

RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDÉ I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES,
TECHNOLOGIES ET GÉOSCIENCES
UNITÉ DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN CHIMIE ET APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDÉ I

POSTGRADUATE SCHOOL OF SCIENCES,
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES
RESEARCH AND POSTGRADUATE TRAINING
UNIT FOR CHEMISTRY AND APPLICATIONS

LABORATOIRE D'ETUDE CHIMIQUE DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES ET DES
PLANTES MEDICINALES (LECEPLaM).

*CHEMICAL STUDY OF MEDICINAL PLANT AND ENDOPHYTIC FUNGI
LABORATORY (LECEPLaM).*

Etude chimique de deux plantes médicinales camerounaises :
Anonidium mannii (Oliver) Engler et Diels (Annonaceae) et
Donella welwitschii (Engl) Pierre ex Aubr. et Pelegr.
(Sapotaceae) et évaluation de leurs activités antibactériennes.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat/Ph.D en Chimie Organique

Par

NGANGOUE Marcelle Oliviane

Matricule : 08T399

Master en Chimie Organique



Sous la direction de :

NGAMENI Bathélémy

Professeur, Université de Yaoundé 1

et

Sous la supervision de :

NGADJUI TCHALEU Bonaventure

Professeur, Université de Yaoundé 1

Année : 2022

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTÉ DES SCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE MEMOIRE DE THESE DE DOCTORAT/*Ph.D* DE
Madame NGANGOUE Marcelle Oliviane

TITRE DE THESE: Etude chimique de deux plantes médicinales camerounaises :
Anonidium mannii (Oliver) Engler et Diels (Annonaceae) et *Donella welwitschii* (Engl)
Pierre ex Aubr. et Pelegr. (Sapotaceae) et évaluation de leurs activités antibactériennes.

Nous soussignés, enseignants ci-dessous nommés, membres du jury de soutenance de thèse de Doctorat/*Ph.D* de Madame NGANGOUE Marcelle Oliviane, Matricule 08T0399, attestons que cette candidate a bel et bien pris en compte dans la mouture finale de sa thèse, toutes corrections et recommandations qui lui ont été faites au cours de sa soutenance en date du 08 Juillet 2022.

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

Fait à Yaoundé, le

Le Jury :

Le Président

MBAZE MEVA'A Luc Leonard,
Professeur

Les rapporteurs

NGADJUI TCHALEU Bonaventure,
Professeur

NGAMENI Bathélémy,
Professeur

Les membres

MKOUNGA Pierre,
Maître de Conférences

EFFA ONOMO Pierre,
Maître de Conférences

ZONDEGOUMBA Ernestine,
Maître de Conférences

RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN

PAIX-TRAVAIL-PATRIE

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTÉ DES SCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROON
PEACE-WORK-FATHERLAND

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE FORMATION DOCTORALE EN CHIMIE ET APPLICATIONS

RESEARCH AND DOCTORAL TRAINING UNIT FOR CHEMISTRY AND APPLICATIONS

DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

LABORATOIRE D'ETUDE DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES ET DES PLANTES MEDICINALES

CHEMICAL STUDY OF MEDICINAL PLANT AND ENDOPHYTE FUNGI LABORATORY

DÉCLARATION SUR L'HONNEUR

Je soussigné, NGANGOUE Marcelle Oliviane Matricule 08T0399, étudiante en thèse de Doctorat/Ph.D en Chimie Organique, sous la direction de NGAMENI Bathélémy et la supervision de NGADJUI TCHALEU Bonaventure, Professeurs à l'Université de Yaoundé I (Cameroun) déclare sur l'honneur que le travail présenté dans cette thèse est original. Ce travail de recherche, effectué dans le cadre de plusieurs collaborations, est intitulé «*Etude chimique de deux plantes médicinales camerounaises : Anonidium mannii (Oliver) Engler et Diels (Annonaceae) et Donella welwitschii (Engl) Pierre ex Aubr. et Pelegr. (Sapotaceae) et évaluation de leurs activités antibactériennes.*».

J'atteste que ce travail n'a jamais été soutenu pour l'obtention d'un diplôme. En foi de quoi je sollicite sa soutenance comme thèse de Doctorat/Ph. D.

J'engage mon entière responsabilité dans le cas où ma déclaration serait mensongère et devant toutes les sanctions y afférentes.

Lu et approuvé par:

NGANGOUE Marcelle
Oliviane

Etudiante

NGAMENI Bathélémy
Professeur

NGADJUI TCHALEU
Bonaventure

Professeur Emérite

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 20 décembre 2021**ADMINISTRATION****DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*****VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*****VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*****VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*****Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*****Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*****1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)**

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP

18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste

35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice Doyen/FMSB/UIYI
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOULATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (31)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
13	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
22	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

25	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Assistant	En poste
26	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
27	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
28	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
29	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
30	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
31	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOU MFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHO GOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
----	---------------	-----------------------	----------

12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	<i>/ MINPROFF</i>
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste

31	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
32	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
33	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (40)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UIYI
2	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
14	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
15	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste

17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
26	ZONDEGOUNBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

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

36	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
37	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
38	OUETE NANTCHOUANG Judith	Assistante	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa

14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>

3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste

24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (44)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste

7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Assistante	En poste
41	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
42	OTTOU ABE Martin Thierry	Assistant	En poste
43	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
44	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste
10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)			

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
----	--------------	-----------	----------

42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste
----	--------------------	-----------	----------

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS

DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (02)	38 (18)
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	05 (02)	46 (14)
BPV	07 (01)	9 (01)	8 (06)	07 (01)	31 (9)
CI	10 (01)	10 (02)	10 (02)	03 (0)	33 (5)
CO	6 (1)	20 (04)	09 (03)	03 (01)	38 (9)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	25 (2)
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	06 (01)	44 (6)
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	42 (7)
Total	75 (6)	103 (28)	114 (32)	48 (12)	345 (78)

Soit un total de **345 (78)** dont :

- Professeurs **75 (6)**
- Maîtres de Conférences **103 (28)**
- Chargés de Cours **114 (32)**
- Assistants **48 (12)**

() = Nombre de Femmes **78**

DEDICACE

À

Mes parents : Mr Djialeu Nicolas et Mme Tientcheu Alice.

REMERCIEMENTS

J'adresse toute ma profonde gratitude au Professeur Emérite **B. T. NGADJUI** qui m'a accueilli dans son équipe de recherche, a supervisé cette thèse de bout en bout et qui m'a toujours encouragé et soutenu.

J'adresse ma profonde gratitude au Professeur **B. NGAMENI**, de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I qui a dirigé ce travail et m'a encouragé sans cesse.

Je remercie le Professeur **D. E. PEGNYEMB**, Directeur et Chef de Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences pour les efforts qu'il consent à la bonne marche du Département.

J'exprime ma reconnaissance au Professeur **S. O. YEBOAH** de l'Université du Botswana qui m'a accordé un séjour dans son laboratoire. Qu'il reçoive ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie également le *Network for Analytical and Bioassay Services in Africa (NABSA)* pour avoir financé mon séjour au Botswana et l'Université du Botswana pour les facilités qu'elle m'a accordées.

Mes remerciements vont à l'endroit de tous les enseignants du Département de Chimie Organique pour l'encadrement et la formation qu'ils m'ont donnés.

Ma gratitude va aux Maitres de Conférences **G. FOTSO** et **P. AMBASSA**, qui ont également suivi ce travail de bout en bout et pour tout le sacrifice consenti.

J'exprime également ma gratitude au Professeur **V. KUETE** de l'Université de Dschang pour les tests biologiques réalisés sur les extraits et les composés isolés au cours de ce travail.

Je remercie très chaleureusement mon époux, Mr. **M. EMALEU** pour toutes son affection, sa patience et pour son soutien multiforme.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit des mes enfants : **W. A Emaleu.**, **D. A Emaleu**, **T. G Emaleu**. et mon oncle **D. Tchandeu** de regretté mémoire pour le courage et la force que vous avez donné.

Une reconnaissance aux Docteurs **G. CHI** et **J. KAMGA** pour les multiples discussions enrichissantes que nous avons mené dans le cadre de la recherche, pour l'enregistrement de certains spectres et les corrections apportées à ce manuscrit, sans oublier les Docteurs, **D. NGNINTENDO**, **J. OUETE**, **R. ACHE** et tous les membres du LECEPLAM pour leurs encouragements, leur esprit de collaboration et d'entraide.

J'exprime également ma gratitude à Mme **T. WOUKOUNGA**, tu es pour moi comme une seconde mère. Tes conseils et ton soutien n'ont jamais été une défaite pour moi.

Je tiens à remercier ma belle-mère Mme **M. TCHOUDJI**, tes conseils et ton soutien ont été une arme précieuse pour moi.

Mes remerciements vont à l'endroit de mes frères et mes soeurs ainsi que tous les membres de ma famille et ma belle-famille, qu'ils reçoivent ici l'expression de mon profond attachement et de la gratitude d'une personne qui les estime beaucoup.

Je tiens à remercier Monsieur **V. NANA** de l'Herbier National du Cameroun pour l'identification des différents échantillons de plantes et la récolte du matériel végétal.

J'exprime toute ma gratitude à tous mes amis, collègues et tous ceux qui, de près ou de loin, matériellement ou moralement ont consenti leurs efforts nécessaires à l'aboutissement de ce travail.

SOMMAIRE

DEDICACE	xii
REMERCIEMENTS	xiii
SOMMAIRE	xv
RESUME	xvii
ABSTRACT	xix
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES	xxi
LISTE DES TABLEAUX	xxiii
LISTE DES FIGURES	xxvi
LISTE DES SCHEMAS	xxix
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	4
I.1. GENERALITES SUR LES ANNONACEAE ET LES SAPOTACEAE	5
I.1.1. GENERALITES SUR LES ANNONACEAE	5
I.1.2. GENERALITES SUR LES SAPOTACEAE	7
I.2. QUELQUES USAGES DES PLANTES DE LA FAMILLE DES SAPOTACEAE ET DES ANNONACEAE	11
I.2.1. Usage des plantes sur les plans industriel, économique et nutritionnel	11
I.2.2. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle	13
I.3. TRAVAUX CHIMIQUES ANTERIEURS SUR LE GENRE <i>ANNONA</i> ET LES SAPOTACEAE	14
I.3.1. Les alcaloïdes	15
I.3.2. Les Acétogénines	23
I.3.3. Les Terpénoïdes	24
I.3.4. Les composés phénoliques et polyphénoliques	39
I.4. TRAVAUX BIOLOGIQUES ANTERIEURS SUR LE GENRE <i>ANNONA</i> ET LES SAPOTACEAE	40
I.5. APERCU SUR LES BACTERIES	42
I.5.1. Définition et classification	42
I.5.2. Mode d'action des antibiotiques et résistance bactérienne aux antibiotiques	43
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	45
II.1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE	46
II.1.1. Matériel végétal	46

II.1.2. Extraction et isolement des métabolites secondaires	46
II.2. CARACTERISATION DES COMPOSES ISOLES DES DEUX PLANTES	54
II.2.1. Les Triterpènes.....	57
II.2.2. Les stéroïdes.....	109
II.2.3. Les alcaloïdes	127
II.2.4. Les dérivés de l'acide benzoïque	156
II.3. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES DES EXTRAITS ET PRODUITS NATURELS ISOLES	167
II.3.1. Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) des extraits bruts des racines et écorces d' <i>Anonidium mannii</i>	167
II.3.2. Résultats des CMI et CMB des composés isolés d' <i>Anonidium mannii</i> et de <i>D.welwitschii</i>	168
II.3.3. Discussion.....	172
II.3.4. Conclusion	174
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	175
CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES.....	177
III.1. APPAREILLAGE	178
III.2. MATERIEL VEGETAL ET ISOLEMENT	179
III.2.1. Extraction.....	179
III.2.2. Isolement des composés.....	179
III.2.2.1. Des racines de <i>A. mannii</i>	180
III.3. DONNEES PHYSIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPOSES ISOLES	187
III.4. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.....	194
III.4.1. Matériel	194
III.4.2. Méthodes	195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	197
ANNEXES	219
TESTS CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLES.....	219
LISTE DES PUBLICATIONS	220

RESUME

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique des extraits bruts au CH₂Cl₂/MeOH (1:1) des racines et écorces du tronc d'*Anonidium mannii* (Oliver) Engler et Diels (Annonaceae) et des lianes de *Donella welwitschii* (Engl) Pierre ex Aubr et Pellegr. (Sapotaceae) suivie de l'évaluation des activités antibactériennes des extraits et de certains métabolites secondaires isolés.

A l'aide des méthodes chromatographiques usuelles quatorze (14) et treize (13) composés ont été isolés d'*A. mannii* et de *D. welwitschii* respectivement. Ces composés dont vingt-sept (27) au total ont été entièrement caractérisés à l'aide des méthodes spectroscopiques usuelles (RMN 1D et 2D), la spectrométrie de masse et l'IR. Trois d'entre eux sont décrits ici pour la première fois. Il s'agit de : deux triterpènes tétracycliques Anomanol A et B, un alcaloïde isoquinoléique, la 9-hydroxy-8-méthoxyphénanthridin- 6(5H) –one. Un composé est isolé pour la première fois des sources naturelles la 8,9-diméthoxyphénanthridin- 6(5H) –one. Tous ces composés ont été isolés des écorces et des racines d'*A. mannii*.

Les vingt-trois autres composés obtenus, déjà décrits dans la littérature, appartiennent aux classes des composés suivantes :

- Trois alcaloïdes : manniindole, Arborinine et oxoanolobine ;
- Treize triterpènes : β -amyrine, acétate de β -amyrine, taraxérol, acétate d' α -amyrine, acétate de taraxérol, polycarpol, érythrodiol, lanosta-7,9(11), 24-triène-3 β ,21-diol, acide ursolique, acide oléanolique, acide diopyrique B;
- Six stéroïdes : β -sitostérol, 3-O- β -D-glucopyranoside de β -sitostérol, spinastérol, 3-O- β -D-glucopyranoside de spinastérol, stigmastérol et 3-O- β -D-glucopyranoside de stigmastérol ;
- Deux dérivés de l'acide benzoïque : Acide 3,4-dihydroxybenzoïque, l'acide vanillique, et une benzophénone : 3-C- β -D-glucopyranosyl-2,4', 4,6-tétrahydroxybenzophénone.

Les extraits bruts des racines (AMR), des écorces (AME) d'*A.mannii* et seize (16) composés isolés ont été évalués pour leur activité antibactérienne sur douze (12) souches et

isolats cliniques de bactéries multi-résistantes dont neuf Gram-négatives et trois Gram-positives. Ces tests ont été réalisés à l'aide de la technique de microdilution avec la ciprofloxacine et le chloramphénicol comme référence. Il en ressort que l'extrait des racines est le plus actif avec une CMI 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur la souche *K. pneumoniae* (ATCC 11296). Par ailleurs, les seize (16) composés testés ont été actifs sur au moins un isolat de tous les espèces (*E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*). Cependant, l'acide diospyrique B a significativement inhibé la croissance de *E. coli* AG100 Atet, *E. aerogenes* ATCC13048, *K. pneumoniae* KP55, *P. stuartii* ATCC 29 et *S. aureus* MRSA3 avec des CMI comprises entre 4 et 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ce composé s'est avéré plus actif que le chloramphénicol sur la souche *E. coli* AG100Atet, avec une CMI égale à 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'érythrodiol et l'acide oléanolique ont montré une activité significative avec des CMI de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur *E. aerogenes* EA27, *K. pneumoniae* ATCC11296 *E. coli* AG100 Atet, *P. stuartii* PS2636 et *S. aureus* MRSA6. L'anomanol A a montré une activité modérée avec des CMI de 32 et 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur les souches *E. coli* AG100Atet et *K. pneumoniae* ATCC 11296 respectivement. L'anomanol B et la 9-hydroxy-8-méthoxyphénanthridin-6(5H)-one ont présenté des faibles activités.

Ces résultats montrent que l'acide diospyrique B, l'anomanol A et l'acide oléanolique sont de potentiels antibactériens et peuvent être explorés dans la conception des médicaments contre les infections bactériens, justifiant ainsi l'usage traditionnel de *A. manni* et *D. welwitschii* contre les douleurs abdominales.

Mots clés : *Anoniduim manni* ; *Donella welwitschii*, Anomanol A, Anomanol B, 9-hydroxyl-8-méthoxyphénanthridin- 6(5H) –one, manniindole, Activité antibactérienne.

ABSTRACT

The present work reports on the chemical study of the dichloromethane-methanol (1:1) extracts of the stem and root barks of *Anonidium mannii* (Oliver) Engl. et Diels (Annonaceae) and liana of *Donella welwitschii* (Engl) Pierre ex Aubr et Pellegr. (Sapotaceae), together with the evaluation of the antibacterial activities of the extracts and some isolates.

Fourteen (14) and thirteen (13) compounds were isolated from the extracts of *A. mannii* and *D. welwitschii* respectively using different chromatographic methods. The structures of these twenty-seven compounds were determined by usual spectroscopic methods such as (1D and 2D) NMR, MS, and IR. Three isolated compounds are described here for the first time: Two tetracyclic triterpenes Anomanol A, B, one isoquinoline alkaloid, 9-hydroxy-8-methoxyphenanthridin- 6(5H) –one. In addition, the alkaloid 9,8-dimethoxyphenanthridin-6(5H)–one previously known as a synthetic compound is herein reported as naturally occurring for the first time. All these compounds were isolated from *A. mannii*.

The twenty-three other compounds are classified as follows:

- Three alkaloids : manniindole, Arborinine and oxoanolobine;
- Eleven triterpenes: β -amyrin, β -amyrin acetate, taraxerol, α -amyrin acetate , taraxeryl acetate, polycarpol, erythrodiol, lanosta-7,9(11), 24-triene-3 β ,21-diol, ursolic acid, oleanolic acid, diopyric acid B;
- Six steroids : β -sitosterol, β -sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside, spinasterol, spinaterol 3-O- β -D-glucopyranoside, stigmasterol and stigmasterol 3-O- β -D-glucopyranoside;
- Three phenolic compounds: 3,4-dihydroxybenzoic acid, vanillic acid, 3-C- β -D-glucopyranosyl-2,4',4,6-tetrahydroxylbenzophenone.

The crude extracts of root and stem barks as well as sixteen isolated compounds were evaluated for their antibacterial activities against thirteen strains of multidrug-resistant including nine Gram-negative and three Gram-positive. Broth microdilution method was used for the determination of Minimal Inhibitory Concentration with Ciprofloxacin and chloramphenicol as reference drugs. The results showed that root extract was the most active with a MIC values at 64 μ g/mL on the *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 11296) strain. Moreover, the sixteen compounds tested were active on at least one isolate of all the germs

(*E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii*, *P.s aeruginosa* and *S. aureus*). However, diospyric acid B exhibited significant activity with MIC of 4 or 8 µg/mL on *E. coli* AG102, *E. aerogenes* ATCC13048, *K. pneumoniae* KP55, *P. stuartii* PS2636 et *S. aureus* MRSA3. This compound was more effective than chloramphenicol on *E. coli* AG100Atet with MIC value of 4 µg/mL.

Erythrodiol and oleanolic acid exhibited significant activity with MIC value of 8 µg/mL on *E. aerogenes* EA27, *K. pneumonia* ATCC11296 *E. coli* AG102, *P. stuartii* PS2636 and *S. aureus* MRSA6. Anomanol A showed moderate activity with MIC values of 32 and 16 µg/mL on *E. coli* AG100Atet and *K. pneumoniae* ATCC 11296 respectively. Anomanol B and 9-hydroxy-8-methoxyphenanthridin-6(5H)-one showed weak activity.

These results show that diospyric acid B, anomanol A, and oleanolic have antibacterial potentials thus can be exploited in the design of drugs against bacterial infections hence justifying the traditional use of *A.mannii* and *D. welwitschii* against abdominal pain.

Key words: *Anoniduim manni*, *Donella welwitschii*, Anomanol A, Anomanol B, 9-hydroxyl-8-methoxyphenanthridin- 6(5H) –one, , manniindol, antibacterial activity.

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

A. :	<i>Annodum ou Annona</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AE :	Acétate d'éthyle
AG :	
ATCC :	American Type Culture Collection
B. :	<i>Bacillus</i>
CC :	Chromatographie sur Colonne
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CoA :	Coenzyme A
COSY :	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d:	Doublet
D. :	<i>Donella</i>
dd :	Doublet Dédoublé
DEPT:	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIC :	Diisopropylcarbodiimide
dl :	Doublet large
E.:	<i>Escherichia</i>
EA:	<i>Enterobacter aerogenes</i>
ESI:	Electron Spray Ionisation
ES-TOF :	Electron Spray-Time of Flight
g:	Gramme
HEX:	Hexane
HMBC:	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HMQC:	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HR-ESI-MS:	<i>High Resolution-Electro Spray Ionisation-Mass Spectrometry</i>
HSQC:	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz:	Hertz
IR :	Infra Rouge
J :	Constante de Couplage en Hertz

K. :	<i>Klebsiella</i>
Kg :	Kilogramme
KP :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
m:	Multiplet
m/z:	Masse/charge d'un ion
MHz:	Méga Hertz
mL:	millilitre
MRSA:	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NOESY :	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
P. :	<i>Providencia</i>
P. :	<i>Pseudomonas</i>
Pf :	Point de Fusion
ppm :	Partie par million
PS :	<i>Pseudomonas stuartii</i>
Pyr :	Pyridine
RDA :	Rétro Diels-Alder
RMN ¹³C :	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone-13
RMN ¹H :	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
s :	Singulet
S. :	<i>Staphylococcus</i>
sl :	Singulet large
SM :	Spectrométrie de Masse
t :	Triplet
V. :	<i>Vibrio</i>
δ (ppm) :	Déplacement Chimique en ppm

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Quelques espèces de Sapotaceae identifiées au Cameroun	8
Tableau 2: Quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur	17
Tableau 3: Quelques alcaloïdes isolés des espèces du genre <i>Annona</i> et des Sapotaceae et activités biologiques	20
Tableau 4: Quelques acétogénines isolés des espèces du genre <i>Annona</i>	23
Tableau 5: Quelques Monoterpènes et sesquiterpènes isolés des espèces du genre <i>Annona</i>	27
Tableau 6: Différents groupes structuraux des triterpènes pentacycliques	29
Tableau 7: Quelques triterpènes isolés de la famille des Sapotaceae et du genre <i>Annona</i> et activités biologiques	35
Tableau 8: Quelques stéroïdes isolés des genres <i>Donella</i> et <i>Annona</i>	38
Tableau 9: Quelques composés phénoliques isolés du genre <i>Annona</i> et des Sapotaceae et activités biologiques	39
Tableau 10: Activités biologiques de quelques espèces du genre <i>Annona</i>	40
Tableau 11: Activités biologiques de quelques espèces de la famille des Sapotaceae.....	41
Tableau 12: Activités biologiques de quelques espèces de la famille des Sapotaceae (suite et fin)	42
Tableau 13: Regroupement des différents composés isolés des écorces, racines et tiges de <i>A. mannii</i> et <i>D. welwitschii</i>	55
Tableau 14: Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de AMr ₁ comparées à celles de polycarpol de la littérature RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz)	59
Tableau 15: Données spectrales de RMN ¹ H et RMN ¹³ C (600 MHz, 150 MHz, DMSO-d ₆) de AMe ₂₈₁	67
Tableau 16: Données spectrales de RMN ¹ H (acétone-d ₆ , 600 MHz), et RMN ¹³ C (acétone-d ₆ , 150 MHz) de AMe ₂₄₀₋₂₄₉	74
Tableau 17: Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de AMRH ₁₆₃ comparées à celles du lanosta-7,9(11),24-trién-3β, 21-diol de la littérature RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃)	78
Tableau 18: Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de de DW ₂ comparées à celles de taraxérol de la littérature RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz)	81
Tableau 19: Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz,) de DW ₉ comparées à celles de l'acétate de taraxérol de la littérature RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz)	83
Tableau 20: Données spectrales de RMN ¹³ C (Pyr, 150 MHz) de DW ₆ comparées à celles de l'acide ursolique de la littérature RMN ¹³ C (Pyr, 150 MHz)	87
Tableau 21: Comparaison des données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de DW ₁₁ avec la β-amyrine (CDCl ₃ , 75 MHz) (Ebajo et al., 2015), et de DW ₄ (CDCl ₃ , 75 MHz) avec l'acétate de β-amyrine.....	92
Tableau 22: Données spectrales de RMN ¹³ C (MeOH, 150 MHz) de DW ₇ comparées à celles de la 28-hydroxy-β-amyrine de la littérature RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz)	98
Tableau 23: Données spectrales de RMN ¹³ C (CHCl ₃ , 100 MHz) de DW ₁₀ comparées à celles de l'acide diospirique B de la littérature RMN ¹³ C (Pyr, 125 MHz).....	103
Tableau 24: Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz,) de de DW ₃ comparées à celles de l'acétate de l'α-amyrine de la littérature RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz).....	106

Tableau 25 : Données spectrales de RMN 13C (CDCl ₃ , 75 MHz) de DW ₈ comparées à celles de l'acide oléanolique RMN 13C (CDCl ₃ , 100 MHz).....	109
Tableau 26: Données RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de DW ₁ comparées à celles de la littérature RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃).	112
Tableau 27 : Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz) de DWB ₃₀ Comparées à celles de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz) du 3-O-β-D-glucopyranoside de spinastérol.....	115
Tableau 28: Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de AMrH ₉₀ comparées à celles de stigmastérol de la littérature RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz).....	120
Tableau 29: Données spectrales de RMN ¹³ C (Pyr-d ₅ , 75 MHz) de AMr ₂₆₄ comparées à celles de β-sitostérol -3-O-β-D-glucopyranoside de la littérature RMN ¹³ C (Pyr-d ₅ , 150 MHz).....	123
Tableau 30: Données spectrales de RMN 13C (pyr-d ₅ , 75 MHz) de AMe ₄₅₇ comparées à celles de 3-O-β-D-glucopyranosyl stigmastérol de la littérature RMN ¹³ C (pyr-d ₅ ,150 MHz)	126
Tableau 31 : Données spectrales de RMN ¹ H et de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 600 et 150 MHz) de AMe ₁₈₄	133
Tableau 32: Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz) de AMr ₁₇₂₋₁₇₅ comparées à celles de 8,9-diméthoxyphénanthridin- 6(5H) -one de la littérature RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz).	137
Tableau 33: Données spectrales de RMN ¹³ C (MeOD, 125 MHz) de AMrA ₃₀₆ comparées à celles du manniindole de la littérature RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 125 MHz)	144
Tableau 34: Données spectrales de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de AMr _{52P} comparées à celles de l'aborinine de la littérature RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz).....	150
Tableau 35: Données spectrales de RMN ¹³ C (DMSO,150 MHz) de AMr ₂₄₁ comparées à celles de l'oxoanolobine de la littérature RMN ¹³ C (MeOD,150 MHz)	156
Tableau 36: Données spectrales de RMN ¹³ C (DMSO, 150 MHz) de AMe ₃₄₉ comparées à celles de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque de la littérature RMN ¹³ C (MeOD, 75 MHz).....	159
Tableau 37: Données spectrales de RMN ¹³ C (Pyr-d ₅ , 100 MHz) de DW ₅ comparées à celles de l'acide- 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque de la littérature RMN ¹³ C (MeOD, 125 MHz).	162
Tableau 38: Données spectrales de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 75 MHz) de DWBP ₂ comparées à celles du 3-C-β-D-glucopyranosyl-2, 4', 4, 6-tétrahydroxylbenzophénone de la littérature RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	167
Tableau 39: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) en µg/mL de la Ciprofloxacine, des extraits des racines et des écorces	168
Tableau 40: concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) en µg/mL du ciprofloxacine et des composés isolés de <i>A. manni</i> contre les bactéries Gram-négatives	169
Tableau 40: concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) en µg/mL du chloramphénicol et de quelques composés isolés de <i>A. manni</i> contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positifs.....	170
Tableau 42: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) en µg/mL des composés isolés de <i>D.welwitschii</i> et du chloramphénicol contre les bactéries Gram-négative et Gram-positives	171
Tableau 43: Chromatogramme de l'extrait brut des racines de <i>A. manni</i>	180
Tableau 44: Chromatogramme du mélange des fractions à Hexane et au dichlorométhane des racines de <i>A. Manii</i>	181
Tableau 45: Chromatogramme de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de <i>A.Manii</i>	182
Tableau 46: Chromatogramme de l'extrait brut des écorces de tronc de <i>A. manni</i>	183

Tableau 47: Chromatogramme de la fraction à l' Hexane A (5,32 g) des lianes de <i>D. welwitschii</i> ...	184
Tableau 48: Chromatogramme de la fraction à l'Acétate d'éthyle B (9 g) des lianes de <i>D. welwitschii</i>	185
Tableau 49: Chromatogramme de la fraction au n-Butanol C (7g) des lianes de <i>D. welwitschii</i>	186
Tableau 50: Chromatogramme de la fraction au Méthanol D (8,5 g) deS lianes de <i>D. welwitschii</i> ..	187

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Photos de <i>A. mannii</i> (oliver) Engler et Diels (Photos : www.africanplants.senckenbeng)	6
Figure 2: Parties aériennes de <i>D. welwitschii</i> (engl) (Photos : M. Ngangoue, Juin 2015 à Bertoua, Région de Est Cameroun).....	11
Figure 3: Quelques exemples de classe d'alcalcoïdes.....	16
Figure 4: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75 MHz) d'AMr ₁	57
Figure 5: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de AMr ₁	58
Figure 6: Spectre de masse ESI haute résolution de AMe ₂₈₁	60
Figure 7: Spectre IR (KBr) de AMe ₂₈₁	61
Figure 8: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (DMSO-d ₆ , 150MHz) de AMe ₂₈₁	62
Figure 9: Spectre de DEPT 135 de AMe ₂₈₁	62
Figure 10: Spectre de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) de AMe ₂₈₁	63
Figure 11: Spectre de HMQC de AMe ₂₈₁	64
Figure 12: Spectre de COSY (DMSO-d ₆ , 600 MHz) de AMe ₂₈₁	64
Figure 13: Spectre de HMBC (DMSO-d ₆) de AMe ₂₈₁	65
Figure 14: Spectre de masse ESI haute résolution de AMe ₂₄₀₋₂₄₉	68
Figure 15: Spectre de RMN ¹ H (Acétone-d ₆ , 600MHz) de AMe ₂₄₀₋₂₄₉	69
Figure 16: Spectre de HMQC de AMe ₂₄₀₋₂₄₉	70
Figure 17: Spectre de COSY (Acétone-d ₆ , 600MHz) de AMe ₂₄₀₋₂₄₉	70
Figure 18: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (Acétone-d ₆ , 150MHz) de AMe ₂₄₀₋₂₄₉	71
Figure 19: Spectre de RMN ¹³ C-DEPT (Acétone-d ₆ , 150MHz) de AMe ₂₄₀₋₂₄₉	72
Figure 20: Spectre de HMBC de AMe ₂₄₀₋₂₄₉	73
Figure 21: Spectre de masse ESI-MS de AMrH ₁₆₃	75
Figure 22: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de AMrH ₁₆₃	76
Figure 23: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75MHz) de AMrH ₁₆₃	76
Figure 24: Spectre de HMQC de AMrH ₁₆₃	77
Figure 25: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75MHz) de DW ₂	79
Figure 26: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de DW ₂	80
Figure 27: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de DW ₉	82
Figure 28: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75MHz) de DW ₉	82
Figure 29: Spectre de RMN ¹ H (MeOD, 300 MHz) de DW ₆	85
Figure 30: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (Pyr-d ₅ , 150MHz) de DW ₆	86
Figure 31: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de DW ₁₁	88
Figure 32: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75 MHz) de DW ₁₁	89
Figure 33: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de DW ₄	90
Figure 34: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75 MHz) de DW ₄	91
Figure 35: Spectre de RMN ¹ H (MeOD, 600 MHz) de DW ₇	94
Figure 36: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (MeOD, 150 MHz) de DW ₇	95
Figure 37: Spectre de HSQC (MeOD) de DW ₇	96
Figure 38: Spectre de HMBC (MeOD) de DW ₇	97
Figure 39 : Spectre de Masse ES-TOF de DW ₁₀	99
Figure 40: Spectre de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) de DW ₁₀	100

Figure 41: Spectre de HSQC de DW ₁₀	100
Figure 42: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (MeOD, 100 MHz) de DW ₁₀	101
Figure 43: Spectre de HMBC de DW ₁₀	102
Figure 44: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de DW ₃	104
Figure 45: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75 MHz) de DW ₃	105
Figure 46 : Spectre de RMN ¹ H (MeOD, 300 MHz) de DW ₈	107
Figure 47: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (MeOD, 75 MHz) de DW ₈	108
Figure 48: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75 MHz) de DW ₁	110
Figure 49: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de DW ₁	111
Figure 50: Spectre de RMN ¹ H (Pyridine-d ₅ , 300 MHz) de DWB ₃₀	113
Figure 51: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (Pyridine-d ₅ , 75 MHz) de DWB ₃₀	114
Figure 52: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) de AMe ₅₀	116
Figure 53: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 150 MHz) de AMe ₅₀	117
Figure 54: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de AMrH ₉₀	118
Figure 55 : Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 75 MHz) de AMrH ₉₀	119
Figure 56: Spectre de RMN ¹ H (Pyr-d ₅ , 300 MHz) de AMr ₂₆₄	121
Figure 57: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (Pyr-d ₅ , 75 MHz) de AMr ₂₆₄	122
Figure 58: Spectre de DEPT 135 (Pyr-d ₅ , 75 MHz) de AMr ₂₆₄	122
Figure 59: Spectre de RMN ¹ H (Pyr-d ₅ , 400MHz) de AMe ₄₅₇	124
Figure 60: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (Pyr-d ₅ , 100MHz) de AMe ₄₅₇	125
Figure 61: Spectre de HMQC (pyr-d ₅) de AMe ₄₅₇	125
Figure 62: Spectre de masse ESI-MS de AMe ₁₈₄	127
Figure 63: Spectre IR (KBr) de AMe ₁₈₄	128
Figure 64: Spectre de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400MHz) de AMe ₁₈₄	129
Figure 65: Spectre de HSQC de AMe ₁₈₄	130
Figure 66: Spectre de COSY (DMSO-d ₆ , 150 MHz) de AMe ₁₈₄	130
Figure 67: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (DMSO-d ₆ , 150 MHz) de AMe ₁₈₄	131
Figure 68: Spectre de HMBC de AMe ₁₈₄	132
Figure 69 : Spectre NOESY de AMe ₁₈₄	132
Figure 70: Spectre de masse ESI-MS de AMrH ₁₇₂₋₁₇₅	134
Figure 71: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de AMrH ₁₇₂₋₁₇₅ comparé à celui de AMe ₁₈₄ (DMSO, 600 MHz).....	135
Figure 72: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 125 MHz) de AMrH ₁₇₂₋₁₇₅	135
Figure 73: Spectre de HMBC (CDCl ₃) de AMrH ₁₇₂₋₁₇₅	136
Figure 74: Spectre de masse ESI-MS de AMrA ₃₀₆₋₃₁₄	138
Figure 75: Spectre IR (KBr) de AMrA ₃₀₆₋₃₁₄	139
Figure 76: Spectre de RMN ¹ H (MeOD, 500 MHz) de AMrA ₃₀₆₋₃₁₄	141
Figure 77: Spectre de COSY (MeOD, 500 MHz) de AMrA ₃₀₆₋₃₁₄	142
Figure 78: Spectre de HMQC de AMrA ₃₀₆₋₃₁₄	142
Figure 79: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (MeOD, 125 MHz) de AMrA ₃₀₆₋₃₁₄	143
Figure 80: Spectre de HMBC (MeOD) de AMrA ₃₀₆₋₃₁₄	144
Figure 81: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (CDCl ₃ , 125MHz) de AMr _{52P}	145
Figure 82: Spectre de DEPT 135 (CDCl ₃ , 125MHz) de AMr _{52P}	146
Figure 83: Spectre de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de AMr _{52P}	147
Figure 84: Spectre de HSQC de AMr _{52P}	148

Figure 85: Spectre de HMBC de AMr _{52P}	149
Figure 86: Spectre de masse ESI-MS de AMr ₂₄₁	151
Figure 87: Spectre de RMN ¹ H DMSO-d ₆ , 600 MHz) de AMr ₂₄₁	152
Figure 88: Spectre de HMQC de AMr ₂₄₁	152
Figure 89: Spectre de COSY (DMSO-d ₆ , 600 MHz) de AMr ₂₄₁	153
Figure 90: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (DMSO-d ₆ , 150 MHz) de AMr ₂₄₁	154
Figure 91: Spectre de DEPT 135 (DMSO-d ₆ , 150) de AMr ₂₄₁	154
Figure 92: Spectre de HMBC (DMSO-d ₆) de AMr ₂₄₁	155
Figure 93: Spectre de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) de AMe ₃₄₉	157
Figure 94: Spectre de HMQC (DMSO-d ₆) de AMe ₃₄₉	157
Figure 95: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (DMSO-d ₆ , 150 MHz) de AMe ₃₄₉	158
Figure 96: Spectre de ¹³ C-DEPT 135 (DMSO-d ₆ , 150 MHz) de AMe ₃₄₉	158
Figure 97: Spectre de RMN ¹ H (Pyr-d ₅ , 400 MHz) de DW ₅	160
Figure 98: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (Pyr-d ₅ , 100 MHz) de DW ₅	161
Figure 99: Spectre de masse ES-TOF de DWBP ₂	163
Figure 100: Spectre de IR de DWBP ₂	163
Figure 101: Spectre de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 300 MHz) de DWBP ₂	164
Figure 102: Spectre de RMN ¹³ C découplé large bande (DMSO-d ₆ , 75MHz) de DWBP ₂	165
Figure 103: Spectre de DEPT1 35 de DWBP ₂	165
Figure 104: Spectre de HMBC de DWBP ₂	166

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1: Biosynthèse des alcaloïdes isoquinoléiques.....	18
Schéma 2: Schéma de biosynthèse des terpénoides.....	26
Schéma 3: Fragmentation Rétro-Diels-Ader des séries oléananes et ursanes	32
Schéma 4: Fragmentation de la série Friedelane	33
Schéma 5: Représentation schématique de la cellule des bactéries Gram-positives et Gram-négatives	43
Schéma 6: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des écorces de <i>A. mannii</i>	47
Schéma 7: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des racines de <i>A. mannii</i> (Première récolte).....	49
Schéma 8: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des racines de <i>A. mannii</i> (deuxième récolte).....	51
Schéma 9: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des lianes de <i>D.welwitschii</i>	53

INTRODUCTION GENERALE

Les infections bactériennes demeurent un problème de santé publique principalement dans les pays à faible revenu. Chaque année on enregistre environ 13 millions de décès dans le monde dus aux infections bactériennes (OMS, 2019a) parmi lesquelles, on cite les gastro-entérites qui sont des inflammations du tractus gastro-intestinales, principalement l'estomac et l'intestin grêle. Elles provoquent principalement les diarrhées et les vomissements. *E. coli*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *campylobacter*, *B. cereus*, *V. cholerae* sont les principaux agents causals (Boyce, 2019; OMS, 2019b, Thomas, 2019). On enregistre environ 1,7 milliards de cas gastro-entérite chaque année et près de 499 mille décès d'enfants de moins de cinq (5) ans dans le monde (OMS, 2019b). En 2021, 2,2% du taux de mortalité étaient enregistrés dans les pays en voie de développement (OMS, 2021). Toutefois, le management des infections gastroentériques se fait principalement par l'administration des antibiotiques. La ciprofloxacine (1) est recommandée en première ligne pour les patients. Le ceftriaxone (2) et le triméthoprim-sulphaméthoxazole (3) sont recommandés en second ligne. Cependant, ces antibiotiques font face à de nombreuses limites comme la toxicité et les phénomènes de résistances (Balkis et al., 2002). Environ 700 000 personnes meurent chaque année à cause de la résistance aux antibiotiques (OMS, 2019a). Les études menées par Marbou et al. (2020) et celles de Mouiche et al. (2019) ont démontrés que les isolats cliniques de *E. coli*, *Staphylococcus Spp.*, *K. pneumonia* obtenus chez les patients de l'hôpital de Mbouda, région de l'Ouest Cameroun étaient multirésistants face aux antibioques tels que la ciprofloxacine (1), l'amoxicilline (4), le ceftriaxone (2) et le triméthoprime-sulphaméthoxazole (3). De même, la résistance de ces bactéries face aux antibiotiques a permis à l'OMS de les inclure dans liste des 12 bactéries pour lesquelles l'intérêt de la recherche de nouveaux médicaments devient un impératif (Jalowiecki et al., 2022).

La recherche de nouveaux principes actifs antibactériens plus efficaces, de source naturelle et moins toxiques pour l'organisme constitue donc un vaste chantier auquel nous avons voulu apporter notre contribution ; ceci en entreprenant dans le cadre de nos travaux en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/Ph.D en Chimie Organique, l'étude chimique de deux plantes médicinales Camerounaises : *A. manni* (Oliver) Engler et Diels.

(Annonaceae) et *D. welwitschii* (Engl) Pierre ex Aubr et Pellegr (Sapotaceae) et évaluation de leurs activités antibactériennes. Ainsi : « les extraits et les molécules isolées de ces deux plantes possèderaient –ils des activités antibactériennes ? Le choix porté sur ces deux plantes a été motivé par leurs divers usages ethnobotaniques (dysentérie, diarrhée, gastro-entérite...) (**Bouquet, 1969**) d'une part, les usages ethnopharmacologiques des espèces des genres *Annona* et *Donella* douées de propriétés antimicrobiennes (**Gajalakshmi et al., 2011; Djeussi et al., 2013 ; Kuete et al. 2013 ; Djoumessi et al., 2012**) d'autre part et le fait qu'au début de nos travaux, ces plantes avaient fait l'objet de très peu d'études chimiques et pharmacologiques à notre connaissance.

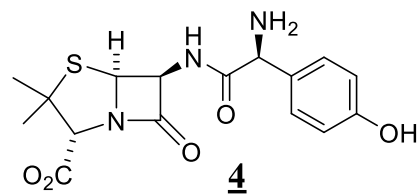
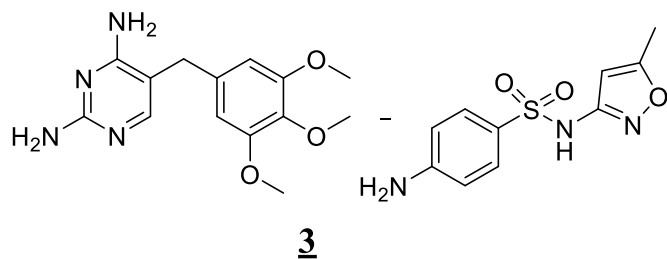
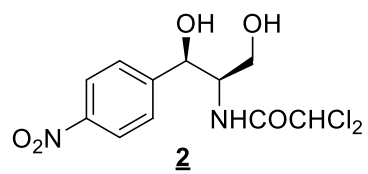
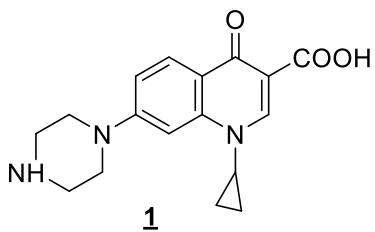
L'objectif général de ce travail est de rechercher les métabolites secondaires à activités antibactériennes de deux plantes médicinales Camerounaises : *A. mannii* (Oliver) Engler et Diels. et *D. welwitschii* (Engl) Pierre ex Aubr et Pellegr (Sapotaceae).

Plus spécifiquement, il est question de :

- Isoler les métabolites secondaires contenus dans les différentes fractions des deux plantes ;
- Caractériser les métabolites secondaires isolés ;
- Evaluer les propriétés antibactériennes des extraits et de certains métabolites secondaires purs isolés.

Ce travail s'articule autour de trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une revue de la littérature sur les deux plantes
- Le second chapitre présente les résultats et discussion, suivie d'une conclusion générale et des perspectives.
- Le troisième chapitre est consacré aux méthodes expérimentales utilisées dans ce travail et s'acheve par la présentation de la bibliographie consultée.



CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. GENERALITES SUR LES ANNONACEAE ET LES SAPOTACEAE

I.1.1. GENERALITES SUR LES ANNONACEAE

Les Annonaceae constituent une grande famille de plantes formées actuellement d'environ 120 genres et 2430 espèces répandues sous les tropiques, la plupart en forêt dense humide de basse altitude. Les plantes de cette famille se caractérisent par l'absence complète de stipules. Les feuilles simples, alternées et distiques ne sont jamais ni lobées, ni dentées. Elles sont généralement courtement pétiolées. Cette famille est constituée d'arbres et d'arbustes. Les arbres atteignent en moyenne 15 à 30 m de hauteur et les arbustes de 7 à 10 m. Les Annonaceae sont aussi caractérisés par un albumen ruminé ; l'embryon est généralement petit. Le nombre de graines ainsi que leur disposition dans les méricarpes correspondent en général à ceux des ovules dans chaque carpelle. Ainsi de nombreux genres peuvent être caractérisés par la disposition unie ou bisériée des graines dans les méricarpes (**Chatrou et al. 2012 ; Couvreur et al. 2019 ; Guo et al. 2017 ; Thomas, 1969 ; Xue et al. 2018**). Parmi les genres les plus répandus on peut citer : *Xyloploma*, *Monodora*, *Duguetia*, *Piptostigma*, *Unonopsis*, *Aethiopia*, *Artabotrys* et *Anonidium* qui fait l'objet de notre étude (**Chaowasku et al. 2018**).

I.1.1.1. Généralités sur le genre *Anonidium* ou *Annona*

Les plantes du genre *Anonidium* sont des arbres et des arbustes à indument de poils simples, avec inflorescences naissant sur le tronc ou sur les rameaux ; à sépales valvaires, soudées à la base et plus petits que les pétales. Les fruits sont syncarpiques, grands, ovoïdes, réticulés, charnus et formés de très nombreuses méricarpes soudées. Les graines sont oblongues-subréniformes, aplaties et nombreuses (une par méricarpe). Les espèces les plus connues sont : *A. floribundum*, *A. Le-Testui*, *A. senegalensis*, *A. montana*, *A. glabra*, *A. muricata*, *A. emarginata*, *A. neosalicifolia*, *A. cherimola*, *A. squamosa*, *A. reticulata*, *A. crassiflora*, *A. purpurea*, *A. salzmannii*, *A. foetida*, *A. vepretorum*, *A. rugulosa*, *A. mucosa*, *A. cuneata*, *A. amazonica*, *A. diversifolia*, *A. hypoglauca*, *A. leptopetala*, *A. pickelii*, *A. sericea* (**Egydio-Brandão, 2017**). En Afrique tropicale le genre *Anonidium* est représenté par quatre espèces, tous en forêt dense humide à savoir : *A. floribundum*, *A. Le-Testui*, *A. muricata* et *A. mannii* qui fait l'objet de notre étude (**Chatrou et al. 2012 ; Guo et al. 2017 ; Thomas, 1969 ; Xue et al. 2018**).

I.1.1.2. Aperçu botanique sur *Anonidium mannii* (Oliver) Engler et Diels

Encore appelée *Annona mannii* ou *Uvaria crassipetala* (Engler), l'espèce *Anonidium mannii* est un arbre de 10 à 30 m de hauteur et de 40-80 cm de diamètre. Son fût est court, légèrement tordu et cannelé. L'écorce vert foncé, lisse et spongieuse recouvre un bois jaune qui s'oxyde rapidement en rouge lie de vin, fibreux, et aromatique. Ses branches sont retombantes à cime dense (**Lathan, 2004**).

Les feuilles longues de 20-40 cm, ont un pétiole long de 3-7 mm, épais, pubérulentes à glabres. Le limbe papyracé à subcoriace elliptique, atténué, arrondi, subcordée vers la base, arrondi et brusquement acuminé au sommet ou atténué-acuminé. La face inférieure est pubérulente à l'état juvénile, devenant glabres. La nervure médiane est très proéminente en dessous. Les nervures latérales sont saillantes à la face inférieure.

Les fruits, pendants sur le tronc sont syncarpiques, gros, cylindriques-ovoides, longs de 25-30 cm, larges de 10-30 cm, réticulés-aréolés, pouvant atteindre 10 Kilos. Les graines sont nombreuses, oblongues aplaties et noyées dans une pulpe abondante (**Thomas, 1969 ; Lathan, 2004**).



Figure 1: Photos de *A. mannii* (oliver) Engler et Diels (Photos : www.africanplants.senckenbeng)

Annona mannii est une plante très répandue en forêt dense humide et en galeries forestières ou en savanes préforestières, sur sols argileux avec humus, du Nigeria à la République centrafricaine et au Congo-kinshasa. Au Cameroun, on la rencontre dans les monts cristal, le Sud du Cameroun ex- britannique, au Centre (**Thomas, 1969**).

I.1.2. GENERALITES SUR LES SAPOTACEAE

La famille des Sapotaceae est l'une des plus importantes de la flore forestière Camerounaise. Les espèces de cette famille sont parfois sous forme d'arbustes et grands arbres pour la plupart (**Lemmens, 2008**). Les Sapotaceae sont aisément reconnus par la présence du latex blanc dans leur système végétatif, une entaille dans l'écorce ; la section d'un rameau, d'une feuille laissant suinter plus ou moins de latex (**Aubréville, 1964**). Elles ont une taille moyenne d'environ 30 m de hauteur. Leur fût rectiligne et cylindrique est quelques fois relativement cannelé, dont le diamètre peut atteindre environ 80 cm. Leurs feuilles sont disposées en fascicules à l'extrémité des rameaux, des branches ainsi que sur le tronc (**Lemmens, 2008**). Leurs feuilles sont simples, alternées ou rarement opposées, souvent entières avec ou sans stipules (**Aubréville, 1964**).

Les fruits jaunes ou verts, dont le nombre est caractéristique de la famille, sont de grosses baies globuleuses aplaties avec un diamètre d'environ 15 cm. Ils renferment également beaucoup de graines noires et recouvertes d'une cicatrice linéaire (**Lemmens, 2008**). Les fleurs sont hermaphrodites et souvent petites, rarement simplement femelle, elles sont groupées en fascicules plus ou moins denses.

Au Cameroun, on dénombre 23 genres et 49 espèces (**Aubréville, 1964**). Les plantes de cette famille sont biologiquement attachées aux forêts denses humides de même qu'aux formations des marais et des bords des rivières. Elles sont des espèces caractéristiques des forêts primaires (**Aubréville, 1964**).

La famille des Sapotaceae est subdivisée en 4 sous-familles (Sideroxyloïdeae, Omphalocarpoïdeae, Mimusopoïdeae et Madhucoïdeae), pour un total d'environ 53 genres et 1100 espèces (**Da Silva et al., 2006 ; Ma, 1993; www.catalogueoflife.org**).

Le Tableau 1 suivant présente quelques espèces de Sapotaceae recensées au Cameroun (www.catalogueoflife.org).

Tableau 1: Quelques espèces de Sapotaceae identifiées au Cameroun

Sous-famille	Genre	Espèce (autorité scientifique)	Nature de la plante	Localisation
<i>Minusopoides</i>	<i>Baillonella</i>	<i>toxisperma</i>	Arbre	Chouam (Reserve du Dja)
	<i>Manilkara</i>	<i>pelliguniana</i>	Arbre	Messamena
<i>Syderoxyloides</i>	<i>Lecomtedoxa</i>	<i>klaineara</i>	Arbre	Messamena
	<i>Gambeya</i>	<i>africana</i>	Arbre	Lolodorf, Oveng, Campo
		<i>albida</i>	Arbre	Yaoundé, Mamfé
		<i>beguei</i>	Arbre	Messamena, Mouloundou
		<i>boukokoensis</i>	Arbre	Nanga Eboko, Bertoua, Yokadouma, Yaoundé
	<i>Englerophytum</i>	<i>hallei</i>	Arbre	Kribi, Edéa, Douala, Lobe, Campo
		<i>kennedyi</i>	Arbre	Yabassi, réserve forestière de Korup, Mont Cameroun.
		<i>letestui</i>	Arbre	Kumba, Mamfé Koumbou
		<i>oubanguiensis</i>	Arbre	Ayong
		<i>stelechanthum</i>	Arbre	Kribi, Ebolowa, rivière Kienke, Edéa, Mamfé
	<i>Donella</i>	<i>ogowensis</i>	Arbre	Réserves de la Sanaga
		<i>pruniformis</i>	Arbre	Messamena, Yaoundé, Ekon,
		<i>ubanguiensis</i>	Arbre	Abong Mbang, Deng Deng, Mouloundou, Loum –route de Sole,
		<i>welwitschii</i>	liane	rivière Nyong, Akonolinga, Garoua, Sambe, Batouri, Betare Oya, Kribi, Eseka
	<i>Malacantha</i>	<i>alnifolia</i>	Arbre	Mayo Kae, Hossere, Doulka, Lagdo, Tonga, Badou
	<i>heudelotiana</i>	Arbre	Garoua	
<i>Wildemaniodaxa</i>	<i>laurentii</i>	Arbre	Mbalmayo (Forêt du fleuve Nyong), Nkolovan	

Tableau 1 : Quelques espèces de Sapotaceae identifiées au Cameroun (suite)

Sous-famille	genre	Espèce (autorité scientifique)	Nature de la plante	Localisation
Syderoxyloides	<i>Vincentella</i>	<i>revoluta</i>	Arbre	Nika
	<i>Brevia</i>	<i>leptosperma</i>	Arbre	Yokadouma, Mouloundou
	<i>Brevia</i>	<i>heine</i>	Arbre	Abong Mbang, Djoum, Nanga Eboko.
	<i>Pachystela</i>	<i>brevipes (Baker) Bail. Exp Engl.</i>	Arbre	Bertoua (route de Batouri et Betare Oya), Nyambeti, Nyambessan–Campo, Zingui–Kribi Mont Mandara, rivière Nyong, Yaoundé.
		<i>msolo Engl</i>	Arbre	Nkambe, Batibo (Kutin)
	<i>Synsepalum</i>	<i>dulcificum (Schum and Thonn.) Daniel</i>	herbe	Nachtigal ,Obala, Eseka, Nange, Betare Oya, Ngaoundéré
		<i>letouzei (Aubrv.)</i>	herbe/ arbre	Akonolinga (NE de Yaberi), Réserve du Dja
		<i>longecuneatum (De wild)</i>	Arbre	Gouyoum, Kalbe, Lom et Kadei, Bertoua.
		<i>stipulatum (Radlk) Engl.</i>	Arbre	Eseka (à l’opposé de la rivière kele)
		<i>zenkeri Abrev. et Pellegr</i>	Arbre	Ebolowa (Ako’ Akas) sur la route d’Evindissi
	<i>Afrosersalisia</i>	<i>afzelii (Engl.) A. Chev.</i>	Arbre	Campo (Mvini), Mamfe (Tabo)
		<i>ceracifera (welw.) Aubrev</i>	Arbre/herbe	Foumban (Ngwenfon), Adamaoua plateau, Ngoundere (Station Fourragere), Mbamkim (par Tibati), Bangwa et Tibati
	<i>Aningeria</i>	<i>altissima (A. Chev.) Aubrev. & Pellegr.</i>	Arbre	Yokadouma (entre Gribé et Song), Hosere Banyo
	<i>Aningeria</i>	<i>robusta (A. Chev.) Aubrev et Pellegr.</i>	Arbre	Kalamaloue (versants), Yaoundé (Mont Fébé)

Tableau 1 : Quelques espèces de Sapotaceae identifiées au Cameroun (**fin**)

Sous-famille	genre	Espèce (autorité scientifique)	Nature de la plante	Localisation
<i>Omphalocarpoïdes</i>	<i>Ituridendron</i>	<i>bequaertii</i> De Wild.	Arbre	village Zendé, 12 km de Nguélémendouka, le long de la route pour Doumé
	<i>Omphalocarpum</i>	<i>elatum</i> (Miers)	Arbre	Biosphère de la Réserve du Dja
		<i>procerum</i> (P. Beauv.)	Arbre	Biosphère de la Réserve du Dja
		<i>lecomteanum</i> (Pierre exp. Engl.)	Arbre	Biosphère de la Réserve du Dja
	<i>Tridesmostemon</i>	<i>omphalocarpoïdes</i>	Arbre	Abong Mbang, Biosphère de la Réserve du Dja Eseka, Yokadouma

Parmi les genres les plus répandus au Cameroun on peut citer : *Englerophytum*, *Synsepalum*, *Gambeya* et *Donella* qui fait l'objet de notre étude.

I.1.2.1. Aperçu botanique sur le genre *Donella*

Le genre *Donella* appartient à la sous-famille des Sideroxyloideae et est représenté au Cameroun par 4 espèces à savoir : *Donella pruniformis*, *Donella ubanguiensis*, *Donella ogoawensis* et *Donella welwitschii* qui fait l'objet de notre étude (**Aubreville, 1964**).

Il est composé de grands arbres avec un diamètre au sol d'environ 1 à 3 m, à fût cannelé ou d'arbustes. Les feuilles à nombreuses nervures latérales, sont fines, très serrées réunies par une nervure inframarginale. Les fleurs sont très petites et pédicellées avec une pubescence rousse, le calice a cinq sépales et la corolle a cinq lobes suborbiculaires plus courts que le tube (**Aubréville., 1964**). Les fruits ont un diamètre moyen d'environ 9 cm et contiennent en moyenne 5 graines aplaties, carénées avec une cicatrice ventrale linéaire (**Aubréville., 1964**).

I.1.2.2. Aperçu botanique sur *Donella welwitschii* (engl) Pierre ex Aubr et Pellegr.

Donella welwitschii (Engl) Pierre ex Aubr et Pellegr est la seule Sapotaceae liane avec des rameaux et des feuilles jeunes. Ses feuilles, revêtues d'une pubescence rousse, ont des formes très variables, ordinairement oblongues ou oblongues-elliptiques, pointues parfois très longues (1,5 cm) ou au contraire courtes et obtuses avec des nervures latérales fines. Ses fleurs, petites en fascicules à l'aisselle des feuilles sont subglobuleuses d'environ 1,5 mm de diamètre avec des pédicelles de 2 mm, des sépales glabres ou garnis de quelques poils roux et à corolle de 1mm de haut, à lobes peu ciliés. (Aubréville, 1964).

Ses fruits sont subglobuleux mais à sommet apiculés, côtelés, jaunes, sessiles environ 3,5 cm de long et 2,5 cm de diamètre. (Aubréville, 1964).



Figure 2: Parties aériennes de *D. welwitschii* (engl) (Photos : M. Ngangoue, Juin 2015 à Bertoua, Région de Est Cameroun)

I.2. QUELQUES USAGES DES PLANTES DE LA FAMILLE DES SAPOTACEAE ET DES ANNONACEAE

Les Sapotaceae et les Annonaceae constituent des familles de plantes d'une grande importance tant pour leurs utilisations en industrie, en économie, en nutrition, qu'en thérapeutique.

I.2.1. Usage des plantes sur les plans industriel, économique et nutritionnel

I.2.1.1. Usage des plantes de la famille des Annonaceae sur les plans industriel, économique et nutritionnel

Les fruits d'*A. manii* très gros, tombent souvent sous l'effet du vent et sont immédiatement consommés par les animaux, la pulpe étant comestible (Lathan, 2004 ; Thomas, 1969).

Plusieurs espèces du genre *Annona* produisent des fruits consommables qui sont des grandes sources en vitamines A, B₁, B₅, B₁₂, phosphore, calcium, graisses, protéines, carbohydrates, fibres lipidiques (**Rainer, 2007**).

Les fruits d'*A. muricata* sont utilisés dans la préparation des crèmes glacées, des bonbons, des boissons et des sirops (**Jaramillo 2000 ; Wu 1995**).

I.2.1.2. Usage des plantes de la famille des Sapotaceae sur les plans industriel, économique et nutritionnel

En général, les espèces des Sapotaceae fournissent des produits importants comme le latex pour le mâchonnement des gommages (résines) et la fabrication du chewing gum ; des bois durs et durables utilisables en menuiserie ou charpenterie et plusieurs fruits comestibles (**Peninggton et al., 1990 ; Troupin, 1985**). C'est ainsi qu'au Nigéria, au Bénin et au Congo, les espèces du genre *Gambeya* (*Gambeya africana*, *Gambeya albida*, *Gambeya lacourtiana*, *Gambeya subnuda*) sont très cultivées pour leurs fruits comestibles (**Nkeoua et Boundzanga, 1999**).

En effet le bois de *Chrysophyllum marginatum* est utilisé en charpenterie et dans la production du charbon et la houille (**Candida da Silva et al., 2006**) ; *Baillonella toxisperma* (moabi), *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Babama, Bibinga), *Autranella congolensis*, *Arginia spinosa* (argan wood) et *Sideroxylon foetidissimum* Jacq. sont exploités au Cameroun non seulement pour des constructions lourdes, mais aussi en menuiserie et comme bois de chauffage, (**Fokou, 2006 ; Sanchez-Medina et al., 2009**).

L'amande des graines des fruits de *Baillonella toxisperma* contient une huile utilisée en cuisine et en cosmétique. Les résidus d'extraction de ses fruits sont employés parfois comme poison de pêche (**Loupe, 2008**).

Les fruits de plusieurs espèces du genre *Pouteria* (*Pouteria sapota*, *Pouteria viridis*, *Pouteria campechiana*) sont comestibles à l'état frais et sont ainsi utilisés pour la fabrication des crèmes des confitures et des marmelades (**Morton, 1987**).

Au Maroc, le bois d'*Arginia spinosa* est utilisé pour le chauffage et pour les charpentes tandis que ses fruits et ses feuilles servent à nourrir le bétail (les chèvres et les chameaux). L'huile faite à base de ses fruits est utilisée comme lait de toilette pour le corps et le visage (**Charrouf et Guillaume, 2007 ; El Kabouss et al., 2001 ; El Babili et al., 2010**).

I.2.2. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle

I.2.2.1 Utilisation des plantes du genre *Annona* en médecine traditionnelle

A. mannii est utilisée en médecine traditionnelle Africaine (Camerounaise, Congolaise, Gabonaise) pour traiter les morsures de serpent, morsures d'araignée, les maux de ventre, la syphilis, la stérilité causée par le poison, la diarrhée, la fièvre et le cancer (**Betti, 2004 ; Kuete et al., 2013**).

Les racines d'*A. muricata* sont utilisées pour le traitement de la dysenterie, les maux de ventre, la dépression, des maladies de la moelle épinière. Cependant l'infusion des feuilles est utilisée pour le traitement de la fièvre (au Togo), de l'hypertension, de la diarrhée, de l'asthme, des parasites, des blessures, des difficultés d'accouchement, de la montée laiteuse (en Inde) et en cas de prolapsus de l'anus, de plaies et d'enflures (**Chao-Ming et al., 1997**). En Afrique tropicale et en Amérique du Sud, cette plante est utilisée comme insecticide et pesticide et est également utilisée dans le traitement des tumeurs et cancers (**Adewole et al., 2009**). Elle possède également des activités anti-protazoaires et antinéoplasiques (**Dominguez et al. 2016 ; Pinto et al. 2005**).

En Malaisie le jus extrait du mélange des feuilles d'*A. muricata* et d'*A. squamosa* est appliqué sur la tête pour protéger contre l'évanouissement (**Ong et al., 1999**).

A. senegalensis et *A. muricata* sont utilisées en médecine traditionnelle comme anticancéreux (**Adewole 2009 ; Gbile 1987**) et antipaludéen (**Ajaiyeoba et al., 2006**).

I.2.2.2. Utilisation des plantes de la famille des Sapotaceae en médecine traditionnelle

En Afrique Centrale les espèces de *Donella* (*D. pruniformis* et *D. welwitschii*) sont utilisées comme antitussive pour soulager le mal de gorge et soigner le torticolis (**Bouquet, 1969**).

Les décoctions des écorces de *Baillonella toxisperma* sont localement utilisées pour soigner les maux de reins, les douleurs dentaires, le rachitisme, les infections vaginales et la toux et les maux de ventre (**Loupe, 2008**).

En Côte d'Ivoire *Chrysophyllum cainito* est utilisée en médecine traditionnelle pour soigner le diabète (**Koffi et al., 2009**). Les écorces, les feuilles et les fruits sont utilisés pour lutter contre les maux de ventre et la toux (**Haji Mohiddin et al., 1992 ; Morton, 1987**). Les racines et les feuilles de *Chrysophyllum albidum* sont utilisées pour soigner la fièvre jaune (**Duyilemi et Lawal, 2009**).

L'huile d'Argan extraite des coques d'*Argania spinosa* possède plusieurs propriétés thérapeutiques notamment contre les rhumatismes, les brûlures des boutons de varicelle, l'acné, peau sèche, les vergetures, le nettoyage et la désinfection. C'est aussi un aphrodisiaque ayant des propriétés spermatogénétiques. Le thé de ses feuilles est utilisé pour soigner les entorses, les plaies tandis que ses racines sont utilisées pour traiter le diabète (El Babili et al., 2010 ; Radis et al., 2003).

Les écorces de *Tridesmostemon omphalocarpoides* sont localement utilisées pour le traitement des maux de ventre et les lésions de la peau (Kuete et al., 2006).

Le « beurre de karité » du genre *Vitellaria* est utilisé pour lutter contre les maladies cardiovasculaires (Louppe, 2008).

L'écorce de *Pouteria campechiana* est utilisée pour soigner la fièvre et les éruptions cutanées. Ses graines sont utilisées pour soigner les ulcères (Morton, 1987). La pulpe du fruit de *Pouteria sapota* soigne l'ulcère gastrique et la dysenterie amibienne (Jun Ma et al., 2004), et sa coque est utilisée pour soigner les kystes et le rhumatisme (Jun Ma et al., 2004 ; Morton, 1987).

Au Bénin, les feuilles fraîches de *Synsepalum dulcificum* sont utilisées dans le traitement du diabète, la fièvre, l'hyperthermie et l'énurésie alors que l'amande est utilisée pour soigner le mal d'estomac, l'anémie et l'obésité (Oumorou et al., 2010). Les racines sont utilisées pour traiter la toux et la tuberculose. Les écorces servent dans le traitement des affections de la prostate (Oumorou et al., 2010).

Les divers usages des plantes de la famille des Sapotaceae et du genre *Annona* en pharmacopée traditionnelle dans le traitement de plusieurs maladies ont amené les chercheurs à effectuer des tests d'activité biologique ainsi que des études chimiques sur ces plantes.

I.3. TRAVAUX CHIMIQUES ANTERIEURS SUR LE GENRE ANNONA ET LES SAPOTACEAE

De nombreuses études visant à isoler les métabolites secondaires du genre *Annona* et de la famille des Sapotaceae ont été réalisées et celles-ci montrent que le genre *Annona* et la famille des Sapotaceae renferment plusieurs classes de composés à l'instar des triterpènes, des alcaloïdes, des acetogenines, les composés phénoliques etc. Au vu de ces travaux, il apparaît que les terpénoïdes (les triterpènes et les stérols) constituent les classes de métabolites

secondaires les plus abondants dans la famille des Sapotaceae (Alaoui et al., 2002; Gunasekara et al., 1997 ; Lavaud et al.,1996; Li et al., 1994 ; Nicolas et al., 1995 ; Nigam et al., 1992 ; Wafo et al., 2010; Wandji et al., 2002 ; 2003). Quant au genre *Annona* il est extrêmement riche en alcaloïdes et en acetogenines (Soheil et al., 2015). Bien que la plupart de ces triterpènes et ces alcaloïdes soient connus, de nouveaux dérivés continuent d'être isolés et élucidés et leurs propriétés médicamenteuses continuent d'être prouvées (Avula 2018 ; Djoumessi et al., 2012 ; Kamdem et al., 2011 ; Mahato et al., 1992 ; Soheil et al., 2015 ; Wafo et al., 2010). Raison pour laquelle nous leur donnerons plus d'attention.

I.3.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules organiques d'origine naturelle, de structures chimiques variées mais ayant en commun la présence d'une fonction azotée souvent responsables des propriétés légèrement alcalines (Kone, 2009).

I.3.1.1.. Classification des alcaloïdes

On estime qu'il y a plus de 15 000 alcaloïdes différents déjà isolés (ou détectés) à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes. Proposer une classification pour les alcaloïdes est une tâche difficile, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale. La classification des alcaloïdes tient compte de deux paramètres distincts : la position de l'atome d'azote au sein de la structure et les différentes fonctions qui en découlent, et la famille de plantes dont ils sont extraits (90 % des alcaloïdes sont issus de plantes). On compte cinq grandes classes d'alcaloïdes, chacune divisée en plusieurs sous familles :

- les alcaloïdes hétérocycliques,
- les alcaloïdes portant un atome d'azote exocyclique,
- les alcaloïdes de type putrescine, spermidine et spermine,
- les alcaloïdes peptidiques et les alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens.

La grande majorité des alcaloïdes fait partie de la classe des alcaloïdes hétérocycliques. Celle-ci est divisée en plusieurs familles suivant le motif hétérocyclique qui la compose (pyrrole, indole, pipéridine, tropane, imidazole, isoquinoline, ...) et est divisée de nouveau suivant leur origine végétale ou animale.

La figure 3 montre quelques exemples de ces classes d'alcaloïdes. Le motif hétérocyclique en vert est celui qui permet de rattacher un alcaloïde à une famille.

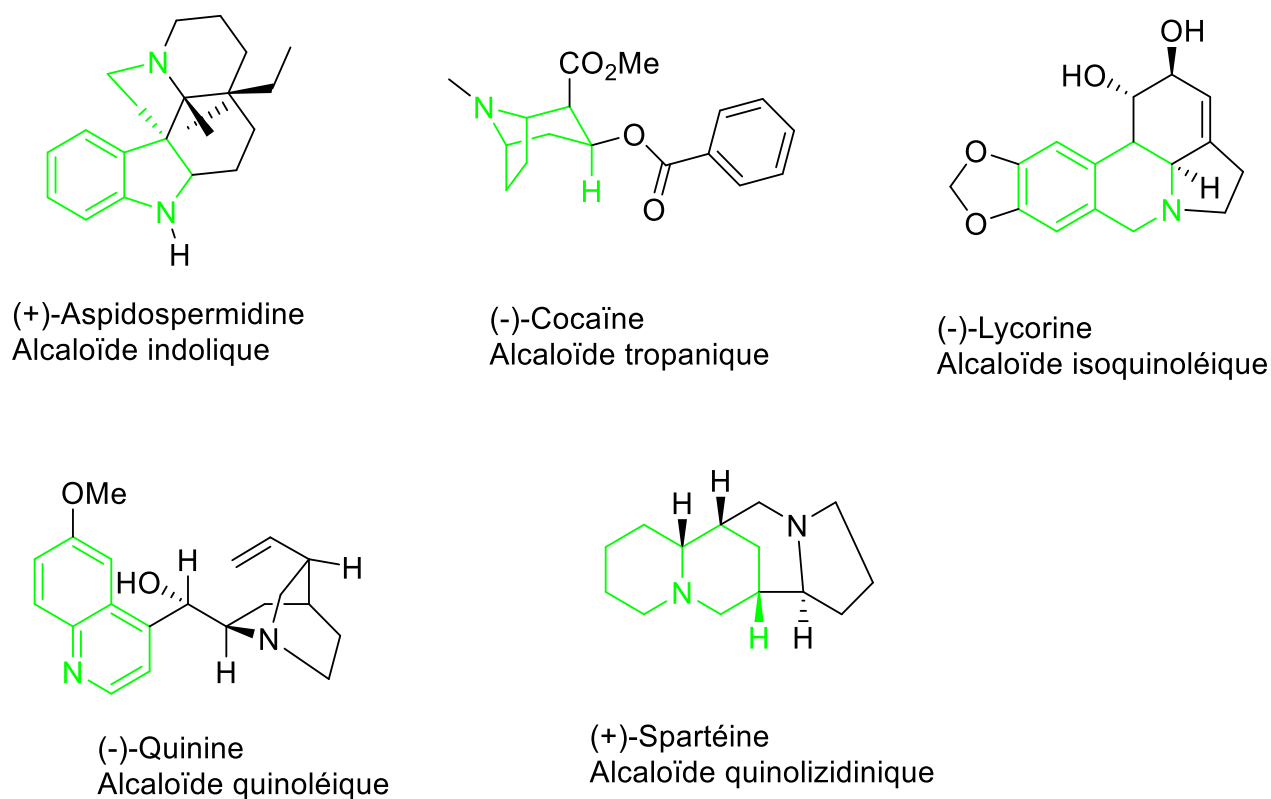


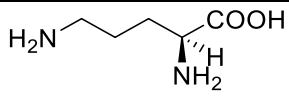
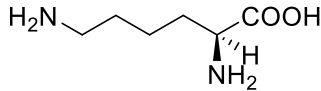
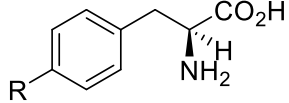
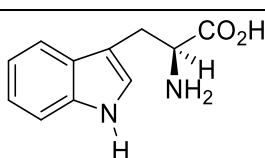
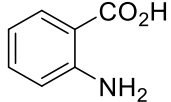
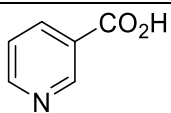
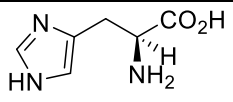
Figure 3: Quelques exemples de classe d'alcaloïdes

I.3.1.2. Biosynthèse des alcaloïdes

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique. Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (**Bhat et al., 2005**).

Dans Tableau 2 ci-dessous sont décrits quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé.

Tableau 2: Quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur

Acide aminé	Type d'alcaloïde
 <p>Ornithine <u>5</u></p>	Pyrrolidines, pyrrolizidines, tropanes
 <p>Lysine</p>	Pipéridines, quinolizidines, indolizidines
 <p>R=H, phénylalanine <u>7</u> R=OH, tyrosine <u>8</u></p>	Alcaloïdes du type éphédrine, isoquinoléines
 <p>Tryptophane <u>9</u></p>	Indoles
 <p>Acide anthranilique <u>10</u></p>	Quinoléines, quinazolines, acridines
 <p>Acide nicotinique <u>11</u></p>	Pyridines
 <p>Histidine <u>12</u></p>	Imidazoles

Le Schéma 1 ci-dessous montre la biosynthèse des alcaloïdes isoquinoléiniques (Berkov et al., 2004 ; Tang et al., 2016).

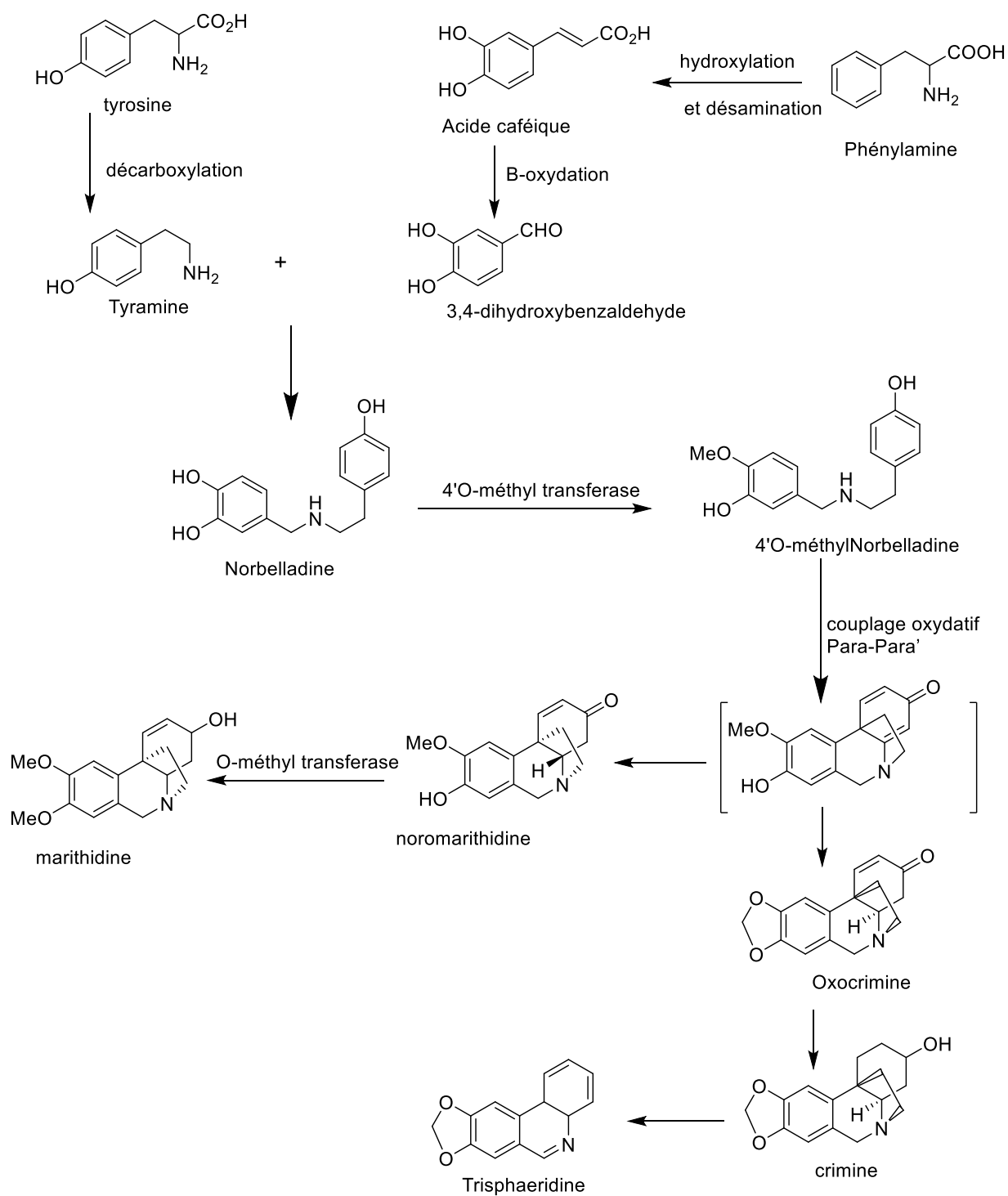


Schéma 1: Biosynthèse des alcaloïdes isoquinoléiques (Berkov *et al.*, 2004 ; Tang *et al.*, 2016)

I.3.1.3. Activités biologiques et pharmacologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des curarisants, des anesthésiques locaux, des anti-fibrillants, anti-tumoraux, antipaludiques, antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires et des amoébicides (**Bruneton, 1993**). Ils sont également utilisés dans le traitement des désordres cardiovasculaires, douleurs rhumatismales, maux de ventre et l'asthme (**Vardamides et al., 2006**). Les alcaloïdes (quinolidines et isoquinoléiniques) possèdent des activités antioxydantes, antiépileptiques, antimicrobiennes, anti trypanosomiales, anti plasmodiales, antifongiques, immuno-stimulantes, sédatives, dépressantes, analgésiques, hypothermiques, anti-tumorales, antipyrétiques et cardiotoniques (**Egydio-brandao et al., 2017 ; Kinghorn et al., 1984**).

Les alcaloïdes retrouvés dans le genre *Annona* sont très nombreux et de types isoquinoléiques (aporphines) et quinoléiques. Ainsi les travaux chimiques déjà effectués sur le genre *Annona* et les Sapotaceae ont permis d'isoler plusieurs composés alcaloïdiques dont quelques-uns sont consignés dans le tableau 3 suivant.

Tableau 3: Quelques alcaloïdes isolés des espèces du genre *Annona* et des Sapotaceae et activités biologiques

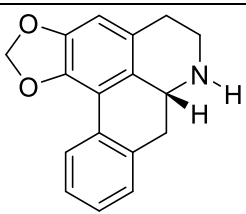
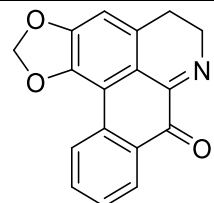
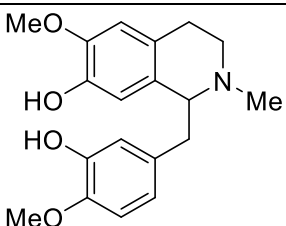
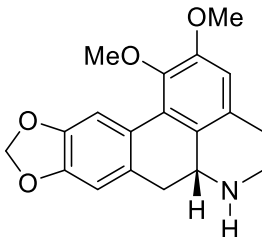
Composés	Sources/ Références	Activités biologiques
 <p>Anonaine 13</p>	<p>Feuilles de <i>A. muricata</i> (Matsushige et al., 2012), Feuilles de <i>A. senegalensis</i> (Lall et al., 2017)</p>	<p>Neurotoxique, antiépileptique (Vendramin et al., 2013)</p>
 <p>Liriodenine 14</p>	<p>Feuilles de <i>A. mucosa</i> (Matsushige et al., 2012); feuilles de <i>A. cherimola</i> (Rabêlo et al., 2015); Fruits de <i>A. diversifolia</i> (Campos et al., 2008); Feuilles et Fruits <i>A. muricata</i> (Hasrat et al., 1997)</p>	<p>Antileishmaniale, antitripanocidale (Costa et al., 2006); antimicrobienne (Costa et al., 2013); antiproliférative (Nakano et al., 2013); antifongique (Cruz-chacon et al., 2011);</p>
 <p>Réticuline 15</p>	<p>Feuilles, écorces, bois et racines de <i>A. muricata</i>; (Leboeuf et al., 1981) <i>A. salmannii</i> (Cruz et al., 2011); <i>A. squamosa</i> (Magadula et al., 2009)</p>	
 <p>Normuciferine 16</p>	<p>Feuilles et Fruits <i>A. muricata</i> (Hasrat et al., 1997)</p>	<p>Antidépresseive (Hasrat et al., 1997); antimicrobienne et antioxydante (Costa et al., 2013).</p>

Tableau 3 : Quelques alcaloïdes isolés des espèces du genre *Annona* et des Sapotaceae et activités biologiques (suite)

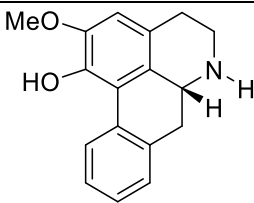
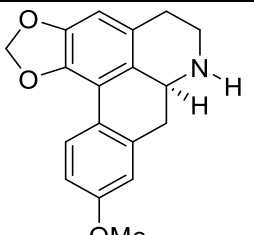
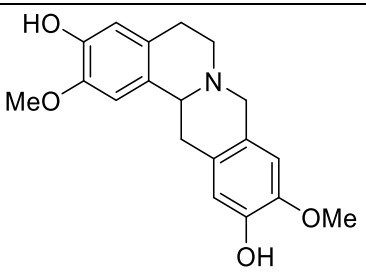
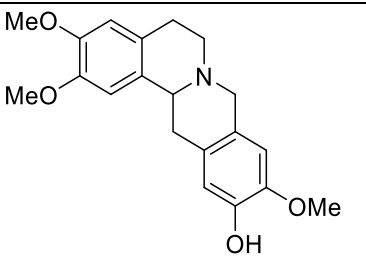
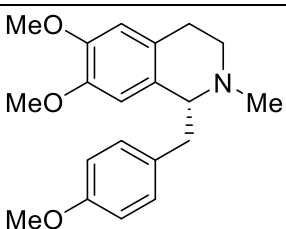
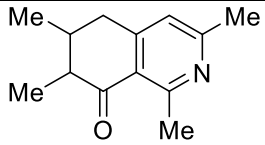
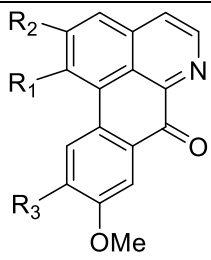
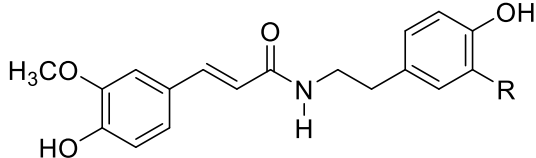
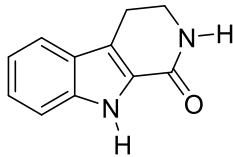
 <p>Asimilobine 17</p>	<p><i>A. pickelii</i> (Costa et al., 2015)</p>	<p>antimicrobienne (Costa et al., 2013) ; antioxydante (Costa et al., 2013)</p>
 <p>xylopine 18</p>	<p>Feuilles de <i>A. muricata</i> (Fofana et al., 2011) feuilles de <i>A. cherimola</i> (Rabêlo et al., 2015)</p>	<p>cytotoxique (Menezes et al., 2016)</p>
 <p>Isocorenximine 19</p>		
 <p>Corytenchine 20</p>	<p>Racine de <i>A. cherimola</i> (Martinez-Vazquez et al., 2005)</p>	<p>Cytotoxique (Martinez-Vazquez et al., 2005) ; antimicrobienne et antioxydante (Costa et al., 2013)</p>
 <p>O-Méthylarmepavine 21</p>	<p>Feuilles de <i>A. squamosa</i> (Soni et al., 2012)</p>	<p>Anti-ulcère (Verde et al., 2003) ; antileishmaniale et antitripanocidale (Vendramin et al., 2013)</p>

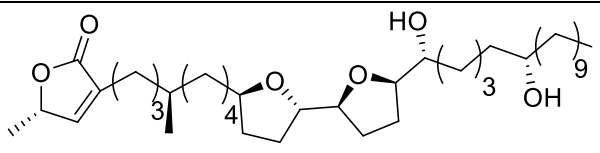
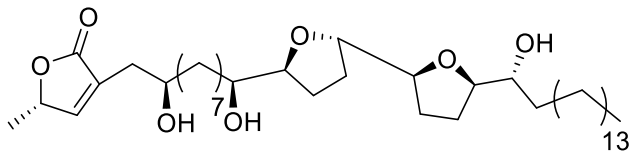
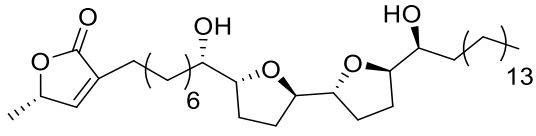
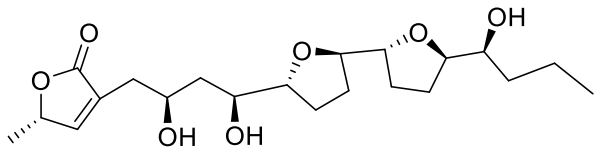
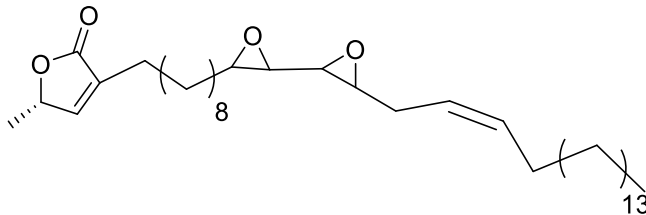
Tableau 3 : Quelques alcaloïdes isolés des espèces du genre *Annona* et des Sapotaceae et activités biologiques (fin)

 <p>N-méthylcorydalidine 22</p>	<p>Feuilles de <i>A. squamosa</i> (Soni et al., 2012)</p>	<p>Anti-ulcère (Verde et al., 2003)</p>
 <p>$R_1+R_2=OCH_2O$, Lauginosine 23 $R_1= R_2= R_3 = OCH_3$, Oxoglaucine 24</p>	<p><i>Annona reticulata</i> (Fofana et al., 2011)</p>	<p>Cytotoxique (Menezes et al., 2016)</p>
 <p>R= H : N-trans-Feruloyltyramine 25 R=OMe : N-trans-Feruloylméthoxytyramine 26</p>	<p><i>Synsepalum dulcificum</i> (Chen et al., 2010 ; Wang et al., 2011)</p>	<p>Anti-oxydante et anti-prolifération des cellules cancéreuses A375.S2 (Wang et al., 2011)</p>
 <p>1, 2, 3, 4-tétrahydronorharman-1-one 27</p>	<p><i>Tridesmostemon omphalocarpoides</i> (Chi et al., 2013)</p>	<p>Antibactérienne (Chi et al., 2013)</p>

I.3.2. Les Acétogénines

C'est l'unique classe des métabolites secondaires en C-35 / C-37 généralement caractérisés par combinaison d'un acide gras avec une unité de 2- propanol en C-2 (**Alali et al., 1999**) qui forme une lactone σ , β -insaturé, substitué en δ -d'un méthyl terminal (**Alali et al., 1999**) et une longue chaîne aliphatique. Ils peuvent avoir un noyau tétrahydrofuranique ou tétrahydropyronique, ayant une double ou triple liaison et des substituants oxygénés généralement les hydroxyles et les époxydes (**Cavé et al., 1997**). Ce groupe de composés est l'une des classes majoritairement isolées du genre *Annona*.

Tableau 4: Quelques acétogénines isolés des espèces du genre *Annona*

Composés	Sources	Activités
 <p>Annoturpuricine A 28</p>	<i>Annona purpurea</i> (Hernández-Fuentes et al., 2019)	Anti prolifératrice (Hernández-Fuentes et al., 2019)
 <p>Annoturpuricine B 29</p>		
 <p>Annoturpuricine C 30</p>		
 <p>Annoturpuricine D 31</p>		
 <p>Annoturpuricine E 32</p>		

I.3.3. Les Terpénoïdes

Les terpènes constituent une grande famille de composés prénologues, c'est-à-dire d'homologues à enchaînement isoprénique (**Donald et Gerge, 1968**). Ces substances organiques font partie des métabolites secondaires les plus répandus dans la nature (**Bouvier et al., 2005**). En effet, plus de 36 000 structures différentes ont été identifiées (**Hill, 2002**). Plus de 30000 terpénoïdes ont été isolés des plantes marines et terrestres (**Dzubak et al., 2006 ; Thoppil et al., 2011**).

I.3.3.1. Biosynthèse des terpénoïdes

La biosynthèse des différents groupes des terpénoïdes est donnée par le schéma 2 à travers l'isoprène qui est l'unité fondamentale de tous les terpénoïdes et un ensemble d'enzymes appelé terpènes syntases, l'isoprène n'est pas le précurseur direct pour plusieurs membres de cette classe. La biosynthèse peut être divisée en quatre étapes.

La première étape dans la biosynthèse des terpènes consiste à activer une molécule d'acide acétique, par la combinaison avec le groupe thiol du coenzyme A « HS-CoA » pour engendrer l'acétyl-CoA. La condensation aldolique de ce dernier sur l'acétyl-CoA conduit au (3S) 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA. Celui-ci est ensuite irréversiblement réduit par le nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH) en acide (3R) mévalonique (MVA). L'autre isomère n'agit pas comme précurseur et l'étape suivante est l'activation de l'acide mévalonique (MVA) par phosphorylation sous l'action d'enzyme spécifique.

Ensuite, une déshydratation interne et une décarboxylation donne l'isopentényl pyrophosphate (IPP) qui peut s'isomériser pour fournir une molécule très réactive : le pyrophosphate d'isopentén-2-yle ou le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP).

La condensation d'une molécule (DMAPP) avec une molécule (IPP), conduit au (GPP) précurseur des monoterpènes en C-10. Le couplage de ce dernier avec une nouvelle molécule (IPP), conduit au (FPP) précurseur des sesquiterpènes en C-15 qui peut agir avec une autre molécule de (IPP) pour former le (GGP) précurseur des diterpènes en C-20. D'autre part, le couplage réductif de deux unités (FPP) donne le squalène en C-30 précurseur des triterpènes cycliques et des stéroïdes (**Dewick, 2002 ; Chappell et al., 1995**). En somme, selon le nombre d'entités isoprènes qui sont incorporées dans leur structures, les terpènes sont subdivisés en : Hémiterpènes (C₅H₈), monoterpènes (C₁₀H₁₆), sesquiterpènes (C₁₅H₂₄), diterpènes (C₂₀H₃₂),

Sesterpènes ($C_{25}H_{40}$), Triterpènes ($C_{30}H_{48}$), Tétraterpènes ($C_{40}H_{56}$) et polyterpènes (C_5H_8)_n (**Dewick, 2002**). Nous nous intéresserons aux classes des triterpènes, des stéroïdes des monoterpènes et des sesquiterpènes.

La cyclisation du 2, 3-époxyqualène à travers le cation intermédiaire protosteryl, la perte des petites molécules, expansions ou contractions des cycles génèrent le lanostérol et le cycloarténol qui sont les précurseurs des stéroïdes. Cependant la cyclisation à travers les cations baccharenyle, dammarenyle et lupenyle produit le lupéol et α/β -amyrin (**Augustin et al., 2011**). (schéma 2)

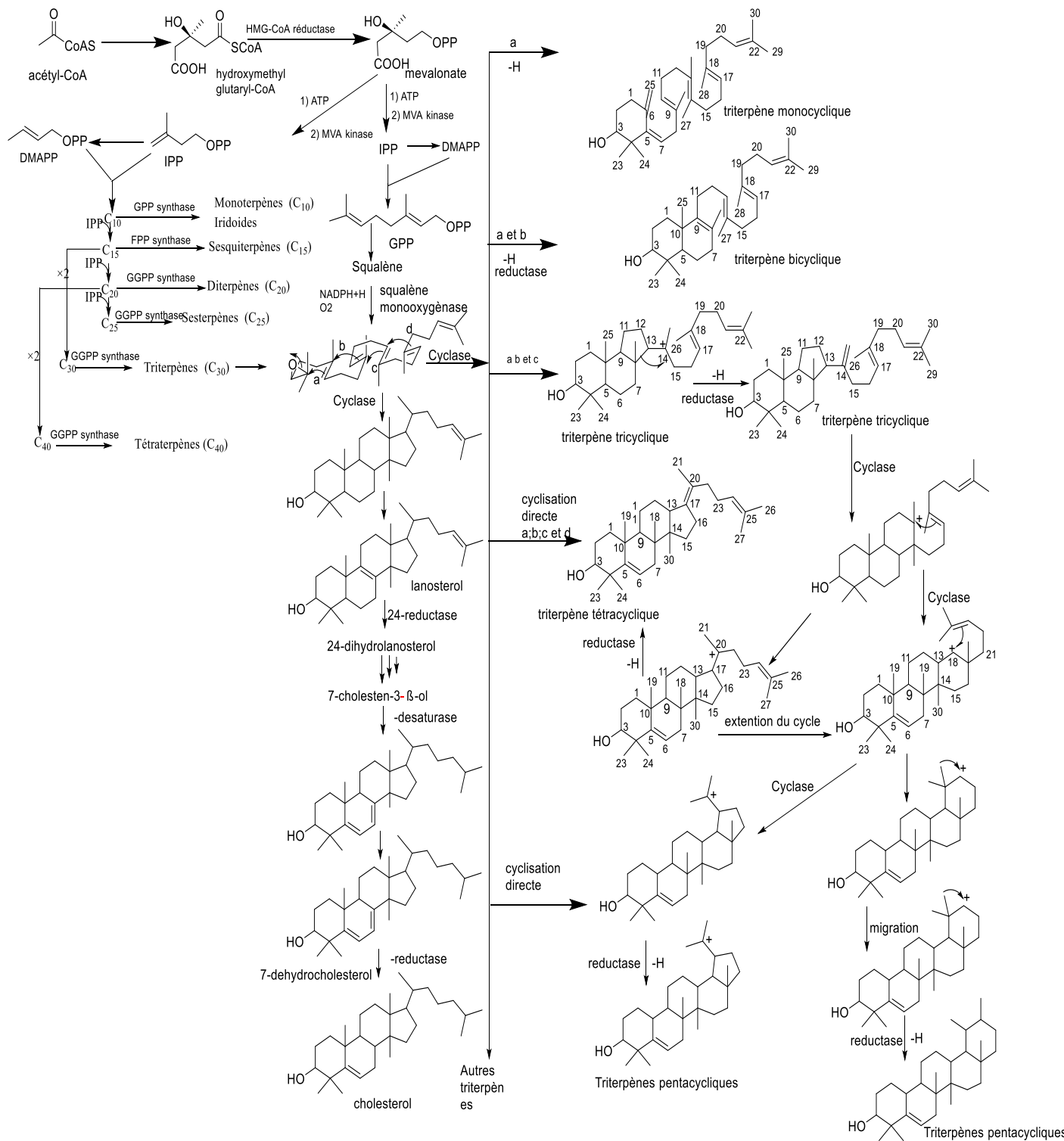


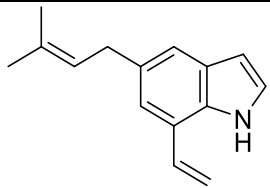
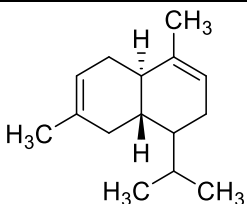
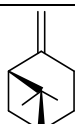
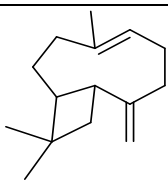
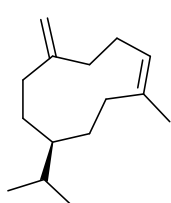
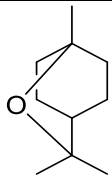
Schéma 2: Schéma de biosynthèse des terpénoides (Dewick, 2002 ; Augustin et al., 2011)

I.3.3.2. Les Monoterpènes et sesquiterpenes

Les travaux réalisés jusqu'ici ont montré que le genre *Annona* est constitué majoritairement des sesquiterpènes.

Les travaux menés par **Agnaniet et al., en 2004** sur les écorces d'*Anonidium mannii* du Gabon ont conduit majoritairement aux sesquiterpènes, principalement l'isopentenylindole **33**. D'autres Monoterpènes et sesquiterpenes ont été isolés des huiles essentielles des fruits d'*A. muricata* notamment β -pinène **34**, la germacrène D **35**, la cadinène **36**, la B-caryophyllène, **37**, 1,8-cineole **38**.

Tableau 5: Quelques Monoterpènes et sesquiterpènes isolés des espèces du genre *Annona*

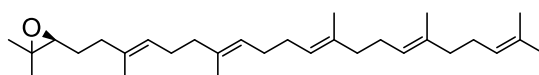
Composés	Sources et références	Composés	Sources et références
 <p>33</p>	<i>A. mannii</i>	 <p>36</p>	<i>A. squamosa</i> , <i>A. muricata</i> , <i>A. reticulata</i> (Thang et al., 2013)
 <p>34</p>	<i>A. Muricata</i> (kossouh et al., 2007), <i>A. amazonica</i>	 <p>37</p>	<i>A. squamosa</i> , <i>A. muricata</i> (jirovetz et al., 1998)
 <p>35</p>		 <p>38</p>	

I.3.3.3. Les Triterpènes

Le terme triterpène forme un vaste ensemble de composé en C₃₀ très répandu chez les végétaux, issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxy-squalène (**39**) ou plus rarement du squalène lui-même. Ils sont presque toujours hydroxylés en position 3 (du fait de l'ouverture de l'époxyde), et présentent une très forte unité structurale. Les triterpènes sont regroupés en six classes : les triterpènes acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, tétracycliques et pentacycliques (**Wansi, 2000**).

Lorsque les cyclisations, sont incomplètes on obtient les terpènes monocycliques, bicycliques ou les triterpènes tétracycliques et lorsqu'elles sont complètes, on obtient des triterpènes pentacycliques (**Wansi, 2000**).

Les triterpènes isolés des Annonaceae sont de types lanastanes.



39

Les triterpènes pentacycliques sont les produits naturels majoritairement isolés des Sapotaceae et ceux-ci ont montrés plusieurs activités biologiques. Ils sont classés dans 24 groupes structuraux qui sont illustrés dans le tableau 6 (**Wafo et al., 2010 ; Kamdem et al., 2011**).

