

Sphingolipides, triterpènoïdes et autres métabolites secondaires des variétés sauvage et cultivée de l'espèceTriumfetta Cordifolia A. Rich (Tiliaceae) : transformations chimiques et évaluation des propriétés biologiques de quelques composés isolés

Louis Pergaud Sandjo

▶ **To cite this version:**

Louis Pergaud Sandjo. Sphingolipides, triterpènoïdes et autres métabolites secondaires des variétés sauvage et cultivée de l'espèceTriumfetta Cordifolia A. Rich (Tiliaceae) : transformations chimiques et évaluation des propriétés biologiques de quelques composés isolés. Autre. Université Paul Verlaine - Metz, 2010. Français. NNT : 2010METZ006S . tel-01752741

HAL Id: tel-01752741
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752741

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

En cotutelle avec

L'UNIVERSITE PAUL-VERLAINE DE METZ

ECOLE DOCTORALE DE LA LORRAINE

Sphingolipides, Triterpènoïdes 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

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

Par

SANDJO Louis Pergaud

Matricule: 98Z127

D.E.A de Chimie Organique

Sous la codirection de:

KIRSCH Gilbert

Professeur

Université Paul-Verlaine de Metz

NGADJUI T. Bonaventure

Professeur

Université de Yaoundé I

Année 2009

DEDICACES

Je dédie ce travail à toute ma famille et plus particulièrement à mon fils

SEUMEN SANDJO Noël Arthur.

REMERCIEMENTS

Au Professeur **B. T. Ngadjui** à qui j'adresse toute ma gratitude pour son attention, son sens de rigueur et sa disponibilité pour le suivi de ce travail.

Au Professeur **G. Kirsch** qui m'a chaleureusement accueilli dans son équipe de recherche et a suivi minutieusement mon travail, je lui exprime toute ma reconnaissance pour les conseils, son sens de générosité et sa disponibilité.

Aux Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I pour la formation tant morale qu'intellectuelle qu'ils m'ont donnés.

Au Gouvernement Français pour m'avoir octroyé une bourse de mobilité en alternance qui m'a permise d'effectuer mes travaux de recherche.

Au Professeur **F. Couty** qui m'a accordé un stage dans son équipe de recherche grâce auquel j'ai acquit d'autres connaissances en chimie. Je lui adresse ma profonde gratitude.

Au Professeur **P. Seck** pour s'être impliqué dans mon travail en facilitant certaines analyses de masse. Qu'il reçoive ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Au Professeur **D. Canet** qui grâce sa collaboration, les analyses de RMN des composés isolés ont été possibles.

Au Dr. **J. Gaumet** qui par sa collaboration, a permis les analyses de spectrométrie de masse.

A Monsieur **V. Rincheval** de l'Université St-Quentin en Yvelines de Versailles pour les tests biologiques de cytotoxité.

Au Professeur **D. Bagrel** de l'Université Paul-Verlaine de Metz pour avoir facilité l'évaluation du potentiel antioxydant des extraits et des composés isolés.

Aux enseignants de la filière de Chimie pour les enseignements et la formation académique.

A ma collègue **Tzvete** pour m'avoir appris à mesurer le potentiel antioxydant des drogues et extrait par la méthode FRAP.

Aux collègues **P. Hannewal** et **Y. Mehdi** qui, grâce à leur collaboration les analyses de spectrométrie de masse et de RMN ont été possibles.

Au Dr. **R. Juan Carlos** pour ses conseils et son intervention incessante dans mon travail. Je lui adresse toute ma reconnaissance.

A **M. Negom** et Aux Drs **H. M. P. Poumalé**, **J. Watchueng**, **I. K. Simo**, **P. Ambassa**, **B. Ngameni** pour avoir guidé mes premiers pas dans la phytochimie.

A tous mes collègues du laboratoire **278/**III^{ème} bâtiment de l'extension de l'Université de Yaoundé I et du **LIMBP** (Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique de l'Université Paul-Verlaine de Metz) pour leur esprit de collaboration et d'entraide. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

A la **FAKA** (Fondation Abbé Kouam et Amis) pour leur support moral et financier.

Au Professeur **Binam** pour ses encouragements et ses conseils incessants.

A ma fiancée **M.-F. Djuimeni Djuimo** pour son assistance morale et ses encouragements permanents.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la bonne marche et à la réalisation de ce travail.

Sommaire.

Dédicaces i
Remerciements ii
Sommaire iv
Abréviation vii
Liste de figures ix
Liste de schémas xiv
Liste de tableaux xvi
Résumé xviii
Abstract xx
Introduction 1
Chapitre I: Revue de la littérature 3
I.1/ Généralités sur les méthodes expérimentales 4
I.1.1/ La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 4
I.1.2/ RMN monodimensionnelle (RMN 1D) 4
I.1.3/ RMN bidimensionnelles (RMN 2D) 5
I.2/ IRTF 5
I.3/ Généralités sur quelques méthodes utilisées en spectrométrie de masse 7
I.3.1/ MALDI 7
I.3.2/ ESI 8
I.3.3/ Temps de vol 9
I.3.4/ FT-ICR 9
I.3.5/ Masse en tandem (SM/SM) 10
I.3.6/ CL-SM 11
I.4/ Aperçu botanique **11**
I.4.1/ Généralités sur les Tiliaceae 11
I.4.2/ Généralités sur le genre *Triumfetta* 12
I.4.3/ Généralités sur *Triumfetta cordifolia* 12
I.4.4/ Répartition géographique des espèces du genre *Triumfetta* au Cameroun 13
I.5/ Quelques usages des espèces de la famille des Tiliaceae 14
I.6/ Quelques études biologiques antérieures 16
I.6.1/ Espèces étudiées dans les Tiliaceae 16
I.6.2/ Propriétés biologiques des produits isolés de *Triumfetta cordifolia* ayant fait l'objet d'études antérieures 17
I.7/ Travaux chimiques antérieurs sur les plantes de la famille des Tiliaceae 18
I.7.1/ Les stéroïdes 19
I.7.2/ Triterpènes 22
I.7.3/ Lignanes 27
I.7.4/ Les Alcaloïdes 28
I.7.5/ Les Flavonoïdes 29
I.7.6/Acide chlorogénique 30
I.7.7/ Acide gras 31
I.7.8/ Huiles essentielles 33
I.8/ Généralités sur les glyco et sphingolipides 33
I.8.1/ Biosynthèse des céramides 34
I.8.2/ Rôles biologiques des sphingolipides 35
I.8.3/ Identification des céramides 35
I.8.4/ Nomenclature des céramides 36
I.9/ Cytotoxicité 36
I.10/Potentiel antioxydant 37
Chapitre II: Résultats et discussion 39

II.1/ Etude phytochimique de l'espèce sauvage de *Triumfetta cordifolia* 40
II.1.1/ Composés isolés des tiges 42
II.1.1.1/ Friedeline (**LP1)** 42
II.1.1.2/ Acide heptadecanoïque (**LP2)** 45
II.1.1.3/ Lupeol (**LP3)** 47
II.1.1.4/ Bétuline (**LP4)** 50
II.1.1.5/ Acide oléanolique (**LP5)** 53
II.1.1.6/ Acide maslinique (**LP6)** 56
II.1.1.7/ Acide corosolique (**LP7)** 58
II.1.1.8/ Mélange de stérols (**LP8)** 60
II.1.1.9/ 3-*O*-D-glucopyranoside de β-sitostérol **LP9** 63
II.1.1.10/ Triumfettamide (**LP10)** 66
II.1.1.11/ Triumfettoside Ic **LP11** 78
II.1.2/ Composés isolés des feuilles 90
II.1.2.1/ Acide henéicosanoïque (**LP12)** 90
II.1.2.2/ *Trans*-tiliroside **(LP13)** 90
II.1.2.3/ Triumfettostérol Id **(LP14)** 96
II.1.2.4/ Triumfettosaponine **(LP15)** 105
II.2 / Composés isolé de l'espèce cultivée de *Triumfetta cordifolia* 120
II.2.1/ Composés isolés des tiges de l'espèce cultivée de *T. cordifolia* 122
II.2.1.1/ Acide tormentique (**LP16)** 122
II.2.2/ Composés isolés des feuilles de l'espèce cultivée de *T. cordifolia* 124
II.2.2.1/ *β*-carotène **(LP20)** 124
II.2.2.2/ Acide 24-hydroxytormentique **(LP21)** 126
II.3/ Transformations chimiques 128
II.3.1/ Réaction d'Oxydation 128
II.3.1.1/ Réaction d'oxydation au $KMnO_4$ 128
II.3.1.1.1/ Généralités 128
II.3.1.1.2/ Application 128
II.3.1.2/ Réaction d'oxydation par l'Oxone 133
II.3.1.2.1/ Généralités 133
II.3.1.2.2/ Application 133
II.3.1.3/ Réaction d'oxydation par le PCC 136
II.3.1.3.1/ Généralités 136
II.3.1.3.2/ Applications 136
II.3.1.3.3/ Mécanisme 142
II.3.2/ Préparation des amines 143
II.3.2.1/ Généralités 143
II.3.2.2/ Application. 143
II.3.3/ Imination 146
II.3.4/ Glucosylation de l'aminocinnamyle 150
Chapitre III: Evaluation biologique 153
III.1/ Etude du pouvoir antioxydant des extraits et de quelques composés isolés 154
III.1.2/ Méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) 154
III.1.3/ Manipulation et mode opératoire 154
III.2/ Evaluation du potentiel cytotoxique de quelques drogues isolées 162
Chapitre IV: Partie expérimentale 166
Conclusion générale 178
Références bibliographiques 180
Annexe 190

I/ Tests caractéristiques 191

II/ Listes des publications 192

ABREVIATIONS

Amb. : Ambiante

ADN : Acide DexoxyriboNucléique

APT : Attached Proton Test

^{13}C : Carbone 13.

°C : degré Celsius

CC : chromatographie sur colonne

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CLSM : Chromatographie Liquide associée à la Spectrométrie de Masse

COSY : Correlated Spectroscopy

CV : Coefficient de variation

d : doublet

DCM : Dichlorométhane

dd : doublet de doublets

ddd : doublet de doublets dédoublés

dl : doublet large

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DIC : Désorption par Ionisation Chimique

DMF : N,N Dimethyl Formamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl

ESI : Electrospray ionisation

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Plasma

FT-ICR : Fourrier Transform Ion Cyclotronic Resonance

^{1}H : Proton

Hex : Hexane

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Connectivity

HRESI-FTICRMSMS: Higher Resolution Electrospray Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Mass Spectrometry

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

HMQC : Heteronuclear Multiple Quanta Correlation

Hz : Hertz

IC_{50} : Concentration Inhibitrice 50 %

IRTF : Infra Rouge à Transformée de Fourier

J : constante de couplage

LCB : Long Chain of Base

m : multiplet

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

MALDI-FTICRMS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry.

MHz : Mégahertz

N : normalité

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

ORAC : Oxygen Radical Absorption Capacity

PCC : Pyridinium Chloro Chromate

Pf : Point de fusion

ppm : partie par million

Rdt : Rendement

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Rf : Rapport Frontal

s : singulet

sl : singulet large

SM/SM : Spectrométrie de Masse en tandem

SMT : Steroid MethylTransferase

SORI-CID : Sustained Off-Resonance Irradiation Collision Induced Dissociation

t : triplet

Temp. : Température

ter-BuOH : *ter*-butanol

ToF : Time of flight

TPTZ : TriPyridylTriaZine

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Coupe d'un appareil de IR 6

Figure 2: Plaque de dépôt d'échantillons pour la source d'ionisation MALDI 8

Figure 3: *Triumfetta cordifolia A Rich* (espèce sauvage et cultivée) 13

Figure 4: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de **LP1** 43

Figure 5: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP1** 44

Figure 6: Spectre de ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de **LP2**. 45

Figure 7: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP2** 46

Figure 8: Spectre ^{1}H (*$CDCl_3$*, 300 MHz) de **LP3** 48

Figure 9: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*$CDCl_3$*, 75 MHz) de **LP3** 49

Figure 10: Spectre de RMN ^{1}H (*Acétone-d_6*, 300 MHz) de **LP4** 51

Figure 11: Spectre de ^{13}C (*Acétone-d_6*, 75 MHz) de **LP4** 52

Figure 12: Spectre de RMN ^{13}C (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP5** 54

Figure 13: Spectre ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de **LP5** 55

Figure 14: Spectre de RMN ^{1}H (*DMSO-d_6*, 250 MHz) de **LP6** 57

Figure 15: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz) de **LP6** 57

Figure 16: Spectre de RMN ^{1}H (*DMSO-d_6*, 250 MHz) de **LP7** 58

Figure 17: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz) de **LP7** 59

Figure 18: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de **LP8** 61

Figure 19: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP8** 62

Figure 20: Spectre de RMN ^{1}H (*DMSO-d_6*, 250 MHz) de **LP9** 64

Figure 21: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz) de **LP9** 65

Figure 22: Spectre HRMALDI-FTIRCMS de **LP10** 66

Figure 23: Spectre Infrarouge sur disque de KBr de **LP10** 67

Figure 24: Spectre de RMN ^{1}H (*C_5D_5N*, 400 MHz) de **LP10** 68

Figure 25: Spectre de RMN ^{13}C (*C_5D_5N*, 100 MHz) de **LP10** 69

Figure 26: Spectre de Corrélations ^{1}H-^{13}C (HMBC) de **LP10** 70

Figure 27: Spectre de Corrélations ^{1}H-^{1}H (COSY) de **LP10** 71

Figure 28: Spectre de masse en tandem de l'ion fragment à m/z 664 72

Figure 29: Spectre de MALDI-TOF du produit de réaction d'acétylation et d'oxydation de **LP10** 73

Figure 30: Spectre de MALDI-TOF de la solution issue de la méthanolyse de **LP10** 75

Figure 31: Spectre de Corrélations ^{1}H-^{13}C (HSQC) de **LP10** 77

Figure 32: Spectre de masse à haute résolution MALDI-FTICR de **LP11** 78

Figure 33: Spectre d'Infrarouge de **LP11** 79

Figure 34: Spectre ^{1}H (*CD_3OD*, 400 MHz) de **LP11** 80

Figure 35: Spectre ^{13}C (APT) (*CD_3OD*, 100 MHz) de **LP11** 81

Figure 36: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMBC) **de LP11** 82

Figure 37: Spectre de corrélation ^{1}H-^{1}H (COSY) de **LP11** 83

Figure 38: Spectre de corrélation ^{1}H-^{1}H dans l'espace (NOESY) de **LP11** 84

Figure 39: Spectre de MALDI-TOF du produit d'acétylation et d'oxydation de **LP11** 85

Figure 40: Spectre d'analyse de MALDI-TOF de la phase organique de la méthanolyse de **LP11** 86

Figure 41: Spectre de masse en tandem de l'ion à *m/z* 736 89

Figure 42: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HSQC) de **LP11** 89

Figure 43: Spectre de RMN ^{1}H (C*D_3OD*, 250 MHz) de **LP13** 94

Figure 44: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (C*D_3OD*, 62.5 MHz) de **LP13** 95

Figure 45: Spectre d'IR de **LP14** 96

Figure 46: Spectre de RMN ^{1}H de **LP14** 97

Figure 47: Spectre de RMN ^{13}C (APT) de **LP14** 98

Figure 48: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMBC) de **LP14** 99

Figure 49: Spectre de corrélation ^{1}H-^{1}H (COSY) de **LP14** 99

Figure 50: Spectre de LC-ESI de la phase organique issue de la méthanolyse de **LP14** 100

Figure 51: Spectre de masse MALDI-TOF de la phase organique issue de la coupure oxydative de **LP14** 101

Figure 52: Spectre de LC-ESI de **LP14** 104

Figure 53: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMQC) de **LP14** 104

Figure 54: Spectre de masse à haute résolution en ESI-FTICR de **LP15** 105

Figure 55: Spectre IR de **LP15** 106

Figure 56: Spectre APT de **LP15** 107

Figure 57: Spectre de RMN ^{1}H de **LP15** 108

Figure 58: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMBC) de **LP15** 109

Figure 59: Spectre de masse en tandem du pic à *m/z* 1369.8031 de **LP15** 114

Figure 60: Spectre de masse en tandem du pic à *m/z* 1369.8031 de **LP15** 115

Figure 61: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMQC) de **LP15** 116

Figure 62: Spectre de corrélation ^{1}H-^{1}H (COSY) de **LP15** 116

Figure 63: Spectre de LC-ESI de la solution issue de l'hydrolyse alcaline 117

Figure 64: Spectre de LC-ESI de la solution issue de l'hydrolyse alcaline 118

Figure 65: Spectre de LC-ESI de la solution issue de l'hydrolyse alcaline 119

Figure 66: Spectre de RMN ^{1}H (*CD_3OD*, 250 MHz) de **LP16** 123

Figure 67: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*CD_3OD*, 62.5 MHz) de **LP16** 123

Figure 68: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de **LP20** 125

Figure 69: Spectre d'APT (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP20** 125

Figure 70: Spectre de RMN ^{1}H (*MeOD*, 400 MHz) de **LP21** 127

Figure 71: Spectre de RMN ^{13}C (*MeOD*, 100 MHz) de **LP21** 127

Figure 72: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de l'acétate de stigmastérol. 131

Figure 73: Spectre d'APT (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de l'acétate de stigmastérol. 131

Figure 74: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de 3-*O*-acétyl-5,6-epoxidestigmastan-22-en-3β-ol 132

Figure 75: Spectre de RMN ^{13}C (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de 3-*O*-acétyl-5,6-epoxystigmastan-22-en-3β-ol 132

Figure 76: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) du mélange de produits d'oxydation. 135

Figure 77: Spectre APT (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) du mélange de produits d'oxydation. 135

Figure 78: Spectre de RMN ^{1}H de 3-*O*-acétylstigmasta-22-ene-3,5,6-triol. 137

Figure 79: Spectre de RMN ^{13}C de 3-*O*-acétylstigmasta-22-ene-3,5,6-triol. 138

Figure 80: Spectre de RMN ^{1}H de stigmasta-4,22-dien-3-one 139

Figure 81: Spectre de RMN ^{13}C de stigmasta-4,22-dien-3-one 140

Figure 82: Spectre de RMN ^{13}C de stigmasta-4,22-diene-3,6-dione 142

Figure 83: Spectres comparatifs de RMN ^{1}H du bromocinnamyle et de l'aminocinnamyle 145

Figure 84: Spectre de LC-ESI de l'aminocinnamyle 146

Figure 85: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 200 MHz) du produit de l'imination. 149

Figure 86: Spectre de RMN ^{13}C (*$CDCl_3$*, 50 MHz) du produit de l'imination. 149

Figure 87: Spectre de RMN ^{1}H de amino cinnamyl-2,3,4,6-*O*-tétraacétyl-α-D-glucopyranoside 151

Figure 88: Spectre APT de amino cinnamyl-2,3,4,6-*O*-tétraacétyl-α-D-glucopyranoside 152

Figure 89: Spectre de LC-ESI du produit de glucosylation à m/z 463 (Temps de rétention: 10.8 min) 152

Figure 90: représentation du potentiel antioxydant des différents produits LP dissous dans le DMSO 158

Figure 91: histogramme representant le potentiel antioxydant des différentes fractions issues du flash 161

Figure 92: Fibrosarcome de la cuisse 162

Figure 93: Pourcentage globale de mort de cellules et pourcentage de mort cellulaire non nécrotique et nécrotique. 163

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1: Protocole simplifié d'ionisation, d'analyse et de détection d'une molécule en ms/ms. 10

Schéma 2: Biosynthèse des stéroïdes et triterpènoïdes 26

Schéma 3: Biosynthèse des céramides 34

Schéma 4: Protocole d'extraction de la poudre des tiges et d'isolement des composés naturels 41

Schéma 5: Protocole d'extraction des feuilles et isolement des composés naturels 42

Schéma 6: Corrélations HMBC de Triumfettamide. 69

Schéma 7: Corrélations COSY de Triumfettamide. 70

Schéma 8: SORI-CID-MALDI-FTICR ms/ms de l'ion fragment *m/z* 664 (composé **LP10**). 71

Schéma 9: Réaction d'acétylation et d'époxydation à l'oxone du composé **LP10** 73

Schéma 10: Mécanisme d'oxydation des oléfines par l'oxone avec l'acétone comme générateur 74

Schéma 11: Quelques ions fragments de composé **LP10** 76

Schéma 12: Corrélations importantes HMBC et COSY de **LP11.** 83

Schéma 13: Corrélations NOESY du composé **LP11** 84

Schéma 14: Réaction d'acétylation et d'oxydation 85

Schéma 15: Quelques ions fragments issus de la ms/ms de l'ion à *m/z* 736 87

Schéma 16: Réaction de méthanolyse de **LP14** 100

Schéma 17: Coupure oxydative de **LP14** par OsO_4-$NaIO_4$, pyridine 101

Schéma 18: Réaction de saponification de **LP15** 110

Schéma 19: Quelques corrélations proton-proton et proton-carbone à distance 112

Schéma 20: Ions fragments donnant la position des sucres 112

Schéma 21: Quelques ions fragments issus de masse en tandem. 113

Schéma 22: Protocole d'extraction et d'isolement des métabolites secondaires des tiges de l'espèce cultivée de *T. cordifolia* A Rich. 120

Schéma 23: Protocole d'extraction et d'isolement des métabolites secondaires des feuilles de l'espèce cultivée de *T. cordifolia* A Rich. 121

Schéma 24: Réaction d'oxydation du stigmastérol après acétylation 129

Schéma 25: Mécanisme d'oxydation au permanganate de potassium en phase hétérogène 129

Schéma 26: Passage d'un cycle tendu à une configuration chaise. 130

Schéma 27: Réaction d'oxydation de l'acétate de stigmastérol par l'oxone. 133

Schéma 28: Réaction d'oxydation de l'acétate de stigmastérol avec PCC en milieu acide 137

Schéma 29: Réaction d'oxydation du stigmastérol par PCC 138

Schéma 30: Réaction d'oxydation du stigmastérol par le PCC 140

Schéma 31: Réaction de préparation de l'aminocinnamyle 143

Schéma 32: mécanisme de préparation d'aminocinnamyle partant de l'azidocinnamyle 143

Schéma 33: Réaction d'imination de la friedeline 146

Schéma 34: mécanisme d'imination. 146

Schéma 35: Réaction de glucosylation de l'aminocinnamyle. 150

Schéma 36: mécanisme de synthèse de glucosylation. 150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Répartition géographique des espèces du genre *Triumfetta* au Cameroun 14

Tableau 2: Travaux biologiques faits sur quelques espèces de la famille des Tiliaceae 16

Tableau 3: Propriétés biologiques des quelques composés isolés de *T. Cordifolia* 17

Tableau 4: Modification chaine latérale de 3. 20

Tableau 5: Quelques stéroïdes isolés de la famille des Tiliaceae. 20

Tableau 6: Exemple de différentes classes de triterpènes 22

Tableau 7: Triterpènes isolés de la famille des Tiliaceae. 24

Tableau 8: Lignanes obtenus de la famille des Tiliaceae 28

Tableau 9: Alcaloïdes isolés des Tiliaceae. 29

Tableau 10: Quelques flavonoïdes isolés des Tiliaceae. 29

Tableau 11: Quelques acides gras isolés de la famille des Tiliaceae. 32

Tableau 12: Quelques huiles essentielles isolées des Tiliaceae. 33

Tableau 13: Données spectrales de RMN ^{1}H (C_5D_5N, 400 MHz) et ^{13}C (APT) (C_5D_5N, 100 MHz) de composé **LP10** 77

Tableau 14: Données spectrales de RMN ^{1}H (CD_3OD, 400 MHz) et ^{13}C (APT) (CD_3OD, 100 MHz,) du composé **LP11** 88

Tableau 15: Données de RMN ^{1}H (CD_3OD, 250 MHz) et ^{13}C (APT) (CD_3OD, 62.5 MHz) de **LP13**. 92

Tableau 16: Données RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **LP14** 103

Tableau 17: Déplacements chimiques de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) du composé **LP14** 103

Tableau 18: Données de RMN ^{1}H (CD_3OD, 400 MHz) du Composé **LP15** 110

Tableau 19: Données de RMN ^{13}C (CD_3OD, 100 MHz) du Composé **LP15** 111

Tableau 20: Déplacements chimiques de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62.5 MHz) du mélange **LP8a** (3-*O*-acétyl-5,6-epoxystigmastan-22-en-3β-ol). 130

Tableau 21: Déplacements chimiques de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62.5 MHz) du mélange **LP8a** et **LP8b** 134

Tableau 22: Données de RMN ^{13}C de stigmasta-4,22-dien-3-one 138

Tableau 23: Données de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62.5 MHz) de stigmasta-4,22-diene-3,6-dione (comparaison avec les déplacements chimiques du produit de réaction issu du cholestérol) 141

Tableau 24: Données de RMN ^{1}H ($DMSO\text{-}d_6$, 250 MHz) de l'aminocinnamyle 144

Tableau 25: Données de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) du produit d'imination (**LP1R**) 147

Tableau 26: Données de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz) et de ^{13}C ($CDCl_3$, 62.5 MHz) de produit de glucosylation 150

Tableau 27: Récapitulatif du mode opératoire de la technique FRAP 155

Tableau 28: Absorbance des composés LP 157

Tableau 29: Absorbance des fractions issues de la chromatographie flash 159

Tableau 30: IC50 des composés testés 163

RESUME

Depuis des décennies, les plantes sont utilisées en pharmacopée traditionnelle pour le soin de plusieurs maladies. Ceci en raison des résistances que présentent certains microorganismes vis-à-vis des produits pharmaceutiques. On notera aussi le manque de moyen financier pour l'accès au soin en médecine moderne. Voilà pourquoi le présent travail porte sur l'extraction, l'isolement, l'élucidation des structures, les transformations chimiques et les tests biologiques des métabolites secondaires des variétés sauvage et cultivée de l'espèce *Triumfetta cordifolia* A Rich (Tiliaceae).

Les chromatographies successives de l'extrait organique des tiges et des feuilles de la variété sauvage ont conduit à l'isolement de quatre produits nouveaux dont deux céramides

isolés des tiges et deux triterpènes obtenus des feuilles. Ces composés ont été identifiés à: (2R,6Z)-2-hydroxy-N-[(2S,3S,4R)-1,3,4-trihydroxyhexacosan-2-yl]heptadec-6-enamide, (2R)-N-{(1S,2R, 3E,6Z,9Z,12Z,15Z)-1-[(*β*-D-glucopyranosyloxy)methyl]-2-hydroxy heneicosa-3,6,9,12, 15-pentaen-1-yl}-2-hydroxytetradecanamide, 3-*O*-propanoyl-29-*O*-triacontanoylstigmasta-5,22-diene-3*β*,29-diol et l'acide 2*α*,3*β*,19*α*-trimethoxyurs-12-ene-24,28-dioique-24-[(2*α*,3*β*)-24,28-bis(*β*-*D*-glucopyranosyloxy)-2-hydroxy-24,28-dioxours-12-en-3-yl] ester. En plus de ces composés, onze autres de structures connues ont été isolés et identifiés à l'acide heptadecanoïque, au glucopyranoside de *β*-sitostérol, à la friedeline, au lupéol, à la bétuline, à l'acide oléanolique, à l'acide maslinique, à l'acide corosolique, au mélange de stigmastérol et *β*-sitostérol, à l'acide heneicosanoïque et au *trans*-tiliroside.

De l'extrait organique des tiges et des feuilles de l'espèce cultivée de *Triumfetta cordifolia* dix produits ont été isolés parmi lesquels trois n'ont pas encore été identifiés, quatre ont été déjà isolés de l'espèce sauvage (mélange de stigmastérol et *β*-sitostérol, glucopyranoside de *β*-sitostérol, triumfettamide) et les trois derniers de structures connues ont été identifiés à l'acide tormentique, à la *β*-carotène et à l'acide 24-hydroxytormentique.

Les structures de ces composés ont été élucidées grâce aux données de RMN (1 et 2D) et elles ont été confirmées en comparant ces données à celles décrites dans la littérature. Le stigmastérol a été soumis à plusieurs réactions d'oxydation et en plus des produits obtenus, certains composés isolés en grande quantité ont été soumis au test de cytotoxicité sur une lignée de cellules HT1080. La méthode utilisée est la cytométrie à flux et certaines de ces drogues ont présenté une grande activité cytotoxique bien que induisant à la fois la mort nécrotique et non nécrotique des cellules cancérigènes. L'activité antioxydante des fractions issues du flash des deux plantes et certains composés a été évaluée par la méthode FRAP.

Le travail révéler ici le caractère préventif et curatif de nos plantes comestibles ; car ces espèces peuvent bien utiliser contre les stress oxydatifs et les études biologiques pourront être approfondies sur certains composés isolés pour mettre en valeur leur propriété anticancer.

Mots-clés *Triumfetta Cordifolia A. Rich*, Tiliaceae, ceramides, Ester de Stéroïde, Saponine, activité antioxydante, activité cytotoxique

ABSTRACT

From decade, plants are used in traditional healer to treat many diseases. This could be explained by microorganism pharmaceutical drug resistance. Beside this, the poverty limits also access to modern treatment. That is why the present work deals with extraction, isolation, structural elucidation, chemical transformation and biological evaluation of secondary metabolites isolated from the wild and the cultivated species of *Triumfetta cordifolia* A Rich (Tiliaceae).

From the organic extract of twigs and leaves of wild *T. cordifolia*, four new compounds were characterized (two ceramides and two triterpens) by successive chromatography methods and identified as (2R,6Z)-2-hydroxy-N-[(2S,3S,4R)-1,3,4-trihydroxyhexacosan-2-yl]heptadec-6-enamide, (2R)-N-{(1S,2R,3E,6Z,9Z,12Z,15Z)-1-[(*β*-D-glucopyranosyloxy)methyl]-2-hydroxyheneicosa-3,6,9,12,15-pentaen-1-yl}-2-hydroxytetra decanamide, stigmasta-5,22-diene-3*β*,29-diol-3-*O*-propanoate- 29-*O*-triacontanoate and 2*α*,3*β*,19*α*-trimethoxyurs-12-ene-24,28-dioique-24-[(2*α*,3*β*)-24,28-bis(*β*-*D*-glucopyranosyl oxy)-2-hydroxy-24,28-dioxours-12-en-3-yl] ester acid.. These compounds were obtained together with eleven known compounds identified as heptadecanoic acid, *β*-sitosterol glucopyranoside, friedelin, lupeol, betulin, oleanolic acid, maslinic acid, corosolic acid, the mixture of stigmasterol and *β*-sitosterol, heneicosanoic acid and *trans*-tiliroside.

From the organic extract of twigs and leaves of cultivated species, ten products were isolated; three among of them have not yet been identified, four of them were already obtained from the wild species and the rest were identified as Tormentic acid, *β*-carotene and 24-hydroxytormentic acid.

The structures of these compounds were determined on the basis of NMR data (^{1}H, ^{13}C, two dimensional NMR analyses), mass spectrometry structure of new compounds were confirmed by chemical transformations while those of known compounds were confirmed by comparison of their physical and spectral data with those reported in the literature and with authentic samples for some of them. Stigmasterol was subjected to different oxidation reactions. The cytotoxic activities of the products and some isolated compounds against human fribosarcoma cell line HT1080 were evaluated. The flow cytometry was used to carry out this assay and some drugs showed good cytotoxic activities although inducing at the same time the apoptotic and necrotic dead of cells. The antioxidant properties of some fractions and compounds were also evaluated by FRAP method. *Trans*-tiliroside and its fraction showed good antioxidant activity.

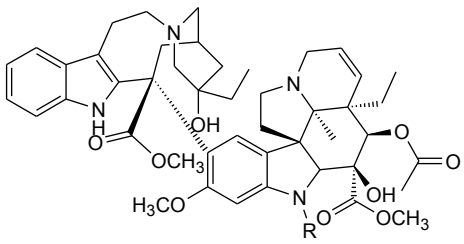
This work reveals the preventive and curative character of both eatable plants since these species could be used against oxidative stress. Other biological studies could be deepened to highlight the anticancer property of some isolated compounds.

Keywords: *Triumfetta Cordifolia A. Rich*, Tiliaceae, Ceramide, Ester of steroid, Saponine, antioxidant activity, cytotoxic activity.

INTRODUCTION

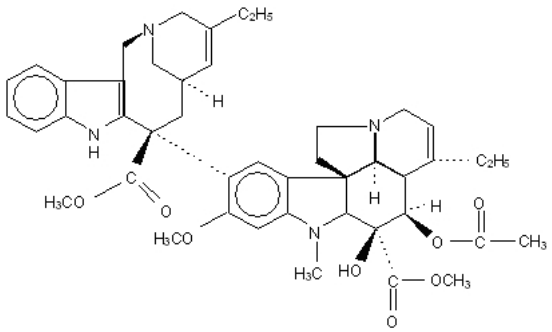
Les plantes jouent un rôle très important dans le vécu quotidien des hommes. Car depuis bien longtemps elles sont utilisées comme bois de chauffage, matières premières dans l'immobilier, la décoration et dans les soins des maladies. Aujourd'hui, celles-ci sont une véritable ruche à médicaments car, elles sont totalement intégrées dans les mœurs africaines et interviennent en pharmacopée traditionnelle dans la lutte contre de nombreuses maladies telles que le paludisme, la dysenterie, la fièvre jaune.

A côté de ces usages ethno pharmacologiques, il est impossible de nier que la nature offre une pharmacopée dont l'usage traditionnel donne des indications sur l'effet attendu. C'est ainsi que plusieurs plantes ont servi de médicament en médecine traditionnelle et sont aujourd'hui introduites en médecine moderne; nous citerons la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus;* Apocynaceae) dont les alcaloïdes (Vinblastine **1** et Vincristine **2**) isolés présentent des propriétés antinéoplasiques;

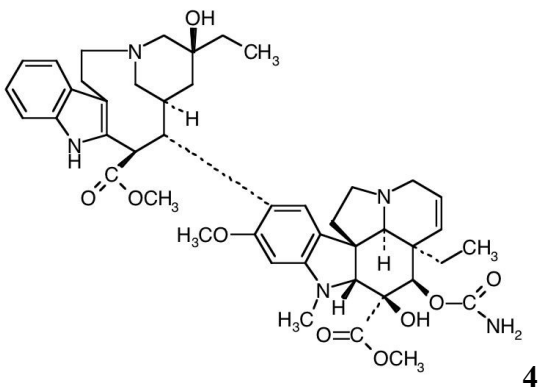


1-Vinblastine R= Me
2- Vincristine R= CHO

Et de nos jours, les dérivées d'hemisynthèse [Vinorelbine (**3**) et Vindesine (**4**)] sont utilisées dans le soin de certains cancers.1

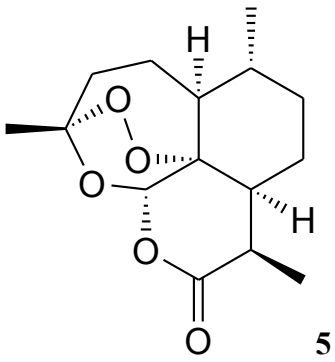


3



4

Récemment les études phytochimiques menées sur *Artemisia annua* (Asteraceae) qui est une plante utilisée depuis des décennies en chine comme antipaludéen a permis d'isoler l'artemisinine **5**.



5

C’est un métabolite secondaire qui a un squelette sesquiterpènique endopéroxyde et qui est utilisé aujourd’hui pour soigner le paludisme.[1]

Malgré le succès de la médecine moderne à travers certains produits pharmaceutiques et techniques de soins, la majeure partie des populations africaines consulte toujours les guérisseurs traditionnels pour leurs problèmes de santé. Ceci en raison du climat de confiance entre le tradipraticien et le malade, du coût élevé des prestations sanitaires et des médicaments conventionnels et de l'insuffisance de campagnes d’éducation sur la santé.

Cependant, malgré l’intégration des médicaments à base des plantes (décoction, infusion, macérât…) dans nos mœurs et leur efficacité plus ou moins observée, des éclaircissements restent à apporter sur la composition chimique, le dosage et la toxicité de ces phytomédicaments. C’est dans cette optique que plusieurs études phytochimiques et biologiques ont été effectuées depuis des décennies au Département de Chimie Organique de l’Université de Yaoundé I, pour promouvoir ou proscrire l’usage de ces plantes.

Pour apporter notre contribution à ce vaste programme, nous avons focalisé le travail sur l’étude phytochimique et biologique de deux plantes (l’une sauvage et l’autre cultivée) de la même espèce se développant dans deux modes de vie différents. Il s’agit de *Triumfetta cordifolia* A. Rich qui est une espèce appartenant à la famille des Tiliaceae. Elle est appelée «Nkui» chez les Bamilékés où elle fait partie de leur alimentation.

L’objectif principal de notre travail est d’isoler, de caractériser et de tester des substances naturelles isolées des espèces sauvages et cultivées de *Triumfetta cordifolia* afin de montrer que même à travers les aliments, la santé peut être retrouvée ou protégée.

