

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION DES
ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET PHYTOTOXIQUE
DE L'EXTRAIT AU METHANOL ET DES METABOLITES
SECONDAIRES ISOLES DES TIGES ET DES
FEUILLES DE THECACORIS CF. ANNOBONAE
(EUPHORBIACEAE)**

Doctorat/PhD. en Chimie Organique

Par :

GUEDEM NKAPWA Alphonsine
DEA en Chimie Organique

Sous la direction
NGADJUI TCHALEU Bonaventure
Professeur

Année Académique
2013-2014





AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : biblio.centrale.uyi@gmail.com

WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: biblio.centrale.uyi@gmail.com

DEDICACE

Je dédie affectueusement ce travail à :

Mes parents Mr et Mme NKAPWA

Mes enfants : A.V. NKAPWA;

A. D. BOGNE;

J.G.YEPMEGNI.

Mes frères et soeurs C. CHELO ; A. DJOKEPSEU; R. DZEUTIEU; P. GEUDJA; C.

YIEPMOU ; B.NKAPWA ; D. TCHOUAMOU et J. KOUATCHO

Mon époux P. A. TCHUEMBOU

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent

Au Professeur B. T. NGADJUI de l'Université de Yaoundé I, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche à qui j'adresse toute ma gratitude pour son attention, son sens de rigueur et sa disponibilité pour le suivi de ce travail.

Au Professeur A. E. NKENGFACK, Chef de Département de Chimie Organique de la faculté des sciences de l'Université de Yaoundé I, pour les efforts qu'il consent à la bonne marche du Département et pour sa disponibilité.

Aux Professeurs B. M. ABEGAZ de l'Université du Botswana et H. LAATSCH de l'Université de Göttingen pour avoir accordé les facilités dans l'enregistrement des spectres des composés isolés.

Au Dr J. C. Liermann de l'Université de Mainz pour avoir permis l'enregistrement des spectres de RMN de l'imidazole.

A tous les enseignants du Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I pour les enseignements qu'ils m'ont dispensés.

A Toute l'équipe de recherche du Professeur Y.SHIONO de l'Université de Yamagata (Japon) ainsi qu'à celle du Dr V.KUETE de l'Université de Dschang (Cameroun) pour les tests biologiques qu'ils ont réalisés.

Aux Professeurs S. F. KOUAM, D. W. G. KAPCHE, F. F. KEUMEDJIO ainsi qu'aux Docteurs B. NGAMENI, P. SONNA, T. TABOPDA, I. K. SIMO, R. METUNO, C. C. F. SIMO, A.V. B. S. DJOUMESSI pour les encouragements qu'ils m'ont donnés.

Au Docteur P. L. SANDJO pour l'enregistrement des spectres de certains composés et aussi pour les contributions scientifiques qu'il a apportées dans la réalisation de ce travail.

Au Docteur H. M. P. POUMALE pour m'avoir accordé son attention, son temps précieux pour la réalisation de cette thèse et pour l'enregistrement des spectres de certains composés.

Aux Docteurs P. AMBASSA, G. W. FOTSO, R. T. KENGAP pour les corrections qu'ils ont apportées à la rédaction de cette thèse.

Au Docteur F. NANA pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté dans la réalisation de cette thèse.

A tous mes camarades de promotion pour les discussions constructives que nous avons eues.

A tous les Etudiants-Chercheurs de l'équipe de recherche du Professeur B. T. NGADJUI pour leur esprit de collaboration, d'entraide et pour les moments que nous avons partagés ensemble. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

A Monsieur V. NANA de l'Herbier National du Cameroun pour l'aide qu'il m'a accordée dans l'identification et la récolte du matériel végétal.

A mon beau-frère R. M. K. DOMGA pour avoir scanné les spectres et m'accordé son temps pour la réalisation de cette thèse en dépit de ses multiples occupations.

A J. S. APHOKENG pour les encouragements et les conseils qu'elle n'a jamais cessé de porter à mon endroit pour ma réussite.

A mon père J. NKAPWA et à ma mère M. YEPMEGNI pour leur encouragement profond dans l'éducation de l'enfant et l'inébranlable attachement à ses principes fondamentaux qui ont été pour moi un exemple révélateur d'amour, qu'ils trouvent ici le fruit de leurs sacrifices énormes.

A mes frères et sœurs C. CHELO ; A. DJOKEPSEU; R. DZEUTIEU; P. GEUDJA; C. YIEPMOU ; B.NKAPWA ; D. TCHOUAMOU et J. KOUATCHO pour leurs complicités, conseils et encouragements.

A mon époux P. A. TCHUEMBOU dont la présence à mes côtés constitue un réel soutien moral et affectif, qu'il soit rassuré de ma profonde sympathie et gratitude.

TABLE DE MATIERES

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES . i	
DECLARATION	xv
DEDICACE	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
TABLE DE MATIERES	xix
RESUME	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES	xxvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxix
LISTE DES SCHEMAS	xxxi
LISTE DES FIGURES	xxxii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I :	
REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
I.2-REVUE DE LA LITTERATURE.....	6
I.2.1-Aperçu botanique	6
I.2.1.1-Généralités sur les Euphorbiaceae.....	6
I.2.1.2-Généralités sur le genre <i>Thecacoris</i>	6
I.2.1.3-Aperçu botanique sur <i>Thecacoris cf. annobonae</i>	7
I.2.1.4-Localisation géographique du genre <i>Thecacoris</i>	8
I.2.2-Quelques usages des espèces de la famille des Euphorbiaceae.....	9
I.2.2.1-Usages industriels et alimentaires.	9
I.2.2.2-Usages thérapeutiques.	9
I.2.3-Travaux chimiques antérieurs sur les plantes de la famille des Euphorbiaceae.	11
I.2.3.1-Les Alcaloïdes	11
I.2.3.2 -Les coumarines.....	13
I.2.3.3- Les acides gras	15
I.2.3.4-Les flavonoïdes	17
I.2.3.5-Les Stéroïdes	19
I.2.3.6-Les composés aromatiques et Lignanes.....	22
I.2.3.7-Les terpenoides.....	25
I.3-APERCU SUR LES MALADIES CIBLEES	41
I.3.1-Les infections microbiennes	41

I.3.2-Les bactéries	41
I.3.3-Les champignons	42
I.3.4-Les antibiotiques: la chimiothérapie antibactérienne et antifongique.....	42
I.3.5-La tuberculose.....	45
I.3.5.1-Définition et Epidémiologie.....	45
I.3.5.2-Symptômes.....	45
I.3.5.3-Diagnostic	46
I.3.5.4-Traitement clinique.....	46
I.3.5.5-Coinfections	48
CHAPITRE II	
RESULTATS ET DISCUSSION	49
II.1-ETUDE PHYTOCHIMIQUE.....	50
II.1.1-Matériau végétal.....	50
II.1.1.1- Tiges et feuilles de <i>Thecacosia annobonae</i>	50
II.1.2-Préparation de l'extrait brut et isolement des produits	50
II.1.2.1-Extraction des tiges de <i>T.annobonae</i>	50
II.1.2.2-Extraction des feuilles de <i>T.annobonae</i>	52
II.1.2.3-Extraction des feuilles de <i>T.annobonae</i> de la seconde récolte	54
II.2-CARACTERISATION DES COMPOSES ISOLES DE T.ANNOBONAE.....	57
II.2.1-Les dérivés phénanthréniques	57
II.2.1.1- Identification de TCA ₁₀ /TCAF ₂ ou acide aristolochique I (114).....	57
II.2.1.2-Identification de TCA ₁₁ ou acide aristolochique méthyle ester (116).	64
II.2.2-Les triterpènes pentacycliques.....	69
II.2.2.1-Détermination de la structure de TCAF ₄ ou 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (117).....	69
II.2.2.2-Identification de TCA ₂ ou bétuline (121).....	81
II.2.2.3-Identification de TCAF ₉ ou lupeol (122).....	84
II.2.2.4. Identification de TCAF ₁₃ ou 16-hydroxylupéol (123).....	86
II.2.2.5 - Identification de TCAF ₃ ou acide bétulinique (124).	88
II.2.2.6 - Identification de TCA ₆ /TCAF ₁ ou friedeline (125).....	92
II.2.2.7-Identification de TCAF ₈ ou friedelane(126).....	96
II.2.2.8-Identification de TCA ₈ ou friedelan-3β-ol (127).	97
II.2.2.9-Identification de TCA ₇ ou acétate de taraxéryle (128).	100
II.2.3-Les acides phénoliques.....	103

II.2.3.1-Identification de TCA ₄ ou acide 4'- acetoxy-3-méthoxybenzoïque (129). ...	103
II.2.3.2-Identification de TCA ₃ , TCAF ₁₀ ou acide vanilique (131).	106
II.2.4-Les stéroïdes	109
II.2.4.1-Identification de TCA ₁ /TCAF ₇ ou β-sitostérol (132).....	109
II.2.4.2- Identification de TCA ₅ / TCAF ₁₁ / ou 3-O-β-D-glucopyranoside de β-sitostérol (133).....	111
II.2.5-Identification de TCA ₁₂ ou bis (2-éthyl hexyle) phthalate (134).	115
II.2.6-Les flavonoides.....	117
II.2.6.1-Identification de TCAF ₅ ou alpinumisoflavone (135).....	117
II.2.6.2-Identification de 4'-O-méthyl alpinumisoflavone (136)	121
II.2.7-Identification de l'imidazole (137).	124
II.3-EVALUATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES	132
II.3.1-Activités antimycobactérienne, antibactérienne et antifongique de l'extrait au méthanol et de quelques composés isolés des tiges de <i>T annobonae</i>	132
II.3.2-Evaluation des activités antimicrobiennes et phytotoxique de quelques composés isolés des feuilles de <i>T. annobonae</i>	136
II.3.2.1-Evaluation des activités antibactérienne et antifongique de quelques composés isolés des feuilles de <i>T.annobonae</i>	136
II.3.2.2- Evaluation de l'activité phytotoxique de quelques composés isolés des feuilles de <i>T. annobonae</i>	138
CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION.....	140
CHAPITRE III	
METHODOLGIE.....	155
III.1-APPAREILLAGE ET MATERIEL VEGETAL	156
III.1.1-Appareillage	156
III.1.2-Materiel végétal.....	157
III.2-EXTRACTION ET ISOLEMENT DES PRODUITS	157
III.2.1-Tiges de <i>theacoris annobonae</i>	157
III.2.2-Feuilles de <i>theacoris annobonae</i>	159
III.2.3-Feuilles de <i>theacoris annobonae</i> issues de la seconde recolte.....	161
III.3-ACTIVITES ANTIMYCOBACTERIENNE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE DE L'EXTRAIT AU METHANOL ET DE QUELQUES COMPOSES ISOLES DES TIGES DE T. ANNOBONAE.	163
III.3.1-Materiel et methodes	163

III.3.1.1-Matériel	163
III.3.1.2-Méthodes	165
III.4-ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET PHYTOTOXIQUE DE QUELQUES COMPOSES ISOLEES DES FEUILLES DE <i>T. ANNOBONAE</i>.....	168
III.4.1-Activités antibactérienne et antifongique de quelques composés isolés des feuilles de <i>T. annobonae</i>	168
III.4.1.1- Espèces microbiennes	168
III.4.1.2- Méthodes et milieux de culture.....	168
III.4.2-Activité phytotoxique de quelques composés isolés des feuilles de <i>T. annobonae</i>	169
BIBLIOGRAPHIE	170
ANNEXE.....	184
I- TESTS CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLEES	185
II-LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE.....	186

RESUME

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et les propriétés pharmacologiques de l'extrait méthanolique et de certains métabolites secondaires isolés des tiges et des feuilles de *Thecacoris cf. annobonae* (Euphorbiaceae).

C'est ainsi que des tiges et des feuilles de *T. annobonae*, nous avons isolé par des méthodes chromatographiques usuelles (CC, Chromatographie flash) vingt composés dont les structures de dix-neuf ont été élucidées grâce aux techniques spectroscopiques de RMN à 1D et 2D (RMN¹H, RMN¹³C, DEPT, HMBC, HMQC, COSY), la spectroscopie de masse, l'IR, l'UV et les RX. La structure du vingtième composé est en cours d'élucidation. Parmi ces composés deux sont décrits ici pour la première fois. Il s'agit d'un nortriterpène : Le 30-nor-lup-20-en-28-oate de méthyle et un imidazole: Le (2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidène) acétonitrile. L'acide aristolochique I et l'acide aristolochique méthyl ester sont isolés ici pour la première fois d'un genre autre qu'*Aristolochia*. Les quinze autres composés obtenus se subdivisent en huit triterpènes pentacycliques : La bétuline, la friedeline, l'acétate de taraxéryle, le friedelan-3 β -ol, l'acide bétulinique, le friedelane, le lupéol, et le 16-hydroxylupéol ; deux stéroïdes : Le β -sitostérol et le 3-O- β -D-glucopyranoside de β -sitostérol ; deux flavonoides : L'alpinumisoflavone et le 4'-O-méthyl alpinumisoflavone ; deux acides phénoliques : L'acide vanilique et l'acide 4-acétoxy-3-méthoxybenzoïque et un phthalate: Le bis (2-éthyl hexyl) phthalate.

L'extrait au méthanol des tiges ainsi que certains composés isolés des tiges de *T. annobonae*, à savoir : L'acide aristolochique I, l'acide aristolochique méthyl ester, l'acide vanilique, l'acide 4-acétoxy-3-méthoxybenzoïque et le friedelan-3 β -ol ont été évalués pour leurs activités antimycobactérienne, antibactérienne et antifongique par les méthodes de MABA (Microplate Alamar Blue Assay) et de microdilution sur quatorze espèces de microorganismes. Nous avons déterminé les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Microbicides (CMM). Il en ressort que l'extrait au méthanol des tiges et l'acide aristolochique I sont capables d'inhiber la croissance de tous les microorganismes testés, à savoir : Les mycobactéries, les champignons et les bactéries Gram-positifs et bactéries Gram-négatifs avec des CMI comprises entre 9,76 et 312,50 μ g/ml. Tous les deux montrent également une forte activité microbicide sur tous les microorganismes testés avec des CMM comprises entre 19,53 et 312,50 μ g/ml. De plus, l'acide aristolochique I inhibe totalement l'activité du proton médié par l'enzyme H⁺-ATPase d'*Escherichia coli* lorsqu'il est testé aux valeurs de CMI. Le friedelan-3 β -ol, l'acide 4-acétoxy-3-méthoxybenzoïque, l'acide aristolochique méthyl ester et

l'acide vanilique quant à eux sont inactifs sur les mycobactéries et ont montré une activité sélective variant de modéré à faible sur les bactéries et les champignons.

Certains composés isolés des feuilles de *T.annobonae* à l'instar du 30-nor-lup-20-en-28-oate de méthyle, l'acide bétulinique, la friedeline, l'acide aristolochique I l'alpinumisoflavone et la 4'-O-méthyl alpinumisoflavone ont été également testés pour leurs activités antimicrobienne et phytotoxique par la méthode de diffusion sur gélose et par le test de croissance des jeunes plantes de salades sur neuf espèces de microorganismes. Les résultats que nous avons obtenu de l'activité antimicrobienne ont montré que le dérivé nouveau le 30-nor-lup-20-en-28-oate de méthyle présente une forte activité antimicrobienne sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Mucor miehei*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus subspicatus* avec la zone d'inhibition de croissance comprise entre 10 et 16 mm. Les autres composés ont montré une faible activité sur *Streptomyces viridochromogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* respectivement. L'évaluation phytotoxique de ces mêmes composés a montré que tous les six inhibent la croissance des racines des salades à la concentration de 100 µg/ml.

Mots clés : *Thecacoris annobonae* ; acide aristolochique I ; 30-nor-lup-20-en-28-oate de méthyle ; (2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidène) acétonitrile; Activités antimicrobienne, algicide et phytotoxique.

ABSTRACT

The present work describes the phytochemical study of *Thecacoris cf. annobonae* (Euphorbiaceae), together with the antimicrobial and phytotoxicity screenings of its methanolic extract and some isolated compounds.

Using chromatographic methods, twenty compounds were isolated from the twigs and leaves of *T. annobonae*, and the structure of nineteen were elucidated using spectroscopic method such as $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{CNMR}$ (1D and 2D), MS, IR, UV and RX.

Among these compounds, two of them the nortriterpene named 30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester has been described here for the first time and the imidazole named (2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acetonitrile who is described here in a new absolute configuration. Additionally two phenanthrenes: Aristolochic acid I and aristolochic acid I methyl ester were isolated for the first time from a plant outside the genus *Aristolochia*. The others fifteen known compounds are eight pentacyclic triterpenes: bétulin, friedelin, taraxeryl acétate, friedelan-3 β -ol, betulinic acid, friedelan, lupéol, 16-hydroxylupeol; two are steroids: β -sitostérol and 3-O- β -D-glucopyranoside of β -sitostérol; two are flavonoids: Alpinumisoflavone and 4'-O-methyl alpinumisoflavone; two are phenolic acids: Vanilic acid and 4-acétoxy vanilic acid and one phthalate: bis (2-ethyl hexyl) phthalate. The methanol extract of the stem bark of *T. annobonae* and some compound isolated such as aristolochic acid I, aristolochic acid I methyl ester, vanilic acid, 4-acetoxyvanilic acid and friedelan-3 β -ol were evaluated for their antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities from these studies. The result illustrated that the methanolic extract of the stem bark of *T. annobonae* as well as aristolochic acid I prevent the growth of all studied organisms, that is mycobacteria, fungi, Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria; they are also inhibited the H^+ -ATPase activity. Friedelan-3 β -ol, 4-acetoxy vanilic acid, aristolochic acid I methyl ester and vanilic acid exhibited selective antimicrobial activity varying from moderate to weak.

The 30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester, betulinic acid, friedelin, aristolochic acid I, alpinumisoflavone and 4'-O-methyl alpinumisoflavone isolated from leaves of *T. annobonae* were also evaluated for their antimicrobial and phytotoxicity activities. Results demonstrated that the new derivative 30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester exhibited significant antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Mucor miehei*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus*

subspicatus; others five compounds exhibited weak antimicrobial activity against *Streptomyces viridochromogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* respectively. Phytotoxicity activity of the same compounds showed that all of them inhibited root growth lettuce at 100 µg/ml.

Keys words: *Thecacoris annobonae*; aristolochic acid; 30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester, 2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acetonitrile; antimicrobial and phytotoxicity activity.

LISTE DES ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

Ac	: Acétyle
APT	: <i>Attached Proton Test</i>
CC	: Chromatographie sur colonne
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CD ₃ CN	: AcétonitrileDeuté
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CMM	: Concentration Minimale Microbicide
CoA	: Coenzyme A
COSY	: <i>Correlated spectroscopy</i>
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
d	: Doublet
dd	: Doublet dédoublé
ddd	: Doublet de doublets dédoublés
DEPT	: <i>Distortionless enhancement by polarization transfert</i>
DIC	: Désorption par Ionisation Chimique
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
dt	: doublet de triplet
EM	: Extrait au Méthanol
ESI	: <i>Electro Spray Ionization</i>
Fig.	: Figure
Hex	: Hexane
HMBC	: <i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HMQC	: <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HREIMS	: <i>High Resolution Electronic Impact Mass Spectrometry</i>
HRESIMS	: <i>High Resolution Electro Spray Ionisation Mass Spectrometry</i>
HSQC	: <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IE	: Impact Electronique
IR	: Infra Rouge
<i>J</i> (Hz)	: Constante de couplage en Hertz
m	: Multiplet
MHz	: Mégahertz
OMS/WHO	: Organisation Mondiale de la Santé / <i>World Health Organization</i>
PF	: Point de Fusion

ppm	: partie par million
q	: quadruplet
NOESY	: <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
RDA	: Retro Diels-Alder
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹³ C	: Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13
RMN ¹ H	: Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN-2D	: Résonance Magnétique Nucléaire à deux Dimensions
RX	: Rayonx X
s	: singulet
SIDA	: Syndrome de l'Immuno-Déficience Acquise
t	: triplet
T	: <i>Thecacoris</i>
TB	: Tuberculose
TOF MS EI	: <i>Time of Flight Mass Spectrometry Electronic Impact</i>
UV	: Ultrat Violet
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
δ (ppm)	: déplacement chimique en ppm

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Localisation géographique du genre <i>Thecacoris</i> en Afrique.	8
Tableau II: Quelques alcaloïdes isolés de la famille des Euphorbiaceae	12
Tableau III: Quelques Coumarines isolées de la famille des Euphorbiaceae	14
Tableau IV: Quelques acides gras isolés de la famille des Euphorbiaceae	16
Tableau V: Quelques flavonoïdes isolés de la famille des Euphorbiaceae.....	18
Tableau VI : Quelques stéroïdes isolés de la famille des Euphorbiaceae.....	21
Tableau VII : Quelques composés aromatiques isolés de la famille des Euphorbiaceae.	23
Tableau VIII : Quelques lignanes isolés de la famille des Euphorbiaceae.....	24
Tableau IX : Différents groupes structuraux des triterpènes pentacycliques [Mahato et <i>al.</i> , 1994; Wafo et <i>al.</i> , 2010].	28
Tableau X : Quelques triterpènes pentacycliques isolés de la famille des Euphorbiaceae.	37
Tableau XI : Quelques diterpènes isolés de la famille des Euphorbiaceae.	40
Tableau XII: Comparaison entre les données spectrales de RMN ¹ H et RMN ¹³ C de TCA ₁₀ /TCAF ₂ (600 MHz et 300 MHz, pyridine) (114), de TCA ₁₁ (150 MHz et 75 MHz, pyridine) (116) et de l'acide aristolochique I [Priestap, 1989] ainsi que quelques corrélations importantes HMBC de TCA ₁₀	68
Tableau XIII: Données spectrales de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) et de RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) de (TCAF ₄ , 117)	80
Tableau XIV : Comparaison des données de RMN ¹³ C (75 MHz, Acétone-d ₆) de TCA ₂ , (121) avec celles de la littérature.....	83
Tableau XV: Comparaison des données de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃), de TCAF ₉ ; (122) avec celles de la littérature [Abdullahi et <i>al.</i> , 2013].....	85
Tableau XVI : Comparaison des données spectrales de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ COCD ₃) de (TCAF ₃ , 124) avec celles de la littérature [Cichewicz et <i>al.</i> , 2004].....	91
Tableau XVII: Comparaison des données de RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) de (TCA ₆ , 125) avec celles de la littérature [Sousa et <i>al.</i> , 2012].	95
Tableau XVIII: Comparaison des données de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de (TCA ₈ , 127) avec celles de la littérature [Sousa et <i>al.</i> , 2012].	99
Tableau XIX: Comparaison des données spectrales de RMN ¹³ C de TCA ₇ (75 MHz, CDCl ₃) (128), avec celles de la littérature [Junichi et <i>al.</i> , 2011].	102
Tableau XX: Comparaison des données spectrales de RMN ¹ H et RMN ¹³ C de TCA ₄ (300 MHz et 75 MHz, pyridine) (129) et TCA ₂ /TCAF ₁₀ (600 MHz et 150 MHz, CD ₃ CN) (131) avec celles de la littérature [Lee et <i>al.</i> , 2013].	108

TableauXXI: Comparaison des données spectrales de RMN ¹³ C (75 MHz, Pyridine) de TCA ₁ , (132) avec celles de la littérature [Furuya et <i>al.</i> , 1987].	110
Tableau XXII : Comparaison des données de RMN ¹³ C (75 MHz, pyridine) de TCA ₅ (133) avec celles de la littérature [De Castro Ferreira Gomes et <i>al.</i> , 1998].	114
Tableau XXIII: Données spectrales de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ COCD ₃) et de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ COCD ₃) de TCAF ₅ (135) et de l'alpinumisoflavone de [Tsukayama et <i>al.</i> , 1992].	120
Tableau XXIV: Données spectrales de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de TCAF ₆ (131) en comparaison avec celles de TCAF ₅ (130)	123
Tableau XXV: Comparaison des données spectrales de RMN ¹ H (400 MHz, acetone-d6) et RMN ¹³ C (100 MHz, acetone-d6) de TCAF ₁₂ (137) avec celles de la littérature [Hua et <i>al.</i> , 2004].	132
Tableau XXVI: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI en µg/ml) de la croissance des mycobactéries, des bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs et des champignons en présence de l'extrait au MeOH, des composés isolés de <i>T. annobonae</i> et des antibiotiques de référence.	134
Tableau XXVII : Concentration Minimale Microbicide (CMM en µg/ml) de la croissance des mycobactéries, des bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs et des champignons en présence de l'extrait au MeOH, des composés isolés de <i>T. annobonae</i> et des antibiotiques de référence.	135
Tableau XXVIII : Activités antibactérienne, antifongique et algicide des composés isolés des feuilles de <i>T. annobonae</i> : résultats exprimés en diamètre de la zone d'inhibition de croissance (mm) pour des disques préparée à 30 µg / ml.	137
Tableau XXIX: Regroupement des différents composés isolés des tiges et des feuilles de <i>T.annobonae</i>	141
Tableau XXX: Chromatogramme de l'extrait au MeOH des tiges de <i>T. annobonae</i> .	158
Tableau XXXI : Chromatogramme de la fraction C issue de l'extrait au MeOH des tiges de <i>T. annobonae</i> .	159
Tableau XXXII : Chromatogramme de l'extrait au mélange CHCl ₃ /acétone des feuilles de <i>T. annobonae</i> .	160
Tableau XXXIII Chromatogramme de la fraction B issue de l'extrait au mélange CHCl ₃ /acétone des feuilles de <i>T. annobonae</i> .	161
Tableau XXXIV : Chromatogramme de l'extrait au MeOH des feuilles de <i>T. annobonae</i> .	162

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Biosynthèse du squalène.....	27
Schéma 2 : Fragmentation Rétro-Diels-Alder des séries oléananes et ursanes (ogunkoya, 1981).....	32
Schéma 3 : Protocole d'extraction et d'isolement des composés des tiges de <i>T.annobonae</i> ...	51
Schéma 4: protocole d'extraction et d'isolement des composés des feuilles de <i>T.annobonae</i> .	53
Schéma 5: protocole d'extraction et d'isolement des composés des feuilles de <i>T.annobonae</i> .	55
Schéma 6 : Quelques ions fragments justifiant la structure du composé TCAF ₄	79

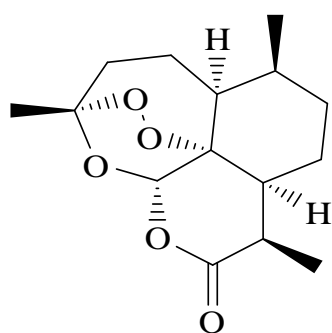
LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Feuilles, tiges et fruits de <i>T.annobonae</i> [image prise par A.N.Guedem le 26 avril 2008].....	7
Figure 2 : Quelques antibiotiques couramment utilisés [Walsh, 2003 ; Ramirez-Ronda et Fuxench-Chiesa, 1984].....	44
Figure 3 : Spectre de masse en EI de (TCA ₁₀ , 114).....	58
Figure 4 : Spectre IR de (TCA ₁₀ , 114).....	58
Figure 5 : Spectre de RMN ¹ H (600 MHz, pyridine) de (TCA ₁₀ , 114).....	59
Figure 6: Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, pyridine) de (TCA ₁₀ , 114).....	60
Figure 7 : Spectre COSY de (TCA ₁₀ , 114).....	61
Figure 8 : Spectre HMBC de (TCA ₁₀ , 114).....	62
Figure 9 : Spectre HSQC de (TCA ₁₀ , 114).....	63
Figure 10 : Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de TCA ₁₀	64
Figure 11 : Spectre de masse en EI de (TCA ₁₁ , 116).....	65
Figure 12 : Spectre de RMN ¹ H (150 MHz, pyridine) DE (TCA ₁₁ ; 116).....	66
Figure 13: Spectre RMN ¹³ C (75 MHz, pyridine) de (TCA ₁₁ ; 116).....	66
Figure 14: Spectre de masse en (+) TOF de (TCAF ₄ ; 117).....	69
Figure 15 : Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de (TCAF ₄ , 117).....	71
Figure 16: Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de (TCAF ₄ , 117).....	71
Figure 17: Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de (TCAF ₄ , 117).....	72
Figure 18: Spectre DEPT 135 de (TCAF ₄ , 117).....	73
Figure 19: Spectre HMQC de (TCAF ₄ , 117).....	74
Figure 20: Spectre HMQC de (TCAF ₄ , 117).....	74
Figure 21: Spectre HMQC de (TCAF ₄ , 117).....	75
Figure 22: Spectre HMBC de (TCAF ₄ , 117).....	76
Figure 23: Spectre HMBC de (TCAF ₄ , 117).....	76
Figure 24: Spectre HMBC de (TCAF ₄ , 117).....	77
Figure 25: Spectre COSY de (TCAF ₄ , 117).....	78
Figure 26 : Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC de TCAF ₄	79
Figure 27: spectre de RMN ¹ H (300 MHz, Acétone-d6) de (TCA ₂ , 121).....	82
Figure 28 : Spectre de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de (TCAF ₁₃ , 123).....	86
Figure 29 : Spectre de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de (TCAF ₁₃ , 123).....	87
Figure 30: Spectre de masse en IE de (TCAF ₃ , 124).....	89
Figure 31: Spectre de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ COCD ₃) de (TCAF ₃ , 124).....	90

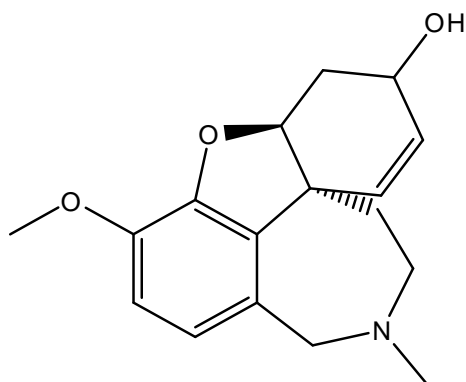
Figure 32: Spectre de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ COCD ₃) de (TCAF ₃ , 124)	90
Figure 33: Spectre de RMN ¹ H (600 MHz, pyridine) de (TCA ₆ , 125)	92
Figure 34: Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) de (TCA ₆ , 125).....	93
Figure 35: Spectre d'ATP (150 MHz, CDCl ₃) de (TCA ₆ , 125).....	94
Figure 36: Spectre de RMN ¹³ C de (TCA ₈ , 126)	96
Figure 37: spectre de RMN ¹ H (300 MHz, pyridine) de (TCA ₁₀ , 127).....	98
Figure 38 : Spectre de RMN ¹ H (300 MHz, CDCL ₃) de (TCA ₇ , 128).....	100
Figure 39: Spectre de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCL ₃) de (TCA ₇ , 128).....	101
Figure 40 : Spectre de RMN ¹ H (300 MHz, pyridine) de (TCA ₄ , 129).....	104
Figure 41: Spectre de RMN ¹³ C (75 MHz, pyridine) de (TCA ₄ , 129).	104
Figure 42 : Spectre de HMBC (300 MHz, pyridine) de (TCA ₄ , 129).....	105
Figure 43: Spectre de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ CN) de (TCA ₃ , 131)	107
Figure 44: Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, CD ₃ CN) de (TCA ₃ , 131)	107
Figure 45: Spectre de masse DIC du 3-O-β-D-glucopyranoside de β-sitostérol (TCA ₅ ; 133)	111
Figure 46 : Spectre de RMN ¹ H (300 MHz, pyridine) de (TCA ₅ , 133)	112
Figure 47: Spectre de RMN ¹³ C (75 MHz, pyridine) du 3-O-β-D-glucopyranoside de β- sitostérol (TCA ₅ ; 133).....	113
Figure 48 : Spectre de RMN ¹ H (300 MHz, pyridine) de (TCA ₁₂ , 134).....	115
Figure 49 : Spectre de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de (TCA ₁₂ , 134).....	116
Figure 50: Spectre de masse en IE de (TCAF ₅ ; 135).....	117
Figure 51: Spectre de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ COCD ₃) de (TCAF ₅ ; 135).....	118
Figure 52: Spectre de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ COCD ₃) de (TCAF ₅ ; 135).....	119
Figure 53 Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de (TCAF ₆ ; 136).	121
Figure 54: Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, acetone-d ₆) de (TCAF ₁₂ , 137).....	125
Figure 55: Spectre de RMN ¹³ C (100 MHz, acetone-d ₆) de (TCAF ₁₂ , 137).....	126
Figure 56: Spectre HSQC de (TCAF ₁₂ , 137).	127
Figure 57: Spectre COSY de (TCAF ₁₂ , 137).	128
Figure 58: Spectre HMBC de (TCAF ₁₂ , 137).	128
Figure 59: Structure cristalline de la molécule de TCAF ₁₂	129
Figure 60: Spectre NOESY de (TCAF ₁₂ , 137).	131
Figure 61: Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de TCAF ₁₂	131
Figure 62: Effet de l'extrait au MeOH de T.annobonae et de l'acide aristolochique I sur le pompage du proton d'Escherichia coli à la CMI et au 1/10 de la CMI.....	136

INTRODUCTION GENERALE

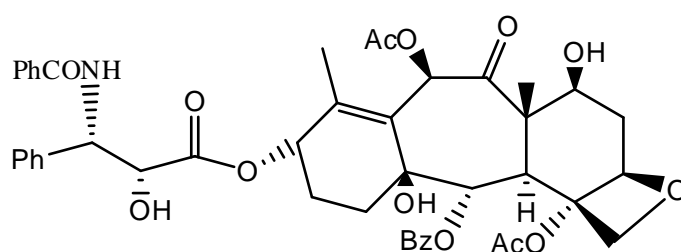
De nos jours, les infections microbiennes causées par des micro-organismes tels que les bactéries, les champignons, sont l'une des principales causes de mortalité dans le monde [OMS, 2010]. Dans les pays en voie de développement, les maladies infectieuses à l'instar de la tuberculose, la fièvre typhoïde, la méningite, la pneumonie pour ne citer que celles là continuent de faire des victimes en grand nombre [Flahaut et Zylberman, 2008 ; Brooks et al., 2005]. Cependant la découverte de nouvelles molécules à potentialité thérapeutique dans les plantes médicinales a permis de réduire la mortalité due à ces infections. C'est ainsi que, des 252 médicaments considérés comme essentiels par OMS, 11% sont exclusivement d'origine naturelle [Rates, 2001] ; nous pouvons entre autres citer : l'artémisinine (1) isolé d'une plante chinoise *Artemisia annua* et ses dérivés utilisés comme antipaludéen, la galantamine (2) isolée de *Galanthus woronowii* utilisée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer et le taxol (3) isolé de l'écorce du tronc de *Taxus brevifolia* qui est utilisé comme médicament de référence pour le traitement du cancer de l'ovaire et du sein



1



2



3

Malgré les progrès scientifiques et techniques, la médecine reste impuissante face à certaines maladies telles que la tuberculose et la fièvre typhoïde qui constituent un problème de santé publique. En effet, plus de 2 milliards de personnes dans le monde sont infectées par le virus de la tuberculose (Bacille de Koch) [McGaw et al., 2008]. Selon les estimations de l'OMS de 2013, la tuberculose tue près de 2 millions de personnes par an et ce presque

exclusivement dans les pays pauvres et 95 % de personnes présentant une tuberculose active vivent dans les pays en voie de développement. Le taux d'incidence de la tuberculose s'accroît avec les systèmes de soins de santé inadéquats et dans les pays où la prévalence du VIH/SIDA est élevée [Zager et McNerney, 2008]. Quant à la fièvre typhoïde, on estime à environ 16 à 33 millions de cas causant près de 500 à 600 mille décès chaque année dans les régions endémiques [OMS, 2009]. Dans les pays en voie de développement, 22 millions de cas sont recensés chaque année et beaucoup plus chez les enfants en âge scolaire et les jeunes adultes [Crump et al., 2004]. Ces chiffres alarmants se justifient du fait de l'augmentation du nombre de souches de bactéries résistantes à la plupart des antibiotiques. De ce fait les résultats obtenus des multiples thérapies susceptibles de réduire de manière importante l'incidence de ces maladies ci-dessus citées sont loin d'être satisfaisants en raison de la chimiorésistance, des effets secondaires dus aux médicaments, de la toxicité de certains médicaments et du diagnostic tardif. De ce fait, les pharmacologues, les biologistes et les chimistes doivent continuer de promouvoir la qualité et le nombre de composés qui entrent dans la fabrication des médicaments. L'investigation phytochimique et biologique des plantes médicinales constituerait donc une perspective de développement de phytomédicaments (médicaments faits à partir des extraits des plantes) dans le cadre de la prévention, du contrôle et du traitement de ces maladies ; les plantes médicinales étant reconnues comme une source inestimable de métabolites antimicrobiens fortement actifs [Gibbons, 2005 ; Pauli et al., 2005]. Dans le souci d'apporter notre contribution à ce vaste programme de recherche, nous chercheurs de l'équipe du Pr NGADJUI du Labo 278 de l'Université de Yaoundé I nous sommes posés la question de savoir comment faire pour aider les populations à combattre les maladies causées par les infections bactériennes ?

En effet pour nos travaux de recherche en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en 2004, nous avons mené des études sur l'espèce *Thecacoris batesii* (Euporbiaceae) et les résultats que nous avons obtenus, nous ont conduit non seulement à une publication mais nous ont montré qu'elle renfermait des composés à activités antimicrobiennes. De plus, une étude bibliographique nous a permis de constater que les plantes du genre *Thecacoris* bien que très utilisées en pharmacopée traditionnelle camerounaise pour le traitement du rhumatisme et comme laxatif n'avaient fait que l'objet de très peu d'études chimiques et pharmacologiques. Dans la continuité de nos travaux sur les activités biologiques des composés obtenus du genre *Thecacoris* nous avons dans le cadre de nos travaux en vue de l'obtention du Doctorat/PhD, porté notre choix sur *T.annobonae* dont nous avons entrepris d'étudier la composition chimique ainsi que la toxicité des métabolites

secondaires de celle-ci. Avec pour objectif général de rechercher les nouveaux principes actifs contre les infections microbiennes et pour objectifs spécifiques:

- 1- D'isoler et caractériser les métabolites secondaires de *Thecacoris cf. annobonae* ;
- 2- d'évaluer les activités antimycobactérienne, antibactérienne, antifongique et phytotoxique de l'extrait au méthanol et de certains métabolites secondaires isolés de cette plante.

Dans le premier chapitre de ce document, nous présenterons la revue de la littérature sur les Euphorbiaceae, l'espèce étudiée, les triterpènes pentacycliques ainsi que sur certaines maladies ciblées. Le deuxième chapitre sera consacré aux résultats obtenus et interprétation d'une part et d'autre part à une conclusion générale et la discussion. Le troisième ressortira la méthodologie utilisée et nous terminerons le document par une présentation de la bibliographie consultée.

CHAPITRE I :

REVUE DE LA LITTERATURE

I.2-REVUE DE LA LITTERATURE

I.2.1-Aperçu botanique

I.2.1.1-Généralités sur les Euphorbiaceae.

Les Euphorbiaceae constituent une grande famille cosmopolite qui compte entre 5000 et 8000 espèces réparties dans environ 300 genres [Lagnika, 2005]. Environ 100 genres sont représentés en Afrique. D'aspect très variable, les plantes de cette famille se caractérisent essentiellement par leur latex blanc irritant la peau, collant et épais [Lagnika, 2005]. Ce sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, arbres, arbustes, ou lianes dont certaines espèces sont succulentes et /ou en forme cactus. Les feuilles sont généralement alternes et simples souvent très réduites chez les espèces succulentes. Certains genres et espèces possèdent cependant des feuilles opposées et /ou palmées. Les stipules sont souvent réduites à des soies, glandes ou épines. Les fleurs sont généralement petites, souvent très réduites. Les sépales, les pétales, les étamines et les carpelles sont disposées comme les rayons d'une roue. Les fruits se présentent généralement sous forme d'une capsule à 3 (parfois 2, rarement 4) loges contenant chacune une seule graine. [Lagnika, 2005]. Les graines albuminées (souvent huileuses) sont pourvues d'une caroncule (petite expansion charnue appréciée des insectes et autres animaux et favorisant la dissémination des graines) [Payne *et al.*, 1992]. Des 100 genres représentés en Afrique on peut citer entre autres les genres *Bridellia*, *Euphorbia*, *Drypetes*, *Mallotus*, *Amanoa*, *Excoecaria*, *Pentabrachion*, *Thecacoris* ...

I.2.1.2-Généralités sur le genre *Thecacoris*

Le genre *Thecacoris* est composé d'arbres ou d'arbustes. Les feuilles sont dioïques, alternes, entières et stipulées. Long de 9 à 27 cm et large de 3 à 13 cm, elles sont rarement allongées et parfois arrondies à la base [Thiselton-Dyer *et al.*, 1913]. Les fleurs mâles présentent cinq sépales imbriqués et lancéolés, un disque constitué de cinq segments libres et cinq étamines insérées entre le disque et les segments et opposées aux sépales. Chez les fleurs femelles, les pétales sont plus petits que chez les fleurs mâles et le disque est annulaire. Les capsules sont trilobées de 6 à 7 cm de diamètre. Les graines là où elles existent sont plus ou moins rondes [Thiselton-Dyer *et al.*, 1913].

I.2.1.3-Aperçu botanique sur *Thecacoris cf. annobonae*

T.cf. annobonae (Pax & K. Hoffm) est un petit arbre trouvé au Cameroun et en Guinée équatoriale. Son habitat naturel est subtropical ou tropical humide. Elle est classée parmi les espèces en voie de disparition à cause du fait que son habitat est détruit au profit de l'agriculture et de l'urbanisme et son bois est utilisé comme bois de chauffage [Cheek, 2004] *T.annobonae* est un arbre d'environ 9 à 12 m de long, aux feuilles alternes et entières. Les fleurs sont jaune-verdâtres [Thiselton-Dyer et al., 1913]. Les fruits sont fixés sur les branches [Observation faite sur le terrain]. La figure 1 présente quelques parties de *T.annobonae*

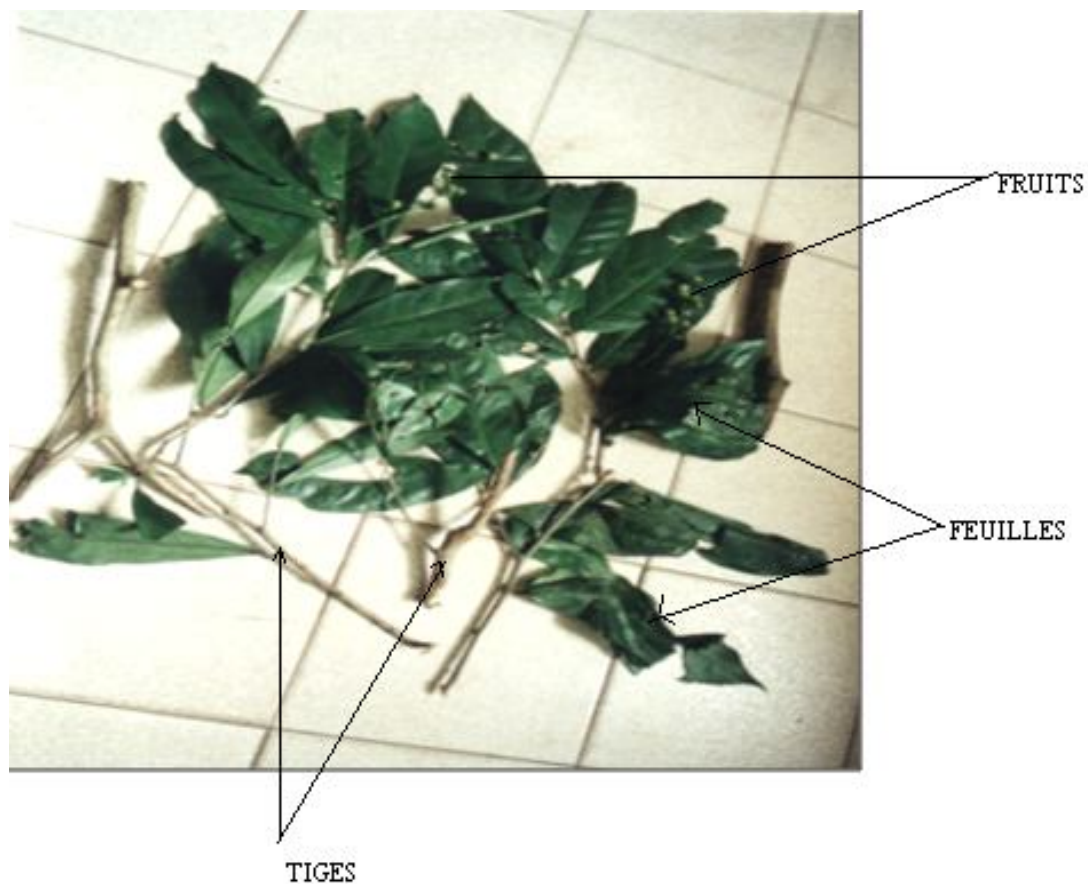


Figure 1 : Feuilles, tiges et fruits de *T.annobonae* [image prise par A.N.Guedem le 26 avril 2008].

I.2.1.4-Localisation géographique du genre *Thecacoris*

Le genre *Thecacoris* renferme environ 20 espèces avec en moyenne 10 rencontrées en Afrique. Quatre d'entre elles sont représentées au Cameroun [Hutchison, 1958] à savoir *T.annobonae*, *T.batesii*, *T.leptobotrya*, *T.stenopetala*.

Tableau I: Localisation géographique du genre *Thecacoris* en Afrique.

Espèces	Localités
<i>T.annobonae</i> *	Afrique centrale
<i>T.batesii</i> * <i>va.gymnogyne</i>	Afrique centrale
<i>T.bussei</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.chevalieri</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.comelia</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.glabrata</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.humbertiivar.anjaharibes</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.leptobotrya</i> *	Afrique centrale
<i>T.lucida</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.madagacarreusis</i>	Madagascar
<i>T.manniana</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.membanacca</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.obanensis</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.perrieri</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.sp</i>	Madagascar
<i>T.spathulifoliavar.greveana</i>	Afrique de l'Est et Madagascar
<i>T.stenopetala</i> *	Afrique centrale
<i>T.talbotae</i>	Afrique de l'ouest
<i>T.trichogyre</i>	Afrique centrale et Angola

*= espèces retrouvées au Cameroun

Certaines plantes de la famille des Euphorbiaceae sont utilisées comme matière première, comme aliment ou en pharmacopée traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies.

I.2.2-Quelques usages des espèces de la famille des Euphorbiaceae

Les utilisations des espèces de la famille des Euphorbiaceae sont très variées notamment dans les domaines de l'industrie, de l'alimentation et de la médecine.

I.2.2.1-Usages industriels et alimentaires.

Plusieurs espèces de la famille des Euphorbiaceae sont plus particulièrement cultivées par l'homme.

La rigidité et la résistance aux attaques des insectes font du bois du genre *Drypetes* une matière première importante utilisée dans la menuiserie et la construction des maisons, ainsi que dans la fabrication des mortiers [Irvine, 1961]. Le bois de la *Ricinodendron heudolotii* est un mauvais combustible et est utilisé dans la fabrication des masques des bols et des tamtams [Keumedjio, 1990]. Le bois de *T.annobonae* est utilisé comme bois de chauffage au Cameroun ([http://en.wikipedia.org/wiki/Thecacoris annobonae](http://en.wikipedia.org/wiki/Thecacoris_annobonae), 2012, consulté le 15 octobre 2013). Le ricin ou *Ricinus communis* est exploité pour l'albumen huileux qui entoure sa graine et à partir duquel est produite la fameuse et purgative huile de ricin. Elle sert principalement dans le milieu industriel dans la fabrication du nylon ou pour la lubrification des moteurs d'avion. L'hévéa est cultivé pour la production de caoutchouc à partir du latex recueillie par incision du tronc [Lagnika, 2005].

Le manioc ou *Manihot esculenta* possède des racines charnues d'où est tiré le tapioca. Ces racines riches en amidon sont la base alimentaire de nombreuses populations, notamment Africaines. En revanche, elles contiennent des hétérosides cyanogénétiques toxiques responsable de l'apparition de goitres et de troubles mentaux d'origine neurologique. C'est pourquoi le manioc amer doit être bouilli pour permettre une hydrolyse partielle de ces hétérosides, alors que pour le manioc doux, il suffit de peler la racine, les hétérosides étant concentrés dans la partie périphérique du tubercule [Lagnika, 2005]. Les graines de la *Ricinodendron heudolotii* aussi connues sous le nom de « jansan » sont utilisées comme condiments au Cameroun et au Gabon [Keumedjio, 1990].

I.2.2.2-Usages thérapeutiques.

Il a été démontré que la plupart des plantes de la famille des Euphorbiaceae sont toxiques à dose élevée. Cette toxicité est due à la présence des phytotoxines ou de résines vésicantes. Cependant, à dose convenable, ces plantes présentent des vertus importantes surtout dans la pharmacopée traditionnelle [Verma et al., 1984].

En Inde, l'espèce *Mallotus abus* est utilisée pour son activité antispasmodique pendant que *Mallotus philippinensis* est connue pour ses vertus purgatives et anthelminthiques [Ngoupayo, 2003]

Les plantes du genre *Drypetes* sont utilisées en Afrique de l'Ouest et Centrale dans le traitement de la gonorrhée, du mal de dents, de la dysenterie, de la sinusite, du rhume et des furoncles [Donfack *et al.*, 2008; Awanchiri *et al.*, 2009]. Elles sont également utilisées comme analgésiques dans le traitement des douleurs rhumatismales et lombaires ; comme aphrodisiaques, vermifuges pour soigner les affections intestinales et urétrites blennorragiques [Wandji *et al.*, 2000]. Elles sont utilisées dans le traitement des maladies infectieuses et sexuellement transmissibles [Kuate *et al.*, 2010].

Le décocté des feuilles de la *Ricinodendron heudelotii* s'utilise en boisson et en bain pour calmer la fièvre. La pulpe de ses feuilles ou de ses écorces est utilisée en application contre les mycoses et pour faire murir les abcès et les furoncles. Le suc obtenu par expression est instillé dans les yeux contre les filaires et la décoction des écorces est administrée contre les règles douloureuses et comme contre poison. C'est également un puissant antidysentérique [Keumedjio, 1990].

Dans la région du Sud-Cameroun, une faible dose de la décoction des feuilles de *T.batesii* est utilisée comme purgatif et contre le rhumatisme. Ses écorces sont utilisées en instillation nasale pour les perturbations psychiatriques [Ngadjui *et al.*, 2007].

En Afrique tropicale et en Asie de l'Est, la sève et les feuilles de *Excoecaria agallocha* sont utilisées comme poison pour la pêche et certains esters isolés de ses feuilles et de ses écorces au Japon et en Thaïlande ont montré qu'elle possède des activités anti-VIH [Konischi *et al.*, 2000].

C'est en raison de la très grande utilisation des plantes de cette famille que de nombreuses études phytochimiques ont été entreprises sur les plantes de la dite famille par des chercheurs dans le but de rechercher les principes actifs et justifier leur utilisation empirique. Cependant, à notre connaissance une étude bibliographique montre que très peu d'activités phytochimiques et pharmacologiques ont été jusqu'ici mis en exergues sur les plantes du genre *Thecacoris*.

I.2.3-Travaux chimiques antérieurs sur les plantes de la famille des Euphorbiaceae.

Les études phytochimiques antérieures effectuées sur les plantes de la famille des Euphorbiaceae ont conduit à l'isolement et à la caractérisation des composés appartenant à la classe des :

- Alcaloïdes ;
- Coumarines ;
- Acides Gras ;
- Flavonoïdes ;
- Composés Aromatiques et Lignanes ;
- Stéroïdes ;
- Terpènes.

I.2.3.1-Les Alcaloïdes

Le terme alcaloïde désigne les substances naturelles réagissant comme des bases [Bruneton, 1993]. On peut considérer les alcaloïdes comme des substances basiques qui contiennent un ou plusieurs atomes d'azote engagés le plus souvent dans un cycle. Ils sont classés en trois groupes [Bruneton, 1993] :

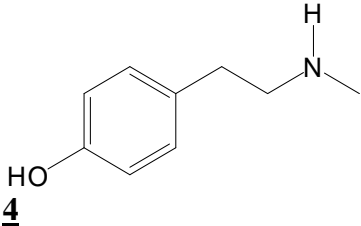
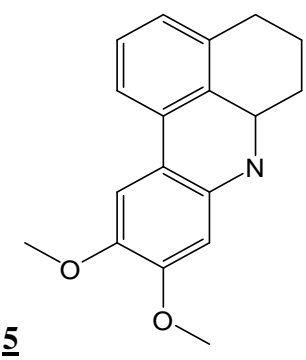
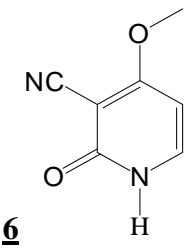
- Les alcaloïdes vrais pour qui l'azote est inclus dans le système hétérocyclique et qui biogénétiquement dérivent des acides aminés ;
- les proto-alcaloïdes qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique .Ils sont réalisés in vitro à partir des acides aminés ;
- les pseudo-alcaloïdes qui présentent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais à la seule différence qu'ils ne dérivent pas des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoides et on parle d'alcaloïdes terpénoïques.

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines variés [Bruneton, 1993].

- Au niveau du système nerveux central ils sont dépresseurs ou stimulants ;
- au niveau du système nerveux autonome, ils sont sympathomimétiques ou sympatholytiques, parasymphatomimétiques, anticholinergiques et ganglioplégiques.

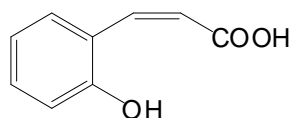
De plus, les alcaloïdes sont des curarisants, des anesthésiques locaux, des anti-fibrillants, des anti-tumoraux, des antipaludiques et des amoébicides [Bruneton, 1993]. Ils sont également utilisés au Cameroun dans le traitement des désordres cardiovasculaires, douleurs rhumatismales, maux de ventre et l'asthme [Vardamides et al., 2006]. Le tableau ci-contre présente quelques alcaloïdes isolés des Euphorbiaceae.

Tableau II: Quelques alcaloïdes isolés de la famille des Euphorbiaceae

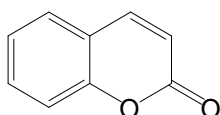
Structure	Noms	Source	Reference
 <p>4</p>	N-méthyltyramine	<i>Croton humilis</i>	[Stuart et al., 1971]
 <p>5</p>	Thaliporphine	<i>Croton draconoide</i>	[Shamma et al., 1971]
 <p>6</p>	Ricine	<i>Ricinus communis</i>	[Keumedjio, 1990]

I.2.3.2 -Les coumarines

Le mot Coumarine dérive de « Coumarou » ; nom vernaculaire Sud-Américain tiré de *Dypteryx odorata Willd* encore appelé fève de tonka d'où fut isolée la première coumarine en 1820 [Brumeton, 1993]. Les Coumarines sont les 2H-1-benzopyran-2-one qui sont des lactones des acides hydroxy-2-cinamique 7. Le plus simple est représenté par la structure 8 [Brumeton, 1993].



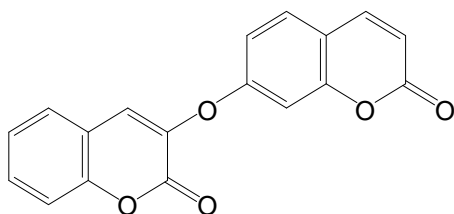
7



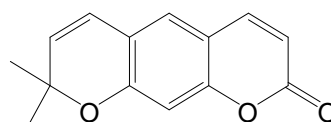
8

Les Coumarines sont subdivisées en 4 grandes classes :

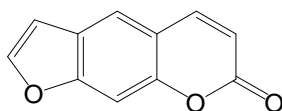
- Les Coumarines simples 8 ;
- les dimères de Coumarines 9 ;
- les furanocoumarines 10 ;
- les pyranocoumarines 11.



9



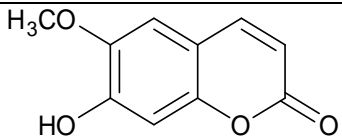
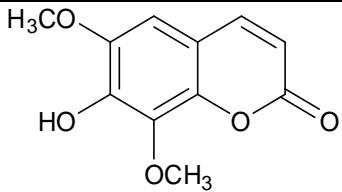
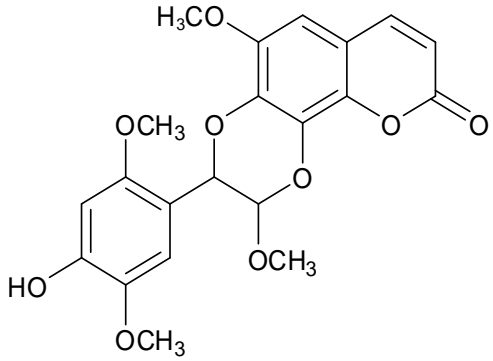
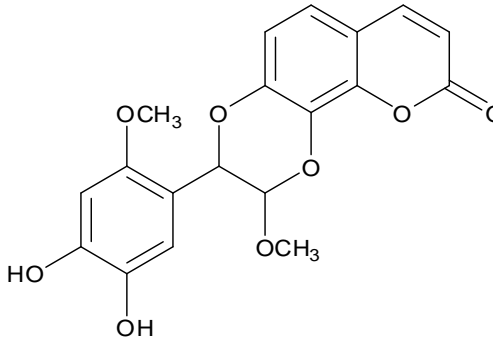
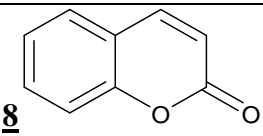
11



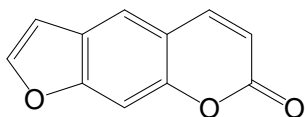
10

Le tableau III présente quelques coumarines isolées des Euphorbiaceae.

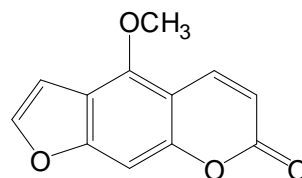
Tableau III: Quelques Coumarines isolées de la famille des Euphorbiaceae

Structures	Noms	Sources	Référence
 12	6-methoxy-7-hydroxycoumarine	<i>Todaroa aura</i>	[Gonzalez et al., 1991]
 13	Isofraxidine	<i>Micranda eleta</i>	[Boris et al., 1980]
 14	Aquilochine	<i>Mallotus apelta</i>	[Cheng et al., 2000]
 15	Demethyl-5'-aquilochine	<i>Mallotus apelta</i>	[Cheng et al., 2000]
 8	2H-1-benzopyran-2-one	<i>Excoecaria cochinchinensis</i>	[Giang et al., 2005]

Les Coumarines et les furanocoumarines sont sédatives [Ambassa, 2007]. Elles produisent des effets spasmodiques, bactériostatiques et anticoagulants. Elles sont hyperthermisantes et hypotensives. Elles élargissent les vaisseaux, calment les douleurs ; ce sont des adjuvants utilisés comme additifs dans l'alimentation et les produits cosmétiques [Simo, 2011]. La toxicité des coumarines et des furanocoumarines s'expriment par voie transcutanée [Cardose et al., 2002]. En effet, les furanocoumarines telles que le Psoralène **10** et le Bergaptène **16** sont des composés photosensibles utilisés couramment dans le traitement du psoriasis, du vitiligo et d'autres maladies de la peau [Ambassa, 2007]. Certains de ces composés peuvent interagir avec l'ADN de l'épiderme absorbant l'énergie [Ambassa, 2007 ; Cardose et al., 2002]. Cette utilisation ne va pas sans inconvénient. En effet, l'injection ou l'application de ces composés peut provoquer des enflures, des rougissements, des lésions de l'épiderme et dans certains cas le cancer de la peau [Cardose et al., 2002]. Généralement, la quantité de Psoralène **10** et de Bergaptène **16** est utilisée comme index de phototoxicité d'une plante [Cardose et al., 2002].



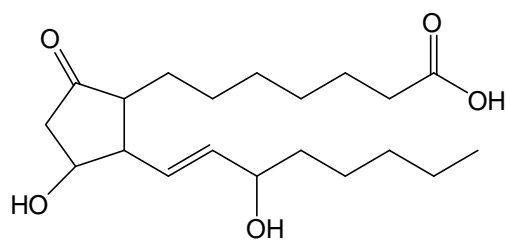
10



16

I.2.3.3- Les acides gras

Les acides gras sont des biomolécules insolubles dans l'eau. Ils sont formés d'une longue chaîne carbonée et d'un groupement carboxylique terminal. Cette chaîne peut être saturée, mono ou poly insaturée dans les cellules eucaryotes ou elle n'est pas ramifiée et contient un nombre pair de carbones. Les doubles liaisons sont généralement dans la configuration cis et présentent le motif HC=CH-CH₂ pour les poly insaturés. Ces composés sont retrouvés parfois liés par des fonctions esters à certains composés ayant des rôles physiologiques. D'autre part, ils sont stockés dans le cytoplasme sous forme de triglycérides et jouent le rôle de molécule énergétique [Gillet et al., 1998]. Certains de leurs dérivés, comme la prostaglandine E1 **17**, présentent des fonctions spécifiques. C'est un agent de signalisation qui active de nombreux récepteurs membranaires [Sandjo, 2009].



17

Le tableau IV présente quelques acides gras isolés de certaines espèces de la famille des Euphorbiaceae

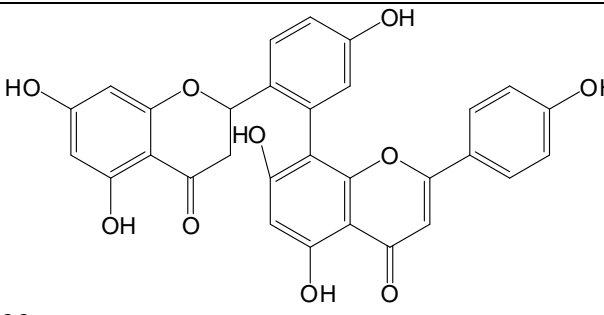
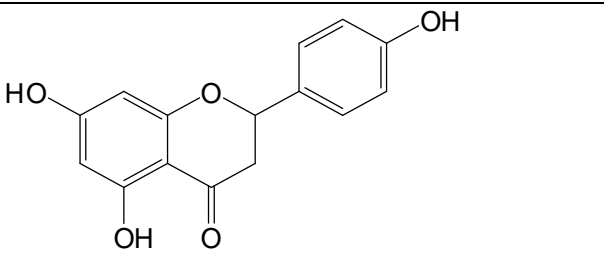
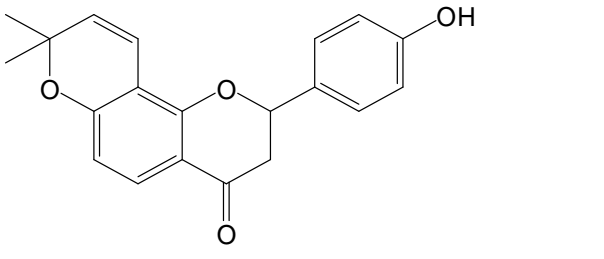
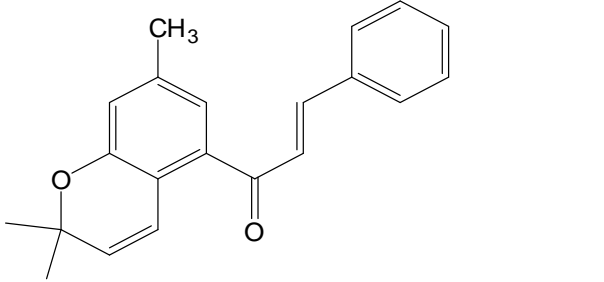
Tableau IV: Quelques acides gras isolés de la famille des Euphorbiaceae

Structures	Noms	Sources	Référence
<p><u>18</u> C₂₉H₅₉</p>	Acide triacontanoïque	<i>Crotons lobatus</i>	[Lagnika, 2005]
<p><u>19</u> C₂₇H₅₅</p>	Acide octacosanoïque	<i>Crotons lobatus</i>	[Lagnika, 2005]
<p><u>20</u> C₁₇H₃₇</p>	Acide stéarique	<i>Drypetes gossweileri</i>	[Ngouela et al., 2003]
<p><u>21</u> C₂₅H₅₁</p>	Acide hexacosanoïque	<i>Thecacoris batesii</i>	[Poumale, 2007]

I.2.3.4-Les flavonoïdes

Ce sont les pigments ayant le motif biphenyl propane à 15 atomes de carbone disposés suivant l'enchaînement $C_6-C_3-C_6$. Les flavonoïdes sont des polyphénols hydrosolubles répandus dans le règne végétal et sont responsables de la couleur des fleurs et des fruits. La chaîne à 3 carbones peut rester ouverte ou même se cycliser à l'un des phényles par un oxygène pour donner un hétérocycle à cinq ou six chaînons [Bruneton, 1993]. Les flavonoïdes sont potentiellement veino-actifs, ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent la résistance [Bruneton, 1993]. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires [Paulino et al., 2006], anti-allergiques, hépatoprotectrices, cytotoxiques, antitumorales, antispasmodiques, hypocholestérolémiantes, diurétiques, antibactériennes, antivirales et certains d'entre eux exhibent l'activité vitrocytostatique [Poumale, 2007].

Tableau V: Quelques flavonoïdes isolés de la famille des Euphorbiaceae.

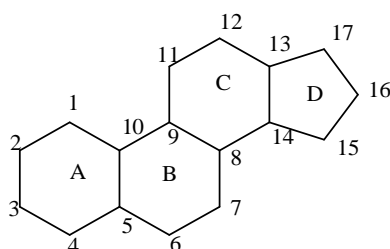
Structures	Noms	Sources	Référence
<p><u>22</u></p> 	Amentoflavone	<i>Drypetes littolaris</i>	[Lin et al., 2001]
<p><u>23</u></p> 	Apigenine	<i>Euphorbia amygdaloide</i>	[Subramanian et al., 1971]
<p><u>24</u></p> 	7,8-(2'',2''-dimethylpyrano)-4'-hydroxyflavanone)	<i>Thecacoris batesii</i>	[Poumale, 2007]
<p><u>25</u></p> 	Obovatachalcone	<i>Mallotus philippinensis</i>	[Cheng et al., 2005]

I.2.3.5-Les Stéroïdes

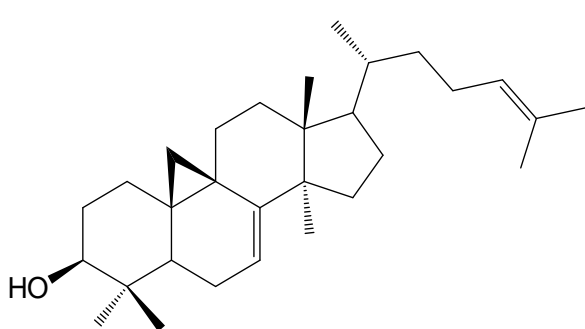
Les stéroïdes sont des composés ayant une structure de base cyclopentanoperhydrophénanthrénique **26**. On les retrouve dans les végétaux (phytostérols) sous forme libre d'ester ou d'éther [Bruneton, 1993]. Parmi eux, on retrouve les composés importants tels que les hormones de reproduction, les corticoïdes, les glycosides cardiotoniques, les amines stéroïdiennes, et les acides biliaires [Bruneton, 1993].

Les stérols régulent la fluidité membranaire en limitant la circulation des acides gras et jouent un rôle dans l'adaptation des membranes aux conditions climatiques. Ils participent au contrôle de celles-ci lorsqu'elles sont associées au métabolisme [Sandjo, 2009].

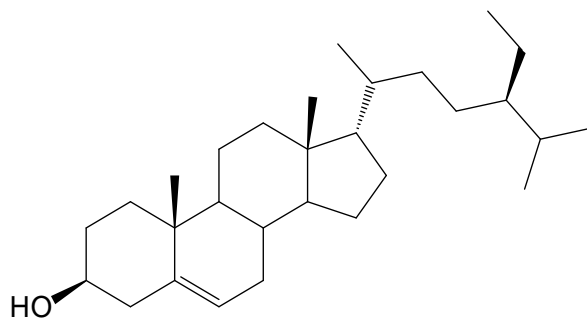
Chez les plantes, le mécanisme de biosynthèse des stéroïdes passe par le cycloarténol **27** et plutôt par le lanostérol **28** chez les animaux ; mais tous subissent ou non deux fois l'action de l'enzyme SMT (Steroid Methyl Transferase) pour aboutir au β -sitostérol **29**, à l'ergostérol **30** ou au cholestérol **31** selon qu'il y ait est un méthyle ou un éthyle ou pas de ramification en position 24 [Chen et al., 2007] ; Xu et al., 2004].



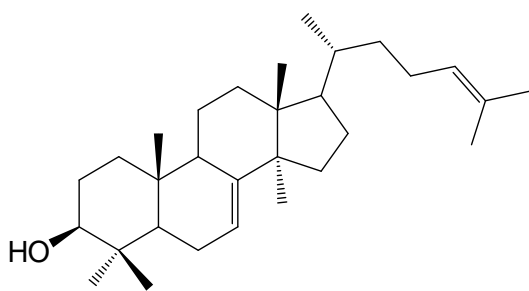
26



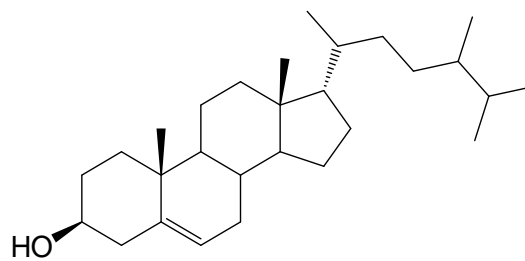
27



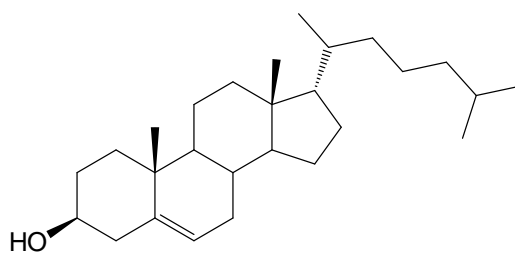
29



28



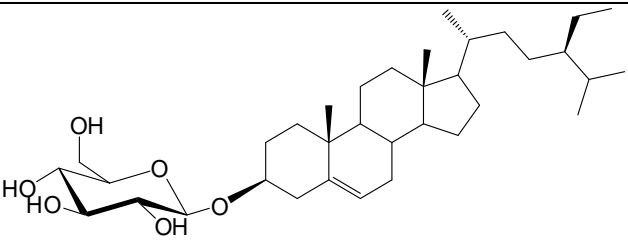
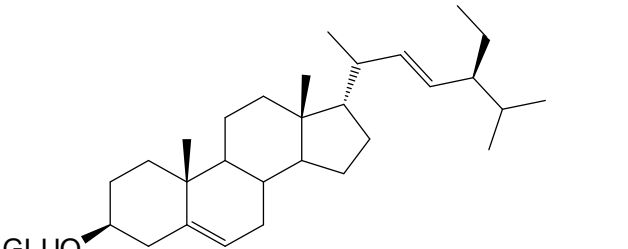
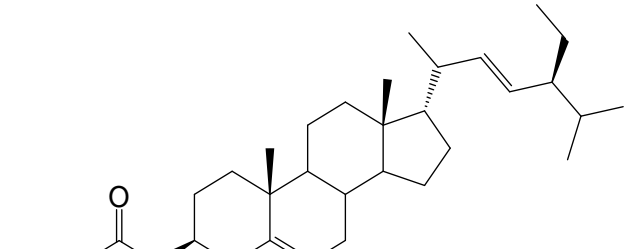
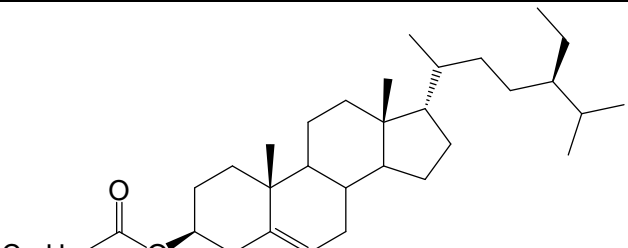
30



31

Les stéroïdes sont recherchés dans les industries pharmaceutiques pour la synthèse des contraceptifs, des anabolisants et pour leurs propriétés antifongiques, cardiotoniques, antibactériennes et hormonales. [Wansi, 2005]. Le β -sitostérol **29** joue un rôle essentiel dans la régulation du taux de cholestérol sanguin ; il atténue l'hypertrophie bénigne de la prostate et est très réactif contre le venin du serpent [Welter et al., 2000].

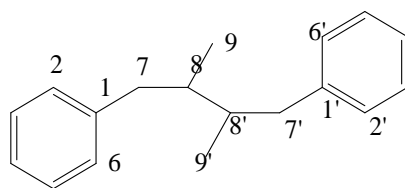
Tableau VI : Quelques stéroïdes isolés de la famille des Euphorbiaceae.

Structures	Noms	Sources	Référence
 <p>32</p>	3-O-β-D-glucopyranoside de β-sitostérol	<i>Thecacoris batesii</i>	[Poumale, 2007]
 <p>33</p>	3-O-β-glucosylstigmastérol	<i>Drypetes hieranensis</i>	[Chen et al., 1999]
 <p>34</p>	Stéarate de stigmastérol	<i>Drypetes gossweileri</i>	[Ngouela et al., 2003]
 <p>35</p>	Stéarate de β-sitostérol	<i>Drypetes gossweileri</i>	[Ngouela et al., 2003]

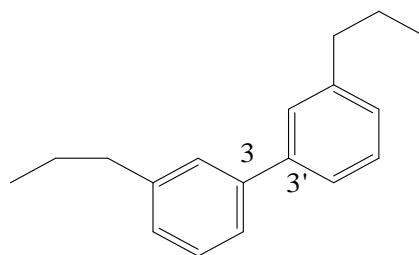
I.2.3.6-Les composés aromatiques et Lignanes.

