

RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

FACULTÉ DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN SCIENCES, TECHNOLOGIES ET
GÉOSCIENCES

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE CHIMIE
ET APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POSTGRADUATE SCHOOL FOR
SCIENCES, TECHNOLOGY AND
GEOSCIENCES

RESEARCH AND POSTGRADUATE
TRAINING UNIT FOR CHEMISTRY AND
APPLICATIONS

LABORATOIRE DE PHARMACOCHEMIE DES SUBSTANCES NATURELLES
NATURAL PRODUCTS PHARMACOCHEMISTRY LABORATORY

Constituants chimiques de deux plantes médicinales
camerounaises et évaluation de leur potentiel antituberculeux :
Cassia arereh Delile et *Distemonanthus benthamianus*
Baillon (Fabaceae).

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat /Ph.D en Chimie Organique

Par :

EVINA Jean-Noël

Matricule : 00T102

Master en Chimie Organique

Sous la Co-direction de :

Dominique Serge NGONO BIKOBO

Maître de Conférences

Dieudonné Emmanuel PEGNYEMB

Professeur

Année 2023



RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

FACULTÉ DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN SCIENCES, TECHNOLOGIES ET
GÉOSCIENCES

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE CHIMIE
ET APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POSTGRADUATE SCHOOL FOR
SCIENCES, TECHNOLOGY AND
GEOSCIENCES

RESEARCH AND POSTGRADUATE
TRAINING UNIT FOR CHEMISTRY AND
APPLICATIONS

LABORATOIRE DE PHARMACOCHEMIE DES SUBSTANCES NATURELLES
NATURAL PRODUCTS PHARMACOCHEMISTRY LABORATORY

Constituants chimiques de deux plantes médicinales
camerounaises et évaluation de leur potentiel antituberculeux :
Cassia arereh Delile et *Distemonanthus benthamianus*
Baillon (Fabaceae).

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat /Ph.D en Chimie Organique

Par :

EVINA Jean-Noël

Matricule : 00T102

Master en Chimie Organique

Sous la Co-direction de :

Dominique Serge NGONO BIKOBO

Maître de Conférences

Dieudonné Emmanuel PEGNYEMB

Professeur

Année 2023



**DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY**

**ATTESTATION DE CORRECTION DU MEMOIRE DE THESE DE
DOCTORAT/Ph.D DE MONSIEUR EVINA Jean-Noël, Matricule 00T102**

Titre de la thèse : « Constituants chimiques de deux plantes médicinales camerounaises et évaluation de leur potentiel antituberculeux : *Cassia arereh* Delile et *Distemonanthus benthamianus* Baillon (Fabaceae) ».

Nous soussignés, enseignants ci-dessous nommés, membres du jury de soutenance de thèse de Doctorat/Ph.D de Monsieur **EVINA Jean-Noël**, attestons que le candidat a bel et bien pris en compte dans la mouture finale de sa thèse, toutes les corrections et recommandations qui lui ont été faites au cours de sa soutenance en date du jeudi 04 Mai 2023.

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

Fait à Yaoundé, le 7.8 MAI - 2023

Le Jury :

Président :

MBAZE MEVA'A Luc, (Pr)

Rapporteurs :


NGONO BKOBO D.S (MC) D.E. PEGNYEMB (Pr)

Membres :

AMBASSA Pantaléon (MC)

DJIOGUE Sefirin (MC)

ATCHADE Alex DE Théodore (Pr)

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

LISTE PROTOCOLAIRE

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 22 juin 2022

ADMINISTRATION

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

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

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

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

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

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

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (39)

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 Wilfred	Professeur	En poste
6.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7.	NJAYOU Frédéric Nico	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.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
15.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
16.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
17.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
18.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Doyen FS / UDs
19.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
20.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
21.	NGUEFACK Julienne	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
26.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
27.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	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.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
34.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35.	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
36.	WILFRED ANGIE Abia	Chargé de Cours	En poste

37.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Assistant	En poste
38.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Chargée de Cours	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE (BPA) (51)

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.	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice Doyen/FMSB/Uyi
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	Chef Service/ MINESUP
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
19.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
23.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
24.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
25.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
26.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
27.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
28.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Maître de Conférences	En poste

29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
34.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
35.	FEUGANG YOUNSSI François	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	METCHI DONFACK Mireille Flaure EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
41.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
42.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
43.	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. Uté Bamenda
44.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
45.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
46.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

47.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
48.	FOKAM Alvine Christelle Epse KEGNE	Assistante	En poste
49.	MAPON NSANGO Indou	Assistant	En poste
50.	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE (BPV) (33)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	Chef de Département /UYII
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste

5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
10.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	DAAC /UDla
11.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
12.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
13.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	CT / MINRESI
14.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste
17.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18.	GONMADGE 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.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL Annie Claude	Chargé de Cours	En détachement/UNESCO MALI
25.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
26.	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
27.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
28.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
29.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
30.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
31.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
32.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (31)

1.	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	En poste
2.	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	Recteur Univ.Ngaoundere
3.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	Ministre Chargé de Miss.PR
4.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
5.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI
6.	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	Vice-Doyen Univ. Bamenda
7.	NENWA Justin	Professeur	En poste
8.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	DOYEN FS Univ.Ngaoundere
9.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	Vice Chancellor/UB
10.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
11.	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
15.	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
17.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	Chef de Département
18.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	CT/ MINPROFF
19.	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
20.	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
21.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
22.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
23.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
24.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	Chef Service/ ENS Bertoua
25.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
26.	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste

27.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
28.	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
30.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
31.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (38)

1.	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UIYI
2.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
3.	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	Directeur/ MINESUP/ Chef de Département
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	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.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14.	KEUMEDJIO Félix	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	Chef de Cellule MINRESI
19.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E.A/ MINESUP
20.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	DAAC/Uté Bertoua
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	Doyen /FS/ UYI
25.	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
26.	ZONDEGOUMBA 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.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
34.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
35.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
36.	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
37.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
38.	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste

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

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	Chef Div.MINESUP
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	Chef Dpt ENS/ IGA.MINESUP
3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste
5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
6.	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	Chef de Département
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
11.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste

12.	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13.	OLE OLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint ENSET. Ebolowa
14.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

15.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
16.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
17.	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
18.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
19.	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
20.	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
21.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
22.	NZEKON NZEKO'O Armel Jacques	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (31)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
----	-----------------------	------------	---------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UWI
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINEPAT
11.	BOGSO ANTOINE MARIE	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste

16.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17.	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	Chef Dpt /ENS Uté Maroua
18.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
21.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
22.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
23.	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste

24.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
25.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
26.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
27.	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28.	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (22)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	Chef de Département
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	Vice-Doyen / DSSE/FS/UYI
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.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
9.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste

10.	BODA Maurice	Chargé de Cours	En position d'absence irrégulière
-----	--------------	-----------------	--------------------------------------

11.	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13.	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
14.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
15.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
16.	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
17.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
18.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
19.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

20.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
21.	NKOUÉ TONG ABRAHAM	Assistant	En poste
22.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste

9. DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE (PHY) (43)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
7.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
8.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
9.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
10.	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	Chef de centre/IRGM/MINRESI
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FSUniv/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.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
23.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
24.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
26.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
27.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
28.	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	Directeur/ENS/UYI
29.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
30.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
31.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
32.	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
33.	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
34.	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
35.	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	Absente depuis Janvier 2022
36.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
37.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
38.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	En poste
39.	TEYOU NGOUPOU Ariel	Chargé de Cours	En poste
40.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Assistant	En poste
41.	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
42.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste

43.	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste
-----	-----------------------	-----------	----------

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

1.	BITOM Dieudonné	Professeur	Doyen / FASA / UDs
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	Vice-Doyen / DRC
9.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	Directeur/Projet Barrage Memve'ele
10.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	Sec. D'Etat/MINMIDT
12.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
13.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	Chef de Département /Uté Maroua
14.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	CT/ MINIMDT
15.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	Cea/MINRESI
17.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19.	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	Chef service Maintenance & du Matériel/UYII
20.	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	Chef.Cell / MINRESI
21.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
22.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	Chef Div. /MINTP
23.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	DG/ART

24.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
-----	----------------------------	-----------------	----------

25.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
26.	Elise SABABA	Chargé de Cours	En poste
27.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
28.	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
29.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle	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	CD/ Uté Maroua
34.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
37.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
40.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
41.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
42.	NGO'O ZE Arnaud	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 (00)	14 (10)	15 (05)	02 (01)	39 (16)
BPA	14 (01)	11 (07)	22 (07)	04 (02)	51 (17)
BPV	06 (01)	10(01)	16 (09)	01 (00)	33 (11)
CI	09(01)	14(04)	08 (01)	00 (00)	31 (06)
CO	06 (01)	20 (04)	08 (03)	04 (01)	38(09)
IN	02 (00)	02 (00)	10 (01)	08 (00)	22 (01)
MAT	02 (00)	08 (00)	14 (01)	07 (01)	31 (02)
MIB	03 (01)	06 (02)	10 (03)	03 (02)	22 (08)
PHY	15 (01)	13 (02)	11 (03)	04 (00)	43 (06)
ST	07 (01)	16 (03)	18 (04)	01 (00)	42(08)
Total	72 (07)	114 (33)	132 (37)	34 (07)	352 (84)

Soit un total de **352 (84)** dont :

- Professeurs **72 (07)**
- Maîtres de Conférences **114 (33)**
- Chargés de Cours **132 (37)**
- Assistants **34 (07)**

() = Nombre de Femmes **84**

DÉDICACES

Je dédie cette thèse à :

- Mes adorables parents ;
- Mon feu père **Evina Jean-Pierre**
- Et ma feu mère **Mbia Ombwa Antoinette,**
- À mon épouse **Andougna Essomba Bernadette,**
- **À mes enfants.**

REMERCIEMENTS

À l'issue de ce travail, j'ai l'immense plaisir de remercier tous ceux qui ont permis sa réalisation dans des conditions exceptionnelles.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier, Monsieur Dieudonné Emmanuel **Pegnyemb, Professeur, Chef de Département de Chimie Organique**, qui a eu l'amabilité de m'accueillir dans son laboratoire et de superviser ce travail. Recevez ici mes sincères remerciements pour les conseils et votre constant soutien. Veuillez trouver dans ces quelques lignes ma profonde reconnaissance.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur Dominique Serge **Ngono Bikobo, Maître de Conférences**, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Vous avez toujours œuvré sans relâche à la recherche des solutions pour l'aboutissement de ce travail, je vous en remercie infiniment. Merci de m'avoir accordé une très grande confiance tout au long de ce parcours. J'espère, de tout mon cœur, avoir été à la hauteur. Merci pour le soutien moral et professionnel indéfectible pendant la réalisation de ce travail. Merci pour votre gentillesse, vos conseils, votre rigueur scientifique et pour votre aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit. Ce fut pour moi un grand honneur de travailler avec vous.

Je tiens à remercier vivement Madame Joséphine **Ngo Mbing, Maître de Conférences**, qui m'a permis de faire mes premiers pas dans la recherche et pour ses incessants encouragements.

A Monsieur Olivier Placide **Noté, Maître de Conférences**, à qui je suis infiniment reconnaissant de m'avoir accordé son soutien sans faille, sa disponibilité et ses connaissances dans la réalisation de ce projet.

Je remercie Monsieur le Docteur Lin Marcellin **Ambassa Messi** pour les échanges scientifiques et personnels qu'on a pu partager et pour tous les moments passés ensemble au sein ou en dehors du laboratoire.

Je remercie Monsieur le Docteur Aristide **Munvera Mfifen** pour l'expertise qu'il m'a apportée afin de parachever ce travail.

J'exprime toute ma considération :

Aux Docteurs : Esther **Moni Ndedi** et Patrick Hervé **Betote Diboue**, du Département de Microbiologie, pour les tests anti-mycobactériens effectués sur les composés et extraits.

À Messieurs : Thierry **Ndongo**, Auguste **Abouém**, Ledoux **Kamto** (**Maîtres de Conférences**) ainsi que les Docteurs : **Mc Jésus Kinyock**, Gaétan **Bayiha**, René **Pemha** et Jeanne Louise **Nkot** qui ont tous su, chacun à sa manière, me prodiguer des conseils judicieux pour la réalisation de ce travail.

Aux membres du jury devant lequel cette thèse est soutenue, pour m'avoir fait l'honneur de bien vouloir juger mon travail.

Aux enseignants des Départements de Chimie Organique et Inorganique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I pour la formation tant morale qu'intellectuelle qu'ils m'ont donnée.

À Monsieur **Victor Nana**, botaniste à l'Herbier National du Cameroun, pour avoir réalisé les travaux d'identification des espèces récoltées dans cette thèse.

À mes collègues de service : Rev. Robert **Eboulou Eyenga**, Messieurs. Joseph Eric **Ayissi**, Patrick Christian **Silla**, Théophile Marcellin **Nlend**, Raphaël **Njock**, Michaël **Mouafo Takam**, **Ngapout Saliou** pour votre assistance, votre indulgence, votre collaboration et votre disponibilité ; j'ai beaucoup appris de vous. Merci.

Tous mes camarades du Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles : notamment les Docteurs : Norbert **Mbabi**, Angélique Nicolas **Messi**, Line **Simo**, Eric Robert **Tiam**, Marius **Balemaken Missi**, Roland **Ebede**, André **Bitombo**. Messieurs Fred René **Zoua**, Robert **Ebeh Messanga**, Onésime **Mayega**, Daniel **Toukea**, Alexis **Nama**, Emmanuel **Biang**, Mlle Yolande **Ngimbous** et à tous les autres « cadets » de laboratoire qui ont su faire régner en son sein, une atmosphère de travail empreinte de convivialité et de fraternité.

Un grand merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

TABLE DES MATIÈRES

Liste protocolaire.....	i
DÉDICACES	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
TABLE DES MATIÈRES	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, ACRONYMES ET SYMBOLES.....	xxv
LISTE DES TABLEAUX.....	xxviii
LISTE DES FIGURES.....	xxx
Liste des schémas.....	xxxiii
RÉSUMÉ.....	xxxiv
ABSTRACT.....	xxxv
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	2
CHAPITER I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
I.1. description botanique et ethnopharmacologique.....	6
I.1.Présentation de la famille des Fabaceae	6
I.1.1. Description Botanique de la famille des Fabaceae.....	6
I.1.1.2. Répartition géographique de la famille des Fabaceae	7
I.1.1.3. Usages ethnopharmacologiques de la famille des Fabaceae	7
I.1.1.4. Position systématique de la famille des Fabaceae.....	8
I.1.1.5. L'intérêt thérapeutique de la famille des Fabaceae	9
I.1.1.6. L'intérêt économique de la famille des Fabaceae	9
I.1.1.7. Toxicité de certaines espèces de la famille des Fabaceae	9
I.1.1.8. Statistique des genres, d'espèces de la famille des Fabaceae dans le monde.....	9
I.1.1.9. Présentation de la sous-famille des Caesalpiaceae.....	10
I.2. Généralités sur le genre <i>Distemonanthus</i>	11
I.2.1. Généralités sur <i>Distemonanthus benthamianus</i>	11
I.2.2. Distribution géographique de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	11
I.2.3. Systématique de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	12
I.2.4. Description botanique de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	14
I.2.5. Usages ethnopharmacologiques de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	14
I.3. Études chimiques et biologiques antérieures	15
I.3.1. Constituants chimiques du genre <i>Distemonanthus</i>	15

I.3.1.1. Les flavonoïdes	15
I.3.1.2. Cas des acétophenones	20
I.3.2. Activités biologiques de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	20
I.3.2.1. Activités antibactériennes	20
I.3.2.2. Activités antiplasmodiales	21
I.3.2.3. Activités anti-diarrhéiques	21
I.3.2.4. Activités antifongiques.....	22
I.4. Généralités sur le genre <i>Cassia</i>	23
I.4.1. Distribution géographique du genre <i>Cassia</i>	23
I.4.2. Description botanique du genre <i>Cassia</i>	23
I.4.3. Classification botanique du genre <i>Cassia</i>	24
I.4.4. Usages ethnopharmacologiques des plantes du genre <i>Cassia</i>	24
I.4.5. Généralités sur l'espèce <i>C. arereh</i>	25
I.4.5.1. Distribution géographique de <i>C. arereh</i>	25
I.4.5.2. Classification botanique de <i>Cassia arereh</i>	26
I.4.5.3. Description botanique de <i>Cassia arere</i>	27
I.4.5.4. Usage ethnopharmacologique de <i>C. arereh</i>	28
I.4.6. Constitution chimique du genre <i>Cassia</i>	28
I.4.6.1. Cas des flavonoïdes.....	28
I.4.6.2. Cas des anthraquinones	36
I.4.6.3. Cas des alcaloïdes	43
I.4.6.4. Cas des triterpènes pentacycliques.....	46
I.4.6.5. Cas des stérols	49
I.4.6.6. Cas des phenylpropanoïdes	50
I.4.6.7. Cas des céramides	51
I.4.7. Étude pharmacologique des plantes du genre <i>Cassia</i>	52
I.4.7.1. Activités antibactériennes et antifongiques.....	52
I.4.7.2. Activités antivirales.....	52

I.4.7.3. Activités antioxydantes	53
I.4.7.4. Activités anticancéreuses	53
I.4.7.5. Activités hépatoprotectrices	54
I.4.7.6. Activités antiplasmodiales	54
I.4.7.8. Activités analgésiques et anti-inflammatoires.....	55
I.4.7.9. Activités antidiabétiques	55
I.5. Généralités sur <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	56
I.5.1. Introduction	56
I.5.2. Tuberculose et agent vecteur	57
I.5.3. Épidémiologie de la tuberculose.....	58
I.5.3.1. Tuberculose pulmonaire.....	58
I.5.3.2. Tuberculose extra pulmonaire.....	59
I.5.3.3. Diagnostic bactériologique.....	60
I.5.3.4. Examens directs des crachats	60
I.5.4. Cycle du <i>Mycobacterium tuberculosis</i> chez l'Homme.....	60
I.5.5. Traitement de la tuberculose.....	62
CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	66
II.1. Étude phytochimique des écorces de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	67
II.1.1. Extraction et Isolement des constituants des écorces de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	67
II.2. Étude phytochimique des feuilles de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	69
II.2.1. Extraction et isolement des constituants des feuilles de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	69
II.3. Détermination structurale des composés isolés de <i>Distemonanthus benthamianus</i> par famille et par classe	71
II.3.1. De la famille des Flavonoïdes.....	71
II.3.1.1. De la classe des Flavones.....	71
II.3.1.1.1. Détermination structurale de DBE ₁	71
II.3.1.1.2. Identification de 6''-O-acetylvitexine (DBE ₆).....	79
II.3.1.1.3. Identification de la swertisine (DBF ₅)	82
II.3.1.1.4. Identification de la swertiajaponine (DBF ₆)	85
II.3.1.1.5. Identification de la lutéoline (DBF ₇).....	88

II.3.1.2. De la classe des Flavonols	91
II.3.1.2.1. Identification de la quercetine (DBE ₅).....	91
II.3.1.2.2. Identification de la quercetine 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (DBE ₇)	94
II.3.2. De la classe des dérivés d'acide benzoïque	96
II.3.2.1. Identification de l'acide gallique (DBF ₂).....	96
II.3.2.2. Identification du Methyl Gallate (DBF ₁)	99
II.3.2.3. Identification de l'acide syringique (DBE ₃).....	101
II.3.2.4. Identification de l'acide 4-methoxygallique (DBE ₄)	103
II.3.3. De la classe des stéroïdes.....	104
II.3.3.1. Identification de la β -Sitosterol (DBF ₄).....	104
II.3.3.2. Identification de la sitostérol 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (DBE ₂).	107
II.3.4. De la famille des alcaloïdes	110
II.3.4.1. Identification de l'allantoïne (DBF ₃)	110
II.4. Extraction et isolement des constituants des écorces de <i>Cassia arereh</i>	113
II.4.1. Extraction des écorces de <i>Cassia arereh</i>	113
II.4.2. Isolement des constituants des écorces de <i>Cassia arereh</i>	113
II.4.3. Détermination structurale des composés isolés	115
II.4.3.1. Détermination structurale de CAE ₁	115
II.4.3.2. Identification de la catéchine (CAE ₂)	124
II.4.3.3. Identification du lupéol (CAE ₃).....	127
II.4.3.4. Identification du bétulinaldéhyde (CAE ₄).....	130
II.4.3.5. Identification de l'acide bétulinique (CAE ₅)	133
II.4.3.6. Identification de l'acide ceanothique (CAE ₆).....	136
II.5. Étude biologique de quelques composés isolés	140
II.5.1. Évaluation de l'activité antituberculeuse	140
II.5.1.1. Résultats.....	140
II.5.1.2. Discussion.....	142
CONCLUSION GÉNÉRALE	144
Conclusion Générale	145
CHAPITRE III : MATÉRIELS ET MÉTHODES	147

III.1. Matériel végétal, extraction et purification des composés	148
III.1.1. Matériel végétal et extraction.....	148
III.1.1.1. Partition, extraction et isolement des constituants des écorces de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	148
III.1.1.1.1. Extraction et partition des écorces de <i>D. benthamianus</i>	148
III.1.1.1.2. Fractionnement et isolement des constituants des écorces de <i>D. benthamianus</i>	148
III.1.1.2. Partition, extraction et isolement des constituants des feuilles de <i>D. benthamianus</i>	149
III.1.1.2.1. Extraction et partition des feuilles de <i>D. benthamianus</i>	149
III.1.1.2.2. Fractionnement et isolement des constituants des feuilles de <i>D. benthamianus</i> ...	150
III.1.1.3. Partition, extraction et isolement des constituants des écorces de <i>C. arereh</i>	151
III.1.1.3.1. Extraction, Partition et fractionnement des écorces de <i>C. arereh</i>	151
III.1.1.4. Criblage chimique.....	151
III.2. Méthodes chromatographiques.....	152
III.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	152
III.2.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)	153
III.2.3. Méthodes chromatographiques préparatives.....	153
III.2.3.1. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC).....	153
III.2.3.2. Chromatographie d'adsorption.....	153
III.2.3.3. Chromatographie d'exclusion	154
III.3. Méthodes physico-chimiques	154
III.3.1. Mesure du point de fusion (Pf).....	154
III.3.2. Spectrométrie infrarouge (IR)	154
III.3.3. Spectrophotométrie UV visible	155
III.3.4. Spectrométrie de masse (MS).....	155
III.3.5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	156
III.3.6. Hydrolyse acide	156
III.4. Méthodes biologiques.....	156
III.4.1. Évaluation des activités antituberculeuses	157
III.4.1.1. Principes des méthodes utilisées.....	157
III.4.1.2. Méthode de microdilution en milieu liquide	157
III.4.1.3. Conditions de préparation et de croissance de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	158

III.5. Constantes physiques et données spectrales des composés isolés.....	159
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165
Publications.....	188

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire
^{13}C	Carbone 13
1D	Monodimensionnel
^1H	Proton
2D	Bidimensionnel
Acétone-d_6	Acétone deutéré
AcOEt	Acétate d'éthyle
AST	<i>Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CC	Chromatographie sur Colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD$_3$OD	Méthanol deutéré
CDCl$_3$	Chloroforme deutéré
CI$_{50}$	Concentration Inhibitrice médiane
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CoA	Coenzyme A
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet de doublets
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO-d_6	Diméthylsulfoxyde deutéré
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EI	<i>Electronic Impact</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
eV	Electron-Volt
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>

GFPP	GéranylFarnésyle PyroPhosphate
GGPP	GéranylGéranyle PyroPhosphate
Glc	Glucopyranosyl
GPP	Géranyle PyroPhosphate
Hex	Hexane
HMB	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HNC	Herbier National du Cameroun
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRESIMS	<i>High Resolution Electro Spray Ionisation Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IR	Infrarouge
ITL	Infection Tuberculeuse Latente
J	Constante de couplage
M	Multiplet
m/z	rapport masse/charge électronique
MCF-7	Lignées de cellules mammaires cancéreuses humaines
MDR	<i>Multi Drug-Resistant</i>
MeOH	Méthanol
MHz	Mégahertz
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory</i>
ND	Non déterminé
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Ortho Rhino Laryngologie
P.F.	Point de Fusion
PNLT	Programme National de Lutte Contre la Tuberculose
ppm	partie par million

RCL	Réaction à chaîne par ligase
Rha	Rhamnopyranosyl
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
s	Singulet
SM	Spectre de Masse
SM-HR	Spectre de masse- Haute résolution
t	Triplet
TB	<i>Tuberculosis</i>
TMS	TétraMéthylSilane
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factoralpha</i>
TOF	<i>Time of flight</i>
UV	Ultra-Violet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	Extensively Drug-Resistant
Xyl	Xylopyranosyl
δ_C	Déplacement chimique du carbone
δ_H	Déplacement chimique du proton
λ	Longueur d'onde (Lambda)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétiques ou morphologiques	8
Tableau II: Statistique des genres, d'espèces de la famille des Fabaceae dans le monde.	10
Tableau III: Classification botanique de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	13
Tableau IV: Quelques flavonoïdes isolés de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	16
Tableau V: Classification botanique de <i>Cassia</i>	24
Tableau VI: Classification botanique de <i>Cassia arereh</i>	26
Tableau VII: Quelques flavonoïdes isolés des plantes du genre <i>Cassia</i>	29
Tableau VIII: Quelques anthraquinones isolés des plantes du genre <i>Cassia</i>	37
Tableau IX: Quelques alcaloïdes isolés des plantes du genre <i>Cassia</i>	44
Tableau X: Quelques triterpènes pentacycliques isolées des plantes du genre <i>Cassia</i>	46
Tableau XI: Quelques stéroles isolées des plantes du genre <i>Cassia</i>	49
Tableau XII: Quelques phenylpropanoïdes isolées du genre <i>Cassia</i>	51
Tableau XIII: Quelques médicaments conventionnels antituberculeux et leur posologie.....	62
Tableau XIV: Quelques composés naturels antimycobactériens issus des plantes.....	64
Tableau XV: Données RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé DBE ₁ dans le DMSO-d ₆ (δ en ppm; J en Hz).	78
Tableau XVI: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBE ₆ avec 6''-O-acetylvitexine (Bayiha et al., 2011)	81
Tableau XVII: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBF ₅ avec la swertisine..	84
Tableau XVIII: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBF ₆ avec la swertiajaponine.....	87
Tableau XIX: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBF ₇ avec la lutéoline	91
Tableau XX: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBE ₅ avec la quercétine.....	94
Tableau XXI: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBE ₇ avec quercétine 3-O-β-D-glucopyranoside.....	96
Tableau XXII: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBF ₂ avec l'acide gallique..	98
Tableau XXIII: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBF ₁ avec le Methyl Gallate	100
Tableau XXIV: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBE ₃ avec l'acide syringique	102
Tableau XXV: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBE ₄ avec l'acide 4-methoxygallique	103

Tableau XXVI: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBF ₄ avec le β-Sitosterol	106
Tableau XXVII: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBE ₂ avec le sitosterol 3-O-β-D-glucopyranoside	109
Tableau XXVIII: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé DBF ₃ avec l'allantoïne..	112
Tableau XXIX: Données de RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) du composé CAE ₁ dans le MeOD-d ₄ (δ en ppm; J en Hz).....	123
Tableau XXX: Comparaison des données RMN ¹ H et ¹³ C du composé CAE ₂ avec la catéchine	127
Tableau XXXI: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C du composé CAE ₃ avec le lupéol	130
Tableau XXXII: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C du composé CAE ₄ avec le bétulinaldéhyde	133
Tableau XXXIII: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C du composé CAE ₅ avec l'acide bétulinique	136
Tableau XXXIV: Comparaison des données de RMN ¹ H et ¹³ C du composé CAE ₆ avec l'acide ceanothique.....	139
Tableau XXXV: Paramètres d'inhibition (CMI et CMB en µg/mL) des composés purs et de l'extrait méthanolique de <i>D. benthamianus</i> H. bail sur la souche <i>Mycobacterium tuberculosis</i> AC45.....	141
Tableau XXXVI: Paramètres d'inhibition (CMI et CMB en µg/mL) de l'extrait brut et de la catéchine issue de <i>C. arereh</i> Delile sur la souche <i>Mycobactérium tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	141

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Carte de répartition géographique des Fabaceae.	7
Figure 2 : Carte de la répartition géographique de <i>Distemonanthus benthamianus</i> en Afrique.....	12
Figure 3 : Photographie de <i>Distemonanthus benthamianus</i>	14
Figure 4: Carte de repartition géographique des <i>Cassia</i>	23
Figure 5: Carte de la répartition géographique de <i>Cassia arereh</i> en Afrique	26
Figure 6 : Photographie de <i>Cassia arereh</i> . A : Plante entière ; B : Inflorescences.	27
Figure 7: structure de la cassiaramide de <i>C. arereh</i>	51
Figure 8: Cycle du <i>Mycobacterium tuberculosis</i> chez L'Homme.....	61
Figure 9: Structure des molécules conventionnelles	62
Figure 10 : Structure de quelques molécules naturelles	63
Figure 11 : Spectre de masse (FAB) du composé DBE ₁	71
Figure 12: Spectre de masse (ESI-MS) du composé DBE ₁	72
Figure 13: Spectroscopie infrarouge du composé DBE ₁	72
Figure 14: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBE ₁	73
Figure 15: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBE ₁	74
Figure 16: Structure de l'Apigénine.....	74
Figure 17: Spectre HSQC du composé DBE ₁	75
Figure 18: Spectre HMBC du composé DBE ₁	76
Figure 19: Spectre NOESY du composé DBE ₁	77
Figure 20: Corrélations HMBC et NOESY du composé DBE ₁	77
Figure 21: Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBE ₆	79
Figure 22: Spectre de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBE ₆	80
Figure 23 : Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBF ₅	82
Figure 24 : Spectre de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBF ₅	83
Figure 25: Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBF ₆	85
Figure 26: Spectre de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBF ₆	86
Figure 27: Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBF ₇	89
Figure 28 : Spectre de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBF ₇	90
Figure 29: Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBE ₅	92
Figure 30: Spectre de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) du composé DBE ₅	92

Figure 31: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_2$	97
Figure 32 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_2$	98
Figure 33 : Spectre de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_1$	99
Figure 34 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_1$	100
Figure 35 : Spectre de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de DBE $_2$	101
Figure 36 : Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) du composé DBE $_3$	102
Figure 37 : Spectre de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_4$	104
Figure 38: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_4$	105
Figure 39 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de DBE $_2$	107
Figure 40: Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) de DBE $_2$	108
Figure 41: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_3$	110
Figure 42 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_3$	111
Figure 43 : Spectre de masse du composé CAE $_1$	115
Figure 44 : Spectre de RMN ^1H élargie (500 MHz, MeOD- d_4) du composé CAE $_1$	116
Figure 45 : Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD- d_4) du composé CAE $_1$	117
Figure 46: trans-3,5-dihydroxy-4'-méthoxystilbéne (Trans-resvératrol).....	117
Figure 47: Spectre de RMN ^1H élargie (500 MHz, MeOD- d_4) du composé CAE $_1$	118
Figure 48: Spectre HSQC du composé CAE $_1$	119
Figure 49: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, MeOD- d_4) du composé CAE $_1$	120
Figure 50: Acide 4,5-dihydroxybenzoïque.....	120
Figure 51: Spectre HMBC (500 MHz, MeOD- d_4) du composé CAE $_1$	121
Figure 52: Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC du composé CAE $_1$	121
Figure 53: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) du composé CAE $_2$	125
Figure 54: Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) de CAE $_2$	126
Figure 55: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, CDCl $_3$) du composé CAE $_3$	128
Figure 56: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl $_3$) du composé CAE $_3$	129
Figure 57: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, CDCl $_3$) du composé CAE $_4$	131
Figure 58: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl $_3$) du composé CAE $_4$	132
Figure 59: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) du composé CAE $_5$	134
Figure 60: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé CAE $_5$	135
Figure 61: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, Acetone- d_6) du composé CAE $_6$	137

Figure 62 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, Acetone- d_6) du composé CAE_6 138

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1: Protocole d'extraction et d'isolement des constituants des écorces de <i>D. benthamianus</i> ..	68
Schéma 2: Protocole d'extraction et d'isolement des constituants des feuilles de <i>D. benthamianus</i> ...	70
Schéma 3: Protocole d'extraction et d'isolement des constituants des écorces de <i>Cassia arereh</i>	114
Schéma 4: Mécanisme de réduction du Blue Alamar.....	157

RÉSUMÉ

Les travaux entrepris sur deux plantes camerounaises à savoir : *Distemonanthus benthamianus* et *Cassia arereh* (Fabaceae), ont conduit à l'isolement et à la caractérisation de vingt (20) composés naturels dont deux (02) nouvelles structures : un (01) glycoside de flavonoïde de type flavone, le distemonanthoside (**182**), isolé des écorces de *D. benthamianus* et un (01) composé phénolique glycosidique dérivé du *trans*-stilbéne, l'arerehioside (**196**), isolé des écorces de *C. arereh*. Les dix-huit (18) autres composés connus sont regroupés en différentes classes dont : sept (07) flavonoïdes [quercétine (**186**); 6''-*O*-acétylvitexine (**187**); quercétine 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**188**); swertisine (**193**); swertiajaponine (**194**); lutéoline (**195**) et catéchine (**197**)], deux (02) phytostérols [sitostérol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**183**) et β -sitostérol (**192**)], quatre (04) triterpènes [lupéol (**198**); bétulinaldéhyde (**199**); acide bétulinique (**200**) et acide ceanothique (**201**)], un (01) alcaloïde [allantoïne (**191**)] et quatre (04) composés phénoliques [acide syringique (**184**); acide 4-méthoxygallique (**185**); méthyle gallate (**189**) et acide gallique (**190**)]. Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C *J* modulé, COSY ^1H - ^1H , HSQC *J*- modulé, HMBC et NOESY), par la spectrométrie de masse (ESI-MS et HR-ESI-MS), par la mesure des pouvoirs rotatoires et par comparaison avec les données de la littérature.

Usant de la méthode bleue d'Alamar avec la rifampicine comme référence, cinq des molécules isolées ont été testées en vue de déterminer leurs activités inhibitrices sur deux souches mycobactériennes du complexe *Mycobacterium tuberculosis* de la lignée cellulaire humaine [AC45 (isolat clinique) et H₃₇RV (souche commerciale)]. Nos résultats montrent que les molécules testées : le distemonanthoside (**182**); le sitostérol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**183**); la 6''-*O*-acétylvitexine (**187**); la quercétine (**186**) et la catéchine (**197**) présentent des activités modérées avec des valeurs de CMI comprises entre 31,25 et 125,00 $\mu\text{g/ml}$ sur les souches suscitées.

Les extraits méthanoliques de *D. benthamianus* et de *C. arereh* ont par contre montré une faible activité inhibitrice vis-à-vis desdites souches.

Mots clés: *Distemonanthus benthamianus*, *Cassia arereh*, *Fabaceae*, distemonanthoside, *trans*-stilbéne, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

The work undertaken on two Cameroonian plants, namely: *Distemonanthus benthamianus* and *Cassia arereh* (Fabaceae), led to the isolation and characterization of twenty (20) natural compounds including two (02) new ones: one (01) flavonoid glycoside of flavone type, distemonanthoside (**182**), isolated from the bark of *D. benthamianus* and one (01) phenolic glycosidic compound derived from trans-stilbene, arerehioside (**196**), isolated from the bark of *C. arereh*. The other eighteen (18) known compounds are grouped in different classes: seven (07) flavonoids [quercetin (**186**); 6"-O-acetylvitexin (**187**); quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside (**188**); swertisin (**193**); swertiajaponin (**194**); luteolin (**195**) and catechin (**197**)], two (02) phytosterols [sitosterol 3-O-β-D-glucopyranoside (**183**) and β-sitosterol (**192**)], four (04) triterpenes [lupeol (**198**); betulinaldehyde (**199**); betulinic acid (**200**) and ceanothic acid (**201**)], one (01) alkaloid [allantoin (**191**)] and four (04) phenolic compounds [syringic acid (**184**); 4-methoxygallic acid (**185**); methyl gallate (**189**) and gallic acid (**190**)]. The molecular structures of the isolated compounds were elucidated mainly by the use of 1D and 2D NMR techniques (¹H, ¹³C *J* modulated, COSY ¹H-¹H, HSQC *J*-modulated, HMBC and NOESY), mass spectrometry (ESI-MS and HR-ESI-MS), by the measurement of rotational powers and by comparison with literature data.

Using the Alamar Blue method with rifampicin as reference, five of the isolated molecules were tested for their inhibitory activities on two mycobacterial strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex of the human cell line [AC45 (clinical isolate) and H37RV (commercial strain)]. Our results show that the tested molecules: distemonanthoside (182); sitosterol 3-O-β-D-glucopyranoside (183); 6"-O-acetylvitexin (187); quercetin (186) and catechin (197) present both moderate and low activities with MIC values ranging from 31.25 to 125.00 µg/ml on the aforementioned strains.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version) The methanolic extracts of *D. benthamianus* and *C. arereh* showed a weak inhibitory activity towards the strains.

Key Words: *Distemonanthus benthamianus*, *Cassia arereh*, *Fabaceae*, distemonanthoside, trans-stilbene, *Mycobacterium tuberculosis*.



INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La tuberculose (TB) est une maladie chronique contagieuse, dont l'agent étiologique principal chez l'homme est *Mycobacterium tuberculosis*. Elle demeure actuellement la principale cause de décès dans le monde au même rang que le VIH-SIDA (WHO, 2022). À l'échelle mondiale, selon les données notifiées, 10,6 millions de personnes ont été nouvellement diagnostiquées en 2021, soit une augmentation de 4,5 % par rapport à 2020, et que 1,6 million de personnes sont décédées de la tuberculose (dont 187 000 parmi les personnes séropositives pour le VIH). En 2019, l'Afrique est classée deuxième région par l'OMS ayant enregistré le plus grand nombre de nouveaux cas (25%), la première étant celle de l'Asie du Sud-Est (44 % de tous les nouveaux cas) (OMS, 2020). Avec 15 080 nouveaux cas en 2013 (NTCP, 2015), le Cameroun est un pays à forte incidence et prévalence de la tuberculose. Selon le ministre de la Santé publique, l'incidence de la tuberculose au Cameroun en 2022 était estimée à 174 nouveaux cas pour 100 000 habitants, ce qui correspondait à 50 000 cas pour l'ensemble de la population. Pour les sujets infectés par le bacille tuberculeux, le risque de développer la maladie à un moment quelconque de la vie se situe entre 5 % et 15 %. Ce risque est toutefois beaucoup plus élevé chez les personnes qui ont un système immunitaire déficient, notamment celles qui vivent avec le VIH (par exemple le pourcentage de patients signalés comme atteints de tuberculose disposant d'un résultat probant de test de dépistage du VIH en 2019 était de 69 %, soit une augmentation par rapport aux 64 % enregistrés en 2018) ou qui souffrent de diabète (OMS, 2020). L'infection à VIH a globalement un impact négatif sur l'évolution de la tuberculose en Afrique subsaharienne (ASS) (Maartens G & Wilkinson RJ, 2007). La tuberculose est donc un grave problème de santé publique dans le monde. Pour remédier à cette maladie, plusieurs antibiotiques sont utilisés depuis des décennies. C'est le cas de l'isoniazide, de la rifampicine, du pyrazinamide et de l'éthambutol (Astier *et al.*, 2017).

Actuellement, les traitements de la tuberculose impliquent un long cycle d'une combinaison d'antibiotiques qui provoquent des effets indésirables conduisant à une mauvaise observance du patient et qui contribue à l'apparition de la tuberculose Multirésistante (TB-MR). Cette pharmacorésistance apparaît quand les médicaments antituberculeux ne sont pas utilisés convenablement. Cette dernière vient donc ajouter un autre problème à la gestion de la tuberculose (elle représente près de 3 % de tous les nouveaux cas de tuberculose signalés) (OMS, 2020). Par conséquent, le développement de nouveaux agents anti-mycobactériens peu toxiques pouvant réduire la prévalence de la tuberculose est devenue une urgente nécessité (Lounis *et al.*, 2010 ; Kamal, 2019).

Les produits naturels jouent un rôle très important dans le processus de découverte et de développement des médicaments (Newman *et al.*, 2003). D'où, un regain pour les plantes médicinales comme sources potentielles des nouveaux médicaments antituberculeux. Les produits à base de plantes médicinales de la famille des Fabaceae ont longtemps été utilisés comme antibactériens dans la médecine traditionnelle, pour le traitement de nombreuses maladies. Ces plantes médicinales présentent des avantages d'être bien tolérées par les patients, avec moins d'effets secondaires que les produits synthétisés et peuvent être plus sûrs à utiliser au fil du temps (Cragg et Newman, 2013 ; Sudjarwo *et al.*, 2017). La découverte des nouveaux composés antibactériens isolés des plantes est donc devenue l'une des alternatives pour les traitements des maladies telles que la tuberculose, le cancer et bien d'autres, car elles sont riches en différents métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les saponines et les composés phénoliques avec des propriétés anti-mycobactériennes (Jyoti et Rajeshwari, 2012).

Dans cette optique, le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles apporte sa contribution dans la recherche des composés bioactifs à partir de la biodiversité camerounaise. Notre stratégie de recherche consiste en la sélection des familles de plantes connues pour leur richesse en métabolites secondaires en se basant essentiellement sur des critères ethnobotaniques. C'est dans ce cadre que, deux plantes de la famille des Fabaceae ont retenu notre attention : *Cassia arereh* et *Disthemonanthus benthamianus*. D'ailleurs, selon des études antérieures, les genres botaniques auxquels elles appartiennent, présentent un intérêt potentiel dans le domaine pharmaceutique (Ngulde *et al.*, 2010 ; Adeniyi et Odumosu (2012) ; Imam *et al.*, 2013 ; Salihu et Ado (2013) ; Tirfe *et al.*, 2015 ; et Yousseu *et al.*, 2019).

Ce travail a pour objectif principal d'isoler et évaluer le potentiel antituberculeux des composés issus des deux plantes médicinales camerounaises : *C. arereh* et *D. benthamianus* (Fabaceae). Plus spécifiquement il s'agit :

- * D'identifier et/ou de caractériser les composés isolés ;
- * D'évaluer leur potentiel antituberculeux sur une souche résistante AC45 à l'isoniazide et une souche sensible H₃₇Rv à l'imipénème ;

Notre travail sera divisé en trois chapitres principaux.

Le premier concerne la revue de la littérature ; le deuxième, portant sur les résultats et discussion, a trait à nos travaux personnels. Enfin, le troisième, qui se réfère à la partie expérimentale, présentera le matériel, les protocoles et les méthodes utilisées. Il est suivi de la présentation d'une liste des références bibliographiques, et en annexe, une liste de publications issues des travaux de cette thèse.



CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1. DESCRIPTION BOTANIQUE ET ETHNOPHARMACOLOGIQUE

I.1.Présentation de la famille des Fabaceae

I.1.1. Description Botanique de la famille des Fabaceae

Les Fabaceae, encore appelées famille des haricots, des pois ou des légumineuses, font partie de la troisième plus grande famille des plantes à fleurs sur terre. Cette famille comprend de nombreux arbustes, arbres et autres plantes herbacées, qui se différencient principalement par leurs feuilles et leurs fruits (Haston *et al.*, 2009). Elle comprend près de 751 genres et environ 19 500 espèces différentes, qui sont largement distribués dans les forêts sèches d'Afrique, d'Amérique et des forêts tropicales humides (Burnham *et al.*, 2004 ; Christenhusz *et al.*, 2016).

Les Fabaceae sont après les Astéraceae la seconde « famille » des triporées (Dupont et Guignard, 2012). Leurs racines sont généralement pivotantes permettant une association fréquente des légumineuses aux graminées, avec des systèmes racinaires compatibles (Peirs, 2005). Les Fabaceae sont des plantes à métabolisme azoté élevé et acides aminés inhabituels, leurs nodules racinaires contiennent des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*).

Les feuilles sont généralement alternes, composées pennées (ou bipennées) à composés palmés, trifoliolés, ou unifoliolés. Elles sont entières à parfois dentées-serrées, à nervation pennée. Les folioles sont parfois transformées en vrilles. Ces plantes sont constituées de renflements moteurs à la base de la feuille et des folioles bien développées, produisant généralement des mouvements de veille et de sommeil. Les stipules sont présentes, minuscules à foliacées, parfois transformées en épines. Les Inflorescences sont presque toujours indéterminées, parfois réduites à une fleur solitaire, terminales ou axillaires. Les fleurs sont généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à hypanthium court, généralement cupuliforme. Les sépales sont généralement au nombre de 5, libres ou soudés, valvaires ou imbriqués, tous semblables, ou le pétale postérieur différent par la forme, la taille et la couleur, disposé intérieurement ou extérieurement dans le bouton, les deux pétales inférieurs étant souvent soudés ou adhérents et formant une carène, ou largement étalés. Les étamines sont parfois nombreuses, mais généralement au nombre de 10, abritées dans le périanthe ou longuement exsertes, parfois bien évidentes. Les grains de pollen sont tricolporés, tricolpés, ou triporés, généralement en monades, mais parfois en tétrades ou en polyades. Le carpelle est souvent unique, libre, généralement allongé, au sommet d'un court gynophore. L'ovaire est supère, à placentation pariétale. Le fruit est généralement une gousse,

parfois une samare, un fruit lomentacé, une gousse indéhiscente, un akéne, une drupe et une baie (Judd *et al.*, 2002).

I.1.1.2. Répartition géographique de la famille des Fabaceae

Le principal centre de diversité des Fabaceae est situé en Amérique du centre et du sud. D'autres centres de diversité sont localisés également en Afrique et en Asie (Ndayishimiye, 2011). En général, les Fabaceae sont distribuées dans tous les biomes terrestres. Cependant, leur répartition varie selon la sous-famille. Ils sont organisés en trois sous groupes qui sont considérées comme étant des sous familles. Les Caesalpinioideae occupent surtout les régions tropicales et subtropicales de l'Amérique, de l'Afrique et de l'Asie. Les Mimosoideae dominent les régions tropicales et subtropicales, ils colonisent aussi les zones arides et semi-arides de l'Afrique, de l'Amérique et de l'Australie (Ndayishimiye, 2011).



Figure 1 : Carte de répartition géographique des Fabaceae (Boutaghane, 2013).

I.1.1.3. Usages ethnopharmacologiques de la famille des Fabaceae

Traditionnellement, diverses espèces de la famille des Fabaceae sont utilisées pour soigner différentes affections (Rahman *et al.*, 2014). Les racines de *Glycyrrhiza glabra* sont utilisées dans le monde entier pour soigner la toux (Rahman *et al.*, 2014). Dans le système de médecine ayurvédique, certaines espèces de la famille des Fabaceae (*Dialium englerianum* Henriq, *Cassia vecidentalis*, *Milletia versicolor* Welw, *Erythrophleum africanum*, *Erythrina mildbraedii*...) sont utilisées pour soigner les maux de tête et la fièvre (Singh *et al.*, 2013). Ils sont également utilisés pour traiter les plaies, infections cutanées, y compris l'eczéma, la gale,

la teigne, la jaunisse, l'anorexie, les rhumatismes et les problèmes gastro-intestinaux (Silva *et al.*, 2008).

I.1.1.4. Position systématique de la famille des Fabaceae

Le monophylétisme des Fabaceae est attesté par de nombreux caractères morphologiques. Généralement, cette famille se subdivise en trois sous-groupes : les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Faboideae (Papilionoideae). Les Faboideae sont cosmopolites, alors que les Mimosoideae et les Caesalpinioideae sont plutôt tropicales. Dans la plupart des classifications (Tableau I), ces groupes sont considérés comme des sous familles, mais sont souvent traités comme des familles indépendantes. Le concept « Leguminosae » est lui utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist) (Judd *et al.*, 2002 ; Spichiger *et al.*, 2004).

Tableau I: Position systématique des Fabaceae selon différentes approches phylogénétiques ou morphologiques (Boutaghane, 2013)

/	Engler (1887-1915)	Cronquist (1988)	Thorne (1992)	APG III (2009)
Règne	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Embranchement	Embryophyta	Magnoliophyta	Spermatophytae	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermae	-	Angiospermae	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Magnoliidae	Eudicotyledonae
Sous-classe	Archichlamydeae	Rosidae	Rutanae	Rosidae
Ordre	Rosales	Fabales	Rutales	Eurosidae (Fabidees)
Sous-ordre	Leguminosineae	-	Fabineae	Fabales
Famille	Leguminosae	Fabaceae (papilionaceae) Mimosaceae Caesalpinaceae	Fabaceae	Fabaceae (Leguminosae)
Sous-famille	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae	-	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae Swartzioideae	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae

Mais selon Dupont et Guingnard (2012), Les Fabaceae peuvent être réparties en 4 sous-familles à savoir :

- ❖ La sous-famille de Bauhinioïdes, avec les arbres à Orchidées (Bauhinia) et les arbres de Judée (Cercis) ;
- ❖ La sous-famille des Mimosoideae ;
- ❖ La sous-famille des Caesalpinioideae ;
- ❖ La sous-famille des Papilionoideae ou Faboïdeae.

I.1.1.5. L'intérêt thérapeutique de la famille des Fabaceae

Les plantes de la famille des fabaceae ont été utilisées pendant de nombreuses années dans la médecine traditionnelle pour traiter les rhumatismes, l'arthrite, l'inflammation, le néoplasme, l'hémorroïde, la bronchite, l'asthme, les infections des voies urinaires et les maladies du foie. Il est rapporté que la famille des Fabaceae a une riche teneur d'acides phénoliques et de flavonoïdes (Demir *et al.*, 2019).

I.1.1.6. L'intérêt économique de la famille des Fabaceae

Les fabaceae sont pour la plupart des plantes alimentaires. Leurs différentes parties entrent dans l'alimentation humaine et animale : c'est le cas du soja, des pois, des haricots (Petit, 2011).

I.1.1.7. Toxicité de certaines espèces de la famille des Fabaceae

D'après Ati (2018), un nombre non négligeable de Fabaceae est toxique et il est important de noter que son ordre comporte plus de 16000 espèces dangereuses. Après avoir cité quelques intérêts thérapeutiques et économiques, il serait utile d'attirer l'attention sur un certain nombre d'espèces dangereuses. Les parties le plus souvent incriminées dans les empoisonnements sont les graines où sont accumulés les principes toxiques. *Tephrosia vogelii* par exemple est utilisée comme poison de pêche, et pour la désinfection des animaux domestiques et les habitations car elle possède des propriétés insecticides (Ati, 2018).

Certaines espèces du genre *Coronilles*, sont toxiques à certains moments de leur développement. Spontanément, le bétail évite de les consommer à ces périodes (Ati, 2018). Le mélilot connu pour ses propriétés thérapeutiques devient toxique à de très fortes doses, il provoque divers troubles et se montre émétique. Lorsque le mélilot moisit, la coumarine se transforme en dicoumarol, substance toxique utilisée pour tuer les rats et les souris par hémorragie interne (Ati, 2018).

I.1.1.8. Statistique des genres, d'espèces de la famille des Fabaceae dans le monde.

Le tableau II ci-dessous représente le nombre de genres, d'espèces de Fabaceae recensés au niveau mondial. Les données indiquées par Lebrun et Stork (2008) concernent les statistiques des Fabaceae pour l'Afrique (Ndayishimiye, 2011).

Tableau II: Statistique des genres, d'espèces de la famille des Fabaceae dans le monde.

Sous-Famille	Allen et Allen (1981)		Mabberley (1997)		Lewis et al (2005)		Lebrun et Stork (2008)	
	Genres	Espèces	Genres	Espèces	Genres	Espèces	Genres	Espèces
Caesalpinioideae	177	2800	153	2175	171	2251	84	501
Faboideae	505	14000	426	12150	478	13805	138	2111
Mimosoideae	66	2900	64	2950	82	3271	25	236
Total	748	19700	643	17275	731	19327	247	2848

Notre attention sera portée particulièrement sur la sous-famille des Caesalpinioideae qui fait l'objet de notre étude.

I.1.1.9. Présentation de la sous-famille des Caesalpinioideae

Caesalpinioideae constituent l'une des trois sous-familles appartenant à la famille des Fabaceae. Avec 171 genres et 2250 espèces (Bruneau *et al.*, 2013), cette famille de dimensions moyennes se situe dans l'ordre des Fabales avec 3 autres familles : les Mimosaceae, les Papilionaceae et, un peu à part, les Polygalaceae.

Les Caesalpinioideae forment une sous-famille paraphylétique et basale au sein de la famille des Fabaceae (Doyle *et al.*, 2000 ; Bruneau *et al.*, 2001). La phylogénie des Caesalpinioideae reste cependant peu connue par rapport à celle des deux autres sous-familles. Les Caesalpinioideae sont principalement des arbres et des arbustes tropicaux et subtropicaux. Centrées sur les forêts et savanes des régions tropicales de basse altitude, les Caesalpinioideae sont presque absentes des régions à hivers froids. Les Caesalpinioideae, généralement constituées d'arbres tropicaux sont exploitées pour leur bois ou leurs fruits. Cette famille compte aussi beaucoup d'arbustes (*Brownea*, *Cassia*, *Cynometra*, *Intsia*) souvent des ornementaux (*Caesalpinia*, *Cassia*) et beaucoup de lianes (*Bauhinia*, *Mezoneuron*) (Pedley, 1997). Les feuilles sont généralement pennées, parfois bipennées. Les fleurs sont plus ou moins irrégulières avec des pétales latéraux couvrant l'étendard dans le bouton. Elles comportent 10 étamines (ou moins), libres ou monadelphes. Par contre, les herbes sont peu fréquentes (*Senna occidentalis*), rarement annuelles et adaptées aux latitudes à hivers froids. C'est le cas de *Chamaecrista fasciculata* dans l'Est des États-Unis. Les feuilles sont alternes, généralement distiques, moins souvent disposées en spirale, pennées, bipennées, plus rarement simples. La floraison est terminale ou latérale, parfois en position cauliflore. Certaines Caesalpinioideae vivent en symbiose racinaire avec des bactéries *Rhizobium* fixant l'azote atmosphérique. Pendant la nuit, de nombreuses espèces rabattent leurs folioles les unes contre les autres, vers le haut ou vers le bas. Il existe quatre tribus au sein des Caesalpinioideae

: les Caesalpinieae, les Cassieae, les Cercideae et les Detarieae. Les relations entre ces tribus à l'intérieur d'elles-mêmes restent problématiques malgré de récentes études moléculaires (Doyle *et al.*, 2000 ; Bruneau *et al.*, 2001) et morphologiques (Herendeen *et al.*, 2003). De cette sous-famille, seuls les genres *Distemonanthus* et *Cassia* feront l'objet de notre étude.

I.2. GÉNÉRALITÉS SUR LE GENRE *DISTEMONANTHUS*

Le genre *Distemonanthus* appartient à la famille des Fabaceae, sous-famille des Caesalpinioideae et est originaire d'Afrique occidentale et équatoriale. Ce genre ne comporte qu'une unique espèce acceptée : *Distemonanthus benthamianus*.

I.2.1. Généralités sur *Distemonanthus benthamianus*

Distemonanthus benthamianus est une espèce de plantes dicotylédones de la famille des Fabaceae, sous-famille des Caesalpinioideae, originaire d'Afrique occidentale et équatoriale. Elle a été décrite pour la première fois par Bail en 1870 (Bidie *et al.*, 2011, Yousseu *et al.*, 2019). En Afrique, plusieurs noms vernaculaires leur sont attribués.

Les autres noms communs de *D. benthamianus* sont : Movingui (Gabon), Barre (Côte d'Ivoire), Bonsamdua (Ghana), Eyen (Sud Cameroun), Ayan (Nigéria). Les noms vernaculaires sont : Eyen, byèn, eyèn, eli-bengang (Fang : Gabon, Guinée Equatoriale et Cameroun), ogèminyà (mpongwès, orungu : Nigéria) ovwèndjo (galoa : Ghana), muvèngè (bavili, baduma, banzabi : Gabon), muvèngi (éshira, bavarama, bavungu, bapunu, balumbu, masangu : Gabon) ovèngè (apindji, bavové, mitsogo, simba : Côte d'Ivoire), mwènzì (loango : RDC) ; mukumbu (mindumu : RDC), kumbu (béséki). Les noms commerciaux sont movingui (Côte d'Ivoire, France, Nigeria), ayan, anyaran (Grande Bretagne, Nigéria), barré, guétalie, koa (Côte d'Ivoire), bonsamdua, duabai (Ghana), okpe (Togo), bosong, eyen, sella (Cameroun) ; eyen, bien (Guinée Equatoriale) (Richter et Dallwitz, 2000).

D. benthamianus se rencontre dans plusieurs pays d'Afrique de l'ouest et du centre.

I.2.2. Distribution géographique de *Distemonanthus benthamianus*

L'aire de répartition de *D. benthamianus* s'étend de la Guinée en passant par la Sierra Leone, la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Nigeria jusqu'au Cameroun, et vers le sud jusqu'au Gabon et au Congo méridional. On la rencontre plus fréquemment dans les forêts du Gabon ainsi que du Cameroun, pays où il semble le plus abondant (Nguelefack *et al.*, 2005 ; Bidie *et al.*, 2011).

Tableau III: Classification botanique de *Distemonanthus benthamianus*

Règne	Plantae
Clade	Angiospermes Dicotylédones vraies Noyau des Dicotylédones vraies Rosidées Fabidées
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Caesalpinioideae
Tribu	Cassieae
Sous-tribu	Dialiinae

I.2.4. Description botanique de *Distemonanthus benthamianus*

C'est l'un des plus grands arbres à feuilles persistantes avec 90 à 125 m de hauteur (Dickinson *et al.*, 1945).

D. benthamianus est un arbre de taille grande, caducifolié ; dépourvu de branches sur 25 m, généralement droit et cylindrique, atteignant parfois jusqu'à 130 cm de diamètre, avec des contreforts courts et arrondis. La surface de l'écorce de *D. benthamianus* est lisse, de couleur variable allant d'orange à rouge, de vert pâle à jaunâtre ; se désquamant par grandes plaques irrégulières, avec une écorce interne fine, fibreuse et une sève crêmeuse de couleur orange ou rose-brun utilisé comme poison pour poisson (Nguelefack *et al.*, 2005 ; Owusu et Louppe, 2012 ; William *et al.*, 2019).

C'est un assez bel arbre, remarquable par son tronc rougeâtre, plus souvent droit et cylindrique. Ses longues racines traçantes sont très minces. Son bois est de couleur jaune clair et très flexible. Ses feuilles alternes, sont composées et pennées souvent rachis légèrement pubescent-ferrugineux. Les inflorescences en panicules ferrugineuses, sont étalées horizontalement. Ses fleurs sont inodores de couleur lie de vin. La gousse plate, est indéhiscente, parcheminée et lisse avec des petites graines brunes et plates (White, 1996).

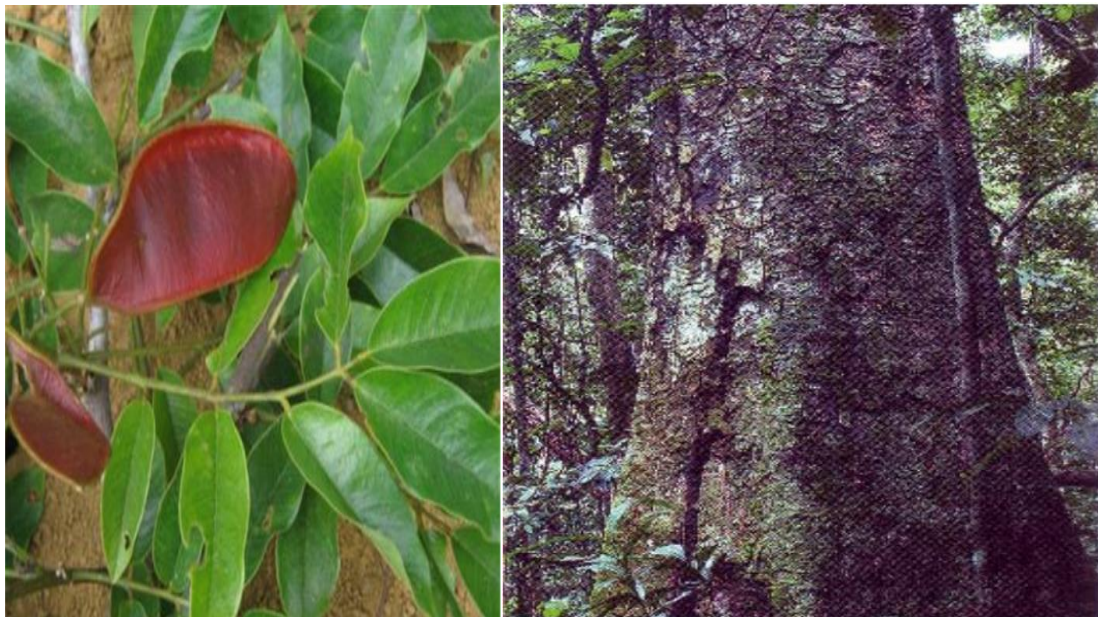


Figure 3 : Photographie de *Distemonanthus benthamianus* (Evina., 2014 à Eséka (koumoul)).

I.2.5. Usages ethnopharmacologiques de *Distemonanthus benthamianus*

D. benthamianus est une espèce très répandue en Afrique où elle est largement utilisée pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. Sur le plan ethnopharmacologique, les écorces, les feuilles et les racines de cette plante sont utilisées pour traiter de nombreuses pathologies

parmi lesquelles les troubles nerveux, la constipation, les troubles digestifs et l'hydropisie. Une décoction du mélange de feuilles et d'écorce est utilisée pour traiter de nombreuses infections bactériennes (Nguelefack *et al.*, 2006). Au Cameroun, son écorce est traditionnellement utilisée pour traiter les cas de diarrhée, les troubles hématologiques, les dermatites, les ulcères gastriques et les infections urogénitales (Adeniyi *et al.*, 2011). Dans la région de l'ouest du Nigéria, les Yorubas utilisent la tige et les racines comme bâtonnet à mâcher pour l'hygiène bucco-dentaire (Nduckwe *et al.*, 2005).

Son écorce est beaucoup utilisée en médecine traditionnelle africaine pour traiter les infections bactériennes, virales et les mycoses (Nguelefack *et al.*, 2005). Broyée, elle est utilisée pour traiter les maladies de la peau (abcès, furoncles), des palpitations et permet de lutter contre l'hépatite. Elle est également utilisée pour des troubles sanguins (infections parasitaires cutanées) et comme laxatif. Et le colorant extrait est utilisé comme un analgésique ou pour décorer le corps. Une décoction chaude d'écorce est utilisée pour traiter la bronchite, le rhumatisme, la fièvre et le paludisme. L'arbre est utilisé lors de nombreuses cérémonies rituelles (Nguelefack *et al.*, 2005 ; Owusu et Louppe, 2012).

Les plantes de ce genre ont déjà fait l'objet d'études chimiques et biologiques.

I.3. ÉTUDES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES ANTÉRIEURES

I.3.1. Constituants chimiques du genre *Distemonanthus*

Plusieurs études ont montré que les extraits de *D. benthamianus* sont riches en alcaloïdes, flavonoïdes, polyphénols, saponines, stérols, tanins et triterpènes (Nguelefack *et al.*, 2006 ; Yousseu *et al.*, 2019).

Les études chimiques réalisées jusqu'à présent sur *D. benthamianus* ont mis en exergue la présence de deux classes de métabolites secondaires à savoir les acétophénones et les flavonoïdes ; ces derniers étant les plus abondants.

I.3.1.1. Les flavonoïdes

Les études entreprises par Happ, 1994 et Malan et al, 1979 ont permis d'isoler du bois de cette plante des flavonoïdes appartenant à la classe des flavan-3-ol. Le tableau ci-dessous représente les flavonoïdes déjà isolés de ces espèces.

Tableau IV: Quelques flavonoïdes isolés de *Distemonanthus benthamianus*

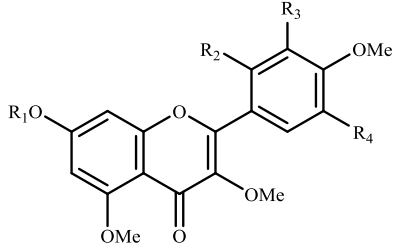
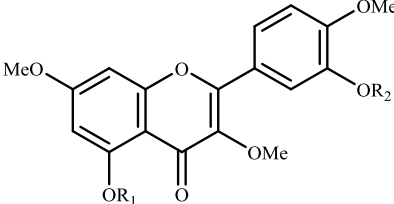
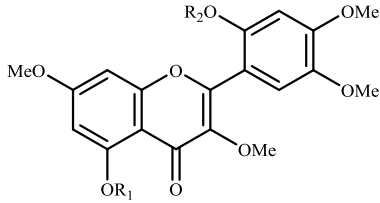
Structures et noms	Sources	Références
 <p>1 R₁=Me, R₂=OMe, R₃=H, R₄=OH: 5'-hydroxy-3,5,7,2',4'-pentamethoxyflavone</p> <p>2 R₁=R₂=R₄=H, R₃=OMe : quercétine-3,5,3',4'-tétraméthyl ether</p> <p>3 R₁=Me, R₂=OMe, R₃=H, R₄=OAc: 5'-acetoxy-3,5,7,2',4'-pentaméthoxyflavone</p>	bois de chauffage (tronc)	Happi, 1994
 <p>4 R₁=H, R₂=Me : quercétine-5-hydroxy-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone</p> <p>5 R₁=R₂=H : ayanine</p> <p>6 R₁=R₂=Me : 3,4',5',5,7-pentaméthoxyflavone</p> <p>7 R₁=R₂=Ac: 5',5-diacetoxy-3,4',7-triméthoxyflavone</p> <p>8 R₁=Ac, R₂=Me: 5-O-acétyl-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone</p>  <p>9 R₁=H, R₂=Me : 5-hydroxy-2',3,4',5',7-pentaméthoxyflavone</p> <p>10 R₁=R₂=H : 2',5-dihydroxy-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone</p> <p>11 R₁=Me, R₂=H : 2'-hydroxy-3,4',5',5,7-pentaméthoxyflavone</p> <p>12 R₁=R₂=Me: 2',3,4',5',7-hexaméthoxyflavone</p> <p>13 R₁=Me, R₂=Ac : 2'-acétoxy-3,4',5',5,7-pentaméthoxyflavone</p> <p>14 R₁=R₂=Ac : 5-acétoxy-2',3,4',5',7-pentaméthoxyflavone</p>	Cœur du bois	Malan et al., 1979

Tableau IV (Suite)

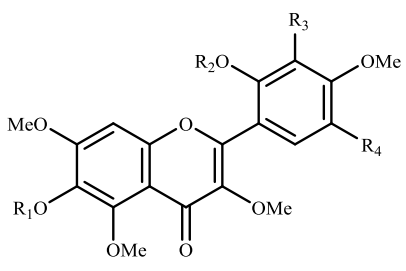
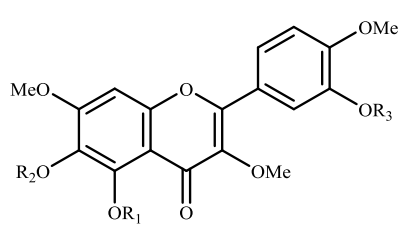
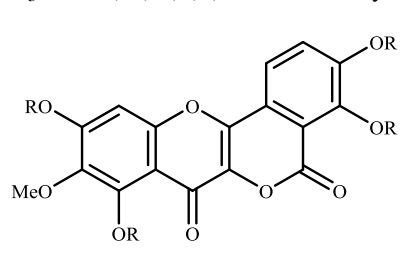
<p>15 $R_1=R_2=Ac$: 2',5-diacétoxy-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone</p>		
<p>16 $R_1=H, R_2=Ac$: 2'-acétoxy-5-hydroxy-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone</p>		
		
<p>17 $R_1=R_2=R_3=H, R_4=OMe$: 2',6-dihydroxy-3,4',5',5,7-pentaméthoxyflavone</p>		
<p>18 $R_1=R_2=Me, R_3=OMe, R_4=H$: 2',3,3',4',5,6,7-heptaméthoxyflavone</p>		
<p>19 $R_1=R_2=Ac, R_3=H, R_4=OMe$: 2',6-diacétoxy-3,4',5',5,7-pentaméthoxyflavone</p>		
<p>20 $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$: 2',3',3,4',5,6,7-heptahydroxyflavone</p>	Cœur du bois	Malan <i>et al.</i> , 1979
<p>21 $R_1=R_2=R_4=H, R_3=Ac$: 2'-acétoxy-5-hydroxy-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone</p>		
		
<p>22 $R_1=R_2=R_3=H$: oxyyanine B</p>		
<p>23 $R_1=R_2=H, R_3=Me$: 5,6-dihydroxy-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone</p>		
<p>24 $R_1=R_2=Ac, R_3=Me$: 5,6-diacétoxy-3,4',5',7-tétraméthoxyflavone</p>		
<p>25 $R_1=H, R_2=R_3=Me$: 5-hydroxy-3,4',5',6,7-pentaméthoxyflavone</p>		
<p>26 $R_1=R_3=Me, R_2=H$: 6-hydroxy-3,4',5',5,7-pentaméthoxyflavone</p>		
<p>27 $R_1=R_2=R_3=Ac$: 5',5,6-triacétoxy-3,4',7-triméthoxyflavone</p>		
<p>28 $R_1=R_2=R_3=Me$: 3,4',5',5,6,7-hexaméthoxyflavone</p>		
		

Tableau IV (Suite)

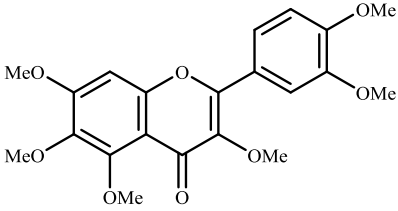
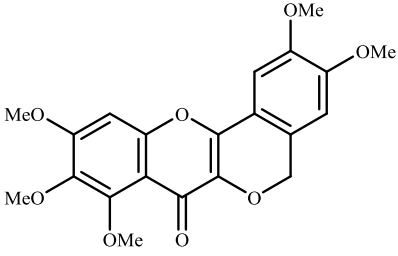
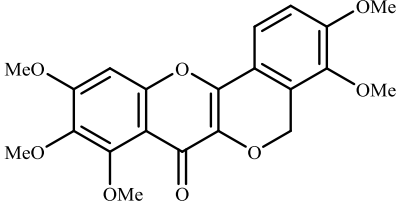
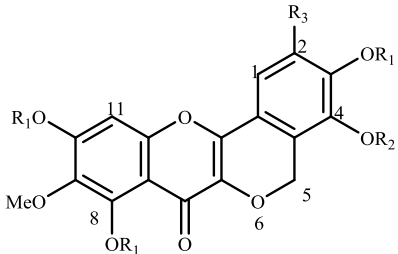
<p>29 R=Ac : distemonanthine tétra-acétate</p> <p>30 R=Me: distemonanthine tétraméthyl ether</p>  <p>31 Oxyayanine B trimethylether</p>  <p>32 Peltogynine</p>  <p>33 mopanine</p>	Cœur du bois	Malan <i>et al.</i> , 1979
 <p>34 R₁=R₃=H, R₂=OH: 3,4,8,10-tétrahydroxy-9-méthoxy-7-oxo[2]benzopyrane[4,3-b][1] benzopyran, benthamianine</p> <p>35 R₁=Ac, R₂=OAc, R₃=H: benthamianine tétra-acétate</p> <p>36 R₁=Me, R₂=OMe, R₃=H: benthamianine tétraméthyl ether</p> <p>37 R₁=Me, R₂=H, R₃=OMe: 5,6-diméthoxypeltogynine triméthyl ether</p>	Cœur du bois	Malan <i>et al.</i> , 1980

Tableau IV (Suite)

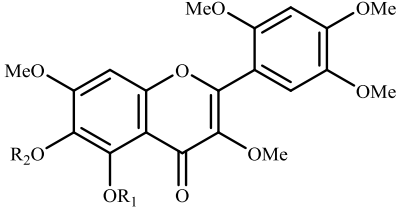
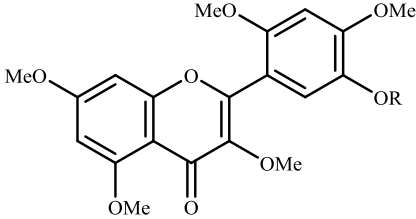
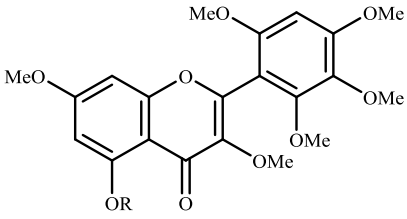
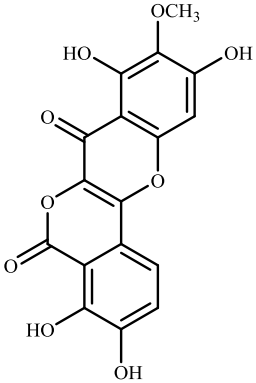
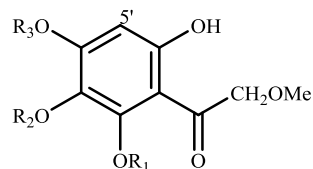
 <p> 38 $R_1=R_2=Ac$: 5,6-diacétoxy-3,7,2',4',5'-pentaméthoxyflavone 39 $R_1=H, R_2=Ac$: 6-Acétoxy-5-hydroxy-3,7,2',4',5'-pentaméthoxyflavone 40 $R_1=R_2=H$: 5,6-dihydroxy-3,7,2',4',5'-pentaméthoxyflavone 41 $R_1=R_2=Et$: 5,6-diéthoxy-3,7,2',4',5'-pentaméthoxyflavone 42 $R_1=H, R_2=Et$: 6-éthoxy-5-hydroxy-3,7,2',4',5'-pentaméthoxyflavone 43 $R_1=R_2=Me$: 3,5,6,7,2',4',5'-heptaméthoxyflavone </p>	Cœur du bois	Malan et al., 1980
 <p> 44 $R=H$: 5'-hydroxy-3,5,7,2',4'-pentaméthoxyflavone 45 $R=Ac$: 5'-acétoxy-3,5,7,2',4'-pentaméthoxyflavone </p>  <p> 46 $R=H$: 5'-hydroxy-3,7,2',3',4',6'-hexaméthoxyflavone 47 $R=Ac$: 5-acétoxy-3,7,2',3',4',6'-hexaméthoxyflavone </p>	Cœur du bois	Malan et al., 1990
	Cœur du bois	Malan et al., 1993

Tableau IV (Suite et fin)

48	distemonanthine	
<div data-bbox="331 286 794 672" style="text-align: center;"> </div>	bois du cœur	Malan et al., 1994
49	R ₁ =H : oxyyanine A	
50	R ₁ =Ac : oxyyanine B	

I.3.1.2. Cas des acétophenones

La littérature fait état de deux molécules d'acétophénone, isolées du cœur de bois de *D. Benthamianus* (Malan et al., 1980).



