

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

ORGANIQUE

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET

FORMATION DOCTORALE EN

SCIENCES, TECHNOLOGIE, ET

GEOSCIENCES

LABORATOIRE DES SUBSTANCES

NATURELLES ET VALORISATION



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ORGANIC

CHEMISTRY

\*\*\*\*\*

POSTGRADUATE SCHOOL OF

SCIENCE, TECHNOLOGY AND

GEOSCIENCE

LABORATORY OF NATURAL

PRODUCTS AND

VALORIZATION

**Contribution à l'étude phytochimique et pharmacologique  
de trois plantes médicinales : *Cissus populnea* Guill. &  
Perr. (Vitaceae), *Gardenia aqualla* Stapf & Hucth  
(Rubiaceae) et *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn  
(Sapotaceae)**

THESE

Présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du diplôme  
de Doctorat/Ph.D en Chimie Organique

Par : **NYEMB Jean Noël**  
Master en Chimie Organique

Sous la direction de  
**MBAFOR TANYI Joseph**  
Professeur  
**TCHINDA TIABOU Alembert**  
Directeur de Recherches Médicales et d'études des  
Plantes Médicinales

Année Académique : 2019



UNIVERSITE DE YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

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

\*\*\*\*\*

UNITE DE RECHERCHE DE  
FORMATION DOCTORALE EN CHIMIE  
ET APPLICATIONS



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

POST GRADUATE SCHOOL FOR  
SCIENCE TECHNOLOGY  
AND  
GEOSCIENCES

\*\*\*\*\*

DOCTORAL RESEARCH UNIT  
IN  
CHEMISTRY AND APPLICATIONS

## ATTESTATION OF CORRECTION

We the undersigned, respectively President of the jury and Examiner of the Thesis presented and defended by **Mr. NYEMB Jean Noël**, Registration number **12T0975** and Titled “**Contribution to the phytochemical and pharmacological study of three medicinal plants : *Cissus populnea* Guill. & Perr. (Vitaceae), *Gardenia aqualla* Stapf & Hucth (Rubiaceae) and *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn (Sapotaceae)**”, hereby testify that this thesis has been corrected in accordance with the criticisms and suggestions made by the jury.


This attestation is therefore issued to serve whatever purpose it deserves.

The President of the Jury

Pr DONGO Etienne

The Examiner

Pr NGO MBING Joséphine

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>UNIVERSITE DE YAOUNDE I</b><br><b>FACULTE DES SCIENCES</b><br>Division de la Programmation et du<br>Suivi des Activités Académiques |  | <b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b><br><b>FACULTY OF SCIENCE</b><br>Division of Programming and<br>follow-up of Academic Affairs |
| <b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>  |   | <b>LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF</b>   |

**ANNEE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION : 15 Janvier 2020**

**ADMINISTRATION**

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

**VICE-DOYEN/DPSAA** : DONGO Etienne, *Professeur*

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

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

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

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche** : MBAZE MEVA' A Luc Léonard, *Professeur*

| <b>I. DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)</b> |                                |                       |                                      |
|--|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| <b>N°</b>                                    | <b>NOMS ET PRENOMS</b>         | <b>GRADE</b>          | <b>OBSERVATIONS</b>                  |
| 1  | BIGOGA DIAGA Jude              | Professeur            | En poste                             |
| 2  | FEKAM BOYOM Fabrice            | Professeur            | En poste                             |
| 3  | FOKOU Elie                     | Professeur            | En poste                             |
| 4  | KANSCI Germain                 | Professeur            | En poste                             |
| 5  | MBACHAM FON Wilfried           | Professeur            | En poste                             |
| 6  | MOUNDIPA FEWOU Paul            | Professeur            | <b>Chef de Département</b>           |
| 7  | NINTCHOM PENLAP V. Epse BENG   | Professeur            | En poste                             |
| 8  | OBEN Julius ENYONG             | Professeur            | En poste                             |
| 9  | ACHU Merci BIH                 | Maître de Conférences | En poste                             |
| 10   | ATOGHO Barbara Mma             | Maître de Conférences | En poste                             |
| 11   | AZANTSA KINGUE GABIN BORIS     | Maître de Conférences | En poste                             |
| 12   | BELINGA née NDOYE FOE M. C. F. | Maître de Conférences | <b>Chef DAF / FS</b>                 |
| 13   | BOUDJEKO Thaddée               | Maître de Conférences | En poste                             |
| 14   | DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline    | Maître de Conférences | En poste                             |
| 15   | EFFA NNOMO Pierre              | Maître de Conférences | En poste                             |
| 16   | MOFOR née TEUGWA Clotilde      | Maître de Conférences | <b>Inspecteur de Service MINESUP</b> |
| 17   | NANA Louise Epse WAKAM         | Maître de Conférences | En poste                             |
| 18   | NGONDI Judith Laure            | Maître de Conférences | En poste                             |

|    |                                 |                       |          |
|----|---------------------------------|-----------------------|----------|
| 19 | NGUEFACK Juliënne               | Maître de Conférences | En poste |
| 20 | NJAYOU Frédéric Nico            | Maître de Conférences | En poste |
| 21 | TCHANA KOUATCHOUA Angèle        | Maître de Conférences | En poste |
| 22 | AKINDEH MBUH NJI                | Chargée de Cours      | En poste |
| 23 | BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie  | Chargée de Cours      | En poste |
| 24 | DAKOLE DABOY Charles            | Chargée de Cours      | En poste |
| 25 | DJOKAM TAMO Rosine              | Chargée de Cours      | En poste |
| 26 | DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane     | Chargée de Cours      | En poste |
| 27 | DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise    | Chargée de Cours      | En poste |
| 28 | EWANE Cécile Anne               | Chargée de Cours      | En poste |
| 29 | FONKOUA Martin                  | Chargé de Cours       | En poste |
| 30 | BEBEE Fadimatou                 | Chargée de Cours      | En poste |
| 31 | KOTUE KAPTUE Charles            | Chargé de Cours       | En poste |
| 32 | LUNGA Paul KEILAH               | Chargé de Cours       | En poste |
| 33 | MANANGA Marlyse Joséphine       | Chargée de Cours      | En poste |
| 34 | MBONG ANGIE M. Mary Anne        | Chargée de Cours      | En poste |
| 35 | PECHANGOU NSANGOU Sylvain       | Chargée de Cours      | En poste |
| 36 | Palmer MASUMBE NETONGO          | Chargé de Cours       | En poste |
| 37 | MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle | Assistante            | En poste |

## II. DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE (BPA) (43)

|    |                                 |                       |   |
|----|---------------------------------|-----------------------|---|
| 1  | AJEAGAH Gideon AGHAINDUM        | Professeur            | <i>V. Doyen/DSSE</i>                                    |
| 2  | BILONG BILONG Charles-Félix     | Professeur            | <b>Chef de Département</b>                              |
| 3  | DIMO Théophile                  | Professeur            | En Poste  |
| 4  | DJIETO LORDON Champlain         | Professeur            | En poste  |
| 5  | ESSOMBA née NTSAMA MBALA        | Professeur            | <i>V. Doyen/FMSB/UYI</i>                                |
| 6  | FOMENA Abraham                  | Professeur            | En Poste  |
| 7  | KAMGANG René                    | Professeur            | <i>C.S. MINRESI</i>                                     |
| 8  | KAMTCHOUING Pierre              | Professeur            | En Poste  |
| 9  | NJAMEN Dieudonné                | Professeur            | En poste  |
| 10 | NJIOKOU Flobert                 | Professeur            | En Poste  |
| 11 | NOLA Moïse                      | Professeur            | En poste  |
| 12 | TAN Paul VERNYUY                | Professeur            | En poste  |
| 13 | TCHUEM TCHUENTE Louis Albert    | Professeur            | <i>Inspecteur de service<br/>Coord. Progr. MINSANTE</i> |
| 14 | ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert     | Professeur            | En poste  |
| 15 | BILANDA Danielle Claude         | Maître de Conférences | En poste  |
| 16 | DJIOGUE Séfirin                 | Maître de Conférences | En poste  |
| 17 | DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré    | Maître de Conférences | En poste  |
| 18 | FOTO MENBOHAN Samuel            | Maître de Conférences | En poste  |
| 19 | NJATSA Hermine épouse MEGAPTCHE | Maître de Conférences | En Poste  |
| 20 | KEKEUNOU Sévilor                | Maître de Conférences | En poste  |
| 21 | MEGNEKOU Rosette                | Maître de Conférences | En poste  |
| 22 | MONY Ruth épouse NTONE          | Maître de Conférences | En Poste  |
| 23 | NGUEGUIM TSOFAK Florence        | Maître de Conférences | En poste  |
| 24 | TOMBI Jeannette                 | Maître de Conférences | En poste  |



|    |                             |                  |                     |
|----|-----------------------------|------------------|---------------------|
| 25 | ALENE Désirée Chantal       | Chargée de Cours | En poste            |
| 26 | ATSAMO Albert Donatien      | Chargé de Cours  | En poste            |
| 27 | BELLET EDIMO Oscar Roger    | Chargé de Cours  | En poste            |
| 28 | DONFACK Mireille            | Chargée de Cours | En poste            |
| 29 | ETEME ENAMA Serge           | Chargé de Cours  | En poste            |
| 30 | GOUNOUE KAMKUMO Raceline    | Chargée de Cours | En poste            |
| 31 | KANDEDA KAVAYE Antoine      | Chargé de Cours  | En poste            |
| 32 | LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.   | Chargé de Cours  | En poste            |
| 33 | MAHOB Raymond Joseph        | Chargé de Cours  | En poste            |
| 34 | MBENOUN MASSE Paul Serge    | Chargé de Cours  | En poste            |
| 35 | MOUNGANG Luciane Marlyse    | Chargée de Cours | En poste            |
| 36 | MVEYO NDANKEU Yves Patrick  | Chargé de Cours  | En poste            |
| 37 | NGOULATEU KENFACK Omer Bébé | Chargé de Cours  | En poste            |
| 38 | NGUEMBOK                    | Chargé de Cours  | En poste            |
| 39 | NJUA Clarisse Yafi          | Chargée de Cours | <i>Chef Div/UBa</i> |
| 40 | NOAH EWOTI Olive Vivien     | Chargée de Cours | En poste            |
| 41 | TADU Zephyrin               | Chargé de Cours  | En poste            |
| 42 | YEDE                        | Chargée de Cours | En poste            |
| 43 | KOGA MANG DOBARA            | Assistant        | En poste            |

### III. DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALE (BPV) (25)

|    |                             |                       |                            |
|----|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1  | AMBANG Zachée               | Professeur            | <i>Chef Division/UYII</i>  |
| 2  | BELL Joseph Martin          | Professeur            | En poste                   |
| 3  | DJOCGOUE Pierre François    | Professeur            | En poste                   |
| 4  | MOSSEBO Dominique Claude    | Professeur            | En poste                   |
| 5  | YOUMBI Emmanuel             | Professeur            | <b>Chef de Département</b> |
| 6  | ZAPFACK Louis               | Professeur            | En poste                   |
| 7  | ANGONI Hyacinthe            | Maître de Conférences | En poste                   |
| 8  | BIYE Elvire Hortense        | Maître de Conférences | En poste                   |
| 9  | KENGNE NOUMSI Ives Magloire | Maître de Conférences | En poste                   |
| 10 | MALA Armand William         | Maître de Conférences | En poste                   |
| 11 | MBARGA BINDZI Marie Alain   | Maître de Conférences | <i>CT/UDs</i>              |
| 12 | MBOLO Marie                 | Maître de Conférences | En poste                   |
| 13 | NDONGO BEKOLO               | Maître de Conférences | <i>CE/MINRESI</i>          |
| 14 | NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.   | Maître de Conférences | En poste                   |
| 15 | TSOATA Esaïe                | Maître de Conférences | En poste                   |
| 16 | TONFACK Libert Brice        | Maître de Conférences | En poste                   |
| 17 | DJEUANI Astride Carole      | Chargée de Cours      | En poste                   |
| 18 | GOMANDJE Christelle         | Chargée de Cours      | En poste                   |
| 19 | MAFFO MAFFO Nicole Liliane  | Chargée de Cours      | En poste                   |
| 20 | MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel  | Chargée de Cours      | En poste                   |
| 21 | NGALLE Hermine BILLE        | Chargé de Cours       | En poste                   |
| 22 | NGOUO Lucas Vincent         | Chargé de Cours       | En poste                   |
| 23 | NNANGA MEBENGA Ruth Laure   | Chargé de Cours       | En poste                   |
| 24 | NOUKEU KOUAKAM Armelle      | Chargé de Cours       | En poste                   |
| 25 | ONANA Jean Michel           | Chargé de Cours       | En poste                   |

| <b>IV. DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)</b> |                                 |                       |  |
|--|---------------------------------|-----------------------|--|
| 1  | AGWARA ONDOH Moïse              | Professeur            | <i>Vice-Recteur/UBa</i>                |
| 2  | ELIMBI Antoine                  | Professeur            | En poste                               |
| 3  | Florence UFI CHINJE Epse MELO   | Professeur            | <i>Recteur/UN</i>                      |
| 4  | GHOGOMU Paul MINGO              | Professeur            | <i>Ministre Chargé de Miss. PR</i>     |
| 5  | NANSEU Njiki Charles Péguy      | Professeur            | En poste                               |
| 6  | NDIFON Peter TEKE               | Professeur            | <b>Chef de Département/ CT-MINRESI</b> |
| 7  | NDIKONTAR Maurice KOR           | Professeur            | <i>Vice-Doyen/UBa</i>                  |
| 8  | NGOMO Horace MANGA              | Professeur            | <i>Vice Chancelor/UB</i>               |
| 9  | NENWA Justin                    | Professeur            | En poste                               |
| 10   | NGAMENI Emmanuel                | Professeur            | <i>Doyen FS/UDs</i>                    |
| 11   | BABALE née DJAM DOUDOU          | Maître de Conférences | <i>Chargée Mission P.R.</i>            |
| 12   | DJOUFAC WOUMFO Emmanuel         | Maître de Conférences | En poste                               |
| 13   | KAMGANG YUBI Georges            | Maître de Conférences | En poste                               |
| 14   | KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.       | Maître de Conférences | En poste                               |
| 15   | KONG SAKEO                      | Maître de Conférences | En poste                               |
| 16   | NDI NSAMI Julius                | Maître de Conférences | En poste                               |
| 17   | NJIOMOU C. Epse DJANGANG        | Maître de Conférences | En poste                               |
| 18   | NJOYA Dayirou                   | Maître de Conférences | En poste                               |
| 19   | YOUNANG Elie                    | Maître de Conférences | En poste                               |
| 20   | ACAYANKA Elie                   | Chargé de Cours       | En poste                               |
| 21   | BELIBI BELIBI Placide Désiré    | Chargé de Cours       | <i>CS/ENS Bertoua</i>                  |
| 22   | CHEUMANI YONA Arnaud M.         | Chargé de Cours       | En poste                               |
| 23   | EMADACK Alphonse                | Chargé de Cours       | En poste                               |
| 24   | KENNE DEDZO GUSTAVE             | Chargé de Cours       | En poste                               |
| 25   | KOUOTOU DAOUDA                  | Chargé de Cours       | En poste                               |
| 26   | MAKON Thomas Beauregard         | Chargé de Cours       | En poste                               |
| 27   | MBEY Jean Aimé                  | Chargé de Cours       | En poste                               |
| 28   | NCHIMI NONO KATIA               | Chargé de Cours       | En poste                               |
| 29   | NEBA née NDO SIRI Bridget NDOYE | Chargée de Cours      | <i>CT / MINFEM</i>                     |
| 30   | NYAMEN Linda Dyorisse           | Chargée de Cours      | En poste                               |
| 31   | PABOUDAM GBAMBIE A.             | Chargée de Cours      | En poste                               |
| 32   | TCHAKOUTE KOUAMO Hervé          | Chargé de Cours       | En poste                               |
| <b>V. DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (32)</b>    |                                 |                       |  |
| 1  | DONGO Etienne                   | Professeur            | <b>Vice-Doyen/PSAA</b>                 |
| 2  | GHOGOMU TIH Robert Ralph        | Professeur            | Directeur IBAF/UDS                     |
| 3  | NGOUELA Silvère Augustin        | Professeur            | En poste                               |
| 4  | NKENGFACK Augustin Ephraïm      | Professeur            | <b>Chef de Département</b>             |
| 5  | NYASSE Barthélemy               | Professeur            | En poste                               |
| 6  | PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel     | Professeur            | <i>Directeur/MINESUP</i>               |
| 7  | WANDJI Jean                     | Professeur            | En poste                               |

|    |                                 |                       |                             |
|----|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 8  | Alex de Théodore ATCHADE        | Maître de Conférences | <i>DEPE/Rectorat/UIYI</i>   |
| 9  | EYONG Kenneth OBEN              | Maître de Conférences | <i>Chef Service DPER</i>    |
| 10 | FOLEFOC Gabriel NGOSONG         | Maître de Conférences | En poste                    |
| 11 | FOTSO WABO Ghislain             | Maître de Conférences | En poste                    |
| 12 | KEUMEDJIO Félix                 | Maître de Conférences | En poste                    |
| 13 | KEUMOGNE Marguerite             | Maître de Conférences | En poste                    |
| 14 | KOUAM Jacques                   | Maître de Conférences | En poste                    |
| 15 | MBAZOA née DJAMA Céline         | Maître de Conférences | En poste                    |
| 16 | MKOUNGA Pierre                  | Maître de Conférences | En poste                    |
| 17 | NGO MBING Joséphine             | Maître de Conférences | <i>Sous Dir/ MINRESI</i>    |
| 18 | NGONO BIKOBO Dominique Serge    | Maître de Conférences | En poste                    |
| 19 | NOTE LOUGBOT Olivier Placide    | Maître de Conférences | <i>Chef Service/MINESUP</i> |
| 20 | NOUNGOUE TCHAMO Didérot         | Maître de Conférences | En poste                    |
| 21 | TABOPDA KUATE Turibio           | Maître de Conférences | En poste                    |
| 22 | TCHOUANKEU Jean-Claude          | Maître de Conférences | <i>Doyen/FS/UIYI</i>        |
| 23 | TIH née NGO BILONG E. Anastasie | Maître de Conférences | En poste                    |
| 24 | YANKEP Emmanuel                 | Maître de Conférences | En poste                    |
| 25 | AMBASSA Pantaléon               | Chargé de Cours       | En poste                    |
| 26 | KAMTO Eutrophe Le Doux          | Chargé de Cours       | En poste                    |
| 27 | MVOT AKAK Carine                | Chargée de Cours      | En poste                    |
| 28 | NGNINTEDO Dominique             | Chargé de Cours       | En poste                    |
| 29 | NGOMO Orléans                   | Chargée de Cours      | En poste                    |
| 30 | OUAHOUE WACHE Blandine M.       | Chargée de Cours      | En poste                    |
| 31 | TAGATSING FOTSING Maurice       | Chargé de Cours       | En poste                    |
| 32 | ZONDENDEGOUMBA Ernestine        | Chargée de Cours      | En poste                    |

## VI. DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

|    |                                |                       |  |
|----|--------------------------------|-----------------------|--|
| 1  | ATSA ETOUNDI Roger             | Professeur            | <i>Chef Div. MINESUP</i>                     |
| 2  | FOUDA NDJODO Marcel Laurent    | Professeur            | <i>Chef Dpt ENS/<br/>Chef I.G.A. MINESUP</i> |
| 3  | NDOUNAM René                   | Maître de Conférences | En poste                                     |
| 4  | ABESSOLO ALO'O Gislain         | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 5  | AMINOUE Halidou                | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 6  | DJAM Xaviera YOUHEP KIMBI      | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 7  | EBELE Serge Alain              | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 8  | KOUOKAM KOUOKAM E. A.          | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 9  | MELATAGIA YONTA Paulin         | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 10 | MOTO MPONG Serge Alain         | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 11 | TAPAMO Hyppolite               | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 12 | KAMGUEU Patrick Olivier        | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 13 | MONTHÉ DJIADEU Valéry M.       | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 14 | OLLE OLLE Daniel Claude Delort | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 15 | TINDO Gilbert                  | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 16 | TSOPZE Norbert                 | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 17 | WAKU KOUAMOU Jules             | Chargé de Cours       | En poste                                     |
| 18 | BAYEM Jacques Narcisse         | Assistant             | En poste                                     |

|    |                           |            |          |
|----|---------------------------|------------|----------|
| 19 | DOMGA KOMGUEM Rodrigue    | Assistant  | En poste |
| 20 | HAMZA Adamou              | Assistant  | En poste |
| 21 | JIOMEKONG AZANZI Fidel    | Assistant  | En poste |
| 22 | KAMDEM KENGNE Christiane  | Assistante | En poste |
| 23 | MAKEMBE S. Oswald         | Assistant  | En poste |
| 24 | MEYEMDOU Nadège Sylvianne | Assistante | En poste |
| 25 | NKONDOCK MI BAHANACK N.   | Assistant  | En poste |

#### VII. DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUE (MA) (26)

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

#### VIII. DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (12)

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

|   |                               |                       |                                    |
|---|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 9   | BOUGNOM Blaise Pascal         | Chargé de Cours       | En poste                           |
| 10  | ESSONO OBOUGOU Germain G.     | Chargé de Cours       | En poste                           |
| 11  | NJIKI BIKOÏ Jacky             | Chargée de Cours      | En poste                           |
| 12  | TCHIKOUA Roger                | Chargé de Cours       | En poste                           |
| <b>IX. DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PHY) (38)</b> |                               |                       |                                    |
| 1   | BEN- BOLIE Germain Hubert     | Professeur            | En poste                           |
| 2   | ESSIMBI ZOBO Bernard          | Professeur            | En poste                           |
| 3   | KOFANE Timoléon Crépin        | Professeur            | En poste                           |
| 4   | NANA ENGO Serge Guy           | Professeur            | En poste                           |
| 5   | NDJAKA Jean Marie Bienvenu    | Professeur            | <b>Chef de Département</b>         |
| 6   | NOUAYOU Robert                | Professeur            | En poste                           |
| 7   | NJANDJOCK NOUCK Philippe      | Professeur            | <i>Sous Directeur/MINRESI</i>      |
| 8   | PEMHA Elkana                  | Professeur            | En poste                           |
| 9   | TABOD Charles TABOD           | Professeur            | <i>Doyen/UBa</i>                   |
| 10  | TCHAWOUA Clément              | Professeur            | En poste                           |
| 11  | WOAFO Paul                    | Professeur            | En poste                           |
| 12  | BIYA MOTTO Frédéric           | Maître de Conférences | <i>DG/HYDRO Mekin</i>              |
| 13  | BODO Bertrand                 | Maître de Conférences | En poste                           |
| 14  | DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM  | Maître de Conférences | En poste                           |
| 15  | EKOBENA FOU DA Henri Paul     | Maître de Conférences | <i>Chef Division/UN</i>            |
| 16  | EYEBE FOU DA Jean sire        | Maître de Conférences | En poste                           |
| 17  | FEWO Serge Ibraïd             | Maître de Conférences | En poste                           |
| 18  | HONA Jacques                  | Maître de Conférences | En poste                           |
| 19  | MBANE BIOUELE                 | Maître de Conférences | En poste                           |
| 20  | NANA NBENDJO Blaise           | Maître de Conférences | En poste                           |
| 21  | NDOP Joseph                   | Maître de Conférences | En poste                           |
| 22  | SAIDOU                        | Maître de Conférences | <i>Sous Directeur/MINRESI</i>      |
| 23  | SIEWE SIEWE Martin            | Maître de Conférences | En poste                           |
| 24  | SIMO Elie                     | Maître de Conférences | En poste                           |
| 25  | VONDOU DerbetiniAppolinaire   | Maître de Conférences | En poste                           |
| 26  | WAKATA née BEYA Annie         | Maître de Conférences | <i>Sous Directeur/MINESUP</i>      |
| 27  | ZEKENG Serge Sylvain          | Maître de Conférences | En poste                           |
| 28  | ABDOURAHIMI                   | Chargé de Cours       | En poste                           |
| 29  | EDONGUE HERVAIS               | Chargé de Cours       | En poste                           |
| 30  | ENYEGUE A NYAM épse BELINGA   | Chargée de Cours      | En poste                           |
| 31  | FOUEDJIO David                | Chargé de Cours       | <i>Chef Cellule MINADER</i>        |
| 32  | MBINACK Clément               | Chargé de Cours       | En poste                           |
| 33  | MBONO SAMBA Yves Christian U. | Chargé de Cours       | En poste                           |
| 34  | MEL'I Joelle Larissa          | Chargé de Cours       | En poste                           |
| 35  | MVOGO ALAIN                   | Chargé de Cours       | En poste                           |
| 36  | OBOUNOU Marcel                | Chargé de Cours       | <i>DA/U Inter Etat /Sangmalima</i> |
| 37  | WOULACHE Rosalie Laure        | Chargée de Cours      | En poste                           |
| 38  | CHAMANI Roméo                 | Assistant             | En poste                           |



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

|           |                   |                 |          |
|-----------|-------------------|-----------------|----------|
| <b>40</b> | TEHNA Nathanaël   | Chargé de Cours | En poste |
| <b>41</b> | TEMGA Jean Pierre | Chargé de Cours | En poste |

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

| <b>NOMBRE D'ENSEIGNANTS</b> |                    |                               |                         |                   |                 |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|
| <b>DÉPARTEMENT</b>          | <b>Professeurs</b> | <b>Maîtres de Conférences</b> | <b>Chargés de Cours</b> | <b>Assistants</b> | <b>Total</b>    |
| B.C.H.                      | 08 (01)            | 13 (08)                       | 15 (07)                 | 01 (01)           | <b>37 (17)</b>  |
| B.P.A.                      | 14 (01)            | 10 (05)                       | 18 (05)                 | 01 (00)           | <b>43 (11)</b>  |
| B.P.V.                      | 06 (00)            | 10 (02)                       | 09 (05)                 | 00 (00)           | <b>25 (07)</b>  |
| C.I.                        | 10 (01)            | 09 (02)                       | 13 (03)                 | 00 (00)           | <b>32 (06)</b>  |
| C.O.                        | 07 (00)            | 17 (04)                       | 08 (04)                 | 00 (00)           | <b>32 (08)</b>  |
| I.N.                        | 02 (00)            | 01 (00)                       | 14 (00)                 | 08 (02)           | <b>25 (02)</b>  |
| M.A.T                       | 01 (00)            | 05 (00)                       | 19 (02)                 | 01 (00)           | <b>26 (02)</b>  |
| M.I.B.                      | 01 (00)            | 05 (02)                       | 06 (01)                 | 00 (00)           | <b>12 (03)</b>  |
| P.H.Y.                      | 11 (00)            | 16 (02)                       | 10 (02)                 | 01 (00)           | <b>38 (04)</b>  |
| S.T.                        | 08 (01)            | 14 (01)                       | 19 (05)                 | 00 (00)           | <b>41 (07)</b>  |
| <b>Total</b>                | <b>68 (04)</b>     | <b>100 (26)</b>               | <b>131 (34)</b>         | <b>12 (03)</b>    | <b>311 (67)</b> |

Soit un total de **311 (67)** dont :

- Professeurs **61 (04)**
- Maîtres de Conférences **100 (26)**
- Chargés de Cours **131 (34)**
- Assistants **12 (03)**

( ) = Nombre de Femmes

## **DEDICACE**

*A la mémoire de mon père Feu Bell NYEMB*

*A ma mère NGO NTONDJE Agnès*

*A ma famille*

## **REMERCIEMENTS**



C'est avec un embarras que j'ai débuté cette thèse, et une grande joie que j'en arrive aujourd'hui à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne. Je commencerai ces remerciements par une citation de **Marcel PROUST** : « *Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.* »

Cette thèse doit beaucoup, à ceux là qui m'ont encouragé et soutenu durant ces quelques six années qui sont passées si rapidement. Je voudrais leur adresser ces quelques mots afin de les remercier.

Au **Pr Joseph TANYI MBAFOR**, mon superviseur de thèse, je vous remercie pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez accueilli dans votre équipe de recherche, pour la confiance que vous m'avez accordée et pour le soutien précieux qui a fait progresser ce travail. Je tiens à vous exprimer ma gratitude, mon estime et mon profond respect.

Je remercie chaleureusement mes Directeurs de thèse, notamment :

**Dr Emmanuel TALLA**, Maître de conférences, Chef de Département de Chimie des Matériaux, et Chef de Division à l'Ecole de Génie Chimique et des Industries Minérales (EGCIM) de l'Université de Ngaoundéré. Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de son implication dans la réalisation de ce travail. Je souhaite à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son aide, soutien sans faille, ses nombreux conseils avisés, sa disponibilité, son dynamisme, sa volonté, son abnégation et sa bonne humeur. Plus qu'un enseignant, vous êtes un père.

**Dr Alembert TCHINDA TIABOU**, Directeur de Recherches, au Centre de Recherche en Plantes Médicinales et Médecine Traditionnelle (CRPMT) de l'Institut de recherches Médicales et d'étude des Plantes Médicinales (IMPM). Au-delà de la théorie, tout ce que je connais en pratique aujourd'hui, surtout en ce qui concerne l'élucidation structurale des composés je vous le dois et ce travail est la preuve parfaite que vos enseignements ne sont pas tombés dans des oreilles sourdes. Je lui adresse ma sincère reconnaissance pour ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité et son soutien. Soyez assuré de ma gratitude et de mon amitié.

Mes remerciements vont également au **Pr Jamshed IQBAL**, Chef du CADR (*Centre for Advanced Drug Research*) au CIIT (*COMSATS Institute of Information and Technology*), University Tombe Camp, Abbottabad, Pakistan, pour m'avoir accueilli dans son institution et dans son laboratoire, et surtout pour n'avoir ménagé aucun effort pour la finalisation de ce travail.

Je remercie sincèrement les **Prs Sophie LAURENT**, **Luce VANDER ELST** et le **Dr Céline HENOUMONT** du Département de Chimie Organique, Générale et Biomédicale, Faculté de Médecine et Pharmacie, Université de Mons, Belgique, pour l'enregistrement des spectres de RMN et de Masse. Merci de vous être toujours rendu disponibles pour nous venir en aide.

Je voudrais remercier : la **Fondation Internationale pour la Science (FIS)**, qui m'a fait bénéficier d'un financement partiel pour ce travail, à travers le projet de recherche N° F/5776-1, portant sur "**l'étude phytochimique et pharmacologique de deux plantes médicinales de la pharmacopée camerounaise**" ; mais également

Je tiens également à remercier la **TWAS (The World Academy of Science)** qui m'a fait bénéficier d'une bourse de mobilité de 12 mois au CADR, CIIT, University Tombe Camp, Abbottabad, Pakistan.

Je remercie le **Pr Augustin Ephrem NKENGACK**, Chef de Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, qui ne cesse de ménager ses efforts pour la bonne marche du Département.

J'exprime ma gratitude au **Pr Dieudonné BITOM**, ex-Doyen de la Faculté des Sciences de l'Université de Ngaoundéré, Doyen de la Faculté d'Agronomie et des Sciences Agricoles (FASA) de l'Université de Dschang, pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant d'exercer en tant que moniteur puis en tant que vacataire au sein de son ancien établissement. Il a également permis que je puisse y faire une partie de mes travaux de thèse. Merci, Monsieur le Doyen.

Je désire particulièrement remercier le **Pr Elisabeth NGO BUM**, Professeur, Doyen de la Faculté des Mines et des Industries Pétrolières, de l'Université de Maroua, que j'appelle affectueusement "Maman". Votre intérêt et vos conseils m'ont redonné espoir. J'ai trouvé en votre histoire personnelle un appui qui m'a permis de persévérer jusqu'au bout. Que l'accomplissement de ce travail soit pour vous un gage de ma gratitude, mon estime et mon profond respect.

A tous les membres du Laboratoire de Substances Naturelles et Valorisation N° 3, du Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, qui font régner au sein de l'équipe, une atmosphère de travail amicale et décontractée. Trouvez ici, l'expression de ma gratitude et ma reconnaissance.

Je remercie tous les enseignants du Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et tous les enseignants du Département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université de Ngaoundéré pour la formation solide qu'ils m'ont donnée.

Pour leurs conseils, encouragements et soutiens incondtionnelles, je tiens vivement à remercier le **Pr Joséphine NGO MBING** et les **Drs Jean Pierre ABDU, Abel Joël YAYA GBWENG, Richard SIMO TAGNE, et Guy Sédar Singor NJATENG**.

Je remercie tous mes amis du Laboratoire de Phytochimie de l'IMPM, notamment **Dr Théodora KOPA KOWA, Ms. Paul TOUKAM DJOUONZO, Raymond AJANG NGIDE, André FOUA**, ... pour leurs soutiens moraux.

Ces années n'auraient pas été les mêmes sans les chercheurs croisés lors de mes passages dans les divers laboratoires ; je les remercie pour les échanges fructueux et amicaux. Je pense tout particulièrement : Aux **Drs Seyda Abida EJAZ, Aziz Ullah KHAN** pour leurs conseils avisés, leurs enthousiasmes, leurs bonnes humeurs mais surtout pour l'amitié qui s'est développée au-delà du laboratoire. Au **Dr Amara MUMTAZ** pour m'avoir initié dans le domaine de la synthèse organique bien que les résultats n'eussent pas donner ce que nous espérions.

Je remercie le **Dr Richard DOMGA, Dr Jean Marie DANGWANG DIKDIM, M. Abel SOUVALBE KANDIBE, M. Abdoulaye HAMIDOU, Mme Madeleine DJANKOU TCHOFFO, Mlle Francine NKOUAM TSOPDJIO** et **M. Thomas ASSOKENG**, mes amis et collègues moniteurs du Département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université de Ngaoundéré, pour leurs encouragements et les bons moments passés ensemble.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à mes amis et collègues boursiers de la TWAS-CIIT 2015, **M. Guy Armel FOTSO KAMGA, M. Franklin NGOUALEM, Dr David NGOUDJOU TSAFACK** et **Dr Roland TCHUENGUEM TCHUENTE**. A tous les moments passés ensemble à apprendre à se soutenir et à ripailler. A nos aventures au-delà des frontières du Cameroun. Frères d'armes et amis nous avons été, frères de sang nous resterons.

Mes sincères remerciements à mes parents, feu **M. BELL NYEMB** et **Mme Agnès NGO NTONDJE** veuve **BELL NYEMB**, qui ont toujours cru en moi et m'ont donné l'opportunité et la liberté de suivre les études qui m'ont permis d'aboutir à cette thèse. Je leurs suis gré pour leur amour, et surtout leur éducation. Ils ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je ne vous serai jamais assez reconnaissant de ce que vous avez fait pour moi.

Je tiens à remercier mes sœurs, **Sandrine Chantal NYEMB** et **Cécile Grazielle Vinny NYEMB** et **Jeanne d'arc NGO NGWEM**, pour cette attention féminine et ce regard fraternel qu'elles ont toujours eu pour moi. Soyez chères toutes, assurées de tout mon amour, mon profond respect et de mon admiration.

Je remercie particulièrement et très sincèrement toute la famille **Jean-Bosco GWETH**, pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté.

Je remercie mes coéquipiers et compagnons de tous les clubs amateurs de football dans lesquels je suis passé. Merci pour ces moments de détente qui m'ont permis de rester loin du stress et de la dépression.

Que tous ceux qui de près ou de loin ont apporté leur contribution et dont j'ai omis de mentionner les noms, trouvent dans ce travail l'expression d'un profond remerciement.

*« A Cœur Vaillant, rien n'est impossible », Jacques CŒUR.*

## **TABLE DES MATIERES**

|  |         |
|--|---------|
| LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS.....                                  | i       |
| DEDICACE.....  | x       |
| REMERCIEMENTS.....   | xii     |
| TABLE DES MATIERES .....   | xvi     |
| ABREVIATIONS ET SYMBOLES.....  | xxiii   |
| LISTE DES TABLEAUX.....  | xxvii   |
| RESUME .....   | xxxvi   |
| ABSTRACT.....  | xxxviii |
| INTRODUCTION.....  | 1       |
| CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE .....                             | 6       |
| I.1. Généralités sur le diabète .....                                  | 7       |
| I.1.1. Définition, Classification et diagnostic .....                  | 7       |
| I.1.2. Facteurs de risque et symptômes .....                           | 8       |
| I.1.3. Prévalence et mortalité .....                                   | 9       |
| I.1.3.1. Prévalence mondiale.....                                      | 9       |
| I.1.3.2. Prévalence dans la région Afrique.....                        | 10      |
| I.1.3.3. Mortalité mondiale .....                                      | 11      |
| I.1.3.4. Mortalité dans la région Afrique .....                        | 11      |
| I.1.3.5. Projections .....   | 11      |
| I.1.4. Traitement et prise en charge.....                              | 12      |
| I.1.4.1. Les mesures hygiéno-diététiques .....                         | 12      |
| I.1.4.1.1. L'alimentation .....  | 12      |
| I.1.4.1.2. L'activité physique .....                                   | 12      |
| I.1.4.2. Les traitements médicamenteux .....                           | 12      |
| I.1.4.2.1. Les Biguanides .....  | 13      |
| I.1.4.2.2. Les glitazones (thiazolidinediones) .....                   | 13      |
| I.1.4.2.3. Les insulino-sécréteurs.....                                | 13      |
| I.1.4.2.3.1. Les sulfamides hypoglycémiantes .....                     | 13      |
| I.1.4.2.3.2. Les glinides.....   | 13      |
| I.1.4.2.4. Les inhibiteurs des $\alpha$ -glucosidases .....            | 13      |
| I.1.4.2.5. Les incrétines.....   | 13      |
| I.1.4.2.4.1. Les Analogues du GLP-1 : incrétino-mimétiques.....        | 14      |
| I.1.4.2.4.2. Les inhibiteurs de la dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) ..... | 14      |
| I.1.4.2.5. Les insulines .....   | 14      |
| I.1.4.3. Traitement par les plantes .....                              | 14      |
| I.1.5. Prévention.....   | 16      |



|  |    |
|--|----|
| I.1.6. Complications du diabète .....  | 17 |
| I.1.6.1. Maladies cardiovasculaires (MCVs) .....   | 18 |
| I.1.6.2. Maladies oculaires liées au diabète .....   | 18 |
| I.1.6.3. Maladies rénales liées au diabète (néphropathies) .....                                 | 19 |
| I.1.6.3. Lésions nerveuses (neuropathies) et pied diabétique.....                                | 19 |
| I.1.6.4. Diabète et infections .....   | 20 |
| I.1.6.4.1. Infections bactériennes.....  | 20 |
| I.1.6.4.2. Infections à <i>Candida</i> .....   | 21 |
| I.1.7. Impact économique .....   | 21 |
| I.1.8. Diabète et stress oxydant .....   | 23 |
| I.1.8.1. Définition du stress oxydant .....  | 23 |
| I.1.8.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....  | 23 |
| I.1.8.2.1. Importance physiologique des ERO .....  | 24 |
| I.1.8.2.2. Les molécules biologiques cibles des ERO.....   | 24 |
| I.1.8.2.2.1. La peroxydation des lipides .....   | 24 |
| I.1.8.2.2.2. Les Protéines.....  | 25 |
| I.1.8.2.2.3. Les Acides Nucléiques .....   | 25 |
| I.1.8.2.3. Moyens de lutte contre les ERO : les antioxydants .....                               | 25 |
| I.1.8.2.3.1. Les antioxydants enzymatiques .....   | 25 |
| I.1.8.2.3.2. Les antioxydants d'origine végétale.....  | 26 |
| I.1.8.3. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète .....           | 26 |
| I.1.8.3.1. La voie des Polyols .....   | 26 |
| I.1.8.3.2. La glycation.....   | 27 |
| I.1.8.3.3. La voie mitochondriale .....  | 27 |
| I.1.8.4. Impact du stress oxydant sur les cellules $\beta$ et sur l'action de l'insuline .....   | 28 |
| I.1.9. Diabète et phosphatases alcalines .....   | 28 |
| I.2. Présentation de <i>Cissus populnea</i> Guill & Perr .....                                   | 31 |
| I.2.1. La famille des Vitaceae .....   | 31 |
| I.2.2. Le Genre <i>Cissus</i> .....  | 31 |
| I.2.3. L'espèce <i>Cissus populnea</i> Guill. & Perr. ....                                       | 32 |
| I.2.4. Utilisations ethnomédicinales et propriétés pharmacologiques du genre <i>Cissus</i> ..... | 33 |
| I.2.5. Métabolites secondaires isolés du genre <i>Cissus</i> .....                               | 35 |
| I.2.5.1. Les flavonoïdes .....   | 35 |
| I.2.5.2. Les triterpénoïdes .....  | 36 |
| I.2.5.2.1. Généralités .....   | 36 |
| I.2.5.2.2. Biosynthèse .....   | 37 |

|  |    |
|--|----|
| I.2.2.5.3. Elucidation structurale .....   | 39 |
| I.2.2.5.4. Activités biologiques des triterpènes .....   | 39 |
| I.2.2.5.5. Triterpénoïdes isolés des <i>Cissus</i> .....   | 39 |
| I.2.5.3. Les coumarines .....  | 41 |
| I.2.5.4. Les stilbènes .....   | 42 |
| I.2.5.5. Les alcaloïdes .....  | 43 |
| I.2.5.6. Autres composés .....   | 44 |
| I.2.3.3. Activités pharmacologiques de quelques métabolites secondaires du genre <i>Cissus</i> ..... | 45 |
| I.3. Présentation de <i>Gardenia aqualla</i> Stapf & Hutch .....                                     | 46 |
| I.3.1. La famille des Rubiaceae .....  | 46 |
| I.3.2. Le Genre <i>Gardenia</i> .....  | 46 |
| I.3.3. L'espèce <i>Gardenia aqualla</i> Stapf & Hutch .....  | 47 |
| I.3.4. Utilisations ethnomédicinales et propriétés pharmacologiques du genre <i>Gardenia</i> .....   | 49 |
| I.3.5. Métabolites secondaires isolés du genre <i>Gardenia</i> .....                                 | 50 |
| I.3.5.1. Les flavonoïdes .....   | 51 |
| I.3.5.2. Les triterpénoïdes .....  | 52 |
| I.3.5.3. Les iridoïdes .....   | 57 |
| I.3.5.4. Les saponines .....   | 57 |
| I.3.2.2.5. Autres composés .....   | 58 |
| I.3.6. Activités pharmacologiques de quelques métabolites secondaires du genre <i>Gardenia</i> ..... | 59 |
| I.4. Présentation de <i>Vitellaria paradoxa</i> C. F. Gaertn .....                                   | 61 |
| I.4.1. La famille des Sapotaceae .....   | 61 |
| I.4.2. Le genre <i>Vitellaria</i> .....  | 61 |
| I.4.3. L'espèce <i>Vitellaria paradoxa</i> C. F. Gaertn .....  | 61 |
| I.4.4. Utilisations ethnomédicinales et propriétés pharmacologiques du genre <i>Vitellaria</i> ..... | 63 |
| I.4.5. Métabolites secondaires isolés du genre <i>Vitellaria</i> .....                               | 64 |
| I.4.5.1. Triterpénoïdes .....  | 64 |
| I.4.5.2. Les flavonoïdes .....   | 65 |
| I.4.5.3. Les saponines .....   | 65 |
| I.4.5.4. Les sphingolipides .....  | 67 |
| I.4.5.4.1. Généralités .....   | 67 |
| I.4.5.4.2. Biosynthèse .....   | 68 |
| I.4.3.3.3. Elucidation structurale des céramides .....   | 69 |
| I.4.3.3.3.4. Activités biologiques .....   | 70 |
| I.4.3.3.3.5. Sphingolipides isolés de <i>V. paradoxa</i> .....                                       | 71 |
| I.4.3.3.5. Autres composés .....   | 71 |

|  |     |
|--|-----|
| 1.4.3.3.2. Activité biologique de quelques métabolites secondaires isolés du genre <i>V. paradoxa</i> ..   | 72  |
| CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION .....  | 74  |
| II.1. Extraction, criblage phytochimique et fractionnement des différents extraits .....                   | 75  |
| II.1.1. Extraction et fractionnement des extraits des différentes parties de <i>C. populnea</i> .....      | 75  |
| II.1.2. Obtention et fractionnement des extraits des différentes parties de <i>G. aqualla</i> .....        | 79  |
| II.1.3. Obtention et fractionnement de l'extrait à l'AcOEt du bois des racines de <i>V. paradoxa</i> ..... | 81  |
| II.1.4. Criblage phytochimique des différents extraits .....   | 82  |
| II.2. Elucidation structurale des composés isolés .....  | 84  |
| II.2.1. Les acétogénines .....   | 85  |
| II.2.1.1. Identification du composé Gae-2 .....  | 85  |
| II.2.1.2. Elucidation structurale du composé Gaf-20 .....  | 86  |
| II.2.1.3. Identification des composés Gae-15, Gaf-1, Gaf-26, Gae-4 et Gaf-22 .....                         | 89  |
| II.2.1.4. Elucidation structurale du composé Gae-14 .....  | 91  |
| II.2.2. Les cérébrosides .....   | 95  |
| II.2.2.1. Elucidation structurale du composé Vr-4 .....  | 95  |
| II.2.3. Les chlorophylles .....  | 104 |
| II.2.3.1. Identification du composé N8-H3 .....  | 104 |
| II.2.4. Les composés phénoliques .....   | 109 |
| II.2.4.1. Les acides phénoliques .....   | 109 |
| II.2.4.1.1. Identification du composé N9-A2 .....  | 109 |
| II.2.4.1.2. Identification du composé Gag-2 .....  | 111 |
| II.2.4.1.3. Identification du composé Gag-6 .....  | 113 |
| II.2.4.2. Les flavonoïdes .....  | 115 |
| II.2.4.2.1. Identification du composé NYR-5 .....  | 115 |
| II.2.4.2.2. Identification du composé Vr-2 .....   | 117 |
| II.2.4.2.3. Identification du composé Vr-5 .....   | 120 |
| II.2.4.3. Les isocoumarines .....  | 123 |
| II.2.4.3.1. Identification du composé N9-A4 .....  | 123 |
| II.2.4.4. Les stilbènes .....  | 126 |
| II.2.4.4.1. Identification du composé N9-A1 .....  | 126 |
| II.2.5. Les glucosides stéroïdiques .....  | 128 |
| II.2.5.1. Identification du composé N9-A3 .....  | 128 |
| II.2.5.2. Identification du composé Vr-3 .....   | 131 |
| II.2.6. Les stéroïdes .....  | 134 |
| II.2.6.1. Identification du composé N9-A0 .....  | 134 |
| II.2.7. Les sucres .....   | 136 |

|   |     |
|---|-----|
| II.2.7.1. Identification du composé Gag-4.....  | 136 |
| II.2.7.2. Identification du composé Gae-7.....  | 138 |
| II.2.8. Les triterpènes pentacycliques.....   | 140 |
| II.2.8.1. Identification du composé NYR-1.....  | 140 |
| II.2.8.2. Identification du composé N8-C1.....  | 143 |
| II.2.8.3. Identification du composé Gag-1.....  | 146 |
| II.2.8.4. Identification du composé Gaf-4.....  | 149 |
| II.2.8.5. Identification du composé Gaf-8.....  | 152 |
| II.2.8.6. Identification du composé Gaf-24.....   | 155 |
| II.3. Transformations chimiques.....  | 160 |
| II.3.1. Réaction de Pechmann à partir de la Catéchine 177 (Vr-2).....   | 160 |
| II.3.2. Réaction d'acétalisation du <i>D</i> -Mannitol 162 (Gag-4).....   | 167 |
| II.4. Etude pharmacologique des espèces <i>C. populnea</i> , <i>G. aqualla</i> et <i>V. paradoxa</i> .....            | 171 |
| II.4.1. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....  | 171 |
| II.4.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....   | 174 |
| II.4.3. Mise en évidence de l'inhibition de l'activité enzymatique.....   | 179 |
| II.4.5. Discussion.....   | 181 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....   | 187 |
| CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES.....  | 192 |
| III.1. Matériel végétal.....  | 193 |
| III.1.1. Récolte, séchage et broyage.....   | 193 |
| III.1.2. Extraction et isolement.....   | 193 |
| III.1.2.1. Extraction et isolement des composés des racines, tiges et feuilles de <i>C. populnea</i> .....            | 194 |
| III.1.2.1.1. Extraction et isolement des composés à partir des racines de <i>C. populnea</i> .....                    | 194 |
| III.1.2.1.2. Extraction et isolement des composés à partir des feuilles de <i>C. populnea</i> .....                   | 195 |
| III.1.2.1.3. Extraction et isolement des composés à partir des tiges de <i>C. populnea</i> .....                      | 196 |
| III.1.2.2. Extraction et isolement des composés à partir des graines, feuilles, et écorces de <i>G. aqualla</i> ..... | 197 |
| III.1.2.2.1. Extraction et isolement des composés à partir des graines de <i>G. aqualla</i> .....                     | 197 |
| III.1.2.2.2. Extraction et isolement des composés à partir des feuilles de <i>G. aqualla</i> .....                    | 198 |
| III.1.2.2.3. Extraction et isolement des composés à partir des écorces de <i>G. aqualla</i> .....                     | 200 |
| III.1.2.3. Extraction et isolement des composés à partir du bois de racine de <i>V. paradoxa</i> .....                | 201 |
| III.1.3. Caractéristiques physiques et spectroscopiques de tous les composés isolés.....                              | 203 |
| III.2. Méthodes analytiques et chromatographiques.....  | 210 |
| III.2.1. Criblage phytochimique des extraits et tests de caractérisation des composés.....                            | 210 |
| III.2.1.1. Caractérisation des alcaloïdes.....  | 210 |

|  |     |
|--|-----|
| III.2.1.2. Caractérisation des flavonoïdes .....   | 210 |
| III.2.1.3. Caractérisation des polyphénols .....   | 210 |
| III.2.1.4. Caractérisation des saponines.....  | 210 |
| III.2.1.5. Caractérisation des tanins.....   | 210 |
| III.2.1.6. Caractérisation des triterpènes et stérols .....  | 211 |
| III.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....  | 211 |
| III.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC) .....  | 211 |
| III.3. Méthodes physico-chimiques.....   | 212 |
| III.3.1. Point de fusion (P.F.).....   | 212 |
| III.3.2. Spectrométrie de masse (MS) .....   | 212 |
| III.3.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....   | 212 |
| III.4. Méthodes chimiques.....   | 212 |
| III.4.1. Acétalisation du <i>D</i> -Mannitol.....  | 212 |
| III.4.2. Synthèse de Pechmann à partir de la Catéchine .....   | 213 |
| III.5. Méthodes biochimiques et biologiques .....  | 213 |
| III.5.1 Tests antioxydant.....   | 213 |
| III.5.1.1. Test antiradicalaire au DPPH .....  | 213 |
| III.5.1.2. Evaluation de la teneur en composé phénolique de l'extrait brut au MeOH des rhizomes de <i>C. populnea</i> (N12)..... | 214 |
| III.5.2. Tests d'inhibition enzymatique .....  | 215 |
| III.5.2.1. Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase.....   | 215 |
| III.5.2.2. Mise en évidence de l'activité inhibitrice de la phosphatase alcaline.....  | 216 |
| III.5.3. Tests antimicrobiens .....  | 217 |
| III.5.3.1. Préparation des substances à tester .....   | 217 |
| III.5.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> .....  | 217 |
| III.5.3.2.1. Préparation de l'inoculum.....  | 217 |
| III.5.3.2.2. Détermination des CMI et CMB .....  | 218 |
| III.5.3.3. Evaluation de l'activité antifongique <i>in vitro</i> .....   | 218 |
| III.5.3.3.1. Préparation des inocula microbiens.....   | 218 |
| III.5.3.3.2. Détermination des CMI et CMF .....  | 219 |
| III.5.5. Traitement de données et analyses statistiques .....  | 219 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....  | 220 |
| ANNEXES .....  | 239 |
| Annexe I : Listes des publications extraites de la thèse .....   | 240 |
| Annexe II : Communication orale .....  | 240 |
| Annexe III : Courbe d'étalonnage de l'Acide gallique (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).....                                    | 240 |

## **ABREVIATIONS ET SYMBOLES**

Les abréviations ci-dessous sont indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc pour la plupart souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <b>% :</b>                         | : Pourcentage  |
| <b>(AcO)<sub>2</sub>Pb</b>         | : Acétate de Plomb II  |
| <b>°C</b>                          | : Degré Celsius  |
| <b>µg</b>                          | : Microgramme  |
| <b>µg.mL<sup>-1</sup> :</b>        | : Microgramme par millilitre   |
| <b>µM</b>                          | : Micromolaire   |
| <b><sup>13</sup>C</b>              | : Carbone-13   |
| <b>1D</b>                          | : Monodimensionnel   |
| <b><sup>1</sup>H :</b>             | : Proton   |
| <b>2D</b>                          | : Bidimensionnel   |
| <b>Acétone-d<sub>6</sub></b>       | : Acétone hexadeutééré   |
| <b>Acétyl-CoA</b>                  | : Acétyl-coenzyme A  |
| <b>AcOEt</b>                       | : Acétate d'éthyle   |
| <b>al</b>                          | : Collaborateurs   |
| <b>APG</b>                         | : <i>Angiosperms Phylogeny Group</i>   |
| <b>Api</b>                         | : Apiose   |
| <b>APT</b>                         | : <i>Attach Proton Test</i>  |
| <b>Ara</b>                         | : Arabinose  |
| <b>ATCC</b>                        | : <i>American Type Culture Collection</i>  |
| <b>BaCl<sub>2</sub></b>            | : Chlorure de Barium   |
| <b>C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N</b> | : Pyridine pentadeutéérée  |
| <b>CC</b>                          | : Chromatographie sur Colonne  |
| <b>CCM</b>                         | : Chromatographie sur Couche Mince   |
| <b>CD<sub>3</sub>OD</b>            | : Méthanol deutéré   |
| <b>CDCl<sub>3</sub></b>            | : Chloroforme deutéré  |
| <b>CDP-Star</b>                    | : <i>Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan])-4-yl]-1-phenyl phosphate</i> |
| <b>CFU</b>                         | : <i>Colony Forming Unit</i>   |
| <b>CI<sub>50</sub></b>             | : Concentration Inhibitrice 50%  |
| <b>cm</b>                          | : Centimètre   |
| <b>CMB</b>                         | : Concentration Minimale Bactéricide   |
| <b>CMF</b>                         | : Concentration Minimale Fongicide   |
| <b>CMI</b>                         | : Concentration Minimale Inhibitrice   |
| <b>COSY</b>                        | : <i>Correlated Spectroscopy</i>   |
| <b>d</b>                           | : <i>Doublet</i>   |
| <b>D<sub>2</sub>O</b>              | : Eau deutérée   |
| <b>dd</b>                          | : Doublet dédoublé   |
| <b>ddd</b>                         | : Doublet de doublet dédoublé  |
| <b>DEA</b>                         | : Diéthanolamine   |
| <b>DEPT</b>                        | : <i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>   |
| <b>DI</b>                          | : Dollar international   |
| <b>dl</b>                          | : Doublet large  |
| <b>DMSO</b>                        | : Diméthylsulfoxyde  |
| <b>DMSO-d<sub>6</sub></b>          | : Diméthylsulfoxyde deutéré  |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>DO</b>               | : Densité Optique  |
| <b>DPPH</b>             | : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle   |
| <b>dt</b>               | : Doublet détriplé   |
| <b>DG</b>               | : Diabète Gestationnel   |
| <b>DTX</b>              | : Diabète de type X  |
| <b>EAG</b>              | : Equivalent d'Acide Gallique  |
| <b>ESI</b>              | : <i>ElectroSpray Ionisation</i>   |
| <b>EtOH</b>             | : Ethanol  |
| <b>FID</b>              | : Fédération Internationale du Diabète   |
| <b>g</b>                | : Gramme   |
| <b>g.L<sup>-1</sup></b> | : Gramme par litre   |
| <b>GCAP</b>             | : <i>Germ Cells Alkaline Phosphatase</i>   |
| <b>gExt</b>             | : Gramme d'extrait   |
| <b>Glc</b>              | : Glucose  |
| <b>h</b>                | : Heure  |
| <b>Hex</b>              | : Hexane   |
| <b>HMBC</b>             | : <i>Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity</i>   |
| <b>HMQC</b>             | : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence spectroscopy  |
| <b>HNC</b>              | : Herbier National du Cameroun   |
| <b>HRESI-MS</b>         | : <i>High Resolution Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry</i>   |
| <b>HSQC</b>             | : <i>Heteronuclear Single Quantum Connectivity</i>   |
| <b>Hz</b>               | : Hertz  |
| <b>IAP</b>              | : <i>Intestinal Alkaline Phosphatase</i>   |
| <b>IM</b>               | : Indice de Mousse   |
| <b>IMPM</b>             | : Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des Plantes Médicinales                                       |
| <b>IPP</b>              | : Isopentényl diphosphate  |
| <b>IR</b>               | : Infra-Rouge  |
| <b>J</b>                | : Constante de couplage  |
| <b>Kg</b>               | : Kilogramme   |
| <b>Km</b>               | : kilomètre  |
| <b>L</b>                | : Litre  |
| <b>Litt</b>             | : Littérature  |
| <b>m</b>                | : Multiplet  |
| <b>m/z</b>              | : Masse / Charge électrique  |
| <b>MeOH</b>             | : Méthanol   |
| <b>mg</b>               | : Milligramme  |
| <b>MHB</b>              | : Mueller Hinton Broth   |
| <b>MHz</b>              | : Mégahertz  |
| <b>min</b>              | : Minute (s)   |
| <b>mL</b>               | : Millilitre   |
| <b>mm</b>               | : Millimètre   |
| <b>mM</b>               | : Millimolaire   |
| <b>mmol</b>             | : Millimole  |
| <b>MODY</b>             | : <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>  |
| <b>MS</b>               | : <i>Mass Spectrometry</i>   |
| <b>MTT</b>              | : <i>Methyl Thiazolyl Tetrazolium salt</i> (Bromure de 3-(4,5-diéthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) |
| <b>Mult.</b>            | : Multiplicité   |



|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>NAD (P)</b>                 | : Nicotineamide adenine dinucléotide (phosphate)        |
| <b>n-BuOH</b>                  | : n-Butanol   |
| <b>nd</b>                      | : Non déterminé(e)                                      |
| <b>nm</b>                      | : Nanomètre   |
| <b>NOESY</b>                   | : <i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>                |
| <b>OMe</b>                     | : Méthoxyle   |
| <b>OMS</b>                     | : Organisation Mondiale de la Santé                     |
| <b>p-NPG</b>                   | : <i>para</i> -Nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside |
| <b>PF</b>                      | : Point de Fusion                                       |
| <b>pH</b>                      | : Potentiel Hydrogène                                   |
| <b>PLAP</b>                    | : <i>Placental Alkaline Phosphatase</i>                 |
| <b>ppm</b>                     | : Partie par million                                    |
| <b>q</b>                       | : Quadruplet  |
| <b>Rf</b>                      | : Rapport frontal                                       |
| <b>Rha</b>                     | : Rhamnose  |
| <b>RMN</b>                     | : Résonance Magnétique Nucléaire                        |
| <b>RMN <sup>13</sup>C</b>      | : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13          |
| <b>RMN <sup>1</sup>H</b>       | : Résonance Magnétique Nucléaire du proton              |
| <b>s :</b>                     | : Singulet  |
| <b>SDB</b>                     | : Sabouraud Dextrose                                    |
| <b>sl :</b>                    | : Singulet large  |
| <b>SM</b>                      | : Spectrométrie de Masse                                |
| <b>t</b>                       | : Triplet   |
| <b>t-BHA</b>                   | : <i>tert</i> -Butylhydroxyanisole                      |
| <b>td :</b>                    | : <i>Triplet doublet</i>                                |
| <b>TMS :</b>                   | : Tétraméthyle sylane                                   |
| <b>TNAP</b>                    | : <i>Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase</i>        |
| <b>TOF</b>                     | : <i>Time Of Fligh</i>                                  |
| <b>U.mL<sup>-1</sup></b>       | : Unité par millilitre                                  |
| <b>USD</b>                     | : <i>United State Dollar</i>                            |
| <b>UV :</b>                    | : Ultra-Violet  |
| <b>v/v</b>                     | : Rapport volume/volume                                 |
| <b>VIH</b>                     | : Virus de l'immunodéficience humaine                   |
| <b>Xyl</b>                     | : Xylose  |
| <b>ZnCl<sub>2</sub></b>        | : Chlorure de zinc                                      |
| <b><math>\delta</math> :</b>   | : Déplacement chimique                                  |
| <b><math>\delta_C</math> :</b> | : Déplacement chimique du carbone                       |
| <b><math>\delta_H</math> :</b> | : Déplacement chimique du proton                        |
| <b><math>\Delta^x</math></b>   | : Double liaison en position x                          |
| <b><math>\mu</math>L :</b>     | : Microlitre  |
| <b><math>\mu</math>M :</b>     | : Micromolaire  |

## **LISTE DES TABLEAUX**

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau I.1 :</b> Quelques plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète au Cameroun.....  | 15  |
| <b>Tableau I.2 :</b> Les principales espèces réactives de l'oxygène.....  | 23  |
| <b>Tableau I.3 :</b> Utilisations ethnomédicinales de quelques espèces du genre <i>Cissus</i> .....   | 33  |
| <b>Tableau I.4 :</b> Propriétés pharmacologiques des espèces du genre <i>Cissus</i> .....   | 34  |
| <b>Tableau I.5 :</b> Quelques triterpènes isolés du genre <i>Cissus</i> .....   | 40  |
| <b>Tableau I.6 :</b> Activités biologiques de quelques composés isolés du genre <i>Cissus</i> .....   | 45  |
| <b>Tableau I.7 :</b> Usages ethnomédicinales de quelques espèces du genre <i>Gardenia</i> .....   | 49  |
| <b>Tableau I.8 :</b> Propriétés pharmacologiques des espèces du genre <i>Gardenia</i> .....   | 50  |
| <b>Tableau I.9 :</b> Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Gardenia</i> .....   | 51  |
| <b>Tableau I.10 :</b> Quelques triterpénoïdes isolés du genre <i>Gardenia</i> .....   | 52  |
| <b>Tableau I.11 :</b> Quelques iridoïdes isolés du genre <i>Gardenia</i> .....  | 57  |
| <b>Tableau I.12 :</b> Quelques autres composés isolés du genre <i>Gardenia</i> .....  | 58  |
| <b>Tableau I.13 :</b> Activités biologiques de quelques composés isolés du genre <i>Gardenia</i> .....  | 59  |
| <b>Tableau I.14 :</b> Quelques triterpénoïdes isolés du genre <i>Gardenia</i> .....   | 64  |
| <b>Tableau I.15 :</b> Quelques saponines isolés de <i>V. paradoxa</i> .....   | 66  |
| <b>Tableau II.1 :</b> Résultats du criblage phytochimique.....  | 83  |
| <b>Tableau II.2 :</b> Données de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de Gaf-20.....                           | 88  |
| <b>Tableau II.3 :</b> Données de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de Gae-14.....                           | 94  |
| <b>Tableau II.4 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz), <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) et COSY de Vr-4103.....   | 108 |
| <b>Tableau II.5 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz), <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) et HMBC de N8-H3.....     | 110 |
| <b>Tableau II.6 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150 MHz) de N9-A2.....       | 114 |
| <b>Tableau II.7 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gag-2112.....    | 114 |
| <b>Tableau II.8 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gag-6114.....    | 116 |
| <b>Tableau II.9 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de NYR-5.....           | 119 |
| <b>Tableau II.10 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Vr-2.....       | 122 |
| <b>Tableau II.11 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Vr-5.....           | 125 |
| <b>Tableau II.12 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz), et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de N9-A4.....     | 127 |
| <b>Tableau II.13 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de N9-A1.....      | 130 |
| <b>Tableau II.14 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de N9-A3.....      | 133 |
| <b>Tableau II.15 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 125 MHz) de Vr-3..... | 135 |
| <b>Tableau II.16 :</b> Données <sup>13</sup> C NMR (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de N9-A0.....  | 137 |
| <b>Tableau II.17 :</b> Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gag-4.....      | 137 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau II.18</b> : Données de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de Gae-7.....  | 139 |
| <b>Tableau II.19</b> : Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de NYR-1 .....  | 142 |
| <b>Tableau II.20</b> : Données RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de N8-C1....  | 145 |
| <b>Tableau II.21</b> : Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gag-1 .....  | 148 |
| <b>Tableau II.22</b> : Données RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de Gaf-4.....   | 151 |
| <b>Tableau II.23</b> : Données RMN <sup>1</sup> H (Acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (Acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gaf-8 .....  | 154 |
| <b>Tableau II.24</b> : Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) et <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gaf-24 .....   | 159 |
| <b>Tableau II.25</b> : Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz), <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) et HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de NHR-1..... | 166 |
| <b>Tableau II.26</b> : Données RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz), <sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) et HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de NHR-2..... | 170 |
| <b>Tableau II.27</b> : Résultats des activités antiradicalaires des extraits des plantes étudiées .....  | 172 |
| <b>Tableau II.28</b> : Résultats des activités antibactériennes (CMI et CMB (µg.mL <sup>-1</sup> )) des composés .....   | 176 |
| <b>Tableau II.29</b> : Activités antifongiques (CMI et CMF (µg.mL <sup>-1</sup> )) des composés vis-à-vis des différentes levures étudiées .....   | 178 |
| <b>Tableau II.30</b> : Résultats de l'inhibition de l'α-glucosidase par les extraits.....  | 179 |
| <b>Tableau II.31</b> : Résultats de l'inhibition de l'activité enzymatique par les composés purs.....  | 181 |
| <b>Tableau II.32</b> : Récapitulatif de tous les métabolites isolés des plantes étudiées .....   | 189 |
| <b>Tableau III.1</b> : Chromatogramme de l'extrait N9-A .....  | 194 |
| <b>Tableau III.2</b> : Chromatogramme de l'extrait N8-C .....  | 195 |
| <b>Tableau III.3</b> : Chromatogramme de l'extrait N8-C .....  | 196 |
| <b>Tableau III.4</b> : Chromatogramme de l'extrait N10-H .....   | 196 |
| <b>Tableau III.5</b> : Chromatogramme de l'extrait N10-A .....   | 197 |
| <b>Tableau III.6</b> : Chromatogramme de l'extrait de graines de <i>G. aqualla</i> .....   | 197 |
| <b>Tableau III.7</b> : Chromatogramme de l'extrait au MeOH des feuilles de <i>G. aqualla</i> .....   | 198 |
| <b>Tableau III.8</b> : Chromatogramme de l'extrait à l'AcOEt des feuilles de <i>G. aqualla</i> .....   | 199 |
| <b>Tableau III.9</b> : Chromatogramme de l'extrait au MeOH des écorces du tronc de <i>G. aqualla</i> .....   | 200 |
| <b>Tableau III.10</b> : Chromatogramme de la série G25 .....   | 201 |
| <b>Tableau III.11</b> : Chromatogramme de l'extrait N12-A .....  | 201 |
| <b>Tableau III.12</b> : Réalisation de l'échelle de McFarland (CLSI, 2015).....  | 218 |

## **LISTE DES FIGURES**

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure I.1</b> : Prévalence mondiale estimée du diabète chez les adultes (20-79 ans) (FID, 2017).....                                      | 10  |
| <b>Figure I.2</b> : Estimation de la prévalence du diabète (20-79 ans) dans la région Afrique (FID, 2017).....                                | 11  |
| <b>Figure I.3</b> : Répartition géographique du genre <i>Cissus</i> .....   | 31  |
| <b>Figure I.4</b> : Photo de <i>C. populnea</i> Guill. & Perr. (Nyemb, 2014) .....  | 32  |
| <b>Figure I.5</b> : Répartition géographique du genre <i>Gardenia</i> .....   | 46  |
| <b>Figure I.6</b> : Photos d'une jeune plante de <i>G. aqualla</i> Stapf & Hutch (Nyemb, 2014).....   | 47  |
| <b>Figure I.7</b> : Répartition géographique de <i>G. aqualla</i> Stapf & Hutch.....  | 48  |
| <b>Figure I.8</b> : Photos d'une jeune plante de <i>V. paradoxa</i> C. F. Gaertn (Nyemb, 2018).....   | 61  |
| <b>Figure I.9</b> : Répartition géographique de <i>Vitellaria paradoxa</i> C. F. Gaertn .....   | 62  |
| <b>Figure II.1</b> : Spectre de masse TOF-ESI-MS+ de Gae-2.....   | 85  |
| <b>Figure II.2</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) et <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de Gae-2 ..... | 85  |
| <b>Figure II.3</b> : Spectre de masse TOF-MS-ESI+ de Gaf-20 .....   | 86  |
| <b>Figure II.4</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) élargi de Gaf-20 .....  | 87  |
| <b>Figure II.5</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) élargi de Gaf-20 .....   | 87  |
| <b>Figure II.6</b> : Spectre COSY (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) élargi de Gaf-20.....   | 87  |
| <b>Figure II.7</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de Gaf-22.....  | 89  |
| <b>Figure II.8</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de Gaf-22.....   | 90  |
| <b>Figure II.9</b> : Spectre de masse TOF-MS-ESI+ de Gae-14.....  | 91  |
| <b>Figure II.10</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de Gae-14 .....  | 91  |
| <b>Figure II.11</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de Gae-14 .....   | 92  |
| <b>Figure II.12</b> : Spectre COSY (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de Gae-14.....   | 92  |
| <b>Figure II.13</b> : Spectre HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de Gae-14.....   | 93  |
| <b>Figure II.14</b> : Spectre HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de Gae-14.....   | 93  |
| <b>Figure II.15</b> : Spectre de masse ESI-TOF-MS+ de Vr-4 .....  | 95  |
| <b>Figure II.16</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de Vr-4 .....  | 96  |
| <b>Figure II.17</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) élargi ( $\delta_H$ 2,90-5,80) de Vr-4 .....         | 96  |
| <b>Figure II.18</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Vr-4 .....                                       | 97  |
| <b>Figure II.19</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) élargi de Vr-4.....                                 | 98  |
| <b>Figure II.20</b> : Spectre DEPT-135 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Vr-4 .....  | 98  |
| <b>Figure II.21</b> : Spectre COSY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de Vr-4.....   | 99  |
| <b>Figure II.22</b> : Spectre COSY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) élargi de Vr-4.....  | 99  |
| <b>Figure II.23</b> : Spectre HSQC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , <sup>1</sup> H : 500 et <sup>13</sup> C : 125 MHz) élargi de Vr-4.....      | 100 |
| <b>Figure II.24</b> : Spectre de masse HRESI-MS de N8-H3 .....  | 104 |
| <b>Figure II.25</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de N8-H3.....  | 105 |
| <b>Figure II.26</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de N8-H3.....                                       | 105 |
| <b>Figure II.27</b> : Spectre HMQC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , <sup>1</sup> H : 500 et <sup>13</sup> C : 125 MHz) de N8-H3.....            | 106 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure II.28</b> : Spectre HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , <sup>1</sup> H : 500 et <sup>13</sup> C : 125 MHz) de N8-H3..... | 106 |
| <b>Figure II.29</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) de N9-A2.....                             | 109 |
| <b>Figure II.30</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 150 MHz) de N9-A2.....                            | 110 |
| <b>Figure II.31</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de Gag-2.....                             | 111 |
| <b>Figure II.32</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gag-2.....                            | 111 |
| <b>Figure II.33</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de Gag-6.....                             | 113 |
| <b>Figure II.34</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gag-6.....                            | 113 |
| <b>Figure II.35</b> : Spectre de RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de NYR-5.....                          | 115 |
| <b>Figure II.36</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de NYR-5.....                            | 116 |
| <b>Figure II.37</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de Vr-2.....                              | 117 |
| <b>Figure II.38</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Vr-2.....                             | 118 |
| <b>Figure II.39</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) élargi de Vr-5.....                       | 120 |
| <b>Figure II.40</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Vr-5.....                             | 121 |
| <b>Figure II.41</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de N9-A4.....                             | 123 |
| <b>Figure II.42</b> : Spectre APT (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de N9-A4.....  | 124 |
| <b>Figure II.43</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de N9-A1.....                             | 126 |
| <b>Figure II.44</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de N9-A1.....                            | 127 |
| <b>Figure II.45</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de N9-A3.....                             | 128 |
| <b>Figure II.46</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de N9-A3.....                            | 129 |
| <b>Figure II.47</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>5</sub> N, 500 MHz) de Vr-3.....                           | 131 |
| <b>Figure II.48</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (C <sub>3</sub> D <sub>5</sub> N, 125 MHz) de Vr-3.....                          | 132 |
| <b>Figure II.49</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de N9-A0.....                                       | 134 |
| <b>Figure II.50</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de N9-A0.....                                      | 134 |
| <b>Figure II.51</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de Gag-4.....                             | 136 |
| <b>Figure II.52</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gag-4.....                            | 137 |
| <b>Figure II.53</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de Gae-7.....                             | 138 |
| <b>Figure II.54</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gae-7.....                            | 139 |
| <b>Figure II.55</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de NYR-1.....                                       | 140 |
| <b>Figure II.56</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de NYR-1.....                                      | 141 |
| <b>Figure II.57</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de N8-C1.....                             | 143 |
| <b>Figure II.58</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de N8-C1.....                            | 144 |
| <b>Figure II.59</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) de Gag-1.....                             | 146 |
| <b>Figure II.60</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) de Gag-1.....                            | 147 |
| <b>Figure II.61</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de Gaf-4.....                                       | 149 |
| <b>Figure II.62</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de Gaf-4.....                                      | 150 |
| <b>Figure II.63</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H (Acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) élargi de Gaf-8.....                   | 152 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure II.64</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ (Acétone- $d_6$ , 125 MHz) de Gaf-8.....                                 | 153 |
| <b>Figure II.65</b> : Spectre TOF-MS-ESI+ de Gaf-24 .....  | 155 |
| <b>Figure II.66</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gaf-24.....                                      | 156 |
| <b>Figure II.67</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gaf-24.....                                   | 156 |
| <b>Figure II.68</b> : Spectre COSY (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gaf-24.....  | 157 |
| <b>Figure II.69</b> : Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gaf-24.....  | 158 |
| <b>Figure II.70</b> : Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gaf-24.....  | 158 |
| <b>Figure II.71</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) élargi ( $\delta_{\text{H}}$ 4,6-7,2) de NHR-1..... | 163 |
| <b>Figure II.72</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) élargi ( $\delta_{\text{H}}$ 1,4-2,8) de NHR-1..... | 163 |
| <b>Figure II.73</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NHR-1 .....                                   | 164 |
| <b>Figure II.74</b> : Spectre DEPT-135 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NHR-1 .....  | 164 |
| <b>Figure II.75</b> : Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-1.....   | 164 |
| <b>Figure II.76</b> : Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) élargi ( $\delta_{\text{H}}$ 4,50-7,50) de NHR-1 .....          | 165 |
| <b>Figure II.77</b> : Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) élargi ( $\delta_{\text{H}}$ 1,47-2,40) de NHR-1 .....          | 165 |
| <b>Figure II.78</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-2 .....                                      | 168 |
| <b>Figure II.79</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NHR-2 .....                                   | 168 |
| <b>Figure II.80</b> : Spectre DEPT-135 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NHR-2 .....  | 169 |
| <b>Figure II.81</b> : Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-2.....   | 169 |
| <b>Figure II.82</b> : Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-2 .....  | 169 |



## **LISTE DES SCHEMAS**

|  |     |
|--|-----|
| <b>Schéma I.1</b> : Déplétion du glutathion par la voie des polyols (Bonnefont-Rousselot et al., 2004).....                                    | 27  |
| <b>Schéma I.2</b> : Relation entre hyperglycémie et stress oxydant (Bonnefont-Rousselot et al., 2004).....                                     | 28  |
| <b>Schéma I.3</b> : Biosynthèse des triterpènes et stérols (Brown, 1998).....  | 38  |
| <b>Schéma I.4</b> : Biosynthèse des sphingolipides (Wennekes et al., 2009). .....  | 69  |
| <b>Schéma II.1</b> : Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des extraits des racines de <i>C. populnea</i><br>.....             | 76  |
| <b>Schéma II.2</b> : Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des extraits des feuilles de <i>C. populnea</i><br>.....            | 77  |
| <b>Schéma II.3</b> : Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des extraits des tiges de <i>C. populnea</i><br>.....               | 78  |
| <b>Schéma II.4</b> : Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des graines de <i>G. aqualla</i> .....                              | 79  |
| <b>Schéma II.5</b> : Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des extraits des feuilles de <i>G. aqualla</i><br>.....             | 80  |
| <b>Schéma II.6</b> : Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des écorces de <i>G. aqualla</i> .....                              | 81  |
| <b>Schéma II.7</b> : Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement du bois de racines de <i>V. paradoxa</i> ..                         | 82  |
| <b>Schéma II.8</b> : Fragmentation proposée de Gaf-20 en TOF-ESI-MS+ .....   | 88  |
| <b>Schéma II.9</b> : Importantes corrélations COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H) et HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) de Gae-14..... | 94  |
| <b>Schéma II.10</b> : Fragmentation proposée pour Gae-14 .....   | 94  |
| <b>Schéma II.11</b> : Importantes corrélations COSY de Vr-4 .....  | 101 |
| <b>Schéma II.12</b> : Fragmentations proposées du composé Vr-4 en TOF-ESI-MS+ .....  | 102 |
| <b>Schéma II.13</b> : Réaction de synthèse de Pechmann à partir de la Catéchine <b>117</b> .....   | 161 |
| <b>Schéma II.14</b> : Mécanisme de la réaction de synthèse de Pechmann .....   | 161 |
| <b>Schéma II.15</b> : Mécanisme de la 2 <sup>ème</sup> étape de la synthèse de Pechmann à partir de la Catéchine.....                          | 162 |
| <b>Schéma II.16</b> : Importantes corrélations HMBC de NHR-1 .....   | 163 |
| <b>Schéma II.17</b> : Réaction d'acétalisation du <i>D</i> -Mannitol.....  | 167 |
| <b>Schéma II.18</b> : Mécanisme de la réaction de synthèse de l'acétalisation.....   | 167 |

## **RESUME**

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et pharmacologique de *Cissus populnea* (Vitaceae), *Gardenia aqualla* (Rubiaceae) et *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae), trois plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète sucré. Les extraits des différentes parties de ces plantes ont été soumis à diverses techniques chromatographiques, conduisant à l'isolement de plusieurs composés bioactifs qui ont par la suite été caractérisés par des méthodes modernes de spectroscopie, de spectrométrie de masse et par comparaison avec des composés apparentés décrits dans la littérature.

Les résultats révèlent l'isolement et l'identification de 29 composés purs parmi lesquels trois dérivés nouveaux : un alcène, le pentapentacontène, un ester d'acide gras, l'heptadécyle heptacosanoate isolés de *G. aqualla*, et un cérébroside, le Vitellaroside isolé de *V. paradoxa*. Les autres composés appartiennent à la classe des alcanes (01), des alcools (05), des chlorophylles (01), des glycosides (02), des composés phénoliques (08), des stéroïdes (03), des sucres (02) et des triterpénoïdes (08).

Le *D*-mannitol isolé de *G. aqualla* a été dérivé en 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-*D*-mannitol, tandis que la Catéchine isolé de *V. paradoxa* a été utilisée pour la synthèse d'un dérivé coumarinoflavanol nouveau, par la réaction de Pechmann.

Certains extraits et composés isolés ont été investigués pour leurs activités anti-radicalaire au DPPH, antimicrobiennes, inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase et de la phosphatase alcaline. Les résultats des tests anti-radicalaires au DPPH ont montré que l'extrait brut au MeOH des rhizomes de *C. populnea* était le plus actifs de tous les extraits avec une  $CI_{50}$  de  $16,20 \pm 0,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Les activités antibactériennes contre *E. coli*, *S. typhi* et *P. aeruginosa*, ainsi que antifongiques contre *C. albicans*, *C. krusei* et *C. parapsilosis*, évaluées par la méthode de microdilution, ont révélé l'efficacité de la plupart des composés testés avec des activités allant de faible à significatives ( $8 \leq CMI \leq 128 \mu\text{g/mL}$ ), en fonction des composés et des souches microbiennes. Les souches bactériennes ayant toutefois été plus sensibles que les champignons. Les résultats de la mise en évidence de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase par la méthode spectrophotométrique, ont révélé que tous les extraits testés étaient des réservoirs d'inhibiteurs de cette enzyme, exception faite pour l'extrait au MeOH des graines de *G. aqualla*. L'activité la plus élevée a cependant été notée pour l'extrait brut au MeOH des racines de *C. populnea* avec une  $CI_{50}$  de  $0,33 \pm 0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . De tous les composés évalués, l'Acide  $19\alpha,23\beta,24\alpha$ -trihydroxyursolique était le plus actif, avec une activité ( $CI_{50} = 1,72 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) significativement ( $P < 0,05$ ) supérieure à celle de l'Acarbose ( $CI_{50} = 234,6 \pm 2,01 \mu\text{M}$ ). De même, les résultats obtenus des tests d'inhibition des isozymes de la phosphatase alcaline (*h*-TNAP et *h*-IAP) par la méthode de luminescence au CDP-Star, ont montré des activités plus ou moins significatives qui étaient fonction du composé évalué et de l'isoenzyme. L'activité la plus élevée étant cependant enregistrée pour la Bergénine à la fois contre les deux isozymes mais avec une préférence pour la *h*-TNAP.

**Mots clés :** *Cissus populnea* ; *Gardenia aqualla* ; *Vitellaria paradoxa* ; Acétogénines ; Cérébrosides ; Composés phénoliques ; Triterpénoïdes ; Activités biologiques.

# **ABSTRACT**

The present work concerned the phytochemical and pharmacological investigation of *Cissus populnea* (Vitaceae), *Gardenia aqualla* (Rubiaceae) and *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae), three medicinal plants. The extracts of these species, were subjected to various chromatographic technique, affording several bioactive compounds, that were then characterized by modern spectroscopic methods, mass spectrometry and by comparison with related compounds described in the literature.

The results reveal the isolation and identification of 29 compounds, including three new ones: an alkene namely pentapentacontene along with a fatty acid ester heptadecyl heptacosanoate from *G. aqualla* (Rubiaceae), and a cerebroside namely Vitellaroside, from *V. paradoxa* (Sapotaceae). The other known compounds belong to alkane (01), alcohols (05), chlorophylls (01), glycosides (02), phenolic compounds (08), steroid (01), sugars (02) and triterpenoids (06).

*D*-Mannitol obtained from *G. aqualla* was derivatized to 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene-*D*-mannitol, while Catechin from *V. paradoxa* was used to synthesize a new coumarinoflavanol derivative through the Pechmann reaction.

Some extracts and isolated compounds have been investigated for their DPPH antiradical scavenging activities, antimicrobial activities,  $\alpha$ -glucosidase and alkaline phosphatase inhibitory activities. The results of the DPPH antiradical scavenging activity showed that the crude MeOH extract of *C. populnea* rhizomes was the most active of all the extracts with an  $IC_{50}$  of  $16.20 \pm 0.62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Antibacterial activities against *E. coli*, *S. typhi* and *P. aeruginosa*, as well as antifungals against *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*, evaluated by the microdilution method, revealed the efficacy of most tested compounds with activities ranging from low to significant ( $8 \leq \text{MIC} \leq 128 \mu\text{g/mL}$ ), depending on the compounds and microbial strains. Bacterial strains, were however more sensitive than fungi. The results of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity by the spectrophotometric method revealed that all the tested extracts were reservoirs of inhibitors of this enzyme, except for the MeOH extract of *G. aqualla* seeds. However, the highest activity, was recorded for the crude MeOH extract of *C. populnea* roots with an  $IC_{50}$  of  $0.33 \pm 0.04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Among all the tested compounds, 19 $\alpha$ , 23 $\beta$ , 24 $\alpha$ -trihydroxyursolic acid was the most potent, with a significant activity ( $IC_{50} = 1.72 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ;  $P < 0.05$ ) greater than the one of Acarbose ( $IC_{50} = 234.6 \pm 2.01 \mu\text{M}$ ). Similarly, the results obtained from the alkaline phosphatase (AP) isozymes inhibitory activities (*h*-TNAP and *h*-IAP) using the CDP-Star luminescence method, showed more or less significant activities according to the tested compounds and the AP isoenzymes. The highest activity was however recorded for Bergenin against both isoenzymes but with a selectivity for *h*-TNAP.

**Key words:** *Cissus populnea*; *Gardenia aqualla*; *Vitellaria paradoxa*; Acetogenins; Cerebrosides; Phenolic compounds; Triterpenoids; Bioactivities.

# **INTRODUCTION**

Le diabète est une maladie qui tue, handicape et touche les personnes dans leurs années les plus productives, appauvrit les familles ou réduit l'espérance de vie des personnes plus âgées. Cette menace courante ne tient compte ni des frontières ni de la classe sociale (OMS, 2016). Aucun pays n'est à l'abri du diabète et l'épidémie devrait continuer à s'étendre. Le fardeau du diabète ponctionne les budgets nationaux dédiés aux soins de santé, réduit la productivité, ralentit la croissance économique, entraîne des dépenses catastrophiques pour les ménages vulnérables et submerge les systèmes de soins de santé (OMS, 2016 ; FID, 2017).

Maladie du pancréas qui cause une élévation de la glycémie, le diabète est une affection chronique qui apparaît lorsque l'organisme ne produit pas suffisamment d'insuline, on parle de diabète de type 1 ou insulino-dépendant, ou lorsque l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit on parle de diabète de type 2 ou diabète sucré. Le diabète de type 2 est le plus répandu de tous, représentant près de 90% de tous les cas de diabète (FID, 2017). Les causes du diabète de type 1 demeurent mal connues à ce jour, cependant des études ont montré que le diabète de type 2 serait favorisé par des facteurs tels que la sédentarité, la mauvaise alimentation, l'alcoolisme et le tabagisme (FID, 2017). Le diabète est diagnostiqué par un taux de glycémie élevé, en présence des symptômes tels que le manque d'énergie et la fatigue extrême, des urines abondantes et fréquentes, une soif excessive et une bouche sèche, une vision trouble, des incontinences nocturnes...etc. S'il demeure non diagnostiqué pendant une période prolongée, ou s'il est mal pris en charge, le diabète peut aboutir à de graves complications liées à l'hyperglycémie chronique, allant des amputations aux attaques vasculo-cérébraux (AVCx), en passant par des insuffisances rénales, des maladies cardio-vasculaires, la rétinopathie, la perte de la vue, la néphropathie, la neuropathie, la microangiopathie et des infections sévères d'origine le plus souvent microbienne (Andrade-Cetto et *al.*, 2008 ; FID, 2017). Il a d'ailleurs été démontré que les infections microbiennes sont une source de déséquilibre du diabète ; ainsi, devant la perturbation d'un diabète habituellement équilibré, il faut rechercher une infection microbienne. Les patients atteints de diabète sont plus sensibles aux infections en raison de leur taux de sucre plus élevé et de leur système immunitaire affaibli. Une glycémie élevée ralentit le processus de guérison et rend les infections plus résistantes au traitement (Holt et *al.*, 2011).

Du fait donc de sa prise en charge non optimale et des multiples complications qui en découlent, le diabète constitue selon l'OMS l'un des principaux tueurs dans le monde, avec 4 million de décès enregistrés en 2017 pour les personnes âgées de 20 à 79 ans ce qui équivaut à un décès toutes les huit secondes et représente 10,7% de la mortalité mondiale toutes causes confondues pour ce groupe d'âge (FID, 2017). Ce chiffre est plus élevé que le nombre combiné de décès dus à des maladies infectieuses telles que le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme (FID, 2017).

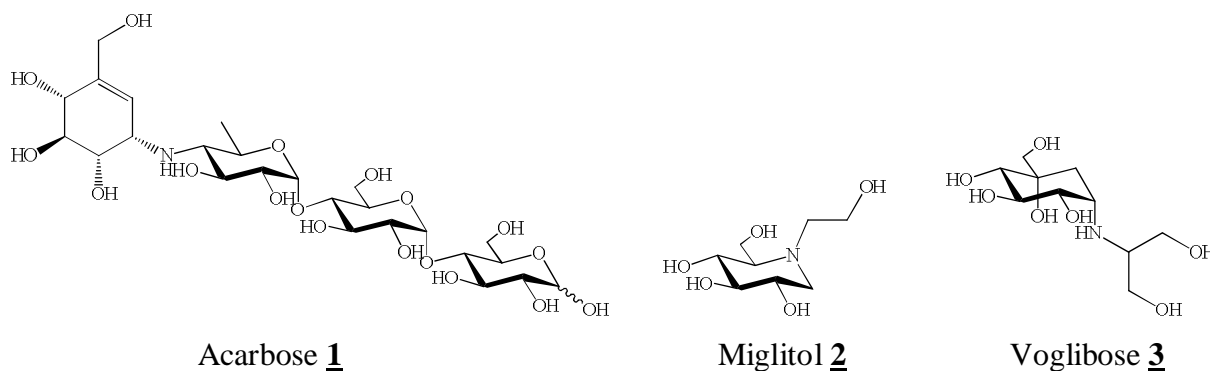


Du point de vue économique, 727 milliards USD sont dépensés chaque année par les personnes atteintes de diabète rien que pour les soins de santé, ce qui correspond à 1 USD sur 8 dépensés dans les soins de santé (FID, 2017).

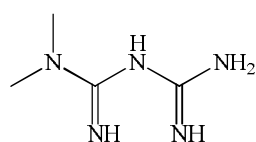
Il faut donc veiller sur le diabète qui d'après les estimations touche 425 millions de personnes âgées entre 20 et 79 ans (451 millions si on élargie la fourchette d'âges entre 18 et 90 ans) soit 8,8% de la population de ce groupe d'âge (FID, 2017). Le diabète gagne cependant du terrain. En effet, parti de 108 millions de cas en 1980, le diabète a atteint 422 millions de cas en 2014 contre 425 millions en 2017 et selon la FID (Fédération Internationale du Diabète) si cette tendance se poursuit d'ici à 2045, nous aurons 629 millions de personnes âgées de 20 à 79 ans (ou 693 millions de personnes âgées de 18-99 ans) atteintes de diabète, ce qui correspondrait à une augmentation de 48% (FID, 2017). Il n'existe cependant pas un seul pays dans le monde ayant diagnostiqué toutes les personnes atteintes de diabète sur son territoire et selon les estimations, pas moins de 212,4 millions de personnes à travers le monde, soit la moitié (50%) de celles atteintes de diabète, ne sont pas conscientes de leur maladie (FID, 2017).

Ainsi, il est urgent d'agir contre ce tueur dont les thérapies actuelles visent à réguler la glycémie et à prévenir les complications ultérieures. Constituées de sulfonurées, de biguanides, de thiazolidinediones et d'inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) (Stein et *al.*, 2013), ces thérapies ont déjà été associés à des effets secondaires tels qu'un gain de poids, une hypoglycémie sévère, des lésions du foie et une hypertension (Ruiz-Vargas et *al.*, 2019), d'où la nécessité de rechercher de nouvelles alternatives.

L'une des approches thérapeutiques les plus prometteuses pour réduire l'hyperglycémie postprandiale chez les patients atteints de diabète est la prévention de l'absorption des glucides après le repas, grâce à l'inhibition des enzymes entériques : l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase. En effet, les amidons complexes et les oligosaccharides ne peuvent pas être facilement transportés hors du lumen intestinal dans le sang, ils doivent d'abord être décomposés en monosaccharides avant d'être absorbés dans le duodénum et le jéjunum supérieur et ce processus est facilité par l' $\alpha$ -amylase pancréatique, et les  $\alpha$ -glucosidases qui sont attachées à la bordure en brosse des cellules intestinales (Andrade-Cetto et *al.*, 2008). Les inhibiteurs actuels de l' $\alpha$ -glucosidase tels que l'acarbose **1**, le miglitol **2** et le voglibose **3** n'ont montré que des effets secondaires mineurs sur le tractus gastro-intestinal et se sont de ce fait révélés être une option thérapeutique sérieuse pour le contrôle du diabète sucré (Van de Laar, 2008 ; Ruiz-Vargas et *al.*, 2019). Ce qui a suscité un intérêt accru pour la découverte de nouveaux inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase plus efficaces.



Depuis la découverte en 1922 de la Metformine **4** à partir des extraits de *Galega officinallis* (Bailey and Day, 2004), le criblage d'inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase d'origine végétale ne cesse de croître. Des inhibiteurs de cette enzyme ont récemment été développés à partir des plantes (Ruiz-Vargas et al., 2019 ; Anyanwu et al., 2019 ; Sheliya et al., 2015 ; Andrade-Cetto et al., 2008). Cependant, le plus grand succès à cet égard demeure le développement de la Metformine **4**, d'où son utilisation clinique actuelle dans le traitement du diabète de type 2 (Bailey and Day, 2004).



**Metformine 4**

La découverte de la Metformine **4** à partir d'une plante a suscité en nous la motivation de porter notre intérêt sur les plantes médicinales pour relever ce défi sanitaire croissant. Ainsi, dans le cadre de ce projet de recherche nous avons focalisé notre attention sur trois plantes médicinales, *Cissus populnea*, *Gardenia aqualla* et *Vitellaria paradoxa*, en raison de leurs utilisations en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète et des maladies microbiennes (Geidam, 2004 ; Awede et al., 2015 ; Karou et al., 2011). Le choix de ces plantes s'est également basé sur le fait qu'à l'exception de *V. paradoxa* qui a fait l'objet d'une étude phytochimique, les deux autres plantes n'ont fait l'objet d'aucune investigation à notre connaissance.

Comment à partir des plantes choisies dans le cadre de cette étude, trouver des médicaments qui permettraient une prise en charge optimale du diabète ? c'est la question à laquelle nous avons essayé d'apporter quelques éléments de réponse au cours de nos travaux partant de l'hypothèse selon laquelle les plantes médicinales choisies dans le cadre de cette étude pourraient contenir des métabolites secondaires doués de potentiels antiradicalaire, antimicrobien et inhibiteur de certaines enzymes impliquées dans le diabète à l'instar de l' $\alpha$ -glucosidase et de la phosphatase alcaline.

Le présent travail qui s'inscrit dans le cadre de la lutte contre le diabète, avait pour principal objectif de trouver des candidats médicaments qui permettraient une prise en charge optimale du

diabète. De façon plus précise, il s'agissait d'extraire, d'isoler, de caractériser, d'élucider les structures des composés isolés des plantes étudiées et de les soumettre ainsi que leurs extraits de départ à une série de tests de dépistage d'activités biologiques à l'instar des activités antiradicalaire contre le DPPH ; antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhimurium* ; antifongique contre *Candida albicans*, *Candida krusei* et *Candida parapsilosis* ; et inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase et des isoenzymes intestinale (IAP, *Intestinal Alkaline Phosphatase*) et tissu non spécifique (TNAP, *Tissue Non Specific Alkaline Phosphatase*) de la phosphatase alcaline impliquées dans le diabète de type 2.

Ce manuscrit se répartit en trois principaux chapitres :

Dans un premier chapitre, nous présenterons les généralités sur le diabète et ses complications, l'état des connaissances bibliographiques botaniques, phytochimiques et pharmacologiques sur les trois plantes choisies ainsi que leurs familles botaniques respectives.

Le deuxième chapitre sera consacré à la présentation des résultats de nos travaux personnels, lesquels revêtent un triple aspect : phytochimique, hémisynthétique et biologique.

Le troisième et dernier chapitre quant à lui présentera le matériel et les méthodes utilisés lors de nos travaux de thèse. Dans cette partie seront présentés, outre l'appareillage, le matériel tant végétal que biologique utilisés, ainsi que les diverses méthodes et protocoles qui ont conduit à l'obtention des composés et à l'évaluation de leurs activités biologiques.

# **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE**

## I.1. Généralités sur le diabète

### I.1.1. Définition, Classification et diagnostic

L'insuline est une hormone produite par le pancréas, qui régule la concentration du glucose dans le sang (glycémie) suite à la consommation de nourriture (OMS, 2016). Lorsqu'elle fait défaut, le taux de sucre augmente dans le sang, et l'organisme est très sensible à ces variations. Le diabète est cette affection chronique qui apparaît lorsque l'organisme ne produit pas suffisamment d'insuline ou qu'il n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit. Ceci entraîne par conséquent une concentration sanguine élevée de sucre (hyperglycémie), qui pourrait conduire avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques s'il n'est pas régulé (OMS, 2016).

La classification du diabète est complexe et a fait l'objet de nombreux débats au fil des décennies. Il est aujourd'hui généralement admis qu'il existe trois grands types de diabète : le diabète de Type 1 (DT1), le diabète de Type 2 (DT2) et le diabète gestationnel (DG) (FID, 2017).

Le DT1 (précédemment appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile) est provoqué par une réaction auto-immune au cours de laquelle le système immunitaire de l'organisme attaque les cellules des îlots du pancréas qui produisent l'insuline. L'organisme devient alors incapable de produire l'insuline dont il a besoin, ou alors il le produit en quantité très faible, avec pour conséquence une déficience relative ou absolue en insuline (FID, 2017).

Le DT2 (précédemment appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète de l'adulte) est le résultat d'une production inadéquate d'insuline et de l'incapacité de l'organisme à répondre pleinement à l'insuline, un état qualifié de résistance à l'insuline. L'insuline s'avère alors inefficace, ce qui déclenche dans un premier temps une hausse de la production de l'insuline pour réduire l'augmentation du taux de glycémie. Au fil du temps, une production inadéquate relative d'insuline peut toutefois se développer (FID, 2017).

Le DG est une affection provisoire qui survient pendant la grossesse. C'est un type de diabète qui affecte généralement les femmes enceintes pendant les deuxièmes et troisièmes trimestres, même s'il peut survenir à tout moment pendant la grossesse. Chez certaines femmes, un diabète peut être diagnostiqué au cours du premier trimestre, mais la plupart du temps, il existait alors déjà avant la grossesse mais n'avait pas été diagnostiqué. Le DG est associé à un risque à long terme de diabète de type 2 (FID, 2017).

Il existe également quelques types moins courants de diabète, dont le diabète monogénique et le diabète secondaire. Le diabète monogénique est le résultat d'une mutation génétique unique d'un gène dominant autosomique plutôt que le fruit de plusieurs gènes et facteurs environnementaux comme observé dans les diabètes de Type 1 et de Type 2. Entre autres exemples de diabète monogénique, il y a le diabète néonatal et le diabète MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*). Le diabète monogénique est responsable d'environ 1-5 % de tous les cas de diabète. Le

diabète secondaire est une complication d'autres maladies, comme des troubles hormonaux (maladie de Cushing ou acromégalie, ...) ou des maladies du pancréas (pancréatite, ...). Il peut également apparaître suite à la prise de médicaments, tels que des corticostéroïdes (FID, 2017).

Les critères de diagnostic du diabète ont également fait l'objet de débats au fil des décennies. Cependant les critères actuels de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) préconisent d'observer l'élévation des taux de glucose dans le sang pour diagnostiquer le diabète. Ainsi selon l'OMS, un diabète doit être diagnostiqué si un ou plusieurs des critères suivants sont satisfaits :

- Glycémie à jeun  $\geq 7,0$  mmol/L (126 mg/dL) ;
- Glycémie à deux heures après ingestion de glucose orale de 75 g (test oral de tolérance au glucose (HGPO))  $\geq 11,1$  mmol/L (200 mg/dL) ;
- Glycémie aléatoire  $> 11,1$  mmol/L (200 mg/dL) ou HbA1c  $\geq 48$  mmol/mol.

Le Type de diabète est parfois difficile à déterminer et des tests supplémentaires sont souvent nécessaires pour faire la distinction entre les différentes formes de diabète (FID, 2017).

### **I.1.2. Facteurs de risque et symptômes**

Les facteurs de risque et les manifestations cliniques du diabète varient d'un type à l'autre.

Les causes du DT1 ne sont pas totalement comprises, mais une susceptibilité génétique combinée à des facteurs déclencheurs environnementaux (infection virale, toxines, alimentation) est impliquée. La maladie peut se développer à tout âge, mais le DT1 apparaît le plus souvent à l'enfance ou à l'adolescence. Les personnes atteintes de cette forme de diabète ont besoin d'insuline chaque jour et ne peuvent survivre sans (OMS, 2016 ; FID, 2017). Le DT1 est diagnostiqué par un taux de glycémie élevé en présence des symptômes tels qu'une soif excessive et la bouche sèche, des urines abondantes, un manque d'énergie et une fatigue extrême, une faim constante, une perte de poids soudaine, des incontinences nocturnes et une vision trouble (FID, 2017).

Les causes du DT2 ne sont également pas totalement comprises, mais il existe un lien étroit avec le surpoids et l'obésité, de même qu'avec l'âge, l'ethnicité et la génétique (antécédents familiaux) qui sont des facteurs de risque de DT2 non modifiables. Parmi les principaux facteurs de risque modifiables, citons une adiposité excessive (obésité), une mauvaise alimentation/nutrition, le sédentarisme, le prédiabète ou l'intolérance au glucose, le tabagisme et des antécédents de DG avec exposition du fœtus à une glycémie élevée pendant la grossesse. Un excès de masse grasse, est le plus grand facteur de risque de DT2. Le surpoids, l'obésité et la sédentarité, sont considérés comme responsables de la plus grande part de la charge de morbidité liée au diabète dans le monde. Les autres facteurs incluent une consommation inadéquate de fruits, légumes, céréales, fibres, ainsi que de graisses saturées (FID, 2017). Les symptômes peuvent être similaires à ceux du DT1, notamment une soif excessive, des urines abondantes, la fatigue, une cicatrisation lente des plaies,

des infections récurrentes et des fourmillements ou un engourdissement des mains et des pieds. Cependant, ils sont souvent moins marqués ou absents. Aussi la maladie peut-elle rester non diagnostiquée pendant plusieurs années, jusqu'à ce que des complications existantes soient constatées. Pendant de nombreuses années, le DT2 n'était observé que chez l'adulte mais il a commencé à toucher les enfants (OMS, 2016 ; FID, 2017).

Le DG apparaît suite à une diminution de l'action de l'insuline (résistance à l'insuline) due à la production d'hormones par le placenta. Les autres facteurs de risque du DG sont notamment l'âge avancé, le surpoids et l'obésité, un gain de poids excessif pendant la grossesse, des antécédents familiaux de diabète et des antécédents d'enfant mort-né ou de naissance d'un enfant présentant une anomalie congénitale. Le diabète pendant la grossesse et le DG augmentent le risque d'obésité future et de DT2 chez les enfants. Les symptômes évidents d'une hyperglycémie pendant la grossesse sont rares et parfois difficiles à distinguer des symptômes normaux de la grossesse (OMS, 2016 ; FID, 2017).

### **I.1.3. Prévalence et mortalité**

#### **I.1.3.1. Prévalence mondiale**

Le diabète est l'une des principales urgences mondiales du 21<sup>ème</sup> siècle en matière de santé. Il figure parmi les 10 premières causes de décès au monde et représente, avec les trois autres grandes maladies non transmissibles (MNT) (maladies cardiovasculaires, cancers et maladies respiratoires chroniques), plus de 80% de tous les décès prématurés dus à des MNT. Le fait que 30 à 80% des personnes atteintes de diabète ne soient pas diagnostiquées contribue dans une large mesure à la problématique du diabète 2 (FID, 2017).

La prévalence mondiale du diabète (normalisée selon l'âge) a presque doublé depuis 1980, passant de 4,7 à 8,8% de la population adulte (OMS, 2016 ; FID, 2017). À l'échelle mondiale, on estime à 108 millions le nombre des adultes (20-79 ans) qui vivaient avec le diabète en 1980, 382 millions en 2013, 422 millions en 2014, contre 425 millions (451 millions si l'on élargit la fourchette d'âge à 18-99 ans) en 2017. Environ 79% vivent dans des pays à faible et moyen revenu (FID, 2017), et dans la majorité des cas (90%), c'est le DT2 qui est en cause (OMS, 2016).

La prévalence du diabète chez les femmes de 20-79 ans est estimée à 8,4%, un pourcentage légèrement inférieur aux hommes (9,1%). On dénombre environ 17,1 millions d'hommes atteints de diabète de plus que de femmes (221,0 millions d'hommes pour 203,9 millions de femmes). 326,5 millions de personnes en âge de travailler (20-64 ans) sont atteintes de diabète, et 122,8 millions de personnes âgées de 65 à 99 ans. Les zones urbaines (279,2 millions) comptent plus de personnes âgées de 20-79 ans atteintes de diabète que les zones rurales (145,7 millions). De même, la prévalence est plus élevée en milieu urbain que rural (10,2% contre 6,9%) (FID, 2017).





**Figure I.1 :** Prévalence mondiale estimée du diabète chez les adultes (20-79 ans) (FID, 2017)

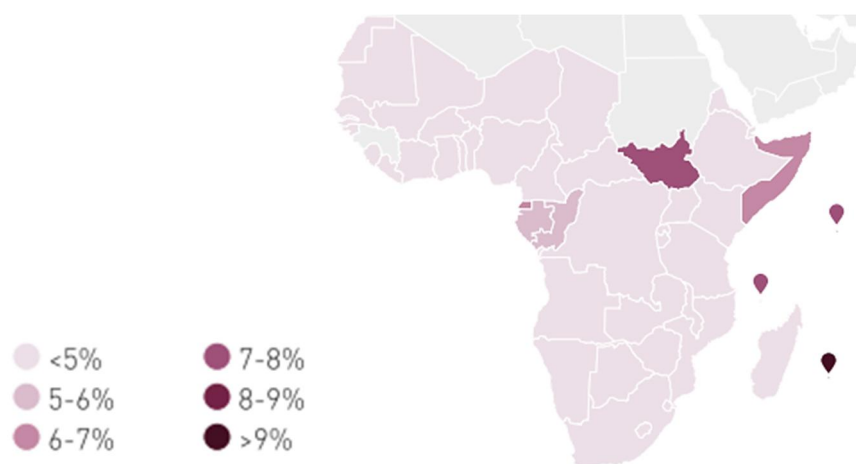
Selon l’OMS, la complexité des examens de laboratoire généralement requis pour distinguer entre le DT1 et celui de type 2, fait qu’il n’existe pas d’estimations mondiales distinctes fiables de la prévalence du DT1 et de celle du DT2 (OMS, 2016). Nonobstant cela, la Fédération Internationale de Diabète (FID) estime qu’environ 87 à 91% des personnes atteintes de diabète dans les pays à revenu élevé souffrent du type 2 ; 7 à 12% du type 1 et 1 à 3% d’une autre forme (FID, 2017). Dans la plupart de ces pays, la majorité des enfants et des adolescents qui développent le diabète ont un DT1 (FID, 2017). Le DT2, précédemment observé presque exclusivement chez les adultes, touche aussi désormais les enfants (OMS, 2016).

### I.1.3.2. Prévalence dans la région Afrique

Selon les estimations de la FID, 15,5 millions d’adultes âgés de 20-79 ans souffrent de diabète dans la région Afrique, ce qui représente une prévalence régionale de 2,1%. Cette région compte le pourcentage le plus élevé de cas de diabète non diagnostiqués (69,2%). Plus de la moitié (55,3 %) des personnes atteintes de diabète vivent en ville, même si la population de la région est essentiellement (60,3%) rurale (FID, 2017).

Au Cameroun, le taux de prévalence du diabète est estimé à 6,4% chez les adultes de 20-79 ans (FID, 2017). Cependant, le taux le plus élevé dans la région Afrique pour ce groupe d’âge est observé sur l’île de la Réunion (13,8%), suivie des Comores (11,9 %) et des Seychelles (10,6%). Les nombres les plus élevés de personnes atteintes sont observés dans certains des pays les plus peuplés d’Afrique à l’instar de l’Éthiopie (2,6 millions), de l’Afrique du Sud (1,8 million), de la République Démocratique du Congo (1,7 millions) et du Nigeria (1,7 million). Environ 45,1% des adultes (20-79 ans) atteints de diabète en Afrique vivent dans ces quatre pays (FID, 2017).





**Figure I.2 :** Estimation de la prévalence du diabète (20-79 ans) dans la région Afrique (FID, 2017)

### I.1.3.3. Mortalité mondiale

Le nombre de personnes âgées entre 20 et 79 ans décédées du diabète en 2017 est estimé à 4,0 millions, ce qui équivaut à un décès toutes les huit secondes. Environ 46,1% de ces décès concernaient des personnes de moins de 60 ans (FID, 2017). Le nombre de décès imputables au diabète est plus élevé dans les pays à revenu faible ou intermédiaire que dans les pays à revenu élevé (OMS, 2016). Il est également plus élevé chez les femmes (2,1 millions) que chez les hommes (1,8 millions), à l'exception de la région Amérique du Nord et Caraïbes, où davantage d'hommes que de femmes meurent de cette maladie (FID, 2017).

### I.1.3.4. Mortalité dans la région Afrique

En 2017, plus de 298 160 décès (6% de tous les décès) dans la région Afrique étaient attribués au diabète, le groupe d'âge 30-39 ans enregistrant le pourcentage le plus élevé de mortalité. Par ailleurs, 77% des décès imputables au diabète sont survenus chez des personnes de moins de 60 ans, la proportion la plus élevée au monde. La mortalité imputable au diabète est 1,6 fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes (FID, 2017).

Au Cameroun, 2% de personnes âgées entre 30 et 79 ans meurent de diabète chaque année et ces décès sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes (OMS, 2016).

### I.1.3.5. Projections

Les estimations du diabète sont en hausse depuis plusieurs décennies et si cette tendance se poursuit, d'ici à 2045, 629 millions de personnes âgées de 20-79 ans (ou 693 millions de personnes âgées de 18-99 ans) seront atteintes de diabète. Ce sont les régions dont l'économie évolue d'un faible revenu à un revenu moyen qui connaîtront la hausse la plus importante. Plus d'un tiers des cas de diabète seraient le résultat de la croissance et du vieillissement de la population, 28% d'une hausse de la prévalence selon l'âge et 32% de l'interaction de ces trois facteurs (FID, 2017). Le nombre de personnes en âge de travailler atteintes de diabète augmentera à 253,4 millions en

2045. La prévalence du diabète devrait augmenter à 9,7% chez les femmes et 10,0% chez les hommes. C'est le groupe d'âge des 65-79 ans qui affiche la prévalence du diabète la plus élevée. Le nombre de personnes atteintes de diabète dans les zones urbaines devrait passer à 472,6 millions en 2045, principalement en raison de l'urbanisation mondiale. De même, le coût économique du diabète va augmenter dans les décennies à venir particulièrement parmi les personnes les plus âgées (70-99) avec une hausse de 104 milliards USD entre 2017 et 2045 (FID, 2017).

#### **I.1.4. Traitement et prise en charge**

Le traitement du diabète, qu'il soit de type 1 ou 2 repose sur la nécessité de faire assimiler le sucre aux cellules du corps et de fournir au corps la quantité d'insuline nécessaire. Des modifications du style de vie associées à une détection précoce, et à un traitement économique du diabète, sont nécessaires pour sauver des vies et empêcher ou retarder considérablement les complications dévastatrices de la maladie. La prise en charge du diabète passe donc à la fois par l'adoption de règles hygiéno-diététiques et la prise de médicaments.

##### **I.1.4.1. Les mesures hygiéno-diététiques**

###### **I.1.4.1.1. L'alimentation**

Pour améliorer le contrôle glycémique des patients diabétiques, il est nécessaire de modifier et contrôler leur régime alimentaire. Une réduction du poids est souvent nécessaire. L'alimentation du diabétique doit être équilibrée entre les 3 repas quotidiens et comporter des glucides (environ 50% de l'apport énergétique total), des lipides (35%) et des protéines (15%).

Des études indiquent que la meilleure alimentation pour prévenir la prise de poids, l'obésité, le DT2 et les maladies cardiovasculaires est une alimentation pauvre en graisse et en boissons sucrées en privilégiant les fibres, les céréales et les protéines (Couaillet, 2015).

###### **I.1.4.1.2. L'activité physique**

Associée à des règles alimentaires spécifiques, la pratique d'une activité physique régulière est indispensable (marche, vélo, natation, course...). Idéalement, une activité de 45 minutes, 3 jours par semaine voire tous les jours est requise. Cela permet de diminuer les besoins en insuline et l'insulino-résistance, de diminuer le taux de triglycérides par augmentation des récepteurs aux LDL et d'augmenter la dépense énergétique. Cependant, pour un patient de DT1, l'exercice physique ne doit pas être intense car il augmente le risque d'hypoglycémie (Couaillet, 2015).

##### **I.1.4.2. Les traitements médicamenteux**

Les diabétiques doivent impérativement adopter un mode de vie sain et équilibré, qui passe par le respect des précautions ci-dessus citées. Si celles-ci sont insuffisantes, un traitement médicamenteux peut être envisagé. Celui-ci se fait par les antidiabétiques oraux.

#### **I.1.4.2.1. Les Biguanides**

Ils ne stimulent pas l'insulinosécrétion. Leur action principale est de diminuer la production hépatique de glucose en freinant la néoglucogenèse. Les biguanides peuvent contribuer à la perte de poids ou à la stabilité pondérale. Ils n'induisent pas d'hypoglycémie par eux-mêmes. La Metformine est un biguanide qui réduit la néoglucogenèse hépatique en diminuant modérément la production de l'ATP (Adénosine Triphosphate) dans les cellules du foie (Couaillet, 2015).

#### **I.1.4.2.2. Les glitazones (thiazolidinediones)**

Les thiazolidinediones (pioglitazone, rosiglitazone) agissent spécifiquement sur l'insulino-résistance. Ces produits réduisent la glycémie, l'insulinémie et la triglycéridémie, en améliorant la sensibilité à l'insuline surtout au niveau musculaire (Couaillet, 2015).

#### **I.1.4.2.3. Les insulino-sécréteurs**

##### **I.1.4.2.3.1. Les sulfamides hypoglycémiant**

Les sulfamides hypoglycémiant agissent principalement en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Ils régulent la sécrétion d'insuline en fermant les canaux potassiques ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane et l'entrée de calcium dans les cellules  $\beta$ . L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire stimule la libération d'insuline par exocytose. Le glimépiride (Amarel®) ou glibenclamide (Daonil®) et le glicazide (Diamicron®) en sont quelques exemples (Couaillet, 2015).

##### **I.1.4.2.3.2. Les glinides**

Ce sont des agents insulino-sécrétagogues. Ils stimulent l'insulino-sécrétion en agissant sur le canal potassique ATP-dépendant, mais leur site de liaison sur la cellule  $\beta$  est différent de celui des sulfamides. Ils stimulent le pic précoce d'insulino-sécrétion et ont une action préférentielle sur la glycémie post-prandiale (Couaillet, 2015).

#### **I.1.4.2.4. Les inhibiteurs des $\alpha$ -glucosidases**

Les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases ralentissent l'absorption des glucides alimentaires complexes. Principalement actifs sur la glycémie postprandiale, ils ne peuvent induire l'hypoglycémie par eux-mêmes. L'acarbose est un inhibiteur des glucosidases intestinales (Couaillet, 2015).

#### **I.1.4.2.5. Les incrétines**

Le GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Peptide*) et le GLP-1 (*Glucagon-Like-Peptide-1*) deux peptides sécrétés respectivement par les cellules K du duodénum et les cellules L de l'iléon et du colon proximal, potentialisent l'insulinosécrétion, préservent les cellules  $\beta$  pancréatiques, réduisent les taux circulants de glucagon et ralentissent la vidange gastrique. (Couaillet, 2015).

#### **I.1.4.2.4.1. Les Analogues du GLP-1 : incrétino-mimétiques**

Les incrétino-mimétiques sont des agonistes du récepteur du GLP-1, résistant à la dégradation par l'enzyme DPP-4 du fait de modifications de leur structure. Les premiers représentants de cette classe sont l'exénatide (Byetta®) et le liraglutide. Ils ont un impact significatif sur la glycémie post-prandiale et s'administrent par voie sous-cutanée en une ou deux injections par jour. (Couailliet, 2015).

#### **I.1.4.2.4.2. Les inhibiteurs de la dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4)**

Ils permettent de prolonger la demi-vie et donc les effets des gluco-incrétones endogènes. Les premiers représentants de cette classe sont la sitagliptine (Januvia®) et la vildagliptine (Galvus®). Ils s'administrent en une ou deux prises quotidiennes per os. Ils ont un impact significatif sur la glycémie post-prandiale et n'ont pas d'impact sur le poids (Couailliet, 2015).

#### **I.1.4.2.5. Les insulines**

Elles se présentent sous différentes formes d'administration (cartouche, flacon) mais la plus commune est le stylo injecteur. On différencie les insulines en fonction de leurs durées d'action. Ainsi on distingue :

- Les insulines lentes, elles ont une durée d'action de 1 à 4 heures et un délai d'action de 24 heures (Insulatard®, Lantus®, Levemir®). Elles miment la sécrétion d'insuline basale et sont administrées une fois par jour.
- Les insulines retardes ou intermédiaires, elles ont une durée d'action de 10 à 30 minutes et un délai d'action de 12 à 20 heures (Humalox mix®, Novomix®, Isuman comb®).
- Les insulines rapides, elles ont une durée d'action de 15 minutes et un délai d'action de 2 à 5 heures (Humalog®, Novorapid®). Elles sont injectées en bolus au moment des repas, elles agissent sur les pics de glucose.

L'insuline utilisée est conditionnée en cartouche. Avant toute injection d'insuline, les patients doivent réaliser un contrôle glycémique. Ils se piquent le doigt à l'aide d'une auto piqueuse afin d'obtenir une goutte de sang. Le sang est placé sur la bandelette d'un lecteur glycémique qui détermine la glycémie (Couailliet, 2015).

#### **I.1.4.3. Traitement par les plantes**

Les plantes représentent la forme majeure de traitement traditionnel dans le monde entier, caractérisées par ses effets positifs avec moins d'effets secondaires graves. Les plantes constituent une grande source de principes actifs qui peuvent être utilisés pour traiter de nombreuses maladies, dont le diabète. Le coût élevé des traitements conventionnels, ainsi que la modicité des revenus des populations suscitent depuis des années, un intérêt croissant et une forte demande pour les

médicaments traditionnels à base de plantes. Une étude ethnobotanique menée par Tsabang et *al.* (2017) a révélé que le Cameroun dispose d'une biodiversité floristique intéressante en matière de plantes antidiabétiques. De plus les tradithérapeutes du pays partagent beaucoup de similitudes dans l'utilisation des espèces végétales. Leur diagnostic repose uniquement sur les symptômes de la maladie. Au total 103 espèces végétales appartenant à 72 genres et 34 familles ont été répertoriées au cours de cette étude (Tsabang et *al.*, 2017). Les plantes ainsi répertoriées constituent un panel pouvant servir de point de départ pour les criblages biologiques au laboratoire. Quelques-unes de ces plantes sont consignées dans le tableau I.1 ci-dessous :

**Tableau I.1 :** Quelques plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète au Cameroun

| Nom de la plante               | Famille        | Partie utilisée   | Mode de préparation      |          |
|--------------------------------|----------------|-------------------|--------------------------|----------|
| <i>Allium cepa</i>             | Alliaceae      | Bulbe             | Mam, Sau, Mac, Déc, Alc  |          |
| <i>Allium sativum</i>          |                | Gousse            |                          |          |
| <i>Aloe vera</i>               | Asparagaceae   | Feuilles          | Gel                      |          |
| <i>Andira inermis</i>          | Fabaceae       | Feuilles, écorces | Déc                      |          |
| <i>Angylocalyx talbotii</i>    | Fabaceae       | n.d               | Déc                      |          |
| <i>Antrocaryon klaineanum</i>  | Anacardiaceae  | Ecorces           | Mac, Déc                 |          |
| <i>Azadirachta indica</i>      | Meliaceae      | Fruits, graines   | Déc, Pou                 |          |
| <i>Bridelia ferruginea</i>     | Euphorbiaceae  | Plante entière    | Pou, Déc Mac             |          |
| <i>Bryophyllum pinnatum</i>    | Crassulaceae   | Feuilles          | Déc                      |          |
| <i>Catharanthus roseus</i>     | Apocynaceae    | Plante entière    | Alc, Déc                 |          |
| <i>Ceiba pentandra</i>         | Bombacaceae    | Ecorces, racines  | Déc                      |          |
| <i>Cissus quadrangularis</i>   | Vitaceae       | Tige feuillées    |                          |          |
| <i>Chamaecrista mimosoides</i> | Fabaceae       | Feuilles          | Déc, Pou noire           |          |
| <i>Corchorus olitorius</i>     | Malvaceae      | Feuilles, graines |                          |          |
| <i>Eclipta prostrata</i>       | Asteraceae     | Plante entière    | Déc                      |          |
| <i>Ekebergia senegalensis</i>  | Miliaceae      | Ecorces du tronc  |                          |          |
| <i>Erythrina senegalensis</i>  | Fabaceae       | Feuilles          |                          |          |
| <i>Euphorbia hirta</i>         | Euphorbiaceae  | Tige feuillées    |                          |          |
| <i>Gardenia ternifolia</i>     | Rubiaceae      | Feuilles          |                          |          |
| <i>Glossocalyx brevipes</i>    | Siparunaceae   |                   |                          |          |
| <i>Ipomoea mauritiana</i>      | Convolvulaceae |                   |                          |          |
| <i>Jatropha curcas</i>         | Euphorbiaceae  |                   |                          |          |
| <i>Khaya senegalensis</i>      | Meliaceae      | Ecorces           |                          | Mac, Déc |
| <i>Laportea ovalifolia</i>     | Urticaceae     | Plante entière    |                          | Déc      |
| <i>Margaritaria discoidea</i>  | Phyllanthaceae | Feuilles, écorces | Mac, Déc                 |          |
| <i>Mitragyna inermis</i>       | Rubiaceae      |                   | Inf, Déc                 |          |
| <i>Momordica charantia</i>     | Cucurbitaceae  | Feuilles          | Inf, Déc, Alc            |          |
| <i>Moringa oleifera</i>        | Moringaceae    | Racines, graines  | Mam, Alc, Pou, Déc, Pou  |          |
| <i>Persea americana</i>        | Lauraceae      | noyau             | Déc                      |          |
| <i>Phyllanthus amarus</i>      | Euphorbiaceae  | Plante entière    | Déc, Pou                 |          |
| <i>Solanum melongena</i>       | Solanaceae     | Feuilles, fruits  | Déc                      |          |
| <i>Spathodea campanulata</i>   | Bignoniaceae   | Ecorces           | Mac, Déc                 |          |
| <i>Staudtia kamerounensis</i>  | Myristicaceae  | Feuilles, écorces |                          |          |
| <i>Terminalia glaucescens</i>  | Combretaceae   |                   | Déc, Pou                 |          |
| <i>Treulia africana</i>        | Moraceae       |                   | Mac, Déc                 |          |
| <i>Vernonia amygdalina</i>     | Asteraceae     | Feuilles          | Inf, Alc, Déc, Pou noire |          |
| <i>Xylopiya aethiopica</i>     | Annonaceae     | Fruits            | Déc, Alc, Pou            |          |

Pou : Poudre ; Déc : Décoction ; Mam : Mixture au Miel ; Mac : Macération ; Sau : Sauce ; Alc : Alcoolature ; Inf : Infusion.

### I.1.5. Prévention

Il n'existe actuellement aucune intervention efficace pour prévenir le DT1. En revanche, la survenue du DT2 peut largement être évitée ou retardée si les individus prennent des mesures simples modifiant leur mode de vie.

De nombreux facteurs influencent le développement du DT2. Parmi celles-ci, certains sont susceptibles d'être modifiés, d'autres pas. Ainsi, l'ethnicité, la génétique et l'âge sont des facteurs de risque de DT2 non modifiables. D'autres facteurs de risque comme l'alimentation, l'adiposité, l'activité physique et l'exposition environnementale peuvent en revanche être modifiés par une série d'approches au niveau de la population et de l'individu. Il est toutefois évident que les facteurs les plus influents sont les comportements généralement associés à l'urbanisation et à un style de vie moderne. C'est notamment le cas de la mauvaise alimentation et des modes de vie inactifs associés à un comportement sédentaire. Des essais contrôlés randomisés réalisés en différents endroits du monde, ont démontré qu'une modification du style de vie combinée à une activité physique et/ou une alimentation saine peuvent retarder ou empêcher l'apparition du DT2 (FID, 2017).

Les recommandations de l'OMS en matière d'alimentation pour la prévention du DT2 préconisent la limitation de la consommation d'acides gras saturés à moins de 10% de l'apport énergétique total (moins de 7% pour les groupes à haut risque) et un apport adéquat en fibres alimentaires (dose journalière minimale de 20,g) grâce à la consommation de céréales complètes, de légumineuses, de fruits et de légumes. Par ailleurs, les recommandations de la FID pour une alimentation saine sont les suivantes (FID, 2017) :

- Opter pour de l'eau, du café ou du thé à la place d'un jus de fruits, d'un soda ou d'autres boissons sucrées ;
- Manger au moins trois portions de légumes par jour, notamment des légumes verts ;
- Manger jusqu'à trois rations de fruits frais par jour, et opter pour des noix, un fruit frais ou un yaourt non sucré comme en-cas ;
- Limiter la consommation d'alcool à deux boissons standards par jour au maximum ;
- Choisir des morceaux maigres de viande blanche, de volaille ou des fruits de mer au lieu de viande rouge ou transformée ;
- Préférer le beurre de cacahuètes au chocolat à tartiner ou à la confiture ;
- Consommer du pain, du riz, ou des pâtes, complets plutôt que leurs équivalents blancs ;
- Privilégier les graisses insaturées (huile d'olive, huile de maïs, huile de tournesol...) plutôt que des graisses saturées (beurre, beurre clarifié, graisse animale, huile de coco ou huile de palme).

