. Caractérisation structurale du composé VP7

Le composé VP7 a été obtenu sous forme de cristaux jaunâtres dans le mélange Hexane/AcOEt (1 : 9) et fond entre 196-198°C. Il est soluble dans le méthanol et visible à l'UV ( $\lambda = 254$  et  $366$  nm). Il répond positivement au test caractéristique des flavonoïdes.

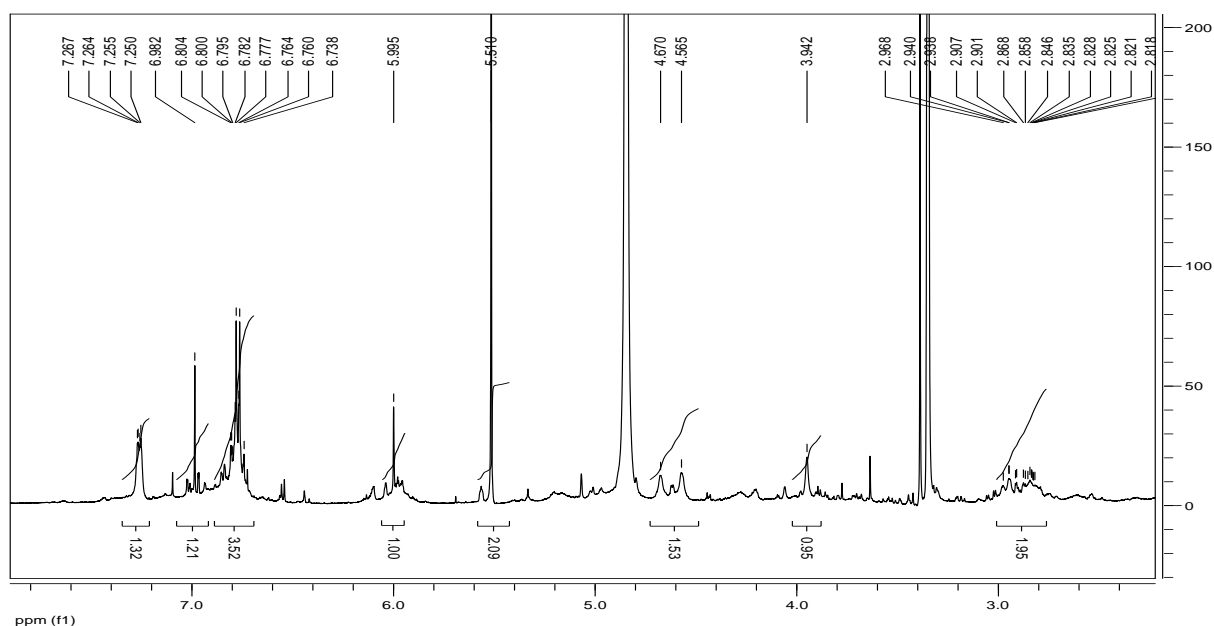
Son spectre de masse (figure 66) présente en mode positif et à haute résolution, le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  291,09 correspondant à la formule brute  $C_{15}H_{14}O_6$  renfermant neuf insaturations.



**Figure 66** : Spectre de masse (APCI) du composé VP7.

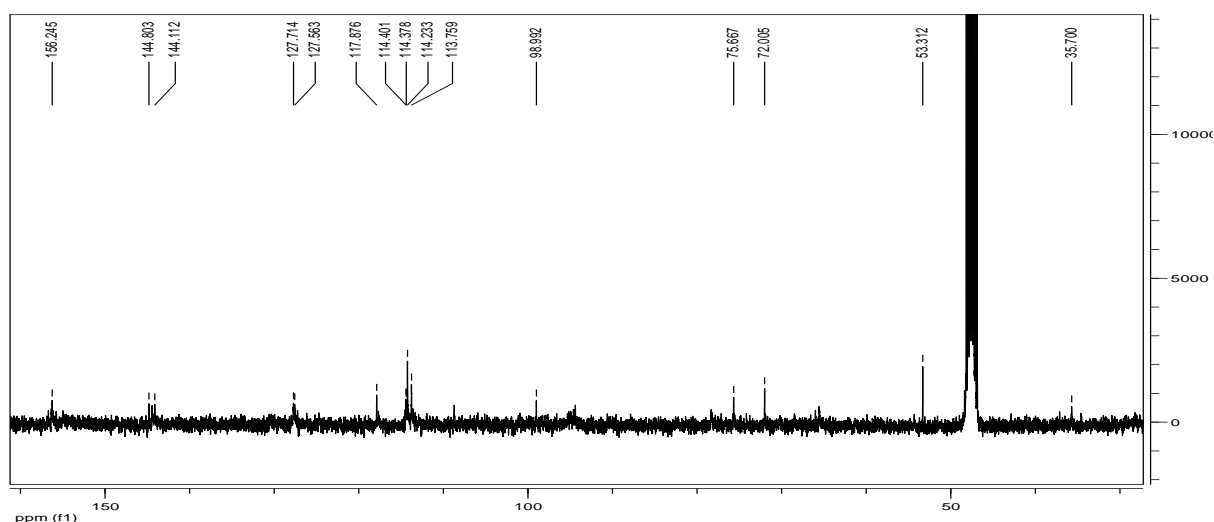
Son spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz, figure 67) présente des signaux constitués d'un ensemble des protons aromatiques entre  $\delta$  7,25 et 5,93. Ensuite, un singulet à  $\delta$  5,46 et un triplet d'un proton à  $\delta$

4,64 caractéristique d'un méthine lié à un atome d'oxygène et enfin, un multiplet de deux protons à  $\delta$  2,79, caractéristiques des protons méthyléniques.



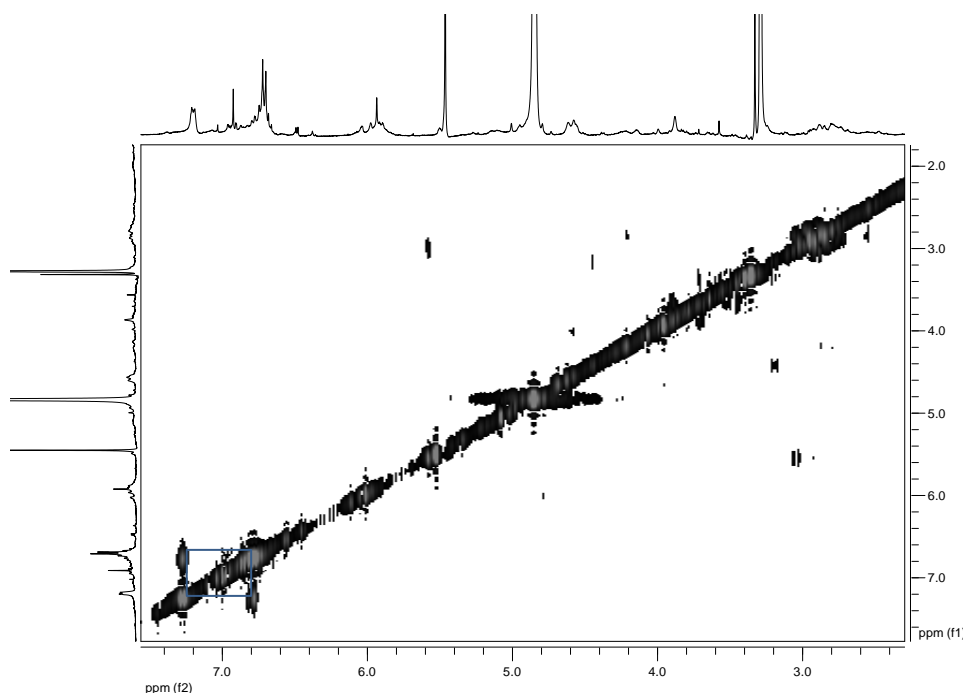
**Figure 67** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) du composé VP7.

Sur son spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125MHz, Figure 68), on observe 15 signaux correspondant aux carbones au sein de la molécule **23**, à savoir des signaux des carbones à  $\delta$  : 156,3 ; 144,8 ; 144,1 ; 127,7 ; 127,6 ; 114,4 ; 114,3 ; 114,2 ; 113,8 ; 98,9 ; 75,7 ; 72,0 ; 53,3 et 35,7. L'analyse rigoureuse de ces signaux révèle la présence des signaux de dix carbones aromatiques entre  $\delta$  156,3 et 98,9 parmi lesquels, les carbones à  $\delta$  156,3 ; 144,8 et 144,1 sont des carbones oxygénés ; deux signaux de carbones  $sp^3$  oxygénés à  $\delta$  75,7 et 72,0 ; un signal de carbone caractéristique d'un carbone méthine aliphatique à  $\delta$  55,3 et également un pic de carbone à  $\delta$  35,7 observé et attribuable au carbone méthylène C-4, aliphatique, porteur de deux protons de nature diastéréotopique.



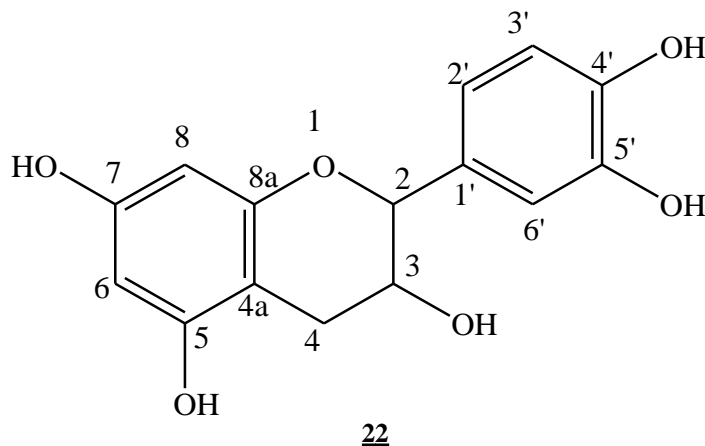
**Figure 68** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) du composé VP7.

Son spectre COSY (Figure 69) montre les corrélations  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  comme la corrélation entre les protons à  $\delta$  7,26 (H-2') et 6,76 (H-3') avec une constante de couplage 8,6 Hz caractéristique des couplages *ortho* du noyau B des flavonoïdes.



**Figure 69** : Spectre COSY du composé VP7.

Ces indications ont trait à une structure apparentée des flavonoïdes. Ces données comparées avec celles du composé VP5-1 (**23**), le composé VP7 diffère de celui de VP5-1 (**23**) par les positions des hydroxyles sur le cycle B. Par conséquent la structure **22** a été attribuée au composé VP7 comme 3,4-dihydro-2-(3',4'-dihydroxyphényl)-2-chromène-3,5,7-triol ou catéchine (Lewis *et al.*, 1999).



**Schéma 38** : Structure du composé **22**.

### II.2.2.3. Identification du composé VP17

Le composé **1** VP17 a été obtenu sous forme de cristaux jaunâtres dans l'acétate d'éthyle pur. Il est soluble dans le méthanol et visible à l'UV ( $\lambda = 254$  et  $366$  nm). Il répond positivement au test caractéristique des flavonoïdes.

Son spectre RMN<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz, figure 70), on observe des séries de protons à savoir entre  $\delta$  4,98 (H-2, d, 12,0 Hz) et  $\delta$  4,55 (H-3, d, 12,0 Hz). Et nous pouvons également remarquer entre  $\delta$  5,88 et 7,36, six signaux correspondant aux protons d'un système benzénique.

L'analyse de ces données spectrales avec six protons aromatiques nous suggèrent la présence de deux noyaux aromatiques dans la structure à élucider.

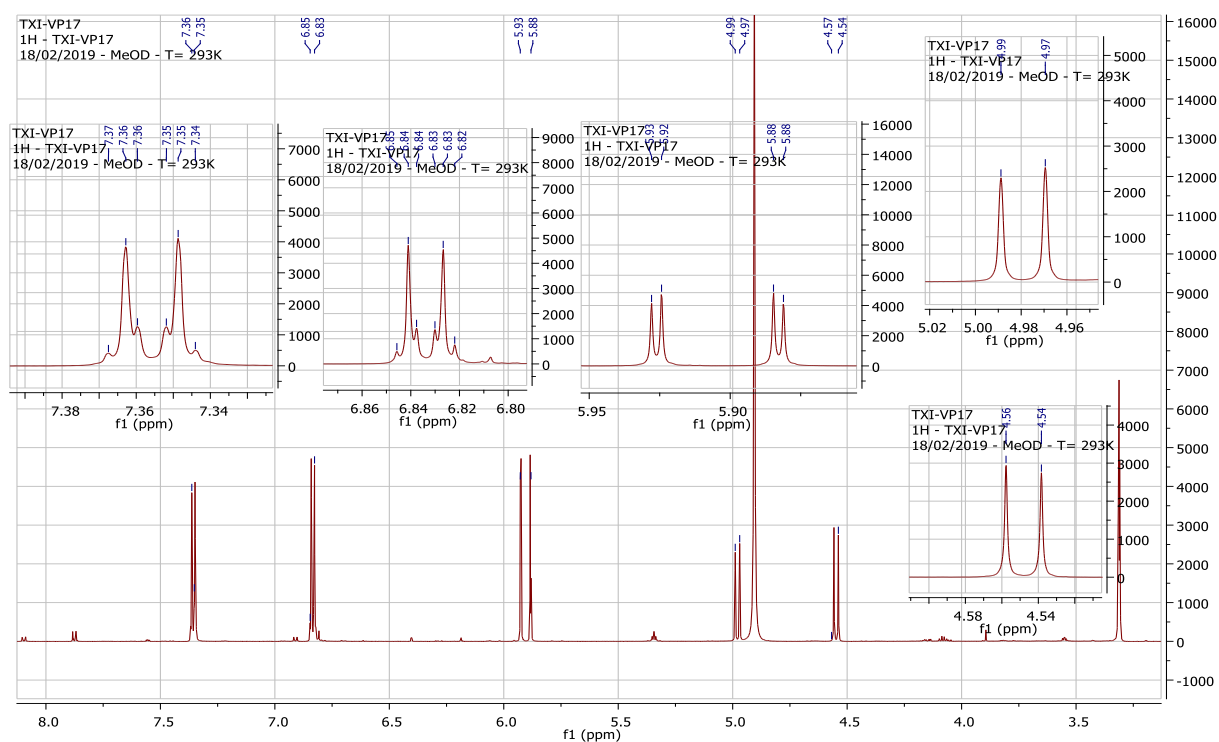
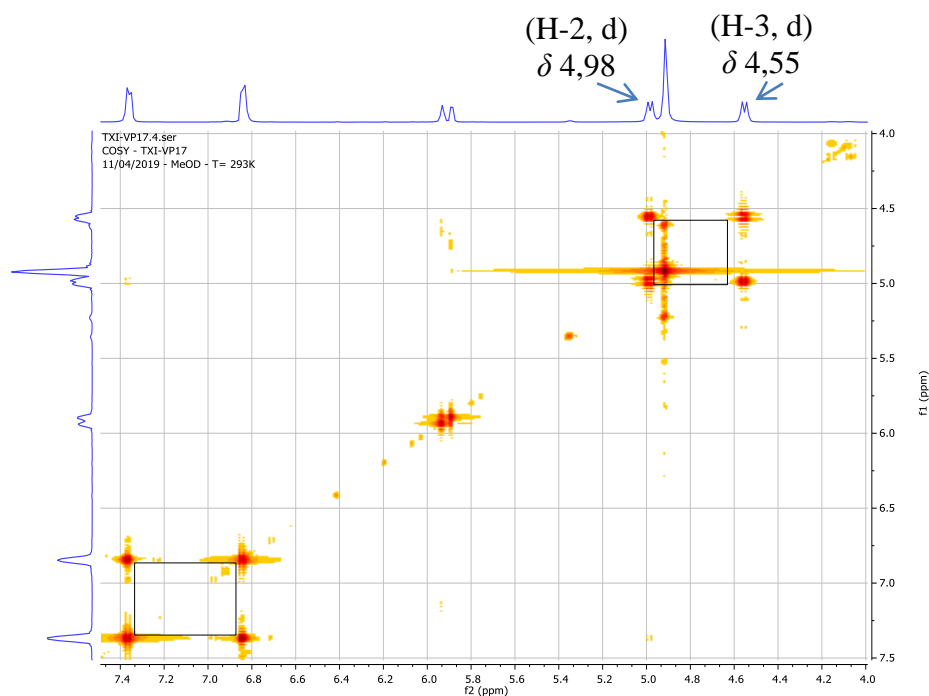


Figure 70 : Spectre proton du composé VP17.

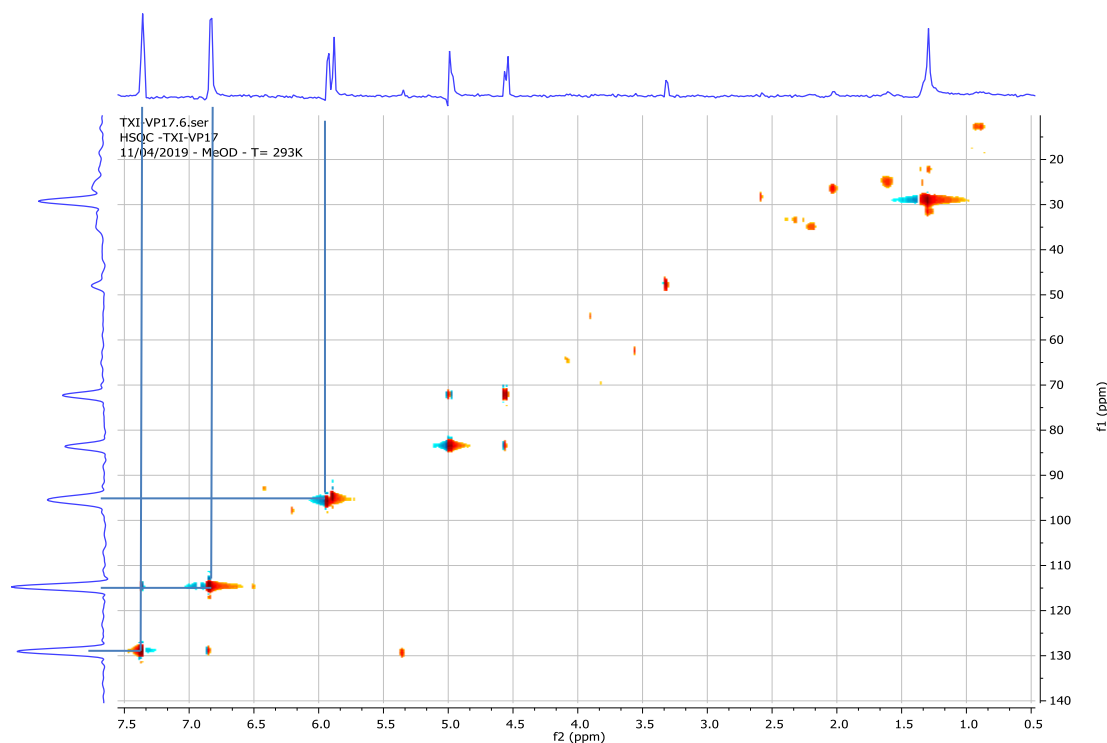
Sur son spectre COSY (Figure 71) montre les corrélations <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H comme la corrélation entre les protons à  $\delta$  4,98 (H-2, d) et  $\delta$  4,55 (H-3, d) avec une constante de couplage 12,0 Hz caractéristique des couplages *Trans* du noyau B des flavonoïdes.



**Figure 71** : Spectre COSY du composé VP17.

Son spectre HSQC (Figure 72, tableau 14) met en relief les corrélations  $J^I$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  entre carbone et proton suivantes :

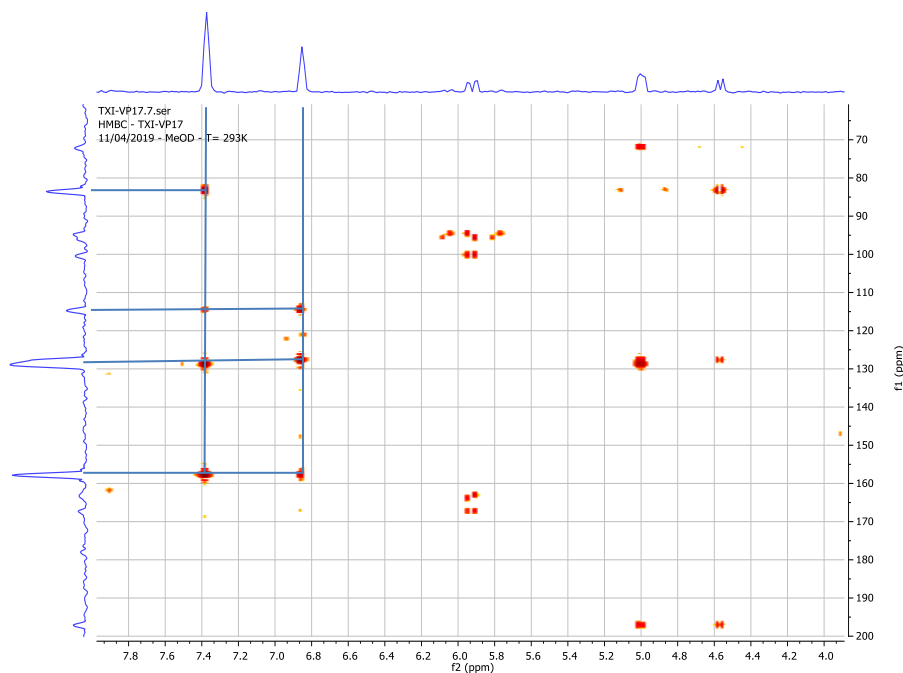
- le proton (H-2) à  $\delta$  4,98 et le carbone (C-2) à  $\delta$  83,4.
- le proton (H-3) à  $\delta$  4,55 et le carbone (C-3) à  $\delta$  72,0.