51 R₁=R₂=Et, R₃=Me : 2',3'-Diéthoxy-6'-hydroxy-2,4'-diméthoxyacetophenone

52 R₁=R₃=Et, R₂=Me : 2',4'-Diéthoxy-6'-hydroxy-2,3'-diméthoxyacetophenone

I.3.2. Activités biologiques de *Distemonanthus benthamianus*

Plusieurs études ont été réalisées relatives à son effet sur les activités antioxydantes, antitumorales, antituberculeuses, bactéricides, antivirales. Ainsi de nombreux travaux de recherches ont démontré les bio-activités des phyto-composés issus de *D. benthamianus*.

I.3.2.1. Activités antibactériennes

Le potentiel antimicrobien de *D. benthamianus* a été évalué par plusieurs chercheurs. Les travaux de Mebude et al. (2017) effectués sur l'extrait éthanolique des brindilles fraîches de *D. benthamianus* sur *Streptococcus mutans* en utilisant la méthode par diffusion sur puits d'agar, ont présenté une activité antibactérienne significative contre les souches de

Streptococcus mutans (PHM50, PHM22, PHM40 et PHM06) avec des CMI et CMB comprises entre 15,6 µg/mL à 1000 µg/mL et 31,25 µg/mL à 1000 µg/mL respectivement.

L'activité antibactérienne *in vitro* de l'extrait au méthanol des racines de *D. benthamianus* a été réalisée en utilisant la méthode par diffusion sur puits d'agar contre des souches standard de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 ainsi que certains isolats cliniques de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* à différentes concentrations et ratios. Tous les micro-organismes testés étaient sensibles à l'effet inhibiteur des extraits à des concentrations de 200 mg/mL et 500 mg/mL. L'extrait a montré des zones d'inhibition allant de 17,7 à 26,7 mm à 200 mg/mL et 19,0 à 26,7 mm à 500 mg/mL avec des CMI et CMB comprises entre 6,25 mg/mL à 100 mg/mL et 25 à 200 mg/mL, respectivement. *D. benthamianus* pourrait donc être une solution dans la gestion des infections des voies urinaires, respiratoires et gastro-intestinales tout en contribuant à atténuer le problème de la résistance aux antimicrobiens (Shittu *et al.*, 2019).

I.3.2.2. Activités antiplasmodiales

L'extrait des tiges de *D. benthamianus* a montré des activités antiplasmodiales significatives avec un taux maximum de chimiosuppression de 77 % et 56 % dans les tests curatifs et suppressifs respectivement, et amélioration considérable du taux de survie. Une inhibition de 55 % dans les évaluations anti-inflammatoires a indiqué une activité modérée dans la réduction de l'inflammation. Dans le test PM, une capacité antioxydante totale de 18,75 gAAE/100 g a été obtenue tandis que dans le test DPPH, la CI_{50} était de 24,83 µg/mL. La dose létale médiane approximative de l'extrait (LD_{50}) était > 2000 mg/kg. Les résultats de cette étude montrent que l'extrait de tige de *D. benthamianus* possède de très bonnes capacités antipaludiques et est relativement sûr à de faibles concentrations (Ayisi *et al.*, 2021).

I.3.2.3. Activités anti-diarrhéiques

D. benthamianus est utilisé au Cameroun pour traiter les épisodes diarrhéiques. Son potentiel antidiarrhéique a été évalué sur des rats Wistar et des souris BALB/c. Dans le cas de la diarrhée induite par l'huile de ricin, une réduction significative ($p < 0,001$) de la fréquence des selles diarrhéiques a été observée avec 100, 200 et 300 mg/kg d'extrait aqueux, tandis que 400 mg/kg d'extrait méthanolique ont montré un effet maximal. La fréquence totale des selles a été significativement réduite ($p < 0,001$) avec des doses de 300 et 400 mg/kg d'extraits. Une protection maximale a été obtenue avec 400 mg/kg des deux extraits dans les diarrhées

induies par le sulfate de magnésium. Cette dose a significativement ($p < 0,001$) réduit l'excrétion de Na^+ , tandis que l'excrétion de Ca^{2+} a été significativement ($p < 0,001$) augmentée avec 100 mg/kg d'extrait aqueux. Les deux extraits ont significativement ($p < 0,01$, $p < 0,001$) réduit la masse et le volume des liquides intestinaux de manière similaire par rapport aux groupes témoins négatifs. La motilité intestinale a été significativement ($p < 0,001$) réduite avec 100 et 200 mg/kg d'extraits méthanolique et aqueux, respectivement. Les extraits sont donc des candidats aux remèdes antidiarrhéiques, puisqu'ils provoquent une diminution de la motilité intestinale, associée à une régulation des fluides et des électrolytes à travers l'intestin (William *et al.*, 2019).

I.3.2.4. Activités antifongiques

L'activité antifongique des extraits à l'hexane et au méthanol des tiges de *D. benthamianus* a été réalisée à l'aide de la méthode par diffusion sur puits d'agar contre des souches cliniques de *Candida albicans*, *Candida valida*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida glabrata*, les dermatophytes suivantes : *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitalis*, *T. tonsurans*, *Epidermophyton floccosum* et les souches standard de *C. albicans* (ATCC 90029), *C. krusei* (ATCC 6825) et *C. parapsilosis* (ATCC 22011). L'extrait au méthanol a montré une activité antifongique significative contre la plupart des espèces/isolats de champignons testés avec des zones d'inhibition entre 13 et 20 mm à la concentration testée. La CMI et la CMF de l'extrait ont été déterminées et étaient comprises entre 0,0625 à 2,00 mg/mL. L'incorporation de la matière organique (sérum 20%) a eu un effet réducteur sur la valeur de la CMI et l'étude cinétique a révélé une diminution du nombre d'organismes viables avec augmentation du temps de contact entre les organismes et l'extrait (Adeniyi *et al.*, 2011).

I.3.2.5. Activités anti-Inflammatoires

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par l'ingestion de la carragénine 1% au niveau de l'aponévrose plantaire des rats Wistars. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire ont montré que le diclofénac et l'extrait aqueux de la plante ont atteint leur activité maximale d'inhibition de l'œdème à la 3^{ème} heure avec une inhibition de 52,88 % et 44,95%, 60,03% et 70,19 aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg/pc respectivement. Quant à la prednisone, il a atteint son activité maximale de 26,66% à la 4^{ème} heure. L'inhibition de l'œdème des pattes des rats par l'extrait de la plante montre ainsi les propriétés anti-inflammatoires de cet extrait. L'utilisation de cette plante comme un anti-inflammatoire en milieu naturel serait donc justifiée. (John *et al.*, 2021).

I.4. GÉNÉRALITÉS SUR LE GENRE *CASSIA*

I.4.1. Distribution géographique du genre *Cassia*

Les plantes du genre *Cassia* se trouvent dans diverses régions, principalement en Asie (Chine, Inde, Pakistan, Birmanie, Yémen, Sri Lanka, Laos, Annam, Cambodge et en Thaïlande). On les rencontre aussi généralement dans des régions telles que l’Afrique du Sud, Afrique de l’Est, les Antilles, l’Amérique, le Brésil et le Mexique ; et très souvent dans certains pays d’Afrique de l’Ouest comme la Tanzanie, le Ghana et le Sénégal et même dans le Sud de l’Arabie saoudite et en Afrique tropical (Nasir *et al.*, 1972 ; Vaidya, 1994 ; Tripathi, 1999 ; Kirtikar *et al.*, 1987).



Figure 4: Carte de répartition géographique des *Cassia* (Nasir *et al.*, 1972 ; Ghanzanfar, 1989).

I.4.2. Description botanique du genre *Cassia*

Les espèces du genre *Cassia* ont des fleurs jaune vif à disposition axillaire ou subsolaire. Les plantes du genre *Cassia* ont cinq calices (imbriqués, tube court), cinq pétales (imbriqués, sous-égal) et dix étamines parfaites ou sous-égales. Le fruit est parfois indéhiscent, boisé et comprimé. Des graines sont principalement endospermiques (Nasir *et al.*, 1972 ; Ghanzanfar, 1989).

I.4.3. Classification botanique du genre *Cassia*

Dans la classification courante, le genre *Cassia* comprenait 650 espèces mais, par la suite, les genres *Chamaecrista* et *Senna* ont été créés et le genre *Cassia* a été réduit à une trentaine d'espèces, voire moins.

Dans la classification de Cronquist (1981) des angiospermes, le genre *Cassia* est classé comme suit Tableau V.

Tableau V: Classification botanique de *Cassia*

Règne	Plantae
Sous-règne :	Tracheobionta ;
Division :	Magnoliophyta ;
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Caesalpinaceae

I.4.4. Usages ethnopharmacologiques des plantes du genre *Cassia*

Les espèces du genre *Cassia* sont utilisées pour l'atténuation et la facilité de diverses conditions physiopathologiques des temps anciens (Agarkar *et al.*, 1999). A l'ère actuelle, l'agent laxatif largement utilisé dans le monde est le séné (*Cassia senna*), qui est préparé à partir des folioles et des gousses séchées (fruits) de deux espèces de *Cassia* dont *C. acutifolia* et *C. angustifolia* (Agarkar *et al.*, 1999).

La décoction des racines de *C. abbreviata* prise par voie orale au Mozambique et en Tanzanie est utilisée pour lutter contre : la diarrhée, la constipation, le paludisme, les plaies, la morsure de serpent, la dysentérie et la syphilis (Ribeiro *et al.*, 2010 ; Mongalo *et al.*, 2013). Au Kenya la décoction des feuilles prise par voie orale est utilisée pour lutter contre le paludisme, la toux et l'épilepsie (Mongalo *et al.*, 2013). Ses fruits broyés puis chauffés sont utilisés pour lutter contre les infections oculaires (Ribeiro *et al.*, 2010) et son écorce de tige pour lutter contre les maux d'estomac et le paludisme au Mozambique (Mongalo *et al.*, 2013).

L'usage extrême de la pâte des graines de *C. absusa* en Inde permet de soigner les infections cutanées et ainsi que les types généraux de cancer (Hosamani, 1994 ; Ahmad *et al.*, 2018). Au Maroc cette même pâte mélangée au miel prise par voie orale permet la

cicatrisation des plaies et de lutter contre les teignes. En Inde lorsqu'elle est appliquée localement, l'usage de la pâte de ses feuilles permet de lutter contre les tumeurs (Kirtikar *et al.*, 1987).

Au Mexique, l'usage des feuilles de *C. acutifolia* sous forme d'infusion orale permet de lutter contre le diabète de type 2 (Kerim *et al.*, 2017). En Inde et en Somalie, ces mêmes feuilles sont consommées sous forme de thé comme laxatif (Duke, 2012).

En Inde et aux Philippines, la décoction des feuilles de *C. alata* est utilisée comme expectorant et aussi contre les crises d'asthme (Singh *et al.*, 2012). Egalement en Inde et en Guinée, ces feuilles sont utilisées comme purgatif, lotion d'eczéma et permettent aussi de lutter contre les infections de la teigne (Khare, 2007). L'extrait aqueux de ses racines permet de lutter contre les troubles de l'utérus au Suriname (Fernand *et al.*, 2008).

En Asie de l'Est notamment en Inde, Sri Lanka, Soudan, Arabie saoudite et ainsi qu'en Libye, les infusions de toutes les parties de *C. angustifolia* sont utilisées pour lutter contre la constipation, l'indigestion, la jaunisse, le paludisme, la splénomégalie, l'hépatomégalie et la perte d'appétit (Tripathi, 1999).

Les feuilles et les fruits de *C. auriculata* prises sous forme de thé par voie orale au Sri Lanka permette de lutter contre la fièvre chronique, le diabète et les helmenthes (Kirtikar *et al.*, 1918). En Inde la plante entière est utilisée comme pilules de leucorrhée (Kainsa *et al.*, 2012).

I.4.5. Généralités sur l'espèce *C. arereh*

I.4.5.1. Distribution géographique de *C. arereh*

Cassia arereh est un petit arbre ou arbuste sauvage de 2 à 5 m de hauteur ; connu sous différents noms locaux : Shitol hibey (Tigrigna), Kerkay (Agew), Malga, Maleduwa, Mihuski ou Dandarazo en haoussa ; Cabbi ou Jutihi en Fulfulde ; Mihuski à Gwari ; kurnggilang dans Babur-Bura et Maraguwa dans les langues Kare-kare (Gambo et Karofi, 2004 ; Blench, 2012). On le rencontre dans la savane soudanaise, sur un sol peu profond mais assez riche (Gambo et Karofi, 2004 ; Blench, 2012). On le trouve également dans le nord du Nigéria, Cameroun, Éthiopie et Érythrée. Il est distribué dans certaines régions de l'Éthiopie telles que les hautes terres du Tigré, Gondar, Gojam, Kefa et Shewa et est largement répandu

dans les savanes à herbes courtes du Soudan du sud (Tirfe *et al.*, 2015 ; Issa *et al.*, 2018), en Inde et en Afrique tropicale (Olusola *et al.*, 2011).

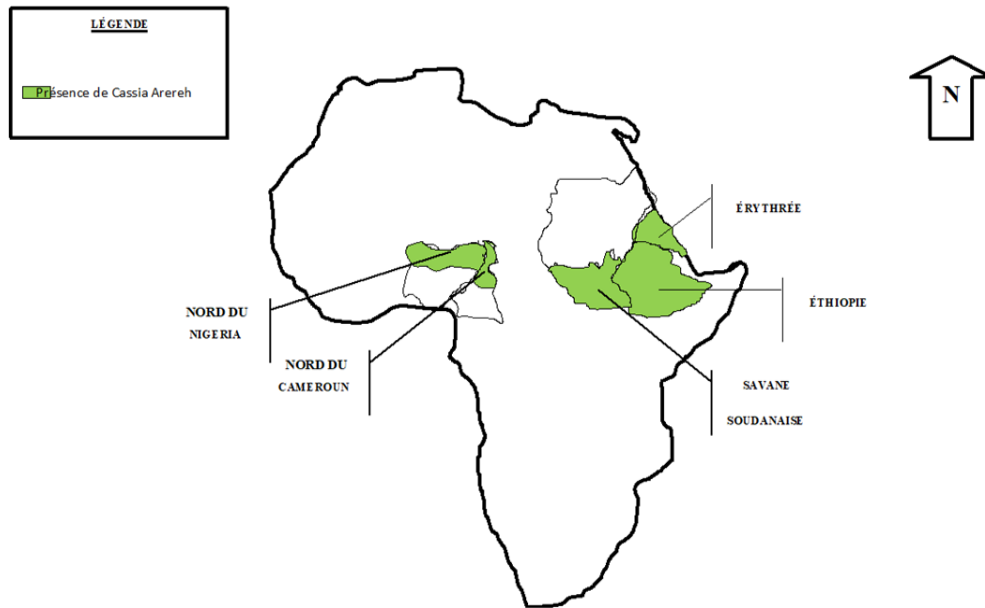


Figure 5: Carte de la répartition géographique de *Cassia arereh* en Afrique (Olusola *et al.*, 2011)

I.4.5.2. Classification botanique de *Cassia arereh*

La classification botanique de *Cassia arereh* est donnée dans le tableau ci-après (Tableau VI).

Tableau VI: Classification botanique de *Cassia arereh*

Sous-Genre	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Cassia</i>
Espèce	<i>Cassia arereh</i>

I.4.5.3. Description botanique de *Cassia arere*

C. arereh Del. (Caesalpiniaceae) est un petit arbre ou arbuste sauvage de 2 à 5 m de hauteur avec des feuilles composées pennées, des inflorescences terminales, des racines courtes, ses fleurs de couleur jaune et des fruits sont sous forme de gousses cylindriques atteignant 35 cm de long, brunes, longues, verticalement déhiscent constitués de nombreuses graines. C'est une plante ligneuse à feuilles caduques qui se trouve souvent dans les endroits rocheux ou les habitats riverains (Issa *et al.*, 2018).

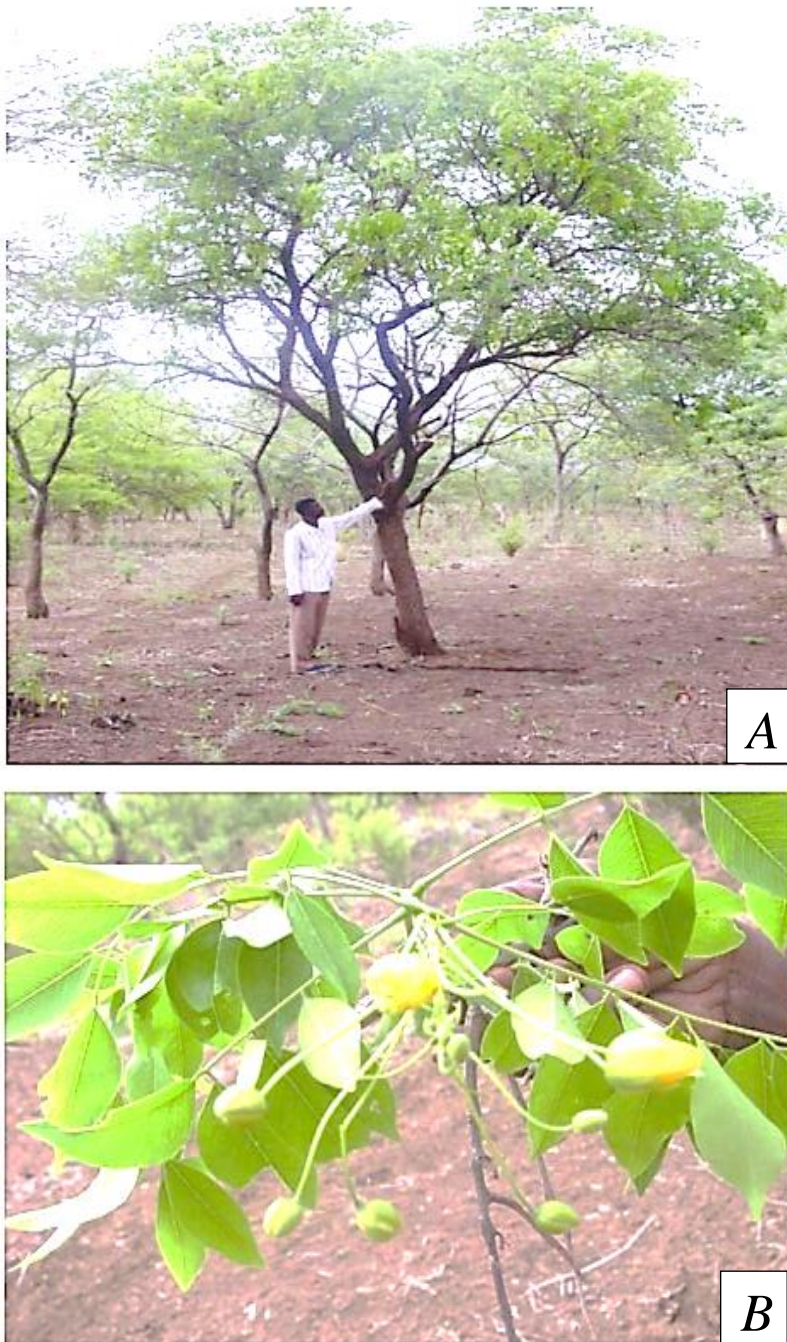


Figure 6 : Photographie de *Cassia arereh*. A : Plante entière ; B : Inflorescences (Evina, 2015 à Mogodé (Mokolo)).

I.4.5.4. Usage ethnopharmacologique de *C. arereh*

C. arereh est traditionnellement utilisé comme poison de pêche pour les poissons et également pour soulager différentes maladies, notamment les troubles du tractus gastro-intestinal, l'infertilité, le diabète, les piqûres d'insectes et diverses infections (Hedberg et Edwards, 1989 ; Etuk *et al.*, 2010 ; Gibree *et al.*, 2013 ; Mustapha, 2013). Presque toutes les parties de la plante sont utilisées comme médicament. Au nord du Nigéria elle est utilisée pour soigner la diarrhée, la dysenterie, la dermatite, le paludisme, des infections cutanées et des maladies du foie (Haidara, 2018). Au nord Cameroun, les populations lui ont donné les noms qui sont en rapport avec ses usages : "binlay" en toupouri, faisant référence à son emploi comme restaurateur de la fertilité chez les femmes ; "saheri" en fulfuldé, pour son effet anti-ulcéreux (Aubreville, 1985). Sa racine et son écorce de tige sont utilisées dans le traitement des maladies telles que la diarrhée, la dysenterie, les maux d'estomac, l'ascite, les maux de tête, la toux, les rhumatismes, les maux de dos, la cicatrisation, la faiblesse, la peste aviaire, la fièvre jaune et le paludisme (Arbonnier, 2004). La pulpe du fruit est utilisée comme laxatif tandis que ses feuilles sont utilisées comme diurétique, antipyrétique, analgésique et dans le traitement de la pleurésie et des brûlures (Arbonnier, 2004). Sa graine est utilisée pour soigner la pneumonie et à des fins magico-religieuses (Arbonnier, 2004). Cependant, peu d'informations scientifiques sont disponibles sur cette plante.

I.4.6. Constitution chimique du genre *Cassia*

Le criblage chimique des différents extraits de plantes du genre *Cassia* a conduit à l'identification des groupes de métabolites secondaires comprenant les alcaloïdes, les anthraquinones, les flavonoïdes, les triterpénoïdes pentacycliques, les stérols, les phénylpropanoïdes et les γ -naphtopyrone. De ces métabolites, les principaux groupes de constituants bioactifs trouvés dans le genre *Cassia* sont des produits issus des anthraquinones et flavonoïdes (Singh & Khan, 1990).

I.4.6.1. Cas des flavonoïdes

Les études chimiques réalisées jusqu'à présent sur *Cassia* ont mis en exergue la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires avec en majorité les flavonoïdes. Les flavonoïdes sont les composés polyphénoliques les plus courants présents dans différents espèces de *Cassia*. Divers rapports scientifiques décrivent le rôle crucial des flavonoïdes dans la prévention de plusieurs maladies telles que le cancer, les maladies coronariennes, troubles neurodégénératifs et problèmes gastro-intestinaux (Tunon *et al.*, 2009).

La structure chimique des flavonoïdes comprend un noyau benzénique lié à un groupement benzo- γ pyrone. Environ 2000 flavonoïdes sont connus dans le monde des constituants bioactifs. Et parmi ceux-ci environ 500 existent sous forme d'aglycone fragments (état libre) et le reste sous forme de *O*- ou *C*- glycosides (Bone et Mills, 2012). Les flavonoïdes sont divisés en différentes sous-classes comprenant les flavones, les flavanols, les flavanones, les flavanonols, les chalcones et anthocyanes (Panche *et al.*, 2016). Du genre *Cassia*, ont été isolé plusieurs types de flavonoïdes. Certains d'entre eux sont répertoriés dans le tableau VII.

Tableau VII: Quelques flavonoïdes isolés des plantes du genre *Cassia*

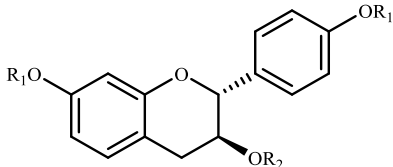
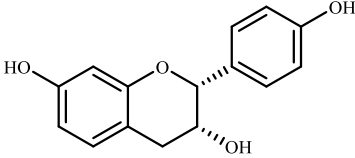
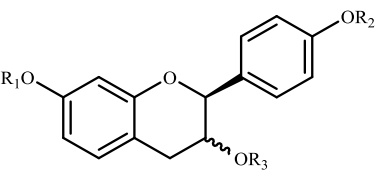
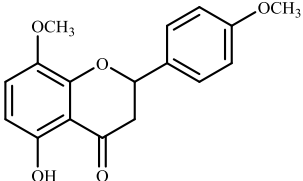
Structures et noms	Sources	Références
 <p>53 $R_1=R_2=H$: (2<i>R</i>,3<i>S</i>)-4',7-dihydroxyflavane-3-ol 54 $R_1=Me$, $R_2=Ac$: 4',7,-di-<i>o</i>-méthyl-3-<i>o</i>-acétylguibourtinidol 55 $R_1=R_2=Ac$: 3,7,6'-triacétylguibourtinidol</p>	<p><i>C. abbreviata</i> (cœur du bois ; écorces de racine)</p>	<p>Nel <i>et al.</i>, 1999 ; Kiplagat <i>et al.</i>, 2016</p>
 <p>56 $R_1=R_2=H$: (2<i>R</i>,3<i>R</i>)-4',7-dihydroxyflavane-3-ol</p>		
 <p>57 $\xi = \blacktriangle$: (2<i>S</i>,3<i>S</i>)-4',7-dihydroxyflavane-3-ol 58 $\xi = \blacktriangleright$: (2<i>S</i>,3<i>S</i>)-4',7-dihydroxyflavane-3-ol</p>		
 <p>59 2,3-dihydro-5-hydroxy-8-méthoxy-2-(4-méthoxyphenyl)chromen-4-one</p>		

Tableau VII (Suite)

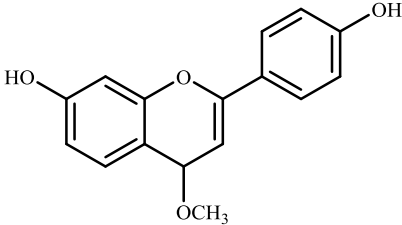
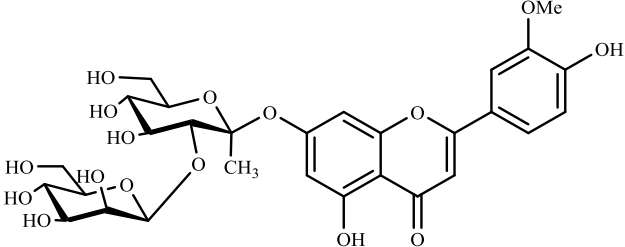
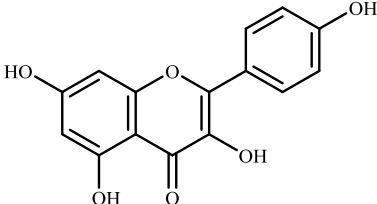
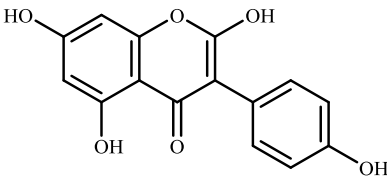
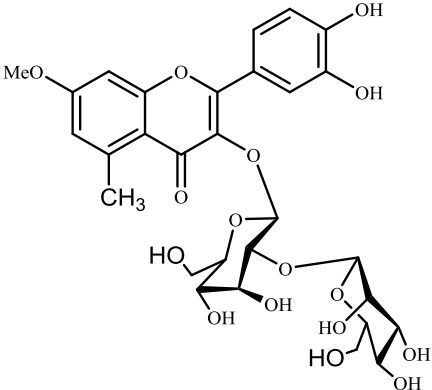
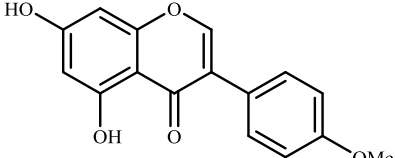
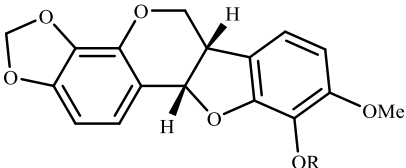
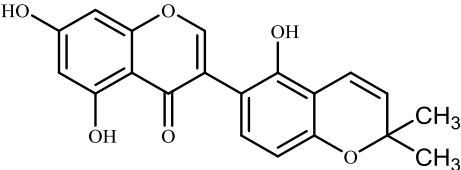
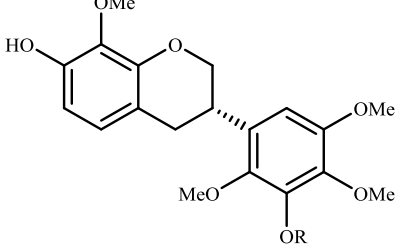
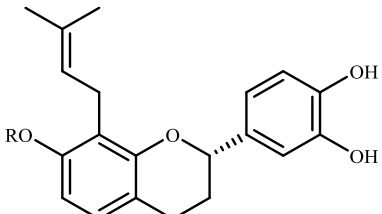
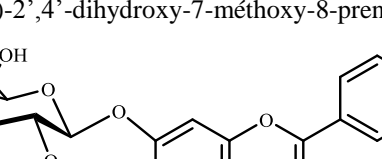
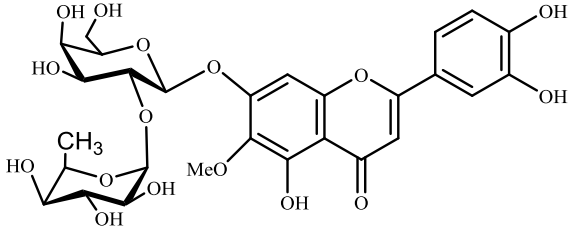
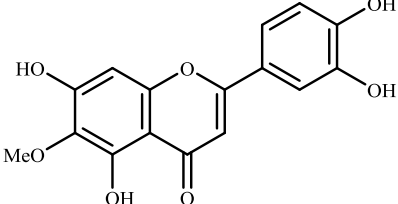
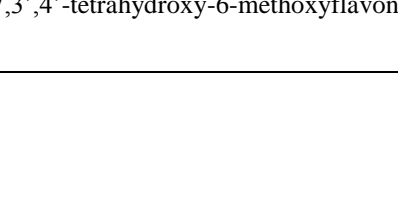
 <p>60 2,3-trans-7,4'-dihydroxy-4-méthoxyflavane</p>	<p><i>C. abbreviata</i> (cœur du bois ; écorces de racine)</p>	<p>Nel et al., 1999 ; Kiplagat et al., 2016</p>
 <p>61 chrysoeriol-7-<i>O</i>-(2''-<i>O</i>-β-D-mannopyranosyl)-β-D-allopyranoside</p>  <p>62 3,5,7,4'-tétrahydroxyflavone</p>  <p>63 2,5,7,4'-tétrahydroxyisoflavone</p>	<p><i>C. alata</i> (graines et feuilles)</p>	<p>Gupta et Sing, 1991 ; Rahman et al., 2008</p>
 <p>64 rhamnetin-3-<i>O</i>-(2''-<i>O</i>-β-D-mannopyranosyl)-β-D-allopyranoside</p>  <p>65 biochanine A</p> 	<p><i>C. fistula</i> (fruits, écorces et tiges)</p>	<p>Yadava et verma., 2003 ; Sartorelli et al., 2009 ; Zhao et al., 2013.</p>

Tableau VII (Suite)

66 67	R=H: fistulaflavonoïde B R=Me: fistulaflavonoïde C			
68	licoisoflavone			
69 70	R=H: (3 <i>S</i>)-3',7-dihydroxy-2',4',8-tétraméthoxyisoflavane R=Me: (3 <i>S</i>)-7-hydroxy-2',3',4',5',8-pentaméthoxyisoflavane			
71	R=H: morusyunnansins F			
72	R=Me: (2 <i>S</i>)-2',4'-dihydroxy-7-méthoxy-8-prenylflavane			
73	5,3',4'-trihydroxy-6-méthoxy-7- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside			
74	5,6,7,3',4'-tétrahydroxy-6-méthoxyflavone			

C. fistula (fruits,
écorces et tiges)

**Yadava et
verma., 2003 ;
Sartorelli *et al.*,
2009 ; Zhao *et al.*,
2013.**

Tableau VII (Suite)

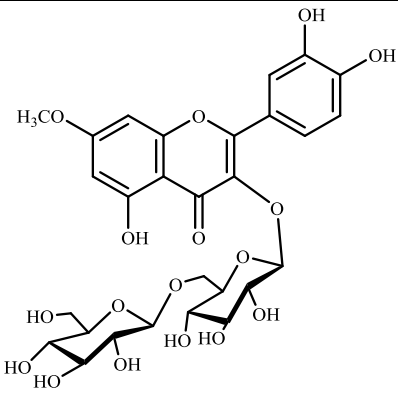
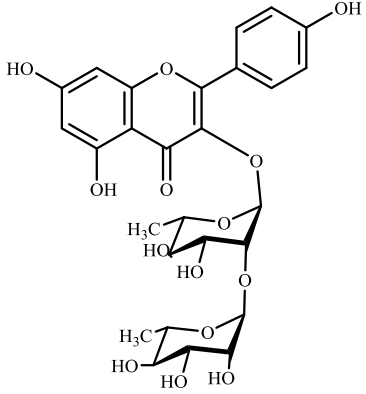
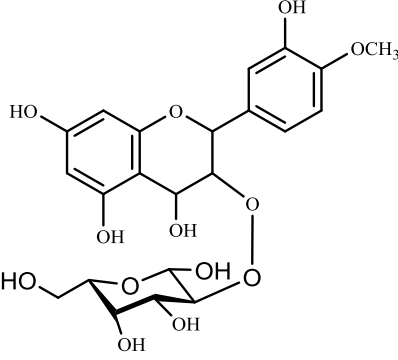
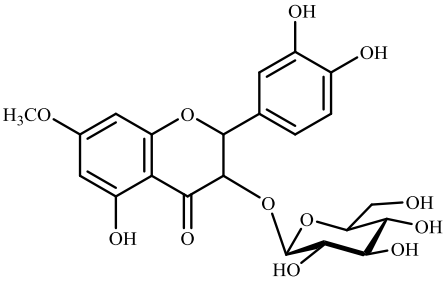
<p>75 rhamnetine 3-<i>O</i>-gentiobioside</p> 	<p><i>C. hirsuta</i> (fleurs)</p>	<p>Vaishnav et Gupta., 1996 ; Rao <i>et al.</i>, 1999</p>
<p>76 kaempférol 3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-α-L-rhamnopyranoside</p> 	<p><i>C. javanica</i> (fleurs)</p>	<p>Tiwari <i>et al.</i>, 1971 ; El-Sayyad et Ross, 1983</p>
<p>77 leucocyanidine 4'-<i>O</i>-méthylether 3-<i>O</i>-β-D-galactopyranoside</p> 		
<p>78 dihydrorhamnetine 3-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside</p> 		

Tableau VII (Suite)

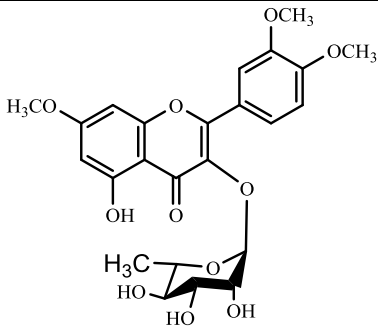
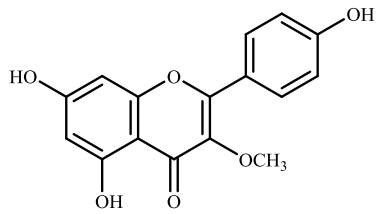
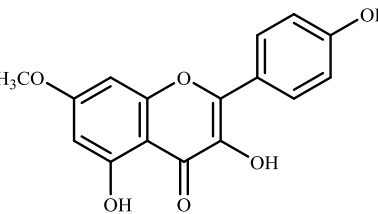
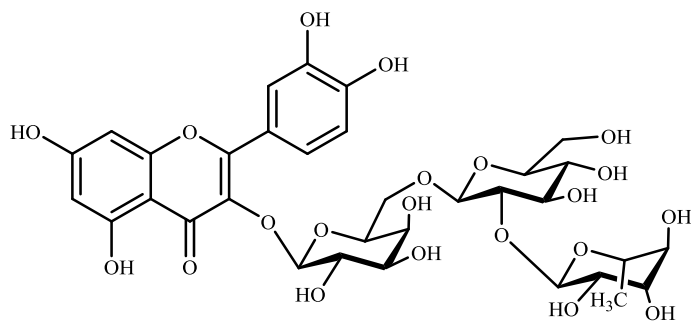
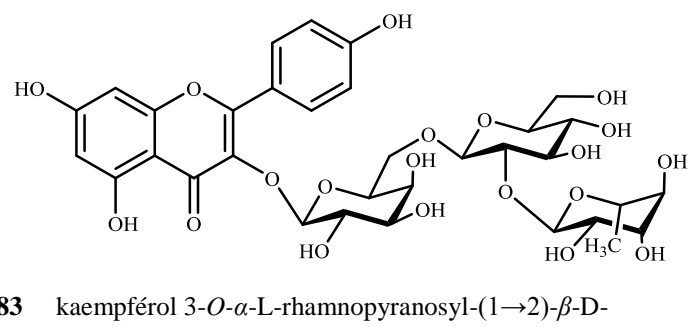
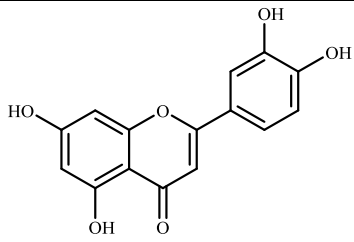
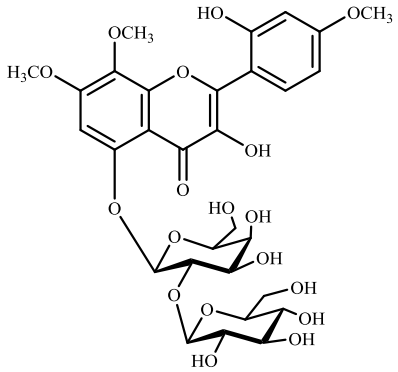
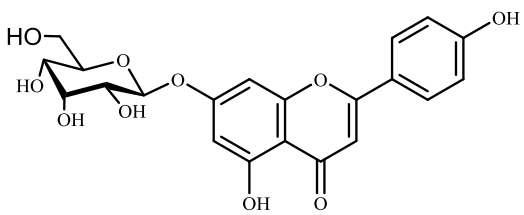
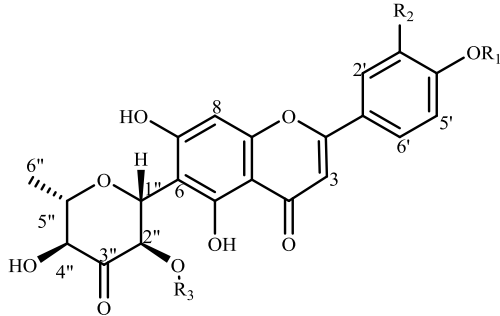
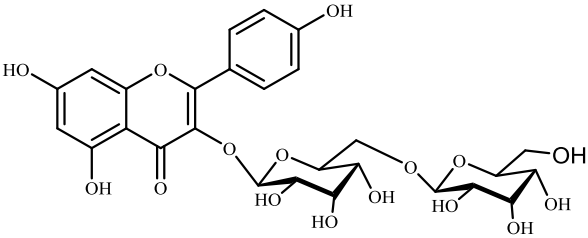
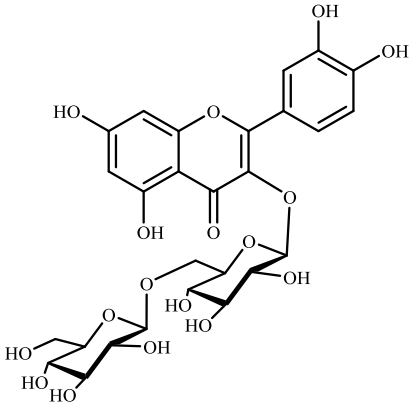
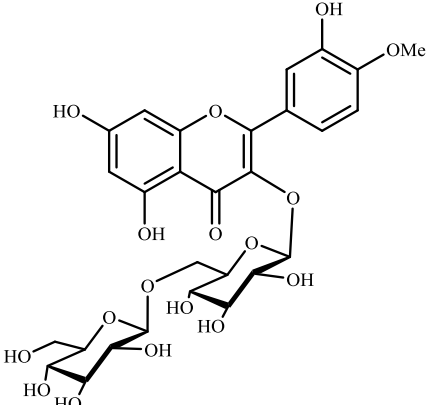
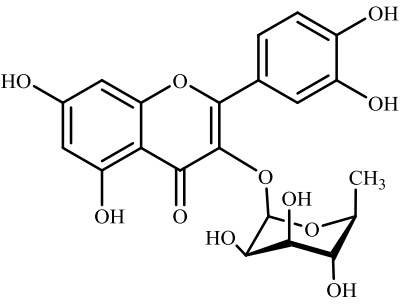
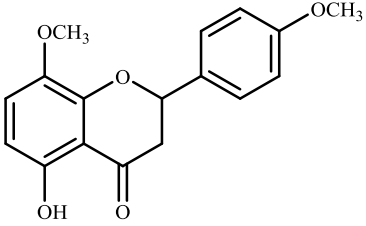
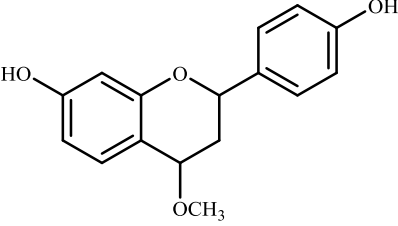
 <p>79 quercetine 3',4',7-triméthylether-3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranoside</p>		
 <p>80 kaempférol 3-méthylether</p>	<i>C. javanica</i> (fleurs)	Tiwari et al., 1971 ; El-Sayyad et Ross, 1983
 <p>81 kaempférol 7-méthylether</p>		
 <p>82 quercétine 3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow6)-β-D-galactopyranoside</p>		
 <p>83 kaempférol 3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow6)-β-D-galactopyranoside</p>	<i>C. marginata</i> (tige)	Chauhan et al., 2002

Tableau VII (Suite)

<p>84</p>  <p>lutéoline</p> <p>85</p>  <p>3,2'-dihydroxy-7,8,4'-triméthoxyflavone-5-O-(β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-galactopyranoside)</p> <p>86</p>  <p>5,4'-dihydroxy apigénin 7-O-β-D-allopyranoside</p>	<p><i>C. marginata</i> (tige)</p>	<p>Chauhan et al., 2002</p>
<p>87</p>  <p>88</p> <p>89</p>	<p><i>C. nigricana</i> (feuilles)</p>	<p>Georges et al., 2008</p>
<p>90</p>  <p>kaempférol 3-O-gentiobioside</p>	<p><i>C. occidentalis</i> (plante entière)</p>	<p>Purwar et al., 2003</p>

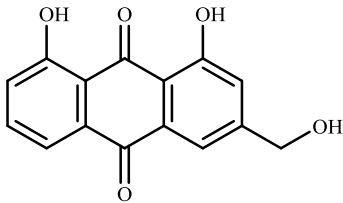
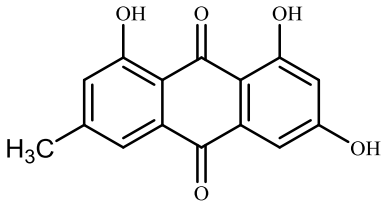
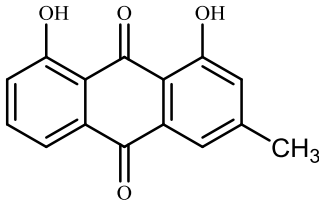
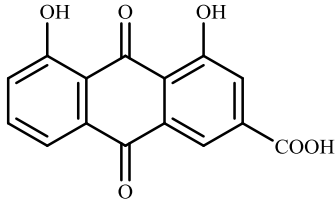
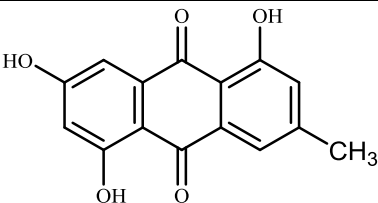
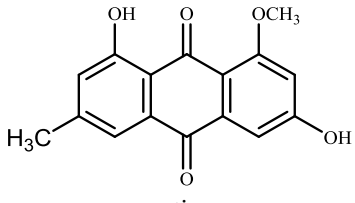
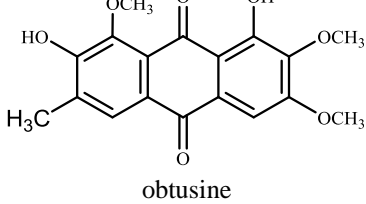
<p>  </p> <p>91 quercétine 3-<i>O</i>-gentiobioside</p>	<p><i>C. angustifolia</i> (feuilles)</p>	<p>Kinjo et al., 1994; Hatano et al., 1999</p>
<p>  </p> <p>92 isorhamnetine 3-<i>O</i>-gentiobioside</p>		
<p>  </p> <p>93 quercétine 3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranoside</p>	<p><i>C. roxburghii</i> (feuilles)</p>	<p>Kinjo et al., 1994</p>

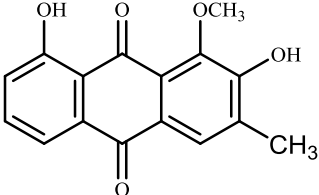
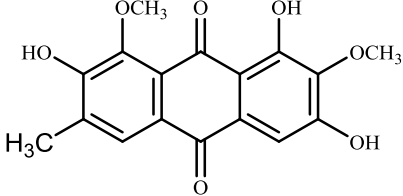
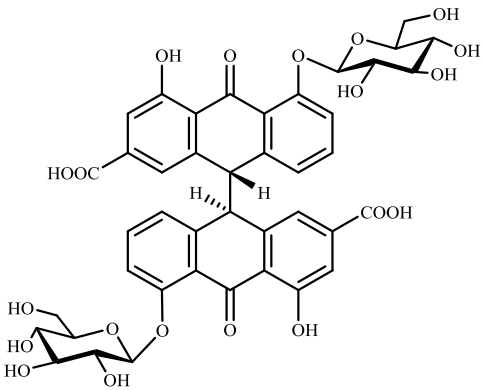
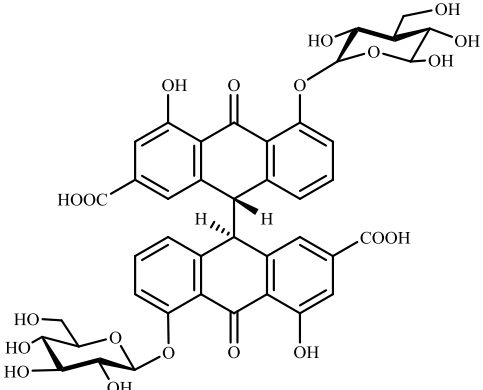
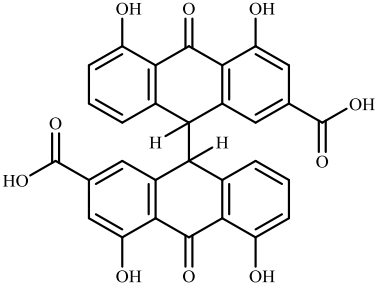
 <p>94 2,3-dihydro-5-hydroxy-8-méthoxy-2-(4-méthoxyphenyl) Chromen-4-one</p>  <p>95 3,4- dihydro-2-(4-hydroxyphenyl)-4-méthoxy-2H-Chromen-7-ol</p>	<p><i>C.abbreviata</i> (écorces des racines)</p>	<p>Kiplagat <i>et al.</i>, 2012</p>
--	--	--

I.4.6.2. Cas des anthraquinones

Les plantes du genre *Cassia* sont un riche réservoir d'anthraquinones, qui sont un groupe de dérivés d'antracène ayant une structure parente de 9, 10-dioxoanthracène. Ils apparaissent généralement sous la forme de solides cristallins ou de poudre avec une combinaison de couleur jaunâtre ou gris clair à gris-vert foncé. Il existe deux voies distinctes responsables de la biosynthèse des anthraquinones. Les anthraquinones sont synthétisées par les voies polycétides à travers la cyclisation des polycétides linéaires (Shukla *et al.*, 2017). Les légumes sont la principale source d'anthraquinones, avec environ 36 mg / kg de poids frais en haricots, pois, chou et laitue (Mueller *et al.*, 1999). Les composés chimiques, principalement glycosides dérivés de cette classe, possèdent de fortes propriétés laxatives ainsi que leur utilisation dans diverses infections fongiques (Li *et al.*, 2004). Plus de 100 dérivés d'anthraquinones ont été isolés à partir de diverses parties de différentes espèces de *Cassia*. Un bref aperçu des anthraquinones présentes dans le genre *Cassia* est présenté dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Quelques anthraquinones isolés des plantes du genre *Cassia*

Structure et nom	Source	Références
<p>96</p>  <p>aloé-émidine</p>	<i>C. absus</i> ; <i>C. grandis</i> ; <i>C. obtusifolia</i>	Rao <i>et al.</i> , 1979 ; Gritsanapan <i>et al.</i> , 1984; Guo <i>et al.</i> , 1998.
<p>97</p>  <p>émordine</p>	<i>C. laevigata</i> ; <i>C. fistula</i> et <i>C. nigricans</i>	Singh <i>et al.</i> , 1980; Lee <i>et al.</i> , 2001.
<p>98</p>  <p>chrysophanol</p>	<i>C. javanica</i> ; <i>C. siamea</i> ; <i>C. tora</i> ; <i>C. garrettiana</i>	Chaudhuri <i>et al.</i> , 1987; Singh <i>et al.</i> , 1992; Choi <i>et al.</i> , 1994; Tewtrakul <i>et al.</i> , 2007.
<p>99</p>  <p>rheine</p>	<i>C. reticulata</i> ; <i>C. didymobotrya</i> ; <i>C. didymobotrya</i> ; <i>C. javanica</i> ; <i>C. angustifolia</i>	Youngken <i>et al.</i> , 1954; El-Sayyad <i>et al.</i> , 1983; Chaudhuri <i>et al.</i> , 1987; Dave <i>et al.</i> , 2012
<p>100</p>  <p>alatinone</p>	<i>C. alata</i>	Hemlata <i>et al.</i> , 1993
<p>101</p>  <p>questine</p>	<i>C. occidentalis</i> ; <i>C. obtusifolia</i> ; <i>C. didymobotrya</i>	Kitanaka <i>et al.</i> , 1989; Crawford <i>et al.</i> , 1990; Delle Monache <i>et al.</i> , 1991
<p>102</p>  <p>obtusine</p>	<i>C. obtusifolia</i> (feuilles et graines)	Crawford <i>et al.</i> , 1990

<p>103</p>  <p>obtusifoline</p> <p>104</p>  <p>aurantio-obtusine</p>	<p><i>C. obtusifolia</i> (feuilles et graines)</p>	<p>Crawford et al., 1990</p>
<p>105</p>  <p>sennoside B</p>	<p><i>C. fistula</i> (fleurs)</p>	<p>Habib & El-Sebakhy, 1980</p>
<p>106</p>  <p>sennoside A</p>	<p><i>C. podocarpa</i> (feuilles)</p>	<p>Dave et Ledwani, 2012</p>
<p>107</p>  <p>sennidine A</p>	<p><i>C. angustifolia</i> (feuilles)</p>	<p>Waltenberger et al., 2008</p>

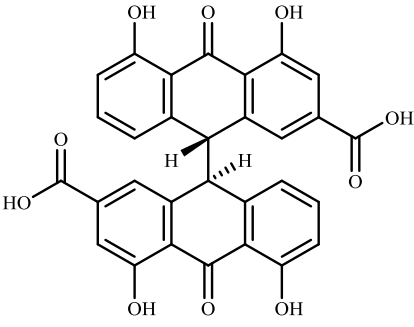
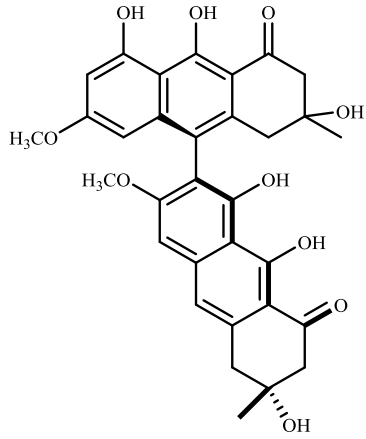
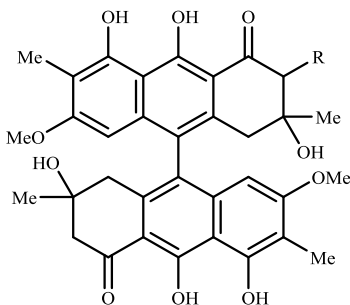
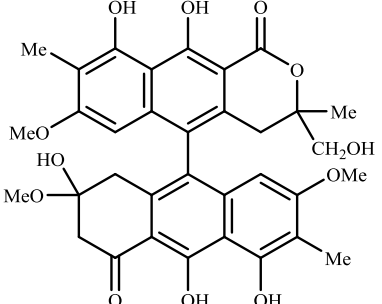
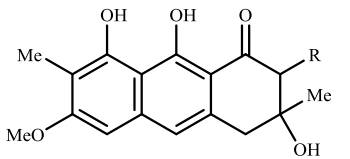
<p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">108 sennidine B</p>	<p><i>C. angustifolia</i> (feuilles)</p>	<p>Waltenberger et al., 2008</p>
<p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">109 phlegmacine B₂</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">110 R=OH: torosaol I</p> <p style="text-align: center;">111 R=H: singueanol I</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">112 torosaol II</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">113 R=H: 7-méthyltorosachryson</p> <p style="text-align: center;">114 R=Me : germitorosone</p>	<p><i>C. torosa</i> (racines fraîches)</p>	<p>Kitanaka et Takido, 1990</p>

Tableau VIII (Suite)

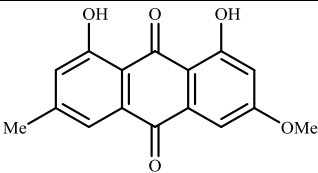
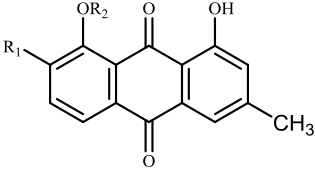
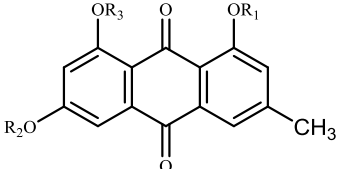
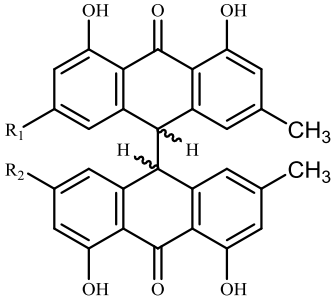
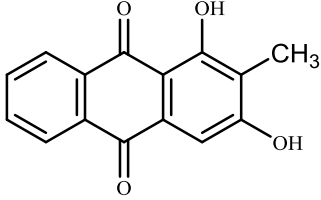
 <p>115 physcione</p>	<i>C. marginata</i> ; <i>C. sophera</i> ; <i>C. pudibundaa</i> ; <i>C. racemosa</i> ; <i>C. siamea</i> (Racines)	Duggal et al., 1982; Joshi et al., 1985; Messana et al., 1991; Mena-Rejóna et al., 2002; Kumar et al., 2013
 <p>116 R₁=R₂=H: chrysophanol 117 R₁=H, R₂=Me: chrysophanol-8-méthylether 118 R₁=OH, R₂=Me: nataloé-émodin-8-méthylether 119 R₁=Ac, R₂=H : 7-acétychrysophanol</p>  <p>120 R₁=R₂=Me, R₃=H: émodin-1,6-dimethylether 121 R₁=H, R₂=R₃=Me: émodin-6,8-dimethylether</p>  <p>122 R₁=R₂=H chrysophanol-10,10'-bianthrone 123 R₁=H, R₂=OMe: physcion-10,10'-bianthrone 124 R₁=R₂=OMe : physcion-10,10'-bianthrone</p>	<i>C. didymobotrya</i> (graines, feuilles et racines)	Delle monache et al., 1991
 <p>125 1,3-dihydroxy-2-méthylantraquinone (Rubiadine)</p>	<i>C. auriculata</i> (feuilles et gousses)	Dave et Ledwani, 2012

Tableau VIII (Suite)

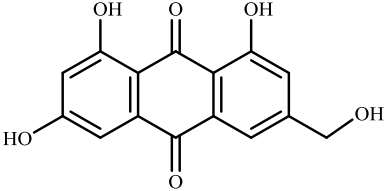
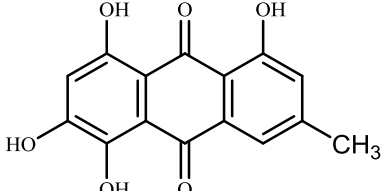
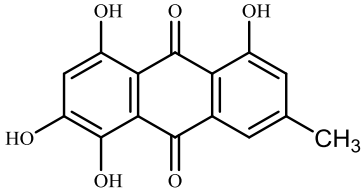
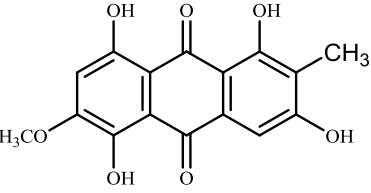
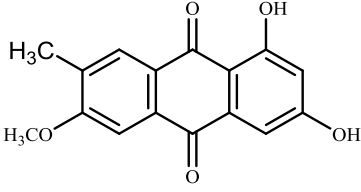
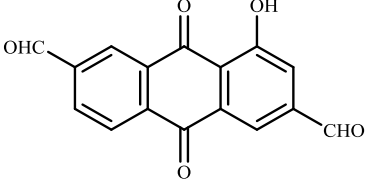
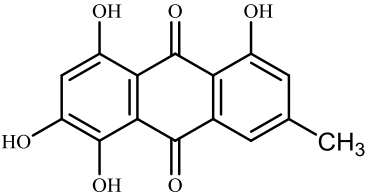
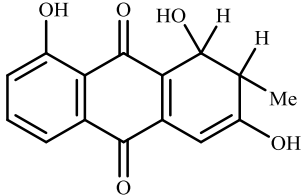
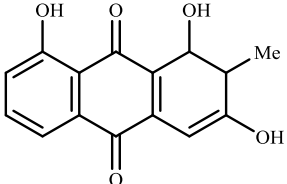
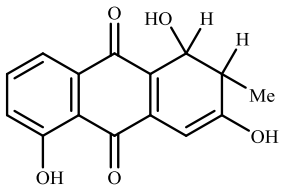
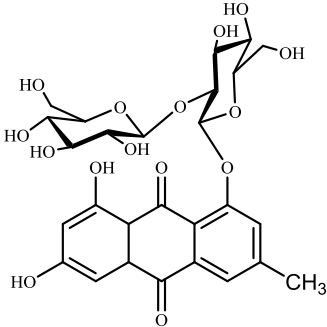
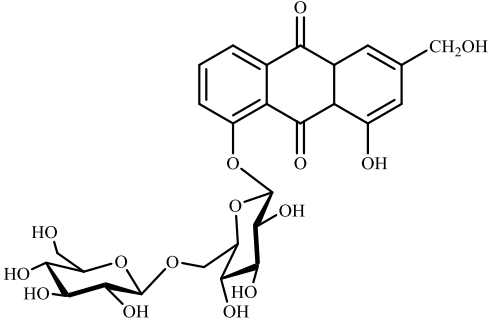
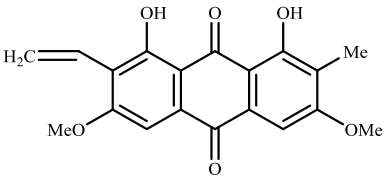
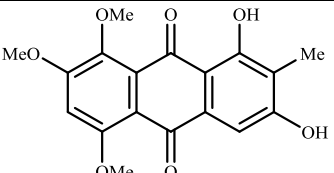
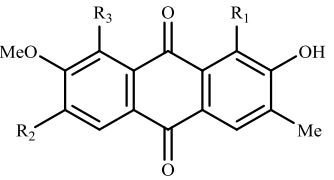
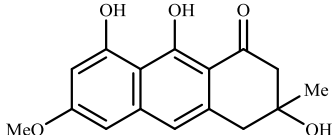
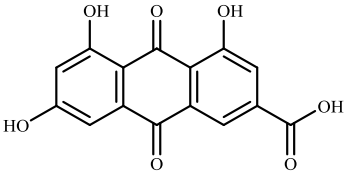
 <p>126 citreoroseine</p>	<i>C. nigricans</i> (feuilles)	Georges et al., 2008
 <p>127 1,5,6,8-tetrahydroxy-3-méthylanthraquinone</p>	<i>C. fistula</i> (feuilles)	Ledwani et Singh, 2005
 <p>128 5-hydroxyémordine</p>  <p>129 1,3,5,8-tetrahydroxy-6-méthoxy-2-méthylanthraquinone</p>	<i>C. javanica</i> (feuilles et fleurs)	Tiwari et Singh, 1979 ; Singh et Singh, 2008
 <p>130 1,3-dihydroxy-6-méthoxy-7-méthylanthraquinone</p>  <p>131 1-hydroxy-3,7-diformylanthraquinone</p>	<i>C. obtusa</i> (racines)	Sekar et al., 1999
 <p>132 1,5,6,8-tetrahydroxy-3-méthylanthraquinone</p>	<i>C. renigera</i> (gousses)	Ledwani et Singh, 2005

Tableau VIII (Suite)

<p>133</p>  <p>roxburghinol</p>		
<p>134</p>  <p>1,3,8-trihydroxy-2-méthylanthraquinone</p>		
<p>135</p>  <p>1,3,5-trihydroxy-2-méthylanthraquinone</p>		
<p>136</p>  <p>émordine 1-O-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-glucopyranoside</p>	<p><i>C. roxburghii</i> (feuilles)</p>	<p>Ashok et Sarma, 1985 ; El-Toumy <i>et al.</i>, 2012</p>
<p>137</p>  <p>aloé-émordine 8-O-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow6)-glucopyranoside</p>		
<p>138</p>  <p>1,8-dihydroxy-3,6-diméthoxy-2-méthyl-7-vinylnanthraquinone</p>	<p><i>C. sophera</i> (écorce de racine)</p>	<p>Dass <i>et al.</i>, 1984</p>

 <p>139 1,3-dihydroxy-5,7,8-triméthoxy-2-méthylanthraquinone</p>	<i>C. sophera</i> (écorce de racine)	Dass et al., 1984
 <p>140 R₁=R₂=R₃=OH: 1-desmethyllaurantio-obtusine 141 R₁=OH, R₂=R₃=OMe : 1-desmethylchryso-obtusine</p>	<i>C. tora</i> (racines)	Zhu et al., 2008
 <p>142 torosachryson</p>	<i>C. obtusifolia</i> (graines)	Kitanaka et Takido, 1981
 <p>143 acide emodique</p>	<i>C. nigricans</i> (feuilles)	Georges et al., 2008

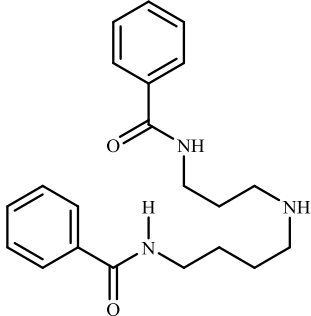
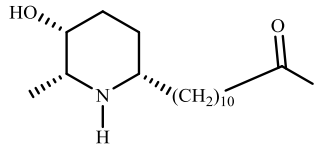
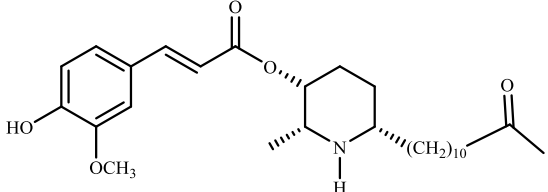
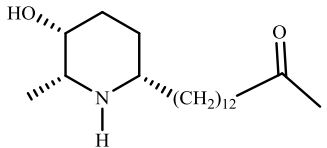
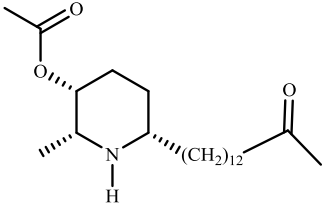
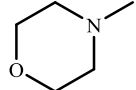
I.4.6.3. Cas des alcaloïdes

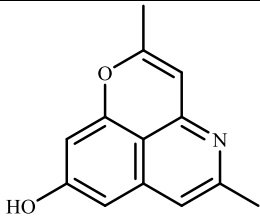
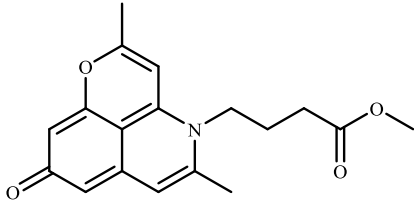
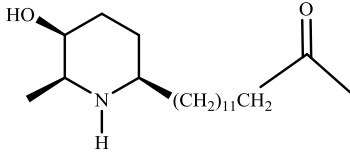
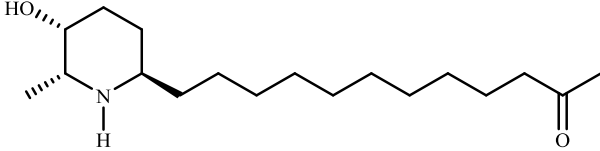
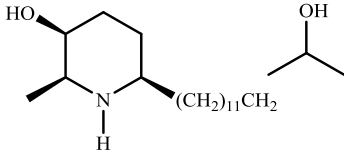
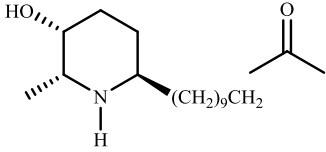
Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées d'origine naturelle pouvant avoir une activité pharmacologique. Ce nom dérive du mot alcalin ; à l'origine, le terme a été employé pour décrire n'importe quelle base de Lewis contenant un hétérocycle azoté. À cause du doublet électronique non liant de l'azote, les alcaloïdes sont considérés comme des bases de Lewis. On trouve des alcaloïdes, principalement chez les végétaux, les champignons et quelques groupes animaux peu nombreux.

Les alcaloïdes sont une classe unique de composés azotés qui démontrent une grande variété de structures chimiques intéressantes au sein du genre *Cassia*, un groupe diversifié d'alcaloïdes, à savoir les alcaloïdes pipéridiniques, a été rapporté dans la littérature, suivi par l'isolement de quelques alcaloïdes de la spermidine. Par exemple, une spermidine alcaloïde, *N*¹, *N*⁸-dibenzoylspermidine, a été isolé à partir des feuilles de *C. floribunda* (Alemayehu et

al., 1988). Un extrait au CH_2Cl_2 de graines de *C. racemosa* a donné une pipéridine alcaloïde : cassine (Mena-Rejóna *et al.*, 2002).

Tableau IX: Quelques alcaloïdes isolés des plantes du genre *Cassia*

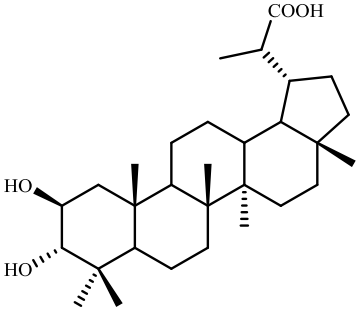
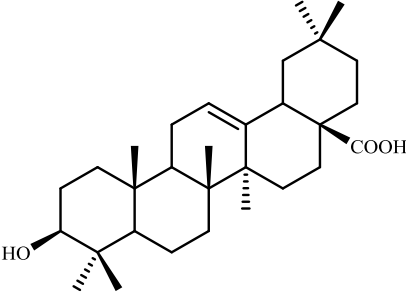
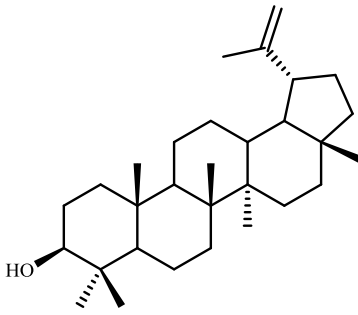
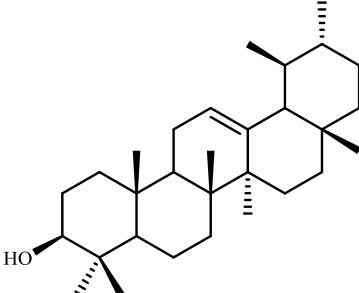
Structure et nom	Source	Références
 <p>144 N^1, N^8-dibenzoylspermidine</p>	<i>C. floribunda</i> (feuilles)	Alemayehu <i>et al.</i>, 1988
 <p>145 cassine</p>	<i>C. racemosa</i> (graines)	Mena-Rejóna <i>et al.</i>, 2002
 <p>146 (+)-3-O-feruloylcassine</p>	<i>C. spectabilis</i> (fruits)	Viegas <i>et al.</i>, 2004
 <p>147 (-)-spectaline</p>		
 <p>148 (-)-3-O-acétylspectline</p>		
 <p>149 <i>N</i>-methylmorpholine</p>	<i>C. occidentalis</i> (graines)	Kim <i>et al.</i>, 1971

<p>150</p>  <p>cassiarinse A</p> <p>151</p>  <p>cassiarinse B</p>	<p><i>C. siamea</i> (feuilles)</p>	<p>Morita <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>152</p>  <p>(+)-spectaline</p> <p>153</p>  <p>(-)-iso-6-cassine</p> <p>154</p>  <p>(-)-spectalinine</p> <p>155</p>  <p>(-)-iso-6-carnavaline</p>	<p><i>C. spectabilis</i> (feuilles et graines)</p>	<p>Christofidis <i>et al.</i>, 1977a ; Christofidis <i>et al.</i>, 1977b</p>

I.4.6.4. Cas des triterpènes pentacycliques

L'étude chimique des espèces du genre *Cassia* a permis d'isoler plusieurs triterpènes pentacycliques dont quelques uns sont répertoriés dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X: Quelques triterpènes pentacycliques isolées des plantes du genre *Cassia*

Structure et nom	Source	Références
 <p>156 acide cassiarique</p>	<p><i>C. arereh</i> (écorces du tronc)</p>	<p>Missi et al., 2021</p>
 <p>157 acide olénolique</p>  <p>158 lupéol</p>  <p>159 α-amyrine</p>	<p><i>C. spectabilis</i> (feuilles)</p>	<p>Silva, 2010</p>

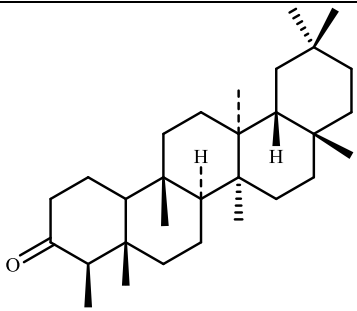
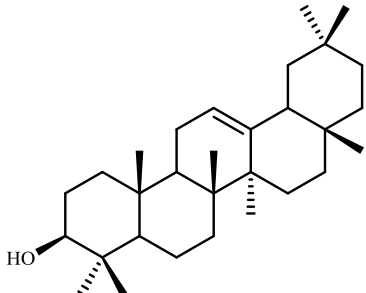
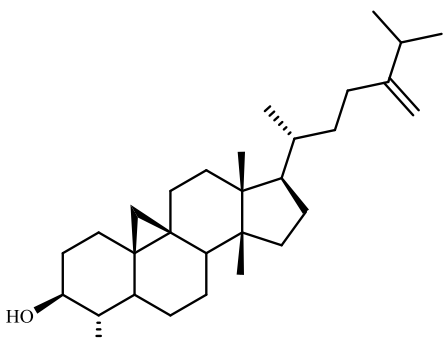
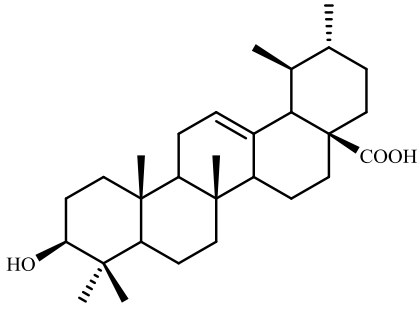
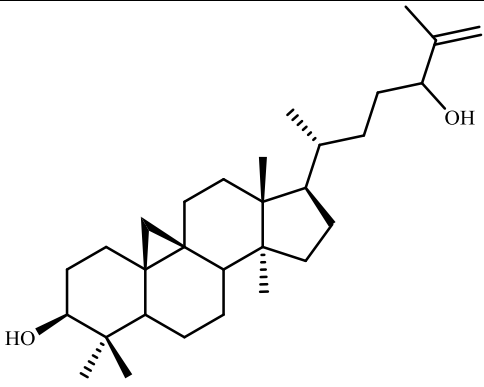
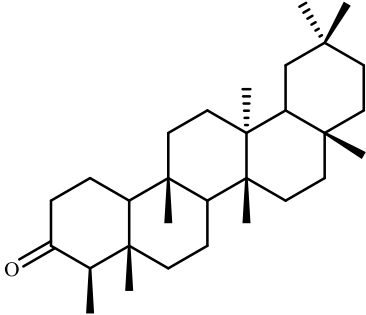
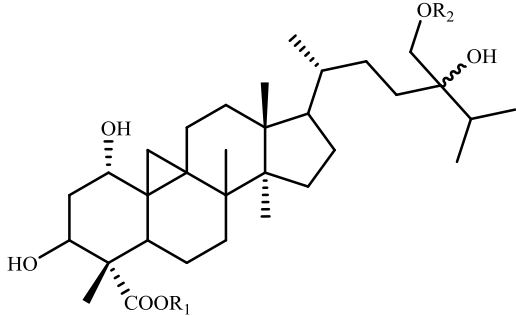
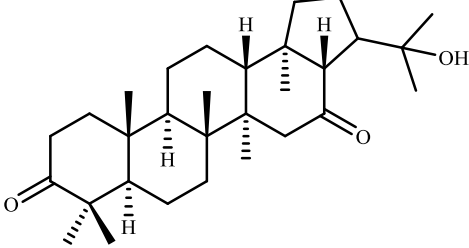
<p>160</p>  <p>friédéline</p>		
<p>161</p>  <p>β-amyrine</p>	<p><i>C. spectabilis</i> (feuilles)</p>	<p>Silva, 2010</p>
<p>162</p>  <p>cycloeucalenol</p>		
<p>163</p>  <p>acide ursolique</p>		

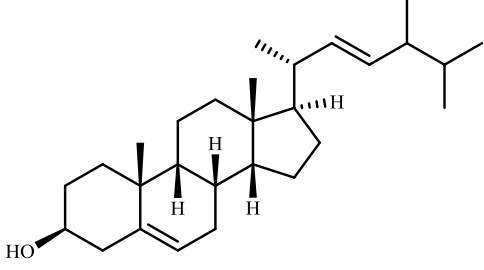
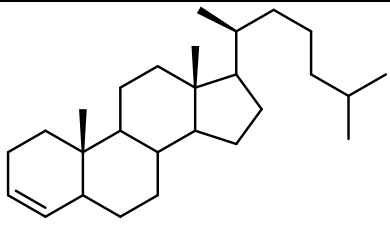
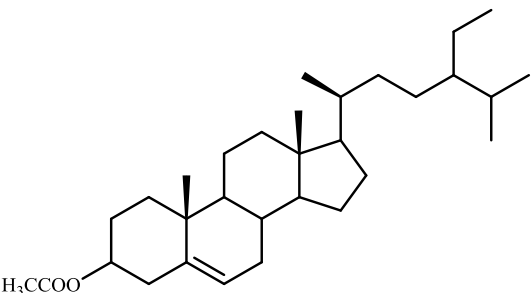
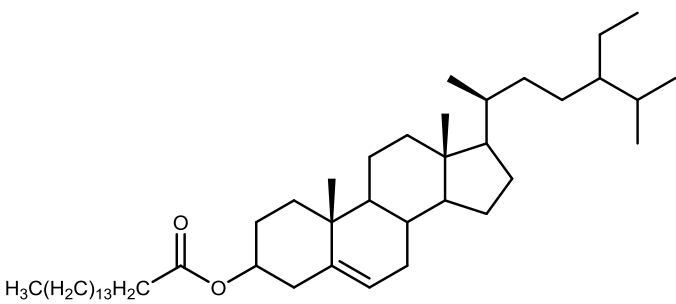
Tableau X (suite et fin)

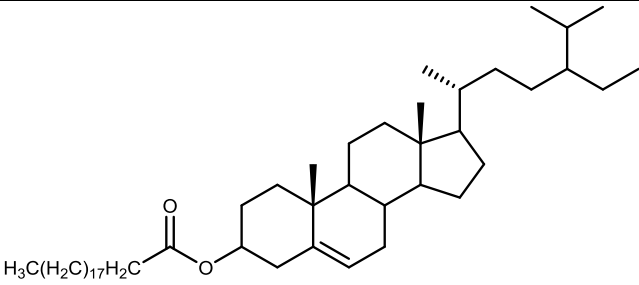
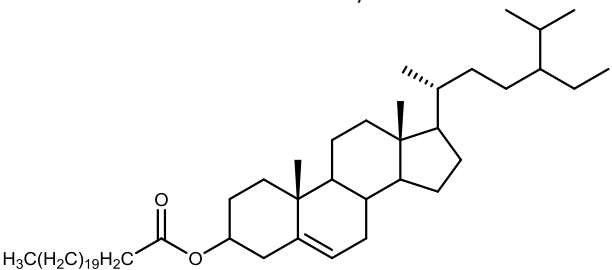
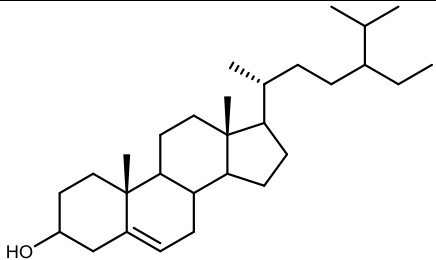
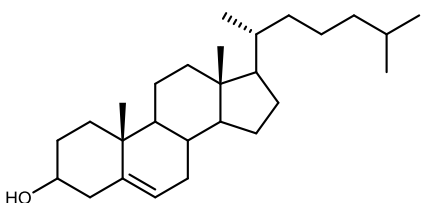
<p>164</p>  <p>cycloart-25-én-3β,24-diol</p>	<p><i>C. siamea</i> (plante entière).</p>	<p>Kumar et al., 2013</p>
<p>165</p>  <p>friedeline</p>		
<p>166</p>  <p>$R_1=R_2=Glc$ cyclosophoside A</p>	<p><i>C. sophera</i> (graines)</p>	<p>Zhao et al., 2007</p>
<p>167</p>  <p>3β,16β,22-trihydroisohopane</p>	<p><i>C. hirsuta</i> (graines)</p>	<p>Singh et Singh, (1986)</p>

I.4.6.5. Cas des stérols

L'étude chimique des espèces du genre *Cassia* a permis d'isoler plusieurs stérols dont quelque-uns sont répertoriés dans le tableau XI ci-dessous.