Les modes de vie modernes se caractérisent par l'inactivité physique et de longues périodes de sédentarité. La FID recommande de pratiquer une activité physique de trois à cinq fois par

semaine et au minimum pendant 30-45 minutes à chaque fois. L'OMS a par ailleurs développé des recommandations en matière d'activité physique pour les différents groupes d'âge (FID, 2017). Ces recommandations sont les suivantes :

- Les enfants et jeunes gens âgés de 5 à 17 ans devraient accumuler au moins 60 minutes par jour d'activité physique d'intensité modérée à soutenue ;
- Les adultes âgés de 18 à 64 ans devraient pratiquer au moins 150 minutes d'activité physique d'intensité modérée (marche rapide, jogging, jardinage) étalées sur la semaine, ou au moins 75 minutes d'activité d'endurance d'intensité soutenue, ou une combinaison équivalente d'activité d'intensité modérée et soutenue.
- Pour les adultes plus âgés, la même quantité d'activité physique est recommandée, mais devrait également inclure des activités de renforcement musculaire et visant à améliorer l'équilibre adaptées à leurs capacités et à leur état.

Une approche couvrant toute la durée de la vie est essentielle pour prévenir le DT2 et ses complications. Les jeunes années représentent une période particulièrement critique pour prévenir le développement du surpoids et de réduire le risque de DT2. Des modes de vie sains peuvent également améliorer la santé à des stades ultérieurs de la vie (FID, 2017).

Les interventions au sein des communautés peuvent arriver jusqu'aux personnes concernées et leur famille par le biais des campagnes, de l'éducation et du marketing social. Des choix sains peuvent ainsi être encouragés dans des environnements spécifiques (école, lieu de travail et domicile) et contribuer à une meilleure santé pour chacun. Ils incluent une activité physique régulière et une alimentation avisée pour maintenir des taux de glycémie, de tension artérielle et de lipides normaux (FID, 2017).

### **I.1.6. Complications du diabète**

Le diabète est difficile à équilibrer, il y a souvent des oscillations entre hyperglycémies et hypoglycémies. Lorsqu'ils ne sont pas correctement gérés, tous les types de diabète peuvent conduire à des complications à différents endroits de l'organisme, avec pour conséquence des hospitalisations fréquentes et une mort précoce (FID, 2017), la durée de vie d'un diabétique étant souvent amputée de cinq à dix ans (Schlienger, 2013).

Les complications liées au diabète surviennent après plusieurs années et sont nombreuses, locales ou générales, insidieuses, chroniques, et graves (Schlienger, 2013). Elles peuvent être présentes dès le diagnostic chez les personnes atteintes de DT2 et peu (environ 5 ans) après le début du DT1 et doivent être dépistées régulièrement (FID, 2017).

On distingue deux types de complications du diabète : aiguës et chroniques. Les complications aiguës incluent l'acidocétose diabétique, le syndrome hyperglycémique hyperosmolaire, le



coma diabétique hyperglycémique, les crises d'épilepsie ou la perte de connaissance et les infections. Les complications microvasculaires chroniques sont la néphropathie, la neuropathie et la rétinopathie, tandis que les complications macrovasculaires chroniques comprennent les coronaropathies conduisant à une angine de poitrine ou un infarctus du myocarde, les artériopathies périphériques contribuant aux accidents vasculaires cérébraux, l'encéphalopathie diabétique et le pied diabétique. De plus, le diabète a été associé à une augmentation des taux de cancers, de handicaps physiques et cognitifs, de tuberculose et de dépression (FID, 2017).

#### **I.1.6.1. Maladies cardiovasculaires (MCVs)**

Les personnes atteintes de diabète présentent un risque accru de MCVs, le plus souvent deux à trois fois plus élevé que les non diabétiques. Une glycémie élevée peut entraîner une activité excessive du système de coagulation sanguine, ce qui augmente le risque de caillots sanguins (FID, 2017). Les complications cardiovasculaires sont inévitables après plusieurs années de diabète (OMS, 2016). En effet, le diabète est associé à une tension artérielle et des taux de cholestérol élevés, lesquels provoquent une augmentation du risque de complications cardiovasculaires, telles qu'une angine de poitrine, une coronaropathie (CP), un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral, une artériopathie périphérique (APP) ou une insuffisance cardiaque congestive (Schlienger, 2013 ; FID, 2017). Les MCVs sont une cause majeure de décès (50%) et des handicaps chez les personnes atteintes de diabète. Elles sont responsables de la mort annuelle de cinq jeunes (8-43 ans) sur 1000 atteints de DT1. Ce chiffre monte jusqu'à 27 personnes sur 1000 chez les personnes d'âge moyen atteintes de DT2 vivant dans les pays à revenu élevé et moyen. L'incidence des MCVs augmente avec l'âge et présente des variations selon les pays, avec des taux plus élevés dans les pays à faible et moyen revenu que dans ceux à revenu élevé (OMS, 2016 ; FID, 2017).

#### **I.1.6.2. Maladies oculaires liées au diabète**

Les maladies oculaires diabétiques (MODs) sont directement causées par des taux de glycémie élevés chroniques provoquant des lésions des capillaires rétinien, ce qui entraîne une fuite capillaire et une obstruction des capillaires. Elles peuvent déboucher sur une perte de vision, et la cécité. Les MODs incluent la rétinopathie diabétique (RD), l'œdème maculaire diabétique (OMD), la cataracte, le glaucome, la perte de la capacité de convergence et la vision double (FID, 2017).

La rétinopathie est liée à l'hyperglycémie et la durée du diabète. Elle touche plus de 50% des diabétiques après 15 ans d'évolution du diabète. La RD est la principale cause de perte de vision chez les adultes en âge de travailler (20 à 65 ans). La prévalence des différentes formes de RD est de 35%, et celle de la rétinopathie proliférante (menaçant la vision) est de 7%. Un contrôle strict de la glycémie peut empêcher le développement d'une RD dans 76% des cas (FID, 2017).



### **I.1.6.3. Maladies rénales liées au diabète (néphropathies)**

Chez les patients atteints de diabète, l'insuffisance rénale chronique peut prendre la forme d'une néphropathie diabétique réelle, mais peut aussi être causée indirectement par le diabète, principalement en raison d'une hypertension, mais aussi par un dysfonctionnement polyneuropathique de la vessie, une incidence accrue des infections des voies urinaires à répétition ou une artériopathie macrovasculaire (FID, 2017).

La néphropathie diabétique évolue à terme, du fait de l'hypertension, vers une insuffisance rénale chronique sévère (Monnier *and* Thuan, 2007). La proportion des cas d'insuffisance rénale terminale imputable au diabète se situe entre 12 et 55%. L'incidence de l'insuffisance rénale terminale est jusqu'à 10 fois plus élevée chez les adultes diabétiques (OMS, 2016 ; FID, 2017).

### **I.1.6.3. Lésions nerveuses (neuropathies) et pied diabétique**

La neuropathie diabétique est un dysfonctionnement des activités normales des nerfs de l'organisme. Il s'agit d'une démyélinisation segmentaire des axones, associée à des dépôts lipidiques sur les cellules de Schwann (Monnier *and* Thuan, 2007). Les lésions nerveuses peuvent être relativement importantes, de sorte que des blessures risquent de passer inaperçues avec, pour conséquence, des ulcérations, des infections graves et, dans certains cas, des amputations (FID, 2017). Elle se manifeste le plus souvent par la polynévrite, une disparition des réflexes ostéo-tendineux, une altération des sensibilités profondes et superficielles. La neuropathie peut également se manifester par des atteintes végétatives : vasomotrices, génito-urinaires et digestives (Monnier *and* Thuan, 2007 ; FID, 2017).

Le pied diabétique est une complication chronique grave, consistant en des lésions des tissus profonds associées à des troubles neurologiques et une maladie vasculaire périphérique des membres inférieurs. Les personnes souffrant d'un pied diabétique présentent généralement les caractéristiques suivantes : âge plus mûr, indice de masse corporelle inférieur, durée plus longue du diabète, hypertension, RD et antécédents de tabagisme. La prévalence mondiale du pied diabétique est de 6,4% et est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Elle est également plus élevée chez les personnes atteintes de DT2 que chez celles de type 1 (FID, 2017).

Le diabète est responsable de l'amputation d'un membre inférieur, en tout ou en partie, toutes les 30 secondes à travers le monde. Ces amputations sont 10 à 20 fois plus fréquentes que chez les non-diabétiques. Les ulcères du pied et les amputations sont plus fréquentes dans les pays à faible et moyen revenu. Toutefois, si le diabète est bien géré, il est possible d'éviter bon nombre d'amputations. Et même en cas d'amputation, il est possible de sauver le reste de la jambe et la vie du patient grâce à un suivi de qualité (FID, 2017).

#### **I.1.6.4. Diabète et infections**

Le diabète est associé à un risque global accru d'infections. Les personnes diabétiques dont la glycémie n'est pas bien contrôlée sont plus à risque de développer des infections, car le corps se défend moins bien contre les microbes. La présence du diabète modifie également l'évolution de nombreuses infections et augmente la morbidité et la mortalité (Holt et *al.*, 2011).

La micro-angiopathie est généralement un facteur d'infections graves telles que l'otite externe maligne, la pyélonéphrite emphysémateuse et la fasciite nécrosante. Les infections des voies urinaires et la bactériurie asymptomatique sont plus courantes chez les diabétiques. Les infections de la peau et des tissus mous sont plus courantes, le pied diabétique infecté en est un excellent exemple. Les maladies vasculaires et la neuropathie diabétique sont des facteurs sous-jacents importants de la vulnérabilité du pied aux infections. Les infections cutanées ou des organes génitaux externes sont des caractéristiques communes du diabète. Certaines infections rares mettant la vie en danger se produisent presque exclusivement chez les diabétiques. Le diabète augmente le risque de tuberculose et augmente également le risque d'échec du traitement. L'insuffisance rénale, l'obésité, le besoin d'hospitalisation, les cathéters à demeure et la cicatrisation retardée sont d'autres facteurs sous-jacents pouvant prédisposer à l'infection. Les infections virales telles que l'hépatite C sont associées à une prévalence plus élevée du diabète. Un traitement antirétroviral hautement actif contre le VIH/sida peut également précipiter le diabète (Holt et *al.*, 2011).

##### **I.1.6.4.1. Infections bactériennes**

Les furoncles, les anthrax, les orgelets et les érythrasmas étaient particulièrement fréquents avant l'introduction de l'insuline et des antibiotiques, et les infections cutanées à *Staphylococcus aureus* sont probablement encore plus fréquentes chez les diabétiques. L'otite externe sévère, une infection potentiellement mortelle causée par une invasion des espèces de *Pseudomonas*, se produit chez les diabétiques âgés et se manifeste par un écoulement purulent avec une douleur intense dans l'oreille. Elle peut évoluer de la cellulite, à l'ostéomyélite, et même à la méningite avec une mortalité élevée. L'érythrasma, causé par *Corynebacterium minutissimum*, est rare mais survient avec une fréquence accrue chez les patients diabétiques obèses. Il se présente sous la forme d'une tache rouge brillante ou squameuse dans les zones intertrigineuses (Holt et *al.*, 2011).

Les infections urinaires sont des pathologies très fréquentes chez le diabétique. Elles sont principalement causées par des entérobactéries, dont *Escherichia coli* qui représente 70 à 80% des bactéries isolées de prélèvements urinaires (Affes et *al.*, 2016). D'autres infections inhabituelles par des bactéries coliformes ou des anaérobies peuvent survenir chez les diabétiques, de même que les infections à *Pseudomonas* des orteils ou du voile des ongles et des infections secondaires des ulcères veineux (Rajbhandari and Wilson, 1998). Une cellulite anaérobie avec des espèces de

*Clostridium* peut survenir chez des patients présentant une acidocétose diabétique, nécessitant un traitement avec contrôle métabolique, un débridement agressif des tissus dévitalisés et une thérapie antimicrobienne par voie intraveineuse (Van Hattem et *al.*, 2008). La fasciite nécrosante est une infection potentiellement mortelle de la peau et des tissus mous qui est plus fréquente chez les diabétiques (Omran et *al.*, 2014). *Streptococcus pyogenes*, les streptocoques anaérobies, *Bacteroides* et *Staphylococcus aureus* font partie des organismes associés à la fasciite nécrosante (Wong et *al.*, 2003). Cette infection potentiellement mortelle doit être traitée par un débridement chirurgical urgent du tissu nécrotique et des antibiotiques par voie intraveineuse, après obtention d'une culture de sang et de tissus. La mortalité reste élevée (environ 25%) malgré un traitement optimal (Aye and Masson, 2002).

#### **I.1.6.4.2. Infections à *Candida***

L'infection à *Candida albicans* peut être une caractéristique du diabète ou se manifester par une complication d'un diabète mal contrôlé. Cette infection se présente sous la forme de papules érythémateuses avec pustules satellites et peut affecter les articulations, la vulve et le pénis, ainsi que les marges des ongles, provoquant une paronychie. Chez les femmes, la vulvovaginite est la manifestation la plus courante et se présente avec un prurit vulvaire qui peut être intense, pénible et particulièrement gênant lorsqu'un patient est hyperglycémique et glycosurique (Ahmed and Goldstein, 2006). La balanite (inflammation du gland), la balanoposthite (inflammation du gland et du prépuce) et le phimosis (incapacité à rétracter le prépuce), moins fréquents chez les hommes pourraient être dus aux infections à *Candida* (Holt et *al.*, 2011). Une stomatite angulaire à *Candida* et une langue atrophique ressemblant à une glossite rhomboïde médiane sont des manifestations buccales du diabète. La candidose buccale se produit plus fréquemment chez les patients diabétiques qui fument ou portent des prothèses dentaires (Baizri et *al.*, 2008).

L'intertrigo à *Candida* se produit le plus souvent sous les seins, dans les aines et les aisselles ou dans les plis de la peau abdominale. Les infections à *Candida* des mains et des pieds ont tendance à être plus graves chez les diabétiques. Un traitement inapproprié avec des stéroïdes ou des antibiotiques peut aggraver l'infection à *Candida* sur n'importe quel site chez le diabétique (Holt et *al.*, 2011).

#### **I.1.7. Impact économique**

Hors mis le fardeau humain qui se caractérise par une mortalité prématurée et une qualité de vie moindre en raison de ses complications, le diabète a également un impact économique considérable sur les pays, les systèmes de soins de santé et, surtout, les personnes qui en sont atteintes. Sur le plan économique, le diabète fait peser une lourde charge sur le système de soins de santé mondial et sur l'économie mondiale en général. Cette charge se mesure en dépenses médicales

directes, en coûts indirects associés à la perte de productivité, en mortalité prématurée et en effets négatifs du diabète sur le produit intérieur brut (PIB) des nations (OMS, 2016). Les dépenses médicales directes associées au diabète incluent les dépenses liées à la prévention et au traitement du diabète et de ses complications (OMS, 2016).

Selon la FID, les dépenses en soins de santé totales pour le diabète sont estimées à 727 milliards USD (20-79 ans) pour l'année 2017, ce qui représente une hausse de 8% par rapport aux estimations de 2015. Si l'on prend en compte le groupe d'âge étendu de 18 à 99 ans, les coûts s'élèvent à 850 milliards USD au total (FID, 2017). L'un des éléments qui contribuent à cette augmentation est la hausse des dépenses liées aux spécialités pharmaceutiques utilisées pour traiter les diabétiques, notamment les nouveaux traitements oraux contre le DT2 et les analogues de l'insuline (OMS, 2016).

On s'attend à ce que le fardeau économique que représente le diabète continue de croître. D'après les projections, les dépenses en soins de santé pour le diabète atteindront 776 milliards USD d'ici 2045 (20-79 ans), soit une hausse de 7%. Si l'on prend en compte le groupe d'âge des 18-99 ans, ces dépenses devraient se chiffrer à 958 milliards USD. Les projections pour 2045 sont très conservatrices, puisqu'elles partent du principe que les dépenses moyennes par personne et le taux de prévalence du diabète resteront constants, et que seules des modifications démographiques seront observées. Cette dynamique est soutenue par l'observation selon laquelle les pays enregistrant les dépenses de santé les plus importantes connaîtront une très faible croissance de leur population (FID, 2017). Les pays à revenu faible ou intermédiaire supporteront ainsi une plus grande part de la charge future des dépenses de santé mondiales que les pays à revenu élevé (OMS, 2016).

Le diabète peut faire peser un lourd fardeau économique sur les personnes atteintes de diabète et leur famille en raison des paiements directs liés aux soins de santé et à la perte de revenu familial associée aux incapacités et aux décès prématurés. Les diabétiques sont sensiblement plus exposés aux dépenses médicales catastrophiques (OMS, 2016).

Dans la région Afrique, les personnes atteintes de diabète ont dépensé 3,3 milliards USD en soins de santé en 2017. Dans cette région, les pays qui enregistrent les dépenses moyennes en soins de santé les plus élevées pour le diabète sont la Guinée Equatoriale (2.087 DI), l'Afrique du Sud (1.884 DI) et la Namibie (1.611 DI). À l'autre bout du spectre, la République centrafricaine (46 DI), la République Démocratique du Congo (65 DI) et Madagascar (86 DI) présentent les dépenses moyennes les plus faibles. Cependant, les pays qui allouent le pourcentage le plus élevé de leur budget de soins de santé au diabète sont les Seychelles et les Comores. Les personnes atteintes de diabète y ont dépensé 13 % et 12 %, respectivement, du budget total de soins de santé (FID, 2017).

## I.1.8. Diabète et stress oxydant

Le diabète sucré s'accompagne d'un stress oxydant et d'une production de radicaux libres par divers mécanismes. Ce stress oxydant se trouve impliqué dans l'aggravation de la maladie ainsi que dans l'apparition des complications chroniques qui lui sont liées.

### I.1.8.1. Définition du stress oxydant

Des espèces réactives de l'oxygène (ERO), parmi lesquelles les radicaux libres, sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique). Cependant, un système efficace de défenses permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pros oxydants (ERO) et les antioxydants en faveur des premiers (Favier, 2003).

### I.1.8.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les ERO et les radicaux libres sont des entités chimiques possédant un ou plusieurs électrons célibataires, ce qui leurs confèrent une grande réactivité. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Couaillet, 2015). Les principales ERO entrant dans les processus physiopathologiques humains sont regroupés dans le tableau I.2 ci-dessous.

**Tableau I.2 :** Les principales espèces réactives de l'oxygène

| Espèces réactives                       | Réaction de formation  | Propriétés   |
|---|--|--|
| L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) | Formé par la réduction mono électrique de l'oxygène : addition d'un seul électron  | C'est le radical le moins réactifs mais le précurseur des autres ERO. (Boyer, 2016)  |
| Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )    | Produit à partir de l'anion superoxyde, réaction catalysée par la superoxyde dismutase   | La majeure partie de sa toxicité provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$ (Boyer, 2016)                                       |
| Le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ) | Formé par la réaction de Fenton à partir du $H_2O_2$   | C'est le radical le plus avide d'électrons et le plus dangereux pour l'organisme (Boyer, 2016)   |
| Le monoxyde d'azote (NO)                | Formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine d'une part, et du $O_2$ d'autres parts en présence de co-facteurs $NADH, H^+$ , réaction catalysé par les NO synthase (NOS)           | Il est réputé pour ses propriétés physiologiques (Boyer, 2016)   |
| Le peroxynitrite ( $ONOO^-$ )           | En l'absence d'une quantité suffisante de co-facteurs, ou de substrat (arginine), les NOS produisent le $O_2^{\bullet-}$ plutôt que le $NO^{\bullet}$ . Le $O_2^{\bullet-}$ produit lie le $NO^{\bullet}$ pour former le peroxynitrite | Très réactif et sans doute responsable d'un stress antyoxydant, il engendre des oxydations irréversibles et des nitrations diverses (Massion et al., 2002) |

La production des ERO dans les cellules humaines est essentiellement d'origine enzymatique et résulte de plusieurs mécanismes dont la chaîne respiratoire mitochondriale, la phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires, et les facteurs environnementaux (intoxication par des métaux lourds, destruction de l'ADN par irradiation, fumée de tabac, l'alcool ou même certains médicaments (xénobiotiques) (Favier, 2003).

#### **I.1.8.2.1. Importance physiologique des ERO**

Le paradoxe des radicaux libres c'est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions à l'instar de la destruction de microorganisme et la régulation du tonus vasculaire. Ils peuvent également jouer le rôle de messagers intra et/ou extracellulaire et sont ainsi impliqués dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée), la prolifération des cellules musculaires lisses (cellules vasculaires), l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, ou bien encore dans l'agrégation plaquettaire (Favier, 2003).

#### **I.1.8.2.2. Les molécules biologiques cibles des ERO**

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides) (Favier, 2003).

##### **I.1.8.2.2.1. La peroxydation des lipides**

La peroxydation lipidique résulte de l'attaque par des radicaux libres des acides gras polyinsaturés (acides linoléique, linoléique, arachidonique). Cette réaction est à l'origine de dommages tissulaires responsables de cancers, de maladies inflammatoires, du vieillissement et de lésions vasculaires comme l'athérosclérose (Racah, 2004). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes (oxydation des LDL) ou les phospholipides membranaires et elle est très dommageable pour les cellules tant au niveau de leur fonction que sur les propriétés de leurs membranes : altération de la fluidité membranaire, augmentation de leur perméabilité, diminution du potentiel de membrane, voire rupture (Racah, 2004).

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, qui en présence d'oxygène va être oxydé en radical peroxyde ( $\text{RCOO}^\bullet$ ) : C'est l'étape d'initiation. Le radical  $\text{RCOO}^\bullet$  formé va s'attaquer à un acide gras voisin et se transformer en hydroperoxydes ( $\text{RCOOH}$ ) tandis que le 2<sup>e</sup> acide gras rentre dans le même circuit de peroxydation pour former un nouveau radical diène conjugué qui sera oxydé par l'oxygène pour former le 2<sup>e</sup> radical peroxyde qui s'attaquera au 3<sup>e</sup> acide gras conduisant à une réaction en chaîne : C'est la propagation. Une partie des hydroperoxydes formés va



être réduit et neutralisée par le glutathion peroxydases, et l'autre partie va se décomposer facilement en différents produits dont les plus étudiés sont le malondialdéhyde (MDA), l'hydroxynonanal et les isoprostanes : c'est la terminaison (Favier, 2003).

#### **I.1.8.2.2.2. Les Protéines**

Les ERO sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. L'oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique. Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant la signalisation cellulaire (Favier, 2003).

#### **I.1.8.2.2.3. Les Acides Nucléiques**

Les radicaux superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ) provoquent des lésions de l'ADN. Ceux-ci peuvent interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques (Therond, 2006). Les produits secondaires de la peroxydation des acides gras polyinsaturés tel que le MDA (aldéhydes mutagènes), peuvent interagir avec l'ADN et formé des adduits (Favier, 2003). Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont pas réparées entraînent à long terme des altérations géniques (Favier, 2003).

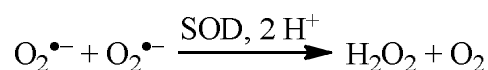
#### **I.1.8.2.3. Moyens de lutte contre les ERO : les antioxydants**

Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement à faibles doses la production les ERO, de limiter leur propagation ou de les détruire. Les systèmes antioxydants peuvent être divisés en deux catégories : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques (Favier, 2003).

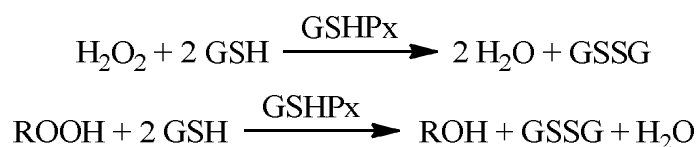
##### **I.1.8.2.3.1. Les antioxydants enzymatiques**

L'organisme dispose d'un arsenal important d'enzymes antioxydantes ubiquitaires.

➤ **Les superoxydes dismutases (SOD)** : ce sont des métalloprotéines qui permettent l'élimination des anions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou tout au moins de les maintenir à un niveau de concentration assez bas, par dismutation en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en une molécule d'oxygène ( $O_2$ ) (Favier, 2003).



➤ **La glutathion peroxydase (GSHPx)** : elle est localisée dans les milieux extracellulaires, le cytosol et les mitochondries. Cette enzyme réduit le  $H_2O_2$  et les RCOOH lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (Favier, 2003).



➤ **La Catalase (CAT)** : c'est une enzyme qui réduit le peroxyde d'hydrogène en libérant de l'oxygène et de l'eau. Son rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Favier, 2003).

#### **I.1.8.2.3.2. Les antioxydants d'origine végétale**

Les polyphénols sont des antioxydants présents dans les végétaux. Ils sont capables de piéger des espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le Fer et le Cuivre qui permettent de catalyser les oxydations. Les phénols réagissent rapidement avec les radicaux libres, notamment les peroxydes en donnant un radical phénoxy incapable de propager la réaction radicalaire. Les polyphénols peuvent protéger contre la glycooxydation des protéines et sont également connus pour avoir des propriétés anti-inflammatoires. Ils peuvent favoriser l'absorption du glucose dans les cellules par le biais d'un mécanisme dépendant de la PI3-kinase qui va mimer l'action de l'insuline. Ce sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés sous forme de fruits, légumes et boissons tel le thé (Munir *et al.*, 2013).

#### **I.1.8.3. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète**

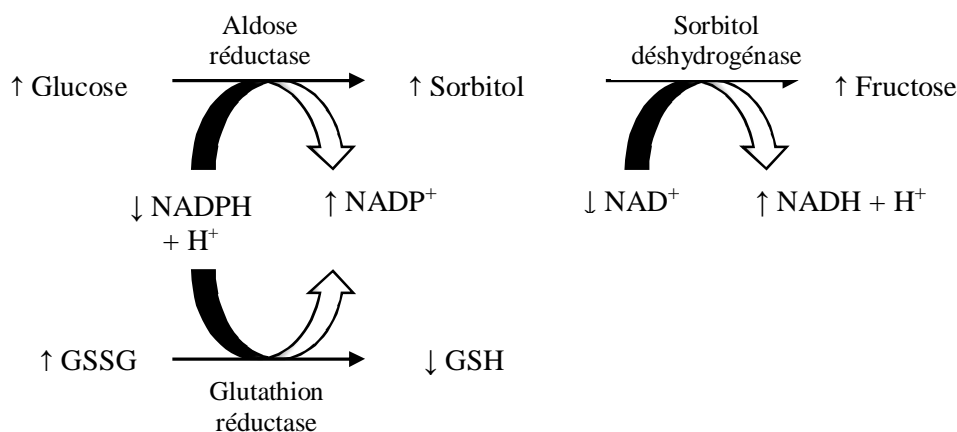
Dans des conditions d'hyperglycémie chronique, plusieurs mécanismes peuvent être responsables de la production de radicaux libres.

##### **I.1.8.3.1. La voie des Polyols**

En présence d'un excès de glucose, une fraction non oxydée de ce substrat est dirigée vers la voie des polyols : sous l'effet de l'aldose réductase, le glucose est réduit en sorbitol par le NADPH (Schéma I.1). Le sorbitol est ensuite oxydé en fructose en présence de NAD<sup>+</sup> par la sorbitol-déshydrogénase. Cette voie va conduire à une déplétion intracellulaire de NADPH puisque ce dernier est nécessaire à l'activité de l'aldose réductase (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2004).

Le déficit intracellulaire de NADPH a pour conséquence une faible régénération du glutathion réduit à partir du glutathion oxydé (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2004).





GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé

**Schéma I.1 :** Déplétion du glutathion par la voie des polyols (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2004)

### I.1.8.3.2. La glycation

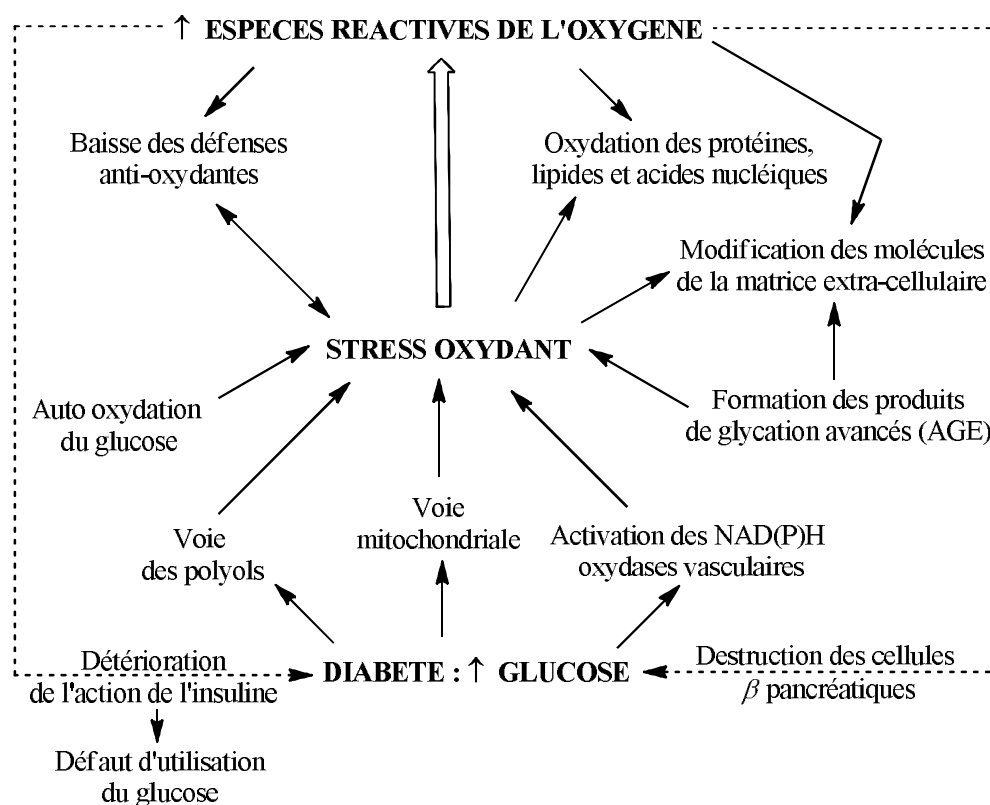
Le glycosylation non enzymatique des protéines ou glycation, est une réaction covalente qui attache des résidus glucose aux  $\text{NH}_2$  libres des protéines, sans l'intervention d'enzyme. L'étape initiale de cette réaction se caractérise par la formation non enzymatique d'une liaison covalente entre le groupement carbonyle d'un sucre réducteur et le groupement amine libre d'un acide aminé. Elle conduit à la formation d'une base de Schiff, qui peut subir des réarrangements intramoléculaires (réarrangements d'Amadori), pour former des composés dicarbonylés. La déshydratation et/ou la condensation de ces composés donnent alors naissance aux produits de fin de glycation AGE (*Advanced Glycation End products*) (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2004).

Ces AGE forment un groupe hétérogène de molécules qui modifient non seulement la fonction de la protéine glyquée mais forment aussi des agents qui se lient à d'autres protéines, tel le collagène et autres protéines de la matrice extracellulaire dont les fonctions se trouvent ainsi altérées avec des conséquences délétères sur les tissus vasculaires, cardiaques et rénaux. Les AGE sont capables aussi de produire des radicaux libres oxygénés par interaction avec des récepteurs spécifiques (RAGE) et induire un stress oxydant (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2004).

### I.1.8.3.3. La voie mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale est le principal site de production de l'anion superoxyde, cette production est accrue en présence de fortes concentrations de glucose (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2004).

A côté de ces 3 voies, d'autres mécanismes peuvent être la source d'un stress oxydant dans le diabète comme : l'auto-oxydation du glucose et l'activation de la NADPH oxydase vasculaire (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2004).



**Schéma I.2 :** Relation entre hyperglycémie et stress oxydant (Bonfont-Rousselot et al., 2004)

#### I.1.8.4. Impact du stress oxydant sur les cellules $\beta$ et sur l'action de l'insuline

Le rôle pathogène des radicaux libres sur les cellules  $\beta$  a souvent été évoqué car ces cellules ont des défenses limitées face au stress oxydant (Rigalleau et al., 2007). En effet les ERO perturbent la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose par la diminution du rapport ATP/ADP intracytosolique, par l'hyperpolarisation anormale de la membrane mitochondriale et une surexpression du complexe I de la chaîne respiratoire ce qui conduit à l'apoptose des cellules  $\beta$  et pourrait expliquer la réduction de leur masse observée dans le DT2 (Guillausseau et al., 2008). Ces radicaux libres pourraient être aussi à l'origine du DT1 (Bonfont-Rousselot et al., 2004).

Il semble aussi que les radicaux libres produits excessivement et insuffisamment dégradés au cours du diabète, participent dans l'instauration et l'aggravation de l'insulino-résistance par activation de voies de signalisation qui mènent à l'inhibition de la cascade de signalisation de l'insuline (Barquissau et al., 2011).

#### I.1.9. Diabète et phosphatases alcalines

Les phosphatases alcalines (PAs) (EC 3.1.3.1) sont des enzymes homodimériques qui appartiennent à la famille protéique des phosphomonoestérases. Largement répandues chez plusieurs espèces allant des bactéries à l'homme, elles sont impliquées dans la catalyse des phosphomonoesters aboutissant à la production du phosphate inorganique (Yang et al., 2015). Ainsi, le rôle physiologique normal des PAs est la régulation du niveau de phosphate inorganique dans le corps,

c'est-à-dire le maintien du processus de minéralisation des os. Cependant, dans l'intestin, elles sont impliquées dans l'absorption des graisses. Les PAs sont des métallo-glycoprotéines car contiennent des ions métalliques (surtout  $Mg^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ ) dans leur site actif, essentiels pour leur activité catalytique. A un pH alcalin, les PAs des mammifères sont des substrats spécifiques et ont une activité maximale envers une large gamme de substrats tels que les phosphates, le bis (*p*-nitrophényl), les polyphosphates inorganiques et les phosphomonoesters (Millán, 2006).

Dans l'organisme, les PAs sont situés dans le foie, les os, l'intestin, le placenta, les reins, les voies biliaires et les globules blancs circulant dans le sang. 90% d'entre elles sont d'origine hépatique et osseuse. Selon leur site de localisation, les PAs sont classés en deux types à savoir les PAs tissus spécifiques et les PAs non tissus spécifiques. Les PAs tissus spécifiques sont en outre classées en trois isoenzymes : la PA placentaire (PLAP, *Placental Alkaline Phosphatase*), la PA des cellules germinales (GCAP, *Germ Cells Alkaline Phosphatase*), et la PA intestinale (IAP, *Intestinal Alkaline Phosphatase*). La PA non tissu spécifique (TNAP, *Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase*), présente dans l'os, le foie et les reins, est à 50% similaire aux trois autres (Khan I. et al., 2015). Les dommages causés à ces tissus entraînent la libération des PAs dans le sang. Le taux de PAs peut être détecté par un test sanguin et est donné en Unités Internationales (UI) par litre de sang. Il est normalement compris entre 40 à 100 UI/L chez l'adulte, 50 à 130 UI/L chez l'adulte de plus de 60 ans, 100 à 200 UI/L chez l'enfant en raison des phénomènes de croissance et 100 à 200 UI/L chez la femme enceinte (Li-Fern and Rajasoorya, 1999).

Toute perturbation du niveau de PAs sert d'indication significative pour certains états pathologiques, maladies et syndromes (Li-Fern and Rajasoorya, 1999). Une diminution du taux de PAs peut-être observée en cas : d'hypothyroïdie (activité insuffisante de la glande thyroïde pouvant notamment provoquer la prise de poids), d'une insuffisance hépatique sévère, d'anémie sévère, de scorbut, ... etc. Cependant, différentes affections tels que la cholécystite, la cholestase, la cirrhose, l'hépatite, le foie gras (stéatose hépatique), les tumeurs hépatiques, la métastase hépatique, la maladie de Paget, l'ostéoporose, la métastase osseuse, les fractures osseuses, le myélome multiple (uniquement en association avec des fractures), l'ostéomalacie, l'insuffisance rénale, les MCVs et le cancer (des os, du sein, de l'utérus, de la prostate, du pancréas, ...) sont associées à des taux élevés de phosphatase alcaline (Sharma et al., 2014). Certaines de ces pathologies sont plus ou moins associées au diabète. Quelques-unes d'entre elles sont des facteurs de risque du diabète, mais pour la plupart, ce sont des conséquences d'un diabète mal contrôlé (complications du diabète).

Des taux élevés de PAs ont également été rapportés chez les personnes souffrant d'obésité (précurseur du DT2, des MCVs, ...). Une étude a montré que le taux sérique de PAs chez les obèses était significativement plus élevé que chez les non-obèses. De manière intéressante, il a

récemment été étudié qu'outre d'autres tissus corporels (foie, os, reins, intestins, ...), les PAs sont également exprimées dans le tissu adipeux qui régule le dépôt de graisse intracellulaire dans les pré-adipocytes pendant l'adipogenèse. Dans l'obésité, l'activité des PAs est renforcée et on s'attend à des dépôts de graisse intracellulaires disproportionnés. En retour, les tissus adipeux libèrent une quantité excessive de PAs dans la circulation sanguine (Khan A. et *al.*, 2015). La diabétoporose, une complication développée au cours du diabète, expose à une fragilité osseuse qui s'apparente à l'ostéoporose. En 2009, une étude a révélé que les individus avec un taux de PAs et de phosphate élevé sont plus exposés à une mortalité cardiovasculaire (Tonelli, 2009).

Tout porte donc à croire que les taux élevés de PAs relevés au cours du diabète seraient à l'origine de certaines de ses complications à l'instar de celles hépatiques, cardiovasculaires, rénales et osseuses.

Dans le cadre de notre étude nous nous sommes intéressés à l'inhibition de la TNAP et l'IAP, deux isozymes structurellement très similaires. La TNAP est principalement impliquée dans l'hydrolyse du pyrophosphate en phosphate inorganique maintenant ainsi le processus de minéralisation osseuse et la croissance, tandis que l'IAP joue un rôle important dans l'absorption des lipides dans l'intestin grêle et la détoxification des lipopolysaccharides, des endotoxines produites par des bactéries Gram-négatif et qui sont responsables des inflammations (Khan I. et *al.*, 2015). On comprend donc de par son rôle que l'IAP présente un intérêt thérapeutique pour certaines maladies inflammatoires chroniques, et pourrait s'avérer très importante dans la prévention de certains troubles métaboliques tel que le DT2. C'est ce qu'a d'ailleurs révélée une étude réalisée en 2015, qui mettait en évidence une corrélation entre le taux de phosphatase alcaline et le DT2, aboutissant à la conclusion selon laquelle un niveau élevé d'IAP est protecteur contre le DT2 (Malo, 2015). Cependant, toute perturbation du niveau de l'IAP (niveau bas ou trop élevé) entraînerait un syndrome inflammatoire de l'intestin (Sharma et *al.*, 2014). Une expression accrue de l'IAP a également été rapportée dans les cas de carcinome hépatocellulaire (Usono et *al.*, 2010).

La modulation des PAs pourrait donc être une nouvelle stratégie potentielle de traitement qui permettrait de réduire ou de ralentir l'apparition de certaines complications du diabète telles que la calcification vasculaire, ce qui permettrait d'améliorer les résultats cardiovasculaires chez les patients diabétiques de type II (Haarhaus et *al.*, 2017). Le développement d'inhibiteurs puissants est donc bigrement nécessaire pour le contrôle de l'activité de cette classe d'enzymes. Les effets synergiques de la phytothérapie font de la médecine traditionnelle une option thérapeutique prometteuse pour la modulation de cette enzyme.

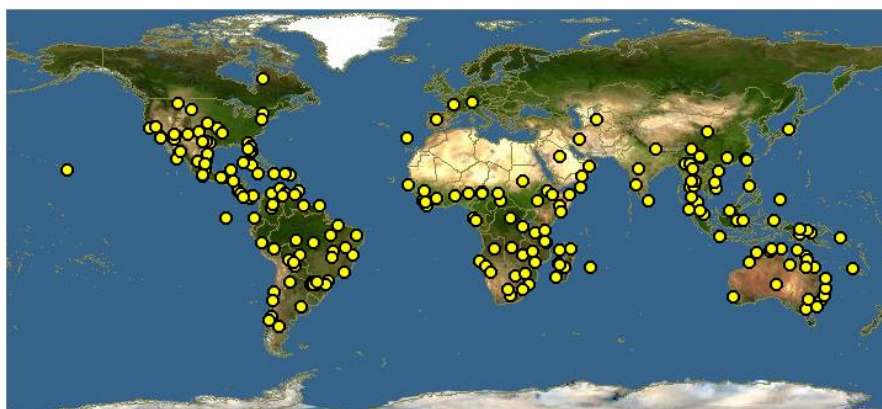
## I.2. Présentation de *Cissus populnea* Guill & Perr

### I.2.1. La famille des Vitaceae

Les Vitaceae sont une famille de plantes angiospermes, dicotylédones, originaires des régions tempérées, subtropicales et tropicales de notre planète. Cette famille, appartenant auparavant à l'ordre des Rhamnales, aujourd'hui à celui des Vitales depuis la classification phylogénétique APG III, regroupe environ 700 à 1000 espèces végétales réparties en 14 à 16 genres botaniques. Son nom lui a été donné par son genre principal *Vitis*, nom latin de la vigne. Le nom "Ampelidaceae" pris comme synonyme de "Vitaceae" est dérivé du nom grec de la vigne, "ampelos". On trouve dans cette famille des plantes grimpantes, quelques arbustes et quelques plantes herbacées, rarement succulentes (Wen et *al.*, 2018).

### I.2.2. Le Genre *Cissus*

Le genre *Cissus* compte environ 350 espèces principalement dans les régions tropicales d'Afrique, d'Asie, d'Australie, d'Amérique centrale, du Sud et du Nord (Mexique). Parmi les espèces les plus répandues, nous avons *C. antarctica* et *C. populnea* (Botineau, 2010).



Les points jaunes indiquent les lieux où au moins une espèce du genre *Cissus* a été repérée.

**Figure I.3 :** Répartition géographique du genre *Cissus* (Pickering, 2019)

Les plantes du genre *Cissus* sont des lianes ligneuses ou herbacées, grimpantes ou brouillées, ou arbustes parfois dressés, hermaphrodites à polygamo-monoéciques ; tiges ailées ou striées, souvent succulentes ; racines parfois tubéreuses ; des vrilles opposées à des feuilles, ramifiées ou non, parfois avec des disques adhésifs à la pointe, surtout lorsqu'elles sont jeunes. Les feuilles sont simples, entières ou parfois lobées, rarement composées 3–5-foliolées, pétiolées ; de taille, forme, pilosité et texture très variables, à nervation pennée ou palmati-pennée, à marges le plus souvent diversement denticulées. Inflorescence souvent corymbe. Les fleurs sont de couleur verdâtre à jaunâtre, tétramères, hermaphrodites, de petite taille, pédicellées ; calice cupuliforme ; pétales adhérent à des cellules épidermiques imbriquées dans le bourgeon, reflétant à l'anthèse, de forme deltoïde ; un disque floral, adossé à la base de l'ovaire, bien visible, cupulaire à 4 lobes ; style



conique ou cylindrique, stigmate entier. Fruit 1 (-4) non comestible ; des graines ovoïdes, à trois coins obtus, pyriformes, avec un raphé encerclant, lisses ou à facettes ou picotées de chaque côté ; endosperme à 3 lobes verticaux, en forme de M en coupe transversale ; cotylédons réniformes, parfois 3, radicules larges (Wen, 2007).

### **I.2.3. L'espèce *Cissus populnea* Guill. & Perr.**

*Cissus populnea* est originaire d'Afrique tropicale de l'Ouest. C'est une espèce grimpante riche en mucilage. Elle a une distribution cosmopolite, bien que se trouvant majoritairement dans les tropiques. L'espèce est répartie du Sénégal au Soudan, où elle est commune et disséminée. La plante vit dans les bosquets et les galeries forestières des zones sahéliennes, dans les savanes sahéliennes et soudano-guinéennes, sur tous les types de sols (Arbonnier, 2002).



**Figure I.4 :** Photo de *C. populnea* Guill. & Perr. (Nyemb, 2014)

**Noms communs :** Oseille des pygmées (Français), *Food gum* (Anglais), *Daafaaraa* (Hausa), *Bakani* (Peul), *Dingale* (Ffulde) (Mapongmetsem et al., 2012).

#### **Systematique :**

**Règne :** Plantae

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Vitales

**Famille :** Vitaceae (Ampelidaceae)

**Genre :** *Cissus*

**Espèce :** *populnea* Guill & Perr

*Cissus populnea* est une liane à vrilles ramifiées, de 8-10 m de haut, souvent à tige annuelle se desséchant durant la saison sèche, recouvrant les arbres dans lesquels elle est accrochée. Ecorce crème et lisse à l'état jeune, puis gris et écailleux, se desquamant par écaille fibreuse sur les vieilles tiges avec entaille orange à l'extérieure et jaunâtre en dessous. Tige finement pubescente devenant glabre, verte, portant une vrille ramifiée opposée à la feuille. Stipule papyracée, plus ou moins rouge ou roussâtre, ovale ou plus ou moins orbiculaire, à sommet en pointe aigüe, (3-) 5-10 mm

de long à la base des feuilles. Les feuilles sont alternes, finement pubescentes devenant rapidement glabres, ovales à sub-orbiculaire, de (5-) 10-18 cm de long et de large, à sommet peu acuminé ou pointu et à base cordée. Pétiole glabre, de 3-13 cm de long. Nervures palmées, importantes, avec 3-5 de bases sécantes au bord du limbe, et 5-7 nervures latérales pennées. Inflorescence paniculée, plusieurs fois ramifiée, pédonculée de 10-20 cm de long et disposée à l'opposé d'une feuille, à la place d'une vrille. Fleurs verdâtre, à pédicelle de 1-3 cm de long, à 4 pétales de 3-4 mm de diamètre. Fruits ovoïde, lisse, dur, 20-25 mm de long et 10-15 mm de large, noir-violet à maturité. La floraison a lieu en saison des pluies (Arbonnier, 2002).

#### I.2.4. Utilisations ethnomédicinales et propriétés pharmacologiques du genre *Cissus*

Plusieurs espèces du genre *Cissus* sont utilisées en Afrique et à travers le monde dans le traitement de nombreuses affections (Tableau I.3). Quelques unes de ces utilisations ont déjà été prouvées au laboratoire (Tableau I.4).

**Tableau I.3 :** Utilisations ethnomédicinales de quelques espèces du genre *Cissus*

| Espèce                   | Partie(s) utilisée(s) | Maladie(s)   | Références  |
|--------------------------|-----------------------|--|---|
| <i>C. aralioides</i>     | n.p.                  | Troubles gastro-intestinaux et urogénitaux   | Fernandes and Banu, 2012  |
| <i>C. assamica</i>       | n.p.                  | Venin de serpent   |   |
| <i>C. debilis</i>        | n.p.                  | Cancer   |   |
| <i>C. hypoglauca</i>     | n.p.                  | Maux de gorge  |   |
| <i>C. cornifolia</i>     | Feuilles              | Troubles mentaux   | Jimoh et al., 2013<br>Chipiti et al., 2015                                  |
|                          | Racines               | Malaria, pharyngite, diabète, amygdalite, problèmes cardiaques vasculaires   |   |
| <i>C. ibuensis</i>       | Feuilles              | Rhumatismes, arthrite, troubles gastriques,  | Ahmadu et al., 2010   |
| <i>C. multistriata</i>   | Feuilles              | Kwashiorkor, marasme nutritionnelle  | Adegoke et al., 2010  |
| <i>C. populnea</i>       | Feuilles              | Trypanosomiase, Paludisme<br>Venin de serpent  | Atawodi et al., 2002<br>Shuaibu et al., 2008 ;<br>Adebayo and Krettli, 2011 |
|                          | Racines               | Poison de flèches, infertilité masculine, seins douloureux des femmes à l'accouchement, ulcères, furoncles, anthelminthique, maladies de la peau, plaies infectées, infections des voies urinaires | Ojekale et al., 2006<br>Soladoye and Chukwuma, 2012<br>Kone et al., 2004    |
|                          | n.p.                  | Aphrodisiaque, laxatif, contre maladies vénériennes, parasites intestinaux, œdèmes, varice, jaunisse, fièvre jaune, blennorragie, coliques, lèpre  | Arbonnier, 2002   |
| <i>C. pteroclada</i>     | n.p.                  | Rhumatismes, contusions crampes  | Yi-jie et al., 2016   |
| <i>C. quadrangularis</i> | Tiges                 | Hémorroïdes  | Tchinda, 2011   |

|                          |                   |  |                          |
|--------------------------|-------------------|--|--------------------------|
| <i>C. quadrangularis</i> | Feuilles          | Furoncles, brûlures, plaies, fractures, rhumatismes  | Tchinda, 2011            |
|                          | Racines           | Indigestions, enflures, douleurs musculaires   |                          |
|                          | n.p.              | Epilepsie, scorbut, asthme, maux d'oreilles, saignement nasal, syphilis, gonoréées, malaria, abcès | Ngo Bum et al., 2008     |
| <i>C. repens</i>         | n.p.              | Furoncles, ulcères   | Subba and Basnet, 2014   |
| <i>C. rubiginosa</i>     | n.p.              | Dysenterie, diarrhée   | Fernandes and Banu, 2012 |
| <i>C. sycoides</i>       | Feuilles et tiges | Diabète, inflammations, hypertension, douleurs, congestions, épilepsie                             | Da silva et al., 2013    |
|                          | Feuilles          | Rhumatismes, abcès   |                          |
| <i>C. verticillata</i>   | n.p.              | Diabète, infections urinaires  | Fernandes and Banu, 2012 |

n.p. : non précisée

**Tableau I.4 :** Propriétés pharmacologiques des espèces du genre *Cissus*

| Espèce                   | Partie(s) étudiée(s) | Activité(s)   | Références  |
|--------------------------|----------------------|---|---|
| <i>C. cornifolia</i>     | Feuilles             | Antidiabétique  | Jimoh et al., 2013  |
|                          | Feuilles et racines  | Antioxydante  | Chipiti et al., 2015  |
| <i>C. ibuensis</i>       | Feuilles             | Antibactérienne   | Ahmadu et al., 2010   |
| <i>C. multistriata</i>   | Feuilles             | Antimicrobienne   | Adegoke et al., 2010  |
| <i>C. Pallida</i>        | n.p.                 | Anti-inflammatoire  | Jayaprakash et al., 2013  |
| <i>C. populnea</i>       | Feuilles             | Antiplasmodiale   | Shuaibu et al., 2008  |
|                          |                      | Anti-trypanosomiase   | Atawodi et al., 2002  |
|                          | Racines              | Antibactérienne   | Koné et al., 2004   |
|                          |                      | Antianémique  | Moody et al., 2003  |
|                          |                      | Insecticide   | Tchoumboungang et al., 2009   |
|                          | Tiges                | Antioxydante<br>Aphrodisiaque<br>pro-fertilisant<br>Antimicrobienne<br>hypoglycémique                                       | Akomolafe et al., 2013<br>Ojekale et al., 2015<br>Osibote et al., 2010<br>Geidam et al., 2004           |
| Racines                  | Anthelminthique      | Mohanambal et al., 2011   |   |
| <i>C. quadrangularis</i> | Feuilles             | Antihyperglycémique<br>Anti-nociceptive   | Chaudhari et al., 2013<br>Mate et al., 2009   |
|                          | Tiges                | Antimicrobienne, antioxydante<br>Antiulcérogénique, sédatif,<br>Anticonvulsivante, inhibition<br>de la phosphatase alcaline | Srivastava et al., 2013<br>Jainu and Devi, 2003<br>Ngo Bum et al., 2008<br>Pathomwichaiwat et al., 2015 |
|                          | Tiges                | Antimicrobienne   | Subba and Basnet, 2014  |
| <i>C. repens</i>         | Racines              | Anti-inflammatoire,<br>analgésique,   | Chang et al., 2012  |
| <i>C. sycoides</i>       | Parties aériennes    | Antidiabétique, antibactérienne   | Beltrame et al., 2002   |

n.p. : non précisée



## I.2.5. Métabolites secondaires isolés du genre *Cissus*

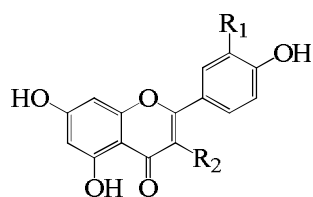
Les plantes du genre *Cissus* contiennent de nombreux métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stilbènes, les alcaloïdes, les coumarines, les stéroïdes, ... etc.

### I.2.5.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques très répandus dans le règne végétal. Présents dans presque tous les organes de la plante, ils jouent un rôle très important dans le système de défense de celles-ci et sont connus pour leurs propriétés biologiques très variées telles que anti-inflammatoire, antimicrobienne, antitumorale, antivirale, ...etc. (Harbone *and* William, 2000).

Al-Saïd *et al.* (1991), ont isolé deux flavonoïdes à partir de *C. digitata*, l'Apigénine **5** et la Lutéoline **6**. Des tiges de *C. quadrangularis*, le Kaémpférol **7**, et la Quercétine **8** avaient été isolés (Thakur *et al.*, 2010).

Trois flavonoïdes : la Delphinidine-3-*O*-rutinoside **9**, la Delphinidine-3-*O*-rhamnoside **10**, et la Cyanidine-3-*O*-rhamnosylarabinoside **11**, ont été isolés de *C. sicyosides* par Toledo *et al.* (1983) ; le Kaémpférol-3-*O*-rhamnoside **12** et la Quercétine-3-*O*-rhamnoside **13** ont été isolés par Beltrame *et al.* (2002).



R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

Apigénine **5**

R<sub>1</sub> = OH ; R<sub>2</sub> = H

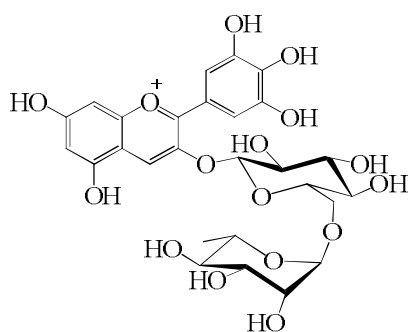
Lutéoline **6**

R<sub>1</sub> = H ; R<sub>2</sub> = OH

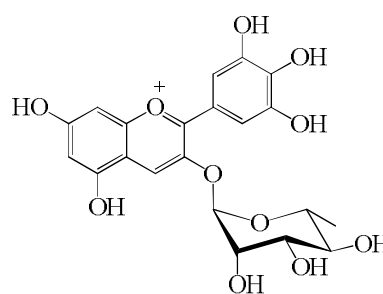
Kaémpférol **7**

R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH

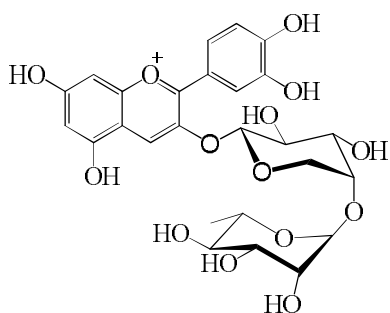
Quercétine **8**



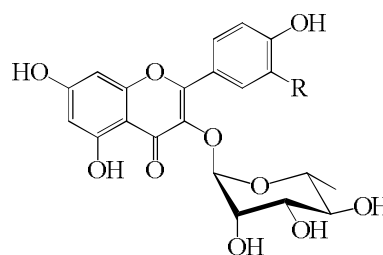
Delphinidine-3-*O*-rutinoside **9**



Delphinidine-3-*O*-rhamnoside **10**



Cyanidine-3-*O*-rhamnosylarabinoside **11**



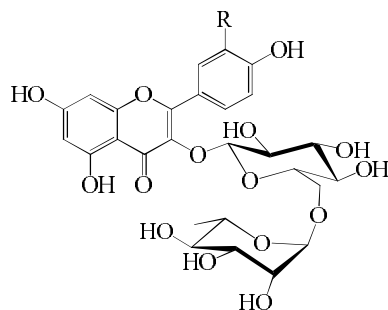
R = H

Kaémpférol-3-*O*-rhamnoside **12**

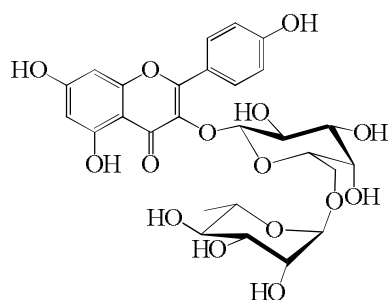
R = OH

Quercétine-3-*O*-rhamnoside **13**

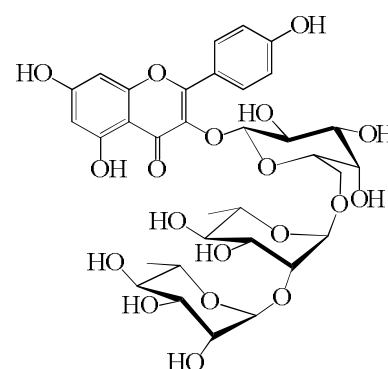
Les travaux d'Ahmadu et *al.* (2010) sur les feuilles de *C. ibuensis*, ont conduit à l'isolement de la Quercétine-3-*O*-rutinoside **14**, du Kaempférol-3-*O*-rutinoside **15**, du Kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-galactopyranoside **16**, et du Kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-galactopyranoside **17**.



R = OH      Quercétine-3-*O*-rutinoside **14**  
 R = H      Kaempférol-3-*O*-rutinoside **15**



Kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranosyl  
 (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-galactopyranoside **16**



Kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -rham-  
 nopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-galactopyranoside **17**

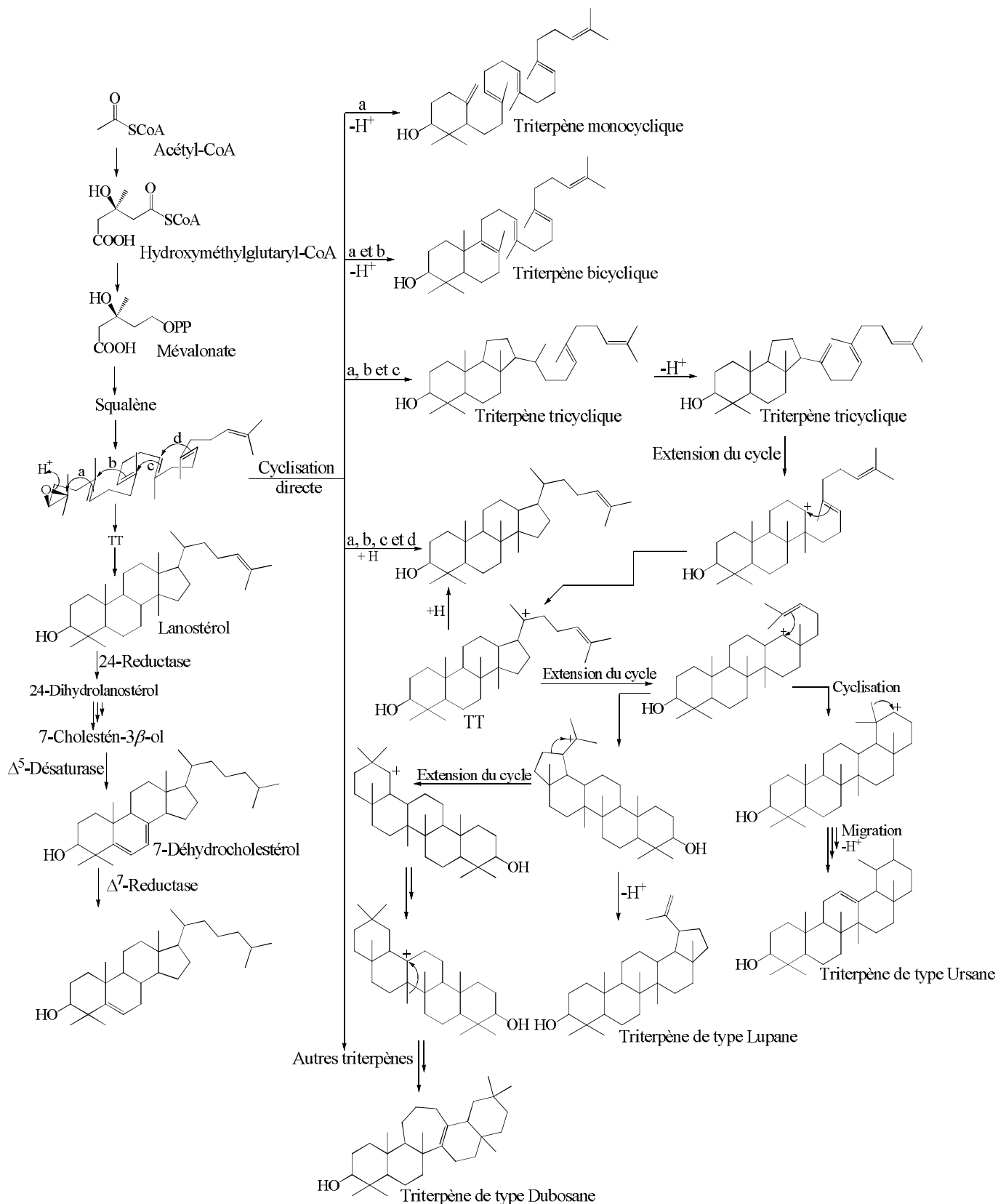
## I.2.5.2. Les triterpénoïdes

### I.2.5.2.1. Généralités

Les triterpénoïdes sont des métabolites secondaires ubiquitaires non-stéroïdiens de la faune et la flore terrestre et marine, sous forme libre ou sous forme d'éthers, d'esters et de glycosides (saponines). Comme leur nom l'indique, les triterpénoïdes sont un ensemble de trois monoterpénoïdes (30 carbones) regroupés en six unités isoprényles. La plupart des triterpènes sont tétracycliques avec trois cycles à six et un cycle à cinq chaînons, et pentacycliques avec soit 4 cycles à 6 et un cycle à chaînons, ou cinq cycles à six chaînons. Toutefois, les triterpènes naturels peuvent aussi être représentés par des squelettes mono-, bi-, tri- et hexacycliques ainsi que par des structures acycliques ; la formation de ces dernières structures peut être expliquée par une interruption plus ou moins rapide du processus de cyclisation, ou encore suite à des modifications de structures pré-existantes (Xu et *al.*, 2004).

### **I.2.5.2.2. Biosynthèse**

La biosynthèse des triterpènes et des stérols commence par la formation du squalène, formation impliquant les isoprénoïdes isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate. Cependant trois précurseurs ont été mentionnés dans la littérature pour la formation de l'IPP. Il s'agit du mévalonate, du désoxyxylulose et des amino acides (Brown, 1998). Des résultats obtenus à partir des expériences de marquages isotopiques ont révélé que le mévalonate est le précurseur préférentiel pour la biosynthèse des stérols et triterpènes. De plus, plusieurs études traitant de la biosynthèse des triterpénoïdes dans les plantes suggèrent la nécessité de plusieurs enzymes (ursane synthase, oléanane synthase, lanostane synthase, cycloartane synthase, lupéol synthase, etc.) catalysant la synthèse de différents types de ces métabolites secondaires. Les stéroïdes sont du point de vue biosynthétique dérivés des triterpénoïdes et sont caractérisés par l'absence des méthyles en position 28 et 29 dans le squelette lanostane ou celui cycloartane (Brown, 1998 ; Haralampidis et *al.*, 2002).



**Schéma I.3 :** Biosynthèse des triterpènes et stérols (Brown, 1998)

Au vu de ce schéma biosynthétique, les près de 200 différents squelettes de triterpènes connus jusqu'à ce jour et isolés de sources naturelles proviennent pour la plupart du squalène et

quelquefois de la cyclisation du 3*S*-2,3-époxydo-2,3-dihydro-squalène. Ces molécules sont presque toujours hydroxylées en position 3 étant donné l'ouverture de l'époxyde lors de la cyclisation (Xu et *al.*, 2004). Les plantes peuvent par ailleurs polyhydroxyler et oxyder les squelettes des triterpènes avec respectivement les enzymes hydroxylase et oxydase. De plus des mono- ou polyglycosylations peuvent se produire sous l'impulsion d'un ou de plusieurs glycosyltransferases spécifiques aboutissant à la formation des saponines (Tava et *al.*, 2011).

#### **I.2.2.5.3. Elucidation structurale**

Sur le spectre RMN <sup>1</sup>H des triterpènes, on peut observer les signaux des groupements méthyles aliphatiques apparaissant comme singulets ou doublets dans la zone de  $\delta_H$  0,6–1,2 ; tandis que les méthyles oléfiniques apparaissent autour de  $\delta_H$  1,5–2,1. Les protons des méthylènes oliféniques exocycliques résonnent autour de  $\delta_H$  4,5–6,0 tandis que ceux oxyméthines apparaissent autour de  $\delta_H$  3,5–4,5.

Le type de squelette triterpénique peut être déterminé en exploitant les données du spectre RMN <sup>13</sup>C. S'ils existent dans le composé, les groupements carboxyles apparaissent autour de  $\delta_C$  170–180, et les carbones oléfiniques quaternaires autour de  $\delta_C$  110–125. Les méthyles terminaux résonnent entre  $\delta_C$  14–33 ; les carbones oxyméthylènes et oxyméthines résonnent respectivement à  $\delta_C$  60–63 et  $\delta_C$  70–83 (Mahato and Kundu, 1994).

En raison de la complexité structurale des différents squelettes de triterpènes, les expériences DEPT et RMN 2D sont souvent utilisées pour l'attribution complète des différents signaux de tous les carbones et hydrogènes.

#### **I.2.2.5.4. Activités biologiques des triterpènes**

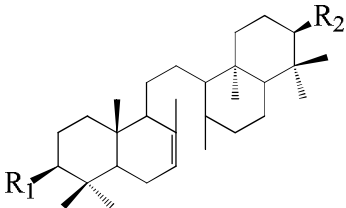
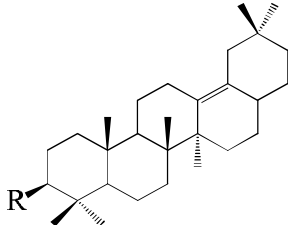
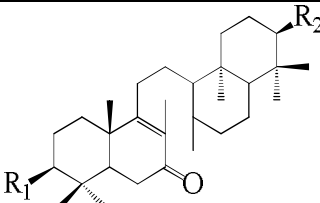
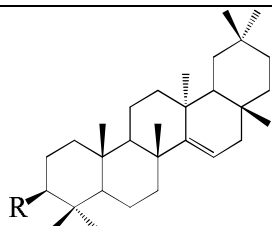
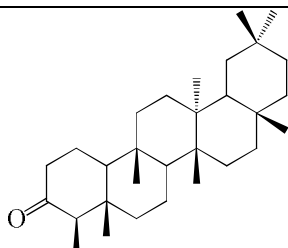
Les triterpènes, au sens large, sont responsables de nombreuses activités biologiques qui en font un groupe de produits naturels de grande importance. Leur panel d'activités biologiques est dû à leur grande diversité structurale. Il est donc difficile de présenter une liste exhaustive des activités biologiques de tous ces composés. Par conséquent, nous avons choisi de citer uniquement quelques activités des triterpènes pentacycliques.

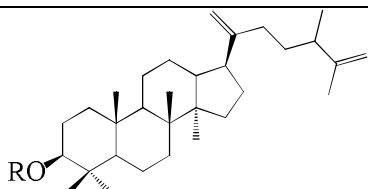
La bibliographie rapporte aux triterpènes des propriétés anti-oxydantes, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes, antiprolifératives, cytotoxyques, antivirales, anti-inflammatoires, hépatoprotectrices, immunomodulateurs, antimicrobiennes et antiparasitaires (Battineni et *al.*, 2018).

#### **I.2.2.5.5. Triterpénoïdes isolés des *Cissus***

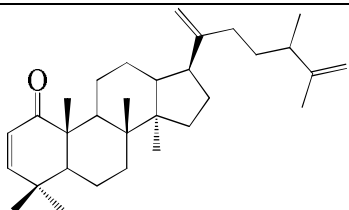
Les quelques terpénoïdes mis en évidence dans le genre *Cissus* ont été principalement isolés de *C. quadrangularis* (Tableau I.5).

**Tableau I.5 :** Quelques triterpènes isolés du genre *Cissus*

| Composés   | Plantes                  | Références                   |
|--|--------------------------|------------------------------|
|  <p> <math>R_1 = \alpha\text{-OH}</math> ; <math>R_2 = \beta\text{-OH}</math>    Onocer-7-ène-3<math>\alpha</math>,21<math>\beta</math>-diol <b><u>18</u></b><br/> <math>R_1 = \beta\text{-OH}</math> ; <math>R_2 = \alpha\text{-OH}</math>    Onocer-7-ène-3<math>\beta</math>,21<math>\alpha</math>-diol <b><u>19</u></b><br/> <math>R_1 = \alpha\text{-OH}</math> ; <math>R_2 = \beta\text{-OAc}</math>    Onocer-7-ène-3<math>\alpha</math>-hydroxy-21-acétate <b><u>20</u></b><br/> <math>R_1 = \beta\text{-OAc}</math> ; <math>R_2 = \alpha\text{-OH}</math>    Onocer-7-ène-21<math>\alpha</math>-hydroxy-3-acétate <b><u>21</u></b><br/> <math>R_1 = R_2 = \text{O}</math> ;                    Onocer-7-ène-3,21-dione <b><u>22</u></b> </p> |                          | Bhutani et <i>al.</i> , 1984 |
|  <p> <math>R = \alpha\text{-OH}</math> ;    <math>\delta</math>-Amyrine <b><u>23</u></b><br/> <math>R = \text{O}</math> ;        <math>\delta</math>-Amyrone <b><u>24</u></b><br/> <math>R = \alpha\text{-OAc}</math> ,    <math>\delta</math>-Amyrine acétate <b><u>25</u></b> </p>  | <i>C. quadrangularis</i> | Thakur et <i>al.</i> , 2010  |
|  <p> <math>R_1 = \beta\text{-OH}</math> ; <math>R_2 = \alpha\text{-OH}</math> ;    7-oxo-onocer-8-ène-3<math>\beta</math>,21<math>\alpha</math>-diol <b><u>26</u></b><br/> <math>R_1 = \beta\text{-OAc}</math> ; <math>R_2 = \alpha\text{-OH}</math> ;    3<math>\beta</math>-acétoxy-21<math>\alpha</math>-hydroxy onocer-8-ène-7-one <b><u>27</u></b><br/> <math>R_1 = R_2 = \text{O}</math> ;                    Onocer-8-ène-3,7,21-trione <b><u>28</u></b> </p>  |                          | Gupta and Verma, 1990        |
|  <p> <math>R = \text{OH}</math>        Taraxérol <b><u>29</u></b><br/> <math>R = \text{OAc}</math>      Taraxérol acétate <b><u>30</u></b> </p>   |                          | Gupta and Verma, 1991        |
|  <p>Friédélan-3-one <b><u>31</u></b></p>  |                          |                              |

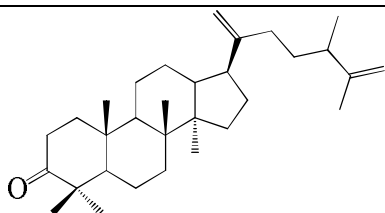


- R = -COCH<sub>3</sub> 24-méthyl-dammara-20,25-diényl-3β-acétate **32**  
 R = -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub> 24-méthyl-dammara-20,25-diényl-3β-palmitate **33**  
 R = -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub> 24-méthyl-dammara-20,25-diényl-3β-stéarate **34**

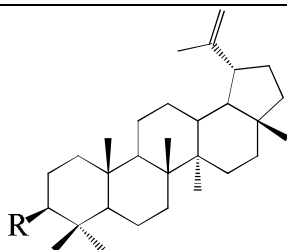


24-méthyl-dammara-2,20,25-trién-1-one **35**

*C. quadrangularis* Pathomwachaiwat et al., 2015



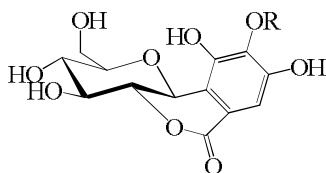
24-méthyl-dammara-20,25-dién-3-one **36**



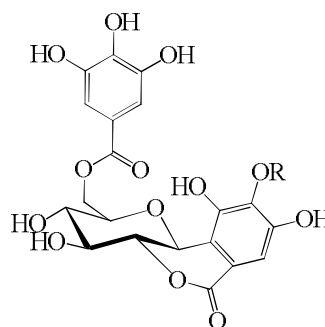
- R = O Lupénone **37**  
 R = OCOCH<sub>3</sub> Lupéol-3-acétate **38**

### I.2.5.3. Les coumarines

Quatre isocoumarines, la Bergénine **39**, la Norbergénine **40**, la 6-*O*-galloylbergénine **41** et la 6-*O*-Galloylnorbergénine **42** avaient été obtenues des racines et tiges de *C. pteroclada* (Lin et al., 2012 ; Yi-jie et al., 2016).

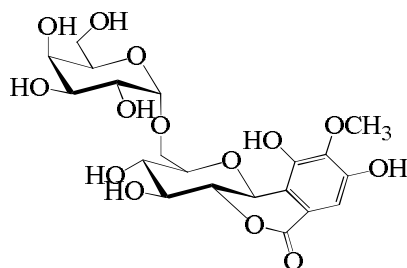


- R = CH<sub>3</sub> Bergénine **39**  
 R = H Norbergénine **40**



- R = CH<sub>3</sub> 6-*O*-Galloylbergénine **41**  
 R = H ; 6-*O*-Galloylnorbergénine **42**

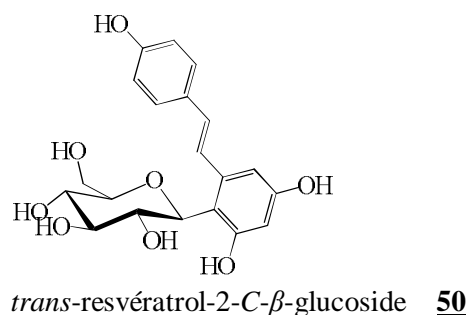
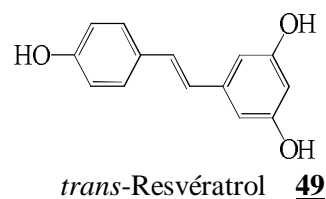
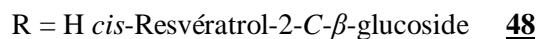
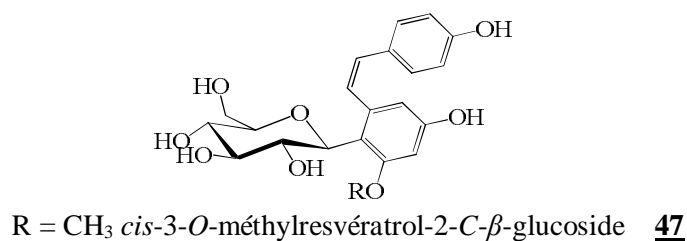
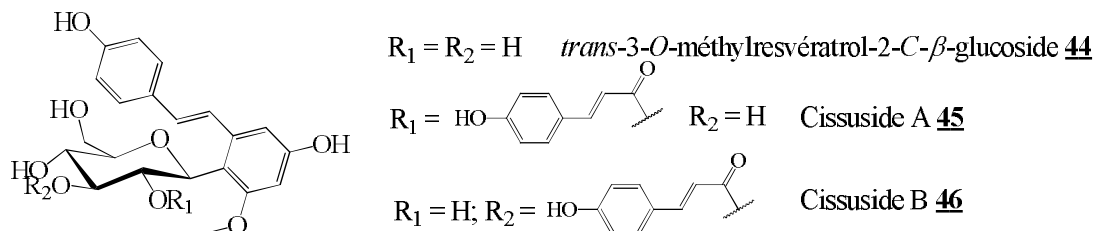
En 2016, en plus des composés ci-dessus cités, Yi-jie et *al.*, reportaient l'isolement d'une nouvelle iso-coumarine, la Bergénine-6-*O*- $\alpha$ -D-galactopyranose **43**.



Bergénine-6-*O*- $\alpha$ -D-galactopyranose **43**

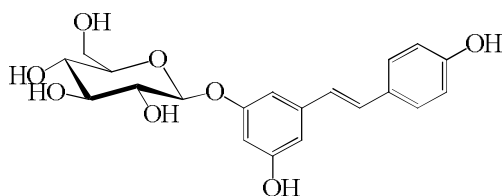
#### I.2.5.4. Les stilbènes

En 2007, Wang et *al.*, lors d'une investigation sur *C. repens* ont isolé quatre nouveaux stilbènes comportant une partie C-glucoside. Le *trans*-3-*O*-méthylresvératrol-2-*C*- $\beta$ -glucoside **44**, le *trans*-3-*O*-méthylresvératrol-2-(2-*p*-coumaric)-*C*- $\beta$ -glucoside (Cissuside A) **45**, et le *trans*-3-*O*-méthylresvératrol-2-(3-*p*-coumaric)-*C*- $\beta$ -glucoside (Cissuside B) **46** et le *cis*-3-*O*-méthylresvératrol-2-*C*- $\beta$ -glucoside **47** avaient ainsi été isolés des parties aériennes de *C. repens*. De cette étude, d'autres composés connus avaient également été obtenus ; c'est le cas du *cis*-Resvératrol-2-*C*- $\beta$ -glucoside **48**, du *trans*-Resvératrol **49** et du *trans*-resvératrol-2-*C*- $\beta$ -glucoside **50**.



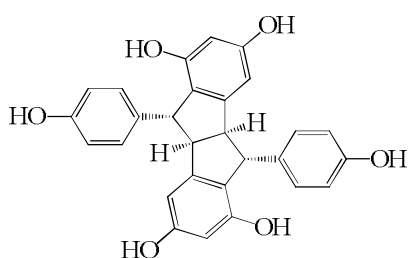


En 2010, Thakur et *al.*, ont reporté l'isolement du *trans*-Resvératrol **49** et du *trans*-Resvératrol-3-*O*-glucopyranoside **51**, obtenus à partir des tiges de *C. quadrangularis*.

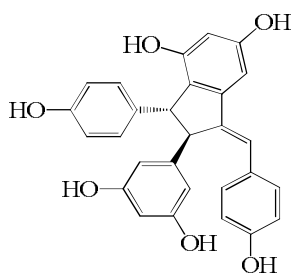


*trans*-Resvératrol-3-*O*-glucopyranoside **51**

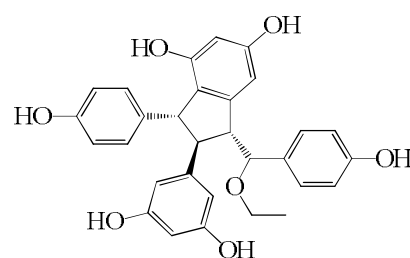
Adesanya et *al.*, (1999) ont reporté avoir isolé des tiges de *C. quadrangularis*, le *trans*-Resvératrol **49**, le Pallidol **52** ; les Quadrangularines A **53**, B **54**, C **55** et le Parthénocissine A **56**.



Pallidol **52**

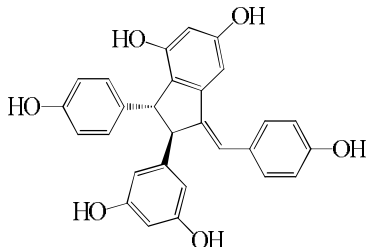


Quadrangularine A **53**



8*S* : Quadrangularine B **54**

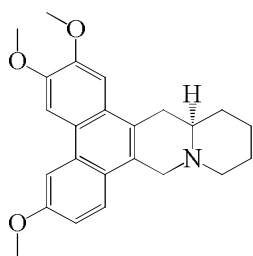
8*R* : Quadrangularine C **55**



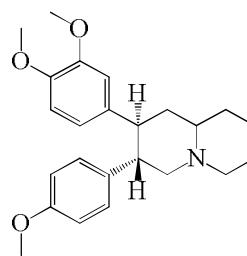
Parthénocissine A **56**

### I.2.5.5. Les alcaloïdes

En 1983, deux alcaloïdes de type quinolizidine avaient été isolés des feuilles de *C. rheifolia* (Saifah et *al.*, 1983). Il s'agit entre autres de la Cryptopleurine **57**, et de la *trans*-2-(3,4-diméthoxyphényl)-3-(4-méthoxyphényl)quinolizidine (ou Kayawongine) **58**.



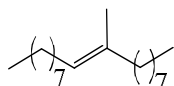
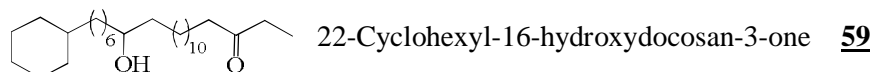
Cryptopleurine **57**,



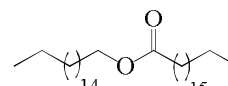
Kayawongine **58**

### I.2.5.6. Autres composés

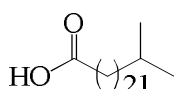
Gupta et Verma en 1991, décrivent de *C. quadrangularis* l'isolement et la caractérisation de la 22-Cyclohexyl-16-hydroxydocosan-3-one **59**, du 9-Méthyl-octadéc-9-ène **60**, de l'Heptadecyl octadécanoate **61**, de l'Acide *iso*-pentacosanoïque **62** et du 31-Méthyltritriacontanol **63**.



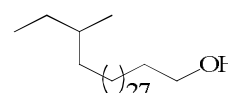
9-Méthyl-octadéc-9-ène **60**



Heptadecyl octadécanoate **61**

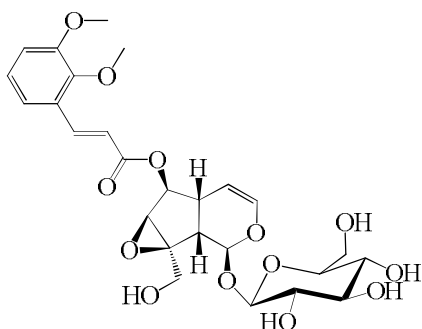


Acide *iso*-pentacosanoïque **62**

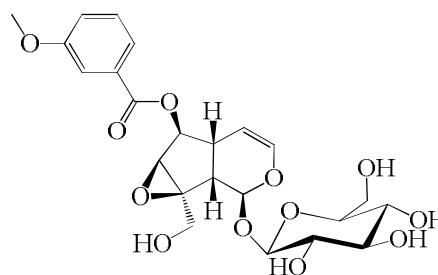


31-Méthyltritriacontanol **63**

En 2007, Singh et *al.* décrivaient l'isolement de trois iridoïdes, le 6-*O*-[2,3-diméthoxy]-*trans*-cinnamoylcatalpol **64** et le 6-*O*-*meta*-méthoxybenzoylcatalpol **65**, de *C. quadrangularis*.

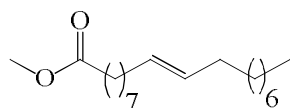


6-*O*-[2,3-diméthoxy]-*trans*-cinnamoylcatalpol **64**

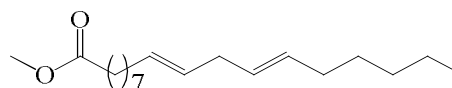


6-*O*-*meta*-méthoxybenzoylcatalpol **65**

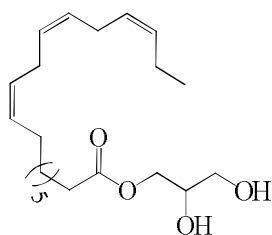
Pathomwichaiwat et *al.* (2015) décrivent également à partir de l'extrait à l'hexane de *C. quadrangularis*, l'isolement du (*E*) Méthyl octadéc-9-énoate **66**, du (*E, E*) Méthyl octadéc-9,12-diénoate **67**, des glycérolipides parmi lesquels le 3-*O*-Linoléoylglycérol **68**, 3-*O*-Linoléoylglycérol **69**, et des phytols gras à l'instar du Phytol palmitate **70**, et le Phytol oléate **71**.



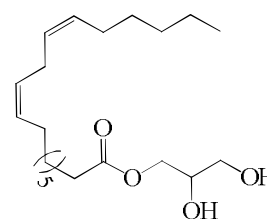
(*E*) Méthyl octadéc-9-énoate **66**



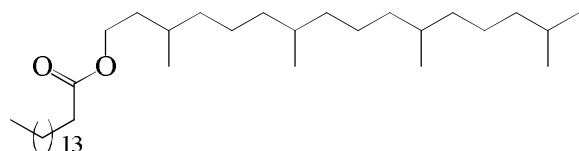
(*E, E*) Méthyl octadéca-9,12-diénoate **67**



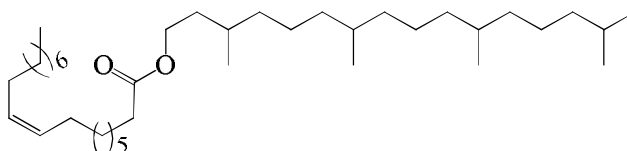
3-*O*-Linoléoylglycérol **68**,



3-*O*-Linoléoylglycérol **69**

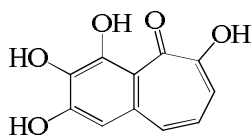


Phytol palmitate **70**

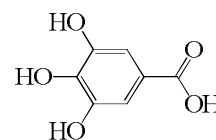


Phytol oléate **71**

Yi-jie et *al.* (2016) en plus des iso-coumarines citées plus haut, ont isolé des parties aériennes de *C. pteroclada*, la Purpurogalline **72** et l'Acide gallique **73**.



Purpurogalline **72**



Acide gallique **73**.

### I.2.3.3. Activités pharmacologiques de quelques métabolites secondaires du genre *Cissus*

Les composés isolés des espèces du genre *Cissus* possèdent une large gamme de propriétés pharmacologiques dont quelques unes sont résumées dans le tableau I.6 ci-dessous :

**Tableau I.6 :** Activités biologiques de quelques composés isolés du genre *Cissus*

| Noms du composé   | Propriétés pharmacologiques   | Références  |
|---|---|---|
| Acide gallique <b>73</b>  | Anti-inflammatoire, antioxydante, antimicrobienne, antiplasmodiale, anthelminthique, antidiabétique         | Yi-jie et <i>al.</i> , 2016<br>Nayeem et <i>al.</i> , 2016                            |
| Bergénine <b>39</b>   | Antiarrhythmique, hépato-protectrices, antimicrobiennes, antiplasmodiales, cytotoxiques, neuro-protectrices | Liang et <i>al.</i> , 2013<br>Khan et <i>al.</i> , 2016<br>Liang et <i>al.</i> , 2013 |
| Bergénine-6- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -galactopyranose <b>43</b><br>Norbergénine <b>40</b> | Anti-inflammatoire  | Yi-jie et <i>al.</i> , 2016   |
| <i>trans</i> -Resvératrol <b>49</b>   | Anticancéreuse, anti-inflammatoire, antioxydante, vasorelaxante, estrogénique, neuroprotectrice             | Xu et <i>al.</i> , 2010<br>Frémont, 2000<br>Yi-jie et <i>al.</i> , 2016               |
| 6- <i>O</i> -Galloylbergénine <b>41</b><br>6- <i>O</i> -Galloylnorbergénine <b>42</b>           | Anti-inflammatoire  | Lin et <i>al.</i> , 2012  |

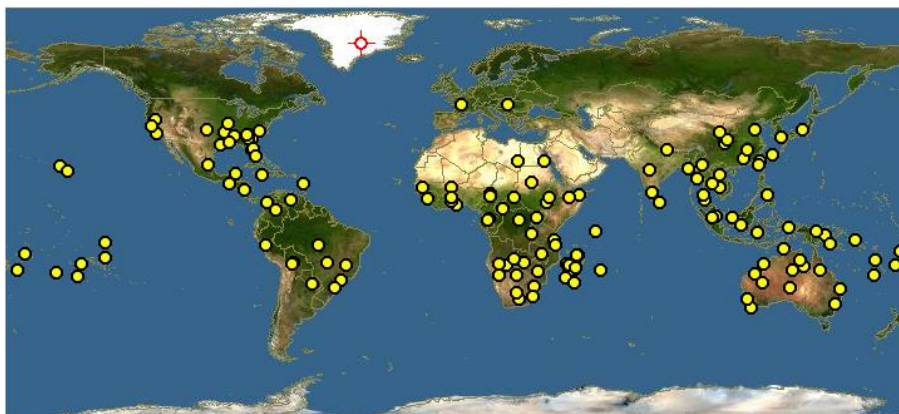
### I.3. Présentation de *Gardenia aqualla* Stapf & Hutch

#### I.3.1. La famille des Rubiaceae

La famille des Rubiaceae est une famille de plantes à fleurs qui tire son nom du genre de la garance *Rubia* d'où elle est communément appelée famille de la garance, famille du gaillet ou famille du café. Elle constitue l'une des six plus vastes familles d'Angiospermes incluant Asterales, Orchidaceae, Fabaceae, Poaceae et Euphorbiaceae. Membre de l'ordre des Gentianales. Les Rubiaceae, à répartition cosmopolite, comptent 13 000 à 14 000 espèces pour 670 genres environ. Connue sous les régions tempérées par des herbacées, la famille, principalement tropicale, est composée essentiellement d'arbustes, de nombreux arbres atteignant une quarantaine de mètres de hauteur, ainsi que de lianes (Mouly, 2008).

#### I.3.2. Le Genre *Gardenia*

Le genre *Gardenia* comprend environ 60 à 250 espèces réparties dans les régions tropicales et sub-tropicales d'Afrique, d'Asie, à Madagascar et aux îles pacifiques. Le genre contient un arbuste ornemental populaire à travers le monde entier qui a été utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies parmi lesquelles le paludisme (Wanjiru, 2009).



Les points jaunes indiquent les lieux où au moins une espèce du genre *Gardenia* a été repotriée.

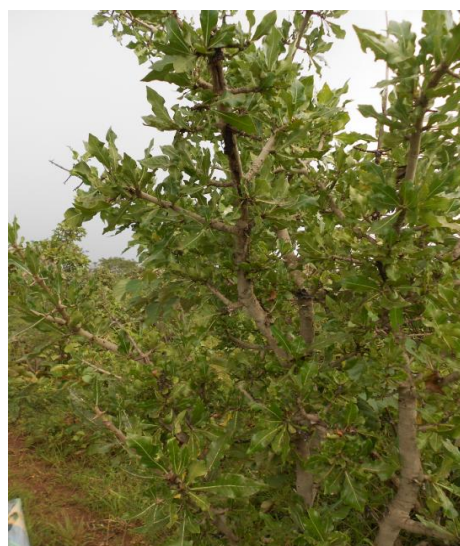
**Figure I.5 :** Répartition géographique du genre *Gardenia* (Pickering, 2019)

Arbustes ou rarement des arbres, quelques fois avec des troncs courts non armés (*Gardenia angkorensis*, *G. sootepensis*), ou avec des troncs courts épineux, avec des bourgeons et jeunes troncs souvent résineux. Raphides absentes. Feuilles opposées ou rarement alternées, quelques fois groupées au tronc épais souvent avec domaties ; stipules persistantes ou à feuilles caduques, unies sous peu autour de la tige ou complètement unies dans un chapeau conique, triangulaire ou une fois uni dans un chapeau se dédoublent alors le long d'un côté. Inflorescence *pseudo*-axillaire et/ou terminale, cyme à plusieurs fleurs ou réduite à une fleur, pédiculée à sessile, bractée. Fleurs sessiles à pédiculées, bisexuées, uniformes, souvent clinquantes. Calice avec ovaire bien développée et

souvent longitudinalement striée ; limbe contenant 5 à 8 lobes ou quelques fois fondue dans un tube ou un chapeau conique qui se dédouble irrégulièrement selon que la corolle s'allonge souvent bien développée. Corolle blanche à jaune-pale, en forme d'entonnoir, glabre ou différemment pubescent de l'intérieur ; 5 à 12 lobes, convolutés dans le bourgeon. 5 à 12 étamines intercalées dans la gorge de corolle, incluses ou partiellement externes ; filaments très courts ou réduits ; anthères dorsales. Ovaire à une alvéole, nombreuses ovules sur 2 à 6 placentas pariétaux ; stigmates clivés ou contenant 2 lobes, inclus ou externes. Fruit généralement jaune orangée, rouge orangée, ou brun avec pulpe habituellement orange, coriace ou charnu, en forme d'ellipse ou sub-globulaire, lisse ou avec des rides longitudinales, avec limbe à calice habituellement persistante, ou quelques fois avec partie supérieure tardivement caduque ; graines nombreuses de taille moyenne, ellipsoïde, comprimées encastrées dans la pulpe ; testa coriace ou membraneux, endosperme habituellement corné, petite embryon ou de taille moyenne, large cotylédon. Les lobes de calices apparemment persistants s'agrandissent remarquablement au fur et à mesure que le fruit se développe dans plusieurs espèces. Ceci pourrait être confus lorsque les lobes fruitiers agrandis de calice sont comparés aux descriptions des lobes fleurissants de calice. Les fleurs sont souvent nocturnes et sont de coutume fortement parfumées avec une mélodieuse bonne odeur (Shu et *al.*, 2011).

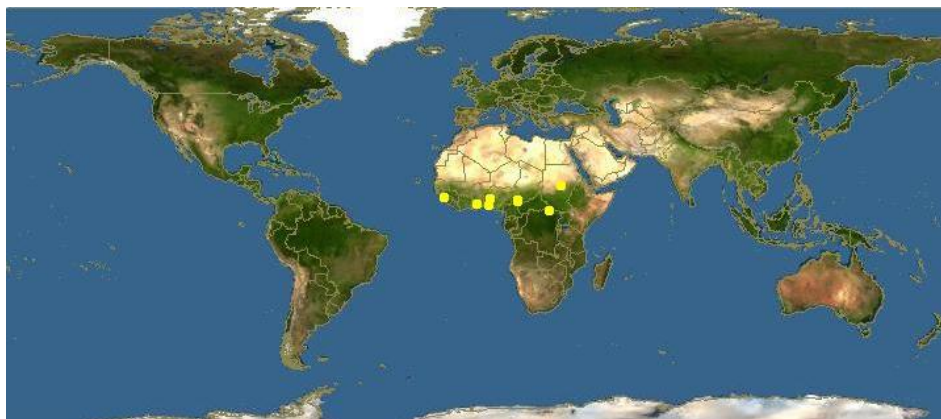
### **I.3.3. L'espèce *Gardenia aqualla* Stapf & Hutch**

Espèce d'Afrique tropicale, *G. aqualla* pousse dans plusieurs types de formations végétales, des savanes soudaniennes à soudano-guinéennes, dans les bas-fonds ombragés et sur les terrasses alluviales. Disséminée, localement commune, *G. aqualla* est répartie du Sénégal au Soudan. Au Cameroun, on la retrouve surtout dans les savanes soudano-guinéennes où elle est assez commune, mais peu grégaire (Arbonnier, 2009).



**Figure I.6 :** Photos d'une jeune plante de *G. aqualla* Stapf & Hutch (Nyemb, 2014)





Les points jaunes indiquent les lieux où l'espèce *G. aqualla* a été repertoriée.

**Figure L.7 :** Répartition géographique de *G. aqualla* Stapf & Hutch (Pickering, 2019)

**Synonymes :** *Gardenia thunbergia* Hiern (Arbonnier, 2009)

**Noms communs :** *Dingale* (*Fufulde*) (Mapongmetsem et al., 2012)

**Systématique :**

**Règne :** Plantae

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Gentianales

**Famille :** Rubiaceae

**Genre :** *Gardenia*

**Espèce :** *aqualla* Stapf & Hutch

*Gardenia aqualla* est un arbuste buissonnant ou petit arbre, de 1-3 m de haut, à fût court, à cime irrégulière et ouverte, avec les feuilles regroupées en touffes au bout de courtes branches. L'écorce est lisse, jaunâtre, se desquamant en écailles irrégulières fines et grises après le passage des feux, à tranche jaunâtre. Rameaux pubescent, court et épais. Stipule caduque, pubescente, triangulaire à sommet arrondi, de 2-4 mm de long. Feuilles opposées et verticillées par trois, pubescentes sur les deux faces, sessiles, plus ou moins étroitement obovales, de taille très variable (les plus petites étant sur les rameaux fleuris et les plus grandes sur les rejets ou les gourmands), de 2-6 (-18) x 1-2 (-5) cm, à sommet arrondi ou obtus ou courtement acuminé, à base en coin, à bords généralement irrégulièrement ondulés. Pennée, à 10-17 paires de nervures saillantes dessous, déprimées dessus sur les feuilles âgées, se raccordant pour la plupart. Nervilles plus ou moins parallèles. Fleur solitaire à l'extrémité des rameaux, blanche ou crème virant au brun, sessile, très odorante, avec un calice en tube pubescent d'environ 6 lobes linéaires (environ 3 mm de long), à corolle en tube, de 2-4 cm de long, d'environ 6 lobes elliptiques (1-2 cm de long). Fruit grisâtre à

jaunâtre, dur, fibreux, rugueux, ayant l'aspect d'un cuir gratté, de forme variable mais généralement plus ou moins globuleux ou ovoïde, peu à profondément côtelé, de 2-4 x 1,5-3 cm, portant au sommet les restes desséchés des lobes du calice et contenant de nombreuses graines. La floraison a lieu en saison sèche (Arbonnier, 2009).

*Gardenia aqualla* est souvent confondu avec *G. ternifolia* subsp. *Jovis-tonantis* var. *goetzei*, dont les feuilles sont pubescentes et plus ou moins scabreuses avec des nervures saillantes sur les deux faces (Arbonnier, 2009).

#### I.3.4. Utilisations ethnomédicinales et propriétés pharmacologiques du genre *Gardenia*

Les espèces du genre *Gardenia* sont connues pour traiter plusieurs maladies. Nous énumérerons dans le tableau I.7 ci-dessous quelques unes d'entre elles.

**Tableau I.7 :** Usages ethnomédicinales de quelques espèces du genre *Gardenia*

| Espèce                  | Partie(s) utilisée(s)                             | Maladie(s)  | Références   |
|-------------------------|---|---|--|
| <i>G. aqualla</i>       | Feuilles  | Paludisme, cancer du sein, ulcères, jaunisse, diabète   | Simo et al., 2014<br>Awede et al., 2015                              |
|                         | Ecorces du tronc                                  | Impuissance masculine, maux de ventre, ulcères, maladies hépatiques   | Jiofack et al., 2009<br>Oluranti et al., 2012<br>Njinga et al., 2014 |
|                         | Racines   | Dysménorrhées, maladies de la peau, jaunisse, lèpre, fièvre, syphilis, cirrhose, ictère, douleurs musculaires | Jiofack et al., 2009<br>Nethengwe et al., 2012<br>Arbonnier, 2009    |
| <i>G. erubescens</i>    | Parties aériennes séchées                         | Gonorrhée, insomnie   | Parmar et al., 2000  |
|                         | Graines   | Hernie, rhumatisme  | Abubakar et al., 2007  |
| <i>G. gummifera</i>     | Résine  | Constipation  | Parmar et al., 2000  |
|                         | Bourgeons   | Antiseptique  |  |
|                         | Feuilles, écorces, racines                        | Diarrhée, ulcères, fièvre   |  |
| <i>G. jasminoides</i>   | Fleurs  | Inflammation des yeux, hépatites, diabète   | Parmar et al., 2000  |
|                         | Fruits  | Inflammations, hypertension, oedèmes, fièvre, jaunisse,   |  |
|                         | Racines   | Fièvre, dyspepsie, flatuosité, douleurs abdominales   | Wahab and Awad, 2015   |
|                         | Ecorces   | Ménorragie  |  |
| <i>G. jovistonantis</i> | Feuilles sèches                                   | Paludisme   | Parmar et al., 2000  |
|                         | Ecorces séchées                                   | Epilepsie   |  |
|                         | Feuilles, écorces du tronc et de racines fraîches | Stérilité féminine, plaies, toux, asthme, mal d'estomac   |  |
| <i>G. latifolia</i>     | Feuilles, écorces, racines                        | Rhumatismes, plaies, diarrhée, dysenterie, indigestion, maladies de la peau, caries                           | Nilip et al., 2014   |
| <i>G. lucida</i>        | Feuilles  | Brûlures, maladies de la peau   | Parmar et al., 2000  |

|                      |                               |  |                                 |
|----------------------|-------------------------------|--|---------------------------------|
| <i>G. sokotensis</i> | Rameaux feuillés              | Paludisme  | Traoré <i>et al.</i> , 2006     |
|                      | Feuilles, écorces, racines    | Hypertension   | Adjanohoun <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>G. ternifolia</i> | Racines                       | Fièvre   | Parmar <i>et al.</i> , 2000     |
|                      | Feuilles et écorces           | Syphilis et ulcère   |                                 |
|                      | Feuilles, écorces,<br>Racines | Asthme, plaies, toux,<br>mal d'estomac   |                                 |
| <i>G. turgida</i>    | Racines                       | Anthelminthique, rhumatisme,<br>maux de tête   |                                 |
|                      | Fruits                        | Infections mammaires   |                                 |
| <i>G. volkensii</i>  | Fruits, racines               | Mal des yeux, maux de tête et<br>d'oreilles, asthme, dysménor-<br>rhée, infertilité, épilepsie, con-<br>vulsions, émétique | Kinuthia, 2009                  |
|                      | Racines                       | Pneumonie  |                                 |

Certaines espèces du genre *Gardenia* ayant été investiguées pour leurs activités pharmacologiques sont données dans le tableau I.8 ci-dessous.

**Tableau I.8 :** Propriétés pharmacologiques des espèces du genre *Gardenia*

| Espèce                | Partie(s) étudiée(s) | Activité(s)  | Références  |
|-----------------------|----------------------|--|---|
| <i>G. aqualla</i>     | Feuilles             | Antiplasmodiale, antioxy-<br>dante, cytotoxique, larvi-<br>cide, antipyrétique | Nethengwe <i>et al.</i> , 2012<br>Simo <i>et al.</i> , 2014 |
|                       | Ecorces du tronc     | Antimicrobienne  | Njinga <i>et al.</i> , 2014                                 |
|                       | Racines              |  |   |
| <i>G. erubescens</i>  | Racines              | Analgésique, diurétique,<br>sédatif, hypotensif,                               | Parmar <i>et al.</i> , 2000                                 |
| <i>G. gummifera</i>   | Feuilles             | Cytotoxique  | Vindhya <i>and</i> Leelavathi, 2014                         |
|                       | Fleurs               | Antioxydant  | Vindhya <i>and</i> Leelavathi, 2015                         |
| <i>G. lucida</i>      | Graines              | Insecticide, larvicide   | Parmar <i>et al.</i> , 2000                                 |
|                       |                      | Antimicrobienne  |   |
| <i>G. sokotensis</i>  | Rameaux feuillés     | Anthelminthique  | Ouedraogo, 1998   |
| <i>G. ternifolia</i>  | Feuilles             | Antiplasmodiale  | Parmar <i>et al.</i> , 2000                                 |
| <i>G. jasminoides</i> | Fruits               | Antioxydante, cytotoxique  | Lee <i>et al.</i> , 2009                                    |
|                       |                      | antimicrobienne, angine  | Park <i>et al.</i> , 2003                                   |
| <i>G. triacantha</i>  | Ecorces du tronc     | Antibactérienne  | Parmar <i>et al.</i> , 2000                                 |
| <i>G. thailandica</i> | Feuilles et tiges    | Anti-VIH-1   | Tuchinda <i>et al.</i> , 2004                               |

### I.3.5. Métabolites secondaires isolés du genre *Gardenia*

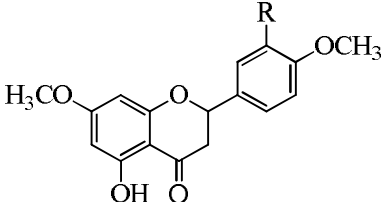
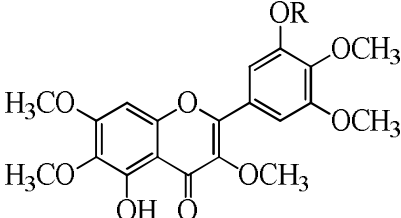
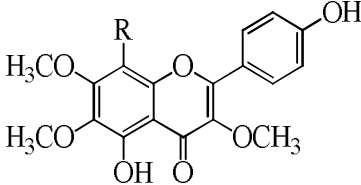
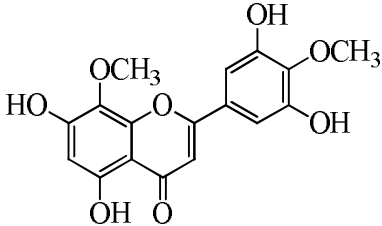
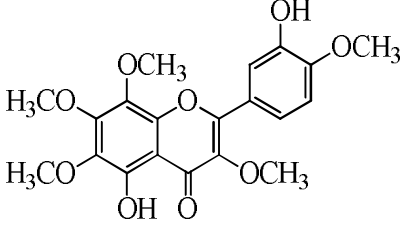
L'investigation phytochimique de près de 20 espèces du genre *Gardenia* a conduit à l'isolement de plus de cent constituants chimiques appartenant à différentes classes de composés bioactifs incluant les flavonoïdes, les terpénoïdes, les carbohydrates, les alcaloïdes, les acétogénines ..., et aromatiques simples (Parmar *et al.*, 2000).

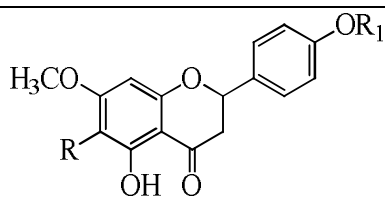


### I.3.5.1. Les flavonoïdes

Plusieurs flavonoïdes ont été isolés des espèces du genre *Gardenia*, la plupart étant des flavones très oxygénés.

**Tableau I.9 :** Quelques flavonoïdes isolés du genre *Gardenia*

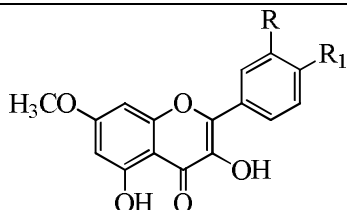
| Composés  | Plantes                                   | Références            |
|---|---|-----------------------|
|  <p>R = H      5-Hydroxy-7',4'-diméthoxyflavanone <b>74</b><br/> R = OCH<sub>3</sub>      5-Hydroxy-7,3',4'-triméthoxyflavanone <b>75</b></p>              | <i>G. erubescens</i>                      |                       |
|  <p>R = H      5,3'-Dihydroxy-3,6,7,4',5'-pentaméthoxyflavone <b>76</b><br/> R = OH      5-Hydroxy-3,6,7,3',4',5'-hexaméthoxyflavone <b>77</b></p>         | <i>G. fosbergii</i><br><i>G. cramerii</i> | Parmar et al., 2000   |
|  <p>R = OCH<sub>3</sub> ;      5,4'-Dihydroxy-3,6,7,8-tétraméthoxyflavone <b>78</b><br/> R = H      5,4'-Dihydroxy-3,6,7-triméthoxyflavone <b>79</b></p> | <i>G. fosbergii</i><br><i>G. cramerii</i> |                       |
|  <p>5,3',5'-Trihydroxy-3,6,7,4'-tétraméthoxyflavone <b>80</b></p>  |   |                       |
|  <p>5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentaméthoxyflavone <b>81</b></p>  | <i>G. obtusifolia</i>                     | Phromnoi et al., 2010 |



R = H ; R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> 5-Hydroxy-4',7-diméthoxyflavanone **82**

R = H ; R<sub>1</sub> = H 4',5-Dihydroxy-7-méthoxyflavanone **83**

R = OCH<sub>3</sub> ; R<sub>1</sub> = H 4',5-Dihydroxy-6,7-diméthoxyflavanone **84**



R = OH ; R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> 3,3',5-Trihydroxy-4',7-diméthoxyflavanone

**85**

R = H ; R<sub>1</sub> = OH 3,4',5-Trihydroxy-7-méthoxyflavone **86**

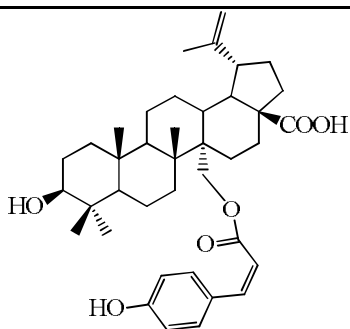
*G. ternifolia* Ochieng et al.,  
2010

### I.3.5.2. Les triterpénoïdes

Plusieurs types de triterpènes allant du type lupane aux cycloartanes en passant par les types ursanes et oléananes ont été isolés de différentes espèces du genre *Gardenia*. Quelques uns des triterpènes isolés des *Gardenia* sont résumés dans le tableau I.10 ci-dessous :

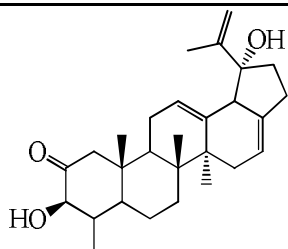
**Tableau I.10 :** Quelques triterpénoïdes isolés du genre *Gardenia*

| Composés  | Plantes             | Références                 |
|---|---------------------|----------------------------|
| <b>Type Lupane</b>  |                     |                            |
|   |                     |                            |
| R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub> Lupéol <b>87</b> |                     |                            |
| R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = COOH Acide bétulinique <b>88</b> | <i>G. saxatilis</i> | Suksamrarn et al.,<br>2003 |
|   |                     |                            |
| R = OCH <sub>3</sub> Acide winchique <b>89</b>                        |                     |                            |
| R = H Acide méssagenique B <b>90</b>                                  |                     |                            |



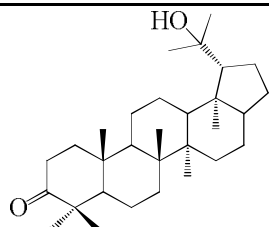
*G. saxatilis* Suksamrarn et al., 2003

Acide méssagenique A **91**



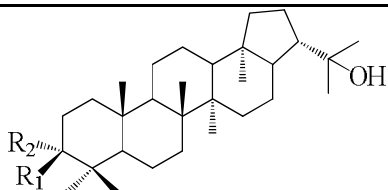
*G. erubescens* Parmar et al., 2000

Erubescenone **92**



20-Hydroxylupan-3-one **93**

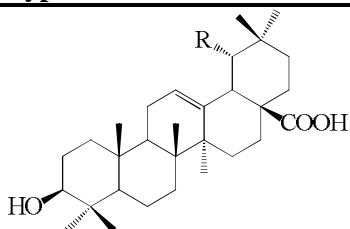
*G. campanulata* Poonlaphdecha, 2005



$R_1 = R_2 = O$  22-Hydroxy-hopan-3-one **94**

$R_1 = OH ; R_2 = H$  3 $\beta$ ,22-Dihydroxyhopane **95**

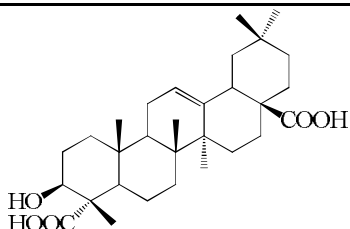
Type oléanane et ursane



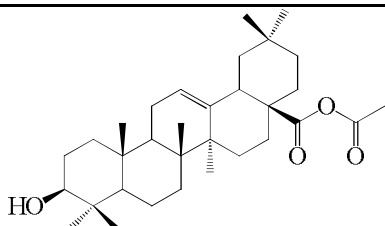
$R = CH_3$  Acide 3 $\beta$ -23 $\alpha$ -dihydroxyoléan-12-én-28-oïque **96**

$R = H$  Acide oléanolique **97**

*G. turgida* Parmar et al., 2000



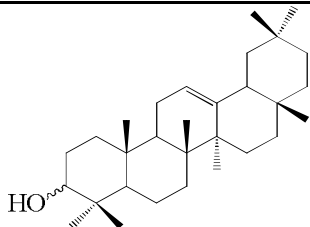
Acide gypsogénique **98**



*G. jasminoides*

Acide acétyloléanolique **99**

---



*G. imperialis*

*G. lutea*

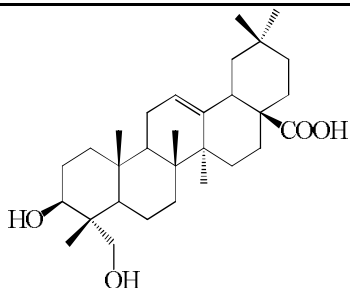
*G. imperialis*

$\alpha$ -OH = 3-épi- $\beta$ -Amyrine **100**

$\beta$ -OH =  $\beta$ -Amyrine **101**

$\beta$ -OAc =  $\beta$ -Amyrine acétate **102**

---

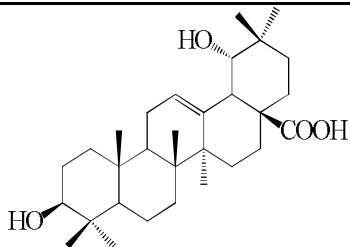


Hédéragénine **103**

---

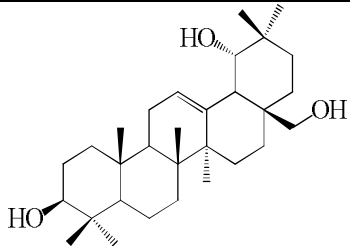
*G. latifolia*

Parmar et al., 2000



Acide spinosique **104**

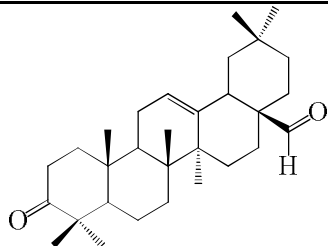
---



19 $\beta$ -Hydroxyérythrodiol **105**

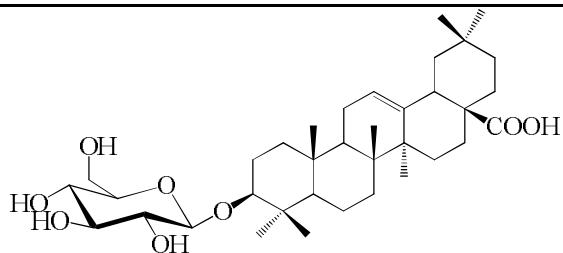
---

*G. gummifera*



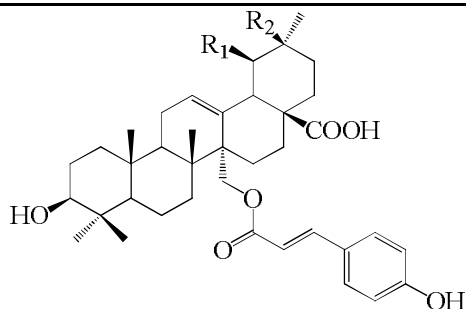
Aldehyde oléanonique **106**

---



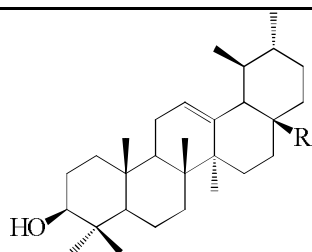
*G. lutea* Parmar et al., 2000  
*G. sootepensis*

Acide oléanolique-3-O-glucopyranoside **107**



*G. saxatilis* Suksarnrarn et al., 2003

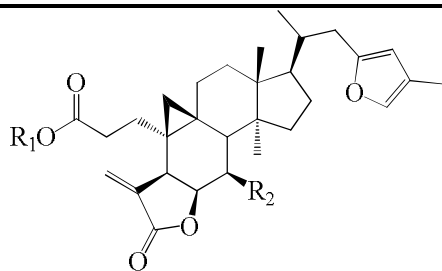
$R_1 = H, R_2 = CH_3$  Acide uncarique E **108**  
 $R_1 = CH_3, R_2 = H$  Acide coumaroyloxursolique **109**



*G. turgida.* Parmar et al., 2000

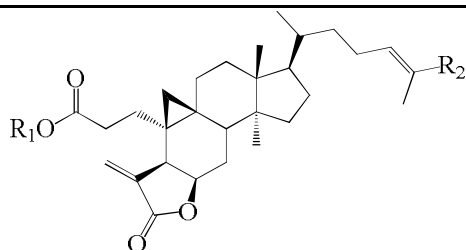
$R = COOH$  Acide ursolique **110**  
 $R = H$   $\alpha$ -Amyrine **111**

**Type cycloartane**



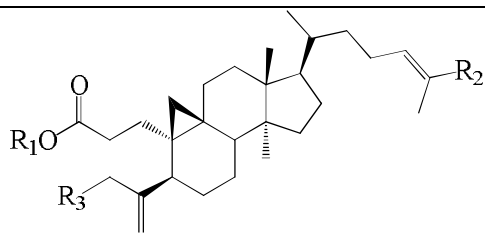
*G. tubifera* Nuanyai et al., 2010

$R_1 = R_2 = H$  Gardénoine A **112**  
 $R = CH_3 ; R_2 = H$  Gardénoine B **113**  
 $R = CH_3 ; R_2 = OH$  Gardénoine C **114**



*G. sootepensis* Nuanyai et al., 2009

$R_1 = CH_3, R_2 = CH_2OH$  Sootépine A **115**  
 $R_1 = H, R_2 = CH_3$  Sootépine B **116**  
 $R_1 = CH_3, R_2 = CH_3$  Méthyltubiférolide ester **117**  
 $R_1 = H, R_2 = CHO$  Coronololide **118**  
 $R_1 = CH_3, R_2 = CHO$  Méthylcoronalolide ester **119**

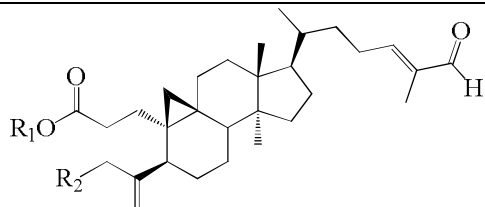


*G. sootepensis* Nuanyai et al., 2009

R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = OH Sootépine C **120**

R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CHO R<sub>3</sub> = OH Sootépine D **121**

R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = H Sootépine E **122**

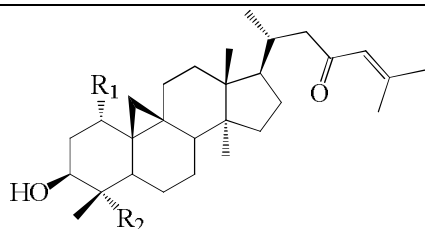


*G. sootepensis* Youn et al., 2016

R<sub>1</sub> = H ; R<sub>2</sub> = COOH Sootépine G **123**

R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> ; R<sub>2</sub> = COOH Sootépine H **124**

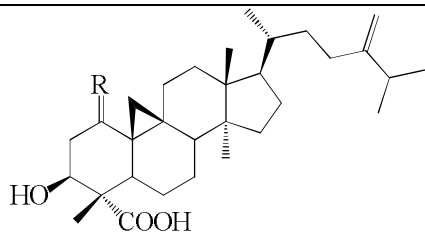
R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> ; R<sub>2</sub> = OH Sootépine I **125**



R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> Thailandiol **126**

R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = COOH Acide gardénolique A **127**

*G. thailandica* Tuchinda et al., 2004



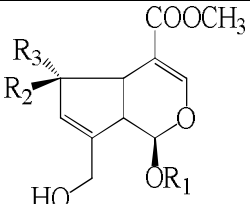
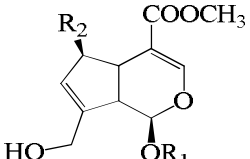
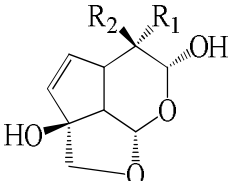
R=O Acide quadrangulaire E **128**

R=H<sub>2</sub> β-Hydroxy-5α-cycloart-24(31)-én-28-oïque **129**

### I.3.5.3. Les iridoïdes

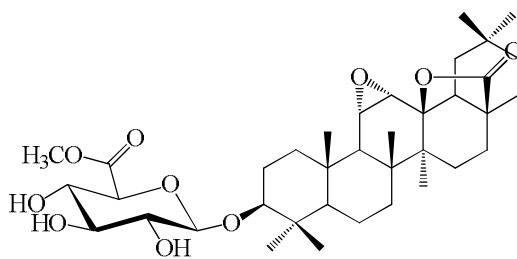
Quelques iridoïdes isolés du genre *Gardenia* sont répertoriés dans le tableau I.11 ci-dessous :

**Tableau I.11** : Quelques iridoïdes isolés du genre *Gardenia*

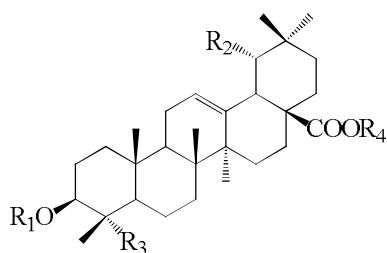
| Composés  | Plantes               | Références        |
|---|-----------------------|-------------------|
|  <p> <math>R_1 = \beta\text{-D-glc}</math> ; <math>R_2 = R_3 = \text{H}</math> Géniposide <b>130</b><br/> <math>R_1 = \beta\text{-D-glc}</math> ; <math>R_2 = \text{OH}</math> ; <math>R_3 = \text{H}</math> Scandoside méthyl ester <b>131</b><br/> <math>R_1 = \beta\text{-D-glc}</math> ; <math>R_2 = \text{H}</math> ; <math>R_3 = \text{OH}</math> Acide diacétylaspérulosidique méthyl ester <b>132</b><br/> <math>R_1 = \beta\text{-D-glc}</math> ; <math>R_2 = \text{H}</math> ; <math>R_3 = \text{OCH}_3</math> Acide 6-<i>O</i>-méthyldiacétylaspérulosidique méthyl ester <b>133</b> </p> | <i>G. fructus</i>     | Chen et al., 2009 |
|  <p> <math>R_1 = \text{H}</math> ; <math>R_2 = \text{OH}</math> 6<math>\beta</math>-hydroxygénipin <b>134</b><br/> <math>R_1 = R_2 = \text{H}</math> Génipine <b>135</b><br/> <math>R_1 = \beta\text{-D-glc}</math> ; <math>R_2 = \text{OH}</math> 6<math>\beta</math>-hydroxygéniposide <b>136</b> </p>  | <i>G. jasminoides</i> | Peng et al., 2013 |
|  <p> <math>R_1 = \text{H}</math> ; <math>R_2 = \text{COOCH}_3</math> <math>\alpha</math>-Gardiol <b>137</b><br/> <math>R_1 = \text{COOCH}_3</math> ; <math>R_2 = \text{H}</math> <math>\beta</math>-Gardiol <b>138</b> </p>  | <i>G. jasminoides</i> | Song et al., 2014 |

### I.3.5.4. Les saponines

Les seules saponines isolées du genre *Gardenia* sont à génines triterpéniques et elles ont toutes été obtenues des racines de *G. jasminoides* par Wang et al. (2012). Il s'agit entre autres des Gardénisides A-C (**139-141**), de l'Acide oléanolique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranoside-6'-*O*-méthyl ester **142**, de l'Acide oléanolique 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranoside **143**, de l'Hédéragénine 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranoside-6'-*O*-méthyl ester **144**, de la Chikusetsusaponine IVa méthyl ester **145**, de la Chikusetsusaponine **146**, de la Chikusetsusaponine IVa butyl ester **147**, et de l'Acide siarésinologique 28-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester **148**.



Gardéniside A **139**



$R_1 = 6-O-CH_3GlcA$  ;  $R_2 = OH$  ;  $R_3 = CH_3$  ;  $R_4 = H$  Gardéniside B **140**

$R_1 = 6-O-CH_3GlcA$  ;  $R_2 = OH$  ;  $R_3 = CH_3$  ;  $R_4 = Glc$  Gardéniside C **141**

$R_1 = 6-O-CH_3GlcA$  ;  $R_2 = R_4 = H$  ;  $R_3 = CH_3$  Acide oléanolique 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucuronopyranoside-6'-*O*-méthyl ester **142**

$R_1 = GlcA$  ;  $R_2 = R_4 = H$  ;  $R_3 = CH_3$  Acide oléanolique 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucuronopyranoside **143**

$R_1 = 6-O-CH_3GlcA$  ;  $R_2 = R_4 = H$  ;  $R_3 = CH_2OH$  Hédérágénin-3-*O*- $\beta$ -*D*-glucuronopyranoside-6'-*O*-méthyl ester **144**

$R_1 = 6-O-CH_3GlcA$  ;  $R_2 = H$  ;  $R_3 = CH_3$  ;  $R_4 = Glc$  Chikusetsusaponine IVa méthyl ester **145**

$R_1 = GlcA$  ;  $R_2 = H$  ;  $R_3 = CH_3$  ;  $R_4 = Glc$  Chikusetsusaponine **146**

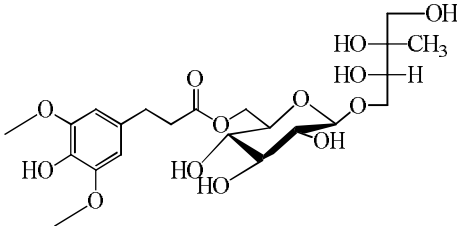
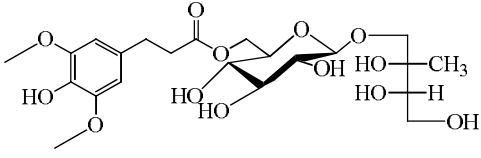
$R_1 = 6-O-butylGlcA$  ;  $R_2 = H$  ;  $R_3 = CH_3$  ;  $R_4 = Glc$  Chikusetsusaponine IVa butyl ester **147**

$R_1 = H$  ;  $R_2 = OH$  ;  $R_3 = CH_3$  ;  $R_4 = Glc$  Acide siarésinologique 28-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl ester **148**

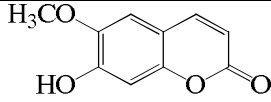
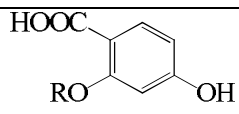
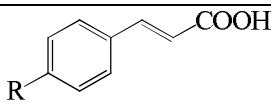
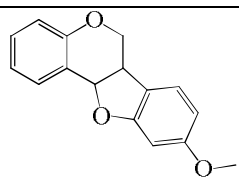
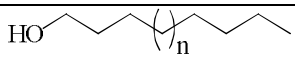
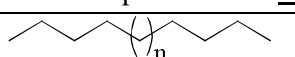
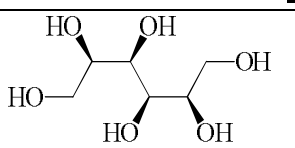
### I.3.2.2.5. Autres composés

A côté des classes de composés ci-dessus mentionnées, plusieurs acides, alcanes, alcools, esters, aldéhydes, coumarines, sucres...etc. ont été isolés des espèces de *Gardenia*. Le tableau I.12 ci-dessous résume quelques-uns.