Tableau 6: Différents groupes structuraux des triterpènes pentacycliques (Mahato et Kundu, 1994 ; Wafo et *al.*, 2010 ; Kamdem et *al.*, 2011)

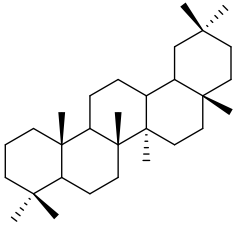
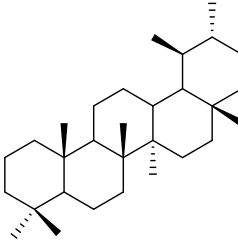
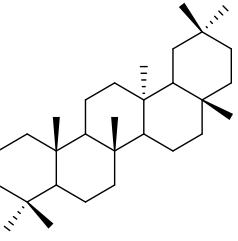
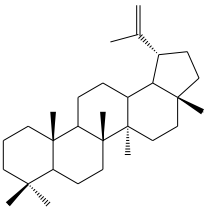
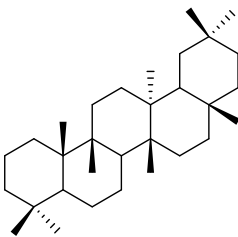
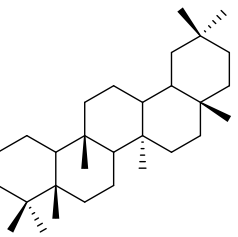
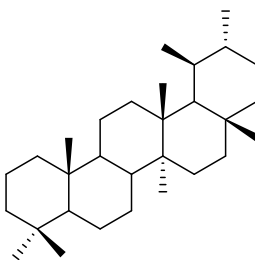
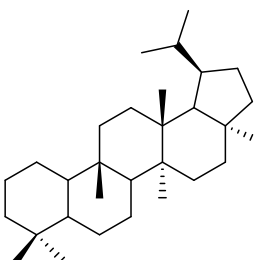
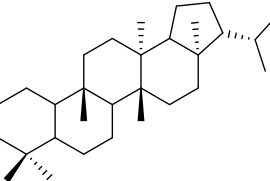
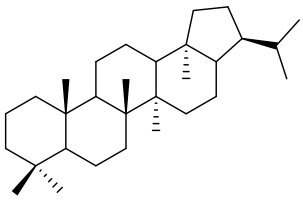
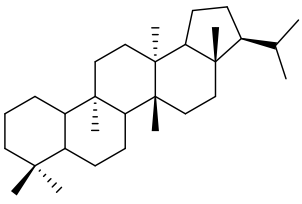
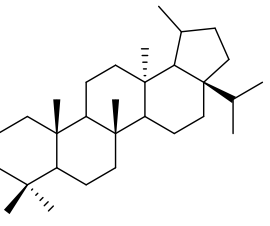
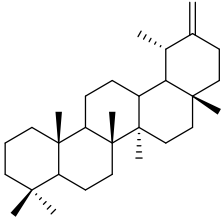
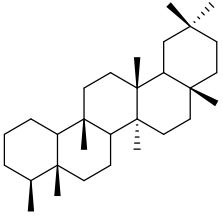
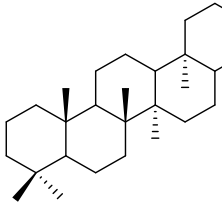
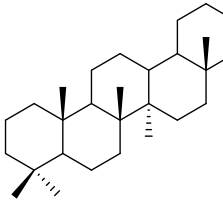
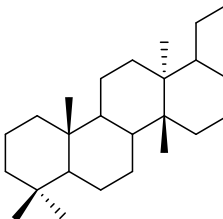
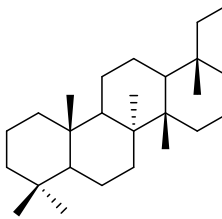
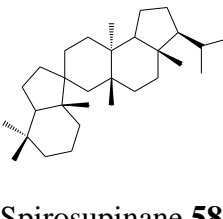
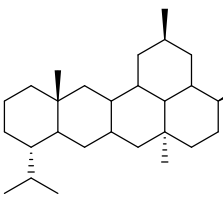
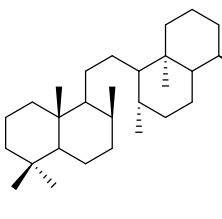
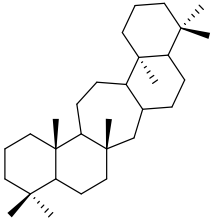
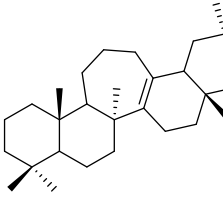
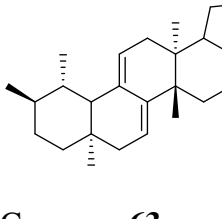
 <p>Oleanane <u>40</u></p>	 <p>Ursane <u>41</u></p>	 <p>Taraxarane <u>42</u></p>
 <p>Lupane <u>43</u></p>	 <p>Glutinane <u>44</u></p>	 <p>Mimosopane <u>45</u></p>
 <p>Bauerane <u>46</u></p>	 <p>Hancokinane <u>47</u></p>	 <p>Fernane <u>48</u></p>
 <p>Hopane <u>49</u></p>	 <p>Sorghumane <u>50</u></p>	 <p>Friedomadeirane <u>51</u></p>

Tableau 6: Différents groupes structuraux des triterpènes pentacycliques (Mahato et Kundu, 1994 ; Wafo et *al.*, 2010 ; Kamdem et *al.*, 2011)

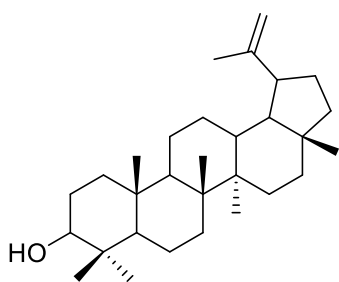
 <p>Taraxastane <u>52</u></p>	 <p>Friedelane <u>53</u></p>	 <p>Gammacerane <u>54</u></p>
 <p>Kairatane <u>55</u></p>	 <p>Swertane <u>56</u></p>	 <p>Stictane <u>57</u></p>
 <p>Spirosupinane <u>58</u></p>	 <p>Bicadinane <u>59</u></p>	 <p>Onocerane <u>60</u></p>
 <p>Serratane <u>61</u></p>	 <p>Dubosane <u>62</u></p>	 <p>Canarane <u>63</u></p>

I.3.3.3.1. Activités biologiques des triterpènes

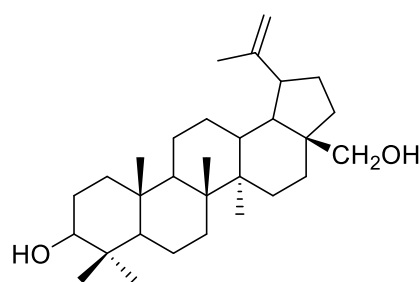
Les triterpénoïdes libres, glucosilés acidifiés ou estérifiés interviennent dans de nombreux mécanismes régissant la vie des êtres vivants en particulier ceux qui possèdent des hydroxyles en C-3 présentent des activités antitumorales, anticancéreuses, anti-inflammatoires et anti-HIV (Pan et al., 1994). Les travaux menés par Hata et al., en 2003 ont permis de montrer que les triterpènes du type lupane comme le lupéol (64) et le bétuline (65) ont des activités anticancéreuses, anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. Certaines études montrent que le lupéol est utilisé pour soigner le diabète, le mal de tête, la toxicité rénale et hépatique. (Murtaza et al ; 2009) ; il réduit également la prolifération et induit la mort des cellules cancéreuses pancréatique. (Saleem et al., 2005).

Les acides donellaniques A B et C (66, 67 et 68) précédemment isolés par Djoumessi et al., en 2012 sont tous cytotoxiques; Les acides A et B possèdent des activités antimicrobiennes mais l'acide C a une activité beaucoup plus marquée sur les bactéries résistantes aux antibiotiques tels qu'*Escherichia coli* AG₁₀₀, *Enterobacter aerogenes* CM₆₄.

L'activité antifongique de plusieurs triterpènes pentacyclique a été testée *in vitro*. Il a été prouvé que les glycosides de l'acide oléanolique sont des puissants fongicides ; De même l'acide ursolique (97) est connu comme anti-inflammatoire, anti-arthritique, antiulcéreuse et hypolipépidémique (Bass, 1985).



Lupéol **64**



Bétuline **65**

I.3.3.3.2. Etude structurale des triterpènes

L'étude structurale des triterpènes et saponines a beaucoup bénéficié du développement de la spectrométrie de masse et de la résonance magnétique nucléaire. Les caractéristiques physiques et analyses spectroscopiques sont des moyens très utilisés dans la détermination des structures (Wansi, 2000).

I.3.3.3.2.1. Spectrométrie de masse

L'avènement des techniques modernes d'analyses telles que la DIC/NH₃ et l'ESI permettent de détecter les ions quasi-moléculaires [M+H]⁺ et pseudo-moléculaires [M+NH₄]⁺, [M+Na]⁺ ou [2M+Na]⁺ et d'en déduire l'ion moléculaire (Yang et al., 2014; Shiping et al., 1999).

Les techniques classiques d'ionisation par impact électronique permettent non seulement d'avoir l'ion moléculaire, mais aussi de déterminer la position de certains groupements dans la molécule (oléan-12-ène ou urs-12-ène).

Dans le cas des séries Δ¹²- oléanènes ou Δ¹²- ursènes, le mode de fragmentation se fait suivant la réaction de Rétro-Diels-Ader (R.D.A) (schéma 3). Le fragment (a) dont dérive généralement le pic de base permet de déduire si le composé porte des substituants sur les cycles D et E (Ogunkoya, 1981).

Contrairement à ce qui précède, dans la série des friedelanes, le mode de fragmentation n'est plus de type Rétro-Diels-Ader mais se fait par rupture de la liaison créée par l'énergie négative fournie à la molécule (schéma 4). Le pic caractéristique des friedelanes n'ayant pas de substituant sur le cycle D ou E est à m/z. 205, correspondant à l'ion fragment (b) (Sengupta et al., 1997; Kuo et Kuo, 1997).

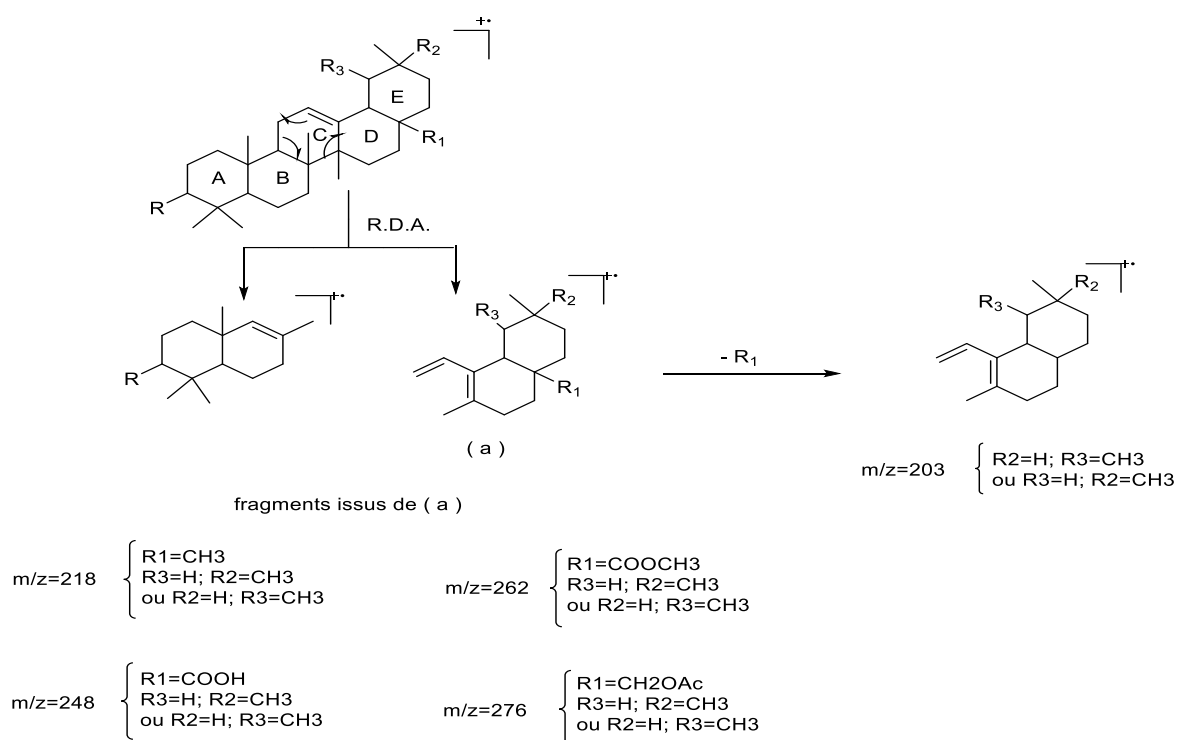


Schéma 3: Fragmentation Rétro-Diels-Ader des séries oléananes et ursanes (Ogunkoya, 1981).

Dans le cas des saponines, on utilise les techniques d'ionisation douce (par exemple le FAB MS) pour déterminer la masse moléculaire à partir des ions $[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$ suivant que l'on opère en mode d'ions positifs ou négatifs. Elles permettent aussi de déterminer la nature de l'enchainement des sucres (Chemli *et al.*, 1987).

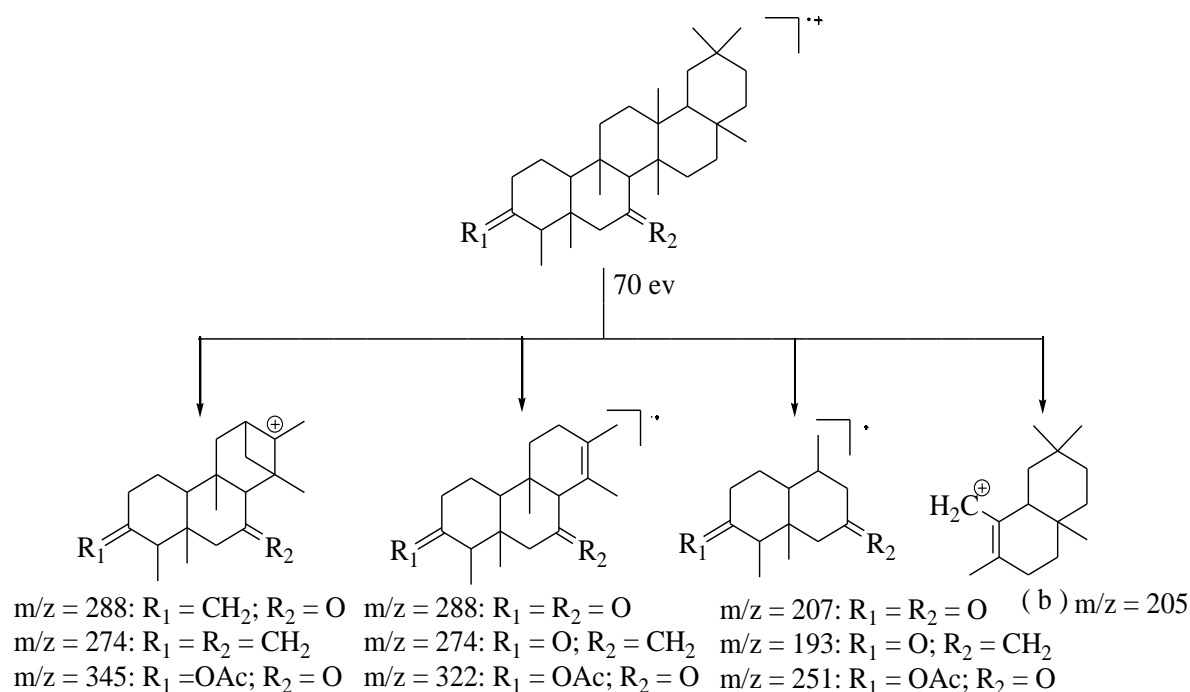


Schéma 4: Fragmentation de la série Friedelane (Sengupta *et al.*, 1997 ; Kuo et Kuo, 1997)

I.3.3.3.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie de masse ne nous permet pas de faire la différence entre les séries des triterpènes. Le meilleur moyen d'atteindre ce but est l'utilisation de la RMN ^{13}C , la RMN 1H et les techniques de RMN à 2D.

La RMN s'est donc révélée très efficace pour l'étude des problèmes structuraux en Chimie Organique. L'utilisation des instruments à haute fréquence a permis d'accroître les potentialités de cette technique spectroscopique dans la détermination des structures des produits organiques. L'importance de cette technique réside également sur le fait qu'elle permet de déterminer la stéréochimie et la conformation des triterpènes fonctionnalisés (Wilson and Williams, 1969).

Le spectre de RMN 1H des triterpènes pentacycliques est assez caractéristique. Généralement, les 8 méthyles angulaires résonnent entre δ_H 0,50 et 1,50. Les protons H-29 et

H-30 de la série urs-12-ène apparaissent sous forme de doublets (**Ageta et Arai, 1983**). On observe généralement les pics caractéristiques des protons oléfiniques entre δ_H 4,50-6,50.

La majorité des triterpènes sont hydroxylés en position 3, le proton de oxyméthine apparaît entre δ_H 3,00 et 4,00 ; mais si le proton attaché à l'oxygène est substitué par un ester, cependant le proton de oxyméthine apparaît dans les champs fort après 4,00 ppm.

Dans la série oléan-12-ène, la formation du pont lactonique entre C-28 et C-21 entraîne le déplacement chimique du proton oléfinique H-12 vers les champs faibles (**Jyoti et al., 1972**). Le proton allylique H-18 apparaît autour de δ_H 2,20 sous forme de doublet dédoublé dans le cas de la série oléan-12-ène et sous forme de doublet dans le cas de la série urs-12-ène. En revanche, si le méthyle en C-17 est oxydé en acide carboxylique, le proton H-18 subit un effet attracteur de la fonction acide qui le déplace vers les champs faibles autour de δ_H 2,84 en série oléan-12-ène et δ_H 2,40 pour la série urs-12-ène (**Furuya et al., 1987**).

Dans le cas des friedelines, on observe généralement un doublet caractéristique attribuable au méthyle 23 vers δ_H 1,08 ayant pour constante de couplage J entre 6,0-7,5 Hz. Le proton H-4 apparaît le plus souvent sous forme d'un quadruplet entre δ_H 2,50-2,90 avec la même constante de couplage.

L'avènement des spectrographes à haut champ de la transformée de Fourier et des nouvelles techniques ont fait de la RMN ^{13}C une méthode très efficace dans la détermination des structures des triterpènes pentacycliques. Généralement, dans les séries oléananes et ursanes, les huit méthyles angulaires résonnent entre δ_C 14,0-33,3 alors que dans la série friedelane, ils apparaissent entre δ_C 6,8-35,0 (**Mahato et Kundu, 1994**). La présence d'un groupement hydroxyle sur le squelette triterpénique entraîne une variation du déplacement chimique des carbones α de δ_C 34,0 à 50,0 et ceux des carbones β de δ_C 2,0 à 10,0 vers les champs faibles. Par contre, elle entraîne vers les champs forts ceux des carbones γ de δ_C 0,0 à 9,0.

Le tableau 7 suivant représente quelques triterpènes isolés du genre *Annona* et de la famille des Sapotaceae

Tableau 7: Quelques triterpènes isolés de la famille des Sapotaceae et du genre *Annona* et activités biologiques

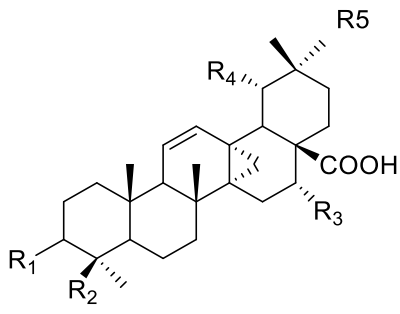
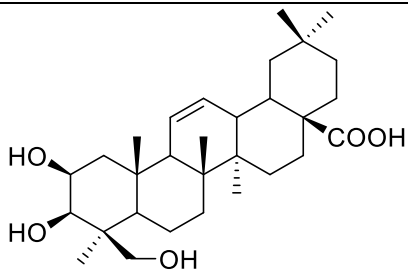
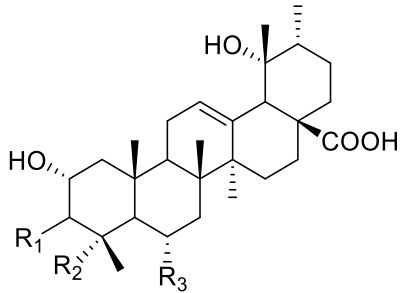
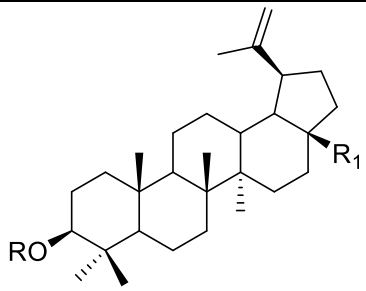
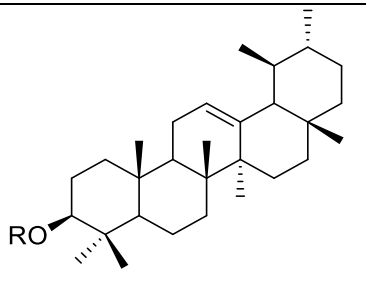
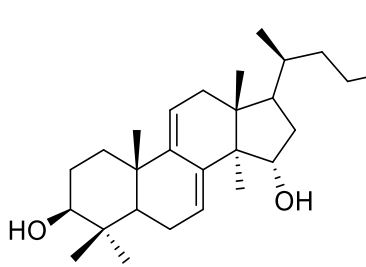
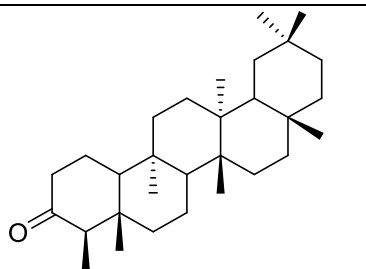
Composés	Sources	Activités
 <p>R₁= O ; R₂= R₃= H ; R₄= OH ; R₅= CH₃ : acide donellanique A 66. R₁= R₄= OH ; R₂=COOH ; R₃= H ; R₅= CH₃ : acide donellanique B 67. R₁= R₃= OH; R₂=COOH; R₄= H; R₅= CH₂ -OH: acide donellanique C 68.</p>	<i>Donella ubanguiensis</i> (Djoumessi et al., 2012) (Djoumessi et al., 2012)	Antibactérienne (Djoumessi et al., 2012)
 <p>Acide 2β, 3β, 23-trihydroxyolean-12-en-28-oïque ou bayogenine 69</p>		Antidiabétique (Xiao-An et al., 2010)
 <p>R₁= α-OH, R₂= COOH, R₃=OH Acide élatumique 70 R₁=βOH, R₂=CH₃, R₃= H Acide tormentique 71</p>	<i>Omphalocarpum elatum</i> (Sandjo et al., 2014) (Sandjo et al., 2014)	Cytotoxique (Sandjo et al., 2014) Cytotoxique (Lee et al., 2010)

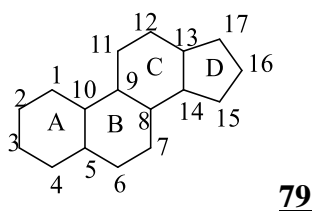
Tableau 7 : Quelques triterpènes isolés de la famille des Sapotaceae et du genre *Annona* et activités biologiques (suite)

 <p>R= CH₃CO, R₁= CH₃ : Acétate de lupéol 72 R= H, R₁= COOH: Acide bétulinique 73.</p>	<p><i>Gambeya boiviniana</i> (Rasoanaivo et al., 2014)</p> <p><i>Donella ubanguensis</i> (Djoumessi et al., 2012)</p>	<p>Anti-inflammatoire et antinociceptive (Rasoanaivo et al., 2014).</p>
 <p>R= H l'α -amyrine 74 R= CH₃(CH₂)₁₄CO-: palmitate d'α-amyrine 75. R=CH₃CO-:3β-O-acetyl-α-amyrine 76.</p>	<p><i>Chrysophyllum marginatum</i> (Candida da Silva et al., 2006)</p> <p>Huile d'<i>Argania spinosa</i>* (Baliga et al., 2011) <i>Manilkara bidentata</i> (Rhoury-Frih et al., 2013)</p>	<p>Antimicrobienne (Díaz-Ruiz et al., 2012) antiinflammatoire (Carretero et al., 2008) Antibacterienne (Díaz-Ruiz et al., 2012)</p>
 <p>Polycarpol 77</p>	<p><i>Anonidium mannii</i> (Matchi et al.,2020; Okogun et Adesomoju, 1985)</p>	<p>Anti-trypanosomale (Ngantchou et al., 2009) ; Antifilariale (Nyasse et al.,2006)</p>
 <p>Friedeline 78</p>	<p><i>A. squamosa</i> (Leboeuf et al., 1982)</p>	

I.3.3.4. Les stéroïdes

Le nom stéroïde est donné à tous les composés dont le squelette de base comporte le noyau perhydrocyclopentanophénanthrène (**79**) et la numérotation des cycles est standardisée comme l'indique la structure de base.

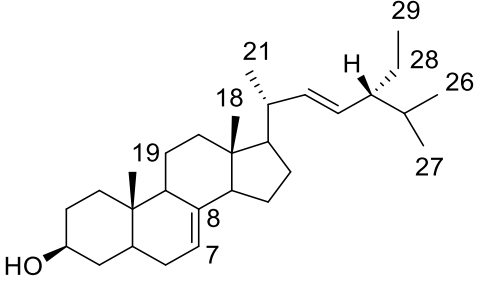
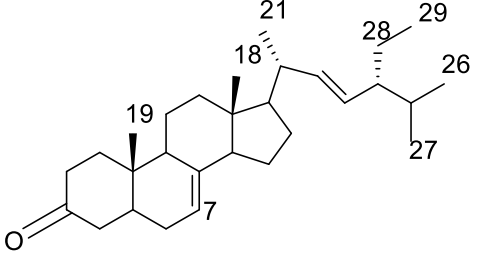
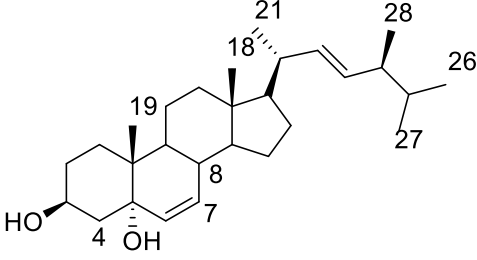
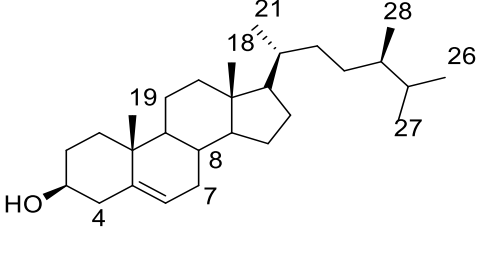
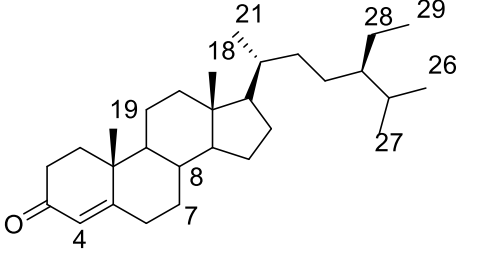
Les stéroïdes sont considérés comme des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins deux méthyles en 4 et 14. Ce sont des composés généralement hydroxylés en position 3. Cependant il peut y avoir des hydroxylations supplémentaires, des insaturations et des lactonisations (**Bruneton, 1993 ; Pan et al., 1994**).



79

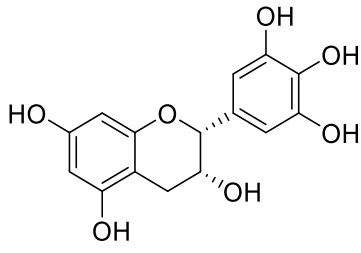
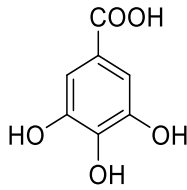
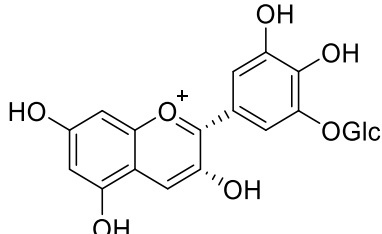
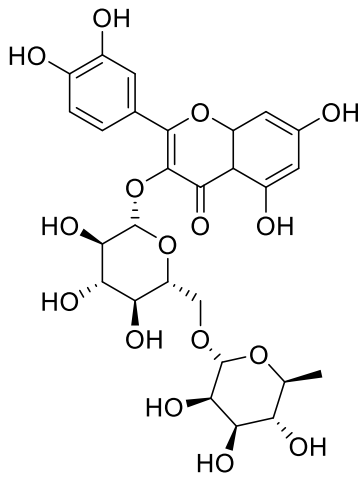
Le tableau **8** suivant présente quelques composés de cette classe isolés des genres *Donella* et *Annona*

Tableau 8: Quelques stéroïdes isolés des genres *Donella* et *Annona*

Structures et noms	Sources / Références
 <p>Chondrillastérol 80</p>	<p>Ecorces et bois de <i>Donella ubangiensis</i></p>
 <p>Chondrillastérone 81</p>	<p>(Djoumessi <i>et al.</i>, 2012)</p>
 <p>3β, 5α, 8α-trihydroxy-campest-6,22-diène 82</p>	
 <p>Sitosténone 83</p>	<p>Ecorces de <i>Annona pickelii</i> (Costa <i>et al.</i>, 2015)</p>
 <p>Campatérol 84</p>	

I.3.4. Les composés phénoliques et polyphénoliques

Tableau 9: Quelques composés phénoliques isolés du genre *Annona* et des Sapotaceae et activités biologiques

Composés	Sources et références	Activités
 <p>(-)- Epigallocatechine 85</p>	<p><i>Chrysophyllum marginatum</i> (Da Silva et al.; 2006)</p> <p><i>A. Muricata</i> (Nam et al., 2017)</p> <p><i>B.muricata</i></p>	<p>Antioxydante (Jun Ma et al., 2004)</p>
 <p>Acide gallique 86</p>	<p><i>Chrysophyllum cainito</i> (Xiao-dong et al., 2002)</p>	<p>Antioxydante (Jun Ma et al., 2004)</p>
 <p>Glucopyranoside de 3-o-β-delphinidine 87</p>		
 <p>Rutine 88</p>	<p><i>A.muricata</i> (Jiménez et al., 2014)</p>	<p>Antioxydante (Nam et al., 2017)</p>

I.4. TRAVAUX BIOLOGIQUES ANTERIEURS SUR LE GENRE *ANNONA* ET LES SAPOTACEAE

Les études biologiques effectuées sur les extraits de plusieurs espèces du genre *Annona* révèlent plusieurs activités biologiques (**Tableau 10**)

Tableau 10: Activités biologiques de quelques espèces du genre *Annona*

Type d'extrait / Activités biologiques	Références
L'extrait brut au méthanol des feuilles et des écorces d' <i>A. mannii</i> possède des activités cytotoxique et antibactérienne.	(Djeussi et al., 2013 ; Kuete et al. 2013)
L'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d' <i>A. muricata</i> possède une activité anticancéreuse.	(Asare et al. 2015 ; Minari et al., 2014)
L'extrait méthanolique des feuilles d' <i>A. muricata</i> possède une activité antidiabétique et hypolipidémie. L'extrait au pentane des feuilles d' <i>A. muricata</i> possède une activité anti plasmodiale.	(Nwokocho al., 2012)
L'extrait méthanolique et aqueux des fruits d' <i>A. muricata</i> possède une activité anti-insecticide.	(Ménan et al., 2006)
L'extrait éthanolique des feuilles possède d' <i>A. muricata</i> des activités anti-inflammatoire, antidépressive ; L'extrait éthanolique et aqueux des écorces possède d' <i>A. muricata</i> une activité antioxydante, anti-parasitique ; L'extrait aqueux et à l'acétate d'éthyle des feuilles de <i>A. muricata</i> possède une activité hepatoprotective, gastroprotective	(Ribeiro et al., 2014) (Kedari, et al., 2014) (Soheil, et al., 2015)
L'extrait méthanolique et aqueux des fruits d' <i>A. cherimola</i> possèdent anti parasitique.	(Bories et al., 1999)
Différents extraits d' <i>A. reticulata</i> ont montré une activité anti-parasitique.	(Pathak et al., 2013)
L'extrait éthanolique de <i>A. senegalensis</i> possède des activités antimalariales et anti-cancéreuses.	(Ajaiyeoba et al., 2006) (Gbile et Adesina ; 1987)
L'extrait hydroéthanolique des différentes parties <i>salzmannii</i> et <i>A. vepreturum</i> anti inflammatoire.	(Diniz et al., 2013 ; Agra ,1997)

Tableau 10 : Activités biologiques de quelques espèces du genre *Annona* (suite et fin)

L'extrait hydroéthanolique des différentes parties d' <i>A. squamosa</i> possède des activités antimicrobiennes, anti inflammatoires, anti-oxydantes, cytotoxiques, antiulcère, anti tumorale, anti-insecticide, anthelminthique	(Gajalakshmi et al., 2011)
--	----------------------------

Les espèces de la famille des Sapotaceae présentent des activités antimicrobiennes, diurétiques, anti-oxydantes, antibactériennes, anti-radicalaire, etc. Le tableau 11 suivant présente les résultats de quelques tests d'activités biologiques réalisés sur les extraits de quelques Sapotaceae.

Tableau 11: Activités biologiques de quelques espèces de la famille des Sapotaceae

Type d'extrait / Activités biologiques	Références
L'extrait brut au méthanol des écorces du tronc et du bois de <i>D.ubanguiensis</i> possède une activité antimicrobienne	(Djournessi et al., 2012)
L'extrait brut phénolique de l'huile d'Argan réduit le taux de cholestérol. Ce résultat démontre à suffisance la valeur diurétique de cette huile et son habileté à prévenir les maladies cardio-vasculaires. L'extrait à l'acétate d'éthyle d' <i>Arginia spinosa</i> possède des activités anti-malariale et antioxydante.	(Berrougui et al., 2006 ; Charrouf et Guillaume, 2007 ; El Babili et al., 2010)
L'extrait à l'éthanol des écorces du tronc de <i>Butyrospermum paradoxum</i> possède une activité anti-trypanosomiale.	(Mbaya et al., 2007)
L'extrait brut au méthanol des feuilles de <i>Chrysophyllum albidum</i> possède une activité antimicrobienne.	(Duyilemi et al., 2009)
L'extrait aqueux des feuilles de <i>Chrysophyllum cainito</i> possède une activité hypoglycémique.	(Koffi et al., 2009)

Tableau 12: Activités biologiques de quelques espèces de la famille des Sapotaceae (suite et fin)

L'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces du tronc de <i>Gambeya boiviniana</i> possède une activité anti-inflammatoire	(Rasoanaivo et al., 2014)
Le fruit de <i>Synsepalum dulcificum</i> possède des activités anti-oxydantes, antidiabétiques et anticancéreuses	(Inglett et Diejun, 2011 ; Swamy et al., 2014)

I.5. APERCU SUR LES BACTERIES

I.5.1. Définition et classification

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires, procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, mais un ADN chromosomique cellulaire situé dans le cytoplasme. De nombreuses bactéries contiennent une autre structure d'ADN extra-chromosomiques appelée plasmide. Elles sont entourées d'une paroi complexe et possèdent souvent des flagelles.

Les bactéries peuvent être classées et donc identifiées par plusieurs paramètres :

- Morphologie microscopique : coque, bacille, groupé en deux, isolé, en chaînette, en anas...
- Morphologie macroscopique : taille, forme, couleur des colonies sur culture
- Température de croissance
- Besoins respiratoires : aérobie, anaérobie strict, ...
- Mobilité
- Présence des spores
- Besoins nutritionnels
- Résultat de la coloration sur Gram : Gram positif - gram négatif

Les bactéries Gram-positifs sont caractérisées par leur paroi particulièrement épaisse, uniforme et recouverte d'un polymère complexe (peptidoglycane) qui empêche la décoloration par l'alcool rendant donc impossible la recoloration par la fuchsine ainsi les bactéries Gram (+) conservent leur coloration violette.

Les bactéries Gram-négatifs pour leur part présentent une paroi fine, de ce fait celle-ci est perméable à l'alcool qui la décolore et permettant donc à la fuchsine de se fixer et de recolorer les bactéries Gram (-) en rouge.

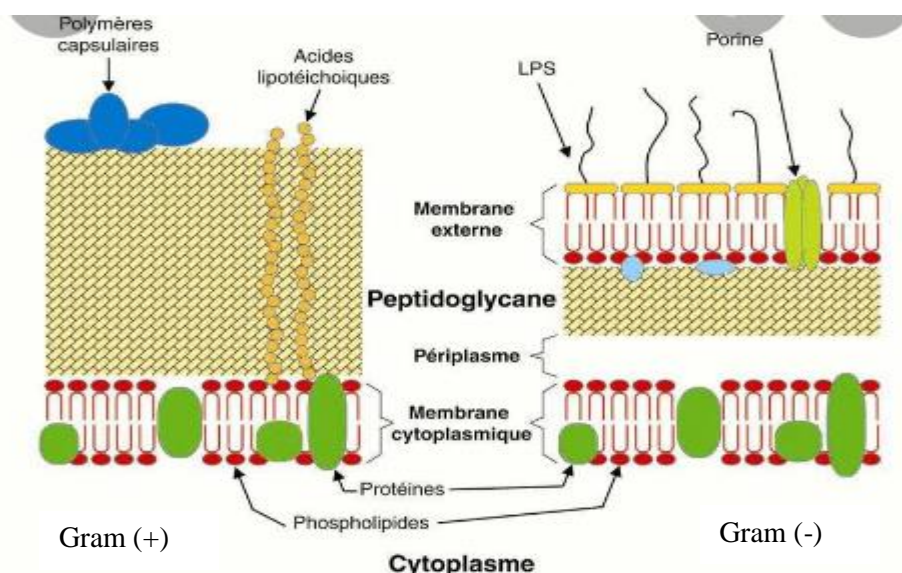


Schéma 5: Représentation schématique de la cellule des bactéries Gram-positives et Gram-négatives

I.5.2. Mode d'action des antibiotiques et résistance bactérienne aux antibiotiques

Pour vaincre aux infections bactériennes, des antibiotiques sont administrés. Un antibiotique est une substance qui va empêcher la multiplication des bactéries ou entraîner leur destruction. Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant les fonctions physiologiques précises.

Les antibiotiques permettent de lutter contre les maladies infectieuses mais, ils sont sans effet sur les virus. Ils doivent être nuisibles pour les microorganismes pathogènes, mais inoffensifs pour les cellules de l'organisme hôte.

Les antibiotiques bloquent les processus métaboliques vitaux spécifiques des bactéries et des champignons sensibles et arrêtent ainsi leur développement, le plus souvent seulement temporairement (effet bactériostatique ou fongistatique selon le cas) mais parfois définitivement (effet bactéricide ou fongicide selon le cas). Cet effet ne se manifeste qu'à partir d'une certaine concentration de l'antibiotique, la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Walsh, 2003).

On peut classer les antibiotiques en quatre groupes selon les critères tels que leur origine, leur spectre d'action ou leur mécanisme d'action (Walsh, 2003). On distingue ainsi :

- Ceux qui inhibent la biosynthèse de la paroi cellulaire (cas de la pénicilline) ;

-
- Ceux qui bloquent les ribosomes microbiens et la synthèse protéique (cas de la tétracycline) ;
 - Ceux qui bloquent la réplication de l'ADN microbien et la biosynthèse de la membrane cytoplasmique (cas de la polymyxine).

Cependant, dans le but de contrer l'action des antibiotiques, les microorganismes développent des mécanismes de résistances telles que :

- la destruction ou l'inactivation enzymatique de l'antibiotique (cas des lactamases)
- la modification des structures cibles (cas des érythromycines)
- l'émergence d'un cycle métabolique nouveau ou de nouvelles enzymes (cas des sulfamides)

La résistance bactérienne est une propriété intrinsèque au monde bactérien qui permet à la bactérie de s'adapter à son environnement. IL existe une multitude de mécanismes biochimiques et de systèmes génétiques permettant aux bactéries d'échapper à l'activité des antibiotiques. Cette diversité, combinée à l'utilisation intensive et fréquemment abusive des antibiotiques rend compte de l'évolution vers la résistance des bactéries observée aujourd'hui.

Une souche bactérienne est dite résistante quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qu'inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce c'est-à-dire les souches qui supportent des concentrations critiques d'antibiotiques plus élevées que celles qu'ils sont possibles d'atteindre *in vivo*.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

II.1.1. Matériel végétal

II.1.1.1 Ecorces du tronc et racines d'*Anonidium mannii* (Oliver) Engler et Diels

Les écorces du tronc ont été récoltées en Mai 2015 au Mont Kalla quant aux racines de *A. mannii*, elles ont été récoltées deux fois en 2015 et en 2017 (Région du Centre, Cameroun) et identifiées en comparaison à l'échantillon N°50327 /HNC par M. Nana Victor de l'Herbier National du Cameroun où un échantillon botanique est conservé.

II.1.1.2 Les lianes de *Donella welwitschii* (Engl) Pierre ex Aubr et Pellegr

Les lianes de *Donella welwitschi* ont été récoltées en Juin 2015 à Bertoua, Région de l'Est, Cameroun et identifiées en comparaison à l'échantillon N° (107085 SFC/Cam) par M. NANA Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun où un échantillon botanique est conservé.

II.1.2. Extraction et isolement des métabolites secondaires

II.1.2.1. Extraction des écorces du tronc de *A. mannii* (Oliver) Engler et Diels. (Annonaceae)

Les écorces du tronc de *A. mannii* ont été découpées, séchées puis broyées pour donner (2000 g) de poudre. Cette poudre a été extraite par macération à température ambiante au mélange CH₂Cl₂/MeOH (1/1) pendant 48 heures puis au MeOH pendant 24 heures. Après évaporation du solvant sous pression réduite, les deux extraits ont été combinés après analyse de leur CCM pour obtenir 90 g d'extrait brut. 87 g de cet extrait brut a ensuite été soumis aux chromatographies successives sur colonne pour donner 7 produits indexés AMe₅₀, AMe₁₀₀, AMe₁₈₄, AMe₂₄₀₋₂₄₉, AMe₂₅₈, AMe₂₈₁ et AMe₃₄₉ comme l'indique le Schéma 5.

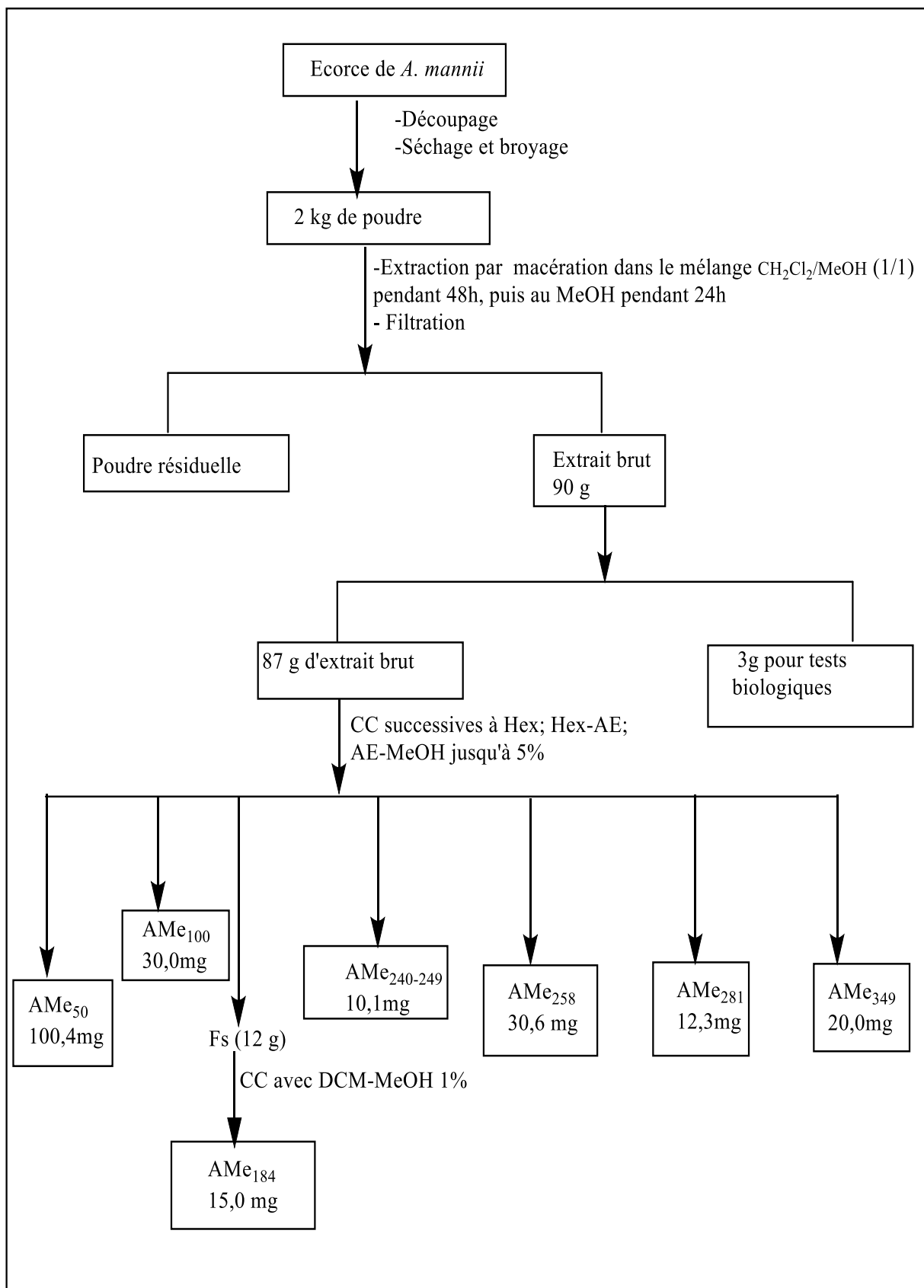


Schéma 6: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des écorces de *A. mannii*

II.1.2.2. Extraction des racines de *A. mannii* (Oliver) Engler et Diels. (Annonaceae) : Première récolte

Les racines de *A. mannii* récoltées en Mai 2015 ont été découpées, séchées puis broyées pour donner (1700 g) de poudre. Cette poudre a été extraite par macération à température ambiante au mélange CH₂Cl₂/MeOH (1:1) pendant 48 heures puis au MeOH pendant 24 heures. Après évaporation du solvant sous pression réduite les deux extraits ont été combinés après analyse de leur CCM pour obtenir 83 g d'extrait brut. 80 g de cet extrait brut a été soumis aux chromatographies successives sur colonne pour donner 6 produits indexés AMr₁, AMr₁₃₉, AMr₂₄₁, AMr₂₆₄, AMr_{180P} et AMr_{52P} comme 'indiqué sur le Schéma 6.

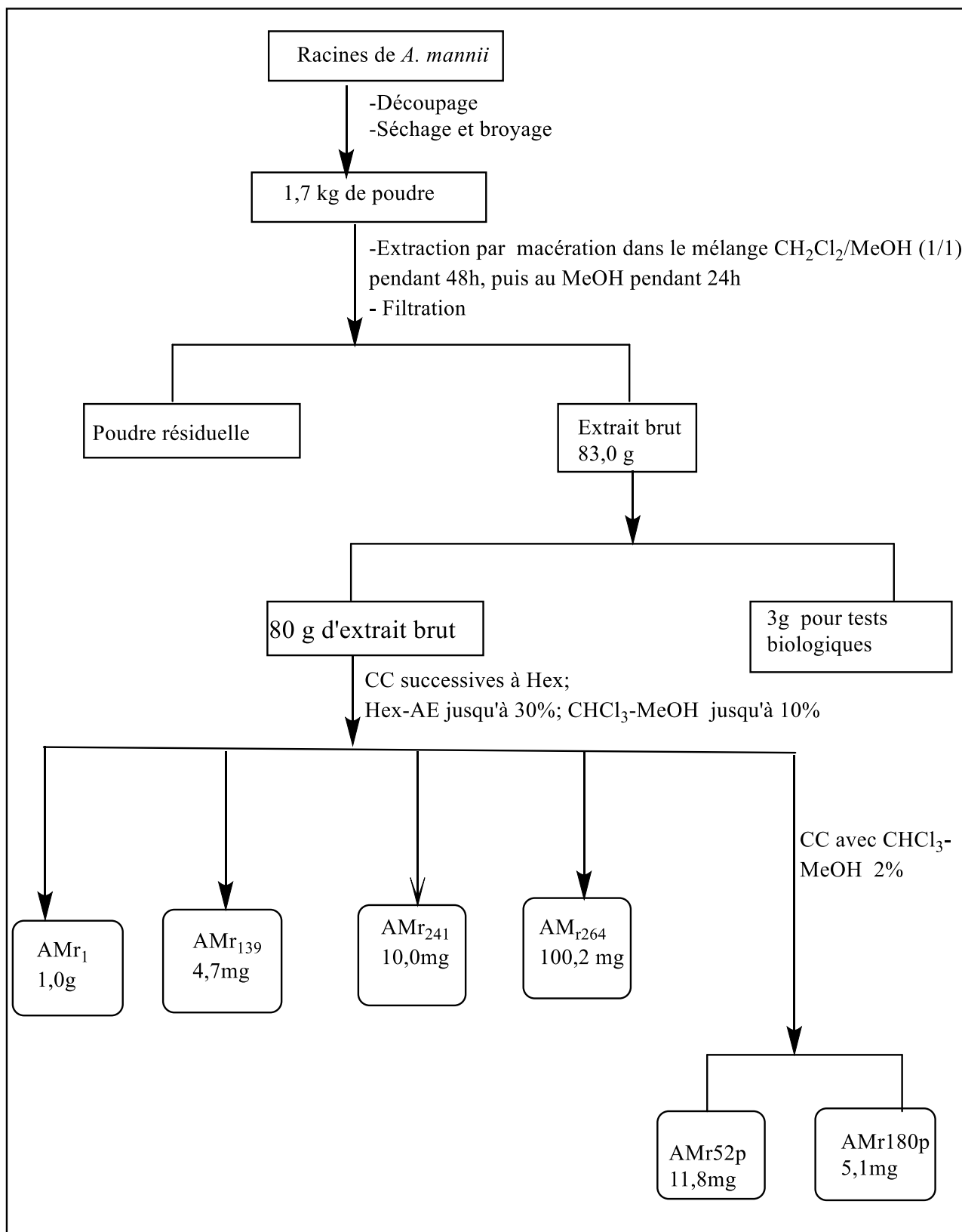


Schéma 7: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des racines de *A. mannii* (Première récolte)

II.1.2.3. Extraction des racines de *A. mannii* (Oliver) Engler et Diels. (Annonaceae) : deuxième récolte

Les racines de *A. mannii* récoltées en Juillet 2017 ont été découpées, séchées puis broyées pour donner (2300 g) de poudre. Cette poudre a été extraite par macération à température ambiante au mélange CH₂Cl₂/MeOH (1:1) pendant 48 heures puis au MeOH pendant 24 heures. Après évaporation du solvant sous pression réduite les deux extraits ont été combinés après analyse de leur CCM pour obtenir 92 g d'extrait brut. 90 g de cet extrait brut a subi des épuisements successifs par solubilité différentielle à l'hexane, au chlorure de méthylène et à l'acétate d'éthyle. Les fractions obtenues ont ensuite été soumises aux chromatographies successives sur colonne pour donner 10 produits indexés AMrH₉₀, AMrH₁₃₀, AMrH₁₅₂, AMr₁₆₃, AMrH₁₇₂, AMra₁₁₈, AMra₁₆₀, AMra₁₉₄, AMra₂₈₇ et AMra₃₀₆ (Schéma 7).

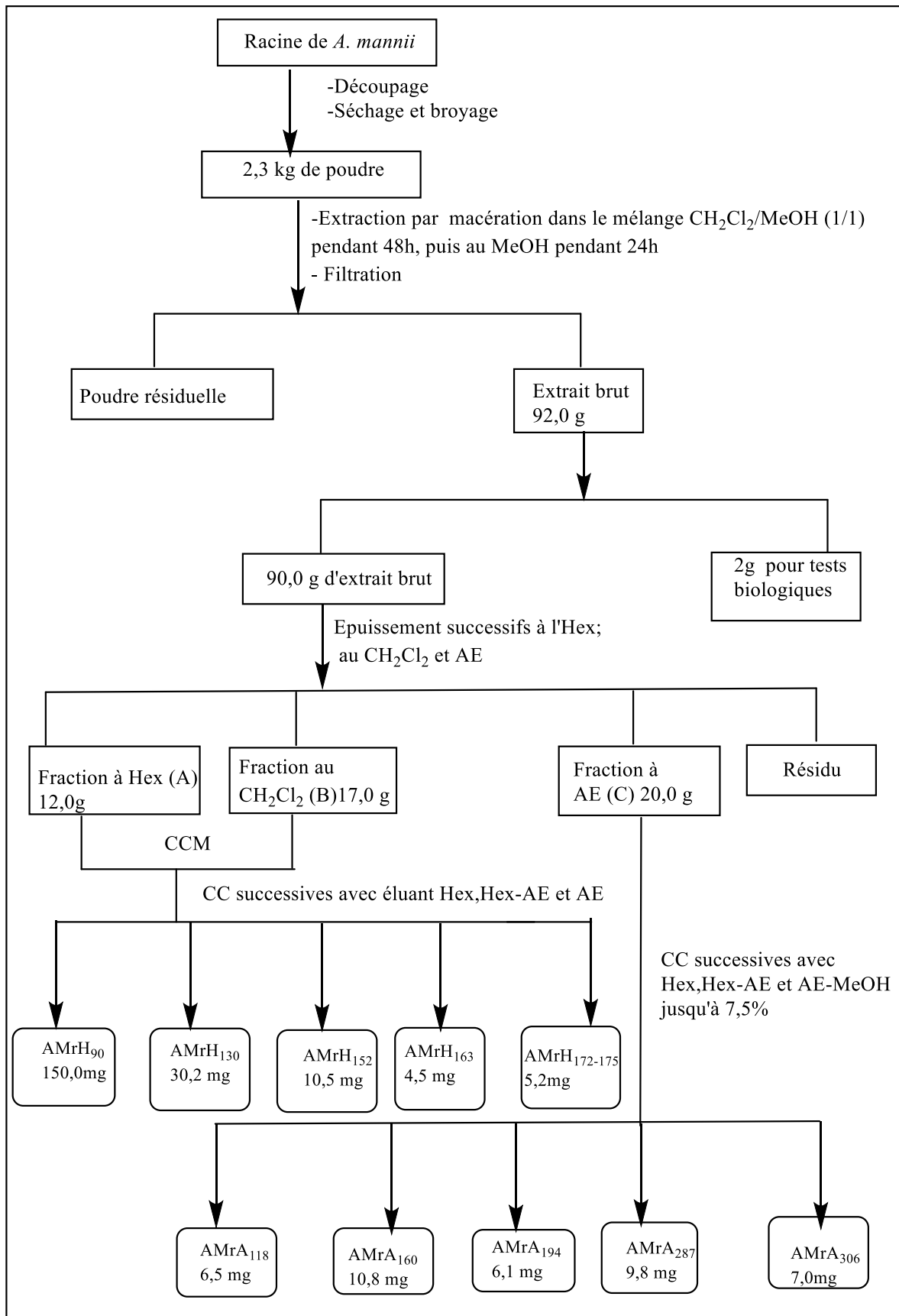


Schéma 8: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des racines de *A. mannii* (deuxième récolte)

II.1.2.4. Extraction des lianes de *D. welwitschii* (Engl) Pierre ex Aubr et Pellegr

La matière végétale (896 g) a été extraite par macération à température ambiante au mélange CH₂Cl₂/MeOH (1:1) pendant 48 heures puis au MeOH pendant 24 heures. Après évaporation du solvant sous pression réduite les deux extraits ont été combinés après analyse de leur CCM pour obtenir 53 g d'extrait brut. 48 g de cet extrait brut a subi des épuisements successifs par solubilité différentielle à l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol et au n-butanol. Les fractions obtenues indexés de A-D ont ensuite été soumises aux chromatographies successives sur colonne pour donner 13 produits indexés DW₁ - DW₁₁, DWB₃₀, et DWBP₂ (Schéma 8).

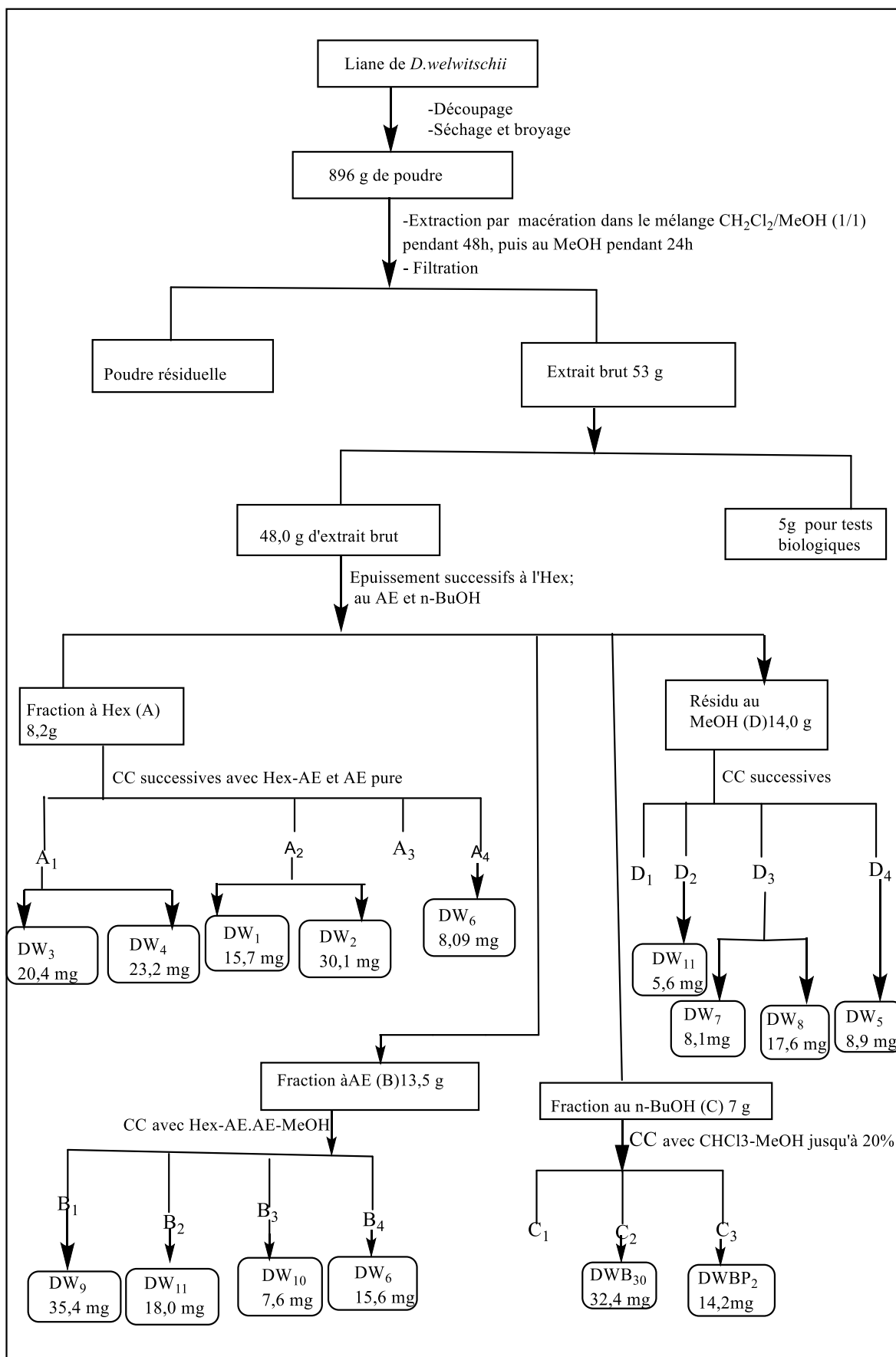


Schéma 9: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des lianes de *D.welwitschii*

II.2. CARACTERISATION DES COMPOSES ISOLEES DES DEUX PLANTES

L'étude phytochimique des écorces du tronc et des racines de *A. manni* et des tiges de *D. welwitchi*, nous a permis d'isoler et caractériser vingt-sept (27) sur la base de leurs données spectroscopiques et physiques ou par comparaison de leurs données spectroscopiques et physiques avec celles de la littérature. Ces différents composés ont été regroupés en quatre classes structurales dont :

- Cinq alcaloïdes ;
- Treize triterpènes ;
- Six stéroïdes ;
- Trois dérivés de l'acide benzoïque ;

Le Tableau **12** ci-dessous résumé les métabolites secondaires isolés et caractérisés des deux plantes.

Tableau 13: Regroupement des différents composés isolés des écorces, racines et tiges de *A. mannii* et *D. welwitschii*

No	Ecorces du tronc de <i>A. mannii</i>	Racines De <i>A. mannii</i> 1 ^è récolte	Racines de <i>A. mannii</i> 2 ^è récolte	Lianes de <i>D. welwitschi</i>	Noms des composés isolés
1	AMe ₅₀				β -sitostérol
2			AMr ₉₀		stigmastérol
3	AMe ₁₀₀	AMr ₁	AMrH ₁₅₂		Polycarpol
4	AMe ₁₈₄ *		AMra ₁₆₀		9-hydroxyl-8-methoxyphenanthridin- 6(5H) -one
5	AMe ₂₄₀₋₂₄₉ *				Anonanol B
6	AMe ₂₅₈		AMrH ₁₇₂		8,9-dimethoxyphenanthridin-6(5H) -one
7	AMe ₂₈₁ *	AMr _{180P}			Anonanol A
8	AMe ₃₄₉				l'acide-3,4-dihydroxybenzoïque
9	AMe ₄₅₇				Glucoside de stigmastérol
10		AMr ₁₃₉	AMrH ₁₆₃		lanosta7,9(11),24-triène-3 β ,21-diol
11		AMr ₂₄₁	AMra ₂₈₇		oxoanolobine
12		AMr ₂₆₄			Glucoside de β -sitostérol
13		AMr _{52P}			Arborinine
14			AMra ₃₀₆₋₃₁		Manniindole

Tableau 12 : Regroupement des différents composés isolés des écorces, racines et tiges de *A. manni* et *D. welwitschii* (suite et fin)

No	Ecorces du tronc de <i>A. manni</i>	Racines de <i>A. manni</i> 1 ^è récolte	Racines de <i>A. manni</i> 2 ^è récolte	Lianes de <i>D. welwitschii</i>	Noms des composés isolés
15				DW ₁	Spinastérol
16				DW ₂	Taraxérol
17				DW ₃	Acetate de α -amyrine
18				DW ₄	Acetate de β -amyrine
19				DW ₅	Acide vanillique
20				DW ₆	Acide ursolique
21				DW ₇	Erythrodiol
22				DW ₈	Acide oléanoïque
23				DW ₉	Acetate de β -taraxérol
24				DW ₁₀	Acide diopyrique B
25				DW ₁₁	β -amyrine
26				DWB ₃₀	Glucoside de β -spinastérol
27				DWBp ₂	3-C- β -D-glucoopyranosyl-2,4',4,6-tetrahydroxylbenzophenone

*** Dérivés nouveaux**

La deuxième récolte a été faite parce que l'analyse de certains composés isolés lors de la première récolte était incomplète. Certains composés issus de la deuxième récolte étaient différents de ceux obtenus de la première récolte ceci serait dû la période de la récolte qui aurait modifier le métabolisme des composés.

II.2.1. Les Triterpènes

II.2.1.1. Identification du composé AMr₁ ou AMe₁₀₀ ou AMrH₁₅₂

AMr₁ a été isolé des racines et des écorces de *A. manni* sous forme de poudre amorphe blanche dans l'acétone et fond entre 172,3-173,5°C. Il est soluble dans le CH₂Cl₂ et donne une coloration rouge violacée avec le test de Liebermann-Büchard caractéristique des triterpènes.

L'analyse combinée des spectres de RMN ¹H et ¹³C nous ont permis de lui attribuer la formule brute C₃₀H₄₈O₂ renfermant 7 degrés d'insaturations

L'analyse de son spectre RMN ¹³C découplé large bande (**Fig. 4**) révèle la présence de 30 atomes de carbones dont :

- Deux oxyméthines à δ_C 78,9 et 74,8 montrant la présence de deux carbones hydroxylés, probablement le carbone C-3 et C-15 respectivement ;
- Six carbones oléfiniques à δ_C 140,9 ; 131,2 ; 124,9 ; 121,3 ; 146,1 ; 116, caractéristiques des double-liaisons $\Delta^{7,8}$, $\Delta^{9,11}$ et $\Delta^{24,25}$ des lanostanes (Ali *et al.*, 2001 ; Silva *et al.*, 2012 ; Xia *et al.*, 2014) ;

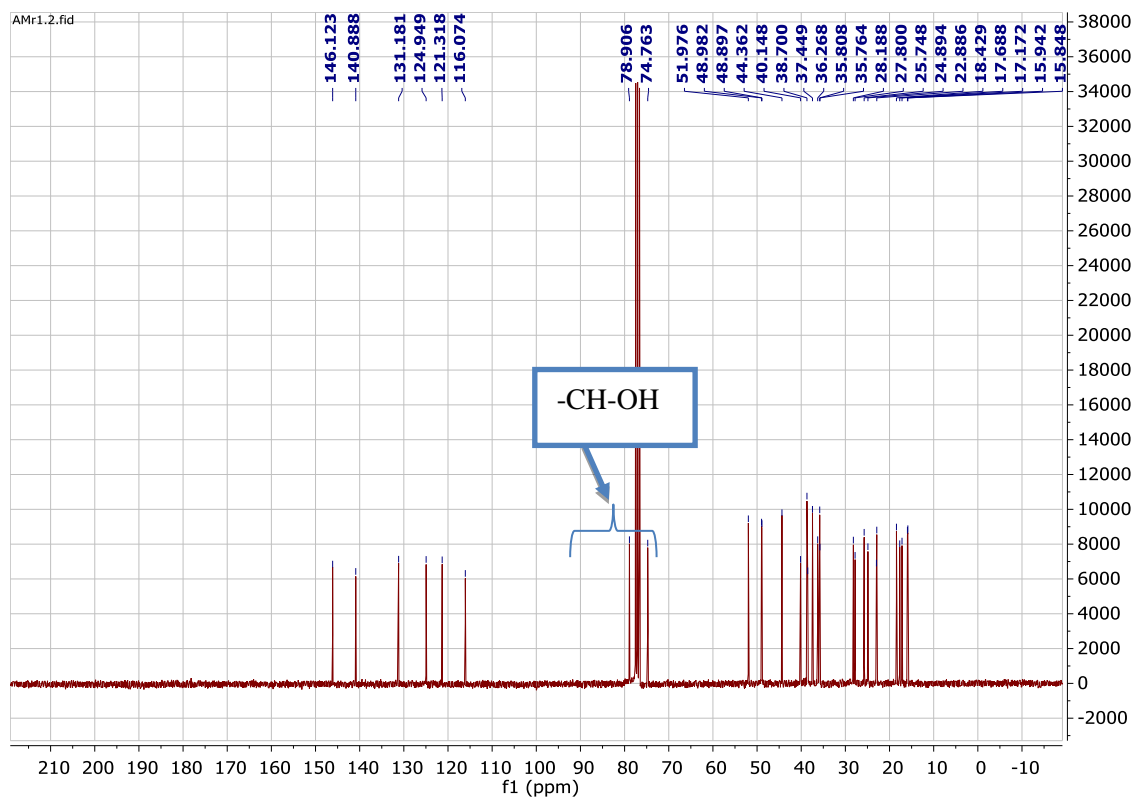


Figure 4: Spectre de RMN ¹³C découplé large bande (CDCl₃, 75 MHz) d'AMr₁

Son spectre de RMN ^1H (**Fig. 5**) présenté un ensemble de six signaux intenses entre δ_{H} 0,65 et 1,04 dont un doublet et cinq singulets attribuables à six groupes méthyle. On observe également deux signaux singulets de 3 protons chacun à δ_{H} 1,64 et 1,73 suggérant la présence d'un groupement gem- diméthyle (deux méthyls vinyliques H-27 et H-26) d'une part et d'autre part deux signaux de multiplets à δ_{H} 4,32(1H,m) et 3,27(1H,m) attribuables aux protons géminés à un hydroxyle attribuables aux protons H-15 et H-3 respectivement. Dans les champs faibles, on observe un faux triplet d'un proton à δ_{H} 5,13 attribuable au proton éthylénique en C-24 de la chaîne latérale des lanostanes, deux doublets à δ_{H} 5,34 et 5,98 ($J= 6$ Hz) attribuable aux protons en C-7 et C-11 respectivement (Ali *et al.*, 2001 ; Xia *et al.*, 2014).

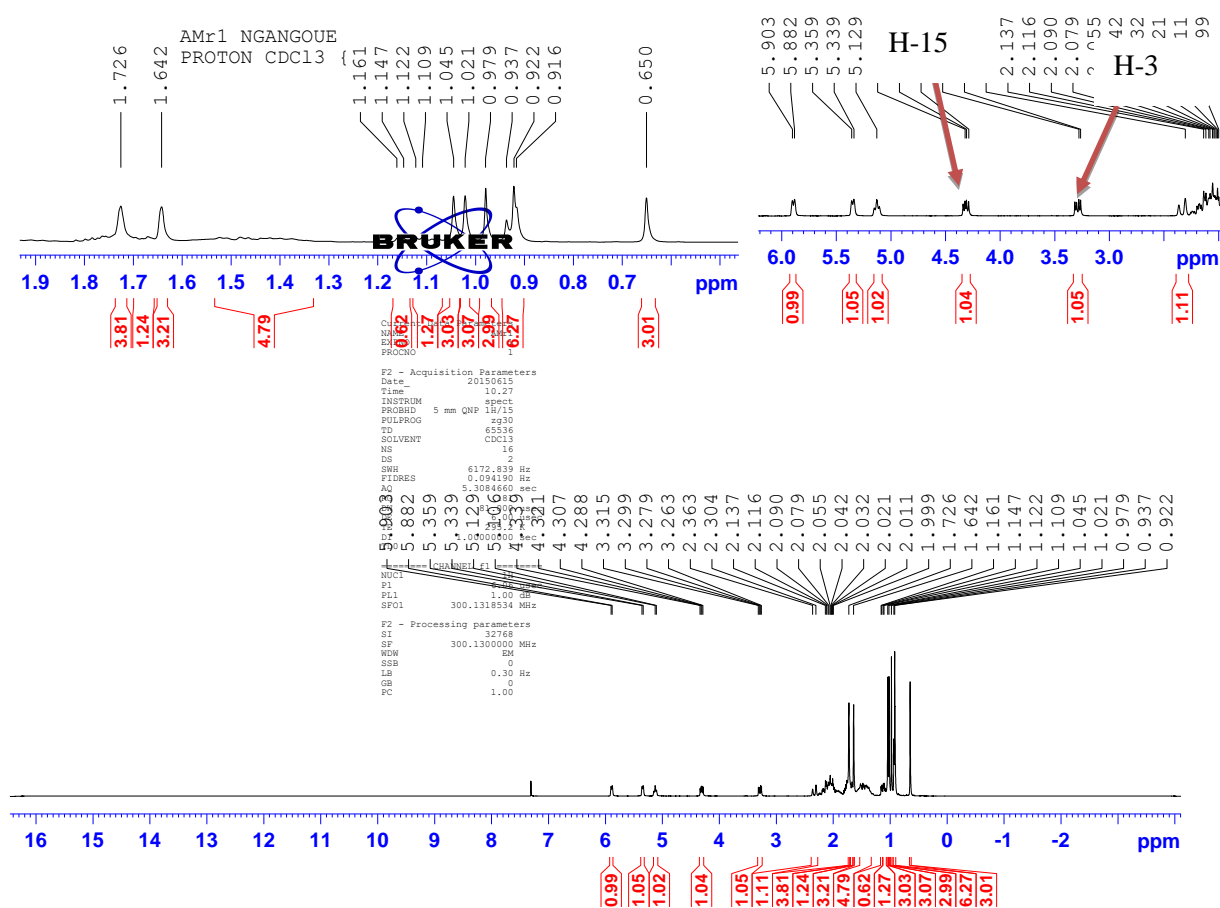


Figure 5: Spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de AMr1

L'ensemble de ces données spectrales combinées à celles rencontrées dans la littérature nous ont conduit à attribuer à AMr1 la structure **89** qui est celle du polycarpol ou lanosta-7,9(11), 24-triène-3 β , 15 α -diol (Silva *et al.*, 2012). Ce composé possède des propriétés anti-trypanosomiale et antifilariale (Ngantchou *et al.*, 2009; Nyasse *et al.*, 2006).

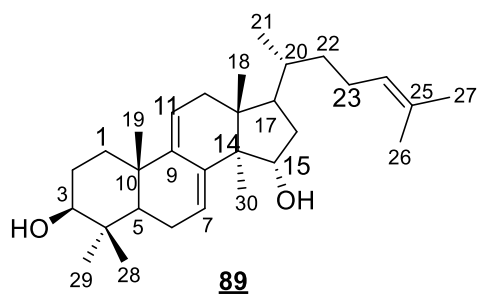


Tableau 14: Données spectrales de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de AMr₁ comparées à celles de polycarpol de la littérature RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) (Silva *et al.*, 2012)

Position	AMr ₁ (δ_c) (89)	Littérature (δ_c)	Position	AMr ₁ (δ_c) (89)	Littérature (δ_c)
1	35,7	35,7	16	40,1	40,1
2	27,9	27,7	17	48,9	48,9
3	78,9	78,9	18	15,9	15,9
4	38,7	38,7	19	22,8	22,8
5	48,8	48,8	20	35,8	35,8
6	22,9	22,9	21	18,4	18,4
7	121,3	121,3	22	36,3	36,2
8	140,9	140,8	23	24,8	24,8
9	146,1	146,1	24	124,9	124,9
10	37,4	37,4	25	131,2	131,2
11	116,1	116,0	26	17,6	17,6
12	38,5	38,6	27	25,7	25,7
13	44,3	44,3	28	28,1	28,1
14	51,9	51,9	29	15,8	15,8
15	74,8	74,7	30	17,2	17,1

II.2.1.2. Caractérisation du composé AMe₂₈₁ ou AMr_{180p}

AMe₂₈₁ a été isolé des écorces d'*A. mannii* sous forme de cristaux marron dans le système Hex-AE (6-4). Il est soluble dans le DMSO et fond entre 217,1-219,9°C. Il donne une coloration rouge violacée avec le test de Liebermann-Büchard caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016).

Son spectre de masse ESI haute résolution (Fig. 6) en mode (+) présente le pic de l'ion pseudo- moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 479,3520 ($[M+Na]^+$, calc 479,3496) compatible avec la formule brute C₃₀H₄₈NaO₃ et renfermant 7 degrés d'insaturations.

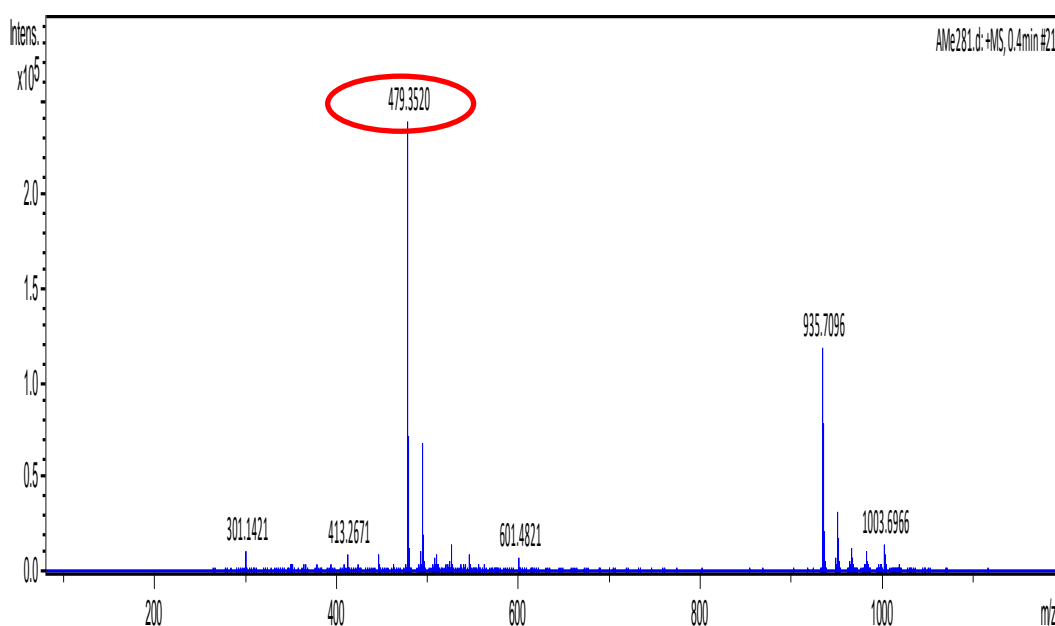


Figure 6: Spectre de masse ESI haute résolution de AMe₂₈₁

Son spectre IR (KBr) (Fig. 7) exhibe entre autres des bandes de vibrations caractéristiques de groupes fonctionnels à : 3352 cm⁻¹ (OH libre) ; 2967,4 et 2921,3 cm⁻¹ (C-H).

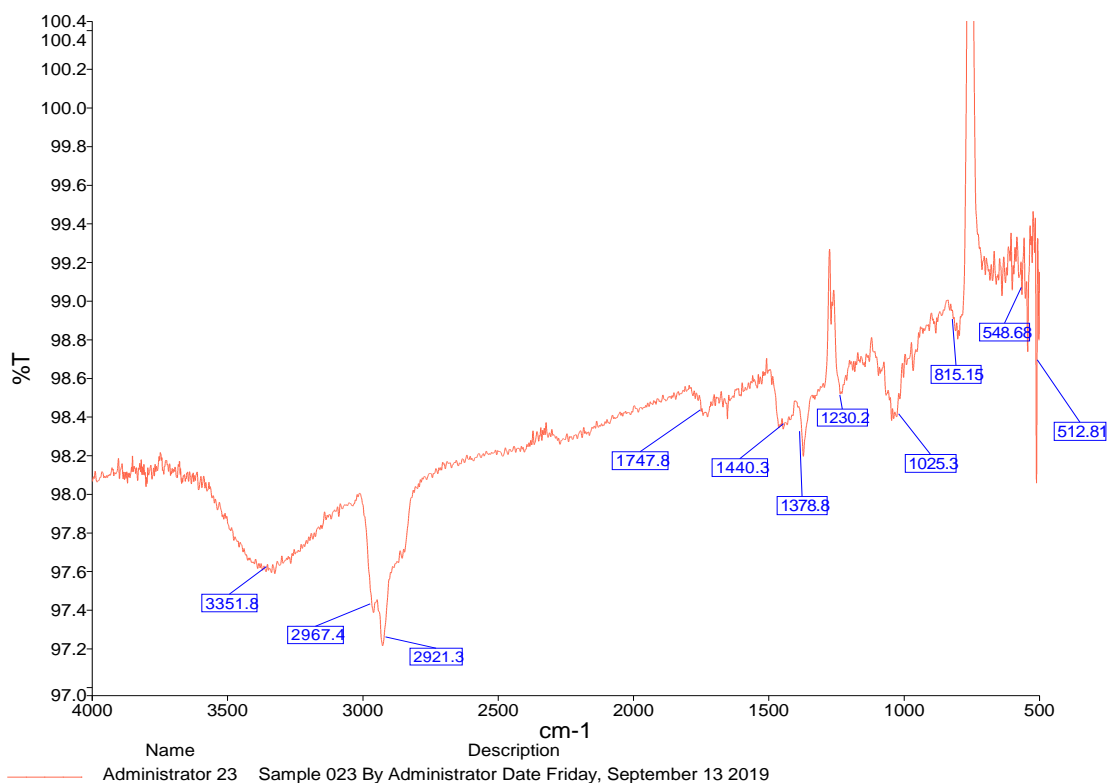


Figure 7: Spectre IR (KBr) de AMe 281

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Fig. 8**) de AMe₂₈₁ couplée au spectre DEPT 135 (**Fig. 9**) relève la présence de 30 signaux d'atomes de carbone parmi lesquels six atomes carbone oléfiniques à δ_{C} 115,5 ; 121,0 ; 123,1 ; 140,9 ; 141,0 et 146,3. Ces déplacements chimiques ont été étroitement similaires à ceux des dérivés de lanosta-7-9-23-triène décrits dans la littérature (**Leong et Harrisson 1999 ; Silva et al., 2012 ; Xia et al., 2014**). En plus on observe 24 carbones sp^3 attribuables à 8 méthyles, 6 méthylènes, 5 méthines incluant deux oxyméthines à δ_{C} 76,8 et 72,4 et cinq carbones quaternaires parmi lesquels un carbone oxygéné à δ_{C} 68,9.

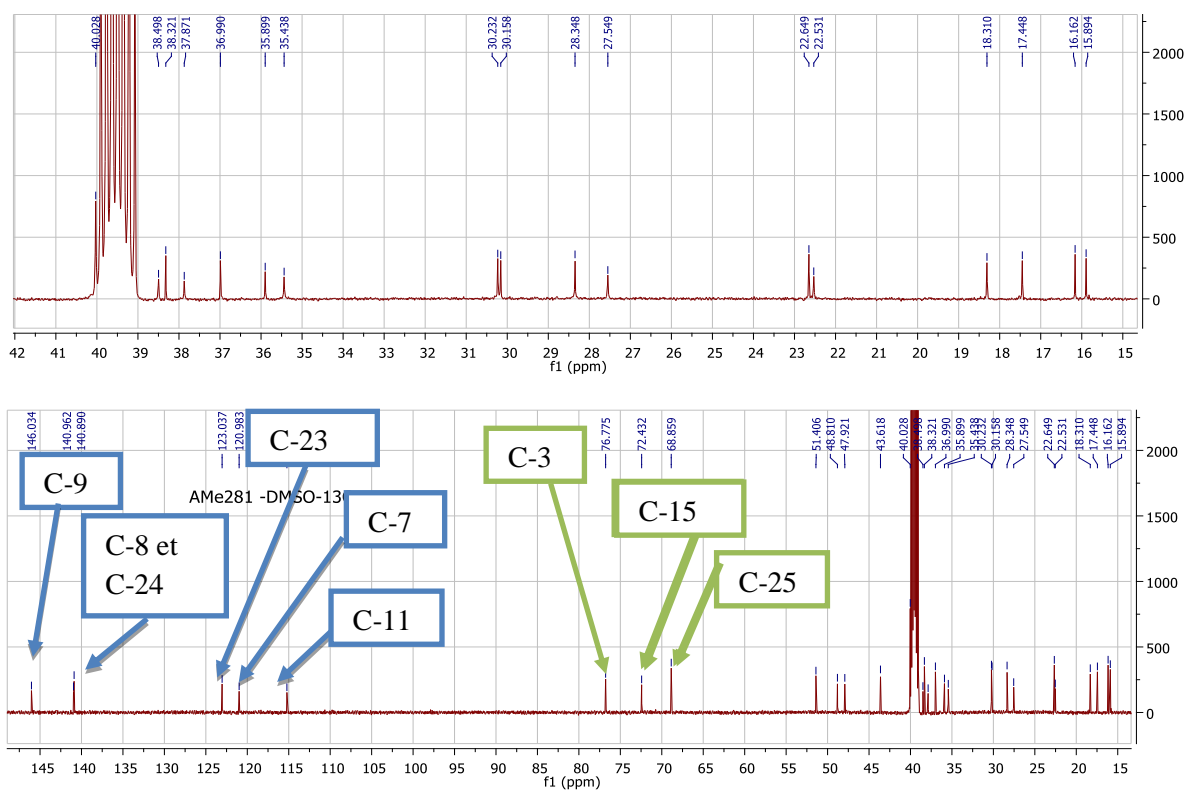


Figure 8: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (DMSO- d_6 , 150MHz) de AMe281

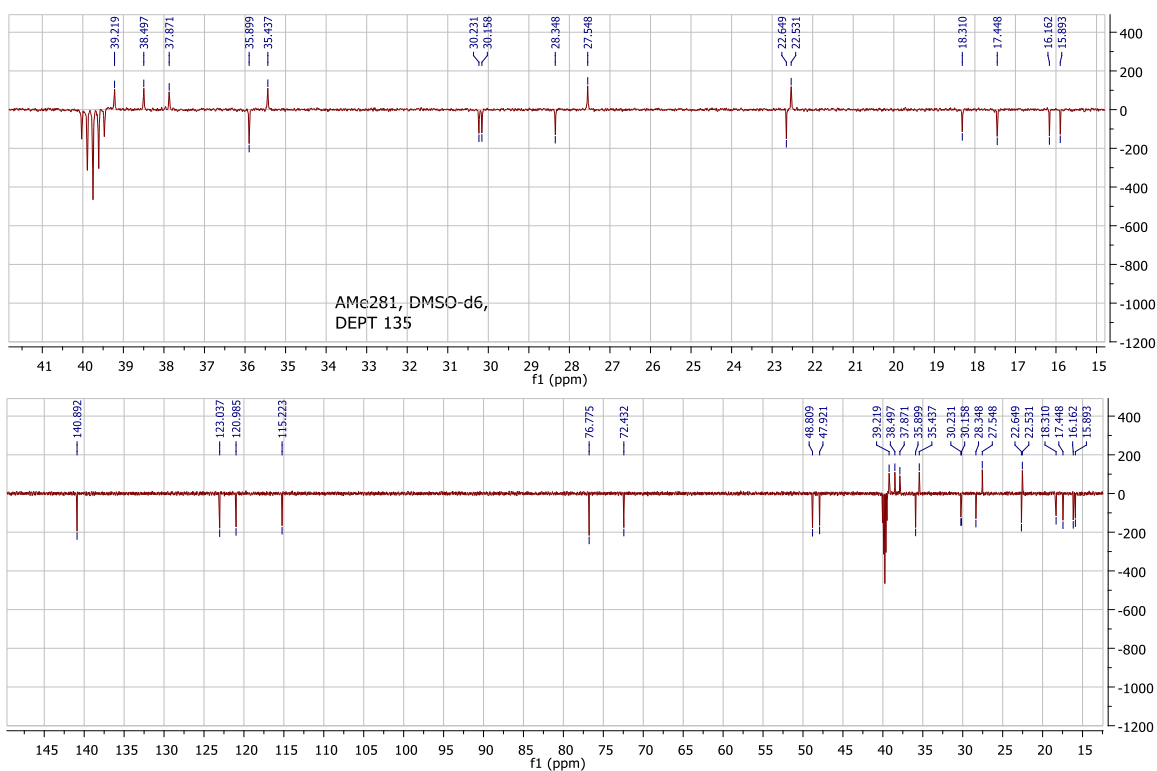


Figure 9: Spectre de DEPT 135 de AMe281

L'analyse du spectre de RMN ^1H (**Fig. 10**) couplée au spectre HMQC (**Fig. 11**) montre 6 signaux de groupes méthyles tertiaires comme singulets entre 0,5-1,15 ppm et un signal apparaissant sous forme de doublet à δ_{H} 0,83(3H ; d ; 6,6 Hz). On observe également les signaux de deux protons oléfiniques à $\delta_{\text{H/C}}$ 5,91(1H ; d ; 6,6 Hz)/121,0 et 5,28 (1H ; d ; 6,6 Hz)/115,3 caractéristiques de la double liaison Δ^{7-9} des lanostanes (**Silva et al., 2012 ; Xia et al., 2014**). Une corrélation à longue distance est observée sur le spectre COSY entre le proton H-7 et H-11 (**Fig. 12**). On observe également les signaux à $\delta_{\text{H/C}}$ 5,47 (1H ; dd ; 5,4 et 15,0 Hz)/123,1 ; 5,52 (1H ; d ; 15,0Hz)/140,8 caractéristiques de la double liaison Δ^{23} (**Leong et Harrison 1999**). La constante de couplage $J=15,0$ Hz suggérerait la présence d'une double liaison trans en position 23 et 24 dans ce composé.

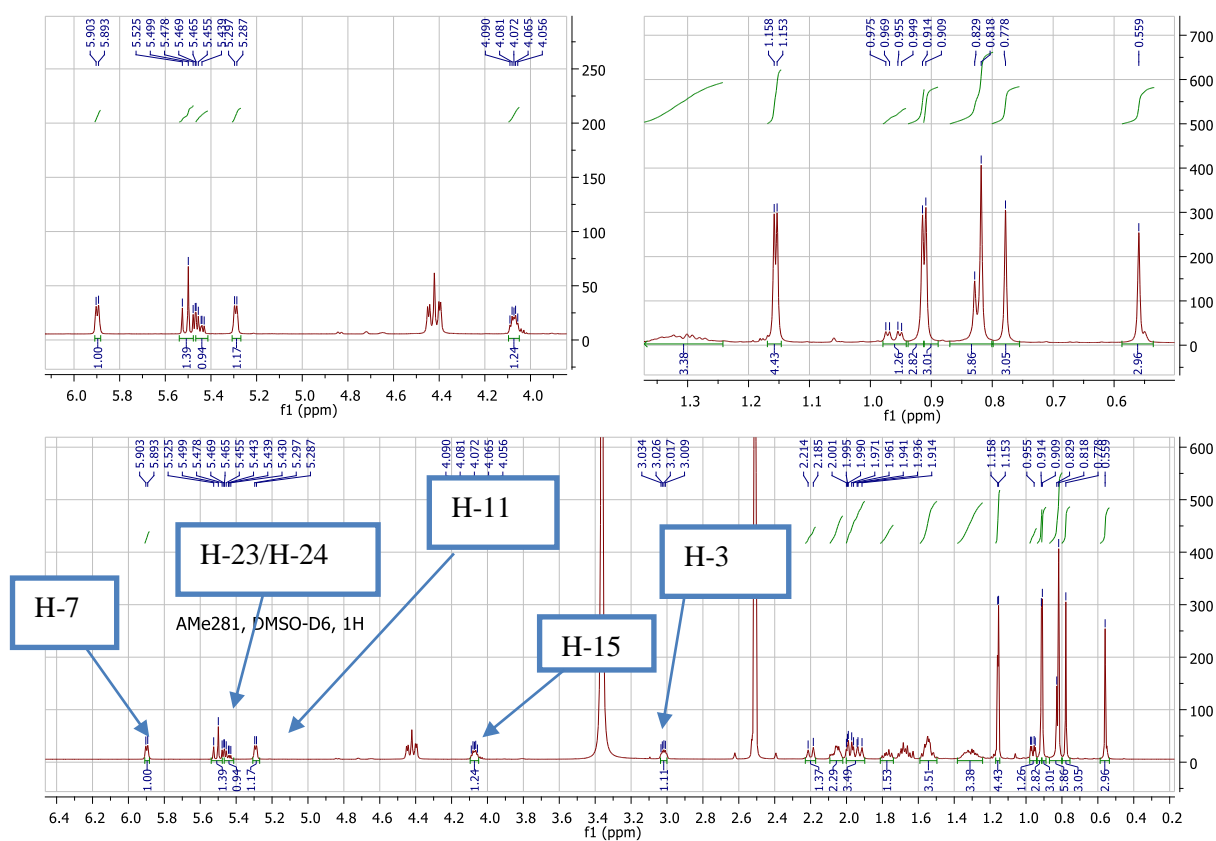


Figure 10: Spectre de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de AMe281

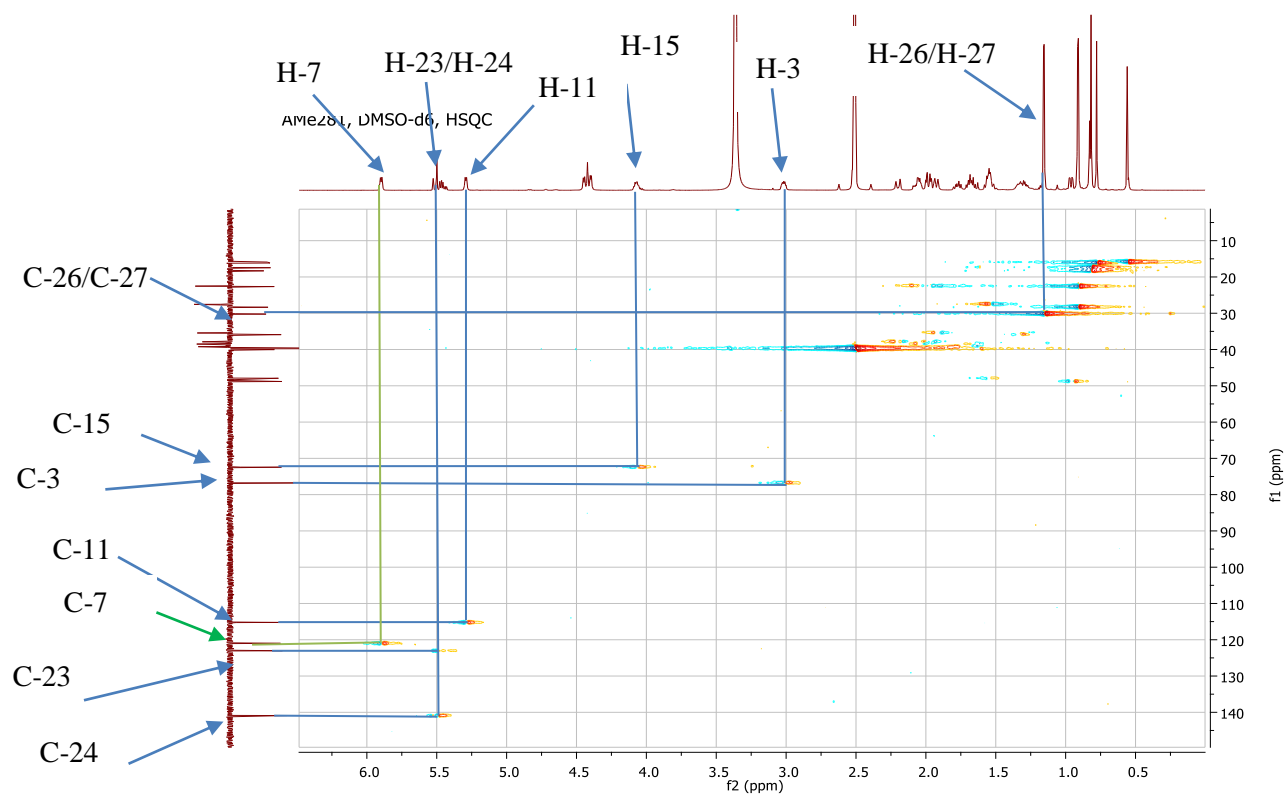


Figure 11: Spectre de HMQC de AMe281

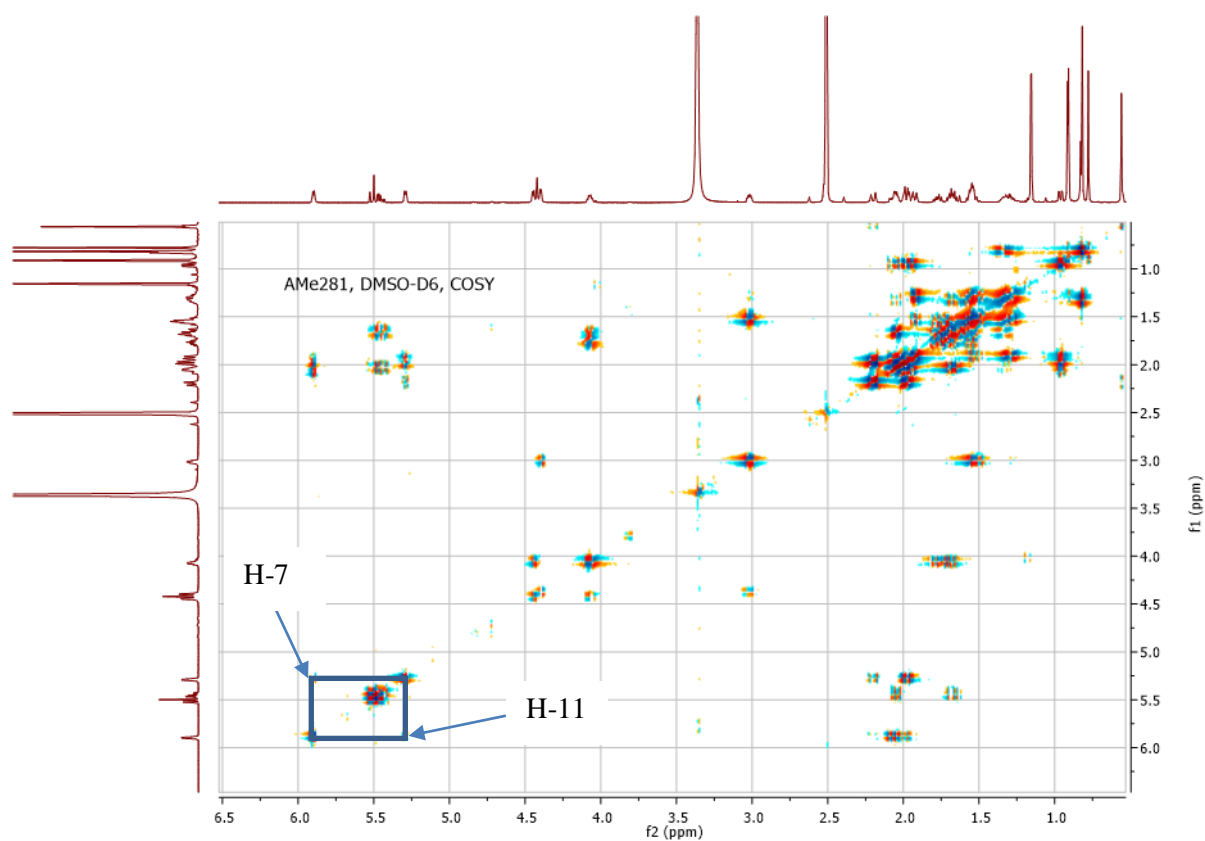


Figure 12: Spectre de COSY (DMSO-d₆, 600 MHz) de AMe281

Comparé au polycarpol (Silva *et al.*, 2012 ; Xia *et al.*, 2014) et à d'autres triterpènes de type lanostane (Luo *et al.*, 2000) qui ont deux groupes méthyles vinyliques entre 1,5-1,6 ppm , il apparait dans AMe₂₈₁ un signal du groupement gem-diméthyle à δ_H 1,15 (6H, s) ; Ils ont été attribués aux méthyles CH₃-26 et CH₃-27 sur la base des corrélations HMBC (Fig. 13) entre ces protons et le carbone quaternaire oxygéné C-25 (68,9 ppm) et le carbone C-24 (140,9 ppm) de la double liaison Δ^{23} .

Les signaux à δ_C 76,9 ; 72,4 ont été attribués aux carbones C-3 et C-15 respectivement sur la base des considérations biogénétiques et des corrélations HMBC (Fig. 13) entre les protons H-28/29 (δ_H 0,92/ 0,78) et C-3 (δ_C 76,9) et entre les protons H-30 (δ_H 0,82) non seulement avec le carbone C-15 (δ_C 72,4), mais aussi avec les carbones C-14 (δ_C 51,5) et C-8 (δ_C 140,8).