Le benzène est un hydrocarbure liquide de formule C_6H_6 . Il a été isolé en 1825 par M. Faraday dans le charbon gazeux. Il est facile à cristalliser à $5.5^\circ C$. Le benzène est un nucléon basique de la famille des composés aromatiques. Dans le passé, le terme aromatique désignait une famille de substance ayant une odeur caractéristique [Poumale, 2007].

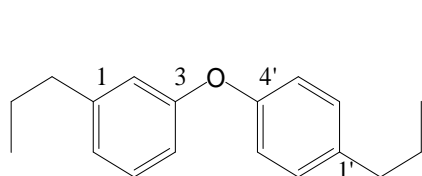
Les lignanes sont considérés comme des composés naturels formés du couplage de deux unités de phenylpropane. Il arrive que ces composés soient liés en position 8,8' **36** ou 3,3' **37** et dans ce dernier cas, on parle de néo-lignane. Tout autre composé de la classe des lignanes lié par des positions différentes de 8,8' est appelé néo-lignane **37**. Nous avons aussi les oxynéolignanes **38** lorsque les unités sont liées par une fonction éther, ainsi que des nor-lignanes **39** lorsque l'un des cycles aromatiques est à cinq carbones ou alors lorsqu'on a un éthyle à la place du propyle [Moss, 2000].



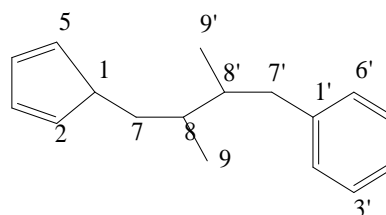
36



37



38



39

Les lignanes pour la plupart, appartenant aux arylnaphtalènes et aux dibenzocyclo-octanes possèdent des propriétés cytostatiques [Bruneton, 1993]. Il a été démontré que certains lignanes sont doués d'activités antifongiques, anti tumorales, anti oxydantes, hypertensives, et antiallergiques [Bruneton, 1993]. Les tableaux VII et VIII présentent respectivement quelques composés aromatiques et lignanes isolés de quelques espèces d'Euphorbiaceae.

Tableau VII : Quelques composés aromatiques isolés de la famille des Euphorbiaceae.

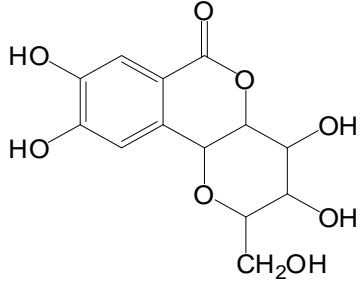
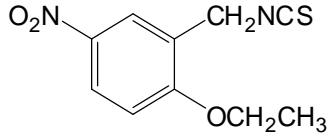
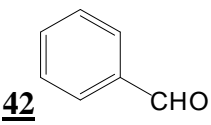
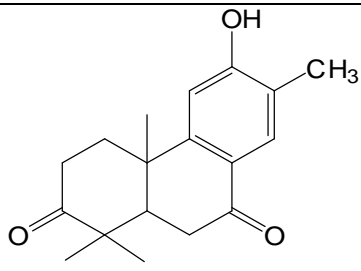
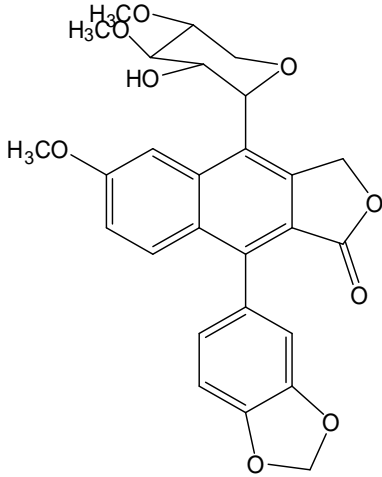
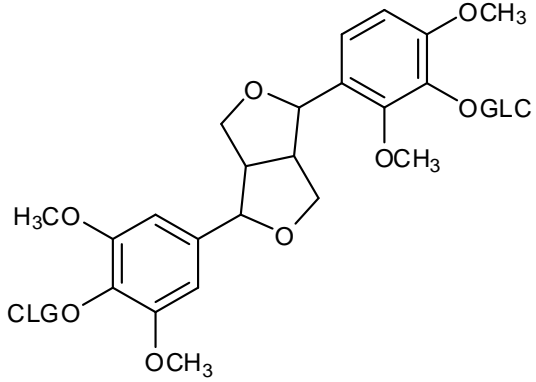
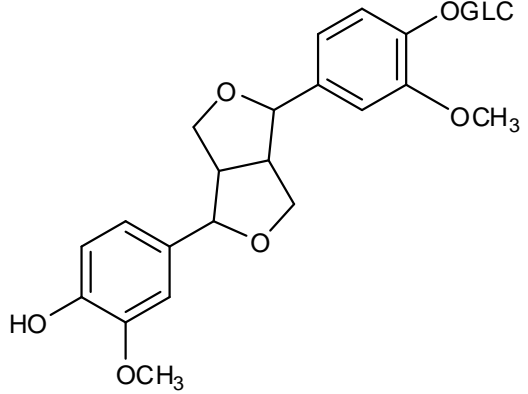
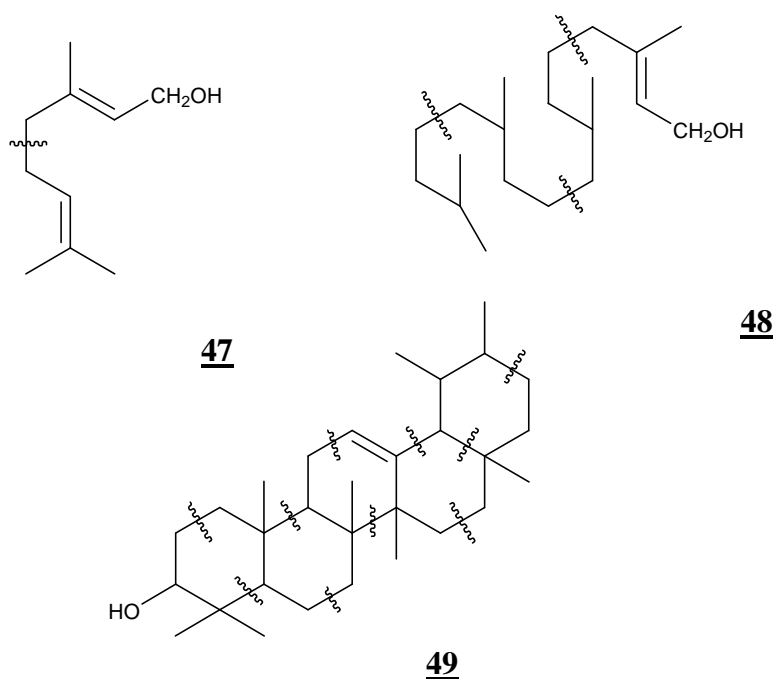
Structures	Noms	Sources	Référence
<p>40</p> 	Bergenine	<i>Fluegge microcarpa</i>	[Ahmad et al., 1972]
<p>41</p> 	Benzylisothiocyanate	<i>Drypetes gossweileri</i>	[Dupont et al., 1997] [MVe-Mba et al., 1997]
<p>42</p> 	Benzaldéhyde	<i>Drypetes gossweileri</i>	[Dupont et al., 1997] [MVe-Mba et al., 1997]
<p>43</p> 	Gossweilone	<i>Drypetes gossweileri</i>	[Ngouela et al., 2003]

Tableau VIII : Quelques lignanes isolés de la famille des Euphorbiaceae.

Structures	Noms	Sources	Référence
<p>44</p> 	<p>Cleistanthine A</p>	<p><i>Cleistanthu spatulus</i></p>	<p>[Govindachari et al., 1969]</p>
<p>45</p> 	<p>(-)-syringaresinol-4'-4''-O-β-D-diglucoopyranoside</p>	<p><i>Drypetes roxburghii</i></p>	<p>[Sengupta et al., 1997] [Sipahimalani et al., 1994]</p>
<p>46</p> 	<p>(-)-pinoresinol-4'-O-β-D-glucoopyranoside</p>	<p><i>Drypetes roxburghii</i></p>	<p>[Sengupta et al., 1997] [Sipahimalani et al., 1994]</p>

I.2.3.7-Les terpénoïdes

Ils constituent un groupe de composés naturels dont le squelette carboné peut être décomposé en unités isopréniques (C_5H_8) comme indiqué dans le géraniol **47** le phytol **48** et l' α - amyryne **49** [Ikan, 1969; Hanson, 1972]. Selon le nombre d'unités isopréniques, on distingue les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les tétraterpènes (C_{40}), et les polyterpènes (C_{5H_8}) n avec $n > 8$.



Cependant la majorité des terpénoïdes isolés des Euphorbiaceae sont soit des triterpènes soit des diterpènes, raison pour laquelle nous nous intéresserons particulièrement à ces deux classes de terpénoïdes.

I.2.3.7.1-Les Triterpènes

I.2.3.7.1.1-Origine biosynthétique

Les monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et sesterpènes sont constitués des unités isopréniques liées tête à tête, alors que les triterpènes et les tétraterpènes sont issus de 2 unités isopréniques en C₁₅ et C₂₀ respectivement jointes queue à queue. Les triterpènes contiennent 30 atomes de carbones renfermant 6 unités isopréniques [Poumale, 2007]. Dans la cellule vivante, la biosynthèse des terpénoïdes se fait par voie mévalonique à partir de l'acide acétique et plus précisément de son équivalent actif l'acétylcoenzyme A (acétyl-SC_OA), ceci aboutit à travers des réactions d'aldolisations successives avec 2 autres molécules de même type au (R)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl SC_OA (HMG-SC_OA) **50** qui est réduit par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) en acide mévalonique **51**. Cet acide subit une double phosphorylation en présence de l'adénosine triphosphate (ATP) pour conduire à l'acide mévalonique-5-pyrophosphate **52**. Ce dernier à son tour se décarboxyle pour donner le précurseur en C₅, l'isopenténylpyrophosphate (IPP) **53** qui s'isomérisé en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) **54**. Les triterpènes dérivent tous du squalène **55** dont la formation à partir de l'isopenténylpyrophosphate (IPP) **53** et de son isomère le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) **54** est représentée sur schéma 1.

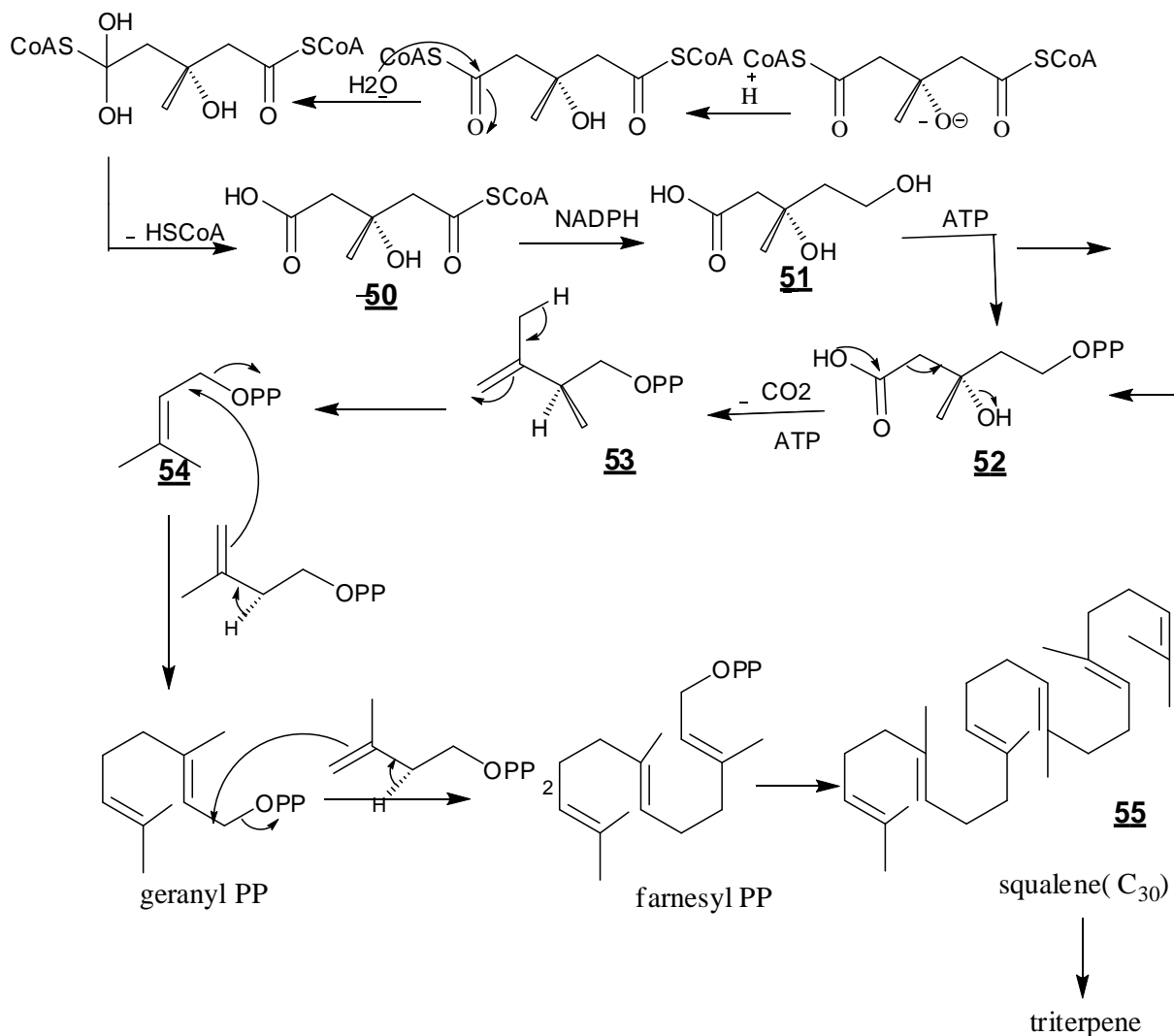
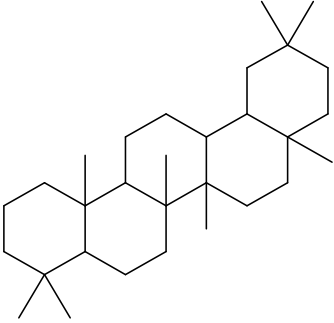
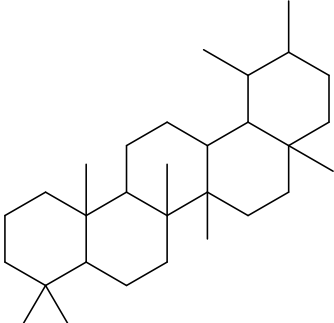
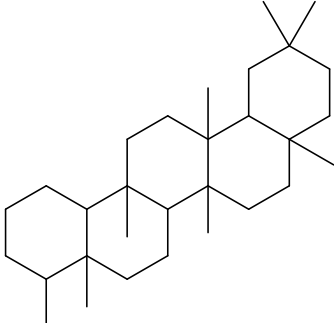
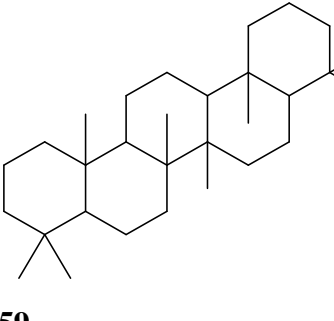
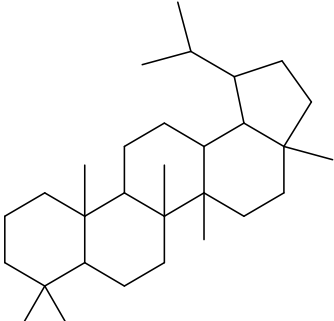
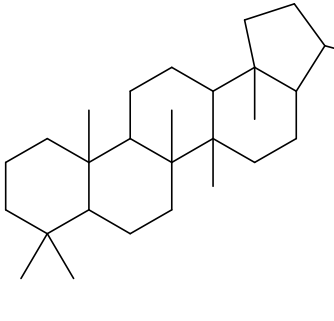
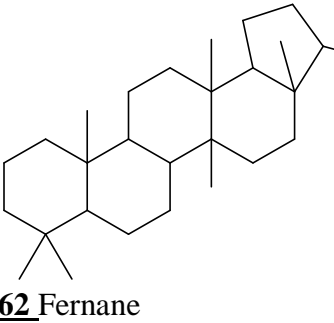
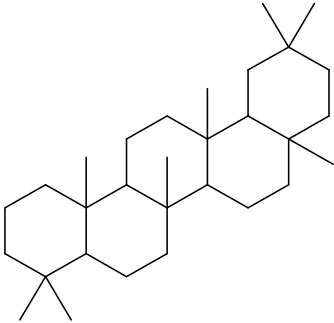
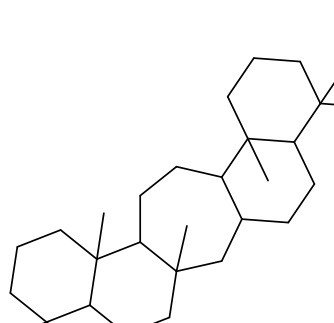
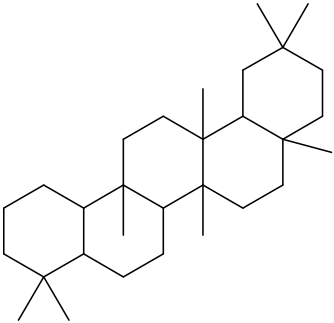
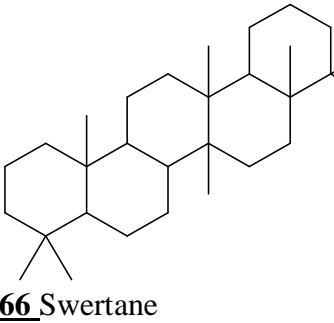
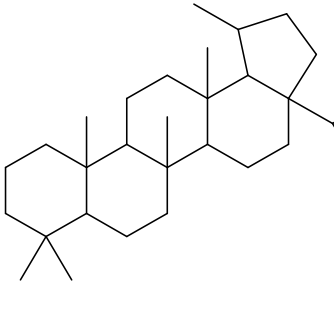


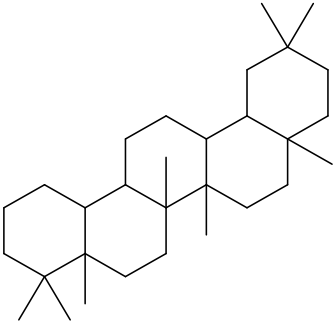
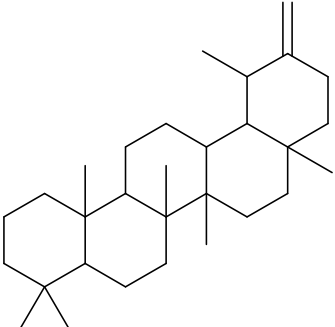
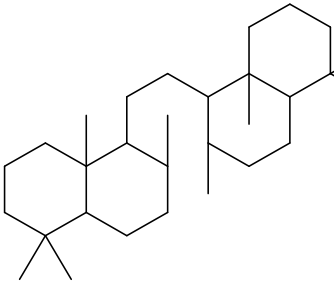
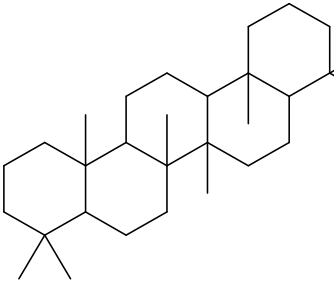
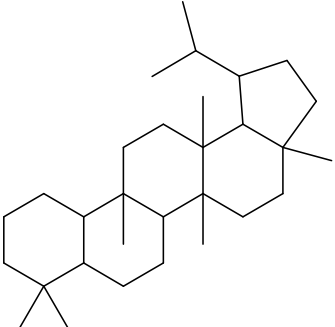
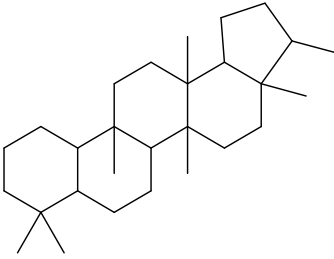
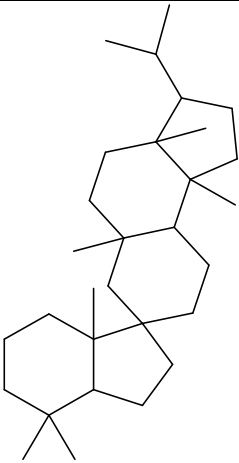
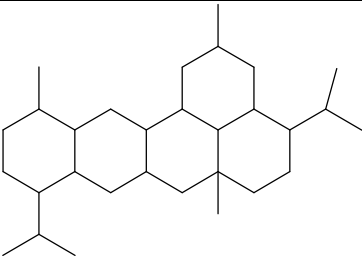
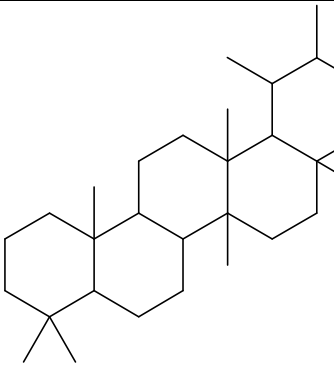
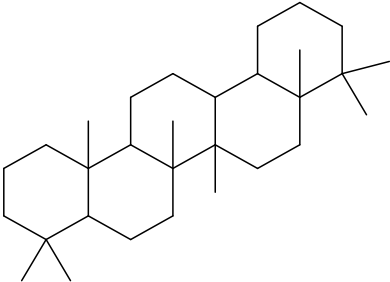
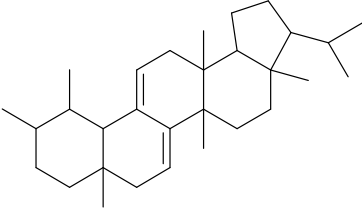
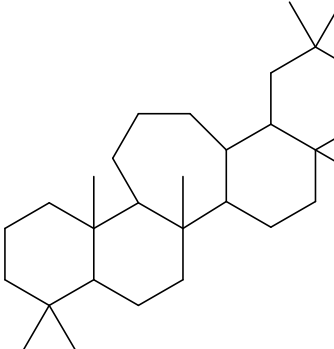
Schéma 1 : Biosynthèse du squalène.

I.2.3.7.1.2-Différents groupes structuraux

Les triterpènes se subdivisent en 6 classes : Les triterpènes acycliques, monocycliques, dicycliques, tricycliques, tétracycliques et pentacycliques, cette dernière classe la plus répandue [Wansi ,2000]. La plupart des triterpènes isolés de la famille des Euphorbiaceae appartiennent à la classe des triterpènes pentacycliques, ils sont classés dans environ 24 groupes structuraux qui sont illustrés dans le tableau IX [Mahato et al., 1994 ; Wafo et al., 2010]. La glycosilation de ces groupes structuraux, conduit à la formation des substances naturelles appelées saponines. [Mahato et al., 1992; Mahato et al., 1994].

Tableau IX : Différents groupes structuraux des triterpènes pentacycliques [Mahato et al., 1994; Wafo et al., 2010].

 <p>56 Oléanane</p>	 <p>57 Ursane</p>	 <p>58 Friedelane</p>
 <p>59 Gammacerane</p>	 <p>60 Lupane</p>	 <p>61 Hopane</p>
 <p>62 Fernane</p>	 <p>63 Taraxarane</p>	 <p>64 Serratane</p>
 <p>65 Glutinane</p>	 <p>66 Swertane</p>	 <p>67 Freedomadeirane</p>

 <p>68 Mimosopane</p>	 <p>69 Taraxastane</p>	 <p>70 Onocerane</p>
 <p>71 Stictane</p>	 <p>72 Hancokinane</p>	 <p>73 Sorghumane</p>
 <p>74 Spirosupinane</p>	 <p>75 Bicadinane</p>	 <p>76 Bauerane</p>
 <p>77 Kairatane</p>	 <p>78 Canarane</p>	 <p>79 Dubosane</p>

Compte tenu du fait que nous avons isolé un triterpène nouveau au cours de nos travaux, il nous a semblé utile de présenter les méthodes expérimentales de détermination des structures des triterpènes.

I.2.3.7.1.3-Généralités sur les méthodes expérimentales

- **Isolement et purification des triterpènes pentacycliques**

La méthode d'obtention des triterpènes est surtout basée sur l'extraction du matériel végétal avec des solvants organiques dument choisis tels que l'éther de pétrole, le méthanol, l'éthanol, le chloroforme, et l'acétate d'éthyle pour ne citer que ceux-là [Boiteau et al., 1964]. Il n'existe pas de méthodes spécifiques de purification des triterpènes pentacycliques. Ils sont séparés à l'aide des techniques chromatographiques usuelles (colonne ouverte à moyenne ou à haute pression etc.), sur des supports classiques (silice, alumine, gel de dextrans). Cependant, ceux comportant des fonctions acides et alcools peuvent être traités de manière particulière pour une purification plus aisée. Ainsi, un mélange de triterpènes polyhydroxylés, très polaire peut être transformé en dérivés peracétylés moins polaires et facilement purifiables. De même, des acides triterpéniques se purifient plus aisément lorsqu'ils sont transformés en esters méthyliques. [Tapondjou, 1996].

Une fois le composé triterpénique obtenu, il faut déterminer sa structure au vu de ses caractéristiques physiques, chimiques et spectroscopiques.

L'étude structurale des triterpénoides a beaucoup bénéficié du développement de la spectrométrie de masse et de la résonance magnétique nucléaire.

- **Spectroscopie de masse**

Le choix des méthodes d'ionisation en spectrométrie de masse dépend de la polarité, de la labilité, et du poids moléculaire du composé à analyser. L'avènement des techniques modernes telles que la DIC/NH₃ et ES permettent de détecter respectivement les ions pseudo moléculaires [M+H]⁺ ou [M+NH₄]⁺ et [M+Na]⁺ ou [M+2Na]⁺ et d'en déduire l'ion moléculaire [Shiping et al., 1999].

Les techniques classiques d'ionisation chimique permettent non seulement d'avoir l'ion moléculaire, mais aussi de déterminer la position de certains groupements dans la molécule. Dans le cas des triterpènes pentacycliques, le mode de fragmentation se fait suivant la réaction Retro-Diels-Alder (RDA) (schéma 2). Pour les triterpènes de type lupane, le pic de base est généralement à *m/z* 189,2. Pour les oléanènes ou ursènes, l'ion fragment a dont dérive

généralement le pic de base permet de déduire si le composé porte des substituants sur les cycles D et E [Ogunkoya, 1981] En effet, les triterpènes de cette série n'ayant pas de substituants sur les cycles D et E ont leur pic de base à m/z 218. Si par contre les cycles D et E portent des groupes fonctionnels tels que COOH, COOMe, CH₂OAc ou OH, on aura un pic de base à m/z 203 et d'autres pics à m/z 248 (203+COOH), m/z 262 (203+COOMe), m/z 264 (203+COOH+OH) et m/z 276 (203+CH₂OAc) [Ogunkoya, 1981 ; Amoros et Girre, 1987] ont montré que les composés portant un groupement COOH en position 17 et un hydroxyle sur le cycle D ou E surtout en position C-16, C-19 ou C-22 ont leur pic de base à m/z 201. Cependant, la spectrométrie de masse ne nous permet pas de faire la différence entre les séries oléanique, ursonique et lupanique. Le meilleur moyen d'atteindre ce but est l'utilisation de la RMN du ¹³C et la RMN du ¹H.

Dans la série des friedelanes, le mode de fragmentation n'est plus de type Retro-Diels-Alder, mais se fait par rupture de la liaison créée par l'énergie négative fournie à la molécule. Le pic caractéristique des friedelanes n'ayant pas de substituants sur le cycle D ou E est à m/z 205. On observe aussi d'autres importants ions à m/z 288 ; 315 et 316 [Sengupta et al., 1968].

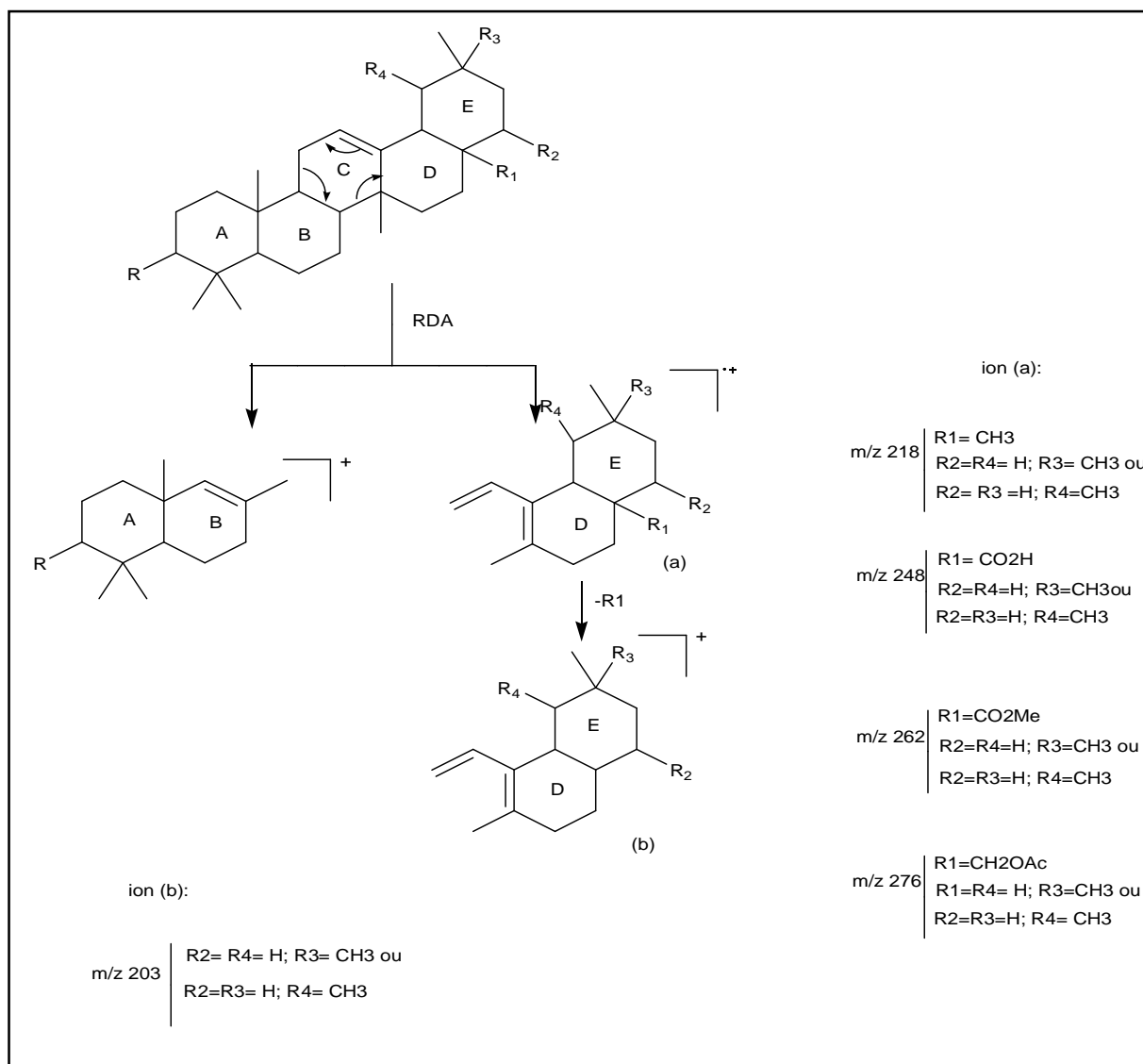


Schéma 2 : Fragmentation Rétro-Diels-Alder des séries oléananes et ursanes (ogunkoya, 1981)

- Spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire (RMN).

RMN du ^1H

Le spectre de RMN du ^1H des triterpènes pentacycliques présente généralement les signaux de 8 méthyles angulaires entre δ_{H} 0.50 et 2.00 ppm. Ces méthyles sont tous des singulets dans la série oléan-12-ène, par contre dans la série urs-12-ène six méthyles apparaissent sous forme de singulets et deux autres (H-29 et H-30) apparaissent sous forme de doublets [Ageta et al., 1983; Kuo et al., 2000]. Cependant, les modifications structurales entraînent sur le squelette carboné un changement systématique des déplacements chimiques des protons autres que ceux des groupes méthyles [Jyoti et al., 1972]. On observe

généralement les pics caractéristiques des protons vinyliques entre δ_H 4.50-6.50 ppm. Dans la série oléan-12-ène, la formation du pont lactonique entre C-28 et C-21 entraîne le déplacement chimique du proton oléfinique H-12 vers les champs faibles [Jyoti et al., 1972]. Le proton allylique H-18 apparaît autour de δ_H 2,20 ppm sous forme de doublet dédoublé dans le cas de la série oléan-12-ène et sous forme de doublet dans le cas de la série urs-12-ène. Mais si par contre le méthyle en position C-17 est oxydé en acide carboxylique, le proton H-18 subit un effet attracteur de la fonction acide qui le déplace vers les champs faibles autour de δ_H 2,84 ppm en, série oléan-12-ène et à δ_H 2,40 ppm en série urs-12-ène [Furuya et al., 1987]. Dans le cas des friedelines, on observe généralement 7 singulets appartenant aux méthyles angulaires entre δ_H 0,90-1,20 ppm et un doublet caractéristique attribuable au méthyle 23 vers δ_H 1,08 ppm ayant pour constante de couplage J entre 6,0-7,5 Hz, le proton H-4 apparaît le plus souvent sous forme d'un quadruplet entre δ_H 2,50-2,90 ppm avec la même constante de couplage [Furuya et al., 1987]. Dans le cas des lupanes, on observe généralement 7 singulets dont 6 appartenant aux méthyles angulaires entre δ_H 0,76-1,03 ppm et un autre attribuable au méthyle vinylique en position 30 vers δ_H 1,76 ppm. On observe généralement les pics caractéristiques des protons du méthylène terminal en position C-29 à δ_H 4.60 et 4.72 ppm [Chueng et Williamson, 1969].

RMN du ^{13}C

L'avènement des spectrographes à haut champ (250, 300, 400, 500 MHz) de la transformée de Fourier et des nouvelles techniques ont fait de la RMN du ^{13}C , une méthode très efficace dans la détermination des structures des triterpènes pentacycliques. En général, dans les composés de type oléanane et ursane, les 8 méthyles angulaires résonnent entre δ_c 14,0-33,0 ppm, dans la série des composés de type friedelane, ils apparaissent entre δ_c 6,8-35,0 ppm. Dans les composés de type lupane, les 7 méthyles résonnent entre δ_c 14,0-28,0 ppm [Mahato et al., 1994].

Le principal avantage des spectres de RMN ^{13}C dans l'étude structurale des triterpènes pentacycliques est qu'ils permettent de différencier de deux manières les séries oléan-12-ène, urs-12-ène et lup-20(29)-ène. D'une part Par le nombre de leurs carbones quaternaires et d'autre part par les déplacements chimiques des carbones vinyliques C-12 et C-13. En effet, les squelettes carbonés des dérivés d'oléa-12-ène, de lup-20(29)-ène et urs-12-ène renferment respectivement six, six et cinq atomes de carbones quaternaires. Quant aux déplacements chimiques, les carbones vinyliques C-12 et C-13 des composés de type urs-12-ène résonnent respectivement entre δ_c 124-125 et 138-139,5 ppm, ceux des composés de type oléan-12-ène résonnent respectivement entre δ_c 121,5-122,5 et 143-144,5 ppm. et les carbones

caractéristiques C-20 et C-29 des composés de type lup-20(29)-ène apparaissent entre δ_c 147,1-151,1 et 110,0-111,00 ppm [Connolly et Hill, 1991]. Cependant, il existe quelques exceptions pour les cas des composés renfermant des substituants à proximité de la double liaison C-12.

La différence des déplacements chimiques des carbones C-12 et C-13 observée dans les séries ursène et oléanène s'explique par le fait : Dans la série ursène, la jonction entre les cycles D/E est cis (conformation chaise-chaise), ce qui rapproche le méthyle 19 β de la double liaison. L'introduction d'un groupement hydroxyle en 19 α sur les dérivés de la série oléan-12-ène est sans effet sur les déplacements chimiques des carbones C-12 et C-13. Mais si cet hydroxyle se trouve en 19 β (équivalent au méthyle 19 β dans la série urs-12-ène), on note un changement remarquable sur les déplacements chimiques des carbones oléfiniques [Mahato et al., 1994]. On note aussi que, la présence d'un groupement acide carboxylique en C-14 influence le déplacement chimique des carbones C-12 et C-13 dans le cas des oléan-12-ènes. De même la présence des groupements hydroxyles sur le squelette triterpénique entraîne un changement des déplacements chimiques des carbones voisins. Il en est de même pour la configuration du carbone C-18 [Mahato et al., 1994].

Effet des substituants OH [Mahato et al., 1994 ; Merfort et al., 1992].

La présence d'un groupement hydroxyle sur le squelette triterpénique entraîne une variation du déplacement chimique des carbones α de δ_c 34,0-50,0 vers les champs faibles et ceux des carbones β de δ_c 2,0-10,0, dans les champs faibles. Par contre, elle entraîne vers les champs forts ceux des carbones γ de δ_c 0, 0-0,9. La position du groupement hydroxyle joue un rôle important dans les déplacements chimiques en RMN¹³C : Comme exemple, un 3 α -hydroxyle influence par interactions 1,3-diaxiales, le déplacement chimique des carbones C-1, C-3, C-5, alors que le 3 β -hydroxyle est bien dégagé de la molécule et rend l'encombrement moindre. La présence d'un hydroxyle en C-23 entraîne une baisse du déplacement chimique du carbone C-3 de δ 6,0 environ si le groupement hydroxyle en C-3 est en β et reste sans effet si ce groupement est en α . On observe plutôt un phénomène inverse dans le cas d'un hydroxyle en C-24.

Toutes ces expériences se sont avérées insuffisantes dans la détermination des structures des triterpènes ayant des structures complexes. D'où la venue de la RMN bidimensionnelle (RMN 2D) pour aider dans l'élucidation des structures de ces molécules complexes.

- **RMN bidimensionnelles [Gunther., 1994].**

Les expériences de RMN 2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage.

- **Corrélations homonucléaires**

- **COSY (^1H - ^1H)** : Cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J et ^3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents
- **NOESY (^1H - ^1H)** : Elle permet d'observer les corrélations dans l'espace (effets over Hauser) entre protons d'une même molécule.

- **Corrélations hétéronucléaires**

- **HMQC ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$)** : Cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.
- **HMBC ($^2\text{J}_{\text{H-C}}$ $^3\text{J}_{\text{H-C}}$)** : Elle permet la détection des couplages longue distance $^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

I.2.3.7.1.4-Activités biologiques des triterpènes pentacycliques

Les triterpènes pentacycliques tout comme d'autres substances naturelles jouent un rôle significatif aussi bien dans les plantes qui les synthétisent que chez l'homme qui les utilise. C'est ainsi que, les triterpènes pentacycliques favorisent la germination, la croissance [Boiteau et al., 1958 ; Solacolu, 1913], le développement et la défense des plantes contre certaines agressions extérieures [Tian et al., 2006 ; Shaw et al., 1962]. L'activité biologique des triterpènes pentacycliques à cycle A séco tel que l'acide 2,3-séco oléan-12-ène-2, 3,28-trioïque **80** a été étudiée par Bass et à l'issue de ces travaux, il a été démontré que ces composés constituent des défenses pour les plantes contre les prédateurs et les micro-organismes pathogènes [Bass, 1985].

Les triterpènes présentent les activités antitoxiques [Duh et al., 1987], antitumorales [Kloos et al., 1982 ; Liu et al., 1972], antivirales et antibactériennes [Aquino et al., 1989 ; Eisa et al., 2000]. Ils présentent également des activités antifongiques, antidiabétiques, anticarcinogéniques, antiparasitiques, antiulcerogéniques, neuroprotectives et antivirales [Gonzalez et al., 2010]. Il a été prouvé que les glucosides de l'acide oléanolique **81** sont de

puissants fongicides ; ils ont en outre une activité anti-inflammatoire, antivalleryque et antiulcéreuse. L'acide ursolique **82** est connu comme agent anti-inflammatoire, antiarthritique, anti-ulcéreux et hypolipidémique [Bass, 1985]. En industrie pharmaceutique, le β -sitostérol **29** et le stigmastérol **83** sont utilisés dans la fabrication des médicaments stéroïdiens (agents contraceptifs et anti-inflammatoires). Il a été aussi prouvé que le β -sitostérol **29** possède un effet anti-inflammatoire dans le traitement de l'inflammation des poumons, de l'asthme et des bronchospasmes [Lee et al., 2012]

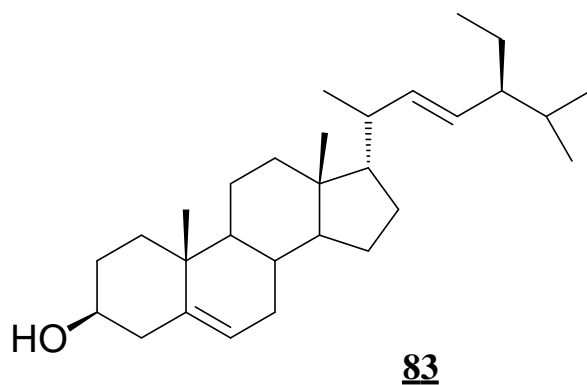
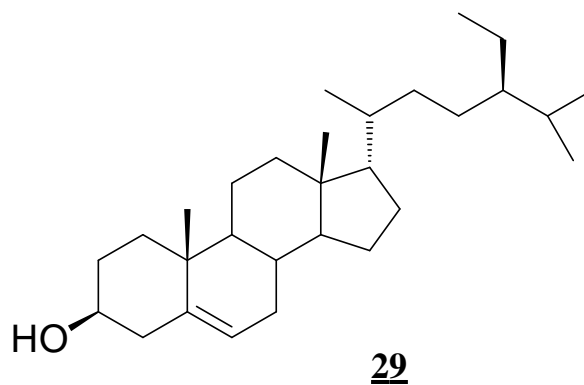
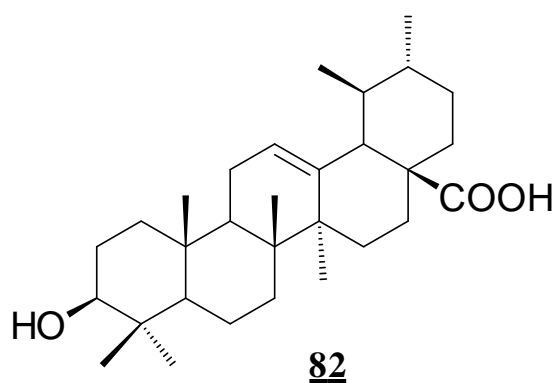
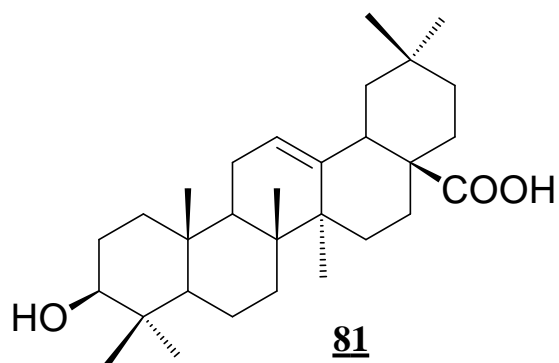
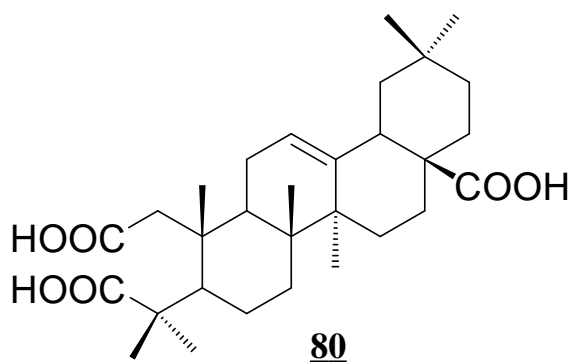
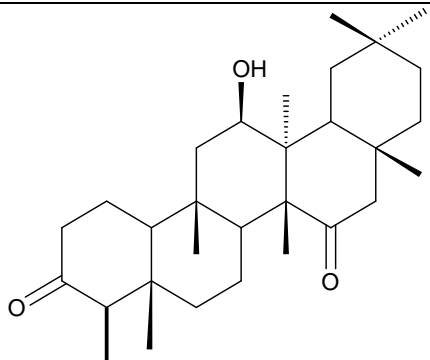
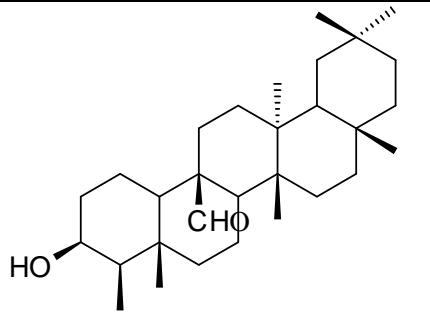
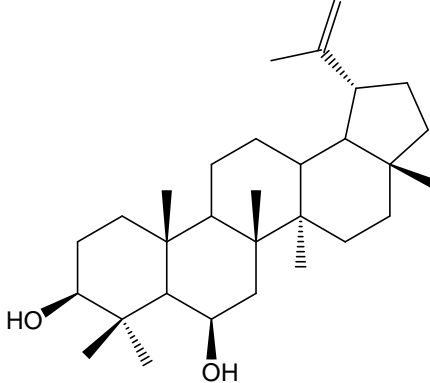
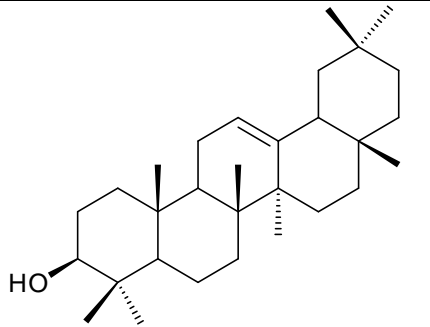
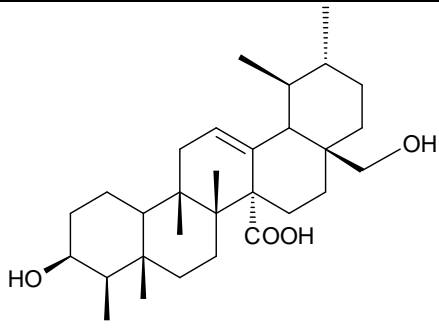
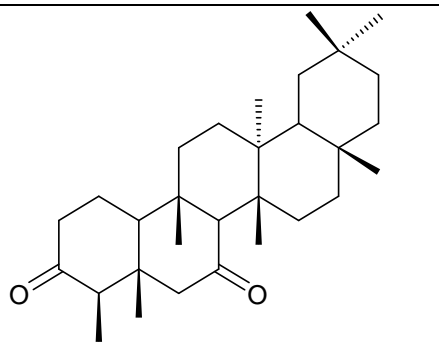


Tableau X : Quelques triterpènes pentacycliques isolés de la famille des Euphorbiaceae.

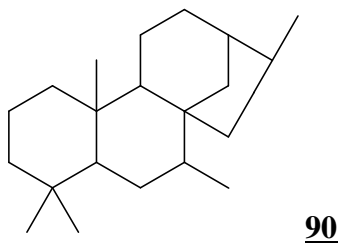
Structures	Noms	Sources	Référence
<p>84</p> 	12 α -hydroxyfriedelane-3-15-dione	<i>Drypetes paxii</i>	[Chiozem et al., 2009]
<p>85</p> 	3 α -hydroxyfriedelan-25-al	<i>Drypetes inaequalis</i>	[Awanchiri et al., 2009] Singh et al., 1992]
<p>86</p> 	3 β , 6 α -dihydroxylup-20(29)-ène	<i>Drypetes tessmaniana</i>	[Donfack et al., 2008]
<p>87</p> 	β -amyrine	<i>Drypetes littolaris</i>	[Lin et al., 2001]

 <p>88</p>	<p>Acide 3β, 28-dihydroxyurs-12-ène-27-oïque</p>	<p><i>Mallotus hookerianus</i></p>	<p>[Hui et al., 1976]</p>
 <p>89</p>	<p>3,7-dioxofriedelane</p>	<p><i>Drypetes tessmanniana</i></p>	<p>[Kueté et al., 2010]</p>

Outre les triterpènes, les diterpènes sont également isolés des Euphorbiaceae.

I.2.3.7.2-Les diterpènes

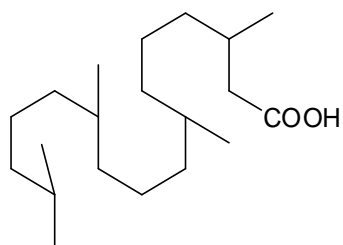
Les diterpènes constituent un vaste groupe de métabolites secondaires avec 20 atomes de carbones dans leur squelette de base et provenant de 4 unités isopréniques. Ils sont largement répandus dans les champignons et les plantes [Bruneton, 1993]. Plusieurs d'entre eux ont une activité biologique et l'énergie de la cellule est toxique aux hormones de croissance des plantes comme la gibbérelline 90 [Keumedjio, 1990].



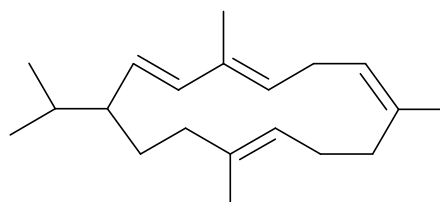
Dans les plantes, on rencontre différents types de diterpènes [Poumale, 2007].

- Les diterpènes acycliques comme l'acide phytonique 91;
- les diterpènes monocycliques comme le cembrene 92;

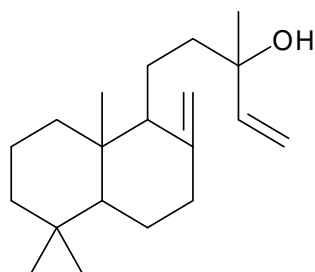
- les diterpènes bicycliques comme le manool **93**;
- les diterpènes tricycliques comme le rimuene **94**;
- les diterpènes tétracycliques comme le kaurène **95**;
- les diterpènespentacycliques comme l'acide trachylobanique **96**;
- les macrocycliques comme la taxusine **97**



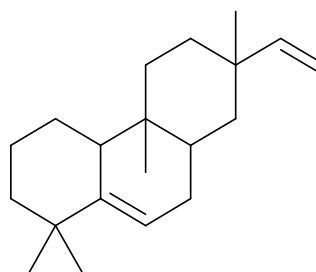
91



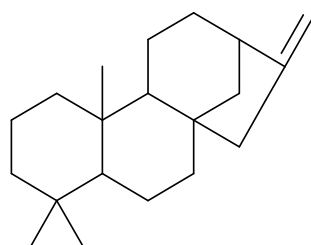
92



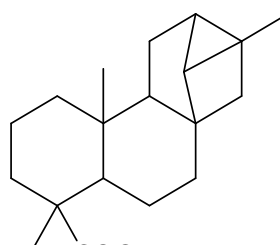
93



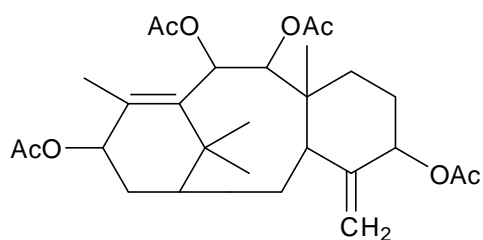
94



95



96

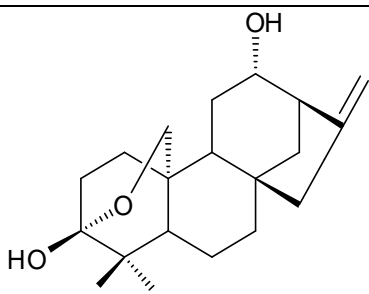
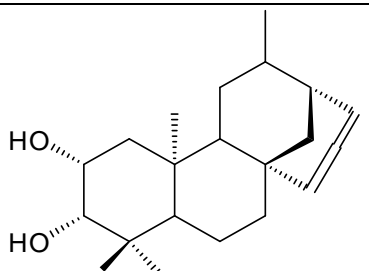
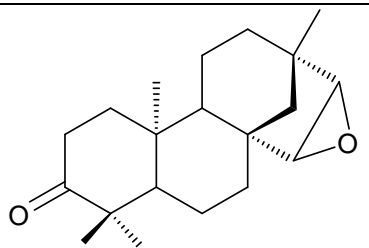
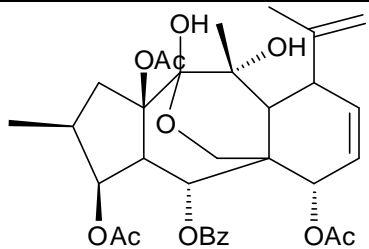


97

Les diterpènes présentent plusieurs activités biologiques. Cependant, leur utilisation est limitée dans l'industrie pharmaceutique. La littérature montre que les diterpènes ont des

propriétés anti-inflammatoires, analgésiques, anti hypertensives et abortives. Ils présentent aussi des activités antimicrobiennes, anti tumorales et cytotoxiques [Bruneton, 1993]. Les diterpènes isolés du genre *Euphorbia* ont des activités cytotoxiques, antivirales [Wiart et al., 2005], toxiques (dont les signes généraux sont la dépression, la perte de cheveux, et le mal de dos. Ils sont fortement irritants et peuvent être utilisés comme des agents antiasthmatiques et anti catarrhal [Nawito et al., 2001]. Ils présentent des propriétés analgésiques et anti leucémiques [Hohmann et al., 1999].

TableauXI : Quelques diterpènes isolés de la famille des Euphorbiaceae.

Structures	Noms	Sources	Référence
 <p>98</p>	Thecacorine A	<i>Thecacoris batesii</i>	[Ngadjui et al., 2007]
 <p>99</p>	Thecacorine B	<i>Thecacoris batesii</i>	[Ngadjui et al., 2007]
 <p>100</p>	Excoecarine E	<i>Excecaria agallocha</i>	[Konichi et al., 2000]
 <p>101</p>	Decipinone B	<i>Euphorbia decipiens</i>	[Zahid et al., 2001]

L'étude pharmacologique des espèces du genre *Thecacoris* a été jusqu'ici très peu menée ; *Thecacoris batesii* est utilisé comme purgatif et contre le rhumatisme en médecine traditionnelle au Cameroun [Ngadjui *et al.*, 2007].

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes limités à l'étude des activités antimycobactérienne, antibactérienne, antifongique et phytotoxique de *T. annobonae*. C'est dans cette optique que nous nous proposons de présenter de manière brève les généralités sur les infections bactériennes ainsi que sur la tuberculose.

I.3-APERCU SUR LES MALADIES CIBLEES

I.3.1-Les infections microbiennes

Ce sont des maladies dues aux microorganismes pathogènes, notamment les bactéries et les champignons qui causent plus de 17 millions de décès par an, ce qui représente un tiers de la mortalité observée annuellement sur la planète. En effet, les maladies respiratoires aiguës d'origine bactérienne causent 3 millions de décès par an, les maladies diarrhéiques 2,5 millions, la tuberculose près de 2 millions, principalement en Afrique Sub-Sahélienne [WHO, 2002] et environ 500.000 à 600.000 pour la fièvre typhoïde dans les régions endémiques [WHO, 2009].

I.3.2-Les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires (procaryotes). Elles sont à l'origine des maladies telles que le choléra, la lèpre et la tuberculose pour ne citer que celles là. On les classe succinctement en deux grands groupes en fonction de la composition de leur paroi. En effet, on distingue les bactéries gram-positif et les bactéries gram-négatif. La teneur en peptidoglycane est plus élevée dans les parois des bactéries gram-positif que dans celles des bactéries gram-négatif. Après lavage à l'éthanol, les bactéries qui retiennent la coloration bleu-foncée du violet de gentiane sont des bactéries gram positif et celles qui ne retiennent aucune coloration sont appelées bactéries gram-négatif [Hermann, 1985; Van, 2001]. Généralement, les organismes infectieux sont regroupés en trois types : [Madigan et Martinko, 2006]

- Les pathogènes obligatoires dont la survie n'est possible qu'à l'intérieur de leur hôte;
- Les pathogènes accidentels dont l'infection chez l'homme se produit dans des conditions accidentelles (infection au tétanos suite à une blessure ou au choléra par une eau contaminée);
- Les pathogènes opportunistes qui infectent les personnes dont le système immunitaire est déjà fragilisé par d'autres affections.

Le pouvoir pathogène d'une bactérie dépend non seulement de son pouvoir invasif (aptitude à se répandre et à se disperser dans les tissus en vue de l'établissement d'un foyer infectieux en dépit des défenses immunitaires), mais aussi de son pouvoir toxicogène (aptitude à produire des toxines).

I.3.3-Les champignons

Ce sont des microorganismes pourvus de noyaux (eucaryotes). Plusieurs espèces de champignons sont pathogènes chez l'homme. En effet, certains *Candida* sont responsables de mycoses et les dermatophytes sont responsables de plusieurs variétés de teignes. Les champignons peuvent envahir les organes internes (poumons) et provoquer une infection pulmonaire. Ces infections surviennent chez des personnes qui ont subi une dépression du système immunitaire [Nielsen et Heitman, 2007].

I.3.4-Les antibiotiques: la chimiothérapie antibactérienne et antifongique

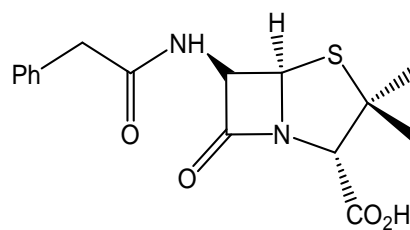
Une substance antibiotique est un médicament ayant la propriété de tuer de façon ciblée des microbes (bactéries, champignons) ou d'empêcher leur prolifération. Les antibiotiques permettent de lutter contre les maladies infectieuses mais, ils sont sans effet sur les virus. Ils doivent être nuisibles pour les microorganismes pathogènes, mais inoffensifs pour les cellules de l'organisme hôte.

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

(CMI). Si la concentration descend en-dessous de la CMI, la croissance microbienne reprend le plus souvent [**Walsh, 2003**].

On peut classer les antibiotiques en 4 groupes selon les critères tels que leur origine, leur spectre d'action ou leur mécanisme d'action [**Walsh, 2003**]. On distingue ainsi:

- ceux qui inhibent la biosynthèse de la paroi cellulaire (cas de la pénicilline, **102**);
- ceux qui bloquent les ribosomes microbiens et la synthèse protéique (cas de la tétracycline, **103**);
- ceux qui bloquent la réplication de l'ADN microbien et la biosynthèse de la membrane cytoplasmique (cas de la polymyxine, **104**);
- ceux qui bloquent les unités monomères dans la synthèse de l'ADN (cas de la ciprofloxacine).



102

La figure ci-contre présente quelques antibiotiques couramment utilisés.

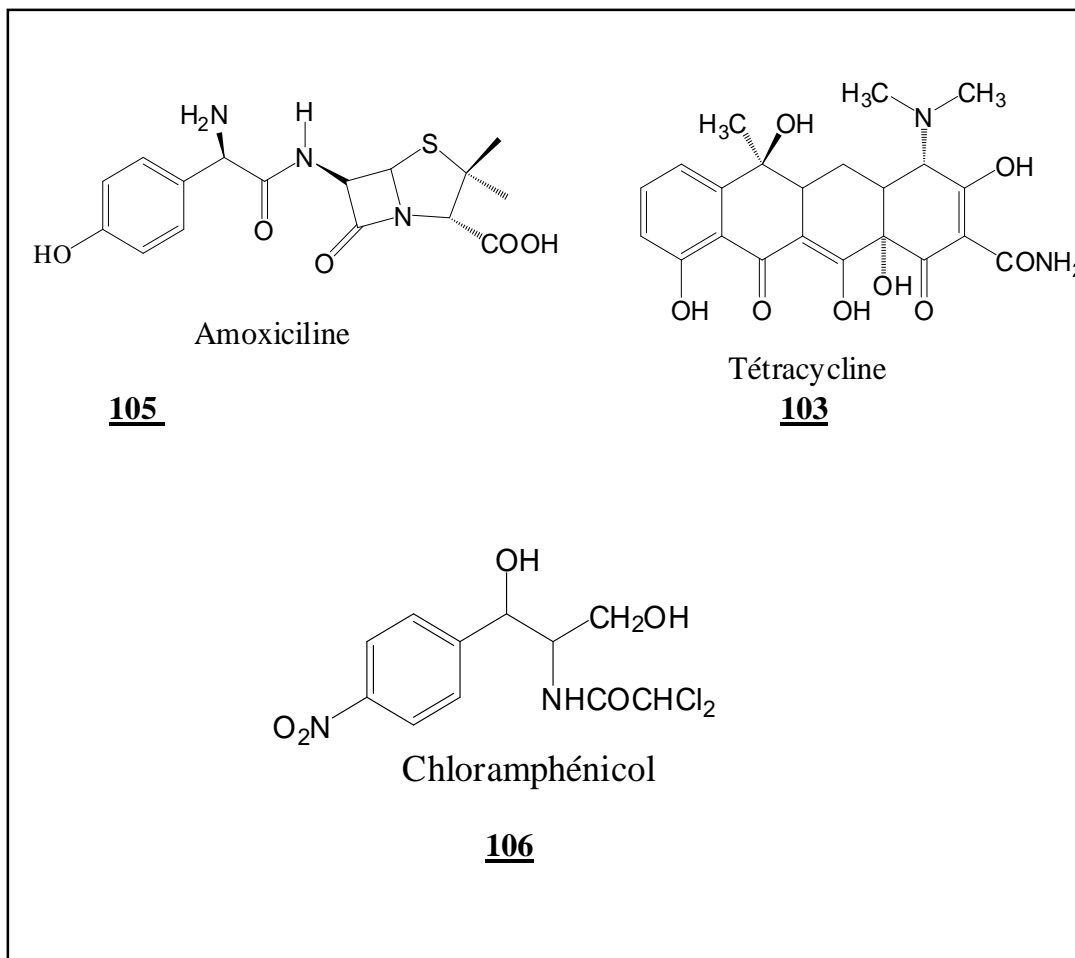


Figure 2 : Quelques antibiotiques couramment utilisés [Walsh, 2003 ; Ramirez-Ronda et Fuxench-Chiesa, 1984]

De nos jours, beaucoup d'antibiotiques sont connus, mais leur utilisation croissante tend à entraîner des cas de résistance. En effet les microorganismes développent des mécanismes de résistances tels que:

- la destruction ou l'inactivation enzymatique de l'antibiotique;
- le changement de la perméabilité des parois;
- la modification des structures cibles;
- l'émergence d'un cycle métabolique nouveau ou de nouvelles enzymes [Mims et al., 1993].

Les activités antimycobactériennes ayant fait l'objet de nos travaux dans cette thèse, il nous paraît opportun de présenter la prévalence de la tuberculose dans le monde et particulièrement en Afrique sub-saharienne.

I.3.5-La tuberculose

I.3.5.1-Définition et Epidémiologie

La tuberculose dont l'agent causal a été isolé par Robert Koch en 1882 (pharmaciens sans frontières) est une maladie infectieuse due à une mycobactérie bacille acido-alcoolo-résistant aérobie strict dont la variété la plus répandue est représentée par le bacille de type humain, *Mycobacterium tuberculosis* [McGaw et al., 2008].

Selon les estimations de l'OMS de 2013, la tuberculose constitue l'une des causes infectieuses majeures de mortalité dans le monde parmi les jeunes et les adultes.

Voici quelques chiffres :

- On estime qu'en 2012, 8,6 millions de personnes ont contracté la tuberculose et 1,3 millions en sont mortes [Simiyu, 2014] ;
- **1/3 de la population mondiale** est infectée par le Bacille de Koch (sans pour autant développer la maladie) ;
- Près de **8 millions de personnes** contractent la tuberculose chaque année ;
- Dans la seule Afrique Subsaharienne, plus de **1,5 millions de personnes** développent la Tuberculose active chaque année ;
- **5 à 10%** de personnes infectées par la Tuberculose font des rechutes à un moment de leur vie ;
- La Tuberculose tue **près de 2 millions de personnes** par an et ce presque exclusivement dans les pays pauvres ;
- **99%** des décès liés à la Tuberculose sont recensés dans les pays pauvres ;
- **Plus de 75%** des maladies et décès associés à la Tuberculose surviennent entre 15-54 ans

I.3.5.2-Symptômes

Au cours de la tuberculose, on assiste généralement à une toux grasse persistante pendant 3 semaines, des expectorations parfois sanglantes, des difficultés à respirer et des

douleurs dans la poitrine, une perte de poids et d'énergie, un sentiment de malaise générale et de fatigue, des sueurs et de la fièvre.

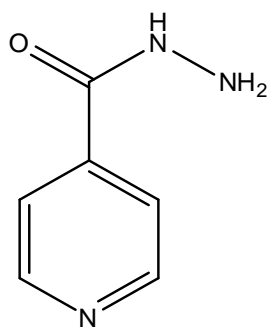
I.3.5.3-Diagnostic

On distingue **la tuberculose pulmonaire** qui est due à la dissémination par voie bronchique des souches *Mycobacterium tuberculosis* à partir du module de primo-infection. Par ailleurs, elle peut affecter par voie lymphatique ou hématogène des sites autres que pulmonaire en particulier les ganglions, les os, la plèvre, les méninges et l'appareil urogénital et dans ce cas on parle de **Tuberculose extra pulmonaire** ou **dissiminée** [Aubry, 2013].

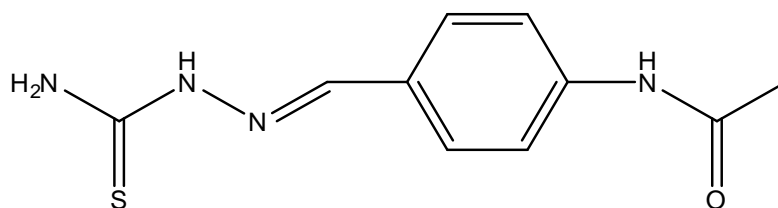
Le rapport sur la tuberculose 2013 porte particulièrement sur le traitement de la **tuberculose multi résistante** qui est devenue un problème de santé publique partout dans le monde. Elle est causée par des bacilles résistants à au moins deux des médicaments antituberculeux les plus efficaces : La rifampicine et l'isoniazide. La tuberculose multirésistante résulte avant tout d'un traitement inadapté ; l'utilisation des médicaments de médiocre qualité ou l'utilisation inappropriée ou incorrecte des antituberculeux peuvent entraîner une résistance aux médicaments. Il existe aussi la **tuberculose ultra résistante** qui est une forme de tuberculose multirésistante répondant à un nombre encore plus restreint de médicaments disponibles, y compris les médicaments antituberculeux de seconde intention les plus efficaces. Elle est déjà signalée dans 92 pays. [Aubry, p., actualités 2013].

I.3.5.4-Traitement clinique

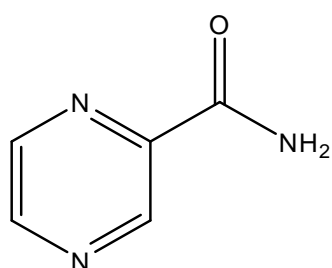
Cliniquement, le traitement de la tuberculose associe les centaines d'antibiotiques tels que : L'isoniazide (**107**), la streptomycine (**112**), la thiacetazone (**108**), la pyrazinamide (**109**), l'éthambutol (**110**), pour ne citer que celles-la (Pharmaciens sans frontières). Lors de la journée mondiale de la tuberculose le 17 mars 2014 il a été dit qu'en Arménie, les médecins sans frontières et le Ministère de la santé ont fourni un nouveau médicament contre la tuberculose: La bédaquiline (**111**) qui apporte un espoir à des patients pour qui il ne restait plus de traitements efficaces.



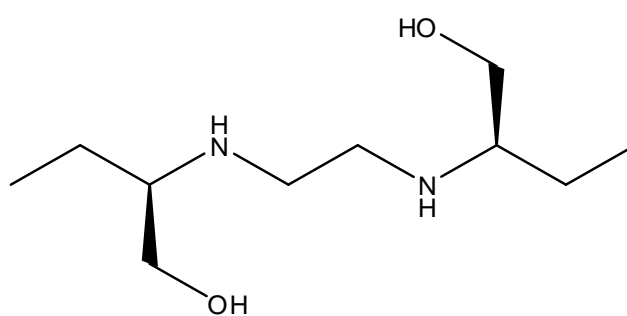
107



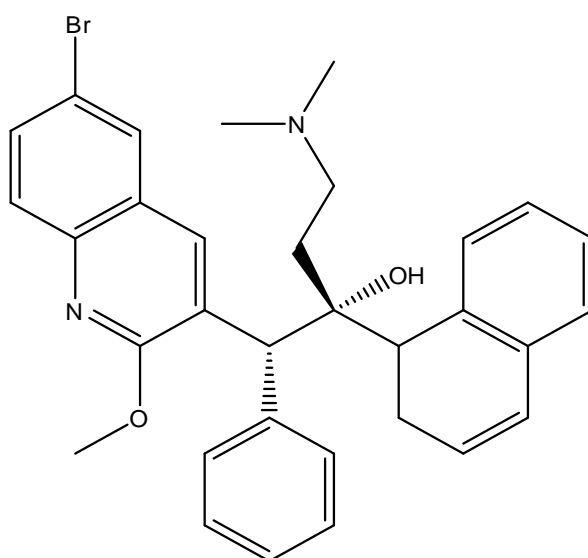
108



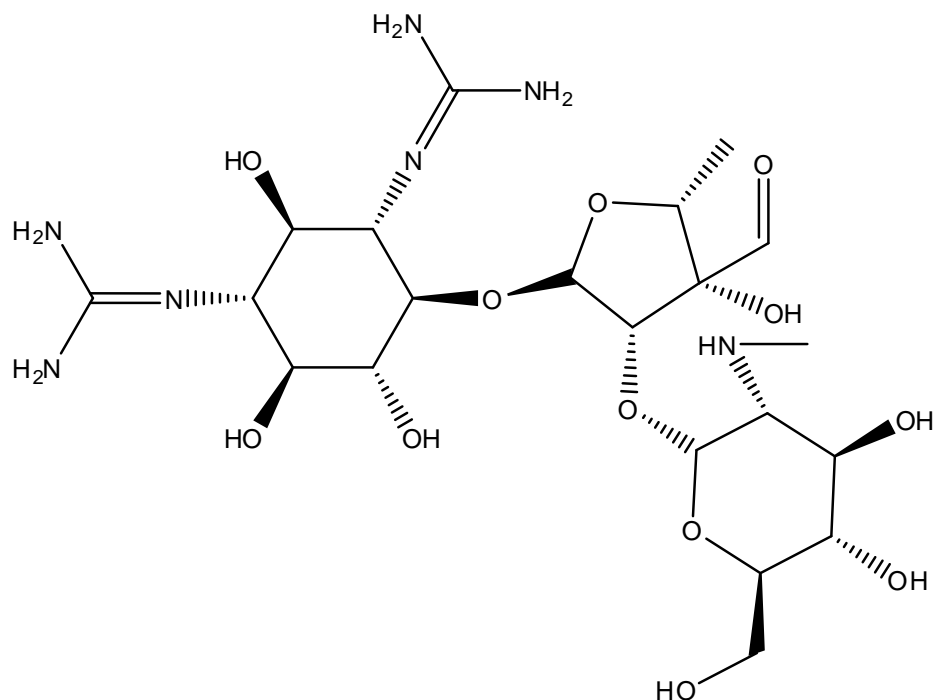
109



110



111



112

I.3.5.5-Coinfections

L'infection à VIH/SIDA reste un problème majeur dans la lutte antituberculeuse, la tuberculose demeurant l'infection opportuniste la plus fréquente chez les sujets VIH positifs (au moins un tiers des 36 millions de personnes vivant avec le VIH sont infectées par le bacille de la tuberculose) [Zager et McNerney, 2008]. En effet, la co-infection VIH/SIDA et la tuberculose est devenue un duo mortel et difficile à traiter. La tuberculose est encore pour longtemps une maladie de notre temps surtout dans les pays pauvres et voie de développement.

CHAPITRE II

RESULTATS ET DISCUSSION

II.1-ETUDE PHYTOCHIMIQUE

II.1.1-Matériel végétal

II.1.1.1- Tiges et feuilles de *Thecacoris annobonae*

Les tiges et les feuilles de *T. annobonae* ont été récoltées en Mars 2005 à Kumba (région de Sud –Ouest Cameroun). Les feuilles ont été récoltées une seconde fois en Avril 2008 et identifiées par M. Nana Victor de l'Herbier National du Cameroun ou un échantillon botanique est conservé et enregistré sous le N°38569/HNC.

II.1.2-Préparation de l'extrait brut et isolement des produits

II.1.2.1-Extraction des tiges de *T.annobonae*

Les tiges de *T. annobonae* ont été découpées, séchées puis broyées pour donner 2,8 kg de poudre. Cette poudre a été extraite par macération à température ambiante au méthanol pendant 48 h. Après filtration et évaporation du solvant sous pression réduite, nous avons obtenu 100,2 g d'extrait brut. 95,2 g de cet extrait brut ont été fixés sur 200 g de silice puis soumis à une chromatographie Flash élue à l'hexane suivi du mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante. Les fractions issues de cette chromatographie Flash ont été ensuite soumises aux chromatographies successives sur colonne de gel de silice pour donner 12 produits indexés de **TCA₁** à **TCA₁₂** (schéma 3).