**Figure 72** : Spectre HSQC du composé VP17.

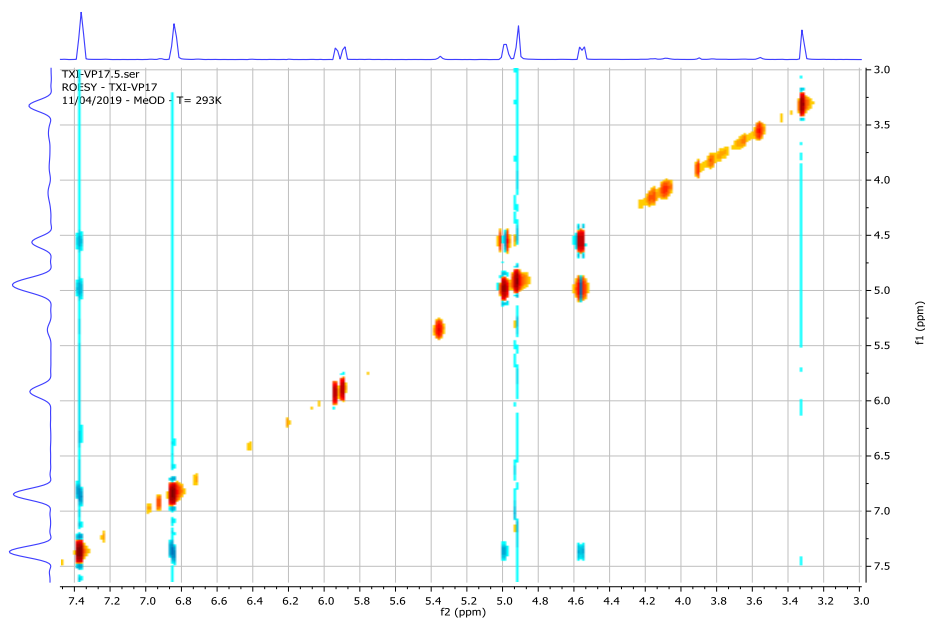
Le spectre HMBC (figure 73, tableau 14) révèle les corrélations entre H-2 ( $\delta$ 4,98) avec C-3 ( $\delta$ 72,0), C-2' ( $\delta$ 128,8) et C-4 ( $\delta$ 197,2) ; H-3 ( $\delta$ 4,55) avec C-2 ( $\delta$ 83,4), C-1' ( $\delta$ 127,8) et C-4 ( $\delta$ 197,2).





**Figure 73** : Spectre HMBC du composé VP17.

Le spectre ROESY (figure 74) montre les corrélations entre H-2 ( $\delta$  4,98) avec H-3 ( $\delta$  4,55) et les protons à  $\delta$  6,83 et  $\delta$  7,36.



**Figure 74** : Spectre ROESY du composé VP17.

La combinaison des données spectrales permet d'attribuer au composé VP17, la structure **130**, un flavonoïde : 2,3-dihydroflavonol ou (2R, 3S)-dihydrokaempférol.

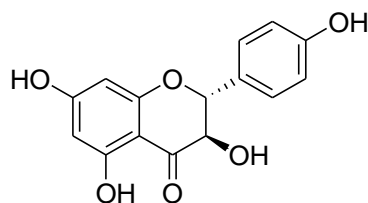


Schéma 39 : Structure du composé **130**.

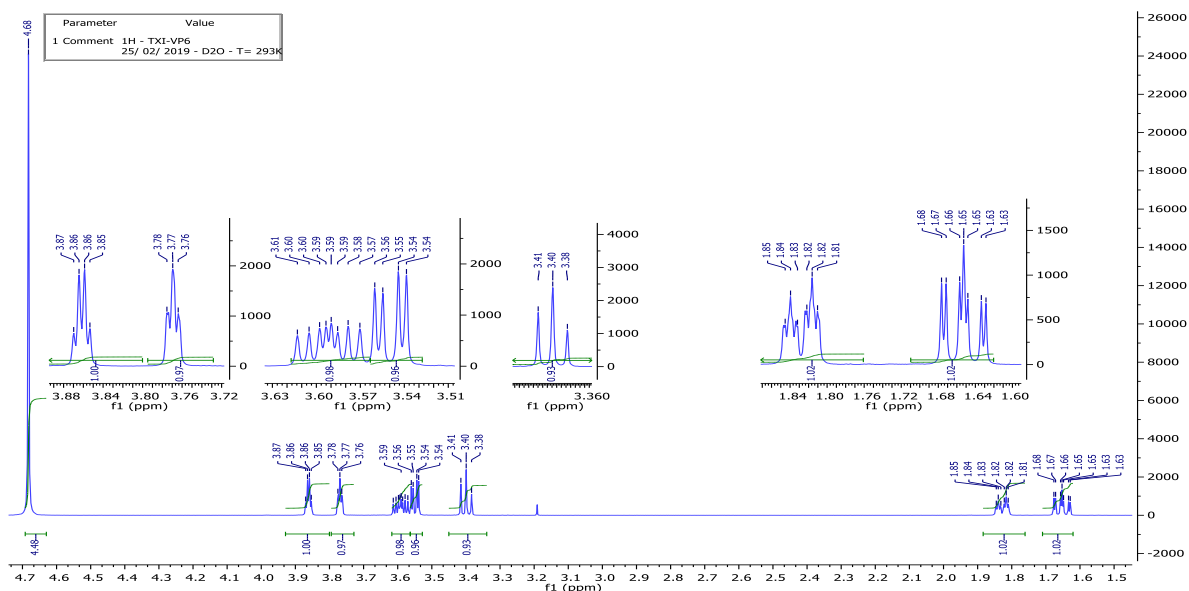
Tableau 14 : Données spectrales protons, carbones et HMBC du composé VP17.

Position	<b>130 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)</b>		
	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$	Corrélations HMBC
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	4,98 (1H, d, 12,0)	83,4	72,0 ; 128,8 ; 197,2
<b>3</b>	4,55 (1H, d, 12,0)	72,0	83,4 ; 127,8 ; 197,2
<b>4</b>	-	197,2	-
<b>5</b>	-	167,1	-
<b>6</b>	5,93 (1H, d, 6,0)	95,9	167,1 ; 163,9 ; 100,4 ; 94,6
<b>7</b>	-	167,1	-
<b>8</b>	5,88 (1H, d, 6,0)	94,6	167,1 ; 163,9 ; 100,4 ; 95,9
<b>9</b>	-	163,9	-
<b>10</b>	-	100,4	-
<b>1'</b>	-	127,8	-
<b>2'</b>	7,36 (1H, t, 6, 12,0)	128,8	83,4 ; 115,0 ; 128,8 ; 157,8
<b>3'</b>	6,83 (1H, t, 6, 12,0)	115,0	127,8 ; 115,0 ; 157,8
<b>4'</b>	-	157,8	-
<b>5'</b>	6,83 (1H, t, 6, 12,0)	115,0	127,8 ; 115,0 ; 157,8
<b>6'</b>	7,36 (1H, t, 6, 12,0)	128,8	83,4 ; 115,0 ; 128,8 ; 157,8

### II.2.3. Le cycloalcane (cyclitol) VP6

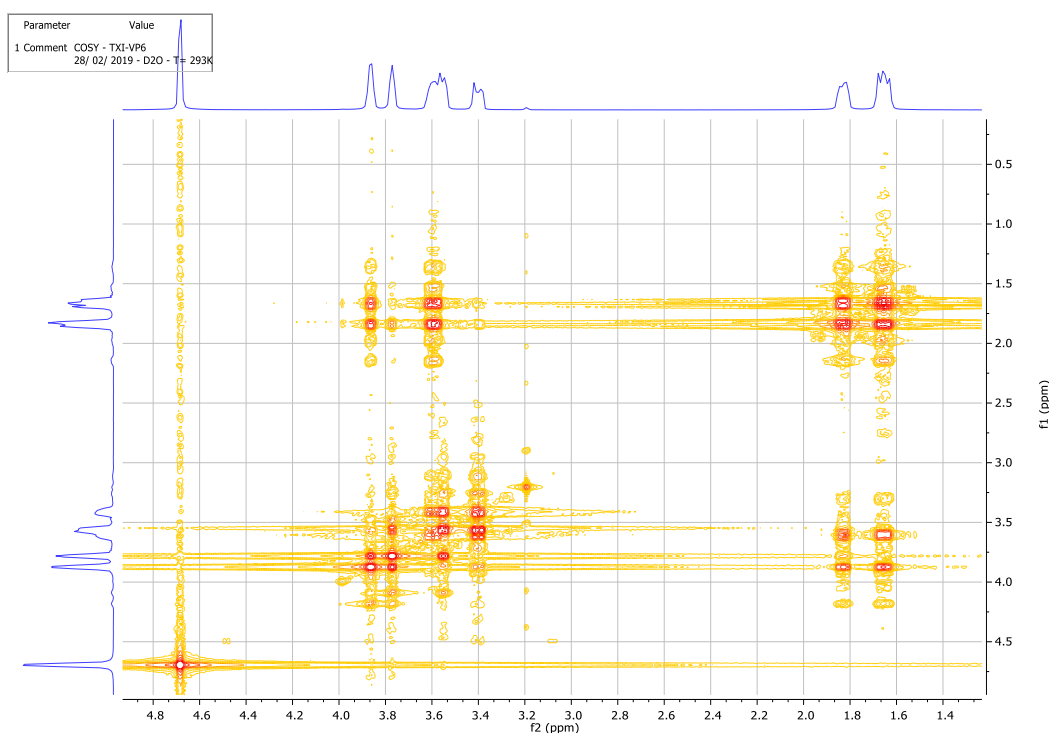
Le composé VP6 a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange acétate d'éthyle-méthanol (7 : 3). Il est soluble dans l'eau, non visible à l'UV ( $\lambda = 254$  et  $366$  nm) et à l'iode.

Sur son spectre RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 600 MHz, figure 74), on observe deux séries de protons à savoir comme entre  $\delta$  3,86 (H-1, m), 3,77 (H-2, t), 3,55 (H-3, dd), 3,40 (H-4, t) et 3,59 (H-5, m) caractéristiques des protons liés aux carbones oxygénés. Et deux protons caractéristiques de protons aliphatiques *sp*<sup>3</sup> liés à un carbone déblindé (C-6) dans la région des champs forts,  $\delta$  1,86 (H-6a, m) et  $\delta$  1,66 (H-6b, m).



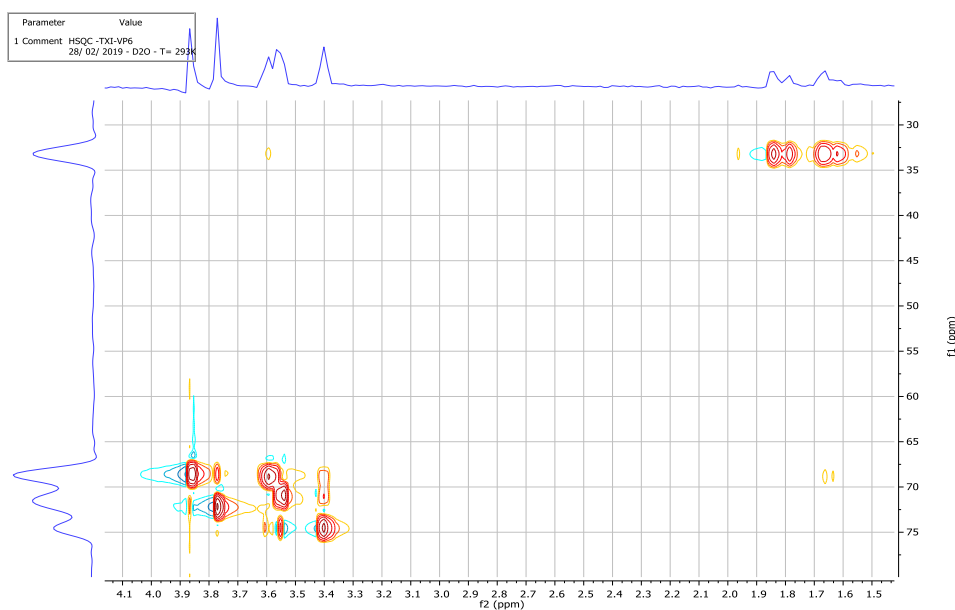
**Figure 75** : Spectre proton du composé VP6.

L'analyse spectrale COSY (figure 76) montre les différentes corrélations  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  entre les protons H-1 ( $\delta$  3,86, m) et H-2 ( $\delta$  3,77, t), H-6 ( $\delta$  1,86 et 1,66, m) ; H-2 ( $\delta$  3,77, t) et H-3 ( $\delta$  3,55, dd) ; H-3 ( $\delta$  3,55, dd) et H-4 ( $\delta$  3,40, t) ; H-5 ( $\delta$  3,59, m) et H-4 ( $\delta$  3,40, t), H-6 ( $\delta$  1,86 et 1,66, m).



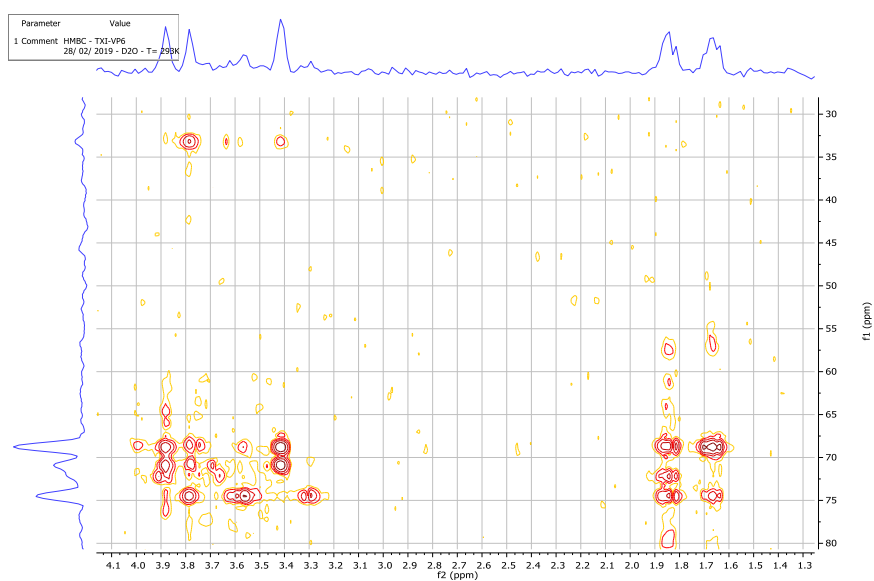
**Figure 76** : Spectre COSY du composé VP6.

L'exploitation minutieuse de spectre HSQC présente des corrélations entre carbone et proton directement lié à des déplacements chimiques suivants : H-1 ( $\delta$  3,86) et C-1 ( $\delta$  68,7) ; H-2 ( $\delta$  3,77) et C-2 ( $\delta$  72,5) ; H-3 ( $\delta$  3,55) et C-3 ( $\delta$  71,5) ; H-4 ( $\delta$  3,40) et C-4 ( $\delta$  74,9) ; H-5 ( $\delta$  3,59) et C-5 ( $\delta$  68,7) ; H-6a ( $\delta$  1,86), H-6b ( $\delta$  1,66) et C-6 ( $\delta$  33,2).



**Figure 77** : Spectre HSQC du composé VP6.

L'expérience HMBC (figure 78, tableau 15) souligne que les protons et carbones suivants corrélient entre eux, par exemples : H-2 ( $\delta$  3,77) avec C-4 ( $\delta$  74,9), C-3 ( $\delta$  71,5) et C-6 ( $\delta$  33,2) ; H-3 ( $\delta$  4,55) avec C-5 ( $\delta$  68,7) et C-1 ( $\delta$  68,7).



**Figure 78** : Spectre HMBC du composé VP6.

L'ensemble de toutes ces données spectrales permet d'assigner au composé VP6 à la structure **131** comme le cyclotol : cyclohexan-1,2,3,4,5-pentanol (Zhang *et al.*, 2014).

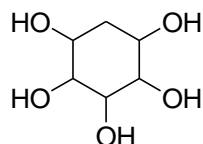


Schéma 40 : Structure du cyclitol **131**.

Tableau 15 : récapitulatif des données spectrales protons, carbones et HMBC du composé VP6.

Position	VP6 <b>131</b> (D <sub>2</sub> O, 600 MHz)		
	$\delta_H$	$\delta_C$	Corrélations HMBC
<b>1</b>	3,86 (1H, m)	68,7	68,7 ; 71,5
<b>2</b>	3,77 (1H, t)	72,5	74,9 ; 71,5 ; 68,7 ; 33,2
<b>3</b>	3,55 (1H, dd)	71,5	68,7 ; 72,5 ; 74,9
<b>4</b>	3,40 (1H, t)	74,9	71,5 ; 68,7 ; 33,2
<b>5</b>	3,59 (1H, m)	68,7	68,7 ; 72,1 ; 74,9
<b>6</b>	1,86 (1H, m), 1,66 (1H, m)	33,2	68,7 ; 72,5 ; 74,9

### II.2.4. L'acide gras VP18

Le composé VP18 a été obtenu sous forme de poudre blanche amorphe dans le mélange Hexane/AcOEt (95 : 5). Il est soluble dans le dichlorométhane et visible à l'UV ( $\lambda = 254$  et  $366$  nm).

Sur son spectre proton réalisé dans le CDCl<sub>3</sub>, les signaux apparaissent tous dans la région du champ fort remarquablement les protons à :

- $\delta$  0,90 un triplet identifiable au groupe méthyle (CH<sub>3</sub>).
- $\delta$  1,20 un amas de pics caractéristique des protons méthyléniques (CH<sub>2</sub>).
- $\delta$  1,65 un quintuplet et  $\delta$  2,36 un triplet à des protons assimilables aux protons en  $\beta$  et  $\alpha$  de la fonction acide carboxylique.

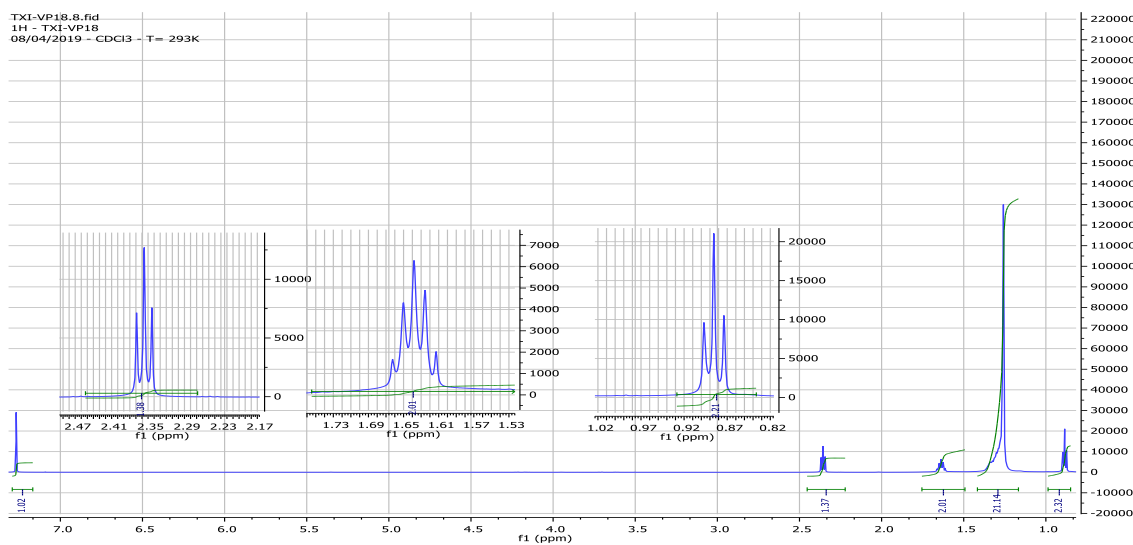
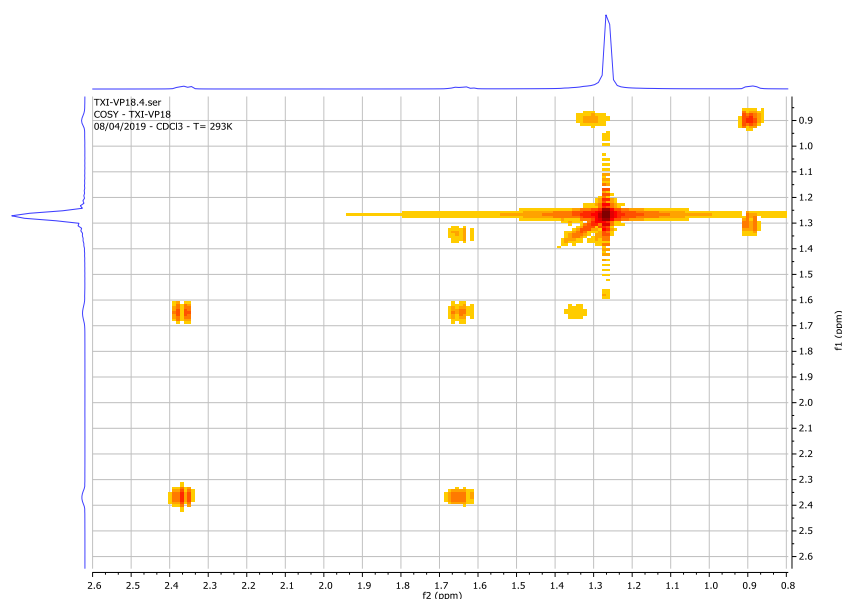


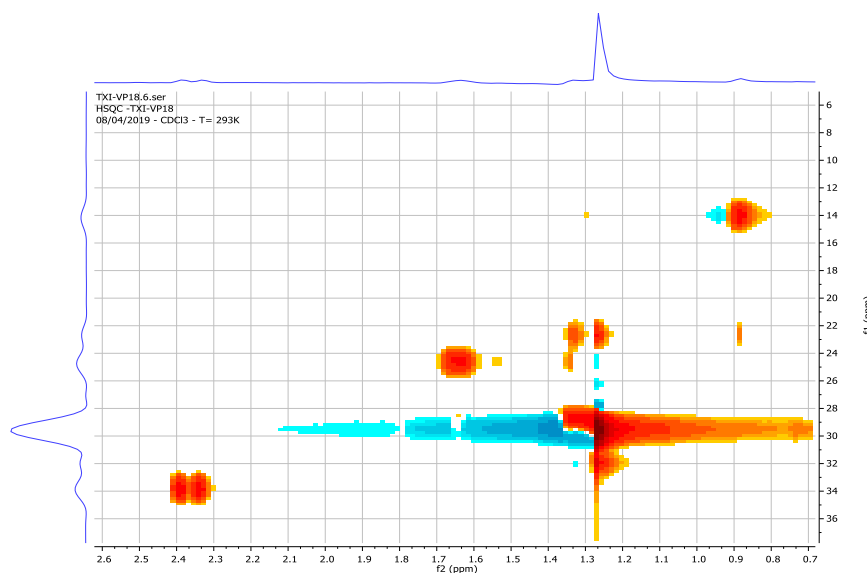
Figure 79 : Spectre proton du composé VP18.