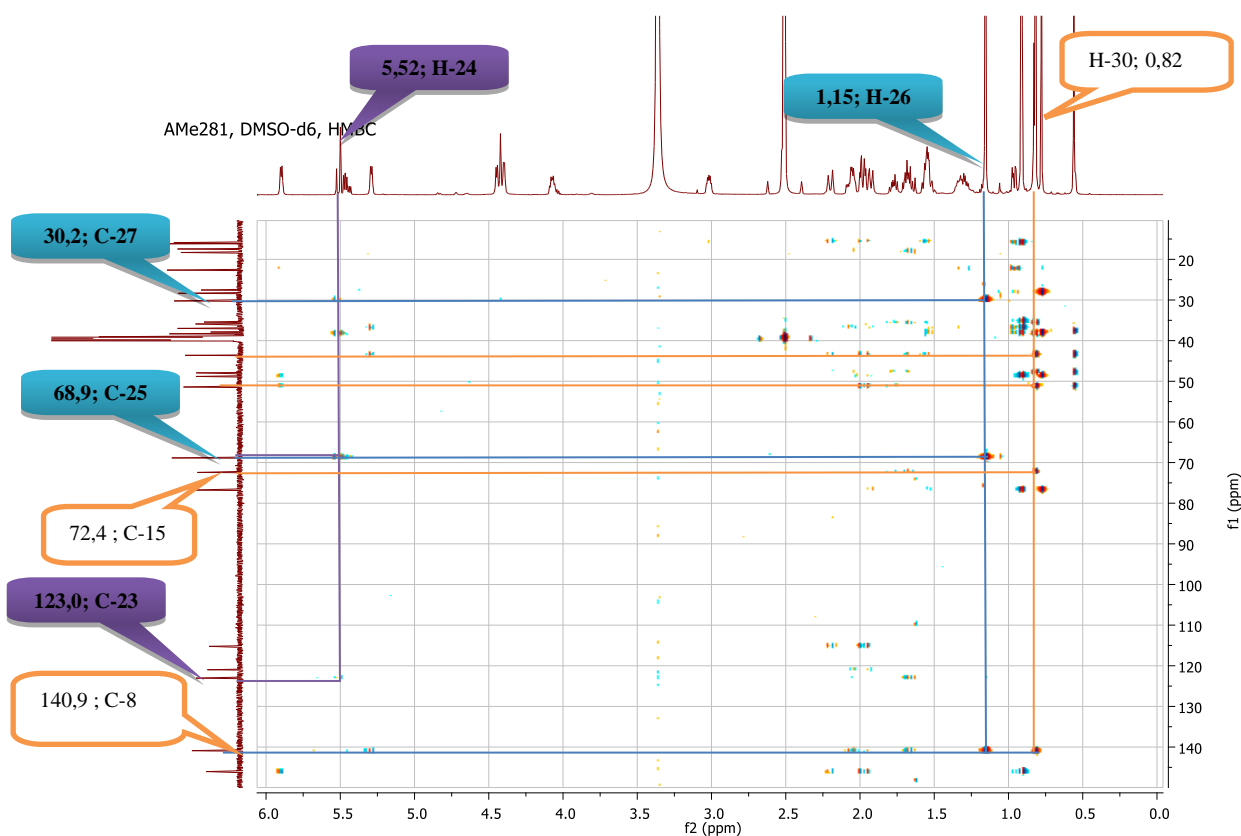


Figure 13: Spectre de HMBC (DMSO-d₆) de AMe₂₈₁

Par ailleurs des corrélations HMBC ont été établies entre :

- les protons du méthyle C-30 à δ_H 0,82 et les carbones à δ_C 43,6 (C-13) ; 51,5(C-14) ; 140,9 (C-8) et 72,4 (C-15).
- les protons du méthyle C-28 à δ_H 0,82 et les carbones à δ_C 38,5(C-4) ; 48,8 (C-5) ; 16,2(C-29).

- les protons du méthyle C-21 à δ_H 0,83 et les carbones à δ_C 35,7 (C-20) ; 39,2 (C-22) ;

- Ce dernier carbone C-22 de même que les carbones à δ_C 30,2 (C-26/C-27) ; 68,9 (C-25) et 123,1 (C-23) se sont avérés être en corrélations J^2 et J^3 avec les protons oléfiniques à δ_H 5,46 (H-23) et 5,52 (H-24) confirmant ainsi la position Δ^{23} de la double liaison de la chaîne latérale.

L'ensemble de ces données spectrales combinées à celles rencontrées dans la littérature nous ont conduit à attribuer à AMe₂₈₁ la structure **90** décrite ici pour la première fois et à laquelle nous avons donné le nom lanosta-7,9(11), 23-triène-3 β , 15 α , 25-triol et de nom trivial anomanol A.

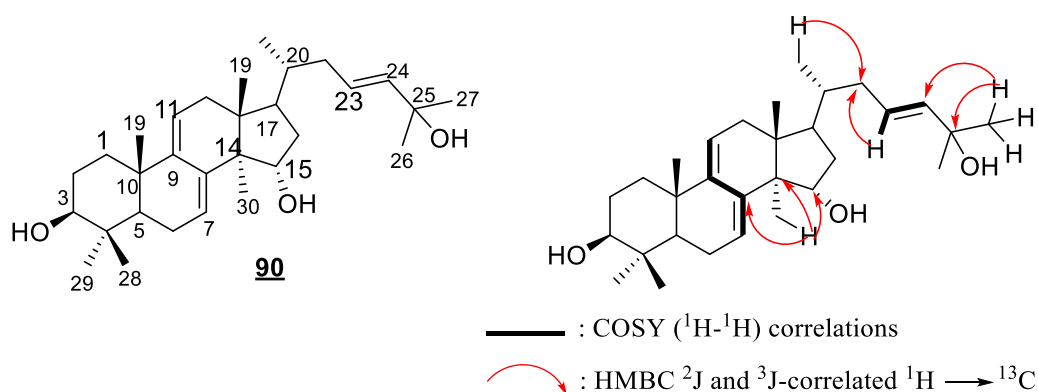


Tableau 15: Données spectrales de RMN ¹H et RMN ¹³C (600 MHz, 150 MHz, DMSO-d₆) de AMe₂₈₁

Position	AMe ₂₈₁ (δ_H) (<u>90</u>)	AMe ₂₈₁ (δ_C) (<u>90</u>)	Position	AMe ₂₈₁ (δ_H) (<u>90</u>)	AMe ₂₈₁ (δ_C) (<u>90</u>)
1	1,55(2H, m)	35,4 (t)	16a	1,93 (1H ; t ; 7,2	36,2 (t)
			16b	Hz) 1,78 (1H, m)	
2a	1,17(1H, m)	27,6 (t)	17	1,60 (1H ; m)	47,9 (d)
2b	1,97(1H, m)				
3	3,01(1H ; q ; 4,8Hz)	76,8 (d)	18	0,56 (3H, s)	15,9 (q)
4	-	38,3 (s)	19	0,91 (3H, s)	22,7 (q)
5	0,96 (1H ; dd ; 3,6 et 12.0Hz)	48,8 (d)	20	1,33 (1H, m)	35,9 (d)
6	2,00 (2H, t, 3,6Hz)	22,5 (t)	21	0,83 (3H ; d ; 6,6 Hz)	18,3 (q)
7	5,90 (1H ; d ; 6,6Hz)	121,0 (d)	22a	1,69 (1H, m)	39,2 (t)
			22b	1,79 (1H, m)	
8	-	141,0 (s)	23	5,52 (1H ; d ; 15,0 Hz)	123,1 (d)
9	-	146,2 (s)	24	5,46 (1H ; dd ; 5,4, 15,0, Hz)	140,9 (d)
10	-	37,9 (s)	25	-	68,9 (s)
11	5,28 (1H ; d, 6,6 Hz)	115,2 (d)	26	1,15 (3H, s)	30,2 (q)
12a	1,96 (1H, m)	38,5 (t)	27	1,15 (3H, s)	30,2 (q)
12b	2,20 (1H ; d ; 17,4Hz)				
13	-	43,6 (s)	28	0,92 (3H, s)	28,3 (q)
14	-	51,4 (s)	29	0,78 (3H, s)	16,2 (q)
15	4,07 (1H, m)	72,4 (d)	30	0,82 (3H, s)	17,4 (q)

II.2.1.3. Caractérisation du composé AMe₂₄₀₋₂₄₉

AMe₂₄₀₋₂₄₉ a été obtenu sous forme de poudre amorphe marrone dans l'Hex-AE 20 %. Il est soluble dans l'acétone. Il donne une coloration rouge violacée avec le test de Liebermann-Büchard caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016).

Son spectre de masse ESI haute résolution (Fig. 14) en mode (+) présente le pic de l'ion pseudo- moléculaire [M+Na]⁺ à m/z 479,3513 ([M+Na]⁺, calcd 479.3501) compatible avec la formule brute C₃₀H₄₈NaO₃ et renfermant 7 degrés d'insaturations.

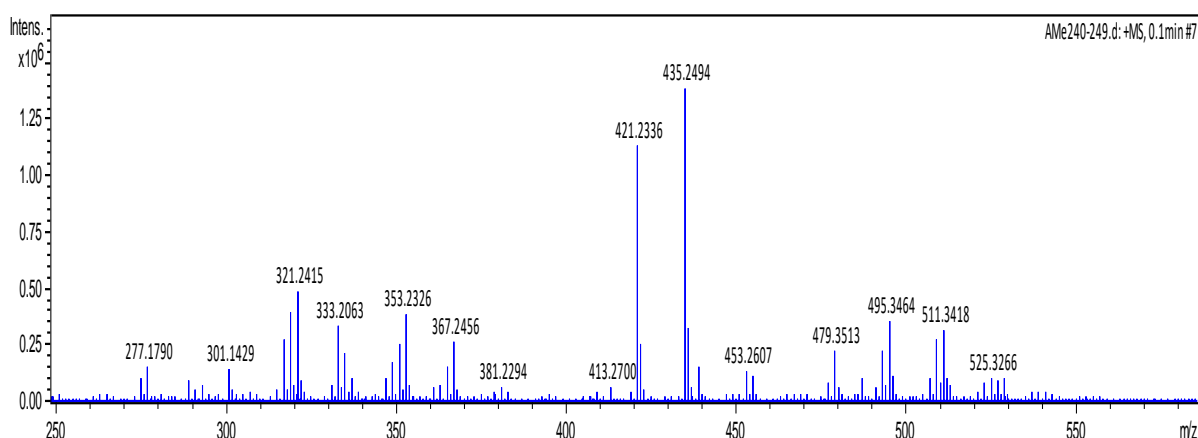


Figure 14: Spectre de masse ESI haute résolution de AMe₂₄₀₋₂₄₉

Les spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C (Fig. 15 et 18) de AMe₂₄₀₋₂₄₉ sont presque superposables à ceux de du composé AMe₂₈₁ précédemment décrit.

En effet l'analyse du spectre de RMN ¹H (Fig. 15) couplé au spectre HMQC (Fig. 16) de AMe₂₄₀₋₂₄₉ montre 6 signaux de groupes méthyles tertiaires comme singulets entre 0,5-1,27 ppm et un signal apparaissant sous forme de doublet à δ_H 0,84 (3H ; d ; 6,6 Hz) comme dans AMe₂₈₁. On observe également les signaux de deux protons oléfiniques à $\delta_{H/c}$ 6,00 (1H ; d ; 5,2 Hz)/122,3 et 5,34 (1H ; d ; 6,4 Hz)/115,3 caractéristiques de la double liaison Δ^{7-9} (Silva et al., 2012 ; Xia et al., 2014). Une corrélation à longue distance est observée sur le spectre COSY (Fig. 17) entre le proton H-7 et H-11. On observe également un signal à $\delta_{H/c}$ 5,60 (2H ; dd ; 5,4 et 13,8 Hz) /128,6 et 137,2 qui serait la double liaison Δ^{22} . La constante de couplage $J=13,8$ Hz suggérerait la présence d'une double liaison trans en position 22 et 23 dans ce composé.

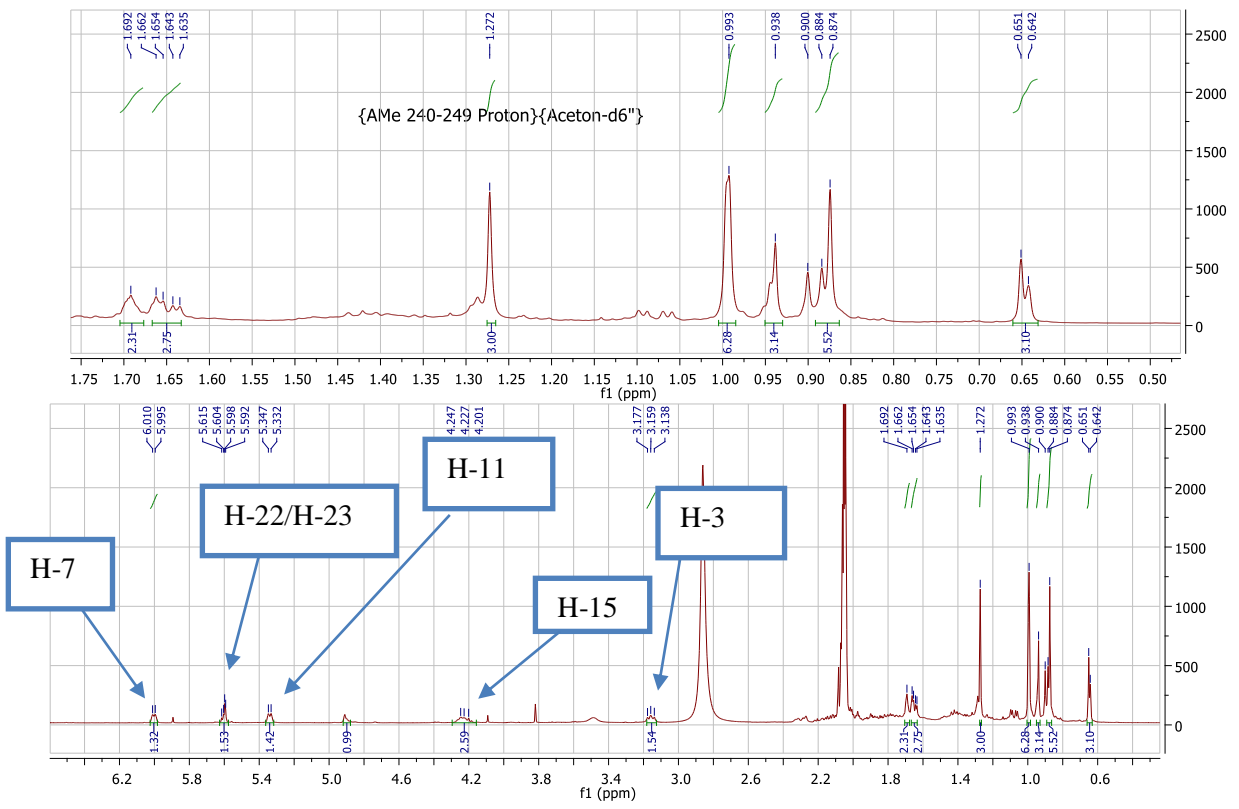


Figure 15: Spectre de RMN ¹H (Acétone-d₆, 600MHz) de AME₂₄₀₋₂₄₉

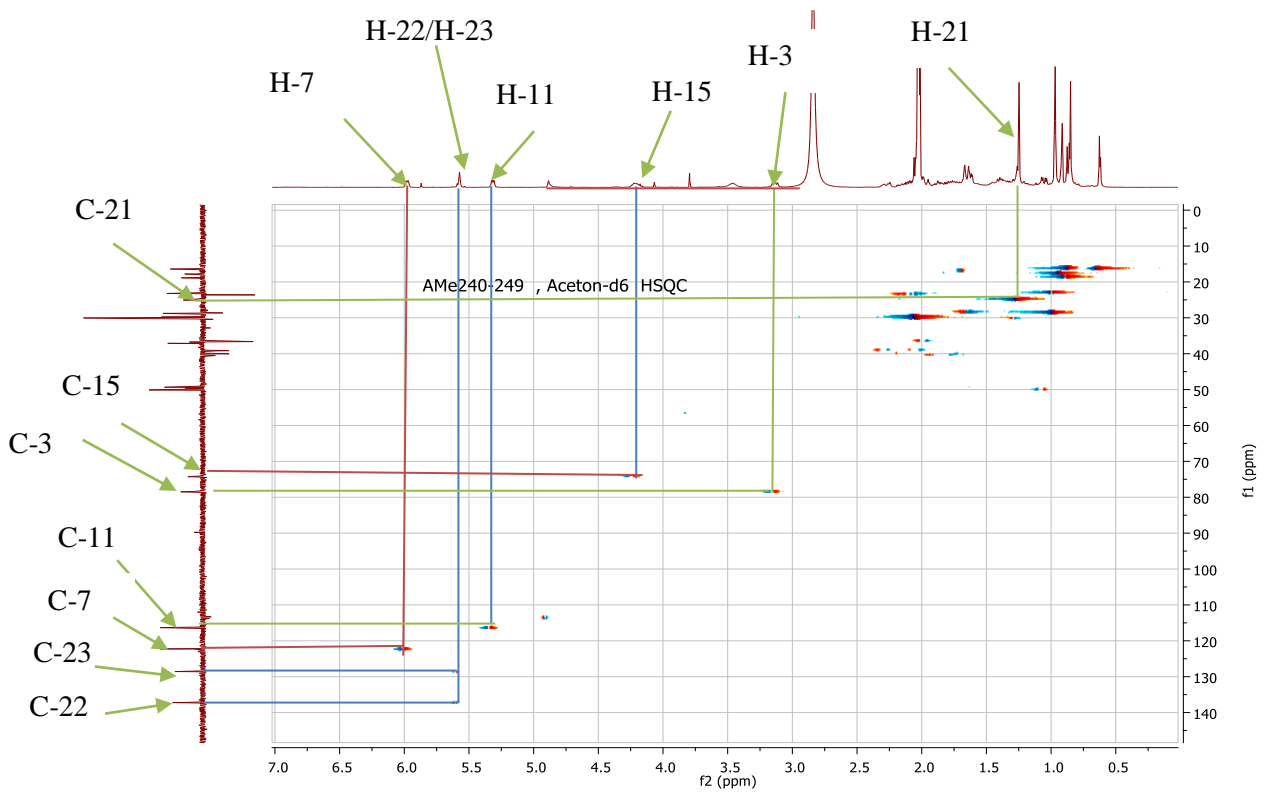


Figure 16: Spectre de HMQC de AMe 240-249

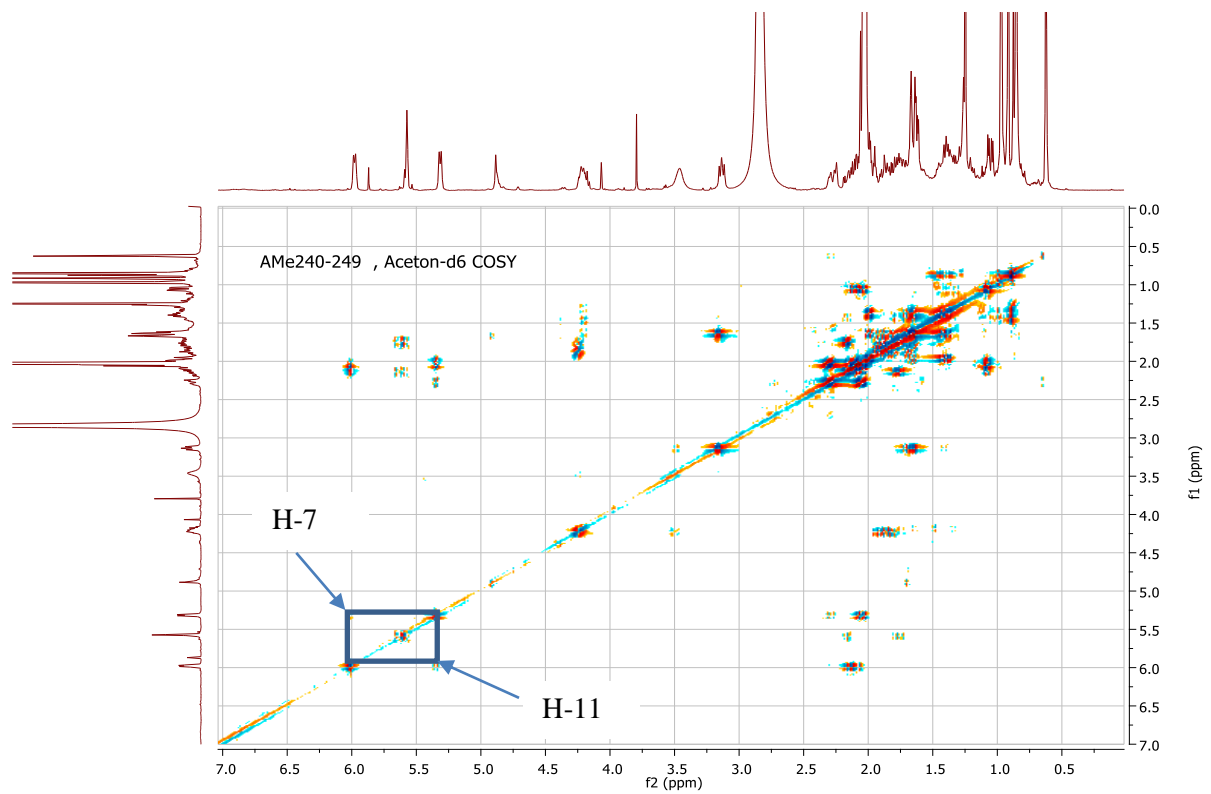


Figure 17: Spectre de COSY (Acétone-d6, 600MHz) de AMe240-249

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Fig. 18**) de AMe₂₈₁ couplée au spectre DEPT 135(**Fig. 19**) relève la présence de 30 signaux d'atomes de carbone parmi lesquels six atomes de carbones oléfiniques à δ_{C} 116,3 ; 122,3 ; 128,6 ; 137,2 ; 142,1 et 147,3. Ces déplacements chimiques ont été étroitement comparés à ceux des dérivés de lanosta-7-9-23-triène décrites dans la littérature (**Leong et Harrison 1999 ; Silva et al., 2012 ; Xia et al., 2014**). En plus on observe 24 carbones sp^3 attribuables à 8 méthyles, 6 méthylènes, 5 méthines incluant deux oxyméthines à δ_{C} 78,5 et 74,3 et cinq carbones quaternaires parmi lesquels un carbone oxygéné à δ_{C} 81,5.

Comparé au polycarpol (**Silva et al., 2012 ; Xia et al., 2014**), à l'anomanol A (AMe₂₈₁) et à d'autres triterpènes de type lanostane (**Luo et al., 2000**) qui ont le groupement méthyle CH₃-21 entre 0,5-1,0 ppm, il apparaît dans AMe₂₄₀₋₂₄₉ un signal de groupement méthyle à δ_{H} 1,27 (3H, s). Il a été attribué au méthyle CH₃-21, qui a été fixé au pied du carbone quaternaire oxygéné C-20 (81,5 ppm) sur la base des corrélations HMBC (**Fig. 20**) entre les protons à δ_{H} 1,27 (H-21) et les carbones C-20 et C-22 (137,2 ppm) de la double liaison Δ^{22} .

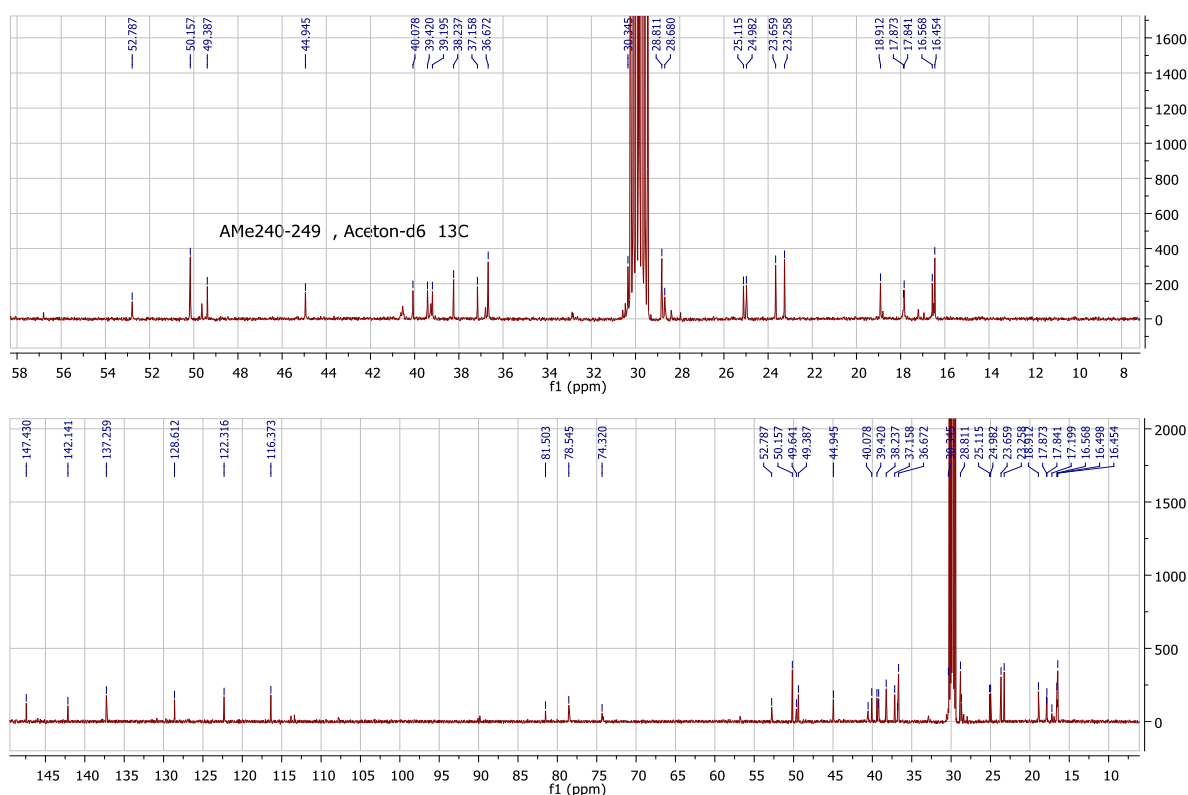


Figure 18: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (Acétone-d₆, 150MHz) de AMe₂₄₀₋₂₄₉

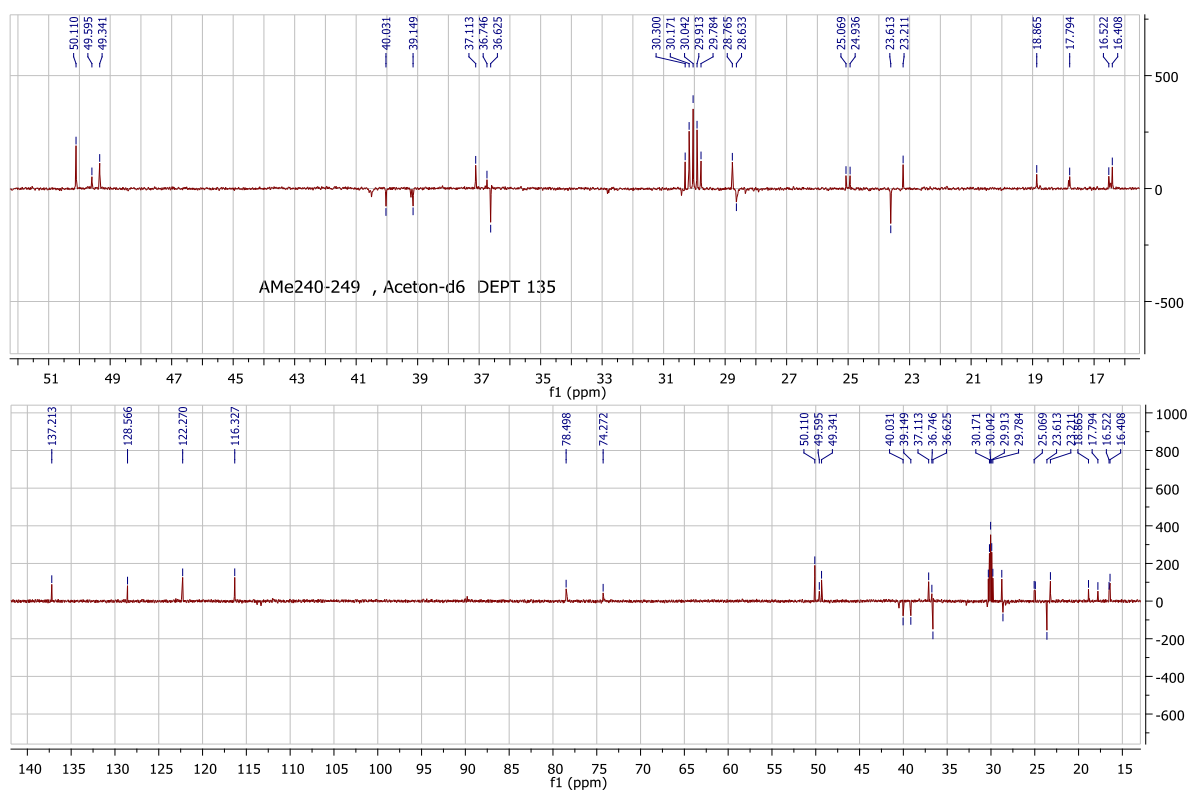


Figure 19: Spectre de RMN ^{13}C -DEPT (Acétone- d_6 , 150MHz) de AMe₂₄₀₋₂₄₉

Par ailleurs les corrélations HMBC sont observées entre :

- les protons du méthyle C-30 à δ_H 0,93 et les carbones à δ_C 44,9 (C-13); 52,8(C-14) ; 142,3 (C-8) et 74,3 (C-15).
- les protons du méthyle C-28 / C-29 à δ_H 0,99 / 0,88 et les carbones à δ_C 76,9 (C-3) ; 50,2 (C-5) ; 39,6 (C-4).
- les protons du méthyle C-21 à δ_H 1,27 et les carbones à δ_C 137,4 (C-22) ; 81,5 (C-20) ;
- les protons oléfiniques à δ_H 5,60 (H-22/ H-23) et Ce dernier carbone C-20, le carbone à δ_C 40,1(C-24) confirmant ainsi la position Δ^{22} de la double liaison de la chaîne latérale.
- Entre les protons à δ_H 0,65 (H-18) et les carbones à δ_C 39,2 (C-12) ; 44,9 (C-13) ; 44,9 (C-17) ; 52,7 (C-14).

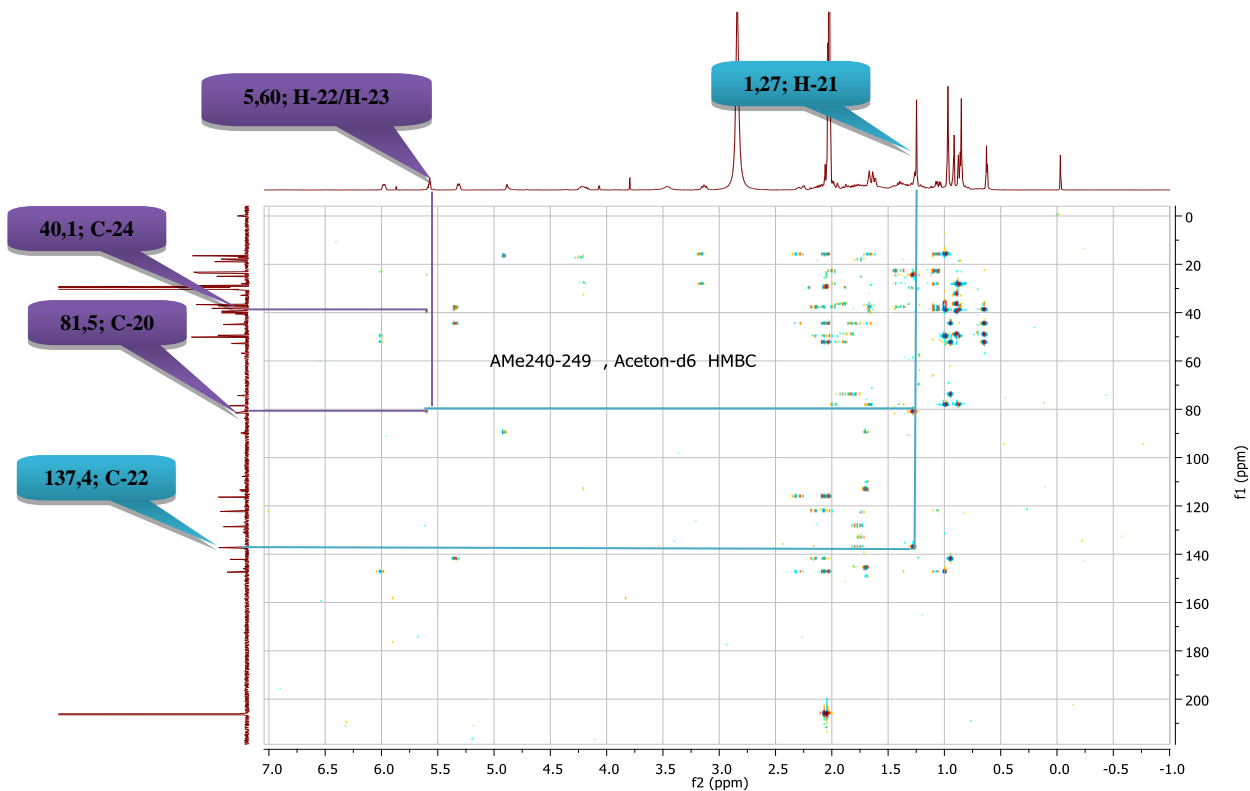
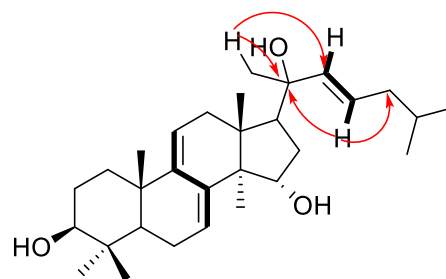
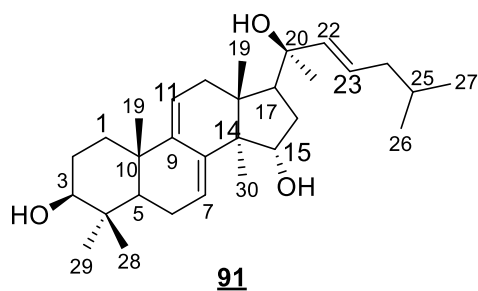


Figure 20: Spectre de HMBC de AMe₂₄₀₋₂₄₉

Ces données spectrales comparées à celles de AMe₂₈₁ nous ont permis d'attribuer à AMe₂₄₀₋₂₄₉ la structure **91** qui est celle de la lanosta-7,9(11), 22-triène-3 β , 15 α , 20-triol, un dérivé nouveau décrite ici pour la première fois et à laquelle nous avons donné le nom trivial Anomanol B.



— : COSY (¹H-¹H) correlations

↷ : HMBC ²J and ³J-correlated ¹H → ¹³C

Tableau 16: Données spectrales de RMN ¹H (acétone-d₆, 600 MHz), et RMN ¹³C (acétone-d₆, 150 MHz) de AMe₂₄₀₋₂₄₉

Position	AMe ₂₄₀₋₂₄₉ (δ _H) (<u>91</u>)	AMe ₂₄₀₋₂₄₉ (δ _C) (<u>91</u>)	Position	AMe ₂₄₀₋₂₄₉ (δ _H) (<u>91</u>)	AMe ₂₄₀₋₂₄₉ (δ _C) (<u>91</u>)
1	1, 97 (2H, m)	36, 6 (t)	16	2,10 (2H, m)	39,1 (t)
2a	0,99 (1H ; d ; 4,5	28,6 (t)	17	1,63 (1H ; d ;	49, 4 (t)
2b	Hz) 1,97 (1H, m)			3,2 Hz)	
3	3,17 (1H ; m)	7, 85 (d)	18	0,65 (3H ; s)	16,4 (q)
4	-	39, 4 (d)	19	0,99 (3H, s)	23, 2 (q)
5	1,06 (1H ; d ;	50,2 (d)	20	-	81,5 (s)
	4,0Hz)				
6	2,05 (2H, t, 4,9Hz)	23,6 (t)	21	1,28 (3H ; s)	25,0 (q)
7	6,00 (1H ; d ;	122, 3 (d)	22	5,60 (1H ; dd ;	12 8,5 (d)
	6,0Hz)			6,6, 13,8 Hz)	
8	-	142,1 (s)	23	5,60 (1H ; dd ;	137,2 (d)
				6,6, 13,8 Hz)	
9	-	147,4 (s)	24a	1,69 (1H, m)	40, 0 (t)
			24b	1,79 (1H, m)	
10	-	38,2 (s)	25	1,47 (1H, m)	37,1 (d)
11	5,35 (1H ; d, 6,4	116,4 (d)	26	0,87 (3H, d, 6,6	18,8 (q)
	Hz)			Hz)	
12a	2,09 (1H ; sl)	39,1 (t)	27	0,87 (3H, d, 6,6	18,8 (q)
12b	2,28 (1H ; dd ; 6,8			Hz)	
	et 17,3Hz)				
13	-	44, 9 (s)	28	0,99 (3H, s)	28,8 (q)
14	-	52,8 (s)	29	0,89 (3H, s)	16, 4 (q)
15	4,20 (1H, m)	74,3 (d)	30	0,94 (3H, s)	17, 8 (q)

II.2.1.4. Identification du composé AMrH₁₆₃

AMrH₁₆₃ a été isolé des racines de *A. mannii* sous forme de paillette blanche dans l'acétone et fond entre 192-194°. Il est soluble dans le CH₂Cl₂ et donne une coloration rouge violacée avec le test de Liebermann-Büchard caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016).

Son spectre de masse ESI-MS (Fig. 20) (en mode positif) exhibe le pic de l'ion pseudo-moléculaire [M+Na]⁺ à $m/z = 479,3475$ dont l'analyse à haute résolution permet de lui attribuer la formule brute C₃₀H₄₈O₂ renfermant 6 degrés d'insaturations.

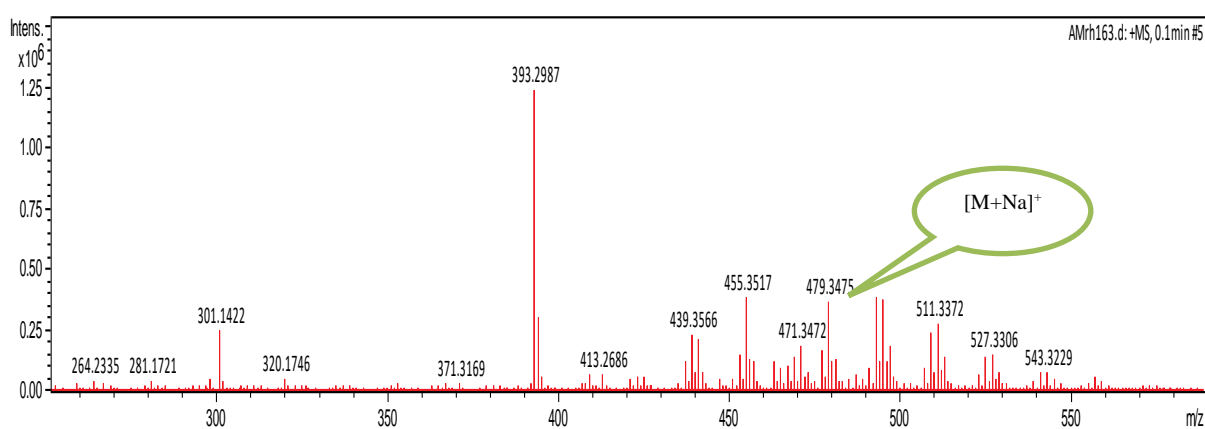


Figure 21: Spectre de masse ESI-MS de AMrH₁₆₃

Comparé à AMr₁, le spectre RMN ¹H (Fig. 21) de AMrH₁₆₃ présente un ensemble de sept signaux de singulets entre δ_H 0,5 et 1,62 attribuables à sept groupes méthyles et un oxyméthine à δ_H 3,17 (1H ; dd ; 6,4 et 21Hz) qui serait le proton H-3. Son spectre de RMN ¹³C (Fig. 22) présente 30 signaux de carbones parmi lesquelles les carbones oléfiniques à 115,9 ; 120,5 ; 124,8 ; 131,5 ; 142,5 ; 146,1 ppm attribuables aux carbones $\Delta^{7,9,24}$ des lanostanes.

Dans AMrH₁₆₃, on note d'une part la disparition du méthyl doublet à δ_H 0,92 et l'apparition de deux signaux à δ_H 3,56(1H ; dd ; 6,0 et 17,2 Hz) et 3,60 (1H ; dd ; 3,6 et 18,4 Hz) qui seraient deux protons diastériotopiques oxygénés probablement l'oxyméthylène en position C-21 ; Ces protons diastériotopiques sont clairement observés sur le spectre HMQC (Fig. 23) et d'autre part on note la présence d'un oxyméthylène à 62,6 ppm sur le spectre de RMN ¹³C. La comparaison des spectres de RMN ¹H et RMN ¹³C des composés AMr₁ et AMrH₁₆₃ montre que AMrH₁₆₃ est un dérivé du polycarpol mais avec un seul oxyméthylène (le groupement méthyle en position 21 de polycarpol A a été hydroxylée).

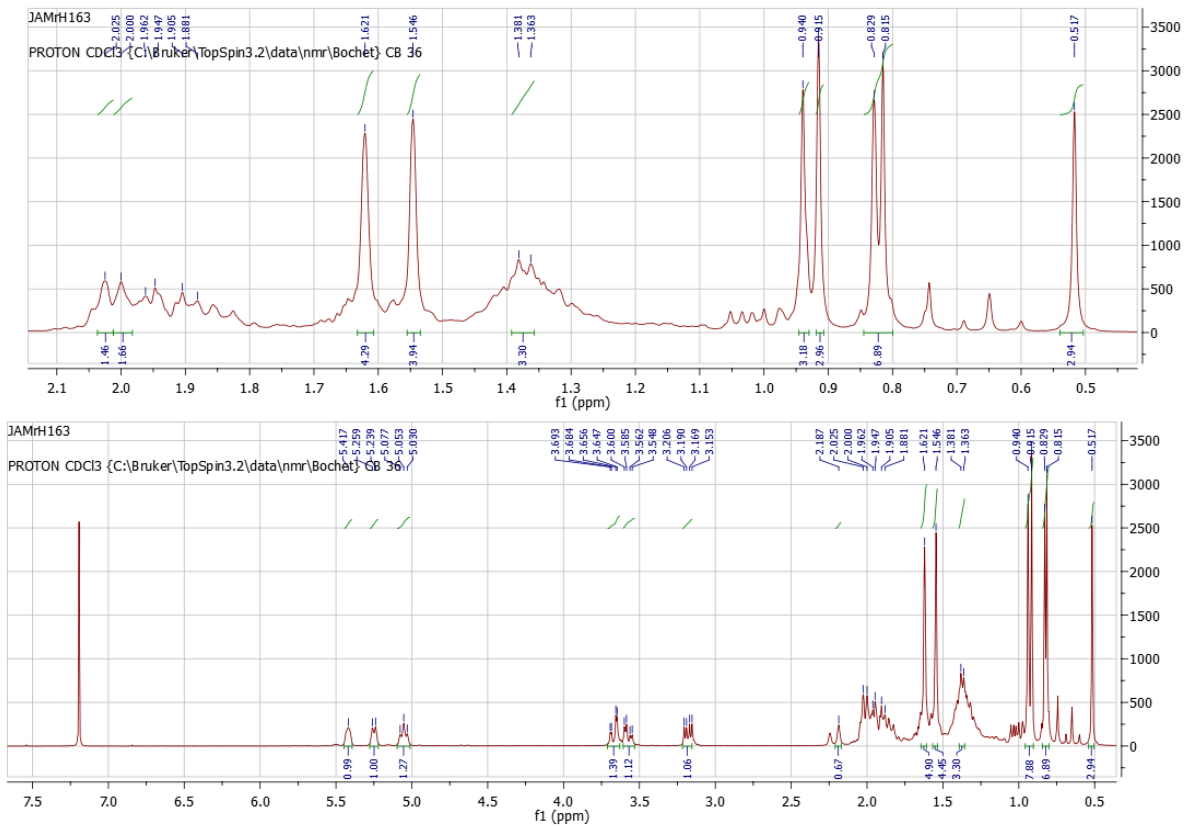


Figure 22: Spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de AMrH163

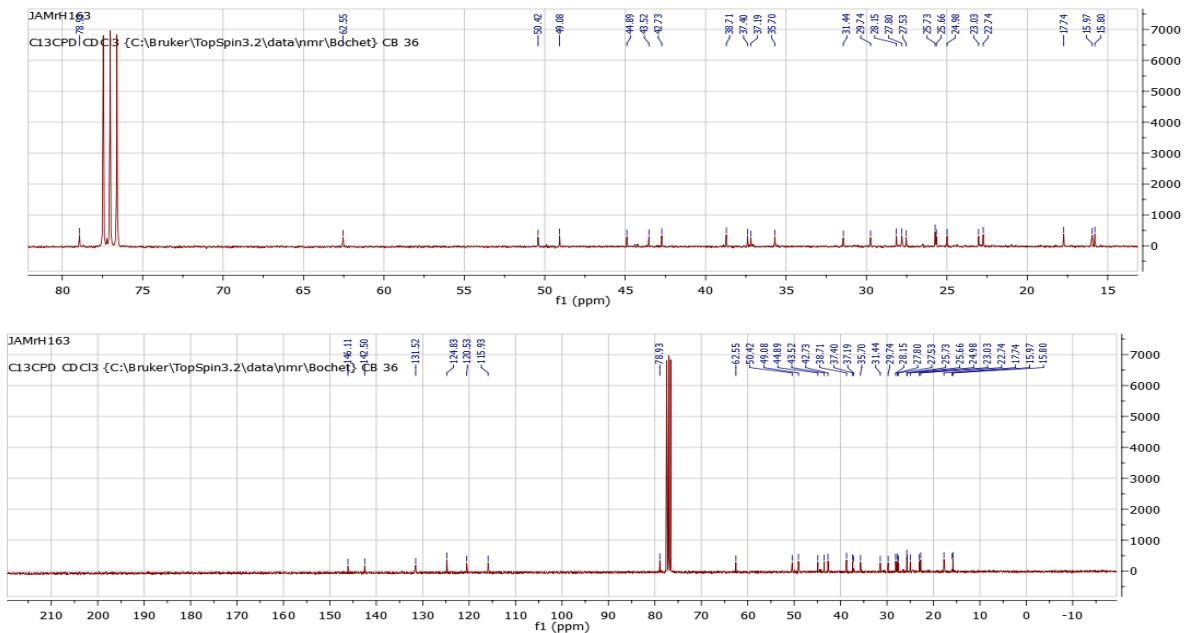


Figure 23: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (CDCl_3 , 75MHz) de AMrH163

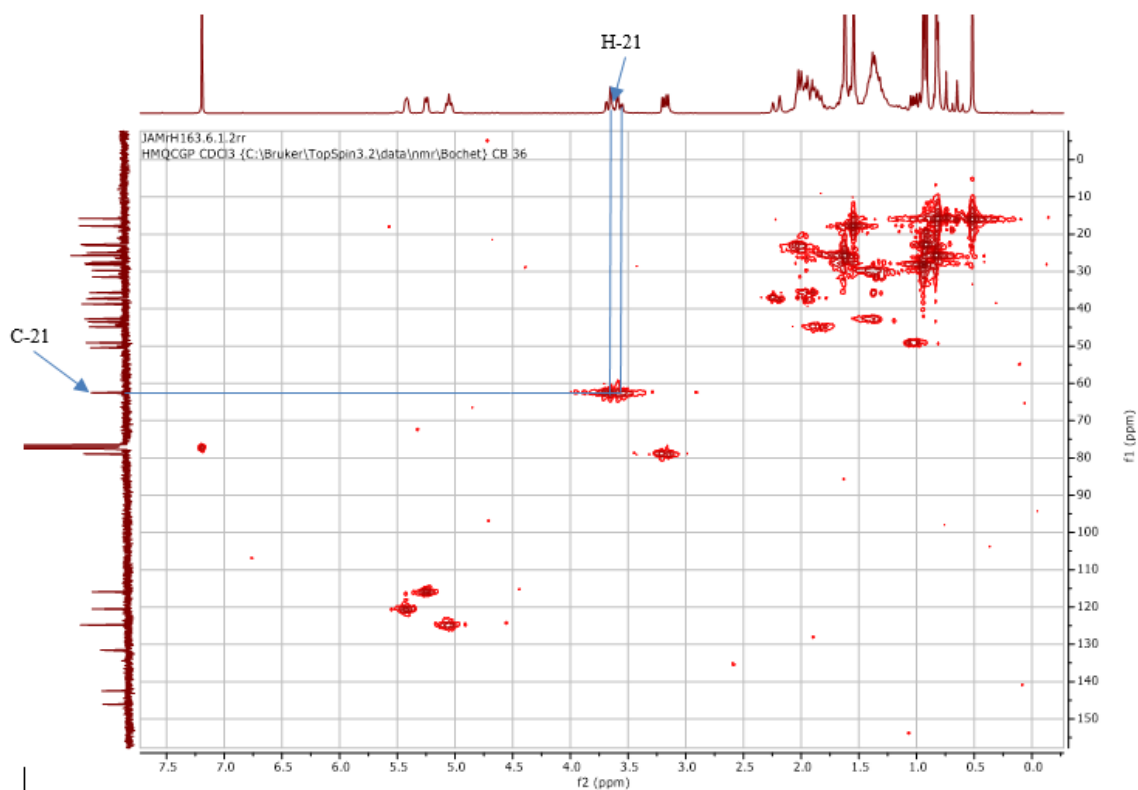


Figure 24: Spectre de HMQC de AMrH₁₆₃

L'ensemble de tous ces informations comparées à la littérature nous a permis d'attribuer à AMrH₁₆₃ la structure (**92**) qui est celle du lanosta-7, 9(11), 24-trién-3 β , 21-diol (**Rosecke et., konig 1999**).

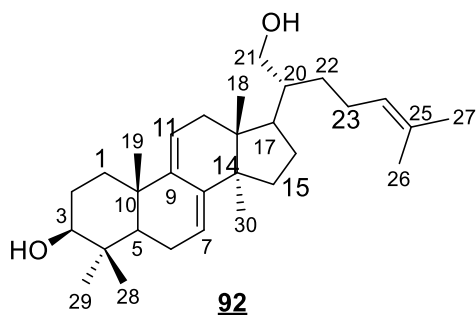


Tableau 17: Données spectrales de RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de AMRH₁₆₃ comparées à celles du lanosta-7,9(11),24-trién-3β, 21-diol de la littérature RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) (Rosecke et al., 1999)

Position	AMrH ₁₆₃ (δ _C) (92)	Littérature (δ _C)	Position	AMrH ₁₆₃ (δ _C) (92)	Littérature (δ _C)
1	35,7	35,7	16	27,5	27,5
2	27,8	27,8	17	44,9	44,9
3	78,9	79,0	18	15,8	15,8
4	38,7	38,7	19	22,7	22,8
5	49,1	49,1	20	42,7	42,7
6	23,0	23,0	21	62,6	62,6
7	120,5	120,5	22	29,7	29,8
8	142,5	142,5	23	25,0	25,0
9	146,1	146,1	24	124,8	124,9
10	37,4	37,4	25	131,5	131,5
11	115,9	116,0	26	17,7	17,7
12	37,2	37,2	27	25,7	25,7
13	43,5	43,6	28	28,1	28,2
14	50,4	50,4	29	15,9	16,0
15	31,4	31,5	30	25,7	25,7

II.2.1.5. Identification du composé DW₂

DW₂ a été isolé de *D. welwitschii* sous forme de cristaux blancs dans le mélange Hex-AE (9-1) et il fond entre 288-289°C. Il est soluble dans le CH₂Cl₂ et donne une coloration rouge violacée avec le test de Liebermann-Büchard caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016).

Sur son spectre de RMN ¹³C (Fig 25), on observe des signaux caractéristiques notamment :

- deux signaux de carbones oléfiniques à δ_H 116,9 et 158,1 caractéristiques des triterpènes de la série des taraxer-14-ènes (Hernandez-Chavez et al., 2012) ;
- un oxyméthine à δ_C 79,1 attribuable au carbone C-3

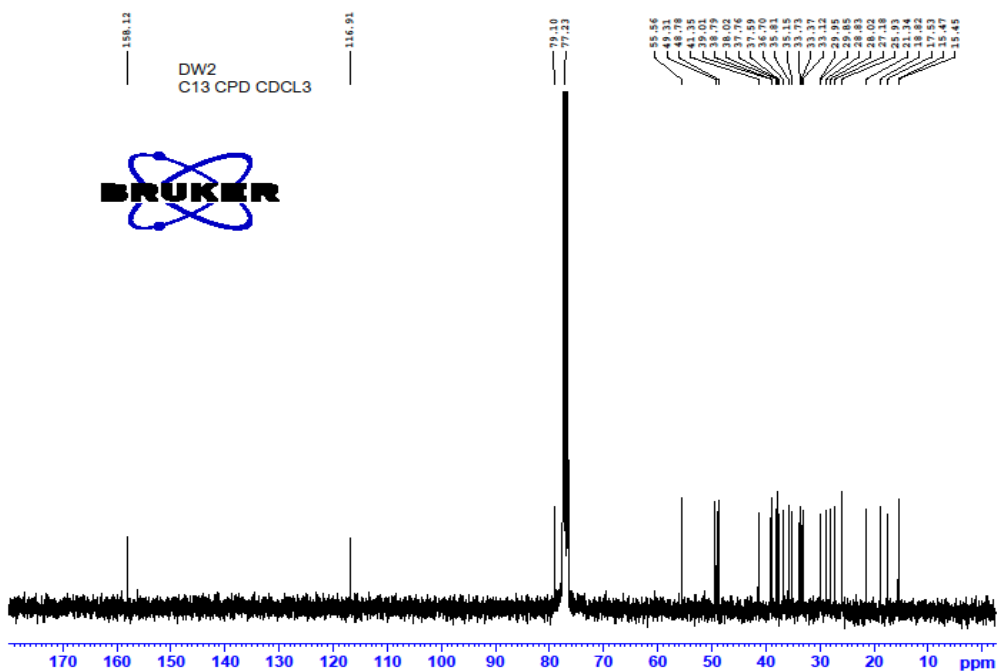


Figure 25: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (CDCl_3 , 75MHz) de DW₂

Son spectre de RMN ^1H (**Fig 26**) révèle la présence de :

- Six signaux de singulets dont deux intenses respectivement à δ_{H} 0,95 (6H, *s*) et δ_{H} 1,30 (6H, *s*) et quatre autres de trois protons chacun respectivement à δ_{H} 0,85 ; 1,00 ; 1,02 et 1,14 attribuables aux huit méthyles angulaires du squelette des triterpènes (**Connolly et Hill, 1991**).
- Un signal d'un proton à δ_{H} 3,24 (1H, dd, 10,7 et 4,3 Hz), attribuable au proton H-3 des triterpènes pentacycliques oxygéné en C-3 (**Mahato et al., 1994**).
- Un doublet dédoublé à δ_{H} 5,55 (1H, dd, 8,7 et 3,0 Hz), attribuable à un proton oléfinique, caractéristique du proton H-15 des taraxar-14-ène (**Hernandez-Chavez et al., 2012 ; Ageta et Arai, 1983**).

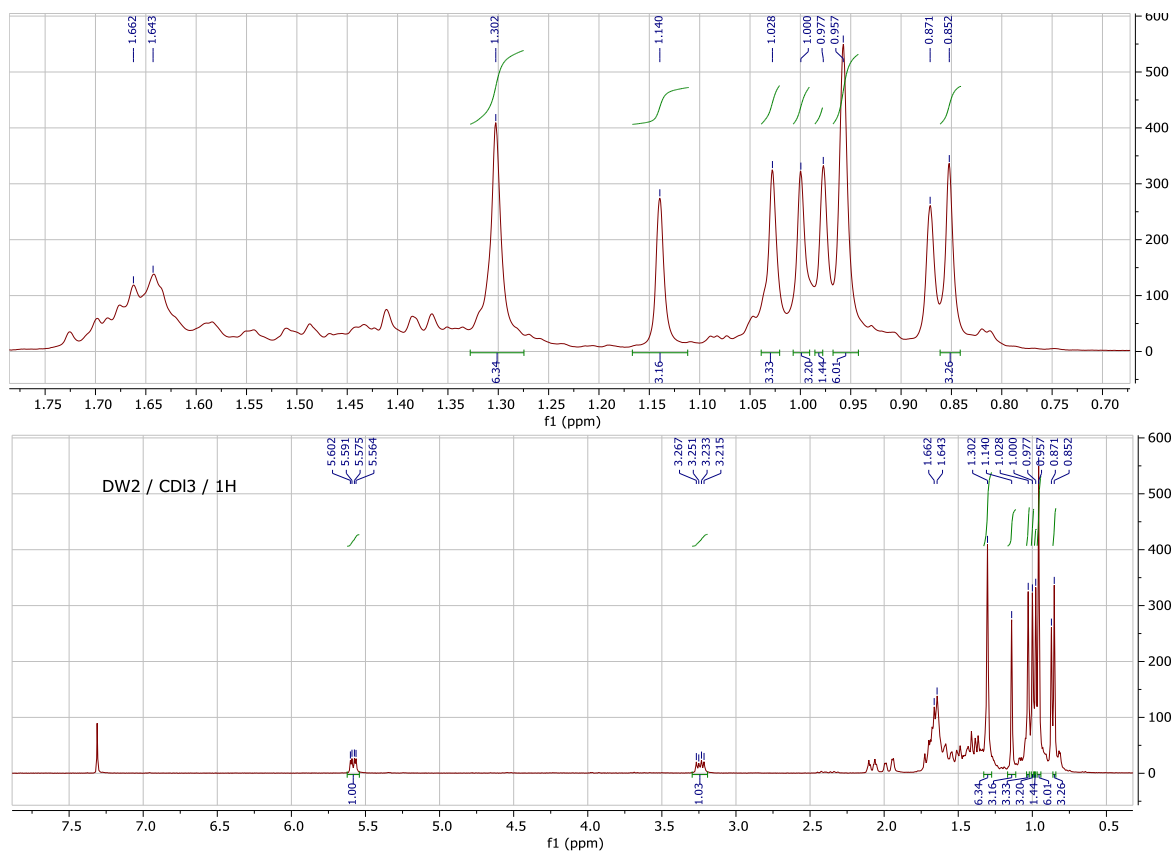


Figure 26: Spectre de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de DW₂

L'ensemble de ces données spectrales comparées à celle décrites dans la littérature nous a permis d'identifier DW₂ comme étant le β-taraxérol (**93**). Ce composé possède une activité anti-giardiale (**Hernandez-Chavez et al., 2012**).

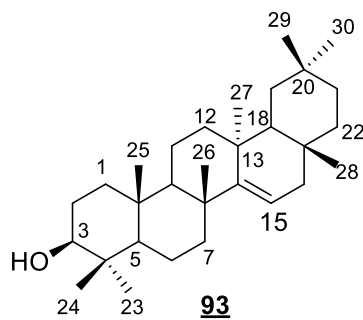


Tableau 18: Données spectrales de RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de de DW₂ comparées à celles de taraxérol de la littérature RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) (Hernandez-Chavez et al., 2012)

Position	DW ₂ (δ _C) (93)	Littérature (δ _C)	Position	DW ₂ (δ _C) (93)	Littérature (δ _C)
1	38,0	38,0	16	36,7	36,9
2	27,2	27,4	17	37,8	38,1
3	79, 1	79,2	18	49,3	49,4
4	39,0	39,1	19	41, 3	41,4
5	55, 5	55,7	20	29, 7	29,0
6	18,8	19,0	21	33,7	33,9
7	35, 1	35,3	22	33,1	33,2
8	38,8	38,9	23	28,0	28,1
9	48,8	48,9	24	15,5	15,6
10	37,8	37,9	25	15,5	15,6
11	17,5	17,7	26	30,0	30,1
12	35,8	35,9	27	25,9	26,0
13	37,6	37,9	28	29,9	30,1
14	158,1	158,1	29	33,4	33,5
15	116,9	117,0	30	21, 4	21,5

II.2.1.6. Identification du composé DW₉.

DW₉ a été isolé de *D. welwitschii* sous forme de cristaux blancs dans le mélange Hex-AE (39/1) et il fond entre 280-282 °C. Il est soluble dans le CH₂Cl₂ et donne une coloration rouge violacée avec le test de Liebermann-Büchard caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016). L'analyse combinée de ses spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C ci-dessous nous permettent de lui attribuer la formule brute C₃₂H₅₂O₂ renfermant 7 degrés d'insaturations.

Le spectre de RMN ¹H (Fig 26) de DW₉ est presque superposable à celui de DW₂ à la seule différence que l'on note la présence d'un singulet de 3 protons à 2,09 ppm attribuable aux protons du méthyle d'un groupement acétoxy et d'un doublet dédoublé à δ_H 4,51 (1H, dd, 5,6 ; 15,9 Hz) caractéristique du proton H-3β des triterpènes pentacycliques acétylés en C-3 (Connolly et Hill, 1991).

La présence du groupement acétoyle est confirmée par le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 27) où l'on observe à 171,0 ppm, le signal du carbonyle d'un ester (Mahato et Kundu, 1994).

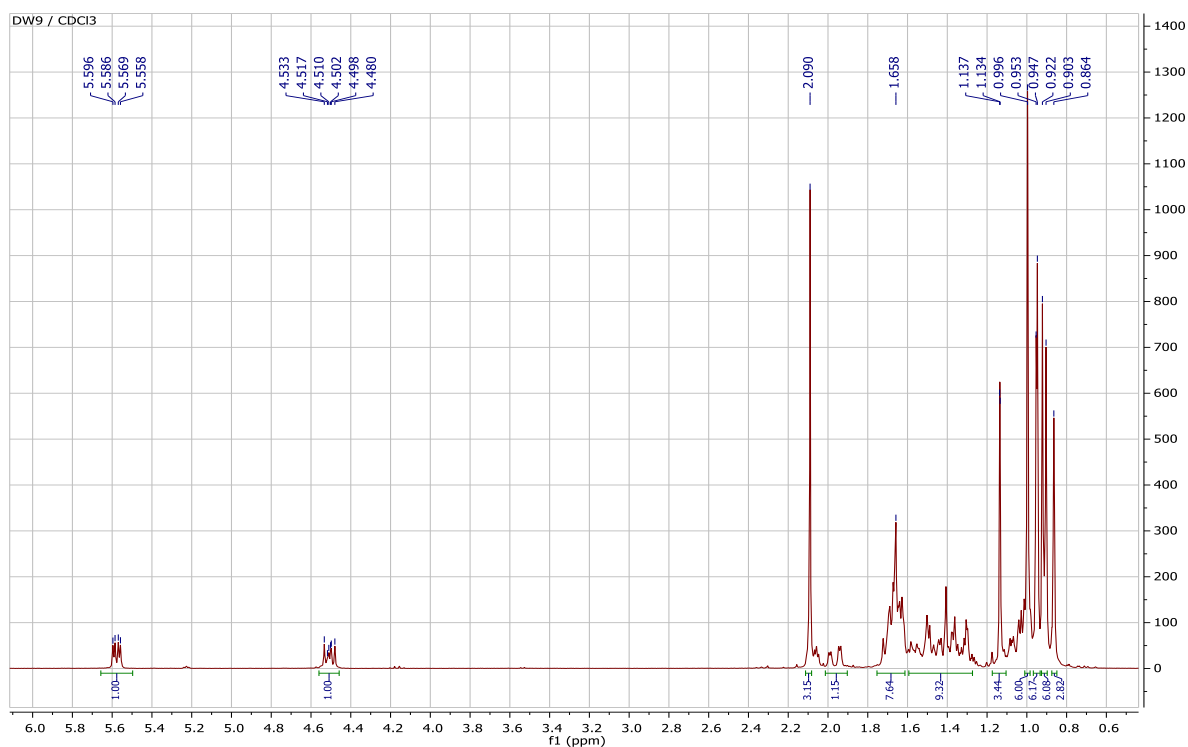


Figure 27: Spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de DW₉

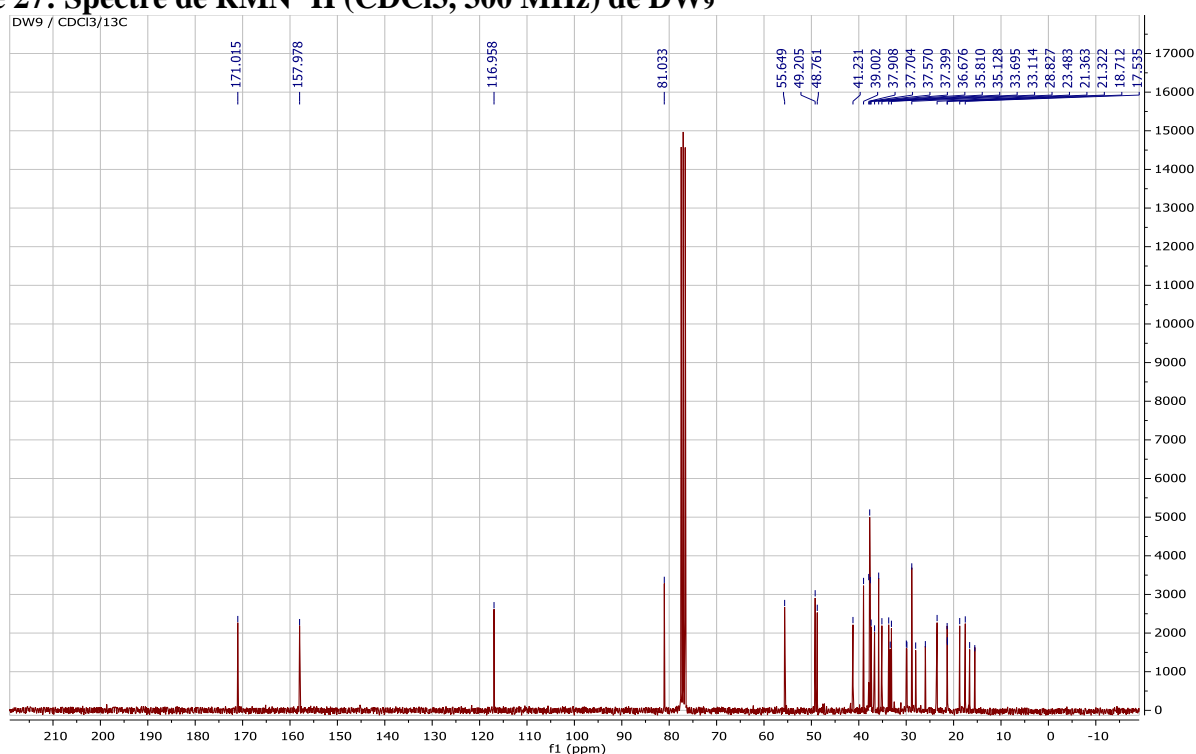


Figure 28: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (CDCl_3 , 75MHz) de DW₉

L'ensemble de toutes ces données spectroscopiques comparées à celles de la littérature (Dong et al., 2014), nous a permis d'attribuer à DW₉ la structure **94** qui est celle de l'acétate de taraxérol qui possède une activité antivirale (Tiwatt et al., 2009).

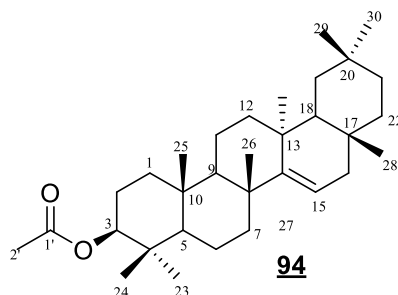


Tableau 19: Données spectrales de RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz,) de DW₉ comparées à celles de l'acétate de taraxérol de la littérature RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) (Dong et al., 2014)

Position	DW ₉ (δ_C) (94)	Littérature (δ_C)	Position	DW ₉ (δ_C) (94)	Littérature (δ_C)
1	39,7	37,9	16	33,4	33,3
2	25,9	25,9	17	35,1	35,1
3	81,0	81,0	18	48,8	48,7
4	37,7	37,7	19	41,2	41,2
5	55,6	55,6	20	29,8	29,7
6	18,7	18,7	21	33,7	33,7
7	33,1	33,1	22	37,4	37,4
8	39,0	39,0	23	28,8	28,7
9	49,2	49,2	24	16,6	16,6
10	37,6	37,5	25	15,5	15,5
11	17,5	17,5	26	28,0	28,0
12	35,8	35,8	27	29,9	29,8
13	36,7	36,6	28	29,9	29,9
14	158,0	158,0	29	23,5	23,4
15	116,9	116,9	30	21,3	21,3
1'	171,0	171,0	2'	21,3	21,3

II.2.1.7. Identification du composé DW₆.

Le composé Dw₆ isolé de *D. welwitschii* à Hex-AE (65-35) précipite dans le système hexane/Acétate (70/30) sous forme de poudre beige, est soluble dans le méthanol et fond entre 283-285°C. Il répond positivement au test de Liebermann-Büchard donnant une coloration rouge violacée caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016). L'analyse combinée de ses spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C ci-dessous nous permettent de lui attribuer la formule brute C₃₀H₄₈O₃ renfermant 7 degrés d'insaturations.

Le spectre de RMN ¹H (Fig. 29) de Dw₆ révèle la présence de :

- 5 signaux de singulets de trois protons chacun respectivement à 0,81 ; 0,88 ; 0,90 ; 0,98 et 1,3 ppm attribuables à cinq groupements méthyles.
- Deux signaux apparaissant sous forme de doublets de trois protons chacun à δ_H 0,91(3H ; d ; 2,4 Hz) et 0,92(3H ; d ; 2,4 Hz) attribuables aux protons des méthyles C-29 et C-30 des urs-12-ène. (Ageta et Arai, 1983)
- Un doublet dédoublé à δ_H 3,1 (1H, dd, 5,1 et 5,1 Hz) attribuable au proton H-3 des triterpènes.
- Un triplet mal résolu à δ_H 5,26 (1H, m) caractéristique du proton H-12 des triterpènes de type urs-12-ène (connolly et al., 1991).

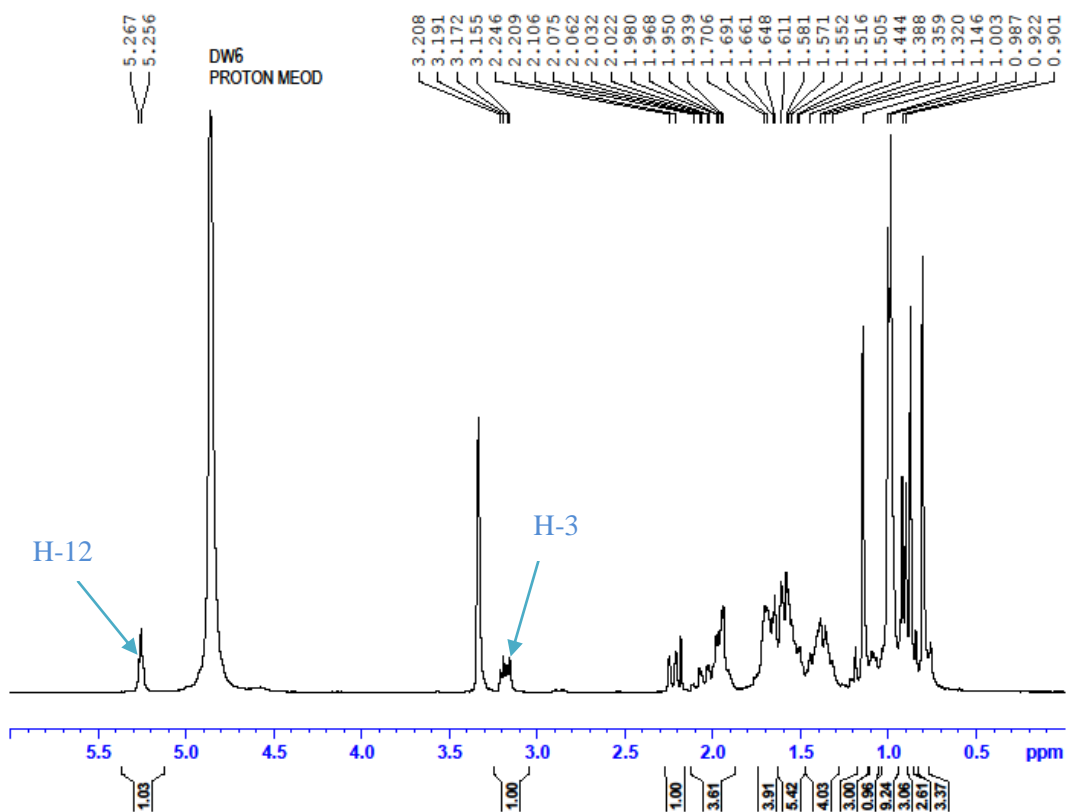


Figure 29: Spectre de RMN ^1H (MeOD, 300 MHz) de DW₆

Son spectre RMN¹³C (**Fig. 30**) totalement découplé révèle la présence de 30 atomes de carbone, dont :

- 7 signaux résonnant entre δ_c 16,2 et 29,4 attribuables aux groupes méthyles.
- Deux signaux à 126,1 et 139,8 correspondant au carbones oléfiniques C-12 et C-13 respectivement suggérant un squelette de type urs-12-ène (**Connolly et Hill, 1991**).
- Un signal de singulet à δ_c 78,7 attribuable au Carbone C-3 des triterpènes hydroxylés en position 3.
- Un signal de singulet à δ_c 180,5 attribuable au carbonyle d'acide carboxylique.

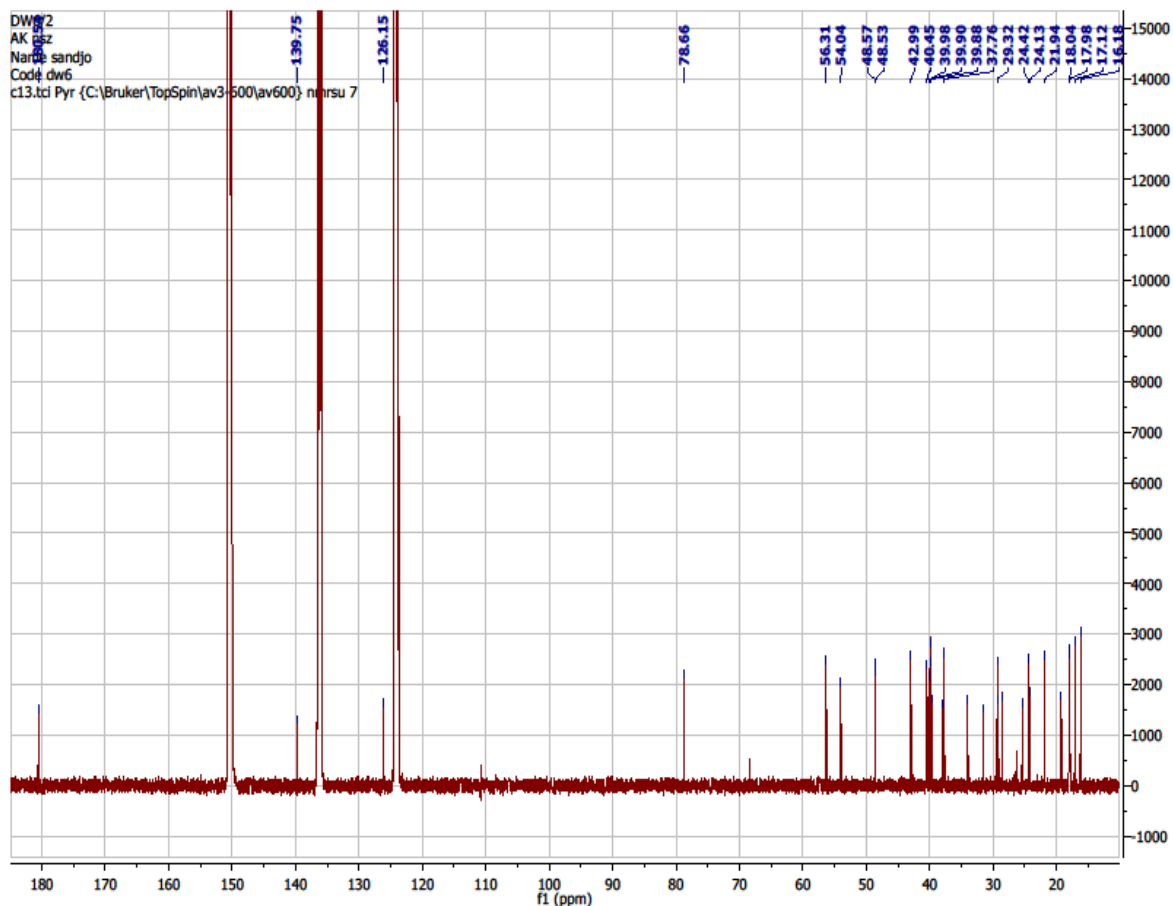


Figure 30: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (Pyr- d_5 , 150MHz) de DW₆

L'ensemble de ces données physiques et spectroscopiques, par comparaison à celles décrites dans la littérature, nous ont permis d'identifier la structure de DW₆ à celle de l'Acide ursolique (**95**) (Liu *et al.*, 2012). Ce composé possède une activité anticancéreuse (Xue-Min *et Xiu*, 2019).

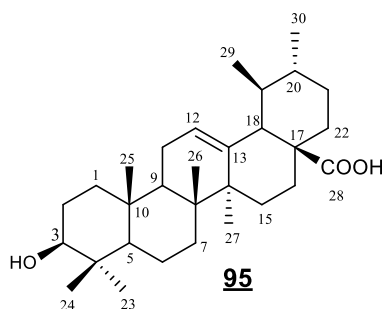


Tableau 20: Données spectrales de RMN ¹³C (Pyr, 150 MHz) de DW₆ comparées à celles de l'acide ursolique de la littérature RMN ¹³C (Pyr, 150 MHz) (Liu et al., 2012)

Position	DW ₆ (δ_C) (95)	Littérature (δ_C)	Position	DW ₆ (δ_C) (95)	Littérature (δ_C)
1	37,8	38,7	16	24.4	24.6
2	26.8	27.8	17	48.7	47.7
3	78.6.	77.8	18	54.0	53.2
4	39.8	39.1	19	39.8	39.2
5	56.3	55.5	20	38.8	38.8
6	19.0	18.5	21	29.3	31.1
7	32.6	33.3	22	40.6	41.5
8	39.9	39.7	23	29.3	28.5
9	48.5	47.7	24	16.2	15.3
10	37.8	37.0	25	17.9	16.2
11	24.1	23.6	26	18.0	17.2
12	126.2	125.3	27	22.0	23.3
13	139.75	138.9	28	180.5	179.5
14	42.9	42.2	29	17.1	17.1
15	28.6	28.4	30	24.1	21.1

II.2.1.8. Identification du composé DW₁₁.

DW₁₁ a été obtenu de *D. Welwitschii* sous forme d'une poudre blanche dans le mélange Hex-AE (9-1) et est soluble dans le chloroforme. Il répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016). L'analyse combinée des spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C ci-dessous nous permettent de lui attribuer la formule brute C₃₀H₅₀O renfermant 6 degrés d'insaturations.

Sur le spectre de RMN ¹H (Fig 31), on observe la présence de 8 singulets de 3 protons chacun apparaissant respectivement à δ_H 0,79 ; 0,83 ; 0,87 ; 0,93 ; 0,96 ; 0,99 ; 1,13 et 1,25 attribuables à 8 groupements méthyles angulaires. Un proton oléfinique à δ_H 5,18 (1H, s) caractéristique du proton H-12 des oléan-12-ènes (Furuya et al., 1987). Un doublet dédoublé à δ_H 3,22 (1H ; dd ; 4,8 et 11,4 Hz) attribuable au proton de l'oxyméthine en C-3 des triterpènes

(Juceni *et al.*, 2007). Un doublet dédoublé à δ_H 1,64 caractéristique du signal du proton H-18 d'un oléan-12-ène (Furuya *et al.*, 1987).

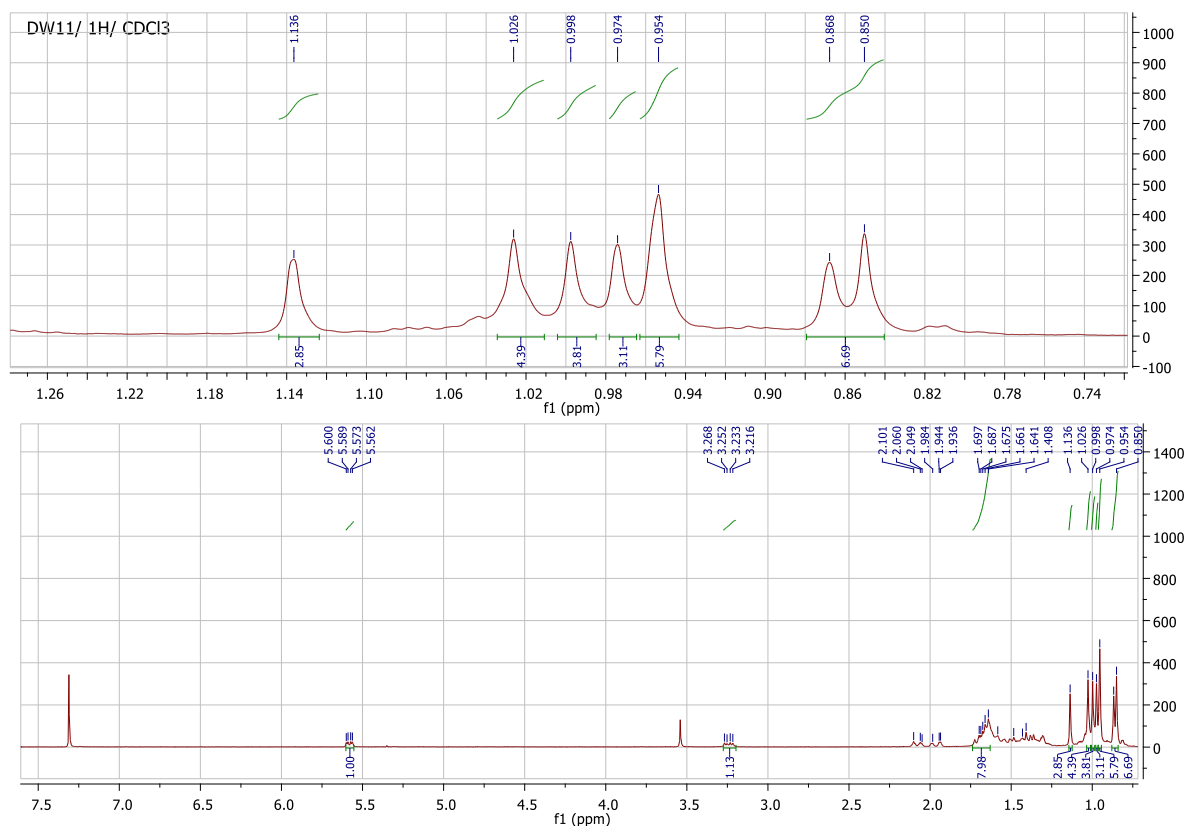


Figure 31: Spectre de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de DW₁₁

Ces informations sont en accord avec le spectre de RMN du ¹³C (Fig 32) où l'on observe respectivement à δ_C 121,7 et δ_C 145,1 les signaux des carbones C-12 et C-13 des oléan-12-ènes (Mahato et Kundu, 1994).

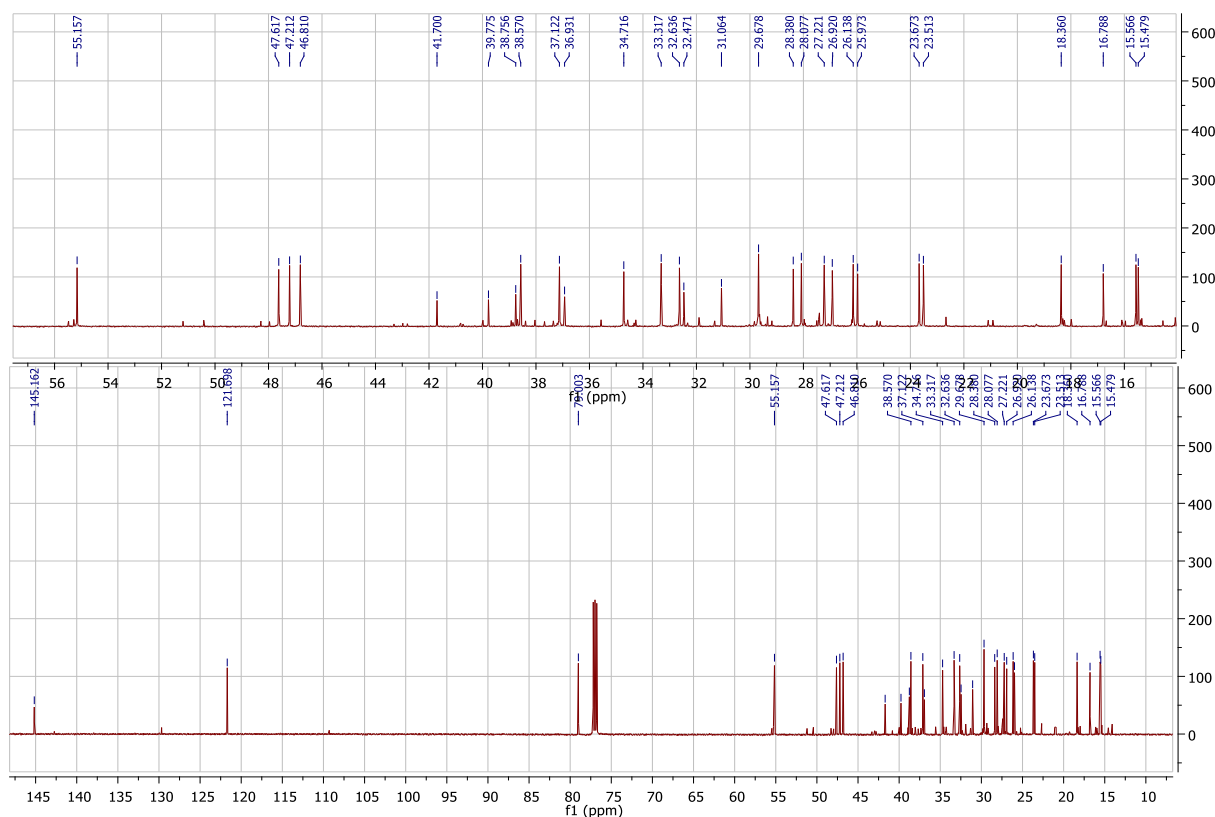
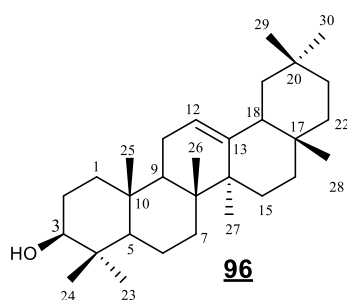


Figure 32: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (CDCl_3 , 75 MHz) de DW_{11}

L'ensemble de toutes ces données comparées à celles de la littérature nous a permis d'attribuer à DW_{11} la structure (**96**) qui est celle de β -amyrine précédemment décrit par (Ebajo *et al.*, 2015) et qui possède une activité anti-inflammatoire (Okoye *et al.*, 2014).



II.2.1.9. Identification du composé DW_4 .

Le composé DW_4 a été isolé de *D. Welwitschii* sous forme de poudre blanche dans le mélange Hex -AE (39-1). Il est soluble dans le chloroforme. Il répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016). L'analyse combinée de ses spectres de RMN ^1H et de RMN ^{13}C ci-dessous nous permettent de lui attribuer la formule brute $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ renfermant 7 degrés d'insaturations.

Le spectre de RMN ^1H (**Fig. 33**) de DW₄ est presque superposable à celui de DW₁₁. L'on observe cependant le signal du proton en position 3 à δ_{H} 4,55 de constantes de couplage 7,5 et 9,3 Hz caractéristique du proton H-3 des triterpènes acétylés en C-3 (**Connolly et Hill, 1991**) et l'apparition d'un singulet de trois protons à δ_{H} 2,10 attribuable au méthyle d'un groupement acétyle.

Sur son spectre de RMN ^{13}C (**Fig. 34**), nous observons 32 signaux d'atomes de carbones dont :

- Un signal à δ_{C} 171,0 attribuable au groupement carbonyle d'un ester,
- Deux carbones oléfiniques à δ_{C} 121,7 et 145,2 caractéristiques de la double liaison $\Delta^{12,13}$ des oléan-12-ènes (**Connolly et Hill, 1991**).

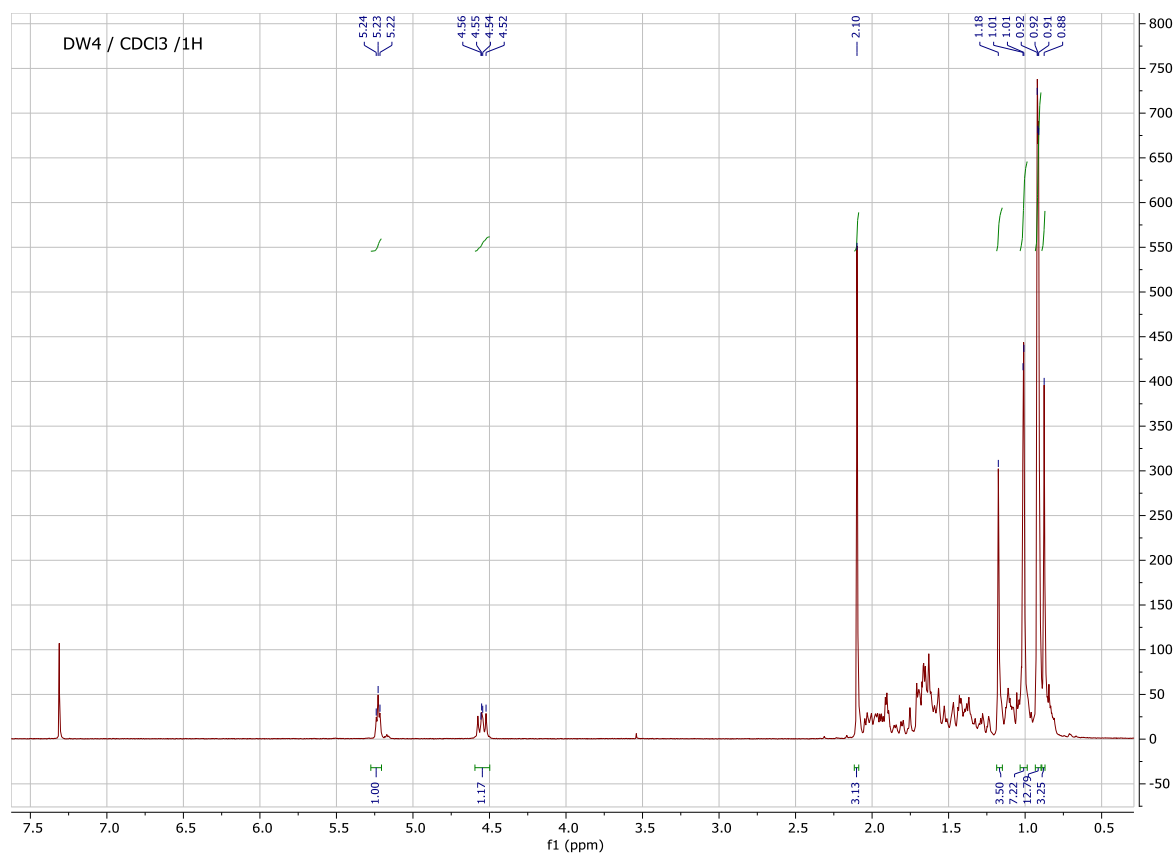


Figure 33: Spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de DW₄

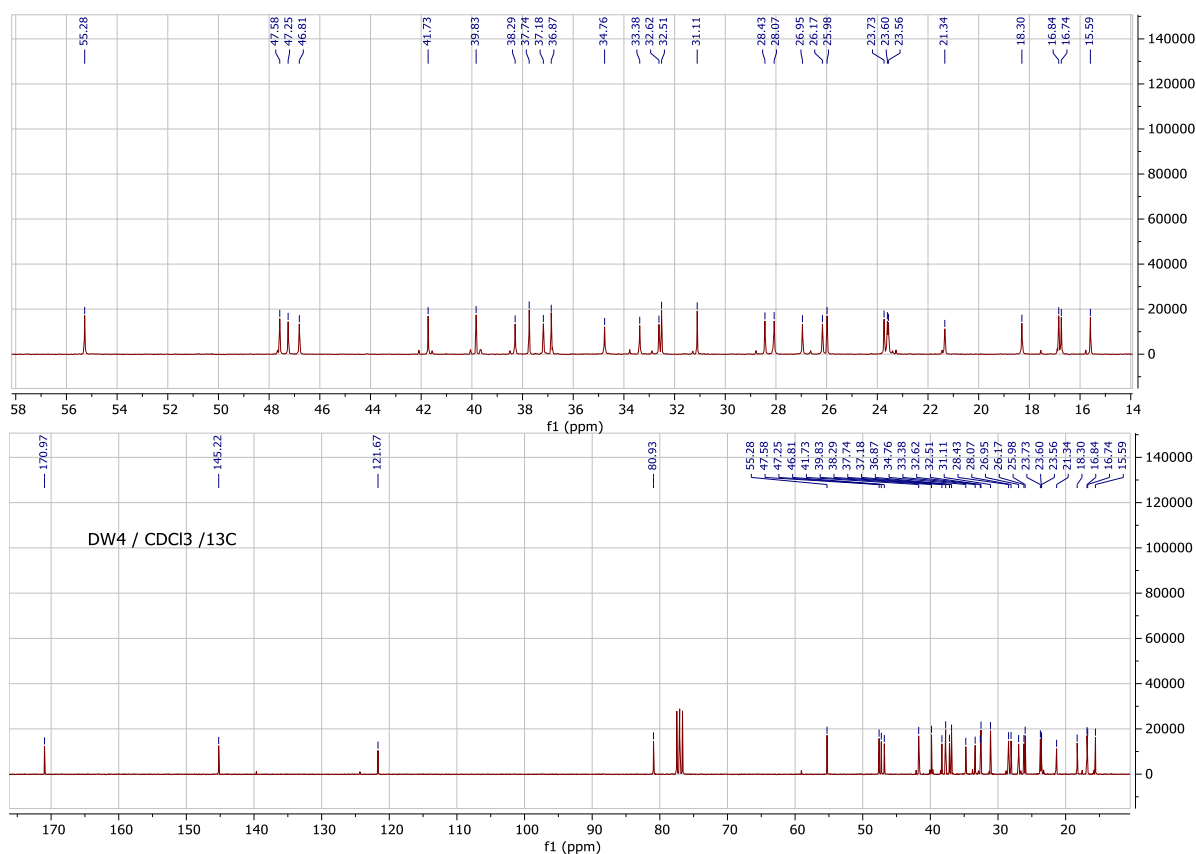


Figure 34: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (CDCl_3 , 75 MHz) de DW₄

Ces données comparées à celles décrites dans la littérature, nous permettent d'attribuer à DW₄ la structure **97** qui est celle de l'acétate de β -amyrine (Ebajo et al., 2015). Il a été démontré que ce composé augmente l'érection ainsi que la durée de l'éjaculation (Watcho et al., 2012).

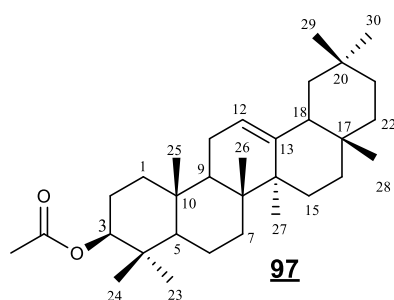


Tableau 21: Comparaison des données spectrales de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de DW₁₁ avec la β -amyryne (CDCl_3 , 75 MHz) (Ebajo et al., 2015), et de DW₄ (CDCl_3 , 75 MHz) avec l'acétate de β -amyryne (Ebajo et al., 2015)

Position	DW ₁₁ (96) (δ_C)	β -amyryne Littérature (δ_C)	DW ₄ (97) (δ_C)	Acétate de β - amyryne Littérature (δ_C)
1	38,5	38,7	37,1	38,8
2	27,0	27,2	27,0	27,4
3	78,9	79,3	81,0	79,2
4	38,7	38,5	38,3	39,0
5	55,1	55,1	55,3	55,4
6	18,3	18,6	18,3	18,6
7	32,6	32,4	32,6	32,9
8	39,7	39,8	39,8	40,2
9	47,6	47,6	47,3	47,4
10	37,0	36,9	36,9	37,2
11	23,4	23,6	23,6	23,8
12	121,7	121,7	121,7	121,9
13	145,0	145,2	145,2	145,4
14	41,7	41,7	41,7	41,9
15	26,2	26,2	26,0	26,4
16	28,3	26,1	26,2	27,1
17	32,5	32,6	32,5	32,7
18	47,2	47,2	47,6	47,8
19	46,8	46,8	46,8	47,0
20	31,1	31,0	31,1	31,3
21	34,8	34,7	37,7	37,4
22	37,2	37,1	34,8	34,9
23	28,1	28,0	15,6	15,7
24	15,5	15,4	28,1	28,3
25	15,5	15,4	16,7	15,8
26	16,8	16,8	16,8	17,0
27	26,0	25,9	26,2	26,2
28	27,3	28,4	28,4	28,6
29	33,2	33,8	33,4	33,7
30	23,6	23,7	23,7	23,9
1'			171,0	171,5
2'			21,3	21,5

II.2.1.10. Identification du composé DW₇.

Le composé DW₇ isolé de *D. welwitschii* sous forme de poudre beige amorphe dans le système Hex/AE (70/30). Il est soluble dans le méthanol et répond positivement au test de Liebermann-Büchard donnant une coloration rouge violacée caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016). L'analyse des spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C permet de lui attribuer la formule brute C₃₀H₄₈O₃ renfermant 7 degrés d'insaturations.

Son spectre de RMN ¹H (Fig. 35) est presque superposable à celui de DW₁₁. L'on observe : notamment :

- Le proton en position 3 à δ_H 3,15 (1H ; dd ; 6,0 Hz et 6,0 Hz).
- Un triplet mal résolu à δ_H 5,20 caractéristique du proton H-12 du squelette des triterpènes (Mahato et al., 1994).
- Un doublet de doublé à δ_H 2,04 attribuable au proton H-18 du squelette de type oléan-12-ène (Furuya et al., 1987).

Et par la suite les signaux supplémentaires de :

- 7 singulets de trois protons chacun qui apparaissent à δ_H 0,79 ; 0,89 ; 0,89 ; 0,97 ; 0,98 ; 0,99 et 1,19 attribuables aux groupements méthyles.
- Deux doublets à δ_H 3,10 (1H, d, 12Hz) et 3,53 (1H, d, 12Hz) attribuables aux protons d'un oxyméthylène ceci est clairement observé sur le spectre HSQC (Fig. 36) où ces protons sont portés par le même carbone et l'absence d'un méthyle.

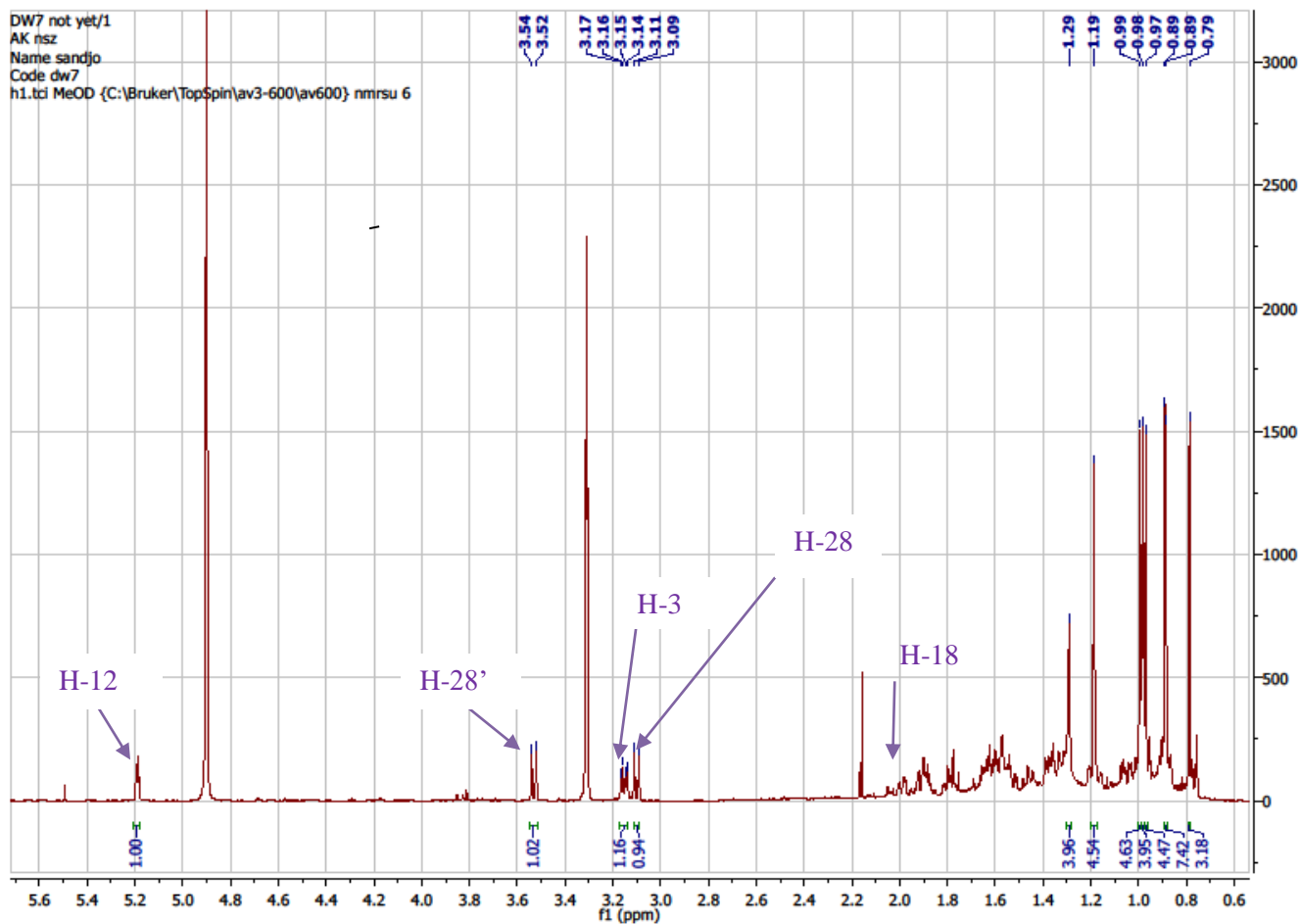


Figure 35: Spectre de RMN ^1H (MeOD, 600 MHz) de DW₇

L'analyse de son spectre de RMN ^{13}C (Fig. 36) couplé au spectre HSQC (Fig. 36), révèle la présence de 30 atomes de carbone dont :

- Sept signaux de méthyles qui résonnent à δ_{C} 16,1 ; 16,3 ; 17,3 ; 24,02 ; 26,5 ; 28,7 ; 33,8.
- Un signal à δ_{C} 79,7 correspondant au carbone C-3 des triterpènes hydroxylés en position 3.
- Un signal à δ_{C} 69,8 attribuable au carbone C-28 qui est un oxyméthylène. Cette position a été confirmée par les corrélations HMBC (Fig. 37) entre ce carbone et le proton H-18.
- Deux signaux à δ_{C} 125,5 et 145,7 caractéristiques des carbones C-12 et C-13 de la série oléaen-12-ène des triterpènes (Mahato *et al.*, 1994).