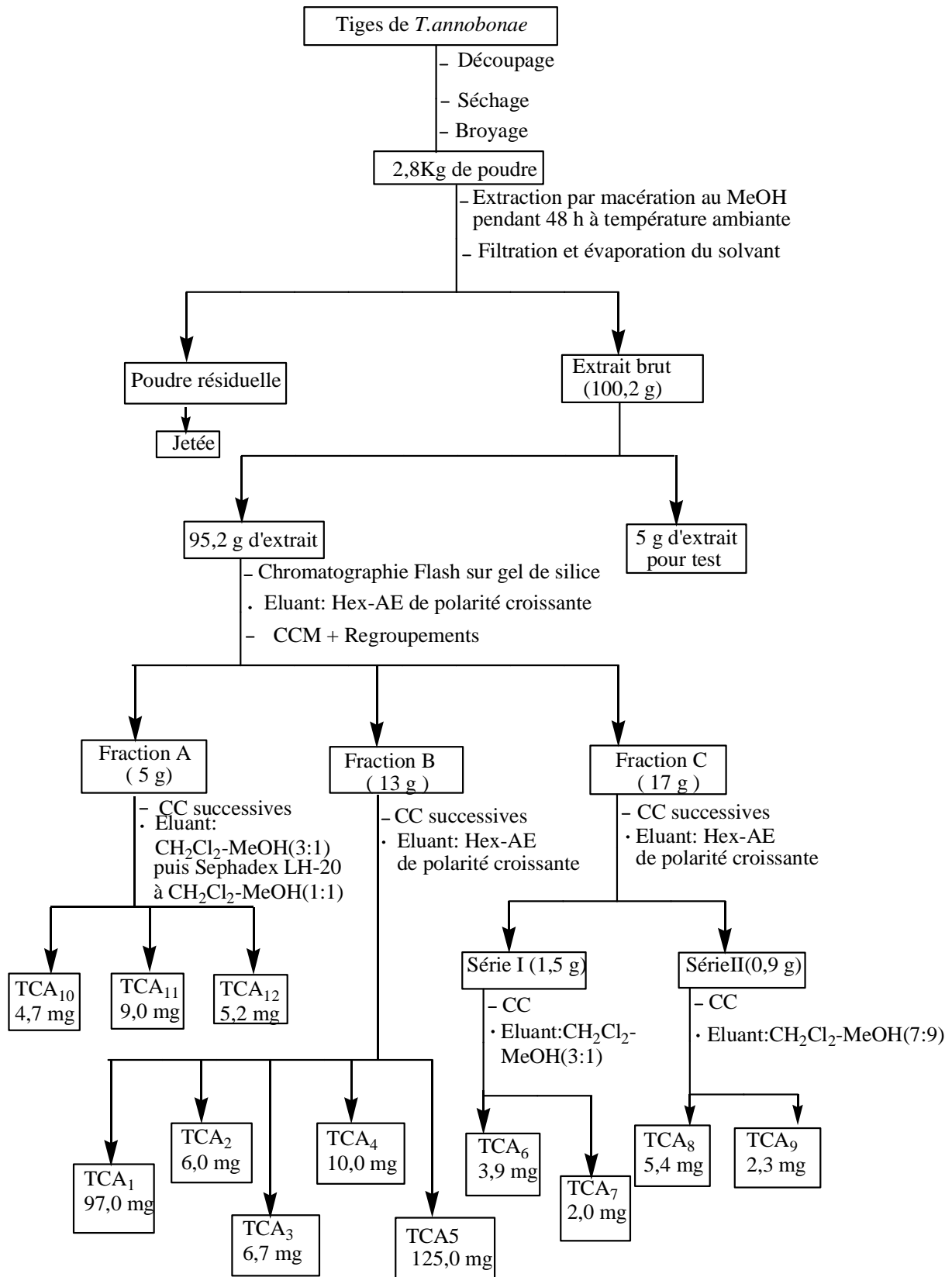


Schéma 3: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des tiges de *T.annobonae*

II.1.2.2-Extraction des feuilles de *T.annobonae*

Les feuilles de *T.annobonae* séchées puis broyées, nous ont permis d'obtenir 500 g de poudre qui a été extraite par macération à température ambiante au mélange chloroforme/acétone (1:1) pendant 24 heures. 40 g d'extrait brut ont ainsi été obtenu après évaporation du solvant sous pression réduite. 5g de cet extrait brut ont été mis de côté pour les tests d'activités biologiques et les 35 g restant ont été fixé sur 75 g de gel de silice pour subir une chromatographie Flash avec comme éluant l'hexane suivi du mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante. La purification des fractions résultantes par chromatographies successives sur colonne de gel de silice et sur colonne à séphadex a permis d'isoler 6 composés indexés de **TCAF₁** à **TCAF₆**.(Schéma 4).

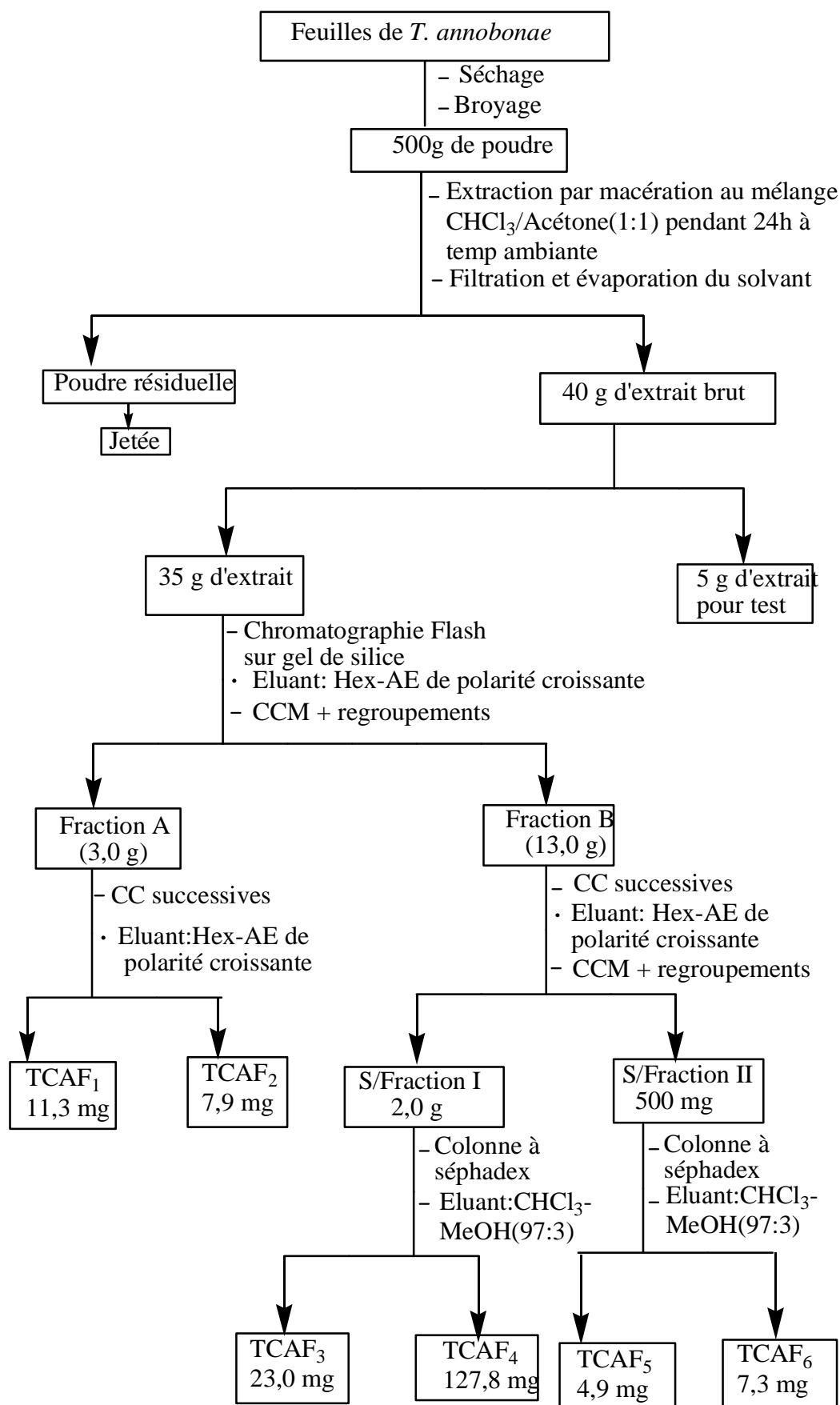


Schéma 4: protocole d'extraction et d'isolement des composés des feuilles de *T.annobonae*.

II.1.2.3-Extraction des feuilles de *T.annobonae* de la seconde recolte

Les feuilles de *T. annobonae* issues de la seconde récolte, séchées puis broyées nous ont permis d'obtenir 1,37 kg de poudre, qui a été extraite successivement par macération à l'Hexane, à l'Acétate d'éthyle et au méthanol pendant 48 heures à température ambiante. Après évaporation du solvant, nous avons obtenu 30 g (Extrait H), 45 g (Extrait E) et 61 g (Extrait M) respectivement. Une partie de l'Extrait M (25 g) a subi des chromatographies sur colonne successives pour donner 7 composés indexés de **TCAF₇** à **TCAF₁₃**. (**Schéma 5**).

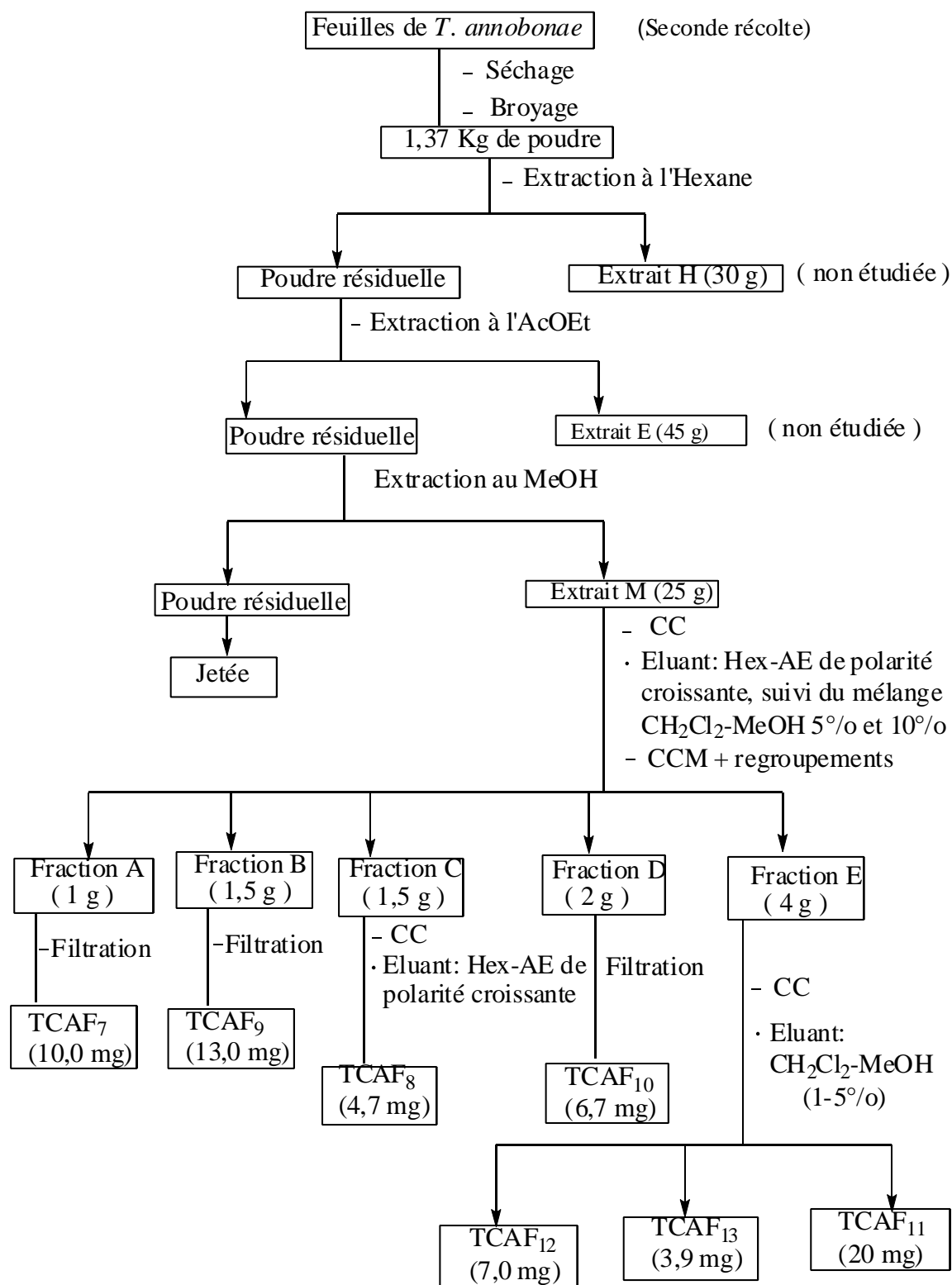


Schéma 5: protocole d'extraction et d'isolement des composés des feuilles de *T.annobonae*.

L'étude phytochimique des tiges et des feuilles de *T.annobonae* nous a permis d'isoler en plus des acides gras 19 métabolites secondaires.

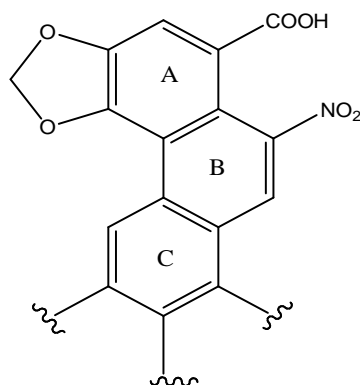
II.2-CARACTERISATION DES COMPOSES ISOLES DE *T.ANNOBONAE*

II.2.1-Les dérivés phénanthréniques

II.2.1.1- Identification de TCA₁₀/TCAF₂ ou acide aristolochique I (114).

Le composé TCA₁₀ a été obtenu sous forme de poudre jaune amorphe dans le mélange CH₂Cl₂-MeOH (3:1). Il est soluble dans le chlorure et réagit positivement au test de Dragendorff avec apparition de précipités rouges.

Sur le spectre de masse en IE (**Fig 3**) de TCA₁₀, on note le pic de l'ion moléculaire à m/z 341,1 soit $[M]^+$, cette masse impaire indique la présence d'un nombre impair d'azote dans la molécule de TCA₁₀. L'analyse des données de RMN¹H et de RMN¹³C couplées à celles de la masse permet de lui attribuer la formule C₁₇H₁₁NO₇ renfermant 13 insaturations. De plus, le pic de base à m/z 295 $[M-NO_2]^+$ correspond à un fragment issu de l'élimination du groupe nitro. Ce qui nous fait penser à un phénanthroïde de type acide aristolochique dont la structure de base est la suivante (113). [Arlt et al., 2002 ; Mizono et al., 1990].



113

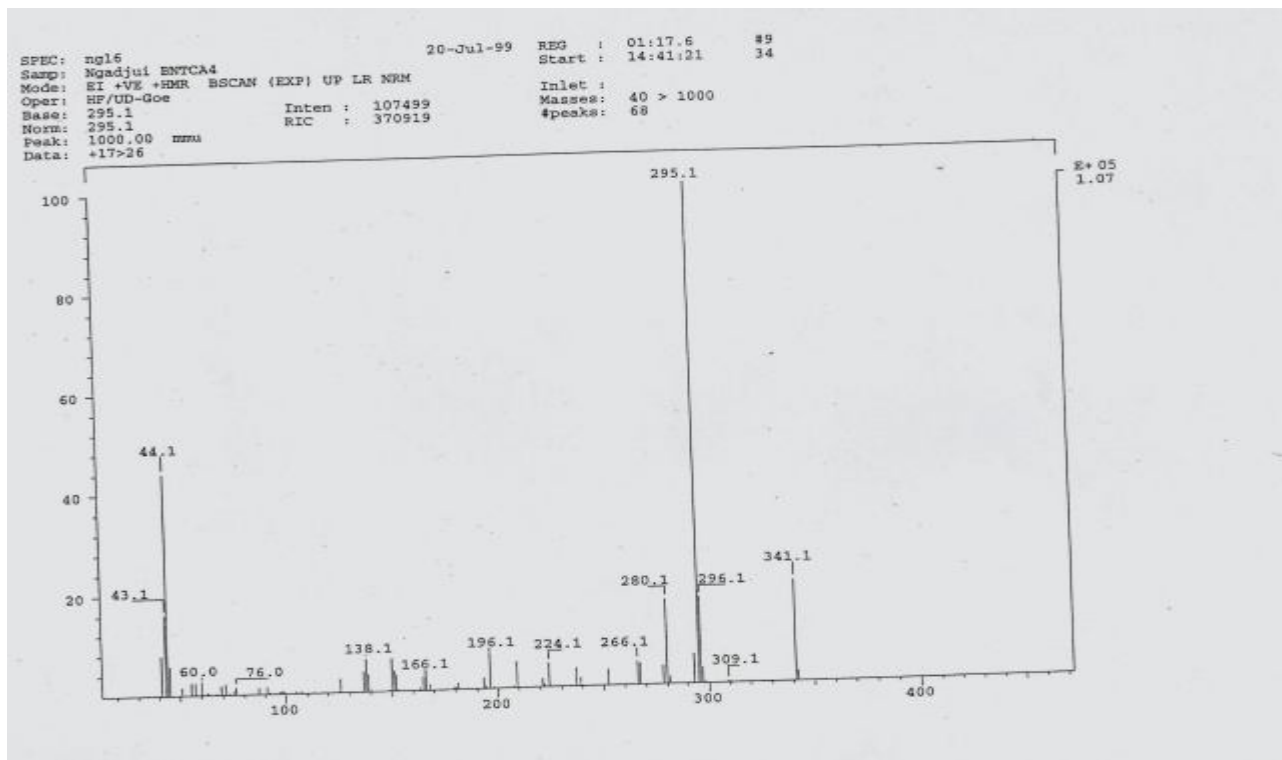


Figure 3 : Spectre de masse en EI de (TCA₁₀, 114)

Le spectre IR (Fig.4) de TCA₁₀ montre les bandes de vibrations caractéristiques de groupes fonctionnels à: 1515 cm⁻¹ et 1342 cm⁻¹ (NO₂ libre), 1715 cm⁻¹ (COOH), et 1267 cm⁻¹ (C-O).

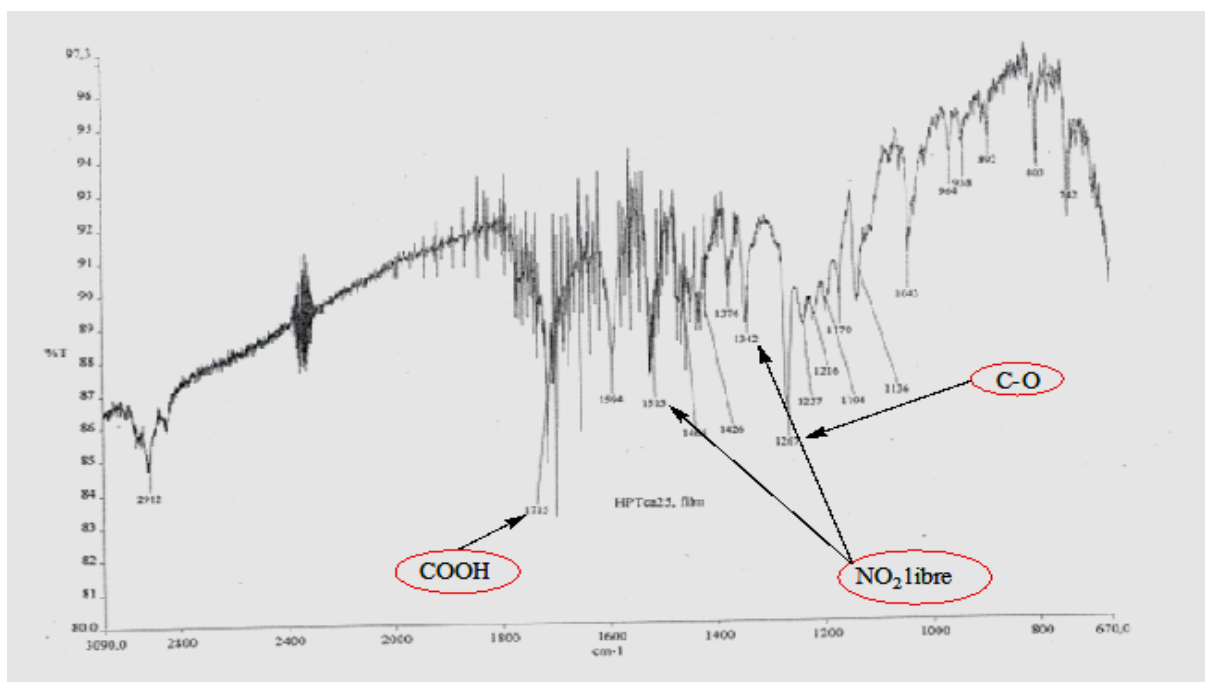


Figure 4 : Spectre IR de (TCA₁₀, 114)

Le spectre de RMN ^1H (600 MHz, pyridine, **Fig.5**) de $\text{TCA}_{10}/\text{TCAF}_2$ révèle la présence :

- D'un singulet de trois protons à δ_{H} 3,90 attribuable aux protons d'un groupement méthoxyle ;
- d'un singulet de deux protons à δ_{H} 6,36 attribuables aux protons du méthylène dioxygéné en position 3,4 du cycle A des acides aristolochiques. Cette information est confirmée par le spectre HMBC où on observe les corrélations entre les protons du méthylène dioxygéné à δ_{H} 6,36 et les carbones C-3 et C-4 du squelette phénanthrénique.
- d'un ensemble de cinq signaux dont deux doublets d'un proton chacun à δ_{H} 7,17 ($J=8,0$ Hz) et 8,76 ($J=8,4$ Hz); un triplet d'un proton à δ_{H} 7,78 et deux singulets d'un proton chacun à δ_{H} 8,22 et 8,98 caractéristiques des protons aromatiques.

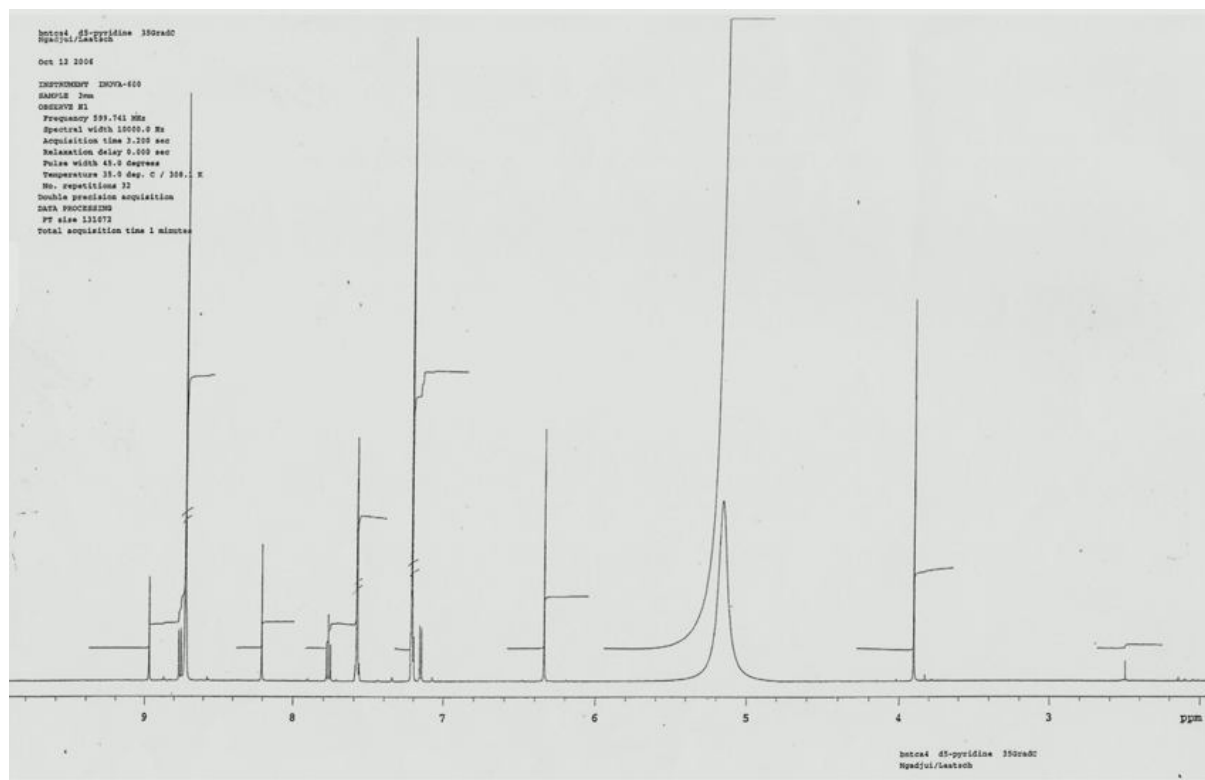


Figure 5 : Spectre de RMN ^1H (600 MHz, pyridine) de (TCA_{10} , 114)

Sur son spectre de RMN ^{13}C (150 MHz, pyridine, **Fig.6**) on observe :

- à δ_c 169,9 un signal caractéristique du carbonyle des acides carboxyliques ;
- à δ_c 56,0 un signal attribuable au carbone du méthoxyle ;
- à δ_c 103, 0 un signal, probablement celui du méthylène dioxygéné en position 3,4 du cycle A des acides aristolochiques;
- entre δ_c 108,5 et 157,0 un ensemble de 4 signaux caractéristiques des carbones aromatiques.

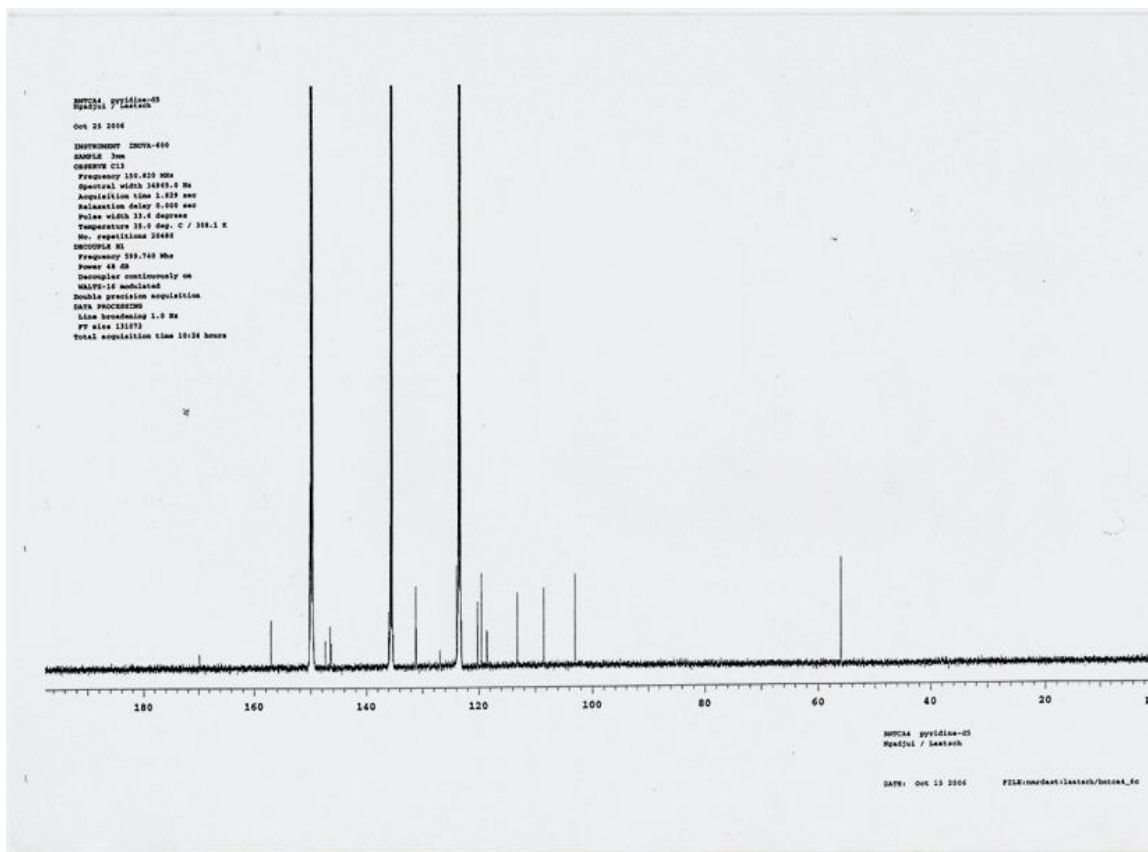


Figure 6: Spectre de RMN ^{13}C (150 MHz, pyridine) de (TCA $_{10}$, 114)

On observe sur le spectre COSY (**Fig.7**), que les protons H-5 à δ_H 8,76 et H-7 à δ_H 7,17 donnent une corrélation avec celui à δ_H 7,78 correspondant au proton H-6.

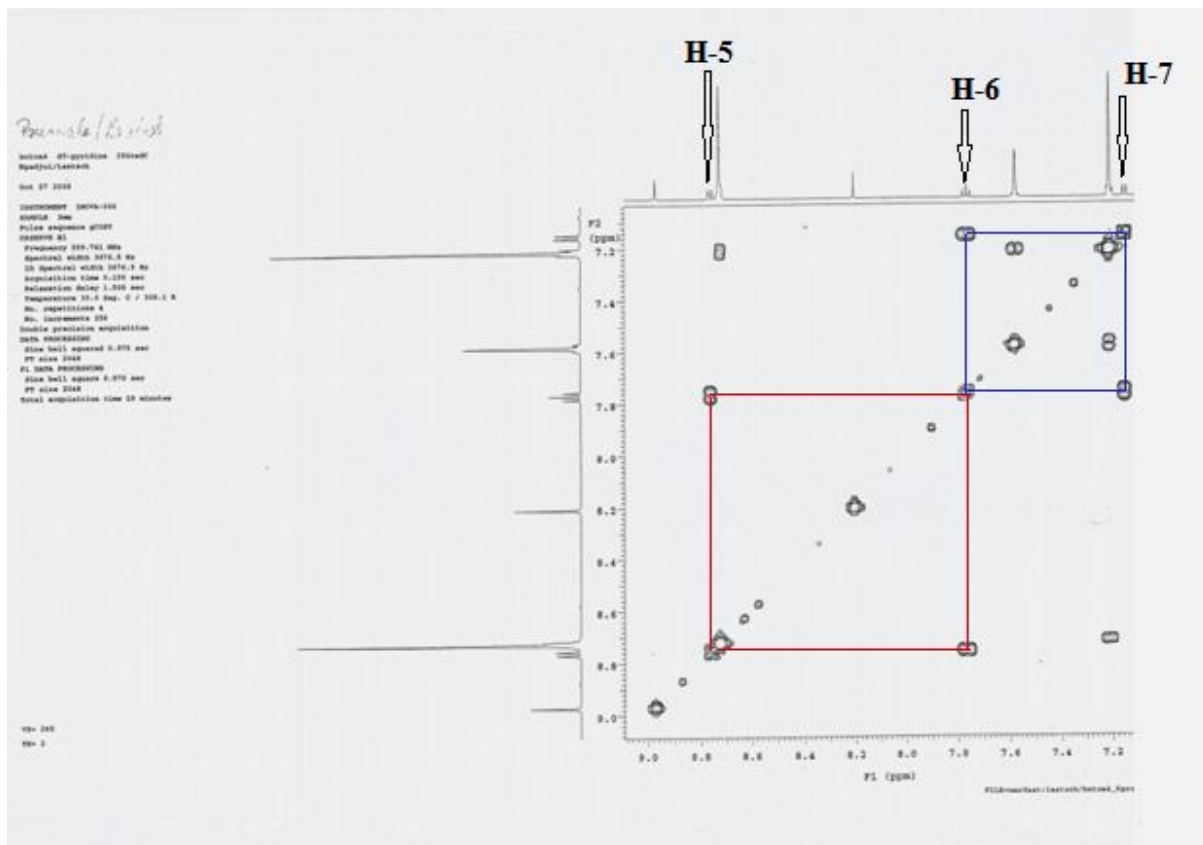


Figure 7 : Spectre COSY de (TCA₁₀, 114)

Sur le spectre HMBC (**Fig.8**), de TCA₁₀, on note des corrélations importantes entre le proton à δ_H 8,98 (H-9) et les carbones à δ_C 157,0 (C-8) ; 131,1 (C-4b) ; 118,7 (C-10a) et 118,5 (C-4a); le proton à δ_H 8,76 (H-5) et les carbones à δ_C 120,3 (C-8a) ; 120,2 (C-9) et 108,5 (C-7) ; le proton à δ_H 8,22 (H-2) et les carbones à δ_C 169,9 ; 146,4 (C-3) ; 118, 7 (C-10a); 145,6 (C-10) et 118,5 (C-4a) .On observe aussi des corrélations significatives entre le proton à δ_H 7,17 (H-7) et les carbones à δ_C 157,0 (C-8) ; 120,3 (C-8a) et 120,2 (C-9). De plus, la corrélation observée entre les protons à δ_H 3,90 (-OCH₃) et le carbone à δ_C 157,0 (C-8) nous permet de fixer le groupement méthoxyle sur le cycle C et en position 8.

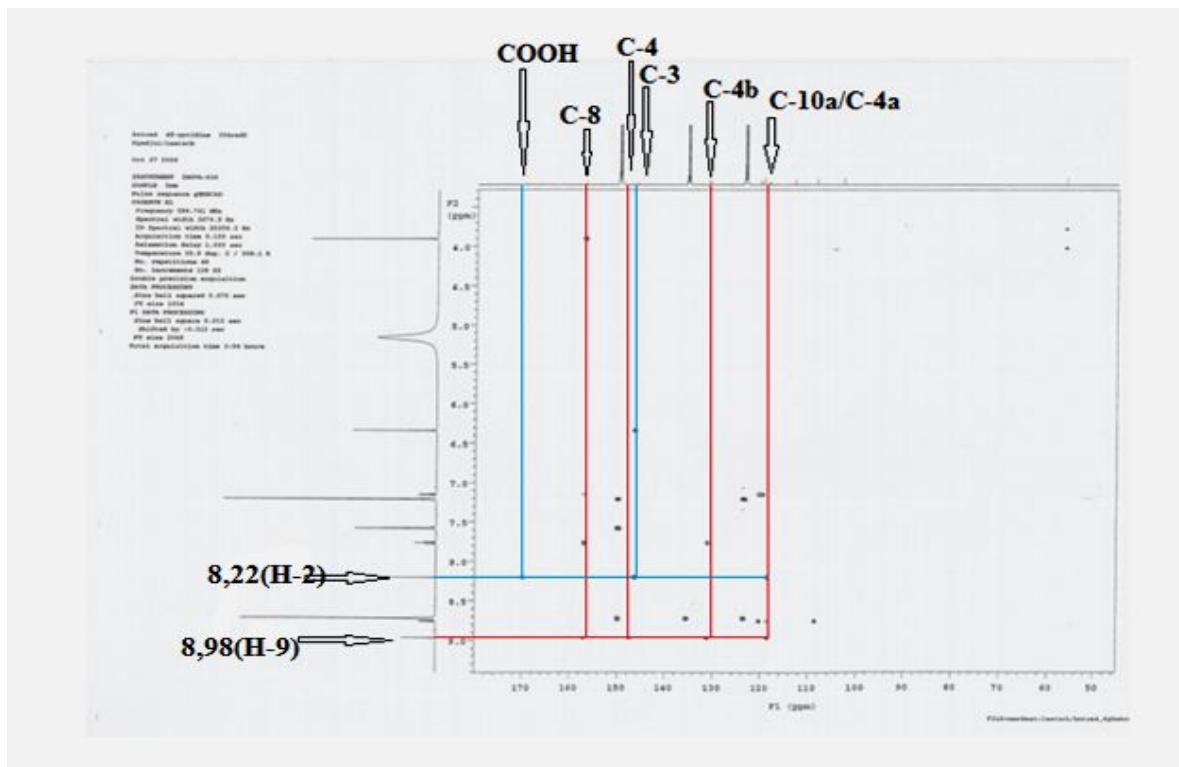


Figure 8 : Spectre HMBC de (TCA₁₀, 114)

Le spectre HSQC (**Fig.9**), exhibe des corrélations directes entre le proton à δ_H 8,98 (H-9) et le carbone à δ_C 120,2 (C-9) ; le proton à δ_H 8,76 (H-5) et le carbone à δ_C 119,6 (C-5) ; le proton à δ_H 8,22 (H-2) et le carbone à δ_C 132,2 (C-2). Les memes observations se notent entre le proton à δ_H 7,17 (H-7) et le carbone à δ_C 108,5 (C-7), le proton, à δ_H 6,36 (H-1') et le carbone à δ_C 103,0 (C-1').

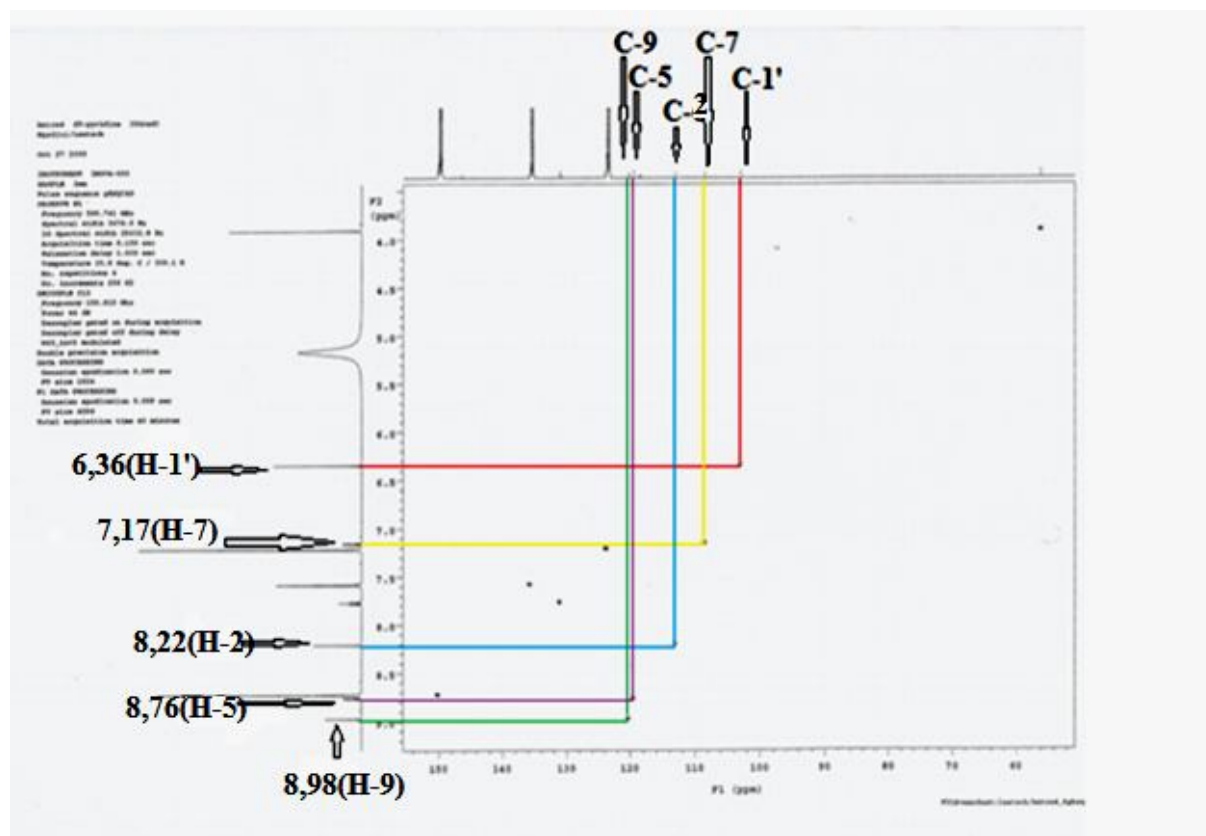
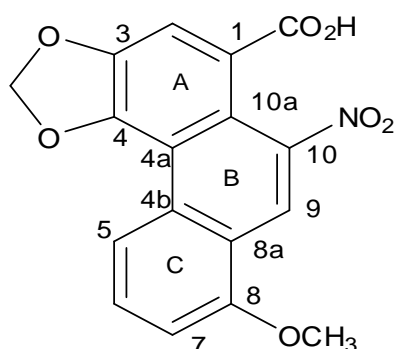
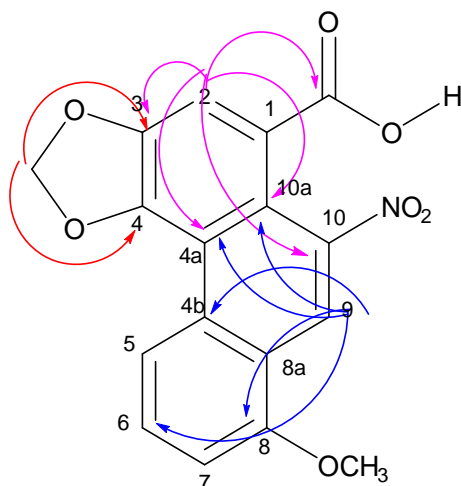


Figure 9 : Spectre HSQC de (TCA₁₀, 114)

L'ensemble de toutes ces données spectroscopiques de TCA₁₀/TCAF₂ comparées avec celles de la littérature nous a permis de lui attribuer la structure 114 qui est celle de l'acide aristolochique I ou acide 8-méthoxy-6-nitro-phénanthro [3,4-d]-1,3-dioxole-5-carboxylique décrit ici pour la première fois dans le genre *Thecacoris*. Il a été déjà isolé d'*Aristolochia argentina* par **Priestap. (1989)**. L'acide aristolochique est utilisé traditionnellement en Chine pour traiter l'arthrite et d'autres inflammations. Cependant une nouvelle étude américaine révèle qu'il est plus cancérigène que le tabac et provoque des cancers des conduits urinaires [**Maher A., 2013**].



114



115

Figure 10 : Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de TCA₁₀

II.2.1.2-Identification de TCA₁₁ ou acide aristolochique méthyl ester (**116**).

Le composé TCA₁₁ a été obtenu sous forme de poudre jaune amorphe dans le mélange CH₂Cl₂-MeOH (3:1). Il réagit positivement au test de draggendorf avec apparition de précipités rouges caractéristique des alcaloïdes.

Sur le spectre de masse en IE (**Fig.11**) on note, le pic de l'ion moléculaire à m/z 355,2 soit [M]⁺, masse impaire qui une fois de plus nous indique que TCA₁₁ renfermerait dans sa molécule un nombre impair d'azote. L'analyse à haute résolution permet de lui attribuer la formule brute C₁₈H₁₃NO₇ renfermant 13 insaturations. De plus le pic de base à m/z 309 correspond à la perte du groupement nitro par la molécule, soit [M-NO₂]⁺. Par ailleurs, le pic à m/z 294 nous indique que TCA₁₁ serait l'ester méthylé de TCA₁₀ soit [M-NO₂-CH₃]⁺.

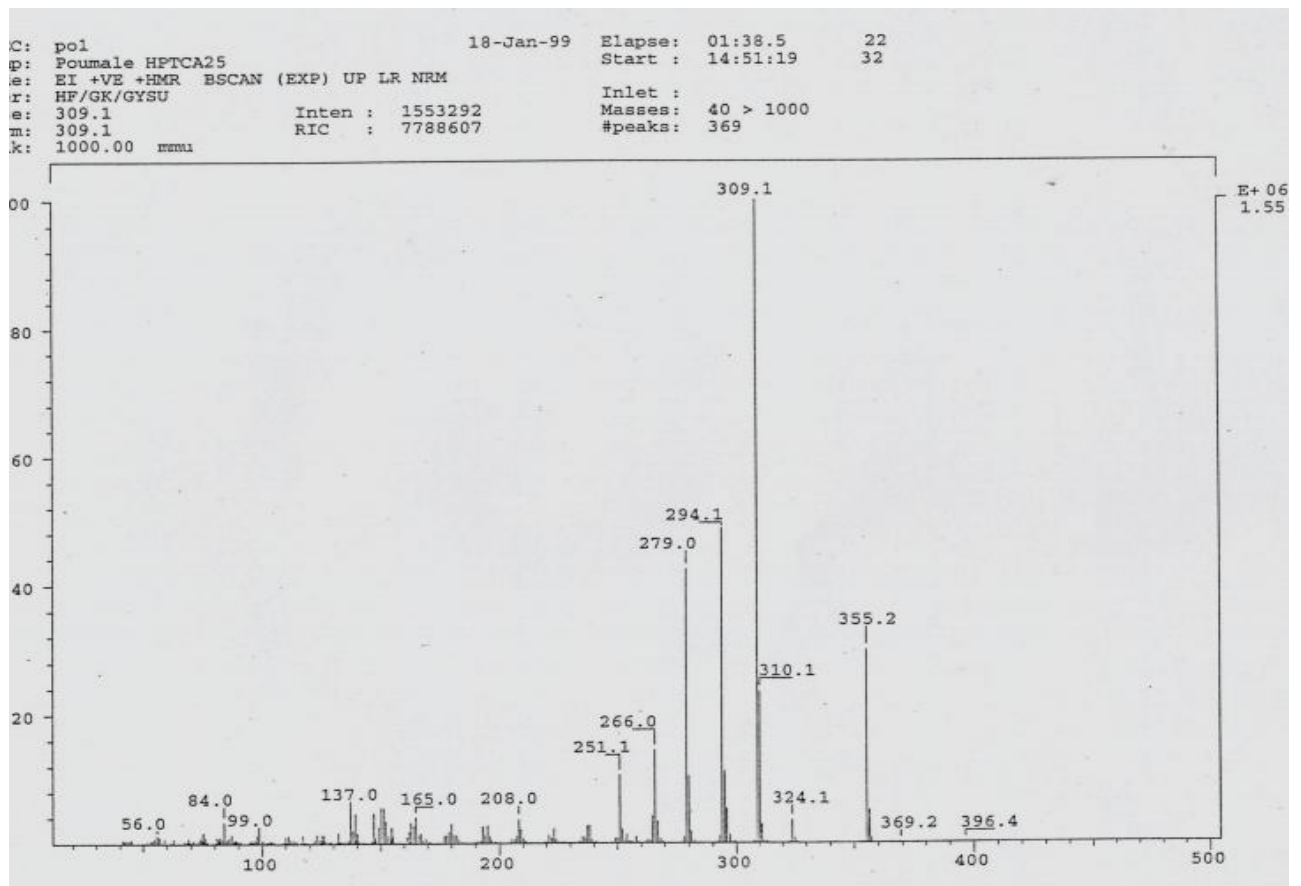


Figure 11 : Spectre de masse en EI de (TCA₁₁, 116).

Les spectres de RMN ¹H (300 MHz, pyridine, **Fig.12**) et de RMN ¹³C (75 MHz, pyridine, **Fig 13**) de TCA₁₁ sont presque superposables à ceux de TCA₁₀. Les seules différences relevées sont :

- La présence sur le spectre de RMN ¹H de TCA₁₁ du signal d'un autre singulet de trois protons à δ_H 3, 92 caractéristiques d'un autre groupe méthoxyle supplémentaire dans le squelette de TCA₁₁.
- La présence sur le spectre de RMN ¹³C de TCA₁₁ d'un signal à δ_c 52,0 attribuable au carbone d'un autre groupe méthoxyle.

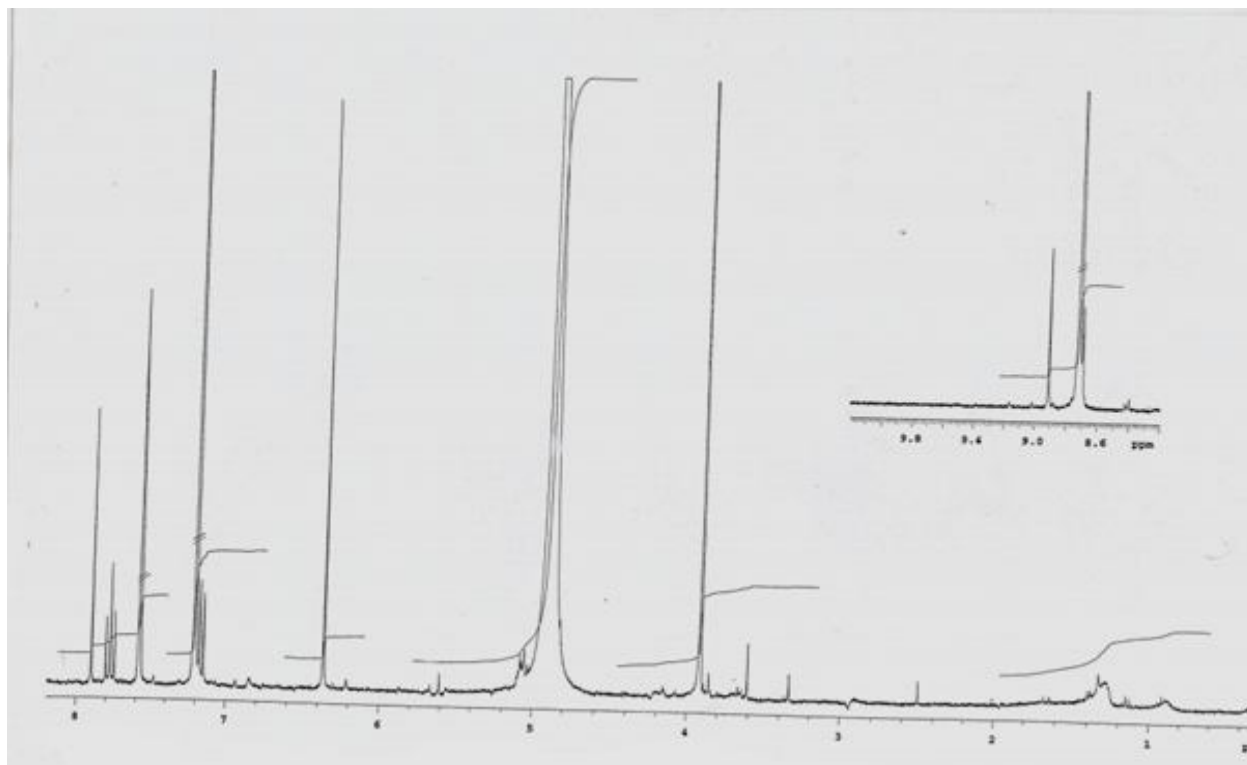


Figure 12 : Spectre de RMN¹H (150 MHz, pyridine) de (TCA₁₁ ; 116).

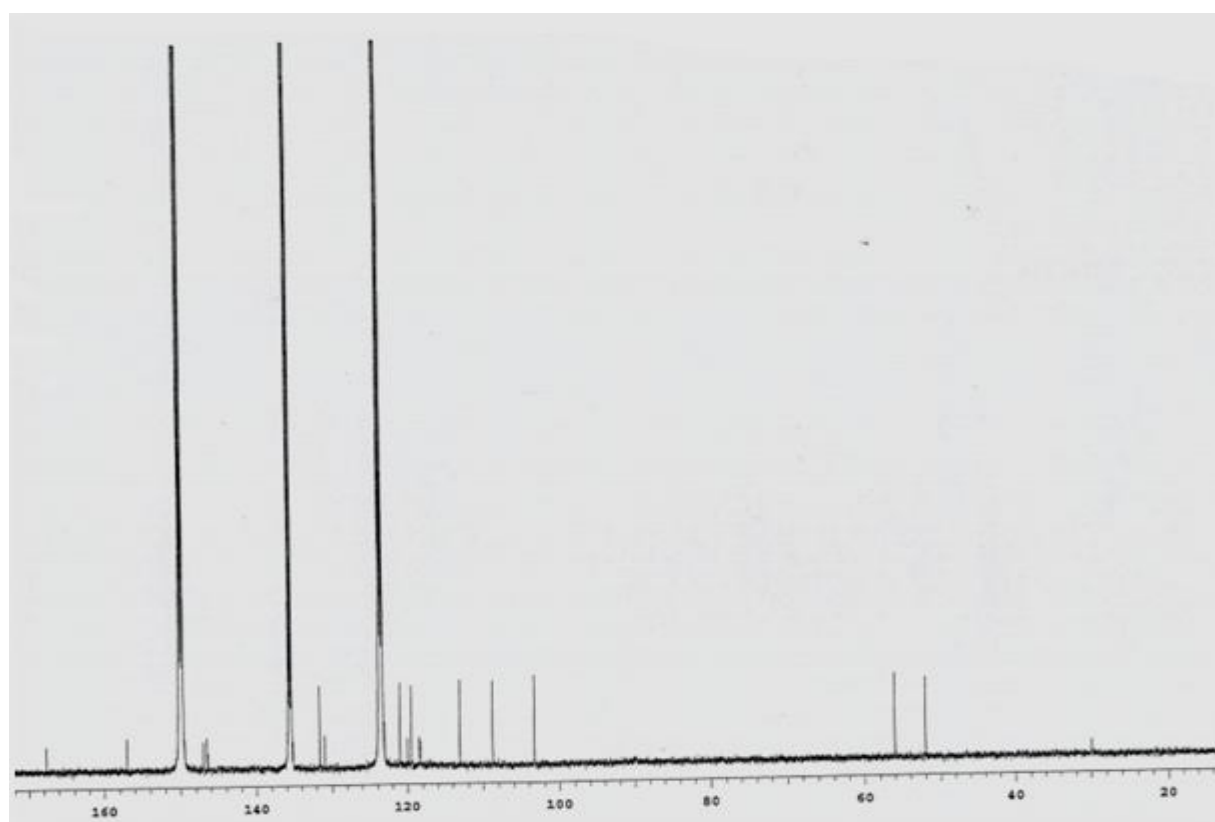
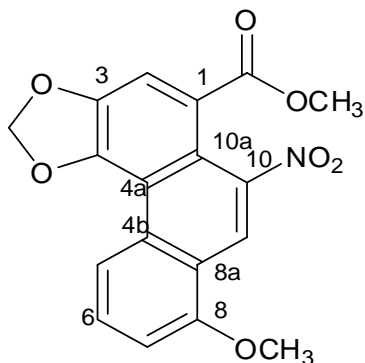


Figure 13: Spectre RMN¹³C (75 MHz, pyridine) de (TCA₁₁ ; 116).

La comparaison des données spectroscopiques (**Tableau XII**) de TCA₁₁ avec celles publiées dans la littérature nous a permis d'identifier TCA₁₁ à l'acide aristolochique méthyl ester (**116**) décrit pour la première fois du genre *Thecacoris* et précédemment isolé d'*Aristolochia liukuensis* par [Mizuno *et al.*, 1990]



116

Tableau XII: Comparaison entre les données spectrales de RMN¹H et RMN ¹³C de TCA₁₀/TCAF₂ (600 MHz et 300 MHz, pyridine) (**114**), de TCA₁₁ (150 MHz et 75 MHz, pyridine) (**116**) et de l'acide aristolochique I [Priestap, 1989] ainsi que quelques corrélations importantes HMBC de TCA₁₀.

Position	Acide aristolochique δ_C (m) [Priestap, 1989]	TCA ₁₀		TCA ₁₁		TCA ₁₀ HMBC (¹ H- ¹³ C)
		δ_C (m) Hz) (114)	δ_H (m ; J en	δ_C (m) en Hz) (115)	δ_H (m ; J	
1	126,6 (s)	124,0 (s)		124,2 (s)		
2	113,0 (d)	113,2 (d)	8,22 (s)	113,1 (d)	7,90 (s)	COOH, C-3, C-4a, C-10, C-10a
3	146,4 (s)	146,4 (s)		146,4 (s)		
4	147,2 (s)	147,4 (s)		147,1 (s)		
4a	nr	118,5 (s)		118,5 (s)		
4b	130,9 (s)	131,1 (s)		131,6 (s)		
5	119,4 (d)	119,6 (d)	8,76 (d ; 8,4)	118,3 (d)	8,71 (d ; 7,5)	C-8a, C-9, C-7
6	131,1 (d)	131,2 (d)	7,78 (t ; 8,2)	131,0 (d)	7,77 (t ; 8,3)	C-8, C-5, C-4b
7	108,4 (d)	108,5 (d)	7,17 (d ; 8,0)	108,7 (d)	7,16 (d ; 8,1)	C-8, C-8a, C-9
8	156,8 (s)	157,0 (s)		157,1 (s)		
8a	120,0 (s)	120,3 (s)		119,5 (s)		
9	120,3 (d)	120,2 (d)	8,98 (s)	121,0 (d)	8,92 (s)	C-8, C-4b, C-4a, C-10a
10	146,3 (s)	146,6 (s)		150,3 (s)		
10a	118,4 (s)	118,7 (s)		120,0 (s)		
COOH	169,9 (s)	169,9 (s)		167,7 (s)		
3,4CH ₂ O 2	103,0 (t)	103,0 (t)	6,36 (s)	103,3 (t)	6,40 (s)	C-3, C-4
MeO-	55,9 (q)	56,0 (q)	3,90 (s)	56,1 (q)	3,91 (s)	C-8
-OOC- Me	/	/	/	52,0(q)	3,92(s)	

II.2.2-Les triterpenes pentacycliques

II.2.2.1-Détermination de la structure de TCAF₄ ou 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (117).

TCAF₄ a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange CH₂Cl₂-MeOH (97:3). Il est soluble dans le chloroforme et fond entre 138-139°C. Il réagit positivement au test de Liebermann-Buchard en donnant une coloration rouge qui vire au violet caractéristique des triterpènes. [Saha et al., 2011]

Son spectre de masse en (+)-ESI montre le pic de l'ion moléculaire [M+H]⁺ à m/z 441, ce qui est confirmé par le spectre de masse en (+) TOF.IE (Fig.14) dont l'analyse à haute résolution permet de lui attribuer la formule brute C₃₀H₄₉O₂ ([M+H]⁺ m/z à 441,3731 ; calc.441, 3732) renfermant 7 insaturations.

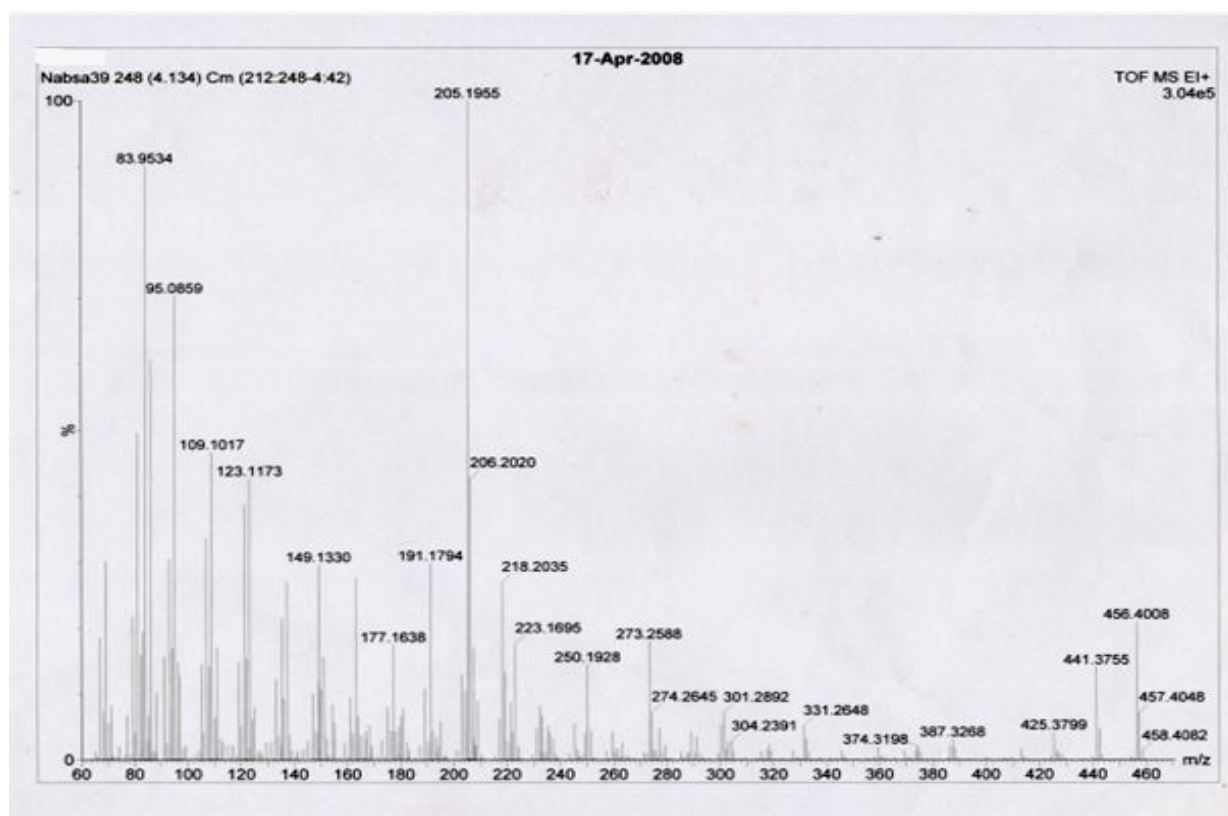


Figure 14: Spectre de masse en (+) TOF de (TCAF₄; 117)

Le spectre IR de TCAF₄ montre des bandes de vibrations caractéristiques de groupes fonctionnels à : 1719cm⁻¹ (C=O) ,1250cm⁻¹ (C-O). On observe aussi d'autres bandes à 2937 cm⁻¹, 1639 cm⁻¹ et 878 cm⁻¹ indiquant la présence d'un groupe vinylidène (=CH₂) caractéristique des lup-20(29)-ène [Nenkep et al., 2008 ; Roitman et Jerd., 1978].

Les données de RMN¹H associées à celles de RMN¹³C suggèrent que TCAF₄ serait un triterpène pentacyclique possédant un groupe exométhylène et un groupe exométhine. En effet, l'analyse des spectres de RMN¹H (400MHz, CDCl₃, **Fig.15 et Fig.16**) de TCAF₄ nous a permis de mettre en évidence la présence de :

- Cinq singulets de trois protons chacun, apparaissant entre 0,86 et 1,04 ppm attribuables aux méthyles angulaires d'un squelette de type triterpène;
- Un singulet à δ_H 3, 65 attribuable à un groupement méthoxyl;
- un doublet de doublet dédoublé à δ_H 5, 61 (1H, ddd, J= 14,2 ; 9,0 ; 7,3 Hz) attribuable au proton en position C-20 des lup-20(29)-ènes. Cette affirmation est confirmée par le spectre COSY sur lequel on observe les taches de corrélations entre le proton à δ_H 5, 61 et ceux à δ_H 4,90;
- un doublet de doublet dédoublé de deux protons à δ_H 4,90 (2H, ddd, J=14,2 ; 9,0 ; 1,3 Hz) attribuable aux protons du méthylène terminal en position C-29 des lup-20(29)-ènes [Chueng et Williamson, 1969];
- un multiplet de deux protons à δ_H 2,30 dont l'analyse du spectre HMQC couplé au DEPT nous indique qu'il s'agit des protons d'un méthylène à δ_C 37,3;
- un signal à δ_H 0,9 dont l'analyse du spectre HMQC couplé au DEPT nous montre clairement qu'il s'agit de deux protons, l'un porté par un méthyl à δ_C 18,2 et l'autre par un méthine à δ_C 58,3;

Par ailleurs, sur ces mêmes spectres de RMN¹H on note l'absence du signal à δ_H 1,70 caractéristique des protons du méthyle vinylique en C-20 des lup-20(29)-ènes suggérant que TCAF₄ serait un nor-lupène. On note également l'absence du signal du proton de l'oxyméthine en C-3 entre [3-4,5 ppm] qui nous révèle que TCAF₄ serait un non hydroxylé en C-3.

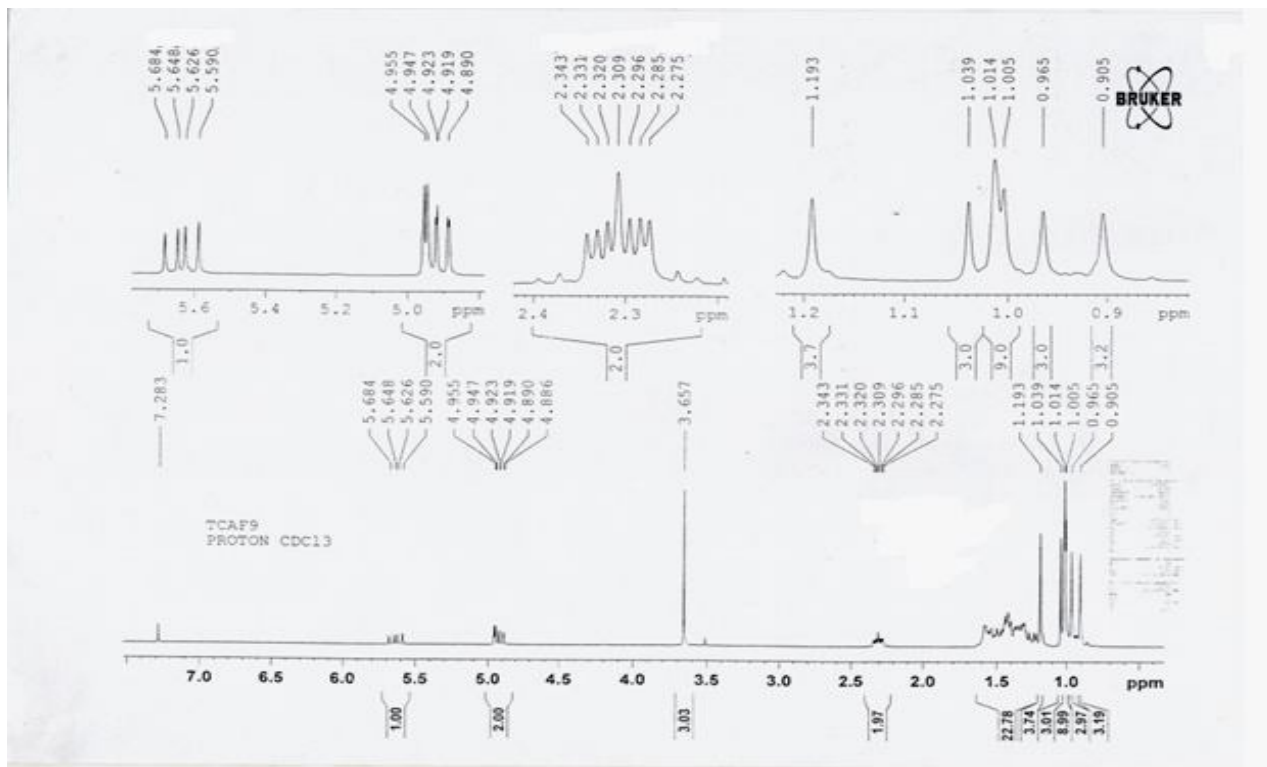


Figure 15 : Spectre de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) de (TCAF₄, 117).

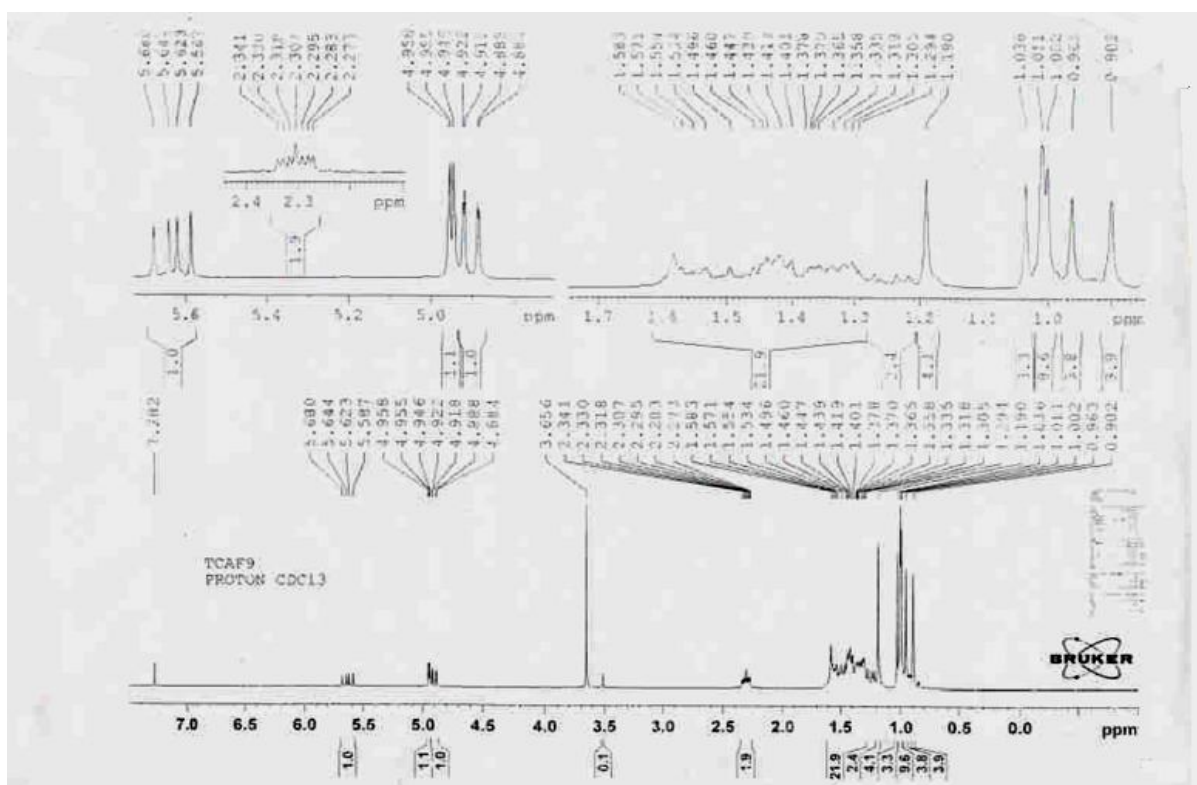


Figure 16: Spectre de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) de (TCAF₄, 117).

Sur les spectres de RMN¹³C (100MHz, CDCl₃, **Fig.17**) et DEPT 135 (**Fig.18**), on observe :

- à δ_c 151,0 et 110,9 des signaux caractéristiques des carbones C-20 et C-29 des lup-20(29)-ènes [**Gunasekera et al., 1982**] ;
- à δ_c 174,3 un signal caractéristique du carbonyle des esters ;
- les signaux de six méthyles, douze méthylènes, six méthines et six carbones quaternaires ;
- on note également l'absence d'un signal du carbone oxygéné ou hydroxylé en C-3 entre [77,7-79,9 ppm] ou [210-213,3 ppm] ce qui nous confirme le fait que TCAF₄ serait un non hydroxylé en C-3.

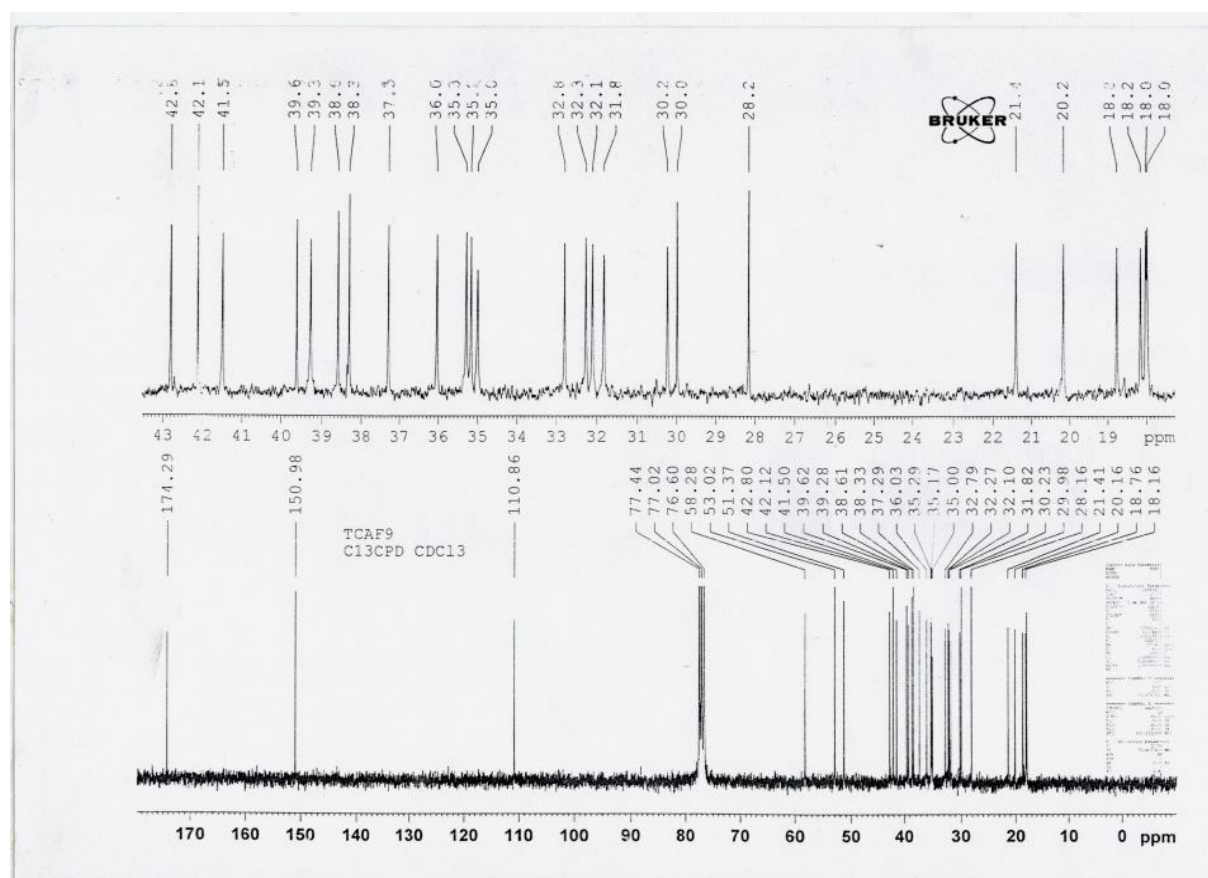


Figure 17: Spectre RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) de (TCAF₄, **117**).