L'expérience COSY met en évidence les corrélations entre les différents protons comme les protons : H-2a ( $\delta$  2,37, d, 12,0 Hz), H-2b ( $\delta$  2,35, d, 12,0 Hz) et H-3a ( $\delta$  1,66, d, 12,0 Hz), H-3b ( $\delta$  1,65, d, 12,0 Hz).



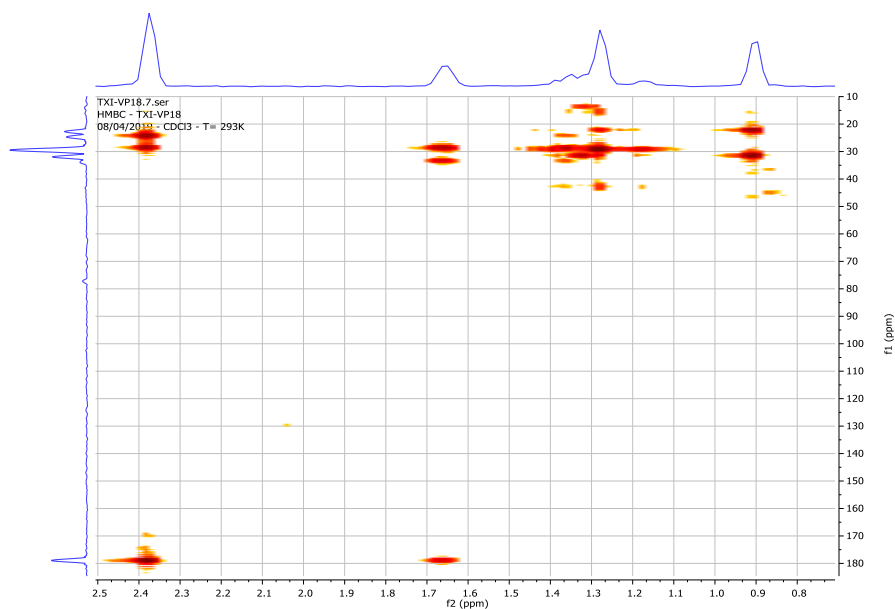
**Figure 80** : Spectre COSY du composé VP18.

L'analyse de son spectre HSQC (figure 81) suivant montre que ces protons et carbones se corrélient entre eux (tableau 16) tels que : H-2a ( $\delta$  2,37), H-2b ( $\delta$  2,35) et C-2 ( $\delta$  34,5) ; H-3a ( $\delta$  1,66), H-3b ( $\delta$  1,65) et C-3 ( $\delta$  24,9) ; H-15 ( $\delta$  0,90) et C-15 ( $\delta$  14,0).



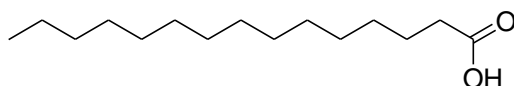
**Figure 81** : Spectre HSQC du composé VP18.

L'analyse spectrale HMBC (figure 82, tableau 16) corrobore bien avec les spectres précédemment exploités. Les protons et carbones suivants corrélient entre eux : H-2a ( $\delta$  2,37), H-2b ( $\delta$  2,35) et C-4 ( $\delta$  29,5), C-3 ( $\delta$  24,9), C-1 ( $\delta$  179,5) ; H-15 ( $\delta$  0,90) et C-14 ( $\delta$  22,0), C-13 ( $\delta$  31,0).



**Figure 82** : Spectre HMBC du composé VP18.

Toutes ces données réunies permettent de caractériser le composé VP18 à la structure **132** qui est celle de l'acide gras saturé principalement dans la graisse de beurre : acide pentadécanoïque.



**Schéma 41** : Structure du composé **132**.

**Tableau 16** : Données spectrales du composé VP18.

Position	VP18 <b>132</b> (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz)		
	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$	Corrélations HMBC
<b>1</b>	-	179,5	-
<b>2</b>	2,37 (1H, d, 12,0) ; 2,35 (1H, d, 12,0)	34,5	29,5 ; 24,9 ; 179,5
<b>3</b>	1,66 (1H, d, 12,0) ; 1,65 (1H, d, 12,0)	24,9	29,5 ; 34,5 ; 179,5
<b>4-12</b>	1,36 (1H, d, 12,0) ; 1,27 (1H, d, 12,0)	29,5	29,5 ; 24,9 ; 179,5
<b>13</b>	1,25 (1H, d, 12,0) ; 1,30 (1H, d, 12,0)	31,0	29,5 ; 22,0 ; 14,0
<b>14</b>	1,20 (2H, d, 12,0)	22,0	29,5
<b>15</b>	0,90 (CH <sub>3</sub> )	14,0	22,0 ; 31,0

## B. COMPOSES DE TRANSFORMATIONS CHIMIQUES

### II.2.5. Caractérisations des composés d'hémisynthèse

#### II.2.5.1. Dérivé du composé VP4-Me (126-méthylation)

Le composé VP4-Me, produit d'hémisynthèse se cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (65%) et fond entre 155-157°C. Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'iode. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption figure 82 à  $\nu_{\max}$  : 3435, 2929, 2871, 1700, 1454 et 1378 de formule brute  $C_{31}H_{51}O_6$  (calc. 519,4). Les spectres RMN  $^1H$  (600 MHz, figure 83) et  $^{13}C$  (150 MHz, figure 84) dans le méthanol deutéré ont montré des caractéristiques similaires avec le composé VP4 du départ. A l'exception, l'apparition de nouveau pic de méthyle à  $\delta$  3,60 (3H, s) sur le RMN  $^1H$  et à  $\delta$  50,7 RMN  $^{13}C$ .

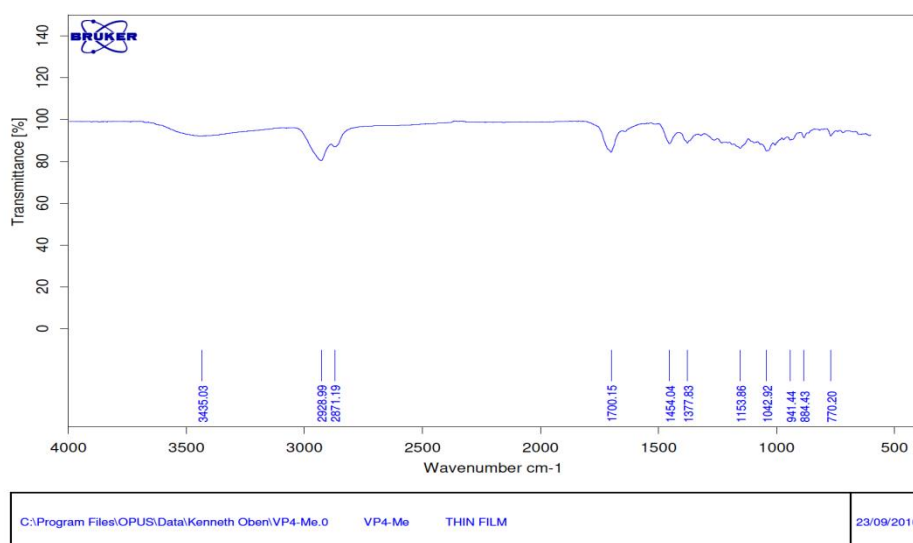


Figure 83 : Spectre IR du composé VP4-Me.

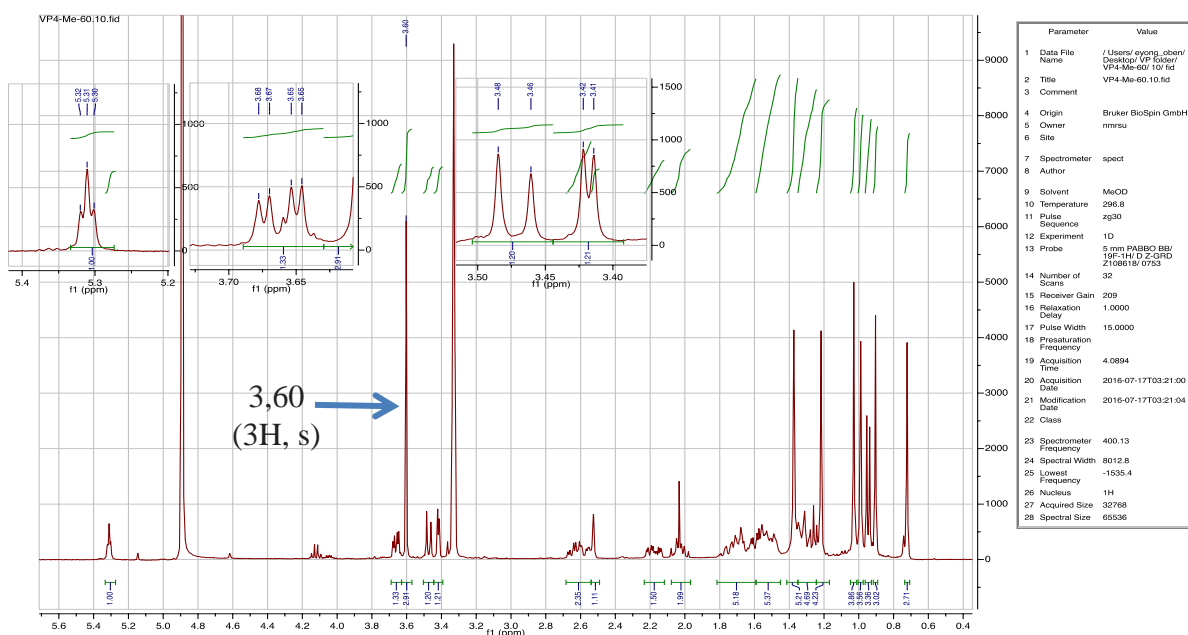
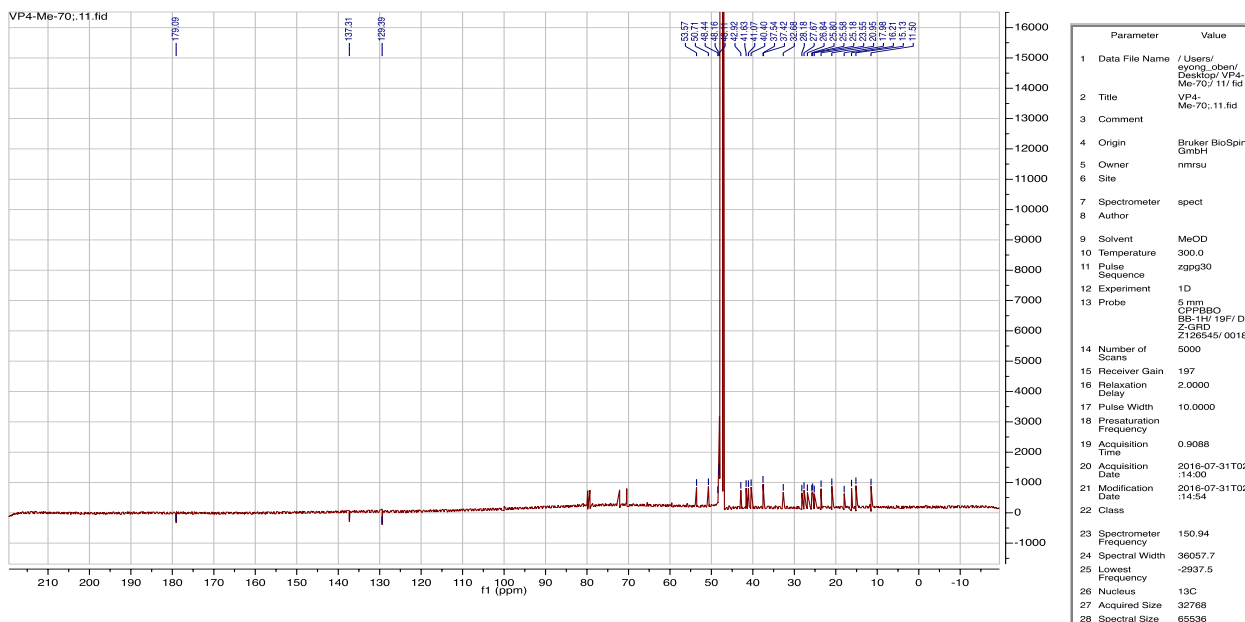


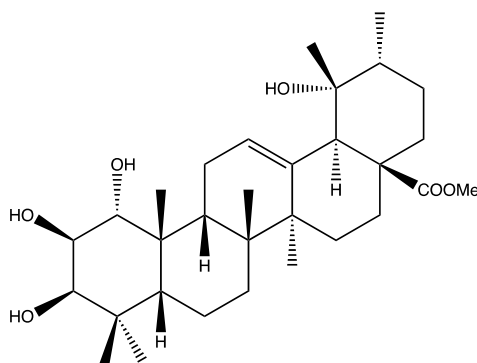
Figure 84 : Spectre RMN  $^1H$  du composé VP4-Me.





**Figure 85** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé VP4-Me.

Toutes ces données permettent de confirmer la méthylation de composé VP4 au composé VP4-Me (**133**) (dérivé).



**Schéma 42** : Structure du composé **133**.

#### II.2.5.2. Dérivé du composé VP5-Me (**127**-méthylation)

Le composé VP5-Me n'est autre que le produit d'hémisynthèse. Il se cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (50%) et fond entre 103-105°C. Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'iode. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption figure 83 à  $\nu_{\text{max}}$  : 3438, 2928, 2873, 1708, 1456 et 1378 de formule brute  $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_5$  (calc. 503.4). Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, figure 86) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, figure 87) dans le méthanol deutéré ont montré des caractéristiques similaires avec le composé VP5 (**127**) du départ. A l'exception, l'apparition d'un nouveau singulet caractéristique de méthyle d'ester à  $\delta$  3,60 (3H, s) sur le RMN  $^1\text{H}$  et à  $\delta$  50,7 RMN  $^{13}\text{C}$ .

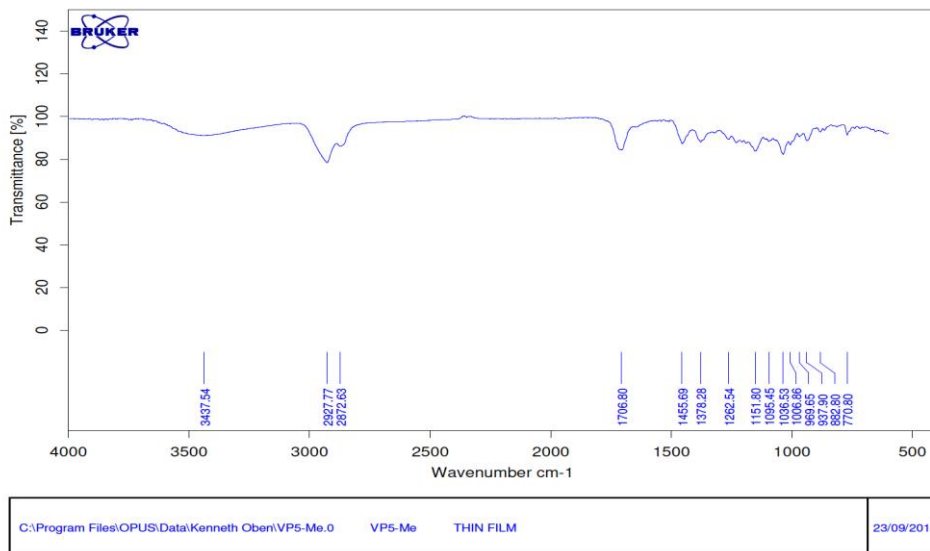


Figure 86 : Spectre IR du composé VP5-Me.

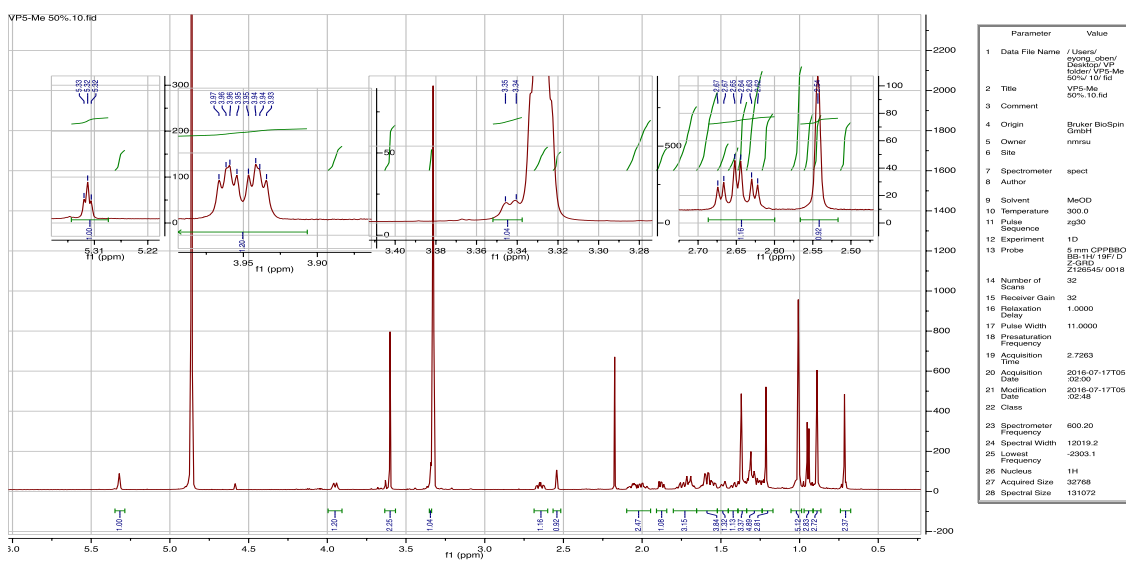


Figure 87 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé VP5-Me.