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTERATURE

I.1/ Généralités sur les méthodes expérimentales

I.1.1/ La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est une technique utilisée pour l'analyse structurale de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination de la structure des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés ici sont le proton ^{1}H, le carbone ^{13}C, le phosphore ^{31}P, et l'azote ^{15}N. Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (^{1}H, ^{13}C, etc) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «spin».[2] La technique de RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué à la molécule entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de telle sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Les échantillons sont dissouts dans un solvant deutéré qui peut être du méthanol, du chloroforme, de la pyridine etc. Ces solvants possèdent des déplacements chimiques spécifiques. Le tube contenant l'échantillon dissout est soumis à un champ magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à l'élucidation des structures.

I.1.2/ RMN monodimensionnelle (RMN 1D)

- RMN proton (^{1}H)

Le spectre de RMN du proton est une méthode utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, l'environnement chimique d'un hydrogène donné, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et la nature de chaque proton par leur déplacement chimique caractéristique.

- RMN carbone (^{13}C): DEPT 135° et Jmod (APT)

Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement chimique unique provoque une crête distincte sur un spectre. Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse du spectre est basée sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chaque atome de

carbone**.** Cette expérience permet la mise en évidence des groupes méthyles, méthylènes, méthines et des carbones quaternaires. Tous ces carbones sont observés ou non suivant la technique utilisée. Le DEPT 135° laisse apparaitre tous les carbones sauf les carbones quaternaires alors que le Jmod les met tous en évidence quelque soit leur nature. Généralement, les carbones quaternaires et secondaires sont dans la même phase que le pic du solvant et l'autre phase comporte les carbones primaires et tertiaires.

I.1.3/ RMN bidimensionnelles (RMN 2D)

Les expériences de RMN 2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage.[3]

Corrélations homonucléaires

- COSY ($^{1}H–^{1}H$): Cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^{2}J et ^{3}J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

- NOESY ($^{1}H–^{1}H$): Elle permet d'observer les corrélations dans l'espace (effets Overhauser) entre protons d'une même molécule.

Corrélations hétéronucléaires

- HSQC ($^{1}J_{H-C}$)**:** cette Technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

- HMBC ($^{2}J_{H-C}$, $^{3}J_{H-C}$)**:** Elle permet la détection des couplages longue distance $^{2}J_{H-C}$, $^{3}J_{H-C}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

I.2/ Infra Rouge à Transformé de Fourrier[4]

C'est une méthode basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau. Elle permet grâce à la détection des vibrations caractérisant les différentes liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse de celles-ci dans une molécule.

Principe: Si la longueur d'onde (énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera la baisse de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine de l'IR entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie et particulièrement de la symétrie moléculaire. Pour une géométrie donnée, on peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la théorie de groupe et ainsi, la position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse.

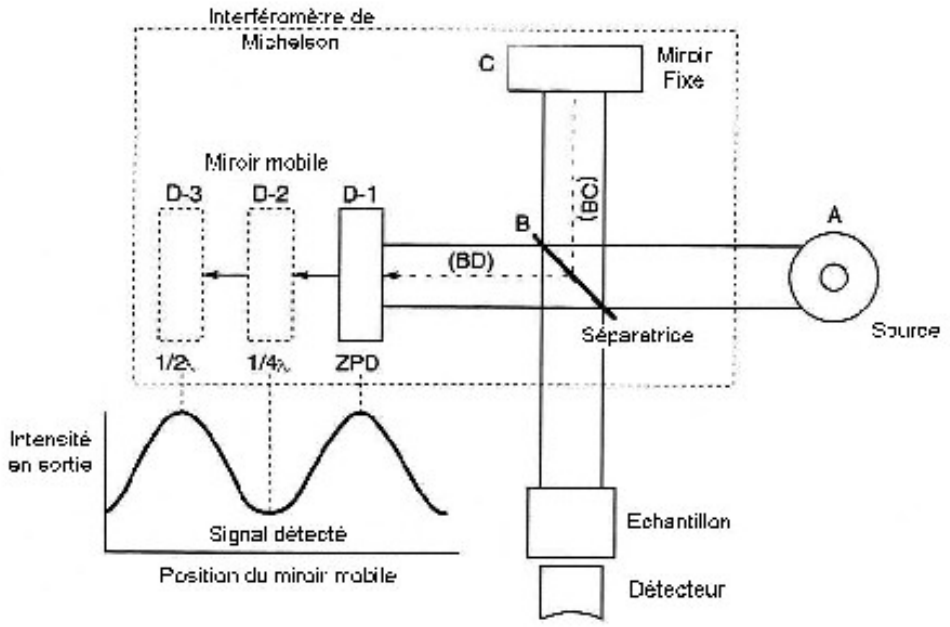


Figure 1: Coupe d'un appareil d'Infra Rouge

Le faisceau provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, et le reste passe à travers la séparatrice et est dirigée vers le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, les interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique. Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme, c'est à dire un signal dont l'intensité est fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet

interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée Transformée de Fourier.

I.3/ Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus. Son principe est basé sur l'ionisation des molécules. Car celles-ci donnent après son introduction dans la source, l'ion moléculaire permettant la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir rupture de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont l'exploitation permet l'identification de la structure moléculaire. Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse.

I.3.1/ MALDI.[5]

C'est une technique d'ionisation s'appliquant préférentiellement aux composés dont le poids moléculaire est supérieur à 1000 Daltons et qui ne se prêtent pas à l'ionisation electrospray. Un analyseur à temps de vol ToF est couplé à la source MALDI car sa gamme d'analyse est en théorie illimitée. Cet analyseur peut être utilisé selon deux modes de fonctionnement: mode linéaire et mode reflectron.

Le mode linéaire est principalement utilisé dans le cas de macromolécules (poids moléculaire supérieur à 50 kDa) et permet de faire des mesures à basse résolution.

Le mode reflectron permet d'effectuer les mesures de masse à haute résolution ainsi que la détermination de la masse exacte des composés analysés, moyennant un étalonnage interne

Principe: L'ionisation par MALDI repose sur la désorption d'ions caractéristiques d'un analyte après irradiation par un faisceau laser d'un mélange cristallin de cet analyte dans une matrice. L'échantillon est dissout puis mélangé à une solution d'un composé appelé matrice pour atteindre un ratio molaire de 1:100 à 1:50000. En fonction des applications, une

solution de sel métallique apportant de cations (Cat^+) peut également être ajoutée. Cette solution ajoutée intervient aussi dans l'ionisation. Une gouttelette (< ou = 1µl) de ce mélange est déposée sur la surface d'une plaque métallique appelée cible. Par évaporation du solvant, le dépôt devient une solution solide de l'échantillon dans la matrice.

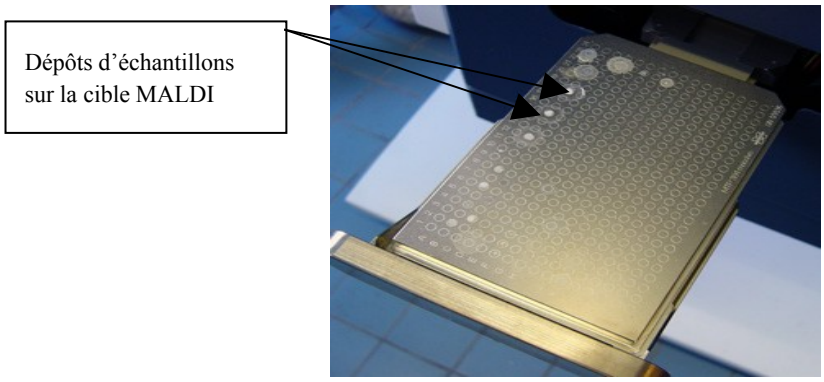


Figure 2: Plaque de dépôt d'échantillons pour la source d'ionisation MALDI

Une fois la cible dans la source MALDI, les différents spots de cristaux de la solution solide sont visualisés grâce à une camera dont le grossissement est de 30. Les différents dépôts sont bombardés par un faisceau laser (laser à N_2, 337 nm) ainsi, la matrice absorbe la longueur d'onde émise par le laser et l'irradiation du mélange cristallin donne lieu à la désorption d'ions caractéristiques de l'échantillon. Tous ces ions (analyte et matrice) sont ensuite extraits de la source d'ionisation par paquet vers l'analyseur de masse ToF et analysés suivant leur rapport de masse sur charge *m/z* pour donner des pics $[M+H]^+$ ou $[M+Cat]^+$ en mode d'ionisation positif et $[M-H]^-$ en mode d'ionisation négatif.

I.3.2/ ESI.[5]

Principe: A pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire de silice métallisé en surface et porté à un potentiel élevé. Le champ électrique leur confère une densité de charge importante. Sous l'effet de celui-ci, et grâce à l'assistance d'un courant d'air co-axial, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation. Sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de désolvatation et d'évaporation. Leur densité de charge devenant trop importante, les répulsions électriques atteignant le niveau des tensions superficielles, les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes constituées de

molécules protonées ou déprotonées de l'analyte, porteuses d'un nombre de charges variables. Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiel électrique appliqué sur deux cônes d'échantillonnage successifs sous un vide poussé (<10^{-5} Torr). Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant, ce qui complète leur désolvatation. En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes. L'avantage de cette méthode d'ionisation est l'obtention d'ions multichargés, pour les macromolécules, polymères. Elle permet d'autre part de générer une ionisation douce.

I.3.3/ Temps de vol.[5]

Principe: L'analyseur à temps de vol consiste à mesurer le temps que met un ion, soumis à une tension préalable, à parcourir une distance donnée. En effet, l'énergie cinétique vaut:

$$E_c = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = \frac{1}{2} \cdot m \cdot \frac{l^2}{t^2}$$

m étant la masse, *v* la vitesse, *l* la distance parcourue pendant le vol, et *t* le temps de vol. Par ailleurs, un ion de charge *z* soumis à une tension accélératrice *V* gagne une énergie cinétique

$E_c = z \cdot e \cdot V$ *e* étant la charge élémentaire.

$$\frac{m}{z} = 2 \cdot e \cdot V \cdot \frac{t^2}{l^2}$$

On en déduit que ainsi

Le rapport masse sur charge est directement mesurable à partir du temps de vol.

I.3.4/ FT-ICR.[5]

L'analyseur à résonance cyclotronique d'ion se compose d'une cellule ICR (de configuration cubique par exemple) comportant notamment six plaques sous tension, isolées les unes des autres. L'application d'un champ magnétostatique B suivant l'axe z soumet les ions à la force de Lorentz F = ez vΛB. Leur mouvement dans le plan (xy) est alors «cyclotronique», c'est-à-dire circulaire uniforme de fréquence f = eB/(2π.m/z). Les ions sont par ailleurs confinés suivant l'axe z par un champ électrostatique imposé par les deux plaques parallèles au plan (OXY), résultant de l'application d'une tension faible. Une fois piégés dans

la cellule, ils ont la même trajectoire mais pas la même position à un instant déterminé. On donne aux ions de même *m/z* un mouvement d'ensemble en les mettant en phase, par résonance cyclotronique. Pour cela, les ions *m/z* sont excités par un champ alternatif de fréquence correspondant à leur fréquence cyclotron: pour exciter ceux d'une certaine gamme de *m/z*, une tension contenant toutes les fréquences cyclotron correspondantes est appliquée. Ils sont alors accélérés, mis en phase ainsi le rayon de leur orbite augmente. Le courant induit par le mouvement cohérent des ions de même *m/z* sera mesuré sur les plaques de détection: ce sera une sinusoïde amortie de fréquence cyclotronique. Le courant total induit mesuré sera donc la somme de sinusoïdes amorties des fréquences cyclotroniques correspondant aux ions de *m/z* excités par résonance. La fréquence cyclotron étant proportionnelle à 1/(*m/z*), l'inverse de la transformée de Fourier du courant obtenu permet d'aboutir au spectre de masse en *m/z*. Le FT-ICR permet l'analyse en MS/MS, avec des possibilités variées d'activation des ions et donc de fragmentation sélectives.

I.3.5/ Masse en tandem (MS/MS).[6]

Principe: Méthode qui consiste à sélectionner un ion stable particulier issu de la source d'ion (appelé ion parent ou précurseur) et à le décomposer une seconde fois pour former des ions fils ou produits. Dans la phase intermédiaire aux deux fragmentations, se trouve la phase d'excitation de l'ion précurseur qui conduit à son excitation (augmentation de l'énergie interne) et à sa fragmentation.

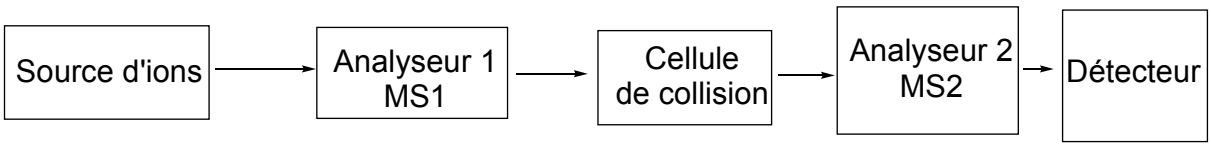


Schéma 1: Protocole simplifié d'ionisation, d'analyse et de détection d'une molécule en MSMS.

La masse en tandem peut se faire aussi bien dans l'espace que dans le temps; le premier cas fait intervenir deux analyseurs montés en série et dans le second les séquences successives de fragmentations se font dans la même enceinte. La spectrométrie de masse à tandem se fait dans le cas où la machine a un analyseur trappe à ion ou à résonnance cyclotronique ionique.

I.3.6/ CL-SM

C'est une technique qui permet de séparer et d'identifier des matières organiques en trace. Il existe plusieurs techniques de séparation en phase liquide: la chromatographie liquide haute performance, la chromatographie ion et l'électrophorèse à zone capillaire qui sont connues pour leur efficacité dans la séparation des mélanges complexes. L'une des limites de ces méthodes est le manque d'un détecteur universel car l'efficacité change avec la nature des produits. Le principe de ces méthodes est basé sur l'affinité de l'échantillon à analyser à l'égard de deux phases dont l'une mobile et l'autre fixe. La colonne peut être à phase inverse ou à phase normale.[7] Ces appareils d'analyse sont munis d'un détecteur spectrophotométrique qui rend compte de la longueur d'onde de chaque élément de l'échantillon et par conséquent de leur temps de rétention sur la colonne. Les éléments détectés passent ensuite dans une cellule d'ionisation où ils sont ionisés, fragmentés, analysés et séparés suivant leur rapport *m/z*. Il existe plusieurs types d'ionisation à savoir l'Electrospray, le bombardement rapide des atomes, l'ionisation chimique à pression atmosphérique, l'ionisation par désorption laser assisté de matrice...[8] Les applications de cette méthode d'analyse sont nombreuses. On l'utilise pour la topographie des peptides, pour l'identification des métabolites ou des impuretés…[9]

I.4/ Aperçu botanique

I.4.1/ Généralités sur les Tiliaceae

Le mot Tiliaceae vient de *Tilia*.[10] Cette famille appartient à l'embranchement des spermatophytes, au sous-embranchement des angiospermes, à la classe des magnoliopsides (dicotylédones) et à l'ordre des malvales.[11] Les plantes de cette famille sont des herbes, des arbustes ou des arbres dont l'écorce est souvent lisse et se détache en fines lanières, donnant ainsi des fibres. Elles possèdent des vertus apaisantes.[12] Les fleurs sont pentamères et comportent un périanthe composé de cinq sépales et cinq pétales; elles sont unisexuées ou bisexuées.[13] Les étamines sont nombreuses, libres ou regroupées en faisceaux.[14] Le fruit est en capsule ou en drupe fibreuse.[12]

Les Tiliaceae retrouvées en majeure partie dans les zones tropicales et tempérées comprennent 500 espèces réparties en plus de 50 genres.[13] Le recensement des molécules isolées des Tiliaceae fait d'elle aujourd'hui une famille de plantes à part car elle était une

sous-famille des Malvaceae. En amérique centrale, la famille des Tiliaceae était composée du genre *Tilia* et *Craigi*; les genres *Colona*, *Corchorus*, *Grewia*, *Microcos* et *Triumfetta* étaient classés dans la famille Grewioideae. Aujourd'hui, les genres les plus répandus sont: *Tilia*, *Duboscia*, *Diplodiscus*, *Grewia*, *Desplatsia*, *Corchorus*, *Ancistrocarpus* et *Triumfetta.13*

I.4.2/ Généralités sur le genre *Triumfetta*

Le genre *Triumfetta* est compte environ 160 espèces dont huit recensées au Cameroun. Les espèces de ce genre sont des arbustes dont les tiges perdent souvent leurs ramifications ultimes, ou les herbes portant des poils étoilés.12 Les feuilles sont alternées, simples et possèdent parfois des lobes. Elles sont dentées et présentent des stipules persistantes.12

Les fleurs sont bisexuées et les fleurs mâles ont 5 à 60 étamines libres, alors que les fleurs femelles disposent de plusieurs loges renfermant chacune deux stigmates.12 Les fruits se présentent sous forme de capsules globuleuses s'ouvrant par trois à cinq valves et parfois indéhiscents, couverts d'aiguillons crochus ou terminés par une ou plusieurs soies. Les valves d'une capsule contiennent des graines obovoïdes en forme de rein.12

Les espèces du genre *Triumfetta* déjà recensées au Cameroun sont entre autres *Triumfetta annua*, *Triumfetta trichocarpa*, *Triumfetta pentandra*, *Triumfetta tomentosa*, *Triumfetta dubia, Triumfetta rhomboidea, Triumfetta pilosa* et *Triumfetta cordifolia*.

I.4.3/ Généralités sur *Triumfetta cordifolia*

C'est un arbuste dressé dont la taille varie de 0.5 à 5 m et portant des poils étoilés simples. Les feuilles sont plus ou moins caduques et à stipules lancéolées de 8 à 17 mm de long. Elles ont de longs pétioles et un limbe ovale-elliptique avec des bords en dents glanduleuses vers la base. Elles possèdent 5 à 7 paires de nervures basales. Les fleurs sont nombreuses et de couleur variant du blanc au jaune orangé. Les sépales sont linéaires à aire glandulaire, arrondie et plus longue que les pétales. On y dénombre 8 à 12 étamines. Les fruits sont des capsules globuleuses, de 0.8 à 1.5 mm de diamètre, renfermant plusieurs loges comportant chacune une graine.12



Figure 3: *Triumfetta cordifolia A Rich* (espèces sauvage et cultivée)

Source photographique: Photos faites par moi-même (Sandjo).

I.4.4/ Répartition géographique des espèces du genre *Triumfetta*.

Les plantes du genre *Triumfetta* se trouvent généralement dans les forêts tropicales d'Afrique Occidentale et Centrale, plus précisément au Nigeria, en Guinée Equatoriale, en République Démocratique du Congo, au Rwanda, au Burundi et au Cameroun.[12, 14]

Au Cameroun, leur répartition géographique est consignée dans le tableau 1.

Tableau 1: Répartition géographique des espèces du genre *Triumfetta* au Cameroun.[15]

Espèces	Localités	Region
T. pentandra	Mayo-louti	Nord
T. tomentosa	Dschang	Ouest
T. dubia	Ngaoundéré	Adamaoua
	Mont-Tenguelé (Garoua)	Nord
T. annua	Mogodé (Mokolo)	Extrême-Nord
T. claudmae	Poli	Nord
	Bertoua, Lomié	Est
T. rhomboïdea	Bafoussam	Ouest
	Bambili	Nord-Ouest
	Tibati	Adamaoua
T. cordifolia	Bayangam, Santchou	Ouest
	Yaoundé	Centre
T. trichocarpa	Linté	Adamaoua

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

I.5/ Quelques usages des espèces de la famille des Tiliaceae.

Les plantes de la famille des Tiliaceae présentent plusieurs utilités selon les localités et l'espèce présente.

Sur le plan alimentaire. *Triumfetta cordifolia* est utilisé comme aliment dans plusieurs localités du Cameroun.

Sur le plan artisanal. Les fibres de l'écorce de *Tilia americana* sont transformées en ficelles pour la couture et en fil fin pour le tissage des sacs.[16] Les fibres de *Triumfetta cordifolia* servent à confectionner les cordes et les tapis traditionnels.[17]

En pharmacopée traditionnelle. La décoction des petites branches de *Tilia americana* est consommée contre les troubles pulmonaires.16 Les fleurs de *Tilia sylvestris* sont utilisées dans le traitement de l'artériosclérose. Elles ont des propriétés calmantes et en infusion, elles sont utilisées contre les troubles digestifs d'origine nerveuse, les palpitations, les vertiges et angoisses, le nervosisme et l'insomnie. Pour soigner des infections opportunistes suite à une infection au HIV, certaines populations en Tanzanie font aussi recours aux feuilles et aux racines de *Grewia bicolor* Juss.[18] La poudre des racines de *Grewia tenax* (Forssk.) *Fiori14* et le jus des feuilles écrasées de *Triumfetta rhomboidea* sont utilisés pour la guérison de la diarrhée.[19] L'extrait aqueux obtenu par macération de *Glyphaea brevis* (Spreng) Monachino est utilisé contre les coliques.[20] Les feuilles de *Triumfetta semitrilobata* sont préparées sous forme de thé et consommées par les patients pour lutter contre la fatigue, la fièvre, les douleurs rénales et gynécologiques.[21] Le jus de l'écorce de *Triumfetta cordifolia* facilite l'expulsion de l'enfant de l'utérus.14 Compte tenu de ces usages divers, beaucoup d'études biologiques et phytochimiques ont été faites sur les Tiliaceae.

I.6/ Quelques études biologiques antérieures.

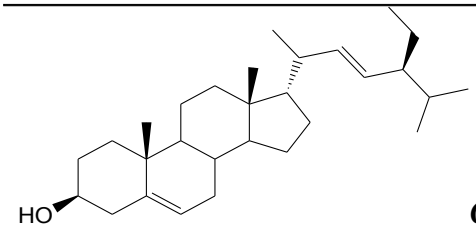
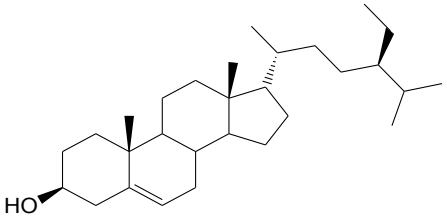
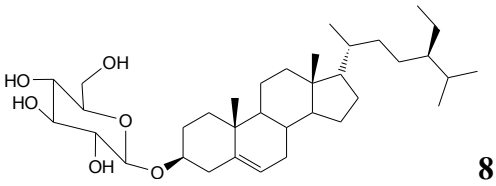
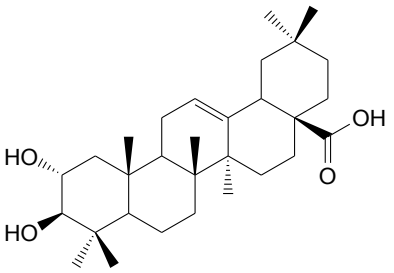
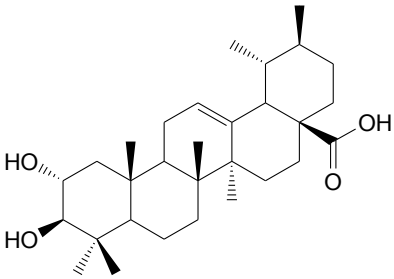
I.6.1/ Espèces végétales de la famille des Tiliaceae déjà étudiées.

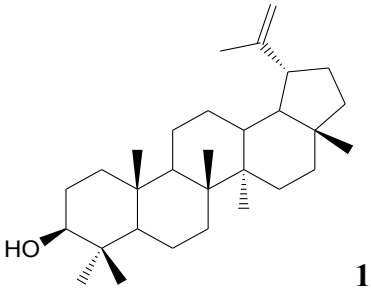
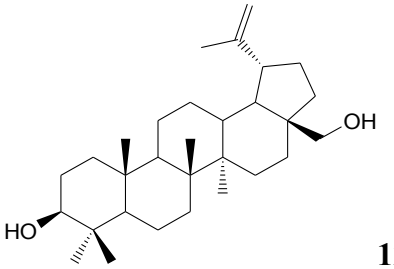
Tableau 2: Travaux biologiques faits sur quelques espèces de la famille des Tiliaceae

Espèce	Propriété biologique	Réf
Tilia europaea	Extrait aqueux présente des effets sédatifs	[22]
Tilia cordata	Extrait aqueux présente des effets apoptotiques sur des lymphocytes normaux et tumoraux	[23]
Tilia americana	Extrait au méthanol a des effets sédatifs	[24]
Triumfetta rhomboidea	Les huiles essentielles obtenues ont une activité antimicrobienne	[25]
Triumfetta welwitschii Mast. var. *hirsuta* (Sprague & Hutch.) Wild	L'extrait au mélange CH_2Cl_2-MeOH (1:1) des feuilles présente une activité antiplasmodium	[26]
Corchorus capsularis	Propriété antinociceptive et anti-inflammatoire de l'extrait au chloroforme des feuilles	[27]
Corchorus olitorius	L'extrait methanolique des graines présente des activités anti bactériennes	[28]
Pentace burmanica	L'extrait issu du mélange de solvants EtOH-H_2O (1:1) inhibe l'effet de venin du *Naja kouathia*	[29]
Grewia tiliaefolia	Propriété cytotoxique des extraits à l'éther de pétrole au benzène et à l'acétate d'éthyle	[30]
Grewia bilamellata	Les neolignanes isolés sont des composés antipaludéens	[31]

I.6.2/ Propriétés biologiques des produits isolés de *Triumfetta cordifolia* ayant fait l'objet d'études antérieures.

Tableau 3: Propriétés biologiques des quelques composés isolés de *T. Cordifolia*

Structure	Nom	Activités	Réf
 **6**	stigmastérol	Propriétés anticancéreuses	[32]
 **7**	*β*-sitostérol	Propriétés analgésiques et anticancéreuses	[33]
 **8**	3-*O*-glucopyranoside de *β*-sitostérol	Analgésique	[33]
 **9**	Acide maslinique	Anti-HIV1	[34]
 **10**	acide corosolique	Propriété antidiabétique	[35]

 **11**	lupeol	Effet anti-inflammatoire	[36]
 **12**	bétuline	Effet anti-inflammatoire	[36]

Vu les usages divers en médecine traditionnelle et les résultats obtenus des tests biologiques, des études phytochimiques ont été faites sur quelques espèces de cette famille.

I.7/ Travaux chimiques antérieurs sur les plantes de la famille des Tiliaceae.

Les études antérieures ont conduit à l'isolement et à la caractérisation des composés appartenant à la classe des:

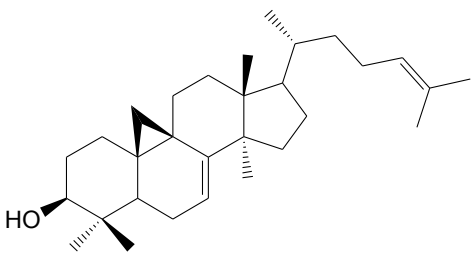
- Stéroïdes.
- Triterpènoïdes.
- Lignanes.
- Alcaloïdes.
- Flavonoïdes.
- Acide chlorogéniques.
- Acides gras.
- Huiles essentielles.

I.7.1/ Les stéroïdes.

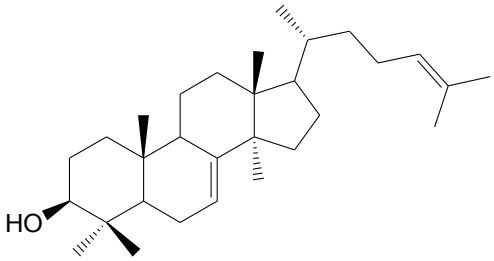
Ce sont des alcools secondaires ayant une structure de base cyclopentanoperhydrophénanthrènique. On les trouve dans les végétaux (phytostérols) sous forme libre, d'ester ou d'éther.[37]

Les stérols régulent la fluidité membranaire en limitant la circulation des acides gras et jouent un rôle dans l'adaptation des membranes aux conditions climatiques. Ils participent au contrôle de celles-ci lorsqu'elles sont associées au métabolisme.[38]

Chez les plantes, le mécanisme de biosynthèse des stéroïdes passe par le cycloartenol **13** et plutôt par le lanostérol **14** chez les animaux; mais tous subissent ou non deux fois l'action de l'enzyme



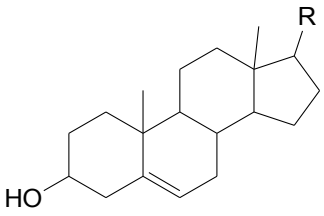
13



14

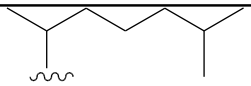
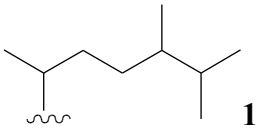
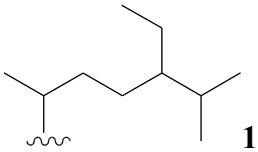
SMT (Steroid MethylTransferase) pour aboutir au *β*-sitostérol, à l'ergostérol ou au cholestérol, selon qu'on ait un méthyle ou un éthyle ou pas de ramification en position 24 **38**.[39, 40, 41]

Les stéroïdes sont une très vaste classe de composés naturels car les différentes modifications de leur chaine latérale ou dans l'un des cycles donnent des sous classes de cette famille de composés **15**.



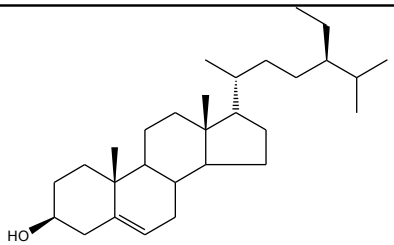
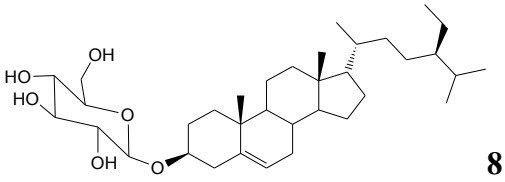
15

Tableau 4: Modification chaine latérale de 3**.**

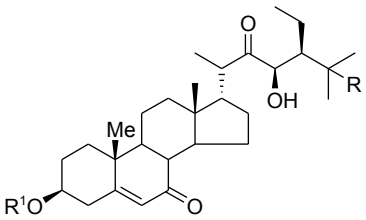
Sous-classe	Réf [42]
Cholestérol	 **16**
Ergostérol	 **17**
Stigmastanol	 **18**

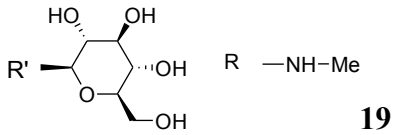
D'autres modifications donnent des composés à double classe tels que les alcaloïdes stéroïdiques. [43]

Tableau 5: Quelques stéroïdes isolés de la famille des Tiliaceae**.**

Nom	Structure	Source	Réf
β-Sitostérol	 **7**	*Corchorus capsularis*	[44]
Glucoside de *β*-sitostérol	 **8**		

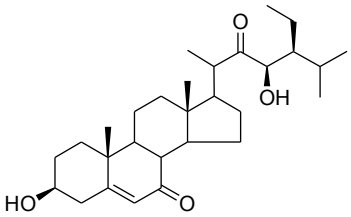
Triumfettoside (I_a)





19

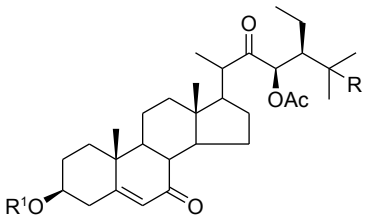
Triumfettostérol (I_b)

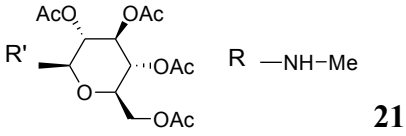


20

Triumfetta flavescens [45]

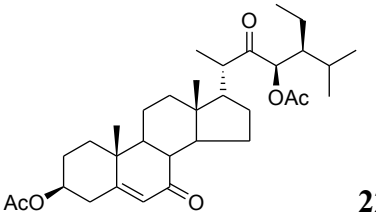
Pentaacetate de Triumfettoside





21

Triumfettostérol diacétate

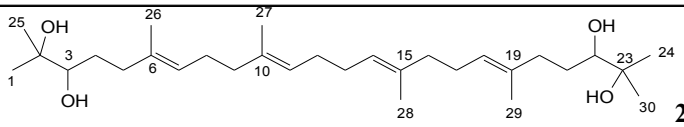
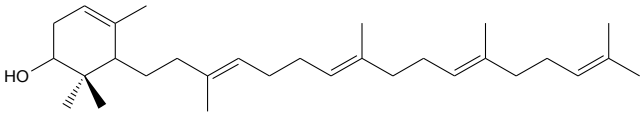
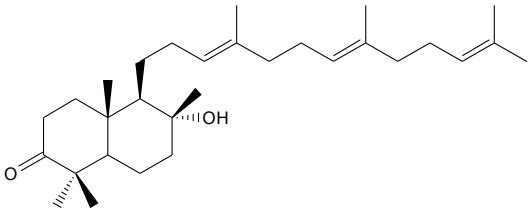
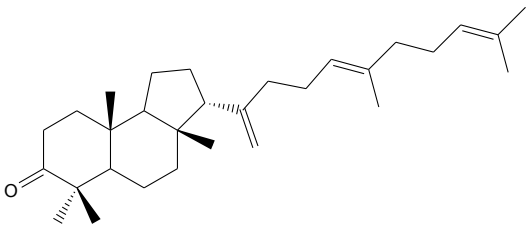
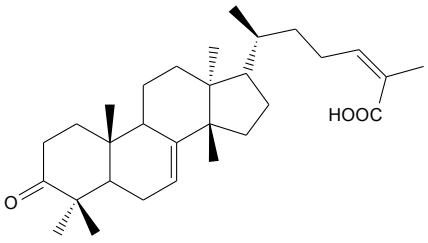


22

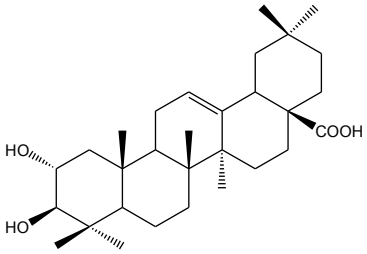
I.7.2/ Triterpènes

C'est une classe de métabolites secondaires dont la structure de base est en C30, elle est très répandue chez les végétaux. Ces composés sont issus du squalène qui est le précurseur dont sa cyclisation ou non donne différentes sous-classes. C'est ainsi qu'il existe les triterpènes acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, tétracycliques, pentacycliques et hexacycliques.

Tableau 6: Exemple de quelques sous-classes de triterpènes

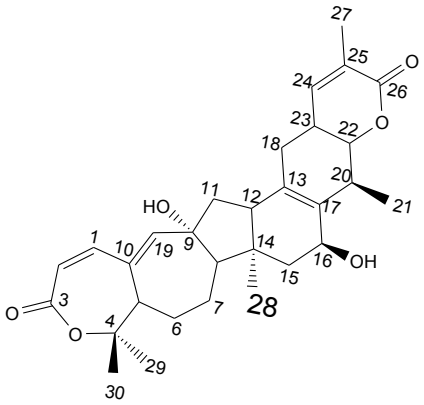
Classe de triterpène (nom)	Structures	Réf
Acyclique: (2,3,22,23-tetrahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,10,14,18-tet-racosatetraene)	 **23**	46
Monocyclique: (camelliol C)	 **24**	47
Bicyclique: [(8R)-3-oxo-8-hydropolypoda-13E,17E,21-triene]	 **25**	48
Tricyclique: (3-oxo-malabarica-14(26),17*E*,21-triene)	 **26**	49
Tétracyclique: (acide masticadienonique)	 **27**	50

Pentacyclique (acide maslinique) [47]



9

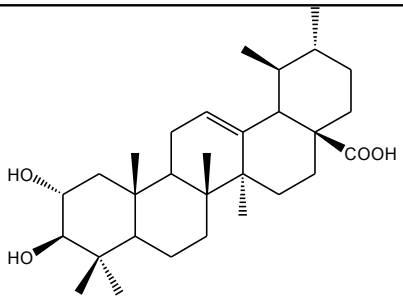
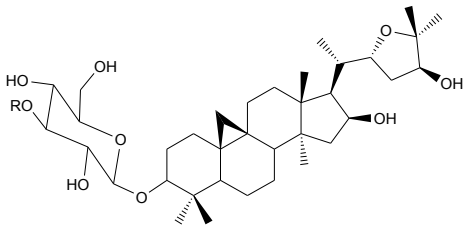
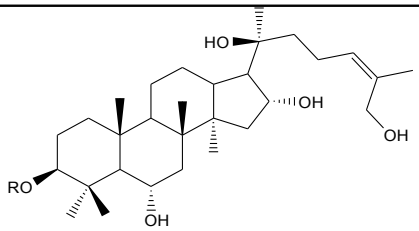
Hexacyclique (kadlongilactone A) [51]

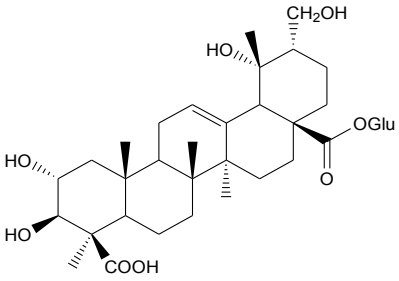
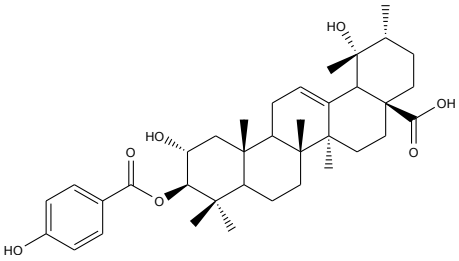
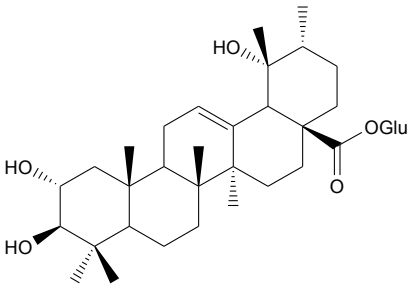
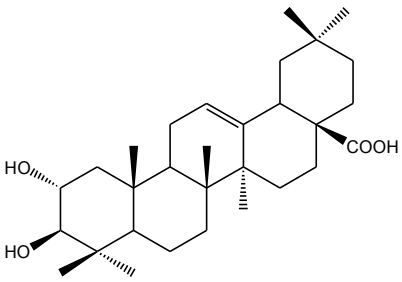
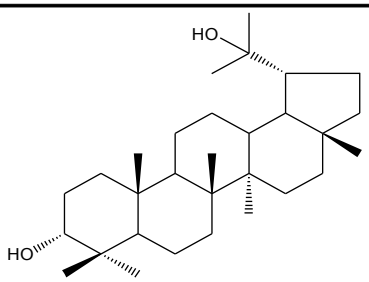


28

Les triterpènes tétra et pentacycliques ont été jusqu'ici les plus répandus dans la famille des Tiliaceae et le tableau ci-dessous récapitule certains qui ont été isolés de cette famille.