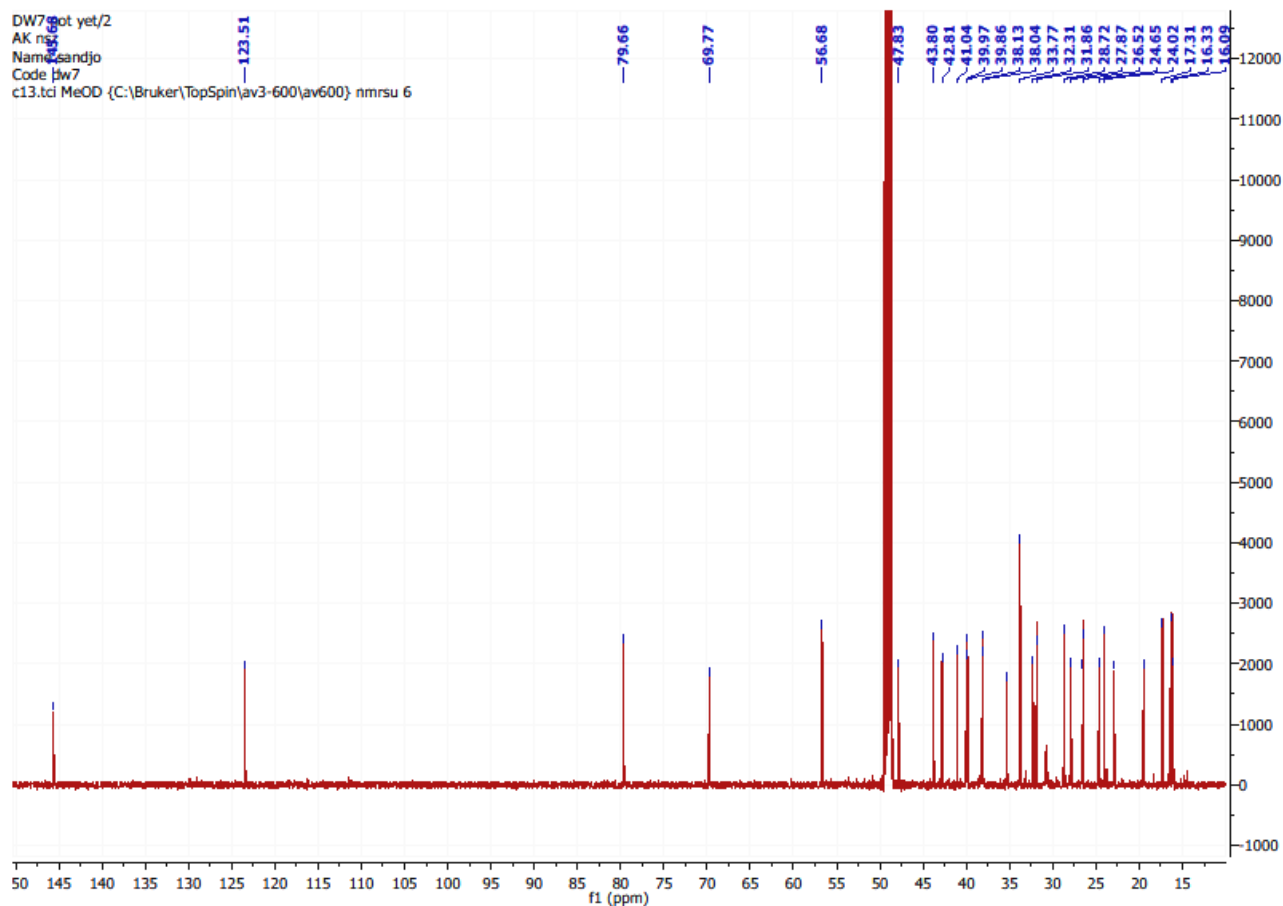


Figure 36: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (MeOD, 150 MHz) de DW₇

Sur son spectre HSQC (**Fig. 36**), on observe des corrélations directes :

Le proton H-18 (2,04 ppm) corrèle avec le carbone C-18 (42,8 ppm)

Le proton H-3 (3,15 ppm) corrèle avec le carbone C-3 (79,8 ppm)

Le proton H-12 (5,20 ppm) corrèle avec le carbone C-12 (123,5 ppm)

Les protons H-28 (3,10 ppm et 3,53 ppm) corrèle avec le carbone C-28 (69,8 ppm)

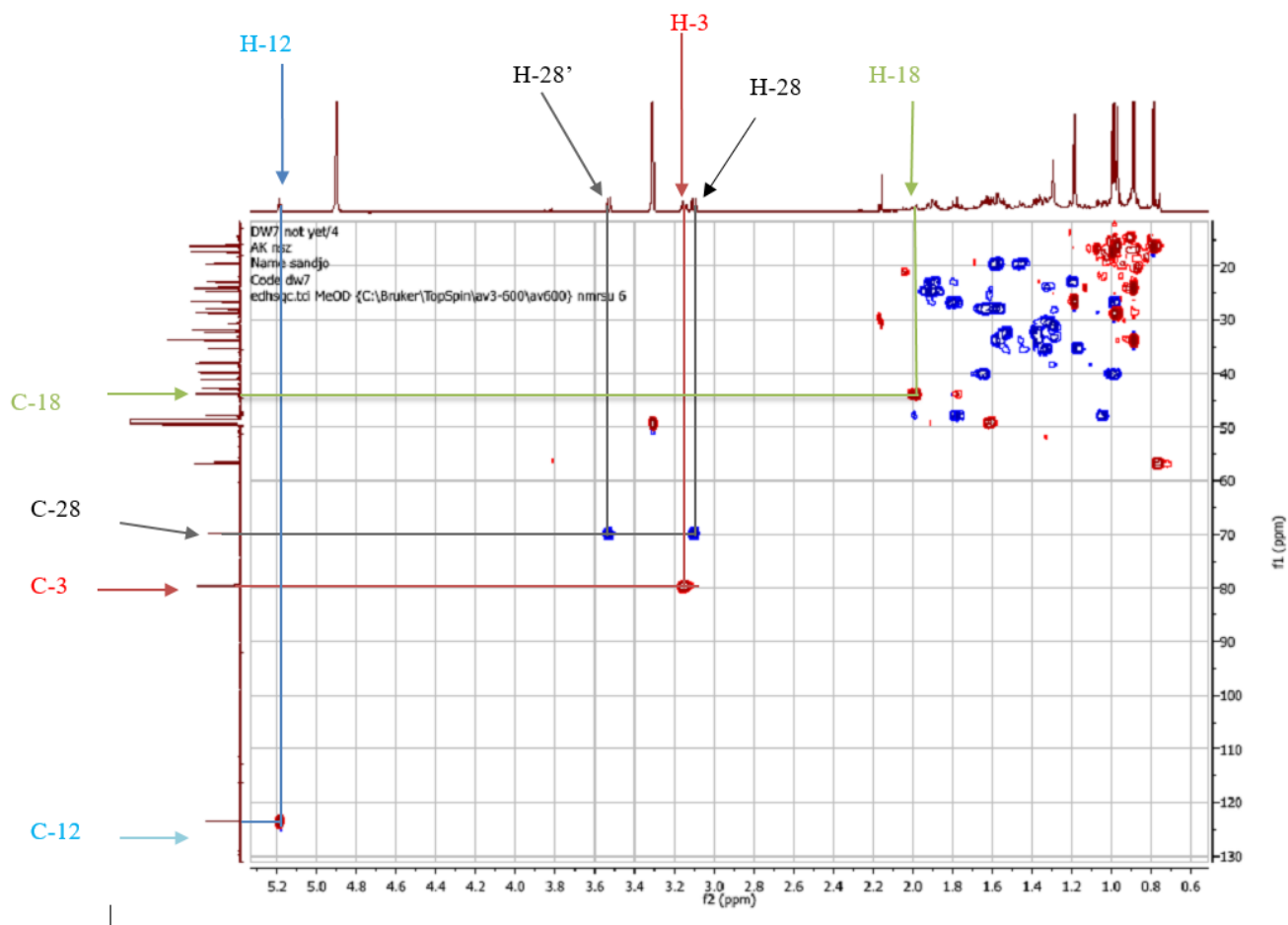
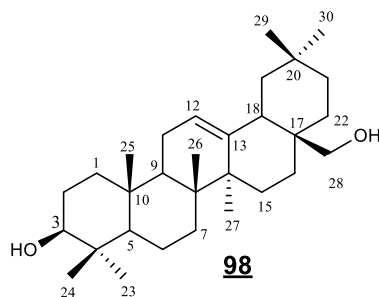


Figure 37: Spectre de HSQC (MeOD) de DW₇

L'ensemble de ces données physiques et spectroscopiques, par comparaison à celles décrites dans la littérature, nous ont permis d'identifier la structure de DW₇ à celle de l'érythrodiol ou le 28-hydroxy β -amyrine (**98**) (Osman *et al.*, 2019). Ce composé a montré une activité antiproliférative et apoptotique dans les cellules d'adénocarcinome humaine HT-29 (Juan *et al.*, 2008).



Cette structure a été confirmée sur le spectre HMBC (**Fig. 38**) par les corrélations entre :

- Le proton H-3 (3,15 ppm) et les carbones C-23(28,7 ppm), C-24 (16,1ppm)
- Le proton H-28 / H-28' (3,10/3,53 ppm) et les carbones C-16 (24,0 ppm) ; C-22 (32,3 ppm) ; C-17 (38,1ppm) ; C-18 (42,8 ppm).
- Le proton H-12 (5,20 ppm) et les carbones C-9 (47,8 ppm) ; C-22 (42,8 ppm) ; C-11 (24,7 ppm).
- Le proton H-18 (2,04 ppm) et les carbones C-16 (24 ppm) ; C-17 (38,1 ppm) ; C-18 (42,8 ppm) ; C-28 (69,8 ppm) ; C-12 (123,5 ppm) ; C-13 (145,7).

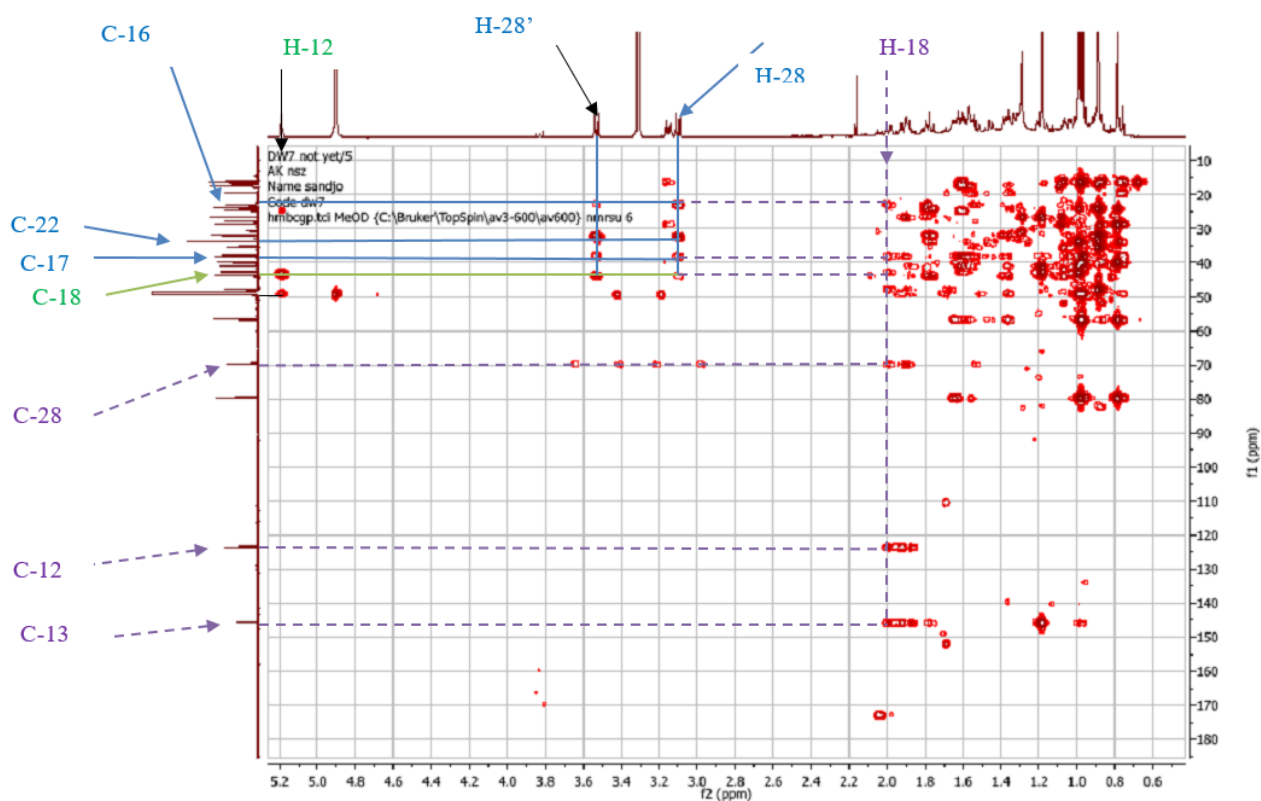


Figure 38: Spectre de HMBC (MeOD) de DW₇

Tableau 22: Données spectrales de RMN ¹³C (MeOH, 150 MHz) de DW₇ comparées à celles de la 28-hydroxy- β-amyrine de la littérature RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) (Osman *et al.*, 2019)

Position	DW ₇ (δ _C) (98)	Littérature (δ _C)	Position	DW ₇ (δ _C) (98)	Littérature (δ _C)
1	38,4	38,6	16	24,0	22,0
2	26,5	27,2	17	38,1	26,9
3	79,7	79,0	18	42,8	42,3
4	39,9	38,8	19	43,8	46,5
5	55,7	55,2	20	27,9	31,0
6	19,1	18,4	21	38,1	34,4
7	31,9	32,6	22	32,3	31,0
8	40,0	39,6	23	28,7	28,1
9	47,8	47,6	24	16,1	15,5
10	38,1	36,9	25	16,3	15,5
11	24,7	23,6	26	17,3	16,7
12	123,5	122,3	27	26,5	25,9
13	145,7	144,2	28	69,8	69,7
14	41,1	41,7	29	33,8	33,2
15	25,1	25,6	30	24,02	23,6

II.2.1.11. Identification du composé DW₁₀.

Le composé DW₁₀ a été isolé de *D. welwitschii* sous forme de cristaux blancs dans le mélange Hex-AE (65-35). Il est soluble dans le méthanol et fond entre 308-310 °C. Il répond positivement au test de Liebermann-Büchard donnant une coloration rouge violacée caractéristique des triterpènes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016).

La formule brute C₃₀H₄₆O₆ a été établie à partir de son spectre de masse ESI haute résolution (Fig. 39) qui a montré le pic d'ion pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 503,3360 (calc [M+H]⁺, 503,3375) renfermant 8 degrés d'insaturations.

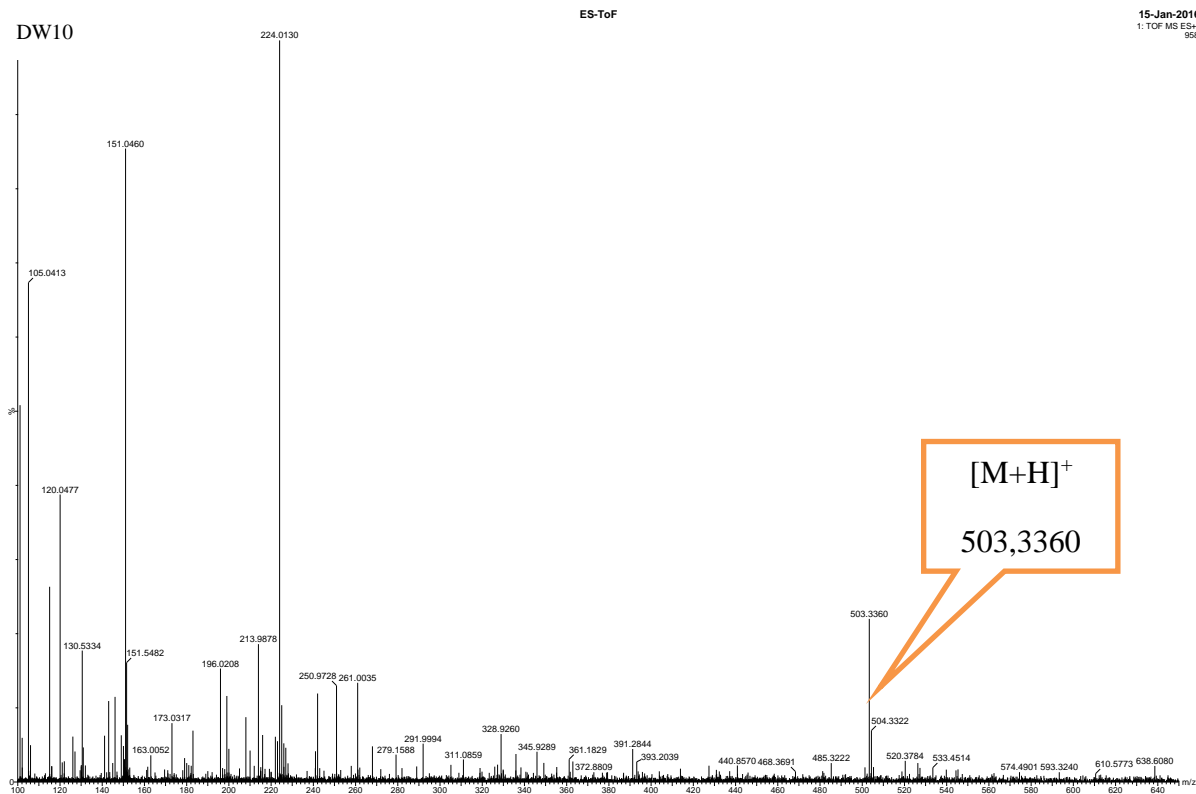


Figure 39 : Spectre de Masse ES-TOF de DW10

L'analyse de son spectre de RMN ^1H (Fig. 40) couplée au spectre HSQC (Fig. 41) révèle :

- Six (6) signaux de trois protons chacun dont 5 singulets qui apparaissent à δ_{H} 1,36 ; 1,24 ; 1,18 ; 0,88 ; 0,98 ; 0,81 et un doublet à δ_{H} 0,92 attribuables aux groupements méthyles.
- Un signal à δ_{H} 3,96 (1H, t, 2,9 Hz) /70,2 caractéristique du proton H-3 des triterpènes ; la faible constante de couplage suggère une orientation $-\alpha$.
- Un signal à δ_{H} 5,28 (1H, t, 3,6Hz) /128,2 caractéristique du proton H-12 du squelette des triterpènes (Mahato *et al.*, 1994).
- Un signal à δ_{H} 2,57 (1H, dt, 4,4 Hz et 13,2Hz) /25,6 attribuable au proton H-16a
- Un signal à δ_{H} 2,49 (1H, s) /53,7 caractéristique au proton H-18 du squelette de type urs-12-ène (Furuya *et al.*, 1987).

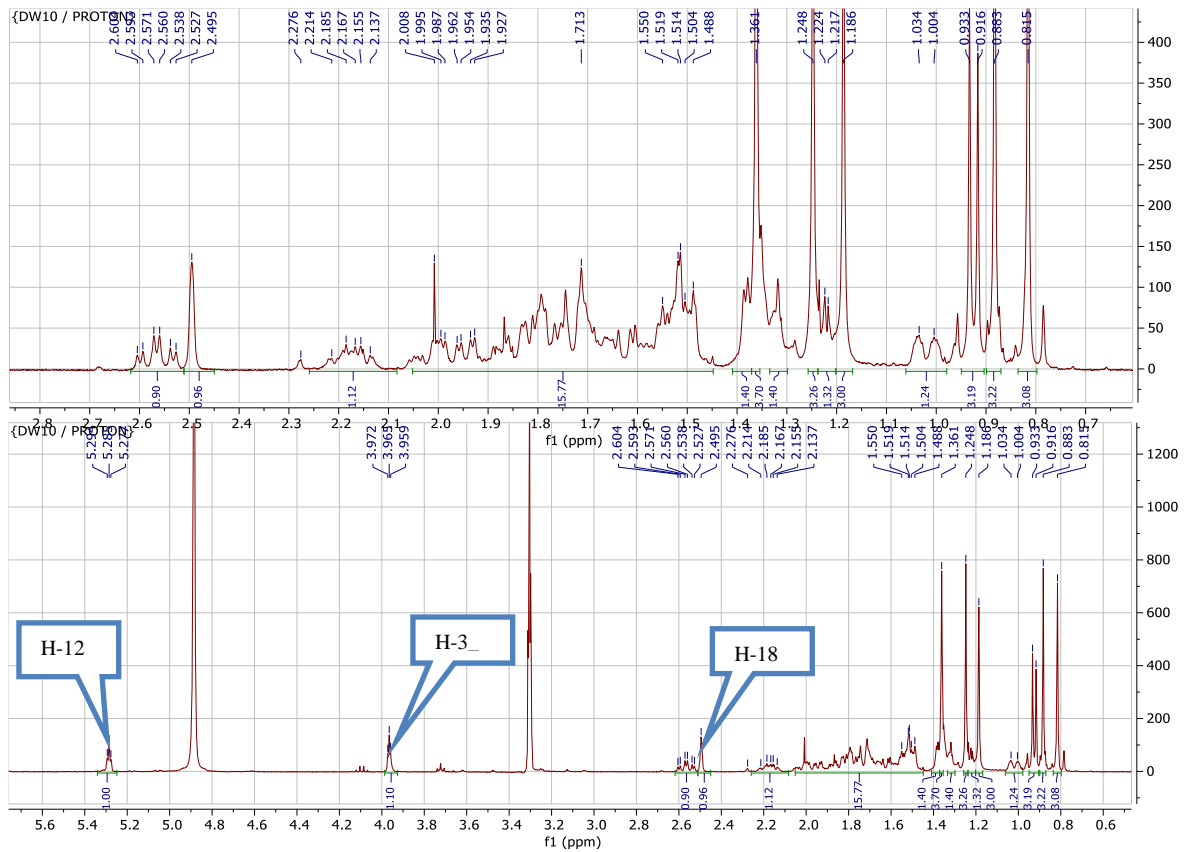


Figure 40: Spectre de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) de DW10

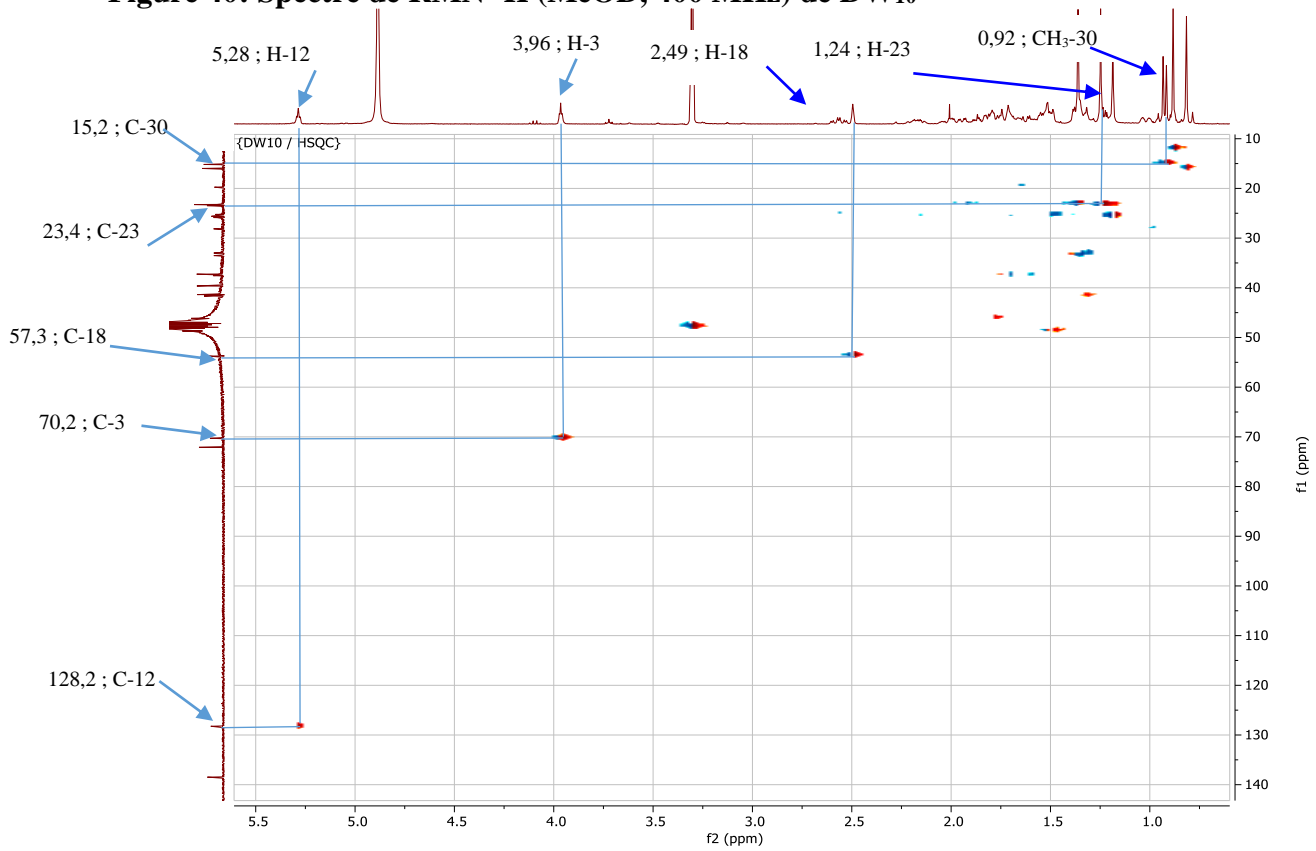


Figure 41: Spectre de HSQC de DW10

Son spectre de RMN ^{13}C (Fig 42) révèle la présence de 30 atomes de carbones dont :

- Deux signaux à δ_{C} 180,9 et 179,9 attribuables aux carbonyles d'acide carboxylique.
- Deux signaux à δ_{C} 128,2 et 138,4 attribuables respectivement aux carbones C-12 et C-13 du squelette de type urs-12-ène (Mahato *et al.*, 1994).
- Deux signaux à δ_{C} 70,2 et 72,1 attribuables respectivement aux carbones C-3 et C-19.

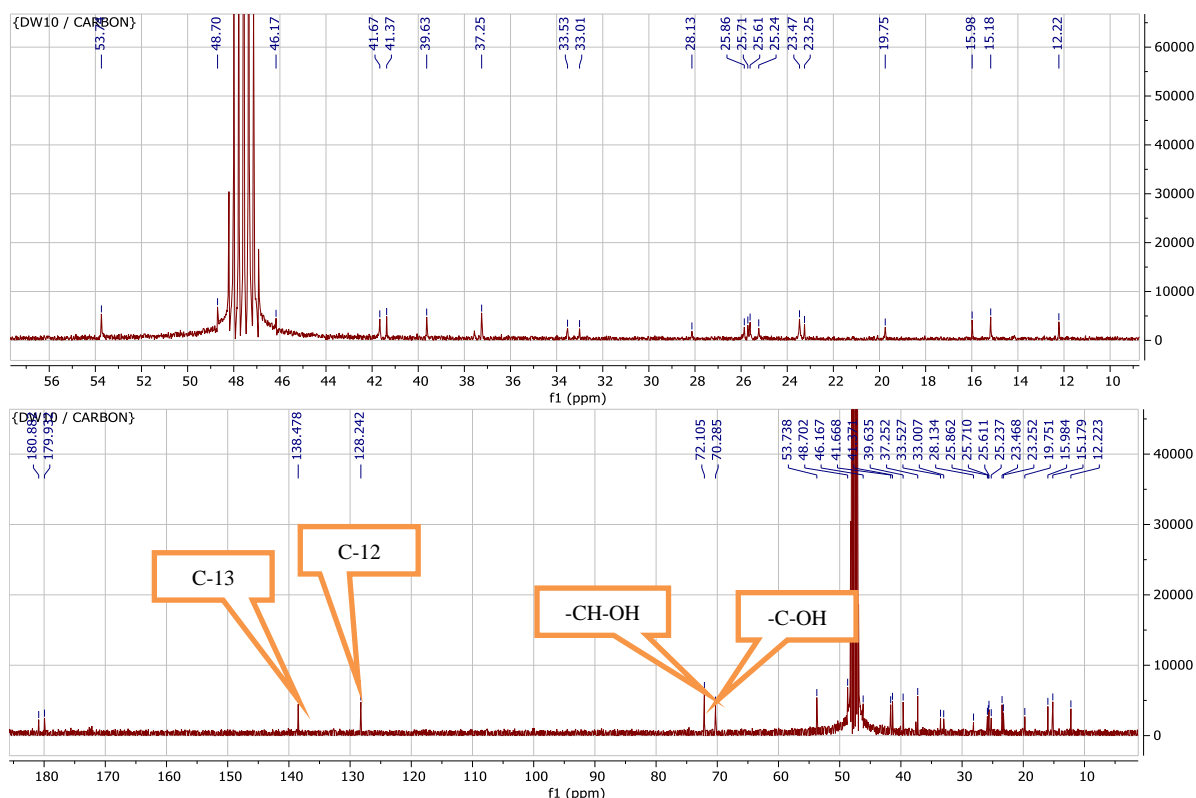


Figure 42: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (MeOD, 100 MHz) de DW10

Sur son spectre HMBC (Fig. 43) on observe les corrélations :

- Entre le méthyle doublet à δ_{H} 0,92 et un méthylène à 25,7 ppm, un carbone oxygéné quaternaire à 72,1 ppm et un méthine à 43,1 ppm. Ces déplacements chimiques sont typiques des dérivés de l'acide ursolique notamment l'acide 19 α -hydroxyurs-12-èn-28-oïque (Araújo *et al.*, 1990).
- Entre le méthyl à δ_{H} 1,24 et les carbones δ_{C} 70,2 (C-3), le carbonyle à δ_{C} 179,9. Ceci suggère qu'un des carbonyles est situé en C-23 ou C-24. Le déplacement chimique du carbone du méthyle à 23,2 montre qu'il s'agit du carbone C-23 et ainsi le carbonyle est localisé en C-24 (Thuong *et al.*, 2008).
- Entre le proton à δ_{H} 2,57 (H-18) et les carbones à δ_{C} 128,2 (C-12) ; 138,4 (C-13) ; 72,1(C-19) ; 47,8 (C-17) ; 25,6 (C-16).

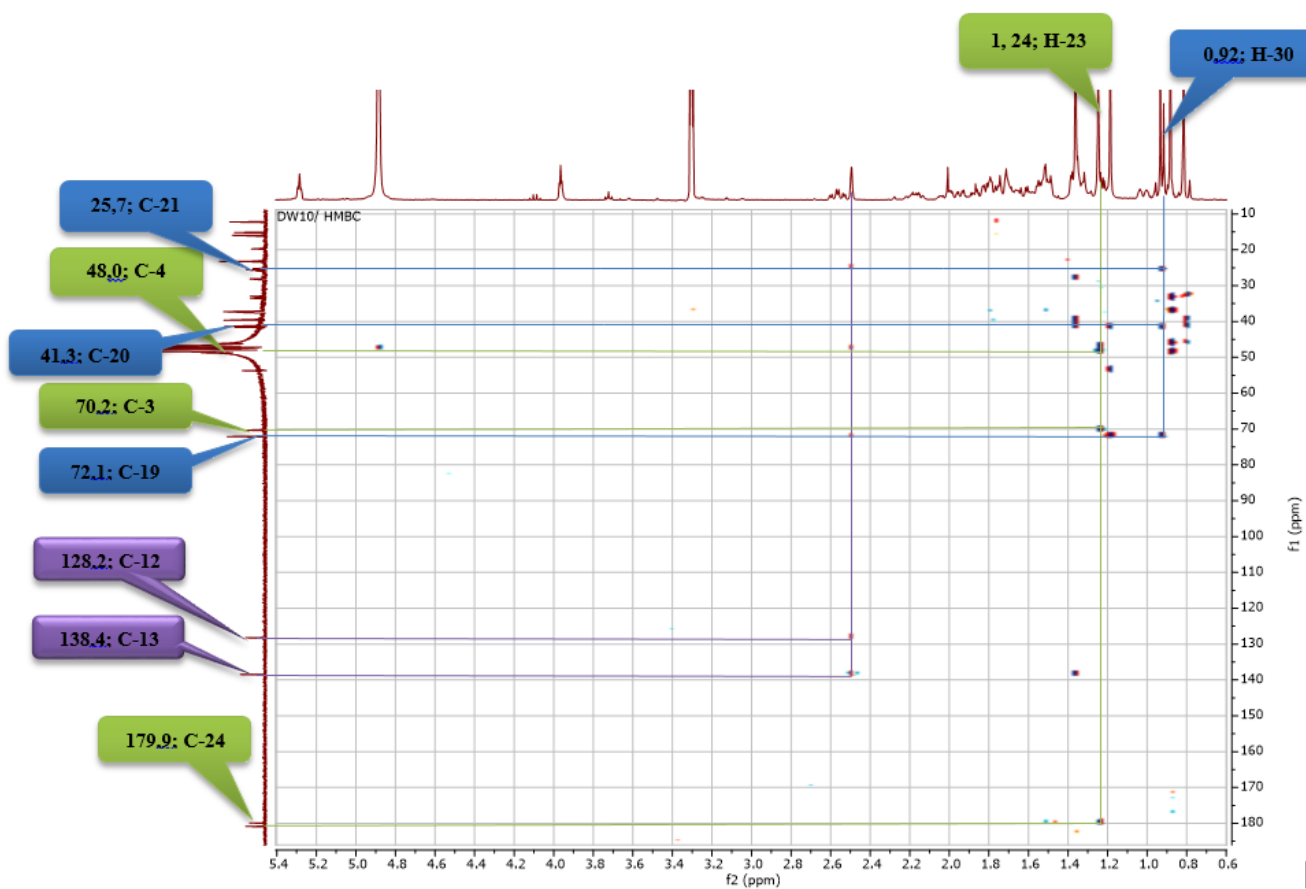


Figure 43: Spectre de HMBC de DW₁₀

L'ensemble de ces données spectrales nous permet d'attribuer à DW₁₀ la structure (**99**) qui est celle de l'acide-3 α , 19 α -dihydroxyurs-12- \acute{e} n-24, 28-dioïque ou l'acide diospyrique B (**Thuong et al., 2008 ; Truong et al., 2018**).

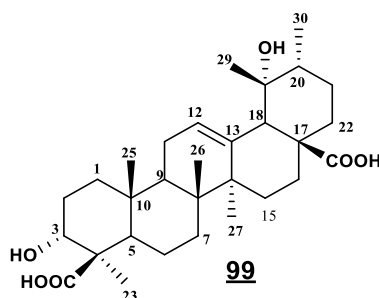


Tableau 23: Données spectrales de RMN ¹³C (CHCl₃, 100 MHz) de DW₁₀ comparées à celles de l'acide diospirique B de la littérature RMN ¹³C (Pyr, 125 MHz) (Truong et al., 2018)

Position	DW ₁₀ (δ_C) (99)	Littérature (δ_C)	Position	DW ₁₀ (δ_C) (99)	Littérature (δ_C)
1	33,5	33,8	16	25,6	25,8
2	25,9	26,3	17	47,8	47,5
3	70,2	70,9	18	53,7	53,6
4	48,0	47,9	19	72,1	73,2
5	48,7	49,2	20	41,3	41,5
6	19,7	20,1	21	25,7	26,2
7	33,0	33,3	22	37,5	37,7
8	39,6	40,2	23	23,2	24,4
9	47,0	46,6	24	179,9	181,3
10	37,5	37,8	25	12,2	13,0
11	23,2	23,9	26	15,9	16,7
12	128,2	129,4	27	23,4	24,3
13	138,4	138,4	28	180,9	180,7
14	41,6	41,6	29	25,8	27,2
15	28,1	28,4	30	15,1	16,2

II.2.1.12. Identification du composé DW₃

DW₃ a été isolé de *D. welwitschii* sous forme de poudre amorphe blanche dans l'hexane. Il est soluble dans le CH₂Cl₂ et donne une coloration rouge violacée avec le test de Liebermann-Büchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre RMN¹H (Fig 44) révèle la présence de :

- Six singulets de trois protons chacun à δ_H 0,83 ; 0,84 ; 0,96 ; 1,02 ; 1,05 et 1,11 caractéristiques des 6 groupements méthyles angulaires.
- Deux doublets de 3 protons chacun à δ_H 0,91 et 0,92 de constante de couplage J = 3,0 Hz correspondant respectivement aux protons des méthyles C-29 et C-30 des tritèrènes de la série des urs-12-ène (Ageta et Arai, 1983)

- Un doublet dédoublé à δ_H 4,55 (1H, dd, $J = 6,3$ et $7,8$ Hz) caractéristique du proton H-3 des triterpènes acétoxylés en C-3 (Connolly *et al.* ; 1991).
- Un large triplet à δ_H 5,18 (1 H, t, $J = 3,6$ Hz) caractéristique du proton H-12 des urs-12-ène (Connolly *et al.* ; 1991).
- Un singulet à δ_H 2,09 (3H, s) attribuable au méthyle d'un groupement acétyle.

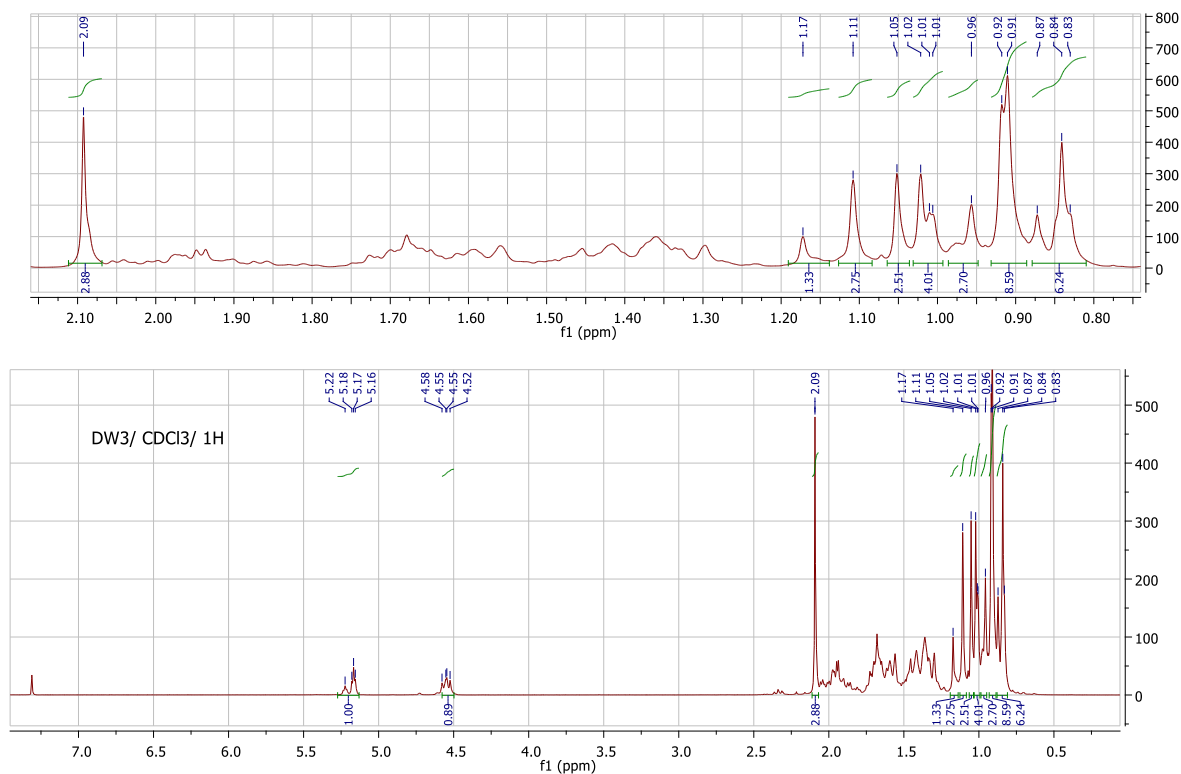


Figure 44: Spectre de RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz) de DW₃

Son spectre de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl₃, Fig 45) présente :

- Un signal à δ_C 171,0 attribuable au carbonyle d'ester ;
- Deux signaux à δ_C 124,3 et 139,6 attribuables respectivement aux carbones C-12 et C-13 du squelette de type urs-12-ène (Mahato *et al.*, 1994)
- Un signal à δ_C 80,9 attribuable au carbone C-3 des triterpènes acétoxylés.

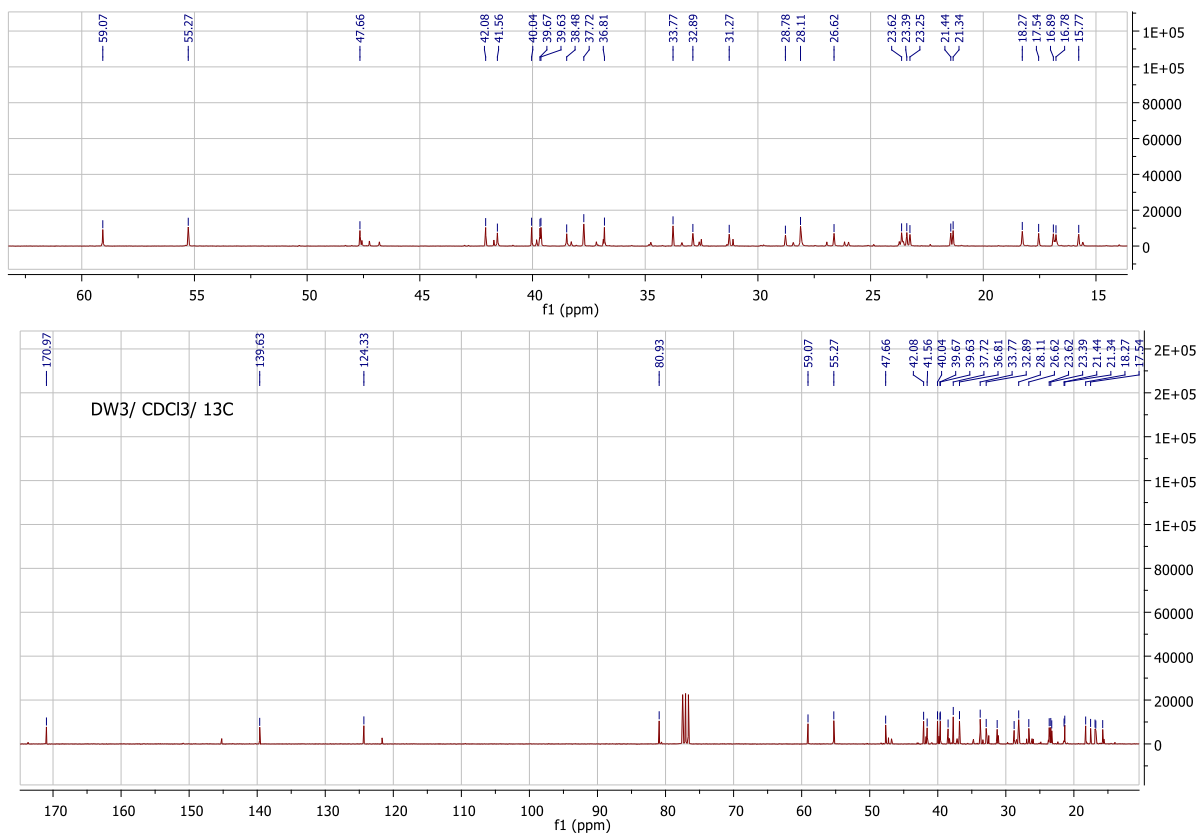


Figure 45: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (CDCl_3 , 75 MHz) de DW3

L'ensemble de ces données spectrales nous permet d'attribuer à DW3 la structure (**100**) qui est celle de l'acétate de l' α -amyrine (Ebajo et al., 2015) qui possède une activité anti-inflammatoire (Okoye et al., 2014).

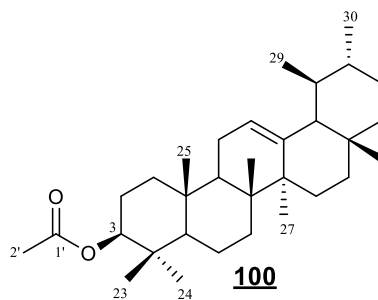


Tableau 24: Données spectrales de RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz,) de de DW₃ comparées à celles de l'acétate de l'α -amyrine de la littérature RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) (Ebajo et al., 2015)

Position	DW ₃ (δ _C) (100)	Littérature (δ _C)	Position	DW ₃ (δ _C) (100)	Littérature (δ _C)
1	38,5	38,4	17	33,8	33,7
2	23,6	23,8	18	59,1	59,0
3	80,9	80,8	19	39,6	39,6
4	37,7	37,9	20	39,7	39,6
5	55,3	55,4	21	31,3	31,2
6	18,3	18,4	22	41,6	41,5
7	32,9	32,9	23	14,8	14,5
8	39,6	39,6	24	28,1	28,1
9	47,7	47,7	25	16,9	16,3
10	36,8	36,6	26	16,8	16,0
11	21,4	21,7	27	21,3	19,4
12	124,3	124,2	28	17,0	18,1
13	139,6	139,5	29	17,5	17,5
14	42,1	42,0	30	21,4	21,4
15	28,1	27,6	1'	171,0	171,0
16	26,6	26,7	2'	22,3	21,4

II.2.1.13. Identification du composé DW₈.

DW₈ est obtenu sous forme de poudre blanche dans le système Hex-AE (85:15). Il est soluble dans le méthanol et donne une coloration violette au test de Liebermann-Burchard, caractéristique des triterpènes. L'analyse combinée des spectres de RMN ¹H et ¹³C permet de lui attribuer la formule brute C₃₀H₄₈O₃ renfermant 7 insaturations.

L'analyse du spectre de RMN ¹H (Fig 46) de DW₈ montre la présence de :

- Sept (7) singulets intenses de 3 protons chacun entre 0,91 et 1,31 ppm ;

- Un singulet large mal résolu à δ_H 2,60 (1H, sl) caractéristique du signal du proton H-18 des oléan-12-ènes (Furuya et al., 1987). D'autre part, le déplacement chimique élevé de ce proton H-18 nous suggère la présence d'un groupement attracteur d'électrons en position C-17;
- Un doublet large à δ_H 3,03 (1H, sl) attribuable au proton de l'oxyméthine en C-3 ;
- Un proton oléfinique à δ_H 5,34 (1H, sl) caractéristique du proton H-12 des oléan-12-ènes (Furuya et al., 1987).

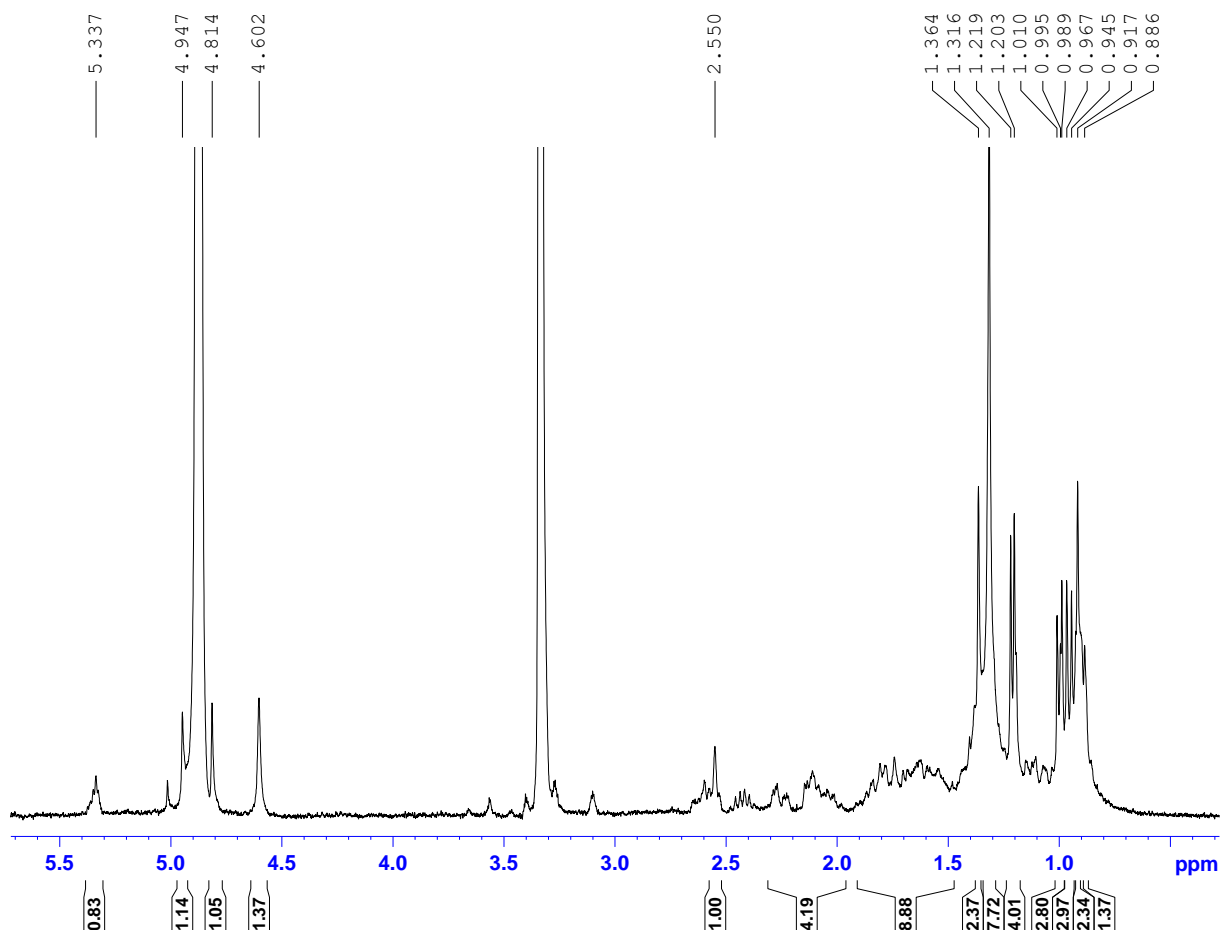


Figure 46 : Spectre de RMN ^1H (MeOD, 300 MHz) de DW₈

Ces informations sont en accord avec le spectre de RMN ^{13}C (Fig.47) où l'on observe respectivement à δ_C 121,5 et δ_C 143,8 les signaux des carbones C-12 et C-13 des oléan-12-ènes (Mahato et Kundu, 1994). La présence du groupement hydroxyle en position C-3 qui raisonne à δ_C 79,0. Sur ce spectre, nous remarquons à δ_C 178,2 le signal du carbonyle d'un acide suggérant la présence d'un groupement carboxyle dans le composé DW₈.

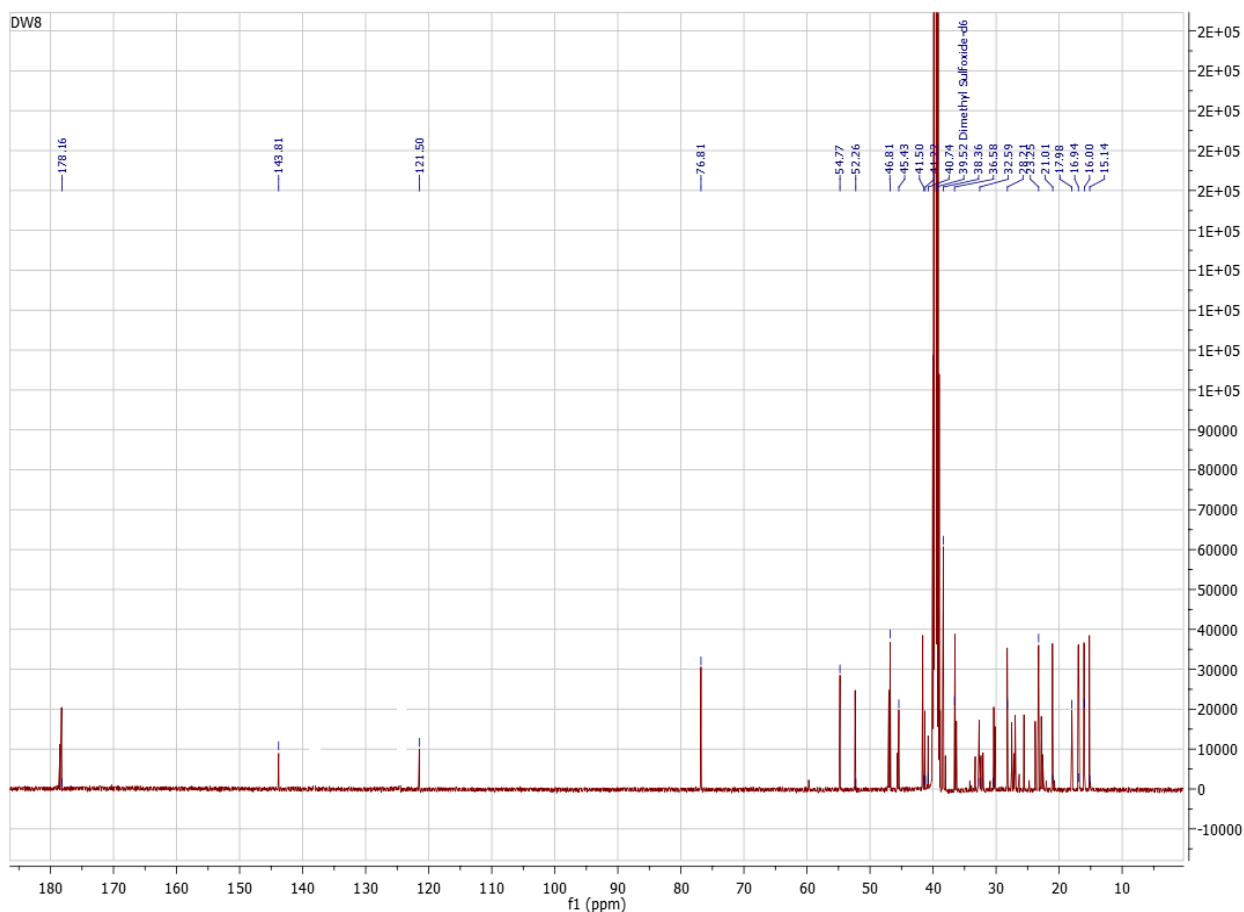


Figure 47: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (MeOD, 75 MHz) de DW₈

Toutes ces données physiques et spectroscopiques comparées à celles décrites dans la littérature (Martins *et al.*, 2013), nous permettent d'identifier DW₈ à l'acide oléanolique (**101**). Il présente des activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anti-HIV (Okoye *et al.*, 2014).

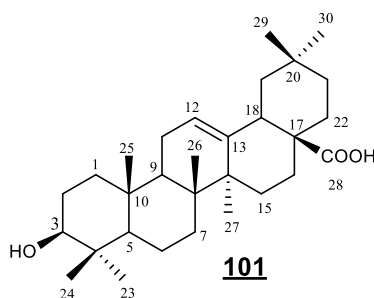


Tableau 25 : Données spectrales de RMN 13C (CDCl₃, 75 MHz) de DW₈ comparées à celles de l'acide oléanolique RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz) (Martins et al., 2013)

N _o	DW ₈ (δ _C) (101)	Littérature δ _C	N _o	DW ₈ (δ _C) (101)	Littérature δ _C
1	38,4	39,9	16	23,2	23,8
2	28,2	28,1	17	46,8	46,7
3	76,9	78,2	18	41,2	42,1
4	39,5	39,4	19	45,5	46,6
5	54,8	55,9	20	30,4	31,0
6	18,0	18,8	21	32,6	33,9
7	32,6	33,4	22	31,8	33,2
8	39,5	39,8	23	28,2	28,8
9	52,2	48,2	24	16,9	16,5
10	36,6	37,4	25	15,1	15,6
11	23,3	23,8	26	17,9	17,5
12	121,6	122,6	27	25,4	26,2
13	143,8	144,8	28	178,2	180,0
14	41,5	42,2	29	32,6	33,4
15	28,2	28,4	30	23,7	23,8

II.2.2. Les stéroïdes

II.2.2.1. Identification du composé DW₁.

DW₁ a été obtenu *D. welwitschii* sous forme de paillettes blanches dans le mélange Hex-AE (9 : 1). Il est Soluble dans le CH₂Cl₂ et donne une coloration rouge violacé avec le test de Liebermann-Büchard caractéristique des stéroïdes.

Le spectre de RMN¹³C (**Fig 48**) révèle 29 signaux de carbone. Les signaux caractéristiques sont observés à δ_C 129,4 et 138,2 caractéristiques des Δ²²-stérols (**Rubinstein et al., 1976**), d'autres à δ_C 117,5 et 139,6 qui sont caractéristiques des Δ⁷-stérols (**Jahan et al., 1995**). On observe également un signal à δ_C 71,1 attribuable à l'oxyméthine en C-3. La configuration β a été établie par comparaison des spectres RMN¹H et RMN¹³C du Spinastérol (**Ragasa et Lim, 2005**).

Son spectre RMN¹H (**Fig. 49**) montre six groupements méthyles dont deux singulets à δ_H 0,59 et 0,84, un doublet de six protons à δ_H 0,84 de constante de couplage 6,3 Hz. Un doublet de trois protons à δ_H 1,07 de constante de couplage 6,6 Hz et un triplet de trois protons de constante de couplage 9,3 Hz à δ_H 0,88. Cette information suggère la nature tétracyclique de notre composé.

Dans les champs faibles, on observe les signaux du proton d'oxyméthine en position 3 à δ_H 3,64 (1H, m) ainsi que les signaux de trois protons oléfiniques à δ_H 5,21 (2H, *dd*, 15,0 Hz, 8,7 Hz), et δ_H 5,09 (1H, *dd*, $J = 15,0$ Hz, 8,4 Hz) attribuables respectivement aux protons en position 7, 23 et 22 du Spinastérol (**Ragasa et Lim, 2005**).

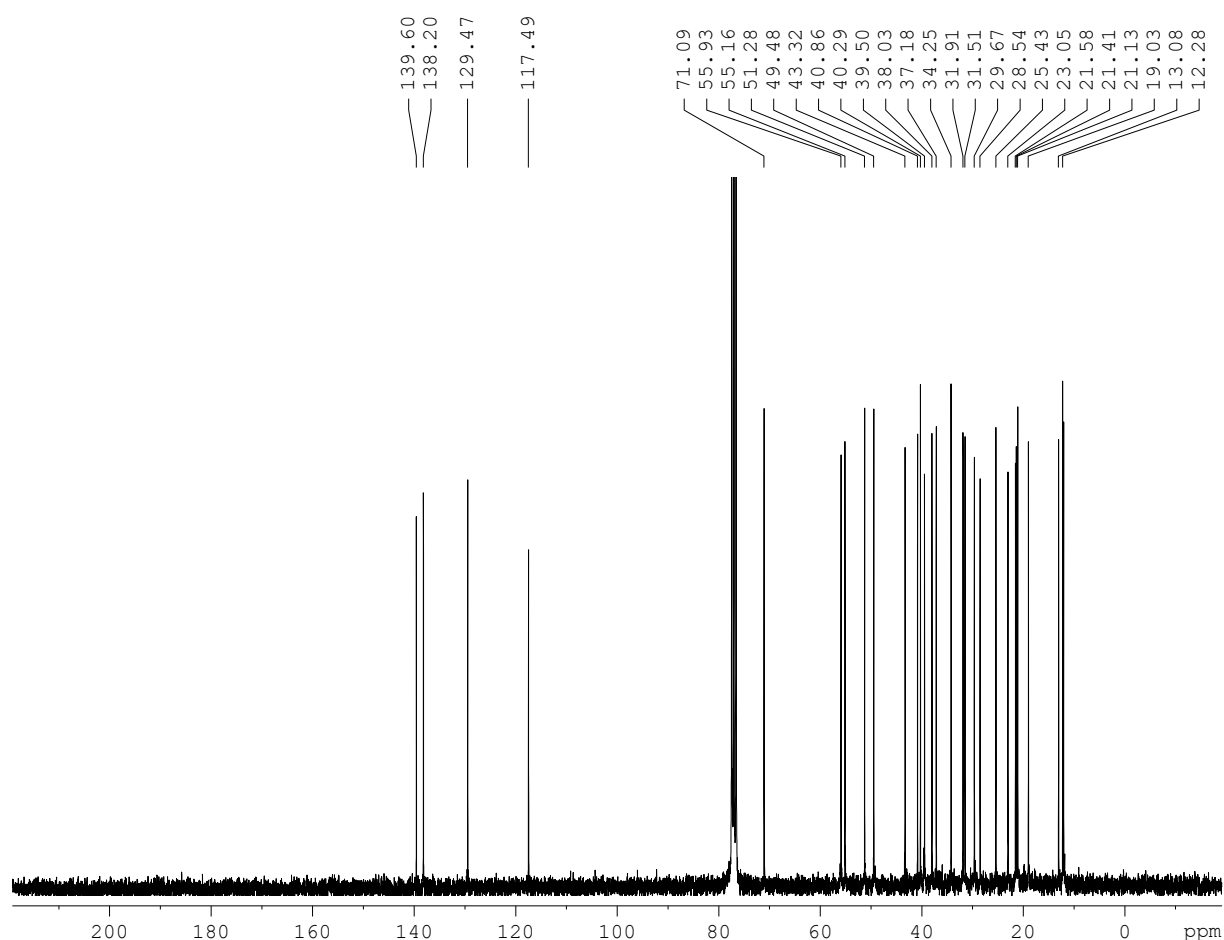


Figure 48: Spectre de RMN ¹³C découplé large bande (CDCl₃, 75 MHz) de DW₁

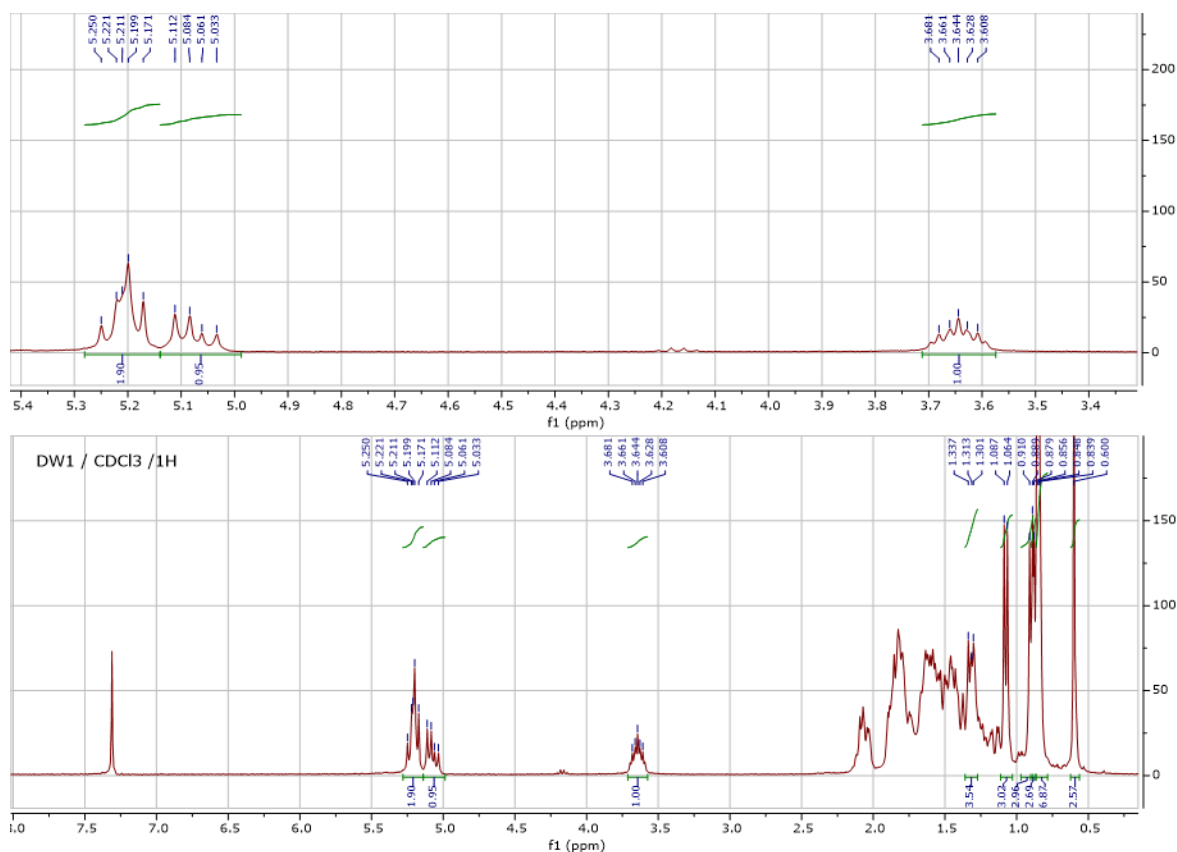


Figure 49: Spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de DW_1

Toutes ces données nous ont permis d'attribuer à DW_1 la structure (**102**) qui est celle du spinastérol (**Ragasa et Lim, 2005**). Il a été démontré que le spinastérol affecte la croissance de certaines lignées cellulaires cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-231), ainsi que la croissance des cellules cancéreuses cervicales (HeLa) (**Jeon et al. 2005**). Ce composé a également un effet inhibiteur contre la biosynthèse de la prostaglandine produite par les enzymes COX-1 et COX-2 (**Faheem et al., 2013**).

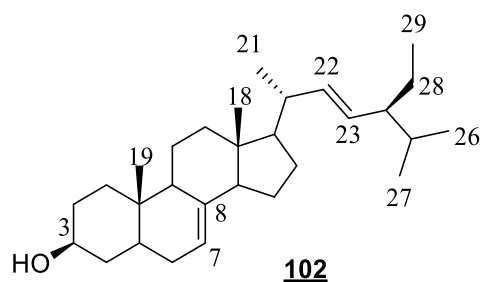


Tableau 26: Données RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) de DW₁ comparées à celles de la littérature RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) (Ragasa et Lim, 2005).

Position	DW ₁ (δ _C) (102)	Littérature (δ _C)	Position	DW ₁ (δ _C) (102)	Littérature (δ _C)
1	37,2	37,2	16	28,6	28,5
2	31,5	31,5	17	55,9	55,8
3	71,1	71,1	18	12,1	12,1
4	38,0	38,0	19	13,1	13,1
5	40,3	40,3	20	40,9	40,9
6	29,7	29,7	21	21,1	21,1
7	117,5	117,5	22	138,2	138,2
8	139,6	139,5	23	129,5	129,4
9	49,5	49,5	24	51,3	51,3
10	34,3	34,3	25	31,9	31,9
11	21,6	21,6	26	19,0	19,0
12	39,5	39,5	27	21,4	21,4
13	43,3	43,3	28	25,4	25,4
14	55,2	55,2	29	12,3	12,3
15	23,0	23,0			

II.2.2.2. Identification du composé DWB₃₀

DWB₃₀ a été obtenu des tiges de *D. welwitschi* sous forme de poudre blanche. Il est soluble dans la pyridine, donne une coloration bleue/vert au test de Liebermann-Burchard et répond positivement au test de Molish caractéristique des stéroïdes glycosilés. L'analyse combinée de ses spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C permet de lui attribuer la formule brute C₃₅H₅₈O₆ renfermant 7 degrés d'insaturations.

Son spectre de RMN¹ H (**Fig. 50**) montre des signaux similaires à ceux du composé DW₁ à la seule différence qu'on note l'apparition des signaux entre 3,50- 4,65 ppm qui après l'examen sont ceux du sucre. Il s'agit des signaux à δ_H 3,50 (1H, t, 5,1 Hz) ; 3,68 (1H, t, 5,1 Hz) ; 3,66 (1H, t, 5,1 Hz) ; 3,67 (1H, dd, 6,0 et 15,0 Hz) ; 3,81 (1H, dd, 6,0 et 15,0 Hz) et du proton anomérique qui apparaît à δ_H 4,38 (1H, d, 10,5 Hz). Ceci révèle que le sucre est le β-D-glucose.

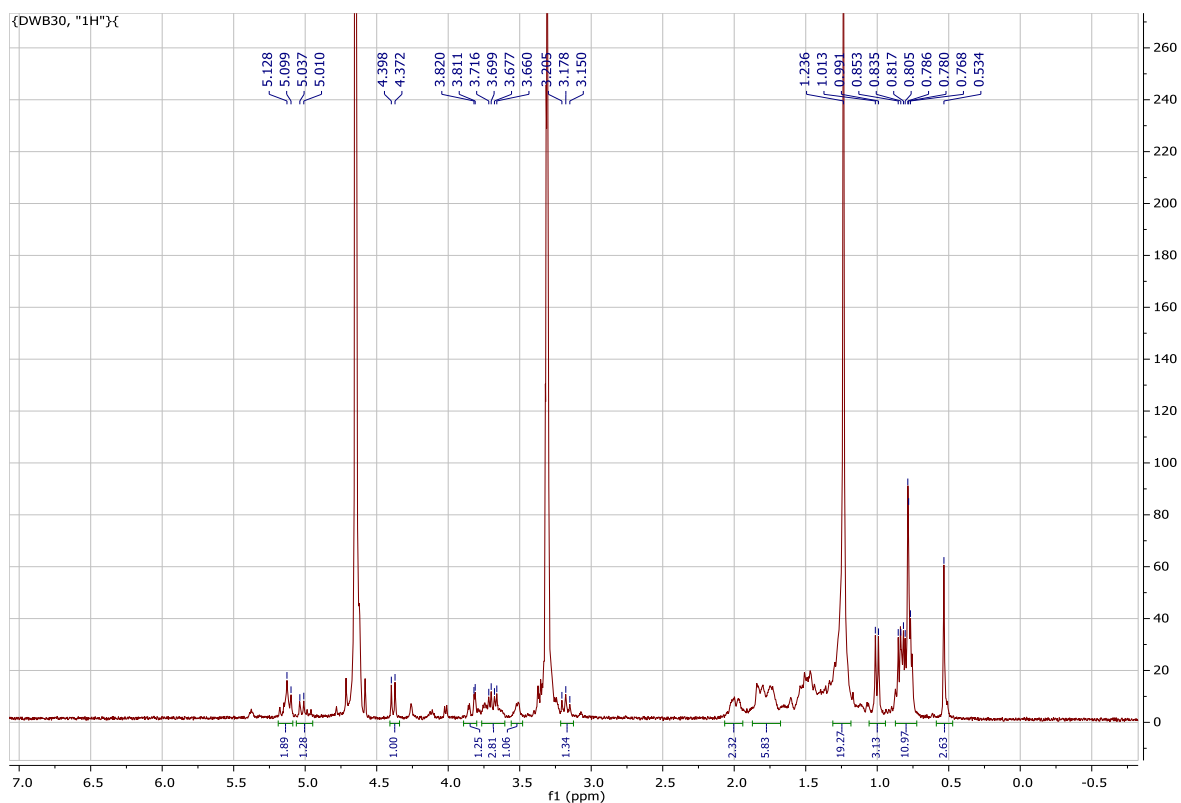


Figure 50: Spectre de RMN ^1H (Pyridine- d_5 , 300 MHz) de DWB30

L'analyse de son spectre de RMN ^{13}C (Fig.51) DEPT inclus ressort un total de 35 signaux comprenant 6 méthyles ; 10 méthylènes ; 11 méthynes- ; et 3 carbones quaternaires. Les signaux du glucose apparaissent à δ_{C} 102,5(C-1') ; 63,3(C-6') ; 78,7(C-5') ; 72,0(C-4') ; 77,4(C-3') ; 75,6(C-2'). Cependant les 29 signaux restants inclus 6 CH_3 - ; 9 CH_2 - ; 16 CH - ; et 3 C. L'ensemble de ces analyses confirme que l'aglycone est le spinastérol.

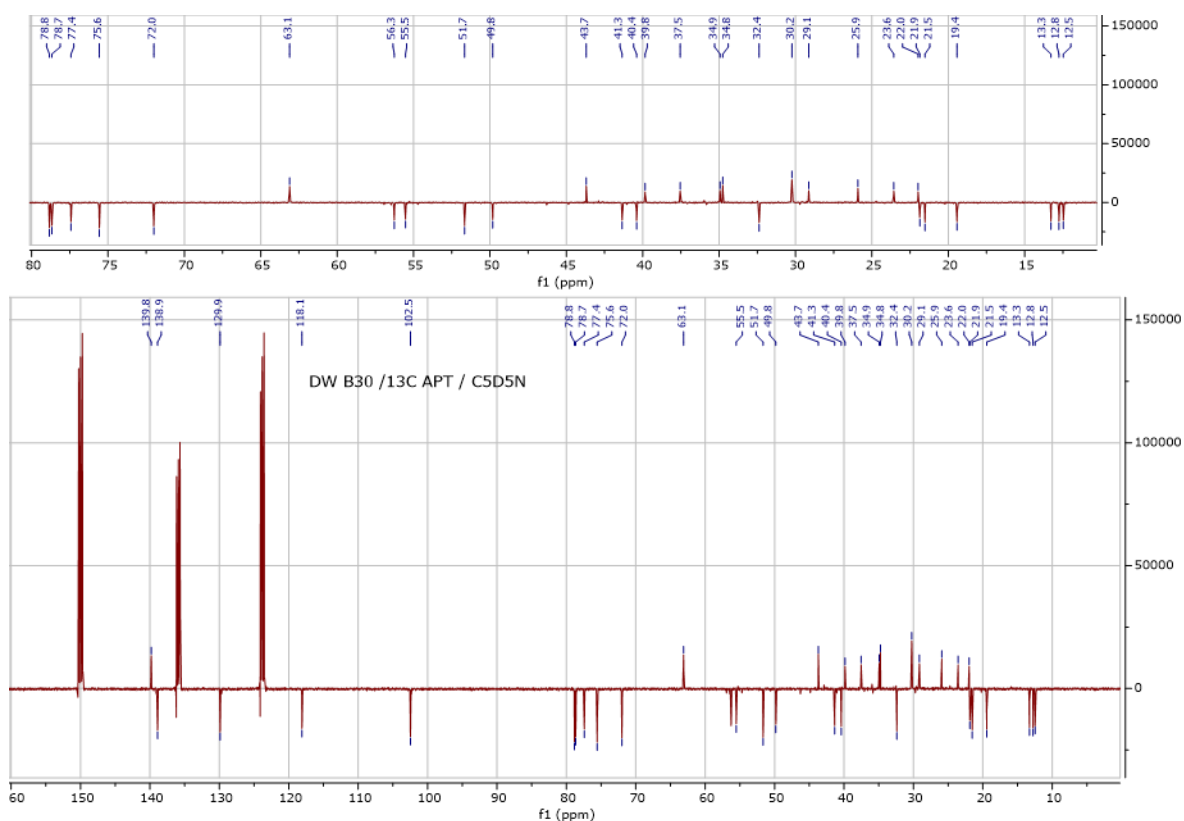


Figure 51: Spectre de RMN¹³C découplé large bande (Pyridine-d₅, 75 MHz) de DWB₃₀

L'ensemble de toutes ces données spectroscopiques comparées à celles décrites dans la littérature (Ferreira Gomes *et al.*, 1998) nous a permis d'attribuer à DWB₃₀ la structure **103** qui est celle du 3-*O*-β-D-glucopyranosyl de spinasterol qui d'après les travaux de Lee *et al.*, 2011 protégerait les fibroblast contre les radiations UV et pourrait être très utile dans le futur dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

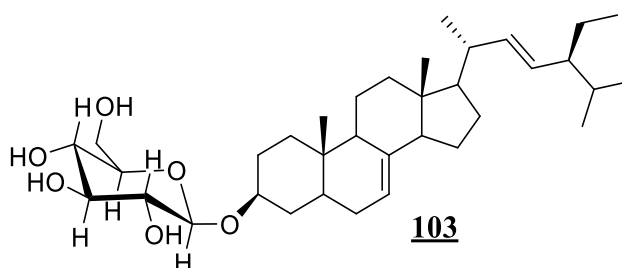


Tableau 27 :Données spectrales de RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) de DWB₃₀ Comparées à celles de RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz) du 3-O-β-D-glucopyranoside de spinastérol (Ferreira Gomes et al., 1998)

Position	DWB ₃₀ (δ _C) (<u>103</u>)	Littérature (δ _C)	Position	DWB ₃₀ (δ _C) (<u>103</u>)	Littérature (δ _C)
1	37,5	37,1	19	13,3	13, 1
2	29, 1	29,0	20	41,3	41,2
3	78,8	78,6	21	21,9	21, 7
4	34,9	34,7	22	138,9	138,7
5	40,4	40,4	23	129,9	129,6
6	30,2	29,4	24	51,7	51, 5
7	118,1	117,9	25	32,4	32,2
8	139,8	139,6	26	21,5	21,4
9	49,8	49,6	27	19,4	19,2
10	34,8	34,5	28	25,9	25,3
11	22,0	23,4	29	12,5	12, 3
12	39,8	39,6	1'	102,5	102,0
13	43,7	43,5	2'	75,6	75,4
14	55,5	55,3	3'	77,4	77,1
15	23,6	23,4	4'	72,0	71,8
16	29,6	29,0	5'	78,7	78,6
17	56,3	56,0	6'	63,1	62,9
18	12,8	12, 6			

II.2.2.3. Identification du composé AMe₅₀

AMe₅₀ a été isolé des écorces d'*A. mannii* sous forme d'une poudre blanche dans le mélange Hex-AE (9:1). Il est soluble dans le chloroforme, répond positivement au test de Liebermann-Burchard en donnant une coloration bleue caractéristique des stérols (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016). L'analyse combinée de ses spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C permet de lui attribuer la formule brute C₂₉H₅₀O renfermant 5 degrés d'nsaturations.

Son spectre de RMN ^{13}C (**Fig 53**) montre la présence de la double liaison Δ^{5-6} qui apparait à δ_{C} 140,9 (C-5) et 121,9 (C-6) indiquant que le composé **AMe₅₀** est un β -sitostérol (**Damasceno et al., 2019**).

Son spectre de RMN ^1H (**Fig 52**) présente entre autres, un ensemble de six signaux intenses entre δ_{H} 0,72 et 1,07 attribuables à six groupes méthyles. On observe sur ce même spectre, d'une part deux signaux remarquables à δ_{H} 5,40 et 3,56 attribuables respectivement au proton d'une double liaison en C-6 et au proton géminé à un groupe hydroxyle en C-3. On observe l'absence de deux doublets dédoublés correspondant aux protons oléfiniques en C-22 et C-23.

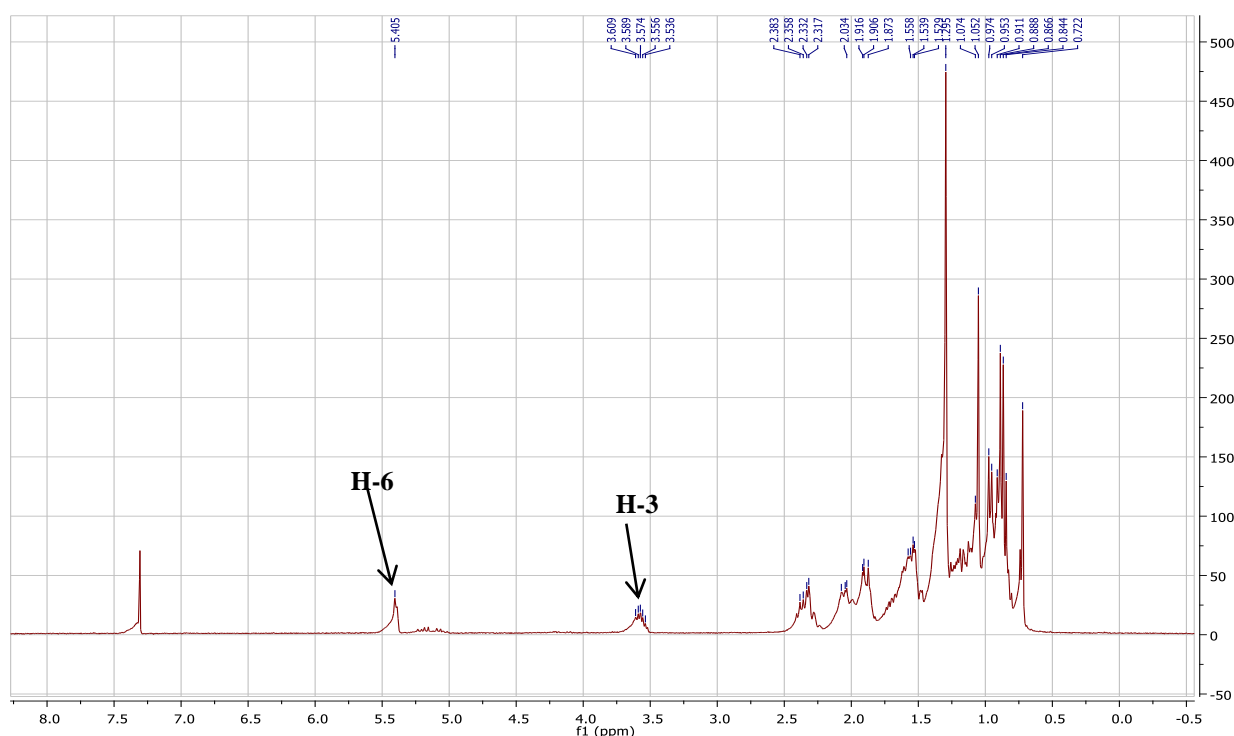


Figure 52: Spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de **AMe₅₀**

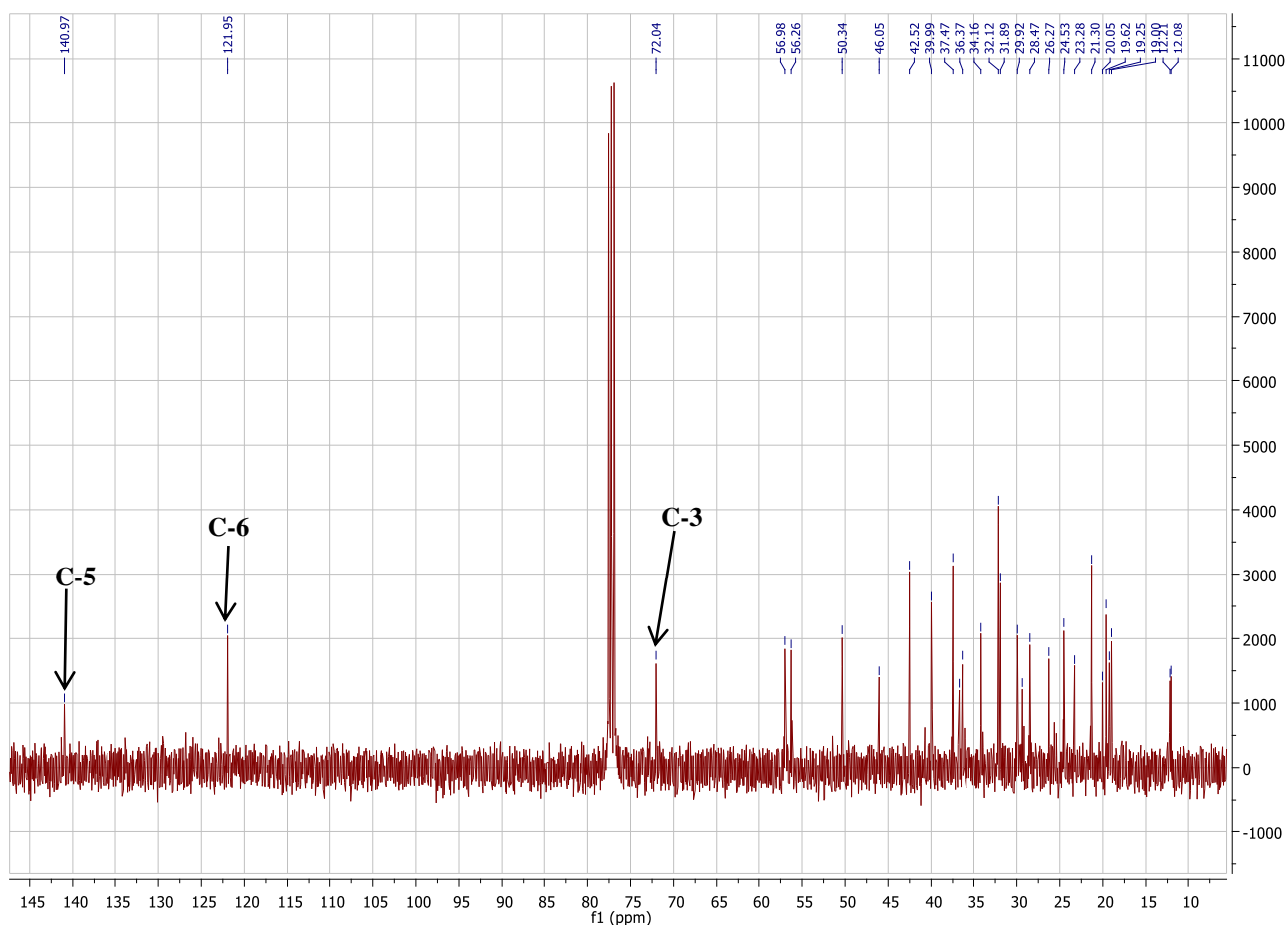
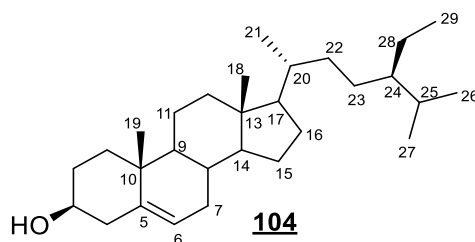


Figure 53: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (CDCl_3 , 150 MHz) de AME_{50}

L'ensemble de toutes ces données spectroscopiques nous conduisent à attribuer à AME_{50} la structure (**104**) qui est celle de β -sitostérol déjà isolé par **Damasceno et al., 2019**. Il a été démontré par **Watcho et al., 2012** que le β -sitostérol favorise l'augmentation de l'érection, ainsi que la durée de l'éjaculation.



II.2.2.4. Identification du composé AMrH₉₀

AMrH₉₀ a été isolé des écorces d'*A. mannii* sous forme d'aiguilles blanches dans mélange Hex-AE (19:1). Il est soluble dans le CH₂Cl₂ et répond positivement au test de Liebermann-Burchard en donnant une coloration bleue caractéristique des stérols. L'analyse combinée des spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C ci-dessous nous permet de lui attribuer la formule brute C₂₉H₄₈O renfermant 6 degrés d'insaturations.

Son spectre de RMN¹H (**Fig. 54**) présente un ensemble de six signaux intenses entre δ_H 0,61- 0,96 dont trois doublets et deux singulets attribuables à six groupes méthyles. On observe sur le même spectre, d'une part deux signaux remarquables à δ_H 3,45(1H, t ; 5,3) et 5,27(1H ; dl ; 7,2 Hz) attribuable respectivement au proton géminé à un hydroxyle et au proton de double liaison en C-6. D'autre part, on observe deux doublets dédoublés résonnant à δ_H 4,90 (1H ; dd ; 8,4 et 15,3 Hz) et à δ_H 5,13(1H ; dd ; 8,4 et 15,3 Hz) correspondant aux protons oléfiniques en C-22 et C-23.

L'analyse de son spectre RMN¹³C (**Fig. 55**) révèle la présence d'un oxyméthine à δ_C 71,8 probablement le carbone C-3 et de quatre carbones oléfiniques à δ_C 121,8 ; 129,3 ; 138,3 et 140,8. Les signaux à δ_C 140,8 et 121,8 sont caractéristiques des carbones de la double liaison Δ^{5-6} les deux autres signaux sont caractéristiques carbones de la double liaison Δ^{22-23} tous appartenant au stigmastérol (**Luhata et Munkombwe, 2015**).

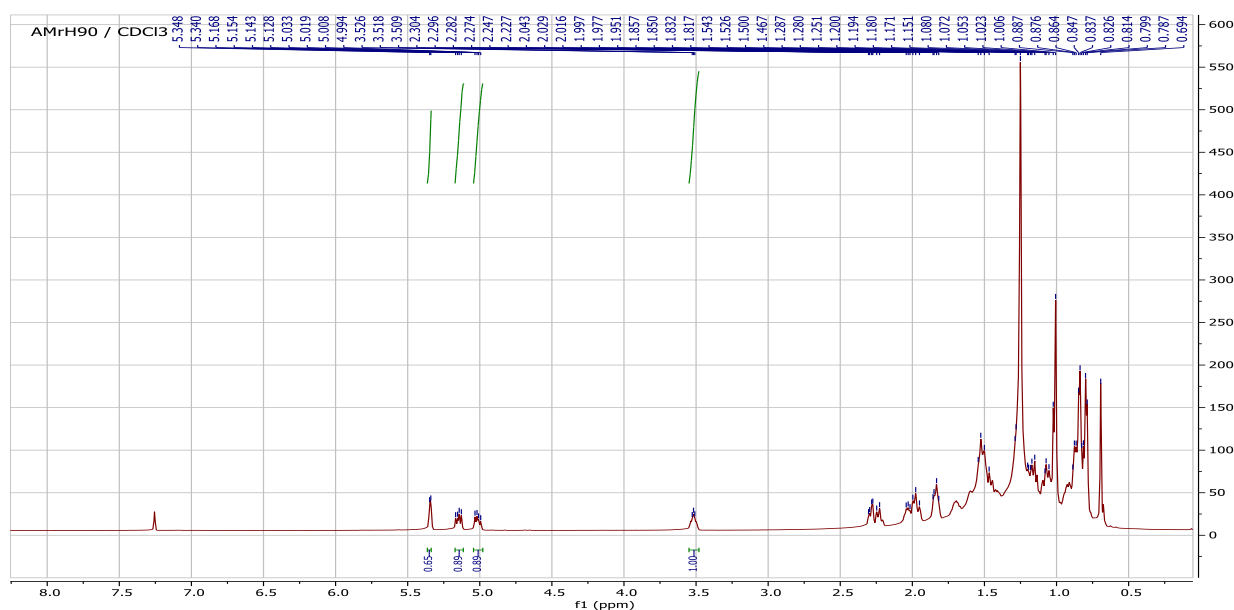


Figure 54: Spectre de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de AMrH₉₀

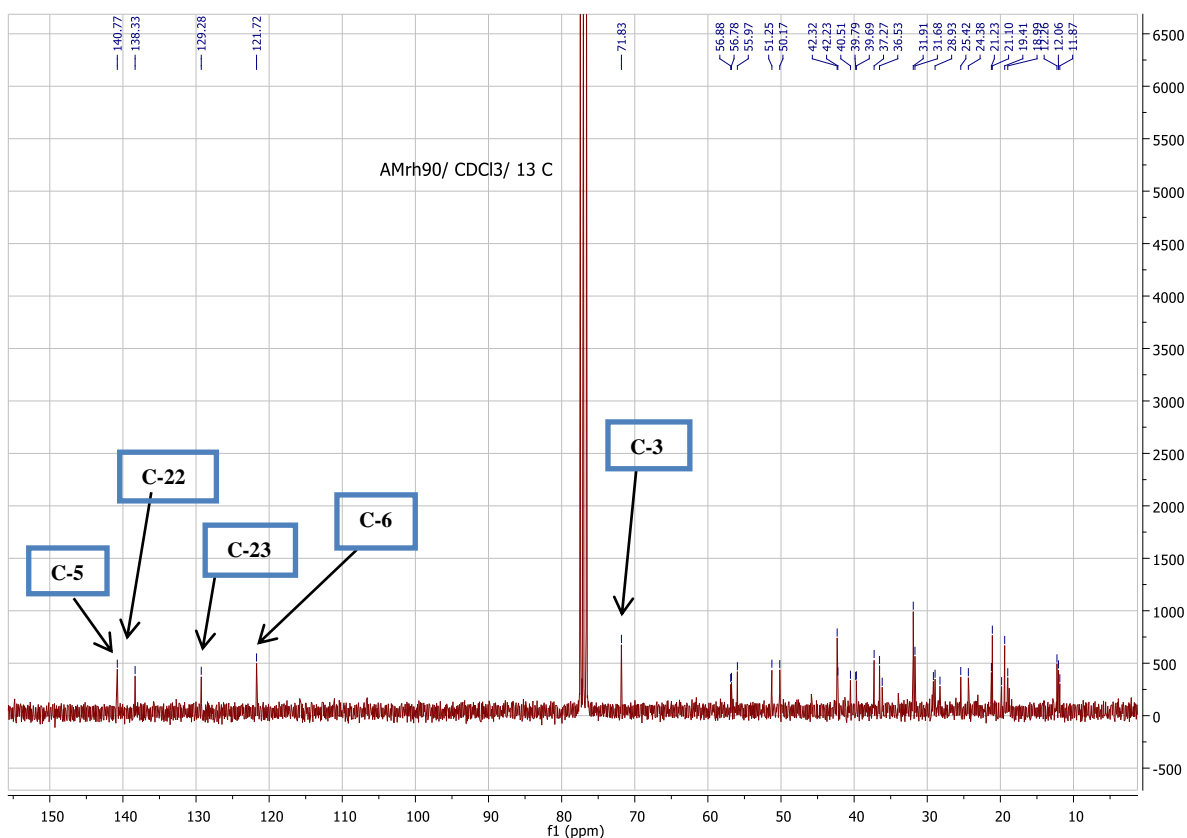


Figure 55 : Spectre de RMN ¹³C découplé large bande (CDCl₃, 75 MHz) de AMrH₉₀

Toutes ces données nous ont permis d'attribuer à AMrH₉₀ la structure (**105**) qui est celle de stigmastérol (Luhata et Munkombwe, 2015). Le stigmastérol est un précurseur dans la production des médicaments stéroïdiens (contraceptifs, anti-inflammatoire, anabolisant, etc) (Bruneton, 1993 ; Lee et al., 2011).

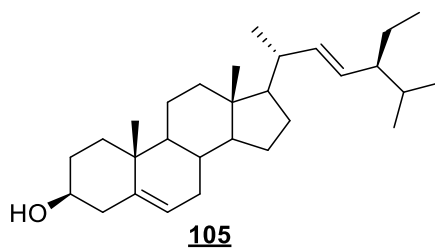


Tableau 28: Données spectrales de RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de AMrH₉₀ comparées à celles de stigmastérol de la littérature RMN¹³C (CDCl₃, 150 MHz) (Luhata et Munkombwe, 2015)

Position	AMrH ₉₀ δ _C (105)	Littérature δ _C	Position	AMrH ₉₀ δ _C (105)	Littérature δ _C
1	37,2	37,6	16	29,4	29,3
2	31,9	32,1	17	55,9	56,2
3	71,8	72,1	18	40,6	40,6
4	42,3	42,4	19	22,7	21,7
5	140,8	141,1	20	50,2	46,1
6	121,7	121,8	21	25,4	25,4
7	31,7	31,8	22	138,3	138,7
8	31,7	31,8	23	129,3	129,6
9	51,2	50,2	24	12,2	12,1
10	36,5	36,6	25	29,7	29,6
11	21,4	21,5	26	21,1	20,2
12	39,7	39,9	27	19,4	19,8
13	42,2	42,4	28	18,9	18,9
14	56,8	56,8	29	12,0	12,2
15	24,4	24,4			

II.2.2.5. Identification du composé AMr₂₆₄

AMr₂₆₄ a été obtenu sous forme de poudre amorphe blanche dans le mélange de solvant CH₂Cl₂-MeOH (19 : 1). Il est soluble dans la pyridine et donne une coloration bleu verte au test de Liebermann-Büchard et une couronne violette au test de Molish caractéristique des glycosides stéroïdiques. L'analyse combinée des spectres de RMN ¹H et ¹³C permettent de lui attribuer, la formule brute C₃₅H₆₀O₆ renfermant 6 degrés d'insaturations.

En effet, son spectre RMN ¹H (**Fig. 56**), on observe deux groupes de signaux :

- L'un principalement entre 0,64 et 5,33 ppm dont un signal à δ_H 5,33 attribuable au proton oléfinique H-6 du squelette stéroïdique, 6 groupements méthyles entre 0,64 et 0,98 et

un multiplet à δ_H 4,06 attribuable au proton H-3 ; la valeur élevée de ce déplacement chimique est en accord avec la présence d'un groupement osidique en C-3 de l'aglycone.

- L'autre entre 4,25 et 5,06 ppm correspondant aux protons de la partie osidique qui a été identifiée au D-glucopyranoside. Parmi ces signaux, on distingue cinq multiplets correspondant au méthylène et aux méthynes et un doublet à 5,05 ppm de constante de couplage de 8,0 Hz attribuable au proton anomérique et suggérant une jonction de stéréochimie β entre l'unité osidique et l'aglycone (Agrawal, 1992).