**Tableau I.12 :** Quelques autres composés isolés du genre *Gardenia*

| Structures et noms des composés   | Sources               | Références                |
|---|-----------------------|---------------------------|
|  <p>2-Méthyl-L-érythritol-4-<i>O</i>-(6-<i>O</i>-<i>trans</i>-sinapoyl)-<math>\beta</math>-<i>D</i>-glucopyranoside <b>149</b></p> | <i>G. jasminoides</i> | Yang <i>et al.</i> , 2013 |
|  <p>2-Méthyl-L-érythritol-1-<i>O</i>-(6-<i>O</i>-<i>trans</i>-sinapoyl)-<math>\beta</math>-<i>D</i>-glucopyranoside <b>150</b></p> |                       |                           |



|   |   |
|---|---|
|    | <i>G. campanulata</i> Poonlaphdecha, 2005   |
| Scopolétine <b>151</b>  |   |
|    |   |
| R = H, R <sub>1</sub> = COOH Acide 3,4-dihydroxybenzoïque <b>152</b>                |   |
| R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = COOH Acide vanillique <b>153</b>             |   |
| R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = CHO Vanilline <b>154</b>                     |   |
|    | <i>G. volkensii</i> Bernard and Runner, 2007  |
| R = H Acide cinnamique <b>155</b>   |   |
| R = OH Acide <i>p</i> -coumarique <b>156</b>  |   |
|    |   |
| Ptérocarpane <b>157</b>   |   |
|   |   |
| n = 18 Pentacosanol <b>158</b>  |   |
| n = 20 Heptacosanol <b>159</b>  | <i>G. sootepensis</i> Parmar et al., 2000   |
|  |   |
| n = 13 Heneicosane <b>160</b>   |   |
| n = 22 Triacontane <b>161</b>   |   |
|  | <i>G. gummifera</i><br><i>G. jasminoides</i> Parmar et al., 2000<br><i>G. sootepensis</i> |
| D-Mannitol <b>162</b>   |   |

### I.3.6. Activités pharmacologiques de quelques métabolites secondaires du genre *Gardenia*

La plupart des composés isolés des *Gardenia* sont connus pour leurs activités biologiques. Quelques unes de ces activités sont répertoriées dans le tableau I.13 ci-dessous :

**Tableau I.13 :** Activités biologiques de quelques composés isolés du genre *Gardenia*

| Noms du composé             | Activités biologiques   | Références          |
|-----------------------------|---|---------------------|
| Acide ursolique <b>110</b>  | Antinéoplasique, antiulcéreuse, anti-inflammatoire, hépatoprotectrice, analgésique, antimicrobienne, virostatique, immuno-modulatrice, antispasmodique, anti-athérosclérose, antitumorale, anti-VIH-1 | Liu et al., 1995    |
| Acide bétulinique <b>88</b> | Anti-inflammatoire, anti-VIH-1, antinéoplastique, cytotoxique   | Parmar et al., 2000 |

|  |   |  |
|--|---|--|
| Acide oléanolique <b>97</b>  | Anti-inflammatoire, anti-VIH, antiulcéreuse, anti-hyperlipidémiques, antimicrobienne, hépatoprotectrice | Liu et <i>al.</i> , 1995                                     |
| Gardéniside A <b>139</b><br>Chikusetsusaponine IVa méthyl ester <b>145</b><br>Chikusetsusaponine IVa butyl ester <b>147</b>  | Cytotoxique   | Wang et <i>al.</i> , 2012                                    |
| Génipine <b>135</b>  | Antidiabétique, anti-inflammatoire  | Zhang et <i>al.</i> , 2006<br>Peng et <i>al.</i> , 2013      |
| Géniposide <b>130</b>  | Anti-inflammatoire, anti-thrombotique, cholagogue,  | Chen et <i>al.</i> , 2009                                    |
| Lupéol <b>87</b>   | Anti-inflammatoire, antinéoplasique   | Suksamrarn et <i>al.</i> , 2003                              |
| Sootépine A <b>115</b><br>Sootépine B <b>116</b><br>Gardénoïne A <b>112</b><br>Gardénoïne C <b>114</b>   | Cytotoxique   | Nuanyai et <i>al.</i> , 2009<br>Nuanyai et <i>al.</i> , 2010 |
| 2-Méthyl-L-érythritol-4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>trans</i> -sinapoyl)- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyrannoside <b>149</b><br>2-Méthyl-L-érythritol-1- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>trans</i> -sinapoyl)- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyrannoside <b>150</b> | Anti-inflammatoire  | Yang et <i>al.</i> , 2013                                    |
| Vanilline <b>154</b>   | Antioxydante  | Bernard and Runner, 2007                                     |
| <i>D</i> -Mannitol <b>162</b>  | Effet dilatateur des muscles vasculaires lisses   | Parmar et <i>al.</i> , 2000                                  |

## I.4. Présentation de *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn

### I.4.1. La famille des Sapotaceae

La famille des Sapotaceae est une famille de plantes à fleurs appartenant à l'ordre des Ericales. Elle comprend environ 1250 espèces constituées d'arbres et arbustes à feuilles persistantes, répartis en environ 58 genres. La famille tire son nom du genre *Sapota*. Parmi les espèces les plus connues sont le karité (*Vitellaria paradoxa*), L'arbre chicle (*Manilkara chicle*), la Sapotille (*Manilkara huberi*), la Cainetta (*Chrysophyllum cainito*) et le Mahua (*Madhuca longifolia*). (Govaerts et al., 2001).

### I.4.2. Le genre *Vitellaria*

Le genre *Vitellaria* ne comprend qu'une seule espèce, *V. paradoxa*.

### I.4.3. L'espèce *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn

Le Karité est un arbre qui pousse en Afrique et dont l'aire écologique correspond au climat soudano-sahélien. Sa zone de production s'étend de l'Afrique de l'Ouest en Afrique Centrale, avec une présence signalée dans certaines régions d'Afrique de l'Est. Sa limite méridionale s'étend de la Côte d'Ivoire au Nigeria en passant par le Niger, le Mali, le Burkina Faso, le Togo, le Ghana et le Nord du Bénin. Son aire de distribution traverse aussi le Nord du Cameroun et va jusqu'au Nord de l'Ouganda (Nikiema and Umali, 2007).

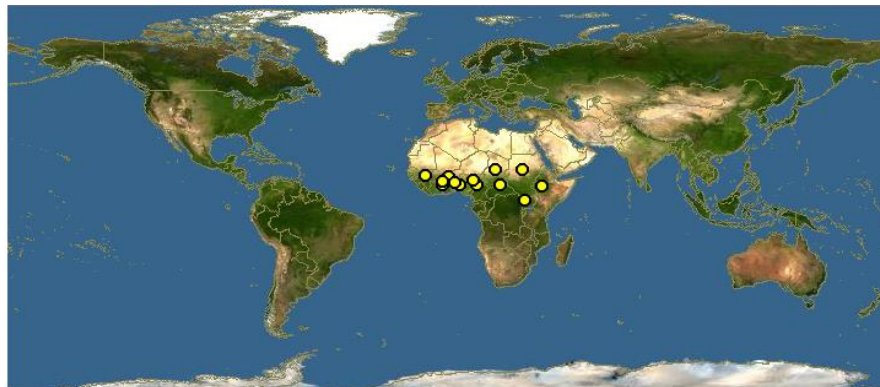


**Figure I.8 :** Photos d'une jeune plante de *V. paradoxa* C. F. Gaertn (Nyemb, 2018)

Au Cameroun, le Karité se retrouve dans la zone septentrionale. Toutefois, sa présence est signalée dans certaines zones de la forêt équatoriale, notamment dans les Régions de l'Ouest et du Nord-Ouest (Nkouam, 2007). *V. paradoxa* pousse sur des sols variés, tels que des sols argileux, argilo-sableux, sableux, caillouteux et latéritiques. L'arbre préfère les pentes colluviales avec des sols moyennement humides, profonds, riches en matière organique.

Deux sous-espèces sont reconnues au sein de *V. paradoxa* : *Vitellaria paradoxa* subsp. *paradoxa* (synonyme : *Butyrospermum parkii* (G. Don) Kotschy) et *Vitellaria paradoxa* subsp. *nilotica* (Kotschy) A. N. Henry, Chithra & N. C. Nair (synonyme : *Butyrospermum niloticum*

Kotschy). La première variété possède une pubescence moins dense et plus courte, et des fleurs légèrement plus petites que la seconde. On retrouve la variété subsp. *paradoxa* du Sénégal jusqu'en Centrafrique et celle subsp. *nilotica* au Soudan et en Ouganda avec de petits peuplements en Ethiopie et en R.D.C. (Nikiema and Umali, 2007).



Les points jaunes indiquent les lieux où l'espèce *V. paradoxa* a été repertoriée.

**Figure I.9 :** Répartition géographique de *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn (Pickering, 2019)

**Synonymes :** *Bassia parkii* G. Don ; *Butyrospermum paradoxum* (C. F. Gaertn.) Hepper ; *Butyrospermum paradoxum* subsp. *parkii* (G. Don) Hepper ; *Butyrospermum parkii* (G. Don) Kotschy.

**Noms pilotes et commerciaux :** Karité, arbre à beurre, beurre de galam, beurre/graisse de karité (Français) ; Shea butter tree, shea tree, bambouk butter tree, galam butter tree (Anglais)

**Noms vernaculaires :** *Karehi* (Ffuldéd), *Souaré* (Tupuri), *Quiré* (Mudang)

**Systématique :**

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Tracheobionta

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-classe :** Dilleniidae

**Ordre :** Ebenales

**Famille :** Sapotaceae

**Genre :** *Vitellaria*

**Espèce :** *paradoxa*

*Vitellaria paradoxa* est un arbre caducifolié de petite à moyenne taille, pouvant atteindre jusqu'à 15 à 25 m de haut ; avec un pivot de 1 à 2 m de long, des racines latérales peu profondes, concentrées à une profondeur de 10 cm et s'étendant jusqu'à 20 m de la souche, des racines latérales secondaires poussant jusqu'à la même profondeur que le pivot. Son fût court, a généralement

3 à 4 m de long et jusqu'à 100 cm de diamètre ; les écorces sont noirâtres, grisâtres ou rougeâtres. Elles sont rugueuses, profondément fissurées et découpées régulièrement en carrés liégeux ou en écailles rectangulaires, produisant du latex blanc lorsque coupées ; Ses cimes sont rondes à fuselées, ou en forme d'ombrelle ou de balai ; jeunes branches initialement pubescentes et rougeâtres, mais devenant glabres, branches en fleurs trapues atteignant jusqu'à 1,5 cm de diamètre, à nombreuses cicatrices foliaires. Feuilles disposées en spirale, souvent en groupes denses à l'extrémité des branches, simples ; stipules petites et caduques ; pétiole de 3 à 10 cm de long ; limbe lancéolé à ovale-oblong, de 10 à 25 cm × 4 à 14 cm, base cunéiforme à arrondie ou légèrement subcordée, apex arrondi à aigu, bords entiers à ondulés, coriace, glabrescent à légèrement poilu sur les deux faces, pennatinervé à nervures proches et régulièrement espacées. Inflorescences contiennent des fascicules denses à l'extrémité d'un rameau, constitués de (8-) 30–40 (-100) fleurs bisexuées, régulières, blanches ou blanc crème, odorantes ; pédicelle jusqu'à 3 cm de long ; sépales libres, en 2 verticilles de 1 à 4 cm de long, pubescents ; corolle à tube court et lobes (6 à 8) environ aussi longs que les sépales, contournés dans le bouton ; étamines (6-8) insérées au sommet du tube de la corolle, libres, staminodes (6-8), alternant avec les étamines, pétaloïdes, à pointe filiforme ; ovaire supère, globuleux à ovoïde, pubescent, (5-6) à (8-10)-loculaire, style long et mince. Baies globuleuses à ellipsoïdes, de 4-8 cm × 2,5-5 cm, pesant 10-57 g, initialement vertes, mais devenant verts jaunâtres ou brunes à maturité, avec 1–2 graines. Graines globuleuses ou largement ellipsoïdes, de 3-5 cm × 2-3,5 cm, pesant 5-16 g ; tégument plutôt fin, luisant, avec large cicatrice ; amande constituée de deux cotylédons épais, charnus, fortement apprimés, et d'une radicule non-exserte. Plantule à germination hypogée, les cotylédons restant dans la graine ; épicotyle de 3-4 cm de long, portant des feuilles rudimentaires stipulées (Nikiema *and* Umali, 2007).

#### **I.4.4. Utilisations ethnomédicinales et propriétés pharmacologiques du genre *Vitellaria***

Les parties de *V. paradoxa* ont été citées dans le traitement de plusieurs affections en médecine traditionnelle notamment dans le traitement des infections de la peau, des infections gastro-intestinales, des rhumatismes, de la diarrhée, des ulcers, de l'asthme, de la tuberculose, du catarrhe, ...etc (Nikiema *and* Umali, 2007). Au Togo, les racines sont utilisées pour traiter le diabète (Karou *et al.*, 2011). En côte d'Ivoire, la plante est également employée pour soigner le paludisme, les caries dentaires, les névralgies (Séréme *et al.*, 2008). Au Cameroun, les feuilles de la plante sont utilisées pour traiter les convulsions et l'épilepsie (Ngo Bum *et al.*, 2011) tandis que les racines sont utilisées contre le cancer de sein (Simo *et al.*, 2014).

Les extraits des écorces du tronc de la plante ont montré des activités antimicrobiennes (Ahmed *et al.*, 2009), anti-inflammatoires (Eyong *et al.*, 2015), anti-amnésique, antioxydante (Foyet *et al.*, 2016) et anthelminthique (Ndjonka *et al.*, 2017).

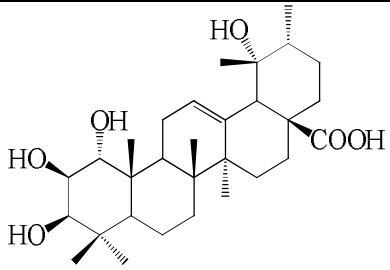
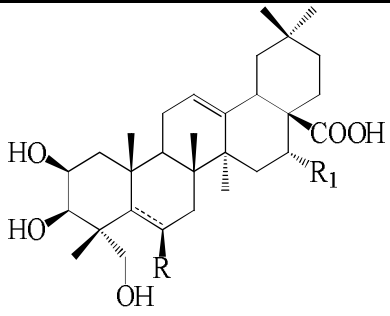
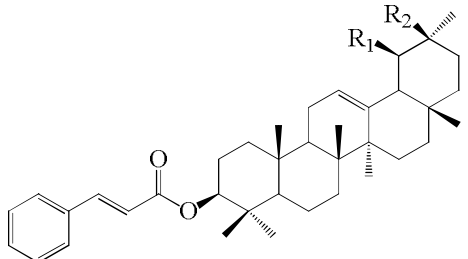
### I.4.5. Métabolites secondaires isolés du genre *Vitellaria*

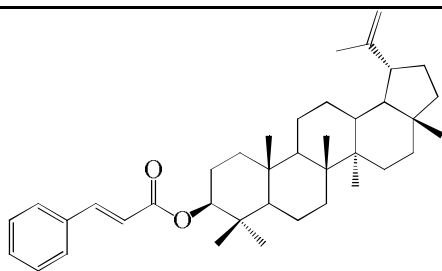
Les travaux phytochimiques antérieurs menés sur *V. paradoxa* ont été effectués pour la plupart sur les graines. Ces travaux ont conduit à l'isolement d'un nombre important de triterpènes, de glycosides, de polyphénols, de flavonoïdes et d'acides gras.

#### I.4.5.1. Triterpénoïdes

Les triterpènes font partir de la classe majeure de métabolites ayant été isolés de *V. paradoxa*. Quelques-uns isolés de cette plante sont énumérés dans le tableau I.14 suivant :

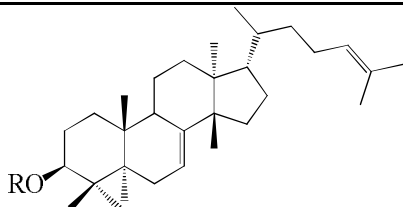
**Tableau I.14 :** Quelques triterpénoïdes isolés du genre *Gardenia*

| Composés   | Références             |
|--|------------------------|
|  <p>Acide 1<math>\alpha</math>,2<math>\beta</math>,3<math>\beta</math>,19<math>\alpha</math>-tétrahydroxyurs-12-én-28-oïque <b>163</b></p>  | Eyong et al., 2015     |
|  <p>R = R<sub>1</sub> = H, <math>\Delta^5</math> Acide bassique <b>164</b><br/> R = OH, R<sub>1</sub> = H Acide protobassique <b>165</b><br/> R = R<sub>1</sub> = OH Acide 16<math>\alpha</math>-hydroxyprotobassique <b>166</b><br/> R = H, R<sub>1</sub> = OH, <math>\Delta^5</math> Acide 16<math>\alpha</math>-hydroxybassique <b>167</b><br/> R = R<sub>1</sub> = H Acide 5,6-dihydrobassique <b>168</b><br/> R = H, R<sub>1</sub> = OH Acide 5,6-dihydro-16<math>\alpha</math>-hydroxybassique <b>169</b></p> | Zhang et al., 2014     |
|  <p>R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H <math>\alpha</math>-Amyrine cinnamate <b>170</b><br/> R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub> <math>\beta</math>-Amyrine cinnamate <b>171</b></p>  | Toshihiro et al., 2010 |



Lupéol cinnamate **172**

---

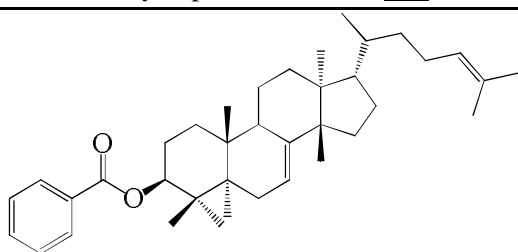


R=H Butyrospermole **173**

R=Ac Butyrospermole acétate **174**

---

Toshihiro et *al.*, 2010

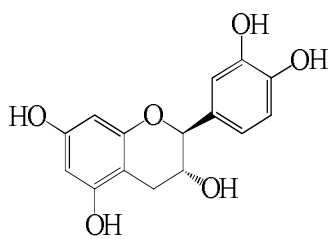


Butyrospermole cinnamate **175**

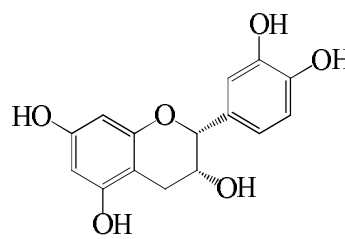
---

#### I.4.5.2. Les flavonoïdes

Les principaux flavonoïdes isolés de *V. paradoxa* sont entre autres la Catéchine **176**, l'Epicatechine **177** et la Quercétine **8**. Ces composés ont été obtenus des graines (Zhang et *al.*, 2014) ainsi que des écorces (Eyong et *al.*, 2015).



Catéchine **176**

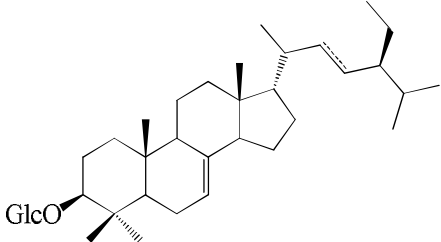
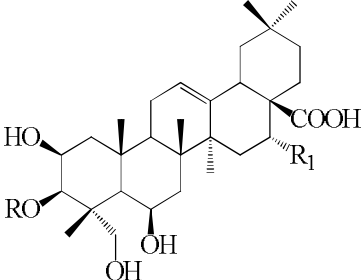
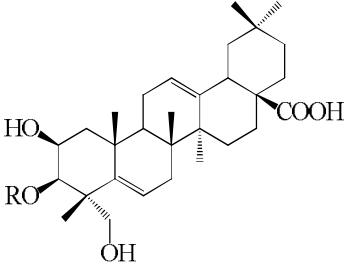
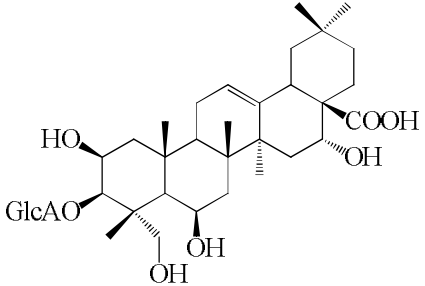


Epicatechine **177**

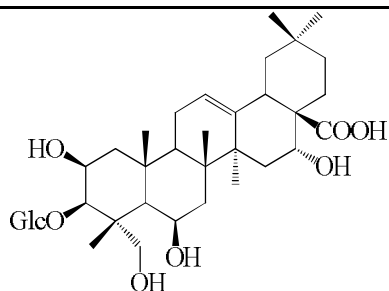
#### I.4.5.3. Les saponines

La quasi-totalité des saponines reportées de cette plante ont été isolées des graines de celle-ci. Le tableau I.15 ci-contre en présente quelques-uns.

**Tableau I.15 :** Quelques saponines isolés de *V. paradoxa*

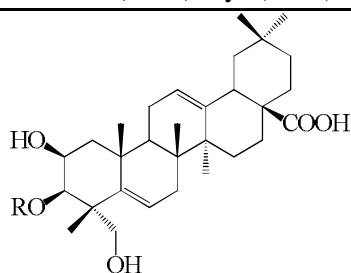
| Composés   | Références         |
|--|--------------------|
|   |                    |
| $\Delta^{22}$ Spinastérol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside <b>178</b><br>22-Dihydrospinastérol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside <b>179</b>   |                    |
|   |                    |
| R = GlcA, R <sub>1</sub> = H Acide 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucuronopyranosylprotobassique <b>180</b><br>R = Glc, R <sub>1</sub> = H Mi-glycoside I <b>181</b><br>R = CH <sub>3</sub> GlcA, R <sub>1</sub> = H Paradoxoside C <b>182</b><br>R = Glc, R <sub>1</sub> = OH Acide 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl-16 $\alpha$ -hydroxyprotobassique <b>183</b> | Zhang et al., 2014 |
|   |                    |
| R = Glc Acide 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosylbassique <b>184</b><br>R = CH <sub>3</sub> GlcA Paradoxoside E <b>185</b>   |                    |
|   |                    |
| R = Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-Ara- Paradoxoside A <b>186</b><br>R = Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-Ara- Paradoxoside B <b>187</b><br>R = Rha-(1 $\rightarrow$ 3)-Xyl-(1 $\rightarrow$ 2)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-Ara- Tieghemelin A <b>188</b>  |                    |



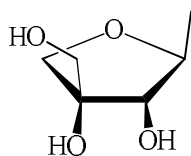


R = Rha-(1→3)-Xyl-(1→2)-Rha-(1→2)-Ara- Arginine C **189**

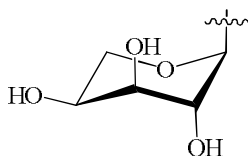
Zhang et al., 2014



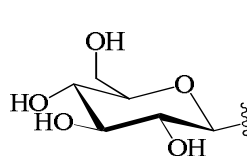
R = Glc-(1→3)-Glc- Paradoxoside D **190**



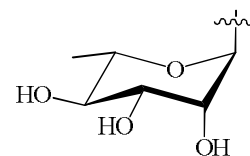
Api



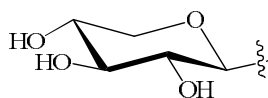
Ara



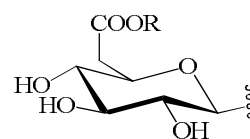
Glc



Rha



Xyl



GlcA R = H

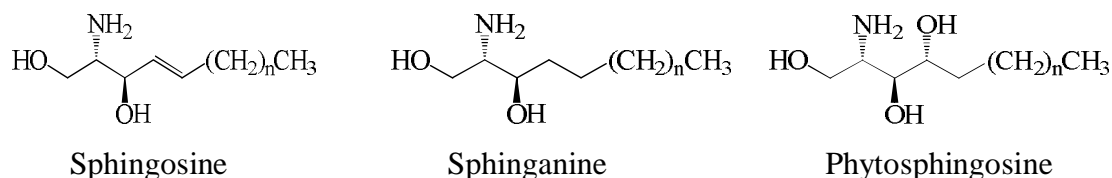
CH<sub>3</sub>GlcA R = CH<sub>3</sub>

#### I.4.5.4. Les sphingolipides

##### I.4.5.4.1. Généralités

Les sphingolipides sont des lipides complexes que l'on retrouve principalement chez les animaux, les champignons, les virus ainsi que chez certains organismes eucaryotes. Ils sont constitués d'une base aminée à longue chaîne appelée base sphingoïde, en général de 18 ou 20 atomes de carbone, avec 2 (sphingosine) ou 3 groupes hydroxyles (phytoshingosine) et le plus souvent une double liaison *trans* en position 4. La plupart des bases sphingoïdes d'origine naturelle sont *N*-acétylées avec une longue chaîne d'acide gras formant ainsi des céramides. Les acides gras de la céramide varient en fonction de la longueur de la chaîne (14 à 30 atomes de carbone), le degré d'insaturation (mais sont le plus souvent saturés) ainsi qu'en fonction de la présence ou de l'absence d'un groupement hydroxyle sur le carbone en  $\alpha$  ou celui en  $\omega$  du carbonyle (Merrill and Sandhoff, 2002).

La sphingosine (ou 4-sphingénine ((2*S*,3*R*,4*E*)-2-amino-4-octadécèn-1,3-diol)) avec 18 atomes de carbone, 2 groupements hydroxyles en positions 1 et 3, une fonction amine en position 2 et une double liaison de configuration *trans*, est la base sphingoïde la plus répandue dans les tissus animaux. Elle est souvent accompagnée par son analogue saturé, la dihydrosphingosine ou sphinganine. La phytosphingosine encore appelée 4-*D*-hydroxy-8-sphingénine ((2*S*,3*R*,4*R*)-2-amino-octadécane-1,3,4-triol) est par ailleurs la base sphingoïde la plus répandue chez les végétaux (Muralidhar et *al.*, 2003).

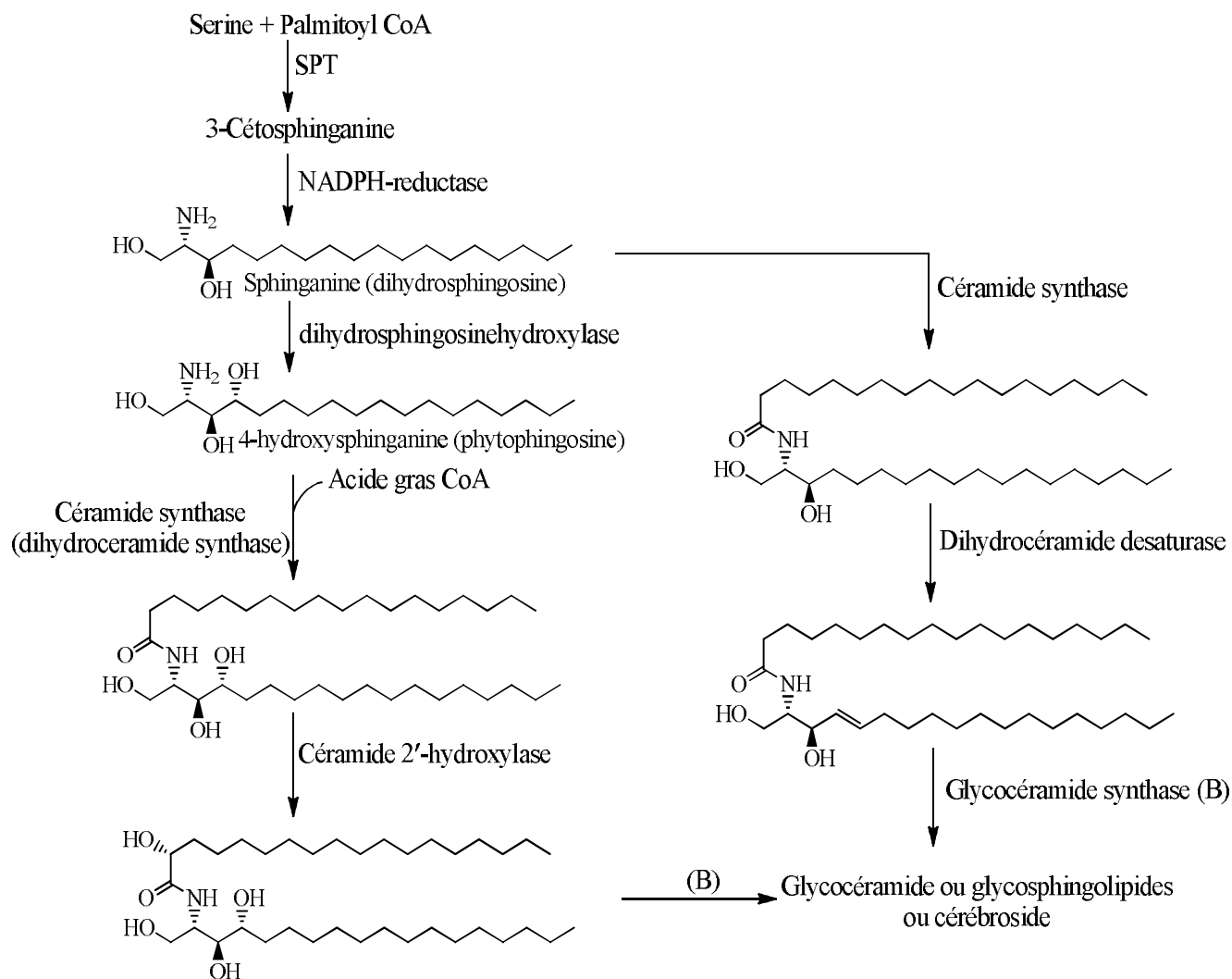


Les sphingolipides sont les constituants essentiels des membranes cellulaires qui régulent la prolifération, la survie et la mort de la cellule. Ils peuvent se répartir en 9 sous-classes : Les sphing-4'-énines ou sphingosines, les céramides, les phosphosphingolipides, les glycosphingolipides neutres, les glycosphingolipides acides, les glycosphingolipides basiques, les glycosphingolipides amphotères et les arsénosphingolipides (Muralidhar et *al.*, 2003).

#### I.4.5.4.2. Biosynthèse

Les gènes qui contrôlent la voie de biosynthèse des sphingolipides chez les plantes n'ont été identifiés que récemment et certains mécanismes restent encore à décrypter, notamment en ce qui concerne la régulation de ces voies (Raffaele et *al.*, 2009). Les bases sphingoïdes ou longues chaînes de bases (LCBs) sont les précurseurs de la voie de biosynthèse des sphingolipides. Elles sont synthétisées à partir des acides gras  $C_{16}$ -CoA (palmitoyl-CoA) et  $C_{18}$ -CoA et de la sérine par une sérine palmitoyltransférase (SPT) composée de 2 sous-unités *AtLCB1* (Chen et *al.*, 2006) et *AtLCB2* codée par 2 gènes *AtLCB2a* et *AtLCB2b* (Dietrich et *al.*, 2008). Les plantes possèdent 8 LCBs différentes qui peuvent être hydroxylées une ou deux fois par 2 bases sphingoïdes hydroxylases codées par les gènes *SBH1* et *SBH2* (Chen et *al.*, 2008). A ces LCBs, se fixe un acide gras sur le groupe amine pour former des céramides par des réactions catalysées par les céramides synthases (dihydrocéramide synthase ou sphinganine acyl-transférase). A ce jour, 3 céramides synthases ont été identifiés et sont codés par les gènes *LOH1* (*At3g25540*), *LOH2* (*At3g19260*) et *LOH3* (*At1g13580*). Les céramides sont généralement constitués d'un alcool aminé (la base sphingoïde) relié par une liaison amide à un acide gras longue chaîne. Ce sont des intermédiaires clés dans la biosynthèse des sphingolipides. Le groupement hydroxyle primaire de la céramide peut être glycosylé pour former les sphingolipides complexes tels que des glucosylcéramides appelés cérébrosides ou des phytoglycolipides (encore appelés inositolphosphorylcéramide, IPC ou GIPC)

selon la nature du résidu glycosyl. Une inositolphosphorylceramide synthase (IPCS) a été identifiée après la caractérisation du mutant *erh*, mutant *T-DNA* inséré dans le gène *At2g37940* (Wang *et al.*, 2008).



**Schéma I.4 :** Biosynthèse des sphingolipides (Wennekes *et al.*, 2009).

#### I.4.3.3.3. Elucidation structurale des céramides

La spectroscopie infrarouge est utilisée pour déterminer la présence de l'amide secondaire, les groupements hydroxyles, les chaînes aliphatiques et les fonctions oléfiniques. C'est ainsi que les absorptions à 3400, 1600 et 1530  $\text{cm}^{-1}$  suggèrent la présence de la fonction amide. Les groupements hydroxyles apparaissent entre 3600 et 3380  $\text{cm}^{-1}$ . Les absorptions à 2928, 2855 et 1467  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux chaînes aliphatiques. Enfin les doubles liaisons apparaissent vers 1630  $\text{cm}^{-1}$  (Kang *et al.*, 2001 ; Tazoo *et al.*, 2007).

Sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$  des céramides, on observe généralement un doublet d'un proton vers  $\delta_{\text{H}}$  8-9 ( $J \approx 8$  Hz). Ce proton est échangeable à l'eau lourde et correspond au proton porté par

l'azote de l'amide. Ce spectre présente également un triplet vers  $\delta_H$  0,8-0,9 (6H) attribuable aux méthyles terminaux, ainsi qu'un singulet large entre  $\delta_H$  1,20-1,36 correspondant à la séquence successive des méthylènes, un multiplet entre  $\delta_H$  2,00-2,20 représentant les protons allyliques (au cas où la molécule a des doubles liaisons) ou en position  $\beta$  du carbonyle. Dans le cas où le composé a une double liaison de configuration *cis*, deux multiplets presque confondus sont observés autour de  $\delta_H$  5,40 et très distincts autour  $\delta_H$  5,45-5,70 si celle-ci est de configuration *trans*. Sur le spectre de RMN  $^{13}C$  on note pour ces doubles liaisons deux pics très voisins ou chevauchants vers  $\delta_C$  130,0 pour la double liaison *cis* et autour de  $\delta_C$  130,0-136,0 si elle est *trans*. Par ailleurs la configuration de cette double liaison peut également être déterminée par les déplacements chimiques de ses carbones adjacents. En effet, les carbones méthyléniques adjacents à une double liaison de configuration *cis* apparaissent autour de  $\delta_C$  26-28 tandis que ceux adjacents à une double liaison *trans* résonnent entre  $\delta_C$  32-33 (Kang et al., 2001 ; Tazoo et al., 2007). Ce spectre RMN  $^{13}C$  montre deux carbones caractéristiques autour de  $\delta_C$  54,0 et 175,5 correspondant au carbone aliphatique azométhine et au carbonyle de la fonction amide. On observe aussi le signal caractéristique de la succession de méthylènes entre  $\delta_C$  29,0-33,0 ainsi qu'un signal à  $\delta_C$  14,4 attribuable aux méthyles terminaux.

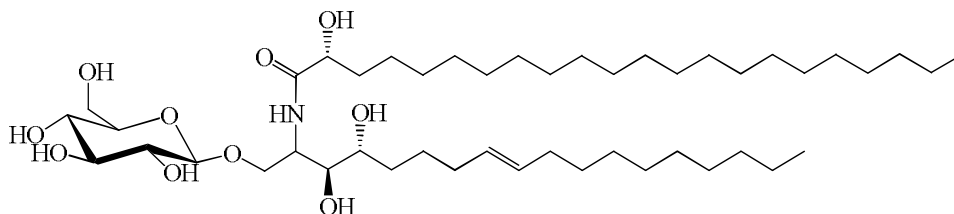
#### I.4.3.3.4. Activités biologiques

Des propriétés intéressantes ont été attribuées aux sphingolipides dans la prévention du cancer du colon ou de la peau (Vesper et al., 1999). Les sphingolipides interagissent également avec le cholestérol au niveau de l'intestin, ce qui limite son absorption. Certains sphingolipides ont présenté des activités immuno-stimulatoires, antimicrobiennes, antivirales, inhibitrices de la phospholipase A2 et antitumorales (Muralidhar et al., 2003). Ils s'avèrent également posséder des propriétés anti-inflammatoires et antidiabétiques (Muralidhar et al., 2003).

Les céramides ont une grande fonction biologique dans les cellules vivantes. Elles seraient responsables du déclenchement de l'apoptose cellulaire et seraient aussi impliquées dans l'activation de la cascade de plusieurs protéines kinases. L'apoptose est un processus nécessaire pour l'homéostasie des tissus ; son arrêt pourrait avoir de graves conséquences entraînant ainsi plusieurs maladies telles que le cancer, le diabète, la neuropathie, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose (Voet and Voet, 2005). Il est possible que la fonction biologique des céramides soit liée à la double liaison C(4)=C(5) de la sphingosine. La configuration de cette double liaison ne paraît pas importante car qu'elle soit *trans* ou *cis*, les céramides induisent l'apoptose cellulaire (Vesper et al., 1999).

#### I.4.3.3.5. Sphingolipides isolés de *V. paradoxa*

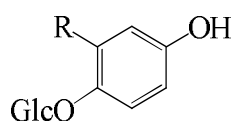
A notre connaissance, aucun sphingolipide n'a encore été publiée sur le genre *Vitellaria*. Cependant un cérébroside, le (8*E*)-*N*-2'-hydroxytétracosanoyl-1-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-4-hydroxy-8-sphingogénine **191** avait été isolé des graines de *Butyrospermum parkii*, une espèce considérée comme étant le synonyme de *V. paradoxa* (Nyaa et al., 2009).



(8*E*)-*N*-2'-hydroxytétracosanoyl-1-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-4-hydroxy-8-sphingogénine **191**

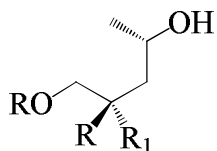
#### I.4.3.3.5. Autres composés

En plus des composés mentionnés plus haut, Zhang et al. (2014) avaient isolé l'Arbutine **192**, l'Isotachioside **193**, le (2*S*,4*S*)-2-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosylpentane-2,4-diol **194**, le (2*R*,4*S*)-2-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosylpentane-2,4-diol **195**, l'Acide gallique **73** et la Rutine **196**.



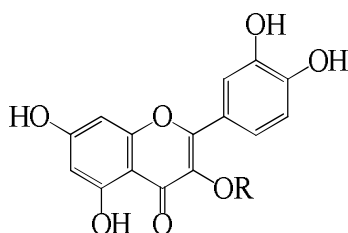
R = H Arbutine **192**

R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> Isotachioside **193**



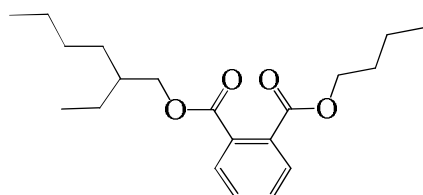
R = CH<sub>3</sub> ; R<sub>1</sub> = H (2*S*,4*S*)-2-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosylpentane-2,4-diol **194**

R = H ; R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> (2*R*,4*S*)-2-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosylpentane-2,4-diol **195**

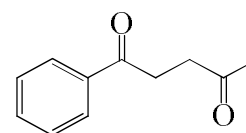


R = Rha-(1→6)-Glc Rutine **196**

Garba et Salihu (2011) ont à partir de l'extrait à l'éthanol de l'écorce de la racine de *V. paradoxa* isolé un phthalate, le Butyl-2-ethylhexylphthalate **197** et une cétone, le 1-Phényl-1,4-pentanedione **198**.

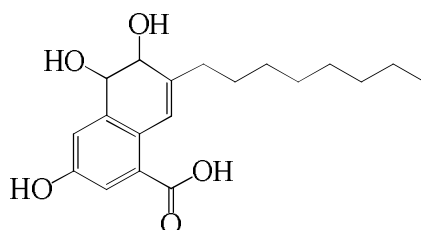


Butyl-2-ethylhexylphthalate **197**



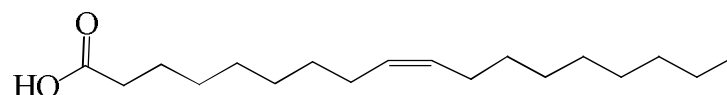
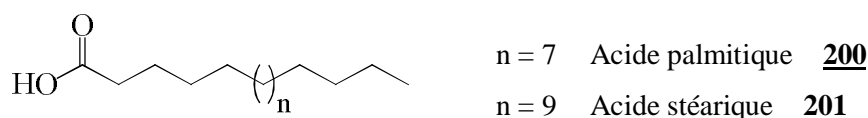
1-Phényl-1,4-pentanedione **198**

Un peu plus tôt en 2007, Ndukwe et son équipe reportaient l'isolement de l'Acide 3,5,6-trihydroxy-7-octyl-5,6-dihydro-1-naphthalene carboxylique **199** (Ndukwe et *al.*, 2007).

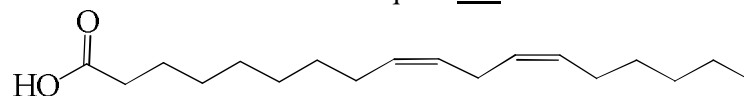


Acide 3,5,6-trihydroxy-7-octyl-5,6-dihydro-1-naphthalène carboxylique **199**

Des acides gras à l'instar de l'Acide palmitique **200**, l'Acide stéarique **201**, l'Acide oléique **202** et l'Acide linoléique **203**, avaient également été obtenus des graines de la plante (Hee, 2011).



Acide oléique **202**



Acide linoléique **203**

#### I.4.3.3.2. Activité biologique de quelques métabolites secondaires isolés du genre *V. paradoxa*

La plupart des composés polaires isolés de l'extrait au MeOH des graines dégraissées de *V. paradoxa* ont présenté des activités anti-radicalaires contre le DPPH, anti-inflammatoires, anti-tumorales, des activités inhibitrices de la mélanogénèse, et cytotoxique contre les cellules humaines *HL-60* (Toshihiro et *al.*, 2010 ; Zhang et *al.*, 2014).

Parmi ces composés, la Quercétine **8**, l'Acide protobassique **164**, la Catéchine **176**, l'Epicatechine **177**, le 22-Dihydrospinastérol-3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside **179**, l'Acide 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosylprotobassique **180**, le Mi-glycoside I **181**, le Paradoxoside C **182**, l'Acide 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-16 $\alpha$ -hydroxyprotobassique **183**, l'Acide 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosylbassique **184**, Paradoxoside E **185**, le Paradoxoside D **190**, l'Arbutine **192**, l'Isotachioside **193**, le (2*S*,4*S*)-2-*O*- $\beta$ -*D*-Glucopyranosylpentane-2,4-diol **194**, le (2*R*,4*S*)-2-*O*- $\beta$ -*D*-Glucopyranosylpentane-2,4-diol **195**, et la Rutine **196** ont présenté des activités inhibitrices de la mélanogénèse ; la Quercétine **8**, l'Acide gallique **73**, la Catéchine **176**, l'Epicatechine **177**, et la Rutine **196**, ont montré des activités antiradicalaires ; les activités anti-inflammatoires ont été enregistrées pour l'Acide 3-*O*-

$\beta$ -D-glucuronopyranosylprotobassique **180**, le Mi-glycoside I **181**, le Paradoxoside A **186**, le Paradoxoside B **187**, la Tiégheméline A **188**, l'Arginine C **189**, le Paradoxoside C **182**, le Paradoxoside D **190**, l'Acide 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylbassique **184** et l'Acide bassique **164** ; les composés **8**, **73**, **164**, **165**, **183–185**, **188**, et **189** ont montré des activités cytotoxiques contre les cellules humaines *HL-60* (Zhang et al., 2014). L'équipe de Toshihiro en 2010 a montré que le Lupéol cinnamate **87** isolé de l'extrait à l'AcOEt du beurre de karité, possède des propriétés anti-inflammatoire *in vivo*.

## **CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION**



Ce chapitre renferme les résultats de l'étude phytochimique des espèces de plantes mises en étude. Précisément nous présentons dans ce chapitre les résultats des extractions des différentes parties des plantes étudiées, du criblage phytochimique des extraits obtenus, l'isolement, la purification et la caractérisation des composés et enfin l'évaluation du potentiel biologique des différents extraits et composés isolés.

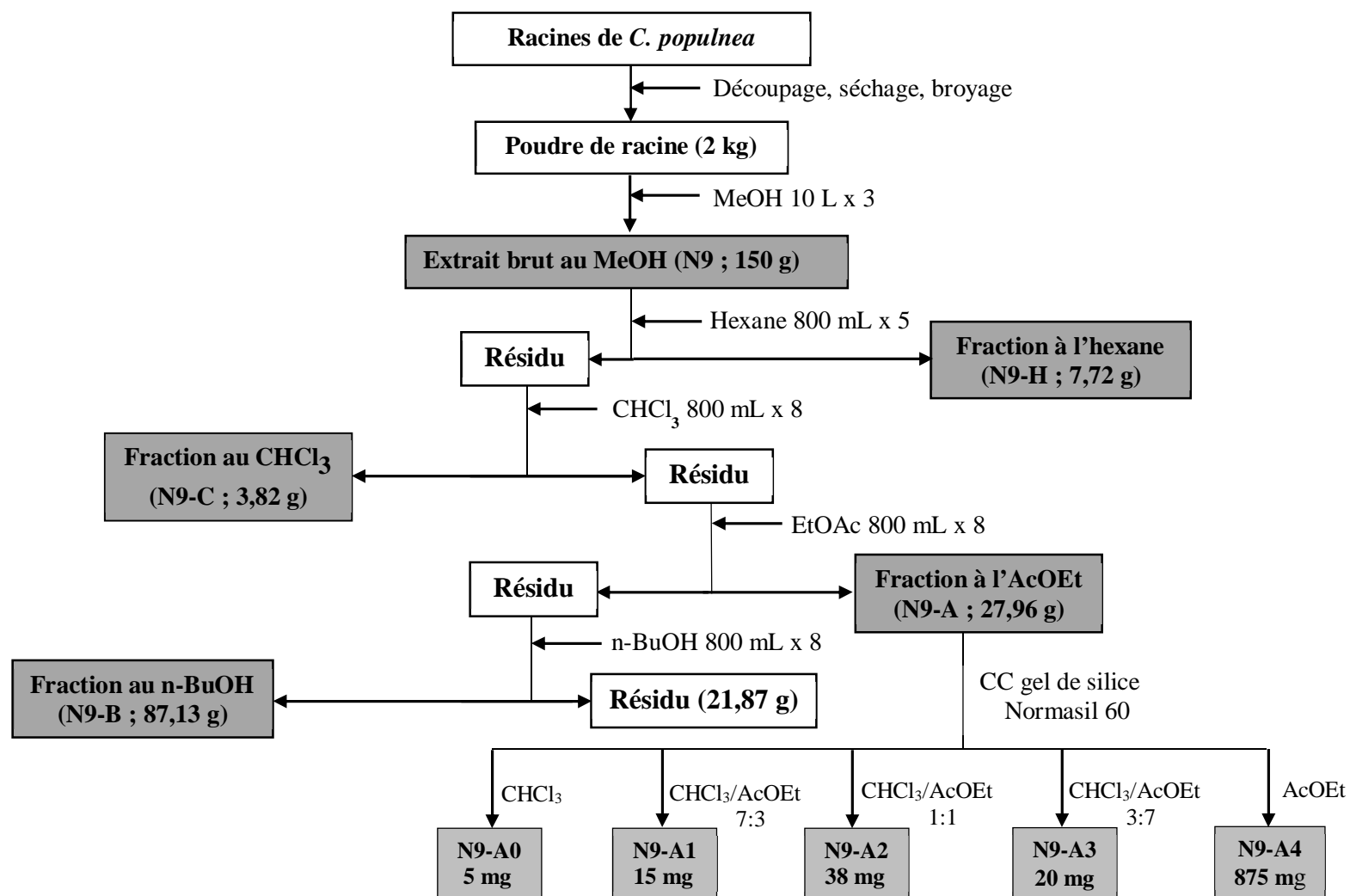
Les trois espèces *C. populnea* (Vitaceae), *G. aqualla* (Rubiaceae) et *V. paradoxa* (Sapotaceae) ont suscité notre attention d'une part pour leurs divers usages en médecine traditionnelle notamment dans le traitement du diabète et de certaines maladies microbiennes, et d'autre part, parce que ces espèces n'avaient jusqu'au début de nos travaux fait l'objet dans la littérature d'aucune étude phytochimique comme c'est le cas de *C. populnea* et *G. aqualla* ou alors de très peu d'études phytochimiques comme c'est le cas de *V. paradoxa*.

## **II.1. Extraction, criblage phytochimique et fractionnement des différents extraits**

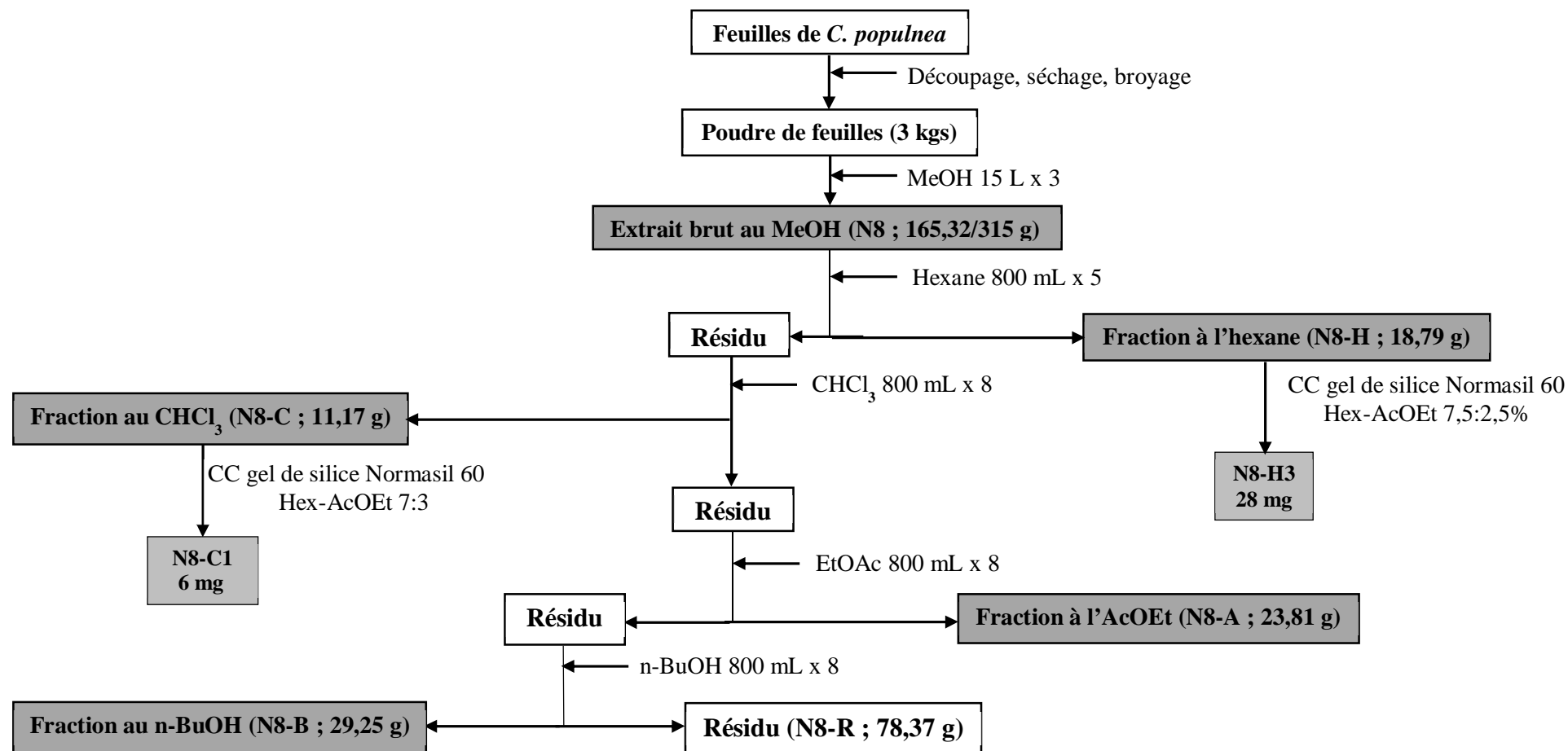
### **II.1.1. Extraction et fractionnement des extraits des différentes parties de *C. populnea***

Les racines, les feuilles, les tiges et les rhizomes de *C. populnea* ont été récoltés au sein du campus universitaire de Ngaoundéré, en septembre 2014. Au moyen des techniques chromatographiques ont été isolés : 6 composés de l'extrait à l'AcOEt de la poudre de racines, 6 composés de la poudre des feuilles (dont 3 de l'extrait à l'Hexane et 3 de celui au CHCl<sub>3</sub>) et 6 composés de la poudre des tiges dont 2 de l'extrait à l'Hex et 4 de l'extrait à l'AcOEt). Les protocoles utilisés sont illustrés par les schémas II.1, II.2 et II.3 ci-dessous.

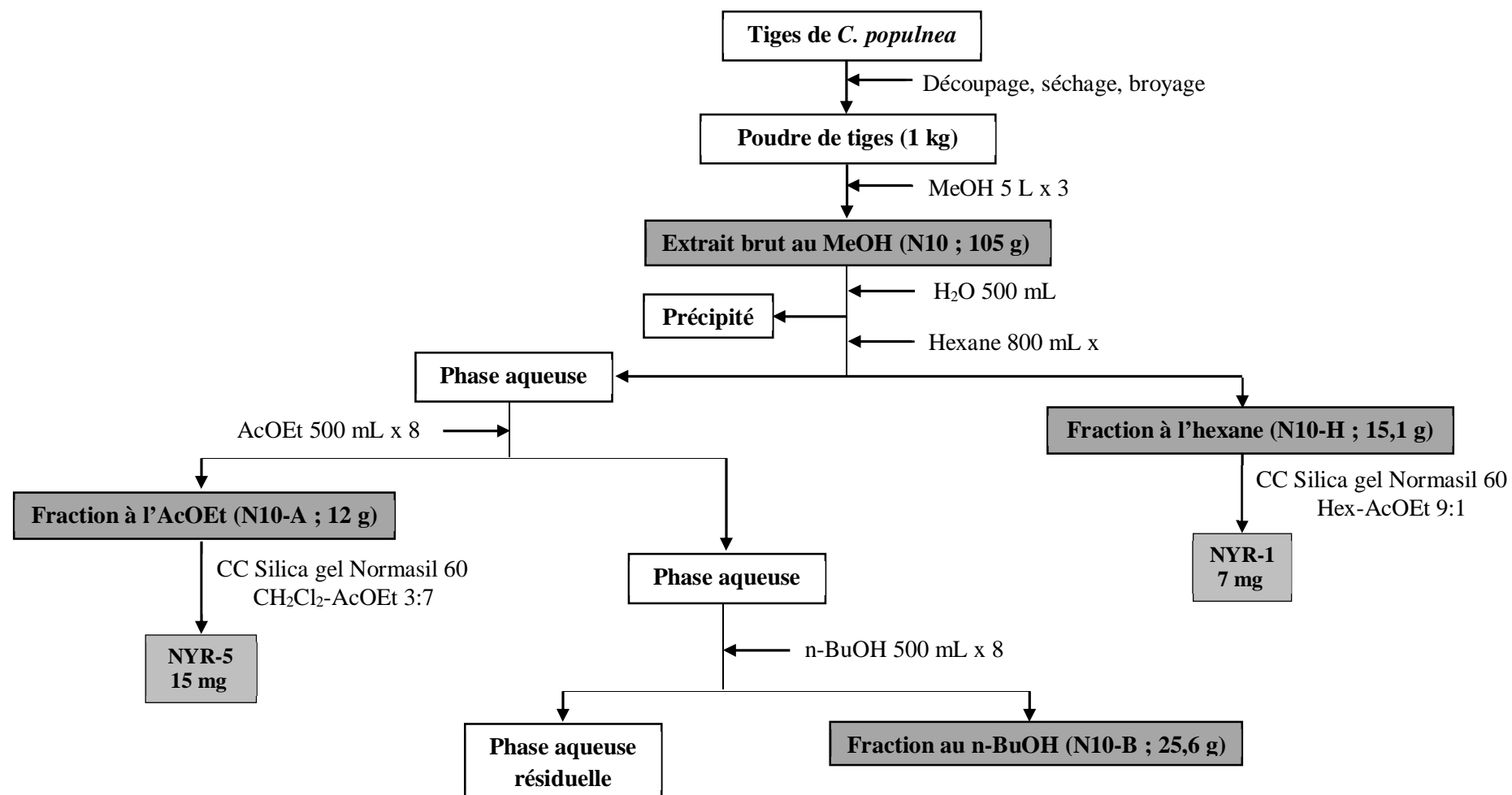
Le fractionnement de l'extrait brut au MeOH de la poudre de rhizomes, a conduit à l'isolement de deux composés qui avaient déjà été isolé des racines.



**Schéma II.1 :** Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des extraits des racines de *C. populnea*



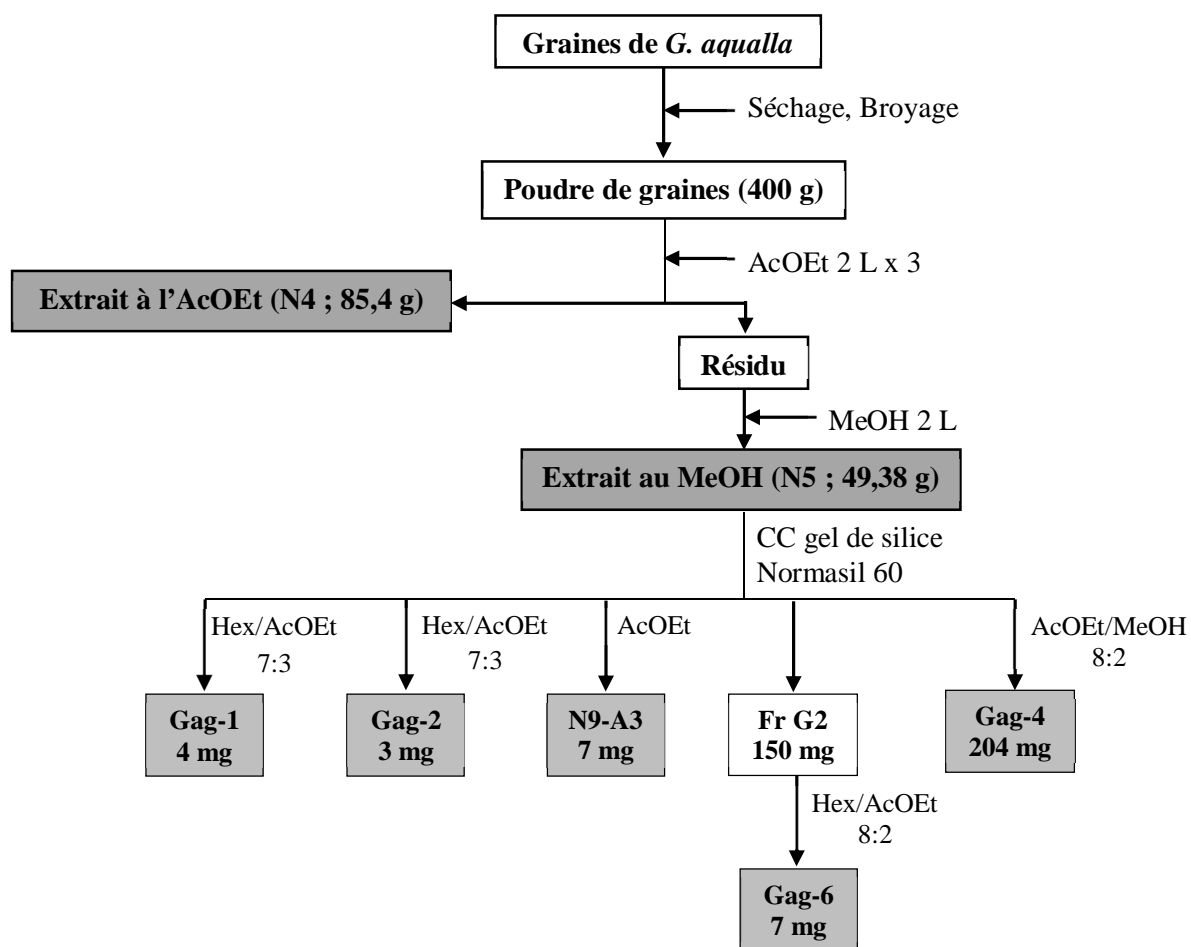
**Schéma II.2 :** Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des extraits des feuilles de *C. populnea*



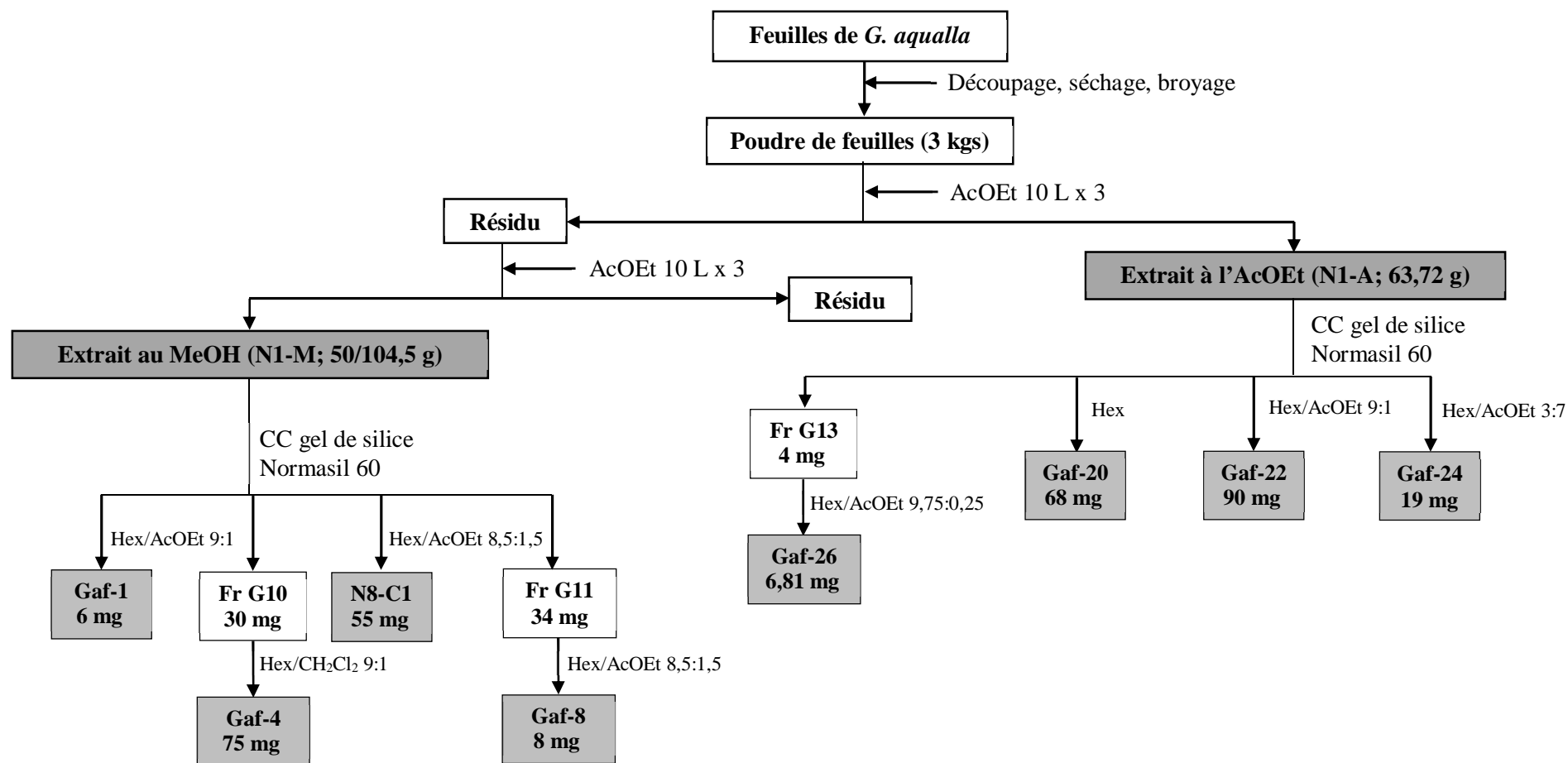
**Schéma II.3 :** Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des extraits des tiges de *C. populnea*

## II.1.2. Obtention et fractionnement des extraits des différentes parties de *G. aqualla*

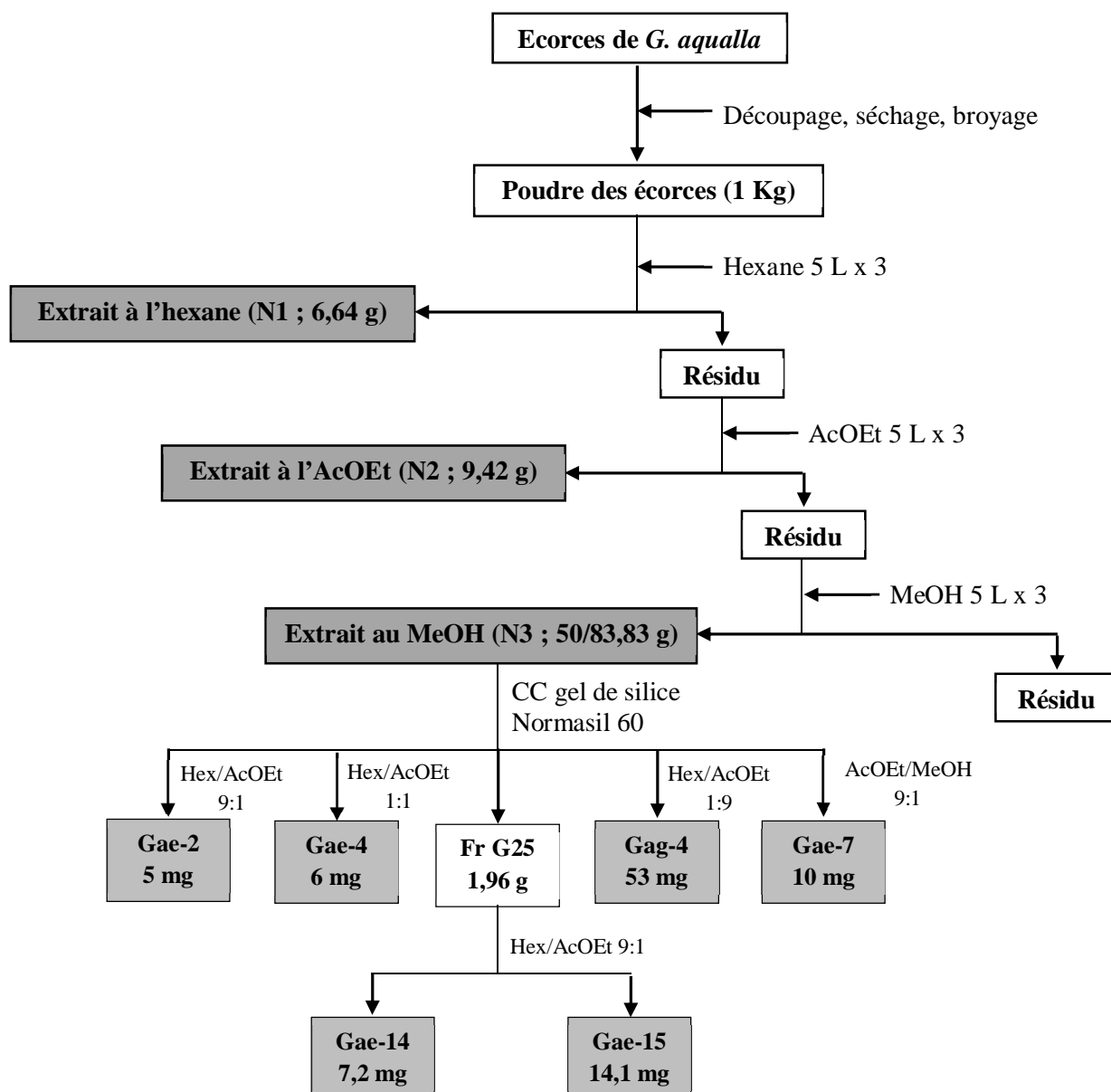
Les parties de *G. aqualla* ont été récoltées à Borongo dans l'arrondissement de Ngaoundéré 3<sup>e</sup> en Septembre 2014. Des différents extraits de poudres de feuilles, graines et écorces sèches, ont été isolés au moyen des techniques chromatographiques : 6 composés de l'extrait au MeOH des graines (Schéma II.4), 10 composés de l'extrait à l'AcOEt et 5 composés de l'extraits au MeOH des feuilles (Schéma II.5), et 6 composés de l'extrait au MeOH des écorces (Schéma II.6).



**Schéma II.4 :** Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des graines de *G. aqualla*



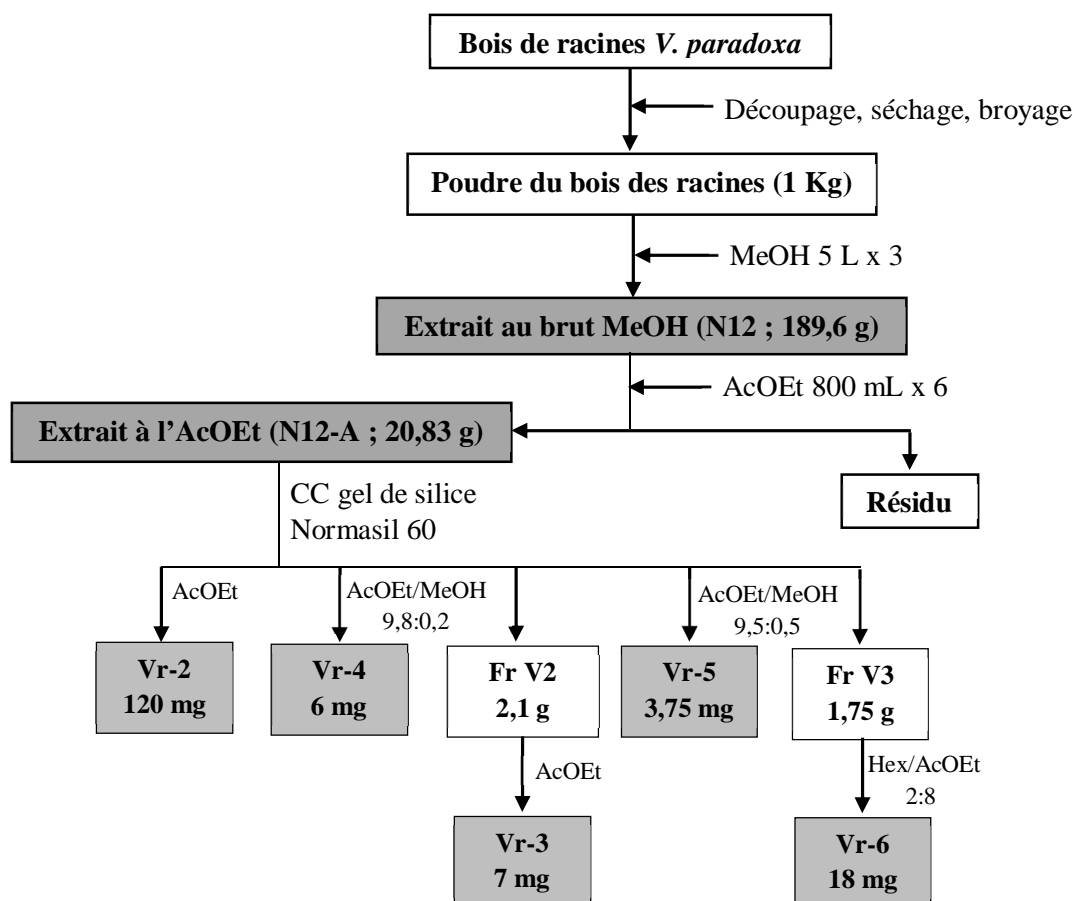
**Schéma II.5 :** Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des extraits des feuilles de *G. aqualla*



**Schéma II.6 :** Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement des écorces de *G. aqualla*

### II.1.3. Obtention et fractionnement de l'extrait à l'AcOEt du bois des racines de *V. paradoxa*

Le bois de racines de *V. paradoxa* a été récolté à Dang dans l'arrondissement de Ngaoundéré 3<sup>e</sup> en Avril 2016. De l'extrait à l'AcOEt de la poudre de bois de ces racines, 5 composés ont été isolés au moyen des techniques de chromatographie. Le protocole utilisé est illustré par le schéma II.7 ci-dessous.



**Schéma II.7 :** Protocole simplifié d'extraction et de fractionnement du bois de racines de *V. paradoxa*

#### II.1.4. Criblage phytochimique des différents extraits

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitations et/ou de colorations. Ces dernières permettent de mettre en évidence la présence ou non de métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, ...etc.) dans une plante ou un extrait de plante.

Les résultats de ce criblage (Tableau II.1) ont révélé la présence de toutes les classes de métabolites recherchées en fonction des extraits et des parties des plantes étudiées. On note cependant une absence d'alcaloïdes dans toutes les parties de *G. aqualla*, ainsi que dans les feuilles, tiges, et rhizomes de *C. populnea*. Les composés phénoliques étaient présents dans tous les extraits à l'exception des extraits à l'hexane des tiges et racines de *C. populnea* ainsi que celui des écorces de *G. aqualla*. De même, seuls les extraits à l'AcOEt des feuilles de *C. populnea* et à l'AcOEt des écorces de *G. aqualla* ne renfermaient pas de triterpènes et des stérols.

La présence de ces familles de composés dans nos extraits et donc dans les plantes étudiées est très instructive, car elle justifie l'utilisation de ces dernières en médecine traditionnelle.



**Tableau II.1 :** Résultats du criblage phytochimique

| Echantillons       |                  |                   | Familles de composés |             |                      |           |                       |                        |
|--------------------|------------------|-------------------|----------------------|-------------|----------------------|-----------|-----------------------|------------------------|
| Plante             | Organe           | Extrait           | Alcaloïdes           | Flavonoïdes | Polyphénols          | Saponines | Tanins                | Triterpènes et Stérols |
|                    |                  |                   | R. Mayer             | R. Shinoda  | FeCl <sub>3</sub> 3% | IM        | (AcO) <sub>2</sub> Pb | R. Libermann Burchard  |
| <i>C. populnea</i> | Feuilles         | Hexane            | -                    | -           | +                    | -         | +                     | +                      |
|                    |                  | CHCl <sub>3</sub> | -                    | -           | +                    | -         | +                     | +                      |
|                    |                  | AcOEt             | -                    | +           | +                    | +         | +                     | -                      |
|                    |                  | n-Butanol         | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | Résidu            | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | MeOH brut         | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    | Tiges            | Hexane            | -                    | -           | -                    | -         | -                     | +                      |
|                    |                  | AcOEt             | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | n-Butanol         | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | Résidu            | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | MeOH brut         | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    | Racines          | Hexane            | -                    | -           | -                    | -         | -                     | +                      |
|                    |                  | CHCl <sub>3</sub> | -                    | -           | +                    | -         | +                     | +                      |
|                    |                  | AcOEt             | -                    | +           | +                    | -         | +                     | +                      |
|                    |                  | n-Butanol         | -                    | -           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | Résidu            | +                    | -           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | MeOH brut         | +                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    | Rhizomes         | MeOH brut         | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
| <i>G. aqualla</i>  | Graines          | AcOEt             | nd                   |             |                      |           |                       |                        |
|                    |                  | MeOH              | -                    | -           | +                    | -         | +                     | +                      |
|                    | Feuilles         | AcOEt             | -                    | +           | +                    | -         | +                     | +                      |
|                    |                  | MeOH              | -                    | +           | +                    | -         | +                     | +                      |
|                    | Ecorces du tronc | Hexane            | -                    | -           | -                    | -         | -                     | +                      |
|                    |                  | AcOEt             | -                    | +           | +                    | -         | +                     | -                      |
|                    |                  | MeOH              | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
| <i>V. paradoxa</i> | Bois de racines  | AcOEt             | -                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | Résidu            | +                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |
|                    |                  | MeOH brut         | +                    | +           | +                    | +         | +                     | +                      |

## II.2. Elucidation structurale des composés isolés

Au terme du processus d'isolement et de purification, 29 composés purs obtenus ont été caractérisés au moyen de la RMN 1 et 2D, de la Spectrométrie de Masse (SM) et par comparaison avec des données spectrales de la littérature pour les composés connus. Ces composés appartiennent à plusieurs classes de métabolites secondaires : les acétogénines (alcane, alcène, alcool, esters d'acide gras), les cérobroside, les chlorophylles, les composés phénoliques (acides phénoliques, aldéhyde phénolique, flavonoïdes, isocoumarine, stilbène), les glucosides stéroïdiques, les stéroïdes, les sucres et les triterpènes pentacycliques.

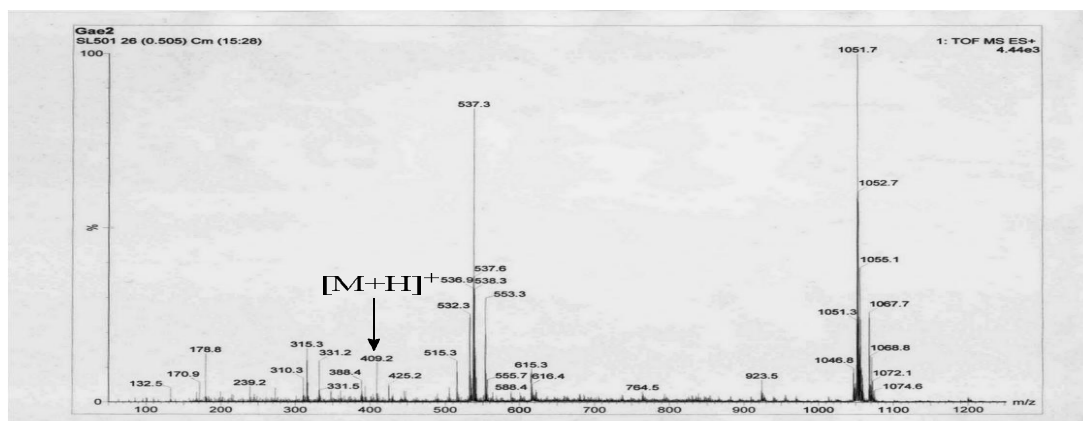
## II.2.1. Les acétogénines

Un alcane linéaire (Gae-2), un alcène linéaire nouveau (Gaf-20), cinq alcools (Gae-4, Gae-15, Gaf-1, Gaf-22 et Gaf-26) et un dérivé nouveau d'esters d'acides gras (Gaf-20) ont été obtenus des écorces et des feuilles de *G. aqualla* au cours de cette étude.

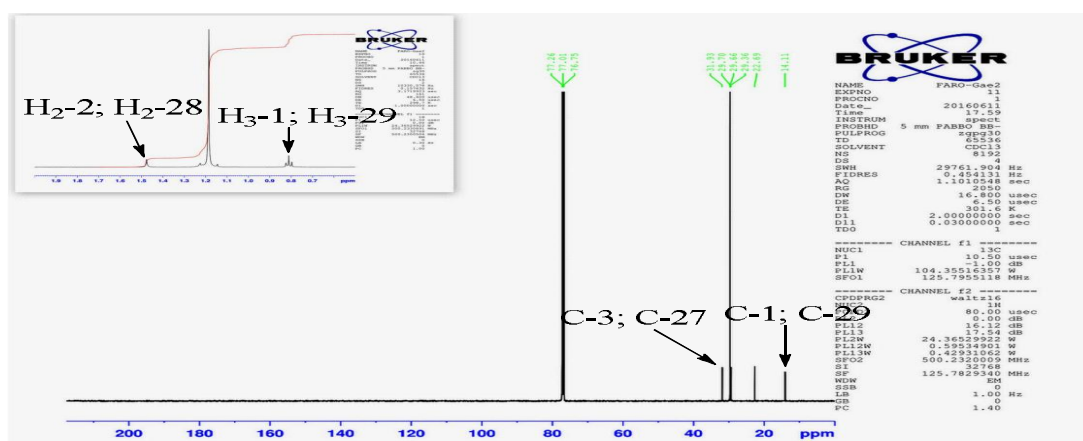
### II.2.1.1. Identification du composé Gae-2

Gae-2 a été obtenu sous forme de poudre blanche dans l'hexane et est soluble dans le  $\text{CHCl}_3$ . Sa nature aliphatique (alcane) a été établie par analyse de ses spectres de masse, et de RMN  $^1\text{H}$  et de RMN  $^{13}\text{C}$ .

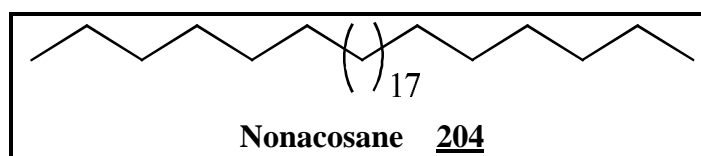
Ce composé a été identifié au Nonacosane du fait de la présence sur son spectre de masse TOF-ESI-MS+ du pic de l'ion *quasi*-moléculaire  $[\text{M}+\text{H}]^+$  à  $m/z$  409,3 ; des intégrations des différents protons, ainsi que par comparaison de ses données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  à celles de la littérature (Tripathi et al., 2006).



**Figure II.1 :** Spectre de masse TOF-ESI-MS+ de Gae-2



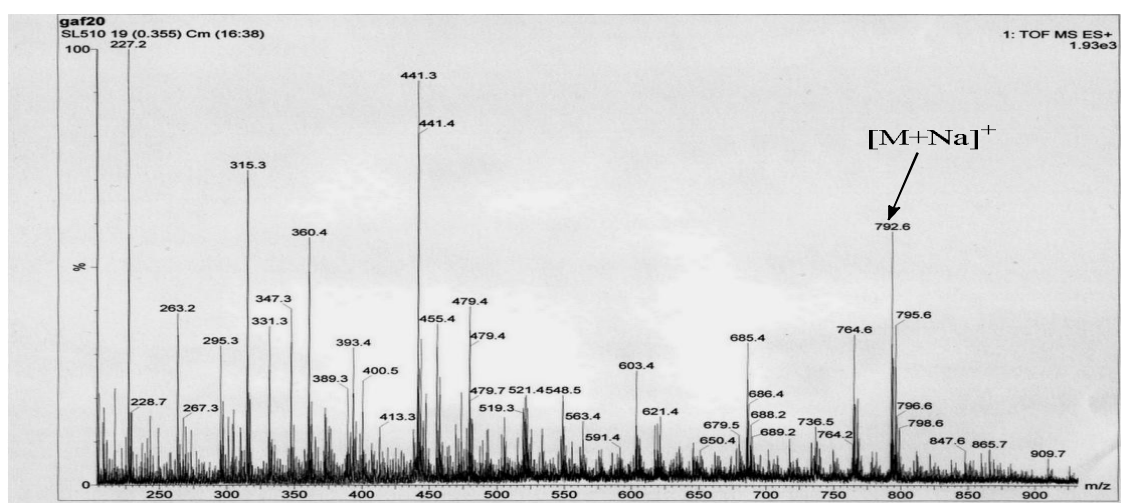
**Figure II.2 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) et  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Gae-2



### II.2.1.2. Elucidation structurale du composé Gaf-20

Le composé Gaf-20 a été obtenu dans l'hexane sous forme de poudre amorphe blanche scintillante, soluble dans le  $\text{CHCl}_3$ .

Son spectre de masse TOF-MS-ESI (Figure II.3) enregistré en mode positif présente le pic d'un ion *pseudo*-moléculaire à  $m/z$  792,6 pour  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  permettant après analyse de ses données RMN 1 et 2D, de déduire pour ce dernier la formule moléculaire  $\text{C}_{55}\text{H}_{110}$ , soit une insaturation.

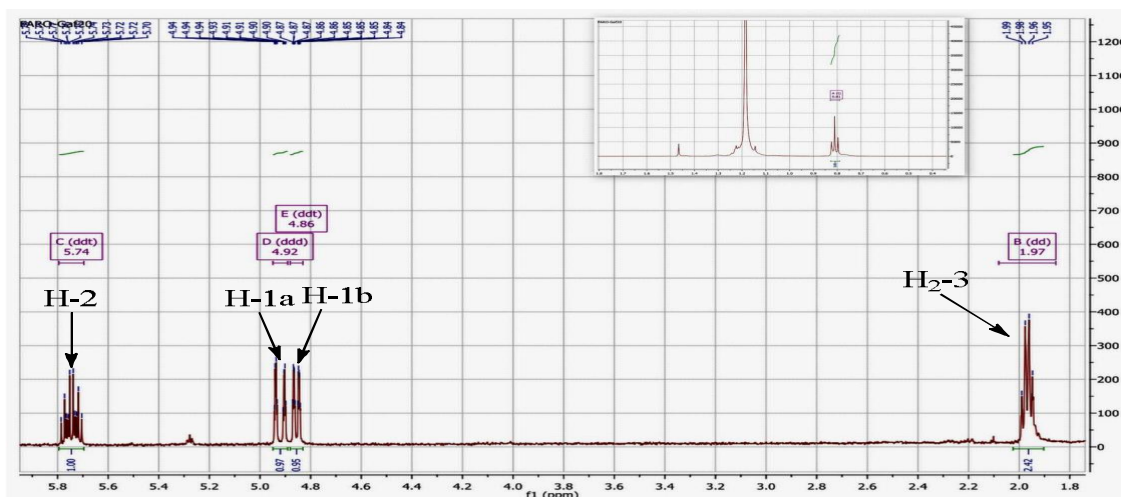


**Figure II.3 :** Spectre de masse TOF-MS-ESI+ de Gaf-20

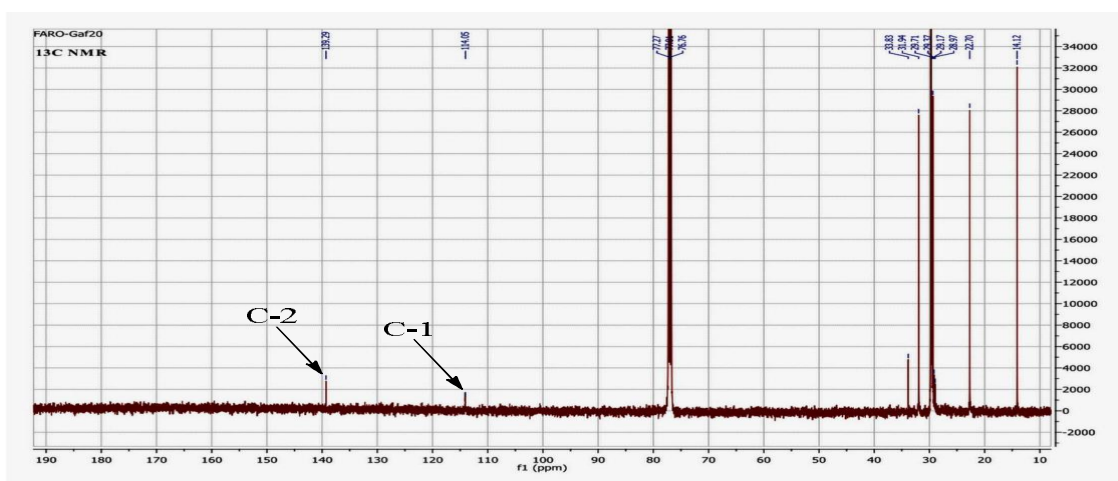
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.4) du composé Gaf-20 présente des pics caractéristiques d'un alcène linéaire. En effet, ce spectre montre le signal d'un méthyne oléfinique à  $\delta_{\text{H}}$  5,74 (1H ;  $m$  ;  $J = 16,9$  ; 10,2 ; 6,7 Hz) et des signaux d'un méthylène oléfinique à  $\delta_{\text{H}}$  4,92 (1H ;  $m$  ;  $J = 17,1$  ; 3,6 ; 1,6 Hz) et 4,86 (1H ;  $m$  ;  $J = 10,2$  ; 2,3 ; 1,2 Hz). Le spectre présente également un signal de deux protons sous forme de doublet dédoublé à  $\delta_{\text{H}}$  1,97 (2H ;  $dd$  ;  $J = 16,9$  ; 10,2 ; 6,7 Hz). On observe en outre sur ce spectre, les signaux caractéristiques d'une longue chaîne aliphatique dont les protons méthyléniques  $(\text{CH}_2)_n$  résonnent à  $\delta_{\text{H}}$  1,20–1,30 sous forme de singulet large, et le méthyle terminal à 0,81 (3H,  $t$ ,  $J = 7,0$  Hz).

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.5) du composé Gaf-20 confirme que ce dernier est un alcène linéaire par la présence des signaux de deux carbones oléfiniques à  $\delta_{\text{C}}$  139,3 et 114,1, des signaux d'une série de carbones méthyléniques entre  $\delta_{\text{C}}$  22,8–33,9 et du signal d'un méthyle terminal à  $\delta_{\text{C}}$  14,2.

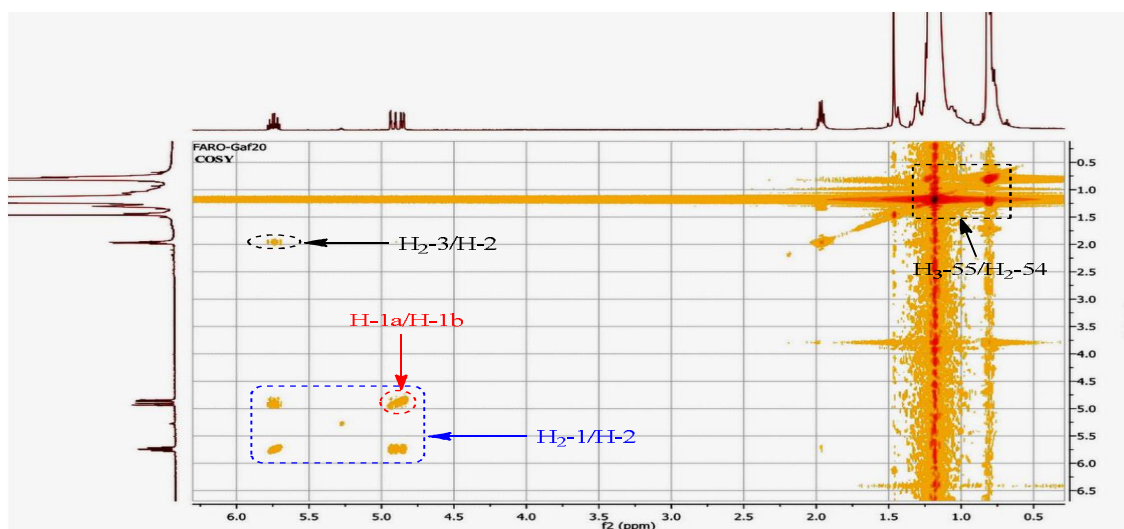
Le spectre COSY (Figure II.6) de Gaf-20 présente plusieurs corrélations parmi lesquelles les plus importantes sont les corrélations entre les deux protons du méthylène oléfinique à  $\delta_{\text{H}}$  4,92 (1H ;  $m$  ;  $J = 17,1$  ; 3,6 ; 1,6 Hz) et 4,86 (1H ;  $m$  ;  $J = 10,2$  ; 2,3 ; 1,2 Hz) ; celles entre ces deux protons et le proton du méthyne oléfinique à  $\delta_{\text{H}}$  5,74 (1H ;  $m$  ;  $J = 16,9$  ; 10,2 ; 6,7 Hz), ce dernier corrélant à son tour avec son méthylène adjacent à  $\delta_{\text{H}}$  1,97 ( $m$ ).



**Figure II.4 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) élargi de Gaf-20



**Figure II.5 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) élargi de Gaf-20

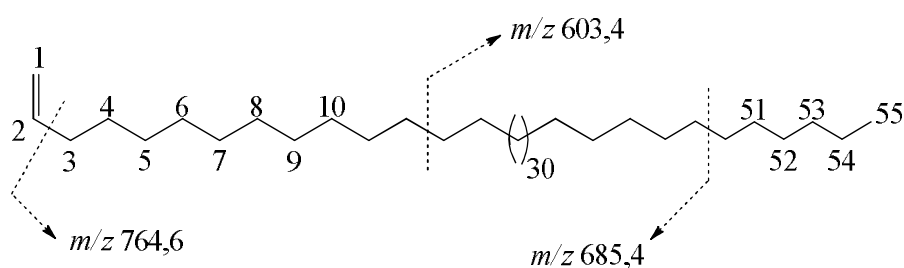
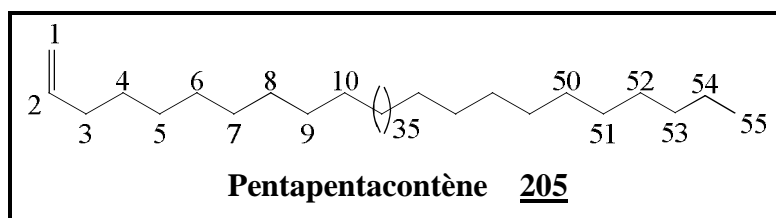


**Figure II.6 :** Spectre COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) élargi de Gaf-20

La longueur de la chaîne aliphatique a été déterminée par l'analyse du spectre TOF-MS-ESI+ de ce composé. Elle a été déduite de la présence de l'ion fragment caractéristique  $[(M+Na)-$

$C_2H_4]^+$  à  $m/z$  764,1 correspondant au clivage en  $\alpha$  de la double liaison qui aboutit à la perte de l'éthylène (Schéma II.8).

Au vu de tout ce qui précède, le composé Gaf-20 s'est vu attribué la structure du Pentapentacontène. A la limite de nos connaissances, c'est la première fois que ce composé est isolé de source naturelle.



**Schéma II.8 :** Fragmentation proposée de Gaf-20 en TOF-ESI-MS+

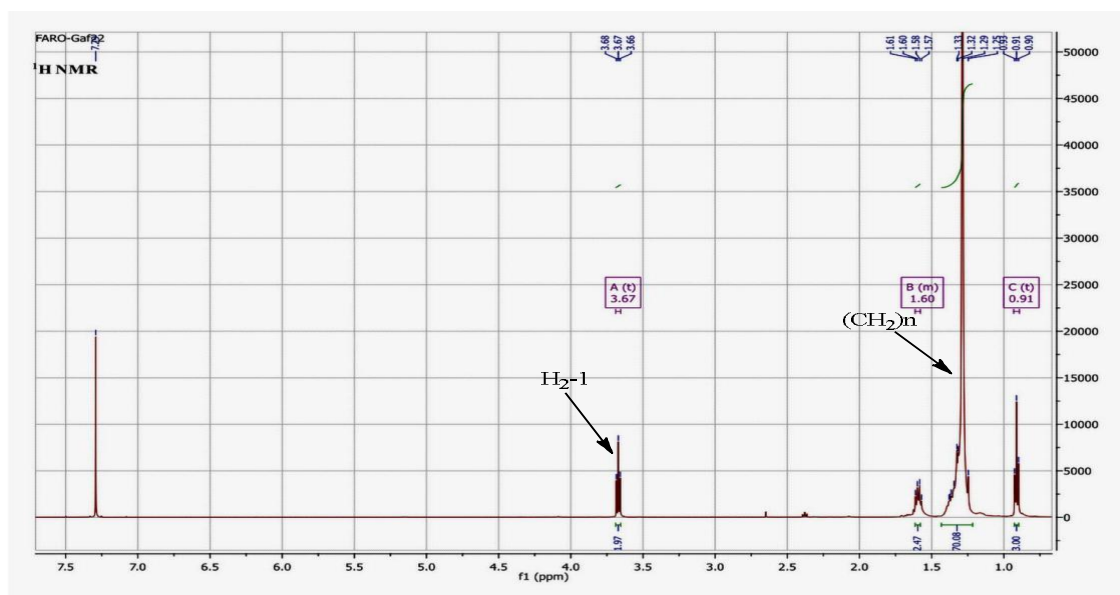
**Tableau II.2 :** Données de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) et  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) de Gaf-20

| N°   | $\delta_H$ (Mult., J(Hz))              | $\delta_C$ | COSY          |
|------|--|------------|---------------|
| 1    | 4,86 ( <i>ddt</i> ; 10,2 ; 2,3 ; 1,2)  | 114,1      | H-1b ; H-2    |
|      | 4,92 ( <i>ddd</i> ; 17,1 ; 3,6 ; 1,6)  |            | H-1a ; H-2    |
| 2    | 5,74 ( <i>ddt</i> , 16,9 ; 10,2 ; 6,7) | 139,3      | 2H-1 ; 2H-3   |
| 3    | 1,97 ( <i>m</i> )                      | 33,8       | H-2 ; 2H-4    |
| 4-52 |  | 28,9-29,7  | /             |
| 53   | 1,21-1,30 ( <i>m</i> )                 | 31,9       | 2H-26         |
| 54   |  | 22,7       | 2H-26 ; 3H-28 |
| 55   | 0,81 ( <i>t</i> ; 7,0)                 | 14,1       | 2H-27         |

### II.2.1.3. Identification des composés Gae-15, Gaf-1, Gaf-26, Gae-4 et Gaf-22

Cinq alcools indexés Gaf-1, Gaf-22, Gaf-26, Gae-4 et Gae-15 ont été obtenus sous forme de poudre blanche des feuilles (pour les composés Gaf) et des écorces (pour ceux Gae) de *G. aqualla*, et sont tous solubles dans le  $\text{CHCl}_3$ .

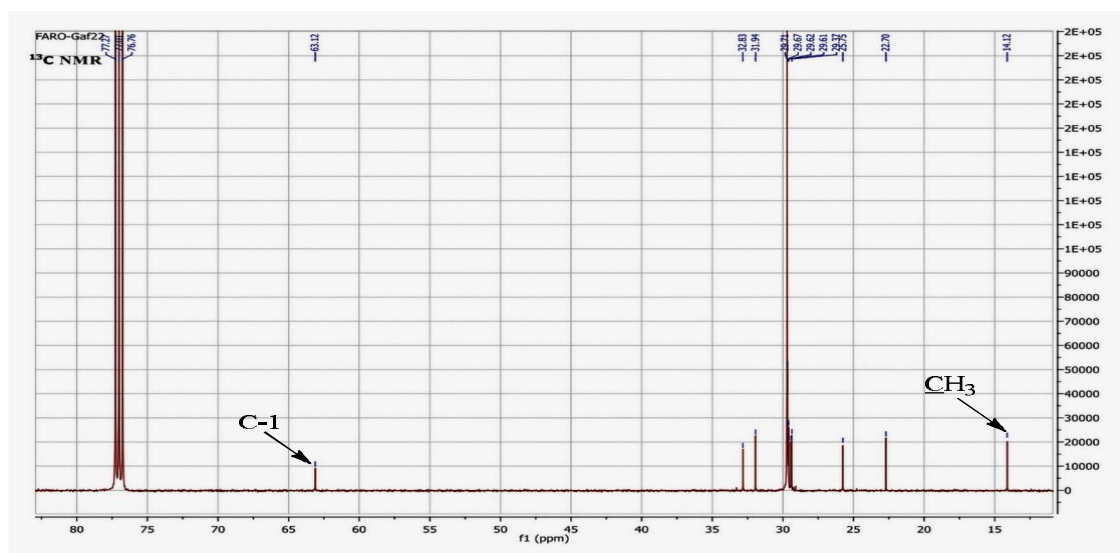
L'analyse des données fournies par les spectres RMN 1 et 2D de chacun de ces composés montre qu'ils sont tous des alcools aliphatiques primaires non ramifiés. En effet, nous observons sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  de ces composés, des signaux correspondant à quatre groupes de protons : dans les champs forts, on observe en effet un signal sous forme de triplet intégrant trois protons à  $\delta_{\text{H}}$  0,86-0,91 (3H,  $J = 6-8$  Hz) correspondant au méthyle terminal ; un large singulet de protons à  $\delta_{\text{H}}$  1,29-1,33 représentant la succession de groupes méthyléniques linéaires  $-(\text{CH}_2)_n-$ . Autour de  $\delta_{\text{H}}$  3,5-4,5 (2H,  $t$ ,  $J = 6-8$  Hz), on observe un triplet attribuable au méthylène en position  $\alpha$  de la fonction alcool  $(-\text{CH}_2-\text{OH})$  ; un autre signal sous forme de multiplet de 2 protons autour de  $\delta_{\text{H}}$  1,5-1,6 attribuable au méthylène en position  $\beta$  de la fonction alcool  $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH})$  est également visible sur ces spectres. Comme exemple nous présentons sur la figure II.7 ci-dessous le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé Gaf-22.



**Figure II.7 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Gaf-22

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT de ces composés révèlent les signaux d'un méthyle terminale autour de  $\delta_{\text{C}}$  13,8-14,1 ; un oxyméthylène autour de  $\delta_{\text{C}}$  63–65, les autres méthylènes apparaissant entre  $\delta_{\text{C}}$  22-33. Tous les signaux des différents protons et carbones ont été attribués par l'entremise de l'analyse des spectres COSY et HSQC.

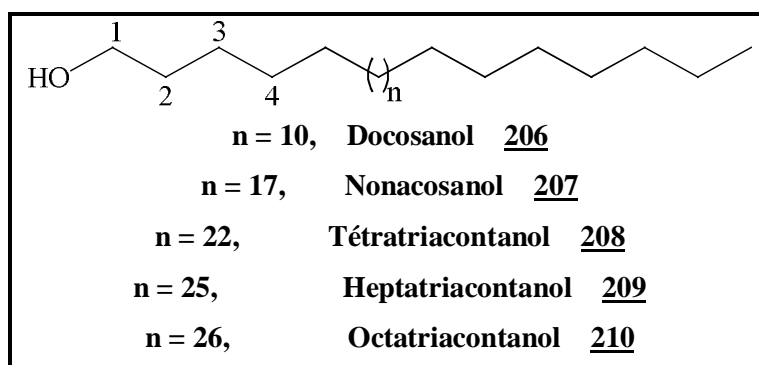




**Figure II.8 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de Gaf-22

Compte tenu du fait que les données de RMN 1 et 2D de ces composés étaient *quasi* identiques, l'identification de chacun d'entre eux a été rendue possible grâce précisément aux intégrations des amas de protons méthyléniques apparaissant entre  $\delta_{\text{H}}$  1,20–1,33 ; seule différence existante au niveau de leurs spectres RMN  $^1\text{H}$ . La confirmation a par la suite été apportée par les spectres de masse TOF-MS-ESI+ de chacun de ces composés.

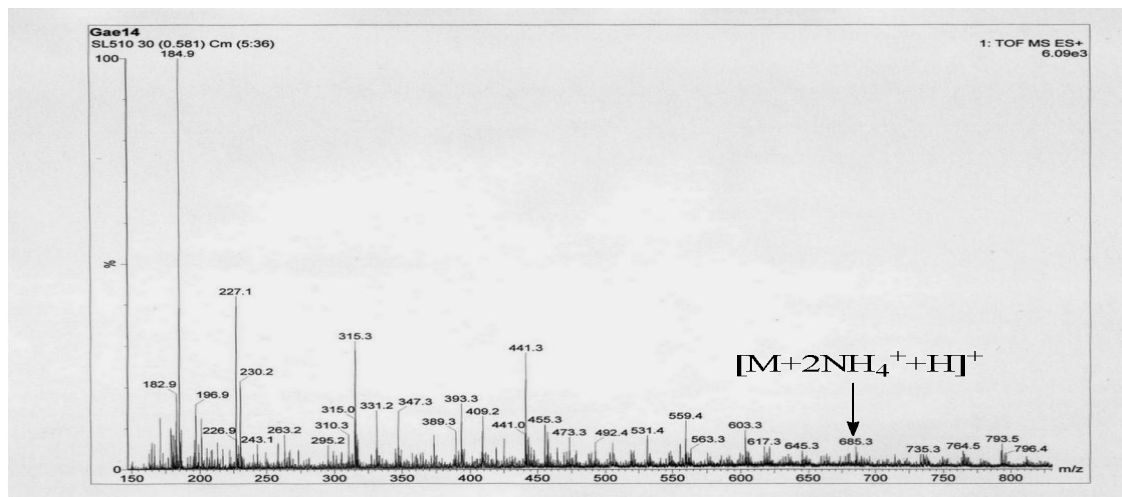
A la lumière donc de tout ce qui précède, les composés Gae-15, Gaf-1, Gaf-26, Gae-4 et Gaf-22 ont respectivement été identifiés au Docosanol **206**, Nonacosanol **207**, Tétratriacontanol **208**, Heptatriacontanol **209** et à l'Octatriacontanol **210**.





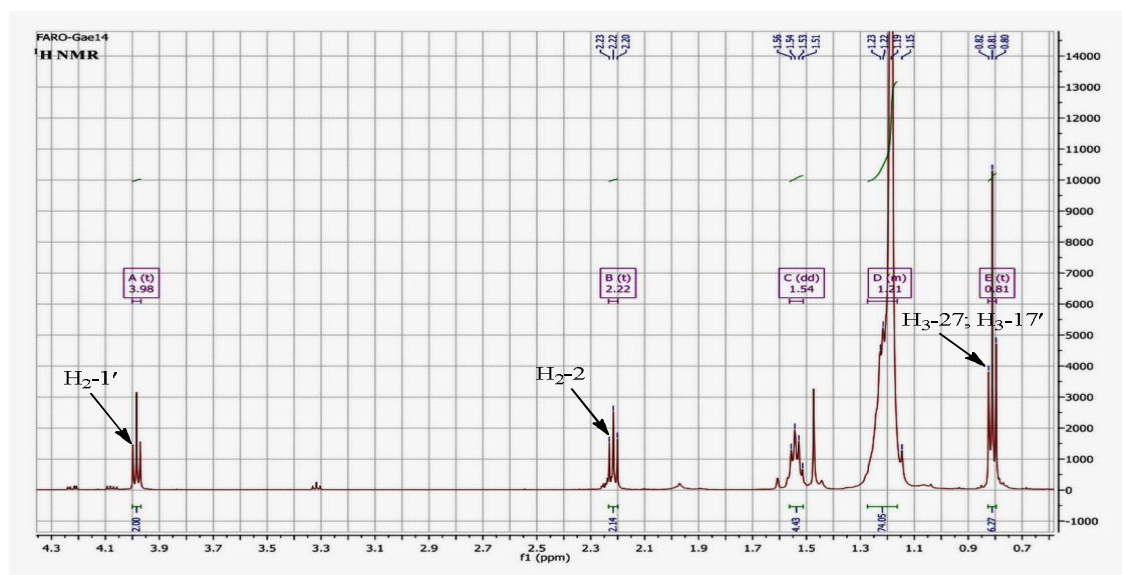
### II.2.1.4. Elucidation structurale du composé Gae-14

Le composé indexé Gae-14 est une poudre blanche obtenue dans le mélange Hex/AcOEt (6,5 : 3,5). Son spectre de masse (Figure II.9) réalisé en électro-nébulisation en mode positif (ESI+) donne un pic à  $m/z = 685,3$  correspondant à l'ion *pseudo*-moléculaire  $[M+2NH_4^++H]^+$  qui est en conformité avec la formule moléculaire  $C_{44}H_{88}O_2$  à lui attribuée.



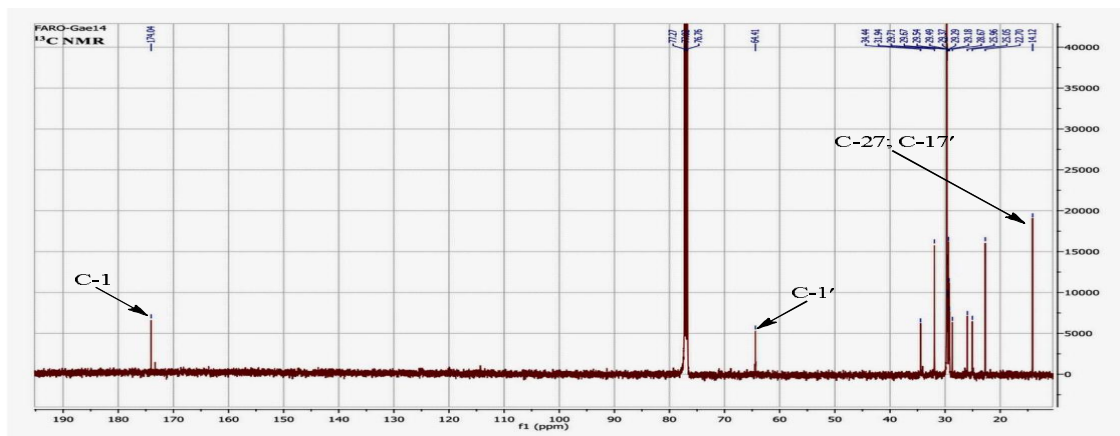
**Figure II.9:** Spectre de masse TOF-MS-ESI+ de Gae-14

Son spectre de RMN  $^1H$  (Figure II.10) présente des signaux d'un ester aliphatique. On peut ainsi remarquer la présence d'un triplet à  $\delta_H$  4,00 (2H, *t*,  $J = 6,7$  Hz) caractérisant les protons d'un groupe  $CH_2$  lié à un groupement ester ( $-CH_2OOC-$ ). A  $\delta_H$  2,22 on a un triplet ( $J = 7,5$  Hz) de deux protons attribuable à un méthylène lié à un groupement carbonyle ( $-CH_2COO-$ ). Des multiplets entre  $\delta_H$  1,20 et 1,61 suggèrent la présence d'une longue chaîne carbonée alors que le signal à  $\delta_H$  0,81 (6H, *t*,  $J = 7,0$  Hz) révèle la présence de deux groupements méthyles en bout de chaîne.



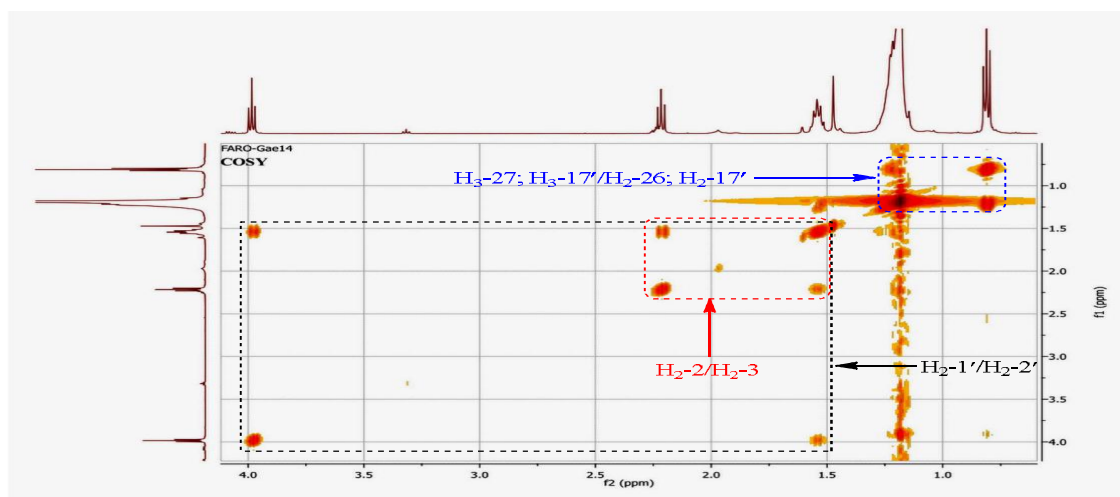
**Figure II.10 :** Spectre RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) de Gae-14

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.11) de Gae-14 présente également des signaux de carbones caractéristiques d'un ester aliphatique avec le signal d'une fonction ester à  $\delta_{\text{C}}$  174,0 ; le signal d'un oxyméthylène à  $\delta_{\text{C}}$  64,3 ; ainsi que le signal de deux méthyles terminaux à  $\delta_{\text{C}}$  14,1. Les autres groupements méthylènes résonnent entre  $\delta_{\text{C}}$  22,7-31,9.



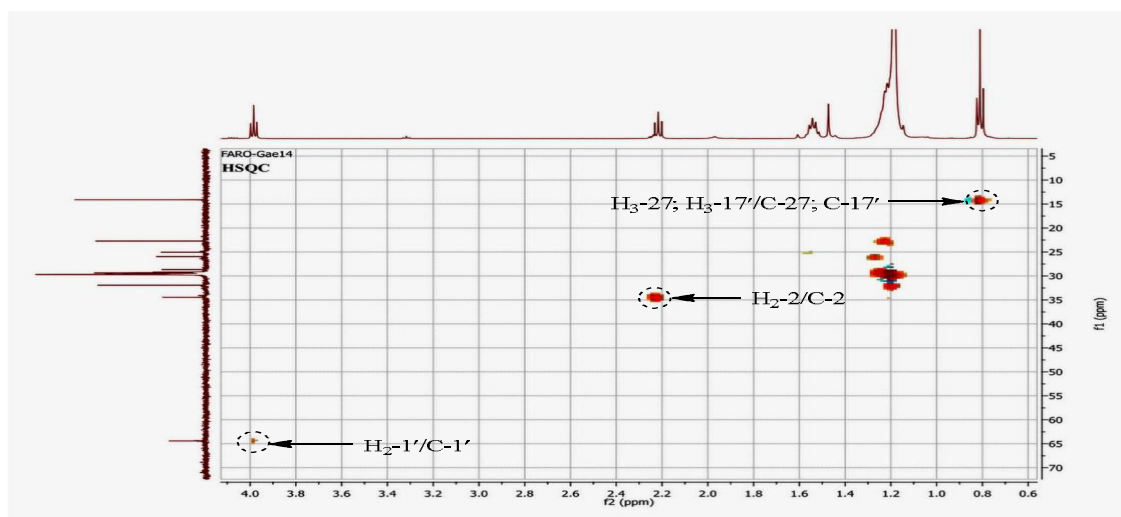
**Figure II.11 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de Gae-14

Le spectre COSY (Figure II.12) de Gae-14 révèle un seul système de spin dû à la longue chaîne aliphatique. Ainsi, nous pouvons apercevoir sur ce spectre la corrélation entre les méthyles terminaux et les protons méthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  1,20 (*m*) qui à leur tour montrent des corrélations avec ceux à  $\delta_{\text{C}}$  1,54 (4H, *m*). Sont également visibles sur ce spectre, les corrélations entre les protons des méthylènes à 1,54 (4H, *m*) et ceux à  $\delta_{\text{H}}$  2,22 (2H, *m*) et à  $\delta_{\text{C}}$  4,00 (2H, *t*,  $J = 6,7$  Hz).



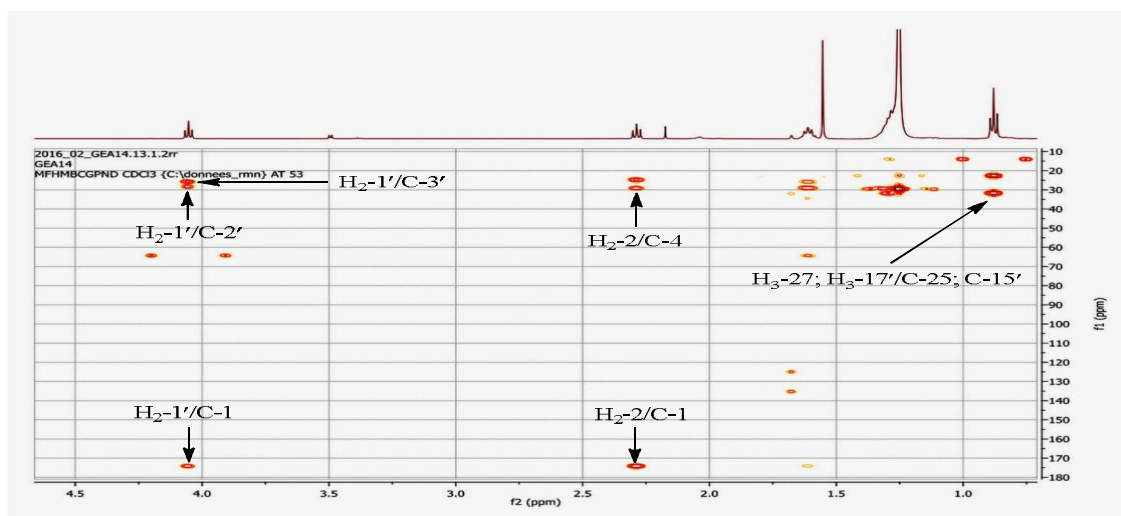
**Figure II.12 :** Spectre COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Gae-14

L'analyse de son spectre HSQC (Figure II.13) a permis d'assigner sans ambiguïté aux protons leurs carbones correspondants (Tableau II.3).



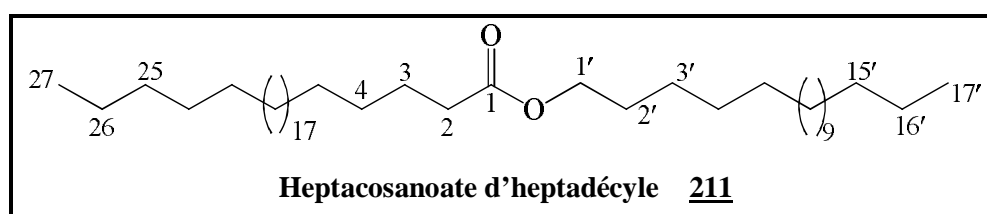
**Figure II.13 :** Spectre HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de Gae-14

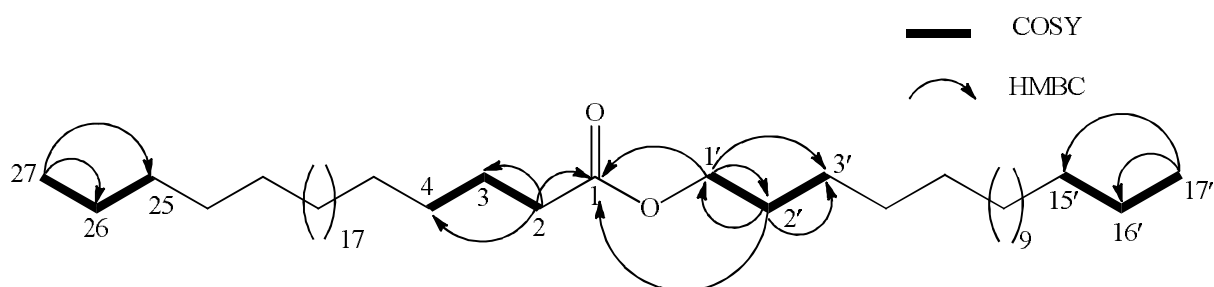
Le spectre HMBC (Figure II.14) présente quelques corrélations importantes parmi lesquelles les corrélations entre les protons méthyléniques à  $\delta_H$  2,22 ( $t$  ; 7,5 Hz) et les carbones à  $\delta_C$  25,1 ; 29,7 et 174,0 ; et les corrélations entre les protons oxyméthyléniques à  $\delta_H$  4,00 ( $t$  ; 6,7 Hz) et les carbones à  $\delta_C$  174,0 ; 28,7 et 26,0 (Schéma II.9).



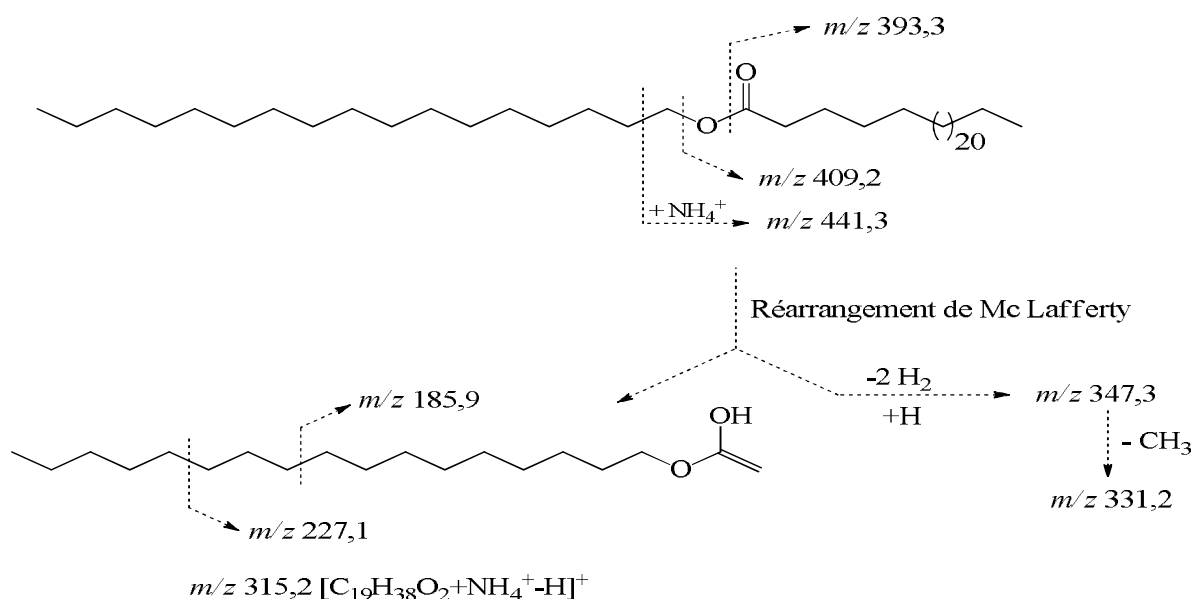
**Figure II.14 :** Spectre HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de Gae-14

Toutes ces données spectrales nous ont permis d'identifier le composé Gae-14 à l'heptacosanoate d'heptadécyle **211** ; Composé isolé ici pour la première fois du règne végétale. Cette structure est supportée par la fragmentation proposée au schéma II.10.





**Schéma II.9 :** Importantes corrélations COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) et HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de Gae-14



**Schéma II.10 :** Fragmentation proposée pour Gae-14

**Tableau II.3 :** Données de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de Gae-14

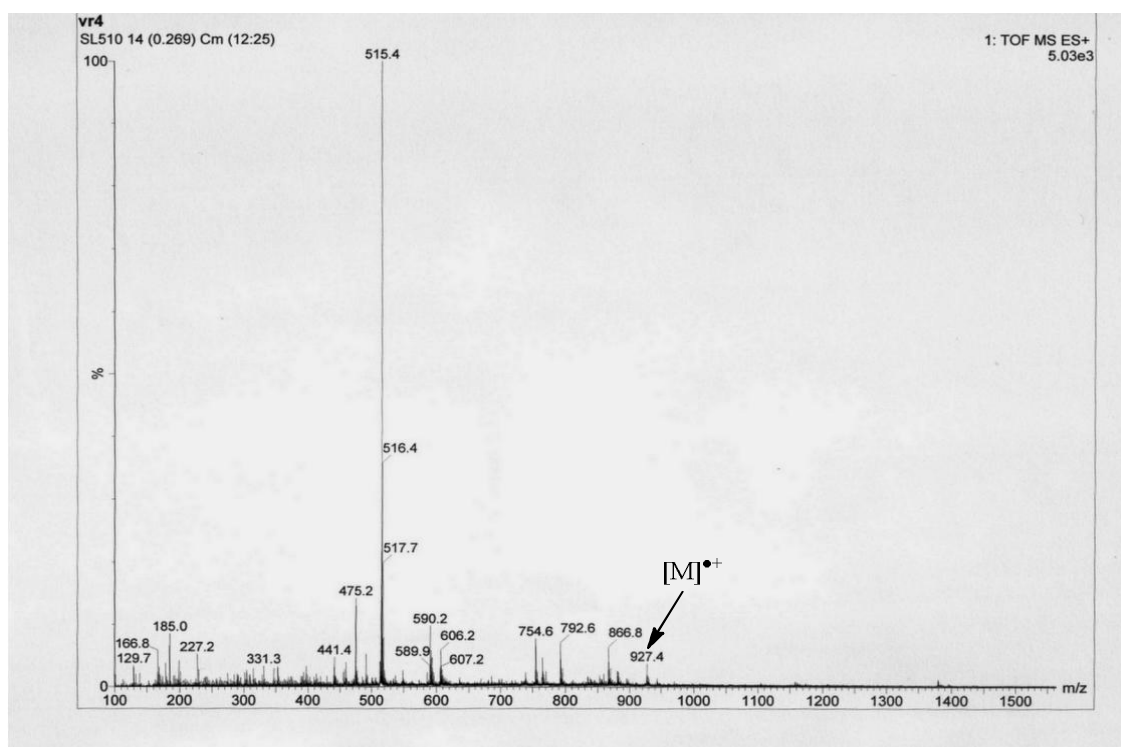
| N°   | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J(Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | COSY                                      |
|------|------------------------------------|---------------------|---|
| 1    | -                                  | 174,0               | H <sub>2</sub> -2                         |
| 2    | 2,22 (t ; 7,5)                     | 34,4                | H <sub>2</sub> -1 ; H <sub>2</sub> -3     |
| 3    | 1,54 (m)                           | 25,1                | 2H-2 ; 2H-4                               |
| 4-24 |                                    | 29,2-29,7           |   |
| 25   | 1,20-1,33 (brs)                    | 31,9                |   |
| 26   |                                    | 22,7                | H <sub>2</sub> -25 ; H <sub>3</sub> -27   |
| 27   | 0,81 (t ; 7,0 Hz)                  | 14,1                | H <sub>2</sub> -26                        |
| 1'   | 4,00 (t ; 6,7 Hz)                  | 64,4                | H <sub>2</sub> -2'                        |
| 2'   | 1,54 (m)                           | 28,7                | H <sub>2</sub> -1' ; H <sub>2</sub> -3'   |
| 3'   |                                    | 26,0                |   |
| 15'  | 1,20-1,33 (brs)                    | 31,9                |   |
| 16'  |                                    | 22,7                | H <sub>2</sub> -15' ; H <sub>3</sub> -17' |
| 17'  | 0,81 (t ; 7,0 Hz)                  | 14,1                | H <sub>2</sub> -16'                       |

## II.2.2. Les cérébrosides

### II.2.2.1. Elucidation structurale du composé Vr-4

Le composé Vr-4 se présentant sous forme de solide amorphe blanc a été obtenu du bois de racines de *V. paradoxa* et a précipité dans le mélange AcOEt/MeOH (98:2). Soluble dans le MeOH et le DMSO, il fond à 147-149°C. Ce composé donne une couronne violette au test de Molish suggérant que la molécule est un glycoside.