Tableau XI: Quelques stérols isolées des plantes du genre *Cassia*

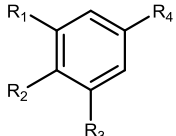
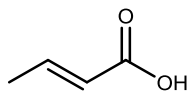
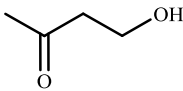
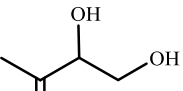
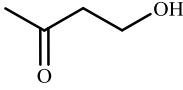
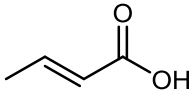
Structure et nom		Source	Références
168	 <p>stigmasterol</p>	<i>C. obtusifolia</i> (feuilles)	Sob <i>et al.</i> , 2008
169	 <p>cholest-3-ène</p>	<i>C. nigricans</i> (feuilles)	Ayo <i>et al.</i> , 2009
170	 <p>acétate de β-sitosterol</p>		
171	 <p>palmitate de β-sitostérol</p>	<i>C. javanica</i> (feuilles)	Chaudhuri et Chawla, (1987)

<p>  172 arachidate de β-sitostérol </p>	<p><i>C. javanica</i> (feuilles)</p>	<p>Chaudhuri et Chawla, (1987)</p>
<p>  173 behenate de β-sitostérol </p>		
<p>  174 β-sitostérol </p>	<p><i>C. reticulata</i> (fleurs)</p>	<p>Messmer et al., 1968</p>
<p>  175 cholestérol </p>		

I.4.6.6. Cas des phenylpropanoïdes

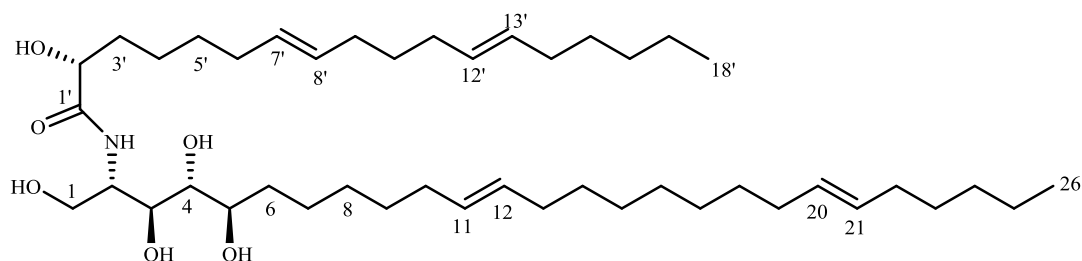
L'étude phytochimique des espèces du genre *Cassia* a permis d'isoler plusieurs phenylpropanoïdes dont quelques uns sont répertoriés dans le tableau XII ci-dessous.

Tableau XII: Quelques phenylpropanoïdes isolées du genre *Cassia*

Structure et nom	Source	Références
		El-Sayyad et Ross (1983) ; Jones <i>et al.</i> , 2000
<p>176</p> <p>$R_1=H, R_2=H, R_3=H, R_4=$ </p> <p>acide sinapique</p>	<i>C. javanica</i> (feuilles)	El-Sayyad et Ross, (1983)
<p>177</p> <p>$R_1=OMe, R_2=OH, R_3=H, R_4=$ </p> <p>acide cinnamique</p>	<i>C. laevigata</i> (feuilles)	Jones <i>et al.</i> , 2000
<p>178</p> <p>$R_1=OMe, R_2=OH, R_3=H, R_4=$ </p> <p>1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphényl)-propan-1-one</p>		
<p>179</p> <p>$R_1=OMe, R_2=OH, R_3=OMe, R_4=$ </p> <p>3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphényl)-propan-1-one</p>		
<p>180</p> <p>$R_1=OMe, R_2=OH, R_3=OMe, R_4=$ </p> <p>2,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-propan-1-one</p>		

I.4.6.7. Cas des céramides

L'étude chimique des espèces du genre *Cassia* a permis d'isoler une céramide des écorces du tronc de *C. arereh* dont sa structure est représentée ci-dessous.



181 Cassiaramide

Figure 7: structure de la cassiaramide de *C. arereh* (Missi *et al.*, 2021)

I.4.7. Étude pharmacologique des plantes du genre *Cassia*

Les plantes appartenant au genre *Cassia* possèdent de nombreuses activités pharmacologiques à grande échelle telles que les activités anti-inflammatoires (Somchit *et al.*, 2003), antitumorales (Prasanna *et al.*, 2009), antiplasmodiales (Iwalewa *et al.*, 1997), antioxydantes (Yen *et al.*, 2000), hypoglycémiques (Jalalpure *et al.*, 2004), hyperglycémiques (Somchit *et al.*, 2003), et antimutagène (Silva *et al.*, 2008). Ces travaux sont confortés par la poursuite d'une large gamme d'activités biologiques notamment les propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydantes comme l'ont démontré les travaux de recherche de Ngulde *et al.* (2010) ; d'Imam *et al.* (2013) ; de Salihu et Ado. (2013) et de Tirfe *et al.* (2015).

I.4.7.1. Activités antibactériennes et antifongiques

Le potentiel antimicrobien des plantes du genre *Cassia* a été évalué par plusieurs chercheurs. Les travaux de Robbins *et al.* (1947) ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de *C. reticulata* inhibe la croissance de *Mycobacterium phlei* et *Neisseria gonorrhoeae* à des concentrations de 64 et 84 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. En utilisant la méthode inhibitrice du bouillon de bœuf. L'extrait aqueux des feuilles de *C. reticulata* a été examiné pour son activité antibactérienne en utilisant la méthode sur plaque de gélose. La torosachrysonne et le singueanol-I isolés de l'extrait au chloroforme des racines de *C. singueana* ont inhibé la croissance de la bactérie à Gram-positif, *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI de 70 et 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivement (Endo et Naoki, 1980).

Les extraits méthanoliques des plantes *C. alata* et *C. angustifolia* ont présenté une inhibition de croissance de 100% contre *Staphylococcus pyogenes* et *Corynebacterium diphtheriae* à la concentration de 400 $\mu\text{g/mL}$ par rapport au médicament standard rifampicine, qui a présenté une inhibition de 83,95% et 95,60% sur les mêmes bactéries à la même concentration. L'activité antifongique de l'extrait au méthanol de la plante entière *C. fistula*, a révélé une inhibition de la croissance de 100% de *Candida albicans* similaire au médicament de référence kétoconazole (100% d'inhibition de *C. albicans*) à la concentration de 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivement.

I.4.7.2. Activités antivirales

L'extrait éthanolique de cœur du bois de *C. garrettiana* et ses composés isolés : aloe-émodyne (96), émodyne (97), chrysophanol (98), rhéine (99) et picéatannol ont été étudiés pour leur potentiel antiviral contre le VIH-1 PR: l'extrait a montré un bon effet antiviral contre (VIH-1 PR) avec une inhibition de $72,0 \pm 1,2\%$ à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ tandis que parmi les composés isolés, le picéatannol a présenté un potentiel antiviral considérable (VIH-1 PR) avec une CI_{50} de 25,4 $\mu\text{g/mL}$ par rapport au médicament témoin

acétyl pepstatine (CI₅₀ de 2,2 µg/mL). Les auteurs ont conclu que ce composé pourrait être responsable de l'action anti-VIH-1 PR de cet extrait (Tewtrakul *et al.*, 2007).

Dans une autre étude, les extraits aqueux et éthanolique du bois de cœur de *C. garrettiana* et le piceatannol ont montré une activité antivirale importante contre (HIV-1 IN) avec des valeurs de CI₅₀ de 26,8, 15,6 et 17,9 µg/mL, respectivement, avec la suramine comme témoin positif ayant une CI₅₀ de 7 µg/mL.

I.4.7.3. Activités antioxydantes

L'activité antioxydante des espèces de *Cassia* a été mesurée par une variété d'essais biologiques avec divers mécanismes. La fraction d'acétate d'éthyle a présenté l'activité antioxydante la plus élevée dans le test de piégeage des radicaux DPPH avec une valeur CI₅₀ de 79,8 µg/mL par rapport à l'hydroxytoluène butylé (BHT) standard ayant une valeur de CI₅₀ de 9,5 µg/mL (Choi *et al.*, 1994). Le comportement antioxydant significatif de la fraction à l'acétate d'éthyle peut être dû à son contenu phénolique élevé. Les composés isolés de l'extrait méthanolique des feuilles de *C. roxburghii* : l'aloé-émodyne (**96**), l'émodyne (**97**), l'émodyne 1-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-glucopyranoside (**136**), l'aloé-émodyne 8-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-glucopyranoside et la quercétine 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside (**137**) ont été testés pour leurs activités antioxydantes en utilisant un test de piégeage des radicaux DPPH. Le composé quercétine 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside est apparu comme un antioxydant puissant avec une valeur de CI₅₀ de 29,49 ± 0,98 µg/mL à la concentration de 100 µg/mL en comparaison avec l'acide ascorbique avec une valeur de CI₅₀ de 7,90 ± 0,21 µg/mL (El-Toumy *et al.*, 2012).

I.4.7.4. Activités anticancéreuses

Le potentiel antiprolifératif des différentes plantes de *Cassia* est lié à leurs structures et aux organismes qu'elles affectent. L'extrait à l'éthanol des feuilles de *C. auriculata* avec la curcumine a été étudié pour son activité anticancéreuse contre les lignées cellulaires humaines MCF-7 et Hep-2 en utilisant le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Dans cet essai, l'extrait a inhibé la croissance des deux lignées cellulaires d'une manière dose-dépendante avec des valeurs de CI₅₀ de 400 et 500 µg/mL pour les cellules MCF-7 et Hep-2, respectivement. L'extrait au méthanol des feuilles de *C. tora* a été évalué pour son potentiel anticancéreux contre la lignée cellulaire HeLa en utilisant le test de prolifération cellulaire MTT. L'extrait présentait une inhibition de croissance dose-dépendante des cellules HeLa avec une CI₅₀ de 191 µg/mL par rapport au cisplatine (médicament standard) qui possédait la valeur CI₅₀ de 173 µg/mL. Cette étude a également confirmé l'apoptose en tant que mécanisme antiprolifératif de l'extrait méthanolique de *C. tora*

et l'activation de la caspase 3 est la raison derrière les effets apoptotiques de cet extrait. L'extrait au méthanol des fleurs de *C. auriculata* a été testé pour son potentiel cytotoxique contre les lignées cellulaires Hela, HEL, Vero et CRFK en utilisant le test MTT. L'extrait a montré une activité cytotoxique sur toutes les lignées cellulaires testées au-dessus de la plage de 100 $\mu\text{g/mL}$, tandis que les médicaments standard brivudine, ganciclovir et ribavirine ont affiché un potentiel cytotoxique compris entre 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$ (Arthanari *et al.*, 2013).

I.4.7.5. Activités hépatoprotectrices

L'extrait éthanolique des feuilles de *C. sophera* a démontré un potentiel hépatoprotecteur en utilisant la méthode d'hépatotoxicité induite par CCl_4 chez les rats mâles albinos. Le groupe traité à l'extrait a nettement rétabli les taux normaux d'AST, d'ALT, d'ALP de bilirubine totale jusqu'à 180,8 $\mu\text{mol/L}$, 135,3 $\mu\text{mol/L}$, 130,5 $\mu\text{mol/L}$ et 0,63 mg/dL par rapport au groupe témoin traité par CCl_4 (251,6 $\mu\text{mol/L}$, 178,3 $\mu\text{mol/L}$, 190 $\mu\text{mol/L}$ et 0,98 mg/dL), respectivement, à la posologie de 400 mg/kg (16 jours) (Mondal *et al.*, 2012). L'activité hépatoprotectrice de l'extrait au méthanol des racines de *C. singueana* a été évaluée en utilisant l'hépatotoxicité induite par CCl_4 chez des rats mâles albinos. Après 14 jours, à la concentration de 2,5 mg/kg, la réduction des taux d'AST, d'ALT, de bilirubine directe et de bilirubine totale a été observée dans le groupe d'animaux traités à l'extrait à 172,90 $\mu\text{mol/L}$, 87,60 $\mu\text{mol/L}$, 19,38 $\mu\text{mol/L}$ et 27,68 $\mu\text{mol/L}$ par rapport au groupe traité avec CCl_4 (témoin) 358,2 $\mu\text{mol/L}$, 151,2 $\mu\text{mol/L}$, 23,27 $\mu\text{mol/L}$ et 37,71 $\mu\text{mol/L}$, respectivement. Les résultats ont montré que le traitement à l'extrait réduisait le taux de malondialdéhyde, entraînait une déplétion du niveau de peroxydation lipidique avec une augmentation concomitante des activités des enzymes CAT et SOD, ce qui devrait favoriser l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Ottu *et al.*, 2013).

I.4.7.6. Activités antiplasmodiales

L'extrait méthanolique des racines de *C. abbreviata* et ses flavonoïdes isolés tels que le 3,4-dihydro-2-(4-hydroxyphényl)-4-méthoxy-2H-chromen-7-ol (**97**) et le chrysoeriol-7-O-(2''-O- β -D-mannopyranosyl)- β -D-allopyranoside (**63**) ont été évalués pour une activité antiplasmodiale contre deux souches de *plasmodium falciparum* telles que W2 résistant à la chloroquine et D6 sensible à la chloroquine en utilisant la [3H]-hypoxanthine (Muregi *et al.*, 2003). L'extrait lui-même a montré une activité antiplasmodiale prometteuse contre les souches W2 et D6 avec des valeurs CI_{50} de 20,56 et 13,31 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Parmi les composés isolés, le chrysoeriol-7-O-(2''-O- β -D-mannopyranosyl)- β -D-allopyranoside a démontré une activité prometteuse contre les souches W2 et D6 avec des valeurs de CI_{50} de 8,89 et 8,12 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, par rapport à la chloroquine, un antipaludique actuellement disponible,

ayant des valeurs de CI_{50} de 0,026 et 0,029 $\mu\text{g/mL}$ pour les souches D6 et W2 (Kiplagat *et al.*, 2016). Cette étude soutient fortement le fait que les flavonoïdes agissent comme des hits dans le traitement du paludisme contre diverses souches parasitaires.

I.4.7.8. Activités analgésiques et anti-inflammatoires

L'extrait au méthanol des fruits de *C. fistula* a présenté des activités des leucotriènes avec l'inhibition de la formation de leucotriène B₄ (LTB₄) dans les leucocytes polymorphonucléaires bovins (PMNL) 5-lipoxygénase avec une CI_{50} de 38 $\mu\text{g/mL}$ en fonction de la concentration par rapport à l'inhibiteur standard acide nordihydroguaiarétique qui a inhibé la biosynthèse de LTB₄ à 50 % à la dose de 0,12 mg/mL. Cela soutient l'utilisation de *C. fistula* pour la prise en charge thérapeutique des maladies inflammatoires et rhumatismales (Sunil Kumar et Müller, 1998). Lorsque l'extrait au méthanol des feuilles de *C. tora* a été testé pour son effet anti-inflammatoire, il a démontré une inhibition maximale de l'œdème sur la patte de rat à la concentration de 400 mg / kg jusqu'à 40,33%, 31,37%, 53,57% et 29,15% après 3 h dans les modèles d'œdème de patte de rat induit par la carraghénine, le dextran, l'histamine et la sérotonine respectivement et par rapport au médicament de référence phénylbutazone qui a montré des valeurs de 45,34%, 39,52%, 62,81% et 40,95% d'inhibition de l'œdème avec le carraghénane, le dextran, l'histamine et la sérotonine œdème de patte de rat induit, respectivement, après un intervalle de temps similaire. La dose de phénylbutazone était de 100 mg/kg (Maity *et al.*, 1998). Les extraits aqueux et éthanolique des écorces de tige de *C. siamea* ont présenté une activité anti-inflammatoire importante de manière dose-dépendante aux concentrations de 100, 200 et 400 mg/kg avec des intervalles de temps de 4, 2 et 1 h, respectivement en utilisant du carraghénane - modèle d'œdème de patte de rat induit chez des rats expérimentaux. Par rapport à un inhibiteur de la cyclooxygénase, le diclofénac, l'extrait aqueux se montre plus actif que l'extrait à l'éthanol qui présente une activité anti-inflammatoire similaire à celle du diclofénac.

I.4.7.9. Activités antidiabétiques

L'activité antidiabétique de l'extrait aqueux des écorces de *C. glauca* a été évaluée sur les rats dont le diabète a été induit par la streptozotocine en abaissant la glycémie au 21^{ème} jour ($260,3 \pm 12,4$ mg/dL) par rapport au 1^{er} jour ($354,5 \pm 7,3$ mg/dL) la concentration de 500 mg/kg/jour tandis que le contrôle glycémique glibenclamide (0,25 mg/kg/jour) a réduit la glycémie au 21^{ème} jour ($212,2 \pm 6,8$ mg/dL) à partir du 1^{er} jour ($294,5 \pm 11,0$ mg/dL). Les animaux de laboratoire ont présenté une augmentation significative du taux d'insuline plasmatique, du taux d'hémoglobine glycosylée et du taux de glycogène hépatique lorsqu'ils ont été traités avec cet extrait à la dose de 500 mg/kg par rapport au contrôle diabétique. Le

poinds corporel du groupe de rats traités à l'extrait est resté constant tout au long de l'étude, ce qui a montré que l'extrait aqueux de *C. glauca* est un candidat potentiel pour contrôler l'état hyperglycémique du diabète (Salahuddin *et al.*, 2010). L'extrait méthanolique des feuilles de *C. alata* et ses fractions à l'acétate d'éthyle et au butanol ont présenté une activité antidiabétique puissante en utilisant un test d'inhibition de α -glucosidase avec des valeurs de CI_{50} de $63,75 \pm 12,81$, $2,95 \pm 0,47$ et $25,80 \pm 2,01 \mu\text{g/mL}$, respectivement de façon dépendante. L'effet inhibiteur de α -glucosidase de ces groupes est meilleur que celui de l'acarbose, médicament de référence cliniquement utilisé ($CI_{50} = 107,31 \pm 12,31 \mu\text{g/mL}$). Grâce aux techniques spectroscopiques, deux flavonoïdes identifiés à partir des fractions d'acétate d'éthyle et de butanol étaient le kaempférol et le kaempférol 3-*O*-gentiobioside qui ont également montré un potentiel d'inhibition le plus élevé de l' α -glucosidase avec une CI_{50} de $56,7 \pm 7,7$ et $50,0 \pm 8,5 \mu\text{M}$, respectivement, par rapport à l'acarbose standard (Varghese *et al.*, 2013).

I.5. GÉNÉRALITÉS SUR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

I.5.1. Introduction

La tuberculose est une maladie transmissible qui figure parmi les grandes causes de mauvaise santé et qui est l'une des premières causes de décès dans le monde. Elle est causée par le bacille *Mycobacterium tuberculosis*, dont la propagation se fait par voie aérienne, lorsque les personnes atteintes de tuberculose toussent par exemple. La maladie touche généralement les poumons (tuberculose pulmonaire) mais peut également avoir d'autres localisations (tuberculose extrapulmonaire). Environ un quart de la population mondiale est infecté par *M. tuberculosis* (OMS. 2020).

La tuberculose peut toucher tout le monde, partout, mais la plupart des personnes qui développent la maladie sont des adultes, plus souvent des hommes que des femmes, et les 30 pays à forte charge de morbidité due à la tuberculose totalisent près de 90 % des cas de tuberculose survenant chaque année. La tuberculose est une maladie de la pauvreté. Dès lors, la détresse économique, la vulnérabilité, la marginalisation, la stigmatisation et la discrimination sont souvent le lot des personnes touchées par la tuberculose (OMS. 2020).

La tuberculose est une maladie qui peut être guérie et évitée. Environ 85 % des personnes qui développent la tuberculose peuvent être traitées avec succès par un schéma thérapeutique de 6 mois, qui a pour autre avantage de réduire la transmission ultérieure de l'infection. Depuis 2000, les traitements antituberculeux ont permis d'éviter plus de 60 millions de décès, bien que l'accès soit encore loin de l'objectif de la couverture sanitaire universelle (CSU) et que des millions de malades restent non diagnostiqués et non traités. Les

personnes atteintes d'une infection à tuberculose latente peuvent bénéficier d'un traitement préventif. Le nombre de personnes développant l'infection et la maladie (et, par conséquent, le nombre de décès liés à la tuberculose) peut également être réduit par une action multisectorielle visant à agir sur les déterminants de l'infection tels que la pauvreté, la sous-nutrition, l'infection à VIH, le tabagisme et le diabète (OMS. 2020).

La pandémie à COVID-19 menace d'inverser les progrès obtenus récemment dans la réduction de la charge de morbidité due à la tuberculose. À l'échelle mondiale, le nombre de décès dus à la tuberculose pourrait augmenter de 200 000 à 400 000 environ pour la seule année 2020, si les services de santé sont perturbés au point de réduire de 25 % à 50 % sur une période de 3 mois le nombre de personnes atteintes de la tuberculose qui sont dépistées et traitées (OMS, 2020). En Afrique du Sud, Inde, Indonésie et aux Philippines, 4 pays qui totalisent 44 % du nombre total des cas de tuberculose, une forte baisse du nombre de personnes diagnostiquées a été constatée entre janvier et juin 2020. En Afrique Subsaharienne, le Cameroun est le deuxième pays le plus touché après l'Afrique du Sud. A l'inverse, l'analyse des données cumulées concernant les pays d'Afrique Centrale (l'espace géographique le moins contaminé jusqu'à lors), fait remarquer qu'à la date du 30 juin 2020, le Cameroun avait les niveaux de contamination et de décès les plus élevés avec 12592 dont 313 décès, représentant ainsi 39,03% (12592/32257) des cas de contamination et 44,33% (313/706) de décès sur l'ensemble des pays d'Afrique centrale. Au Cameroun, les deux (2) premiers cas atteints de la Covid-19 ont été détectés le 06 mars 2020 (OMS, 2020). Depuis lors, le nombre de cas ne cesse de s'accroître. À la date du 24 juin 2020, ce pays comptait 12 270 cas atteints avec 313 décès. En réalité, dans une période de quatre (04) mois, du 06 mars au 06 juillet 2020, ce nombre a grimpé jusqu'à 14 916 cas atteints de la Covid19 avec 359 décès.

I.5.2. Tuberculose et agent vecteur

Mycobacterium tuberculosis ou bacille de Koch, est un bacille intracellulaire facultatif, de métabolisme aérobie strict et de croissance lente. Le principal agent responsable, il se transmet par voie aérienne, par l'intermédiaire des microgouttelettes de mucus appelées gouttelettes de Pflügge expulsées par la toux, les éternuements et les crachats. Cette maladie peut atteindre de nombreux organes mais préférentiellement les poumons. L'homme est le réservoir habituel de *M. tuberculosis*. La transmission est aérienne. Les vecteurs sont les résidus de condensation de sécrétions respiratoires aérosolisées émises par un patient contagieux. En cas d'infection pérenne, celle-ci est d'abord latente puis évolue facultativement vers une tuberculose (maladie) après quelques mois ou quelques années. Le

passage à la tuberculose (maladie), tuberculose pulmonaire la plupart des cas, survient par extension centrifuge ou dissémination par voie bronchique à partir de la fistulisation d'un ganglion d'une tuberculose pulmonaire ; plus rarement par dissémination hémato-gène (surtout chez l'immunodéprimé), avec survenue d'une miliaire ou de localisations extrapulmonaires (Maillet *et al.*, 2020).

I.5.3. Épidémiologie de la tuberculose

En 2017, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a désigné la tuberculose comme la maladie infectieuse la plus meurtrière au monde devant le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)-syndrome d'immunodéficience acquise. Environ deux millions de personnes chaque année décèdent des suites de cette maladie qui constitue donc un problème majeur de santé publique. La tuberculose est présente sur tous les continents. Sur les dix millions d'individus infectés recensés en 2017, 87 % étaient issus des trente pays à forte charge tuberculeuse dont l'Inde, la Chine, l'Indonésie, les Philippines, le Pakistan, le Nigéria, le Bangladesh et l'Afrique du Sud. En tout, 1,6 million de personnes en sont mortes (Mahaza *et al.*, 2020). La plupart vivait dans des pays à revenus faibles ou intermédiaires, notamment ceux d'Afrique et d'Asie du Sud-Est. Une personne séropositive présente un risque vingt fois plus élevé de développer une tuberculose qu'une personne séronégative. Parmi les patients décédés en 2017, 300 000 étaient porteurs du VIH. La résistance aux antituberculeux n'aide pas à réduire le nombre de décès. L'Inde, la Chine et la Fédération de Russie répertorient près de la moitié des cas de tuberculose multirésistante, forme insensible à l'isoniazide et à la rifampicine (Mahaza *et al.*, 2020).

On distingue 3 types de tuberculose :

- La tuberculose pulmonaire ou « phtisie ». C'est la forme la plus courante de tuberculose (environ 70 % des cas) ;
- La tuberculose extra pulmonaire (Pleurésie, ganglionnaire, osseuse, péritonéale, péricardique etc.) ;
- La tuberculose disséminée ou miliaire (comme des graines de millet disséminées dans tout le poumon, lui donnant une apparence caractéristique).

I.5.3.1. Tuberculose pulmonaire

La tuberculose pulmonaire résulte soit d'une surinfection exogène à partir d'un sujet très contagieux (tuberculose primaire) ; soit d'une réinfection tuberculeuse, granulome ou tuberculose pulmonaire insuffisamment ou non traitée ayant laissé en place des bacilles vivants (tuberculose secondaire). En raison de sa contagiosité, elle est responsable de la

transmission du bacille tuberculeux. Les lésions anatomiques et la symptomatologie clinique ne sont pas proportionnelles en général.

Dans la majorité des cas, le tableau clinique est celui d'une maladie respiratoire aiguë, d'une infection broncho-pulmonaire aiguë, d'une bronchite récidivante ne régressant pas de façon satisfaisante sous antibiothérapie, pleurésie, pneumothorax, hémoptysie dans le cas de la maladie avancée... Le symptôme, le plus fréquent est la toux qui est d'abord sèche puis devient productive. Les bacilles tuberculeux sont peu nombreux et dormants durant la phase d'infection tuberculeuse latente (ITL). La sensibilisation des cultures est trop faible à ce stade pour faire un test diagnostique suffisant. Ce n'est donc pas la mise en évidence du bacille tuberculeux qui définit l'ITL, mais la détection d'une réaction immunitaire aux bacilles tuberculeux. Or, il n'est pas certain que l'équation « immunité adaptative = infection tuberculeuse » (latente) soit systématiquement exacte. De ce fait, il n'existe pas de test étalon d'une ITL et nous sommes soumis à tous les aléas des immunodiagnostic (Karembe, 2020). Les symptômes systématiques non spécifiques tels qu'une asthénie ne cédant pas au repos, un amaigrissement progressif, une anorexie, une fièvre bien tolérée accompagnée d'hypersudation à prédominance nocturne peuvent marquer l'évolution de la maladie. La progression des lésions parenchymateuses ou pleurales peut expliquer une dyspnée ; d'abord à l'effort, puis permanente.

- La Co-infection Tuberculose – VIH/sida

Le tableau clinique de la tuberculose chez les patients atteints de VIH/sida peut être souvent atypique et les symptômes systématiques peuvent être proches des symptômes liés au VIH et à d'autres co-infections. La recherche de la tuberculose doit être systématique chez les patients séropositifs au VIH car la tuberculose est la plus fréquente des infections opportunistes qui apparaissent de façon précoce chez ces patients (Karembe, 2020).

I.5.3.2. Tuberculose extra pulmonaire

Les malades présentant une tuberculose extra pulmonaire ne sont pas contagieux, s'il n'y a pas de localisations pulmonaires. Les symptômes qui la caractérisent sont souvent propres aux organes atteints, on peut avoir :

- La tuberculose Hépatosplénique ;
- La tuberculose Gastro intestinale ;
- La péricardite Tuberculeuse ;
- La pleurésie Tuberculeuse ;
- La tuberculose Ganglionnaire ;
- La miliaire Tuberculeuse ;

– La tuberculose Ostéoarticulaire ;

Puis celle de la sphère ORL, Oculaire, tous les organes peuvent être atteints.

I.5.3.3. Diagnostic bactériologique

La Bacilloscopie est la méthode la moins coûteuse pour le diagnostic de la tuberculose et diagnostic de suivi.

I.5.3.4. Examens directs des crachats

Le diagnostic de certitude de la tuberculose repose sur la mise en évidence du BK dans les produits pathologiques. Dans la tuberculose pulmonaire, elle permet la recherche des sujets bacillifères qui sont à l'origine de la propagation de la maladie (Yombi & Olinga, 2015).

I.5.4. Cycle du *Mycobacterium tuberculosis* chez l'Homme

La localisation la plus fréquente de la maladie tuberculeuse est pulmonaire. Les gouttelettes de Pflügge émises par ces malades se transforment en noyaux microscopiques (1 à 10 micromètres) demeurant longtemps en suspension dans l'air ambiant. Ces bacilles, une fois inhalés, vont se loger au niveau des alvéoles pulmonaires et créer la lésion initiale. Selon les estimations, 50 millions d'infections par an maintiennent un pool d'environ 2 milliards d'individus infectés de manière latente. Dans quelques cas, l'infection se transforme directement en tuberculose active. Avec la réactivation et la réinfection, cela donne lieu à environ 9 millions de nouveaux cas de tuberculose par an. Lors de l'inhalation de telles gouttelettes, le pathogène atteint les voies respiratoires pulmonaires et est phagocyté par les macrophages alvéolaires. La cellule hôte infectée induit une réponse pro-inflammatoire localisée qui attire les cellules mononucléées et les lymphocytes T pour former un granulome, la réaction tissulaire caractéristique de la tuberculose. Les individus en bonne santé peuvent contrôler le pathogène à ce stade, mais restent infectés de manière latente et risquent donc d'être réactivés à vie. La maturation du granulome (solide, nécrotique, et caséuse) se produit à des vitesses différentes et aboutit généralement à la coexistence de toutes les formes de lésions pendant la tuberculose active. Le granulome caséant perd sa solidité à cause de la désintégration de son centre en une accumulation sans structure de débris de cellules hôtes, le caséum. Le Mtb atteint un nombre élevé, est libéré dans les voies respiratoires et toussé sous forme d'aérosol contagieux.

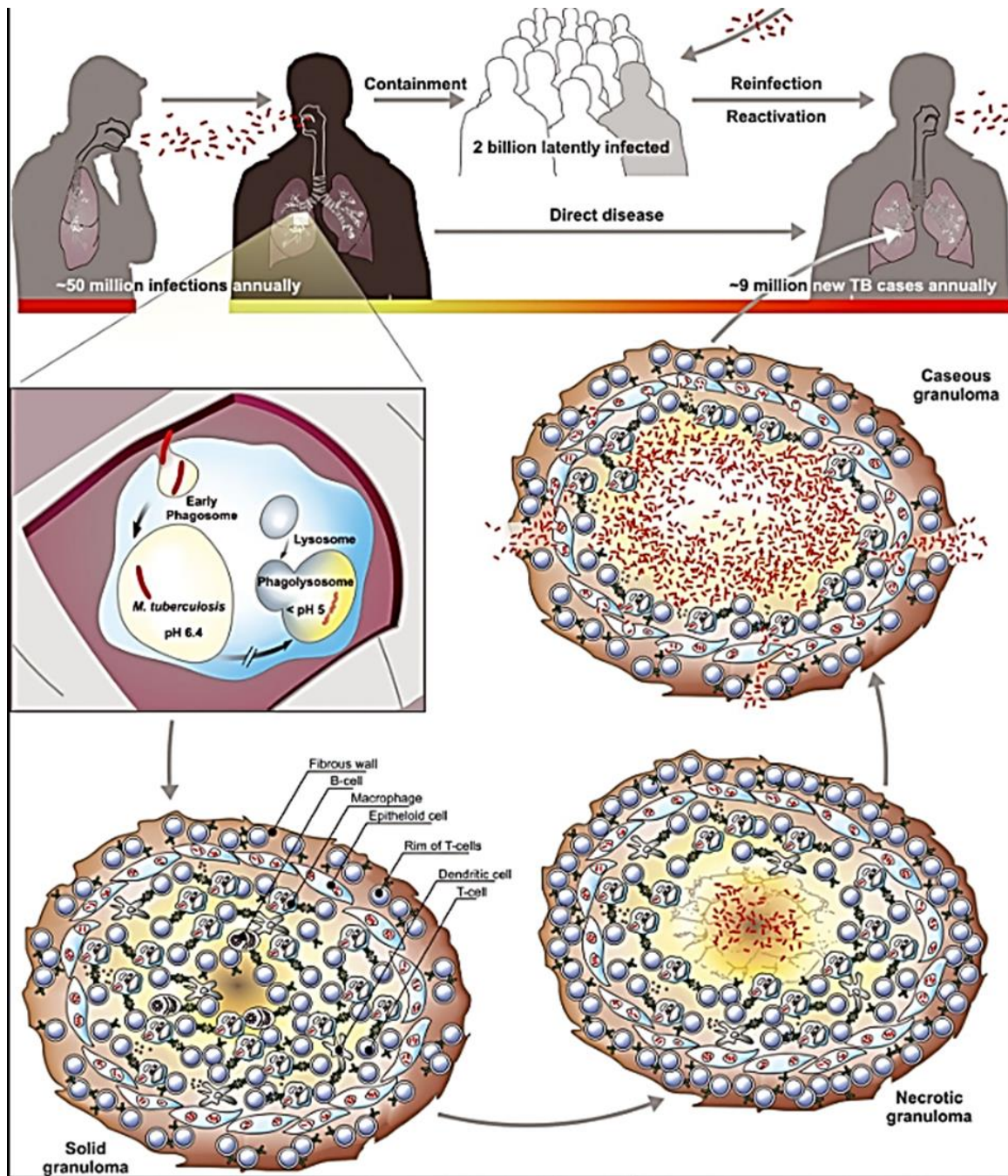


Figure 8: Cycle du *Mycobacterium tuberculosis* chez L'Homme (Schnappinger *et al.*, 2003).

Le Mtb est protégé dans l'environnement par une paroi cellulaire robuste. Lors de la phagocytose par les cellules hôtes, Mtb subit des changements environnementaux drastiques et doit donc réaliser son métabolisme pour assurer sa survie. Les techniques de micro réseau à l'échelle du génome pour étudier la réponse transcriptionnelle de Mtb à cette transition ont fourni des informations plus approfondies sur la nature de l'environnement phagosomal, qui a été suggéré comme nitrosatif, oxydant, faible en tension d'oxygène et limité en nutriments (Schnappinger *et al.*, 2003).

I.5.5. Traitement de la tuberculose

Il est important de signaler que depuis au moins 35 ans, voire 45 ans, le traitement de la tuberculose n'a pratiquement pas changé ou peu, en-dehors de celui des multirésistances. Ce traitement met en œuvre une association de quatre anti-tuberculeux de première ligne que sont l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide et l'éthambutol (Tableau XIII). En général, on prescrit une quadrithérapie pendant 2 mois, suivie par une bithérapie avec la rifampicine et isoniazide pendant quatre mois supplémentaires (Yombi & Olinga, 2015).

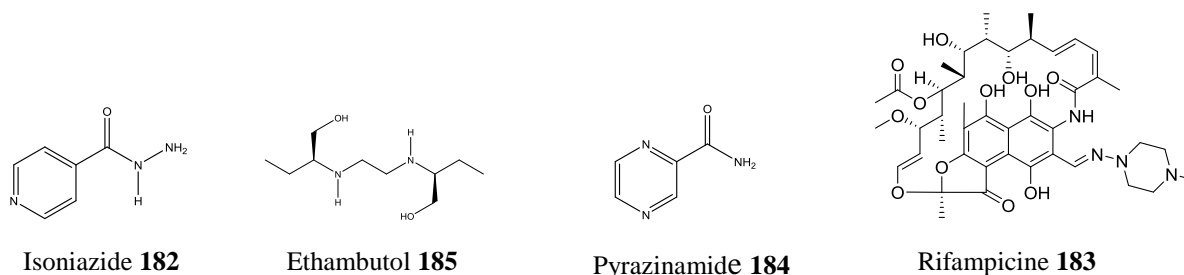


Figure 9: Structure des molécules conventionnelles

Tableau XIII: Quelques médicaments conventionnels antituberculeux et leur posologie

Médicaments conventionnels	Administration quotidienne			Administration intermittente 3x/semaine		
	Enfants (mg/kg)	Adultes (mg/kg)	Dose maximale mg/jour	Enfants (mg/kg)	Adultes (mg/kg)	Dose maximale mg/jour
Isoniazide	5-10 (15)	5	300	10	10 (15)	900
Rifampicine	10-20	10	600	10	10	600
Pyrazinamide	25-40	25	2000	35-50	35	2000
Ethambutol	15 (25)*	15 (25)	1600	30	30	2000

() Dose majorée en cas de tuberculose grave

*25 mg pas plus de 30 jours (Yombi et Olinga., 2015).

Il est important de se rendre compte que, dans cette combinaison, les antibiotiques jouent un rôle différent, ce qui nous permet de comprendre la raison sous-jacente de cette association d'antibiotiques. La durée du traitement est de 6 mois pour les tuberculoses pulmonaires ainsi que pour les tuberculoses extrapulmonaires, excepté dans les tuberculoses neuroméningées où elle est de 9 à 12 mois. Pour les tuberculoses ostéo-articulaires, il y a discussion entre un traitement conventionnel de 6 mois versus un traitement de 9 à 12 mois. (Yombi et Olinga, 2015). À côté de ce traitement à base des médicaments conventionnels, il

existe cependant, une pharmacothérapie stricte qui n'est pas accessible à la plupart des patients, en particulier ceux des pays à forte charge, d'Asie et d'Afrique. Les produits naturels ont joué un rôle crucial dans le traitement de la tuberculose. L'effort mondial pour réduire l'incidence de la tuberculose, combiné au développement rapide de souches résistantes, a accru l'intérêt pour les produits naturels en tant que sources de nouveaux composés antituberculeux. Plus de 353 nouveaux agents antituberculeux ont été identifiés et caractérisés à partir des sources biologiques (Copp & Pearce, 2007). De plus, 127 composés de différentes classes issus de 58 espèces végétales ayant montré une activité contre les souches de *Mycobacterium tuberculosis*. Parmi ceux-ci, on dénombre 39 composés qui peuvent être développés en tant que futurs médicaments antimycobactériens avec des CMI < 10 µg/mL, comparables aux agents antimycobactériens tels que l'Isoniazide (**182**), la Rifampicine (**183**) et l'Ethambutol (**185**) (Santhosh *et al.*, 2013). Ces composés étaient des Alcaloïdes, Flavonoïdes, Chalcones et quinones, Coumarines, lignanes et phénols, Chromones, acides gras et terpénoïdes, Alcanes, alcènes, alcynes, et divers composés aromatiques, soulignant davantage l'importance de ces classes de produits naturels dont quelques uns sont consignés dans le tableau ci-dessous.

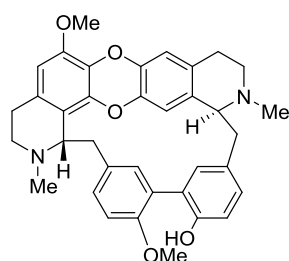
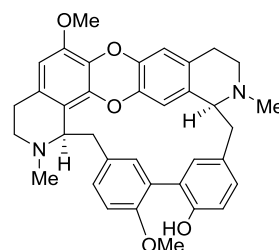
Tiliacorinine **186**Tiliacrine **187****Figure 10** : Structure de quelques molécules naturelles

Tableau XIV: Quelques composés naturels antimycobactériens issus des plantes

Composés	Classe	Source végétale	lignées cellulaires	CMI (µg/mL)	Références
tiliacorinine	Alcaloïde	<i>Tiliacora triandra</i> (racines)	MRC-5	3,1	Sureram <i>et al.</i> , 2012
2'-nortiliacorinine	Alcaloïde	<i>Tiliacora triandra</i> (racines)	MRC-5	3,1	Sureram <i>et al.</i> , 2012
tiliacorine	Alcaloïde	<i>Tiliacora triandra</i> (racines)	MRC-5	3,1	Sureram <i>et al.</i> , 2012
13'-bromo-tiliacorinine	Alcaloïde	<i>Tiliacora triandra</i> (racines)	MRC-5	1,5-3,1	Sureram <i>et al.</i> , 2012
pinocembrine	Flavonoïde	<i>Cryptocarya chinensis</i> (feuilles)	H ₃₇ RV	6,25	Chou <i>et al.</i> , 2011
isobachalcone	Flavonoïde	<i>Dorstenia barteri</i> (racines)	H ₃₇ RV	2,8	Kuete <i>et al.</i> , 2010
(2S)-naringénine	Flavonoïde	<i>Ficus nervosa</i> (racines)	H ₃₇ RV	2,8	Chen <i>et al.</i> , 2010
7-méthyljuglone	Quinone	<i>Euclea natalensis</i> (racines)	mycothiol disulfure réductase	0,24	Mahapatra <i>et al.</i> , 2007
palmarumycine JC2	Quinone	<i>Diospyros ehretioides</i>	mycothiol disulfure réductase	0,24	Prajoubklang <i>et al.</i> , 2005
licarine A	Coumarine	<i>Aristolochia taliscana</i> (racines)	H ₃₇ RV	3,12-12,5	León-Díaz <i>et al.</i> , 2010
époxyfuranoïdes beilschmin A	Lignane	<i>Beilschmiedia tsangii</i> (racines)	H ₃₇ RV	2,5-7,5	Chen <i>et al.</i> , 2007
époxyfuranoïdes beilschmin B	lignane	<i>Beilschmiedia tsangii</i> (racines)	H ₃₇ RV	2,5-7,5	Chen <i>et al.</i> , 2007

Les produits naturels sus-cités ont montré une activité antimycobactérienne remarquable avec une CMI allant de 0,4 à 7,5 µg/mL. Ce pendant il est nécessaire de pourssuivre la recherche des nouvelles molécules bioactives ayant une activité antimycobactérienne intéressante pouvant conduire aussi à un candidat médicament.



CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION

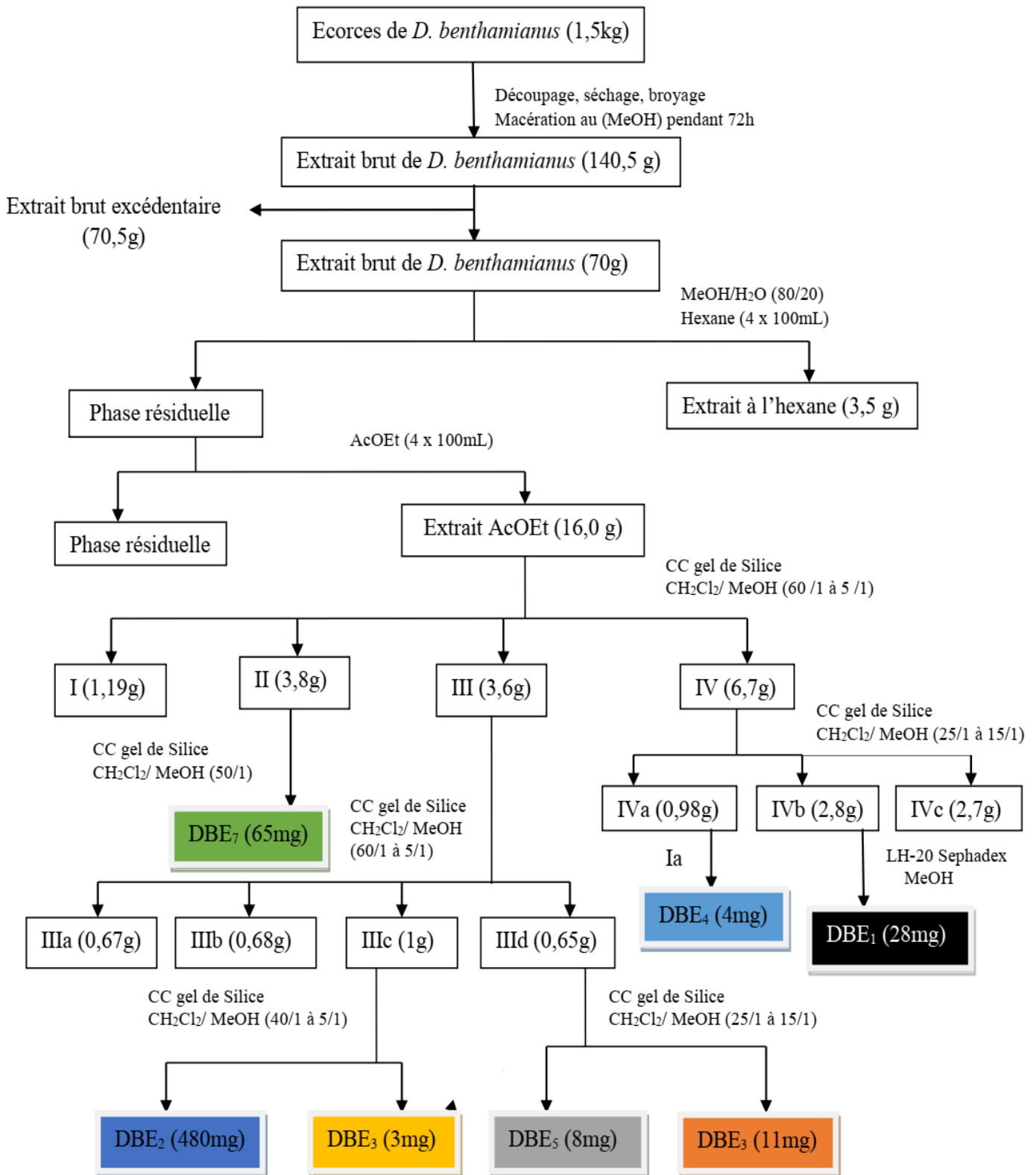
II.1. ÉTUDE PHYTOCHYMIQUE DES ÉCORCES DE *DISTEMONANTHUS BENTHAMIANUS*

II.1.1. Extraction et Isolement des constituants des écorces de *Distemonanthus benthamianus*

Les écorces de *Distemonanthus benthamianus*, ont été récoltées dans l'arrondissement d'Eséka, Région du Centre, département du Nyong et Kélé, plus précisément dans la localité de Koumoul en Mars 2014. La plante (écorces et feuilles) a été authentifiée par le botaniste victor Nana de l'Herbier National de Yaoundé-Cameroun et un échantillon de référence s'y trouve au N°45488 HNC. Le matériel végétal a été ensuite séché à l'air libre et à l'abri du soleil pendant deux semaines puis broyées.

La poudre sèche de *D. benthamianus* (1,5 kg) a subi une macération dans 3 L de méthanol à température ambiante pendant 72h. Cette opération s'est répétée trois fois avec à chaque fois renouvellement du solvant. Après filtration et évaporation du solvant, une masse de 140,5 g d'extrait brut a été obtenue. 70 g de cet extrait a été mis en suspension dans le mélange MeOH-H₂O (80:20). Cette solution hydro-méthanolique a subi une délipidation avec du n-hexane (100ml x 4), puis a été soumise à une extraction liquide-liquide avec EtOAc (100ml x 4). L'épuisement de la phase résiduelle (MeOH/H₂O) avec l'acétate d'éthyle a donné un extrait à l'acétate d'éthyle de 16 g. Cet extrait a été fractionné sur une colonne ouverte de gel de silice selon un gradient de polarité croissante CH₂Cl₂/MeOH (60/1 à 5/1). Les flacons ont été combinés en quatre fractions majeures indexées : I (1,19 g ; 1-30) ; II (3,8 g ; 31-109), III (3,6 g ; 110-170) ; IV (6,7 g ; 171-254) en fonction de leur profil chromatographique (CCM).

La purification des fractions par différentes méthodes chromatographiques a permis d'isoler sept composés. Le schéma 1 ci-dessous présente les différentes étapes d'isolement des composés de *D. benthamianus*.



Légende : (Ia) CC gel de Silice : CH₂Cl₂/ MeOH (25/1 à 15/1)

Schéma 1: Protocole d'extraction et d'isolement des constituants des écorces de *D. benthamianus*

II.2. ÉTUDE PHYTOCHYMIQUE DES FEUILLES DE *DISTEMONANTHUS BENTHAMIANUS*

II.2.1. Extraction et isolement des constituants des feuilles de *Distemonanthus benthamianus*

La poudre sèche de *D. benthamianus* (1,3 kg) a subi une macération dans 3 L de méthanol à température ambiante pendant 72h. Cette opération s'est répétée trois fois avec à chaque fois renouvellement du solvant. Après filtration et évaporation du solvant, 120,5 g d'extrait brut a été obtenu. 60 g de cet extrait a été mis en suspension dans le mélange MeOH-H₂O (80/20). Cette solution hydro-méthanolique a subi une délipidation avec du n-hexane (100ml x 4), puis a été soumise à une extraction liquide-liquide avec EtOAc (100ml x 4). L'épuisement de la phase résiduelle (MeOH/H₂O) avec l'acétate d'éthyle a donné un extrait à l'acétate d'éthyle de 14,5 g. Cet extrait a été fractionné sur une colonne ouverte de gel de silice selon un gradient de polarité croissante CH₂Cl₂/MeOH (40/1 à 5/1). Les flacons ont été combinés en quatre fractions majeures indexées : I (1,1 g ; 1-40) ; II (4 g ; 41-99), III (3,9 g ; 100-140) ; IV (5,5 g ; 141-200) en fonction de leur profil chromatographique (CCM).

La purification des fractions par différentes méthodes chromatographiques a permis d'isoler sept composés. Le schéma 2 ci-dessous présente les différentes étapes d'isolement des composés de *D. benthamianus*.

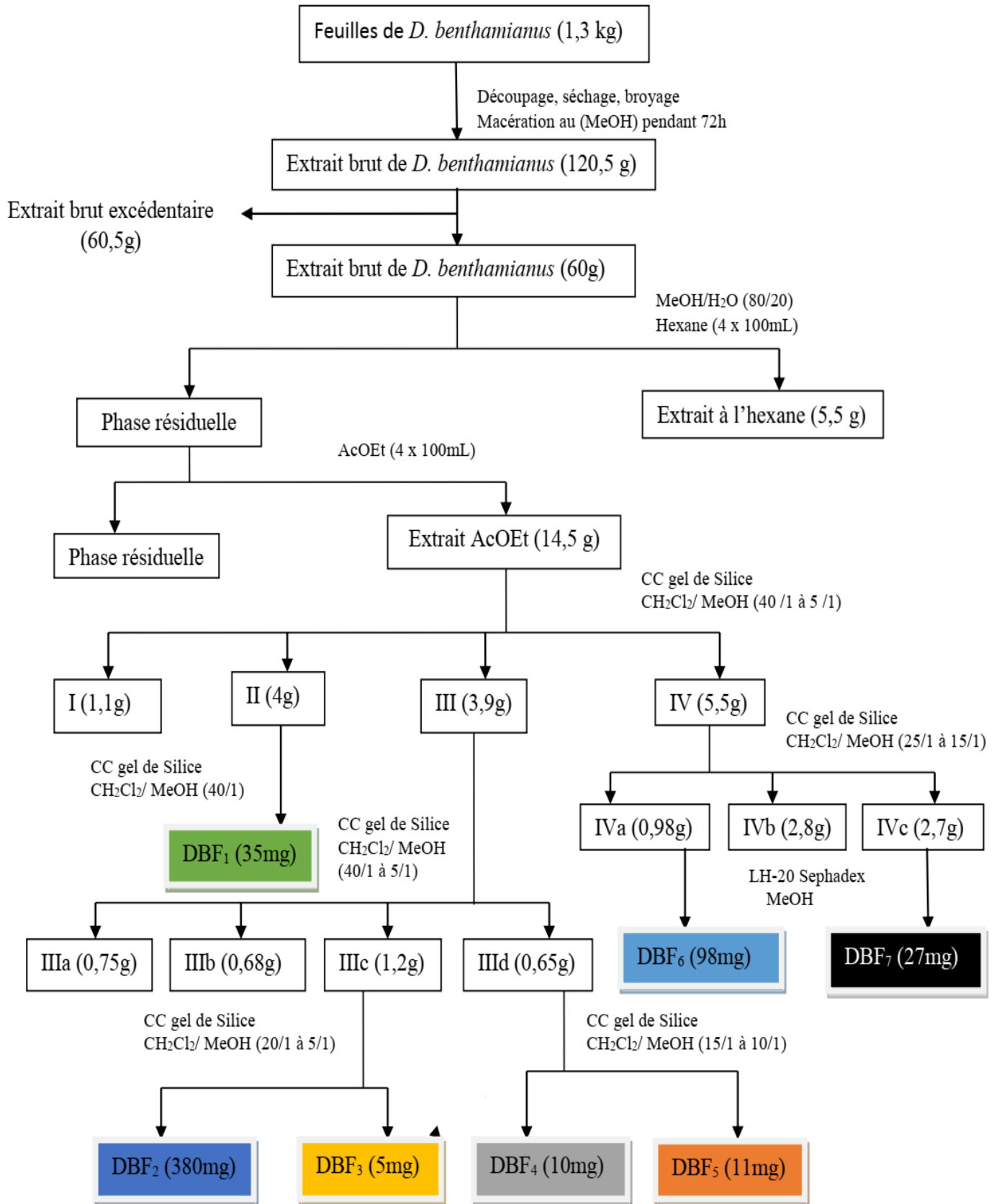


Schéma 2: Protocole d'extraction et d'isolement des constituants des feuilles de *D. benthamianus*

II.3. DÉTERMINATION STRUCTURALE DES COMPOSÉS ISOLÉS DE *DISTEMONANTHUS BENTHAMIANUS* PAR FAMILLE ET PAR CLASSE

L'élucidation structurale des composés isolés a été effectuée principalement au moyen des techniques de spectrométrie de masse (MS) et de résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces composés ont été regroupés en quatre classes : les Flavonoïdes, les dérivés d'acide benzoïque, les stéroïdes et les alcaloïdes.

II.3.1. De la famille des Flavonoïdes

II.3.1.1. De la classe des Flavones

II.3.1.1.1. Détermination structurale de DBE₁

Le composé DBE₁ a été obtenu sous forme de poudre amorphe de couleur jaune dans le système CH₂Cl₂/MeOH (10/1). Il répond positivement au test de Shinoda, caractéristique des flavonoïdes. Son spectre de masse FAB présente le pic de l'ion *pseudo* moléculaire [M+2H]²⁺ à m/z = 580. Cette masse est confirmée par le spectre ESI-MS en mode négatif qui présente le pic de l'ion adduit protoné [M-H]⁻ à m/z 577,4 en accord avec la formule brute C₂₇H₃₀O₁₄.

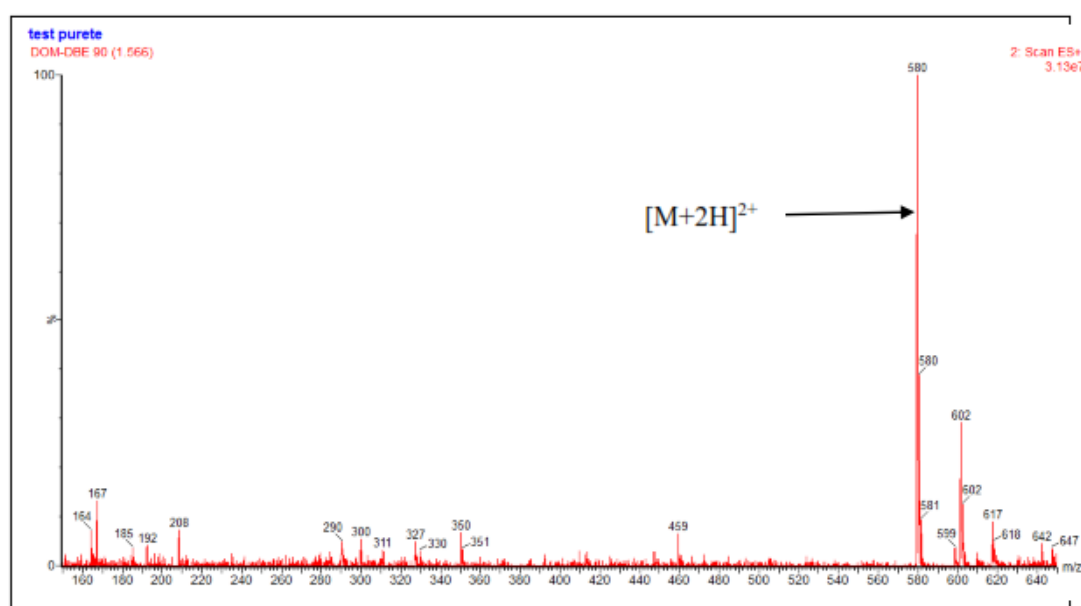


Figure 11 : Spectre de masse (FAB) du composé DBE₁

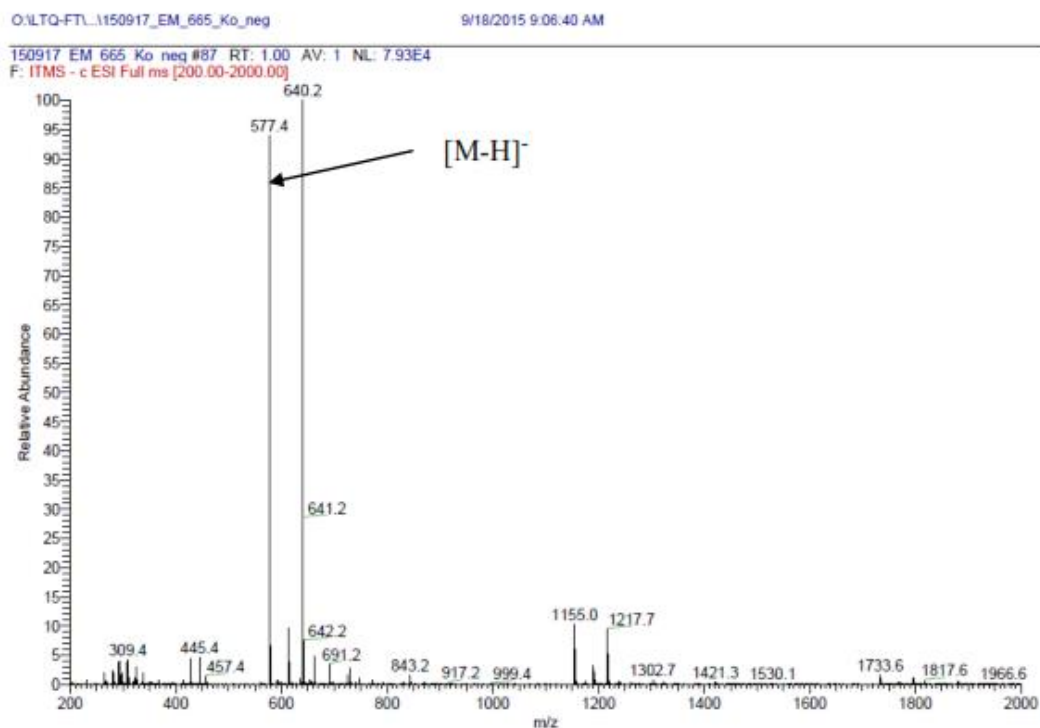


Figure 12: Spectre de masse (ESI-MS) du composé DBE₁

Son spectre IR indique la présence du groupement hydroxyle (-OH) à 3219 cm⁻¹, d'un carbonyle chélaté (-C=O chélaté) à 1652 cm⁻¹ et les bandes d'absorptions correspondant aux noyaux aromatiques entre 1603-1572 cm⁻¹ en accord avec les structures de type flavonoïdes. Les propriétés spectrales UV de DBE₁ ont montré des maxima d'absorption à λ_{max} 340 nm (bande I) et 268 nm (bande II) dans le MeOH, caractéristiques d'une unité flavone substituée (Mabry *et al.*, 1970).

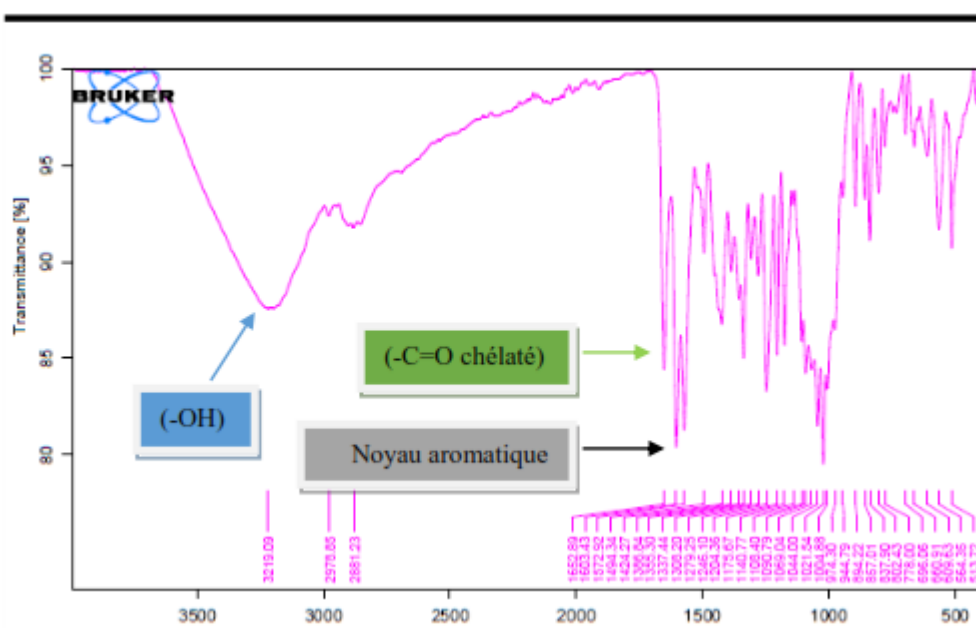


Figure 13: Spectroscopie infrarouge du composé DBE₁

Le spectre de RMN ^1H (Figure 12) du composé DBE₁ met en évidence un signal d'un singulet à δ_{H} 6,82 (s, H-3), caractéristique du proton H-3 d'une unité flavone (Mabry *et al.*, 1970). Sur ce même spectre, on observe un système AA'BB' de 4 protons dont les signaux apparaissent à δ_{H} 8,04 (2H, d, $J=8,8$ Hz, H-2' et H-6') et 6,96 (2H, d, $J=8,8$ Hz, H-3' et H-5') pour le cycle B. On observe également un proton aromatique dont le signal apparait sous forme de singulet à δ_{H} 6,44 (1H, s, H-8) indiquant que le noyau aromatique A est pentasubstitué et un singulet à δ_{H} 3,86 suggérant la présence d'un méthoxyle dans la molécule.

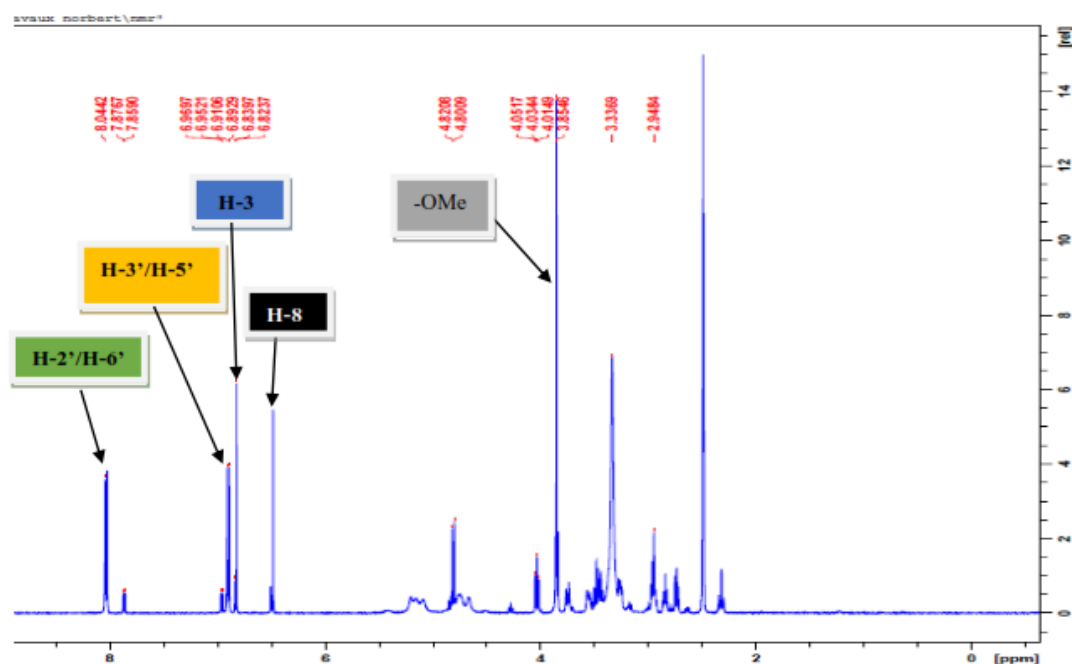


Figure 14: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé DBE₁

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C découplé proton large bande, nous permet de distinguer 6 méthines aromatique (CH) à δ_{C} 102,3 (C-3) ; 94,8 (C-8) ; 115,8 (C-3'/5') et 128,9 (C-2'/6') ainsi que 9 carbones quaternaires (C) parmi lesquels 6 carbones oxygénés hybridés sp^2 dont un carbonyle à δ_{C} 182,1 (C-4) le reste raisonnant respectivement à δ_{C} 164,1 (C-2) ; 163,4 (C-7) ; 161,4 (C-9) ; 161,2 (C-4') et 155,5 (C-5).

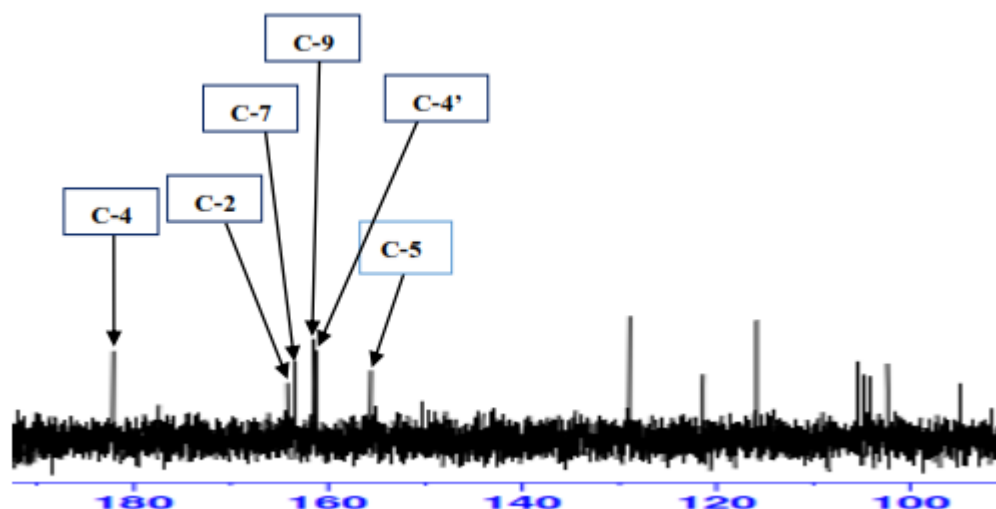


Figure 15: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé DBE_1

Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre les signaux de protons à 6,82 ppm (H-3) et les carbones à δ_{C} 104,7 (C-6), 121,3 (C-1'), 155,5 (C-5) et à 182,1 (C-4) respectivement puis à δ_{H} 6,44 (H-8) et les carbones respectifs à δ_{C} 163,4 (C-7), 161,4 (C-9) et à 104,7 (C-6). Toutes les valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres COSY et HSQC du composé DBE_1 .

L'analyse des spectres de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC et HMBC de DBE_1 a permis d'attribuer toutes les valeurs des déplacements chimiques de notre aglycone identifié à l'apigénine.

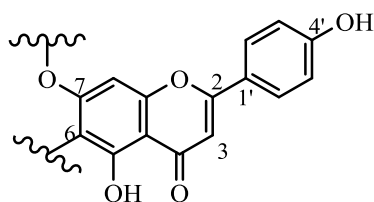


Figure 16: Structure de l'Apigénine

L'observation du signal du carbone résonnant à δ_{C} 104,7 (C-6), montre que DBE_1 est un dérivé de type 6 monodesmosidique de l'apigénine (**Figure 16**) ayant une chaîne osidique liée en C-6 au moyen d'une liaison carbone-carbone [(C-6)-(C-1'')] (Takayuki *et al.*, 2012).

Les sucres de DBE_1 ont été déterminés comme étant les monosaccharides suivants : D-Glc et D-Xyl par hydrolyse acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CGP) de leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les sucres de références du laboratoire.

En effet, l'analyse du spectre de RMN ^1H de DBE_1 permet de distinguer deux signaux de protons anomériques résonnant à δ_{H} 4,81 (d, $J = 10$ Hz, H-1'') et 3,82 (d, $J = 7,0$ Hz, H-

1''') qui corrént en HSQC avec les carbones δ_C 73,5 (C-1'') et 105,3 (C-1'''). La configuration β a été attribuée au proton anomérique de Glc et Xyl sur la base de leurs constantes de couplage $^3J_{H-1, H-3}$ comprises entre 7,0-10 Hz (Takayuki *et al.*, 2012).

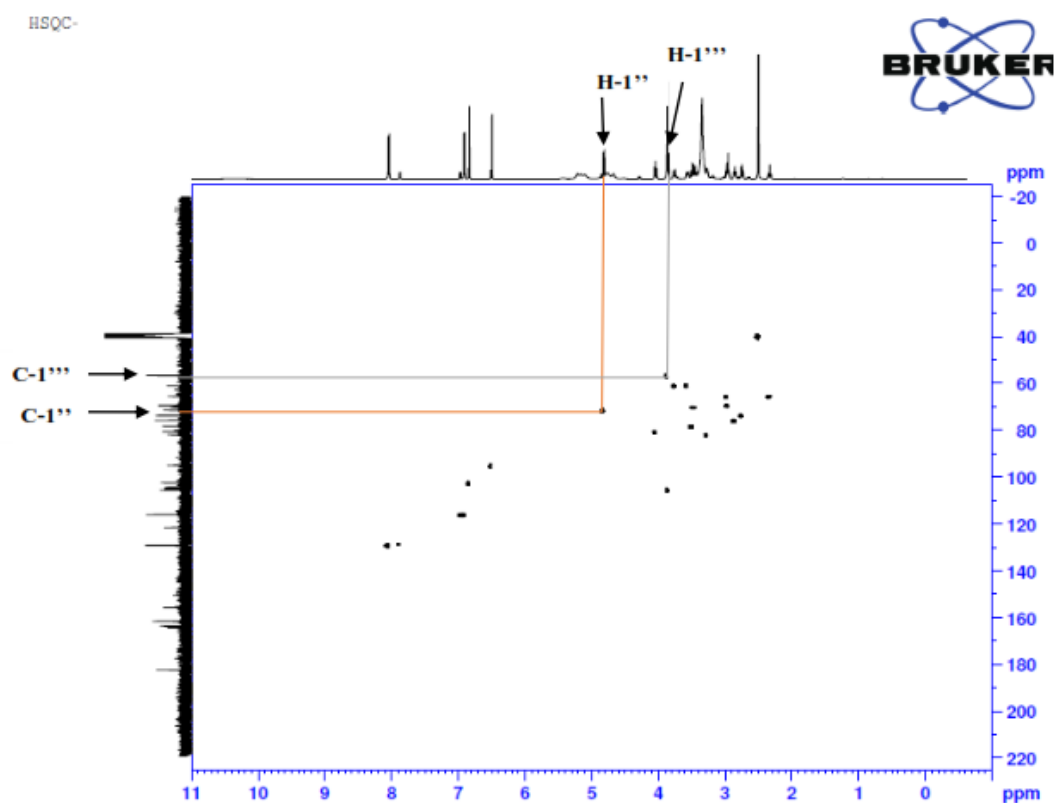


Figure 17: Spectre HSQC du composé DBE₁

L'analyse des spectres HMBC et NOESY a permis de déterminer les points de jonction des chaînes osidiques sur l'aglycone ainsi que les liaisons interglycosiques.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le proton à δ_H 4,81 (H-1'' Glc) et les carbones à δ_C 163,4 (C-7); 155,5 (C-5); 104,7 (C-6) et 81,7 (C-5'') (Figure 16), suggère que le glucose est lié à l'apigénine en position 6.