Tableau 7: Triterpènes isolés de la famille des Tiliaceae.

Noms	Structures	Sources	Réf
Acide corosolique	 **10**	*Corchorus capsularis*	44
Depressoside F	 R= alpha-D-glucopyranosyl **29**	*Corchorus depressus*	52
R=H: 3*β* ,6*α*,16*α*,20(*S*),27-Pentahydroxydammar-24(*Z*)-ene R= Gluc: 3*β* -D-Glucopyranosyloxy-6*α*,16*α*,20(*S*),27-tetrahydroxydammar-24(*Z*)-ene (2)	 **30**: R = H **31**: R glucosyl	*Corchorus trilocularis L.*	53

Ester d'acide 2*α*,3*β* ,19*α*, 30-tetrahydroxyurs-12-en-24,28-dioique 28-*O*-*β* -D-glucopyranosyl	 **32**		
Acide 3*β*-*p*-hydroxybenzoyl oxytormentique	 **33**	*Luehea divaricata*	54
Acide 28-*O*-*β*-D-gluco pyranoside tormentique	 **34**		
Acide 2α,3β-dihydroxy olean-12-èn-28-oique ou l'acide maslinique	 **9**		
3α,20-Lupandiol	 **35**	*Grewia bilamellata*	31

Les stéroïdes et les triterpenoides sont des classes de composés offrant une grande gamme de substances naturelles, ceci dû à leur origine biosynthétique.

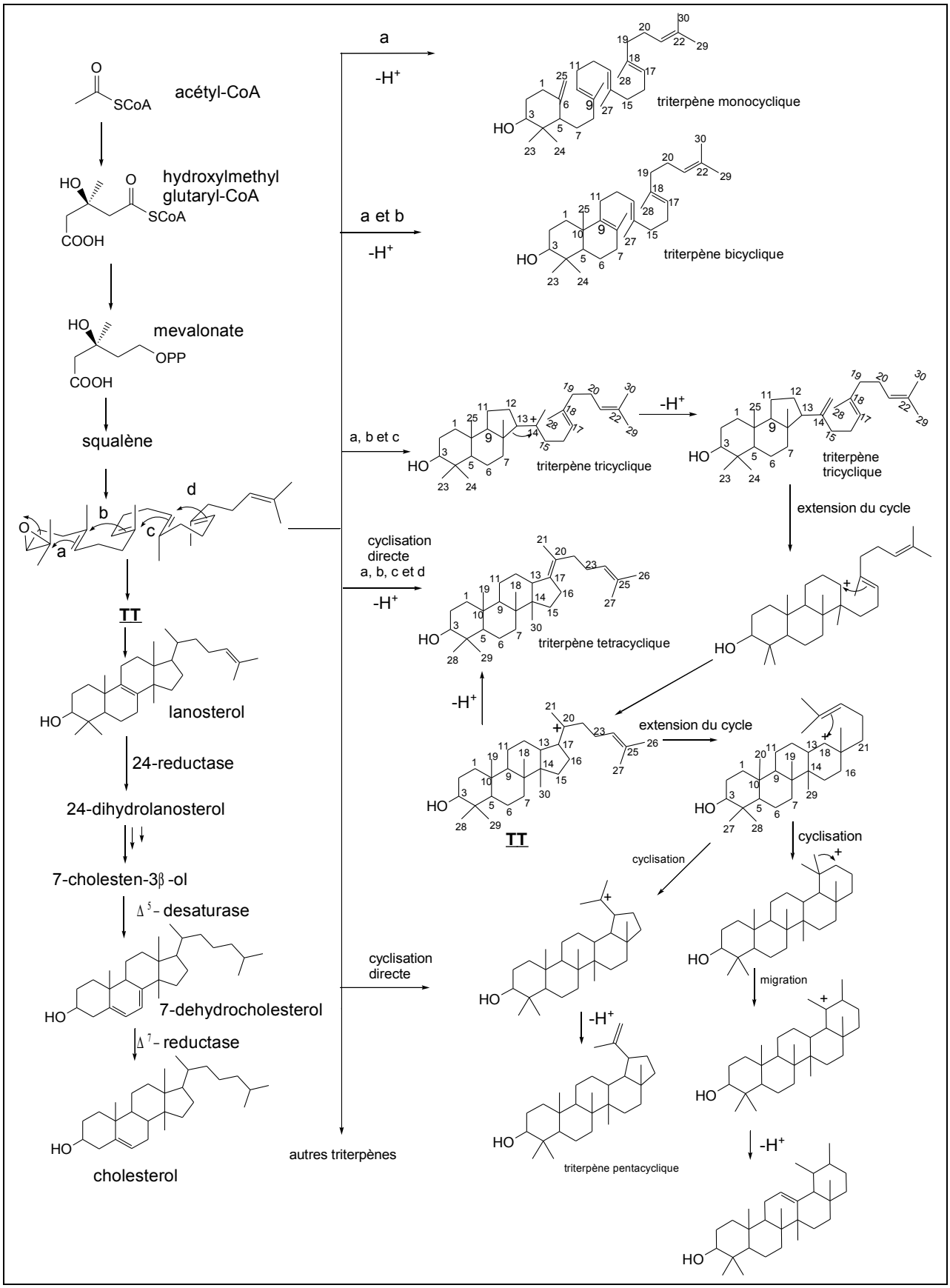
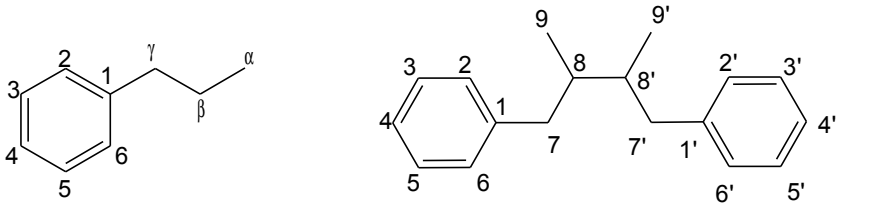


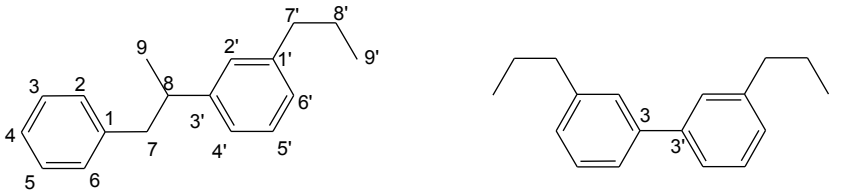
Schéma 2: Biosynthèse des stéroïdes et triterpènoïdes

I.7.3/ Lignanes.[55]

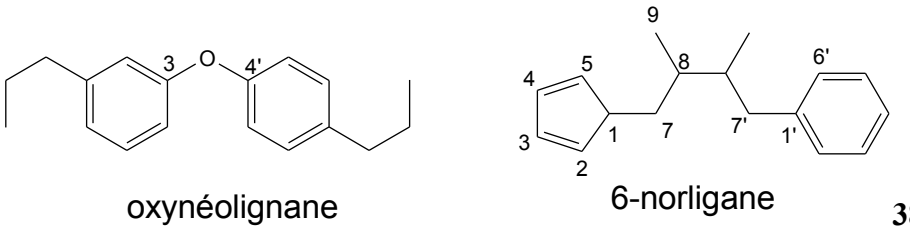
Elles sont considérées comme des composés naturels formés du couplage de deux unités en C6 et C3 (**36**) donnant un squelette propylbenzènique. Il arrive que ces composés soient liés en position 8,8' (**36**) ou 3,3' (**37**) et dans le dernier cas on parle de néo lignane. Tout autre composé de la classe des lignanes lié par des positions différentes de 8,8' est aussi appelé néo lignane (**37**). Nous avons aussi des oxynéo lignanes (**38**) lorsque les unités sont liées par une fonction éther ainsi que des nor-lignanes (**38**), lorsque l'un des cycles aromatiques est à cinq carbones ou alors lorsqu'on a un éthyle à la place du propyle.



36



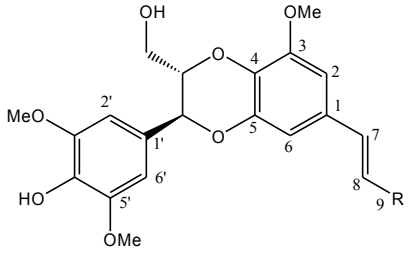
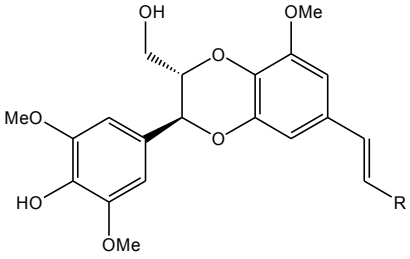
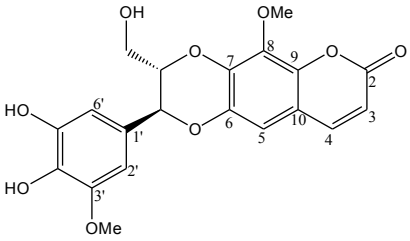
37



38

Le tableau ci-dessous présente quelques lignanes isolés des Tiliaceae.

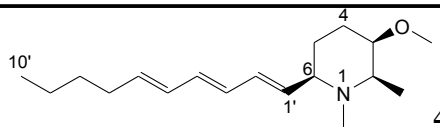
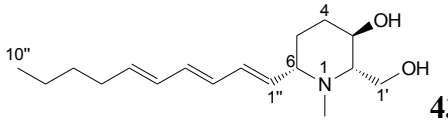
Tableau 8: Lignanes isolés de la famille des Tiliaceae

Nom	Structure	Source	Réf.
Bilagrewin	 **R** = CHO **39**	*Grewia bilamellata*	56
Nitidanin	 **R** = CH_2OH **40**		
Grewin	 **41**		

I.7.4/ Les Alcaloïdes.

Ce sont des composés organiques ayant un hétérocycle azoté; ils sont d'origine animale et végatale[57] qui peuvent être dotés de propriétés pharmacologiques marquées. Le mot alcaloïde dérive du mot *alcalin* qui était utilisé pour décrire les bases de Lewis contenant les hétérocycles azotés. Ces métabolites secondaires sont définis aujourd'hui comme des composés azotés plus ou moins basiques.37 Le mode d'extraction est basé sur leur facilité à former des sels d'ammonium quaternaire et leur détection se fait par des tests caractéristiques de Bertrand (Réactif silicotungstique), de Bouchardat (Iodure de potassium) ou même de Dragendorff (Iodobismuthate de potassium). Suivant leur structure chimique, ils ont été classés en plusieurs catégories telles que les Indoles, les Pyrrolidines, les Pyridines, les Quinolines etc [57]

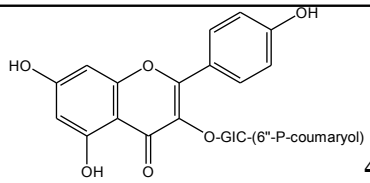
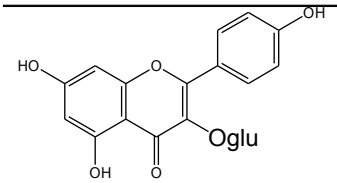
Tableau 9: Alcaloïdes isolés des Tiliaceae**.**

Nom	Structure	Source	Réf.
N-méthyl-6*β*-(déca-1',3',5'-trienyl)-3*β*-méthoxy-2*β*-méthylpiperidine	 **42**	*Microcos paniculata*	58
Micropine	 **43**	*Microcos philippinensis*	59

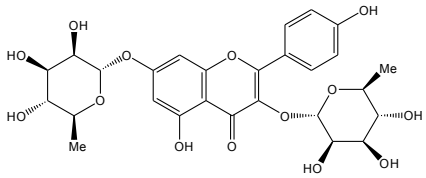
I.7.5/ Les Flavonoïdes.[60]

Ce sont des pigments ayant le motif biphenylpropane à 15 atomes de carbones disposés suivant l'enchainement C6-C3-C6. Les flavonoïdes sont des polyphénols hydrosolubles répandus dans le règne végétal et sont responsables de la couleur des fleurs et des fruits. La chaine à trois carbones peut rester ouverte ou même se cycliser à l'un des phényles par un oxygène pour donner un hétérocycle à six ou à cinq chaînons. Suivant toutes ces variations structurales, nous avons différentes sous-classes: chalcone, flavone, flavonol, flavanone, anthocyanine et isoflavonoïde.

Tableau 10: Quelques flavonoïdes isolés des Tiliaceae.

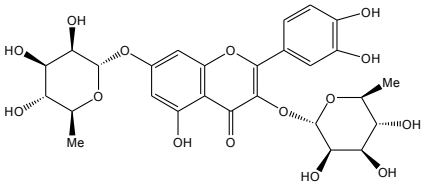
Noms	Structures	Sources	Réf
Trans-tiliroside	 **44**	*Tilia argentea*	61
Kaempferol-3-*0*-*β*-D-glucopyranoside	 **45**	*Tilia argentea*	61

Kaempferol 3,7-*α*-L-dirhamnoside



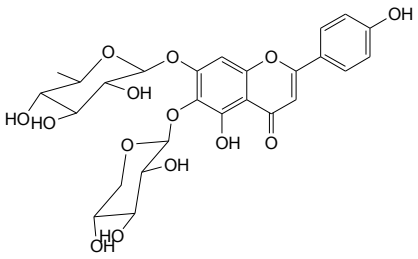
46

Quercetin 3,7-α-L-dirhamnoside



47

Triumboidin ou (5,4′-dihydroxy-6-*O*-*β*-D -xylopyranosyloxy-7-*O*-L –rhamnopyranosyloxy flavone



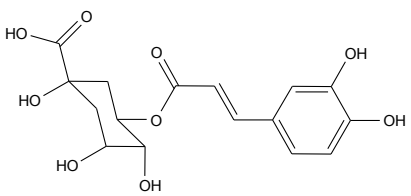
48

Triumfetta rhomboidea [62]

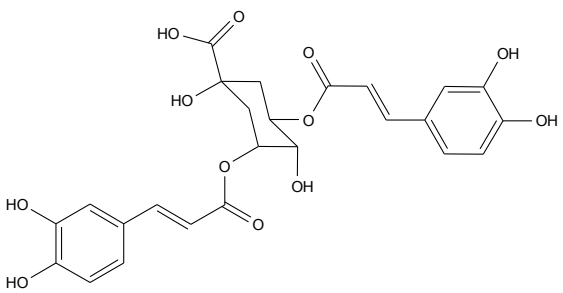
I.7.6/ Acide chlorogénique.[63]

C'est un acide phénolique encore appelé acide 5-*O*-caffeoylquinique, il dérive de l'acide hydroxycinnamique.

L'acide chlorogénique **49** et l'acide 5-caffeoyl chlorogénique **50** ont été isolés des feuilles de *Corchorus olitorius*.[64]



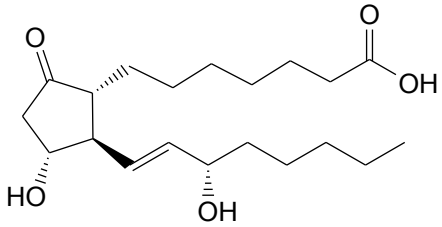
49



50

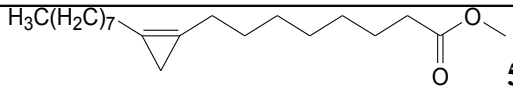
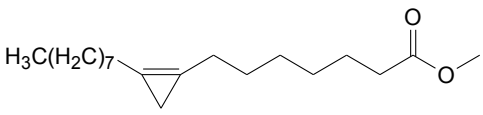
I.7.7/ Acide gras

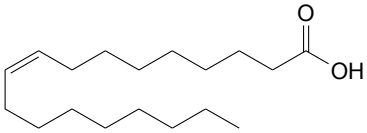
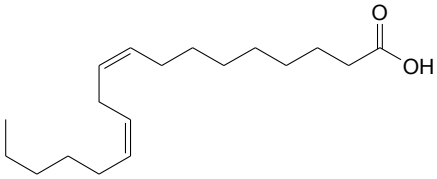
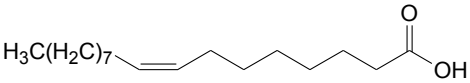
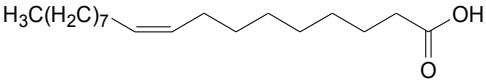
Les acides gras sont des biomolécules insolubles dans l'eau. Ils sont formés d'une longue chaine carbonée et d'un groupement carboxylique terminal. Cette chaine peut être saturée, mono ou polyinsaturée dans les cellules eucaryotes où elle n'est pas ramifiée et contient un nombre pair de carbones. Les doubles liaisons sont généralement dans la configuration cis et présentent le motif $CH=CHCH_2$ pour les polyinsaturés. Ces composés sont retrouvés parfois liés par des fonctions esters à certains composés ayant des rôles physiologiques. D'autre part, ils sont stockés dans le cytoplasme sous forme de triglycérides et jouent le rôle de molécule énergétique. [65] Certains de leurs dérivés comme la prostaglandine E_1 **51** (hormone dérivant de l'acide arachidonique) présente des fonctions spécifiques. C'est un agent de signalisation qui active de nombreux récepteurs membranaires.[66]



51

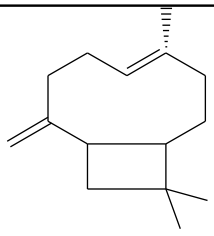
Tableau 11: Quelques acides gras isolés de la famille des Tiliaceae.

Nom	Structure	Source	Réf
8-(2-Octyl-cycloprop-1-enyl)-octanoate de méthyle	 **52**	*Triumfetta pilosa*	[67]
7-(2-Octyl-cycloprop-1-enyl)-heptanoate de méthyle.	 **53**		
Acide palmitique	H_3C-$(CH_2)_{14}$-COOH **54**		

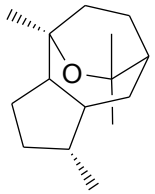
Acide stéarique	$H_3C\text{-}(CH_2)_{16}\text{-}COOH$	**55**
Acide oléique		**56**
Acide linoléique		**57**
Acide malvalique		**58**
Acide sterculique		**59**

I.7.8/ Huiles essentielles

Tableau 12: Quelques huiles essentielles isolées des Tiliaceae**.**

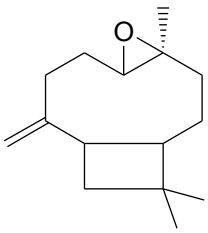
Nom	Structure	Source	Réf
Trans-β-caryophyllene: 4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo[7.2.0.]undec-4-ene	 **60**	*Triumfetta rhomboidea*	[68]

Kessane



61

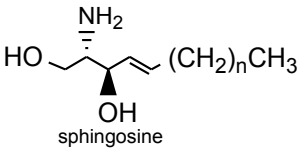
(1R,4R,6R,10S)-4,12,12-Trimethyl-9-methylene-5-oxa-tricyclo[8.2.0.0]4,6)]dodecane



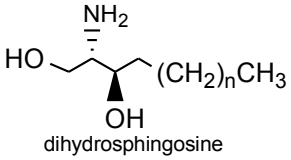
62

I.8/ Généralités sur les glyco et sphingolipides.

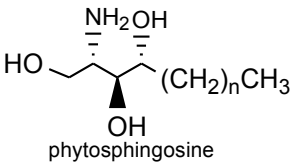
Les sphingolipides sont une classe de lipides dont l'acide gras est lié à une longue chaine de base ou encore sphingoïde par une fonction amide. Le terme «sphingo» a été adopté par Thudichum en 1884 et le terme «sphingolipide» a été introduit par Carter et *al*. en 1947. [69] Les sphingolipides complexes ont été trouvés dans la membrane plasmique des cellules animales.69 Il existe trois principaux types de sphingoïdes: les D-*Erythro*-sphingosines (**63**) qui sont les longues chaines basiques présentes dans les cellules animales; les D-*Erythro*-dihydrosphingosines (**64**) qui sont les plus abondantes du règne animal et les D-*Ribo*-phytosphingosines (**65**) qui sont les principales bases trouvées chez les végétaux et les champignons. La chaine alkyle de la base à 18 atomes de carbone est prédominante et varie entre 14 et 22 atomes de carbone. Le nombre de carbone de l'acide gras varie entre 14 et 30 avec la présence ou non d'un groupement hydroxyle sur le carbone en position α ou ω du carbonyle.[70]



63



64



65

I.8.1/ Biosynthèse des céramides.[70, 71, 72]

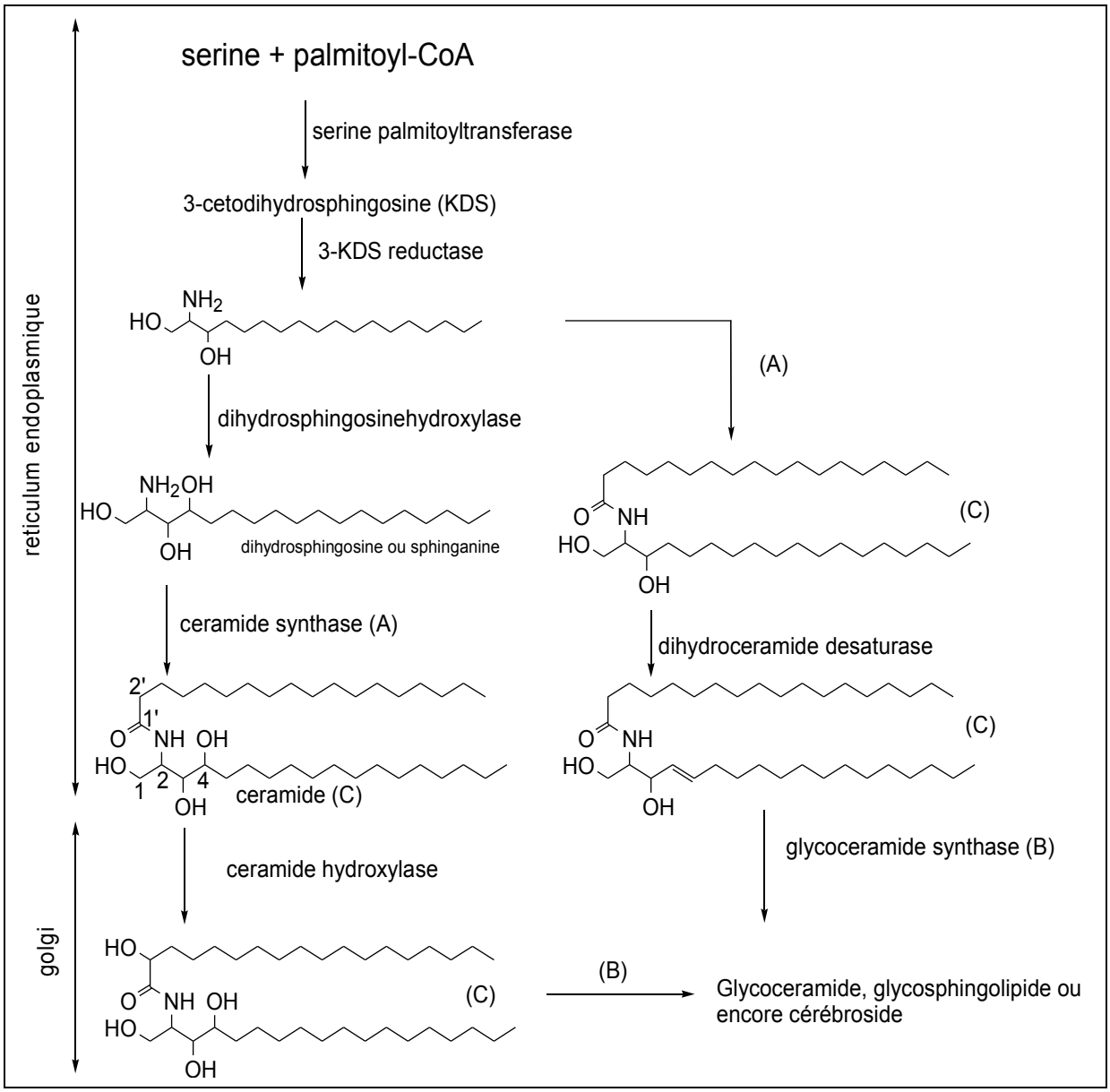


Schéma 3: Biosynthèse des céramides

I.8.2/ Rôles biologiques des sphingolipides.69

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. En effet, les céramides sont synthétisées dans les conditions de tout stress cellulaire.

L'apoptose est le processus par lequel la cellule active son suicide qui est une étape essentielle à son renouvellement. Ce processus est nécessaire pour l'homéostasie des tissus. L'arrêt de l'apoptose pourrait avoir de graves conséquences entrainant ainsi plusieurs maladies telles que le cancer, le diabète, la neuropathie, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose. Il est possible que la fonction biologique des céramides soit liée à la double liaison C(4)=C(5) de la sphingosine. La configuration *trans* de cette double liaison ne paraît pas importante car les céramides à configuration *cis* (double liaison C(4)=C(5)) induisent aussi l'apoptose cellulaire.

I.8.3/ Identification des céramides.[73]

Le spectre de RMN du proton présente généralement un doublet intégrant pour un proton vers δ(H) 8.70 ayant une constante de couplage de 8.8 Hz ceci lorsque le solvant de dissolution ne contient pas de trace d'eau deutérée. Celui-ci est échangeable à l'eau lourde et correspond au proton porté par l'azote de l'amide. Ce spectre de RMN ^{1}H présente également le triplet vers δ(H) 0.8 intégrant pour 6 protons qui sont attribuables aux méthyles terminaux ainsi qu'un singulet large entre δ(H) 1.20 et 1.40 qui est la séquence successive des methylènes, un multiplet entre δ(H) 2.20 et 2.00 représentant les protons en position allylique au cas où la molécule a des doubles liaisons ou en position β du carbonyle. Dans le cas où le composé a une double liaison de configuration *cis*, deux multiplets presque confondus sont observés autour de δ(H) 5.40 et très distincts autour δ(H) 5.70 et 5.45 si elle est de configuration *trans*. Le spectre de RMN ^{13}C exhibe deux pics très voisins ou chevauchants vers δ(C) 130.0 pour la double liaison *cis* et à δ(C) 134.0 et 136.0 si elle est *trans.* Ce même spectre montre deux carbones caractéristiques autour de δ(C) 54.0 et 175.5 correspondant au carbone aliphatique lié à l'azote et au carbonyle de la fonction amide. On observe aussi le signal caractéristique de la succession de méthylènes entre δ (C) 29.0 et 33.0 ainsi qu'un signal à δ (C) 14.4 attribuable aux méthyles terminal.

I.8.4/ Nomenclature des céramides.

Les céramides sont des sphingoïdes *N*-acylés. Elles sont nommées en considérant la chaine amino alcool comme chaine principale et celle de l'acide gras comme substituant. Par exemple une ceramide contenant la (2*R*)-2-hydroxyoctadecanoïque comme acide gras et la (2*S*,3*S*,4*R*)-2-aminooctadecane-1,3,4-triol comme sphinganine sera nommée (2*S*,3*S*,4*R*)-2-[(2'*R*)-2'-hydroxyoctadecanoylamino]octadecane-1,3,4-triol ou encore (2*S*,3*S*,4*R*)-2*N*-[(2'*R*)-2'-hydroxyoctadecanoyl]octadecane-1,3,4-triol.[73,74]

I.9/ Cytotoxicité.[75]

La lésion cellulaire est la perturbation de la structure ou de la fonction cellulaire liée à une séquence d'événements apparaissant lorsque la cellule a perdu son pouvoir d'adaptation à un stimulus. Ce stress peut être réversible et si la perturbation persiste, la cellule atteint un point de non retour aboutissant ainsi à la lésion irréversible d'où la mort de la cellule.

La mort cellulaire est la conséquence d'un stress aigue induit par divers stimuli qui sont d'origines variées. Il existe schématiquement deux types de mort cellulaire.

La Nécrose qui est généralement entrainée par des facteurs extérieurs. Elle déclenche les réactions inflammatoires. Les éléments causant la nécrose peuvent être d'origine chimique: médicaments, produits chimiques. D'origine physique: radiation, brûlure, électrocution. La mort cellulaire peut être aussi induite par le manque d'oxygène, une attaque infectieuse, une réaction immunologique ou un déséquilibre nutritionnel et tous ces facteurs sont dits cytotoxiques.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée qui est un phénomène physiologique de la cellule. Elle ne déclenche pas de réaction inflammatoire car c'est une étape normale du cycle de vie cellulaire. Elle se manifeste par la formation de protubérances membranaires (Membrane Blebbing), la perte du volume cellulaire (Cell Shrinkage), la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, l'inversion du feuillet membranaire avec exposition des phosphatidyl-sérines (PS) (mais pas de perte de l'intégrité membranaire), la dégradation des protéines, la formation de corps apoptotiques et digestion par les cellules voisines ou par les macrophages.

Cette mort programmée de la cellule joue un double rôle dans l'organisme: sur la plan physiologique, elle assure l'homéostasie des épithéliums et le développement embryonnaire et sur le plan pathologique, elle élimine les cellules anormales (cancérigènes), infectées par des microorganismes. La mort programmée de la cellule se déroule en trois phases: la phase d'induction, de décision et d'exécution. La première phase est une conséquence des stimuli exogènes (chimiothérapie, radio ionisante etc…) ou endogène (fas/fas ligand, P53, granzyme/perforine)

Fas: ce sont des recepteurs qui induisent l'apoptose après leur liaison avec des fas ligands ou des anticorps antifas.

P53: gardien du génome, il induit l'apoptose lorsque les lésions de l'ADN sont trop importantes.

Granzyme/perforine: les lymphocytes T cytotoxiques induisent l'apoptose cellulaire par l'intermédiaire de ce système.

Les méthodes de détection du mécanisme de mort cellulaire sont l'essai Caspase-activité ou la détection du changement de potentiel de la membrane mitochondriale pour l'apoptose, la détection de l'inflammation et des dommages dans l'environnement tissulaire pour la nécrose.

I.10/ Potentiel antioxydant.

Les composés antioxydants sont des composés qui retardent le processus d'oxydation dans la cellule en inhibant la polymérisation en chaines initiées par des radicaux libres et autres réactions d'oxydation. Ces entités assurent la protection des cellules humaines et végétales contre les dégâts d'oxydation et les maladies chroniques telles que le cancer, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires.

Les dégâts dus à l'oxydation sont induits par l'accumulation dans les cellules, des acides gras saturés qui donnent facilement des radicaux libres. [76] L'oxygène bien qu'essentiel à la vie cellulaire est le principal responsable de l'oxydation. Car il génère dans le milieu cellulaire des radicaux oxygénés très réactifs de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et hydroxyl ($^{\cdot}OH$) qui peuvent être piégés par des lipides insaturés, des polyphénols, des systèmes polyinsaturés, des composés soufrés et des métaux de transition tels que le fer, le cuivre et le sélénium.[77]

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant: ORAC qui est la capacité d'absorption des radicaux d'oxygènes, DPPH qui signifie 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl qui est un piégeur de radicaux libres, le FRAP pouvoir antioxydant par réduction de fer.76

Les usages ethno-pharmacologiques des espèces de cette famille de plantes ainsi que les travaux chimiques et biologiques déjà faits, nous ont emmenés à étudier deux végétaux (l'un sauvage et l'autre cultivé) de l'espèce *Triumfetta cordifolia A Rich* (Tiliaceae) qui sont tous deux comestibles au Cameroun et communément appelés «Nkui». Le travail consistera à extraire, à séparer, à purifier, à isoler et à faire les tests biologiques des métabolites secondaires de ces deux entités végétales. L'objectif principal ici sera d'établir le lien entre l'activité biologique des extraits ainsi que les métabolites secondaires isolés et l'avantage à consommer ces plantes en tant que aliment.

CHAPITRE II
RESULTATS ET DISCUSSION

II.1/ Etude phytochimique de l'espèce sauvage de *Triumfetta cordifolia*

Les tiges et les feuilles de *Triumfetta cordifolia A Rich* ont été récoltées le 30 octobre 2004 au pied du Mont Elomdem à Mendong (quartier de Yaoundé, région du Centre-Cameroun).

Les tiges découpées, séchées et broyées ont donné 3.95 kg de poudre qui ont été extraits à chaud au méthanol. 80 grammes d'extrait organique obtenus après évaporation sous vide, ont été soumis à une extraction liquide-liquide entre l'acétate d'éthyle et de l'eau. Les deux phases concentrées sous pression réduite ont données 34 g d'extrait organique et 42.3 g d'extrait aqueux. L'extrait à l'acétate d'éthyle a été fractionné grâce à une chromatographie sur colonne sous pression réduite et par ordre de polarité croissante de cyclohexane et d'acétate d'éthyle, pour donner 5 fractions indexées de F1 à F6. 11 Composés indexés de **LP1** à **LP11** (schéma 4) ont été isolés par chromatographie sur colonne.

Après avoir séché et broyé les feuilles, 1.87 kg de poudre obtenue a été extraite deux fois par le mélange de solvants CH_2Cl_2-MeOH (1:1) pendant 48h/tour d'extraction. 93 grammes d'extrait organique obtenu était soumis à une chromatographie flash donnant 5 fractions indexées de F1' à F6'. Les 4 produits isolés (schéma 5) grâce à la chromatographie sur colonne ont été indexés de **LP12** à **LP15**.



Schéma 4: Protocole d'extraction et d'isolement des métabolites secondaires des tiges de l'espèce sauvage de *T. cordifolia* A Rich.