Il s'est vu attribué la formule moléculaire  $C_{54}H_{105}NO_{10}$  (3 insaturations) sur la base de l'analyse de ses données spectrales RMN 1 et 2D ainsi que de son spectre de masse TOF-MS-ESI+ qui présente le pic de l'ion radicalaire  $[M]^{\bullet+}$  à  $m/z$  927,4.

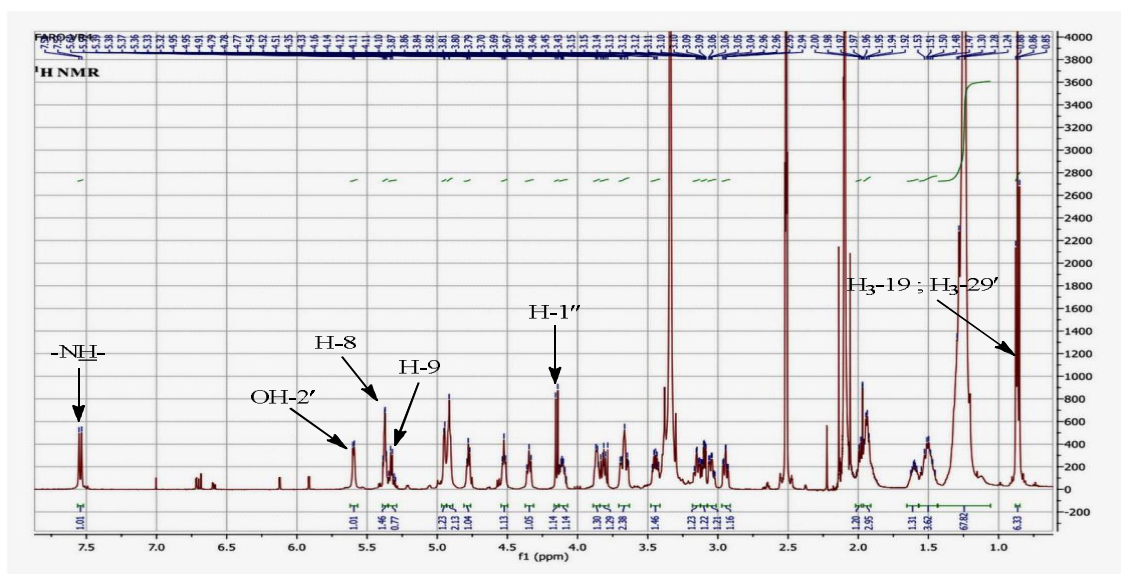


**Figure II.15 :** Spectre de masse ESI-TOF-MS+ de Vr-4

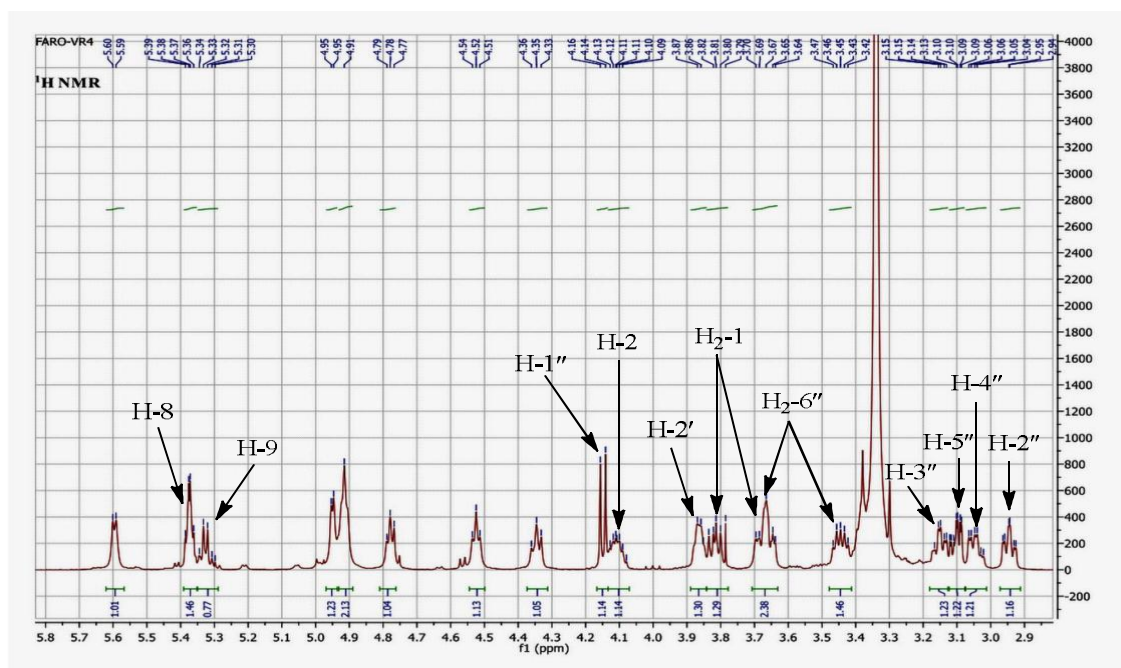
Les spectres de RMN 1D ( $^1H$  et  $^{13}C$ ) du composé Vr-4 montrent des signaux caractéristiques d'un squelette de type glycosphingolipide qui présente généralement une fonction amide, une unité osidique et deux longues chaînes aliphatiques plus ou moins insaturées (Wu et *al.*, 2004). En effet, sur le spectre RMN  $^1H$  du composé Vr-4 (Figure II.16) on peut observer : un signal à  $\delta_H$  7,54 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz) attribuable au proton d'une fonction amide secondaire  $-\text{CONH}-$  ; le signal du proton anomérique d'une unité osidique à  $\delta_H$  4,15 (1H, *d*,  $J = 7,7$  Hz) dont la large constante de couplage traduit la configuration  $\beta$  de ce dernier ; les signaux de huit oxyméthines parmi lesquels quatre apparaissant à  $\delta_H$  2,95 (1H ; *td* ;  $J = 8,9 ; 2,7$  Hz) ; 3,15 (1H ; *td* ;  $J = 8,8 ; 3,0$  Hz) ; 3,04 (1H ; *dd* ;  $J = 9,1 ; 3,7$  Hz) et 3,09 (1H, *dd* ;  $J = 5,8 ; 2,0$  Hz) ont été attribué à l'unité osidique ; les 3 autres résonent à  $\delta_H$  3,38 (1H, *m*) ; 3,31 (1H, *m*) et 3,86 (1H, *dd* ;  $J = 10,6 ; 6,7$  Hz). Le spectre présente



également les signaux de deux oxyméthylènes résonnant à  $\delta_H$  3,66 (1H ; *m*) ; 3,81 (1H ; *dd* ;  $J = 10,6 ; 6,7$  Hz) ; 3,44 (1H ; *m*) et 3,67 (1H ; *m*) ; deux longues chaînes aliphatiques caractérisées par la présence d'un singulet large entre  $\delta_H$  1,20-1,36 et deux méthyles terminaux à  $\delta_H$  0,86 (6H ; *t* ;  $J = 6,9$  Hz). Toutes ces données suggèrent la nature glycosphingolipidique du composé Vr-4 (Wu *et al.*, 2004) avec un squelette de base de type phytosphingosine (Merrill *and* Sandhoff, 2002 ; Muralidhar *et al.*, 2003). De plus, on observe les signaux de deux protons oléfiniques à  $\delta_H$  5,37 (1H, *m*, H-8) et 5,31 (1H, *m*, H-9) suggérant que la molécule porte une double liaison.

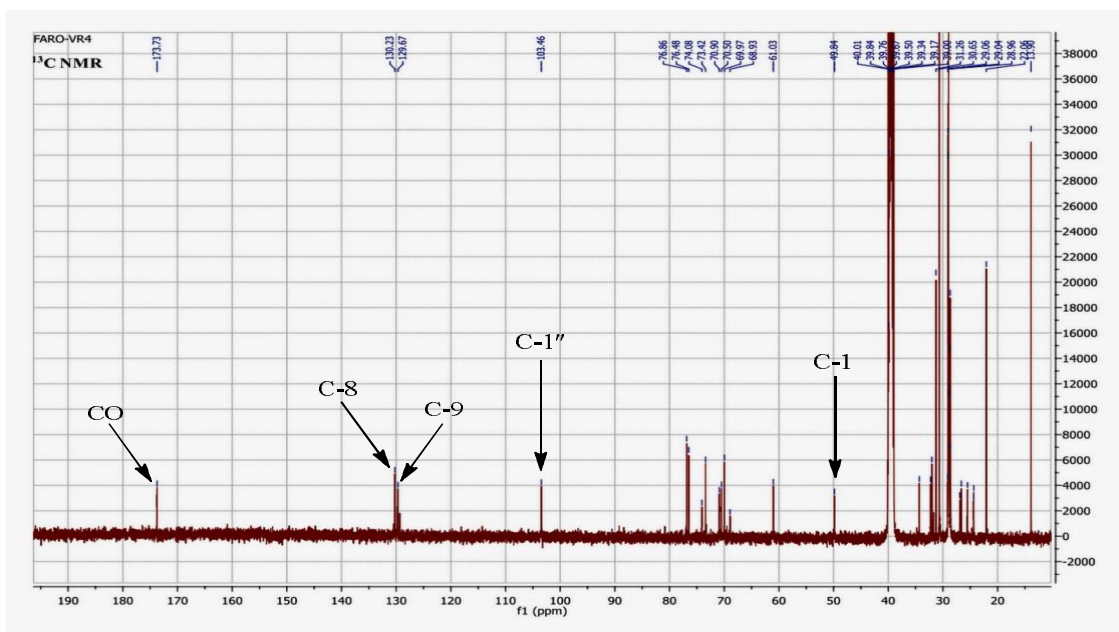


**Figure II.16 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Vr-4

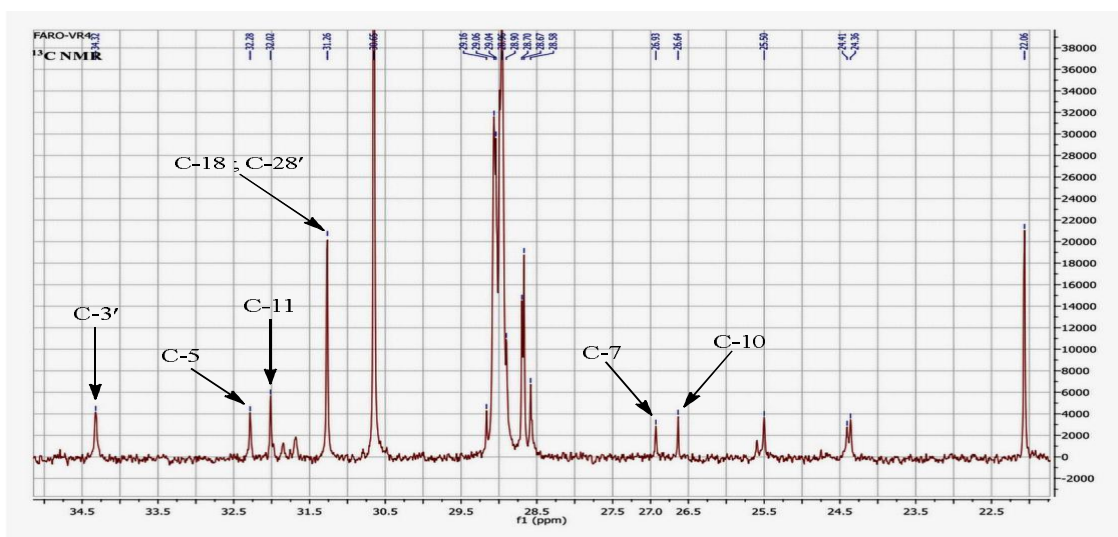


**Figure II.17 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) élargi ( $\delta_H$  2,90-5,80) de Vr-4

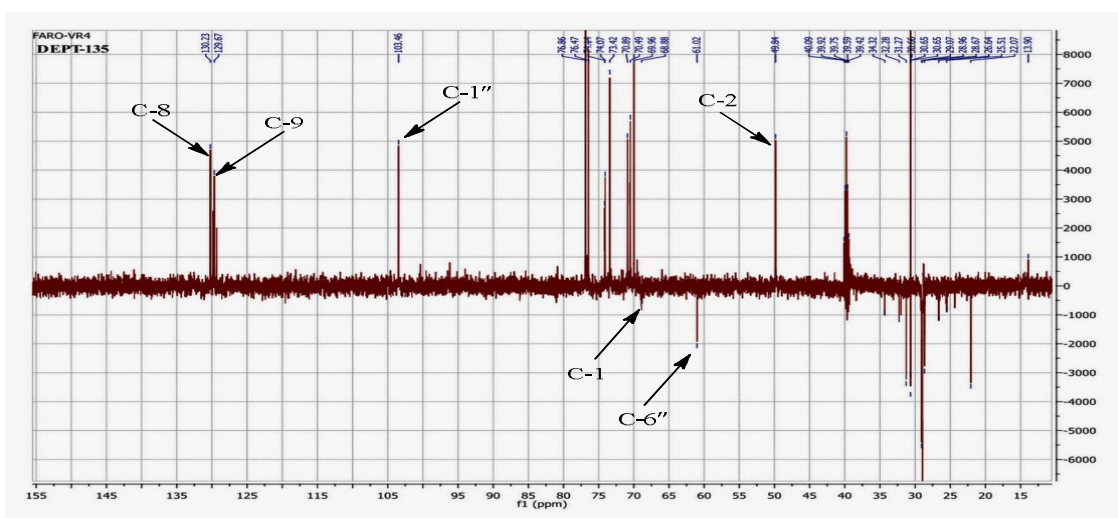
Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Vr-4 (Figure II.18) montre une série de signaux parmi lesquels le signal d'un carbone anomérique à  $\delta_{\text{C}}$  103,4 ; les signaux de quatre oxyméthines à 69,9 ; 73,4 ; 76,4 ; 76,8 et le signal d'un oxyméthylène à  $\delta_{\text{C}}$  61,0 attribués à l'unité osidique et dont la comparaison avec les données de la littérature (Tazoo et *al.*, 2007) ainsi que la large constante de couplage ( $J = 7,7$  Hz) du proton anomérique ont permis d'identifier le sucre comme étant le  $\beta$ -D-glucopyranoside. La présence sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  d'un carbone azométhinique à  $\delta_{\text{C}}$  49,8 et d'un carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  173,7 confirme la présence d'une fonction amide secondaire au sein du squelette carboné du composé Vr-4. A  $\delta_{\text{C}}$  130,2 et 129,7 nous observons les signaux de deux carbones oléfiniques confirmant la présence d'une double liaison dont la configuration *cis* a été déterminée par les déplacements chimiques des carbones allyliques respectifs à  $\delta_{\text{C}}$  26,6 et 26,5 (Figure II.19). En effet, il est connu que la géométrie d'une double liaison dans un alcène linéaire peut être déterminée sur la base des déplacements chimiques des différents carbones des groupements méthylènes adjacents à la double liaison. Généralement, les carbones méthyléniques adjacents à une double liaison de configuration *cis* apparaissent autour de  $\delta_{\text{C}}$  26-28 tandis que ceux adjacents à une double liaison *trans* résonnent entre  $\delta_{\text{C}}$  32-33 (Kang et *al.*, 2001 ; Tazoo et *al.*, 2007). Les signaux sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'un autre oxyméthylène à  $\delta_{\text{C}}$  68,9 ; de trois autres oxyméthines à  $\delta_{\text{C}}$  70,5 ; 70,9 et 74,4 ainsi que le signal d'une longue chaîne aliphatique à  $\delta_{\text{C}}$  28,6-29,2 et deux méthyles terminaux à  $\delta_{\text{C}}$  13,9 confirment l'hypothèse selon laquelle le squelette de base sphingoïde du composé Vr-4 est de type phytosphingosine (Muralidhar et *al.*, 2003). Il découle de l'analyse ci-dessus que le composé Vr-4 serait un cérébroside de type phytosphingosine possédant une partie acide gras hydroxylé en position C-2 et une unité  $\beta$ -D-glucopyranoside.



**Figure II.18 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Vr-4



**Figure II.19 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) élargi de Vr-4

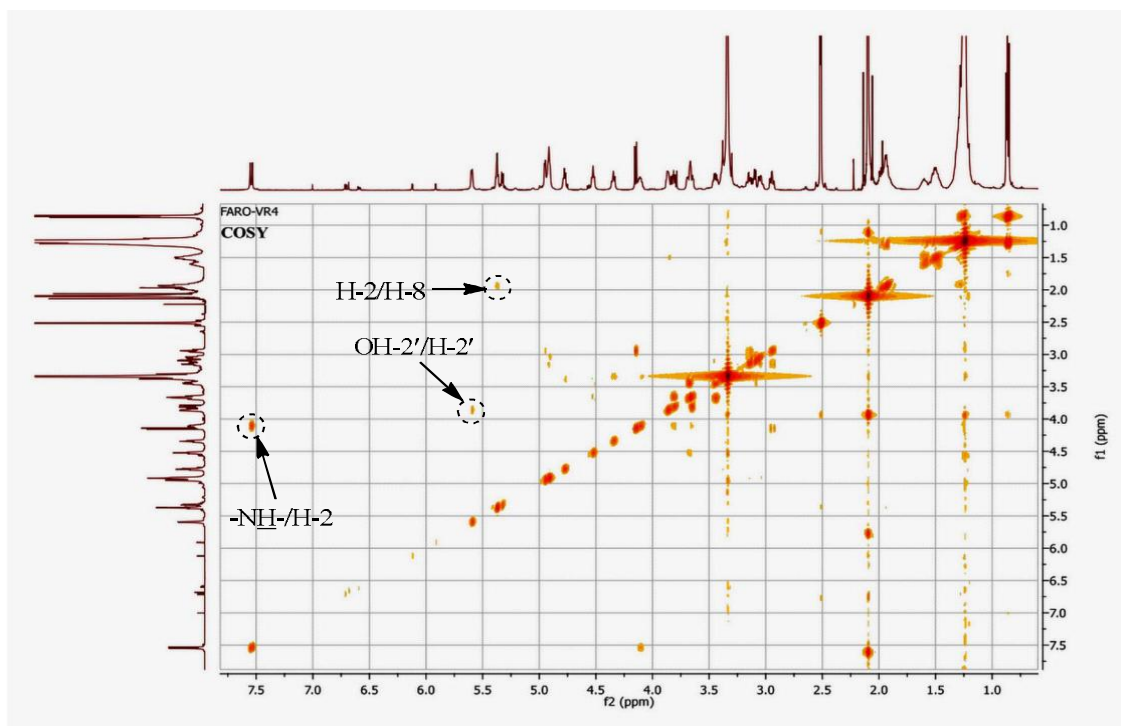


**Figure II.20 :** Spectre DEPT-135 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Vr-4

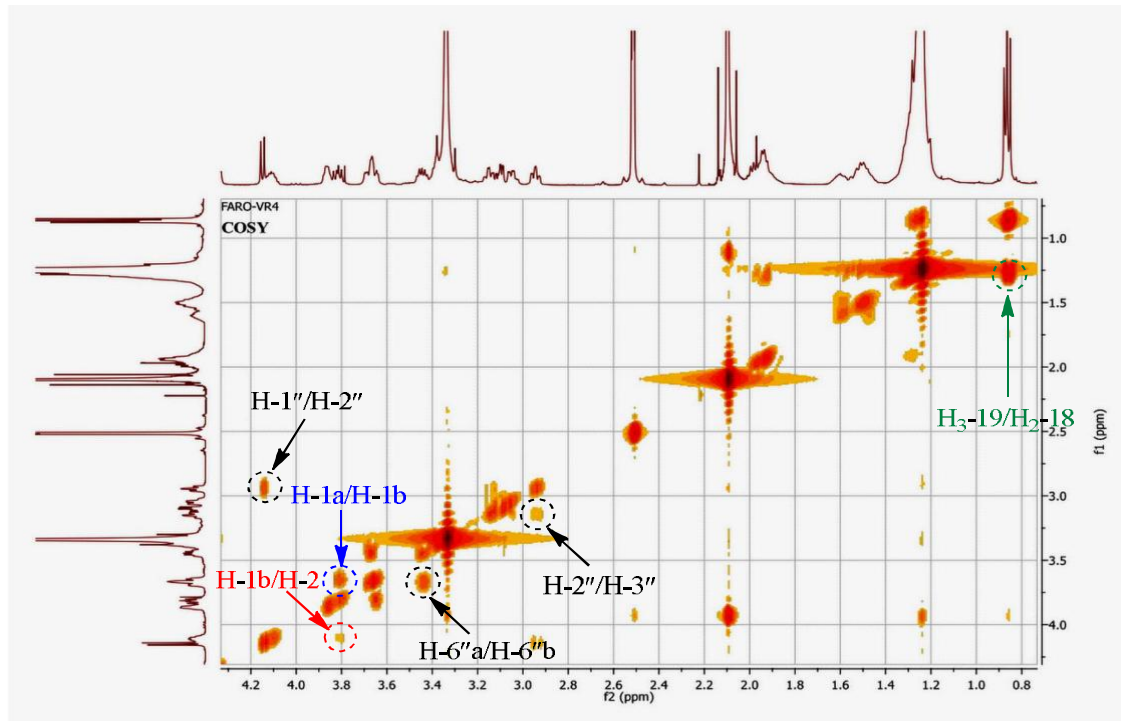
Le spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du composé Vr-4 (Figure II.21) montre une corrélation entre le proton amide à  $\delta_{\text{H}}$  7,51 (*d*,  $J = 9,5$  Hz) et celui azométhine à  $\delta_{\text{H}}$  4,10 (1H ; *dt* ;  $J = 15,5$  ; 5,3 Hz) qui à son tour présente des corrélations avec trois autres protons oxyméthines à  $\delta_{\text{H}}$  3,81 (1H ; *dd* ;  $J = 10,6$  ; 6,7 Hz) ; 3,38 (*m*) et 3,66 (*m*). Par la suite, le proton à  $\delta_{\text{H}}$  3,38 présente une corrélation avec celui à  $\delta_{\text{H}}$  3,31 (*m*). Tout ceci confirme la présence dans la molécule d'un squelette de type phytosphingosine. Le signal à  $\delta_{\text{H}}$  3,86 (1H ; *dd* ;  $J = 10,6$  ; 6,7) présente une corrélation avec un méthylène à  $\delta_{\text{H}}$  1,50 qui lui-même montre une tache de corrélation avec l'amas de méthylène entre 1,20-1,36 et cet amas corrélant à son tour avec le méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  0,86 et (3H ; *t* ;  $J = 6,9$  Hz). On peut également observer sur ce spectre les corrélations entre les deux protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  5,37 et 5,31 ainsi que celles respectives entre ces différents protons et leurs méthylènes adjacents à  $\delta_{\text{H}}$  1,94 et 1,98. Des corrélations additionnelles sont observées entre les protons de l'unité  $\beta$ -D-glucopyranose.



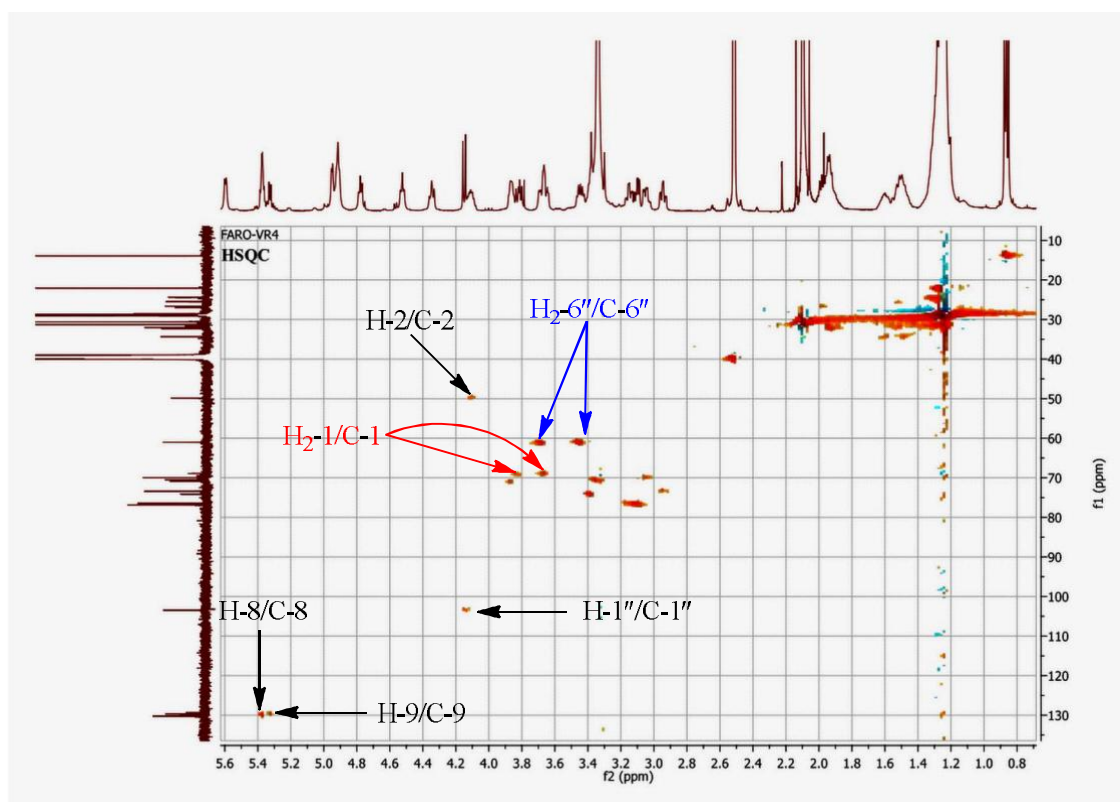
Le spectre HSQC (Figure II.23) a permis d'attribuer les différents protons caractéristiques à leurs carbones respectifs.



**Figure II.21 :** Spectre COSY (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Vr-4



**Figure II.22 :** Spectre COSY (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) élargi de Vr-4



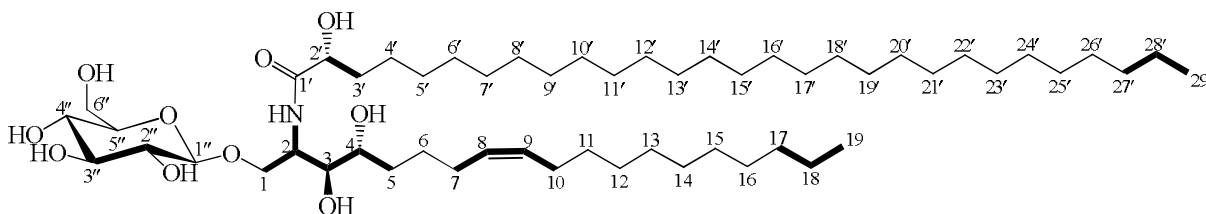
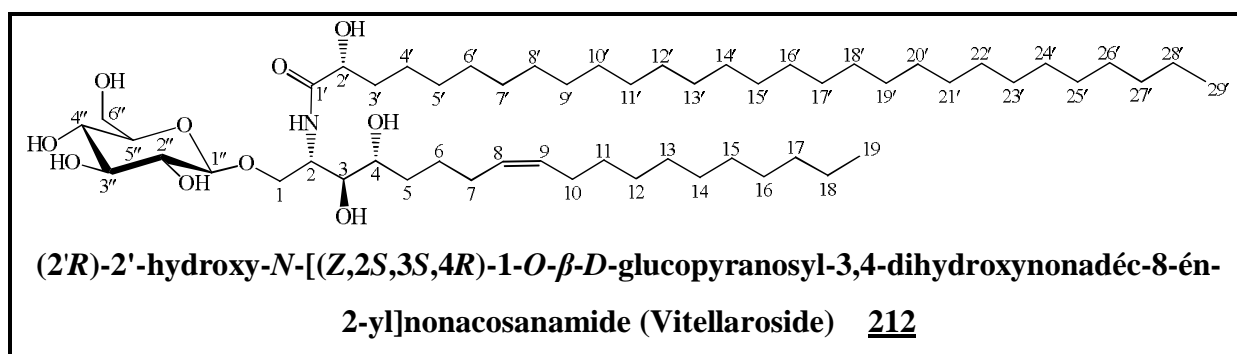
**Figure II.23 :** Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ ,  $^1\text{H}$  : 500 et  $^{13}\text{C}$  : 125 MHz) élargi de Vr-4

La longueur de la chaîne de base a été déterminée par l'analyse du spectre TOF-MS-ESI+ (Figure II.15) du composé Vr-4 qui présente le pic de l'ion radicalaire fragment caractéristique à  $m/z$  475,2  $[\text{Glc-OCH}_2\text{CHCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_3\text{CHCH}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3]^{\bullet+}$  (Figure II.15, Schéma II.12). Ce fragment combiné à celui observé à  $m/z$  166,8  $[\text{CHCH}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3]^{\bullet+}$  qui résulte du clivage en  $\alpha$  de la double liaison  $\Delta^8$  confirment la position de la double liaison sur la longue chaîne de base. La présence de l'unité osidique est confirmée ici par les ions fragments à  $m/z$  764,6  $[\text{M}-163]^{\bullet+}$  et à  $m/z$  606,2  $[\text{M}-180-\text{C}_{10}\text{H}_{21}]^{\bullet+}$  ; ce dernier résultant de la perte du glucose suivie du clivage en  $\alpha$  de la double liaison  $\Delta^8$ . La longueur de la chaîne acide gras a été déduite à partir du fragment à  $m/z$  515,4  $[\text{GlcOCH}_2\text{C}(=\text{NHCO})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_3\text{CHCH}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3]^{\bullet+}$  résultant du clivage en  $\alpha$  du carbonyle de la fonction amide suivie de la perte de deux protons.

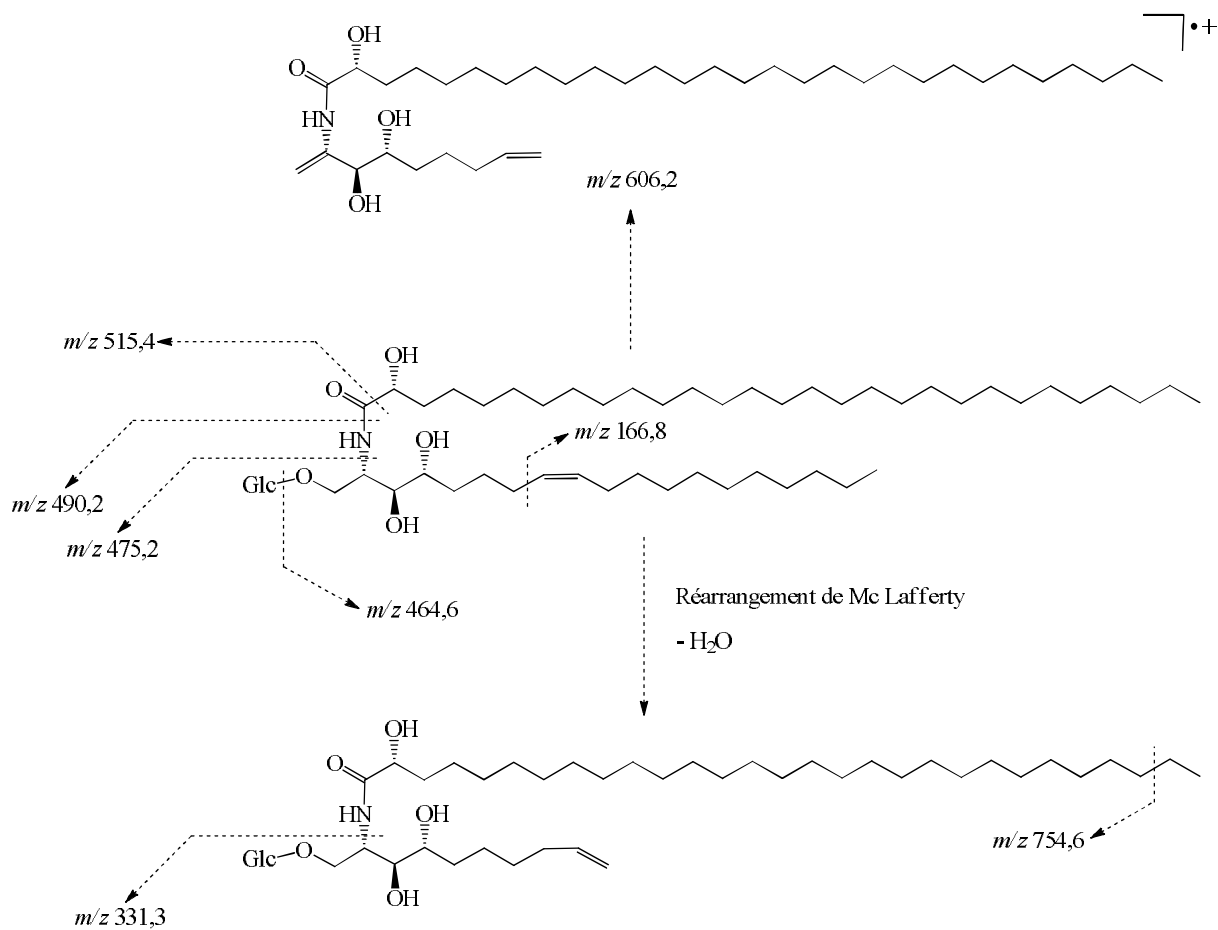
La configuration absolue des carbones asymétriques du composé Vr-4 a été déduite des observations relevant de la biosynthèse de la phytosphingosine ainsi que de la comparaison des déplacements chimiques des protons et carbones caractéristiques avec ceux des cérébrosides similaires reportés dans la littérature. En effet, il a été établi que les déplacements chimiques du proton H-2 et surtout des carbones C-1 à C-4 ainsi que des carbones C-1' et C-2' des cérébrosides sont particulièrement importants pour la détermination de la stéréochimie du squelette phytosphingosine (Hua *and* Pei, 2001 ; Zhang *et al.*, 2011). La revue de la littérature révèle d'une part que la configuration absolue du carbone C-2 de la plupart des cérébrosides naturels est 2*S* et d'autre part

la biosynthèse des cérébrosides naturels suggère une configuration  $2S$ ,  $3S$  et  $4R$  du squelette phytosphingosine (Merrill *and* Sandhoff, 2002 ; Yang *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2015). Ainsi donc, au vu des déplacements chimiques du proton H-2 (4,10 ; *dt* ;  $J = 15,5 ; 5,3$  Hz) et des carbones C-1 ( $\delta_C$  68,9), C-2 ( $\delta_C$  49,8), C-3 ( $\delta_C$  74,4), C-4 ( $\delta_C$  70,5), C-1' ( $\delta_C$  173,8) et C-2' ( $\delta_C$  70,9) ainsi que de tous les faits ci-dessus mentionnés, la configuration absolue du composé Vr-4 a été trouvée essentiellement identique à celle reportée pour d'autres cérébrosides ayant un squelette ( $2S,3S,4R$ )-phytosphingosine et une partie acide gras ( $2'R$ )-hydroxylée.

A partir de l'analyse des données spectrales 1D et 2D, la structure du composé Vr-4 a été déterminée comme étant le ( $2'R$ )-2'-hydroxy-N-[( $Z,2S,3S,4R$ )-1- $O$ - $\beta$ - $D$ -glucopyranosyl-3,4-dihydroxynonadéc-8-én-2-yl]nonacosanamide nommé Vitellaroside **212** décrit ici pour la première fois.



**Schéma II.11** : Importantes corrélations COSY de Vr-4



**Schéma II.12 :** Fragmentations proposées du composé Vr-4 en TOF-ESI-MS+

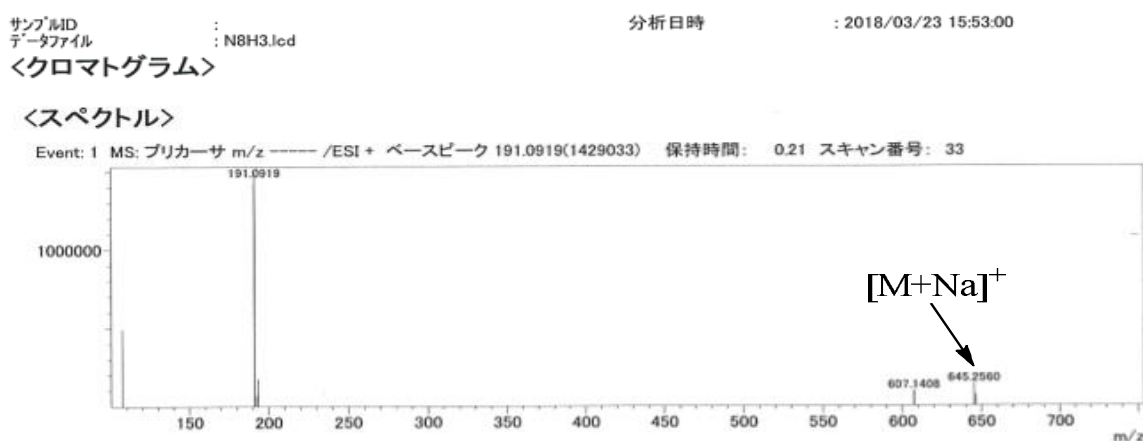
**Tableau II.4 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) et COSY de Vr-4

| Position                          | $\delta_{\text{H}}$ (mult. $J(\text{Hz})$ ) | $\delta_{\text{C}}$ | COSY                                      |
|-----------------------------------|---|---------------------|---|
| <b>Squelette de Base</b>          |   |                     |   |
| 1                                 | 3,66 ( <i>m</i> )                           | 68,9                | H-1b                                      |
|                                   | 3,81 ( <i>dd</i> ; 10,6 ; 6,7)              |                     | H-1a ; H-2                                |
| 2                                 | 4,10 ( <i>dt</i> ; 15,5 ; 5,3)              | 49,8                | H-1b ; H-3                                |
| 3                                 | 3,38 ( <i>m</i> )                           | 74,4                | H-2 ; H-4                                 |
| 4                                 | 3,31 ( <i>m</i> )                           | 70,5                | H-3 ; H <sub>2</sub> -5                   |
| 5                                 | 1,92 ( <i>m</i> )                           | 32,3                |   |
| 6                                 | 1,50 ( <i>m</i> )                           | 25,5                |   |
| 7                                 | 1,94 ( <i>m</i> )                           | 26,6                |   |
| 8                                 | 5,37 ( <i>m</i> )                           | 130,2               | H-9 ; H <sub>2</sub> -7                   |
| 9                                 | 5,31 ( <i>m</i> )                           | 129,7               | H-8 ; H <sub>2</sub> -10                  |
| 10                                | 1,98 ( <i>m</i> )                           | 26,5                |   |
| 11                                |   | 32,0                |   |
| 12-16                             |   | 28,6-29,2           |   |
| 17                                | 1,20-1,34 ( <i>m</i> )                      | 31,3                |   |
| 18                                |   | 22,1                | H <sub>2</sub> -17 ; H <sub>3</sub> -19   |
| 19                                | 0,86 ( <i>t</i> ; 6,9)                      | 13,9                | H <sub>2</sub> -18                        |
| OH-3                              | 4,77 ( <i>d</i> ; 6,4)                      | /                   | H-3                                       |
| OH-4                              | 4,35 ( <i>t</i> ; 7,3)                      | /                   | H-4                                       |
| NH                                | 7,54 ( <i>d</i> ; 9,5)                      | /                   | 4,10                                      |
| <b>Partie N-acyl (acide gras)</b> |   |                     |   |
| 1'                                | /   | 173,7               | /   |
| 2'                                | 3,86 ( <i>dd</i> ; 10,6 ; 6,7)              | 70,9                | H <sub>2</sub> -3'                        |
| 3'                                | 1,60 ( <i>m</i> ) ; 1,49 ( <i>m</i> )       | 34,3                | H-2'                                      |
| 4'                                |   | 24,4                |   |
| 5'-26'                            |   | 28,6-29,2           |   |
| 27'                               | 1,20-1,34 ( <i>m</i> )                      | 31,3                |   |
| 28'                               |   | 22,1                | H <sub>2</sub> -27' ; H <sub>3</sub> -29' |
| 29'                               | 0,86 ( <i>t</i> ; 6,9)                      | 13,9                | H <sub>2</sub> -28'                       |
| OH-2'                             | 5,60 ( <i>d</i> ; 4,9)                      | -                   | H-2'                                      |
| <b>Unité glucosidique</b>         |   |                     |   |
| 1''                               | 4,15 ( <i>d</i> ; 7,7)                      | 103,3               | H-2''                                     |
| 2''                               | 2,95 ( <i>td</i> ; 8,9 ; 2,7)               | 73,4                | H-1'' ; H-3'' ; OH-2''                    |
| 3''                               | 3,15 ( <i>td</i> ; 8,8 ; 3,0)               | 76,5                | H-2'' ; H-4'' ; OH-3''                    |
| 4''                               | 3,04 ( <i>dd</i> ; 9,1 ; 3,7)               | 69,9                | H-3'' ; H-5'' ; OH-4''                    |
| 5''                               | 3,09 ( <i>dd</i> ; 5,8 ; 2,0)               | 76,9                | H-4'' ; 2H-6''                            |
| 6''                               | 3,44 ( <i>m</i> )                           | 61,0                | H-5'' ; Hb-6'' ; OH-6''                   |
|                                   | 3,67 ( <i>m</i> )                           |                     | H-5'' ; Ha-6'' ; OH-6''                   |
| OH-2''                            | 4,95 ( <i>d</i> ; 3,5)                      | /                   | H-2''                                     |
| OH-3''                            |   | /                   | H-3''                                     |
| OH-4''                            | 4,91 ( <i>d</i> ; 4,3)                      | /                   | H-4''                                     |
| OH-5''                            |   | /                   | /   |
| OH-6''                            | 4,52 ( <i>t</i> ; 5,6)                      | /                   | 2H-6''                                    |

## II.2.3. Les chlorophylles

### II.2.3.1. Identification du composé N8-H3

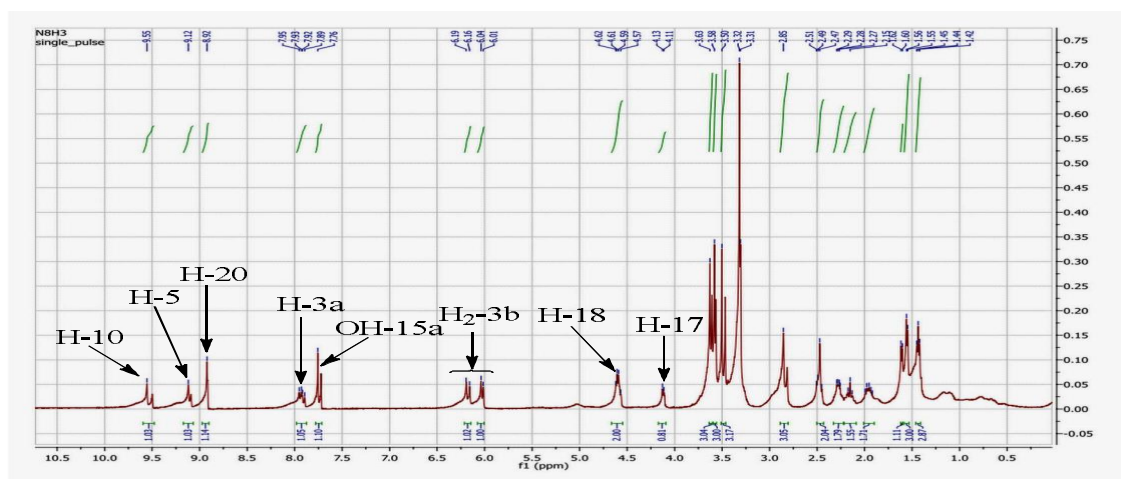
Le composé N8-H3 a été obtenu des feuilles de *C. populnea* sous forme de poudre verte-sombre soluble dans le DMSO et le  $\text{CHCl}_3$ . Sa nature de type chlorophylle a été suggérée par sa texture et par analyse de sa CCM qui présente une tache verte sur plaque après révélation à  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dilué. Son spectre de masse enregistré en Electrospray haute résolution et en mode positif (Figure II.24) présente le pic de l'ion *pseudo*-moléculaire  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z$  645,2560 compatible avec la formule moléculaire  $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5$  renfermant 20 insaturations.



**Figure II.24 :** Spectre de masse HRESI-MS de N8-H3

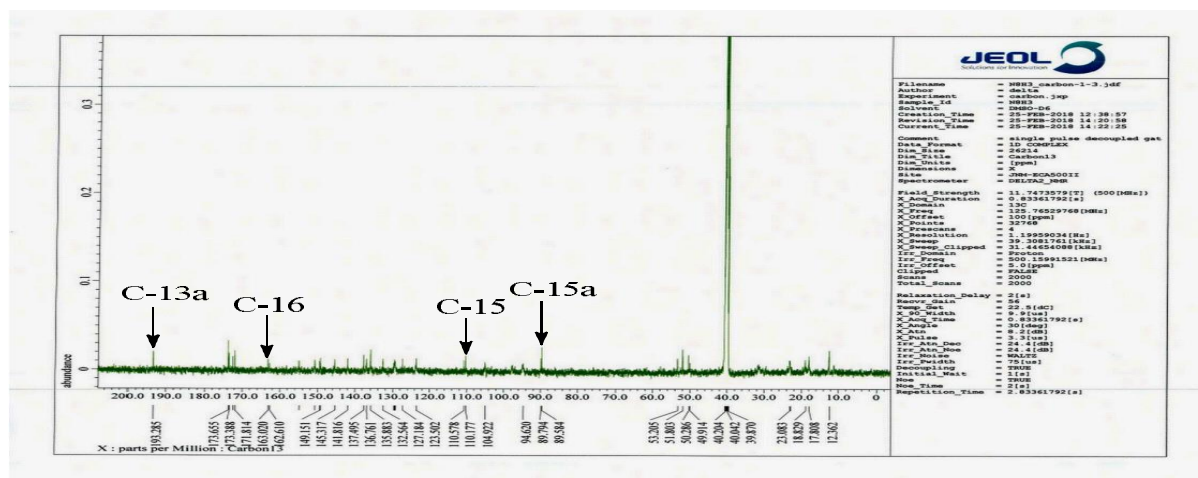
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé N8-H3 (Figure II.25) enregistré dans le  $\text{DMSO-}d_6$  présente les signaux caractéristiques d'un squelette de type chlorine (Helaja, 2000). On peut ainsi observer les signaux de trois protons oléfiniques sous forme de singulet à  $\delta_{\text{H}}$  8,91 (1H, *s*) ; 9,13 (1H, *s*) ; et 9,55 (1H, *s*) ; un groupement vinylique dont les protons résonnent à  $\delta_{\text{H}}$  6,01 (1H, *m*) ; 6,16 (1H, *m*) et 7,93 (1H, *m*) ; trois singulets de 3 protons chacun, résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  2,85 ; 3,32 et 3,62 attribués à des groupements méthyles directement connectés à des cycles aromatiques. Un autre groupement méthyle était visible à  $\delta_{\text{H}}$  1,55 sous forme de doublet. A  $\delta_{\text{H}}$  1,44 (3H ; *t* ;  $J = \text{Hz}$ ) et 3,31 (2H, *m*), on a les signaux d'un groupement éthyle directement substitué à un cycle aromatique. Le spectre présente également les signaux d'un groupement propionate de méthyle parmi lesquels : deux méthylènes à  $\delta_{\text{H}}$  2,25 (1H, *m*) ; 2,13 (1H, *m*) ; 2,44 (1H, *m*) et 2,19 (1H, *m*) ; un groupement méthyle ester à  $\delta_{\text{H}}$  3,47 (3H, *s*). Tous ces signaux caractéristiques en plus du signal d'un groupement méthyle ester supplémentaire à  $\delta_{\text{H}}$  3,56 (3H, *s*) et ceux de deux groupements amines secondaires à  $\delta_{\text{H}}$  1,60 (1H, *s*) et 1,62 (1H, *s*) sont similaires à ceux reportés dans la littérature pour l'ester méthylique du phéophorbide A (Kamarulzaman et *al.*, 2011) à la seule différence que sur le spectre du composé N8-H3 on note l'absence remarquable du signal à  $\delta_{\text{H}}$  6,27 (*s*) caractérisant généralement le proton H-15a de l'ester méthylique du phéophorbide A, et la présence du signal d'un proton échangeable à  $\delta_{\text{H}}$  7,74 (*s*) attribué à un groupement hydroxyle.





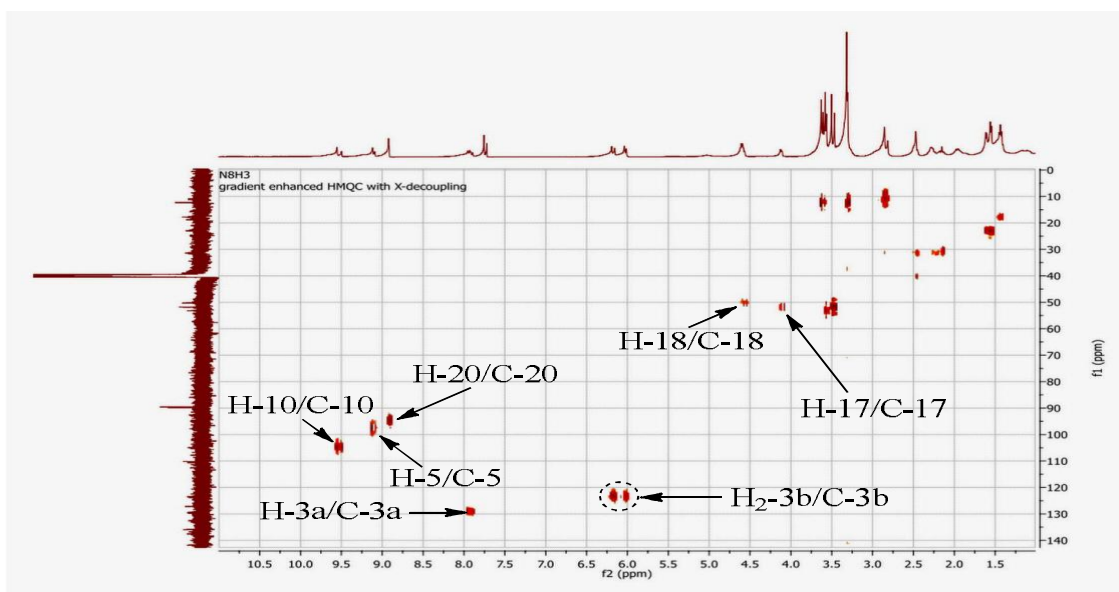
**Figure II.25 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de N8-H3

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé N8-H3 (Figure II.26) en combinaison avec celui HMQC (Figure II.27) révèle la présence de 36 signaux de carbones répartis en 19 carbones quaternaires (dont 3 carbonyles : deux esters à  $\delta_{\text{C}}$  171,8 et 173,6 ; une cétone cyclique à  $\delta_{\text{C}}$  193,3 ; un carbone aliphatique à  $\delta_{\text{C}}$  89,8 et 15 oléfiniques) ; 6 méthines parmi lesquels 4 oléfiniques et 2 aliphatiques ; 4 méthylènes (un oléfinique et trois aliphatiques) et 7 méthyles (Tableau II.6).

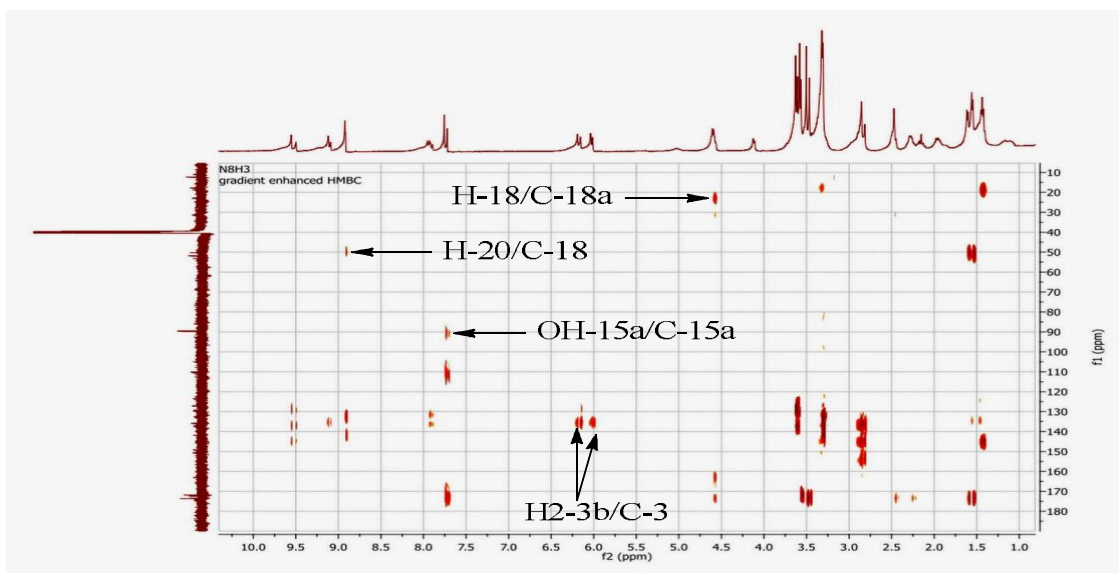


**Figure II.26 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de N8-H3

Chaque proton a été attribué à son carbone correspondant grâce à l'analyse du spectre HMQC (Figure II.27), tandis que les positions des carbones quaternaires ont été confirmées par l'analyse du spectre HMBC (Figure II.28). Ainsi, sur le spectre HMBC du composé N8-H3, on pouvait apercevoir les corrélations du singulet à  $\delta_{\text{H}}$  3,32 et les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  141,8 ; 132,6 et 136,3 ; les corrélations entre les protons du méthylène oléfinique à  $\delta_{\text{H}}$  6,01 et 6,16 et le carbone à 136,3 ainsi que les corrélations respectives entre les deux groupements méthoxyyles à  $\delta_{\text{H}}$  3,47 et 3,56 avec les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  173,6 et 171,8. D'autres corrélations HMBC des différents protons du composé N8-H3 sont consignées dans le tableau II.5.



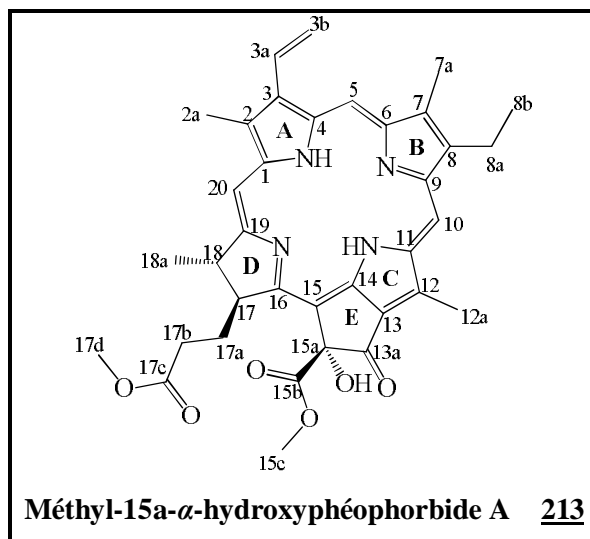
**Figure II.27 :** Spectre HMQC (DMSO- $d_6$ ,  $^1\text{H}$  : 500 et  $^{13}\text{C}$  : 125 MHz) de N8-H3



**Figure II.28 :** Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ ,  $^1\text{H}$  : 500 et  $^{13}\text{C}$  : 125 MHz) de N8-H3

Tenant compte de toutes ces analyses et en comparant les données du composé N8-H3 à celles de la littérature, ce dernier a été identifié comme étant la Méthyl-15a- $\alpha$ -hydroxyphéophorbide A ou 15a- $\alpha$ -hydroxyphéophorbide A méthyle ester **213**, un tétrapyrrole intermédiaire de la dégradation de la chlorophylle A. C'est la première fois que ce composé est isolé d'une espèce de la famille des Vitaceae. Précédemment isolé de *Clerodendrum cyrtophyllum* il est connu pour ses propriétés cytotoxiques contre les cellules cancéreuses chimio-sensibles *KB*, *A-549*, *HCT-8*, *CAKI-1*, *IA9* (*OVCAR*), *MCF-7*, *SK-MEL* et résistantes *KB-7d* et *KB-CPT* (Cheng et al., 2001).





**Tableau II.5 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) et HMBC de N8-H3

| N°     | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz))  | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC           | Cheng et al. (2001)* |
|--------|--|---------------------|----------------|----------------------|
| 1      | -                                      | 141,8               | -              | 142,0                |
| 2      | -                                      | 132,6               | -              | 131,7                |
| 2a     | 3,32 ( <i>s</i> )                      | 12,1                | 1 ; 2 ; 3      | 12,0                 |
| 3      | -                                      | 136,3               | -              | 136,3                |
| 3a     | 7,93 ( <i>m</i> )                      | 129,2               | 2, 3           | 128,9                |
| 3b     | 6,01 ( <i>m</i> )<br>6,16 ( <i>m</i> ) | 123,5               | 3<br>3a ; 3    | 122,7                |
| 4      | -                                      | 135,9               | -              | 136,1                |
| 5      | 9,13 ( <i>s</i> )                      | 97,5                | 4              | 97,8                 |
| 6      | -                                      | 153,7               | -              | 155,2                |
| 7      | -                                      | 136,8               | -              | 136,1                |
| 7a     | 2,85 ( <i>s</i> )                      | 11,1                | 6 ; 7 ; 8      | 11,0                 |
| 8      | -                                      | 145,3               | -              | 145,0                |
| 8a     | 3,31 ( <i>m</i> )                      | 18,8                | 8b             | 19,3                 |
| 8b     | 1,44 ( <i>t</i> )                      | 17,8                | 8 ; 8a         | 17,3                 |
| 9      | -                                      | 149,2               | -              | 150,9                |
| 10     | 9,55 ( <i>s</i> )                      | 104,8               | 8 ; 11 ; 12    | 104,0                |
| 11     | -                                      | 137,5               | -              | 137,7                |
| 12     | -                                      | 129,4               | -              | 129,3                |
| 12a    | 3,62 ( <i>s</i> )                      | 12,1                | -              | 12,2                 |
| 13     | -                                      | 127,2               | -              | 126,9                |
| 13a    | -                                      | 193,3               | -              | 191,9                |
| 14     | -                                      | 149,2               | -              | 149,8                |
| 15     | -                                      | 110,6               | -              | 107,6                |
| 15a    | -                                      | 89,8                | -              | 89,0                 |
| 15b    | -                                      | 171,8               | -              | 172,3                |
| 15c    | 3,56 ( <i>s</i> )                      | 53,2                | 15b            | 53,4                 |
| 16     | -                                      | 162,6               | -              | 162,4                |
| 17     | 4,11 ( <i>m</i> )                      | 51,8                | -              | 51,8                 |
| 17a    | 2,25 ( <i>m</i> ) ; 2,13 ( <i>m</i> )  | 30,5                | 17c ; 18       | 31,4                 |
| 17b    | 2,44 ( <i>m</i> ) ; 2,19 ( <i>m</i> )  | 31,2                | 17 ; 17a ; 17c | 31,1                 |
| 17c    | -                                      | 173,6               | -              | 174,0                |
| 17d    | 3,47 ( <i>s</i> )                      | 50,3                | 17c            | 51,7                 |
| 18     | 4,60 ( <i>m</i> )                      | 49,9                | 18a ; 19 ;     | 50,3                 |
| 18a    | 1,55 ( <i>d</i> )                      | 22,8                | 17 ; 18 ; 19   | 22,6                 |
| 19     | -                                      | 173,4               | -              | 172,8                |
| 20     | 8,91 ( <i>s</i> )                      | 94,6                | 1 ; 2 ; 18     | 93,6                 |
| OH-15a | 7,74 ( <i>s</i> )                      | -                   | 15 ; 15a ; 15b | -                    |
| NH-A   | 1,60 ( <i>s</i> )                      | -                   | -              | -                    |
| NH-C   | 1,62 ( <i>s</i> )                      | -                   | -              | -                    |

\* Données enregistrées dans le  $\text{CDCl}_3$  à 125 MHz.

## II.2.4. Les composés phénoliques

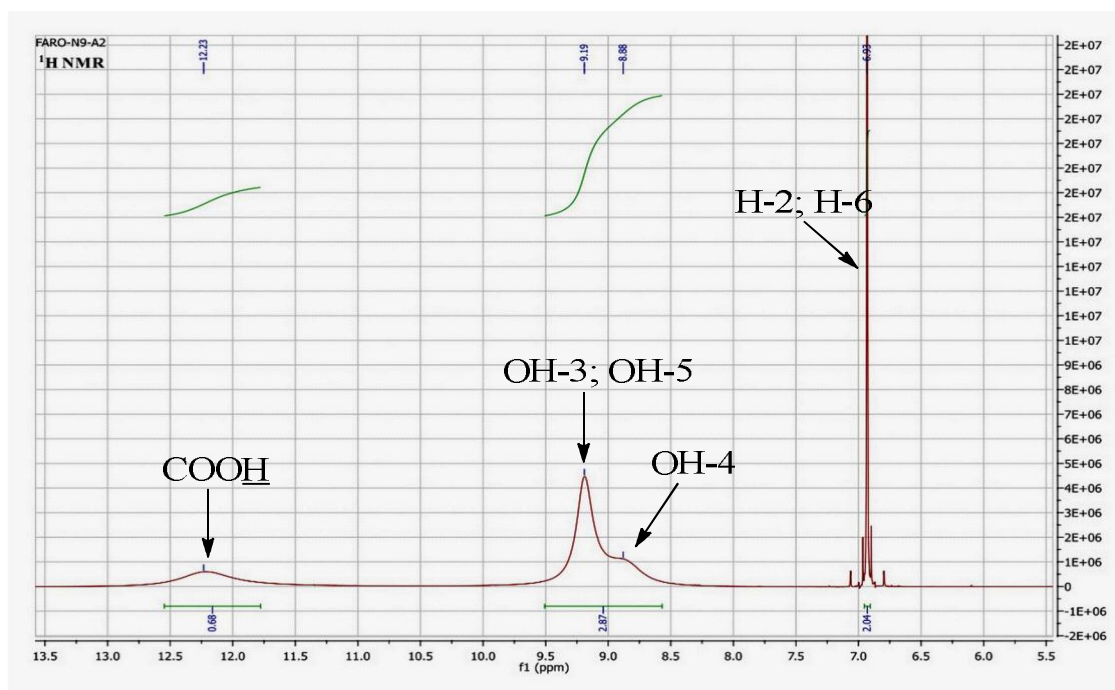
Un total de huit composés phénoliques a été isolé des différentes parties des plantes étudiées. Parmi ceux-ci, on distingue deux acides phénoliques, quatre flavonoïdes, une isocoumarine et un stilbène.

### II.2.4.1. Les acides phénoliques

#### II.2.4.1.1. Identification du composé N9-A2

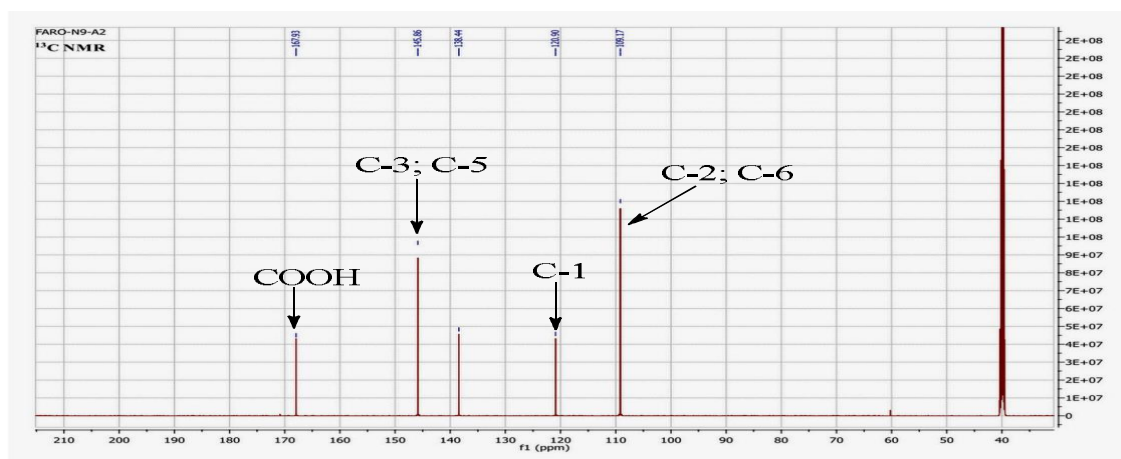
Le composé N9-A2 a été obtenu des racines de *C. populnea* et du bois de racines de *V. paradoxa*, sous forme d'une poudre beige soluble dans le MeOH. Il donne une réaction positive au test au FeCl<sub>3</sub> caractéristique des composés phénoliques.

L'étude de son spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure II.29) a montré un profil relativement simple. En effet, sur le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé, il est observé la présence d'un signal de deux protons sous forme de singulet à  $\delta_H$  6,93 (2H, *s*) attribuables à deux protons aromatiques chimiquement équivalents, un singulet large d'un proton à  $\delta_H$  12,23 attribuable au proton de la fonction acide carboxylique, et enfin deux derniers signaux sous forme de singulet large intégrant un total de trois protons et apparaissant à  $\delta_H$  9,19 (2H, *sl*) et 8,88 (1H, *sl*) ; ces derniers signaux correspondent à trois groupement hydroxyles. Ces données montrent clairement la présence d'un acide benzoïque trihydroxylé.



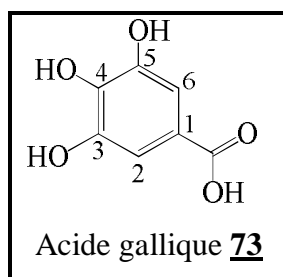
**Figure II.29 :** Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) de N9-A2

Les données de RMN <sup>13</sup>C (Figure II.30) confirment cette hypothèse en présentant 5 signaux de carbones dont des méthines C-2 et C-6 résonnant tous deux à  $\delta_C$  109,2 ; un carbonyle à  $\delta_C$  167,9 et quatre carbones quaternaires aromatiques à  $\delta_C$  120,9 ; 138,4 et 145,9.



**Figure II.30 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) de N9-A2

Toutes ces données ont été attribuées et confirmées par comparaison avec les données de la littérature (Guo et *al.*, 2007). Elles montrent clairement qu'il s'agit d'un dérivé de l'Acide benzoïque connu sous le nom d'Acide gallique **73**. Il a été précédemment isolé de *Cissus pteroclada* (Yi-jie et *al.*, 2016) et de plusieurs autres espèces de plantes à l'instar de *Allan blackia floribunda*, *Garcinia densivenia*, *Bridelia micrantha*, *Caesalpinia sappan*, et *Dillenia indica* (Nayeem et *al.*, 2016). Il est connu pour ses propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antiplasmodiales, anthelminthiques, et antidiabétiques (Nayeem et *al.*, 2016).



**Tableau II.6 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) de N9-A2

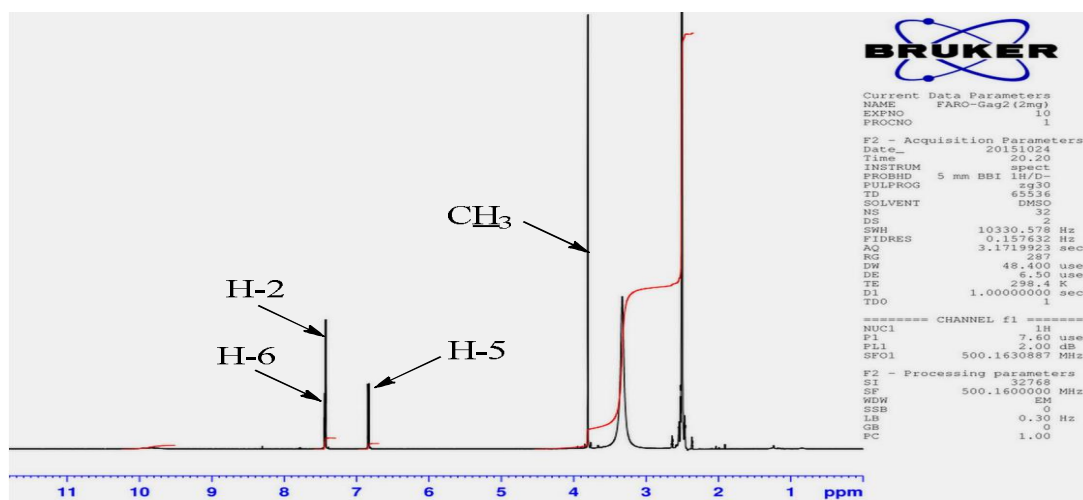
| N°          | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | Benabdelaziz (2015)* |
|-------------|---------------------------------------|---------------------|----------------------|
| 1           | -                                     | 120,9               | 121,1                |
| 2           | 6,93 ( <i>s</i> )                     | 109,2               | 109,0                |
| 3           | -                                     | 145,9               | 145,7                |
| 4           | -                                     | 138,4               | 138,3                |
| 5           | -                                     | 145,9               | 145,7                |
| 6           | 6,93 ( <i>s</i> )                     | 109,2               | 109,0                |
| COOH        | 12,23 ( <i>sl</i> )                   | 167,9               | 168,0                |
| OH-3 ; OH-5 | 9,19 ( <i>sl</i> )                    | -                   | -                    |
| OH-4        | 8,88 ( <i>sl</i> )                    | -                   | -                    |

\* Données enregistrées dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 150 MHz

### II.2.4.1.2. Identification du composé Gag-2

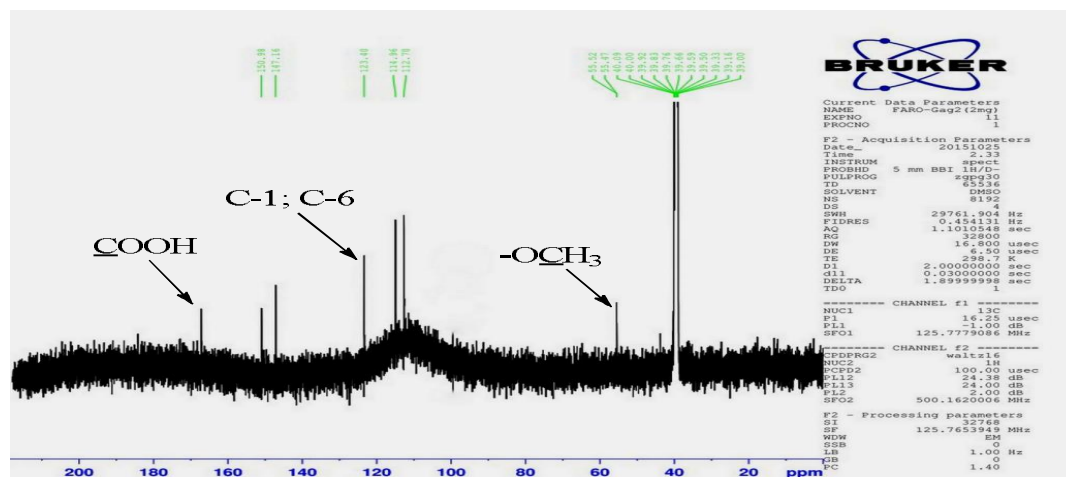
Le composé Gag-2 a été obtenu sous forme de poudre blanche des graines de *G. aqualla*, et est soluble dans le MeOH. Son spectre RMN  $^1\text{H}$  donnant un total de trois protons aromatiques laisse envisager un noyau benzénique trisubstitué.

L'analyse de ce spectre (Figure II.31) montre un proton aromatique à  $\delta_{\text{H}}$  7,44 (1H, *dd*,  $J = 8,2 ; 1,9$  Hz) couplant avec deux autres protons aromatiques en *ortho* et en *meta* ; un proton aromatique à  $\delta_{\text{H}}$  7,41 (1H ; *d* ;  $J = 1,9$  Hz) couplant en *meta* ; un proton aromatique à  $\delta_{\text{H}}$  6,82 (1H ; *d* ;  $J = 8,2$  Hz) couplant en *ortho* ; un groupement méthoxyle sous forme de singulet à  $\delta_{\text{H}}$  3,81.



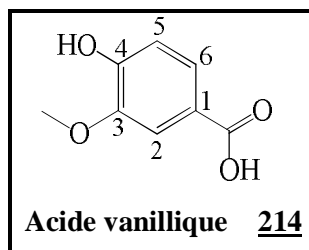
**Figure II.31 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gag-2

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.32) présente huit signaux de carbone dont un  $-\text{OCH}_3$ , trois CH aromatiques et quatre carbones quaternaires dont un carbonyle. Au vu des intégrations protons, du nombre de carbone et de la formule brute ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ ), cela laisse supposer un cycle aromatique tri-substitué ayant pour substituant un groupement acide carboxylique  $-\text{COOH}$ , un groupement hydroxyle  $-\text{OH}$  et un groupement méthoxyle  $-\text{OCH}_3$ .



**Figure II.32 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gag-2

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé Gag-2 avec celles de la littérature nous a permis d'identifier le composé Gag-2 à l'Acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (Acide vanillique) **214**, composé connu, précédemment isolé de *Cynanchum paniculatum* (Weon et al., 2012) et de *Leptoderris fasciculata* (Kouame, 2012) et connu pour ses propriétés neuroprotectrices (Weon et al., 2012).



**Tableau II.7 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gag-2

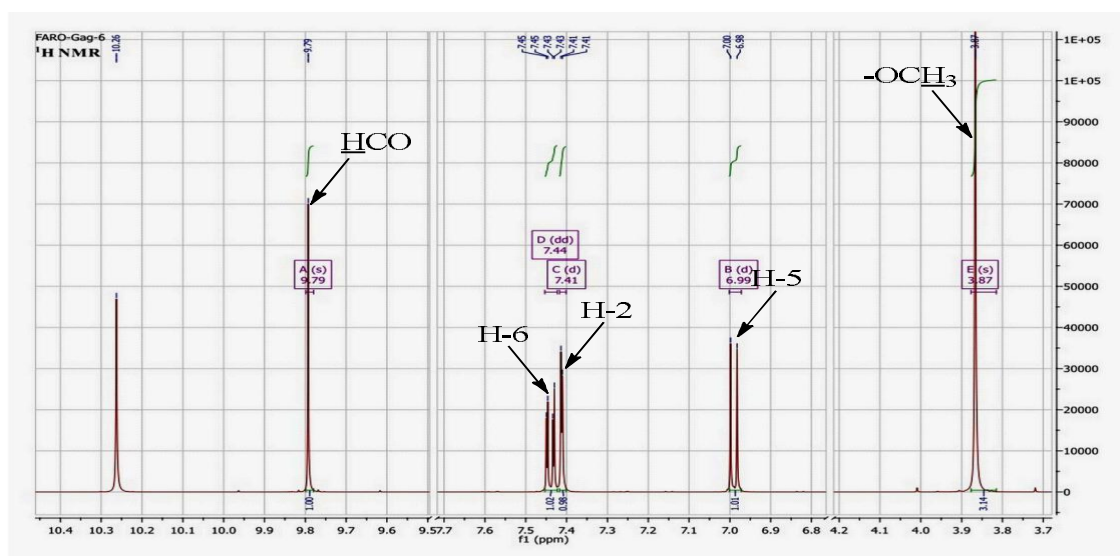
| N°               | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | (Kouame, 2012)* |
|------------------|-------------------------------------|---------------------|-----------------|
| 1                | -                                   | 123,1               | 123,0           |
| 2                | 7,41 (d ; 1,9)                      | 112,7               | 113,5           |
| 3                | -                                   | 147,2               | 149,1           |
| 4                | -                                   | 151,0               | 152,1           |
| 5                | 6,82 (d ; 8,2)                      | 114,9               | 115,5           |
| 6                | 7,44 (dd ; 8,2 ; 1,9)               | 123,4               | 124,9           |
| COOH             | -                                   | 166,8               | 167,5           |
| OCH <sub>3</sub> | 3,82 (s)                            | 55,5                | 56,4            |
| OH               | -                                   | -                   | -               |

\* Données enregistrées dans l'Acétone- $d_6$  à 125 MHz

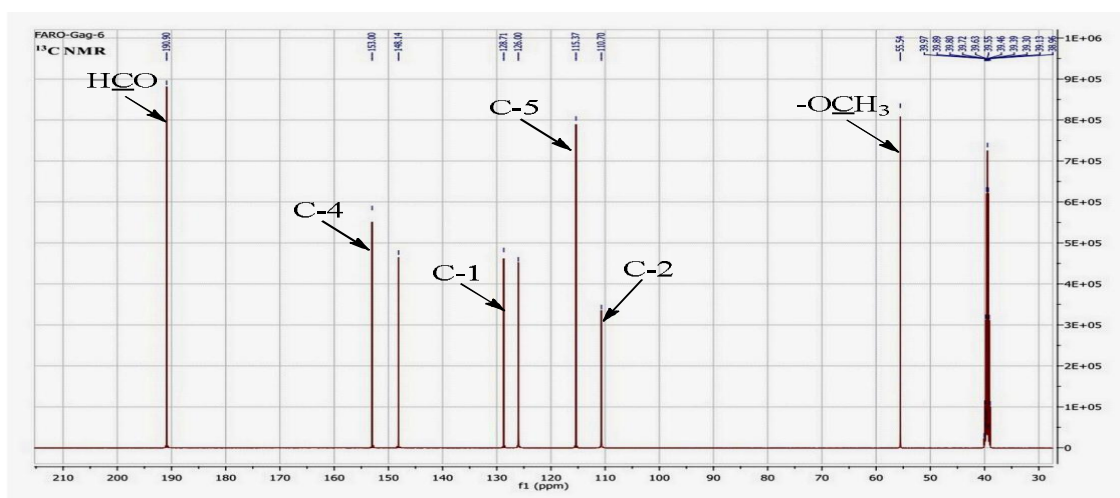
### II.2.4.1.3. Identification du composé Gag-6

Le composé Gag-6 obtenu des graines de *G. aqualla* a précipité sous forme de poudre blanche soluble dans le MeOH. Il donne une réaction positive au test au  $\text{FeCl}_3$  caractéristique des composés phénoliques.

La comparaison des données spectrales de ce composé avec celles du composé Gag-2 révèle de grandes similitudes. La différence majeure se situe au niveau du signal d'un proton résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  9,76 (1H, s) et qui corréle en HSQC avec un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  190,9. Ce signal est attribuable au proton d'un groupement aldéhyde (Mukonyi *and* Ndiege, 2001). Ainsi, le composé Gag-6 possède un groupement  $-\text{HCO}$  en lieu et place du groupement  $-\text{COOH}$  dans le composé Gag-2. L'attribution complète des différents signaux de protons et carbones ainsi que les positions relatives des substituants ont été rendues possible grâce aux expériences DEPT, COSY, HSQC et HMBC.

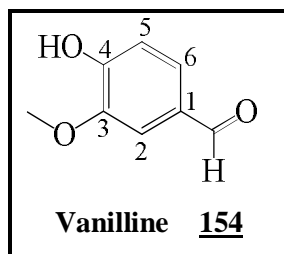


**Figure II.33 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz) de Gag-6



**Figure II.34 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz) de Gag-6

Tenant en compte toutes ces considérations, et en comparaison avec les données de la littérature, Gag-6 a été identifié comme étant la 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldehyde connue sous le nom de Vanilline **154** (Xiang *et al.*, 2011). Il a précédemment été isolé de *Gardenia volkensii* (Bernard *and* Runner, 2007).



**Tableau II.8 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gag-6

| N°               | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | (Xiang <i>et al.</i> , 2011)* |
|------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| 1                | -                                   | 128,7               | 126,1                         |
| 2                | 7,41 ( <i>d</i> ; 1,9)              | 110,7               | 115,1                         |
| 3                | -                                   | 148,1               | 148,1                         |
| 4                | -                                   | 153,0               | 152,7                         |
| 5                | 6,82 ( <i>d</i> ; 8,0)              | 115,4               | 110,0                         |
| 6                | 7,44 ( <i>dd</i> ; 8,0 ; 1,9)       | 126,0               | 129,8                         |
| HCO              | 9,76 ( <i>s</i> )                   | 190,9               | 190,1                         |
| OCH <sub>3</sub> | 3,87 ( <i>s</i> )                   | 55,5                | 55,4                          |
| OH               | 10,26 ( <i>s</i> )                  | -                   | -                             |

\* Données enregistrés dans l'Acétone- $d_6$  à 100 MHz.

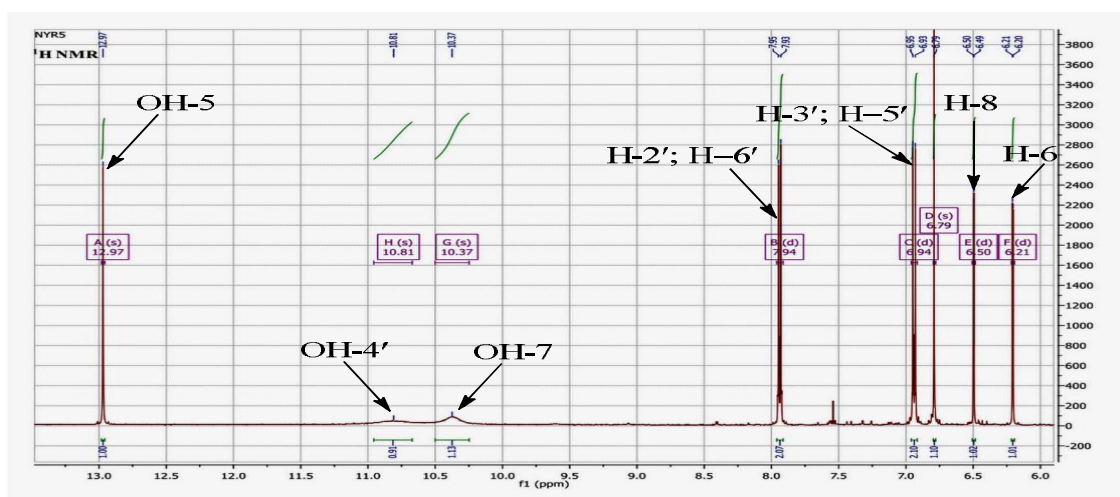


## II.2.4.2. Les flavonoïdes

### II.2.4.2.1. Identification du composé NYR-5

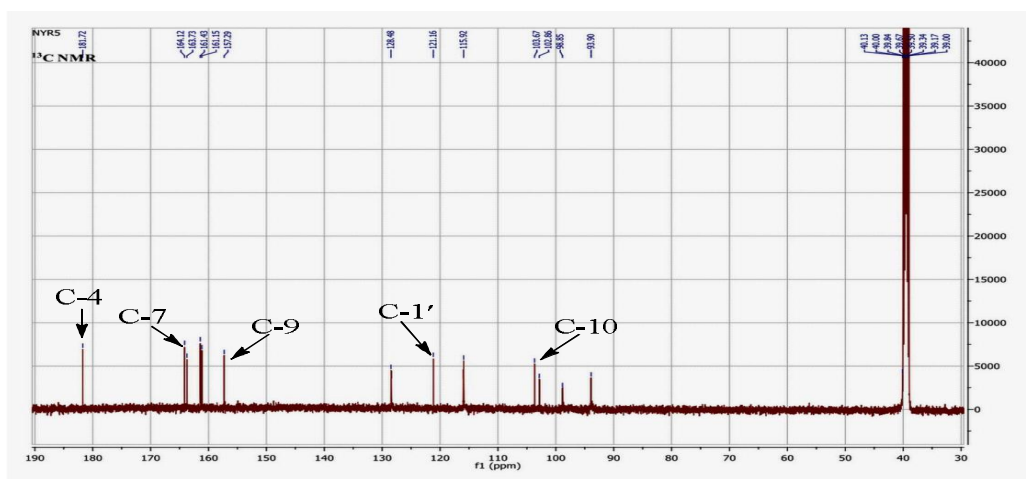
Le composé NYR-5 a été obtenu des tiges de *C. populnea* et se présente sous forme de poudre jaune pâle qui a précipité dans le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (30 : 70). Il répond positivement au test de Shinoda des flavonoïdes.

Le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé NYR-5 (Figure II.35) présente un profil relativement simple, laissant apparaître deux doublets à δ<sub>H</sub> 7,94 (*J* = 8,8 Hz) et 6,94 (*J* = 8,8 Hz), intégrant chacun pour deux protons. Il s'agit ici d'un système AA'BB' de deux paires de protons aromatiques couplés en *ortho* et suggérant la présence d'un noyau aromatique symétrique. Nous avons également pu mettre en évidence un système AB de deux protons couplant en *meta* et dont les signaux résonnent à δ<sub>H</sub> 6,50 (1H ; *d* ; *J* = 2,1 Hz) et 6,94 (1H ; *d* ; *J* = 2,1 Hz), deux singulets d'un proton chacun à δ<sub>H</sub> 12,97 et 6,79 correspondant pour le premier à un groupement hydroxyle chélaté en position 5 et pour le second au proton en position 3 du cycle C d'une flavone (Markham *and* Geiger, 1994).



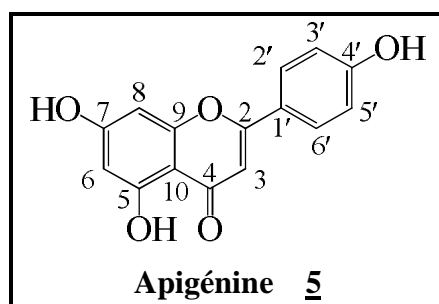
**Figure II.35 :** Spectre de RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) de NYR-5

Le spectre RMN <sup>13</sup>C (Figure II.36) a révélé 15 signaux de carbones parmi lesquels on a dénombré 7 CH aromatiques après analyse des spectres DEPT-135. On a ainsi pu observer parmi ces signaux, le signal à δ<sub>C</sub> 181,7 caractéristique d'un groupe carbonyle conjugué (Tanaka *et al.*, 1984), et les signaux à δ<sub>C</sub> 128,5 et 115,9 caractéristiques chacun d'une paire de carbones magnétiquement équivalents.



**Figure II.36 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NYR-5

L'attribution complète des signaux réalisée au moyen de l'analyse des spectres de corrélations COSY, HSQC et HMBC, ainsi que la comparaison des données spectrales avec celles relevées dans la littérature, ont conduit à l'identification de NYR-5 à l'Apigénine 5. Ce composé a déjà été caractérisé dans le genre *Cissus*, et plus particulièrement chez *C. digitata* (Al-Saïd et *al.*, 1991).



**Tableau II.9 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NYR-5

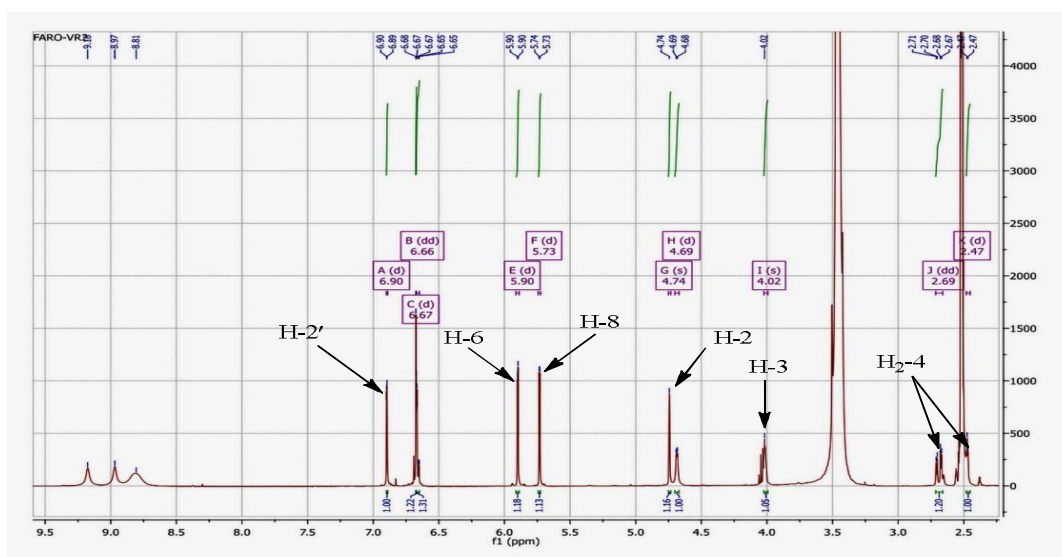
| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult. ; $J$ (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | Wawer and Zielinska (2001)* |
|----|--|---------------------|-----------------------------|
| 1  | -                                      | -                   | -                           |
| 2  | -                                      | 163,7               | 164,1                       |
| 3  | 6,79 (s)                               | 102,9               | 102,8                       |
| 4  | -                                      | 181,7               | 181,8                       |
| 5  | -                                      | 161,4               | 161,1                       |
| 6  | 6,21 (d ; 2,1)                         | 98,9                | 98,8                        |
| 7  | -                                      | 164,1               | 163,8                       |
| 8  | 6,50 (d ; 2,1)                         | 93,9                | 94,0                        |
| 9  | -                                      | 157,3               | 157,3                       |
| 10 | -                                      | 103,7               | 103,7                       |
| 1' | -                                      | 121,2               | 121,3                       |
| 2' | 7,94 (d ; 8,8)                         | 128,5               | 128,4                       |
| 3' | 6,94 (d ; 8,9)                         | 115,9               | 116,0                       |
| 4' | -                                      | 161,1               | 161,5                       |
| 5' | 6,94 (d ; 8,9)                         | 115,9               | 116,0                       |
| 6' | 7,94 (d ; 8,8)                         | 128,5               | 128,4                       |

\* Données enregistrées dans le DMSO- $d_6$  à 75 MHz

### II.2.4.2.2. Identification du composé Vr-2

Le composé Vr-2 a été obtenu du bois de racines de *V. paradoxa*. Il précipite dans l'AcOEt sous forme de poudre blanche soluble dans le MeOH et répond positivement au test de Shinoda caractéristique des flavonoïdes, en donnant une coloration rouge-brique.

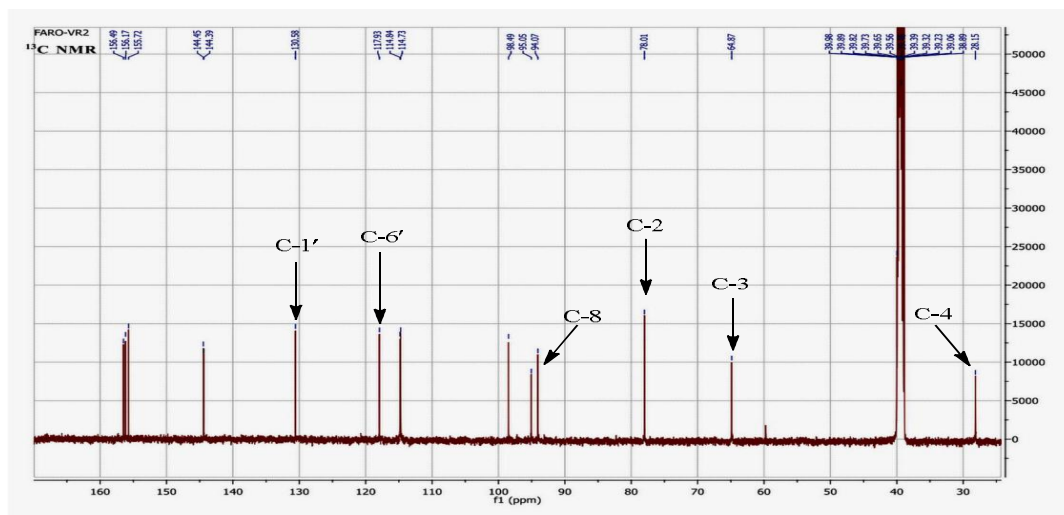
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé Vr-2 (Figure II.37) enregistré dans le DMSO- $d_6$  révèle les signaux de 5 protons aromatiques entre  $\delta_{\text{H}}$  6,1 et 7,7 attribuables aux protons aromatiques des cycles A et B d'un flavonoïde substitué en 5, 7, 3' et 4' (Lhuillier, 2007). Sur ce spectre, on observe à  $\delta_{\text{H}}$  5,90 (1H ; *d* ;  $J = 2,3$  Hz) et 5,73 (1H ; *d* ;  $J = 2,3$  Hz) deux protons aromatiques couplant entre eux et dont la même constante de couplage ( $J = 2,3$  Hz) est typique d'un couplage en *meta* sur un cycle aromatique. Ces deux signaux sont respectivement caractéristiques des protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Le spectre présente également les signaux de trois autres protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  6,90 (1H ; *d* ;  $J = 1,5$  Hz) ; 6,68 (1H ; *d* ;  $J = 8,0$  Hz) et 6,66 (1H ; *dd* ;  $J = 8,2$  ; 1,7 Hz) formant un système ABX d'un noyau benzénique 1,3,4-trisubstitué. Ces signaux sont caractéristiques du cycle B 1',3',4'-trisubstitué d'un flavonoïde. Le spectre présente également les signaux de deux protons non équivalents d'un  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{H}}$  2,69 (1H ; *dd* ;  $J = 16,3$  ; 4,4 Hz) et 2,47 (1H ; *d* ;  $J = 3,7$  Hz), ainsi que les signaux de deux protons oxyméthines sous forme de singulets larges à  $\delta_{\text{H}}$  4,74 (1H, *sl*, H-2) et 4,02 (1H, *sl*, H-3). Toutes ces données sont caractéristiques d'un flavonoïde sans groupement carbonyle, suggérant une structure de type flavane (Fathy et al., 2002), substituée en position 3 par un groupement hydroxyle dont le signal apparaît à  $\delta_{\text{H}}$  4,69 (1H ; *d* ;  $J = 4,0$  Hz).



**Figure II.37 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Vr-2

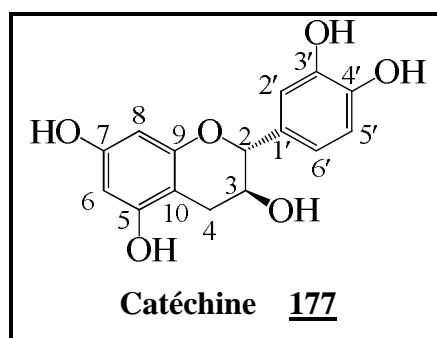
L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.38) vient confirmer les précédentes assertions en montrant les signaux de 15 carbones qui, après analyse des spectres DEPT-135 et HSQC ont été répartis en 7 CH dont 2 hybridés  $\text{sp}^3$  à  $\delta_{\text{C}}$  64,9 et 78,0 ; 5 aromatiques à  $\delta_{\text{C}}$  94,0 ; 95,1 ; 114,7 ;

114,8 et 118,0 ; et un CH<sub>2</sub> à  $\delta$ c 28,2 ; ce qui permet de déduire la présence de 7 carbones quaternaires aromatiques, dont 5 oxygénés à  $\delta$ c 144,5 ; 144,4 ; 156,5 ; 156,2 et 155,7 ; les deux autres carbones non oxygénés résonnent à  $\delta$ c 98,5 et 130,6. Ces signaux des carbones confirment l'hypothèse d'un squelette de type flavane du composé Vr-2 (Fathy et *al.*, 2002).



**Figure II.38 :** Spectre RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) de Vr-2

Toute cette analyse nous a permis d'identifier le composé Vr-2 comme étant la Catéchine **177**, composé connu, précédemment isolé des graines (Zhang et *al.*, 2014) et des écorces (Eyong et *al.*, 2015) de *V. paradoxa*. Elle est connue pour ses propriétés antioxydantes, antiradicalaires et inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase (Kato et *al.*, 2008).



**Tableau II.10 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Vr-2

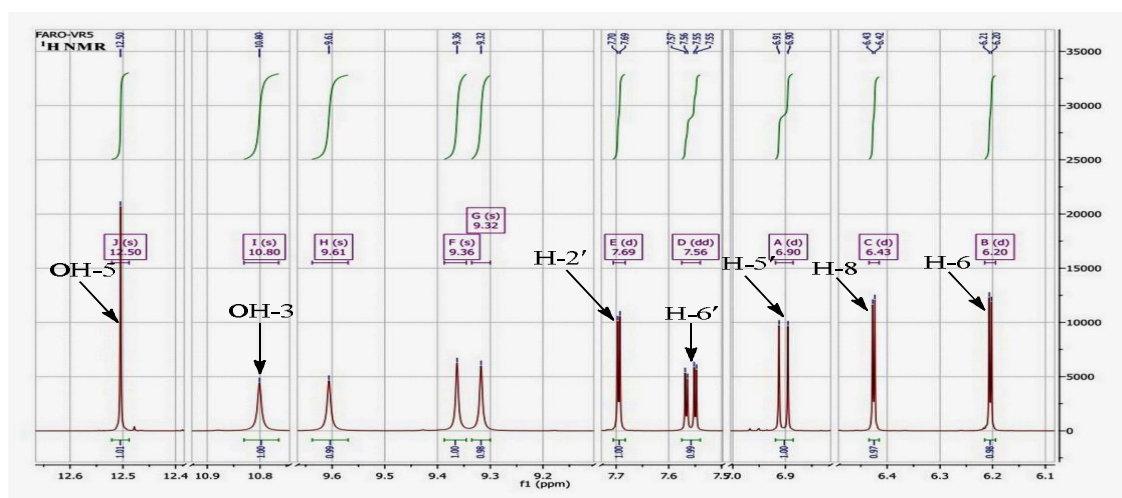
| N°    | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J (Hz))                      | $\delta_{\text{C}}$ | Almahy and Alhassan (2011)* |
|-------|--|---------------------|-----------------------------|
| 2     | 4,74 ( <i>sl</i> )                                       | 78,0                | 80,9                        |
| 3     | 4,02 ( <i>sl</i> )                                       | 64,9                | 66,2                        |
| 4     | 2,69 ( <i>dd</i> ; 16,3 ; 4,4)<br>2,47 ( <i>d</i> , 3,7) | 28,2                | 27,7                        |
| 5     | -  | 156,2               | 156,0                       |
| 6     | 5,90 ( <i>d</i> ; 2,3)                                   | 95,1                | 93,7                        |
| 7     | -  | 156,5               | 156,                        |
| 8     | 5,73 ( <i>d</i> ; 2,3)                                   | 94,0                | 95,0                        |
| 9     | -  | 155,7               | 155,2                       |
| 10    | -  | 98,5                | 99,0                        |
| 1'    | -  | 130,6               | 130,5                       |
| 2'    | 6,90 ( <i>d</i> ; 1,5)                                   | 114,7               | 115,0                       |
| 3'    | -  | 144,5               | 144,7                       |
| 4'    | -  | 144,4               | 144,7                       |
| 5'    | 6,68 ( <i>d</i> ; 8,0)                                   | 114,8               | 114,4                       |
| 6'    | 6,66 ( <i>dd</i> ; 8,2 ; 1,7)                            | 118,0               | 118,3                       |
| OH-3  | 4,69 ( <i>d</i> ; 4,0)                                   | -                   | -                           |
| OH-5  | 8,81 ( <i>sl</i> )                                       | -                   | -                           |
| OH-7  | 8,81 ( <i>sl</i> )                                       | -                   | -                           |
| OH-3' | 8,97 ( <i>s</i> )  | -                   | -                           |
| OH-4' | 9,18 ( <i>s</i> )  | -                   | -                           |

\* Données enregistrées dans le DMSO- $d_6$  à 100 MHz

### II.2.4.2.3. Identification du composé Vr-5

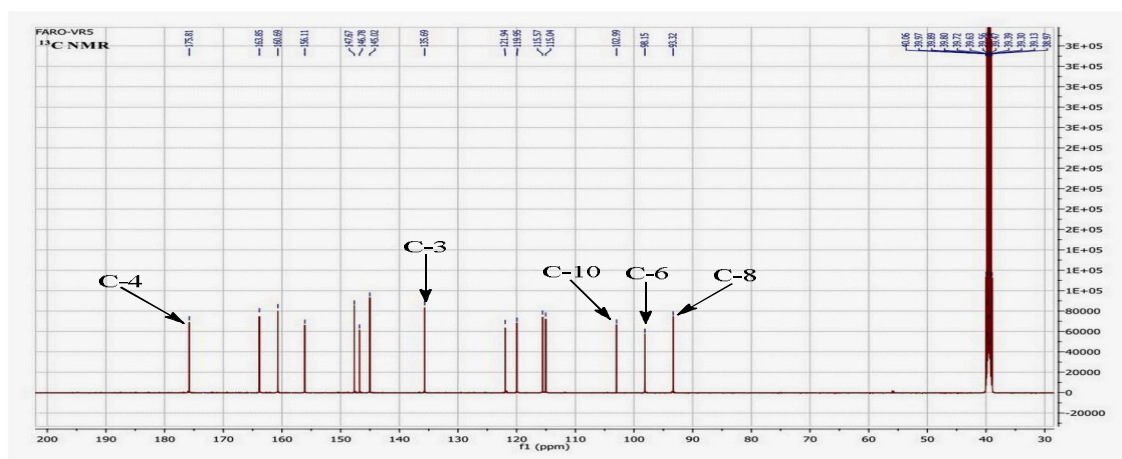
Le composé Vr-5 a été isolé du bois des racines de *V. paradoxa* et se présente sous forme de poudre jaune dans le système AcOEt/MeOH (95:5). Soluble dans le MeOH, il donne une réaction positive au test de Shinoda laissant envisager une structure de type flavonoïde.

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé (Figure II.39) montre des similitudes avec celui du composé Vr-2 précédent laissant apparaître des signaux caractéristiques des cycles A et B d'un flavonoïde substitué au niveau des positions 5, 7, 3' et 4'. A  $\delta_{\text{H}}$  6,20 (1H ; *d* ;  $J = 2,1$  Hz) et 6,43 (1H ; *d* ;  $J = 2,1$  Hz), on a les signaux de deux protons aromatiques couplant en *meta*. Un système ABX de trois protons d'un noyau benzénique 1,3,4-trisubstitué apparaît à  $\delta_{\text{H}}$  7,69 (1H ; *d* ;  $J = 2,2$  Hz) ; 7,56 (1H, *dd*,  $J = 8,5$  ; 2,2 Hz) et 6,90 (1H ; *d* ;  $J = 8,5$  Hz). On note par ailleurs la présence d'un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  12,50 (1H ; *s*) suggérant la présence d'un groupement hydroxyle chélaté, probablement due à la proximité d'un groupement carbonyle. De cette analyse, il ressort qu'on est donc en présence d'une unité flavonoïdique de type flavonol tétrasubstituée en positions 5, 7, 3' et 4' par des groupements hydroxyles, les autres groupements hydroxyles apparaissant respectivement à 10,80 (1H, *s*) ; 9,61 (1H, *s*) ; 9,36 (1H, *s*) et 9,32 (1H, *sl*).



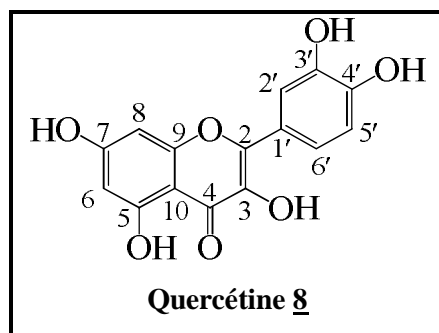
**Figure II.39 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) élargi de Vr-5

Comme pour le composé Vr-2, le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Vr-5 (Figure II.40) présente 15 signaux de carbones à la seule différence que celui-ci ne comporte aucun CH, ni  $\text{CH}_2$  hybridé  $\text{sp}^3$ . Parmi les signaux observés, on distingue dix carbones quaternaires dont un carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  175,8 et un carbone oxygéné caractéristique d'un flavonol à  $\delta_{\text{C}}$  135,7. On observe en outre les signaux de cinq CH aromatiques (Tableau II.11).



**Figure II.40 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Vr-5

Toutes ces données comparées avec celles relevées dans la littérature (Lhuillier, 2007), ont permis de suggérer pour le composé Vr-5 la structure ci-dessous qui est celle de la 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol communément connue sous le nom de Quercétine **8**. C'est un composé qui a déjà été isolé des graines de *V. paradoxa* par Zhang *et al.*, (2014). Réputé pour être le plus actif des flavonoïdes, il est connu pour ses propriétés antioxydantes (Mc Anlis *et al.*, 1999), anti-inflammatoires (Tarayre *and* Laressergues, 1977), anti-histaminiques (Thornhill *and* Kelly, 2000), et inhibitrices de l' $\alpha$ -glucosidase (Kato *et al.*, 2008).



**Tableau II.11 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Vr-5

| N°    | $\delta_{\text{H}}$ (Mult. ; $J$ (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | Wawer and Zielinska (2001)* |
|-------|--|---------------------|-----------------------------|
| 2     | -                                      | 146,8               | 146,9                       |
| 3     | -                                      | 135,7               | 135,9                       |
| 4     | -                                      | 175,8               | 176,0                       |
| 5     | -                                      | 160,7               | 160,9                       |
| 6     | 6,20 ( $d$ ; 2,1)                      | 98,2                | 98,3                        |
| 7     | -                                      | 163,9               | 164,0                       |
| 8     | 6,43 ( $d$ ; 2,1)                      | 93,2                | 93,5                        |
| 9     | -                                      | 156,1               | 156,3                       |
| 10    | -                                      | 103,0               | 103,2                       |
| 1'    | -                                      | 121,9               | 122,2                       |
| 2'    | 7,69 ( $d$ ; 2,2)                      | 115,0               | 115,3                       |
| 3'    | -                                      | 145,0               | 145,2                       |
| 4'    | -                                      | 147,7               | 147,8                       |
| 5'    | 6,90 ( $d$ ; 8,5)                      | 115,6               | 115,8                       |
| 6'    | 7,56 ( $dd$ ; 8,5 ; 2,2)               | 119,9               | 120,1                       |
| OH-3  | 10,80 ( $s$ )                          | -                   | -                           |
| OH-5  | 12,50 ( $s$ )                          | -                   | -                           |
| OH-7  | 9,61 ( $s$ )                           | -                   | -                           |
| OH-3' | 9,36 ( $s$ )                           | -                   | -                           |
| OH-4' | 9,32 ( $s$ )                           | -                   | -                           |

\*Données enregistrées dans le DMSO- $d_6$  à 75 MHz

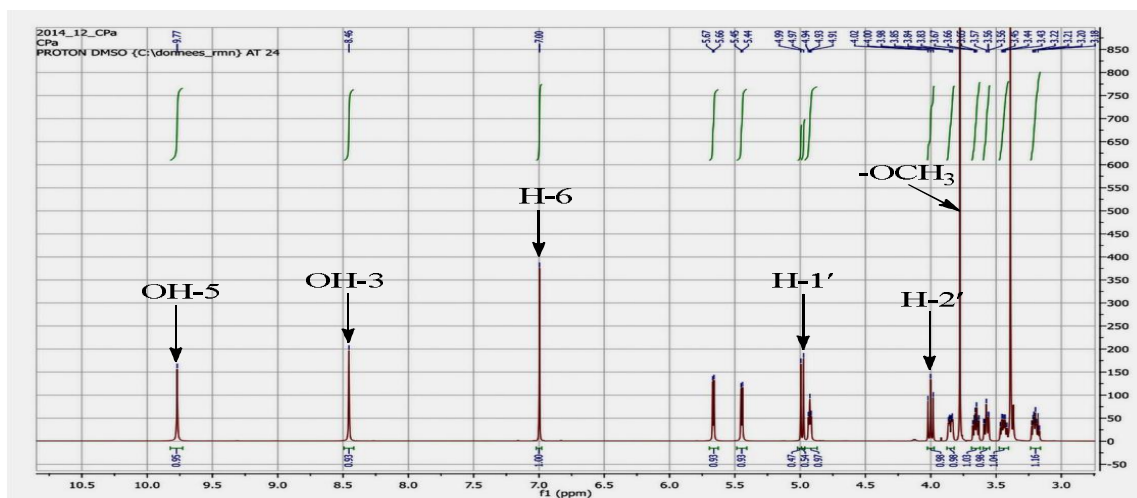


## II.2.4.3. Les isocoumarines

### II.2.4.3.1. Identification du composé N9-A4

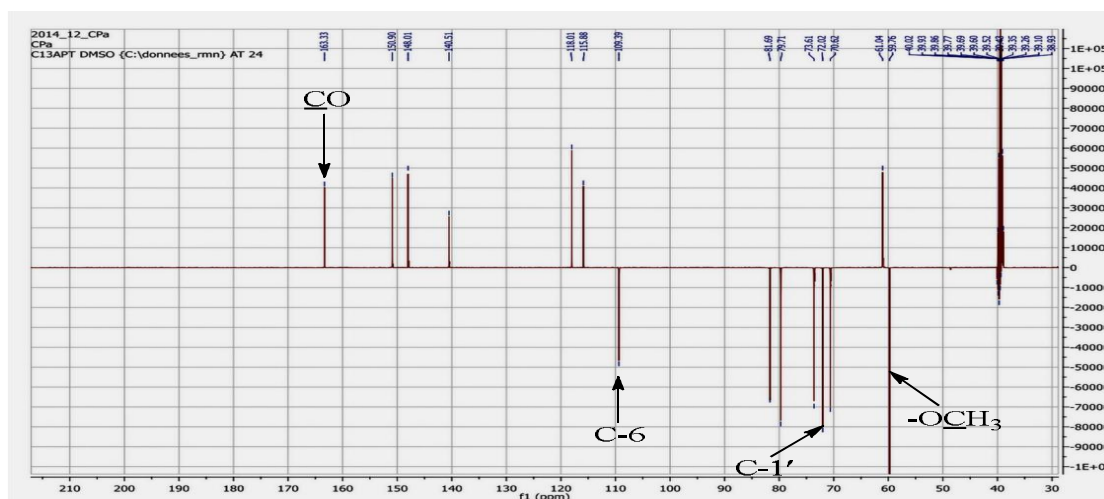
Le composé N9-A4 a précipité dans la fraction à l'AcOEt des racines de *C. populnea* et a également été obtenu au cours de la CC de cet extrait, où il a précipité dans le système AcOEt/MeOH (90:10) sous forme de cristaux blancs.

L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.41) du composé N9-A4 a montré un profil relativement simple, permettant de mettre en évidence la présence d'un proton aromatique sous forme de singulet à  $\delta_{\text{H}}$  7,00 (1H, *s*) caractéristique d'un cycle benzénique pentasubstitué et un groupement méthoxyle à  $\delta_{\text{H}}$  3,78. On observe également sur ce spectre les signaux d'une unité osidique dont le proton anomérique résonne à  $\delta_{\text{H}}$  4,99 (1H ; *d*) avec une large constante de couplage  $J = 10,5$  Hz traduisant la configuration  $\beta$  de ce dernier (Bahia *et al.*, 2010). Les autres signaux de ce sucre résonnent à  $\delta_{\text{H}}$  4,00 (1H ; *dd* ;  $J = 10,5$  ; 9,5) ; 3,66 (1H ; *td* ;  $J = 9,1$  ; 5,4) ; 3,20 (1H ; *td* ;  $J = 9,3$  ; 5,4) ; 3,58 (1H ; *ddd* ;  $J = 9,7$  ; 7,7 ; 2,1) ; 3,45 (1H ; *dd* ;  $J = 13,1$  ; 5,6) et 3,85 (1H ; *d* ;  $J = 11,6$ ). Les signaux de cinq protons échangeables avec le  $\text{D}_2\text{O}$  et attribuables à cinq groupements hydroxyles, étaient également visibles à  $\delta_{\text{H}}$  8,46 (1H, *s*) ; 9,77 (1H, *s*) ; 5,69 (1H ; *d* ;  $J = 5,4$  Hz) ; 5,47 (1H ; *d* ;  $J = 5,4$ ) et 4,94 (1H ; *t* ;  $J = 10,5$  Hz).



**Figure II.41 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de N9-A4

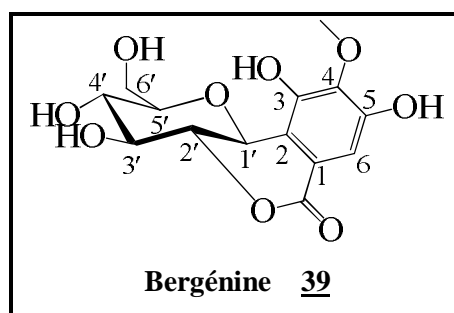
Le spectre APT (Figure II.42) de ce composé présente 14 signaux de carbones, entre autres : un groupement méthoxyle à  $\delta_{\text{C}}$  59,8 ; un oxyméthylène à  $\delta_{\text{C}}$  61,0 ; six méthines parmi lesquels un CH aromatique à  $\delta_{\text{C}}$  109,4 et cinq oxyméthines à  $\delta_{\text{C}}$  72,0 ; 79,7 ; 73,9 ; 70,9 ; et 81,9 ; et six carbones quaternaires dont un carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  163,3 et cinq carbones aromatiques à  $\delta_{\text{C}}$  118,0 ; 115,9 ; 148,0 ; 140,5 ; et 150,8. La comparaison des données spectroscopiques de l'unité osidique avec celle de la littérature, a permis d'identifier la présence du glucose, et le carbone anomérique à  $\delta_{\text{C}}$  72,0 suggère que le composé N9-A4 est un dérivé C-glucoside (Bahia *et al.*, 2010).



**Figure II.42 :** Spectre APT (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de N9-A4

L'absence sur le spectre proton du signal correspondant au groupement hydroxyle OH-2', la résonance du proton H-2' ( $\delta_H$  4,00) dans les champs plus faibles que ceux des autres protons du glucose à l'exception du proton anomérique ( $\delta_H$  4,99), ainsi que l'apparition du signal de C-2' à  $\delta_C$  79,7 suggèrent que les carbones C-2' et C-1 sont reliés par un groupement ester. L'hypothèse du C-glucoside ainsi que les positions des différents substituants ont été étayées par l'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC.

L'ensemble des données précédentes a permis d'établir la structure du composé N9-A4 comme étant la Bergénine **39**, composé isolé précédemment de *Cissus pteroclada* (Lin et al., 2012) et de plusieurs autres espèces végétales à l'instar de *Endopleura uchi* (Da Silva et al., 2009), *Bergenia ligulata* (Uddin et al., 2014), *Mallotus philippensis* (Khan et al., 2016) ..., etc. La Bergénine **39** est connue pour ses nombreuses propriétés parmi lesquelles les propriétés hépato-protectrices (Kim et al., 2000), antimicrobiennes (Da Silva et al., 2009), antiplasmodiales (Liang et al., 2013 ; Khan et al., 2016), cytotoxiques contre les cellules *HeLa* et *HepG2* (Liang et al., 2013), et neuro-protectrices (Takashi et al., 2003).



**Tableau II.12 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz), et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de N9-A4

| N°               | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz))                     | APT   | Lin et al. (2012)* |
|------------------|---|-------|--------------------|
| CO               | -   | 163,3 | 163,3              |
| 1                | -   | 118,0 | 118,0              |
| 2                | -   | 115,9 | 115,9              |
| 3                | -   | 148,0 | 148,0              |
| 4                | -   | 140,5 | 140,5              |
| 5                | -   | 150,8 | 150,9              |
| 6                | 7,00 ( <i>s</i> )   | 109,4 | 109,4              |
| OCH <sub>3</sub> | 3,78 ( <i>s</i> )   | 59,8  | 59,8               |
| OH-3             | 8,46 ( <i>s</i> )   | -     | -                  |
| OH-5             | 9,77 ( <i>s</i> )   | -     | -                  |
| 1'               | 4,99 ( <i>d</i> ; 10,5)                                   | 72,0  | 72,0               |
| 2'               | 4,00 ( <i>dd</i> ; 10,5 ; 9,5)                            | 79,7  | 79,7               |
| 3'               | 3,66 ( <i>td</i> ; 9,1 ; 5,4)                             | 73,9  | 73,6               |
| 4'               | 3,20 ( <i>td</i> ; 9,3 ; 5,4)                             | 70,9  | 70,6               |
| 5'               | 3,58 ( <i>ddd</i> ; 9,7 ; 7,7 ; 2,1)                      | 81,9  | 81,7               |
| 6'               | 3,45 ( <i>dd</i> ; 13,1 ; 5,6)<br>3,85 ( <i>d</i> ; 11,6) | 61,0  | 61,1               |
| OH-3'            | 5,69 ( <i>d</i> ; 5,4)                                    | -     | -                  |
| OH-4'            | 5,47 ( <i>d</i> ; 5,4)                                    | -     | -                  |
| OH-6'            | 4,94 ( <i>t</i> ; 10,5)                                   | -     | -                  |

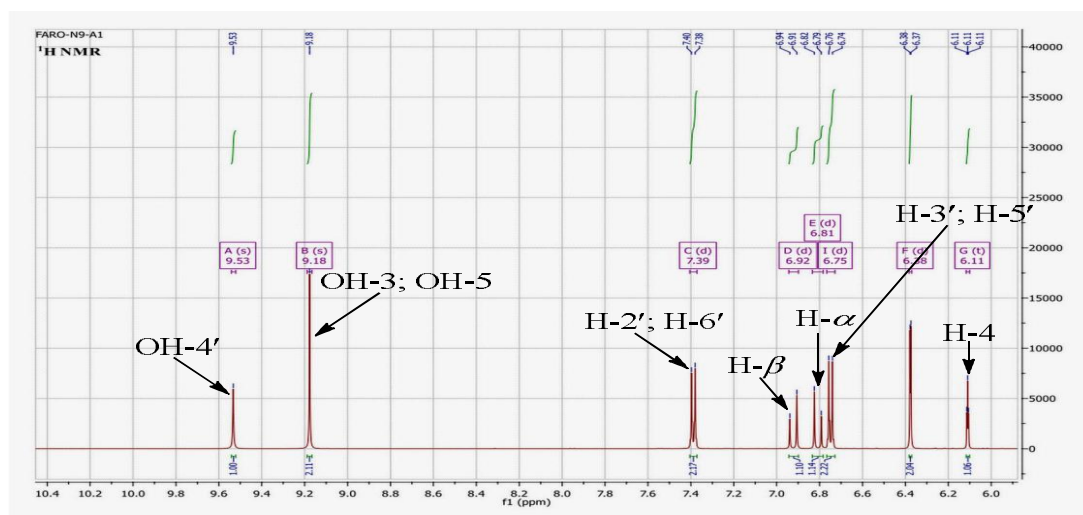
\* Données enregistrées dans le DMSO- $d_6$  à 125 MHz

## II.2.4.4. Les stilbènes

### II.2.4.4.1. Identification du composé N9-A1

Le composé N9-A1 a été isolé des racines de *C. populnea* et a précipité dans le système Hex/AcOEt (30 : 70) sous forme de poudre jaunâtre soluble dans le MeOH.

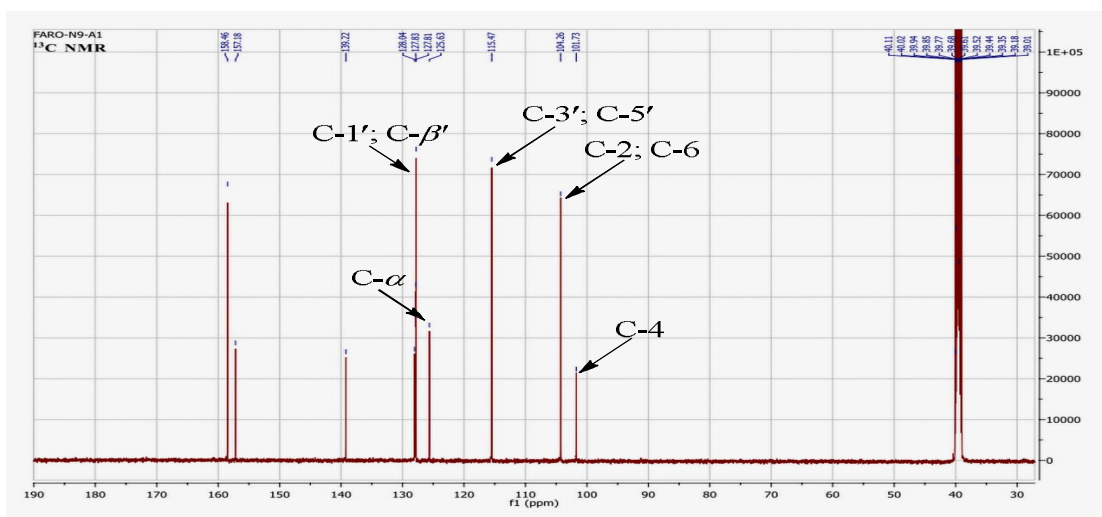
Son spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.43) a montré des signaux caractéristiques d'un stilbène. En effet, on observe sur ce spectre des signaux caractéristiques d'un système  $\text{AB}_2$  de trois protons aromatiques dont deux résonnent à  $\delta_{\text{H}}$  6,38 (2H, *s*,  $J = 2,1$  Hz) et le troisième à  $\delta_{\text{H}}$  6,11 (1H ; *t* ;  $J = 2,1$  Hz), un système AB de deux protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  6,92 (1H, *d*,  $J = 16,3$  Hz) et 6,81 (1H, *d*,  $J = 16,3$  Hz) avec une constante de couplage élevée ( $J = 16$  Hz) qui confère à la double liaison la conformation *trans*. On note également dans ce spectre un système  $\text{AA}'\text{BB}'$  de quatre protons à  $\delta_{\text{H}}$  7,39 (1H, *d*,  $J = 8,6$  Hz) et 6,75 (1H, *d*,  $J = 8,6$  Hz), caractéristique d'un noyau benzénique *para*-substitué.



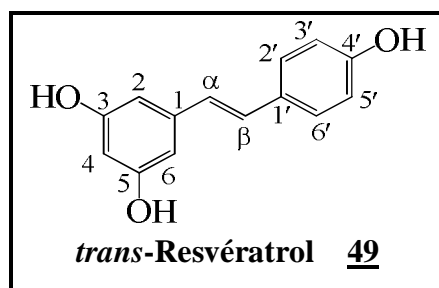
**Figure II.43 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de N9-A1

Son spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.44) présente les signaux de 14 carbones qui grâce aux spectres DEPT-135 et HSQC ont été repartis en 9 méthines et 5 carbones quaternaires. L'exploitation des autres spectres de RMN 2D (COSY et HMBC) a permis l'attribution complète de tous les signaux.

L'ensemble de ces données spectroscopiques en comparaison avec celles présentes dans la littérature nous a permis d'identifier le composé N9-A1 comme étant le *trans*-Resvératrol **49**, composé connu, précédemment isolé du genre *Cissus* plus précisément de l'espèce *C. repens* (Wang et al., 2007), ainsi que de plusieurs autres plantes à l'instar de *Morus alba*, *Vitis vinifera* (Park and Boo, 2013), ...etc. Il est connu pour ses propriétés anticancéreuses, anti-inflammatoires, antioxydantes, vasorelaxantes, estrogéniques (Frémont, 2000), antidépresseuses et neuroprotectrices (Xu et al., 2010).