En outre, la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton à δ_H 3,82 (Xyl H-1''') et le carbone à δ_C 80,4 (Glc C-3'') suggère que la xylose est liée au glucose en position 3''. Ceci est confirmé par la corrélation observée dans le spectre NOESY à δ_H 4,01 (H-3'') / δ_H 3,82 (Glc H-3'' / Xyl H-1''').

Le groupement methoxyle quant à lui, a été fixé sur l'aglycone grâce à la corrélation observée sur le spectre HMBC (**Figure 18**) entre le proton à δ_H 3,86 (7-OCH₃) et le carbone δ_C 163,4 (C-7) suggérant que le groupement méthoxy est lié au carbone C-7 du noyau A. En

outre, l'expérience NOESY (**Figure 19**) a confirmé cette position par la corrélation observée entre H-8 (δ_H 6,44) et les signaux des protons méthoxyles à δ_H 3,86.

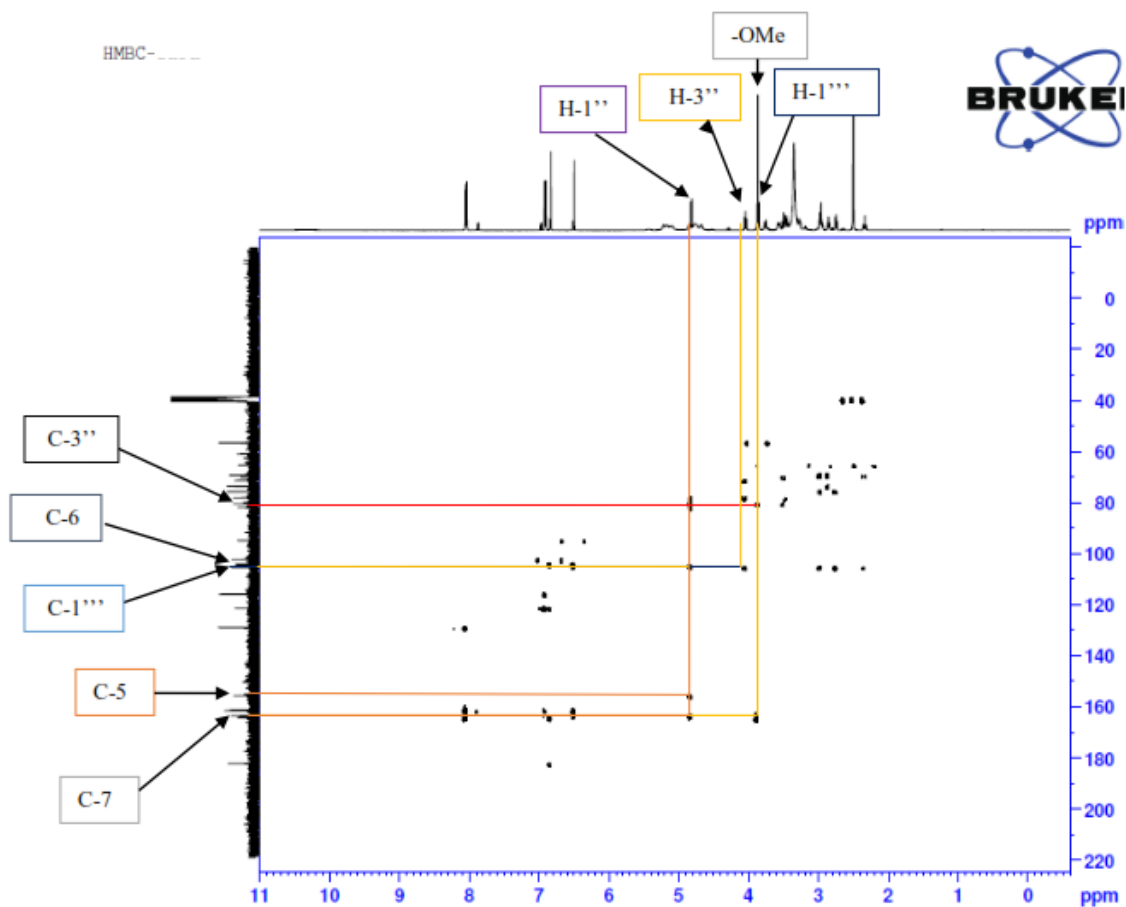


Figure 18: Spectre HMBC du composé DBE₁

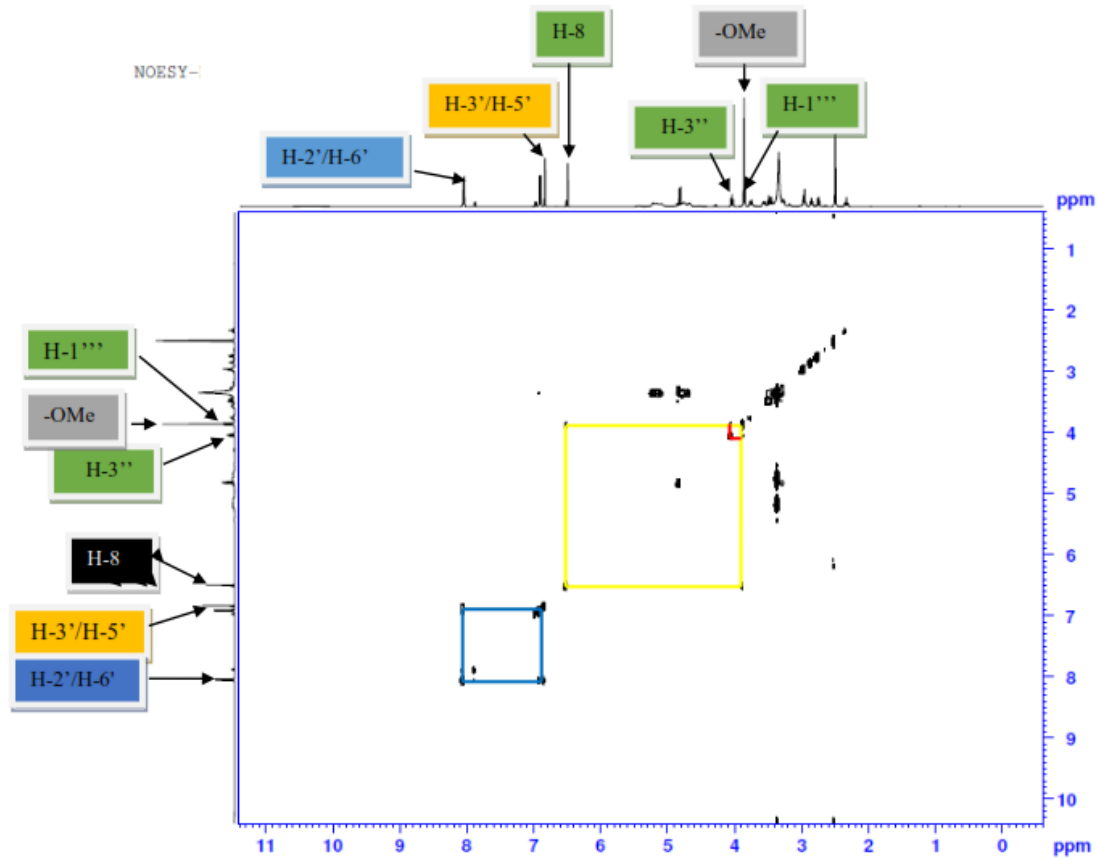


Figure 19: Spectre NOESY du composé DBE₁

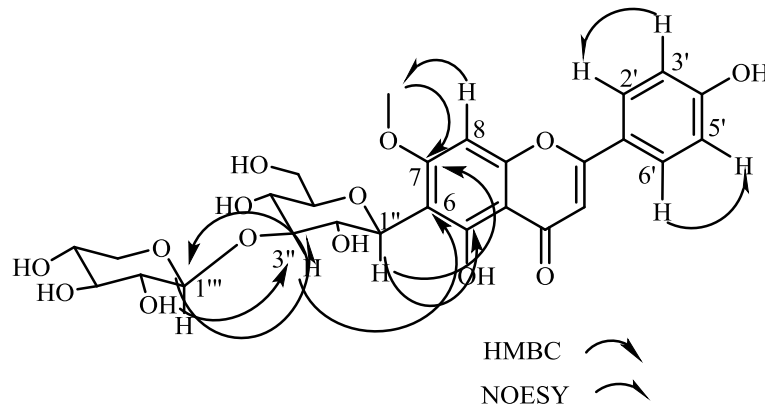
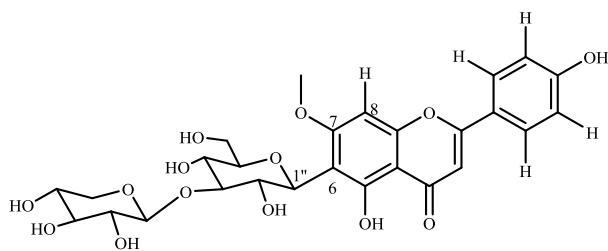


Figure 20: Corrélations HMBC et NOESY du composé DBE₁

Sur la base de ces résultats, la structure de DBE₁ a été établie comme étant l'apigénine 7-méthyl éther 6-C-[β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glucopyranoside] auquel le nom distemonanthoside a été attribué, composé nouvellement isolé de *D. benthamianus* (Évina *et al.*, 2017).



188

Apigénine 7-méthyl éther 6-C-[β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glucopyranoside]

Tableau XV: Données RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé DBE₁ dans le DMSO- d_6 (δ en ppm; J en Hz).

N°	δ_{H}	δ_{C}	HMBC (C \rightarrow H)
2	-	164,1	-
3	6,82 (s)	102,3	-
4	-	182,1	-
5	-	155,5	-
6	-	104,7	-
7	-	163,4	-
8	6,44 (s)	94,8	-
9	-	161,4	-
10	-	104,1	-
1'	-	121,3	-
2'	8,04 (d; 8,8)	128,9	C-3'; C-5'
3'	6,96 (d; 8,8)	115,8	C-2'; C-6'
4'	-	161,2	C-2'; C-5'
5'	6,96 (d; 8,6)	115,8	C-2'; C-6'
6'	8,04 (d; 8,6)	128,9	C-3'; C-5'
7-OCH ₃	3,86 (s)	56,5	-
6-C-glucose			
1''	4,81 (d; 10)	73,5	C-2''; C-5''
2''	3,39	78,1	C-1''
3''	4,01	80,4	C-1''
4''	3,36	73,3	C-2''; C-5''
5''	3,21	81,7	C-1''; C-6''
6''	3,72 (dd; 11,3; 2,4)3,42	60,8	C-5''
3''-O-xylose			
1'''	3,82 (d; 7,0)	105,3	C-2'''; C-5'''
2'''	2,78	75,6	C-1'''
3'''	2,81	76,4	C-1'''; C-5'''
4'''	2,89	69,2	C-5'''
5'''	2,83 (dd; 11,5; 4,0)2,39	65,3	C-1'''; C-4'''

II.3.1.1.2. Identification de 6''-O-acetylvitexine (DBE₆)

Le composé DBE₆ se présente sous forme de cristaux jaunes avec un point de fusion compris entre 220-222 °C. Son spectre UV est similaire à celui de la vitexine. Il réagit positivement au test de Shinoda, caractéristique des flavonoïdes. Son spectre de masse HR-FAB-MS montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 474,1151, ce qui est cohérent avec la formule moléculaire C₂₃H₂₂O₁₁ renfermant 13 degrés d'insaturations.

Les bandes d'absorption à ν_{\max} 3370, 1710, 1650, 1606 et 1520 cm⁻¹ sur le spectre IR sont caractéristiques des groupes hydroxyle, carbonyle non conjugué, carbonyle à liaison hydrogène et aromatique, respectivement. Son spectre UV (MeOH) a montré des maxima d'absorption à 270 (Bande II), 333 (Bande I) nm.

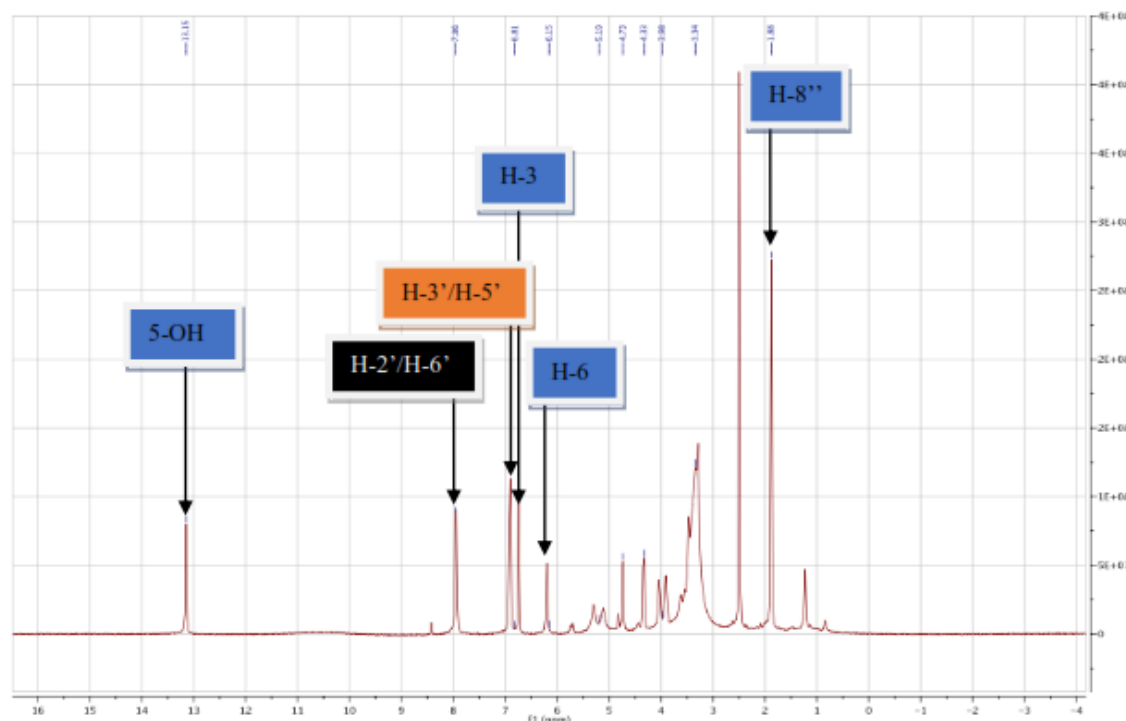


Figure 21: Spectre de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé DBE₆

Le spectre de RMN ¹H indique la présence d'un groupement OH chélaté caractéristique de la présence en C-5 d'un OH dans le squelette flavonoïde à δ_H 13,15 (5-OH), un noyau benzénique disubstitué présentant un système AA'XX' établi à partir des signaux à 7,95 (2H; d; $J = 8,8$ Hz; H-2'/6') et 6,91 (2H; d; $J = 8,8$ Hz; H-3'/5'), un noyau benzénique pentasubstitué à δ_H 6,25 (s; H-6), un proton à δ_H 6,77 (s; H-3) qui caractérise les protons portés par le carbone C-3 des flavones, un groupe acétyle à δ_H 1,98 (s; H-8''). Ces données indiquent que la fraction aglycone était analogue à l'apigénine à l'exception de l'absence d'un proton dans le cycle A.

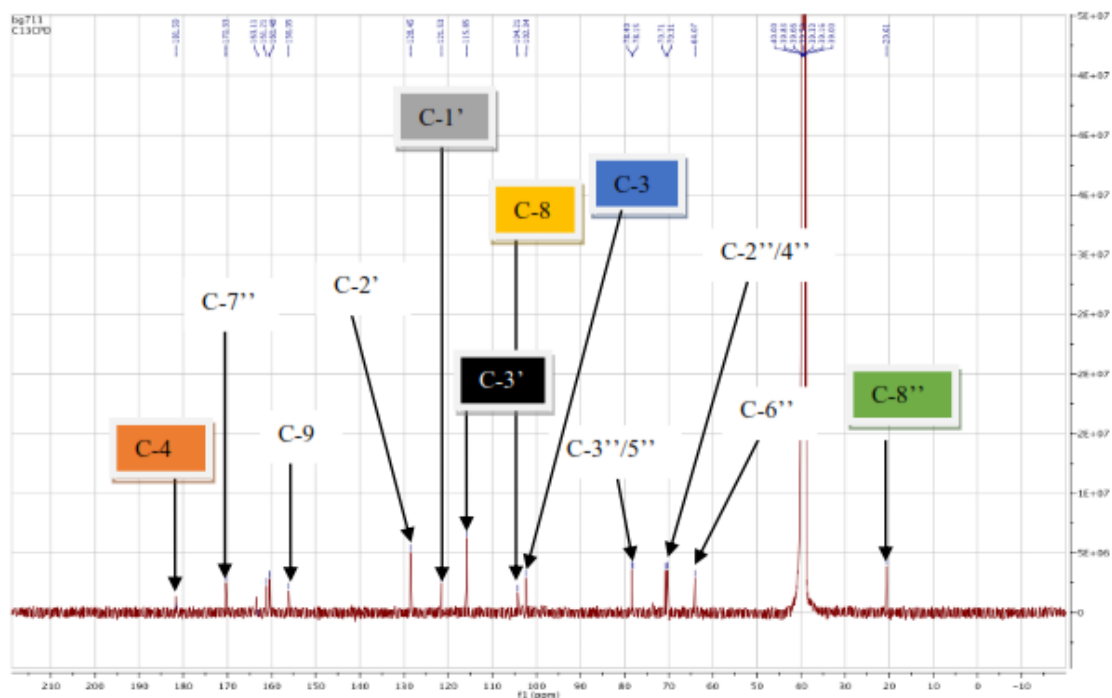
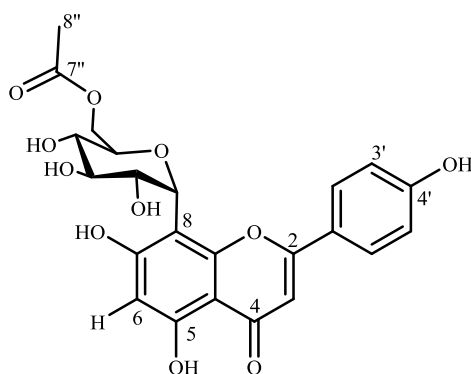


Figure 22: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé DBE_6

On observe sur le spectre de RMN ^{13}C 23 signaux de carbones confirmant la présence d'un flavonoïde, d'une fraction saccharide et d'un groupe acétyle dans DBE_6 . Les six signaux carbonés de la fraction osidique observée dans le spectre DEPT à δ_{C} 73,7 (CH), 70,7 (CH), 78,2 (CH), 70,3 (CH), 78,4 (CH) et 64,1 (CH_2), suggérant que DBE_6 est un C-glucoside flavone avec le glucose comme sucre. Le site de fixation du sucre à l'aglycone a été déduit en position C-8 au vu du déplacement chimique du carbone C-8 à δ_{C} 103,4. Le spectre HMBC établit clairement d'une part les corrélations entre le proton anomérique à δ_{H} 6,95 (H-1'') et le carbone à δ_{C} 156,1 (C-9), ce qui permet de confirmer que DBE_6 est un C-glycoside flavonoïde et d'autre part les corrélations entre les protons du groupe oxyméthylénique à δ_{H} 4,33 et 4,03 (H-6'') et le carbonyle du groupe acétyle à δ_{C} 170,4 (C-7'').

Par conséquent, la structure de DBE_6 a été identifiée comme étant la 6''-O-acetylvitexine (psilosin), composé isolé précédemment de *Ouratea gilgiana* H. Gilg (Bayiha *et al.*, 2011).



193

Tableau XVI: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBE₆ avec 6''-O-acetylvitexine (Bayiha *et al.*, 2011)

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
2	-	163,4	-	164,0
3	6,77 (s)	102,4	6,82 (s)	102,6
4	-	181,7	-	182,0
5	13,15 (s)	160,5	12,80 (s)	161,3
6	6,25 (s)	98,6	6,52 (s)	98,3
7	-	165,2	-	162,6
8	-	103,4	-	104,1
9	-	156,1	-	156,0
10	-	104,2	-	104,1
1'	-	121,5	-	121,7
2'/6'	8,00 (d; 8,8)	128,5	8,05 (d; 8,4)	128,6
3'/5'	6,91 (d; 8,8)	115,9	6,90 (d; 8,7)	117,0
4'	-	161,2	-	162,6
1''	6,95 (d; 8,7)	73,7	6,03 (d; 3,1)	79,2
2''	3,91 (d; 8,7)	70,7	5,76 (d; 3,1)	85,4
3''	3,25 (d; 2,4)	78,2	5,10 (d; 2,4)	75,5
4''	3,42 (m)	70,3	4,63 (m)	82,6
5''	3,47 (m)	78,4	4,93 (m)	70,1
6''	4,33 (d; 11)	64,1	4,49 (m)	65,3
	4,03 (m)		4,31 (m)	-
7''	-	170,4	-	170,3
8''	1,98 (s)	20,7	2,02	20,8

II.3.1.1.3. Identification de la swertisine (DBF₅)

Le composé DBF₅ se présente sous forme de solide jaune, il réagit positivement au test de Shinoda caractéristique des flavonoïdes avec un point de fusion à 295 °C. Son spectre UV visible présente un maximum à λ_{max} 340 nm.

L'analyse de son spectre IR révèle trois bandes d'absorption à 3363 cm⁻¹ pour le groupe hydroxyle (OH), à 1652 cm⁻¹ correspondant au groupe carbonyle chélaté et à 1603 cm⁻¹ pour la double liaison (C=C). Le spectre de masse HRESIMS en mode positif présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 447,1249 [M + H]⁺ (masse calculée 447,1245) correspondant à la formule moléculaire C₂₂H₂₂O₁₀ renfermant 12 degrés d'insaturations.

Le spectre de RMN ¹H (**Figure 23**) du composé DBF₅ met en évidence le signal d'un singulet à δ_H 6,84 (s, H-3), caractéristique d'une unité flavone (Mabry *et al.*, 1970). Sur ce même spectre, on observe un système AA'BB' dont les signaux apparaissent tous sous forme de doublets à δ_H 8,05 (H-6') / 7,91 (H-2') ($J=8,6$ Hz respectivement) et 6,97 (H-3') / 6,90 (H-5') ($J=8,8$ Hz) pour le noyau B. On observe également un proton aromatique dont le signal apparaît sous forme de singulet à δ_H 6,53 (1H, s, H-8) indiquant que le noyau aromatique A est pentasubstitué et un singulet à δ_H 3,88 suggérant la présence d'un méthoxyle dans la molécule. L'analyse du spectre de RMN ¹H de DBF₅ permet de distinguer le signal d'un proton anomérique résonnant à δ_H 4,71.

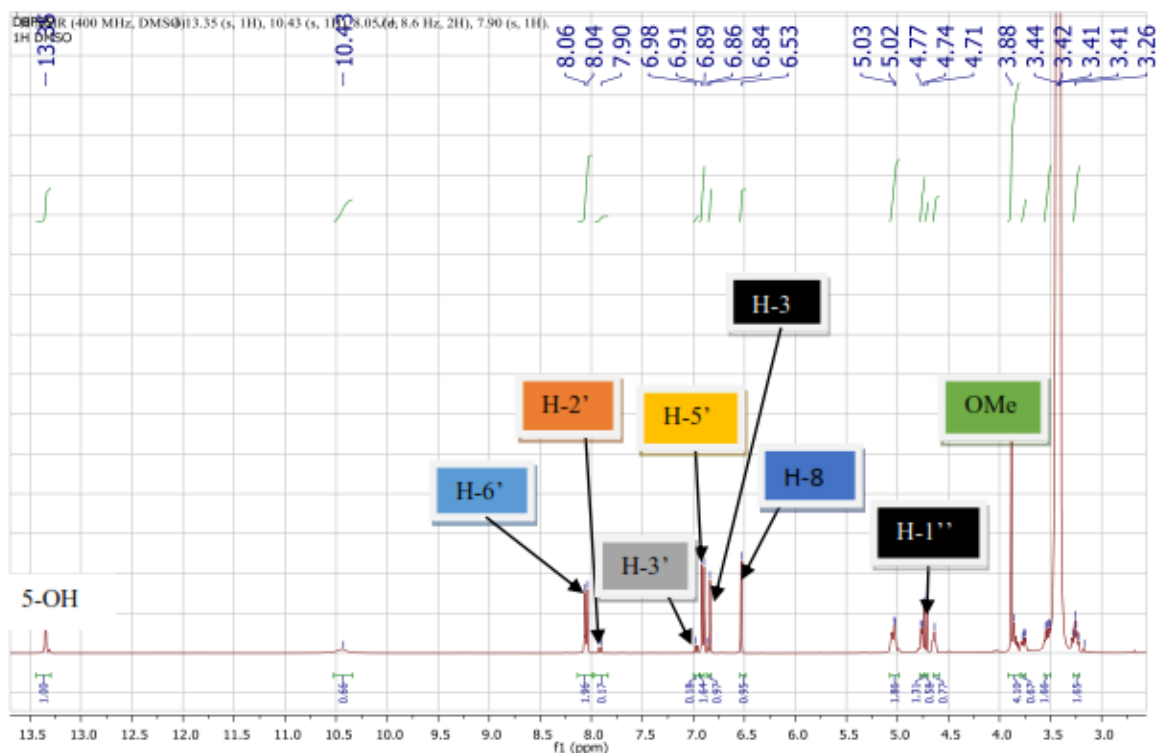


Figure 23 : Spectre de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) du composé DBF₅

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C , nous permet de distinguer 6 carbones tertiaires (CH) résonnant respectivement à δ_{C} 102,9 (C-3); 95,0 (C-8); 129,2 (C-2'/6') et 115,9 (C-3'/5') ainsi que 9 carbones quaternaires (C), parmi lesquels, 6 carbones oxygénés hybridés sp^2 dont un carbonyle à δ_{C} 182,4 (C-4) et le reste résonnant respectivement à δ_{C} 163,4 (C-2); 164,5 (C-7); 155,2 (C-9); 162,7 (C-4') et 161,4 (C-5).

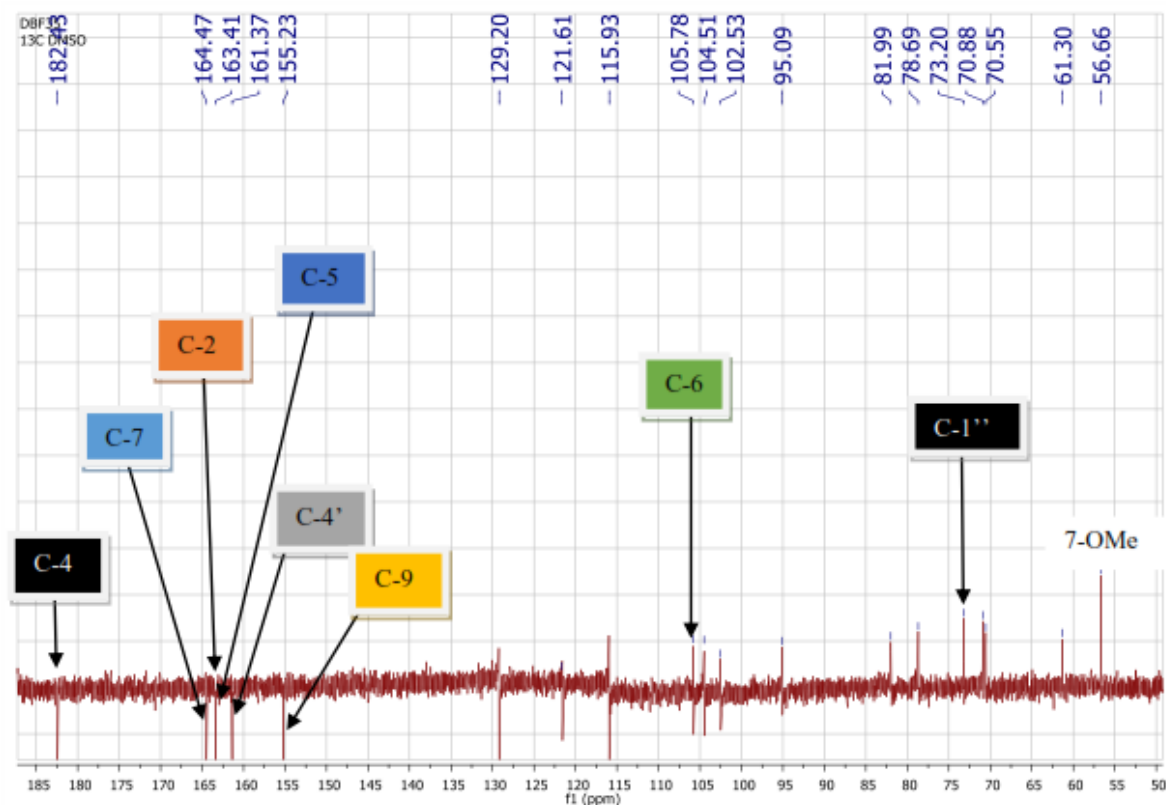


Figure 24 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé DBF_5

L'analyse du spectre HMBC a permis de déterminer les points de jonction du glucoside et du méthoxyle sur l'aglycone. L'observation du signal du carbone résonnant à δ_{C} 105,7 (C-6), montre que DBF_5 est un dérivé de type 6 monodesmosidique de la swertisine ayant une chaîne osidique liée en C-6 au moyen d'une liaison carbone-carbone (C-6-C-1').

Le groupement méthoxyle quant à lui, a été fixé sur l'aglycone grâce à la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le signal du proton à δ_{H} 3,88 (7-OMe) et le carbone δ_{C} 164,5 suggérant que le groupement méthoxy est lié au carbone C-7 du noyau A. En outre, le spectre NOESY a confirmé cette position par la corrélation observée entre H-8 (δ_{H} 6,84) et les signaux des protons méthoxyles à δ_{H} 3,88.

Toutes ces données spectroscopiques sont identiques à celles de la swertisine, précédemment isolée par Frank *et al.* (2012).

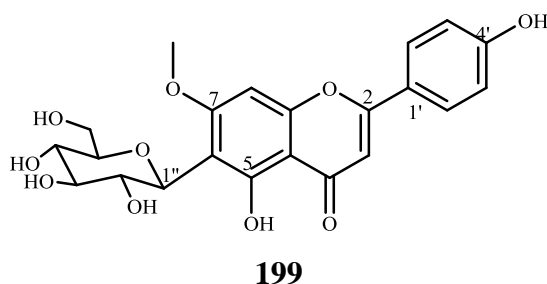


Tableau XVII: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C du composé DBF₅ avec la swertisine (Frank *et al.*, 2012).

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
2	-	163,4	-	164,0
3	6,84 (s)	102,9	6,85 (s)	102,7
4	-	182,4	-	182,2
5	-	161,4	-	159,5
6	-	105,7	-	109,6
7	-	164,4	-	164,9
8	6,53 (s)	95,0	6,82 (s)	91,0
9	-	155,2	-	156,8
10	-	104,5	-	104,0
1'	-	121,6	-	120,3
2'	7,91 (d; 8,6)	129,2	7,96 (d; 8,9)	128,5
3'	6,97 (d; 8,8)	115,9	6,92 (d; 8,9)	116,1
4'	-	162,7	-	162,1
5'	6,90 (d; 8,8)	115,9	6,92 (d; 8,9)	116,1
6'	8,05 (d; 8,6)	129,2	7,96 (d; 8,9)	128,5
7-OMe	3,88 (s)	56,6	3,87 (s)	56,2
1''	4,72 (d; 9,9)	73,2	4,48 (d;	72,8
2''	3,86 (s)	70,8	4,19 (dt; 10; 2,6)	69,6
3''	3,25 (s)	78,7	3,18 (m)	79,0
4''	3,38 (s)	70,5	3,09 (m)	70,9
5''	3,23 (s)	81,9	3,16 (m)	81,6
6''	3,52 (dd; 11,8; 5,8) 3,75(m)	61,3	3,70 (dd; 12,9 ; 4,3);3,37(m)	61,7

II.3.1.1.4. Identification de la swertiajaponine (DBF₆)

Le composé DBF₆ se présente sous forme de solide jaune qui réagit positivement au test de Shinoda caractéristique des flavonoides avec un point de fusion situé à 295 °C. Son spectre UV présente un maximum à λ_{max} compris entre 272-347 nm.

L'analyse de son spectre IR révèle trois bandes d'absorption à 3363 cm⁻¹ pour le groupe hydroxyle (OH), à 1652 cm⁻¹ correspondant au groupe carbonyle chélaté et à 1603 cm⁻¹ pour la double liaison (C=C). Le spectre de masse LC-MS en mode positif présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 609 [M + H]⁺, correspondant à la formule molaire C₂₂H₂₃O₁₁ renfermant 11 degrés d'insaturations.

Son spectre de RMN ¹H (**Figure 25**) met en évidence le signal d'un singulet à δ_H 6,72 (s, H-3), caractéristique d'une unité flavone (Mabry *et al.*, 1970). Sur ce même spectre, on observe un système ABX dont l'un des signaux apparait sous forme de doublet dedoublé à δ_H 6,91 (3H; dd; $J= 9,1; 7,6$ Hz; H-6'), l'autre sous forme de doublet à δ_H 7,84 (2H; d; $J= 8,7$ Hz; H-5') et le signal d'un proton résonnant sous forme de multiplet à δ_H 7,97 (H-2') pour le noyau B. On observe également un proton aromatique dont le signal apparait sous forme de singulet à δ_H 6,47 (1H, s, H-8) indiquant que le noyau aromatique A est pentasubstitué et un singulet à δ_H 3,83 suggérant la présence d'un methoxy dans la molécule. L'analyse du spectre de RMN ¹H de DBF₆ permet de distinguer le signal d'un proton anomérique qui apparait sous forme de doublet résonnant à δ_H 4,73 (H-1'').

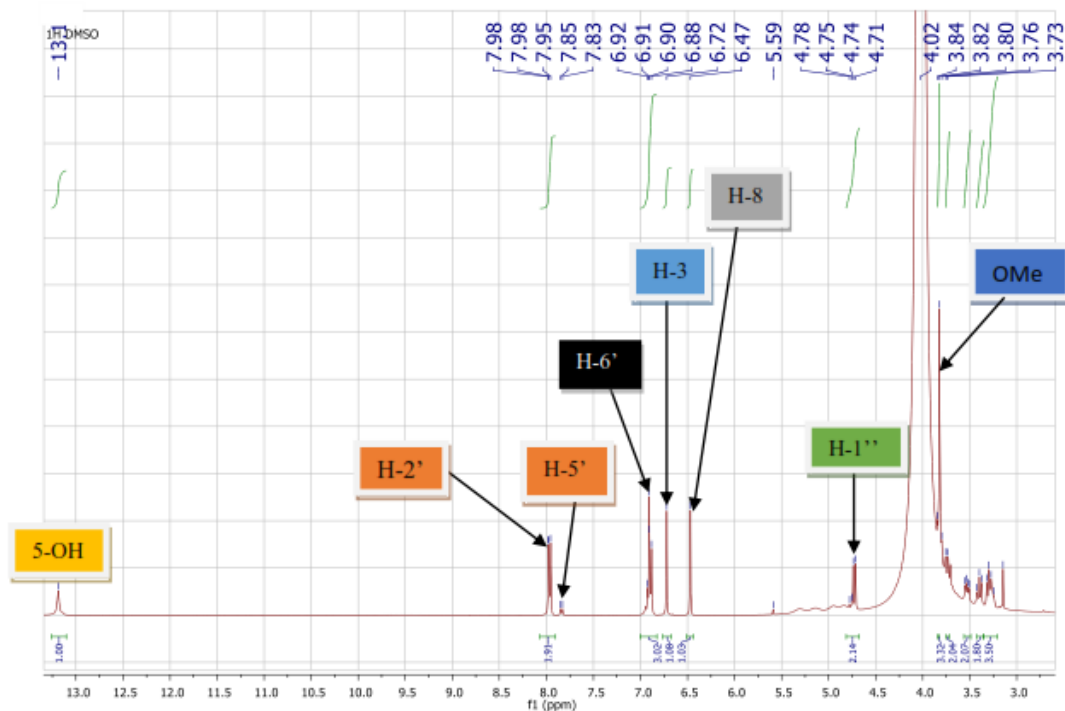


Figure 25: Spectre de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé DBF₆

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C de DBF_6 présente de fortes similitudes avec ceux du composé DBF_5 , à l'exception de la présence du groupement hydroxyle (-OH) fixé en position C-3' et la présence du système ABX en DBF_6 .

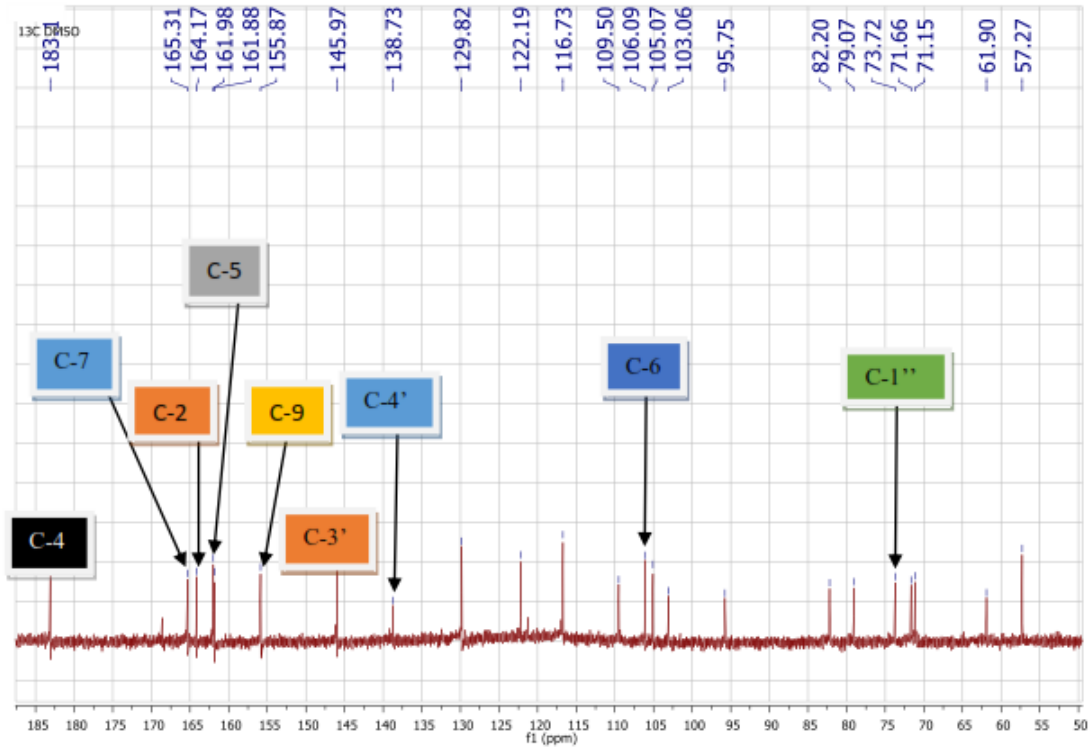


Figure 26: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) du composé DBF_6

Par conséquent, la structure du composé DBF_6 a été identifiée comme étant la swertiajaponine précédemment isolée des fleurs de cultivars (Mizuno *et al.*, 2013).

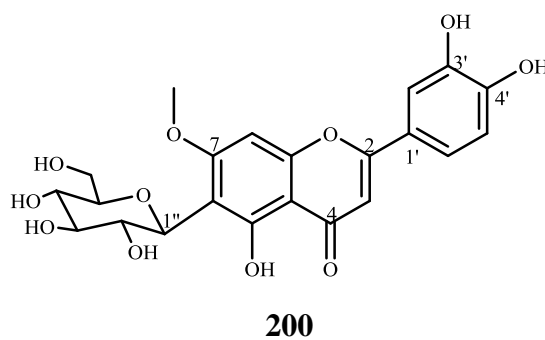


Tableau XVIII: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C du composé DBF₆ avec la swertiajaponine (Mizuno *et al.*, 2013).

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (pyridine- <i>d</i> ₅)	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
2	-	164,1	-	164,8
3	6,72 (s)	103,0	6,95 (s)	104,1
4	-	183,1	-	183,1
5	-	161,9	-	161,8
6	-	106,1	-	110,9
7	-	165,3	-	164,6
8	6,47 (s)	95,7	6,62 (s)	90,3
9	-	155,8	-	157,6
10	-	105,1	-	105,8
1'	-	122,1	-	122,6
2'	7,97 (m)	109,5	7,97 (s)	114,6
3'	-	145,9	-	151,9
4'	-	138,9	-	147,9
5'	7,84 (d; 8,7)	116,7	7,40 (d; 8,0)	116,9
6'	6,91 (dd; 9,1; 7,6)	129,8	7,58 (d; 8,2)	119,6
7-OMe	3,83 (s)	57,2	3,75 (s)	56,4
1''	4,73 (t; 7,6)	73,7	5,79 (d; 9,8)	74,8
2''	3,82 (m)	71,6	4,44 (m)	81,1
3''	4,74 (m)	79,1	5,17 (t)	72,5
4''	5,59 (m)	71,1	5,45 (m)	71,6
5''	3,74 (m)	82,2	4,24 (m)	83,4
6''	3,73 (dd; 11,9; 5,6); 3,53(m)	61,9	4,69 (d; 10,5); 4,4(m)	63,6

II.3.1.1.5. Identification de la lutéoline (DBF₇)

Le composé DBF₇ est obtenu sous forme de cristaux de couleur jaune avec une température de fusion de 338,4 °C. Il réagit positivement au test de shinoda caractéristique des flavonoides. Son spectre UV présente un maximum à 248 nm.

L'analyse de son spectre IR révèle cinq bandes d'absorption à 3395,05 cm⁻¹ attribué à la vibration d'étirement du groupe hydroxyle phénolique (Ar-OH), 1663 cm⁻¹ correspondant au groupe carbonyle chélaté, 1445,09 cm⁻¹ pour la double liaison aromatique (C=C), 1340,62 cm⁻¹ au cycle pyrane (C-O-C) et 849,72 cm⁻¹ attribuable à la courbure aromatique (C-H). On observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 286,24 g/mol [M+H]⁺, correspondant à la formule molaire C₁₅H₁₀O₆ renfermant 11 degrés d'insaturations.

Sur son spectre de RMN ¹H on observe trois signaux de protons portés par le noyau A dont un résonne sous forme de doublet, dédoublé à δ_H 7,40 (1H; dd; $J = 8,3; 2,2$ Hz; H-6') et les autres sous forme de doublets à δ_H 7,43 (1H; d; $J = 2,2$ Hz; H-2'); 6,90 (1H; d; $J = 8,3$ Hz; H-5'), l'ensemble de ces trois protons constitue le système ABX. L'analyse du même spectre révèle la présence de signaux de deux protons portés par le noyau B qui résonnent sous forme de doublets respectivement à δ_H 6,19 (1H; d; $J = 2,0$ Hz; H-6) et à δ_H 6,45 (1H; d; $J = 2,0$ Hz; H-8) puis le signal d'un proton porté par le noyau C résonnant sous forme de singulet à δ_H 6,68 (1H; s; H-3). On observe également sur ce spectre RMN ¹H le signal d'un groupement hydroxyle (-OH) résonnant sous forme de singulet à δ_H 12,99 (1H; s; 5-OH) en position 5 au voisinage d'un groupement carbonyle.

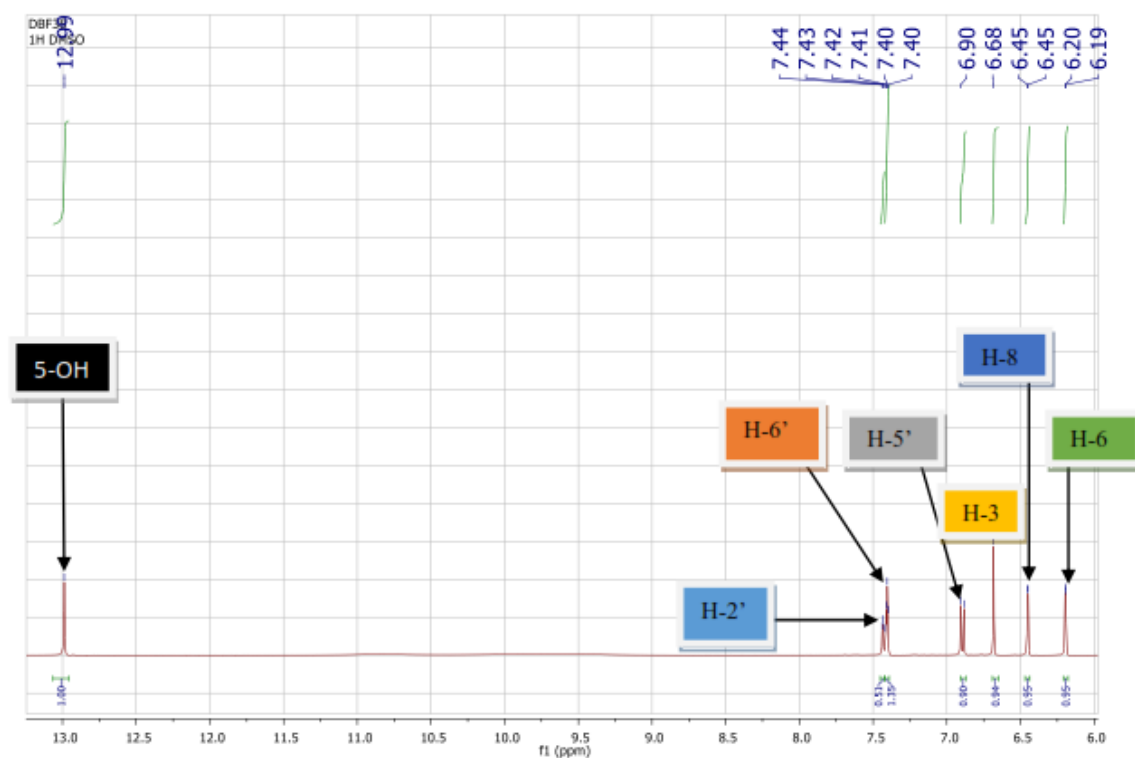


Figure 27: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF $_7$

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C , nous permet de distinguer quinze signaux : soit 6 carbones tertiaires (CH) et 9 carbones quaternaires (C) parmi lesquels 7 carbones oxygénés hybridés sp^2 dont un carbonyle à δ_{C} 182,4 (C-4) et le reste résonnant respectivement à δ_{C} 164,6 (C-2) ; 164,3 (C-7) ; 157,7 (C-9) ; 150,1 (C-4') ; 146,2 (C-3') et 161,9 (C-5).

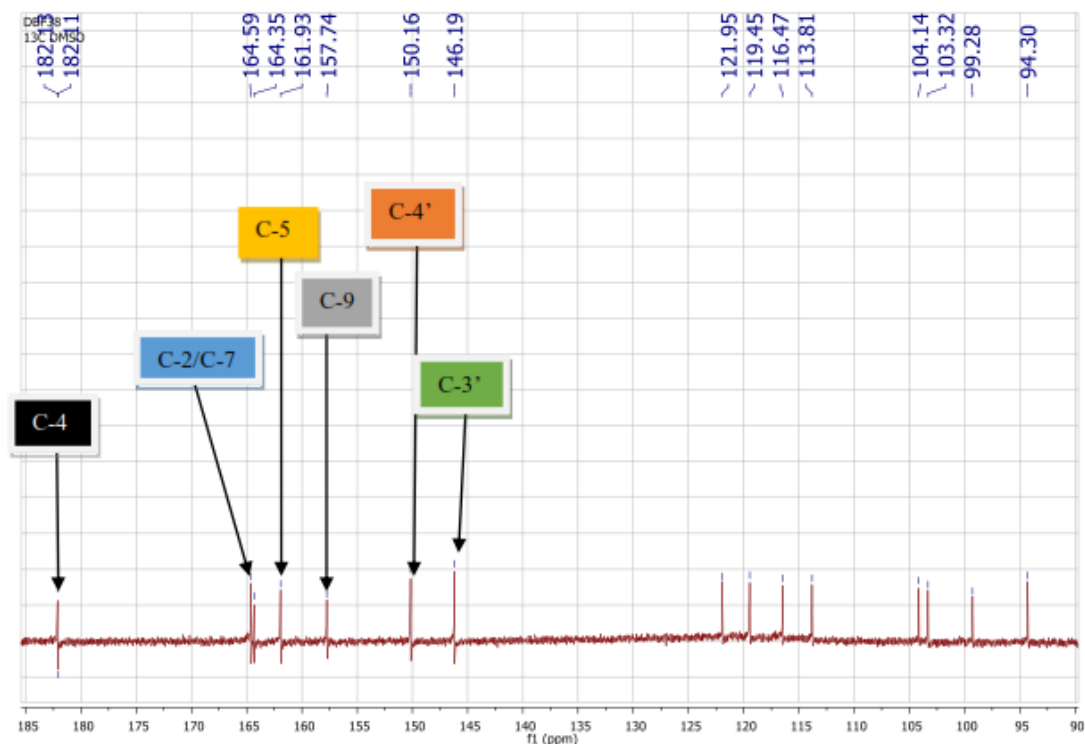
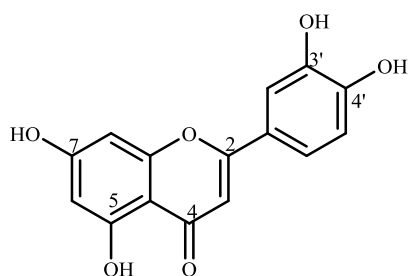


Figure 28 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé DBF_7

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C de DBF_7 présentent de fortes similitudes avec ceux du composé DBE_7 , à l'exception de la présence du groupement osidique fixé en position C-3. L'ensemble des données spectrales 1D et 2D, comparées avec celles de la littérature nous ont permis de conclure que DBF_7 est la lutéoline composé précédemment isolé de *Cirsium japonicum var. maackii* (Wagle *et al.*, 2018).



201

Tableau XIX: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C du composé DBF₇ avec la lutéoline (Wagle *et al.*, 2018).

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
2	-	164,6	-	164,1
3	6,68 (s)	103,3	6,66 (s)	102,8
4	-	182,4	-	181,6
5	-	161,9	-	161,4
6	6,19 (d; 2,0)	99,3	6,18 (d; 2,2)	98,8
7	-	164,3	-	163,8
8	6,45 (d; 2,0)	94,3	6,44 (d; 2,2)	93,8
9	-	157,7	-	157,2
10	-	104,1	-	103,7
1'	-	121,9	-	118,9
2'	7,43 (d; 2,2)	113,8	7,39 (d; 2,2)	113,3
3'	-	146,2	-	145,7
4'	-	150,1	-	149,7
5'	6,89 (d; 8,3)	116,5	6,88 (d; 9,2)	116,0
6'	6,91 (d; 8,8)	119,4	7,41 (dd; 9,2; 2,2)	121,5

II.3.1.2. De la classe des Flavonols

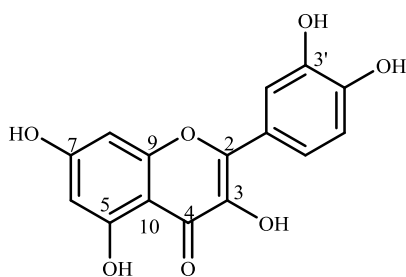
II.3.1.2.1. Identification de la quercetine (DBE₅)

Le composé DBE₅ obtenu se présente sous forme de solide de couleur jaune dans le système CH₂Cl₂/MeOH. Il répond positivement au test de Shinoda, caractéristique des flavonoïdes. Son point de fusion se situe entre 255-257°C. Son spectre d'absorption UV (méthanol) présente deux maxima à 256 nm et à 364 nm. L'analyse de son spectre de masse ESI-MS en mode négatif fait ressortir le pic de l'ion pseudo-moléculaire [M-H]⁻ à m/z 301,02 (masse calculée 301,06) correspondant à la formule moléculaire brute C₁₅H₁₀O₇ renfermant 11 degrés d'insaturations.

Sur son spectre de RMN ^{13}C , on observe quinze signaux correspondant à quinze atomes de carbones car deux ont une intensité double.

L'attribution des déplacements chimiques des protons aromatiques est corroborée par les expériences COSY, HSQC et HMBC. Sur le spectre COSY, le proton H-2' à δ_H 7,73 corrèle avec H-6' situé à δ_H 7,70 qui lui-même corrèle avec H-5' résonant à δ_H 6,87. Sur ce même spectre on observe des corrélations entre le proton H-6 à δ_H 6,23 et les carbones situés à δ_C 104,5 (C-10) et δ_C 98,6 (C-8), ainsi que des corrélations entre le proton H-8 à δ_H 6,45 et les carbones à δ_C 104,5 (C-10) et δ_C 98,0 (C-6). Au niveau du noyau B le proton H-2' (7,73 ppm) corrèle avec les carbones en C-6' (120,0 ppm), C-4' (147,2 ppm) et C-2 (157,0 ppm). De même on observe des corrélations entre le proton H-5' (6,87 ppm) et les carbones C-1' (122,4 ppm) et C-3' (146,5 ppm) ainsi qu'entre le proton H-6' et les carbones C-4' (147,2 ppm) et C-2' (115,0 ppm) confirmant la disubstitution du noyau B.

L'ensemble des données spectrales 1D et 2D, comparées avec celles de la littérature nous a permis de conclure que DBE₅ est la quercétine, composé précédemment isolé des parties aériennes d'*Aceriphyllum rossii* (Han *et al.*, 2004).



192

Tableau XX: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBE₅ avec la quercétine (Han *et al.*, 2004).

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
2	-	157,0	-	158,2
3	-	134,5	-	135,4
4	-	176,5	-	179,2
5	-	161,1	-	162,7
6	6,23 (d; 2,0)	98,0	6,17 (d; 2,0)	99,8
7	-	164,5	-	165,7
8	6,45 (d; 2,0)	93,8	6,35 (d; 2,0)	94,6
9	-	156,8	-	158,8
10	-	104,5	-	105,5
1'	-	122,4	-	123,1
2'	7,73 (d; 2,2)	115,0	7,71 (d; 2,4)	115,8
3'	-	146,5	-	145,6
4'	-	147,2	-	145,7
5'	6,87 (d; 8,5)	117,1	6,85 (d; 8,6)	115,7
6'	7,70 (dd; 2,2 ; 8,5)	120,0	7,56 (dd; 2,4 ; 8,6)	122,8

II.3.1.2.2. Identification de la quercétine 3-O- β -D-glucopyranoside (DBE₇)

Le composé DBE₇ se présente sous forme de solide de couleur jaune. Il répond positivement au test de Shinoda, caractéristique des flavonoïdes. Son point de fusion est compris entre 231-233°C. Son spectre d'absorption UV (méthanol) présente deux maxima à $256 > \lambda > 358$ nm. Son spectre IR montre la présence d'un groupement hydroxyle (-OH) à 3300 cm^{-1} et d'un carbonyle chélaté (-C=O) à 1650 cm^{-1} .

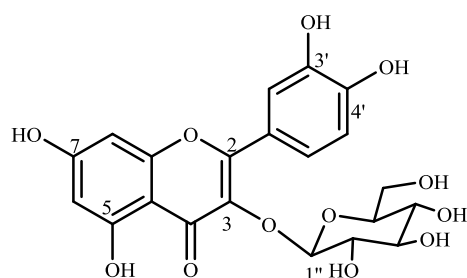
L'analyse de son spectre de masse FAB/MS en mode négatif fait ressortir le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M-H}]^-$ à m/z : 487,04 (masse calculée 487,01) correspondant à la formule moléculaire brute C₂₁H₂₃O₁₂ renfermant 10 degrés d'insaturations.

L'analyse des spectres de RMN ^1H , COSY ^1H et HSQC montre la présence des noyaux aromatiques pentasubstitué en accord avec un squelette flavonol.

Sur le spectre RMN ^1H , on observe des signaux des protons portés par le noyau A à δ_H 6,30 (1H; d; $J=2,0$ Hz; H-6) et à δ_H 6,54 (1H; d; $J=2,0$ Hz; H-8), ceux portés par le noyau B à δ_H 7,94 (1H; d; $J=2,0$ Hz; H-2'); δ_H 6,96 (1H; d; $J=8$ Hz; H-5') et δ_H 7,64 (1H; dd; $J=2,8$ Hz; H-6'). On observe également le signal d'un groupement hydroxyle (-OH) chélaté résonnant à δ_H 12,35 (1H; s) en position 5 au voisinage d'un groupement carbonyle. Sur ce

même spectre de RMN ^1H du composé DBE₇ on distingue le signal d'un proton anomérique résonnant à δ_H 5,48 (1H; d; $J = 8$ Hz; H-1'') et qui corrèle en HSQC avec le carbone à δ_C 104,7 (C-1''). La configuration β a été attribuée au proton anomérique de Glc sur la base de la constante de couplage $^3J_{\text{H-1}''} = 8$ Hz.

En effet, les données RMN ^1H et ^{13}C de DBE₇ sont très similaires à celles du composé DBE₅, à l'exception de la position C-3 du noyau C de l'aglycone (quercétine) qui constitue le point de jonction du groupement osidique. L'analyse des spectres HMBC et NOESY a permis de déterminer le point de jonction osidique sur l'aglycone. Par conséquent, la structure de DBE₇ a été identifiée comme étant la quercétine 3-O- β -D-glucopyranoside (isoquercitrine), composé isolé précédemment d'*Aceriphyllum rossii* (Han *et al.*, 2004).



194

Tableau XXI: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBE₇ avec quercetine 3-*O*- β -D-glucopyranoside (Han *et al.*, 2004).

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
2	-	157,5	-	158,2
3	-	134,5	-	135,4
4	-	178,5	-	179,2
5	-	162,3	-	162,7
6	6,30 d (2,0)	99,2	6,17 (d; 2,0)	99,8
7	-	165,2	-	165,7
8	6,54 d (2,0)	94,1	6,35 (d; 2,0)	94,6
9	-	157,3	-	158,8
10	-	102,7	-	105,5
1'	-	122,0	-	123,1
2'	7,94 d (2,0)	115,7	7,71 (d; 2,4)	11 5,8
3'	-	145,5	-	145,6
4'	-	149,3	-	145,7
5'	6,96 d (8,0)	117,1	6,85 (d; 8,6)	11 5,7
6'	7,64 dd (2,0 ; 8,0)	122,1	7,56 (dd; 2,4 ; 8,6)	122,8
1''	5,48 d (8,0)	104,7	5,23 (d; 7,6)	104,2
2''	3,20 (m)	78,0	3,22 (m)	75,6
3''	3,30 (m)	77,4	3,29 (m)	78,2
4''	3,39 (m)	75,0	3,41 (m)	71,1
5''	3,50 (m)	70,7	3,51 (m)	77,9
6''	3,69 (dd; 2,0; 8,0) 3,57	62,0	3,71 (dd; 2,4; 12,0) 3,58	62,4

II.3.2. De la classe des dérivés d'acide benzoïque

II.3.2.1. Identification de l'acide gallique (DBF₂)

Le composé se présente sous forme de solide blanc, il réagit positivement au test au chlorure ferrique (FeCl_3), test caractéristique des composés phénoliques. Son spectre d'absorption UV (méthanol) présente deux maxima à λ_{max} compris entre 215-271 nm. Son spectre IR montre la présence d'un groupement carboxyle (COOH) à 3371 cm^{-1} , d'un groupement methine (C-H) à 3057 cm^{-1} , d'un carbonyle chélaté (-C=O) à 1705 cm^{-1} et d'une double liaison (C=C) à 1620 cm^{-1} . Sa formule brute $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$ a été déduite de son spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) qui montre le pic de l'ion quasi moléculaire $[\text{M-H}]^-$ à m/z 169,21 (masse calculée 169,25) en accord avec la formule moléculaire brute $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$ renfermant 6 degrés d'insaturations.

L'analyse du spectre de RMN ^1H du composé DBF_2 montre un signal typique pour les protons aromatiques à δ_{H} 6,92 (s; H-2/H-6). Sur la base de l'intégration des signaux, il existe deux protons aromatiques (H-2 et H-6) qui sont symétriques l'un de l'autre. Par conséquent, les deux protons donnent le même signal à δ_{H} 6,92. Dans la région de champs faibles, on observe un autre signal de protons hydroxy résonant à δ_{H} 13,20 (s; H acide OH).



Figure 31: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé DBF_2

Le spectre de RMN ^{13}C du composé DBF_2 (**figure 32**), présente des résonances pour sept types de carbones comprenant un signal $\text{C}=\text{O}$ à δ_{C} 168,5 (C-7) indiquant la présence d'un carboxyle, un signal de carbone aromatique oxygéné à δ_{C} 138,7 (C-4), deux signaux symétriques de carbones aromatiques oxygénés à δ_{C} 145,9 (C-3 et C-5), un signal de carbone aromatique quaternaire à δ_{C} 121,8 (C-1) et deux signaux symétriques de carbones méthiniques aromatiques à δ_{C} 109,5 (C-2 et C-6). Ces signaux sont similaires à tous les signaux de carbone de l'acide gallique.

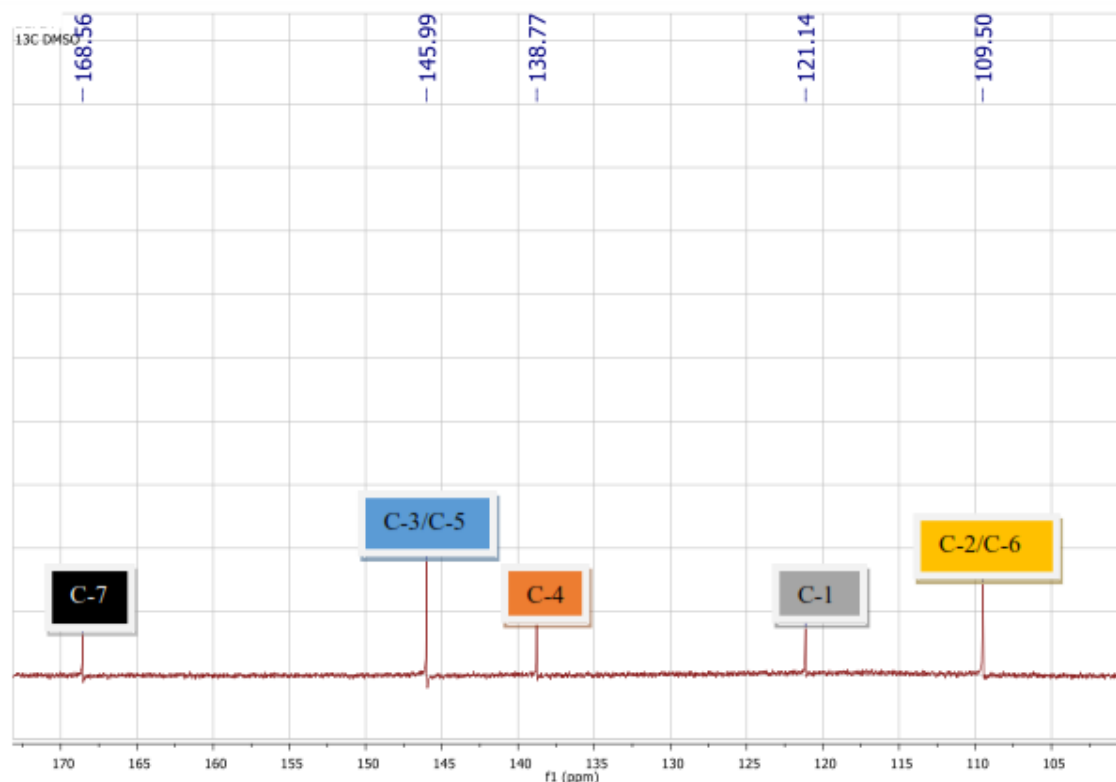
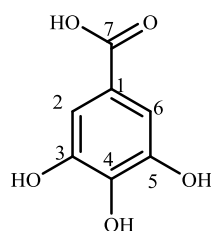


Figure 32 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé DBF_2

Sur la base de ces résultats, la structure de DBF_2 , présentée ci-dessous, a pu être établie comme étant l'acide gallique (Kamatham *et al.*, 2015) composé isolé pour la première fois du genre *Distemonanthus*.



196

Tableau XXII: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBF_2 avec l'acide gallique (Kamatham *et al.*, 2015).

N°	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1	-	121,8	-	119,8
2/6	6,92 (s)	109,5	7,22 (s)	108,1
3/5	-	145,9	-	143,9
4	-	138,7	-	136,6
7	-	168,5	-	167,0

II.3.2.2. Identification du Methyl Gallate (DBF₁)

Le composé DBF₁ a été obtenu sous forme de cristaux blancs, il réagit positivement au test du chlorure ferrique (FeCl₃), test qualitatif des composés phénoliques. Son spectre d'absorption UV présente deux maxima à $215 > \lambda > 271$ nm. Son spectre IR montre la présence d'un groupement hydroxyle (-OH) à 3506 cm^{-1} d'un carbonyle chélaté (-C=O) à 1697 cm^{-1} et de la double liaison (C=C) à 1618 cm^{-1} . Sur son spectre de masse ESI-MS on observe le pic de l'ion pseudo moléculaire à m/z 185,35 [M+H]⁺, (masse calculée 185,39) qui est en accord avec la formule moléculaire brute C₈H₈O₅ renfermant 5 degrés d'insaturations.

Le spectre RMN ¹H du composé DBF₁ montre un signal typique de protons aromatiques à δ_H 6,94. Sur la base de l'intégration de ce signal, il existe deux protons aromatiques qui sont symétriques l'un de l'autre. On observe, dans la région de champ fort, un autre signal de protons de méthoxy aliphatiques à δ_H 3,74 et sur la présence de ces protons est en accord avec le nombre de protons dans le substituant méthoxy.

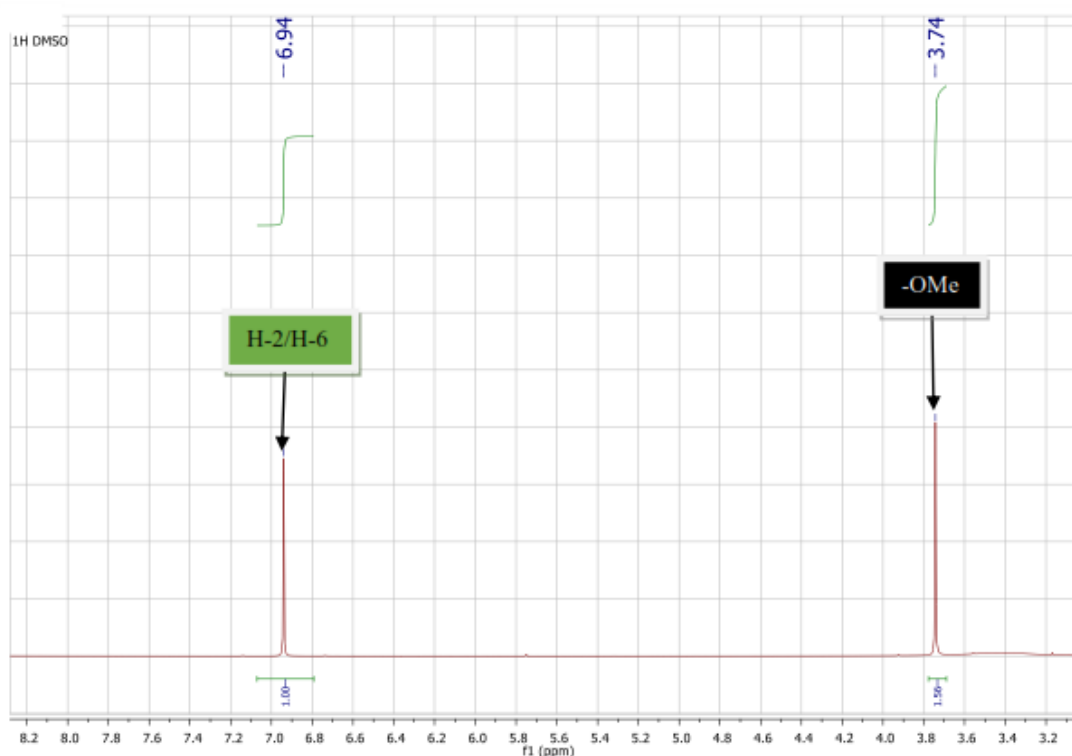


Figure 33 : Spectre de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé DBF₁

Le spectre de RMN ¹³C du composé DBF₁ (**figure 34**) présente des résonances pour sept types de carbones comprenant un signal C=O à δ_C 166,5 (C-7) indiquant la présence d'ester carbonyle, un signal de carbone aromatique oxygéné à δ_C 138,3 (C-4), deux signaux symétriques de carbones aromatiques oxygénés à δ_C 145,8 (C-3 et C-5), un signal de carbone aromatique quaternaire à δ_C 119,7 (C-1) et deux signaux symétriques de carbones méthiniques aromatiques à δ_C 108,5 (C-2 et C-6).

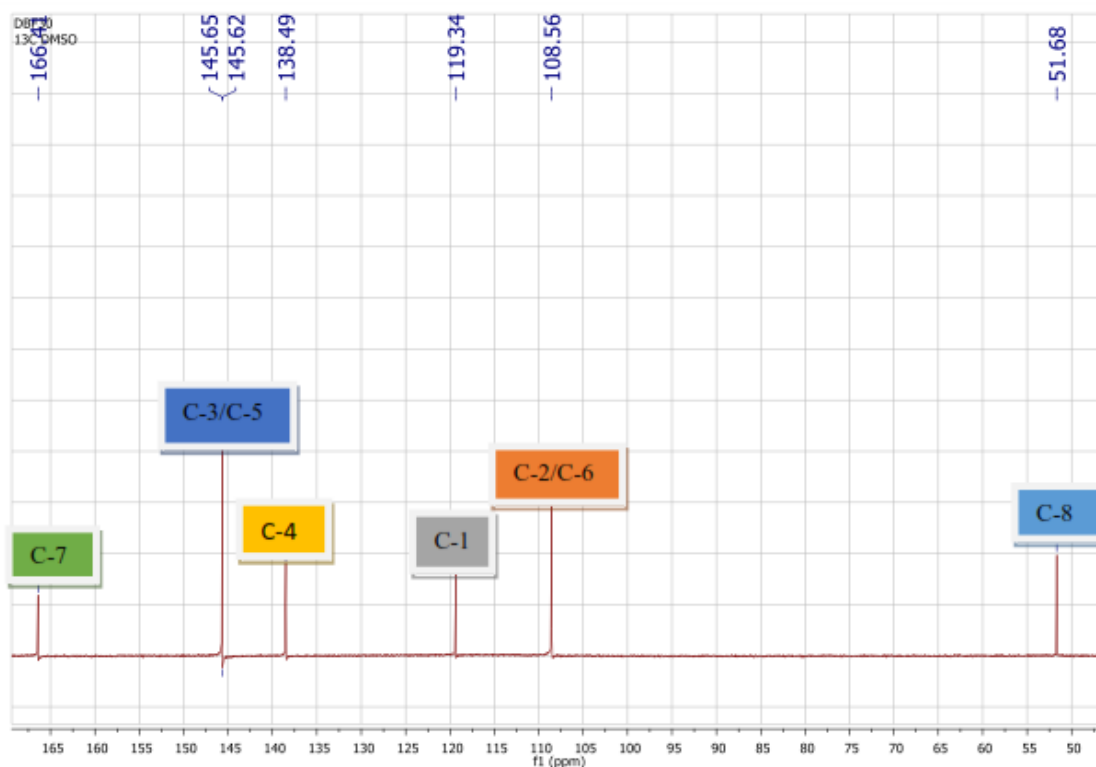
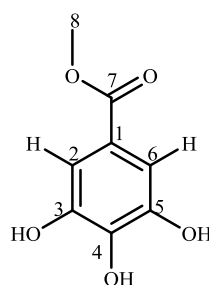


Figure 34 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé DBF_1

Toutes ces données spectroscopiques nous ont amené à identifier DBF_1 au gallate de méthyle récemment isolé à partir de *Givotia rottleriformis* (Kamatham *et al.*, 2015) composé isolé pour la première fois dans le genre *Distemonanthus*.



197

Tableau XXIII: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBF_1 avec le Methyl Gallate (Kamatham *et al.*, 2015).

N°	Expérimental ($\text{DMSO-}d_6$)		Littérature (CDCl_3)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1	-	119,3	-	118,8
2/6	6,94 (s)	108,5	7,26 (s)	107,8
3/5	-	145,6	-	144,1
4	-	138,4	-	136,9
7	-	166,4	-	165,7
8	3,74 (s)	51,6	4,01 (s)	50,36

II.3.2.3. Identification de l'acide syringique (DBE₃)

Le composé DBE₃ se présente sous forme de cristaux beige, il est soluble dans le méthanol et son point de fusion se situe entre 270-272 °C. Il réagit positivement au test de chlorure ferrique (FeCl₃) caractéristique des composés phénoliques. Son spectre IR montre la présence d'un étirement à 1650 cm⁻¹ correspondant à la liaison C=O. Son spectre de masse ESI-MS quant à lui, montre le pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 184,06 [M+H]⁺ (masse calculé 184,04) correspondant à la formule moléculaire C₈H₈O₄ renfermant 5 degrés d'insaturations.

L'analyse du spectre RMN ¹H présente quatre pics dont deux sont très intenses, preuve d'une molécule symétrique à δ_H 3,39 correspondant au signal d'un groupement méthoxy (-OMe) puis à δ_H 3,75 correspondant à une famille de proton hydroxyles et à δ_H 6,95 (H-3/H-7) représentant deux protons phénolique en position *mé*ta.