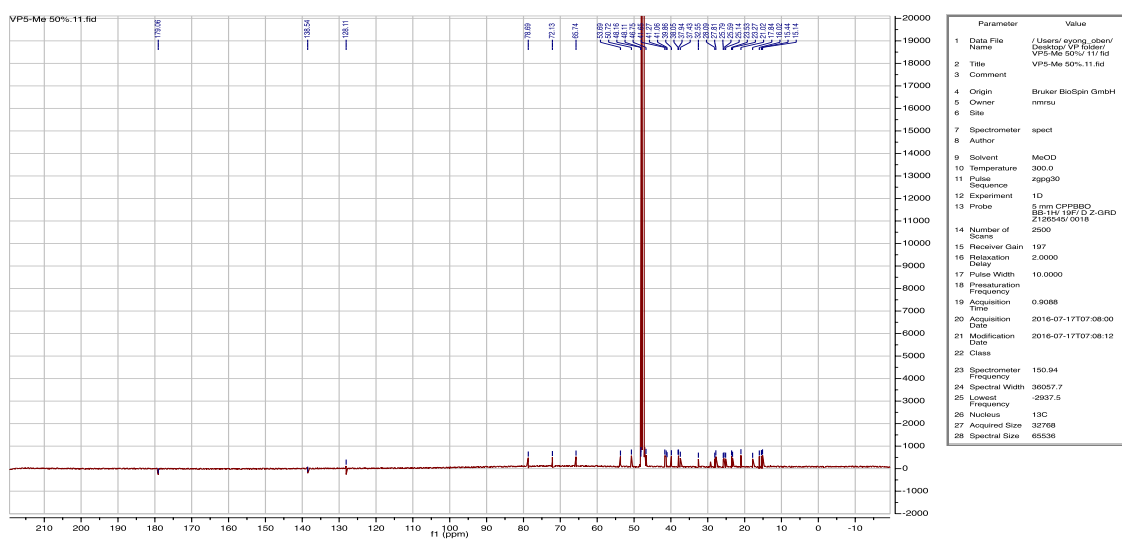
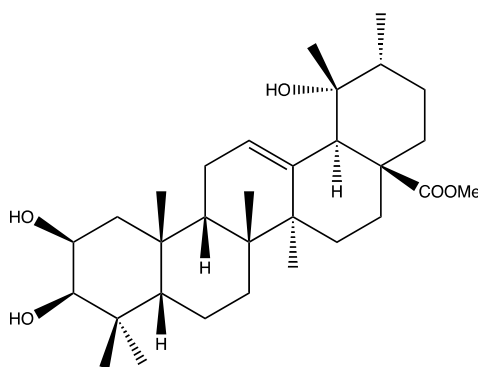


Figure 88 : Spectre <sup>13</sup>C du composé VP5-Me.

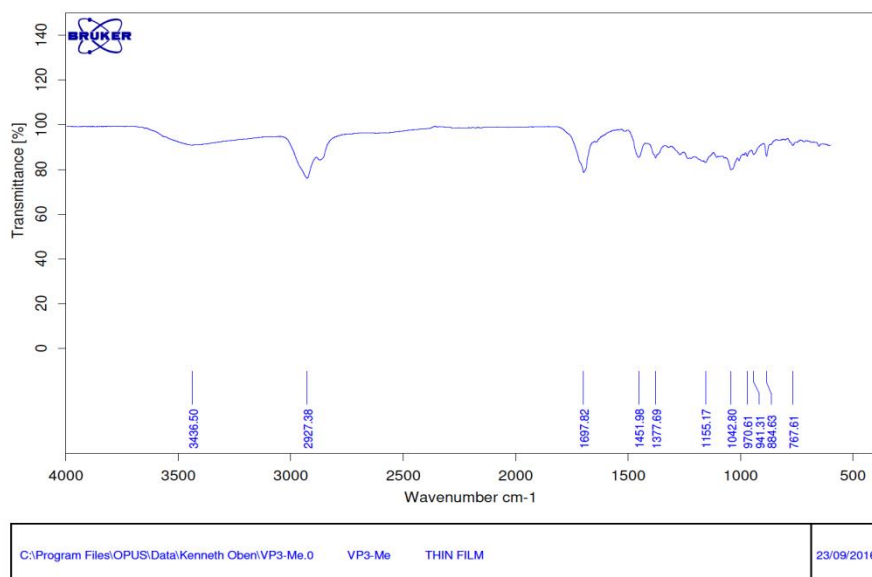
L'ensemble des données spectrales d'assigner au composé VP5-Me à la structure **134** comme le dérivé méthylé du composé VP5 (**127**).



**Schéma 43** : Structure du composé **134**.

### II.2.5.3. Dérivés du composé VP3-Me (Dérivé 1, **91**)

Le composé VP3-Me résulte d'une transformation chimique de l'acide bétulinique. Il se présente sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (20%) et fond entre 205-207°C. Il est soluble dans le dichlorométhane et se révèle à l'iode. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption figure 88 à  $\nu_{\max}$  : 3437, 2927, 1698, 1452 et 1378 de formule brute  $C_{31}H_{51}O_3$  (calc. 471,4). Ses spectres RMN  $^1H$  (600 MHz, figure 89) et  $^{13}C$  (150 MHz, figure 90) dans le dichlorométhane deutéré ont montré des caractéristiques similaires avec l'acide (3 $\beta$ )-3-hydroxylup-20(29)en-28-oïque **91** du départ. Un constat, l'apparition d'un nouveau singulet caractéristique de méthyle d'ester à  $\delta$  3,60 (3H, s) sur le RMN  $^1H$  et à  $\delta$  51,3 RMN  $^{13}C$ .



**Figure 89** : Spectre IR du composé VP3-Me.

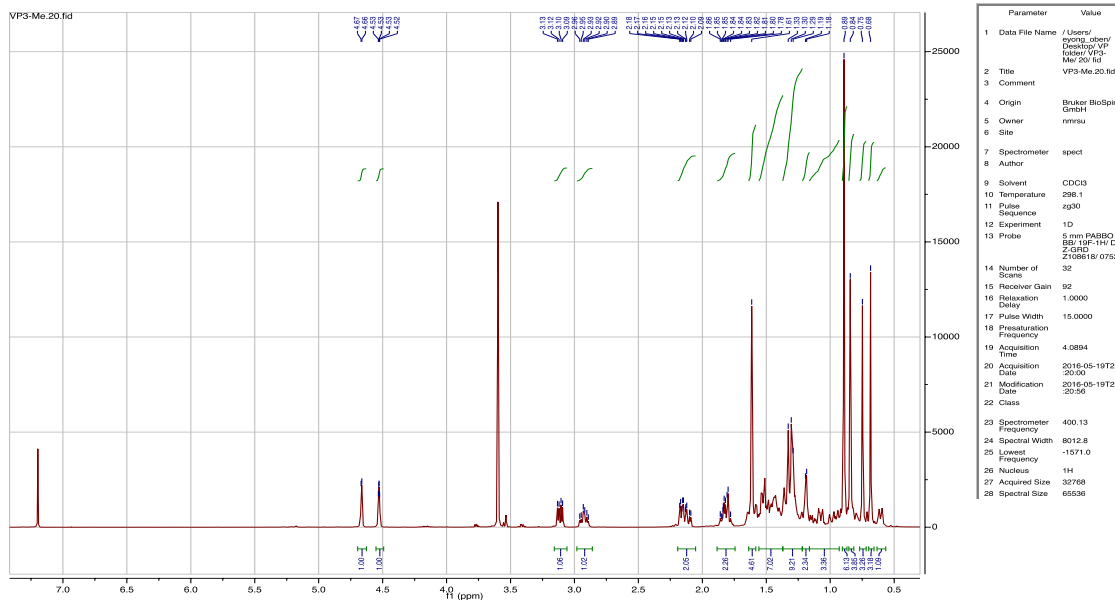


Figure 90 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé VP3-Me.

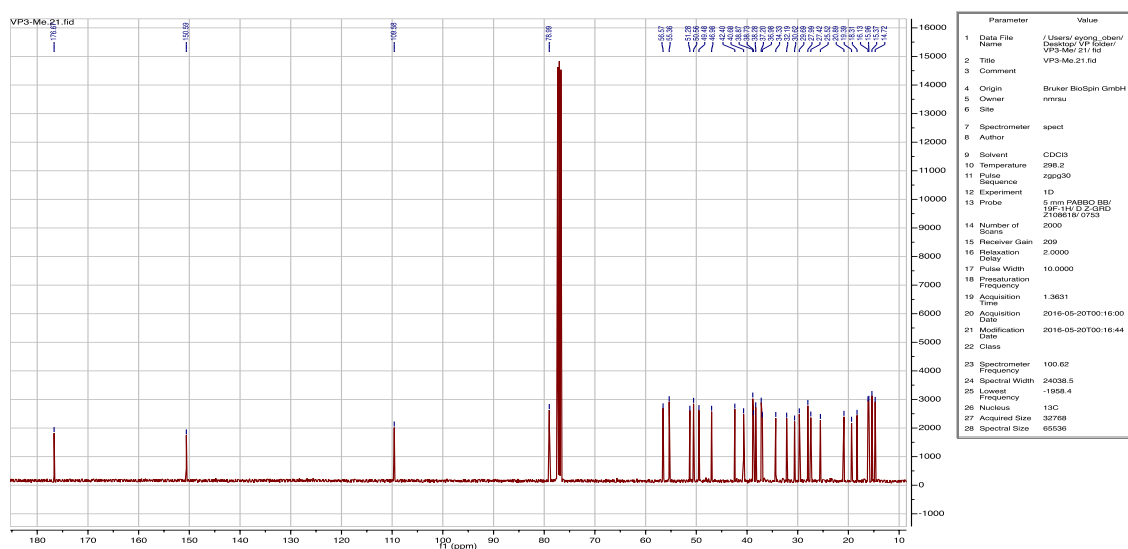


Figure 91 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé VP3-Me.

Toutes ces informations fournies par les différentes données spectrales sont nécessaires et suffisantes d'attribuer au composé VP3-Me à la structure **135**, le dérivé méthylé en position C-28 du composé VP3.

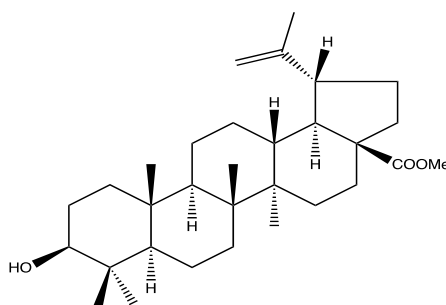


Schéma 44 : Structure du composé **135**.

#### II.2.5.4. Composé VP3-H1 (Dérivé 2, **91**)

Le composé VP3-H1 est le produit du couplage du composé VP3-H (**91**) avec l'anhydride heptanoïque en position C-3. Il présente sous forme de poudre blanche amorphe et soluble dans le dichlorométhane. L'interprétation de son spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz, figure 91) présente des données similaires avec le substrat du départ. A l'exception le blindage de H-3 ( $\delta$  4,48) mais également l'apparition d'un triplet de doublet à  $\delta$  2,99, caractéristique de protons méthyléniques ( $\text{CH}_2$ ) en  $\alpha$  de la fonction ester.

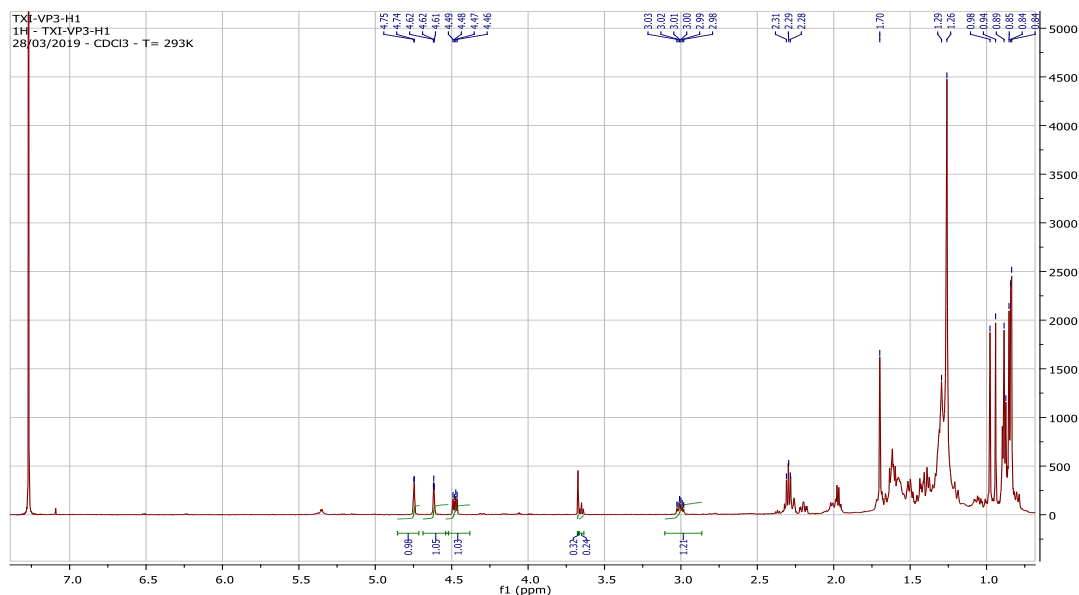


Figure 92 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **136**.

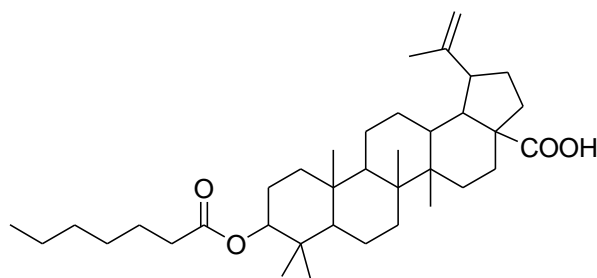
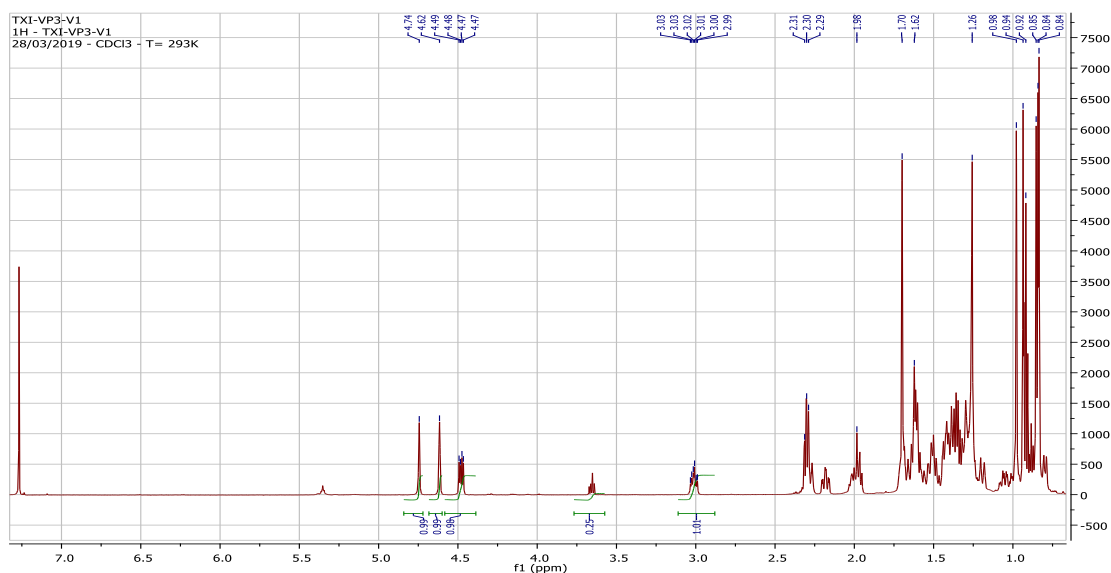


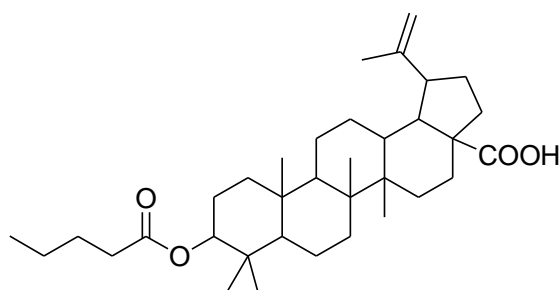
Schéma 45 : Structure du composé **136**.

#### II.2.5.5. Composé VP3-V1 (Dérivé 3, **91**)

Ce composé VP3-V1 est le produit du couplage du composé VP3 (**91**) avec l'anhydride valérique en position C-3. Il présente sous forme de poudre blanche amorphe et soluble dans le dichlorométhane. Les informations fournies par RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz, figure 92) présentent des données similaires avec le composé VP3 (**91**). A l'exception, le proton H-3 est blindé ( $\delta$  4,48) et aussi l'apparition d'un nouveau triplet de doublet à  $\delta$  3,00 suggère la présence d'une fonction ester au sein de la molécule.



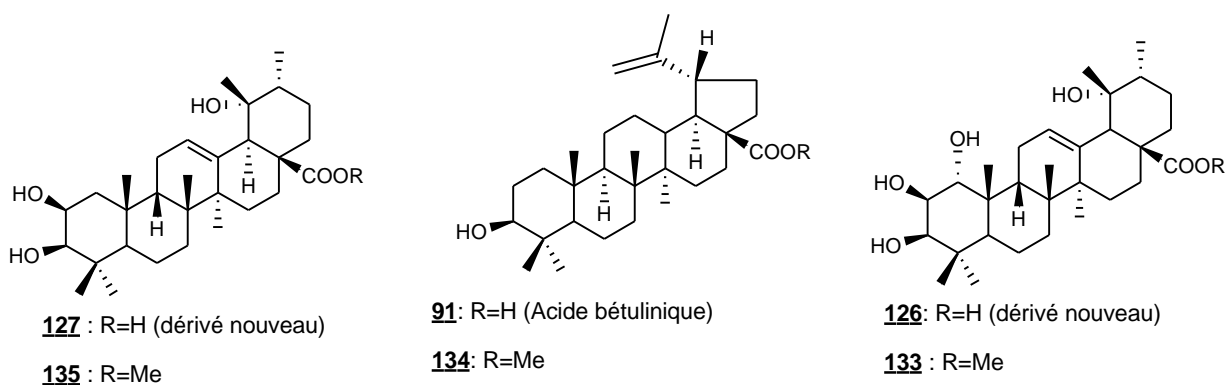
**Figure 93** : Spectre RMN 1H du composé VP3-V1.



**Schéma 46** : Structure du composé **137**.

### II.3. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES TRITERPENES ET LEURS DERIVES

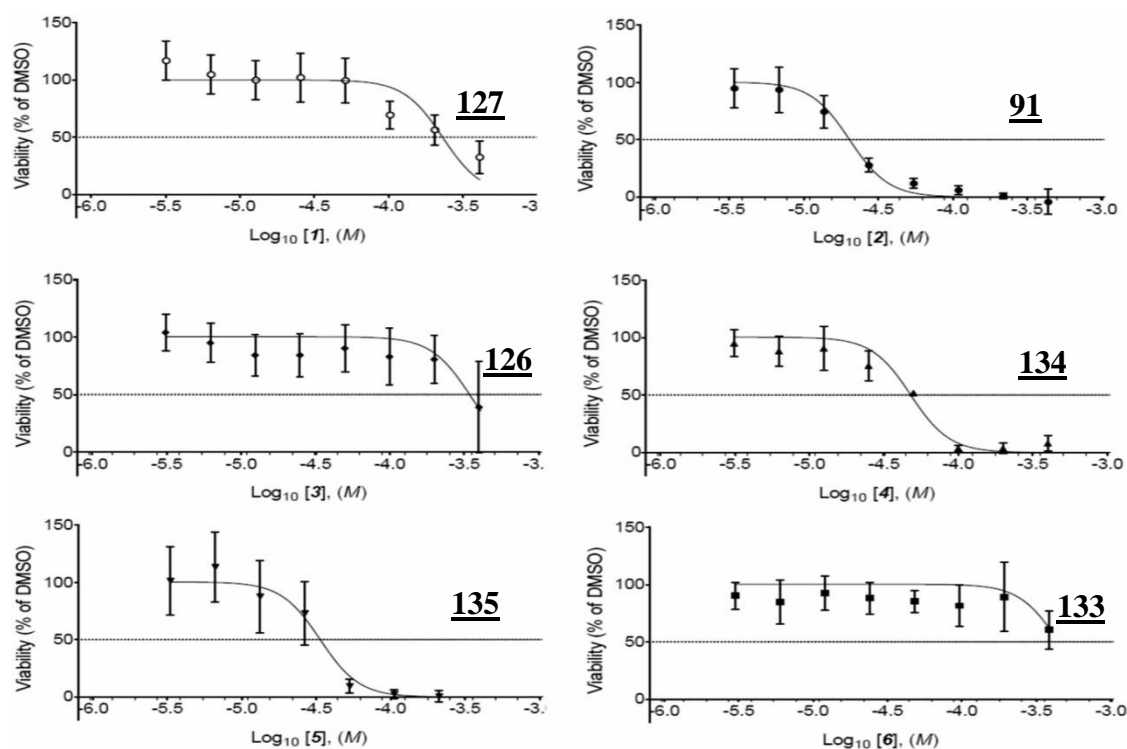
Les triterpènes isolés ont été évalués pour l'activité anticancéreuse sur des souches du cancer du sein. Il en existe de 3 types dépendant des marqueurs : Les tumeurs à l'œstrogène ou à la progestérone, Les tumeurs HER2 positives et Les tumeurs triples négatives (TNBC). Le choix est porté sur ce dernier type (TNBC) car l'absence des marqueurs fait qu'elle est très maligne et son diagnostic est généralement tardif quand la tumeur est déjà à un stade final.



**Schéma 47** : Structures des triterpènes et leurs dérivés estérifiés.

Les résultats de l'activité cytotoxique sur ces triterpènes et leurs dérivés montrent que l'acide bétulinique **91** et les dérivés méthylés (**133**, **134** et **135** estérifiés) sont actifs, figure 94 et tableau 17 ci-après.

Ce gain d'activité observé sur les dérivés estérifiés peut s'expliquer par un des principes de Drug Design qui stipule que, les composés hydrophobes sont plus facilement pénétrables dans les membranes lipidiques cellulaires.