**Figure II.44 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de N9-A1



**Tableau II.13 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de N9-A1

| N°          | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz))* | $\delta_{\text{C}}$ | Lee et al. (2009)* |
|-------------|--|---------------------|--------------------|
| 1           | -                                      | 139,2               | 141,1              |
| 2           | 6,38 ( <i>d</i> ; 2,1)                 | 104,3               | 105,8              |
| 3           | -                                      | 159,0               | 159,7              |
| 4           | 6,11 ( <i>t</i> ; 2,1)                 | 101,7               | 102,6              |
| 5           | -                                      | 159,0               | 159,7              |
| 6           | 6,38 ( <i>d</i> ; 2,1)                 | 104,3               | 105,8              |
| $\alpha$    | 6,81 ( <i>d</i> ; 16,3)                | 125,6               | 127,0              |
| $\beta$     | 6,92 ( <i>d</i> ; 16,3)                | 127,8               | 129,4              |
| 1'          | -                                      | 127,8               | 130,4              |
| 2'          | 7,39 ( <i>d</i> ; 8,6)                 | 128,0               | 128,8              |
| 3'          | 6,75 ( <i>d</i> ; 8,6)                 | 115,8               | 116,5              |
| 4'          | -                                      | 157,2               | 158,4              |
| 5'          | 6,75 ( <i>d</i> ; 8,6)                 | 115,8               | 116,5              |
| 6'          | 7,39 ( <i>d</i> ; 8,6)                 | 128,0               | 128,8              |
| OH-3 ; OH-5 | 9,18 ( <i>s</i> )                      | -                   | -                  |
| OH-4'       | 9,53 ( <i>s</i> )                      | -                   | -                  |

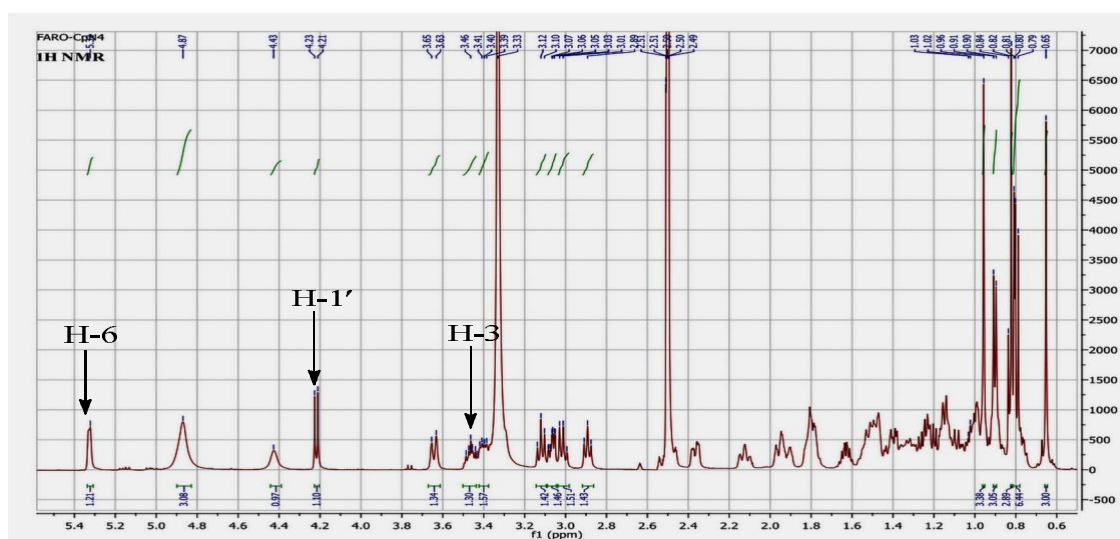
\* Données enregistrées dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 125 MHz

## II.2.5. Les glucosides stéroïdiques

### II.2.5.1. Identification du composé N9-A3

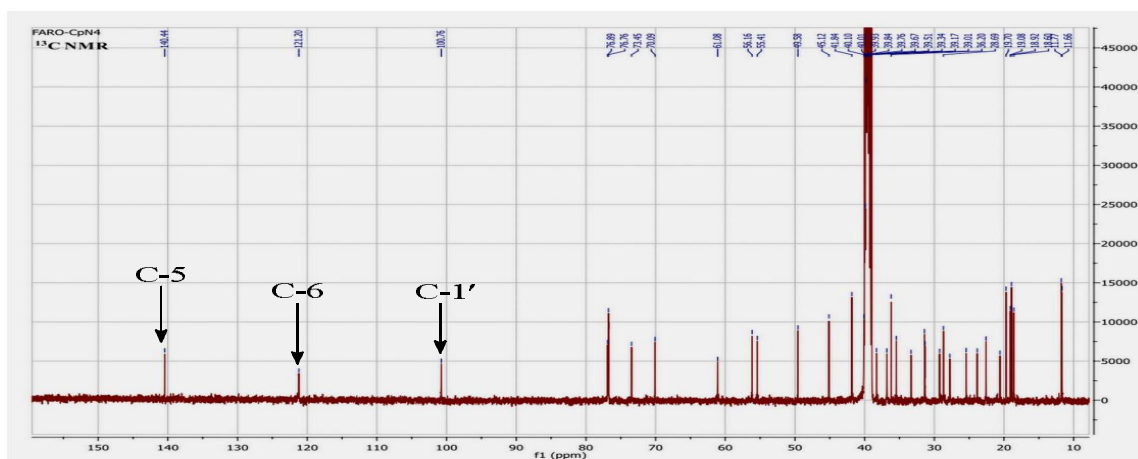
Ce composé a été obtenu des racines de *C. populnea* et des graines de *G. aqualla*. Il se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1:1) et dans le DMSO. Il donne une coloration bleu-verdâtre au test de Liebermann-Bürchard indiquant ainsi son appartenance à la classe des stéroïdes.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé (Figure II.45) présente le signal d'un proton oléfinique à  $\delta_{\text{H}}$  5,33 (1H, *m*), les signaux de six groupements méthyles dans la région allant de  $\delta_{\text{H}}$  0,65 à 0,96 parmi lesquels deux méthyles angulaires à  $\delta_{\text{H}}$  0,65 (3H, *s*) et 0,96 (3H, *s*) ; trois doublets à  $\delta_{\text{H}}$  0,90 (3H ; *d* ;  $J = 6,5$  Hz), 0,81 (3H ; *d* ;  $J = 6,9$  Hz) et 0,80 (3H ; *d* ;  $J = 6,9$  Hz) ; et enfin un signal sous forme de multiplet à 0,82 (3H, *m*,  $J = 7,2$  Hz). Le signal sous forme de multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  3,46 (1H ; *m*) suggère la présence d'un proton oxyméthine. Ce sont là des signaux typiquement caractéristiques des sitostérols (Sandjo, 2009). En plus de ces signaux de stéroïdes, on observe sur ce spectre des signaux caractéristiques d'une unité osidique parmi lesquels un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  4,22 (1H ; *d* ;  $J = 7,8$  Hz) assigné à un proton anomérique, dont la large constante de couplage  $^3J$  suggère ainsi une configuration  $\beta$  de ce dernier (Bahia et al., 2010). Cinq autres signaux sont présents sur ce spectre de RMN  $^1\text{H}$  et correspondent sans doute aux protons de la partie osidique. Ces signaux apparaissant à  $\delta_{\text{H}}$  3,64 (1H ; *d* ;  $J = 11,1$  Hz) ; 3,40 (1H ; *dd* ;  $J = 11,1$  ; 5,4 Hz) ; 3,02 (1H ; *t* ;  $J = 8,9$  Hz) ; 3,12 (1H ; *t* ;  $J = 8,8$  Hz) ; 2,90 (1H ; *t* ;  $J = 8,3$  Hz) ; 3,07 (1H ; *ddd* ;  $J = 11,1$  ; 5,8 ; 1,9 Hz), ont été respectivement attribués (Tableau II.14). Les signaux à 4,87 (3H, *sl*) et à 4,43 (1H, *sl*) ont été attribués à quatre protons échangeables avec  $\text{D}_2\text{O}$  due aux quatre groupements hydroxyles de l'unité osidique.



**Figure II.45 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de N9-A3

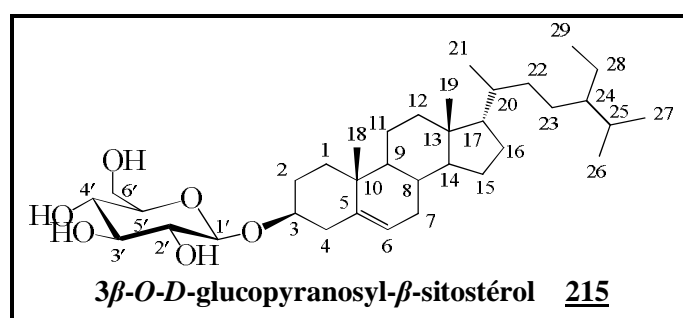
Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.46) de ce composé présente les signaux de 35 atomes de carbones, répartis à l'aide du spectre DEPT-135 en 3 C, 14 CH, 12  $\text{CH}_2$  et 6  $\text{CH}_3$ . Sur ce spectre, sont clairement visibles les signaux caractéristiques d'un phytostérol, notamment des carbones oléfiniques apparaissant à  $\delta_{\text{C}}$  140,4 et 121,2 ; l'oxyméthine à  $\delta_{\text{C}}$  77,2 ; les méthines à  $\delta_{\text{C}}$  49,6 ; 56,1 et 55,4 ; enfin les six groupements méthyles à  $\delta_{\text{C}}$  11,7 ; 11,8 ; 18,6 ; 18,9 ; 19,1 et 19,7. Le carbone anomérique de l'unité osidique apparaît à  $\delta_{\text{C}}$  100,7 et les autres signaux des carbones osidiques résonnent à  $\delta_{\text{C}}$  76,7 ; 73,4 ; 70,1 et 61,1.



**Figure II.46 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de N9-A3

Toutes les valeurs de protons et de carbones ont été attribuées après l'analyse des spectres de RMN 2D de corrélation homonucléaire COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC ainsi qu'en comparant ces données avec celles trouvées dans la littérature.

Le composé N9-A3 a donc été identifié comme étant le  $3\beta$ -*O*-*D*-glucopyranosyl- $\beta$ -sitostérol ou Daucostérol **215**, composé précédemment isolé de *Cissus pteroclada* (Chi *et al.*, 2010), *C. sicyoides* (Beltrame *et al.*, 2002), *Triumfetta cordifolia* (Sandjo, 2009), *Cordia platythyrsa* (Dabole, 2013), *Paulinna pinnata* (Lunga *et al.*, 2014), *Pseuderanthemum palatiferum* (Nualkaew *et al.*, 2015), ...etc. Le Daucostérol **215** est connu pour ses propriétés antimicrobiennes (Beltrame *et al.*, 2002 ; Lunga *et al.*, 2014), inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase isolé du *Bacillus stearotherophilus* (Sheng *et al.*, 2014), et hypoglycémique (Nualkaew *et al.*, 2015).





**Tableau II.14 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de N9-A3

| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | Sheng et al. (2014)* |
|----|---------------------------------------|---------------------|----------------------|
| 1  | 1,77 ( <i>m</i> ) ; 0,95 ( <i>m</i> ) | 36,8                | 36,1                 |
| 2  | 1,82 ( <i>m</i> ) ; 1,48 ( <i>m</i> ) | 29,3                | 31,3                 |
| 3  | 3,46 ( <i>m</i> )                     | 76,9                | 76,6                 |
| 4  | 2,11 ( <i>m</i> ), 2,35 ( <i>m</i> )  | 38,2                | 38,2                 |
| 5  | -                                     | 140,4               | 140,3                |
| 6  | 5,33 ( <i>m</i> )                     | 121,2               | 121,0                |
| 7  | 1,93 ( <i>m</i> ) ; 1,39 ( <i>m</i> ) | 31,4                | 31,3                 |
| 8  | 1,49 ( <i>m</i> )                     | 31,3                | 31,2                 |
| 9  | 0,87 ( <i>m</i> )                     | 49,6                | 49,5                 |
| 10 | -                                     | 36,2                | 35,5                 |
| 11 | 1,38 ( <i>m</i> ) ; 1,47 ( <i>m</i> ) | 20,6                | 20,5                 |
| 12 | 1,97 ( <i>m</i> ) ; 1,12 ( <i>m</i> ) | 39,2                | 39,2                 |
| 13 | -                                     | 41,8                | 41,8                 |
| 14 | 0,96 ( <i>m</i> )                     | 56,1                | 56,1                 |
| 15 | 1,53 ( <i>m</i> ) ; 1,00 ( <i>m</i> ) | 23,8                | 23,7                 |
| 16 | 1,20 ( <i>m</i> ) ; 1,22 ( <i>m</i> ) | 27,8                | 27,7                 |
| 17 | 1,07 ( <i>m</i> )                     | 55,4                | 55,3                 |
| 18 | 0,65 ( <i>s</i> )                     | 11,7                | 11,6                 |
| 19 | 0,96 ( <i>s</i> )                     | 18,9                | 18,8                 |
| 20 | 1,32 ( <i>m</i> )                     | 35,5                | 36,7                 |
| 21 | 0,90 ( <i>d</i> ; 6,5)                | 18,6                | 18,5                 |
| 22 | 1,29 ( <i>m</i> ) ; 0,97 ( <i>m</i> ) | 33,3                | 33,3                 |
| 23 | 1,15 ( <i>m</i> ) ; 1,09 ( <i>m</i> ) | 25,4                | 25,4                 |
| 24 | 0,89 ( <i>m</i> )                     | 45,1                | 45,1                 |
| 25 | 1,63 ( <i>m</i> )                     | 28,7                | 28,6                 |
| 26 | 0,81 ( <i>d</i> ; 6,9)                | 19,1                | 19,0                 |
| 27 | 0,80 ( <i>d</i> ; 6,9)                | 19,7                | 19,6                 |
| 28 | 1,18 ( <i>m</i> ) ; 1,24 ( <i>m</i> ) | 22,6                | 22,5                 |
| 29 | 0,82 ( <i>m</i> )                     | 11,8                | 11,7                 |
| 1' | 4,22 ( <i>d</i> ; 7,8)                | 100,8               | 100,7                |
| 2' | 2,90 ( <i>t</i> , 8,3)                | 73,5                | 73,4                 |
| 3' | 3,12 ( <i>t</i> , 8,8)                | 76,8                | 76,9                 |
| 4' | 3,02 ( <i>t</i> ; 8,9)                | 70,1                | 70,0                 |
| 5' | 3,07 ( <i>ddd</i> ; 11,1 ; 5,8 ; 1,9) | 76,8                | 76,7                 |
| 6' | 3,64 ( <i>d</i> ; 11,1)               | 61,1                | 61,0                 |
|    | 3,41 ( <i>dd</i> ; 11,1 ; 5,4)        |                     |                      |

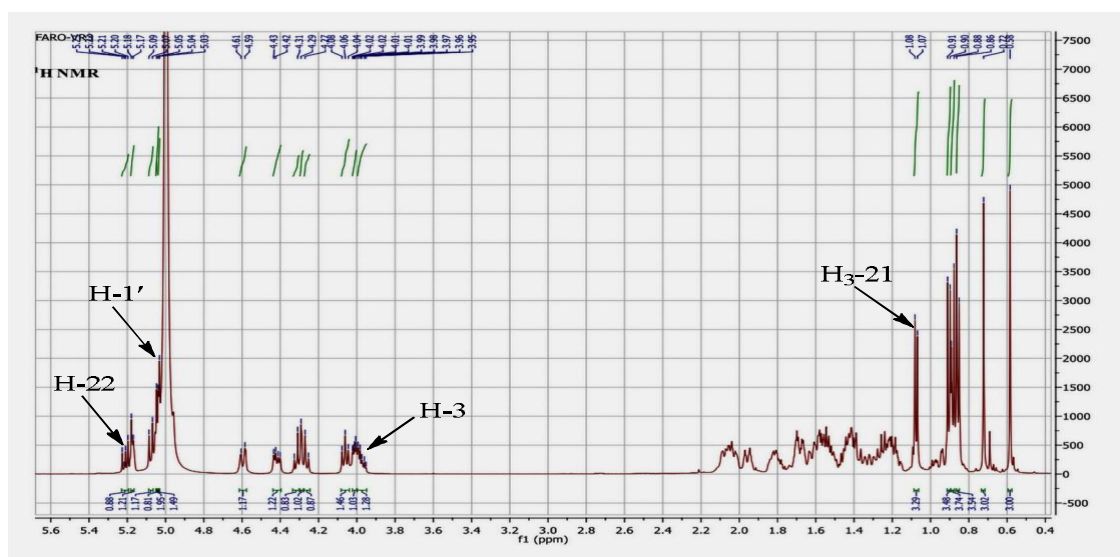
\*Données RMN enregistrées dans le DMSO- $d_6$  à 100 MHz



## II.2.5.2. Identification du composé Vr-3

Le composé Vr-3 obtenu du bois de racine de *V. paradoxa* précipite dans l'acétone sous forme de cristaux blancs et fond à 284-285°C. Il réagit positivement au test de Liebermann-Bürchard (coloration bleue-vert) et à celui de Molish (coloration rouge brique), ce qui suggère que ce dernier est un phytostérol glycosylé.

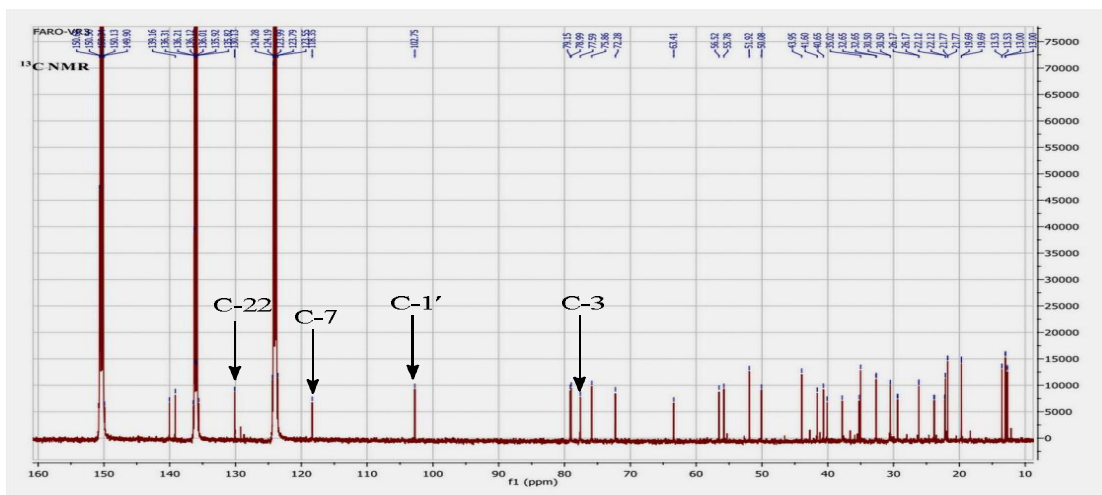
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de Vr-3 (Figure II.47) révèle les signaux de trois protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  5,21 (1H, *dd*,  $J = 9,3 ; 5,9$  Hz), 5,08 (1H, *d*,  $J = 9,0$  Hz), et 5,17 (1H, *dl* ;  $J = 4,9$ ), le signal d'un proton oxyméthine à  $\delta_{\text{H}}$  3,97 (1H, *m*), ainsi que les signaux de six groupements méthyles parmi lesquels deux méthyles angulaires à  $\delta_{\text{H}}$  0,58 (3H, *s*) et 0,72 (3H, *s*), les trois autres méthyles apparaissant sous forme de doublet à  $\delta_{\text{H}}$  0,86 (3H ; *d* ;  $J = 6,4$  Hz) ; 0,92 (3H ; *d* ;  $J = 6,6$  Hz) et 1,08 (3H ; *d* ;  $J = 6,5$  Hz). Le spectre fait également ressortir les signaux d'une unité glucosidique dont le proton anomérique à 5,03 (1H, *d*,  $J = 7,2$  Hz) suggère une configuration  $\beta$  de cette dernière. Les autres signaux des protons osidiques résonnaient à  $\delta_{\text{H}}$  4,08 (1H ; *t* ;  $J = 8,2$  Hz) ; 4,02 (1H ; *m*) ; 4,29 (1H ; *m*) ; 4,34 (1H ; *m*) ; 4,60 (1H ; *d* ;  $J = 10,1$  Hz) et 4,42 (1H ; *dd* ;  $J = 11,7 ; 5,3$  Hz).



**Figure II.47 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de Vr-3

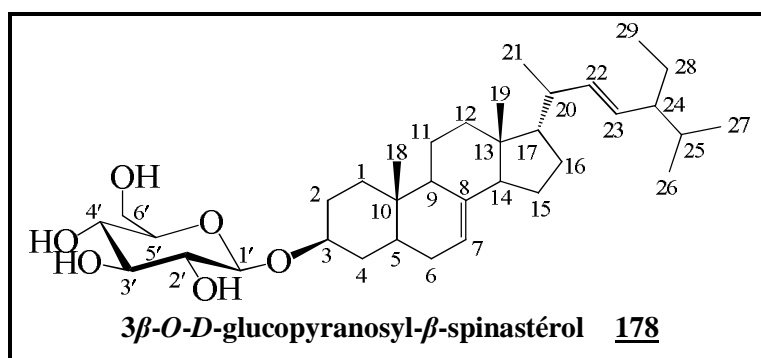
Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Vr-3 (Figure II.48) présente les signaux de 34 carbones qui sur la base du spectre DEPT-135 ont été répartis en 6  $\text{CH}_3$ , 9  $\text{CH}_2$ , 16  $\text{CH}$  et 3 carbones quaternaires. Les signaux à  $\delta_{\text{C}}$  130,1 et 139,2 sont caractéristiques d'un  $\Delta^{22}$ -stérol tandis que ceux à  $\delta_{\text{C}}$  118,4 et 140,1 sont caractéristiques d'un  $\Delta^7$ -stérol. Ces signaux suggèrent l'existence de deux doubles liaisons dans le squelette du dit composé et ont respectivement été attribués à la double liaison de la chaîne latérale  $\Delta^{22}$ , et à celle  $\Delta^7$ . Le carbone oxyméthinique du squelette stéroïdique résonne à  $\delta_{\text{C}}$  77,6 tandis que les signaux de l'unité glucosidique apparaissent à  $\delta_{\text{C}}$  102,7 ; 72,3 ; 78,9 ; 75,9 ; 79,1 et 63,4 (Tableau II.15).

Les différents signaux des protons et carbones ont été attribués par le biais de l'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC.



**Figure II.48 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de Vr-3

Toute cette analyse spectrale en comparaison avec les données de la littérature nous a permis d'identifier le composé Vr-3 au 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosylspinastérol **178**. Ce composé a déjà été isolé des graines de *V. paradoxa* (Zhang et al., 2014) ainsi que de nombreuses autres plantes parmi lesquelles *Koreana stewartia* (Lee et al., 2011), *Scrophularia takesimensis* (Kim et al., 2012), ...etc. Il est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires remarquables (Lee et al., 2012).



**Tableau II.15 :** Données RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de Vr-3

| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz))                     | $\delta_{\text{C}}$ | Lee et al. (2011)* |
|----|---|---------------------|--------------------|
| 1  | 1,67 ( <i>m</i> ) ; 0,95 ( <i>m</i> )                     | 37,8                | 37,5               |
| 2  | 2,07 ( <i>m</i> ) ; 1,62 ( <i>m</i> )                     | 30,5                | 30,2               |
| 3  | 3,99 ( <i>m</i> )   | 77,6                | 77,2               |
| 4  | 2,03 ( <i>m</i> ), 1,40 ( <i>m</i> )                      | 35,2                | 34,7               |
| 5  | 1,22 ( <i>m</i> )   | 40,7                | 40,3               |
| 6  | 1,70 ( <i>m</i> )   | 30,5                | 30,2               |
| 7  | 5,17 ( <i>dl</i> ; 4,9)                                   | 118,4               | 117,9              |
| 8  | -   | 140,1               | 139,6              |
| 9  | 1,58 ( <i>m</i> )   | 50,1                | 49,7               |
| 10 | -   | 35,0                | 34,9               |
| 11 | 1,49 ( <i>m</i> ) ; 1,42 ( <i>m</i> )                     | 22,2                | 21,8               |
| 12 | 1,96 ( <i>m</i> ) ; 1,19 ( <i>m</i> )                     | 40,1                | 39,8               |
| 13 | -   | 43,9                | 43,6               |
| 14 | 1,83 ( <i>m</i> )   | 55,8                | 55,4               |
| 15 | 1,55 ( <i>m</i> ) ; 1,44 ( <i>m</i> )                     | 23,8                | 23,5               |
| 16 | 1,80 ( <i>m</i> ) ; 1,31 ( <i>m</i> )                     | 29,4                | 29,1               |
| 17 | 1,25 ( <i>m</i> )   | 56,5                | 56,2               |
| 18 | 0,58 ( <i>s</i> )   | 12,7                | 12,4               |
| 19 | 0,72 ( <i>s</i> )   | 13,5                | 13,2               |
| 20 | 2,05 ( <i>m</i> )   | 41,6                | 41,3               |
| 21 | 1,08 ( <i>d</i> ; 6,5)                                    | 22,1                | 21,9               |
| 22 | 5,21 ( <i>dd</i> ; 9,3 ; 5,9)                             | 139,2               | 138,7              |
| 23 | 5,08 ( <i>d</i> ; 9,0)                                    | 130,1               | 129,6              |
| 24 | 1,58 ( <i>m</i> )   | 51,9                | 51,6               |
| 25 | 1,54 ( <i>m</i> )   | 32,7                | 32,3               |
| 26 | 0,86 ( <i>d</i> ; 6,4)                                    | 19,7                | 19,3               |
| 27 | 0,90 ( <i>d</i> ; 6,6)                                    | 21,8                | 21,5               |
| 28 | 1,42 ( <i>m</i> ) ; 1,20 ( <i>m</i> )                     | 26,2                | 25,9               |
| 29 | 0,88 ( <i>m</i> )   | 13,0                | 12,7               |
| 1' | 5,03 ( <i>d</i> ; 7,2)                                    | 102,7               | 102,3              |
| 2' | 4,08 ( <i>t</i> , 8,2)                                    | 75,9                | 75,5               |
| 3' | 4,34 ( <i>m</i> )   | 79,1                | 78,8               |
| 4' | 4,29 ( <i>m</i> )   | 72,3                | 71,9               |
| 5' | 4,02 ( <i>m</i> )   | 78,9                | 78,6               |
| 6' | 4,60 ( <i>d</i> ; 10,1)<br>4,42 ( <i>dd</i> ; 11,7 ; 5,3) | 63,4                | 63,0               |

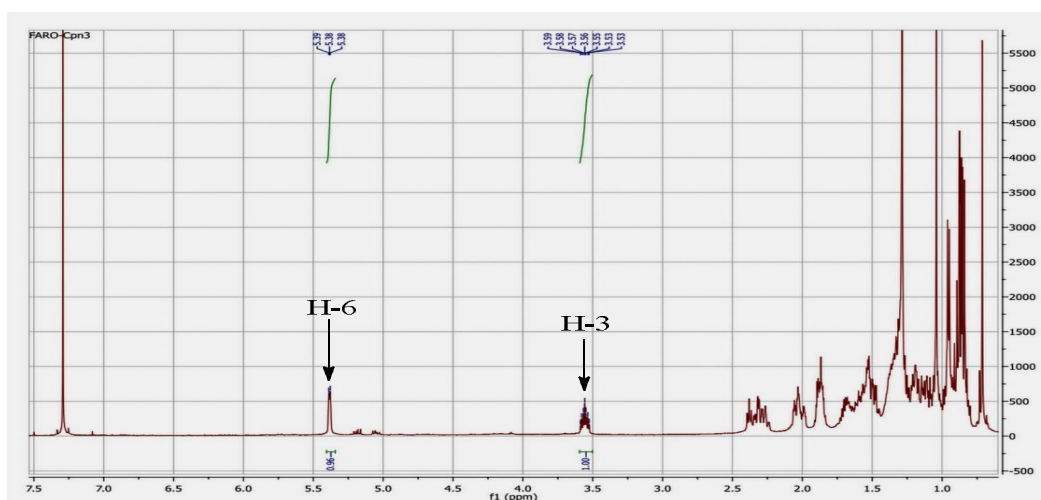
\*Données enregistrées dans la  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  à 100 MHz

## II.2.6. Les stéroïdes

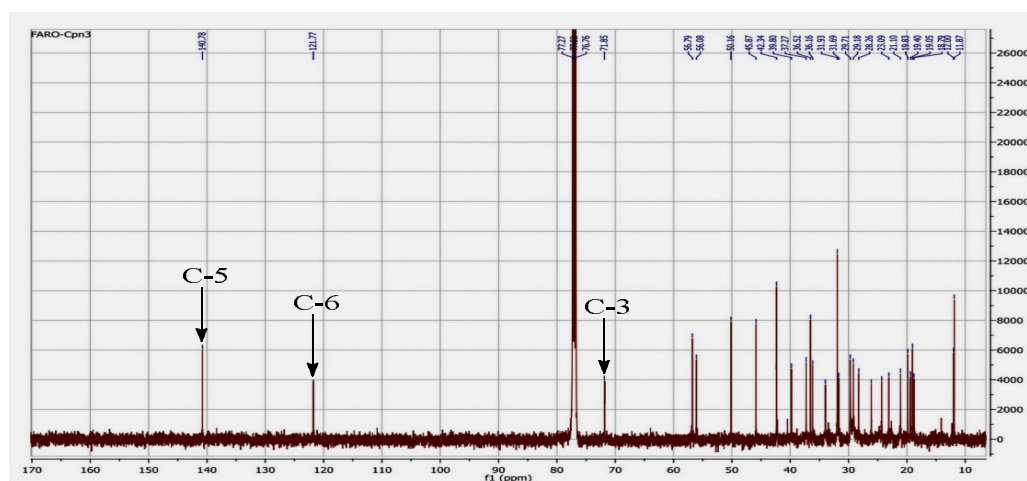
### II.2.6.1. Identification du composé N9-A0

Le composé obtenu des racines de *C. populnea* précipite sous forme de poudre blanche dans l'hexane. Il est soluble dans le  $\text{CHCl}_3$  et répond positivement au test de Liebermann-Bürchard en donnant une coloration bleu-vert caractéristique des stéroïdes.

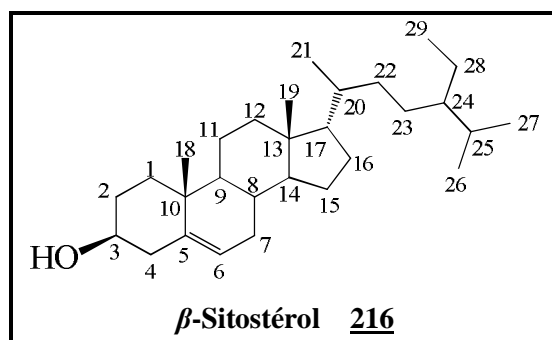
Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.49) et  $^{13}\text{C}$  (Figure II.50) du composé N9-A0 indique un ensemble de signaux identiques à ceux relevés pour le composé décrit plus haut à quelques différences près. La différence principale entre les spectres de ces deux composés réside dans le fait que les spectres du composé ne présentent pas les signaux caractéristiques de la partie glucosidique. Le composé a par conséquent été identifié au  $\beta$ -sitostérol **216**, et cette identification est en accord avec les données de la littérature (Sheng et al., 2014). C'est un composé commun à presque toutes les plantes supérieures du règne végétal. Plusieurs études ont montré qu'il présente des propriétés antinéoplasique, anti-inflammatoire, angégionique..., (Saeidnia et al., 2014).



**Figure II.49 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de N9-A0



**Figure II.50 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de N9-A0



**Tableau II.16 :** Données  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de N9-A0

| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz))  | $\delta_{\text{C}}$ | Sheng et al. (2014)* |
|----|--|---------------------|----------------------|
| 1  |  | 37,3                | 37,3                 |
| 2  |  | 31,9                | 31,9                 |
| 3  | 3,53 ( <i>ddd</i> ; 15,9 ; 11,0 ; 4,6) | 71,8                | 71,8                 |
| 4  |  | 42,4                | 42,4                 |
| 5  | -                                      | 140,8               | 140,8                |
| 6  | 5,35 ( <i>t</i> ; 5,1)                 | 121,7               | 121,7                |
| 7  |  | 32,0                | 32,0                 |
| 8  |  | 31,9                | 31,9                 |
| 9  |  | 50,1                | 50,2                 |
| 10 | -                                      | 36,6                | 36,6                 |
| 11 |  | 21,1                | 21,1                 |
| 12 |  | 39,8                | 39,8                 |
| 13 | -                                      | 42,3                | 42,3                 |
| 14 |  | 56,8                | 56,8                 |
| 15 |  | 24,3                | 24,3                 |
| 16 |  | 28,2                | 28,2                 |
| 17 |  | 56,1                | 56,1                 |
| 18 | 0,71 ( <i>s</i> )                      | 11,9                | 11,9                 |
| 19 | 1,04 ( <i>s</i> )                      | 19,0                | 19,4                 |
| 20 |  | 36,2                | 36,2                 |
| 21 | 0,88 ( <i>d</i> ; 1,8)                 | 18,8                | 18,8                 |
| 22 |  | 34,0                | 34,0                 |
| 23 |  | 26,3                | 26,3                 |
| 24 |  | 45,9                | 45,9                 |
| 25 |  | 29,3                | 29,3                 |
| 26 | 0,95 ( <i>d</i> ; 6,6)                 | 19,4                | 19,8                 |
| 27 | 1,01 ( <i>d</i> ; 7,0)                 | 19,8                | 19,4                 |
| 28 |  | 23,1                | 23,2                 |
| 29 | 0,85 ( <i>ch</i> )                     | 12,0                | 12,2                 |

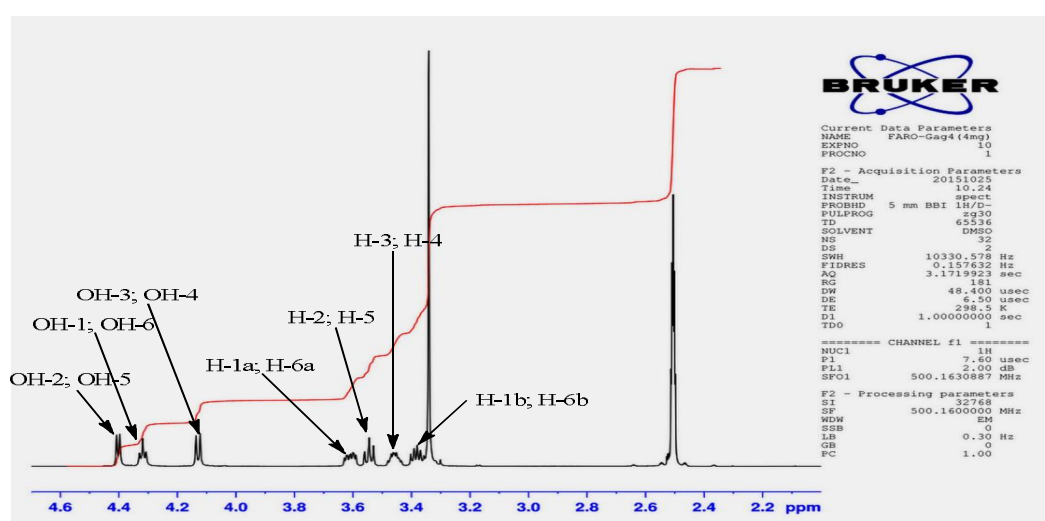
\* Données enregistrées dans le  $\text{CDCl}_3$  à 100 MHz

## II.2.7. Les sucres

### II.2.7.1. Identification du composé Gag-4

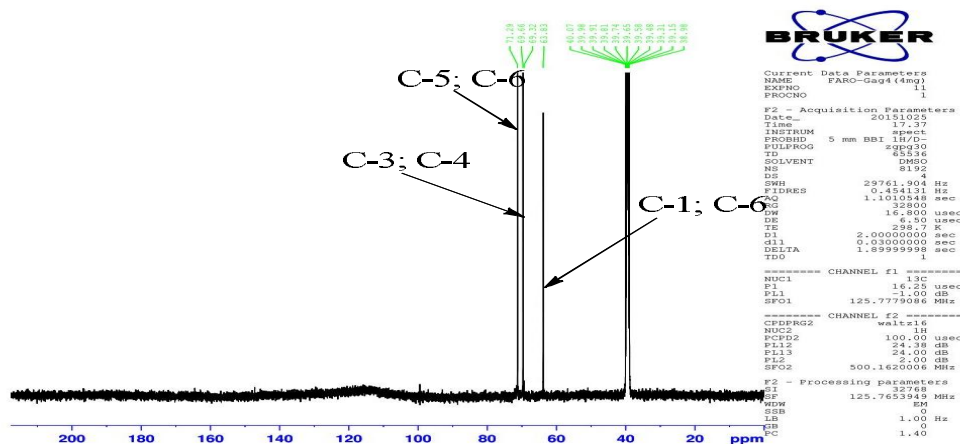
Le composé Gag-4 a été obtenu des graines et des écorces de *G. aquala*. Il se présente sous forme de paillettes blanches qui fondent entre 166-168°C. Soluble dans le DMSO et l'eau, il réagit avec le réactif de Molish laissant envisager une structure de type polysaccharide.

Son spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.51) indique deux signaux de quatre protons oxyméthiques identiques deux à deux, sous forme de multiplets à  $\delta_{\text{H}}$  3,45 et 3,55. A  $\delta_{\text{H}}$  3,39 (*m*) et 3,62 (*m*) on a les signaux de deux oxyméthylènes identiques. Nous observons également sur ce même spectre des signaux de protons échangeables par  $\text{D}_2\text{O}$  dont deux doublets à  $\delta_{\text{H}}$  4,12 et 4,40 ; et un triplet à 4,31 correspondant respectivement aux hydroxyles de la molécule.



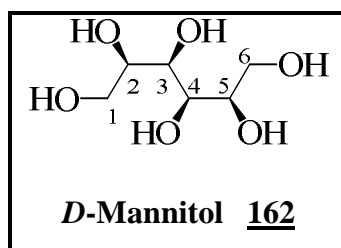
**Figure II.51 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gag-4

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Gag-4 (Figure II.52) présente uniquement trois signaux dont deux à  $\delta_{\text{C}}$  71,3 et 69,7 correspondant à quatre oxyméthines identiques deux à deux et le dernier signal à  $\delta_{\text{C}}$  63,8 correspondant à deux oxyméthylènes identiques. Ces signaux ont facilement été assignés aux atomes de carbones respectifs grâce au spectre HSQC qui faisait ressortir 2  $\text{CH}_2$ , et 4 CH.



**Figure II.52 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gag-4

Toutes ces données spectrales comparées à celles de la littérature suggèrent pour le composé Gag-4, la structure ci-dessous qui est celle de l'hexan-1,2,3,4,5,6-hexol ou *D*-Mannitol **162**, polyol dérivant du Glucose. Composé connu, le *D*-Mannitol **162** a été isolé de plusieurs espèces du genre *Gardenia* à l'instar de *G. sootepensis*, *G. lucida*, *G. jasminoides*, *G. pomodora* et *G. vogelii* (Parmar et al., 2000) ; Ainsi que de plusieurs autres plantes à l'instar de *Pleurotus cornucopiae* (Hagiwara et al., 2005), ...etc. Le *D*-Mannitol **162** est connu pour ses propriétés antihypertensives (Hagiwara et al., 2005).



**Tableau II.17 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gag-4

| N°         | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | Hagiwara et al. (2005)* |
|------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------|
| 1 ; 6      | 3,39 (m)<br>3,62 (m)                | 63,8                | 63,6                    |
| 2 ; 5      | 3,55 (m)                            | 71,3                | 71,2                    |
| 3 ; 4      | 3,45 (m)                            | 69,7                | 69,6                    |
| OH-1; OH-6 | 4,31 (t; 5,7)                       | -                   | -                       |
| OH-2; OH-5 | 4,40 (d; 5,1)                       | -                   | -                       |
| OH-3; OH-4 | 4,11 (d; 6,9)                       | -                   | -                       |

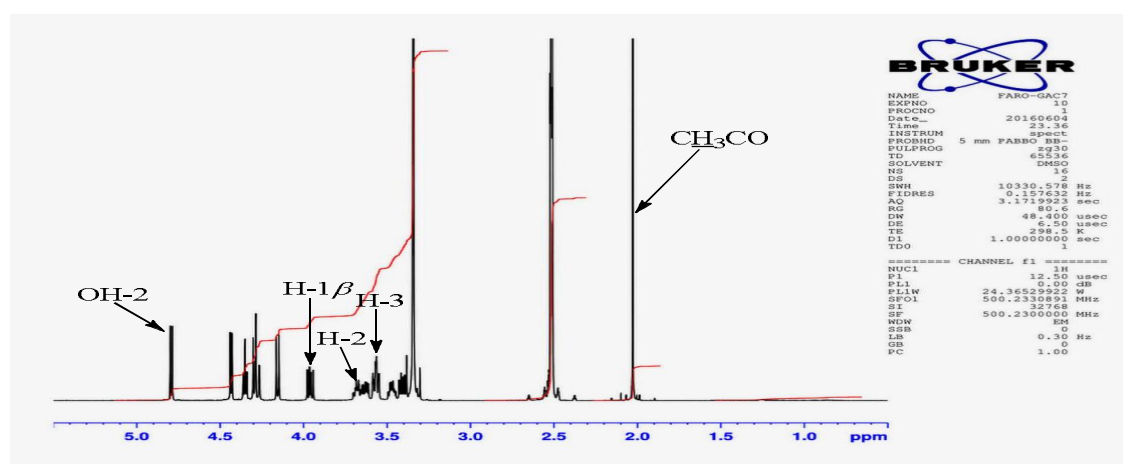
\*Données enregistrées dans le  $\text{D}_2\text{O}$  à 125 MHz

### II.2.7.2. Identification du composé Gae-7

Le composé Gae-7 a été obtenu des écorces de *G. aqualla* sous forme de solide amorphe blanc qui précipite dans le mélange AcOEt-MeOH (90:10). Soluble dans H<sub>2</sub>O et dans le DMSO, il répond positivement au test de Molish caractéristique des polyols et fond entre 123-124°C.

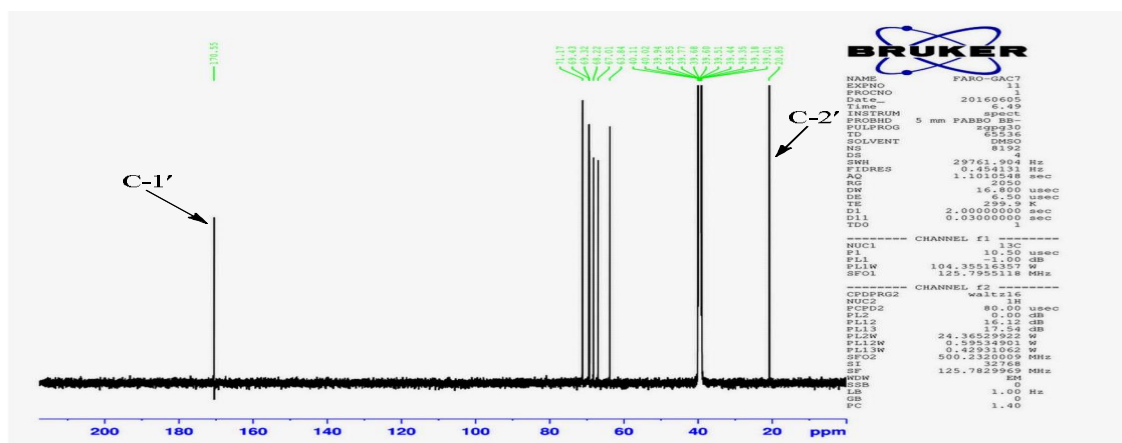
Ce composé possède des données spectrales qui se rapprochent de celles du *D*-Mannitol **162** (Gag-4). En effet, son spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure II.53) présente les signaux de quatre protons oxyméthiniques sous forme de multiplets à  $\delta_H$  3,68 ; 3,54 ; 3,55 et 3,47 ; ainsi que ceux de quatre protons oxyméthyléniques apparaissant à  $\delta_H$  4,28 ; 3,96 ; 3,62 et 3,40 toujours sous forme de multiplets. Le spectre présente également des signaux de protons ne corrélant avec aucun carbone en HSQC, et de ce fait attribués aux groupements hydroxyles de la molécule. Il s'agit entre autres de deux doublets à  $\delta_H$  4,75 (1H ; *d* ; *J* = 5,6 Hz) et 4,41 (1H ; *d* ; *J* = 5,5 Hz), d'un triplet à  $\delta_H$  4,33 (1H ; *t* ; *J* = 5,7 Hz) ainsi que du signal de deux autres protons qui se chevauchent à  $\delta_H$  4,14 (2H ; *ov*). On distingue par ailleurs sur ce même spectre le signal sous forme de singulet de trois protons apparaissant à  $\delta_H$  2,03 (3H, *s*) attribuables aux signaux du méthyle d'un groupement acétyle. Toutes ces informations sont corroborées par les corrélations <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H observées sur le spectre COSY.

Son spectre de RMN <sup>13</sup>C (Figure II.54) complètement découplé montre huit signaux d'atomes de carbone dont l'analyse par les techniques DEPT et HSQC a permis de mettre en évidence : quatre carbones oxyméthines hybridés sp<sup>3</sup> résonnant à  $\delta_C$  68,2 ; 69,3 ; 69,4 et 71,2 ; deux carbones oxyméthyléniques apparaissant à  $\delta_C$  63,8 et 67,0 ; un méthyle à  $\delta_C$  20,8 et 1 carbone quaternaire à  $\delta_C$  170,5.



**Figure II.53 :** Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) de Gae-7

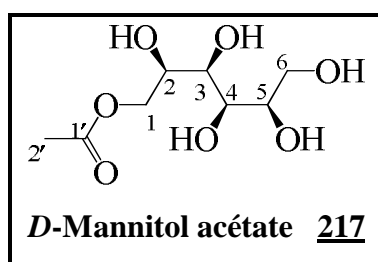




**Figure II.54 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gae-7

L'attribution complète des signaux de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  a été accomplie par la combinaison des données des spectres COSY, HSQC et HMBC.

Sur la base de toute cette analyse, nous avons attribué au composé Gae-7 la structure ci-dessous qui est celle du *D*-Mannitol acétate ou 1-*O*-acétyl-*D*-mannitol **217**. Ce composé a précédemment été isolé de *Fucus vesiculosus* (Lindberg, 1953).



**Tableau II.18 :** Données de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de Gae-7

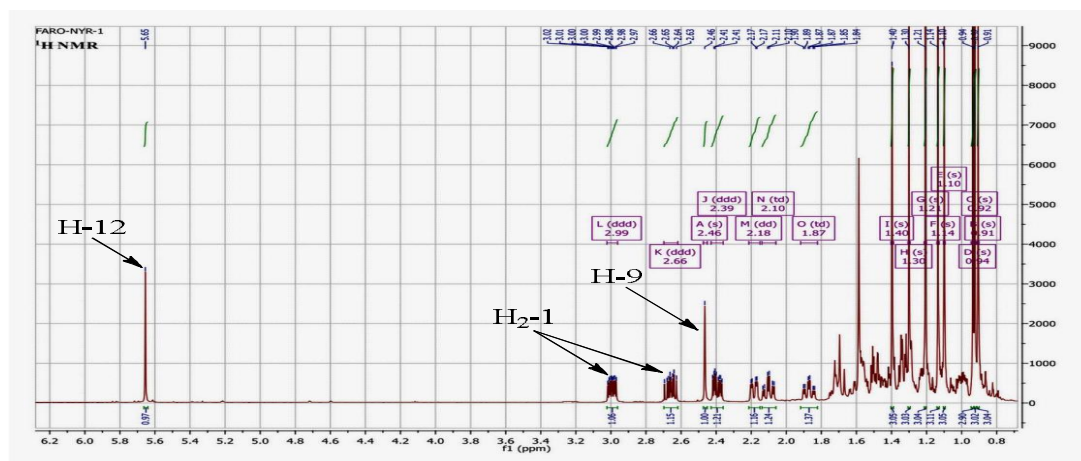
| N°         | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ |
|------------|---------------------------------------|---------------------|
| 1          | 4,28 ( <i>m</i> )                     | 67,0                |
|            | 3,96 ( <i>m</i> )                     |                     |
| 2          | 3,68 ( <i>m</i> )                     | 68,2                |
| 3          | 3,54 ( <i>m</i> )                     | 69,3                |
| 4          | 3,55 ( <i>m</i> )                     | 69,4                |
| 5          | 3,47 ( <i>m</i> )                     | 71,2                |
| 6          | 3,62 ( <i>m</i> )                     | 63,8                |
|            | 3,40 ( <i>m</i> )                     |                     |
| 1'         | -                                     | 170,5               |
| 2'         | 2,03 ( <i>s</i> )                     | 20,8                |
| OH-2       | 4,75 ( <i>d</i> ; 5,6)                | -                   |
| OH-3; OH-4 | 4,14 ( <i>d</i> ; 7,1)                | -                   |
| OH-5       | 4,41 ( <i>d</i> ; 5,5)                | -                   |
| OH-6       | 4,33 ( <i>t</i> ; 5,7)                | -                   |

## II.2.8. Les triterpènes pentacycliques

### II.2.8.1. Identification du composé NYR-1

Le composé NYR-1 a été isolé des tiges de *C. populnea*. Il précipite sous forme de poudre blanche dans le mélange Hex/AcOEt 30%. Soluble dans le  $\text{CHCl}_3$ , il réagit positivement au test de Liebermann-Bürchard (coloration rouge brique) orientant vers une structure de type triterpène.

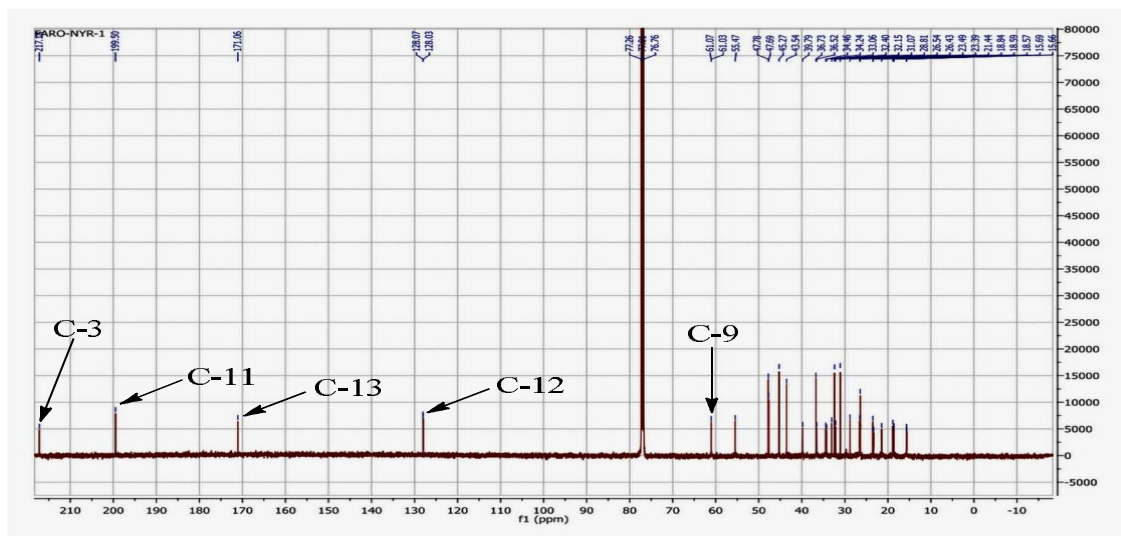
Sur son spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.55), la majorité des signaux sont observés dans la région des hauts champs, indiquant la présence de protons aliphatiques. Parmi eux, huit signaux de trois protons chacun résonnant sous forme de singulets entre  $\delta_{\text{H}}$  0,91 et 1,40 confirmant ainsi la présence des huit méthyles d'un squelette triterpénique. On observe également sur ce spectre deux signaux sous forme de singulets d'un proton chacun à  $\delta_{\text{H}}$  2,46 et 5,65. En général, ces deux protons n'apparaissent pas sous forme de singulet ; cette multiplicité ainsi que le déblindage de ces deux protons nous font penser que les protons habituellement en position C-11 du squelette triterpénique ont été substitués par un groupement fortement électro-attracteur. Par ailleurs, le signal caractéristique du proton oxyméthine H-3 des triterpènes qui apparaît le plus souvent à  $\delta_{\text{H}}$  3-4 est inexistant sur ce spectre du composé NYR-1, ce qui suggère que le groupement hydroxyle généralement en C-3 a été oxydé en une fonction cétone. Cette hypothèse est supportée ici par la présence des signaux à  $\delta_{\text{H}}$  2,39 (1H ; *ddd* ;  $J = 15,8 ; 6,5 ; 4,1$  Hz) ; 1,44 (*m*) ; 2,66 (1H ; *ddd* ;  $J = 15,8 ; 6,5 ; 4,1$  Hz) ; et 2,99 (1H ; *ddd* ;  $J = 13,6 ; 7,1 ; 4,1$  Hz), que nous avons grâce aux spectres COSY et HSQC attribués aux méthylènes adjacents en C-1 et C-2 de ce type de squelette.



**Figure II.55 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de NYR-1

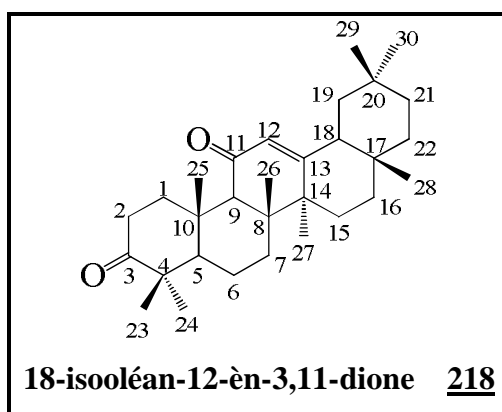
L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.56) a fourni plus d'indications confirmant les assertions ci-dessus énoncées. Les 30 signaux de ce spectre confirment l'hypothèse d'un squelette de type triterpène pour le composé NYR-1 avec huit méthyles dont l'expérience HSQC a permis de définir sans ambiguïté les corrélations protons. La double liaison  $\Delta^{12}$  habituelle de ce type de composé est représentée ici par les signaux à  $\delta_{\text{C}}$  128,1 et 171,1 dont le très fort déblindage confirme

l'hypothèse de la proximité d'un groupement attracteur. On observe également sur ce spectre les signaux de deux groupements carbonyles à  $\delta_C$  217,2 et 199,5 attribués respectivement aux carbones C-3 et C-11 du fait du déblindage de la double liaison  $\Delta^{12}$  observé plus haut et de l'absence du signal du carbone oxyméthine C-3 qui apparaît généralement à  $\delta_C$  70-80 pour ce type de composé.



**Figure II.56 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de NYR-1

Toutes ces données spectrales en comparaison avec celles trouvées dans la littérature, nous ont permis d'identifier le composé NYR-1 comme étant le 18-Isooléan-12-èn-3,11-dione **218** ; composé précédemment isolé de *Euonymus hederaceus* (Hu et al., 2005) et de la propolis (Dabole, 2013).



**Tableau II.19 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NYR-1

| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J (Hz))  | $\delta_{\text{C}}$ | Hu et al. (2005)* |
|----|--|---------------------|-------------------|
| 1  | 2,99 ( <i>ddd</i> ; 13,6; 7,1; 4,1); 1,44 ( <i>m</i> )                       | 39,8                | 40,0              |
| 2  | 2,66 ( <i>ddd</i> ; 15,8; 11,2; 7,1);<br>2,39 ( <i>ddd</i> ; 15,8; 6,5; 4,1) | 34,2                | 34,5              |
| 3  | -  | 217,2               | 217,4             |
| 4  | -  | 47,8                | 48,0              |
| 5  | 1,34 ( <i>m</i> )  | 55,5                | 55,6              |
| 6  | 1,59 ( <i>m</i> )  | 18,8                | 19,0              |
| 7  | 1,50 ( <i>m</i> )  | 32,1                | 32,3              |
| 8  | -  | 45,3                | 45,5              |
| 9  | 2,47 ( <i>s</i> )  | 61,1                | 61,2              |
| 10 | -  | 36,7                | 36,9              |
| 11 | -  | 199,5               | 199,7             |
| 12 | 5,65 ( <i>s</i> )  | 128,1               | 128,2             |
| 13 | -  | 171,1               | 171,3             |
| 14 | -  | 43,5                | 43,7              |
| 15 | 1,88 ( <i>td</i> ; 13,6; 4,4); 1,23 ( <i>m</i> )                             | 26,5                | 26,7              |
| 16 | 2,10 ( <i>td</i> ; 13,7; 4,5); 1,01 ( <i>m</i> )                             | 26,4                | 26,6              |
| 17 | -  | 32,4                | 32,6              |
| 18 | 2,18 ( <i>dd</i> ; 13,6; 3,3)  | 47,7                | 47,9              |
| 19 | 1,12 ( <i>m</i> ); 1,11 ( <i>m</i> )   | 45,3                | 45,5              |
| 20 | -  | 31,1                | 31,3              |
| 21 | 1,39 ( <i>m</i> ); 1,21 ( <i>m</i> )   | 34,5                | 34,7              |
| 22 | 1,36 ( <i>m</i> ); 1,32 ( <i>m</i> )   | 36,5                | 36,7              |
| 23 | 1,14 ( <i>s</i> )  | 26,4                | 26,7              |
| 24 | 1,10 ( <i>s</i> )  | 21,4                | 21,6              |
| 25 | 1,30 ( <i>s</i> )  | 15,7                | 15,9              |
| 26 | 1,21 ( <i>s</i> )  | 18,6                | 18,9              |
| 27 | 1,40 ( <i>s</i> )  | 23,4                | 23,6              |
| 28 | 0,90 ( <i>s</i> )  | 28,8                | 29,0              |
| 29 | 0,93 ( <i>s</i> )  | 33,1                | 33,8              |
| 30 | 0,92 ( <i>s</i> )  | 23,5                | 23,3              |

\*Données enregistrées dans le  $\text{CDCl}_3$  à 125 MHz

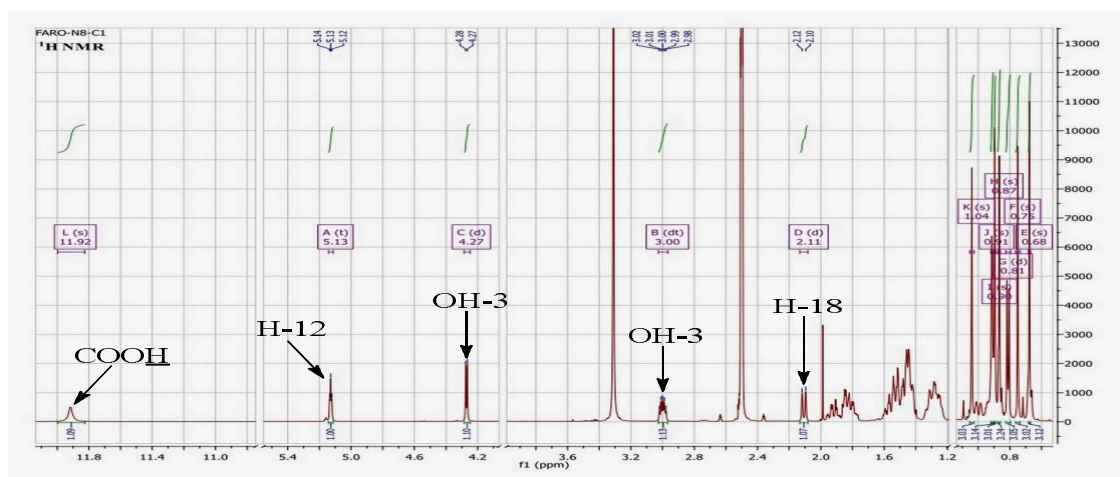
### II.2.8.2. Identification du composé N8-C1

Le composé N8-C1 isolé des feuilles de *C. populnea* et de *G. aqualla* (N8-C1) a précipité sous forme de poudre blanche dans le mélange Hex/AcOEt 70:30. Il donne une coloration rouge intense qui vire au violet avec le réactif Liebermann-Bürchard, ce qui nous fait penser que N8-C1 est un triterpénoïde.

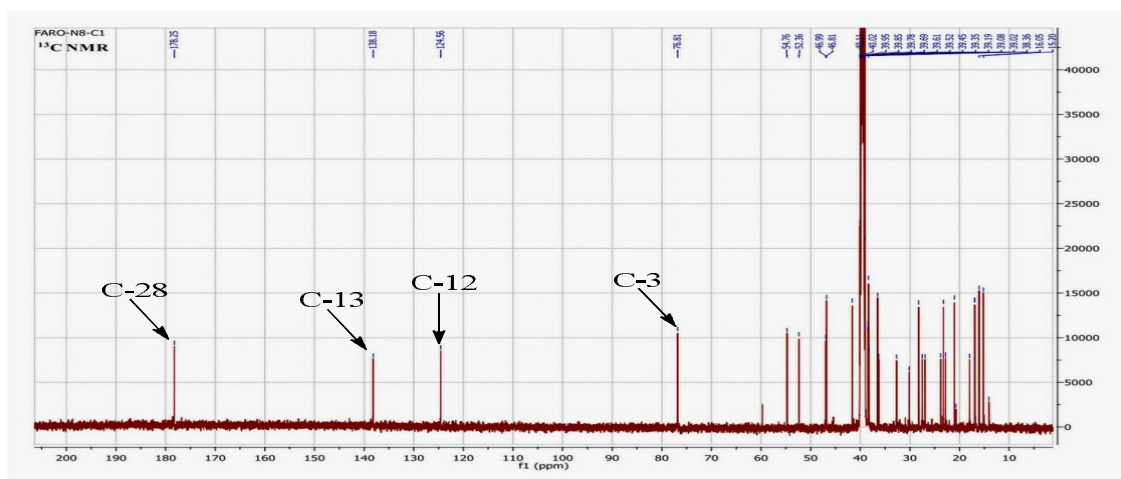
Les spectres de RMN<sup>1</sup>H (Figure II.57) et RMN<sup>13</sup>C (Figure II.58) montrent des signaux caractéristiques d'un composé de la classe des  $\Delta^{12}$  ursènes (Mahato *and* Kundu, 1994).

En effet, sur le spectre RMN<sup>1</sup>H du composé N8-C1 on note la présence de signaux à des champs très élevés que l'on peut attribuer, sans ambiguïté, à sept groupements méthyles : nous distinguons notamment cinq singulets à  $\delta_H$  0,68 ; 0,75 ; 0,90 ; 0,91 et 1,04 et deux doublets à  $\delta_H$  0,81 ( $J = 6,5$  Hz) et 0,87 ( $J = 7,4$  Hz). La détection de ces deux doublets nous oriente sur l'hypothèse d'une molécule de type ursane et ces deux signaux sont identifiés aux méthyles portés respectivement par les carbones C-19 et C-20. Le squelette de base de ce type de composé renferme 8 méthyles dont 6 angulaires ; l'observation de 7 signaux de méthyles indique donc qu'un d'entre eux a été oxydé. Nous observons également la présence du signal d'un proton résonnant sous forme de triplet à  $\delta_H$  5,13 ( $J = 3,4$  Hz) attribuables au proton H-12 des triterpènes de type  $\Delta^{12}$  ursènes (Mahato *and* Kundu, 1994). Le signal d'un proton à  $\delta_H$  3,00 (1H, *dt*, 10,2 ; 5,2 Hz) est caractéristique du proton oxyméthynique en position 3 de ce type de composé. Le signal à  $\delta_H$  4,27 (1H, *d*,  $J = 5,2$  Hz) est relatif au groupement hydroxyle en position 3- $\beta$  du cycle A, tandis que le signal à  $\delta_H$  2,11 (1H, *d*,  $J = 11,3$  Hz) est généralement celui du méthine en position C-18.

Sur le spectre RMN<sup>13</sup>C (Figure II.58) de N8-C1 (N8-C1), on dénombre 30 signaux de carbones confirmant ainsi la structure triterpénique de N8-C1. L'analyse du spectre DEPT-135 conjointement à celui HSQC a permis de répartir ces carbones en six carbones quaternaires parmi lesquels un carbone oléfinique à  $\delta_C$  138,2 et un carbonyle résonnant à  $\delta_C$  178,3 ; six CH dont un oléfinique à  $\delta_C$  124,6 et un oxyméthine à  $\delta_C$  76,8 ; neuf CH<sub>2</sub>, et sept CH<sub>3</sub>.



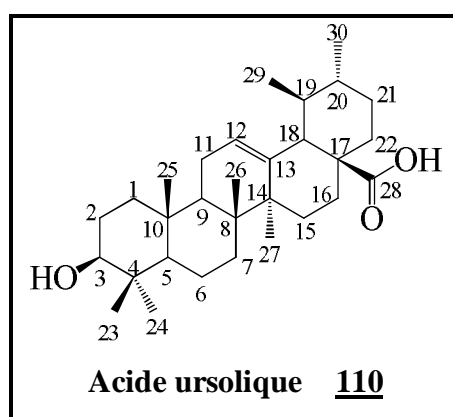
**Figure II.57 :** Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) de N8-C1



**Figure II.58 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de N8-C1

L'attribution complète des différents signaux de  $^1\text{H}$  et de  $^{13}\text{C}$  a été rendue possible grâce à l'analyse des spectres HSQC, COSY et HMBC.

Considérant l'ensemble des informations recueillies et analysées, et nous référant aux données de la littérature, nous avons pu établir que le composé N8-C1 (N8-C1) représentée ci-dessous est l'Acide ursolique **110**. Il est largement distribué dans le règne végétal et est présent dans de nombreuses familles de plantes (Babalola *and* Shode, 2013). A la limite de nos connaissances, c'est la première fois que ce composé est isolé d'une espèce du genre *Cissus*. L'Acide ursolique **110** est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, hépatoprotectrices, analgésiques, antimicrobiennes, antimycotiques, virostatiques, immuno-modulatrices, diurétiques, antispasmodiques, anti-athérosclérose, antitumorales, anti-VIH-1 (Liu *et al.*, 1995 ; Babalola *and* Shode, 2013).



**Tableau II.20 :** Données RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de N8-C1

| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | Seebacher et al. (2003)* |
|----|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 1  |                                     | 38,2                | 39,2                     |
| 2  |                                     | 27,0                | 28,2                     |
| 3  | 3,00 ( <i>dt</i> ; 10,2 ; 5,2)      | 76,8                | 78,2                     |
| 4  | -                                   | 38,3                | 38,9                     |
| 5  |                                     | 54,8                | 55,9                     |
| 6  |                                     | 18,0                | 18,8                     |
| 7  |                                     | 32,7                | 33,7                     |
| 8  | -                                   | 41,6                | 40,1                     |
| 9  |                                     | 47,0                | 48,1                     |
| 10 | -                                   | 36,5                | 37,5                     |
| 11 |                                     | 22,8                | 23,7                     |
| 12 | 5,13 ( <i>t</i> ; 3,4)              | 124,6               | 125,7                    |
| 13 | -                                   | 138,2               | 139,3                    |
| 14 | -                                   | 41,6                | 42,6                     |
| 15 |                                     | 27,5                | 28,8                     |
| 16 |                                     | 23,8                | 25,0                     |
| 17 | -                                   | 46,8                | 48,1                     |
| 18 | 2,11 ( <i>d</i> ; 11,3)             | 52,4                | 53,6                     |
| 19 | -                                   | 38,5                | 39,5                     |
| 20 |                                     | 38,4                | 39,4                     |
| 21 |                                     | 30,2                | 31,1                     |
| 22 |                                     | 36,3                | 37,4                     |
| 23 | 0,91 ( <i>s</i> )                   | 28,2                | 28,8                     |
| 24 | 0,90 ( <i>s</i> )                   | 16,01               | 16,5                     |
| 25 | 0,75 ( <i>s</i> )                   | 15,2                | 15,7                     |
| 26 | 0,68 ( <i>s</i> )                   | 16,9                | 17,5                     |
| 27 | 1,04 ( <i>s</i> )                   | 23,3                | 24,0                     |
| 28 | -                                   | 178,3               | 179,7                    |
| 29 | 0,81( <i>d</i> ; 6,5)               | 17,0                | 17,5                     |
| 30 | 0,87 ( <i>d</i> ; 7,4)              | 21,1                | 21,4                     |

\* Données enregistrées dans la pyridine- $d_5$  à 150 MHz

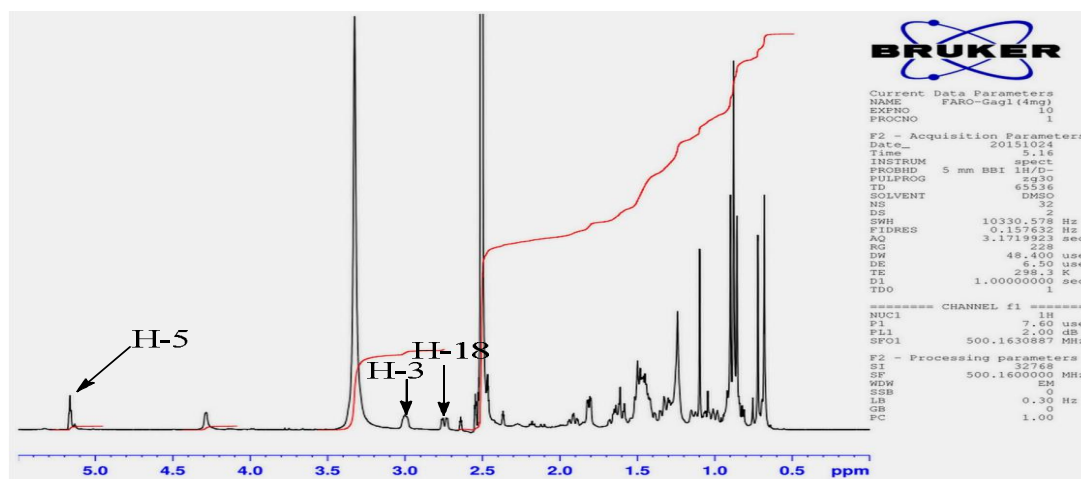


### II.2.8.3. Identification du composé Gag-1

Le composé Gag-1 isolé des graines de *G. aqualla*, se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le  $\text{CHCl}_3$ . Il réagit positivement au réactif de Liebermann-Bürchard, suggérant ainsi une structure de type triterpénique.

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  (Figure II.59) et RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.60) du composé Gag-1 présentent des signaux caractéristiques d'un composé de la classe des oléanènes  $\Delta^{12}$  (Mahato and Kundu, 1994).

En effet, on observe 7 singulets bien individualisés aux déplacements de  $\delta_{\text{H}}$  0,68 ; 0,71 ; 0,85 ; 0,88 ; 0,90 ; 1,10 et 1,23 confirmant la présence de sept méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique. Le squelette de base de ce type de composé renferme 8 méthyles angulaires ; l'observation de 7 indique donc qu'un d'entre eux a été oxydé. Nous observons également la présence du signal d'un proton résonant à  $\delta_{\text{H}}$  5,23 sous l'aspect d'un triplet ( $J = 3,5$  Hz) attribuable au proton d'un groupement méthine impliqué dans une double liaison que l'on peut situer en position 12. Le signal sous forme de multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  3,01 caractérisant un proton pour lequel le carbone porteur possède une fonction alcool secondaire, est généralement caractéristique de l'oxyméthine en position C-3 des oléan-12-ènes avec une configuration  $\beta$  de l'hydroxyle (Mahato and Kundu, 1994). Le singulet à  $\delta_{\text{H}}$  4,31 est relatif au groupement hydroxyle en position 3- $\beta$  du cycle A, tandis que le signal à  $\delta_{\text{H}}$  2,73 (1H, *dd*,  $J = 12,8 ; 4,4$  Hz) est généralement celui du méthine en position C-18.

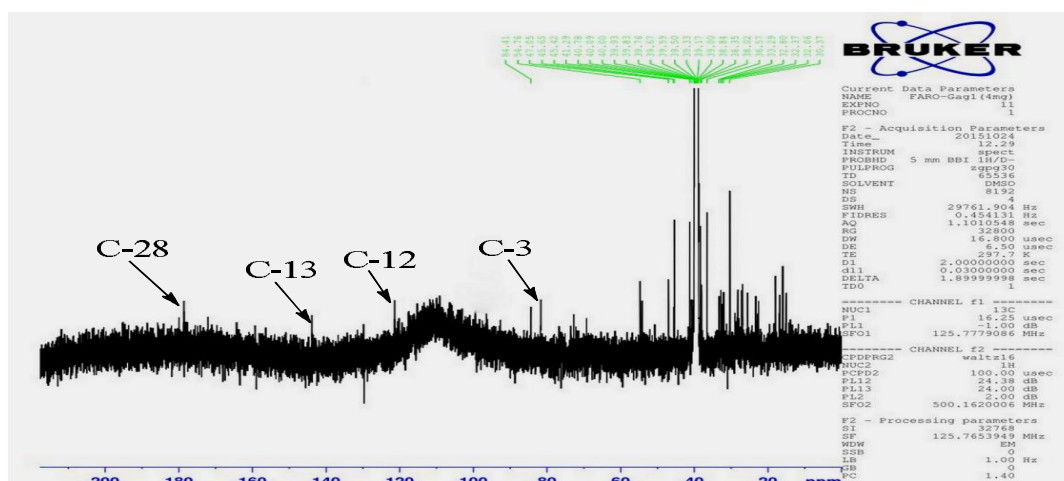


**Figure II.59 :** Spectre RMN $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gag-1

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé Gag-1 présente 30 signaux qui confirment la présence d'un triterpène avec sept méthyles. Pour des raisons biogénétiques, sur un oléanène, ces méthyles sont portés par les carbones quaternaires C-4 (Me-23 à  $\delta_{\text{C}}$  28,2 et Me-24 à  $\delta_{\text{C}}$  16,00), C-10 (Me-25 à  $\delta_{\text{C}}$  15,1), C-8 (Me-26 à  $\delta_{\text{C}}$  16,8), C-13 (Me-27 à  $\delta_{\text{C}}$  26,9) et C-20 (Me-29 à  $\delta_{\text{C}}$  32,8 et Me-30 à  $\delta_{\text{C}}$  23,3). Par ailleurs, la double liaison est confirmée par la présence dans le spectre des signaux à  $\delta_{\text{C}}$  143,7 et 121,5. Le groupement oxyméthinique est confirmé par le déplacement chimique à  $\delta_{\text{C}}$

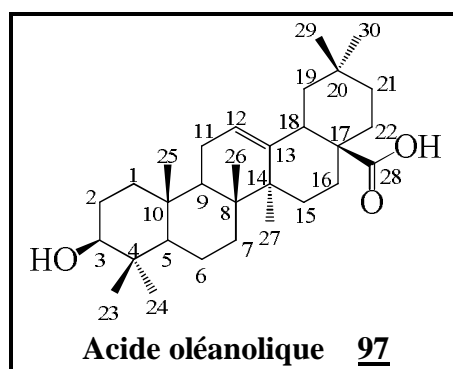


78,9 tandis que le signal résonnant à  $\delta_C$  54,8 signe l'identité du carbone C-5 de ce type de squelette, indiquant ainsi que la décaline A/B est une *trans*-décaline.



**Figure II.60 :** Spectre RMN<sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) de Gag-1

Toutes ces données spectrales en comparaison avec celles de la littérature nous ont permis d'identifier le composé Gag-1 à l'Acide oléan-12-én-28-oïque ou Acide oléanolique **97**. Ce composé a déjà été isolé d'autres espèces du genre *Gardenia*, à l'instar de *G. turgida* (Parmar et al., 2000). Il a également été isolé de plusieurs autres plantes telles que *Triumfetta cordifolia* (Sandjo, 2009), *Callistemon viminalis*, *Syzygium guineense*, *Syzygium aromaticum* (Djoukeng, 2005), ... etc. L'Acide oléanolique **97** est connu pour ses nombreuses propriétés parmi lesquelles les propriétés anti-inflammatoires, anti-hyperlipidémiques, antimicrobiennes, hépatoprotectrices et antivirales (Liu et al., 1995).



**Tableau II.21 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gag-1

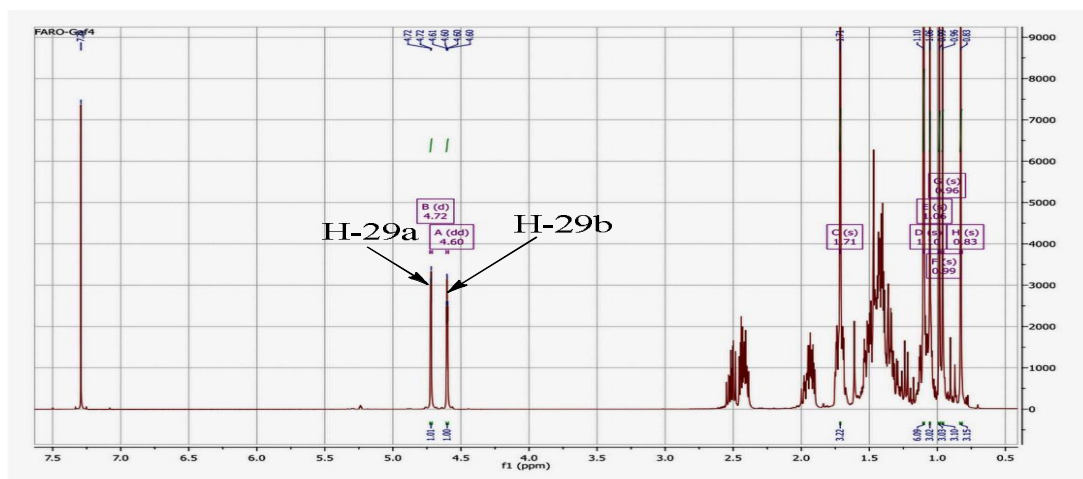
| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J$ (Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | Seebacher et al. (2003)* |
|----|---------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 1  |                                       | 39,0                | 39,0                     |
| 2  |                                       | 27,2                | 28,1                     |
| 3  | 3,03 ( <i>m</i> )                     | 78,9                | 78,2                     |
| 4  | -                                     | 38,4                | 39,4                     |
| 5  |                                       | 54,8                | 55,6                     |
| 6  |                                       | 18,0                | 18,8                     |
| 7  |                                       | 32,1                | 33,4                     |
| 8  | -                                     | 38,0                | 39,8                     |
| 9  |                                       | 47,1                | 48,2                     |
| 10 | -                                     | 36,6                | 37,4                     |
| 11 |                                       | 22,6                | 23,8                     |
| 12 | 5,23 ( <i>t</i> ; 3,7)                | 121,5               | 122,6                    |
| 13 | -                                     | 143,7               | 144,8                    |
| 14 | -                                     | 40,8                | 42,2                     |
| 15 |                                       | 28,2                | 28,4                     |
| 16 |                                       | 25,6                | 23,8                     |
| 17 | -                                     | 45,7                | 46,7                     |
| 18 | 2,73 ( <i>dd</i> , 13,9 ; 4,4)        | 41,3                | 42,1                     |
| 19 | -                                     | 45,4                | 46,6                     |
| 20 |                                       | 30,4                | 31,0                     |
| 21 |                                       | 33,3                | 34,3                     |
| 22 |                                       | 32,4                | 33,2                     |
| 23 | 1,27 ( <i>s</i> )                     | 28,2                | 28,8                     |
| 24 | 0,85 ( <i>s</i> )                     | 16,0                | 16,5                     |
| 25 | 0,68 ( <i>s</i> )                     | 15,1                | 15,6                     |
| 26 | 0,71 ( <i>s</i> )                     | 16,8                | 17,5                     |
| 27 | 1,10 ( <i>s</i> )                     | 26,9                | 26,2                     |
| 28 | -                                     | 178,9               | 180,0                    |
| 29 | 0,88 ( <i>s</i> )                     | 32,8                | 33,4                     |
| 30 | 0,90 ( <i>s</i> )                     | 23,3                | 23,8                     |

\* Données enregistrées dans la pyridine- $d_5$  à 150 MHz

#### II.2.8.4. Identification du composé Gaf-4

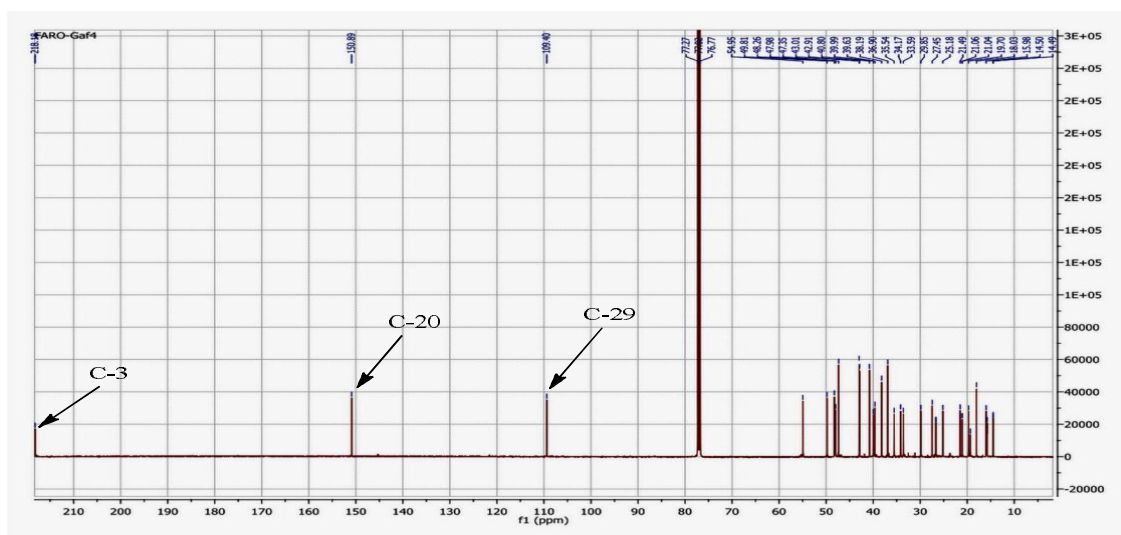
Le composé Gaf-4 a été obtenu des feuilles de *G. aqualla* sous forme de poudre blanche soluble dans le  $\text{CHCl}_3$ . Il réagit positivement au test de Liebermann-Bürchard en donnant une couleur rouge-violacée, caractéristique des triterpènes.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé (Figure II.61) présente six singulets parmi lesquels cinq intégrant trois protons chacun à  $\delta_{\text{H}}$  0,83 ; 0,96 ; 0,99 ; 1,06 ; 1,71 et un intégrant six protons à  $\delta_{\text{H}}$  1,10. Le signal à  $\delta_{\text{H}}$  1,71 (3H, *s*) est attribué au méthyle d'un groupement vinylique dont la présence est confirmée ici par les signaux de deux protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  4,72 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz) et 4,60 (1H, *dd*,  $J = 2,4 ; 1,3$  Hz). Ces signaux sont typiques d'un triterpène pentacyclique de type lupane indiquant ainsi que le composé Gaf-4 appartient à la classe des lupanes. Le signal sous forme de multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  2,42 (*m*) est attribué au proton H-19 de ce type de composé. On note sur le spectre, l'absence du signal du proton oxyméthine H-3 apparaissant généralement autour de  $\delta_{\text{H}}$  3,17.



**Figure II.61 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de Gaf-4

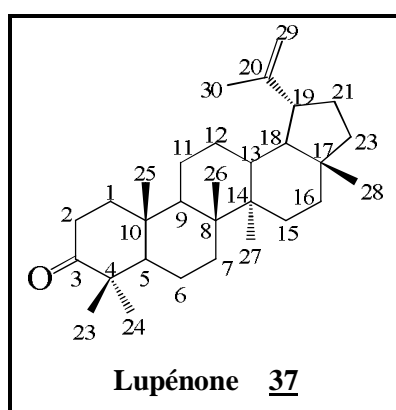
Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.62) et DEPT-135 de Gaf-4 montrent les signaux de 30 carbones répartis en 7 méthyles, 11 méthylènes, 5 méthines et 7 carbones quaternaires. Les groupements méthyles apparaissent à  $\delta_{\text{C}}$  14,5 ; 15,8 ; 16,0 ; 18,0 ; 21,0 et 26,7 respectivement pour les carbones C-27, C-26, C-25, C-28, C-24 et C-23 des triterpènes de type Lupane (Xu et *al.*, 2018). Les signaux à  $\delta_{\text{C}}$  19,3 ; 109,4 et 150,9 confirment la présence d'un groupement vinylique. Le signal du carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  218,2 attribuable à une fonction cétone cyclique pourrait justifier l'absence du proton oxyméthine H-3, suggérant ainsi une probable oxydation du groupement hydroxyle généralement présent à cette position.



**Figure II.62 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de Gaf-4

Les spectres HSQC, COSY et HMBC ont permis une attribution complète des signaux aux différents carbones et protons de la molécule.

La comparaison de toutes ces données spectroscopiques avec celles de la littérature (Xu et *al.*, 2018), nous a amené à identifier le composé Gaf-4 à la Lupénone **37**, composé connu déjà isolé du genre *Gardenia* notamment de *G. saxatilis* par Suksamrarn et *al.* (2003) et de plusieurs autres plantes (Xu et *al.*, 2018) ainsi que de la propolis (Sakava et *al.*, 2014). Le Lupénone est un agent thérapeutique et chimiopréventif connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, antivirales, antidiabétiques et anticancéreuses (Xu et *al.*, 2018).



**Tableau II.22 :** Données RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de Gaf-4

| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J(Hz))     | $\delta_{\text{C}}$ | Xu et al. (2018)* |
|----|--|---------------------|-------------------|
| 1  | 1,92 (m) ; 1,39 (m)                    | 39,6                | 39,6              |
| 2  | 2,52 (m) ; 2,45 (m)                    | 34,2                | 34,1              |
| 3  | -                                      | 218,2               | 218,2             |
| 4  | -                                      | 47,4                | 47,2              |
| 5  | 1,37 (m)                               | 54,9                | 54,9              |
| 6  | 1,72 (m) ; 1,50 (m)                    | 19,7                | 19,6              |
| 7  | 1,48 (m) ; 0,91 (m)                    | 33,6                | 33,5              |
| 8  | -                                      | 40,8                | 40,7              |
| 9  | 1,44 (m)                               | 49,8                | 49,8              |
| 10 | -                                      | 36,9                | 36,8              |
| 11 | 1,46 (m) ; 1,33 (m)                    | 21,5                | 21,4              |
| 12 | 1,74 (m) ; 1,13 (m)                    | 25,2                | 25,1              |
| 13 | 1,72 (m)                               | 38,2                | 38,1              |
| 14 | -                                      | 42,9                | 42,8              |
| 15 | 1,12 (m) ; 1,07 (m)                    | 27,5                | 27,4              |
| 16 | 1,53 (m) ; 1,42 (m)                    | 35,5                | 35,5              |
| 17 | -                                      | 43,0                | 42,9              |
| 18 | 1,43 (m)                               | 47,9                | 47,9              |
| 19 | 2,42 (m)                               | 48,3                | 48,2              |
| 20 | -                                      | 150,9               | 150,8             |
| 21 | 1,95 (m) ; 1,37 (m)                    | 29,8                | 29,8              |
| 22 | 1,43 (m) ; 1,24 (m)                    | 40,0                | 39,9              |
| 23 | 1,10 (s)                               | 26,7                | 26,6              |
| 24 | 1,06 (s)                               | 21,0                | 20,9              |
| 25 | 0,96 (s)                               | 16,0                | 15,7              |
| 26 | 1,10 (s)                               | 15,8                | 15,9              |
| 27 | 0,99 (s)                               | 14,5                | 14,4              |
| 28 | 0,83 (s)                               | 18,0                | 17,9              |
| 29 | 4,72 (d; 2,4)<br>4,60 (dd ; 2,4 ; 1,3) | 109,4               | 109,5             |
| 30 | 1,71 (s)                               | 19,3                | 19,2              |

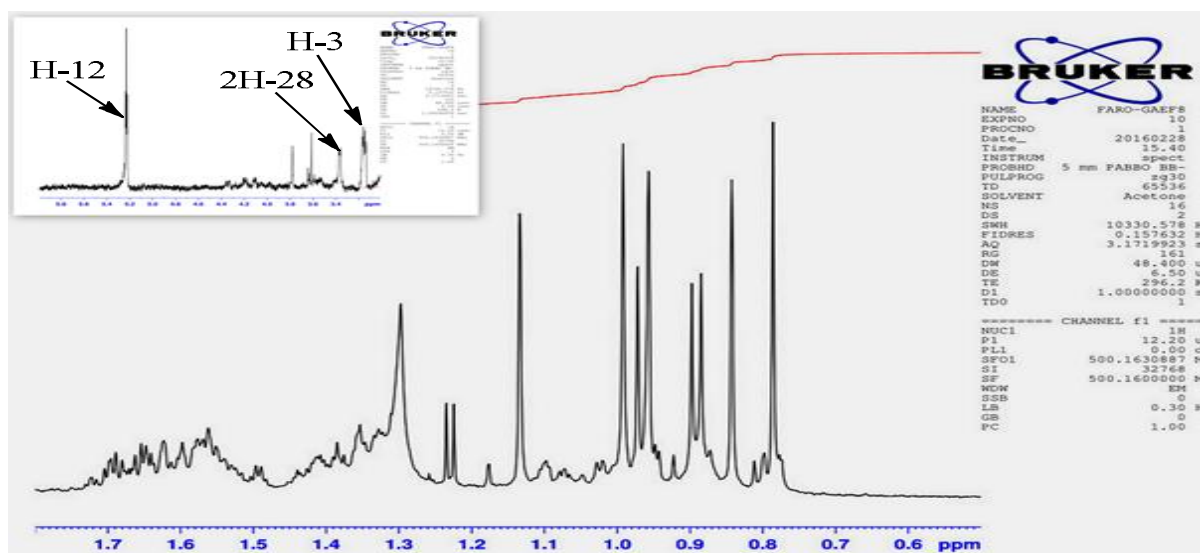
\* Données enregistrées dans le  $\text{CDCl}_3$  à 25 MHz

### II.2.8.5. Identification du composé Gaf-8

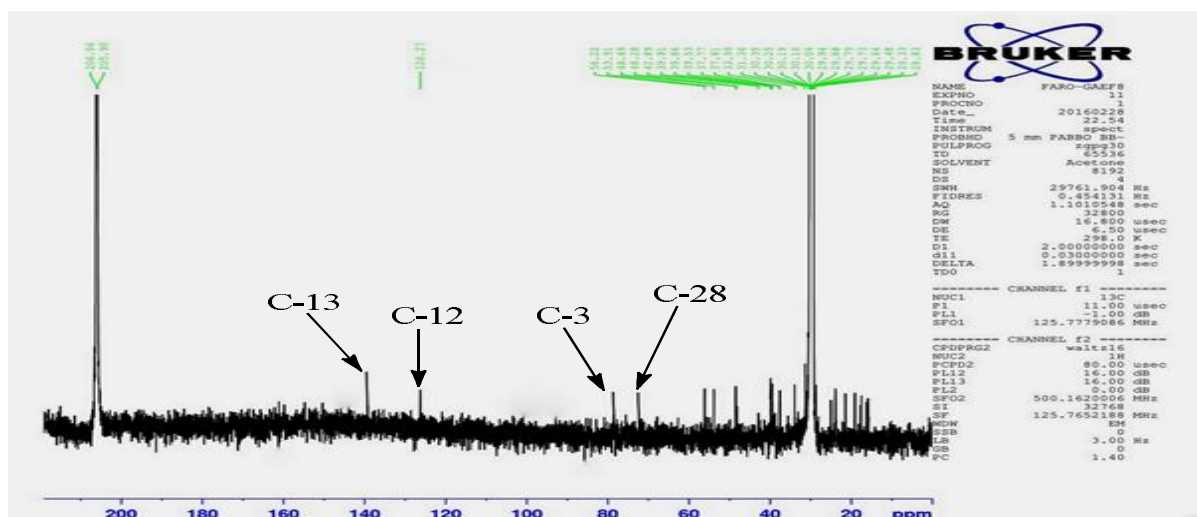
Le composé Gaf-8 a été isolé des feuilles de *G. aqualla* sous forme de poudre verte, soluble dans l'acétone. Il réagit positivement au réactif Liebermann-Bürchard en donnant une coloration rouge violacée caractéristique des triterpènes.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé Gaf-8 (Figure II.63) présente dans la zone des champs forts, les signaux de sept groupements méthyles entre  $\delta_{\text{H}}$  0,77 et 1,12 : on distingue notamment six singulets à  $\delta_{\text{H}}$  0,77 ; 0,83 ; 0,93 ; 1,02 et 1,12 ainsi que deux doublets à  $\delta_{\text{H}}$  0,89 ( $d$ ,  $J = 6,7$  Hz) et 0,96 ( $d$ ,  $J = 6,9$  Hz). La présence de ces doublets nous oriente sur l'hypothèse d'un squelette triterpénique de type ursane. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de Gaf-8 présente en outre les signaux d'un proton oléfinique à  $\delta_{\text{H}}$  5,18 ( $t$ ,  $J = 3,6$  Hz) et d'un proton oxyméthinique à  $\delta_{\text{H}}$  3,15 ( $dd$ ,  $J = 11,8$  ; 5,6 Hz) correspondant respectivement aux protons H-12 et H-3 des urs-12-ènes. On note également la présence d'un oxyméthylène à  $\delta_{\text{H}}$  3,33 ( $m$ ) et deux singulets de protons échangeables au  $\text{D}_2\text{O}$  à  $\delta_{\text{H}}$  3,69 et 3,78 que nous pouvons attribuer aux protons des groupements hydroxyles.

L'analyse des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.64) et DEPT-135 du composé Gaf-8 confirme son appartenance à la classe des triterpènes. En effet on observe les signaux de 30 carbones répartis en 6 carbones quaternaires, 7 méthines, 10 méthylènes et 7 méthyles. Les signaux à  $\delta_{\text{C}}$  126,3 ; 138,9 ; et 78,9 sont typiquement caractéristiques des triterpènes pentacycliques de type urs-12-ène. Les spectres révèlent à  $\delta_{\text{C}}$  70,7 le signal d'un groupement oxyméthylène, tandis que les signaux des groupements méthyles apparaissent à  $\delta_{\text{C}}$  28,7 ; 15,9 ; 16,4 ; 17,7 ; 23,9 ; 17,5 et 21,5. L'attribution complète de ces signaux a été réalisée par l'analyse du spectre HSQC.

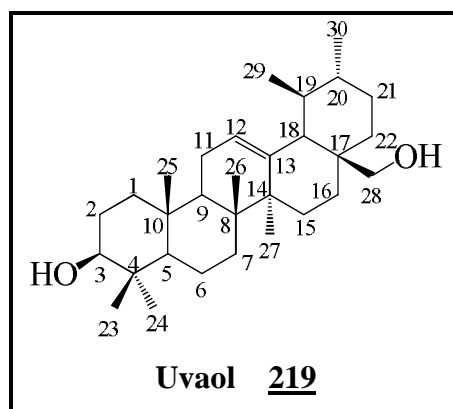


**Figure II.63 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (Acétone- $d_6$ , 500 MHz) élargi de Gaf-8



**Figure II.64 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Acétone- $d_6$ , 125 MHz) de Gaf-8

La comparaison des valeurs des déplacements caractéristiques des  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé Gaf-8 avec celles de la littérature nous a permis d'identifier ce dernier comme étant le  $3\beta$ ,  $28\beta$ -dihydroxyurs-12-ène appelé Uvaol **219**, précédemment isolé de *Ochrosia elliptica* Labill par El-shiekh et al. (2017).



**Tableau II.23 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (Acétone- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (Acétone- $d_6$ , 125 MHz) de Gaf-8

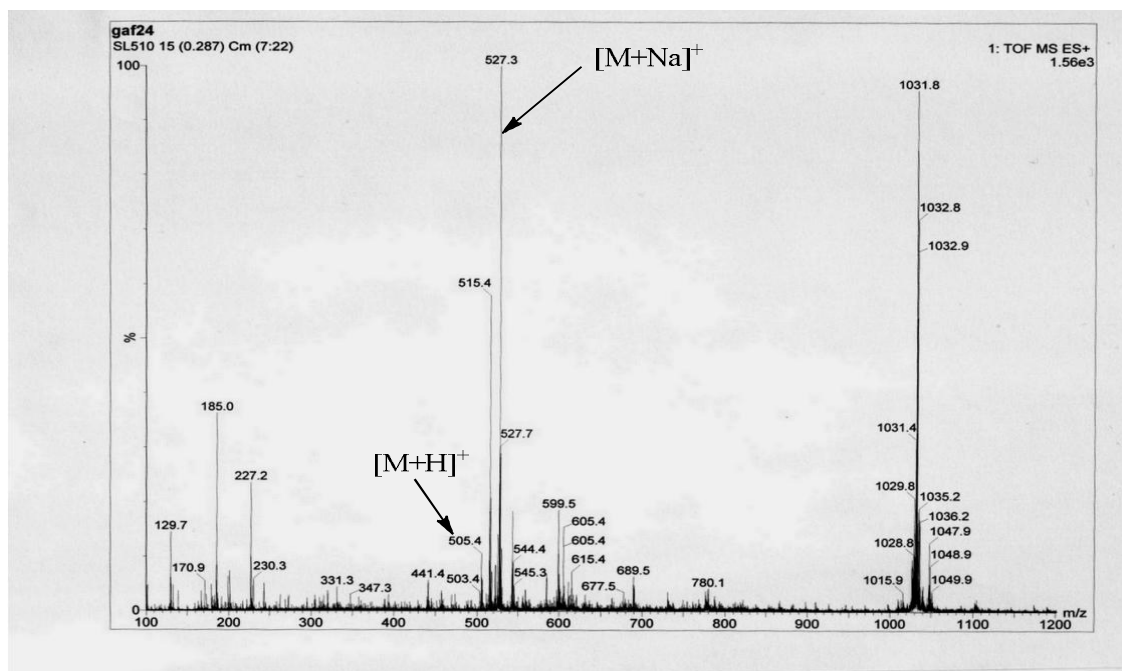
| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J(Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | El-shiekh et al. (2017)* |
|----|------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 1  |                                    | 37,6                | 39,3                     |
| 2  |                                    | 28,8                | 27,3                     |
| 3  | 3,15 (dd; 11,8; 5,6)               | 78,9                | 79,0                     |
| 4  | -                                  | 38,6                | 38,8                     |
| 5  |                                    | 56,2                | 55,2                     |
| 6  |                                    | 19,1                | 18,3                     |
| 7  |                                    | 39,5                | 32,8                     |
| 8  | -                                  | 40,2                | 40,0                     |
| 9  |                                    | 48,5                | 47,7                     |
| 10 | -                                  | 37,7                | 36,9                     |
| 11 |                                    | 25,0                | 23,4                     |
| 12 | 5,18 (t; 3,5)                      | 126,3               | 125,0                    |
| 13 | -                                  | 138,7               | 138,7                    |
| 14 | -                                  | 42,8                | 42,0                     |
| 15 |                                    | 29,3                | 26,0                     |
| 16 |                                    | 24,0                | 23,4                     |
| 17 | -                                  | 37,7                | 36,9                     |
| 18 |                                    | 53,8                | 54,0                     |
| 19 | -                                  | 38,9                | 39,4                     |
| 20 |                                    | 39,9                | 39,4                     |
| 21 |                                    | 33,9                | 30,6                     |
| 22 |                                    | 31,4                | 36,4                     |
| 23 | 1,02 (s)                           | 28,7                | 28,1                     |
| 24 | 0,93 (s)                           | 15,9                | 15,7                     |
| 25 | 0,77 (s)                           | 16,4                | 15,6                     |
| 26 | 0,83 (s)                           | 17,7                | 16,8                     |
| 27 | 1,12 (s)                           | 23,9                | 23,3                     |
| 28 | 3,33 (m)                           | 70,7                | 69,9                     |
| 29 | 0,89 (d; 6,7)                      | 17,5                | 17,4                     |
| 30 | 0,96 (d, 6,9)                      | 21,5                | 21,3                     |

\*Données enregistrées dans  $\text{CDCl}_3$  à 100 MHz



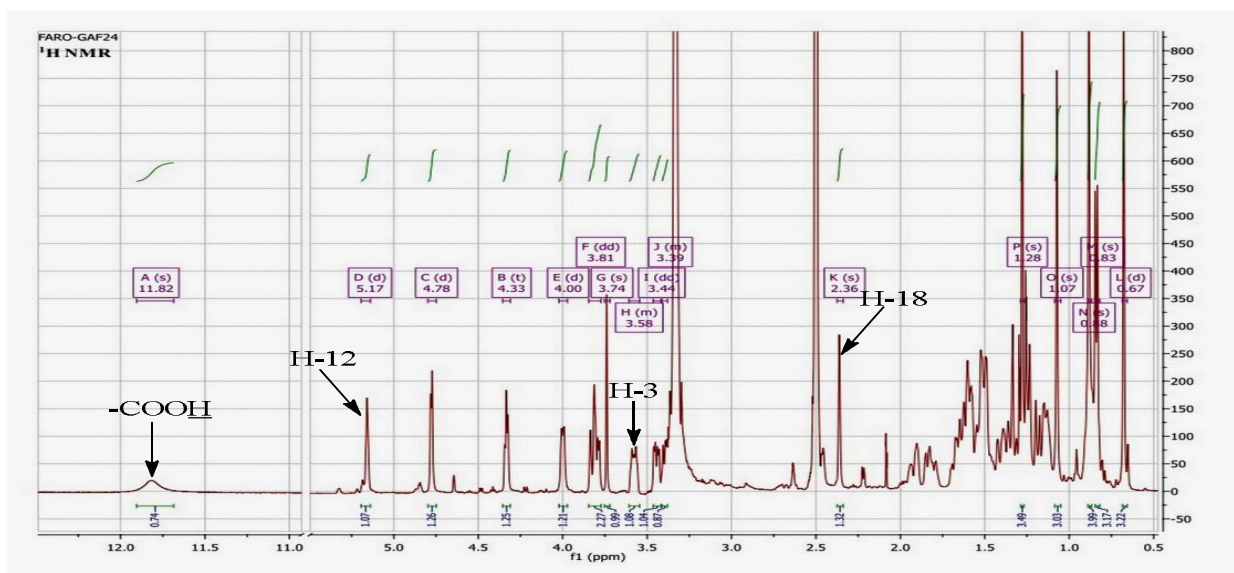
### II.2.8.6. Identification du composé Gaf-24

Le composé Gaf-24 obtenu sous forme de poudre blanche des feuilles de *G. aqualla*, a précipité dans l'AcOEt et répond positivement au test de Lieberman-Bürchard, en donnant une coloration rouge-violacée caractéristique des triterpènes. L'analyse de son spectre TOF-MS-ESI+ (Figure II.65) révèle les pics des ions *quasi*-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  505,3 et *pseudo*-moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  527,3 qui, en combinaison avec l'analyse des données spectrales RMN 1 et 2D ont permis de lui attribuer la formule brute  $C_{30}H_{48}O_6$  renfermant 7 degrés d'insaturations.



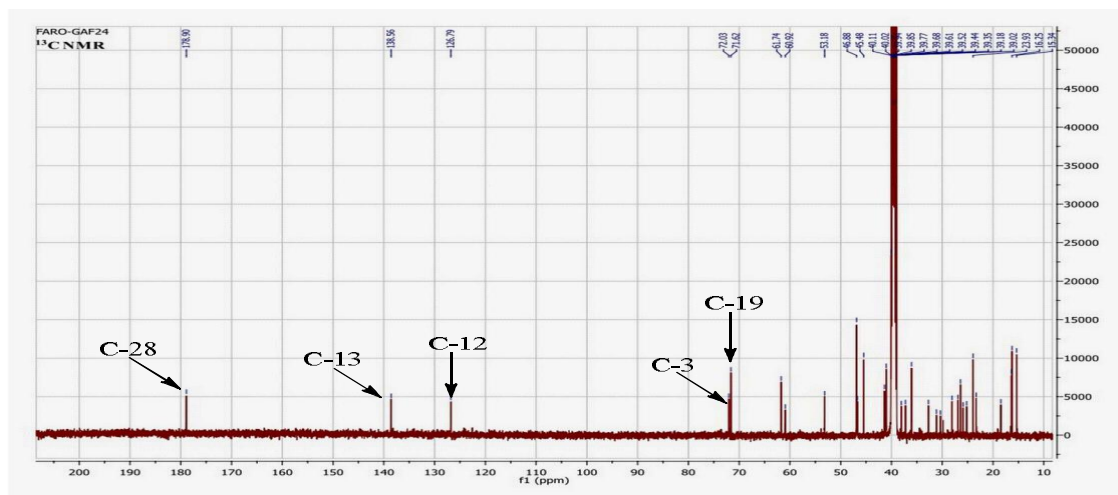
**Figure II.65 :** Spectre TOF-MS-ESI+ de Gaf-24

Le spectre RMN  $^1H$  (Figure II.66) de Gaf-24 présente les signaux de quatre méthyles angulaires à  $\delta_H$  0,68 ; 0,88 ; 1,08 et 1,28 (3H, *s*, chacun), un méthyl secondaire à  $\delta_H$  0,84 (3H, *d*,  $J = 6,7$  Hz), un proton oléfinique d'une double liaison trisubstituée à  $\delta_H$  5,17 (H, *t*,  $J = 2,8$  Hz ; H-12), un proton oxyméthinique à  $\delta_H$  3,58 (1H, *m*, H-3), deux groupements oxyméthyléniques, le premier apparaissant à  $\delta_H$  3,81 (1H, *dd*,  $J = 11,4 ; 3,1$  Hz ; H-23a) et 3,38 (1H, *dd*,  $J = 11,6 ; 7,5$  Hz ; H-23b), le second apparaissant à  $\delta_H$  3,79 (1H, *dd*,  $J = 10,8 ; 5,0$  Hz ; H-24a) et 3,44 (1H, *dd*,  $J = 11,0 ; 4,7$  Hz ; H-24b). Toutes ces données en plus de la présence du signal à 2,36 (*s*), suggèrent que le composé Gaf-24 est un dérivé triterpénique de type ursane possédant une double liaison  $\Delta^{12}$  et un groupement  $\alpha$ -hydroxyle en position C-19 (Young et *al.*, 2011 ; Tan et *al.*, 2014). Les signaux apparaissant à  $\delta_H$  4,80 (1H, *d*,  $J = 4,6$  Hz), 4,35 (1H, *t*,  $J = 4,9$  Hz), 4,01 (1H, *dd*,  $J = 7,2 ; 3,3$  Hz) et 3,77 (1H, *s*) ont été attribués aux quatre groupements hydroxyles de la molécule parmi lesquels trois sont attachés au cycle A tandis que le quatrième est relié au cycle E.



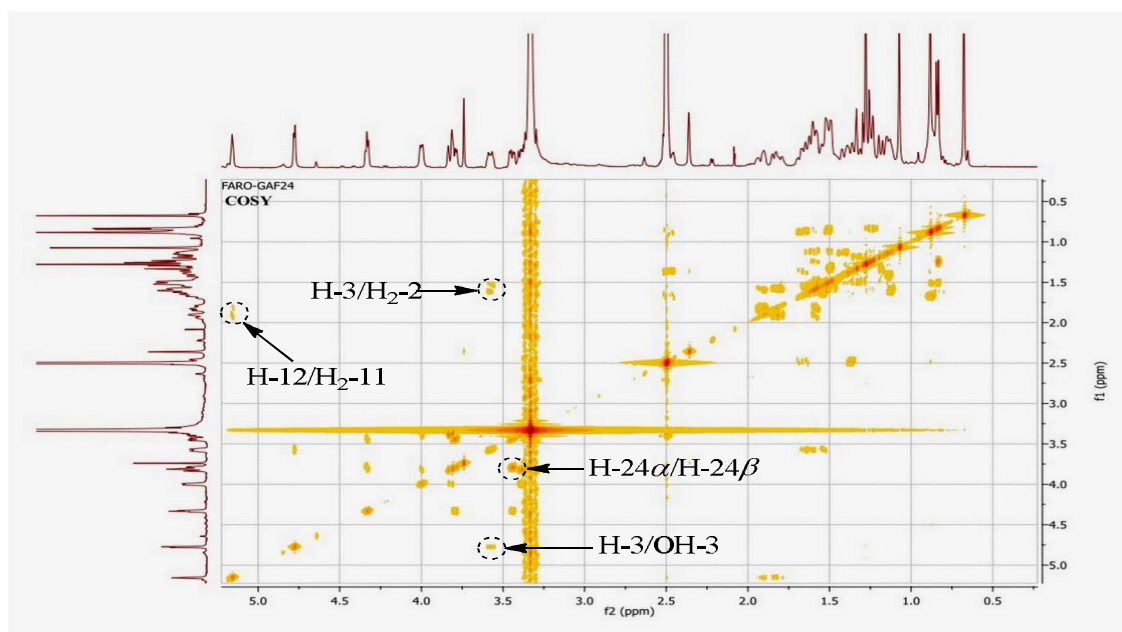
**Figure II.66 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gaf-24

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure II.67) DEPT-135 et HSQC (Figure II.69) du composé Gaf-24 confirment son appartenance à la classe des triterpènes de type ursane possédant une double liaison  $\Delta^{12}$  et un  $\alpha\text{-OH}$  en position C-19. En effet, la présence sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  des signaux de 30 carbones parmi lesquels un oxyméthine à  $\delta_{\text{C}}$  72,0 ; deux carbones oxyméthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  60,7 et 61,7 ; un carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  71,5 ; un carbonyle  $\delta_{\text{C}}$  178,9 et une double liaison trisubstituée à  $\delta_{\text{C}}$  126,8 et 138,5 ; confirme le squelette d'un acide tétrahydroxyurs-12-énoïque avec un groupement  $\alpha$ -hydroxyle en C-19.



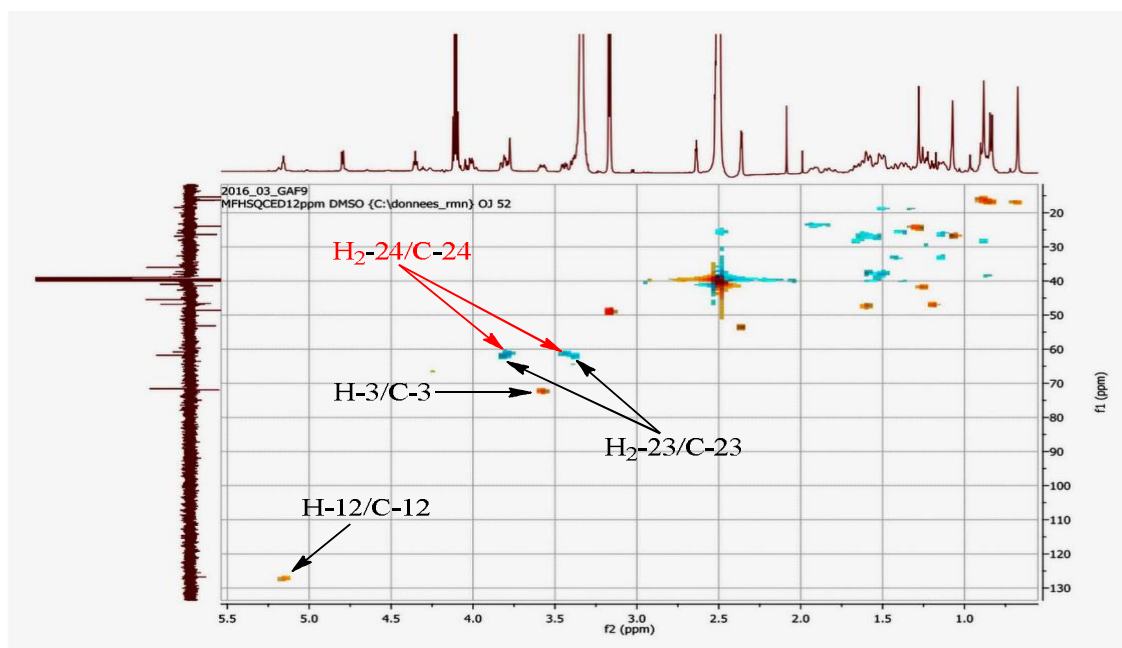
**Figure II.67 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gaf-24

Le spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure II.68) de Gaf-24 montre les corrélations entre le proton à  $\delta_{\text{H}}$  3,58 (*m*) et ceux à  $\delta_{\text{H}}$  1,57 (*m*) et 1,41 (*m*), entre le proton à  $\delta_{\text{H}}$  5,17 (*t*,  $J = 2,6$  Hz) et les deux protons à  $\delta_{\text{H}}$  1,92 (*m*) et 1,82 (*m*). Une autre corrélation était observée entre le proton à  $\delta_{\text{H}}$  1,25 (*m*) et le méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  0,84 (*d* ;  $J = 6,7$  Hz).

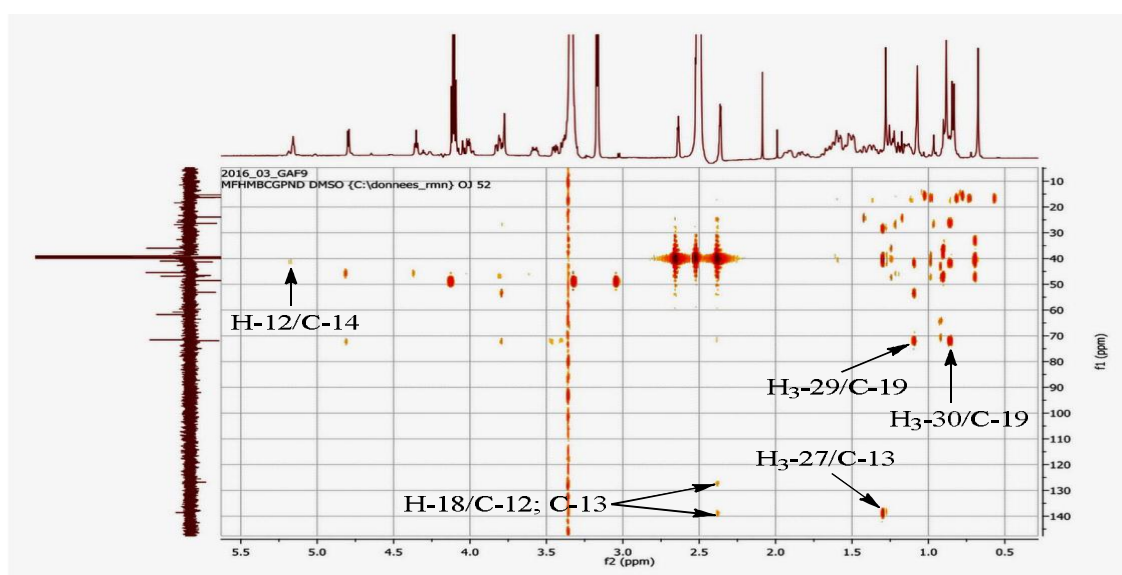


**Figure II.68 :** Spectre COSY (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de Gaf-24

Les positions des différents groupements hydroxyles et méthyles ont été assignées par des corrélations HMBC longue distance parmi lesquelles la corrélation du proton à  $\delta_H$  2,36 avec les carbones à  $\delta_C$  71,5 ; 126,8 ; 138,5 et 178,9 vient confirmer le fait que le composé Gaf-24 est du type 19 $\alpha$ -hydroxyurs-12-ène. Les corrélations sans ambiguïté des protons à  $\delta_H$  3,81 (*dd*,  $J = 11,4$  ; 3,1 Hz) et 3,38 (*dd*,  $J = 11,6$  ; 7,5 Hz) avec les carbones à  $\delta_C$  72,0 et 46,8 ; ainsi que des protons à  $\delta_H$  3,79 (*dd*,  $J = 10,8$  ; 5,0 Hz) et 3,44 (*dd*,  $J = 11,0$  ; 4,7 Hz) avec les carbones à  $\delta_C$  72,0 ; 45,4 et 46,8 ; ont permis de placer les deux groupements hydroxyméthylènes sur les carbones C-23 et C-24. Les différents groupements méthyles ont été attribués à partir des corrélations longue distance des protons à  $\delta_H$  1,08 (*s*) et les carbones à  $\delta_C$  53,1 ; 71,5 et 41,4 ; les protons à  $\delta_H$  0,84 (*d*,  $J = 6,7$  Hz) avec les carbones à  $\delta_C$  71,5 ; 41,4 et 26,2 ; les protons à  $\delta_H$  0,68 (*s*) avec les carbones à 32,7 ; 46,8 ; 40,9 ; 46,6 et 38,0 ; les protons à  $\delta_H$  0,88 (*s*) avec les carbones à  $\delta_C$  36,0 ; 46,6 et 38,0 ; et enfin la corrélation des protons à  $\delta_H$  1,28 (*s*) avec les carbones à  $\delta_C$  40,9 ; 138,5 et 28,3 (Tableau II.24).

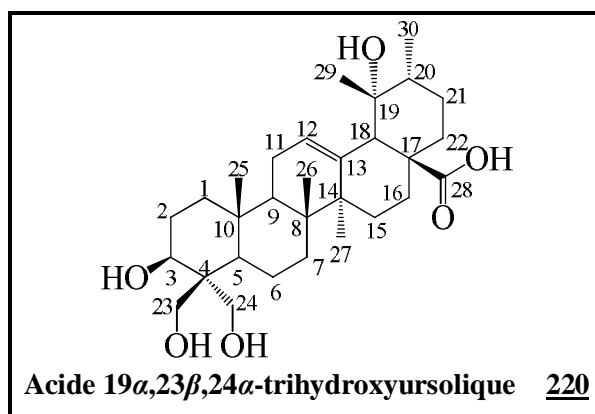


**Figure II.69 :** Spectre HSQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) de Gaf-24



**Figure II.70 :** Spectre HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) de Gaf-24

La comparaison de ces données avec celles de la littérature nous a permis d'identifier le composé Gaf-24 à l'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique **220**, composé précédemment isolé des écorces de *Nauclea officinalis* par Tao et *al.* (2012). Au cours de cette étude, l'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique avait montré une activité inhibitrice significative de l'oxyde nitrique (NO) produite par les lipopolysaccharides (LPS)-induites à la production du NO dans les cellules macrophages RAW 264.7 des souris.



**Tableau II.24 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de Gaf-24

| N° | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$ )   | $\delta_{\text{C}}$ | COSY                                  | HMBC             | Tao et al. (2012)* |
|----|--|---------------------|---------------------------------------|------------------|--------------------|
| 1  | 1,41 (m), 1,13 (m)                             | 32,7                |                                       |                  | 37,2               |
| 2  | 1,57 (m), 1,41 (m)                             | 25,9                |                                       |                  | 23,3               |
| 3  | 3,58 (m)                                       | 72,0                | H-2 $\beta$                           | 4                | 72,0               |
| 4  | -  | 45,4                |                                       |                  | 45,5               |
| 5  | 1,59 (m)                                       | 46,8                |                                       |                  | 46,1               |
| 6  | 1,50 (m), 1,33 (m)                             | 18,4                |                                       |                  | 18,4               |
| 7  | 1,87 (m), 1,56 (m)                             | 36,0                |                                       |                  | 32,7               |
| 8  | -  | 40,9                |                                       |                  | 39,0               |
| 9  | 1,18 (m)                                       | 46,6                |                                       |                  | 46,8               |
| 10 | -  | 38,0                |                                       |                  | 36,0               |
| 11 | 1,92 (m), 1,82 (m)                             | 23,3                |                                       |                  | 25,2               |
| 12 | 5,17 (t ; 2,8)                                 | 126,8               | 2H-11                                 | 14, 18           | 126,7              |
| 13 | -  | 138,5               |                                       |                  | 138,6              |
| 14 | -  | 42,7                |                                       |                  | 41,0               |
| 15 | 0,87 (m), 1,66 (m)                             | 28,3                |                                       |                  | 28,1               |
| 16 | 1,53 (m), 1,61 (m)                             | 26,9                |                                       |                  | 25,9               |
| 17 | -  | 46,9                |                                       |                  | 46,8               |
| 18 | 2,36 (s)                                       | 53,1                |                                       | 19, 12, 13, 28   | 53,2               |
| 19 | -  | 71,5                |                                       | -                | 71,6               |
| 20 | 1,25 (m)                                       | 41,4                | 3H-30                                 | 20, 21, 22       | 41,4               |
| 21 | 1,60 (m), 1,12 (m)                             | 26,2                |                                       |                  | 26,9               |
| 22 | 1,61 (m), 1,49 (m)                             | 37,2                |                                       |                  | 38,0               |
| 23 | 3,81 (dd, 11,4 ; 3,1)<br>3,38 (dd, 11,6 ; 7,5) | 61,7                |                                       | 3, 5<br>3, 5, 23 | 61,7               |
| 24 | 3,79 (dd, 10,8 ; 5,0)<br>3,44 (dd, 11,0 ; 4,7) | 60,7                | 24-H $\beta$ , 24-OH<br>H-24 $\alpha$ | 4, 5<br>3        | 60,8               |
| 25 | 0,68 (s)                                       | 16,4                |                                       | 1, 5, 8, 9, 10   | 15,3               |
| 26 | 0,88 (s)                                       | 15,4                |                                       | 7, 9, 10         | 16,3               |
| 27 | 1,28 (s)                                       | 23,9                |                                       | 8, 13, 15        | 23,9               |
| 28 | -  | 178,9               |                                       | -                | 178,9              |
| 29 | 1,08 (s)                                       | 26,4                |                                       | 18, 19, 20       | 26,4               |
| 30 | 0,84 (d, 6,7)                                  | 16,3                | H-20                                  | 19, 20, 21       | 16,4               |

\* Données enregistrées dans le DMSO- $d_6$  à 100 MHz



## II.3. Transformations chimiques

Le deuxième aspect de notre travail a consisté à entreprendre des transformations chimiques sur les composés ayant été isolés en quantité appréciable, en vue de potentialiser leurs activités biologiques. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à la Catéchine **177** et au *D*-Mannitol **162**.

### II.3.1. Réaction de Pechmann à partir de la Catéchine **177** (Vr-2)

C'est une réaction de synthèse des coumarines à partir de la condensation des phénols et des  $\beta$ -cétoesters ou des acide  $\beta$ -céto carboxyliques en présence d'un catalyseur acide  $H_2SO_4$ ,  $P_2O_5$ ,  $AlCl_3$ ...etc. Cette réaction est également connue comme étant la synthèse de Pechmann, cyclisation de Pechmann (ou condensation de Pechmann) ou cyclisation de Pechmann.

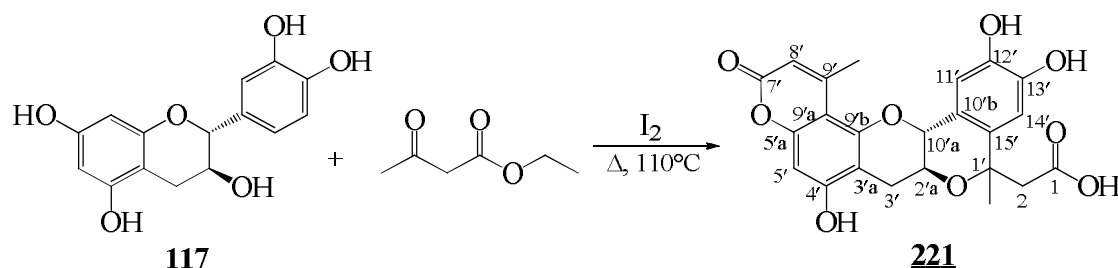
Le résultat de cette réaction dépend à la fois de la nature du phénol, du  $\beta$ -cétoester et du réactif de condensation. La présence sur le composé phénolique d'un groupement électro-donneur en position *meta* du groupement hydroxyle favorise davantage la condensation de Pechmann tandis que les phénols avec un groupement électro-attracteur en position *meta* de l'hydroxyle ou un groupement électro-donneur à une position autre que celle *meta* de l'hydroxyle résistent à cette réaction. Par ailleurs la présence des substituants en position  $\alpha$  ou  $\gamma$  sur le  $\beta$ -cétoester ralentit la réaction.

La réaction a été effectuée sur la Catéchine isolé du bois de racines de *V. paradoxa*, avec l'acétoacétate d'éthyle en utilisant le diiode comme catalyseur à 110°C et en absence de solvant, tel que décrit par Prajapati *and* Gohain (2007). Notons que c'est la première fois que cette réaction est effectuée sur la Catéchine **177**.

L'unique réactivité du  $I_2$  tant dans les milieux aqueux que dans ceux organiques, et surtout sa stabilité font de lui un catalyseur doux utilisé depuis plus d'une décennie comme acide de Lewis dans de nombreuses transformations chimiques (Prajapati *and* Gohain, 2007). L'utilisation de l'approche sans solvant est meilleure parce qu'elle conduit à un rendement plus élevé en un temps plus réduit. L'avantage donc de cette méthode est qu'elle est plus efficace, plus économique et amie de l'environnement.

Au vu de tout ce qui a été mentionné plus haut (paragraphe 2), nous pouvons dire que la condition idoine pour qu'un composé phénolique subisse une cyclisation de Pechmann est que non seulement la position *ortho* du groupement hydroxyle doit être libre, mais le composé doit également comporter un groupement électrodonneur en position *meta* du groupement hydroxyle. De ce point de vue, et vu la structure de la Catéchine **117**, la réaction de Pechmann ne peut avoir lieu que sur le cycle A de celle-ci (Schéma II.13). Par ailleurs, la présence du groupement hydroxyle en position 2' du cycle C de la Catéchine **117** augmente la densité électronique de la position 6' qui

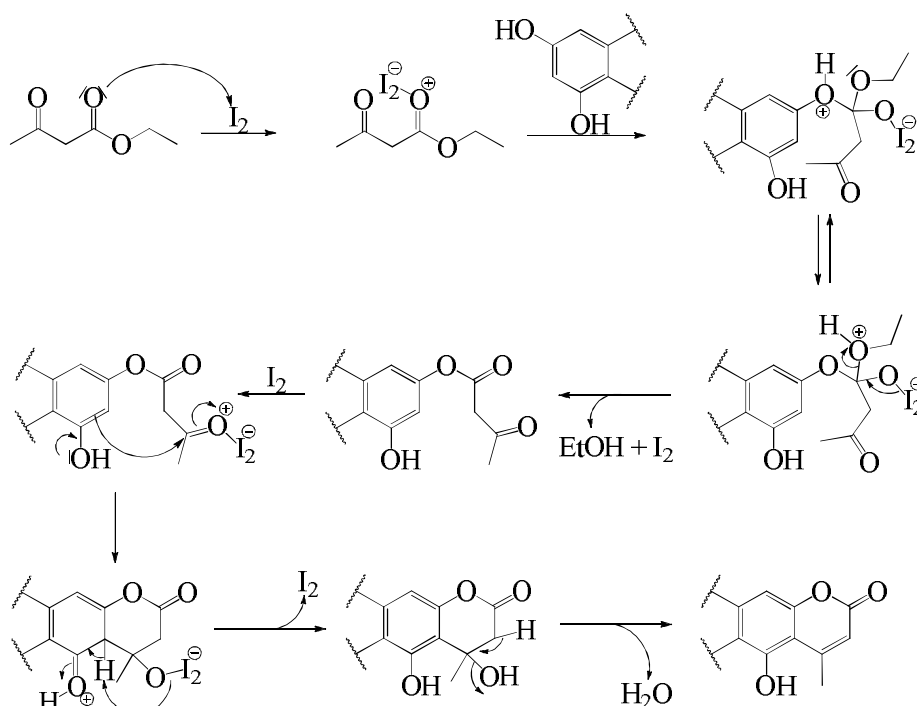
devient à son tour plus susceptible à une attaque électrophile. La réaction va donc se poursuivre par une substitution électrophile en position 6' suivie d'une cyclisation favorisée par la proximité de l'hydroxyle en position 3. Cette réaction a conduit au final à l'Acide 2-[(2'aS,10'aR)-4',13',12'-trihydroxy-1',9'-diméthyl-7'-oxo-1',2'a,3',10'a-tetrahydro-3H-isochromeno[4,3-b]pyrano[2,3-h]chromenyl] acétique **221**.