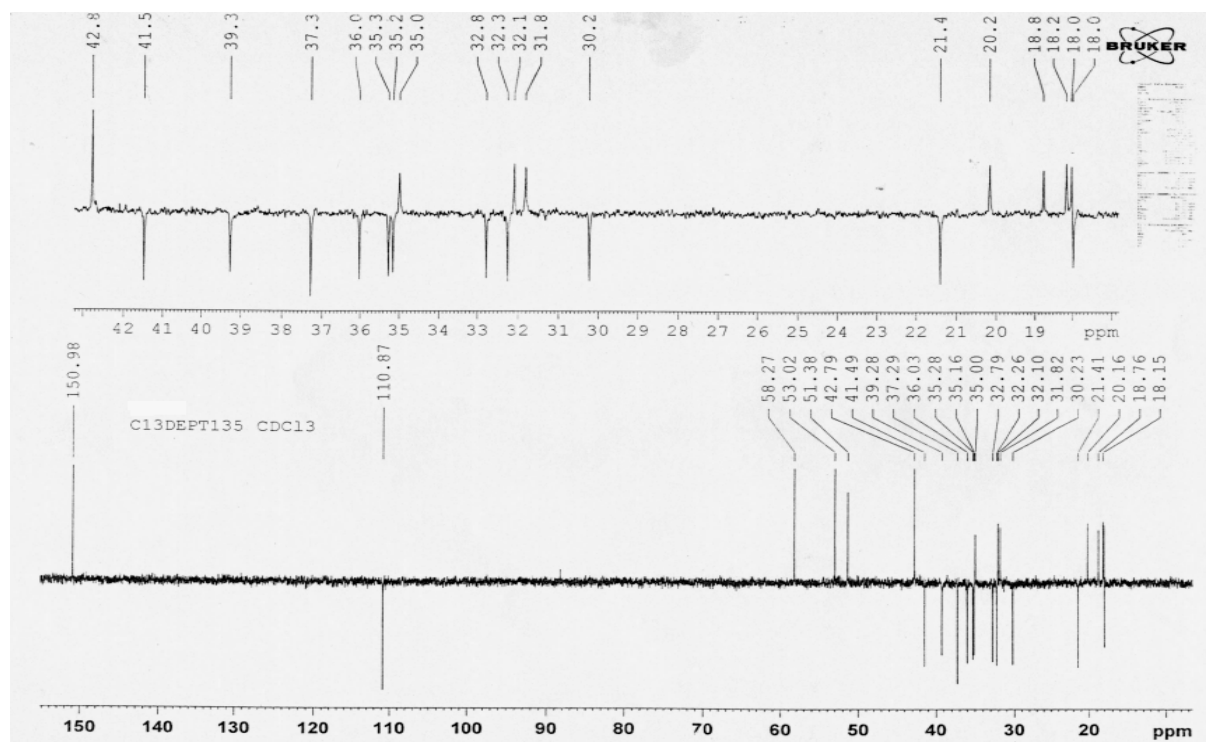


Figure 18: Spectre DEPT 135 de (TCAF₄, 117).

Toutes ces informations sont supportées par les spectres HMQC, HMBC et COSY. En effet on observe sur les spectres HMQC (**Fig.19, Fig.20 et Fig. 21**) de TCAF₄ des corrélations directes entre le proton à δ_H 2,30 (H-22) et le carbone à δ_C 37,3 ; le proton à δ_H 0,90 (H-18 et H-25) et les carbones à δ_C 58,3 et 18,2 respectivement. Ces observations sont également faites entre le proton à δ_H 5,61 (H-20) et le carbone à δ_C 151,0; entre celui à δ_H 4,90 (H-29) et le carbone à δ_C 110,9 ; celui à δ_H 3,65 (H-1') et le carbone à δ_C 51,4. Les protons à δ_H 1,37 (H-13) et 1,42 (H-6) et les carbones à δ_C 53,0 et 18,0 respectivement; le proton à δ_H 1,01 (H-23) et le carbone à δ_C 20,2. On note également sur ces mêmes spectres des corrélations directes entre les protons à δ_H 1,03 (H-26) et 1,19 (H-9) et les carbones à δ_C 18,8 et 32,1 respectivement; entre celui à δ_H 0,96 (H-5) et le carbone à δ_C 35,0.

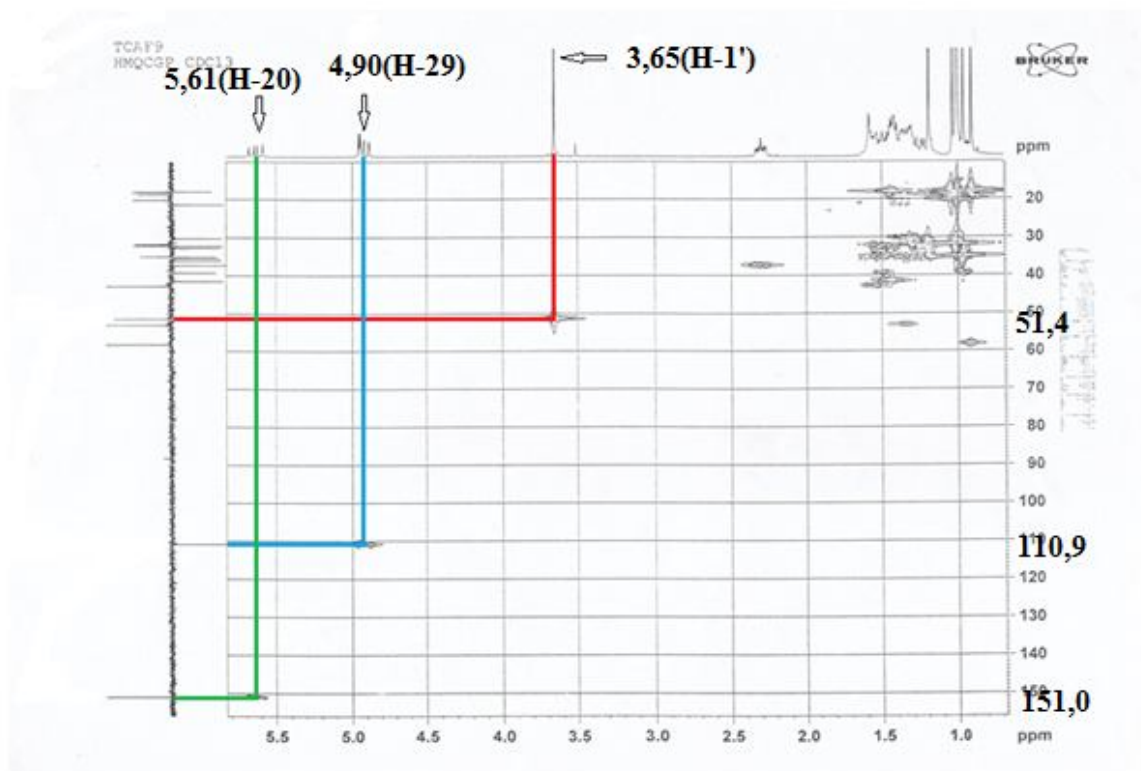


Figure 19: Spectre HMQC de (TCAF₄, 117).

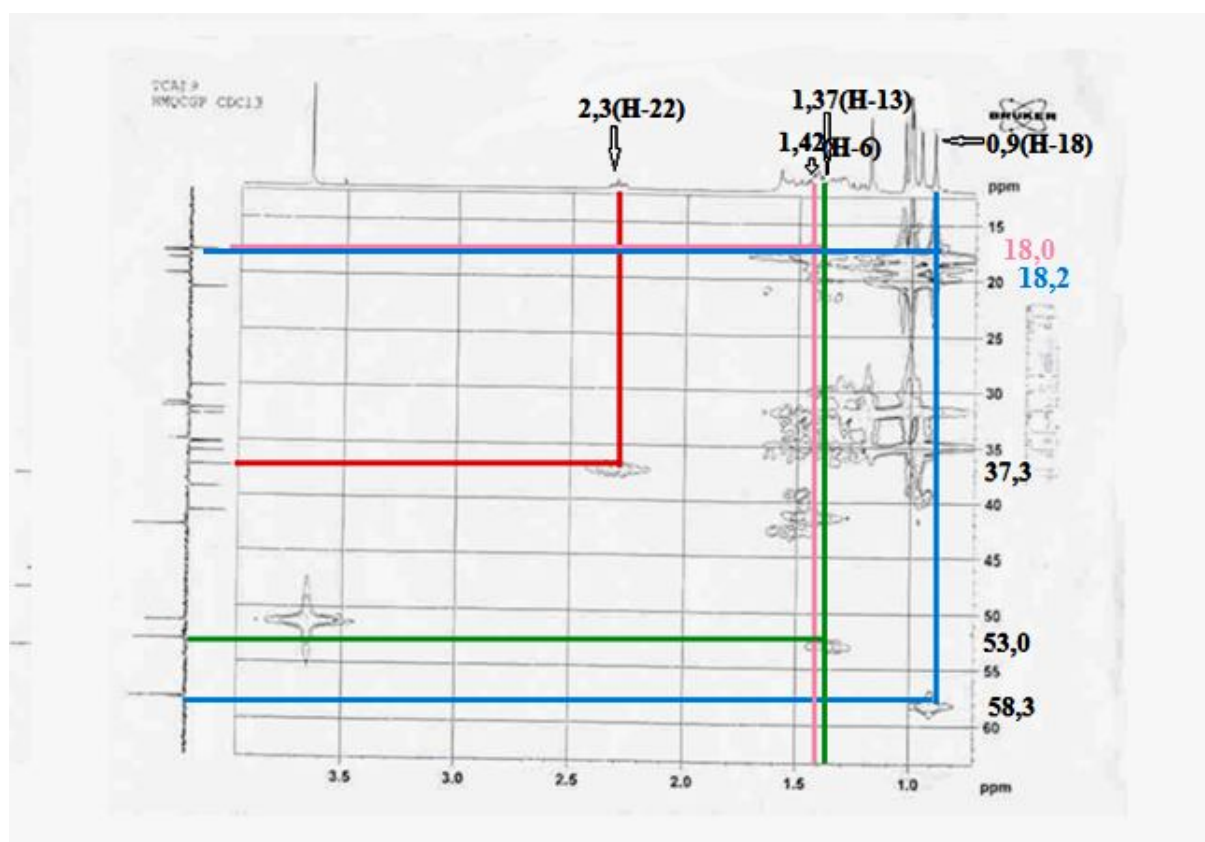


Figure 20: Spectre HMQC de (TCAF₄, 117).



Figure 21: Spectre HMQC de (TCAF₄, 117).

Sur les spectres HMBC (Fig. 22, Fig. 23 et Fig. 24) la corrélation entre le proton à δ_H 3,65 (H-1') et le carbone à δ_C 174,3 (C-28) et la corrélation entre celui à δ_H 2,30 (H-22) et ce même carbone nous permet de fixer le groupement méthoxyle en position 28. Ce qui est confirmé par le spectre de masse sur lequel on observe un ion fragment à m/z 249. On observe également des corrélations importantes entre le proton à δ_H 2,30 (H-22) et les carbones à δ_C 58,3 (C-18) et 42,1 (C-17); le proton à δ_H 5,61 (H-20) et les carbones à δ_C 42,1 (C-17), 42,8 (C-19), 41,5 (C-21), 58,3 (C-18) et 151,0 (C-20) ; le proton à δ_H 4,90 (H-29) et les carbones à δ_C 42,8 (C-19), 110,9 (C-29) et 151,0 (C-20). D'importantes corrélations sont également observées entre le proton à δ_H 1,19 (H-9) et les carbones à δ_C 42,8 (C-19), 38,6 (C-10), 39,3 (C-1) et 30,0 (C-8); le proton à δ_H 0,90 (H-19) et les carbones à δ_C 53,0 (C-13), 38,3 (C-14), et 58,3 (C-18); le proton à δ_H 1,00 (H-27) et les carbones à δ_C 58,3 (C-18), 53,0 (C-13) et 151,0 (C-20).

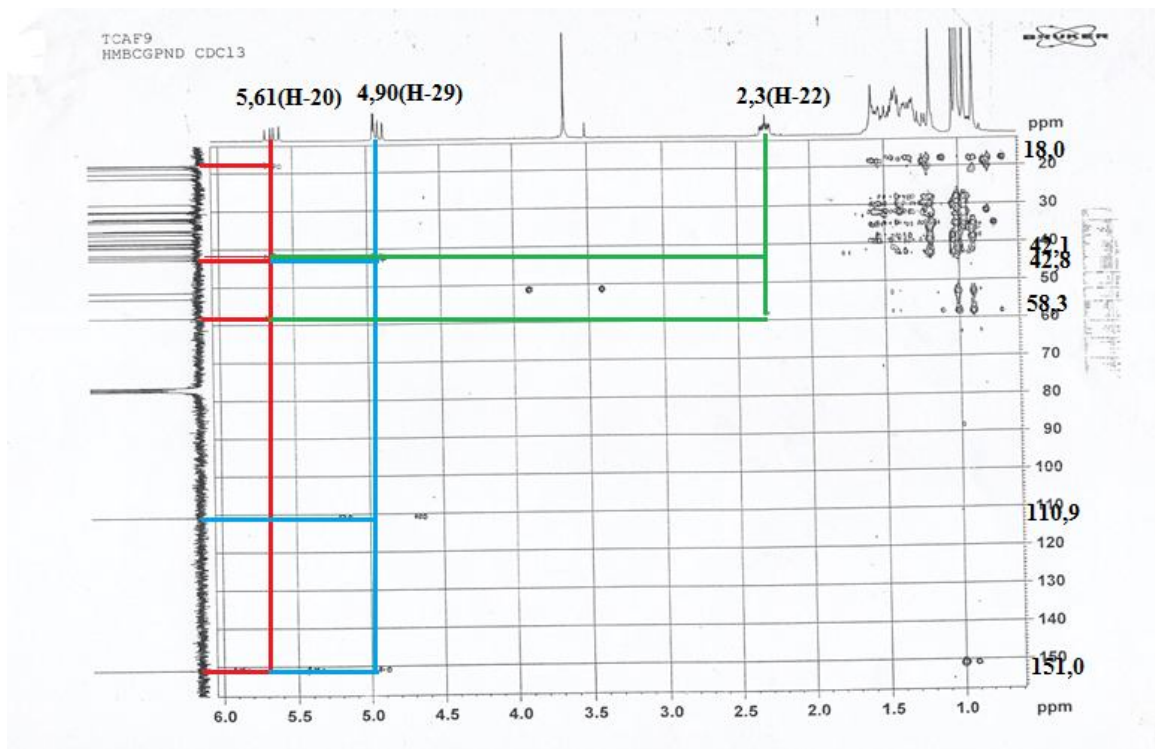


Figure 22: Spectre HMBC de (TCAF₄, 117).

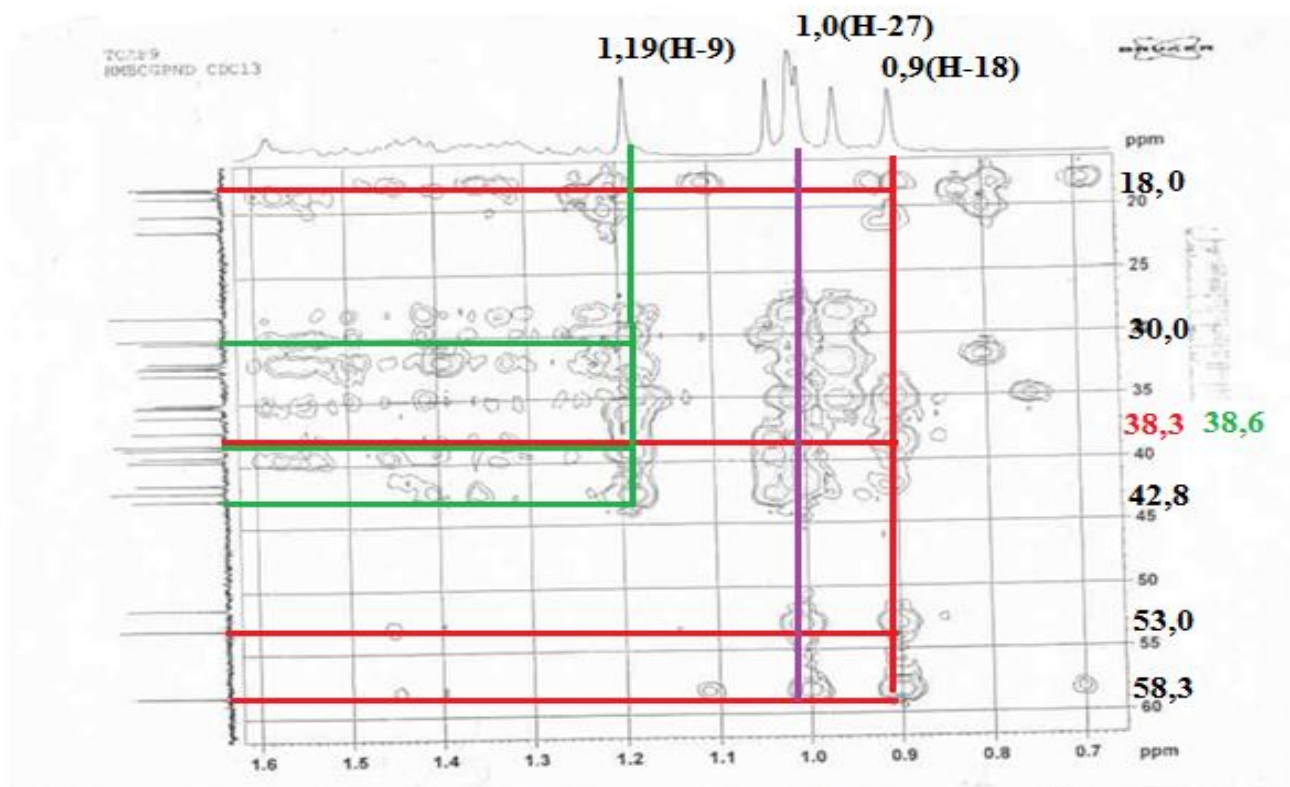


Figure 23: Spectre HMBC de (TCAF₄, 117).

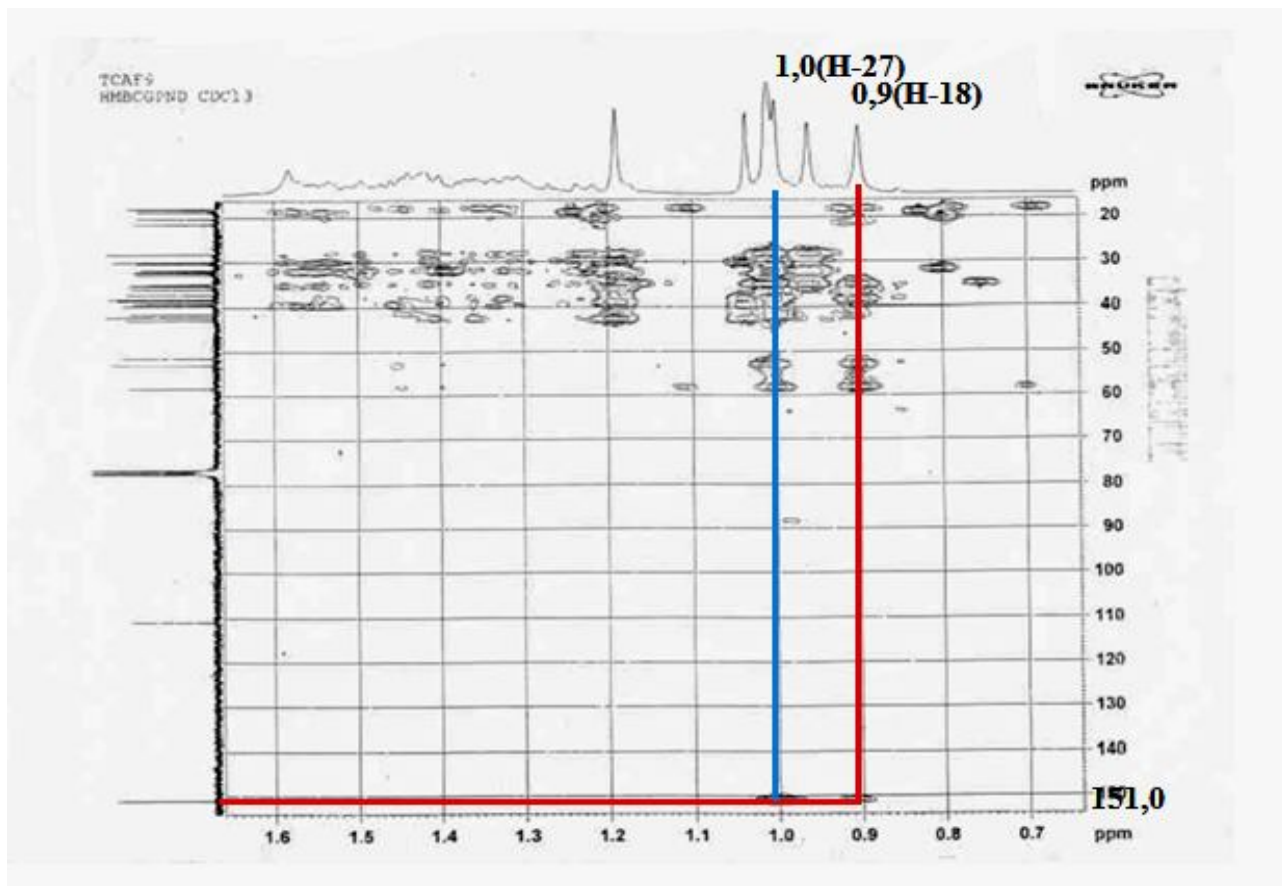


Figure 24: Spectre HMBC de (TCAF₄, 117).

Le spectre COSY (**Fig.25**) de TCAF₄ montre des corrélations importantes entre les protons à δ_H 5, 61 (H-20) et 4,90 (H-29) d'une part et entre celui à δ_H 2, 3 (H-22) et ceux à δ_H 1,4 (H-21) et 1,6 (H-19) d'autre part. Ces différentes corrélations, permettent de confirmer l'absence du carbone en C-30.

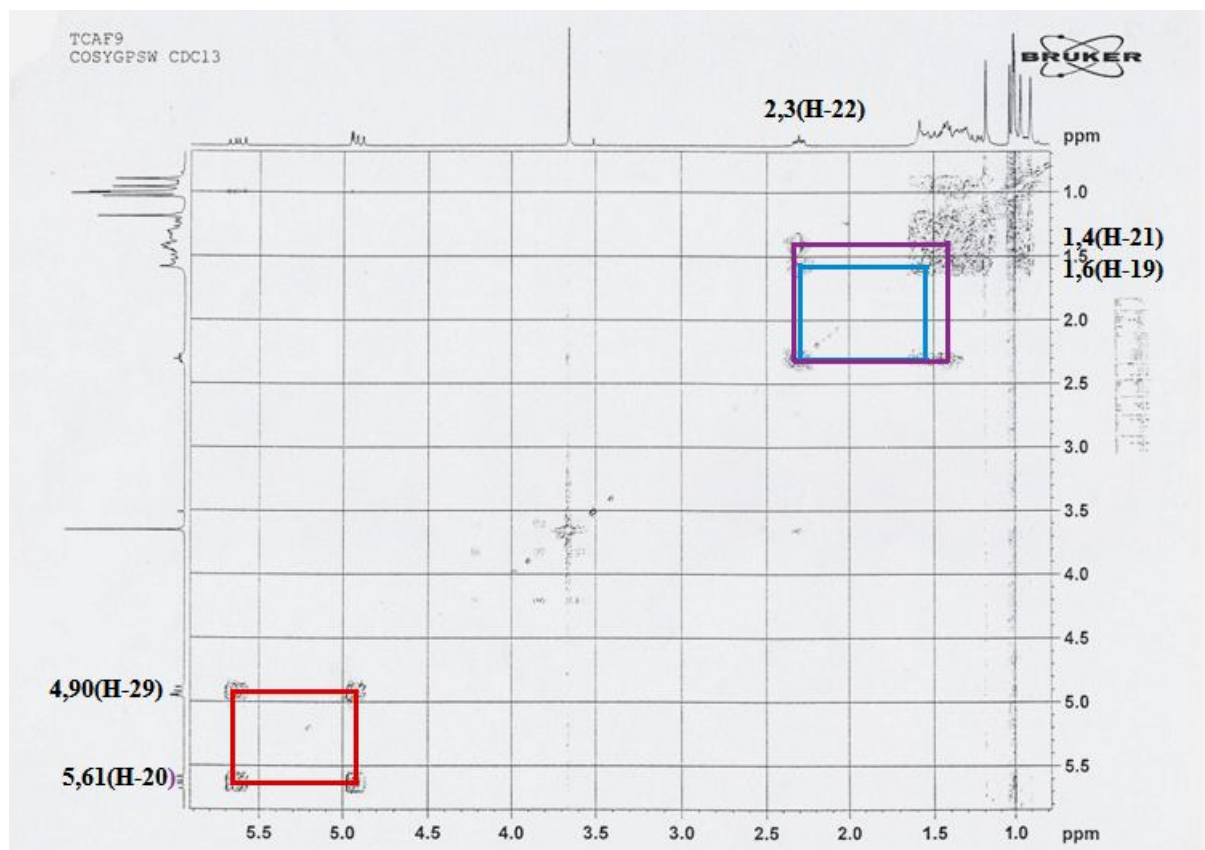
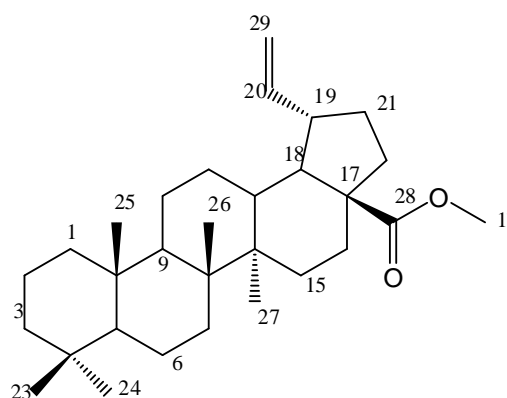


Figure 25: Spectre COSY de (TCAF₄, 117).

De tout ce qui précède, nous avons attribué à TCAF₄ la structure 117 qui est celle du 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle décrite ici pour la première fois.



117

Cette structure est confirmée par les ions fragments importants observés sur le spectre de masse.

Tableau XIII: Données spectrales de RMN¹H (600 MHz, CDCl₃) et de RMN¹³C (150 MHz, CDCl₃) de (TCAF₄, 117)

Position C/H	TCAF ₄ , δ _H (m, J en Hz) (<u>117</u>)	TCAF ₄ , δ _c (m) (<u>117</u>)	TCAF ₄ , HMBC (¹ H- ¹³ C) (<u>117</u>)
1	1,31 (2H, m)	39,3 (t)	C-5, C-10, C-25
2	1,35 (2H, m)	30,2 (t)	C-1, C-4
3	1,33 (2H, m)	36,0 (t)	C-1, C-4, C-23, C-24
4	-	39,6 (s)	-
5	0,96 (1H, m)	35,0 (d)	C-7, C-10, C-9
6	1,42 (2H, m)	18,0 (t)	C-4, C-8
7	1,51 (2H, m)	35,2 (t)	C-5, C-6, C-8
8	-	30,0 (s)	-
9	1,19 (1H, m)	32,1 (d)	C-25, C-8, C-10
10	-	38,6 (s)	-
11	1,27 (2H, m)	21,4 (t)	C-8, C-12, C-13
12	1,49 (2H, m)	35,3 (t)	C-9, C-11, C-14
13	1,37 (1H, m)	53,0 (d)	C-8, C-14, C-17
14	-	38,3 (s)	-
15	1,56 (1H, m) 1,24 (1H, m)	32,8 (t)	C-14, C-16, C-17, C-27
16	1,29 (1H, m) 1,14 (1H, m)	32,3 (t)	C-14, C-15, C-17
17	-	42,1 (s)	-
18	0,90 (1H, m)	58,3 (d)	C-14, C-13, C-10
19	1,6 (1H, m)	42,8 (d)	C-17, C-18
20	5,61 (1H, ddd, 14,2 ; 9,0 ; 7,3)	151,0 (d)	C-18, C-21, C-27, C-20, C-19, C-17
21	1,43 (1H, m) 1,46 (1H, m)	41,5 (t)	C-25, C-26, C-11
22	2,3 (2H, m)	37,3 (t)	C-18, C-28, C-19
23	1,01 (3H, s)	20,2 (q)	C-3, C-4, C-24
24	1,01 (3H, s)	20,2 (q)	C-3, C-5, C-23
25	0,90 (3H, s)	18,2 (q)	C-6, C-5, C-9
26	1,03 (3H, s)	18,8 (q)	C-9, C-14
27	1,00 (3H, s)	18,0 (q)	C-18, C-13, C-20
28	-	174,3 (s)	-
29	4,90 (2H, ddd, 14,2 ; 9,0 ; 1,3)	110,9 (t)	C-20, C-19
1'	3,65 (3H, s)	51,4 (q)	C-28, C-13

(Multiplicités et constante de couplage sont données entre parenthèses)

II.2.2.2-Identification de TCA₂ ou bétuline (121).

Il a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange Hexane-Acétate d'éthyle (9 :1). Il réagit positivement au test de Liebermann-Buchard en donnant une coloration rouge qui vire au violet caractéristique des triterpènes [Saha *et al.*, 2011] suggérant que TCA₂ serait un triterpène.

Sur le spectre de RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆, Fig 27.) de TCA₂, on observe :

- 5 singulets intenses de trois protons chacun à δ_H 0,75 ; 0,85 ; 0,95 ; 0,96 et 1,01 attribuables aux 5 méthyles angulaires ;
- un singulet de 3 protons à δ_H 1,7 attribuable au méthyle vinylique ;
- deux singulets d'un proton chacun à δ_H 4,59 et 4,72 caractéristiques des protons du méthylène terminal en position C-29 des lup-20(29)-ène [Chueng et Williamson, 1969] ;
- deux protons diastéréotopiques d'un oxyméthylène à δ_H 3, 04 (1H, dd, J=5,4 et 10,8 Hz) et à δ_H 3, 11 (1H, dd, J=5,4 et 10,8) ;
- un signal d'un proton à δ_H 3,3 caractéristique du proton de l'oxyméthine en C-3 des triterpènes

Son spectre de RMN¹³C (75 MHz, Acétone-d₆,) présente :

- à δ_c 77,7 un signal caractéristique du carbone de l'oxyméthine en C-3 des triterpènes ;
- à δ_c 150,8 et 109,1 des signaux caractéristiques des carbones C-20 et C-29 des lup-20(29)-ènes [Gunasekera *et al.*, 1982].

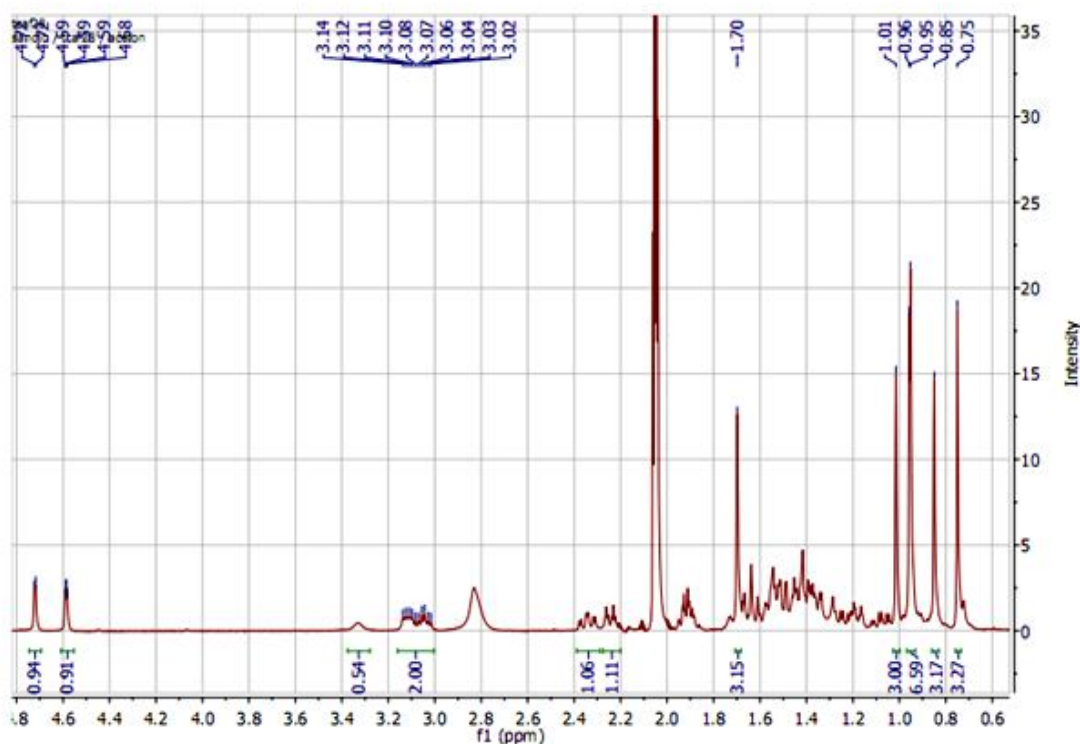
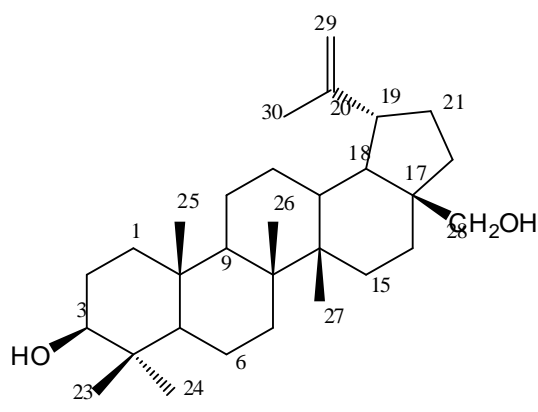


Figure 27: spectre de RMN ^1H (300 MHz, Acétone- d_6) de (TCA_2 , 121)

De tout ce qui précède, nous avons attribuer à TCA_2 la structure 121 qui est celle de la bétuline ou 3β , 28-dihydroxylup-20(29)-ène précédemment isolée de *Adenium obesum* par [Tijjani et al., 2012]. La bétuline possède les activités anti-tuberculeuses, hépatoprotectrices, anti-HIV, cytotoxiques et anti-inflammatoires [Abdel-Nomen et al., 2003, Robert et al., 2004]. Aussi, Il a été démontré qu'elle peut subir des transformations chimiques pour donner des composés ayant des activités anti-inflammatoires, antibactériennes, anti-virales et anticarcinogéniques [Alakurtti et al., 2006].



121

Tableau XIV : Comparaison des données de RMN¹³C (75 MHz, Acétone-d₆) de TCA₂, (121) avec celles de la littérature.

Position	DEPT	TCA ₂ , δc, (121)	Bétuline δc, [Tijjani et al., 2012]
1	CH ₂	37,9	38,9
2	CH ₂	27,9	27,5
3	CH	77,3	79,2
4	C	38,1	38,4
5	CH	55,2	55,4
6	CH ₂	18,4	18,4
7	CH ₂	34,1	34,3
8	C	41,0	41,0
9	CH	50,0	50,5
10	C	37,1	37,4
11	CH ₂	21,1	20,9
12	CH ₂	25,0	25,3
13	CH	37,2	37,2
14	C	42,6	42,8
15	CH ₂	27,2	27,1
16	CH ₂	28,2	29,2
17	C	47,3	47,9
18	CH	48,0	47,9
19	CH	48,1	48,8
20	C	150,8	150,6
21	CH ₂	29,5	29,8
22	CH ₂	34,1	34,1
23	CH ₃	27,6	28,1
24	CH ₃	15,0	15,4
25	CH ₃	15,8	16,2
26	CH ₃	15,9	16,1
27	CH ₃	14,8	14,8
28	CH ₂	59,8	60,6
29	CH ₂	109,1	109,8
30	CH ₃	18,8	19,2

II.2.2.3-Identification de TCAF₉ ou lupeol (122).

Il a été obtenu sous forme de cristaux blancs dans le mélange hexane – acétate d'éthyle (19:1) et fond entre 215–216 °C. Il est soluble dans le chloroforme et réagit positivement avec le réactif de Liebermann–Burchard en donnant une coloration violacée caractéristique des triterpènes [Saha et al., 2011]. Il présente en spectrométrie de masse l'ion moléculaire [M]⁺ à *m/z* 426 dont une analyse combinée avec les spectres de RMN permet de lui attribuer la formule brute C₃₀H₅₀O présentant 6 insaturations.

Sur son spectre de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), on observe:

- 6 singulets intenses de 3 protons chacun à δ_H 0,76; 0,79; 0,83; 0,94; 0,97; 1,03 attribuables aux 6 méthyles angulaires;
- Un singulet de 3 protons à δ_H 1,68 attribuable au méthyle vinylique;
- Deux singulets d'un proton chacun à δ_H 4,60 et 4,72 caractéristiques des protons du méthylène terminal en position C-29 des lup-20(29)-ène [Chueng et Williamson, 1969] ;
- Un doublet dédoublé à δ_H 3,15 (1H; *J* = 4,7 et 11,4 Hz) attribuable au proton géminé au groupement hydroxyle en position C-3 d'un squelette triterpénique [Chueng et Williamson, 1969].

Le spectre de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de TCAF₉ (DEPT inclus) présente:

- à δ_C 79,0 un signal caractéristique du carbone de l'oxyméthine en C-3 des triterpènes;
- à δ_C 150,9 et 109,3 des signaux caractéristiques des carbones C-20 et C-29 des lup-20(29)-ènes [Gunasekera et al., 1982].

L'ensemble de toutes ces données spectroscopiques nous permet d'attribuer à TCAF₉ la structure 118 qui est celle du lupéol précédemment isolé de *Lonchocarpus sericeus* par [Abdullahi et al., 2013] (Tableau XV). Le lupéol dans les conditions invitro montre une activité antimalariale et une activité hypotensive [Fotie et al, 1994]; de même, il inhibe la prolifération et induit la mort des cellules pancréatiques cancérigènes [Saleem et al., 2005].

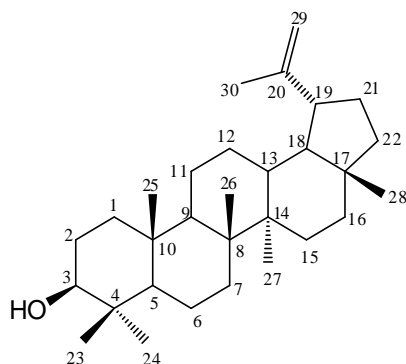


Tableau XV: Comparaison des données de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), de TCAF₉; (**122**) avec celles de la littérature [Abdullahi et al., 2013]

Position	DEPT	TCAF ₉ , δc (122)	Lupeol, δc , [Abdullahi et al., 2013]
1	CH ₂	38,2	38,7
2	CH ₂	26,9	27,4
3	CH	79,0	79,0
4	C	38,8	38,9
5	CH	55,1	55,5
6	CH ₂	18,7	18,5
7	CH ₂	34,0	34,2
8	S	41,0	40,9
9	CH	50,3	50,5
10	C	37,2	37,2
11	CH ₂	20,9	21,0
12	CH ₂	25,2	25,2
13	CH	38,0	38,1
14	C	43,1(42,9
15	CH ₂	27,1	27,1
16	CH ₂	35,4	35,5
17	C	43,0	43,0
18	CH	48,2	48,3
19	CH	48,1	48,0
20	C	150,9	151,0
21	CH ₂	29,7	29,9
22	CH ₂	39,8	40,0
23	CH ₃	28,0	28,0
24	CH ₃	15,0	15,1
25	CH ₃	15,9	16,1
26	CH ₃	16,0	16,0
27	CH ₃	14,9	14,8
28	CH ₃	18,1	18,0
29	CH ₂	109,3	109,0
30	CH ₃	19,3	19,5

II.2.2.4. Identification de TCAF₁₃ ou 16-hydroxylupéol (123)

TCAF₁₃ est obtenu sous forme de poudre blanche dans le CH₂Cl₂. Il est soluble dans le chloroforme et donne un test positif avec la coloration violacée au réactif de Liebermann–Burchard, ce qui nous suggère que TCAF₁₃ est un triterpène [Saha *et al.*, 2011]. Son spectre de masse en IE présente le pic de l'ion moléculaire à m/z 442 dont une analyse combinée avec les spectres RMN permet de lui attribuer la formule brute C₃₀H₅₀O₂ renfermant six insaturations.

Sur son spectre de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Fig. 28), on observe :

- Entre δ_H 0,88 et 1,76 les signaux de 7 méthyles dont 6 angulaires et celui à 1,76 ppm attribué aux protons du méthyle vinylique en C-30 des lup-20(29)-ène [Chueng et Williamson, 1969] ;
- à δ_H 3,24 le signal du proton H-3 des triterpènes hydroxylés en C-3 ;
- à δ_H 4,82 et 4,88 ppm deux singulets d'un proton chacun attribuables aux signaux d'un méthylène terminal des lup-20(29)-ène [Chueng et Williamson, 1969] ;
- à δ_H 4,02 le signal d'un proton apparaissant sous forme d'un triplet attribuable au proton d'un oxyméthine voisin d'un méthylène.

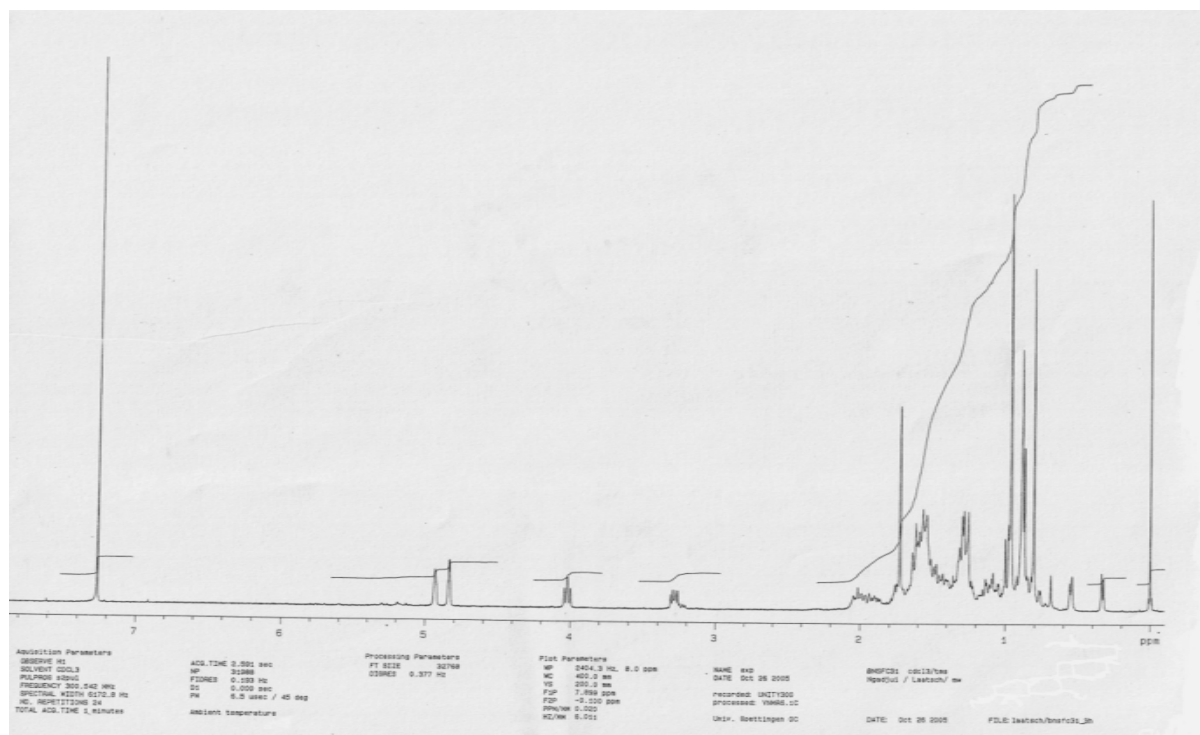
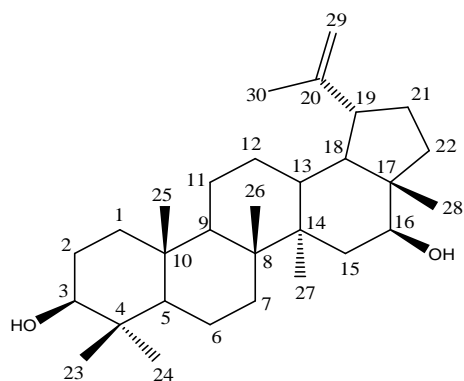


Figure 28 : Spectre de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de (TCAF₁₃, 123).



123

II.2.2.5 - Identification de TCAF₃ ou acide bétulinique (124).

TCAF₃ est obtenu sous forme de cristaux blancs dans le système CH₂Cl₂/MeOH (97 :3). Il est soluble dans le DMSO et fond entre 316-318°C. Le test de Liebermann-Burchard donne une coloration violette, ce qui nous suggère que TCAF₃ serait un triterpène [Saha *et al.*, 2011]. Son spectre de masse en IE (**Fig. 30**) présente le pic de l'ion moléculaire à *m/z* 456 dont une analyse combinée avec les spectres RMN permet de lui attribuer la formule brute C₃₀H₄₈O₃ renfermant sept insaturations.

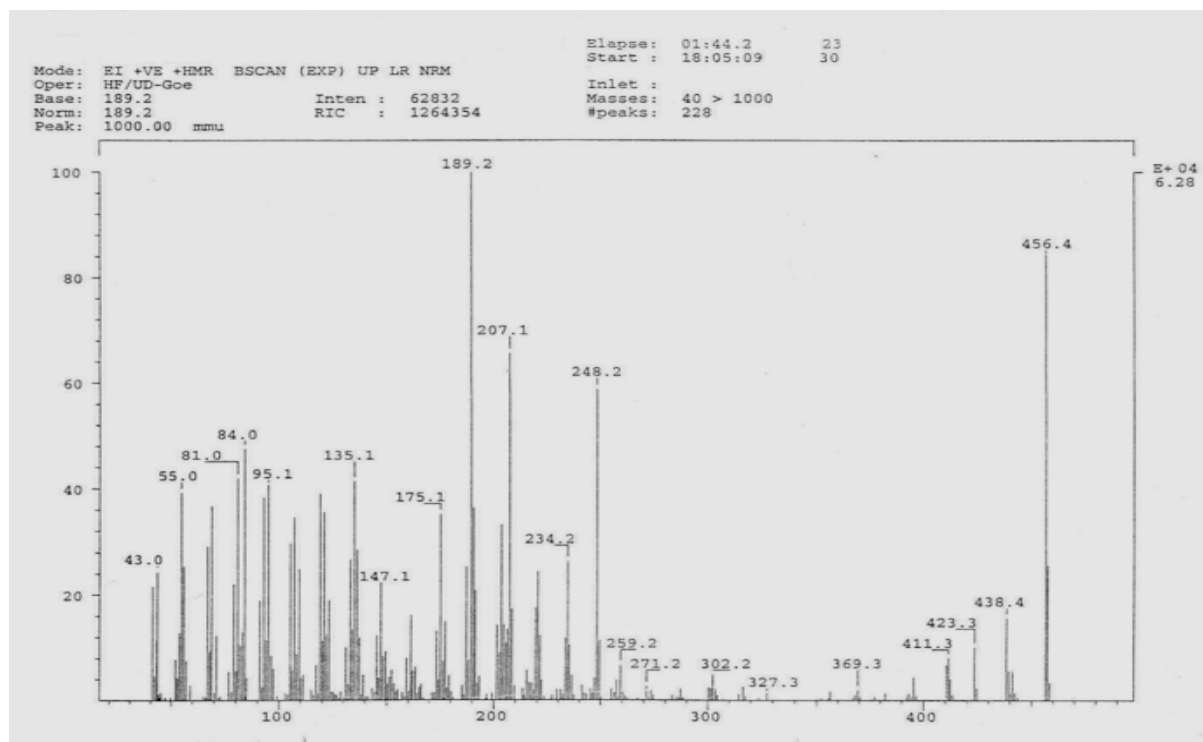
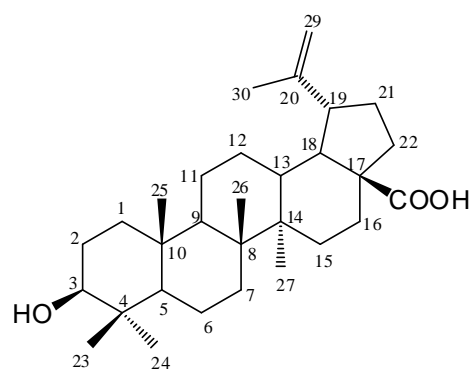


Figure 30: Spectre de masse en IE de (TCAF₃, 124)

Son spectre de RMN du ¹³C (75 MHz, acetone-*d*₆, **Fig. 31**) est presque superposable à celui de TCAF₉. La seule différence majeure est l'absence du signal d'un méthyle qui est remplacé ici par un signal apparaissant à δ_C 176,6 attribuable à un carboxyle [**Connolly et Hill, 1991**].

Ceci est confirmé par le spectre de RMN ¹H (300 MHz, acetone-*d*₆, **Fig. 32**) de TCAF₃, où l'on observe un doublet dédoublé d'un proton à δ_H 2,85 attribuable au proton H-18 déblindé par un groupement attracteur (COOH) [**Furuya et al., 1987**].

Ces données physiques et spectroscopiques comparées à celles décrites dans la littérature (**Tableau XVI**) par **Mahato et Kundu, 1994** nous permettent d'identifier TCAF₃ à l'acide bétulinique 124 précédemment isolé de *Malaleuca cajuput* par [**Faujan et al., 2010**]. L'acide bétulinique a été identifié comme pouvant être un agent potentiel pour la chimiothérapie dans le traitement du cancer et des infections HIV [**Cichewicz et al., 2004**].



124

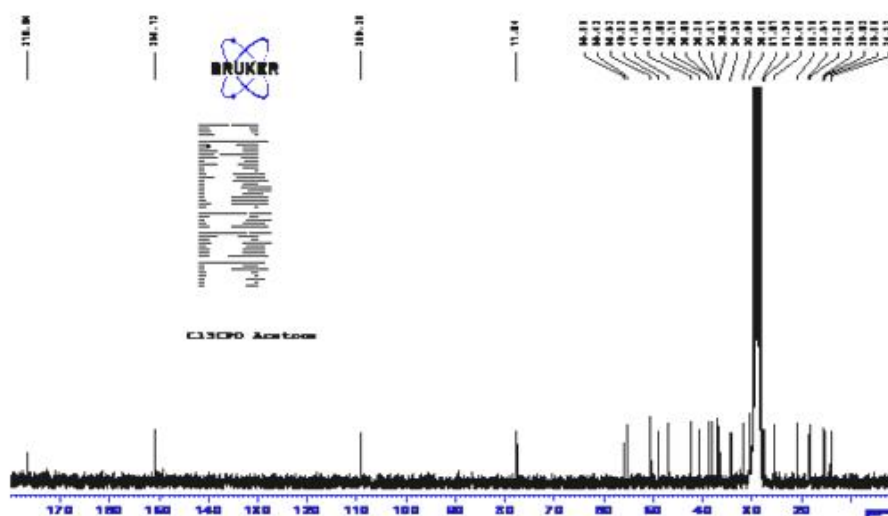


Figure 31: Spectre de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3COCD_3) de (TCAF $_3$, **124**)

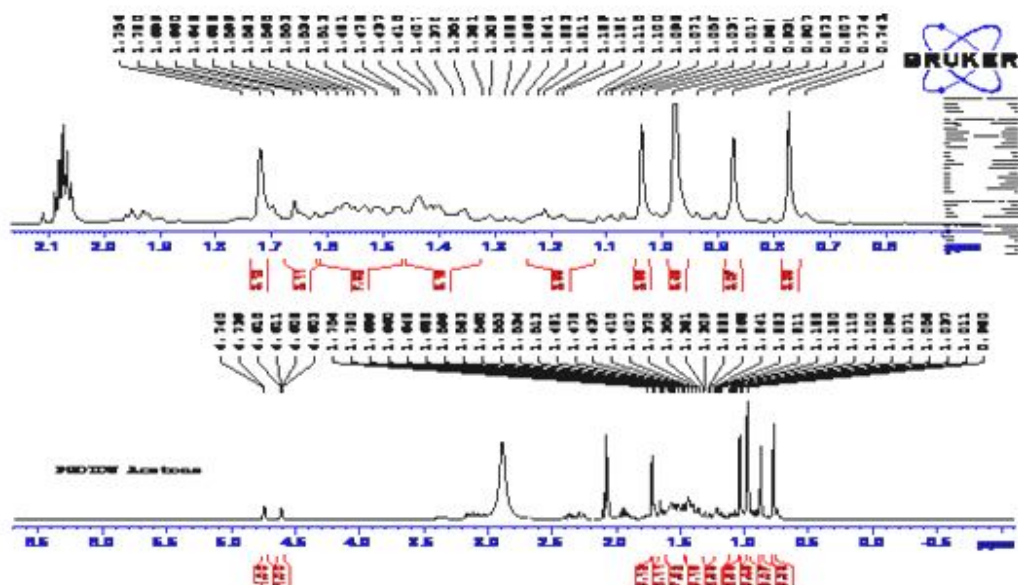


Figure 32: Spectre de RMN ^1H (300 MHz, CD_3COCD_3) de (TCAF $_3$, **124**)

Tableau XVI : Comparaison des données spectrales de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3COCD_3) de (TCAF₃, 124) avec celles de la littérature [Cichewicz et *al.*, 2004].

Position	DEPT	TCAF ₃ δc (<u>124</u>)	Acide bétulinique δc [Cichewicz et <i>al.</i> , 2004]
1	CH ₂	38,6	39,9
2	CH ₂	27,3	28,3
3	CH	79,0	78,1
4	C	38,7	39,5
5	CH	55,4	56,0
6	CH ₂	18,1	18,8
7	CH ₂	34,9	34,9
8	C	40,6	41,1
9	CH	50,5	51,0
10	C	37,0	37,6
11	CH ₂	20,7	21,2
12	CH ₂	25,4	26,2
13	CH	38,1	38,7
14	C	42,3	42,9
15	CH ₂	30,4	30,3
16	CH ₂	31,9	32,9
17	C	55,8	56,6
18	CH	47,0	49,8
18	CH	49,0	47,8
20	C	150,8	151,3
21	CH ₂	30,4	31,2
22	CH ₂	37,0	37,6
23	CH ₃	27,6	28,7
24	CH ₃	15,2	16,3
25	CH ₃	15,6	16,4
26	CH ₃	15,7	16,4
27	CH ₃	14,1	14,9
28	C	180,5	178,8
29	CH ₂	109,1	109,9
30	CH ₃	18,5	19,5

Sur son spectre de RMN¹³C (150 MHz, CDCl₃, **Fig.34**) le signal résonnant à δc 213,3 nous suggère la présence d'un carbonyle d'une cétone dans le squelette de base de TCAF₁ probablement en position 3 d'après les considérations biogénétiques. De plus, le spectre ATP (150 MHz, CDCl₃, **Fig.35**) nous révèle la présence de 11 méthylènes, 8 carbones quaternaires, 8 méthyles et 3 méthines.

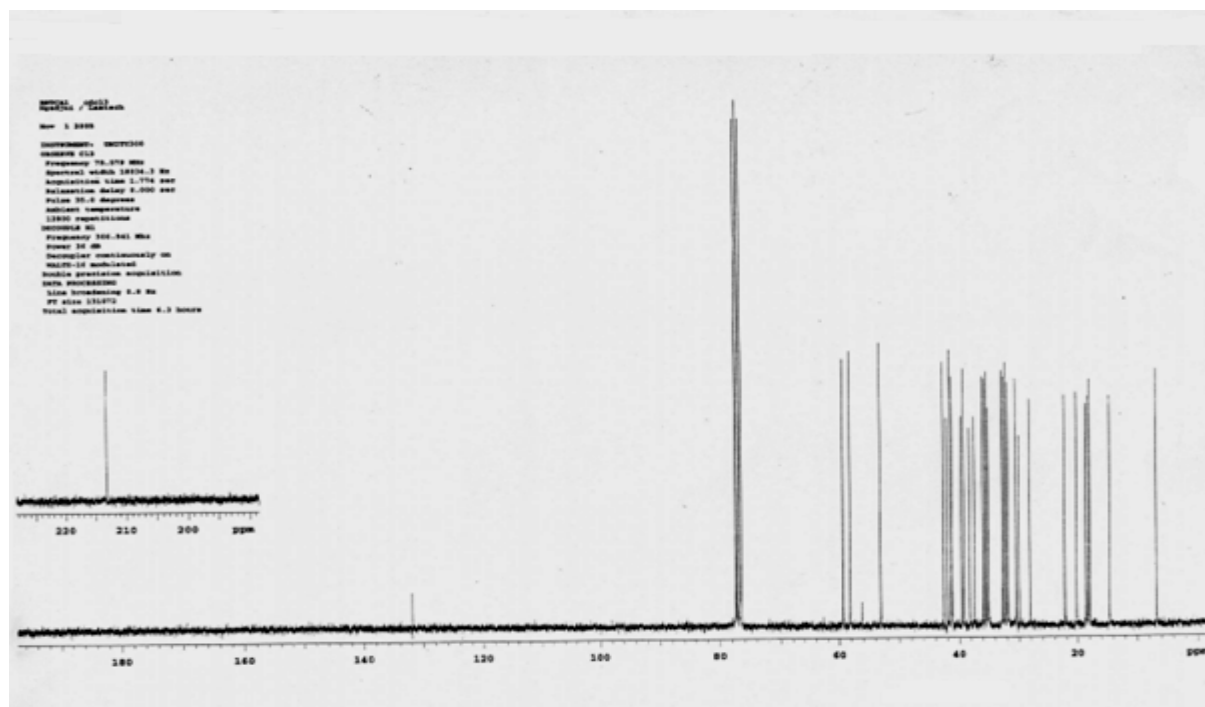


Figure 34: Spectre de RMN¹³C (150 MHz, CDCl₃) de (TCA₆, 125)

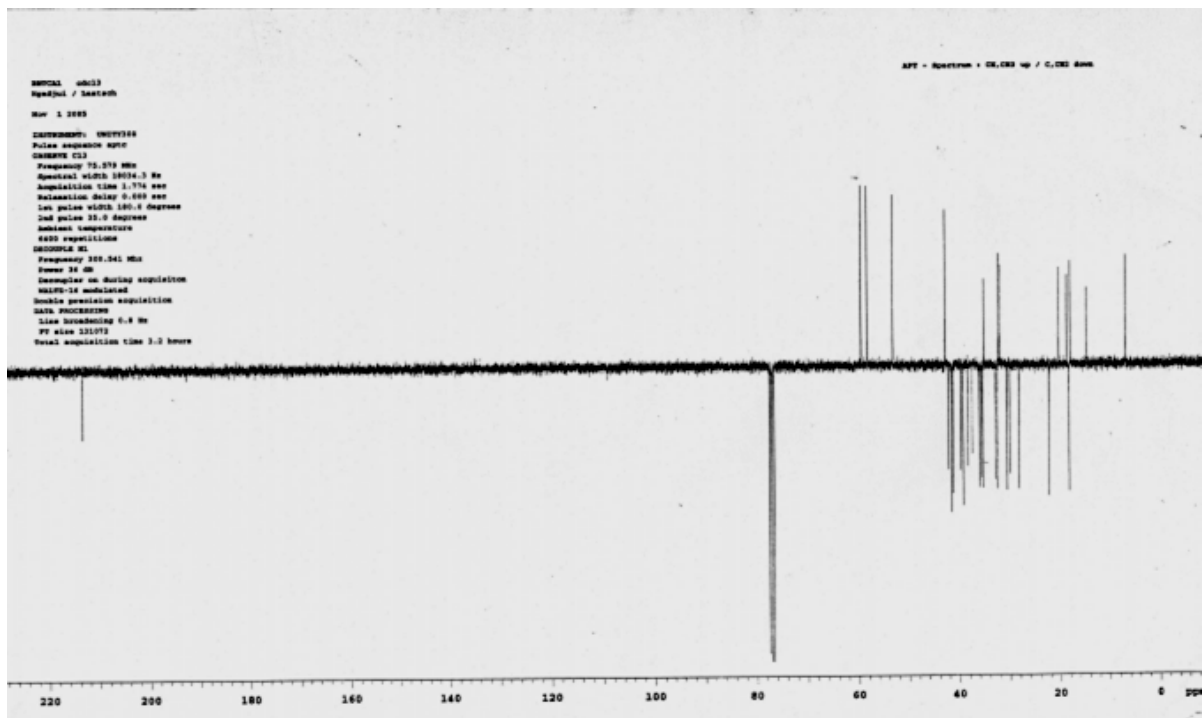
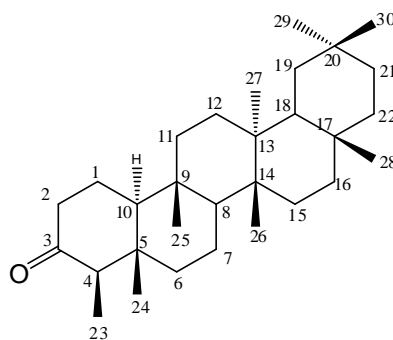


Figure 35: Spectre d'ATP (150 MHz, CDCl₃) de (TCA₆, 125)

Ces données physiques et spectroscopiques (**Tableau XVII**) ont permis d'identifier TCA₆/TCAF₃ à la friedeline 125 [Ageta et Arai, 1990] précédemment isolé de *Maytenus robusta* par [Sousa et al., 2012], elle possède des activités antimicrobiennes [Sundararajan al., 2006. ; Kuete et al., 2009].



125

Tableau XVII: Comparaison des données de RMN¹³C (150 MHz, CDCl₃) de (TCA₆, 125) avec celles de la littérature [Sousa et al., 2012].

Position	DEPT	TCA ₆ , (δc) (<u>125</u>)	Friedeline, (δc) [Sousa et al., 2012].
1	CH ₂	22,3	22,3
2	CH ₂	41,4	41,5
3	C	213,2	213,2
4	CH	58,2	58,2
5	C	41,9	42,2
6	CH ₂	31,4	41,3
7	CH ₂	18,3	18,3
8	CH	53,1	53,1
9	C	37,6	37,5
10	C	59,2	59,5
11	CH ₂	35,6	35,6
12	CH ₂	30,3	30,5
13	C	38,3	38,3
14	C	39,6	39,7
15	CH ₂	32,4	32,4
16	CH ₂	36,0	36,0
17	C	29,8	30,0
18	CH	42,9	42,8
19	CH ₂	35,2	35,4
20	C	28,1	28,2
21	CH ₂	32,7	32,8
22	CH ₂	39,3	39,3
23	CH ₃	6,8	6,8
24	CH ₃	14,9	14,7
25	CH ₃	17,9	18,0
26	CH ₃	20,2	20,3
27	CH ₃	18,7	18,7
28	CH ₃	32,3	32,1
29	CH ₃	34,9	35,0
30	CH ₃	30,9	31,8

II.2.2.7-Identification de TCAF₈ ou friedelane(126).

Le composé TCAF₈ a été isolé sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (6 :1). Il donne un test positif au réactif de Libermann-Buchard avec une coloration rouge qui vire au violet caractéristique des triterpènes [Saha *et al.*, 2011]. Son spectre de masse en IE montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 412 dont une analyse à haute résolution permet de lui attribuer la formule brute C₃₀H₅₂ renfermant cinq insaturations.

Les spectres de RMN ¹H et RMN¹³C sont presque semblables à ceux de TCAF₁. La seule différence est que sur son spectre de RMN¹³C (**Fig.36**), on note l'absence du carbone à δc 213,3 caractéristique du carbonyle en C-3 des triterpènes pentacycliques.

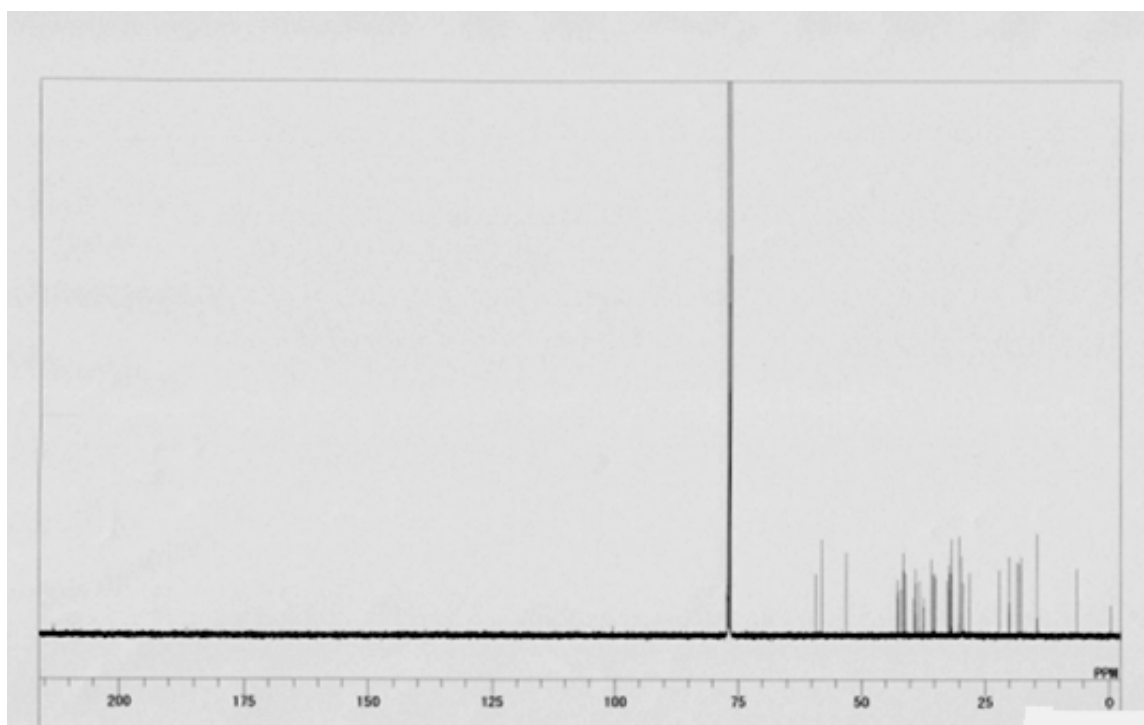
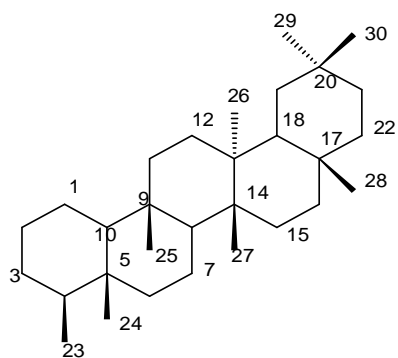


Figure 36: Spectre de RMN¹³C de (TCA₈, 126)

L'ensemble de toutes ces données physiques et spectroscopiques nous ont permis d'attribuer à TCAF₈ la structure 126 qui est celle de la friedelane [Mahato *et Kundu*, 1994].



126

II.2.2.8-Identification de TCA₈ ou friedelan-3β-ol (127).

TCA₆ est obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange CH₂Cl₂-MeOH (7 :9) et fond entre 229-231°C. Il présente en spectrométrie de masse en impact électronique le pic de l'ion moléculaire à m/z 428 dont l'analyse à haute résolution permet de lui, attribuer la formule brute C₃₀H₅₂O renfermant cinq degrés d'insaturations.

Le spectre de RMN¹³C(75 MHz, CDC₁₃) de TCA₈ est presque superposable à celui de TCA₅, à la seule différence qu'il présente un signal à δ_c 79,2 attribuable au carbone des triterpènes hydroxylés en position 3 [Mahato et Kundu, 1994] confirmant l'existence du groupement hydroxyle dans la molécule de TCA₈.

Son spectre de RMN¹H (300 MHz, pyridine, Fig.37) est aussi superposable à celui de TCA₈, mais il présente en plus des signaux des huit méthyles angulaires des triterpènes pentacycliques, un signal à δ_H 3,99 attribuable au proton de l'oxyméthine en position 3.

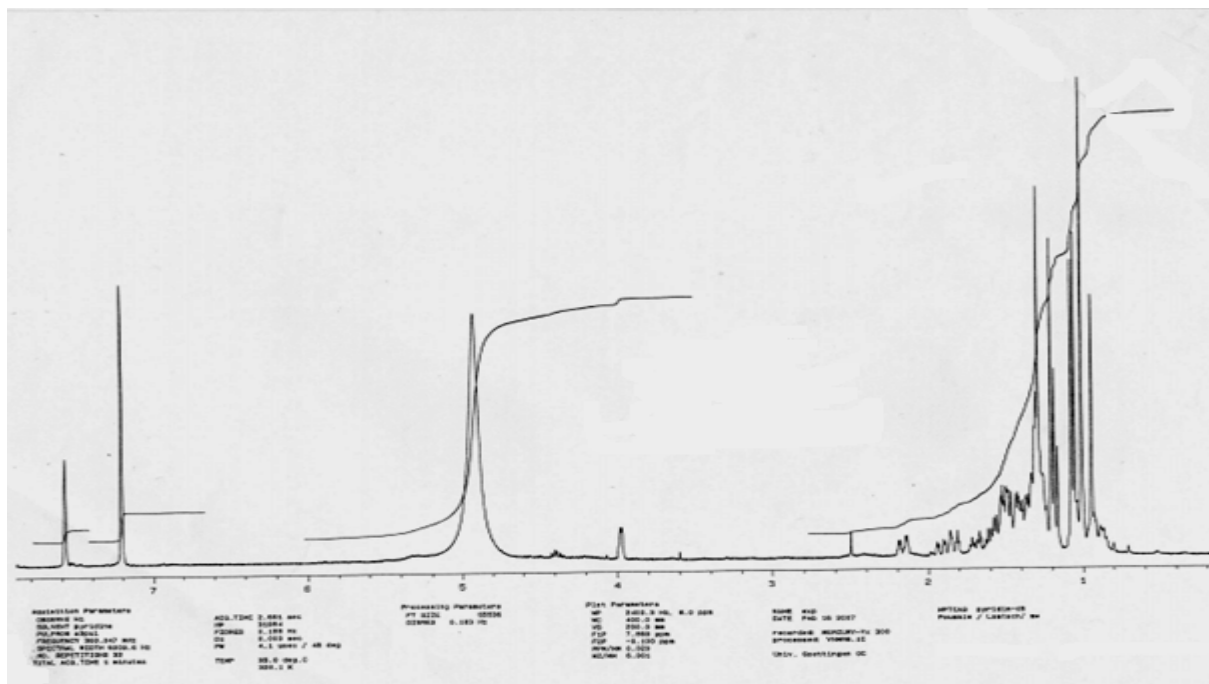
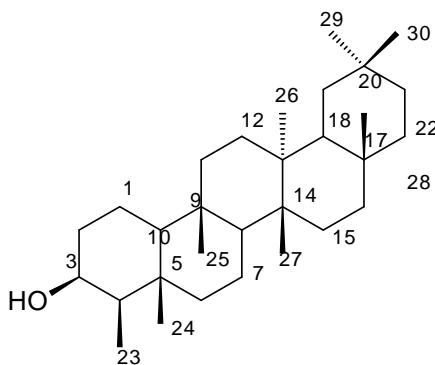


Figure 37: spectre de RMN¹H (300 MHz, pyridine) de (TCA₁₀, 127)

De tout ce qui précède, nous avons attribué à TCA₈ la structure 127 (Tableau XVIII) qui est celle de le friedelan-3β-ol déjà isolé de *Drypetes gerrardii* par [Ng'ang'a et al 2008] et évalué pour son activité anti-inflammatoire par [Sundararajan et al 2006].



127

Tableau XVIII: Comparaison des données de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) de (TCA₈, 127) avec celles de la littérature [Sousa et al., 2012].

Position	DEPT	TCA ₈ , (δc) (<u>127</u>)	friedelan-3β-ol, (δc) [Sousa et al., 2012].
1	CH ₂	15,7	15,8
2	CH ₂	35,9	36,1
3	CH	79,2	72,8
4	CH	49,2	49,1
5	C	37,5	37,8
6	CH ₂	41,4	41,7
7	CH ₂	17,3	17,5
8	CH	53,1	53,2
9	C	37,4	37,1
10	C	61,2	61,3
11	CH ₂	35,6	35,3
12	CH ₂	30,3	30,6
13	C	38,3	38,4
14	C	39,6	39,7
15	CH ₂	32,3	32,3
16	CH ₂	35,2	35,5
17	C	29,8	30,0
18	CH	42,9	42,8
19	CH ₂	35,2	35,2
20	C	28,1	28,2
21	CH ₂	32,7	32,8
22	CH ₂	39,3	39,3
23	CH ₃	11,2	11,6
24	CH ₃	16,7	16,4
25	CH ₃	17,9	18,2
26	CH ₃	20,2	20,1
27	CH ₃	18,7	18,6
28	CH ₃	32,3	32,1
29	CH ₃	34,9	35,0
30	CH ₃	30,8	31,8

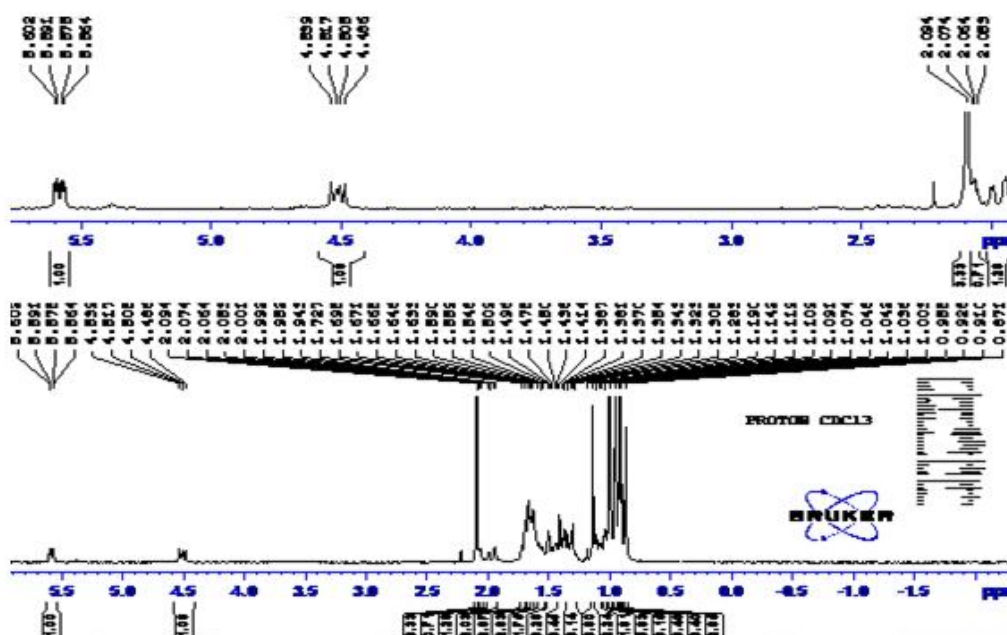
II.2.2.9-Identification de TCA₇ ou acétate de taraxéryle (128).