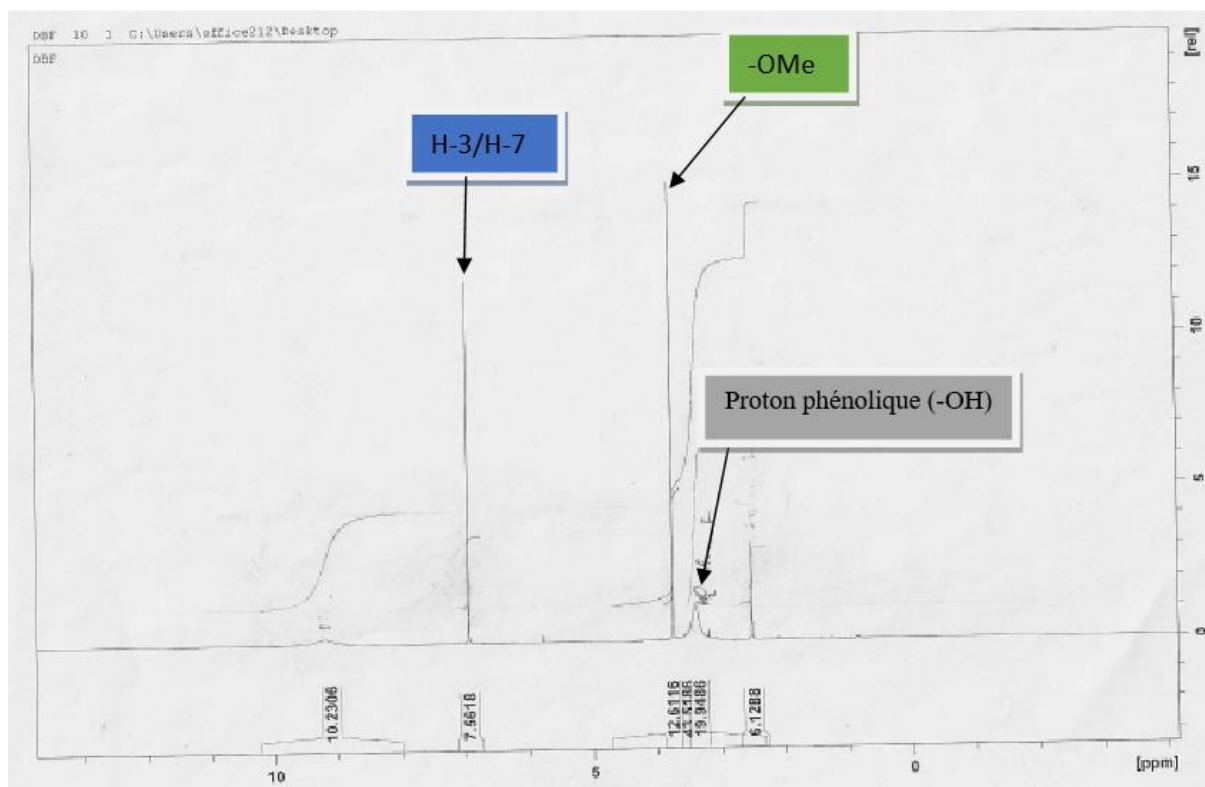


Figure 35 : Spectre RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) de DBE₂

Son spectre de RMN ¹³C montre six signaux à δ_C 166,7 (C-1) ; 146,0 (C-4/C-6) ; 138,8 (C-5) ; 119,7 (C-2) ; 108,9 (C-3/C-7) et 52,0 (5-OCH₃) ce qui confirme la symétrie totale de la molécule telle que prédite au spectre RMN ¹H.

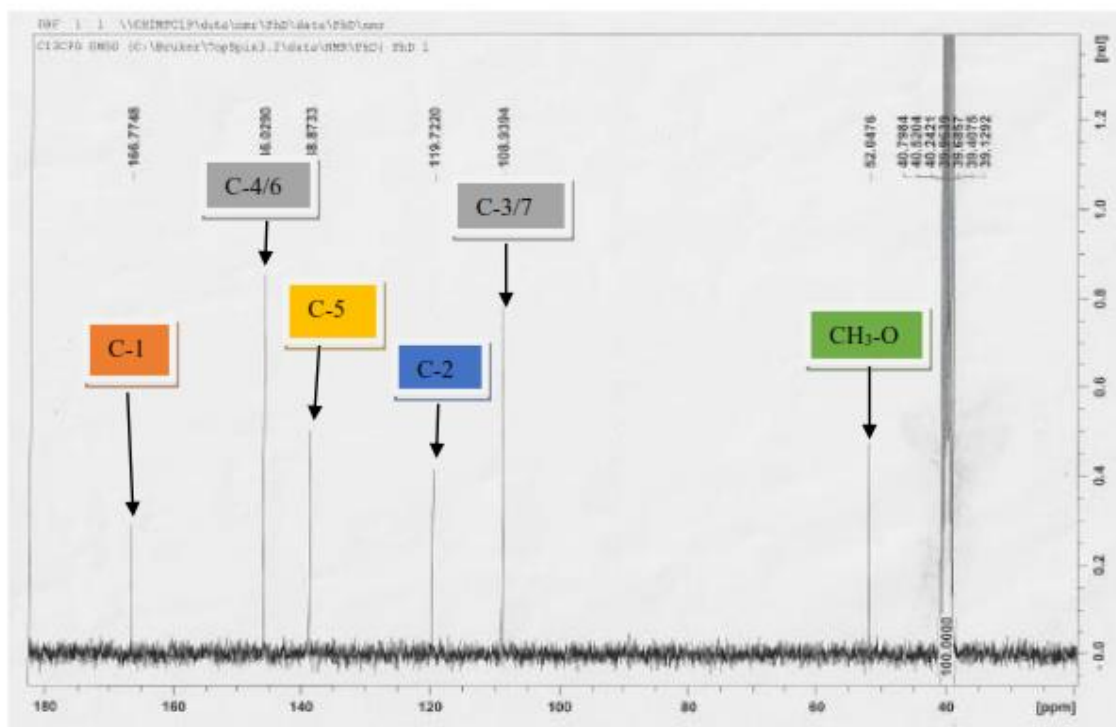
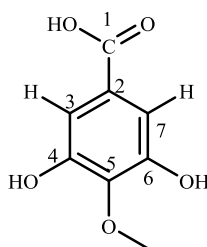


Figure 36 : Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé DBE_3

Par conséquent la structure de DBE_3 a été identifiée comme étant l'acide syringique, composé isolé précédemment de *Ouratea gilgiana* H. Gilg (Bayiha *et al.*, 2011) composé isolé pour la première fois dans le genre *Distemonanthus*.



190

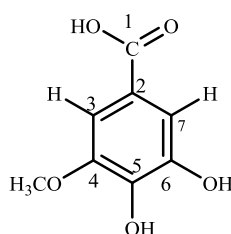
Tableau XXIV: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBE_3 avec l'acide syringique (Bayiha *et al.*, 2011).

N°	Expérimental ($\text{DMSO-}d_6$)		Littérature ($\text{DMSO-}d_6$)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1	-	166,7	-	166,6
2	-	119,7	-	125,2
3/7	6,95 (s)	108,9	7,33 (s)	107,2
4/6	-	146,0	-	153,0
5	-	138,6	-	142,6
5- OCH_3	3,75 (s)	52,0	3,93 (s)	52,0

II.3.2.4. Identification de l'acide 4-methoxygallique (DBE₄)

DBE₄ se présente sous forme de cristaux de couleur beige dans le mélange CH₂Cl₂/MeOH. Son point de fusion est situé dans l'intervalle 268-270 °C. Il répond positivement au test du chlorure ferrique caractéristique des composés phénoliques. Son spectre de masse ESI-MS montre le pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 184,06 [M+H]⁺ correspondant à la formule moléculaire C₈H₈O₄ renfermant 5 degrés d'insaturations.

Les données RMN ¹H, ¹³C et IR de DBE₄ présentent des similitudes avec celles du composé DBE₃, à l'exception de la position du groupement (-OMe) en position 4 dans DBE₄. À partir de toutes ces données spectrales, DBE₄ a été identifié à l'acide 4-methoxygallique (Bayiha *et al.*, 2011) composé isolé pour la première fois dans le genre *Distemonanthus*.



191

Tableau XXV: Comparaison des données RMN ¹H et ¹³C du composé DBE₄ avec l'acide 4-methoxygallique (Bayiha *et al.*, 2011).

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1	-	166,7	-	166,7
2	-	134,5	-	121,2
3/7	7,32 (s)	106,8	7,33 (s)	107,0
4/5	-	146,0	-	146,8
4-OCH3	3,80 (s)	51,9	3,90 (s)	52,0

II.3.3. De la classe des stéroïdes

II.3.3.1. Identification de la β -Sitosterol (DBF₄)

Le composé DBF₄ se présente sous forme de cristaux blancs avec un point de fusion compris entre 136-137°C. Il répond positivement au test de Libermann Buchard caractéristique des stéroïdes ou triterpénoïdes.

L'analyse spectrale IR révèle un large pic entre 3200-3450 cm⁻¹ pour le groupe OH, l'étirement à 1500 cm⁻¹ indique le groupe C=C et un autre étirement à 2950 cm⁻¹ indiquant la présence du groupe C-H. Sa formule brute C₂₉H₅₀O a été déduite de son spectre de masse EI-MS qui montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 414 [M⁺] renfermant 5 degrés d'insaturations.

Le spectre de RMN ¹H révèle la présence d'un large triplet à δ_H 5,37 (1H; t; J= 4,8Hz; H-6) correspondant au proton oléfinique et un multiplet à δ_H 3,53 (1H; m; H-3) correspondant au signal d'un méthine portant un atome d'oxygène. Le reste des protons est apparu dans la zone des champs forts entre 0,7 et 2,0 ppm (Parveen *et al.*, 2011). On observe également les signaux de quatre groupes méthyle secondaires, tous apparaissant sous forme de doublets à δ_H 0,91 (H-19) ; 0,82 (H-24) ; 0,81 (H-26) et 0,79 (H-27) avec J= 6,4 ; 7,2 ; 6,4 et 6,4 Hz, respectivement et deux groupes méthyles tertiaires résonnant sous forme de singulets à δ_H 0,66 (H-28) et 0,99 (H-29).

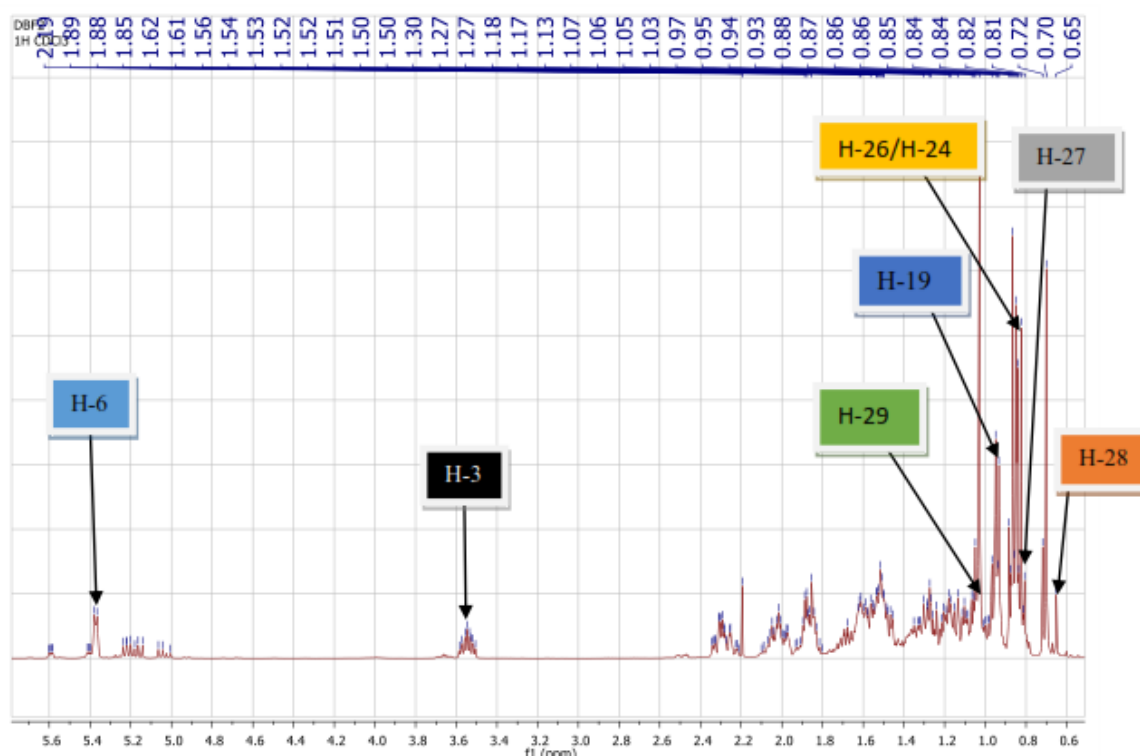


Figure 37 : Spectre de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du composé DBF₄

Le spectre de RMN ^{13}C présente 29 signaux, caractéristiques des phytostérols. Quelques uns sont représentés sur le spectre ci-dessous.

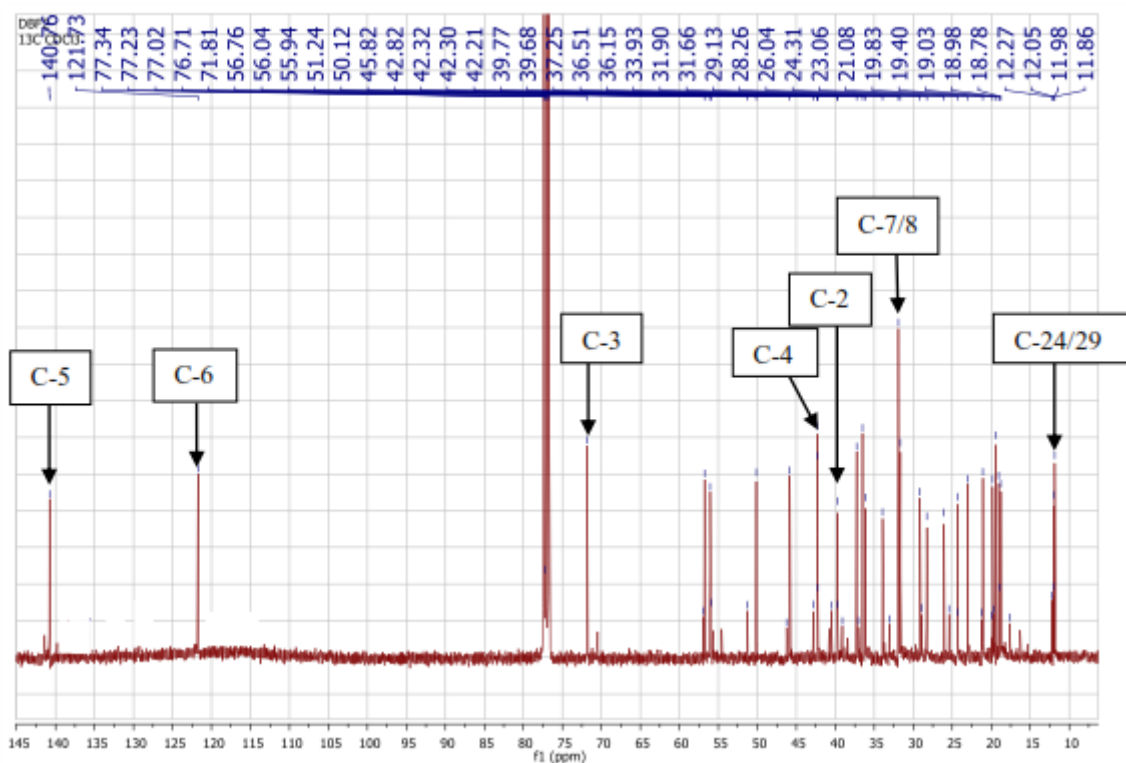
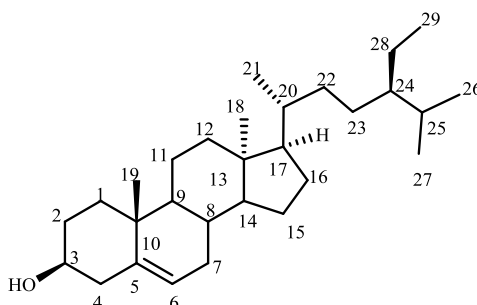


Figure 38: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé DBF₄

Les spectres RMN ^1H ; ^{13}C , HSQC et HMBC de DBF₄ sont identiques à ceux du β -sitostérol isolé de *Justicia gendarussa burm. F* (Phatangare *et al.*, 2017). Ce qui nous a permis de l'identifier au composé DBF₄ comme dans la littérature. Composé isolé pour la première fois dans le genre *Distemonanthus*.



198

Tableau XXVI: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBF₄ avec le β -Sitosterol (Phatangare *et al.*, 2017).

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1	-	37,7	-	37,5
2	-	39,8	-	40,0
3	3,53	71,7	3,50 (m)	72,1
4	-	42,6	-	42,6
5	-	140,7	-	141,0
6	5,36 (t; 4,8)	121,9	5,33 (t)	121,9
7	-	31,9	-	32,2
8	-	31,7	-	31,9
9	-	50,2	-	50,4
10	-	36,6	-	36,8
11	-	21,2	-	21,3
12	-	39,8	-	40,0
13	-	42,4	-	42,6
14	-	56,9	-	57,0
15	-	26,0	-	26,4
16	-	27,5	-	28,5
17	-	56,0	-	56,3
18	-	36,5	-	36,4
19	0,92 (d; 6,2)	19,6	0,91 (d; 6,6)	19,3
20	-	34,4	-	34,2
21	-	24,3	-	24,5
22	-	46,7	-	46,1
23	-	22,8	-	23,3
24	0,82 (d; 7,2)	12,1	0,82 (d; 7,2)	12,2
25	-	29,3	-	29,4
26	0,81 (d; 6,4)	19,8	0,81 (d; 6,4)	20,0
27	0,79 (d; 6,4)	19,1	0,79 (d; 6,4)	19,6
28	0,69 (s)	18,7	0,66 (s)	19,0
29	0,99 (s)	11,9	0,99 (s)	12,1

II.3.3.2. Identification de la sitostérol 3-O- β -D-glucoopyranoside (DBE₂).

DBE₂ a été obtenu sous forme de poudre amorphe blanche dont le point de fusion est compris entre 232 et 235 °C. Il répond positivement au test de Libermann Buchard caractéristique des stéroïdes. Son spectre IR montre la présence d'un groupement hydroxyle (3430 cm⁻¹), d'une liaison C-O (1100; 1055 cm⁻¹), d'une double liaison C=C (1629; 883 cm⁻¹) et des groupements CH₂ et CH₃ (2931; 2865; 1465 et 1375 cm⁻¹). Sa formule brute C₃₅H₆₀O₆ a été déduite de son spectre de masse haute résolution ESI-MS qui a montré l'adduit sodique à m/z 599,4282 [M + Na]⁺ (masse calculée 599,4282).

Son spectre de RMN ¹H révèle la présence de trois signaux de méthyles apparaissant sous forme de doublets à δ_H 0,88 (3H; d; $J = 7,0$ Hz; H-27); 0,92 (3H; d; $J = 7,3$ Hz; H-26) et 1,00 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-21); deux signaux de méthyles sous forme de singulets résonant à δ_H 0,67 (3H; s; H-18) et 0,95 (3H, s, H-19) et le signal d'un méthyle terminal à δ_H 0,89 (3H; t; $J = 7,4$ Hz; H-29) et un proton oléfinique à δ_H 5,32 (1H; m; H-6) suggérant la présence d'une double liaison sur un squelette stigmastane ou poriférastane (Gupta *et al.*, 1981) qui sont des stéréoisomères en C-24.

L'analyse du spectre de RMN ¹H de DBE₂ permet de distinguer le signal d'un proton anomérique caractéristique d'une unité osidique apparaissant sous forme de doublet résonnant à δ_H 4,23 (1H; d; $J = 7,7$ Hz; H-1'). La configuration β a été attribuée au proton anomérique de glucose sur la base de sa constante de couplage à $J = 7,7$ Hz.

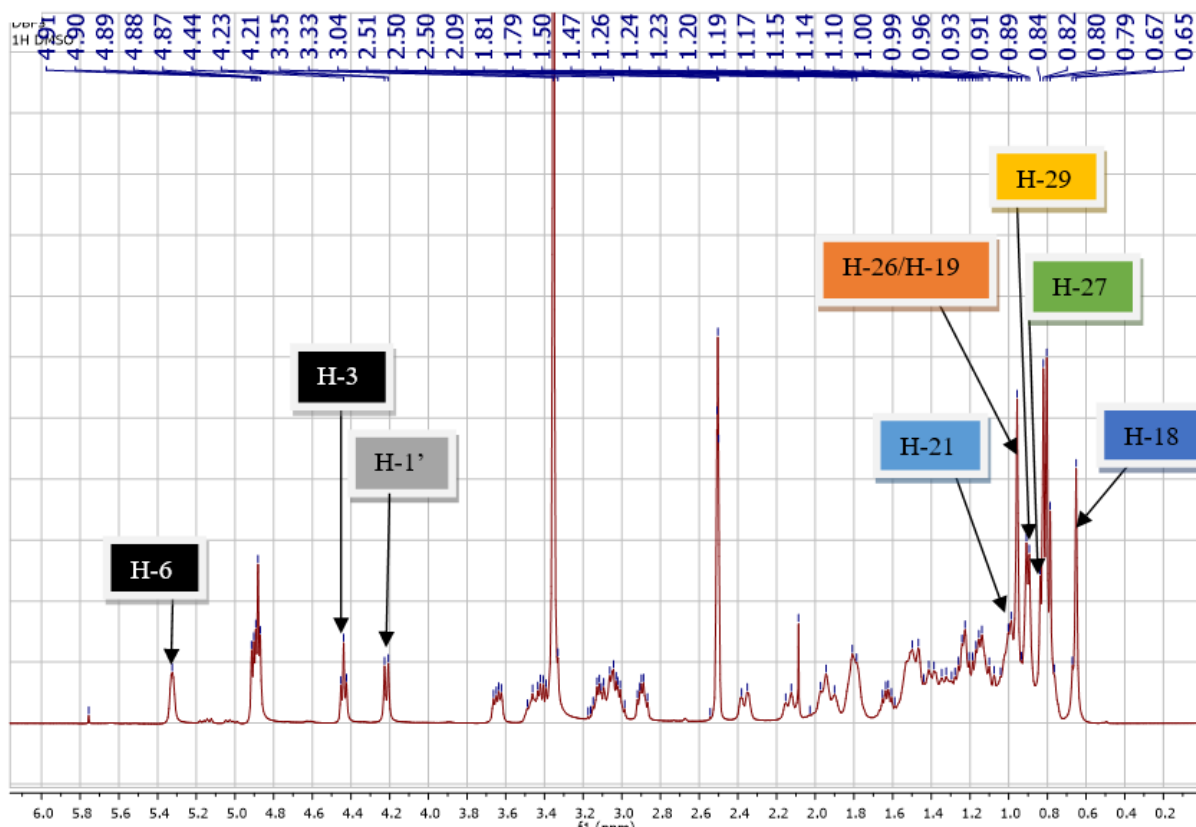


Figure 39 : Spectre RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) de DBE₂

L'analyse du spectre RMN ^{13}C de DBE₂ montre 35 signaux parmi lesquels la présence de deux signaux de carbones méthylénique à δ_{C} : 140,5 (C-5) et 120,9 (C-6). Par ailleurs, on note la présence de six groupements méthyles résonnant à δ_{C} : 11,6 (C-18); 19,1 (C-19); 18,9 (C-21); 19,7 (C-26); 20,6 (C-27) et 11,8 (C-29).

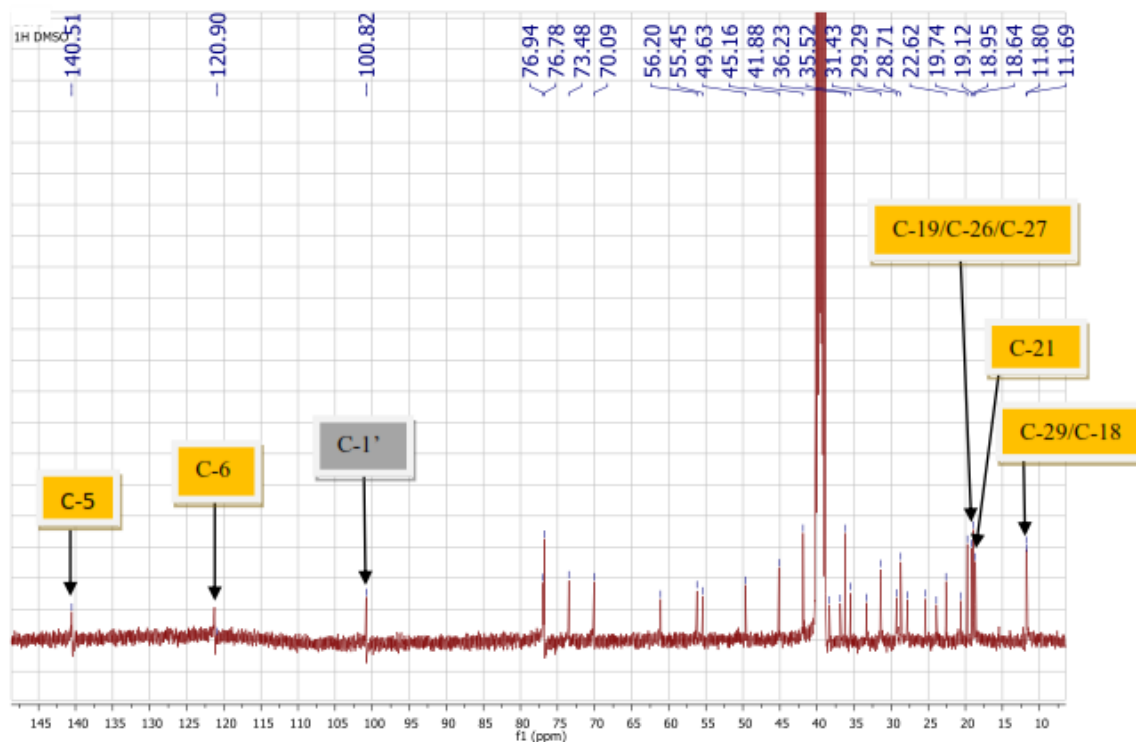


Figure 40: Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆) de DBE₂

L'analyse des données spectrales nous permet alors de déduire que l'aglycone comprend : une double liaison trisubstituée, six groupements méthyles, huit carbones méthiniques dont un lié à un hétéroatome, onze carbones méthyléniques et deux carbones quaternaires. La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C de DBE₂ est identique à celle d'un sitosterol 3-*O*- β -D-glucopyranoside composé connu, précédemment isolé de *Campylospermum densiflorum* (Ngono *et al.*, 2014) et isolé pour la première fois dans le genre *Distemonanthus*.

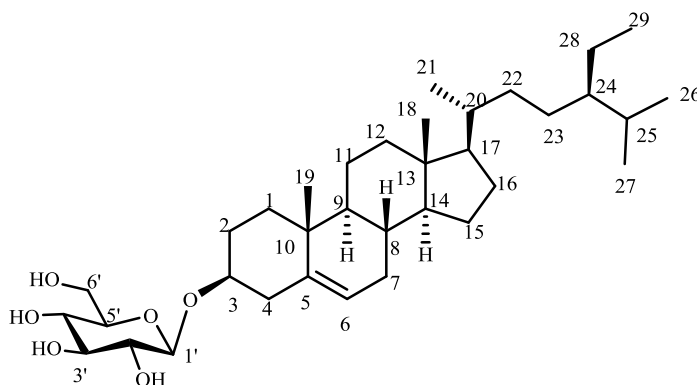


Tableau XXVII: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBE₂ avec le sitosterol 3-*O*- β -*D*-glucopyranoside (Ngono *et al.*, 2014).

N°	Expérimental		Littérature		N°	Expérimental		Littérature	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}		δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1	1,00 (m)	36,9	1,00 m	36,7	17	1,10 (m)	55,5	1,20 m	55,3
	1,80 (m)		1,74 m			18	0,67 (s)	11,6	0,70 s
2	1,82 (m)	29,3	1,78 m	29,2	19	0,95 (s)	19,1	0,94 s	19,0
	1,48 (m)		1,46 m		20	1,34 (m)	35,6	1,40 m	35,4
3	3,06 (m)	76,8	2,98 m	76,8	21	1,00 (d; 7,5)	18,9	0,95d (6,5)	18,5
4	1,96 (m)	39,4	2,26 dt, (4,69 ; 8,10)	39,2	22	1,52 (m)	31,5	1,20 m	33,2
			1,98 ddd (1,98 ; 12,94 ; 12,94)			23	1,40 (m)	20,7	1,25 m
	1,14 (m)					1,48 (m)			
5	-	140,5	-	140,4	24	0,91 (m)	45,2	0,94 m	45,1
6	5,32 (brs)	120,9	5,35 t, (3,6)	121,20	25	1,63 (m)	28,8	1,68 m	28,6
7			1,73 ddd, (2,5 ; 7,0 ; 16,0)	31,3	26	0,92 (d; 7,5)	19,7	0,87 d (7,0)	19,6
	1,05 (m)	33,5	1,95 ddd, (16,0 ; 2,5 ; 7,0)			27	0,88 (d; 7,6)	20,6	0,88 d (7,0)
	1,30 (m)								
8	1,39 (m)	31,5	1,36 m	31,2	28	1,15 (m)	25,5	1,30 m	22,1
9	0,89 (m)	49,7	0,85 m	49,5	29	0,89 (m)	11,8	0,97 t (7,5)	11,7
10	-	36,3	-	36,1	1'	4,23 (d; 7,9)	100,8	4,20 d (7,9)	100,7
11	1,23 (m)	22,7	1,42 m	20,5	2'	2,89 (t; 8,0)	73,5	2,89 dt (4,5 ; 8,0)	73,4
			1,42 m		3'	3,12 (m)	76,8	3,27 dt ; 8,0 (4,5 ; 8,0)	76,8
12	2,36 (dd; 4; 12)	38,4	1,52 dd, (4,3 ; 12,37)	38,2	4'	3,02 (m)	70,2	3,00 dt (4,5 ; 8,0)	70,0
	2,12 (m)		1,20 m		5'	3,45 (m)	77,1	3,06 dt (4,5 ; 8,0)	76,7
13	-	41,9	-	41,8	6'	3,64 (m);	61,1	4,55 dd, (2,5 ; 11,77)	62,8
14	0,98 (m)	56,3	0,95 m	56,1			3,40 (m)		4,40 dd (5,2 ; 11,77)
15	0,81 (m)	23,9	1,05 m	23,8	2' (OH)	-	-	3,56 d (4,5)	-
	1,19 (m)		1,57 m		3' (OH)	-	-	3,56 d (4,5)	-
16	1,23 (m)	27,9	1,25 m	27,7	4' (OH)	-	-	3,40 d (4,5)	-
	1,79 (m)		1,85 m		5' (OH)	-	-	3,60 t ((4,5)	-

II.3.4. De la famille des alcaloïdes

II.3.4.1. Identification de l'allantoïne (DBF₃)

Le composé DBF₃ se présente sous forme des cristaux de couleur jaune en paillettes. Son spectre UV visible présente le maxima à λ_{max} compris entre 226 et 230 nm. Le composé donne une coloration bleu vif sur le test de Lassaigne pour l'azote caractéristique des composés de type urée. Son point de fusion est de 230°C. le modèle de fragmentation MS montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 158 [M⁺], correspondant à la formule moléculaire (C₄H₆N₄O₃) renfermant 4 degrés d'insaturations.

Le spectre IR de DBF₃ présente une bande d'absorption à 1780 cm⁻¹ due au groupe carbonyle et une autre à 3438 cm⁻¹ caractéristique d'un groupement (-NH).

Son spectre RMN ¹H montre la présence de cinq protons dans la zone comprise entre 5,24-10,54 ppm. Sur ce même spectre, on observe deux signaux dont un résonnant sous forme de doublets à δ_H 6,89 (1H; d; $J= 8,2$ Hz; H-3) et l'autre apparaissant sous forme de doublets dédoublés à δ_H 5,24 (1H; dd; $J= 8,2; 1,1$ Hz; H-6). On observe également les signaux de trois singulets à δ_H 5,79 (2H; s ; H-8) ; 8,06 (1H; s; H-4) et 10,55 (1H; s; H-1).

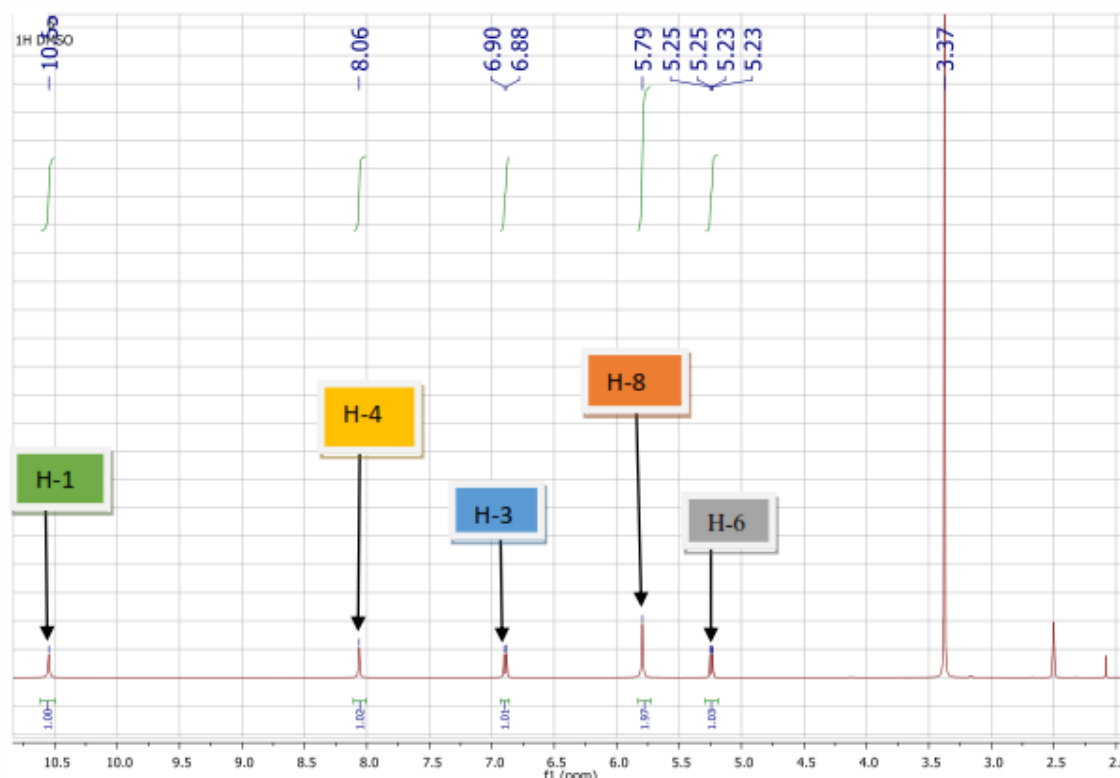


Figure 41: Spectre de RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) du composé DBF₃

Le spectre de RMN ¹³C large bande de DBF₃ exhibe quatre signaux distincts à δ_C 62,4 (C-4) ; 156,8 (C-2) ; 157,4 (C-7) et 173,6 (C-5).

Le spectre de RMN DEPT 90 de DBF_3 révèle la présence d'un seul signal à δ_C 62,4 indiquant un seul groupe méthine (CH).

Par conséquent, les autres signaux de protons sont dûs à des protons attachés à des hétéroatomes. Il existe quatre de ces signaux dans le spectre RMN ^1H .

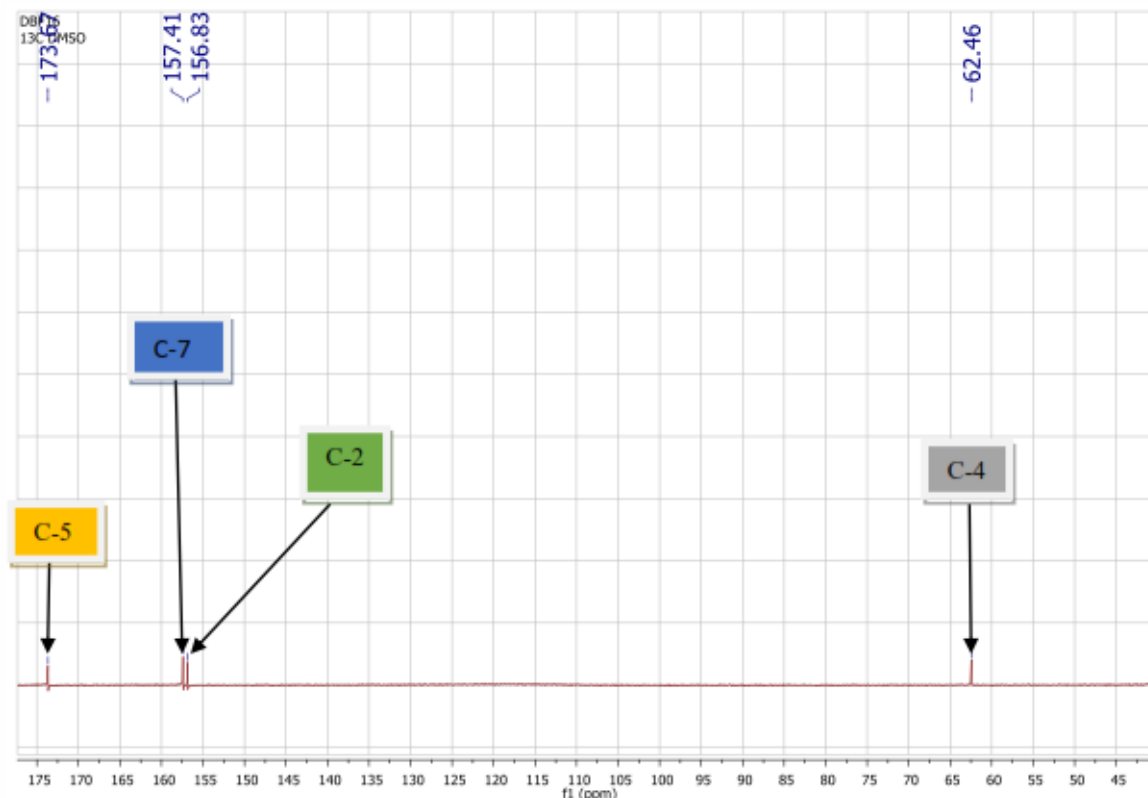


Figure 42 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) du composé DBF_3

Une analyse approfondie de tous les spectres et une comparaison des données spectrales avec celles de la littérature ont permis d'identifier le composé DBF_3 à l'allantoïne récemment isolé des feuilles de *Pisonia grandis* R.Br. (Sripathi *et al.*, 2011). Composé isolé pour la première fois dans le genre *Distemonanthus*.

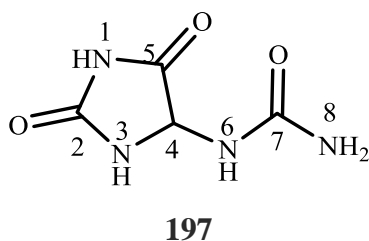


Tableau XXVIII: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé DBF₃ avec l'allantoïne (Sripathi *et al.*, 2011).

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (CDCL ₃)	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1	-	-	10,54 (s)	-
2	-	156,8	-	157,2
3	6,89 (d; 8,2)	-	6,68-9,96 (d)	-
4	6,89 (d; 8,2)	62,4	8,0 (s)	62,9
5	-	173,6	-	171,0
6	5,24 (dd; 8,2; 1,1)	-	5,3 (d)	-
7	-	157,4	-	157,9
8	5,79 (s)		5,83 (s)	-

II.4. EXTRACTION ET ISOLEMENT DES CONSTITUANTS DES ÉCORCES DE *CASSIA AREREH*

II.4.1. Extraction des écorces de *Cassia arereh*

Le solvant utilisé c'est le méthanol à température ambiante. Les écorces de *Cassia arereh* ont été séchées puis broyées pour donner une poudre de (1,2 kg). Cette poudre a été macérée dans 5L de méthanol pendant 72 h. le solvant a été évaporé et l'extrait brut (114,5 g) a été obtenu. Une partie de cet extrait (55,5 g) a été partitionnée en utilisant le mélange MeOH/H₂O (80 :20) puis additionnée à l'hexane (4 x 100 mL) pour le débarrasser des huiles et de la chlorophylle. L'épuisement de la phase résiduelle (MeOH/H₂O) avec l'acétate d'éthyle a donné un extrait à l'acétate d'éthyle de (12,5 g).

II.4.2. Isolement des constituants des écorces de *Cassia arereh*

L'extrait à l'acétate d'éthyle a été fractionné sur une colonne de gel de silice, l'élution a été effectuée avec le mélange CH₂Cl₂/MeOH de polarité croissante. Cinq fractions majeures sont indexées : I (2,67 g ; 1-10) ; II (1,76 g ; 11-18) ; III (1,65 g ; 19-42) ; IV (3,27 g ; 43-53) ; V (4,15 g ; 54-74).

La purification des fractions par différentes méthodes chromatographiques a permis d'isoler six composés. Le schéma 3 ci-dessous présente les différentes étapes d'isolement des composés de *C. arereh*.

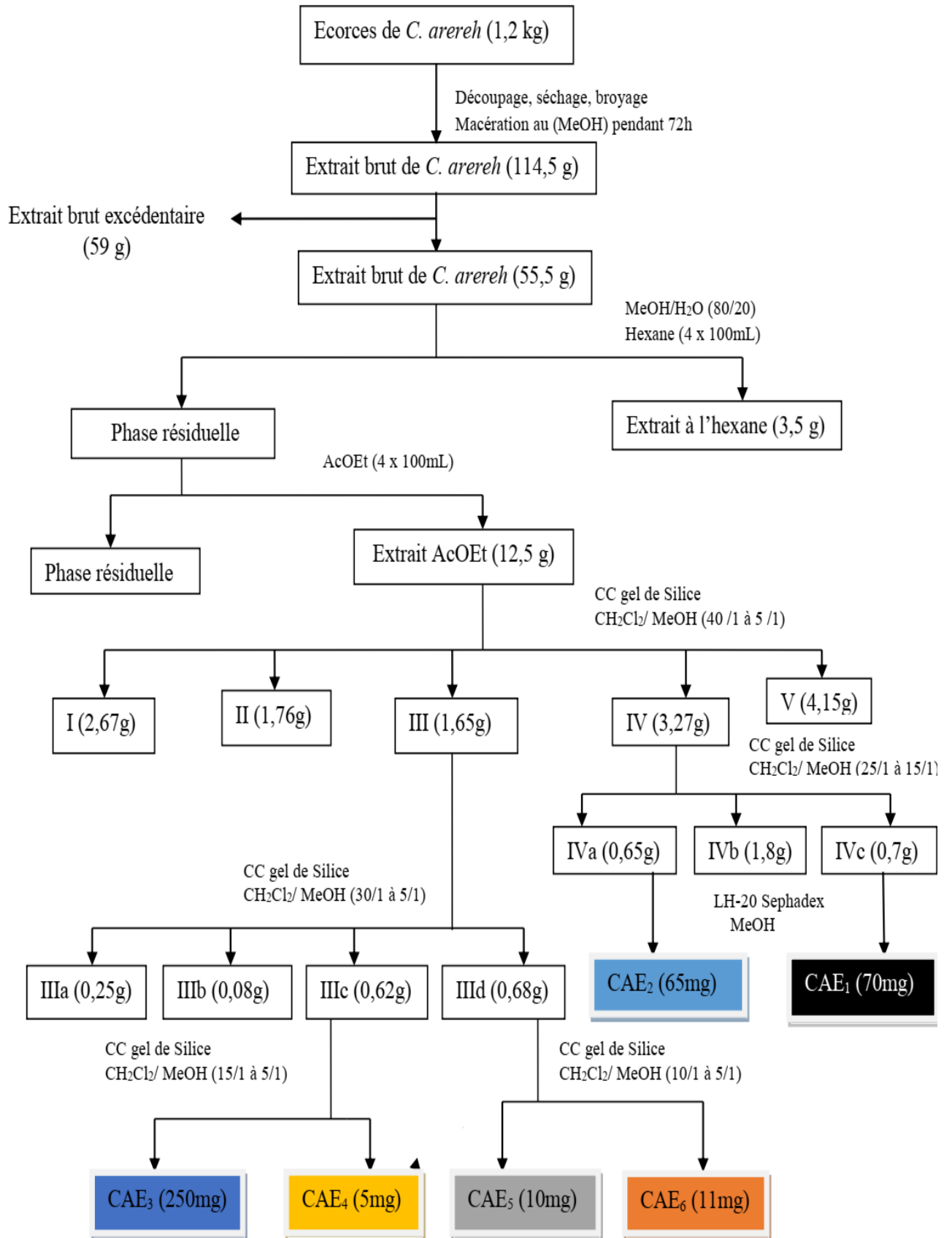


Schéma 3: Protocole d'extraction et d'isolement des constituants des écorces de *C. arereh*

II.4.3. Détermination structurale des composés isolés

II.4.3.1. Détermination structurale de CAE₁

Le composé CAE₁ se présente sous forme de poudre blanche avec un point de fusion 208 °C. Il réagit positivement au chlorure ferrique (vert) (FeCl₃), test caractéristique des composés phénoliques.

Son spectre IR permet d'observer une bande d'absorption du groupe hydroxyle (-OH) à 3250 cm⁻¹, alors que sur son spectre UV on observe deux maxima dans la région de longueurs ondes comprise entre 308-336 nm suggérant la présence d'un système aromatique conjugué (kashiwada *et al.*, 1984).

Son spectre de masse ESI-MS à haute résolution en mode positif présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 657,2239 [M+H]⁺ (masse calculée 657,2236) correspondant à la formule brute C₃₃H₃₆O₁₄ renfermant 16 degrés d'insaturations.

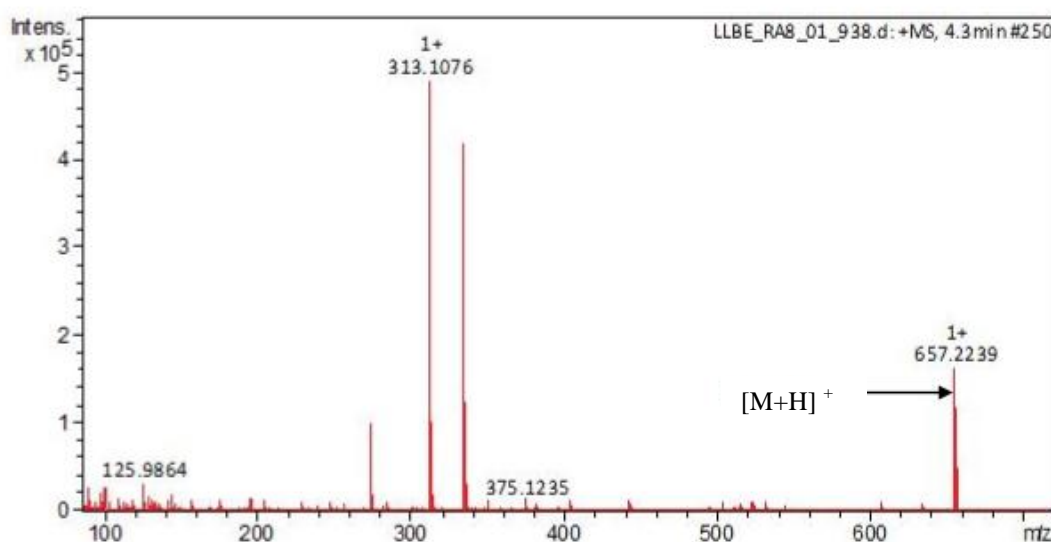


Figure 43 : Spectre de masse du composé CAE₁

Son spectre de RMN ¹H (**Figure 44**) met en évidence le signal d'un méthoxyle à δ_H 3,82 (s) et de deux protons oléfiniques résonnant sous forme de doublet à δ_H 6,94 (1H; d; $J=16,3$ Hz; H-7) et 7,04 (1H; d; $J=16,3$ Hz; H-8). La nature de la constante de couplage (16,3 Hz) des protons H-7 et H-8 indique la présence d'un couplage *trans*-oléfinique. Sur ce même spectre, on observe un système AA'BB' dont les signaux apparaissent à δ_H 7,49 (2H ; d ; $J=8,8$ Hz ; H-2' et H-6') et 6,92 (2H ; d ; $J=8,8$ Hz ; H-3' et H-5') et qui sont assignables à un noyau aromatique 1',4'-disubstitué. On observe également des signaux de type ABB' à δ_H 6,50 (1H ; brs ; H-2) puis à 6,70 (1H ; t ; $J=2,1$ Hz ; H-4) et enfin à 6,78 (1H; d; $J=1,6$ Hz ; H-6) assignables aux protons d'un système 1,3,5-trisubstitué d'un noyau aromatique.

L'analyse du spectre de RMN ^1H de CAE_1 permet de distinguer deux signaux de protons anomériques résonnant à δ_{H} 5,01 (d; $J = 7,8$ Hz; H-1'') et 4,61 (d; $J = 1,4$ Hz; H-1''') et qui corrélient en HSQC avec les carbones δ_{C} 100,9 (C-1'') et 100,7 (C-1''') respectivement. La configuration β a été attribuée au proton anomérique de Xyl et celle α à Rha sur la base de leurs constantes de couplage $J = 7,8$ et 1,4 Hz respectivement.

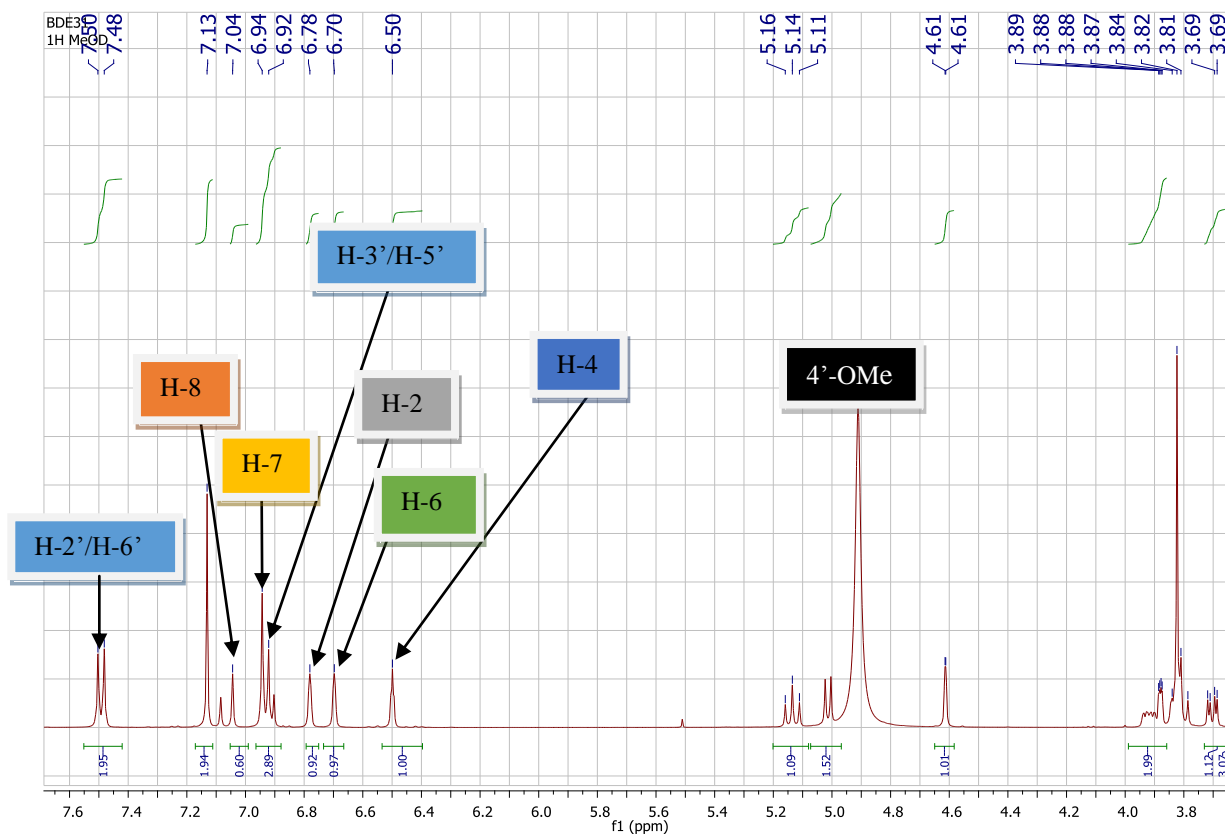


Figure 44 : Spectre de RMN ^1H élargie (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) du composé CAE_1

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C , nous permet de distinguer 9 carbones tertiaires (CH) et 9 carbones quaternaires (C) parmi lesquels 6 carbones hybridés Sp^2 oxygénés et un carbone primaire à δ_{C} 54,3 (4'- OCH_3).

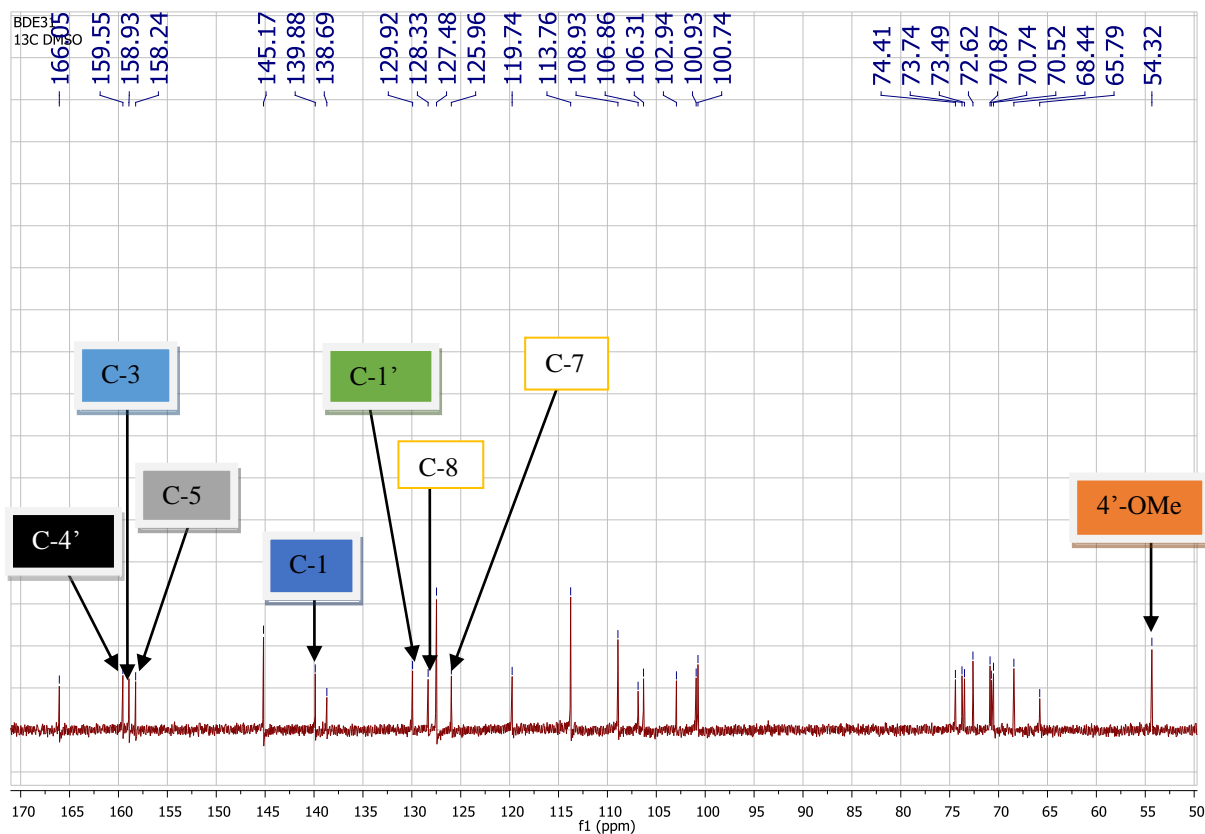


Figure 45 : Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) du composé CAE_1

Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le signal du proton oléfinique à δ_H 6,92 et les carbones à δ_C 128,3 (C-8) ; 139,9 (C-1) puis celles à δ_H 7,06 et les carbones à δ_C 125,9 (C-7) ; 129,9 (C-1'). Toutes les valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC de CAE_1 . Ces données sont semblables à celles décrites par Atta-ur-Rahman et collaborateurs en 2005.

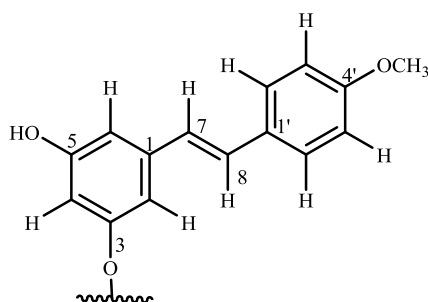


Figure 46: *trans*-3,5-dihydroxy-4'-méthoxystilbène (*Trans*-resvératrol)

L'observation du signal de carbone résonnant à δ_C 158,9 (C-3), montre que CAE_1 est un dérivé de type 3 monodesmosidique du *trans*-3,5-dihydroxy-4'-méthoxystilbène (**Figure**

44) ayant une chaîne osidique liée en C-3 au moyen d'une liaison éther (Atta-ur-Rahman *et al.*, 2005).

Les sucres de CAE₁ ont été déterminés comme étant les monosaccharides suivants : L-Rha et D-Xyl par hydrolyse acide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylesylates et par comparaison avec les sucres de références du laboratoire.

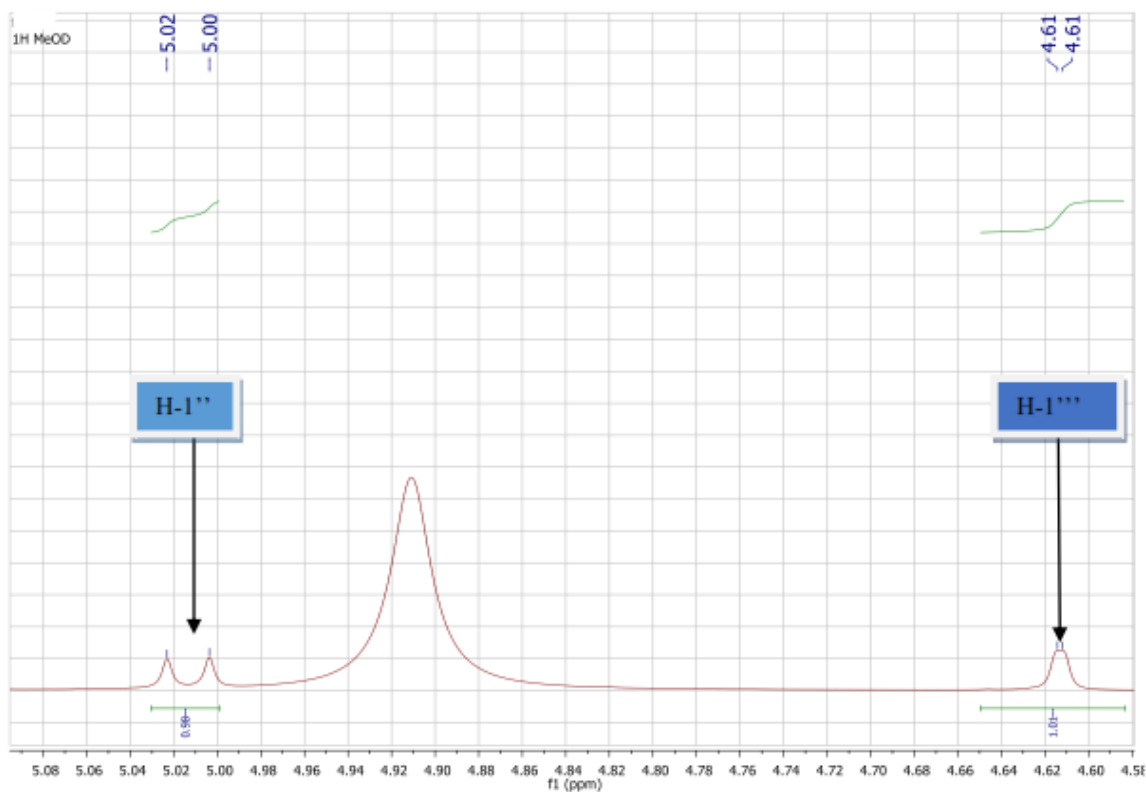


Figure 47: Spectre de RMN ¹H élargie (500 MHz, MeOD-d₄) du composé CAE₁

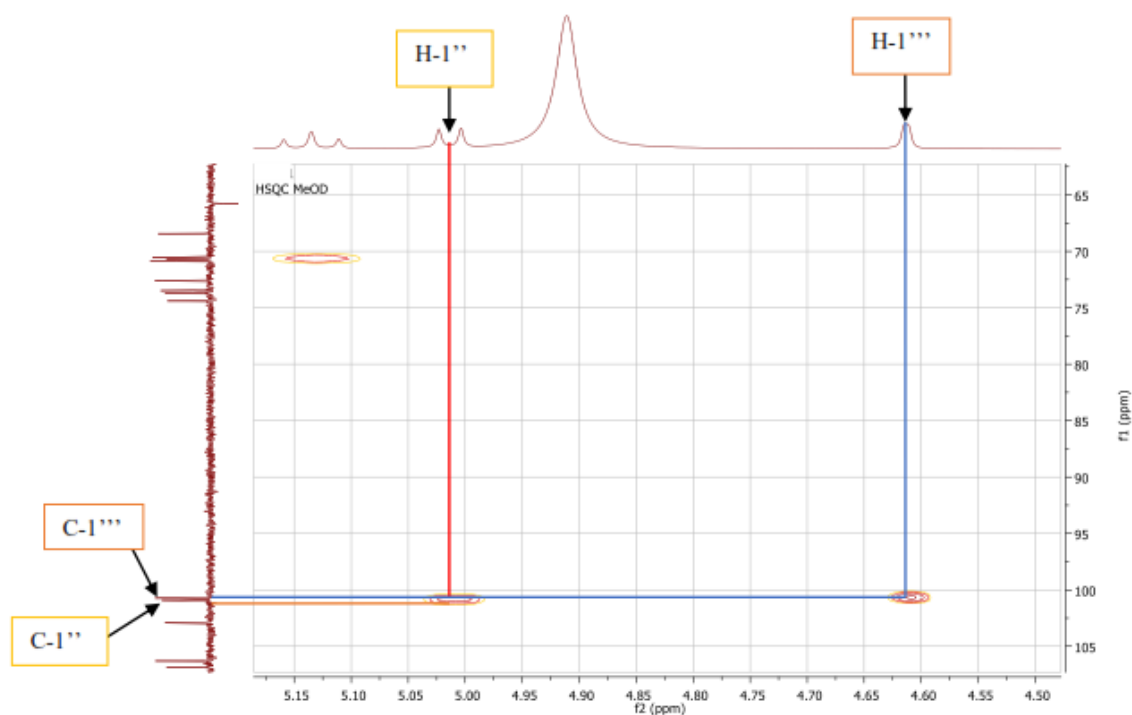


Figure 48: Spectre HSQC du composé CAE₁

Sur son spectre de RMN ¹H (**Figure 48**) on observe la présence d'un système ABM avec un signal très intense d'un singulet résonant à δ_H 7,13 (1H; s; H-3''''/H-6''') attribuable à deux protons en position *mé*ta et *ortho* d'un noyau aromatique et un autre proton lui aussi intense mais résonnant sous forme de doublet à δ_H 7,49 (1H; d; $J = 8,8$ Hz; H-7''') suggérant la présence d'un dérivé d'acide vanillique dans la molécule.

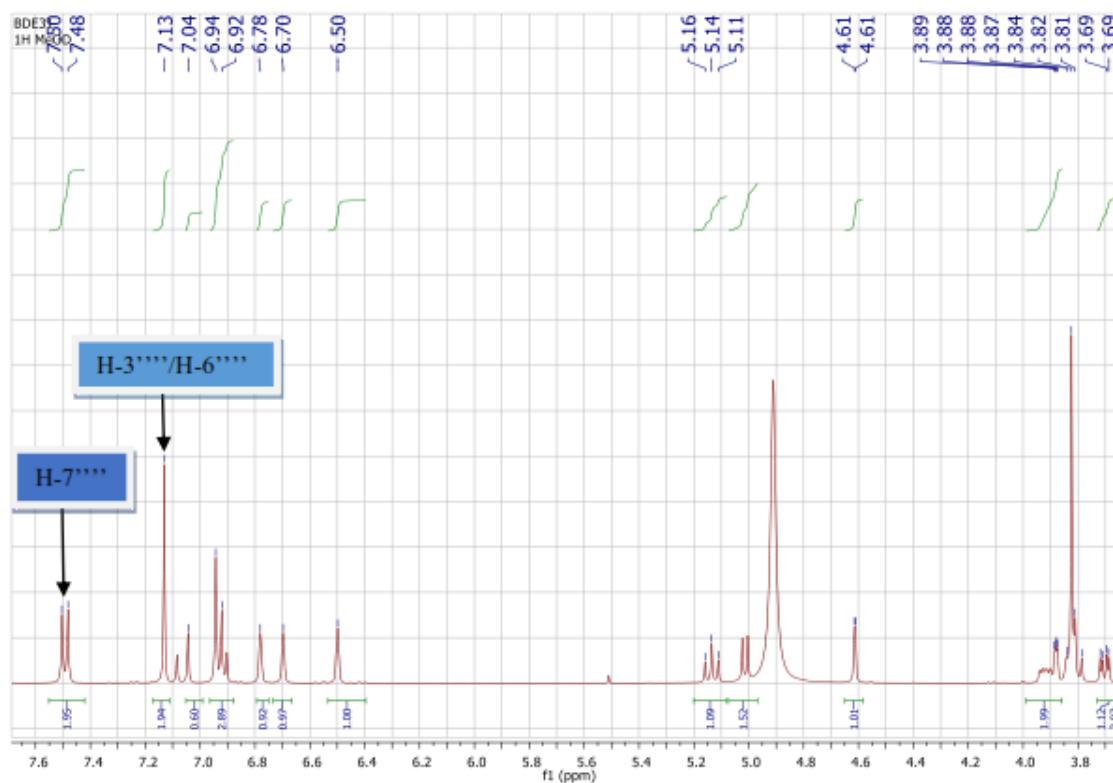


Figure 49: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) du composé CAE_1

L'analyse des spectres de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC et HMBC de CAE_1 a permis d'attribuer toutes les valeurs des déplacements chimiques de notre dérivé d'acide vanillique (acide protocatéchique). Ces données sont semblables à celles décrites par Bchir et collaborateurs en 2011.

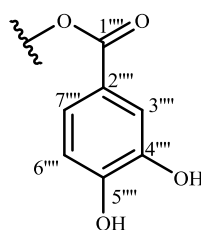


Figure 50: Acide 4,5-dihydroxybenzoïque

L'analyse du spectre HMBC a permis de déterminer les points de jonction des chaînes osidiques sur le *trans*-resvératrol ainsi que les liaisons interglycosiques.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le signal de proton à δ_{H} 5,01 (H-1'' Xyl) et le carbone à δ_{C} 158,9 (C-3) suggère que le Xylose est lié au *trans*-3,5-dihydroxy-4'-méthoxystilbène en position 3.

En outre, la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton à δ_{H} 3,59 (Xyl H-2'') et le carbone δ_{C} 100,7 (Rha C-1''') suggère que le Rhamnose est lié au Xylose en position 2''.

L'estérification du groupe hydroxyle en C-4'' du Xylose par le dérivé d'acide vanillique a été suggéré à partir de la position déblindée de H-4'' de Xyl et C-4'' avec des résonances à δ_H 5,14 et δ_C 70,7 respectivement. Ceci a été confirmé par la corrélation HMBC, entre le signal à δ_H 5,14 (Xyl H-4'') et le carbone à δ_C 166,0 (C-1''') du dérivé d'acide vanillique.

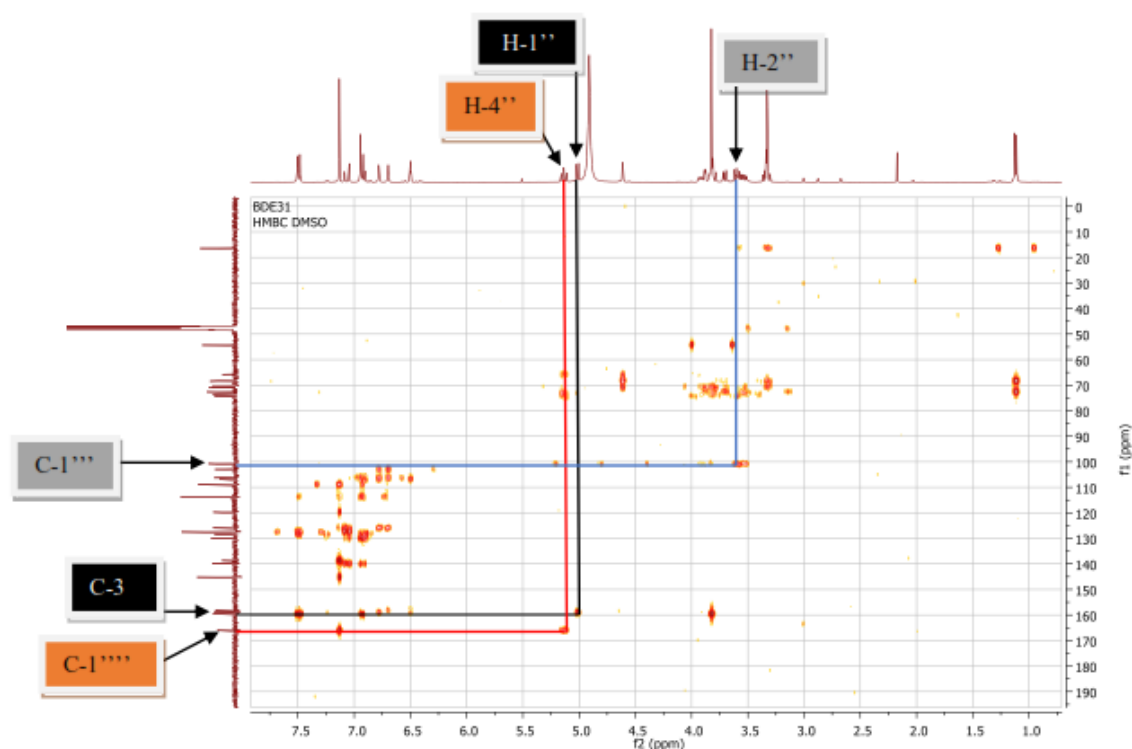


Figure 51: Spectre HMBC (500 MHz, MeOD- d_4) du composé CAE₁

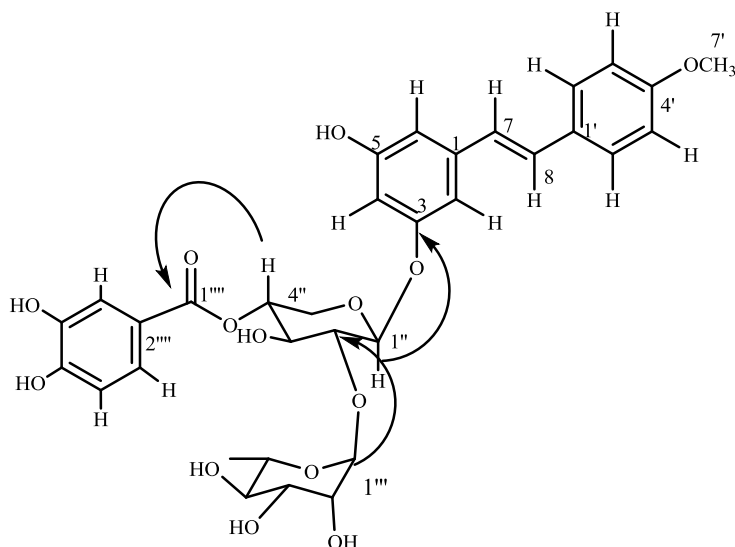


Figure 52: Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC du composé CAE₁

Sur la base des études spectroscopiques ci-dessus, la structure du composé CAE₁ a été déterminée comme étant le *trans*-4',5-dihydroxy-4'-méthoxystilbène-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)[4''-(4''''',5''''')-dihydroxybenzoyl]- β -D-xylopyranoside **196**, qui est un dérivé de stilbène décrit pour la première fois. C'est une première de décrire un dérivé stilbène dans le genre.

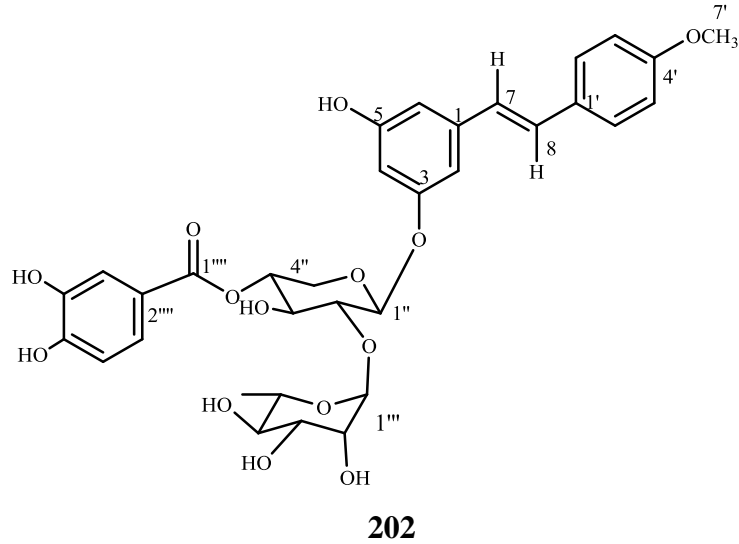


Tableau XXIX: Données de RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé CAE₁ dans le MeOD-*d*₄ (δ en ppm; *J* en Hz).