**Schéma II.13 :** Réaction de synthèse de Pechmann à partir de la Catéchine **117**

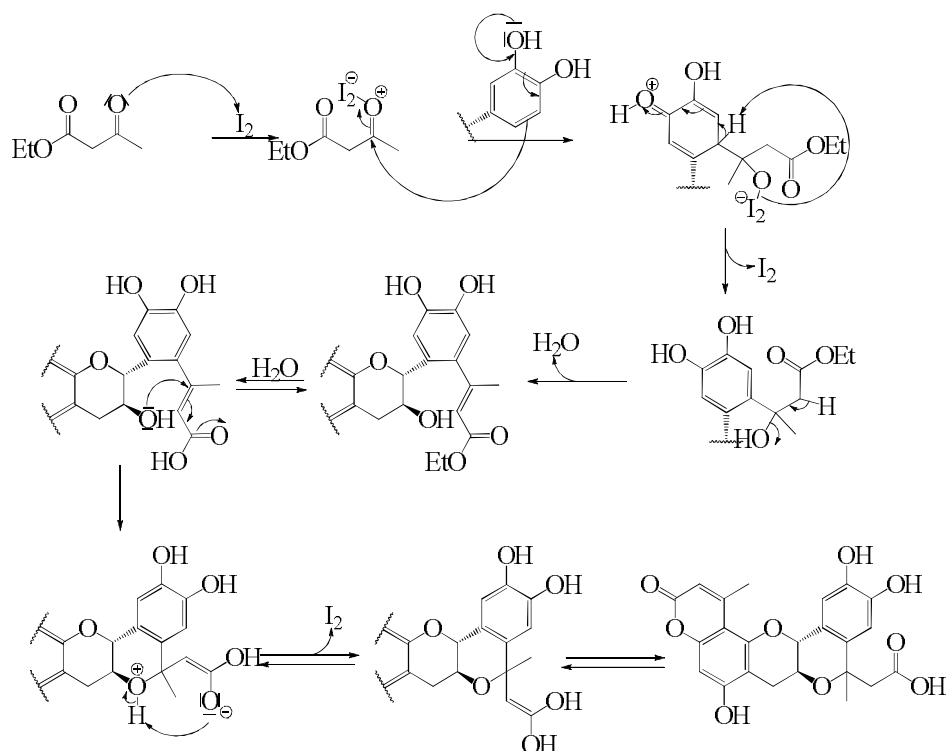
La première étape de cette synthèse et qui constitue la réaction de Pechmann proprement dite débute par une transestérification suivie d'une cyclisation et d'une déshydratation (Schéma II.14). L'utilisation de l'acétoacétate d'éthyle comme  $\beta$ -cétoester entraîne la libération de l'éthanol dans le milieu. Notons que ce mécanisme n'est pas spécifique, puisqu'il a été démontré que le mécanisme de cette réaction de Pechmann peut suivre l'une des trois voies suivantes, sinon les trois de façon simultanée (Daru *and* Sterling, 2011) :

- Trans-estérification puis attaque électrophile et enfin élimination de l'eau ;
- Attaque électrophile puis élimination de l'eau et enfin trans-estérification ;
- Attaque électrophile suivie d'une trans-estérification et enfin élimination de l'eau.



**Schéma II.14 :** Mécanisme de la réaction de synthèse de Pechmann

La deuxième étape de cette réaction qui peut être considérée comme une réaction secondaire liée à la structure de type catéchine du substrat, se déroule en quatre phases : substitution électrophile aromatique sur le cycle C de la catéchine, élimination d'une molécule d'eau, hydrolyse de l'ester puis cyclisation. Au cours de la première phase, l'attaque électrophile se fait sur le groupement acétyle de l'acétoacétate d'éthyle suivie de l'élimination d'une molécule d'eau qui va par la suite hydrolyser la fonction ester du groupement électrophile. Enfin, interviendra une cyclisation qui ici est due à la proximité du groupement OH en position 3.



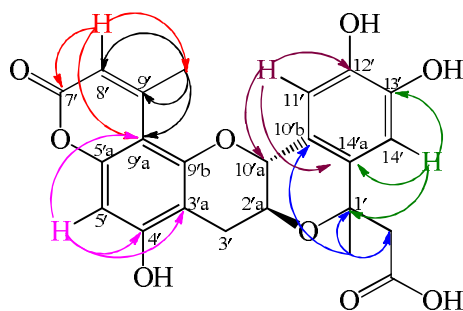
**Schéma II.15 :** Mécanisme de la 2<sup>ième</sup> étape de la synthèse de Pechmann à partir de la Catéchine

La première étape de cette réaction qui est la synthèse de Pechmann et qui a lieu sur le cycle B de la Catéchine se matérialise sur les spectres RMN <sup>1</sup>H (mal résolu), <sup>13</sup>C et DEPT-135 du produit obtenu par l'absence des signaux des protons H-8 ( $\delta_H$ ) et C-8 ( $\delta_C$  94,0) de la Catéchine et l'apparition du signal d'un carbone quaternaire à  $\delta_C$  102,1 (C-9'a) en lieu et place du carbone C-8 de la Catéchine et aussi des signaux supplémentaires d'un méthyle angulaire à  $\delta_H/\delta_C$  2,32/23,9 (Me-9') ; d'un proton oléfinique à  $\delta_H$  5,81 (H-8') lié à un carbone à 109,5 (C-8'), d'un deuxième carbone quaternaire à  $\delta_C$  154,9 (C-9) et du carbonyle d'une fonction lactone à  $\delta_C$  160,6 (C-7').

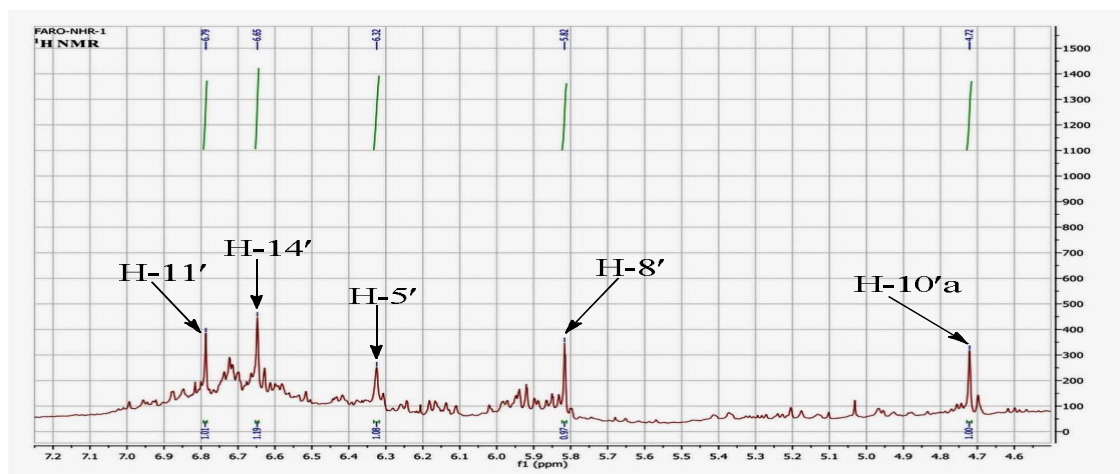
La deuxième étape qui a conduit au produit final, s'est quant à elle matérialisée par la disparition des signaux de H-6'/C-6' à  $\delta_H/\delta_C$  11/118,0 de la Catéchine, au profit du signal d'un carbone quaternaire à 122,1 (C-15'). La présence supplémentaire d'un carbone quaternaire résonnant à  $\delta_C$  76,7 d'un méthyle angulaire  $\delta_H/\delta_C$  1,53/26,5 ; d'un méthylène à  $\delta_H/\delta_C$  1,53/26,5 probablement déblindé par la proximité de la fonction acide résonnant ici à  $\delta_C$  168,8.



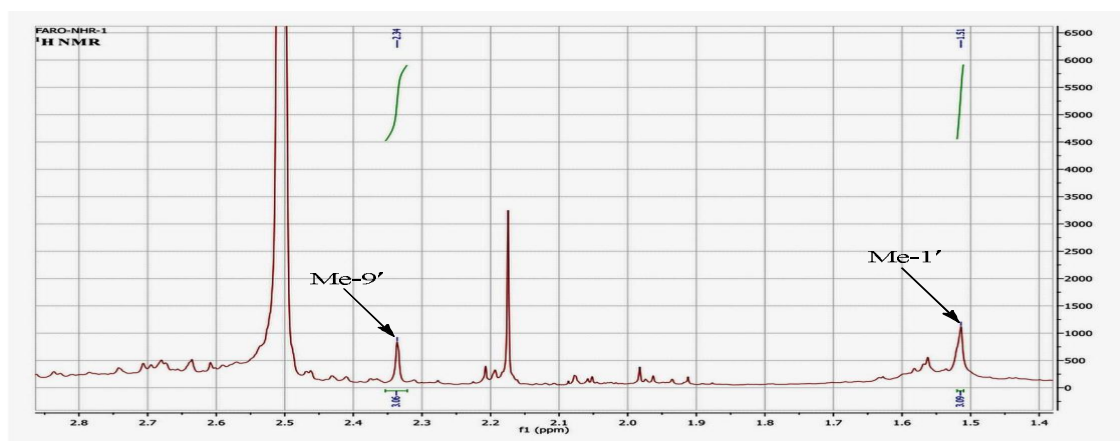
Tous les carbones protonés de la molécule ont été attribués grâce à l'analyse du spectre HSQC. L'observation des corrélations HMBC longue distance entre le proton H-8' ( $\delta_H$  5,81) et les carbones C-7' (160,6), C-9'a ( $\delta_C$  102,3) et Me-9' ( $\delta_C$  23,9) ; entre les protons du méthyle en position 9' (H<sub>3</sub>-9') résonnant à  $\delta_H$  2,33 et les carbones C-9'a, C-2 ( $\delta_C$  109,5) et C-9' ( $\delta_C$  154,9) entre le proton H-14' à  $\delta_H$  6,64 et les carbones quaternaires C-1' ( $\delta_C$  76,7) et C-14'a ( $\delta_C$  122,4) ; entre les protons du méthyle en position H<sub>3</sub>-1' et les carbones C-2 ( $\delta_C$  47,), C-1' ( $\delta_C$  76,7) et C-10'b ( $\delta_C$  131,5) témoignent ainsi de la réussite de la réaction.



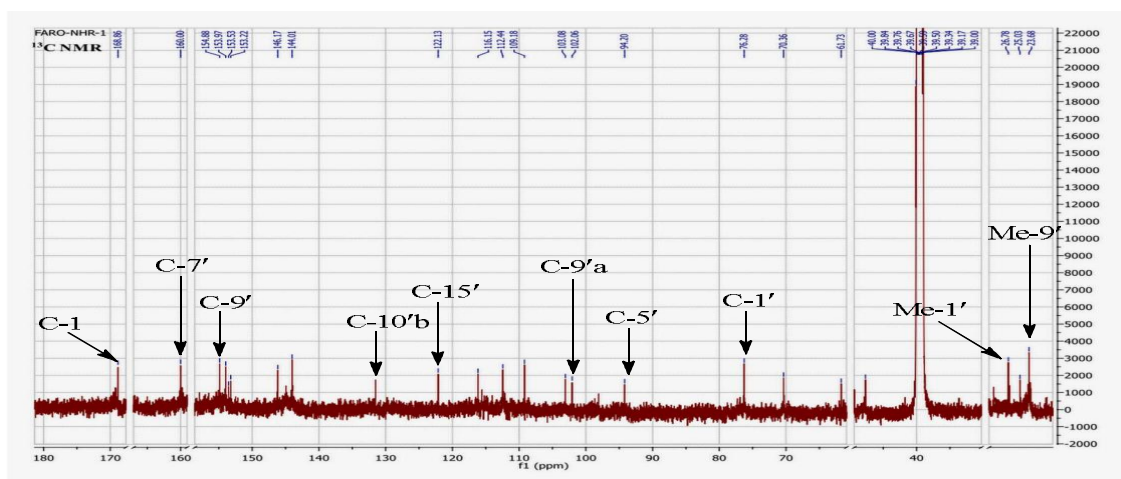
**Schéma II.16 :** Importantes corrélations HMBC de NHR-1



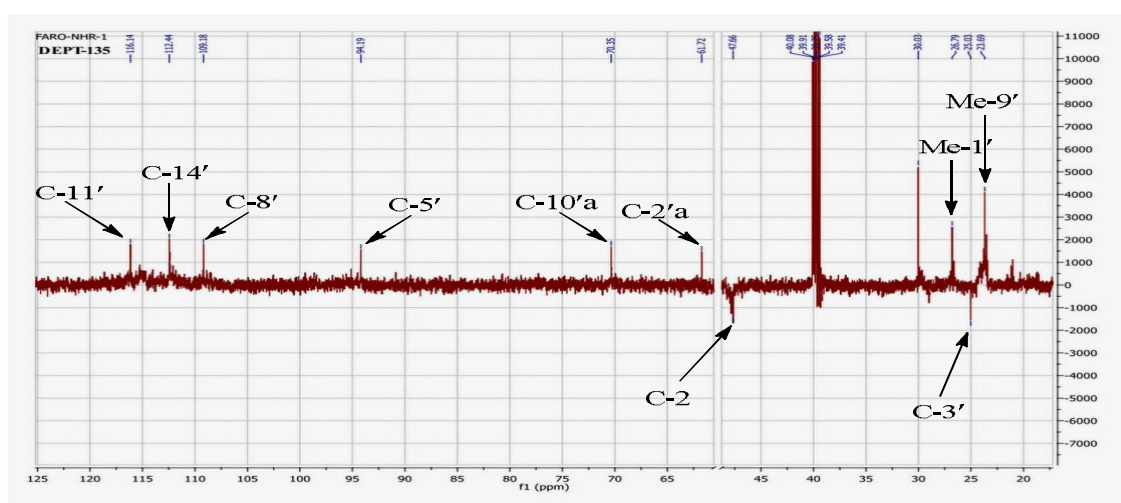
**Figure II.71 :** Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) élargi ( $\delta_H$  4,6-7,2) de NHR-1



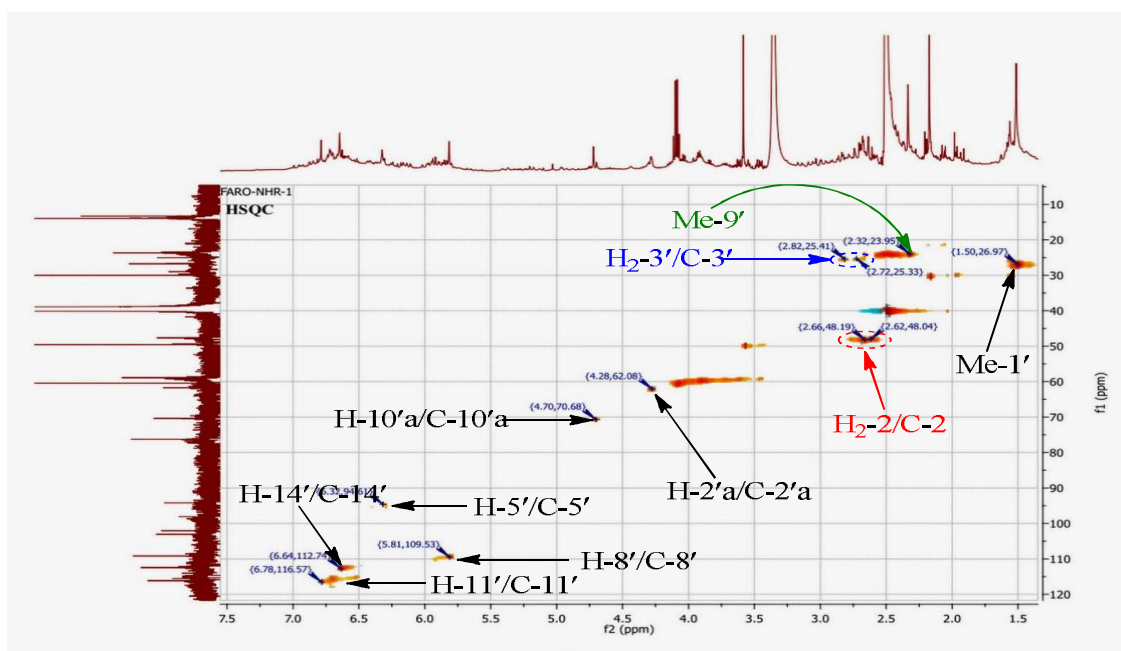
**Figure II.72 :** Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) élargi ( $\delta_H$  1,4-2,8) de NHR-1



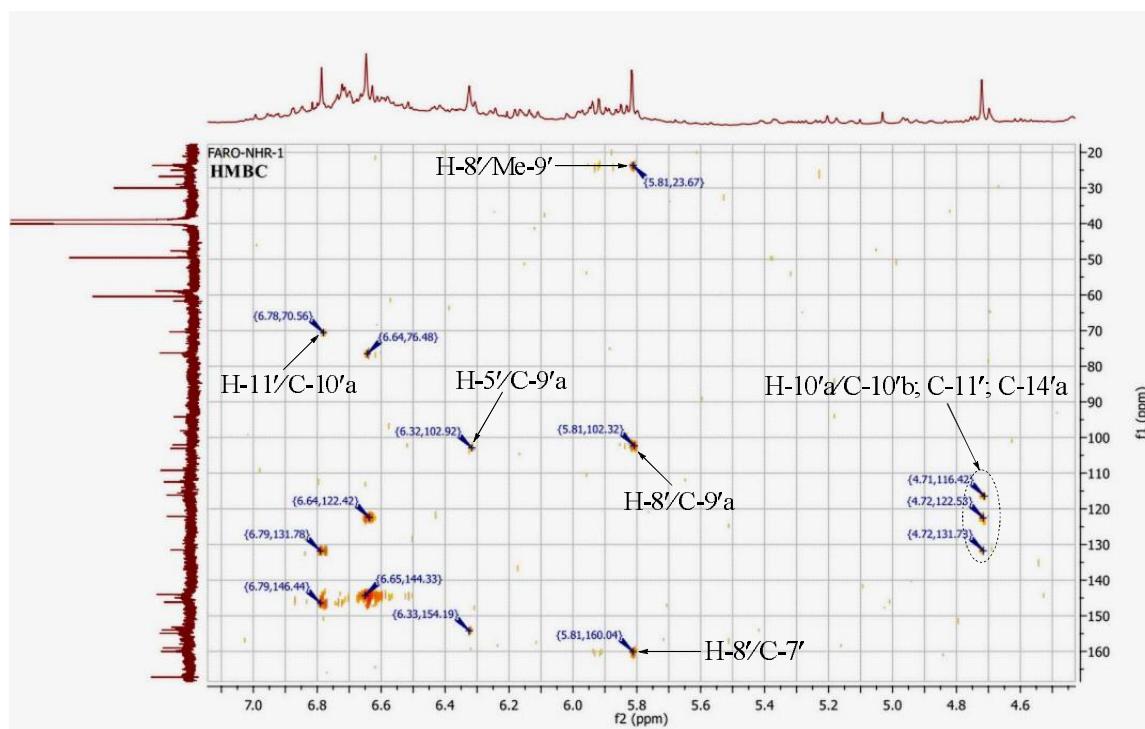
**Figure II.73 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NHR-1



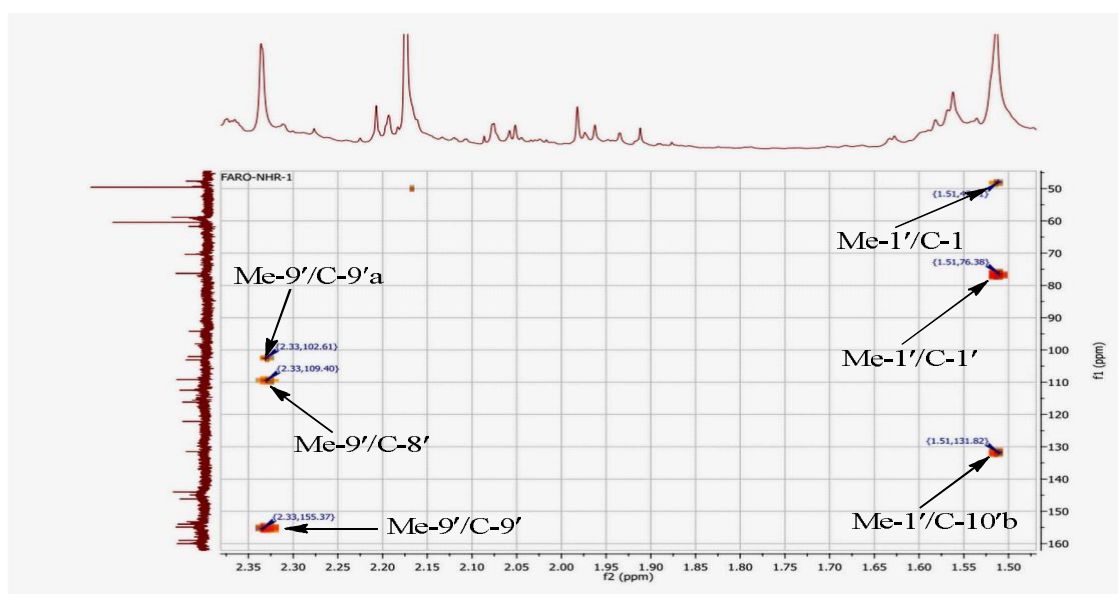
**Figure II.74 :** Spectre DEPT-135 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NHR-1



**Figure II.75 :** Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-1



**Figure II.76 :** Spectre HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) élargi (δ<sub>H</sub> 4,50-7,50) de NHR-1



**Figure II.77 :** Spectre HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) élargi (δ<sub>H</sub> 1,47-2,40) de NHR-1

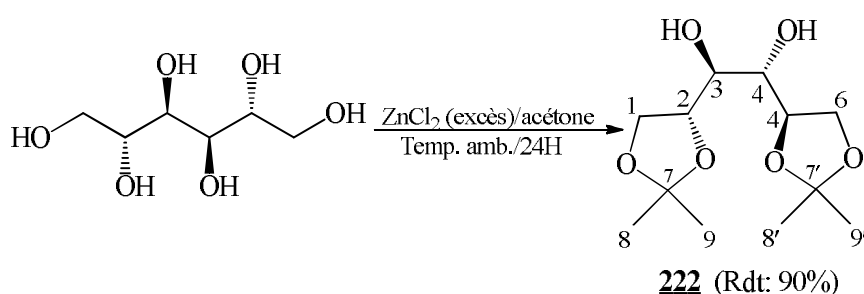
**Tableau II.25 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) et HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-1

| N°    | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., J(Hz)) | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC                 |
|-------|------------------------------------|---------------------|----------------------|
| 1     | -                                  | 168,8               | -                    |
| 2     | 2,62 (m) ; 2,66 (m)                | 47,7                | -                    |
| 1'    | -                                  | 76,7                | -                    |
| 2'    | /                                  | /                   | /                    |
| 2'a   | 4,28 (s)                           | 61,7                | -                    |
| 3'    | 2,82 (m) ; 2,72 (m)                | 25,0                | -                    |
| 3'a   | -                                  | 103,1               | -                    |
| 4'    | -                                  | 153,6               | -                    |
| 5'    | 6,32 (s)                           | 94,6                | 3'a ; 4' ; 5'a ; 9'a |
| 5'a   | -                                  | 153,2               | -                    |
| 6'    | -                                  | -                   | -                    |
| 7'    | -                                  | 160,6               | -                    |
| 8'    | 5,81 (s)                           | 109,2               | 7' ; 9' ; 9'a ; Me-9 |
| 9'    | -                                  | 154,9               | -                    |
| 9'a   | -                                  | 102,1               | -                    |
| 9'b   | -                                  | 153,5               | -                    |
| 10'   | -                                  | -                   | -                    |
| 10'a  | 4,70 (s)                           | 70,4                | 10'b ; 13' ; 14'a    |
| 10'b  | -                                  | 122,1               | -                    |
| 11'   | 6,78 (s)                           | 116,2               | 10'a ; 10'b ; 12'    |
| 12'   | -                                  | 146,2               | -                    |
| 13'   | -                                  | 144,0               | -                    |
| 14'   | 6,64 (s)                           | 112,4               | 1' ; 13' ; 14'a      |
| 14'a  | -                                  | 131,5               | -                    |
| Me-1' | 1,50 (s)                           | 26,7                | 1' ; 2 ; 14'a        |
| Me-9' | 2,32 (s)                           | 23,9                | 8' ; 9' ; 9'a        |

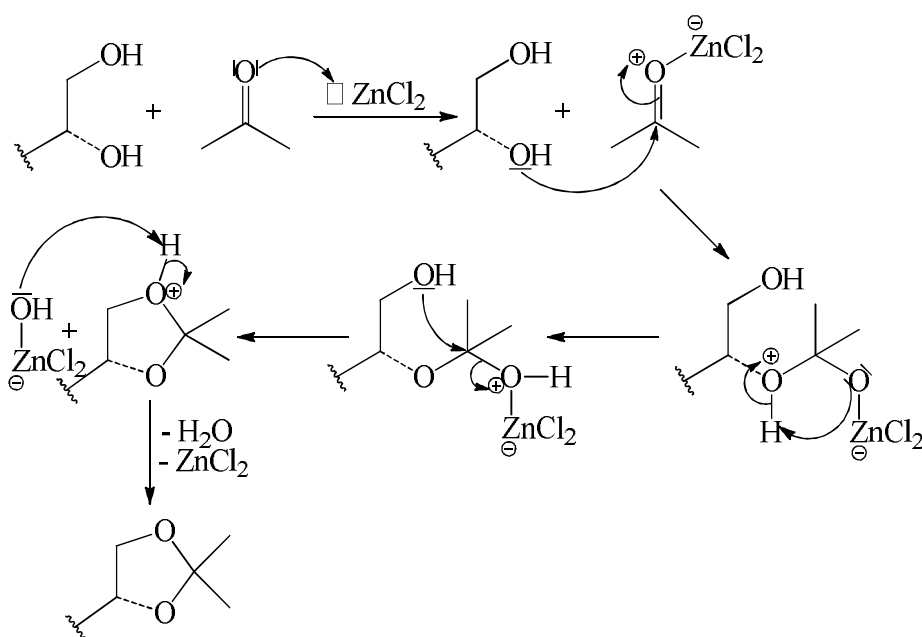
### II.3.2. Réaction d'acétalisation du *D*-Mannitol **162** (Gag-4)

L'acétalisation est une réaction de protection des diols conjugués. En effet, les diols réagissent avec les aldéhydes, les cétones, le 2,2-diméthoxypropane et le 2-méthoxypropène pour donner des acétals cycliques.

La réaction a été effectuée sur le *D*-Mannitol. En fonction du réactif utilisé, le produit de l'acétalisation du *D*-Mannitol varie du fait de sa structure de type polyol. La méthode utilisée ici est celle développée par De Alvarenga et *al.* (2006) qui fait intervenir un excès de chlorure de zinc (II) anhydre dans de l'acétone anhydre à température ambiante. Seuls les hydroxyles en position 1,2 et 5,6 ont été protégés conduisant à la formation du 1,2:5,6-di-*O*-Isopropylidène-*D*-mannitol **222**, qui est un intermédiaire de synthèse connu.



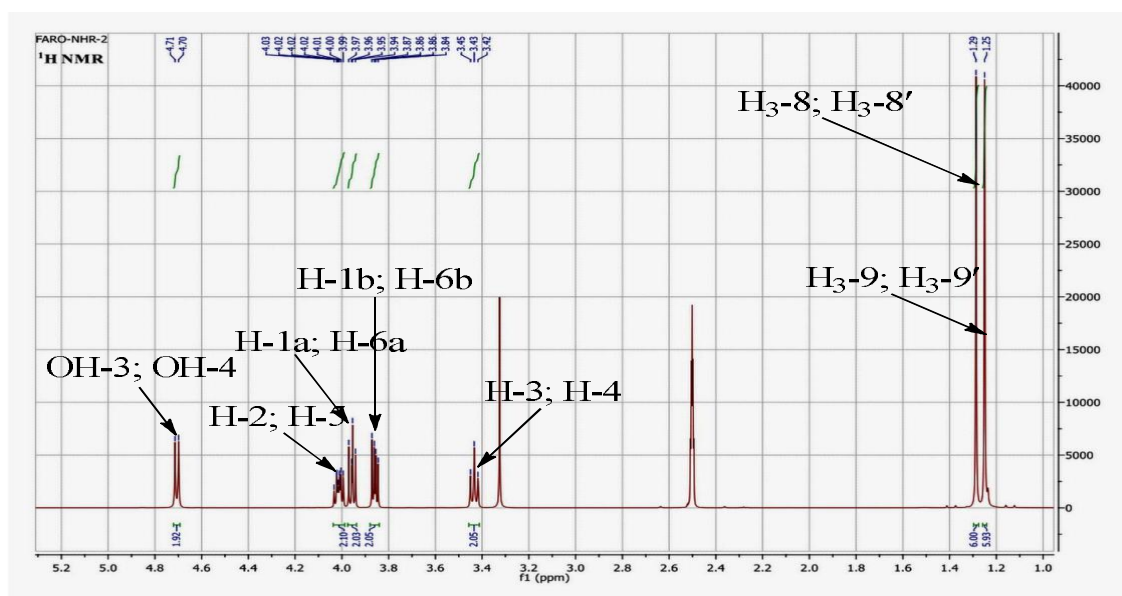
**Schéma II.17 :** Réaction d'acétalisation du *D*-Mannitol



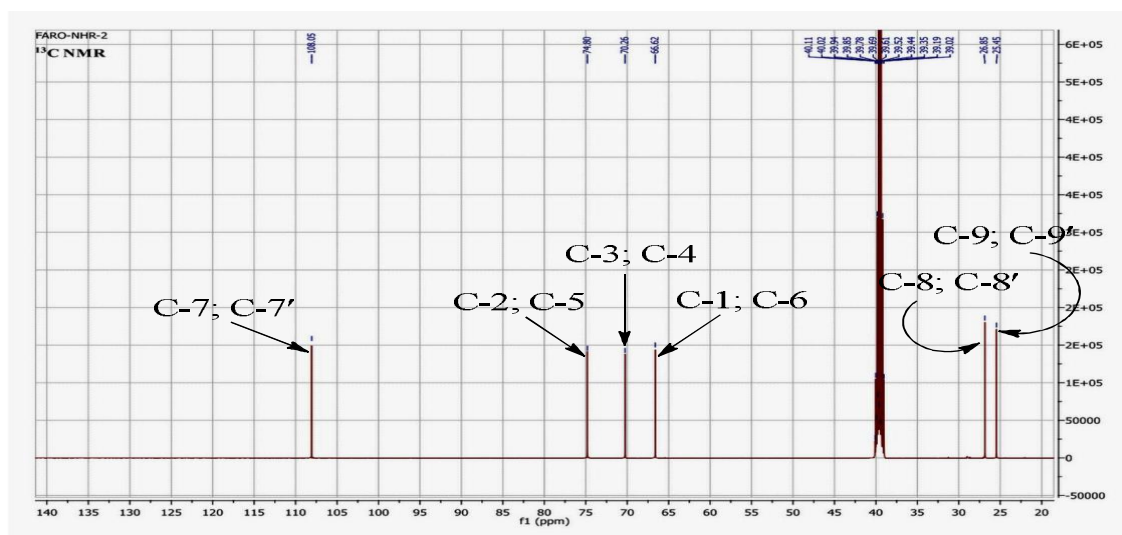
**Schéma II.18 :** Mécanisme de la réaction de synthèse de l'acétalisation

La formation du diacétal est marquée par l'apparition sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  des signaux à 1,25 et 1,29 intégrant six protons chacun et attribuables aux quatre groupements méthyles des deux cycles acétals. Sur son spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , on note également un supplément de trois signaux à  $\delta_{\text{C}}$  25,5 ; 26,8 et 108,1 attribuables aux carbones des quatre groupements méthyles (C-8, C-8', C-9 et C-9') et aux deux carbones quaternaires (C-7 et C-7') des cycles acétals.

Outre ces signaux, on peut également observer sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ , un doublet de deux protons à  $\delta_{\text{H}}$  4,70 (2H, *d*,  $J = 77,7$  Hz) attribuables aux deux groupements hydroxyles OH-3 et OH-4, deux doublets dédoublés de deux protons chacun à  $\delta_{\text{H}}$  3,86 (2H, *dd*,  $J = 8,2 ; 5,0$  Hz) et 3,96 (2H, *dd*,  $J = 8,2 ; 6,2$  Hz) attribuables respectivement aux protons H<sub>2</sub>-1 et H<sub>2</sub>-6, un triplet à  $\delta_{\text{H}}$  3,43 (2H, *t*,  $J = 8,0$  Hz, H-3 ; H-4) et un multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  4,01 (2H, *m*). On remarque donc ainsi la disparition des signaux des hydroxyles en position 1, 2, 4 et 6 apparaissant généralement sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du *D*-Mannitol. L'attribution complète des signaux des différents protons et carbones a été effectuée grâce à l'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC.

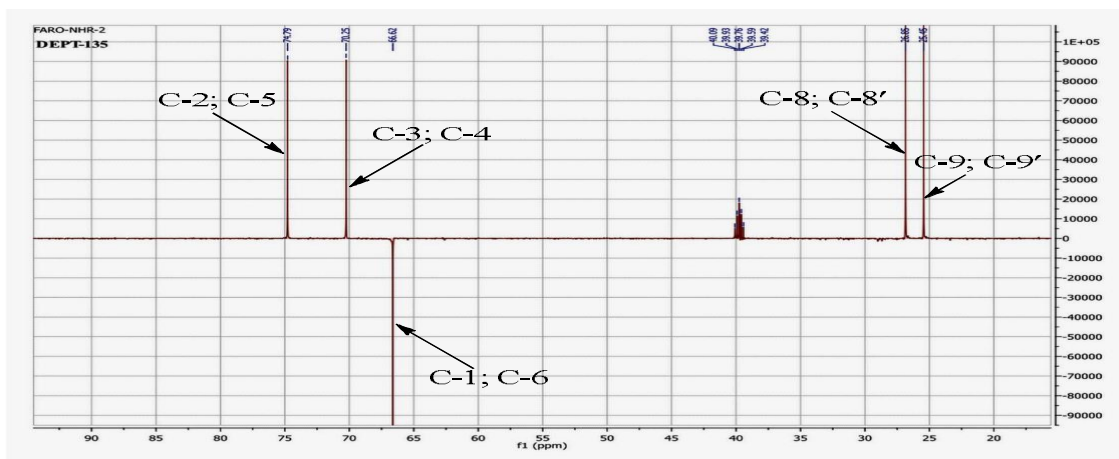


**Figure II.78 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-2

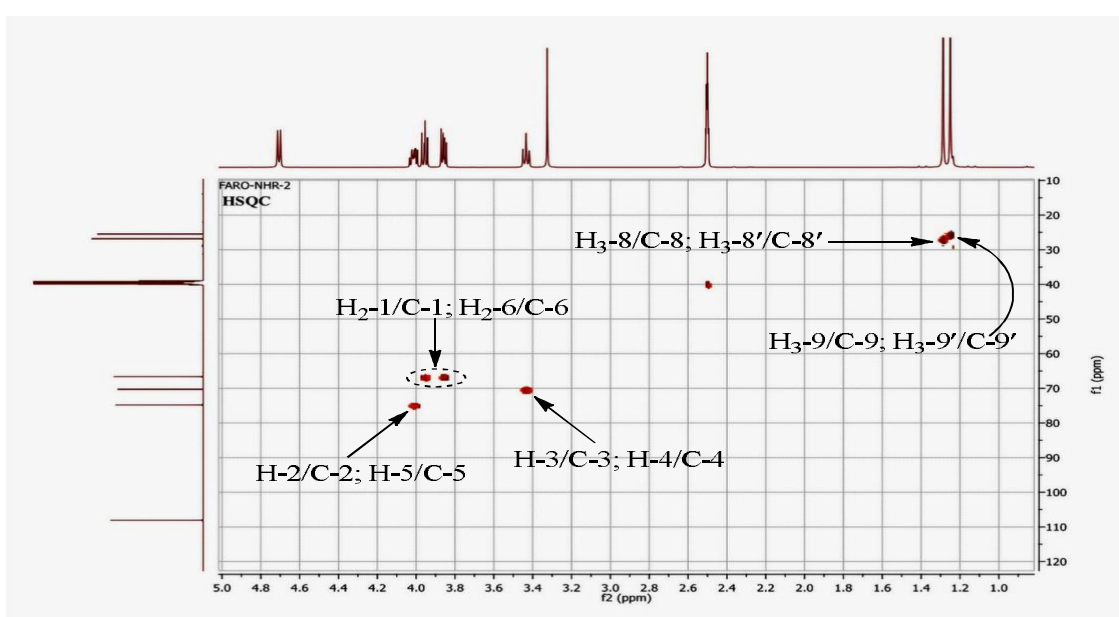


**Figure II.79 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NHR-2

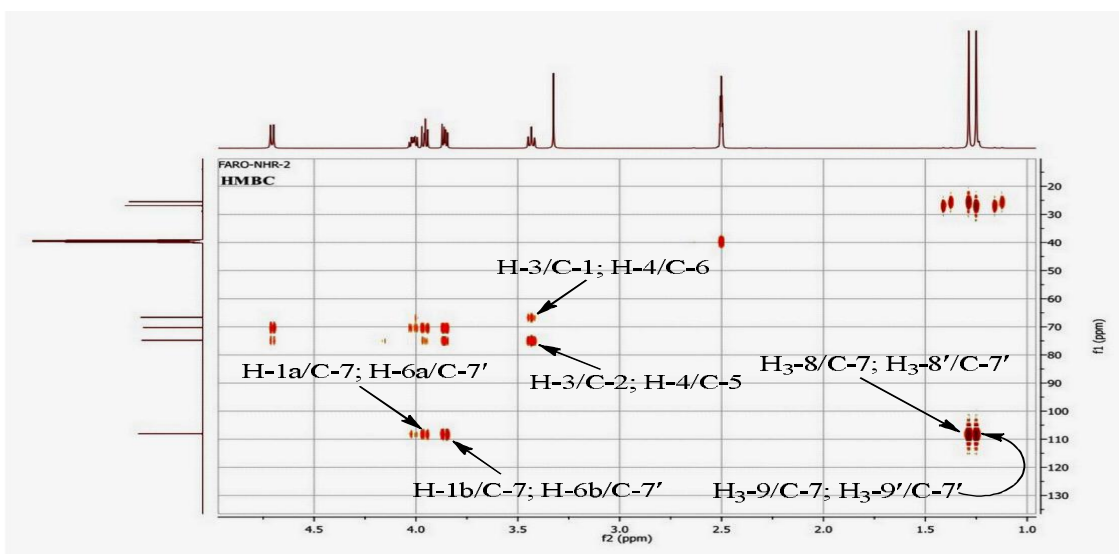




**Figure II.80 :** Spectre DEPT-135 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) de NHR-2



**Figure II.81 :** Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-2



**Figure II.82 :** Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-2

**Tableau II.26 :** Données RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) et HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) de NHR-2

| N°          | $\delta_{\text{H}}$ (Mult., $J(\text{Hz})$ )                   | $\delta_{\text{C}}$ | HMBC       |
|-------------|--|---------------------|------------|
| 1           | 3,86 ( <i>dd</i> ; 8,2 ; 5,0)<br>3,96 ( <i>dd</i> ; 8,2 ; 6,2) | 66,6                | 2 ; 3 ; 7  |
| 2           | 4,01 ( <i>m</i> )  | 74,8                | 3 ; 7      |
| 3           | 3,43 ( <i>t</i> ; 8,0)   | 70,3                | 1 ; 2      |
| 4           | 3,43 ( <i>t</i> ; 8,0)   | 70,3                | 5 ; 6      |
| 5           | 4,01 ( <i>m</i> )  | 74,8                | 4 ; 7      |
| 6           | 3,86 ( <i>dd</i> ; 8,2 ; 5,0)<br>3,96 ( <i>dd</i> ; 8,2 ; 6,2) | 66,6                | 4 ; 5 ; 7' |
| 7           | -  | 108,1               |            |
| 7'          | -  | 108,1               |            |
| 8           | 1,25 ( <i>s</i> )  | 25,4                | 7 ; 9      |
| 8'          | 1,25 ( <i>s</i> )  | 25,4                | 7' ; 9'    |
| 9           | 1,29 ( <i>s</i> )  | 26,8                | 7 ; 8      |
| 9'          | 1,29 ( <i>s</i> )  | 26,8                | 7' ; 8'    |
| OH-3 ; OH-4 | 4,71 ( <i>d</i> ; 7,7)   | -                   |            |



## II.4. Etude pharmacologique des espèces *C. populnea*, *G. aqualla* et *V. paradoxa*

Les activités pharmacologiques de certains extraits et quelques composés isolés des trois plantes mises en étude *C. populnea*, *G. aqualla* et *V. paradoxa*, ont été évaluée *in vitro* et axées sur trois tests principaux : l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne, l'inhibition de l'activité enzymatique.

### II.4.1. Mise en évidence de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits et composés isolés a été évaluée par leur capacité à inhiber le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et aussi par la quantification des polyphénols totaux des extraits grâce au réactif de Folin-Ciocalteu.

L'évaluation de l'activité antiradicalaire dans notre laboratoire se fait par la méthode spectrophotométrique au DPPH, un radical stable. Cette méthode repose sur la réduction en solution de ce radical DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, aboutissant ainsi à la formation de la forme non radicalaire DPPH-H. Cette transformation entraîne un changement de coloration de la solution qui vire alors du violet au jaune, et qui peut être visualisé spectrophotométriquement à 517 nm. La capacité de chaque échantillon à piéger le radical DPPH a été exprimé ici en terme de pourcentage d'inhibition pour les échantillons inactifs et de concentration inhibitrice pour ceux actifs. En effet, à la suite d'un criblage préliminaire à une concentration de 2 mg.mL<sup>-1</sup> pour les extraits et de 10 mM pour les composés purs, les échantillons ayant montré un pourcentage d'inhibition (PI) inférieur à 50 étaient considérés comme inactifs tandis que ceux avec un PI  $\geq$  50 étaient considérés comme actifs et leurs concentrations inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) ont par la suite été déterminées en effectuant une série de huit dilutions à partir de la solution mère (2 mg.mL<sup>-1</sup>). Rappelons que la CI<sub>50</sub> est la concentration minimale de l'échantillon à tester, nécessaire pour inhiber 50 % l'activité du radical DPPH. Plus cette valeur est grande, moins l'activité est importante et vice-versa. Les valeurs des CI<sub>50</sub> ont été déterminées graphiquement à partir des courbes logarithmiques des absorbances (prises après réaction) en fonction des concentrations des extraits, ceci à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.01.

Il serait plus judicieux de noter ici que seuls les extraits ayant montré une présence plus ou moins marquée des composés phénoliques lors du criblage phytochimique, ont été soumis à ce test anti-radicalaire au DPPH dont les résultats sont confinés dans le tableau II.27.

**Tableau II.27** : Résultats des activités antiradicalaires des extraits des plantes étudiées

| Echantillons       |                 |                   |       | DPPH   |
|--------------------|-----------------|-------------------|-------|--|
| Plantes            | Parties         | Extraits          | Codes | CI <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )±SEM/% Inhibition |
| <i>C. populnea</i> | Feuilles        | MeOH brut         | N8    | 37,24 ± 0,75 <sup>a</sup>                                |
|                    |                 | Hexane            | N8-H  | 139,00 ± 4,04 <sup>b</sup>                               |
|                    |                 | CHCl <sub>3</sub> | N8-C  | 35,98 %  |
|                    |                 | AcOEt             | N8-A  | 66,68 ± 3,06 <sup>c</sup>                                |
|                    |                 | n-BuOH            | N8-B  | 65,86 ± 2,95 <sup>c</sup>                                |
|                    |                 | Résidu            | N8-R  | 17,50 ± 1,17 <sup>d</sup>                                |
|                    | Racines         | MeOH brut         | N9    | 49,92 ± 2,71 <sup>e</sup>                                |
|                    |                 | Hexane            | N9-H  | 177,83 ± 9,53 <sup>f</sup>                               |
|                    |                 | CHCl <sub>3</sub> | N9-C  | 100,70 ± 3,37 <sup>g</sup>                               |
|                    |                 | AcOEt             | N9-A  | 43,78 ± 2,14 <sup>h</sup>                                |
|                    |                 | n-BuOH            | N9-B  | 37,08 ± 0,40 <sup>a</sup>                                |
|                    |                 | Résidu            | N9-R  | 38,81 ± 1,37 <sup>a,h</sup>                              |
|                    | Tiges           | MeOH brut         | N10   | 33,76 ± 0,57 <sup>a</sup>                                |
|                    |                 | Hexane            | N10-H | n.d.   |
|                    |                 | AcOEt             | N10-A | 21,74 ± 0,85 <sup>d,i</sup>                              |
|                    |                 | n-BuOH            | N10-B | 25,89 ± 0,77 <sup>i</sup>                                |
|                    |                 | Résidu            | N10-R | n.d.   |
|                    | Rhizomes        | MeOH brut         | N11   | <b>16,20 ± 0,62<sup>d</sup></b>                          |
| <i>G. aqualla</i>  | Graines         | AcOEt             | N4    | n.d.   |
|                    |                 | MeOH              | N5    | 13,96 %  |
|                    | Feuilles        | AcOEt             | N6    | 28,31 %  |
|                    |                 | MeOH              | N7    | 54,6 ± 3,10 <sup>e</sup>                                 |
|                    | Ecorces         | Hexane            | N1    | n.d.   |
|                    |                 | AcOEt             | N2    | 19,74 %  |
|                    |                 | MeOH              | N3    | 40,27 %  |
| Témoins positifs   | n-propylgallate |                   |       | <b>5,56 ± 0,22<sup>j</sup></b>                           |
|                    | t-BHA           |                   |       | <b>8,84 ± 0,56<sup>j</sup></b>                           |

Les valeurs affectées de lettres différentes, diffèrent significativement au seuil de probabilité  $P < 0,05$  (test de Newman-Keuls).

Il ressort de ces résultats que tous les extraits testés ont montré une capacité plus ou moins élevée à inhiber l'action du radical DPPH. L'extrait au CHCl<sub>3</sub> des feuilles de *C. populnea*, les extraits au MeOH des graines et à l'AcOEt des feuilles, à l'AcOEt et au MeOH des écorces de *G. aqualla*, étaient considérés comme inactifs avec des pourcentages d'inhibition allant de 13,96 % à 40,27 %. Pour ce qui est des extraits actifs, les CI<sub>50</sub> variaient de 16,20 ± 0,62 µg.mL<sup>-1</sup> à 177,83 ± 9,53 µg.mL<sup>-1</sup>.

L'extrait brut au MeOH des rhizomes de *C. populnea* (N11) a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée avec une CI<sub>50</sub> de 16,20 ± 0,62 µg.mL<sup>-1</sup>, suivie par la fraction résiduelle des feuilles (N8-R), puis par l'extrait à l'AcOEt des tiges (N10-A) de la même plante avec des CI<sub>50</sub> de 17,5 ± 1,17 µg.mL<sup>-1</sup> et 21,74 ± 0,85 µg.mL<sup>-1</sup> respectivement. Tous ces extraits ne présentent au-

cune différence significative dans leurs activités ( $P < 0,05$ ) qui demeurent toutefois significativement inférieures à celles enregistrées pour le *n*-propylgallate ( $CI_{50} = 5,56 \pm 0,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et pour le *t*-Butylhydroxyanisole (*t*-BHA,  $CI_{50} = 8,84 \pm 0,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) utilisés ici comme contrôles positifs. L'activité la plus faible de tous les extraits testés a été enregistré pour l'extrait à l'hexane des racines de *C. populnea* ( $CI_{50} = 177,87 \pm 9,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Parmi les extraits de *G. aqualla*, seul l'extrait au MeOH était actif avec une  $CI_{50} = 54,6 \pm 3,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Nous remarquons par ailleurs qu'il y a une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre l'activité anti-radicalaire de l'extrait le plus actif de *C. populnea* (N11, qui est également le plus actif de tous les extraits testés) et celle de l'extrait le plus actif de *G. aqualla* (N7). Parmi les composés isolés, seule la Bergénine (N9-A4) a été testé et a montré une très faible activité avec un pourcentage d'inhibition de 17,89 %, ce qui lui a valu d'être considérée comme inactive.

Suite aux résultats obtenus après les tests anti-radicalaire sur les extraits ci-dessus répertoriés, nous avons entrepris d'évaluer la quantité de polyphénols totaux contenu dans l'extrait le plus actif qui est l'extrait brut au MeOH des rhizomes de *C. populnea*. La méthode traditionnelle utilisée dans notre laboratoire est la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu basée sur la réduction du réactif phosphotungstique-phosphomolybdate en milieu légèrement basique par les ions phénolates, entraînant ainsi une coloration bleue qui présente un maximum d'absorption à 760 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec un standard étalon (Acide gallique, 15-200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et exprimée en grammes d'équivalents d'Acide gallique par 100 grammes d'extrait ( $\text{g EAG.100 mg}^{-1}$ ).

Les résultats de l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux ont montré que l'extrait brut au MeOH des rhizomes de *C. populnea* est riche en polyphénols totaux avec une teneur de  $20,69 \pm 2,13 \text{ g EAG/100 gEx}$ .

#### II.4.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée uniquement sur les composés isolés par la méthode *in vitro* de microdilution en milieu gélosé pour les champignons et celle de microdilution en bouillon pour les bactéries. Cette méthode permet de déterminer, pour chaque échantillon, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), concentration la plus faible permettant l'inhibition totale de la croissance microbienne (Andrews, 2001). Parmi les souches microbiennes utilisées, quatre étaient des souches de référence de laboratoire de type ATCC (*American Type Culture Collection*) obtenues par le biais du Laboratoire de Bactériologie et Mycologie du Centre Pasteur de Yaoundé. Il s'agit entre autres de *S. typhi* ATCC 6539, *P. aeruginosa* ATCC 9721, *C. albicans* ATCC 9002 et *C. parapsilosis* ATCC 22019. Les autres souches *E. coli* et *C. krusei* auxquelles s'ajoutent deux autres *S. typhi* et *C. albicans* étaient des isolats provenant de Ayub Teaching Hospital of Abbottabad (Pakistan) pour ce qui est de *E. coli* et *C. albicans* et du Centre Pasteur de Yaoundé pour les souches *C. Krusei* et *S. typhi*. Les composés testés sont des composés purs appartenant aux familles des alcanes, alcènes, alcools, esters aliphatiques, stéroïdes, triterpènes, composés phénoliques et sucres.

Les résultats des tests antibactériens présentés dans le tableau II.29 montrent qu'à l'exception de l'alcane Gae-2, de l'alcène Gaf-20, et des triterpènes Gaf-4 et NYR-1 qui n'ont montré aucune activité contre l'ensemble des souches bactériennes testées, tous les autres composés ont présenté en fonction des souches bactériennes, des activités plus ou moins élevées. Dans cette étude, l'évaluation de l'activité s'est faite selon la méthode proposée par Kuete (2010) qui suppose que l'activité antimicrobienne d'un composé peut être définie comme significative pour une CMI  $< 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , modérée pour  $10 < \text{CMI} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  et faible pour une CMI  $> 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dans notre cas, un composé était considéré comme étant inactif lorsque sa CMI était supérieure à  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (CMI  $> 128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

D'après ces résultats (Tableau II.28), tous les composés de la classe des alcools (Gae-2, Gaf-22 et Gae-15) ont présenté une faible activité (CMI =  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) qui s'étend sur la totalité des souches bactériennes à l'exception de *S. typhi*, isolat qui s'est montré résistant contre l'action antibactérienne de tous les trois composés de cette classe. Le Nonacosanol (Gaf-1) a présenté une faible activité contre *E. coli* et *P. aeruginosa*, l'Octatriacontanol (Gaf-22) uniquement contre *S. typhi* ATCC 6539 tandis que le Docosanol **206** (Gae-15) quant à lui a faiblement inhibé la croissance de ces trois souches.

De tous les triterpènes pentacycliques évalués, seuls l'Acide ursolique **149** (N8-C1), l'Uvaol **284** (Gaf-8) et l'Acide  $19\alpha,23\beta,24\alpha$ -trihydroxyursolique **285** (Gaf-24) ont montré des activités relatives en fonction des souches testées. Ainsi, l'Acide ursolique **149** (N8-C1) a présenté une activité modérée (CMI =  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) contre *P. aeruginosa*, et faible (CMI =  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )

contre les deux souches de *S. typhi* avec une activité bactéricide contre *S. typhi* ATCC 6539. L'activité de l'Uvaol **219** (Gaf-8) était modérée contre *S. typhi* ATCC 6539 et *P. aeruginosa* avec des CMI de 64 et 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivement, et faible (CMI = 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) contre *S. typhi* isolat. *E. coli* s'est montré résistant à ces deux composés. L'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique **220** (Gaf-24) était actif contre toutes les souches de bactéries, avec une activité bactéricide modérée (CMI = 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) contre l'isolat de *S. typhi*, modérée (CMI = 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) contre *P. aeruginosa* et faible (CMI = 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) contre *E. coli* et *S. typhi* ATCC 6539.

L'activité antibactérienne des composés phénoliques testés ici dépendait également des souches bactériennes et du type de composé. Ces composés appartenant à trois classes principales (flavonoïdes, coumarines, acides phénoliques) ont présenté des activités allant de significatives à faibles. L'activité la plus marquée c'est-à-dire significative a été enregistrée avec la Bergénine **39** (N9-A4) et la Quercétine **8** (Vr-5) contre *P. aeruginosa* avec un effet bactéricide pour chacun des deux composés. La Bergénine **39** (N9-A4) et l'Acide gallique **73** (N9-A2) sont les seuls composés phénoliques ayant présenté des activités contre chacune des souches bactériennes avec une activité modérée enregistrée contre *E. coli*, *S. typhi* ATCC 6539, et *S. typhi* isolat avec un effet bactéricide contre les deux dernières souches. Une activité bactériostatique modérée a été enregistrée pour la Quercétine **8** (Vr-5) contre *E. coli* et pour l'Acide gallique **73** (N9-A2) et la Catéchine **177** (Vr-2) contre *P. aeruginosa*. L'Apigénine **5** (NYR-5) a montré une faible activité contre *E. coli* et une activité bactéricide modérée contre *P. aeruginosa*.

La souche isolat de *S. typhi* s'est révélée résistante vis-à-vis des deux glucosides stéroïdiques, le Daucostérol **215** (N9-A3) et le Spinastérol-3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyrannoside **178** (Vr-3). Le Daucostérol **215** (N9-A3) n'a présenté qu'une faible activité (CMI = 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) contre *P. aeruginosa* et une activité bactéricide modérée (CMI = 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) contre *E. coli*. Le Spinastérol-3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyrannoside **178** (Vr-3) quant à lui était modérément actif (CMI = 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sur *S. typhi* ATCC 6539 et faiblement sur *E. coli* et *P. aeruginosa* avec un effet bactéricide sur cette dernière.

**Tableau II.28 :** Résultats des activités antibactériennes (CMI et CMB ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )) des composés

| Echantillons                | Bactéries               |     |                          |     |                          |     |                               |     |
|-----------------------------|-------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|-----|-------------------------------|-----|
|                             | <i>E. coli</i> (isolat) |     | <i>S. typhi</i> ATCC6539 |     | <i>S. typhi</i> (isolat) |     | <i>P. aeruginosa</i> ATCC9721 |     |
|                             | CMI                     | CMB | CMI                      | CMB | CMI                      | CMB | CMI                           | CMB |
| <b>Alcane</b>               |                         |     |                          |     |                          |     |                               |     |
| Gae-2                       | -                       | -   | -                        | -   | -                        | -   | -                             | -   |
| <b>Alcènes</b>              |                         |     |                          |     |                          |     |                               |     |
| Gaf-20                      | -                       | -   | -                        | -   | -                        | -   | -                             | -   |
| <b>Alcools</b>              |                         |     |                          |     |                          |     |                               |     |
| Gaf-1                       | 128                     | -   | -                        | -   | -                        | -   | 128                           | -   |
| Gaf-22                      | -                       | -   | 128                      | -   | -                        | -   | -                             | -   |
| Gae-15                      | 128                     | -   | 128                      | -   | -                        | -   | 128                           | 128 |
| <b>Triterpènes</b>          |                         |     |                          |     |                          |     |                               |     |
| N8-C1                       | -                       | -   | 128                      | 128 | 128                      | -   | 64                            | -   |
| Gaf-4                       | -                       | -   | -                        | -   | -                        | -   | -                             | -   |
| Gaf-8                       | -                       | -   | 64                       | -   | 128                      | -   | 16                            | 64  |
| Gaf-24                      | 128                     | -   | 128                      | 128 | 32                       | 64  | 32                            | -   |
| NYR-1                       | -                       | -   | -                        | -   | -                        | -   | -                             | -   |
| <b>Composés Phénoliques</b> |                         |     |                          |     |                          |     |                               |     |
| N9-A4                       | 64                      | -   | 32                       | 128 | 64                       | 128 | <b>8</b>                      | 32  |
| NYR-5                       | 128                     | 128 | -                        | -   | -                        | -   | 64                            | 128 |
| Vr-2                        | -                       | -   | 128                      | 128 | 64                       | -   | 16                            | 128 |
| Vr-5                        | 16                      | 128 | -                        | -   | -                        | -   | <b>8</b>                      | 32  |
| N9-A2                       | 64                      | -   | 64                       | 128 | 32                       | 64  | 16                            | 128 |
| <b>Glucosides</b>           |                         |     |                          |     |                          |     |                               |     |
|                             | 32                      | 32  | -                        | -   | -                        | -   | 128                           | -   |
| Vr-3                        | 128                     | -   | 64                       | -   | -                        | -   | 64                            | 128 |
| <b>Sucres</b>               |                         |     |                          |     |                          |     |                               |     |
| Gag-4                       | 64                      | 128 | 32                       | 128 | 32                       | 32  | 128                           | 128 |
| Gae-7                       | 64                      | -   | 128                      | -   | 32                       | -   | 64                            | 128 |
| <b>Autres</b>               |                         |     |                          |     |                          |     |                               |     |
| VR-4                        | -                       | -   | -                        | -   | 64                       | -   | 32                            | 128 |
| NHR-1                       | <b>8</b>                | 64  | 64                       | 128 | 32                       | 128 | <b>8</b>                      | 32  |
| NHR-2                       | -                       | -   | -                        | -   | -                        | -   | 128                           | -   |
| <b>Ciprofloxacine</b>       | 0,5                     | 0,5 | 0,5                      | 1   | 0,5                      | 0,5 | 0,5                           | 1   |

Le *D*-Mannitol **162** (Gag-4) a montré des activités bactéricides modérées contre toutes les souches bactériennes à l'exception de *P. aeruginosa*, contre laquelle son activité était faible (CMI =  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) avec toujours un effet bactéricide. Son homologue monoacétylé, le *D*-Mannitol acétate **217** (Gae-7) a vu son activité subir quelques modifications en fonction des souches bactériennes. Celle-ci a diminué vis-à-vis de *S. typhi* ATCC 6539 et s'est plutôt accrue contre *P. aeruginosa* passant de faible à modérée (CMI =  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). L'acétalisation du *D*-Mannitol **162** (Gag-4) a par ailleurs entraîné une diminution de son activité antibactérienne puisque le composé

obtenu, le 1,2:5,6-di-*O*-Isopropylidène-*D*-mannitol **222** (NHR-2) n'a présenté qu'une faible activité (CMI = 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) contre *P. aeruginosa*.

L'Heptacosanoate d'heptadécyle **211** (Gae-14) a présenté une faible activité (CMI = 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) contre toutes les souches bactériennes étudiées, avec un effet bactéricide contre *P. aeruginosa*. Le Vitellaroside **212** (Vr-4) quant à lui n'a montré aucune activité contre *E. coli* et *S. typhi* ATCC 6539 ; cependant, il était modérément actif avec des CMI de 64 et 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivement contre *S. typhi* et *P. aeruginosa* avec un effet bactéricide contre cette dernière souche.

Le dérivé nouveau coumarinoflavanol, Acide 2-[(2'aS,10'aR)-4',13',12'-trihydroxy-1',9'-diméthyl-7'-oxo-1',2'a,3',10'a-tetrahydro-3*H*-isochromeno [4,3-*b*]pyrano[2,3-*h*]chromenyl] acétique **221** (NHR-1) obtenue par hémisynthèse à partir de la Catéchine **177** (Vr-2), a montré des activités antibactériennes significatives contre *E. coli* (CMI = 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et *P. aeruginosa* (CMI = 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) avec respectivement des effets bactériostatique et bactéricide. Cependant, il s'est révélé modérément bactéricide contre toutes les souches de *S. typhi* (CMI = 64 et 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivement pour les souches ATCC6539 et celle isolée).

Il ressort des résultats des activités antifongiques présentés dans le tableau II.29 que tous les composés étaient inactifs contre toutes les souches de champignons testées, à l'exception de Gae-15, Gaf-24, Vr-3 et NHR-1. En effet, le Docosanol **206** (Gae-15) et le Spinastérol-3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyrannoside **178** (Vr-3) ont chacun montré de faibles activités (CMI = 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) contre toutes les souches de champignons utilisées. *C. krusei* a été plus sensible à l'Acide 2-[(2'aS,10'aR)-4',13',12'-trihydroxy-1',9'-diméthyl-7'-oxo-1',2'a,3',10'a-tetrahydro-3*H*-isochromeno [4,3-*b*]pyrano[2,3-*h*]chromenyl] acétique **221** (NHR-1) (CMI = 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). L'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique **220** (Gaf-24) était le plus actifs de tous les composés testés avec un effet fongicide modérée contre chacun des champignons.

**Tableau II.29 :** Activités antifongiques (CMI et CMF ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )) des composés vis-à-vis des différentes levures étudiées

| Echantillons                | Levures                        |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
|-----------------------------|--------------------------------|-----|-----------------------------|-----|-------------------------------------|-----|---------------------------|-----|
|                             | <i>C. albicans</i><br>ATCC9002 |     | <i>C. albicans</i> (isolat) |     | <i>C. parapsilosis</i><br>ATCC22019 |     | <i>C. krusei</i> (isolat) |     |
|                             | CMI                            | CMF | CMI                         | CMF | CMI                                 | CMF | CMI                       | CMF |
| <b>Alcane</b>               |                                |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
| Gae-2                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| <b>Alcènes</b>              |                                |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
| Gaf-20                      | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| <b>Alcools</b>              |                                |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
| Gaf-1                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| Gaf-22                      | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| Gae-15                      | 128                            | -   | 128                         | -   | 128                                 | -   | 128                       | -   |
| <b>Triterpènes</b>          |                                |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
| N8-C1                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| Gaf-4                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| Gaf-8                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| Gaf-24                      | 32                             | 32  | 32                          | 32  | 64                                  | 64  | 32                        | 32  |
| NYR-1                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| <b>Composés Phénoliques</b> |                                |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
| N9-A4                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| NYR-5                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| VR-2                        | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| VR-5                        | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| N9-A2                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| <b>Glucosides</b>           |                                |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
| VR-3                        | 128                            | -   | 128                         | -   | 128                                 | -   | 128                       | -   |
| <b>Sucres</b>               |                                |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
| Gag-4                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| Gae-7                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| <b>Autres</b>               |                                |     |                             |     |                                     |     |                           |     |
| VR-4                        | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| NHR-1                       | 128                            | -   | 128                         | -   | 128                                 | -   | 64                        | -   |
| NHR-2                       | -                              | -   | -                           | -   | -                                   | -   | -                         | -   |
| <b>Kétoconazole</b>         | 0,5                            | 64  | 0,25                        | 64  | 2                                   | 16  | 2                         | 64  |



### II.4.3. Mise en évidence de l'inhibition de l'activité enzymatique

Le potentiel inhibiteur d'enzymes des extraits et composés isolés a été évalué contre l' $\alpha$ -glucosidase et deux isozymes (*h*-TNAP et *h*-IAP) de la phosphatase alcaline.

Les extraits ont uniquement été évalué pour leur capacité à inhiber l'action de l' $\alpha$ -glucosidase. L'efficacité de nos différents extraits a été comparée sur la base des valeurs de leurs  $CI_{50}$  résultantes comme le montre le tableau II.30 ci-dessous.

**Tableau II.30 :** Résultats de l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase par les extraits

| Echantillons       |          |                   |   | $\alpha$ -Glucosidase                                      |
|--------------------|----------|-------------------|---|--|
| Plantes            | Parties  | Extraits          | Codes   | $CI_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) $\pm$ SEM/% Inhibition |
| <i>C. populnea</i> | Feuilles | MeOH brut         | N8  | $0,58 \pm 0,01^{a,b}$                                      |
|                    |          | Hexane            | N8-H  | $1,53 \pm 0,23^a$  |
|                    |          | CHCl <sub>3</sub> | N8-C  | $2,95 \pm 0,51^c$  |
|                    |          | AcOEt             | N8-A  | $1,55 \pm 0,35^a$  |
|                    |          | n-BuOH            | N8-B  | $1,10 \pm 0,30^{a,d}$                                      |
|                    |          | Résidu            | N8-R  | $0,94 \pm 0,04^{a,d}$                                      |
|                    | Racines  | MeOH brut         | N9  | <b><math>0,33 \pm 0,04^{b,d}</math></b>                    |
|                    |          | Hexane            | N9-H  | $2,42 \pm 0,34^c$  |
|                    |          | CHCl <sub>3</sub> | N9-C  | $1,13 \pm 0,17^{a,d}$                                      |
|                    |          | AcOEt             | N9-A  | $5,83 \pm 0,07^e$  |
| n-BuOH             |          | N9-B              | $0,36 \pm 0,05^{b,d}$   |  |
|                    | Résidu   | N9-R              | $0,57 \pm 0,05^{a,d}$   |  |
| <i>G. aqualla</i>  | Graines  | AcOEt             | N4  | n.d.   |
|                    |          | MeOH              | N5  | 35,08%   |
|                    | Feuilles | AcOEt             | N6  | $20,03 \pm 1,80^f$   |
|                    |          | MeOH              | N7  | $9,65 \pm 0,06^g$  |
| Témoin positif     | Acarbose |                   | <b><math>234,6 \pm 2,01</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b> |  |

Les valeurs affectées de lettres différentes, diffèrent significativement au seuil de probabilité  $P < 0,05$  (test de Newman-Keuls).

Les résultats confinés dans le tableau II.30 ci-dessus, montrent que tous les extraits à l'exception de l'extrait au MeOH de graines de *G. aqualla*, ont présenté une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase élevée. L'activité la plus significative a été enregistrée pour l'extrait brut au MeOH des racines de *C. populnea* (N9) avec une  $CI_{50}$  de  $0,33 \pm 0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$  tandis que l'activité la plus faible était celle de l'extrait à l'AcOEt des feuilles de *G. aqualla* (N6,  $CI_{50} = 20,03 \pm 1,80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Parmi tous les extraits de feuilles de *C. populnea*, l'extrait brut au MeOH (N8) présentait l'activité la plus élevée ( $CI_{50} = 0,58 \pm 0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) tandis que l'activité la plus faible revenait à l'extrait au CHCl<sub>3</sub> (N8-C,  $CI_{50} = 2,95 \pm 0,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). L'extrait à l'AcOEt (N9-A) avec une  $CI_{50}$  de  $5,83 \pm 0,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$  était le moins actifs de tous les extraits de racines de *C. populnea*. D'une manière générale, les extraits de *C. populnea* ont montré des activités significativement supérieures à celles des extraits de *G. aqualla*.

Un total de dix-sept composés appartenant à plusieurs classes, ont été évalué *in vitro* pour leur potentiel à inhiber l'action de l' $\alpha$ -glucosidase. A la suite d'un criblage préliminaire, 6 des 17 composés (soit 35 %) ont montré des aptitudes élevées à inhiber de façon significative l'action de l' $\alpha$ -glucosidase. Il est à noter ici que pour le criblage préliminaire, les composés purs ont été testés à une concentration de 10 mM tandis que les mélanges à une concentration de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Il ressort des résultats présentés dans le tableau II.30 que seuls les triterpènes et les composés phénoliques étaient actifs contre l' $\alpha$ -glucosidase. Tous ces composés étaient cependant significativement plus actifs que l'Acarbose utilisé ici comme témoin positif. L'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique **220** (Gaf-24) a présenté l'activité la plus élevée avec une CI<sub>50</sub> de 1,72 ± 0,1  $\mu$ M suivi par la Quercétine **8** (Vr-5, CI<sub>50</sub> = 4,30 ± 0,01  $\mu$ M) puis par l'Acide gallique **73** (N9-A2, CI<sub>50</sub> = 5,35 ± 0,18  $\mu$ M). L'activité la plus faible était celle de la Catéchine **177** (Vr-2) avec une CI<sub>50</sub> de 68,3 ± 1,25  $\mu$ M, qui était tout de même significativement supérieures à celle de l'Acarbose de l'ordre de 234,6 ± 2,01  $\mu$ M. Le 1,2:5,6-di-*O*-Isopropylidène-*D*-mannitol **222** (NHR-2), produit de l'acétalisation du *D*-Mannitol **162** est resté inactif malgré une hausse d'activité par rapport à son précurseur.

Nous avons également dans cette étude évalué le potentiel de certains composés à inhiber les isozymes de la phosphatase alcaline à l'instar de la phosphatase alcaline non spécifique des tissus humains (*h*-TNAP) et de la phosphatase alcaline intestinale (*h*-IAP), en utilisant la méthode de luminescence. En effet, la luminescence des solutions de phosphatases alcalines actives, donne la possibilité d'évaluer l'activité inhibitrice de certains composés lorsqu'ils sont exposés à ces solutions par atténuation de la luminescence de celles-ci. Des résultats obtenus (Tableau II.31), il ressort que tous les composés évalués pour leurs propriétés inhibitrices des isozymes étudiées, se sont révélés plus ou moins significativement actifs comparativement aux composés de référence utilisés pour chaque iso-enzyme. L'inhibition de la phosphatase alcaline par les composés testés était fonction de l'iso-enzyme (*h*-TNAP ou *h*-IAP) et du composé. Cependant, l'activité la plus élevée était celle de la Bergénine **39** (N9-A4) à la fois contre les deux isozymes mais avec une sélectivité pour la *h*-TNAP (CI<sub>50</sub> = 1,62 ± 0,01  $\mu$ M) par rapport à la *h*-IAP (CI<sub>50</sub> = 12,86 ± 0,03  $\mu$ M). Cette activité de la Bergénine **39** était significativement supérieure à celle du Levamisole (CI<sub>50</sub> = 20,2 ± 1,9  $\mu$ M) et de la L-phénylalanine (CI<sub>50</sub> = 80,2 ± 0,001  $\mu$ M) composés de référence, respectivement utilisés contre la *h*-TNAP et la *h*-IAP. L'activité la plus faible revenait par ailleurs à la Catéchine **177** (Vr-2) contre les deux iso-enzymes. Le Vitellaroside **212** (Vr-4) a montré une activité modérée contre les deux isozymes avec une légère préférence pour la *h*-IAP (CI<sub>50</sub> = 78,11 ± 3,70  $\mu$ M) par rapport à la *h*-TNAP (CI<sub>50</sub> = 88,84 ± 2,70  $\mu$ M).

**Tableau II.31 :** Résultats de l'inhibition de l'activité enzymatique par les composés purs

| Composés   | $\alpha$ -Glucosidase                          | Phosphatase Alcaline                          |  |
|--|--|---|--|
|  |  | <i>h</i> -TNAP                                | <i>h</i> -IAP                                  |
| CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M) $\pm$ SEM/% Inhibition |  |   |  |
| <b>Alcène</b>                                      |  |   |  |
| Gaf-20   | 12,42 %  | /   | /  |
| <b>Alcools</b>                                     |  |   |  |
| Gae-15   | 13,5 %   | /   | /  |
| Gaf-22   | 42,32 %  | /   | /  |
| <b>Triterpènes</b>                                 |  |   |  |
| N8-C1  | 11,06 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>                  | /   | /  |
| Gaf-4  | 16,75 %  | /   | /  |
| Gaf-8  | 22,80 $\pm$ 2,31 <sup>b</sup>                  | /   | /  |
| Gaf-24   | <b>1,72 <math>\pm</math> 0,03<sup>c</sup></b>  | /   | /  |
| <b>Composés phénoliques</b>                        |  |   |  |
| N9-A4  | 17,89 %  | <b>1,62 <math>\pm</math> 0,01<sup>a</sup></b> | <b>12,86 <math>\pm</math> 0,03<sup>a</sup></b> |
| Vr-2   | 68,3 $\pm$ 1,25 <sup>d</sup>                   | 312,54 $\pm$ 6,44 <sup>b</sup>                | 777,47 $\pm$ 18,55 <sup>b</sup>                |
| Vr-5   | 4,30 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>                   | 121,44 $\pm$ 3,51 <sup>c</sup>                | 47,95 $\pm$ 0,35 <sup>c</sup>                  |
| N9-A2  | 5,35 $\pm$ 0,18 <sup>e</sup>                   | 236,39 $\pm$ 4,82 <sup>d</sup>                | 81,89 $\pm$ 4,73 <sup>d</sup>                  |
| <b>Glucosides</b>                                  |  |   |  |
| N9-A3  | 28,32 %  | 48, 24 $\pm$ 1,03 <sup>e</sup>                | 75,11 $\pm$ 1,39 <sup>d</sup>                  |
| Vr-3   | 41,42 %  | 41, 24 $\pm$ 1,33 <sup>f</sup>                | 68,91 $\pm$ 2,19 <sup>d</sup>                  |
| <b>Sucres</b>                                      |  |   |  |
| Gag-4  | 28,58 %  | n.d.  | n.d.   |
| Gae-7  | 22,32 %  | n.d.  | n.d.   |
| <b>Autres</b>                                      |  |   |  |
| Vr-4   | 32,62 %  | 88,84 $\pm$ 2,70 <sup>g</sup>                 | 78,11 $\pm$ 3,70 <sup>d</sup>                  |
| NHR-2  | 44,6 %   | n.d.  | n.d.   |
| <b>Témoins positifs</b>                            |  |   |  |
| Acarbose   | <b>234,6 <math>\pm</math> 2,01<sup>f</sup></b> | /   | /  |
| Levamisole   | /  | <b>20,2 <math>\pm</math> 1,9<sup>h</sup></b>  | /  |
| L-phénylalanine                                    | /  | /   | <b>80,2 <math>\pm</math> 0,001<sup>d</sup></b> |

Les valeurs affectées de lettres différentes, diffèrent significativement au seuil de probabilité  $P < 0,05$  (test de Newman-Keuls).

#### II.4.5. Discussion

Il est important de préciser à priori que l'appréciation des activités a été faite sur la base d'une échelle relative en fonction du test effectué et du laboratoire dans lequel ce dernier a été effectué, d'où sa valeur plutôt comparative qu'absolue. Par ailleurs, rappelons qu'un résultat observé lors de l'évaluation de l'activité biologique d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la conséquence de l'activité intrinsèque des composés actifs et de leur quantité relative dans l'extrait. Ainsi, une activité avérée d'un extrait pourrait bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande quantité de constituants peu actifs. Les résultats de ce type investigations doivent donc toujours être analysés avec un esprit critique.

Presque tous les extraits étudiés (76,19 %) ont réagi positivement au test anti-radicalaire au DPPH. Ceci pourrait s'expliquer par la présence dans la plupart de ces extraits de nombreux composés phénoliques dont l'activité anti-radicalaire a largement été documentée, mais également des tanins et des triterpènes phénoliques (Rahman *and* Moon, 2007 ; Talla *et al.*, 2016). Les profils des activités anti-radicalaires obtenus (Tableau II.27) révèlent que la plante *C. populnea* comparée à *G. aqualla* est de loin la plus active. A la limite de nos connaissances, c'est la première fois que les extraits des écorces et graines de *G. aqualla*, et les extraits de feuilles et rhizomes de *C. populnea* sont investigués pour leur potentiel anti-radicalaire. Cependant, les résultats de l'activité anti-radicalaire des tiges et racines de *C. populnea* ainsi que des feuilles de *G. aqualla* sont en accord avec ceux obtenus par Akomolafe *et al.*, (2013) pour le premier et par Simo *et al.*, (2014) pour les deux derniers, dans la mesure où ils ont tous révélés le potentiel anti-radicalaire des tiges et racines de *C. populnea* ainsi que des feuilles de *G. aqualla*. En effet, l'équipe d'Akomolafe avait démontré l'activité anti-radicalaire des tiges de *C. populnea* en évaluant la capacité de son extrait aqueux à inhiber le radical DPPH, tandis que celle de Simo avait pu mettre en évidence le potentiel anti-radicalaire plus élevé de l'extrait brut au MeOH des racines de *C. populnea* par rapport à celui des feuilles de *G. aqualla*. Il a été établi que l'efficacité d'un composé en tant qu'anti-radicalaire serait principalement due à la présence de certains sites potentiels au sein de sa structure. Ces éléments structuraux établis par plusieurs auteurs (Van Acker *et al.*, 1996 ; Aliaga *and* Lissi, 2004) sont : la présence, le nombre et la position des groupement hydroxyles, la présence d'un système conjugué, ainsi qu'une planéité de la molécule. En effet, l'efficacité d'un anti-radicalaire dépend de la stabilité du radical qui se forme après la réduction du DPPH. Cette stabilité résulte en outre de la formation d'une ou de plusieurs liaisons hydrogènes, mais aussi et surtout des effets de conjugaison et de résonance qui permettent la délocalisation de l'électron non apparié. Une délocalisation importante de cet électron non apparié a d'ailleurs été corrélée avec une bonne activité anti-radicalaire (Leopoldini *et al.*, 2004). Ceci pourrait expliquer l'activité anti-radicalaire observée pour certains composés de type chlorophylle, sphingolipides et autres acides gras insaturés..., et par ricochet permettrait de comprendre l'activité observée (aussi faible qu'elle soit) pour certains extraits dont le criblage phytochimique n'a révélé aucune trace de composés phénoliques. Bien qu'étant une isocoumarine et donc un composé phénolique, la Bergénine **39** s'est révélée inactive vis-à-vis du radical DPPH. Ce résultat corrobore avec ceux obtenus par les équipes de Uddin (2014) et Khan (2016). Cette inactivité ne pourrait cependant pas s'expliquer par la thèse du nombre de groupement -OH phénoliques, puisque le *t*-BHA utilisé ici comme second témoin positif a montré une activité anti-radicalaire très élevée. Du point de vue structurale, la Bergénine **39** possède deux -OH phénoliques non adjacents puisque séparés l'un de l'autre par un groupement -OCH<sub>3</sub> plus lipophile. Il a par ailleurs été démontré que plus un composé phénolique possède des

–OH adjacents, plus ce dernier sera anti-radicalaire. Ainsi donc, l'inactivité de la Bergénine **39** face au radical DPPH pourrait non seulement être attribué à la non proximité de ses –OH phénoliques mais également au fait que l'un de ses –OH phénoliques se situe entre le groupement méthoxyle et celui glucoside. En effet, le glucoside étant un gros groupement pourrait causer une gêne stérique à l'approche du radical DPPH qui est aussi volumineux de par sa structure. En plus donc des facteurs ci-dessus énumérés, l'activité anti-radicalaire d'un composé pourrait également dépendre de l'encombrement stérique autour de ses –OH.

Les résultats des tests antimicrobiens révèlent des réponses variables en fonction des souches et du type de composés testés. Néanmoins, l'activité la plus élevée a été enregistrée pour la Quercétine **8** (Vr-5) et la Bergénine **39** (N9-A4) contre *P. aeruginosa*. Cette souche était d'ailleurs la plus sensible (sensible à 75 % des composés testés) tandis que la souche isolat de *S. typhi* était la plus résistante (sensible à 50 % des composés testés). Les résultats obtenus pour les composés de la classe des alcanes et alcènes ne sont pas surprenants puisqu'aucune activité antimicrobienne n'a déjà été répertorié pour ce type de composés. Au vu des résultats obtenus pour les composés de la même famille, il serait illogique de faire une prédiction claire concernant la relation structure-activité des différents métabolites secondaires vis-à-vis des microorganismes. A titre d'exemple, certains auteurs ont reporté que les composés phénoliques ayant moins de groupements –OH sont plus actifs sur les microorganismes (Chabot et al., 1992) ; d'autres par contre ont trouvé que l'activité antimicrobienne des composés phénoliques augmente avec le nombre de groupement –OH (Scalbert, 1991 ; Sato et al., 1996). Il est donc facilement remarquable qu'il n'y ait aucune prédictibilité précise concernant le degré d'hydroxylation et la toxicité des composés phénoliques envers les microorganismes. Par ailleurs, les différences de susceptibilité constatées pour un même composé avec des souches microbiennes différentes, seraient dues à certains facteurs intrinsèques spécifiques à chaque bactérie et levure. En effet, d'après Takeo et al. (2004), les mécanismes d'action des principes actifs peuvent varier d'une espèce à l'autre ou même d'une souche à l'autre, ce qui expliquerait les différences observées au niveau de la sensibilité au sein des espèces de *Candida*, des souches de *Salmonella* et des autres espèces de bactéries vis-à-vis des différents composés. Les résultats montrent d'un point de vue général une sensibilité notable des bactéries à Gram-négatif par rapport aux levures. Ceci concorde avec les rapports de la littérature qui stipulent que, les levures sont connues pour être généralement plus résistantes à l'action des métabolites secondaires que les bactéries. Ce phénomène serait en particulier dû aux différences de composition et de perméabilité des parois cellulaires. En effet, la paroi des bactéries à Gram-négatif est constituée en plus de la membrane plasmique, d'une membrane externe constituée de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et des phospholipides qui la rendent imperméable à la plupart des molécules. La

surface des lipopolysaccharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et les porines (lipoprotéines) bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire (Kosanić et *al.*, 2012 ; Manojlović et *al.*, 2012). Cette enveloppe externe complexe définit un espace périplasmique rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'elles puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques) (Labioud, 2016). Par ailleurs, des facteurs tels que l'acidité peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane et ainsi favoriser l'inhibition de la croissance des bactéries Gram-négatif (Georgantelis et *al.*, 2007). La paroi des champignons et des levures présente une perméabilité encore plus sélective, puisque formée majoritairement de glycoprotéines et de polysaccharides tels que la Chitine, les glucanes et les mannanes (Bowman and Free, 2006). Contrairement aux bactéries Gram-négatif, les levures sont acido-résistantes (Kuetze et *al.*, 2004). Plusieurs paramètres peuvent être à l'origine de la présence ou de l'absence de l'activité antimicrobienne. Parmi ceux-ci, on a : la méthode utilisée pour l'évaluation de cette activité, la concentration du composé à tester, son degré de pureté, et sa toxicité à elle-même. Au cours de nos travaux, nous avons utilisé la méthode de microdilution en milieu liquide qui a pour avantage la détermination précise de la CMI, et permet de s'affranchir des problèmes de diffusion souvent causés par l'hétérogénéité du milieu. L'action d'un métabolite secondaire sur la cellule microbienne se déroule généralement en trois phases (Daferera et *al.*, 2003) : d'abord l'attaque de la paroi cellulaire, conduisant à une augmentation de sa perméabilité suivi de la perte de certains constituants cellulaires ; Puis, l'acidification de l'extérieure de la cellule, entraînant le blocage de la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de la structure ; Enfin, la destruction pure et simple du matériel génétique conduisant à la mort du microbe. On comprend donc mieux l'effet de la majorité des composés sur les bactéries par rapport aux levures. Nos résultats apportent de nouvelles informations et des informations complémentaires à celles de la littérature en ce qui concerne les activités antimicrobiennes des composés connus. Cependant, il ne serait pas judicieux de les comparer avec ceux présentés dans la littérature puisque les techniques utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne de ces composés ainsi que leurs concentrations et les souches microbiennes testées sont variées.

La plupart des études qui recherchent des extraits naturels susceptibles de contribuer au traitement du DT2 se sont concentrées sur l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase, car cette enzyme joue un rôle dans la libération de glucose à partir du maltose et/ou du saccharose. Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase ont ainsi été isolés à partir des ressources naturelles (microorganismes et plantes médicinales). Chez les plantes, ce sont généralement des alcaloïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les composés phénoliques, les saponines, et même les stéroïdes qui sont responsables de cet effet (Yin et *al.*, 2014). Le test d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase s'est révélé positif pour 14 des



15 extraits évalués (93,33 %). Tous les extraits de feuilles et racines de *C. populnea* ont montré une activité élevée, ceci laisserait penser que certains constituants apolaires et/ou de polarité moyenne de cette plante possède une capacité à bloquer l'action de l' $\alpha$ -glucosidase. L'extrait aqueux des écorces de la tige de *C. populnea* avait cependant déjà montré des propriétés hypoglycémiantes (Geidam et al., 2004), traduisant ainsi de probables propriétés antidiabétiques que posséderait la plante. Toutefois, les extraits de cette plante n'avaient jamais été évalués pour leur potentiel inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase. Cette capacité de *C. populnea* à inhiber l' $\alpha$ -glucosidase pourrait être attribuée à la présence dans la plante des composés phénoliques tels que le Resvératrol **49**, l'Apigénine **5**, ...etc. et des triterpènes à l'instar de l'Acide ursolique **110**, isolés des feuilles, racines et tiges de la plante au cours de cette étude et dont le potentiel inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase a déjà été démontré (Yin et al., 2014 ; Zeng et al., 2016 ; Zhang et al., 2017). Seuls les extraits de feuilles de *G. aqualla* se sont révélés actifs vis-à-vis de l' $\alpha$ -glucosidase ; ceci pourrait être attribué à la présence dans ces extraits des triterpènes polyoxygénés à l'instar de l'Uvaol **219**, de l'Acide ursolique **110** et de l'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique **220** isolés ici et qui ont pour certains (**219** et **110**) déjà démontré leur potentiel inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase (Morocho et al., 2018). Cependant, il est à noter que l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase du même composé peut être différente dans différents rapports, en raison du fait que l'inhibition de l'enzyme dépend des concentrations du substrat et de l'enzyme, de la concentration et du pH de la solution tampon, ainsi que de la durée de l'incubation avec l'enzyme. A la limite de nos connaissances, c'est la première fois que les extraits de *G. aqualla* sont évalués pour leurs potentiels inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase.

Parmi tous les composés dont l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase a été évaluée, seuls ceux appartenant aux classes des triterpènes et des composés phénoliques étaient actifs. On a cependant noté l'inactivité de la Lupénone **37** (Gaf-4) et de la Bergénine **39** (N9-A4). L'inactivité de la Bergénine **39** n'est pas surprenante puisqu'elle avait déjà été signalée par Kashima et al. (2013). Les résultats obtenus ici montrent d'avantage que pour un composé donné, la structure, la position et le nombre de groupements –OH et/ou –COOH sont des facteurs déterminant pour une bonne activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase. Ceci est en accord avec les travaux de Proença et al. (2017) qui ont clairement démontré que la position *ortho* des groupements –OH des flavonoïdes favoriserait l'interaction avec l' $\alpha$ -glucosidase et pourrait de ce fait être responsable de l'effet inhibiteur plus élevé, tandis que la position *meta* de ces groupements –OH diminuerait la densité des nuages électroniques résultant ainsi à une activité inhibitrice inférieure. En outre, la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, ainsi que la présence d'un –OH supplémentaire en position 3 des flavonoïdes conduirait à une augmentation de cette activité (Proença et al., 2017). La thèse de la position *ortho* des groupements –OH pourrait être généralisé à tous les composés phénoliques et

permettrait ainsi de mieux appréhender les activités observées pour les différents composés phénoliques évalués dans cette étude. De même pour les triterpènes, il a été établi que le nombre et la position des groupements –OH et aussi –COOH sur le noyau triterpénique seraient cruciaux pour une bonne activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase (Uddin et *al.*, 2012). En effet, cette importance des groupements –OH dans l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase serait due à la liaison hydrogène et aux interactions électrostatiques que ceux-ci établissent avec le site actif de l'enzyme (Uddin et *al.*, 2012). Notre étude démontre que le potentiel de *C. populnea* en tant qu'agent antidiabétique naturel pourrait être attribué à la coexistence de deux types de composés actifs, dont les uns présenteraient une activité anti-radicalaire et les autres, un effet inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase. La combinaison de ces activités antioxydantes et inhibitrices de l' $\alpha$ -glucosidase de *C. populnea* rend cette plante particulièrement prometteuse dans le traitement du diabète de type II.

Les phosphatases alcalines (PAs) sont des enzymes qui servent de marqueurs biologiques en fournissant de nombreux renseignements pour le dépistage et le suivi de plusieurs maladies telles que le diabète et les cancers à l'instar du cancer de la prostate, du cancer du foie, des os... En raison des niveaux élevés de phosphatase alcaline observés chez certains patients atteints de diabète, la découverte de composés aux potentiels non seulement antidiabétique mais qui suppriment également les niveaux élevés de PAs, pourrait être une idée révolutionnaire en diabétologie. En effet, les niveaux élevés de PAs pourraient être à l'origine des complications hépatiques, cardiovasculaires, rénales et osseuses (Sharma et *al.*, 2014). L'inhibition de la phosphatase alcaline est une nouvelle approche dans la prévention des complications du diabète. Aussi, la recherche d'inhibiteurs de la phosphatase alcaline à partir des plantes médicinales est un nouvel axe de recherche. La plupart des composés évalués ici l'ont été pour la première fois, à l'exception de la Quercétine **8** (Vr-5) qui a déjà été évalué pour son potentiel inhibiteur de la *c*-IAP et de la TNAP (Hashmi et *al.*, 2015). Aucune étude de structure-activité n'a déjà été faite entre les différents isozymes de la phosphatase alcaline et ses inhibiteurs d'origine naturelle. Néanmoins, tout comme dans le cas de l' $\alpha$ -glucosidase, l'activité inhibitrice d'un composé vis-à-vis de chaque iso-enzyme de la phosphatase alcaline pourrait être due non seulement à la présence et la position des groupements hydroxyles et carboxyles au sein de sa structure, mais également au type de squelette carboné de ce composé.



## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Le diabète par sa charge de morbidité et de mortalité constitue un problème mondial de santé publique et un lourd fardeau économique et social. Son ampleur est d'ailleurs reflétée par les chiffres alarmants de l'OMS avec 425 millions de personnes atteintes et 4 millions de décès en 2017. C'est dans le cadre de la lutte contre ce fléau et ses complications que le présent travail qui porte sur l'étude phytochimique et pharmacologique de *Cissus populnea* (Vitaceae), *Gardenia aqualla* (Rubiaceae) et *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae), a été entrepris avec pour principal objectif de trouver des candidats médicaments qui permettraient une prise en charge optimale du diabète. Le choix de ces espèces a principalement été fondé sur leurs utilisations en médecine traditionnelle pour traiter le diabète ainsi que certaines maladies infectieuses.

Différents procédés relatifs à la chimie des substances naturelles entre autres l'extraction par macération et au reflux, le criblage phytochimique, le fractionnement et la purification par des méthodes chromatographiques, ainsi que la caractérisation des composés isolés à l'aide des techniques spectroscopiques (RMN et SM), ont largement été utilisés pour cerner le contenu moléculaire de façon non exhaustive, des différents extraits de ces trois espèces de plantes. Au terme de l'étude phytochimique, 29 composés ont été isolés à partir des extraits des espèces de plantes mises en étude et caractérisés au moyen des méthodes modernes de RMN et de la spectrométrie de masse. Parmi ces composés, on dénombre 3 dérivés nouveaux, un cérébroside, un ester d'acide gras et un alcène aliphatique. Les autres composés tous connus, sont : des acétogénines (06), des composés phénoliques (04 flavonoïdes, 01 stilbène, 02 acides phénoliques, 01 isocoumarine), des terpénoïdes (10 triterpènes pentacycliques dont 01 de type lupane, 05 de type ursane et 04 de type oléanane), des stéroïdes (01 stérol), des glucosides (03 glucosides stéroïdiques), et b des cérébrosides (01). Tous les métabolites secondaires isolés des différentes parties de ces espèces de plantes sont résumés dans le tableau II.32. Cette variété structurale de la composition chimique des plantes étudiées, témoigne de leur richesse en métabolites secondaires issus de diverses voies de biogénèse.

Il est intéressant de mentionner que les composés tels que le 18-Isooléan-12-ène-3,11-dione **218**, et le Méthyl-15a- $\alpha$ -hydroxyphéophorbide A **213** sont isolés pour la première fois dans le genre *Cissus*, il en est de même pour l'Uvaol **219** et l'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique **220** dans le genre *Gardenia*.

Des transformations chimiques ont été effectuées sur le *D*-Mannitol **162** et sur la Catéchine **177**. Nous avons ainsi réalisé l'acétalisation du *D*-Mannitol **162** conduisant au 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-*D*-Mannitol **222** et la synthèse d'une coumarinoflavanol, l'Acide 2-[(2'aS,10'aR)-4',13',12'-trihydroxy-1',9'-diméthyl-7'-oxo-1',2'a,3',10'a-tetrahydro-3*H*-isochromeno[4,3-*b*]pyrano[2,3-*h*]chromenyl] acétique **221**, à travers la réaction de Pechmann.

**Tableau II.32 :** Récapitulatif de tous les métabolites isolés des plantes étudiées

| NOM DE LA MOLECULE IDENTIFIEE  | SOURCE             |    |    |    |                   |    |    |                    |
|--|--------------------|----|----|----|-------------------|----|----|--------------------|
|  | <i>C. populnea</i> |    |    |    | <i>G. aqualla</i> |    |    | <i>V. paradoxa</i> |
|  | Ra                 | Rh | Ti | Fe | Ec                | Fe | Gr | Bois de Ra         |
| <b>ACÉTOGÉNINES (07)</b>   |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| Nonacosane <u>204</u>  |                    |    |    |    | X                 |    |    |                    |
| <i>Pentapentacontène</i> <u>205</u>  |                    |    |    |    |                   | X  |    |                    |
| Docosanol <u>206</u>   |                    |    |    |    | X                 |    |    |                    |
| Heptatriacontanol <u>209</u>   |                    |    |    |    | X                 |    |    |                    |
| Nonacosanol <u>207</u>   |                    |    |    |    |                   | X  |    |                    |
| Octatriacontanol <u>210</u>  |                    |    |    |    |                   | X  |    |                    |
| Tétratriacontanol <u>208</u>   |                    |    |    |    |                   | X  |    |                    |
| <b>CHLOROPHYLLES (01)</b>  |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| 15a- $\alpha$ -hydroxyphéophorbide A méthyle ester <u>213</u>                    |                    |    |    | X  |                   |    |    |                    |
| <b>COMPOSES PHENOLIQUES (08)</b>   |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| Acide gallique <u>73</u> (acide phénolique)                                      | X                  |    |    |    |                   |    |    | X                  |
| Acide vanillique <u>214</u> (acide phénolique)                                   |                    |    |    |    |                   |    | X  |                    |
| Apigénine <u>5</u> (flavonoïde)  |                    |    | X  |    |                   |    |    |                    |
| Bergénine <u>39</u> (isocoumarine)   | X                  | X  |    |    |                   |    |    |                    |
| Catéchine <u>177</u> (flavonoïde)  |                    |    |    |    |                   |    |    | X                  |
| Quercétine <u>8</u> (flavonoïde)   |                    |    |    |    |                   |    |    | X                  |
| <i>trans</i> -Resvératrol <u>49</u> (stilbène)                                   | X                  |    |    |    |                   |    |    |                    |
| Vanilline <u>154</u> (aldéhyde phénolique)                                       |                    |    |    |    |                   |    | X  |                    |
| <b>CEREBROSIDES (01)</b>   |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| <i>Vitellaroside</i> <u>212</u>  |                    |    |    |    |                   |    |    | X                  |
| <b>ESTERS D'ACIDE GRAS (01)</b>  |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| <i>Heptacosanoate de heptadécyle</i> <u>211</u>                                  |                    |    |    |    | X                 |    |    |                    |
| <b>GLUCOSIDES STEROÏDIQUES (02)</b>  |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| Daucostérol <u>215</u>   | X                  |    |    | X  |                   |    | X  |                    |
| 3 $\beta$ - <i>O</i> - <i>D</i> -Glucopyranosyl- $\beta$ -spinastérol <u>178</u> |                    |    |    |    |                   |    |    | X                  |
| <b>STEROÏDES (01)</b>  |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| $\beta$ -Sitostérol <u>216</u>   | X                  | X  | X  | X  | X                 | X  |    | X                  |
| <b>SUCRES (02)</b>   |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| <i>D</i> -Mannitol <u>162</u>  |                    |    |    |    | X                 |    | X  |                    |
| <i>D</i> -Mannitol acétate <u>217</u>  |                    |    |    |    | X                 |    |    |                    |
| <b>TRITERPENES PENTACYCLIQUES (06)</b>   |                    |    |    |    |                   |    |    |                    |
| 18-Isoooléan-12-ène-3,11-dione <u>218</u>  |                    |    | X  |    |                   |    |    |                    |
| Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique <u>220</u>       |                    |    |    |    |                   | X  |    |                    |
| Acide oléanolique <u>97</u>  |                    |    | X  |    |                   |    | X  |                    |
| Acide ursolique <u>110</u>   |                    |    | X  | X  |                   | X  |    |                    |
| Lupénone <u>37</u>   |                    |    |    |    |                   | X  |    |                    |
| Uvaol <u>219</u>   |                    |    |    |    |                   | X  |    |                    |

En gras et italique : produits nouveaux. Ra : racines ; Rh : rhizomes ; Ti : tiges ; Fe : feuilles ; Ec : écorces ; Gr : graines.

L'activité antioxydante des différents échantillons des espèces *C. populnea* et *G. aqualla* a été évaluée par la méthode de réduction du radical libre DPPH. Les résultats ont montré que l'extrait brut au MeOH des rhizomes de *C. populnea* présentait l'activité antiradicalaire la plus élevée.

Quantitativement, l'évaluation du contenu en polyphénols totaux de cet extrait a révélé la présence d'une quantité moyennement importante en polyphénols.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne indiquent que la plupart des composés a montré des activités antibactériennes remarquables, allant de faibles à significatives selon la souche de bactéries et le type de composés. Toutefois, l'activité la plus significative a été observée pour la Quercétine **8** et la Bergénine **39** contre *P. aeruginosa*. Pour ce qui est de l'activité antifongique, l'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique **220** était le plus actif de tous les composés testés avec un effet fongicide modérée contre chacune des souches de champignons utilisées. Parmi tous les autres composés testés, seuls le Docosanol **206**, et le 3 $\beta$ -O-D-Glucopyranosyl- $\beta$ -spinastérol **178**, présentaient de faibles activités en fonction des souches de champignons.

Les tests de détection des activités inhibitrices de l' $\alpha$ -glucosidase ont été effectués sur les extraits de *C. populnea* et de *G. aqualla*, ainsi que sur certains des produits isolés des trois plantes étudiées. D'une manière globale, les extraits de *C. populnea* ont montré des activités significativement supérieures à celles des extraits de *G. aqualla*, l'extrait brut au MeOH des racines de *C. populnea* s'avérant être le plus actif avec une CI<sub>50</sub> de 0,33  $\pm$  0,04  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Parmi les composés isolés et testés pour cette activité, l'Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique **220** avait l'activité la plus élevée (CI<sub>50</sub> de 1,72  $\pm$  0,1  $\mu$ M), significativement (p < 0,05) supérieure à celle de l'Acarbose (234,6  $\pm$  2,01  $\mu$ M), composé de référence.

La mise en évidence d'inhibiteurs de la phosphatase alcaline, a montré que tous les composés évalués ce sont révélés plus ou moins significativement actifs comparativement aux composés de référence utilisés, en fonction de l'isoenzyme. L'inhibition de la phosphatase alcaline par les composés testés variait selon l'isoenzyme (*h*-TNAP ou *h*-IAP) et selon les composés. Néanmoins, l'activité la plus élevée a été enregistrée pour la Bergénine **39** à la fois contre les deux isozymes mais avec une sélectivité pour la *h*-TNAP (CI<sub>50</sub> = 1,62  $\pm$  0,01  $\mu$ M) par rapport à la *h*-IAP (CI<sub>50</sub> = 12,86  $\pm$  0,03  $\mu$ M).

Il apparaît au vu de ce travail, que la plupart des activités des molécules évaluées ici semblent être influencées par la présence des fonctions carboxyles et hydroxyles. Le type et la position des hydroxyles sont donc déterminants dans l'observation ou non des effets escomptés, tout comme le nombre de groupement carboxyles.

L'isolement dans ces trois plantes, des composés à l'instar des Acides ursolique **110** et oléanolique **97**, du *trans*-Resvératrol **49**, ...etc., aux propriétés déjà connues allant de anti-inflammatoires, à antivirales en passant par celles antiplasmodiales, antimicrobiennes et anti-tumorales, pourrait justifier l'emploi de ces plantes en médecine traditionnelle dans le traitement de certaines affections telles que le cancer, le paludisme, les maladies microbiennes...etc.

Notre étude sur *C. populnea*, *G. aqualla* et *V. paradoxa*, a en particulier nettement contribué à la connaissance et à l'enrichissement des données bibliographiques sur la composition phytochimique de ces trois espèces de plantes, et a en général permis de valoriser la flore camerounaise. Elle a en outre démontré l'intérêt de ces plantes comme source de nouveaux produits naturels aux activités biologiques et pharmacologiques prometteuses, certaines de ces activités ayant permis de faire un rapprochement avec l'utilisation traditionnelle de ces plantes. Cette étude est cependant loin d'être complète, certains points qui ont émergés au cours de ce travail doivent être améliorés à l'avenir. Les principales orientations sont les suivantes :

- A la lumière des résultats obtenus, nous pensons que d'autres analogues triterpéniques polyoxygénés, et ou polyphénoliques dont certains potentiellement inédits, restent à isoler. Ainsi, il serait sans doute judicieux de poursuivre les fractionnements afin d'isoler, de purifier et d'identifier d'autres métabolites secondaires contenus dans les fractions restantes ;

- Poursuivre les modifications structurales sur l'intermédiaire de synthèse 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-*D*-Mannitol 222, et sur d'autres composés en quantité suffisante, dans l'optique de potentialiser leurs activités biologiques.

- Les mécanismes d'actions des composés contre diverses bactéries et champignons étant complexes et parfois spécifiques (Takeo et *al.*, 2004), il serait intéressant de déterminer le mode d'action des composés les plus actifs pour pouvoir déterminer les sites sur lesquels agissent ces molécules, d'autant plus qu'elles sont connues pour diverses autres activités ;

- La détermination du type d'inhibition mis en jeu : compétitif, incompétitif, non compétitif ou mixte, pour chacun des composés ayant présenté l'activité la plus élevée sur l'une ou l'autre des enzymes étudiées ( $\alpha$ -glucosidase ou phosphatase alcaline) devrait être envisagé. Il en est de même pour des études de modélisation moléculaire et celles de la relation structure-activité. Par la suite, il serait également intéressant de faire des essais cellulaires puisque le passage membranaire constitue une étape indispensable pour un bon inhibiteur.

- L' $\alpha$ -glucosidase est une enzyme impliquée dans certains troubles métaboliques aboutissant au DT2 qui prend de plus en plus de l'ampleur dans notre société. C'est pourquoi cette voie devrait être plus explorée au vu des résultats obtenus. Il faudrait aussi élargir l'étude du spectre des activités biologiques de ces trois plantes (contre d'autres bactéries et champignons, contre les insectes, aux activités cytotoxiques, anti-inflammatoires, antivirales, anti-nociceptives, antiplasmodiales, ...etc.).

- Faire des essais de mise sur pieds des MTAs antidiabétiques à partir des extraits les plus actifs de chacune des différentes plantes étudiées.

## **CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES**

Notre travail expérimental concernait principalement l'étude phytochimique de trois espèces de plantes à savoir *Cissus populnea* (Vitaceae), *Gardenia aqualla* (Rubiaceae) et *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae). Il avait pour but de contribuer à la lutte contre le diabète et certaines de ses complications, à travers l'isolement et la caractérisation des molécules bioactives présentes dans les plantes étudiées. Pour ce faire nous avons procédé à la récolte, l'extraction, au fractionnement et à la purification des différents phytoconstituants en utilisant diverses techniques chromatographiques (CC, CCM). Les métabolites secondaires isolés ont par la suite été analysés et caractérisés principalement par des techniques de spectrométrie de masse (SM) et de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) monodimensionnelle et bidimensionnelle. Ces données ont été dans certains cas, complétées par la prise des points de fusion. Le travail s'est terminé par l'évaluation des propriétés biologiques de quelques extraits et composés isolés.

### **III.1. Matériel végétal**

#### **III.1.1. Récolte, séchage et broyage**

Les trois plantes médicinales *C. populnea*, *G. aqualla*, et *V. paradoxa* qui ont fait l'objet de cette étude ont été récoltées en Septembre 2014 dans l'arrondissement de Ngaoundéré 3<sup>e</sup> (Département de la Vina, Région de l'Adamaoua). Elles ont été identifiées botaniquement par M. Victor Nana, Botaniste à l'Herbier National de Yaoundé, Cameroun (HNC).

Les parties étudiées de *C. populnea* ont été récoltées dans l'enceinte du campus universitaire de Ngaoundéré sis à Dang. Un échantillon de référence se trouve à l'Herbier National de Yaoundé, Cameroun (HNC) au N° 36962/HNC.

Les parties de *G. aqualla* ont été récoltées dans la localité de Borongo située à environ 2 Km de Dang sur la route Ngaoundéré-Garoua. Un échantillon est enregistré à l'HNC de Yaoundé au N° 36894/HNC.

Les parties de *V. paradoxa* ont été récoltées dans la localité de Dang. Un échantillon de la plante est également enregistré à l'HNC de Yaoundé au N° 50216/HNC.

Le matériel végétal a été découpé, séché à l'air libre pendant 3 à 4 semaines. Les plantes ont ensuite été broyées finement pour être soumises à des extractions.

#### **III.1.2. Extraction et isolement**

Au sein de notre Laboratoire des Substances Naturelles et Valorisation N°3 de l'Université de Yaoundé 1, la méthode d'extraction de routine employée est la macération. Elle se fait soit par un solvant (MeOH) ou un mélange de solvant (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 1:1 ; MeOH/H<sub>2</sub>O, 8:2 ; EtOH/H<sub>2</sub>O 7:3), suivi du partitionnement avec l'hexane, l'AcOEt et le n-BuOH ; soit séquentiellement avec l'hexane, l'AcOEt et le MeOH. La quantité de solvant est fonction de celle

de la matière végétale, dans notre cas, on utilise généralement 3 L de solvant pour 1 Kg de poudre. L'extraction est effectuée sous agitation fréquente pendant 48 à 72 heures.

### III.1.2.1. Extraction et isolement des composés des racines, tiges et feuilles de *C. populnea*

L'intérêt porté sur *C. populnea* vient du fait qu'elle est utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement du diabète, et qu'aucune étude phytochimique de la plante n'avait jusqu'au début de ce projet été rapporté dans la littérature.

#### III.1.2.1.1. Extraction et isolement des composés à partir des racines de *C. populnea*

Après récolte, séchage et broyage, la poudre de racines (2 Kg) de *C. populnea* a été extraite par macération au MeOH conduisant à 209,35 g d'extrait brut (N9). Une partie de cet extrait brut au MeOH (150 g) a successivement été épuisée à l'hexane, au CHCl<sub>3</sub>, à l'AcOEt et au n-BuOH. Après concentration et évaporation des différents solvants, les phases organiques ont donné 7,12 g ; 3,82 g ; 27,96 g et 90,09 g respectivement. La fraction résiduelle avait une masse de 21,01 g. L'extrait à l'AcOEt (N9-A ; 26,94 g) a par la suite été soumis à des fractionnements par chromatographie sur colonne (CC) de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM). L'élution s'est faite avec des polarités croissantes des mélanges de solvants Hex/CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/AcOEt, et AcOEt/MeOH. Dans chaque cas, des fractions de 250 mL ont été recueillies et rassemblées sur la base de leurs profils CCM (Tableau III.1).

**Tableau III.1 :** Chromatogramme de l'extrait N9-A

| Système d'élution             | Fractions | Séries | Observations   |
|-------------------------------|-----------|--------|--|
| CHCl <sub>3</sub> 100%        | 1-9       | N9-AA  | Mélange de composés  |
|                               | 10-13     |        | N9-A0 (poudre blanche, 5 mg) précipite. Soluble dans le CHCl <sub>3</sub> il présente une tache violette à un Rf de 0,26 dans le CHCl <sub>3</sub> .   |
|                               | 14-22     |        |  |
| CHCl <sub>3</sub> /AcOEt 10%  | 23-34     | N9-AB  | Mélange de composés  |
| CHCl <sub>3</sub> : AcOEt 30% | 35-46     |        |  |
|                               | 47-54     |        | N9-A1 (15 mg) précipite sous forme de poudre blanche. Soluble dans le MeOH, il présente sur CCM une tache orange à un Rf de 0,77 dans Hex/AcOEt 70%. Il est UV-visible.                      |
| CHCl <sub>3</sub> /AcOEt 50%  | 55-70     | N9-AC  | Mélange de composés  |
|                               | 71-75     |        |  |
|                               | 76-88     |        | Mélange de composés  |
| CHCl <sub>3</sub> /AcOEt 70%  | 89-94     | N9-AC  | N9-A2 (38 mg) précipite sous forme de poudre beige. Présentant une tache grise sur plaque CCM à un Rf de 0,71 dans l'AcOEt et est UV-visible.  |
|                               | 95-97     |        | Mélange de composés  |
|                               | 98-104    |        |  |
|                               | 105-114   |        | N9-A3 (20 mg) précipite sous forme de poudre blanche. Il est soluble dans le CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1:1. Il présente une tache violette sur plaque CCM à un Rf de 0,57 dans AcOEt/MeOH 10%. |



|                  |         |       |   |
|------------------|---------|-------|---|
| AcOEt 100%       | 115     |       | Mélange de N9-A3 + N9-A4  |
|                  | 116-131 | N9-AD | N9-A4 (875 mg) poudre blanche précipite. Soluble dans le MeOH, il présente une tache verte sur plaque CCM après révélation à H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50% puis chauffage. Son Rf est de 0,4 dans l'AcOEt. |
|                  | 132-147 |       | Mélange complexe de 2 composés  |
| AcOEt : MeOH 10% | 148-151 | N9-AE | Mélange de composés   |
|                  | 152-162 |       |   |
| AcOEt/MeOH 30%   | 163-175 |       |   |
| AcOEt/MeOH 50%   | 176-194 |       |   |
| AcOEt/MeOH 70%   | 195-203 |       |   |
| MeOH 10%         | 204-212 |       |   |

### III.1.2.1.2. Extraction et isolement des composés à partir des feuilles de *C. populnea*

Les feuilles de *C. populnea* ont pratiquement subi le même traitement que ses racines. En effet, la poudre sèche (3 Kg) de feuilles a été extraite par macération au MeOH conduisant ainsi à 315 g d'extrait brut indexé N8. Une partie de cet extrait N8 (165,5 g) a subi des épauements successifs à l'hexane, au CHCl<sub>3</sub>, à l'AcOEt puis au n-Butanol aboutissant respectivement à 18,79 g (N8-H) ; 11,17 g (N8-C) ; 23,81 g (N8-A) ; et 29,25 g (N8-B) d'extrait. Seuls les extraits N8-H et N8-C ont été fractionnés. Les CC sur gel de silice 60 (70-230 mesh) de 15 g et de 9,87 g des extraits N8-H et N8-C respectivement ont conduit à l'isolement de six composés dont 3 pour chaque extrait selon les chromatogrammes ci-après (Tableau III.2 et III.3).

**Tableau III.2 :** Chromatogramme de l'extrait N8-C

| Système d'élué | Fractions | Séries | Observations  |
|----------------|-----------|--------|---|
| Hex 100%       | 1-39      | N8-HA  | Mélange huileux   |
| Hex/AcOEt 5%   | 40-60     |        | Mélange de composés   |
| Hex/AcOEt 10%  | 61-69     |        | N8-HB   |
|                | 70-83     |        |   |
| Hex/AcOEt 15%  | 84-103    |        |   |
| Hex/AcOEt 20%  | 104-108   |        |   |
|                | 109-127   |        |   |
| Hex/AcOEt 25%  | 128-139   |        |   |
| Hex/AcOEt 25%  | 140-141   | N8-HC  | N8-H3 (75 mg) précipite sous forme de poudre verte soluble dans le CHCl <sub>3</sub> . Il présente une tache verte sur plaque CCM à un Rf de 0,50 dans le système Hex/AcOEt 30% |
|                | 142-144   |        | Mélange de composés dont N8-H3  |
|                | 149-158   |        |   |
| Hex/AcOEt 30%  | 159-180   | N8-HD  | Mélange de composés   |
| Hex/AcOEt 50%  | 181-200   |        |   |
| AcOEt 100%     | 200-210   |        |   |

**Tableau III.3** : Chromatogramme de l'extrait N8-C

| Système d'éluion | Fractions | Séries | Observations   |
|------------------|-----------|--------|--|
| Hex 100%         | 1-31      | N8-CA  | Mélange huileux  |
| Hex/AcOEt 10%    | 32-46     |        | Mélange de composés  |
| Hex/AcOEt 20%    | 47-61     |        |  |
| Hex/AcOEt 30%    | 62-63     | N8-CB  | Le composé N8-C1 (6 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le MeOH. Il présente une tache violette sur plaque CCM à un Rf de 0,48 dans le système Hex/AcOEt 30% |
|                  | 64-65     |        |  |
| Hex/AcOEt 40%    | 82-94     |        | Mélange de composés  |
| Hex/AcOEt 60%    | 95-101    |        |  |
| Hex/AcOEt 80%    | 102-119   | N8-CC  | Mélange complexe de 2 composés   |
|                  | 120-128   |        |  |
| AcOEt 100%       | 129-137   | N8-CD  | Mélange de composés  |
|                  | 138-148   |        | Mélange complexe de 2 composés   |
|                  | 149-158   |        | Mélange de composés  |
| AcOEt/MeOH 10%   | 159-182   | N8-CE  | Trainées de composés   |
| AcOEt/MeOH 20%   | 183-212   |        |  |
| AcOEt/MeOH 50%   | 213-233   |        |  |

**III.1.2.1.3. Extraction et isolement des composés à partir des tiges de *C. populnea***

La poudre de tige (1 Kg) a été extraite au MeOH à froid pendant 72 heures. L'extrait brut obtenu, indexé N10 (105 g) a été dissout partiellement dans 500 mL d'eau distillée et partitionné avec 500 mL d'hexane, 500 mL d'AcOEt et 500 mL de n-BuOH dans une ampoule à décanter. Les phases organiques ont après concentration et évaporation des différents solvants, conduit à 15,1 g (N10-H) ; 12,0 g (N10-A) et 25,6 g (N10-B) d'extraits respectivement. Les extraits N10-H (12 g) et N10-A (8 g) ont été soumis à des CC de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) pour conduire à 6 composés selon les chromatogrammes ci-après :

**Tableau III.4** : Chromatogramme de l'extrait N10-H

| Système d'éluion | Fractions | Séries                         | Observations  |
|------------------|-----------|--------------------------------|---|
| Hex 100%         | 1-21      | A1                             | Mélange de composés   |
| Hex/AcOEt 10%    | 22-35     |                                | Le composé NYR-1 (7 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le chloroforme. Il présente une tache violette sur plaque CCM à un Rf de 0,55 dans le système Hex/AcOEt 15% |
|                  | 36-38     |                                |   |
| Hex/AcOEt 20%    | 39-50     | Mélange de composés dont NYR-1 |   |
| Hex/AcOEt 30%    | 51-62     | A2                             | Mélange de composés   |
| Hex/AcOEt 50%    | 76-78     | A3                             |   |
|                  | 79-90     |                                |   |
| Hex/AcOEt 70%    | 101-111   | A4                             | Trainées de composés  |
| AcOEt 100%       | 112-139   |                                |   |
| AcOEt/MeOH 20%   | 140-166   |                                |   |
| AcOEt/MeOH 20%   | 167-175   |                                |   |
| AcOEt/MeOH 20%   | 176-179   |                                |   |

**Tableau III.5 :** Chromatogramme de l'extrait N10-A

| Système d'élution                          | Fractions | Séries | Observations  |
|--|-----------|--------|---|
| Hex 100%                                   | 1-15      | N10-AA | Mélange de composés   |
| Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 10%    | 16-27     |        |   |
| Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 15%    | 28-50     |        |   |
| Hex/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 30%   | 51-65     |        |   |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%       | 66-82     |        |   |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 70% | 83-90     | N10-AB | Le composé NYR-5 (15 mg) précipite sous forme de poudre verte soluble dans le MeOH. Il présente une tache jaune sur plaque CCM à Rf = 0,75 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 75%) |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 75% | 91-116    | N10-AC | Mélange de composés   |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 80% | 117-125   |        |   |
|  | 126-130   |        |   |
| AcOEt 100%                                 | 131-145   |        |   |
| AcOEt/MeOH 5%                              | 146-152   |        |   |
|  | 153-159   |        |   |
| MeOH 100%                                  | 160-170   | N10-AD | Trainées de composés  |

### III.1.2.2. Extraction et isolement des composés à partir des graines, feuilles, et écorces de *G. aqualla*

#### III.1.2.2.1. Extraction et isolement des composés à partir des graines de *G. aqualla*

Les graines séchées de *G. aqualla* ont été écrasées en fine poudre et extraites par macération, successivement avec de l'AcOEt puis avec du MeOH. 40 g de l'extrait au MeOH a été fractionné par CC ouverte de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM), en utilisant un gradient d'Hex/AcOEt puis d'AcOEt/MeOH de polarité croissante. Des fractions de 300 mL sont recueillies et rassemblées sur la base de leur profil CCM (Tableau III.6).

**Tableau III.6 :** Chromatogramme de l'extrait de graines de *G. aqualla*

| Eluant         | Fractions | Séries | Observations   |
|----------------|-----------|--------|--|
| Hex 100 %      | 1-15      | G1     | Mélange d'huiles   |
| Hex/AcOEt 20 % | 16-65     |        | Mélange de composés  |
| Hex/AcOEt 30 % | 66-71     | G2     | Gag-1 (4 mg, poudre blanche) précipite. Soluble dans le CHCl <sub>3</sub> , il présente une tache violette à un Rf de 0,70 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 85%). |
|                | 72-82     |        | Mélange de composés  |
|                | 83-90     | G3     | Gag-2 (3 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le MeOH. Il présente une tache violette à un Rf de 0,68 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 85%).   |
|                | 92-106    |        | Mélanges de composés   |
| Hex/AcOEt 50 % | 107-151   | G4     |  |
|                | 152-168   |        |  |
| Hex/AcOEt 70 % | 169-178   |        | G4   |
| AcOEt 100 %    | 179-185   |        |  |
|                | 186-198   |        |  |

|                 |         |         |   |
|-----------------|---------|---------|---|
| Hex/AcOEt 10 %  | 199-235 | G5      | Mélanges de composés  |
| AcOEt/MeOH 20 % | 236-260 |         | Gag-4 (204 mg, paillettes blanches) précipite. Soluble dans le H <sub>2</sub> O, il présente une tache violette à un R <sub>f</sub> de 0,78 dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt 85% |
|                 |         | 261-315 | G6  |
| AcOEt/MeOH 30 % | 316-340 |         |   |
| AcOEt/MeOH 50 % | 341-408 | G7      | Trainées de composés  |
| MeOH 100 %      | 409-418 |         |   |

#### ❖ Traitement de la sous-fraction G2

La sous-fraction G2 (0,15 g) a été rechromatographiée sur colonne de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM), conduisant au composé Gag-6 (7 mg) obtenu sous forme de poudre blanche à Hex/AcOEt 20%. Son R<sub>f</sub> est de R<sub>f</sub> de 0,73 dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 85%.

#### III.1.2.2.2. Extraction et isolement des composés à partir des feuilles de *G. aqualla*

Les feuilles séchées et broyées (3 Kg) de *G. aqualla* ont été extraites par l'AcOEt puis par le MeOH. 104,5 g d'extrait à l'AcOEt et 63,72 g d'extrait au MeOH ont été obtenus. L'extrait au MeOH (50 g) a été fractionné sur une colonne ouverte de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) en suivant un gradient Hex/AcOEt de polarité croissante (1:0 à 0:1). Les fractions de 300 mL ont été collectées et rassemblées sur la base de la CCM analytique (Tableau III.7).

**Tableau III.7 :** Chromatogramme de l'extrait au MeOH des feuilles de *G. aqualla*

| Eluant         | Fractions | Séries | Observations  |
|----------------|-----------|--------|---|
| Hex/AcOEt 5 %  | 1-39      | G8     | Mélange d'huiles  |
| Hex/AcOEt 10 % | 40-42     | G9     | Mélange de composés   |
|                | 43-47     |        | Gaf-1 (6 mg, poudre blanche) précipite. Soluble dans le CHCl <sub>3</sub> , il est non UV-visible et a un R <sub>f</sub> de 0,41 dans le système Hex/AcOEt 10%.                     |
|                | 48-61     |        | Mélange de composés   |
|                | 62-103    | G10    | Mélange de composés dont un majoritaire   |
| 104-112        |           |        |   |
| Hex/AcOEt 15 % | 113-119   | G11    | N8-C1 (55 mg, poudre blanche) précipite. Il présente une tache non UV-visible à un R <sub>f</sub> de 0,56 dans le système Hex/AcOEt 30%, et est soluble dans le CHCl <sub>3</sub> . |
|                | 120-209   |        |   |
| Hex/AcOEt 35 % | 210-259   | G12    | Mélange de composés   |
| Hex/AcOEt 55 % | 260-290   |        |   |
| Hex/AcOEt 80 % | 291-366   |        |   |
| AcOEt 100 %    | 367-411   |        |   |

#### ➤ Traitement des fractions de la série G10

La série G10 (0,32 g) a été soumise à une CC répétitive sur gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) avec comme solvant d'élution le mélange Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10%, pour donner 75 mg du composé Gaf-4, qui se présente sous forme de poudre blanche et est soluble dans le CHCl<sub>3</sub>. Il est non UV-visible et présente une tache à un R<sub>f</sub> de 0,74 dans le système Hex/AcOEt 5%.

➤ **Traitement de la série G11**

La série G11 (1,56 g) a été chromatographiée sur colonne de silice avec le mélange Hex/AcOEt en mode gradient de polarité. La fraction éluée avec le système Hex/AcOEt 15% a permis l'obtention de 8 mg du composé Gaf-8 sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl<sub>3</sub> (Rf de 0,67 dans le système Hex/AcOEt 30%).

La partie à l'AcOEt (50 g) des feuilles de *G. aqualla* a également été fractionnée comme précédemment par des CC de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) pour donner 3 composés purs (Gaf-20, Gaf-22 et Gaf-24) à partir de la colonne principale et 10 fractions G13-G22 sur la base des profils obtenus par CCM (Tableau III.8).

**Tableau III.8 :** Chromatogramme de l'extrait à l'AcOEt des feuilles de *G. aqualla*

| Système d'éluion | Fractions | Séries | Observations  |
|------------------|-----------|--------|---|
| Hex 100 %        | 1-4       | G13    | Rien  |
|                  | 5-23      |        | Gaf-20 (68 mg) précipite sous forme de solide blanc brillant. Il est soluble dans le CHCl <sub>3</sub> et a un Rf de 0,61 (Hex) |
|                  | 50-52     |        | Mélange de composés   |
| Hex/AcOEt 5%     | 53-55     | G14    | Gaf-22 (90 mg, poudre blanche) précipite et est soluble dans le CHCl <sub>3</sub> . Rf = 0,52 (Hex/AcOEt 5%)                    |
|                  | 56-70     |        |   |
|                  | 71-75     |        |   |
| Hex/AcOEt 10%    | 76-85     | G15    | Mélange de composés   |
|                  | 86-87     |        |   |
| Hex/AcOEt 20%    | 88-126    | G16    | Mélange de Chlorophylles  |
|                  | 127       |        |   |
| Hex/AcOEt 30%    | 128-129   | G17    | Mélange de composés   |
|                  | 130-172   |        |   |
| Hex/AcOEt 40%    | 173-196   | G18    | Mélange de composés dont deux majoritaires  |
|                  | 197-209   |        |   |
| Hex/AcOEt 50%    | 210-215   | G19    | Mélange de deux composés Gaf-24 +Gaf-25   |
|                  | 216-242   |        |   |
| Hex/AcOEt 70%    | 243-262   | G20    | Gaf-24 (19 mg, poudre blanche) précipite et est soluble dans le MeOH. Rf = 0,74 dans AcOEt/MeOH 10%.                            |
|                  | 263-264   |        |   |
| AcOEt 100 %      | 265-274   | G21    | Mélange de composés   |
|                  | 275-290   | G22    | Mélange de composés dont un majoritaire   |
|                  | 291-307   |        |   |

❖ **Traitement de la série G13 (0,42 g)**

De cette fraction, nous avons obtenu le composé Gaf-26 (6,81 mg) après CC de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) dans la fraction obtenue à Hex/AcOEt 2,5%. Il se présente sous forme de poudre blanche.

### III.1.2.2.3. Extraction et isolement des composés à partir des écorces de *G. aqualla*

Les écorces découpées, séchées et broyées, ont donné 1 Kg de poudre qui a subi une macération successive dans l'hexane, l'AcOEt puis le MeOH, pendant 3x72 h pour chaque solvant. La filtration et l'évaporation sous pression réduite des solutions résultantes, a conduit à 6,74 g d'extrait à l'hexane ; 9,42 g d'extrait à l'AcOEt et 83,83 g d'extrait au MeOH. L'extrait au MeOH (50 g) après fixation au gel de silice, a été assujéti à la CC de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM). Le système d'éluion utilisé était le mélange Hex/AcOEt de polarité croissante suivi du mélange AcOEt/MeOH de polarité croissante. Les fractions de 300 mL ont été collectées et rassemblées sur la base de la CCM analytique (Tableau III.9).