Le composé TCA₇ a été isolé sous forme de poudre blanche dans le mélange CH₂Cl₂-MeOH (3 :1). Il est positif au test de Liberbann-Buchard et donne une coloration rouge qui vire au violet caractéristique des triterpènes [Saha et al., 2011].

Son spectre de masse en EI indique le pic de l'ion moléculaire à m/z 468 suggérant la formule brute C₃₂H₅₂O₂ renfermant six insaturations.

Sur le spectre de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, Fig.38) de TCA₇ on note:

- Entre δ_H 0,80 et 1,13 un ensemble de 8 signaux tous singulets caractéristiques des protons des groupes méthyles ;
- à δ_H 5,60(1H, dd, J=3,3Hz) un doublet dédoublé d'un proton caractéristique d'un proton éthylénique ;
- à δ_H 2,10 un singulet de trois protons attribuables aux protons du méthyle d'un groupement acétoxyle.



- neuf méthyles, dix méthylènes, cinq méthynes parmi lesquels un oxyméthyne à δ_c 81,0 (C-3) et huit carbones quaternaires.

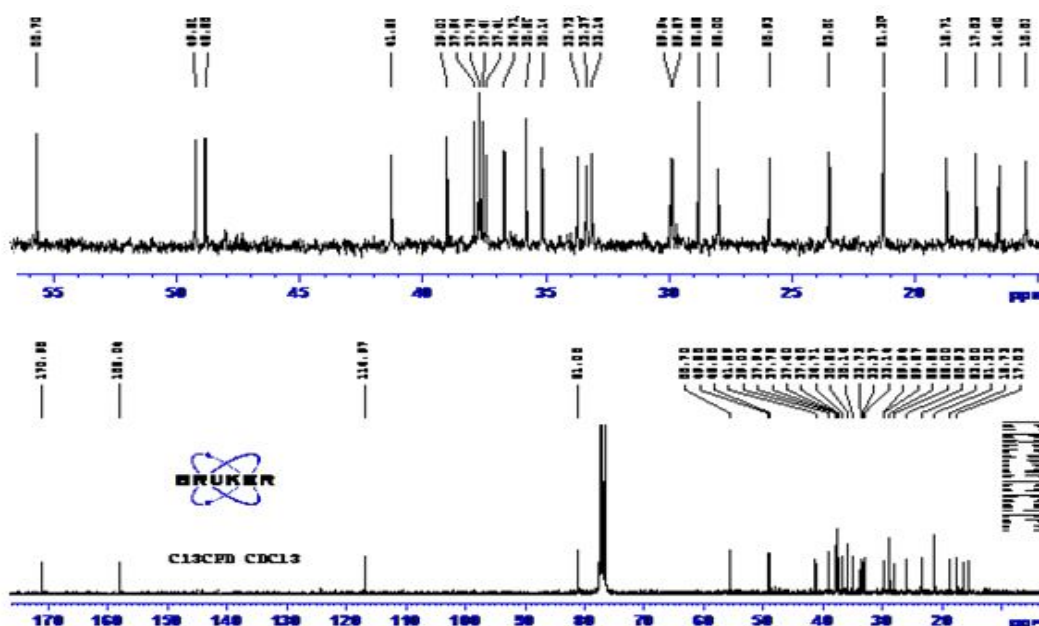
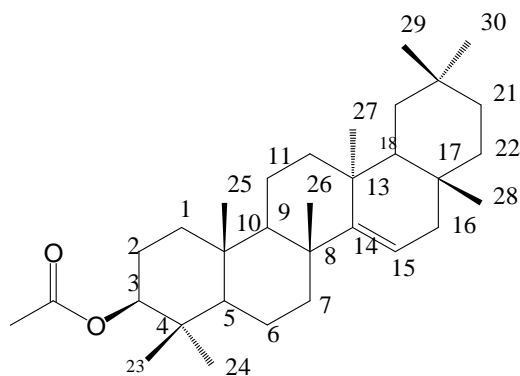


Figure 39: Spectre de RMN¹³C (75 MHz, CDCL₃) de (TCA₇, 128)

L'ensemble de toutes ces données spectroscopiques comparées à celles de la littérature [Junichi *et al.*, 2011], nous a permis d'attribuer à TCA₇ la structure 128 (Tableau XIX) qui est celle de l'acétate de taraxéryle prédominamment isolé de *Lactuca indica* par [Junichi *et al.*, 2011] et qui possède une activité antivirale [Tiwatt *et al.*, 2009].



128

Tableau XIX: Comparaison des données spectrales de RMN ^{13}C de TCA₇ (75 MHz, CDCl₃) (**128**), avec celles de la littérature [Junichi et al., 2011].

Position	DEPT	TCA ₇ , δ_{C} (128)	Acetate de taraxéryle, δ_{C} , [Junichi et al., 2011]
1	CH ₂	37,4	37,3
2	CH ₂	23,5	23,4
3	CH	81,0	80,6
4	C	37,7	37,6
5	CH	55,7	55,5
6	CH ₂	18,7	18,6
7	CH ₂	41,2	41,1
8	C	37,9	38,9
9	CH	49,2	49,1
10	C	37,7	37,8
11	CH ₂	17,5	17,4
12	CH ₂	33,7	33,6
13	C	37,4	37,5
14	C	158,0	157,9
15	CH	116,9	116,9
16	CH ₂	37,6	37,6
17	CH ₂	35,8	35,7
18	C	48,8	48,6
19	CH ₂	36,7	36,6
20	C	28,8	28,7
21	CH ₂	33,1	33,0
22	CH ₂	35,1	35,0
23	CH ₃	28,0	27,9
24	CH ₃	16,6	16,5
25	CH ₃	15,5	15,4
26	CH ₃	25,9	25,9
27	CH ₃	21,3	21,2
28	CH ₃	29,8	29,8
29	CH ₃	33,3	33,3
30	CH ₃	29,9	29,9
COO-	C	170,9(s)	171,0(s)
CH ₃ -OOC-	CH ₃	21,3(q)	21,3(q)

II.2.3-Les acides phenoliques.

II.2.3.1-Identification de TCA₄ ou acide 4'- acetoxy-3-méthoxybenzoïque (129).

Le composé TCA₄ a été obtenu sous forme de poudre brune amorphe dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (40 :60). Son spectre en (-)-ESI montre le pic de l'ion moléculaire [M-H]⁻ à m/z 209,045 dont une analyse combinée avec les spectres de RMN permet de lui attribuer la formule brute C₁₀H₁₀O₅ renfermant six insaturations.

Son spectre IR montre les bandes de vibrations caractéristiques des groupes fonctionnels à 1716 cm⁻¹ (COOH) et 1269 cm⁻¹ (C-O) indiquant la présence d'un groupe ester dans la structure de TCA₄.

Le spectre de RMN¹H de TCA₄ (300 MHz, pyridine, **Fig.40**) présence:

- à δ_H 2,31 un singulet de 3 protons caractéristiques du méthyle d'un groupement acétyle ;
- à δ_H 3,78 un singulet de 3 protons attribuable à un groupement méthoxyl;
- un système de ABX de 3 protons caractérisé par deux doublets d'un proton chacun respectivement à δ_H 7,34 (1H, J=1,8 Hz) et δ_H 8,05 (1H, J=8,0 Hz), ainsi qu'un doublet dédoublé d'un proton à δ_H 8,09 (1H, J=8,0; 1,8 Hz). Ce système est confirmé par le spectre COSY de TCA₄ ou les corrélations entre ces 3 protons sont clairement observées.

De plus ces informations sont corroborées par le spectre de RMN¹³C (75 MHz, pyridine, **Fig. 41**) de TCA₄ ou on observe :

- à δ_c 20,5 et 56,1 les signaux du méthyle du groupe acétyle et du groupement méthoxyl respectivement ;
- les signaux de trois méthynes à δ_c 123,4; 122,8 et 113,6 ;
- les signaux des carbones quaternaires, avec deux oxygénés à δ_c 151,4 et δ_c 144,1 et un non oxygéné à δ_c 129,5 ;
- les signaux de deux carbonyles d'ester et d'acide carboxylique respectivement à δ_c 169,4 et δ_c 167,4

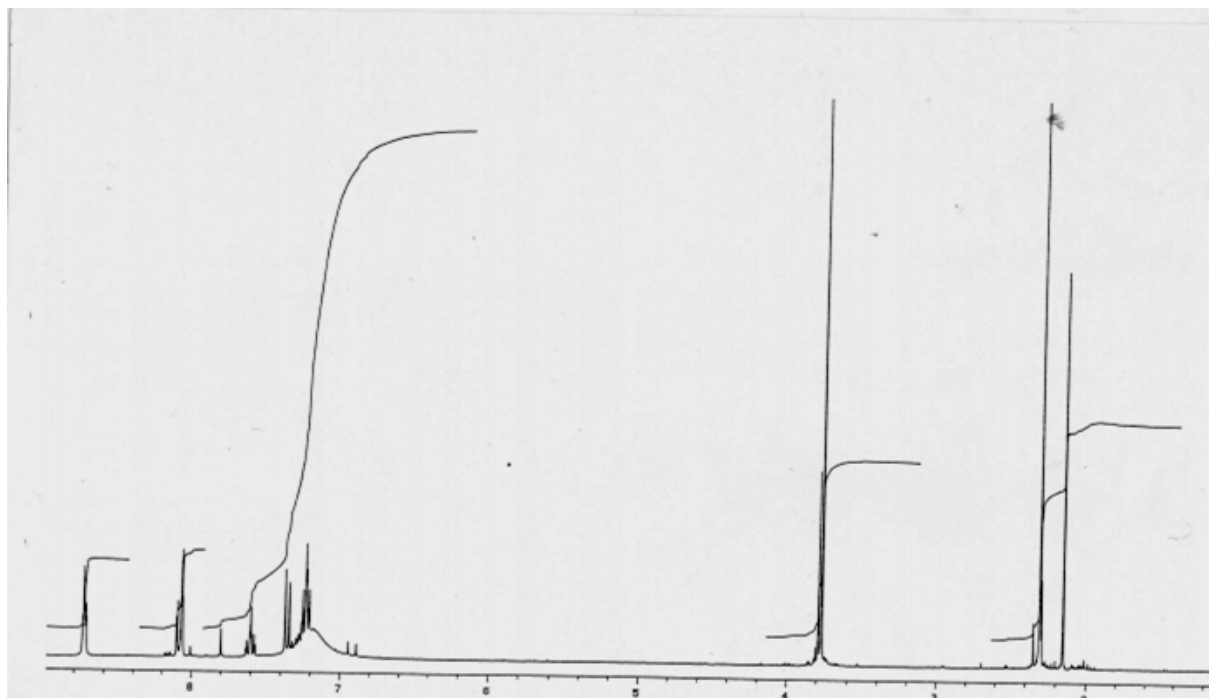


Figure 40 : Spectre de RMN ^1H (300 MHz, pyridine) de (TCA₄, 129).

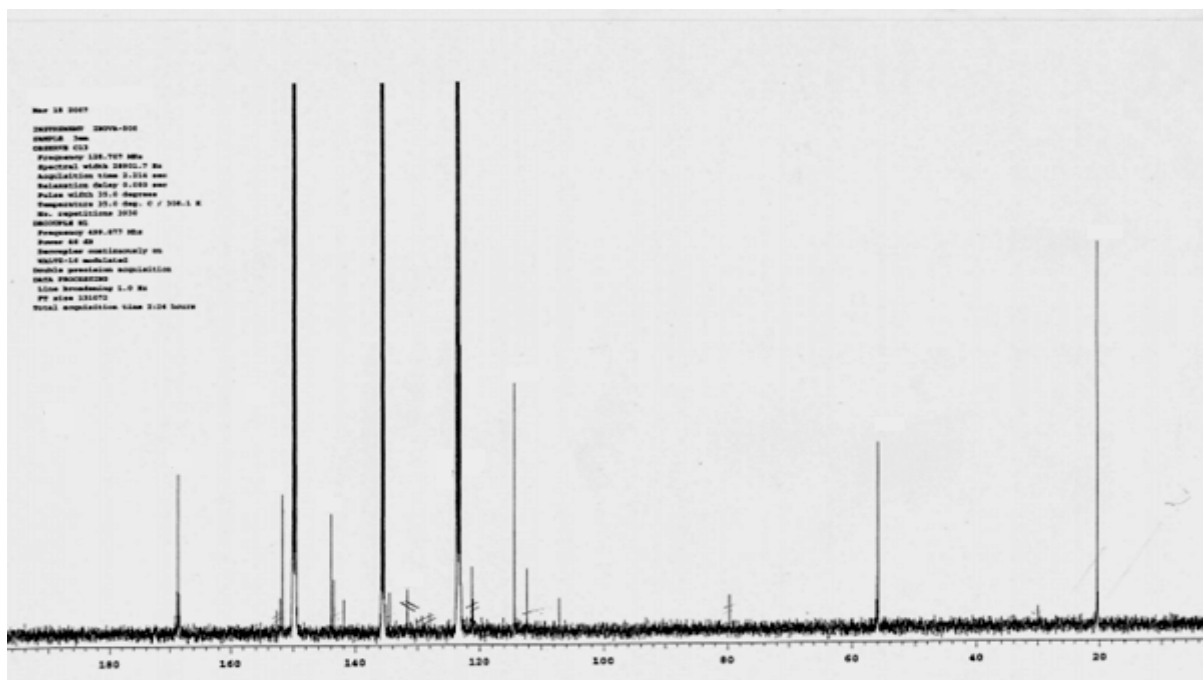
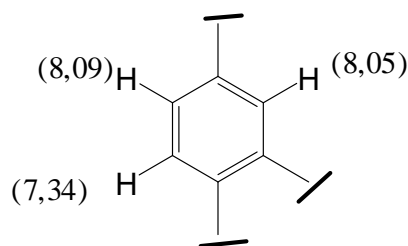


Figure 41: Spectre de RMN ^{13}C (75 MHz, pyridine) de (TCA₄, 129).

Toutes ces informations nous suggèrent la sous-structure suivante :



130

Les positions des groupements carboxyle (COOH-), acétoxyl (CH₃COO-) et méthoxyl (-OCH₃) ont été déduites de l'analyse du spectre HMBC (300 MHz, pyridine, **Fig.42**) de TCA₄ ou l'on observe des taches de corrélations entre le proton à δ_H 8,05 et les carbones à δ_C 169,41; 167,41; 151,43; 144,07 ; 123,44 et 113,60. On note également les taches de corrélations entre le proton à δ_H 8,09 et les carbones à δ_C 169,41; 167,41; et 144,07; entre le proton à δ_H 7,34 et les carbones à δ_C 151,43; 144,07 et 129,5.

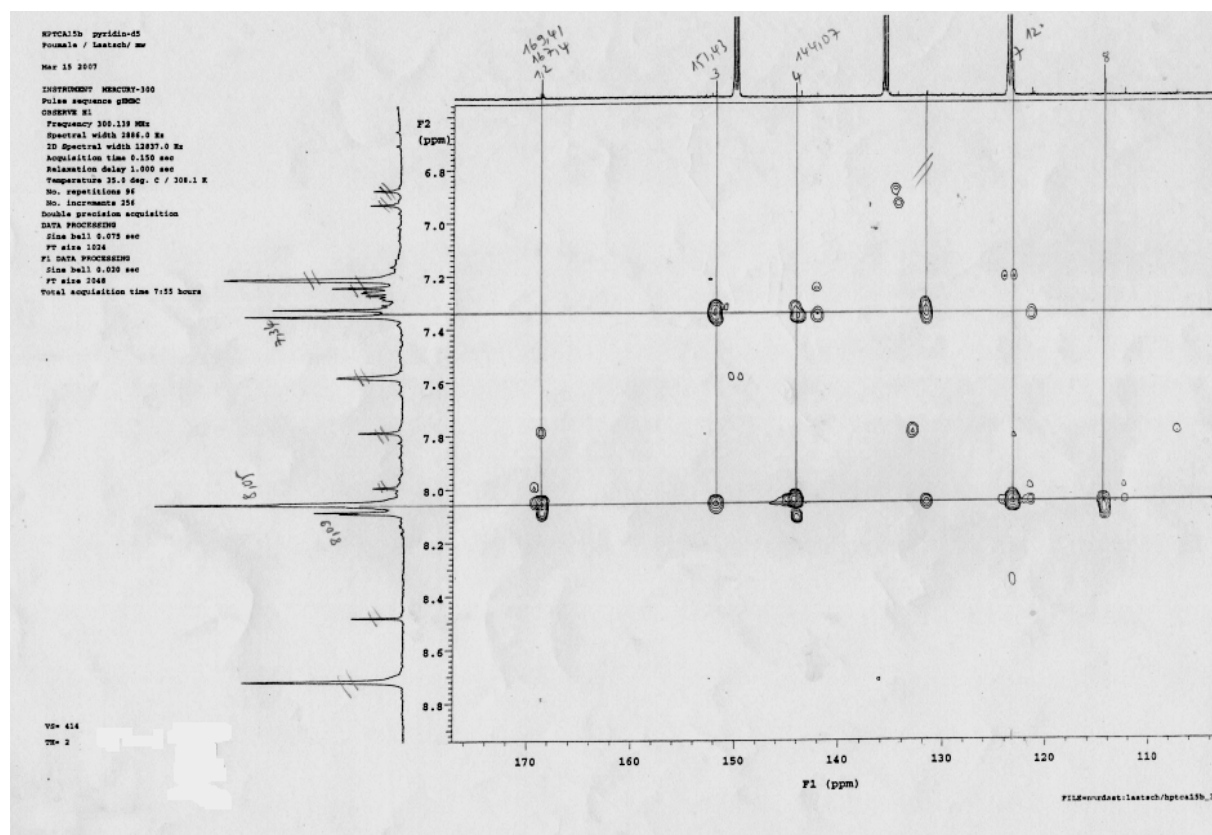
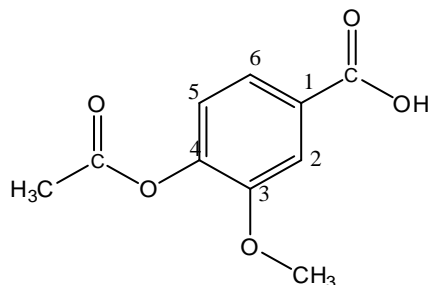


Figure 42 : Spectre de HMBC (300 MHz, pyridine) de (TCA₄, **129**).

Sur la base de toutes ces données spectroscopiques, la structure de TCA₄ a été établie comme étant celle de l'acide 4-acetoxy-3-méthoxybenzoïque **129** déjà décrite par **Li et Huang, 2000**.



129

II.2.3.2-Identification de TCA₃, TCAF₁₀ ou acide vanilique (**131**).

Le composé TCA₃ a été obtenu sous forme de poudre brune amorphe dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (40 :60). Son spectre de masse en impact électronique montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 168 dont l'analyse à haute résolution permet de lui attribuer la formule brute C₈H₈O₄ renfermant cinq degrés d'insaturations.

Les spectres de RMN¹H (600 MHz, CD₃CN, **Fig. 43**) et RMN¹³C (150 MHz, CD₃CN, **Fig. 44**) de TCA₃ sont presque superposables à ceux de TCA₄ les seules différences observées sont :

- Sur le spectre de RMN¹H de TCA₃ on note l'absence du signal à δ_H 2,31 attribuable aux protons du méthyle du groupe acétoxyle ;
- sur le spectre de RMN¹³C, on note l'absence des signaux à δ_C 169,4 et 20,5 caractéristiques du carbonyle des esters et du carbone du méthyle du groupe acétoxyle.

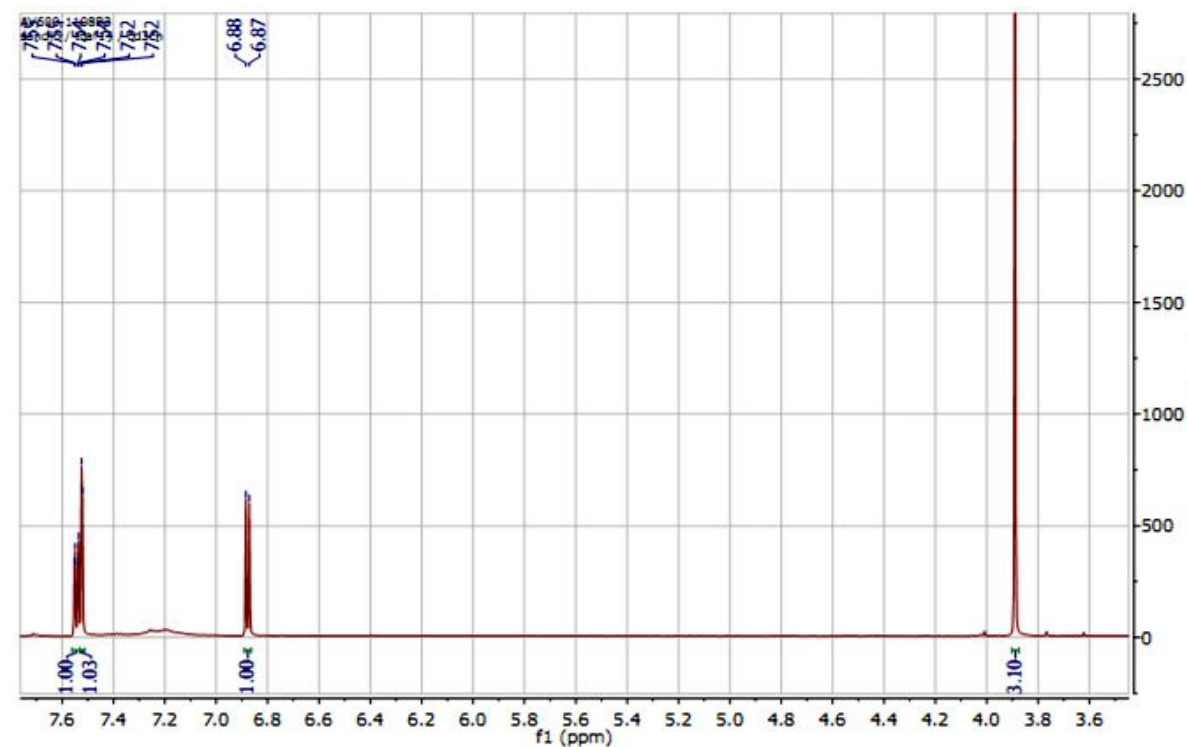


Figure 43: Spectre de RMN ^1H (600 MHz, CD₃CN) de (TCA₃, **131**)

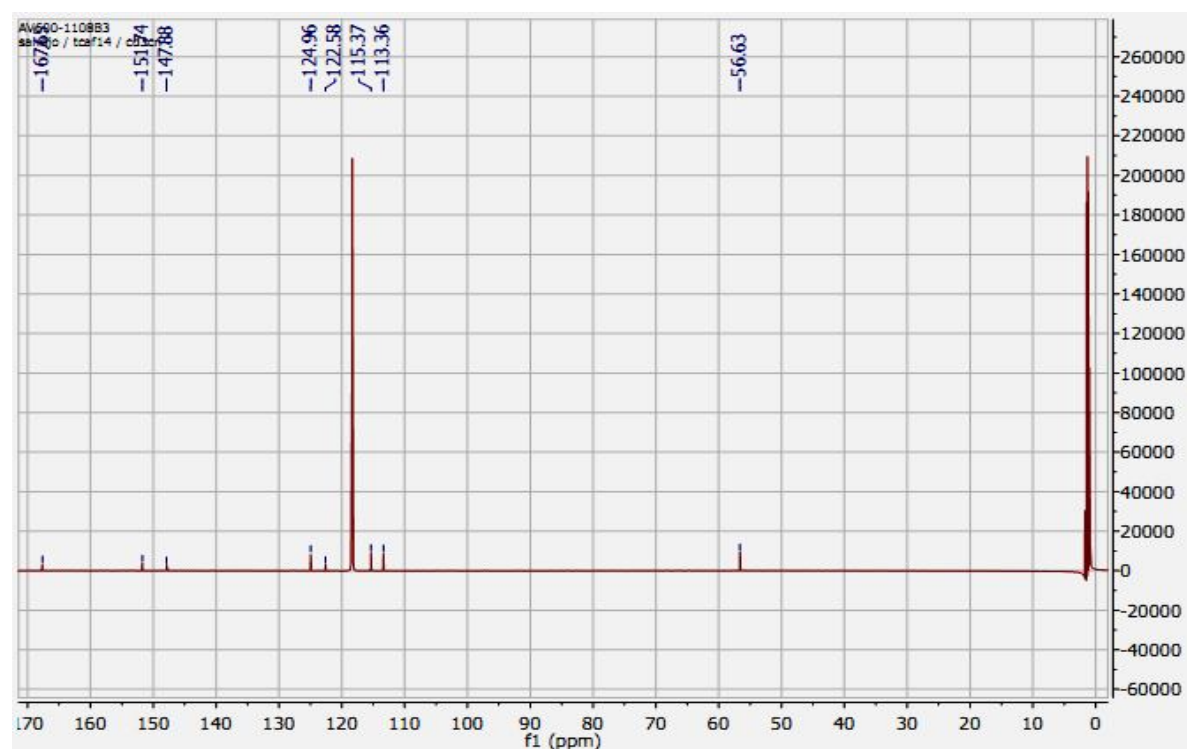
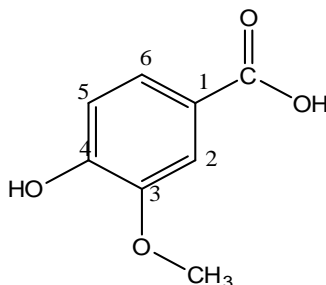


Figure 44: Spectre de RMN ^{13}C (150 MHz, CD₃CN) de (TCA₃, **131**)

Sur la base de ces données spectroscopiques et physiques, nous avons attribué à TCA₃/TCAF₁₀ la structure **131** qui est celle de l'acide vanilique précédemment isolé de *Acanthopanax senticosus* par [Lee et al., 2013] (Tableau XX) et évalué pour son activité antimicrobienne par [Delaquis et al., 2005].



131

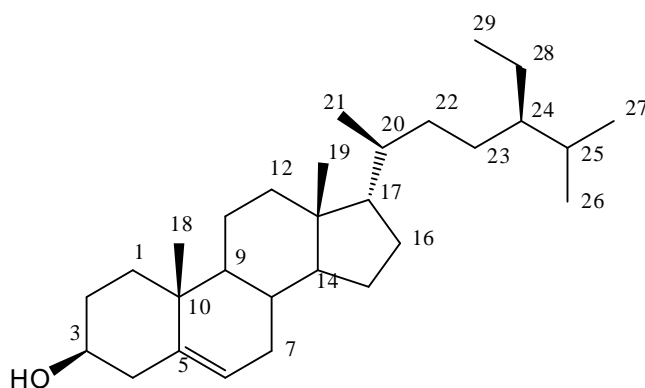
Tableau XX: Comparaison des données spectrales de RMN¹H et RMN¹³C de TCA₄ (300 MHz et 75 MHz, pyridine) (**129**) et TCA₂/TCAF₁₀ (600 MHz et 150 MHz, CD₃CN) (**131**) avec celles de la littérature [Lee et al., 2013].

Position	TCA ₄		TCA ₃		Acide vanilique	
	δ _H (m)	δ _c (m)	δ _H (m)	δ _c (m)	δ _H (m)	δ _c (m)
	(129)		(131)		[Lee et al., 2013].	
1	/	129,5 (s)	/	124,9 (S)	/	123,8 (s)
2	8,05 (d)	113,6 (d)	7,53 (d)	113,4 (d)	7,06 (d)	114,3 (d)
3	/	151,4 (s)	/	151,7 (s)	/	149,2 (s)
4	/	144,1 (s)	/	147,9 (d)	/	153,3 (d)
5	7,34 (d)	123,4 (d)	6,88 (d)	122,6 (d)	6,61 (d)	116,8 (d)
6	8,09 (dd°)	122,8 (d)	7,55 (d)	115,4 (d)	7,35 (dd)	126,0 (d)
CH ₃ -O	3,78 (s)	56,1 (q)	3,85 (s)	56,6 (q)	3,76 (s)	57,0 (q)
CH ₃ -COO-	2,31 (s)	29,49 (q)	/	/	/	/
COO-	/	169,4 (s)	/	/	/	/
COOH	/	167,4 (s)	/	167,6 (s)	/	170,8 (s)

II.2.4-Les stéroïdes

II.2.4.1-Identification de TCA₁/TCAF₇ ou β -sitostérol (**132**)

Le composé TCA₁ précipite sous forme d'aiguilles blanches dans le mélange Hexane-acétate d'éthyle (95:5). Il réagit positivement au test de Libermann-Buchard en donnant une coloration bleu-verte caractéristique des phytostérols [Saha *et al.*, 2011]. Il a été identifié par comparaison sur plaque CCM et confirmé par CPG avec un échantillon disponible dans notre laboratoire au β -sitostérol **132**. En industrie pharmaceutique, le β -sitostérol **132** est utilisé dans la fabrication des médicaments stéroïdiens (agents contraceptifs et anti-inflammatoires). Il a été aussi prouvé que le β -sitostérol **132** possède un effet anti-inflammatoire dans le traitement de l'inflammation des poumons, de l'asthme et des bronchospasmes [Lee *et al.*, 2012].



132

TableauXXI: Comparaison des données spectrales de RMN ^{13}C (75 MHz, Pyridine) de TCA₁, (132) avec celles de la littérature [Furuya et al., 1987].

Position	DEPT	TCA ₁ , δ_{C} (<u>132</u>)	β -sitostérol, δ_{C} , [Furuya et al., 1987].
1	CH ₂	37,6	37,4
2	CH ₂	30,3	31,7
3	CH	72,2	71,9
4	CH ₂	40,2	39,9
5	C	141,1	141,1
6	CH	122,1	122,0
7	CH ₂	32,3	32,0
8	CH	32,0	32,0
9	CH	50,5	50,3
10	C	36,9	36,6
11	CH ₂	21,5	21,2
12	CH ₂	40,8	42,4
13	C	42,7	42,4
14	CH	57,1	56,9
15	CH ₂	24,7	24,4
16	CH ₂	28,6	28,3
17	CH	56,4	56,3
18	CH ₃	12,8	11,9
19	CH ₃	20,1	19,4
20	CH	36,5	36,2
21	CH ₃	18,8	18,8
22	CH ₂	34,3	34,1
23	CH ₂	26,5	26,3
24	CH	46,2	46,0
25	CH	29,5	29,3
26	CH ₃	19,8	19,9
27	CH ₃	19,4	19,1
28	CH ₂	22,1	23,2
29	CH ₃	13,0	12,0

II.2.4.2- Identification de TCA₅/ TCAF₁₁/ ou 3-O-β-D-glucopyranoside de β-sitostérol (133)

Ce composé précipite sous forme de cristaux beiges dans le mélange Hex-AcOEt (1:3) et fond entre 257-258 °C. Il répond positivement au test de Liebermann-Burchard (coloration bleu-verdâtre) caractéristique des phytostérols et au test de Molish caractéristique des sucres [Saha *et al.*, 2011]. Son spectre de masse DIC (Fig. 45) montre l'ion *pseudomoléculaire* [M+NH₄]⁺ à *m/z* 594 qui combiné à l'analyse des spectres de RMN ¹H et ¹³C permet de déduire la formule brute C₃₅H₆₀O₆ renfermant 6 insaturations.

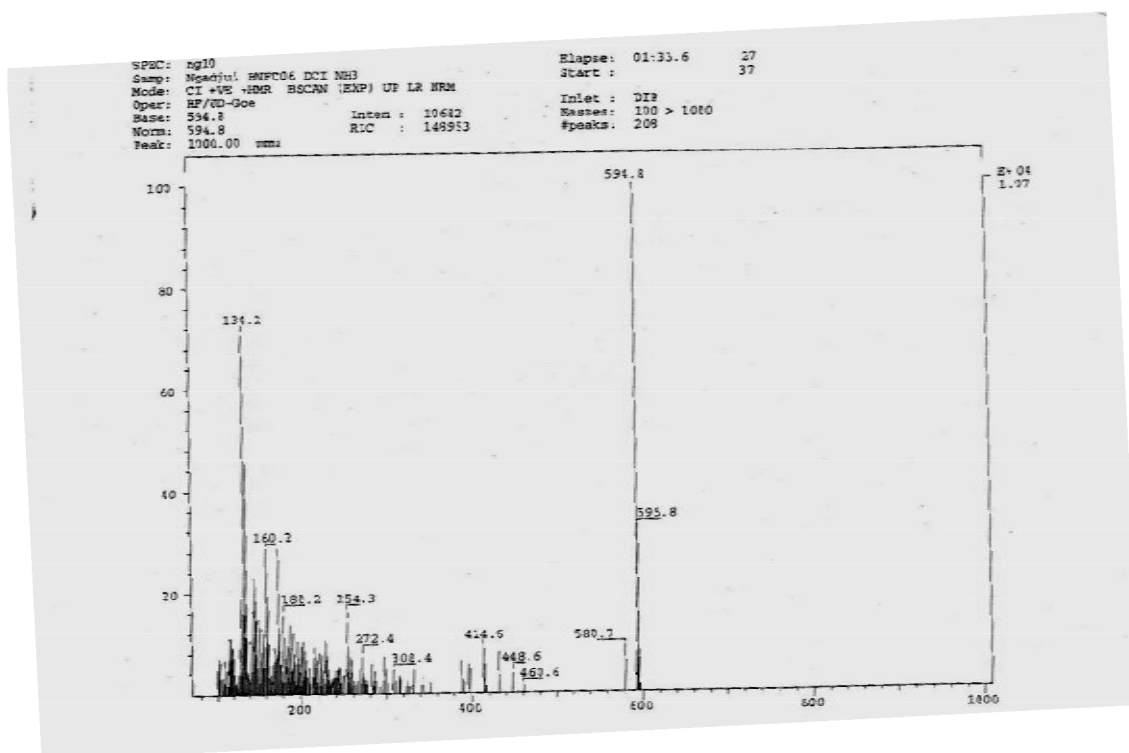


Figure 45: Spectre de masse DIC du 3-O-β-D-glucopyranoside de β-sitostérol (TCA₅ ; 133)

Le spectre de RMN ¹H (300 MHz, pyridine, Fig. 46) de TCA₅ met en évidence deux groupes de signaux:

- L'un principalement entre δ_H 0,5 et 5,5 correspondant aux protons de l'aglycone qui a été identifié au β-sitostérol substitué en C-3;
- l'autre entre δ_H 3,90 et 5,05 attribuable aux protons de la partie osidique qui a été identifiée au 3-O-β-D-glucopyranoside.

Parmi les signaux appartenant à la partie osidique, on distingue cinq multiplets correspondant aux méthylènes et aux méthynes et un doublet à δ_H 5,05 de constante de couplage de 8,8 Hz attribuable au proton anomérique et suggérant une jonction de stéréochimie β entre l'unité osidique et l'aglycone [Agrawal, 1992].

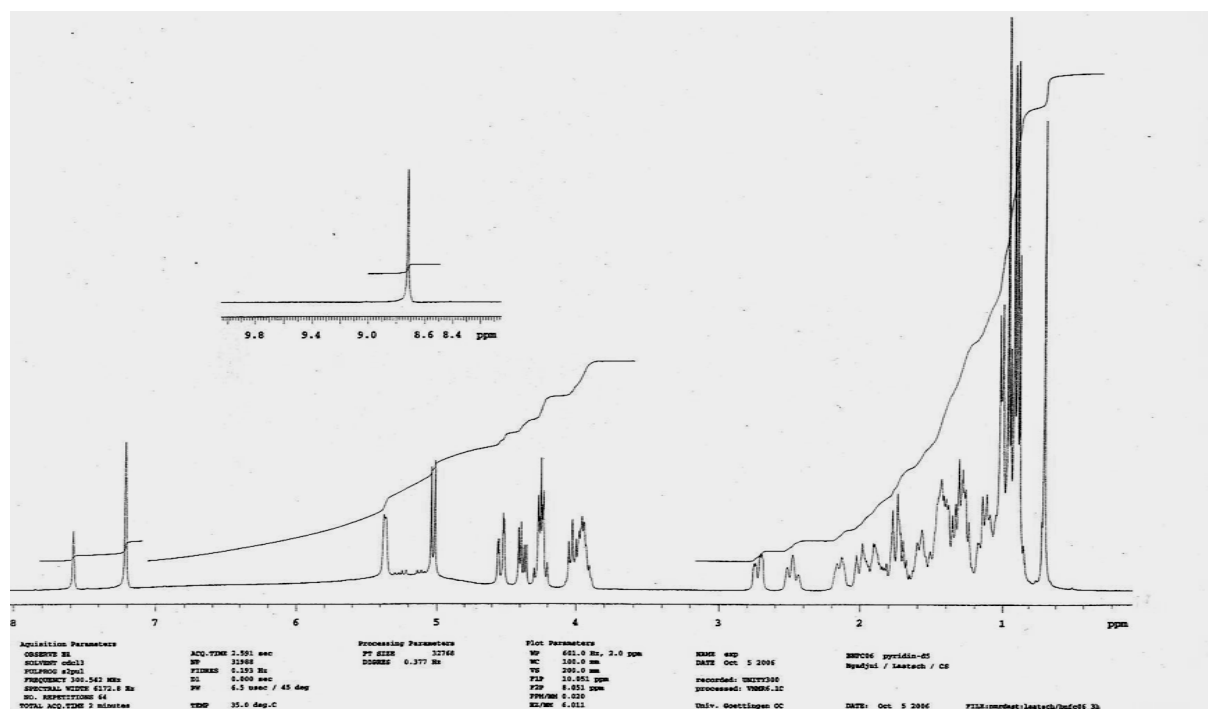


Figure 46 : Spectre de RMN 1H (300 MHz, pyridine) de (TCA₅, 133)

Son spectre de RMN ^{13}C (75 MHz, pyridine, Fig.47) couplé au DEPT montre 35 atomes de carbones dont 6 méthyles, 12 méthylènes, 14 méthines, et 3 carbones quaternaires. Parmi eux, on note :

- Les signaux de deux carbones éthyléniques à δ_C 141,0 et 121,9 caractéristiques des carbones en position 5 et 6 respectivement des phytostérols et le signal d'un oxyméthine à δ_C 78,6 attribuable au carbone C-3 des phytostérols [Mahato et Kundu, 1994];
- les signaux de l'unité osidique dont celui du carbone anomérique à δ_C 102,5; d'un oxyméthylène à δ_C 62,5 (C-6') et de quatre oxyméthines à δ_C 70,9 (C-4'); δ_C 75,5 (C-2'); δ_C 78,2 (C-5'); δ_C 78,4 (C-3').

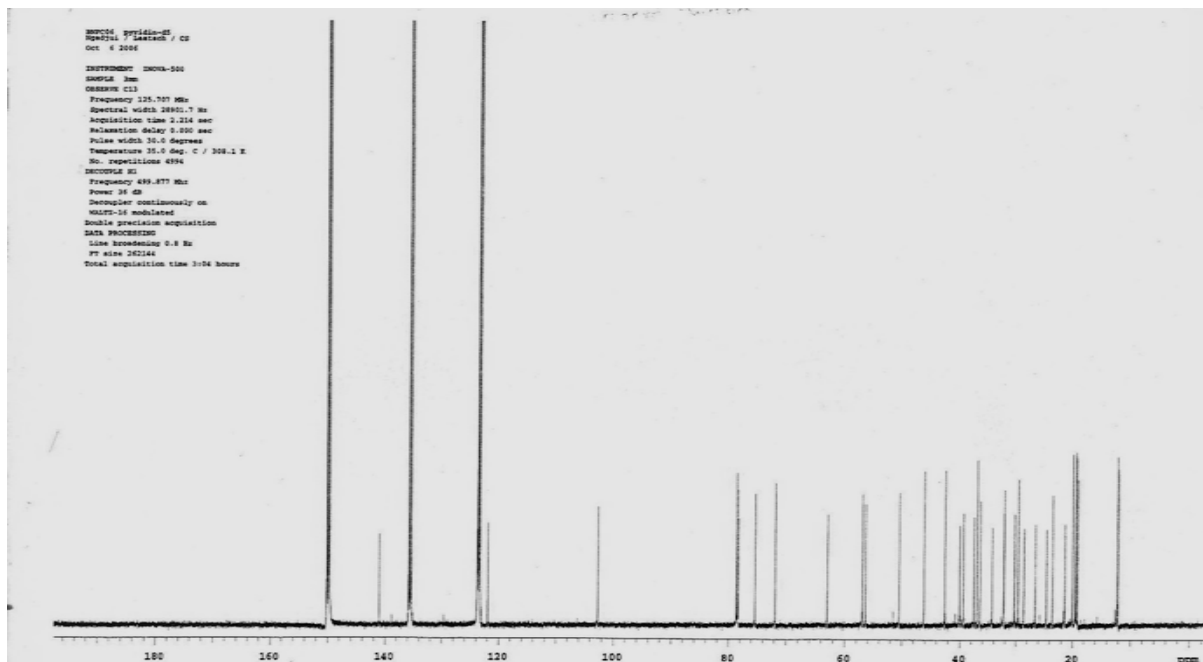
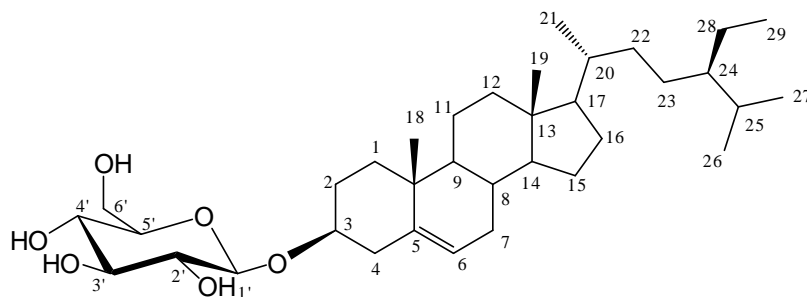


Figure 47: Spectre de RMN ^{13}C (75 MHz, pyridine) du 3-O- β -D-glucopyranoside de β -sitostérol (TCA5 ; 133)

La comparaison de ces données spectroscopiques avec celles rencontrées dans la littérature nous a permis d'identifier TCA₅ au 3-O- β -D-glucopyranoside de β -sitostérol 128 déjà décrit par [De Castro Ferreira Gomes *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2006] (Tableau XXII) et qui inhibe l'activité de l'enzyme polymérase de l'ADN des mammifères [Mizushima *et al.*, 2006].



133

Tableau XXII : Comparaison des données de RMN ¹³C (75 MHz, pyridine) de TCA₅ (133) avec celles de la littérature [De Castro Ferreira Gomes et al., 1998].

Position	DEPT	TCA ₅ (δ _C) (128)	3-O-β-D-glucopyranoside de β-sitostérol (δ _C) [De Castro Ferreira Gomes et al., 1998].
1	CH ₂	37,3	37,4
2	CH ₂	30,5	30,2
3	CH	78,6	78,6
4	CH ₂	39,7	39,3
5	CH	141,0	140,9
6	CH ₂	121,9	121,9
7	CH	32,4	32,1
8	C	22,9	23,0
9	CH	50,7	50,3
10	C	36,4	36,9
11	CH ₂	20,4	21,2
12	CH ₂	39,7	39,9
13	C	42,8	42,4
14	CH	57,0	56,8
15	CH ₂	23,7	24,5
16	CH ₂	29,8	28,5
17	CH	56,4	56,2
18	CH ₃	12,4	12,1
19	CH ₃	19,7	19,9
20	CH	36,3	36,4
21	CH ₃	19,4	19,4
22	CH	34,0	34,2
23	CH	25,4	26,3
24	CH	46,4	46,0
25	CH	29,3	29,4
26	CH ₃	19,7	19,0
27	CH ₃	20,4	19,2
28	CH ₂	23,5	23,3
29	CH ₃	12,1	11,9
Glucose			
1'	CH	102,9	102,5
2'	CH	75,5	75,3
3'	CH	78,4	78,5
4'	CH	70,9	71,6
5'	CH	78,2	78,0
6'	CH ₂	62,5	62,8

II.2.5-Identification de TCA₁₂ ou bis (2-éthyl hexyle) phthalate (134).

Le composé TCA₁₂ a été obtenu sous forme de poudre blanche amorphe dans la colonne séphadex éluée au MeOH. Il est soluble dans l'acétone, le chloroforme et le méthanol. Il présente en spectrométrie de masse en impact électronique l'ion moléculaire à m/z 390 dont l'analyse à haute résolution permet de lui attribuer la formule brute C₂₄H₃₈O₄ renfermant six insaturations.

Sur le spectre de RMN¹H de TCA₁₂ (300 MHz, pyridine, **Fig. 48**), on note la présence de:

- Deux doublets dédoublés de deux protons chacun à δ_H 7,90 et 7,60 caractéristiques de 2 protons aromatiques vicinaux avec couplage ortho ;
- un signal à δ_H 4,20 attribuable au proton d'un oxyméthylène ;
- un triplet de 6 protons à δ_H 0,91 attribuables aux protons de 2 groupes méthyles ;
- une longue chaîne de 4 CH₂ à δ_H 1,41

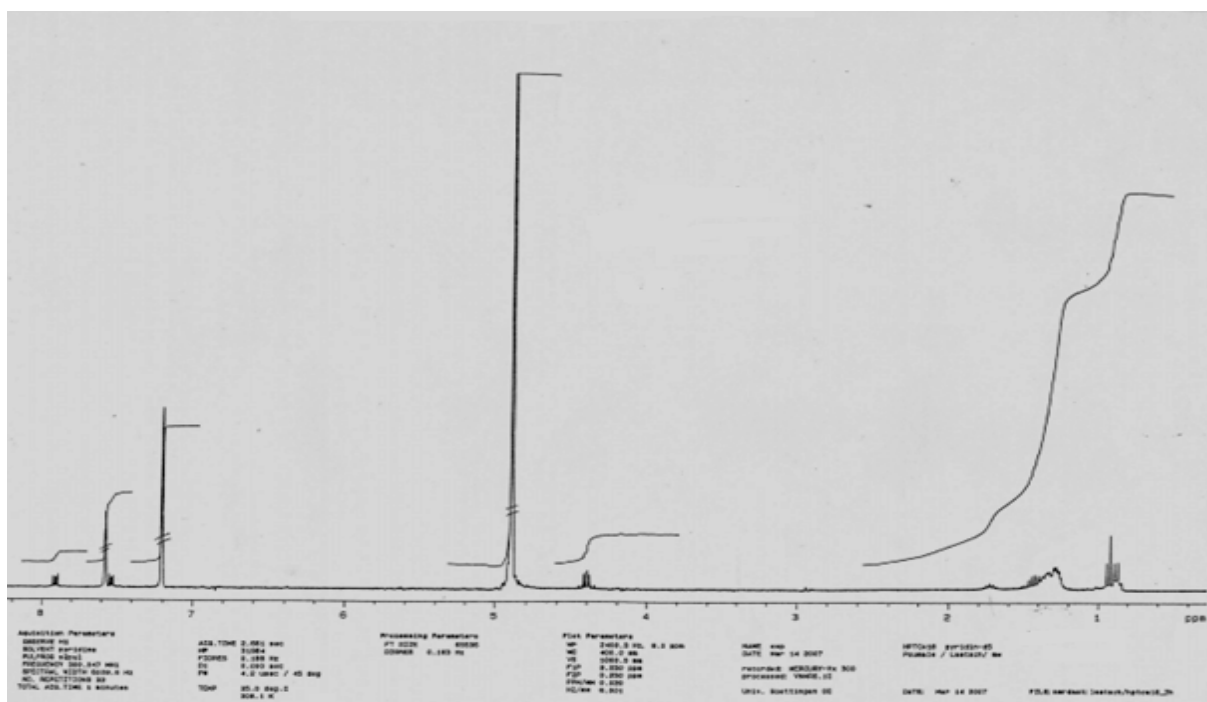


Figure 48 : Spectre de RMN¹H (300 MHz, pyridine) de (TCA₁₂, 134)

Le spectre de RMN¹³C de TCA₁₂ (75 MHz, CDCl₃, **Fig. 49**) Présente :

- Un signal à δ_c 168,0 attribuable au carbonyl des esters ;
- trois signaux à δ_c 132,1; 131,5; et 129,4 caractéristiques des carbones aromatiques ;
- deux signaux à δ_c 10,9 et 14,1 attribuables aux carbones des groupes méthyles ;
- un signal à δ_c 38,3 attribuable au carbone d'un méthyne ;

- 5 signaux à δ_c 23,0 ; 23,7 ; 28,9 ; 30,4 et 68,1 correspondant aux carbones des groupes méthylènes.

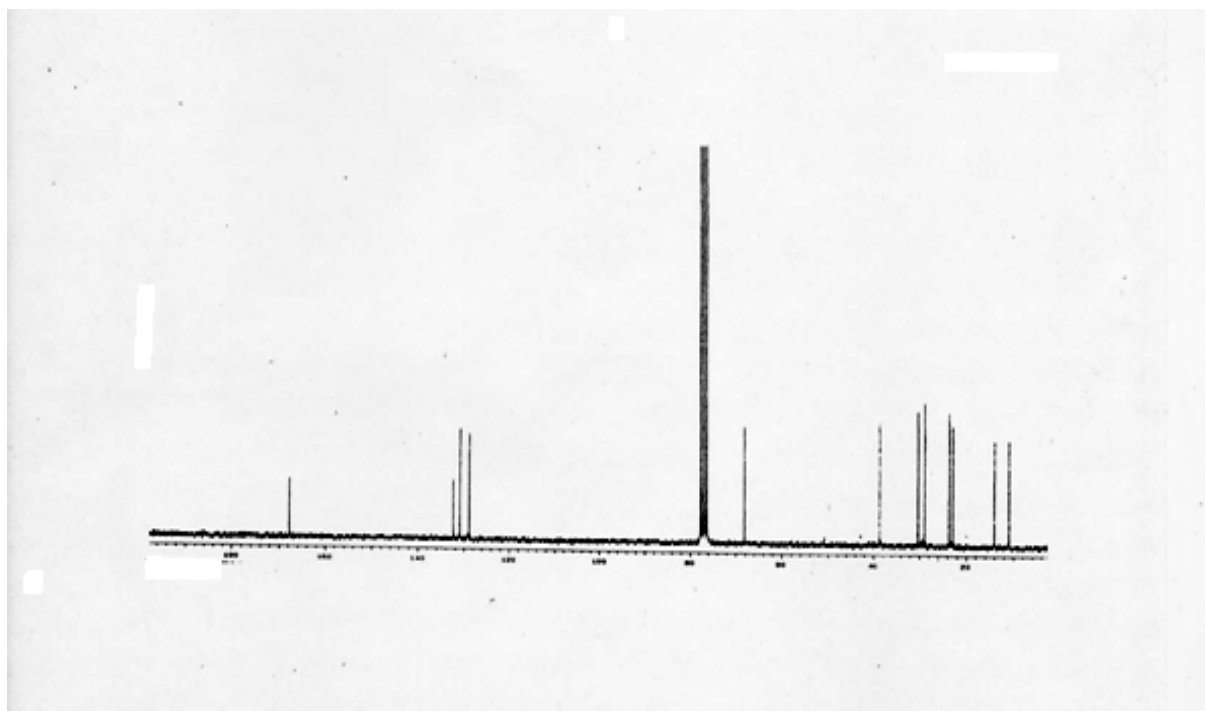
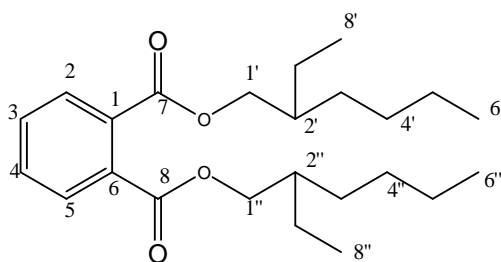


Figure 49 : Spectre de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) de (TCA₁₂, **134**)

L'ensemble de toutes ces données spectroscopiques comparées à celles décrites dans la littérature [Laatsch, 2006] nous a permis d'attribuer à TCA₁₂ la structure **134** qui est celle du bis (2-éthyl hexyle) phthalate isolé pour la première fois par Amade *et al.*, 1994 et qui serait probablement un artefact provenant du solvant.



134

II.2.6-Les flavonoides

II.2.6.1-Identification de TCAF₅ ou alpinumisoflavone (135).

TCAF₅ est obtenu sous forme de cristaux jaunes dans la colonne de séphadex éluée au CH₂Cl₂-MeOH (97 :3). Il est soluble dans l'acétone et fond entre 210-212 °C. Il répond positivement au test des phénols (coloration violette avec le chlorure ferrique) et au test de Shinoda (coloration rougeâtre avec le mélange Mg/HCl), ce qui nous suggère que TCAF₅ serait un flavonoïde.

Son spectre de masse en IE (**Fig.50**) montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 336 dont l'analyse combinée avec les spectres de RMN permet de lui attribuer la formule brute C₂₀H₁₆O₅ renfermant 13 insaturations.

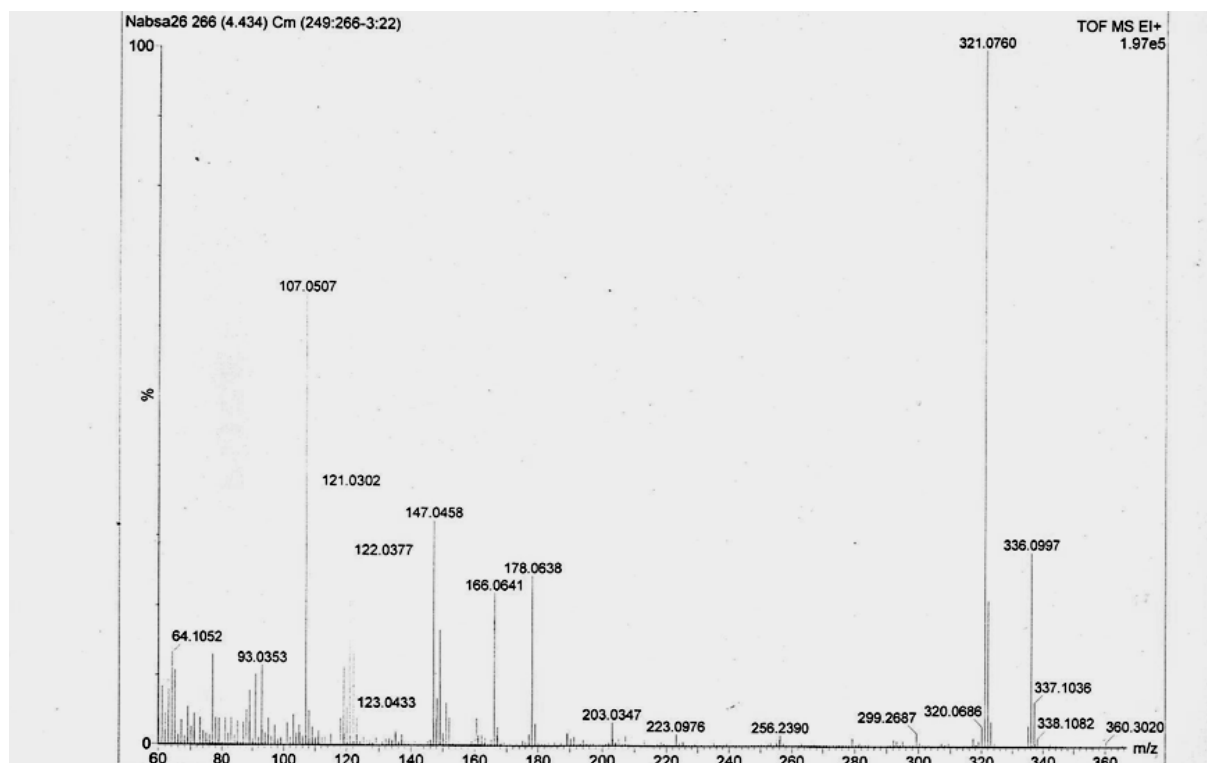


Figure 50: Spectre de masse en IE de (TCAF₅ ; 135)

Le spectre de RMN ¹H (300 MHz, CD₃COCD₃, **Fig.51**) de TCAF₅ présente entre autres:

- Un système AA'BB' à δ_H 6,92 (2H; d; J = 8,7 Hz) et 7,47 (2H; d; J = 8,7 Hz) caractéristique d'un noyau aromatique paradisubstitué [Marbry et al., 1970];
- un singulet d'un proton à δ_H 8,20 caractérisant le proton H-2 d'une isoflavone [Darbour et al., 2007];

- un singulet à δ_H 13,45 indiquant la présence d'un hydroxyle chélaté dans la molécule [Darbour et al., 2007];
- un autre singulet à δ_H 6,38 attribué au proton H-8 ou H-6;
- un ensemble de signaux caractéristiques des 2,2-diméthylpyrano dont ceux d'un système AB d'un proton chacun à δ_H 5,79 (1H; d; J = 10,0 Hz) et 6,70 (1H; d; J = 10,0 Hz) d'une part et d'autre part celui d'un singulet intense intégrant 6 protons à δ_H 1,48 attribuable à un groupement gem-diméthyle [Tsukayama et al., 1992].

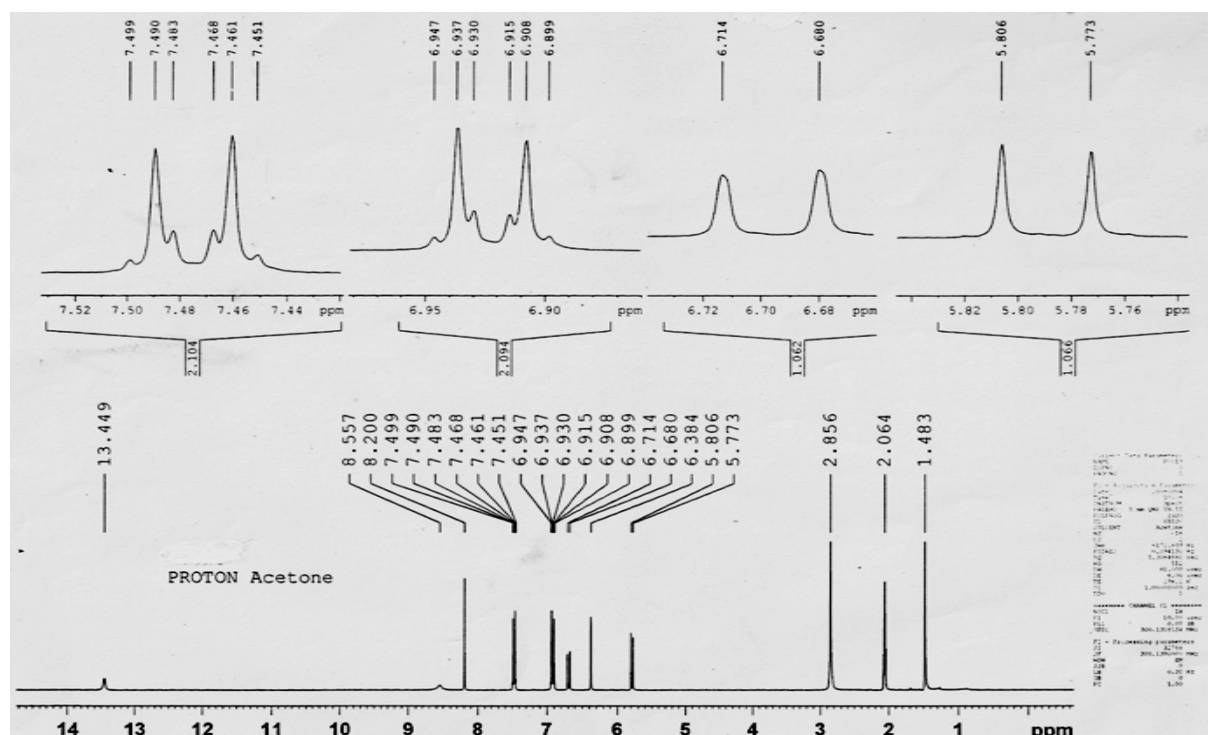


Figure 51: Spectre de RMN 1H (300 MHz, CD_3COCD_3) de (TACF₅; 135).

Les spectres de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3COCD_3 , **Fig.52**) et DEPT 135 montrent les signaux de 20 atomes de carbone parmi lesquels trois signaux à δ_C 153,5; 122,0 et 181,0 caractéristiques des carbones centraux C-2, C-3 et C-4 des isoflavones [Darbour et al., 2007]. Les autres signaux sont composés de: huit carbones quaternaires, deux méthyles à δ_C 27,5 et sept méthines.

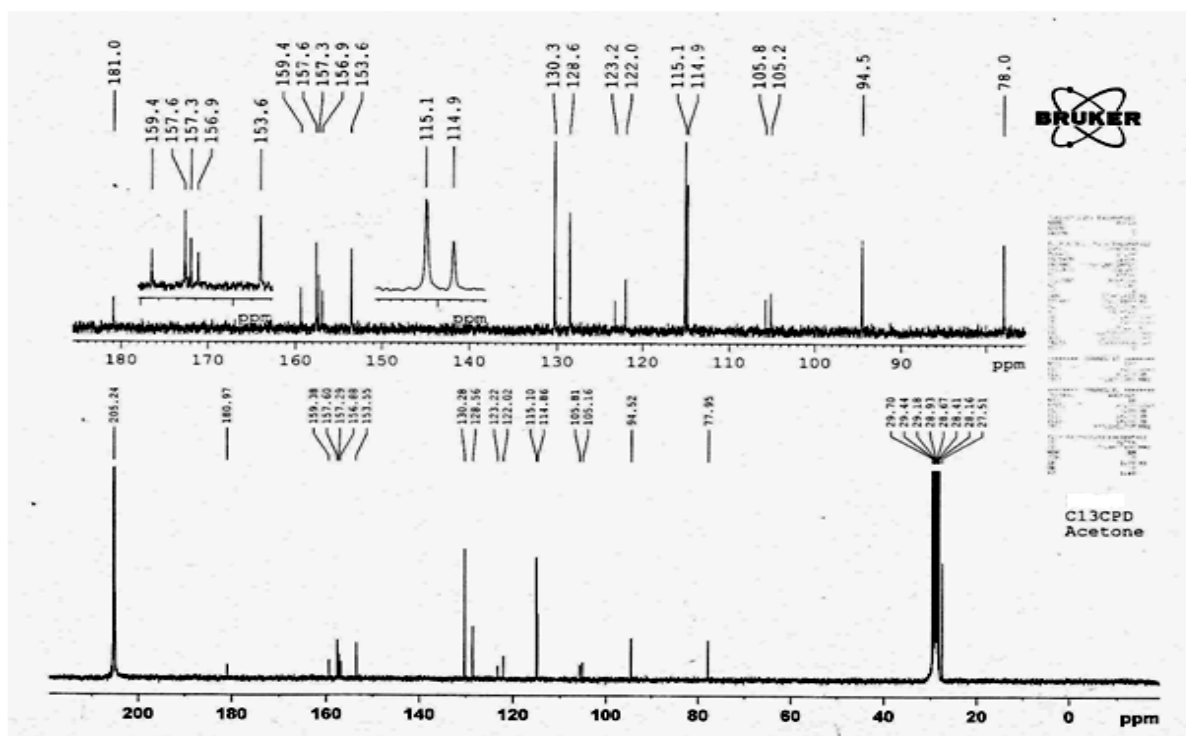
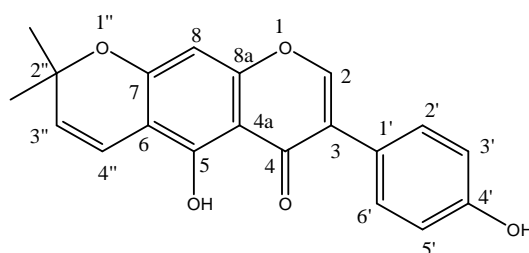


Figure 52: Spectre de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3COCD_3) de (TCAF $_5$; **135**)

Le cycle B étant paradisubstitué, le groupement 2,2-diméthylpyranne ne peut être fixé que sur le cycle A en position 6;7 (arrangement linéaire) ou 7;8 (arrangement angulaire) [Agrawal, 1989]. Les valeurs des déplacements chimiques observés à δ_{C} 105,2 (s) et 94,5 (d) ne peuvent être assignées respectivement qu'aux carbones C-6 et C-8 d'où l'arrangement du groupement 2,2-diméthylpyranne dans cette molécule est linéaire [Agrawal, 1989].

Toutes ces données spectroscopiques comparées (**Tableau XXIII**) avec celles rencontrées dans la littérature nous ont permis d'attribuer à TCAF $_5$ la structure **135** qui est celle de l'alpinumisoflavone ou la 5,4'-dihydroxy-2'',2''-diméthylpyrano[5'',6'': 6,7] isoflavone déjà isolé par Tsukayama *et al.*, 1992] et qui possède des activités antimicrobiennes [Kuete *et al.*, 2008, Kuete *et al.*, 2009].



135

Tableau XXIII: Données spectrales de RMN ¹H (300 MHz, CD₃COCD₃) et de RMN ¹³C (75 MHz, CD₃COCD₃) de TCAF₅ (135) et de l'alpinumisoflavone de [Tsukayama *et al.*, 1992].

Position	alpinumisoflavone δ _H (m; J en Hz) de [Tsukayama <i>et al.</i> , 1992]	TCAF ₅ , δ _H (m; J en Hz) (135)	δ _C (m) alpinumisoflavone de [Tsukayama <i>et</i> <i>al.</i> , 1992]	TCAF ₅ , δ _C (m) (135)
2	8,18 (s)	8,20 (s)	153,5 (d)	153,6 (d)
3	/	/	122,0 (s)	122,0 (s)
4	/	/	181,9 (s)	181,0 (s)
5	/	/	157,6 (s)	157,6 (s)
6	/	/	105,1 (s)	105,2 (s)
7	/	/	159,4 (s)	159,4 (s)
8	6,37 (s)	6,38 (s)	94,5 (d)	94,5 (d)
8a	/	/	157,3 (d)	157,3 (d)
4a	/	/	105,8 (s)	105,8 (s)
1'	/	/	123,2 (s)	123,2 (s)
2'	7,46 (d; 8,7)	7,47 (d; 8,7)	130,2 (d)	130,3 (d)
3'	6,91 (d; 8,7)	6,92 (d; 8,7)	115,1 (d)	115,1 (d)
4'	/	/	156,8 (s)	156,9 (s)
5'	6,91 (d; 8,7)	6,92 (d; 8,7)	115,1 (d)	115,1 (d)
6'	7,46 (d; 8,7)	7,47 (d; 8,7)	130,2 (d)	130,3 (d)
2''	/	/	78,0 (s)	78,0 (s)
3''	5,76 (d; 10,2)	5,79 (d; 10,0)	128,5 (d)	128,6 (d)
4''	6,70 (d; 10,2)	6,70 (d; 10,0)	114,5 (d)	114,9 (d)
5''	1,47 (s)	1,48 (s)	27,5 (q)	27,5 (q)
6''	1,47 (s)	1,48 (s)	27,5 (q)	27,5 (q)
5-OH	13,41 (s)	13,45 (s)	/	/

II.2.6.2-Identification de 4'-O-méthyl alpinumisoflavone (**136**)

TCAF₆ est obtenu sous forme de cristaux jaunes dans la colonne de séphadex éluée au CH₂Cl₂-MeOH (97 :3). Il est soluble dans l'acétone et répond positivement au test des phénols (coloration violette avec le chlorure ferrique) et au test de Shinoda (coloration rougeâtre avec le mélange Mg/HCl) ce qui nous suggère que TCAF₆ est un flavonoïde.

Son spectre de masse en IE montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 350 dont l'analyse combinée avec les spectres de RMN permet de lui attribuer la formule brute C₂₁H₁₈O₅ renfermant 13 insaturations.

Les spectres de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃, **Fig. 53**) et RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de TCAF₆ sont similaires à ceux de TCAF₅ Les seules différences observées sont :

- Sur le spectre de RMN¹H de TCAF₆ on note en plus des autres signaux la présence d'un singulet de trois protons à δ_H 3, 82 caractéristiques des protons du méthyle d'un groupement méthoxyle ;
- Sur son spectre de RMN ¹³C, la présence du groupement méthoxyle est confirmée par la présence d'un signal à δ 56,2

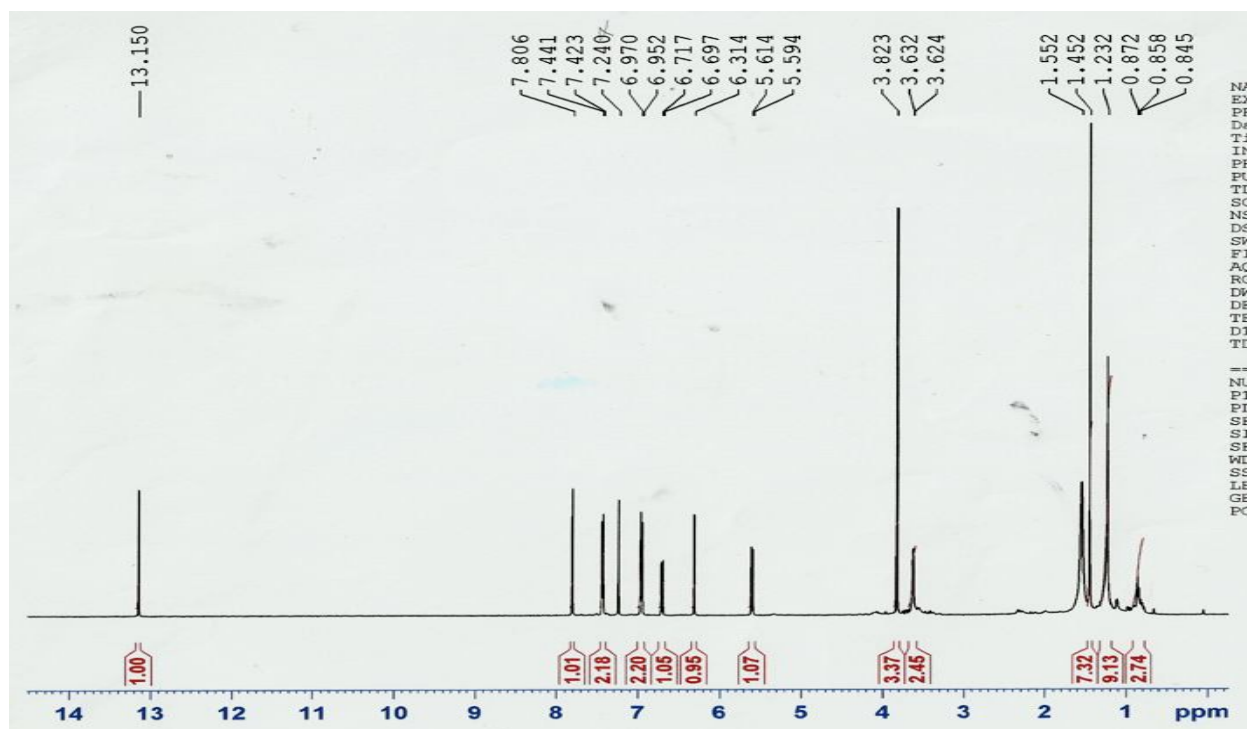
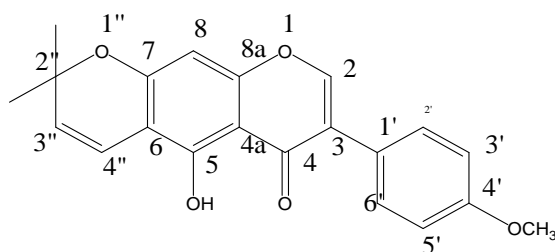


Figure 53 Spectre de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) de (TCAF₆ ; **136**).

Les corrélations observées sur le spectre HMBC de TCAF₆ entre le proton du méthoxyl à δ_H 3, 82 et le carbone C-4' nous permet de fixer le groupement méthoxyl en position 4'.

Toutes ces données spectroscopiques comparées avec celles rencontrées dans la littérature (**Tableau XXIV**) nous ont permis d'attribuer à TCAF₆ la structure **136** qui est celle de 4'-O-méthyl épinumisoflavone déjà décrite par [Liu *et al.*, 2009] et qui représente la première petite molécule qui inhibe l'activation de HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) par la suppression simultanée de la respiration mitochondriale et le désordre dans la translation des protéines *in vitro* [Liu *et al.*, 2009].