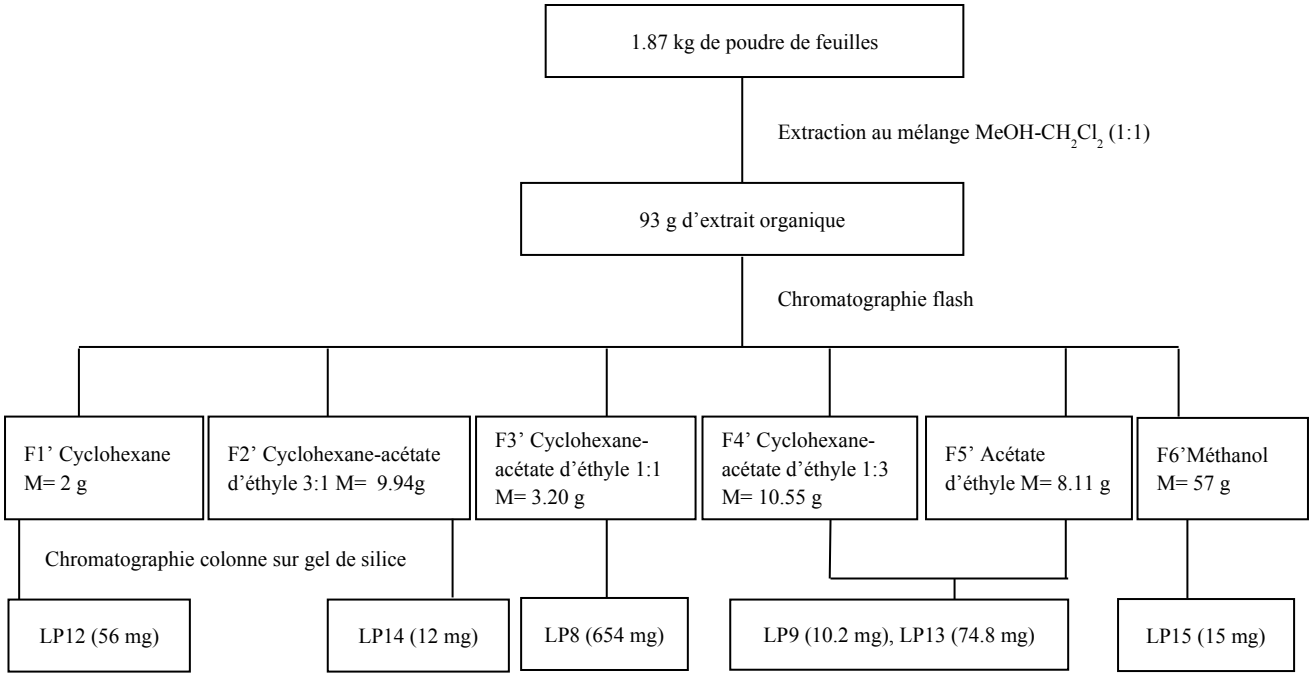
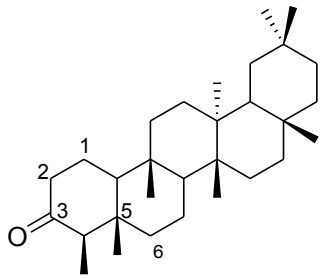


Schéma 5: Protocole d'extraction et d'isolement des métabolites secondaires des feuilles de l'espèce sauvage de *T. cordifolia* A Rich.

II.1.1/ Composés isolés des tiges de l'espèce sauvage de *T. cordifolia*.

II.1.1.1/ Friedeline (LP1).

LP1 a été isolé sous forme de poudre blanche du système cyclohexane-AcOEt (93:7). Les spectres de RMN ^{1}H (Fig. 4) et ^{13}C (Fig. 5) exhibent un ensemble de signaux caractéristiques de friedeline.[78] En effet, on observe 8 pics dont un doublet à δ(H)/δ(C) 0.88 (J = 5.7 Hz)/6.8 correspondant au méthyle 23 et 7 singulets correspondant aux méthyles angulaires entre 0.73 et 1.25 ppm. On observe également le pic de la fonction cétone en position 3 à δ(C) 213.2. Celle-ci déblinde ses positions alpha (C(2) et C(4)) qui apparaissent respectivement à δ(H-2)/δ(C) [2.37, 2.25 (m)/ 41.3] et δ(H-4)/δ(C) [2.30 (m)/58.2]. En plus de ces données de RMN, le composé **LP1** a été identifié à la friedeline par CCM comparative avec un échantillon authentique du laboratoire.



66

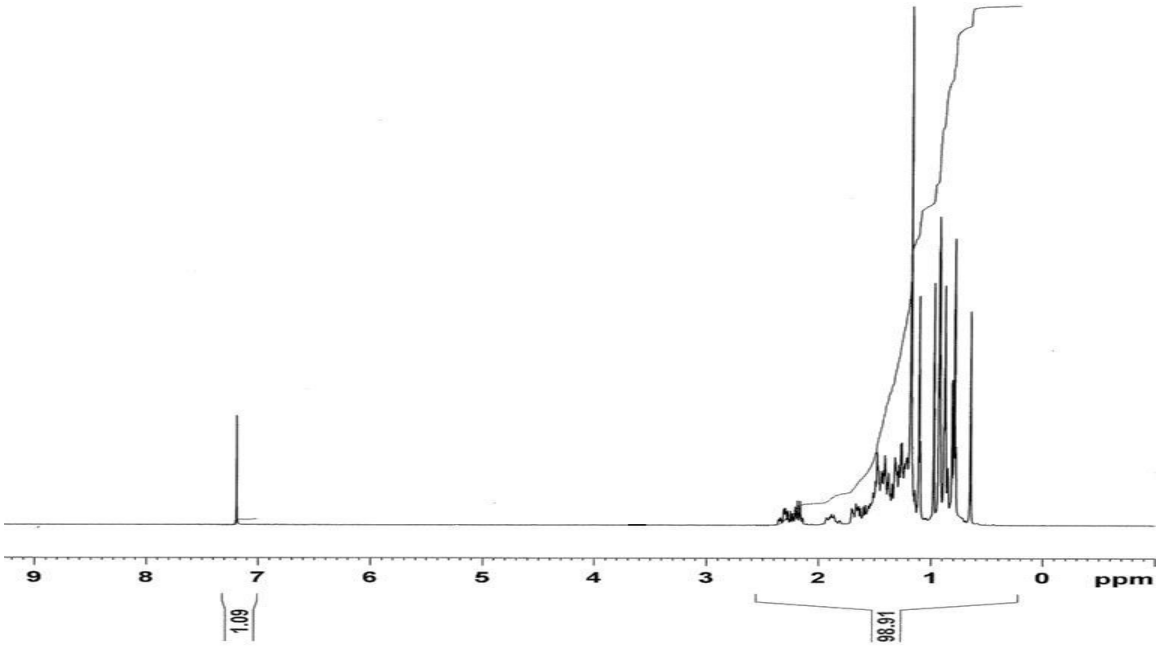


Figure 4: Spectre de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz) de **LP1**

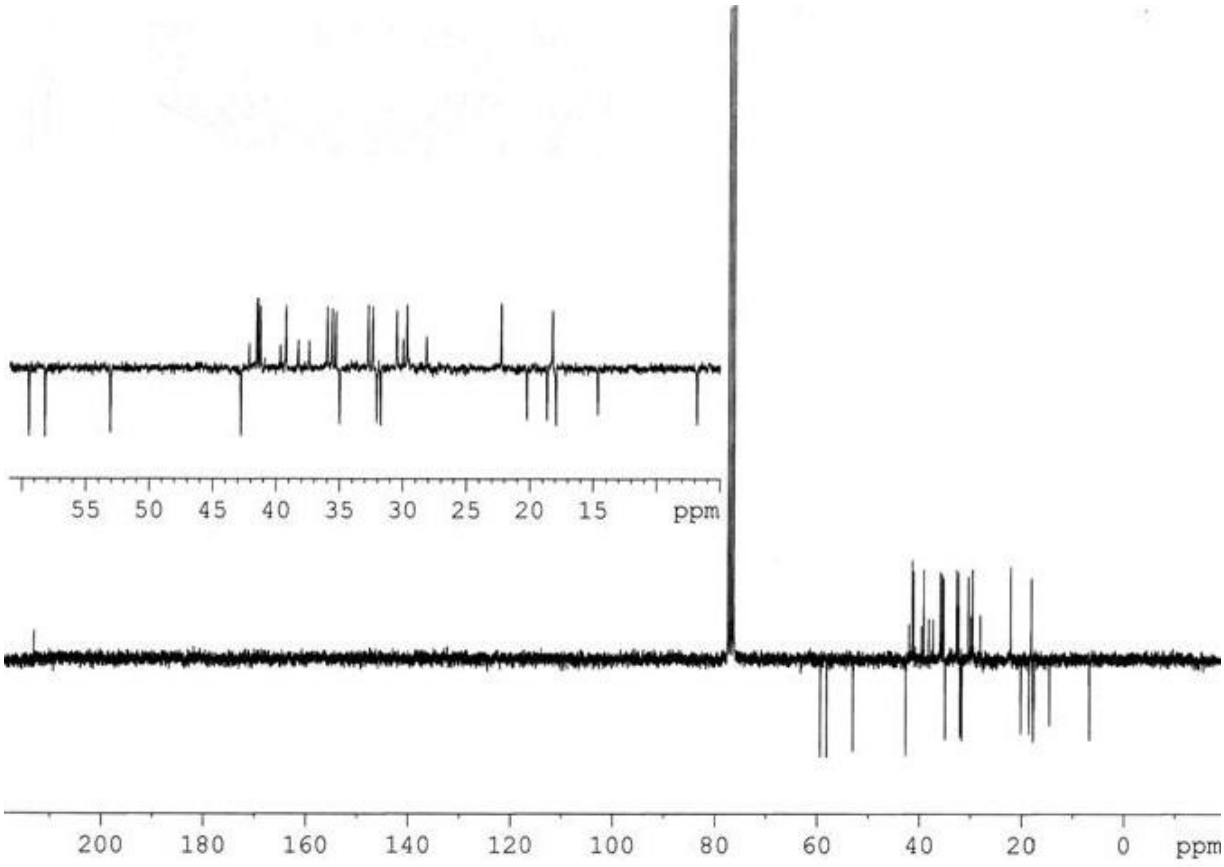
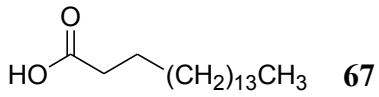


Figure 5: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP1**

II.1.1.2/ Acide heptadecanoïque (LP2).

LP2 est un solide amorphe recristallisé à l'acétone et isolé du système cyclohexane-AcOEt (23:2). Les spectres de RMN ^{1}H (Fig. 6) et APT (Fig. 7) montrent les pics caractéristiques d'acide gras.[79] En effet, on observe un ensemble de signaux à δ(H) 0.81 (3H, *s* large) correspondant au méthyle terminal, un large singulet de 26 protons à δ(H)/δ(C) 1.22/ (22.7; 24.7; 29.1-29.7) représentant la succession des méthylènes. Les deux méthylènes en position alpha et beta du carbonyle (179.0) apparaissent à δ(H)/δ(C) 2.30 (*t*, *J* = 5.8 Hz)/33.8 et 1.60 (*m*)/31.9 respectivement. L'ensemble des données a permis d'identifier **LP2** à l'acide heptadecanoïque.



67

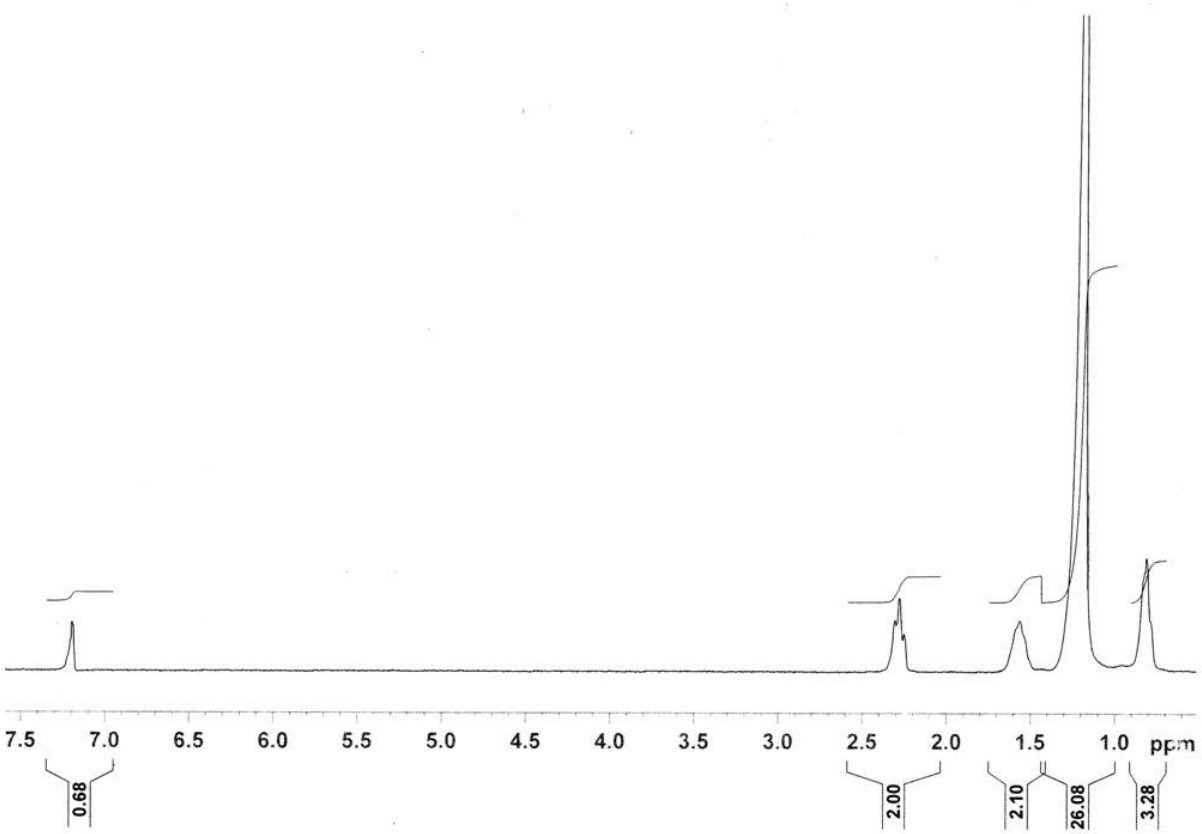


Figure 6: Spectre de ^{1}H (*CDCl$_3$*, 250 MHz) de **LP2**.

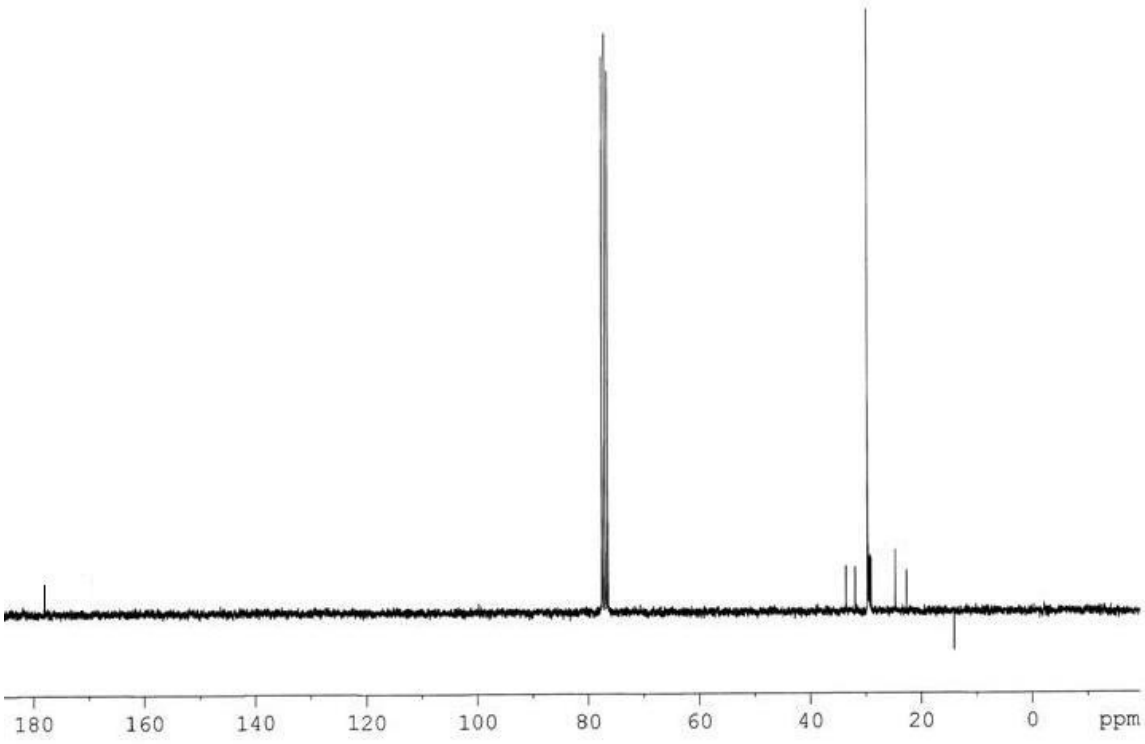
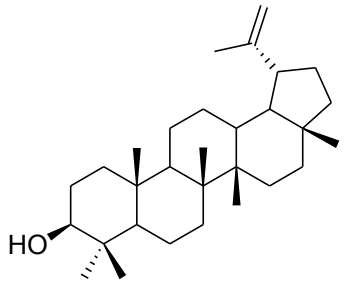


Figure 7: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP2**

II.1.1.3/ Lupeol (LP3).

Poudre blanche isolée du système de solvants cyclohexane-AcOEt (9:1), elle donne une coloration rouge violacée au test de Liebermann-Burchard montrant que notre molécule a un squelette triterpènique. On observe sur les spectres de RMN ^{1}H (Fig. 8) et ^{13}C (APT) (Fig. 9) des signaux à δ(H)/δ(C) 4.58 (1H, singulet large)/109.3, 4.47 (1H, singulet large)/109.3, 3.21 (1H, m)/79.0 correspondant aux déplacements chimiques des protons et carbones du méthylène terminal 29 et de l'oxymethine en position 3 des composés de la classe de lup-20(29)-en-3-ol.[78] De plus sur le spectre APT (Fig. 9) on observe un signal à 151.0 correspondant au carbone 20 du lupeol. Sept singulets apparaissent sur le spectre ^{1}H correspondant aux méthyles angulaires. Toutes ces données ont permis d'identifier ce composé au lupéol.



68

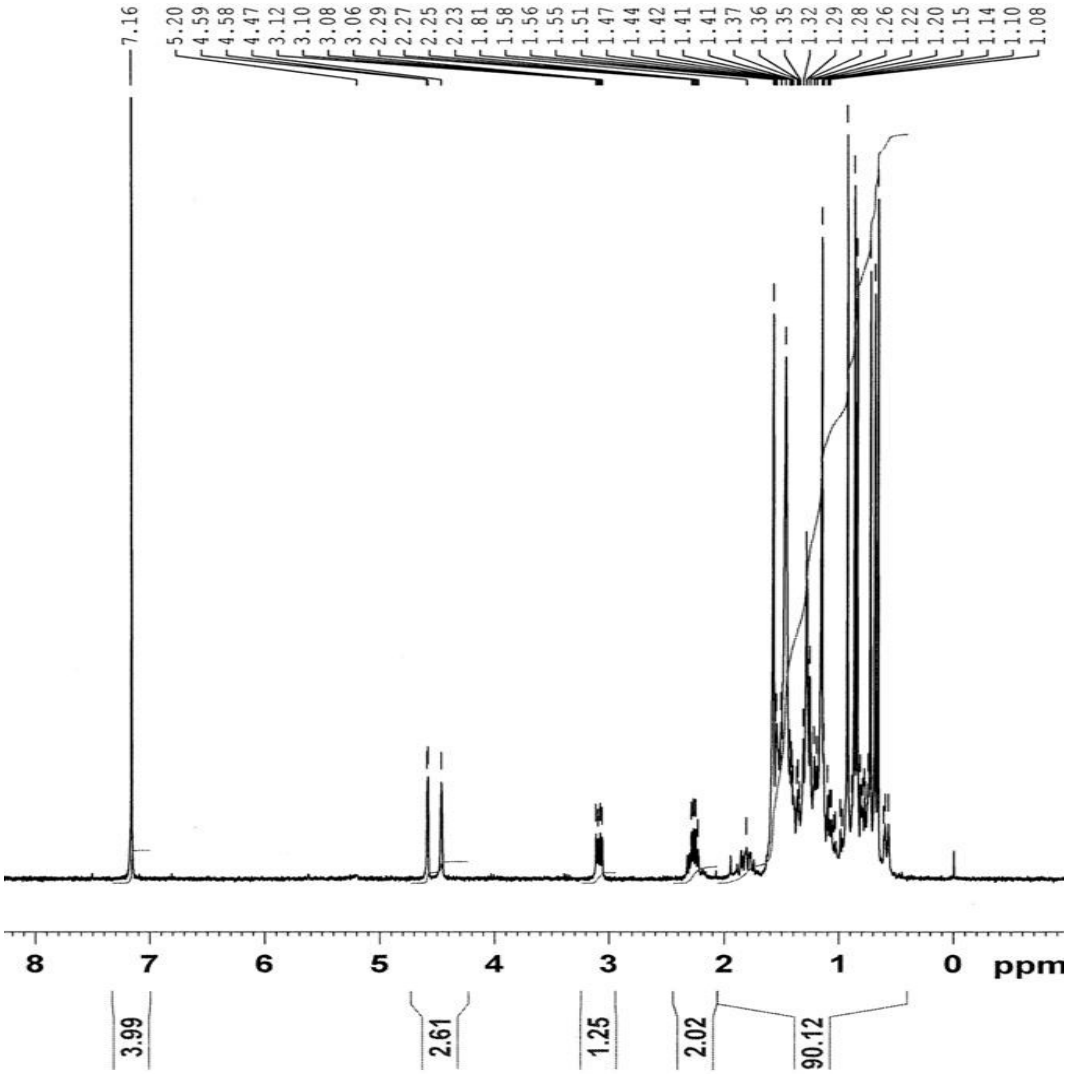


Figure 8: Spectre ^{1}H (*$CDCl_3$*, 300 MHz) de **LP3**

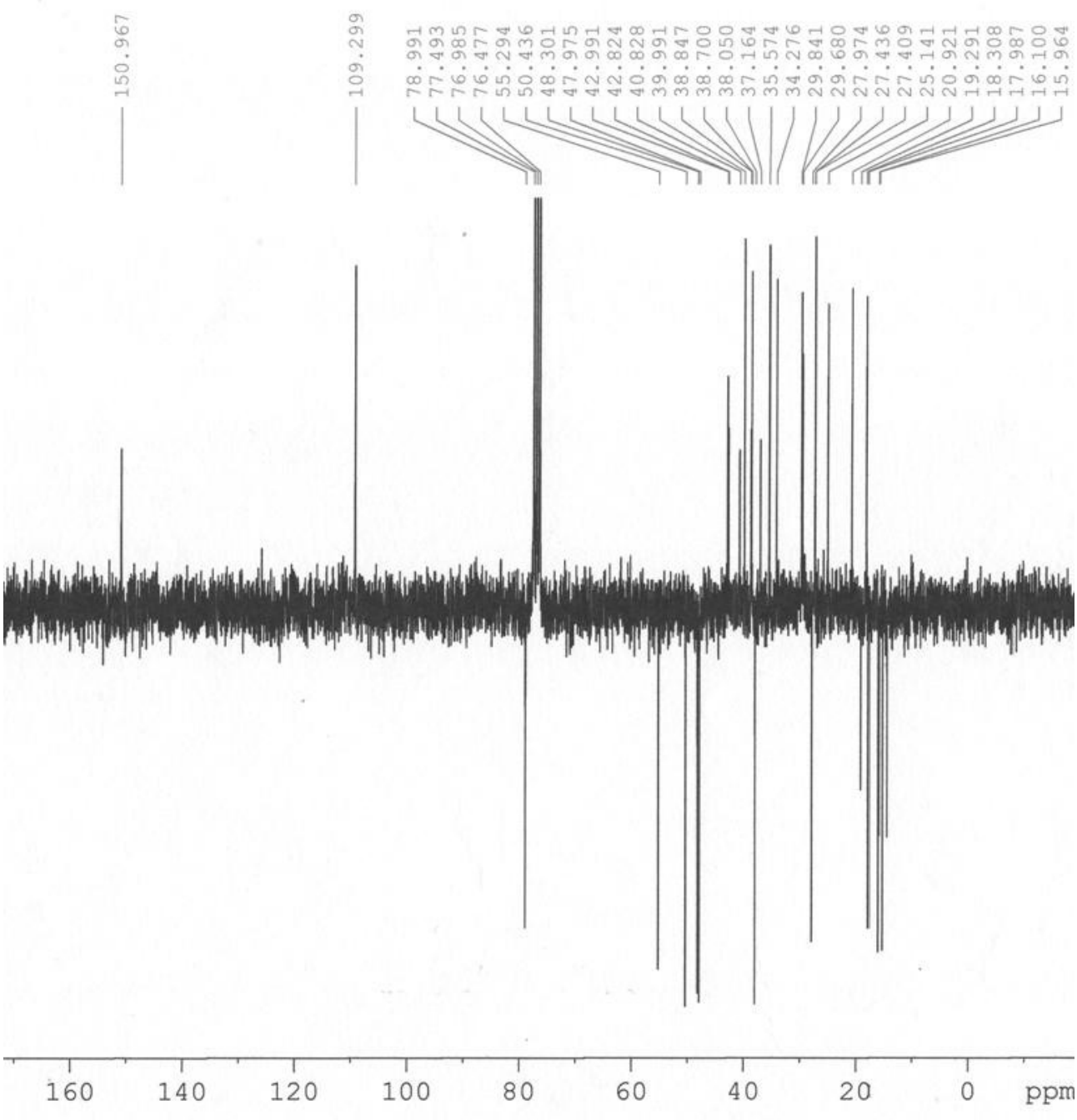
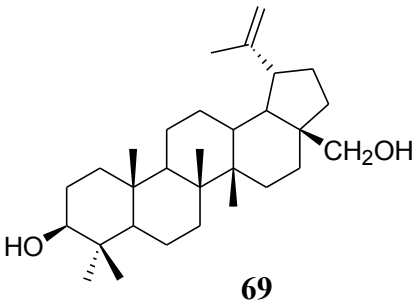


Figure 9: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*$CDCl_3$*, 75 MHz) de **LP3**

II.1.1.4/ Bétuline (LP4).

Composé se présentant comme une poudre blanche, il a été isolé du mélange solvants cyclohexane-AcOEt (17:3). Il répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes. Ses spectres de RMN ^{1}H (Fig. 10) et APT (Fig. 11) sont presque superposables à ceux de **LP3** hors mis la disparition d'un singulet correspondant au méthyle angulaire et l'apparition de deux protons diastéréotopiques d'un oxyméthylène à δ(H)/δ(C) 3.30 (1H, *dd*, *J* = 5.4, 10.8 Hz)/58.9, 3.74 (1H, d, *J* = 5.4, 10.8 Hz)/58.9. De ce qui précède, **LP4** a été identifié comme étant la bétuline ou 3β,28-dihydroxylup-20(29)-ene.



69

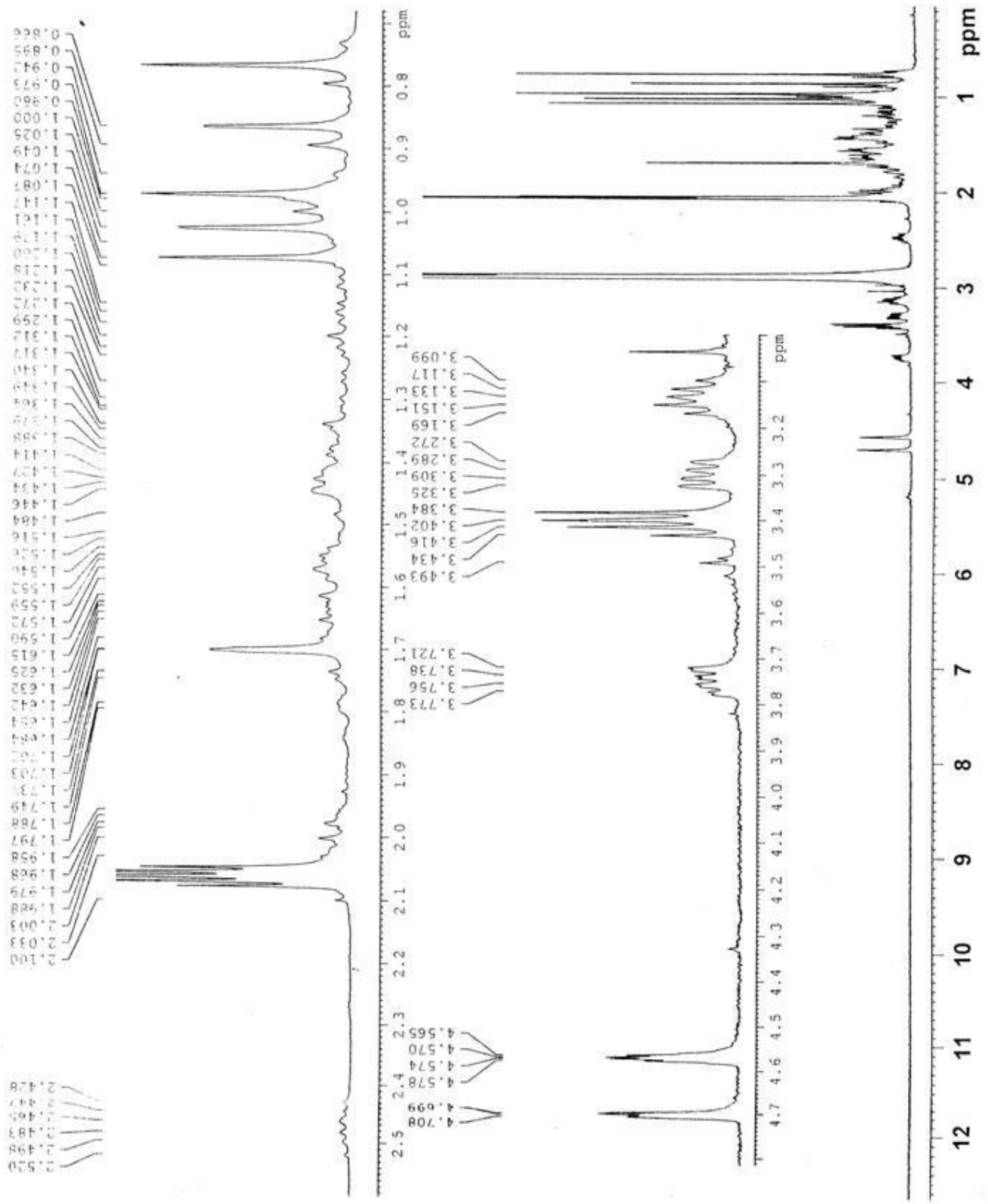


Figure 10: Spectre de RMN ^{1}H (*Acétone-d_6*, 300 MHz) de **LP4**

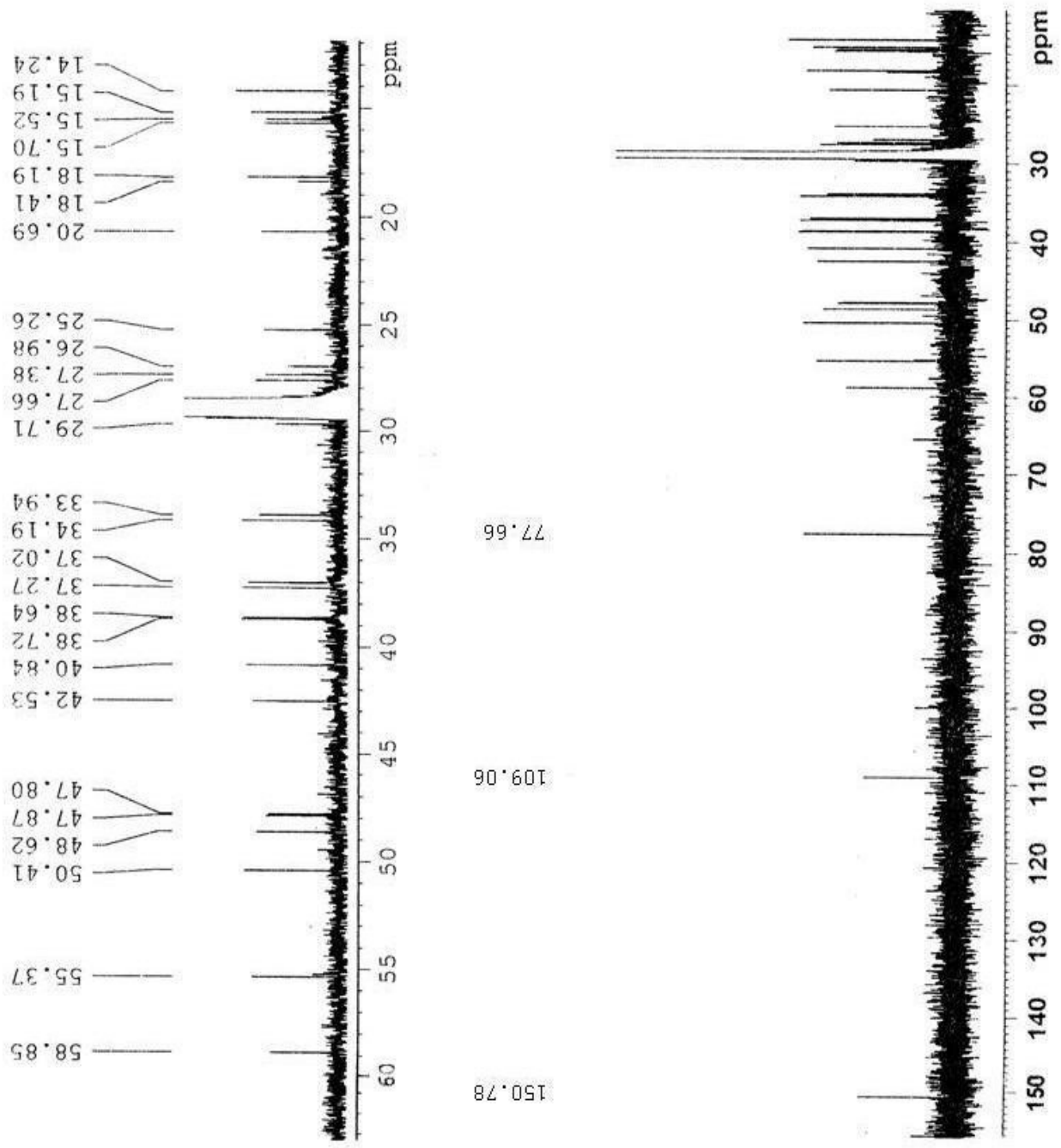
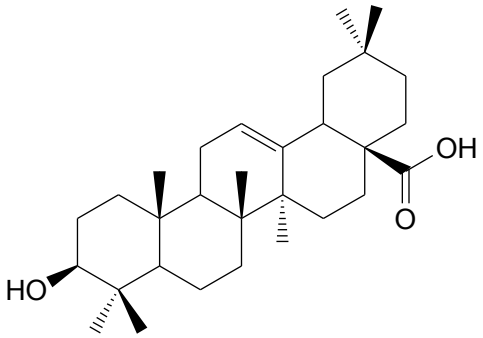


Figure 11: Spectre de ^{13}C (*Acétone-d_6*, 75 MHz) de **LP4**

II.1.1.5/ Acide oléanolique (LP5).

Il a été isolé sous forme de poudre blanche du mélange de solvants Cyclohexane-AcOEt (7:1). **LP5** répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes. On observe sur son spectre de RMN ^{1}H (Fig. 13) un ensemble de signaux à δ (H) 5.10 (1H, *t*, *J* = 3.0 Hz), 3.03 (1H, *dd*, *J* = 9.0, 3.0 Hz) et 2.81 (1H, *dd*, *J* = 9.1, 3.0 Hz) attribuables respectivement au proton Δ^{12} des triterpènes pentacycliques, celui de l'oxyméthine en position C(3) et le méthine en position C(18).78 De plus, on observe 7 singulets attribuables aux méthyles angulaires des triterpènes pentacycliques de type olean-12-ene.78 Le squelette de base de ce type de composé renferme 8 méthyles angulaires mais l'observation de 7 indique que l'un d'eux a été oxydé. Cette information est confirmée par la présence sur le spectre APT (Fig. 12) d'un carbonyle des acides à δ(C) 182.7 pouvant être celui en position C(28).78 Nous observons également sur ce spectre APT les signaux à δ(C) 79.0, 122.6 et 143.6 qui sont ceux des carbones C(3), C(12) et C(13) respectivement.78 L'ensemble de ces données comparées à celles de la littérature, ont conduit à l'identification de **LP5** comme étant l'acide oléanolique.