**Tableau III.9 :** Chromatogramme de l'extrait au MeOH des écorces du tronc de *G. aqualla*

| Système d'éluion | Fractions | Séries  | Observations   |
|------------------|-----------|---------|--|
| Hex 100%         | 1-16      | G23     | Mélange huileux  |
| Hex/AcOEt 10%    | 17-53     |         | Gae-2 (5 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl <sub>3</sub> .  |
| Hex/AcOEt 20%    | 54-121    | G24     | Mélange de composés  |
| Hex/AcOEt 40%    | 122-199   |         |  |
| Hex/AcOEt 50%    | 200-213   | G25     | Le composé Gae-4 (6 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl <sub>3</sub> . Il a un Rf de 0,51 dans Hex/AcOEt 15% |
|                  | 214-241   |         |  |
|                  | 242-253   |         |  |
| Hex/AcOEt 60%    | 254-259   | G26     | Mélanges de composés   |
| Hex/AcOEt 80%    | 286-320   |         |  |
| Hex/AcOEt 90%    | 321-366   |         | Le composé Gag-4 (53 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le DMSO. Il a un Rf de 0,49 dans AcOEt/MeOH 20%             |
| AcOEt 100%       | 367-391   | G27     | Mélange de composés  |
| AcOEt/MeOH 10%   | 392-399   |         |  |
|                  |           | 400-402 |  |
| AcOEt/MeOH 20%   | 403-407   |         |  |
|                  | 408-426   |         |  |
|                  | 427-444   |         |  |
| AcOEt/MeOH 40%   | 445-510   |         | Mélanges de composés   |
| AcOEt/MeOH 60%   | 511-556   | G28     | Trainées de composés   |
| AcOEt/MeOH 70%   | 557-580   |         |  |

#### ❖ Traitement de la série G25

La série G25 de masse 1,96 g a subi une CC de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) en utilisant l'hexane avec un gradient d'AcOEt comme solvant d'éluion. Des fractions de 50 mL sont recueillies et réunies sur la base de la CCM analytique (Tableau III.10).

**Tableau III.10** : Chromatogramme de la série G25

| Système d'éluion | Fractions | Séries | Observations  |
|------------------|-----------|--------|---|
| Hex 100%         | 1-16      | G25-A  | Mélange huileux   |
| Hex/AcOEt 10%    | 17-18     | G25-B  | Le composé Gae14 (7,2 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl <sub>3</sub> . Il possède un Rf de 0,62 dans le système Hex/AcOEt 10% |
|                  | 19-20     |        | Mélange de composés   |
|                  | 21-22     | G25-C  | Le composé Gae-15 (14,1 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl <sub>3</sub> . Son Rf est de 0,33 dans le système Hex/AcOEt 15%.    |
|                  | 23-24     |        | Mélange de deux composés Gae15  |
|                  | 25-28     |        | Mélange de trois composés   |
| Hex/AcOEt 20%    | 29-45     | G25-D  | Mélange de composés   |
| Hex/AcOEt 30%    | 46-70     |        |   |
| Hex/AcOEt 40%    | 71-100    |        | Longue traînée  |

### III.1.2.3. Extraction et isolement des composés à partir du bois de racine de *V. paradoxa*

1 Kg de poudre de bois de racines de *V. paradoxa*, a été extrait par macération au MeOH (10 L) pendant 72 h, conduisant à 189,6 g d'extrait brut au MeOH (N12) qui par la suite ont été repris dans de l'AcOEt jusqu'à épuisement, aboutissant ainsi à 26,8 g d'extrait à l'AcOEt (N12-A). 20 g de cet extrait à l'AcOEt a été fractionnée comme précédemment par CC de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) conduisant à l'obtention de 3 composés (Vr-2, Vr-4 et Vr-5) à partir de la colonne principale et quatre fractions N12-A1 à N12-A4 (Tableau III.11). La purification des trois premières d'entre elles, toujours par la CC de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) a permis l'isolement supplémentaire de deux composés (Vr-3 et Vr-6).

**Tableau III.11** : Chromatogramme de l'extrait N12-A

| Système d'éluion | Fractions | Séries | Observations   |
|------------------|-----------|--------|--|
| AcOEt 100%       | 1-21      | V1     | Mélange de composés  |
|                  | 22        |        | Le composé Vr-2 (120 mg) précipite sous forme de poudre blanche soluble dans le MeOH. Il présente une tache jaune à un Rf de 0,67 dans le système Hex/AcOEt 60%. |
|                  | 23-47     |        | Mélange de composés  |
| AcOEt/MeOH 2%    | 48-53     | V2     | Le composé VR4 (6 mg) précipite sous forme de poudre blanche. Soluble dans le MeOH, il présente une tache violette à un Rf de 0,57 dans AcOEt /MeOH 2%           |
|                  | 54-59     |        | Mélanges de composés   |
| AcOEt/MeOH 5%    | 60-61     | V3     | Mélanges de composés   |
|                  | 62-69     |        | Le composé VR5 (3,75 mg) précipite sous forme de poudre jaune soluble dans le MeOH. Rf = 0,52 dans AcOEt/MeOH 5%   |
| AcOEt/MeOH 10%   | 70-77     |        | Mélange de composés  |
| AcOEt/MeOH 30%   | 78-109    | V4     |  |
| AcOEt/MeOH 50%   | 110-121   |        |  |
| AcOEt/MeOH 85%   | 122-133   |        | Trainées de composés   |
|                  | 133-150   |        |  |



❖ **Traitement de la série V2 (0,58 g)**

Le traitement de cette série par chromatographie sur colonne de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM), avec pour éluant l'AcOEt 100% a abouti au composé VR-3 (7 mg).

❖ **Traitement de la série V3 (2 g)**

Cette série a été soumise à une CC de gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM), éluee avec un mode gradient de polarité croissante du système Hex/AcOEt (7:3 à 0:1). Des précipités bruns obtenus à Hex/AcOEt 80% ont été recristallisés dans du MeOH puis passés sur une colonne de Sephadex LH-20 éluee par un mélange isocratique MeOH/H<sub>2</sub>O 10% conduisant ainsi à 18 mg du composé N9-A2, présentant une tache jaune à un Rf de 0,44 dans CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (7:3:0,2).



### III.1.3. Caractéristiques physiques et spectroscopiques de tous les composés isolés

#### 1. Gae-2 : Nonacosane 204

Solide amorphe blanc

P.F. : 50-51°C



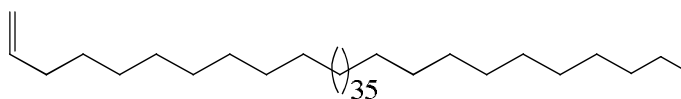
TOF-MS-ESI+ :  $[M+H]^+$  à  $m/z = 409,3$  calc. pour  $C_{29}H_{60}$

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) :  $\delta$  0,91 (6H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, 3H-1, 3H-29), 1,59 (4H, *m*, 2H-2, 2H-28) et 1,20-1,39 [ $(CH_2)_{27}$ , *brs*]. RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  14,1 (C-1, C-29), 22,7 (C-2, C-28), 31,9 (C-3, C-27), et 29,4-29,7 (C-4-C-26).

#### 2. Gaf-20 : Pentapentacontène 205

Poudre amorphe blanche scintillante

TOF-MS-ESI+ :  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 792,6$  calc. pour  $C_{55}H_{110}$



RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) voir Tableau II.4

#### 3. Gae-15 : Docosanol 206

Solide amorphe blanc

P.F. : 58-59°C.



TOF-MS-ESI+ :  $[M+6NH_4^+ + 6H]^+$  à  $m/z = 440,2$  calc. pour  $C_{22}H_{46}O$ .

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) :  $\delta$  3,67 (2H, *t*,  $J = 6,6$  Hz, H<sub>2</sub>-1), 1,59 (4H, *m*, H<sub>2</sub>-2 et H<sub>2</sub>-3), 1,20-1,39 [ $(CH_2)_{18}$ , *brs*] et 0,91 (3H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H<sub>3</sub>-22). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  63,1 (C-1), 32,8 (C-2), 25,7 (C-3), 29,4-29,7 (C-4-C-19), 31,9 (C-20), 22,7 (C-21) et 14,1 (C-22).

#### 4. Gaf-1 : Nonacosanol 207

Poudre blanche

TOF-MS-ESI+ :  $[M+H]^+$  à  $m/z = 425,1$  calc. pour  $C_{29}H_{60}O$ .



RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) :  $\delta$  3,63 (2H, *t*,  $J = 6,5$  Hz, H<sub>2</sub>-1), 1,56 (4H, *m*, H<sub>2</sub>-2 et H<sub>2</sub>-3), 1,20-1,29 [ $(CH_2)_{24}$ , *brs*] et 0,89 (3H, *t*,  $J = 6,7$  Hz, H<sub>3</sub>-37). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  63,1 (C-1), 32,8 (C-2), 25,7 (C-3), 29,4-29,7 (C-4-C-34), 31,9 (C-35), 22,7 (C-36) et 14,1 (C-37).

#### 5. Gaf-26 : Tétratriacontanol 208

Poudre blanche

TOF-MS-ESI+ :  $[M+Na^++2H]^+$  à  $m/z = 519,3$  calc. pour  $C_{34}H_{70}O$ .



RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) :  $\delta$  3,67 (2H, *t*,  $J = 6,7$  Hz, H<sub>2</sub>-1), 1,60 (4H, *m*, H<sub>2</sub>-2 et H<sub>2</sub>-3), 1,25-1,39 [ $(CH_2)_{30}$ , *brs*] et 0,91 (3H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H<sub>3</sub>-37). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  63,1 (C-1), 32,8 (C-2), 25,7 (C-3), 29,4-29,7 (C-4-C-34), 31,9 (C-35), 22,7 (C-36) and 14,1 (C-37).

## 6. Gae-4 : Heptatriacontanol 209

Solide Amorphe blanc

P.F. : 88–89°C

TOF-MS-ESI+ :  $[M+H]^+$  à  $m/z = 537,3$  calc. pour  $C_{37}H_{76}O$

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) :  $\delta$  3,65 (2H, *t*,  $J = 6,8$  Hz,  $H_{2-1}$ ), 1,60 (4H, *m*,  $H_{2-2}$  et  $H_{2-3}$ ), 1,20–1,39 [ $(CH_2)_{33}$ , *brs*] et 0,89 (3H, *t*,  $J = 7,5$  Hz,  $H_{3-37}$ ). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  63,1 (C-1), 32,8 (C-2), 25,7 (C-3), 29,4–29,7 (C-4–C-34), 31,9 (C-35), 22,7 (C-36) et 14,1 (C-37).



## 7. Gaf-22 : Octatriacontanol 210

Poudre blanche

TOF-MS-ESI+ :  $[M+H]^+$  à  $m/z = 551,4$  calc. pour  $C_{38}H_{78}O$

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) :  $\delta$  3,67 (2H, *t*,  $J = 6,6$  Hz,  $H_{2-1}$ ), 1,60 (4H, *m*,  $H_{2-2}$  et  $H_{2-3}$ ), 1,25–1,39 [ $(CH_2)_{34}$ , *brs*] et 0,91 (3H, *t*,  $J = 6,9$  Hz,  $H_{3-38}$ ). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  63,1 (C-1), 32,8 (C-2), 25,7 (C-3), 29,4–29,7 (C-4–C-34), 31,9 (C-35), 22,7 (C-36) et 14,1 (C-38).



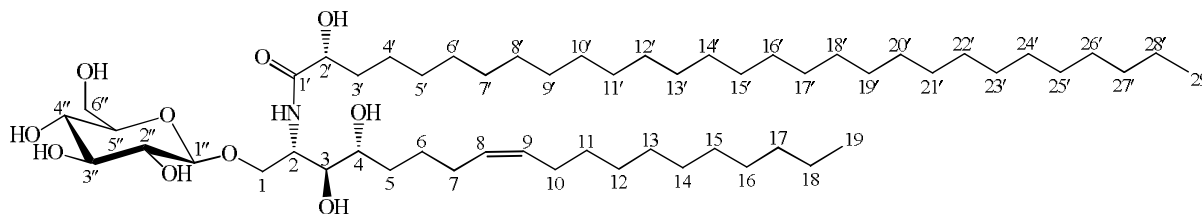
## 8. Vr-4 : Vitellaroside 212

Solide amorphe blanc

P.F. : 147–149°C

TOF-MS-ESI+ :  $[M]^{\bullet+}$  à  $m/z 927,4$  calc. pour  $C_{54}H_{105}NO_{10}$

RMN  $^1H$  ( $DMSO-d_6$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}C$  ( $DMSO-d_6$ , 125 MHz) voir Tableau II.5



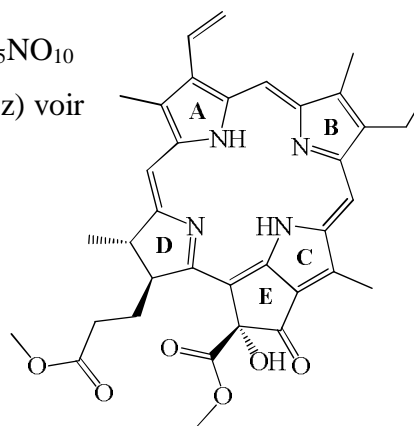
## 9. N8-H3 : Méthyl-15a- $\alpha$ -hydroxyphéophorbide A 213

Poudre amorphe verte

HR-MS-ESI+ :  $[M+Na]^+$  à  $m/z 645,2560$  calc. pour  $C_{54}H_{105}NO_{10}$

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) voir

Tableau II.6

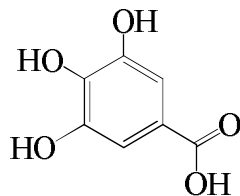


**10. N9-A2 : Acide gallique 73**

Poudre amorphe blanche

Test du FeCl<sub>3</sub> : positif

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.7

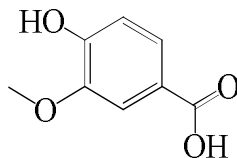


**11. Gag-2 : Acide vanillique 214**

Poudre amorphe blanche

Test du FeCl<sub>3</sub> : positif

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.8

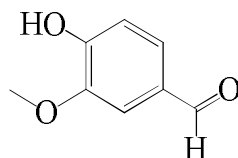


**12. Gag-6 : Vanilline 154**

Poudre amorphe blanche

Test du FeCl<sub>3</sub> : positif

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.9



**13. NYR-5 : Apigénine 5**

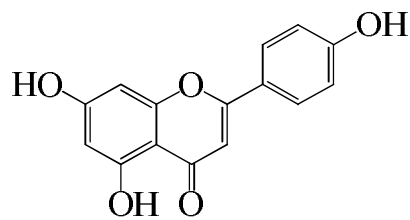
Poudre verte

Test du FeCl<sub>3</sub> : positif

Test de Shinoda : positif

TOF-MS-ESI+ : [M+H]<sup>+</sup> à *m/z* = 271,1 calc. pour C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.10



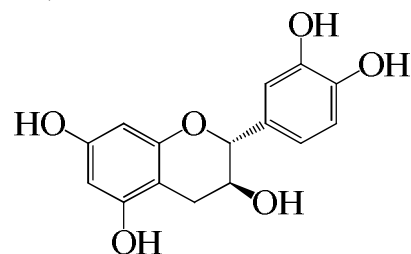
**14. Vr-2 : Catéchine 177**

Poudre blanche

Test de Shinoda : positif

TOF-MS-ESI+ : [M+H]<sup>+</sup> à *m/z* = 291,2 calc. pour C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.11



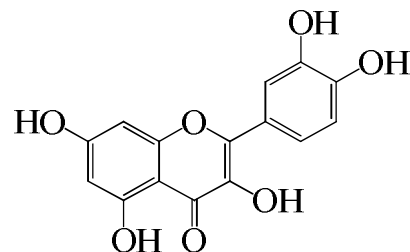
**15. Vr-5 : Quercétine 8**

Poudre jaune

Test du FeCl<sub>3</sub> : positif

Test de Shinoda : positif

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.12



**16. N9-A4 : Bergénine 39**

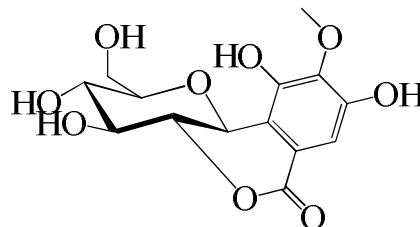
Cristaux blancs

P.F. : 157-159°C

Test du FeCl<sub>3</sub> : positif

TOF-MS-ESI<sup>+</sup> : [M+Na]<sup>+</sup> à  $m/z = 351,1$  calc. pour C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.13

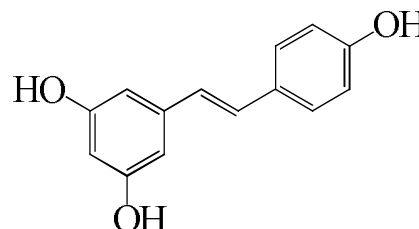


**17. N9-A1 : *trans*-Resvératrol 49**

Poudre blanche

Test du FeCl<sub>3</sub> : positif

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.14



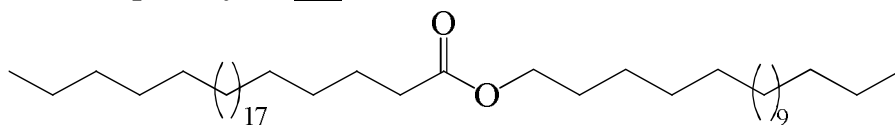
**18. Gae-14 : Heptacosanoate d'heptadécyle 211**

Solide amorphe blanc

P.F. : 65-66°C

TOF-MS-ESI<sup>+</sup> : [M+2NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+H]<sup>+</sup> à  $m/z = 685,3$  calc. pour C<sub>44</sub>H<sub>88</sub>O<sub>2</sub>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.4



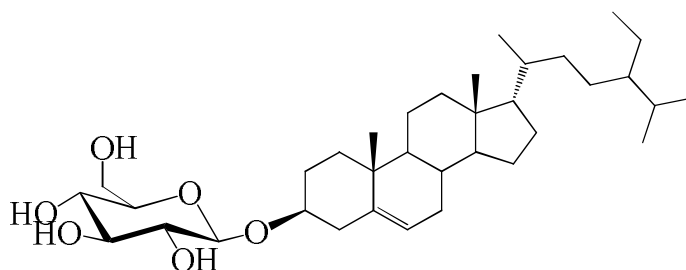
**19. N9-A3 : Daucostérol 215**

Poudre blanche

Test de Liebermann-Bürchard : positif

TOF-MS-ESI<sup>+</sup> : [M+Na]<sup>+</sup> à  $m/z = 599,2$  calc. pour C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.15



**20. Vr-3 : 3-*O*-β-*D*-glucopyranosylspinastérol 178**

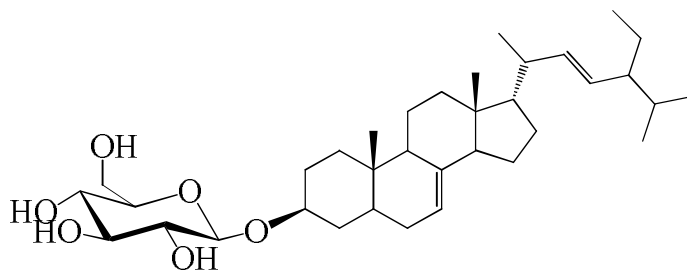
Cristaux blancs

P.F. : 284-285°C

Test de Liebermann-Bürchard : positif

TOF-MS-ESI<sup>+</sup> : [M+Na]<sup>+</sup> à  $m/z = 597,4$  calc. pour C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>

RMN <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) voir Tableau II.16

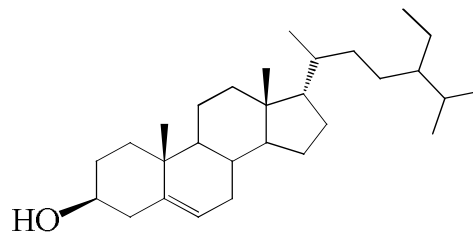


**21. N9-A0 :  $\beta$ -sitostérol 216**

Poudre blanche

Test de Liebermann-Bürchard : positif

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) voir Tableau II.17



**22. Gag-4 : *D*-Mannitol 162**

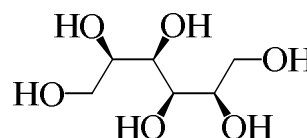
Paillettes blanches

P.F. : 168-169°C

Test de Molish : positif

TOF-MS-ESI+ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  à  $m/z = 182,9$  et  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z = 205,0$  calc. pour  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz) voir Tableau II.18



**23. Gae-7 : *D*-Mannitol acétate 217**

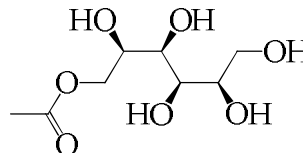
Solide amorphe blanc

P.F. : 123-124°C

Test de Molish : positif

TOF-MS-ESI+ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z = 247,1$  calc. pour  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_7$

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz) voir Tableau II.19



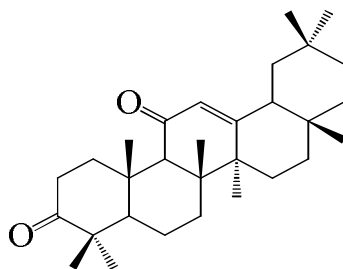
**24. NYR-1 : 18-isooléan-12-èn-3,11-dione 218**

Poudre blanche

Test de Liebermann-Bürchard : positif

TOF-MS-ESI+ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  à  $m/z = 439,3$  calc. pour  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_2$

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz) voir Tableau II.20

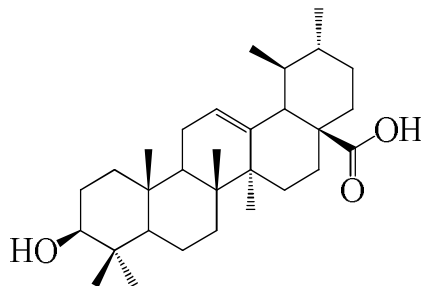


## 25. N8-C1 : Acide ursolique 110

Poudre blanche

Test de Liebermann-Bürchard : positif

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) voir Tableau II.21



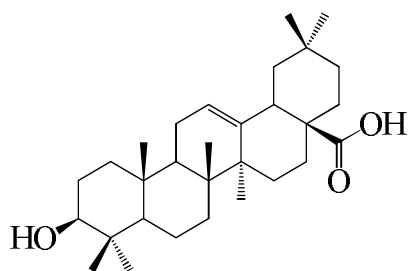
## 26. Gag-1 : Acide oléanolique 97

Poudre blanche

Test de Liebermann-Bürchard : positif

TOF-MS-ESI+ : [M+Na]<sup>+</sup> à *m/z* 479,3 calc. pour C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.22



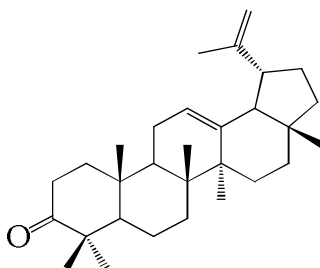
## 27. Gaf-4 : Lupénone 37

Poudre blanche

Test de Liebermann-Bürchard : positif

TOF-MS-ESI+ : [M+Na]<sup>+</sup> à *m/z* 479,4 calc. pour C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) voir Tableau II.23



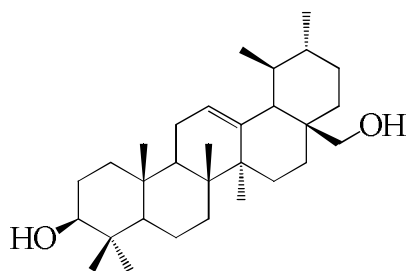
## 28. Gaf-8 : Uvaol 219

Poudre blanche

Test de Liebermann-Bürchard : positif

TOF-MS-ESI+ :  $[M+NH_4^++3H]^+$  à  $m/z$  479,3 calc. pour  $C_{30}H_{50}O_2$

RMN  $^1H$  (Acétone- $d_6$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (Acétone- $d_6$ , 125 MHz) voir Tableau II.24



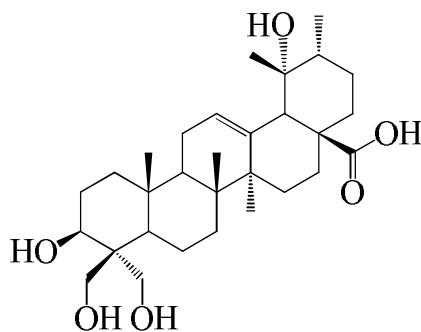
**29. Gaf-24 : Acide 19 $\alpha$ ,23 $\beta$ ,24 $\alpha$ -trihydroxyursolique 220**

Poudre blanche

Test de Liebermann-Bürchard : positif

TOF-MS-ESI+ :  $[M+H]^+$  à  $m/z$  505,3 calc. pour  $C_{30}H_{48}O_6$

RMN  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) voir Tableau II.25



## **III.2. Méthodes analytiques et chromatographiques**

### **III.2.1. Criblage phytochimique des extraits et tests de caractérisation des composés**

L'analyse phytochimique sommaire a été réalisée sur la base des tests de coloration caractéristiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques : alcaloïdes, composés phénoliques, flavonoïdes, saponines, tanins, triterpènes et stérols. Ces tests ont été effectués en utilisant les procédures standards d'identification des composés tel que décrites par Harbone (1973) et Trease *and* Evans (1989).

#### **III.2.1.1. Caractérisation des alcaloïdes**

A 5 mL d'extrait dissout, ajouter 2 mL de HCl dilué. A ce mélange chlorhydrique ajouter quelques gouttes du réactif de Valser-Mayer (tétra-iodomercurate de potassium). La formation d'un précipité qui n'est pas solubilisé par addition d'éthanol atteste de la présence d'alcaloïdes.

#### **III.2.1.2. Caractérisation des flavonoïdes**

La présence des flavonoïdes dans les différents extraits a été mise en évidence par un test simple et rapide appelé "réaction de Shinoda". Ce test consistait à ajouter à environ 2 mL de l'extrait dissout, quelques gouttes d'HCl concentré et quelques copaux de magnésium. Laisser agir 3 min et regarder le changement de couleur. L'apparition d'une coloration orangée (flavones), rouge (flavonols) ou violette (flavonones) indiquait la présence de flavonoïdes.

#### **III.2.1.3. Caractérisation des polyphénols**

A 2 mL de chaque extrait dissout, a été ajoutée une à trois gouttes d'une solution de chlorure ferrique (2, 3 ou 5%). Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée.

#### **III.2.1.4. Caractérisation des saponines**

Le test utilisé ici pour la mise en évidence des saponines dans nos différents extraits est celui à l'indice de mousse (IM). En effet, après agitation pendant une minute d'un tube à essai contenant quelques millilitres d'extrait dissout dans de l'eau, la formation d'une mousse persistante en présence indiquait la présence des saponines.

#### **III.2.1.5. Caractérisation des tanins**

Nous avons utilisé pour ce test la réaction à la gélatine. A 3 mL d'extrait dissout, une solution de gélatine 1% contenant du chlorure de sodium 10% a été ajoutée. La formation d'un précipité blanc indiquait la présence des tanins.



### III.2.1.6. Caractérisation des triterpènes et stéroïdes

Le test de Libermann-Bürchard a été utilisé ici pour la caractérisation des triterpènes et des stéroïdes. En effet, à quelques mL d'échantillon dissout dans du chloroforme, un volume équimolaire d'anhydride acétique y est ajouté suivi de quelques gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Le changement de coloration est observé pendant 15 à 30 min : une coloration bleu-vert indiquait la présence de stéroïdes tandis que le rouge-violacé à rose dénotait de la présence des triterpènes.

### III.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince nous ont permis de vérifier la présence et l'état de pureté des composés suivis. Elles ont été réalisées sur deux types de plaques, les unes de fabrication locale réalisées sur plaques en verre de dimensions 10 x 20 cm ou 20 x 20 cm recouvertes de gel de silice (230-400 Mesh), et les autres étant préfabriquées sur feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice (gel 60 F<sub>254</sub>, 0,20 mm ; Merck). Ces plaques étaient après dépôt des taches plongées dans des cuves chromatographiques en verre contenant la phase mobile appropriée qui était généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon la complexité du mélange et le type de séparation recherchée.

Après élution dans les phases mobiles adéquates, les plaques ont été systématiquement observées sous lumière UV à 254 et à 366 nm, avant révélation par des vapeurs d'iode ou par pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique dilué (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% ou 50% v/v) suivi d'un chauffage à 110°C pendant 10 à 15 minutes.

### III.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mis en œuvre dans des colonnes en verre dont les dimensions (taille et diamètre) étaient choisies en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. Le gel de silice 60 (70-230 mesh, ASTM) a été utilisée dans la première ou seconde étape de fractionnement des extraits. Le débit de la phase mobile et le volume des fractions collectées ont été adaptés à la quantité et à la nature (extrait, fraction) des échantillons à séparer. Les systèmes d'élution étaient dans la plupart des cas des mélanges binaires de solvants (Hex, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et MeOH) préalablement déterminées sur la base d'analyses par CCM. Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions en séries, ont également été effectués sur la base de la CCM. Les échantillons à séparer ont été introduits sous forme solide, en les adsorbant préalablement sur une quantité de silice correspondant à 2-5 fois leurs poids de phase.

Les chromatographies d'exclusion ou filtrations sur gel ont été réalisées comme étapes de purification sur Sephadex LH-20 ; les échantillons à séparer ont dans ce cas été introduits sous forme liquide après dissolution dans le plus petit volume d'éluant possible. Les éluations ont été réalisées par simple gravité.

### **III.3. Méthodes physico-chimiques**

#### **III.3.1. Point de fusion (P.F.)**

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil à capillaire Stuart SMP-3 (Staffordshire, United Kingdom) ou Electrothermal IA9000 SERIES. Le changement d'état est observé à l'aide d'un microscope et la température correspondante relevée, sans correction.

#### **III.3.2. Spectrométrie de masse (MS)**

Les spectres de masse des composés isolés ont été réalisés en mode positif par électro-nébulisation ou *Electrospray* (ESI). Les analyses TOF-MS-ESI ont été réalisées sur un appareil Q-Tof Ultima (Waters, UK, Altrincham) par le Pr Sophie Laurent de l'Université de Mons-Hainaut (Belgique), tandis que les analyses HRESI-MS ont été effectuées sur un spectromètre JEOL Delta 2 à l'Institut de Médecine Naturelle de l'Université de Toyama (Japon) par le biais du Dr Awouafack Maurice Ducret.

#### **III.3.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur des appareils de type Brüker Avance AV-500 du Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et Imagerie Moléculaire de la Faculté des sciences et de Médecine-Pharmacie de l'Université de Mons-Hainaut (Belgique), et Brüker Avance II 500 du Centre Inter-facultaire de Recherche du Médicament (CIRM) de l'Université de Liège (ULg, Belgique). Les fréquences des appareils étaient réglées à 500 MHz pour les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et à 125 MHz pour ceux de RMN  $^{13}\text{C}$ . Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ , et pyridine- $d_5$ . Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne ; les constantes de couplage ( $J$ ) sont exprimées en Hz. Les spectres des expériences bidimensionnelles, ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionsnelles spécifiques fournies par le fabricant de l'appareil.

### **III.4. Méthodes chimiques**

#### **III.4.1. Acétalisation du D-Mannitol**

La réaction d'acétalisation est beaucoup utilisée dans la protection des diols parce que les acétals sont stables sous de conditions variées et peuvent facilement être clivés par hydrolyse

acide. Le protocole utilisé est celui de De Alvarenga et *al.* (2006) avec quelques modifications. Dans un ballon de 100 mL, 40 g (293 mmol) de ZnCl<sub>2</sub> anhydre a été dissout dans 400 mL d'acétone anhydre, puis 20 g (110 mmol) de *D*-Mannitol a été rapidement ajouté ; le mélange a ensuite été agité à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution claire (5 h). Cette solution a par la suite été versé dans une suspension de carbonate de potassium (45 g dans 45 mL de H<sub>2</sub>O). Après agitation vigoureuse et filtration du carbonate de potassium, ce dernier a été lavé avec de l'acétone (50 mL). Le filtrat a été concentré pour enlever l'acétone et l'eau résiduelle. Le solide blanc obtenu a été dissout dans du diéthyl éther (60 mL) et transféré dans une ampoule à décanter. La phase organique a été recueillie et la phase aqueuse extraite avec du diéthyl éther (3 x 50 mL). Les phases organiques ont par la suite été regroupées, séchées avec du sulfate de magnésium anhydre qui a par la suite été filtré et lavé avec du diéthyl éther (20 mL). L'évaporation du solvant sous vide à température ambiante a conduit à l'obtention d'une bouillie blanche. 100 mL d'hexane a été ajouté à cette bouillie et l'ensemble a été agité pendant 20 min, puis conservé au congélateur à -20°C pendant 30 min, ensuite au réfrigérateur à 8°C pendant 30 min supplémentaire. Après ce temps, le mélange a été filtré sous vide et le solide obtenu lavé avec 100 mL d'hexane glacé. Après 2 heures de séchage au dessiccateur sous vide, on a obtenu 55 mg du diacétal indexé NHR-2.

#### **III.4.2. Synthèse de Pechmann à partir de la Catéchine**

Un mélange de Catéchine (1,1 g ; 10 mmol), d'acétoacétate d'éthyle (2,6 g, 20 mmol) et de diiode (0,025 g) a été introduit dans un ballon de 100 mL et chauffé dans un bain d'huile de paraffine à 110°C (température du bain) pendant 5 heures. Une fois la réaction achevée (monitorée par CCM), le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante, supplémenté d'une solution glacée de thiosulfate de sodium 6% et agité pendant 10 à 15 min. Le précipité résultant a ensuite été séparé, lavé avec de l'eau glacée et recristallisé dans de l'éthanol chaud pour conduire à 98 mg du composé NHR-1 se présentant sous forme de poudre verte.

### **III.5. Méthodes biochimiques et biologiques**

#### **III.5.1 Tests antioxydant**

##### **III.5.1.1. Test antiradicalaire au DPPH**

Le test au DPPH a été réalisé sur microplaque de 96 puits selon la méthode décrite par Jamshed et *al.* (2012) avec quelques légères modifications. En effet, dans des alvéoles distinctes d'une microplaque à 96 puits (Corning Costar, Cambridge, MA, USA), 10 µL d'échantillon était amené à réagir avec 90 µL d'une solution méthanolique de DPPH (1,1 mM) puis le mélange a été incubé à 37°C à l'obscurité pendant 30 min.

Après ce temps d'incubation, les absorbances ont été lues à la longueur d'ondes de 517 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque Fluo star Omega, et les pourcentages d'inhibition (P.I.) calculés grâce à la formule ci-dessous :

$$\text{P.I.} = 100 - \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_0} \times 100$$

Avec :

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance de l'échantillon

$A_0$  : Absorbance du contrôle négatif

Notons qu'un criblage préliminaire à une concentration de 2 mg.mL<sup>-1</sup> pour les extraits et de 10 mM pour les composés purs, a d'abord été effectué et seuls les échantillons ayant montré un pourcentage d'inhibition supérieur ou égal à 50% (P.I. ≥ 50) étaient considérés comme actifs. Leurs concentrations inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) ont par la suite été déterminées en effectuant une série de huit dilutions successives d'un facteur de 3 à partir de la solution mère. Tous les échantillons ont été dissouts dans le DMSO puis dilués avec de l'eau distillée de façon à avoir une concentration en DMSO inférieure à 2%. Le n-Propylgallate (Sigma-Aldrich) et le 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (*t*-BHA, Sigma-Aldrich) ont été utilisés comme témoins positifs tandis que le DMSO 10% a été utilisé comme témoin négatif. Les opérations ci-dessus décrites ont été effectuées en triplicata pour chaque échantillon testé.

### III.5.1.2. Evaluation de la teneur en composé phénolique de l'extrait brut au MeOH des rhizomes de *C. populnea* (N12)

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Le principe du dosage repose sur la réaction d'oxydation des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est un mélange de complexes d'acides phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). La teneur se calcule par comparaison de la densité optique lue à 760 nm à celle résultant d'un étalon de l'acide gallique de concentration connue.

Le test a été réalisé en utilisant le protocole de Talla et *al.* (2014) avec quelques modifications. En effet, une solution méthanolique de l'extrait a été préparée à une concentration de 200 mg.L<sup>-1</sup>. A l'aide d'une micropipette, on a prélevé 20 µL de cet extrait auquel on a ajouté 200 µL du réactif de Folin-Ciocalteu et 1,380 µL d'eau distillée. Le mélange a été homogénéisé puis supplémenté de 400 µL de solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% trois minutes plus tard. La solution vire alors du jaune au vert. La solution verdâtre obtenue est par la suite incubée pendant 20 min à l'obscurité. Mêmement, l'Acide gallique a été préparé dans l'EtOH pour donner une solution mère de 200 mg.L<sup>-1</sup> à partir de laquelle des solutions filles de concentrations 0,1 ; 0,05 ; 0,025

et 0,012 g.L<sup>-1</sup> ont été obtenues par dilutions successives. Le témoin négatif (blanc) était constitué uniquement du réactif de Folin-Ciocalteu, du carbonate de sodium et de l'eau distillée. L'absorbance a ensuite été lue à 760 nm. La quantification des polyphénols s'est fait grâce à une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x + b$ ) à différentes concentrations d'acide gallique selon la formule ci-dessous :

$$x = \frac{(y - b)V_2}{V_1 \cdot a \cdot m} \times 100 \text{gExt}$$

**x** = la teneur en polyphénols et **y**=équation de la droite d'étalonnage linéaire;

**a** est le coefficient de la droite d'étalonnage linéaire et **b** est une constante;

**V<sub>1</sub>** = volume de la solution mère préparée et **V<sub>2</sub>** = volume prélevé de la solution mère pour le test; **m** = masse de l'extrait et **Ext** = extrait.

Les résultats obtenus ont été exprimés en gramme équivalent d'Acide gallique par 100 g d'extrait (gEAG/100 gExt).

### III.5.2. Tests d'inhibition enzymatique

Les enzymes sont des biocatalyseurs de nature protéinique synthétisés par la cellule vivante et spécifique d'une réaction chimique cellulaire ou extracellulaire donnée. Elles sont toutes connues comme étant des protéines, donc des composés à poids moléculaires élevés constitués principalement des chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. L'utilisation des enzymes dans le diagnostic de la maladie est l'un des avantages importants découlant de la recherche intensive en biochimie. L'une des propriétés qui rend les enzymes si importantes en tant qu'outils de diagnostic et de recherche est leur spécificité vis-à-vis des réactions qu'elles catalysent.

Dans le cadre notre étude nous nous sommes focalisés sur l'inhibition de deux enzymes principales, l' $\alpha$ -glucosidase et la phosphatase alcaline deux enzymes impliquées dans le diabète.

#### III.5.2.1. Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase a été évaluée avec l'aide du Dr Seyda Abida Ejaz par la méthode utilisée au Laboratoire de Biologie moléculaire du *Centre for Advanced Drug Research (CADR)*, au *COMSATS Institute of Technology Information (CIIT)*, désormais *COMSATS University Islamabad, Abbottabad Campus*, Pakistan. Cette méthode spectrophotométrique rapportée par Kazmi et al. (2017) utilise le *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG) comme substrat et l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase provenant de *Saccharomyces cerevisiae*, une levure de pâtisserie.

Le test a débuté par une incubation préliminaire à 37°C d'une solution constituée d'un mélange de 70 µL de tampon phosphate (70 mM, pH 6,8), 10 µL d'échantillon et 10 µL de la solution d'enzyme (2,5 U.mL<sup>-1</sup>). Après 5 à 10 min de pré-incubation, la réaction était initiée par l'ajout de 10 µL de *p*-NPG (10 mM) dans chaque puit de la microplaque et cette dernière était encore incubée à 37°C pour 20 min supplémentaires. Après ce temps, la réaction était stoppée par l'ajout de 80 µL d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,2 M). La capacité des échantillons à inhiber l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase a été déterminée en mesurant à la longueur d'onde de 405 nm, grâce à un lecteur de microplaque FluoStar Omega (BMG LabTechnologies, Germany), la quantité de *p*-nitrophénol produit. L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase de chaque échantillon a d'abord été exprimée en pourcentage d'inhibition calculée par la formule ci-dessous :

$$\text{P.I.} = 100 - \frac{A_{\text{puit test}}}{A_0} \times 100$$

$A_{\text{puit test}}$  : Absorbance du puits testé

$A_0$  : Absorbance du contrôle négatif

Pour les échantillons actifs (P.I.  $\geq$  50%), les CI<sub>50</sub> ont été obtenues à la suite d'une dilution en série de huit concentrations différentes d'un facteur de 3. Les CI<sub>50</sub> ont été déterminées à l'aide du logiciel GraphPad PRISM version 5.01 (San Diego, CA, USA). Tous les échantillons ont été dissous dans du DMSO 10 % et testés trois fois à des concentrations mères de 1 mM pour les composés purs, et 1 mg.mL<sup>-1</sup> pour les extraits. Les solutions d' $\alpha$ -glucosidase et de *p*-NPG ont été préparées dans le tampon phosphate (70 mM, pH 6,8). L'Acarbose a été utilisé comme témoin positif tandis que le DMSO 10% a été utilisé comme témoin négatif.

### III.5.2.2. Mise en évidence de l'activité inhibitrice de la phosphatase alcaline

L'activité inhibitrice de la phosphatase alcaline (PA) par nos échantillons a été évaluée sur deux isoenzymes, la PA intestinale (IAP pour *Intestinal Alkaline Phosphatase*) et la PA non-tissu spécifique (TNAP, *Tissue Non Specific Alkaline Phosphatase*). Lorsque actives, les isoenzymes de la PA sont luminescentes en solution ce qui offre une possibilité d'évaluer la capacité de certains échantillons à les inhiber par atténuation de cette luminescence. Ainsi, l'équipe du Pr Jamshed Iqbal dans son Laboratoire de Biologie moléculaire du CADR-CIIT (Pakistan), a réussi à mettre au point une méthode de luminescence efficace et spécifiquement optimisée (en fonction des isoenzymes) permettant l'évaluation de l'inhibition de ces enzymes par des composés d'intérêts. Cette méthode utilise le CDP-star comme substrat pour la détermination de l'activité inhibitrice par les composés de la *h*-TNAP (*human Tissue-Non specific Alkaline Phosphatase*) et la *h*-IAP (*human Intestinal Alkaline Phosphatase*).

En effet, tel que précédemment décrit par Ejaz et *al.* (2017) un criblage préliminaire a été effectué sur tous les composés testés à la concentration de 0,1 mM. Une solution tampon constituée de diéthanolamine (DEA, 8 M), du MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM) et du ZnCl<sub>2</sub> (0,05 mM) à un pH de 9,8 a été utilisée. Le test a débuté par une pré-incubation pendant 3 à 5 min à 37°C, d'un mélange constitué de 10 µL d'échantillon et 20 µL de la solution d'enzyme *h*-TNAP (0,8 U.mL<sup>-1</sup>) ou *h*-IAP (1 U.mL<sup>-1</sup>) préparée dans le tampon DEA. Après incubation, la luminescence a été mesurée comme pré-lecture à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioTek FL x 800 Instruments, Inc., USA) puis 20 µL de CDP-star (110 µM) ont été ajoutés au mélange pour initier la réaction et le mélange a encore été incubé pendant 15 à 20 min (en fonction de l'isoenzyme) à 37°C. A la fin de l'incubation, le changement de luminescence a été remesuré. Le pourcentage d'inhibition de chaque isoenzyme par chacun des composés testés contre le témoin négatif a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$P.I. = 100 - \frac{Lum_{\text{puit test}}}{Lum_0} \times 100$$

Lum<sub>puit test</sub> : Absorbance du puits testé

Lum<sub>0</sub> : Absorbance du contrôle négatif

Le Levamisole (2 mM/puit) et le L-phénylalanine (4 mM/puit) ont respectivement été utilisés comme témoin positif pour l'inhibition de *h*-TNAP et *h*-IAP. De même que pour les activités précédentes, les composés ayant montré un P.I. ≥ 50% ont vu leur CI<sub>50</sub> déterminées en effectuant des dilutions en série (de même facteur) de 6-8 concentrations.

### III.5.3. Tests antimicrobiens

#### II.5.3.1. Préparation des substances à tester

Les composés isolés et les antibiotiques de référence ont été dissouts d'abord dans du DMSO, puis le volume a été complété avec le milieu de culture de manière à avoir une quantité de DMSO ≤ 10% dans la solution stock. Les composés à tester ont été préparés à une concentration de 6144 µg.mL<sup>-1</sup> alors que l'antibiotique était préparé à 512 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### III.5.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne *in vitro*

##### II.5.3.2.1. Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été préparées en prélevant d'une culture bactérienne de 18 heures (à 37°C) des colonies qui ont été diluées dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à obtention d'une turbidité correspondant au point 0,5 de l'échelle de Mc Farland. La suspension a ensuite été diluée 100 fois avec le milieu de culture pour avoir une concentration de 1,5 x 10<sup>6</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> (Jang-Gi et *al.*, 2009).



**Tableau III.12** : Réalisation de l'échelle de McFarland (CLSI, 2015)

| Echelle de Mc Farland   | 0     | 0,5  | 1    | 2    | 3    | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     |
|---|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1% BaCl <sub>2</sub> (mL)   | 0,00  | 0,05 | 0,10 | 0,20 | 0,30 | 0,40  | 0,50  | 0,60  | 0,70  | 0,80  | 0,90  |
| 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)                              | 0,00  | 9,95 | 9,90 | 9,80 | 9,70 | 9,60  | 9,50  | 9,40  | 9,30  | 9,20  | 9,10  |
| Eau distillée (mL)  | 10,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| Concentration approximative des cellules (X 10 <sup>8</sup> CFU/mL) | 0,00  | 1,5  | 3,00 | 6,00 | 9,00 | 12,00 | 15,00 | 18,00 | 21,00 | 24,00 | 27,00 |
| DO  | 0,00  | 0,13 | 0,20 | 0,33 | 0,49 | 0,64  | 0,66  | 0,72  | 0,94  | 0,101 | 0,118 |

### II.5.3.2.2. Détermination des CMI et CMB

Les CMI ont été déterminées par la méthode de microdilution en milieu liquide telle que décrite par Mativendlela et *al.* (2006) avec quelques modifications. En effet, dans des microplaques de 96 puits, 100 µL de bouillon de Mueller Hinton Broth (MHB) a été introduit dans chaque puits. Ces puits ont ensuite été supplémentés par les solutions de composés de façon à obtenir une série de concentrations allant de 128 à 1 µg.mL<sup>-1</sup> pour le produit et de 1,5 à 0,3 µg.mL<sup>-1</sup> pour l'antibiotique de référence Ciproflaxine (selon une progression géométrique de raison 2). Finalement, 100 µL d'inoculum à une densité de 1,5 x 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> ont été introduits dans chaque puits. Des puits témoins négatifs contenant uniquement le bouillon et le DMSO à 10% et ceux contenant l'inoculum sans produit. Les microplaques ont ensuite été soigneusement recouvertes et incubées à 37°C. Après 24 h d'incubation, 40 µL d'une solution de MTT 2% (*3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-bromide tetrazolium*), ont été ajoutés dans l'un des puits de chaque concentration puis incubé à nouveau pendant 30 minutes à 37°C. Le MTT est instantanément métabolisé par les bactéries viables en un dérivé formazan bleu. Après incubation toutes les concentrations ayant empêché l'apparition de la couleur bleue ont été considérées comme des concentrations inhibitrices et la plus petite a été notée comme la CMI.

Pour la détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), 150 µL de MHB ont préalablement été introduits dans de nouvelles plaques puis 50 µL du contenu de chaque puits ayant présenté une inhibition de la croissance bactérienne y ont été ajoutés et l'ensemble a été incubé à 37°C pendant 48 h. La révélation de l'activité bactérienne a par la suite été faite en introduisant 40 µL de MTT pour observer la coloration bleue. La plus petite concentration ayant inhibé la croissance bactérienne était la CMB.

### III.5.3.3. Evaluation de l'activité antifongique *in vitro*

#### III.5.3.3.1. Préparation des inocula microbiens

Les inocula ont été préparés à partir des colonies de culture de levures âgées de 48 h et d'une solution de NaCl 0,9% stérile. Une concentration de suspension de 1,5 x 10<sup>6</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> a été obtenue en comparant sa turbidité à celle de l'échelle 0,5 de Mc Farland. Des dilutions



successives de cette préparation à l'aide du milieu de culture (le bouillon de Sabouraud Dextrose (SDB)), ont permis d'avoir un inoculum de  $2 \times 10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup>, utilisé pour les tests.

### III.5.3.3.2. Détermination des CMI et CMF

La méthode de micro-dilution en milieu liquide a également été utilisée à cet effet mais cette fois selon le protocole décrit par la *National committee for Clinical Laboratory Standard* (2002). 100 µL du SDB ont été introduits dans les puits d'une microplaque de 96 puits, 100 µL des solutions mères des composés à tester ont ensuite été introduites dans les premiers puits de chaque colonne et des dilutions successives en série de facteur 2 ont été faites dans les autres puits en maintenant le volume à 100 µL. Un volume de 100 µL d'inoculum a été de nouveau introduit dans chaque puits. Les plaques contenant 200 µL de solution finale par puits, ont été incubées à 35°C pendant 48 heures. Pour chaque substance, 3 répétitions ont été réalisées. Les témoins positifs étaient réalisés dans des puits contenant le milieu de culture, le mélange milieu de culture et MeOH (1:1, v/v) et le microorganisme. Les témoins négatifs étaient constitués de milieu de culture et de DMSO. Après la durée d'incubation appropriée, la croissance fongique a été révélée en observant la turbidité au fond des puits et en la comparant à celle des témoins négatifs. Les CMIs étaient définies comme étant les plus petites concentrations de composés pour lesquelles nous n'avons pas eu de croissance visible à l'œil nu (absence de turbidité).

Les concentrations minimales fongicides (CMF) ont été obtenues en repiquant sur milieu liquide (chaque puits de la plaque de 96 puits contenant 150 µL de milieu de culture), 50 µL du contenu des puits qui n'ont pas présenté de croissance. Les plus petites concentrations qui ont induit une absence de turbidité au fond des puits après incubation étaient les CMFs.

### III.5.5. Traitement de données et analyses statistiques

Les spectres RMN 1 & 2D ont été traités grâce au logiciel MestRenova 6.0.2., tandis que les structures ont été dessinées grâce au logiciel Chemdraw Ultra 12.0.2. Le logiciel GraphPad Prism 6.01 a été utilisé pour l'analyse des variances de certaines données obtenues et la différence entre les moyennes a été déterminée par le test de comparaison multiple de Newman-Keuls.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abubakar M. S., Musa A.M., Ahmed A. and Hussaini I. M. The perception and practice of traditional medicine in the treatment of cancers and inflammations by the Hausa and *Fulani* tribes of Northern Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, **111**: 625–629.
- Adebayo J. O. and Krettli A.U. Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, **133**: 289-302.
- Adebowale K. O., Nwokocha L. M., and Agbaje W. B. Composition of *Cissus populnea* stem. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2013**, **30**: 41-46.
- Adesanya S. A., Nia R., Martin M.-T., Boukamcha N., Montagnac A., and Mary Païs M. Stilbene Derivatives from *Cissus quadrangularis*. *Journal of Natural Products*, **1999**, **62**: 1694-1695.
- Affes L., Mnif F., Cheikhrouhou N., Hadjkacem F, Charfi N., et al. P612 Infections urinaires et diabète : à propos de 100 cas. *Annales d'Endocrinologie*, **2016**, **77**: 498–528.
- Ahmadu A. A., Onanuga A. and Aquino R. Flavonoid glycosides from the leaves of *Cissus ibuensis* HOOK (Vitaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **2010**, **7** (3): 225 – 230.
- Ahmed I., and Goldstein B. Diabetes mellitus. *Clinics in Dermatology*, **2006**, **24**: 237-246.
- Ahmed R. N., Sani A. and Igunnugbemi O. O. Antifungal profiles of extracts of *Vitellaria paradoxa* (Shea-Butter) Bark. *Ethnobotanical Leaflets*, **2009**, **13**: 679-688.
- Akomolafe S. F., Oboh G., Akindahunsi A. A., Akinyemi A. J. and Tade O. G. Inhibitory effect of aqueous extract of stem bark of *Cissus populnea* on ferrous sulphate- and sodium nitroprusside-induced oxidative stress in rat's testes *in vitro*. *International Scholarly Research Notices: Pharmacology*, **2013**: 130989.
- Aliaga C. and Lissi A. E. Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Canadian Journal of Chemistry*, **2004**, **82**: 1668-1673.
- Almahy H. A. and Alhassan N. I. Studies on the Chemical constituents of the leaves of *Ficus bengalensis* and their Antimicrobial Activity. *Journal of Science and Technology*, **2011**, **13**: 118-124.
- Al-Saïd M. S., Khalifa A. S., and Al-Azizi M. M. Flavonoids from *Cissus digitata*. *International Journal of Pharmacognosy*, **1991**, **29**: 281-283.
- Andrade-Cetto A., Becerra-Jiménez J., and Cardenas-Vázquez, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, **116**: 27–32.
- Andrews J. M. The development of the BSAC standardization method of disc diffusion testing. JAC. Ed: *British society for antimicrobial Chemotherapy*, **2001**, **48**: 29-42.
- Anyanwu G.O., Iqbal J., Khan S.U., Zaib S., Rauf K., Onyeneke C. E., Ojo O. O., Nisar-Ur-Rahman. Antidiabetic activities of chloroform fraction of *Anthocleista vogelii* Planch root bark in rats with diet- and alloxan -induced obesity-diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **2019**: **229**: 293-302.
- Arbonnier M. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. 2<sup>e</sup> Ed. CIRAD – UICN, **2002**.

- Arbonnier M. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Editions Quae/MNHN, France, **2009**.
- Atawodi S. E., Ameh D. A., Ibrahim S. Indigenous knowledge system for treatment of trypanosomiasis in Kaduna state of Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, **79**: 279-282.
- Awede B., Houetchegnon P., Djego J.G., Djrolo F., Gbenou J., and Laleye A. Effects of *Lophira lanceolata* and of Three Species of *Gardenia* Leaves Aqueous Extracts on Blood Glucose and Lipids in Wistar Rat. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*, **2015**, **5**: 757-765.
- Aye M., and Masson E. A. Dermatological care of the diabetic foot. *American Journal of Clinical Dermatology*, **2002**, **3**: 463-474.
- Babalola I. T., and Shode F. O. Ubiquitous Ursolic acid: a potential pentacyclic triterpene natural product. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2013**, **2**: 214-222.
- Bahia M. V., Davi J. M., Rezende L. C., Guedes M. L. S., and David J. P. A C-glucoside benzoic acid derivative from the leaves of *Peltophorum dubium*. *Phytochemistry Letters*, **2010**, **3**: 168-170.
- Bailey, C. J., and Day, C. Metformin: its botanical background. *Practical diabetes*, **2004**, **21**: 115-117.
- Baizri H., Bouchrik M., Boufaress F., Qacif H., Sekkach Y., et al. P133 Candidoses buccales chez le diabétique de type 2 (étude prospective à propos de 150 patients). *Diabetes & Metabolism*, **2008**, **34**: H80.
- Barquissau V. et Morio B. Physiopathologie de l'insulinorésistance dans le muscle squelettique et implication des fonctions mitochondriales. *Nutrition clinique et métabolisme*, **2011**, **25**: 114-130.
- Battineni J. K., Koneti P. K., Bakshi V., Boggula N. Triterpenoids: A review. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2018, **3** : 91-96.
- Beltrame F. L., Pessini G. L., Doro D. L., Filho B. P. D., Bazotte R. B., and Cortez D. A. G. Evaluation of the Antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **2002**, **45**: 21 - 25.
- Benabdelaziz I. Etude chimique des espèces *Helianthemum sessiliflorum* et *Euphorbia pterococca*. Thèse de Doctorat en Sciences, Spécialité Chimie Organique. Université HADJ LAKHDAR-BATNA-Algérie, **2015**.
- Bhutani K. K., Kapoor R., and Atal C. K. Two unsymmetric tetracyclic triterpenoids from *Cissus quadrangularis*. *Phytochemistry*, **1984**, **23**: 407-410.
- Bonnefont-Rousselot D., Beaudoux J.-L., Thérond P., Peynet J., Legrand A., et Delattre J. Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales Pharmaceutiques. Françaises*, **2004**, **62** : 147-157.
- Botineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Edts Lavoisier, Cachan, **2010**.
- Bowman S. M. and Free S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, **2006**, **28**: 799-808.
- Boyer F. Stress oxydant et pathologie diabétique : Impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses. Thèse de Doctorat/Ph.D. en Biochimie, Université de la Réunion, **2016**.

- Brown G. D. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Report*, **1998**, **15**: 653-696.
- Chabot S., Bel-Rhlied R., Chenevert R. and Piche Y. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions. *New Phytology*, **1992**, **122**: 461-467.
- Chang C.-W., Chang W.-T., Liao J.-C., Chiu Y.-J., Hsieh M.-T., et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Cissus repens* in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, **2012**: 1-10. doi:10.1155/2012/135379
- Chaudhari R. L., Patil P. S., Chaudhari R. Y., and Bhargale J. O. Antihyperglycaemic activity of ethanolic extract of *Cissus quadrangularis* (L.) Leaves in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2013**, **3**: 073-077.
- Chen M., Han G., Dietrich C. R., Dunn T. M. and Cahoon E. B. The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell*, **2006**, **18**: 3576-3593.
- Chen M., Markham J. E., Dietrich C. R., Jaworski J. G. and Cahoon E. B. Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2008**, **20**: 1862-1878.
- Chen Q. C., Zhang W. Y., Youn U., Kim H., Lee I., Jung H. J., Na M., Min B. S., Bae K. Iridoid glycosides from *Gardeniae fructus* for treatment of ankle sprain. *Phytochemistry*, **2009**, **70**: 779-784.
- Cheng H.-H., Wang H.-K., Ito J., Bastow K. F., Tachibana Y., Nakanishi Y., Xu Z., Tsui-Yun Luo T.-Y., Lee K.-H. Cytotoxic pheophorbide-related compounds from *Clerodendrum calamitosum* and *C. cyrtophyllum*. *Journal of Natural Products*, **2001**, **64**: 915-919.
- Chi C. Y., Wang F., Lei T., Xu S. Y., Hong A. H., et al. Studies on the chemical constituents from *Cissus pteroclada*. *Chinese Medicinal Materials*, **2010**, **33**: 1566-1568.
- Chipiti T., Ibrahim M. A., Neil Anthony Koorbanally N. A., and Islam Md. S. *In vitro* antioxidant activity and GC-MS analysis of the ethanol and aqueous extracts of *Cissus cornifolia* (Baker) splanh (Vitaceae) parts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, **2015**, **72**: 119-127.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10 (ISBN 1-56238-987-4 [Print]; ISBN 1-56238-988-2 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, **2015**.
- Couaillet L. Le stress oxydant au cours du DT2. Application à la détermination de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane chez le patient diabétique. Thèse de doctorat d'Etat en Pharmacie, Université de Rouen, **2015**.
- Da Silva P. C. A., Leal A. D. S., Dos Santos A. M. C., Da Costa C. A. S., and Boaventura G. T. The intake effects of *Cyssus sicyoides* drink on body mass, glycemia and femur parameters in male rats. *Nutrición Hospitalaria*, **2013**, **28**: 1757-1759.

- Da Silva S. L., De Oliveira V. G., Yano T., Nunomura R. C. S. Antimicrobial activity of Bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. *Acta amazonica*, **2009**, **39**: 187–192.
- Dabole B. Etude phytochimique et activités biologiques des substances naturelles isolées de *Cordia platythyrsa* et de la Propolis de Meiganga (Région de L'Adamaoua-Cameroun). Thèse de Doctorat/Ph.D en Chimie Organique, Université de Yaoundé I-Cameroun, **2013**.
- Daferera D. J., Ziogas B. N. and Polissiou M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, **2003**, **22**: 39-44.
- Daru J. and Stirling A. Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. *The Journal of Organic Chemistry*, **2011**, **76**: 8749-8755.
- De Alvarenga E. S., Carneiro V. M. T., Silvério F. O., Saliba W. A. A high yield synthesis of 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene-D-mannitol. *Journal of Chilean Chemical Society*, **2006**, **51**: 986-988.
- Dietrich C., Han G., Chen M., Berg R. H., Dunn T. M., and Cahoon E. B. Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant Journal*, **2008**, **54**: 284-98.
- Djoukeng J. D., Abou-Mansour E., Tabacchi R., Tapondjou A. L., Bouda H. and Lontsi D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, **101**: 283-286.
- El-shiekh R. A., Al-Mahdy D. A., Hifnawy M. S., Tzanova T., Evain-Bana E., Philippot S., Bagrel D., and Abdelsattar E. A. Chemical and biological investigation of *Ochrosia elliptica* Labill. cultivated in Egypt. *Records of Natural Products*, **2017**, **11**: 552-557.
- Eyong K. O., Foyet H. S., Baïrysa G., Folefoc G. N., Asongalem E. A., Lagojda A., and Lamshöft M. A new ursane triterpenoid acid and other potential anti-inflammatory and anti-arthritic constituents from EtOAc extracts of *Vitellaria paradoxa* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*, **2015**, **174**: 277-286.
- Fathy M. S., Afaf H. S., Amal E. K., and Shahera M. E. An acylated kaempferol glycoside from flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. dulce*. *Molecules*, **2002**, **7**: 245-251.
- Favier A. Le stress oxydant. *Actualité Chimique*, **2003**, **2003**: 108-15.
- FID. Atlas du Diabète de la Fédération International du Diabète. 8<sup>e</sup> Edition, Bruxelles, Belgique. **2017**.
- Foyet H. S., Asongalem A. E., Oben E. K., Cioanca O., Hancianu M. and Hritcu L. Effects of the methanolic extract of *Vitellaria paradoxa* stem bark against scopolamine-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in the rat hippocampus. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **2016**, **36** (7) : 1139-1149.
- Frémont L. Biological effects of Resveratrol. *Life Sciences*, **2000**, **66**: 663-673.
- Garba S. and Salihu L. Antibacterial activities of 2-*O*-butyl-1-*O*-(2'-ethylheyl) benzene-1,8-dicarboxylate and 1-phenyl-1,4-pentanedione isolated from *Vitellaria paradoxa* root bark. *Asian Journal of Scientific Research*, **2011**, **4**: 149-157.

- Geidam M. A., Adoga G. I., and Sanda F. A. Effects of aqueous stem bark extract of *Cissus populnea* on some serum enzymes in normal and alloxan induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **2004**, **7**: 1427-1429.
- Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., and Georgakis S A. Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, **2007**, **76**: 172-181.
- Govaerts R., Frodin D. and Pennington T. World checklist and bibliography of Sapotaceae. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, Londres, GB. **2001**.
- Guillausseau P.-J., Meas T., Virally M., Laloi-Michelin M., Ambonville C., and Kevorkian, J. P. Insulinosécrétion et diabète de type 2. *Médecine et Maladies Métaboliques*, **2008**, **1**: s21-s24.
- Gupta M. M., and Verma R. K. Lipid constituents of *Cissus quadrangularis*. *Phytochemistry*, **1991**, **30**: 875-878.
- Gupta M. M., and Verma R. K. Unsymmetric Tetracyclic from *Cissus quadrangularis*. *Phytochemistry*, **1990**, **29**: 336-340.
- Guo X. Y., Wang N. L., Bo L., Li Y. H., Xu Q. and Yao X. S. Chemical constituents from *Pithecellobium clypearia* and their effects on T-lymphocytes proliferation. *Journal of Physics and Chemistry of Solid*, **2007**, **16**: 208-213.
- Haarhaus M., Brandenburg V., Kalantar-Zadeh K., Stenvinkel P., and Magnusson P. Alkaline phosphatase: A novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. *Nature Review*, **2017**, **13**: 429-442.
- Hagiwara S., Takahashi M., Shen Y., Kaihou S., Tomiyama T., Yazawa M., Tamai Y., Sin Y., Kazusaka A., Terazawa M. A phytochemical in the edible Tamogi-take Mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-Mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **2005**, **69**: 1603-1605.
- Haralampidis K., Trojanowska M. and Osbourn A. E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, **2002**, **75**: 31-49.
- Harborne J. B. *Phytochemical methods*. 3<sup>rd</sup> edition. Chapman and Hall Ltd. London; **1973**.
- Harborne J. B. and Williams C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **2000**, **55**: 481-504.
- Hashmi M. A., Shah H. S., Khan A., Farooq U., J. Iqbal, et al. Anticancer and alkaline phosphatase inhibitory effects of compounds isolated from the leaves of *Olea ferruginea* Royle. *Records of Natural Products*, **2015**, **9** (1): 164-168.
- Hee S. N. Quality Characteristics of West African shea butter (*Vitellaria paradoxa*) and approaches to extend shelf-life. PhD thesis, University of New Jersey, **2011**.
- Helaja J. Structural analysis of natural chlorin derivatives utilizing NMR spectroscopy and molecular modelling. Academic dissertation in Organic Chemistry, University of Helsinki, **2000**.
- Hennebelle T., Sahpaz T., Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **2004**, **1**: 3-6.



- Holt R. I. G., Cockram C., Flyvbjerg A., Goldstein B. J. Textbook of Diabetes, 4<sup>th</sup> Edition, Wiley-Blackwell, **2011**.
- Hu H.-j., Wang K.-w., Wu B., Sun C.-r., and Pan Y.-j. Chemical shift assignments of two oleanane triterpenes from *Euonymus hederaceus*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, **2005**, **6B**: 719-721.
- Hua H. M., and Pei Y. H. A survey of the study on cerebrosides. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, **2001**, **18**: 299-306.
- Jainu M., and Devi C. S. S. Potent antiulcerogenic activity of methanol extract of *Cissus quadrangularis* by antioxidative mechanism. *Journal of Clinical Biochemical Nutrition.*, **2003**, **34**: 43-47.
- Jang-Gi C., Ok-Hwa K., Young-Seob L., Hee-Sung C., You-Chang O., Obiang-Obounou B., Min-San K., Dong-Hwan S., Hun-Soo K., Hyun P., Dong-Won S., Jung-Rae R., and Dong-Yeul K. *In Vitro* and *in vivo* antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**, **2011**: 1-7.
- Jayaprakash T., Koduri S., Krishnan S. A., Venkatesh K., and Ali F. Anti-Inflammatory Activity of ethanolic extract of *Cissus Pallida* in acute and sub-acute models. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, **2013**, **5**: 74-78.
- Jimoh A., Tanko Y., and Mohammed A. Anti-diabetic effect of methanolic leaf extract of *Cissus cornifolia* on alloxan-induced hyperglycemic in wistar rats. *Annals of Biological Research*, **2013**, **4**: 46-54.
- Jiofack T., Ayissi L., Fokunang C., Guedje N., and Kemeuze V. Ethnobotany and phytomedicine of the upper Nyong valley forest in Cameroon. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2009**, **3**: 144–150.
- Kamarulzaman F. A, Shaari K., Ho A. S., Lajis N. H., Teo S. H., and Lee H. B. Derivatives of pheophorbide-A and pheophorbide-b from photocytotoxic *Piper penangense* extract. *Chemistry and Biodiversity*, **2011**, **8**: 494-502.
- Kang S. S., Kim J. S., Son K. H., Kim H. P. and Chang H. W. Cyclooxygenase-2 inhibitory cerebrosides from *Phytolacca Radix*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2001**, **49**: 321-323.
- Karou S. D., Tchacondo T., Tchibozo M. A. D., Abdoul-Rahaman S., Anani K., Koudouvo K., Batawila K., Agbonon A., Simpore J., and De Souza C. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus and hypertension in the Central Region of Togo. *Pharmaceutical Biology*, **2011**, **49**: 1286–1297.
- Kashima Y., Yamaki H., Suzuki T. and Miyazawa M. Structure-activity relationships of bergenin derivatives effect on  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2013**, **28**: 1162-1170.
- Kato A., Minoshima Y., Yamamoto J., Adachi I., Watson A. A., et al. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2008**, **56**: 8206–8211.



- Khan A. R., Awan F. R., Najam S. S., Is lam M. Siddique T. Zain M. Elevated serum level of human alkaline phosphatase in obesity. *Journal of the Pakistan Medical Association*, **2015**, **65**: 1182–1185.
- Khan H., Amin H., Ullah A., Saba S., Rafique J., Khan K., Ahmad N., and Badshah S. L. Antioxidant and antiplasmodial activities of Bergenin and 11-*O*-Galloylbergenin isolated from *Mallotus philippensis*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**: 1-6.
- Khan I., Shah S., Ejaz S., Ibrar A., Hameed S., Lecka J., Millán J. L., Sévigny J. and Iqbal J. Investigation of quinoline-4-carboxylic acid as a highly potent scaffold for the development of alkaline phosphatase inhibitors: Synthesis, SAR analysis and molecular modelling studies. *RSC Advance*, **2015**, **5**: 64404-64413.
- Kim H. M., Ahn M.-J., and Lee S. Isolation and identification of phytochemical constituents from *Scrophularia takesimensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2012**, **6**: 3923-3930.
- Kim H.-S., Lim H.-K., Chung M.-W. and Kim Y. C. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, **69**: 79-83.
- Kinuthia E. W. Screening for antimicrobial compounds in *Gardenia volkensii* and *Meyna tetraphylla* (Rubiaceae). Master of Science degree thesis in Chemistry, Egerton University, **2009**.
- Koné W. M., Atindehou K. K., Terreaux C., Hostettmann K., Traoré D. and Dosso M. Traditional medicine in North Côte d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, **93**: 43–49.
- Kosanić M., Ranković B. and Stanojković T. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **2012**, **92**: 1909-1916.
- Kouame K. F.-P. Valorisation de quatre plantes médicinales ivoiriennes : étude phytochimique. Thèse de Doctorat de Chimie Organique, Université de Nantes-Université de Cocody-Abidjan, **2012**.
- Kuete V. Potential of Cameroonian plants and derived-products against microbial infections: a review. *Planta Medica*, **2010**, **76**: 1-13.
- Kuete V., Penlap B. V., Etoa F.-X., Modjo S. L., Bogne P., Assob J. C., and Lontsi D. Activités antimicrobiennes de l'extrait total et des fractions de jus de fruit de *Citrus medica* Lin. (Rutaceae). *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, **2004**, **13**: 91-101.
- Labiou R. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta*: activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de Doctorat de Biochimie appliquée, Université Badji Mokhtar-Annaba, **2016**.
- Lee J.-H., Lee D.-U. and Jeong C.-S. *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **2009**, **47**: 1127-1131.
- Lee S. R., Jung K., Noh H. J., Park Y. J., Lee H. L., Lee K. R., Kang K. S., and Kim K. H. A new cerebroside from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* and its applicability to cancer treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2015**, **25**: 5712-5715.

- Lee T. H., Jung M., Bang M.-H., Chung D. K. and Kim J., Inhibitory effects of a spinasterol glycoside on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via down-regulating MAP kinase pathways and NF- $\kappa$ B activation in RAW264.7 macrophage cells. *International Immunopharmacology*, **2012**, **13**: 264-270.
- Lee T. H., Lee S. M., Lee D.-Y., Son Y., Chung D. K., Baek N. I., and Kim J. A glycosidic spinasterol from *Koreana stewartia* promotes procollagen production and inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in UVB-irradiated human dermal fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2011**, **34**: 768-773.
- Leopoldini M. P. I. P., Russo N. and Toscano M. Structure, conformation, and electronic properties of Apigenin, Luteolin, and Taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. *Journal of Physical Chemistry A*, **2004**, **108**: 92-96.
- Lhuillier A. Contribution à l'étude de quatre plantes malgaches: *Agaurias alicifolia* Hook. ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse, Paris (France), **2007**.
- Liang J., Li Y., Liu X., Huang Y., Shen Y., Wang J., Liu Z., and Zhao Y. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of bergenin. *Biomedical Reports*, **2013**, **2**: 260-264.
- Li-Fern H. and Rajasoorya C. The elevated serum alkaline phosphatase-the chase that led to two endocrinopathies and one possible unifying diagnosis. *European Journal of Endocrinology*, **1999**, **140**: 143-147.
- Lin C.-F., Hwang T.-L., Lin S.-Y. and Huang Y.-L. Bioactive isocoumarins from *Cissus pteroclada*. *Journal of Chinese Medicine*, **2012**, **23**: 41-49.
- Lindberg B. Low-molecular carbohydrates in algae. *Acta Chemica Scandinavica*, **1953**: 1119-1122.
- Liu J., Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, **1995**, **49**: 57-68.
- Lunga P. K., Qin X.-J., Yang X. W., Kuate J. R., Du Z. Z. and Gatsing D. Antimicrobial steroidal saponin and oleanane-type triterpenoid saponins from *Paullinia pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2014**, **14**: 1-7.
- Mahato S. B. and Kundu A. P.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **1994**, **37**: 1517-1575.
- Malo M. S. A high level of intestinal alkaline phosphatase is protective against type 2 diabetes mellitus irrespective of obesity. *EBioMedicine*, **2015**, **2** (12): 2016-2023.
- Manna P., Das J., Ghosh J. and Sil P. C. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IkBa/NF-kB, MAPKs, and mitochondria-dependent prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, **2010**, **48**: 1465-1484.
- Manojlović N., Ranković B., Kosanić M., Vasiljević P., and Stanojković T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, **2012**, **19**: 1166-1172.

- Mapongmetsem P.M., Kapchie, V. N. and Tefempa B. H. Diversity of local fruit trees and their contribution in sustaining the rural livelihood in the Northern Cameroon. *Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management*, **2012**, **5**: 32-46.
- Markham K. R., and Geiger H. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: Harborne J. B., editor. The flavonoids: advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, **1994**.
- Massion P, Preiser J. C., et Balligand J. L. Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères ? *Nutrition clinique et Métabolisme*, **2002**, **16**: 248-252.
- Mate G. S., Naikwade N. S., Magdum C. S., Chowki A. A. and Patil S. B. Evaluation of anti-nociceptive activity of *Cissus quadrangularis* on albino mice. *International Journal of Green Pharmacy*, **2009**: 118-121.
- Mativindlela S. P. N., Lall N., Meyer J. J. M. Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of (the roots of) *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts. *South African Journal of Botany*, **2006**, **72**: 232-237.
- Mc Anlis G. T., Mc Eneny J., Pearce J. and Young I. S. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, **1999**, **53**: 92-96.
- Merrill A. and Sandhoff K. Sphingolipids: metabolism and cell signaling. In Vance DE, Vance JE (eds.) Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. (4<sup>th</sup> Edn), Elsevier Sci. BV, **2002**: 373-407.
- Millán J. L. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal.*, **2006**, **2**(2): 335-341.
- Mohanambal E., Shobana K., Sowmya S. M., Kusuma G. M., Satish K., et al. Isolation of alcoholic extract of *Cissus quadrangularis* and evaluation of *in vitro* anthelmintic activity. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, **2011**, **1**: 6-9.
- Monnier L., and Thuan J.-F. Type 1 diabetes of the child and the adult. Type 2 diabetes of the adult. Complications of diabetes. *La Revue du Praticien*, **2007**; **57**: 653-64.
- Moody J. O., Ojo O. O., Omotade O. O., Adeyamo A. A., Olumuse P. E., and Ogundipe O. O. Anti-sickling potential of a Nigeria herbal formula (Ajawaron HF) and the major plant compound (*Cissus populnea* L. CPK). *Phytotherapy Research*, **2003**, **17**: 1173-1176.
- Morocho V., Valle A., García J., Gilardoni G., Cartuche L. and Suárez A. I.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition and antibacterial activity of secondary metabolites from the Ecuadorian species *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts. *Molecules*, **2018**, **23**: 146.
- Mouly A. Systématique de la tribu des Ixoreae A. Gray (Rubiaceae): phylogénie, biogéographie et taxinomie. *Acta Botanica Gallica*, **2008**, **155**: 457-464.
- Mukonyi K. W., and Ndiege I. O. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde: aromatic taste modifying compound from *Mondia whytei* skeels. *Bulletin of Chemical Society of Ethiopia*, **2001**, **15**: 137-141.
- Munir K. M., Chandrasekaran S., Gao F., and Quon M. J. Mechanisms for food polyphenols to ameliorate insulin resistance and endothelial dysfunction: therapeutic implications for diabetes and its

- cardiovascular complications. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **2013**, **15**: E679-86.
- Muralidhar P., Radhika P., Krishna N., Venkata Rao D. and Rao C. B. Sphingolipids from marine organisms: A review. *Natural Product Sciences*, **2003**, **9**: 117-142.
- Nayeem N., SMB A., Salem H., and AHEI-Alfgy S. Gallic acid: a promising lead molecule for drug development. *Journal of Applied Pharmacy*, **2016**, **8**: 213.
- Ndjonka D., Ayouba M., Ahamat A., Djafsia B., and Ndouwe T. M. H. *In vivo* Toxicity Study and Antifilarial Activity of Four Plants from Nord-Cameroon. *European Journal of Medicinal Plants*, **2017**, **19**: 1-12.
- Ndukwe I. G. Amupitan J. O., Zhao Y. and Isah Y. Isolation and characterization of 3,5,6-trihydroxy-7-octyl-5,6-dihydro-1-naphthalene carboxylic acid from the stem methanolic extract of *Vitellaria paradoxa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2007**, **1**: 060-062.
- Nethengwe M. F., Opoku A. R., Dlodla P. V., Madida K. T., Shonhai A., et al., Larvicidal, antipyretic and antiplasmodial activity of some Zulu medicinal plants. *Journal of Medicinal Plant Research*, **2012**, **6**: 1255-1262.
- Ngo Bum E., Ngoupaye G. T., Talla E., Dimo T., Nkanchoua G. C. N., Pelanken M. M., and Taiwe G. S. The anticonvulsant and sedative properties of stems of *Cissus quadrangularis* in mice. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2008**, **2**: 42-47.
- Ngo Bum E., Taiwe G. S., Ngoupaye G. T., Vougat R. R. N., Sakoue V. D., Gwa C., Ayissi E. R., Dong C., Rakotonirina A. and Rakotonirina S.V. Antiepileptic medicinal plants used in traditional medicine to treat Epilepsy *In Clinical and genetic aspects of Epilepsy*. Dr. Zaid Afawi (Ed.), Intech, **2011**.
- Nikiema A. and Umali B. E. “*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.”.-In: Van der Vossen H. A. M. & Mkamilo G. S. (eds.) “Plant resources of tropical Africa 14 : vegetable oils”. - Wageningen : PROTA Foundation ; Leiden : Backhuys ; Wageningen : CTA, **2007**.
- Njinga N. S., Sule M. I., Pateh U. U., Hassan H. S., Usman M. A., Bilkisu A., Danja B. A. and Ache R. N. Phytochemical and antimicrobial activity of stem-bark of *Gardenia aqualla* Stapf and Hutch (Rubiaceae). *Journal of Medicinal Plant Research*, **2014**, **8**: 942-946.
- Nkouam G. B. Conservation des fruits du Karité (*Vitellaria paradoxa* Gaertn.) et de l'aïéle (*Canarium schweinfurtii* Engl.): isothermes de sorption d'eau et extraction des matières grasses des fruits stockés. Thèse de doctorat en Génie des procédés, Université de Ngaoundéré, Cameroun, **2007**.
- Nualkaew S., Padee P. and Talubmook C. Hypoglycemic activity in diabetic rats of stigmaterol and sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated from *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. leaf extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2015**, **9**: 629-635.
- Nuanyai T., Chokpaiboon S., Vilaivan T. and Pudhom K. Cytotoxic 3,4-seco-cycloartane triterpenes from the exudate of *Gardenia tubifera*. *Journal of Natural Products*, **2010**, **73**: 51-54.

- Nuanyai T., Sappapan R., Teerawatananond T., Muangsin N., and Pudhom K. Cytotoxic 3,4-seco-cycloartane triterpenes from *Gardenia sootepensis*. *Journal of Natural Products*, **2009**, **72**: 1161–1164.
- Nyaa L. B. K., Tapondjou L. A., Barboni L., Tamokou J. D. D., Kuiaté J. R., Tane P., and Park H.-J. NMR Assignment and Antimicrobial/Antioxidant Activities of 1 $\beta$ -Hydroxyeuscaphic acid from the Seeds of *Butyrospermum parkii*. *Natural Product Sciences*, **2009**, **15**: 76-82.
- Ochieng C. O., Midiwo O. and Owuor P. O. Anti-plasmodial and larvicidal effects of surface exudates of *Gardenia ternifolia* aerial parts. *Research Journal of Pharmacology*, **2010**, **4**: 45-50.
- Ojekale A. B., Lawal O. A., Jewo P. I., Oguntola J. A., and Latifat O. A. *Cissus populnea* (Guill & Perr): A study of the aqueous extract as potential spermatogenic enhancers in male Wistar Rats. *American Journal of Medical and Biological Research*, **2015**, **3**: 124-127.
- Ojekale A. B., Lawal O. A., Lasisi A. K. and Adeleke T. I. Phytochemistry and spermatogenic potentials of aqueous extract of *Cissus populnea* (Guill. and Perr.) stem bark. *The Scientific World Journal*, **2006**, **6**: 2140-2146.
- Oluranti A. C., Michael U. O., Jane U.-O. C., and Ayembe N.A. Ethnobotanical studies of medicinal plants used in the management of peptic ulcer disease in Sokoto State, North Western Nigeria. *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2012**, **2**: 225-230.
- Omran S., Chadli A., El Aziz S., et Farouqi A. La fasciite nécrosantes et diabète (à propos de 15 cas). *Annales d'Endocrinologie*, **2014**, **75**: 391.
- OMS. Rapport mondial sur le diabète. **2016**.
- Ortiz-Andrade R. R., Garcia-Jiménez S., Castillo-Espana P., Ramirez-Avila G., Villalobos-Molina R., and Estrada-Soto S.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent. *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, **109**: 48–53.
- Osibote E. A. S., Ogunlesi M., Okiei W., Asekun T., and FAMILONI O. B. Assessment of antimicrobial activity of the essential oil from the stem powder of *Cissus populnea* and the leaves of *Sesamum radiatum*, herbal medications for male infertility factor. *Research Journal of Medicinal Plant*, **2010**, **4**: 14-20.
- Ouedraogo A. Etude *in vivo* de l'activité antiplasmodiale de l'extrait hydroalcoolique de *Gardenia Sokotensis* Hutch (Rubiaceae) chez la souris NMRI infestée par *Plasmodium Berghei*. Thèse de doctorat en pharmacie, Faculté des Sciences de la Santé, Université de Ouagadougou, **1998**.
- Park E.-H., Joo M.-H., Kim S.-H. and Lim C.-J. Antiangiogenic activity of *Gardenia jasminoides* fruit. *Phytotherapy Research*, **2003**, **17**, 961–962.
- Park J. and Boo Y. C. Isolation of Resveratrol from *Vitis Viniferae* Caulis and its potent inhibition of human tyrosinase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**: 1-11.
- Parmar V., Sharma S. K., and Poonam. Novel constituents of *Gardenia* species – A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **2000**, **59**: 893-903.
- Pathomwachaiwat T., Ochareon P., Soonthornchareonnon N., Ali Z., Khan I. A., and Prathanturarug S. Alkaline phosphatase activity-guided isolation of active compounds and new dammarane-type



- triterpenes from *Cissus quadrangularis* hexane extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **2015**, 160: 52-60.
- Peng K., Yang L., Zhao S., Chen L., Zhao F. and Qiu F. Chemical constituents from the fruit of *Gardenia jasminoides* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, **23**: 1127-1131.
- Phromnoi K., Reuter S., Sung B., Limtrakul P., and Aggarwal B. B. A Dihydroxy-pentamethoxyflavone from *Gardenia obtusifolia* suppresses proliferation and promotes apoptosis of tumor cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Anticancer Research*, **2010**, **30**: 3599-3610.
- Pickering J. Discover Life. [en ligne]. (mise à jour **2019**) disponible sur : [https://www.discover-life.org/mp/20m?act=make\\_map](https://www.discover-life.org/mp/20m?act=make_map) (consulté le 17/11/2019).
- Poonlaphdecha J. Chemical constituents of *Gardenia campanulata* (Rubiaceae). Master thesis in Organic Chemistry, Mahidol University, **2005**.
- Prajapati D. and Gohain M. Iodine a simple, effective and inexpensive catalyst for the synthesis of substituted coumarins. *Catalysis Letters*, **2007**, **119**: 59-63.
- Proença C., Freitas M., Ribeiro D., Oliveira E. F. T., Sousa J. L. C., Tomé S. M., Ramos M. J., Silva A. M. S., Fernandes P.A., and Fernandes E.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an *in vitro* and *in silico* structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2017**, **32**: 1216–1228.
- Pudhom K., Nuanyai T., Matsubara K. and Vilaivan T. Antiangiogenic activity of 3,4-seco-cycloartane triterpenes from Thai *Gardenia* spp. and their semi-synthetic analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, **22**: 512–517.
- Raccach D. Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*, **2004**, **1**: 29–42.
- Raffaele S., Vailleau F., Leger A., Joubes J., Miersch O., Huard C., Blée E, Mongrand S, Domergue F, Roby D. A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2008**, **20**: 752-767.
- Rahman M. A. A. and Moon S. S. Antioxidant polyphenol glycosides from the plant *Draba nemorosa*. *Bulletin of Korean Chemistry Society*, **2007**, **28**: 827-831.
- Rajbhandari S. M., and Wilson R. M. Unusual infections in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **1998**, **39**: 123–128.
- Rigalleau V., Lang J., et Gin H. Étiologie et physiopathologie du diabète de type 2. *Endocrinologie-Nutrition*, **2007**, 10-366-D-10.
- Ruiz-Vargas J. A., Morales-Ferra D. L., Ramírez-Ávila G., Zamilpa A., Negrete-León E., Acevedo-Fernández J. J., Peña-Rodríguez L. M.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity and *in vivo* antihyperglycemic effect of secondary metabolites from the leaf infusion of *Ocimum campechianum* mill. *Journal of Ethnopharmacology*, **2019**, **243**: 112081.
- Saeidnia S., Manayi A., Gohari A. R. and Mohammad Abdollahi M. The story of Beta-sitosterol- A review. *European Journal of Medicinal Plants*, **2014**, **4**: 590-609.

- Saifah E., Kelley C. J., and Leary J. D. Constituents of the leaves of *Cissus rheifolia*. *Journal of Natural Products*, **1983**, **46**: 353-358.
- Sakava P., Talla E., Chelea M., Tchinda T. A., Zeuko'o M. E., et al. Pentacyclic triterpenes and crude extracts with antimicrobial activity from cameroonian brown propolis samples. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2014**, **4**: 1-9.
- Sandjo L. P. Sphingolipides, Triterpénoïdes et autres métabolites secondaires des variétés sauvage et cultivée de l'espèce *Triumfetta cordifolia* A. Rich. (Tiliaceae) : Transformations chimiques et évaluation des propriétés biologiques de quelques composés isolés. Thèse de Doctorat /Ph.D en Chimie Organique, Université de Yaoundé I- Cameroun, **2009**.
- Sato M. S., Fujiwara H., Tsuchiya T., Fujii T., Linuma M., Tosa H., and Ohkawa Y. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, **1996**, **54**: 171-176.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **1991**, **30**: 3875-3883.
- Schlienger J.-L. Complications du DT2. *La Presse Medicale*, **2013**, **42**: 839-848.
- Seebacher W., Simic N., Weis R., Saf R., and Kunert O. Spectral assignments and reference data : Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2003**, **41**: 636-638.
- Séréme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S., et Nacro M. Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines*, **2008**, **15**: 41-49.
- Sharma U., Pal D. and Prasad R. Alkaline phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **2014**, **29** (3): 269-278.
- Sheliya M. A., Rayhana B., Ali A., Pillai K. K., Aeri V. Sharma M., Mir S. R. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by new prenylated flavonoids from *Euphorbia hirta* L. herb. *Journal of Ethnopharmacology*, **2015**, **176**: 1-8.
- Sheng Z., Dai H., Pan S., Wang H., Hu Y., and Ma W. Isolation and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Musa* spp. (Baxijiao) flowers. *Molecules*, **2014**, **19**: 10563-10573.
- Shu Z. Z., Tao C. and Taylor C. M. *Gardenia* J. Ellis. *Flora of China*, **2011**, **19**: 141-144.
- Shuaibu M. N., Wuyep P. A., Yanagi T., Hirayama K., Tanaka T., and Kouno I. The use of microfluorometric method for activity-guided isolation of antiplasmodial compounds from plant extracts. *Parasitology Research*, **2008**, **102**: 1119-1127.
- Simo T. R., Telefo B. F., Nyemb J. N., Yemele D. M., Njina S. N., Goka S. M. C., Lienou L. L., Kamdje A. H. N., Moundipa P. F., Ahsana Dar Farooq A. D. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **2014**, **7**: S442-S447.
- Singh G., Rawat P., and Maurya R. Constituents of *Cissus quadrangularis*. *Natural Product Research*, **2007**, **21**: 522-528.

- Soladoye M. O., and Chukwuma E. C. Phytochemical analysis of the stem and root of *Cissus populnea* (Vitaceae) – an important medicinal plant in Central Nigeria. *Phytology Balcanica*, **2012**, **18**: 149-153.
- Song J.-L., Wang R., Shi Y.-P., Qi H.-Y. Iridoids from the flowers of *Gardenia jasminoides* Ellis and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2014**, **56**: 267-270.
- Srivastava S., Seethalakshmi I., and Rebecca L. J. Antimicrobial and antioxidant properties of *Cissus quadrangularis*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2013**, **5**: 131-134.
- Stein S. A., Lamos E. M., Davis S. N. A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. *Expert Opinion on Drug Safety*, **2013**, **12**: 153 – 175.
- Subba B. and Basnet P. Antimicrobial activity of some medicinal plants from east and central part of Nepal. *International Journal of Applied Science and Biotechnology*, **2014**, **2** (1): 88-92.
- Suksarnrarn A., Tanachatchairatana T., and Kanokmedhakul S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, **88**: 275-277.
- Takashi H., Kosaka M., Watanabe Y., Nakade K., and Fukuyama Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **2003**, **11**: 1781-1788.
- Takeo O., Masato K., Keiko S., Rika O., Junko M., Hiroshi I., Kawauchi H., Akashi T., Asaka T., Morimoto S. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of tricyclic ketolide TE-802 and its analogs. *The Journal of Antibiotics*, **2004**, **57**: 518-527.
- Talla E., Nyemb J. N., Tchinda A. T., Zambou D. S. G., Biyanzi P., Sophie L., Vander Elst L., and Mbafor J. T. Antioxidant activity and a new ursane-type triterpene from *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) stem barks. *European Journal of Medicinal Plants*, **2016**, **16**: 1-20.
- Tan Q.-W., Ouyang M.-A. and Gao B. Three new ring-a modified ursane triterpenes from *Davidia involucrata*. *Molecules*, **2014**, **19**: 4897–4906.
- Tanaka, H., Ichino K., and Ito K. Dihydro- chalcones from *Lindera umbellata*. *Phytochemistry*, **1984**, **23**: 1198-1199.
- Tao J.-Y., Dai S.-J., Zhao F., Liu J.-F., Fang W.-S., et al. New ursane-type triterpene with NO production suppressing activity from *Nauclea officinalis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, **2012**, **14**: 97–104.
- Tarayre J. P. and Laouressergues H. Advantages of a combination of proteolytic enzymes, flavonoids and ascorbic acid in comparison with non-steroid antiinflammatory agents. *Arzneimittel forschung*, **1977**, **27**: 1144-1149.
- Tava A., Scotti C., Avato P. Biosynthesis of saponins in the genus *Medicago*. *Phytochemical Reviews*, **2011**, **10**: 459-469.
- Tazoo D., Krohn K., Hussain H., Kouam S. F., Dongo E. Laportoside A and Laportomide A: A new cerebroside and a new ceramide from leaves of *Laportea ovalifolia*. *Zeitschrift für Naturforsch B*, **2007**, **62b**: 1208-1212.



- Tchinda A. T. *Cissus quadrangularis* L. [Internet] Fiche de PROTA4U. Brink, M. & Achigan-Dako, E.G. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas, **2011**. <http://www.prota4u.org/search.asp>
- Tchoumboungang F., Jazet D. P. M., Sameza M. L., Mbanjo E. G. N., Fotso. G. B. T., Amvam Z. P. H., and Menut C. Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **2009**, **13**: 77-84.
- Thakur A., Jain V., Hingorani L., Laddha K. S. Phytochemicals studies on *Cissus quadrangularis* Linn. *Pharmacognosy Research*, **2009**, **1**: 213-215.
- Therond P. Stress oxydant Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutique Françaises*, **2006**, **64**: 383-393.
- Thornhill S. M. and Kelly A. M. 2000. Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Alternative Medicine Review*, **2000**, **5**: 448-454.
- Toledo M. C. F., Reyes F. G. R., Iaderoza M., Francis F. J., Draetta I. S. Anthocyanins from *Anil trepador* (*Cissus sicyosides* Linn) [M]. *Journal of Food Science*, **1983**, **48**:1368-1369.
- Tonelli M. Relation between alkaline phosphatase, serum phosphate, and all-cause or cardiovascular mortality. *Circula*, **2009**, **120**: 1784-1792.
- Toshihiro A., Nobuo K., Takashi K., Ken Y., Harukuni T., Eliot T. M., Monosroi A. and Monosroi J. Anti-inflammatory and chemopreventive effects of triterpene cinnamates and acetates from shea fat. *Journal of Oleo Science*, **2010**, **59**: 273-280.
- Traoré M., Guiguemdé A., Yagob I., Nikièma J. B., Tinto H., Dakuyo Z. P., Ouédraogo J. B., Guissou I. P., Guiguemdé T. R. Investigation of antiplasmodial compounds from two plants, *Cochlospermum Tinctorium* A. Rich and *Gardenia Sokotensis* Hutch. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **2006**, **3**: 34-41.
- Trease G. E., and Evans W. C. Pharmacognosy. 11<sup>th</sup> edition. Brailliar Tiridel and Macmillan Publishers, London; **1989**.
- Tripathi S. K., Asthana R. K., and Ali A. Isolation and characterization of 5-ethylhentriacontane and Nonacosane from *Salvia plebeian*. *Asian Journal of Chemistry*, **2006**, **18**: 1554-1556.
- Tsabang N., Fongzossié E., Keumeze V., Jiofack R., Njamen D., Sonwa D. J. and Nguielefack B. T. Ethnomedical and ethnopharmacological study of plants used by indigenous people of cameroon for the treatments of diabetes and its signs, symptoms and complications. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, **2017**, **8**: 1-5.
- Tuchinda P., Saijai A., Pohmakotr M., Yoosook C., Kasisit J., Napaswat C., Santisuk T., and Reutrakul V. Anti-HIV-1 cycloartanes from leaves and twigs of *Gardenia thailandica*. *Planta Medica Letter*, **2004**, **70**: 366-370.
- Uddin G., Rauf A., Al-Othman A. M., Collina S., Arfan M., Ali G., Khan I. Pistagremic acid, a glucosidase inhibitor from *Pistacia integerrima*. *Fitoterapia*, **2012**, **83**: 1648-1652.

- Uddin G., Sadat A. and Siddiqui B. S. Comparative antioxidant and antiplasmodial activities of 11-*O*-galloylbergenin and bergenin isolated from *Bergenia ligulata*. *Tropical Biomedicine*, **2014**, **31**: 143-148.
- Usoro N. I., Omabbe M. C., Usoro C. A.O. and Nsonwu A. Calcium, inorganic phosphates, alkaline and acid phosphatase activities in breast cancer patients in Calabar, Nigeria. *African Journal of Health Science*, **2010**, **10**: 9-13.
- Van Acker S. A. B. E., Van Den Berg D. J., Tromp M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom W. P., et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **1996**, **20**: 331-342.
- Van de Laar, F. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc. Health Risk Management.*, **2008**, **4**: 1189 – 1195.
- Van Hattem S., Bootsma A. H., Thio H. B. Skin manifestations of diabetes. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, **2008**, **75**: 772-787 .
- Vesper H., Schmelz E. M., Nikolova-Karakashian M. N., Dillehay D. L., Lynch D. V. and Merrill A. H. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *Journal of Nutrition*, **1999**, **129**: 1239-1250.
- Vindhya K. and Leelavathi S. Evaluation of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of *Gardenia gummifera* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **2015**, **32**: 255-261.
- Vindhya K. and Leelavathi S. *In vitro* cytotoxic activities of leaf extract of *Gardenia latifolia* Ait. and *Gardenia gummifera* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2014**, **5**: 4977-4980.
- Voet D. and Voet J. G. Biochimie, 2<sup>ème</sup> Ed. De Boeck, Bruxelles, **2005**.
- Wahab U. H. A. and Awad Z. J. Isolation and characterization of iridoid glycoside (Gardenoside) present in the leaves of *Gardenia jasminoides* J. Ellis cultivated in Iraq. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2015**, **24**: 40-48.
- Wang J., Lu J., Lv C., Xu T. and Jia L. Three new triterpenoid saponins from root of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Fitoterapia*, **2012**, **83**: 1396–1401.
- Wang W., Yang X., Tangchaiburana S., Ndeh R., Markham J. E., Tsegaye Y., Dunn T. M., Wang G.-L., Bellizzi M., Parsons J. F., Morrissey D., Bravo J. E., Lynch D. V., and Xiao S. An inositolphosphoryl-ceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2008**: 1-17.
- Wang Y.-H., Zhang Z.-K., He H.-P., Wang J.-S., Zhou H., Ding M., and Hao X.-J. Stilbene C-glucosides from *Cissus repens*. *Journal of Asian Natural Product Research*, **2007**, **9**: 631–636.
- Wen J. Vitaceae. In: Kubitzki K. (eds) Flowering Plants Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg, **2007**: 467-479.

- Wen J., Lu L.-M., Nie Z.-L., Liu X.-Q., Ning Zhang N., Ickert-Bond S., Gerrath J., Manchester S. R., Boggan J., Chen Z.-D. A new phylogenetic tribal classification of the grape family (Vitaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, **2018**, **9999**: 1-11.
- Wennekes T., Van den Berg R. J. B. H. N., Boot R. G., van der Marel G. A., Overkleeft H. S., Aerts J. M. F. G. Glycosphingolipids—Nature, function, and pharmacological modulation. *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, **48**: 8848-8869.
- Weon J. B., Kim C. Y., Yang H., J., and Ma C. J. Neuroprotective compounds isolated from *Cynanchum paniculatum*. *Archives of Pharmacal Research*, **2012**, **35**: 617-621.
- Wong C. H., Chang H. C., Pasupathy S., Khin L. W., Tan J. L., and Low C. O. Necrotizing fasciitis: clinical presentation, microbiology, and determinants of mortality. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American*, **2003**, **85**: 1454-1460.
- Wu T., Kong D. Y., and Li H. T. Structure identification of two new cerebroside from *Helicia nilagirica* Beed. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2004**, **39**: 525-527.
- Xiang M., Su H., Hu J. and Yan Y. Isolement, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2011**, **5**: 1685-1691.
- Xu F., Huang X., Wu H., and Wang X. Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2018**, **103**: 198–203.
- Xu R., Fazio G. C. and Matsuda S. P. T. On the origins of terpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, **2004**, **65**: 261-291.
- Xu Y., Wang Z., You W., Zhang X., Li S., Barish P. A., Vernon M. M., Du X., Li G., Pan J., Ogle W. O. Antidepressant-like effect of *trans*-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system. *European Neuropsychopharmacology*, **2010**, **20**: 405-413.
- Yang G., Sandjo L., Yun K., Leutou A. S., Kim G. D., Choi H. D., Kang J. S., Hong J., Son B. W. Flavusides A and B, antibacterial cerebroside from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2011**, **59**: 1174-1177.
- Yang L., Peng K., Zhao S., Zhao F., Chen L. and Qiu. 2-Methyl-L-erythritol glycosides from *Gardenia jasminoides*. *Fitoterapia*, **2013**, **89**: 126-130.
- Yang Y., Millán J. L., Meccas J. and Guillemin K. Intestinal Alkaline Phosphatase deficiency leads to lipopolysaccharide desensitization and faster weight gain. *Infection and Immunity*, **2015**, **83**(1): 247-258.
- Yi-jie L., Cheng-ting X., Dan-dan L., Jiang-ke Q., Gao-jie Y., and Qing-hua D. Anti-inflammatory polyphenol constituents derived from *Cissus pteroclada*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2016**, **26**: 3425–3428.
- Yin Z., Zhang W., Feng F., Zhang Y. and Kang W.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, **2014**, **3**: 136–174.

- Youn U. J., Park E.-J., Kondratyuk T. P., Sripisut T., Laphookhieo S., Pezzuto J. M. and Chang L. C. Anti-inflammatory triterpenes from the apical bud of *Gardenia sootepensis*. *Fitoterapia*, **2016**, **114**: 92–97.
- Young L. S., Kim J. S., Choi R. J., Kim Y. S., Lee J.-H. and Kang S. S. A new polyoxygenated triterpene and two new Aeginetic acid quinovosides from the roots of *Rehmannia glutinosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2011**, **59**: 742-746.
- Zeng L., Zhang G., Lin S. and Gong D. Inhibitory mechanism of Apigenin on  $\alpha$ -glucosidase and synergy analysis of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2016**, **64**: 6939-6949.
- Zhang A. J., Rimando A. M., Mizuno C. S. and Mathews S. T. Alpha-glucosidase inhibitory effect of Resveratrol and Piceatannol. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2017**, **47**: 86-93.
- Zhang C.-Y., Parton L. E., Ye C. P., Krauss S., Shen R., Lin C.-T., Porco Jr. J. A., and Lowell B. B. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced  $\beta$  cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell metabolism*, **2006**, **3**: 417–427.
- Zhang J. Y., Pu S. B., Qian S. H., and Liu D. New cerebrosides from *Acanthopanax gracilistylus*. *Chinese Journal of Natural Medicine*, **2011**, **9**: 105-107.
- Zhang J., Kurita M., Shinozaki T., Ukiya M., Yasukawa K., Shimizu N., Tokuda H., Masters E. T., Momoko Akihisa M., and Akihisa T. Triterpene glycosides and other polar constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels and their bioactivities. *Phytochemistry*, **2014**, **108**: 157-170.

## **ANNEXES**

## Annexe I : Listes des publications extraites de la thèse

1. **Jean Noël Nyemb\***, Alembert T. Tchinda, Emmanuel Talla, Emmanuel B. Nanga, David T. Ngoudjou, Jamshed Iqbal, Celine Henoumont, Sophie Laurent, and Joseph T. Mbafor. Vitellaroside, a new cerebroside from *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) and its bioactivities. *Natural Products Chemistry & Research*, **2018**, **6**, 306: 1-9.

2. **Jean Noël Nyemb\***, Magnibou Mekontso Larissa, Emmanuel Talla, Alembert Tiabou Tchinda, Roland Tchuente Tchuenguem, Celine Henoumont, Sophie Laurent and Joseph Tanyi Mbafor. Lipids constituents of *Gardenia aqualla* stem barks. *Open Chemistry*, **2018**, **16**: 371-376.

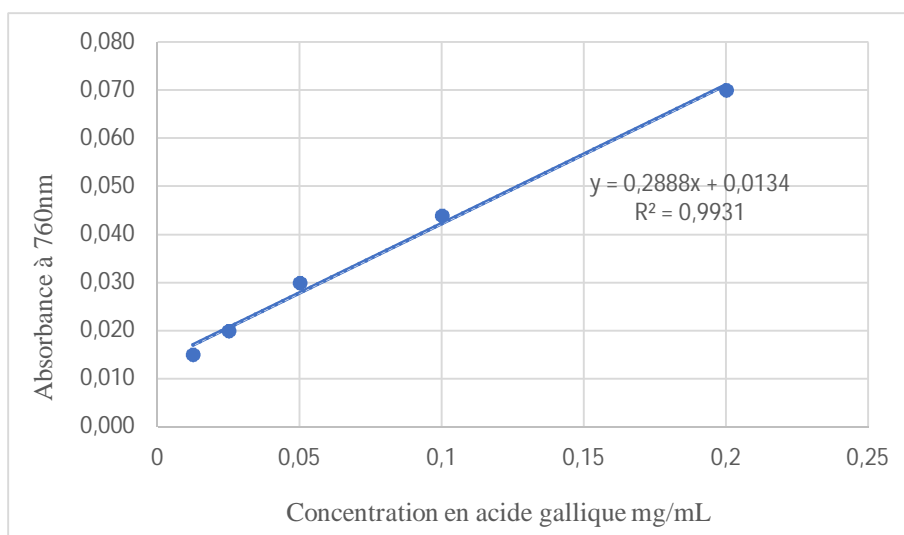
3. **Jean Noël Nyemb\***, Roland Ndoubalem, Emmanuel Talla, Alembert Tiabou Tchinda, Dieudonné Ndjonka, Celine Henoumont, Sophie Laurent, and Joseph Tanyi Mbafor. DPPH antiradical scavenging, anthelmintic and phytochemical studies of *Cissus populnea* rhizomes. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **2018**, **11** (4): 280-284.

4. **Jean Noël Nyemb\***, Madeleine T. Djankou, Emmanuel Talla, Alembert T. Tchinda, David T. Ngoudjou, Jamshed Iqbal and Joseph T. Mbafor. Antimicrobial,  $\alpha$ -Glucosidase and Alkaline Phosphatase inhibitory activities of Bergenin, the major constituent of *Cissus populnea* roots. *Medicinal Chemistry (Los Angeles)* **2018**, **8** (2): 426-430.

## Annexe II : Communication orale

**Jean Noël NYEMB\***, Roland Ndoubalem, Emmanuel Talla, Alembert TiabouTchinda, Dieudonné Djonka, Celine Henoumont, Sophie Laurent, Adewole E. and Joseph Tanyi Mbafor. Phytochemical, antioxydant and anthelmintic studies of the rhizomes of Food gum (*Cissus populnea*). DAAD ALUMNI EVENT, University of Ngaoundere, Cameroon; November 15-18<sup>th</sup>, 2017.

## Annexe III : Courbe d'étalonnage de l'Acide gallique (moyenne $\pm$ SD de trois mesures)





## Vitellaroside, A New Cerebroside from *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) and its Bioactivities

Jean Noël Nyemb<sup>1,2,3\*</sup>, Alembert T Tchinda<sup>4</sup>, Emmanuel Talla<sup>2</sup>, Emmanuel B Nanga<sup>2</sup>, David T Ngoudjou<sup>5</sup>, Céline Henoumont<sup>6</sup>, Sophie Laurent<sup>6</sup>, Jamshed Iqbal<sup>3</sup> and Joseph T Mbafor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde 1, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Ngaoundere, P.O. Box 454, Ngaoundere, Cameroon

<sup>3</sup>Centre for Advanced Drug Research, COMSATS Institute of Information Technology, Abbottabad-22060, Pakistan

<sup>4</sup>Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Ministry of Scientific Research and Innovation, P.O. Box 6163 Yaounde, Cameroon

<sup>5</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, P.O. Box 67, Dschang, Cameroon

<sup>6</sup>Department of General, Organic and Biomedical Chemistry, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Mons, NMR and Molecular Imaging Laboratory, B-7000 Mons, Belgium

\*Corresponding author: Nyemb JN, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde 1, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon, Tel: (+237) 674 75 95 84; E-mail: nyembjeannoel@gmail.com

Received: November 20, 2017; Accepted: December 20, 2017; Published: January 12, 2018

Copyright: © 2018 Nyemb JN, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### Abstract

A new cerebroside (2R)-2-hydroxy-N-[(Z,2S,3S,4R)-1-O-β-D-glucopyranosyl-3,4-dihydroxynonadec-8-en-2-yl] nonacosanamide (1) was isolated from the wood of roots of *V. paradoxa* along with six known compounds including catechin (2), quercetin (3), spinasterol 3-O-β-D-glucopyranoside (6), gallic acid (7) and a mixture of β-sitosterol (4) and stigmasterol (5). The structure of the new compound was established by 1D (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) and 2D NMR (COSY and HSQC) spectroscopy, extensive mass spectrometry and by comparison with published data. The antibacterial, α-glucosidase and alkaline phosphatase (AP) inhibitory activities of all the pure compounds were evaluated. The antibacterial activities were evaluated against three gram negative bacteria (*Escherichia coli*; *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*) while APs inhibitory activities were evaluated on h-TNAP and h-IAP. Significant antibacterial activity was recorded for quercetin (3) against *P. aeruginosa*. Most of the compounds except 1 and 6 were found to be inhibitors of α-glucosidase. The highest inhibitory potential being recorded for quercetin (3) with IC<sub>50</sub> value of 4.30 ± 0.01 μM, 55 fold higher than the standard drug acarbose (IC<sub>50</sub>=234.6 ± 2.01 μM). All tested compounds exhibited moderate inhibitory activities against APs. h-TNAP inhibitory values were ranged between 41.24 ± 1.33 μM and 312.54 ± 6.44 μM while h-IAP inhibitory values were in the range of 47.95 ± 0.35 μM and 777.47 ± 18.55 μM. Quercetin (3) was found to be the most active h-IAP inhibitor (IC<sub>50</sub>=47.95 ± 0.35 mM), whereas, spinasterol 3-O-β-D-glucopyranoside (6) was found to be the most active h-TNAP inhibitor (IC<sub>50</sub>=41.24 ± 1.33 mM). The new compound (1) showed moderate inhibition on h-IAP (78.11 ± 3.70 μM) and on h-TNAP (88.84 ± 2.70 μM).

**Keywords:** *Vitellaria paradoxa*; Sapotaceae; Cerebroside; Antibacterial activity; α-glucosidase; Alkaline phosphatase

### Introduction

Sphingolipids are a class of lipids containing a backbone of sphingoid bases, a set of aliphatic amino alcohols and found essentially in all animals, fungi, as well as some prokaryotic organisms and viruses. The most commonly occurring sphingoid bases from plant sources are phytosphingosine [1]. Most of the sphingoid bases in natural products are N-acylated with long-chain fatty acids to produce ceramides(s). The fatty acids of ceramide vary in chain length (14 to 30 carbon atoms), degree of unsaturation (but are mostly saturated), and presence or absence of a hydroxyl group on the α- or ω-carbon atom [2]. This variation in chain length, the presence or the absence of double bonds and hydroxyl groups, including their position, the stereochemistry, the glycosidation and the phosphorylation produce a large structural diversity in sphingolipids. More than 300 different types of complex sphingolipids have been reported [2]. Cerebrosides or monohexosylceramides, are simple members of the glycosphingolipids. Their structures are characterized by the presence of a sphingoid base

backbone that is amide-linked to a fatty acid, and carbohydrate head group (mostly glucose or galactose) attached to C-1 hydroxyl group of the sphingoid base. Sphingolipids, particularly cerebrosides exhibit various biological activities such as antiulcerogenic activity [3], antifungal, antitumor, immunomodulating, antiviral, antitumor, immunostimulatory activities [1,4], anti-neuroinflammatory activity [5], antiparasitoid, antileishmanial and cytotoxic activities [6]. Therefore, sphingolipids could be considered as an extremely interesting group of natural products that should continue to attract attention for further investigations that may lead to new drug candidates.

Infectious, chronic and degenerative diseases are nowadays the major health problems in developing as well as developed countries as the impacts of these diseases are immense and can be felt across the world. They are major causes of morbidity and death [7]. Bacterial infections and typhoid fever are among the major diseases with high degree of risk within the population [8], due to the increasing prevalence of multidrug resistant strains of bacteria and the recent appearance of strains with reduced susceptibility to antibiotics that







EtOAc 90:10. Fraction V2 (0.58 g) was submitted to CC of silica gel with EtOAc as solvent of elution in isocratic mode yielding spinasterol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (6, 7 mg). Fraction V3 (2 g) was passed through a silica gel CC eluted with a gradient of hexane/EtOAc (7:3-0:1) to give gallic acid (7, 18 mg) at hexane/EtOAc 2:8 by crystallization from MeOH.

(2R)-2-hydroxy-N-[(Z,2S,3S,4R)-1-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4-dihydroxynonadec-8-en-2-yl] nonacosanamide (1): White powder, m.p. 147-149°C. -TOF-ESI-MS+:  $m/z$  =927.4 [M]<sup>+</sup> calculated for C<sub>52</sub>H<sub>97</sub>NO<sub>12</sub>. Important <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY correlations are illustrated in Figure 2. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta_{H}$ : 0.84 (t, J=6.5 Hz, 6H, 3H-29', 3H-18), 1.20-1.34 (br s, H-11-18, H-4'-28'), 1.49 (m, H-3'a), 1.50 (m, 2H, H-6), 1.60 (m, H-3'b), 1.92 (m, 2H, H-5), 1.94 (m, 2H, H-7), 1.98 (m, 2H, H-10), 2.95 (td, J=8.9, 2.7 Hz, 1H, 2''-H), 3.04 (dd,

J=9.1, 3.7 Hz, 1H, H-4''), 3.09 (dd, J=5.8, 2.0 Hz, 1H, H-5''), 3.15 (td, J=8.8, 3.0 Hz, 1H, H-3''), 3.31 (m, 1H, H-4), 3.38 (m, 1H, H-3), 3.44 (m, 1H, H-6''a), 3.66 (m, 1H, H-1a), 3.67 (m, 1H, H-6''b), 3.81 (dd, J=10.0, 6.7 Hz, 1H, H-1b), 3.86 (dd, J=10.0, 6.4 Hz, 1H, H-2''), 4.10 (dt, J=15.5, 5.3 Hz, 1H, H-2), 4.15 (d, J=7.7 Hz 1H, H-1''), 4.35 (m, 1H, OH-5''), 4.52 (t, J=5.6 Hz, 1H, OH-6''), 4.77 (t, J=5.6 Hz, 1H, OH-3), 4.91 (t, J=4.3 Hz 2H, OH-3'', OH-4''), 4.95 (d, J=3.5 Hz, 2H, OH-2''), 5.31 (m, 1H, H-9), 5.37 (m, 1H, H-8), 5.60 (d, J= 4.9 Hz, 1H, OH-4) 7.54 (d, J=9.5 Hz, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta_{C}$ : 13.9 (C-29', C-19), 22.1 (C-18, C-28''), 24.4 (C-4'), 25.5 (C-6), 26.5 (C-10), 26.6 (C-7), 28.6-29.2 (C-12-16, C-5'-26'), 31.3 (C-17, C-27''), 32.0 (C-11), 32.3 (C-5), 34.3 (C-3'), 49.8 (C-2), 61.0 (C-6''), 68.9 (C-1), 69.9 (C-4''), 70.5 (C-4), 70.9 (C-2'), 73.4 (C-2''), 74.4 (C-3), 76.5 (C-3''), 76.9 (C-5''), 103.3 (C-1''), 129.8 (C-9), 130.2 (C-8), 173.7 (C-1).

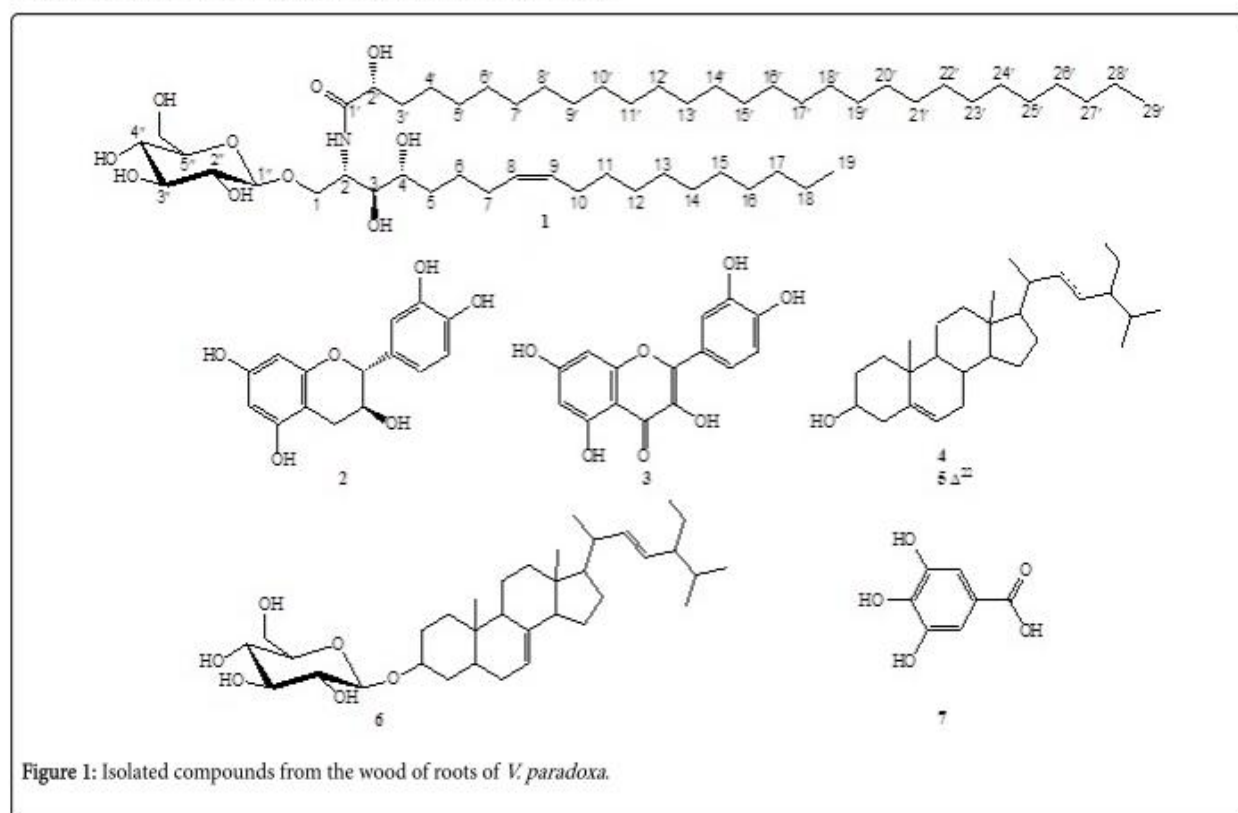


Figure 1: Isolated compounds from the wood of roots of *V. paradoxa*.

### In vitro antibacterial assay

**Microorganisms and culture media:** Compounds were tested against 4 microorganisms, four bacterial strains (*Salmonella typhi* ATCC6539, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9721, *Escherichia coli*). Among these microorganisms *E. coli* were isolated from Ayub Theaching Hospital of Abbottabad (Pakistan) while *S. typhimurium* was isolated from the Laboratory of Bacteriology and Mycology of the "Centre Pasteur" of Yaounde, Cameroon respectively. These microorganisms were maintained on agar slant in refrigerator at 4°C. The reference strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Mueller Hinton Agar (MHA) for the activation of tested Gram-negative bacteria while Mueller Hinton Broth (MHB) was used for the *in vitro* antibacterial assay as culture media [24].

**MTT colorimetric assay for MIC and MBC determination:** The microdilution method using the MTT colorimetric assay was used to

determine the Minimal Inhibitory Concentrations and Minimal Bactericidal Concentrations (MICs and MBCs) of the samples and reference antibiotics. Indeed, samples were first dissolved in 50  $\mu$ L of DMSO 10%. To the solution obtained 950  $\mu$ L of MHB was added and then serially diluted two fold in a 96-well microplate. The final concentration of DMSO was lower than 2.5% in order to not affect the microbial growth. 100  $\mu$ L of inoculum ( $1.5 \times 10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>) in MHB were then added. The plates were covered with a sterile plate sealer, then agitated with a plate shaker to mix the contents of the wells and incubated at 37°C for 18 h. Wells containing MHB broth, 100  $\mu$ L of inoculum and DMSO to a final concentration of 2.5% served as negative control. The assay was done in triplicate and the MIC of each sample was detected after 18 h of incubation at 37°C following addition of 40  $\mu$ L MTT (0.2 mg.mL<sup>-1</sup>) and incubation at 37°C for 30 min. Viable bacteria converted the yellowish solution of MTT to a dark blue characteristic of the water-insoluble MTT formazan by



mitochondrial dehydrogenases of living cells. The MIC was the sample concentration that prevented this color change of the medium and exhibited complete inhibition of microbial growth; in other words, the MIC corresponds to the lowest concentration of the compounds that inhibits visible growth (visual turbidity) that was detected by the reduction of MTT into MTT formazan, a dark blue molecule. The highest dilution of a compound in which no a dark blue color appears corresponds to its MIC. For the determination of the MBC, 50  $\mu$ L aliquots of the preparations (from the well which did not show any growth after incubation during MIC assays) were added to 150  $\mu$ L of adequate broth. These preparations were incubated at 37°C for 48 h. The MBC was considered as the lowest concentration of samples that prevented the color change of the medium after addition of MTT as mentioned above [25,26].

**$\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity:** The  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay was performed spectrophotometrically using p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (p-NPG) as substrate in a 96-well microtiter plate (Corning Costar, Cambridge, MA, USA), following the reported procedures [27] slightly modified. Briefly, the assay started with the pre-incubation at 37°C of a mixed solution containing 70  $\mu$ L phosphate buffer (70 mM, pH 6.8), 10  $\mu$ L of test compound (0.1 mM) and 10  $\mu$ L of enzyme ( $\alpha$ -glucosidase (2.5 U.mL<sup>-1</sup>), after 5-10 min of pre-incubation, 10  $\mu$ L of p-NPG (10 mM) was added to each well of a 96 well plate and further incubated at 37°C for 20 min. The reaction was stopped by adding 80  $\mu$ L of 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. The solutions of  $\alpha$ -glucosidase and its substrate were prepared in 70 mM phosphate buffer (pH 6.8), while the tested compounds were dissolved in DMSO 10%. Negative control was constituted of 10  $\mu$ L of distilled water instead of test compounds, while acarbose was used as positive control. The activity of test compounds against glucosidase isoenzymes was determined by measuring the amount of p-nitrophenol released at a wavelength of 405 nm using a FluoStar Omega plate reader (BMG LabTechnologies, Offenburg, Germany). The percent inhibition was calculated using the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = [100 - (\text{Absorbance}_{\text{test well}} / \text{Absorbance}_{\text{control}})] \times 100$$

For all the test compounds, assay was performed in triplicate. IC<sub>50</sub> values of the compounds showing more than 50% activity were determined by further serial dilution into eight different concentrations. IC<sub>50</sub> values were determined using GraphPad PRISM software version 5.0 (San Diego, CA, USA) as the mean  $\pm$  S.E.M. of three assays.

**Alkaline phosphatase inhibition assay:** Alkaline phosphatase activity was performed using a previous reported luminescence method [28] with slight modifications in which CDP-Star was used as substrate for the determination of enzyme inhibition of compounds on bovine kidney alkaline phosphatase (h-TNAP) enzyme and calf intestine alkaline phosphatase (h-IAP). Initial screening was performed for all the tested compounds at a concentration of 0.1 mM. An assay buffer constituted of 8 M diethanolamine (DEA), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.05 mM ZnCl<sub>2</sub> at pH 9.8, was used. The assay mixture containing 10  $\mu$ L of tested compound (0.1 mM) and 20  $\mu$ L of enzyme h-TNAP (1:800 times diluted (0.8 units per mL) enzyme in assay buffer) or 20  $\mu$ L of h-IAP (1:800 times diluted (1 unit per mL) enzyme in assay buffer) was pre-incubated for 4 to 5 minutes at 37°C, the luminescence was then measured as a pre-read using microplate reader (BioTek FL  $\times$  800, Instruments, Inc. USA). After that, 20  $\mu$ L of CDP-star (final concentration of 110  $\mu$ M) was added to initiate the reaction and the assay mixture was incubated again for 15-20 min more at 37°C and then, the change in the luminescence was measured as after-read. The

inhibitory activity of each tested compound was compared with negative control (without any inhibitor), while Levamisole (2 mM per well) and L-phenylalanine (4 mM per well) were used as a positive controls respectively against h-TNAP and h-IAP. For all the compounds which exhibiting more than 50% inhibition of either h-TNAP or h-IAP activity, further analysis were performed in order to determine IC<sub>50</sub> values. For this aim, serial dilutions (6-8 concentrations) of each compound (100  $\mu$ M to 20 nM) were prepared in assay buffer and their dose response curves were obtained by assaying each inhibitor concentration on both Aps isozymes using the above mentioned reaction conditions. All experiments were performed in triplicate then the IC<sub>50</sub> values were determined by the non-linear curve fitting program PRISM 5.0 (GraphPad, San Diego, California, USA).

**Statistical analysis:** All values obtained were compared using One-way ANOVA with a Student Newman-Keuls post-test using GraphPad Prism 6 Software, Inc. (San Diego, CA, USA). Differences at p<0.05 were considered statistically significant.

## Results and Discussion

Compound 1 was obtained as a white powder, its molecular formula C<sub>52</sub>H<sub>97</sub>NO<sub>12</sub> was deduced from the TOF-MS ESI+ analysis which showed a molecular radical ion peak at *m/z* 927.4 [M]<sup>•+</sup> consistent with the above molecular formula. Subsequently, the structure was fully elucidated by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. The 1D NMR spectrum pattern of compound 1 coincided with glycosphingolipids skeleton, which shows the presence of an amide linkage, a sugar, and long chain aliphatic moieties. Indeed, the two signals at  $\delta_C$  49.8 (C-N) and 173.8 (C-O) in the <sup>13</sup>C NMR spectrum of compound 1 together with the signal at  $\delta_H$  7.54 (1H, d, J=9.5 Hz) can be attributed to the signals of an amide function -NHCO- suggesting the presence of an amide group.