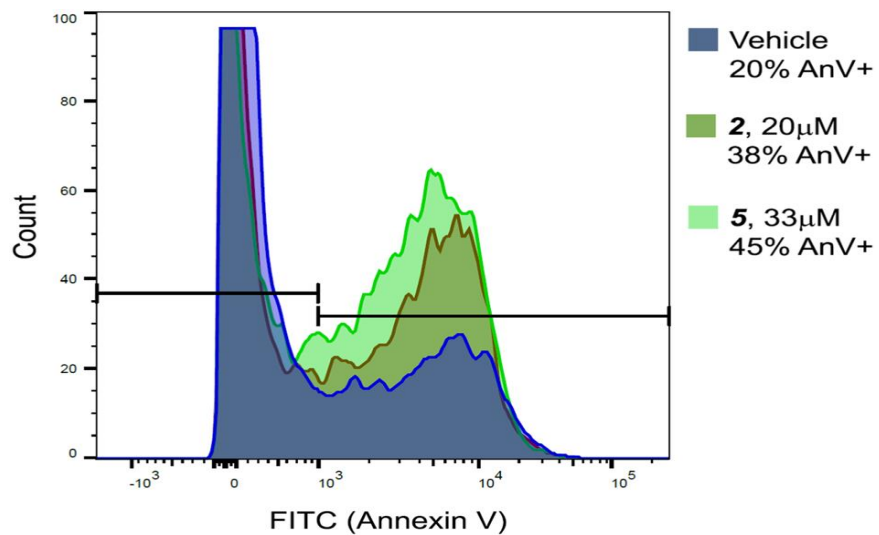


**Figure 94** : Activité cytotoxique des triterpénoïdes sur la cellule cancéreuse de cancer du sein MDA-MB-231 (TNBC).

**Tableau 17** : IC<sub>50</sub> valeurs calculées de figure 93 pour les composés indiqués lors d'une exposition de 3 jours aux cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.

Composés	<b>127</b>	<b>91</b>	<b>126</b>	<b>134</b>	<b>135</b>	<b>133</b>
IC <sub>50</sub> (µM)	230	19,9	63,5	46,7	32,9	43,0
95% confidence intervals (µM)	179-295	17,2-23,1	51,5-78,3	39,8-54,9	24,9-43,4	328-564

Les tests d'efficacité réalisés (**91** et **135**) sur les cellules cancéreuses montrent que ces cellules meurent toutes par induction d'apoptose, c'est-à-dire les cellules sont détruites (figure 94).



**Figure 95** : Induction d'apoptose des triterpènes **91** (2) et **135** (5).



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nous avons dans cette thèse procédé à l'étude phytochimique des racines, graines et écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* de la famille des Sapotaceae, à l'évaluation d'activités antineurodégénérative et cytotoxique, et entrepris quelques transformations chimiques de certains composés isolés.

A l'heure actuelle, l'humanité se heurte aux maladies neurodégénératives et cancers. Bien que le taux de prévalence de ces maladies soit en croissance perpétuelle, chimistes et cliniciens creusent chaque jour davantage pour une solution alternative dans ce sens.

L'étude bioguidée est envisagée sur *Vitellaria paradoxa*. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) révèle que l'extrait brut au méthanol des écorces du tronc est riche en composés polyphénoliques. Les tests biologiques réalisés sur l'extrait brut au méthanol, et sur les extraits fractionnés notamment l'extrait à l'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux ont montré une activité anti-inflammatoire intéressante.

En effet, l'extrait brut au méthanol des écorces de tronc a permis de soigner les rats souffrants de polyarthrites. Cette activité diminue lorsqu'on soumet les mêmes rats malades aux extraits à l'acétate d'éthyle et aqueux. L'extrait épuisé à l'acétate d'éthyle est plus actif que celui à l'extrait aqueux et a été purifié par les différentes méthodes chromatographiques permettant d'obtenir seize composés dont dix sont entièrement caractérisés. De ces dix composés, on dénombre cinq triterpènes, trois flavonoïdes, un cyclitol et un acide gras. Parmi ces différents composés, deux sont des dérivés triterpènes nouveaux notamment l'acide  $1\alpha,2\beta,3\beta,19\alpha$ -tetrahydroxyurs-12-en-28-oïque **126** et l'acide  $2\beta,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oïque **127**. L'activité cytotoxique des triterpènes de *Vitellaria paradoxa* en général et en particulier, de ces nouveaux dérivés a été explorée.

Les résultats de l'activité cytotoxique sur les triterpènes isolés **91**, **126**, **127** et leurs dérivés **133**, **134**, **135** montrent que l'acide bétulinique **91** et les dérivés méthylés (estérifiés) sont plus actifs. Cette amélioration d'activité observée sur les dérivés estérifiés peut s'expliquer par un des principes de Drug Design qui stipule que, les composés hydrophobes pénètrent facilement dans les membranes lipidiques cellulaires. On remarque que les cellules affectées par l'acide bétulinique **91**, meurent toutes par apoptose, un mécanisme complexe de mort cellulaire programmée. Cela appuie l'hypothèse que la mitochondrie est le site d'action du composé. Elle permet, en effet, de sélectionner et d'éliminer les cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme, les cellules surnuméraires et les cellules dysfonctionnelles (Pisha, E. *et al.*, 1995). Il est intéressant de noter que des souris saines ont été traitées avec de très fortes doses d'acide bétulinique **91** sans observer une quelconque toxicité. La forte activité antitumorale de l'acide bétulinique **91** a motivé l'équipe de chercheurs à protéger l'utilisation de ce composé et à synthétiser certains dérivés (Genet *et al.*, 2010, Das Gupta, T.K. et Pezzuto, J. M., 1997; Pezzuto, J. M. *et al.*, 1999a et Pezzuto, J. M. *et al.*, 1999b). La co-solvation du **91** est aussi amorcée, l'exemple de DMSO permettant d'augmenter l'hydrosolubilité de 30 à 50 et

l'activité antitumorale de 1,5 à 3 de l'acide bétulinique (Jeong, H. J. *et al.*, 1999) voire la vectorisation.

Pour la suite de nos travaux, nous envisageons de :

- identifier et caractériser les autres composés ;
- récolter, extraire et purifier les extraits à l'acétate d'éthyle des écorces de tronc dans le but d'obtenir les quantités analysables de certains composés et aussi sur les fractions non purifiées ;
- soumettre les différents composés décrits au criblage biologique par rapport à l'activité anti-inflammatoire ou antineurodégénérative ;
- expliciter le mécanisme d'action des composés actifs par rapport à leur activité cytotoxique ;
- déterminer la configuration absolue du composé **127** ;
- une dérivatisation plus poussée de ces triterpénoïdes pourrait conduire à une meilleure compréhension des relations structure-activité pour cette classe de produits naturels ;
- faire un screening supplémentaire contre une plus large gamme de lignées cellulaires cancéreuses pour révéler une utilité supplémentaire de ces composés en tant que leads ;
- rechercher les récepteurs cellulaires putatifs et la compréhension au niveau moléculaire de leur mode d'action.

## **CAPITRE III : ETUDE EXPERIMENTALE**

### **III.1. MATERIEL ET METHODES**

#### **III.1.1. Appareillage**

Tous les points de fusion sont mesurés sur un appareil de marque Electrothermal 9100 (Max 400°C).

Une balance électronique de marque Sartorius, type 1265001 a été utilisée pour effectuer les pesées tout au long de notre étude expérimentale.

Les spectres RMN ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de type BRUKER (Photographie 2) en utilisant comme solvant le MeOH deutéré (CD<sub>3</sub>OD) à des fréquences de l'ordre de 500 à 600 MHz pour la RMN<sup>1</sup>H et 125 à 150 MHz pour la RMN<sup>13</sup>C.

Les chromatogrammes sur couche mince (CCM) sont réalisés sur plaques constituées de feuilles d'aluminium et plastique de dimension 20 x 20 Cm et recouvertes d'environ 0,2 mm d'épaisseur de silice G60, de type 254 MERCK. Ces plaques ont été développées dans les cuves contenant un système hexane/acétate d'éthyle de polarités variées. La détection des composés aux cours des différentes CCM a été faite soit par visualisation des plaques à la lampe UV ( $\lambda = 254 ; 366$  nm), soit par pulvérisation des celles-ci par des réactifs spécifiques (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué, des vapeurs d'iode et autres). La concentration des fractions a été faite sous pression réduite au moyen des évaporateurs rotatifs (rotavapors) de type Heidoph VV2000.

Les colonnes en verre de dimensions 1 à 5 cm de diamètre et 32 à 86 cm de hauteur ont servi valablement de réaliser les chromatographies sur colonne sous pression atmosphérique. Le gel de silice utilisé pour la chromatographie sur colonne est de fabrication MERCK a pour la granulométrie 0,025-0,06 mm.

L'appareil CAMAG a permis de réaliser la plaque préparative de CCM pour la purification des composés et le gel de silice utilisé est de type 0,02 mm de granulométrie.

L'appareil BÜCHI Recirculating Chiller B-740 réglable nous a aidé de faire circuler l'eau à une température désirée dans les réfrigérants des dispositifs et la pompe de type BÜCHI, VAC<sup>®</sup> V-500 servant de concentrer sous pression réduite.



**Photographie 2** : Appareil de résonance magnétique nucléaire (BAIRY, 2019, Bordeaux, France).

### **III.1.2. Matériel végétal**

Les écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* ont été récoltées à Garoua dans la région du Nord Cameroun, en juillet 2012. La plante a été identifiée par Monsieur Jean Paul BAMBA, Taxonomiste à l'Herbier de l'Ecole de Faune de Garoua, en comparaison avec un échantillon enregistré sous le numéro HEFGN 6276.

Aussi les racines, les graines et écorces de tronc ont été récoltées en République Centrafricaine. Les racines ont été récoltées à PK27 route de Boali dans la préfecture de l'Ombella MPoko. Les écorces de tronc au quartier Ngakassa en octobre 2016, dans la sous-préfecture de Bimbo aux environs de l'aéroport international de Bangui M'Poko. Tandis que les graines sont achetées directement sur le marché à Bossangoa (RCA), ville située à 305 Km de la capitale. La sous-préfecture de Bossangoa, chef-lieu de la préfecture de l'Ouham abonde le karité. Ces différents organes sont identifiés et enregistrés au Centre d'Etudes et de Recherche sur la Pharmacopée et la Médecine Traditionnelles Africaines (CERPHAMETA) à l'Université de Bangui sous le numéro N°054/UB/CER/D.16.

Ces essences végétatives sont séchées à l'ombre au laboratoire pour une durée de 14 à 21 jours. Elles ont été pulvérisées en vue d'éviter les moisissures.



Jeune pied de karité



racines



Tronc d'arbre



feuilles, fruit et graines



graines

**Photographie 3** : Racines, graines et écorces de tronc de karité (2012 et 2016)

### III.1.3. L'extraction

Trois techniques d'extraction ont été utilisées pour extraire les poudres de *Vitellaria paradoxa* : le bain ultrason, le Soxhlet et la macération. Les racines, les graines et écorces ont été séchées au laboratoire, découpées et broyées le même jour après le séchage. Les poudres obtenues ont été extraites séquentiellement et/ou successivement à polarité croissante : l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol ou n-butanol et à l'eau.

#### III.1.3.1. Le bain ultrason ou le sonicateur

500g de poudre (écorces) sont introduits dans un erlenmeyer de 2 litres. Le contenu est additionné d'un (1) litre de solvant et porté dans le sonicateur (photographie 4). Le temps d'extraction est fixé entre 30 à 120 minutes. La température est contrôlée, inférieure ou égale à 40°C. L'arrêt automatique de l'appareil, le contenu d'erlenmeyer est filtré et évaporé à l'évaporateur rotatif sous pression réduite à 40°C. Les résidus obtenus constituent l'extrait brut. Cette opération est répétée 3 à 4 fois jusqu'à l'épuisement total de poudre. Les résidus sont repris par un autre solvant après séchage sous la hotte et l'élimination complète des traces du solvant précédent (3,5 Kg extraits pendant 4 jours).



**Photographie 4** : Le bain ultrason (le sonicateur).

### III.1.3.2. Le Soxhlet

Généralement, on utilise du méthanol à chaud. 100 g de poudre (écorces) a été introduit dans une cartouche et placée dans l'appareil de Soxhlet. Cette quantité a été extraite avec un (1) litre de méthanol. Après cinq (5) siphonages, la solution devient limpide. Le contenu du ballon est concentré au rotavapor à 40°C. Au total 3,5 Kg de poudre ont été extraits pendant 12 jours (300 g/jour). Les extraits recueillis et réduits après l'évaporateur rotatif sous pression réduite ont conduit à l'extrait brut au méthanol. Ce dernier est partitionné (fractionné) à polarité croissante, successivement à l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol ou au n-butanol et la phase aqueuse est lyophilisée pour donner respectivement les extraits fractionnés : VPHE (m = 120 g), VPEE (m = 140 g), VPME (m = 530,4 g) et VPAE (m = 80 g).

### III.1.3.3. La macération à température ambiante (72 heures)

3,5 Kg de poudre sont extraits (écorces) par le mélange méthanol/dichlorométhane (1 : 1) pendant 72 heures à 25°C dans un récipient à verre fermé. Le contenu du récipient est filtré sur papier filtre et évaporé constitue l'extrait brut. L'action est répétée 3 fois (72 heures X 3), soit 9 jours. Les extraits recueillis et réduits après l'évaporateur rotatif sous pression réduite ont conduit à l'extrait brut au méthanol/Chlorure (m = 192,3g). Ce dernier est partitionné à polarité croissante, successivement à l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol ou au n-butanol et la phase aqueuse est lyophilisée pour donner respectivement les extraits fractionnés : VPHE (m = 22g), VPEE (m = 22,6g), VPME (m = 17g) et VPAE (m = 27g).

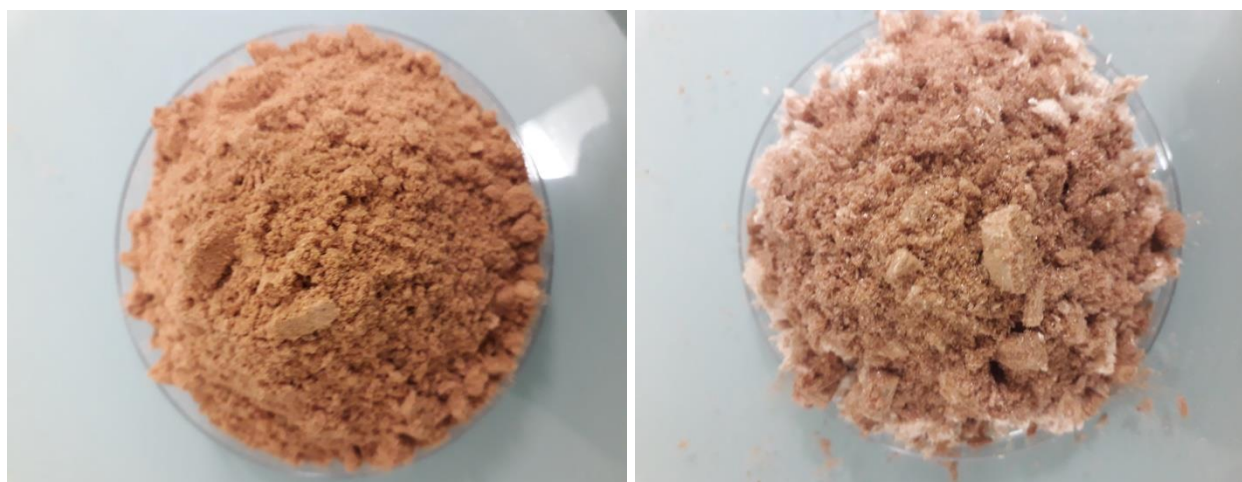
### III.1.3.4. La macération avec agitateur mécanique

1,5 Kg de poudre des écorces de tronc sont extraits avec 7,5 litres de n-heptane (délipidation) dans un gros bûcher de 10 litres en utilisant un agitateur mécanique pendant 2 heures à température ambiante. Le contenu du récipient est filtré sur coton/linge puis sur papier filtre. Le filtrat est évaporé sous pression réduite à 39°C. Cette manipulation est reprise 3 fois avec les résidus pour donner 19,18 g

d'extrait à n-heptane. Les résidus sont séchés sous la hotte toute la nuit. L'extrait au méthanol est amorcé le lendemain.

L'extraction au méthanol : Après la délipidation de 1,5 Kg, les résidus séchés sont repris avec 5 litres de méthanol. Même opération avec n-heptane, cependant, l'extrait total au méthanol est réduit considérablement en un volume de 100ml. Ce volume est transvasé dans une éprouvette de 1000 ml et ajusté d'eau à 900 ml. Le contenu est ensuite transvasé dans l'ampoule à décanter (2000 ml) et partitionné avec 900 ml d'acétate d'éthyle. Après l'épuisement total, la phase organique (acétate d'éthyle) est évaporée sous pression réduite à 39°C (réglage de pression automatique). Un volume réduit est ajouté de 50 ml d'eau et évaporé à nouveau pour éliminer complètement l'acétate d'éthyle. Enfin, le ballon est refroidi dans l'azote liquide pour le congeler et lyophilisé pendant 4 jours pour donner l'extrait à l'acétate d'éthyle,  $m = 16,4$  g (Photographie 5).

La phase aqueuse ( $m = 30,7$  g) quant elle, est passée à l'évaporateur à 40°C dans l'objectif d'éliminer les traces de l'acétate d'éthyle mais également de réduire le volume de la phase aqueuse avant de la congeler et de la lyophiliser.



Extrait Acétate d'éthyle

Extrait aqueux

**Photographie 5** : Les extraits à l'acétate d'éthyle et aqueux (2019)

Les différents extraits ont subi une chromatographie sur couche mince analytique (tableau 18) avant d'être exécutés à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS), passés à l'étude des propriétés respectives d'anti-inflammatoires et chromatographiés sur colonne.

**Tableau 18** : Profil chromatographique des extraits des écorces

Extraits	Eluants	Observations sur les chromatogrammes
MeOH	Hex/AcOEt (90 : 10)	3 taches + traînées
Hexane	Hex/AcOEt (95 : 5)	4 taches
AcOEt	Hex/AcOEt (90 : 10)	7 taches
Aqueux	Hex/AcOEt (90 : 10)	2 taches + traînée

## **III.2. ETUDES DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DES EXTRAITS DES ECORCES DE TRONC DE *VITELLARIA PARADOXA* CHEZ LES RATS ALBINOS**

### **III.2.1. Matériel animal**

Les effets anti-inflammatoires de *Vitellaria paradoxa* ont été évalués chez les rats blancs de souche Swiss albinos de sexe féminin (Photographie 6). Ces animaux âgés de 3 mois environ et pesant entre 150 et 300 g, ont été préalablement élevés à l'Animalerie de l'Ecole Normale Supérieure de Maroua Cameroun dans les conditions de température ambiante et d'aération suffisante. Leur alimentation était composée de 34 Kg de maïs, de 4 Kg de farine de soja, 6 Kg de tourteaux de coton, 5 kg de poudre de poisson, 1 Kg de poudre d'os et 1,5 Kg de sel de cuisine, soit un mélange de 51,5 Kg pour une valeur nutritionnelle de 56,62% de glucides, 18,68% de protéides, 10,6% de lipides, 12,1% de sels minéraux et 2% de vitamines. La préparation de l'aliment consistait à macérer chaque jour une quantité suffisante de ce mélange avec un peu d'eau, à former des boules et à les déposer au-dessus des cages. L'eau de boisson était servie à volonté dans des biberons.



**Photographie 6** : Rats blancs de souche Swiss albinos de sexe féminin



### III.2.2. Evaluation des propriétés anti-inflammatoires

Les extraits à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol ou n-butanol (VPEM) et aqueux ont été étudiés pour les propriétés anti-inflammatoires sur les rats blancs de souche Swiss de sexe féminin (*in vivo*).

#### III.2.2.1. Inflammation aigüe induite par la carragénine (Saha *et al.* ; 2011)

Le modèle décrit par Saha *et al.* (2011) a été utilisé. Les rats ont été répartis en cinq lots de cinq animaux chacun. Les rats du premier lot ont été traités au DMSO 10% (10 mL/Kg ; *p.o*), ceux du deuxième lot au diclofénac de sodium (10 mg/Kg *p.o*) et ceux des neuf derniers lots aux différents extraits de *Vitellaria paradoxa* de différentes doses (75, 150 et 300 mg/Kg), à raison de 3 lots par type d'extrait. Une heure après ce traitement, l'œdème de la patte a été induit par injection de 0,1 ml de carragénine (1%) sous l'aponévrose plantaire gauche de tous les animaux. L'augmentation du volume de la patte gauche a été mesurée 30 minutes après l'induction de l'inflammation, puis toutes les heures et ce pendant 6 heures à l'aide du pied à coulisse électronique de marque « Fischer scientific » (Photographie 7). La patte enflée a été prise entre les deux dents du pied à coulisse préalablement ouvertes et refermées sur elle. La taille de l'œdème est lue sur le cadran digital du pied à coulisse.



**Photographie 7** : Pied à coulisse électronique.

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation a été calculé suivant la formule :

$$PI (\%) = (1 - V / V_t) \times 100$$

V = Volume moyen de l'œdème de la patte des rats traités au diclofénac ou à l'extrait.

V<sub>t</sub> = Volume moyen de l'œdème de la patte des rats traités uniquement à une solution de DMSO 10%.