70

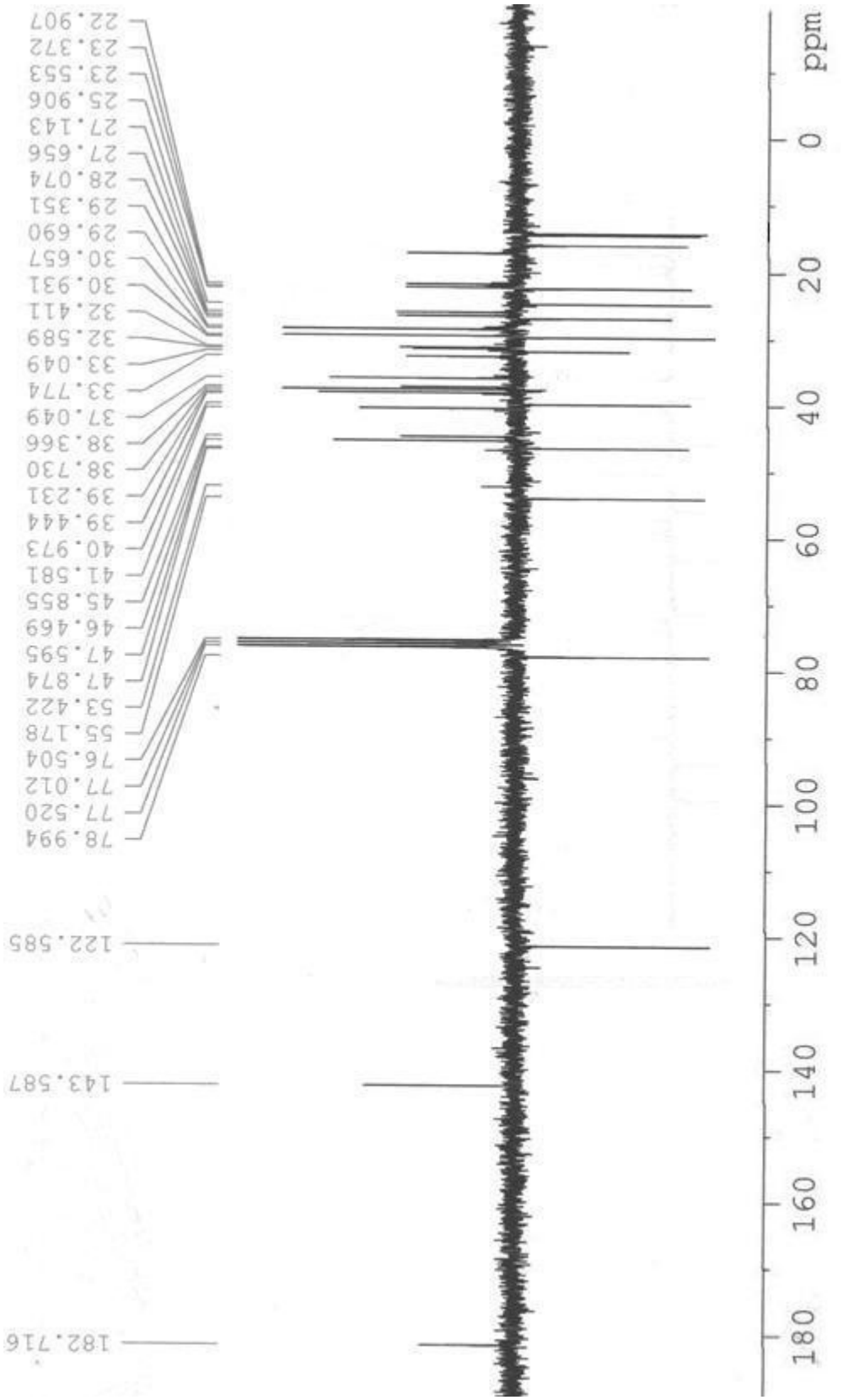


Figure 12: Spectre de RMN ^{13}C (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP5**

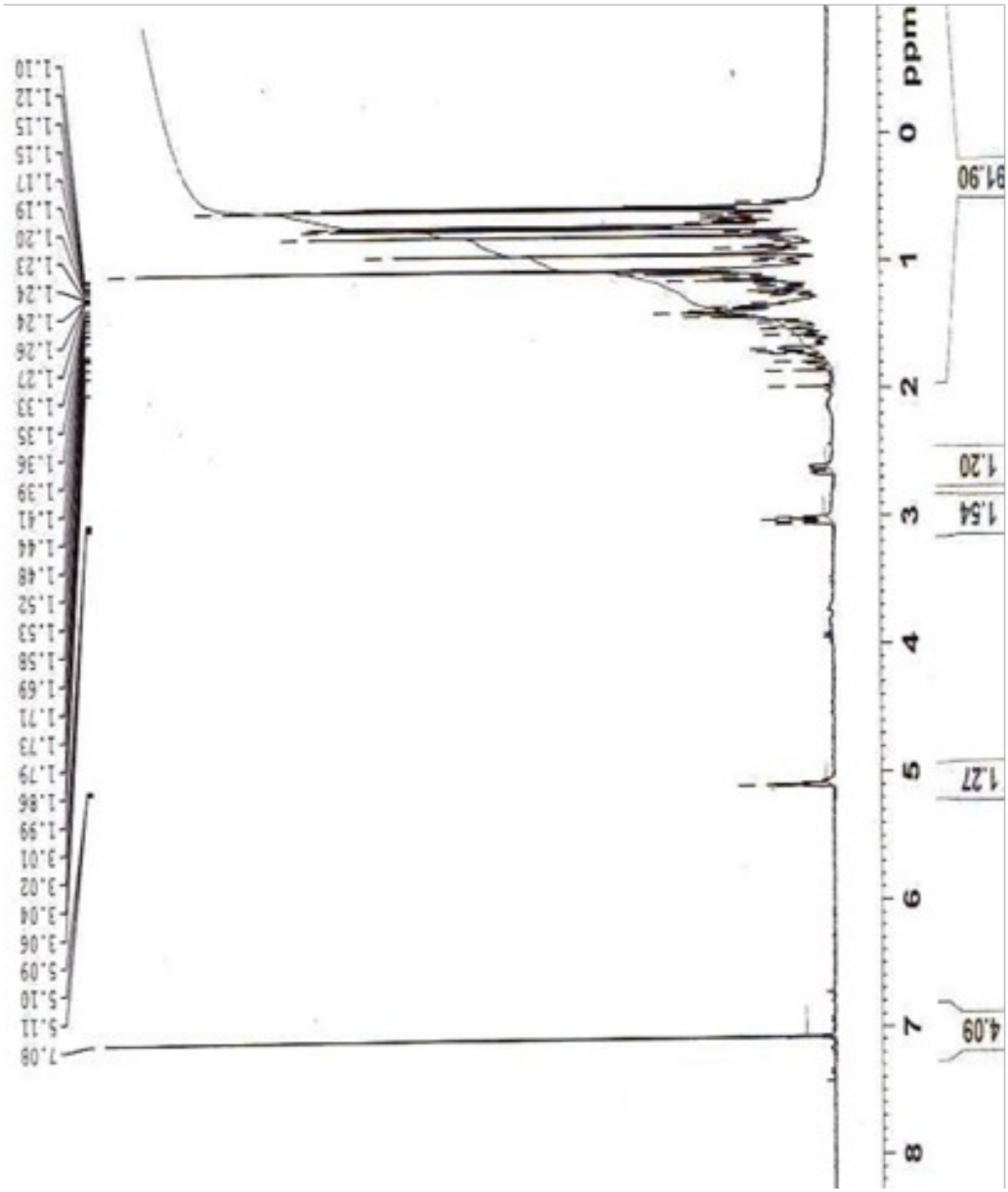
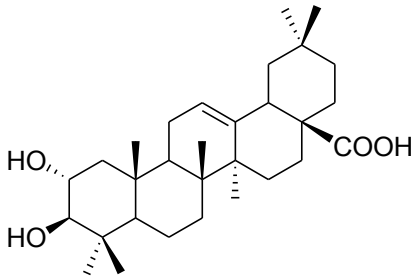


Figure 13: Spectre ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de **LP5**

II.1.1.6/ Acide maslinique (LP6).

LP6 se présente sous forme de poudre blanche isolée des fractions éluées au mélange de solvants cyclohexane-AcOEt (3:1). Il donne une coloration rouge violacée au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes. Les spectres de RMN ^{1}H (Fig. 14) et d'APT (Fig. 15) montrent des signaux caractéristiques d'un composé de la classe des Δ^{12} oleanenes78. En effet, on observe un signal à δ(H)/δ(C) 5.29 (1H, *s*, H-12)/121.3 et un ensemble de 7 pics correspondant aux méthyles angulaires C(23), C(24), C(25), C(26), C(27), C(29), C(30).78 Nous avons aussi un doublet à δ(H)/δ(C) 2.85 (1H, J = 9.3 Hz)/82.9 et un multiplet d'un proton à δ(H)/δ(C) 3.52/68.1 attribuables respectivement aux signaux des oxymethines C(3) et C(2) des olean-12-ènes avec les configurations respectives β, α des hydroxyles; deux carbones quaternaires à δ(C) 143.9 et 178.7 sont également observés attribuables C(13) et C(28).78 Le proton à δ(H) 2.00 en position β du carbonyle et autre informations ont permis d'identifier **LP6** comme étant l'acide maslinique ou acide 2*α*,3*β*-dihydroxyolean-12-en-28-oïque.



9

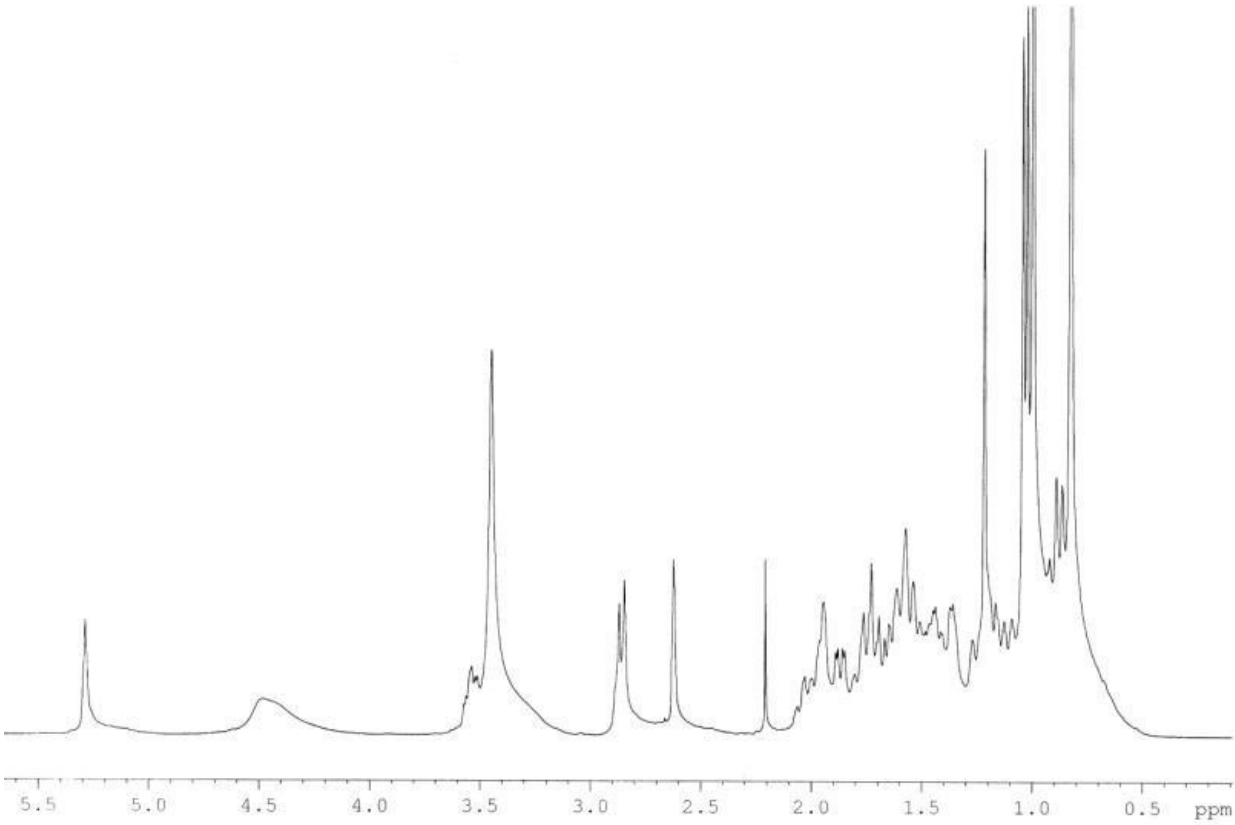


Figure 14: Spectre de RMN ^{1}H (*DMSO-d_6*, 250 MHz) de **LP6**

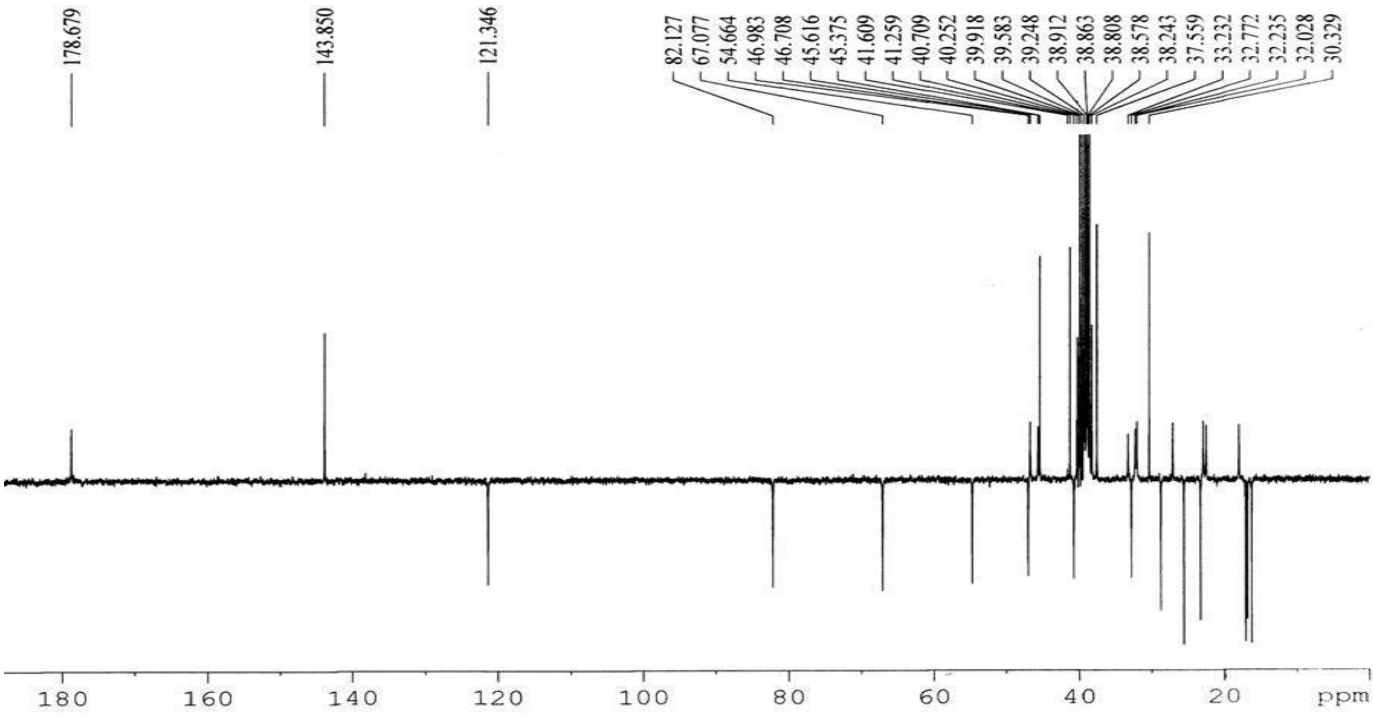
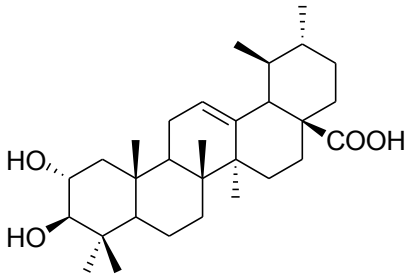


Figure 15: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz) de **LP6**

II.1.1.7/ Acide corosolique (LP7).

LP7 répond positivement au test de Liebermann-Burchard et se présente sous forme d'un solide blanc isolé des fractions issues de l'élution au mélange de solvant cyclohexane-AcOEt (3:1). Ses spectres de RMN ^{1}H (Fig.16) et APT (Fig. 17) sont presque superposables à ceux de **LP6** à la seule différence que les signaux de carbones oléfiniques apparaissent à δ(C) 124.4 et 138.2 correspondant aux carbones 12 et 13 des composés de la classe des Δ^{12} ursènes.78 On observe également le même système d'oxymethines avec les groupements hydroxyles en C(2α) et C(3β).78 Le spectre d'APT présente également un carbonyle à 178.3, ce qui permet de conclure que ce composé est un isomère de position de **LP6** et par conséquent identifié comme étant l'acide corosolique ou l'acide 2α-hydroxyursolique.



10

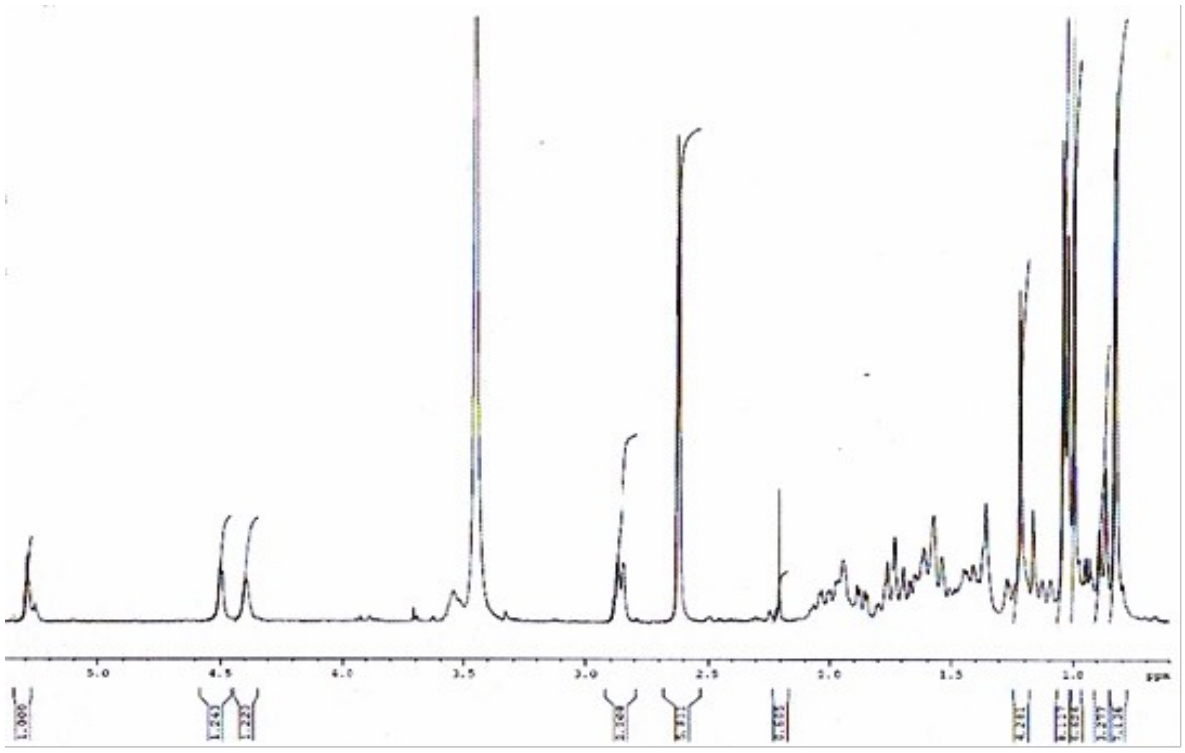


Figure 16: Spectre de RMN ^{1}H (*DMSO-d_6*, 250 MHz) de **LP7**

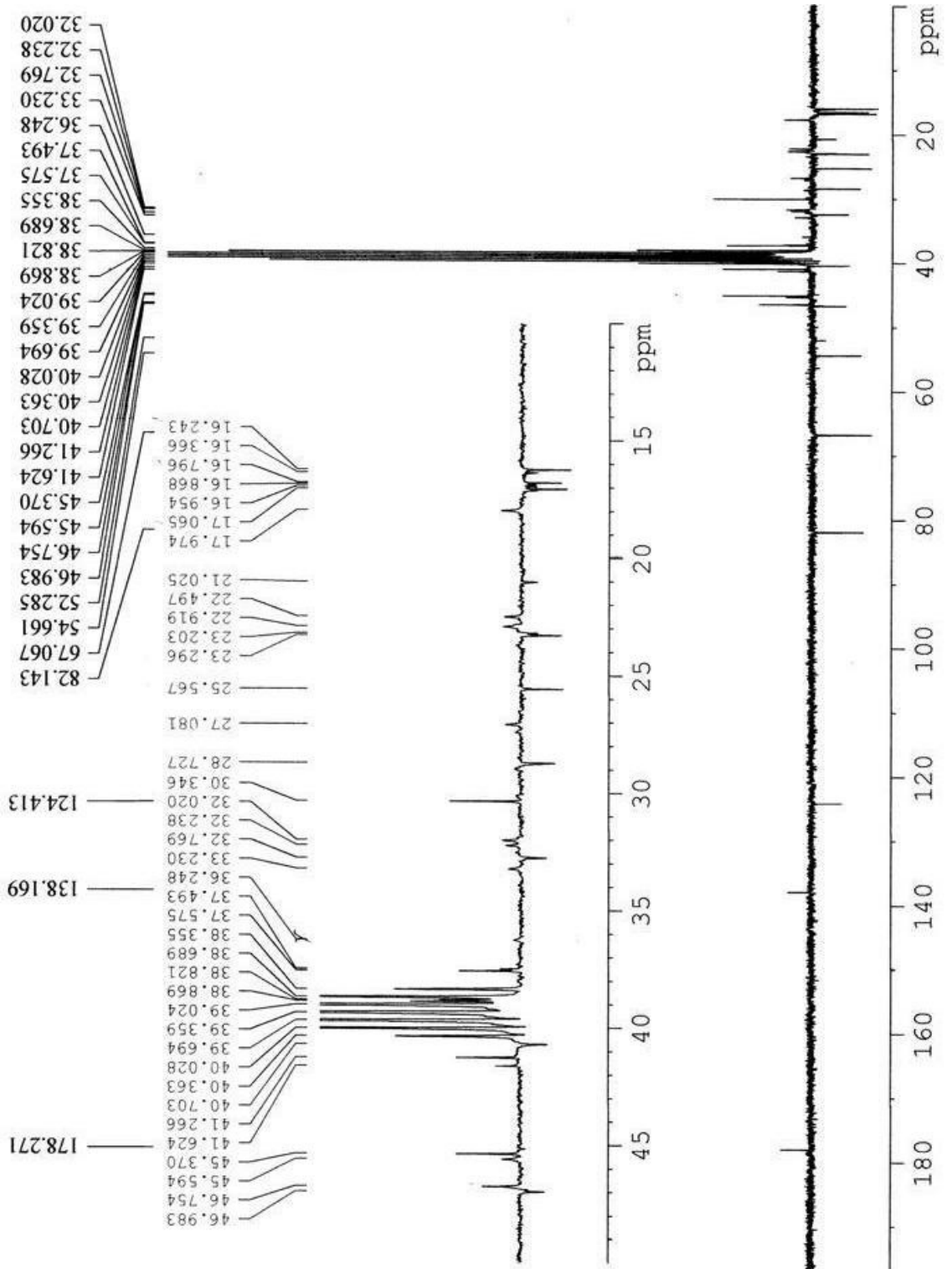
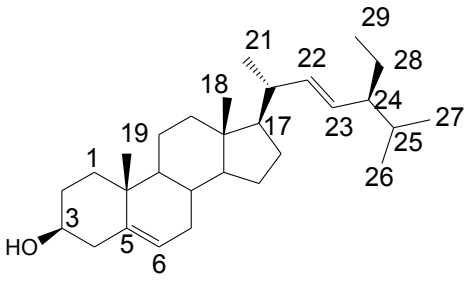


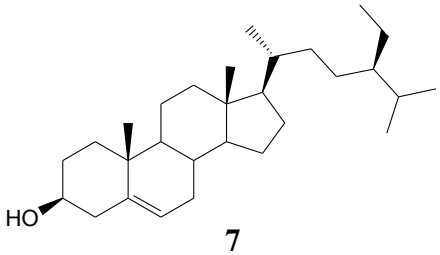
Figure 17: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz) de **LP7**

II.1.1.8/ Mélange de stérols (*β*-sitostérol, stigmastérol) (LP8).

LP8 se présente sous forme de poudre blanche isolée de la fraction à 50% du cyclohexane-AcOEt de la chromatographie flash, elle donne une coloration bleue au test de Liebermann-Burchard caractéristique des stéroïdes. Le spectre de RMN ^{1}H (Fig. 18) montre trois pics à δ(H) 5.35, 5.12, 5.01 attribuables respectivement aux signaux des protons H-C(5), H-C(22') et H-C(23') du mélange de stérols (stigmastérol et *β*-sitostérol)[80]. De plus on observe sur le spectre APT (Fig. 19) des signaux de 4 carbones oléfiniques à δ(C) 121.7, 140.7, 129.2 et 138.3 correspondant respectivement aux signaux, des carbones oléfiniques C(6) et C(5) des deux stéroïdes ainsi qu'à ceux présents dans la chaine latérale en position C(22) et C(23) du stigmastérol.[80] Les autres valeurs de signaux comparées à celles trouvées dans la littérature ont conduit aux structures ci-dessous qui sont celle du stigmastérol et du *β*-sitostérol



6



7

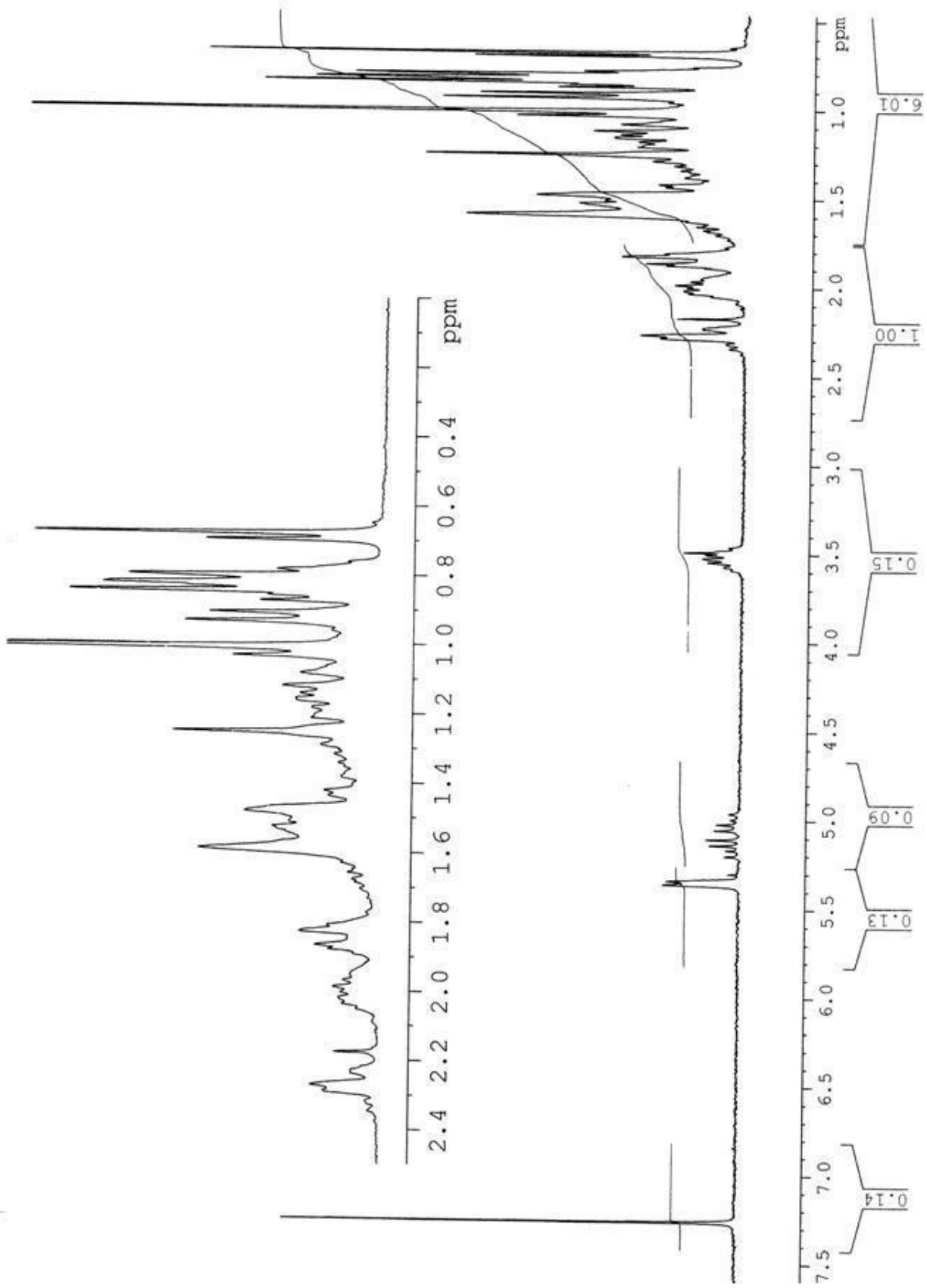


Figure 18: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de **LP8**

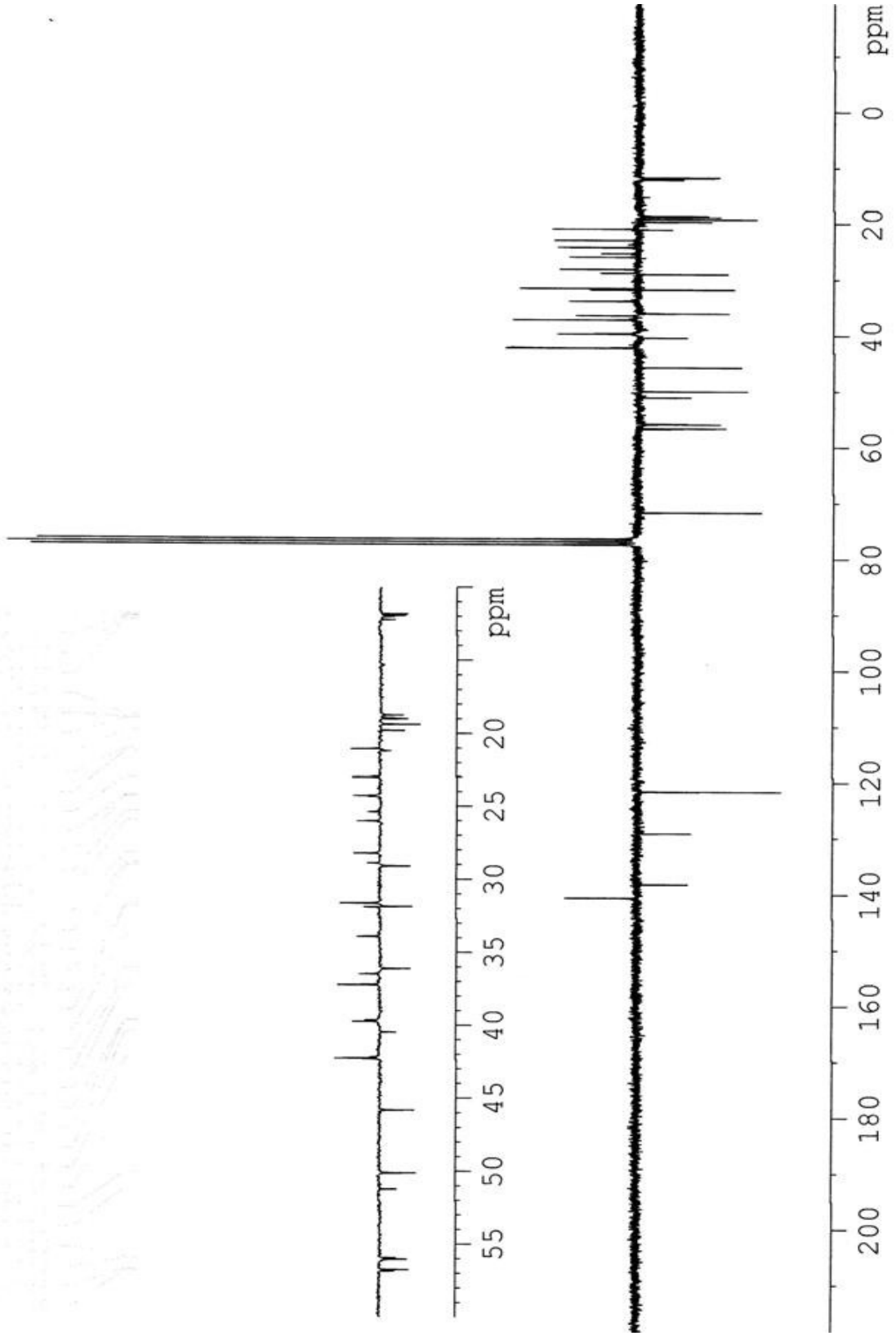
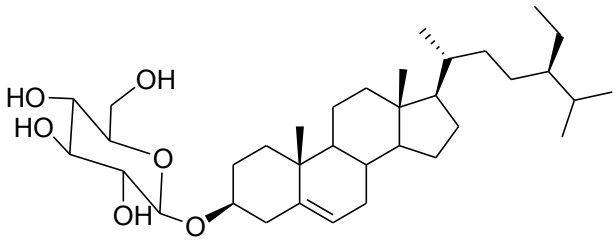


Figure 19: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de **LP8**

II.1.1.9/ 3-*O*-D-glucopyranoside de *β*-sitostérol (LP9). [81]

Ce composé a été isolé sous la forme d'une poudre blanche du système de solvant CH_2Cl_2-MeOH (19:1). Il donne une coloration bleue vert au test de Liebermann-Burchard et une couronne violette au test de Molish caractéristiques des glycosides stéroïdiques. Son spectre APT (Fig. 21) est presque superposable à celui du mélange de stérols ci-dessus. On observe les similitudes au niveau des signaux caractéristiques suivants: la double liaison C(5)=C(6) à *δ*(C) 140.9 et 121.7, l'oxyméthine C(3) à *δ*(C) 77.3, les C(9) 50.0, C(14) 56.6 et C(17) 55.9. La différence est au niveau de la présence des signaux confirmant que le composé est un oside; car on observe la carbone anomérique à *δ*(C) 101.2, l'oxyméthylène C(6') à *δ*(C) 61.5 et les oxymethines C(4'), C(2'), C(5'), C(3') sortant à *δ*(C) 70.5, 73.9, 77.2, 77.2 respectivement. Et toutes ces valeurs nous permettent de suggérer que ce composé est un glucoside stéroïdique. Ces données comparées à celles de la littérature nous permettent d'attribuer à ce composé la structure du 3-*O*-D-glucopyranoside de *β*-sitostérol.