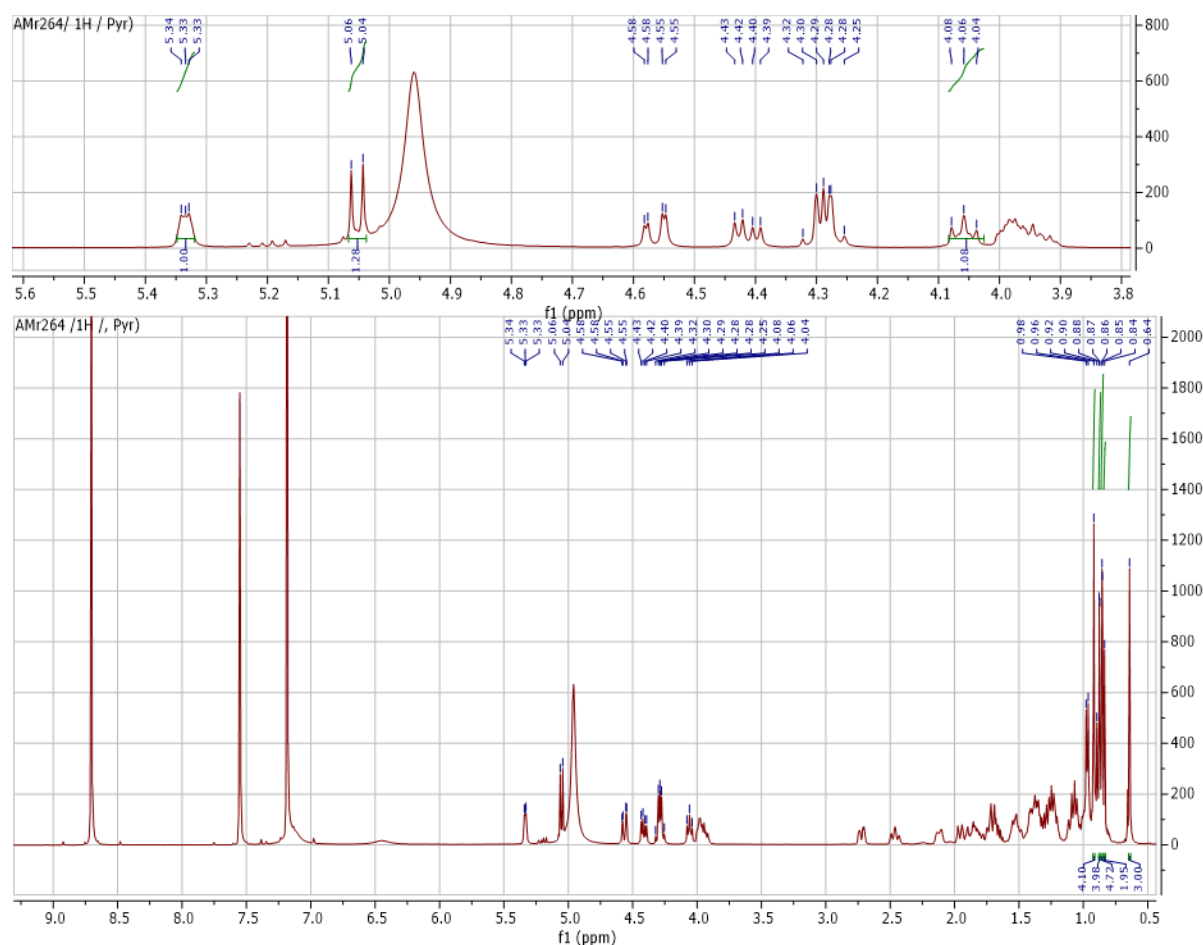


Figure 56: Spectre de RMN 1H (Pyr- d_5 , 300 MHz) de AMr264

Les spectres de RMN ^{13}C et DEPT (Fig. 57 et 58) révèlent la présence de 35 atomes de carbones dont 6 méthyls, 12 méthylènes, 14 méthines et 3 carbones quaternaires. Les Signaux à δ_C 102,4 (C-1') ; 75,1 (C-2') ; 78,2 (C-3') ; 71,5(C-4') ; 78,4 (C-5') et 62,6 (C-6') indiquent la présence d'un glucose.

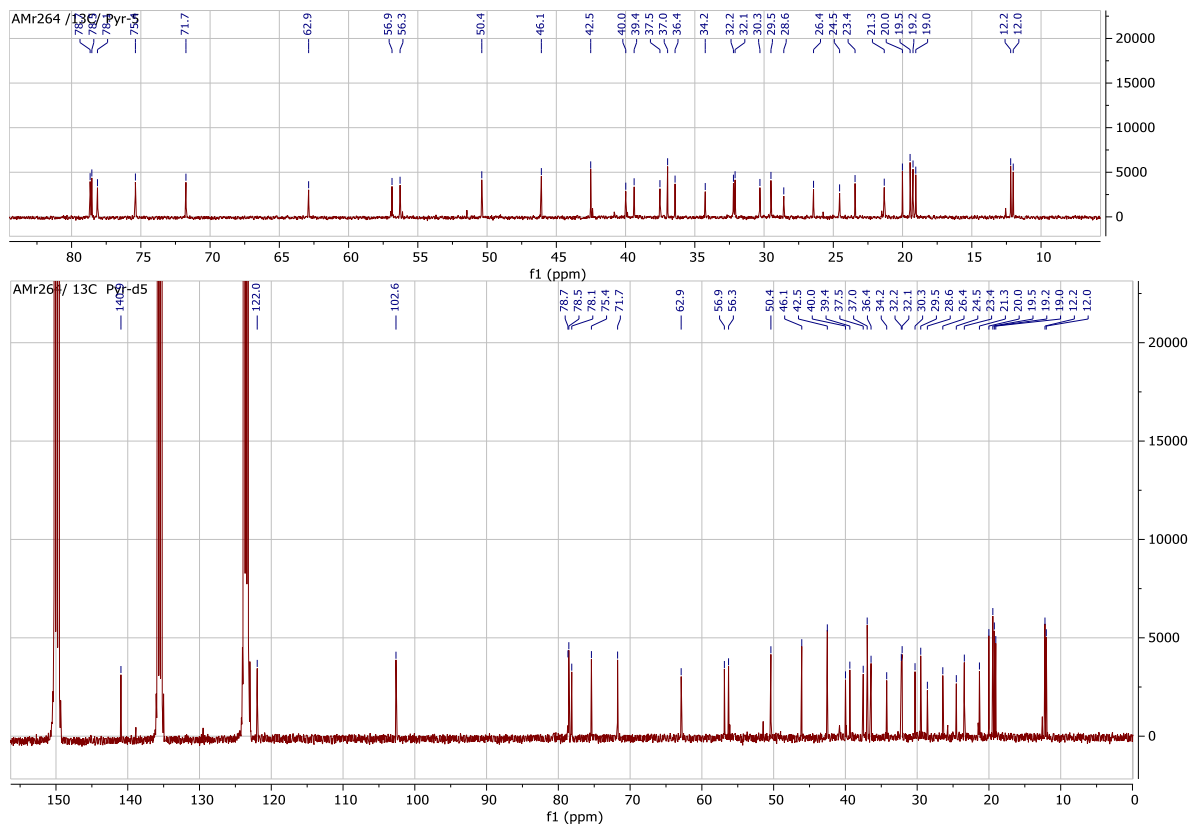


Figure 57: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (Pyr-d5, 75 MHz) de AM_r264

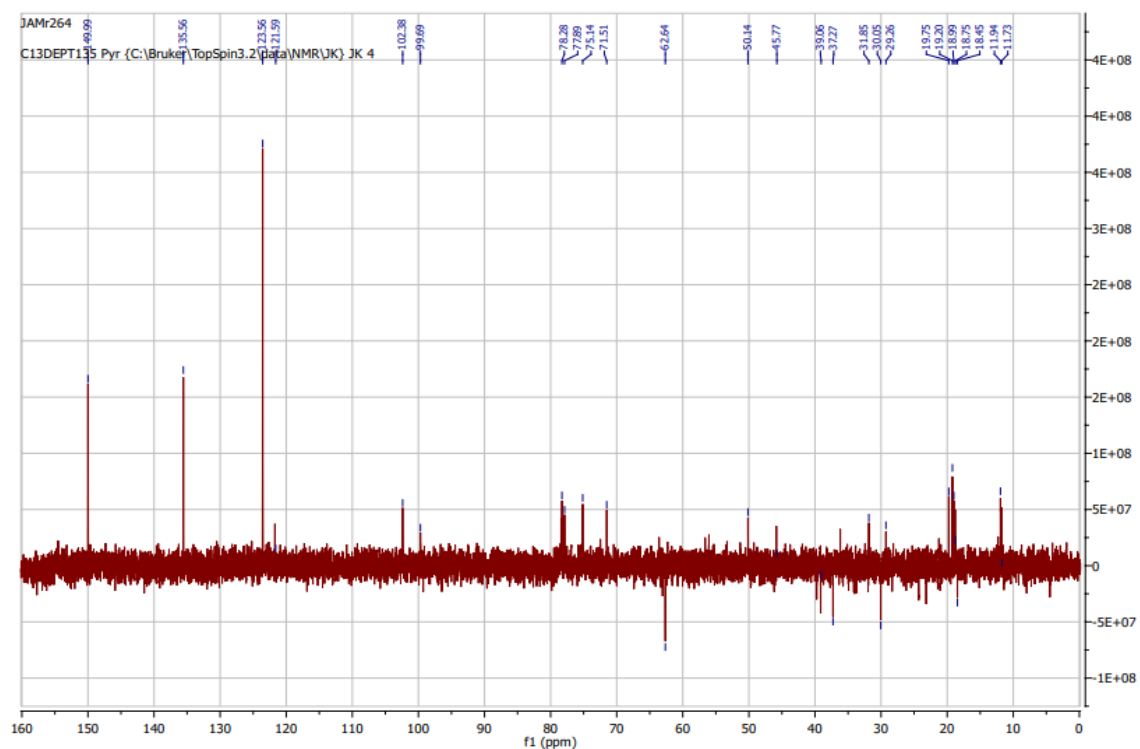


Figure 58: Spectre de DEPT 135 (Pyr-d5, 75 MHz) de AM_r264

Toutes ces données nous ont permis d'attribuer au composé AMr₂₆₄ la structure **106** qui est celle du β -sitostérol -3-O- β -D-glucopyranoside (Luhata et Munkombwe, 2015).

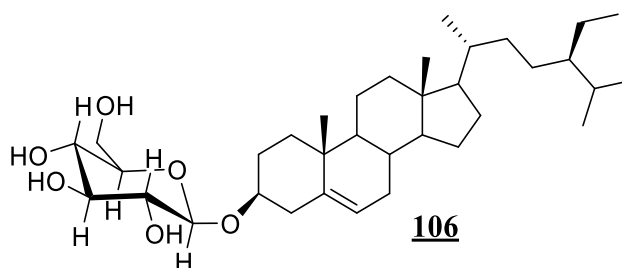


Tableau 29: Données spectrales de RMN ¹³C (Pyr-d₅, 75 MHz) de AMr₂₆₄ comparées à celles de β -sitostérol -3-O- β -D-glucopyranoside de la littérature RMN ¹³C (Pyr-d₅, 150 MHz) (Luhata et Munkombwe, 2015)

Position	AMr264 (δ C)	Littérature (δ C)	Position	AMr264 (δ C)	Littérature (δ C)
	(106)			(106)	
1	37,3	37,3	19	19,2	19,8
2	31,9	30,6	20	36,7	36,3
3	78,5	78,9	21	18,8	19,4
4	39,1	39,7	22	34,0	34,1
5	140,7	141,2	23	26,2	25,4
6	122,3	122,3	24	45,8	46,4
7	32,0	32,4	25	30,1	29,8
8	23,2	22,9	26	19,0	19,6
9	50,1	50,7	27	19,8	20,4
10	36,2	36,4	28	23,3	23,7
11	21,1	20,4	29	11,8	12,1
12	41,0	39,7	1'	102,6	102,9
13	42,3	42,8	2'	75,4	75,7
14	56,6	57,2	3'	78,2	78,4
15	24,3	23,7	4'	71,7	72,0
16	29,3	29,8	5'	78,7	79,1
17	56,1	56,6	6'	62,9	63,2
18	12,0	12,4			

II.2.2.6. Identification du composé AMe457

AMe₄₅₇ a été isolé de l'extrait des écorces d'*A. mannii* sous forme de poudre blanche dans le mélange AE-MeOH (95:5). Il est soluble dans la pyridine et réagit positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des stérols et à celui de Molish caractéristique des sucres. L'analyse combinée de ses spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C nous permet d'attribuer à AMe₄₅₇ la formule brute C₃₅H₅₈O₆ renfermant 7 degrés d'insaturations.

Ses spectres de RMN ¹H (Fig 59) et de RMN ¹³C (Fig 60) sont presque comparables à ceux du stigmastérol (AMrH₉₀). La seule différence est la présence des signaux caractéristiques d'une unité de sucre notamment ceux du proton anomérique à δ_H 5,06 (1H ; d ; 7,6 Hz) et du carbone anomérique à δ_C 102,6 comme l'indique le spectre HMQC (Fig 61). Les signaux des carbones caractéristiques 75,3 (C-2') ; 78,5 (C-3') ; 71,7 (C-4') ; 78,6 (C-5') et 62,8 (C-6') indiquent que l'unité osidique est un glucose.

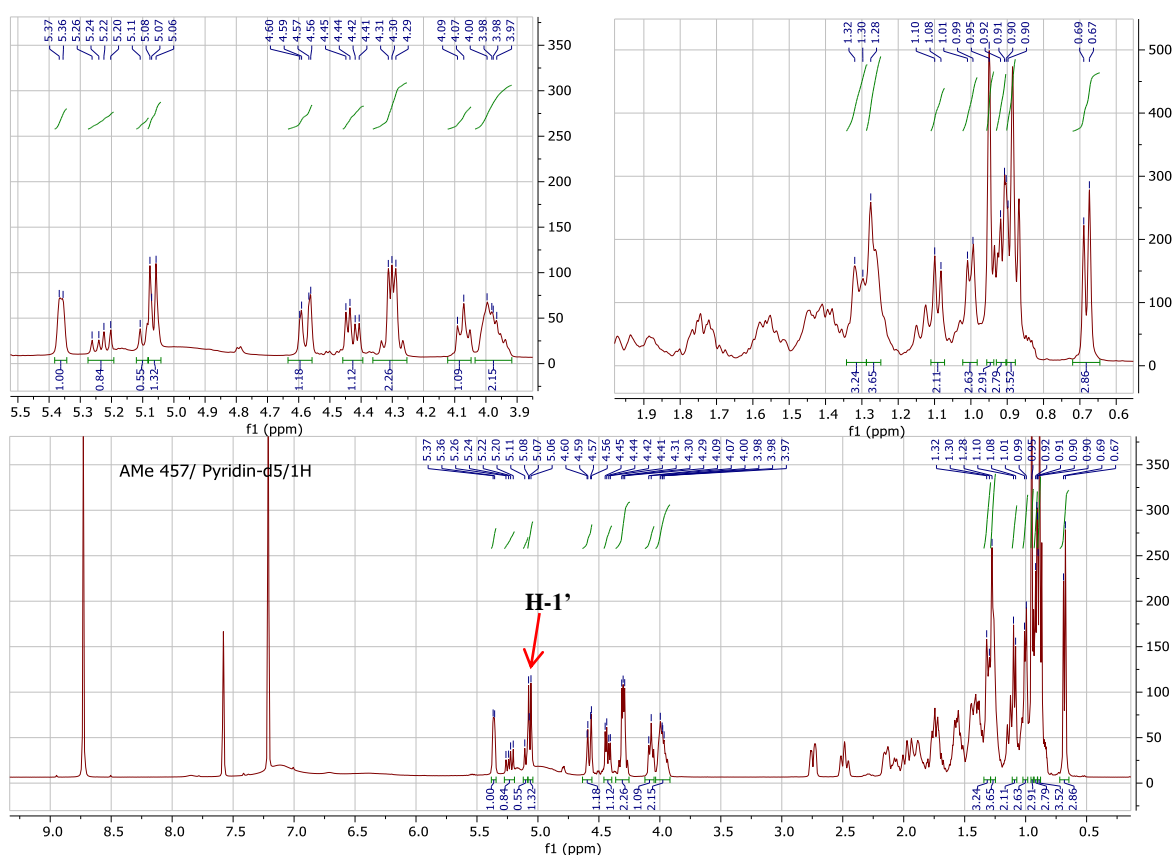


Figure 59: Spectre de RMN ¹H (Pyr-d₅, 400MHz) de AMe₄₅₇

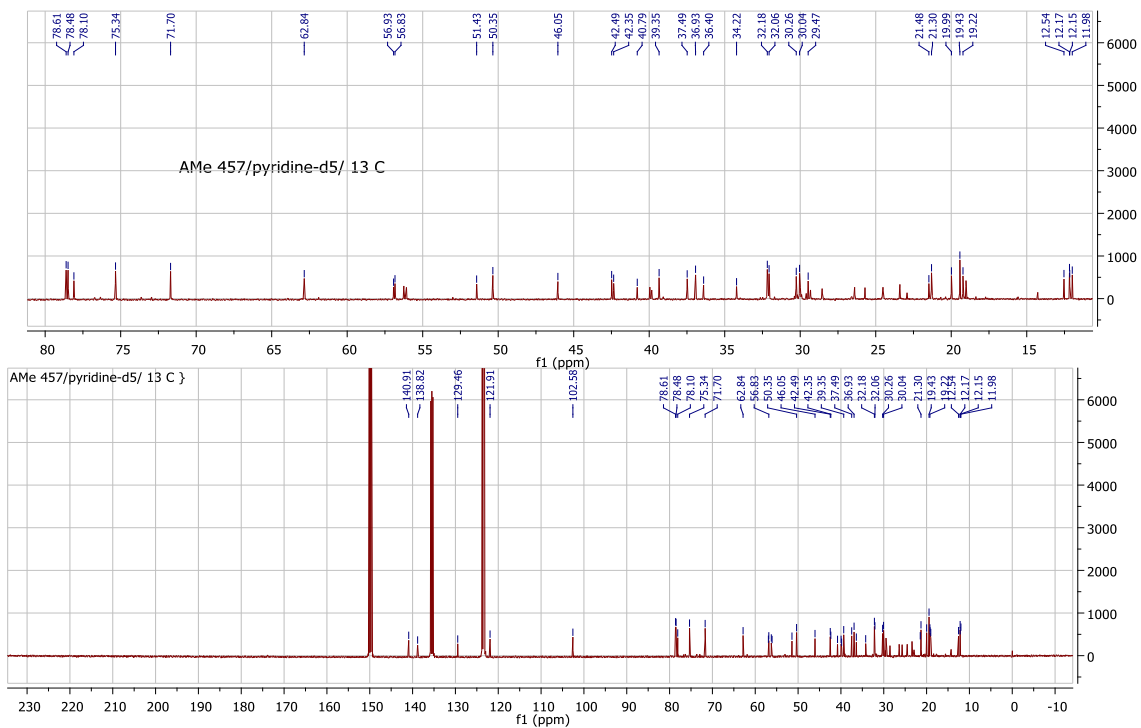


Figure 60: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (Pyr-d5, 100MHz) de AMe₄₅₇

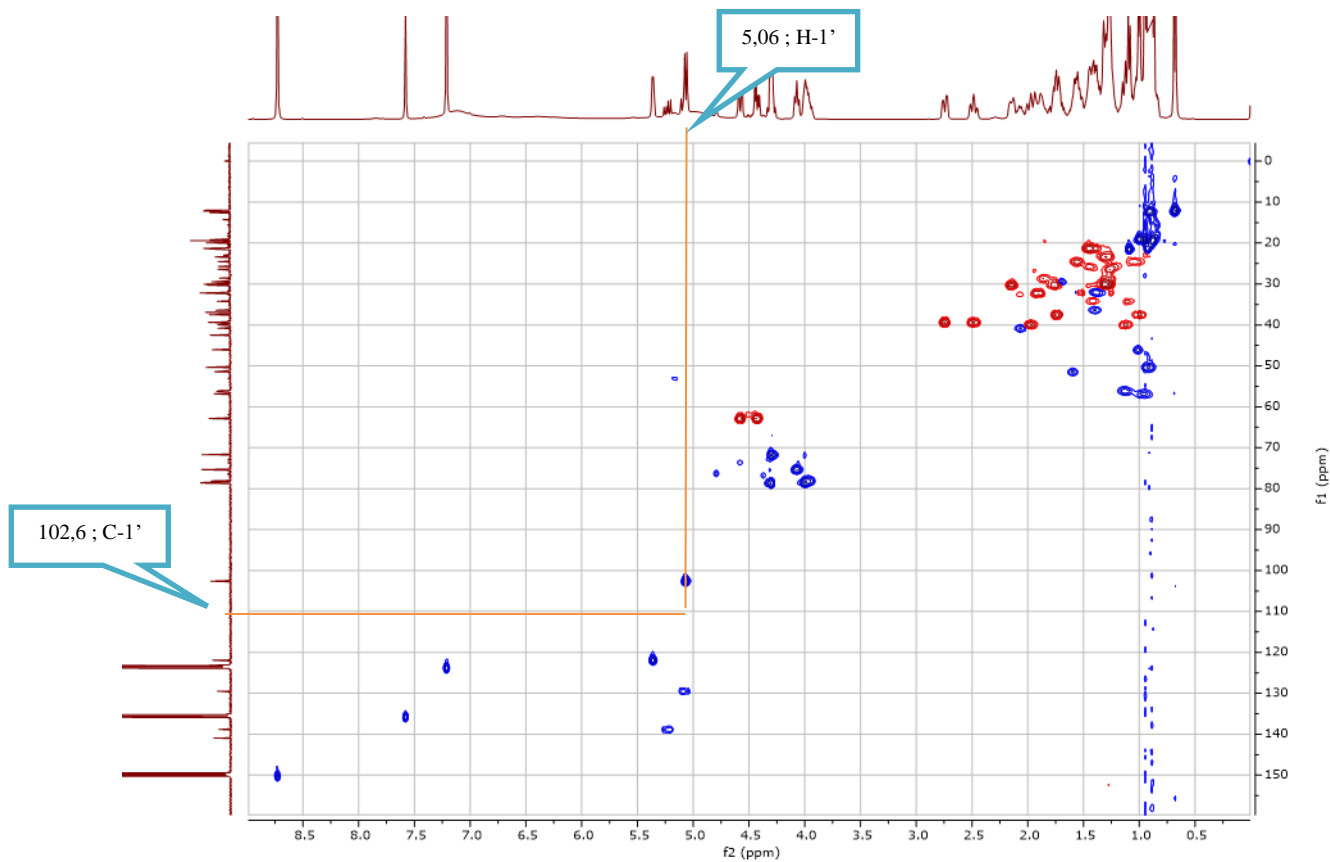


Figure 61: Spectre de HMQC (pyr-d5) de AMe₄₅₇

L'ensemble de toutes ces données comparées à celles de la littérature nous ont permis d'attribuer à AMe₄₅₇ la structure **(107)** suivante qui est celle de 3-*O*-β-D-glucopyranosyl stigmastérol ; Ce composé a montré une activité cytotoxique pour la lignée cellulaire HCT-116 (Damasceno *et al.*, 2019). Il possède des propriétés anti-inflammatoires, anabolisants (Lee *et al.*, 2011).

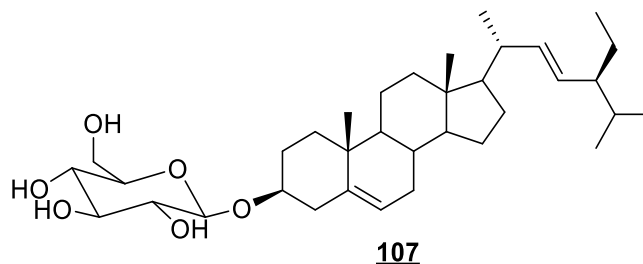


Tableau 30: Données spectrales de RMN 13C (pyr-d5, 75 MHz) de AMe₄₅₇ comparées à celles de 3-*O*-β-D-glucopyranosyl stigmastérol de la littérature RMN 13C (pyr-d5,150 MHz) (Damasceno *et al.*, 2019)

Position	AMe ₄₅₇ (δ_C) (107)	Littérature (δ_C)	Position	AMe ₄₅₇ (δ_C) (107)	Littérature (δ_C)
1	37,3	37,3	19	19,2	19,8
2	31,9	30,6	20	36,7	36,3
3	78,6	78,9	21	18,8	19,4
4	39,1	39,7	22	138,8	34,1
5	140,9	141,2	23	129,5	25,4
6	121,9	122,3	24	45,8	46,4
7	32,0	32,4	25	30,1	29,8
8	23,2	22,9	26	19,0	19,6
9	50,1	50,7	27	19,8	20,4
10	36,2	36,4	28	23,3	23,7
11	21,1	20,4	29	11,8	12,1
12	41,0	39,7	1'	102,5	102,9
13	42,3	42,8	2'	75,3	75,7
14	56,6	57,2	3'	78,1	78,4
15	24,3	23,7	4'	71,7	72,0
16	29,3	29,8	5'	78,5	79,1
17	56,1	56,6	6'	62,8	63,2
18	12,0	12,4			

II.2.3. Les alcaloïdes

II.2.3.1. Caractérisation du composé AMe184/AMra160

AMe₁₈₄ a été obtenu des écorces d'*A. manni* sous forme de cristaux jaunes dans le système Hex-AE (80:20). Il est soluble dans le DMSO et fond entre 199,6-200,8°C. Il répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des phénols et au test de Mayer caractéristique des alcaloïdes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016).

Son spectre de masse ESI-haute résolution (Fig. 62) présente en mode (+), le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 264,0711 ($[M+Na]^+$, C₁₄H₁₁NO₃Na⁺; calc. 264,0637) compatible avec la formule brute C₁₄H₁₁NO₃ et renfermant 10 degrés d'insaturations.

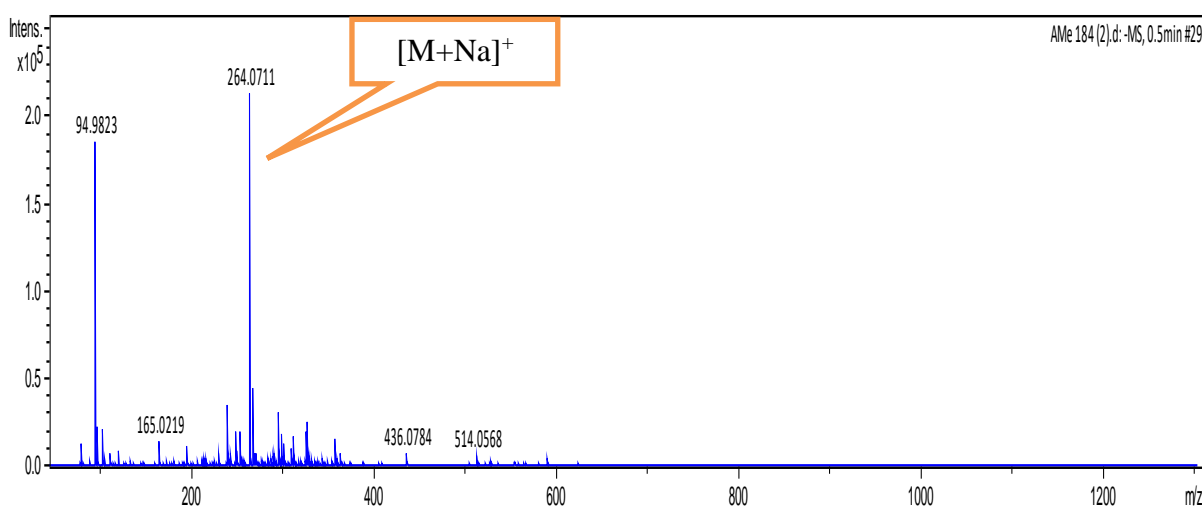


Figure 62: Spectre de masse ESI-MS de AMe₁₈₄

Son spectre IR (KBr) (Fig 62) exhibe des bandes de vibration caractéristiques de groupes fonctionnels à : 3198 cm⁻¹ (OH libre et N-H des amides), 1712cm⁻¹ (C=O) et 1620 cm⁻¹ (C=C).

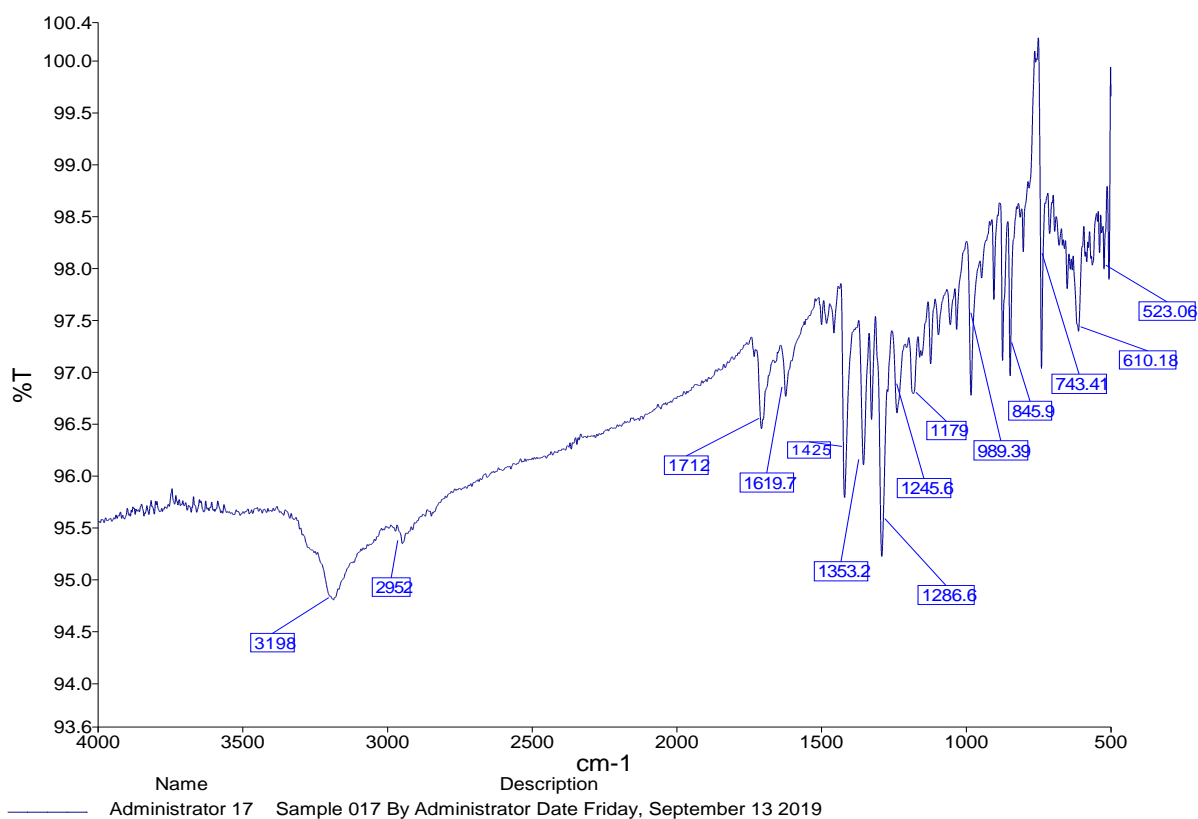
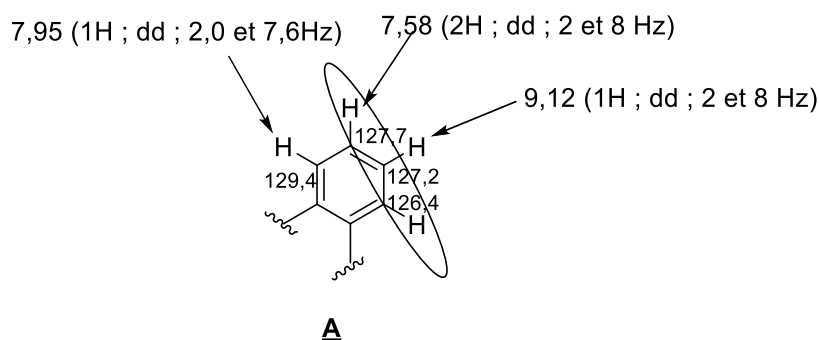


Figure 63: Spectre IR (KBr) de AMe₁₈₄

L'analyse des spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C (**Fig 64** et **67**) couplé au spectre HSQC (**Fig 65**) montre :

– les signaux des protons aromatiques d'un système AMX₂ à δ_H 9,12(1H ; dd ; 2,0 Hz et 8,0 Hz) / δ_C 127,2 ; δ_H 7,95 (1H, dd, 2,0 et 7,6Hz) / δ_C 129,4 et δ_H 7,58 (2H ; dd ; 2,0 et 8,0 Hz) / δ_C 126,4 et 127,7. Ceci a été confirmé par les corrélations COSY (**Fig 66**) entre les protons précédemment mentionnés d'où la sous structure **A** suivante.



– Un signal δ_H 4,03(3H, s) / δ_C 59,9 qui suggère la présence d'un groupe méthoxy dans le composé.

- Un signal a δ_H 10,8(1H, s) suggérant la présence d'un proton porté par un hétéroatome probablement l'azoté.
- Deux autres signaux de protons aromatiques sous forme de singulet à δ_H 7,10 (1H, S) / δ_C 104,3 et à δ_H 7,62(1H, S) / δ_C 113,8 qui suggère la présence d'un noyau aromatique tétrasubstitué d'où la sous-structure **B** suivante.

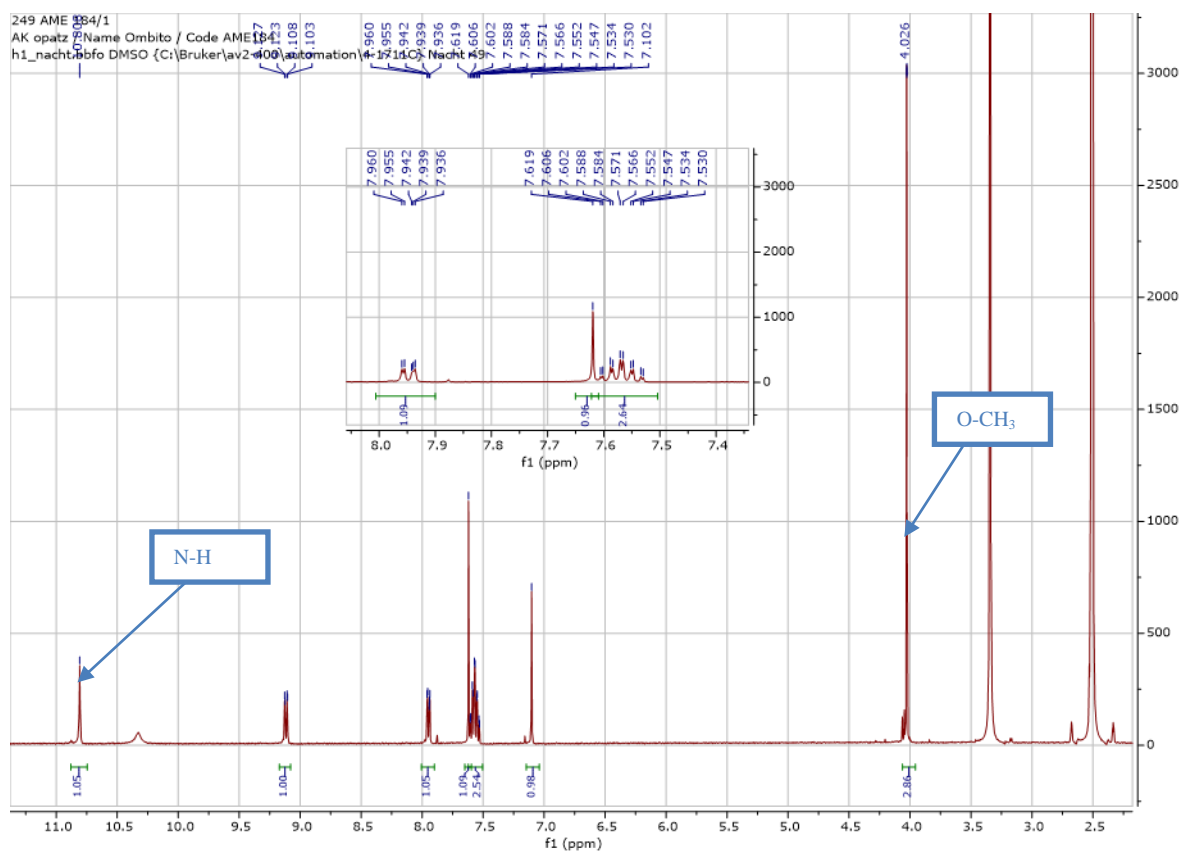
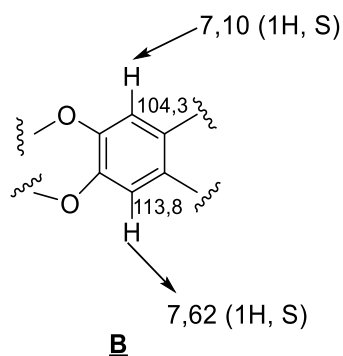


Figure 64: Spectre de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de AMe $_{184}$

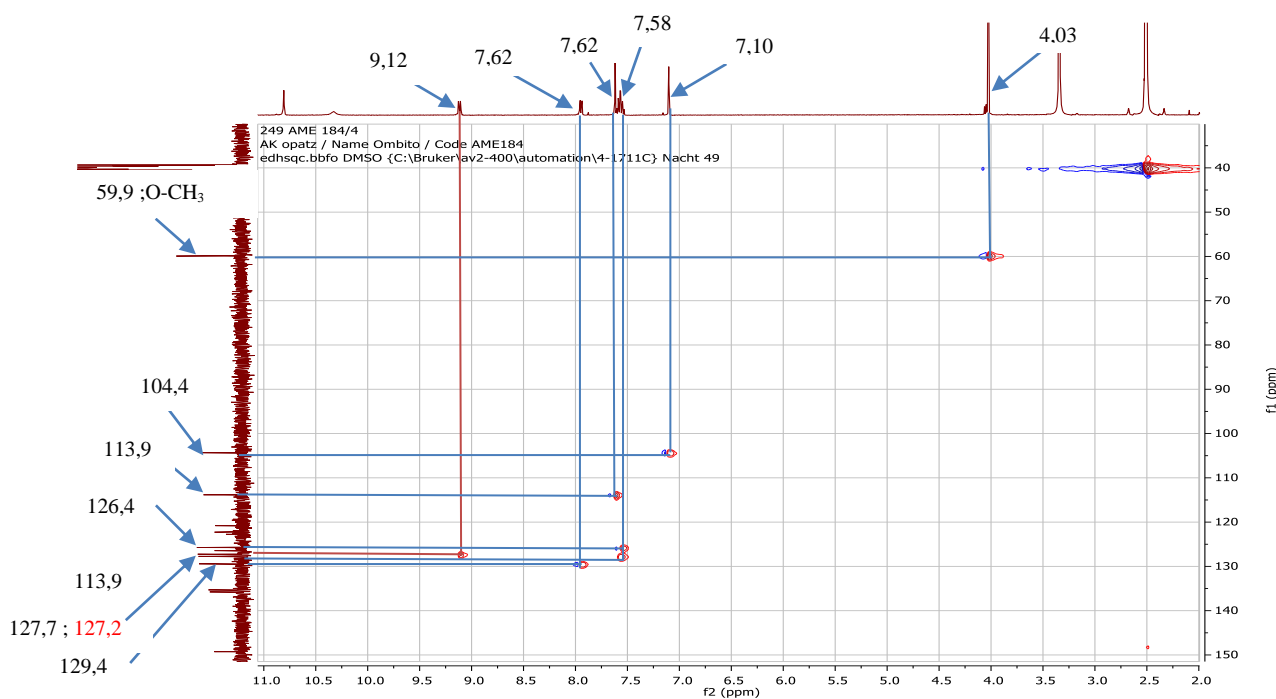


Figure 65: Spectre de HSQC de AME₁₈₄

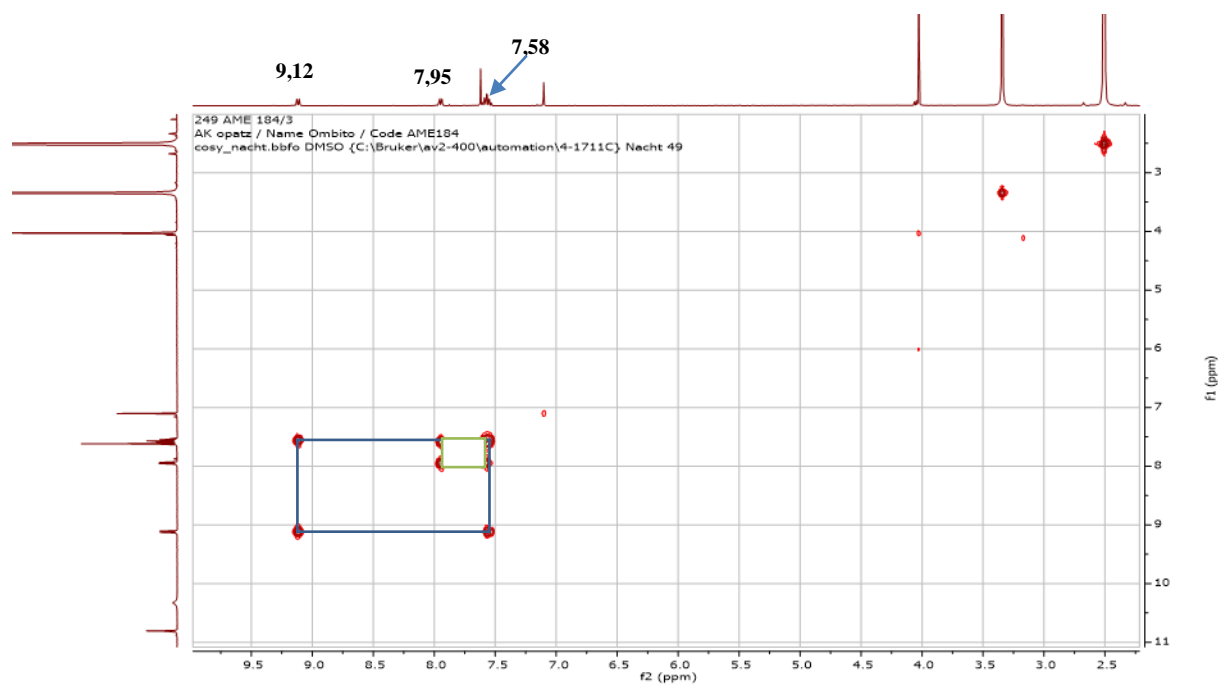


Figure 66: Spectre de COSY (DMSO-d₆, 150 MHz) de AME₁₈₄

L'analyse du spectre de RMN ¹³C (Fig. 65) montre en plus des carbones précédemment cités ceux d'un carbonyle d'amide à δ_C 169,2 et deux carbones ortho oxygénés à δ_C 149,3 et 152,7

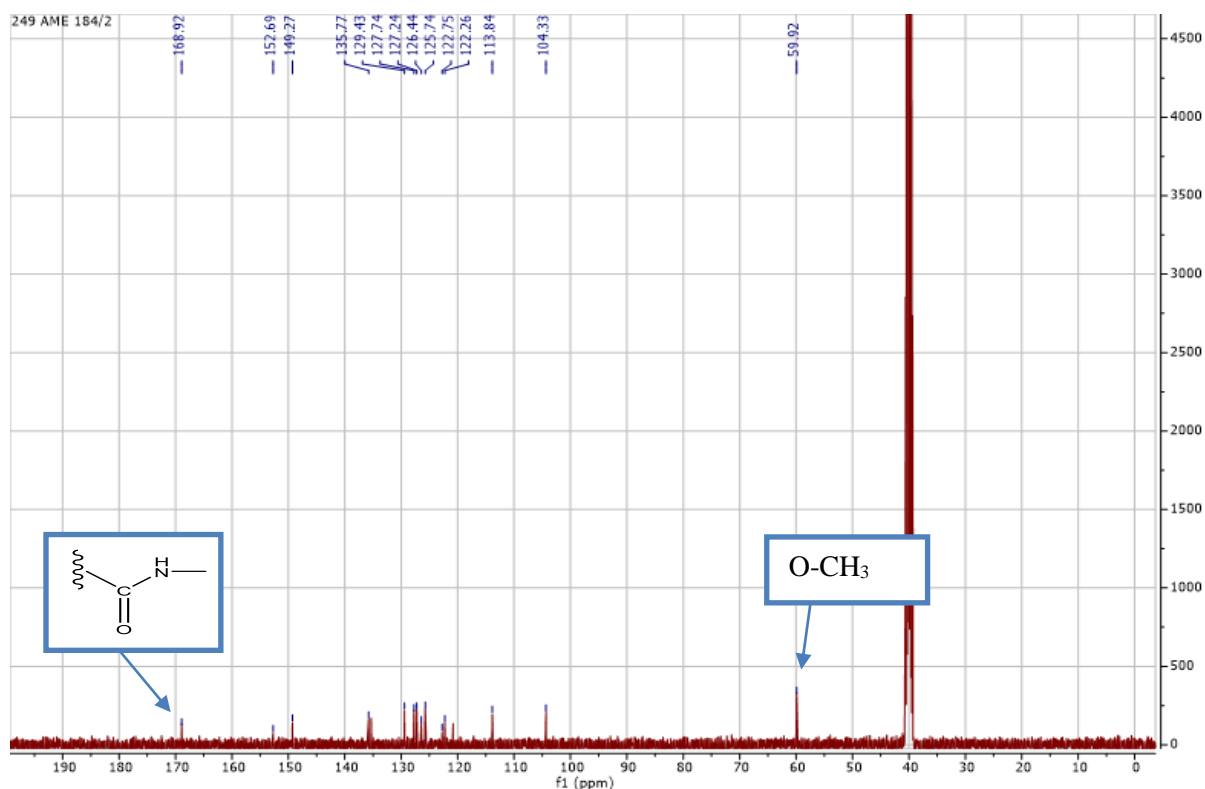


Figure 67: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (DMSO- d_6 , 150 MHz) de AME $_{184}$

L'analyse du spectre HMBC (**Fig 67**) montre :

- Les corrélations entre le proton azoté et deux carbones quaternaires à δ_{C} 122,6 et 135,8 qui sont des carbones du noyau aromatique de la sous structure **A**. Cette information en plus de la présence d'un carbonyle d'amide à δ_{C} 168,9 sont en conjonction avec les données de la littérature suggérant la présence d'un squelette de type phénanthridin-6(5H)-one (**Bhakuni et al., 2012 ; Hu et al., 2019 ; Liang et al., 2013**).
- Les corrélations entre le proton à δ_{H} 7,62 (1H, s, H-7) et les carbones quaternaires à δ_{C} 122,3 ; 149,3 ; 152,7 et le carbonyle précédent.
- Les corrélations entre le proton à δ_{H} 7,10 (1H, s, H-10) et les carbones à δ_{C} 122,3(C-6a) ; 125,7(C-10a). Ceci montre que ces deux protons singulets appartiennent au même noyau. La présence de deux protons aromatiques singulets appartenant au même noyau et des carbones aromatiques à δ_{C} 149,3 et 152,7 suggère un noyau tétra-substitué confirmant la sous-structure **B** précédente.
- Les corrélations entre le proton à δ_{H} 9,12 (1H ; dd ; 2,0 Hz et 8,0 Hz ; H-1) et les carbones à δ_{C} 127,7(C-3) ; 135,8(C-4a).

- Une corrélation entre le proton à δ_H 4,03 (3H, S) et le carbone à δ_C 149,9 (C- 8) qui suggère que le groupement méthoxy serait fixé en position 8.

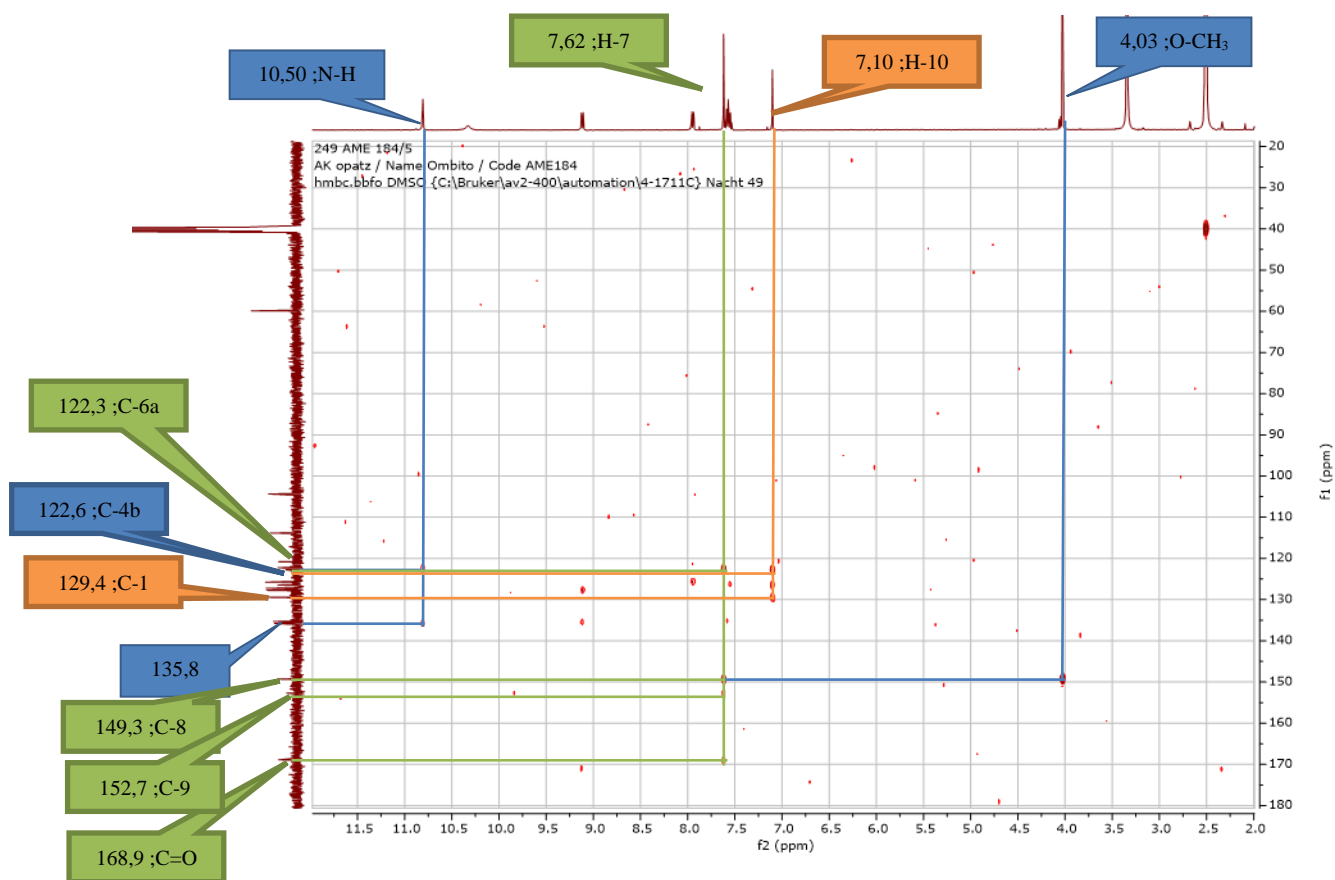


Figure 68: Spectre de HMBC deAME184

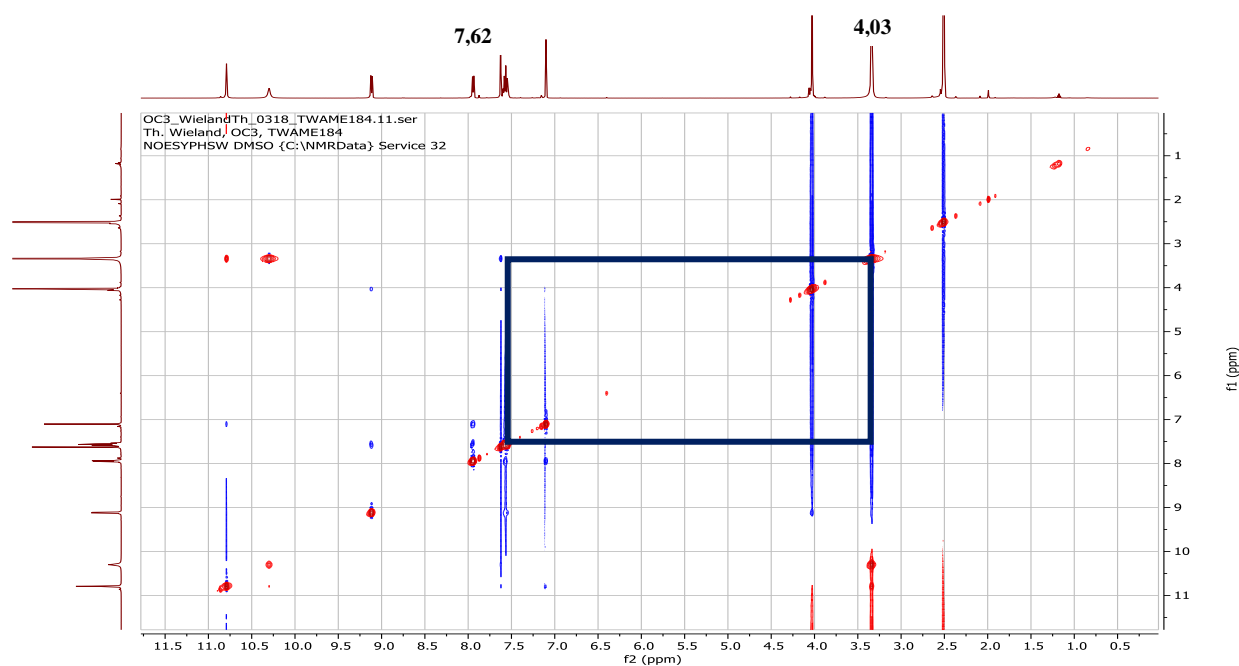
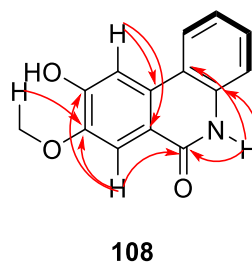
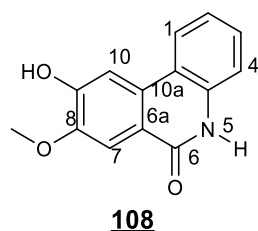


Figure 69 : Spectre NOESY deAME184

Le méthoxy a été positionné en C-8 grâce au carré de corrélation observé sur spectre NOESY (**Fig 69**) entre le proton H-7 à δ_H 7,62 et les protons du méthoxy à δ_H 4,03.

L'ensemble de ces données spectrales combinées à celles rencontrées dans la littérature (**Bhakuni et al., 2012 ; Hu et al., 2019 ; Liang et al., 2013**) nous ont conduit à attribuer à AMe₁₈₄ la structure (**108**) qui est celle de la 9-hydroxy-8-méthoxyphénanthridin- 6(5H) –one, un dérivé nouveau décrite ici pour la première.



— : COSY (¹H-¹H) correlations

↷ : HMBC ²J and ³J-correlated ¹H → ¹³C

Tableau 31 : Données spectrales de RMN ¹H et de RMN ¹³C (DMSO-d₆, 600 et 150 MHz) de AMe₁₈₄

Positions	AMe ₁₈₄ (δ_H) (108)	AMe ₁₈₄ (δ_C) (108)
1	7,95 (1H ; dd ; 2,0 et 7,6Hz)	129,4
1a	-	122,6
2	7,58 (1H ; dd ; 2 et 8 Hz)	127,7
3	9,12 (1H ; dd ; 2 et 8 Hz)	127,2
4	7,58 (1H ; dd ; 2 et 8 Hz)	126,4
4a	-	135,8
5	10,80 (1H, s)	-
6	-	168,9
6a	-	122,3
7	7,62 (1H, s)	113,8
8	-	149,3
9	-	152,7
10	7,10 (1H, s)	104,3
10a	-	125,7
OMe	4,03 (3H, s)	59,9

II.2.3.2. Identification du composé AMrH₁₇₂₋₁₇₅ ou AMra₁₁₈

AMrH₁₇₂₋₁₇₅ a été obtenu sous forme de poudre amorphe jaune dans Hex-AE (75:25). Il est soluble dans le CDCl₃ et répond positivement au test Mayer caractéristique des alcaloïdes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016).

Son spectre de masse ESI haute résolution (Fig. 70) en mode (+) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire [M+Na]⁺ à m/z 278,0834 ([M+Na]⁺, C₁₅H₁₃NO₃Na⁺; calc. 278.0793) compatible avec la formule brute C₁₅H₁₃NO₃ et renfermant 10 degrés d'insaturations.

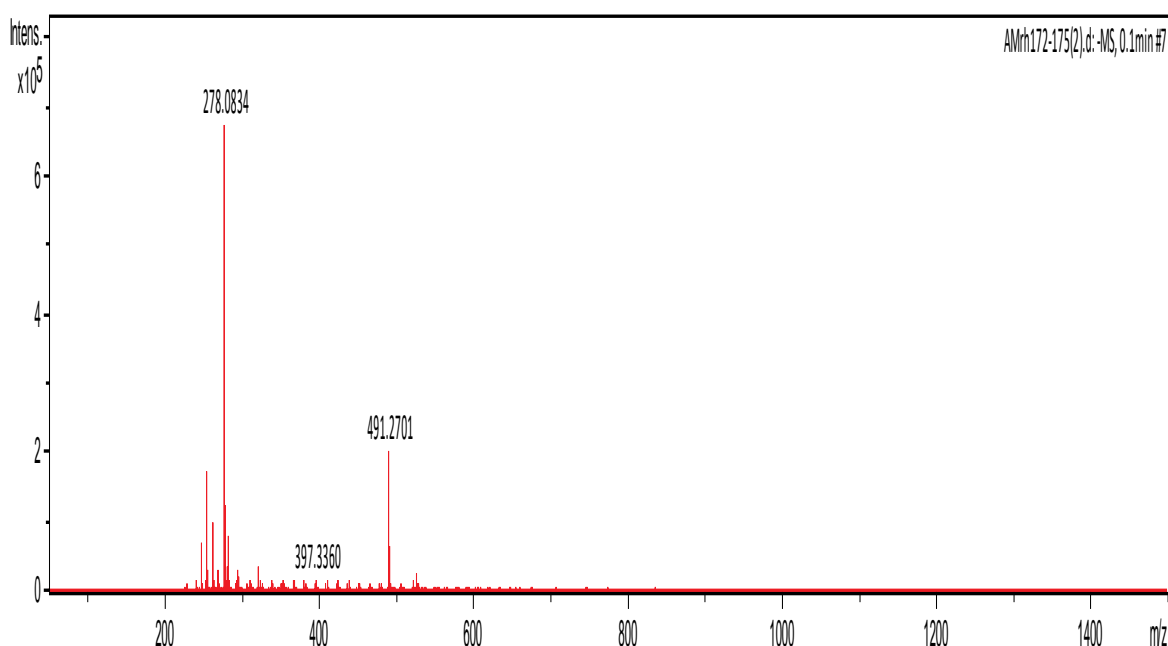


Figure 70: Spectre de masse ESI-MS de AMrH₁₇₂₋₁₇₅

Le spectre de RMN ¹H (Fig 71) de AMrH₁₇₂₋₁₇₅ est presque superposable à celui de AMe184 à la seule différence que l'on note ds les champs forts la présence deux singulets de 3 protons chacun à 4,12 et 4,16 ppm attribuable aux protons d'un groupement méthoxyle.

La présence des groupements méthoxyle est confirmée par le spectre de RMN ¹³C de AMrH₁₇₂₋₁₇₅ (Fig. 72) où l'on observe à 56,9 et 60,3 ppm, les signaux des méthyls oxygénés.

La comparaison des spectres de RMN ¹H et RMN ¹³C des composés AMrH₁₇₂₋₁₇₅ et AMe184 montre que AMrH₁₇₂₋₁₇₅ est un dérivé des phénanthridin- 6(5H) –one mais avec deux groupements méthoxyls.

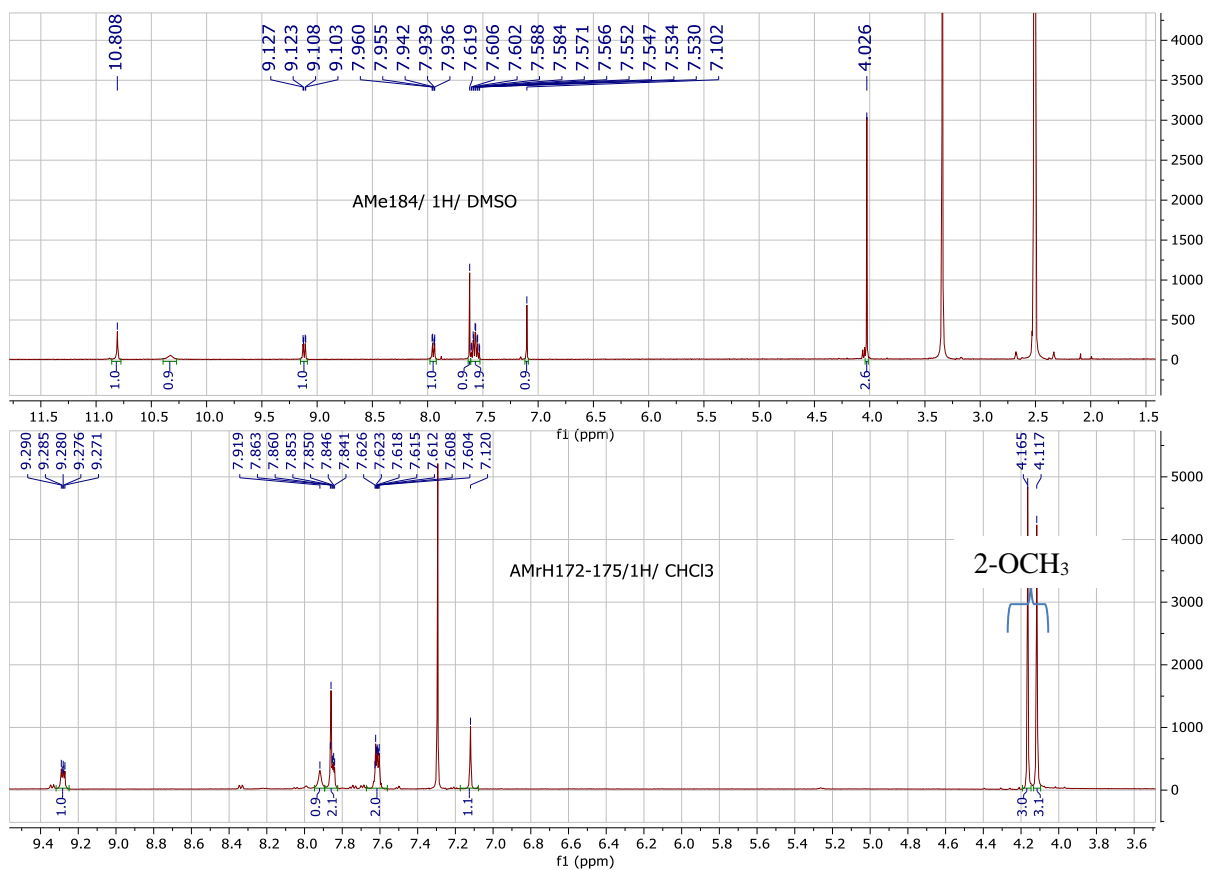


Figure 71: Spectre de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de AMrH₁₇₂₋₁₇₅ comparé à celui de AMe184 (DMSO, 600 MHz)

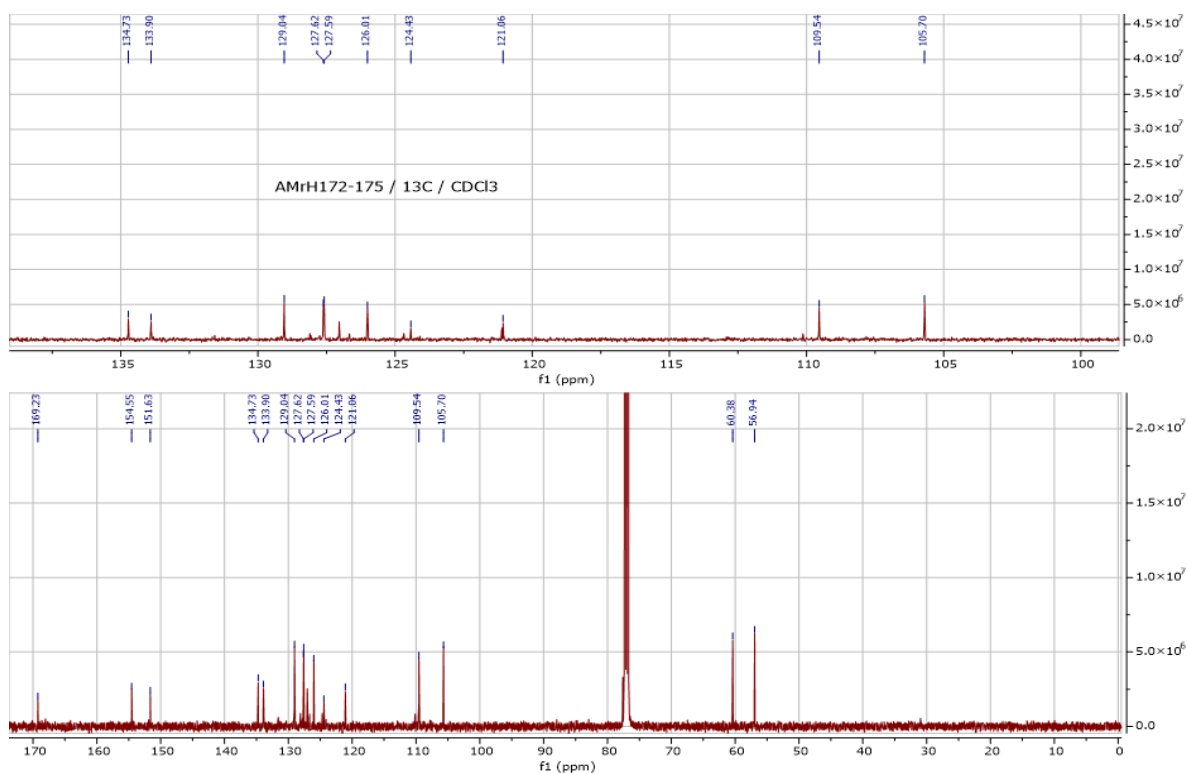


Figure 72: Spectre de RMN ¹³C découplé large bande (CDCl₃, 125 MHz) de AMrH₁₇₂₋₁₇₅

L'analyse du spectre HMBC de AMrH₁₇₂₋₁₇₅ (**Fig 73**) montre :

- Les corrélations entre les protons des méthoxy à δ_H 4,12 et 4,16 et les carbones à δ_C 154,5 et 151,6 respectivement.
- Les corrélations entre les protons δ_H 7,61 (2H, m) et les carbones à δ_C 134,7 ; 127,5 et 129,0.
- Les corrélations entre le proton à δ_H 9,28 (1H ; dd ; 2,0 Hz et 8,0 Hz) et les carbones à δ_C 127,5 ; 134,7.
- Les corrélations entre le proton à δ_H 7,86 (1H, s, H-7) et les carbones quaternaires à δ_C 121,1 ; 151,6 ; 154,6 ; et le carbonyle à δ_C 169,2.
- Les corrélations entre le proton à δ_H 7,12 (1H, s, H-10) et les carbones à δ_C 121,1 ; 124,3 ; 134,7 et 133,9.

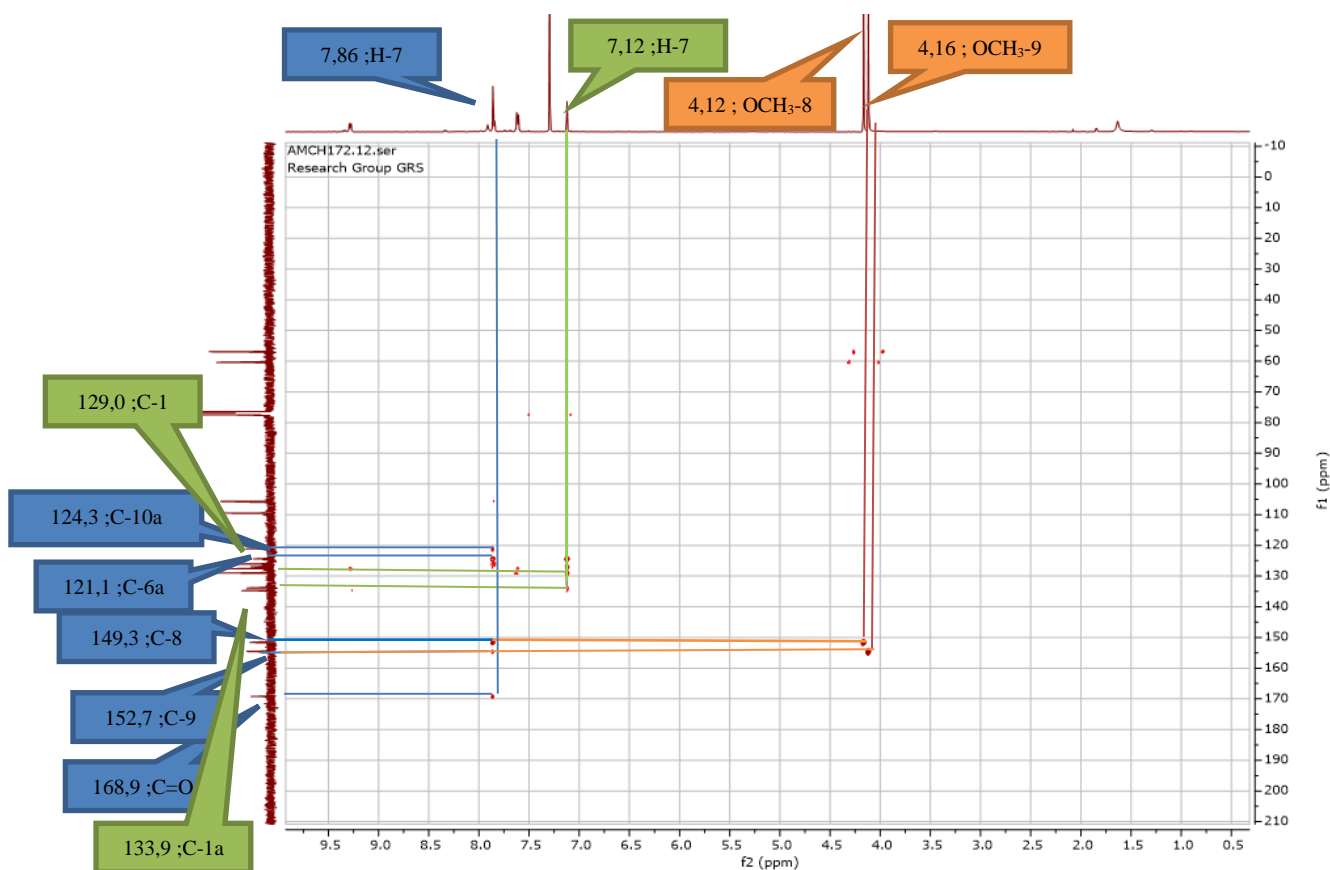


Figure 73: Spectre de HMBC (CDCl₃) de AMrH₁₇₂₋₁₇₅

L'ensemble de ces données spectrales combinées à celles rencontrées dans la littérature nous ont conduit à attribuer à AMrH₁₇₂₋₁₇₅ la structure (**109**) qui celle de la 8,9-diméthoxyphénanthridin- 6(5H) -one précédemment décrite par **Bhakuni et al., en 2012** et isolée ici de source naturelle pour la première fois.

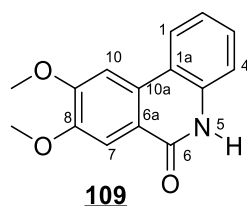


Tableau 32: Données spectrales de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) de AMr $_{172-175}$ comparées à celles de 8,9-diméthoxyphénanthridin- 6(5H) -one de la littérature RMN ^{13}C (DMSO-d_6 , 100 MHz) (Bhakuni *et al.*, 2012).

Positions	AMrH $_{172-175}$ (δ_{H}) (109)	AMrH $_{172-175}$ (δ_{C}) (109)	Littérature (δ_{H})	Littérature (δ_{C})
1	7,84 (1H ; t ; 2,5 Hz)	129,0	7,43 (1H ; t ; 6Hz)	129,5
1a	-	133,9		136,5
2	7,60(1H ; m)	126,0	7,43 (1H ; t ; 6Hz)	123,4
3	9,28 (1H ; dd ; 2 et 6,6 Hz)	127,6	9,28 (1H ; d ; 8 Hz)	129,0
4	7,62 (1H ; m)	127,5	7,24 (1H ; t ; 8 Hz)	129,0
4a	-	134,7		136,5
5	7,91 (1H, s)	-	8,26 (1H, s)	-
6	-	169,2		160,9
6a	-	121,1		116,4
7	7,86 (1H, s)	109,5	8,05 (1H, s)	108,3
8	-	151,6		149,9
9	-	154,5		153,7
10	7,12 (1H, s)	105,7	7,56 (1H, s)	104,6
10a	-	124,4		122,6
OMe-8	4,16 (3H, s)	60,3	3,91 (3H, s)	56,6
OMe-9	4,12 (3H, s)	56,9	4,03 (3H, s)	56,0

II.2.3.3. Identification du composé AMrA₃₀₆₋₃₁₄

AMrA₃₀₆₋₃₁₄ a été obtenu sous forme de poudre amorphe jaune dans le mélange Hex-AE (20 :80). Il est soluble dans le méthanol et répond positivement au test de Mayer caractéristique des alcaloïdes (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016).

Son spectre de masse ESI haute résolution (Fig. 74) présente en mode (+), le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 298,1922 ($[M+H]^+$, C₁₈H₂₄N₃O⁺) compatible avec la formule brute C₁₈H₂₃N₃O et renfermant 9 degrés d'insaturations.

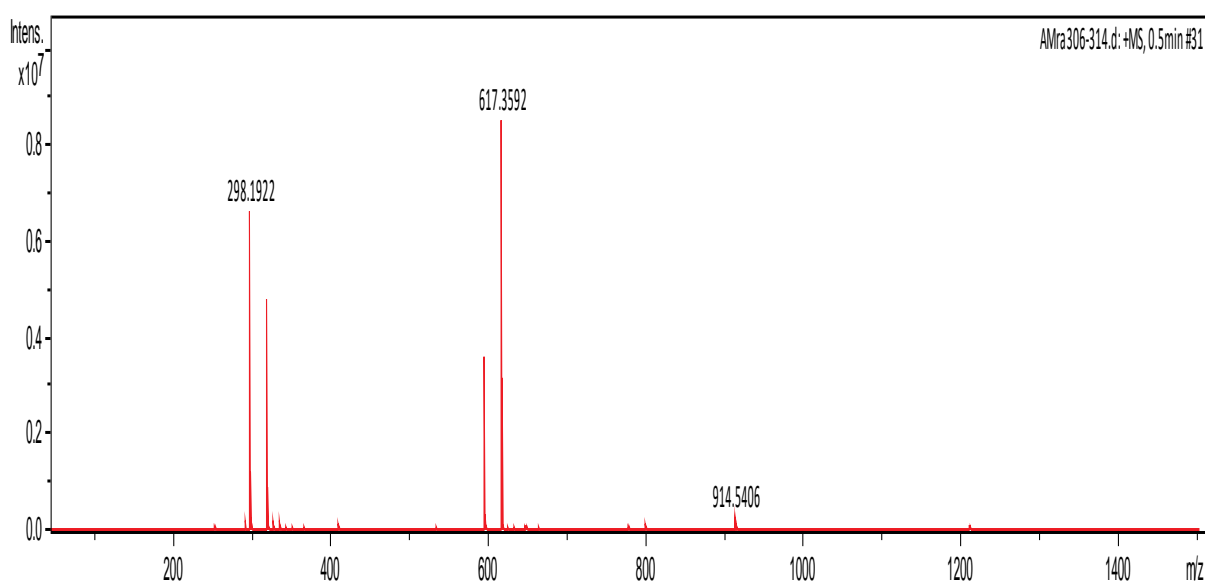


Figure 74: Spectre de masse ESI-MS de AMrA₃₀₆₋₃₁₄

Son spectre IR (KBr) (Fig 75) exhibe des bandes de vibration caractéristiques de groupes fonctionnels à : 3428 cm⁻¹ (N-H des indoles), 3259 cm⁻¹ (N-carbamoyle pyrrolidine) (D'Ambrosio et al, 1986), 3055 cm⁻¹ (NH₂), 1645cm⁻¹ (C=O) et 1460 cm⁻¹ (C=C).

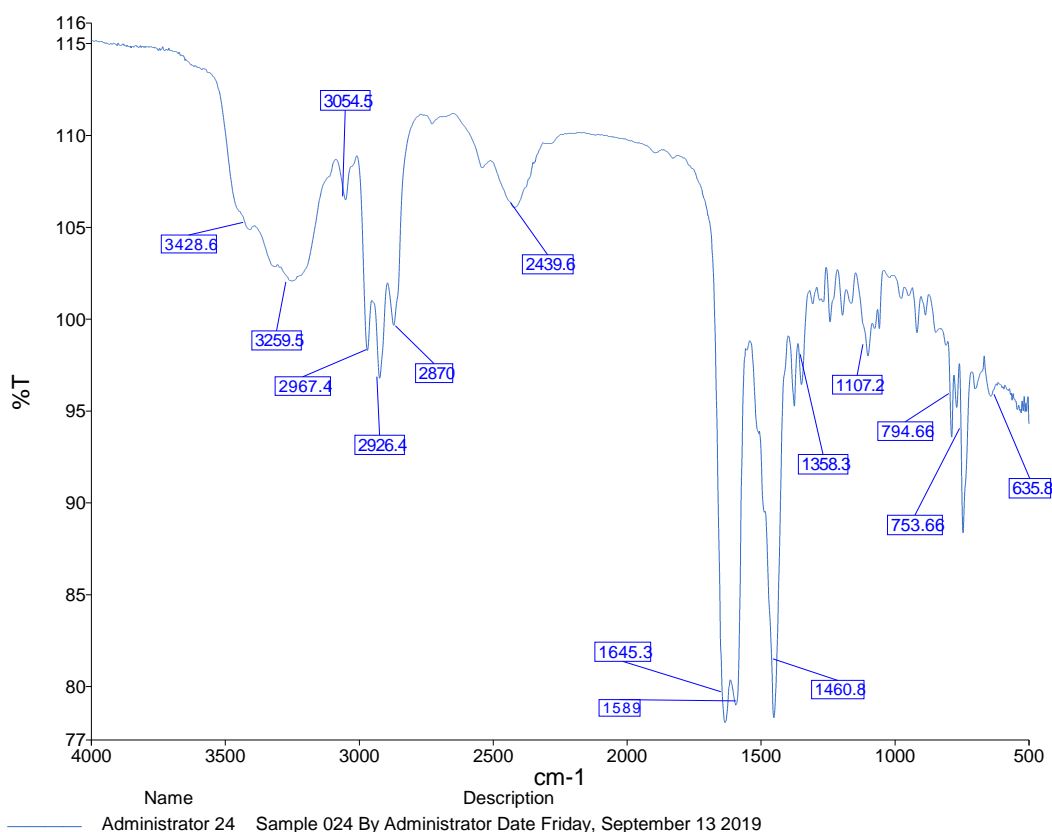
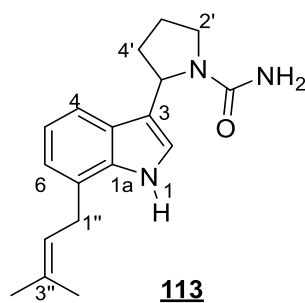


Figure 75: Spectre IR (KBr) de AMrA₃₀₆₋₃₁₄

L'ensemble de ces données spectrales combinées à celles rencontrées dans la littérature nous ont conduit à attribuer à AMra 306-314 la structure **110** qui est celle de la -3-(5'-N-carbamoylpyrrolidine)-7- (3''-methyl-2''butenyl) indole ou manniindole déjà isolé par **Matchi et al., 2020**.

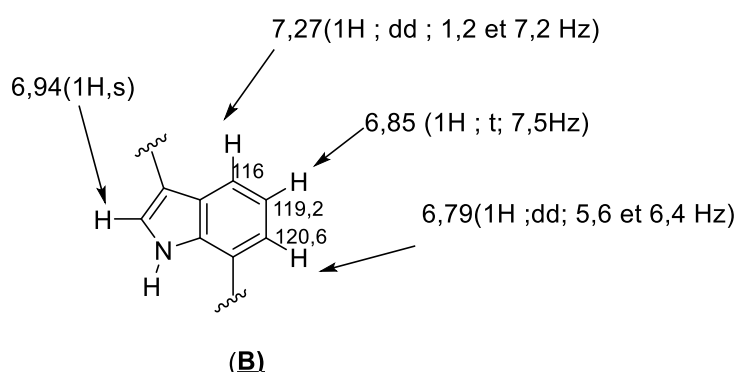
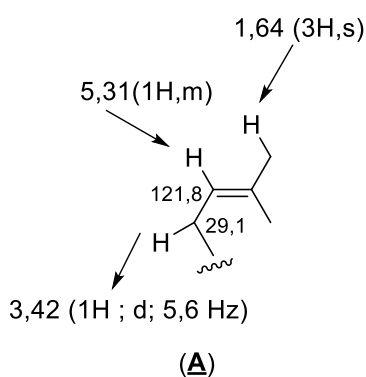


En effet, l'analyse des spectres RMN ^1H (**Fig. 76**) et ^{13}C (**Fig. 79**) couplé au spectre HMQC (**Fig. 78**) montre :

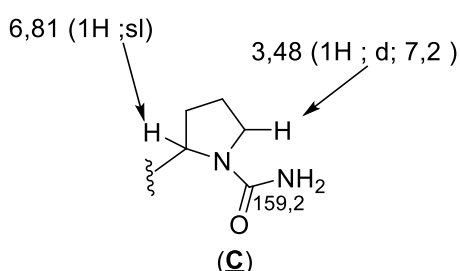
- Les signaux caractéristiques d'un groupement prényle notamment : Un signal à δ_H 1,64 (6H, s) / δ_C 24,5 et 16,6 suggérant la présence d'un groupement gem-diméthyle ; Un signal à δ_H 3,42 (2H, d, 5,6 Hz) / δ_C 29,1 qui serait un méthylène proche d'une double

liaison et un signal à δ_H 5,31 (1H, m) / δ_C 121,8 suggérant la présence d'un proton oléfinique. D'où la structure **(A)** ci-dessous.

- Les signaux caractéristiques d'un noyau indolique notamment : les signaux d'un noyau aromatique ABC à δ_H 7,27 (1H ; dd ; 1,2 et 7,2) / δ_C 116,0 ; 6,85 (1H ; t ; 7,5 Hz) / δ_C 119,0 ; 6,79 (1H ; dd ; 6,4 et 2 Hz) / δ_C 120,6 et le signal du proton H-2 des indoles à δ_H 6,94 (1H, s) **(Beneso et al. 1969)**, d'où la sous-structure **(B)** ci-dessous.



- Les signaux caractéristiques d'un groupement N-carbamoyl pyrrolidine **(Matchi et al. 2020)** en occurrence les signaux des protons aliphatiques à δ_H 3,48 (2H, d, 7,2 Hz, H-2') / δ_C 46,3 ; 1,81(2H, m, H-3') / δ_C 23,0 ; δ_H 1,90 (1H, dt, 3,3 et 6,7 Hz, H-4a') et 2,18(1H, m, H-4b') / δ_C 34,3 le signal d'un méthine lié à un hétéroatome probablement l'azote à δ_H 5,04 (1H, s, H-5') / δ_C 54,9, d'où la sous-structure **(C)** suivante.



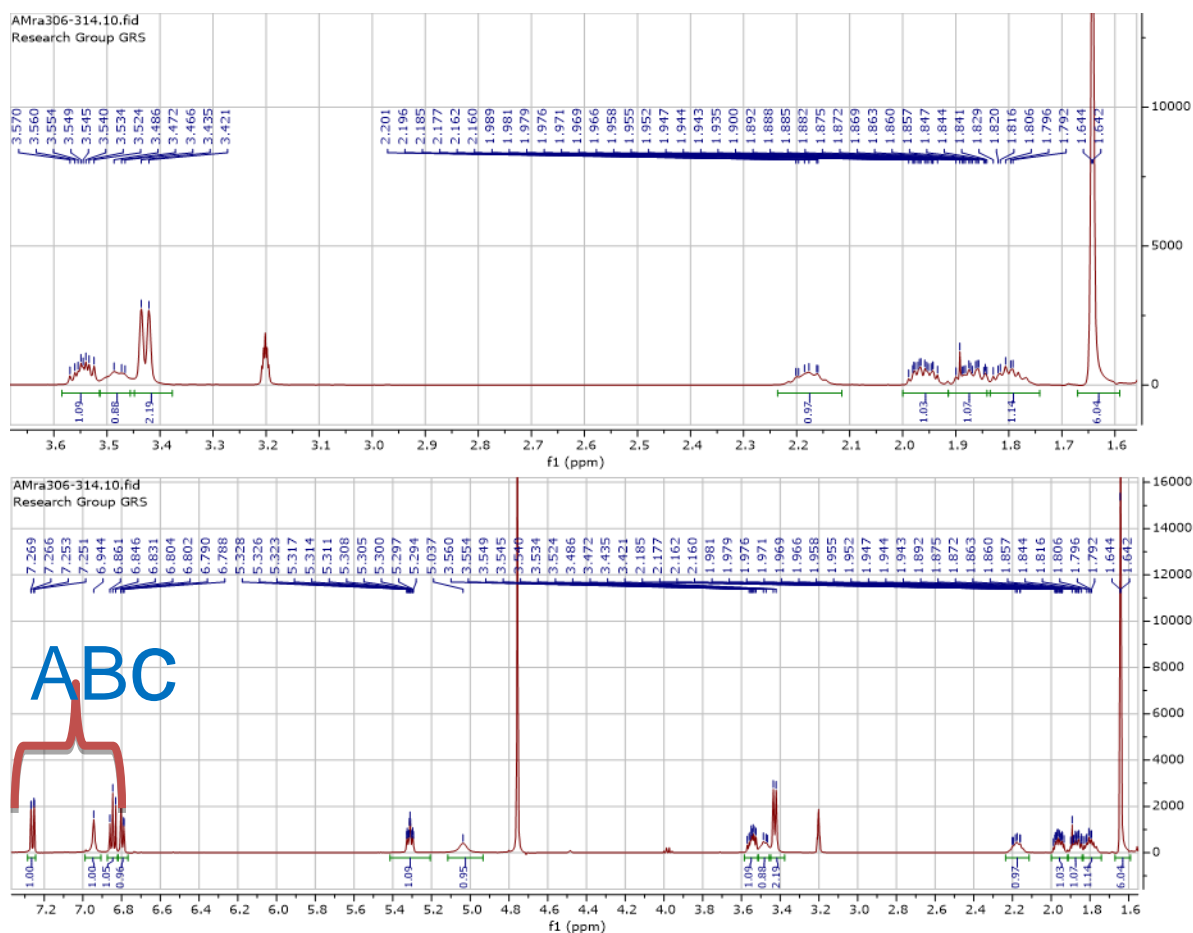


Figure 76: Spectre de RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) de AMrA306-314

Ces informations sont corroborées par le spectre COSY (Fig. 77) de AMrA306-314 où on peut observer les corrélations suivantes :

- Entre le proton à δ_H 5,31 (1H, m) et le proton à δ_H 3,42 (2H, d, 5,6 Hz).
- Entre le proton à δ_H 3,42 (2H, m) et les protons à δ_H 7,27 (1H ; dd ; 1,2 et 7,2 Hz) et 6,81 (1H ; d ; 6 Hz). Ceci suggère que le groupement prényle et le noyau aromatique seraient liés par le méthylène à δ_H 3,42 du groupement prényle.

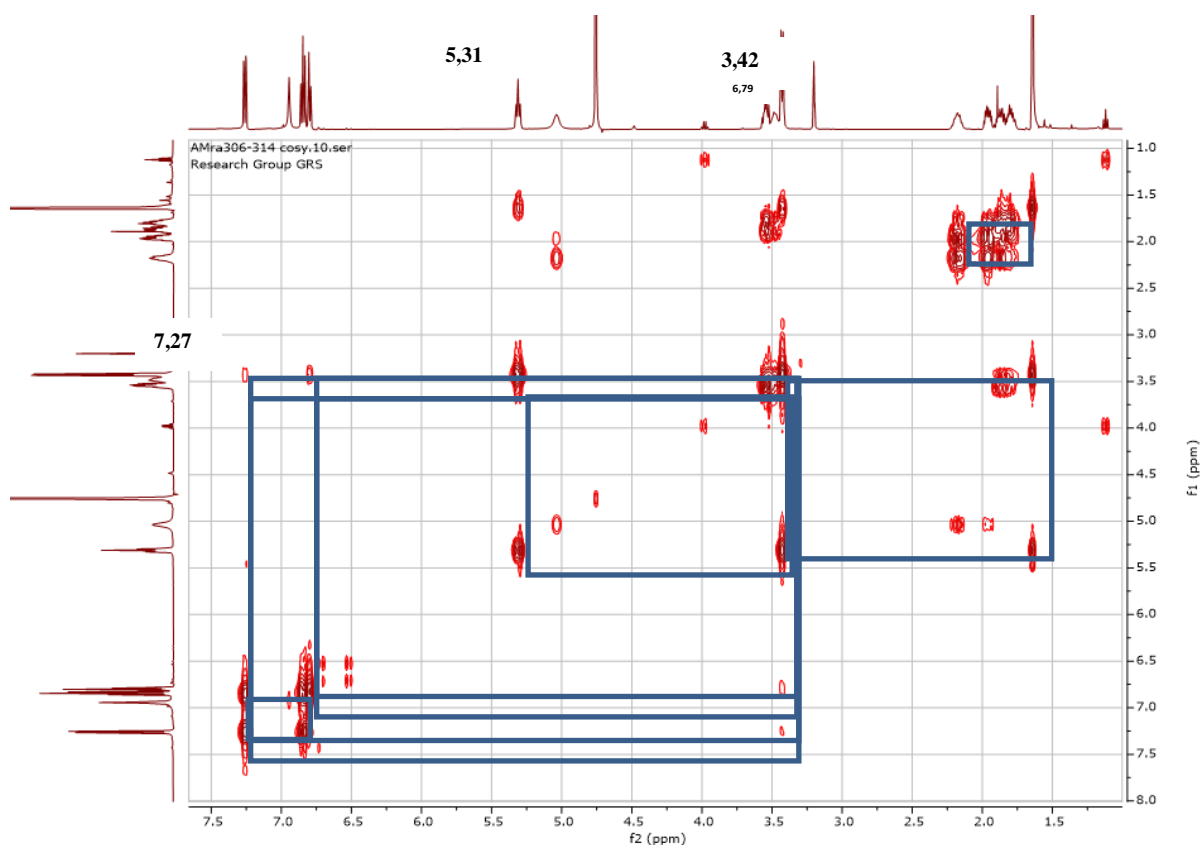


Figure 77: Spectre de COSY (MeOD, 500 MHz) de AMrA306-314

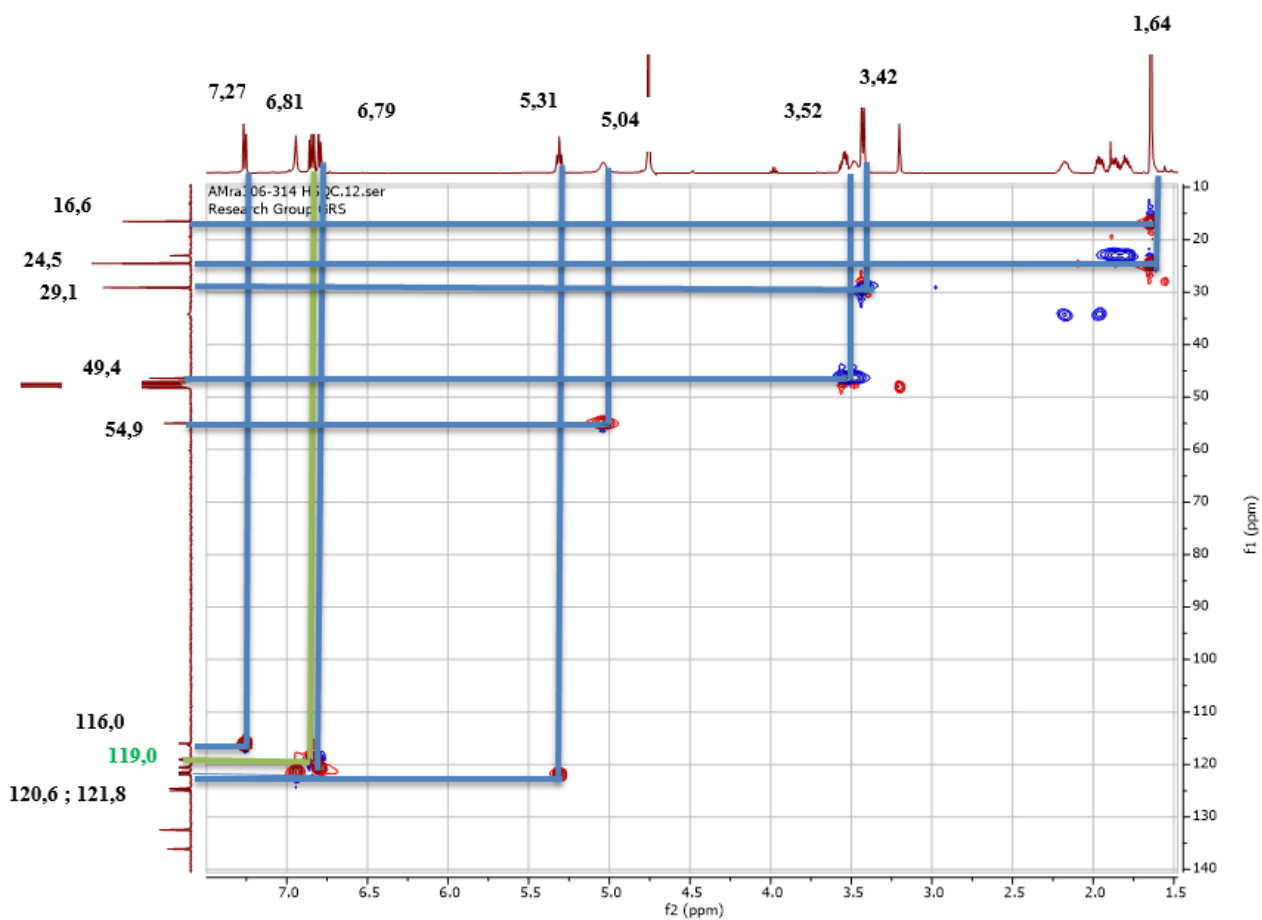


Figure 78: Spectre de HMQC de AMrA306-314

L'analyse des spectres RMN¹³C (**Fig. 79**) relève la présence de 16 signaux de carbones dont

- un carbonyle d'amide à 159,2 ppm.
- Des signaux des carbones oléfiniques entre 116,0 et 136,1 ppm

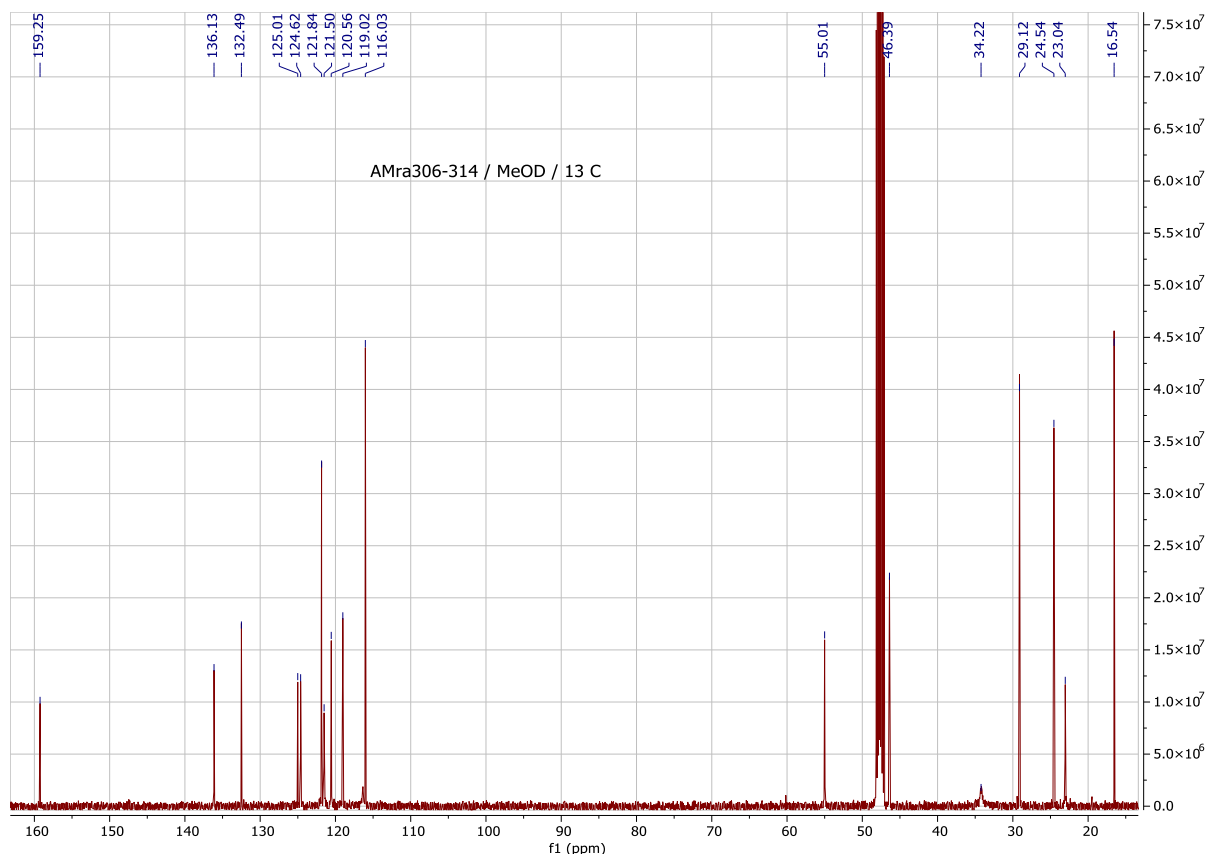


Figure 79: Spectre de RMN ¹³C découplé large bande (MeOD, 125 MHz) de AMrA₃₀₆₋₃₁₄

L'analyse du spectre HMBC (**Fig. 80**) montre les corrélations suivantes entre :

- Les protons à δ_H 7,27 /6,81 et les carbones δ_C 136,1 ; 125,0 et 120,5.
- Le proton à δ_H 6,79 (H-7) et les carbones précédents en plus du méthylène à 29,1 ppm
Ceci montre que le groupement prényle (**A**) serait lié au groupement indole (**B**) par le carbone C-7.
- Le proton à δ_H 5,31(H-2) de l'indole et les carbones à δ_C 125,0 (C-4a), 136,1 (C-1a) et 116,3 (C-3).
- Le proton à δ_H 1,92 (H-4') et les carbones à δ_C 116,0 (C-3), 55,0 (C-5'), 23,0 (C-3') et 46,3 (C-2'). Ceci montre que le groupement N-carbamyolpyrrolidine est fixé en position C-3 de l'indole.