### III.2.2.2. Inflammation chronique induite par l'adjuvant complet de Freund (Foyet *et al.*, 2011)

Six groupes de 5 animaux chacun ont été utilisés et divisés en 2 grands groupes répartis comme suit :

A) Un lot dit normal où les animaux ne subissent aucune injection d'adjuvant complet de Freund mais sont traités à la solution de DMSO 10%.

B) Les animaux ayant reçu par injection sous l'aponévrose plantaire de 0,1 mL d'adjuvant complet de Freund et subdivisés en 5 lots comme suit :

- un lot témoin traité à la solution de DMSO 10%, 10 mL/Kg *p.o* ;
- neuf lots essais recevant par voie orale l'extrait au méthanol, l'extrait à l'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux des feuilles de *Vitellaria paradoxa* aux doses de 75, 150 et 300 mg/Kg ;
- un lot témoin positif recevant par voie orale le diclofénac à la dose de 4 mg /Kg.

Les jours 0, 4, 7, 10, 12, 14, 19, 21, 24 et 28, le poids corporel des animaux a été mesuré et l'activité antiarthritique de *Vitellaria paradoxa* a été évaluée grâce aux paramètres suivants : le diamètre de l'articulation, le temps de latence face au stimulus thermique, le score de l'arthrite.

Au 28<sup>ème</sup> jour, le sang des animaux a été collecté après sacrifice des animaux par overdose du phentobarbital. Les analyses suivantes ont été réalisées : la détermination du taux de globules blancs, la détermination du taux globules rouges, la détermination du taux d'hémoglobine. Des coupes histologiques du tissu suivants ont été réalisées : le cartilage hyalin, le tissu cutané et le tissu osseux, le poids des organes lymphoïdes (rate, foie, thymus) a été mesuré.

### III.2.2.3. Mesure de la taille de l'arthrite

La taille de l'arthrite a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse électronique. L'articulation de la patte enflée a été prise entre les deux dents du pied à coulisse préalablement ouvertes et refermées sur elle. Le diamètre ou la taille de l'articulation est lu sur le cadran digital du pied à coulisse.

### III.2.2.4. Détermination du score de l'arthrite

Les modifications morphologiques telles que la rougeur, le gonflement et les érythèmes ont été évaluées visuellement et par attribution des scores selon les critères du tableau 10 ci-dessous (Patil *et al.*, 2012).

**Tableau 19** : Score de l'arthrite en fonction de la morphologie de la patte infectée

<b>Morphologie</b>	<b>Scores</b>
Patte normale (pas de gonflement, ni d'érythème)	0
Faible gonflement et d'érythème confiné au niveau des doigts	1
Gonflement et d'érythème au niveau des doigts	2
Gonflement sévère et d'érythème	3
Grosse déformation et impossibilité d'utiliser la patte	4
Le score maximal	8

#### III.2.2.5. Mesure du poids des animaux

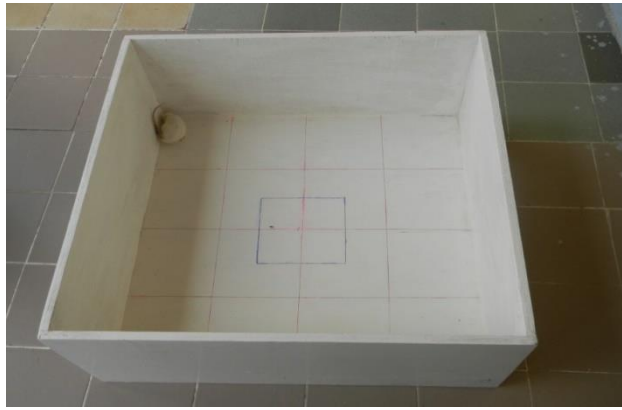
Chaque animal a été pesé sur une balance à précision de marque « Precisa 12000 D SCS » (Photographie 8 ci-après). Chaque animal était placé au centre du plateau de la balance et son poids s'affichait automatiquement sur le cadran de l'appareil.



**Photographie 8** : Balance de précision.

#### III.2.2.6. Mesure de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice a été mesurée par le test du labyrinthe à champ ouvert illustré dans la photographie 9 ci-dessous. Chaque animal était placé au centre de l'arène et laissé pendant 5 minutes. Le nombre de lignes traversées (mouvement horizontal) et le nombre de dressage ont été pris comme indicateurs de l'activité locomotrice des animaux. Ce test permet de mesurer non seulement l'activité locomotrice des animaux, mais également le comportement anxiolytique.



**Photographie 9** : Un rat dans un labyrinthe à champ ouvert

### III.2.2.7. Mesure de l'effet nociceptif

Nous avons utilisé une plaque chauffante constituée d'un bain marie maintenue à  $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  au-dessus duquel était posé un plateau métallique ne permettant pas à l'animal de se soustraire de l'arène (photographie 10). Chaque animal a été déposé sur la plaque et le seuil de la douleur a été déterminé par le temps de latence de la réponse algésique (retrait ou léchage de la patte douloureuse). Un « cut-off » time de 15 secondes a été observé pour tous les sujets.



**Photographie 10** : Dispositif de plaque chauffante

### III.2.2.8. Mesure du poids des organes

A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Quelques organes lymphoïdes (thymus, rate, foie) ont été prélevés sur chaque animal et pesés.

### III.2.2.9. Détermination des paramètres sanguins

Quelques paramètres hématologiques (taux de globules blancs (WBC), taux de globules rouges (RBC), taux d'hémoglobine (Hb)) ont été évalués à partir du sang recueilli dans des tubes à NFS de 5 ml contenant un anticoagulant, l'EDTA K3. Ces paramètres ont été déterminés grâce à l'automate d'hématologie de marque « Sysmex KX -21 N » dont le principe est basé sur la variation d'impédance (principe Coulter) qui est la mesure de la variation de résistance électrique au passage d'une cellule : le liquide de dilution étant plus conducteur que ne sont les cellules, chaque passage correspond à une baisse de conductivité électrique. La chute de tension électrique est proportionnelle à la taille de la cellule.



**Photographie 11** : Automate d'hématologie

### III.2.2.10. Réalisation des coupes histologiques

Les coupes histologiques ont été réalisées sur le cartilage hyalin, le tissu cutané et le tissu osseux des animaux selon la méthode décrite par Paquet en 2000. Les étapes des analyses histologiques sont les suivantes :

- La fixation : la fixation s'est faite grâce au formol 10%.

- La décalcification : la décalcification a été réalisée par immersion des organes dans une solution d'acide chlorhydrique à 5% réalisée avec le fixateur pendant une durée de 3 jours.
- Le « Trimming » : après fixation, les organes ont été prélevés et déposés sur du papier absorbant le formol. A l'aide d'une coupelle à lame de rasoir, les organes ont été coupés avec une orientation précise et rangés dans des cassettes bien étiquetées.
- La déshydratation : ce procédé a consisté à faire séjourner les cassettes contenant les tissus successivement dans des bains d'alcool de concentration croissante pendant un temps bien précis : l'éthanol à 50% (1h), puis à 70% (1h), ensuite à 95% (1h dans le 1<sup>er</sup> bac, 1h30 min dans 2<sup>ème</sup> bac) et enfin à 100% (1h dans le 1<sup>er</sup> bac, 1h30 min dans le 2<sup>ème</sup> bac et 2h dans le 3<sup>ème</sup>).
- L'éclaircissement : il s'agit de remplacer la solution de déshydratation par un solvant miscible dans le milieu d'inclusion. Cette étape consiste au passage des cassettes contenant les tissus dans des bacs de xylène (1h dans le 1<sup>er</sup> et 1h30 dans le 2<sup>ème</sup>).
- L'imprégnation : l'imprégnation a permis de faire séjourner les cassettes contenant les tissus dans des bains de paraffine en fusion (étuve à 60°C) ; 1h dans le 1<sup>er</sup> bain, 1h30 min dans le 2<sup>ème</sup> et 2h dans le 3<sup>ème</sup>.
- L'inclusion : les tissus ont été placés dans des moules remplis de paraffine en fusion qui était mise à solidifier sur une surface froide après orientation appropriée du tissu dans le bloc.
- Les coupes : les blocs obtenus ont été coupés à l'aide d'un microtome volant de marque « Reichert-Jung 2030 ». Des rubans de coupes (5 µm) d'organes obtenus ont été étalés dans un bain marie contenant de l'eau gélatinée. Au moyen de lames porte-objet propre et étiquetées, les coupes ont été recueillies et séchées à l'étuve à 45 °C pendant 24 heures.
- La coloration : les colorations ont permis de visualiser les constituants cellulaires et tissulaires en leur faisant capter et fixer les colorants de façon plus ou moins sélective. Les coupes ont subi dans un premier temps une étape de déparaffinage. Il s'agissait de faire séjourner les coupes 5 à 10 min dans des bains de xylène (2 bacs), puis dans 3 bacs d'éthanol de concentration décroissante (100%, 95% et 70%). Les lames ont été ensuite rincées 5 à 10 min à l'eau distillée avant de commencer la coloration proprement dite. Deux colorations ont été utilisées à savoir la coloration à l'hématoxyline-éosine et la coloration de trichrome de masson.
- Le montage : le montage a permis de protéger les coupes par une fine lamelle de verre et de les conserver. Le milieu de montage était la résine synthétique non miscible à l'eau, par conséquent, les coupes ont été déshydratées et éclaircies avant d'être montées. L'observation s'est faite au microscope « Olympus Japan 5119 ».

### III.3. SEPARATION ET CARACTERISTIQUES DES COMPOSES

#### III.3.1. Séparation

La séparation des métabolites secondaires est basée sur la chromatographie classique sur colonne, la plaque CCM préparative et le sephadex sont utilisés pour la purification des fractions issues des dégrossissements. Les colonnes en verre de dimensions 1 à 5 Cm de diamètre et 32 à 86 Cm de hauteur ont servi valablement de réaliser les chromatographies sur colonne sous pression atmosphérique ; le gel de silice utilisé comme adsorbant pour la chromatographie sur colonne est de fabrication MERCK ayant pour la granulométrie 0,025-0,06 mm.

Les colonnes ont été éluées avec un gradient ou système de polarité croissante : hexane, hexane/acétate d'éthyle, acétate d'éthyle, acétate d'éthyle/méthanol et méthanol. Entre autres, 150 à 230 fractions de 100 à 200 ml chacun, ont été recueillies, concentrées et regroupées sur la base de la chromatographie sur couche mince (CCM).

Certaines fractions précipitaient, d'autres ont été filtrées directement suivies d'une recristallisation ou purifiés. Les différents composés sont révélés sur la CCM à l'UV qu'après pulvérisation à l'iode et indexés VP1 à VPn.

- Chromatographie sur colonne de 17g de VPEE des écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* 17 g de VPE<sub>A</sub> a été fixé avec 17 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur colonne de 4 cm de diamètre et 0,76 cm de hauteur en utilisant comme adsorbant le gel de silice (100 g) de même granulométrie. Cette colonne a été éluée avec un gradient de polarité croissante Hex/AcOEt et enfin le MeOH. En tout 223 fractions de 100 ml, chacune ont été recueillies, concentrées et regroupées sur la base de la CCM, voir le tableau 20 ci-dessous.

**Tableau 20** : Profil chromatographique de 17 g de l'extrait VPEE

Eluants	Fractions	Eluants pour CCM	Observations sur les Chromatogrammes
Hex (100%)	1 - 11	Hex/AcOEt (97,5 : 2,5 )	2 taches (T)
Hex/AcOEt (99 : 1)	12 -18	Hex/AcOEt (97,5 : 2,5)	2T
Hex/AcOEt (98 : 2)	19 - 25	Hex/AcOEt (95 : 5)	19-20 : 2T ; 21 : 1T(VP1) ; 22-24 : 2T ; 25 : 1T (VP2)
Hex/AcOEt (97 : 3)	26 - 35	Hex/AcOEt (93: 7)	1T (VP2)
Hex/AcOEt (96 : 4)	36 - 45	Hex/AcOEt (92,5 : 7,5)	2T
Hex/AcOEt (95 : 5)	46 - 54	Hex/AcOEt (92 : 8)	46-50 : 3T ; 51-52 : 1T ; 53-54 : 2T
Hex/AcOEt (94 : 6)	55 - 66	Hex/AcOEt (90 : 10)	55-61 : 3T ; 62 : 1T ; 63-64 : 2T ; 65-66 : 4T
Hex/AcOEt (93 : 7)	67 - 83	Hex/AcOEt (85 : 15)	67-69 : 4T ; 70-73 : 3T ; 74-83 : 2T
Hex/AcOEt (92 : 8)	84 - 93	Hex/AcOEt (85 : 15)	2T
Hex/AcOEt (90 : 10)	94 - 103	Hex/AcOEt (80 : 20)	2T

Hex/AcOEt (85 : 15)	104 - 113	Hex/AcOEt (85 : 15)	104-106 : 4T ; 110-113 : 1T (VP3)
Hex/AcOEt (80 : 20)	114 - 123	Hex/AcOEt (85 : 15)	1T (VP3)
Hex/AcOEt (75 : 25)	124 - 131	Hex/AcOEt (80 : 20)	124-126 : (VP3)+2T ; 127-131 : 2T
Hex/AcOEt (70 : 30)	132 - 141	Hex/AcOEt (80 : 20)	132-134 : 5T ; 135-136 : 3T ; 137 : 1T(VP6) ; 138-139 : 2T ; 140-141 : 1T
Hex/AcOEt (65 : 35)	142 - 150	Hex/AcOEt (70 : 30)	142-148 : 3T ; 149-150 : 1T (VP4)
Hex/AcOEt (60 : 40)	151 - 158	Hex/AcOEt (70 : 30)	(VP4) + 2T
Hex/AcOEt (55 : 45)	159 - 168	Hex/AcOEt (70 : 30)	159-163 : 2T ; 164-165 : 1T ; 166-168 : 2T
Hex/AcOEt (50 : 50)	169 - 178	Hex/AcOEt (65: 35)	169-175 : 3T ; 176-178 : 1T (VP5)
Hex/AcOEt (45 : 55)	179 - 187	Hex/AcOEt (65: 35)	(VP5) + T
Hex/AcOEt (40: 60)	188 - 195	Hex/AcOEt (20 : 80)	2T
Hex/AcOEt (20 : 80)	196 - 205	AcOEt (100)	196-197 : (VP7) + T ; 198 : 1T (VP5-1) ; 199-205 : traînée
AcOEt (100)	206 - 215	AcOEt/MeOH (90 : 10)	Une traînée
AcOEt/MeOH (90 : 10)	216 - 223	AcOEt/MeOH (90 : 10)	Une traînée

**Tableau 21** : Profil chromatographique sur colonne de 22,6g de l'extrait VPEE des racines

<b>Eluants</b>	<b>Fractions</b>	<b>Eluants pour CCM</b>	<b>Observations sur les Chromatogrammes</b>
Hexane (100%)	1 - 11	Hex (100%)	1-7 : 1 taches (T) ; 8-11 : 2T
Hex/AcOEt (98 : 2)	12 -23	Hex/AcOEt (97 : 3)	12-13 : 2T ; 14-16 : 1T ; 17-21 : 0T ; 22-23 : 3T
Hex/AcOEt (98 : 4)	24 - 34	Hex/AcOEt (97 : 3)	24-26 : 3T ; 27-34 : 2T
Hex/AcOEt (94 : 6)	35 - 44	Hex/AcOEt (95 : 5)	35-44 : 2T
Hex/AcOEt (90 : 10)	45 - 55	Hex/AcOEt (95 : 5)	45-49 : 2T ; 50-55 : 1T
Hex/AcOEt (85 : 15)	56 - 64	Hex/AcOEt (95 : 5)	56-64 : 1T
Hex/AcOEt (80 : 20)	65 - 76	Hex/AcOEt (90 : 10)	65-76 : 1T
Hex/AcOEt (75 : 25)	77 - 87	Hex/AcOEt (85 : 15)	77-87 : 1T
Hex/AcOEt (70 : 30)	88 - 95	Hex/AcOEt (60 : 40)	88-95 : 1T
Hex/AcOEt (65 : 35)	96 - 101	Hex/AcOEt (60 : 40)	96-101 : 1T
Hex/AcOEt (60 : 40)	102 - 124	Hex/AcOEt (45 : 55)	102-103 : 2T ; 104-108 : 3T ; 109-124 : 2T
Hex/AcOEt (55 : 45)	125 - 133	Hex/AcOEt (45 : 55)	125-133 : 1T
Hex/AcOEt (50 : 50)	134 - 152	Hex/AcOEt (45 : 55)	134-152 : 1T
Hex/AcOEt (40 : 60)	153 - 163	Hex/AcOEt (40 : 60)	153-160 : 2T ; 161-163 : 1T
Hex/AcOEt (20 : 80)	164 - 173	Hex/AcOEt (40 : 60)	164-170 : 1T ; 171-173 : 1T+traînée
AcOEt (100%)	174 - 185	AcOEt (100%)	174-182 : 1T+traînée ; 183-185 : traînée
A/MeOH (90 : 10)	186 - 193	AcOEt (100%)	186-193 : traînée
MeOH (100%)	194 - 200	A/MeOH (90 : 10)	194-200 : traînée



**Tableau 22** : Profil chromatographique sur colonne de 8 g de l'extrait VP EEG des graines.

Eluants	Fractions	Eluants pour CCM	Observations sur les Chromatogrammes
Hexane (100%)	1 - 6	Hex/AcOEt (85 : 15)	1-2 : Otaches (T) ; 3 : 1T ; 4-6 : 0T
Hex/AcOEt (95 : 5)	7 - 9		7-9 : 0T
Hex/AcOEt (90 : 10)	10 - 18		10 : 0T ; 11-12 : 6T ; 13 : 3T + trainée ; 14-18 : 1T (VP18) + trainée
Hex/AcOEt (85 : 15)	19 - 23	Hex/AcOEt (70 : 30)	19-22 : 1T + trainée ; 23 : trainée
Hex/AcOEt (80 : 20)	24 - 28		24-28 : trainée
Hex/AcOEt (75 : 25)	29 - 34		29-34 : 1T
Hex/AcOEt (70 : 30)	35 - 39	Hex/AcOEt (50 : 50)	35-37 : trainée + 1T ; 38-39 : 1T
Hex/AcOEt (65 : 35)	40 - 44		40-44 : 1T
Hex/AcOEt (60 : 40)	45 - 48		45-48 : 1T
Hex/AcOEt (50 : 50)	49 - 51		49-51 : 2T
Hex/AcOEt (35 : 65)	52 - 56		52-56 : 2T
Hex/AcOEt (20 : 80)	57 - 63	AcOEt (100%)	57-95 : trainée
AcOEt (100%)	64 - 72		
A/MeOH (90 : 10)	73 - 80		
MeOH (100%)	81 - 95		

### III.3.2. Quelques tests caractéristiques des composés

#### III.3.2.1. Test des stérols et des terpénoïdes

Réactif : 1 ml de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré, 20 ml d'anhydride acétique, 50 ml de CHCl<sub>3</sub>.

Manipulation : Dans un tube à hémolyse, on dissout une petite quantité de produit à l'aide d'un solvant approprié (de préférence). A la solution obtenue, on ajoute quelques gouttes de réactifs de Libermann-Buchard, les triterpènes donnent avec le réactif, une coloration violacée et les stérols une coloration vert-bleuâtre.

#### III.3.2.2. Test des flavonoïdes

Dans un tube à essai, on introduit 0,5g d'extrait ou fraction de plante dans 5ml de méthanol. On ajoute quelques copeaux de Magnésium et de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré, ceci goutte à goutte. On observe une effervescence de la solution qui vire au rouge indiquant ainsi la présence des flavonoïdes.

### III.3.3. Technique d'extraction et séparation par le bain ultrason

Au cours de ces travaux, le sonicateur (Digital ultrasonic cleaner) est retenu pour les extractions. Il présente l'avantage de fournir un bon rendement par rapport à la macération tout en évitant la dégradation des composés qu'on observe avec le Soxhlet, ainsi que la réduction du temps d'extraction. Ceci nous a permis d'obtenir des extraits en quantité suffisante afin de réaliser les analyses RMN et les activités biologiques.

### III.4. HEMISYNTHESE DES DERIVES DES COMPOSES ISOLEES

Les triterpènes pentacycliques **127**, **126** et **91** ont subi des transformations chimiques sur la fonction carboxylique en C-28 (méthylation). Ils sont évalués pour des activités anticancéreuses et les résultats sont très concluants. L'acide bétulinique **91** était le plus actif et nous a permis d'envisager la synthèse des analogues structuraux.