8

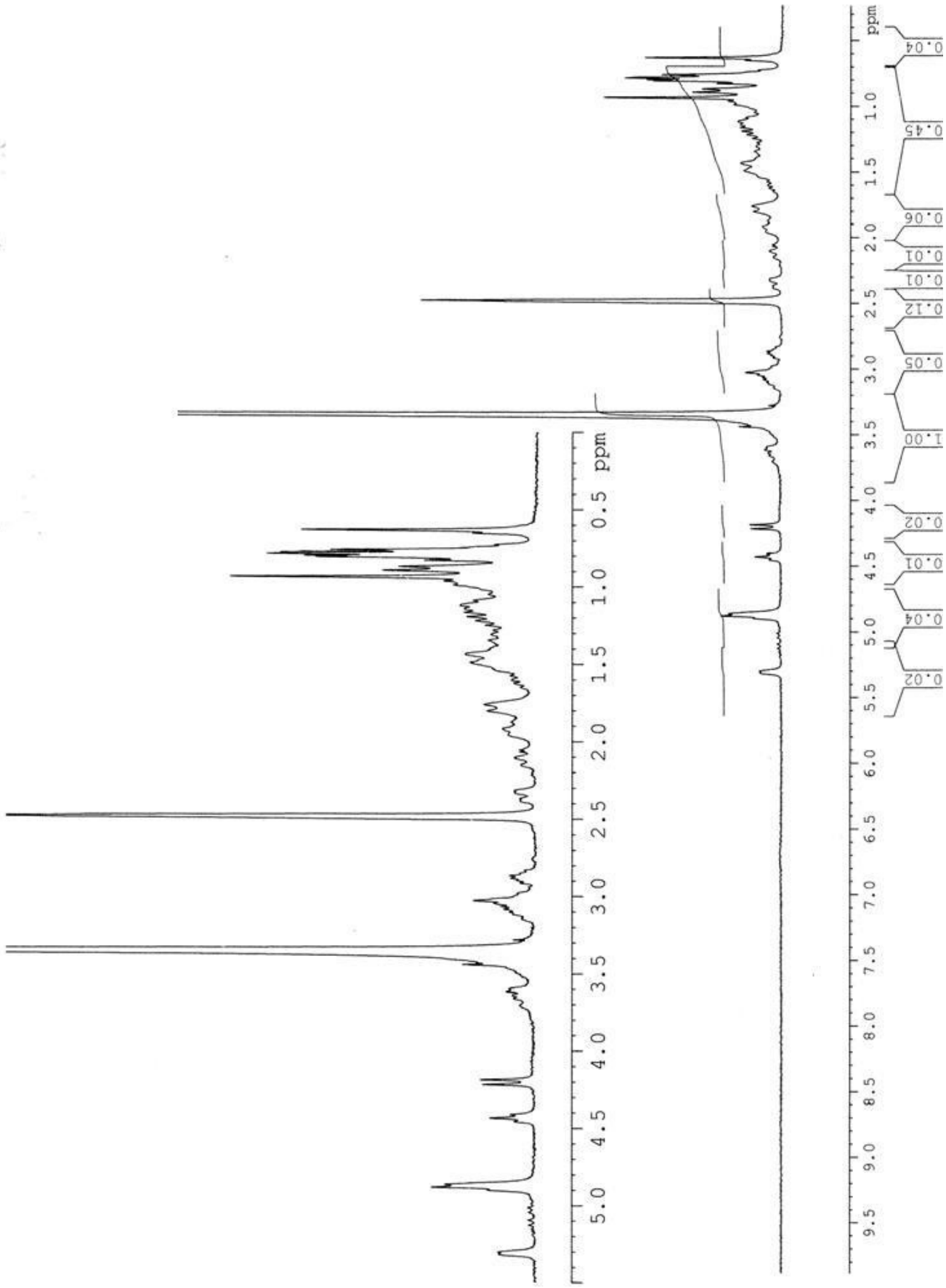


Figure 20: Spectre de RMN ^{1}H (*DMSO-d_6*, 250 MHz) de **LP9**

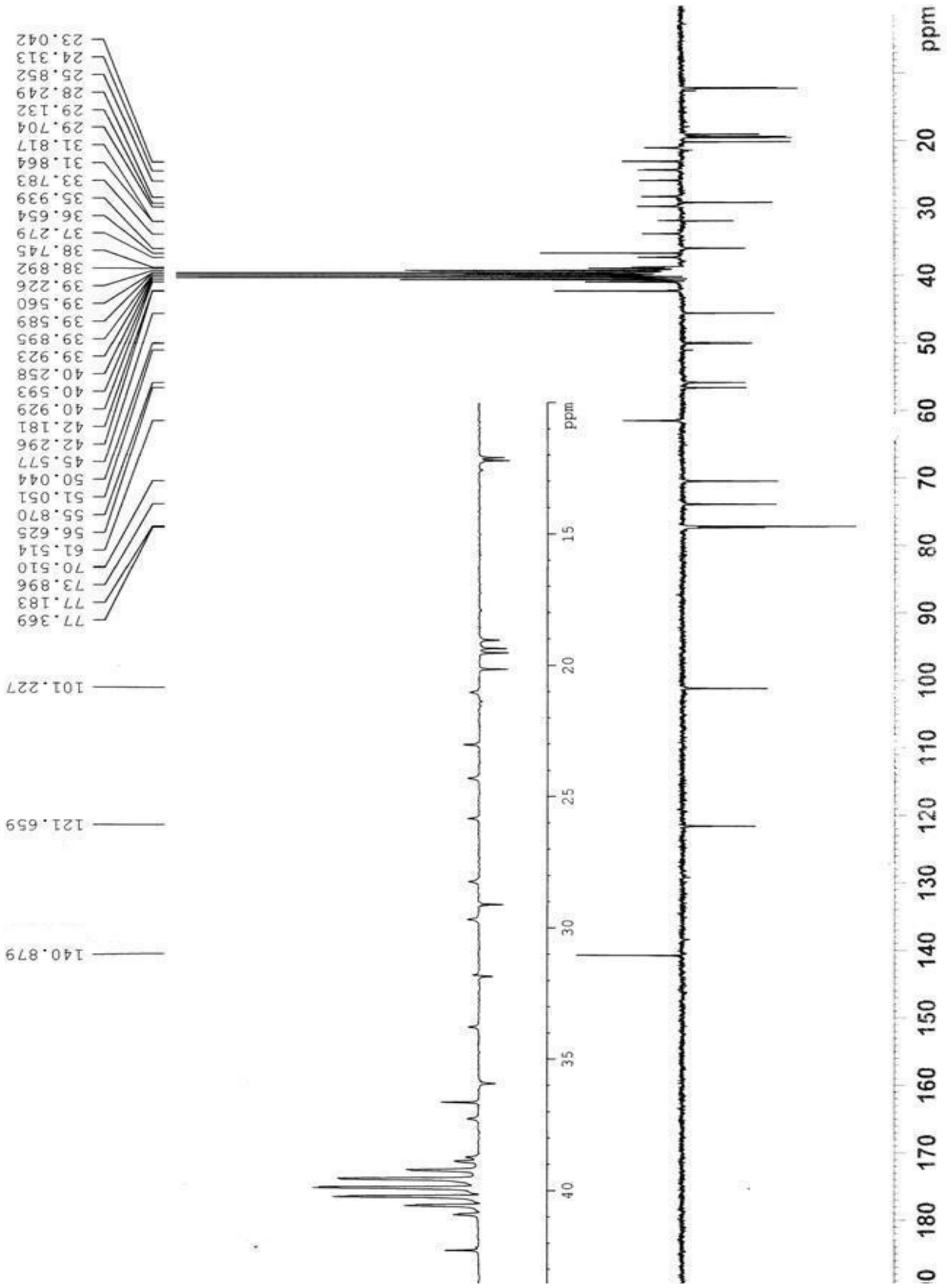


Figure 21: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz) de **LP9**

II.1.1.10/ Triumfettamide (LP10).

Ce composé a été obtenu sous forme d'une poudre blanche du mélange de solvants CH_2Cl_2-MeOH (19:1). Son spectre de masse MALDI-FTICR (Fig. 22) à haute résolution montre l'ion *pseudo*moléculaire à *m/z* 718.6315 $[M+Na]^+$ (masse théorique calculée: 718.6320) en mode positif. Cette masse correspond à la formule $C_{43}H_{85}NO_5$ et à deux degrés d'insaturation.

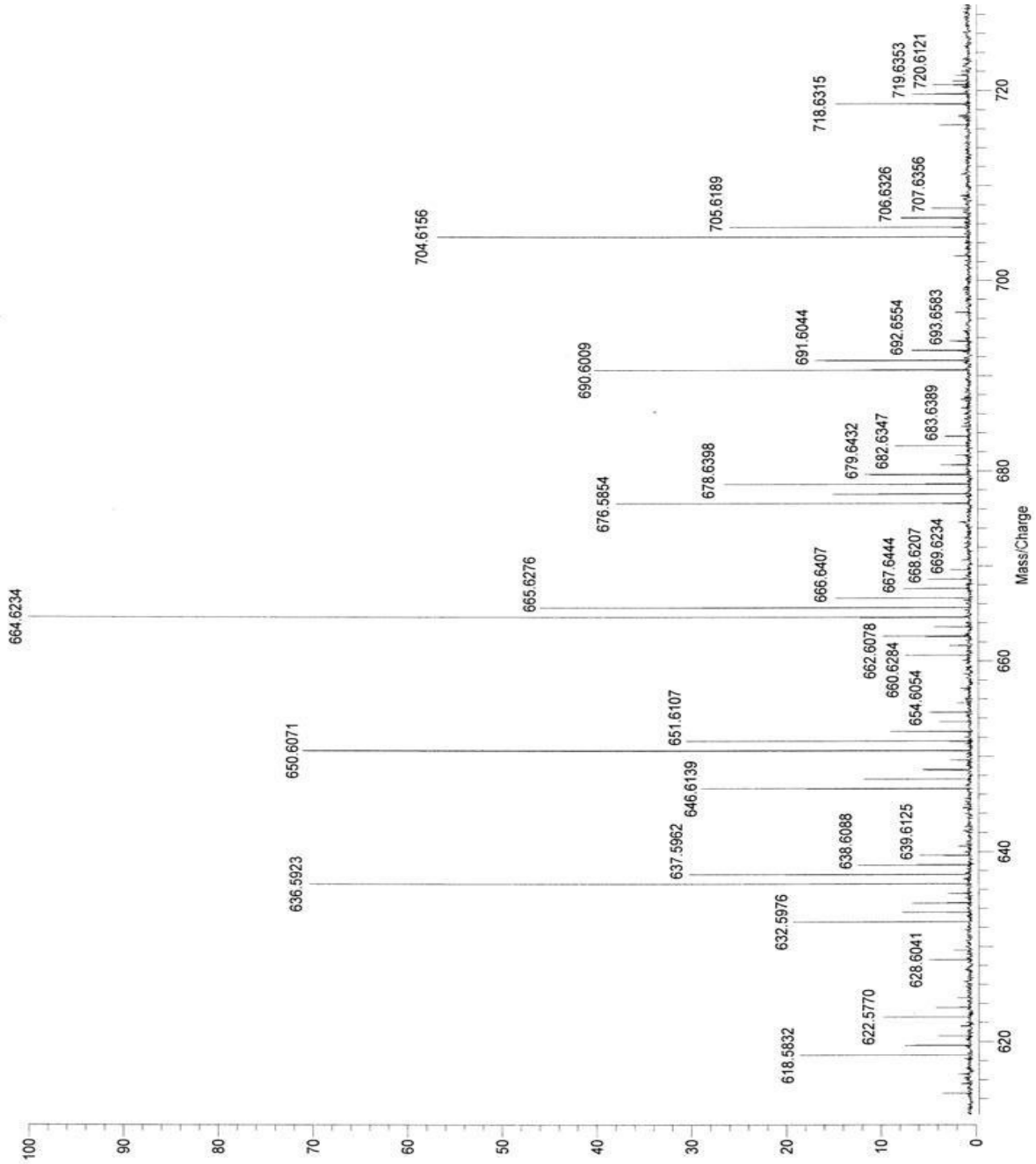


Figure 22: Spectre HRMALDI-FTIRCMS de **LP10**

Le spectre Infrarouge à transformée de Fourier (Fig. 23) montre la bande d'absorption des hydroxyles libres et des N-H à 3336 et à 3210 cm^{-1}; celle des carbonyles des amides à 1622 cm^{-1}.[82]

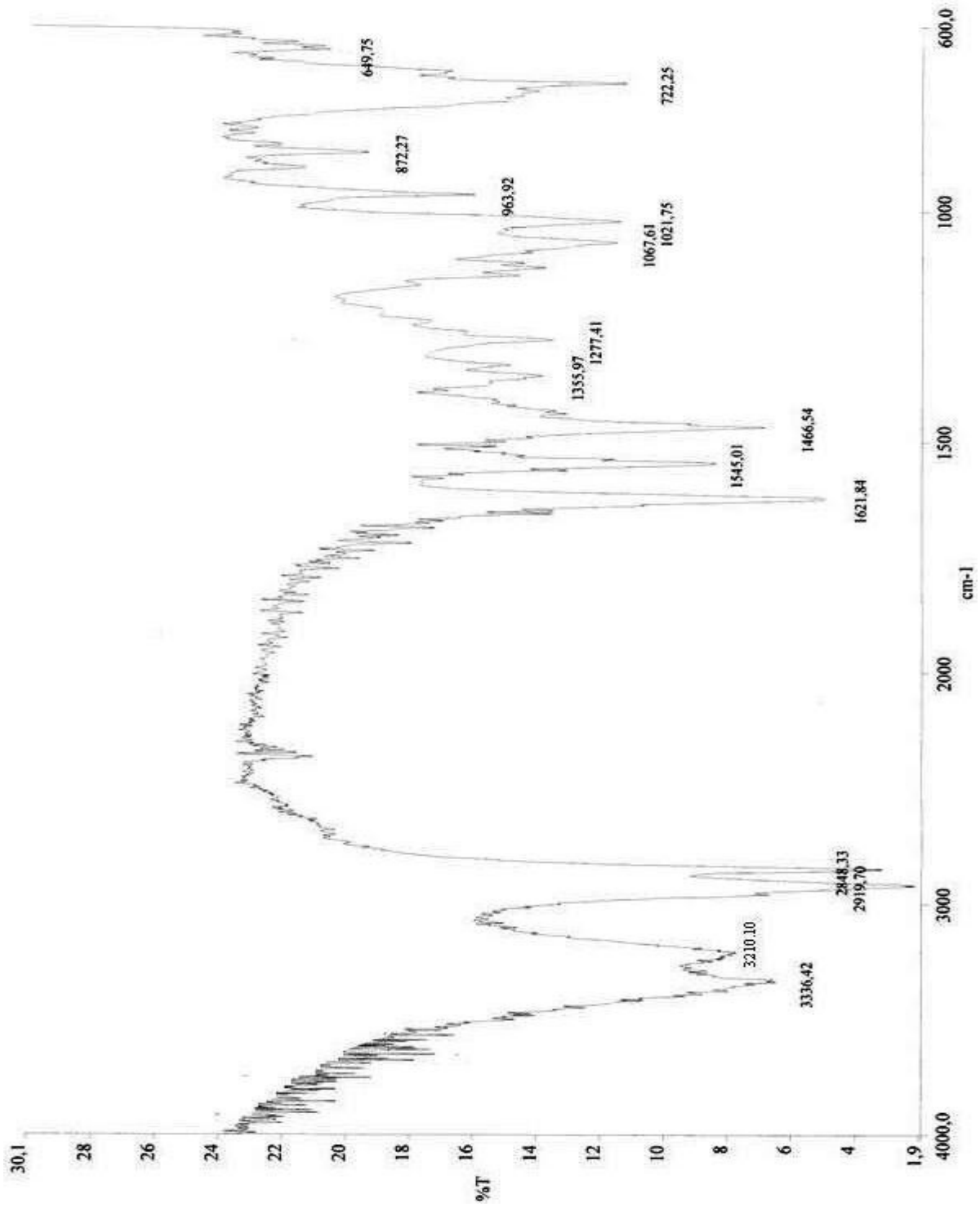


Figure 23: Spectre Infrarouge sur disque de KBr de **LP10**

Le spectre de RMN ^{1}H (Fig. 24) montre un signal d'un proton de N**H** à δ(H) 8.29 (*d*, *J* = 8.3 Hz) échangeable à l'eau lourde, un large singulet à δ(H) 1.00 (protons méthyléniques), un triplet de six protons à δ(H) 0.57 (*J* = 7.0 Hz) correspondant à deux méthyles terminaux et deux protons géminés à un hétéroatome à δ(H) 4.15 (*dd*, *J* = 10.3, 5.3 Hz) et 4.05 (*dd*, *J* = 10.3, 5.3 Hz); l'ensemble de ces informations nous permet de suggérer la structure d'un sphingolipide. De plus, nous observons deux doublets de triplet de deux protons oléfiniques à δ(H) 5.20 et 5.25 (*J* = 8.0, 4.0 Hz) suggérant que cette molécule porte une double liaison.

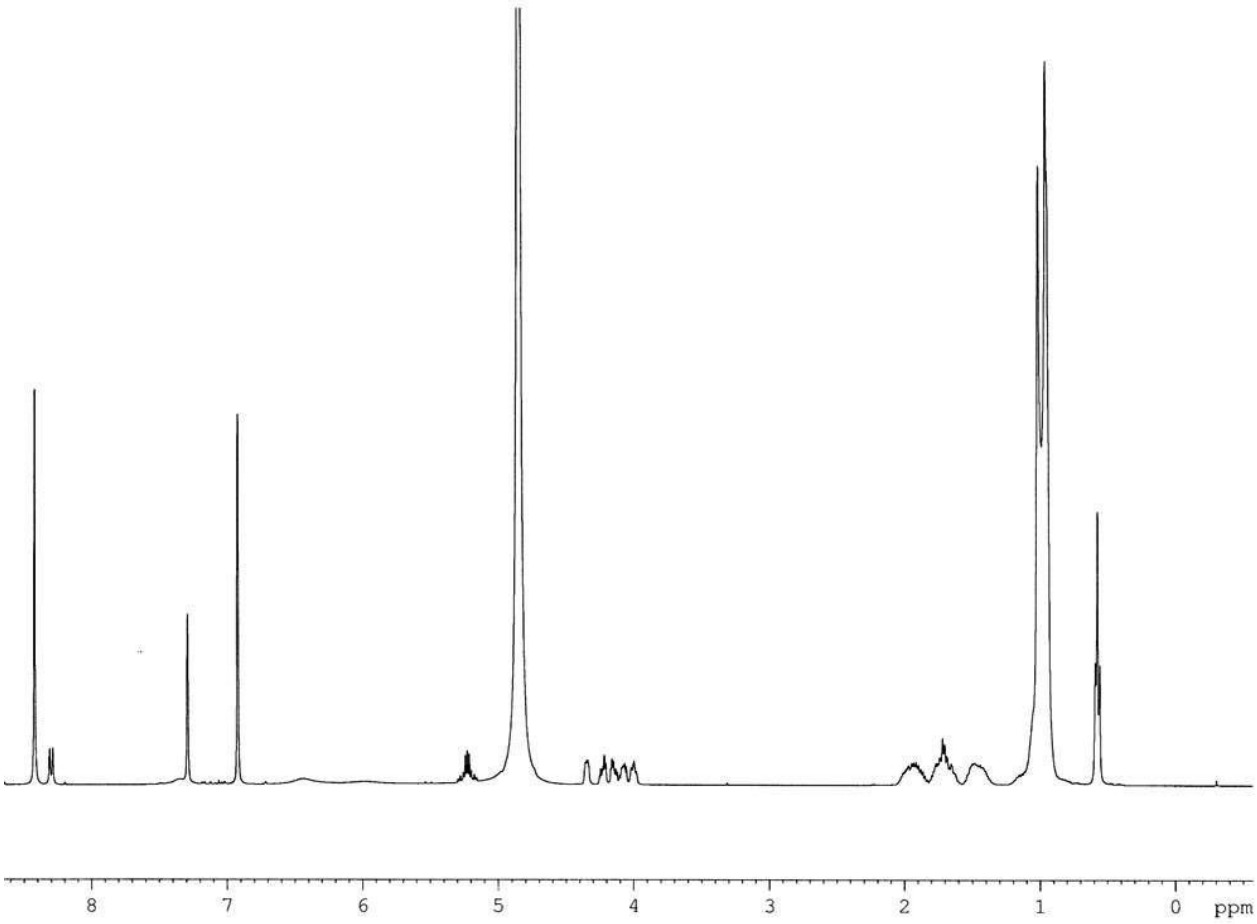


Figure 24: Spectre de RMN ^{1}H (C_5D_5N, 400 MHz) de **LP10**

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 25) exhibe un signal de carbone à δ(C) 175.0 et une ensemble de pics dans l'intervalle 23.9-33.9 confirmant ainsi sa nature amide d'acide gras82 et ceux observés à δ(H)/ δ(C) 4.80/52.8, 3.90/72.8, 3.98/76.5 et 4.25/72.2 confirme sa nature amino-alcool.82 Ce composé est considéré comme étant une céramide ayant une double liaison C=C de configuration *cis* et comportant trois oxymethines. La configuration *cis* est justifiée par la constante de couplage des protons oléfiniques qui est de 8.0 Hz et le

déplacement chimique des carbones allyliques à δ(C) 26.5 lesquels sortiraient à plus de 30 ppm avec une constante de couplage à 14.0 Hz si la configuration était *trans.*[83]

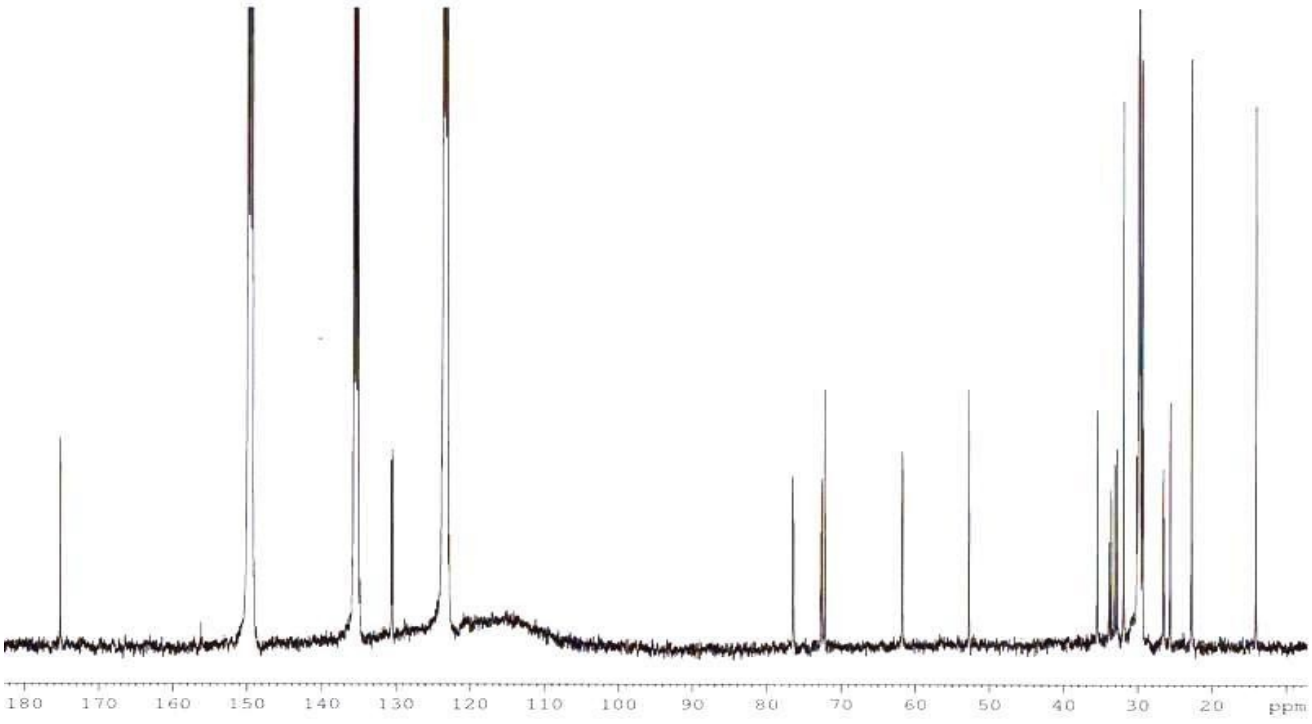


Figure 25: Spectre de RMN ^{13}C (C_5D_5N, 100 MHz) de **LP10**

Le spectre de HMBC (Fig. 26) nous montre des corrélations entre les protons de l'oxyméthine à δ(H) 4.25, de l'amide à δ(H) 8.29 (NH) et le carbonyle à δ(C) 175.0. Le proton de l'azométhine à δ(H) 4.80 présente une corrélation avec l'oxyméthylène à δ(C) 61.7.

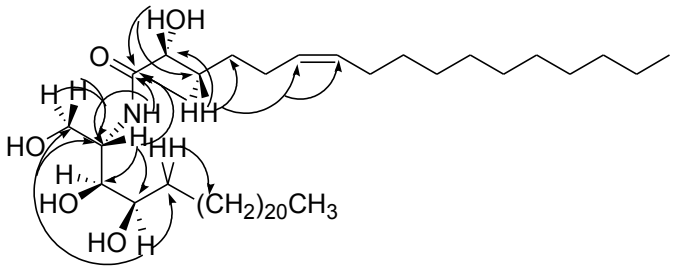


Schéma 6: Corrélations HMBC de Triumfettamide.

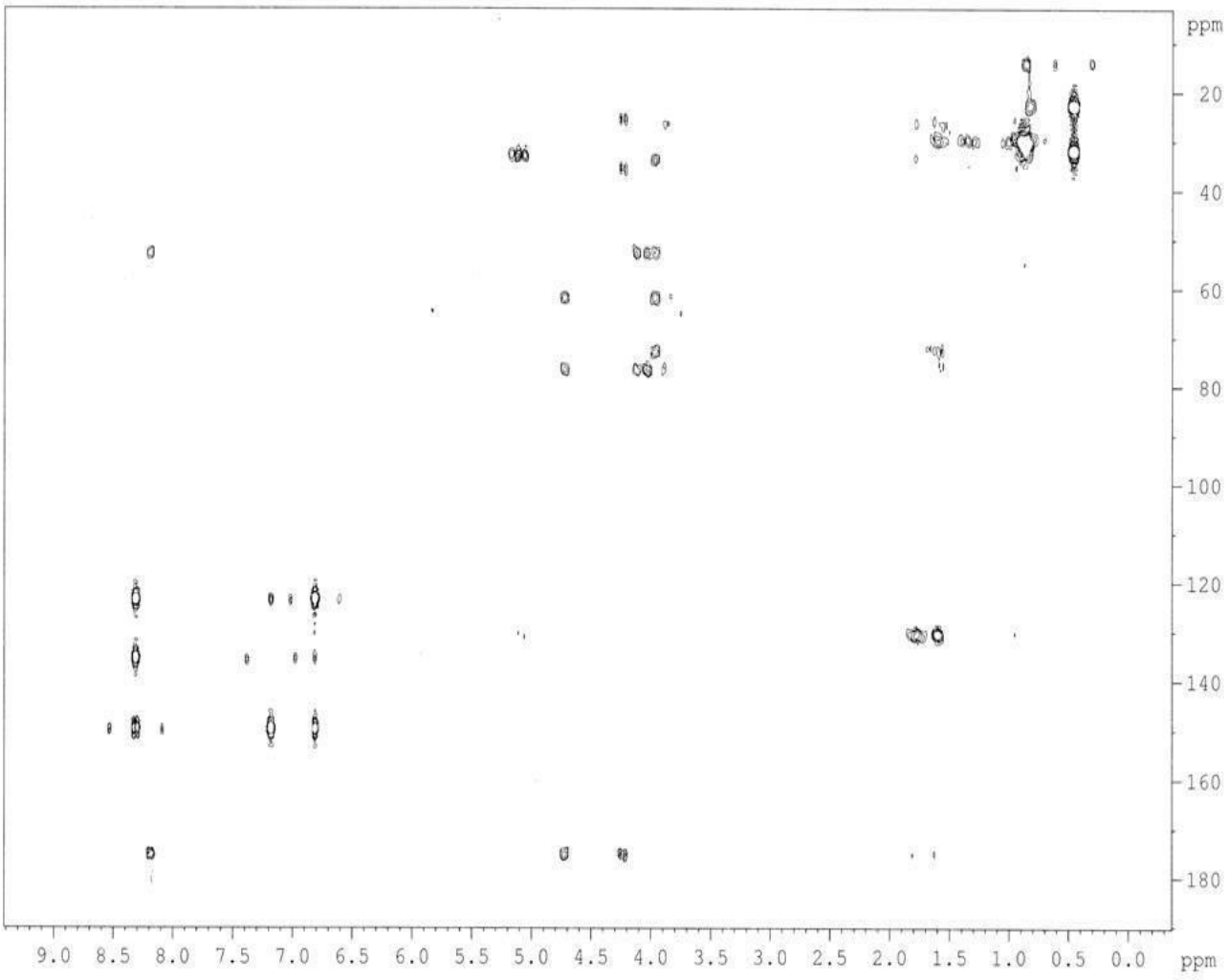


Figure 26: Spectre de Corrélations ^{1}H-^{13}C (HMBC) de **LP10**

Ajouté au spectre de HMBC, le spectre de COSY (Fig.27) donne des corrélations permettant de suggérer que la double liaison est du côté du groupement acyle.

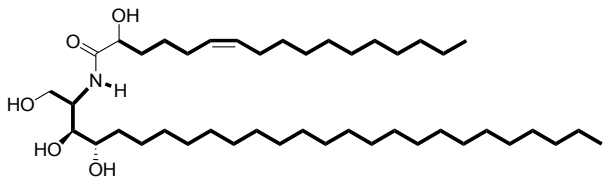


Schéma 7: Corrélations COSY de Triumfettamide.

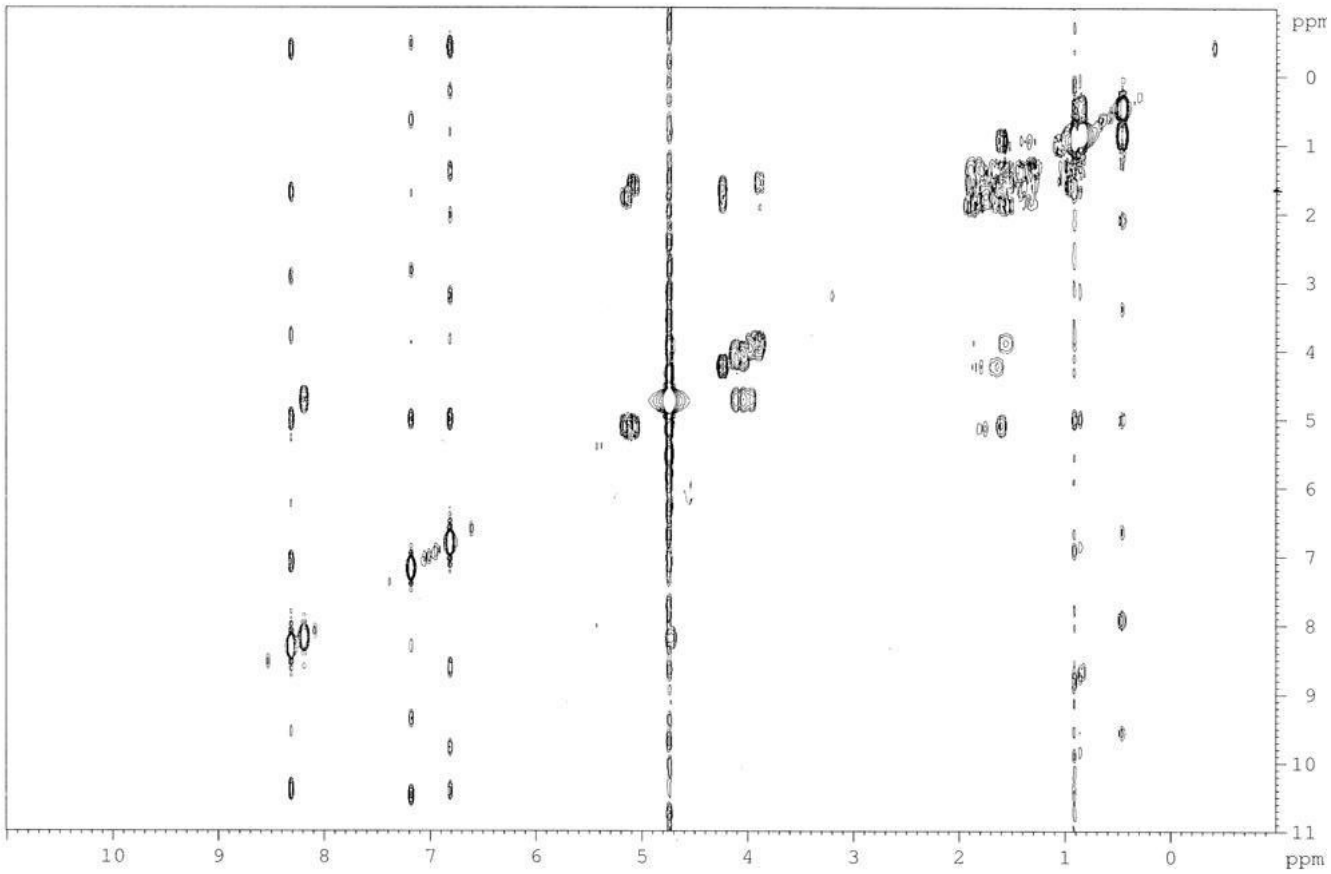


Figure 27: Spectre de Corrélations ^{1}H-^{1}H (COSY) de **LP10**

Cette hypothèse a été confirmée par application du mécanisme de fragmentation (schéma 6) des céramides développée par Hsu et *al*.[84]

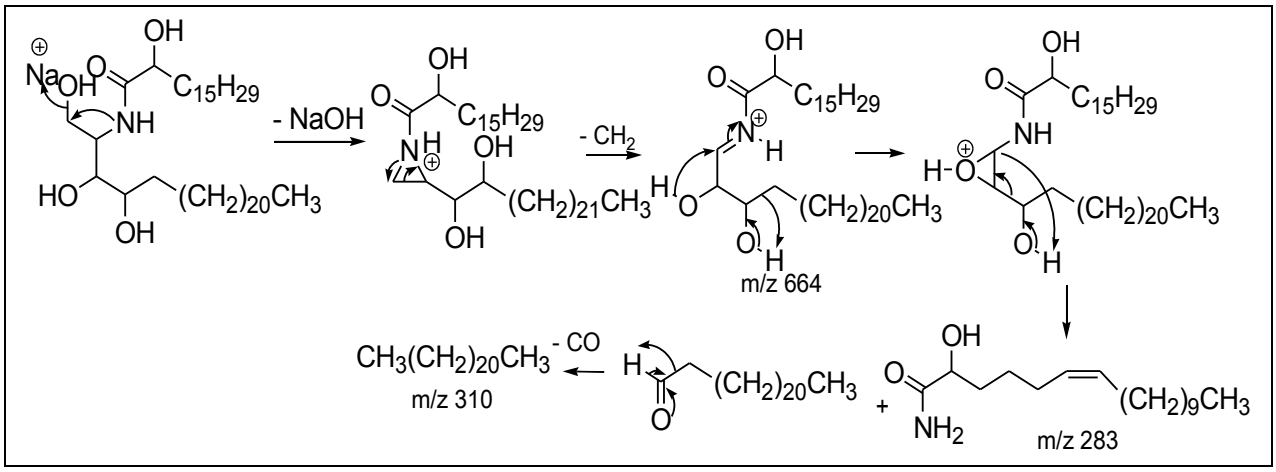


Schéma 8: SORI-CID-MALDI-FTICR ms/ms de l'ion fragment m/z 664 (composé **LP10**).

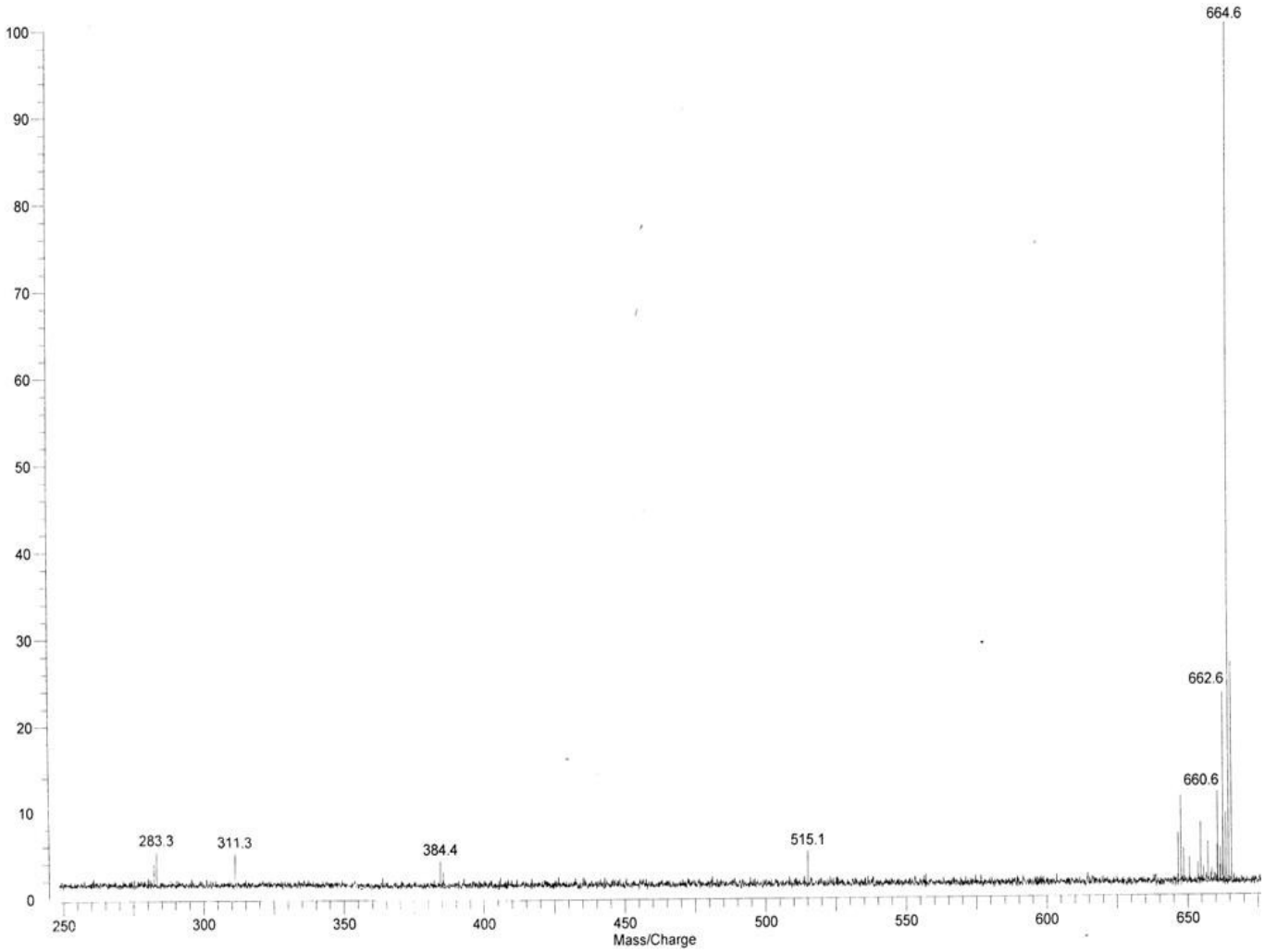


Figure 28: Spectre de masse en tandem de l'ion fragment à m/z 664 de **LP10**

Les réactions d'acétylation et d'oxydation[85, 86] ont été faites, donnant le composé **LP10'** qui après une ionisation douce en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) nous a donné un pic à m/z 902 $[879+Na]^+$ (Fig. 29).