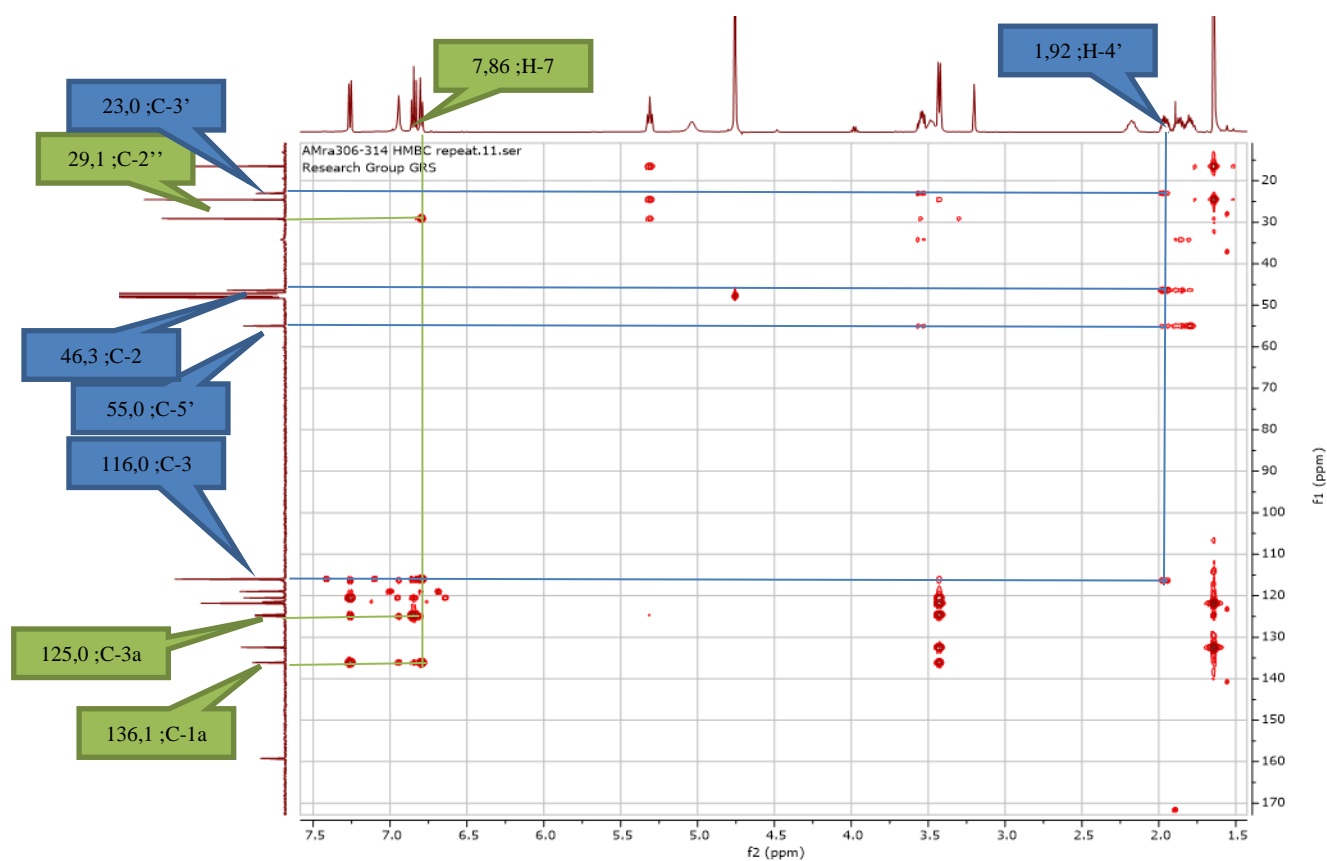


Figure 80: Spectre de HMBC (MeOD) de AMrA₃₀₆₋₃₁₄

Tableau 33: Données spectrales de RMN ¹³C (MeOD, 125 MHz) de AMrA₃₀₆ comparées à celles du manniindole de la littérature RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) (Matchi et al., 2020)

Positions	AMrA ₃₀₆₋₃₁₄ (δ_c) (110)	Littérature	position	AMrA ₃₀₆₋₃₁₄ (δ_c) (110)	Littérature
1a	136,1	135,5	3'	23,0	23,4
2	121,8	121,8	4'	34,2	33,7
3	116,0	117,8	5'	55,0	53,6
3a	125,0	125,1	1''	29,1	29,1
4	116,0	116,4	2''	121,5	122,2
5	119,0	118,7	3''	132,5	131,9
6	120,6	119,7	4''	24,5	25,6
7	124,6	124,5	5''	16,5	17,7
2'	46,4	46,1	N₂-C=O	159,3	157,2

II.2.3.4. Identification du composé AMr_{52p}

AMr_{52p} a été obtenu sous forme de poudre amorphe marrone dans CHCl₃-MeOH (99-1). Il est soluble dans le CDCl₃ et répond positivement au test Mayer caractéristique des alcaloïdes.

L'analyse combinée de ses spectres de RMN ¹H et de RMN ¹³C nous permet d'attribuer à AMr_{52p} la formule brute C₁₆H₁₇NO₄ renfermant 9 degrés d'insaturations.

L'analyse couplée de ses spectres RMN ¹³C (**Fig. 81**) et DEPT 135 (**Fig. 82**) révèle la présence 16 signaux dont un carbonyle cétonique résonnant à δ_c 180,7 ; un N-Me apparaissant à δ_c 34,0 (**Iftekhar et al., 2014**) ; deux groupes méthoxy (O-Me) apparaissant à δ_c 60,0 et 60,9 ; cinq méthynes et 7 carbones quaternaires dont trois oxygénés à δ_c 130,1 ; 156,0 et 159,2.

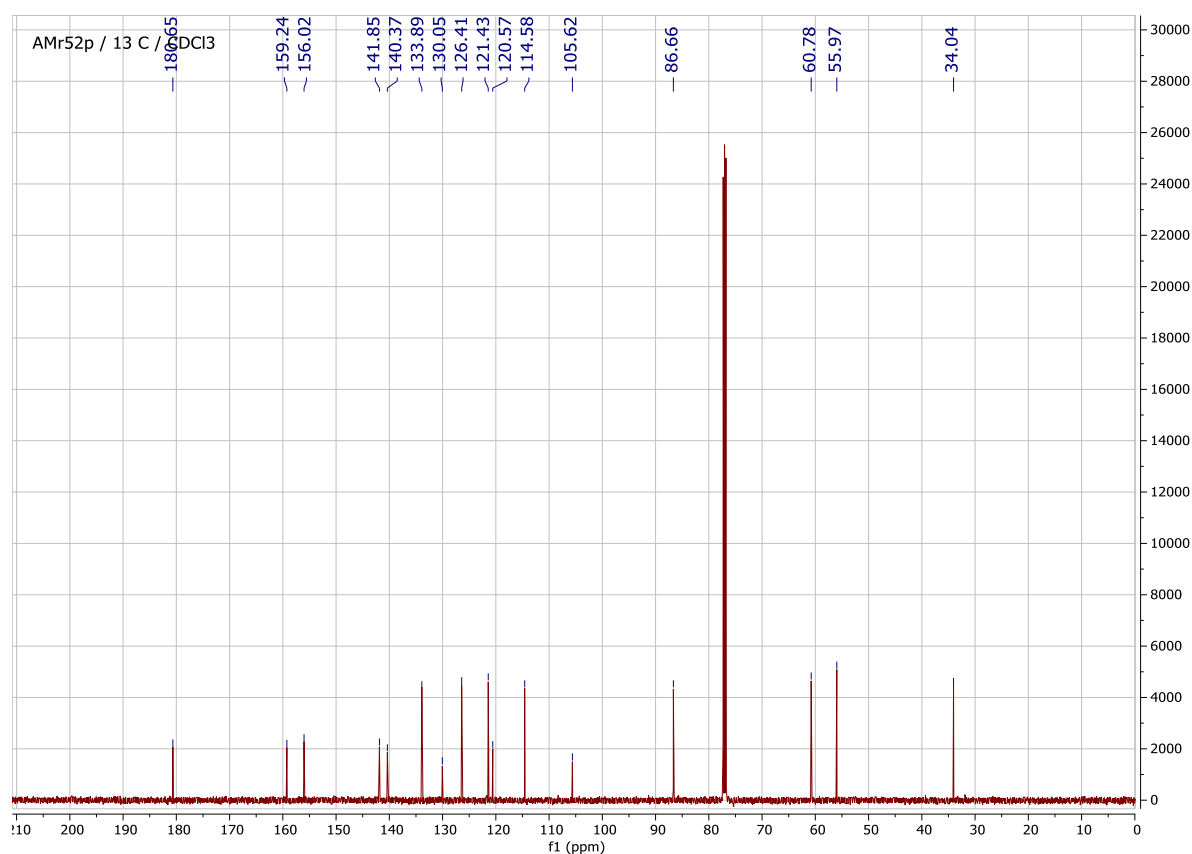


Figure 81: Spectre de RMN ¹³C découplé large bande (CDCl₃, 125MHz) de AMr_{52p}

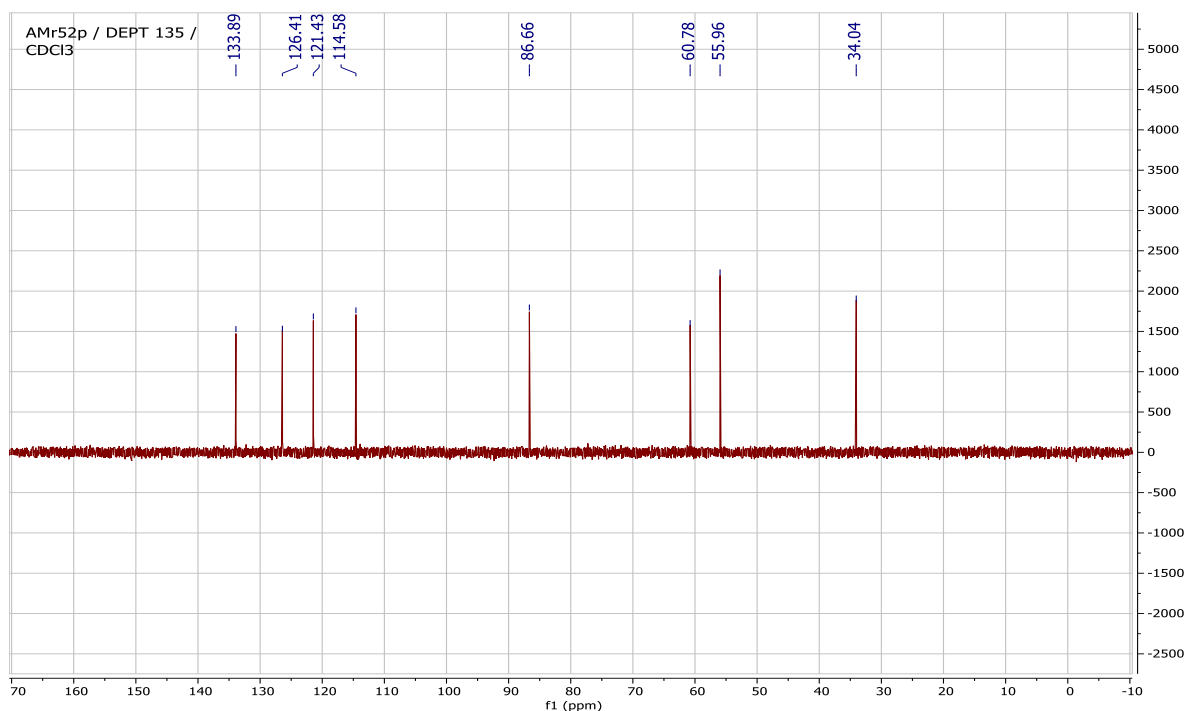
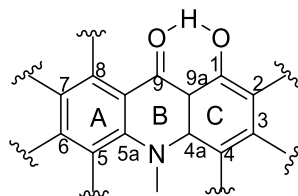


Figure 82: Spectre de DEPT 135 (CDCl₃, 125MHz) de AMr_{52P}

L'analyse couplée de ses spectres RMN ¹H et HSQC (**Fig 83** et **84**) montre :

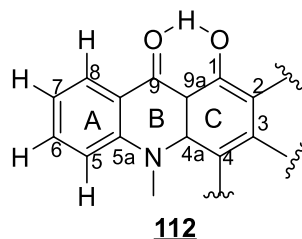
- un singlet d'un proton à δ_H 14,76 qui est caractéristique d'un groupement hydroxyle phénolique chélaté au carbonyle en C-9 des acridones (**Brader et al., 1996 ; Iftekhar et al., 2014**) ; Ce qui permet de présenter le squelette acridonique (**111**) ci-après.



111

- Un système de spin de type ABCD de quatre protons adjacents apparaissant respectivement à δ_H / δ_C 8,38 (1H ; dd ; 1,7 et 8,1 Hz)/ 126,4 ; δ_H / δ_C 7,70 (1H ; ddd ; 1,7 ; 6,9 et 8,7 Hz)/ 134,0 ; δ_H / δ_C 7,47 (d, 8,7 Hz)/ 114,6 ; δ_H / δ_C 7,26 (1H ; ddd ; 1,0 ; 6,9 et 8,0 Hz)/ 121,4. Ce système de spin traduirait la présence d'un noyau benzénique disubstitué.

Au regard de la trisubstitution du cycle C, la seule éventualité plausible est celle qui attribue le système de spin ABCD au cycle A d'où la sous-structure (**112**).



- Un singulet d'un proton à δ_H / δ_C 6,30 (1H, s)/ 86,7.
- deux méthoxyles dont les signaux des protons résonnent respectivement à δ_H 3,94 (3H, s) et δ_H 4,01 (3H, s).
- L'on note aussi la présence du N-CH₃ dont les signaux des protons apparaissent à δ_H 3,79 (3H, s).

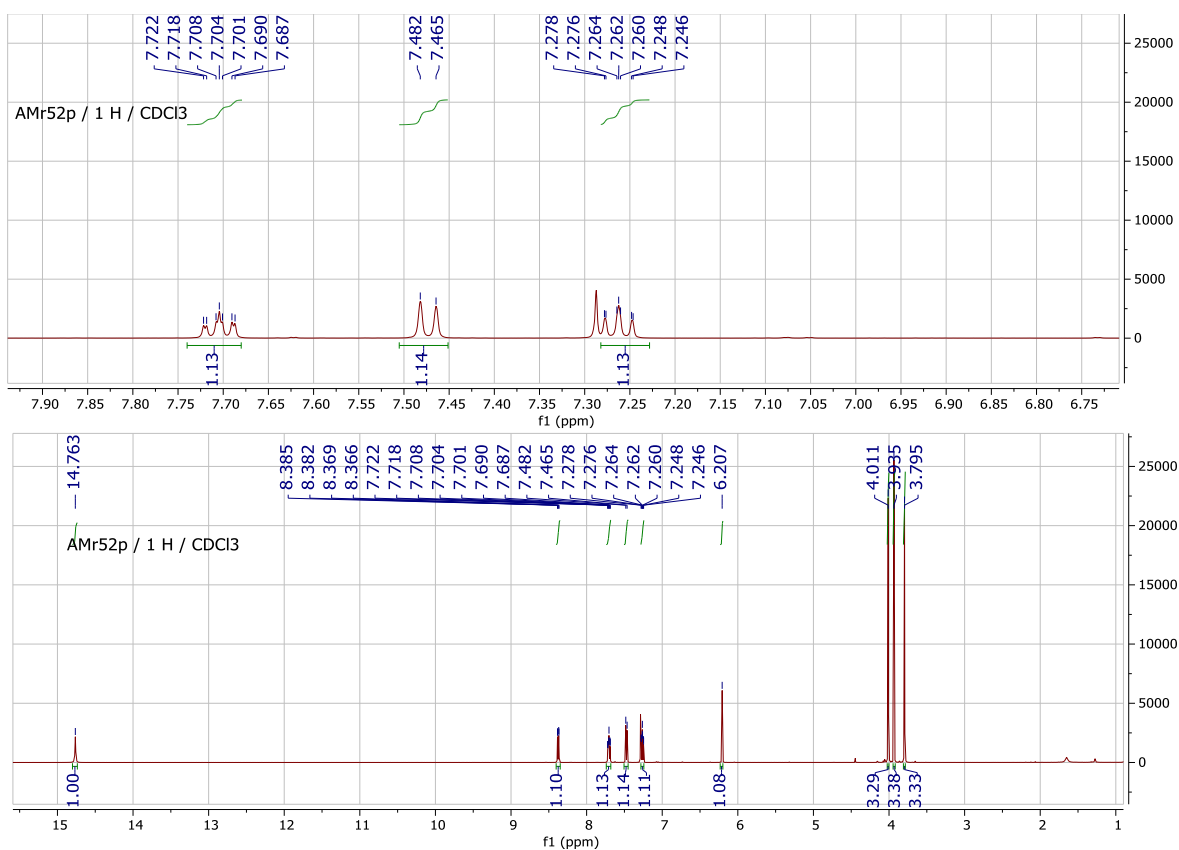


Figure 83: Spectre de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de AMrP₅₂

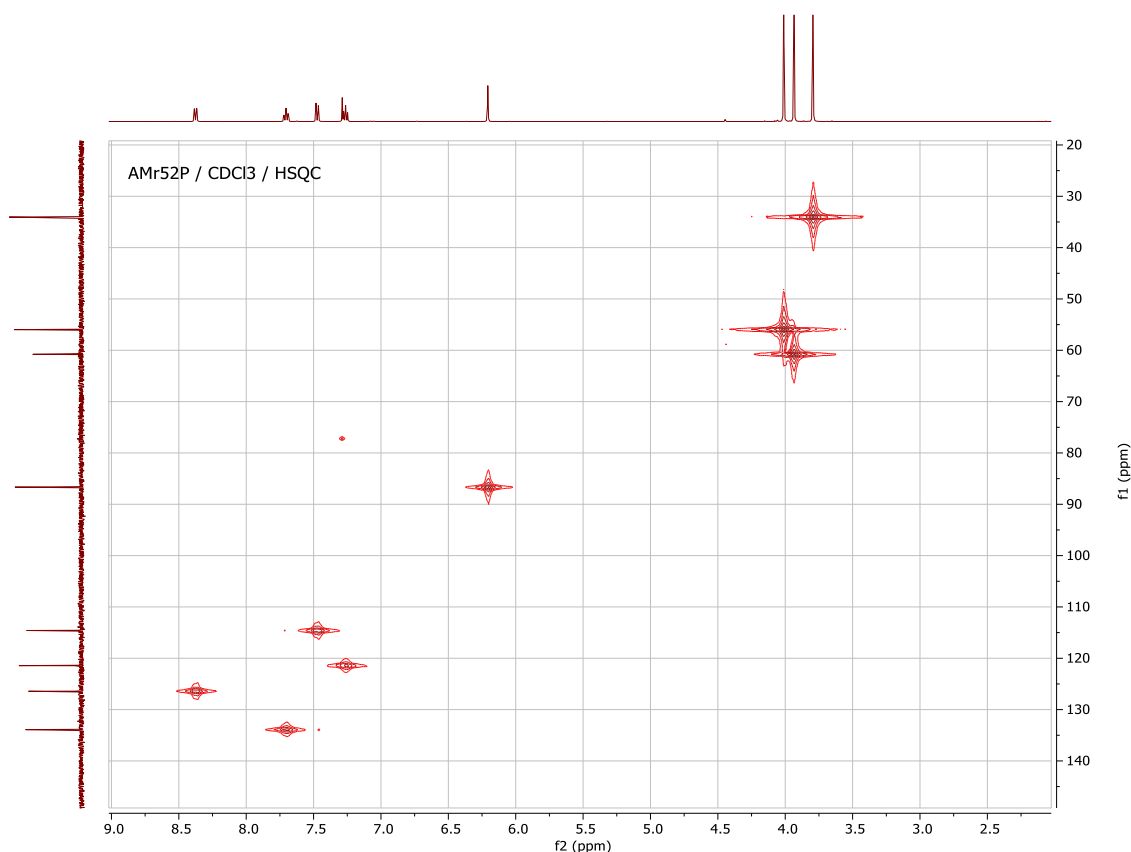


Figure 84: Spectre de HSQC de AMr_{52P}

Le spectre HMBC (Fig. 85) quant à lui montre plusieurs corrélations :

- Entre le proton à δ_H 8,38 et le carbonyle en C-9 à δ_C 180,7. Ce proton est particulièrement déblindé par rapport aux 3 autres protons du cycle C. D'où l'attribution de ce signal au proton H-8.
- Entre les protons du N-CH₃ à δ_H 3,79 le carbone à δ_C 86,9. De plus ce carbone serait blindé par les groupements donneurs par effet mésomère situés en ortho et para. D'où l'attribution de ce signal au carbone C-4.
- Entre le proton à δ_H 6,30 (H-4) et les carbones à δ_C 130,1 (C-2) ; 105,6 (C-9a) ; 140,4 (C-4a) ; 159,2 (C-3) et 180,7 (C-9).
- Entre le proton chélaté à δ_H 14,76 et les carbones à δ_C 130,1 (C-2) ; 105,6 (C-9a) et 156,0 (C-1).

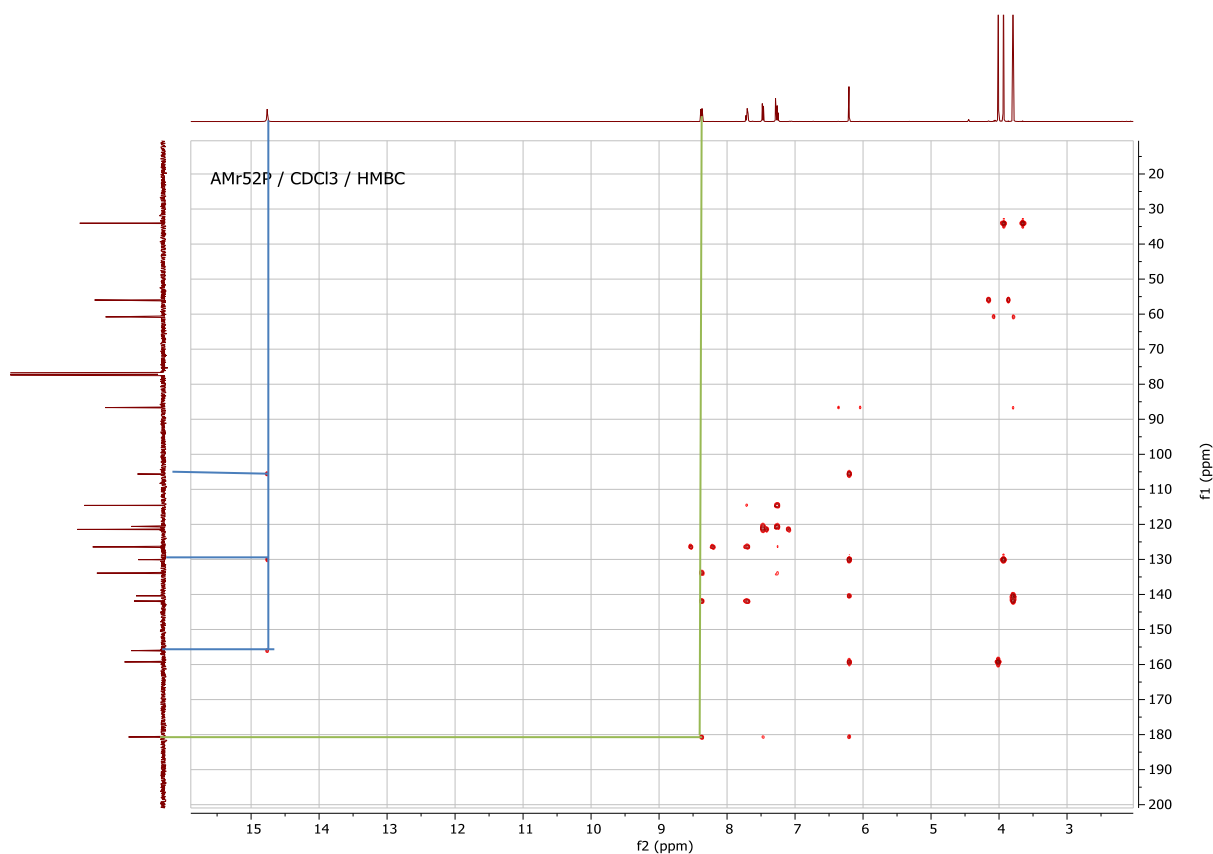


Figure 85: Spectre de HMBC de AMr_{52P}

L'ensemble de ces données spectrales combinées à celles rencontrées dans la littérature nous ont conduit à attribuer à AMr_{52P} la structure **113** qui est celle de 1-hydroxy-2,3-diméthoxyacrida-9-one ou arborinine précédemment décrite par **Tahia et al., 2015**.

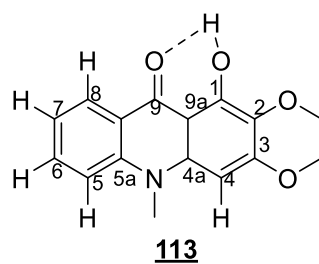


Tableau 34: Données spectrales de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de AMr_{52P} comparées à celles de l'aborinine de la littérature RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) (Tahia *et al.*, 2015).

N°	AMr _{52P} (δ_C) (113)	Littérature	N°	AMr _{52P} (δ_C) (113)	Littérature
1	156,0	156,3	8	126,4	126,7
2	130,0	130,2	8a	120,6	120,7
3	159,2	159,4	9	180,7	180,8
4	86,7	86,7	9a	105,6	105,7
4a	140,4	140,4	N-CH₃	34,0	34,1
5	114,6	114,6	2-OCH₃	60,8	60,8
5a	141,9	141,9	3-OCH₃	56,0	56,0
6	133,9	133,9	-OH	14,70	14,50
7	121,4	121,5			

II.2.3.5. Identification du composé AMr₂₄₁

AMr₂₄₁ a été obtenu sous forme de poudre amorphe marrone dans Hex-AE (60 :40). Il est soluble dans le DMSO et répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des phénols et au test Mayer caractéristique des alcaloïdes.

Son spectre de masse ESI haute résolution (**Fig. 86**) présente en mode (+), le pic de l'ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 314,0482 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{NO}_4\text{Na}^+$) compatible avec la formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{NO}_4$ et renfermant 14 degrés d'insaturations.

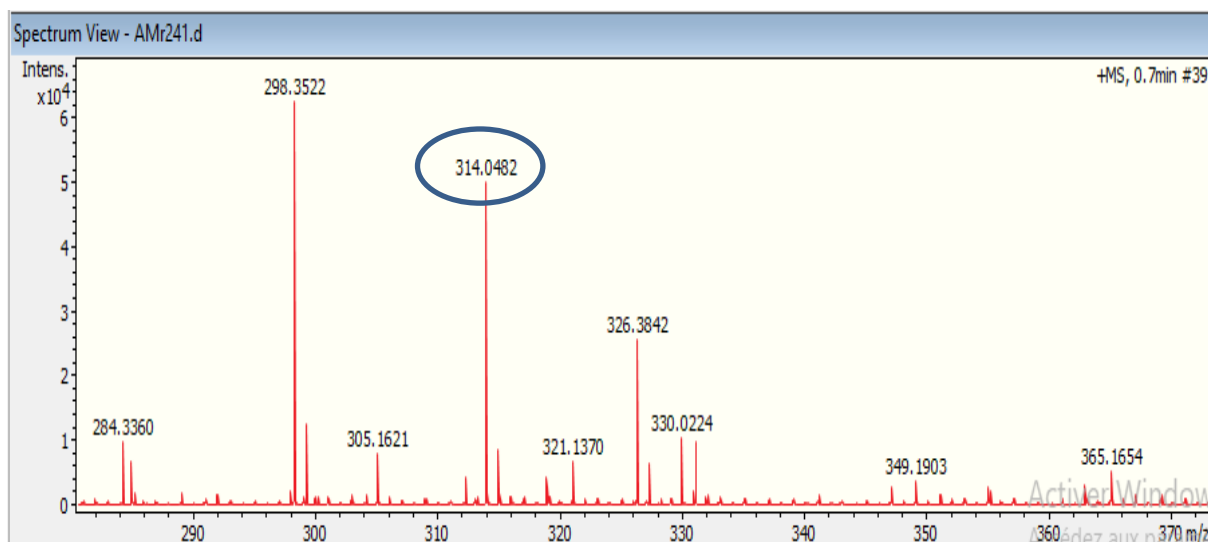
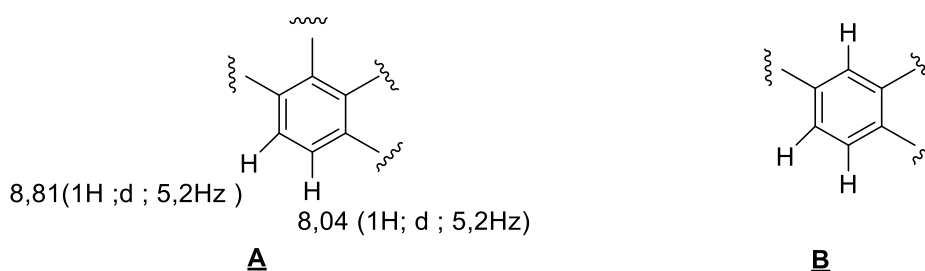


Figure 86: Spectre de masse ESI-MS de AMr₂₄₁

L'analyse des spectres de RMN¹H (**Fig. 87**) et de RMN¹³C (**Fig. 90**) couplée au spectre HMQC (**Fig. 88**) montre ;

– Les signaux des protons aromatiques à δ_H 8,81 (1H ; d ; 5,2Hz) / δ_C 144,3 , à δ_H 8,04 (1H ; d ; 5,2Hz) / δ_C 124,6 d'une part et à δ_H 8,52 (1H ,d, 8,8Hz) / δ_C 129,1 ; à δ_H 7,72 (1H ;d ; 2,8Hz) / δ_C 112,8 , à δ_H 7,33 (1H ; dd ; 2,8 et 8,8Hz) / δ_C 122,1 suggérant la présence d'un noyau aromatique ortho, méta et para substitué d'une part et d'un système ABX d'autre part. Ceci a été confirmé par les corrélations COSY (**Fig. 89**) entre les protons précédemment mentionnés d'où les sous-structures (**A** et **B**) suivantes.



Ce spectre montre également :

- Un signal d'un proton aromatique à δ_H 7,52 (1H, S) / δ_C 102,2.
- Un signal de singulet à δ_H 6,41 (2H, S) / δ_C 103,1 attribuable aux protons d'un méthylènedioxy.

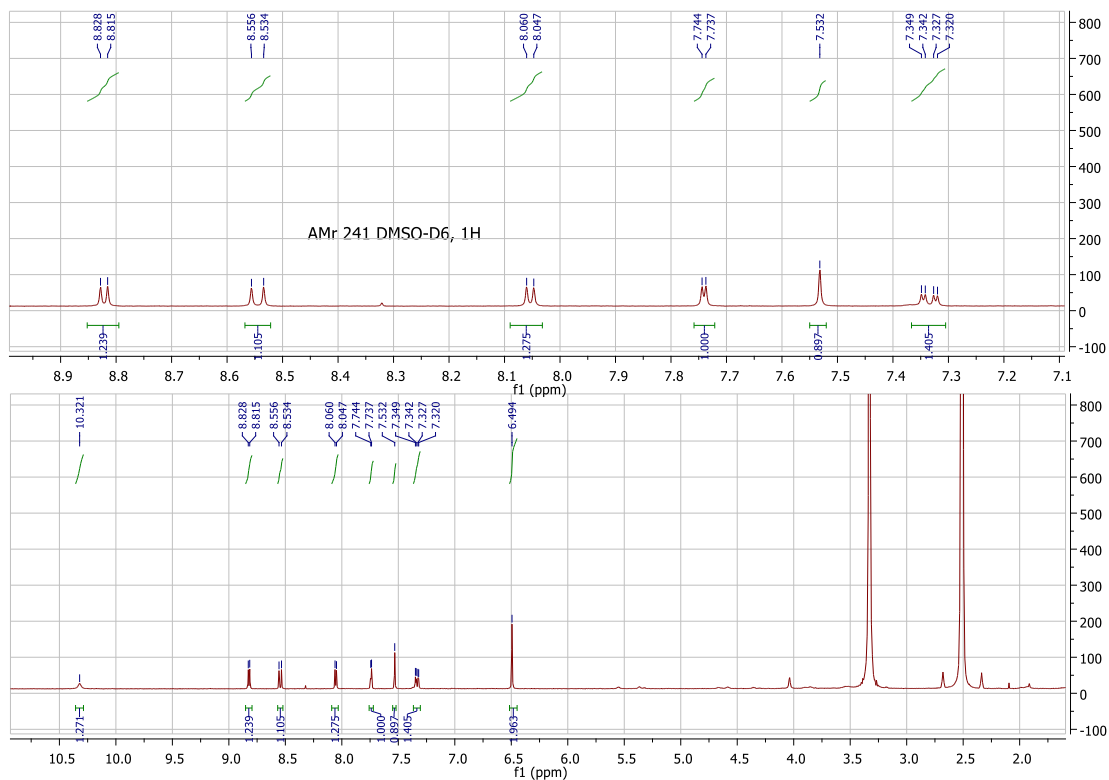


Figure 87: Spectre de RMN ^1H DMSO- d_6 , 600 MHz) de AMr₂₄₁

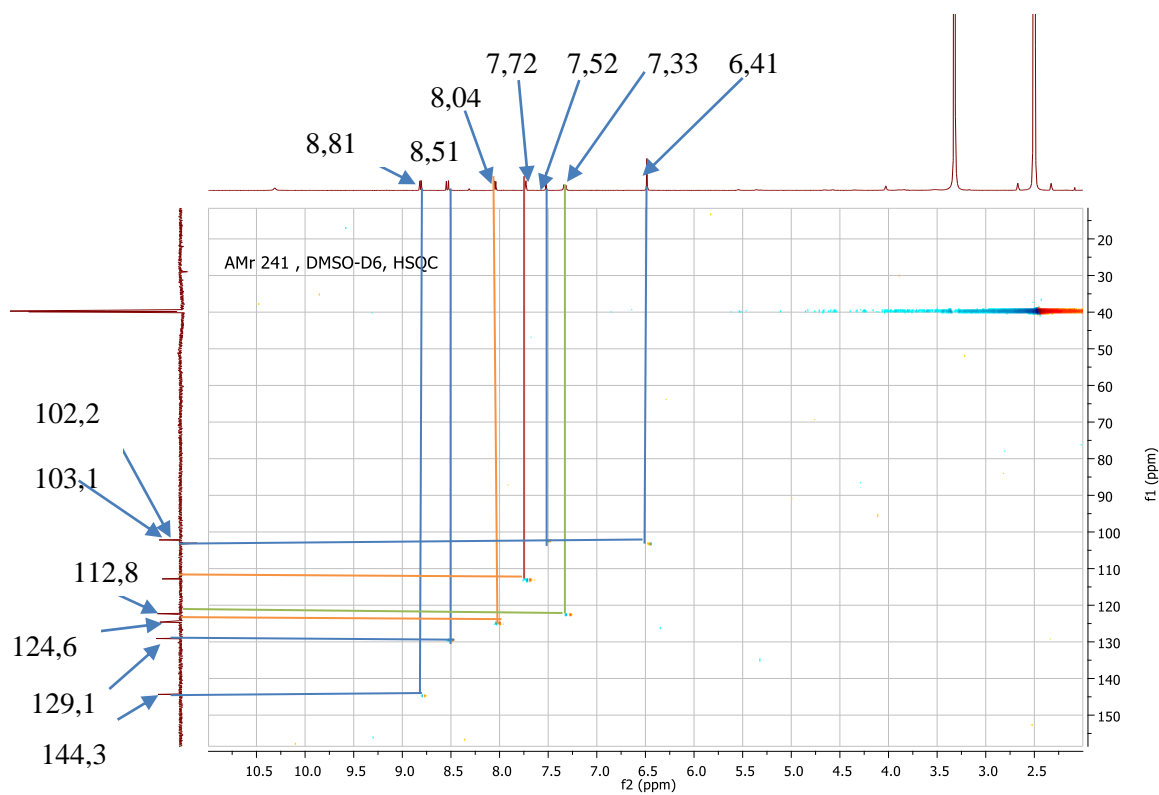


Figure 88: Spectre de HMQC de AMr₂₄₁

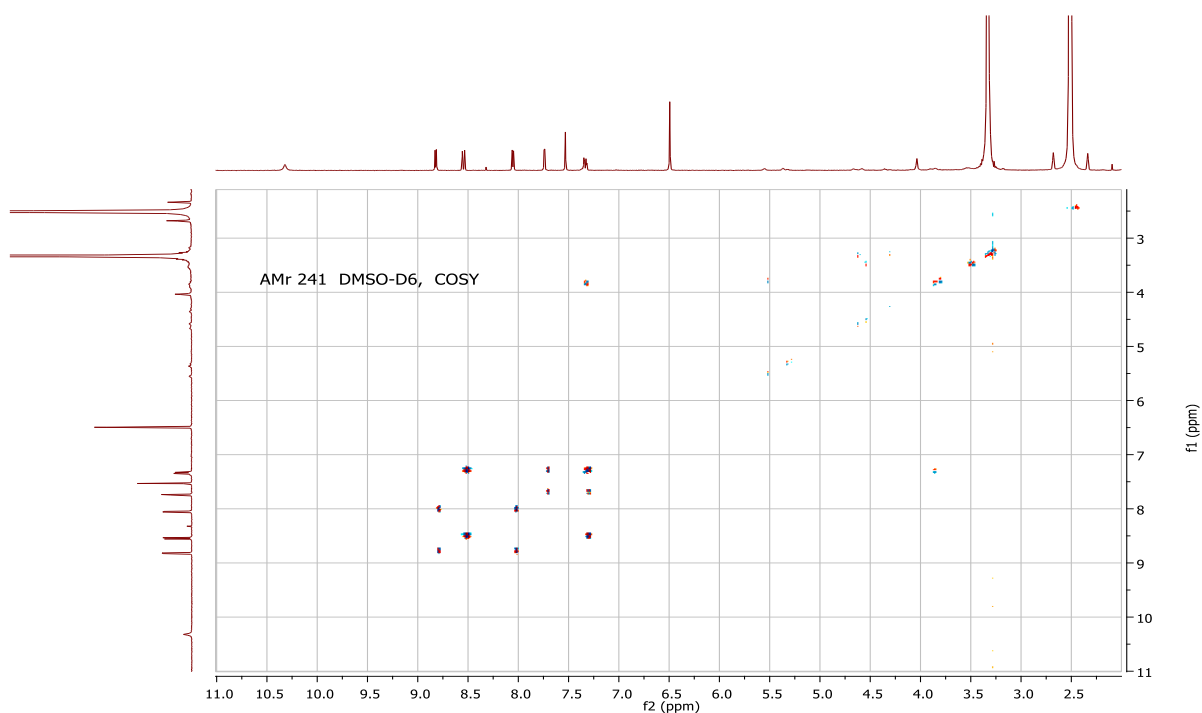


Figure 89: Spectre de COSY (DMSO-d₆, 600 MHz) de AMr₂₄₁

L'analyse des spectres RMN ¹³C (**Fig. 90**) et DEPT (**Fig. 91**) révèle la présence de 17 signaux de carbones dont un méthylène, 6 méthines et 10 carbones quaternaires. Dans les champs faibles on observe un signal à δ_C 181,1 attribuable à un carbonyle α -insaturé. Cependant les signaux résonants à δ_C 157,7 et δ_C 151,7 sont attribués aux carbones C-5' et C-6 respectivement. Le signal à δ_C 135,4 a été attribué à un carbone d'un méthylène lié à un azote (C-9).

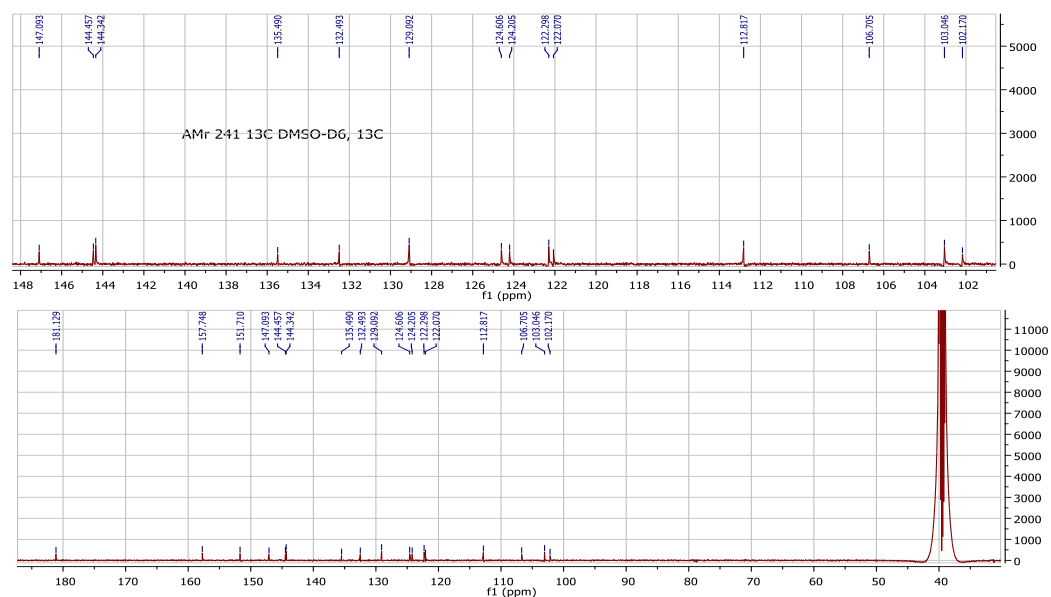


Figure 90: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (DMSO-d₆, 150 MHz) de AMr₂₄₁

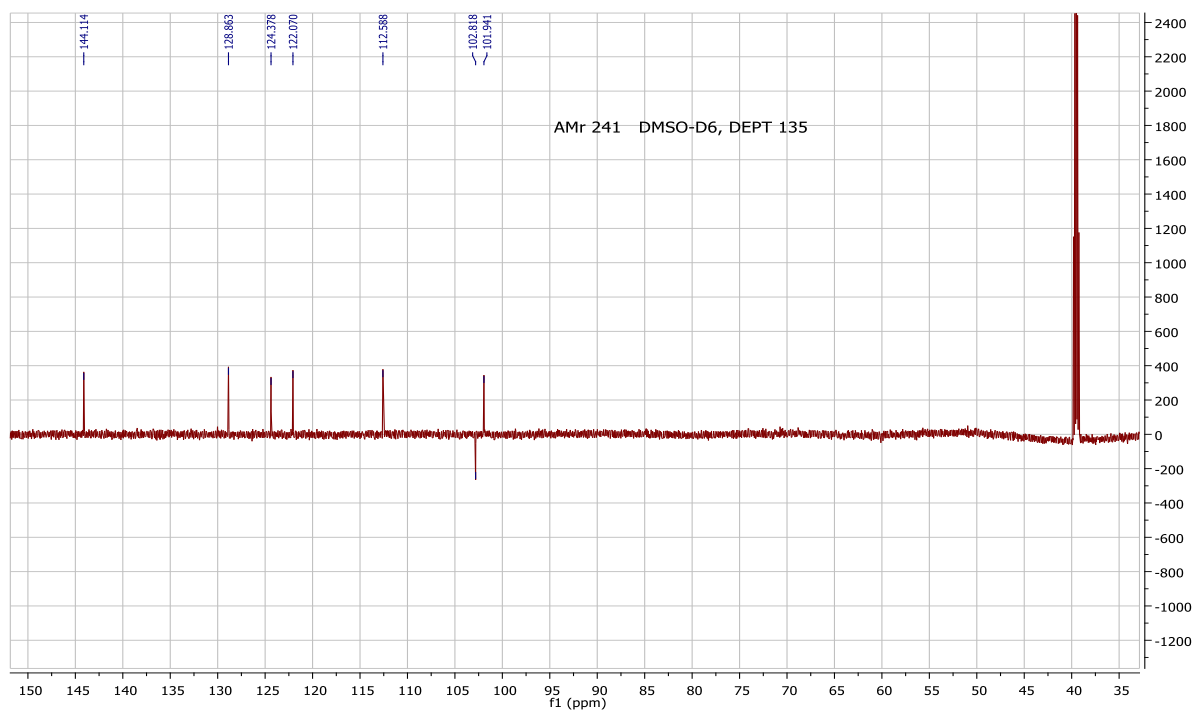


Figure 91: Spectre de DEPT 135 (DMSO-d₆, 150) de AMr₂₄₁

Sur son spectre HMBC (Fig. 92) on observe les différentes corrélations suivantes entre :

- Les protons à δ_H 6,48 et les carbones à δ_C 151,7 et 147,0
- Le proton à δ_H 7,52 et les carbones à δ_C 151,7 ; 147,0 ; 122,3 ; 124,6 et 106,7
- Le proton à δ_H 8,04 et les carbones à δ_C 102,2 ; 144,3 ; 122,3 et 135,4
- Le proton à δ_H 8,81 et les carbones à δ_C 124,6 ; 144,3 ; 122,3 et 135,4

- Le proton à δ_H 7,72 et les carbones à δ_C 181,1 ; 122,3 et 124,2
- Le proton à δ_H 7,31 et les carbones à δ_C 112,8 et 124,2

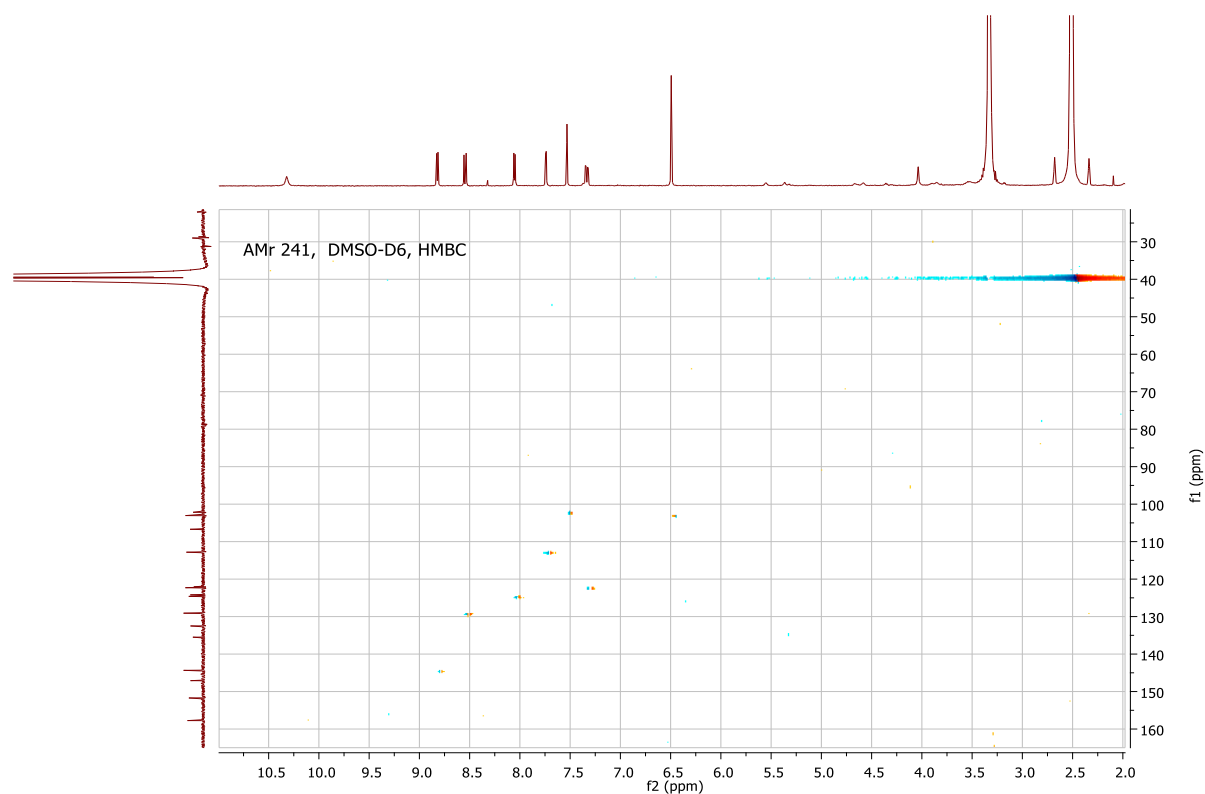


Figure 92: Spectre de HMBC (DMSO-d₆) de AMr₂₄₁

Ces corrélations nous ont permis de relier les différents fragments. L'ensemble de ces données spectrales combinées à celles rencontrées dans la littérature nous ont conduit à attribuer à AMr₂₄₁ la structure (**114**) qui est celle de l'oxoanolobine précédemment décrite par **Rattana et al 2016**. Ce composé a montré une activité anticancéreuse (**Rattana et al., 2016**).

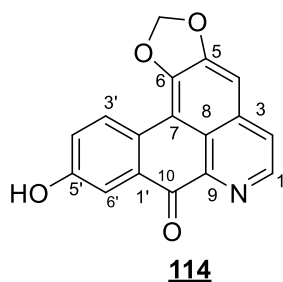


Tableau 35: Données spectrales de RMN ¹³C (DMSO,150 MHz) de AMr₂₄₁ comparées à celles de l'oxoanolobine de la littérature RMN ¹³C (MeOD,150 MHz) (Rattana et al., 2016)

Position	AMr ₂₄₁ (δ_C) (114)	Littérature (δ_C) (MeOD)	Position	AMr ₂₄₁ (δ_C) (114)	Littérature (δ_C) (MeOD)
1	144,3	138,6	10	181,1	182,2
2	124,6	127,8	1'	122,3	130,5
3	122,3	146,9	2'	124,2	132,7
4	102,2	104,6	3'	129,1	131,8
5	147,1	164,5	4'	122,1	133,9
6	151,7	164,2	5'	157,7	157,8
7	106,7	121,8	6'	112,8	130,9
8	132,4	140,2	CH₂O	103,1	107,1
9	135,4	161,4			

II.2.4. Les dérivés de l'acide benzoïque

II.2.4.1. Identification du composé AMe₃₄₉

AMe₃₄₉ a été obtenu sous forme de poudre amorphe jaune des écorces de *A. mannii* dans le système Hex-AE (1 : 1). Il est soluble dans la DMSO et répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des phénols.

L'analyse de son spectre de RMN ¹H (**Fig. 93**) couplée au spectre HMQC (**Fig. 94**) met en évidence un système ABX intégrant trois protons aromatiques à δ_H/δ_C 7,34 (1H ; d ; 2,0 Hz) /116,7 ; 7,29 (1H ; dd ; 2,0 et 8,4 Hz) /121,9 et 6,78 (1H ; d ; 8,4 Hz) /115,2.

L'analyse couplée des spectres de RMN ¹³C et de DEPT 135 (**Fig. 95 et 96**) révèle la présence de sept carbones dont un carbonyle d'acide à δ_C 167,3, trois méthynes oléfiniques à δ_C 121,9 ; 116,7 ; 115,2 et trois carbones quaternaires dont deux à δ_C 144,9 et 150 assignables aux carbones aromatiques ortho oxygénés et un non hydroxylé à δ_C 121,6

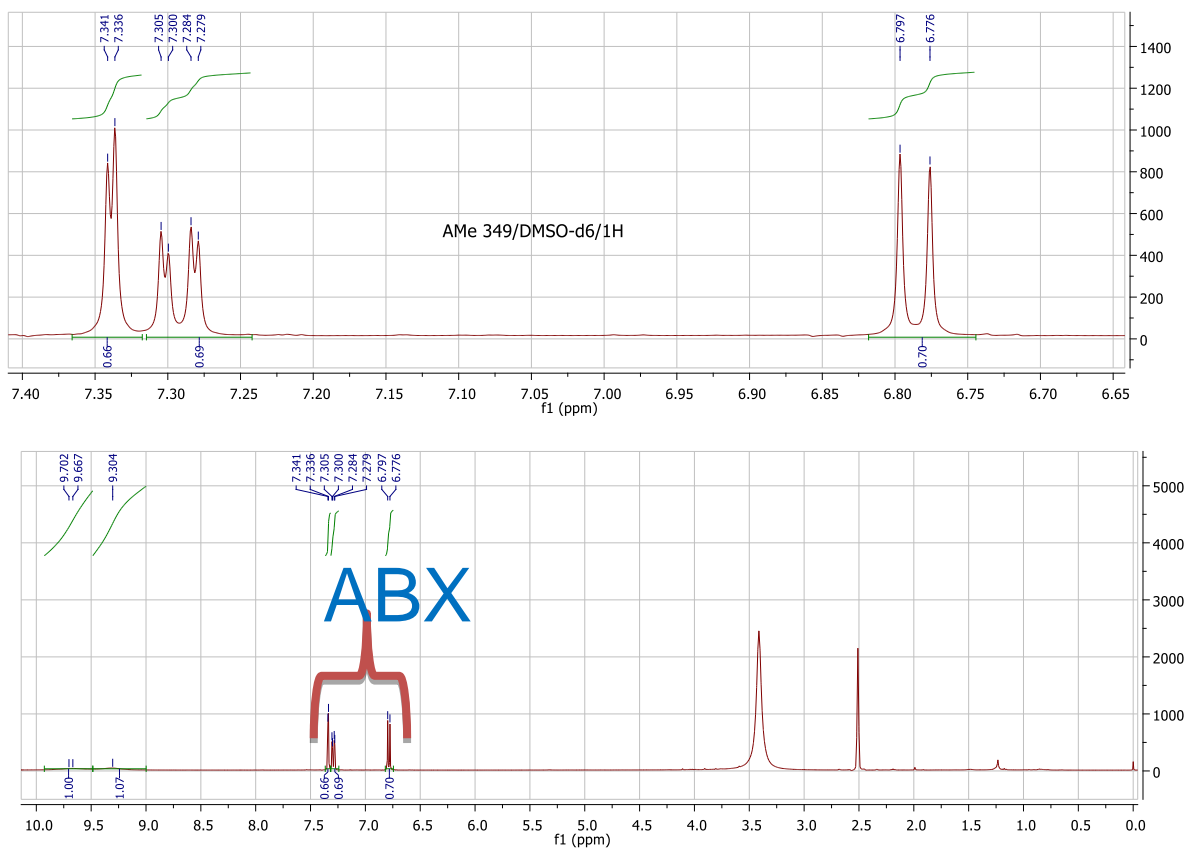


Figure 93: Spectre de RMN ^1H (DMSO-d₆, 600 MHz) de AMe₃₄₉

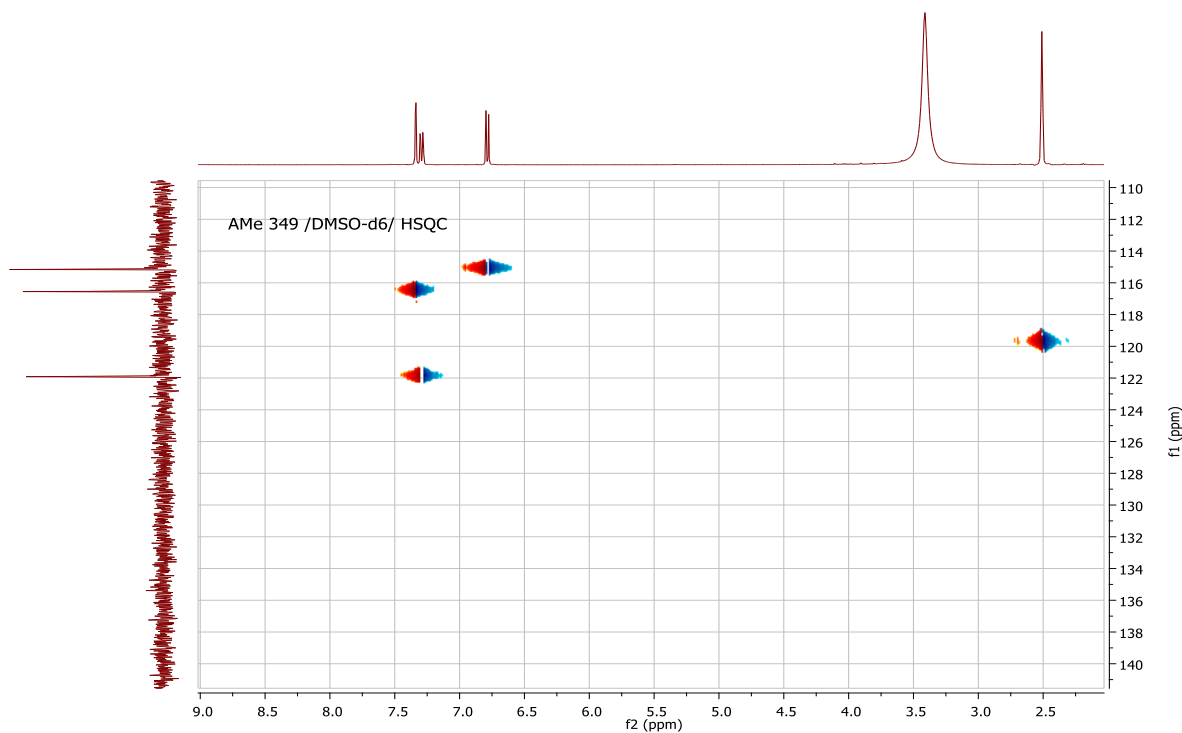


Figure 94: Spectre de HMQC (DMSO-d₆) de AMe₃₄₉

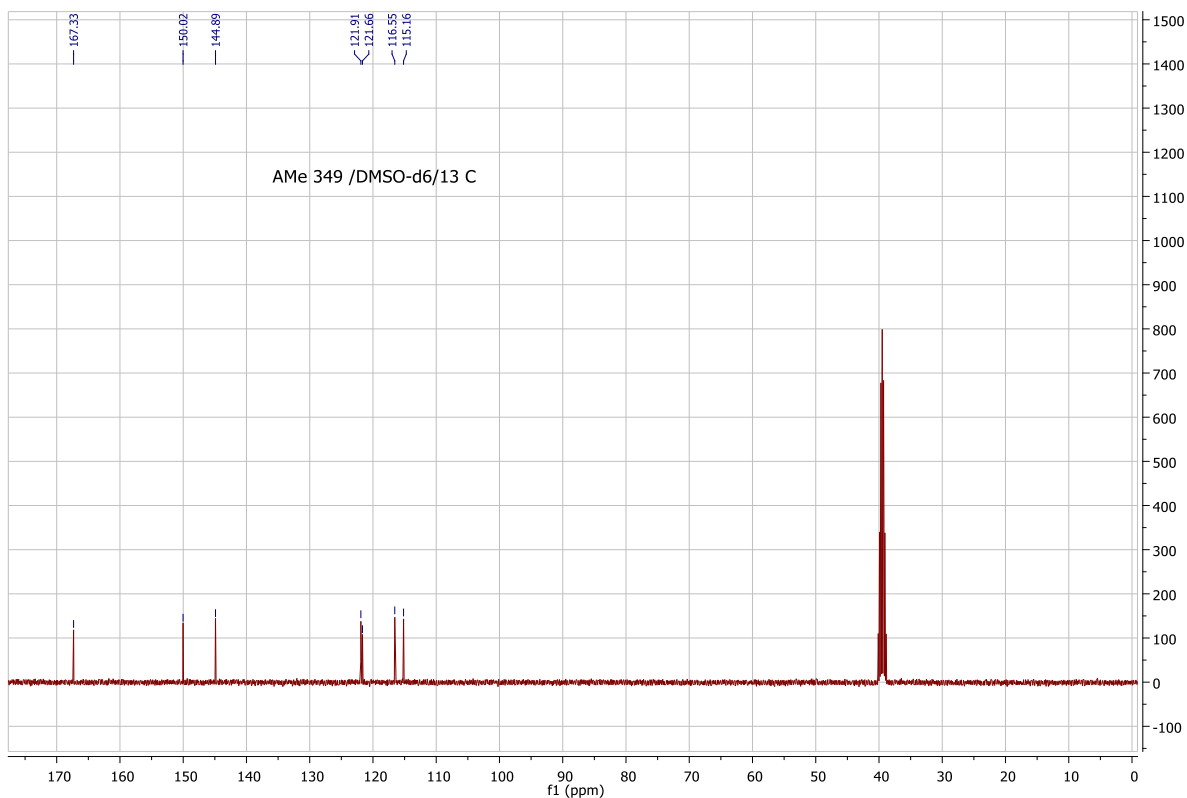


Figure 95: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (DMSO-d₆, 150 MHz) de AMe₃₄₉

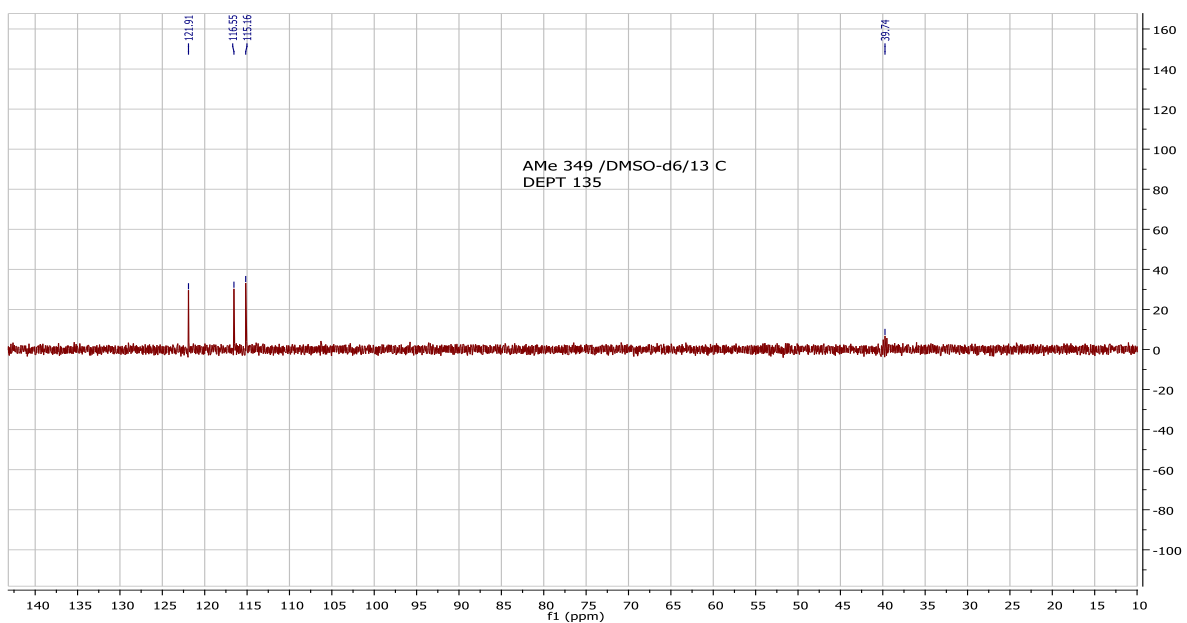


Figure 96: Spectre de ^{13}C -DEPT 135 (DMSO-d₆, 150 MHz) de AMe₃₄₉

L'analyse de ces données nous permet d'attribuer à AMe₃₄₉ la structure (**115**) qui est celle de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque qui possède une forte activité antioxydante (Syafni et Putra, 2012).

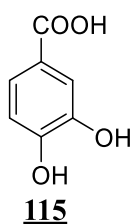


Tableau 36: Données spectrales de RMN ¹³C (DMSO, 150 MHz) de AMe₃₄₉ comparées à celles de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque de la littérature RMN ¹³C (MeOD, 75 MHz) (Syafni et Putra, 2012).

Positions	AMe ₃₄₉ (δ_H) (115)	AMe ₃₄₉ (δ_C) (115)	Littérature (δ_C)
1	-	121,2	121,7
2	7,34(1H, d ,2 Hz)	116,7	116,3
3	-	144,9	144,6
4	-	150,1	150,1
5	6,78(1H ; d ; 8,4 Hz)	115,2	114,3
6	7,29(1H ; dd ; 2 et 8,4 Hz)	121,9	122,4
C=O	-	167,3	160,3

II.2.4.2. Identification du composé DW₅

DW₅ a été obtenu sous forme de poudre amorphe jaune des lianes de *D. Welwitschii* dans Hex-AE (25 :75). Il est soluble dans la pyridine et répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des phénols.

L'analyse de son spectre de RMN ¹H (**Fig. 97**) met en évidence un système ABX intégrant trois protons aromatiques à δ_H 7,31(1H, d, 8Hz), à δ_H 8,06 (1H, d, 8, 3 Hz) et 8,14 (1H ; dd ; 4 et 8,4 Hz). Un signal à δ_H 3,75(3H, s) suggérant la présence d'un groupement méthoxy.

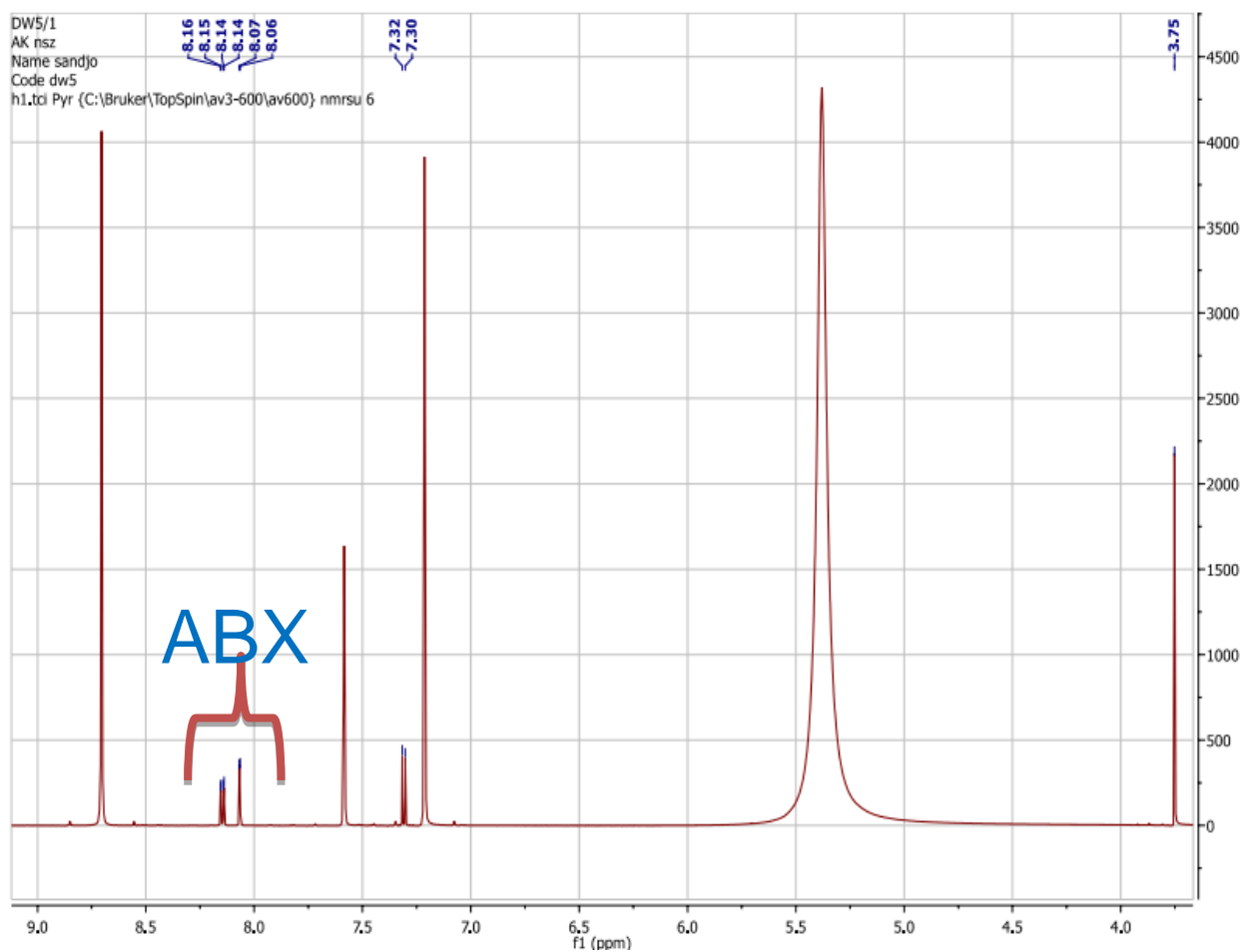


Figure 97: Spectre de RMN ^1H (Pyr- d_5 , 400 MHz) de DW $_5$

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C (**Fig. 98**) révèle la présence de huit carbones dont un carbonyle à δ_c 170,5 ; trois méthynes aromatiques à δ_c 126,1 ; 117,4 ; 115,1 et trois carbones quaternaires dont deux hydroxylés à δ_c 149,6 et 153 et un non hydroxylé à δ_c 124,5. La présence du signal à δ_c 57,1 est en accord avec la présence d'un groupe méthoxy.

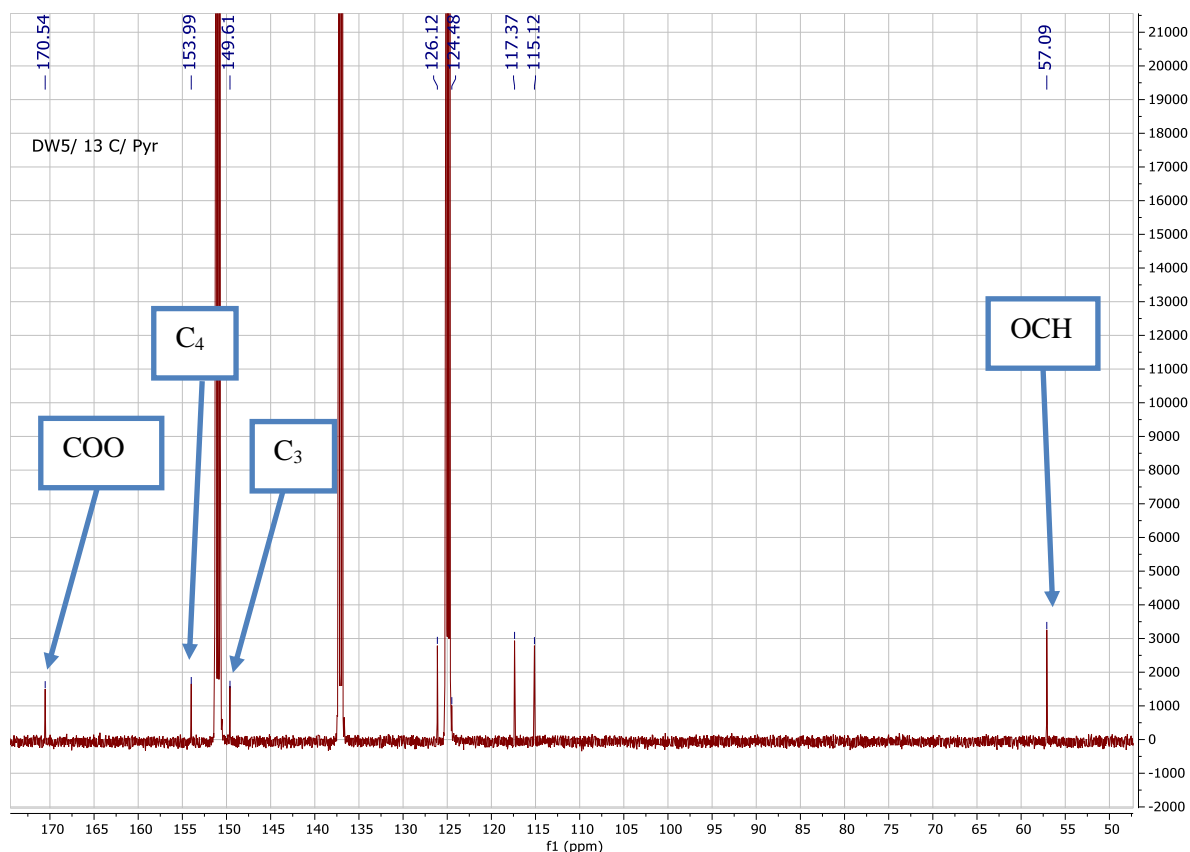


Figure 98: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (Pyr- d_5 , 100 MHz) de DW₅

L'analyse de ces données nous permet d'attribuer à DW₅ la structure (**116**) qui est celle de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (Chang *et al.*, 2009). Ce composé a montré une activité antihistaminique (Duke, 2000)

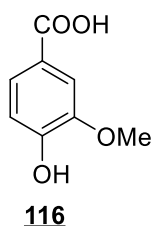


Tableau 37: Données spectrales de RMN ¹³C (Pyr-d₅, 100 MHz) de DW₅ comparées à celles de l'acide- 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque de la littérature RMN ¹³C (MeOD, 125 MHz) (Chang et al., 2009).

Positions	DW ₅ (δ _C) (116)	Littérature (δ _C)
1	124,5	124,1
2	115,1	116,5
3	149,6	147,5
4	154,0	151,4
5	117,4	114,3
6	126,1	122,9
C=O	170,5	167,6
OMe	57,1	55,2

II.2.4.3. Identification du composé DWBP₂

DWBP₂ obtenu sous forme de poudre amorphe marron de *D. welwitschii*, après CCM préparative de la sous-fraction éluée avec CHCl₃ - MeOH (85-15) de la fraction au n-butanol. Il est soluble dans le DMSO. La formule brute C₁₉H₂₀O₁₀ a été établie à partir de son spectre de masse ESI haute résolution (**Fig. 99**) qui a montré le pic d'ion moléculaire à m/z 433,1112 renfermant 10 degré d'insaturations.

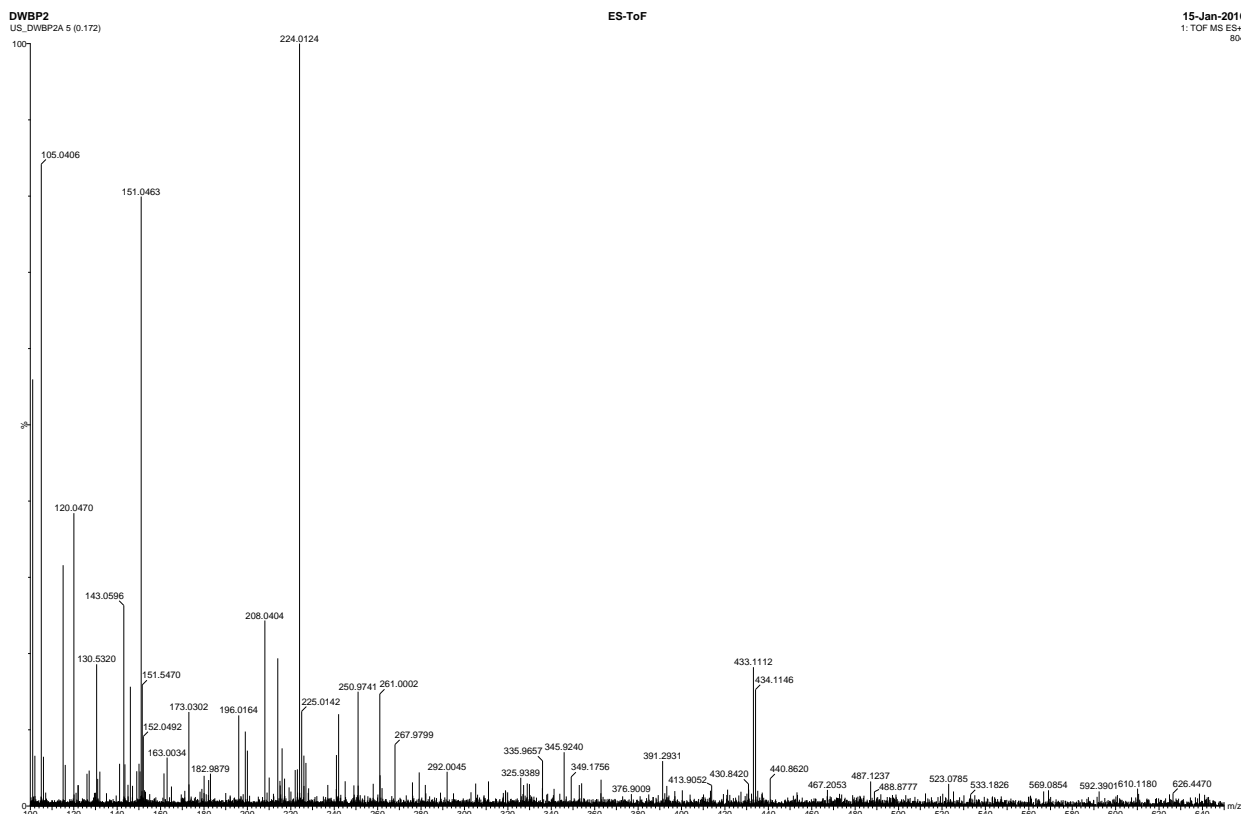


Figure 99: Spectre de masse ES-TOF de DWBP₂

Son spectre IR (**Fig.100**) exhibe des bandes de vibration caractéristiques de groupes fonctionnels à : 3340 cm⁻¹ (OH libre), 1606cm⁻¹ (C=O).

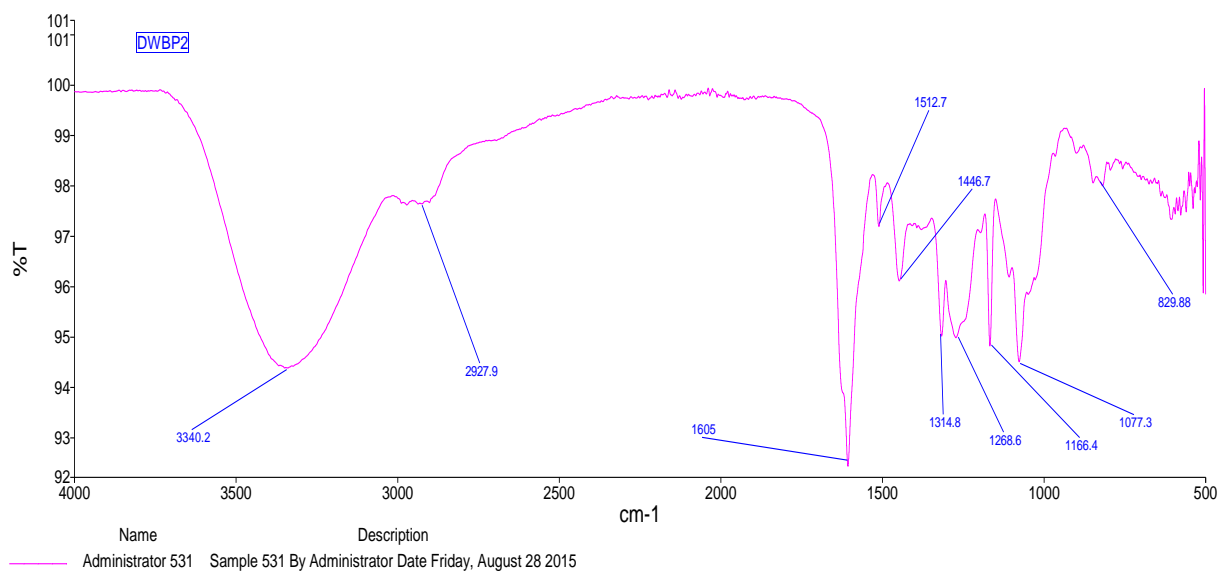


Figure 100: Spectre de IR de DWBP₂

Le spectre de RMN ^1H de DWBP₂ (**Fig 101**) révèle la présence :

- Des signaux d'un noyau aromatique di-substitué (système AA'BB') à δ_{H} 7,56 (2H ; d ; 8,7 Hz, H-2' et H-6') et 6,77 (2H, d ; 8,8 Hz, H-3' et H-5') ;
- D'un proton anomérique C-substitué d'un sucre à δ_{H} 4,51 (1H, d, 10,0 Hz)
- D'un proton à δ_{H} 5,96 (1H, s, H-5) ;
- Des signaux entre 3,63 et 3,32 ppm qui seraient ceux du D-glucose.

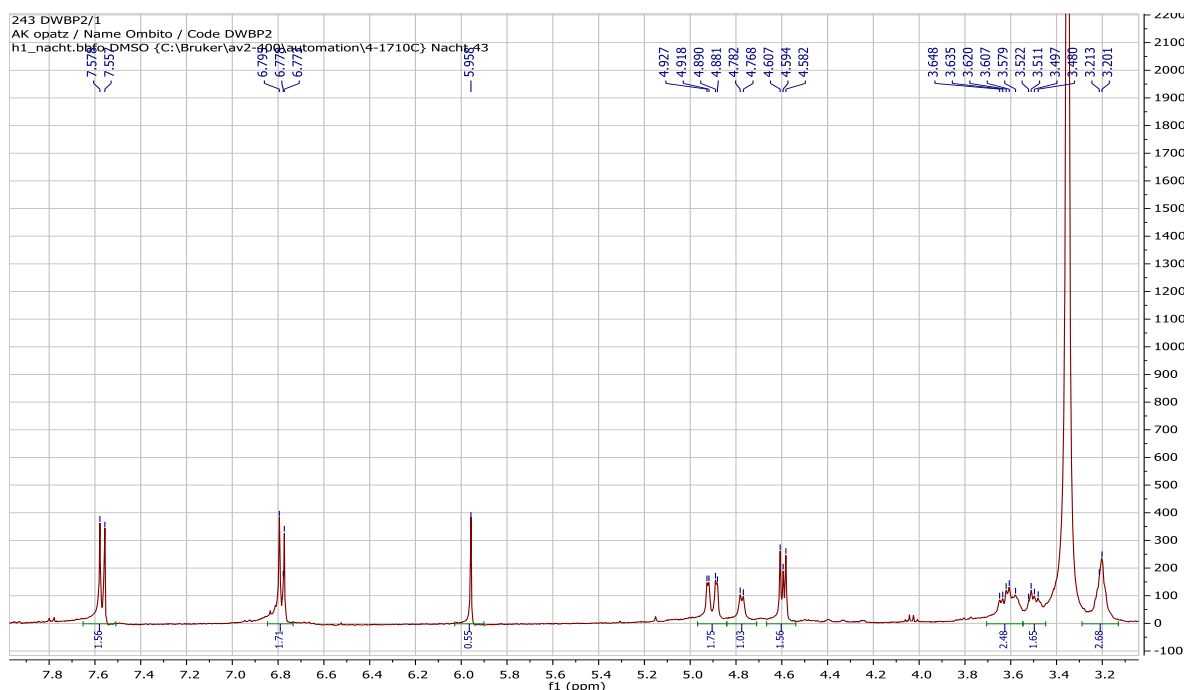


Figure 101: Spectre de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) de DWBP₂

L'analyse de ses spectres de RMN ^{13}C (**Fig 102**) et DEPT (**Fig 103**) révèle la présence de 17 signaux de carbones dont 1 méthylène, 9 méthines et 7 carbones quaternaires. Les carbones quaternaires incluent ceux d'une cétone à 195,1 ppm ; quatre signaux de carbones aromatiques oxygénés à 161,5 ; 103,1 ; 159,9 ; 95,2 ppm ; trois signaux de carbones aromatiques C-substitués à 131,1 ; 107,4 et 157,8 ppm.

Deux signaux intenses à 132,0 et 115,1 ppm correspondant aux signaux de quatre méthines aromatiques montrant ainsi la présence d'un noyau aromatique disubstitué. Les cinq méthines aliphatiques restants sont ceux du sucre.

L'absence d'un signal de CH dans la zone de 100-105 ppm caractéristique des O-glucosides, montre que le sucre est directement lié au noyau aromatique (C-glucose).

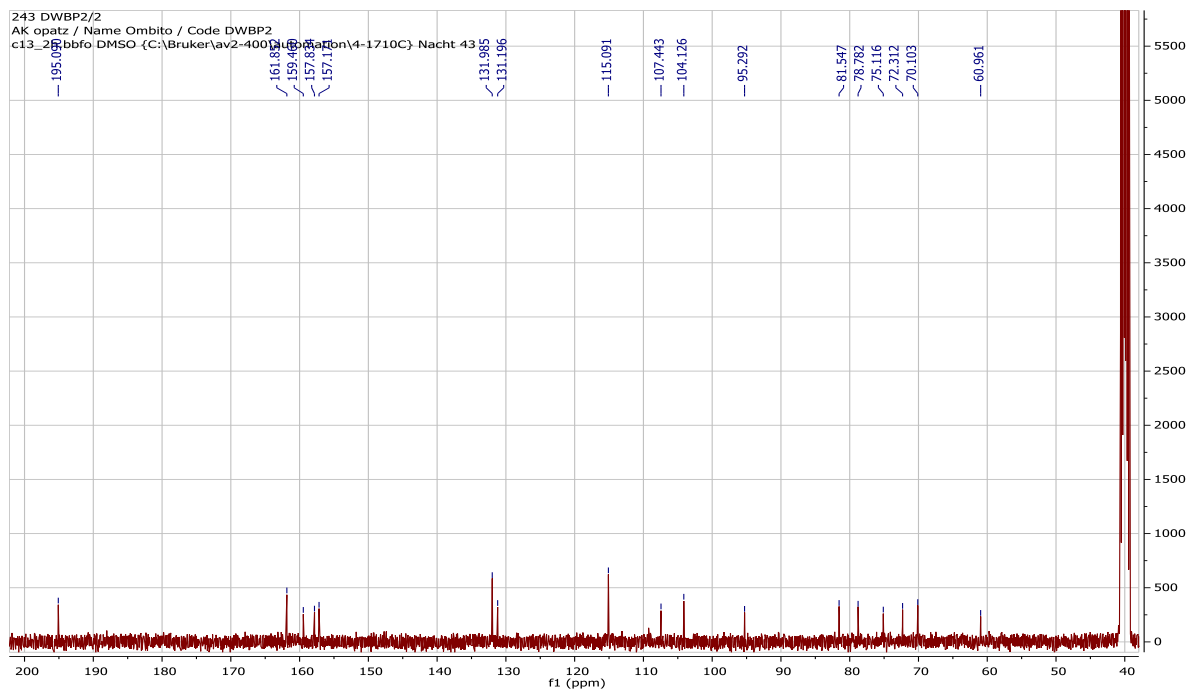


Figure 102: Spectre de RMN ^{13}C découplé large bande (DMSO- d_6 , 75MHz) de DWBP $_2$

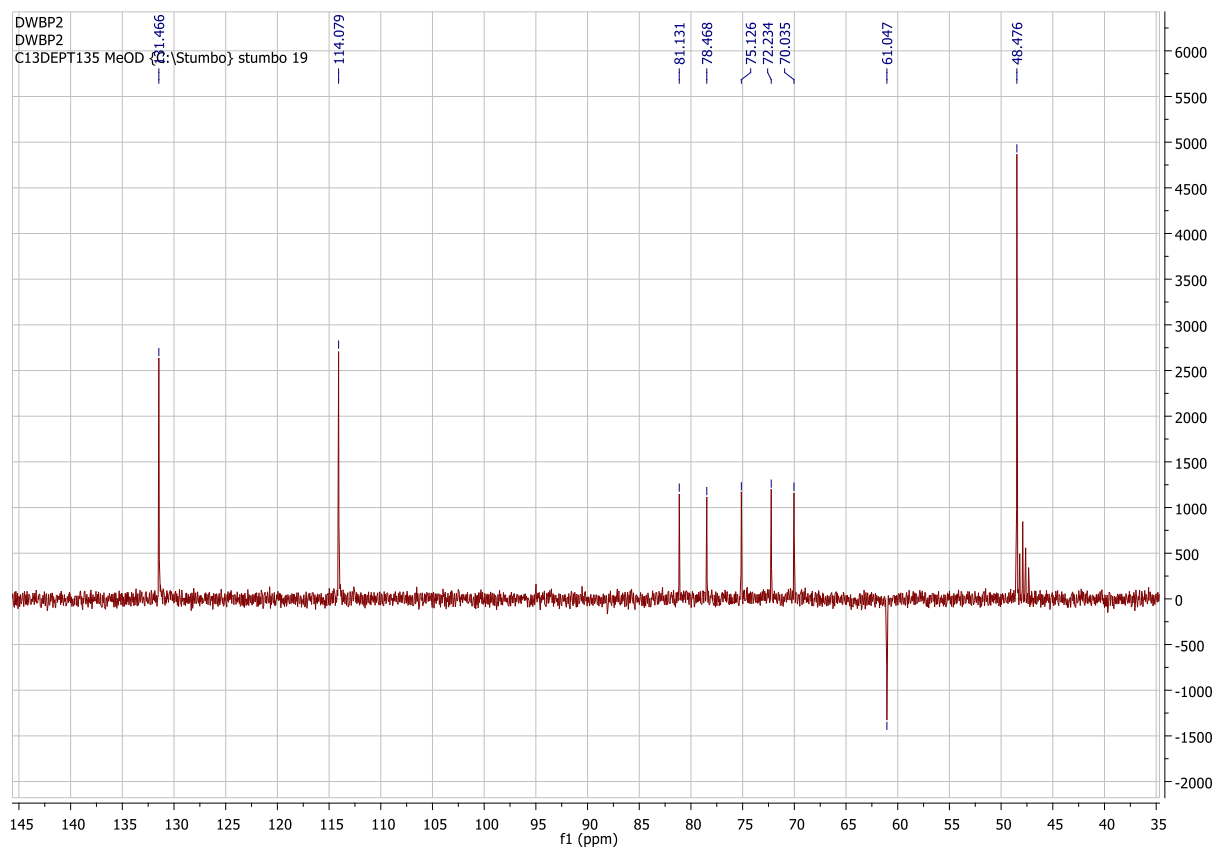


Figure 103: Spectre de DEPT1 35 de DWBP $_2$

Le spectre HMBC (Fig 104) montre les corrélations entre le proton H-1'' du sucre à δ_H 4,51 (1H ; d ; 6,0 Hz) et les carbones C-2, C-4, C-3 à δ_C 157,1 ; 159,8 ; 157,8 respectivement du noyau aromatique substitué au sucre d'une part et d'autre part on observe les corrélations HMBC entre ce proton et les carbones C-5'' et C-2'' du sucre. Le proton à δ_H 7,61 (2H ; d ; 8,8 Hz ; H-2') montre une corrélation HMBC avec le carbonyle à 197,6 ppm et un carbone oxygène aromatique à 161,8 ppm (C-4'). De plus le proton H-3' à δ_H 6,77 (2H ; d ; 8,8 Hz) corrèle avec ce dernier carbone (161,8 ppm) et le carbone à 132,0 ppm (C-2').

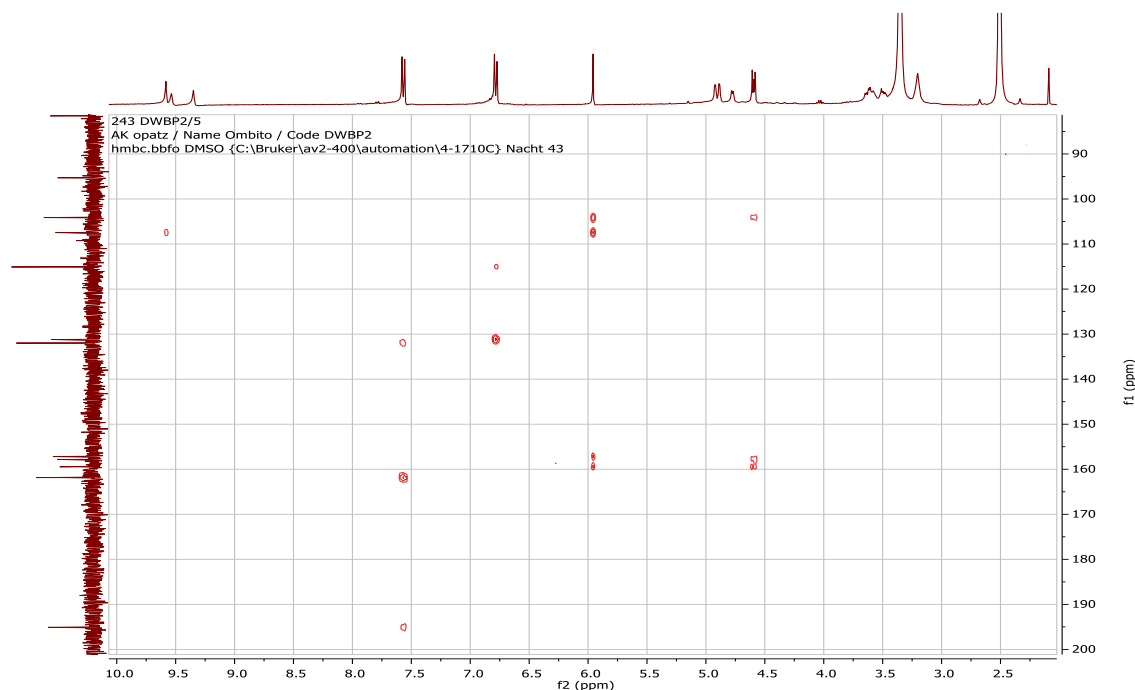


Figure 104: Spectre de HMBC de DWBP₂

Ainsi sur la base de ce qui précède et par comparaison avec les données spectrales tirées de la littérature (Severi et al., 2009) DWBP₂ a été identifié au 3-C- β -D-glucopyranosyl-2, 4', 4, 6-tétrahydroxybenzophénone (**117**).

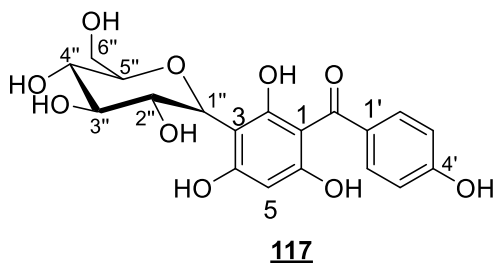


Tableau 38: Données spectrales de RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75 MHz) de DWBP₂ comparées à celles du 3-C-β-D-glucopyranosyl-2, 4', 4, 6-tétrahydroxyllbenzophénone de la littérature RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz) (Severi et al., 2009)

Position	DWBP2 (δ_C) (117)	Littérature (δ_C)	Position	DWBP2 (δ_C) (117)	Littérature (δ_C)
1	107,4	106,9	4'	161,8	161,3
2	157,1	156,8	5'	115,1	114,6
3	157,8	157,4	6'	132,0	131,4
4	159,8	159,1	1''	75,1	74,6
5	104,1	103,6	2''	72,3	71,9
6	95,3	94,9	3''	78,7	78,3
7	195,1	194,6	4''	70,0	69,6
1'	131,1	130,7	5''	81,5	81,0
2'	132,0	131,4	6''	60,9	60,5
3'	115,1	114,6			

II.3. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES DES EXTRAITS ET PRODUITS NATURELS ISOLES

II.3.1. Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) des extraits bruts des racines et écorces d'*Anonidium mannii*

Des résultats obtenus, il en ressort que les extraits bruts des racines et des écorces d'*A. mannii* possèdent une activité antibactérienne variable d'une souche à une autre avec des gammes de CMI comprises entre 64 µg/mL et 1024 µg/mL (Tableau 39).

Tableau 39: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) en µg/mL de la Ciprofloxacine, des extraits des racines et des écorces

Souche bactérienne Gram-négatives		Extraits des racines (AMR)		Extraits des écorces (AME)		Antibiotique de référence
		CMI (CMB) (µg/mL)	CMB/CMI	CMI (CMB) (µg/mL)	CMB/CMI	
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	256 (1024)	4	256 (-)		≤0.5 (1)
	AG100Atet	1024 (-)		1024 (-)		1 (4)
<i>P. aeruginosa</i>	PA 01	256 (-)		128 (-)		0.5 (4)
	PA 124	1024 (-)		256 (-)		≤0.5 (1)
<i>P. stuartii</i>	ATCC 29916	1024 (-)		1024 (-)		≤0.5 (≤0.5)
	PS 2636	256 (-)		128 (-)		≤0.5
<i>E. aerogenes</i>	ATCC 13048	256 (1024)	4	128 (1024)	8	≤0.5 (≤0.5)
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 11296	64 (256)	4	128 (1024)	8	≤0.5 (2)
	KP 55	256 (-)		512 (-)		≤0.5 (1)

(-) : Valeur de CMI ou de CMB > 1024 µg/mL pour AMR et AME. **En rouge** : activité significative.

II.3.2. Résultats des CMI et CMB des composés isolés d'*Anonidium mannii* et de *D.welwitschii*

Les activités antibactériennes de quelques composés isolés d'*Anonidium mannii* à savoir : anomanol A (**90**), 9-hydroxy-8-méthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**110**), lanosta-7,9(11),24-triène-3β,21-diol (**94**), l'oxoanolobine (**114**), l'acide 3, 4-dihydroxybenzoïque (**115**), le polycarpol (**89**), la 8,9-diméthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**109**), l'arborinine (**113**), le maniindole (**110**) et l'anomanol B (**91**); ont été évaluées. Les résultats sont consignés dans les tableaux ci-dessous (Tableaux **40** et **41**).

Les composés isolés des lianes de *D.welwitschii* à savoir : l'acide diospyrique B (**101**), D-glucopyranosyl-2,4',4,6-tetrahydroxylbenzophénone (**117**), spinastérol (**101**), taraxérol (**93**), l'acide oléanolique (**101**) et la 28-hydroxy-β-amyrine (**98**), ont été évalués pour leurs activités antibactériennes. (Tableau **42**).

Il en ressort que les composés testés possèdent des activités antibactériennes variées selon les souches ou isolats étudiés et la classe de composé, avec des gammes de CMI comprises entre 4 µg/mL et 512 µg/m (Tableaux 40, 41,42)

Tableau 40: concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) en µg/mL du ciprofloxacine et des composés isolés de *A. mannii* contre les bactéries Gram-négatives

Souche bactérienne multirésistante Gram-		CMI et CMB (en parenthèse) valeurs (µg/mL) des composés isolés						Antibiotique de référence
		AMe ₁₈₄ (108)	AMe ₂₈₁ (90)		AMr ₂₄₁ (114)	AMrH ₁₆₃ (92)	AMe ₃₄₉ (115)	ciprofloxacine
			CMI (CMB)	CMI /CMB				
<i>E.coli</i>	ATCC 8739	-			-	-	128 (-)	≤0,5 (1)
	AG100 Atet	128 (-)	32 (32)	1	128 (256)	128 (-)	256 (-)	1 (4)
<i>P. aeruginosa</i>	PA 01	256 (-)	-		-	256 (-)	128 (-)	0,5 (4)
	PA 124	256 (-)	-		-	128 (-)	256 (-)	≤0,5 (1)
<i>P. stuartii</i>	ATCC 29916	128 (-)	-		-	-	128 (-)	≤0,5 (≤0,5)
	PS 2636	-	-		-	-	256 (-)	≤0,5
<i>E. aerogenes</i>	ATCC 13048	-	256 (-)		-	-	128 (-)	≤0,5 (≤0,5)
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 11296	-	16 (32)	2	128 (-)	-	256 (-)	≤0,5 (2)
	KP 55	-	-		-	-	128 (-)	≤0,5 (1)

(-) : Valeur de CMI ou de CMB >512 µg/mL pour les composés **En rouge**: activité modérée.

AMe₁₈₄ : 9-hydroxy-8-méthoxyphénanthridin-6(5H)-one, AMe₂₈₁ : anomanol A, AMr₂₄₁ : oxoanobine, AMrH₁₆₃ : lanosta-7,9(11),24-triène-3β,21-diol, AMe₃₄₉ : acide 3, 4-dihydroxybenzoïque.

Tableau 41: concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) en µg/mL du chloramphénicol et de quelques composés isolés de *A. mannii* contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positifs

souches et isolats bactériens		CMI et CMB (en parenthèse) valeurs (µg/mL) des composés isolés					Antibiotique de référence
		AMr ₁ (89)	AMr ₁₇₂ (109)	AMr _{52P} (113)	AMra ₃₀₆ (110)	AMe ₂₄₀₋₂₄₉ (91)	chloramphénicol
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	256 (nd)	64 (nd)	32(128)	128 (nd)	128 (nd)	8 (64)
	AG100A tet	256 (-)	64 (nd)	64 (128)	256 (nd)	128 (nd)	8 (128)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA 01	- (-)	- (-)	128(nd)	256 (nd)	256 (nd)	4 (32)
	PA 124	- (-)	226 (nd)	128(nd)	256 (nd)	256 (nd)	4 (64)
<i>Providencia stuartii</i>	ATCC 29916	128 (-)	128 (nd)	64 (-)	128 (nd)	256 (nd)	8 (64)
	PS 2636	256 (nd)	64 (nd)	64 (256)	64 (128)	128 (nd)	8(128)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	256 (nd)	128 (nd)	64 (256)	128 (nd)	128 (nd)	4 (128)
	EA27	128 (nd)	128 (nd)	128(nd)	128 (nd)	128 (nd)	8(64)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 11296	128 (nd)	64 (nd)	64 (256)	128 (nd)	128 (nd)	4 (32)
	KP 55	128 (nd)	128 (nd)	64 (-)	256 (nd)	256 (nd)	8 (32)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	128 (nd)	128 (nd)	64 (256)	128 (nd)	256 (nd)	2 (32)
	MRSA3	128 (nd)	64 (nd)	128 (nd)	64 (256)	256 (nd)	4(32)
	MRSA6	128 (nd)	64 (nd)	32 (128)	128 (nd)	128 (nd)	4(128)

(-) : Valeur de CMI ou de CMB > 1024 µg/mL ou inactif pour les composés ; (nd) : non déterminée. **En bleu** : activité modérée. AMr₁ : polycarpol, AMr₁₇₂: 8,9-diméthoxyphénanthridin-6(5H)-one, AMr_{52P}: arborinine, AMra₃₀₆: maniindole, et AMe₂₄₀₋₂₄₉: anomanol B

Tableau 42: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) en µg/mL des composés isolés de *D.welwitschii* et du chloramphénicol contre les bactéries Gram-négative et Gram-positives

souches bactérienne multirésistantes Gram-(10) et Gram+(3)		CMI (CMB) valeurs (µg/mL) et CMB /CMI des composés isolés									Antibiotique de référence
		DwBP ₁ (117)	Dw ₁ (102)	DW ₂ (93)	DW ₁₀ (99)		DW ₈ (101)		DW ₇ (98)		Chloramphénicol
					CMI (CMB)	CMB /CMI	CMI (CMB)	CMB /CMI	CMI (CMB)	CMB /CMI	
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	512 (nd)	128 (nd)	128 (256)	64 (512)	4	64 (256)	4	32 (512)	16	8 (64)
	AG100Atet	128 (nd)	128 (nd)	512 (nd)	4 (128)	32	8 (128)	16	16 (512)	32	8 (128)
<i>P. aeruginosa</i>	PA 01	256 (nd)	128 (nd)	256 (nd)	32 (512)	16	64 (256)	4	128 (512)	4	4 (128)
	PA 124	128 (nd)	128 (nd)	512 (nd)	32 (512)	8	32 (128)	4	8 (1024)	128	8 (64)
<i>P. stuartii</i>	ATCC 29916	256 (nd)	128 (nd)	256 (256)	32 (256)	64	8 (512)	64	4 (512)	128	4 (32)
	PS 2636	512 (nd)	64 (nd)	128 (12)	8 (128)	4	128 (512)	4	128(512)	4	8(32)
<i>E. aerogenes</i>	ATCC 13048	256 (nd)	256 (nd)	512 (nd)	8 (128)	32	16 (512)	32	64 (256)	4	8 (64)
	EA27	512 (nd)	512 (nd)	258 (nd)	32 (128)	64	8 (512)	64	128 (256)	2	8 (128)
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 11296	512 (nd)	128 (nd)	256 (nd)	32 (256)	4	64 (256)	4	128 (512)	4	4 (32)
	KP 55	512 (nd)	128 (nd)	512 (nd)	4 (64)	4	32 (128)	4	64 (512)	8	4 (64)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	128 (nd)	512 (nd)	128 (12)	32 (512)	4	128 (512)	4	64 (256)	4	2 (32)
	MRSA3	128 (nd)	512 (nd)	128 (51)	8 (128)	4	128 (512)	4	128 (256)	2	4(32)
	MRSA6	128 (nd)	512 (nd)	128 (25)	64 (512)	4	128 (512)	4	8 (512)	64	4 (128)

(-) : Valeur de CMI ou de CMB > 1024 ou inactif µg/mL pour les composés ; (nd) : non déterminée **En bleu** : activité modérée ; **En rouge** : activité significative.