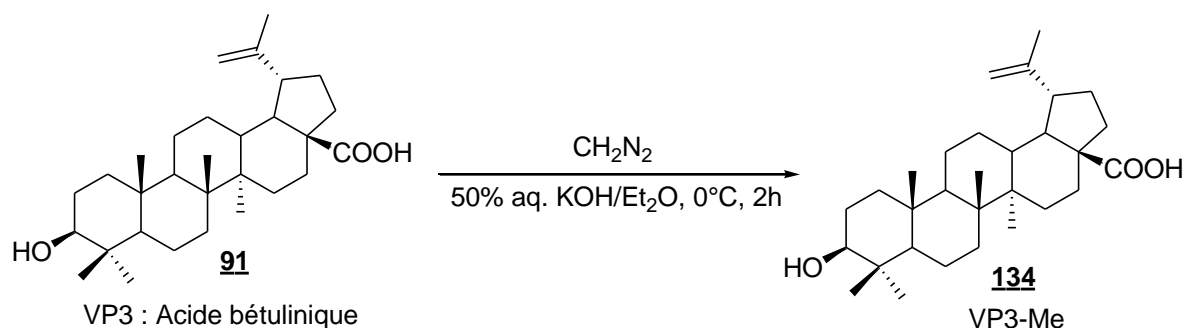


Schéma 48 : Fonctionnalisation de COOH (VP3)

#### III.4.1. Aperçu bibliographique sur l'acide bétulinique

L'acide bétulinique **91** est un composé naturel de la famille des triterpènes pentacycliques du lupane. Depuis sa découverte et en raison de ses activités biologiques très importantes contre beaucoup de pathologies, il a attiré l'attention de nombreux chercheurs à fonctionnaliser l'acide bétulinique pour obtenir de nouveaux dérivés avec l'activité biologique améliorée par l'amination, l'estérification, l'alkylation et autres (Kim *et al.*, 1998 ; 2001, Jeong *et al.*, 1999 ; Genet *et al.*, 2010). Cependant, l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique est considérée comme un problème majeur de sa biodisponibilité dans l'organisme vivant.

L'acide bétulinique comporte 3 positions fonctionnelles qui ont servi de cibles dans la synthèse des analogues : l'hydroxyle en position C-3, l'alcène en position C-20 et l'acide carboxylique en position C-28.

Nombreuses études menées sur l'acide bétulinique ont montré que :

- la fonction alcène en position C-20 n'est pas un site fonctionnel favorable à modifier pour augmenter la cytotoxicité.

- l'acide carboxylique en C-28 : cette fonction s'est avérée essentielle pour présenter l'activité cytotoxique. Toutefois, des conjugués d'acides aminés avec une hydrosolubilité supérieure : leucine, alanine, valine et glycine ont présenté des propriétés cytotoxiques similaires à l'acide bétulinique.
- la synthèse d'analogues en position C-3 : un nombre limité de structures a été évalué pour la cytotoxicité. L'ajout d'une fonction oxime sur cet hydroxyle n'a pas d'impact positif sur l'activité anticancéreuse, en plus de provoquer la perte de sélectivité (Hiroya *et al.*, 2002).
- l'attachement d'un sucre (glycosylation) en positions C-3 et C-28 augmente sensiblement son hydrosolubilité. En revanche, cela diminue considérablement sa réactivité (Kim *et al.*, 1998).

Dans l'organisme vivant, une modification de l'hydrosolubilité influence principalement les propriétés pharmacocinétiques. C'est-à-dire l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination du composé dans les fluides corporels, ainsi que le transport membranaire de la molécule. Donc, la glycosylation peut dans certains cas, restreindre ou inhiber la diffusion de la molécule à travers la membrane cellulaire. Autres conséquences d'influencer fortement le transport à travers des barrières biologiques importantes comme la barrière hémato-encéphalique et bloquer ainsi l'entrée de plusieurs composés essentiels à l'intérieur du tissu cervical.

L'objectif visé pour la synthèse des dérivés de l'acide bétulinique, était de faire un remplacement non réactif par approche conceptionnelle de médicaments basée sur le substrat (Substrate Based Drug Design) en fonctionnalisant l'hydroxyle en position C-3. Fort de ce qui précède, le choix d'un réactif à longue chaîne carbonée, l'un des principes caractéristiques de Drug Design. Ces dérivés seront facilement pénétrables dans les membranes cellulaires.

### III.4.2. Réactifs et produits utilisés pour la synthèse

Les réactifs et produits qui ont fait de la modification chimique sont consignés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 23** : Réactifs et produits de synthèse

N°	Désignation	N° cas : Quantité	Nom du fabricant
01	Pyridine anhydre 99,8% (C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N) : M=79,10 ; d=0,983 ; bp=116°C	110-86-1 : 250ml	FLUKA
02	4-Diméthylamino-pyridine (DMAP) : C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> ; M=122,17 ; Fp=110°C ; mp=111°C	1122-58-3 : 25g	SIGMA
03	Acide chlorhydrique (HCl) ≥ 37% : M=36,46 ; bp >100°C	7647-01-0 : 1l	SIGMA- ALDRICH
04	Sodium sulfate anhydrous (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) ≥ 99% : M=142,04	7757-82-6 : 5Kg	FLUKA
05	Sodium Chloride (NaCl) : M=58,44 ;	7647-14-5 : 1Kg	SIGMA
06	Silice : 40 - 63 µm	7631-86-9 : 1	CHEMICALS

		Kg	
07	Valeric anhydride 97% (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> ) : M=186,25 ; d=0,944 ; bp=228-230°C ; mp=-56°C	2082-59-9 : 100 ml	ALDRICH
08	Heptanoic anhydride 99% (C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> ) : M=242,36, d=0,917	626-27-7 : 100 ml	ACROS ORGANICS
09	Diazomethane (MNG)		

### III.4.3. Conditions opératoires d'hémisynthèse des dérivés de l'acide bétulinique

50mg (0,11 mmol, 1,0 éq) de l'acide bétulinique sont dissous dans 0,5 ml de pyridine anhydre. On ajoute au mélange 116 µL (0,44 mmol, 4,0 éq) d'anhydride heptanoïque ou valérique, 87 µL (0,44 mmol, 4,0 éq) ou 26 mg (0,22 mmol, 2,0 éq) de DMAP respectivement. Le mélange réactionnel est porté au reflux sous l'azote pendant 10 heures. Le milieu réactionnel est ensuite acidifié avec HCl 5% et extrait avec 5ml de CHCl<sub>3</sub>. La phase organique est lavée avec de l'eau et de NaCl (10%), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, et évaporée. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par la chromatographie sur colonne en utilisant la silice comme adsorbant et CHCl<sub>3</sub> (100%), l'éluant pour obtenir une poudre blanche amorphe avec un rendement de 60%.

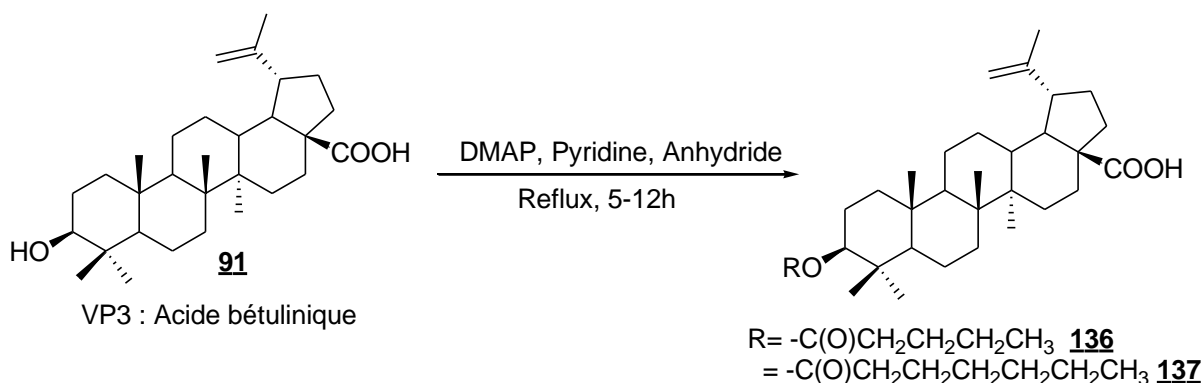
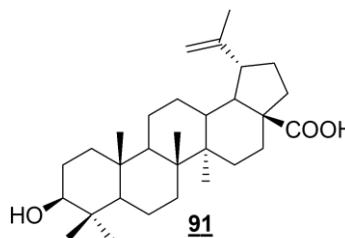


Schéma 49 : Hémisynthèse sur OH de VP3 en C-3

## III.5. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES

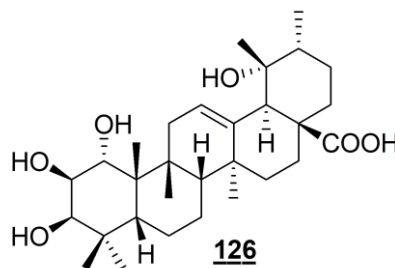
### III.5.1. Composé VP3 (91)

- PF : 282-285°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>3</sub>
- Masse molaire : 455 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz, figure 19, tableau 10)
- Spectre RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz, figure 20, tableau 10)



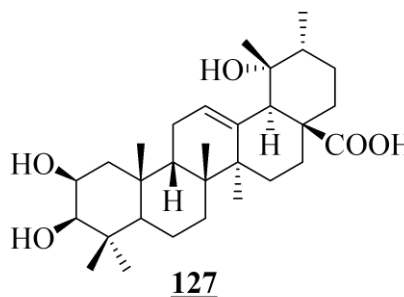
### III.5.2. Composé VP4 (126)

- PF : 262-264°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute :  $C_{30}H_{47}O_6$
- Masse molaire : 503 g/mol
- Spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 600 MHz, figure 28, tableau 11)
- Spectre RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 150 MHz, figure 30, tableau 11)



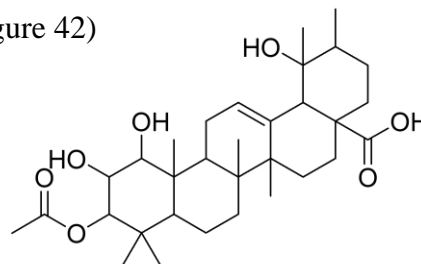
### III.5.3. Composé VP5 (127)

- PF : 260-262°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute :  $C_{30}H_{48}O_5$
- Masse molaire : 489 g/mol
- Spectres RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz, figure 41)
- Spectre RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 125 MHz, figure 42)



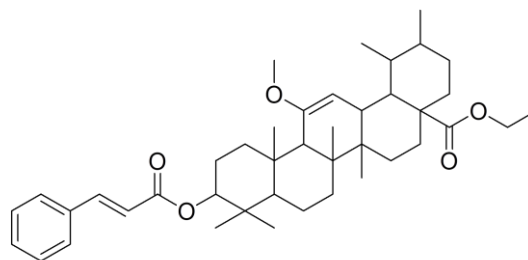
### III.5.4. Composé VP11 (128)

- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute :  $C_{32}H_{50}O_7$
- Masse molaire : 535 g/mol
- Spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz, figure 50, tableau 12)



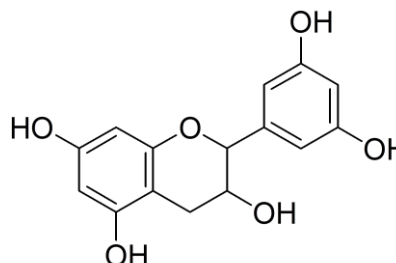
### III.5.5. Composé VP2 (129)

- Aspect : Cristaux blancs
- Formule brute :  $C_{41}H_{60}O_5$
- Masse molaire : 632 g/mol
- Spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz, figure 56, tableau 13)



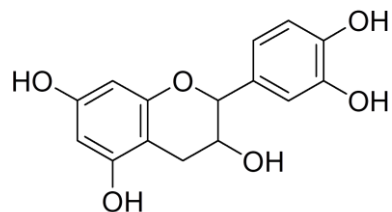
### III.5.6. Composé VP5-1 (23)

- PF : 212-214°C
- Aspect : Cristaux jaunes
- Formule brute :  $C_{15}H_{14}O_6$
- Masse molaire : 290 g/mol
- Spectre RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz, figure 61)
- Spectre de RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 125 MHz, figure 63)



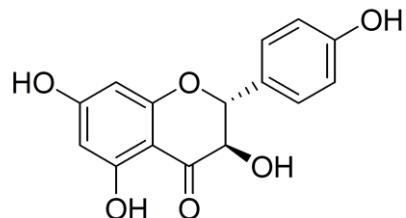
### III.5.7. Composé VP7 (22)

- PF : 196-198°C
- Aspect : Cristaux jaunâtres
- Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>
- Masse molaire : 291 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz, figure 67)
- Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz, figure 68)



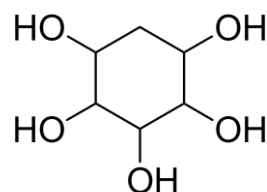
### III.5.8. Composé VP17 (130)

- Aspect : cristaux jaunes
- Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>
- Masse molaire : 288 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz, figure 70, tableau 14)



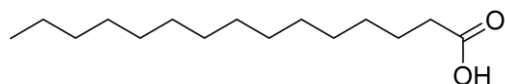
### III.5.9. Composé VP6 (131)

- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>
- Masse molaire : 164 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 600MHz, figure 76, tableau 15)



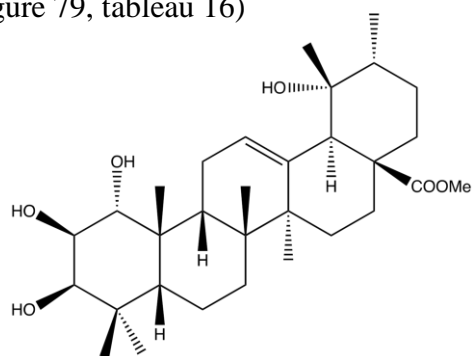
### III.5.10. Composé VP18 (132)

- Aspect : Poudre blanche amorphe
- Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>
- Masse molaire : 242 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, figure 79, tableau 16)



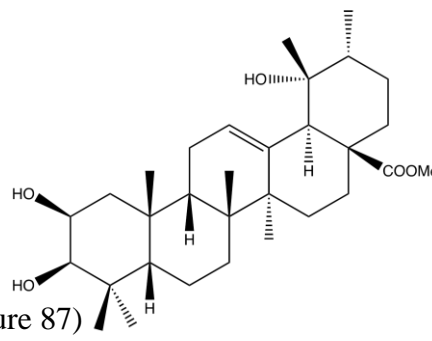
### III.5.11. Composé VP4-Me (133)

- Point de fusion : 155-157°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C<sub>31</sub>H<sub>51</sub>O<sub>6</sub>
- Masse molaire : 519 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz, figure 84)
- Spectre RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz, figure 85)



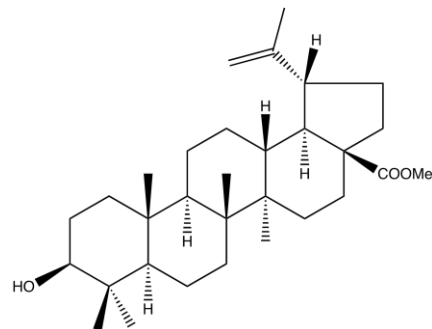
### III.5.12. Composé VP5-Me (134)

- Point de fusion : 103-105°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C<sub>31</sub>H<sub>51</sub>O<sub>5</sub>
- Masse molaire : 503 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz, figure 87)
- Spectre RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz, figure 88)



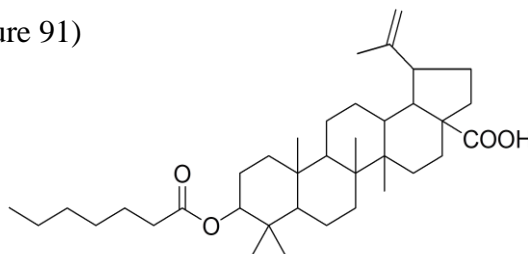
### III.5.13. Composé VP3-Me (135)

- Point de fusion : 205-207°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C<sub>31</sub>H<sub>51</sub>O<sub>3</sub>
- Masse molaire : 471 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, figure 90)
- Spectre RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz, figure 91)



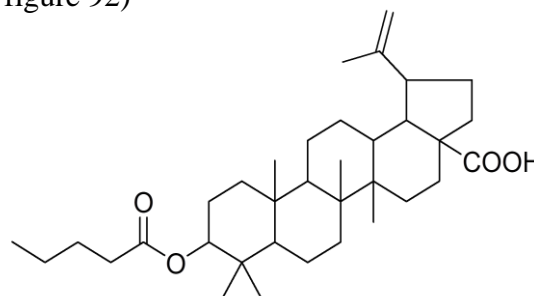
### III.5.14. Composé VP3-H1 (136)

- Aspect : Poudre blanche amorphe
- Formule brute : C<sub>37</sub>H<sub>59</sub>O<sub>4</sub>
- Masse molaire : 567 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H d (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, figure 92)



### III.5.15. Composé VP3-V1 (137)

- Aspect : Poudre blanche amorphe
- Formule brute : C<sub>35</sub>H<sub>55</sub>O<sub>4</sub>
- Masse molaire : 539 g/mol
- Spectre RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, figure 93)



## III.6. ETUDE D'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES COMPOSES

Les essais biologiques ont été réalisés par l'équipe de Docteur Daniel ROMO du Département de Chimie et Biochimie, Synthèse CPRIT et Laboratoire Drug-Lead Discovery, Université Baylor, Waco, Texas aux Etats-Unis. Les conditions opératoires sont ci-après.

### III.6.1. Culture cellulaire

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées dans le milieu d'aigle modifié de Dulbecco (Corning), supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (Gibco) et des antibiotiques (Lonza).

### **III.6.2. Evaluation de l'activité cytotoxique**

Pour la détermination de la cytotoxicité, les cellules ont été plaquées dans des plaques à puits (Nid Scientifique) à une densité de 2000 cellules par puits dans 100µl de milieu par puits. Le lendemain, le milieu a été aspiré et 100µl de milieu dans lesquels une dilution en série de composés dissous dans DMSO (DMSO comme contrôle) a été ajouté aux puits en triple. Trois jours plus tard, le nombre relatif de cellules métaboliquement actives a été déterminé par l'ajout du réactif CellTiter-Glo (Promega) et la mesure de la chimioluminescence selon le protocole du fabricant en utilisant un Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific).

### **III.6.3. Calcul de pourcentage**

Pour calculer le pourcentage de viabilité, le signal des puits de fond (milieu seulement) a été soustrait de chaque puits, puis la valeur de chimioluminescence restante a été normalisée pour signaler les puits avec quantités équivalentes de DMSO.

### **III.6.4. Induction d'apoptose**

L'induction de l'apoptose a été mesurée en utilisant le kit de coloration à l'Annexine V/ iodure de propidium (BD Biosciences) selon les instructions du fabricant. Les analyses ont été effectuées en au moins trois exemplaires.



## REFERENCES

- Abe, I., Rohmer, M., Prestwich, G.D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews*, 1993 : 2189-2206.
- Abramson, O., Durant, M., Mow, W., Finley, A., Kodali, P., Wong, A. Incidence, prevalence and time trends of pediatric inflammatory bowel disease in Northern California, 1996 to 2006. *The Journal of Pediatrics*, 2010 : 233-239.
- Adjanooun, E., De Souza, S., Guinko, S. Les ordres des Angiospermes. Principales familles et espèces caractéristiques. Cotonou, Université du Bénin (*ex. Dahomey*). 1973.
- Adle-Biassette, H., Chretien, F., Wingertsmann, L., Hery, C., Ereau, T., Scaravilli, F., et al. Neuronal apoptosis does not correlate with dementia in HIV infection but is related to microglial activation and axonal damage. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1999 : 123-133.
- Adoum. Technique artisanale d'extraction du beurre de karité au Moyen-Chari Sud du Tchad. In Siaka Kone (éd), Atelier International d'échanges sur « Oléagineux et petites technologies ». 23-27 septembre, Ngaoundéré, Cameroun. 1996.
- Adu-Ampomah, Y., Amponsah, J.D., Yidana, J.A. Collecting germplasm of Shea nut (*Vitellaria paradoxa*) in Ghana. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 1995 : 37-38.
- Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A. Alpha-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes ; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006 : 449-455.
- Allal, F., Vaillant, A., Sanou, H., Kelly, B., Bouvet, J.M. Isolation and characterization of new microsatellite markers in shea tree (*Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn). *Molecular Ecology Resources*, 2008 : 824.
- Allard, S., Ourisson, G. Remarques sur la nomenclature des triterpènes. *Tetrahedron*, 1957 : 277-283.
- Amieva, H., Andrieu, S., Berr, C., Buée, L., Checler, F., Clément, S., et al. Maladie d'Alzheimer : enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux. INSERM ; s.d.  
<http://lara.inist.fr/handle/2332/1336> (consulté le 15 Septembre 2014).
- Asubiojo, O.I., Guinn, U.P., Okunuga, A. Multiement analysis of Nigerian chewing sticks by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical Chemistry*, 1982 : 149-156.
- Aubreville, A. Notes sur les Sapotacées de l'Afrique équatoriale. *Notulae Systematicae*, 1960 : 253p.