The signal at  $\delta_H$  4.15 (1H, d, J=7.7 Hz) that is associated to the carbon at  $\delta_C$  105.6, can be attributed to the anomeric proton of a sugar moiety. All these signals combined with the ones of two long chain aliphatic moieties including aliphatic methylenes ( $\delta_H$  1.20-1.36, m) and a triplet of six protons ( $\delta_H$  0.86, 6H, t, J=6.9 Hz), suggested a glycosphingolipid nature of compound 1 [29-33]. The presence of a sugar moiety was confirmed by a positive reaction of compound 1 in the Molish test. The <sup>13</sup>C NMR spectrum also shown a set of C-atom signals appeared at  $\delta_C$  61.0 (CH<sub>2</sub>), 69.9 (CH), 73.4 (CH), 76.4 (CH), 76.8 (CH), and 103.4 (CH), that suggested the presence of a  $\beta$ -glucopyranoside. The high coupling constant of the anomeric proton (J=7.7 Hz) corresponding to two trans diaxial protons, further confirmed the  $\beta$ -configuration of the glucoside unit. The position of the glucose moiety was found to be at C-1 due to the downfield chemical shift observed for the hydroxymethylene carbon C-1 at  $\delta_C$  68.9 [34,35]. Further extensive analysis of <sup>1</sup>H NMR spectra revealed two olefinic proton signals at  $\delta_H$  5.37 (m, H-8), and 5.31 (m, H-9) attributable to the presence of a disubstituted double bond. Furthermore, it is known that the geometry of the double bond in a long-chain alkene can be determined on the basis of the <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts of the methylene carbons adjacent to the olefinic carbons. Usually, the chemical shifts for the adjacent carbons to a cis (Z) double bond appear in the range of  $\delta_C$  26-28, while those of a trans double bond appear in the range of  $\delta_C$  32-33 [35,36]. Thus, the  $\Delta^8$  double bond was determined to be cis (Z) due to the downfield chemical shifts of C-7 ( $\delta$  26.6) and C-10 ( $\delta$  26.5) [37].

<sup>1</sup>H NMR spectrum of 1 also showed three other methine signals at  $\delta_H$  3.38 (m, CHOH), 3.34 (m, CHOH), 3.86 (dd, 10.6; 6.7, CHOH),



attributed to H-3, H-4 and H-2' respectively and were supported by the signals at  $\delta_C$  70.5 (C-4, CHOH), 70.9 (C-2', CHOH), and 74.4 (C-3, CHOH) in the  $^{13}C$  NMR spectrum. The above data suggested that the sphingoid base of compound 1 is phytosphingosine [38]. Therefore, compound 1 is suggested to be a molecular species of phytosphingosine-type cerebroside possessing 2-hydroxy fatty acid and  $\beta$ -glucopyranose moieties. It has been stated that the chemical shift of the H-2 signal and the  $^{13}C$  chemical shifts of C-1-C-4, C-1' and C-2' of glucosphingolipids are especially suitable for the determination of the absolute stereochemistry of the phytosphingosine moiety [30,39]. Literature survey revealed that the absolute configuration at C-2 of most natural cerebrosides is all-2S; the biogenetic pathway of the natural cerebrosides suggested a 2S, 3S-configuration of the phytosphingosine part [40-44]. Thus, from the chemical shift of H-2 (4.10, *dt*;  $J=15.5; 5.3$  Hz) and the carbon chemical shifts at  $\delta_C$  68.9 (C-1), 49.8 (C-2), 74.4 (C-3), 70.5 (C-4), 173.8 (C-1') and 70.9 (C-2') and all the facts above mentioned, the configuration of compound 1 was essentially identical to those reported for other cerebrosides with (2S, 3S, 4R)-phytosphingosine and (2R)-2-hydroxy fatty acid moieties [45,46].

The  $^1H$ - $^1H$  COSY spectrum presented a correlation between the amide proton at  $\delta_H$  7.51 and 2-H methine at  $\delta_H$  4.10 which in turn coupled to three other protons at  $\delta_H$  3.81, 3.38, and 3.62 corresponding respectively to H-1a, H-3 and H-1b. Furthermore, H-3 ( $\delta_H$  3.38) showed correlation with H-4 ( $\delta_H=3.31$ ). Cross peaks were also observed between the signal at  $\delta_H$  3.86 (H-2') and the downfield proton signals at  $\delta_H$  1.50 corresponding to 2H-3'. This confirmed the presence of the fourth hydroxyl group at C-2' of the fatty acid chain. The positions of the three hydroxyl groups in the long chain base were further confirmed by the mass fragmentation pattern (Figure 3). The COSY spectrum also revealed the correlations between the protons at  $\delta_H$  0.86 with a set of protons at  $\delta_H$  1.26 that in turn correlated with others protons at  $\delta_H$  1.34, in addition with the correlations between all the protons of the sugar moiety. The correlation between the two olefinic protons H-8 at  $\delta_H$  5.37 and H-9 at  $\delta_H$  5.31, as well as the correlations of these protons and the adjacent ones at  $\delta_H$  1.94 (C-7) and  $\delta_H$  1.98 (C-10) respectively were also visible.

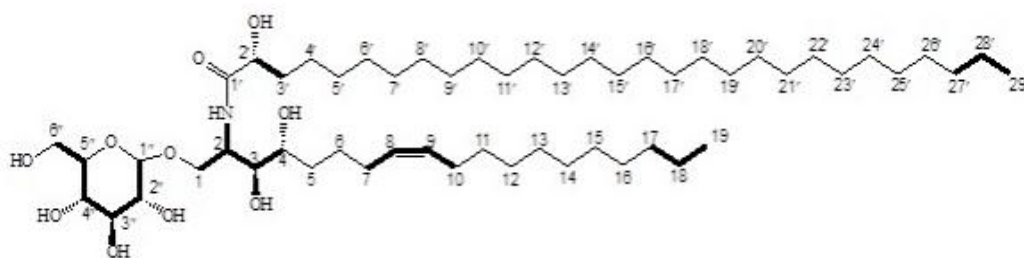
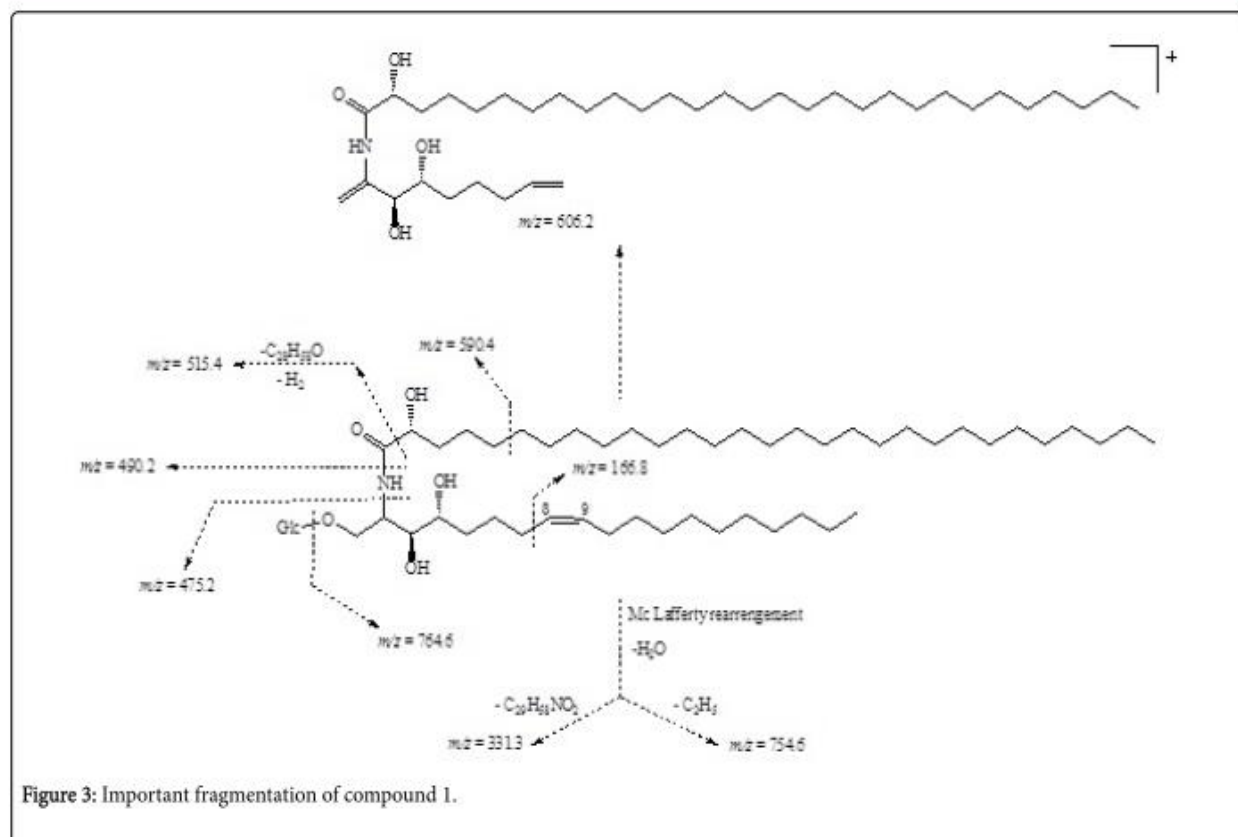


Figure 2: Important  $^1H$ - $^1H$  COSY correlations of compound 1.

The length of the long chain base was determined by the characteristic ion at  $m/z$  475.2 [Glc-OCH<sub>2</sub>CHCH(OH)CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (Figure 3). The fragment at  $m/z$  =166.8 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CHCH]<sup>+</sup> resulting from the cleavage in  $\alpha$  of the  $\Delta^8$  double bond confirmed the position of the double bond in the long chain base. The typical fragment ions at 764.6 [M-163]<sup>+</sup> and at 606.2 [M-163]<sup>+</sup> (Figure 3), resulting from the loss of the sugar moiety followed by the cleavage in  $\alpha$  of the  $\Delta^8$  double (between C-9 and C-10), further confirmed the presence of the glucoside moiety and the ester function. The length of the fatty acid chain was deduced from the fragment at 515.4 [GlcOCH<sub>2</sub>C(=CH<sub>2</sub>)NHCOCH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CHCHCO]<sup>+</sup> (Figure

3), resulting from the cleavage in  $\alpha$  of the carbonyl group of the amide function. From the foregoing data, the structure of compound 1 was elucidated as (2R)-2-hydroxy-N-[(2S,2S,3S,4R)-1-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4-dihydroxynonadec-8-en-2-yl] nonacosanamide and named Vitellaroside. To the best of our knowledge, this is the first time that a cerebroside is reported from *Vitellaria paradoxa*.

The known compounds (2-7) (Figure 1) were identified by comparing their NMR spectroscopic data with those reported in the literature, as catechin (2), quercetin (3),  $\beta$ -sitosterol (4), stigmasterol (5), spinasterol glucoside (6) and gallic acid [22].



### Antibacterial activities

All pure compounds were screened for their antibacterial activities using the microbroth dilution method in 96-well micro-plates against three gram negative (-) bacteria: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*; and *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity was measured as MIC which is defined as the concentration that inhibits the growth of 50% of organisms. The results presented in Table 1, indicated that all the tested compounds were active depending on the bacterial strain with MIC values ranging from 8 to 128 µg/mL. Compound 7 inhibited the growth of 100% of the 3 tested bacteria with the MICs ranged from 16 to 128 µg/mL. The antibacterial activity of compounds has been defined as significant when MIC <10 µg/mL, moderate when 10<MIC<100 µg/mL and low when MIC>100 µg/mL [33,47]. Therefore, in this study, a compound was considered as inactive if its MIC value was above 128 µg/mL (MIC>128 µg/mL).

hus, low activities were recorded for catechin (2), spinasterol 3-O-β-D-glucopyranoside (6) and gallic acid (7) respectively against *S. typhi* ATCC6539, *E. coli* and *P. aeruginosa*. Inactivity was recorded for compound 1, catechin (2) and spinasterol 3-O-β-D-glucopyranoside (6) against *E. coli*, for compounds 1, catechin (2) and quercetin (3) against *S. typhi* ATCC6539, and for quercetin (3) and spinasterol 3-O-β-D-glucopyranoside (6) against the isolate of *S. typhi*. Meanwhile, all

the tested compounds were active against *P. aeruginosa*, the significant activity being observed for compound quercetin (3) (MIC=8 µg/mL, while the activities of the remaining compounds were considered as moderate with MIC value ranging from 16 to 64 µg/mL. The new compound 1, exhibited a moderate activity against the isolate strain of *S. typhi* and *P. aeruginosa*. The activity of the tested compounds against all the 3 tested gram (-) bacteria was lower comparing to the reference antibiotic compound Ciprofloxacin (0.5 µg/mL).

All the bacterial strains used in this study were gram-negative bacteria possessing complex and multilayered lipopolysaccharides cell walls. Therefore, for many compounds including synthetic and natural antibiotics, the access to this membrane is more restricted [48]. The activity of all the compounds against the gram (-) bacteria used in this study suggests that these compounds could be able to cross this tough barrier. All these compounds presented in their structures many organic functions (hydroxyls groups, amide, alkene, ester functions, phenols and carboxylic acids) that can be responsible for the observed activities [49,50]. This study confirms the fact that the number and the position of hydroxyl groups influenced the membrane interaction effects of organic compounds. Antibacterial activity of the isolated compound obtained in this study may provide some explanation for the traditional uses of *V. paradoxa*.

| Bacterial strains | Tested compounds and MIC values (µg/mL) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |               |     |
|-------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|-----|
|                   | 1                                       |     | 2   |     | 3   |     | 6   |     | 7   |     | Ciprofloxacin |     |
|                   | MIC                                     | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC           | MBC |
|                   |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |               |     |



|                      |          |    |     |     |     |    |     |     |     |    |     |     |     |
|----------------------|----------|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| <i>E. coli</i>       | Isolate  | -  | -   | -   | -   | 16 | 128 | 128 | -   | 64 | -   | 0.5 | 0.5 |
| <i>S. typhi</i>      | ATCC6539 | -  | -   | 128 | 128 | -  | -   | 64  | -   | 64 | 128 | 0.5 | 1   |
|                      | Isolate  | 64 | -   | 64  | -   | -  | -   | -   | -   | 32 | 64  | 0.5 | 0.5 |
| <i>P. aeruginosa</i> | ATCC9721 | 32 | 128 | 16  | 128 | 8  | 32  | 64  | 128 | 16 | 128 | 0.5 | 1   |

(-): >128 µg/mL. *E. coli*: *Escherichia coli*; *S. typhi*: *Salmonella typhimurium*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*. In bold: significant activity [47].

Table 1: MICs and MBCs of isolated compounds on the selected bacteria.

### α-Glucosidase and alkaline phosphatase inhibitory activities

The pure isolated compounds were tested for their glucosidase inhibitory potential by *in vitro* enzyme assay. Following preliminary screening, catechin (2), quercetin (3) and gallic acid (7) showed very strong inhibitory effects against α-glucosidase, and were further studied for their concentration dependent activity in order to calculate IC<sub>50</sub> values (Table 2). Spinasterol 3-O-β-D-glucopyranoside (6) and the new compound 1 showed a weak activity, 35.62% and 41.42% respectively. Quercetin (3) and gallic acid (7) possessed high potency

with the IC<sub>50</sub> value of 4.30 ± 0.01 and 5.35 ± 0.18 µM, respectively, as compared with that of acarbose (IC<sub>50</sub>=234.6 ± 2.01 µM) which was used as a positive control. In addition, compound 2 also exhibited a potent activity against α-glucosidase with an IC<sub>50</sub> of 68.3 ± 1.25 µM which was ~ 4-fold higher compared to the positive control (acarbose). Catechin (2), quercetin (3) and gallic acid (7) may be the main anti-hyperglycemic agents present in this plant, and they have been already reported for their glucosidase inhibition activities [51,52].

| Code                                       | α-Glucosidase             | Alkaline                   |                             |
|--|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|  |                           | <i>h</i> -TNAP             | <i>h</i> -IAP               |
| IC <sub>50</sub> (µM) ± SEM or% inhibition |                           |                            |                             |
| 1  | 41.42%                    | 88.84 ± 2.70 <sup>a</sup>  | 78.11 ± 3.70 <sup>a</sup>   |
| 2  | 68.3 ± 1.25 <sup>a</sup>  | 312.54 ± 6.44 <sup>b</sup> | 777.47 ± 18.55 <sup>b</sup> |
| 3  | 4.30 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 121.44 ± 3.51 <sup>c</sup> | 47.95 ± 0.35 <sup>c</sup>   |
| 6  | 35.62%                    | 41.24 ± 1.33 <sup>d</sup>  | 68.91 ± 2.19 <sup>a</sup>   |
| 7  | 5.35 ± 0.18 <sup>b</sup>  | 236.39 ± 4.82 <sup>a</sup> | 81.89 ± 4.73 <sup>a</sup>   |
| Acarbose                                   | 234.6 ± 2.01 <sup>c</sup> | /                          | /                           |
| Levamisole                                 | /                         | 20.2 ± 1.9 <sup>f</sup>    | /                           |
| L-Phenylalanine                            | /                         | /                          | 80.2 ± 0.001 <sup>a</sup>   |

Mean values followed by the same letter superscripts in a column are not significantly different (n=3, p<0.05). IC<sub>50</sub> is the concentration at which 50% of the enzyme activity is inhibited.

Table 2: α-Glucosidase and alkaline phosphatase inhibition of the isolated compounds.

the luminescence of the solutions of active APs gives a possibility to evaluate the inhibitory activity of some compounds when exposed to these solutions by attenuation of the luminescence. This activity can therefore be measured via a luminescence based assay. In this study, the isolated pure compounds from the wood of roots of *V. paradoxa* were investigated for their potential to inhibit the human tissue nonspecific (*h*-TNAP) and intestinal (*h*-IAP) alkaline phosphatase isozymes.

The results resumed in Table 2 shows that all tested compounds were active against both isoenzymes of alkaline phosphatase. *h*-TNAP inhibitory values were ranged between 41.24 ± 1.33 and 312.54 ± 6.44 µM while *h*-IAP inhibitory values were in the range of 47.95 ± 0.35 and 777.47 ± 18.55 µM. Most of the tested compounds (60%) display selective inhibitory activity for *h*-IAP. Among all the tested

compounds, quercetin (3) showed the highest activity against *h*-IAP which was found to be 47.95 ± 0.35 nM, ~ 2 fold more active than the standard L-phenylalanine and ~ 3 fold more selective for *h*-IAP over *h*-TNAP. Meanwhile, spinasterol 3-O-β-D-glucopyranoside (6) was found to be the most potent inhibitor of *h*-TNAP through the series, but its activity was ~ 2 fold less when compared to the one of Levamisole used here as the standard for this isoenzyme. Catechin (2) was found to be the least inhibitor of both isoenzymes *h*-IAP and *h*-TNAP with IC<sub>50</sub> values of 777.47 ± 18.55 µM and 312.54 ± 6.44 µM respectively. The new compound 1 also demonstrated a good inhibition potential with a slight specific inhibition against *h*-IAP.

## Conclusion

In the present study, we reported the isolation of a new cerebroside, Vitellaroside (1), from the wood of barks of *Vitellaria paradoxa*, together with catechin, quercetin, spinasterol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, gallic acid and a mixture of phytosterols. All the pure compounds were tested for their antibacterial,  $\alpha$ -glucosidase and alkaline phosphatase inhibitory activities and, most of them show either moderate or low activities. herefore, some like quercetin and gallic acid were very active against  $\alpha$ -glucosidase. To the best of our knowledge, (2R)-2-hydroxy-N-[(Z,2S,3S,4R)-1-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,4-dihydroxynonadec-8-en-2-yl] nonacosanamide (1) is the first cerebroside identified from this plant and from the Sapotaceae family. Except the new compound (1), all the others have already been reported from this plant.

## Acknowledgement

Authors are thankful to the Centre of Advanced Drug Research (CADR), COMSATS Institute of Information Technology (CIIT), Pakistan, for research facilities and the Third World Academy of Sciences (TWAS), Italy for financial support under the TWAS-CIIT Post Graduate Sandwich program [grant No. 3240287163, 2015] granted to JNN. Authors are also thankful to the Medical Microbiology laboratory, Pasteur Centre, Yaoundé (Cameroon) and to the Ayub Theaching Hospital of Abbottabad (Pakistan) for providing some clinical bacteria.

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## References

- Muralidhar P, Radhika P, Krishna N, Venkata RD, Bheemasankara RC (2003) Sphin-golipids from Marine Organisms: A Review. Nat Prod Sci 9: 117-142.
- Merrill A, Sandhoff K (2002) Sphingolipids: metabolism and cell signaling. In: Vance DE, Vance JE (eds.) Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. (4th Edn), Elsevier Science BV, pp: 373-407.
- Okuyama E, Yamazaki M (1983) The principles of Tetragonia tetragonoides having anticarcinogenic activity. II. Isolation and structure of cerebroside. Chem Pharm Bull 31: 2209-2219.
- Emura CR, Higuchi T, Miyamoto (2005) Amphimeliosides A-F, Six New Ceramide Di-hexosides Isolated from a Japanese Marine Sponge Amphimedon sp. J Org Chem 70: 3031-3038.
- Yu JS, Moon E, Kim KH (2017) A new cerebroside from the twigs of *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume. Bioorg Chem 74: 122-125.
- Tantry MA, Idris A, Khan IA (2013) Glycosylsphingolipids from *Euonymus japonicus* Thunb. Fitoterapia 89: 58-67.
- WHO (2009) World health statistics 2009: Cause-specific mortality and morbidity.
- Kuete V, Efferth T (2010) Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. Frontiers in Pharmacol 1: 1-19.
- Kazmi M, Zaib S, Amjad ST, Khan I, Ibrar A, et al. (2017) Exploration of aroyl/heteroaroyl iminothiazolines featuring 2,4,5-trichlorophenyl moiety as a new class of potent, selective, and in vitro efficacious glucosidase inhibitors. Bioorg Chem 74: 134-144.
- Joshi SR, Standl E, Tong N, Shah P, Kalra S, et al. (2015) Therapeutic potential of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review. Expert Opin Pharmacother 16: 1959-1981.
- Khan I, Shah S, Ejaz S, Ibrar A, Hameed S, et al. (2015) Investigation of quinoline-4-carboxylic acid as a highly potent scaffold for the development of alkaline phosphatase inhibitors: Synthesis, SAR analysis and molecular modelling studies. RSC Adv 5: 64404-64413.
- Tonelli M (2009) Relation between alkaline phosphatase, serum phosphate, and all-cause or cardiovascular mortality. Circula 120: 1784-1792.
- Haarhaus M, Brandenburg V, Kalantar-Zadeh K, Stenvinkel P, Magnusson P (2017) Alkaline phosphatase: A novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. Nature Rev 13: 429-442.
- Ma XH, Zheng CJ, Han LY, Xie B, Jia J, et al. (2009) Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. Drug Discov Today 14: 579-588.
- Williamson EM (2001) Synergy and other interactions in phytomedicines. Phytomed 8: 401-409.
- Yang Y, Zhang Z, Li S, Ye X, Li X, et al. (2014) Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. Fitoterapia 92: 133-147.
- Moore S (2008) The role of *Vitellaria Paradoxa* in poverty reduction and food security in the Upper East region of Ghana. Earth Environ 3: 209-245.
- Tagne SR, Telefo BF, Nyemb JN, Yemele DM, Njina SN, et al. (2014) Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. Asian Pac J Trop Med 7: 442-447.
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Anthony S (2009) Agroforestry database: A tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre ICRAF, Nairobi, KE.
- Jiofack T, Fokunang C, Guedje N, Kemeuze V, Fongnzossie E, et al. (2010) Ethnobotanical uses of medicinal plants of two ethnoecological regions of Cameroon. Int J Med Med Sci 2: 60-79.
- Maranz S, Wiesman Z, Gartin (2003) Phenolic Constituents of Shea (*Vitellaria paradoxa*) Kernels. J Agric Food Chem 51: 6268-6273.
- Zhang J, Kurita M, Shinozaki T, Ukiya M, Yasukawa K, et al. (2014) Triterpene glycosides and other polar constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels and their bioactivities. Phytochem 108: 157-170.
- Talla E, Nyemb JN, Tchinda AT, Zambou DSG, Biyanzi P, et al. (2016) Antioxidant activity and a new ursane-type triterpene from *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) stem barks. EJMP 16: 1-20.
- Ngoudjou TD, Arfat YM, Njateng GSS, Fokunang C, Nyemb JN, et al. (2017) GC/MS analysis, antisalmonella potential of methanol leaf extracts of *Tristemma mauritianum* and effects on hematological parameters on wistar rats infected with *Salmonella typhi*. Int J Pharm 7: 120-131.
- Kuete V, Wansi JD, Mbaveng AT, Kana SMM, Tadjong AT, et al. (2008) Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Teclea afzelii* (Rutaceae). South Afr J Bot 74: 572-576.
- Kuete V, Nana F, Ngameni B, Mbaveng AT, Keumedjio F, et al. (2009) Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). J Ethnopharmacol 124: 556-561.
- Kazmi M, Zaib S, Amjad ST, Khan I, Ibrar A, et al. (2017) Exploration of aroyl/heteroaroyl iminothiazolines featuring 2,4,5-trichlorophenyl moiety as a new class of potent, selective, and in vitro efficacious glucosidase inhibitors. Bioorg Chem 74: 134-144.
- Ejaz SA, Saeed A, Siddique MN, Nisa ZU, Khan S, et al. (2017) Synthesis, characterization and biological evaluation of novel chalcone sulfonamide hybrids as potent intestinal alkaline phosphatase inhibitors. Bioorg Chem 70: 229-236.
- Xiao ZY, Chen DH, Si JY (2000) Chemical studies on *Momordica charantia* L. Chin. Tradit Herb Drugs 31: 571-573.
- Hua HM, Pei YH (2001) A survey of the study on cerebroside. J Shenyang Pharm Univ 18: 299-306.
- Hu YM, Ye WC, Yin ZQ, Zhao SX (2007) Chemical constituents from *Flos Sesamum indicum* L. Acta Pharm Sin 42: 286-291.
- Wu T, Kong DY, Li HT (2004) Structure identification of two new cerebroside from *Helicia nilagirica* Beed. Acta Pharma Sin 39: 525-527.



33. Talla E, Yaya GAJ, Mokale KAL, Abdou JP, Tchinda A, et al. (2016) Chemical constituents from *Erythrina droogmansiana* (Fabaceae), radical scavenging and antibacterial potential of some extracts and compounds. *NPAIJ* 12: 12-20.
34. Kasai R, Sasaki A, Hashimoto T, Kaneko T, Ohtani K, et al. (1999) Glycosides from *Trichosanthes tricuspidata*. *Phytochem* 51: 803-808.
35. Mbosso EJT, Nguedia JCA, Meyer F, Lenta BN, Ngouela S, et al. (2012) Ceramide, cerebroside and triterpenoid saponin from the bark of aerial roots of *Ficus elastica* (Moraceae). *Phytochem*. 83: 95-103.
36. Tazoo D, Krohn K, Hussain H, Kouam SF, Dongo E (2007) Laportoside A and Laportomide A: A New Cerebroside and a New Ceramide from Leaves of *Laportea ovalifolia*. *Z Naturforsch* 62: 1208-1212.
37. Kang SS, Kim JS, Son KH, Kim HP, Chang HW (2001) Cyclooxygenase-2 Inhibitory Cerebrosides from *Phytolacca Radix*. *Chem Pharm Bull* 49: 321-323.
38. Muralidhar P, Radhika P, Krishna N, Venkata RD, Bheemasankara RC (2003) Sphingolipids from Marine Organisms: A Review. *Nat Prod Sci* 9: 117-142.
39. Zhang JY, Pu SB, Qian SH, Liu D (2011) New Cerebrosides from *Acanthopanax gracilistylus*. *Chin J Nat Med* 9: 105-107.
40. Kang SS, Kim JS, Xu YN, Kim YH (1999) Isolation of a new cerebroside from the root bark of *Aralia elata*. *J Nat Prod* 62: 1059-1060.
41. Liu JK, Hu L, Dong ZJ (2003) A Glucosylceramide with a Novel Ceramide and Three novel ceramides from the basidiomycete *Cortinarius umidicola*. *Lipids* 38: 669-675.
42. Yang G, Sandjo L, Yun K, Leutou AS, Kim GD, et al. (2011) Flavusides A and B, Antibacterial Cerebrosides from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus flavus*. *Chem Pharm Bull* 59: 1174-1177.
43. Lee SR, Jung K, Noh HJ, Park YJ, Lee HL, et al. (2015) A new cerebroside from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* and its applicability to cancer treatment. *Bioorg Med Chem Lett* 25: 5712-5715.
44. Wang W, Wang Y, Tao H, Peng X, Liu P, et al. (2009) Cerebrosides of the Halotolerant Fungus *Alternaria raphani* isolated from a Sea Salt Field. *J Nat Prod* 72: 1695-1698.
45. Inagaki M, Isobe R, Kawano Y, Miyamoto T, Komori T, et al. (1998) Isolation and structure of three new ceramides from the Starfish *Acanthaster planci*. *Eur J Org Chem* 129-131.
46. Lin WY, Yen MH, Teng CM, Tsai IL, Chen IS (2004) Cerebrosides from the rhizomes of *Gynura japonica*. *J Chin Chem Soc* 51: 1429-1434.
47. Kuate V (2010) Potential of Cameroonian plants and derived-products against microbial infections: a review. *Planta Med* 76: 1-13.
48. Rakholiya K, Vaghela P, Rathod T, Chanda S (2014) Comparative Study of Hydroalcoholic Extracts of *Momordica charantia* L. against Foodborne Pathogens. *Indian J Pharm Sci* 76: 148-156.
49. Caneschi CA, De Almeida AM, Martins FJ, Hyaric ML, Oliveira MME, et al. (2017) In vitro antifungal activity of organic compounds derived from amino alcohols against onychomycosis. *Braz J Microbiol* 48: 476-482.
50. Wu T, He M, Zang X, Zhou Y, Qiu T, et al. (2013) A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochim Biophys Acta* 1828: 2751-2756.
51. Wansi JD, Lallemand MC, Chiozem DD, Toze FAA, Mbaze LM, et al. (2007)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). *Phytochem* 68: 2096-2100.
52. Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W (2014)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *FSHW* 3: 136-174.





## Research Article

## Open Access

Jean Noël Nyemb\*, Larissa Mekontso Magnibou, Emmanuel Talla, Alembert Tiabou Tchinda, Roland Tchuente Tchuenguem, Celine Henoumont, Sophie Laurent, Joseph Tanyi Mbafor

# Lipids constituents from *Gardenia aqualla* Stapf & Hutch

<https://doi.org/10.1515/chem-2018-0035>

received January 3, 2018; accepted February 5, 2018.

**Abstract:** *Gardenia aqualla* a plant of the Rubiaceae family is being used extensively in Africa, particularly in Cameroon as an herbal medicine. Therefore it is necessary to have knowledge of the constituents of the plant of our native species. Thus, the aim of the present study was to investigate chemical constituents of this herbal medicine. Nine compounds, including one alkane, n-Nonacosane (1), two aliphatic alcohols n-heptatriacontanol (2) and n-Docosanol(3), one fatty ester, Heptadecyl heptacosanoate (4), two sugars, D-mannitol (5) and D-mannitol acetate (6), and a mixture of three phytosterols,  $\beta$ -sitosterol (7), stigmasterol (8) and fucosterol (9), have been isolated and purified from the stem barks of *Gardenia aqualla* Stapf & Hutch. Their structures were elucidated using spectroscopic analyses, including 1D and 2D NMR and ESI-MS. The fatty acid ester, heptadecyl heptacosanoate (4) is reported here for the first time. All the isolated compounds were tested for their antimicrobial activities against four Gram negative bacteria (*Salmonella Typhimurium* ATCC6539,

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9721, *Escherichia coli*, and *S. Typhi*) and four yeasts (*Candida albicans* ATCC9002, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida krusei* and *C. albicans*).

**Keywords:** *Gardenia aqualla* stem barks; Alkanes; Alcohols; Fatty acid esters; Antimicrobial.

## 1 Introduction

In Africa, much like elsewhere in the whole world, plants have always been an important source of natural products with very high therapeutic values. Many people are still interested in using natural products from plants for curative and preventive medicine. Thus, it has been estimated that over 60% of the world population and 80% of the population of developing countries still directly rely on medicinal plants, for their primary health care needs [1]. Hostettmann et al. [2] stated that in some African countries, up to 90% of the population still depended exclusively on medicinal plants as a source of medicines. Nowadays, people are still very interested in medicinal plants. Thus, with this growing interest in the field of medicinal plants, there is a great need to produce databases that would contain as much information as possible about the secondary metabolites produced by plants and their importance in today's world. About 15% of the known angiosperm species in tropical regions have been examined for their pharmacological properties [3]. Therefore, there are most definitely a large number of plant-derived medicines and other useful compounds that have yet to be discovered and characterized around the world.

Cameroon has a very rich and diverse flora estimated in 2003 at 8,620 known plants species [4], that a large majority of population are using some of them as medicines for their primary healthcare. However, in the Cameroonian pharmacopoeia, there is still a serious lack of information on the uses and the phytochemical content of a large number of plants and spices traditionally employed in

\*Corresponding author: Jean Noël Nyemb, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon; Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Ngaoundere, P.O. Box 454, Ngaoundere, Cameroon, E-mail: nyembjeannoel@gmail.com.

Larissa Mekontso Magnibou, Emmanuel Talla: Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Ngaoundere, P.O. Box 454, Ngaoundere, Cameroon

Alembert Tiabou Tchinda: Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Ministry of Scientific Research and Innovation, P.O. Box 6163 Yaounde, Cameroon

Roland Tchuente Tchuenguem: Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, P.O. Box 67, Dschang, Cameroon

Celine Henoumont, Sophie Laurent: Department of General, Organic and Biomedical Chemistry, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Mons, NMR and Molecular Imaging Laboratory, B-7000 Mons, Belgium

Joseph Tanyi Mbafor: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

the treatment of several ailments. *Gardenia aqualla* Stapf & Hutch (Rubiaceae) is among those medicinal plants extensively used in Cameroon and not well documented.

Known as “Dingale” in Ffulde in the Adamawa Region of Cameroon, *Gardenia aqualla* is a bushy shrub or a small tree that grows up to 3 m high and belongs to the Sudanese to Sudano-Guinean savannahs on shady lowlands and alluvial terraces [5]. It is widely distributed from Senegal to Cameroon and as far as Sudan, scattered, locally common. Medicinally, the plant is used in the treatment of several ailments such as leprosy, oral and ear infections [6], dysmenorrhea [7], jaundice, ulcers [8], diabete [9], syphilis [10], cancer [11].

As the plant is being used extensively in our country as an herbal medicine, it is necessary to have knowledge of the constituents of the plant of our native species. Previous phytochemical investigation on this species revealed the presence of steroids, triterpenes and flavonoids in the petroleum ether extract of the stem barks while the methanolic extract was found to contain anthraquinones, carbohydrates, cardiac glycosides, flavonoids, saponins, steroids, tannins and triterpenes [12]. To the best of our knowledge, currently no compound has been isolated from this plant species. The present study aims therefore to investigate chemical constituents of this herbal medicine.

## 2 Experimental Procedures

### 2.1 Plant material

The Stem barks of *G. aqualla* Stapf & Hutch were collected at Dang in the District of Ngaoundere III, Region of Adamawa Cameroon. A voucher is deposited at National Herbarium of Cameroon in Yaounde under number 36894/HNC.

### 2.2 Extraction and isolation

The ground dried stem barks (1.00 kg) were consecutively extracted with Hexane, EtOAc and MeOH to give 6.74 g, 9.42 g and 83.83 g of extracts respectively. A portion (50.0 g) of the MeOH extract was fractionated by silica gel column chromatography using a gradient elution with successively Hexane-EtOAc (1:0→0:1) and EtOAc-MeOH (1:0→0:1). 510 sub-fractions of 300 mL were collected and according to their chromatographic profiles on TLC, they were grouped into six fractions G<sub>1</sub>-G<sub>6</sub>. From the main column seven compounds were obtained, compound 1 at Hexane-EtOAc (9:1) from the assembly of sub-fractions 17-

53, compound 2 at Hexane-EtOAc (1:1) from the assembly of sub-fractions 242-253, compound 5 at Hexane-EtOAc (1:9) from the assembly of sub-fractions 321-366 and compound 6 at EtOAc-MeOH (9:1) from the assembly of sub-fractions 400-402. Fraction G<sub>3</sub> (1.96 g) was further purified on CC of silica gel using a gradient polarity of hexane-EtOAc (1:0→6:4) leading to compound 3 from the sub-fractions 17-18, compound 4 from the sub-fractions 21-22, and from the assembly of sub-fractions 25-28 compounds 7, 8 and 9 were obtained as a mixture. All these last five compounds were obtained at the same polarity (Hexane-EtOAc (9:1)). Nonacosane (1): white solid, m.p. 50–51°C. TOF-MS-ESI<sup>+</sup>: [M+H]<sup>+</sup> at  $m/z = 409.3$ , [M+K]<sup>+</sup> at  $m/z = 447.3$ , and [2M+K+H]<sup>+</sup> at  $m/z = 856.5$  for C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.91 (6H, t,  $J = 7.0$  Hz, 3H-1, 3H-29), 1.59 (4H, m, 2H-2, 2H-28) and 1.20-1.39 [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, brs]. <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 14.1 (C-1, C-29), 22.7 (C-2, C-28), 31.9 (C-3, C-27), and 29.4–29.7 (C-4–C-26) [13].

Heptatriacontanol (2): white solid, m.p. 88–89°C. TOF-MS-ESI<sup>+</sup>: [M+H]<sup>+</sup> at  $m/z = 537.3$ , for C<sub>37</sub>H<sub>76</sub>O. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.65 (2H, m, 2H-1), 1.60 (2H, m, 2H-2), 1.20-1.39 [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, brs] and 0.89 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, 3H-37). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 63.1 (C-1), 32.8 (C-2), 25.7 (C-3), 29.4–29.7 (C-4–C-34), 31.9 (C-35), 22.7 (C-36) and 14.1 (C-37). [14]

Docosanol (3): white solid, m.p. 58–59°C. TOF-MS-ESI<sup>+</sup>: [M+6NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+6H]<sup>+</sup> at  $m/z = 440.2$  and [M+4NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+3H]<sup>+</sup> at  $m/z = 401.4$ , for C<sub>22</sub>H<sub>46</sub>O. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.67 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz, 2H-1), 1.59 (2H, m, 2H-2), 1.29 [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, brs] and 0.91 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz, 3H-22). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 63.1 (C-1), 32.8 (C-2), 25.7 (C-3), 29.4–29.7 (C-4–C-19), 31.9 (C-20), 22.7 (C-21) and 14.1 (C-22). [15]

Heptadecyl heptacosanoate (4): white solid, m.p. 65–66°C. TOF-MS-ESI<sup>+</sup>: [M+2NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>  $m/z = 685.3$  for C<sub>66</sub>H<sub>138</sub>O<sub>2</sub>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.81 (6H, t,  $J = 7.0$  Hz, 3H-27, 3H-17'), 1.20-1.33 [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, brs], 1.54 (4H, m, 2H-3, 2H-2'), 2.22 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, 2H-2), 4.00 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz, 2H-1'). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 174.0 (C-1), 64.4 (C-1'), 34.4 (C-2), 31.9 (C-25 and C-15'), 29.2-29.7 (C-4–C-24 and C-4'–C-14'), 28.7 (C-2'), 26.0 (C-3'), 25.1 (C-3), 22.7 (C-26 and C-16') and 14.1 (C-27 and C-17').

D-mannitol (5): white solid, m.p. 168–169°C. TOF-MS-ESI<sup>+</sup>: [2M+Na]<sup>+</sup> at  $m/z = 387.2$  for C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 4.41 (2H, d,  $J = 5.5$  Hz, HO-2 and 5), 4.33 (2H, t,  $J = 5.7$  Hz, HO-1 and 6), 4.13 (2H, d,  $J = 7.1$  Hz, HO-3 and 4), 3.62 (2H, ddd,  $J = 10.8, 5.7, 3.5$  Hz, H-1a and 6a), 3.56 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-3 and 4), 3.47 (2H, m, H-2 and 5) and 3.39 (2H, m, H-1b and 6b). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 63.8 (C-1 and 6), 71.3 (C-2 and 5) and 69.7 (C-3 and 4). [16]

D-mannitol acetate (6): white solid, m.p. 123–124°C. TOF-MS-ESI<sup>+</sup>: [M+Na]<sup>+</sup> at  $m/z = 247.1$  and [M+Na]<sup>+</sup> at  $m/z = 471.1$  for C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 4.75 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, HO-2), 4.41 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz, HO-5), 4.33 (1H, t,  $J = 5.7$  Hz, HO-6), 4.28 (2H, ov, H-1a and HO-3), 4.14 (2H, d,  $J = 7.1$



Hz, HO-4), 3.96 (1H, m, H-1b), 3.68 (1H, m, H-2), 3.62 (1H, m, H-6a), 3.54 (2H, m, H-3 and 4), 3.47 (1H, m, H-5) and 3.40 (1H, m, H-6b), 2.03 (3H, s,  $\text{OCOCH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  20.8 ( $-\text{OCOCH}_3$ ), 63.8 (C-6), 67.0 (C-1), 68.2 (C-2), 69.3 (C-3), 69.4 (C-4), 71.2 (C-5) and 170.5 ( $-\text{OCOCH}_3$ ).

$\beta$ -sitosterol (7): white solid.  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 5.35 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz, H-6), 3.53 (1H, ddd,  $J = 15.9, 11.0, 4.6$  Hz, H-3), 1.04 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-27), 0.95 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H<sub>3</sub>-26), 0.88 (3H, d,  $J = 1.8$  Hz, H<sub>3</sub>-21), 0.85 (3H, ov, H<sub>3</sub>-29) and 0.71 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  37.3 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 31.9 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 71.8 (CH, C-3), 42.4 ( $\text{CH}_2$ , C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (CH, C-6), 31.7 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 31.9 (CH, C-8), 50.2 (CH, C-9), 36.6 (C, C-10), 21.1 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 39.8 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 42.3 (CH, C-13), 56.8 (CH, C-14), 24.3 ( $\text{CH}_2$ , C-15), 28.2 ( $\text{CH}_2$ , C-16), 56.1 (CH, C-17), 11.9 ( $\text{CH}_3$ , C-18), 19.0 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 36.2 ( $\text{CH}_2$ , C-20), 18.8 ( $\text{CH}_3$ , C-21), 34.0 ( $\text{CH}_2$ , C-22), 26.3 ( $\text{CH}_2$ , C-23), 45.9 (CH, C-24), 29.3 (CH, C-25), 19.4 ( $\text{CH}_3$ , C-26), 19.8 ( $\text{CH}_3$ , C-27), 23.1 ( $\text{CH}_2$ , C-28), 12.0 ( $\text{CH}_3$ , C-29). [17]

Stigmasterol (8): white solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 5.38 (1H, m, H-6), 5.14 (1H, ov, H-22), 5.05 (1H, dd,  $J = 15.2, 8.7$  Hz, H-23), 3.56 (1H, ddd,  $J = 15.8, 11.0, 4.5$  Hz, H-3), 1.04 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-27), 0.95 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H<sub>3</sub>-26), 0.88 (3H, d,  $J = 1.8$  Hz, H<sub>3</sub>-21), 0.85 (3H, ov, H<sub>3</sub>-29) and 0.71 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 37.2 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 31.9 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 71.8 (CH, C-3), 42.3 ( $\text{CH}_2$ , C-4), 140.8 (C, C-5), 121.7 (CH, C-6), 31.7 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 31.9 (CH, C-8), 50.2 (CH, C-9), 36.5 (C, C-10), 21.1 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 39.8 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 42.3 (C, C-13), 56.8 (CH, C-14), 24.3 ( $\text{CH}_2$ , C-15), 28.2 ( $\text{CH}_2$ , C-16), 56.1 (CH, C-17), 12.1 ( $\text{CH}_3$ , C-18), 19.0 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 40.5 ( $\text{CH}_2$ , C-20), 18.8 ( $\text{CH}_3$ , C-21), 138.4 (CH, C-22), 129.3 (CH, C-23), 51.2 (CH, C-24), 45.9 (CH, C-25), 19.4 ( $\text{CH}_3$ , C-26), 19.8 ( $\text{CH}_3$ , C-27), 24.3 ( $\text{CH}_2$ , C-28), 12.3 ( $\text{CH}_3$ , C-29). [18]

Fucosterol (9): white solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 5.38 (1H, m, H-6), 5.17 (1H, ov, H-28), 3.56 (1H, ddd,  $J = 15.8, 11.0, 4.5$  Hz, H-3), 1.57 (3H, ov, H-29), 1.04 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-27), 0.95 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H<sub>3</sub>-26), 0.88 (3H, d,  $J = 1.8$  Hz, H<sub>3</sub>-21) and 0.71 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 37.2 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 31.9 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 71.8 (CH, C-3), 42.3 ( $\text{CH}_2$ , C-4), 140.8 (C, C-5), 121.7 (CH, C-6), 31.7 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 31.9 (CH, C-8), 50.2 (CH, C-9), 36.5 (C, C-10), 21.1 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 39.8 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 42.3 (C, C-13), 56.8 (CH, C-14), 24.3 ( $\text{CH}_2$ , C-15), 28.2 ( $\text{CH}_2$ , C-16), 56.1 (CH, C-17), 11.8 ( $\text{CH}_3$ , C-18), 19.3 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 36.5 ( $\text{CH}_2$ , C-20), 18.8 ( $\text{CH}_3$ , C-21), 36.1 (CH, C-22), 26.1 (CH, C-23), 145.9 (CH, C-24), 34.0 (CH, C-25), 21.1 ( $\text{CH}_3$ , C-26), 21.1 ( $\text{CH}_3$ , C-27), 116.4 ( $\text{CH}_2$ , C-28), 12.8 ( $\text{CH}_3$ , C-29). [19]

## 2.3 Antimicrobial assays

Antibacterial and anticandidal activities of isolated compounds were performed against four bacterial strains

(*Salmonella Typhimurium* ATCC6539, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9721, *Escherichia coli*, and *S. Typhi* isolate) and four strains of yeast (*Candida albicans* ATCC9002, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida krusei* and *Candida albicans* isolate). Minimum inhibitory concentrations (MICs), minimum bactericidal concentrations (MBCs) and minimum fungicidal concentrations (MFCs) were determined by the broth microdilution method as previously described by Nyemb et al. [20] and Dzoyem et al. [21] respectively for antibacterial and antifungal activities. Ciprofloxacin was used as standard drug for antibacterial assay, while ketoconazole was used as positive control for the antifungal assay. All the experiments were carried out in triplicate.

Ethical approval: The conducted research is not related to either human or animals use.

## 3 Results and Discussion

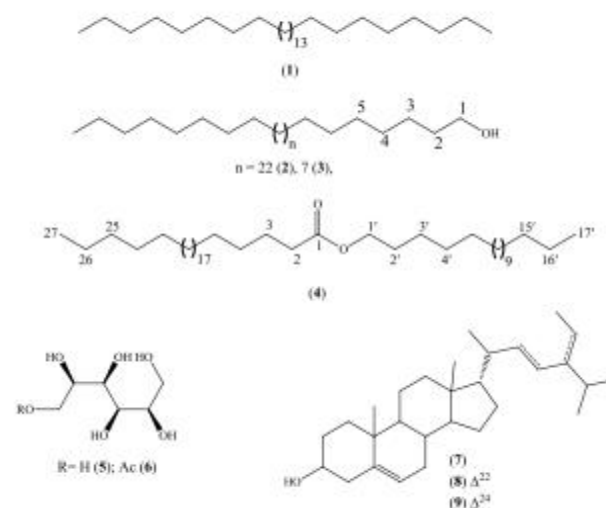


Figure 1: Isolated compounds from *G. aqualla* stem barks.

Compound 4 was obtained as a white powder. Its molecular formula was found to be  $\text{C}_{66}\text{H}_{88}\text{O}_2$  on the basis of its TOF-MS-ESI<sup>+</sup> spectra that showed pseudo-molecular ion peak  $[\text{M}+2\text{NH}_4^++\text{H}]^+$  at  $m/z = 685.3$ . The  $^1\text{H}$  NMR had peaks characteristics of aliphatic esters [22-24]. The spectrum revealed the presence of a signal of two protons triplet at  $\delta_{\text{H}}$  4.00 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz) probably due to the 2H-1' deshielded by the proximity of the ester function fixed on the same carbon C-1', a broad signal between  $\delta_{\text{H}}$  1.20 and 1.33 was attributed to the hydrocarbon chain ( $\text{CH}_2$ )<sub>n</sub>, this signal showed an integration of 74 protons corresponding to 37 methylene groups. A triplet of six protons at  $\delta_{\text{H}}$  0.81 (6H, t,  $J = 7.0$  Hz) corresponding to two terminal

methyl groups was also visible. The  $^1\text{H}$  NMR spectra also displayed a signal of two protons triplet at  $\delta_H$  2.22 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz) attributed to the methylene protons adjacent to the carbonyl group of the ester function. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data indicated characteristic signals of a fatty ester among which a signal of a carbonyl ester function at  $\delta_C$  174.0 attributable to the C-1, a signal of a methylene carbon at  $\delta_C$  64.3 (C-1') deshielded by the proximity of the ester function, a signal at  $\delta_C$  14.1 corresponding to the terminal methyl groups (C-27 and C-17'). The remaining methylene carbons appeared between  $\delta_C$  22.7 and 31.9 were assigned accordingly. The COSY spectra of compound **4** revealed one spin system associated with the alkane long chain. Thus, the methyls at  $\delta_H$  0.81 (6H, t,  $J = 7.0$  Hz) correlated with a set of protons at  $\delta_H$  1.20 which in turn correlated with the methylene protons at  $\delta_H$  1.54 (*m*). The correlations of the methylene at  $\delta_H$  1.54 with the ones at  $\delta_H$  2.22 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz) and 4.00 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz) respectively were also visible (Figure 2). From the HMBC spectra of compound **4**, long range correlations were unambiguously detected between the protons 2H-1' at  $\delta_H$  4.00 and carbons C-2' ( $\delta_C$  28.4), C-3' ( $\delta_C$  26.0) and C-1 ( $\delta_C$  174.0); methylene protons 2H-2' ( $\delta_H$  1.54) and carbons C-1' ( $\delta_C$  64.3), C-3' ( $\delta_C$  26.0), C-4' ( $\delta_C$  29.1) and C-1 ( $\delta_C$  174.0). Another set of long range correlations was observed between the methylene at  $\delta_H$  2.22 (2H-2) and C-1 ( $\delta_C$  174.0), C-3 ( $\delta_C$  25.1) and C-4 ( $\delta_C$  29.2) (Figure 2). On the basis of above discussion the structure of compound **4** was elucidated as heptadecyl heptacosanoate. The mass spectral fragmentation was also consistent with the proposed structure. The prominent ion fragments arising at  $m/z$  393.3 [ $\text{M}-\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{O}^\bullet$ ] $^+$  and 409.2 [ $\text{M}-\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{O}_2^\bullet$ ] $^-$  (Figure 3) suggested that heptacosanoic acid was esterified with heptadecanol. The fragment ion arising at  $m/z$  315.2 [ $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2+\text{NH}_4^+-\text{H}^+$ ] $^+$  correspond to the loss of hexacosene ( $\text{C}_{26}\text{H}_{52}$ ) through a Mc Lafferty rearrangement. Further loss of 113 uma ( $\text{C}_8\text{H}_{17}^\bullet$ ) by this fragment led to the base peak at  $m/z$  185.0.

Nonacosane (**1**), heptatriacontanol (**2**), Docosanol (**3**), D-mannitol (**5**), D-mannitol acetate (**6**), and a mixture of  $\beta$ -sitosterol (**7**), stigmasterol (**8**) and fucosterol (**9**) in a ratio of 3:1:2 (estimated from the relative intensities of protons H-22 and H-23 of stigmasterol (**8**), H-28 of fucosterol (**9**) and H-6 in  $^1\text{H}$ -NMR signals), were also isolated and characterized from spectral analysis and comparison with the literature [13-19].

The antibacterial and anticandidal activities of compounds which were in sufficient amount were investigated using the broth microdilution method. This microdilution method has been adopted because it is less expensive, less cumbersome than the macrodilution method and it yields reproducible results. Bacterial



Figure 2: Important COSY and HMBC correlations of compound **4**.

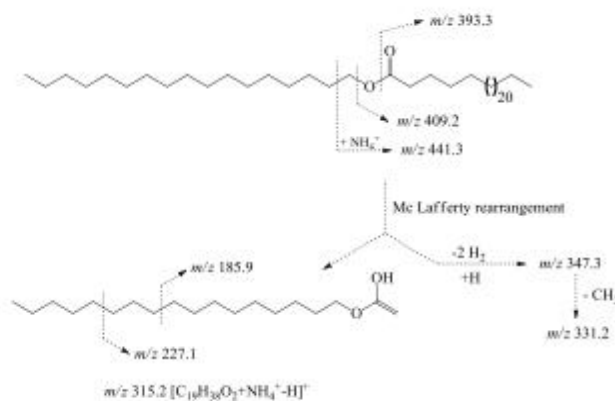


Figure 3: Important fragmentation of compound **4**.

growth could be assessed either visually by grading turbidity or spectrophotometrically by measuring optical density. The MICs and MFCs of all the tested compounds were determined (Table 1). The tested compounds showed variable antimicrobial activity with MICs values ranging from 32 to 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . D-mannitol (**5**) and D-mannitol acetate (**6**) presented the highest antibacterial activities depending on the bacteria strains, while they were inactive ( $> 128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) against all tested yeast strains. These two compounds had the same activities (MIC = 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) against the isolate strains of *E. coli* and *S. typhi*. This activity has decreased for D-mannitol acetate (**6**) against *S. typhi* ATCC6539 (MIC = 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and increased against *P. aeruginosa* ATCC972. The highest antifungal activity (MIC = 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was recorded for docosanol (**3**) and the mixture of phytosterols  $\beta$ -sitosterol (**7**), stigmasterol (**8**) and fucosterol (**9**) against all the tested yeast except for *C. parapsilosis* which was not sensitive to the mixture of phytosterols.

## 4 Conclusion

This study conducted on the stem barks of *Gardenia aqualla*, is a part of our research on the bioactive constituents of the medicinal plant of Cameroon pharmacopeae. *G. aqualla* is a medicinal plant growing in the Sudano-Guinean savannahs of the country. From the MeOH extract of the plant stem barks, nine compounds were isolated and their structures were elucidated by

Table 1: MICs, MBCs and MFCs of some isolated compounds.

| Microorganism          |           | Tested compounds and MIC, MBC and MFC values (µg/mL) |     |     |     |     |     |     |     |       |     | Ciprofloxacin |     |
|------------------------|-----------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|---------------|-----|
|                        |           | 3  |     | 4   |     | 5   |     | 6   |     | 7+8+9 |     | MIC           | MBC |
| Bacteria               |           | MIC  | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC   | MBC | MIC           | MBC |
| <i>E. coli</i>         | Isolate   | 128  | -   | 128 | -   | 64  | 128 | 64  | -   | 128   | -   | 0.5           | 0.5 |
|                        | ATCC6539  | -  | -   | 128 | -   | 32  | 128 | 128 | -   | 128   | 128 | 0.5           | 1   |
| <i>S. typhi</i>        | Isolate   | 128  | -   | 128 | -   | 32  | 32  | 32  | -   | -     | -   | 0.5           | 0.5 |
| <i>P. aeruginosa</i>   | ATCC9721  | 128  | 128 | 128 | 128 | 128 | 128 | 64  | 128 | -     | -   | 0.5           | 1   |
| Yeasts                 |           | MIC  | MFC | MIC | MFC | MIC | MFC | MIC | MFC | MIC   | MFC | ketoconazole  |     |
| <i>C. parapsilosis</i> | ATCC22019 | 128  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -     | -   | 2             | 16  |
|                        | ATCC9002  | 128  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 128   | -   | 0.5           | 64  |
| <i>C. albicans</i>     | Isolate   | 128  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 128   | -   | 0.25          | 64  |
| <i>C. krusei</i>       | Isolate   | 128  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 128   | -   | 2             | 64  |

(-): >128 µg/mL. *E. coli*: *Escherichia coli*; *S. typhi*: *Salmonella Typhimurium*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *C. parapsilosis*: *Candida parapsilosis*; *C. albicans*: *Candida albican*; *C. krusei*: *Candida krusei*

extensive NMR spectroscopy and Mass Spectrometry. This is the first report on the isolation of compounds from this plant species and to the best of our knowledge, compound 4 is reported here for the first time from plant kingdom, while compounds 1, 2, 3, 6 and 9, are reported here for the first time from the genus *Gardenia*.

**Acknowledgments:** This work was supported by the International Foundation of Science (IFS) Grant No. F/5776-1 awarded to Mr JNN.

**Conflict of interest:** Authors state no conflict of interest.

## References

- Shrestha P.M., and Dhillon S.S. Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal. *J. Ethnopharmacol.*, 2003, 86, 81-96.
- Hostettmann K., Marston A., Ndjoko K., Wolfender J.-L., 2000. The potential of African plants as a source of drugs. *Curr. Org. Chem.*, 2000, 4, 973-1010.
- Misganaw T., Alemayehu Y., and Negera A. Assessment of Antibacterial Activities and Phytochemical Screening of Leaf and Fruit of *Solanum marginatum*. *J. Biol. Chem. Res.*, 2015, 32(2), 966-971.
- Kuete V., and Efferth T., 2010. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Front. Pharmacol.*, 1, 1-19.
- Arboreli M., Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Editions Quae/MNHN, France, 2009.
- Burkill H.M., Useful plants of West Tropical Africa. Edinburgh: Royal Botanic Garden, 1985.
- Jiofack T., Ayissi L., Fokunang C., Guedje N., Kemeuze V., Ethnobotany and phytomedicine of the upper Nyong valley forest in Cameroon, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 2009, 3(4), 144-150.
- Oluranti A.C., Michael U.O., Jane U.-O.C., Ayembe N.A., Ethno botanical studies of medicinal plants used in the management of Peptic ulcer disease in Sokoto State, North Western Nigeria, *Int. Res. J. Pharm. Pharmacol.*, 2012, 2(9), 225-230.
- Awede B., Houetcheignon P., Djego J.G., Djirou F., Gbenou J., Laleye A., Effects of *Lophira lanceolata* and of Three Species of *Gardenia* Leaves Aqueous Extracts on Blood Glucose and Lipids in Wistar Rat, *J. Physiol. Pharm. Adv.*, 2015, 5(10), 757-765.
- Nethengwe M.F., Opoku A.R., Dlodla P.V., Madida K.T., Shonhai A., Smith P., et al., Larvicidal, antipyretic and antiplasmodial activity of some Zulu medicinal plants, *J. Med. Plant. Res.*, 2012, 6(7), 1255-1262.
- Simo T.R., Telefo B.F., Nyemb J.N., Yemele D.M., Njina S.N., Goka S.M.C., et al., Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *APJTM.*, 2014, 7, S442-S447.
- Njinga N.S., Sule M.I., Pateh U.U., Hassan H.S., Usman M.A., Bilkisu A., et al., Phytochemical and antimicrobial activity of stem-bark of *Gardenia aqualla* Stapf and Hutch (Rubiaceae), *J. Med. Plants Res.*, 2014, 8(27), 942-946.
- Tripathi S.K., Asthana R.K., Ali A., Isolation and characterization of 5-ethylhentriacontane and Nonacosane from *Salvia plebeian*. *Asian J. Chem.*, 2006, 18, 1554-1556.
- Gohar A.A., Heptatriacontanol and phenolic compounds from *Halochris hispida*. *OJBS*, 2001, 1(9), 843-845.
- De Almeida B.C., Araújo B.Q., Barros E.D.S., Freitas S.D.L., Maciel D.S.A., Ferreira A.J.S., et al., Dammarane Triterpenoids from Carnauba, *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (Arecaceae), *Wax. J. Braz. Chem. Soc.*, 2017, 28(8), 1371-1376.
- Branco A., Santos J.D.G., Pimentel M.M.A.M., Osuna J.T.A., Lima L.S., David J.M., D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. *Ind. Crops and Prod.*, 2010, 32, 507-510.
- Sheng Z., Dai H., Pan S., Wang H., Hu Y., Ma W., Isolation and Characterization of an  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from *Musa spp.* (Baxijiao) Flowers. *Molecules*, 2014, 19, 10563-10573.
- Ahmed Y., Rahman S., Akhtar P., Islam F., Rahman M., Yaakob Z., Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii*. *IFRJ*, 2013, 20(5), 2939-2943.
- Majik M.S., Adel H., Shirodkar D., Tilvi S., Furtado J. Isolation of Stigmast-5,24-dien-3-ol from marine brown algae *Sargassum*

- tenerrimum* and its antipredatory activity. RSC Adv., 2015, (5), 51008-51011.
- [20] Nyemb J.N., Tchinda T.A., Talla E., Nanga E.B., Ngoudjou T.D., Henoumont C., et al., Vitellaroside, a new cerebroside from *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) and its bioactivities, Nat. Prod. Chem. Res., 2018, 6, 306. doi:10.4172/2329-6836.1000306.
- [21] Dzoyem J.P., Tchuenguem T.R., Kuate J.R., Teke N.G., Kechia FA., Kuete V., *In Vitro* and *in vivo* antifungal activities of selected Cameroonian dietary spices, BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, 14(58), 1-8.
- [22] Gupta M.M., Verma R.K. Lipid Constituents of *Cissus Quadrangularis*, Phytochem., 1991, 30(3), 875-878.
- [23] Najib S., Ahamad J., Ali M., Mir S.R., Isolation and characterization of fatty acid esters from the seeds of *Cichorium intybus*, AJPCT, 2014, 2(4), 469-473.
- [24] Talla E., Daouda D., Nyemb J.N., Sophie L., Vander E.L., Dabole B., et al., Two new compounds from stem barks of *Vepris heterophylla* (Engl.) R. Let. (Rutaceae), J. Chem. Pharm. Res., 2015, 7(7), 553-557.





IF: 0.925

Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

journal homepage: www.apjtm.org



doi: 10.4103/1995-7645.231468

©2018 by the Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. All rights reserved.

## DPPH antiradical scavenging, anthelmintic and phytochemical studies of *Cissus poulnea* rhizomes

Jean Noël Nyemb<sup>1,2✉</sup>, Roland Ndoubalem<sup>2</sup>, Emmanuel Talla<sup>2</sup>, Alembert Tiabou Tchinda<sup>3</sup>, Dieudonné Ndjonka<sup>4</sup>, Celine Henoumont<sup>5</sup>, Sophie Laurent<sup>5</sup>, Joseph Tanyi Mbafor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Ngaoundere, P.O. Box 454, Ngaoundere, Cameroon

<sup>3</sup>Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Ministry of Scientific Research and Innovation, P.O. Box 6163 Yaounde, Cameroon

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Ngaoundere, P.O. Box 454, Ngaoundere, Cameroon

<sup>5</sup>Department of General, Organic and Biomedical Chemistry, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Mons, NMR and Molecular Imaging Laboratory, B-7000 Mons, Belgium

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 January 2018

Received in revised form 25 February 2018

Accepted 9 March 2018

Available online 2 April 2018

#### Keywords:

*Cissus populnea*

*Onchocerca ochengi*

Antioxidant

Phenolic compounds

Phytochemical constituent

Bergenin

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the phytochemical constituents, antioxidant and anthelmintic activities of the crude methanol extract of *Cissus populnea* (*C. populnea*) rhizomes. **Methods:** Phytochemical screening was performed using standard protocols, and column chromatography of silica gel was used for the compounds isolation. DPPH antiradical scavenging assay was performed in order to evaluate the antioxidant activity. Total phenolic content was evaluated using the Folin–Ciocalteu assay. The anthelmintic activity was screened on the bovine adult male forms of parasitic nematode *Onchocerca ochengi*, by the *in vitro* evaluation of the inhibition of adult worm motility and mortality. Worms were incubated in the presence of different concentrations of the plant extract and effects on survival were monitored after 24 and 48 h. **Results:** The preliminary phytochemical screening revealed the presence of phenolic compounds, saponins, steroids, tannins, and terpenoids. Bergenin and a mixture of phytosterol,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol were isolated from this extract and were identified by nuclear magnetic resonance, mass spectrometry and by comparison with published data. The crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes showed a strong DPPH antiradical activity with a good amount of total phenolic content ((20.69±2.13) g gallic acid equivalent/100 g of extract) and significant anthelmintic activity comparable to the standard drug ivermectin. Bergenin was found to be inactive even after 72 h of incubation. **Conclusions:** This study constitutes the first report on the anthelmintic activity of this plant and supports the traditional use of *C. populnea* as a natural antioxidant and anthelmintic.

## 1. Introduction

Most of the pathologies known in today world are caused or aggravated by the presence of free radicals in the body. These free radicals generated during metabolism are involved in most of degenerative pathologies such as cancer, diabetes, aging, atherosclerosis, hypertension, and heart attack[1]. It has been reported that subjects with parasitic diseases most often present cases of oxidative stress caused by excessive production of potent

reactive oxygen species that can cause tissue damage[2].

*Onchocerca volvulus* (*O. volvulus*) is a helminth transmitted to humans through the bite of infected *Simulium* blackflies breeding in fast-flowing streams and rivers. The presence of this filarial parasite (death or alive) in the body causes chronic lesions of the

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms..

**For reprints contact:** reprints@medknow.com

©2018 Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Produced by Wolters Kluwer- Medknow

**How to cite this article:** Nyemb JN, Ndoubalem R, Talla E, Tchinda AT, Ndjonka D, Henoumont C, et al. DPPH antiradical scavenging, anthelmintic and phytochemical studies of *Cissus poulnea* rhizomes. Asian Pac J Trop Med 2018; 11(4): 280-284.

✉First and corresponding author: Jean Noël Nyemb, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Ngaoundere, P.O Box 454, Ngaoundere, Cameroon.  
E-mail: nyembjeannoel@gmail.com



skin and eyes that can lead to onchocerciasis or river blindness[3]. Onchocercomas are nodule of worms often located in the skin and deeper tissues[3]. Onchocerciasis is still a major cause of blindness in Cameroon. The development of resistance of *O. volvulus* against ivermectin[4] led to a great need to search for new anthelmintic drugs. Several studies reported the efficacy of plant extracts against helminthes[4]. Therefore, anthelmintics from the natural sources may play a key role in the treatment of these parasite infections.

Commonly known as “food gum”, *Cissus populnea* (*C. populnea*) is a useful plant playing a very important role in medicine and in nutrition. Belonging to the genus *Cissus* of Vitaceae family, *C. populnea* is one of the most widespread species of the genus *Cissus*[5]. In Africa, the plant is principally found in the Sahelian zones, in the Sudano-Guinean and Guinean savannahs[5]. In Cameroon, it is found in the regions of Adamaoua, North and Far North where it is seasonal. *C. populnea* has always been used as spice[5,6] and as medicinal plant against a broad spectrum of diseases including intestinal parasites, leprosy[5], and malaria[7,8]. The roots of the plant have been reported to be used as anthelmintic[9]. Several pharmacological studies revealed its antimicrobial[9], antiparasitic[7,10], larvicidal[11], hypoglycemic[12] and antioxidant activities[13]. It has been reported that the leaves, stem barks and roots of *C. populnea* contain tannins, flavonoids, saponins, cyanogenic glycosides, alkaloids, anthraquinones, terpenoids and steroids[14–17]. However, there are no reports on phytochemical studies as well as pharmacological studies of the rhizomes of *C. populnea*. The aim of this study was to determine the chemical composition of the crude methanol extract of the rhizomes of *C. populnea* as well as to investigate its *in vitro* antioxidant and anthelmintic activities.

## 2. Materials and methods

### 2.1. General experimental procedures

Column chromatography was performed on silica gel 60 (Merck, 70–230 Mesh) with *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc) and methyl alcohol (MeOH) as eluents. The column chromatography was monitored by thin layer chromatography and UV light (254 and 365 nm), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% followed by heating at 105 °C was used for spots detection. A spectrometer Bruker Avance AV-500 was used for <sup>1</sup>H NMR (500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) respectively. Tetramethylsilane was used as internal standard, while CDCl<sub>3</sub> or DMSO-*d*<sub>6</sub> was used as solvents. A Q-TOF Ultima spectrometer (Waters) was used for TOF-ESI-MS spectra (ionization voltage 3 kV), while a Rayleigh Vis-723N spectrophotometer was used for absorbance reading.

### 2.2. Plant material, extraction and isolation

The rhizomes of *C. populnea* Guill & Perr. were collected in September 2014 in Ngaoundere, Adamawa-Cameroon. The plant

was authenticated in the Cameroon National Herbarium (CNH), Yaounde (Cameroon) where a voucher specimen (36962/HNC) was deposited. The plant material was dried in the shade and protected from light and moisture in a well-ventilated room at 30 °C.

A total of 450 g of dried powder was macerated trice in 1.5 L of MeOH with constant shaking 3 times/d for 3 d. After filtration and evaporation of the combined filtrates, 40 g of the resulting crude methanol extract was subjected to column chromatography of silica gel using Hexane/EtOAc (1:0–0:1) and EtOAc-MeOH (1:0–0:1) as solvent to give five fractions (S1 to S5) according to their thin layer chromatography profiles. From the main column, three known compounds, Bergenin (300 mg), and a mixture of β-sitosterol and stigmasterol (15 mg) were obtained. The structures of all the compounds were elucidated by comparison of their spectroscopic nuclear magnetic resonance (NMR) data to those of the literature[18,19].

### 2.3. Phytochemical screening

The preliminary phytochemical content of extracts was evaluated according to the methods described by Talla *et al*[20] with slight modifications.

#### 2.3.1. Alkaloids

Few drops of Dragendroff's reagent were added to 3 mL of the extract. Red precipitate indicated the presence of alkaloids.

#### 2.3.2. Phenolic compounds

Bluish-black color appearing after adding 2 or 3 drops of a solution of FeCl<sub>3</sub> in the dissolved extract indicated the presence of phenols.

#### 2.3.3. Steroids and terpenoids

When an equal volume of acetic anhydride and concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to the extract, the appearance of blue (or green) color or golden yellow color indicated the presence of steroids or triterpenoids respectively.

#### 2.3.4. Saponins

Persistent foam, result of shaking the extract in distilled water for 10–15 min indicated the presence of saponins.

#### 2.3.5. Tannins

For detection, 3–5 drops of a 1% gelatin solution containing NaCl 10% were added to an aliquot of 3 mL of the extract. White precipitates indicated the presence of tannins.

### 2.4. Determination of total phenolic content

The Folin–Ciocalteu assay was used for the determination of total phenolic content as described by Talla *et al*[20] with slight modifications. Briefly, an aliquot of 0.1 mL of extract (0.2 mg/mL) was allowed to react with 0.2 mL of Folin–Ciocalteu reagent (Sigma, 0.2 mol/L), 2 mL of H<sub>2</sub>O for 3–5 min, then 1 mL of 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

(Labosi, 99.5%) and the mixture was incubated at room temperature for 60 min. Absorbances were then taken at 760 nm. Gallic acid was used as standard and results were expressed as milligram gallic acid equivalent (mg GAE)/g dry weight of plant material.

### 2.5. DPPH radical-scavenging assay

DPPH radical scavenging assay was performed according to the protocol described by Jamshed *et al.*[21] with some modifications. In a 96-well plate (Costar), 10  $\mu$ L of sample reacted with 90  $\mu$ L of DPPH (1.1 mmol/L) then incubated at 37  $^{\circ}$ C for 30 min. After incubation, absorbances were read at 517 nm on a microplate reader. Eight dilutions of each sample were prepared and tested in triplicate. All samples were dissolved in DMSO then dilute with H<sub>2</sub>O (final concentration of DMSO <2%), and the DPPH solution was prepared in MeOH. *n*-Propylgallate (Sigma-Aldrich, 97%) and 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (Sigma-Aldrich,  $\geq$ 98%) were used as positive control, while 10% DMSO was used as negative control. Percent radical scavenging activity (%) of samples was determined using the formula below:

Percent radical scavenging activity (%) = 100/Absorbance of sample/Absorbance of reference  $\times$  100.

### 2.6. Anthelmintic activity

#### 2.6.1. Extraction and in vitro screening assay of *Onchocerca ochengi* (*O. ochengi*) adults worms

Cattle skins containing nodules of *O. ochengi* was carefully washed and sterilized with 10% povidone iodine for dissection[22]. Adult males of *O. ochengi* were then isolated from nodules with collagenase at 37  $^{\circ}$ C, washed with phosphate-buffered saline and transferred to the culture medium which consisted of a solution of RPMI-1640 containing penicillin/streptomycin (100 U/100  $\mu$ g/mL). Six individual worms (one per microliter culture medium in each well) were then incubated with different concentrations of samples in culture medium. A MTT colorimetric assay was used to determine the cell viability of worms, and their mortality was determined after 24 and 48 h. All assays were conducted at 37  $^{\circ}$ C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in humidified air.

#### 2.6.2. Samples preparation and in vitro assay

Stock solutions of samples (4 mg/mL) were prepared in 100% DMSO. In order to determine the lethal concentration of sample required to kill 50% of the worms (LC<sub>50</sub>), samples were tested in triplicate at six different concentrations obtained by serial dilution starting with a concentration of 1.00 mg/mL. In each well of a 24-well plate, an aliquot of 1 000  $\mu$ L of each concentration was added to six washed adult worms and then incubated at 37  $^{\circ}$ C in RPMI-1640 medium containing *L*-glutamine, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100  $\mu$ g/mL). After 24 and 48 h of incubation, mortality of worms was checked on microscope. Fully elongated and immotile worms were considered as dead. Ivermectin (2.5 mmol/L) prepared in M9-DMSO 10% was used as positive control, while M9-DMSO

10% was used as negative control. LC<sub>50</sub> values were determined and the results are expressed as mean values $\pm$ standard error of the mean (SEM).

### 2.7. Statistical analysis

The results were presented as mean $\pm$ SEM. Significance between the control and the treated groups were determined by Fisher's *LSD* test and a two-way ANOVA using GraphPad Prism 6 Software, Inc. (San Diego, CA, USA). Significant differences between mean were considered at *P*<0.05.

## 3. Results

### 3.1. Phytochemical screening

The result of the phytochemical screening of the crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes revealed the presence of phenolic compounds, saponins, steroids, triterpenoids, and tanins except alkaloids.

### 3.2. Isolation of compounds

Column chromatography of the crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes led to the isolation of bergenin,  $\beta$ -sistosterol and stigmasterol. The NMR spectra of these compounds are in accordance with reported data for these compounds.

### 3.3. Total phenolic content of the extract

The total phenolic content of the extract was determined from the calibration curve of gallic acid ( $y = 0.288888x + 0.0134$ ,  $r = 0.993$ ), and was found to be (20.69 $\pm$ 2.13) g GAE/100g of extract (g of Gallic acid per 100 g of extract). This result indicated the presence of a good amount of phenolic compounds in the extract.

### 3.4. DPPH radical scavenging activity

The crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes showed a good DPPH anti-radical activity with an inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>) of 16  $\mu$ g/mL. However, this activity of the crude extract was significantly lower than that of the standards *n*-propylgallate and *t*-butylhydroxyanosole [(16.20 $\pm$ 0.62)  $\mu$ g/mL *vs.* (5.56 $\pm$ 0.22)  $\mu$ g/mL; (16.20 $\pm$ 0.62)  $\mu$ g/mL *vs.* (8.84 $\pm$ 0.56)  $\mu$ g/mL]. Bergenin with 17.89% of inhibition was considered as inactive.

### 3.5. Anthelmintic activity

#### 3.5.1. In vitro survival test of *O. ochengi* in RPMI

This assay was done in order to evaluate the survival ability of the parasites in the culture media RPMI. The survival time of adult male worms of *O. ochengi* was found to be 5 d.



### 3.5.2. Effect of the crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes on *O. ochengi* males

The anthelmintic activity against adult *O. ochengi* males was recorded firstly as percent mortality (Figure 1) and then as lethal concentration (LC<sub>50</sub>). After 24 and 48 h of incubation at 37 °C in the presence of different concentrations (0.10, 0.20, 0.40, 0.50, 0.75 and 1.00 mg/mL) of the extract, the mortality rate of worms was found to be time- and concentration-dependent (Figure 1). The extract killed 100% of worms at 1.00 and 0.75 mg/mL respectively after 24 and 48 h. The LC<sub>50</sub> of the crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes against on adult male worms of *O. ochengi* was significantly higher than that of ivermectin ( $P < 0.05$ ) respectively after 24 and 48 h [(0.45±0.03) vs. (0.30±0.02) mg/mL after 24 h; (0.17±0.02) vs. (0.10±0.01) mg/mL after 48 h]. However, no mortality was observed during the experimental period neither in the presence of bergenin nor in the mixture of M9-DMSO, used here as the negative control.

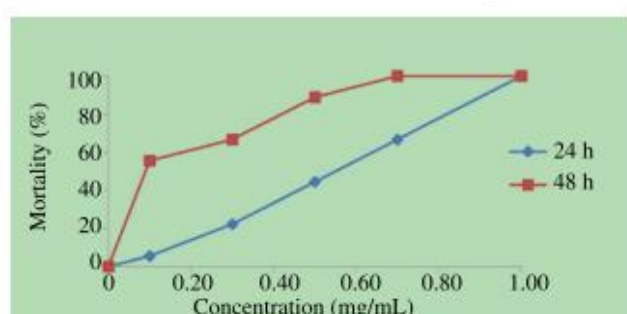


Figure 1. Mortality rates of *O. ochengi* after 24 and 48 h of exposure to the crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes.

## 4. Discussion

The results of phytochemical screening of an extract depend of the solvent used for the extraction. Phenolics, tannins, terpenoids, steroids and saponins revealed in this plant could explain its wide use in traditional medicine, as these families of compounds are well known to possess a broad spectrum of pharmacological activities. Bergenin and the mixture of phytosterol isolated from the crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes belong to the family of phenolic compounds and steroids respectively. This confirmed the result of phytochemical screening that revealed the presence of these two families of compounds. Bergenin had already been reported as an anti-diabetic[23], antimalarial[24,25], and cholinesterase inhibitor[26].

The antioxidant activity of bergenin and the crude extract was measured using the DPPH method. The results were expressed by the mean of IC<sub>50</sub> values for the active samples and by the percentage of inhibition for the inactive ones. After a preliminary screening of all samples, those that showed 50% (or more) of inhibition of the DPPH free radical were diluted and their IC<sub>50</sub> were calculated. The crude extract was screened at the concentration of 2 mg/mL while bergenin and standards were screened at the concentration of 10 mmol/L. The high DPPH radical scavenging activity of the crude methanol extract of *C. populnea* rhizomes corroborates with the presence in this extract

of a good amount of phenolic compounds, and tannins as revealed by the primarily phytochemical studies. The isolated phenolic compound bergenin was found to be inactive against DPPH, and this result corroborates with some previous studies[24,25]. The inactivity of bergenin could be due to the fact that it has only two free –OH phenolic group, with the third one being substituted by –OMe group which is more lipophilic. Moreover, it is known that the more a phenolic compound has adjacent free –OH groups, the more active it is; however, the two –OH groups of bergenin are not adjacent. The thesis of the number of free phenolic –OH groups in bergenin cannot be sufficient to explain its inactivity since one of the positive controls used here (*t*-butylhydroxyanosole) has only one free –OH phenolic group in its structure. Thus, this observed inactivity of bergenin could therefore also be attributed to the proximity of one of the free phenolic –OH groups of the molecule, to the glucoside group which is a large group and which could thus cause a steric hindrance at the approach of the DPPH radical (which by its structure is also a large group). The antioxidant activity of phenolic compounds depends on the number, the position of hydroxyl groups in the molecule and also on the steric hindrance.

The anthelmintic activity of the extract was determined *in vitro* by the evaluation of the inhibition of adult worm motility and mortality. The results of the present study demonstrated the high anthelmintic activity of the methanol extract of *C. populnea* rhizomes. The anthelmintic activity of the extract against *O. ochengi* may be due to the presence of phenolic compounds and tannins as revealed by the preliminary phytochemical screening of the crude extract, as it has been reported that compounds belonging to these two families of metabolites can cause the death of helminth parasites through a known mechanism[27]. To the best of our knowledge, this is the first study on the anthelmintic activity of *C. populnea* as well as bergenin on *O. ochengi*. The crude methanol extract of rhizomes of *C. populnea* should also be active on the human parasite *O. volvulus*, since *O. ochengi* is biologically the closest species to *O. volvulus*.

The present study assessed the crude methanol extract of the rhizomes *C. populnea* for the *in vitro* DPPH free radical scavenging activity and anthelmintic activity against *O. ochengi*. Our results revealed that the crude extract of the rhizomes of *C. populnea* contains a good level of phenolic compounds, significant free radical scavenging activity against DPPH, and a high *in vitro* anthelmintic activity against the filarial parasite *O. ochengi* which may be due to the presence of this high polyphenolic content. The study also reported for the first time the isolation of bergenin and a mixture of phytosterol from the crude methanol extract of the rhizomes of *C. populnea*. As bergenin, the only phenolic compound isolated in this study, was found to be inactive, further studies may be needed to isolate specific compounds responsible for these antioxidant and anthelmintic properties of *C. populnea* rhizomes. This study therefore supports the traditional use of *C. populnea* as a natural antioxidant and anthelmintic.

## Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.



## References

- [1] Raguveer C, Tandon RV. Consumption of functional food and our health concerns. *Pak J Physiol* 2009; **5**: 76-83.
- [2] Mahmoud RAE. Involvement of free radicals in parasitic infestations. *J Appl Animal Res* 2013; **41**(1): 69-76.
- [3] Tamarozzi F, Halliday A, Gentil K, Hoerauf A, Pearlman E, Taylor MJ. Onchocerciasis: The role of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in parasite biology, disease pathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**(3): 459-468.
- [4] Ndjonka D, Abladam ED, Djafsia B, Ajonina-Ekoti I, Achukwi MD, Liebau E. Anthelmintic activity of phenolic acids from the axle wood tree *Anogeissus leiocarpus* on the filarial nematode *Onchocerca ochengi* and drug-resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Helminthol* 2014; **88**: 481-488.
- [5] Arbonnier M. *Trees, shrubs and lianas of West African dry zones*. Versailles, France: Editions Quae; 2004.
- [6] Adebowale KO, Nwokocho LM, Agbaje WB. Composition of *Cissus populnea* stem. *J Food Comp Anal* 2013; **30**: 41-46.
- [7] Shuaibu MN, Wuyep PA, Yanagi T, Hirayama K, Tanaka T, Kouno I. The use of microfluorometric method for activity-guided isolation of antiplasmodial compound from plant extracts. *Parasitol Res* 2008; **102**: 1119-1127.
- [8] Adebayo JO, Krettli AU. Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. *J Ethnopharmacol* 2011; **133**: 289-302.
- [9] Koné WM, Atindehou KK, Terreaux C, Hostettmann K, Traoré D, Dosso M. Traditional medicine in North Côte d'Ivoire: Screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2004; **93**(1): 43-49.
- [10] Atawodi SE, Ameh DA, Ibrahim S. Indigenous knowledge system for treatment of trypanosomiasis in Kaduna state of Nigeria. *J Ethnopharmacol* 2002; **79**: 279-282.
- [11] Azokou A, Koné MW, Koudou BG, Bi HFT. Larvicidal potential of some plants from West Africa against *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae). *J Vector Borne Dis* 2013; **50**: 103-110.
- [12] Geidam MA, Adoga GI, Sanda FA. Effects of aqueous stem bark extract of *Cissus populnea* on some serum enzymes in normal and alloxan induced diabetic rats. *Pak J Biol Sci* 2004; **7**: 1427-1429.
- [13] Akomolafe SF, Oboh G, Akindahunsi AA, Akinyemi AJ, Tade OG. Inhibitory effect of aqueous extract of stem bark of *Cissus populnea* on ferrous sulphate- and sodium nitroprusside-induced oxidative stress in rat's testes *in vitro*. *ISRN Pharmacol* 2013; **2013**: 130989.
- [14] Ojekale AB, Lawal OA, Lasisi AK, Adeleke TI. Phytochemistry and spermatogenic potentials of aqueous extract of *Cissus populnea* (Guill. and Perr.) stem bark. *Sci World J* 2006; **6**: 2140-2146.
- [15] Ibrahim H, Mdaou BB, Ahmed A, Ilyas M. Anthraquinones of *Cissus populnea* Guill & Perr (Amplidaceae). *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011; **8**(2): 140-143.
- [16] Soladoye MO, Chukwuma EC. Quantitative phytochemical profile of the leaves of *Cissus populnea* Guill. & Perr. (Vitaceae) – an important medicinal plant in central Nigeria. *Arch Appl Sci Res* 2012; **4**(1): 200-206.
- [17] Soladoye MO, Chukwuma EC. Phytochemical analysis of the stem and root of *Cissus populnea* (Vitaceae) – an important medicinal plant in Central Nigeria. *Phytol Balcan* 2012; **18**(2): 149-153.
- [18] Lin C-F, Hwang T-L, Lin S-Y, Huang Y-L. Bioactive isocoumarins from *Cissus Pterocladia*. *J Chin Med* 2012; **23**(1): 41-49.
- [19] Zhanwu S, Haofu D, Siyi P, Hui W, Yingying H, Weihong M. Isolation and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Musa* spp. (Baxijiao) flowers. *Molecules* 2014; **19**: 10563-10573.
- [20] Talla E, Nyemb JN, Tchinda AT, Zambou Djou SG, Biyanzi P, Sophie L, et al. Antioxidant activity and a new ursane-type triterpene from *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) stem barks. *EJMP* 2016; **16**: 1-20.
- [21] Iqbal J, Zaib S, Farooq U, Khan A, Bibi I, Suleman S. Antioxidant, antimicrobial, and free radical scavenging potential of aerial parts of *Periploca aphylla* and *Ricinus communis*. *ISRN Pharmacol* 2012; **2012**: 563267.
- [22] Ndjonka D, Ayouba M, Ahamat A, Djafsia B, Ndouwe TMH. In vivo toxicity study and antifilarial activity of four plants from Nord-Cameroon. *EJMP* 2017; **19**(3): 1-12.
- [23] Sariga CD, Shakila R, Kothai S. Isolation, characterization and quantification of bergenin from *Syzygium cumini* stem barks. *Int Res J Pharm* 2014; **6**(2): 108-110.
- [24] Uddin G, Sadat A, Siddiqui BS. Comparative antioxidant and antiplasmodial activities of 11-O-galloylbergenin and bergenin isolated from *Bergenia ligulata*. *Trop Biomed* 2014; **31**(1): 143-148.
- [25] Khan H, Amin H, Ullah A, Saba S, Rafique J, Khan K, et al. Antioxidant and antiplasmodial activities of bergenin and 11-O-galloylbergenin isolated from *Mallotus philippensi*. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 1051925.
- [26] Elufioye TO, Obuotor EM, Agbedahunsi JM, Adesanya SA. Isolation and characterizations of bergenin from *Peltophorum pterocarpum* leaves and its cholinesterase inhibitory activities. *EJMP* 2016; **11**(2): 1-7.
- [27] Athnasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastro intestinal nematodes of sheep: *In vitro* and *in vivo* studies. *Vet Parasitol* 2001; **99**: 205-219.





# Antimicrobial, $\alpha$ -Glucosidase and Alkaline Phosphatase Inhibitory Activities of Bergenin, The Major Constituent of *Cissus populnea* Roots

Jean Noël Nyemb<sup>1,5\*</sup>, Madeleine T Djankou<sup>1</sup>, Emmanuel Talla<sup>2</sup>, Alembert T Tchinda<sup>2</sup>, David T Ngoudjou<sup>3</sup>, Jamshed Iqbal<sup>4</sup> and Joseph T Mbafor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, PO Box 812, Yaounde, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Ngaoundere, PO Box 454, Ngaoundere, Cameroon

<sup>3</sup>Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Ministry of Scientific Research and Innovation, PO Box 6163 Yaounde, Cameroon

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, PO Box 67, Dschang, Cameroon

<sup>5</sup>Centre for Advanced Drug Research, COMSATS Institute of Information Technology, Abbottabad-22060, Pakistan

## Abstract

Bergenin (**1**) was isolated as the major compound of the Roots of *Cissus populnea*. Its structure was elucidated on the basis of spectral analysis, including 1D and 2D NMR experiments and Mass Spectrometry (MS) as well as by comparison with available data in the literature. Bergenin (**1**) was evaluated for its antimicrobial activity against four bacteria strains (*Salmonella typhi* ATCC6539, *Salmonella typhi* (isolate), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9721 and *Escherichia coli* (isolate)) and four yeasts (*Candida albicans* ATCC9002, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida krusei* (isolate) and *Candida albicans* (isolate)) using micro broth dilution method and for its enzymatic activities against  $\alpha$ -glucosidase and Alkaline Phosphatase (*h*-TNAP and *h*-IAP). It exhibited significant to moderate antibacterial activities with the MIC ranking from 8 to 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , while it appeared to be inactive ( $\text{MIC} > 125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) against all the tested yeast. However, it was found to be high potent inhibitor of both *h*-TNAP and *h*-IAP alkaline phosphatase isoenzymes, with a selectivity for the *h*-TNAP. Daucosterol (**4**) and a mixture of sitosterol (**2+3**) were also obtained and were screening for the same bioactivities.

**Keywords:** *Cissus populnea*; Bergenin; Antibacterial;  $\alpha$ -Glucosidase; Alkaline phosphatase

## Introduction

*Cissus populnea* belongs to the Vitaceae family, a grape family of angiosperm with about 14 genera and 900 species principally distributed in tropical regions, with a few genera in temperate regions [1]. *C. populnea* is very little known in Cameroon and not well documented. However, it is an important medicinal plant in Nigeria where it is very famous for its uses in traditional medicine as well as like a spice. The plant is cited in the treatment of several infectious diseases including male infertility, urinary infections, skin diseases, indigestion, wounds, venereal diseases, gonorrhoea, ulcers, jaundice, icterus, trypanosomiasis [2]. *C. populnea* is also used against inflammations, colics, hypertension, hemorrhoids, fever, oedema, yellow fever, leprosy [3,4], malaria [5]. The roots of the plant are used in Adamawa region of Cameroon for the treatment of breast cancer [6]. *C. populnea* has been extensively studied biologically. Antimalarial activity [5,7], larvicidal activity [8], antimicrobial properties [9,10], antianaemic activities [11], spermatogenic potentials [12], hypoglycemic activity [13], as well as antiproliferative activities [6,14] of the plant parts have been reported. Previous qualitative phytochemical screening revealed that the aqueous extract of the stem bark contains flavonoids, steroids, saponins and tanins [12]. The stem barks were also found to contain carbohydrates, tanins, cyanogenic glycosides, saponins and anthraquinones [15,16]. The quantitative phytochemical analysis of the plant has also been reported [3,4]. However, to the best of our knowledge, no studies related to the isolation of compounds from this plant have been reported.

In the present investigation, the extraction and the isolation of the roots of *C. populnea* gave a brown extract from which Bergenin (**1**) was isolated. Bergenin (**1**) is a crystalline compound which has been previously isolated from *Cissus pteroclada* [17,18] and from several other plant species [19-23]. However, this paper reports for the first time its isolation from *C. populnea*. Furthermore, extraction of the roots of *C. populnea* gave in addition to Bergenin (**1**) a mixture of sitosterol (**2** and **3**), and Daucosterol (**4**). The isolated compounds

were evaluated for their antimicrobial,  $\alpha$ -glucosidase, and alkaline phosphatase inhibitory activities.

Alkaline Phosphatases (APs) are enzymes present in large quantities in the liver and bones. These enzymes can be used as markers in certain cancers, since an increase in their level may be related to bone cancer, liver cancer or others. However, this over expression of APs has been reported in patients with type 2 Diabetes for several years [24]. The use of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors is considered to be an effective strategy in the treatment of diabetes. Several  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, such as acarbose and voglibose obtained from natural sources have been used clinically in the treatment of diabetes mellitus [25], since they control effectively the blood glucose level after food intake. Unfortunately, only a few  $\alpha$ -glucosidase inhibitors are commercially available and most of them are often associated with a number of serious side effects [26]. Screening of  $\alpha$ -glucosidase and APs inhibitors from plants and synthetic sources is increasing. Inhibitors of these enzymes have been recently developed from natural sources [27,28].

## Experimental Protocols

### General experimental procedures

Column chromatography (CC) was performed on silica gel 60 (Merck, 63-200  $\mu\text{m}$ ) with a gradient of *n*-hexane-EtOAc then, EtOAc-MeOH for the elution. For analytical Thin Layer Chromatography

\*Corresponding author: Jean Noël Nyemb, Department of Organic Chemistry, University of Yaounde 1, PO Box 812 Yaounde, Cameroon, Tel: +237674759584; E-mail: nyembjeannoel@gmail.com

Received January 27, 2018; Accepted February 01, 2018; Published February 07, 2018

Citation: Nyemb JN, Djankou MT, Talla E, Tchinda AT, Ngoudjou DT, et al. (2018) Antimicrobial,  $\alpha$ -Glucosidase and Alkaline Phosphatase Inhibitory Activities of Bergenin, The Major Constituent of *Cissus populnea* Roots. Med Chem (Los Angeles) 8: 426-430. doi: 10.4172/2161-0444.1000492

Copyright: © 2018 Nyemb JN, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



(TLC), silica gel precoated aluminium sheets F<sub>254</sub> Merck (20 × 20 cm) were used. The TLC plates after development were visualized under UV light (254 and 365 nm) and then sprayed with 15% sulfuric acid followed by heating at 105°C for 15 min. Melting points of the compounds were measured in open capillaries using Stuart melting point apparatus (SMP-3) and are uncorrected. <sup>1</sup>H (500 MHz) and <sup>13</sup>C (125 MHz) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance AV-500 spectrometer, with chemical shifts given in ppm. The spectra were run using CDCl<sub>3</sub> or DMSO-*d*<sub>6</sub> as solvents and TMS as internal standard. ESI-MS spectra were measured on a Q-TOF Ultima spectrometer (Waters). Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), and Ketoconazole (European Pharmacopoeia, Sigma-Aldrich) were used as reference standards respectively for antibacterial and antifungal assay. All organic solvents used for the tests were upgrade. Water used was distilled. All solutions were used on the day of preparation [29-31].

### Plant material

The roots of *C. populnea* Guill & Perr were collected in October 2015 in the Soudano-Guinea savanna of the University of Ngaoundere, Region of Adamawa, Cameroon. The samples were taxonomically identified by M. Nana Victor, botanist at the National Herbarium of Yaounde (Cameroon) where a voucher specimen (36962/HNC) is deposited.

### Extraction and isolation

Air-dried powder of roots (300 g) were extracted by maceration in MeOH (2 L) resulting after evaporation to dryness under reduced pressure to a dark brown extract (20.72 g) which was then refluxed in EtOAc (750 mL) three rounds of four hours each. All the EtOAc extracts were combined and then evaporated to dryness under reduced pressure at 40°C to a minimum volume and allowed to stand resulting in the precipitation of a white solid. This precipitate was washed several times using hexane, EtOAc, and acetone then recrystallized in MeOH. After recrystallization, the MeOH soluble portion was passed through a column chromatography of sephadex LH-20 using a mixture of EtOAc/MeOH 8:2 as solvent of elution leading to compound 1 as a white powder (510 mg). The remaining EtOAc fraction (7.8 g) was chromatographed on a silica gel column and eluted with a gradient of increasing polarity using Hexane/EtOAc (1:0-0:1, v/v) and EtOAc/MeOH (1:0-0:1, v/v) as solvent. From the main column, in addition of 1, compounds 2 and 3 were obtained as a mixture in a ratio (3:1) and compounds 4 as a pure compound.

**Bergenin (1):** white powder, m.p. 157-159°C; Rf 0.45 [EtOAc: MeOH (9:1)]; TOF-MS-ESI+ *m/z* 351.1 [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>9</sub>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 7.00 (1H, s, H-6), 9.77 (1H, s, COOH), 8.46 (1H, s, OH-4), 3.78 (6H, s, OCH<sub>3</sub>-5), 3.39 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 5.00 (1H, d, J=10.5 Hz, H-1'), 4.00 (1H, dd, J=10.5; 9.5 Hz, H-2'), 3.66 (1H, td, J=9.1; 5.4 Hz, H-3'), 3.20 (1H, td, J=9.3; 5.4 Hz, H-4'), 3.58 (1H, ddd, J=9.7; 7.7; 2.1 Hz, H-5'), 3.45 (1H, dd, J=13.1; 5.6 Hz, H-6a'), 3.85 (1H, d, J=11.6 Hz, H-6b'), 3.38 (2H, ov, OH-2'), 5.69 (1H, d, J=5.4 Hz, OH-3'), 5.47 (1H, d, J=5.4 Hz, OH-4'), 4.94 (1H, t, J=10.5 Hz, OH-6'). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 118.0 (C, C-1), 115.9 (CH, C-2), 148.0 (C, C-3), 150.8 (C, C-4), 140.5 (C, C-5), 109.4 (C, C-6), 72.0 (CH, C-1'), 79.7 (CH, C-2'), 73.9 (CH, C-3'), 70.9 (CH, C-4'), 81.9 (CH, C-5'), 61.0 (CH<sub>2</sub>, C-6'), 163.3 (C, CO) (Figure 1).

**$\beta$ -sitosterol (2):** colourless needles, Rf 0.35 [Hexane/AcOEt (9:1)]; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 5.35 (1H, d, J=5.1 Hz, H-6), 3.53 (1H, ddd, J=15.9, 11.0, 4.6 Hz, H-3), 1.04 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, J=7.0 Hz, H<sub>3</sub>-27), 0.95 (3H, d, J=6.6 Hz, H<sub>3</sub>-26), 0.88 (3H, d, J=1.8 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0.85 (3H,

ov, H<sub>3</sub>-29) and 0.71 (3H, s, H<sub>3</sub>-18). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  37.3 (CH<sub>3</sub>, C-1), 31.9 (CH<sub>2</sub>, C-2), 71.8 (CH, C-3), 42.4 (CH<sub>2</sub>, C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (CH, C-6), 31.7 (CH<sub>2</sub>, C-7), 31.9 (CH, C-8), 50.2 (CH, C-9), 36.6 (C, C-10), 21.1 (CH<sub>2</sub>, C-11), 39.8 (CH<sub>2</sub>, C-12), 42.3 (CH, C-13), 56.8 (CH, C-14), 24.3 (CH<sub>2</sub>, C-15), 28.2 (CH<sub>2</sub>, C-16), 56.1 (CH, C-17), 11.9 (CH<sub>3</sub>, C-18), 19.0 (CH<sub>3</sub>, C-19), 36.2 (CH<sub>2</sub>, C-20), 18.8 (CH<sub>3</sub>, C-21), 34.0 (CH<sub>2</sub>, C-22), 26.3 (CH<sub>2</sub>, C-23), 45.9 (CH, C-24), 29.3 (CH, C-25), 19.4 (CH<sub>3</sub>, C-26), 19.8 (CH<sub>3</sub>, C-27), 23.1 (CH<sub>2</sub>, C-28), 12.0 (CH<sub>3</sub>, C-29).

**Stigmasterol (3):** colourless needles, Rf 0.35 [Hexane/AcOEt (9:1)]; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 5.38 (1H, m, H-6), 5.14 (1H, ov, H-22), 5.05 (1H, dd, J=15.2, 8.7 Hz, H-23), 3.56 (1H, ddd, J=15.8, 11.0, 4.5 Hz, H-3), 1.04 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, J=7.0 Hz, H<sub>3</sub>-27), 0.95 (3H, d, J=6.6 Hz, H<sub>3</sub>-26), 0.88 (3H, d, J=1.8 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0.85 (3H, ov, H<sub>3</sub>-29) and 0.71 (3H, s, H<sub>3</sub>-18). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 37.2 (CH<sub>3</sub>, C-1), 31.9 (CH<sub>2</sub>, C-2), 71.8 (CH, C-3), 42.3 (CH<sub>2</sub>, C-4), 140.8 (C, C-5), 121.7 (CH, C-6), 31.7 (CH<sub>2</sub>, C-7), 31.9 (CH, C-8), 50.2 (CH, C-9), 36.5 (C, C-10), 21.1 (CH<sub>2</sub>, C-11), 39.8 (CH<sub>2</sub>, C-12), 42.3 (C, C-13), 56.8 (CH, C-14), 24.3 (CH<sub>2</sub>, C-15), 28.2 (CH<sub>2</sub>, C-16), 56.1 (CH, C-17), 12.1 (CH<sub>3</sub>, C-18), 19.0 (CH<sub>3</sub>, C-19), 40.5 (CH<sub>2</sub>, C-20), 18.8 (CH<sub>3</sub>, C-21), 138.4 (CH, C-22), 129.3 (CH, C-23), 51.2 (CH, C-24), 45.9 (CH, C-25), 19.4 (CH<sub>3</sub>, C-26), 19.8 (CH<sub>3</sub>, C-27), 24.3 (CH<sub>2</sub>, C-28), 12.3 (CH<sub>3</sub>, C-29).

**Daucosterol (4):** C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>, colourless needles; TOF-MS-ESI+ *m/z* 599.2 [M+Na]<sup>+</sup> for C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ : 5.33 (1H, m, H-6), 4.22 (1H, d, J=7.8 Hz, H-1'), 3.64 (1H, d, J=11.1 Hz, H-6'a), 3.40 (1H, dd, J=11.1, 5.4 Hz, H-6'b), 3.02 (1H, t, J=8.9 Hz, H-4'), 3.12 (1H, t, J=8.8 Hz, H-3'), 2.90 (1H, t, J=8.3 Hz, H-2'), 3.07 (1H, ddd, J=11.1, 5.8, 1.9 Hz, H-5'), 3.46 (1H, m, H-3), 2.11 (1H, m, H-4b), 2.35 (1H, m, H-4a), 0.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 0.90 (3H, d, J=6.5 Hz, CH<sub>3</sub>-21), 0.82 (3H, m, J=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-29), 0.81 (3H, d, J=6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-26), 0.80 (3H, d, J=6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-27), 0.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ : 36.8 (CH<sub>3</sub>, C-1), 31.3 (CH<sub>2</sub>, C-2), 76.9 (CH, C-3), 38.2 (CH<sub>2</sub>, C-4), 140.4 (C, C-5), 121.2 (CH, C-6), 31.4 (CH<sub>2</sub>, C-7), 31.3 (CH, C-8), 49.6 (CH, C-9), 35.5 (C, C-10), 20.6 (CH<sub>2</sub>, C-11), 39.2 (CH<sub>2</sub>, C-12), 41.8 (C, C-13), 56.1 (CH, C-14), 23.8 (CH<sub>2</sub>, C-15), 27.8 (CH<sub>2</sub>, C-16), 55.4 (CH, C-17), 11.7 (CH<sub>3</sub>, C-18), 18.9 (CH<sub>3</sub>, C-19), 36.2 (d, C-20), 18.6 (CH<sub>3</sub>, C-21), 33.3 (CH<sub>2</sub>, C-22), 25.4 (CH<sub>3</sub>, C-23), 45.1 (CH<sub>2</sub>, C-24), 28.7 (CH, C-25), 19.1 (CH<sub>3</sub>, C-26), 19.7 (CH<sub>3</sub>, C-27), 22.6 (CH<sub>2</sub>, C-28), 11.8 (CH<sub>3</sub>, C-29),

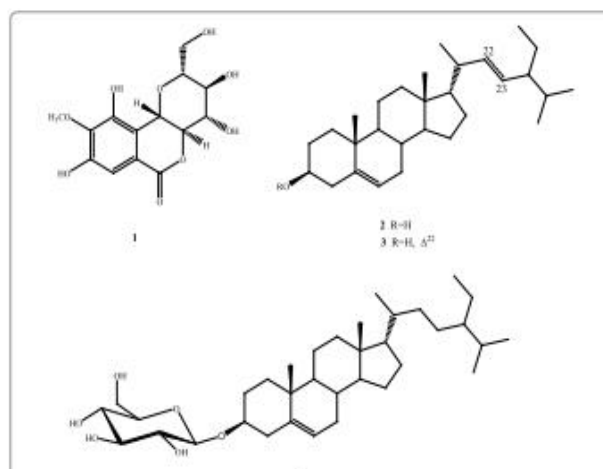


Figure 1: Chemical structures of compounds isolated from the roots of *Cissus populnea*. Bergenin (1); Mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol (2+3); Daucosterol (4).



100.8 (CH, C-1'), 73.5 (CH, C-2'), 76.8 (CH, C-3'), 70.1 (CH, C-4'), 76.7 (CH, C-5'), 61.1 (CH<sub>2</sub>, C-6').

### In vitro antimicrobial assays

**Microorganisms and culture media:** Eight microorganisms including four bacterial strains (*Salmonella typhi* ATCC6539, *Salmonella typhimurium* (isolate), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9721, *Escherichia coli* (isolate)) and four yeasts (*Candida albicans* ATCC9002, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida krusei* (isolate) and *Candida albicans* (isolate)), were used for the assays. *E. coli* was isolated from Ayub Theaching Hospital of Abbottabad (Pakistan), *S. typhimurium*, *C. krusei* and *C. albicans* were isolates from the Laboratory of Bacteriology and Mycology of the "Centre Pasteur" of Yaounde, Cameroon while the reference strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Microorganisms were maintained on agar slant in refrigerator at 4°C. Mueller Hinton Agar (MHA) was used for the activation of tested Gram-negative bacteria while Mueller Hinton Broth (MHB) was used for the *in vitro* antibacterial assay as culture media.

**Antibacterial assay:** The Minimal Inhibitory Concentrations and Minimal Bactericidal Concentrations (MICs and MBCs) of the samples and reference antibiotic were determined by the microdilution method using the MTT colorimetric assay as previously described by Nyemb et al. [27].

**Anticandidal assay:** For the anticandidal activity of all samples, the broth microdilution method previously described by Dzoyem et al. [32] was used for the determination of MICs and Minimum Fungicidal Concentrations (MFCs).

**$\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity:** The  $\alpha$ -glucosidase inhibition was evaluated according to the spectrophotometric method reported by Nyemb et al. [27], in which  $\alpha$ -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) was used. Baker's yeast is widely used for enzymatic assays due to its availability and ease of handling [27,28,32,33].

**Alkaline phosphatase inhibition assay:** The luminescence method using CDP-Star as substrate for the determination of enzyme inhibition of samples on human tissue non-specific alkaline phosphatase (*h*-TNAP) and human intestine alkaline phosphatase (*h*-IAP) enzymes, was used as previously reported by Nyemb et al. [27].

## Results and Discussion

### Compounds isolation

The crude MeOH extract of *C. populnea* roots was separated by column chromatography of silica gel yielded four compounds reported for the first time from this species. The structure of all compounds was elucidated using ESI-TOF MS, NMR spectroscopy and by comparison with previous reported data of similar compounds. Thus, the isolated compounds (Figure 1) were identified as Bergenin (1) [22], a mixture (3:1) of  $\beta$ -sitosterol (2) and stigmasterol (3) [33,34] and Daucosterol ( $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucoside, 4) [34].

### Antimicrobial activity

All the isolated compounds were screened for their antimicrobial activity using the microbroth dilution method against eight microorganisms including four Gram (-) bacteria and four yeasts.

Regarding the results of the antibacterial activity (Table 1), it appears that Bergenin (1) was active against all the four selected

bacteria including ATCC strains and clinical phenotypes, with MICs ranging from 8  $\mu$ g/mL to 64  $\mu$ g/mL. Bergenin (1) exhibited a significant antibacterial activity against *P. aeruginosa* ATCC9721 (8  $\mu$ g/mL), and moderate activities against the others bacterial strains [35,36]. The mechanism of antibiosis of Bergenin (1) determined by the MIC index (MBC/MIC values) suggested its bactericidal effect (MBC/MIC  $\leq$  4) on all the tested Gram-negative bacteria [36-38]. These results suggest that Bergenin (1) could be able to easily cross the complex and multilayered lipopolysaccharide cell walls of the tested Gram-negative bacterial strains [39]. The significant bactericidal activity (MIC < 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> and MBC/MIC  $\leq$  4) of Bergenin (1) against *P. aeruginosa* recorded in this study is very important since *P. aeruginosa* is considered as an important nosocomial pathogen highly resistant to clinically used antibiotics, causing a wide spectrum of infections and leading to substantial morbidity and mortality [40]. However, the activity of Bergenin (1) against all the tested Gram-negative bacteria was lower comparing to the reference antibiotic compound Ciprofloxacin (0.5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). Among the other compounds, only Daucosterol (4) exhibited a moderate activity (32  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) against *E. coli* while its activity against *P. aeruginosa* was weak (128  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) [35,36].

No compound exhibited any antifungal activity (MIC > 128  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) at the tested concentration against all the tested yeasts. This could probably explain why *C. populnea* is not used in traditional medicine to treat fungal infections. The inactivity of this compound towards all strain of tested yeast could be probably due to the peculiar structure of the external layers of yeasts, as for example *C. albicans* presents a thick cell wall where  $\beta$ -glucans and chitin are abundant [41].

Previously, antimicrobial studies were reported for Bergenin (1) [23], using agar diffusion method against standard and isolate microorganisms: *E. coli* (ATCC25922 and isolate), *Salmonella enteritidis* (ATCC11076 and isolate), *P. aeruginosa* (ATCC27853 and isolate), *Enterococcus faecalis* (ATCC49212), *Staphylococcus aureus* (ATCC49213), *C. albicans* (ATCC36232 and isolate), *Candida guilliermondii* (ATCC 6260 and isolate), *Aspergillus flavus* (ATCC32612 and isolate), *Aspergillus nidulans* (ATCC 28901 and isolate), *Aspergillus niger* (isolate), *Candida tropicalis* (isolate), *Shigella sonnei* (isolate), *Serratia marcescens* (isolate), *Klebsiella pneumoniae* (isolate), *Enterococcus faecalis* (isolate) and *Staphylococcus aureus* (isolate). Bergenin (1) was found to be inactive against all the tested Gram positive and Gram-negative bacteria, while it shown weak to moderate activities against *Filamentous fungi* and all yeasts [23].  $\beta$ -sitosterol (2) formally isolated from *Citrus grandis* fruits, shown activities against gram-positive (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*) and gram-negative (*E. coli* and *Salmonella enteritidis*) bacteria, with MIC value of 300  $\mu$ g/mL [42]. Daucosterol (4) isolated from the leaves of *Paulinna pinnata* demonstrated antibacterial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* with MIC values of 25 and 100  $\mu$ g/mL respectively [43].

### Enzymatic activity

The enzymatic activity of the isolated compounds was also evaluated *in vitro* against  $\alpha$ -glucosidase and alkaline phosphatase (*h*-TNAP and *h*-IAP) (Table 2). All the tested compounds were weakly active against the  $\alpha$ -glucosidase enzyme at the tested concentration. The glucosidase activity recorded here for Bergenin (1) is not surprising since Kashima et al. [44] also reported its low inhibitory activity (22.7  $\pm$  0.6% at 300  $\mu$ M) against the same  $\alpha$ -glucosidase enzyme from baker's yeast but at the concentration of 0.2 U/mL.  $\beta$ -Sitosterol (2) and Daucosterol (4) also showed activities against yeast and bacterial  $\alpha$ -glucosidase enzyme [34,45]. However, the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of the same



| Microorganisms         | Tested compounds, MICs, MBCs and MFC values ( $\mu\text{g/mL}$ ) |     |     |       |     |   |     |     |    |               |      |     |
|------------------------|--|-----|-----|-------|-----|---|-----|-----|----|---------------|------|-----|
|                        | 1  |     |     | 2 + 3 |     |   | 4   |     |    | Standard drug |      |     |
| Bacterial strains      | MIC  | MBC | X   | MIC   | MBC | X | MIC | MBC | X  | MIC           | MBC  |     |
| <i>E. coli</i>         | Isolate  | 64  | -   | /     | -   | - | /   | 32  | 32 | /             | 0.5  | 0.5 |
|                        | ATCC6539   | 32  | 128 | 4     | -   | - | /   | -   | -  | /             | 0.5  | 1   |
| <i>S. typhi</i>        | Isolate  | 64  | 128 | 2     | -   | - | /   | -   | -  | /             | 0.5  | 0.5 |
| <i>P. aeruginosa</i>   | ATCC9721   | 8   | 32  | 4     | -   | - | /   | 128 | -  | /             | 0.5  | 1   |
| Yeasts                 | MIC  | MFC | X   | MIC   | MFC | X | MIC | MFC | X  | MIC           | MFC  |     |
| <i>C. albicans</i>     | ATCC9002   | -   | -   | /     | -   | - | /   | -   | -  | /             | 0.5  | 64  |
|                        | Isolate  | -   | -   | /     | -   | - | /   | -   | -  | /             | 0.25 | 64  |
| <i>C. parapsilosis</i> | ATCC22019  | -   | -   | /     | -   | - | /   | -   | -  | /             | 2    | 16  |
| <i>C. krusei</i>       | Isolate  | -   | -   | /     | -   | - | /   | -   | -  | /             | 2    | 64  |

(-):  $>128 \mu\text{g/mL}$ ; /: Not determined; X: MBC(MFC)/MIC; Standard drug: Ciprofloxacin and Ketoconazole respectively for antibacterial and antifungal assays. *E. coli*; *Escherichia coli*; *S. typhi*; *Salmonella typhimurium*; *P. aeruginosa*; *Pseudomonas aeruginosa*; *C. albicans*; *Candida albicans*; *C. parapsilosis*; *Candida parapsilosis*; *C. krusei*; *Candida krusei*. In bold: significant activity.

**Table 1:** MICs, MBCs and MFCs ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of isolated compounds on tested microorganisms.

| Code   | $\alpha$ -Glucosidase | Alkaline Phosphatase |                  |
|--|-----------------------|----------------------|------------------|
|  |                       | <i>h</i> -TNAP       | <i>h</i> -IAP    |
| IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) $\pm$ SEM or % Inhibition |                       |                      |                  |
| 1  | 17.89%                | 1.62 $\pm$ 0.01      | 12.86 $\pm$ 0.03 |
| 2+3  | 8.12%                 | /                    | /                |
| 4  | 28.32%                | 48.24 $\pm$ 1.02     | 75.11 $\pm$ 1.39 |
| Acarbose   | 234.6 $\pm$ 2.01      | /                    | /                |
| Levamisole   | /                     | 20.2 $\pm$ 1.9       | /                |
| L-Phenylalanine  | /                     | /                    | 80.2 $\pm$ 0.001 |

/: not determined; IC<sub>50</sub> is the concentration at which 50% of the enzyme activity is inhibited.

**Table 2:**  $\alpha$ -Glucosidase and alkaline phosphatase inhibition of the isolated compounds.

compound can be different in different reports, due to the fact that the enzyme inhibition is dependent on the concentration of the substrate, the concentration of the enzyme, the concentration and the pH of the buffer solution and the duration of incubation with the enzyme.

Bergenin (1) was active against the two alkaline phosphatase isoenzymes, *h*-TNAP and *h*-IAP used in this study. It exhibited high potency against *h*-TNAP and *h*-IAP with the IC<sub>50</sub> values of 1.62  $\pm$  0.01  $\mu\text{M}$  and 12.86  $\pm$  0.03  $\mu\text{M}$ , respectively. However, this activity of Bergenin (1) was ~8 fold more selective for *h*-TNAP over *h*-IAP and was respectively ~12 and ~6 fold higher compared to the positive controls levamisole and L-phenylalanine. Daucosterol (4) was also evaluated for its alkaline phosphatase inhibitory activities and exhibited good inhibitory activities against both isoenzymes but with a slight specificity for *h*-TNAP.

## Conclusion

As far as we are aware, this is the first report regarding the isolation of compounds from the roots of *C. populnea*. This first phytochemical study of the roots of *C. populnea* led to the isolation of Bergenin (1) as the major compound along with Daucosterol (4) and a mixture (3:1) of  $\beta$ -Sitosterol and Stigmasterol. The alkaline phosphatase inhibitory activity of Bergenin (1) and Daucosterol (4) was also evaluated for the first time in this study and both compounds were found to have potent activities against the two isoenzymes TNAP and IAP used. With a broad spectrum of antimicrobial activity against the tested Gram-negative bacteria, Bergenin (1) might be the active constituent at least in part, responsible for the previous antibacterial activities observed for this plant. The results showed that *C. populnea* could be a good source of antibacterials and APs inhibitors.

## Acknowledgements

JNN gratefully acknowledge UNESCO-TWAS and CIIT for the financial support to this project through the 2015 CIIT-TWAS Sandwich Postgraduate Fellowship (No. 3240287163). Authors are thankful to Mr. Victor NANA from the National Herbarium of Cameroon for identification of plants, and to Prof. Dr. Sophie Laurent and Dr. Celine Henoumont of the NMR and Molecular Imaging Laboratory, Department of General, Organic and Biomedical Chemistry, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Mons (Belgium), for their assistance in NMR and MS analysis of compounds. We also want to express our gratitude to the Medical Microbiology laboratory, Pasteur Centre, Yaoundé (Cameroon) and to the Ayub Theaching Hospital of Abbottabad (Pakistan) for providing some clinical bacteria.

## References

- Soejima A, Wen J (2006) Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on three chloroplast markers. *American Journal of Botany* 93: 278-287.
- Abu AH, Ofukwu RA, Mazawaje D (2009) A Study of traditional animal health care in Nasarawa State, Nigeria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3: 468-472.
- Soladoye MO, Chukwuma EC (2012) Quantitative phytochemical properties of the leaves of *Cissus populnea* Guill & Perr - an important medicinal plant in Nigeria. *Archives of Applied Science Research* 4: 200-206.
- Soladoye MO, Chukwuma EC (2012) Phytochemical analysis of the stem and root of *Cissus populnea* (Vitaceae) - an important medicinal plant in Central Nigeria. *Phytologia Balcanica* 18: 149-153.
- Shuaibu MN, Wuyep PA, Yanagi T, Hirayama K, Tanaka T, et al. (2008) The use of microfluorometric method for activity-guided isolation of antiplasmodial compound from plant extracts. *Parasitology Research* 102: 1119-1127.
- Simo TR, Telefo BF, Nyemb JN, Yemele DM, Njina SN, et al. (2014) Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7: S442-S447.
- Adebayo JO, Krettli AU (2011) Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. *Journal of Ethnopharmacology* 133: 289-302.



8. Azokou A, Kone MW, Koudou BG, Bi HFT (2013) Larvicidal potential of some plants from West Africa against *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Borne Diseases* 50: 103-110.
9. Kone WM, Atindehou KK, Traore D, Dosso M (2004) Traditional medicinal plants in north Cote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93: 43-46.
10. Osibote EAS, Ogunlesi M, Okiei W, Asekun T, Familoni OB (2010) Assessment of antimicrobial activity of the essential oil from the stem powder of *Cissus populnea* and the leaves of *Sesamum radiatum*, herbal medications for male infertility factor. *Research Journal of Medicinal Plants* 4: 14-20.
11. Moody JO, Ojo OO, Omotade OO, Adeyemo AA, Olumuse PE, et al. (2003) Anti-sickling potential of a Nigeria herbal formula (Ajawaron HF) and the major plant compound (*Cissus populnea* L. CPK). *Phytotherapy Research* 17: 1173-1176.
12. Ojekale AB, Lawal OA, Lasisi AK, Adeleke TI (2006) Phytochemistry and Spermato-genic Potentials of Aqueous Extract of *Cissus populnea* (Guill. and Perr) Stem Bark. *The Scientific World Journal* 6: 2140-2146.
13. Geidam MA, Adoga GI, Sanda FA (2004) Effects of aqueous stem bark extract of *Cissus populnea* on some serum enzymes in normal and Alloxan induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7: 1427-1429.
14. Osibote E, Noah N, Sadik O, McGee D, Ogunlesi M (2011) Electrochemical sensors, MTT and immunofluorescence assays for monitoring the proliferation effects of *Cissus populnea* extracts on Sertoli cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9: 1-14.
15. Ibrahim H, Mdau BB, Ahmed A, Ilyas M (2011) Anthraquinones of *Cissus populnea* Guill & Perr (ampelidaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8: 140-143.
16. Ibrahim H, Rai PP, Bangudu AB (1993) Pharmacognostic studies of the stem bark of *Cissus populnea* Guill & Perr. *Glimpses in Plant Research* 1: 175-180.
17. Chi CY, Wang F, Lei T, Xu SY, Hong AH, et al. (2010) Studies on the chemical constituents from *Cissus pteroclada*. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 33: 1566-1568.
18. Lin CF, Hwang TL, Lin SY, Huang YL (2012) Bioactive isocoumarins from *Cissus pteroclada*. *Journal of Chinese Medicine* 23: 41-49.
19. Khan H, Amin H, Ullah A, Saba S, Rafique J, et al. (2016) Antioxidant and Antiplasmodial Activities of Bergenin and 11-O-Galloylbergenin Isolated from *Mallotus philippensis*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 1-6.
20. Nunomura RCS, Oliveira VG, Da Silva SL, Nunomura SM (2009) Characterization of Bergenin in *Endopleura uchi* Bark and its Anti-Inflammatory Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20: 1060-1064.
21. Subramanian R, Subbramanyan P, Raj V (2015) Isolation of Bergenin from *Peltophorum pterocarpum* flowers and its bioactivity. *BENI-SUEF University Journal of Basic and Applied Sciences* 4: 256-261.
22. Caldas CS, De Simone CA, Pereira MA, Malta VRS, Carvalho RLP, et al. (2002) Bergenin monohydrate, a constituent of *Hurmiria balsamifera*, at 120 K. *Acta Crystallographica Section E* 58: 609-611.
23. Da Silva SL, De Oliveira VG, Yano T, Nunomura RCS (2009) Antimicrobial activity of Bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec *Acta amazonica* 39: 187-192.
24. Maxwell DB, Fisher EA, Ross-Clunis HA, Estep HL (1986) Serum alkaline phosphatase in diabetes mellitus. *Journal of the American College of Nutrition* 5: 55-59.
25. Playford RJ, Pither CR, Gao R, Middleton SJ (2013) Use of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose in patients with 'Middleton syndrome': normal gastric anatomy but with accelerated gastric emptying causing postprandial reactive hypoglycemia and diarrhea. *Canadian Journal of Gastroenterology* 27: 403-404.
26. Zhang BB, Moller DE (2000) New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Current Opinion in Chemical Biology* 4: 461-467.
27. Nyemb JN, Tchinda TA, Talla E, Nanga EB, Ngoudjou TD, et al. (2018) Vitellarioside, a new cerebroside from *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) and its bioactivities. *Natural Products Chemistry & Research* 6: 306
28. Hashmi MA, Shah HS, Khan A, Farooq U, Iqbal J, et al. (2015) Anticancer and Alkaline Phosphatase Inhibitory Effects of Compounds Isolated from the Leaves of *Olea ferruginea* Royle. *Records of Natural Products* 9: 164-168.
29. Kazmi M, Zaib S, Amjad ST, Khan I, Ibrar A, et al. (2017) Exploration of aroyl/heteroaryl iminothiazolines featuring 2,4,5-trichlorophenyl moiety as a new class of potent, selective, and in vitro efficacious glucosidase inhibitors. *Bioorganic Chemistry* 74: 134-144.
30. Park H, Hwang KY, Oh KH, Kim YH, Lee JY, et al. (2008) Discovery of novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitors based on the virtual screening with the homology-modeled protein structure. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16: 284-492.
31. Choi CW, Choi YH, Cha MR, Yoo DS, Kim YS, et al. (2010) Yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibition by isoflavones from plants of Leguminosae as an in vitro alternative to acarbose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9988-9993.
32. Dzoyem JP, Tchuenguem TR, Kuate JR, Teke NG, Kechia FA, et al. (2014) In Vitro and in vivo antifungal activities of selected Cameroonian dietary spices. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14: 1-8.
33. De-Eknamkul W, Potduang B (2003) Biosynthesis of beta-sitosterol and stigmaterol in *Croton slybryatus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* 62: 389-398.
34. Sheng Z, Dai H, Pan S, Wang H, Hu Y, et al. (2014) Isolation and Characterization of an  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from *Musa* spp. (Baxijiao) Flowers. *Molecules* 19: 10563-10573.
35. Kuete V (2010) Potential of Cameroonian plants and derived-products against microbial infections: a review. *Planta Medica* 76: 1-13.
36. Talla E, Yaya GAJ, Mokale KAL, Abdou JP, Tchinda A, et al. (2016) Chemical constituents from *Erythrina droogmansiana* (Fabaceae), radical scavenging and antibacterial potential of some extracts and compounds. *Natural Products: An Indian Journal* 12: 012-020.
37. Mbaveng AT, Kuete V, Mapunya BM, Beng VP, Nkengfack AE, et al. (2011) Evaluation of four Cameroonian medicinal plants for anticancer, anticonorrheal and antireverse transcriptase activities. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32: 162-167.
38. Mbaveng AT, Ngameni B, Kuete V, Simo IK, Ambassa P, et al. (2008) Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 116: 483-489.
39. Rakholiya K, Vaghela P, Rathod T, Chanda S (2014) Comparative Study of Hydroalcoholic Extracts of *Momordica charantia* L. against Foodborne Pathogens. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 76: 148-156.
40. Cardoso O, Alves AF, Leitao R (2007) Surveillance of antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a central hospital in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60: 452-454.
41. Bisio A, Schito AM, Ebrahimi SN, Hamburger M, Mele G, et al. (2015) Antibacterial compounds from *Salvia adenophora* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry* 110: 120-132.
42. Matook SM, Fumio H (2005) Evaluation of the antimicrobial activity of extract from limitan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit peel. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8: 1090-1095.
43. Lunga PK, Qin XJ, Yang XW, Kuate JR, Du ZZ, et al. (2014) Antimicrobial steroidal saponin and oleanane-type triterpenoid saponins from *Paullinia pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14: 1-7.
44. Kashima Y, Yamaki H, Suzuki T, Miyazawa M (2013) Structure-activity relationships of bergenin derivatives effect on  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 28: 1162-1170.
45. Tabussum A, Riaz N, Saleem M, Ashraf M, Ahmad M, et al. (2013)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory constituents from *Chrozophora plicata*. *Phytochemistry Letters* 6: 614-619.