DwBP₁ : D-glucopyranosyl-2,4',4,6-tetrahydroxylbenzophénone, **Dw₁** : spinastérol , **Dw₂** : taraxérol, **DW₁₀**: acide diospyrique B, **DW₈**: acide oléanolique, **DW₇**: érythrodiol

II.3.3. Discussion

D'après l'échelle de classification des activités établis par **Kuete** en **2010**, l'activité antibactérienne de l'extrait de la plante est classée comme significative si la CMI <100 µg/mL ; modérée si $100 < CMI \leq 625$ µg/mL ; et faible si la CMI >625 µg/ml. Au regard de cette échelle et des CMI des extraits obtenus vis-à-vis des souches multirésistantes, il est à noter que les extraits bruts des racines (AMR) et des écorces (AME) ont des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ≤ 1024 µg/ml sur toutes les souches bactériennes testées. L'extrait le plus actif avec des CMI variant de 64 µg/mL à 1024 µg/mL est celui des racines. La plus faible valeur de CMI 64 µg/mL a été obtenue sur la souche *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 11296). L'activité significative l'extrait brut des racines (AMR) (CMI < 100 µg/mL) envers *K. pneumoniae* ATCC11296 est contraire à l'étude de **Djeussi et al., 2013** qui a montré que l'extrait méthanolique des feuilles était inactif sur la même souche. En effet nos échantillons ont été recolté en Mai 2015 dans la région du Centre alors que le leur a été achecté en Janvier 2011 sur les marchés de la région de l'Ouest Cameroun. L'extrait des racines a été mondérément actif sur les souches *Escherichia coli* ATCC8739, *P. aeruginosa* PA01, *P. stuartii* PS2636, *E. aerogenes* ATCC13048 et *K. pneumoniae* KP55. De même, l'extrait des écorces a été mondérément actif sur les souches précédentes en plus des souches *P. aeruginosa* PA124 et *K. pneumoniae* ATCC11296. L'extrait brut des racines possède une activité bactériostatique sur des souches *E. coli* ATCC 8739, *E. aerogenes* ATCC 13048 et *K. pneumoniae* ATCC11296.

Selon l'échelle de classification des activités établis pour les composés purs obtenus à partir de plantes médicinales par **Kuete** en **2010**, les composés purs sont considérés comme ayant une activité significative s'ils ont une CMI <10 µg/mL, une activité modérée si $10 < MIC \leq 100$ µg/mL et une activité faible s'ils ont une CMI >100 µg/mL. Sur cette base l'anomanol A (**90**), la 9-hydroxy-8-méthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**108**), la lanosta-7,9(11),24-triène-3β,21- diol (**92**), l' oxoanolobine (**114**), l'acide 3, 4-dihydroxybenzoïque (**116**), ont été respectivement actifs (de façon modérée et faible) sur 3/11 (27,27%), 3/11 (27,27%), 3/11 (27,27%), 2/11 (18,18%) et 11/11 (100%) des bactéries testées. Le polycarpol (**89**), la 8,9-diméthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**109**), l'arborinine (**113**), l'anomanol B (**91**), et le manniindole (**110**), ont été respectivement actifs (de façon modérée et faible) sur 10/13 (76,92%), 12/13 (92,3%) , 13/13 (100 %), 13/13 (100%) et 13/13 (100%) des bactéries testées.

Vis-à-vis de l'ensemble des espèces de bactéries testées, les produits : D-glucopyranosyl-2,4',4,6-tetrahydroxylbenzophenone (**117**), spinastérol (**102**), l'acide oléanolique (**101**), l'acide diospyrique B (**99**), l'érythrodiol (**98**) l'anomanol B (**91**), l'arborinine (**113**) et le manniindole (**110**) ont présenté un spectre d'activité appréciable (actif sur 100 % des souches bactériennes testées), les autres produits testés ont présentés des activités variables selon les isolats et souches.

Cependant, l'acide diospyrique B (**101**) a significativement inhibé (CMI < 10 µg/mL) la croissance de *E. coli* AG102, *E. aerogenes* ATCC13048, *K. pneumoniae* KP55, *P. stuartii* ATCC 29916 et *S. aureus* MRSA3 avec des CMI comprises entre 4 et 8 µg/mL. L'activité significative de la 28-hydroxy-β-amyrine (**98**) (CMI < 10 µg/mL) envers *P. stuartii* ATCC 29916, *P. aeruginosa* PA124 et *S. aureus* MRSA6 est en accord avec l'étude d'**Abdel-Raouf et al., 2015** qui a mis en évidence l'intéressante capacité d'inhibition de croissance de β-amyrine contre *S. aureus* NCTC 7447 et *S. typhi* ATCC 19430. L'acide oléanolique (**101**) a montré une activité significative avec des CMI de 8 µg/mL sur *E. coli* AG100 Atet, *E. aerogenes* EA27 et ce qui est conforme aux travaux de **Martins et al., 2011** qui ont montré l'activité antibactérienne de l'acide oleanoïque contre *E. coli* AG100, *S. aureus* COL résistant à la méthicilline, *S. aureus* HPH 107 et *M. tuberculosis* H37Rv.

L'acide diospyrique B (**101**) possède un effet bactéricide sur les souches de *E. coli* AG100 Atet, *E. aerogenes* ATCC13048 et un effet bactériostatique sur les souches *P. stuartii* PS 2636 et *K. pneumoniae* KP55 et *S. aureus* MRSA3. L'acide oléanolique (**101**) a montré un effet bactéricide sur *E. coli* AG100 Atet, *E. aerogenes* EA27 et *P. stuartii* ATCC 29916. Quand à érythrodiol (**98**), il possède un effet bactéricide sur les espèces *P. stuartii* ATCC 29916, *P. aeruginosa* PA124 et *S. aureus* MRSA6.

L'anomanol A (**90**) a montré une activité modérée avec des CMI de 32 et 16 µg/mL sur les souches *E. coli* AG100Atet et *K. pneumoniae* ATCC 11296 respectivement. Le manniindole (**113**) a montré des activités modérées sur les souches *P. stuartii* et *S. aureus* avec une CMI de 64 µg/mL. La 8,9-diméthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**109**), l'arborinine (**113**) ont présenté des activités modérées avec des CMI de 32 et /ou 64 µg/mL sur la plus part des souches utilisées.

Le D-glucopyranosyl-2,4', 4,6-tetrahydroxylbenzophenone (**117**), le polycarpol (**89**), l'acide 3, 4-dihydroxybenzoïque (**116**), le taraxérol (**93**), la 9-hydroxy-8-

méthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**107**) et l'anomanol B (**91**) ont présenté de faibles activités avec une CMI qui variait d'une souche à l'autre entre 128 et 256 µg/mL bien que le taraxérol (**93**) et l'anomanol B (**91**) se soient démarqués en étant faiblement actifs sur tous les espèces bactériennes testées. Les composés isolés d'*A. mannii* et de *D. welwitschii* possèdent une activité bactériostatique sur l'ensemble des souches bactériennes testées.

II.3.4. Conclusion

L'évaluation des activités antibactérienne des extraits des écorces, des racines et des composés isolés d'*A. mannii* et *D. welwitschii* a révélé que certains de ces composés à savoir : l'acide diospyrique B (**101**), l'erytrodol (**98**), l'acide oléanolique (**101**), possèdent une activité bactérienne significative alors que l'anomanol A (**90**), le manniindole (**113**); la 8,9-diméthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**109**), l'arborinine (**113**) possèdent une activité bactérienne modérée faisant ainsi de ces extraits de potentiels candidats pour des études plus approfondis dans la recherche des voies et moyens de traitement des maladies infectieuses causées par les bactéries.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude phytochimique que nous avons entreprise sur les écorces du tronc et les racines d'*A. mannii* ainsi que sur les lianes de *D. welwitschii* a conduit à l'isolement de 14 et 13 composés respectivement. Les structures de ces vingt-sept composés ont été élucidées au moyen des techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie infrarouge (IR), la spectrométrie de masse et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à une et à deux dimensions. Certains composés ont été identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles de la littérature. Ces composés appartiennent à différentes classes de produits naturels dont :

- Cinq alcaloïdes : 9-hydroxyl-8-méthoxyphénanthridin- 6(5H) -one (**108**) un dérivé nouveau décrit ici pour la première fois, 8,9-diméthoxyphénanthridin- 6(5H) -one (**109**), manniindole (**110**), arborinine (**113**) et oxoanolobine (**114**) ;
- Treize triterpènes : Anonanol A (**90**), anonanol B (**91**), deux dérivés nouveaux décrit ici pour la première fois, β -amyrine (**96**), acétate de β -amyrine (**97**), taraxérol (**93**), acétate d' α -amyrine (**100**), acétate de taraxéryle (**94**), polycarpol (**89**), érythrodiol (**98**), lanosta-7,9(11),24-triène-3 β ,21-diol (**92**), acide ursolique (**95**), acide diopyrique B (**99**) , acide oléanolique (**101**);
- Six stéroïdes : β -sitostérol (**105**), 3-O- β -D-glucopyranoside de β -sitostérol (**106**), spinastérol (**102**), 3-O- β -D-glucopyranoside de spinastérol (**103**), stigmastérol (**104**) et 3-O- β -D-glucopyranoside de stigmastérol (**107**) ;
- Trois dérivés de l'acide benzoïque : Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (**115**), l'acide vanillique (**116**), 3-C- β -D-glucopyranosyl-2,4', 4,6-tétrahydroxylbenzophénone (**117**).

Les tests antibactériens sur douze souches et isolats de bactéries dont neuf Gram négative et trois Gram positive multiresistantes contre les médicaments ont été effectués sur 16 composés naturels isolés. Ces composés ont été actifs sur au moins un isolat de tous les genres (*E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*). Cependant, l'acide diospyrique B (**99**), l'érythrodiol (**98**), l'acide oléanolique (**101**) ont présenté des activités significatives avec des CMI comprises entre 4 et 8 $\mu\text{g/mL}$ sur *E. coli* AG100 Atet, *P. stuartii*, *E. aerogenes* EA27, *K. pneumonia* ATCC11296 et *S. aureus* MRSA6.

L'anonanol A (**90**) a montré une activité modérée avec des CMI de 32 et 16 $\mu\text{g/mL}$ sur *E. coli* AG100Atet et *K. pneumoniae* ATCC 11296 respectivement. Le manniindole (**110**) a montré des activités modérées sur les souches *P. stuartii* et *S. aureus* avec une CMI de 64 $\mu\text{g/mL}$. La 8,9-diméthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**109**) et l'arborinine (**113**) ont présenté des activités modérées avec des CMI de 32 et / ou 64 $\mu\text{g/mL}$ sur la majorité des souches utilisées.

Le D-glucopyranosyl-2,4',4,6-tétrahydroxylbenzophénone (**117**), le polycarpol (**89**), l'acide 3, 4-dihydroxybenzoïque (**115**), le taraxérol (**93**), la 9-hydroxy-8-méthoxyphénanthridin-6(5H)-one (**108**) et l'anomanol B (**91**) ont présenté des faibles activités bien que Le D-glucopyranosyl-2,4',4,6-tétrahydroxylbenzophénone (**117**), le taraxérol (**93**) et l'anomanol B (**91**) se soient démarqués en étant faiblement actifs sur tous les germes bactériens testés.

Dans la suite de nos travaux, nous envisageons :

- D'étendre notre étude à d'autres espèces du genre *Annona* ;
- D'étudier la toxicité des extraits et de certains composés isolés des deux plantes ;
- De faire des transformations chimiques dans le but d'améliorer les activités de certains composés isolés.
- De faire les CIV
- De formuler les médicaments traditionnels améliorés

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

III.1. APPAREILLAGE

Lors de ce travail les différentes masses ont été mesurées sur des balances électroniques de type SARTORIUS pour la poudre végétale et MELTER PC 2000 de précision 10^{-3} pour les composés analysés.

Les différentes techniques chromatographiques ont été réalisées à l'aide :

- Des colonnes en verre de diamètre et de hauteur variées pour la chromatographie sur colonne.
- Du gel de silice de type silica gel 60 de granulométrie comprise entre 0.043 et 0.063 mm comme phase stationnaire pour les différentes chromatographies sur colonne.
- Des plaques préfabriquées sur feuille d'aluminium de type MERCK, de dimensions $20 \times 20 \text{ cm}^2$; recouvertes de gel de silice 60 F254 utilisées pour la chromatographie sur couche mince.
- Le développement des plaques a été réalisé dans différents systèmes de solvants tels que : Hex, Hex/AE et CH_2Cl_2 /MeOH, de polarité variée en fonction de la nature des composés à séparer.

La révélation des taches quant à, elle s'est faite de différentes manières :

- Utilisation de la lampe UV à des longueurs d'onde de 254 et 366 nm.
- Pulvérisation des plaques à l'aide de l'acide sulfurique dilué à 50%. Suivie du chauffage sur une plaque chauffante.

L'évaporation s'est faite à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque Buchi et Heidolph.

Les expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été effectuées dans différents solvants deutériés (methanol deutérié, chloroforme deutérié, pyridine, diméthylsulfoxyde et acetone deutérié) sur les spectromètres de type BRÜKER AVANCE-III à Transformé de Fourier pour les expériences 1D et 2D opérant respectivement à 600, 400 et 300MHz pour le proton et 150, 100 et 75MHz pour le carbone, avec le TMS comme référence interne. Les déplacements chimiques des carbones et des protons sont exprimés en ppm et les constantes de couplage J en Hz.

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil électronique de type BUCHI SMP-20 et ne sont pas corrigés.

Les spectres IR ont été enregistrés à l'aide Spectromètre de type Perkin Elmer Spectrum, 100 équipé d'un dispositif d'échantillonnage ATR en diamant.

Les spectres de masses ont été réalisés HRESI-MS sur les appareils de type JOEL MS et Q-TOF ULTIMA-III (Waters) quadropole TOF.

III.2. MATERIEL VEGETAL ET ISOLEMENT

Les écorces du tronc et les racines d'*A. mannii* ont été récoltées respectivement en Mai 2015 et en Mars 2017 au Mont Kala, Région du Centre-Cameroun et identifiées par comparaison aux échantillons authentiques de l'herbier National (N° 45582S) par M. NANA Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun. Le matériel végétal a été découpé, séché puis broyé. Après ce processus nous avons obtenu respectivement 2 Kg et 4Kg de poudre pour extraction.

Les lianes de *D. welwitschii* ont été récoltées en Juin 2015 à Bertoua, Région de l'Est Cameroun et identifiées en comparaison au N° (107085SFC/Cam) par M. NANA Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun.

III.2.1. Extraction

III.2.1.1. Extraction des racines et des écorces du tronc d'*A. mannii*

Les poudres des racines (1700 et 2300 g) et des écorces (2 Kg) du tronc d'*A. mannii* obtenues ont été extraites séparément par macération à température ambiante au mélange CH₂Cl₂/MeOH (1/1) pendant 48 heures et au MeOH pendant 24 heures. Après filtration, les solutions obtenues ont été concentrées au moyen d'un évaporateur rotatif, 170 g (83 et 92g) et 90 g d'extraits bruts ont été récupérés respectivement des racines et des écorces.

- L'extrait des racines obtenu de la première récolte (90 g) a subi une partition solide-liquide à hexane, au chloroforme et l'acétate d'éthyle pour donner les fractions A (12g), B (17g) et C (20g) respectivement.
- L'extrait des racines obtenu de la deuxième récolte (80g) a été directement chromatographié sur colonne de gel de silice.

III.2.1.2. Extraction des lianes de *D. welwitschii*

Les poudres des lianes de *D. welwitschii* (896 g) a été extraite par macération à température ambiante au mélange CH₂Cl₂/MeOH (1/1) pendant 48 heures puis au MeOH pendant 24 heures. Après filtration, les solutions obtenues ont été concentrées au moyen d'un évaporateur rotatif, 53 g d'extraits bruts ont été récupérés. 48 g de cet extrait brut a subi des épauvements successifs par solubilité différentielle à l'hexane, à l'acétate d'éthyle et au n-butanol. Les fractions obtenues indexés de A-D ont ensuite été soumises aux chromatographies successives sur colonne.

III.2.2. Isolement des composés

III.2.2.1. Des racines de *A. mannii*

L'extrait brut des racines obtenu de la deuxième récolte (80 g) a été fixé sur 90 g de gel silice pour subir une chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant l'hexane, les mélanges Hex-AE jusqu'à 30%, et le mélange CHCl₃-MeOH jusqu'à 10 %.

Au terme de ce processus, 280 fractions de 200 mL chacune ont été recueillies et groupées sur la base d'une CCM analytique en 12 fractions (voir tableau 42). Le mélange de β -sitotérol et stigmastérol (**AMr90**, 150,0 mg), le polycarpol (**AMr1**, 1,0 g), le lanosta7,9(11),24-triène-3 β ,21-diol (**AMr139**, 12 mg), l'oxoanobine (**AMr241** ; 10,0 mg) et 3-O- β -D-glucopyranosyle de- β -stigmastérol (**AMr264**, 100,2 mg) ont directement cristallisé des fractions 80-118, 119-129, 130-148, 237-250, 251-267 respectivement.

Cependant la fraction 268-280 a été purifiée par chromatographie sous gel de silice utilisant comme éluant le mélange CHCl₃/MeOH 2% et nous avons obtenu **AMr180P** (5,1 mg) et l'**arborinine** (**AMr52P** ; 11,8 mg).

Tableau 43: Chromatogramme de l'extrait brut des racines de *A. mannii*

Eluant : CC	Fractions	Observations
Hexane pur	1-20	Mélange huileux jaune
Hex/AE 5%	21-79	Mélange de 4 composés
Hex/AE 10%	80-118	AMr90 + Mélange de 5 composés
Hex/AE 12,5%	119-129	AMr1 + trainée
Hex/AE 15%	130-148	AMr139 + Mélange de 4 composés
Hex/AE 20%	149-170	Mélange de 4 composés
Hex/AE 25%	171-183	Mélange de 4 composés+Trainée
Hex/AE 30%		
CHCl ₃	184-213	Mélange de 3 composés
CHCl ₃ /MeOH 2,5%	214-236	Mélange de 2 composés
CHCl ₃ /MeOH 5%	237-250	AMr241 +mélange de 3 composés
CHCl ₃ /MeOH 7,5%	251-267	AMr264 +mélange de 4 composés
CHCl ₃ /MeOH 10 %	268-280	AMr52P + AMr180P + mélanges de 5 composés + Trainées

Sous la base de la CCM les fractions A et B obtenues de l'extrait brut de la première récolte, ont été combinés et fixé sur 25 g de gel silice pour subir une chromatographie sur

colonne de gel de silice avec comme éluant l'hexane, les mélanges Hex-AE, et l'acétate. 200 fractions de 100 mL chacune ont été recueillies et groupées sur la base d'une CCM analytique en 9 séries indexés A₁-A₉ (voir tableau 43)

Tableau 44: Chromatogramme du mélange des fractions à Hexane et au dichlorométhane des racines de *A. Manii*

Éluant : CC	Sous-Fractions	Séries	Observations
Hexane pur	1-27	A ₁	Mélange huileux jaune
Hex/AE 2,5%	28-54		
Hex/AE 5%	55-73	A ₂	Mélange de 4 composés
Hex/AE 7,5%	74-100	A ₃	AMrH₉₀ + trainée
Hex/AE 10%	101-121	A ₄	AMrH₁₃₀ + Mélange de 2 composés
Hex/AE 12 ; 5%	122-137		
Hex/AE 15%	138-158	A ₅	AMrH₁₅₂ +Trainée
Hex/AE 20%	159-170	A ₆	AMrH₁₆₃ + Mélange de 3 composés
Hex/AE 25%	171-176	A ₇	AMrH₁₇₂₋₁₇₅ +Mélange de 3 composés
Hex/AE 30%	177-183	A ₈	Mélange de 2 composés
AE pure	184-200	A ₉	Mélange de 3 composés + trainée

Le stigmastérol (**AMrH₉₀**, 50,0 mg), (**AMrH₁₃₀**= **AMr_{180P}**; 30,2 mg), le polycarpol (**AMrH₁₅₂**= **AMr₁**; 10,5 mg), le lanosta7,9(11),24-triène-3 β ,21-diol (**AMrH₁₆₃**= **AMr₁₃₉**; 4,6 mg), 9,8-dimethoxyphenanthridin- 6(5H) -one (**AMrH₁₇₂₋₁₇₅**; 5,2 mg) ont été obtenu par recristallisation dans différents mélanges de solvant des séries A₃, A₄, A₅, A₆, et A₇ respectivement.

La fraction C quant à elle a été purifiée sous gel de silice utilisant comme éluant les mélange Hex-AE et AE-MeOH de polarité croissante. 350 fractions de 200mL ont été collectées et regroupées en 14 sous-fractions suivant les profils de leurs CCM. Au terme de ce processus nous avons obtenu sept composés : **AMrA₁₁₈**= **AMrH₁₇₂₋₁₇₅** (6,5 mg), **AMrA₁₆₀** (10,8 mg), l'acide-3,4-dihydroxybenzoïque (**AMrA₁₉₄**; 6,5 mg), l'oxoanolobine (**AMrA₂₈₇**; 9,8 mg), le manniindole (**AMrA₃₀₆₋₃₁₄**, 7,0 mg). Ces composés ont été obtenus par filtration simple et recristallisation dans le méthanol, le dichlorométhane, les mélanges Hex-AE 40%, Hex-AE 80%, des différentes fractions les contenant respectivement.

Tableau 45: Chromatogramme de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *A.Manii*

Eluant : CC	Sous-Fractions	Observations
Hex/AE 5%	1-43	Mélange huileux jaune
Hex/AE 7,5%	44-77	
Hex/AE 10%	78-98	Mélange de 3 composés
Hex/AE 15%	99-103	Mélange de 4 composés
Hex/AE 20%	104-126	Mélange de 4 composés contenant AMrA₁₁₈
Hex/AE 25%	127-159	Mélange de 4 composés
Hex/AE 30%	160-194	Mélange de 3 composés contenant AMrA₁₆₀
Hex/AE 40%	195-231	Mélange de 3 composés contenant AMrA₁₉₄
Hex/AE 50%	232-251	Mélange de 4 composés
Hex/AE 60%	252-272	
Hex/AE 70%	273-295	Mélange de 3 composés + AMrA₂₈₇
Hex/AE 80%	296-318	Mélange de 3 composés contenant AMrA₃₀₆₋₃₁₄
AE pure	319-332	Mélange de 2 Composés + trainée
AE/MeOH 5%	333-339	Mélange de 3 Composés + trainees
AE/MeOH 10%	340-350	Trainée

III.2.2.2. Des écorces du tronc d'*A. manii*

L'extrait brut des écorces de tronc (87 g) a été fixé sur 100 g de silice et chromatographié avec le mélange Hex-AE et AE-MeOH de polarité croissante tel que consigné dans le chromatogramme ci-dessous :

Tableau 46: Chromatogramme de l'extrait brut des écorces de tronc de *A. mannii*

Eluant : CC	Fractions	Observations
Hexane pur	F_1 [1-56]	Mélange huileux jaune dont AMe₅₀
Hex/AE 5%	F_2 [44-94]	
Hex/AE 10%	F_3 [95-150]	Mélange de plusieurs composés dont AMe₁₀₀
Hex/AE 15%	F_4 [151-175]	Mélange de 4 composés
Hex/AE 20%	F_5 [176-220]	Mélange de 4 composés dont AMe₁₈₄
Hex/AE 25%	F_6 [221-259]	Mélange de 4 composés contenant AMe₂₄₀₋₂₄₉ et AMe₂₅₈
Hex/AE 30%	F_7 [260-290]	Mélange de 3 composés contenant AMe₂₈₁
Hex/AE 40%	F_8 [291-300]	Mélange de 3 composés
Hex/AE 50%	F_9 [301-350]	Mélange de 4 composés dont AMe₃₄₉
Hex/AE 60%	F_{10} [351-370]	Mélange de 5 composés
Hex/AE 70%	F_{11} [371-381]	Mélange de 3 composés
AE pure	F_{12} [382-391]	Mélange de 3 composés
AE/MeOH 5%	F_{13} [392-400]	Mélange de 4 Composés + trainée
AE/MeOH 10%	F_{14} [401-510]	Mélange de 4 Composés +Trainees dont AMe₄₅₇

Les fractions F_4 et F_5 ont été mélangées pour donner une sous-fraction **Fs** (12,0g). Cette sous-fraction a été fixée sur 15 g de silice puis soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme solvant le mélange CH_2Cl_2 -MeOH de polarité croissante. L'élution au mélange CH_2Cl_2 -MeOH 1 % a conduit à l'isolement de **AMe₁₈₄** (11mg).

β -sitostérol (**AMe₅₀**; 100,4 mg), polycarpol (**AMe₁₀₀** = **AMr₁**, 10,0mg), Anomanol B (**AMe₂₄₀**; 10,1 mg); 9,8 diméthoxyphénanthridin- 6(5H) -one (**AMe₂₅₈** = **AMrH₁₇₂**; 30,6 mg), Anomanol A (**AMe₂₈₁**, 12,0mg), l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (**AMe₃₄₉**, 20,0mg) et le glucoside de stigmastérol (**AMe₄₅₇**, 25,0mg) ont été obtenus par filtration simple et recristallisation dans différents mélanges de solvant des différentes fractions les contenant respectivement.

III.2.2.3. Des lianes de *D. welwitschii*

La fraction à l'Hexane (fraction A ; 5,3 g) a été fixée sur une masse équivalente silice puis chromatographiée sous colonne de gel de silice avec comme éluant le système Hex-AE polarité croissante. 200 fractions de 150 ml chacune ont été collectées. Ces fractions ont été regroupées en 4 séries (A₁ – A₄) sous la base de la CCM analytique tel que consigné dans le chromatogramme ci-dessous :

Tableau 47: Chromatogramme de la fraction à l' Hexane A (5,32 g) des lianes de *D. welwitschii*

Solvants	Sous-Fractions	Regroupements	Remarques
Hex (100%)	1 – 30	1 – 45	A ₁ : mélange de 5 composés dont DW₃ et DW₄
Hex/AE (5%)	31 – 60	46 – 90	A ₂ : mélange de 4 composés dont DW₁ et DW₂
Hex/AE (25%)	61 - 90		
Hex/AE (30%)	91 – 120	91 – 100	A ₃ : Mélanges de 4 composés
Hex/AE (50%)	121 – 150		
Hex/AE (75%)	150 – 200	101 – 160	A ₄ : mélange de 5 composés dont DW₆
AE (100%)			

Le spinastérol (**DW₁**; 15,7 mg) et le taraxérol (**DW₂**, 30,1 mg) ont été obtenus par purification de A₂ par chromatographie sous gel de silice avec comme solvant le système Hex-AE (9-1). L'acétate de α -amyrine (**DW₃**; 20,4 mg) et l'acétate de β -amyrine (**DW₄**; 23,2 mg) ont été obtenus en lavant les sous-fractions de la serie A₃ avec Hex-AE (85-15) et l'acide ursolique (**DW₆**; 8,06 mg) en lavant la série A₄ au mélange Hex-AE (1:1).

9,0 g de la fraction B ont été fixés sur 10 g de silice puis chromatographiés avec le système Hex - AE puis AE- MeOH de polarité croissante. 200 fractions de 150 ml chacune ont été collectées. Ces fractions ont été regroupées en 5 séries (B₁ – B₅) sous la base de la CCM Analytique tel que consigné dans le chromatogramme ci-dessous :

Tableau 48: Chromatogramme de la fraction à l'Acétate d'éthyle B (9 g) des lianes de *D. welwitschii*

Solvants	Fractions	Regroupements	Remarques
Hex (100%)	1 – 12	1 – 19	B ₁ : DW ₉
Hex/AE (5%)	13 – 35	20 – 42	B ₂ : DW ₁₁
Hex/AE (25%)	36 - 65		
Hex/AE (30%)	67 – 92	43 – 106	B ₃ : DW ₁₀ + mélanges de trois composés
Hex/AE (50%)	93 – 122		
Hex/AE (75%)	123 – 136	107 – 160	B ₄ : DW ₆
AE (100%)			
AE-MeOH (95-5)	137 - 169	161 - 200	B ₅
AE-MeOH (9-1)	170 - 200		

L'acide diospirique B (DW₁₀; 7,6 mg) a été obtenu par purification de B₃ utilisant la chromatographie sur gel de silice avec comme éluant le système de solvant CHCl₃- MeOH (97-3).

Cependant l'acétate de taraxérol (DW₉; 35,4 mg), la β-amyrine (DW₁₁; 15,6 mg) et l'acide ursolique (DW₆; 15,1 mg) ont été obtenus en lavant les séries B₁, B₂ et B₄ respectivement.

La fraction C (7,0 g) a été fixée sur 10 g de silice puis chromatographiée avec comme éluant le système CHCl₃-MeOH de polarité croissante jusqu'à 20%. Au terme de ce processus 145 fractions de 100 ml chacune ont été collectées. Sous la base de la CCM celles-ci ont été regroupées en 4 séries (C₁ – C₄) tel que consigné dans le chromatogramme ci-dessous :

Tableau 49: Chromatogramme de la fraction au n-Butanol C (7g) des lianes de *D. welwitschii*

Solvants	Fractions	Regroupements	Remarques
CHCl ₃ (100%)	1 – 10	1 – 12	C ₁ :
CHCl ₃ -MeOH (2.5%)	11 – 24	13 – 45	C ₂ : mélange de 5 composés dont DWB ₃₀
CHCl ₃ -MeOH (5%)	25 - 49		
CHCl ₃ -MeOH (7.5%)	50 – 75	46 – 105	C ₃ : mélange de 6 composés dont DWBP ₂
CHCl ₃ -MeOH (10%)	76 – 99		
CHCl ₃ -MeOH (15%)	100 – 145	107 – 160	C ₄ : trainée

Le glucoside de β -spinastérol (**DWB₃₀** ; 32,4mg) a été obtenu par purifications de C₂ par chromatographie sur gel de silice avec le système de solvant CHCl₃- MeOH (97-3). La 3-C- β -D-glucopyranosyl-2, 4', 4, 6-tetrahydroxyylbenzophenone (**DWBP₂** ; 8,9 mg) a été obtenu par purification de C₃ (350 mg) sur CCM préparative.

8.5 g de la fraction D ont été fixés sur 10 g de silice puis chromatographiés avec le système Hex / A E, puis AE / MeOH de polarité croissante. 175 fractions de 150 ml chacune ont été collectées. Sous la base de la CCM Analytique ces fractions ont été regroupées en 4 séries (D₁ – D₄).tel que consigné dans le chromatogramme ci-dessous :

Tableau 50: Chromatogramme de la fraction au Méthanol D (8,5 g) deS lianes de *D. welwitschii*

Solvants	Fractions	Regroupements	Remarques
Hex (100%)	1 – 10	1 – 12	D ₁ :
Hex/AE (5%)	11 – 23	13 – 45	D ₂ : DW ₁ et DW ₂
Hex/AE (25%)	24 - 49		
Hex/AE (30%)	50 – 81	46 – 105	D ₃ : DW ₇ et DW ₈
Hex/AE (50%)	82 – 98		
Hex/AE (75%)	99 – 125	107 – 160	D ₄ : DW ₅
AE (100%)			
AE-MeOH (95-5)	126 - 145	161 - 200	D ₅
AE-MeOH (9-1)	146 - 175		

La 28-hydroxy- β -amyrine (DW₇; 8,1 mg), l'acide ursolique (DW₆, 6,0 mg), l'acide oléanolique (DW₈ ; 17,6 mg) et l'acetate de taraxerol (DW₉; 35,4 mg) ont été obtenus par purifications de D₃ par chromatographie sur gel de silice avec comme éluant le système CHCl₃-MeOH (98-2). Cependant l'acide vanilique (DW₅ ; 8,1 mg) a été obtenu par purification de D₄ (246 mg) sur CCM préparative.

III.3. DONNEES PHYSIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPOSES ISOLES

AMe₂₈₁/ AMr_{180p} : lanosta-7,9(11), 23-triène-3 β , 15 α , 25-triol ou Anomanol A (90)

Crystaux marron

Formule brute : C₃₀H₄₈O₃

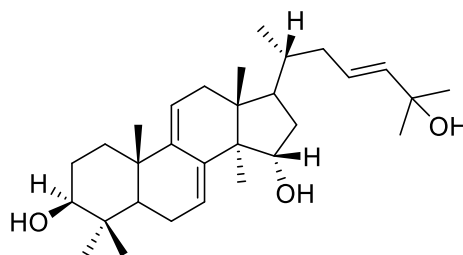
Point de fusion : 217,1-219,9 °C

IR ν_{\max} (cm⁻¹) : 3352 ; 2967,4 ; 2921,3

HREIMS : *m/z* 479,3520 ([M+Na]⁺, calc 479,3496)

Données de RMN (¹H : 600 MHz, ¹³C :150MHz, DMSO-

d₆) tableau 14 Page 65



AMe₂₄₀₋₂₄₉ : lanosta-7,9(11), 23-triène-3 β , 15 α , 20-triol ou Anomanol B (91)

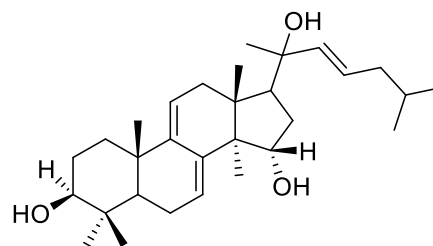
Poudre amorphe marrone

Formule brute : C₃₀H₄₈O₃

IR ν_{\max} (cm⁻¹) : 3352 ; 2967,4 ; 2921,3

HREIMS: *m/z* 479, 3513 ([M+Na]⁺, calcd 479,3501)

Données de RMN (¹H : et ¹³C) tableau 15 Page 72

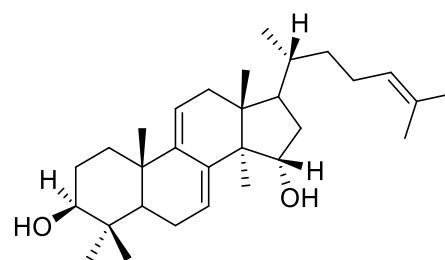


AMr₁/AMrH₁₅₂/ AMe₁₀₀: Polycarpol ou lanosta-7,9(11) ,24-trièn-3 β , 15-diol (89)

Poudre amorphe blanche

Formule brute : C₃₀H₄₈O₂

Données de RMN ¹³C : Tableau 16 Page 57



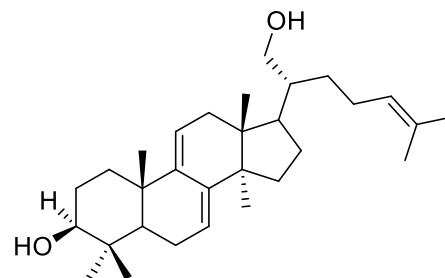
AMrH₁₆₃/AMr₁₃₉ : lanosta-7,9 (11) ,24-trièn-3 β , 21-diol (92)

Poudre amorphe blanche

Formule brute : C₃₀H₄₈O₂

HREIMS : *m/z* 479, 3475 (calc pour [M + Na]⁺:
479,3291)

Données de RMN ¹³C : Tableau 16 Page 76

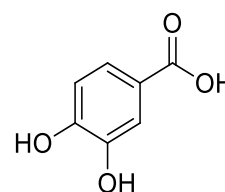


AMe₃₄₉/AMrA₁₉₄: Acide-3, 4-dihydroxybenzoïque, (115).

Poudre amorphe jaune ;

Formule brute : C₇H₆O₄

Données de RMN tableau 35 Page 160

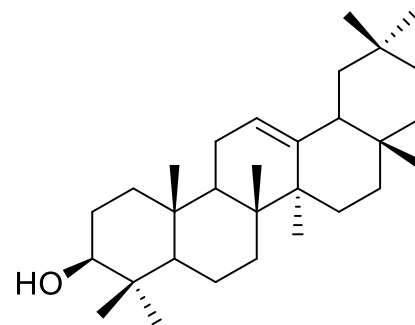


DW₁₁: β-amyrine (98)

Poudre blanche

Formule brute : C₃₀H₅₀O

Données de RMN ¹³C voir tableau 20 page 90.



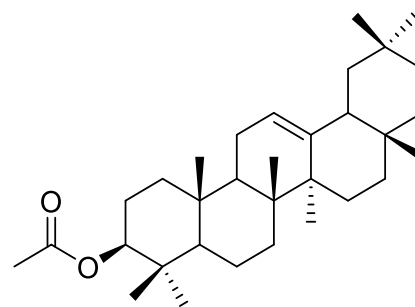
DW₄: Acétate de β-amyrine (97)

Cristaux blancs

Pont de Fusion : 281-283°C

Formule brute : C₃₂H₅₂O₂

Données de RMN ¹³C : voir tableau 20 page 90



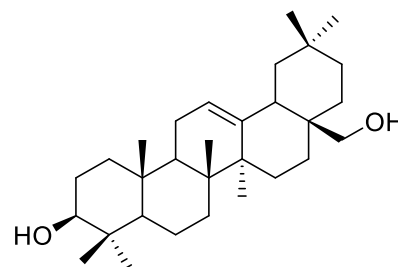
DW₇: 28-hydroxy- β-amyrine(98)

Cristaux blancs

Pont de Fusion : 235 – 237°C

Formule brute : C₃₀H₄₈O₃

Données de RMN ¹³C : voir tableau 21 page 96

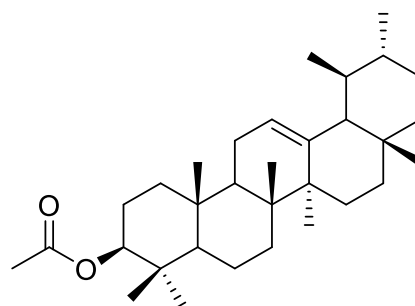


DW₃ : Acétate de α-amyrine (100)

Poudre blanche

Formule brute : C₃₂H₅₂O₂

Données de RMN ¹³C voir tableau 23 page 104.



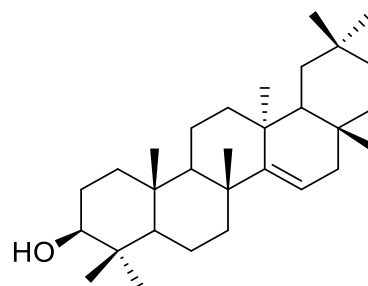
DW₂ : Taraxerol (93)

Cristaux blancs

Pont de Fusion : 288-289°C

Formule brute : C₃₀H₅₀O

Données de RMN ¹³C voir tableau 17 page 79.



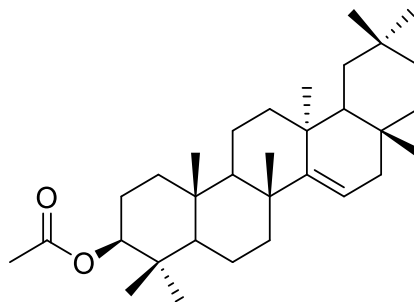
DW₉ : Acétate de taraxerol (94)

Cristaux blancs

Pont de Fusion : 280-282 °C

Formule brute : C₃₂H₅₂O₂

Données de RMN ¹³C voir tableau 18 page 81.

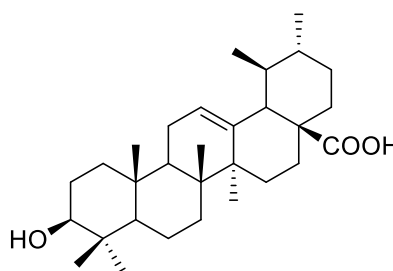


DW₆: Acide ursolique (96)

Poudre belge

Formule brute : C₃₀H₄₈O₃

Données de RMN ¹³C voir tableau 19 page 85



DW₁₀: Acide diospyrique B ou acide -3α, 19α-dihydroxyur-12-ène-24, 28 dioïque (99)

Cristaux blancs

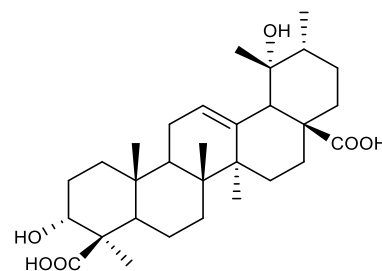
Formule brute : C₃₀H₄₂O₈ ;

Pont de Fusion : 308-310 °C ;

HREIMS : m/z 503, 3360 (calc pour [M +H]⁺;

503,3375)

Données de RMN ¹³C voir tableau 22 page 101

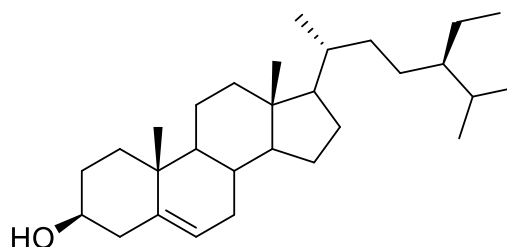


AMe₅₀: β-sitostérol (104)

Aiguilles blanches

Pont de Fusion : 135 - 137°C

Formule brute : C₂₉H₅₀O

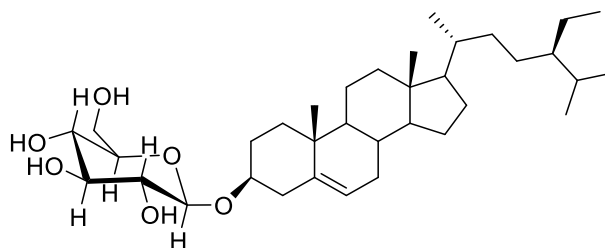


AMr₂₆₄ : 3-O-β-D-glucopyranoside de β-sitostérol (106)

Poudre blanche

Formule brute C₃₅H₆₀O₆

Données de RMN ¹³C voir tableau 28 page 121.

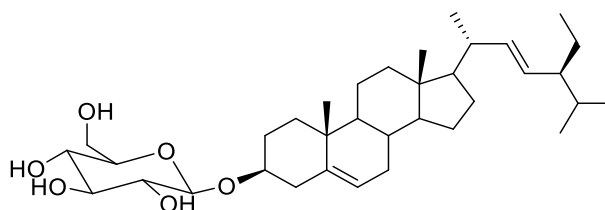


AMe₄₅₇ : 3-O-β-D-glucopyranoside de Stigmastérol (107)

Poudre blanche

Formule brute C₃₅H₆₀O₆

Données de RMN ¹³C voir tableau 29 page 124.



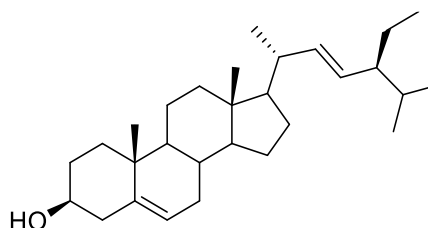
AMrH₉₀ : Stigmastérol (105)

Aiguilles blanches

Pont de Fusion : 174-176 °C

Formule brute : C₂₉H₄₈O

Données de RMN ¹³C voir tableau 27 page 118.



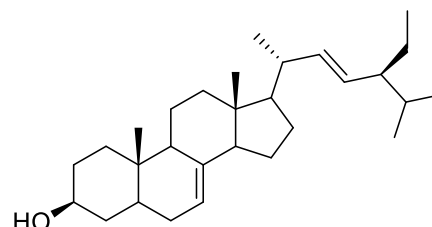
DW₁ : Spinastérol (102)

Paillettes Blanches

Pont de Fusion : 169-170 °C

Formule brute : C₂₉H₄₈O

Données de RMN ¹³C voir tableau 25 page 110.



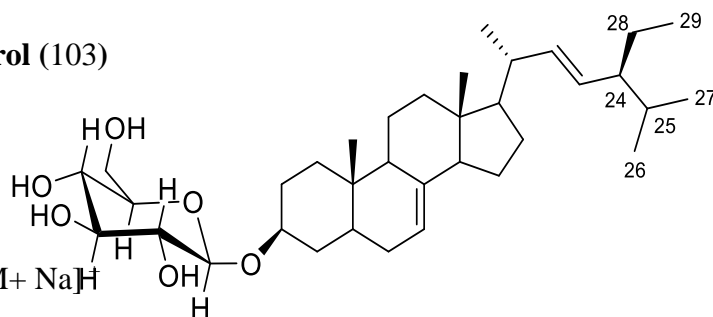
DWB₃₀ : 3-O-β-D-glucopyranoside de β-spinastérol (103)

Poudre blanche

Formule brute : C₃₅H₅₈O₆

Spectre de masse en HR-ESI-MS : m/z 597,4175 [M+ Na]⁺

Données de RMN ¹³C voir tableau 26 page 113.



AMe184/Amra 160: 9-hydroxyl-8-methoxyphenanthridin- 6(5H) -one (108)

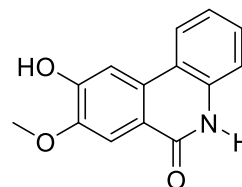
Cristaux jaunes

Pont de Fusion : 199,6-200,8 °C

Formule brute : C₁₄H₁₁NO₃

HREIMS : m/z 264,0711 (calc pour [M+Na]⁺:264,0637)

Données de RMN 13C voir tableau 30 page 131.



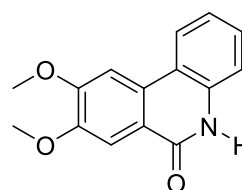
AMrH172/AMe258/ AMra118 : 9,8-dimethoxyphenanthridin- 6(5H) -one (109)

Poudre amorphe jaune

Formule brute : C₁₅H₁₃NO₃

HREIMS : m/z 278,0834 (calc pour [M+Na]⁺: 278.0793)

Données de RMN 13C voir tableau 31 page 138.



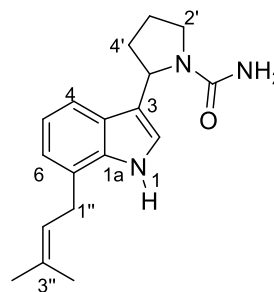
AMrA306-314 : Manniindole (110)

Poudre amorphe jaune

Formule brute : C₂₀H₂₈NO

HREIMS : m/z 298,1922 (calc pour [M+H]⁺: 298.2171)

Données de RMN 13C voir tableau 32 page 145.



AMr241 : Oxoanolobine (114)

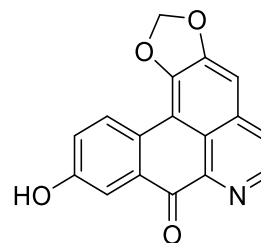
Poudre amorphe marron

Pont de Fusion : 270-273°C

Formule brute: C₁₇H₉NO₄

HREIMS: m/z 314,0482 [M+ Na]⁺

Données de RMN 13C voir tableau 34 page 157.

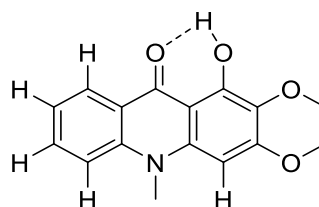


AMr_{52P} : Arborinine (113)

Poudre amorphe marron

Formule brute : C₁₆H₁₇NO₄

Données de RMN 13C voir tableau 33 page 151.

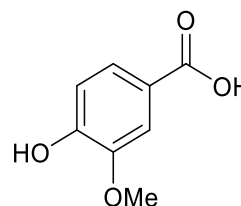


DW₅ : l'acide- 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque ou l'acide vanillique (116)

Poudre amorphe jaune

Formule brute : C₈H₈O₄

Données de RMN 13C voir tableau 36 page 163.



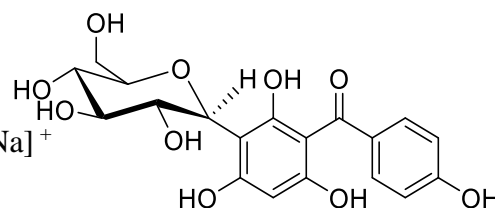
DWBP₂ : 3-C-β-D-glucopyranosyl-2,4',4,6-tetrahydroxybenzophenone (117)

Poudre amorphe jaune

Formule brute : C₁₉H₂₀O₁₀

Spectre de masse en HR-ESI-MS : m/z 433,1112 [M + 2H + Na]⁺

Données de RMN 13C voir tableau 37 page 168.

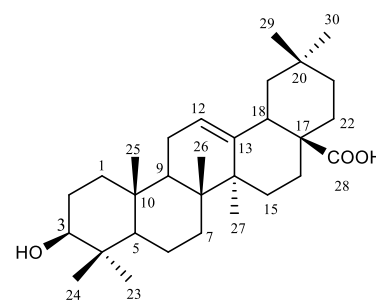


DW₈ : Acide oléanoïque (101)

Poudre amorphe jaune

Formule brute : C₁₉H₂₀O₁₀

Données de RMN 13C voir tableau 24 page 107.



III.4. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

III.4.1. Materiel

III.4.1.1. Souches bactériennes utilisées

Les microorganismes utilisés étaient constitués de douze (12) souches et isolats cliniques de bactéries multi-résistantes dont 9 à Gram-négatives et 3 bactéries à Gram-positives pour les tests des produits isolés et de 11 souches bactériennes pour les tests des extraits bruts des écorces du tronc et des racines d'*A.mannii*. Celles-ci étaient constituées de souches de référence et d'isolats cliniques *Escherichia coli* (ATCC8739 et AG100Atet), *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048 et EA27), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC11296 et KP55), *Providencia stuartii* (ATCC29916 et PS 2636), *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 et PA124) et *Staphylococcus aureus* (ATCC25923, MRSA3, MRSA6). Les souches de référence proviennent de la société de collection *American Type Culture Collection* (ATCC) et les isolats cliniques de l'Université de Marseille en France à travers le Pr Victor KUETE de l'Université de Dschang.

III.4.1.2. Milieux de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés dans ce travail : La gélose de Mueller Hinton ou *Mueller Hinton Agar* (MHA) pour l'activation et le repiquage des souches bactériennes et le brouillon de Mueller Hinton ou *Mueller Hinton Broth* (MHB) pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices et concentration minimale bactéricide. Les souches et les isolats ont été maintenues à 4°C dans les boîtes de pétri constituées de gélose fraîche et appropriée.

III.4.1.3. Réactifs chimiques et molécules de référence

Les réactifs chimiques et les molécules de références sont :

- Chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP) ont été obtenus de Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) ;
- L'indicateur microbien utilisé était le chlorure de *p*-iodonitrotétrazolium (INT \geq 97% (INT, Sigma-Aldrich) qui est le révélateur de croissance des bactéries métaboliquement actives.
- Le DMSO (Sigma-Aldrich) a été utilisé comme solvant chimique pour la dissolution des extraits et produits isolés.

III.4.2. Méthodes

III.4.2.1. Préparation des inocula bactériens

Les suspensions bactériennes ont été préparées en introduisant quelques colonies âgées de 18h dans 10 mL d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention d'une turbidité similaire à celle de l'échelle 0,5 de *Mc Farland*, correspondant à une concentration de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Ces suspensions ont été diluées à l'aide du *Mueller Hinton Broth* pour l'obtention d'une concentration en bactéries de 2×10^6 UFC/mL pour les tests de sensibilité.

III.4.2.2. Préparation des solutions mères d'extraits et d'antibiotiques à tester

Pour l'évaluation des activités antibactériennes en milieu liquide (détermination des CMI et CMB), les solutions mères d'extraits ont été préparées à la concentration de 8192 µg/mL et celles des antibiotiques à 256 µg/mL. Pour ce faire un volume de DMSO inférieure ou égale à 10% du volume de la solution mère a été ajouté à une masse d'extrait ou d'antibiotique requise pour ces concentrations, puis l'ensemble est homogénéisé au vortex afin de dissoudre l'échantillon, le volume est complété par la suite avec le MHB.

III.4.2.3. Détermination des CMI et CMB (Test colorimétrique à l'INT)

Les CMI de chaque extrait sur les différentes souches ont été déterminées par la méthode de micro-dilution en milieu liquide tel que décrit par **Newton et al. 2002** ; **Kuete et al. 2009**. Dans chaque puits de microplaque a été introduit 100 µL de *Mueller Hinton Broth*, ensuite dans les deux premiers puits de chaque colonne a été introduit un volume de 100 µL de chaque solution mère. Les dilutions successives en série de raison 2 nous ont permis d'obtenir une gamme de concentration allant de 16 à 2048 µg/mL. Un volume de 100 µL d'inoculum concentré à 2×10^6 UFC/mL a été par la suite introduit dans chaque puits, pour un volume final de 200 µL/puits. Les plaques ont été scellées et incubées à 37°C pendant une période de 18H. Le témoin neutre a été constitué des puits contenant exclusivement le *MHB* et le témoin négatif a été constitué du *MHB* et d'inoculum. Le témoin positif a été constitué du chloramphénicol ou ciprofloxacine, antibiotiques de référence dont la gamme des concentrations a été comprise entre 2 µg/mL et 256 µg/mL d'une part et de 0,5 à 64 µg/mL d'autre pour le Chloramphénicol et la Ciprofloxacine respectivement. Après incubation, la révélation de la croissance bactérienne s'est fait par ajout de 40 µL de l'INT (*para-iodothétrazoliumchloride*) 0,2% dont le principe est basé sur la capture des protons émis par la membrane des bactéries vivantes après avoir métabolisé le glucose, celui-ci se réduit et rosit le milieu après environ 30mn de ré-incubation.

Les CMI ont été définies comme les concentrations minimales pour lesquelles nous n'avons pas observé de croissance bactérienne (absence de coloration rose dans les puits).

Pour ce qui était des CMB, un volume de 150µL de bouillon a été introduit dans de nouvelles plaques, ensuite le volume a été complété à 200 µL par ajout d'un volume de 50µL du contenu des puits de concentration supérieur ou égale à la CMI. Les plus petites concentrations où il n'y avait pas eu croissance après 48h d'incubation à 37°C suivie de la révélation de la croissance par l'INT ont été notées comme CMB. D'après **Kuete, 2010**, l'activité antibactérienne de l'extrait de la plante est classée comme significative si la CMI <100 µg/mL ; modérée si $100 < CMI \leq 625$ µg/mL ; et faible si la CMI >625 µg/mL. Pour les métabolites secondaires dérivés de plantes, l'activité antibactérienne est significative ou forte si CMI ≤10 µg/mL ; modérée si $10 < CMI \leq 100$ µg/mL et faible ou négligeable si CMI > 100 µg/mL. Un extrait de plante a été considéré comme bactériostatique si CMB/CMI ≤ 4 et de Bactéricide si CMB/CMI > 4 (**Gatsing et Adoga, 2007**).

REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES

Abdel-Raouf N., Al-Enazi N.M., Al-Homaidan.A.A., Ibraheem I. B.M., Al-Othman M.R., Hatamley A.A., 2015, Antibacterial β -amyrin isolated from *Laurencia microcladia*, *Arabian Journal of Chemistry*, **81**, 32-37.

Adewole S., Ojewole J., 2009, Protective effects of *Annona muricata* linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats, *African Journal of Traditional Complementary and Alternative*, **6**, 30–41.

Ageta H., Arai Y., 1983, Fern constituents: Pentacyclic triterpenoids isolated from *Polypodium niponicum* and *Polypodium fermasonum*, *Phytochemistry*, **22**, 1801-1808.

Agnaniet H., Menut C., Bessiere J.M., 2004, Aromatic Plants of tropical Central Africa. Part LII. Comparative study of the volatile constituents from barks of four Annonaceae species growing in Gabon, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **7**, 201-209.

Agra M.F., 1977, Farmacopea Popular da Paraíba. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba (MEC), 10-16.

Agrawal P.K., 1992, NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligo saccharides and glycosides, *Phytochemistry*, **31**, 3307-3330.

Ajaiyeoba E., Falade M., Ogbale O., Okpako L., Akinboye D., 2006, *In vivo* antimalarial and cytotoxic properties of *Annona senegalensis* extract, *African Journal Traditional*, **3**, 137-141.

Alali F., Liu X.M., Laughlin J., 1999, Annonaceous acetogenins: recent progress, *Journal of Natural Products*, **62**, 504–540.

Alaoui A., Charrouf Z., Soufiaoui M., Carbone V., Malorni A., Pizza C., Piacente S., 2002, Triterpenoid saponins from the shells of *Argania spinosa* seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4600-4603.

Ali M.C., 2001, Techniques in terpenoid identification, Delhi: Birla Publication, p 284

Ameh S. J., Obodozie O.O., Babalola P.C., Gamaniel K.S., 2011, Medical Herbalism and Herbal Clinical Research: A Global Perspective, British, *Journal of Pharmaceutical Research*, **4**, 99 – 123.

Asare G.A., Afriyie D., Ngala R.A., Abutiata H., Doku D., Mahmood S.A., Rahman H., 2015, Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. on the prostate, BPH-1 cells, and some target genes, *Integrative Cancer Therapies*, **14**, 65–74.

Aubréville A., 1964, « Flore du Cameroun » sapotaceae. Ed. Museum national d'histoire naturelle, Paris 5^e, **2**, pp 3-143.

Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S., 2011, Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins, *Phytochemistry*, **72**, 435–457.

Avula B, Bae J.Y, Majrashi T, Wu T.Y, Wang Y.H, Wang M, Ali Z, Wu YC, Khan I.A., 2018, Targeted and non-targeted analysis of annonaceous alkaloids and acetogenins from *Asimina* and *Annona* species using UHPLC-QToF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **159**, 548–566.

Baliga S.M., Ramakrishna J.P., Harshith P.B., Princy L.P., Rekha B., 2011, Chemistry and medicinal properties of the Bakul (*Mimusops elengi* Linn): A review, *Food Research International*, **44**, 1823-1829.

Balkis M.M., Leidich S.D., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A., 2002, Mechanisms of Fungal Resistance, *Drugs*, **62**, 1025 – 1040.

Bass W.J., 1985, “Natural occurring seco-ring-A-triterpenoides and their possible biological significance”, *photochemistry*, **24**, 1875-1889.

Benesova V, Samek Z, Herout V, Sorm F., 1969, Isolation and structure of two new indole alkaloids from *Riccardia sinuata* (HOOK.) Trev. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences.

Berkov S., Sidjimova B., Evstatieva L., Propov S., 2004, Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*, *Phytochemistry*, **65**, 579-586.

Berrougui H., Cloutier M., Isabelle M., Khalil A., 2006, Phenolic extract from argan oil (*Arginia spinosa*) inhibits human low-density lipoprotein (LDP) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages, *Atherosclerosis*, **184**, 389-396.

Betti J.L., 2004, An ethnobotanical study of medicinal plants among the baka pygmies in the dja biosphere reserve, Cameroon, *African Study Monographs*, **25**, 1–27.

Bhakuni B.S., Kumar A., Balkrishna S.J., Sheikh J.A., Konar S., Kumar S., 2012, tBuOK mediated synthesis of phenanthridinones and dibenzoazepinones, *Organic Letters*, **43**, 10–13.

Bhat S.V., Nagasampagi B.A., Sivakumar M., 2005, Chemistry of Natural Products, Pringer 1^{ème} Edition, P 237.

Bories C., Loiseau P., Cortes D., Myint S.H., Hocquemiller R., Gayral P., 1991, Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimola* seeds, *Planta Medica*, **57**, 434-436.

Bouquet A., 1969, Féticheurs et Médecines traditionnelles du Congo Brazzaville, Mémoire ORSTOM, Paris, p 224.

Bouvier F., Rahier A., Camara B., 2005, Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids, *Progress in lipid research*, **44**, 357-429.

Boyce T., 2019, Gastroenteritis. Retrieved from <https://www.merckmanuals.com/en-ca/professional/gastrointestinal-disorders/gastroenteritis/gastroenteritis>.

Brader G., Bacher M., Greger H., Hofer O., 1996, Pyranoquinolines and acridones from *Vepris bilocularis*, *Phytochemistry*, **42**, 881-884.

Bruneton J. ; 1993, Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, Université de paris sud, France, 2^{ème} Edition, technique documentation Lavoisier, 816-822.

Campos F.R., Batista R.L., Batista C.L., 2008, Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (Annonaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, 804- 806.

Carretero M.E., López-Pérez J.L., Abad M.J., Bermejo P., Tillet S., Israel A., Noguera P.B., 2008, Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fraction from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, **116**, 11-15.

Cavé A., Figadère B., Laurens A., Cortes D., 1997, Acetogenins from Annonaceae, *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, **70**, 81–288.

Chang W.S., Kim K.H., Lee K., Choi S.U., Ryu Y.S., Lee K.R., 2009, Phytochemical Constituents of *Bistorta manshuriensis*, *Natural Product Science*, **15**, 243–240.

Chao-Ming L., Ning-Hua T., Qing M., Hui-lan Z., Xiao-Jiang H., Yu W. Jun Z., 1997, Cyclopeptide de fruits de *Annona squamona* L., *Phytochemistry*, **45**, 521-523.

Chaowasku T., Damthongdee A., Jongsook H., Ngo D.T., Le H.T., Tran D. M., 2018, Enlarging the monotypic Monocarpieae (Annonaceae, Malmeoideae) : recognition of a second genus from Vietnam informed by morphology and molecular phylogenetics, *Candollea*, **73**, 261–275.

Chappell J., Wolf F., Proulx J., Cuellar R., Saunders C., 1995, Is the reaction catalysed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants, *Plant Physiology*, **109**, 1337-1343.

Charrouf Z., Guillaume D., 2007, Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*, *American Journal of Food and Technology* **2**, 679-683.

Chatrou L.W., Pirie M., Erkens R.H., Couvreur T.L.P., Neubig K.M., Abbott J., 2012, A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics, *Botanical Journal Linnean Society*, **169**, 5–40.

Chemli R., Babadjamian A., Faure R., Boukef K., Balansaid G. and Vidal E., 1987, Arvensoside A and B, triterpenoids saponins from *Calendula arvensis*, *Phytochemistry*, **26**, 1785-1788.

Chen C.Y., Wang Y.D., Wang H.M., 2010, Chemical constituents from the roots of *Synsepalum dulcificum*, *Chemistry of Natural Compounds*, **46**, 495.

Chi G.F., Sandjo L.P., Kuete V., Liermann J.C., Schollmeyer D., Yeboah S.O., Mapiitse R., Abegaz B.M., Ngadjui B.T., and Opatz T., 2013, Omphalocarpoidone, a new lanostane-type furano-spiro- γ -lactone from the wood of *Tridesmostemon omphalocarpoides* Engl. (Sapotaceae), *Phytochemistry Letters*, **6**, 676 – 680.

Connolly J.D., Hill R.A., 1991, “Method in plant biochemistry”, Academic press limited, **7**, 331-359.

Costa E.V., Cruz P.E.O., Lourenco C.C, Moraes V.R.S., Nogueira P.C.L., Salvador M.J., 2013, Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae), *Natural Products Research*, **27**, 1002-1006.

Costa E.V., Pinheiro M.L.B., Xavier C.M., Silva J.R.A., Amaral A.C., Souza A.D.L., 2006, A Pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity, *Journal of Natural Products*, **69**, 292-294.

Costa E.V., Sampaio M.F.C., Salvador M.J., Nepel A., Barison A., 2015, Chemical constituents from the stem bark of *Annona pickelii* (Annonaceae), *Quimica Nova*, **38**, 769-776.

Couvreur T.L.P, Helmstetter A.J., Koenen E.J.M., Bethune K., Brandoa D.R., Little S.A., Ssaquet H., Erkens R.H.J., 2019, Phylogenomics of the major tropical plants

family Annonaceae using Targeted enrichment of nuclear genes, *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1-15.

Cruz P.E.O., Costa E.V., Moraes V.R.S., Nogueira P.C.L., Vendramin M.E., Barison A., 2011, Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, **39**, 872-875.

Cruz-Chacón I.D.L., González-Esquinca A.R., Fefer P.G., Garcia L.F.J., 2011, Liriodenine early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, **66**, 377-384.

D'Ambrosio M., Guerriero A., Pietra F., 1986, Carbamoylpyrrolidine and 7-Chlorocavernicolone, Two new metabolites of the Mediterranean sponge *Aplysina* (*Verongia*) *cavernicola*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **83**, 309–312.

Da Silva C.V., Lopes M.N., Da Silva B.V., 2006, chemical Study of leaves of *Chrysophyllum marginatum* (HOOK. & ARN.) RADLK (Sapotaceae), *Quimica Nova*, **29**, 493-495.

Damasceno L.M.O., Silva L.N.A., Santos F.R., Feitosa A.T., Viana G.F.L., Oliveira-Junior G.R., Silva G.M., Rolim A.L., Araujo S.C., Araujo C.C.E., 2019, Cytotoxic activity of chemical constituents and essential oil from the leaves of *Leonotis nepetifolia* (Lamiaceae), *Revista Virtual Quimica*, **11**, 517–528.

Dewick P. M., 2002, The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds, *Natural Product Reports*, **19**, 181-222.

Díaz-Ruiz G., Hernández-Vázquez L, Héctor L., María D.C. Wachter-Rodarte, Arturo N.O., 2012, Growth Inhibition of *Streptococcus* from the Oral Cavity by α -Amyrin Esters, *Molecules*, **17**, 12603-12611.

Diniz T.C., Araújo C.S., Silva J.C., Oliveira Júnior R.G., Lima-Saraiva S.R.G., Quintans J. L., 2013, Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice, *Journal of Medicinal Plant Research*, **7**, 2729-2735.

Djeussi D.E., Noumedem J.A.K., Seukep J.A., Fankam A.G., Voukeng J.K., Tankeo S.B., Nkuete A.H.L., Kuete V., 2013, Antibacterial activities of selected edible plant extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria, *BMC Complementary Alternative Medicine*, **13**, 164-169.

Djoumessi V.B.A., Sandjo P.L., Liermann C.J., Dieter S., Kuete.V., Rincheval V., Abegaz M., Befhanu S., Yeboah O., Wafo P., Ngadjui T.B., Opatz O., 2012, Donellanic acids A-C: new cyclopropanic oleanane derivatives from *Donella ubanguiensis* (Sapotaceae), *Tetrahedron*, **68**, 4621-4627.

Dominguez F., Gonzalez-Trujano E., Gallardo J.M., Orozco-Suarez S., 2016, Antidepressant medicinal plants and compounds used in traditional medicines in North America. In: Herbal medicine in depression. Basel, Switzerland, *Springer International Publishing*, 381–431.

Donald J.C., Gearge S.H., 1968, Chimie organique 2 Edition, *Gautier Villars*.p142-161.

Dong X-Y., Wen B., Shen Y-H., 2014, Chemical constituents of *Ainsliaea latifolia*, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, **45**, 2148-2152.

Duke J.A., 2000, Biological activity summary for cacao (*Theobroma cacao* L.), *Journal of Medicinal Foods*, **3**, 115-119.

Duyilemi O.P., Lawal I.O., 2009, Antibacterial activity and phytochemical screening of *Chrysophyllum albidum* leaves, *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, Special Issue, S75-S79.

Dzuback P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J., 2006, Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications, *Natural Product Reports*, **23**, 394-411.

Ebajo Jr.V.D., Shen C.C., Ragasa C.Y., 2015, Terpenoids and sterols from *Hoya multiflora* Blume, *Journal of applied pharmaceutical science*, **5**, 033-039.

Egydio-brandão, Monteiro A.P., Novaes P., Santos, Yara D., 2017, Alkaloids from *Annona*: review from 2005 to 2016, *JSM Biochemistry and Molecular Biology*, **4**, 15625-15658.

El Babili F., Bouajila J., Fouraste I., Valentin A., Mauret S., Moulis C., 2010, Chemical study, antimalarial and antioxidant activities, and cytotoxicity to human breast cancer cells (MCF7) of *Argania spinosa*, *Phytomedicine*, **17**,157-160.

El Kabouss A., Charrouf Z., Oumzil H., Faid H., Lamnaouer D., Miyata Y., & Miyahara K., 2001, Caractérisation des flavonoïdes des feuilles d'Arganier *Argania spinosa*

(L.) Skeels, (Sapotaceae) et étude de leur activité antimicrobienne, *Actes Institut. Agronomique et Vétérinaire*, (Maroc) **21**, 157-162.

Faheem A., Keng C.W., Ibrahim E., Mohammad Z.A., Hasnah O., 2013, Evaluation of Biological Activities of Extracts and Chemical Constituents of *Mimusops elengi*, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **12**, 591-596.

Ferreira G.C.D.D., Alegrio V.L., 1998, Acyl steryl glycosides from pithecellobium cauliflorum, *Phytochemistry*, **38**, 1345-1347.

Fofana S., Ziyaev R., Abdusamatov A., Zakirov S.K., 2011, Alkaloids from *Annona muricata* leaves, *Chemistry of Natural Compounds*, **47**, 321–321.

Fokou A.P., 2006, Chemical investigation of three plants used in Cameroonian traditional medicine: *Maesopsis eminii* (Rhamnaceae), *Autranella congolensis* (Sapotaceae) and *Pentadesma grandifolia* (Guttiferae), Doctorat/Ph.D Thesis in Chemistry, Bielefeld University-Germany, p.13.

Furuya T., Yataka D., Hayashi C., 1987, Triterpenoids from *Eucalyptus perriniana*, culture cells, *Phytochemistry*, **26**, 715-719.

Gajalakshmi S., Divya R., Divya Deepika V., Mythili S., Sathiavelu A., 2011, Pharmacological Activities of *Annona squamosa*: A review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **10**, 24-29.

Gatsing D., Adoga G.I., 2007, Antisalmonella activity and phytochemical screening of various parts of *cassia petersiana* (cesulpiniaceae), *Resource journal of Microbiology*, **2**, 876-880.

Gbile Z.O., Adesina S.K., 1987, Nigerian Flora and their Pharmaceutical Potential, Ibadan: University Press, **19**, 1-16.

Gunasekera S.P., Kumar V., Sultanbawa M. U. S., Balasubramanian S., 1997, Triterpenoids and steroids of some sapotaceae and their chemotaxonomic significance, *Phytochemistry*, **16**, 923-926.

Guo X, Tang C.C., Thomas D.C., Couvreur T.L.P., Saunders R.M.K., 2017, A mege-phylogeny of the Annonaceae: taxonomic placement of five enigmatic genera and recognition of a new tribe, phoenicantheae Scientific Report, 7, 7323 doi: 10.1038/s41598-017-07252-2.

Haji Mohiddin M.Y.B., Chin W., Holdsworth D., 1992, Traditional medicinal plants of Brunei, Darussalam part III, Seng-Kurong, *International Journal of pharmacognosy*, **30**, 105-108.

Hasrat J., Bruyne T.D., Backer J.P., Vauquelin G., Vlietinck A., 1997, Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: Unexploited antidepressive (lead) products, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **49**, 1145–1149.

Hata K., Hori K., Ogasawara H., Takahashi S., 2003, Anti-leukemia activities of lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene, *Toxicology Letters*, **143**, 1-7.

Hernandez-Chavez I., Torres-Tapia L.W., Sima-Polanca P., Cedillo-Rivera R., Moo-Puc R., Peraza-Sanchez S.R., 2012, Antigiardial Activity of *Cupania dentate* Bark and its Constituents, *Journal of Mexican Chemical Society*, **56**, 105-108.

Hernández-Fuentes G.A., García-Argáez A.N., Peraza Campos A.L., Delgado-Enciso I., Muñiz-Valencia R., Martínez-Martínez F.G., Toninello A., Gómez-Sandoval Z., Mojica-Sánchez J.P., Dalla Via L., Parra-Delgado H., 2019, Cytotoxic Acetogenins from the Roots of *Annona purpurea*, *International Journal of Molecular Science*, **20**, 2-24.

Hill R.A., 2002, Dictionary of natural products on CD-ROM, Ed. version 10.2.

Hu Q.F.T.T., Gao T.T., Shi Y.J., Lei Q., Liu Z.H., Feng Q., Chen Z.J., Yu L.T., 2019, Design, synthesis and biological evaluation of novel 1-phenyl phenanthridin-6(5H)-one derivatives as anti-tumor agents targeting TOPK, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **162**, 407–422.

Iftekhar A., Ridwan I., Md. Al Amin S., Mohammed R. H., Md. Al-Mansur A., Mohammad A. R., 2014, Alkaloid, Sterol and Triterpenoids from *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC. Dhaka University, *Journal of Pharmacology Science*, **13**, 115-118.

Inglett G.E., Diejun C., 2011, Contents of Phenolics and Flavonoids and Antioxidant Activities in Skin, Pulp, and Seeds of Miracle Fruit, *Journal of Food Science*, **76**, 479-482.

Jahan N., Ahmed W., Malik A., 1995, New steroidal glucosides from *Mimusops elengi*, *Journal of Natural Products*, **58**, 1244-1247.

Jałowiecki L., Hubeny J., Harnisz M., Plaza G., 2022, Seasonal and Technological Shifts of the WHO Priority Multi-Resistant Pathogens in Municipal Wastewater Treatment

Plant and Its Receiving Surface Water : A Case Study, *International Journal of Environmental Research*, 19, 1-13.

Jaramillo-Flores M., Hernandez-Sanchez H., 2000, Thermal diffusivity of soursop (*Annona muricata* L.) pulp, *Journal of Food Engineering*, **46**, 139–143.

Jeon C.C., Park M. S., Yoon C.H., Sin H.S., Um S.J., 2005, Antitumor activity of spinaterol isolated from *Pueraria* roots, *Experimental and Molecular Medicine*, **37**, 111-120.

Jiménez V.M., Gruschwitz M., Schweiggert R.M., Carle, R., Esquivel P., 2014, Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection, *Food Research International*, **65**, 42–46.

Jirovetz L., Buchbauer G., Ngassoum M.B., 1998, Essential oil compounds of the *Annona muricata* fresh fruit pulp from Cameroon, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3719–3720.

Juan E.M., Wenzel U., Daniel H., Planas J.M., 2008, Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferatives and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells, *Molecular Nutrition and food Research*, **52**, 595-599.

Juceni P., Jailton F., Jorge M.D., Alaise G.G., Fernanda W.M.L., Geórgia L.S.S., 2007, New triterpene and antibacterial labdenoic acid derivatives from *Moldenhawera nutans*, *Journal of Brazilian Chemical Society*, **18**, 1585-1589.

Jun Ma., Yang H., Basile M.J., Kennelly E.J., 2004, Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 5873-5878.

Jyoti M. K., Kulshreshtha D.K., Rastogi R.P., 1972, The triterpenoids, *Phytochemistry*, **11**, 2369-2381.

Kamdem R.S.T., Wafo P., Yousuf S., Ali Z., Adhikari A., Rasheed S., Khan I. A., Ngadjuji T.B., Fun H-K., Choudhary M.I., 2011, Canarene: A triterpenoids with a unique carbon skeleton from *Canarium schweinfurthii*, *Organic letters*, **13**, 5492 –5495.

Kedari, T.S and Ayesha A.K, 2014, Guyabano (*Annona muricata*): A review of its Traditional uses Phytochemistry and Pharmacology, *American Journal of Research Communication*, **2**, 247-268.

Kinghorn A.D, Balandrin M.F, Pelletier S.W (Eds.), 1984, Alkaloids, *Chemical and Biological Perspectives*, **2**, 105.

Koffi N., Amoikon K.E., Tiébré M.S., Kadja B., Zirihi G.N., 2009, Effect of aqueous extract of *Chrysophyllum cainito* leaves on the glycaemia of diabetic rabbits, *African Journal of pharmacy and pharmacology*, **3**, 501-506.

Kone D., 2009, Enquête ethnobotanique de six plantes Médicinales maliennes - extraction, Identification d'alcaloïdes - Caractérisation, quantification de Polyphénols : Etude de leur activité Antioxydante, Thèse de Doctorat de chimie organique, Université de Bamako, 97-115.

Kossouh C., Moudachirou M., Adjakidje V., Chalchat J.C., Figuérédo G., 2007, Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. Leaves from Benin, *Journal of Essential Oil Research*, **19**, 307–309.

Kuete V., Tangmouo J.G.V., Penlap B.V., Ngounou F.N., Lontsi D., 2006, Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmontemon omphalocarpoides*, (sapotaceae), *Journal of ethnopharmacology*, **104**, 5-11.

Kuete V., Nana F., Ngameni B., Mbaveng A.T., Keumedjio F., Ngadjui B.T., 2009, Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and Compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae), *Journal of Ethnopharmacology*, **124**, 556-561.

Kuete V., 2010, Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review, *Planta Medica*, **76**, 1479–1491.

Kuete V., Fankam A.G., Wiench B., Efferth T., 2013, Cytotoxicity and modes of action of the methanol extracts of six Cameroonian medicinal plants against multidrug-resistant tumor cells, *Evid Based Complementary Alternative Medicine*, **2013**, 1–10.

Kuo Y. H., Kuo L. M. Y., 1997, Antitumour and anti-aids triterpenes from *Celastrus hindus*, *Phytochemistry*, **44**, 1275-1281.

Lall N., Kishore N., Bodiba D., More G., Tshikalange E., Kikuchi H., Oshima Y., 2017, Alkaloids from aerial parts of *Annona senegalensis* against *Streptococcus mutans*, *Natural Products Research*, **31**, 1944-1947.

Latham P., 2004, Useful Plants of Bas-Congo Province, Democratic Republic of Congo, Department for International Development, London, UK, p 53.

Lavaud C., Massiot G., Becchi M., Misra G., Nigam S. K., 1996, Saponins from three species of *Mimusops*, *Phytochemistry*, **41**, 887-893.

Leboeuf M., Cavé A., Bhaumik P.K., Mukherjee B., Mukherjee R., 1982, The Phytochemistry of the Annonaceae, *Phytochemistry*, **21**: 2783-2813.

Leboeuf M., Legueut C., Cavé A., Desconclois, J., Forgacs P., Jacquemin H., 1981, Alcaloïdes des annonacées XXIX1 : Alcaloïdes de l'*Annona muricata* L. (in French), *Planta Medica*, **42**, 37-44.

Lee D.Y., Jung L., Park J.H., Yoo K.H., Chung I.S., Baek N.I., 2010, Cytotoxic triterpenoids from *Cornus kousa* Fruits. *Chemistry of Natural Compounds*, **46**, 142-145.

Lee S.Y., Kim J.S., Choi J., Kim Y.S., Lee J.H., Kang S.S. 2011, A new polyoxygenated triterpene and two new aegnetic acid quinovosides from the roots of *Rehmania glutinosa*, *Chemical pharmacy Bulletin*, **59**, 742-746.

Lemmens R., 2008, *Omphalocarpum elatum* Miers. In : Louppe D., Oteng-Amoako, A.A et Brink, M. Prota, **7**(1), Timbers/Bois d'oeuvre 1. Prota, Wageninge, 427-567.

Leong Y.W., Harrison L.J., 1999, (20R, 23E)-Eupha-8, 23-diene-3b, 25-diol from *Tripetalum cymosum*, *Phytochemistry*, **50**, 849-857.

Li X., Liu Y., Wang D., Yang C., Nigam S. K., Misra G., 1994, Triterpenoid saponins from *Madhuca butyraceae*, *Phytochemistry*, **37**, 827-829.

Liang D., Hu Z., Peng J., Huang J., Zhu Q., 2013, Synthesis of Phenanthridinones via Palladium-Catalyzed C (sp²) –H Aminocarbonylation of Unprotected o-Arylanilines, *Chemical Communications*, **49**,173-175.

Liu M., Yang S., Jin L., Hu D., Wu Z., Yang S., 2012, Chemical Constituents of the Ethyl Acetate Extract of *Belamcanda chinensis* (L.) DC Roots and their Antitumor Activities, *Molecules*, **17**, 6156-6169.

Louppe D., Oteng-Amoako, Brink M., 2008, Plant Resources of Tropical Africa 7(1), Timbers1 PROTA FoundationWageningen Netherlands/Backhuys, Leiden, Netherlands/CTA, p. 704.

Luhata P.L., Munkombwe N.M., 2015, Isolation and characterisation of stigmasterol and β -sitosterol from *Odontonema strictum* (Acanthaceae), *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Science*, **2**, 88-96.

Luo X., Wu S., Ma Y., Wu D., 2000, Tirucallane triterpenoids from *Dysoxylum hainanense*, *Phytochemistry*, **54**, 801–805.

Ma C.Y., Zhang H.J., Tan. G., T.,Van N.V., Cuong N.M., Soejarto D.D., Flong Mabberley D.J., 1993, The Plant-book: A Portable dictionary of the higher plants, Cambridge University Press: New York, p 520.

Magadula J.J., Innocent E., Otieno J.N., 2009, Mosquito larvicidal and cytotoxic Activities of *Annona species* and isolation of active principles, *Journal of Medicinal Plant Research*, **3**, 674-680.

Mahato S. B Nandy A. K., Gita R., 1992, Triterpenoids. *Phytochemistry*, **31**, 2199-2249.

Mahato S. B. Kundu A. P., 1994, ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids: A compilation and some salient features, *Phytochemistry*, **37**, 1517-1575.

Marbou W.J., Jain P., Samajpati S., Halder G., Mukhopadhyay A.K., S Dutta S., Kuete V., 2020, Profiling Virulence and Antimicrobial Resistance Markers of Enterovirulent Escherichia Coli from Fecal Isolates of Adult Patients with Enteric Infections in West Cameroon, *Osong Public Health and Research Perspectives*, **11**, 216-230

Martínez-Vázquez M., Diana G., Estrada-R.R., González L.M., Apan T.R., Heinze G., 2005, Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*, *Fitoterapia*, **76**, 733-736.

Martins A., Vasas A., Viveiros M., Molnár J., Hohmann J., Amaral, 2011, Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **37**, 438–444.

Martins D., Carrion L.L., Ramos D.F., Kahlil S.S., Da Silva P.E.A., Barison A., Nunez C.V., 2013, Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae), *BioMed Research International*, **2013**, 1-7, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/605831>.

Matchi J.L.T., Nougoué T.D., Boissier I.K.J., Tchouankeu J.C., Nothisen M., Chaubet G., Garnier D., Ursueguib S., Ngouela S.A., Wagner A., 2021, Manniindole, an indole derivative from the roots of *Anonidium mannii* and combined antischistosomal and enzymatic activities, *Natural Products Research*, **35**, 5665-5673.

Matsushige A., Kotake Y., Matsunami K., Otsuka H., Ohta S., Takeda Y., 2012, Annonamine; a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annona muricata*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **60**, 257–259.

Mbaya, A.W., Nwosu C.O., Onyeyili P.A., 2007, Toxicity and anti-trypanosomal effects of ethanolic extract of *Butyrospermum paradoxum* (Sapotaceae) stem bark in rats infected with *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense*, *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, 526-530.

Ménan H., Banzouzi J.T., Hocquette A., Pélissier Y., Blache Y., Koné M., Mallié M., Assi L.A., Valentin A., 2006, Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in west african traditional medicine for the treatment of malaria, *Journal of Ethnopharmacology*, **105**, 131–136.

Menezes L.R.A., Costa C.O.D., Rodrigues A.B., Santo F.R., Nepel A., Dutra L.M., Silva F.A., Soares M.B.P., Barison A., Costa E.V., Bezerra P.D., 2016, Cytotoxic Alkaloids from the Stem of *Xylopia laevigata*, *Molecules*, **21**, 890.

Minari J., Okeke U., 2014, Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA-induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice, *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, **15**, 327–334.

Morton J. F., Miami FL., Winterville N.C., 1987, Fruits of Warm Climates, Echo Point Books and Media, 398-405.

Mouiche M.M., Moffo M., Akoachere J.T.K., Okah-Nnane N.H., Mapiefou P.N., Ndze V.N., Wade A., Teukeng F.F., Toghua D.J., Zambou H.R., Kameni J.M., LeBreton M., Awah-Ndukum J., 2019, Antimicrobial resistance from a one health perspective in Cameroon : a systematic review and meta-analysis, *BMC Public Health*, **19**, 1135.

Murtaza I., Saleen M., Adhami V.M., Hafeez B. B., Mukhtar H., 2009, Suppression of cFLIP by lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemo resistant human pancreatic cancer cells, *Cancer Research*, **69**, 1156-1165.

Nakano D., Ishitsuka K., Kamikawa M., Matsuda M., Tsuchihashi R., Okawa M., 2013, Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukemia/lymphoma (III), *Journal of Natural Products*, **67**, 894-903.

Nam J.S., Park S.Y., Jang H.L., Rhee Y.H., 2017, Phenolic compounds in different parts of young *Annona muricata* cultivated in Korea and their antioxidant activity, *Applied Biological Chemistry*, **60**, 535–543.

Newton S.M., Lau C.G., Gurcha S.S., Besra G.S., Wright C.W., 2002, The evaluation of forty-three plants species for *in vitro* anti-mycobacterial activities, isolation of active constituents from *Psorale accorylifolia* and *sanguin ariacadensis*, *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 57-63.

Ngantchou I., Nkwengoua E., Nganso Y., Nyasse B., Denier C., Hannaert V., Schneider B., 2009, Antitrypanosomal activity of polycarpol from *Piptostigma preussi* (Annonaceae), *Fitoterapia*, **80**, 188-191.

Nicolas G., Oulad-Ali A., Guillaume D., Lobstein A., Weniger B., Anton R., 1995, Triterpenoid saponins from the root of *Sideroxylon foetidissimum*, *Phytochemistry*, **38**, 225-228.

Nigam S. K., Li X., Wang D., Misra G., Yang C., 1992, Triterpenoidal saponins from *Madhuca butyracea*, *Phytochemistry*, **31**, 3169-3172.

Nkeoua G., Boundzanga G. C., 1999, Données sur les produits forestiers non ligneux en république du Congo Projet GCP/INT/679/EC, Forestry Statistics and Data Collection – AFDCA/TN/08, 19-125.

Nwokocha C.R., Owu D.U., Gordon A., Thaxter K., McCalla G., Ozolua R.I., Young L., 2012, Possible mechanisms of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive sprague-dawley rat, *Pharmaceutical Biology*, **50**, 1436–1441.

Nyasse B., Ngantchou I., Nono J.J., Schneider B., 2006, Antifilarial activity in vitro of polycarpol and 3-*O*-acetyl aleuritolic acid from Cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*, *Natural Products Research*, **20**, 391-397.

Ogunkoya L., 1981, Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry*, **20**, 121-126.

Okogun J.I., Adesomoju A.A., 1985, Isolation of polycarpol from *Anonidium mannii*, *Fitoterapia*, **56**, 252-253.

Okoye N.N., Lotanna A.D., Nnaemeka O.H., Emeka I.E., Nworu C.S., Okoye F.B.C. 2014, beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity, *Pharmaceutical Biology*, **52**, 1478-1486.

OMS, 2010, Microbes et antimicrobiens, *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, **88**, 797-876.

OMS, 2019a. Global report for research on infectious diseases of poverty, on behalf of Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)', Geneva, Switzerland.

OMS, 2019b, Gastroentérite, *Easten Mediterranean Health Journal*, **25**, 147-148

OMS, 2021, Vaccins antirotavirus: Note de synthèse de l'OMS du 16 JULY 2021, *Weekly epidemiological record*, 96, 301–320.

Ong H., Norzalina J., 1999, Malay herbal medicine in Gemencheh, Negri Sembilan Malaysia, *Fitoterapia*, **70**, 10–14.

Osman W., Ibrahim M., Adam M., Mothana R., Mohamed M., Abdoon I., Basudan O., Garelnab E., Mohamed H, Osman B., Ahmad S., 2019, Isolation and characterization of four terpenoidal compounds with potential antimicrobial activity from *Tarconanthus camphoranthus* L.(Asteraceae), *Journal of Phamacology and Bioallied Sciences*, **11**, 373-376.

Oumorou M., Dah.D J., Aboh B.A., Hounsoukaka M., Sinsin B. 2010, Contribution à la conservation de *synsepalum dulcificum* : régénération et importance socioéconomique dans le département de l'ouémé (Bénin), *Annale de la Science Agronomique Francaise et Etrangère*, **14**, 101-120.

Pan H., Lennart L., Rofl A.; 1994, Triterpene caffeadates from bark of *pubescens*, *Phytochemistry*, **37**, 795-799.

Pathak K., Zaman K., 2013, Na overview on medicinally important plant – *Annona reticulata* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, **5**, 299-30.

Pennington, T.D., 1990, Flora Neotropica – monograph Sapotaceae, *The New York Botanical Garden*, **52**, 1-2.

Pinto A.D.Q., Cordeiro M.C.R., Andrade S.R.M., de Ferreira F.R., Filgueiras H.D.C., Alves R.E., Kinpara D.I., 2005, Monograph of *Annona* species. Southampton, UK: International Centre for Underutilised Crops, 186-195.

Rabêlo S.V., Costa E.V., Barison A., Dutra L.M., Nunes X.P., Tomaz J.C., 2015, Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimola* × *Annona squamosa*), *Revista Brasileira Farmacognosia*, **25**, 419-421.

Radi. N., 2003, L'arganier : arbre du sud-ouest marocain, en péril, à protéger, thèse de doctorat Université de Grenoble.

Ragasa C. Y., Lim K., 2005, Sterols from *Cucurbita maxima*, *Philippine Journal of Science*, **134**, 83-87.

Rainer H., 2007, Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A, St.-Hil, *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien Serie B Botanic Zoology* **108B**, 191–205.

Rasoanaivo L.H., Wadouachi A., Andriamampianina T.T., Andriamalala S.G., Razafindrakoto E.J.B., Raharisololalao A., Randimbivololona F., 2014, Triterpenes and steroids from the stem bark of *Gambeya boiviniana* Pierre, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **3**, 68-72.

Rates S.M., 2001, Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**, 603-13.

Rattana R., Cushnie B., Taepongsorat L., Phadungkit M., 2016, Chemical constituents and In vitro anticancer activity of *Tiliacora triandra* leaves, *Pharmacognosy Journal*, **8**, 1-3.

Rhourri-Frih, B., Renimel, I., Chaimbault, P., Andre, P., Herbette, G., Lafosse, M., 2013, Pentacyclic triterpenoids from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties, *Fitoterapia*, **88**, 101-108.

Ribeiro L.P., Akhtar Y., Vendramim J.D., Isman M.B., 2014, Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*, *Crop Protection*, **62**, 100–106.

Rosecke J., .Konig W.A., 1999, Steroids from the fungus *fomitopsis pinicola*, *Phytochemistry*, **52**, 1621-1627.

Rubinstein I., Goad J.L., Clague A.D.H., Mulheirn L.J., 1976, The 220 MHz NMR Spectra of phytosterols, *Phytochemistry*, **15**, 195-200.

Saleen M., Kaur M.H., 2005, Lupéol, a fruit and vegetable-based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway, *Carcinogenesis*, **26**, 1956-1964.

Sánchez-Medina A., Stevenson P.C., Habtemariam S., Peña-Rodríguez L.M., Olivia Corcoran O., Mallet A. I., Veitch N. C., 2009, Triterpenoid saponins from a cytotoxic root extract of *Sideroxylon foetidissimum* subsp., Gaumeri, *Phytochemistry*, **70**, 765-772

Sandjo L.P., Chi G.F., Kuete V., Nana F., Yeboah S. O., Mapitse R., Abegaz B.M., Efferth T., Opatz T., Ngadjui B.T., 2014, Elatemic Acid : A New Ursolic Acid Congener from *Omphalocarpum elatum* Miers (Sapotaceae), *Zeitschrift für Naturforschung*, **69**, 276-282.

Sengupta P., Ghosh S. K., Das S., 1997, Chemistry of the constituents of *Putranjiva roxburghii*, *Journal of the Indian Chemical Society*, **74**, 827-830.

Severi J.A., Lima Z.P., Kushima H., Brito A.R.M., Dos Santos L.C., Vilegas W., Hiruma-Lima C.A., 2009, Polyphenols with Antiulcerogenic Action from Aqueous Decoction of Mango leaves (*Mangifera indica* L.), *Molecules*, **14**, 1098 – 1110.

Shiping F., Chunyan H., Zhiquiang L., Fengrui S., Shuying L., 1999, Application of electrospray ionisation mass spectrometry combined with sequential tandem mass spectrometry technique for the profiling of steroidal saponin mixture extracted from *Tribulus terrestris*, *Planta Medica*, **65**, 68-73.

Silva M., Koolen H.H.F., Barison A., Souza A., Pinheiro M., 2012, Steroids and triterpene from the bark of *Unonopsis guatterioides* R. E. FR. (Annonaceae), *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**, 522–523.

Soheil Z.M., Mehran F., Nikzad S., Gokula M., Hapipah M.A., Habsah A. K., 2015, *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities, *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 15625-15658.

Soni V.K., Yadav D.K., Bano N., Dixit P., Pathak M., Maurya R., 2012, N-methyl-6, 7-dimethoxyisoquinolone in *Annona squamosa* twigs is the major immune modifier to elicit polarized Th1 immune response in BALB/c mice, *Fitoterapia*, **83**, 110-116.

Suryawanshi P., Vidyasagar G.M., 2016, Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw, *Journal Medicinal Plants*, **4**, 39–43.

Swamy K.B., Hadi S.A., Sekaran M., Pichika M.R., 2014, The Clinical Effects of *Synsepalum dulcificum*: A Review, *Journal of Medicinal Food*, **17**, 1165–1169.

Syafni N., Putra D.P., 2012, *Trichomanes chinense* L. Isolation, antimicrobial and antioxidant properties of *Trichomanes chinense* L. Indones, *Journal of Chemistry*, **12**, 273–278.

Tahia F., Sikder Al Amin M., Haque R. M., Shilpi A. J., Awang K., Al-Mansur Md. A., Rashid A. M., 2015, Alkaloids, Coumarin and Cinnamic Acid Derivative from *Murraya koenigii* (Linn.) Spreng. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Science*, **14**, 29-33.

Tang M.C., Zou Y, Watanabe K., Walsh C.T., Tang Y., 2016, Oxydative cyclization in naturel product biosynthesis, *Chemical Review*, **117**, 5226-5333.

Thang T., Dai D., Hoi T., Ogunwande I., 2013, Study on the volatile oil contents of *Annona glabra* L., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L. and *Annona reticulata* L. from Vietnam, *Natural Products Research*, **27**, 1232–1236.

Thomas D.J., 2019, Infectious gastrointestinal disorders. In L. Dunphy, J. Winland-Brown, B. Porter, & D. Thomas (Eds.), *Primary care : The art and science of advanced practice nursing – an interprofessional approach* (5th ed, pp. 544-565), Philadelphia, PA: F. A. Davis.

Thomas. A., 1969,’’ Flore du Gabon’’, Ed. Museum National d’histoire Naturelle, Paris, 9.

Thoppil R.J.Bishayee A.; 2011, Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer, *World Journal of Hepatology*, **9**, 228-249.

Thuong P.T., Lee C.H., Dao T.T., Nguyen P.H., Kim W.G., Lee S.J., Won K., 2008, Triterpenoids from the Leaves of *Diospyros kaki* (Persimmon) and Their Inhibitory Effects on Protein Tyrosine Phosphatase 1B, *Journal of Natural Products*, **71**, 1775–1778.

Tiwatt K., Rutt S., Thitima P., Nijisiri R., 2009, Chemical structure and antiviral activity of aerial part from *Laggera pterodonta*, *Journal of Health Research*, **23**, 175-177.

Troupin G., 1985, Flore du Rwanda, Spermatophytes, Agence de Coopération Culturelle et Technique ; Muséum Royal de l’Afrique Centrale-Tervuren, *Belgique Annales-Series IN-8-Sciences Economiques*, **15**, 23-24.

Trương T. T., Nguyễn T. H., Khoa D., Trường Đ. D., Đại H., 2018, Các hợp chất triterpenoid phân lập từ lá cây hồng (*Diospyros kaki* L.f. - Ebenaceae), *The Pharmaceutical journal*, **58**, 0866 – 7861.

Vardamides J.C., Dongmo A.B., Meyer M., Ndom J.C.A.G.B., Zounda M.R.S., Sielinou V.T., Ndemangou B., Nkengfack A.E., Ngando T.M., and Fomun Z.T., 2006,

Alkaloids from the stem bark of *Turraeanthus africanus* (Meliaceae), *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **54**, 1034-4036.

Vendramin M.E., Costa E.V., Santos E.P., Campos F.R., 2013, Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, **49**, 152-155.

Verde V.G.M., Paula J.R., Carneiro D.M., 2003, Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO), *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **13**, 64-66.

Wafo P., Kamdem R. S. T., Ali Z., Anjum S., Khan S. N., Begum A., Krohn K., Abegaz B., Ngadjui T. B., Choudhary I. M., 2010, Duboscic acid: a potent α -glucosidase inhibitor with unprecedented triterpenoidal carbon skeleton from *Duboscia macrocarpa*, *Organic letters*, **12**, 5760 – 5763.

Walsh C., 2003, Antibiotic: Actions, origins, resistance. Washington D C., USA, 3-155.

Wandji J., Tillequin F., Mulholland D.A., Shirria C.J., Tsabang N., Seguin E., Verite P., Libot F., Fomum Z.T., 2003, Pentacyclic triterpenoid and saponins from *Gambeya boukokoensis*, *Phytochemistry*, **64**, 845–849.

Wandji J., Tillequin F., Mulholland D.A., Wansi J.D., Fomum T.Z., Fuendjiep V., Libot F., Tsabang N., 2002, Fatty acid esters of triterpenoids and steroid glycosides from *Gambeya africana*, *Planta, Medica*, **68**, 822-826.

Wang H.M., Chou Y.T., Hong Z.L, Chen H.A., Chang Y.C., Yang W.L., Chang H.C., Mai C.T., Chen C.Y., 2011, Bio constituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell (Sapotaceae) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxydant properties, *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **42**, 204-211.

Wang Y. P., Zhu Z. Y., Yang J. S., 1988, Determination of oleanolic acid and total saponins in *Aralia L.* *Zhongguo Zhongyao Zazhy*, **23**, 518-521.

Wansi J. D., 2000, Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales du Cameroun : *Gambeya africana* (Sapotaceae) et *Drypetes molunduanana* (Euphorbiaceae). Thèse de Doctorat de troisième cycle en chimie organique, Université de Yaoundé I, Cameroun, p 29.

Watcho P., Zelefack F., Ngouela S., Nguenefack T.B., Kamtchouing P., Tsamo E., Kamanyi A., 2012, Enhancement of erectile function of sexually naive rats by β -sitosterol and α - β -amyrin acetate isolated from the hexane extract of *Mondia whitei*, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **12**,1266-1269.

Wilson R.G. and Williams D.H., 1969, Solvent shifts induced by benzene in triterpenes as an aid to structure elucidation, *Tetrahedron*, **25**, 155-162.