136

Tableau XXIV: Données spectrales de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de TCAF₆ (131) en comparaison avec celles de TCAF₅ (130)

Position	DEPT	TCAF ₆ , δ_{C} , (<u>136</u>)	TCAF ₅ , δ_{C} , (<u>135</u>)
2	CH	153,7	153,6
3	C	121,9	122,0
4	C	181,4	181,0
5	C	157,6	157,6
6	C	105,1	105,2
7	C	159,4	159,4
8	CH	94,5	94,5
8a	CH	157,3	157,3
4a	C	105,8	105,8
1'	C	123,2	123,2
2'	CH	130,2	130,3
3'	CH	115,1	115,1
4'	C	156,3	156,9
5'	CH	114,2	115,1
6'	CH	130,2	130,3
2''	C	78,0	78,0
3''	CH	128,5	128,6
4''	CH	114,5	114,9
5''	CH ₃	27,5	27,5
6''	CH ₃	27,5	27,5
O-CH ₃	CH ₃	56,2	/

II.2.7-Identification de l'imidazole (137).

Le composé TCAF₁₂ a été obtenu sous forme d'aiguilles brillantes dans le mélange CH₂Cl₂-MeOH (97:3). Il est soluble dans l'acétone et fond à 193K. Son spectre de masse en ESI montre le pic de l'ion pseudomoléculaire à m/z 190,047 [M+Na]⁺ dont l'analyse à haute résolution permet de lui attribuer la formule brute C₈H₉NO₃ renfermant cinq degrés d'insaturations.

L'analyse du spectre de RMN¹H (400 MHz, acétone-d₆, **Fig. 54**) de TCAF₁₂ nous permet de mettre en évidence la présence de:

- un multiplet entre δ_H 4,12 et 4,18 correspondant à la fois au signal d'un proton au pied de l'hydroxyle à δ_H 4,16 et aux signaux des protons de deux hydroxyles. Cette information est confirmée sur le spectre de HSQC où on observe qu'un seul de ces hydrogènes celui à δ_H 4,16 (1H, m) est rattaché à un carbone oxygéné à δ_C 74,5 ;
- trois protons oléfiniques à δ_H 6,55 (1H, dd, J=2,5 ; 10,1 Hz), 6,04 (1H, dd, J=1,8 ; 10,1 Hz) et 5,63 (1H, br s), indiquant la présence de deux doubles liaisons dans la molécule. Ce qui est confirmé par la présence sur le spectre de RMN¹³C des carbones à δ_C 124,0 ; 139,6 ; 159,7 ; et 93,7 ;
- un doublet à δ_H 4,60 (1H, d, J=7,9 Hz) attribuable au proton d'un hydroxyle. Cette information est confirmée par le spectre HSQC qui montre que le proton à δ_H 4,60 n'est lié à aucun atome de carbone ;
- deux multiplets d'un proton chacun à δ_H 4,42 et 4,49 correspondant aux protons au pied de l'hydroxyle.

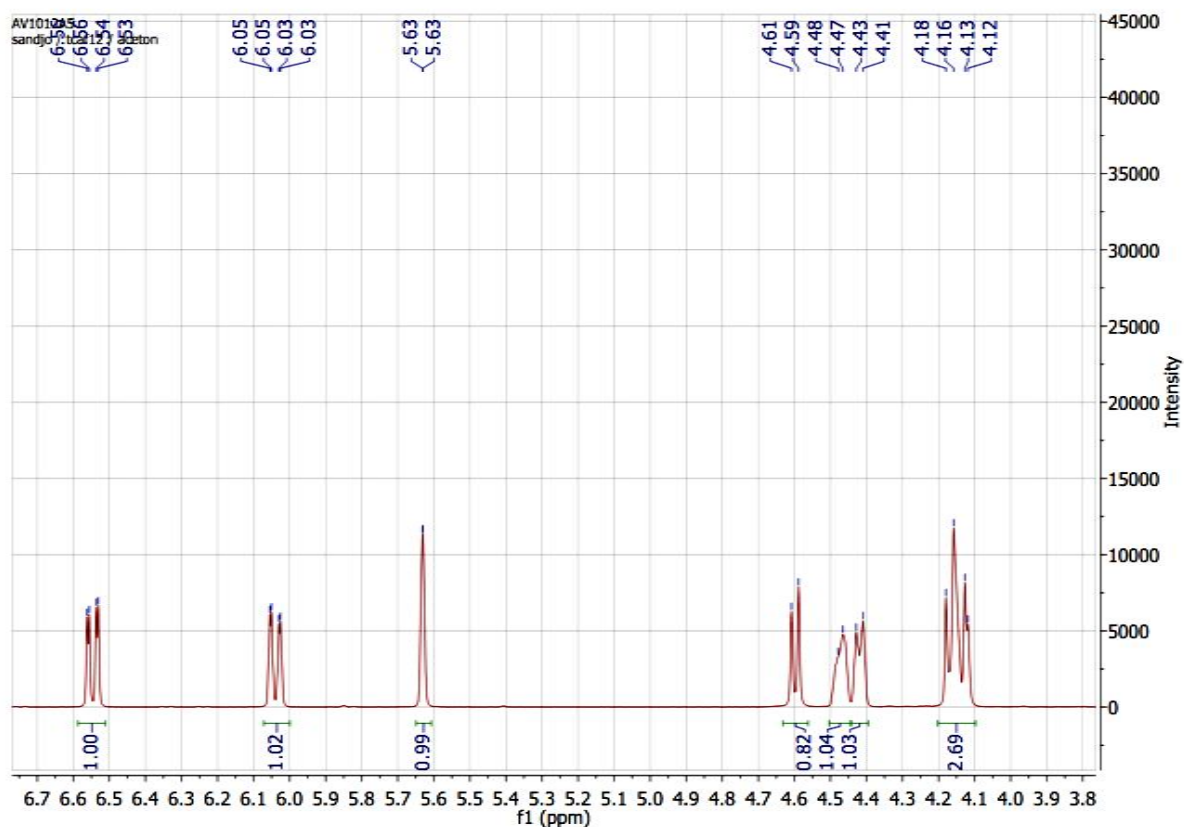


Figure 54: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, acetone- d_6) de (TCAF $_{12}$, 137).

Le spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, acétone- d_6 , **Fig. 55**) de TCAF $_{12}$ quant à lui nous révèle la présence de:

- Un ensemble de trois signaux à δc 69,6 ; 71,9 ; et 74,5 attribuable aux carbones de trois oxyméthines ;
- un signal à δc 93,7 attribuable au carbone lié au groupe nitrile [Hua et al., 2004] ;
- un signal à δc 117,6 caractéristique du carbone du groupe nitrile [Hua et al., 2004] .

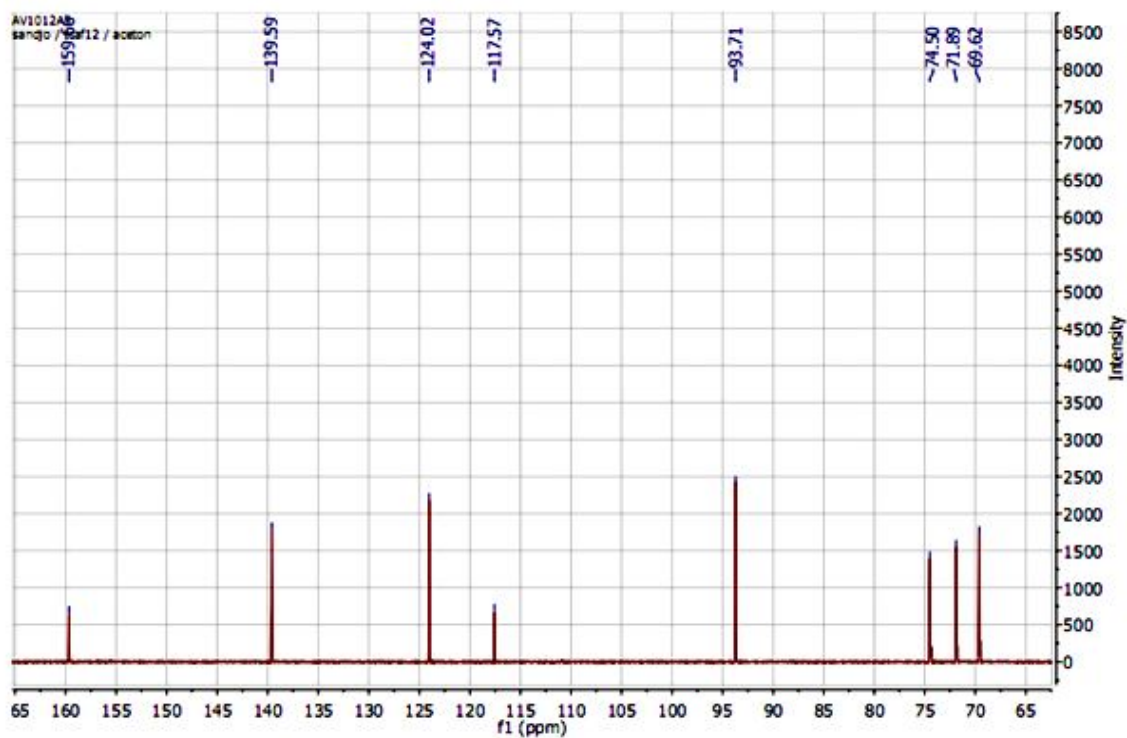


Figure 55: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, acetone- d_6) de (TCAF $_{12}$, 137).

Sur le spectre HSQC (**Fig 56**) de TCAF $_{12}$ on note les corrélations directes entre les protons à δ_{H} 6,55 ; 6,04 ; 5,63 et les carbones à δ_{C} 124,0 ; 139,6 ; 93,7 respectivement. On observe également les corrélations directes entre les protons au pied de l'hydroxyle à δ_{H} 4,16 (1H, m) ; 4,42 (1H, m) et 4,49 (1H, m) et les carbones lié chacun à un groupe hydroxyle à δ_{C} 74,5 ; 71,9 et 69,6 respectivement. Suggérant la présence d'un fragment $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})-$ dans la structure de TCAF $_{12}$ [Hua *et al.*, 2004].

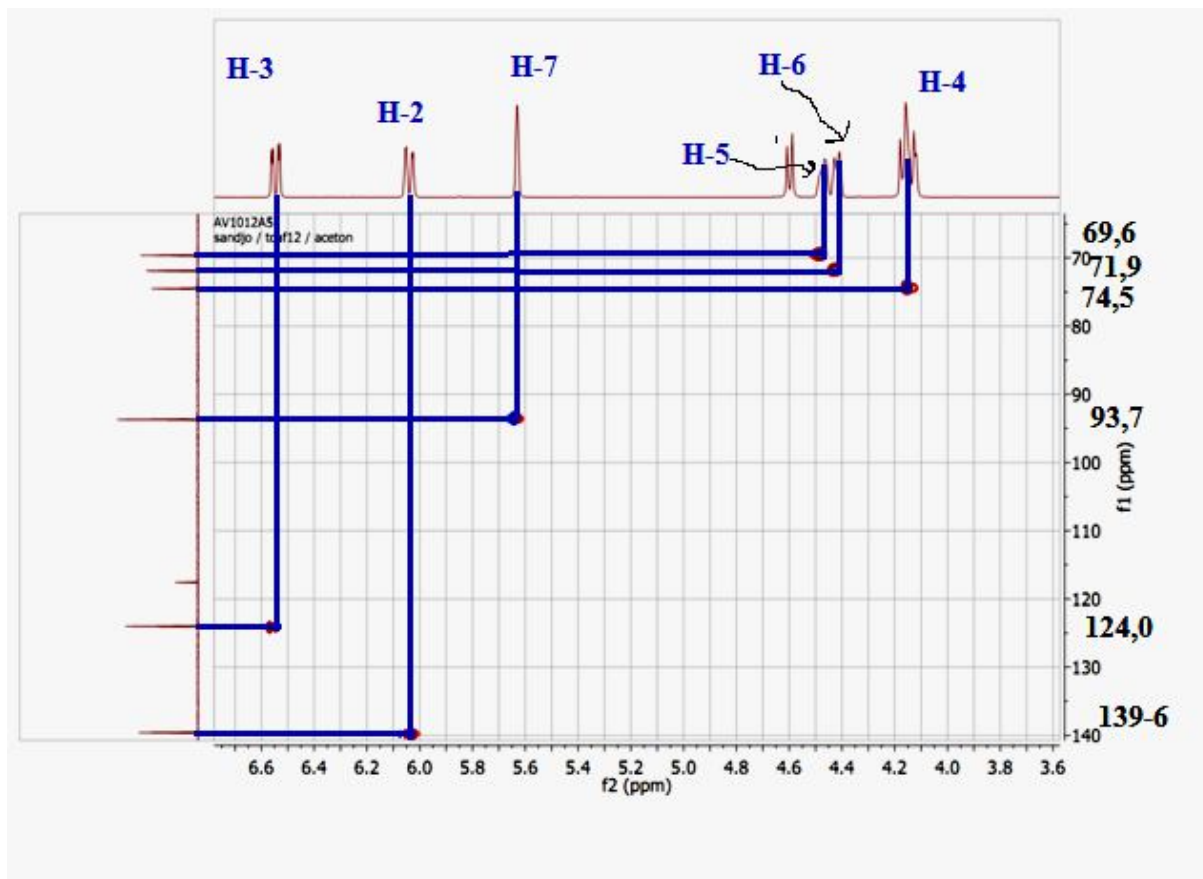


Figure 56: Spectre HSQC de (TCAF₁₂, 137).

Des observations importantes sont faites sur le spectre COSY (**Fig.57**) de TCAF₁₂. En effet on note les tâches de corrélations entre les protons à δ_H 6,55 et 6,04 d'une part et entre celui à δ_H 5,63 ceux à δ_H 6,04 et 4,42.d'autre part. Les mêmes observations sont faites entre les protons à δ_H 4,60 et 4,42 et entre ceux à δ_H 4,49 et 4,16.

Les observations faites sur le spectre HMBC de TCAF₁₂ (**Fig. 58**) montrent une corrélation entre le proton à δ_H 6,55 (H-3) et les carbones à δ_C 159, 7 (C-1) ; 93,7 (C-7) ; 71,9 (C-6) et 69,6 (C-5). Le proton à δ_H 6,04 (H-2) et les carbones à δ_C 159, 7 (C-1) et 74,5 (C-4) ; entre le proton à δ_H 5,63 (H-7) et les carbones à δ_C 159, 7 (C-1) ; 117,6 (C-8) ; 71,9 (C-6) et 124,0 (C-3). On observe également sur ce même spectre les corrélations entre le proton à δ_H 4,16 (H-4) et les carbones à δ_C 139, 6 (C-2) ; 93,7 (C-7) ; 71,9 (C-6) et 69,6 (C-5).

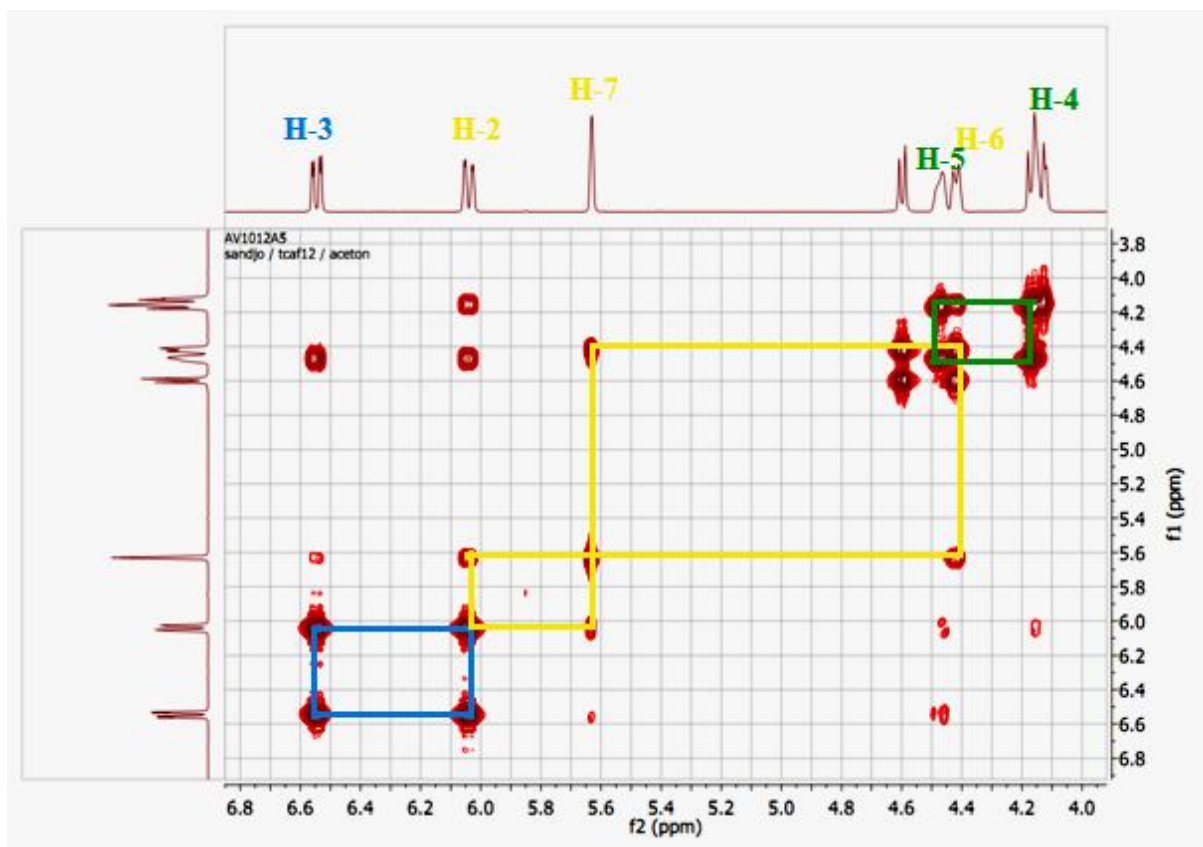


Figure 57: Spectre COSY de (TCAF₁₂, 137).

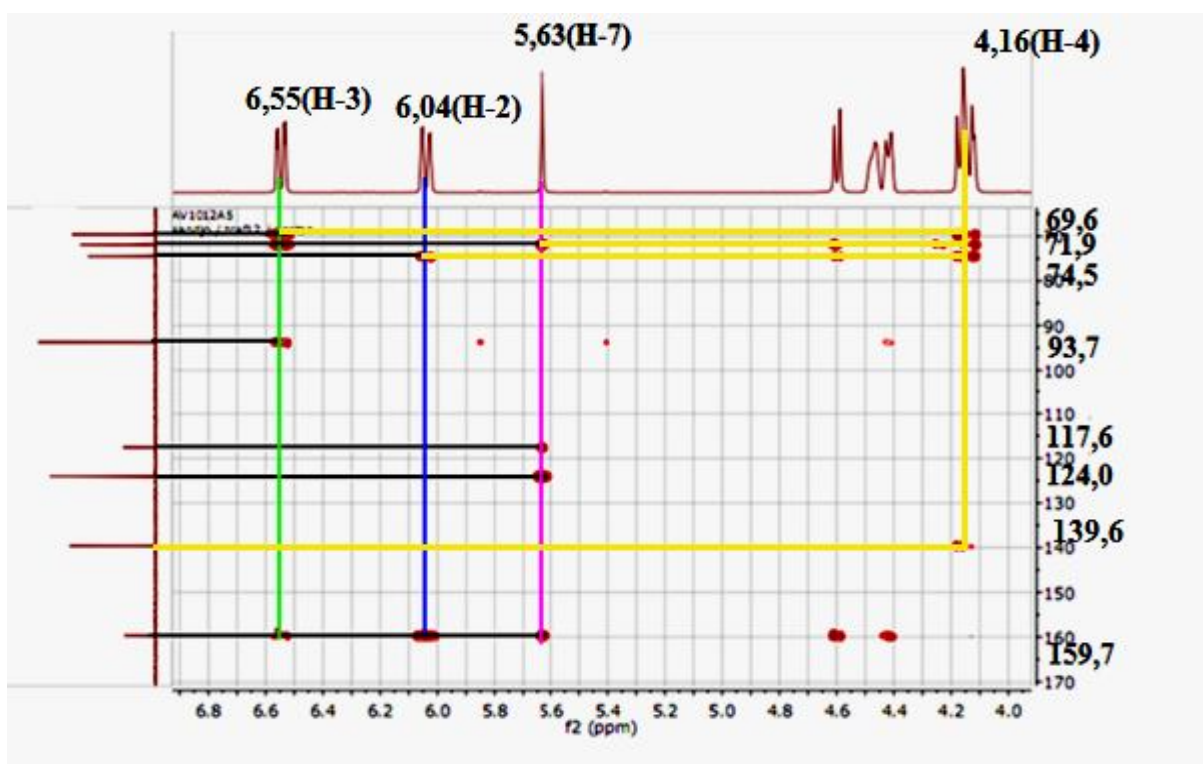
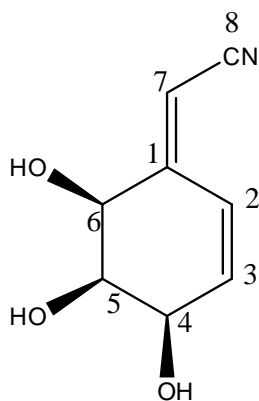


Figure 58: Spectre HMBC de (TCAF₁₂, 137).

De tout ce qui précède, nous avons attribuer à TCAF₁₂, la structure **137** qui est celle du (2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acétonitrile dont un diastéréoisomère a été isolé de source naturelle des racines de *Semiaquilegia adoxoides* (Ranunculaceae) par [Hua *et al.*, 2004].



137

Cette structure a été confirmée sans ambiguïté par l'analyse des données cristallographiques obtenues par diffraction des rayons X sur monocristal. Cette analyse montre que le monocristal appartient au système monoclinique de groupe spatial P2₁ et de coordonnées

$a = 4,8159(5) \text{ \AA}$; $b = 10,2482(5) \text{ \AA}$; $c = 8,3573(9) \text{ \AA}$

$\beta = 102,842(4)^\circ$; $V = 402,15(6) \text{ \AA}^3$; $Z = 2$

La structure cristalline de TCAF₁₂ est représentée par la **figure 59**

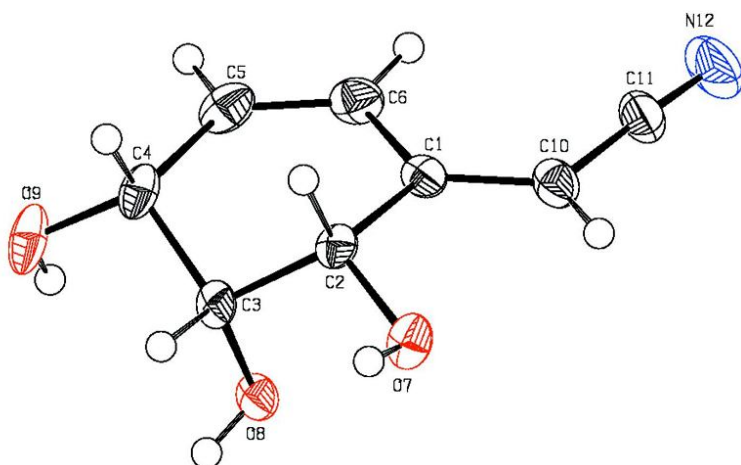
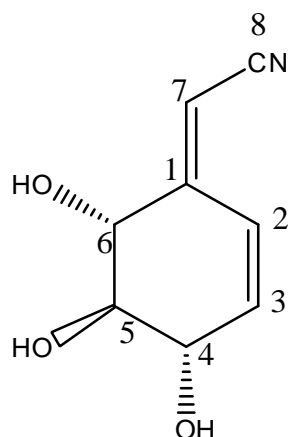


Figure 59: Structure cristalline de la molécule de TCAF₁₂

Il est à noter que **Hua et al. (2004)** ont donné à ce composé la structure ci-contre qui est celle du (1E, 4 α , 5 β , 6 α)-4, 5, 6-trihydroxy-2-cyclohexen-1-ylidèneacétonitrile.



138

La comparaison des données de RMN¹H et de RMN¹³C de TCAF₁₂ et celles du composé obtenu par **Hua et al., (2004)** montre des différences pour C-5 (δ_H 4,49 / δ_c 69,9 pour TCAF₁₂, et δ_H 3,36 / δ_c 79,5 pour celui de **Hua et al., (2004)** ; Pour C-4 (δ_H 4,16 / δ_c 74,5 pour TCAF₁₂, et δ_H 4,22 / δ_c 73,9 pour celui de **Hua et al., (2004)** et pour C-6 (δ_H 4,42 / δ_c 71,9 pour TCAF₁₂, et δ_H 4,13 / δ_c 73,8 pour celui de **Hua et al., (2004)**). Suggérant une configuration différente en C-4 et C-6. Donc TCAF₁₂ serait un diastéréoisomère en C-4 et C-6 du composé isolé par **Hua et al., (2004)**. Ceci est confirmé par les tâches de corrélation observées sur le spectre NOESY (**Fig. 60**) entre le proton du OH-5 à δ_H 4,60 et celui du OH-6 à δ_H 4,18 et celui du OH-4 à δ_H 4,14 ; ce qui montre que les trois OH sont du même côté dans le plan. TCAF₁₂ est donc un diastéréoisomère nouveau.

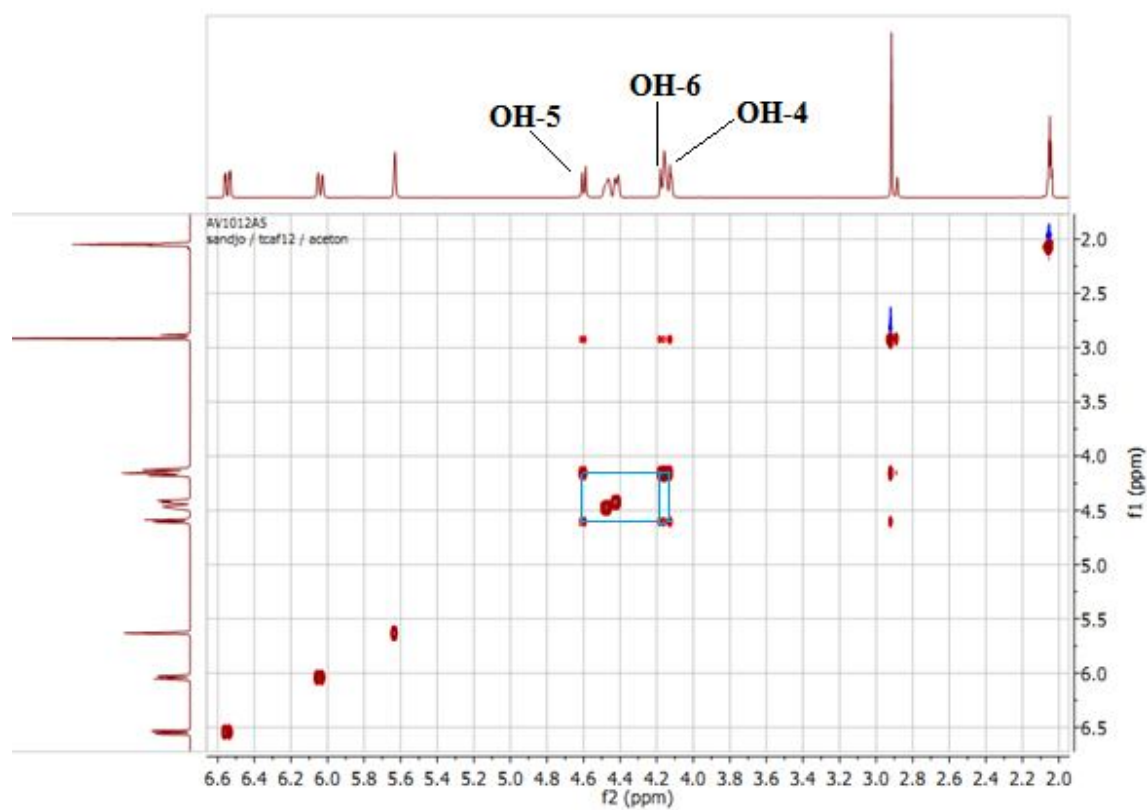
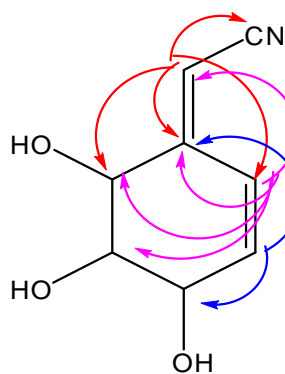


Figure 60: Spectre NOESY de (TCAF₁₂, 137).



139

Figure 61: Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de TCAF₁₂

Tableau XXV: Comparaison des données spectrales de RMN¹H (400 MHz, acetone-d₆) et RMN¹³C (100 MHz, acetone-d₆) de TCAF₁₂ (137**) avec celles de la littérature [Hua et al., 2004].**

Position	(2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acetonitrile (TCAF ₁₂ , 137).		(1E, 4 α , 5 β , 6 α)-2-(4, 5,6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acetonitrile [Hua et al., 2004]	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	159,7	-	161,6
2	6,04 (dd, J=1,8 ; 10,1Hz)	124,0	6,56 (dd, J=2,4 ; 10,1Hz)	124,7
3	6,55 (dd, J=2,5 ; 10,1Hz)	139,6	6,14 (br, d, J=10,1Hz)	141,6
4	4,16 (m)	74,5	4,22 (br, d, J=8,1 Hz)	73,9
5	4,49 (m)	69,6	3,36 (dd, J=10,6 ; 8,1Hz)	79,5
6	4,42 (m)	71,9	4,03 (dd, J=10,6 ; 2,0 Hz)	73,8
7	5,63 (s)	93,7	5,63 (br, s)	93,6
8	-	117,6	-	118,3

II.3-Evaluation des activités biologiques

II.3.1-Activités antimycobactérienne, antibactérienne et antifongique de l'extrait au méthanol et de quelques composés isolés des tiges de *T annobonae*.

Dans cette étude, nous avons évalué les activités antimycobactérienne, antibactérienne et antifongique de l'extrait au méthanol et de quelques composés isolés des tiges de *T. annobonae*, à savoir: L'acide aristolochique I (TCA₁₀ ; **114**), l'acide aristolochique méthyl ester (TCA₁₁ ; **116**), l'acide vanilique (TCA₃ ; **131**), l'acide 4-acétoxy vanilique (TCA₄ ; **129**), la friedeline (TCA₆ ; **125**) et la friedelan-3 β -ol (TCA₈ ; **127**). Les résultats sont présentés dans les **tableaux (XXVI), (XXVII)** et sur la (**figure 62**).

Les résultats de détermination des CMI rapportés dans le **tableau (XXVI)** montrent que l'extrait au méthanol et l'acide aristolochique I (TCA₁₀ ; **114**), sont capables de prévenir la croissance de tous les microorganismes étudiés à savoir: Les mycobactéries, les champignons, les bactéries Gram-positifs et les bactéries Gram-négatifs avec des CMI

comprises entre 9,76 et 312,50 µg/ml. Tandis que les autres composés (friedeline-3β-ol (**TCA₈**; **127**), acide 4-acétoxy vanilique (**TCA₄**; **129**), acide aristolochique méthyl ester (**TCA₁₁**; **125**) et l'acide vanilique (**TCA₃**; **131**)) montrent une activité sélective respectivement sur 50 % (7/14); 42,9 % (6/14); 35,7 % (5/14) et 21,4 % (3/14) des organismes étudiés. La plus faible valeur de CMI (19,53 µg/ml) a été obtenue avec l'extrait au méthanol vis-à-vis de la souche *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. La plus faible valeur CMI de (9,76 µg/ml) pour les composés individuels a été observée avec l'acide aristolochique I (**TCA₁₀**; **114**) sur la même souche ainsi que vis-à-vis de *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les CMM de ces composés ont été également évaluées (**tableau XXVII**). Il en ressort que l'extrait au méthanol ainsi que l'acide aristolochique I (**TCA₁₀**; **114**) montrent une activité microbicide sur tous les microorganismes étudiés à savoir: Les mycobactéries, les champignons, les bactéries Gram-positifs et les bactéries Gram-négatifs avec des CMM comprise entre 19,53 et 312,50 µg/ml. Les valeurs CMM inférieures à 312,50 µg/ml ont été observées respectivement avec l'acide aristolochique I (**TCA₁₀**; **114**) et l'extrait au méthanol sur 92 % (13/14) et 85,7 % (12/14) des microorganismes étudiés.

Les résultats illustrés sur la (**figure 62**) montrent que l'acide aristolochique I (**TCA₁₀**; **114**) inhibe totalement l'activité du proton médié par l'enzyme H⁺-ATPase lorsqu'il est testé aux valeurs de CMI. On note également une activité inhibitrice partielle avec la CMI de l'extrait au méthanol, ce qui suggère que les concentrations faibles sont moins actives. Cependant, l'effet inhibiteur est observé jusqu'au 1/10 de CMI.

Tableau XXVI: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI en µg/ml) de la croissance des mycobactéries, des bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs et des champignons en présence de l'extrait au MeOH, des composés isolés de *T. annobonae* et des antibiotiques de référence.

Microorganismes	Echantillons testés ^a						
	Extrait au MeOH	Composés testés de <i>T.annobonae</i>					AR*
		TCA ₁₀	TCA ₁₁	TCA ₃	TCA ₄	TCA ₈	
Mycobactéries							
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	39,06	19,53	-	-	-	312,50	0,61
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	19,53	9,76	-	-	-	-	0,31
<i>Mycobacterium tuberculosis MTCS1</i>	78,12	39,06	-	-	-	-	78,12
<i>Mycobacterium tuberculosis MTCS2</i>	78,12	19,53	-	-	-	-	0,61
bactéries Gram-positifs							
<i>Bacillus cereus</i>	39,06	9,76	312,50	312,50	312,50	156,25	9,76
<i>Staphylococcus aureus</i>	312,50	156,25	-	-	-	-	9,76
<i>Streptococcus faecalis</i>	312,50	78,12	-	-	-	312,50	9,76
bactéries Gram-négatifs							
<i>Citrobacter freundii</i>	312,50	156,25	-	-	-	-	19,53
<i>Escherichia coli</i>	39,06	19,53	156,25	156,25	156,25	39,06	9,76
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39,06	9,76	156,25	156,25	156,25	78,12	19,53
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39,06	19,53	312,50	-	156,25	78,12	78,12
<i>Salmonella typhi</i>	78,12	19,53	312,50	-	156,25	156,25	39,06
champignons							
<i>Candida albicans</i>	312,50	78,12	-	-	156,25	-	39,06
<i>Microsporum audouinii</i>	312,50	156,25	-	-	-	-	39,06

a : Les échantillons testés étaient l'extrait au MeOH et les composés isolés des tiges de *T. annobonae* (TCA₁₀, 104 : acide aristolochique I ; TCA₁₁, 116 : acide aristolochique méthyl ester ; TCA₃, 131 : acide vanilique ; TCA₄, 129 : acide 4-acetoxy vanilique ; TCA₈, 127 : friedeline-3β-ol), les AR ou antibiotiques de référence (ciprofloxacine et l'isoniazide pour *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium. Tuberculosis* respectivement, nystatine pour les champignons et gentamycine pour les autres bactéries).

(-) : Non déterminé parce que les CMI était supérieure à 312,50 µg/ml

Tableau XXVII : Concentration Minimale Microbicide (CMM en µg/ml) de la croissance des mycobactéries, des bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs et des champignons en présence de l'extrait au MeOH, des composés isolés de *T. annobonae* et des antibiotiques de référence.

Microorganismes	Echantillons testés ^a						AR*
	Extrait au MeOH	Composés testés de <i>T.annobonae</i>					
		TCA ₁₀	TCA ₁₁	TCA ₃	TCA ₄	TCA ₈	
Mycobactéries							
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	78,12	39,06	nd	nd	nd	nd	1,22
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	39,06	19,53	nd	nd	nd	nd	0,61
<i>Mycobacterium tuberculosis MTCS1</i>	156,25	78,12	nd	nd	nd	nd	156,25
<i>Mycobacterium tuberculosis MTCS2</i>	312,50	39,06	nd	nd	nd	nd	1,22
bactéries Gram-positifs							
<i>Bacillus cereus</i>	78,12	19,53	312,50	nd	312,50	nd	19,53
<i>Staphylococcus aureus</i>	nd	312,50	nd	nd	nd	nd	19,53
<i>Streptococcus faecalis</i>	312,50	156,25	nd	nd	nd	nd	19,53
bactéries Gram-négatifs							
<i>Citrobacter freundii</i>	312,50	nd	nd	nd	nd	nd	39,06
<i>Escherichia coli</i>	78,12	39,06	312,50	312,50	312,50	156,25	19,53
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	156,25	19,53	nd	312,50	nd	nd	39,06
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	156,25	78,12	nd	nd	nd	nd	156,25
<i>Salmonella typhi</i>	156,25	39,06	312,50	nd	312,50	nd	78,12
champignons							
<i>Candida albicans</i>	312,50	312,50	nd	nd	nd	nd	78,12
<i>Microsporium audouinii</i>	nd	312,50	nd	nd	nd	nd	78,12

a : Les échantillons testés étaient l'extrait au MeOH et les composés isolés de *T. annobonae* (TCA₁₀, **114** : acide aristolochique I ; TCA₁₁, **116**: acide aristolochique méthyl ester ; TCA₃, **131**: acide vanilique ; TCA₄, **129** : acide 4-acetoxy vanilique ; TCA₈, **127**: friedeline-3β-ol), les AR ou antibiotiques de référence (ciprofloxacine et l'isoniazide pour *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium. Tuberculosis* respectivement, nystatine pour les champignons et gentamycine pour les autres bactéries).

(nd) : Non déterminé parce que la CMM était supérieure à 312,25 µg/ml

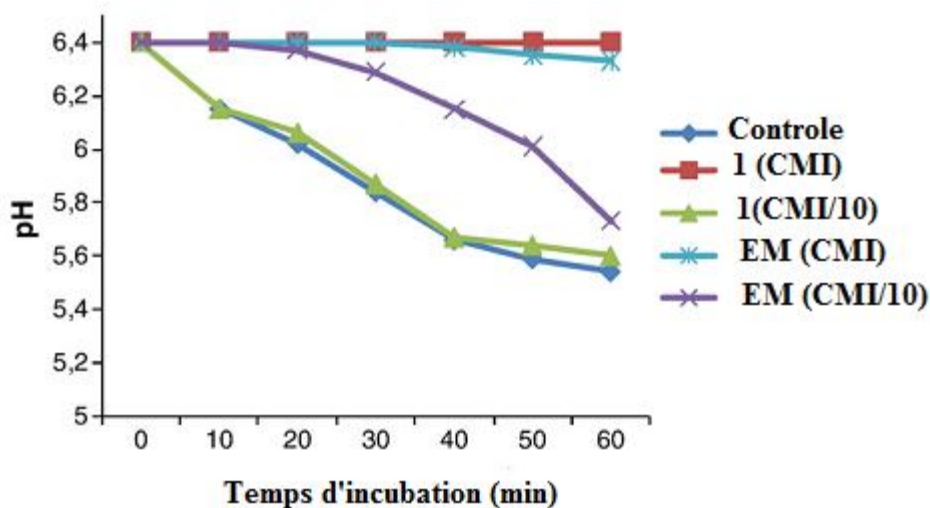


Figure 62: Effet de l'extrait au MeOH de *T.annobonae* et de l'acide aristolochique I sur le pompage du proton d'*Escherichia coli* à la CMI et au 1/10 de la CMI.

II.3.2-Evaluation des activités antimicrobiennes et phytotoxique de quelques composés isolés des feuilles de *T. annobonae*.

II.3.2.1-Evaluation des activités antibactérienne et antifongique de quelques composés isolés des feuilles de *T.annobonae*.

Les composés isolés des feuilles de *T. annobonae* qui ont été testés sont : Le 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**), l'acide bétulinique (TCAF₃; **124**), la friedeline (TCAF₁; **125**), l'acide aristolochique I (TCAF₂; **114**), l'alpinumisoflavone (TCAF₅; **135**) et le 4'-O-methylalpinumisoflavone (TCAF₆; **136**). Leurs activités antifongique, algicide et antibactérienne ont été déterminées en utilisant la méthode de diffusion sur gélose avec des disques de papier de 8 mm de diamètre imprégnés de 30 µg / ml de chaque composé. Les résultats sont consignés dans le **tableau (XXVIII)**.

Tableau XXVIII : Activités antibactérienne, antifongique et algicide des composés isolés des feuilles de *T. annobonae* : résultats exprimés en diamètre de la zone d'inhibition de croissance (mm) pour des disques préparée à 30 µg / ml.

Composés	Souches microbiennes								
	Bacteries Gram+		Bactéries Gram-		Champignons		Microalgue		
	Bs	Sa	Ec	Sv	Mm	Ca	Cv	Cs	Ss
TCAF ₄	16	13	14	15	10	-	10	-	14
TCAF ₃	11	-	11	-	-	12	-	-	-
TCAF ₁	10	-	9	-	-	11	-	-	-
TCAF ₂	13	-	13	-	-	14	-	-	-
TCAF ₅	11	15	9	15	-	-	-	-	-
TCAF ₆	13	15	12	13	-	-	-	-	-

Antibiotique de référence utilisé : Nystatine

Concentration de l'échantillon testé: 1 mg/ ml; Bs: *Bacillus subtilis*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Ec: *Escherichia coli*, Sv: *Streptomyces viridochromogenes*, Mm: *Mucor miehei*, Ca: *Candida albicans*, Cv: *Chlorella vulgaris*, Cs: *Chlorella sorokiniana* , Ss: *Scenedesmus subspicatus*; -: zone d'inhibition nulle

D'après ce tableau, le composé 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**), a montré une activité forte sur 7 des 9 microorganismes testés soit un pourcentage de 77,78 %. Il s'agit de *Bacillus subtilis* (16 mm de diamètre de la zone d'inhibition), *Staphylococcus aureus* (13 mm), *Escherichia coli* (14 mm), *Streptomyces viridochromogenes* (Tu 57) (15 mm), *Mucor miehei* (10 mm), *Chlorella vulgaris* (10 mm) et *Scenedesmus subspicatus* (14 mm). Les composés tels que l'acide vanilique (TCAF₁₀; **131**), la friedeline (TCAF₁; **125**) et l'acide aristolochique I (TCAF₂; **114**) ont montré des activités faibles sur 3 des 9 microorganismes : *Bacillus subtilis* (11 mm, 10 mm, 13 mm), *Escherichia coli* (11 mm, 9 mm, 13 mm) et *candida albicans* (12 mm, 11 mm, 14 mm) respectivement, soit un pourcentage de 33,33 %. Les composés alpinumisoflavone (TCAF₅; **135**) et 4'-O-methylalpinumisoflavone (TCAF₆; **136**) quant à eux ont montré des activités faibles sur les 4 souches bactéries *Streptomyces viridochromogenes* (Tu 57) (15,13 mm), *Bacillus subtilis* (11, 13 mm), *Escherichia coli* (11,12 mm) et *Staphylococcus aureus* (15,15 mm), respectivement, soit un pourcentage de 44,44 %.

Tous les 6 composés sont actifs contre *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* mais le composé 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**), avec la zone d'inhibition la plus élevée présente une meilleure activité par rapport aux autres composés. De plus le

composé 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**), est actif sur 3 souches microbiennes où les 5 autres composés se sont montrés inactifs. Cette différence d'activité pourrait s'expliquer par le fait que contrairement aux autres composés, le composé 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**) ne possède pas de groupe hydroxyle dans sa structure.

II.3.2.2- Evaluation de l'activité phytotoxique de quelques composés isolés des feuilles de *T. annobonae*

Les composés isolés des feuilles de *T. annobonae* qui ont été testés sont : Le 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**), l'acide bétulinique (TCAF₃; **124**), la friedeline (TCAF₁; **125**), l'acide aristolochique I (TCAF₂; **121**), l'alpinumisoflavone (TCAF₅; **135**) et le 4'-O-methylalpinumisoflavone (TCAF₆; **136**). L'activité inhibitrice de croissance des plantes a été déterminée en utilisant le test de croissance des jeunes plantes de salade. L'inhibition de croissance des racines des salades par les composés tels que : Le 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**), l'acide bétulinique (TCAF₃; **124**), la friedeline (TCAF₁; **125**), l'acide aristolochique I (TCAF₂; **121**), l'alpinumisoflavone (TCAF₅; **135**) et le 4'-O-methylalpinumisoflavone (TCAF₆; **136**) à la concentration de 100 µg/ml est de 10 %, 25 %, 55 %, 20 %, 15 % et 17 % respectivement comparée au contrôle. l'acide bétulinique (TCAF₃; **124**) a été décrit comme ayant une bonne activité contre les cellules cancéreuses d'origine neuroectodermique et leucémiques [Kessler et al., 2007]. Aussi, il a une forte activité inhibitrice sélective contre le VIH-1 [Faujan et al., 2010].

En définitive, l'étude pharmacologique de l'extrait au méthanol ainsi que certains composés isolés des tiges et des feuilles de *T. annobonae* révèle que l'activité antimicrobienne de l'extrait brut serait due à la présence dans cet extrait des dérivés phénanthréniques et des triterpènes. En effet, les composés les plus actifs sont l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) et le 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**). L'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) est capable de prévenir la croissance de tous les organismes étudiés à savoir : Les bactéries Gram-positifs (*Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*), les bactéries Gram-négatifs (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter freundii*) et les champignons (*Candida albicans* et *Microsporum audouinii*) avec des CMI comprises entre 9,76 et 312,50 µg/ml. L'extrait au méthanol et l'acide aristolochique I (TCAF₄; **117**) ont une activité microbicide; les valeurs de CMM inférieures à 312,50 µg/ml ont été

observées respectivement avec l'acide aristolochique I (TCAF₄ ; **117**) et l'extrait au méthanol sur 92 % et 85,7 % des microorganismes étudiés. Aussi, l'acide aristolochique I (TCAF₄ ; **117**) inhibe le pompage du proton médié par l'enzyme H⁺ATPase dans *Escherichia coli*.

Le composé 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄ ; **117**), a montré une activité forte sur 7 des 9 microorganismes testés soit un pourcentage de 77,78 %. Il s'agit de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Mucor miehei*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus subspicatus*.

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

A-CONCLUSION GENERALE

L'objectif de notre travail a porté sur l'étude phytochimique de l'espèce *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae), ainsi que sur l'évaluation des activités antimicrobienne et phytotoxique de quelques métabolites secondaires isolés de cette plante

L'étude bibliographique préalablement réalisée sur cette espèce a montré que l'on ne disposait de presque pas d'informations de nature chimique et/ou biologique.

L'étude phytochimique que nous avons entreprise sur les tiges et les feuilles de *T. annobonae* a conduit à l'isolement de 19 composés. Les structures ont été élucidées au moyen des techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie infrarouge (IR), ultraviolet (UV), la spectrométrie de masse, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à une et à deux dimensions, et la spectroscopie des rayons X. Certains composés ont été identifiés par comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles de la littérature. Ces différents composés ont été regroupés en 7 classes structurales dont: 2 stéroïdes, 9 triterpènes pentacycliques, 2 acides phénoliques, 2 dérivés phénanthréniques, 2 flavonoïdes, 1 phthalate et 1 imidazole.

Tableau XXIX: Regroupement des différents composés isolés des tiges et des feuilles de *T.annobonae*

N°	Tiges de <i>T. annobonae</i>	Feuilles de <i>T. annobonae</i>	Noms des composés	Observations ou références
1	TCA ₁	TCAF ₇	β-sitostérol	Awanchiri <i>et al.</i> , 2009
2	TCA ₂	/	Bétuline	Tijjani <i>et al.</i> , 2012
3	TCA ₃	TCAF ₁₀	Acide vanilique	Delaquis <i>et al.</i> , 2005
4	TCA ₄	/	Acide 4'-O-acétoxyvanilique	Li et Huang, 2000
5	TCA ₅	TCAF ₁₁	3-O-β-D-glucopyranoside de β-sitostérol	De Castro Ferreira Gomes <i>et al.</i> , 1998
6	TCA ₆	TCAF ₁	Friedeline	Wandji <i>et al.</i> , 2003
7	TCA ₇	/	Acétate de taraxéryle	Junichi <i>et al.</i> , 2011
8	TCA ₈	/	Friedelan-3β-ol	Ng'ang <i>et al.</i> , 2008
9	TCA ₁₀	TCAF ₂	Acide aristolochique I	Arlt <i>et al.</i> , 2002
10	TCA ₁₁	/	Acide aristolochique methyl ester	Mizuno <i>et al.</i> , 1990
11	TCA ₁₂	/	Bis (2-éthylhexyle) phthalate	Amade <i>et al.</i> , 1994
12	/	TCAF ₃	Acide bétulinique	Faujan <i>et al.</i> , 2010
13	/	TCAF₄	30-norlup-20-en-28-oate de méthyle	triterpène nouveau
14	/	TCAF ₅	Alpinumisoflavone	Tsukayama <i>et al.</i> , 1992
15	/	TCAF ₆	4'-O-méthyl alpinumisoflavone	Liu <i>et al.</i> , 2009
16	/	TCAF ₈	Friedelane	Mahato et Kundu, 1994
17	/	TCAF ₉	Lupeol	Abdullahi <i>et al.</i> , 2013
18	/	TCAF₁₂	(2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acétonitrile	Diastéréoisomère nouveau
19	/	TCAF ₁₃	16-hydroxylupeol	Mahato et Kundu, 1994

Dans le souci d'augmenter les quantités des produits obtenus des feuilles, les feuilles ont été récoltées deux fois et les protocoles d'extractions différents ont été utilisés.

De la première récolte, nous avons obtenu 500 g de poudre végétale qui a été extraite par macération à température ambiante au mélange chloroforme/acétone (1:1) pendant 24 heures pour donner 40 g d'extrait. De cet extrait, nous avons isolé par des méthodes chromatographiques usuelles 6 composés à savoir: le friedeline (**TCAF₁**; **125**), l'acide bétulinique (**TCAF₃**; **124**), le 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (**TCAF₄**; **117**) qui est un dérivé nouveau décrit ici pour la première fois, l'alpinumisoflavone (**TCAF₅**; **135**), le 4'-O-méthylalpinumisoflavone (**TCAF₆**; **136**) et l'acide aristolochique I (**TCAF₂**; **114**).

La seconde récolte quant à elle a donné 1,37 Kg de poudre qui a été extraite successivement par macération à l'hexane, à l'acétate d'éthyle et au méthanol pendant 48 heures à température ambiante pour donner respectivement 30 g, 45 g et 25 g d'extrait. Des 25 g d'extrait au méthanol, nous avons obtenu 7 composés à savoir : (2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5,6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acétonitrile (**TCAF₁₂**; **137**) qui est un stéréoisomère nouveau ; l'acide vanilique (**TCAF₁₀**; **131**) ; le β -sitostérol (**TCAF₇**; **132**) ; le 3-O- β -D-glucopyranoside de β -sitostérol (**TCAF₁₁**; **133**) ; le 16-hydroxylupéol (**TCAF₁₃**; **123**), le friedelane (**TCAF₈**; **126**) et le lupéol (**TCAF₉**; **122**).

De même certains composés ont été isolés à la fois des tiges et des feuilles de *T.annobonae*. Il s'agit de la friedeline (**TCA₆/TCAF₁**; **121**), du β -sitostérol (**TCA₁/TCAF₇**; **132**), du 3-O- β -D-glucopyranoside de β -sitostérol (**TCA₅/TCAF₁₁**; **133**), de l'acide vanilique (**TCA₃/TCAF₁₀**; **131**), du 4'-O- méthylalpinumisoflavone (**TCAF₆**; **136**) et de l'acide aristolochique I (**TCA₁₀/TCAF₂**; **114**). Pour cela, il est encore difficile de prédire les activités biologiques tout comme les constituants chimiques des espèces du genre *Thecacoris*. En effet, en 2004 nous avons travaillé sur l'espèce *T. batesii* et les résultats ont conduit aux diterpènes, aux stéroïdes, aux acides gras et aux flavonoides.

Toutes ces différences observées entre les métabolites secondaires isolés de *T. annobonae* et ceux des autres espèces du genre *Thecacoris* peuvent être dûes à l'influence géographique ou environnementale.

Dans la partie biologique de notre travail, les essais biologiques effectués sur l'extrait au méthanol et certains composés isolés des tiges et des feuilles de *T. annobonae*, nous ont permis de mettre en évidence leurs activités antimycobactérienne, antibactérienne , antifongique, algicide et phytotoxique.

Ainsi, les activités antimicrobiennes de l'extrait au méthanol et de cinq composés isolés des tiges de *T.annononae* à savoir : Le friedelan-3 β -ol (**TCA₈**; **127**), l'acide vanilique (**TCA₃**; **131**), l'acide 4-acetoxy vanilique (**TCA₄**; **129**), l'acide aristolochique I (**TCA₁₀**; **114**), et l'acide aristolochique methyl ester (**TCA₁₁**; **116**) ont été évaluées par la méthode de MABA (Microplate Alamar Blue Assay) et par la méthode de microdilution. Nous avons déterminé les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Microbicides (CMM) des divers échantillons. Les résultats que nous avons obtenus ont montré que l'extrait au méthanol et l'acide aristolochique I (**TCA₁₀**; **114**) sont les plus actifs principalement sur tous les microorganismes étudiés à savoir : Les mycobactéries (*Mycobactérium smegmatis*, *Mycobactérium tuberculosis*), les bactéries Gram-positifs (*Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*), les bactéries Gram-négatifs (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter freundii*) et les champignons (*Candida albicans* et *Microsporium audouinii*) démontrant ainsi le fort potentiel antimycobactérien, antibactérien et antifongique de ces composés. Ces résultats illustrent également que l'acide aristolochique I (**TCA₁₀**; **114**) inhibe totalement l'activité du proton médié par l'enzyme H⁺ATPase d'*Escherichia coli* lorsqu'il est testé aux valeurs de CMI confirmant ainsi son effet bactéricide.

Les activités antimicrobienne et phytotoxique de six composés isolés des feuilles de *T.annobonae* à savoir :le 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (**TCAF₄**; **117**), l'acide bétulinique (**TCAF₃**; **124**), la friedeline (**TCAF₁**; **125**), l'acide aristolochique I (**TCAF₂**; **114**), l'alpinumisoflavone (**TCAF₅**; **135**) et le 4'-O-methylalpinumisoflavone (**TCAF₆**; **136**) ont également été évaluées par la méthode de diffusion sur gélose et par le test de croissance des jeunes plantes de salades respectivement. Les résultats que nous avons obtenus de l'activité antimicrobienne révèlent que le 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (**TCAF₄**; **117**) a une activité antimicrobienne significative sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Mucor miehei*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus subspicatus* à une concentration de 30 μ g/ml; les cinq autres composés sont sans actions sur les microalgues et ont une activité sélective sur les bactéries et les champignons. L'évaluation phytotoxique a montré que tous les six composés inhibent la croissance des racines des salades à une concentration de 100 μ g/ml.

B-DISCUSSION

Des tiges de *T. annobonae*, trois classes de composés ont été isolés, à savoir deux dérivés phénanthréniques: l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) et l'acide aristolochique méthyl ester (TCA₁₁; **116**); Deux acides phénoliques: l'acide vanilique (TCA₃; **131**) et l'acide 4-acétoxy vanilique (TCA₄; **129**) et deux terpénoides: la friedelan-3β-ol (TCA₈; **127**) et la friedeline (TCA₆; **125**). Plusieurs composés appartenant à ces classes de métabolites secondaires ont été évalués pour leurs activités antimicrobiennes [Bruneton, 1999; Cowan, 1999]. L'activité antimicrobienne de la friedeline (TCA₆; **125**) vis à vis des champignons et des bactéries a été récemment évaluée par Kuete et al., 2007 raison pour laquelle elle n'a pas été testée dans cette étude. L'activité antimicrobienne de l'acide vanilique (TCA₃; **131**) contre *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi*, et *L. seeligeri* a été évaluée par Delaquis et al., 2005; mais contrairement à cette documentation, l'acide vanilique (TCA₃; **131**) dans cette étude et son dérivé l'acide 4-acétoxy vanilique (TCA₄; **129**) montrent une très faible activité sur les mycobactéries, les champignons et les bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs utilisés ici. A notre connaissance, l'activité antimicrobienne de *Thecacoris.annobonae* ainsi que celle de l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) sont décrites ici pour la première fois car très peu d'activités pharmacologiques sont documentées sur le genre *Thecacoris*, d'où notre intérêt à nous focaliser sur *T. annobonae*.

Cette étude identifie l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) comme le principal composé antimicrobien de *T. annobonae* et donne des informations importantes sur l'activité antimicrobienne du genre *Thecacoris*. Cependant, bien que l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) soit utilisé en chine pour lutter contre le surpoids et d'autres maladies telles que l'arthrite et certaines inflammations, il est carcinogénique et exhibe une néphrotoxicité élevée [Cosyns, 2003; Poon et al., 2007]: **Il est donc comprométant pour la santé.**

Il ressort du **tableau XXVII** que les valeurs de CMM obtenues sont en général supérieure à celles des CMI (**tableauXXVI**) sur les espèces testées correspondantes. Ce qui suggère un effet microbicide de l'extrait au méthanol et des composés isolés sur l'ensemble des microorganismes étudiées [Mims et al., 1993]. De plus, les valeurs de CMI inférieures à 100 µg/ml ont été obtenues pour 9 des espèces microbiennes étudiées soit 64,3 % suggérant que l'extrait de *T. annobonae* pourrait être un candidat potentiel de source naturelle pour la fabrication des médicaments.

La réduction de la population d'*Echérichia coli* par l'extrait au méthanol et l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) comme observée dans le test de « colony count » a aussi

montré le potentiel antiinfectieux de cette plante, ce qui confirme l'effet microbicide de l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) et de l'extrait au méthanol sur les espèces microbiennes étudiées.

Pour étudier l'un des mécanismes possibles de l'action de l'extrait au méthanol et de l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) I, nous avons évalué leur capacité à inhiber le pompage du proton médié par l'enzyme H⁺ATPase chez *Eschérichia coli*. Par ailleurs, il est bien connu que les bactéries survivent dans la gamme de pH comprise entre 1 et 11 et que le pH cytoplasmique bactérien qui est proche du neutre (pH=7) est régulé par les systèmes de transport des cations variés [Padan et al., 1981] Certaines données suggèrent que chez *Eschérichia coli*, le pH cytoplasmique est régulé par l'exclusion du proton via la chaîne respiratoire et l'influx du potassium au pH acide et l'antiporteur cation/proton régule le pH dans les états alcalins [Kobayashi, 1985]. Cependant, les données obtenues dans cette étude indiquent que l'inhibition du proton médié par l'enzyme H⁺ATPase pourrait être un des mécanismes antimicrobiens possible de l'extrait au méthanol à cause de la prédominance de l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**). Les autres mécanismes tels que l'interaction de l'ADN de ce composé sont à démontrer. En effet, plusieurs composés renfermant l'atome d'azote sont connus pour leur activité antimicrobienne à travers leur habilité à interfeurer avec l'ADN [Phillipson et O'Neill, 1987].

Au total, les infections causées par les bactéries, les champignons et les mycobactéries constituent un problème de santé publique important dans le monde et particulièrement en Afrique, à cause de leur forte prévalence d'une part et à cause de la résistance croissante aux antibiotiques et antifongiques tels que la pénicilline, la tétracycline, la gentamycine ou la nystatine d'autre pat. Les résultats de cette étude sont encourageants du fait de l'importance médical des microorganismes étudiés et surtout parceque *T. annobonae* est consommée traditionnellement comme anti-infectieux tout en ignorant qu'elle renferme des composés nocifs pour la santé tels que l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**) son composé majeur. En conséquence, de cette étude, les traditionnalistes sauront désormais que la consommation des plantes renfermant l'acide aristolochique I est et reste déconseillée.

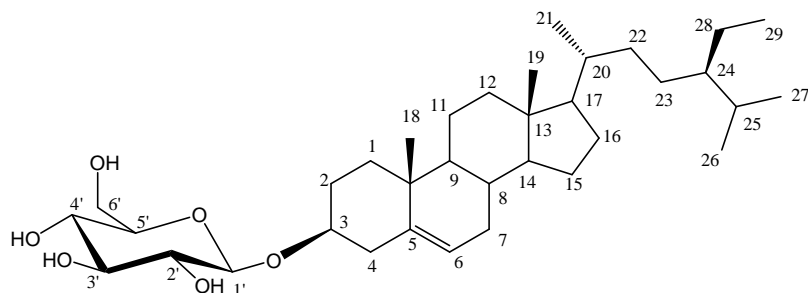
PERSPECTIVES

Dans le but de rechercher de nouvelles activités ou de potentialiser celles déjà existantes, nous nous proposons en perspectives:

- D'étudier toutes les autres parties de la plante à savoir:les fruits, les racines et écorces;
- d'étudier les extraits restants au laboratoire (Extraits à l'hexane et à l'acétate d'éthyle);
- d'étendre notre étude à l'espèce de genre *Thecacoris* restante au Cameroun (*T. stenopetala*);
- d'étudier la toxicité des extraits de *T. annobonae*;
- d'améliorer la quantité des composés isolés intéressants tels que l'acide aristolochique I et le (2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-Trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidène) acétontrile afin de faire des hémisynthèses et les synthèses;
- de vérifier la possibilité à l'acide aristolochique I à interférer avec l'ADN;
- comment faire pour que la consommation de l'extrait au méthanol de *T. annoboane* soit possible;
- de voir dans la mesure du possible comment faire pour atténuer la toxicité de l'acide aristolochique I à travers les réactions chimiques.

C-CARACTERISTIQUES SPECTROSCOPIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES ISOLES

-TCA5/TCAF11 ou 3-O- β -D-glucopyranoside de β -sitostérol (**133**).



Formule brute $C_{35}H_{60}O_6$.

Aspect physique: Cristaux blanchâtres.

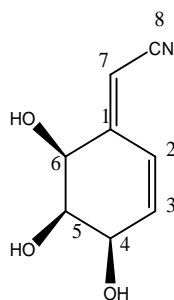
Solvant de cristallisation: Hex-AcOEt (1:3).

Point de fusion: 257-258 °C.

Spectre de RMN ^{13}C (75 MHz, pyridine- d_5): Voir Tableau XXII

Spectre de masse DIC/ NH_3 : m/z 594 $[M+NH_4]^+$.

-TCAF₁₂ ou (2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5,6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acetonitrile (**137**).



Formule brute : $C_8H_9NO_3$

Aspect physique: Aiguilles brillantes.

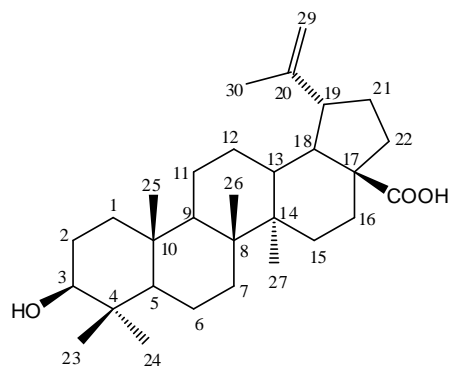
Solvant de cristallisation: CH_2Cl_2 -MeOH
(97 :3)

Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, acetone- d_6). Voir Tableau XXV

Spectre de RMN 1H (400 MHz, acetone- d_6). Voir Tableau XXV

Spectre de masse (ESI) : m/z 190,0470 (calcd pour $[C_8H_9NO_3+Na]^+$ 190,0475)

- TCAF₃ ou acide bétulinique (124).



Formule brute: C₃₀H₄₈O₃.

Aspect physique: Cristaux blancs.

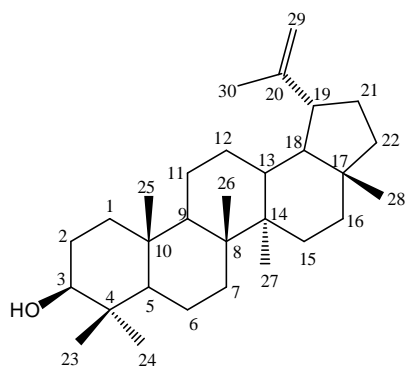
Solvant de cristallisation: CHCl₃-MeOH (97 :3)

Point de fusion: 316–318 °C.

Spectre de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): Voir Tableau XVI

Spectre de masse en IE: *m/z* (%) 456 (65) [M]⁺.

- TCAF₉ ou lupéol (122).



Formule brute C₃₀H₅₀O.

Aspect physique: Cristaux blancs.

Solvant de cristallisation: Hex-AcOEt (19:1).

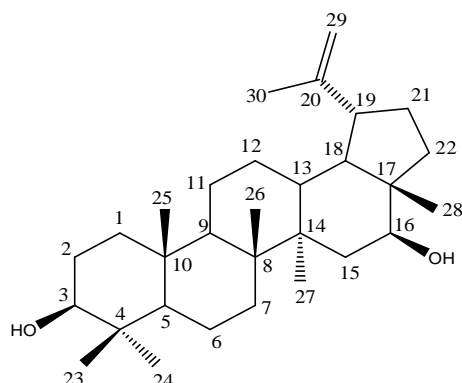
Point de fusion: 215–216 °C.

Spectre IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3300, 3065, 1640, 1385, 880.

Spectre de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): Voir Tableau XV

Spectre de masse (IE): *m/z* (%) 426 (100) [M]⁺.

-TCAF₁₃ ou 16-hydroxylopeol. (123)



Formule brute : C₃₀H₅₀O₂

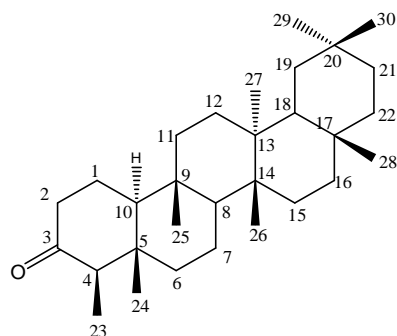
Aspect physique : Poudre blanche

Spectre de RMN¹³C (75 MHz,

CDCl₃): 36,1(C-1) ; 27,4(C-2) ; 77,0(C-3) ; 38,7(C-4) ; 56,1(C-5) ; 17,5(C-6) ; 35,3(C-7) ; 40,5(C-8) ; 50,8(C-9) ; 39,2(C-10) ; 24,6(C-11) ; 30,6(C-12) ; 39,5(C-13) ; 46,3(C-14) ; 35,6(C-15) ; 78,8(C-16) ; 44,2(C-17) ; 42,3(C-18) ; 48,3(C-19) ; 147,1(C-20) ; 30,1(C-21) ; 40,3(C-22) ; 28,1(C-23) ; 19,5(C-24) ; 16,2(C-25) ; 19,8(C-26) ; 15,4(C-27) ; 21,7(C-28) ; 110,0(C-29) ; 19,5(C-30).

Spectre de masse en IE: *m/z* (%) 442 (100) [M]⁺

-TCAF₁/TCA₆ ou Friedeline (125).



Formule brute: C₃₀H₅₀O.

Aspect physique: Poudre blanche

Solvant de cristallisation: CH₂Cl₂

Point fusion: 247-249°C.

Spectre de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃): Voir Tableau XVII

Spectre de masse en IE: *m/z* (%) 426 (100) [M]⁺

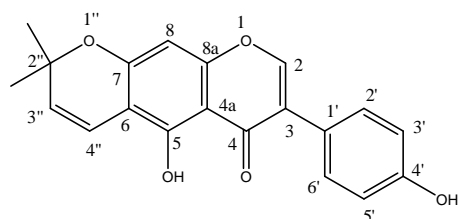
-TCAF₅ ou alpinumisoflavone (135).

Formule brute: C₂₀H₁₆O₅.

Aspect physique: Cristaux jaunes.

Solvant de cristallisation: CHCl₃-MeOH (97 :3)

Point de fusion: 210–212 °C.



Spectre de RMN ¹H (300 MHz, Acétone-*d*₆): voir Tableau XXV

Spectre de RMN ¹³C (75 MHz, Acétone-*d*₆): voir Tableau XXV

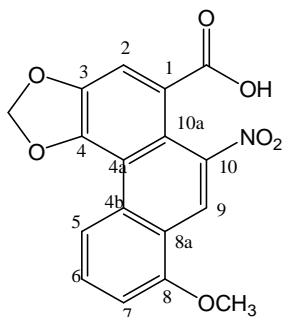
Spectre de masse en IE: *m/z* (%) 336 (100) [M]⁺

-TCAF₁₀/TCAF₂ ou acide aristolochique I (114).

Formule brute : C₁₇H₁₁NO₇

Aspect physique : cristaux jaunes

Solvant de cristallisation : CH₂Cl₂-MeOH
(97 :3)



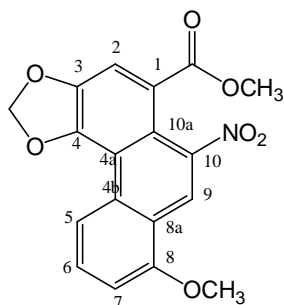
Spectre de RMN ¹H (600 MHz, pyridine-*d*₅) : Voir tableau XII

Spectre de RMN ¹³C (150 MHz, pyridine-*d*₅) : Voir tableau XII

Spectre IR (KBr) : $\nu=2912,1715,1594,1515,1465,1426,1376,1342,1267,1237,1216,1194,1170,$
 $1136, 1043, 964, 938, 892, 803,742 \text{ cm}^{-1}$

Spectre de masse en IE (70eV) : *m/z*(%)341(M⁺,21)296(17),295(100),280(16),44(43).(+)ESI
HR : *m/z* 359,08745([M+NH₄]⁺, calcd 359,08738 pour C₁₇H₁₁NO₇).

-TCA₁₁ ou acide aristolochique methyl ester (116).



Formule brute : C₁₈H₁₃NO₇

Aspect physique : Cristaux jaunes

Solvant de cristallisation : CH₂Cl₂-MeOH
(97 :3)

Spectre de RMN¹H (300 MHz, pyridine-d₅) : Voir tableau XVIII

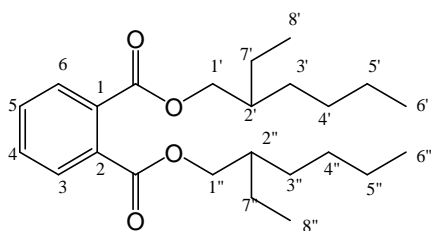
Spectre de RMN¹³C (125 MHz, pyridine-d₅) : Voir tableau XII

Spectre de masse en IE (70eV) : m/z (‰) 355(M⁺,31) ; 310(24) ; 309(100) ; 294(48) ; 279(42) ; 266(14) ; 251(10). (+)-ESI HR : m/z373, 10303[M+NH₄]⁺ ; 378,05842[M+Na]⁺ ;356,07648([M+H]⁺,calcd 356,07702 pour C₁₈H₁₃NO₇).

Méthylation de l'acide aristolochique I: 0,5ml d'acide aristolochique I a été dissous dans 1,5ml de dichlorométhane et 2ml d'une solution étherique de diazométhane a été ajouté à une température de -20°C. L'évaporation immédiate du solvant (to dryness and usual work-up) a conduit a un solide jaune (0,5mg, 96 ‰) dont la RMN est identique a celle du methyl ester acide aristolochique I isolé.

-

TCA₁₂ ou bis (2-ethylhexyl) phthalate (134).



Formule brute : C₂₄H₃₈O₄

Aspect physique : Poudre blanche amorphe

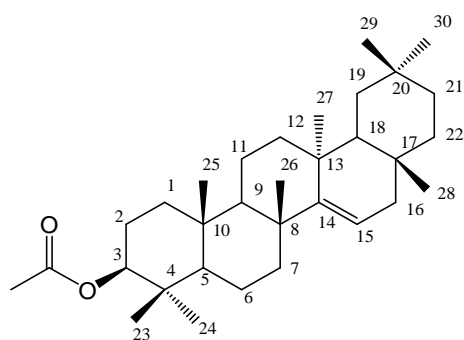
Solvant de cristallisation : CH₂Cl₂-MeOH (97 :3)

Spectre de RMN¹H (300 MHz,pyridine) :δ=7,9(m,2H,3/6-H) ;7,6(m,2H,4/5-H) ; 4,2 (m,4H,1'/1''-H) ;1,63 (m,2H,2'/2''-H) ;1,3 (m,16H,3'/3'',4'/4'',5'/5'',7'/7''-H) ; 0,91 (m,12H,6'/6'',8'/8''-H).

Spectre de RMN¹³C (75 MHz, pyridine) : δ =168(s,C-7/C-8) ; 132, 4(s,C-1/C-2) ; 131,5(d,C-3/C-6) ; 129,8 (d,C-4/C-5) ; 68,1 (t,C-1'/C-1'') ; 38,3 (d,C-2'/C-2'') ; 30,4 (t,C-7'/C-7'') ; 28,9 (t,C-3'/C-3'') ; 23,7 (t,C-4'/C-4'') ; 23,0 (t,C-5'/C-5'') ; 14,1(q,C-8'/C-8'') ; (10,9(q,C-6'/C-6'')).

Spectre de masse en IE : m/z (%) 390 (100) [M]⁺

-TCA₇ ou acetate de taraxeryle (128).



Formule brute : C₃₂H₅₂O₂

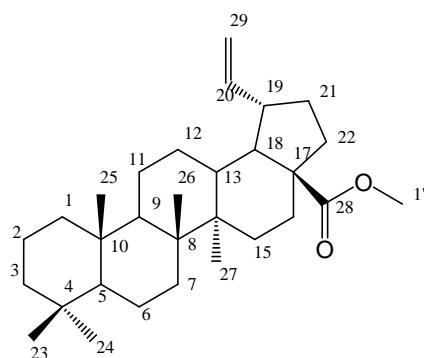
Aspect physique: Poudre blanche

Point de fusion: 276-278 °C.

Spectre de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) : Voir tableauXIX

Spectre de masse en IE : m/z(%) 468[M]⁺

-TCAF₄ ou 30-norlup-20-en-28-oate de methyle (117).