N°	δ_H (<i>J</i> en Hz)	δ_C	HMBC (C→H)	Position	δ_H (<i>J</i> en Hz)	δ_C	HMBC (C→H)
1	-	139,9	-				
2	6,78 (d ; 1,6)	106,3	-	1'''	4,61(d; 1,0)	100,7	-
3	-	158,9	-	2'''	3,87 (dd; 3,3; 1,5)	70,5	-
4	6,50 (t; 2,1)	102,9	-	3'''	3,30 (m)	72,6	-
5	-	158,2	-	4'''	3,69 (dd; 9,5; 3,4)	70,8	-
6	6,70 (s)	106,8	-	5'''	3,58 (m)	68,4	-
7	6,92 (d; 16,3)	125,9	C-6; C-2; C-8	6'''	1,12 (d; 6,2)	16,4	-
8	7,06 (d; 16,3)	128,3	C-2' ; C-6' ; C-7				
1'	-	129,9	-	1''''	-	166,0	-
2'	7,49 (d; 8,8)	127,5	-	2''''	-	119,7	-
3'	6,91 (d; 8,8)	113,7	-	3''''	7,13 (s)	108,9	-
4'	-	159,5	-	4''''	-	138,6	-
5'	6,91 (d; 8,8)	113,7	-	5''''	-	145,1	-
6'	7,49 (d; 8,8)	127,5	-	6''''	7,13 (s)	108,9	-
7'	3,82 (s)	54,3	-	7''''	7,49 (d; 8,8)	127,5	-
1''	5,01 (d; 7,8)	100,9	C-3				
2''	3,59 (m)	73,7	C-1'''				
3''	3,92 (m)	74,4	-				
4''	5,14 (t; 9,7; 1,0)	70,7	C-1''''				
5''	3,53 (m); 3,83 (d; 5,5)	65,7	-				

II.4.3.2. Identification de la catéchine (CAE₂)

Le composé CAE₂ se présente sous forme de poudre jaune, il réagit positivement au test de Shinoda caractéristique des flavonoïdes (shinoda., 1928). Son spectre UV présente les maxima à 280 nm et à 235 nm.

L'analyse de son spectre IR révèle deux bandes d'absorption à 3291 cm⁻¹ attribuées à la vibration d'étirement du groupe hydroxyle phénolique (Ar-OH) et un large étirement dans la région comprise entre 1515 à 1456 cm⁻¹ correspondant aux doubles liaisons aromatiques. Sur son spectre de masse ESI-MS, on observe le pic de l'ion moléculaire à m/z 290 g/mol [M]⁺, correspondant à la formule brute C₁₅H₁₄O₆ renfermant 9 degrés d'insaturations.

L'analyse de son spectre RMN ¹H met en évidence trois signaux de protons portés par le noyau B dont un résonne sous forme de doublets dédoublés à δ_H 6,86 (1H; dd; $J= 6,6$ Hz; H-6') et les autres sous forme de multiplets à δ_H 5,82 (1H; m; H-2'); 6,68 (1H; m; H-5'), l'ensemble de ces trois protons constitue le système ABX. Sur le même spectre on observe les signaux de deux protons portés par le noyau A qui résonnent sous forme de singulets respectivement à δ_H 4,78 (1H; s; H-6) et à δ_H 4,71 (1H; s; H-8) puis les signaux de trois protons portés par le noyau C dont deux résonnent sous forme de doublets dédoublés à δ_H 2,63 (1H; dd; $J= 16,8; 2,8$ Hz; H-4b); 2,76 (1H; dd; 16,7; 4,6 ; H-4a) respectivement et l'autre sous forme de multiplet à δ_H 4,07 (1H; m; H-2). On observe également sur ce spectre RMN ¹H le signal d'un groupement hydroxyle (-OH) résonnant sous forme de multiplet à δ_H 3,21 (1H; m; 3-OH).

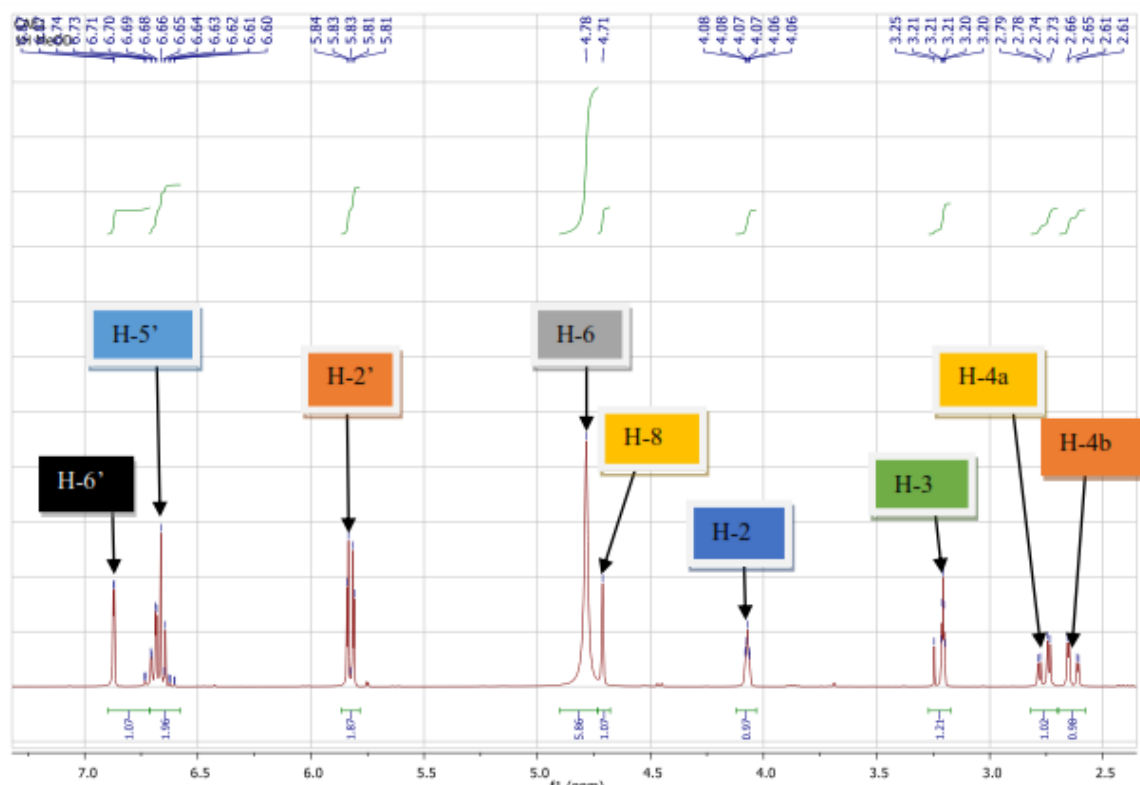


Figure 53: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) du composé CAE_2

De l'analyse du spectre de RMN ^{13}C , on observe quinze signaux : soit 6 carbones tertiaires (CH) et 9 carbones quaternaires (C) parmi lesquels 7 carbones oxygénés hybridés sp^2 à δ_{C} 67,3 (C-3); 80,5 (C-2) ; 159,1 (C-7) ; 159,0 (C-9) ; 147,3 (C-4') ; 147,2 (C-3') et 159,0 (C-5).

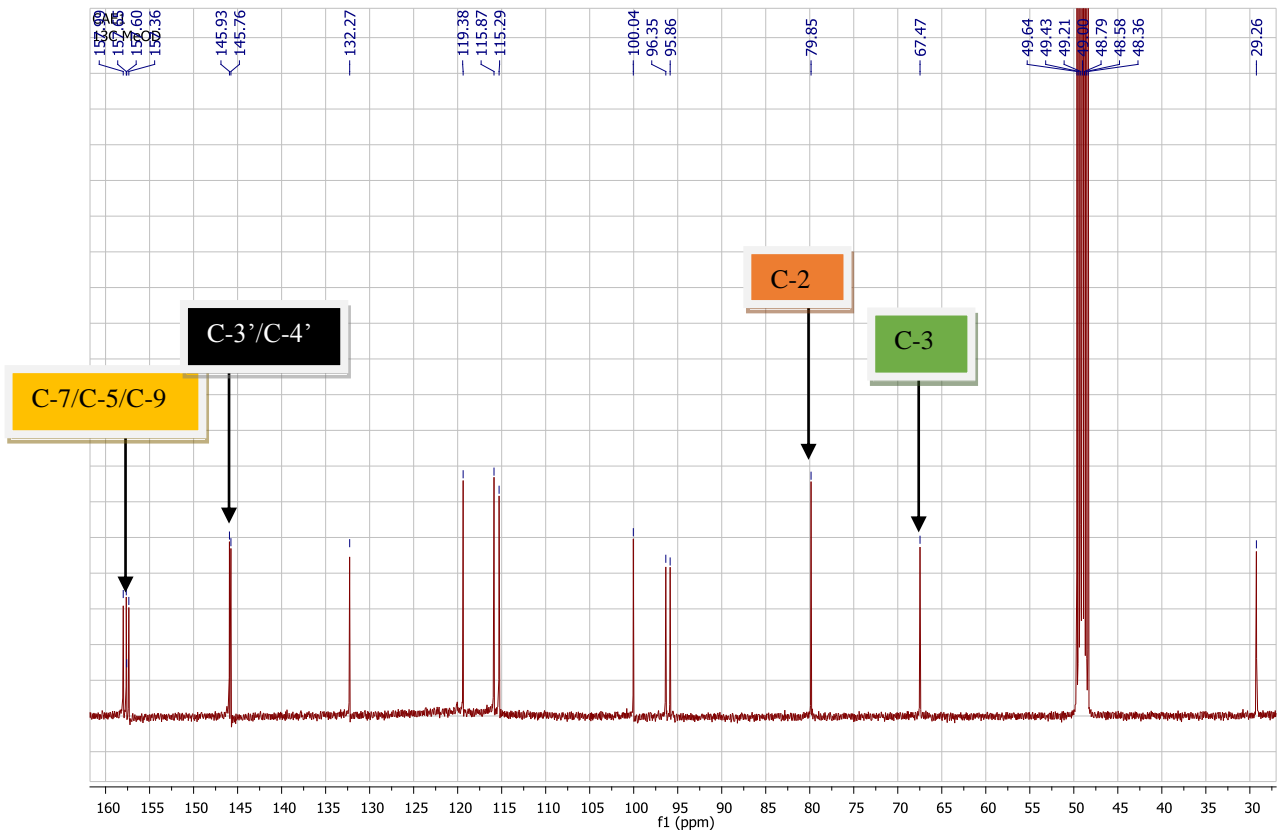
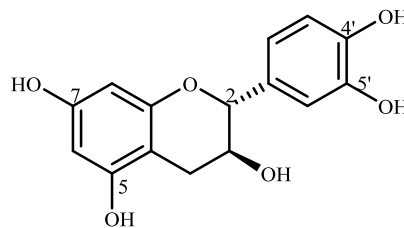


Figure 54: Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) de CAE $_2$

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des données RMN ^1H et ^{13}C de CAE $_3$ avec celles de la littérature nous a permis de l'identifier à la Catéchine, précédemment isolée de la tige d'*Acer tegmentosum maxix* par Hong et collaborateurs en (2007).



203

Tableau XXX: Comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C du composé CAE₂ avec la catéchine (Hong *et al.*, 2007)

N°	Expérimental (MeOD- <i>d</i> ₄)		Littérature (MeOD- <i>d</i> ₄)	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
2	4,07 (m)	80,5	4,56	82,7
3	3,22 (m)	67,3	3,99 d (8,3)	68,4
4	2,63 dd (16,8 ; 2,8) 2,76 dd (16,7 ; 4,6)	30,1	2,91 dd (16,1 ; 5,4) 2,53 (16,1 ; 8,3)	28,8
5	-	159,0	-	157,2
6	4,78 (s)	97,0	6,02 d (2,3)	96,2
7	-	159,1	-	157,8
8	4,71 (s)	96,2	5,88 d (2,3)	95,5
9	-	159,0	-	157,0
10	-	100,6	-	100,7
1'	-	132,5	-	132,3
2'	5,82 (m)	119,8	6,75	120,1
3'	6,68 (m)	116,5	6,79	115,7
4'	-	147,3	-	145,7
5'	-	147,2	-	145,7
6'	6,86 d (6,6)	116,7	6,89	115,3

II.4.3.3. Identification du lupéol (CAE₃)

Le composé CAE₃ se présente sous forme de poudre blanche avec un point de fusion situé entre 215-217 °C. Il répond positivement au test de Libermann Buchard caractéristique des triterpènes.

L'analyse spectrale IR révèle un large pic à 3311 cm⁻¹ correspondant à l'étirement du groupe hydroxyle (-OH), à 2950 cm⁻¹ indiquant la présence du groupe C-H et à 1461 cm⁻¹ indiquent le groupe C=C. Sur son spectre de masse ESI-MS, on observe le pic de l'ion pseudo moléculaire à m/z 426 [M+H]⁺ correspondant à la formule brute C₃₀H₅₀O renfermant 5 degrés d'insaturations.

Le spectre de RMN ^1H présente sept signaux de protons de méthyle résonnant sous forme de singulet à δ_{H} 0,78 (H-24); 0,82 (H-28); 0,83 (H-25); 0,93 (H-27); 1,02 (H-23); 1,03 (H-26) et 1,68 (H-30) et corrélent avec les carbones à δ_{C} 15,4 (C-24); 18,0 (C-28); 16,1 (C-25), 14,5 (C-27); 29,7 (C-23); 15,9 (C-26) et 19,3 (C-30) respectivement. On observe également sur ce même spectre, le signal d'un proton méthinique qui apparait sous forme d'un doublet de doublet à δ_{H} 3,21 (1H ; dd ; J= 11,2 ; 5,0 Hz). Il a également montré deux protons oléfiniques à δ_{H} 4,59 et 4,71 en C-29 (2H, *d*, J = 1,9 Hz, H-29a, H-29b) représentant la double liaison exocyclique ainsi qu'un signal méthyle à δ_{H} 1,68 (H-30) suggérant que le composé isolé CAE₃ était un triterpénoïde de type lupane.

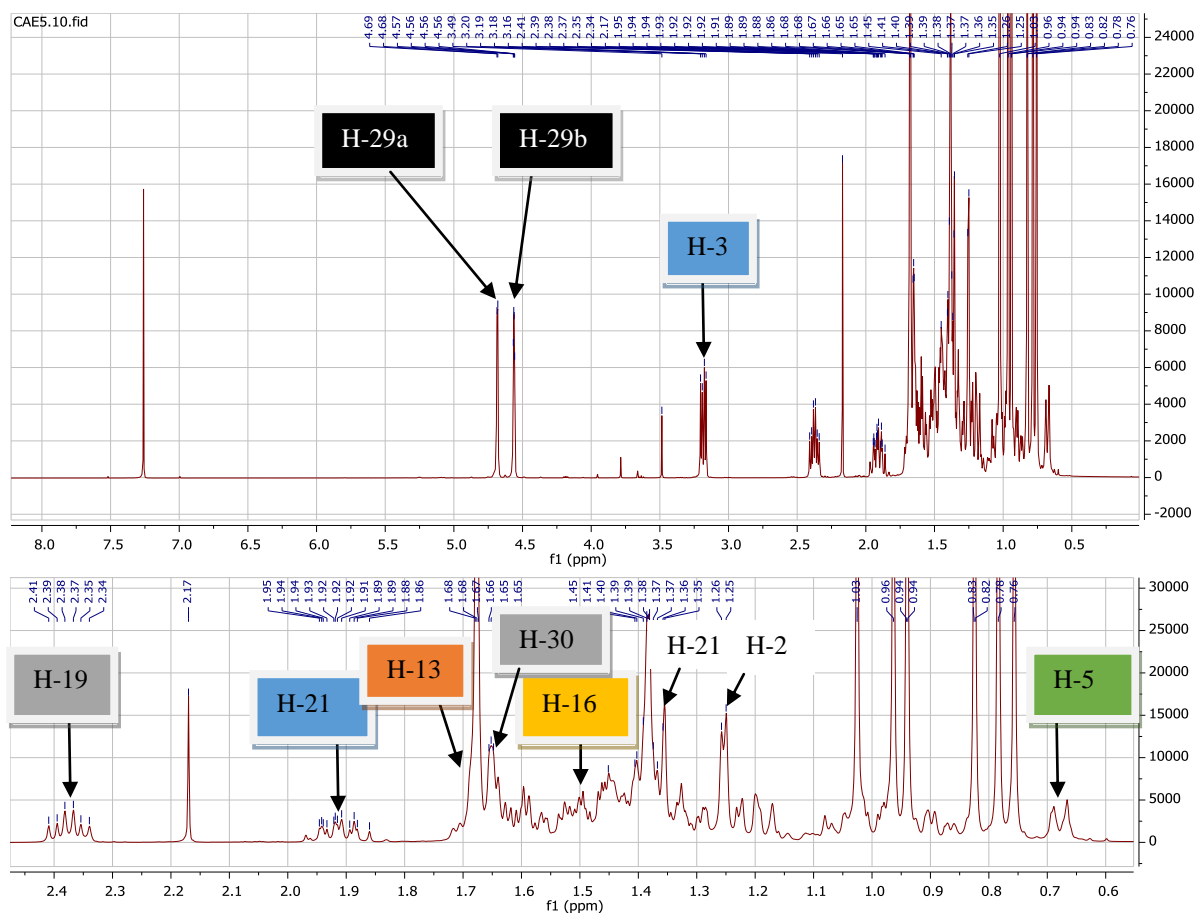


Figure 55: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) du composé CAE₃

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C nous permet d'observer 30 signaux de carbone parmi lesquels : sept méthyles, onze méthylènes, six méthines et six carbones quaternaires. Tout ceci nous suggère un squelette du type lupane qui comprend un carbone lié au groupe (-OH) en position C-3 apparaissant à δ_{C} 79,0. Les carbones oléfiniques de la double liaison exocyclique apparaissent à δ_{C} 151,0 (C-20) et à δ_{C} 109,3 (C-29).

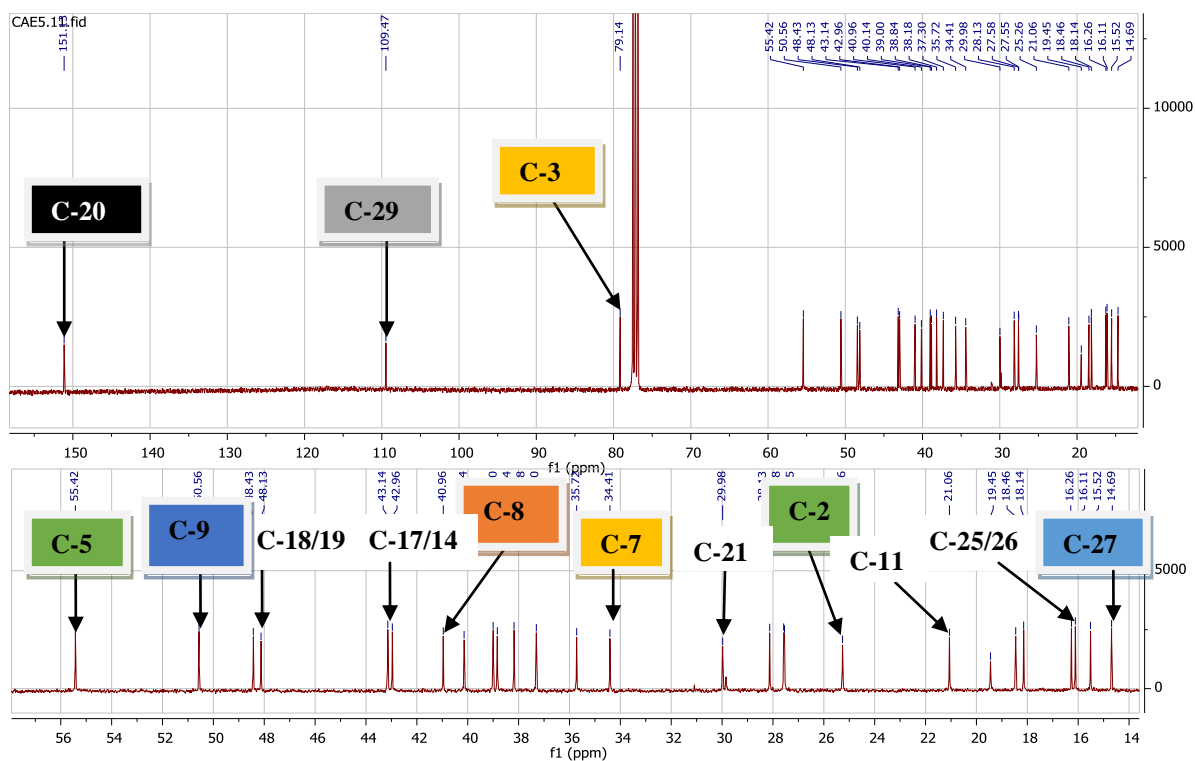
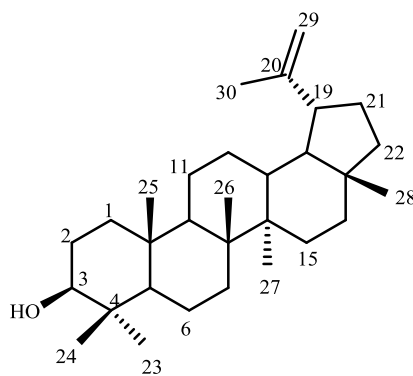


Figure 56: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) du composé CAE_3

L'analyse des spectres de RMN ^1H , ^{13}C en comparaison avec celles publiées dans la littérature permettent d'attribuer à CAE_3 la structure ci-dessous qui est celle du Lupéol, isolée précédemment des écorces de la tige de *Diospyros ehretioides* (Shwe *et al.*, 2019).



204

Tableau XXXI: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C du composé CAE₃ avec le lupéol (Shwe *et al.*, 2019)

N°	Expérimental (CDCl ₃)		Littérature (CDCl ₃)		N°	Expérimental (CDCl ₃)		Littérature (CDCl ₃)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C		δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1	0,92 m	38,7	0,90 m	38,8	16	1,39 m	35,6	1,35 m	35,5
	1,69 m		1,65 m			1,50 m		1,45 m	
2	1,24 m	27,4	1,52 m	27,4	17	-	43,8	-	42,9
	1,70 m		1,67 m		18	-	48,2	1,36 m	48,2
3	3,21 (dd; 11,2; 5,0)	79,0	3,20 dd	78,9		-		1,37 m	
4	-	38,8	-	38,7	19	2,37 td (11,0 ; 5,8)	47,9	2,40 m	47,9
5	0,70 m	55,3	0,67 m	55,2				1,45 m	
6	1,40 m	18,3	1,37 m	18,3	20	-	151,0	-	150,9
	1,52 m		1,52 m		21	1,35 m	29,8	1,3 m	28,8
7	1,41 m	34,3	1,39 m	34,2		1,94		1,91 m	
8		40,0		40,8	22	1,21 m	40,1	1,18 m	39,9
9	1,29 m	50,4	1,25 m	50,4		1,40 m		1,37 m	
10		37,2		37,1	23	1,02 m	29,7	0,90 s	27,9
11	1,28 m	20,9	1,20 m	20,9	24	0,78 (s)	15,4	0,76 s	15,3
	1,43 m		1,40 m		25	0,83 s	16,1	0,83 s	16,1
12	1,06 m	25,1	1,06 m	25,1	26	1,03 s	15,9	1,03 s	15,9
	1,62 m		1,62 m		27	0,96 s	14,5	0,94 s	14,6
13	1,70 m	38,0	1,66 m	38,0	28	0,82 s	18,0	0,79 s	17,9
14	-	42,8		42,8	29	4,59 (d; 1,1)	109,3	4,57,	109,3
15	1,06 m	27,9	1,05 m	27,4		4,71 (d; 2,4)		4,69 d, (1,9)	
	1,62 m		1,60 m		30	1,68 s	19,3	1,67 s	19,2

II.4.3.4. Identification du bétulinaldéhyde (CAE₄)

Le composé CAE₄ a été obtenu sous forme de poudre blanche, présentant un point de fusion situé entre 207-209°C. Il répond positivement au test de Libermann Buchard caractéristique des triterpènes.

L'analyse spectrale IR révèle un large pic à 3380-3060 cm⁻¹ correspondant à l'étirement du groupe hydroxyle (-OH), à 2950-2880 cm⁻¹ indiquant la présence du groupe C-H, puis à 1730 cm⁻¹ pour le carbonyle C=O et à 1470 cm⁻¹ indique le groupe C=C. Sur son spectre de masse ESI-MS en mode positif, on observe le pic de l'ion moléculaire à m/z 441,3156 g/mol [M]⁺ (masse calculée 441,3133) correspondant à la formule brute C₃₀H₄₈O₂ renferment 7 degré d'insaturations.

Le spectre RMN ^1H du composé CAE₄, superposé à celui de CAE₃ (lupéol) précédent se révèle quasi-similaire. Il diffère de ce dernier par la présence d'un signal de proton aldéhyde à

δ_H 9,67 (1H; s; H-28) et six singulets de méthyles au lieu de sept. Les autres signaux sont similaires à ceux reportés pour le composé CAE₃.

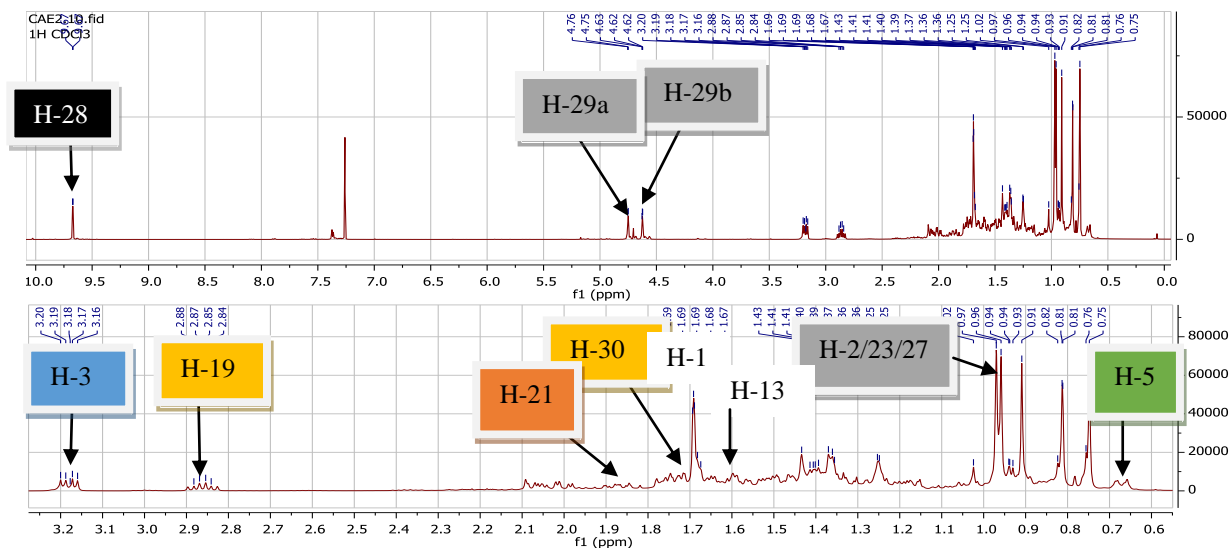


Figure 57: Spectre de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) du composé CAE₄

Son spectre RMN ¹³C montre un triplet à δ_C 33,3 (C-16) de par son déplacement vers les champs forts à δ_H 2,4 dû au groupement aldéhyde substitué en C-28 et un triplet à δ_C 33,4 blindé pour le C-22. Le singulet à δ_C 43,1 dans le composé CAE₃ a été déplacé vers des champs faibles à δ_C 16,3 en CAE₄. Ceci confirme la substitution du groupe aldéhyde en position C-28. Les autres signaux de carbone furent identifiés par analogie et attribués par correspondance avec ceux du lupéol précédent, exception du carbone C-28 du groupe aldéhyde qui apparaît à δ_C 206,8.

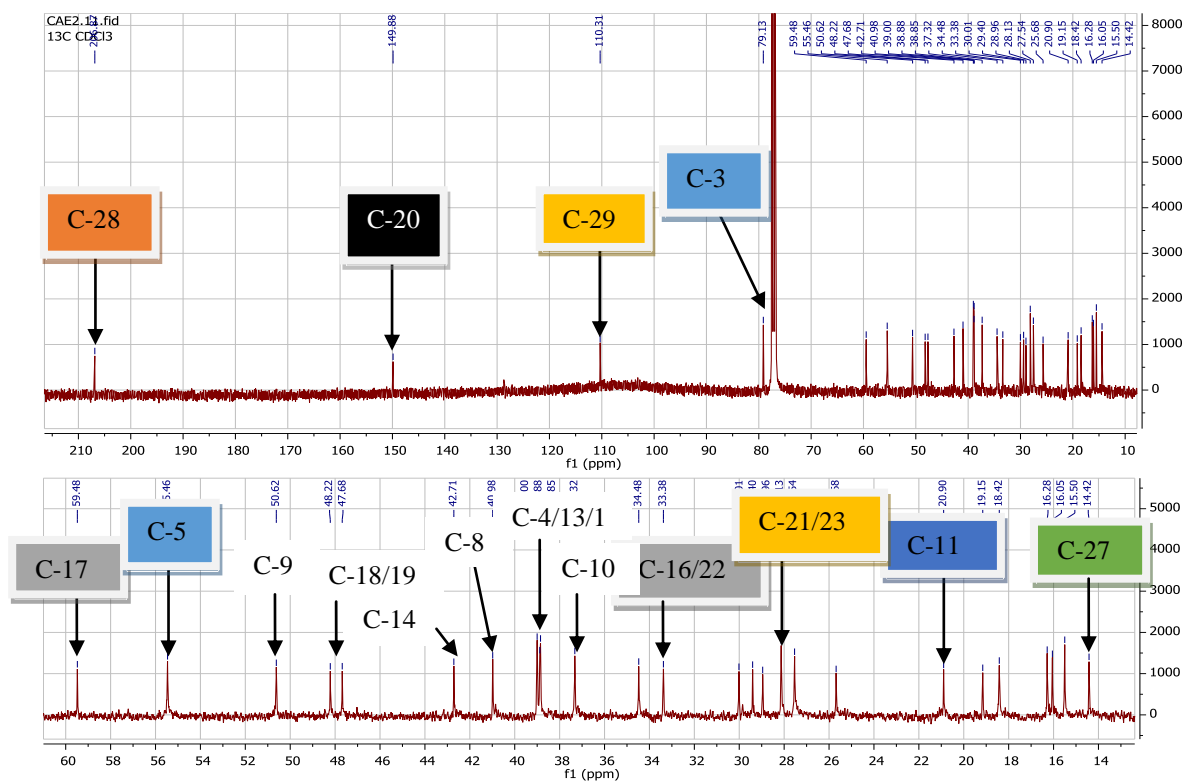
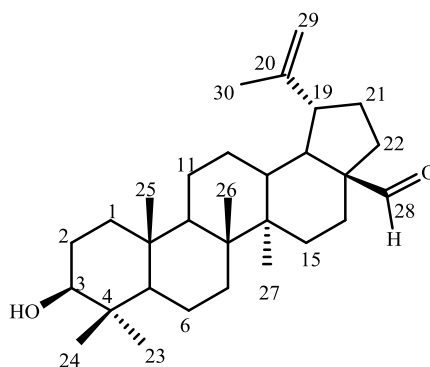


Figure 58: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) du composé CAE_4

Sur la base de ces données spectrales RMN et par comparaison avec celles de la littérature, le composé CAE_4 , qui représente une étape dans la séquence d'oxydation en C-28 du lupéol a été identifié sur la base de la similitude des données IR et RMN ^1H avec celles des composés typiques du lupane avec l'ajout du signal aldéhyde.

Par conséquent, la structure du composé CAE_4 a été identifiée comme étant le bétulinaldéhyde précédemment isolée des écorces de *Diospyros canaliculata* (Zhong *et al.*, 1984).



205

Tableau XXXII: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C du composé CAE₄ avec le bétulinaldéhyde (Zhong et al., 1984)

N°	Expérimental (CDCl ₃)		Littérature (CDCl ₃)		N°	Expérimental (CDCl ₃)		Littérature (CDCl ₃)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C		δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1	0,92 m	38,8	0,90 m	38,7	16	1,37 m	33,3	1,35 m	32,2
	1,68 m		1,65 m			1,45 m			
2	0,97 m	27,5	1,52 m	27,4	17	-	59,4	-	56,3
	1,61 m		1,67 m			1,36 m		49,6	
3	3,18 (dd; 11,3; 4,9)	79,1	3,15 (dd; 11; 4,8)	79,0	18	1,49 m	48,2	1,37 m	
4	-	39,0	-	38,9	19	2,86 (td; 11,1; 5,8)	47,6	2,80 m	49,3
5	0,67 m	55,4	0,67 m	55,4		1,44 m		1,45 m	
6	1,39 m	18,4	1,37 m	18,3	20	-	149,8	-	150,4
	1,53 m		1,52 m			1,30 m		29,8	
7	1,40 m	34,4	1,39 m	34,3		1,90 m		1,91 m	
8	-	40,9	-	40,7	22	1,28 m	34,4	1,18 m	37,0
9	1,25 m	50,6	1,25 m	50,5		1,37 m		1,37 m	
10	-	37,3	-	37,2	23	0,97 s	28,9	0,95 s	28,0
11	0,83 m	20,9	1,20 m	20,9		24	0,75 s	15,5	0,95 s
			1,40 m		25	0,81 s	16,2	0,80 s	16,1
12	1,03 m	25,6	1,06 m	25,5	26	0,91 s	16,0	0,90 s	16,0
	1,68 m		1,62 m		27	0,96 s	14,4	0,73 s	14,7
13	1,60 m	38,8	1,66 m	38,4	28	9,67 s	206,8	9,65 s	197,2
14	-	42,7	-	42,4	29	4,62 (dt; 7,3; 3,6)	110,3	4,60	109,3
15	1,24 m	30,0	1,05 m	30,6		4,75 (d; 1,9)		4,72 br.s	
	1,42 m		1,60 m		30	1,69 s	19,1	1,68 s	19,4

II.4.3.5. Identification de l'acide bétulinique (CAE₅)

Le composé CAE₅ obtenu sous forme de cristaux blancs après recristallisation dans le méthanol a un point de fusion comprise entre 315-317°C (Prakash., 2012). Son spectre UV est similaire à celui du composé CAE₅. Il donne une réaction positive au test de Liberman Buchard, caractéristique des triterpènes. Son spectre de masse (EI-MS) en mode positif montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 455,3531 [M^+], qui correspond à la formule moléculaire C₃₇H₄₈O₃ avec 14 degrés d'insaturations.

Le spectre IR du composé CAE₅ présente une large bande d'absorption à 3391 cm⁻¹ attribuée à l'étirement O-H, une très faible absorption à 3050 cm⁻¹ attribuée à l'étirement Csp²-H (éthylénique). Des bandes d'absorption à 2870 et 2943 cm⁻¹ attribuées à l'étirement

symétrique et asymétrique de Csp^3-H (méthylénique), tandis qu'une bande d'absorption modérée à 1686 cm^{-1} indique la présence de l'étirement $C=C$.

Le spectre RMN 1H du composé CAE_5 présente des signaux identiques à ceux du composé CAE_4 (bétulinaldéhyde) précédent, excepté le signal de proton du groupe aldéhyde à δ_H 9,67 qui n'apparaît plus. Il a montré six singulets de méthyle tertiaire à δ_H 0,64 ; 0,76 ; 0,86 ; 0,87 ; 0,93 ; 1,64 un groupe hydroxyle secondaire à δ_H 2,95 et deux protons oléfiniques à δ_H 4,56 et 4,69 représentant une double liaison exocyclique (Prakash, 2012).

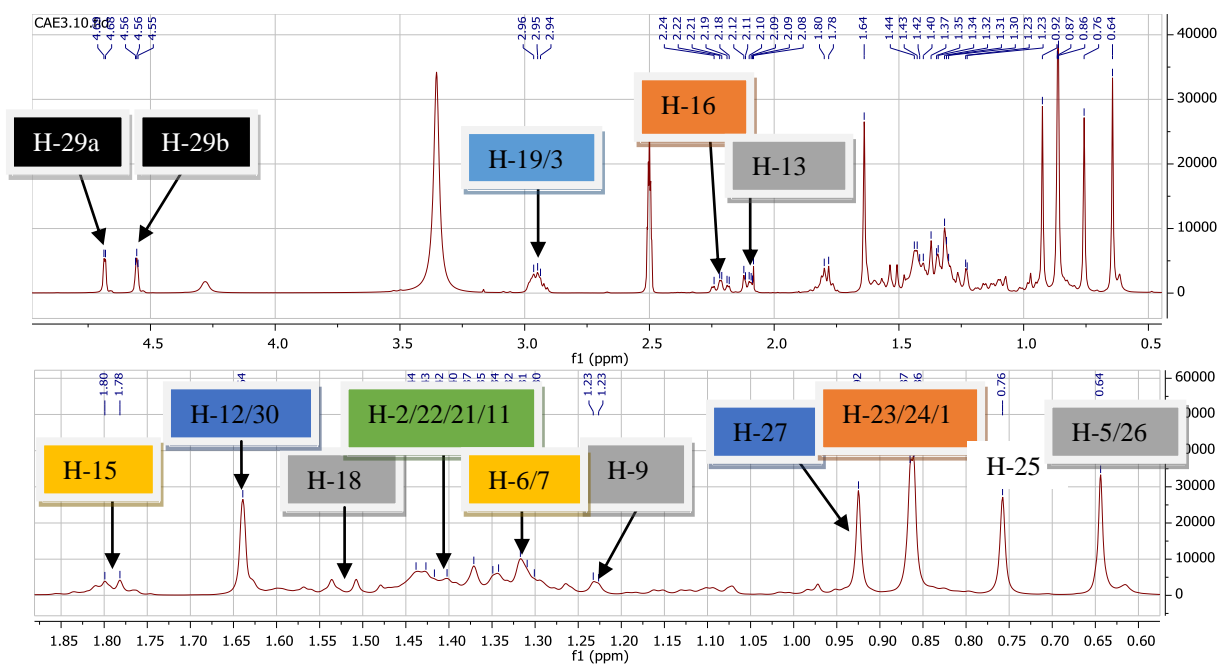


Figure 59: Spectre de RMN 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) du composé CAE_5

Le spectre de RMN ^{13}C de CAE_5 présente 30 signaux de carbones parmi lesquels : six méthyles, douze méthylènes, six méthines, six carbones quaternaires dont un carbonyle d'acide à δ_C 177,3. Cependant, l'absence de singulet méthyle, avec apparition d'un motif carbonyle, suggère la présence d'un groupe acide dans sa structure qui pourrait être attribuée à la position de C-28 (Rosli *et al.*, 2020). La paire caractéristique de carbones sp^2 qui correspond à une double liaison exocyclique a été observée à δ_C 150,3 (C-20) et 109,7 (C-29). Un signal à δ_C 76,8 a été attribué à un carbone oxygéné, C-3.

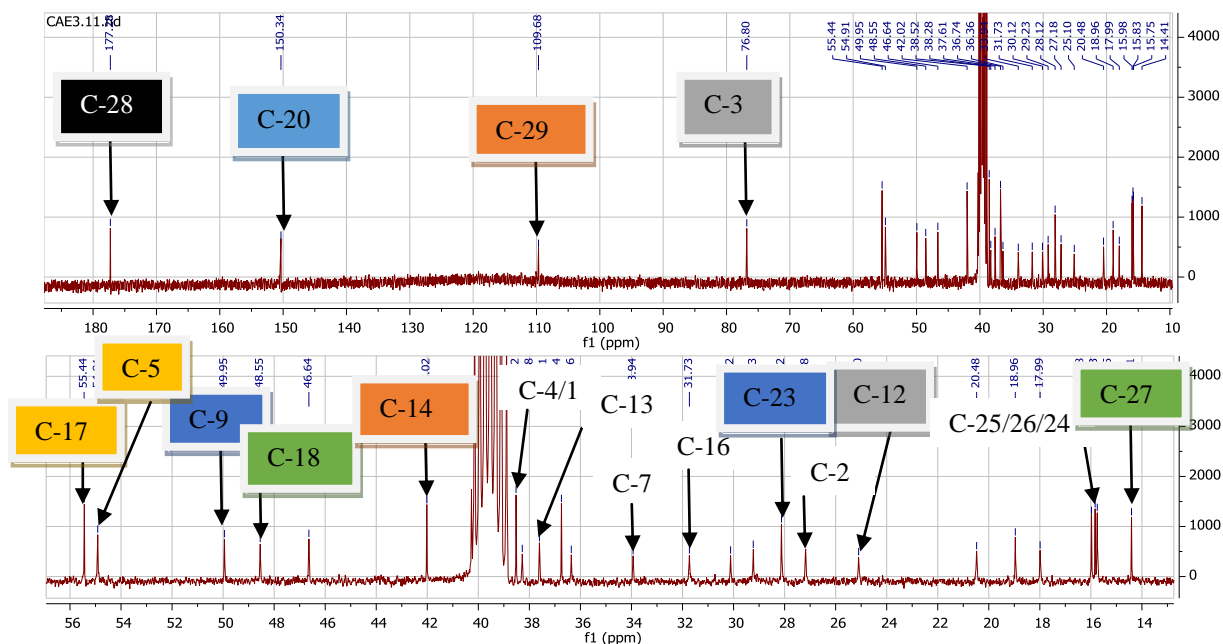
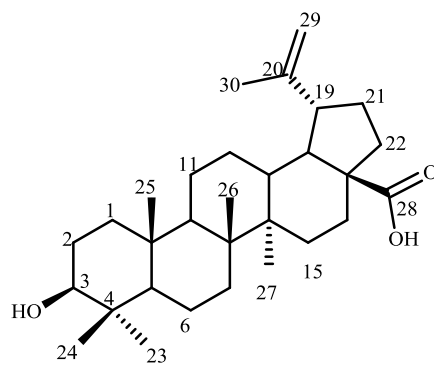


Figure 60: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) du composé CAE_5

Les données expérimentales du composé CAE_5 confirmées par RMN ^1H et ^{13}C ont identifié celui-ci à l'acide 3β -dihydroxylup-20(29)-ène-28-oïque, généralement connu sous le nom d'acide bétulinique précédemment isolé de l'écorce de *Garcinia hombroniana* (Jamila *et al.*, 2014).



206

Tableau XXXIII: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C du composé CAE₅ avec l'acide bétulinique (Jamila *et al.*, 2014)

N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (pyridine- <i>d</i> ₅)		N°	Expérimental (DMSO- <i>d</i> ₆)		Littérature (pyridine- <i>d</i> ₅)	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}		δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1	0,86 m	38,2	0,99 m	39,3	16	1,37 m	31,7	1,55 m	32,8
	1,54 br		1,67 (d; 12,9)			2,12 m		2,63 m	
2	1,43 m	27,1	1,85 m	28,3	17	-	55,4	-	56,6
3	2,96 br	76,8	3,45 (t; 8,0)	78,1	18	1,52 m	48,5	1,77 (t; 11,5)	49,8
4	-	38,5	-	39,5	19	2,95 m	46,6	3,52 m	47,7
5	0,62 m	54,9	0,82 m	55,1				1,45 m	
6	1,44 m	17,9	1,38 m	18,8	20	-	150,3	-	151,3
	1,32 m		1,56 m		21	1,09 m	29,2	1,53 m	31,2
7	1,32 m	33,9	1,56 m	34,8		1,38 m		2,24 m	
			1,38 m						
8	-	40,2	-	41,1	22	1,42 m	36,3	1,57 m	37,5
9	1,24 m	49,9	1,38 m	50,9		1,79 m		2,25 m	
10	-	36,7	-	37,5	23	0,87 s	28,1	1,22 s	28,6
11	1,20 m	20,4	1,21 m	21,6	24	0,86 s	15,7	1,00 s	16,3
	1,36 m		1,43 m		25	0,76 s	15,9	0,83 s	16,4
12	0,96 m	25,1	1,21 m	26,1	26	0,64 s	15,8	1,06 s	16,4
	1,62 m		1,94 m		27	0,93 s	14,4	1,07 s	14,9
13	2,21 (td; 12,3; 3,6)	37,6	2,74 m	38,6	28	-	177,8	-	178,8
14	-	42,0	-	42,8	29	4,69 (d; 2,5)	109,7	4,94 (d; 2,4)	109,9
15	1,31 m	30,1	1,26 m	30,2		4,56 brd		4,77 (d; 2,4)	
	1,80 m		1,88 m		30	1,64	18,9	1,80 s	19,5

II.4.3.6. Identification de l'acide ceanothique (CAE₆)

Le composé CAE₆ se présente sous forme d'une poudre blanche amorphe avec un point de fusion de 300 °C. Son spectre de masse EI-MS en mode positif montre le pic de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 443,3166 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (masse calculée 443,3163) correspondant à la formule moléculaire C₃₀H₄₄O₄ renfermant 7 degrés d'insaturations.

Son spectre IR révèle la présence de groupement hydroxyle libre entre 2928-2869 cm⁻¹, d'acide carboxylique à 1688 cm⁻¹, des doubles liaison C=C à 1560 cm⁻¹, une déformation hors plan du méthylène dans un groupe isopropényle entre 954-888 cm⁻¹ et une large bande entre 757-799 cm⁻¹ suggérant une liaison éthylénique disubstituée en cis. Ces données sont semblables à celles décrites par Mayo et Staratt. (1962).

La comparaison des données spectrales de RMN ^1H avec celles du composé d'acide bétulinique, révèle de nombreuses similitudes mais également quelques différences. Comme éléments de similitude, on note sur ce spectre, la présence de 5 méthyles angulaires et d'un groupement isopropényl dont les signaux résonnent à δ_{H} 4,72(1H, s, H-29a) et 4,59(1H,

s, H-29b) et le méthyl à δ_{H} 1,69 (3H, *s*, H-30). On observe également un proton hydroxyméthine à δ_{H} 4,16 (1H, *s*, H-3). L'ensemble de ces données plaide en faveur de l'existence au sein de ce composé d'un squelette de type lupane.

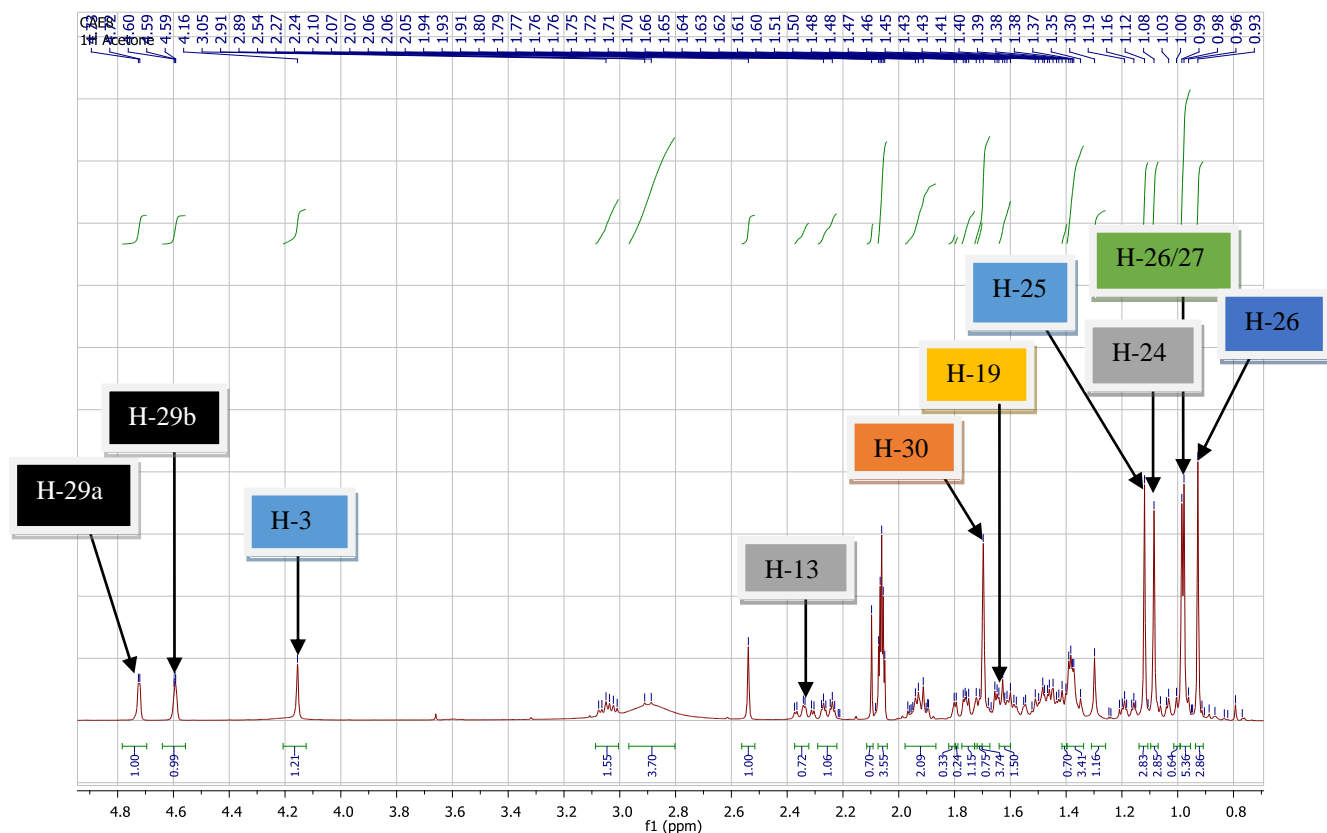


Figure 61: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, Acetone- d_6) du composé CAE₆

Le spectre de RMN ^{13}C de CAE₆ montre 30 signaux de carbone parmi lesquels : six méthyles, neuf méthylènes, sept méthines et huit carbones quaternaires. Ses données spectrales sont presque similaires à celles de l'acide bétulinique (CAE₅) avec la présence de deux carbonyles à δ_{C} 176,4 (C-1) et 177,5 (C-28) respectivement.

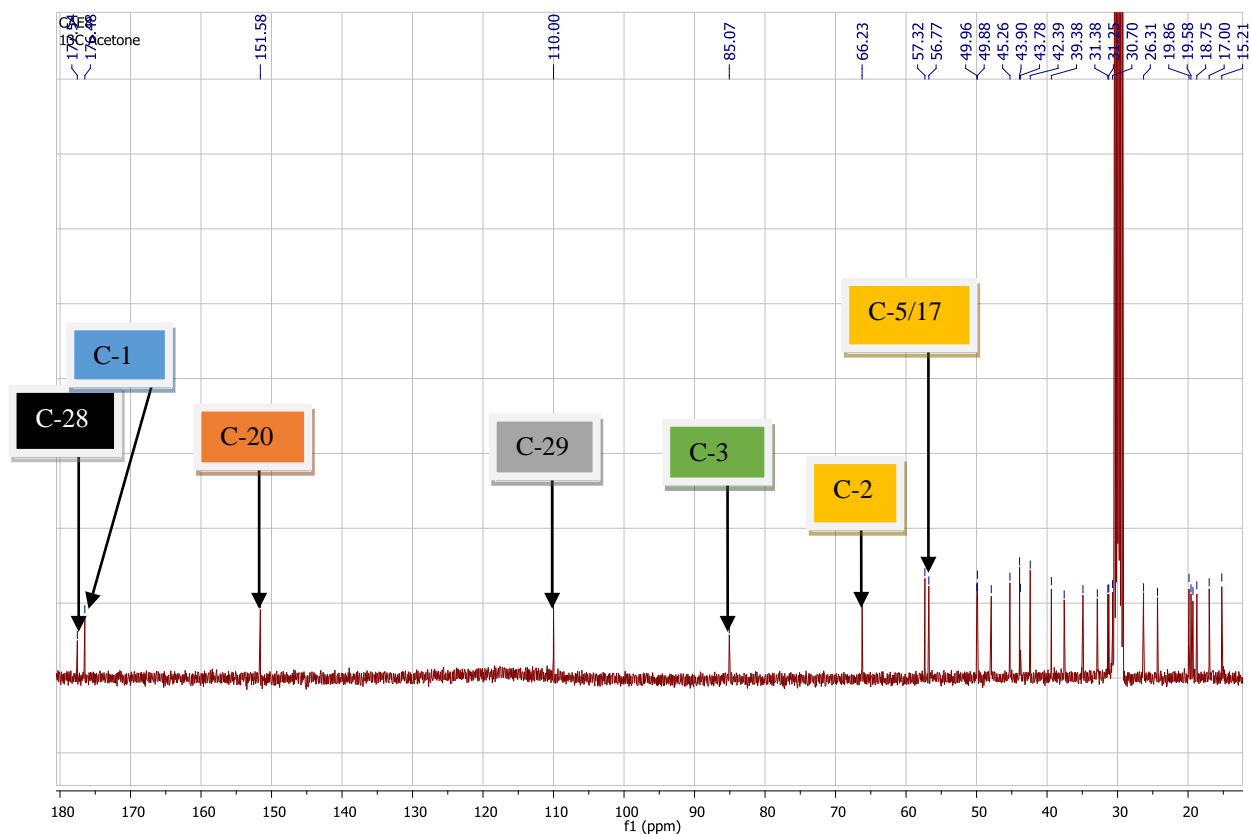
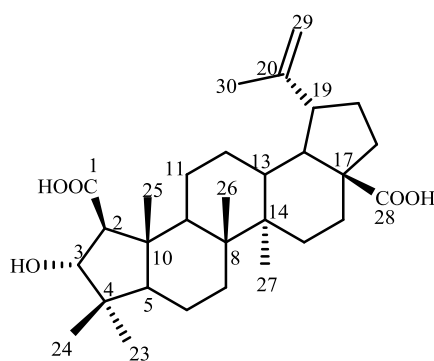


Figure 62 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, Acetone- d_6) du composé CAE₆

Sur la base de toutes ces données spectroscopiques, et en comparaison avec celles de la littérature, la structure du composé CAE₆ a été attribuée à celle de lup-20(29)-èn-3 β ,28-diol donc le nom trivial est l'acide ceanothique isolé de *Ziziphus mauritiana* (Rambabu *et al.*, 2011) ce qui nous a permis d'attribuer à CAE₆ le nom d'acide ceanothique.



207

Tableau XXXIV: Comparaison des données de RMN ^1H et ^{13}C du composé CAE₆ avec l'acide ceanothique (Rambabu et al., 2011).

N°	Expérimental (Acetone- <i>d</i> 6)		Littérature (pyridine- <i>d</i> ₅)		N°	Expérimental (Acetone- <i>d</i> 6)		Littérature (pyridine- <i>d</i> ₅)	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C		δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1		176,4	-	178,4	16	1,44 m ; 2,23 m	32,8	1,50 ; 2,61 d (11,4)	33,3
2	2,53 s	66,2	3,22 m	67,4	17		56,7	-	57,0
3	4,16 (s)	85,0	4,84 m	85,1	18	1,61 m	49,9	1,71 m	50,1
4		43,9	-	44,2	19	3,02 m	47,9	3,51 d (2,3)	48,0
5	1,72	57,3	2,23 d, (2,8)	57,4	20	-	151,5	-	
6	1,36 m	19,3	1,45 m	19,5	21	1,36 m	31,3	1,50 m	31,7
	-		-			1,90 m		2,23	
7	1,36 m	34,9	1,54 m	35,1	22	1,47 m	37,5	1,50 m	38,0
8	-	43,2	-	42,5		1,91 m		2,23	
9	-	45,2	2,23 d (2,8)	45,5	23	0,97 s	17,0	1,09 s	17,4
10	-	49,8	-	50,0	24	1,06 s	31,2	1,41 s	31,9
11	1,60 m	24,3	1,60 m	24,6	25	1,11 s	18,7	1,29 s	19,2
	1,42 m		2,11 d (11,4)		26	0,93 s	19,8	1,17 s	20,7
12	1,03 m	26,3	1,34 m	26,6	27	0,97 s	15,2	1,68 s	15,5
	1,65 m		1,98 d (10,5)		28	-	177,5	-	179,3
13	2,32 ddd (13,0 ; 11,5 ; 3,6)	39,3	2,79 dd (2,8 ; 8,5)	39,5	29	4,59 (m)	110,0	4,68 s	110,1
14	-	43,7	-	43,9		4,72 (d; 2,0)		4,87 d (10,0)	
15	1,16 m	30,7	1,25 m	30,9	30	1,69 s	19,5	1,44 s	20,0
	1,56 m		1,92 dd (2,8 ; 10,5)						

II.5. ÉTUDE BIOLOGIQUE DE QUELQUES COMPOSÉS ISOLÉS

Afin de conforter notre hypothèse de recherche de départ, qui suggère que les plantes sont une source importante pour la découverte de nouveaux médicaments et d'atteindre notre objectif principal qui vise la recherche de composés potentiellement antituberculeux émanant de la biodiversité camerounaise aux fins de lutter contre les phénomènes de résistances et de faible sélectivité des médicaments, nous avons entrepris de soumettre les extraits bruts ainsi que quelques composés isolés des espèces *D. benthamianus* H bail et *C. arereh* Delile, à des tests antimycobactériens. De plus, il est ressorti de la littérature que, plusieurs parties (racines, écorces, feuilles) des espèces appartenant aux genres *Cassia* et *Distemonanthus*, sont utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, pour le traitement de diverses pathologies entre autres, l'arthrite, l'asthme, les rhumatismes, les néphrites, les cancers, la tuberculose, l'athérosclérose, le diabète sucré, les lésions inflammatoires, les maladies à immunosuppression, les désordres métaboliques et les maladies d'Alzheimer (Stephen., 2001; Arbonnier., 2004; Tiwari., 2005 ; Musa *et al.*, 2011). Ainsi, les résultats issus de ces tests pourraient nous permettre également de confirmer ou infirmer ces utilisations en médecine traditionnelle.

Les méthodes utilisées pour les tests antituberculeux sont la méthode de microdilution en milieu liquide du CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) (Wayne., 2011) et la méthode de diffusion sur disque (NCCLS., 2002). Celle utilisée pour les tests antituberculeux est la méthode du test au diméthylthiazol-diphényl-tétrazolium (MTT) ou la résazurine. (Mosmann, 1983). Ces méthodes sont décrites au chapitre 3 consacré à la partie expérimentale.

II.5.1. Évaluation de l'activité antituberculeuse

II.5.1.1. Résultats

L'activité antituberculeuse des extraits méthanoliques et de quelques métabolites secondaires isolés des écorces du tronc de *D. benthamianus* et *C. arereh*, a été évaluée à l'égard de deux souches mycobactériennes (*Mycobacterium tuberculosis* AC45 et H₃₇Rv : isolat clinique et souche commerciale respectivement) par la méthode de microdilution en milieu liquide (Wayne, 2011) et avec comme contrôle positif la rifampicine.

L'ensemble des résultats obtenus de ces différents tests est présenté dans les tableaux XXXV et XXXVI ci-après.

Tableau XXXV: Paramètres d'inhibition (CMI et CMB en $\mu\text{g/mL}$) des composés purs et de l'extrait méthanolique de *D. benthamianus* H. bail sur la souche *Mycobacterium tuberculosis* AC45.

Extrait brut et composés purs	Activité contre <i>Mycobactérium tuberculosis</i> AC45 ($\mu\text{g/mL}$)		Rapport CMB/CMI	Classification du composé
	CMI	CMB		
<i>D. benthamianus</i>	1250	2500	2	Bactéricide
Distemonanthoside (182)	125	125	1	Bactéricide
Sitosterol 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (183)	62,5	125	2	Bactéricide
Acide 4-méthoxy gallique (185)	31,25	125	4	Bactéricide
Quercétine (186)	62,5	125	2	Bactéricide
Rifampicine	0,976	7,8125	8	Bactériostatique

Selon Cantrell *et al.* (2001), les composés isolés qui présentent une CMI au moins inférieure ou égale à 64 $\mu\text{g/ml}$ sont considérés comme prometteurs. Pour les extraits bruts, la CMI devrait être inférieure ou égale à 125 $\mu\text{g/ml}$ (Gu *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus ont montré que la sitostérol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**183**), l'acide 4-méthoxy gallique (**185**) et la quercétine (**186**) inhibent la croissance cellulaire de la souche résistante de *Mycobacterium tuberculosis* AC45 à l'isoniazide avec des valeurs de CMI de 62,5 ; 31,25 et 62,5 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. L'extrait méthanolique de *D. benthamianus* quant à lui, a montré une faible activité inhibitrice contre *M. tuberculosis*, avec des valeurs de CMI et CMB de 1250 et 2500 $\mu\text{g/ml}$ respectivement par conséquent n'est pas actif.

Selon Peterson et Shanholtzer (1992), l'activité bactériostatique a été définie comme un rapport entre le CMB et la CMI supérieure à 4. D'après le tableau XXXV, on constate que tous les composés testés présentent une activité bactéricide.

Tableau XXXVI: Paramètres d'inhibition (CMI et CMB en $\mu\text{g/mL}$) de l'extrait brut et de la catéchine issue de *C. arereh* Delile sur la souche *Mycobactérium tuberculosis* H₃₇Rv

Extraits et composé pur	Activité contre <i>Mycobactérium tuberculosis</i> H ₃₇ Rv ($\mu\text{g/mL}$)		Rapport CMB/CMI	Classification du composé
	CMI	CMB		
<i>C. arereh</i>	2500	ND	/	/
Catéchine (197)	31,25	125	4	Bactéricide
Rifampicine	0,976	7,8125	8	Bactériostatique

Donc les résultats obtenus montrent que la catéchine (**197**) inhibe la croissance cellulaire de la souche sensible *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv avec une valeur de CMI de 31,25 µg/ml. Par contre pour l'extrait, l'activité est extrêmement faible.

II.5.1.2. Discussion

L'activité antibactérienne de quatre composés isolés des écorces du tronc de *D. benthamianus* [distemonanthoside (**182**), sitostérol 3-*O*-β-D-glucopyranoside (**183**), acide 4-méthoxygallique (**185**), la quercétine (**186**)] et de son extrait méthanolique, ont été testée sur la souche résistante de *Mycobactérium tuberculosis* AC45 (tableau XXXV) en utilisant la rifampicine comme contrôle positif. C'est un antibiotique antituberculeux à large spectre associé dans le traitement contre certaines infections bactériennes mutant du complexe *M. tuberculosis* des voies respiratoires en particulier des poumons (Gayout *et al.*, 2017).

De ce qui précède, il ressort que l'extrait méthanolique des écorces de *D. benthamianus* a montré une activité inhibitrice très faible sur la souche *Mycobactérienne* AC45 résistante à l'isoniazide utilisée, avec des valeurs de CMI et CMB comprises entre 1250 et 2500 µg/mL inférieure à la valeur seuil de 125 µg/mL (Gu *et al.*, 2004). En ce qui concerne les composés purs testés sur la même souche, les résultats obtenus ont montré que le sitostérol 3-*O*-β-D-glucopyranoside (**183**), l'acide 4-méthoxy gallique (**185**) et la quercétine (**186**) inhibent la croissance cellulaire de la souche *Mycobacterium tuberculosis* AC45 avec des valeurs de CMI de 62,5 ; 31,25 et 62,5 µg/ml respectivement. Ces résultats obtenus sont en conformité avec ceux de Nkot *et al.* (2018), de Tiam *et al.* (2017) et de Cantrell *et al.* (2001), pour les classes des composés testés. Néanmoins, on constate également desdits résultats que la distemonanthoside (**182**) présente une activité quatre fois plus faible que l'acide 4-méthoxy gallique (**185**). D'où l'on part du postulat que la glycosylation a pour effet de diminuer l'activité anti-mycobactérienne. Les composés les moins polaires du pannel de composé à savoir : la catéchine (**197**) et l'acide 4-méthoxy gallique (**185**) testés, ont une activité similaire (31,25 µg/ml) et meilleure que les autres. Justifiant ainsi la sensibilité des souches mycobactériennes envers les composés moins polaires, telle que stipulée par les travaux de Pauli *et al.* (2001), et corroborés par les résultats de Tiam *et al.* (2017) ; Nkot *et al.* (2018) et les nôtres, confirment ainsi donc une sensibilité du microorganisme pour les composés peu polaires.

Dans le cas de la souche *Mycobactérium tuberculosis* H₃₇RV sensible à l'imipénème, par rapport à l'extrait méthanolique de *C. arereh* ayant subi le test, nous avons obtenu une CMI de 2500 µg/mL largement supérieure à la valeur normale. Alors que dans les mêmes conditions, la valeur de CMI de la catéchine (**197**) est de 31,25 µg/mL. Par

conséquent, les résultats de la présente étude sont en accord avec le rapport précédent concernant les valeurs de CMI des composés isolés (Gu *et al.*, 2004 ; Jiménez-Alleranes *et al.*, 2007 ; Tiam *et al.*, 2017 ; Nkot *et al.*, 2018).



CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion Générale

L'étude chimique réalisée sur les écorces et les feuilles de l'espèce *D. benthamianus*, puis sur les écorces du tronc de *C. arereh* a permis d'isoler, par diverses méthodes chromatographiques, 20 composés naturels répartis en cinq classes de métabolites secondaires :

- 08 flavonoïdes dont une structure décrite pour une première fois ; l'apigénine 7-méthyl éther 6-C-[β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glucopyranoside] (**182**) mais également, la quercétine (**184**), le 6''-O-acetylvitexine (**185**), la quercétine 3-O- β -D-glucopyranoside (**186**), la swertisine (**191**), la swertiajaponine (**192**), la lutéoline (**193**) et la catéchine (**195**) ;

- 02 stérols :

Le sitostérol 3-O- β -D-glucopyranoside (**181**) et le β -sitostérol (**190**) ;

- 04 triterpènes :

Le lupéol (**196**), le bétulinaldéhyde (**197**), l'acide bétulinique (**198**) et l'acide céanothique (**199**) ;

- 01 alcaloïde : l'allantoïne (**189**) ;

- 05 composés phénoliques dont une structure nouvelle ; le trans-4',5-dihydroxy-4'-méthoxystilbène-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-[4''-(4''',5''')-dihydroxybenzoyl]-xylopyranoside (**194**) en plus de l'acide gallique (**188**), acide 4-méthoxygallique (**183**), acide syringique (**182**) et le méthyle gallate (**187**).

Les structures des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC et NOESY), couplées à la spectrométrie de masse (MS) et par comparaison avec les données de la littérature.

L'activité antimycobactérienne des extraits méthanoliques de *D. benthamianus* et *C. arereh* ainsi que des composés tels que : l'apigénine 7-méthyl éther 6-C-[β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glucopyranoside] (**180**), le sitostérol 3-O- β -D-glucopyranoside (**181**), l'acide 4-méthoxygallique (**183**), la quercétine (**184**) et la catéchine (**195**) a été évaluée sur deux souches de Mycobactéries : une souche résistante à l'isoniazide qui est un isolat clinique (AC45) et une souche sensible H₃₇Rv. Il ressort des tests biologiques que les composés non osidiques (l'acide 4-méthoxygallique et la catéchine) ont montré la meilleure activité antimycobactérienne avec une CMI de 31,25 $\mu\text{g/ml}$ respectivement sur l'une et l'autre souche. Par conséquent, la polarité est un facteur qui abaisserait l'activité mycobactérienne et subséquemment, les résultats de la présente étude sont en accord avec le rapport précédent concernant les valeurs de CMI de composés isolés selon Gu *et al.*, 2004 ; Jiménez-Alleranes *et al.*, 2007.

En perspective, nous nous proposons dans la suite de ce travail :

- ✓ En ce qui concerne les composés nouveaux, de préparer un certain nombre de leurs dérivés dans le but d'améliorer non seulement leurs activités mais aussi leur indice de sélectivité ;
- ✓ De soumettre une publication sur le dérivé nouveau isolé de *C. arereh* ;
- ✓ Effectuer des tests sur les cellules de la lignée animale en l'occurrence *Mycobacterium bovis* ;
- ✓ De mener des études cytotoxiques et de toxicité afin de mettre sur pied un phytomédicament issu des plantes *Cassia arereh* et *Distemonanthus benthamianus* ;
- ✓ Enfin, d'étendre nos travaux sur d'autres espèces des genres étudiés.



CHAPITRE III : MATÉRIELS ET MÉTHODES

III.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL, EXTRACTION ET PURIFICATION DES COMPOSÉS

III.1.1. Matériel végétal et extraction

Les feuilles et écorces de *D. benthamianus* ont été récoltées dans la région du Centre, département du Nyong et Kéllé, plus précisément dans la localité de Koumoul, en Mars 2014 et identifiées par M. Victor Nana (botaniste). Un échantillon de référence au N°45488 HNC se trouve à l'Herbier National de Yaoundé-Cameroun.

Les écorces de *C. arereh* Delile ont été récoltées dans la région de l'Extrême- Nord département du Mayo-Danay, plus précisément dans la localité de Mogodé à 15 km de Mokolo en octobre 2015. L'identité du matériel végétal a été confirmée à l'Herbier National du Cameroun où un échantillon de référence s'y trouve au N° 24093 SFRCAM.

Le matériel végétal a été découpé, séché à l'air libre pendant 2 à 3 semaines, ensuite broyé. Les plantes ont ensuite été extraites trois fois par le méthanol (MeOH). Chaque extraction a été effectuée avec au minimum 24 heures d'agitation à température ambiante dans une proportion d'à peu près 1 litre de solvant pour 200 g de plante. Les solvants ont été évaporés à basse pression et les extraits finalement séchés.

III.1.1.1. Partition, extraction et isolement des constituants des écorces de *Distemonanthus benthamianus*

III.1.1.1.1. Extraction et partition des écorces de *D. benthamianus*

Pour les écorces, la méthode d'extraction utilisée était la macération à température ambiante. Le solvant utilisé ici était le méthanol.

Les écorces de *Distémonanthus benthamianus* ont été séchées puis broyées pour donner une poudre de 1,5 kg. Cette poudre a été macérée dans 5 L de méthanol à température ambiante pendant 72h. le solvant a été évaporé et l'extrait brut de 140,5 g a été obtenu. Une partie de cet extrait de 70 g a été partitionnée en utilisant le mélange MeOH/H₂O (80 :20) puis à l'hexane (100mL x 4) pour le débarrasser des huiles et de la chlorophylle. L'épuisement de la phase résiduelle (MeOH/H₂O) avec l'acétate d'éthyle (100mL x 4) a conduit à l'obtention de 3,5 g d'extrait à l'hexane et 16 g d'extrait à l'acétate d'éthyle.

III.1.1.1.2. Fractionnement et isolement des constituants des écorces de *D. benthamianus*

L'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces ayant montré une bonne activité antituberculeuse et antioxydante a été fractionné sur colonne de gel de silice afin d'isoler les

constituants actifs, l'élution a été effectuée avec un gradient $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. La séparation de cet extrait a été effectuée comme suit : 254 flacons de 350 mL ont été récoltés et concentrés à chaque fois. Ces fractions ont été regroupées judicieusement selon les résultats de la CCM en 4 fractions majeures :

La fraction **I (1,19g)** contenait des huiles.

La fraction **III** ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 60/1 à 5/1) analysée par CCM a permis d'obtenir 4 sous-fractions énumérées IIIa (0,67g), IIIb (0,67g), IIIc (1g) et IIId (0,65g). La sous-fraction IIIc (1g) a présenté un mélange constitué des composés **DBE₂** et **DBE₃**. Ces produits ont été séparés sur une cc de gel de silice (63-200 μm) avec le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (40/1 à 5/1) pour obtenir 480 mg du composé **DBE₂** et 3 mg du composé **DBE₃**.

L'analyse CCM de la fraction **III d** ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20 :1) a établi que cette dernière était principalement constituée de composés **DBE₅** et **DBE₆**. Ces produits ont été séparés en ayant recours à la CC de gel de silice (63-200 μm) avec un gradient isocratique ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 25/1 à 15/1) pour obtenir 8 mg du composé **DBE₅**, 11 mg du composé **DBE₆**.

La fraction **II** (3,8g) contenait des cristaux qui ont été purifiés sur une colonne de silice au mélange ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50/1) pour donner le composé **DBE₇** (65 mg).

L'analyse CCM de la fraction **IV** ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5 :1) a permis d'obtenir 3 sous-fractions énumérées IVa (0,98g), IVb (2,8g) et IVc (2,7g). La sous-fraction IVa (0,98g) a été purifiée sur CC de gel de silice (63-200 μm) avec un système isocratique ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10/1) pour obtenir 4 mg du composé **DBE₄**. La sous-fraction IVb (2,8g) a présenté un mélange de composés. Ces produits ont été séparés en ayant recours à la CC de gel de silice (63-200 μm) avec un système isocratique ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 25/1 à 5/1) puis purifiés sur colonne de gel de séphadex LH-20 MeOH pour obtenir 28 mg du composé **DBE₁**.

III.1.1.2. Partition, extraction et isolement des constituants des feuilles de *D. benthamianus*

III.1.1.2.1. Extraction et partition des feuilles de *D. benthamianus*

Dans le cadre de notre travail, la poudre des écorces obtenues plus haut a subi une extraction séquentielle. Les solvants ont été utilisés par ordre de polarité croissante : hexane < acétate d'éthyle < méthanol. Par la suite, une macération à température ambiante a été réalisée sur la poudre des feuilles et des écorces.

Pour l'obtention des extraits, 1,3 kg de poudre a été pris puis trempé dans 5 L de méthanol. Le mélange a été introduit dans un bocal placé sous agitation continue. Après 72h, la solution obtenue a été filtrée sous-vide. Par la suite le résidu a été à nouveau extrait avec le même solvant trois fois de suite pour maximiser le rendement. Les trois volumes d'extraits

ont été mélangés puis évaporés dans un évaporateur rotatif de type Heindolph. Pour obtenir l'extrait à l'hexane, le même processus a été effectué avec l'extrait : à l'acétate d'éthyle, au méthanol, à l'acétone et l'extrait à l'éthanol-eau 20%.

III.1.1.2.2. Fractionnement et isolement des constituants des feuilles de *D. benthamianus*

L'extrait à l'acétate d'éthyle ayant montré une bonne activité cytotoxique contre les cellules « *Mycobacterium tuberculosis* » avec des pourcentages de viabilité à 1250µg/ml de 0,976% par rapport à l'extrait au méthanol 7,813%, a été fractionné afin d'isoler les composés responsables de cette activité. La séparation de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de *D. benthamianus* a été effectuée selon le protocole du schéma 2.

L'extrait à l'acétate d'éthyle (14,5 g) a été fractionné sur une colonne de gel de silice, l'élution a été effectuée avec le système CH₂Cl₂/MeOH de polarité croissante (40/1 à 5/1) et 200 flacons de 300 mL ont été collectés à chaque fois. Ces fractions ont été regroupés judicieusement selon les résultats de CCM sous 4 fractions majeures (I à IV).

La fraction III (3,9 g) a été purifiée successivement sur une colonne de silice en utilisant comme éluant le mélange (CH₂Cl₂/MeOH 40/1 à 5/1) pour obtenir quatre sous-fractions (IIIa-IIIId).