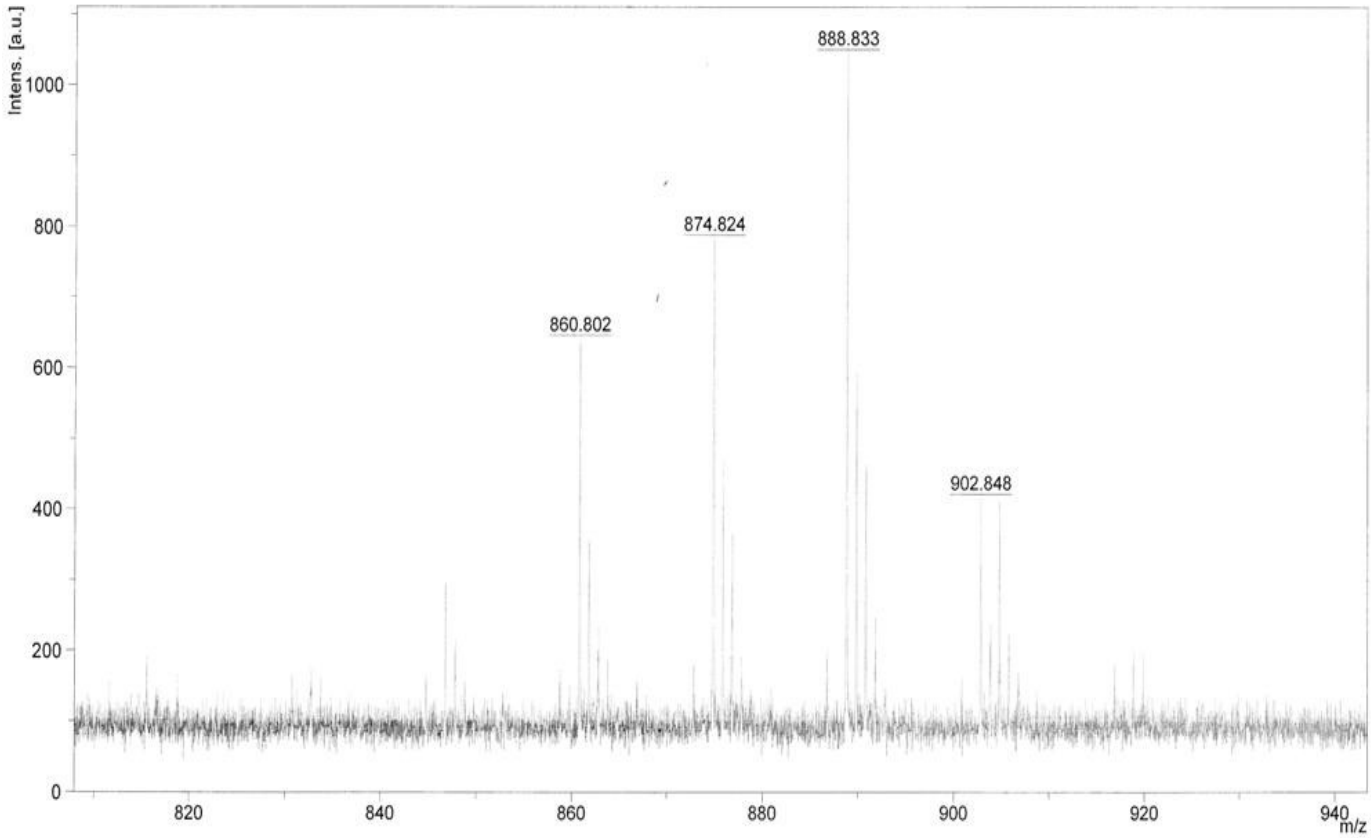
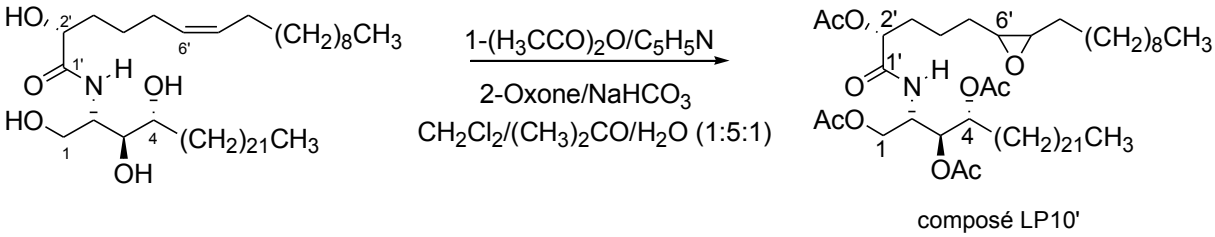


Figure 29: Spectre de MALDI-TOF du produit de réaction d'acétylation et d'oxydation de **LP10**

Les deux réactions avaient un double objectif, celle de confirmer le nombre de fonction alcool et de double liaison dans la molécule. C'est ainsi que le calcul va nous mener à 4 fonctions alcool et une double liaison; sachant qu'après acétylation chaque acétate contribue pour *m/z* 42 et que l'époxydation est un ajout de *m/z* 16 on aura donc (**4x42**)+**16**+695 = 879.



composé LP10'

Schéma 9: Réaction d'acetylation et d'époxydation à l'oxone® du composé **LP10**

Le système ternaire ci-dessus a été mis au point pour avoir un milieu réactionnel en phase homogène où tous les éléments sont solubles. Le dichlorométhane solubilise le composé acétylé, l'eau dissout l'oxone® et le sel de bicarbonate de sodium; l'acétone est le générateur de diméthyl dioxirane qui a permis la formation de l'époxyde (schéma 8).

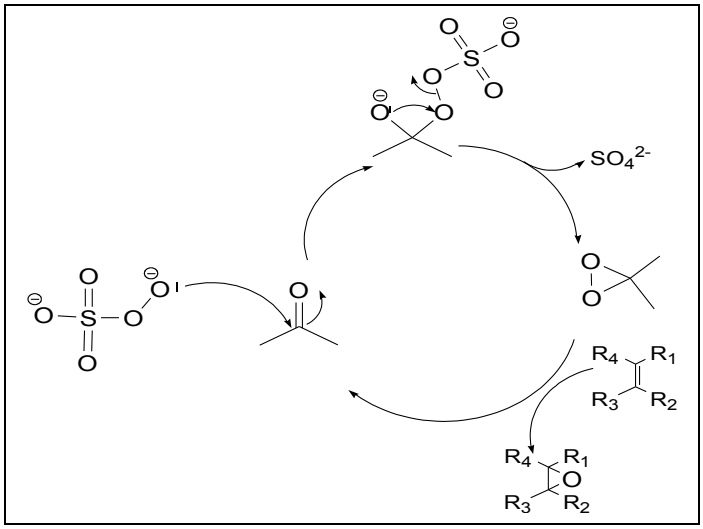


Schéma 10: Mécanisme d'oxydation des oléfines par l'oxone® avec l'acétone comme générateur de dioxirane

Les composés résultant de la réaction d'époxydation par l'oxone® et l'acétone comme médiateur de diméthyl dioxirane sont des époxydes. Mais leur formation dépend du pH du milieu qui est contrôlé par l'addition du bicarbonate de sodium; s'il est approximativement neutre, l'époxyde est formé mais est tout de suite converti en *trans*-diol si le milieu devient acide. Dans ce dernier cas, la réaction continue et les fonctions alcool sont oxydées en dicétone.[85, 86]

La méthanolyse (0.9N HCl-MeOH/70°C/18h) de **LP10** a conduit au mélange de méthyle ester d'acide gras et de la longue chaine basique (amino-alcool). L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis de détecter la longue chaine basique à *m/z* 452 correspondant à $[LCB+Na]^+$ identifié au 2-aminohexacosan-1,3,4-triol et de déduire l'ester d'acide gras au (2*R*,6*Z*)-2-hydroxy-6-heptadecenoate de méthyle.

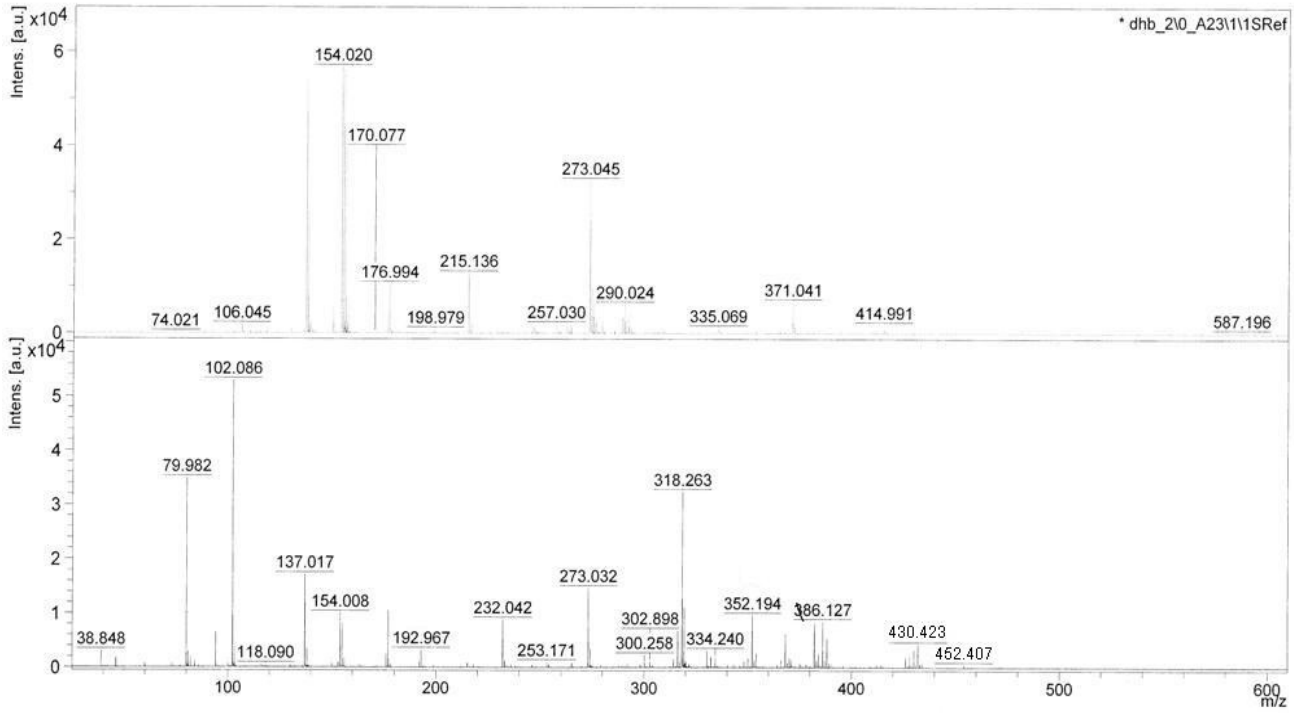
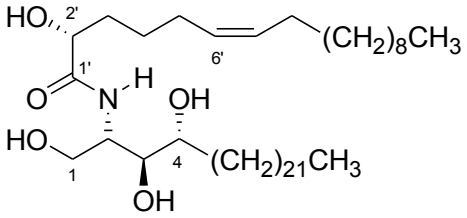


Figure 30: Spectre de MALDI-TOF de la solution issue de la méthanolyse de **LP10**

L'analyse des données de RMN et de spectrométrie de masse ont permis d'identifier ce produit au (2*R*,6*Z*)-2-hydroxy-*N*-[(2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxyhexacosan-2-yl]heptadec-6-enamide de nom trivial *Triumfettamide* isolé ici pour la première fois.



71

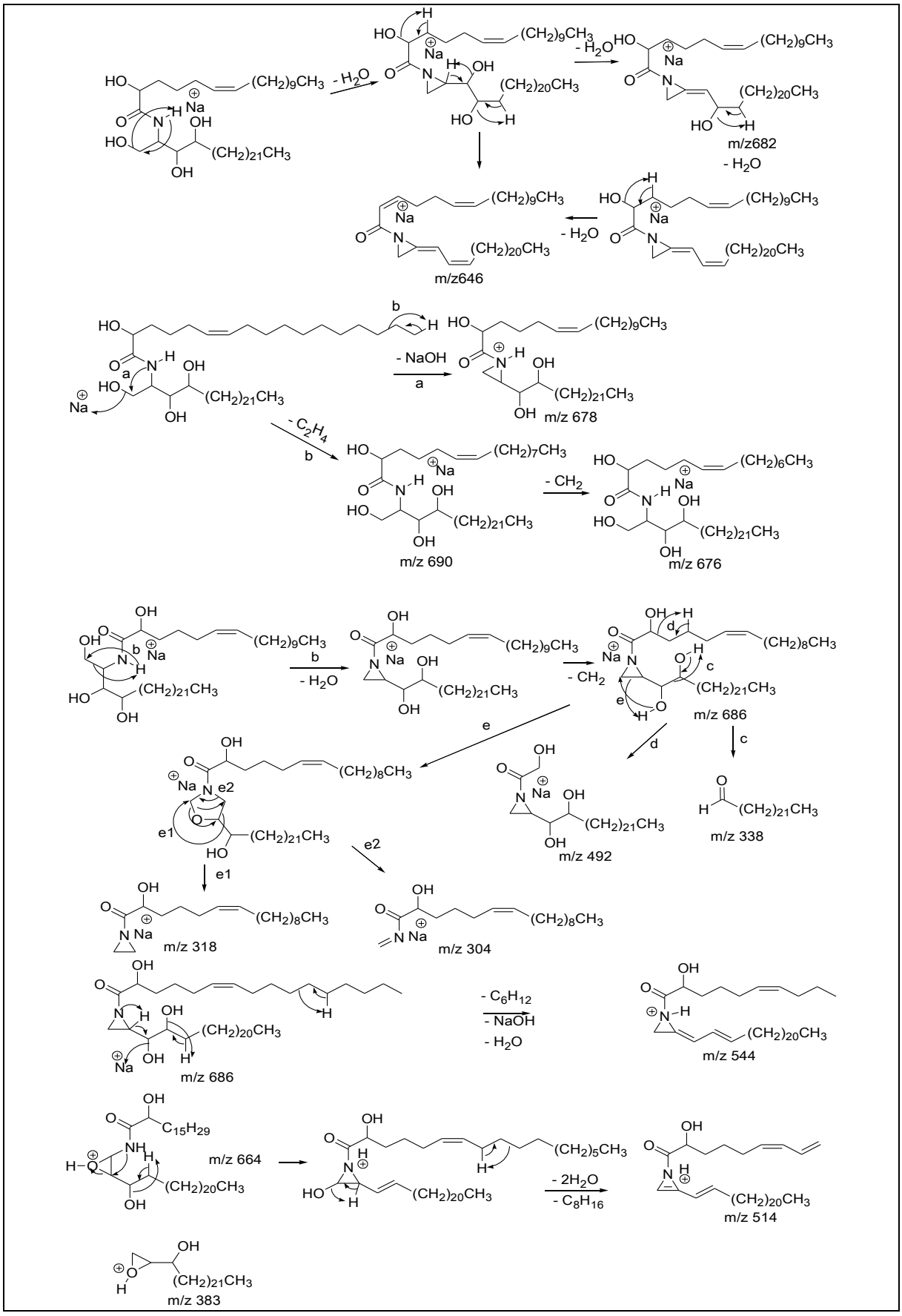


Schéma 11: Quelques ions fragments de composé **LP10**.

Tableau 13: Données spectrales de RMN ^{1}H (C_5D_5N, 400 MHz) et ^{13}C (APT) (C_5D_5N, 100 MHz) de Triumfettamide.

Position	δ(H) (*m,* J/Hz)	δ(C) (APT)	Position	δ(H)	δ(H) (APT)
1a	4.15(*dd*, 10.3, 5.3)	61.7	**3'b**	1.65 (*m*)	36.5
1b	4.05(*dd*, 10.3, 5.0)	-	**4'a**	1.40 (*m*)	33.5
2	4.80 (*m*)	52.8			
3	3.98 (*m*)	76.5	**5'a**	1.65 (*m*)	26.5
4	3.90 (*m*)	72.8			
5	1.60 (*m*)	33.9	**6'**	5.20 (*dt*, 8.0, 4.0)	130.4
6-25, 9'-17' (CH_2)	1.35 (*s large*)	20.0, 23.0, 23.9, 30.0, 32.0	**7'**	5.25 (*dt*, 8.0, 4.0)	130.6
NH	8.29 (*d*, 8.3)		**8'a**	1.80 (*m*)	26.5
1'		175.0	**8'b**	-	-
2'	4.25 (*m*)	72.2	**17', 26 (CH_3)**	0.95 (*t*, 7.2)	14.0
3'a	1.80 (*m*)	36.5			

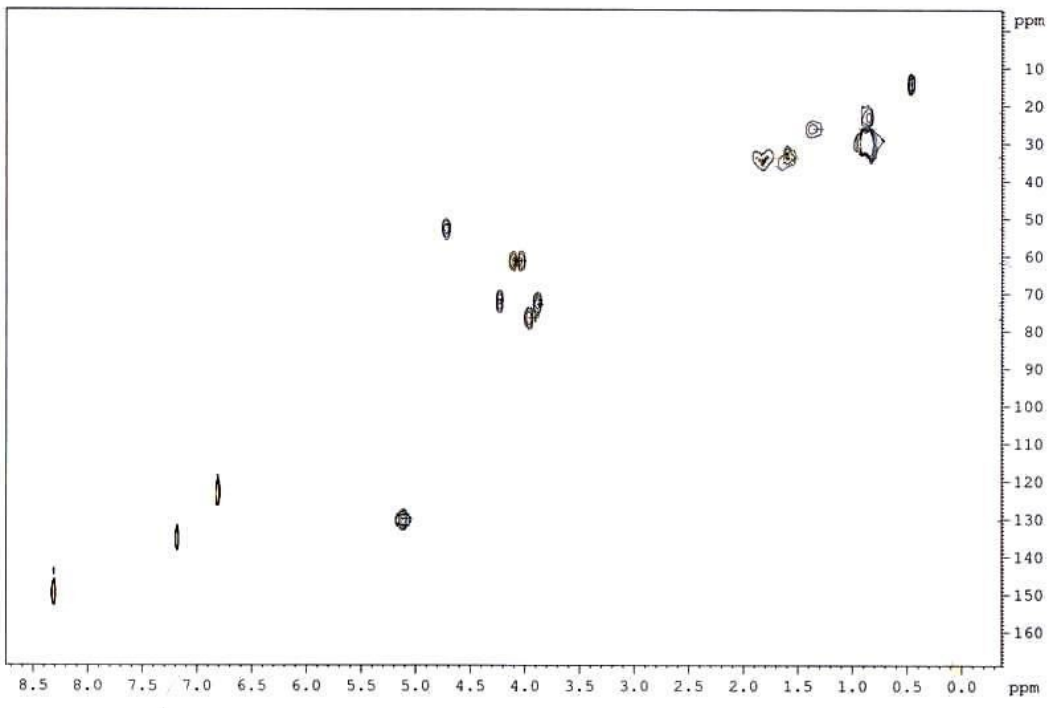


Figure 31: Spectre de Corrélations ^{1}H-^{13}C (HSQC) de **LP10**

II.1.1.11/ Triumfettoside Ic (LP11).

Le composé suivant a été obtenu sous forme de poudre blanche du système de solvants EtOAc-MeOH (9:1). Son spectre de masse MALDI-FTICR à haute résolution (Fig. 32) montre l'ion *pseudo*-moléculaire à *m/z* 736.5327 $[M+H]^+$ (masse théorique calculée: 736.5358), correspondant à la formule moléculaire $C_{42}H_{73}NO_9$ ayant sept degrés d'insaturation.

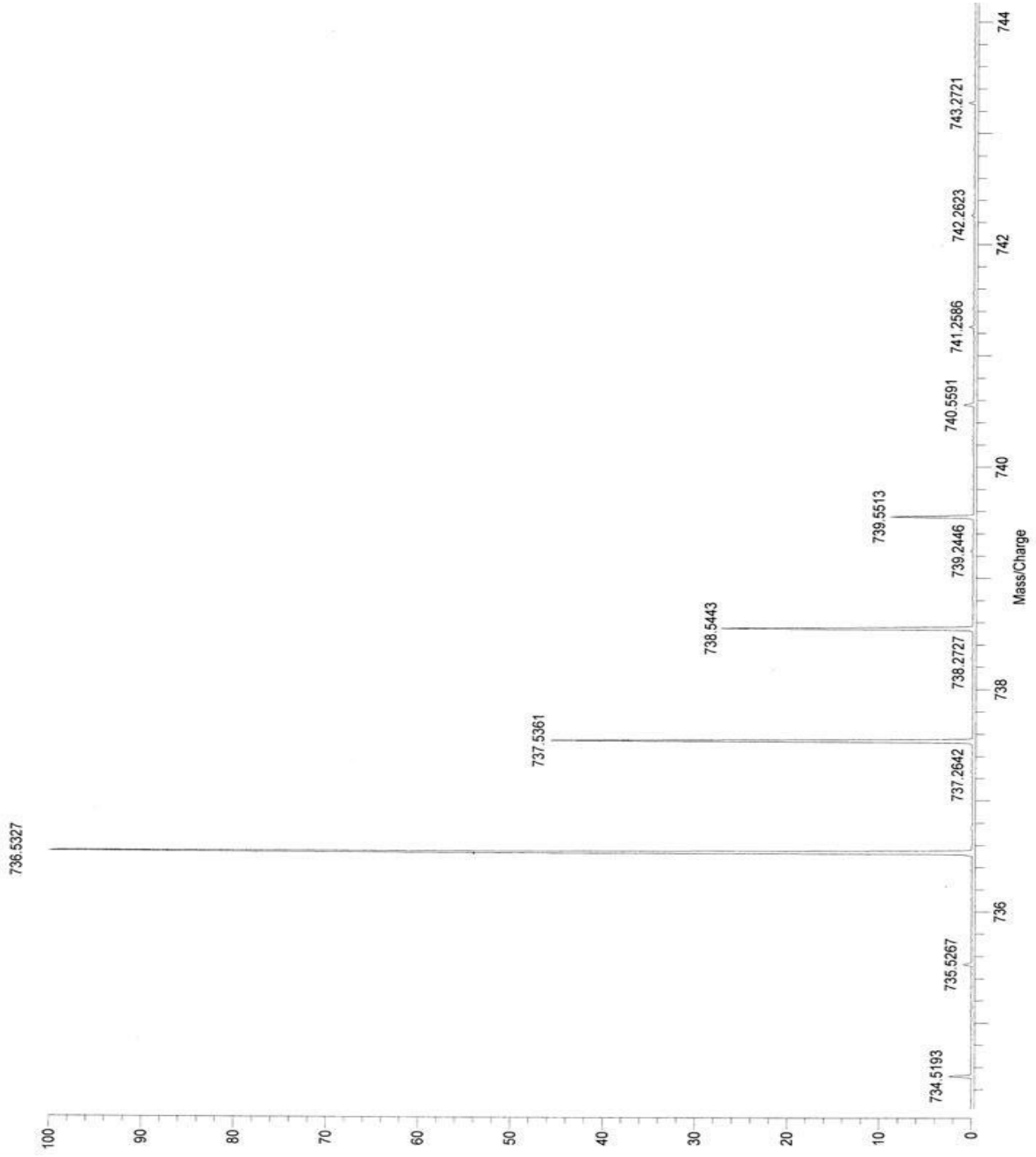


Figure 32: Spectre de masse à haute résolution MALDI-FTICR de **LP11**

Son spectre IR (Fig. 33) montre une large bande d'adsorption à 3350 correspondant au groupement OH et une bande intense des amides secondaires à 1637 et 1542.82

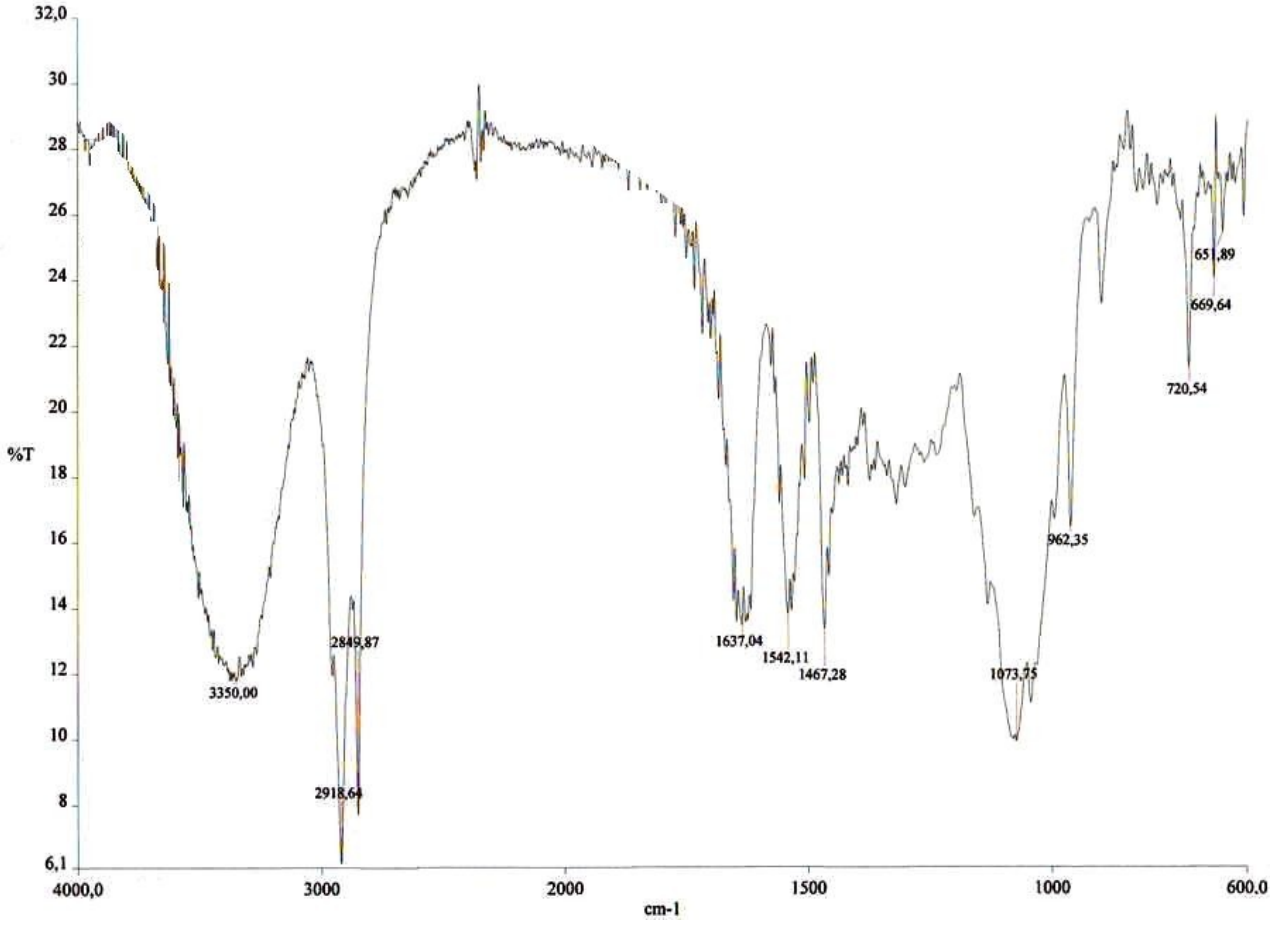


Figure 33: Spectre d'Infrarouge de **LP11**

Cette précédente donnée est marquée par la présence sur le spectre de RMN ^{13}C d'un carbone lié à un azote à δ(C) 53.5 et d'un carbonyle à δ(C) 175.8. Ce composé donne une couronne violette au test de Molish suggérant que notre molécule est un glycoside. On observe sur les spectres de RMN ^{1}H (Fig. 34) et ^{13}C (APT) (Fig. 35), le signal du proton anomérique à δ(H)/δ(C) 4.30 (1H, *d, J* = 8.0 Hz)/103.2 et un ensemble de carbone à δ(C) 74.1, 76.4, 70.1, 76.6, 61.2 correspondant aux signaux du β-D-glucopyranoside.[84] De plus, on observe un oxymethylène à δ(H)/δ(C) 3.80-3.85(*m*, Ha-C(1)), 3.72-3.76 (*m*, Hb-C(1))/68.5, deux oxymethines à δ(H)/δ(C) 4.18/71.4 et 4.05/71.6, deux protons éthyléniques de configuration *trans* δ(H)/δ(C) 5.61 (*d, J* = 16.0 Hz)/130.6 et 5.87 (*dd*, *J* = 16.0, 8.0 Hz)/133.0 [87], huit protons oléfiniques de configuration *cis* entre 5.58 et 5.49 ppm (*dt*, *J* = 8.0, 4.0 Hz, δ(C) 130.2, 130.2, 130.0, 129.9, 129.8, 129.5, 129.4, 129.3), une longue chaine aliphatique caractérisée par un singulet large entre δ(H) 1.30-1.60 et deux méthyles terminaux à

δ(H)/δ(C) (1.03, *t*, *J* = 7.3 Hz)/13.0. Ces données nous permettent donc de suggérer le composé **LP11** comme étant un dérivé de céramides poly éthylénique β-D-glucosylé.

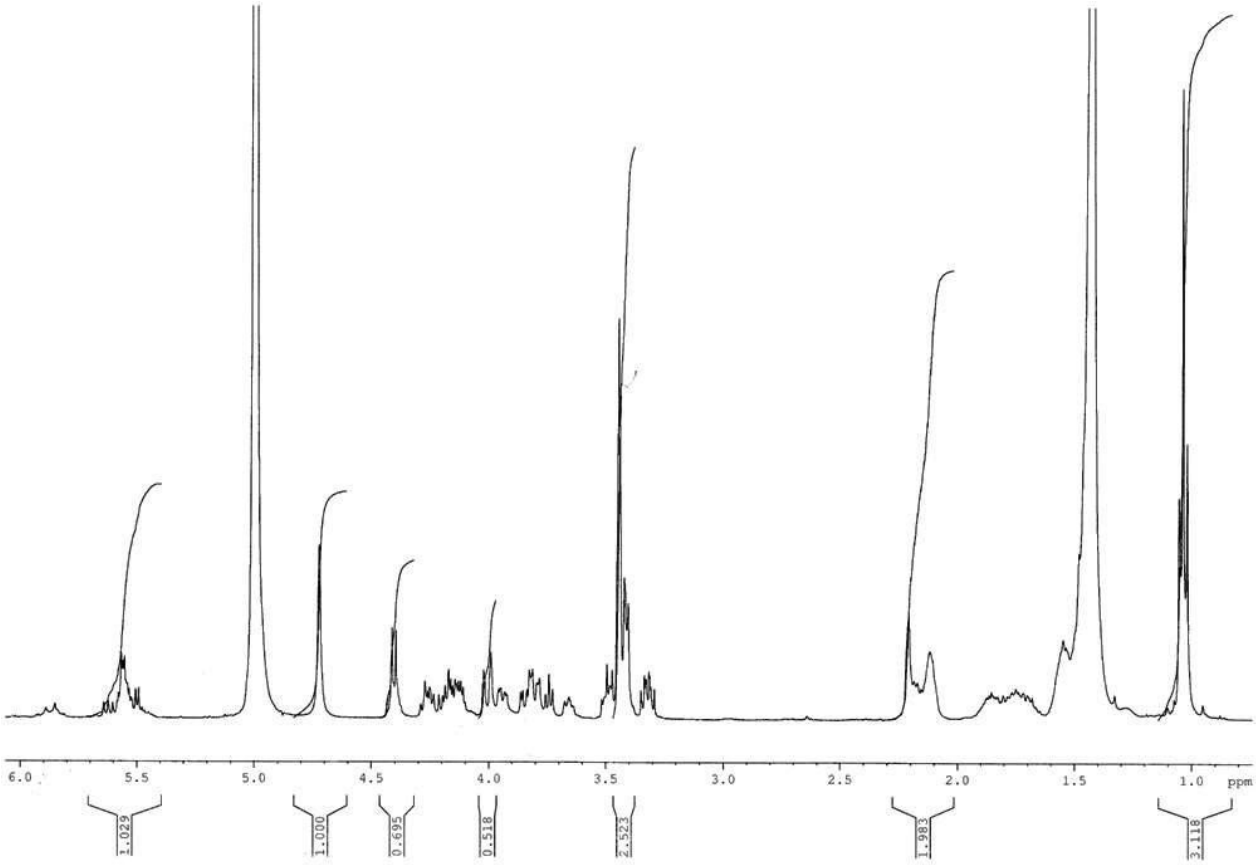


Figure 34: Spectre ^{1}H (*CD_3OD*, 400 MHz) de **LP11**

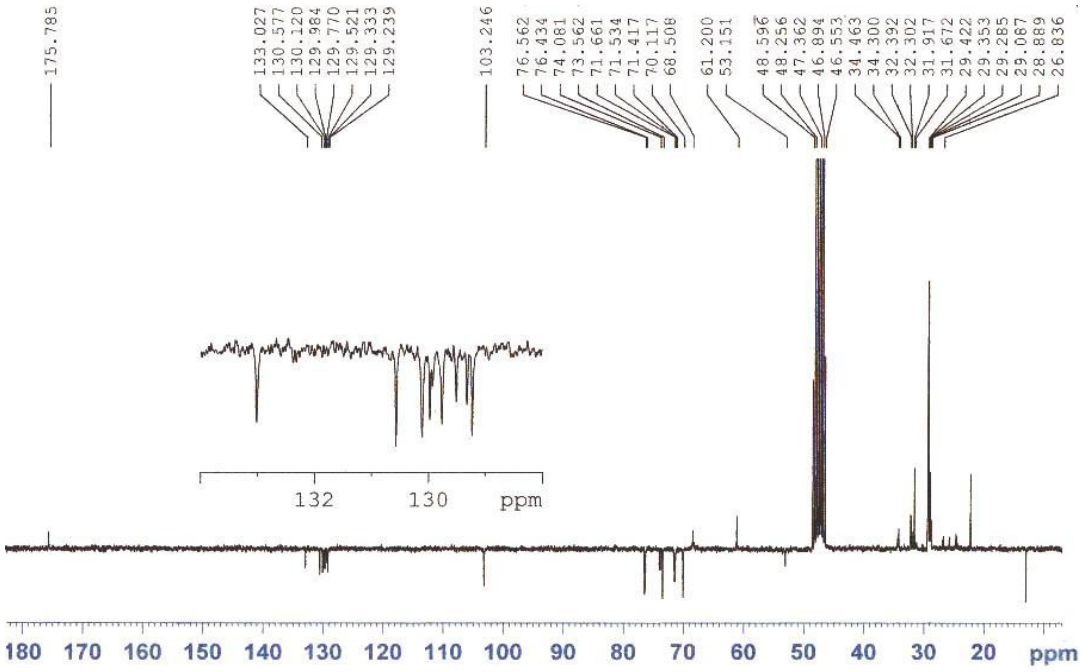


Figure 35: Spectre ^{13}C (APT) (*CD_3OD*, 100 MHz) de **LP11**

D'importantes interactions sont observées sur le spectre HMBC (Fig. 36) qui présente une corrélation entre les protons de l'oxyméthylène Ha-C(1), Hb-C(1) et le carbone anomérique suggérant la fixation du sucre sur le carbone C(1). Le Hb-C(1) montre une corrélation avec les carbones C(2) et C(3) ; H-C(3) en présente aussi avec les carbones C(1), C(2), C(4), et C(5); celles observées entre les protons H-C(4), H-C(5) et les carbones C(3), C(6) nous ont permis de conclure que la double liaison *trans* est du côté de la sphingosine.