Formule brute : C₃₀H₄₉O

Aspect physique : Poudre blanche

Solvant de cristallisation : CHCl₃-MeOH (97 :3)

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{23} +34,2(c 0,7, CHCl_3)$

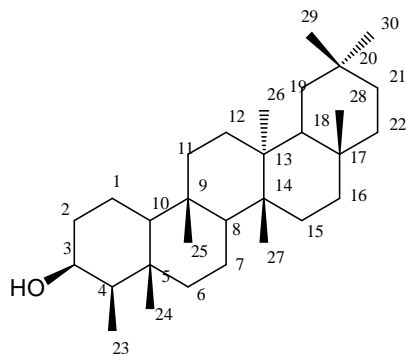
Spectre IR (KBr) : $\nu=2937, 1719, 1639, 1250, 878 \text{ cm}^{-1}$

Spectre de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) : Voir tableau XV

Spectre de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) : Voir tableau XV

Spectre de masse (ESI) ([M+H]⁺ m/z 441)

-TCA₈ ou friedelan-3β-ol (127).



Formule brute: C₃₀H₅₂O.

Point fusion: 229-231°C.

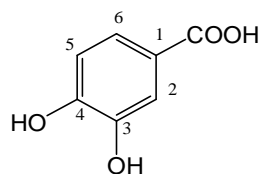
Aspect physique: Poudre blanche

Solvant de cristallisation : CH₂Cl₂

Spectre de masse en IE : m/z (%) 428 [M]⁺⁺

Spectre de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃): Voir Tableau XX

-TCA₃/TACF₁₀ ou acide vanilique (131).



Formule brute : C₈H₈O₄

Aspect physique : Cristaux bruns amorphes

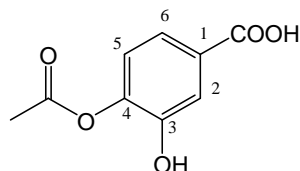
Solvant de cristallisation : CH₂Cl₂-MeOH (95 :5)

Point de fusion : 203-206°C.

Spectre de RMN¹³C (600 MHz, cd₃cn) : Voir tableau XX

Spectre de masse (IE, 70eV) : m/z (%) 168[M]⁺

-TCA₄ ou acide-4-acetoxy vanilique (129).



Formule brute C₁₀H₁₀O₅

Aspect physique : Poudre amorphe

Solvant de cristallisation : CH₂Cl₂-MeOH (95 :5)

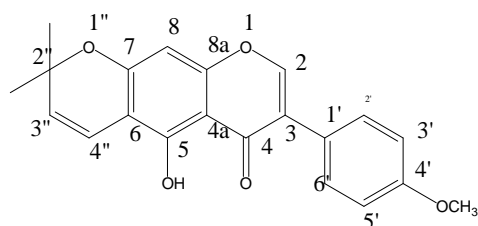
Spectre IR : ν=3079, 2940, 2849, 2640, 1767, 1716, 1699, 1634, 1602, 1509, 1464, 1418, 1370, 1269, 1196, 1173, 1122, 1031, 901, 879, 835, 801, 767, 739 cm⁻¹

Spectre de RMN¹H (300 MHz, pyridine-d₅) : Voir tableau XX

Spectre de RMN¹³C (125 MHz, pyridine-d₅) : Voir tableau XX

Spectre de masse en (-)-ESI : m/z 209,045 ([M-H]⁻)

-TCAF₆ ou 4'-O-methylalpinumisoflavone (136).



Formule brute: C₂₁H₁₈O₅.

Aspect physique: Cristaux jaunes.

Solvant de cristallisation: CHCl₃-MeOH (97 :3)

Spectre de RMN ¹³C (75 MHz, Acétone-*d*₆): 153,6 (C-2) ; 122,0 (C-3) ; 181,0 (C-4) ; 157,6 (C-5) ; 105,2 (C-6) ; 159,4 (C-7) ; 94,5 (C-8) ; 157,3 (C-8a) ; 105,8 (C-4a) ; 123,2 (C-1') ; 130,3 (C-2') ; 115,1 (C-3') ; 156,9 (C-4') ; 115,1 (C-5') ; 130,3 (C-6') ; 78,0 (C-2'') ; 128,6 (C-3'') ; 114,9 (C-4'') ; 27,5 (C-5'') ; 27,5 (C-6'') ; 56,2 (OCH₃).

Spectre de masse en IE: m/z (%) 350 [M]⁺⁺

CHAPITRE III

METHODOLOGIE

III.1-APPAREILLAGE ET MATERIEL VEGETAL

III.1.1-Appareillage

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide des appareils électrothermiques (Yanako, Tokyo-Japan).

Les masses des matériels, extraits, et produits ont été prises sur balance électronique MELTER PC 2000.

Les spectres de masse en impact électronique ont été enregistrés sur un spectromètre de marque FINNIGAN. MAT 95 (70 eV) avec le perfluorokérosène comme substance de référence alors que les spectres de masse en « electrospray ionisation » sont enregistrés sur un spectromètre de masse BRUKER FTICR 4.7T.

Les spectres de RMN sont enregistrés sur les spectromètres Varian UNITY 300 (300,145 MHz), BRUKER advance 300 (300,131 MHz), BRUKER advance II 400 (400 MHz) et Varian INOVA 500 (499,876 MHz) avec comme références les pics résiduels des solvants. Les solvants utilisés en RMN sont le chloroforme deutéré (CDCl_3), le méthanol deutéré (CD_3OD), la pyridine deutérée ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), l'acétone deutéré (CD_3COCD_3) et le diméthylsulfoxyde deutéré ($\text{DMSO-}d_6$).

Pour les différents types de chromatographie, plusieurs matériels ont été utilisés:

La CCM a nécessité des plaques de silice sur feuilles d'aluminium (plaques préfabriquées de type MERCK de dimension 20×20 cm et d'épaisseur 0,2 mm recouverte de Kieselgel F₂₅₄). Ces plaques ont été développées dans les cuves contenant les systèmes de solvants tels que: Hex/AE, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, AE/MeOH avec différentes proportions. Les révélations des taches ont été faites en utilisant soit la lampe UV de type «spectroline», soit la vapeur d'iode, ou même encore la pulvérisation à l' H_2SO_4 dilué à 50% suivie du chauffage à l'étuve à environ 110°C.

Les plaques utilisées pour les CCM préparatives sont fabriquées en déposant une couche de gel de silice 60 HF₂₅₄₊₃₆₆ d'épaisseur de 0,1 mm sur des lames de verre.

La CC et la chromatographie flash ont nécessité le gel de silice MERCK de granulométries variées (0,025-0,040 mm; 0,040-0,063 mm ; 0,063-0,2 mm).

L'évaporation s'est faite sur un évaporateur rotatif de type BUCHI.

L'activité optique des composés a été mesurée sur un polarimètre Perkin Elmer (Model 241) à 25 °C en solubilisant les produits dans le chloroforme.

Les spectres IR ont été enregistrés dans 0,5 à 1% de pastille de KBr à l'aide d'un électrophotomètre JM-DX 300.

Les spectres UV ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de type Shimadzu UV-210 PC UV-vis.

Pour la structure cristalline, les programmes CORINC et SIR 97 ont été utilisés pour déterminer la structure et la méthode SHELXL97 a été utilisée pour les graphiques moléculaires.

III.1.2-Matériel végétal

Les tiges et feuilles de *T. annobonae* ont été récoltées en Mars 2005 à Kumba (Région de Sud-Ouest, Cameroun). Une seconde récolte des feuilles a été faite dans la même localité en avril 2008. Cette plante a été identifiée par M. Nana Victor de l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé. L'échantillon botanique a été conservé et enregistré à l'Herbier National du Cameroun sous le numéro 38569/HNC.

III.2-EXTRACTION ET ISOLEMENT DES PRODUITS

III.2.1-Tiges de *theacoris annobonae*

Les tiges de *T. annobonae* ont été découpées, séchées, puis broyées pour donner 2,8 kg de poudre. Cette poudre a été extraite par macération au méthanol pendant 48 heures. Après évaporation du solvant sous pression réduite, nous avons obtenu 100,2 g d'extrait brut. Une partie de cet extrait brut (5g) a été mis de côté pour les tests et le reste (95,2 g) a été fixée sur 120 g de gel de silice puis soumise à une chromatographie flash éluée à l'hexane, suivie du mélange hexane-acétate d'éthyle (25%, 50%, 75% et 100%). Cent quinze fractions de 250 ml chacune ont été collectées, concentrées sous pression réduite puis regroupées sur la base de la CCM analytique en trois grandes fractions A, B et C. Les résultats sont regroupés dans le (Tableau XXX).

Tableau XXX: Chromatogramme de l'extrait au MeOH des tiges de *T. annobonae*.

Eluant	Fractions recueillies	Regroupements	Remarques
Hexane	1-10	1-36	Mélange jaunâtre de produits
Hex-AcOEt (3 :1)	11-36	(Fraction A)	dont TCA ₁₀ , TCA ₁₁ , TCA ₁₂
Hex-AcOEt (1 :1)	37-62	37-88 (Fraction B)	Mélange de plusieurs produits dont TCA ₁ , TCA ₂ , TCA ₃ , TCA ₄ et TCA ₅
Hex-AcOEt (1 :3)	63-88	89-115	Mélange de plusieurs produits dont
AcOEt	89-115	(Fraction C)	TCA ₆ , TCA ₇ , TCA ₈ et TCA ₉

La fraction A (5 g) a été fixée sur 10 g de silice et soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme solvant le mélange CH₂Cl₂-MeOH (3:1).³² sous fractions de 100 ml chacune ont été recueillies et les sous-fractions 13-26 ont été purifiées dans une colonne à Séphadex LH-20 avec comme éluant le système CH₂Cl₂-MeOH (1:1) pour donner l'acide aristolochique I (TCA₁₀; **114**; 4,7 mg), l'acide aristolochique méthyl ester (TCA₁₁; **116**; 6,0 mg) et le bis (2-éthyl hexyl) phthalate (TCA₁₂; **134**; 5,2 mg).

La fraction B (13,0 mg) a été fixée sur 15 g de silice et soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant le mélange Hexane-Acétate d'éthyle de polarité croissante. L'élution au mélange Hex-AcOEt (95 :5) et (90 :10) a conduit respectivement à l'isolement du β-sitostérol (TCA₁; **132**; 97,0 mg) et à la bétuline (TCA₂; **121**; 6,0 mg). L'acide vanilique (TCA₃; **131**; 6,7 mg) et l'acide 4'-acetoxy-3-benzoïque (TCA₄; **129**; 10,0 mg) ont été obtenus à la polarité Hex-AcOEt (40 :60). Quant au 3-O-β-D-glucopyranosyl sitostérol (TCA₅; **133**; 125 mg), il a été isolé à la polarité Hex-AcOEt (25 :75).

La fraction C (17,0 g) a été fixée sur 30 g de silice et soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant le mélange Hexane-Acétate d'éthyle de polarité croissante. 50 sous fractions de 100 ml chacune ont été collectées, concentrées sous pression réduite puis regroupées sur la base de la CCM analytique en 2 séries I et II. Les résultats sont consignés dans le (Tableau XXXI).

Tableau XXXI : Chromatogramme de la fraction C issue de l'extrait au MeOH des tiges de *T. annobonae*.

Eluant	Fractions recueillies	Regroupements	Remarques
Hex-AcOEt (9 :1)	1-10	1-37 (Série I ; 1,5g)	Mélange de produits dont TCA ₆ et TCA ₇
Hex-AcOEt (3 :1)	11-21		
Hex-AcOEt (1:1)	22-32		
Hex-AcOEt (1 :3)	33-43	38-50 (Série II ; 0,9g)	Mélange de produits dont TCA ₈ et TCA ₉
AcOEt	44-50		

La série I (1,5 g) a été chromatographiée sur gel de silice en utilisant comme éluant le mélange de CH₂Cl₂-MeOH de polarité croissante. L'élution au mélange CH₂Cl₂-MeOH (3 :1) nous a permis d'obtenir 2 produits : La friedeline (TCA₆; **125** ; 3,9 mg) et l'acétate de taraxeryle (TCA₇; **128** ; 2,0 mg).

La série II (0,9 g) dans les mêmes conditions d'élution nous a conduit à l'isolement de la friedelan-3β-ol (TCA₈; **127** ; 5,4 mg) et du (TCA₉; 4,9 mg) dont la structure est en cours d'élucidation.

III.2.2-Feuilles de *theacoris annobonae*

Les feuilles de *T. annobonae* séchées puis broyées nous ont permis d'obtenir 500 g de poudre qui a été extraite par macération à température ambiante au mélange CHCl₃/acétone (1 ;1) pendant 24 heures. 40 g d'extrait brut ont ainsi été obtenu après évaporation du solvant sous pression réduite. 35 g de cet extrait ont été fixé sur 50 g de gel de silice puis soumis à une chromatographie flash élue à l'Hexane, suivie du mélange Hex-AcOEt (25%, 50%, 75% et 100%). 105 fractions de 250 ml chacune ont été collectées, concentrées sous pression réduite puis regroupées sur la base de la CCM analytique en 2 grandes fractions A et B. (Tableau XXXII)

Tableau XXXII : Chromatogramme de l'extrait au mélange CHCl₃/acétone des feuilles de *T. annobonae*.

Eluant	Fractions recueillies	Regroupements	Remarques
Hexane	1-10	1-34	Mélange d'environ 4 produits
Hex-AcOEt (3 :1)	11-34	(Fraction A ; 3,0g)	dont TCAF ₁ et TCAF ₂
Hex-AcOEt (1 :1)	35-58	35-100	Mélange de plusieurs produits dont
Hex-AcOEt (1 :3)	59-82	(Fraction B ; 13,0g)	TCAF ₃ , TCAF ₄ , TCAF ₅ et TCAF ₆
AcOEt	83-100		
MeOH	100-105		Trainée sur plaque CCM

La fraction A (3,0 g) a été fixée sur 8 g de silice et soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant le mélange Hex-AcOEt (6 :1). A l'issue de cette chromatographie, nous avons obtenue la friedeline (TCAF₁; **125**; 11,3 mg) et l'acide aristolochique I (TCAF₂; **114**; 7,9 mg).

La fraction B (13,0 g) a été fixée sur 20 g de silice et soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant le mélange Hex-AcOEt de polarité croissante. A l'issue de cette chromatographie et sur la base de la CCM analytique, les sous-fractions de 100 ml chacune ont été collectées, concentrées puis regroupées en 2 sous-fractions I et II. Les résultats sont consignés dans le (**Tableau XXXIII**)

Tableau XXXIII Chromatogramme de la fraction B issue de l'extrait au mélange CHCl₃/acétone des feuilles de *T. annobonae*.

Éluant	Fractions recueillies	Regroupements	Remarques
Hex-AcOEt (9 :1)	1-10		Trainée sur plaque CCM
Hex-AcOEt (3 :1)	11-21	11-40 (sous-fraction I ;2,0g)	Mélange verdâtre de produits dont TCAF ₃ et TCAF ₄ qui est majoritaire
Hex-AcOEt (1 :1)	22-35		
Hex-AcOEt (1 :3)	36-49	41-55	Mélange de produits dont TCAF ₅ et TCAF ₆ présentant 2 taches de couleur jaune sur plaque CCM
AcOEt	50-55	(sous-fractionII ; 500 mg)	

La fraction I (2,0 g) a été purifiée dans une colonne à séphadex avec comme éluant le mélange CHCl₃/MeOH (97 :3). Cette purification nous a conduit à l'isolement de l'acide bétulinique (TCAF₃; **124**; 23,0 mg) et au 30-norlup-20-en-28-oate de méthyle (TCAF₄; **117**; 127,8 mg) qui précipite sous forme de poudre blanche.

La fraction II (500 mg) a été purifiée dans les mêmes conditions pour donner l'alpinumisoflavone (TCAF₅; **135**; 4,9 mg) et le 4'-O-méthylepinumisoflavone (TCAF₆; **136**; 7,3mg).

Dans le souci d'augmenter les quantités de composés obtenus des feuilles afin de pouvoir faire les réactions, nous avons jugé nécessaire de faire une nouvelle récolte.

III.2.3-Feuilles de *thecacoris annobonae* issues de la seconde récolte

Les feuilles de *T. annobonae* issues de la seconde récolte séchées puis broyées nous ont permis d'obtenir 1,37 kg de poudre qui a été extraite successivement par macération à température ambiante à l'hexane, à l'acétate d'éthyle et au méthanol pendant 48 heures. 30 g, 45 g et 61 g d'extrait brut ont ainsi été obtenus respectivement après évaporation des solvants sous pression réduite. Une partie de l'extrait au Méthanol (25 g) a été fixée sur 40 g de silice et soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant le mélange Hex-AcOEt de polarité croissante (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, CH₂Cl₂-MeOH

5% et CH₂Cl₂ –MeOH 10 %). 115 fractions de 250 ml chacune ont été collectées, concentrées sous pression réduite puis regroupées sur la base de la CCM analytique en 5 grandes fractions A, B, C, D et E (Tableau XXXIV).

Tableau XXXIV : Chromatogramme de l'extrait au MeOH des feuilles de *T. annobonae*.

Eluant	Fractions recueillies	Regroupement	Remarques
Hex-AcOEt (95 :5)	1-15	1-15 (Fraction A) (1 g)	Mélange de plusieurs produits contenant TCAF ₇ qui précipite
Hex-AcOEt (90 :10)	16-31	16-31 (Fraction B) (1,5 g)	Mélange d'environ 3 produits dont TCAF ₉ qui précipite
Hex-AcOEt (85 :15)	32-47	32-75 (Fraction C) (1,5 g)	Mélange d'au moins 4 produits dont TCAF ₈
Hex-AcOEt (80 :20)	48-63		
Hex-AcOEt (75 :25)	64-79	76-96 (Fraction D) (2 g)	Mélange contenant TCAF ₁₀ qui précipite
Hex-AcOEt (70 :30)	80-95		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (95 :5)	96-106-	97-109 (Fraction E) (4 g)	Mélange de produits dont TCAF ₁₁ , TCAF ₁₂ et TCAF ₁₃
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (90 :10)	107-115	110-115	Trainée sur plaque CCM

Après filtration des fractions contenant les précipités, nous avons obtenu les produits suivants : Le stérol (TCAF₇; **132**; 10,0 mg) ; le lupeol (TCAF₉; **122**; 13,0 mg) et l'acide vanilique (TCAF₁₀; **131**; 6,7 mg).

La fraction C a été purifiée dans une colonne chromatographique avec comme éluant le mélange Hex-AcOEt de polarité croissante. Nous avons obtenu la friedelane (TCAF₈; **126**; 4,7 mg) à la polarité Hex-AcOEt (85 :15).

La fraction E a été fixée avec de la célite et purifiée dans une colonne contenant de la silice. L'élution s'est faite avec le CH₂Cl₂ suivie du mélange CH₂Cl₂-MeOH 1%, 2%, 3%, 4%, et 5%. Le 16-hydroxylupéol a été obtenu à l'élution au CH₂Cl₂ le composé (2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5,6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acetonitrile (TCAF₁₂; **137**; 7,0 mg) a été obtenu sous forme d'aiguilles brillantes dans les fractions obtenues à l'élution au CH₂Cl₂-MeOH 3%. Et le 3-O-β-D-glucopyranosyl de β-sitosterol (TCAF₁₁; **133**; 20 mg) quant à lui a été isolé dans les fractions obtenues au CH₂Cl₂-MeOH 4%.

III.3-ACTIVITES ANTIMYCOBACTERIENNE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE DE L'EXTRAIT AU METHANOL ET DE QUELQUES COMPOSES ISOLEES DES TIGES DE *T. ANNOBONAE*.

III.3.1-Matériel et méthodes

III.3.1.1-Matériel

III.3.1.1.1-Espèces microbiennes

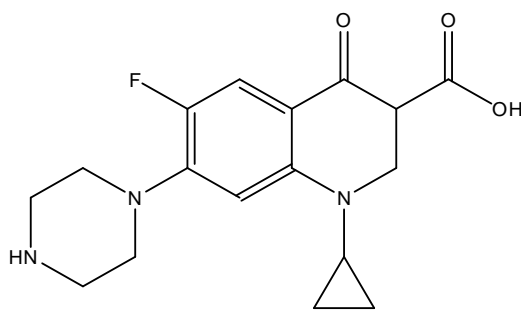
Quatorze espèces de microorganismes ont été utilisées pour cette étude. Il s'agit de : *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 700084), *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv (ATCC 27294), *Mycobacterium tuberculosis*(MTCS1), *Mycobacterium tuberculosis* (MTCS2), *Staphylococcus aureus* (B 845), *Streptococcus faecalis* (B 846), *Escherichia coli* (B 831), *Bacillus cereus* (B 864), *Citrobacter freundii* (B 828), *Pseudomonas aeruginosa* (B 832), *Salmonella typhi* (B 839), *Klebsiella pneumoniae* (B 837), *Candida albicans* (F 702) et *Microsporium audouinii* (F 712). *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv ont été obtenus de «American Type, Rockville, MD, USA Culture Collection». Les autres microorganismes testés étaient des isolats cliniques issus de l'hôpital général de Yaoundé au Cameroun. Avant leur utilisation, leur identification a été confirmée par le Laboratoire de Microbiologie appliquée et de pharmacologie moléculaire de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I.

III.3.1.1.2-Milieus de culture

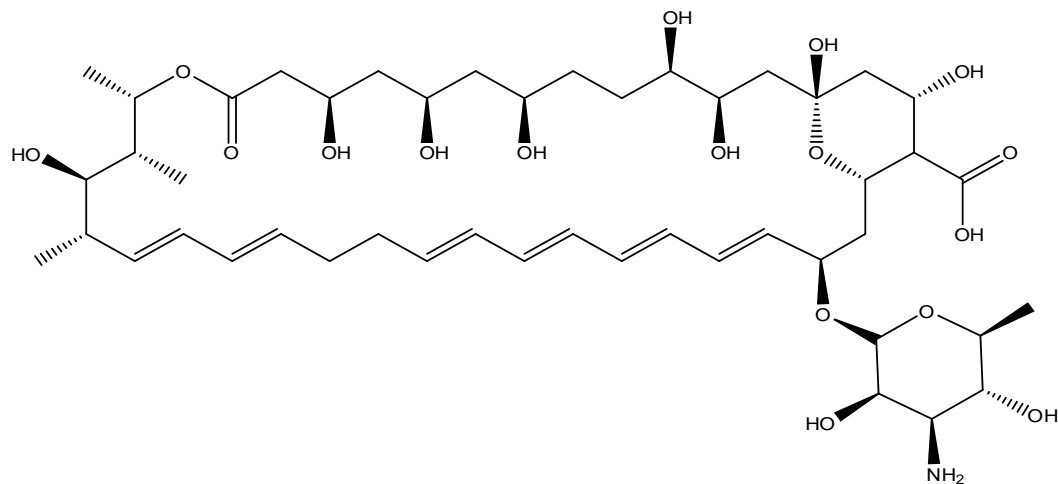
Mycobacterium smegmatis a été mis en culture sur milieu de gélose de Middlebrook 7H11 puis incubé pendant 24 h. *Mycobacterium tuberculosis* a été ensemencé sur milieu de Löwenstein-Jensen et l'incubation a été de 3 à 4 semaines à 37 ° C. Le bouillon 7H9 a été utilisé pour la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et la CMM (Concentration Minimale Microbicide) des différents échantillons contre *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium tuberculosis*. La gélose nutritive (GN) a été utilisée pour d'autres bactéries. La gélose de Sabouraud a été utilisée pour la culture des champignons. Par ailleurs le bouillon de Mueller Hinton (BMH) a été utilisé pour la détermination des CMI et CMM de tous les échantillons contre les champignons et les bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs.

III.3.1.1.3-Antibiotiques de référence

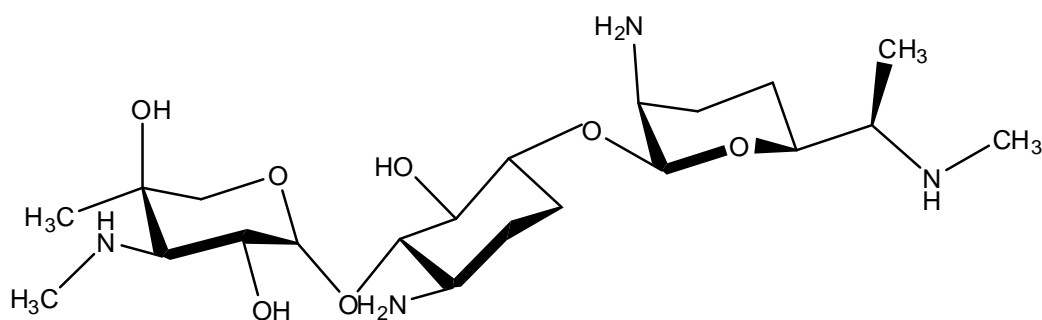
La ciprofloxacine (**138**) et l'isoniazide (**107**) (INH) (Sigma) ont été utilisées comme antibiotiques de références contre *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium.tuberculosis*, respectivement. La nystatine (Sigma) (**139**) et la gentamycine (Sigma) (**140**) ont été utilisées, comme antibiotiques de références contre les champignons et les autres bactéries respectivement.



138



139



140

III.3.1.2-Méthodes

III.3.1.2.1-Tests de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis*.

L'activité de tous les échantillons a été évalué contre les souches de *Mycobacterium tuberculosis* en utilisant la méthode de MABA (Microplate Alamar Blue Assay) [Jimenez-Arellanes et al., 2003]. Brièvement, chacune des souches de *M. tuberculosis* a été mis en culture à 37 °C dans un bouillon de Middlebrook 7H9 et supplémentée de 0,2 % de glycérol et 10 % d'acide oléique-dextrose-catalase (Sigma) jusqu'à ce que la croissance logarithmique soit atteinte. Environ 6×10^6 UFC/ml d'inoculum de *M. tuberculosis* a été ensuite ajouté aux échantillons ayant subi une dilution de raison 2. La concentration finale du DMSO dans tous les tests a été de 2,5 % ou moins et cette dilution a aussi servi de solvant de contrôle. Les

échantillons ont été testés trois fois. Tous les tests ont été réalisés sur microplaques de 96 puits stériles. Chaque microplaque a été incubée pendant 5 jours à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO₂ dans un sac en plastique scellé perméable au CO₂. Après 5 jours d'incubation, 32 µl du mélange d'une solution de « Blue alamar » fraîchement préparée et 20 % de Tween-80 (Sigma) 1 : 1 V/V ont été ajoutée dans un puits de contrôle de croissance. Les microplaques ont été encore incubées à 37⁰C pendant 24 heures. Si un changement de couleur du bleu au rose est observé dans l'échantillon de contrôle de croissance alors, 32 µl de solution « Blue alamar » est ajoutée dans chacun des puits restants et la microplaque reste encore incubée pendant 24 heures. L'observation de la couleur rose dans un puits a été interprétée comme une croissance bactérienne positive alors que l'observation de la couleur bleue a été interprétée comme une absence de croissance. La CMI correspond à la concentration minimale de l'échantillon la plus diluée dans lequel le changement de couleur du bleu au rose n'est pas observé.

Les échantillons avec des valeurs de CMI obtenues suivant la méthode de MABA ont été testés pour leur effet mycobactéricide [Jimenez-Arellanes et al., 2003]. Brièvement 5 µl de suspension mycobactérienne non développée ont été transférée du précédent à une nouvelle microplaque contenant 195 µl de milieu de culture fraîche par puits. Trois puits ont été inoculés avec 100 µl d'inoculum fraîche comme dans la méthode de MABA et trois autres ont été incubés avec 200 µl de milieu de culture uniquement comme contrôle négatif. Les microplaques ont été incubées et développées avec « blue alamar » comme pour MABA. La CMM correspond à la concentration minimale de l'échantillon qui ne cause pas un changement de couleur dans les cultures re-incubées dans un milieu frais.

III.3.1.2.2-Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales microbicides (CMM) des bactéries Gram-positifs, des bactéries Gram-négatifs et des champignons.

La détermination des CMI des bactéries Gram-positifs (*Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*) des bactéries Gram-négatifs (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter freundii*) et des champignons (*Candida albicans* et *Microsporum audouinii*) a été menée utilisant la méthode colorimétrique rapide (XXT) selon [Petit et al., 2005 ; Eloff ,1998]. L'échantillon à tester et l'antibiotique de référence (AR) ont été premièrement dissous dans le DMSO/MHB ou le bouillon de DMSO/7H9. La concentration finale de DMSO a été inférieure à 2,5 % et n'a pas affecté la croissance microbienne. La solution obtenue a été ensuite ajoutée au

bouillon 7H9 (pour *Mycobacterium smegmatis*) ou au bouillon de Mueller Hinton (pour les autres organismes), et a subi une dilution de raison 2 (dans une microplaque à 96 puits). Un volume de 100 µl d'inoculum $1,5 \times 10^6$ UFC/ml préparé dans un bouillon approprié a été ensuite ajouté dans les puits. Les plaques ont été couvertes avec un couvercle stérile, agitées pour mélanger le contenu des puits (utilisant un agitateur) puis incubées à une température de 30°C pendant 24 heures (pour *Microsporium audouinii*) et une température de 37°C pendant 18 heures (pour les autres microorganismes). Les expériences ont été répétées trois fois. Les puits contenant le bouillon adéquat de 100 µl d'inoculum et le DMSO de concentration finale 2,5% ont servi de témoin négatif.

Les CMI des échantillons ont été détectées après 18 heures d'incubation à une température de 37°C en ajoutant 40 µl de 0,2 mg/l de P-iodonitrotetrazolium (INT) et incubées à 37°C pendant 30 minutes. La croissance bactérienne qui fait virer la couleur jaune au rose a été déterminée visuellement. La CMI a été définie comme étant la plus faible concentration d'échantillon qui empêche ce changement de couleur. La CMM a été déterminée en prélevant un volume de 50 µl du contenu des puits de chaque échantillon correspondant aux concentrations supérieures ou égales à la CMI, qui a été ajoutée à 150 µl du bouillon adéquat. Ces préparations ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. La CMM a été considérée comme la plus faible concentration de l'extrait ne produisant aucun changement de couleur après addition de l'INT comme mentionné ci-dessus.

III.3.1.2.3-Effets de l'extrait au MeOH et de l'acide aristolochique I sur le pompage du proton H⁺-ATPase médiaté.

Les activités du pompage du proton H⁺ d'*Escherichia coli* ont été déterminées en suivant l'acidification du milieu externe induit par le glucose en mesurant le pH avec une électrode [Manavathu et al., 2001]. Brièvement, 50 ml de culture d'*Escherichia coli* ont été mis en croissance dans le bouillon de Mueller Hinton (to late log phase) (absorbance de 5 à 590 nm de longueur d'onde). Les cultures résultantes ont été centrifugées à 3500 g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire obtenu a été lavé une fois avec de l'eau distillée, puis une fois avec 50 mM de KCl et re-suspendu dans 50 ml de KCl 50 mM. Les cellules de la suspension ont été incubées à 4°C pendant (18 heures) pour starvation du glucose, puis centrifugées et diluées à une absorbance de 8 (à 590 nm) dans un volume de 1,8 ml du milieu réactionnel (une cuve de spectrophotomètre de 3 ml) contenant KCl 150 mM. L'extrait au méthanol de *T. annobonae* et le composé I (acide aristolochique I) (aux CMI et 1/10 de CMI), et le tout ajusté à un pH de 6,4. Après 10 minutes de pré-incubation à 37°C, le milieu d'acidification a été

initié après addition de 20 % de glucose (0,2 ml). Le PH a été mesuré après toutes les 10 minutes pendant 1 heure en utilisant une électrode. au DMSO 2,5 de % a été utilisé à la place de l'acide aristolochique I comme contrôle.

III.4-Activités antimicrobienne et phytotoxique de quelques composés isolés des feuilles de *T. annobonae*

III.4.1-Activités antibactérienne et antifongique de quelques composés isolés des feuilles de *T. annobonae*

III.4.1.1- Espèces microbiennes

Neuf espèces de microorganismes ont été utilisés pour cette étude ; Il s'agit de: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Mucor miehei*, *Candida albicans*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus subspicatus*.

III.4.1.2- Méthodes et milieux de culture

L'activité de tous les échantillons a été évaluée contre les souches microbiennes en utilisant la méthode de diffusion sur gélose [Poumale et al., 2006]. La gélose de peptone a été utilisée pour *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* ; Le bouillon nutritif de Bacto a été utilisé pour *Staphylococcus aureus* ; La gélose de M Test pour *Streptomyces viridochromogenes* et la gélose de Sabouraud pour les champignons (*Mucor miehei*, *Candida albicans*) et les trois microalgues sur *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus subspicatus*. Les composés ont été dissous dans un mélange azéotropique de chloroforme / méthanol (87 : 13). Les disques de papier de 8 mm de diamètre ont été imprégnés de 30µg/ml de chaque composé en utilisant une seringue de 100 µl puis séchés pendant une heure sous conditions stériles et placés sur les plats de gélose d'essai préalablement préparés. Les plats contenant les bactéries et les champignons ont été incubés à 37°C pendant 12 heures, ceux contenant les microalgues ont été incubés pendant trois jours à température ambiante sous la lumière du jour. Le diamètre des zones d'inhibition ont été mesurés.

La nystatine (**139**) a été utilisée comme antibiotique de référence et le test a été répété trois fois.

III.4.2-Activité phytotoxique de quelques composés isolés des feuilles de *T. annobonae*

Neuf graines de salade (*Lactuca sativa L.*) ont été utilisées pour l'expérience. Les graines ont été déposées sur papier filtre préalablement trempé dans une solution de concentration bien connue contenant le composé à tester (dans la boîte de pétri de 4 cm) ; 1 ml d'eau distillée contenant 100 ppm (w /v) de Tween-80 a été ajoutée dans la boîte de pétri. La boîte de pétri a été incubée à 25°C pendant 7 jours sous lumière continue. Les expériences de contrôle ont été effectuées dans de l'eau distillée uniquement. La mesure de la longueur des racines et des « shoots » a été comparée à celle de l'expérience de contrôle.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Monem A., Kadiya S. E., Rwaida A. A., and Jaber S. M., *Phytochemical and pharmacological studies of Maytenus forsskaoliana*, Saudi Pharmaceutical Journal, 11(4), 184-191, (2003).
- Abdullahi S. M., Musa A. M., Abdullahi M. L., Sule M. I., and Sani Y. M., *Isolation of Lupeol from the stem bark of Lonchocarpus sericeus (Papilionaceae)*, Scholars Academic Journal of Biosciences, 1(1), 18-19, (2013).
- Ageta H., Arai Y., *Chemotaxonomie of ferns.3.triterpenoids from Polypodium polypodioide*, Journal of Natural Products, 53, 325-332, (1990).
- Ageta H., Arai Y., *Fern constituents: Pentacyclic triterpenoids isolated from polypodium niponicum and polypodium fermasomun*, Phytochemistry, 22, 1801-1808, (1983).
- Agrawal P. K., *NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligo saccharides and glycosides*, Phytochemistry, 31, 3307-3330, (1992).
- Ahmad S. A., Kapoor S. K., Zaman A., *Euphorbiaceae: Bergeninin Fluegge amicrocarpa*, Phytochemistry, 11, 452-453, (1972).
- Alakurti S., Makela T., Koskimies S., Yli-Kauhahuoma J., *Pharmacological properties of the ubiquitous natural products betulin*, European Journal of pharmacological sciences, 29, 1-13, (2006).
- Amade P., Mallea M., Bouaicha N., *Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by penicillium olsonii bainier and sartory*; Journal Antibiot, 47, 201-207, (1994).
- Ambassa P., *Composés phénoliques de Dorstenia elliptica bureau et Dorstenia barteri bureau var Multiradiata. Synthèse totale et activité anticancereuse des chalcones*, Thèse de Doctorat/PHD en Chimie Organique, Université de Yaoundé 1, Cameroun, 4-5, (2007).
- Aquino R., De Simone F., Pizza C., Conti C., Stein M. L., *Plant metabolites. Structure and in vitro antiviral activity of quinolic acid glycosides from Uncariatomentosa and Guettarda*, Journal of Natural. Product, 52, 679-685, (1989).
- Arlt V. M., Stiborova M., Schmeiser H. H., *Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review*.Mutagenesis, 17, 265-277, (2002).
- Aubry P., *Tuberculose et Sida, tuberculose multi-résistante*, Diplome de medecine Tropicale des pays de l'Océan Indien, 2-3, (actualités 2013), mise à jour le 15/12/2013.
- Awanchi S.S., VanDufat H.T., Shiri J.C., Dongfack M. D. J., Nguenang G. M., Bouteefnouchet S., Fomun Z. T., Seguin, E., Verite P., Tillequin F., Wandji J.,

- Triterpenoids with antimicrobial activity from Drypetes inaequalis*, *Phytochemistry*, 70, 419-423, (2009).
- Bass W. J., *Natural occurring seco-ring A-triterpenoids and their possible biological significance*, *Phytochemistry*, 24, 1875-1889, (1985).
- Boiteau P., Pasich B., Ratsimamanga A. R., *Les triterpenoides en physiologie végétale et animale*, Gauthier-Villas, 55 quai des grands Augustins, Paris, 469-470, (1964).
- Boiteau P., Ratsimamanga A. R., *Effects of asiaticoside on germination and growth of plants*, *C. R. Soc. Biol.*, 152, 1106-1107, (1958).
- Borges-Argaez R., Canche-Chaya C. I., Pena-Rodrigueza L. M., Said-Fernandez S., Molina-Slinas G. M., *Antimicrobial activity of Diospyros anisandra*, *Fitoterapia*, 78, 370-372, (2007).
- Borris P. R., Cordell A. G., Farnsworth R. N., *Isofraxidin, a cytotoxic coumarin from Micranda eleta* (Ephorbiaceae), *Journal of Natural Product*, 43, 641-643, (1980).
- Brooks W. A., Hossain A., Goswami D., Nahar K., Alam K., Ahmed N., Naheed A., Nair G. B., Luby S., Breiman R. F., *Bacteremic typhoid fever in children in an urban slum*, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*, 78, 370-372, (2007).
- Bruneton J., *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*, 2^{ème} édition technique et documentation, Lavoisier, 792, 266-285, (1993).
- Cardose C. L. A., Villegas W., Barison A., Honda N. K., *Simultaneous determination of furanocoumarins in infusion and decoction from Carapia (Dorsteniaspecies) by high performance liquid chromatography*, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 1465-1470, (2002).
- Cheek M., *Thecacoris annobonae*. *IUCN red list of threatened species*. (modifié le 13 avril 2008), disponible sur <http://WWW.juenredlist.org/apps/redlist/details/45457/0>. Consulté le 15 février 2009.
- Chem C-H., Huang C. F., Lee S. S., Chen L., Karin C. S., *Chemical constituents from Drypetes hieranensis*, *Chinese Pharmaceutical Journal (Taipei)*, 51(1), 75-85, (1999).
- chemotherapy*. In: Mims, et al. (Eds.), *Medical Microbiology Review*: 35, 34-35, (1993)
- Chen Q., Steinhaur L., Hammerlindl J., Keller W., Zou J., *Biosynthesis of phytosterolesters: Identification of a sterol O-acyltransferase in Arabidopsis 1[OA]*, *Plant Physiology*, 45, 974-984, (2007).
- Cheng W., Chen H., Zhang Y., GAO S., Tao Y., and GU K., *Study on chemical constituents in Rosmarinus officinalis*, *Zhongcaoyao*, 36, 1622-1624, (2005).

- Cheng X. F., and Chen Z. L., *Coumarino-lignoids of Mallotus apelta*, *Fitoterapia*, 71, 341-342, (2000).
- Cheung H. T., Williamson D. G., *N.M.R. Signals of methyl groups of triterpenes with oxygen fonctions at position 2, 3, and 23*, *Tetrahedron* 25, 119-128, (1969).
- Chiozem D. D., Trinh-Van-Dufat H., Wansi J. D., Djama C. M., Fannang V. S., Seguin E., Tillequin F., and Wandji J., *New Friedelane Triterpenoids with Antimicrobial activity from the stems of Drypetes paxii*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 57 (10), 1119-1122, (2009).
- Cichewicz R. H., Kouzi A. S., *Chemistry, biological activity and chemotherapeutic potential of Betulinic Acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection*, *Medicinal Research Reviews*, 24, 90-114, (2004).
- Connolly J. M., Hill R. A., *Method in plant biochemistry*, Academic Press Limited, 7, 331-359, (1991)
- Cosyns J. P., *Aristolochic acid and Chinese herbs nephropathy: a review of the evidence to date*, *Drug Safety*, 26, 33-48, (2003).
- Cowan M. M., *Plant products as antimicrobial agents* *Clinical Microbiology Review*, 12, 564-582, (1999).
- Crump J. A., Luby S. P., Mintz E. D., *The global burden of typhoid fever*, *Bulletin of the World Health Organization*, 82, 346-353, (2004).
- Darbour N., Bayet C., Bercion S. R., Elkhomsy Z., Lurel F., Chaboud A., Guilet D., *Isoflavones from Ficus nymphaeifolia*, *Natural Product Research*, 21, 461-464, (2007)
- De Castro Ferreira Gomes D., Alegrio L. V., *Acyl steryl glycosides from Pithecellobium cauliflorum*, *Phytochemistry*, 49, 1365-1367, (1998).
- Delaquis P., Stanich K., Toivonen P., *Effect of pH on the inhibition of Listeria spp. By vanillin and vanillic acid*, *Journal of Food Protection*, 68, 1472-1476, (2005).
- Doddred D. M., Khong P. W., Lewis K. G., *The structure dependence of ¹³C chemical shifts in olean-12-ènes and urs-12-ènes as an aid to structural assignment*, *Tetrahedron Lett.* 27, 2381-2384, (1974).
- Dongfack M. D. J., Van-Dufat H. T., Lallemand M-C., Wansi J-D., Seguin E., Tillequin F., and Wandji J., *New Triterpenoids from the stem barks of Drypetes tessmanniana*. *Chemical. Pharmaceutical, Bulletin*, 56(9), 1321-1323, (2008).
- Duh C. Y., Pezzuto J. M., Kingorn A. D., Lung S. L., and Farsworth N. R., *Plant anticancer agents XLIV, Cytotoxic constituents from Stizophyllum niparium*, *Journal of Natural Product*, 50, 63-74, (1987)

- Eisa M., Almagboul A., Omer M., and Elegami A., *Antibacterial activity of Dichroostachys cinerea*, *Fitoterapia*, 71, 324-327, (2000).
- Ellof J. N., *A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria*, *Planta Medica*, 64, 711-713, (1998).
- Faujan N. H., Alitheen N. B., Yeap S. K., Ali A. M., Muhajir A. H. and Ahmad F. B. H., *Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from Melaleuca cajuput on human myeloid leukemia (HL-60) cell line*, *African Journal.Biotech.*, 9, 6387-6396, (2010)
- Flahaut A., Zylberman P., *Des épidémies et des hommes*, Edition la Martinière, p.4, (2008).
- Fotie J., Bohle D. S., Leimanis M. L., Georges E., Rukunga G., Nkengfack A. E., *Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from Holarrhena floribunda*, *Journal of Natural Products*, 69, 62-67, (2006).
- Furuya T., Yutaka D., Hayashi C., *Triterpenoids from Eucalyptus perriniana culture cells*, *Phytochemistry*, 26, 715-719, (1987).
- Giang M P., Son P. T., Matsunami K., and Otsuka H., *New megastigmane glucosides from Excoecaria cochinchinensis Lour. Var. cochinchinensis*, *Chemical & pharmaceutical Bulletin*, 53, 1600-1603, (2005).
- Gibbons S., *Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents*, *Phytochemistry Reviews*, 4, 63-78, (2005).
- Gillet B., Bleneau S., Beloeil J. C., *Acide gras*, *Analysis Magazine*, EDP Sciences, Wiley-VCH, 26, 26-33, (1998).
- Gonzalez A. G., Barrere J. B., Arancibia L. L., Dias J. G., Perez de Paz P., *Two phenylpropanoids from Todaroa aurea subsp. Suaveolens*, *Phytochemistry*, 30, 4189-4190, (1991).
- Gonzalez-coloma A., Lopez-Balboa C., Santana O., Reina M., Fraga B. M., *Triterpene-based plant defenses*, *Phytochem Rev*, (2010).
- Gottlieb O. R., *in new natural product and plant drugs with pharmacological biological or therapeutical activity*, Ed. H. Vagner, Wolff, Spinge, Heidelberg, 227-230, (1977).
- Gunasekera S. P., Cordell G. A., Farnsworth N.R., *Constituents of Puhecellobium nutriflorum*, *Journal of Natural product*, 45, 651, (1982).
- Gunther H., *La spectroscopie de RMN*, Masson, Paris, 10-18, (1994)
- Hanson J. R., *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*, Ed. Newman, A. A., Academic Press, London and New York, 1-9. (1972).

- Hermann *Eléments de microbiologie*, Editeur des sciences et des arts, Paris, 4-15, (1985).
- Hohmann J., Gunther G., Vasas A., Kalman A., and Argay G., *Isolation and structure revision of pepluane diterpenoids from Euphorbia pelpus*, Journal of Natural Product, 62, 107-109, (1999).
- Horacio A. Priestap., ¹³CNMR spectroscopy of aristolochic acid and aristololactams, Magnetic Res.Chem., 27, 460-469, (1989).
- [http:// en .wikipedia.org/wiki/Thecacoris annobonae](http://en.wikipedia.org/wiki/Thecacoris_annobonae) Consulté le 15 février 2012.
- Hua Z., Zhi-Xin L., Jian-Min Y., *Cyano- and Nitro-containing compounds from the roots of Semiaquilegia adoxoides*, Chin.J.Chem. 22, 1200-1203, (2004).
- Hui and Li. *Triterpenoids from two Mallotus species: A nor-triterpene and two new acids*. Phytochemistry, 15, 985-986, (1976).
- Ikan. R., *Natural products*, Academic Press, London and New York, 1969, 137.
- Irvine F. R., *Woody plants of Ghana*, London, 222-227, (1961).
- Itokawa H., Ichihara Y., Watanabe k., and Takeya K., *An antitumor principle from Euphorbia lathyris*, Planta Medica., 55, 271-274, (1989).
- Jimenez-Arellanes A., Meckes M., Ramez R., Torres J., Luna-Herrera J., *Activity against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Mexican plants used to treat respiratory diseases*, Phytotherapy Research, 17, 903-908, (2003).
- Junichi S., Takahisa N., Naoe O., Akihito T., Kazuo M., *composite constituent: Lactucenyl Acetate, a novel migrated lupane triterpenoid from Lactuca indica Revision of structure of tarolupenyl acetate*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 59, 767-769, (2011).
- Jyoti M. K., Kulshreshtha D. K., Rastogi R. P., *The triterpenoids*, Phytochemistry, 11, 2369-2381, (1972).
- Kamdem R. S. T., Wafo P., Yousouf S., Ali Z., Adhicari A., Racheed S., Khan I. A., Ngadjui B. T., Fun H-K., Choudhary M. I., *Canarene: A triterpenoid with a unique carbon skeleton from Canarium chweinfurthii*, Organic Letters, 13, 5492-5495, (2001).
- Kapetanovic R., Sladic D., Popov S., Zlatovic M., Kljajic Z., Gasic M. J., *Stérol composition of the Adriatic sea algae ulvalactuca, coddiumichotomum, cystoseira adriatica and Fucus virsoides*, Journal Serbian chemical Society, 70, 1395-1400, (2005).
- Kessler J. H., Mullauer F. B., De Roo G. M. and Medema J. P., *Broad in vitro efficacy of plant-derived betunilic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types*, Cancer Lett., 251, 132-145, (2007).

- Keumedjo F., *Contribution à l'étude chimique des plantes médicinales du cameroun: Recinodendron heudolotii (Euphorbiaceae)*, Doctorat de Troisième cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé Cameroun, 3-7, (1990).
- Kloos H., McIlough F. S., *Plant molluscicides*, *Planta Medica.*, 1982, 46, 195-209.
- Kobayashi H., *A proton –translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm*, *Journal of Biological Chemistry*, 260, 72-76, (1985).
- Konichi T., Konochima T., Fujiwara Y., and Kiyosawa S., *Excoecarins D, E, and F, from Excoecaria agallocha*, *Journal of Natural Product*, 63, 344-346, (2000).
- Kuete V., Dongfack M. D. F., and Wandji, J., *Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from the stem bark of Drypetes tessmanniana*, *Chin. J. Integr. Med*, Aug 16(4), 337-343, (2010).
- Kuete V., Nana F., Ngameni B., Mbaveng A. T., Keumedjio F., Ngadjui B. T., *Antimicrobial activity of the crude extract , fractions and compounds from stem bark of Ficus ovate (Maraceae)*, *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 556-561, (2009).
- Kuete V., Nguemeving J. R., Beng V .P., Azezbaze A. G. B., Etoa F. X., Meyer M., Bodo B., Nkengfack A. E., *Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from Vismia laurentii De Wild (Guttiferae)*, *Journal of Ethnopharmacology*, 109,372-379, (2007).
- Kuo Y. H., Chiang Y. M., *Six new ursane and oleanane type triterpenes from the aerials roots of Ficu microcarpa*.*Chemical and pharmaceutical Bulletin*, 48, 593-596, (2000)
- Laatsch H., *Natural products antibase*, *Chemical concepts*, Weinhein, (2006).
- Lagnika L., *Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises*, Docteur en pharmacognosie, Université Louis pasteur Strasbourg, 60-76, (2005).
- Lee I-A., Eun-Jin K., Dong-Hyun K., *Inhibitory effect of β -sitosterol on TNBS-Induced colitis in mice*, *Planta Medica*, 78, 896-898. (2012).
- Lee J. M., Lee D. G., Lee K. H., Cho S. H., Nam K-W., and Lee S., *Isolation and identification of phytochemical constituents from fruits of Acanthopanax senticosus*, *African Journal of Pharmacology*, 7(6), 294-301, (2013).
- Li X. G., Huang M. R., *Structure of thermotropic copolymers from p-acetoxy benzoic acid, poly(ethylene terephthalate) and six third monomers*, *Polymer Testing*, 19, 373-383, (2000).

- Liu W. C., Kugelan M., Wiklson R. A., Rao K. V., *A crystalline saponin with anti-tumor activity from Entada phaseoloides*, *Phytochemistry*, 11, 171-173, (1972).
- Liu Y., Veena C. K., Morgan J. B., Mohammed K. A., Jekabsons M. B., Nagle D. G., and Zhou Yu-Dong, *methylalpinumisoflavone inhibits Hypoxia-inducible Factor-1(HIF-1) activation by simultaneously targeting multiple pathways*. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 5859-5868, (2009).
- Mabry T. J., Markhan K. R., Thomas M. B., *The systematic identification of flavonoids*. ed. Springer-Verlag, New-York, 41-64,(1970).
- Madigan M., Martinko J., *Brock biology of microorganisms*; 11th ed., Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 5, (2006).
- Mahato S. B., and Kundu P. A., ¹³C NMR spectra of pentacyclitriterpenoids compilation and some patient features, *Phytochemistry*, 37, 1517-1575, (1994).
- Mahato S. B., Nandy A. K., Gita R., *Triterpenoids*, *Phytochemistry*, 31, 2199-2249, (1992).
- Manavathu E. K., Dimmock J. R., Sarvesh C. V., Chandrasekar P. H., *Inhibition of H⁺-ATPase-mediated proton pumping in Cryptococcus neoformans by a novel conjugated styryl ketone*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47,491-494, (2001).
- Mayer A., *Cancer: L'acide aristolochique plus cancérigène que le tabac* (modifié le 09/08/2013 à 15 heures), disponible sur WWW. Top santé.com/medecine/cancers/cancer/prevenir/cancer-I-acide-aristolochique-plus-cancerigene-que-le-tabac-42415, consulté le 01septembre 2014.
- Mbaveng A. T., Ngameni B., Kuete V., Konga Simo I., Ambassa P., Roy R., Bezabih M., Etoa F. X., Ngadjui B. T ., Abegaz B. M., Meyer J. J. M., Lall N., Penlap B. V., *Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of Dorstenia barteri(Moraceae)*, *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 483-489, (2008).
- McGaw L. J., Lall N., Meyer J.J .M., Eloff J. N., *The potential of South African plants against mycobacterium infectious*, *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 482-500, (2008).
- Mei-Tsu L., Lih-Chun C., Chien-Kuang C., Karin L., Chen C. S., and Shoei-sheng L., *Chemical constituents from Drypetes littoralis*, *Journal of Natural products*, 64(6), 707-709, (2001).
- Merfort I., Buddrus J., Nawwan M. A. M., Lambert J., *A Triterpene from the bark of Tamarix aphylla*, *Phytochemistry*, 31, 4031-4032, (1992).
- Mims C. A., Playfair J. H. L., Roitt I. M., Wakelin D., Williams R., *Antimicrobial agents and*

- Mizuno M., Oka M., Iinuma M., Tanaka T., *An aristolochic acid and derivative of Aristolochia liukiuensis*, Journal of Natural Product, 53, 179-181, (1990).
- Moss. G. P., *Nomenclature of lignans and neolignans*, pure and applied chemistry, 72, 1493-1523, (2000).
- Mve-Mba C., Bessiere M. C., Lamaty J. M., Ekekang G., Denamganai L. N., *Aromatic plants of tropical Central Africa. X X I X. Benzyl isothiocyanate as major constituent of bark essential oil of Drypetes gossweilleris Moore*, Journal of Essential oil Research, J. 9(3), 367-370, (1997).
- Nawito M., Ahmed F., Shalaby I., Zayed M. A. D., Hecker E., *Dietary cancer risk from conditional cancerogens(tumor promoters) in produce of livestock fed on species of spurge(Euphorbiaceae).Toxicologic and pathophysiologic observations in lactating goats and their suckling kids fed on the irritant herbs Euphorbia nubica and Euphorbia helioscopia:An etiologic model for investigations on the putative risk of cancer by consumption of food polluted with tumor promoters.*J.Cancer Res clin On col, 127, 34-39, (2001)
- Nenkep V. N., Shiri J. C., Van-Dufat H. T., Sipepnou F., Verite P., Seguin E., Tillequin F., and Wandji J., *New flavan and unusual chalcone glycosides from Drypetes parvifolia*, Chinese Chem.Lett., 19, 943-946, (2008).
- Ng'ang'a M. M., Chhabra S., Langat-Thoruwa C., Hussain H., Krohn K., *Chemical constituents from leaves of Drypetes gerrardii*, Biochemical Systematics and Ecology, 36, 320-322, (2008).
- Ngadjui B. T., Abegaz B. M., *Studies in natural products chemistry, bioactive natural products in: Atta-Ur-Rahman*(Ed), Part I, vol.29, Oxford, .761-805, (2003).
- Ngadjui B. T., Poumale H. M. P.,Guedem A. N., Merhatibeb, B. and Abegaz B. M., *Ent-Kaurene and Ent Beyerene diterpenoides and others constituents of thecacoris batesii*, Bull.Chem.Soc.Ethiop., 21(1), 1-6, (2007).
- Ngouela S., NOUNGUE D. T., Ngoupayo J., Tsamo E., Connolly J. D., Gossweilone. *A New podocarpane derivative from the stem bark of drypetes gossweileri (Euphorbiaceae)*, Bulletin Chemistry Society of Ethiopia, 17(2), 181-184, (2003).
- Ngoupayo J., *Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales : Drypetes gossweileri (Euphorbiaceae) et Parkiafilicoidea (Mimosaceae)*. Doctorat de 3^e cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé, Cameroun, 10, (2003).
- Nielsen K., Heitman J., *Sex and virulence of human pathogenic fungi*. Advanced Genetics, 57, 143-173, (2007).

- Ogunkoya L., *Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes*.
Phytochemistry, 20, 121-126, (1981).
- OMS *Microbes et antimicrobiens*, Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, 88,
797-876, (2010).
- Padan E., Zilberstein D., Schuldiner S., *pH homeostasis in bacteria*. *Biochimica et
Biophysica Acta*, Reviews on Biomembranes, 650, 151-166, (1981).
- Pauli G. F., Case R. J., Inui T., Wang Y., Cho S., Fischer N. H., Franzblau S. G., *New
perspectives on natural products in TB drug research*, Life Sciences, 78, 485-
494, (2005).
- Paulino N., Teixeira C., Martins R., Scremin A., Dirsch V. M., Vollmar A. M., Abreu S.
R. L., Decastro S. L., and Marcucci M. C., *Evaluation of the analgesic and anti-
inflammatory effects of a Brazilian green propolis*, Planta Medica, 2006, 72,
899-606.
- Payne G. F., Bringi V., Pince C., Shuler M. L., *Plant cell and tissues culture in liquid
system*, Munch, 3, (1992).
- Petit R. K., Weber C. A., Kean M. J., Hoffmann H., Petit G. R., Tan R., Franks K. S.,
Horton M. L., *Microplate alamar blue assay for Staphylococcus epidermidis
biofilm susceptibility testing*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49,
2612-2617, (2005).
- Poon W. T., Lai C. K., Yan-WoChan A., *Aristolochic acid nephropathy; the Hong Kong
perspective*, Hong Kong Journal of Nephrology, 1, 7-14, (2007).
- Poumale H. M. P., *Secondary metabolites from bacteria and two plants: Thécacoris batesii
(Euphorbiaceae) and Fagaratessmannii (Rutaceae). Some Biological tests and
chemical transformation of some isolated compounds*. Doctorat/ PhD en chimie
organique, Université de Yaoundé, Cameroun, 9-39, (2007).
- Ramirez-Ronda C.H., Fuxench-Chiesa Z. Z., *Modification of bacterial adherence by
antibiotics*. In: *New dimensions in antimicrobial therapy*, edited by Root, R.K and
Sande, M.A., Churchill Livingstone, New-york, 203-241, (1984).
- Rates S. M., *Plants as source of drugs*, Toxicon, 39, 603-613, (2001).
- Robert H. C., and Samir A. K., *Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic
potential of Betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV
infection*. Medicinal Research Review, 24 (1), 90-114, (2004).
- Roitman J. N., and Jurd L., *Triterpenoid and phenolic constituents of colubrina granulose*,
Phytochemistry, 17, 491-494, (1978).

- Saha M. R., Debnath P. C., Rahman Md A., Islam Md A.UL, Evaluation of in vitro anthelmintic activities of leaf and stem extracts of *Justicia gendarussa*, Bangladesh Journal of Pharmacology, 7, 50-53, (2012).
- Saha S., Subrahmanyam E. V. S., Kodangala C., Shastry S. C., *Isolation and characterization of triterpenoids and fatty acid ester of triterpenoid from leaves of Bauhinia variegata*, Der Pharma Chemica, 3 (4), 28-37, (2011).
- Saleem M., Kweon M. H., *Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Rassignaling pathway*, Carcinogenesis, 26, 1956-1964, (2005).
- Sandjo L. P., *Sphingolipides, Triterpnoides et autres métabolites secondaires des variétés sauvage et cultivée de l'espèce Triumfetta A. Rich. (Tiliaceae) : Transformations chimiques et évaluation biologique de quelques composés*, Doctorat/PhD en Chimie Organique, Université de Yaoundé 1, Cameroun, 31, (2000).
- Sengupta P., Chakraborty A. K., Duffied A. M., Durham L. J., Djerassi C., *chemical investigation on putranjiva roxburghii, The structure of a new triterpene, Putranjivadione*. Tetrahedron, 24(3), 1205-1213, (1968).
- Sengupta P., Ghosh S. K., Das S., *Chemistry of the constituents of putranjiva roxburghii*, Journal of the Indian chemical Society, 74 (11-12), 827-830, (1997).
- Shamma M., Shine R. J., Budock B. S., *ThalictrumAlcaloids-IV, Three new alkaloids from T. fendleri: Thalidezine, Thaliporphine and Preocoteine*, Tétrahedron, 23, 2887-2888, (1971).
- Shaw G., Yeadon A., *Isolation of lupeol from the common spangle gall of oak*, Journal of Chemical Society, 38, 3276, (1962).
- Shiping F., Chuyan H., Zhiquiang L., Fenguri S., shuying L., *Application of Electrospray ionisation mass spectrometry combined with sequential tandem mass spectrometry technique for the profiling of steroidal Saponin mixture extracted from Tritubulus ferrestris*, Planta Medica, 65, 68-73, (1999).
- Simiyu K., (En ligne) *Les innovations appuyées par le canada contribuent à la lutte contre la tuberculose dans les pays à revenu faible ou intermédiaire*, Grands Défis Canada, 24 mars 2014.
- Simo F. C. C., *Isolement, caractérisation et évaluation des activités hépatoprotectrices, antioxydantes et antimicrobiennes des métabolites secondaires de Ficus chlamydocarpa mildbreadburet et Ficus benjamina LiNN (Moraceae)*, Doctorat/PHD en Chimie Organique, Université de Yaoundé 1, Cameroun, 12-20, (2011).

- Singh G. B., Singh S., Bani S., Gupta B. D., Banerjee S. K., *Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice*, Journal of pharmacy and pharmacology, 44, 456-458, (1992).
- Sipahimalani A., H. Noerr H. Wagner. *Phenylpropanoid glycosides and tetrahydrofurofuranlignanglycosides from the adaptogenic plant drugs Tinospora cordifolia and Drypetes roxburghii*, Planta Medica. 60 (6), 596-597, (1994).
- Solacolu F., *Saponins as a source of nourishment for plants*, C. R. Soc.Biol. , 74, 304-306, (1913).
- Sousa G. F., Duarte L. P., Alcantara A. F. C., Silva R. R., Oliveira D. M., and Takahashi J. A., *New Triterpenes from Maytenus robusta: Structural Elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations*, Molecules, 17, 13439-13456, (2012).
- Stuart K. L., Byfield D. Y., *Euphorbiaceae: Alkaloids from Croton humilis*. Phytochemistry, 10, 460-462, (1971).
- Subramanian S. S., and Nagarajan S., *Euphorbiaceae Flavonoids of some Euphorbiaceous plants*, Phytochemistry, 10, 2548-2549, (1971).
- Sundararajan P., Dey A., Smith A., Doss A. G., Rajappan M., and Natarajan S., *Studies of anticancer and antipyretic activity of Bideus pilosa whole plant*, African Health Sciences, 6(1), 27-30, 2006.
- Taponjou L. A., *Etude phytochimique de deux plantes médicinales du Camreoun : Myrianthus liberecus et Cecropia peltada(Cécropiacées) et synthèse de quelques dérivés triterpéniques*, Thèse de Doctorat de 3^{ième} cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé 1, 25-26, (1996).
- Thisleton-Dyer W. T., *Flora of Tropical Africa*, Vol .IV. Section 1. London, 658-660, (1913).
- Tian Z., LIU, Y-M., Chen, S-B., Yang, J.S., Xiao, P-G., Wang, and Wu, E., *Citotoxicity of two triterpenoids from Nigella glandulifera*. Molecules, 11, 693-699, (2006).
- Tijjani A., Ndukwe I. G., and Ayo R.G., *Isolation and characterization of Lup-20(29)-ene-3, 28-diol (Betulin) from the stem-bark of Adenium obesum, (Apocynaceae)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 11(2), 259-262, (2012).
- Tiwatt K., Rutt S., Thitima P., Nijisiri R., *Chemical structure and antiviral activity of aerial part from Laggera pterodonta*, Journal of Health Research, 23, 175-177, (2009).
- Van H. J., *Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan*, Glycobiology, 11, 25 R-36 R, (2001).
- Vardamides J. C., Dongmo A. B., Meyer M., Ndom J. C., A. G. B., Zounda M. R. S., Sielinou V. T., Ndemangou B., Nkengfack A .E., Ngando T .M., and Fomun Z. T., *Alkaloids*

- from the stem bark of *Turraeanthus africanus* (Meliaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, 54(7), 1034-4036, (2006).
- Verma G., Hishikar T., *Purgative and anthelmintic effect of Mallotusphilippinensis in rats against tape worm*, *Indian Journal of Physiology and Pharmacology.* 28, 63-66, (1984).
- Wafo P., Kamdem R. S. T., Ali Z., Anjum S., Khan S. N., Begum A., Krohn K., Abegaz B. M., Ngadjui B.T., Choudhary I. M., *Duboscicacid: A potent α -glucosidase inhibitor with an unprecedented triterpenoidal carbon skeleton from Duboscia macrocarpa*, *Organic Letters*, 12, 5760-5763, (2010).
- Walsh C., *Antibiotic: Actions, Origins, Resistance*, Washington D. C., USA, 3-155, (2003).
- Wandji J., Tillequin F., Dagne E., Mulholland D. A., Temgoua A. D., Wansi J. D., Seguin E., Fomun Z. T., *Phenolic constituents from Drypetes amoracia*, *Phytochemistry*, 63, 453-456, (2003).
- Wandji J., Wansi J. D., Fuendjiep V., Dagne E., Mulholland D. A., Tillequin F., Fomun Z. T., Sondengam B. L., Nkeh B. C., Njamen D., *Sesquiterpene lactone and friedelane derivative from Drypetes molunduana*, *Phytochemistry*, 54, 811-815, (2000).
- Wang Y., Tongle D., Lin L., Yuanjiang P., Xiaoxiang Z., *Bioassay-guided isolation of antiatherosclerotic phytochemicals from Artocarpus altilis*, *Phytotherapy research*, 20, 1052-1055, (2006).
- Wansi D., *Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales du cameroun: Gambeya africana (Sapotacée) et Drypetes molunduana (Euphorbiacée)*, Thèse de Doctorat 3^e cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé 1, 22-23, (2000).
- Wansi J. D., *Etude phytochimique et pharmacologique de Oriciopsis glaberrima (Rutacées) et Drypetes chevalieri (Euphorbiacées) et synthèse d'analogues structuraux de l'Acridone*, Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun, 75-90, (2005).
- Welter W., Bertina M., Nuno A. P., *Natural plant products active against snakebite, the molecular approach*, *Phytochemistry*, 55, 463-482, (2000).
- WHO *Mortality data*, 2002, retrieved on 2010-01-30.
- Wiat C., Kumar K., Yusof M.Y., Hamimah H., Fauzi Z.M., and Sulaiman M., *Antiviral properties of ent-labdenediterpenes of Andrographi spaniculatanees, inhibitor of herpes simplex virus type 1*, *Phytotherapy Research*, 19, 1069-1070, (2005).

- World Health Organisation (WHO), *Diarrhoeal diseases*. WHO, Geneva. Available at: www.who.int/vaccine-research/diseases/diarrhoeal/en/index7.html (consulté le 06 mars 2014).
- Xu R., Fazio G. C., Matsuda S. P. T., *on the origins of triterpenoid skeletal diversity*, *Phytochemistry*, 65, 261-291, (2004).
- Yang Y., Kaoru K., Kiyotaka K., Kunio T., Norio K., Hiroshi Y., *New Triterpenes from Machaerocereusearuca*, *Journal of Natural Products*, 61, 456-460, (1998).
- Yang Yu., Jiang J., Qimei L., Yan X., Zhao J., Yuan H., Qin Z., and Wang M., *The fungicidal terpenoids and essential oil from Litsea cubeba in Tibet*, *Molecules*, 15, 7075-7082, (2010).
- Zager E. M., McNerney R., *Multidrug-resistant tuberculosis*, *BMC Infectious Diseases* 8, 1010-1186/1471-2334-8-10, (2008).
- Zahid M., Husani S. R., Abbas M., Pan Y., Jassbi A .R., Asim M., Parvez M. ,Voelter W., Ahmad V. U., *Eight new diterpenoids from Euphorbia decipiens*, *Helvetica chimica acta*, 84, 1980-1987, (2001)

ANNEXE

I- TESTS CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLEES

I.1- TEST DES PHENOLS

Dissoudre quelques mg de produit dans quelques ml d'eau ou dans un mélange eau-éthanol à 25 °C. Si le produit n'est pas soluble dans l'eau. Ajouter quelques gouttes d'une solution aqueuse de FeCl₃ 0,2 M. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des phénols.

I.2- TEST DE MOLISH

Dans un tube à essai, dissoudre une petite quantité de produit dans le méthanol. Dissoudre 100 mg de α -naphthol dans 10 ml d'éthanol. Prélever 2 ml de cette solution et l'ajouter à la solution du produit puis homogénéiser. Faire couler doucement quelques gouttes d'acide sulfurique concentré sur le mélange. L'observation d'une coloration violette à l'interface indique la présence d'un sucre.

I.3- TEST DE LIEBERMANN- BURCHARD

Réactif: anhydre acétique + acide sulfurique concentrée

Dissoudre la substance dans le chloroforme. Ajouter quelques gouttes d'anhydride acétique à la solution de la substance. Introduire quelques gouttes de H₂SO₄ concentrée; La solution dans le chloroforme se colore en rouge intense, en violet puis en bleu et prend finalement une coloration vert foncé.

I.4- TEST DE SHINODA

A une solution alcoolique du produit à analyser, on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes se manifeste par une effervescence suivie d'un changement de couleur de la solution qui devient rose ou pourpre.

II.5-TEST DE DRAGGENDORF

Dans un tube à essai contenant 5ml d'eau distillée, ajoutons 2mg de notre produit et 2M d'acide chlorhydrique et laissons la réaction se produire. Dans cette réaction, 1ml du réactif de Dragendorff est introduit et l'apparition de précipités rouges ou rouge- orangés indiquent la présence des alcaloïdes.

II-LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE

1-Kuete, V., Poumale, P. H. M., **Guedem, N. A.**, Shiono, Y., Randrianasolo, R., Ngadjui, T. B., *Antimicrobial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from Thecacoris annobonae (Euphorbiaceae)*, South African Journal of Botany, 76, 536-542, (2010).

2-**Guedem, N.A.**, Sandjo, L. P., Opatz, T., Schollmeyer, D., Ngadjui, T. B., *(2E, 4R, 5R, 6S)-2-(4, 5, 6-Trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene) acetonitrile*, Acta Crystallographica Section E, 68, 2737, (2012).

3-Poumale, P. H. M., **Guedem, N. A.**, Sandjo, L. P., Ngadjui, T. B., and Shiono, Y., *Lupane type triterpene isolated from the leaves of Thecacoris annobonae (Euphorbiaceae)*, Journal of Advances in chemistry, vol.5, No.2, 695-701, (2013).

Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae)

V. Kuete^{a,*}, H.M. Poumale Poumale^{b,c}, A.N. Guedem^b, Y. Shiono^b,
R. Randrianasolo^d, B.T. Ngadjui^c

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, PO Box 67 Dschang, Cameroon

^b Department of Bioresource Engineering, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka, Yamagata 997-8555, Japan

^c Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, PO Box 812, Yaounde, Cameroon

^d Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Antananarivo, PO Box 906, Antananarivo 101, Madagascar

Received 11 May 2009; received in revised form 15 January 2010; accepted 9 April 2010

Abstract

This study was designed to evaluate the antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract from the stem bark of *Thecacoris annobonae* Pax & K. Hoffm, that of aristolochic acid I (1) and other isolated compounds. The microplate alamar blue assay (MABA) and the broth microdilution method were used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC) of the above samples. The H⁺-ATPase-mediated proton pumping assay was used to evaluate a possible mechanism of action for both the methanol extract and aristolochic acid I. The results of the MIC determinations showed that the methanol extract and aristolochic acid I prevent the growth of all studied organisms. The results obtained in this study also showed that the methanol extract as well as aristolochic acid I inhibited the H⁺-ATPase activity. The overall results provided evidence that the methanol extract of *T. annobonae* might be a potential source of new antimicrobial drug against tuberculosis, and some bacterial and fungal diseases, but should be consumed with caution, bearing in mind that the main active component, aristolochic acid I is a potentially toxic compound.

© 2010 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Antimicrobial activity; Aristolochic acid I; Compounds; Euphorbiaceae; Methanol extract; *Thecacoris annobonae*

1. Introduction

Infectious diseases are serious health problems worldwide. Tuberculosis (TB) infection, caused by *Mycobacterium* species remains one of the most important modifiable infectious human diseases in the developing world with more than 2 billion people being infected (McGaw et al., 2008). World statistics of TB reached a ceiling of estimated 9.2 million new cases and 1.7 million deaths in 2006 (McGaw et al., 2008). TB is widespread in poor countries with the highest incidence of the disease (more than 80% of cases) occurring in Asia and Africa (Zager and McNerney, 2008). The annual incidence of the disease indicates a rate of over 600 cases per 100,000 reported

in many sub-Saharan Africa countries (Corbett et al., 2006) with the persistent increase attributed to the acquired immune deficiency syndrome pandemic combined with inadequate healthcare systems (Zager and McNerney, 2008). Typhoid fever (TF) is a more classical systemic infection caused by the typhoid bacillus, *Salmonella enterica serovar* Typhi, the most common cause of enteric fever, which also includes paratyphoid fever caused by *S. paratyphi* A, B and C. With an estimated 16–33 million cases resulting in 500,000 to 600,000 deaths annually in endemic areas, the WHO (2009) identifies typhoid as a serious public health problem. The true burden of TF in developing countries is difficult to estimate. According to recent estimates, 22 million cases occur each year causing 216,000 deaths, predominantly in school-age children and young adults (Crump et al., 2004). Asia, with 274 cases per 100,000 persons has the highest incidence of TF cases worldwide, especially in

* Corresponding author. Tel.: +237 77 355927; fax: +237 22 226018.
E-mail address: kuetevictor@yahoo.fr (V. Kuete).

Southeast Asian countries and on the Indian subcontinent, followed by sub-Saharan Africa and Latin America with 50 cases per 100,000 persons. In an urban slum in Dhaka, incidence of TF was found to be 390/100,000 persons (Brooks et al., 2005). *Staphylococcus aureus* can cause a range of illnesses from minor skin infections to life-threatening diseases such as pneumonia, meningitis, osteomyelitis, endocarditis, toxic shock syndrome, and septicemia (Carbonnelle et al., 1987). *Pseudomonas aeruginosa* is a highly relevant opportunistic pathogen and one of its most worrisome characteristics is its low antibiotic susceptibility (Sleigh and Timbury, 1998). Also, *Candida* species are the predominant pathogens causing invasive disease in intensive care, invasive fungal infections being of increasing relevance for severely ill and immuno-compromised patients (Presterl et al., 2009), with up to 50% mortality (Wenzel, 1995).