L'analyse CCM de la sous-fraction **IIIc** (1,2 g) (CH₂Cl₂/MeOH 20/1 à 5/1) a établi que cette dernière était principalement constituée de composés **DBF₂** et **DBF₃**. Ces produits ont été séparés en ayant recours à la CC de gel de silice (63-200 µm) avec un système isocratique (CH₂Cl₂/MeOH 10 :1) pour obtenir 380 mg de **DBF₂** et 5 mg de **DBF₃**.

La fraction **IIIId** (0,65 g) a subi à son tour une CC de gel de silice (63-200 µm) avec un système isocratique (CH₂Cl₂/MeOH 15/1 à 5/1) pour obtenir 10 mg de **DBF₄** et 11 mg de **DBF₅**.

La fraction IV (5,5 g) a été purifiée successivement sur une colonne de gel de silice en utilisant comme éluant le mélange (CH₂Cl₂/MeOH 25/1 à 5/1) pour obtenir trois sous-fractions (IVa-IVc).

La sous-fraction **IVa** (0,98 g) a été soumise à une CC sur Sephadex LH-20 avec du MeOH comme éluant, pour donner 98 mg de **DBF₆**.

Le même procédé est utilisé pour la sous-fraction IVc (2,7 g) pour obtenir 27 mg de **DBF₇**.

Par contre la fraction II (4 g) a été purifiée sur une CC de gel de silice au mélange (CH₂Cl₂/MeOH 40 :1) pour donner 35 mg de **DBF₁**.

III.1.1.3. Partition, extraction et isolement des constituants des écorces de *C. arereh*

III.1.1.3.1. Extraction, Partition et fractionnement des écorces de *C. arereh*

Les écorces de *Cassia arereh* ont été séchées puis broyées pour donner une poudre de (1,2 kg). Cette poudre a été trempée dans 5L de méthanol à température ambiante pendant 72h. Le solvant a été évaporé et l'extrait brut (220 g) a été obtenu. Une partie de cet extrait (55,5 g) a été partitionnée en utilisant le mélange MeOH/H₂O (80 :20) puis additionnée à l'hexane (4 x 100 mL) pour le débarrasser des huiles et de la chlorophylle. L'épuisement de la phase résiduelle (MeOH/H₂O) avec l'acétate d'éthyle (4 x 100 mL) a donné un extrait à l'acétate d'éthyle de (12,5 g). 70 flacons de 350 mL ont été collectés et concentrés à chaque fois. Ces flacons ont été regroupés judicieusement selon les résultats de CCM sous 5 fractions majeures : I (2,67 g, 1-21) ; II (1,76 g ; 22-39) ; III (1,65 g ; 40-50) ; IV (3,27 g ; 51-60) et V (4,15 g ; 61-70).

La fraction **III (1,65 g)** a été purifiée successivement sur une colonne de gel de silice en utilisant comme éluant le mélange (CH₂Cl₂/MeOH 30/1 à 5/1) pour obtenir quatre sous-fractions (IIIa-III d).

La sous-fraction **IIIc (0,62 g)** (CH₂Cl₂/MeOH 15/1 à 5/1) analysée par CCM a présenté un mélange constitué de **CAE₁** et **CAE₂**. Ces produits ont été séparés sur une CC de gel de silice (63-200 µm) pour obtenir 250 mg de **CAE₁** et 5 mg de **CAE₂**.

L'analyse CCM de la sous-fraction **III d (0,68 g)** a établi que cette dernière était principalement constituée de **CAE₃** et **CAE₄**. Ces produits ont été séparés en ayant recours à la colonne chromatographique de gel de silice (63-200 µm) avec un système isocratique (CH₂Cl₂/MeOH 10 :1) pour obtenir 10 mg de **CAE₃** et 11 mg de **CAE₄**.

La fraction **IV (5,5 g)** a été soumise à une CC sur gel de silice à l'aide du système de solvant CH₂Cl₂/MeOH (20/1 à 12/1) pour donner trois sous-fractions (IVa à IVc). La sous-fraction **IVa (0,65 g)** a été purifiée par CC sur gel de silice avec le système isocratique puis purifiés sur colonne de gel de séphadex LH-20 (100% MeOH) pour obtenir 65 mg de **CAE₅**. Le même procédé est utilisé pour la sous-fraction **IVc (0,7 g)** pour obtenir 70 mg de **CAE₆**.

III.1.1.4. Criblage chimique

Le criblage chimique permet d'identifier les différentes familles de composés présentes dans les extraits.

*Test des phénols

3 mL d'une solution de chlorure ferrique 5% fraîchement préparée pendant 5 min est ajoutée à 0,5 g d'extrait dissout dans 2 mL d'eau. Après homogénéisation, quelques gouttes

d'une solution de ferricyanure de potassium sont ajoutées. L'observation d'un précipité vert indique un test positif et révèle la présence des phénols.

***Test des flavonoïdes**

500 mg d'extrait sont dissouts dans 5 mL de NaOH 1N. La décoloration de la couleur jaune obtenue après addition d'acide chloridrique 1N indique la présence des flavonoïdes.

***Test des alcaloïdes**

500 mg d'extrait sont chauffés dans 10 mL d'acide sulfurique 1% pendant 2 à 3 min puis filtré. A 1 mL du filtrat, on ajoute quelques gouttes du réactif de Mayer. L'obtention d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

***Test de Lassaigne**

Il s'agit généralement de faire bouillir un échantillon alcalin d'eau extraite de la fusion du sodium avec du sulfate de fer, puis à refroidir et à acidifier avec de l'acide sulfurique dilué. L'apparition d'une coloration bleue ou d'un précipité bleu foncé confirme la présence d'azote.

Il semble que l'apparition d'une coloration bleue et/ou d'un précipité lors d'un test positif dépend du pH et de la température. Lorsque le pH est à peine inférieur à 7, le développement de la coloration est inhibé. Il est donc nécessaire de s'assurer de la présence d'un excès d'acide. De même, le refroidissement de la solution est conseillé car le développement de la coloration bleue semble être inhibé dans les solutions chaudes.

***Test des triterpènes et des stéroïdes**

50 mg d'extrait sont dissouts dans 20 mL de chlorure de méthylène. A cette solution, on ajoute successivement 4 gouttes d'anhydride acétique et de l'acide sulfurique. La présence des triterpènes se manifeste par un changement de la couleur rouge violacée, alors que la couleur bleue verdâtre est caractéristique des stéroïdes.

III.2. MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

III.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Utilisés à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Nous avons utilisé essentiellement des plaques prêtes à l'emploi à support en

aluminium ou en verre (Merck) : en phase normale, Kieselgel 60 F254 Merck, 250 µm et en phase inverse, RP 18 F254S, 200 µm Merck.

Les plaques utilisées pour la réalisation des chromatographies sur plaques préparatives sont en verre recouvertes de silice Kieselgel 60F254 Merck, 250 µm (20 x 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant la révélation par un révélateur à base d'acide sulfurique dilué à 50% dans l'eau.

III.2.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

La chromatographie liquide ultra performante (UPLC®, Waters, Milford, USA) permet d'améliorer sensiblement la séparation et la résolution des pics chromatographiques, par rapport à un système HPLC classique. Le couplage de cette technique séparative avec un analyseur de Masse à haute résolution est idéal pour établir une comparaison de fractions ou d'extraits, ou d'effectuer de la déréplication. Le système UPLC® est composé des mêmes éléments qu'un système HPLC. L'analyseur de masse de type temps de vol (*Time Of Flight*, en anglais, abrégé TOF) (LCT Premier, Micromass®, Waters) est connecté à la sortie du détecteur DAD par une interface de type électrospray (ESI). Le système HPLC utilisé pour les analyses HPLV/TSP-MS était le système hybride comprenant une pompe 600-MS (Waters) pour l'addition post-colonne du tampon. L'interface permettant la connexion au spectromètre de masse était un modèle du type Thermospray II (*Finnigan MAT*). Les conditions standard d'ionisation étaient les suivantes : Source 280°C, vaporisateur 100°C, dynode 15 Kv, filament off, mode ions positifs, balayages/s.

III.2.3. Méthodes chromatographiques préparatives

III.2.3.1. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mises en oeuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier

III.2.3.2. Chromatographie d'adsorption

Des colonnes ouvertes sur gel de silice 60 (0,063 – 0,2 mm E. Merck, Darmstadt, Allemagne) ont été utilisées dans la première ou seconde étape de fractionnement des extraits à l'AcOEt. La taille des colonnes, la granulométrie de la phase solide, le débit de la phase

mobile et la taille des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature (extrait, fraction) des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des flacons ont été effectués sur la base d'analyses par CCM. Les échantillons ont été introduits sous forme solide en les mélangeant avec de 2,5 à 3 fois leur poids de phase. Des gradients en plateaux de mélanges dichlorométhane : méthanol ont été utilisés comme systèmes d'élution, et les fractions ont été récoltées soit manuellement soit par un collecteur automatique de fractions Bio-Rad model 2110.

III.2.3.3. Chromatographie d'exclusion

Les chromatographies d'exclusion ou filtration sur gel ont été réalisées soit dans le but d'éliminer les sucres contenus dans les extraits, employant alors comme phase stationnaire du Diaion® HP20, soit comme méthode de purification de fractions, employant du Sephadex® LH-20.

Dans tous les cas où cette technique a été utilisée (séparations, purifications), la phase stationnaire était le gel séphadex LH-20 (pharmacia) et la phase mobile était le MeOH. Les échantillons étaient introduits sous forme liquide. Le débit, généralement lent, n'excédait pas 1 mL/min. la taille des colonnes utilisées était sélectionnée selon la quantité d'échantillon à séparer. Le suivi des séparations, ainsi que le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses CCM.

III.3. MÉTHODES PHYSICO-CHIMIQUES

Une fois les composés purs isolés, plusieurs appareils et méthodes physico-chimiques ont été utilisés dans le but de les caractériser.

III.3.1. Mesure du point de fusion (Pf)

Les points de fusion des composés purs sont mesurés à l'aide d'un appareil à plaque chauffante Mettler FP 80/82. Une pointe de spatule du composé est déposée sur une lamelle en verre, elle-même déposée sur une plaque qui est progressivement chauffée. Le changement d'état est observé à l'aide d'un microscope Wild, et la température correspondante est relevée, sans correction.

III.3.2. Spectrométrie infrarouge (IR)

Le spectre IR des composés a été déterminé sur un spectromètre FT-IR Spectrum One® Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA). La technique employée pour la préparation de l'échantillon solide est la création d'une pastille de KBr. 2 mg du composé pur ont été intimement broyés avec 150 mg de KBr anhydre (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suisse). Ce mélange de poudre est ensuite introduit dans un moule, puis mis sous presse hydraulique

(Perkin Elmer), à 10 bar, afin d'obtenir une pastille transparente. Le spectre de cette dernière a été mesuré entre 400 et 4000 cm^{-1} ; largeur de fente spectrale 2 cm^{-1} sur une durée de 20 minutes.

III.3.3. Spectrophotométrie UV visible

Les spectres UV-visible des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre.

III.3.4. Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse des produits purs isolés ont été obtenus par plusieurs modes d'ionisation.

III.3.4.1. Ionisation par Electrospray (Electro Spray Ionisation) ESI

L'ionisation est ici produite par application, à pression atmosphérique, d'un fort champ électrique (3 à 6 KeV) sur un liquide traversant un capillaire à un faible débit (1-10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$). Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire. La rupture de la phase liquide forme des gouttelettes hautement chargées (Spray). L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer leur rétrécissement jusqu'au sommet où des forces coulombiennes répulsives vont approcher le niveau des forces de cohésion de celles-ci et provoquer leur explosion. Ces gouttelettes subissent alors une cascade de fissions donnant des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leur surface devient suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ces ions ainsi produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule. Les spectres ESI ont été enregistrés en modes positifs et négatifs sur un spectromètre à triple quadripôle Sciex API 365 (Perkin-Elmer) contrôlé par le logiciel Analyst (Agilent, version 1.3.1).

III.3.4.2. Impact Electronique Ionisation et par bombardement d'atomes rapides (EI et FAB)

En EI, un faisceau d'électrons de haute énergie bombarde les molécules en phase gazeuse et le spectromètre de masse enregistre les impacts d'électrons sous la forme d'un spectre d'ions positifs séparés sur la base du rapport masse/charge (m/z). Les fragments sont formés à partir de l'ion moléculaire et la plupart d'entre eux portent une charge positive unitaire. L'ionisation par impact électronique présente un inconvénient quant au repérage de l'ion moléculaire, d'intensité souvent très faible, voire indétectable.

Les spectres de masse en EI ont été réalisés sur un spectromètre Nermag R-10-10 avec un champ de 70 eV.

Les données MS ont été acquises et traitées sur le logiciel MassLynx TM (version 4.1)

III.3.5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été mesurés à 400 MHz (^1H) et 100 MHz (^{13}C) avec des spectromètres Bruker Avance III 400, Bruker DRX500 (500 MHz pour ^1H et 125 MHz pour ^{13}C) et la Bruker DRX600 (600 MHz pour ^1H et 150 MHz pour ^{13}C). Les spectres DEPT-135, ainsi que les expériences bidimensionnelles NOESY, COSY, HSQC et HMBC, ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionsnelles spécifiques. Les échantillons ont été dissous dans des solvants deutérés CDCl_3 , CD_3COCD_3 , CD_3OD ou $\text{DMSO-}d_6$. Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne.

III.3.6. Hydrolyse acide

Cette technique permet la libération de toutes les unités osidiques engagées dans des liaisons O-glycosidiques, ainsi leur identification sera possible par comparaison à des sucres standards. Tous les glycosides terpenoidiques (2 mg) sont hydrolysés avec 2 ml de HCl 2M à 85 °C pendant 2 h. Après refroidissement, le solvant est éliminé sous pression réduite. Le mélange de sucre est extrait de la phase aqueuse (10 ml) et lavé avec CH_2Cl_2 (3x 5 ml). Les extraits combinés de CH_2Cl_2 sont lavés avec de l'eau distillée pour donner après évaporation le fragment aglycone. Les sucres sont d'abord analysés par CCM sur gel de silice (CHCl_3 – MeOH – H_2O , 8: 5: 1) par comparaison avec des échantillons standards. La configuration absolue de chaque monosaccharide a été déterminée à partir d'une analyse GC-MS de leurs dérivés triméthylsilylés par comparaison avec des échantillons authentiques en utilisant la méthode décrite précédemment (Chaabi *et al.*, 2010).

III.4. MÉTHODES BIOLOGIQUES

Les tests biologiques sont nécessaires pour guider le processus de fractionnement, d'isolement des substances actives et pour évaluer l'activité des composés purs isolés. Ces tests doivent être simples, peu coûteux et rapides afin de pouvoir analyser un grand nombre d'échantillons. Par ailleurs, ils doivent être suffisamment sensibles car les principes actifs sont généralement de faible concentration.

Dans notre recherche, nous avons utilisé des tests antituberculeux sur deux souches bactériennes (*Mycobacterium tuberculosis* AC45 et *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV) en culture *in vitro*.

Les activités antituberculeuses des composés purs et extraits ont été réalisées à l'aide de la méthode de microdilution en milieu liquide (Wayne, 2011) et pour l'évaluation de

l'activité inhibitrice, nous avons utilisé la méthode du test au diméthylthiazol-diphényltétrazolium (MTT) ou la résazurine.

Les cultures ont été obtenues, et les tests biologiques effectués dans différents laboratoires :

Au laboratoire de Génétique du Département de Biochimie, Génétiques et Microbiologie de l'Université de Pretoria (Afrique du Sud), pour la souche *Mycobacterium tuberculosis H37RV* ;

À l'hôpital de district de Sangmelima dans la région du Sud du Cameroun et son profil génétique de la résistance a été réalisé au Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose (Centre de Biotechnologie, Université de Yaoundé I) pour les tests antituberculeux sur la souche *Mycobacterium tuberculosis AC45*.

III.4.1. ÉVALUATION DES ACTIVITÉS ANTITUBERCULEUSES

III.4.1.1. Principes des méthodes utilisées

III.4.1.2. Méthode de microdilution en milieu liquide

Cette méthode colorimétrique est basée sur la capacité qu'ont les cellules viables à métaboliser la résazurine, forme oxydée du Bleu Alamar, par réduction en résorufine forme réduite du Bleu Alamar. Le mécanisme réactionnel de réduction est présenté par la figure 59 ci-après.

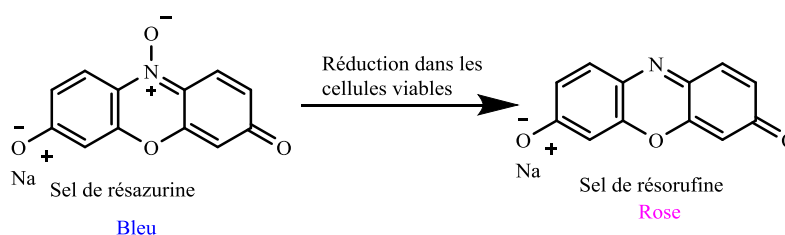


Schéma 4: Mécanisme de réduction du Bleu Alamar (Lancaster et Fields, 1996).

L'indicateur redox Blue Alamar sous forme oxydée (résazurine), de couleur bleue est réduit en présence des cellules fongiques/bactériennes en croissance, en forme réduite (résorufine) de coloration rose ou rouge. Lorsque la croissance des cellules fongiques/bactériennes est complètement inhibée par un extrait ou un composé pur, la coloration bleue est maintenue (Lancaster et Fields, 1996).

III.4.1.3. Conditions de préparation et de croissance de *Mycobacterium tuberculosis*

Les souches de mycobactéries ont été cultivées à 37°C pendant deux semaines dans Middlebrook 7H9 (Himedia, Mumbai, Inde) additionné de 0,05 % (v/v), 2 % de glycérol et 10 % d'OADC (acide oléique–albumine dextrose–catalase de Liofilchem s.r.l, Roseto degli Abruzzi, Italie). La densité optique de 0,45 à 0,55 a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 550 nm pour obtenir une suspension de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL (Collins et Franzblau 1997).

III.4.2. Préparation d'extraits et de produits chimiques pour tests antituberculeux

L'activité de tous les produits chimiques (extraits et composés purs) contre les souches de *M. tuberculosis* susmentionnées a été testée à l'aide du bleu d'alar sur microplaque (MABA) tel que décrit précédemment par Collins et Franzblau (1997) et Jimenez-Alleranes et al. (2003, 2007). Dans des microplaques à 96 puits, tous les puits ont reçu 100 µl de bouillon Middlebrook 7H9 supplémentaire, puis des solutions de métabolites de travail (100 µl) ont été versées dans le premier puits de chaque rangée, à partir desquelles des séries de dilutions doubles ont été effectuées à travers la colonne de la microplaque. L'inoculum de test (100 µl) a été ajouté à tous les puits de test, ainsi qu'aux puits de contrôle sans médicament. La concentration finale de DMSO dans les puits était de 7 % v/v.

III.4.2.1. Test de sensibilité aux médicaments de *Mycobacterium tuberculosis*

III.4.2.1.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les valeurs de CMI ont été déterminées à l'aide du MABA ; la rifampicine a été utilisée comme référence. Les souches de mycobactéries ont été cultivées à 37°C pendant deux semaines dans Middlebrook 7H9 (Himedia, Mumbai, Inde) supplémentaire avec 0,05 % (v/v), 2 % de glycérol et 10 % d'OADC (acide oléique-albumine-dextrose-catalase de Liofilchem srl, Roseto degli Abruzzi, Italie). Les plaques à 96 puits ont reçu 100 µL de bouillon Middlebrook 7H9 et une dilution en série des composés a été effectuée directement sur la plaque avec des concentrations de médicament de 0,244 à 250 µg/mL et de 5 000 à 4,882 µg/mL pour les extraits. Les plaques ont été recouvertes et scellées avec du parafilm et incubées à 37°C pendant 14 jours. Ensuite, 40 µl d'un mélange 1:1 fraîchement préparé de réactif bleu alamar et de 0,05 % de Tween 80 (Himedia, Mumbai, Inde) ont été ajoutés à la plaque et incubés pendant 24 h. Une couleur bleue dans le puits a été interprétée comme étant une absence de croissance bactérienne et la présence de couleur rose a été interprétée comme

une croissance. La CMI était définie comme la plus faible concentration de médicament, qui empêchait le changement de couleur du bleu au rose.

Les résultats de l'activité antituberculeuse sont présentés dans les tableaux XXXIV et XXXV. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon conformément aux directives du Clinical and Laboratory Standards Institute (2011).

III.4.2.1.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB), 50 μL de chaque puits dont la concentration est supérieure ou égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui a été sous-cultivée dans 150 μL de milieu MbK 7H9 et incubée à 37°C pendant 10 jours, puis la croissance mycobactérienne a été réalisée par addition de 40 μL de bleu alamar. La CMB a été définie comme étant la plus faible concentration d'extrait à laquelle aucune croissance visible du germe n'a été observée. La concentration bactéricide minimale a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon selon les directives du CLSI 2011.

Chaque expérience a été réalisée au moins deux fois selon les directives du Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, 2011)

III.5. Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

Apigénine 7-méthyl éther 6-C-[β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glucopyranoside]

Aspect physique : Poudre amorphe blanche

$[\alpha]_D^{25}$: -54° (C 0,05 MeOH)

Test de Shinoda

Solubilité: Methanol

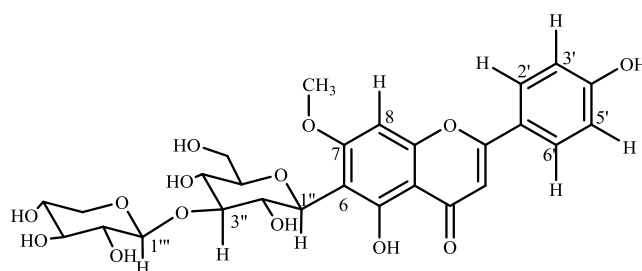
Formule Brute: $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$,

PF: 285-287°C ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

IR (KBr): ν_{max} 3267, 2923, 2853, 1595, 1512, 1226, 1176, 1159 cm^{-1} .

HRESI-MS: (négatif) m/z 577,4 [M-H]⁻ (calculée pour $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$: m/z 577,01)

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) et ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): Voir **tableau XV**



Sitostérol 3-O- β -D-glucopyranoside

Aspect physique: Poudre amorphe blanche

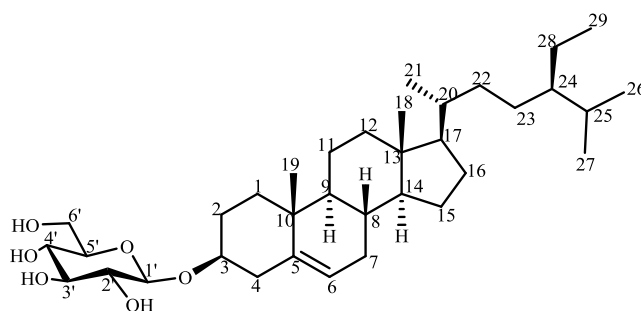
Formule brute : $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$

IR (KBr) ν_{max} 3430, 2931, 2865, 1465, 1629, 1375, 1100, 1055 et 883 cm^{-1} .

Point de fusion: 232- 235 °C.

Test de Libermann Buchard

ESI-MS (positive) m/z 599,4 $[M+Na]^+$;
 HRESI-MS m/z 599,4282 $[M+Na]^+$ (masse
 calculée 599,42821 pour $C_{35}H_{60}O_6Na$).
 RMN 1H (500 MHz; $DMSO-d_6$) et ^{13}C (125
 MHz; $DMSO-d_6$) Voir **tableau XXVII**

**Acide syringique**

Aspect physique: cristaux beige

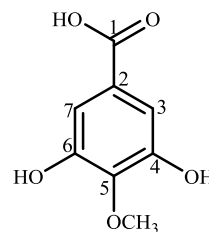
Formule brute: $C_8H_8O_4$

Solubilité: Methanol

Test de $(FeCl_3)$

HRESIMS m/z 184,06 $[M-H]^+$

RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) et ^{13}C (125
 MHz, $DMSO-d_6$) Voir **tableau XXIV**

**Acide 4-methoxygallique**

Aspect physique: cristaux beige

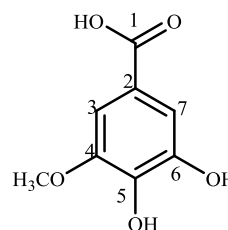
Formule brute: $C_8H_8O_4$

Solubilité: Methanol

Test de $(FeCl_3)$

HRESIMS m/z 184,06 $[M-H]^+$

RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) et ^{13}C (125
 MHz, $DMSO-d_6$) Voir **tableau XXV**

**Quercetine**

Aspect physique: Poudre jaune

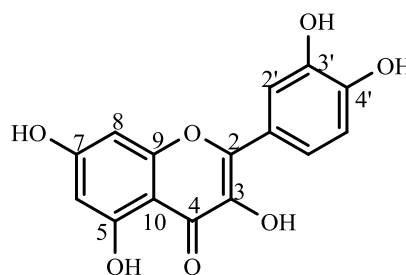
Formule brute : $C_{15}H_{10}O_7$

Point de fusion (Pf): 256-257 °C

Test de Shinoda

ESI-MS (négative) m/z 301,02 $[M-H]^-$ (masse
 calculée 301,06)

RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) et ^{13}C (125
 MHz, $DMSO-d_6$) Voir **tableau XX**

**6''-O-acetylvitexine**

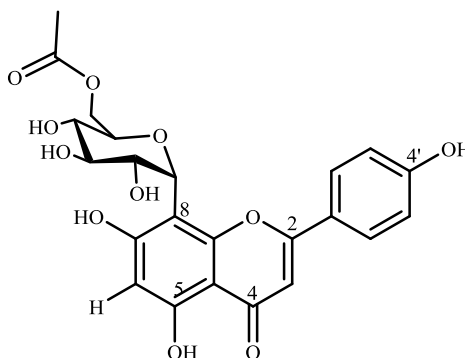
Aspect physique: Cristaux jaune

Formule brute: $C_{23}H_{24}O_{11}$

HRESIMS (positif) m/z 489 $[M+H]^+$

Test de shinoda

RMN 1H (500 MHz, $MeOH-d_6$) et ^{13}C (125
 MHz, $DMSO-d_6$) Voir **tableau XVI**

**Quercetine 3-O-β-D-glucopyranoside**

Aspect physique: Solide jaune

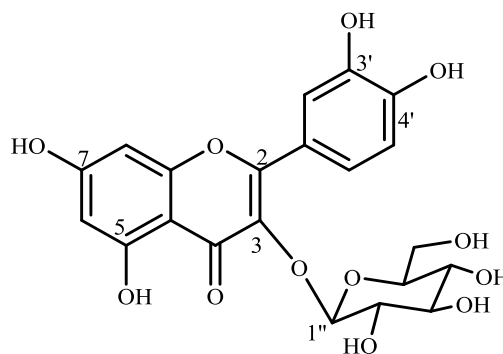
Test de shinoda

Formule brute: $C_{21}H_{23}O_{12}$

Point de fusion (Pf): 231-233°C

FAB/MS (négatif) à m/z : 487 $[M-H]^-$ (masse calculée 487,01)

RMN 1H (500 MHz, $MeOH-d_6$) et ^{13}C (125 MHz, $DMSO-d_6$) Voir **tableau XXI**



Methyl Gallate

Aspect physique: Cristaux blancs

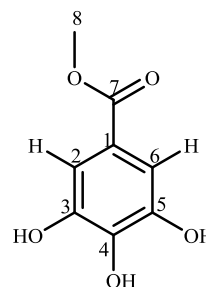
Formule brute: $C_8H_8O_5$

Test chlorure féérique ($FeCl_3$)

ESI-MS (positif) m/z 185,35 $[M+H]^+$ (masse calculée 184,00)

RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_4$) et

^{13}C (125 MHz, $DMSO-d_4$) Voir **tableau XXIII**



Acide gallique

Formule brute: $C_7H_5O_5$.

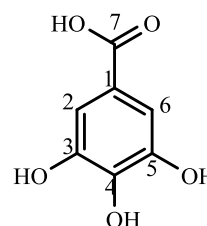
Aspect physique: Solide blanc

Test chlorure féérique ($FeCl_3$)

ESI-MS (en mode négatif) m/z 169,21 $[M-H]^-$ (masse calculée 169,00)

RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_4$)

RMN ^{13}C (125 MHz, $DMSO-d_4$) Voir **tableau XXII**



Allantoïne

Formule brute: $C_4H_6N_4O_3$

Aspect physique: Cristaux de couleur jaune en paillettes

Test de Lassaigne

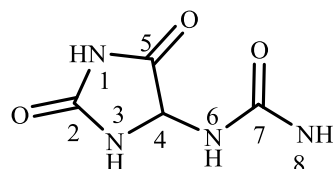
Point de fusion: 230°C

FAB/MS (positif) à m/z 158 $[M]^+$

IR (KBr) ν_{max} 1780, 3438 cm^{-1} .

RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_4$) et

^{13}C (125 MHz, $DMSO-d_4$) Voir **tableau XXVIII**



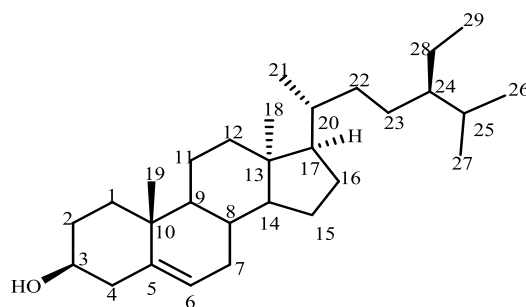
β -Sitosterol:Formule brute: $C_{29}H_{50}O$

Aspect physique: Cristaux blanc

Point de fusion: 136-137°C

Test de Liberman Buchard

EI-MS (positif) m/z 414 [M+]

RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_4) et ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_4) Voir **tableau****XXVI****Swertisine**Formule brute: $C_{22}H_{22}O_{10}$

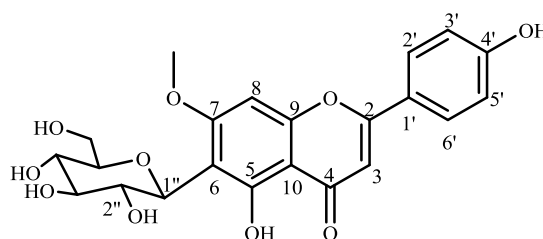
Aspect physique: Solide jaune

Point de fusion: 295 °C

Test de shinoda

HRESIMS (positif) m/z 447,1249 [M+H]⁺

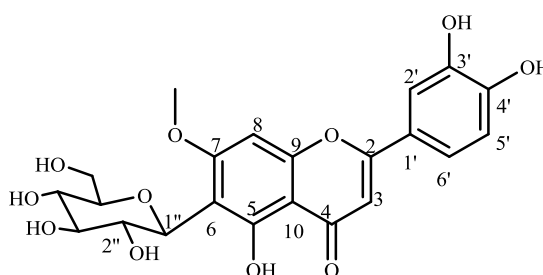
(masse calculé 447,1286)

RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6) et ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) Voir **tableau XVII****Swertiajaponine**Formule brute: $C_{22}H_{23}O_{11}$

Aspect physique: Solide jaune

Point de fusion: 295 °C

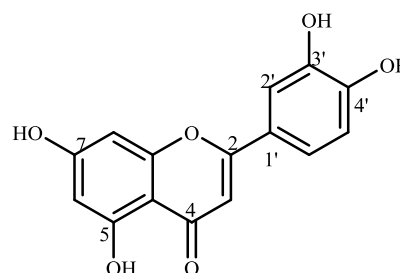
Test de shinoda

LC-MS (positif) m/z 609 [M+H]⁺RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_4) et ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_4) Voir **tableau****XVIII****Lutéoline**Formule brute: $C_{15}H_{10}O_6$

Aspect physique: Critaux de couleur jaune

Point de fusion: 338,4 °C

Test de shinoda

LC-MS (positif) m/z 286,24 g/mol [M+H]⁺RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6) et ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) Voir **tableau XIX**

Trans-4',5-dihydroxy-4'-méthoxystilbène-3-O- $\{\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[acide 4,5-dihydroxybenzoïque-(1 \rightarrow 4)]- β -D-xylopyranoside

Formule brute: C₃₃H₃₆O₁₄

Aspect physique: Poudre amorphe blanche

Point de fusion (Pf): 206-208°C

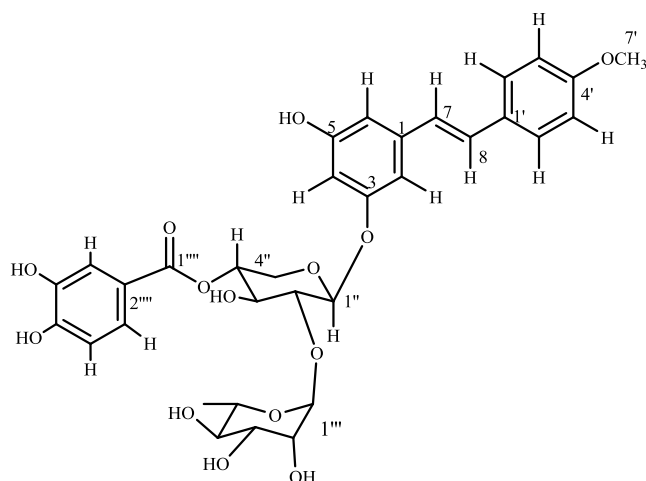
Test au FeCl₃

UV 308, 336 nm

IR (KBr) ν_{\max} 3250 cm⁻¹

EI-MS (positif) m/z 657,2239 g/mol [M+H]⁺
(masse calculé 657,036)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD-*d*₆) et ¹³C (100 MHz, MeOD-*d*₆) Voir **tableau XXIX**



Catéchine

Aspect physique: Solide incolore

Solubilité: Methanole

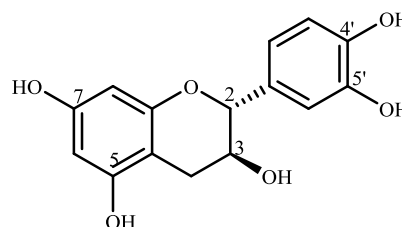
Formule Brute : C₁₅H₁₄O₅, PM : 290

Point de fusion (PF): 175-187°C; $[\alpha]_D^{25}$: +14°

IR (KBr): ν_{\max} 3313, 1621, 1514, 1285, 1243, 1180, 1145, 1112, 1073

RMN ¹H (400 MHz, MeOD-*d*₆) et ¹³C

(150 MHz, MeOD-*d*₆) : Voir **tableau XXX**



Lupéol

Aspect physique : Solide blanc

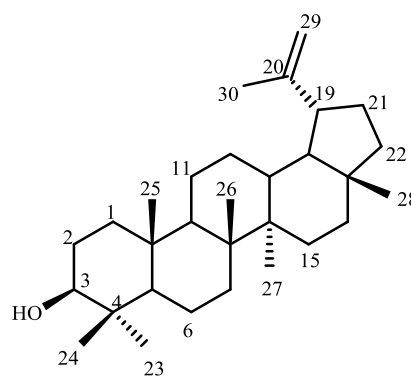
Solubilité: Chloroforme

Formule Brute : C₃₀H₅₀O, PM : 426

PF : 215-217°C ;

IR (KBr): ν_{\max} 3311, 2946, 2870, 1638, 1464, 1189, 1035, 996, 680 cm⁻¹

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) et ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : Voir **tableau XXXI**



Bétulinaldéhyde

Aspect physique : solide blanc

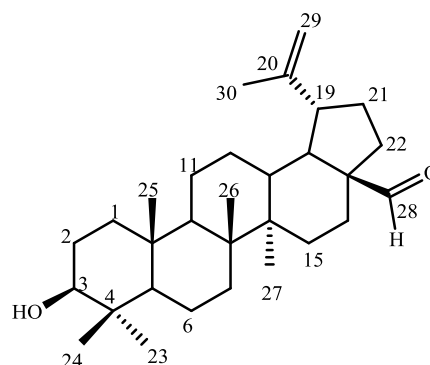
Solubilité: Chloroforme

Formule Brute : C₃₀H₄₈O₂, PM : 440

PF : 207-209°C ;

HRESIMS: m/z 441,3156 [M+H]⁺ (calculée 441,3733 pour C₃₀H₄₉O₂)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) et ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : Voir **tableau XXXII**



Acide Betulinique

Aspect physique : Cristal blanc

Solubilité: MeOH

Formule Brute : $C_{30}H_{48}O_3$, PM : 456

PF : 315-317°C $[\alpha]_D^{23}$: +7,9°

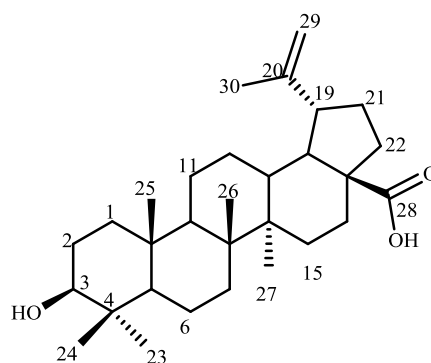
HRESIMS: m/z

455,3531 [M-H]⁻ (calculée 455,3525 pour

$C_{30}H_{47}O_3$)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD-*d*₆) et ¹³C (100

MHz, MeOD-*d*₆) : Voir **tableau XXXIII**



Acide ceanothique

Aspect physique : Solide blanc

Solubilité: Méthanol

Formule Brute : $C_{30}H_{46}O_5$, PM 454

PF : 324-327°C ; $[\alpha]_D^{25}$: -16,3° (MeOH)

IR (KBr): ν_{max} 3432, 2925, 2854, 1710, 1641,

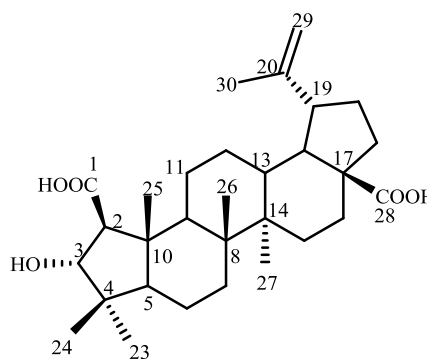
1462, 1377, 1271, 1124, 1072, 883, 741 cm^{-1}

HRESIMS: m/z 454,3638 [M+H]⁺ (calculée

454,3423 pour $C_{30}H_{47}O_5$)

RMN ¹H (400 MHz, Acetone-*d*₆) et ¹³C

(100 MHz, Acetone-*d*₆) : Voir **tableau 34**





RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adeniyi, B.A., Obasi, O.J., Lawal, T.O. (2011). *In-vitro* antifungal activity of *Distemonanthus benthamianus* stem. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4): 52-56.
- Adeniyi, C.B.A. and Odumosu, B.T. (2012). Antibacterial and Antifungal properties of *Distemonanthus benthamianus* (Fabaceae) Crude Extract. *The Global Journal of Pharmaceutical Research* Vol. 1(4): 567-574
- Adjanohoun, E., & Assi, L. A. (1979). *Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire* (Vol. 1). Centre Nationale de floristique.
- Ado, K., Garba, S & Salihu, L. (2014). *Fundulopanchax gardneri* Test: A Convenient Method of Bioassay for Active Constituents of Natural Products. *Natural Products Chemistry & Research*, 2:133.
- Agarkar, S. & Jadge, D. (1999). Phytochemical and pharmacological investigations of genus *Cassia*: A review. *Asian Journal of Chemistry*, 11(2): 259–299.
- Ahmad, S., Hassan, A., Abbasi, W.M. & Rehman. T. (2018). Phytochemistry and pharmacological potential of *Cassia absus*—A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(1): 27–41.
- Alemayehu, G., Abegaz, B., Snatzke, G. & Duddeck. H. (1988). Bianthraquinones and a spermidine alkaloid from *Cassia floribunda*. *Phytochemistry*, 27(10): 3255–3258.
- Arbonnier, M. (2004). Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. *Trees, Shrubs and Lianas of West African Dry Zones*, 1-574.
- Arthanari, S., Vanitha, J., Krishnaswami, V., Renukadevi, P., Deivasigamani, K., & De Clercq, E. (2013). *In vitro* antiviral and cytotoxic screening of methanolic extract of *Cassia auriculata* flowers in HeLa, Vero, CRFK and HEL cell lines. *Drug invention today*, 5(1), 28-31.
- Ashok, D., & Sarma, P. N. (1985). Roxburghinol, a 1, 2-dihydroanthraquinone from the leaves of *Cassia roxburghii*. *Phytochemistry*, 24(11), 2673-2675.
- Astier, H., Briquet, A., & Garnotel, E. (2017). *Mycobacterium canettii*, une mycobactérie du complexe tuberculosis. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2017(496), 47-59.

- Ati, S. (2018). Etude biologique et phytochimique de trois genets endémiques en Algérie : « *Genista numidica* spach, *Genista ferox* poiret et *Genista tricuspidata* Desf ». Thèse de doctorat, université Badji Mokhtar-Annaba, pp. 9-108.
- Atta-ur-Rahman,†, Naz, H., Fadimatou,‡, Makhmoor, T., Yasin, A., Fatima, N., ... & Choudhary, M. I. (2005). Bioactive Constituents from *Boswellia papyrifera*. *Journal of natural products*, 68(2), 189-193.
- Aubreville, M. (1985). Les plantes utiles des savanes soudano-sahéliennes, *Editions Clé, Yaoundé-Cameroun ; French*.
- Ayisi, F., Mensah, C. N., & Borquaye, L. S. (2021). Antiplasmodial potential and safety evaluation of the ethanolic stem bark extract of *Distemonanthus benthamianus* baill.(Leguminosae). *Scientific African*, 12, e00809.
- Ayo, R. G., Amupitan, J. O., Ndukwe, I. G., & Audu, O. T. (2009). Some chemical constituents of the leaves of *Cassia nigricans* Vahl. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 3(11), 208-211.
- Bayiha Ba Njock, G., Bartholomeusz, T. A., Foroozandeh, M., Pegnyemb, D. E., Christen, P., & Jeannerat, D. (2012). NASCA-HMBC, a New NMR Methodology for the Resolution of Severely Overlapping Signals: Application to the Study of Agathisflavone. *Phytochemical Analysis*, 23(2), 126-130.
- Bchir, S., Hammami, S., Bergaoui, A., & Mighri, Z. (2011). Chemical and structural studies of *tunisian Anacyclus Cyrtolepidioïdes* butanol extract. *Journal de Societe Algerienne de Chimie*, 21, 59-64.
- Bidie, A. P., N'Guessan, B. B., Yapo, A. F., N'Guessan, J. D., & Djaman, A. J. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8(1-2), 1-12.
- Blench, R. (2012). *An atlas of Nigerian languages*. Oxford: Kay Williamson Educational Foundation.
- Bone, K. & Mills, S. (2012). Principles and practice of phytotherapy: Modern Herbal Medicine (2nd ed.). *Churchill Livingstone: London, England*.
- Boutaghane, N. (2013). Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum*

- (sch.Bip.) coss. & kralik ex Batt (Asteraceae). Thèse de doctorat, université de Constantine 1, pp. 16-156.
- Bruneau, A. (2013). The Legume Phylogeny Working Group, “Legume Phylogeny and Classification in the 21st Century: Progress, Prospects and Lessons for Other Species-Rich Clades”, *Taxon*, 62, 2, p. 217-248.
- Bruneau, A., Forest, F., Herendeen, P. S., Klitgaard, B. B., & Lewis, G. P. (2001). Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL intron sequences. *Systematic Botany*, 26(3), 487-514.
- Burnham, R.J. & Johnson, K.R. (2004). South American palaeobotany and the origins of neotropical rainforests. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1450), 1595–1610.
- Cameroon National Tuberculosis Control Programme (NTCP. 2015). Plan strategique de lutte contre la tuberculose au Cameroun 2015–2019. Yaoundé, Cameroon: NTCP, 2015. http://www.pnlt.cm/index.php/documentation/plan-strategique-national/doc_download/18-plan-strategique-natinal-tuberculose-cameroun. [French] Accessed May 2016.
- Cantrell, C. L., Franzblau, S. G., & Fischer, N. H. (2001). Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta medica*, 67(08), 685-694.
- Chaabi, M., Chabert, P., Vonthron-Sénécheau, C., Weniger, B., Ouattara, M., Corstjens, H., Sente, I., Declercq, L. & Lobstein, A. (2010). Acylated flavonol pentaglycosides from *Baphia nitida* leaves. *Phytochemistry Letters* 3, 70–74.
- Chaudhuri, K. & Chawla, H.M. (1987). Anthraquinones and terpenoids from *Cassia javanica* leaves. *Journal of Natural Products*, 50(6), 1183–1183.
- Chauhan, D., Rai, R. & Chauhan, J. (2002). Two flavonoid triglycosides from *Cassia marginata*. *Indian Journal of Chemistry*, 41B, 446–448.
- Chen, J. J., Chou, E. T., Peng, C. F., Chen, I. S., Yang, S. Z., & Huang, H. Y. (2007). Novel epoxyfuranoid lignans and antitubercular constituents from the leaves of *Beilschmiedia tsangii*. *Planta medica*, 73(06), 567-571.
- Chen, L. W., Cheng, M. J., Peng, C. F., & Chen, I. S. (2010). Secondary metabolites and antimycobacterial activities from the roots of *Ficus nervosa*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(7), 1814-1821.

- Choi, J. S., Lee, H. J., & Kang, S. S. (1994). Alatemin, cassiaside and rubrofusarin gentiobioside, radical scavenging principles from the seeds of *Cassia tora* on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Archives of Pharmacal Research*, 17(6), 462-466.
- Chou, T. H., Chen, J. J., Peng, C. F., Cheng, M. J., & Chen, I. S. (2011). New flavanones from the leaves of *Cryptocarya chinensis* and their antituberculosis activity. *Chemistry & Biodiversity*, 8(11), 2015-2024.
- Christenhusz, M.J. & Byng, J.W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217.
- Christofidis, I., Welter, A. & Jadot, J. (1977a). Spectaline and iso-6 cassine, two new piperidin 3-ol alkaloids from the leaves of *Cassia spectabilis*. *Tetrahedron*, 33(9), 977–979.
- Christofidis, I., Welter, A. & Jadot, J. (1977b). Spectalinine and iso-6-carnavaline, two unprecedented piperidine alkaloids from the seeds of *Cassia spectabilis*. *Tetrahedron*, 33(22), 3005–3006.
- Collins, L. A., & Franzblau, S. G. (1997). Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(5), 1004-1009.
- Copp, B. R., & Pearce, A. N. (2007). Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Natural Product Reports*, 24(2), 278-297.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.
- Crawford, L., McDonald, G. M., & Friedman, M. (1990). Composition of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) toxic weed seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(12), 2169-2175.
- Dass, A., Joshi, T. & Shukla, S. (1984). Anthraquinones from *Cassia sophera* root bark. *Phytochemistry*, 23(11), 2689–2691.
- Dave, H. & Ledwani, L. (2012). A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3, 291–319.

- Delle Monache, G., De Rosa, M. C., Scurria, R., Monacelli, B., Pasqua, G., Dall'Olio, G., & Botta, B. (1991). Metabolites from in vitro cultures of *Cassia didymobotrya*. *Phytochemistry*, 30(6), 1849-1854.
- Demir, S., Turan, İ., Misir, S., & Aliyazicioglu, Y. (2019). Selective cytotoxic effect of *Dorycnium pentaphyllum* extract on human breast, liver, and lung cancer cells. *ksu tarim ve doga dergisiI-ksu Journal Of Agriculture And Nature*, 22(3).
- Dickinson, F.E., Hess, R.W. and Wangaard, F.F. (1945). "Properties and uses of tropical woods," *Tropical Woods*, vol. 95, p. 145.
- Doyle, J.J., Chapill, J.A., Bailey, C.D. and Kajita, T. (2000). Towards a Comprehensive Phylogeny of Legumes: Evidence from rbcL Sequences and Non-molecular Data. In: (eds.), *Advances in Legume Systematics, Part 9. Kew, Royal Botanical Gardens, London*, pp. 1-20.
- Duggal, J.K. & Misra, K. (1982). Anthraquinones of *Cassia marginata* seeds. *Planta Medica*, 45(05), 48–50.
- Duke, J. (2012). *Handbook of legumes of world economic importance. Springer Science & Business Media: New York.*
- Dupont, F. et Guignard, J-L. (2012). *Botanique les familles de plantes. 15ème édition, Elsevier Masson SAS, Paris, 300 p.*
- El-Sayyad, S.M. & Ross, S.A. (1983). A phytochemical study of some *Cassia* species cultivated in Egypt. *Journal of Natural Products*, 46(3), 431–432.
- El-Toumy, S.A., El Souda, S.S., Mohamed, T.K., Brouard, I. & Bermejo, J. (2012). Anthraquinone glycosides from *Cassia roxburghii* and evaluation of its free radical scavenging activity. *Carbohydrate Research*, 360, 47–51.
- Endo, M. & Naoki, H. (1980). Antimicrobial and antispasmodic tetrahydroanthracenes from *Cassia singueana*. *Tetrahedron*, 36(17), 2449–2452.
- Etuk, E.U., Bello, S.O., Isezuo, S.A. & Mohammed, B.J. (2010). Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants used for the Treatment of Diabetes *Mellitus* in the North Western Region of Nigeria. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1(1):55-59.

- Evina, J. N., Ngonu, B. D. S., Zintchem, A. A. A., Nyemeck, N. M., Ndedi, E. D. F. M., Diboué, P. H. B., ... & Bochet, C. G. (2017). *In vitro* antitubercular activity of extract and constituents from the stem bark of *Disthemonanthus benthamianus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(1), 739-743.
- Fernand, V. E., Dinh, D. T., Washington, S. J., Fakayode, S. O., Losso, J. N., van Ravenswaay, R. O., & Warner, I. M. (2008). Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of *Cassia alata* L. by use of high performance liquid chromatography. *Talanta*, 74(4), 896-902.
- Frank, J.H., Powder-George, Y.L., Ramsewak, R.S. and Reynolds, W.F. (2012). Variable-Temperature 1 H-NMR Studies on Two C-Glycosylflavones. *Molecules*, 17(1), 7914-7926.
- Gambo, M.K., Karofi MUN. (2004). Karekare-English-Hausa dictionary. Ed. Schuh R G ©Yobe Language Research Project. *Ajami presspublishers, Potiskum, Nigeria*, 38.
- Gayout, M., Ballouhey, J. et Melloni, B. (2017). Modalités de traitement de la tuberculose. *Actualités pharmaceutiques* 32, n° 568, septembre 2017.
- Georges, K., Jayaprakasam, B., Dalavoy, S.S. & Nair, M.G. (2008). Pestmanaging activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. *Bioresource Technology*, 99(6), 2037–2045.
- Ghanzanfar, S. A. (1989). Savanna Plants. *An Illustrated Guide*), *Macmillan Publishers Ltd., London*, 60-64.
- Gibree, H.H., Kordofani, M.A.Y., Warrag, E.I. & Ahmed, H.O. (2013). Medicinal value and ecotaxonomy of the flora of Blue Nile State-Sudan. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(2):36-43.
- Gritsanapan, W., Tantisewie, B. & Jirawongse, V. (1984). Chemical constituents of *Cassia timorensis* and *Cassia grandis*. *Journal of The Science Society of Thailand*, 10(3), 189–190.
- Gu, J. Q., Wang, Y., Franzblau, S. G., Montenegro, G., Yang, D., & Timmermann, B. N. (2004). Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta medica*, 70(06), 509-514.
- Guo, H., Chang, Z., Yang, R., Guo, D. & Zheng, J. (1998). Anthraquinones from hairy rootcultures of *Cassia obtusifolia*. *Phytochemistry*, 49(6), 1623–1625.

- Gupta, D. & Singh, J. (1991). Flavonoïd glycosides from *Cassia alata*. *Phytochemistry*, 30(8), 2761–2763.
- Gupta, M.M., Lal, R.N., Shukla, Y.N. (1981). 5 α -Stigmast-9(11)-en-3 β -ol, a sterol from *costus speciosus* roots. *Phytochemistry* 20 : 2557-2559.
- Habib, A-A.M. & El-Sebakhy, N.A. (1980). Spectrophotometric estimation of sennosides and rhein glycosides in *senna* and its preparations. *Journal of Natural Products*, 43(4), 452–458.
- Haidara, M., Haddad, M., Denou, A., Marti, G., Bourgeade-Delmas, S., Sanogo, R., ... & Aubouy, A. (2018). *In vivo* validation of anti-malarial activity of crude extracts of *Terminalia macroptera*, a Malian medicinal plant. *Malaria Journal*, 17(1), 1-10.
- Han, J. T., Bang, M. H., Chun, O. K., Kim, D. O., Lee, C. Y., & Baek, N. I. (2004). Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. *Archives of Pharmacal Research*, 27(4), 390-395.
- Happi, E. N., & Mpondo, T. N. (1994). Two polymethoxylated flavones from *Distemonanthus benthamianus*. *Journal of Natural Products*, 57(2), 291-293.
- Haston, E., Richardson, J.E., Stevens, P.F., Chase, M.W. & Harris, D. J. (2009). The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: A linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 128–131.
- Hatano, T., Mizuta, S., Ito, H. & Yoshida, T. (1999). C-Glycosidic flavonoids from *Cassia occidentalis*. *Phytochemistry*, 52(7), 1379–1383.
- Hedberg, I. & Edwards, S. (1989). Flora of Ethiopian and Eritrea. National Herbarium, Addis Ababa and Uppsala, 3:560-571.
- Hemlata, K.S.B. & Kalidhar, S. (1993). Alatinone, an anthraquinone from *Cassia alata*. *Phytochemistry*, 32(6), 1616–1617.
- Herendeen, P. S., Lewis, G. P., & Bruneau, A. (2003). Floral morphology in caesalpinoid legumes: testing the monophyly of the “Umtiza clade”. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S5), S393-S407.
- Hong, B. K., Eom, S. H., Lee, C. O., Lee, J. W., Jeong, J. H., Kim, J. K., ... & Kim, M. J. (2007). Biological activities and bioactive compounds in the extract of *Acer tegmentosum* Maxim. stem. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 15(4), 296-303.

- Hosamani, K.M. (1994). A rich source of novel 9-ketooctadec-cis15-enoic acid from *Cassia absus* seed oil and its possible industrial utilization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 33(4), 1058–1061.
- Imam, H., Abd Alla, A.E.W.H. & Yagi, S.M. (2013). Evaluation of the Larvicidal, Antiplasmodial and Cytotoxicity Properties of *Cassia arereh* Del. Stem Bark. *European Journal of Medicinal Plants*, 3(1): 78-87.
- Issa, T.O., Mohamed, Y.S., Yagi, S., Ahmed, R.H. (2018). Ethnobotanical investigation on medicinal plants in Algoz area (South Kordofan), Sudan. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* (14) :31.
- Irvine, F.R. (1961). Woody plants of Ghana. London: Oxford Unversty press. 301-302p.
- Iwalewa, E., Lege-Oguntoye, L., Rai, P. & Iyaniwura, T. (1997). *In vivo* and *in vitro* antimalarial activity of two crude extracts of *Cassia occidentalis* leaf. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 23–28.
- Jalalpure, S., Patil, M., Pai, A., Shah, B. & Salahuddin, M. (2004). Antidiabetic activity of *Cassia auriculata* seeds in alloxan induced diabetic rats. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, 8(1), 22–23.
- Jamila, N., Melati, K., Sadiq, N.K, Naeem, K. and Hasnah, O. (2014) Phytochemicals from the Bark of *Garcinia hombroniana* and Their Biological Activities. *Supporting Information. Records of Natural Products*. 8:3, 312-316.
- Jimenez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., & Luna-Herrera, J. (2003). Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(8), 903-908.
- Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Torres, J., & Luna-Herrera, J. (2007). Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 202-205.
- John, K. K., & Shcherazade, D. O. S. F. (2021). Activité Anti-Inflammatoire Et Études Phytochimiques De L'extrait Aqueux Des Écorces *Distemonanthus Benthamianus* Baill.(Caesalpinioideae: Leguminosae-Caesalpinioideae).

- Jones, L., Bartholomew, B., Latif, Z., Sarker, S. & Nash, R. (2000). Constituents of *Cassia laevigata*. *Fitoterapia*, 71(5), 580–583.
- Joshi, T., Dass, A., Pandey, S. & Shukla, S. (1985). An anthraquinone 3-neohesperidoside from *Cassia sophera* root bark. *Phytochemistry*, 24(12), 3073–3074.
- Judd, W-S., Campbell, C-S., Kellogg, E-A., Stevens, P. (2002). *Botanique systématique une perspective phylogénétique*. 1^{er} édition, paris, 459 p.
- Jyoti, S. and Rajeshwari, S. (2012). Evaluation of phytochemical constituents in conventional and non-conventional species of curcuma. *Internationa Research of Jornal Pharmaceutical.*, 3: 203-204
- Kainsa, S., Kumar, P. & Rani, P. (2012). Pharmacological potentials of *Cassia auriculata* and *Cassia fistula* plants: A review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(9), 408–417.
- Kamal, O.T. (2019). Caractérisation des huiles essentielles de deux plantes médicinales et aromatiques du Maroc (*Laurus nobilis* et *Thymus satureioides*) : Essai de valorisation dans la conservation antimicrobienne d'une préparation pharmaceutique. Université Chouaib Doukkali Faculté des Sciences El Jadida. Centre d'Etudes Doctorales « Sciences et Technologie » THESE de Doctorat.
- Kamatham, S., Kumar, N., Gudipalli, P. (2015). Isolation and characterization of gallic acid and methylgallate from the seed coats of *Givotia rottleriformis* Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoidcarcinoma A431 cells. *Toxicology Reports* 2 (2015) 520–529
- Karembe, S. (2020). Itinéraire et délai de diagnostic de la tuberculose pulmonaire à bactériologie positive à Bamako, Mali. Thèse Med Bamako ;2020. 15-17.
- Kashiwada, Y., Nonaka, G., & Nishioka, I. (1984). Studies on Rhubarb (*Rhei Rhizoma*). VI. Isolation and characterization of stilbenes. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 32(9), 3501-3517.
- Kerim, R.O.A., Elisa, A.G.A., Lucía, B.V.J., Martín, R.R.C., Arcelia, G.C.T., Javier, R.L.E. & David, R.A.E. (2017). Impact of *Cassia acutifolia* infusion on glucose levels in obesity and diabetes rat model. *Journal of Pharmacopuncture*, 20(3), 201–206.

- Khare, C. (2007). Indian medicinal plants (1st ed.). *Springer Science Publishers*: New York, NY.
- Khumkomkhet, P., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Hahnvajanawong, C., & Soyong, K. (2009). Antimalarial and cytotoxic depsidones from the fungus *Chaetomium brasiliense*. *Journal of natural products*, 72(8), 1487-1491.
- Kim, H.L., Camp, B.J. & Grigsby, R.D. (1971). Isolation of N-methylmorpholine from the seeds of *Cassia occidentalis* (coffee senna). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 19(1), 198–199.
- Kinjo, J., Ikeda, T., Watanabe, K. & Nohara, T. (1994). An anthraquinone glycoside from *Cassia angustifolia* leaves. *Phytochemistry*, 37(6), 1685–1687.
- Kiplagat, D.M., Akala, H.M., Liyala, P.O., Wangui, J.M., Odhiambo, R.A. & Omolo, J.O. (2016). Antiplasmodial activity of flavan derivatives from rootbark of *Cassia abbreviata* Oliv. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20, S140–S144.
- Kiplagat, D.M., Akala, H.M., Liyala, P.O., Wangui, J.M., Odhiambo, R.A.O., Omolo, J.O. (2012). Antiplasmodial activity of flavan derivatives from rootbark of *Cassia abbreviata* Oliv. *Journal of Saudi Chemical Society* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2012.10.002>
- Kirtikar, K. R., & Basu, B. D. (1987). Indian Medicinal Plants. 2 [sup] nd ed. *Dehradun: International Book Distributors*, 204-13.
- Kirtikar, K., & Basu, B. (1918). Indian medicinal plants. Periodical Experts Book Agency: Bihar, India.
- Kitanaka, S. & Takido, M. (1981). Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia*: The structures of two new lactones, isotoralactone and cassialactone. *Phytochemistry*, 20(8), 1951–1953.
- Kitanaka, S. & Takido, M. (1989). Two new bitetrahydroanthracenes from roots of *Cassia occidentalis* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(2), 511–512.
- Kitanaka, S. & Takido, M. (1990). Studies on the constituents of the roots of *Cassia torosa*. II: The structures of two dimeric tetrahydroanthracenes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38(5), 1292–1294.
- Konate N.-M. (2010). Diversité interspécifique d'efficience d'utilisation de l'eau des Acacias sahéliens et australiens. Thèse de doctorat, université Henri Poincaré, Nancy1, p. 20.

- Kuete, V., Ngameni, B., Mbaveng, A. T., Ngadjui, B., Meyer, J. M., & Lall, N. (2010). Evaluation of flavonoids from *Dorstenia barteri* for their antimycobacterial, antigonorrhoeal and anti-reverse transcriptase activities. *Acta tropica*, 116(1), 100-104.
- Kumar, D., Karmase, A., Jagtap, S., Shekhar, R. & Bhutani, K.K. (2013). Pancreatic lipase inhibitory activity of Cassiamin A, a bianthraquinone from *Cassia siamea*. *Natural Product Communications*, 8(2), 195–198.
- Lancaster M., Fields R. (1996) Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. United States, Patent N° 5 : 501, 959.
- Ledwani, L. & Singh, M. (2005). Anthraquinone glycoside from stem bark, fatty acids and sterols from seeds of *Cassia reingera*. *Indian Journal of Chemistry*, 44, 1970–1971.
- Lee, C.K., Lee, P.H. & Kuo, Y.H. (2001). The chemical constituents from the aril of *Cassia fistula* L. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 48(1), 1053–1058.
- León-Díaz, R., Meckes, M., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G. M., Vargas-Villarreal, J., Torres, J., ... & Jiménez-Arellanes, A. (2010). Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(1), 45-51.
- Li, F. K., Lai, C. K., Poon, W. T., Chan, A. Y. W., Chan, K. W., Tse, K. C., ...Lai, K. N. (2004). Aggravation of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced hepatitis and acute renal failure by slimming drug containing anthraquinones. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(7),1916–1917.
- Lounis, N., Guillemont, J., Veziris, N., Koul, A., Jarlier, V., Andries, K. (2010). R207910 (TMC207): un nouvel antibiotique pour le traitement de la tuberculose. *Médecine et maladies infectieuses* 40(1), 383-390.
- Maartens, G. & Wilkinson, R.J. (2007). Tuberculosis. *Lancet*; 370:2030—43.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). The Systematic Identification of Flavonoïds. *Springer*, 354 p.
- Mahapatra, A., Mativandlela, S. P., Binneman, B., Fourie, P. B., Hamilton, C. J., Meyer, J. J. M., ... & Lall, N. (2007). Activity of 7-methyljuglone derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* and as subversive substrates for mycothiol disulfide reductase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(24), 7638-7646.
- Mahaza, C., Dupont, A., Apaire-Marchais, V. (2020). Actualités pharmaceutiques. *Elsevier Masson SAS*. N° 593.

- Maillet, M., Janssen, C., Fraisse, P. (2020). *Mycobacterium tuberculosis*. Elsevier Masson SAS.12, 21-24.
- Maity, T.K., Mandal, S.C., Mukherjee, P.K., Saha, K., Das, J., Pal, M. & Saha, B. (1998). Studies on antiinflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (fam. Leguminosae). *Phytotherapy Research*, 12(3), 221–223.
- Malan, E. (1993). A flavonol with a tetrasubstituted B-ring from *Distemonanthus benthamianus*. *Phytochemistry*, 32(6): 1631-1632.
- Malan, E., & Roux, D. G. (1979). Flavonoids from *Distemonanthus benthamianus* Baillon. Methoxylated flavones and inter-relationships of benthamianin, a [2] benzopyrano [4, 3-b][1] benzopyran. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2696-2703.
- Malan, E., Naidoo, S. (1980). Two flavonols from *Distemonanthus benthamianus*. *Phytochemistry*, 19(2): 2731-2733.
- Malan, E., Naidoo, S. (1990). A hexa-substituted flavonol from *Distemonanthus benthamianus*. *Phytochemistry*, 29(7): 2366.
- Malan, E., Swinny, E., Ferreira, D. (1994). A 3-oxygenated flavonolignoid from *Distemonanthus benthamianus*. *Phytochemistry*, 37(6): 1771-1772.
- Marouf, A. et Reynaud, J. (2007). La botanique de A à Z. Dunod, paris, 342.
- Mayo, P. D., & Starratt, A. N. (1962). Terpenoids: II. Ceanothenic Acid: A C₂₉ A-Norlupane Derivative. *Canadian Journal of Chemistry*, 40(8), 1632-1641.
- Mebude, O. O., Adeniyi, B. A., & Lawal, T. O. (2017). *In vitro* antimicrobial activities of ethanol extract of *Distemonanthus benthamianus* (Aayan) Baillon (Fabaceae) on *Streptococcus mutans*. *British of Journal Medicinal Medical Research*, 22(5), 1-8.
- Mena-Rejóna, G.J., Pérez-Rivas, K., Sansorez-Peraza, P., Rios, T. & Quijano, L. (2002). Racemochryson, a dihydroanthracenone from *Senna racemosa*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(1), 777–779.
- Messana, I., Ferrari, F., Cavalcanti, M.S.B. & Morace, G. (1991). An anthraquinone and three naphthopyrone derivatives from *Cassia pudibunda*. *Phytochemistry*, 30(2), 708–710.
- Messmer, W. M., Farnsworth, N. R., Persinos, G. J., & Wilkes, J. D. (1968). Phytochemical investigation of the flowers of *Cassia reticulata* Willd.(Leguminosae). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(11), 1996-1998.

- Missi, M. B., Evina, J. N., Zintchem, A. A. A., October, N., Bona, A., Moela, P., Diboué, P. H. B., Ngono, B. D. S & Pegnyemb, D. E. (2021). Antibacterial and cytotoxic activities of undescribed cassiaric acid and other constituents from *Cassia arereh* stem barks. *Natural Product Research*, 1-10.
- Mizuno, T., Yabuya, T., Kitajima, J., Iwashina, T. (2013). Identification of novel C-glycosylflavones and their contribution to flower colour of the Dutch iris cultivars. *Plant Physiology et Biochemistry*. S0981-9428(13)00259-3
- Mondal, A., Karan, S. K., Singha, T., Rajalingam, D., & Maity, T. K. (2012). Evaluation of hepatoprotective effect of leaves of *Cassia sophera* Linn. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,5(1), 1–5.
- Mongalo, N. & Mafoko, B. (2013). *Cassia abbreviata* Oliv. A review of its ethnomedicinal uses, toxicology, phytochemistry, possible propagation techniques and pharmacology. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(45), 2901–2906.
- Morita, H., Oshimi, S., Hirasawa, Y., Koyama, K., Honda, T., Ekasari, W., Zaini, N.C. (2007). Cassiarins A and B, novel antiplasmodial alkaloids from *Cassia siamea*. *Organic Letters*, 9(18), 3691–3693.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth & survival : application to proliferation & cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 :55-63.
- Musa, S., Abdelrasool, F.E., Elsheikh, E.A., Ahmed, L.A.M.N., Mahmoud, A.L.E., Yagi, S.M. (2011) Ethnobotanical study of medicinal plants in the Blue Nile State, South-eastern Sudan. *Journal of Medicinal Plants research*, 5:4287-4297.
- Mustapha, A.A. (2013). Ethno- medicinal field study of anti-fertility medicinal plants used by the local people in Keffi Local Government, Nasarawa State, Nigeria. *International Journal of Medicinal Plants Research*, 2(5): 215-218
- Nasir, E., Ali, S. & Stewart, R.R. (1972). *Flora of West Pakistan*. Karachi, Pakistan: University of Karachi.
- NCCLS, 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA

- Ndayishimiye, J. (2011). Diversité, endémisme, géographie et conservation des Fabaceae de l'Afrique centrale. Thèse de doctorat, université libre de Bruxelles (université d'Europe), pp. 12-15.
- Ndukwe, K.C., Okeke, I.N., Lamikanra, A., Adesina, S.K. and Aboderin, O. (2005). "Antibacterial activity of aqueous extracts of selected chewing sticks," *Journal of Contemporary Dental Practice*, vol. 6, no. 3, pp. 86–94.
- Nel, R.J., Mthembu, M., Coetzee, J., Van Rensburg, H., Malan, E. & Ferreira, D. (1999). The novel flavan-3-ol, (2R, 3S) -guibourtinidol and its diastereomers. *Phytochemistry*, 52(6), 1153–1158.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products* 66, 1022–1037.
- Ngono, B. D. N., Mosset, P., Abouem, A., Zintchem, A., Atchadé, A. T., Missi, M. B., ... & Pegnyemb, D. E. (2014). Campylospermine, an N-Hydroxy-alkaloid from the Leaves of *Campylospermum densiflorum* (Ochnaceae). *International Journal Pharmacy Phytopharmacol. Research.*, 6(2), 719-728.
- Nguelefack, E.M.P., Ngu, K.B., Atchade, A., Dimo, T., Tsabang, N. and Mbafor, T. (2006). "Phytochemical composition and *in vitro* effects of the ethyl acetate bark extract of *Distemonanthus benthamianus* Baillon (Caesalpiniaceae) on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*," *Cameroon Journal of Experimental Biology*, 1(1), 50–53.
- Nguelefack, M.P.E., Ngu, B.K., Atchade, A., Dimo, T., Tsabang, N., Mbafor, T.J. (2005). Phytochemical composition and *in vitro* effects of the ethyl acetate bark extract of *Distemonanthus benthamianus* Baillon (Caesalpiniaceae) on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Cameroon Journal of Experimental Biology*, 1(1): 50-53.
- Ngulde, S.I., Sanni, S., Sandabe, U.K. & Sani, D. (2010). Phytochemical and antimicrobial screening of the aqueous extract of *Cassia arereh* Del. stem-bark. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(8): 530-534.
- Njeru, S. N., Obonyo, M. A., Ngari, S. M., Onsarigo, S. N., Njeru, J. M., & Kamweru, P. K. (2015). Antituberculous, antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical activity study of *Piliostigma thonningii* extract fractions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(22), 655-663.
- Nkot, J. L., Ngono Bikobo, D. S., Abouem A Zintchem, A., Nyemeck, N. M., Moni Ndedi, E. D. F., Betote Diboué, P. H., Pegnyemb, D. E., Bochet, C. G. & Koert, U. (2018).

- Antitubercular evaluation of root extract and isolated phytochemicals from *Lophira lanceolata* against two resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharmaceutical biology*, 56(1), 318-324.
- Olusola, A., Olutayo, O., Michael, A., Olakunle, F. & Edah, A.O. (2011). Elemental analysis and Anti-microbial potentials of the leaf extract of *Cassia arereh* Del. *International Research of Pharmacy and Pharmacology*, 1(8):188-193.
- O.M.S (2022). Rapport sur la tuberculose dans le monde 2021.
- Ottu, O., Atawodi, S. & Onyike, E. (2013). Antioxidant, hepatoprotective and hypolipidemic effects of methanolic root extract of *Cassia singueana* in rats following acute and chronic carbon tetrachloride intoxication. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(8), 609–615.
- Owusu, F.W. & Louppe, D. (2012). *Distemonanthus benthamianus* Baill. [Internet] Fiche de PROTA4U. Lemmens, R.H.M.J., Louppe, D. & Oteng-Amoako, A.A. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l’Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas.
- Panche, A., Diwan, A. & Chandra, S. (2016). Flavonoïds: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 1–15.
- Pauli, G. F. (2001). qNMR—a versatile concept for the validation of natural product reference compounds. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 12(1), 28-42.
- Pedley, L. (1997). “Notes on *Caesalpinia* subg. *mezoneuron* (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Australia”, *Austrobaileya*, 5 (1), p. 97-102.
- Peirs C., 2005. Contribution à d’étude phytochimique de *Galega officinalis* L. (*Fabaceae*). Thèse de doctorat. Ecole doctorale : sciences des procédés (France), pp. 25-27.
- Peterson, L. R., & Shanholtzer, C. J. (1992). Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clinical microbiology reviews*, 5(4), 420-432.
- Petit, A-C. (2011). Toxicité et utilisation de quelques *Fabaceae* alimentaires et médicinales. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré-NANCY-I, pp. 2-22.

- Phatangare, N.D., Deshmukh, K.K., Murade, V.D., Naikwadi, P.H., Hase, D.P., Chavhan, M.J., Velis, H.E. (2017). Isolation and Characterization of β -Sitosterol from *Justicia gendarussa* burm. F.-An Anti-Inflammatory Compound. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*; 9(9); 1280-1287.
- Prajoubklang, A., Sirithunyalug, B., Charoenchai, P., Suvannakad, R., Sriubolmas, N., Piyamongkol, S., ... & Kittakoop, P. (2005). Bioactive deoxypreussomerins and dimeric naphthoquinones from *Diospyros ehretioides* fruits: deoxypreussomerins may not be plant metabolites but may be from fungal epiphytes or endophytes. *Chemistry & biodiversity*, 2(10), 1358-1367.
- Prakash, C., Prakash, I. (2012). Isolation and Structural Characterization of Lupane Triterpenes from *Polypodium Vulgare*. *Research Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1:23-27.
- Prasanna, R., Harish, C., Pichai, R., Sakthisekaran, D. & Gunasekaran, P. (2009). Anti-cancer effect of *Cassia auriculata* leaf extract in vitro through cell cycle arrest and induction of apoptosis in human breast and larynx cancer cell lines. *Cell Biology International*, 33(2), 127–134.
- Purwar, C., Rai, R., Srivastava, N. & Singh, J. (2003). New flavonoid glycosides from *Cassia occidentalis*. *Indian Journal of Chemistry*, 42, 434–436.
- Rahman, A. & Parvin, M.I.A. (2014). Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh. *Research in Plant Sciences*, 2(1), 6–8.
- Rahman, A., Rahman, M.M., Sheik, M., Shadli, S. & Alam, M. (2008). Free radical scavenging activity and phenolic content of *Cassia sophera* L. *African Journal of Biotechnology*, 7(10), 1591–1593.
- Rambabu, P., Ramana, K. V., & Ganapaty, S. (2011). Isolation and characterization of triterpenes from *Zizyphus glabrata*. *International of Journal Chemical Sciences*, 9(5), 1014-1024.
- Rao, K., Damu, A., Jayaprakasam, B. & Gunasekar, D. (1999). Flavonol glycosides from *Cassia hirsuta*. *Journal of Natural Products*, 62(2), 305–306.
- Rao, R.K., Rao, J.S. & Vimaladevi, M. (1979). Phytochemical investigation of *Cassia absus* (roots and leaves). *Journal of Natural Products*, 42(3), 299–300.