- Aubreville, A. Flore forestière soudano-guinéenne. Société d'Éditions géographiques maritimes et coloniales. Paris, 1950.
- Badifu, G. Lipid composition of Nigerian *Butyrospermum paradoxum* kernel. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1999 : 238-244.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves : the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001 : 125-132.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., Delattre, J.Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 2003 : 323-331.
- Berchtold, N.C., Cotman, C.W. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease : Greco-Roman Period to the 1960s. *Neurobiology of Aging*, 1998 : 173-189.
- Berhaut, J. Flore du Sénégal, 2 éd. Clairafrique. Dakar, 1967.
- Bieche, I., Khodja, A., Lidereau, R. Deletion mapping of chromosomal region 1p32 in primary breast cancer. *Genes Chromosome Cancer*, 1999 : 255-263.
- Bishayee, A., Ahmed, S., Brankov, N., Perloff, M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in Bioscience. Journal Virtual Library*, 2011 : 980-996.
- Block, M.L., Zecca, L., Hong, J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007 : 57-69.
- Bonkougou, G.E. Monographie du karité, *Butyrospermum paradoxum* (GAERTN. f.) HEPPER, espèce agroforestière à usages multiples. *IRBET/CNRST – Ouagadougou*. 1987.
- Booth, S.F.M., Wickens, G.E. Non-timbers uses of selected arid zone trees and shrubs in Africa. *FAO conservation guide 19*, Rome (Italie), 1988.
- Brat, P., Georgé, S., Bellamy, A., Du Caffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., Amiot, M.J. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *Journal Nutrition*, 2006 : 2368-2373.
- Bruneton, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. 2 TEC DOC. Paris, 1993.
- Bruneton, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris: Technique et Documentation-Lavoisier, 2009.

- Buttini, M., Appel, K., Sauter, A., Gebicke-Haerter, P.J., Boddeke, H.W. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience*, 1996 : 1-16.
- Carette, C., Malotaux, M., Van Leewen, M., Tolkamp, M. Shea nut and butter in Ghana, opportunities and constraints for local processing. 2009. [www.resilience-foundation.nl/docs/shea](http://www.resilience-foundation.nl/docs/shea) (consulté le 15 Avril 2014).
- Chaudard, P., MANGE, L. Timidité, volonté, activité. (Voir au-delà de la connaissance). 3ème Millénaire, 1981.
- Chevalier, A. Le karité ou arbre à beurre. Oléagineux, p.4. In Les oléagineux dans les pays d'Afrique occidentale associés au marché commun ; I la production, le commerce et la transformation des produits. Paris: Editions Champion, 1946.
- Clifford, M.N. Phenol-protein interactions and their possible significance for astringency. In G.G. Birch and M.G. Lindley (eds), Interaction of Food Components. *Elsevier Applied Science*, 1986 : 143-64.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 : 72-79.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. 2006.
- De la Monte, S.M., Wands, J.R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling and malfunction in the central nervous system: Relevance to Alzheimer's disease. *Journal Alzheimer's Disease*, 2005 : 45-61.
- DFSC (Danida Forest Seed Centre). *Vitellaria Paradoxa* Gaertn. F. Seed Leaflet, No. 50. 2000.
- Disease, International Alzheimer. *World Alzheimer Report 2013 Journey of Caring*. s.d. Alzheimer Disease International. [http://www.alz.co.uk/research/World Alzheimer Report 2013. pdf](http://www.alz.co.uk/research/World%20Alzheimer%20Report%202013.pdf) (consulté le 03 Mai 2014).
- Emberger, L. Les végétaux vasculaires - Traité de Botanique (systématique). Masson et Cie, 1960.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, M.D. GLOBOCAN 2002 cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC cancer base no. 5, version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004. **P**
- Foyet, H.S., Abdou Bouba, A., Ponka, R., Asongalem, A.E., Kamtchouing, P., Nastasa, V. Effets of Hibiscus asper leaves extracts on carrageenan induced oedema and complete Freund's adjuvant-induced arthritics in rats. *Journal of Cell and Animal Biology*, 2011 : 69-75.

- Foyet, H.S., Tsala, E.T., Zogo, E.B.J.C., Azanfack, N.C., Lissia, T.H., Eyong, K.O. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of a methanol extract from *Vitellaria paradoxa* stem bark. *Pharmacognosy Research*, 2015 : 1595.
- Fulda, S., Jeremias, L., Pietsch, T., Debatin, K.M. Betulinic acid : a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors, *Klinische Paediatric*. 1999a : 319-322.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., et al. Malignant astrocytic glioma : genetics, biology, and paths to treatment. *Gene & Development*, 2007 : 2683-2710.
- Genet, C., Strehle, A., Schmidt, C., Boudjelal, G., Lobstein, A., Schoonjans, K., et al. Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid, A Novel and Selective TGR5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010 : 178-190 .
- Gennari, C., Castoldi, D., Sharon, O. Natural products with taxol-like anti-tumor activity: synthetic approaches to eleutherobin and dictyostatin. *Pure and Applied Chemistry*, 2007 : 173-180.
- Germonprez, N., Maes, L., Van Puyvelde, L., Van Tri, M., Tuan, D.A., De Kimpe, N. In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005 : 32-37.
- Giles, P.M. Revised section F: Natural products and related compounds - IUPAC Recommendations 1999. *Pure and Applied Chemistry*, 1999 : 587-643.
- Gintl, W.H. Über das Urson. Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly. 1893.
- Globocan 2008, IARC, 2010, 2013. *Cancer [WWW Document]*. WHO. s.d. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/index.html> (consulté le 9 Juillet 2013).
- Goedert, M., Jackes, R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005 : 40-50.
- Goldbach-Mansky, R., Dailey, N.J., Canna, S.W., Gelabert, A., Jones, J., Rubin, B.I. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *Neonatal-onset muN. The England Journal of Medicine*, 2006 : 581-592.
- Goreja, W.G. Shea Butter: The Nourishing Properties of Africa's Best-Kept Natural Beauty. Amazing HerbS Press. *New York, NY*. 2004.
- Gottesman, M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, 2002 : 615-627.

- Graeber, M.B., Bise, K., Mehraien, P. CR3/43, a marker for activated human microglia: application to diagnostic neuropathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1994: 406-408.
- Hall, J.B., Aebischer, D.P., Tomlison, H.F., Osei-Amang, E., Hindle, J.R. *Vitellaria paradoxa* a monograph. School of Agricultural and forest Sciences. *University of Wales. Bangor U.K.* 1996.
- Han, S.K., Ko, Y.I., Park, S.J., Jin, I.J., Kim, Y.M. Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids*, 1997 : 769-773.
- Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R.A., Quinn, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015 : 111-1129.
- He, Z.D., Ma, C.Y., Zhang, H.J., Tan, G.T., Tamez, P., Sydara, K., Bouamanivong, S., Southavong, B., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H. Antimalarial constituents from *Nauclea orientalis* (L.) L. *Chemistry & Biodiversity*, 2005 : 1378-1386.
- Herrinton, L.J., Liu, L., Lafata, J.E., Allison, J.E., Andrade, S.E., Korner, E.J., et al. Estimation of the period prevalence of inflammatory bowel disease among nine health plans using computerized diagnoses and outpatient pharmacy dispensing. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2007 : 451-461.
- Hiroya, K., Takahashi, T., Miura, N., Naganuma, A., Sakamoto, T. Synthesis of betulin derivatives and their protective effects against the cytotoxicity of cadmium. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002 : 3229-3236.
- <http://www.actea-sante.fr/wp-content/uploads/1-SNC.pdf>. s.d. (consulté le 12 Janvier 2019).
- <http://www.usamvcluj.ro/fiziopatologie/images/franceza/curs/Cours%2012-13%20-%20Physiopathologie%20I%20-%202016-2017.pdf>. s.d. (consulté le 20 Janvier 2019).
- Ismaili, H., Milella, L., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Camporese, A., Sosa, S., et al. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004 : 31-36.
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M., Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 2009 : 2016-2031.
- Jeong, H.J., Chai, H.B., Park, S.Y., Kim, D.S.H.L. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1999 : 1201-1204.

- Jiofack, T., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V., Fongnzossie, E., Nkongmeneck, B.A. Ethnobotanical uses of medicinal plants of two ethnoecological regions of Cameroon. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 2010: 60-79.
- Kanzler, H., Barrat, F.J., Hessel, E.M., Coffman, R.L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 2007 : 552-559.
- Kassamba, B. Synthèse des techniques connues d'extraction et de conditionnement du beurre de karité au Burkina Faso. Rapport Final, Projet filière karité du CECI-IRSAT, Ouagadougou. 1997.
- Kim, D.K., Baek, J.H., Kang, C.M., Yoo, M.A., Sung, J.W., Chung, H.Y., et al. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *International Journal Cancer*, 2000 : 629-636.
- Kim, D.S.H.L., Chen, Z., Nguyen, T., Pezzuto, J.M., Qiu, S., Lu, Z.Z. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synthetic Communications*, 1997 : 1607-1612.
- Kim, D.S.H.L., Pezzuto, J.M., Pisha, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998 : 1707-1712.
- Kuete, V. *Medicinal Plant Research in Africa. 1 ed.* 2013.
- Kwon, S.H., Park, H.Y., Kim, J.Y., Jeong, I.Y., Lee, M.K., Seo, K.I. Apoptotic action of ursolic acid isolated from Corni fructus in RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells. *Elsevier, Amsterdam*. 2010.
- Lavestone, S., McLoughlin, D.M. Protein aggregates and dementia: is there a common toxicity? *Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry*, 2002 : 152-161.
- Le Pecq, J.B. Chimiothérapie anticancéreuse : mécanismes d'action des substances antitumorales. *Coll. «Actualités scientifiques et industrielles, 1388»*. Paris: Hermann., 1978.
- Lefferts, A.C.L., Bartels, G., Tsongalis. Molecular oncology: current trends in diagnostics. *Future Oncology*, 2008 : 61-70.
- Liu, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005: 92-94.
- Liu, Y., Klimberg, V.S., Andrews, N.R., Hicks, C.R., Peng, H., Chiriva-Internati, M., Henry-Tillman, R., Hermonat, P.L. Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *Journal of Human Virology*, 2001 : 329-334.

- MacRaid, C.A., Stewart, C.R., Mok, Y-F., Gunzburg, M.J., Perugini, M.A., Lawrence, L.J., et al. Non-fibrillar components of amyloid deposits, mediate the self-association and tangling of amyloid fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 2004 : 21038-21045.
- Maldini, M., Sosa, S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balck, M.J., Pizza, C., Loggia, R.D. Screening of tropical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlov and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009 : 430-433.
- Matig, O.E., Ndoye, O., Kengue, J., Awono, A. Les fruitiers forestiers comestibles du Cameroun. 2006.
- Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H. Dossier: Alzheimer la maladie du siècle. *Recherche*, 1997 : 58.
- McGeer, P.L., Rogers, J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology*, 1992 : 447-449.
- MEA. 4e Rapport du Mali sur la Mise en Œuvre de la Convention sur la Diversité Biologique. Rapport. Bamako. 2009.
- Miles, D.H., Kokpol, U., Zalkow, L.H., Steindel, S.J., Nabors, J.B. Tumor inhibitors I : Preliminary investigation of antitumor activity of *Sarracenia flava*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1974 : 613-615.
- Moore, S. The role of *Vitellaria Paradoxa* in poverty reduction and food security in the Upper East region of Ghana. *Earth & Environment*, 2008 : 209-245.
- Mora, C., Robertson, D.R. Causes of latitudinal gradients in species richness : a test with the endemic shorefishes of the tropical eastern pacific. *Ecology*, 2005 : 1771-1782.
- Nafan, D., Abdourahamane, S., N'guessan, K.A. Le karité au Nord de la Côte d'Ivoire : Utilisations possibles, processus de transformation et analyse de la filière de commercialisation. 2001.
- Ndukwe, I.G., Amupitan, J.O., Isah, Y., Adegoke, K.S. Phytochemical and antimicrobial Screening of crude extracts from the stem bark, the root and leaves of *Vitellaria paradoxa* (GAERTN. F). *African Journal of Biotechnology*, 2007 : 1905-1909.
- Ohgaki, H., Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2005 : 479-489.
- Old, L. Immunotherapy for Cancer. *Scientific American -American Ed.*, 1996 : 136-143.

- Oldeman, L.R., Hakkeling, R.T.A., Sombroek, W.G. World Map of the Status of Human-Induced Soil Degradation : An Explanatory Note, UNEP and ISRIC, Wageningen. 1991.
- Olson, J.S. The history of cancer : an annotated bibliography. Coll. Bibliographies and indexes in medical studies, no. 3. *New York : Greenwood Press*, 1989.
- OMS. Faits et chiffres. Vieillesse et qualité de vie. 2014.  
[http://www.who.int/features/factfiles/ageing/ageing\\_facts/fr/](http://www.who.int/features/factfiles/ageing/ageing_facts/fr/) (consulté le 07 mars 2016).
- OMS. Cancer. 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/> (consulté le 21 Octobre 2015).
- OMS. Classification Statistique Internationale des maladies et des problèmes de santé connexes. 10ème révision, Genève : CIM-10, 2010.
- OMS. Fact Sheet, Traditional medicine. Geneva, 2003.
- OMS. Les principales causes de mortalité dans le monde, 1. 2018.
- Orgogozo, J.M., Gilman, S., Dartigues, J.F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A beta 42 immunization. *Neurology*, 2003 : 46-54.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Anthony, S. Orwa, C., et al. Agroforestry tree Database : a tree reference and selection guide version 4.0. 22 février 2009.  
<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>. (consulté le 22 février 2018).
- PAF. Projet d'Appui aux Filières Bio-Alimentaires. La filière karité. Rapport Définitif, Sicarex, Ouagadougou. 1999.
- Paterson, I., Anderson, E.A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. *Science*, 2005 : 451-453.
- Patil, M.V.K., Kandhare, A.D., Bhise, S.D. Anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Xanthium strumarium* L, ethanol extract in complete Freund's adjuvant-induced arthritis. *Biomedicine & Aging Pathology*, 2012 : 6-15.
- Pehaut, Y. Les oléagineux dans les pays d'Afrique occidentale associés au marché commun : la production, le commerce et la transformation des produits. Paris : Editions Champion, 1976.
- Pennington, T.D. The genera of Sapotaceae. Royal Botanic Gardens, Kew and The New York Botanical Garden. 1991.



- Pisha, E., Chai, H., Lee, I.S., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N., Cordell, G.A., et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature Medicine*, 1995 : 1046-1051.
- Pontanier, R., M'hiri, A., Aronson, J., Akrimi, N., Le Floc'h, E. *L'homme peut-il refaire ce qu'il a défait? Colloques et Congrès, Science et changements*. 455 p. Paris: John Libbey, 1995.
- Pouly, S., Becher, B., Blain, M., Antel., J.P. Interferon  $\gamma$  modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2000 : 280-286.
- Qureshi N., Porter J.W. In biosynthesis of isoprenoids compound. *New York*, 1981 : 47-94.
- Ramirez-Espinosa, J.J., Rios, M.Y., Lopez-Martinez, S., Lopez-Vallejo, F., Medina-Franco, J.L., Paoli, P., Camici, G., Navarrete-Vazquez, G., Ortiz-Andrade, R., Estrada-Soto, S. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011 : 2243-2251.
- Rastogi, T., Hildesheim, A., Sinha, R. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nature Review Cancer*, 2004 : 909-917.
- Ritchie, K., Lavestone, S. The dementias. *Lancet*, 2002 : 1759-1766.
- Robertson A., Soliman G., Owen E.C. Methods of manufacturing betulinic acid. *Journal of Chemistry Society*, 1939 : 1267-1273.
- Ross, S.A., Halliday, M.I., Campbell, G.C., Byrnes, D.P., Rowlands, B.J. The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *British Journal Neurosurgery*, 1994 : 419-425.
- Ruyssen, B. Le karité au Soudan. *Agronomie Tropicale*. 1957 : 143-172, 279-307.
- Ruzicka. History of the isoprene rule. Proc. Chem. Soc.p. (Faraday lecture). 1959.
- Saha, S., Subrahmanyam, E.V., Chandrashekar, K.S., Chastry, C.S. *In vivo* study for anti-inflammatory activity of *Bauhinia variegata* L. leaves. *Pharmaceutical Crops.*, 2011 : 70-73.
- Said, A., Usama, W., Salwa, M.N., Rashed, K. Pharmacochimical methanolic extract of *Diospyros leaves*. *Research Journal of Phytochemistry*, 2009 : 1-12.
- Sanou, H., Lamien, N. *Vitellaria paradoxa*, karité. Conservation et utilisation durable des ressources génétiques des espèces ligneuses alimentaires prioritaires de l'Afrique subsaharienne. Bioersivity International : Rome Saforgen. 2011 : 12.

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature Publishing Group*, 1999: 173-177. .
- Seto, R., Nakamura, H., Nanjo, F., Hara, Y. Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1997 : 1434-1439.
- Setzer, W.N., Rozmus, G.F., Setzer, M.C., Schmidt, J.M., Vogler, B., Reeb, S., et al. Bioactive principles in the bark of *Pilidiostigma tropicum*. *Journal of Molecular Modeling*, 2006 : 703-711.
- Setzer, W.N., Setzer, M.C., Bates, R.B., Jackes, B.R. Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from paluma, north Queensland, Australia, *Planta Medica.*, 2000 : 176-177.
- Silva, T., Reis, J., Teixeira, J., Borges, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles : from natural products to drug prototypes. *Ageing Research Reviews*, 2014 : 116-145.
- Sippy, B.D., Hofman, F.M., Wallach, D., Hinton, D.R. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha receptors in the brains of patients with AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 1995 : 511-521.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. Human breast cancer : Correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. *Science*, 1987 : 177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., et al. Studies of the her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989 : 707-712.
- Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P., Nadar, A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003: 299-305.
- Steven, M., Wiesman, Z., Nissim, G. Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernel. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2003 : 6268-6273.
- Stradonitz, F.K.V. Sur la constitution des substances aromatiques. In Bulletin de la Société Chimique de Paris. 1865.

- Tagne, R.S., Telefo, B.P., Nyemb, J.N., Yemele, D.M., Njina, S.N., Goka, S.M.C., et al. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian plants medicinal. *Asian Pacific Journal Tropical Medicine*, 2014 : 442-447.
- Thurnher, D., Turhani, D., Pelzmann, M., Wannemacher, B., Knerer, B., Formanek, M., et al. Betulinic acid : a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck*. 2003 : 732-740.
- Trials.gov., Clinical. See studies on Map. s.d. Clinical Trials.gov.  
[Shttps://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=Alzheimer](https://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=Alzheimer). (consulté le 10 août 2014).
- Trommsdorff, H. *Archiv der Pharmazie*. 1854.
- UNIFEM. Fonds de Développement des Nations Unies pour la Femme. Le karité l'or blanc des africaines. Bureau régional de Dakar, Sénégal. 1997.
- Vuillet, J. Le Karité et ses produits. Service de l'agriculture du Haut Sénégal-Niger. Paris : Emile LAROSE, 1911.
- Wald, N.J., Hackshaw, A.K. Cigarette smoking: an epidemiological overview. *British Medical Bulletin*, 1996 : 3-11.
- Wallace, J.L., McKnight, W., Del-Soldato, P., Baydoun, AR., Cirino, G. Anti-thrombotic effects of a nitric oxide-releasing, gastric-sparing aspirin derivative. *The Journal of Clinical Investigation*, 1995 : 2711-2718.
- Wallach, O. Alicyclic compounds. 1910. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/) (consulté le 12 Mars 2015).
- Warra, A.A. Cosmetic Potentials of African Shea Nut (*Vitellaria paradoxa*) Butter. *Current Research in Chemistry*, 2011 : 80-86.
- Wendt, K.U., Schulz, G.E. Isoprenoid biosynthesis : manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure*, 1998 : 127-133.
- Wenning, G.K., Tison, F., Seppi, K. Multiple system atrophy. *The Lancet Neurology*, 2004 : 93-103.
- Wick, W., Grimmel, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J., Weller, M. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999 : 1306-1312.

- Wilkinson, D.G. The pharmacology of donepezil : a new treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 1999 : 121-135.
- Wilkinson, K., Boyd, J.D., Glicksman, M., Moore, K.J., El Khoury, J. A high-content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid- $\beta$  interactions with its receptor CD36. *The Journal of biological and Chemical Sciences*, 2011 : 34914-34922.
- Word. Word Cancer Report. IARC, 2014.
- Wu, H.Y., Chang, C.I., Lin, B.W., Yu, F.L., Lin, P.Y., Hsu, J.L., et al. Suppression of Hepatitis B Virus X Protein-Mediated Tumorigenic Effects by Ursolic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011 : 1713-1722.
- www.graphpad.com. s.d.
- Xu, H. X., Zeng, F.Q., Wan, M., Sim, K.Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *Journal of Natural Products*, 1996 : 643-645.
- Yi, J.E., Obminska-Mrukowicz, B., Yuan, L.Y., Yuan, H. Immunomodulatory effects of betulinic acid from the bark of white birch on mice. *Journal of Veterinary Science*, 2010 : 305-313.
- Yun, Y., Han, S., Park, E., Yim, D., Lee, S., Lee, C.K., et al. Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Archives of Pharmacal Research*, 2003 : 1087-1095.
- Zerbo, J. Expérimentations de techniques de production de plantes d'arbres utilisés en agroforesterie traditionnelle. Cas du karité, *Butyrospermum paradoxum* (Gaertn. F.). Mémoire IDR, Université de Ouagadougou. 1987.
- Zhang, J., Kurita, M., Shinozaki, T., Ukiya, M., Yasukawa, K., Shimizu, N., et al. Triterpene glycosides and other polar constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels and their bioactivities. *Phytochemistry*, 2014 : 157-170.
- Zhang, R., Luo D., Miao, R., Bai, Q.G., Sessa, W.C., Min, W. Hsp90-Akt phosphorylates ASK 1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene*, 2005 : 3954-3963.