Due to the permanent resistance of the microorganisms to available drugs, continuous search for new antimicrobials is a scientific challenge. Natural products continue to play a most significant role in the drug discovery and development process (Newman and Cragg, 2007), and plants are recognized as a useful source of highly active antimicrobial metabolites (Gibbons, 2005; Pauli et al., 2005). In our continuous search of antimicrobial agents from natural sources, this study was designed to assess the antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of *Thecacoris annobonae* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). *T. annobonae* is a tree found in Cameroon and Equatorial Guinea. Its natural habitat is subtropical or tropical moist lowland forests and was listed as an endangered species (Cheek, 2004). Though few medicinal properties have been reported on the genus *Thecacoris*, *T. batesii* is used as a purgative and antirheumatic remedy in the traditional medicine in Cameroon (Ngadjui and Abegaz, 2003; Ngadjui et al., 2007).

2. Material and methods

2.1. Plant material, instruments, solvents, extraction and isolation

The stem bark of *T. annobonae* was collected in March 2005 at Kumba, South-West (Cameroon) and identified at the Cameroon National Herbarium, where a voucher specimen is deposited (Ref. No 38569/HNC).

Air dried powdered stem bark of *T. annobonae* (2.8 kg) was extracted with MeOH at room temperature for 48 h. After removing the solvent by evaporation under reduced pressure, the crude extract (100.2 g) was chromatographed on silica gel using hexane/ethyl acetate in increasing polarity (pure hexane; hexane/ethyl acetate 7.5/2.5; hexane/ethyl acetate 5:5; hexane/ethyl acetate 2.5/7.5; pure ethyl acetate). One hundred and fifteen fractions were collected and pooled on the basis of analytical thin layer chromatography in three main fractions, A (fraction 1 to 36); B (37–88); and C (89–115).

Fraction A (5.0 g) was column chromatographed using silica gel 60 and eluted with CH₂Cl₂–MeOH (1:3). Thirty-two sub-fractions of 100 ml each were collected and sub-fractions 13–26 were purified by using column chromatography on Sephadex LH-20 with CH₂Cl₂–MeOH (1:1) as eluent to afford aristolochic acid I C₁₇H₁₁NO₇ [1; yellow amorphous powder,

4.7 mg; *R_f*: 0.3 (CH₂Cl₂/3%MeOH); *m/z*: 341] (Priestap, 1989; Arlt et al., 2002) and aristolochic acid I methyl ester C₁₈H₁₃NO₇ [2; Yellow amorphous powder; *R_f*: 0.4 (CH₂Cl₂/3%MeOH); 9.0 mg; *m/z*: 355] (Arlt et al., 2002).

Fraction B (13.0 g) was chromatographed on silica gel and eluted with a mixture of hexane/ethyl acetate in increasing polarity. Fraction eluted hexane/ethyl acetate 40:60 yielded vanillic acid C₈H₈O₄ [3, Brown amorphous powder; 6.7 mg; *R_f*: 0.3 (CH₂Cl₂/5% MeOH); *m/z*: 168] (Fang et al., 2008) and 4-acetoxy vanillic acid C₁₀H₁₀O₅ [4, amorphous powder; 10.0 mg; *R_f*: 0.5 (CH₂Cl₂/5% MeOH); *m/z*: 209] (Li and Huang, 2000).

Fraction C (17.0 g) was chromatographed on silica gel and eluted using hexane/ethyl acetate. A total of 50 fractions of 300 ml each were collected and combined on the basis of TLC analysis leading to two main series (I and II). Series I (1.5 g) [fractions 1–37] was column chromatographed on silica gel and eluted with CH₂Cl₂–MeOH (3:1) to yield friedelin C₃₀H₅₀O [6, White powder; *R_f*: 0.7 (CH₂Cl₂); 3.9 mg; m.p.: 247–249 °C; *m/z*: 426] (Ageta and Arai, 1990). Series II (0.9 g) [fractions 38–50] eluted with CH₂Cl₂–MeOH (7:9) yielded friedelin-3β-ol C₃₀H₅₂O [5, White powder; *R_f*: 0.6 (CH₂Cl₂); 5.4 mg; m.p.: 229–231 °C; *m/z*: 428] (Fun et al., 2007; Ng'ang'a et al., 2008).

2.2. General experimental instruments and procedure

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were measured on Varian Unity 300 (300.145 MHz) and Varian Inova 500 (499.876 MHz) spectrometers. ESI mass spectra were recorded on a Finnigan LCQ with quaternary pump Rheos 4000 (Flux Instrument). ESI HR mass spectra were recorded on a Bruker FTICR 4.7 T mass spectrometer. EI mass spectra were recorded on a Finnigan MAT 95 spectrometer (70 eV) with perfluorokerosene as reference substance for HREI-MS. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 1600 Series FT-IR spectrometer from films. Melting and decomposition points were measured with an Electrothermal (Yanaco, Tokyo-Japan) melting point apparatus and were not corrected.

2.3. Microbial strains and culture media

The test organisms included Mycobacteria namely *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700084, drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (America Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), two clinical strains, *M. tuberculosis* MTCS1, and *M. tuberculosis* MTCS2, Gram-positive bacteria (B) including a methicillin-resistant *S. aureus* B845, *Streptococcus faecalis* B 846, *Bacillus cereus* B864, Gram-negative bacteria namely β-lactamase positive (βL⁺) *Escherichia coli* B831, ampicillin-resistant *Klebsiella pneumoniae* B837, carbenicillin-resistant *P. aeruginosa* B832, chloramphenicol-resistant *Salmonella typhi* B839, chloramphenicol-resistant *Citrobacter freundii* B828 and two fungi (F) namely *Candida albicans* F702 and *Microsporium audouinii* F712. The clinical isolates were obtained from Yaoundé General Hospital (Cameroon). Their identifications were confirmed (and they were encoded) before use at the Laboratory of Applied Microbiology

and Molecular Pharmacology (LMP) (Faculty of Science, University of Yaoundé I). This was followed by culturing on the specific media and biochemical test using API system as previously reported (Mbaveng et al., 2008). *M. smegmatis* was cultured on Middlebrook 7H11 agar and allowed to grow for 24 h. *M. tuberculosis* was plated on Löwenstein-Jensen medium and allowed to grow for 3–4 weeks at 37 °C. Middlebrook 7H9 broth was used to determine the MIC and MMC values of the test samples on *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. Nutrient Agar (NA) was used for other bacteria. Sabouraud Glucose Agar was used for the activation of fungi. Mueller Hinton broth (MHB) was used to determine the MIC and MMC of all samples against fungi, Gram-positive and Gram-negative bacteria.

2.4. Reference antibiotics

Ciprofloxacin and isoniazid (INH) (Sigma) were used as reference antibiotics (RA) for *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* respectively. Nystatin (Sigma) and gentamycin (Sigma) were used as RA respectively against fungi and other bacteria.

2.5. Microplate alamar blue assay

The activity of all samples against *M. tuberculosis* strains was tested using the MABA (Jimenez-Arellanes et al., 2003). Briefly, each of the above *M. tuberculosis* strains was cultured at 37 °C in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 0.2% glycerol and 10% Oleic Acid–Albumin–Dextrose–Catalase (Sigma) until logarithmic growth was reached. About 6×10^6 CFU/ml inoculum of *M. tuberculosis* was then added to the two fold serially diluted samples. The final concentration of DMSO in all assays was 2.5% or less and this dilution also served as solvent control. The samples were assayed in triplicate. All tests were carried out in sterile flat-bottomed 96-well microplates. Each microplate was incubated for 5 days at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in a sealed plastic CO₂-permeable bag. After 5 days of incubation, 32 µl of a mixture of freshly prepared alamar blue solution and 20% sterile Tween-80 (Sigma) 1:1 v/v were added to one growth-control well. The microplates were incubated again at 37 °C for 24 h. If a colour shift from blue to pink was observed in the growth-control sample, 32 µl of alamar blue solution was added to each of the remaining wells, and the microplate was further incubated for 24 h. A well-defined pink colour was interpreted as positive bacterial growth, whereas a blue colour indicated an absence of growth. The MIC corresponded to the greatest dilution of sample extract in which the colour shift from blue to pink was not observed.

Samples with recorded MIC values following MABA were assayed for their mycobactericidal effect (Jimenez-Arellanes et al., 2003). Briefly, 5 µl of the undeveloped mycobacterial suspensions were transferred from the former to a new microplate that contained 195 µl of fresh culture medium per well. Three wells were inoculated with 100 µl of fresh inoculum as for MABA and three more wells were incubated with 200 µl of culture medium only, as negative controls. The microplates were incubated and developed with Alamar Blue as for MABA. The MMC corresponded to the minimum sample concentration that

did not cause a colour shift in cultures re-incubated in fresh medium.

2.6. XTT colourimetric assay

The MIC determinations on *M. smegmatis*, fungi, Gram-positive and negative bacteria were conducted using rapid XTT colorimetric assay according to Pettit et al. (2005) and Eloff (1998). The test sample and RA were first of all dissolved in DMSO/MHB or DMSO/7H9 broth. The final concentration of DMSO was lower than 2.5% and does not affect the microbial growth. The solution obtained was then added to 7H9 broth (*M. smegmatis*) or MHB (other organisms), and serially diluted two fold (in a 96-well microplate). 100 µl of inoculum 1.5×10^6 CFU/ml prepared in appropriate broth was then added. The plates were covered with a sterile plate sealer, then agitated to mix the contents of the wells using a plate shaker and incubated at 30 °C for 48 h (*M. audouinii*) or 37 °C for 18 h (other organisms). The assay was repeated thrice. Wells containing adequate broth, 100 µl of inoculum and DMSO to a final concentration of 2.5% served as negative control. The MIC of samples was detected after 18 h incubation at 37 °C, following addition (40 µl) of 0.2 mg/ml p-iodonitrotetrazolium violet (INT) and incubation at 37 °C for 30 min. Viable bacteria reduced the yellow dye to a pink. MIC was defined as the lowest sample concentration that inhibited this change. The MMC was determined by adding 50 µl aliquots of the preparations, which did not show any growth after incubation during MIC assays, to 150 µl of adequate broth. These preparations were incubated at 37 °C for 48 h. The MMC was regarded as the lowest concentration of extract, which did not produce a colour change after addition of INT as mentioned above.

2.7. Effects of the methanol extract and aristolochic acid I on H⁺-ATPase-mediated proton pumping

The proton-pumping activities of *E. coli* were determined monitoring glucose-induced acidification of the external medium by measuring the pH with an electrode (Manavathu et al., 2001). Briefly, 50 ml cultures of *E. coli* were grown in MHB to late log phase (absorbance of 5 at 590 nm wavelength). The resulting cultures were centrifuged at 3500 g for 10 min. The pellet was washed once with distilled water, then once with 50 mM KCl, and re-suspended in 50 ml of 50 mM KCl. The cells suspension was incubated at 4 °C overnight (18 h) for glucose starvation, then centrifuged and diluted to the absorbance of 8 (at 590 nm) in 1.8 ml of reaction medium (a spectrophotometer curve of 3 ml) containing 50 mM KCl, methanol extract of *T. annobonae* and compound 1 (at MIC and MIC/10), and all adjusted to pH 6.4. After 10 min pre-incubation at 37 °C, medium acidification was initiated after addition of glucose 20% (0.2 ml). The pH was measured after every 10 min for 1 h. DMSO 2.5% was used instead of compound 1 as the control.

3. Results

The structures of the isolated compounds were established using spectroscopic analysis. The compounds isolated from the

stem bark of *T. annobonae* (Fig. 1) were aristolochic acid I (1), aristolochic acid I methyl ester (2), vanillic acid (3), 4-acetoxy vanillic acid (4), friedelin-3 β -ol (5) and friedelin (6).

The results of the MIC determinations (Table 1) showed that the methanol extract and compound 1 were able to prevent the growth of all studied organisms, including mycobacteria, fungi, Gram-positive and Gram-negative bacteria, within the concentration range of 9.76 to 312.50 μ g/ml. Other compounds showed selective activity, with their inhibitory effects being noted on 7 of the 14 (50%), 6/14 (42.9%), 5/14 (35.7%), 3/14 (21.4%) studied organisms respectively for compounds 5, 4, 2 and 3. The lowest MIC value for the methanol extract (19.53 μ g/ml) was obtained on sensitive *M. tuberculosis* H37Rv strain. The lowest value for individual compounds (9.76 μ g/ml) was recorded with compound 1 on *M. tuberculosis* H37Rv, *Bacillus cereus* and *P. aeruginosa*. Results of MMC determinations (Table 2) also showed good activities for both crude extract and compound 1. MMC values not greater than 312.50 μ g/ml were recorded on 13/14 (92.9%) and 12/14 (85.7%) studied microorganisms respectively for compound 1 and the crude extract. The results illustrated in Fig. 2 showed that compound 1 was able to totally inhibit the H⁺-ATPase activity when tested at the MIC values. An important, but not total inhibitory activity was also noted at with the methanol extract MIC, meanwhile lower concentrations were less active. However, the inhibitory effect was still observable up to MIC/10.

4. Discussion

The compounds isolated from *T. annobonae* were two alkaloids (1–2), two phenolic acids (3–4), and two terpenoids (5–6). Many compounds belonging to these secondary metabolite classes have been reported for their antimicrobial activities (Bruneton, 1999; Cowan, 1999). The antimicrobial activity of friedelin (6) on fungi and bacteria has recently been reported (Kuete et al., 2007). Therefore this compound was not tested in this study. The antimicrobial activity of vanillic acid against *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi*, and *L. seeligeri* was reported (Delaquis et al., 2005). Contrary to previously documented data on *Listeria* sp, vanillic acid (3) and its derivative (4) showed only very weak activity on the mycobacteria, fungi and other bacterial species observed in this study. To the best of our knowledge, the antimicrobial activity of *T. annobonae* as well as that of aristolochic acid I is being reported for the first time. This study identifies aristolochic acid I as the main antimicrobial component of this plant. Only a few pharmacological activities on the genus *Thecacoris* are documented. This study therefore provides important baseline information for the antimicrobial activity of this genus. However, it has been documented that aristolochic acid, a rodent carcinogen, also exhibiting high nephrotoxicity (<http://www.cfsan.fda.gov>). Despite these well-documented dangers, aristolochic acid is still sometimes used as herbal remedy for weight loss (<http://www.cfsan.fda.gov>).

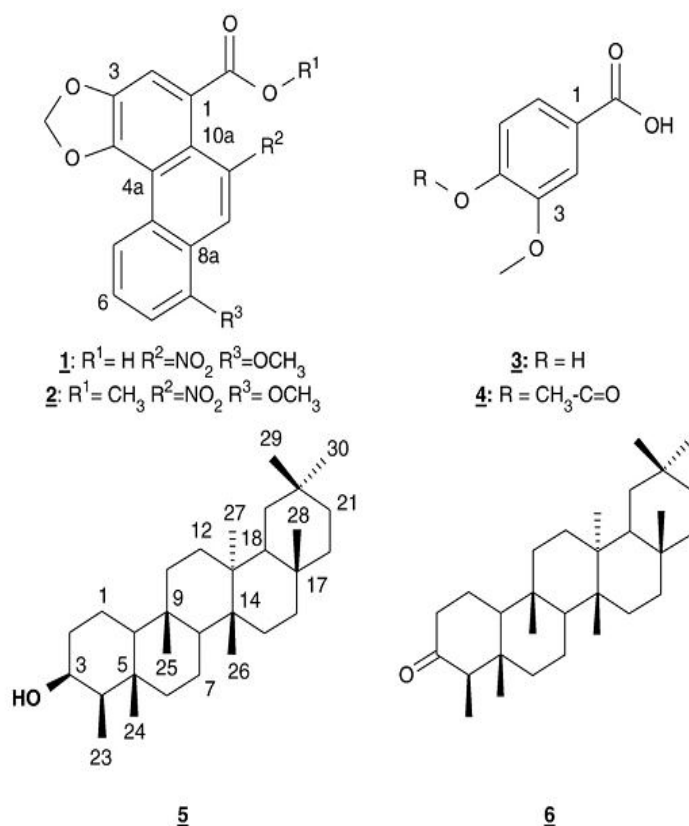


Fig. 1. Chemical structures of compounds isolated from the stem bark of *T. annobonae*.

Table 1
MIC ($\mu\text{g/ml}$) of the methanol extract and compounds isolated (1–5) from *T. annobonae* and reference drugs on the studied microbial species.

Microbial species	Tested samples					RA*	
	Methanol extract	Isolated compounds					
		1	2	3	4	5	
Mycobacteria							
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	39.06	19.53	–	–	–	312.50	0.61
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	19.53	9.76	–	–	–	–	0.31
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> MTCS1	78.12	39.06	–	–	–	–	78.12
<i>M. tuberculosis</i> MTCS2	78.12	19.53	–	–	–	–	0.61
Gram-positive bacteria							
<i>Bacillus cereus</i>	39.06	9.76	312.50	312.50	312.50	156.25	9.76
<i>Staphylococcus aureus</i>	312.50	156.25	–	–	–	–	9.76
<i>Streptococcus faecalis</i>	312.50	78.12	–	–	–	312.50	9.76
Gram-negative bacteria							
<i>Citrobacter freundii</i>	312.50	156.25	–	–	–	–	19.53
<i>Escherichia coli</i>	39.06	19.53	156.25	156.25	156.25	39.06	9.76
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39.06	9.76	156.25	156.25	156.25	78.12	19.53
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39.06	19.53	312.50	–	156.25	78.12	78.12
<i>Salmonella typhi</i>	78.12	19.53	312.50	–	156.25	156.25	39.06
Fungi							
<i>Candida albicans</i>	312.50	78.12	–	–	156.25	–	39.06
<i>Microsporium audouinii</i>	312.50	156.25	–	–	–	–	39.06

*RA: reference antibiotics (ciprofloxacin for *M. smegmatis*, isoniazid for *M. tuberculosis*, gentamicin for other bacteria, nystatin for fungi).
(–): MIC > 312.50.

Observation of the MMC values indicates that most of them are not more than four folds their corresponding MICs. This proves that the killing effects could be expected on the sensitive strains (Mims et al., 1993). It is also important to note that for antimicrobial activity, MIC value of 100 $\mu\text{g/ml}$ is considered significant for plant extracts (Borges-Argáez et al., 2007). The MIC values lower than this threshold value (100 $\mu\text{g/ml}$) were

obtained on 9 of the studied microbial species (64.3%) showing that *T. annobonae* extract is a potential candidate for future drug development from a natural source. The results obtained with aristolochic acid I (1) are significant, as some of the recorded MIC values were lower than that of the reference drugs on many tested organisms (Table 1). This explains why we focused on this compound.

Table 2
MMC ($\mu\text{g/ml}$) of the methanol extract and compounds isolated (1–5) from *T. annobonae* and reference drugs on the studied microbial species.

Microbial species	Tested samples					RA*	
	Methanol extract	Isolated compounds					
		1	2	3	4	5	
Mycobacteria							
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	78.12	39.06	nd	nd	nd	–	1.22
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	39.06	19.53	nd	nd	nd	nd	0.61
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> MTCS1	156.25	78.12	nd	nd	nd	nd	156.25
<i>M. tuberculosis</i> MTCS2	312.50	39.06	nd	nd	nd	nd	1.22
Gram-positive bacteria							
<i>Bacillus cereus</i>	78.12	19.53	312.50	–	312.50	–	19.53
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	312.50	nd	nd	nd	nd	19.53
<i>Streptococcus faecalis</i>	312.50	156.25	nd	nd	nd	–	19.53
Gram-negative bacteria							
<i>Citrobacter freundii</i>	312.50	–	nd	nd	nd	nd	39.06
<i>Escherichia coli</i>	78.12	39.06	312.50	312.50	312.50	156.25	19.53
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	156.25	19.53	–	312.50	–	–	39.06
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	156.25	78.12	–	nd	–	–	156.25
<i>Salmonella typhi</i>	156.25	39.06	312.50	nd	312.50	–	78.12
Fungi							
<i>Candida albicans</i>	312.50	312.50	nd	nd	–	nd	78.12
<i>Microsporium audouinii</i>	–	312.50	nd	nd	nd	nd	78.12

*RA: reference antibiotics (ciprofloxacin for *M. smegmatis*, isoniazid for *M. tuberculosis*, gentamicin for other bacteria, nystatin for fungi); nd: not determined as MIC was greater than 312.25 $\mu\text{g/ml}$.
(–): MMC > 312.50.

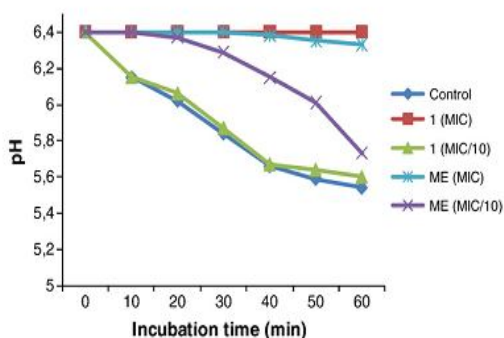


Fig. 2. Effect of the methanol extract (ME) of *T. cf. annobonae* and aristolochic acid I (I) on the proton pumping of *E. coli* at MIC and MIC/10.

The reduction of the *E. coli* population by the methanol extract and aristolochic acid I as observed in the colony count assay also highlighted the anti-infective potency of this plant. This confirmed the killing effect of this compound as well as that of the methanol extract on the studied microbial species. When investigating one of the possible mechanisms of action of the methanol extract and compound I, we have evaluated its capacity to inhibit *E. coli* H⁺-ATPase-mediated proton pumping. It is well known that bacteria are viable in a wide range of pH (1–11) and that the bacterial cytoplasmic pH is kept near neutral (Padan et al., 1981). It is also generally accepted that bacterial cytoplasmic pH is regulated by various cation transport systems (Padan et al., 1981). Some data suggests that in *E. coli*, cytoplasmic pH is regulated by proton extrusion via the respiratory chain and potassium influx at acid pH, and cation/proton antiporter regulates the pH in alkaline states (Kobayashi, 1985). The data obtained in this experiment therefore indicated that inhibition of the H⁺-ATPase could be one of the possible antimicrobial mechanisms of action of the methanol extract. That effect might be due predominantly to the presence of compound I. Other mechanisms such as DNA interaction of this compound are to be investigated. In fact, many alkaloid compounds are known to exhibit their antimicrobial activity through their ability to intercalate with DNA (Phillipson and O'Neill, 1987). It should be noted that aristolochic acid, one of the active components of this plant, was documented for its carcinogenicity, its high nephrotoxicity and may be a causative agent in Balkan nephropathy (Cosyns, 2003; Poon et al., 2007). However, the amount in the plants extract was very low, explaining why this compound was generally more active than the crude extract, as it appeared to be one of its main bioactive components.

The data reported herein are very important, taking into account the medical importance of the studied microorganisms, and that this plant is consumed traditionally as anti-infective remedy, without taking into account the presence of health-compromising components such as aristolochic acid I. Hence, the overall results of the present investigation provided evidence that the crude extract *T. annobonae* could serve as an antimicrobial drug but should be taken with caution, bearing in mind that aristolochic acid I, a potentially nephrotoxic and carcinogenic compound, is the main active component.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the International Foundation for Science (Grant no. F/4579-1 to VK) and Japan Society for the Promotion of Science (P08430 to HMPP).

References

- Ageta, H., Arai, Y., 1990. Chemotaxonomie of ferns. 3. Triterpenoids from polypodium-polypodioides. *Journal of Natural Products* 53, 325–332.
- Arit, M.V., Stiborova, M., Schmeiser, H.H., 2002. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* 17, 265–277.
- Borges-Argáez, R., Canche-Chaya, C.I., Peña-Rodríguez, L.M., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G.M., 2007. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia* 78, 370–372.
- Brooks, W.A., Hossain, A., Goswami, D., Nahar, K., Alam, K., Ahmed, N., Naheed, A., Nair, G.B., Luby, S., Breiman, R.F., 2005. Bacteremic typhoid fever in children in an urban slum, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases* 11, 326–329.
- Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales*, 3rd ed. Tec&Doc, Paris. 1021.
- Carbonnelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vague, R., 1987. *Bactériologie Médicale: Techniques Usuelles*. SIMEP, Paris, p. 228.
- Cheek, M., 2004. *Thecacoris annobonae*. IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/45457/0>. Accessed on 13 April 2008.
- Corbett, E.L., Marston, B., Churchyard, G.J., De Cock, K.M., 2006. Tuberculosis in sub-Saharan Africa: opportunities, challenges, and change in the era of antiretroviral treatment. *Lancet* 367, 926–937.
- Cosyns, J.P., 2003. Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy': a review of the evidence to date. *Drug Safety* 26, 33–48.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review* 12, 564–582.
- Crump, J.A., Luby, S.P., Mintz, E.D., 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization* 82, 346–353.
- Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P., 2005. Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Protection* 68, 1472–1476.
- Eloff, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64, 711–713.
- Fang, J.J., Ye, G., Chen, W.L., Zhao, W.M., 2008. Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum*. *Phytochemistry* 69, 1279–1286.
- Fun, H.K., Boonnak, N., Chantrapromma, S., 2007. A cocrystal of friedelan-3beta-ol and friedelin (0.75/0.25). *Acta Crystallographica* 63, 2014–2016.
- Gibbons, S., 2005. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochemistry Reviews* 4, 63–78. <http://www.cfsan.fda.gov/%20dms/addsbot.html>. FDA warns consumers to discontinue use of botanical products that contain aristolochic acid. Accessed on February 13, 2006.
- 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* 17, 903–908.
- Kobayashi, H., 1985. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry* 260, 72–76.
- Kuete, V., Nguemaving, J.R., Beng, V.P., Azebaze, A.G.B., Etoa, F.X., Meyer, M., Bodo, B., Nkengfack, A.E., 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology* 109, 372–379.
- Li, X.G., Huang, M.R., 2000. Structure of thermotropic copolymers from p-acetoxybenzoic acid, poly (ethylene terephthalate) and six third monomers. *Polymer Testing* 19, 373–383.
- Manavathu, E.K., Dimmock, J.R., Sarvesh, C.V., Chandrasekar, P.H., 2001. Inhibition of H⁺-ATPase-mediated proton pumping in *Cryptococcus neoformans* by a novel conjugated styryl ketone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 491–494.

- Mbaveng, A.T., Ngameni, B., Kuete, V., Konga Simo, I., Ambassa, T., Roy, R., Bezabih, M., Etoa, F.X., Ngadju, B.T., Abegaz, B.M., Meyer, J.J.M., Lall, N., Penlap, B.V., 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 116, 483–489.
- McGaw, L.J., Lall, N., Meyer, J.J.M., Eloff, J.N., 2008. The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 482–500.
- Mims, C.A., Playfair, J.H.L., Roitt, I.M., Wakelin, D., Williams, R., 1993. Antimicrobials and chemotherapy. In: Mims, C.A. (Ed.), *Medical Microbiology Review*, 35, pp. 1–34.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70, 461–477.
- Ngadju, B.T., Abegaz, B.M., 2003. Studies in natural products chemistry, bioactive natural products. In: Atta-Ur-Rahman (Ed.), Part 1, vol. 29. Elsevier, Oxford, pp. 761–805.
- Ngadju, B.T., Poumale, H.M.P., Guedem, A.N., Bezabih, M., Abegaz, M.B., 2007. ENT-kaurene and ENT-beyerene diterpenoids and other constituents of *Thecacoris batesii*. *Bulletin of Chemical Society of Ethiopia* 21, 89–94.
- Ng'ang'a, M.M., Chhabra, S., Langat-Thoruwa, C., Hussain, H., Krohn, K., 2008. Chemical constituents from the leaves of *Dypetes gerrardii*. *Biochemical Systematics and Ecology* 36, 320–322.
- Padan, E., Zilberstein, D., Schuldiner, S., 1981. pH homeostasis in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta—Reviews on Biomembranes* 650, 151–166.
- Pauli, G.F., Case, R.J., Inui, T., Wang, Y., Cho, S., Fischer, N.H., Franzblau, S.G., 2005. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sciences* 78, 485–494.
- Pettit, R.K., Weber, C.A., Kean, M.J., Hoffmann, H., Pettit, G.R., Tan, R., Franks, K.S., Horton, M.L., 2005. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2612–2617.
- Phillipson, J.D., O'Neill, M.J., 1987. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharmaceutica Nord* 1, 131–144.
- Poon, W.T., Lai, C.K., Yan-Wo Chan, A., 2007. Aristolochic acid nephropathy: the Hong Kong perspective. *Hong Kong Journal of Nephrology* 1, 7–14.
- Presterl, E., Parschalk, B., Bauer, E., Lassnigg, A., Hajdu, S., Graninger, W., 2009. Invasive fungal infections and (1, 3)- β -D-glucan serum concentrations in long-term intensive care patients. *International Journal of Infectious Diseases* 13, 707–712.
- Priestap, A.H., 1989. ^{13}C NMR-spectroscopy of aristolochic acids and aristolochic lactams. *Magnetic Resonance Chemistry* 27, 460–469.
- Sleigh, D.J., Timbury, M.C., 1998. *Note on Medical Bacteriology*. Churchill Livingstone, New York. 428.
- Wenzel, R.P., 1995. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clinical Infectious Diseases* 20, 1531–1534.
- World Health Organization (WHO), 2009. *Diarrhoeal Diseases*. WHO, Geneva. Available at: www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index7.html (accessed on 16 March 2009).
- Zager, E.M., McNemey, R., 2008. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infectious Diseases* 8, 10.1186/1471-2334-8-10.



(2*E*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-(4,5,6-Trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene)acetonitrile

Alphonsine N. Guedem,^a Louis P. Sandjo,^b Till Opatz,^b Dieter Schollmeyer^b and Bonaventure T. Ngadjui^{a*}

^aDepartment of Organic Chemistry, University of Yaounde I, PO Box 812 Yaounde, Cameroon, and ^bUniversity Mainz, Duesbergweg 10-14, 55128 Mainz, Germany
 Correspondence e-mail: ngadjui@ yahoo.fr

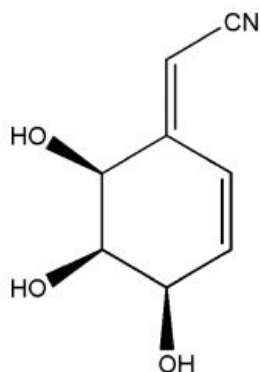
Received 11 July 2012; accepted 9 August 2012

Key indicators: single-crystal X-ray study; $T = 193$ K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.002$ Å; R factor = 0.026; wR factor = 0.071; data-to-parameter ratio = 10.4.

The crystal structure of the title compound, $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3$, is characterized by a complex three-dimensional hydrogen-bond network in which every molecule is connected to six symmetry-related neighbours.

Related literature

For the isolation of this natural product, see: Hua *et al.* (2004). For previous phytochemical and biological studies of the stem bark of *Thecacoris annobonae*, see: Kuete *et al.* (2010).



Experimental

Crystal data

$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3$
 $M_r = 167.16$

Monoclinic, $P2_1$
 $a = 4.8159$ (5) Å

$b = 10.2482$ (5) Å
 $c = 8.3573$ (9) Å
 $\beta = 102.842$ (4)°
 $V = 402.15$ (6) Å³
 $Z = 2$

Cu $K\alpha$ radiation
 $\mu = 0.90$ mm⁻¹
 $T = 193$ K
 $0.60 \times 0.06 \times 0.06$ mm

Data collection

Enraf-Nonius CAD-4 diffractometer
 2174 measured reflections
 1514 independent reflections

1501 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{int} = 0.021$
 3 standard reflections every 60 min
 intensity decay: 5%

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.026$
 $wR(F^2) = 0.071$
 $S = 1.08$
 1514 reflections
 146 parameters
 1 restraint

All H-atom parameters refined
 $\Delta\rho_{max} = 0.21$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{min} = -0.12$ e Å⁻³
 Absolute structure: Flack, (1983)
 Flack parameter: -0.04 (16)

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

<i>D</i> -H... <i>A</i>	<i>D</i> -H	H... <i>A</i>	<i>D</i> ... <i>A</i>	<i>D</i> -H... <i>A</i>
O7-H17...O9 ⁱ	0.79 (2)	1.93 (2)	2.6885 (14)	160 (2)
O8-H18...N12 ⁱⁱ	0.77 (2)	2.18 (2)	2.9138 (16)	160 (2)
O9-H19...O7 ⁱⁱⁱ	0.78 (3)	2.02 (2)	2.7944 (15)	170 (2)

Symmetry codes: (i) $-x + 2, y - \frac{1}{2}, -z + 1$; (ii) $x + 1, y, z + 1$; (iii) $-x + 1, y + \frac{1}{2}, -z + 1$.

Data collection: *CAD-4 Software* (Enraf-Nonius, 1989); cell refinement: *CAD-4 Software*; data reduction: *CORINC* (Dräger & Gattow, 1971); program(s) used to solve structure: *SIR97* (Altomare *et al.*, 1999); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *PLATON* (Spek, 2009); software used to prepare material for publication: *PLATON*.

We thank Dr J. C. Liermann (Mainz) for performing the NMR spectroscopy.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: NC2287).

References

Altomare, A., Burla, M. C., Camalli, M., Casciarano, G. L., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Moliterni, A. G. G., Polidori, G. & Spagna, R. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 115–119.
 Dräger, M. & Gattow, G. (1971). *Acta Chem. Scand.* **25**, 761–762.
 Enraf-Nonius (1989). *CAD-4 Software*. Enraf-Nonius, Delft, The Netherlands.
 Flack, H. D. (1983). *Acta Cryst.* **A39**, 876–881.
 Hua, Z., Zhi-Xin, L. & Jian-Min, Y. (2004). *Chin. J. Chem.* **22**, 1200–1203.
 Kuete, V., Poumale Poumale, H. M., Guedem, A. N., Shiono, Y., Randrianasolo, R. & Ngadjui, B. T. (2010). *S. Afr. J. Bot.* **76**, 536–542.
 Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.
 Spek, A. L. (2009). *Acta Cryst.* **D65**, 148–155.

supplementary materials

Acta Cryst. (2012). E68, o2737 [doi:10.1107/S1600536812035313]

(2*E*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-(4,5,6-Trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene)acetonitrile

Alphonsine N. Guedem, Louis P. Sandjo, Till Opatz, Dieter Schollmeyer and Bonaventure T. Ngadjui

Comment

Previous phytochemical and biological studies of the stem bark of *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae) led to several bioactive secondary metabolites: Kuete *et al.* (2010). In the continuation of this investigation, the title compound was isolated from the leaves of the same plant using chromatographic methods and characterized by single crystal X-ray diffraction. It should be noted that this natural product was previously obtained from the root of *Semiaquilegia adoxoides* (Ranunculaceae): Hua *et al.* (2004).

In the crystal structure of the title compound the six membered ring adopts an envelope conformation in which C(3) is 0.678 (1) Å below the ring plane (Fig. 1). The acrylonitrile group is nearly coplanar to the least square plane of the ring system. The packing is characterized by a complex three-dimensional network formed by hydrogen bonds. Every molecule interacts by hydrogen bonds with six symmetry related molecules. While the hydroxyl groups O7 and O9 are both donor and acceptor of hydrogen bonds, O8 only interacts with N12 *via* hydrogen bonding (Fig. 2 and Table 1).

Experimental

Air-dried powder of leaves of *Thecacoris annobonae* (1.37 kg) was successively macerated with hexane, ethyl acetate and methanol for two days each. Three fractions H (30 g), E (45 g), and M (61 g) were collected. The Methanol fraction M was subjected to a silica gel column chromatography eluted with CH₂Cl₂ to MeOH gradient yielding 7 mg of this secondary metabolite. It crystallized as needles in three of the fractions eluted with the mixture CH₂Cl₂/MeOH in a ratio of 97:3.

Refinement

All hydrogen atoms were located from a difference Fourier map and refined with isotropic displacement parameters. The absolute structure was determined on the basis of 705 Friedel pairs.

Computing details

Data collection: *CAD-4 Software* (Enraf–Nonius, 1989); cell refinement: *CAD-4 Software* (Enraf–Nonius, 1989); data reduction: CORINC (Dräger & Gattow, 1971); program(s) used to solve structure: *SIR97* (Altomare *et al.*, 1999); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *PLATON* (Spek, 2009); software used to prepare material for publication: *PLATON* (Spek, 2009).

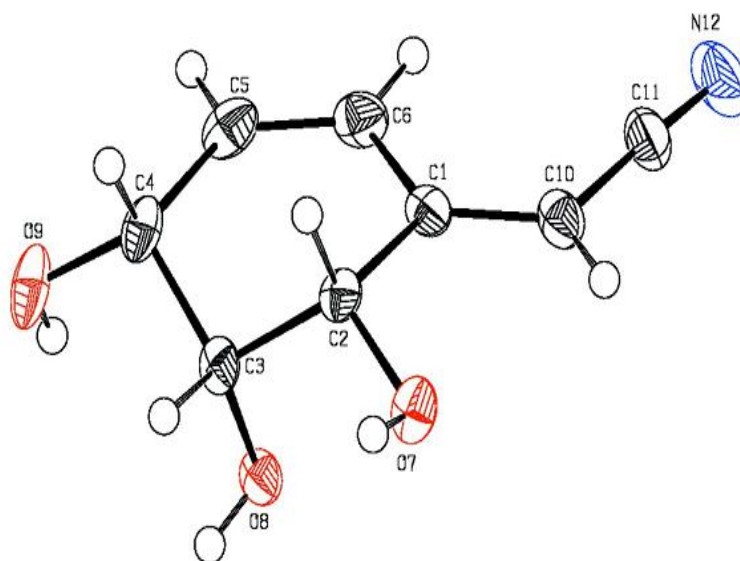


Figure 1
Crystal structure of the title compound with labelling and displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level.

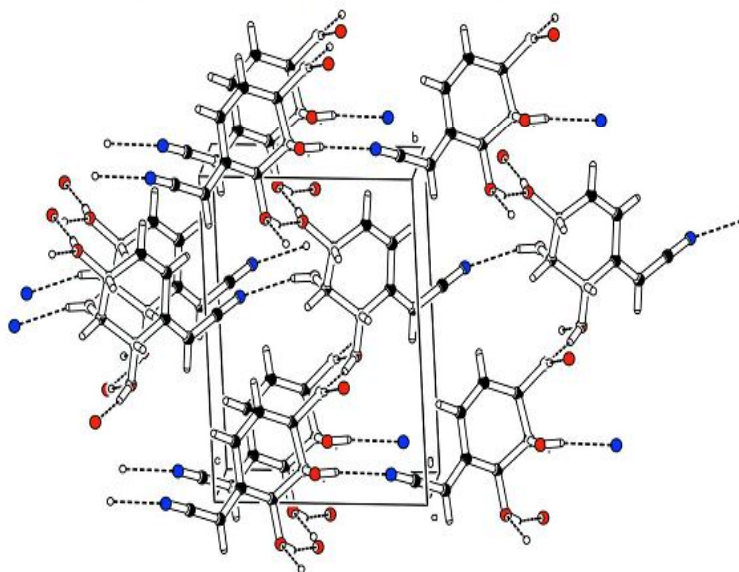


Figure 2
Crystal structure of the title compound with view along the a-axis. For clarity only H-atoms involved in hydrogen bonds are shown. Intermolecular hydrogen bonding is represented as dashed lines.

(2*E*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-(4,5,6-Trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene)acetonitrile

Crystal data

$C_8H_9NO_3$

$M_r = 167.16$

Monoclinic, $P2_1$

Hall symbol: $P\ 2_1yb$

$a = 4.8159(5)\ \text{\AA}$

$b = 10.2482(5)\ \text{\AA}$

$c = 8.3573(9)\ \text{\AA}$

$\beta = 102.842(4)^\circ$

$V = 402.15(6)\ \text{\AA}^3$

$Z = 2$

$F(000) = 176$
 $D_x = 1.380 \text{ Mg m}^{-3}$
 Cu $K\alpha$ radiation, $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$
 Cell parameters from 25 reflections
 $\theta = 35\text{--}46^\circ$

$\mu = 0.90 \text{ mm}^{-1}$
 $T = 193 \text{ K}$
 Needle, colourless
 $0.60 \times 0.06 \times 0.06 \text{ mm}$

Data collection

Enraf-Nonius CAD-4
 diffractometer
 Radiation source: rotating anode
 Graphite monochromator
 $\omega/2\theta$ scans
 2174 measured reflections
 1514 independent reflections
 1501 reflections with $I > 2\sigma(I)$

$R_{int} = 0.021$
 $\theta_{max} = 70.0^\circ$, $\theta_{min} = 5.4^\circ$
 $h = -5 \rightarrow 5$
 $k = -12 \rightarrow 12$
 $l = -10 \rightarrow 10$
 3 standard reflections every 60 min
 intensity decay: 5%

Refinement

Refinement on F^2
 Least-squares matrix: full
 $R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.026$
 $wR(F^2) = 0.071$
 $S = 1.08$
 1514 reflections
 146 parameters
 1 restraint
 Primary atom site location: structure-invariant
 direct methods
 Secondary atom site location: difference Fourier
 map

Hydrogen site location: inferred from
 neighbouring sites
 All H-atom parameters refined
 $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0474P)^2 + 0.0306P]$
 where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
 $(\Delta/\sigma)_{max} < 0.001$
 $\Delta\rho_{max} = 0.21 \text{ e \AA}^{-3}$
 $\Delta\rho_{min} = -0.12 \text{ e \AA}^{-3}$
 Extinction correction: *SHELXL97* (Sheldrick,
 2008), $F_c^* = kFc^*[1 + 0.001xFc^2\lambda^3/\sin(2\theta)]^{-1/4}$
 Extinction coefficient: 0.018 (3)
 Absolute structure: Flack, (1983)
 Flack parameter: -0.04 (16)

Special details

Experimental. ^1H -, ^{13}C - and two-dimensional-NMR spectra were recorded on Bruker AVANCE II-400 MHz spectrometer equipped with a 5 mm observe probe and a z-gradient coil using standard pulse sequences. HR-ESI-MS was carried out on a Waters Q-TOF Ultima III mass spectrometer. HR-ESI-MS m/z 190.0470 (calcd. for $[\text{C}_8\text{H}_6\text{NO}_3 + \text{Na}]^+$ 190.0475); NMR (^1H -NMR, 400 MHz, acetone- d_6): 6.55 (1H, dd, $J = 2.5, 10.1$ Hz, H-2), 6.04 (1H, dd, $J = 1.8, 10.1$ Hz, H-3), 4.11–4.16 (1H, m, H-4), 4.40–4.44 (1H, m, H-5), 4.44–4.50 (1H, m, H-6), 5.63 (1H, s, H-7), 4.60 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, OH-5), 4.16–4.18 (2H, m, OH-4 and 6); (^{13}C -NMR, 100 MHz, acetone- d_6): 159.7 (C-1), 124.0 (C-2), 139.6 (C-3), 74.5 (C-4), 69.6 (C-5), 71.9 (C-6), 93.7 (C-7), 117.6 (C-8).

Geometry. All e.s.d.'s (except the e.s.d. in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell e.s.d.'s are taken into account individually in the estimation of e.s.d.'s in distances, angles and torsion angles; correlations between e.s.d.'s in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell e.s.d.'s is used for estimating e.s.d.'s involving l.s. planes.

Refinement. Refinement of F^2 against ALL reflections. The weighted R -factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R -factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > \sigma(F^2)$ is used only for calculating R -factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R -factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R -factors based on ALL data will be even larger.

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters (\AA^2)

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U_{iso}^*/U_{eq}
C1	0.4167 (3)	0.60278 (13)	0.16499 (15)	0.0204 (3)
C2	0.6543 (3)	0.54538 (12)	0.29376 (15)	0.0193 (3)
H2	0.822 (3)	0.5471 (15)	0.2490 (18)	0.014 (3)*

supplementary materials

C3	0.7220 (3)	0.63193 (13)	0.44623 (15)	0.0195 (3)
H3	0.881 (4)	0.5923 (17)	0.525 (2)	0.023 (4)*
C4	0.8147 (3)	0.76563 (13)	0.39626 (17)	0.0244 (3)
H4	0.992 (4)	0.7516 (17)	0.364 (2)	0.023 (4)*
C5	0.6001 (3)	0.81945 (14)	0.2530 (2)	0.0291 (3)
H5	0.591 (4)	0.911 (2)	0.238 (2)	0.041 (5)*
C6	0.4214 (3)	0.74407 (14)	0.14727 (17)	0.0277 (3)
H6	0.289 (4)	0.7814 (18)	0.059 (2)	0.023 (4)*
O7	0.5884 (2)	0.41531 (9)	0.32843 (12)	0.0246 (2)
H7	0.730 (5)	0.381 (2)	0.375 (2)	0.038 (5)*
O8	0.47685 (18)	0.64281 (10)	0.51340 (11)	0.0221 (2)
H8	0.530 (4)	0.644 (2)	0.607 (3)	0.031 (5)*
O9	0.8700 (2)	0.85292 (10)	0.53125 (14)	0.0320 (3)
H9	0.730 (5)	0.870 (2)	0.559 (3)	0.045 (6)*
C10	0.2197 (3)	0.52459 (15)	0.07211 (16)	0.0252 (3)
H10	0.220 (4)	0.431 (2)	0.0850 (19)	0.024 (4)*
C11	-0.0065 (3)	0.57476 (17)	-0.05275 (17)	0.0316 (3)
N12	-0.1938 (3)	0.61195 (18)	-0.15135 (17)	0.0451 (4)

Atomic displacement parameters (\AA^2)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
C1	0.0145 (6)	0.0289 (7)	0.0186 (5)	0.0032 (5)	0.0053 (4)	0.0007 (5)
C2	0.0106 (6)	0.0241 (6)	0.0233 (6)	0.0012 (5)	0.0043 (5)	0.0010 (5)
C3	0.0086 (5)	0.0255 (6)	0.0227 (5)	0.0031 (4)	-0.0001 (4)	0.0005 (5)
C4	0.0128 (6)	0.0260 (7)	0.0344 (7)	-0.0030 (5)	0.0054 (5)	-0.0046 (5)
C5	0.0271 (8)	0.0222 (7)	0.0391 (8)	-0.0003 (5)	0.0098 (6)	0.0065 (5)
C6	0.0229 (7)	0.0318 (8)	0.0273 (6)	0.0039 (6)	0.0034 (5)	0.0097 (6)
O7	0.0167 (5)	0.0204 (5)	0.0340 (5)	0.0034 (4)	-0.0001 (4)	0.0022 (4)
O8	0.0134 (4)	0.0328 (5)	0.0197 (4)	0.0006 (4)	0.0030 (3)	-0.0018 (4)
O9	0.0135 (5)	0.0332 (6)	0.0489 (6)	-0.0054 (4)	0.0060 (4)	-0.0162 (5)
C10	0.0186 (6)	0.0354 (7)	0.0212 (6)	0.0016 (5)	0.0034 (5)	-0.0014 (5)
C11	0.0250 (7)	0.0477 (9)	0.0208 (6)	-0.0052 (6)	0.0024 (6)	-0.0037 (6)
N12	0.0319 (7)	0.0705 (11)	0.0269 (6)	0.0011 (7)	-0.0064 (5)	0.0055 (6)

Geometric parameters (\AA , $^\circ$)

C1—C10	1.3479 (19)	C4—H4	0.963 (18)
C1—C6	1.4563 (19)	C5—C6	1.334 (2)
C1—C2	1.5054 (16)	C5—H5	0.94 (2)
C2—O7	1.4151 (15)	C6—H6	0.943 (18)
C2—C3	1.5272 (17)	O7—H7	0.79 (2)
C2—H2	0.962 (16)	O8—H8	0.77 (2)
C3—O8	1.4200 (16)	O9—H9	0.78 (3)
C3—C4	1.5277 (18)	C10—C11	1.426 (2)
C3—H3	0.981 (17)	C10—H10	0.96 (2)
C4—O9	1.4178 (17)	C11—N12	1.144 (2)
C4—C5	1.5019 (19)		
C10—C1—C6	123.87 (12)	C5—C4—C3	110.86 (10)

supplementary materials

C10—C1—C2	120.34 (12)	O9—C4—H4	107.3 (10)
C6—C1—C2	115.77 (11)	C5—C4—H4	109.1 (10)
O7—C2—C1	110.18 (11)	C3—C4—H4	105.9 (10)
O7—C2—C3	113.10 (10)	C6—C5—C4	122.94 (13)
C1—C2—C3	110.92 (10)	C6—C5—H5	119.0 (12)
O7—C2—H2	110.0 (10)	C4—C5—H5	118.1 (12)
C1—C2—H2	106.6 (9)	C5—C6—C1	122.05 (12)
C3—C2—H2	105.8 (9)	C5—C6—H6	120.6 (11)
O8—C3—C2	109.47 (10)	C1—C6—H6	117.4 (11)
O8—C3—C4	110.90 (11)	C2—O7—H7	108.3 (16)
C2—C3—C4	108.30 (10)	C3—O8—H8	106.5 (14)
O8—C3—H3	111.0 (10)	C4—O9—H9	111.1 (17)
C2—C3—H3	108.2 (10)	C1—C10—C11	122.16 (14)
C4—C3—H3	108.9 (10)	C1—C10—H10	123.0 (10)
O9—C4—C5	112.14 (12)	C11—C10—H10	114.9 (10)
O9—C4—C3	111.28 (11)	N12—C11—C10	177.70 (18)
C10—C1—C2—O7	-16.29 (16)	O8—C3—C4—C5	-68.05 (13)
C6—C1—C2—O7	165.07 (11)	C2—C3—C4—C5	52.09 (14)
C10—C1—C2—C3	-142.30 (13)	O9—C4—C5—C6	-149.07 (14)
C6—C1—C2—C3	39.06 (15)	C3—C4—C5—C6	-24.01 (19)
O7—C2—C3—O8	-63.88 (13)	C4—C5—C6—C1	1.4 (2)
C1—C2—C3—O8	60.49 (13)	C10—C1—C6—C5	172.38 (14)
O7—C2—C3—C4	175.09 (9)	C2—C1—C6—C5	-9.0 (2)
C1—C2—C3—C4	-60.54 (13)	C6—C1—C10—C11	-0.6 (2)
O8—C3—C4—O9	57.48 (13)	C2—C1—C10—C11	-179.10 (12)
C2—C3—C4—O9	177.62 (10)	C1—C10—C11—N12	-141 (4)

Hydrogen-bond geometry (Å, °)

<i>D</i> —H... <i>A</i>	<i>D</i> —H	H... <i>A</i>	<i>D</i> ... <i>A</i>	<i>D</i> —H... <i>A</i>
O7—H7...O9 ⁱ	0.79 (2)	1.93 (2)	2.6885 (14)	160 (2)
O8—H8...N12 ⁱⁱ	0.77 (2)	2.18 (2)	2.9138 (16)	160 (2)
O9—H9...O7 ⁱⁱⁱ	0.78 (3)	2.02 (2)	2.7944 (15)	170 (2)

Symmetry codes: (i) $-x+2, y-1/2, -z+1$; (ii) $x+1, y, z+1$; (iii) $-x+1, y+1/2, -z+1$.



Lupane Type Triterpene Isolated from the Leaves of *Thecacoris Annobonea* (Euphorbiaceae)

Herve Martial Poumale Poumale,^{* a,b} Alphonsine Nkapwa Guedem,^a Louis Pergaud Sandjo,^a Bonaventure Tchaleu Ngadjui,^a and Yoshihito Shiono^b

^aDepartment of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

^bDepartment of Bioresource Engineering, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka, Yamagata 997-8555, Japan

* Corresponding author: E-mail: poumale@yahoo.fr

ABSTRACT

A new lupane type triterpene (1), together with betulinic acid (2), friedelin (3), aristolochic acid I (4), alpinumisoflavone (5) and 4'-O-methylepinumisoflavone (6) have been isolated from the leaves of *Thecacoris annobonea*. The structure of the new compound was elucidated on the basis of 1 and 2D NMR experiments. The isolated compounds were evaluated for their phytotoxicity and antimicrobial activity. 1 exhibited significant antimicrobial activity at 30 µg/ml and compounds 1, 2, 3, 4, 5 and 6 inhibited root growth lettuce at 100 µg/ml.

Indexing terms/Keywords

Thecacoris annobonea; lupane; phytotoxic; antimicrobial.

Academic Discipline and Sub-Disciplines

Organic Chemistry

SUBJECT CLASSIFICATION

Triterpene and flavonoid compounds

TYPE (METHOD/APPROACH)

Natural product and experimental study

Council for Innovative Research

Peer Review Research Publishing System

Journal: Journal of Advances in Chemistry

Vol. 5, No. 2

editor@cirworld.com

www.cirworld.com, member.cirworld.com



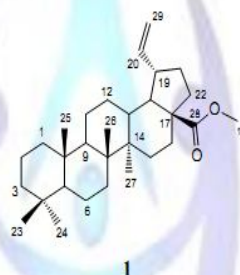
INTRODUCTION

Thecacoris annobonea (Euphorbiaceae) is a small tree or shrub growing in South and South-West provinces of Cameroon. It is widely used in traditional Cameroonian folk medicine. The leaf decoction of *T. batesii* is used as purgative and anti-rheumatic remedies in the medicinal plant therapy in Cameroon [1]. In our previous study on the genus *Thecacoris*, aristolochic acid, vanillic acid and friedelin which showed good antimicrobial activities were isolated from the stem bark of *T. annobonea* [2] and, diterpenoids and triterpenoids were isolated from the twigs of *T. batesii* [1]. As a continuation of our search for biologically active compounds in the genus *Thecacoris*, one new compound together with five known compounds were isolated from the leaves of *T. annobonea*. The known compounds were identified as betulinic acid (2), friedelin (3), aristolochic acid I (4), alpinumisoflavone (5) and 4'-O-methylepinumisoflavone (6). The present paper deals with the isolation and structural elucidation of one new lupane type triterpene and also demonstrates its phytotoxicity and antimicrobial activity together with the other isolated known compounds.

RESULTS AND DISCUSSION

The leaves of *T. annobonea* were extracted with CHCl_3 /acetone (1:1) at room temperature during 24 hours. The extract was submitted to repeated column chromatography and preparative TLC to afford betulinic acid, friedelin, aristolochic acid I, alpinumisoflavone, 4'-O-methylepinumisoflavone as well as one new lupane type triterpene (1). The ^1H and ^{13}C NMR, and MS of the known compounds were consistent with those reported in the literature.

Compound 1 was obtained as a white powder in fraction B, with the optical rotation $[\alpha]_D^{23} +34.2$ (c 0.7, CHCl_3). The empirical formula was deduced as $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$ by ESI MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 441), and confirmed by the HRESI MS (found 441.3731, calcd. 441.3732 for $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$). The IR spectrum showed an ester [3] absorption bands at ν 1719 cm^{-1} (C=O), 1250 cm^{-1} (C-O) and three absorption bands at ν 2937, 1639 and 878 cm^{-1} indicating the presence of a vinylidene group (=CH₂), characteristic of lup-20(29)-ene [4, 5].



The ^1H NMR and DEPT spectra (Table 1) indicated that compound 1 is a pentacyclic triterpenoid [6] with six methyl groups at δ 0.86, 0.89, 0.92, 0.99, 1.00 and 3.63 (3H each, s), six methine and twelve methylene groups. The signal at δ 3.63 (3H, s) was attributed to a methyl connected to an oxygen which showed a correlation with the carbon C-28 (δ 174.1). The olefinic methyl which normally appears in lupeol/lupane type triterpene at δ 1.70 was absent suggesting the absence of C-30 in the molecule. The methine signals at δ 2.30 (2H) were attributed to the protons at positions C-18 and C-19 according to the 1J (^1H - ^{13}C) correlation in HSQC spectrum. Three olefinic signals appeared at δ 4.90 (2H, ddd, J = 14.2, 9.0, 1.3 Hz, H-29) and 5.61 (1H, ddd, J = 14.2, 9.0, 7.3 Hz, H-20) indicating an exomethylene and an exomethine group, respectively.

The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) of compound 1 revealed the presence of 30 carbon atoms, which were in accordance with the proton data, in addition to a carboxylic ester signal at δ 174.1. The carbon atoms at δ 150.9 and 110.8 are characteristic for the carbons 20 and 29 of lup-20(29)-ene [7]. The 1J (^1H - ^{13}C) correlation of one proton with the carbon at δ 150.9 in HSQC spectrum, confirmed the absence of carbon C-30 in compound 1. These data indicated that compound 1 might be a lupan-type triterpene. The fragment at m/z 191 supported the presence of 30-lup-20(29)-ene [7]. The two main fragments at m/z 191 and m/z 249 in EI mass spectrum came from the breaking of alkane carbons C8-C14 and C9-C11 (Figure 1).

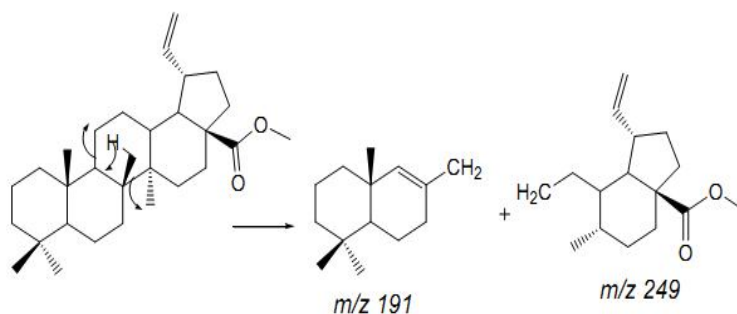


Fig 1: EI MS fragments justifying the structure of compound 1.



In the HMBC spectrum (Figure 2), correlations between the proton H-18/H-19 (δ 2.30) signals and carbons 12, 13, 14, 17, 18, 20, 21, 22, 28 and 29 indicated that compound **1** was 30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester, which is described here for the first time.

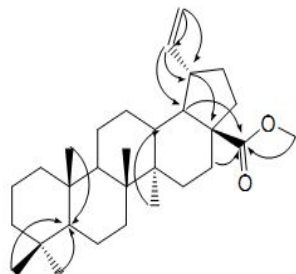


Fig 2: Selected HMBC correlation in compound **1**

Table 1: ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) NMR spectral data of 30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester (**1**) in CDCl_3 . Multiplicities and coupling constant in Hz are given in parentheses.

C/H	30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester (1)		
	δ_{H}	δ_{C} , DEPT	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	0.84 (2H, m)	37.2, CH ₂	C-2, C-3, C-5, C-10, C-25
2	1.15 (2H, m)	29.9, CH ₂	C-1, C-4, C-10
3	1.17 (2H, m)	35.2, CH ₂	C-1, C-4, C-23, C-24
4	-	39.6, C	-
5	1.09 (1H, m)	51.3, CH	C-7, C-10, C-24
6	1.11 (2H, m)	18.0, CH ₂	C-4, C-8
7	1.18 (2H, m)	35.9, CH ₂	C-5, C-6, C-8, C-9
8	-	39.8, C	-
9	1.25 (1H, m)	41.4, CH	C-10, C-25, C-26
10	-	38.6, C	-
11	1.87 (2H, m)	30.2, CH ₂	C-8, C-12, C-13
12	1.39 (2H, m)	31.8, CH ₂	C-9, C-11, C-13, C-14
13	1.63 (1H, m)	35.1, CH	C-8, C-14, C-17
14	-	38.3, C	-
15	1.83 (1H, m) 1.24 (1H, m)	34.9, CH ₂	C-13, C-14, C-16, C-17, C-27
16	2.19 (1H, m) 1.04 (1H, m)	32.2, CH ₂	C-14, C-15, C-17, C-18, C-28
17	-	58.2, C	-
18	2.30 (1H, m)	42.0, CH	C-12, C-13, C-14, C-17, C-18, C-20, C-21, C-22, C-28, C-29
19	2.30 (1H, m)	42.7, CH	C-12, C-13, C-14, C-17, C-18, C-20, C-21, C-22, C-28, C-29
20	5.61 (1H, ddd, 14.2, 9.0, 7.3)	150.9, CH	C-18, C-19, C-21, C-29
21	1.99 (1H, m)	32.1, CH ₂	C-17, C-18, C-19, C-20, C-22



1.46 (1H, m)		
22 1.54 (2H, m)	32.8, CH ₂	C-18, C-19, C-28
23 0.92 (3H, s)	28.1, CH ₃	C-3, C-4, C-24
24 0.86 (3H, s)	17.9, CH ₃	C-3, C-5, C-23
25 0.89 (3H, s)	18.7, CH ₃	C-1, C-5, C-9
26 1.00 (3H, s)	18.1, CH ₃	C-7, C-9, C-14
27 0.99 (3H, s)	21.3, CH ₃	C-8, C-14, C-15
28 -	174.1, C	-
29 4.90 (2H, ddd, 14.2, 9.0, 1.3)	110.8, CH ₂	C-19, C-20
1' 3.63 (3H, s)	52.9, CH ₃	C-28

Biological Activities

The antifungal and antibacterial activities of **1**, **2**, **3**, **4**, **5** and **6** were determined using the agar diffusion method with 8 mm paper disks loaded with 30 µg of each compound isolated from this plant. 30-Norlup-20-en-28-oic acid methyl ester (**1**) showed some activities against *Bacillus subtilis* (16 mm inhibition diameter), *Staphylococcus aureus* (13 mm), *Escherichia coli* (14 mm), *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) (15 mm), *Mucor miehei* (10 mm), *Chlorella vulgaris* (10 mm) and *Scenedesmus subspicatus* (14 mm). Compounds **2**, **3** and **4** showed weak activities against *Bacillus subtilis* (11, 10, 13 mm); *Escherichia coli* (11, 9, 13 mm), and *Candida albicans* (12, 11, 14 mm), respectively. Compounds **5** and **6** showed some activities against *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) (15, 13 mm), *Bacillus subtilis* (11, 13 mm), *Escherichia coli* (9, 12 mm) and *Staphylococcus aureus* (15, 15 mm), respectively. Nystatin was used as the reference and the test was repeated three times.

The plant growth inhibitory activities of compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5** and **6** (Figure 3) was determined using seedling growth test on lettuce. Compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5** and **6** at a concentration of 100 µg/mL inhibited lettuce root growth by 10%, 25%, 55%, 20%, 15% and 17% respectively, of that of the control. Betulinic acid (**2**) is reported to have a good activity against cancer cells of neuroectodermal origin and leukaemias [8] and, it is highly selective inhibitors of HIV-1 [9].

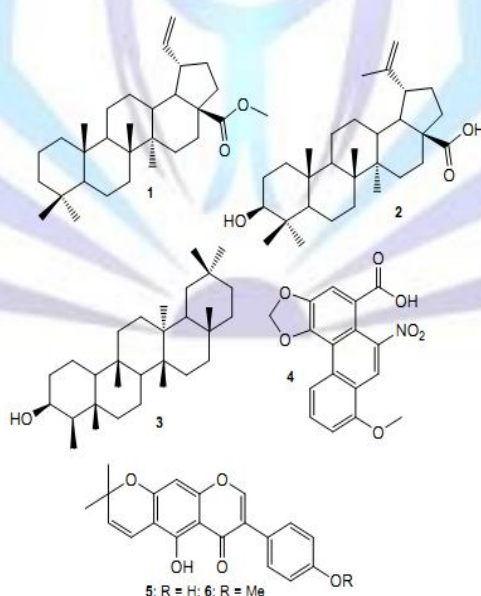


Fig 3: Structure of compounds 1, 2, 3, 4, 5 and 6



Experimental

General

ESI mass spectra were recorded on a Finnigan LCQ with quaternary pump Rheos 4000 (Flux Instrument). HRESI mass spectra were recorded on a Bruker FTICR 4.7 T mass spectrometer. EI mass spectra were recorded on a Finnigan MAT 95 spectrometer (70 eV) with perfluorokerosene as a reference substance for HREI-MS.

The ^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired with a Jeol EX-400 spectrometer. Chemical shifts are given on a δ (ppm) scale with TMS as an internal standard. Melting point is uncorrected and was obtained with a micro melting point apparatus (Yanaco, Tokyo-Japan). Optical rotation values were measured with a Horiba SEPA-300 polarimeter, and IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 1600 Series FT-IR spectrometer from films. Column chromatography was conducted on silica gel 60 (Kanto Chemical Co., Inc., Japan) and Sephadex LH-20 (Pharmacia, Sweden). TLC analysis was carried out using precoated silica gel plates (Merck), and spots were detected by spraying with $\text{H}_2\text{SO}_4/10\%$ vanillin and then heating. Flash chromatography was carried out on silica gel (230-400 mesh). R_f values were measured on Polygram SIL G/F₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co.) and melting and decomposition points were measured by the melting point apparatus of Electrothermal and were not corrected.

Plant Material

The leaves of *T. annobonea* were collected in April 2008 from Kumba, South-West Cameroon and were identified by Mr. Victor Nana of the Cameroon National Herbarium (Yaoundé), where a voucher specimen was deposited (Ref. N° 38569/HNC).

Extraction and Isolation

The leaf powder of *T. annobonea* (500 g) was extracted with CHCl_3 /acetone (1:1) at room temperature for 24 hours. After removing the solvents by evaporation under reduced pressure, the crude extract (40 g) was chromatographed on silica gel. Using hexane/ethyl acetate of increasing polarity, a total of 105 sub-fractions (ca. 250 ml each) were collected and combined on the basis of TLC analysis leading to two main fractions A and B.

Fraction A (3.0 g) was applied on a silica gel column chromatography and eluted with hexane/ethyl acetate (6:1) to achieve friedelin (3, 11.3 mg) [2, 10] and aristolochic acid I (4, 7.9 mg) [2, 11].

Fraction B (13.0 g) was chromatographed on silica gel and eluted with a mixture of hexane/ethyl acetate of increasing polarity to give two main fractions (I and II). Fraction I (2.0 g) was purified with a small Sephadex LH-20 column with $\text{CHCl}_3/3\%$ MeOH as solvent to yield betulinic acid (2, 23.0 mg) [12, 13] and 30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester (1, 127.8 mg). Fraction II (500 mg) produced in the same way alpinumisoflavone (5, 4.9 mg) and 4'-O-methylepinumisoflavone (6, 7.3 mg) [14].

30-Norlup-20-en-28-oic acid methyl ester (1)

White powder

MP: 138-139 °C

$R_f = 0.73$ (CHCl_3)

$[\alpha]_D^{25} +34.2$ (c 0.7, CHCl_3)

IR (film) (ν/cm^{-1}): 2937, 2874, 1719, 1639, 1453, 1374, 1250, 1182, 1026, 985, 964, 920, 878; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): See Table 1

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): See Table 1

EIMS (70 eV): m/z (rel. Int.) 440 (M^+ , 18), 425 (22), 410 (78), 387 (10), 332 (14), 313 (12), 274 (43), 249 (51), 208 (28), 205 (100), 191 (64), 177 (62), 166 (43), 151 (34), 126 (12), 109 (54), 86 (80), 72 (21), 43 (40)

(+) – HRESI MS calcd $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$ 441.3732 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found m/z 441.3731.

Phytotoxic Assay

Lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) were used for the bioassay. Nine seeds were deposited on filter paper containing a defined concentration of the test compound in a Petri dish (4 cm id.). Distilled water (1 ml, containing 100 ppm (w/v) Tween 80) was added to the Petri dish, and incubation was done at 25 °C under continuous light for 7 days. The control experiments were conducted with distilled water alone. The elongation of the roots and shoots was measured and compared with those of the control.

Antimicrobial assay

Agar diffusion tests were performed in the usual manner [15] with *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* (on peptone agar), *Staphylococcus aureus* (Bacto nutrient broth), *Streptomyces viridochromogenes* (M Test agar), the fungi *Mucor miehei* and *Candida albicans* (Sabouraud agar), and three microalgae (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus subspicatus*).



Compounds were dissolved in an azeotrope chloroform/MeOH (87:13) and 30 μg pro paper disks (\varnothing 8 mm) were impregnated with each using a 100 μl syringe, dried for 1 h under sterile conditions and placed on the pre-made agar test plates. Bacteria and fungi plates were kept in an incubator at 37 °C for 12 h, micro algae plates for three days at room temperature in a day light incubator. The diameter of inhibition zones was measured.

Conclusion

In this study, we focused on the secondary metabolites of CHCl_3 /acetone (1:1) extract. One new compound, 30-norlup-20-en-28-oic acid methyl ester (1) with five known compounds, betulinic acid (2), friedelin (3), aristolochic acid I (4), alpinumisoflavone (5) and 4'-O-methylepinumisoflavone (6) were isolated from the leaves of *T. annobonea*. Using 1 and 2D NMR, the new compound was fully characterized. All the isolated compounds were evaluated for their phytotoxic and antimicrobial activity. At a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the new isolated (1) was the most active compound compare to the control for phytotoxicity and antimicrobial activity, respectively. Friedelin (3) and aristolochic acid I (4) were also isolated from the stem bark of *T. annobonea*.² It still difficult to predict the biological activities as well as the chemical constituents from *Thecacoris* species. The few differences between the secondary metabolites isolated from the leaves of *T. annobonea* and other *Thecacoris* species [1, 2] are may be related to the real specific differences or, more probably to a geographic or environmental influence on biosynthesis [16]. In conclusion, more studies are required to determine properly the chemical constituents of the *Thecacoris* species as well as a relationship between their biological activities.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) for the fellowship (N^o. P08430) awarded to Dr. Poumale Herve Martial Poumale at the University of Yamagata, Japan.

References

- [1] Ngadjui, B. T., Poumale, H. M. P., Guedem, A. N., Bezabih, M. and Abegaz, B. M. (2007), "Ent-kaurene and Ent-beyerene diterpenoids and other constituents of *Thecacoris batesii*", *Bull. Chem. Soc. Ethiopia*, **21**, 89-94.
- [2] Kuete, V., Poumale, H. M. P., Guedem, A. N., Shiono, Y., Randrianasolo, R. and Ngadjui BT. (2010), "Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae)", *South African Journal of Botany*, **76**, 536-542.
- [3] Poumale, H. M. P., Randrianasolo, R., Rakotoarimanga, J. V., Raharisololalao, A., Krebs, H. C., Tchouankeu, J. C. and Ngadjui, B. T. (2008), "Flavonoid glycosides and Other Constituents of *Psorospermum androsaemifolium* Baker (Clusiaceae)", *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1428-1430.
- [4] Nenkep, V. N., Shirri, J. C., Van-Dufat, H. T., Sipepnou, F., Verite, P., Seguin, E., Tillequin, F. and Wandji, J. (2008), "New flavan and unusual chalcone glycosides from *Drypetes parvifolia*", *Chinese Chem. Lett.*, **19**, 943-946.
- [5] Roitman, J. N. and Jurd, L. (1978), "Triterpenoid and phenolic constituents of *Colubrina granulose*", *Phytochemistry*, **17**, 491-494.
- [6] Cheung, H. T. and Williamson, D. G. (1969) "N.M.R. signals of methyl groups of triterpenes with oxygen functions at positions 2, 3 and 23", *Tetrahedron*, **25**, 119-128.
- [7] Mbaze, L. M., Poumale, H. M. P., Wansi, J. D., Lado, J. A., Khan, S. N., Iqbal, M. C., Ngadjui, B. T. and Laatsch H. (2007), " α -Glucosidase inhibitory pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Fagara tessmannii* (Rutaceae)", *Phytochemistry*, **68**, 591-595.
- [8] Kessler, J. H., Mullauer, F. B., De Roo, G. M. and Medema, J. P. (2007), "Broad *in vitro* efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types", *Cancer Lett.*, **251**, 132-145.
- [9] Faujan, N. H., Alitheen, N. B., Yeap, S. K., Ali, A. M., Muhajir, A. H. and Ahmad, F. B. H. (2010), "Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line", *African J. Biotech.*, **9**, 6387-6396.
- [10] Kuete, V., Nguemeving, J. R., Beng, V. P., Azebaze, A. G. B., Etoa, F. X., Meyer, M., Bodo, B. and Nkengfack, A. E. (2007), "Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae)", *J. Ethnopharmacol.*, **109**, 372-379.
- [11] Nascimento, I. R. and Lopes, L. M. X. (2003), "Diterpene esters of aristolochic acids from *Aristolochia pubescens*", *Phytochemistry*, **63**, 953-957.
- [12] Poumale, H. M. P., Amadou, D., Shiono, Y., Kapche, G. D. W. F., Ngadjui, B. T. (2011), "Chemical constituents of *Dorstenia convexa* (Moraceae)", *Asian J. Chem.*, **23**, 525-527.
- [13] Kamga, J., Sandjo, L. P., Poumale, H. M., Ngameni, B., Shiono, Y., Yemloul, M., Rincheval, V., Ngadjui, B. T. and Kirsch, G. (2010), "Politamide, a new constituent from the stem bark of *Ficus polita* Vahl (Moraceae)", *Arkvoc*, **ii**, 323-329.



- [14] Nkengfack, A. E., Azebaze, A. G. B., Waffo, A. K., Fomum, Z. T., Meyer, M. and Van Heerden, F.R. (2001), "Cytotoxic isoflavones from *Erythrina indica*", *Phytochemistry*, **58**, 1113-1120.
- [15] Poumale, H. M. P., Ngadjui, B. T., Helmke, E. and Laatsch, H. (2006), "New Anthraquinones from a Marine *Streptomyces* sp. -Isolation, Structure Determination and Biological Activities", *Zeitschrift für Naturforschung*, **61b**, 1450-1454.
- [16] Pistelli, L., Chiellini, E. E. and Morelli, I. (2000), "Flavonoids from *Ficus pumila*", *Biochem. Syst. Ecol.*, **28**, 287-289.