- Rapport sur la tuberculose dans le monde 2020 : résumé d'orientation [Global tuberculosis report 2020 : executive summary]. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2020. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Ribeiro, A., Romeiras, M.M., Tavares, J. & Faria, M.T. (2010). Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: Medicinal plants and traditional knowledge. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6(1), 33.
- Richter, H.G. and Dallwitz, M.J. (2000) onwards. Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In English, French, German, Portuguese, and Spanish. Version: 16th April 2006.
- Robbins, W.J., Kavanagh, F. & Thayer, J. (1947). Antibiotic activity of *Cassia reticulata* Willd. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 74, 287–292.
- Rosli, S.S., Kadir, W.N.A.M., Wong, C.Y., Han, F.Y., Lim, J.W., Lam, M.K., Yusup, S., Kiatkittipong, W., Kiatkittipong, K., Usman, A. (2020). Insight review of attached microalgae growth focusing on support material packed in photobioreactor for sustainable biodiesel production and wastewater bioremediation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 134 (2020) 110306
- Salahuddin, M., Jalalpure, S.S. & Gadge, N.B. (2010). Antidiabetic activity of aqueous bark extract of *Cassia glauca* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(2), 153–160.
- Salihu, L. & Ado, K. (2013). *In-vitro* antimicrobial screening of some medicinal plants. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 3(2) :110-115.
- Santhosh, R. S., & Suriyanarayanan, B. (2014). Plants: a source for new antimycobacterial drugs. *Planta medica*, 80(01), 9-21.
- Sartorelli, P., Carvalho, C.S., Reimão, J.Q., Ferreira, M.J.P. & Tempone, A.G. (2009). Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of *Cassia fistula* (Leguminosae). *Parasitology Research*, 104(2), 311–314.
- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I. (2003). Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *Journal of Experimental Medicine* 198(5), 693–704.
- Sekar, M., Prasad, K.R., Sidduraju, P. & Janardhanan, K. (1999). New anthraquinones from *Cassia obtusa*. *Fitoterapia*, 70(3), 330–332.

- Shinoda, J. (1928). color reations of flavone and flavonol derivatives and the like. *Yakugaku zasshi* 48: 214-220.
- Shittu, A. O., Aliyu, A., David, M. S., Njinga, N. S., & Ishaq, H. I. (2019). Potential antibacterial activity of two important local chewing sticks “*Fagara zanthoxyloides* and *Distemonanthus benthamianus*” along with antioxidant capacities. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(2), 223-232.
- Shwe, H.H., Win, K.K., Moe, T.T., Myint, A.A., Win, T. (2019). Isolation and Structural Characterization of Lupeol from the Stem Bark of *Diospyros ehretioides* Wall. *IEEE-SEM*, Volume 7, Issue 8, 2320-9151.
- Silva, C., Monteiro, M., Rocha, H., Ribeiro, A., Caldeira-de-Araujo, A., Leit~ao, A., Pádula, M. (2008). Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of *senna* (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using *in vitro* assays. *Toxicology In Vitro*, 22(1), 212–218.
- Silva, F. D. O., Oliveira, Í. R. D., Silva, M. G. D. V., & Braz-Filho, R. (2010). Chemical compounds of leaves from *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. *Quimica Nova*, 33, 1874-1876.
- Singh, B., Nadkarni, J. R., Vishwakarma, R. A., Bharate, S. B., Nivsarkar, M., & Anandjiwala, S. (2012). The hydroalcoholic extract of *Cassia alata* (Linn.) leaves and its major compound rhein exhibits antiallergic activity via mast cell stabilization and lipoxygenase inhibition. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 469-473.
- Singh, J. & Singh. J. (1986). A bianthraquinone and a triterpenoid from the seeds of *Cassia hirsuta*. *Phytochemistry*, 25(8), 1985–1987.
- Singh, J., Tiwari, A. & Tiwari, R. (1980). Anthraquinones and flavonoids of *Cassia laevigata* roots. *Phytochemistry*, 19(6), 1253–1254.
- Singh, S. & Singh, J. (2008). A bianthraquinone and anthraquinone from *Cassia javanica* heart wood. *Journal of the Indian Chemical Society*, 85(11), 1159–1162.
- Singh, S., Singh, S.K. & Yadav, A. (2013). A review on *Cassia* species: Pharmacological, traditional and medicinal aspects in various countries. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(3), 291–312.
- Singh, V., & Khan, A. M. (1990). Medicinal plants and folklores: A strategy towards conquest of human ailments (Vol. 9, pp. 60–177). New Delhi, India: Today &

Tomorrow Printers and Publishers.

- Singh, V., Singh, J. & Sharma, J. (1992). Anthraquinones from heartwood of *Cassia siamea*. *Phytochemistry*, 31(6), 2176–2177.
- Sob, S.V.T., Wabo, H.K., Tane, P., Ngadjui, B.T. & Ma, D. (2008). A xanthone and a polyketide derivative from the leaves of *Cassia obtusifolia* (Leguminosae). *Tetrahedron*, 64(34), 7999–8002.
- Somchit, M., Reezal, I., Nur, I.E. & Mutalib, A. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(1), 1–4.
- Spichiger, R-E., Murielle, F.V-V.-S., Jeanmonod, D. (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs. 3^{ème} édition, presses polytechniques et universitaires Romandes, 413 p.
- Sripathi, S.K., Gopal, P. and Lalitha, P. (2011). Allantoin from the leaves of *Pisonia grandis* R.Br. *Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)*, 2(6), 815-817.
- Stephen, J. (2001). Pathogenesis of infections diarrhea. *Canadian Journal of Gastroenterology* 15:669-683.
- Sudjarwo, S.A. and Koerniasari, G.W. (2017). Protective effect of curcumin on lead acetate-induced testicular toxicity in Wistar rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(5), 381-390.
- Sunil, K.K.C. & Müller. K., (1998). Inhibition of leukotriene biosynthesis and lipid peroxidation in biological models by the extract of *Cassia fistula*. *Phytotherapy Research*, 12(7), 526–528.
- Sureram, S., Senadeera, S. P., Hongmanee, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2012). Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(8), 2902-2905.
- Takayuki, M., Tsutomu, Y., Nobuhiro, S., Tsukasa, I. (2012). Phenolic compounds, including novel C-glycosylflavone, from the flowers of the tall bearded Iris cultivar ‘Victoria Falls’. *Natural Product Communication* 7(12), 1591–1594.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Rattanasuwan, P. & Puripattanvong, J. (2007). HIV-1 protease inhibitory substances from *Cassia garrettiana*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29, 145–149.

- Tiam, E. R., Ngoni Bikobo, D. S., Abouem A Zintchem, A., Mbabi Nyemeck, N., Moni Ndedi, E. D. F., Betote Diboué, P. H., Nyegue, M. A., Atchadé, A. D. T., Pegnyembe, D. E., Bochet, C. G. & Koert, U. (2017). Secondary metabolites from *Triclisia gillettii* (De Wild) Staner (Menispermaceae) with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Natural Product Research*, 33(5), 642-650.
- Tirfe, M., Gebrehiwot, M., Gebrelibanos, M., Sintayehu, B. and Gebremedhin, G. (2015). Radical Scavenging Activity and Preliminary Phytochemical Screening of Pods of *Cassia arereh* Del. (Fabaceae). *Momona Ethiopian Journal of Science (MEJS)*, V7(1):125-133.
- Tiwari, R. & Singh, J. (1979). Anthraquinone rhamnosides from *Cassia javanica* root bark. *Phytochemistry*, 18(5), 906–906.
- Tiwari, R. & Yadava, O. (1971). The flavonoids of *Cassia javanica* flowers. *Phytochemistry*, 10(9), 2256–2263.
- Tripathi, Y. (1999). *Cassia angustifolia*, a versatile medicinal crop. *International Tree Crops Journal*, 10(2), 121–129.
- Tunon, M., Garcia-Mediavilla, M., Sanchez-Campos, S. & Gonzalez-Gallego, J. (2009). Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: Modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Current Drug Metabolism*, 10(3), 256–271.
- Vaidya, A. (1994). Indian medicinal plant—A compendium of 500 species (pp. 26–30). Hyderabad, India: Orient Longman Ltd.
- Vaishnav, M. & Gupta, K. (1996). Rhamnetin 3-*O*-gentiobioside from *Cassia fistula* roots. *Fitoterapia*, 67(1), 78–79.
- Varghese, G.K., Bose, L.V. & Habtemariam, S. (2013). Antidiabetic components of *Cassia alata* leaves: Identification through α -glucosidase inhibition studies. *Pharmaceutical Biology*, 51(3), 345–349.
- Viegas, C., da Bolzani, S.V., Furlan, M., Barreiro, E.J., Young, M.C.M., Tomazela, D. & Eberlin, M.N. (2004). Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. *Journal of Natural Products*, 67(5), 908–910.
- Wagle, A., Seong, S.H., Joung, E-J., Kim, H-R., Jung, H.A. and Choi, J.S. (2018). Discovery of a Highly Potent Tyrosinase Inhibitor, Luteolin 5-*O*- β -*D*-Glucopyranoside,

- Isolated from *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum., Korean Thistle: Kinetics and Computational Molecular Docking Simulation. *ACS Omega*, 3, 17236–17245.
- Waltenberger, B., Avula, B., Ganzera, M., Khan, I., Stuppner, H. & Khan, S. (2008). Transport of sennosides and sennidines from *Cassia angustifolia* and *Cassia senna* across Caco-2 monolayers—an *in vitro* model for intestinal absorption. *Phytomedicine*, 15(5), 373–377.
- Wayne, P. A. (2011). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes Approved Standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Susceptibility Testing*.
- White, L.J.T. & Abernethy, K. (1996). Guide de la végétation de la réserve de la Lopé, Gabon, Ecofac-Gabon, Libreville 224 p.
- William, Y. N., Gilbert, A., Shah, A. J., Marius, M., Mireille, T. T. L., Vanessa, M. M. M., Adjouzem, C. F., Teboukeu, B. G., Awouafack, M. D., Taous, K. & Albert, K. (2019). Extracts from the trunk bark of *Distemonanthus benthamianus* Baillon. (Caesalpiniaceae) developed antidiarrhoeal activities in rats and mice. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19(4), 421-433.
- World Health Organization. (2015). Global Tuberculosis Report. Geneva, Switzerland. p1-145.
- Yadava, R. & Verma, V. (2003). A new biologically active flavone glycoside from the seeds of *Cassia fistula* (Linn.). *Journal of Asian Natural Products Research*, 5(1), 57–61.
- Yen, G.C. & Chuang, D.Y. (2000). Antioxidant properties of water extracts from *Cassia tora* L. in relation to the degree of roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2760–2765.
- Yombi, J. C., & Olinga, U. N. (2015). La tuberculose : épidémiologie, aspect clinique et traitement. *Louvain med*, 134(10), 549-559.
- Youngken, H.W. & Walsh, R.A. (1954). Antibacterial activity of *Cassia reticulata* Willd. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 43(3),139–140.
- Yousseu, N., Ateufack, G., Abdul, J. (2019). “Extracts from the trunk bark of *Distemonanthus benthamianus* Baillon. (Caesalpiniaceae) developed antidiarrhoeal activities in rats and mice,” *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19(1), 421–433.

- Zhao, W., Zeng, X., Zhang, T., Wang, L., Yang, G., Chen, Y-K., Miao, M. (2013). Flavonoids from the bark and stems of *Cassia fistula* and their anti-tobacco mosaic virus activities. *Phytochemistry Letters*, 6(2), 179–182.
- Zhao, Y., Liu, J-P., Lu, D. & Li, P-Y. (2007). A novel cycloartane triterpene glycoside from the seeds of *Cassia sophera* L. *Natural Product Research*, 21(6), 494–499.
- Zhong, S., Waterman, P., Jeffreys, J. (1984). Naphtoquinones and triterpenes from African *Diospyros* species. *Phytochemistry*, 23:1067-1072.
- Zhu, L., Yu, S., Zeng, X., Fu, X. & Zhao, M. (2008). Preparative separation and purification of five anthraquinones from *Cassia tora* L. by highspeed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, 63(3), 665–669.



Publications

Evina, J. N., Ngonu, B. D. S., Zintchem, A. A. A., Nyemeck, N. M., Ndedi, E. D. F. M., Diboué, P. H. B., Nyegué, A. M., Atchadé, T. D. A. & Bochet, C. G. (2017). *In vitro* antitubercular activity of extract and constituents from the stem bark of *Disthemonanthus benthamianus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 739-743.

Missi, M. B., Evina, J. N., Zintchem, A. A. A., October, N., Bona, A., Moela, P., Diboué, P. H. B., Ngonu, B. D. S & Pegnyemb, D. E. (2021). Antibacterial and cytotoxic activities of undescribed cassiaric acid and other constituents from *Cassia arereh* stem barks. *Natural Product Research*, 1-10.



Original Article

In vitro antitubercular activity of extract and constituents from the stem bark of *Disthemonanthus benthamianus*



Jean Noel Evina^a, Dominique Serge Ngoni Bikobo^{a,e,*}, Auguste Abouem A. Zintchem^{a,b}, Norbert Mbabi Nyemeck II^{a,c}, Esther Del Florence Moni Ndedi^d, Patrick Hervé Betote Diboué^d, Maximilienne Ascension Nyegue^d, Alex de Théodore Atchadé^a, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb^a, Ulrich Koert^c, Christian G. Bochet^e

^a Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

^b Department of Chemistry, Higher Training College, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

^c Faculty of Chemistry, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

^d Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

^e Department Chemie, Universität Fribourg, Fribourg, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2017

Accepted 12 September 2017

Available online 4 November 2017

Keywords:

Fabaceae

Antitubercular activity

Disthemonanthoside

Flavonoids

Phenolic acids

ABSTRACT

A new C-glycosylflavone, apigenin 7-methyl ether 6-C-[β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glucopyranoside] named disthemonanthoside was isolated from the stem bark of *Disthemonanthus benthamianus* Baill., Fabaceae, along with six known compounds, sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside, 4-methoxygallic acid, syringic acid, quercetin, 6''-O-acetylvitexin, quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside. The structures of those compounds and others were determined through spectral analyses. Compounds disthemonanthoside, sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside, 4-methoxygallic acid and quercetin were tested against a clinical isolate strain of *Mycobacterium tuberculosis* AC 45; they exhibited good to moderate antitubercular activities with MIC values ranged from 31.25 to 125 μ g/ml.

© 2017 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Tuberculosis (TB) is a chronic contagious disease caused by several species of *Mycobacterium*. Due to the fact that there is a doubt nowadays on the efficiency of current antibiotics for the treatment of tuberculosis, micro-organisms developed resistance inducing an increase of the number of patients with the disease in worldwide (WHO, 2016). This increasing of MDR-TB incidence has led to an urgent need for the discovery of new plant natural products that may potentially eradicate TB. Several *in vitro* growth inhibition of different strains of *M. tuberculosis* by plant extracts have been reported (Okunade et al., 2004; Copp and Norrie Pearce, 2007; Gautam et al., 2007; Mc Gaw et al., 2008). The Cameroonian medicinal plant *Disthemonanthus benthamianus* Baill., Fabaceae, is a large rainforest tree widely distributed in Africa, especially in equatorial region. This essence is highly appreciated industrially for heavy construction and some countries use to export it as

“Movingi”. In Mayombé region (Congo), traditional healers employ the stem bark in the treatment of several diseases as: parasitic, dermatitis, furuncles, aces and chancres. In the Chaillu region (Congo), that plant is used to cure bronchitis affections and children fever (Bouquet, 1969). In previous works carried on *D. benthamianus*, mainly methoxylated flavonols and flavones were isolated (King et al., 1952; King et al., 1954; Malan and Roux, 1979; Happi and Mpondo, 1994); this paper describes the isolation and structure elucidation of constituents from stem bark of *D. benthamianus*. The evaluation of antitubercular activities of compounds disthemonanthoside (1), sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside, 4-methoxygallic acid (2) and quercetin against resistant strain of *M. tuberculosis* was also examined.

Material and methods

General procedures

Melting points were uncorrected and were measured on a Mettler Toledo instrument. IR spectra were recorded on an Alpha FT-IR Spectrometer from Bruker, while 1D and 2D NMR spectra were

* Corresponding author.

E-mail: ngonos@uy1.uninet.com (D.S. Bikobo).

obtained on a Bruker DRX 500 (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C spectra) spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany) with chemical shifts reported in δ (ppm) using TMS (δ_{H}) as an internal standard. The HR-ESI-MS was obtained on LTQ-FT instrument (Thermo Scientific). UPLC-MS was measured by a Shimadzu UPLC-MS system. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 polarimeter. Silica gel 60 (230–400 mesh E. Merck, Darmstadt, Germany) was employed for column chromatography, the solvent mixing systems for elution were mainly $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ with increasing polarity each.

Plant material

Stem bark of *Distemonanthus benthamianus* Baill., Fabaceae, were collected at Eséka (Koumoul) near Yaoundé (3° 38' 60.00" N, 10° 46' 0.00" E) in the Centre Region of Cameroon in March 2014 and identified by Victor Nana. A voucher specimen (No. 45488 HCN) was deposited at the National Herbarium in Yaoundé, Cameroon.

Extraction and isolation

Dried and powdered stem bark of *D. benthamianus* (254 g) were extracted for 48 h with MeOH (3 × 1 l) at room temperature. After filtration and evaporation of solvent, the crude MeOH extract (16 g) was subjected to CC (150 × 3 cm) [SiO_2], eluting with a gradient solvent system ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) giving four main fractions: I (1.9 g), II (3.8 g), III (3.6 g) and IV (6.7 g). Fractions (100 ml) were collected and grouped on the basis of TLC analysis. Fraction II (3.8 g) was submitted to CC (SiO_2 , 100 × 1 cm) using solvent system $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50/1) to give sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside (65 mg). Fraction III (3.6 g) was submitted to CC (SiO_2 , 100 × 1 cm) using solvent system $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (60/1 to 5/1) to give four sub-fractions (IIIa, IIIb, IIIc and III d). Sub-fraction IIIc (1 g) was chromatographed (SiO_2 , 50 × 1 cm) using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (40/1–15/1) to afford compound **2** (480 mg) and compound **3** (3 mg). Sub-fraction III d (0.65 g) was subjected to a silica gel column in gradient elution mixture solvent composed of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (25/1–5/1) to afford quercetin (8 mg) and quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (11 mg). Using the same process, fraction IV (6.7 g) gave three sub-fractions (IVa, IVb and IVc). Sub-fraction IVa (0.98 g) was further chromatographed on a silica gel column (100 × 1 cm) using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10/1) to afford compound **4** (4 mg). Sub-fraction IVb (2.8 g) was purified by repeated CC on silica gel (100 × 1 cm) with the solvent system $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10/1–1/1) to provide compound **1** (28 mg).

Structural characterization of distemonanthoside (**1**)

Yellow solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -54^\circ$ (c 0.05, MeOH); m.p. 285–287 °C; $\text{IR}_{\text{vmax}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3267, 2923, 2853, 1595, 1512, 1226, 1159; TLC, R_f : 0.28 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10); ESI-MS m/z : ESI-MS: 577.4 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, LC-MS: m/z 579 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ and ESI-MS: m/z 601.5 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}\text{Na} = 601.5$); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ_{H} : 8.09 (2H,

d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6'), 6.96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' and 5'), 6.82 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, s, H-8), 4.81 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1''), 4.01^b (1H, H-3''), 3.86 (3H, s, -OCH₃), 3.82 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'''), 3.72 (1H, dd, $J = 11.3$; 2.4 Hz, H-6''), 3.42^b (1H, H-6''), 3.39^b (1H, H-2''), 3.36^b (1H, H-4''), 3.21^b (1H, H-5''), 2.83 (1H, dd, $J = 11.5$; 4.0 Hz, H-5''), 2.81^b (1H, H-3'''), 2.78^b (1H, H-2'''), 2.39^b (1H, H-5'''); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{C} : 182.1 (C-4), 164.1 (C-2), 163.4 (C-7), 161.4 (C-9), 161.2 (C-4'), 155.5 (C-5), 128.9 (C-2' and C-6'), 121.3 (C-1'), 115.8 (C-3' and C-5'), 105.3 (C-1'''), 104.7 (C-6), 104.1 (C-10), 102.3 (C-3), 94.8 (C-8), 81.7 (C-5''), 80.4 (C-3''), 78.1 (C-2''), 76.4 (C-3'''), 75.6 (C-2'''), 73.5 (C-1''), 71.3 (C-4''), 69.2 (C-4'''), 65.3 (C-5'''), 60.8 (C-6''), 56.5 (-OCH₃).

^bSignal patterns are unclear due to overlap.

Antitubercular activity

MIC values were determined for the extract against *M. tuberculosis* strain AC 45 (clinical isolate obtained from Sangmelima district's Hospital in South Region of Cameroon) employing the microplate Alamar Blue assay, using Rifampicin as reference. The 96 wells plate received 100 μl of Middlebrook 7H9 medium supplemented with 10% OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase) 2% glycerol and 0.05% v/v of tween 80. Broth and serial dilution of compounds were made directly on the plate with drug concentrations of 0.244 to 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Plates were covered and sealed with parafilm and incubated at 37 °C for 14 days. Then, 40 μl Alamar Blue solution was added to the plate and incubated for 24 h. A blue colour in the well was interpreted as no bacterial growth and pink colour was scored as growth. The MIC was defined as the lowest drug concentration, which prevented colour change from blue to pink. The result of antitubercular activity depicted in Table 1. The MIC and MBC were determined according to the guidelines of CLSI (2011). Each experiment was performed at least twice according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011).

Acid hydrolysis of **1**

Compound **1** (8 mg) was dissolved in 7% H_2SO_4 (0.5 ml) and heated on an aqueous bath at 100 °C for 4 h. The reaction mixture was diluted with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 . The CH_2Cl_2 layer was evaporated to dryness and purified by preparative TLC over silica gel with CH_2Cl_2 -MeOH (5/1) as eluent. Apigenin-7-methyl ether 6-C-glucoside (3 mg) was isolated and identified through direct comparison with authentic samples (TLC, MP, and IR). The neutralized and lyophilized aqueous hydrolysates of the aqueous solution gave only xylose. GC-MS (Column: 5% phenyl and 95% methyl silicone on ultra 2, 0.2 × 46 m, column temp.: 250 °C, carrier gas: He 0.8 ml/min, sample: trimethylsilyl derivatives: t_R (min) xylose (19.29 for **1**).

Table 1

MIC and MBC values of the methanol extract and the isolated compounds against clinical isolate strain of *Mycobacterium tuberculosis* (AC 45).

Plant species/compounds	MIC ^a ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC ^a (μM)	MBC ^b ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MBC/MIC
<i>D. benthamianus</i>	1250	nd ^c	2500	2
1	125	216.3	125	1
Sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside	62.5	108.5	125	2
2	31.25	169.8	125	4
Quercetin	62.5	207.0	125	2
RMP	0.976	nd ^c	7.8125	8

RMP, Rifampicin.

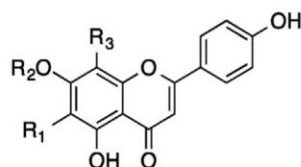
^a MIC, Minimum Inhibitory Concentration.

^b MBC, Minimum Bactericidal Concentration.

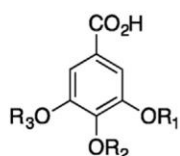
^c nd, Not determined.

Results and discussion

The detailed investigation of methanol extract of the stem bark of *D. benthamianus* led to the isolation of seven compounds. Six of them were identified as the known sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside (Ngono Bikobo et al., 2014), 4-methoxygallic acid (2) (Ouyang et al., 2007), syringic acid (3) (Bayiha Ba Njock et al., 2011), quercetin (Güvenalp and Demirezer, 2005), 6''-O-acetylxyloside (4) (Bayiha Ba Njock et al., 2011), quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (Murai et al., 2014). The structures of these compounds were elucidated by NMR spectroscopy analysis, including 1D and 2D techniques and also by comparing experimental data with respective literature data



1 R₁= β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glucopyranosyl; R₂=CH₃; R₃=H
4 R₁=R₂=H; R₃=6''-O-acetylglucopyranosyl



2 R₁=R₂=OH; R₃=CH₃
3 R₁=R₂=CH₃; R₃=OH

Compound **1** was obtained as yellow amorphous powder, $[\alpha]_D^{25} = -54^\circ$ ($c = 0.05$, MeOH). Its molecular formula, C₂₇H₃₀O₁₄ was established by negative-ion HR-ESI-MS (Fig. S4). The spectrum displayed the deprotonated molecule peak $[M-H]^-$ at $m/z = 577.4$ in agreement with the above formula (calcd, 577.44). The IR spectrum of **1** showed absorption bands characteristic of hydroxyl groups (3219 cm⁻¹), conjugated carbonyl groups (1652 cm⁻¹) and aromatic rings (1603 and 1572 cm⁻¹). UV spectral properties of **1** showed absorption maxima at λ_{max} 340 nm and 268 nm in MeOH, characteristic for a substituted flavone (Mabry et al., 1970). In addition, acid hydrolysis of **1** gave apigenin 7-methyl ether 6-C-glucoside and β -xylose which were identified by TLC analysis and comparison with authentic samples (GC; t_R 19.29 min). In the ¹H NMR spectrum (Table 2) the set of *ortho*-coupled AA'BB' type protons at δ_H 8.04 (2H, d, $J = 8.8$ Hz) and 6.96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), was respectively assigned to H-2'/6' and H-3'/5' protons of the B-ring of the molecule, while an isolated aromatic proton appeared at δ_H 6.44 (s, H-8) from A ring. The spectrum also revealed the presence of a methoxyl group at δ_H 3.86 and two signals assignable to anomeric sugar protons, which were identified to be an inner β -glucopyranose and a terminal β -pyranose structure of xylose. This was strengthened by the observation in ¹³C NMR and DEPT spectra of eleven carbon signals (Table 2) among which two are anomeric carbon signals at δ_C 73.5 and 105.3, seven methine carbon signals, two oxymethylene carbons at δ_C 60.8 and 65.3. Since the anomeric protons of glucose and xylose at δ_H 4.81 and 3.82 exhibited large coupling constants ($J = 10.0$ and 7.0 Hz), the sugars were considered of the β -pyranose type. The HMBC spectrum of compound **1** revealed correlations of the anomeric proton at δ_H 4.81 (H-1'') and carbons at δ_C 161.3 (C-7), 155.6 (C-5) 104.7 (C-6) and 81.7 (C-5'') (Fig. 1), indicating the C-C bond between the inner β -glucopyranosyl moiety and the aglycone at 6-position. In addition, H-1''' at δ_H 3.82 correlates to both C-3'' (δ_C 80.4) and C-5''' (δ_C 65.3)

Table 2

¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of compound **1** (500 and 125 MHz in DMSO-*d*₆) δ in ppm.

Position	δ_C	DEPT	δ_H (J in Hz)	HMBC (C \rightarrow H)
<i>Apigenin</i>				
2	164.1	C		H-C(3); H-C(2')
3	102.3	CH	6.82 (s)	
4	182.1	C		H-C(3)
5	155.5	C		H-C(1'')
6	104.7	C		H-C(1'')
7	163.4	C		H-C(1''); CH ₃ O-
8	94.8	CH	6.44 (s)	
9	161.4	C		H-C(8)
10	104.1	C		H-C(3)
1'	121.3	C		H-C(3); H-C(2', 6')
2'	128.9	CH	8.04 (d, 8.8)	H-C(3', 5')
3'	115.8	CH	6.96 (d, 8.8)	H-C(2', 6')
4'	161.2	C		H-C(2'); H-C(5')
5'	115.8	CH	6.96 (d, 8.6)	H-C(2', 6')
6'	128.9	CH	8.04 (d, 8.6)	H-C(3', 5')
7-OCH ₃	56.5	CH ₃	3.86 (s)	
<i>Inner glucose</i>				
1''	73.5	CH	4.81 (d, 10)	H-C(2''); H-C(5'')
2''	78.1	CH	3.39 ^a	H-C(1'')
3''	80.4	CH	4.01 ^a	H-C(1'')
4''	71.3	CH	3.36 ^a	H-C(2''); H-C(5'')
5''	81.7	CH	3.21 ^a	H-C(1''); H-C(6'')
6''	60.8	CH ₂	3.72 (dd, 11.3; 2.4) 3.42 ^a	H-C(5'')
<i>Terminal xylose</i>				
1'''	105.3	CH	3.82 (d, 7.0)	H-C(2'''); H-C(5''')
2'''	75.6	CH	2.78 ^a	H-C(1''')
3'''	76.4	CH	2.81 ^a	H-C(1'''); H-C(5''')
4'''	69.2	CH	2.89 ^a	H-C(5''')
5'''	65.3	CH ₂	2.83 (dd, 11.5; 4.0) 2.39 ^a	H-C(1'''); H-C(4''')

^a Signal patterns are unclear due to overlap.

revealing that the β -xylopyranosyl moiety was linked to C-3'' at δ_C 80.4, showing that glucose and xylose are linked through a 1 \rightarrow 3 type. This was strengthened by the NOESY crosspeaks of the protons H-3'' (δ_H 4.01) with H-1''' (δ_H 3.82) confirming the aforementioned bonding. The attachment of a methoxyl group to the 7-position was shown by the observation of the crosspeaks at δ_H 3.86 (3H, s, OMe) and δ_C 164.1 (C-7) in the long-range HMBC spectrum. Moreover the correlation between H-8 (δ_H 6.44) and the methoxyl proton signals at δ_H 3.86. The complete assignment of all proton and carbon resonances was achieved after careful analysis of COSY, HSQC and HMBC techniques.

Some significant HMBC correlations are shown in Fig. 1 and in Table 2. Compound **1** is closely related to the previously reported swertisin 2''-O-arabinoside from the tall bearded *iris* (Takayuki et al., 2012); meanwhile, differences occur in the sequence of sugar moieties and this is exemplified by the values of the retention times of xylose [which is close to reported data (Liu et al., 2009)]. This assertion is also strengthened by the upper chemical shift values of protons of the xylose moieties compared to those of arabinose (Gu et al., 2011).

Accordingly, **1** was defined as apigenin 7-methyl ether 6-C-[β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glucopyranoside] named distemonanthoside. To the best of our knowledge, this is the first report of the isolation of this compound and others (phenolic acids and sterols) from *D. benthamianus*.

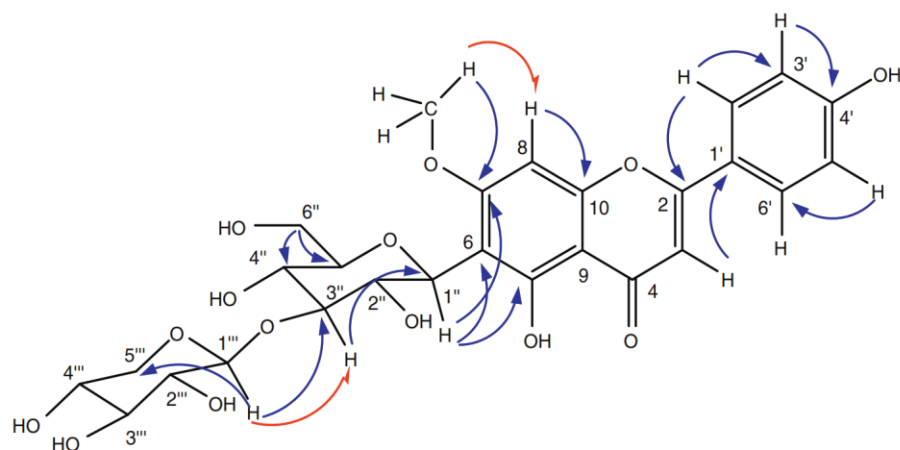


Fig. 1. Selected HMBC (blue arrow) and NOESY (red arrow) correlations of compound 1.

According to Cantrell et al. (2001) isolated compounds that exhibit a MIC of 64 $\mu\text{g/ml}$ or lower are considered promising. For crude extracts, the MIC should be equal to or lower than 125 $\mu\text{g/ml}$ (Gu et al., 2004). Thus, the values of 125, 62.5, 31.25 and 62.5 $\mu\text{g/ml}$ for **1**, sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside, 4-methoxygallic acid and quercetin, respectively obtained here, are as good as a promising isolated compounds except for compound **1** (Table 1). According to Gu et al. the methanol extract of *D. benthamianus* showed poor inhibitory activity against *M. tuberculosis*, exhibiting a MIC and MBC of 1250 and 2500 $\mu\text{g/ml}$ respectively, suggesting the low lipophilicity of its constituents (more polar compounds) when they act mutually in synergy. According to Peterson and Shanholzer (1992) bacteriostatic activity has been defined as a ratio of MBC to MIC of >4. Thus, all tested compounds exhibited bactericidal activity. The results of the present study are in accordance with previous report regarding the values of MIC of isolated compounds (Gu et al., 2004; Jiménez-Alleranes et al., 2007).

Conclusion

The species *D. benthamianus*, is known as abundant sources of flavonoids. Compounds **1**, sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside and 4-methoxygallic acid were isolated for the first time from this species. The bioactivity study of the isolated compounds indicated that three compounds (sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside, 4-methoxygallic acid and quercetin) exhibited interesting antitubercular activity.

Authors' contributions

JNE (PhD student) contributed running the laboratory work, and drafted the paper; EFMN, PHBD and MAN contributed to biological studies, running the laboratory work, analysis of the data and drafted the paper; NMN contributed to analysis of the data and drafted the paper; UK, ATA, DEP and CB contributed to critical reading of the manuscript; AAZ and DSNB contributed in collecting plant samples, supervised the laboratory work, did the NMR investigations and revised the paper. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Swiss National Science Foundation (SNSF) (No: IZK0Z2-157272) for research fellowships in Switzerland to D. S. Ngono Bikobo. We thank Mr V. Nana for the collection and identification of plant material. We thank Mr Felix Fehr of Department of Chemistry of University of Fribourg and Koert's team, particularly Mr Oliver Born of Philipps-Universität Marburg for spectral analysis.

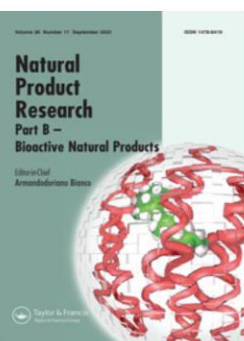
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bjp.2017.09.006.

References

- Bayiha Ba Njock, G., Bartholomeusz, T.A., Foroozandeh, M., Pegnyemb, D.E., Christens, P., Jeannerat, D., 2011. NASCA-HMBC, a new NMR methodology for the resolution of severely overlapping signals: application to the study of agathisflavone. *Phytochem. Anal.* 23, 126–130.
- Bouquet, A., 1969. Fetish and traditional medicine of Congo (Brazzaville). *O.R.S.T.O.M. Paris* 36, 177–178.
- Cantrell, C.L., Franzblau, S.G., Fischer, N.H., 2001. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.* 67, 685–694.
- CLSI, 2011. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA, Approved Standard M24-A2.
- Copp, B.R., Norrie Pearce, A., 2007. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Rep.* 24, 278–297.
- Gautam, R., saklani, A., Jachak, S.M., 2007. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *J. Ethnopharmacol.* 110, 200–234.
- Gu, J.Q., Wang, Y., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Yang, D., Timmermann, B.N., 2004. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med.* 70, 509–514.
- Gu, X., Lee, S.G., Bar-Peled, M., 2011. Biosynthesis of UDP-xylose and UDP-arabinose in *Sinorhizobium meliloti* 1021: first characterization of a bacterial UDP-xylose synthase, and UDP-xylose 4-epimerase. *Microbiology* 157, 260–269.
- Güvenalp, Z., Demirezer, O., 2005. Flavonol glycosides from *Asperula arvensis* L. *Turk. J. Chem.* 29, 163–169.
- Happi, E.N., Mpondo, T.N., 1994. Two polymethoxylated flavones from *Distemonanthus benthamianus*. *J. Nat. Prod.* 57, 291–293.
- Jiménez-Alleranes, A., Meckes, M., Torres, J., Herrera-Luna, J., 2007. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (verbenaceae). *J. Ethnopharmacol.* 111, 202–205.
- King, F.E., King, T.J., Sellars, K., 1952. The chemistry of extractives from hardwoods. Part V. The isolation of 3,7,4'-trimethylquercetin (ayanin) from the heartwood of *Distemonanthus benthamianus*. *J. Chem. Soc. O*, 92–95.
- King, F.E., King, T.J., Stokes, P.J., 1954. The chemistry of extractives from hardwoods. Parts XIX. The structures of further new flavones occurring in ayan (*Distemonanthus benthamianus*). *J. Chem. Soc. O*, 4587–4594.
- Liu, R., Ma, S., YU, S., Pei, Y., Zhang, S., Chen, X., Zhang, J., 2009. Cytotoxic oleanane triterpene saponins from *Albizia chinensis*. *J. Nat. Prod.* 72, 632–639.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, 354 p.

- Malan, E., Roux, D.G., 1979. Flavonoids from *Distemonanthus benthamianus* Baillon. Methoxylated flavones and inter-relationships of benthamianin, a [2]-benzopyrano-[4,3-b] [1]-benzopyran. *J. Chem. Soc.* 1, 2696–2703.
- Mc Gaw, L.J., Lall, N., Meyer, J.J.M., Eloff, J.N., 2008. The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. *J. Ethnopharmacol.* 119, 482–500.
- Murai, Y., Kitajima, J., Iwashina, T., 2014. Flavonoids from two alpine *Campanula* species in Japan. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci.* 40, 113–118.
- Ngono Bikobo, D.S., Mosset, P., Abouem, A., Zintchem, A., Atchadé, A.T., Balemaken Missi, M., Mbabi Nyemeck II, N., Pegnyemb, D.E., 2014. Campylopermine, an *N*-hydroxy alkaloid from the leaves of *Campyloperum densiflorum* (Ochnaceae). *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.* 6, 719–728.
- Okunade, L., Elvin-Lewis, M.P., Lewis, W.H., 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry* 65, 1017–1032.
- Ouyang, M.A., Wein, Y.S., Su, R.K., Kuo, Y.H., 2007. Rhusemialins A–C, new cyclolignan esters from the roots of *Rhus javanica* var. *roxburghiana*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 804–807.
- Peterson, L.R., Shanholtzer, C.J., 1992. Tests for bactericidal effects of antibacterial agents: technical performance and clinical relevance. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 420–432.
- Takayuki, M., Tsutomu, Y., Nobuhiro, S., Tsukasa, I., 2012. Phenolic compounds, including novel C-glycosylflavone, from the flowers of the tall bearded *Iris* cultivar 'Victoria Falls'. *Nat. Prod. Commun.* 7, 1591–1594.
- WHO, 2016. Global Tuberculosis Report. Global and Investments Fall Far Short of Those Needed to End the Global TB Epidemic. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_main_text.pdf [accessed 03.05.17].




Antibacterial and cytotoxic activities of undescribed cassiatic acid and other constituents from *Cassia arereh* stem barks

Marius Balemaken Missi, Jean Noel Evina, Auguste Abouem A Zintchem, Natasha October, Angela Bona, Pontsho Moela, Patrick Hervé Betote Diboué, Dominique Serge Ngoni Bikobo & Dieudonné Emmanuel Pegnyemb


To cite this article: Marius Balemaken Missi, Jean Noel Evina, Auguste Abouem A Zintchem, Natasha October, Angela Bona, Pontsho Moela, Patrick Hervé Betote Diboué, Dominique Serge Ngoni Bikobo & Dieudonné Emmanuel Pegnyemb (2022) Antibacterial and cytotoxic activities of undescribed cassiatic acid and other constituents from *Cassia arereh* stem barks, Natural Product Research, 36:17, 4330-4339, DOI: [10.1080/14786419.2021.1981313](https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1981313)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1981313>

 View supplementary material 

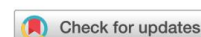
 Published online: 27 Sep 2021.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 129

 View related articles 

 View Crossmark data 



Antibacterial and cytotoxic activities of undescribed cassiatic acid and other constituents from *Cassia arereh* stem barks

Marius Balemaken Missi^{a,b}, Jean Noel Evina^a, Auguste Abouem A Zintchem^{a,c},
Natasha October^b, Angela Bona^b, Pontsho Moela^d,
Patrick Hervé Betote Diboué^{e,f}, Dominique Serge Ngono Bikobo^a and
Dieudonné Emmanuel Pegnyemb^a

^aFaculty of Science, Department of Organic Chemistry, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon; ^bDepartment of Chemistry, University of Pretoria, Hatfield, South Africa; ^cDepartment of Chemistry, Higher Teacher's Training College, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon; ^dDepartment of Biochemistry, Genetics, and Microbiology, University of Pretoria, Hatfield, South Africa; ^eFaculty of Science, Department of Microbiology, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon; ^fCenter for Studies on Medicinal Plants and Traditional Medicine (CRPMT), Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Yaoundé, Cameroon

ABSTRACT

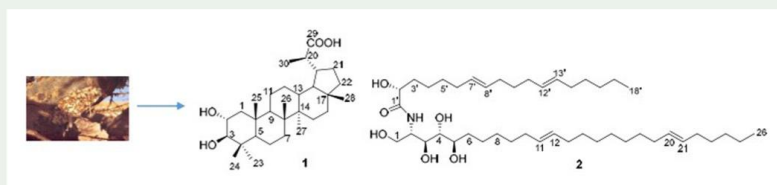
A new lupane-type triterpene, 2 α ,3 β -dihydroxylupan-29-oic acid (**1**), and one new ceramide derivative: (2*S**,2'*R**,3*S**,4*R**,5*R**,7'*E*,11*E*,12'*E*,20*E*)-*N*-[2'-hydroxyoctadeca-6,11-dienoyl]-2-aminohexacos-11,20-diene-1,3,4,5-tetrol (**2**) were isolated from the ethyl acetate fraction obtained from the methanol extract of the stem barks of *Cassia arereh* together with seven known compounds. Their structures were characterized using two-dimensional NMR, mass spectrometry, and compared with reported data. To date, this is the first report of the isolation of a multiple double bonds sphingolipid type (**2**) from this genus. The ethyl acetate extract and selected isolates were examined for antimicrobial and cytotoxic activities *in vitro*. Betulinaldehyde (**5**) has shown to be active against all bacterial strains whereas, cassiatic acid (**1**) and betulinic acid (**6**) have demonstrated to be moderately active. In addition, cassiatic acid (**1**) showed the best cytotoxic result against HeLa and MCF-7 cell lines tested with IC₅₀ 75.00 μ M, while lupeol (**3**) and betulinic acid (**6**) displayed weak cytotoxicity at 100.00 μ M.

ARTICLE HISTORY


Received 11 February 2021
Accepted 11 September 2021

KEYWORDS

Cassia arereh; Fabaceae; cassiatic acid; lupane triterpenoid derivative; cassiaramide; sphingolipid; antimicrobial and cytotoxicity



CONTACT Ngono Bikobo Dominique Serge ✉ ngono_serge@yahoo.fr

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1981313>.

This article has been republished with minor changes. These changes do not impact the academic content of the article.

1. Introduction

Cancer is a life-threatening disease; more than 100 different types of cancers have resulted due to underlying molecular changes within cells (Shahat et al. 2019). It is the second leading cause of death worldwide and accounted for an estimated 9.6 million (or one in six) death in 2018. The World Health Organization (WHO) predicts the number of cancer related deaths to double by 2040 in both developed and developing countries (WHO 2020). Parkin et al. (2014) estimated that 650,000 of 965 million indigenous Africans are diagnosed with cancer annually. In Cameroon, approximately 3273 new cancer cases were detected and in 2018 an estimate of 10,533 mortalities from 15,769 total cases of cancer were reported. Among the different cancer types, breast and cervical cancers remain the most common (WHO 2020). Cervical cancer cells may be vulnerable to grow under the influence of infectious agents such as bacteria, fungi, viruses and parasites. According to a recent study, infection with some particular strains of Human papillomavirus (HPV) is a well-known risk for cervical cancer (Moradi et al. 2017). Breast cancer is an invasive tumor that develops in mammary glands, it is the leading cause of death among women in European countries and low- and middle-income countries (GLOBOCAN 2012). Moreover, the spread of antibiotic-resistant bacteria represents a substantial threat to morbidity and mortality worldwide. Multidrug-resistant infections are being considered by WHO as a global priority to develop new drugs (Tacconelli et al. 2018). Historically, plants have provided a good source of anti-infectious and anti-cancer agents. For this reason, ethnomedical reports are considered of great value in drug discovery (Gezici and Şekeroğlu 2019). The genus *Cassia* (Fabaceae), comprises approximately 600 species, widely used in different communities across the globe to treat various ailments. Its ethnopharmacological values are globally acknowledged as antioxidants which have shown experimentally to neutralize or trap reactive oxygen species. A direct effect of this finding prevents cellular damage caused by the reaction of these species with proteins and nucleic acids (Jacob et al. 2002). *Cassia arereh* is an aesthetics medicinal tree widely distributed in India and Africa (Arbonnier 2004; Olusola et al. 2011). This tree is used in folk medicine and other practices to treat cancer, bacterial infections, diarrhea, dysentery, cough, dermatitis, pneumonia, yellow fever, malaria, rheumatism, and liver diseases. It is also a diuretic, an antipyretic and an analgesic agent, and sought after for its use in religious practices (Arbonnier 2004; Musa et al. 2011; Ngulde et al. 2015). *C. arereh* has shown to be a good source of alkaloids, anthraquinones, carbohydrates, bufadienolides, flavonoids, phenols, saponins, steroids, tannins and terpenoids (De et al. 2009; Ngulde et al. 2010, 2013; Olusola et al. 2011; Akanbi and Nnakaogu 2012; Imam et al. 2013; Ado et al. 2014). Furthermore, prior findings have shown-cased the excellent anticancer and antibacterial properties displayed by *C. arereh* (Ngulde et al. 2015). This finding has prompted our research team to further investigate and extend the anti-cancer and antibacterial potential of a wider selection of *C. arereh* related plant species.

In this present study, we intend to investigate the antibacterial and cytotoxic properties of the phytoconstituents isolated and purified from the EtOAc fraction. This paper describes the isolation and elucidation of various secondary metabolites, which

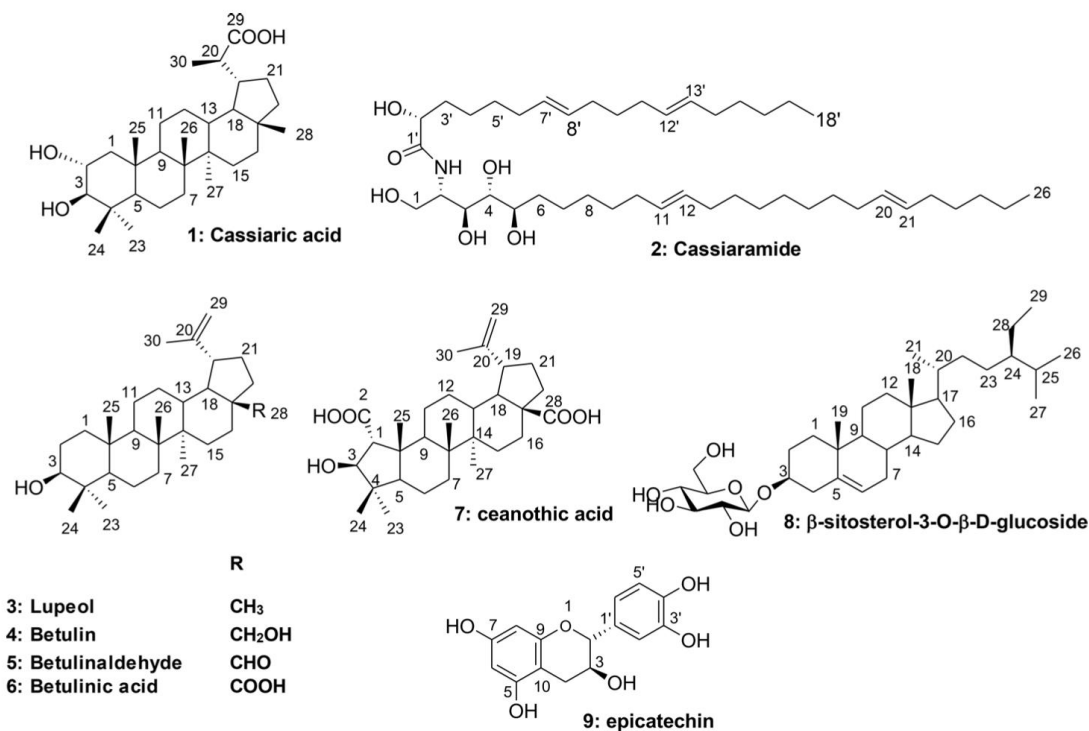


Figure 1. Structures (1–9) of the isolated compounds from *Cassia arereh*.

include a highly unsaturated sphingolipid, from the *Cassia* genus, and bio-evaluation of the antibacterial and cytotoxic potentials of the isolates and extracts.

2. Results and discussion

A proportion of MeOH/H₂O (80:20, v/v) extract, prepared from the dried stem barks of *C. arereh* was partitioned with EtOAc and the resulting portion was repeatedly subjected to column chromatography, to afford two new compounds, 2 α ,3 β -dihydroxylupane-29-oic acid (**1**) and a ceramide derivative, (2S*,2'R*,3S*,4R*,4R*,7'E,11E,12'E,20E)-N-[2'-hydroxyoctadeca-6,11-dienoyl]-2-aminohexacos-11,20-diene-1,3,4,5-tetraol (**2**). Based on spectroscopic analysis and comparison to literature values, the structures of the known compounds were elucidated as lupeol (**3**) (Prakash and Prakash 2012), betulin (**4**) (Chaniad et al. 2019), betulinaldehyde (**5**) (Zhong et al. 1984), betulinic acid (**6**) (Bisoli et al. 2008), ceanothic acid (**7**) (Rambabu et al. 2011), β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside (**8**) (Kojima et al. 1990) and epicatechin (**9**) (Spek et al. 1984) (Figure 1).

Compound **1**, obtained as a white solid, gave a positive result in the Liebermann–Burchard test for triterpenes. It was assigned the molecular formula C₃₀H₅₀O₄ based on HR-ESI-MS at *m/z* 473.3649 [M–H][–] (calcd. for C₃₀H₄₉O₄: 473.3650), indicating six degrees of unsaturation. The ¹H-NMR spectrum of **1** confirmed the characteristic features for a triterpene lupane base skeleton: six tertiary methyl groups at δ_{H} 0.70, 0.75, 0.81, 0.85, 0.86 and 0.97 (each 3H, s, Me-28, Me-24, Me-26, Me-23, Me-27 and Me-25), one secondary methyl at δ_{H} 1.00 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, Me-30), and two carbonylic protons at δ_{H} 3.14 and 3.75 (1H each, bd, H-3 and m, H-2). The methine broad doublet at δ_{H} 3.14 (H-3) coupled to the one at δ_{H} 3.75 (H-2), indicates that the extra hydroxyl group is at position 2 in ¹H-¹H COSY experiment. In addition, we have

noticed the absence of the characteristic lupenyl type proton derivative H_{β} -19 at δ_H 2.38 described for the lupeol derivative compounds (Pereira et al. 1996). For compound **1**, of the isoprenyl moiety has been replaced by an isopropyl group, characterized by the downfield shift of methine H-20 at δ_H 2.57 (1H, m) and the upfield shift of methyl at position 28. The ^{13}C -NMR and DEPT 135 spectra revealed 30 carbon signals. In addition, we unambiguously confirmed the skeleton of **1** to correspond to a lupane triterpenoid class of substructure, using ^1H - and ^{13}C -NMR analysis (see [Supplementary material, Table S1](#)). Thus, instead of observing the characteristic isoprenyl carbons at δ_C 151.9 (C-20) and 110.3 (C-29) respectively, (Pereira et al. 1996; Prakash and Prakash 2012) for the isoprenyl moiety; six quaternary methyl carbons, two oxymethine carbons at δ_C 65.2 and 78.2, and one carboxyl at δ_C 177.1 signals were assigned to the isopropyl group. The signals that correspond to the α and β -hydroxyl groups at C-2 and C-3 were distinctly assigned by comparing their spectral data with literature values (Schmidt et al. 1995; Rungsimakan and Rowan 2014). Firstly, the configurations of these hydroxyl groups were assigned 2α and 3β , based on the absence of interactions between H-2 and H-3 (NOESY), and secondly, by the absence of diaxial spin-spin coupling (small J value of H-3, $J = 2.5$ Hz) which indicates an equatorial position of both protons H-2 and H-3 (Culioli et al. 2003) ([Supplementary material, Figure S15](#)). In the HMBC spectrum, the H-1 proton signal at δ_H 1.46 correlated with carbons C-2 (δ_C 65.2), C-3 (δ_C 78.2), C-5 (δ_C 47.8), and C-10 (δ_C 38.2); proton H-2 at δ_H 3.75 (1H, m) correlated with carbon C-1 (δ_C 42.0) confirming the correct position of these alcoholic methine protons. The position of the carboxylic acid functional group at C-29 was confirmed by the observation on the HMBC spectrum of $^{2,3}J_{\text{C-H}}$ interactions between H-19 at δ_H 1.70 and H-20 at δ_H 2.57 to carbons C-29 (δ_C 177.1) and C-30 (δ_C 17.5); proton H-30 at δ_H 1.00 correlated to carbon C-29 (δ_C 177.1) ([Supplementary material, Figure S14 and Table S1](#)). Moreover, the ^1H - ^1H COSY spectrum of **1** revealed the presence of structural characteristics of C(18)–C(19)–C(20)–C(30) as shown in [Figure S1 \(Supplementary material\)](#). The presence of the carboxyl group attached to C-20 was also supported by the downfield shift observed for H-20 and C-20; thus, the isopropyl moiety in **1** was fully confirmed. The relative configuration of **1** was assigned from the NOESY spectrum ([Supplementary material, Figure S15](#)), in which the correlations from H-3 to H-23/H-27, H-23 to H-27, and H-3 to H-5/H-18 showed that the H-3, H-5, H-18 and two methyl groups (C-27 and C-26) were α -oriented, while the NOESY correlations from H-2 to H-13/H-24/H-25/H-26, H-25 to H-28/30 indicated that the H-2, H-13 and C-24, C-25, C-26, C-28 and C-30 methyl groups were β -oriented (Peng et al. 2019). Subsequently, the structure of **1** was established as shown and proposed the name $2\alpha, 3\beta$ -dihydroxylupan-29-oic acid, for which the trivial name cassiatic acid was suggested.

Compound **2** was isolated as a white amorphous powder. The negative HR-ESI-MS analysis showed a *quasi*-molecular ion at m/z 718.6014 $[\text{M}-\text{H}]^-$, consistent with the formula $\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_6$ (calcd. for $\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_6$: 718.6017), which accounted for five degrees of unsaturation. The IR spectrum showed the presence of hydroxyl (3331 cm^{-1}), amide (1622 and 1544 cm^{-1}) and methylene (722 cm^{-1}) groups in the molecule ([Figure 1](#)). A broad shoulder-like band, which appeared at the higher frequency (1067 and 1022 cm^{-1}), as opposed to carbonyl absorption which appeared at 964 cm^{-1} ,

corresponded to a *trans* carbon-carbon double bond (Svatos and Attygalle 1997). Subsequently, the structure was fully elucidated by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The ^{13}C NMR spectrum revealed a signal at δ_{C} 51.4 (C-N) and a carbonyl signal at δ_{C} 175.6, suggesting the presence of an amide group. The ^1H NMR spectrum (Supplementary material, Table S2) of **2** indicated a broad signal in the range of δ_{H} 1.28–2.02 (m, CH_2 group) and a triplet at 0.89 (6H; $J=6.7$ Hz, two-terminal Me groups, Me-26 and Me-18') assigned to two long aliphatic chains. A signal at δ_{H} 5.40 (8H, m) suggested a double bond of olefinic protons. Hence, amongst the five unsaturations of **2**, four of them could unambiguously be assigned to the olefinic double bonds and the last one to the carbonyl group. Finally, the presence of four oxygenated methines (δ_{H} 3.52, 3.54, 3.56 and 4.04; δ_{C} 72.0, 72.1, 74.9 and 71.6 respectively) in compound **2** was consistent with the structure of a ceramide (Sharma et al. 2014; Khedr et al. 2018). Also, in agreement with the above-mentioned structure, we observed the characteristic peak of an oxymethylene at δ_{H} 3.77 (H-1) correlating in the HSQC spectrum with a carbon at δ_{C} 60.8 and a signal at δ_{H} 7.38 (d, $J=8.0$ Hz), identified as an amide hydrogen due to the absence of correlation in the HSQC spectrum. Moreover, the assignments of various protons and carbons in the NMR spectra were based on ^1H - ^1H COSY and HMBC (Supplementary material, Figures S21 and S24) experiments. The COSY spectrum revealed coupling for the methine attached to the nitrogen at δ_{H} 4.12 (H-2) with the oxymethylene at δ_{H} 3.77 (H-1), the oxymethine at δ_{H} 3.56 (H-3) and nitrogen proton at δ_{H} 7.38 (N-H) respectively. The positions of the hydroxyl groups were confirmed based on the HMBC spectrum in which the proton of oxymethine signal at δ_{H} 3.56 (H-3) showed correlations with the carbon signals at δ_{C} 72.0 (C-4) and 72.1 (C-5). Methine signal at δ_{H} 4.12 (H-2) exhibited correlations with the carbonyl at δ_{C} 175.6 (C-1'); moreover, the HMBC correlation between the proton signal at δ_{H} 4.04 (H-2') and the carbonyl at δ_{C} 175.6 (C-1') confirmed the presence of a α -hydroxylated long-chain fatty acid. The position of the double bond in the alkenyl side chain was deduced from mass spectral analysis of the corresponding α,β -bis-methyl thiolated derivatives, which showed distinct characteristic fragments on electron bombardment (Supplementary material, Figures S2 and S27). In addition a, the presence of double bonds was supported by two ethylenic carbon values at δ_{C} 129.9 and 130.4. In this case, the derivatization reaction led to methyl thiolated derivatives, which mass spectrum showed two fragments at m/z 131 (cleavage between C(12') and C(13'), as well as between C(20) and C(21), respectively) and m/z 199 (C(7') and C(8')), indicative of the presence of double bonds separated by three or several methylene groups. The above evidence was further supported by HMBC (Figure 2): cross-peaks of the olefinic protons at δ_{H} 5.40 with a carbon atom at δ_{C} 32.3 and 32.4 (C-10, C-13, C-19 and C-22) on the one hand, and between unsaturated adjacent methylene protons at δ_{H} 1.97 and 2.02 with olefinic carbons at δ_{C} 129.9 and 130.4 on the other. The double bonds were determined to be *trans*, according to the chemical shifts of allyl carbons at δ_{C} 32.3 and 32.4 (Ngono et al. 2011; dos Santos et al. 2012). Despite the double bond at position 11 of sphingosine moiety not demonstrating through dimethyl disulfide (DMDS) derivative reaction, the occurrence of *trans* olefinic double bond predominates at this position for long alkyl chain (Hay and Morrison 1973). This was confirmed by HMBC spectrum in which H-8 (δ_{H} 1.31) correlated with C-6 (δ_{C} 31.9) and C-10 (δ_{C}

32.4), thus, verifying the aforementioned assertion. While the stereochemistry of chiral centers has already been established in molecules (Honda et al. 1991), the comparison was made with analogous compounds (dos Santos et al. 2012). The NOESY correlation (Supplementary material, Figure S26) observed between H-2' (δ_{H} 4.04) and H-2 (δ_{H} 4.12), and H-2 and H-4 (δ_{H} 3.52) indicated the common orientation on the same side of the molecule for these protons. Thus, the relative stereochemistry for the stereocenters C-2, C-2', C-3, C-4 and C-5 was presumed to be $2S^*$, $2'R^*$, $3S^*$, $4R^*$ and $5R^*$, respectively and also confirming the presence of a long-chain base and a α -hydroxylated long-chain fatty acid in **2**. Additionally, a comparison with literature data of natural sphingamines (Nana et al. 2012; Tian et al. 2014) led to the conclusion that the optical rotation, $[\alpha]_{\text{D}} = +16.9^\circ$ supported the (2*S*,2'*R*,3*S*,4*R*) configuration. The 1,3,4,5 tetrahydroxylated long-chain base was confirmed by the ion at m/z 440 ($\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{NO}_4$). Methanolysis of **2** produced only one fatty acid methyl ester, which was identified by LC-MS (APCI and UPLC). The MS showed one *pseudo* molecular ion peak $[\text{M} + \text{H}]^+$ at m/z 311.1715 (calcd. 311.1884) confirmed as methyl 2-hydroxy-octadeca-7,12-dienoate. Furthermore, the molecular formula was confirmed by the fragment ions peaks at $m/z = 166, 252, 279, 382, 440$ and 649 in its UPLC (Supplementary material, Figure S2). In conclusion, compound **2** was established to be (2*S**,2'*R**,3*S**,4*R**,5*R**,7'*E*,11*E*,12'*E*,20*E*)-*N*-[2'-hydroxyoctadeca-7,12-dienoyl]-2-aminohexacos-11,20-diene-1,3,4,5-tetrol (**2**), for which the trivial name cassiaramide was proposed. To the best of our knowledge, there is no evidence in the literature concerning research done on this type of ceramide, making this study the first report to conduct a detailed investigation of the isolation and characterization of this compound.

The antibacterial activities of three isolated compounds and the crude MeOH extract against

Gram-negative bacteria are summarized in Table S3 (Supplementary material). All three triterpenes tested displayed variable antibacterial activity. The presence of polar substituents in positions 2, 17 and 20 led to the loss of inhibitory potency as exemplified in compounds **1** (which is the most polar triterpene) and **6** (which comes second in terms of polarity) with MICs values ranging between 31.25 and 62.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Both exhibited moderate activity against all microorganisms and these results are in accordance with the published data, reported by Vázquez et al. (2012). In this research he highlighted the antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes with MIC values ranging from 64 – 1088 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against similar microorganisms. The presence of aldehyde substituent at the C-17 position (less polar than acidic substituent) in **5** may lead to an increased activity (Supplementary material, Table S3), verifying the findings in previous studies which demonstrated that the good inhibitory effects observed may be attributed to the presence of less polar substituents on triterpenes of this class, evaluated against the similar microorganisms (Selm and Litinas 2015; Gossan et al. 2016). Evident from the MBC/MIC ratio values and according to the findings proposed by Fauchère (2002), we concluded that compounds **1** and **6** showed bactericidal effect ($1 \leq \text{MBC}/\text{MIC} \leq 2$) against all the strains assessed, while compound **4** and the crude extract displayed either bactericidal or bacteriostatic effects ($4 \leq \text{MBC}/\text{MIC} \leq 16$). However, we cannot fully explain the mode of action of antimicrobial activity of these triterpenes. For triterpenoids containing an aldehyde function, only the pharmacologic

activity has been established, demonstrating their high toxicity effect (O'Brien et al. 2005), however concrete reasoning for their molecular mechanism of action could not be proposed. The cytotoxic activities of **1**, **3**, **6**, **7** and **9** were evaluated against the two human cancer cell lines (HeLa and MCF-7) at different concentrations by means of MTT method (Mosmann 1983); compounds **2**, **4**, **5** and **8** were excluded from the evaluation in this study due to their low amounts. Compound **1** exhibited the best cytotoxic activity against HeLa and MCF-7 cell lines compared to other tested compounds. As shown in Figure S4 (Supplementary material), compound **1** displayed moderate cytotoxicity against all cell lines tested, with IC_{50} value $75.00 \mu\text{M}$. Compounds **3** and **6** showed weak or were inactive ($IC_{50} \geq 100 \mu\text{M}$) against the same cancer cell lines. Although previous studies of lupane-type triterpenes such as betulin, betulinic acid and lupeol showed a range of moderate to good bioactivities against various cancer cell lines (lung, liver, stomach, colorectal and breast cancers) (Cháirez-Ramírez et al. 2016), our findings reveals a more superior cytotoxic inhibitory activity of isolated triterpenes (**1**, **3** and **6**) than the those reported. Possible reasoning for this observation, could be due to these inhibitors perturbing the cell cycle and inducing apoptotic cell death in cancer cells (Rajavel et al. 2017). A lack of cytotoxic activity against MCF-7 cell lines at concentrations below $100 \mu\text{M}$ and HeLa cell lines at $75 \mu\text{M}$ was noted for compounds **7** and **9**. Percentage of living cells (cell viability) present after treatment with the tested compounds at different concentrations are given in Figures S4 and S5 (Supplementary material) and show an example of three replicate of MCF-7 cell viability data for compound **6** at different concentrations. Cell viabilities were converted from absorbances of formazan formed after MTT treatment. It is clear that cell viability decreased as the concentration of test compounds increased.

3. Experimental (in supplementary data)

4. Conclusion

Two new compounds cassiatic acid (**1**) and cassiaramide (**2**) were isolated from *Cassia arereh*. Our findings suggest that most of the isolated compounds may have originated from lupane triterpene derivatives. Even though, triterpenes of this type have been isolated from several *Cassia* species as mentioned before, except for ceanothic acid, the isolation of C-29 acid triterpenes and ceramides from *Cassia* genus have never been reported. Thus, our study revealed unambiguously the isolation of triterpenes as major components from *Cassia* genus.

Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. We are indebted to Dr Mamoalosi Selepe and Adetola Adewole for NMR and technical assistance and to Mr Victor Nana (National Herbarium of Cameroon) for the botanical identification.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The study was partly funded by the South African Medical Research Council Self-Initiated Research (SAMRC), grant number: A1A979, and the National Research Foundation Thuthuka (grant No. 113980).

References

- Ado KGS, Salihu L. 2014. Fundulopanchax gardneri Test: A Convenient Method of Bioassay for Active Constituents of Natural Products. *Nat Prod Chem Res.* 2:4. DOI: [10.4172/2329-6836.1000133](https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000133)
- Akanbi BO, Nnakaogu CJ. 2012. Phytochemical screening and antimicrobial property of *Cassia arereh*. *Researcher.* 4:96–100.
- Arbonnier M. 2004. *Trees, shrubs and lianas of West African Dry Zones*, CIRAD Margraf publishers GMBH MNHN, Côte d'Ivoire.
- Bisoli E, Garcez WS, Hamerski L, Tieppo C, Garcez FR. 2008. Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum*. *Molecules.* 13(11):2717–2728.
- Cháirez-Ramírez MH, Moreno-Jiménez MR, González-Laredo RF, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzmán NE. 2016. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: a review. *EXCLI J.* 15:758–771.
- Chaniad P, Sudsai T, Septama AW, Chukaew A, Tewtrakul S. 2019. Evaluation of anti-HIV-1 integrase and anti-inflammatory activities of compounds from *Betula alnoides* Buch-Ham. *Adv Pharmacol Sci.* 2019:2573965..
- Culioli G, Mathe C, Archier P, Vieillescazes C. 2003. A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia sp.*, Burseraceae). *Phytochemistry.* 62(4):537–541.
- De N, Maori L, Ardo H. 2009. A study on antimicrobial effect of extracts of *Cassia arereh* (Del.) on some clinical isolates. *J Med Plants Res.* 3:116–119.
- dos Santos EO, Meira M, do Vale AE, David JM, de Queiróz LP, David JP. 2012. Isolation and Characterization of New Ceramides from Aerial Parts of *Lepidaploa Cotoneaster*. *Nat Prod Commun.* 7(6):781–783.
- Fauchère J-L. 2002. *Bactériologie générale et médicale*, Editions Ellipses/Broché : Editions Ellipses: Paris.
- GLOBOCAN. 2012. International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- Gossan DP, Alabdul Magid A, Yao-Kouassi PA, Josse J, Gangloff SC, Morjani H, Voutquenne-Nazabaioko L. 2016. Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from the roots of *Combretum racemosum*. *Fitoterapia.* 110:89–95.
- Gezici S, Şekeroğlu N. 2019. Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. *ACAMC.* 19(1):101–111.
- Hay JD, Morrison WR. 1973. Positional isomers of cis and trans monoenoic acids from ox (steer) perinephric fat. *Lipids* 8:94–95.
- Honda M, Ueda Y, Sugiyama S, Komori T. 1991. Synthesis of a new cerebroside from a *Chondropsis sp.* Sponge. *Chem Pharm Bull.* 39(6):1385–1391.
- Imam H, Abd Alla AEWH, Yagi Abd Alla SM. 2013. Evaluation of the larvicidal, antiplasmodial and cytotoxicity properties of *Cassia arereh* Del. Stem Bark. *Europ J Med Plants.* 1:78–87.
- Jacob DL, Odeh SO, Otsapa PBL. 2002. Preliminary *in vivo* studies of the anti-ulcer effects of the crude seed and leaves extracts of *Cassia occidentalis* in albino Wistar rats. *J Med Trop.* 2: 15–18.

- Khedr AIM, Ibrahim SRM, Mohamed GA, Yamada K, Ross SA. 2018. Panduramides A-D, new ceramides from *Ficus pandurata* fruits. *Phytochem Lett.* 23:100–105.
- Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H. 1990. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry.* 29(7):2351–2355.
- Moradi S, Hasani MT, Darvish L, Roozbeh N. 2017. Evaluating cervico vaginal infections and cervical cancer in women with low socioeconomic levels. *Iran J Public Health.* 46:867–868.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2):55–63.
- Musa SM, Abdelrasool FE, Elsheikh EA, Ahmed LAMN, Mahmoud ALE, Yagi SM. 2011. Ethnobotanical study of medicinal plants in the Blue Nile State, South-eastern Sudan. *J Med Plants Res.* 17:4287–4297.
- Nana F, Sandjo LP, Keumedjio F, Ambassa P, Malik R, Kuete V, Rincheval V, Choudhary MI, Ngadjui BT. 2012. Ceramides and cytotoxic constituents from *Ficus glumosa* Del. (Moraceae). *J Braz Chem Soc.* 23(3):482–487.
- Ngono BD, Nkot JL, Mosset P, Atchade AT, Ndongo JT, Pemha R, Pegnyemb DE. 2011. Acylsteryl glycosides and other constituents from *Campylospermum densiflorum* (Ochnaceae). *Rasayan J Chem.* 4:753–763.
- Ngulde SI, Sandabe UK, Hussaini IM. 2015. Ethnobotanical survey of anticancer plants in Askira/Uba local government area of Borno State, Nigeria. *Afr J Pharm Pharmacol.* 5:123–130.
- Ngulde SI, Sanni S, Sandabe UK, Sani D. 2010. Phytochemical and antimicrobial screening of the aqueous extract of *Cassia arereh* Del. stem-bark. *Afr J Pharm Pharmacol.* 8:530–534.
- Ngulde SI, Tijjani MB, Ihopo JM, Ya'uba AM. 2013. Antitrypanosomal Potency of Methanol Extract of *Cassia arereh* Delile Root Bark in Albino Rats. *Int J Drug Res Technol.* 1:1–7.
- O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. 2005. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol.* 35(7):609–662.
- Olusola A, Olutayo O, Afolayan M, Olakunle F, Edah AO. 2011. Elemental analysis and anti-microbial potentials of the leaf extract of *Cassia arereh* Del. *Int. Res. J. Pharm. Pharmacol.* 8: 188–193.
- Parkin DM, Bray F, Jemal J, Ferlay A. 2014. Cancer in Africa 2012. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 23(6):953–966.
- Peng W, Huo G, Zheng L, Xiong Z, Shi X, Peng D. 2019. Two new oleanane derivatives from the fruits of *Leonurus japonicas* and their cytotoxic activities. *J Nat Med.* 73:252–256.
- Pereira FBM, Domingues FMJ, Silva AMS. 1996. Triterpenes from *Acacia dealbata*. *Nat Prod Lett.* 8(2):97–103.
- Prakash CVS, Prakash I. 2012. Isolation and structural characterization of lupane triterpenes from *Polypodium Vulgare*. *Res J Pharmaceutical Sci.* 1:23–27.
- Rajavel T, Mohankumar R, Archunan G, Ruckmani K, Devi KP. 2017. Beta sitosterol and Daucosterol (phytosterols identified in *Grewia tiliaefolia*) perturbs cell cycle and induces apoptotic cell death in A549 cells. *Sci Rep.* 7(1):3418.
- Rambabu P, Ganapaty S, Ramana VS. 2011. Isolation and characterization of triterpenes from *zizyphus glabrata*. *Int J Chem Sci.* 9:1014–1024.
- Rungsimakan S, Rowan MG. 2014. Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. *Phytochemistry.* 108:177–188.
- Schmidt J, Himmelreich U, Adam G. 1995. Brassinosteroids, sterols and lup-20(29)-en-2 α ,3 β ,28-triol from *Rheum rhabarbarum*. *Phytochemistry.* 40(2):527–531.
- Svatos A, Attygalle AB. 1997. Characterization of vinyl-substituted, carbon-carbon double bonds by GC/FT-IR analysis. *Anal Chem.* 69(10):1827–1836.
- Selm YA, Litinas KE. 2015. Cytotoxic and antimicrobial activities of two new triterpenoids from the peels of local Egyptian *Malus domestica* L. *J Chil Chem Soc.* 60(2):2896–2899.
- Shahat AA, Hidayathulla S, Khan AA, Alanazi AM, Al Meanazel OT, Alqahtani AS, Alsaied MS, Hussein AA. 2019. Phytochemical profiling, antioxidant and anticancer activities of *Gastrocotyle hispida* growing in Saudi Arabia. *Act Tropic.* 191:243–247.

- Sharma S, Chattopadhyay SK, Singh M, Bawankule DU, Kumar S. 2014. Novel chemical constituents with anti-inflammatory activity from the leaves of *Sesbania aculeate*. *Phytochemistry*. 100:132–140.
- Spek AL, Kojić-Prodić B, Labadie RP. 1984. Structure of (–)-epicatechin: (2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol, C₁₅H₁₄O₆. *Acta Crystallogr C Cryst Struct Commun*. 40(12):2068–2071.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, et al. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 18(3): 318–327.
- Tian XR, Tang HF, Feng JT, Li YS, Lin HW, Fan XP, Zing X. 2014. Neritinaceramides A–E, New ceramides from the marine bryozoan *Bugula neritina* inhabiting South China sea and their cytotoxicity. *Mar Drugs*. 72:1987–2003.
- Vàzquez LH, Palazon J, Navarro-Ocana A. 2012. The pentacyclic triterpenes α , β amyryns: a review of sources and biological activities. In: Rao W, editor. *Phytochemicals – a global perspective of their role in nutrition and health*. edited by Venketeshwer Rao published by InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. pp. 487–502.
- World Health Organization, WHO. 2020., Report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. World Health Organization.
- Zhong SM, Waterman PG, Jeffreys JAD. 1984. Naphthoquinones and triterpenes from african *Diospyros* species. *Phytochemistry*. 23(5):1067–1072.