Wu F.E., Gu Z.M., Zeng L., Zhao G.X., Zhang Y., McLaughlin J.L., Sastrodihardjo S., 1995, Two new cytotoxic monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, annomuricins a and b, from the leaves of *Annona muricata*, *Journal of Natural Products*, **58**, 830–836.

Xia Q., Zhang H., Sun X., Zhao H., Wu L., Zhu D., Yang G., Shao Y., Zhang X., Mao X., 2014, A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma* spp, *Molecules*, **19**, 17478–17535.

Xiao-An W., Jun L., Lu-Yong Z., Pei-Zhou N., Hong-Bin S., 2010, Synthesis and Biological Evaluation of Arjunolic Acid, Bayogenin, Hederagonic Acid and 4-Epi-hederagonic Acid as Glycogen Phosphorylase Inhibitors, *Chinese Journal of Natural Medicines*, **8**, 0441-0448.

Xiao-dong L., Basile M.J., Kennelly E.J., 2002, Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (Star apple), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1379-1382.

Xue B., Tan Y.H., Thoma, D.C., Chaowasku T., Hou X.L., Saunders R.M.K., 2018, A new Annonaceae genus, Wuodendron, provides support for a post-boreotropical origin of the Asian-Neotropical disjunction in the tribe Miliuseae, *Taxon*, **67**, 250–266.

Xue-Min F., Xiu L.S., 2019, Anticancer effect of ursolic acid via mitochondria-dependent pathways (Review), *Oncology Letters*, **17**, 4761- 4767.

Yang M., Wang X., Guan S., Xia J., Sun J., Guo H., Guo D., 2014, Analysis of Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of American Society*, **18**, 927- 939.

[http : www.africanplants.senckenberg](http://www.africanplants.senckenberg), de *Annonidium mannii* (Oliv.)Engl. And Diels-African PlantsA ,consulté le 01 Octobre 2021 à 11h 45mn.

<https://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/gastro-enterite/quest-ce-que-cest>, consulté le 15 Décembre 2021 à 12h 00 min.

www.catalogueoflife.org, consulté le 05 avril 2021 à 17h 05 mn de catalogue of life checklist.

ANNEXES

TESTS CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLEES (Suryawanshi et Vidyasagar, 2016 ; Saha *et al.*, 2011 ; Bruneton, 1996)

1- TEST DE PHENOLS (FeCl₃/EtOH)

Dissoudre le composé phénolique dans quelques mL d'eau ou dans un mélange eau-éthanol à 25°C. Si le produit n'est pas soluble dans de l'eau. Y ajouter quelques gouttes d'une solution aqueuse de chlorure ferrique (FeCl₃ 0,2 M). Il se forme un complexe de type [Fe(OAr)₆]³⁻ de couleur bleue, rouge, violette ou verte, selon la structure du composé phénolique.

2- TEST DE MOLISH (Caractéristiques des sucres)

Dans un tube à essai, dissoudre une petite quantité de produit dans le méthanol. Dissoudre 100 mg de α -naphtol dans 10 mL d'éthanol. Prélever 2 mL de cette solution et l'ajouter à la solution du produit puis homogénéiser. Faire couler doucement quelques gouttes d'acide sulfurique concentré sur le mélange. L'observation d'une coloration violette à l'interface indique la présence d'un sucre.

3- TEST DE LIEBERMANN-BURCHARD (caractéristiques des triterpènes et des stérols)

Dissoudre une petite quantité de substance dans le chloroforme ou le dichlorométhane. Y ajouter quelques gouttes d'anhydride acétique ainsi que l'acide sulfurique concentré. Les triterpènes et leurs saponines se manifestent par changement de coloration du rouge intense au vert foncé en passant par le violet alors que les stérols présentent une coloration bleue.

4- TEST DE MAYER

Dans un tube à essai contenant 5 mL de chloroforme, ajoutons 2 mg de notre produit, puis évaporons le chloroforme du filtrat par chauffage au bain-marie ensuite ajoutons 3 gouttes de réactif de Mayer et laissons la réaction se produire. L'apparition de précipités crévés et rouge ou rouge orangés indiquent la présence des alcaloïdes.

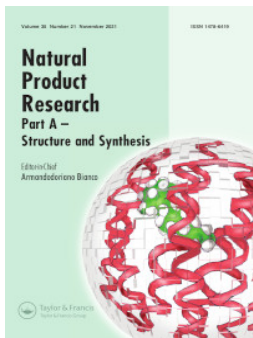
Le réactif de Mayer est fraîchement préparé en dissolvant un mélange de mercure chlorure (1,36 g) et d'iodure de potassium (5,00 g) dans l'eau (100,0 mL). La plupart des alcaloïdes sont précipités à partir d'une solution neutre ou légèrement acide par le réactif de Mayer (solution d'iodure potassiomercurique) pour donner un précipité de couleur crème.

LISTE DES PUBLICATIONS

1-**Ngangoue M.O**, Ngameni B, Ambassa P, Chi F.G, Wamba Nougan BE, Ombito O.J, Bojase M.G, Fotso W.G, Kuete V, Ngadjui T. B., **2021**, A phenanthridin-6(5H)-one derivative and a lanostane-type triterpene with antibacterial properties from *Anonidium mannii* (Oliv). Engl. & Diels (Annonaceae), *Natural Products Research.*, **35**, 4041-4050.

2-Guefack M.G.F, **Ngangoue M.O.**, Mbaveng A.T., Nayim P., Ngaff C.N., Chi G.F., Ngameni B., Ngadjui B.T., Kuete V., **2022**, Antibacterial and antibiotic-potential activity of the constituents from aerial part of *Dowella welwitshii* (Sapotaceae) against multidrug resistant phenotypes, *BCM Complementary Medicine and Therapies*, **22**, 1-14.

3- **Ngangoue M.O**, Guefack M.F., Ache R.N, Chi G.F., Ngameni B., Kuete V, Ngadjui T. B., **2022**, Isolation and antibacterial activity of anomanol B and other secondary metabolites from the stem bark of *Anonidium mannii* (Oliv). Engl. & Diels (Annonaceae) (**encours**)





A phenanthridin-6(5H)-one derivative and a lanostane-type triterpene with antibacterial properties from *Anonidium mannii* (Oliv). Engl. & Diels (Annonaceae)

Marcelle Oliviane Ngangoue, Bathelemy Ngameni, Pantaleon Ambassa, Godloves Fru Chi, Brice Elvis Nougan Wamba, Japheth Omollo Ombito, Gomotsang Moleta Bojase, Ghislain Wabo Fotso, Victor Kuete & Bonaventure Tchaleu Ngadjui


To cite this article: Marcelle Oliviane Ngangoue, Bathelemy Ngameni, Pantaleon Ambassa, Godloves Fru Chi, Brice Elvis Nougan Wamba, Japheth Omollo Ombito, Gomotsang Moleta Bojase, Ghislain Wabo Fotso, Victor Kuete & Bonaventure Tchaleu Ngadjui (2021) A phenanthridin-6(5H)-one derivative and a lanostane-type triterpene with antibacterial properties from *Anonidium mannii* (Oliv). Engl. & Diels (Annonaceae), Natural Product Research, 35:21, 4041-4050, DOI: [10.1080/14786419.2020.1758094](https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1758094)


To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1758094>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 13 May 2020.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 114



 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

 Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)



A phenanthridin-6(5H)-one derivative and a lanostane-type triterpene with antibacterial properties from *Anonidium mannii* (Oliv). Engl. & Diels (Annonaceae)

Marcelle Oliviane Ngangoue^a, Bathelemy Ngameni^b, Pantaleon Ambassa^a, Godloves Fru Chi^a , Brice Elvis Nougan Wamba^c, Japheth Omollo Ombito^d, Gomotsang Moleta Bojase^d, Ghislain Wabo Fotso^a , Victor Kuete^c and Bonaventure Tchaleu Ngadjui^a

^aFaculty of Science, Department of Organic Chemistry, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon;

^bFaculty of Medicine and Biomedical Sciences, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon; ^cFaculty of Science, Department of Biochemistry, University of Dschang, Dschang, Cameroon; ^dDepartment of Chemistry, University of Botswana, Gaborone, Botswana

ABSTRACT

The chemical investigation of *Anonidium mannii* root extract by column chromatography techniques led to the isolation of eight compounds among which two previously unreported compounds; a lanostane-type triterpene, lanosta-7,9(11),23-triene-3 β ,15 α -diol **1** and an alkaloid, 9-hydroxy-8-methoxyphenanthridin-6(5H)-one **2** along with six known compounds: lanosta-7,9(11),24-triene-3 β ,21-diol **3**, oxoanobine **4**, 3, 4-dihydroxybenzoic acid **5**, stigmasterol **6**, β -sitosterol **7** and 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -stigmasterol **8**. Their structures were established from spectral data, mainly HR-ESIMS, 1D and 2D NMR and by comparison with literature data. The crude root and stem bark extracts (AMR and AMB) and the isolated compounds (**1–8**) were tested against nine Gram-negative bacteria using rapid *p*-iodonitrotetrazolium chloride $\geq 97\%$ (INT) microdilution technique. It was found that AMR, AMB and compound **5** were active against the nine tested bacteria with MIC values ranging from 64 to 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compounds **1–4** had selective antibacterial activities whilst **6–8** were not active.

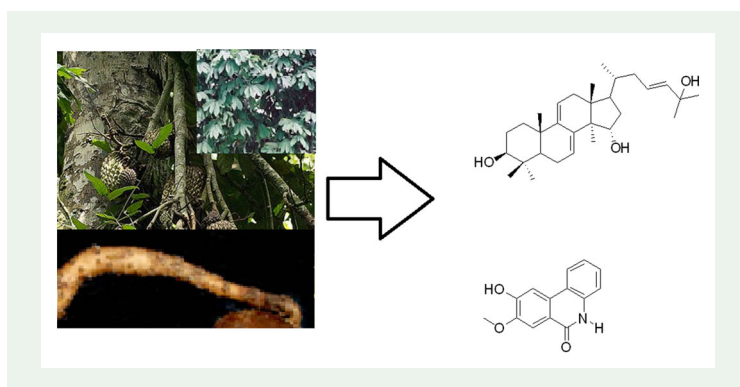
ARTICLE HISTORY

Received 25 February 2020

Accepted 16 April 2020

KEYWORDS

Anonidium mannii;
lanostane-type triterpene;
phenanthridin-6(5H)-one
alkaloid; antibacter-
ial activity



1. Introduction

Anonidium mannii (Jungle sop) is a plant of the Annonaceae family, same as the sour-sop. It is a fast-growing tropical African tree that grows to 8-30 m high, a girth of 2 m, with leaves between 20-40 cm long and large flowers which produce large fruits usually 4-6 kg but can reach 15 kg (Latham 2004). Wild soursop roots, barks, leaves and fruits are used in folk medicine; the root extracts are used to treat cancer, convulsion, venereal diseases, diarrhoeal, dysentery, filariasis, male impotency and have antineoplastic and antiprotozoal activities (Pinto et al. 2005; Dominguez et al. 2016). The curative effect of soursops has been linked to the presence of various compounds including flavonoids, alkaloids, tanins and saponins (Pinto et al. 2005; Dominguez et al. 2016; Djeussi et al. 2013; Moghadamtoussi et al. 2015). Sugar apples contain aporphine, roemerine, norcorydine, corydine, norisocorydine, glaucine and anonaine alkaloids (Avula et al. 2018). 16 β ,17-dihydroxykauran-19-oic acid isolated from sugar apples demonstrated anti-HIV activities (Wu et al. 1996). *Annona muricata* leaf extract has been shown to suppress tumour initiation and propagation even at low dosage (Hamizah et al. 2012). These activities were linked to the presence of acetogenins in *A. muricata* extracts (Melot et al. 2009). *A. mannii* is used in traditional medicine to treat spider bites, snake bites, gastroenteritis, syphilis, sterility caused by poison, dysentery, diarrhoea, malaria and cancer (Betti 2004; Kuete et al. 2013). Despite the isolation of polycarpol from *A. mannii* (Okogun and Adesomoju 1985), the cytotoxicity and the antibacterial activities of its methanolic crude extract (Djeussi et al. 2013; Kuete et al. 2013), there has been insufficient scientific basis and information supporting the medicinal potential of this plant and its chemical constituents. This study was designed to ascertain the use of *A. mannii* in traditional medicine by the evaluation of its root and stem bark crude extracts' antibacterial activity as well as that of the isolated secondary metabolites.

2. Results and discussion

The chemical investigation of the root extracts of *A. mannii* by usual chromatographic techniques led to the isolation of eight secondary metabolites including two previously unreported **1** and **2**.

Compound **1** was obtained in the solvent system *n*-hexane-EtOAc (6:4) as brown crystals soluble in DMSO. Its melting point was 217.1–218.9 °C and it gave a red-violet coloration to the Liebermann-Buchard test characteristic of triterpenes (Suryawanshi and Vidyasagar 2016). Its HRESI-MS (Figure S1, Supplementary data) gave a pseudo molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 479.3520 (calcd. 479.3496) corresponding to the molecular formula $C_{30}H_{48}NaO_3^+$. The IR spectrum of **1** (Figure S2, Supplementary data) exhibited mainly bands for OH-group at 3352 cm^{-1} and aliphatic CH-groups at 2967.4 and 2921.3 cm^{-1} . Its ^1H NMR spectrum (Figure S3, Supplementary data) displayed signals for seven tertiary methyl groups as singlets between 0.5–1.15 ppm and one as a doublet at δ_{H} 0.83 (3H, d, $J=6.6$ Hz). Signals of two olefinic protons were observed at $\delta_{\text{H/C}}$ [5.90 (1H, d, 6.6 Hz)/120.9; 5.28 (1H, d, 6.6 Hz)/115.3] characteristic of the double bonds $\Delta^{7,9}$ (Silva et al. 2012; Xia et al. 2014). Long range correlation was observed between H-7 and H-11 on the COSY spectrum (Figure S4, Supplementary data). Signals of a Δ^{23} double bond (Leong and Harrisson 1999) were observed at $\delta_{\text{H/C}}$ [5.46 (1H, dd, 5.4, 15.0 Hz)/123.1; 5.52 (1H, d, 15.0 Hz)/140.8]. The coupling constant $J=15.0$ Hz was in accordance with two olefinic protons in *trans* position on the side chain of **1**. Compared to polycarpol (Xia et al., 2014; Silva et al., 2012) and other lanostane type triterpenes (Luo et al., 2000) having two vinylic methyl groups between 1.5–1.6 ppm, signals of a gem-methyl groups appeared upfield at γH 1.15 (6H, s). They were attributed to the methyl C-26 and C-27 based on their HMBC correlations (Figures S8 and S16, Supplementary data) with the oxygenated quaternary C-25 at δ_{C} 68.9 and C-24 of the Δ^{23} double bond at 140.8 ppm. The ^{13}C NMR spectrum of **1** in conjunction with DEPT and HSQC (Figures S5–S7, Supplementary data) revealed the presence of thirty carbon atoms among which six olefinic carbon atoms at δ_{C} 115.5, 120.9, 123.1, 140.9, 141.1 and 146.3. Their chemical shifts were closely comparable to those of lanosta-7, 9, 23-triene derivatives reported in the literature (Leong and Harrisson 1999; Silva et al. 2012; Xia et al. 2014). In addition, twenty-four sp^3 carbons were observed attributed to eight methyls, six methylenes, five methines including two oxymethines at δ_{C} 76.9, 72.4, and five quaternary carbon of which is oxygenated at 68.9 ppm. The chemical shift values at δ_{C} 76.9 and 72.4 were assigned to C-3 and C-15, respectively, based on biogenetic considerations and HMBC correlations (Figures S8 and S16, Supplementary data) between H-28/29 (δ_{H} 0.92/0.78) and C-3 (δ_{C} 76.9) and between H-30 (δ_{H} 0.82) not only with C-15 (δ_{C} 72.4) but also with C-14 (δ_{C} 51.5) and C-8 (δ_{C} 140.9). Four non oxygenated quaternary carbons appeared at δ_{C} 37.2 (C-10), 38.3 (C-4), 43.8 (C-13), 51.5 (C-14) together with an oxygenated one δ_{C} 68.9 (C-25). Further HMBC correlations were established between the protons of the methyl C-30 at δ_{H} 0.82 with carbons at δ_{C} 43.6, 51.5 and 140.9; methyl protons at δ_{H} 0.83 (H-21) correlated with carbons at δ_{C} 35.7 (C-20) and 39.2 (C-22), the latter carbon, together with carbons at δ_{C} 30.2, 68.9 and 123.1 were found to be in 2J and 3J correlations with the olefinic protons at δ_{H} 5.46 (H-23) and δ_{H} 5.52 (H-23) confirming the position Δ^{23} of the side chain double bond. This information, together with previously mentioned literature data (Leong and Harrisson 1999; Silva et al. 2012; Xia et al. 2014) allowed us to unequivocally identify compound **1** as the new lanosta-7,9(11),23-triene-3 β ,15 α -diol to which the trivial name Anomanol A was given.

Compound **2** was isolated as yellow crystals, soluble in DMSO and with melting point of 199.6-200.8 °C. It gave a positive ferric chloride test characteristic of phenols (Mahadeva and Muhammad 2016). Its molecular formula $C_{14}H_{11}NO_3$ was deduced from its positive mode HRESIMS (Figure S9, Supplementary data) showing the pseudo molecular ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 264.0711 (calcd. for $C_{14}H_{11}NaNO_3^+$, 264.0637). Its IR spectrum (Figure S10, Supplementary data) exhibited bands for OH, C=O and C=C at 3198, 1712 and 1620 cm^{-1} , respectively. The 1H and ^{13}C NMR coupled with HSQC spectra of **2** (Figures S11-S13, Supplementary data) showed signals for aromatic protons at δ_H 9.12 (1H, dd, 2.0, 8.0 Hz)/ δ_C 127.2; 7.95 (1H, dd, 2.0, 7.6)/ δ_C 129.4 and 7.58 (2H, dd, 2.0, 8.0 Hz)/ δ_C 126.4, 127.7 suggesting an *ortho* di-substituted aromatic ring. This was confirmed by correlations on COSY spectrum (Figure S14, Supplementary data) between the aforementioned protons. A singlet at δ_H 4.03 was in accordance with the presence of a methoxy group in **2**. HMBC correlations (Figures S15 and S16, Supplementary data) were observed between an N-bound proton at δ_H 10.80 (1H, s) and two quaternary carbons at δ_C 120.8 and 135.8 which are part of the latter aromatic ring and to an aromatic bonded carbonyl at δ_C 168.9. This information in conjunction with literature data (Bhakuni et al. 2012; Peng and health 2013; Hu et al. 2019); suggested the presence of a phenanthridin-6(5*H*)-one skeleton. Further HMBC correlations between a proton at $\delta_{H/C}$ 7.62 (1H, s, H-7)/113.8 were observed with quaternary carbons at δ_C 122.3, 149.3, 152.7 and the above-mentioned carbonyl at 168.9 ppm. The proton at δ_H 7.10 (1H, s, H-10)/ δ_C 104.3 of the same aromatic ring showed correlations with carbons at δ_C 122.3 (C-6a), 125.7 (C-10a). The presence of two aromatic protons as singlets and oxygenated aromatic carbons at δ_C 149.3 and 152.7 suggested an *ortho* tetra-substituted aromatic ring. The methoxy group was located at C-8 based on the HMBC correlation of its protons at δ_H 4.03 (3H, s) and carbon C-8 at δ_C 149.9. This information compared to the literature (Bhakuni et al. 2012; Peng and health 2013; Hu et al. 2019) allowed compound **2** to be characterised as 9-hydroxy-8-methoxyphenanthridin-6(5*H*)-one, reported here for the first time.

The structures of the known compounds **3-8** were obtained by comparing their spectra data with similar data in literature. They were identified as: lanosta-7,9(11),24-triene-3 β ,21-diol **3** (Rosecke and Konig 1999), oxoanolobine **4** (Yu et al. 1998); 3,4-dihydroxybenzoic acid **5** (Syafni and Putra 2012; Guria et al. 2013); stigmasterol **6** (Khatun et al. 2012; Luhata and Munkombwe 2015); β -sitosterol **7** and 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -stigmasterol **8** (Khatun et al. 2012; Damasceno et al. 2019) (Figure 1).

A. *mannii* crude extracts (AMR and AMB) and the isolated compounds (**1-8**) were tested against nine Gram-negative bacteria and the results are summarized in Table S3. It was found that AMR, AMB and compound **5** were active against the nine tested bacteria with MIC values ranging from 64 to 1024 $\mu g/mL$. Compounds **1-4** had selective antibacterial activities whilst **6-8** were not active. In antibacterial testing, activities are considered good if MICs are below 100 $\mu g/mL$ and 10 $\mu g/mL$ for crude extracts and pure compounds respectively, or moderate if MIC values are between 100 - 625 $\mu g/mL$ (crude extracts) or 10 - 100 $\mu g/mL$ (pure compounds) or low if MIC are above 625 $\mu g/mL$ (crude extracts) or 100 $\mu g/mL$ (pure compounds) (Kuete 2010; Kuete and Efferth 2010). Therefore, it can be concluded that AMR and AMB mostly displayed moderate antibacterial activities while the pure compounds generally had low effects.

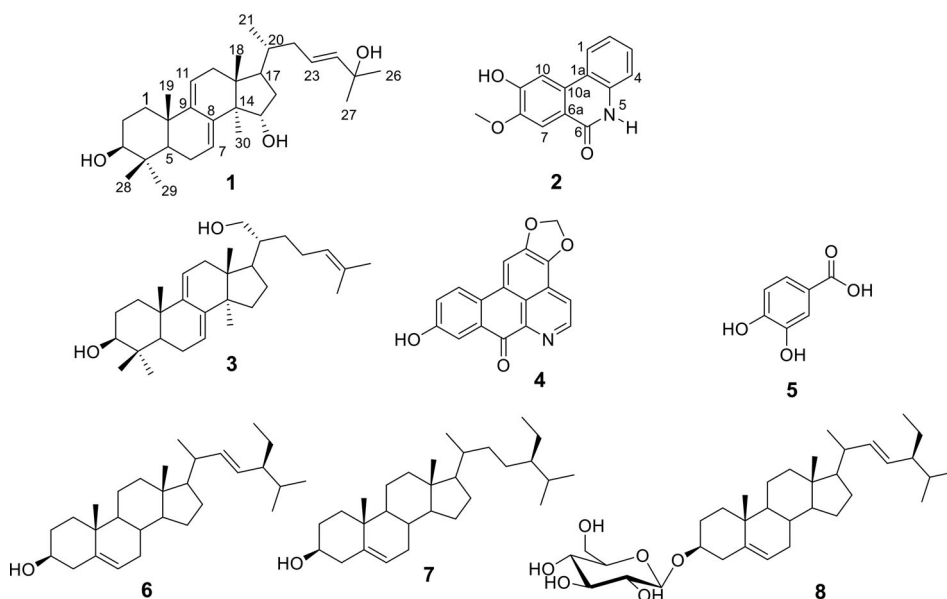


Figure 1. Structures of compounds 1–8 isolated from *Anonidium mannii*.

Nonetheless, a good activity of AMR was obtained against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 11296 with a MIC value of 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The reference drug had good antibacterial activities with MIC values below 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Regarding the structure-activity relationship, it appeared that poor antibacterial effects were recorded with triterpenoids **1** and **3** as well as alkaloids **2** and **4**, meanwhile no effect was obtained with steroids **6–8**. Only the phenolic acid **5** had a broad spectrum of antibacterial activity. The results obtained with triterpenoids and steroids are in accordance with previous documented reports, as the low antibacterial activities of terpenoids have been demonstrated (Kuethe 2010; Kuethe and Efferth 2010). Though the isolated compounds had low antibacterial effects, they could serve as lead compounds which can undergo structural modifications to yield more potent chemicals.

3. Experimental

3.1. General methods

IR spectra were recorded on Perkin Elmer Spectrum 100 Spectrophotometer equipped with a diamond ATR sampling device. ^1H -, ^{13}C - and 2D-NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III-600 MHz, 500 MHz, 400 MHz, 300 MHz spectrometers equipped with a 5 mm inverse TCI cryoprobe using standard pulse sequences. Spectra were processed using the computer software MestReNova 9.1. Melting points were determined on a Buchi SMP-20 melting point apparatus and are uncorrected. Column chromatography (CC) were performed over silica gel 60 63–43 μm Merck, particle size between 0.043 and 0.063 mm in diameter and porosity 230–400 mesh ASTM.

Evaporations were done on a BUCHI type rotary evaporator "ROTA VAPOR" under pressure. Plant materials, extracts and fractions were weighed on a Satorius OT12 type electronic mass balance with rating 12000g/1g. Pure compounds or fractions were weighed on a Satorius BP221S type electronic balance maximum rating 220 g d=0.1 mg. Filtrations were performed on the Whatman type and Macherey-Nagel type filter papers of diameter 70, 90, 150 and 300 mm. Analytical TLC were carried out on pre-coated silica gel 60 F254 aluminium sheets (0.25 mm layer, Merck). The chromatograms were visualised under UV light at λ 254 and 366 nm and with 10% H₂SO₄ spray then heated.

3.2. Plant material

The roots of *A. mannii* were collected from Mt Kala, Yaoundé – Cameroon in May 2015. The plant was identified by Nana Victor, staff of the National Herbarium in Yaoundé where a voucher specimen was conserved under specimen No: 45582 HNC.

3.3. Extraction and isolation

The air-dried and powdered roots (4.0 kg) of *A. mannii* (Oliv) were macerated in CH₂Cl₂-MeOH (1:1, 10 L) for 48 h, twice. The solvent was evaporated at 40 °C under vacuum to afford 173 g of dark paste. Part of the extract (70 g) was dissolved in CHCl₃-MeOH mixture, adsorbed on 85 g of coarse silica gel and then mounted on a column packed with 700 g fine silica gel. The column was eluted with hexane-ethyl acetate gradient up to (70-30) and then with CHCl₃-MeOH gradient up to (70-30). 280 fractions of 200 mL each were collected. The fractions were pooled based on their TLC profiles. Fractions 80-96, 130-139 gave white powders of compounds **6** (53 mg), **7** (100 mg) and fractions 262-264 yielded a white solid compound **8** (45 mg). Fractions 271-280 gave yellow powder of compound **1** (10 mg) after silica gel column chromatography using CHCl₃-MeOH (98-2). The other part of the root extract (98 g) was partitioned by solid-liquid process using hexane, chloroform and ethyl acetate to give fractions A (10 g), B (10 g), and C (20 g) respectively. Based on TLC profiles, fractions A and B were combined, adsorbed on 25 g of silica gel and mounted on a silica gel column packed with 160 g of fine silica gel and eluted with a gradient of hexane-ethyl acetate. Fractions of 200 mL were collected, 300 fractions combined on bases of their TLC profiles into 11 pools labelled A1-A11. A2 was washed with acetone to give more of compound **1** (30 mg). Sub-fraction A5 afforded white crystals of compound **7** (50 mg), while sub-fractions A9 yielded white crystals of compound **3** (10 mg). Fraction C was purified on silica gel using CHCl₃-MeOH (95-5) to give yellow crystals of compounds **2** (15 mg), **4** (15 mg) and **5** (20 mg) respectively.

3.3.1. Lanosta-7,9(11),23-triene-3 β ,15 α -diol (anomanol A) **1**

Brown crystals; m.p: 217.1–218.9 °C; IR (KBr) ν_{\max} : 3352 (O–H), 2967.4 and 2921.3 (CH-groups), 1440 and 1379 (gem-dimethyl), 1230 and 1025 (C–O); ¹H NMR (DMSO, 600 MHz): 1.55 (2H, m, H-1), 1.17 (1H, m, H-2a), 1.97 (1H, m, H-2b), 3.01 (1H, q, 4.8, H-3), 0.96 (1H, dd; 3.6, 12.0, H-5), 2.00 (2H, t, 3.6, H-6), 5.90 (1H, d, 6.6, H-7), 5.28 (1H, d,

6.6, H-11), 1.96 (1H, m, H-12a), 2.20 (1H, d, 17.4, H-12b), 4.07 (1H, m, H-15), 1.93 (1H, t, 7.2, H-16a), 1.78 (1H, m, H-16b), 1.60 (1H, m, H-17), 0.56 (3H, s, H-18), 0.91 (3H, s, H-19), 1.33 (1H, m, H-20), 0.83 (3H, d, 6.6, H-21), 1.69 (1H, m, H-22a), 1.79 (1H, m, H-22b), 5.52 (1H, d, 15.0, H-23), 5.46 (1H, dd; 5.4, 15.0, H-24), 1.15 (3H, s, H-26), 1.15 (3H, s, H-27), 0.92 (3H, s, H-28), 0.78 (3H, s, H-29), 0.82 (3H, s, H-30); ^{13}C NMR (DMSO, 150 MHz): 35.4 (C-1), 27.6 (C-2), 76.8 (C-3), 38.3 (C-4), 48.8 (C-5), 22.5 (C-6), 120.9 (C-7), 140.9 (C-8), 146.0 (C-9), 37.8 (C-10), 115.3 (C-11), 38.5 (C-12), 43.6 (C-13), 51.4 (C-14), 72.4 (C-15), 36.2 (C-16), 47.9 (C-17), 15.8 (C-18), 22.7 (C-19), 35.9 (C-20), 18.3 (C-21), 39.2 (C-22), 123.1 (C-23), 140.8 (C-24), 68.9 (C-25), 30.2 (C-26), 30.2 (C-27), 28.3 (C-28), 16.1 (C-29), 17.4 (C-30); HR-ESI-MS: m/z 479.3520 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd. For $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NaO}_3^+$, 479.3496).

3.3.2. 9-Hydroxy-8-methoxyphenanthridin-6(5H)-one, 2

Yellow crystals; $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$. m.p: 199.6–200.8 °C; IR (KBr) ν_{max} : 3198 (O–H), 1712 (C=O), 1620 (C=C), 1287 (C–O); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 7.95 (1H, m, H-1), 7.58 (1H, m, H-2), 9.12 (1H, dd; 2.0, 9.5, H-3), 7.58 (1H, m, H-4), 10.80 (1H, s, H-5), 7.62 (1H, s, H-7), 7.10 (1H, s, H-10), 4.03 (3H, s, 8-OMe); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 129.4 (C-1), 127.7 (C-2), 127.2 (C-3), 126.4 (C-4), 135.8 (C-4a), 168.9 (C-6), 122.3 (C-6a), 113.8 (C-7), 149.3 (C-8), 152.7 (C-9), 104.3 (C-10), 125.7 (C-10a), 120.8 (C-10b), 59.9 (OCH₃); HR-ESI-MS: m/z 264.0711 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NaNO}_3^+$, 264.0637).

3.4. Antibacterial bioassay

The reference antibiotics used was ciprofloxacin (CIP) obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) was used to dissolve the tested samples; the microbial growth indicator used was *p*-iodonitrotetrazolium chloride $\geq 97\%$ (INT, Sigma-Aldrich).

A panel of nine Gram-negative bacteria were investigated in this work. They included resistant strains of *Escherichia coli* (ATCC 8739 and AG100Atet), *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC11296 and KP55), *Providencia stuartii* (ATCC 29916 and PS2636) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 and PA124). These bacteria strains were obtained both from the American Type Culture Collection (ATCC) and clinical Laboratory isolates (Fankam et al., 2014). Prior to the test, bacteria were cultured on Mueller Hinton Agar (MHA; Sigma) slant meanwhile Mueller Hinton Broth (MHB; Sigma) was used for antibacterial assay (Kuete et al., 2009).

The minimum inhibitory concentration (MIC) of samples was evaluated following the broth microdilution using the well-known rapid INT method (Eloff, 1998; Kuete et al., 2007). Crude extracts, compounds and reference drug were dissolved in DMSO-MHB. The bacterial inoculum used was 1.5×10^6 CFU/mL and the incubation conditions at 37 °C and 18 h. DMSO at less than 2.5% was used as solvent control while CIP was used as positive control. The assays were in triplicate. The MIC of samples was detected following addition (40 μL) of 0.2 mg/mL *p*-iodonitrotetrazolium chloride and incubation at 37 °C for 30 min. MIC was defined as the lowest sample concentration that prevented this change and exhibited complete inhibition of bacterial growth (Nielsen, 2008).

4. Conclusion

The chemical investigation of *A. mannii* root extracts by column chromatography techniques led to the isolation of one previously unreported lanostane-type triterpene, lanosta-7,9(11),23-triene-3 β ,15 α -diol **1** and a new alkaloid, 9-hydroxy-8-methoxyphenanthridin-6(5*H*)-one **2** together with six known compounds: lanosta-7,9(11),24-trien-3 β ,21-diol **3**, oxoanolobine **4**, 3, 4-dihydroxybenzoic acid **5**, stigmasterol **6**, sitosterol, **7** and β -stigmasteryl-3 β -*O*-D-glucoopyranoside **8**. The isolated compounds and standard drug Ciprofloxacin were evaluated for their antibacterial properties against nine Gram-negative bacteria using rapid *p*-iodonitrotetrazolium chloride \geq 97% (INT) microdilution technique. Crude extracts AMR, AMB and compound **5**, compounds **1–4**, and **6–8** have been shown to possess moderate, weak and no antibacterial properties, respectively. These results are consistent with weak antibacterial properties reported for triterpenoids. However, it is probable that higher dosage or repeated use of the extracts may cumulate the antibacterial activity. This may justify the use of *A. mannii* this plants in conditions related to bacterial infections such as gastroenteritis, dysentery and diarrhea.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The authors acknowledge support from NABSA and DAAD (German Academic Exchange Service) through the Yaoundé-Bielefeld Graduate school of Natural Products with Anti-parasites and Antibacterial activities [YaBiNaPA project n°57316173] for providing research facilities for the isolation and identification of compounds.

ORCID

Godloves Fru Chi  <http://orcid.org/0000-0002-1484-3995>

Ghislain Wabo Fotso  <https://orcid.org/0000-0003-3815-0883>

References

- Avula B, Bae J-Y, Majrashi T, Wu T-Y, Wang Y-H, Wang M, Ali Z, Wu Y-C, Khan IA. 2018. Targeted and non-targeted analysis of annonaceous alkaloids and acetogenins from *Asimina* and *Annona* species using UHPLC-QToF-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 159:548–566.
- Betti JL. 2004. An ethnobotanical study of medicinal plants among the baka pygmies in the dja biosphere reserve, Cameroon. *Afr Study Monogr.* 25:1–27.
- Bhakuni BS, Kumar A, Balkrishna SJ, Sheikh JA, Konar S, Kumar S. 2012. tBuOK mediated synthesis of phenanthridinones and dibenzoazepinones. *Org Lett.* 43(40):10–13.
- Damasceno LMO, Silva LNA, Santos FR, Feitosa AT, Viana GFL, Oliveira-Júnior GR, Silva GM, Rolim AL, Araújo SC, Araújo CCE, et al. 2019. Cytotoxic activity of chemical constituents and essential oil from the leaves of *Leonotis nepetifolia* (Lamiaceae). *Rev Virtual Quim.* 11:517–528.

- Djeussi DE, Noumedem JAK, Seukep JA, Fankam AG, Voukeng JK, Tankeo SB, Nkuete AHL, Kuete V. 2013. Antibacterial activities of selected edible plant extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complem Altern Med.* 13 (164)..
- Domínguez F, González-Trujano E, Gallardo JM, Orozco-Suárez S. 2016. Antidepressant medicinal plants and compounds used in traditional medicines in North America. In: *Herbal medicine in depression*. Basel, Switzerland: Springer International Publishing; p. 381–431.
- Eloff JN. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64(8):711–713.
- Fankam AG, Kuate JR, Kuete V. 2014. Antibacterial activities of *Beilschmiedia obscura* and six other Cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. *BMC Complem Altern Med.* 14:241..
- Guria MP, Mitra P, Ghosh T, Gupta S, Mitra PK. 2013. 3, 4 dihydroxybenzoic acid isolated from the leaves of *Ageratum conyzoides* L. *European J Biotechnol Biosci.* 1:25–28.
- Hamizah S, Roslida AH, Fezah O, Tan KL, Tor YS, Tan Cl. 2012. Chemopreventive potential of *Annona muricata* L leaves on chemically-induced skin papillomagenesis in mice. *Asian Pac J Cancer Prev.* 13(6):2533–2539.
- Hu QF, T-T, Gao TT, Shi Y-J, Lei Q, Liu Z-H, Feng Q, Chen Z-J, Yu L-T. 2019. Design, synthesis and biological evaluation of novel 1-phenyl phenanthridin-6(5H)-one derivatives as anti-tumor agents targeting TOPK. *Eur J Med Chem.* 162:407–422.
- Khatun M, Billah M, Quader MA. 2012. Sterols and sterol glucoside from *Phyllanthus* species. *Dhaka Univ J Sci.* 60(1):5–10.
- Kuete V, Efferth T. 2010. Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Front Pharmacol.* 2010:1–19..
- Kuete V, Fankam AG, Wiench B, Efferth T. 2013. Cytotoxicity and modes of action of the methanol extracts of six Cameroonian medicinal plants against multidrug-resistant tumor cells. *Evid Based Complem Altern Med.* 2013:1–10.
- Kuete V, Nana F, Ngameni B, Mbaveng AT, Keumedjio F, Ngadjui BT. 2009. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). *J Ethnopharmacol.* 124(3):556–561.
- Kuete V, Wabo GF, Ngameni B, Mbaveng AT, Metuno R, Etoa F-X, Ngadjui BT, Beng VP, Meyer JJM, Lall N. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). *J Ethnopharmacol.* 114(1):54–60.
- Kuete V. 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. *Planta Med.* 76(14):1479–1491.
- Latham P2004. *Useful Plants of Bas-Congo Province, Democratic Republic of Congo*, Department for International Development, London, UK.
- Leong Y-W, Harrison LJ. 1999. 20R, 23E)-Eupha-8,23-diene-3b,25-diol from *Tripetalum cymosum*. *Phytochemistry.* 50(5):849–857.
- Luhata PL, Munkombwe NM. 2015. Isolation and characterisation of stigmasterol and β -sitosterol from *Odontonema strictum* (Acanthaceae). *J Innov Pharm Biol Sci.* 2:88–96.
- Luo X, Wu S, Ma Y, Wu D. 2000. Tirucallane triterpenoids from *Dysoxylum hainanense*. *Phytochemistry.* 54(8):801–805.
- Mahadeva USR, Muhammad A. 2016. Phytochemical screening, total flavonoid and phenolic content assays of various solvent extracts of tepal of *Musa paradisiaca*. *Malaysian J Anal Sci.* 20: 1181–1190.
- Melot A, Fall D, Gleye C, Champy P. 2009. Apolar annonaceous acetogenins from the fruit pulp of *Annona muricata*. *Molecules.* 14(11):4387–4395.
- Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *Int J Mol Sci.* 16(7):15625–15658.
- Nielsen TRH, Kuete V, Jäger AK, Meyer M, Jacobus J, Lall N. 2008. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 119:462–472.
- Okogun JI, Adesomoju AA. 1985. Isolation of polycarpol from *Anonidium mannii*. *Fitoterapia.* 56: 252–253.

- Pinto ADQ, Cordeiro MCR, Andrade SRM, de Ferreira FR, Filgueiras H. d C, Alves RE, Kinpara DI. 2005. Monograph of *Annona* species. Southampton, UK: International Centre for Underutilised Crops.
- Rosecke J, König WA. 1999. Steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry*. 52: 1621–1627.
- Silva M, Koolen HHF, Barison A, Souza A, Pinheiro M. 2012. Steroids and triterpene from the bark of *Unonopsis guatterioides* R. E. FR. (Annonaceae). *Int J Pharm Pharm Sci*. 4:522–523.
- Suryawanshi P, Vidyasagar GM. 2016. Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw. *J Med Plants*. 4:39–43.
- Syafni N, Putra DP. 2012. Trichomanes chinense L. Isolation, antimicrobial and antioxidant properties of *Trichomanes chinense* L. *Indones. J Chem*. 12:273–278.
- Wu Y, Hung Y, Chang F, Cosentino M, Wang H, Lee K. 1996. Identification of ent -16, 17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *J Nat Prod*. 59(6):635–637.
- Xia Q, Zhang H, Sun X, Zhao H, Wu L, Zhu D, Yang G, Shao Y, Zhang X, Mao X, et al. 2014. A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma* spp. *Molecules*. 19(11):17478–17535.,
- Yu H-J, Chen C-C, Shieh B-J. 1998. Two new constituents from the leaves of *Magnolia coco*. *J Nat Prod*. 61(8):1017–1019.

RESEARCH

Open Access



Antibacterial and antibiotic-potential activity of the constituents from aerial part of *Donella welwitschii* (Sapotaceae) against multidrug resistant phenotypes

Michel-Gael F. Guefack¹, Marcelle O. Ngangoue², Armelle T. Mbaveng^{1*} , Paul Nayim¹, Jenifer R. N. Kuete³, Carine M. N. Ngaffo¹, Godloves F. Chi⁴, Bathelemy Ngameni⁵, Bonaventure T. Ngadjui² and Victor Kuete^{1*} 

Abstract

Background: The rise of multidrug-resistant (MDR) bacteria is a real public health problem worldwide and is responsible for the increase in hospital infections. *Donella welwitschii* is a liana or shrub belonging to the family Sapotaceae and traditionally used to cure coughs.

Objective: This study was conducted with the objective to validate the medicinal properties of this plant, the aerial part was studied for its phytochemical composition using column and PTLC chromatography and exploring its antibacterial and antibiotic-modifying activity as well as those of its phytochemicals.

Methods: The structures of the compounds were elucidated from their physical and spectroscopic data in conjunction with literature. The antibacterial activity of the isolated metabolites was performed toward a panel of MDR Gram negative and Gram-positive bacteria. The broth micro-dilution method was used to determine antibacterial activities, efflux pump effect using the efflux pump inhibitor (EPI) (phenylalanine-arginine- β -naphthylamide (PA β N)), as well as the modulating activity of antibiotics. Monitoring the acidification of the bacterial growth medium was used to study the effects of the samples on the bacterial proton-ATPase pumps and cellular ATP production.

Results: Eleven compounds were isolated including pentacyclic triterpenes, C-glucosyl benzophenones. With a MIC value < 10 μ g/mL, diospyric acid (**7**) significantly inhibited the growth of *Escherichia coli* AG102, *Enterobacter aerogenes* ATCC13048, *Klebsiella pneumoniae* KP55, *Providencia stuartii* NEA16 and *Staphylococcus aureus* MRSA3. 28-hydroxy- β -amyirin (**8**) significantly impaired the growth of *Enterobacter aerogenes* EA27, *Klebsiella pneumoniae* ATCC11296 and *Staphylococcus aureus* MRSA6; and oleanolic acid (**9**) strongly impaired the growth of *Escherichia coli* AG 102, *Enterobacter aerogenes* EA27 and *Providencia stuartii* PS2636. Diospyric acid (**7**) and 28-hydroxy- β -amyirin (**8**) induced perturbation of H⁺-ATPase pump and inhibition of the cellular ATP production. Moreover, at MIC/2 and MIC/4, compounds **7**, **8**, and **9** strongly improved the antibacterial activity of norfloxacin, ciprofloxacin and doxycycline with antibiotic-modulating factors ranging between 2 and 64.

*Correspondence: armbatsa@yahoo.fr; kuetevictor@yahoo.fr

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, Dschang, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article



Conclusion: The overall results of the current work demonstrate that diospyric acid (**7**), 28-hydroxy- β -amyirin (**8**) and oleanolic acid (**9**) are the major bioactive constituents of *Donella welwitschia* towards Gram-negative bacteria expressing MDR phenotypes.

Keywords: *Donella welwitschia*, Benzopehenone, Triterpenes, MDR bacteria, Antibacterial

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), high levels of resistance to many pathogenic bacteria remains a serious health concern globally [1]. The rapid emergence of bacterial multidrug-resistant (MDR) phenotypes is a critical issue in the fight against infectious diseases [2]. Consequently, there is a need to search for new antimicrobial agents that can efficiently tackle bacterial resistance. The WHO has stated that most of the developing world still benefits from the use of traditional medicines derived from medicinal plants [3]. Moreover, many studies revealed the antibacterial inhibition activity of botanicals from African medicinal plants against MDR bacteria [4–9]. Several constituents including triterpenoids, phenolics, as well as alkaloids isolated from African medicinal plants were also documented for their antibacterial activities [10–13]. The present study focusses on the antibacterial activity of the constituents of *Donella welwitschii* (Engl.) Pierre ex Aubrev. & Pellegr. (Sapotaceae). The antibacterial activity of many secondary metabolites from plants belonging to the Sapotaceae family such as *Tridesmostemon omphalocarpoides* [14], *Omphalocarpum elatum* [15], *Chrysophyllum lacourtianum* [16], *Synsepalum msolo* [17], and *Manilkara zapota* [18] have been reported. The infusion of the shrub of *D. welwitschii* is traditionally used in the Central African Region and is used as an antitussive to relieve coughs and a stiff neck [19]. Previous phytochemical studies on species of the genus *Donella* reported cyclopropane type triterpene di-acids [20]. Herein, we reported the isolation of 11 secondary metabolites from *D. welwitschii*, and their antibacterial potential against a panel of MDR bacteria.

Materials and methods

Chemicals for antibacterial assays

A few reference antibiotics (RA), namely chloramphenicol (CHL), streptomycin (STR), erythromycin (ERY), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), ampicillin (AMP), and doxycycline (DOX) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) were predominantly used for the sample association tests, and only one was used as a positive control. Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) was used to dissolve the samples before any tests. p-Iodonitrotetrazolium chloride (INT; Sigma-Aldrich) and phenylalanine-arginine- β naphthylamide (PA β N; Sigma-Aldrich) were

used as microbial growth indicator and efflux pump inhibitor (EPI), respectively. Solvents used for extraction and purification of bioactive compounds were of analytical grade.

Plant materials and extraction procedure

The aerial part of *D. welwitschii* was collected from Manjo in Bertoua, the East region of Cameroun on May 2018. The appropriate authorisation has been obtained for the collection of the plant and its use has been carried out in accordance with the relevant guidelines. The identification of the plant was carried out by Dr. Tchien-gue Barthelemy at the Cameroon National Herbarium (Yaoundé) where a voucher specimen was conserved under specimen No: 10708SFC / 56630HNC. The air-dried and powdered twig and leaf (1160g) of *D. welwitschii* were macerated in a mixture of CH₂Cl₂ – MeOH (1:1, 5L) for 48 h, three times. The filtrate was evaporated at 40 °C under vacuum to yield 42.7 g of dark brown extract. The structures of compounds (Fig. 1) were determined by means of modern spectroscopic techniques (NMR and MS) and comparison with available literature (SM1). All ¹H and ¹³C NMR spectra and major chemical shifts of these compounds are shown in the supplementary file (SM1).

Separation and purification of extracts of *D. welwitschii*

Forty-gram (40.0 g) of the crude extract was partitioned by solid-liquid process into hexane (DWa 12.2 g), ethyl acetate (DWb 11.7 g), and methanol (DWc 25.6 g) extracts. Part of the methanol extract was suspended in distilled water (200 mL) and extracted with n-butanol, this yielded n-BuOH extract (DWd 10.5 g) and aqueous extract (DWe 9.2 g). DWa and DWb were combined based on their TLC profiles to give 23.5 g of combined extract (DWab). The combined hexane and ethyl acetate extracts (DWab, 23.5 g) adsorbed on 30 g silica gel was applied to column packed with silica gel 60 (63–43 μ m Merck, particle size between 0.043 and 0.063 mm in diameter and porosity 230–400 mesh ASTM) eluting with hexane and ethyl acetate, ethyl acetate and methanol under gradient conditions. 189 fractions of 150 mL each were collected and pooled based on their TLC profiles. Hex: frs 1–15, Hex-EtOAc (95:5) frs 16–33, Hex-EtOAc (90:10) frs 34–50, Hex-EtOAc (85:15) frs 51–70, Hex-EtOAc (80:20) frs 71–92, Hex-EtOAc (75:25) frs

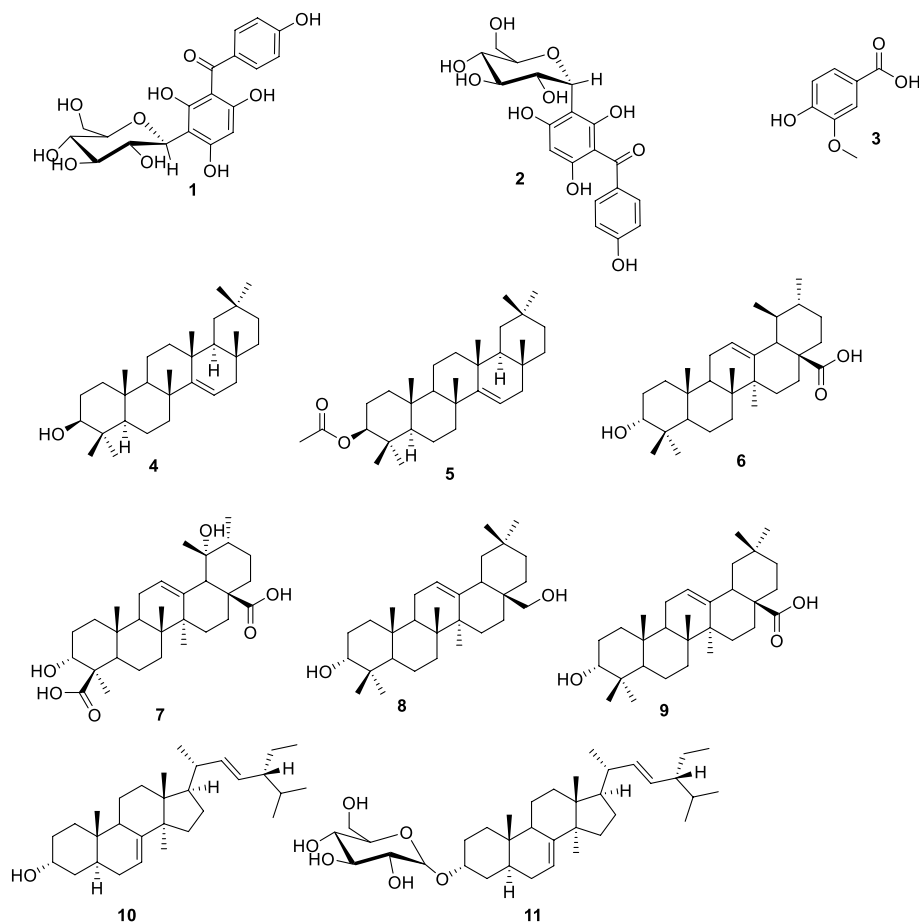


Fig. 1 Compounds isolated from *D. welwitschia*. **1:** 3- β -D-glucopyranosyl-2,4,6-trihydroxyl (4-phenyl) methanone, **2:** 3- α -D-glucopyranosyl-2,4,6-trihydroxyl (4-phenyl) methanone, **3:** vanillic acid, **4:** taraxerol, **5:** taraxeryl acetate, **6:** ursolic acid, **7:** diospyric acid, **8:** 28-hydroxy- β -amyrin, **9:** oleanolic acid, **10:** spinasterol **11:** 3-O- β -D-glucopyranosyl spinasterol

93–117, Hex-EtOAc (70:30) frs 118–132, Hex-EtOAc (60:40) frs 133–148, Hex-EtOAc (25:75) frs 149–158, EtOAc frs 159–171, EtOAc (85:15) frs 172–184. Further purification of sub fractions 1–50 led to the compound taraxeryl acetate, **5** (23 mg); 51–117 yielded spinasterol **10** (80 mg) and taraxerol **3** (35 mg) Ursolic **6** (27 mg) and oleanolic **9** (17 mg) acids respectively. Diospyric acid **7** (45 mg), 28-hydroxyolean-12-ene **8** (23 mg) and 3-O- β -D-glucopyranosyl spinasterol **11** (65 mg) were isolated from subfractions 118–132, 133–148 and 149–171 by purification on silica gel columns. The n-BuOH fraction (DwD, 9.32 g) was adsorbed on 20 g of fine silica, dried and applied to silica gel column eluted with DCM and Methanol under gradient conditions. 150 subfractions of 150 mL each were collected and pooled based on their TLC profiles. Subfractions 1–20 and 97–120 were purified by preparatory TLC yielding vanillic acid **3** (3 mg), 3- α -D-glucopyranosyl-2,4,6-trihydroxyl (4-phenyl) methanone **2** (80 mg) and

3- α -D-glucopyranosyl-2,4,6-trihydroxyl (4-phenyl) methanone **1** (60 mg) respectively.

Bacteria strains, culture media and growth conditions

Thirteen pathogenic strains consisting of Gram-negative and Gram-positive bacteria were recruited to measure the bacteriostatic and bactericidal power of the samples used in the study. Gram-negative bacteria included multidrug-resistant (MDR) isolates (laboratory collection) and reference strains of *Escherichia coli* (ATCC 10536, and AG102), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048 and EA27), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 11296 and KP55), *Providencia stuartii* (ATCC 29916 and NEA16) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 and PA124). Note that the clinical strains came from the laboratory collection of the UMR-MD1, University of Marseille, France. The Gram-positive bacterial strains were specifically *Staphylococcus aureus* including a reference strain obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (ATCC

25923), and a methicillin-resistant *S. aureus* isolate (MRSA3 and MRSA6) obtained from the culture collection of the Laboratory of Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Japan, and was provided by Prof. Dr. Dzoyem of the University of Dschang [21, 22]. Susceptibility patterns of the tested bacteria are given in the Supplementary file (Table S1, SM2).

Evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

The ability of the isolated compounds to stop growth and kill bacteria was achieved through the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC). This was possible using microdilution methods as described by Eloff (1998) [23] with some modifications and improvements [22, 24]. Briefly, series of dilutions of the samples were performed in a 96-well microplate after dissolving the samples in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)/Mueller Hinton broth (MHB). Then 100 μ L of bacterial inoculum (2×10^6 colony forming units (CFU)/mL) was added to each well. Chloramphenicol was used as a reference substance. The final concentrations ranged 4–512 μ g/mL. Plates were then covered with a sterile plate sealer and incubated at 37°C for 18 h. Revelation was done by adding 40 μ L of INT (0.2 mg/mL) followed by incubation at 37°C for 30 min. The MIC of each sample was defined as the lowest concentration of the sample that completely inhibited the growth of the bacteria. The MICs obtained were classified as follows: significant activity MIC < 100 μ g/mL (MIC < 10 μ g/mL for pure compounds), moderate activity 100 μ g/mL < MIC \leq 625 μ g/mL (10 < MIC \leq 100 μ g/mL for pure compounds), weak activity MIC > 625 μ g/mL (MIC > 100 μ g/mL for pure compounds) [22, 25].

After MIC readings, minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined by introducing 150 μ L of MHB into a new 96-well microplate, after addition of 50 μ L of the microplate contents, where no microbial growth was observed, and which did not receive INT during the MIC reading. The MBC of each sample was determined after 48 h of incubating at 37°C, by adding 40 μ L of 0.2 mg/mL INT, as previously described [22]. MBC was the lowest concentration of the samples, which did not produce a colour change after adding INT. Each experiment was performed in triplicate and repeated three times.

Evaluation of the role of efflux pumps in the antibacterial activity of the samples

After testing the isolated compounds alone, the same compounds were put in the presence of Pa β N (at 30 μ g/mL) against 13 bacterial strains including five MDR

phenotypes (*E. coli* AG102, *E. aerogenes* EA27, *K. pneumoniae* KP55, *P. stuartii* PS2636 and *S. aureus* MRSA3) as previously described [25, 26]. The activity improvement factor (AIF) or fold increase of the activity was determined as ratio of MIC_(sample alone)/MIC_(sample + Pa β N) [22]. Each assay was performed in duplicate and repeated three times.

Assessment of the antibiotic-modifying activity of the samples

The combination assay was performed as previously described, with some modifications made during the procedure [4, 7]. The test was briefly performed by introducing 100 μ L of MHB into the wells of a 96-well microplate, followed by the addition of 100 μ L of the test antibiotics in the first well of each column and progressive dilution. 50 μ L of solution of test compounds at sub-inhibitory concentrations (MIC/2 and MIC/4) were then introduced into the wells, followed by the addition of 50 μ L of bacterial inoculum. The microplates were sealed and incubated for 18 h at 37°C. MICs were determined using the INT as previously described. The antibiotic modulation factor (AMF), calculated as MIC_(antibiotic alone)/MIC_(antibiotic + compound), was used to express the modulating effects of compounds on antibiotics [5, 22, 27]. Each test was performed in duplicate and repeated three times.

H⁺ -ATPase-mediated proton pumping assay

The ability of compounds 7 and 8 to inhibit the H⁺ – ATPase mediated proton pumps of *E. coli* AG102 was assessed by monitoring the acidification of the bacterial growth medium as previously described [28] with slight modifications [22]. Briefly, 100 mL of bacteria suspension was cultured in MHB for 18 h at 37°C. The resulting culture was centrifuged at 3000 tr/min for 10 min at 4°C. The pellet was first washed twice in distilled water, then in 50 mM KCl and suspended in 50 mL of 50 mM KCl. Then, the cell suspension was incubated overnight (18 h) at 4°C for glucose starvation. In 4 mL of the cell medium, 0.5 mL of the tested samples (MIC/2, MIC, and 2 \times MIC) were added, and pH adjusted to 6.8 with 1 M HCl or 0.1 M NaOH. Upon 10 min pre-incubation at 37°C, medium acidification was initiated by adding 0.5 mL of 20% glucose, followed by pH measurement every 10 min for 1 h using a pH-meter. Tube containing MHB, inoculum, and DMSO was used as negative control. Each assay was performed in triplicates.

Measurement of cellular ATP concentration

The ability of compounds 7 and 8 to inhibit the cellular ATP production of *E. coli* AG102 was assessed as previously described [28] with slight modifications. Briefly, 100 mL of bacterial culture (1:100 v/v) was grown in

Table 1 MIC and MBC (µg/mL) of phytochemicals

Bacterial strains	Tested samples, MIC, and MBC values in µg/mL																		
	1	2	3	4	6	7	8	9	10	CHL									
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC							
<i>E. coli</i>	ATCC10536	256	nd	512	nd	128	2048	126	512	64	512	32	512	64	256	128	nd	8	64
	AG102	256	nd	128	nd	512	nd	16	128	4	128	16	512	8	128	128	nd	8	128
<i>E. aerogenes</i>	ATCC13048	128	nd	256	nd	512	nd	128	512	8	128	64	256	16	512	256	nd	4	128
	EA27	512	nd	512	nd	256	nd	32	256	32	512	8	1024	8	512	512	nd	8	64
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC11296	256	nd	256	nd	512	nd	16	128	32	256	4	512	64	256	128	nd	4	32
	KP55	256	nd	512	nd	256	nd	16	128	4	64	128	512	32	128	512	nd	8	32
			nd		nd		nd												
<i>P. stuartii</i>	PS2636	128	nd	512	nd	256	nd	128	nd	32	256	64	256	8	512	128	nd	8	64
	NEA16	512	nd	512	nd	128	2048	32	128	8	128	128	256	128	512	64	nd	8	128
<i>P. aeruginosa</i>	PA01	256	nd	512	nd	256	nd	256	nd	32	512	128	512	64	256	128	nd	4	32
	PA124	256	nd	512	nd	512	nd	256	nd	32	256	64	512	32	128	128	nd	4	64
<i>S. aureus</i>	ATCC25923	128	nd	512	nd	128	2048	128	nd	32	512	64	256	128	512	512	nd	2	32
	MRSA3	512	nd	128	nd	64	nd	512	nd	8	128	128	256	128	512	512	nd	4	32
	MRSA6	256	nd	128	nd	256	nd	64	256	64	512	8	256	128	512	512	nd	4	128

MIC Minimal inhibitory concentration, **MBC** Minimal bactericidal concentration, Values in bold indicate significant activity [25]. **1:** 3-β-D-glucopyranosyl-2,4,6-trihydroxyl (4-phenyl) methanone, **2:** 3-α-D-glucopyranosyl-2,4,6-trihydroxyl (4-phenyl) methanone, **7:** Diospyric acid, **8:** 28-hydroxy-β-amyrin, **9:** Oleanolic acid, **6:** Ursolic acid, **10:** Spinasterol, **4:** Taraxerol, **3:** Vanillic acid, **CHL:** chloramphenicol

Table 2 MIC (in µg/mL) of phytochemicals and chloramphenicol in combination of PAβN against a panel of 13 bacterial strains

Bacterial strains	Tested Samples, MIC values in the presence of absence of PAβN (in µg/mL)																			
	1	2	3	4	6	7	8	9	10	CHL										
	MIC (+PAβN)	R (+PAβN)	MIC (+PAβN)	R (+PAβN)	MIC (+PAβN)	R (+PAβN)	MIC (+PAβN)	R (+PAβN)	MIC (+PAβN)	R (+PAβN)										
<i>E. coli</i>																				
ATCC10536	256 (8)	32	-	-	128 (4)	32	126 (8)	16	64 (2)	32	32 (0.5)	64	64 (2)	32	128 (4)	32	8 (0.125)	64		
AG102	256 (16)	16	-	-	512 (16)	32	16 (1)	16	4 (0.125)	32	16 (0.5)	32	8 (0.5)	16	128 (8)	16	8 (0.125)	64		
<i>E. aerogenes</i>																				
ATCC13048	128 (8)	16	256 (4)	4	512 (8)	64	128 (2)	64	8 (0.5)	16	64 (1)	64	16 (0.25)	64	-	-	4 (0.25)	16		
EA27	512 (8)	4	512 (8)	8	256 (8)	32	32 (1)	32	32 (1)	32	8 (0.25)	32	8 (0.125)	64	-	-	8 (0.125)	64		
<i>K. pneumoniae</i>																				
ATCC11296	256 (16)	8	256 (8)	4	256 (16)	16	-	16 (2)	8	32 (2)	16	4 (0.25)	16	64 (1)	64	128 (16)	8	4 (0.5)	8	
KP55	256 (8)	8	512 (8)	4	512 (16)	32	-	16 (0.5)	32	4 (0.25)	16	128 (4)	32	32 (1)	32	512 (8)	64	8 (0.125)	64	
<i>P. stuartii</i>																				
PS2636	128 (4)	4	512 (16)	2	512 (8)	64	256 (16)	16	128 (16)	8	32 (0.5)	64	64 (2)	32	8 (0.125)	64	128 (16)	8	8 (0.25)	32
NEA16	512 (16)	8	512 (32)	4	512 (16)	32	128 (16)	8	32 (2)	16	8 (0.25)	32	128 (2)	64	128 (8)	16	64 (4)	16	8 (0.125)	64
<i>P. aeruginosa</i>																				
PA01	-	-	-	2	-	-	256 (8)	32	32 (1)	32	128 (4)	32	64 (2)	32	128 (8)	16	4 (1)	16	4 (1)	4
PA124	-	-	-	2	-	-	256 (32)	8	32 (0.5)	64	64 (1)	64	32 (0.5)	64	128 (4)	32	4 (0.5)	32	4 (0.5)	8
<i>S. aureus</i>																				
ATCC25923	128 (4)	4	128 (16)	1	512 (8)	64	128 (8)	16	32 (1)	32	64 (2)	32	128 (2)	64	512 (8)	64	2 (2)	64	2 (2)	1
MRSA3	512 (8)	1	128 (8)	4	512 (16)	32	64 (2)	32	8 (0.125)	64	128 (2)	64	128 (8)	16	-	-	4 (4)	-	4 (4)	1
MRSA6	256 (8)	1	128 (8)	1	512 (16)	32	256 (16)	16	64 (2)	32	8 (0.25)	32	128 (4)	32	-	-	4 (4)	-	4 (4)	1

MIC Minimal inhibitory concentration, PAβN Phenylalanine arginyl β-Naphthylamide, R Ameliorating Factor: MIC sample alone/MIC sample + PAβN ratio (this means the factor which determines the improvement of the activity of samples by PAβN; the activity of a sample was improved when its AIF was > 2); (-): MIC > 512 µg/mL for compound

MHB culture medium for 18 h at 37 °C, followed by centrifugation (3500×g, 10 min). The pellet was washed twice with distilled water, then with 50 mM KCl and suspended in 50 mL of 50 mM KCl. The cell suspension (1.5–2 × 10⁸ CFU/mL) was incubated overnight (18 h, 4 °C) for glucose starvation and then centrifuged. To 4 mL of the reaction medium, 0.5 mL of compounds **7** and **8** corresponding to MIC/2, MIC, and 2 × MIC was added, and the pH was adjusted to 6.4. After 10 min of pre-incubation under shaking at 37 °C, acidification of the medium was initiated after addition of 0.5 mL of 20% (w/v) glucose. The pH measurement was recorded every 20 min for a total period of 160 min. The experiment was conducted in the presence of DMSO (control) at a final concentration of 2.5%, to measure the degree of acidification of the external medium in the absence of compounds **7** and **8**. The experiment was performed in triplicate and repeated twice. The measured pH was used to plot the pH versus time curve [pH = f (time)]. Any inhibition of acidification of the medium in the presence of samples was attributed to an inhibitory effect of the H⁺-ATPase pumps.

Statistical analysis

Data from each experimental group was expressed as mean ± SD. One-way analysis of variance (ANOVA)

followed by Dunnett's post-hoc test for multiple comparisons were used for statistical analysis of data using GraphPad Prism Version 8.1.0 (GraphPad Software, CA, USA). Differences were considered significant at a probability level of 5% ($p < 0.05$), ** p -values < 0.01, and *** p -values < 0.001.

Results

Phytochemistry

Column chromatography of the major fractions afforded eleven compounds, which were identified as 3-β-D-glucopyranosyl-2,4,6-trihydroxyl (4-phenyl) methanone (**1**), 3-α-D-glucopyranosyl-2,4,6-trihydroxyl (4-phenyl) methanone (**2**), vanillic acid (**3**), taraxerol (**4**), taraxeryl acetate (**5**), ursolic acid (**6**), diospyric acid (**7**), 28-hydroxy-β-amyrin (**8**), oleanolic acid (**9**), spinasterol (**10**) and 3-O-β-D-glucopyranosyl spinasterol (**11**). These compounds include two benzophenones: **1** and **2**, one phenolic acid **3**, six triterpenoids **4–9**, one sterol **10**, and one sterol saponin **11**.

MICs and MBCs of phytochemicals

The antibacterial activity of the isolated compounds **1–4** and **7–10** has been evaluated against *E. coli* (ATCC 10536, and AG102), *E. aerogenes* (ATCC 13048 and EA27), *K. pneumoniae* (KP55 and ATCC 11296), *P.*

Table 3 MICs of antibiotics in association with phytochemical **7** against selected bacteria

Antibiotics	Concentrations of compound 7	Bacterial strain, MIC (μg/mL) and AMF (in bracket)					
		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
STR	0	ATCC 10536	AG102	PA01	PA124	ATCC 11296	KP55
	MIC/2	8	16	64	32	16	4
	MIC/4	2(4)	1(16)	16(4)	16(2)	1(16)	0.25(16)
ERY	0	8	4	16	16	32	8
	MIC/2	4(2)	0.25(16)	4(4)	8(2)	16(2)	4(2)
	MIC/4	4(2)	0.5(8)	8(2)	16(1)	16(2)	8(1)
NOR	0	32	2	16	8	32	16
	MIC/2	8(4)	0.25(8)	4(4)	2(4)	1(32)	4(4)
	MIC/4	16(2)	0.5(4)	16(1)	2(4)	4(8)	4(4)
CIP	0	8	4	8	16	8	8
	MIC/2	0.25(32)	1(4)	2(4)	1(16)	0.5(16)	0.125(64)
	MIC/4	1(8)	2(2)	2(4)	1(16)	0.5(16)	1(8)
AMP	0	4	4	32	16	8	8
	MIC/2	0.5(8)	2(2)	16(2)	4(4)	8(1)	4(2)
	MIC/4	0.5(8)	2(2)	16(2)	8(2)	8(1)	4(2)
DOX	0	2	8	8	8	16	8
	MIC/2	0.25(4)	0.5(16)	2(4)	0.5(16)	0.5(32)	2(4)
	MIC/4	0.25(4)	1(8)	4(2)	2(4)	0.5(32)	4(2)

Antibiotics tested at 256 μg/mL [STR streptomycin, ERY Erythromycin, NOR Norfloxacin, AMP Ampicillin, CIP Ciprofloxacin, DOX Doxycycline, CHL Chloramphenicol, TET Tetracycline]. MIC Minimal Inhibitory Concentrations; Values in bold represent significant antibacterial activity and significant antibiotic-modulating factor (AMF). AMF ≥ 2 was set as the cut-off for biologically significance of antibiotic resistance modulating effects [27]

stuartii (ATCC 29916, and NEA16), *P. aeruginosa* (PA01 and PA124), and *S. aureus* (ATCC 25923 MRSA3 and MRSA6). The results obtained show that phytochemicals **5** and **11** exhibited weak activities against all strains tested. However, the other phytochemicals showed variable antibacterial activities depending on the bacterial strains tested, with MICs ranging from 4 to 512 µg/mL (Table 1). Compounds **7** showed significant antibacterial activities (MIC < 10 µg/mL) against *E. coli* AG102, *E. aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* KP55, *P. stuartii* NEA16 and *S. aureus* MRSA3, compound **8** (against *E. aerogenes* EA27, *K. pneumoniae* ATCC 11296 and *S. aureus* MRSA6); and compound **9** (against *E. coli* AG 102, *E. aerogenes* EA27 and *P. stuartii* PS2636). In the MBC determinations, the active phytochemicals exhibited bactericidal activity against at least one bacterial strain tested. Overall, the MBCs of the phytochemicals ranged from 32 to 128 µg/mL (Table 1). A closer look at the MBC/MIC ratios indicated that the tested samples had mainly bacteriostatic effects (MBC/MIC > 4).

Effect of PAβN on the antibacterial activity of the tested samples

The susceptibility of *E. coli* (ATCC 10536, and AG102), *E. aerogenes* (ATCC 13048 and EA27), *K. pneumoniae* (KP55 and ATCC 11296), *P. stuartii* (ATCC 29916, and

NEA16), *P. aeruginosa* (PA01 and PA124), and *S. aureus* (ATCC 25923 MRSA3 and MRSA6) to compounds and chloramphenicol in the presence of PAβN, was evaluated. Phytochemicals **6**, **7**, **8** and **9** in the presence of PAβN showed improved antibacterial activity (MIC reduction) against the tested bacteria by 2 to > 64 times. These isolated compounds were more effective against MDR bacteria and mainly against Gram-negative bacteria. Moreover, PAβN did not affect the activity of chloramphenicol against Gram-positive bacteria (*S. aureus*: ATCC 25923 and MRSA3) (Table 2).

Antibiotic-modulating activity of compounds

The modulatory activity of active phytochemicals (**7**, **8** and **9**) was investigated on six classical antibiotics including streptomycin (STR), erythromycin (ERY), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), ampicillin (AMP) and doxycycline (DOX). The overall results showed a considerable increase in the activity of the tested antibiotics. The best potentiating effects were recorded with NOR, CIP and DOX, in combination with phytochemicals **7**, **8** and **9** at MIC/2 and MIC/4. It was found that the overall activity enhancement factors (AEFs) obtained with the antibiotics ranged from 2 to 64 (Table 3, Table 4 and Table 5), indicating a 2 to 64 fold increase in antibacterial activity of the antibiotics. These activities were predominantly

Table 4 MICs of antibiotics in association with phytochemical **8** against selected bacteria

Antibiotics	Concentrations of compound 8	Bacterial strain, MIC (µg/mL) and AMF (in bracket)					
		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
STR	0	ATCC10536	AG102	PA01	PA124	ATCC11296	KP55
	MIC/2	8	16	64	32	16	4
	MIC/4	0.25(32)	4(4)	16(4)	16(2)	32(2)	2(2)
ERY	0	8	4	16	16	32	8
	MIC/2	4(2)	0.5(8)	4(4)	8(2)	4(8)	4(2)
	MIC/4	4(2)	1(4)	8(2)	16(1)	16(2)	8(1)
NOR	0	32	2	16	8	32	16
	MIC/2	8(4)	0.25(8)	4(4)	2(4)	1(32)	4(4)
	MIC/4	8(4)	0.5(4)	16(1)	2(4)	4(8)	4(4)
CIP	0	8	4	8	16	8	8
	MIC/2	0.25(32)	0.25(16)	0.25(32)	1(16)	0.5(16)	0.25(32)
	MIC/4	0.25(32)	0.25(16)	1(8)	4(4)	2(4)	1(8)
AMP	0	4	4	32	16	8	8
	MIC/2	0.5(8)	2(1)	16(2)	4(4)	8(1)	4(2)
	MIC/4	0.5(8)	2(1)	16(2)	8(2)	8(1)	4(2)
DOX	0	2	8	8	8	16	8
	MIC/2	0.125(8)	0.5(16)	2(4)	0.5(16)	0.5(32)	2(4)
	MIC/4	0.25(4)	1(8)	4(2)	2(4)	0.5(32)	4(2)

Antibiotics tested at 256 µg/mL [STR streptomycin, ERY Erythromycin, NOR Norfloxacin, AMP ampicillin, CIP Ciprofloxacin, DOX Doxycycline, CHL Chloramphenicol, TET Tetracycline]. MIC Minimal Inhibitory Concentrations; Values in bold represent significant antibacterial activity and significant antibiotic-modulating factor (AMF). AMF ≥ 2 was set as the cut-off for biologically significance of antibiotic resistance modulating effects [27]

recorded on the MDR strain *E. aerogenes* EA-CM64. The reference strain *E. coli* ATCC 10536 was also sensitive to the same combination (Table 3, Table 4 and Table 5). Combination of the other antibiotics and the compounds associations has mainly presented indifference or antagonistic effects.

Effect of compound 7 and 8 on proton-ATPase pumps

Figure 2a and b display the effects compounds 7 and 8 on the activity of proton-ATPase pumps. The differences observed in compounds 7 and 8 tested at MIC/2, MIC and 2MIC were significant compared to the control. In compound 7, a slight decrease in pH was observed, reaching 7.35 at a time equal to 20 min. Then a constant progression of pH to 7.35 until a time $t=60$ min overall, with small variations of pH between 7.3 and 7.45 during the experiment, at concentrations equal to MIC/2, MIC and 2MIC. Contrary to the control whose pH decreases from the beginning of the experiment until reaching pH6.2 at the end ($T=60$ min) (Fig. 2a). In compound 8, a constant progression of pH (pH7.3) can be observed until the end of the experiment, at MIC and 2MIC concentrations. At CMI/2, a decrease in pH is observed until reaching 6.4 at $t=20$ min, then remains constant until the end of experiment. Contrary to the control whose

pH decreases from the beginning of the experiment until reaching pH6.2 at the end ($t=60$ min) (Fig. 2b).

Effect of compound 7 and 8 on cellular ATP production

Figure 3a and b show the results of the effects of actives compounds 7 and 8 on the activity of ATP synthase. The differences observed in compounds 7 and 8 tested at MIC/2, MIC and 2MIC were significant compared to the control. For compound 7, an increase in pH can be observed from the second minute of the experiment (pH7.9), at concentrations of MIC/2, MIC and 2MIC. Contrary to the control whose pH decreases from the beginning of the experiment until reaching pH6.1 at the end ($T=160$ min) (Fig. 3a). Virtually the same behaviour was observed with compound 8 (Fig. 3b).

Discussion

Chemical compounds produced by plants, generally help them to resist fungi, bacteria, and plant virus infections, and consumption by insects and other animals. However, some phytochemicals' class have been used as medicine to cure various ailments. In the current work, we explored the anti-MDR bacteria's chemicals of *Donella welwitschii*, as well as the mechanism of action through which they exhibited their antibacterial effects.

Table 5 MICs of antibiotics in association with phytochemical 9 against selected bacteria

Antibiotics	Concentrations of compound 9	Bacterial strain, MIC ($\mu\text{g/mL}$) and AMF (in bracket)					
		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
STR	0	ATCC10536	AG102	PA01	PA124	ATCC11296	KP55
	MIC/2	8	16	64	32	16	4
	MIC/4	0.5(16)	8(2)	16(4)	16(2)	32(2)	2(2)
ERY	0	2(4)	16(4)	32(2)	32(1)	32(2)	2(2)
	MIC/2	8	4	16	16	32	8
	MIC/4	4(2)	1(4)	4(4)	8(2)	32(1)	4(2)
NOR	0	4(2)	0.5(8)	8(2)	16(1)	32(1)	8(1)
	MIC/2	32	2	16	8	32	16
	MIC/4	16(2)	0.25(8)	4(4)	2(4)	2(16)	4(4)
CIP	0	8(4)	0.5(4)	16(1)	2(4)	8(8)	4(4)
	MIC/2	8	4	8	16	8	8
	MIC/4	0.5(16)	0.5(8)	0.25(32)	0.5(32)	0.5(16)	1(8)
AMP	0	1(8)	2(2)	0.5(16)	1(16)	0.5(16)	2(4)
	MIC/2	4	4	32	16	8	8
	MIC/4	0.5(8)	2(1)	16(2)	4(4)	8(1)	2(4)
DOX	0	1(4)	2(1)	16(2)	8(2)	8(1)	4(2)
	MIC/2	2	8	8	8	16	8
	MIC/4	0.125(16)	0.5(16)	1(8)	0.5(16)	0.5(32)	1(8)
		0.25(4)	1(8)	4(2)	2(4)	0.5(32)	4(2)

Antibiotics tested at 256 $\mu\text{g/mL}$ [STR streptomycin, ERY Erythromycin, NOR Norfloxacin, AMP ampicillin, CIP Ciprofloxacin, DOX Doxycycline, CHL Chloramphenicol, TET Tetracycline]. MIC Minimal Inhibitory Concentrations; Values in bold represent significant antibacterial activity and significant antibiotic-modulating factor (AMF). AMF ≥ 2 was set as the cut-off for biological significance of antibiotic resistance modulating effects [27]

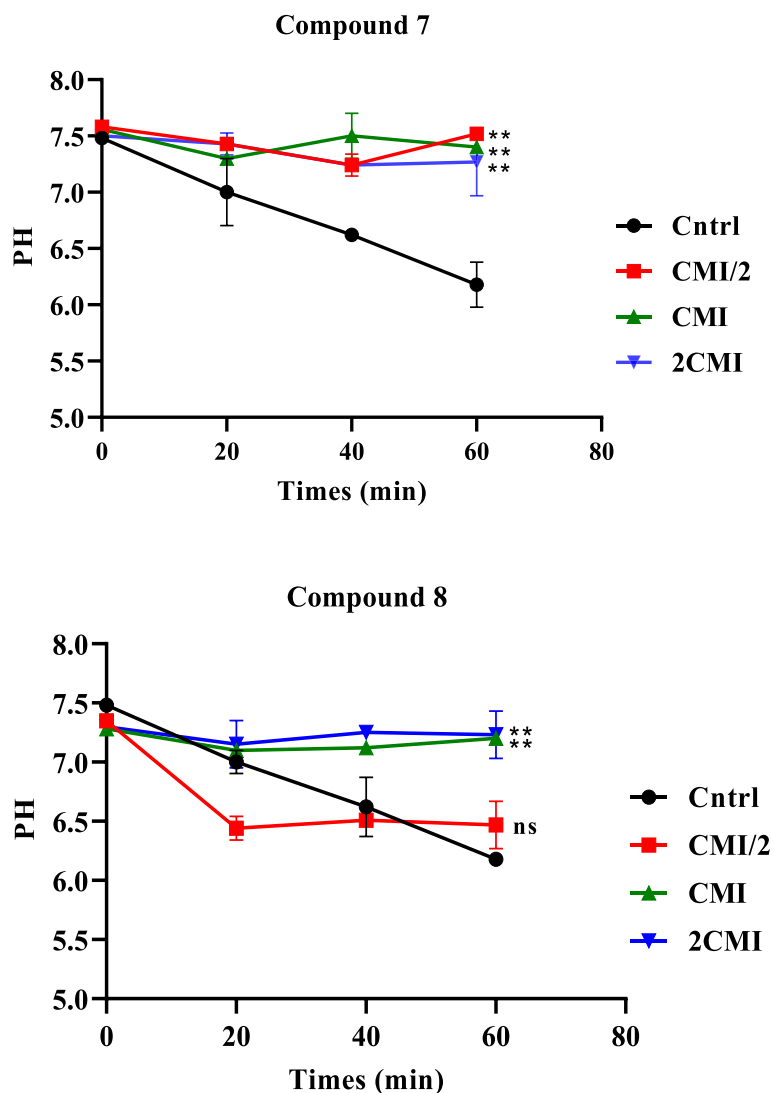


Fig. 2 (a) Effects of compound 7 and **(b)** compound 8 from *D. welwitschii* on ATPase pumps of *E. coli* AG102. MIC: Minimum inhibitory concentration. Results are expressed as Mean \pm SD. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** p -values < 0.01 , and *** p -values < 0.001 ; ns: non-significant

The chemical investigation of the methylene chloride-methanolic extract of *D. welwitschii* aerial part, led to isolation of eleven compounds belonging to various class of secondary metabolites known for their antimicrobial activities through specific mechanisms of actions i.e. terpenoids, phenolic compounds and alkaloids [29, 30]. Vanillic acid 3 [31] is a phenolic acid belonging to phenolic compounds' group, taraxerol 4 [32], taraxeryl acetate 5 [33], ursolic acid 6 [34], diospyric acid 7 [35], 28-hydroxy- β -amyrin 8 [36] and Oleanolic acid 9 [37] are all triterpenes belonging to terpenoids group.

Against a panel of MDR Gram-negative and Gram-positive bacteria, *D. welwitschii*'s compounds 5 and 11 were found to be inactive, while other compounds (1–4, 6–10) were selectively significantly active, moderately active and/or weakly active. Diospyric acid (7) significantly inhibited (MIC $< 10 \mu\text{g}/\text{mL}$) the growth of *E. coli* AG102, *E. aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* KP55, *P. stuartii* NEA16 and *S. aureus* MRSA3. To the best of our knowledge, this study is illuminating for the first time the antibacterial activity of diospyric acid against the Gram-negative and Gram-positive

MDR bacteria. The significant activity of 28-hydroxy- β -amyrin toward *E. aerogenes* EA27, *K. pneumonia* ATCC11296 and *S. aureus* MRSA6 is in accordance with the study of Abdel-Raouf et al. [38] which highlighted the interesting inhibition growth capacity of β -amyrin against *Staphylococcus aureus* NCTC 7447 and *Salmonella typhi* ATCC 19430. Oleanolic acid (9), one of the isolated triterpenes compounds, significantly impaired the growth of *E. coli* AG102, *E. aerogenes* EA27 and *P. stuartii* PS2636). The antimicrobial activity and mechanism of action of oleanolic acid is widely reported in the literature. Martins et al. [39] showed the antibacterial activity of oleanolic against *E. coli* AG100, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* COL, *S. aureus* HPH 107, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Moreover, Fontanay et al. [40] showed the effect of oleanolic acid against *E. faecalis*

ATCC 28212. In the present work, we also investigated the effect of diospyric acid (7) and 28-hydroxy- β -amyrin (8) on the functioning of H⁺-ATPase pump and the cellular ATP production of *E. coli* AG102. Let's note that from the studies of Futai and Kanazawa [41] and those of Senior and Wise [42], it is well established that the H⁺-ATPase pump of *Escherichia coli* membranes catalyses ATP synthesis and the formation of ATP-driven proton electrochemical gradients, and resembles analogous enzymes from mitochondria, chloroplasts, and other bacteria. The *D. welwitschii*'s compounds might induce bacteria growth inhibition through significant perturbation of H⁺-ATPase pump and inhibition of the cellular production of ATP.

Clinically tripartite efflux systems, AcrAB-TolC for *Enterobacteriaceae* or MexAB-OprM for *P. aeruginosa*, are associated with multidrug resistance of

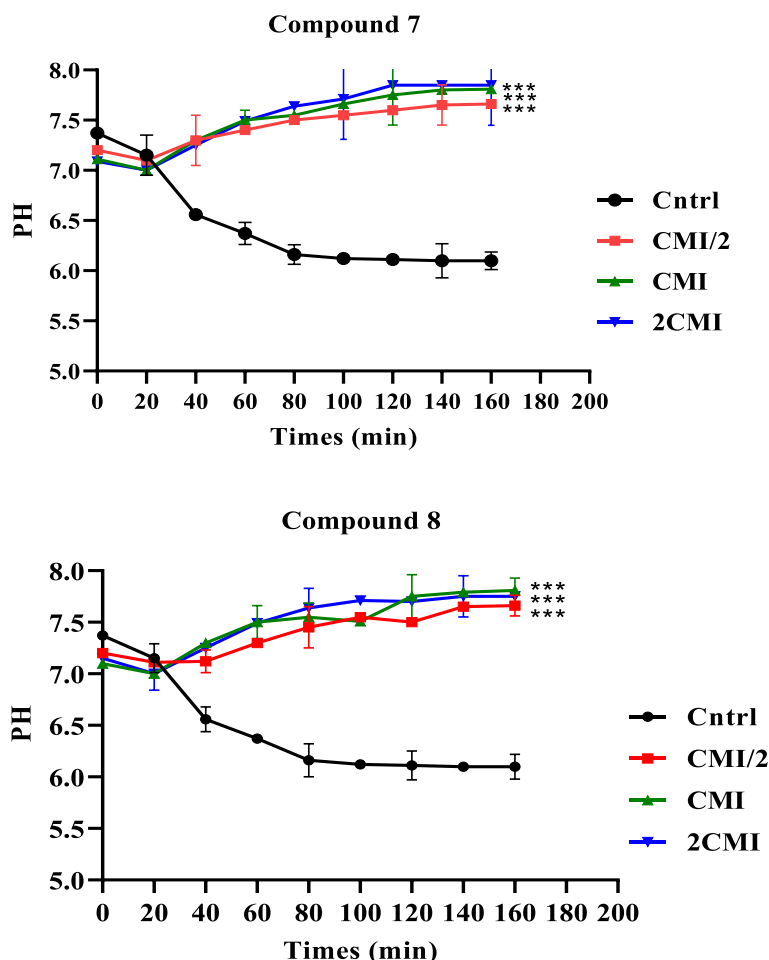


Fig. 3 (a) Effects of compound 7 and **(b)** compound 8 from *D. welwitschia* on cellular ATP production in *E. coli* AG102. MIC: Minimum inhibitory concentration. Results are expressed as Mean \pm SD. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** p -values < 0.01 , and *** p -values < 0.001 ; ns: non-significant

pathogenic Gram-negative bacteria [43–45]. PA β N has been reported as a potent inhibitor of the RND efflux systems and is especially active on AcrAB-ToIC and MexAB-OprM [46–49]. PA β N has been used to demonstrate the role of efflux pumps in MDR of the tested microorganisms. In presence of the efflux pump inhibitor PA β N, the MIC values of phytochemicals 7–9 decreased, showing that these compounds could be substrates of efflux pumps acting in resistant strains used in our study. These data suggested that combination of these compounds with antibiotics could improve the antibacterial activity of conventional antibiotics against MDR phenotypes. Combining phytoconstituents 7–9 with antibiotics against MDR bacteria at MIC/2 and MIC/4 strongly improved the antibacterial activity of norfloxacin, ciprofloxacin and doxycycline with antibiotic-modulating factors ranging between 2 and 64. This indicated that compounds 7, 8 and 9 behave as natural efflux pumps inhibitor. Martins et al. [39] revealed the antibiotic potentiating capacity (tetracycline) of β -amyrin (8) and Oleanolic acid (9) against *E. coli* AG100_{TET^R}. Moreover, our results are in accordance with those of Abreu et al. [50] which highlighted synergism effect against drug-resistant *Staphylococcus aureus* when oleanolic acid was combined to tetracycline or erythromycin, as well as those of Basri et al. [51] showing the synergistic interaction arising from the combination of the oleanolic acid and norfloxacin against SA1199B and MRSA274829 [51].

Conclusion

The overall results of the current work provide baseline information for the possible use of some compounds, diospyric acid (7), 28-hydroxy- β -amyrin (8) and Oleanolic acid (9), of *Donella welwitschii* extract to fight against bacterial infections involving MDR phenotypes. In addition, the data reported herein indicated that compounds diospyric acid (7), 28-hydroxy- β -amyrin (8) and Oleanolic acid (9) behave like efflux pump inhibitors. They are the major antibacterial constituents of *D. welwitschii* against MDR Gram-negative bacteria as well as *Staphylococcus aureus*.

Abbreviations

ATCC: American-type culture collection; ATP: Adenosine triphosphate; CFU: Colony-forming unit; CIP: Ciprofloxacin; DMSO: Dimethyl sulfoxide; EPIs: Efflux pump inhibitors; INT: *P*-Iodonitrotetrazolium chloride; MBC: Minimal bactericidal concentration; MDR: Multidrug resistance; MHA: Mueller–Hinton agar; MHB: Mueller–Hinton broth; MIC: Minimal inhibitory concentration; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; NMR: Nuclear magnetic resonance; Pa β N: Phenylalanine arginine- β - naphthylamide; TLC: Thin-layer chromatography.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03673-3>.

Additional file 1. SM1. Physical properties and NMR data of Compounds 1–10. **SM2. Table S1:** Bacterial features of the tested of microorganisms.

Acknowledgements

ATM and VK are thankful to Alexander von Humboldt Foundation for the 3 months further research stay fellowship at home from November 2021 to January 31, 2022.

Authors' contributions

M-GFG, MON, PN, CMNN, JRNK, GFC carried out the experiments and contributed to the data analysis; ATM, BN, BTN, VK designed the study; PN, M-GFG, GFC, VK drafted the manuscript; ATM, VK provided the bacterial strains and facilities for the antimicrobial testing; All authors read and agreed on the final version of the manuscript.

Funding

No funding.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and the supporting file.

Declarations

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The identification of the plant was carried out by Dr. Tchiengue Barthelemy at the Cameroon National Herbarium (Yaoundé) where a voucher specimen was conserved under specimen No: 10708SFC / 56630HNC.

Competing interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author details

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, Dschang, Cameroon. ²Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon. ³Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Dschang, Dschang, Cameroon. ⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Buea, Buea, Cameroon. ⁵Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon.

Received: 9 May 2022 Accepted: 12 July 2022

Published online: 20 July 2022

References

- World Health Organization (WHO). The World health statistic 2019a. 2019a.
- Centres for Disease Control and Prevention, "Office of Infectious Disease Antibiotic resistance threats in the United States 2013. Apr, 2013.
- World Health Organization. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. 2019b.
- Guefack MGF, Tankeo SB, Ngaffo CMN, Nayim P, Wamba BEN, Bonsou IN, et al. Mbaveng AT antibiotic-potential activities of three animal species extracts, *Bitis arietans*, *Helix aspersa*, and *Aristaeomorpha foliacea* and mode of action against MDR gram-negative bacteria phenotypes. *Invest Med Chem Pharmacol.* 2021;4:000478.
- Ngaffo CMN, Tankeo SB, Guefack MGF, Nayim P, Wamba BEN, Kuete V, et al. Phytochemical analysis and antibiotic-modulating activity of

- Cocos nucifera*, *Glycine max* and *Musa sapientum* methanol extracts against multidrug resistant gram-negative bacteria. Invest Med Chem Pharmacol. 2021;4:53.
6. Dzotam JK, Touani FK, Kuete V. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) gram-negative bacteria. BMC Complement Altern Med. 2016;16:9.
 7. Manekeng HT, Mbaveng AT, Nguenang GS, Seukep AJ, Wamba BEN, Nayim P, et al. Anti-staphylococcal and antibiotic-potentiating activities of seven Cameroonian edible plants against resistant phenotypes. Invest Med Chem Pharmacol. 2018;1:7.
 8. Fankam AG, Kuate JR, Kuete V. Antibacterial activities of *Beilschmiedia obscura* and six other Cameroonian medicinal plants against multidrug resistant gram-negative phenotypes. BMC Complement Altern Med. 2014;14:241.
 9. Lacmata ST, Kuete V, Dzoyem JP, Tankeo SB, Teke GN, Kuate JR, et al. Antibacterial activities of selected Cameroonian plants and their synergistic effects with antibiotics against bacteria expressing MDR phenotypes. Evid Based Complementary Altern Med. 2012;623723.
 10. Kuete V, Sandjo LP. Isobavachalcone: an overview. Chin Jour Integ Med. 2012;18(2):543–7.
 11. Kuete V, Tangmouo JG, Meyer JJM LN. Diospyrone, crassiflorone and plumbagin: three antimycobacterial and antioncorrhoeal naphthoquinones from two *Diospyros* spp. Int J Antimicrob Agents. 2009;34(8):322–5.
 12. Nguemeving JR, Azebaze AG, Kuete V, Carly NNE, Beng VP, Meyer M, et al. Laurentixanthones A and B, antimicrobial xanthones from *Vismia laurentii*. Phytochem. 2006;67(6):1341–6.
 13. Nono EC, Mkounga P, Kuete V, Marat K, Hultin PG, Nkengfack AE. Pycnanthulignenes A–D, antimicrobial cyclolignene derivatives from the roots of *Pycnanthus angolensis*. J Nat Prod. 2010;73:213–6.
 14. Kuete V, Tangmouo JG, Penlap VB NFN, Lontsi D. Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocaroides* (Sapotaceae). J Ethnopharmacol. 2006;104(11):5–11.
 15. Sandjo LP, Fru CG, Kuete V, Nana F, Yeboah SO, Mapiitse R, et al. Elatumatic acid: a new ursolic acid congener from *Omphalocarpum elatum* Miels (Sapotaceae). Zeitschrift für Naturforschung C. Journ. Biosc. 2014;69(4):276–82.
 16. Talla RM, Jouda JB, Mawabo IK, Tegasne C, Happi GM, Kapche G, et al. One new constituent from the stem bark of *Chrysophyllum lacour-tianum* De wild. (Sapotaceae). Nat Prod Res. 2021:1986–193.
 17. Ndifor AR, Stanislaus NN, Fru CG, Talontsi F, Tabopda TK, Menkem EZ, et al. Two new sphingolipids from the stem bark of *Synsepalum msolo* (Sapotaceae). Biochem Bioph Rep. 2021;27:101014.
 18. Mourão MLC, Xavier-Júnior FH, Rodrigues AMS, Stien D, Allegretti SM, Garcia VL. Antimicrobial and anthelmintic activities of the ethanolic extract, fractions and isolated compounds from *Manilkara zapota* L. P Royen (Sapotaceae) Journ Pharm Pharmacol. 2021;73(2):377–87.
 19. Aubreville A, du Cameroun F. familles des Sapotaceae 2. *Musée National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de pharmacopée, phamemegemee*. Paris. 1964:3–21.
 20. Djoumessi AVB, Sandjo LP, Liermann JC, Schollmeyer D, Kuete V, Rincheval V, et al. Donellanic acids A–C: new cyclopropanic oleanane derivatives from *Donella ubanguiensis* (Sapotaceae). Tetrahedron. 2012;68(1):4621–7.
 21. Dzoyem JP, Hamamoto H, Ngameni B, Ngadjui BT, Sekimizu K. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. Drug Discov Ther. 2013;7(2):66–72.
 22. Demgne OMF, Damen F, Fankam AG, Guefack MF, Wamba BEN, Nayim P, et al. Botanicals and phytochemicals from the bark of *Hypericum roeperianum* (Hypericaceae) had strong antibacterial activity and showed synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant bacteria expressing active efflux pumps. J Ethnopharmacol. 2021;114257.
 23. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med. 1998;64(1):711–3.
 24. Kuete V, Metuno R, Ngameni B, Tsafack AM, Ngandeu F, Fotso GW, et al. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Treculia obovoidea* (Moraceae). J Ethnopharmacol. 2007;112(1):531–6.
 25. Kuete V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. Planta Med. 2010;76(1):1479–91.
 26. Lorenzi V, Muselli A, Bernadini AF, Berti L, Pagès J-M. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug resistant isolates from gram-negative species. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(2):2209–11.
 27. Kovac J, Gavari N, Bucar F, Smole MS. Antimicrobial and resistance modulatory activity of *Alpinia katsumadai* seed extract, essential oil and post distillation extract. Food Technol Biotechnol. 2014;52(1):248–54.
 28. Manavathu EK, Dimmock JR, Sarvesh CV, Chandrasekar PH. Inhibition of H⁺-ATPase-mediated proton pumping in *Cryptococcus neoformans* by a novel conjugated styryl ketone. J Antimicrob Chemother. 2001;47(3):491–4.
 29. Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):564–82.
 30. Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. Medicines. 2015;2(1):251–86.
 31. Chang SW, Kim KH, Lee IK, Choi SU, Ryu SY, Lee KR. Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*. Nat Prod Sci. 2009;15(4):234–40.
 32. Sangeetha K SS, Shanmuganathan V. β 3 -taraxerol of *Mangifera indica*, a PI3K dependent dual activator of glucose transport and glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. Biochim Biophys Acta. 2010;1800(3):359–66.
 33. Díaz-Ruiz G, Hernández-Vázquez L, Luna H, Del Carmen W-RM, Navarro-Ocaña A. Growth inhibition of streptococcus from the oral cavity by α -amyirin esters. Molecules. 2012;17(11):12603–11.
 34. Liu M, Yeng S, Jin L, Hu D, Wu Z, Yang S. Chemical constituents of the ethyl acetate extract of *Belamcanda chinensis* (L.) DC roots and their antitumor activities. Molecules. 2012;17(5):6156–69.
 35. Thuong PT, et al. Triterpenoids from the leaves of *Diospyros kaki* (persimmon) and their inhibitory effects on protein tyrosine phosphatase 1B. J Nat Prod. 2008;71(1):1775–8.
 36. Shashi BM, Asish AP. 13C Nmr spectra of pentacyclic triterpenoids-a and some salient features. Phytochemistry. 1994;37(6):1517–75.
 37. Seebacher W, Simic N WR, Saf R, Kunert O. Complete assignments of 1H and 13C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. Magn Reson Chem. 2003;41(8):636–8.
 38. Abdel-Raouf N, Al-Enazi NM, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM, Al-Othman MR, Hatamley AA. Antibacterial β -amyirin isolated from *Laurencia microcladia*. Arab J Chem. 2015;8(1):32–7.
 39. Martins A, Vasas A, Viveiros M, Molnár J, Hohmann J, Amaral L. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(1):438–44.
 40. Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RM. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. J Ethnopharmacol. 2008;120(2):272–6.
 41. Futai M, Kanazawa H. Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F₀F₁): biochemical and molecular biological approaches. Microbiol Rev. 1983;47(2):285–312.
 42. Senior AE, Wise JG. The proton-ATPase of bacteria and mitochondria. J Membr Biol. 1983;73(1):105–24.
 43. Blot S, Depuydt P, Vandewoude K, De Bacquer D. Measuring the impact of multidrug resistance in nosocomial infection. Curr Opin Infect Dis. 2007;20(2):391–6.
 44. Pages J-M, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomics. 2009;1794(1):826–33.
 45. Papadopoulos CJ, Carson CF, Chang BJ, Riley TV. Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1, 8-cineole and α -terpineol. Appl Environ Microbiol. 2008;74(6):1932–5.
 46. Pietras A, Bavro VN, Furnham N, Pellegrini-Calace M, Milner-White EJ, Luisi BF. Structure and mechanism of drug efflux machinery in gram negative bacteria. Current Drug Target. 2008;9:719–28.
 47. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—a vision for applied use. Biochem Pharmacol. 2006;71(2):910–8.
 48. Pagès J-M, Lavigne JP, Leflon-Guibout V, Marcon E, Bert F, Noussair L, et al. Efflux pump, the masked side of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. PLoS One. 2009;4(1):4817.
 49. Kuete V, Ngameni B, Tangmouo JG, Bolla JM, Albert-Franco S, Ngadjui BT, et al. Efflux pumps are involved in the defense of gram-negative bacteria against the natural products isobavachalcone and diospyrone. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):1749–52.

50. Abreu AC, Paulet D, Coqueiro A, Malheiro J, Borges A, Saavedra JM, et al. Antibiotic adjuvants from *Buxus sempervirens* to promote effective treatment of drug-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *RSC Adv.* 2016;6(3):95000–9.
51. Basri DF, Xian LW, Abdul-Shukor NJ. Bacteriostatic antimicrobial combination: antagonistic interaction between epsilon-viniferin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res Int.* 2014;2014(16):461756.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