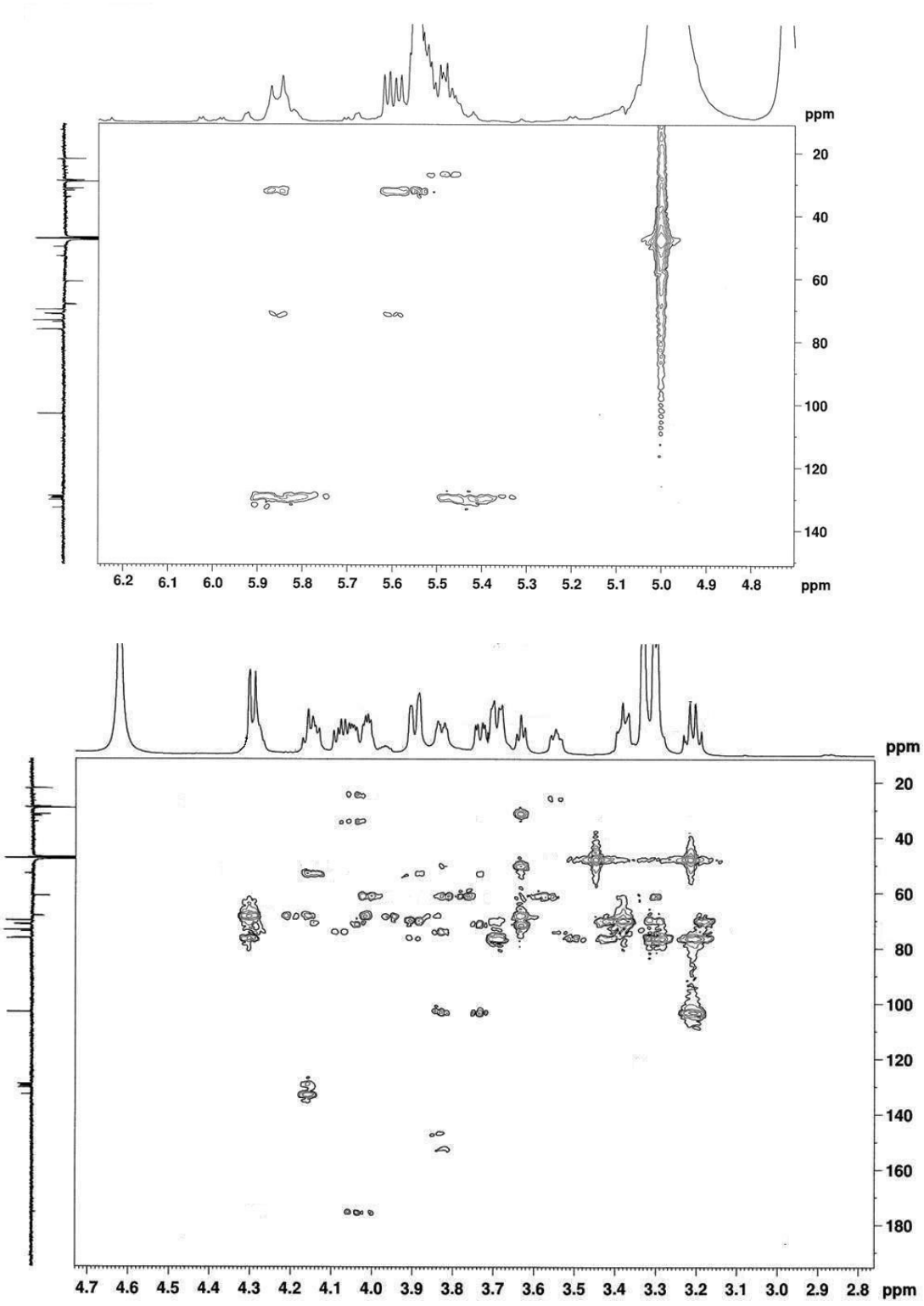


Figure 36: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMBC) **de LP11**

Le spectre COSY (Fig. 37) nous permet de confirmer la position du sucre car il montre une corrélation entre le proton anomérique H-C(1'') et Ha-C(1). Il montre aussi des corrélations importantes entre les H-C(3) et (Hb-C(1), H-C(2), H-C(4)), H-C(4) et H-C(5),

Ha-C(6) et Hb-C(6); H-C(5) donne des corrélations avec les protons Ha-C(6) et Hb-C(6). On en observe aussi entre tous les protons oléfiniques et ceux résonnant à δ(H)/δ(C) 2.10 et 2.00/31.7, 29.4 suggérant la présence d'une séquence allylique répétitive. La suggestion selon laquelle toutes les doubles liaisons seraient du même côté et que l'acide gras serait saturé découle du fait que le proton H-C(2') de l'acide gras corrèle avec le proton H-C(3') qui lui-même montre une tache de corrélation avec l'amas de méthylène entre 1.30-1.60 et cet amas avec le méthyle à δ(H) 1.03.

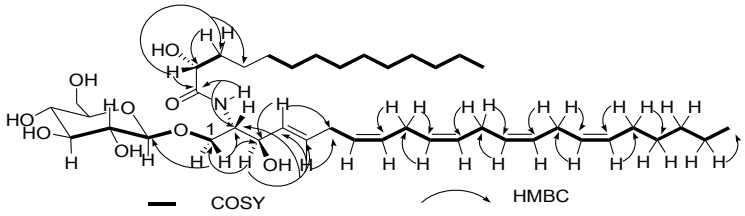


Schéma 12: Corrélations importantes HMBC et COSY de **LP11.**

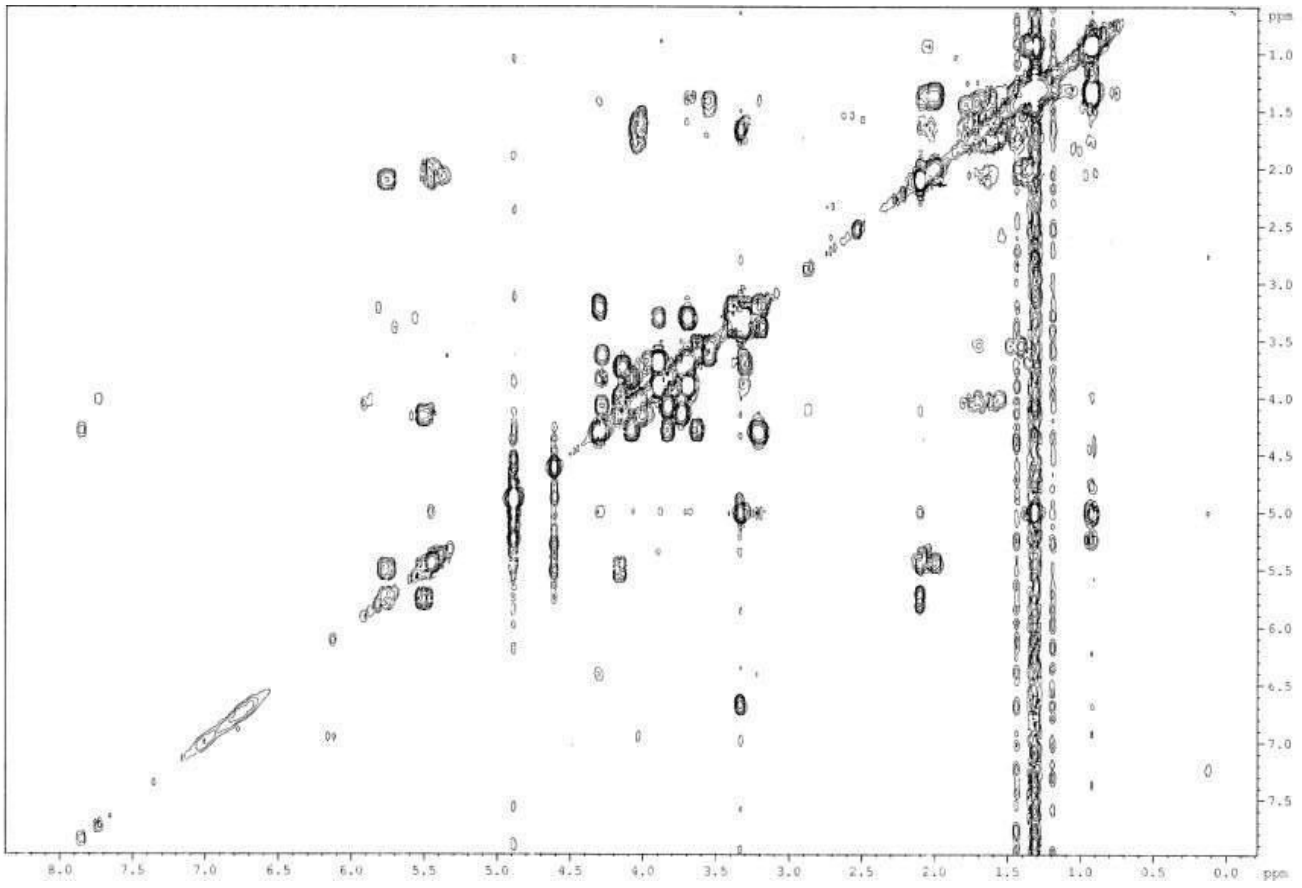
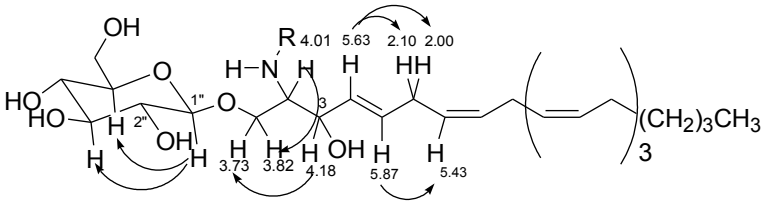


Figure 37: Spectre de corrélation ^{1}H-^{1}H (COSY) de **LP11**

Le spectre NOESY (Fig. 38) confirme l'hypothèse de la position des doubles liaisons et de la séquence allylique en montrant des interactions entre les protons H-C(4) et ceux à δ(H) à 2.10, 2.00 ainsi qu'entre les protons H-C(5) et H-C(7).



R= $C_{14}H_{27}O_2$

Schéma 13: Corrélations NOESY du composé **LP11.**

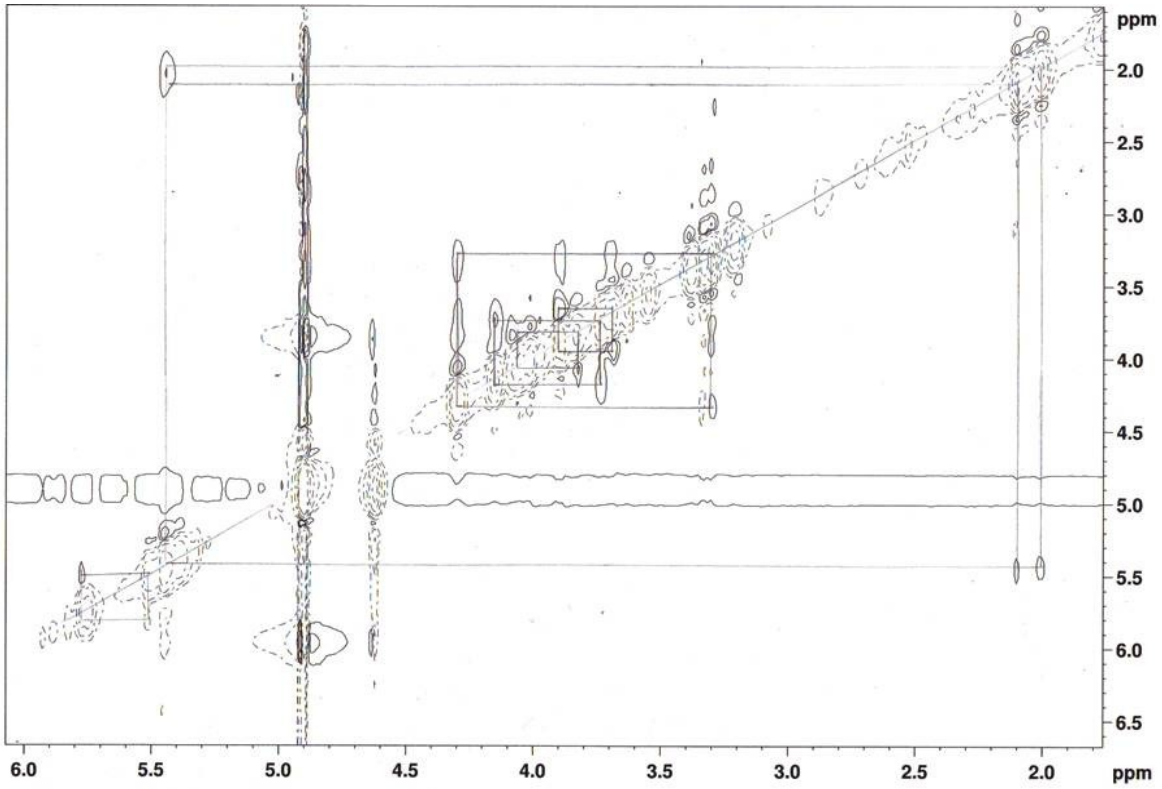


Figure 38: Spectre de corrélation ^{1}H-^{1}H dans l'espace (NOESY) de **LP11**

Le composé **LP11** a été acétylé (anhydride acétique/pyridine) et oxydé85,86 (schéma 12) par l'oxone dans un mélange ternaire H_2O/DCM/acétone (1:1:5) en présence du bicarbonate de sodium pendant 3H sous agitation magnétique et à température ambiante. Cette réaction a conduit à un composé donc l'analyse en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) montre le pic à 1176 $[1153+Na]^+$ (Fig. 39).

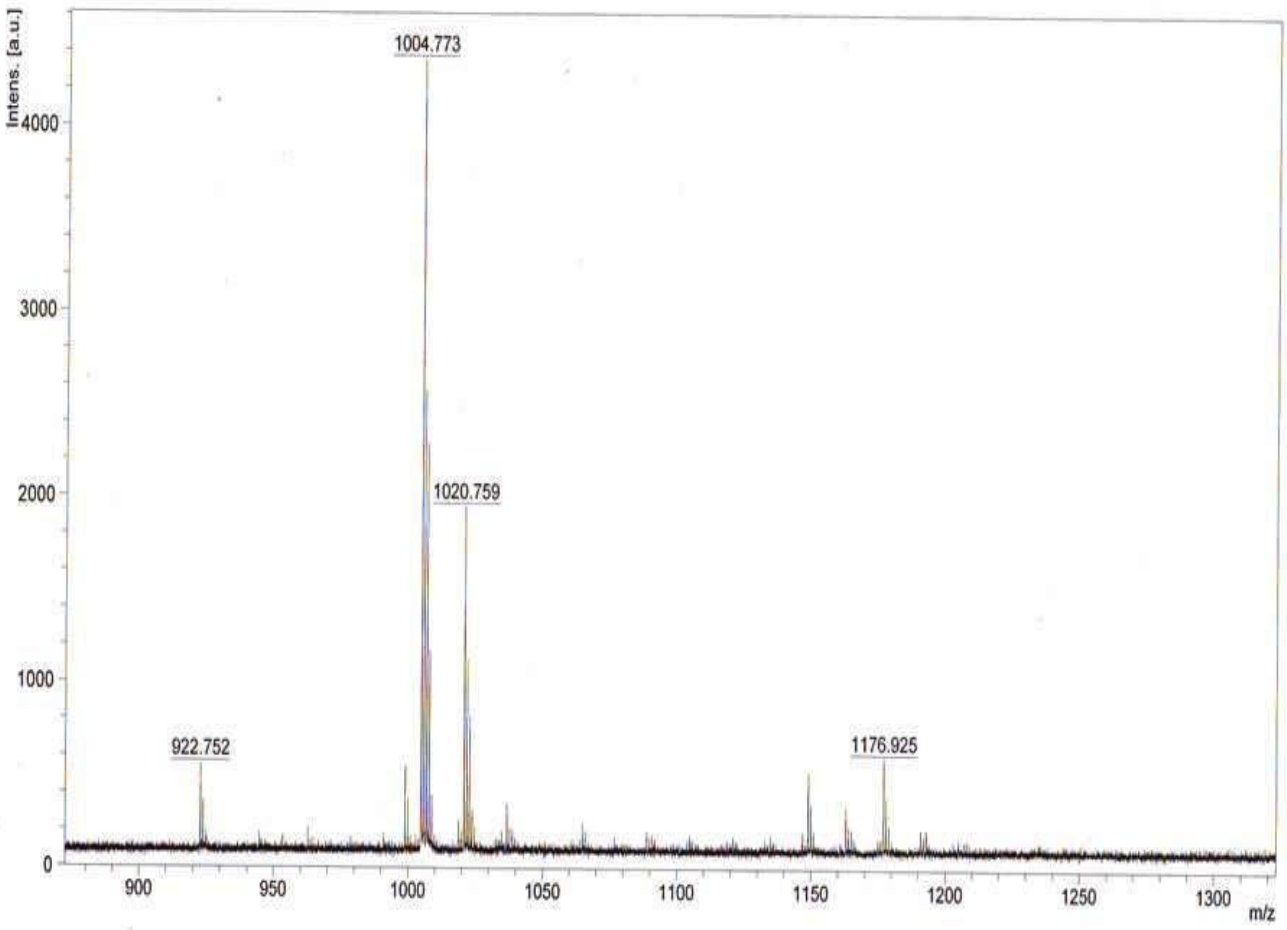


Figure 39: Spectre de MALDI-TOF du produit d'acétylation et d'oxydation de **LP11**

Cette valeur nous confirme que la molécule non seulement a six alcools libres mais a aussi 5 doubles liaisons éthyléniques.

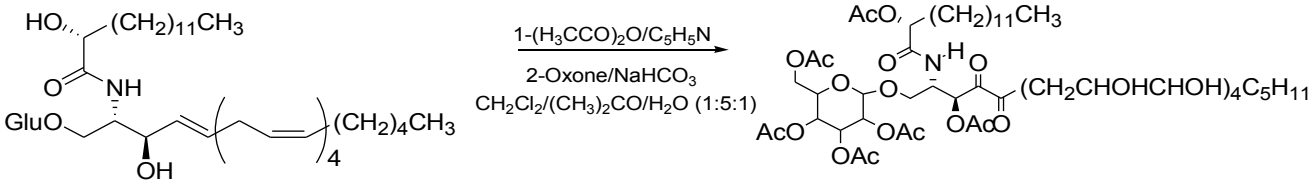


Schéma 14: Réaction d'acétylation et d'oxydation

LP11 a été soumis à une hydrolyse acide en présence du méthanol (0.9N HCl-MeOH/18h/70°C).[88] Le milieu réactionnel a été neutralisé par une solution de carbonate de sodium et extrait au chloroforme. L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) (Fig. 40) de la phase organique a permis d'identifier la sphingosine (longue chaine basique ou

amino-polyol) à m/z 386 $[347+K]^+$ et de déduire l'ester d'acide gras comme étant le 2-hydroxytetradecanoate de méthyle.

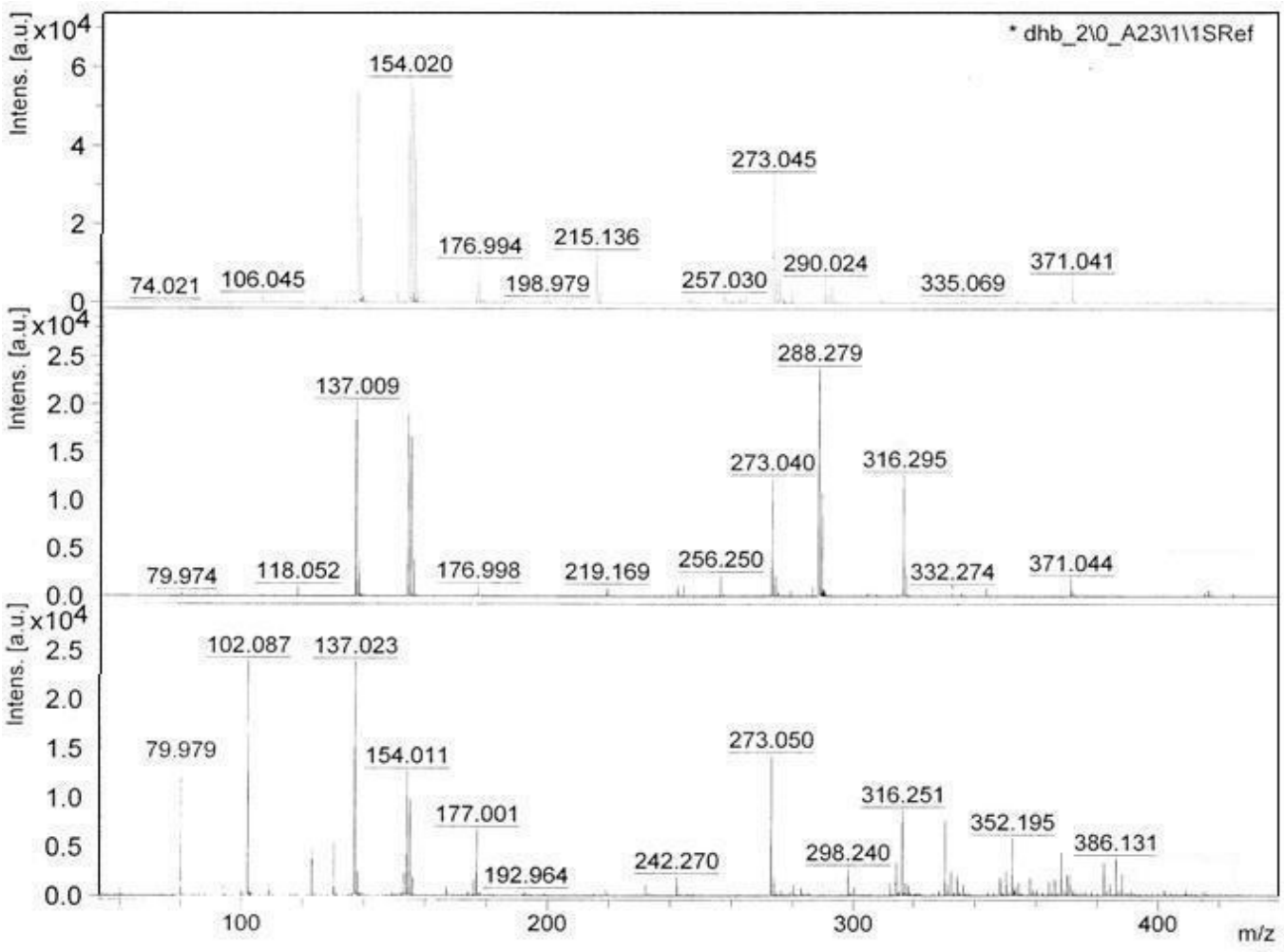
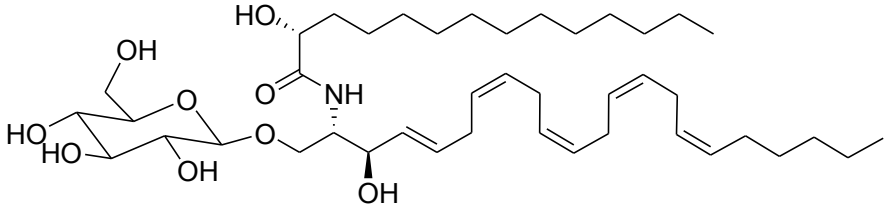


Figure 40: Spectre d'analyse de MALDI-TOF de la phase organique de la méthanolyse de **LP11**

A partir de l'analyse des données spectrales et ainsi que des résultats obtenus après les réactions chimiques, le composé **LP11** a été identifié au (2*R*)-*N*-{(1*S*,2*S*,3*E*,6*Z*,9*Z*,12*Z*,15*Z*)-1-[(*β*-D-glucopyranosyloxy)methyl]-2-hydroxyheneicosa-3,6,9,12,15-pentaen-1-yl}-2-hydroxytetradecanamide ou triumfettoside Ic décrit ici pour la première fois.



72

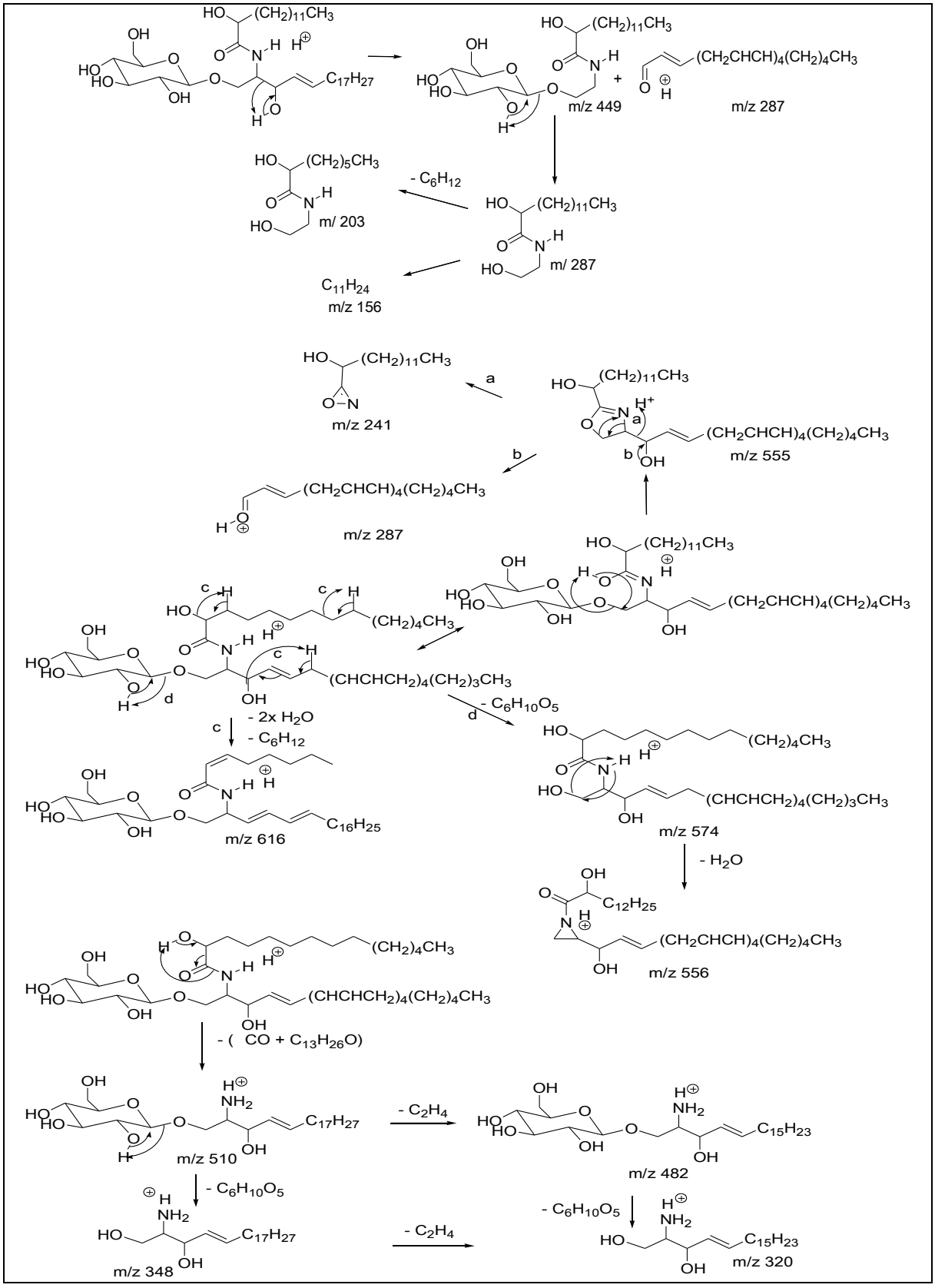


Schéma 15: Quelques ions fragments issus de la msms de l'ion à m/z 736

Tableau 14: Données spectrales RMN ^{1}H (*CD_3OD*, 400 MHz) et ^{13}C (APT) (*CD_3OD*, 100 MHz,) du composé **LP11**.

Position	δ(H) (*m*, *J*/ Hz)	δ(C) (APT)	**Position**	δ(H)	δ(C) (APT)
1a	3.82 (*m*)	68.5	19, 20, 21	1.44 (*s* large)	22.5-29.3
1b	3.73 (*m*)	68.5	1’	-	175.8
2	4.01 (*m*)	53.5	2’	4.05 (*dd*, 4.0, 8.0)	71.6
3	4.18 (*dd*, 8.0, 12.0)	71.4	3’a or 3’b	1.73 (*m*)	33.3
4	5.61 (*dd*, 8.0, 16.0)	130.6	3’b or 3’a	1.65 (*m*)	33.3
5	5.87 (*d*, 16.0)	133.0	4’-13’ (CH_2)	1.44 (*s l*)	29.3, 29.0, 28.8, 22.5
6a or 6b	2.10 (*s* large)	32.4	14’, 22 (CH_3)	1.03 (*t*, 12.0)	13.0
6b or 6a	2.00 (*s* large)	32.4			
9a or 9b	2.00 (*sl*), 2.10 (*sl*)	26.8	Glucose		
12a or 12b	2.00 (*sl*), 2.10 (*sl*)	26.8	1”	4.30 (*d*, 8.0)	103.2
15a or 15b	2.00 (*sl*), 2.10 (*sl*)	26.8	2”	3.21 (*dd*, 7.0, 11.6)	74.1
18a or 18b	1.80 (*sl*), 1.99 (*sl*)	26.8	3”	3.30 (*dd*, 7.6, 8.0)	76.4
7, 8, 10,	5.49-5.58 (*m*)	130.2, 130.2, 130.0,	4”	3.32 (*dd*, 8.0)	70.1
11, 13, 14,	5.49-5.58 (*m*)	129.9, 129.8, 129.5,	5”	3.40(*ddd*, 4.0, 8.0, 12.0)	76.6
16, 17	5.49-5.58 (*m*)	129.4, 129.3	6”a or 6”b	3.91 (*d l*, 12.0)	61.2
				3.74 (*dd*, J = 4.0, 12.0)	

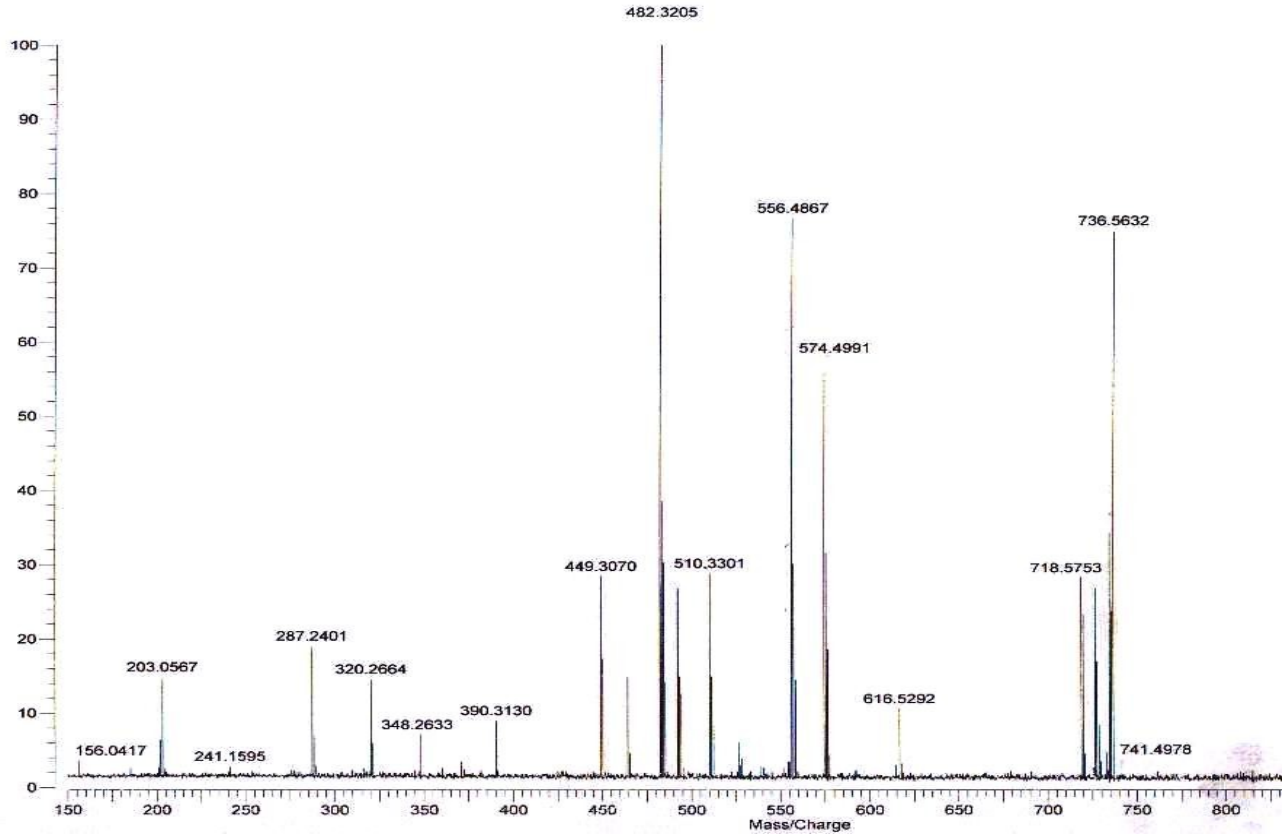


Figure 41: Spectre de masse en tandem de l'ion à m/z 736

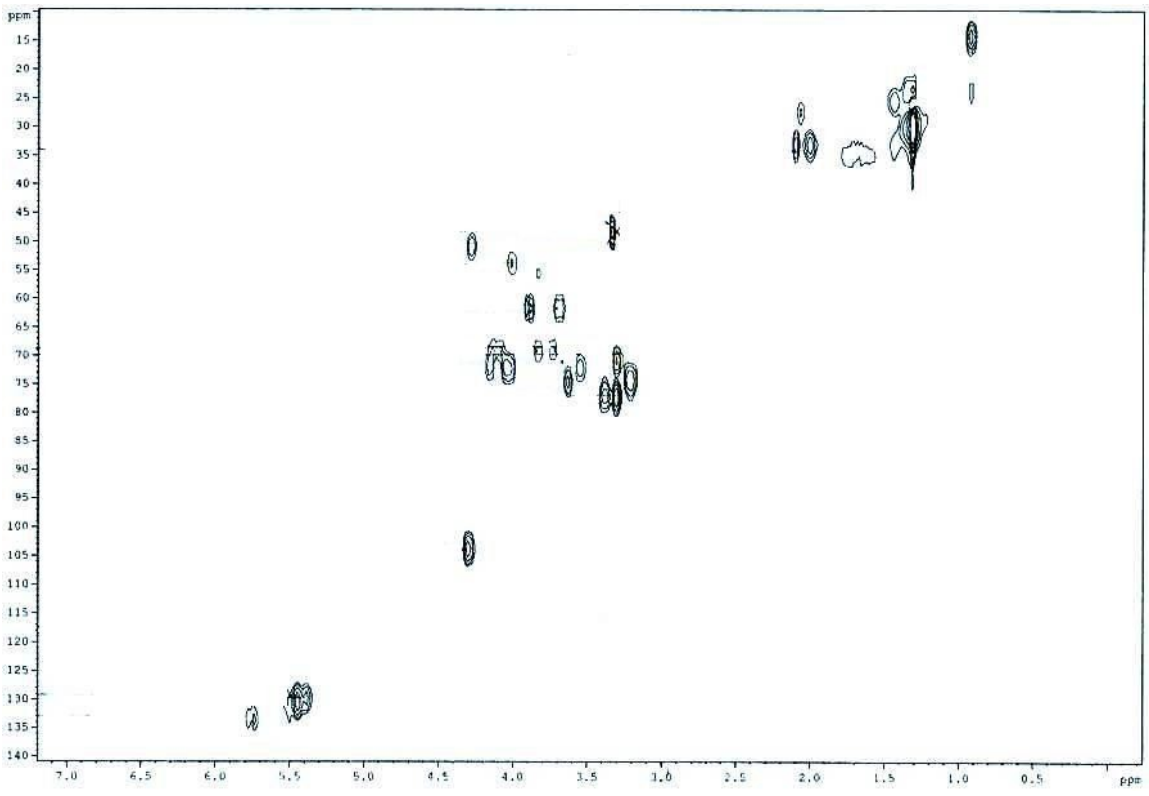
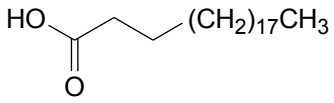


Figure 42: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HSQC) de **LP11**

II.1.2/ Composés isolés des feuilles

II.1.2.1/ Acide henéicosanoïque (LP12).

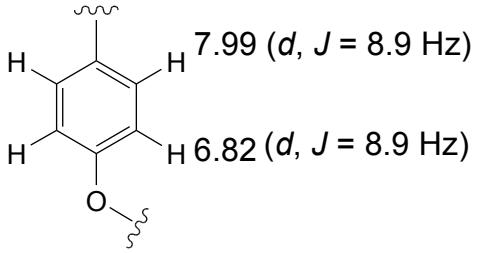
Ce composé a été isolé du même système de solvant que **LP2**. Il se présente sous forme de solide amorphe et précipite dans l'acétone. Il laisse une tache translucide sur du papier et ses spectres RMN ^{1}H (Fig. 6) et ^{13}C (APT) (Fig. 7) présentent les mêmes signaux que ceux observés sur les spectres de **LP2**. La différence est notée sur le spectre ^{1}H qui présente le singulet large à δ(H) 1.18 de l'amas des méthylènes avec un intégral de 34 protons équivalents à 17 CH_2. Toutes ces données permettent d'identifier **LP12** comme étant l'acide henéicosanoïque.



73

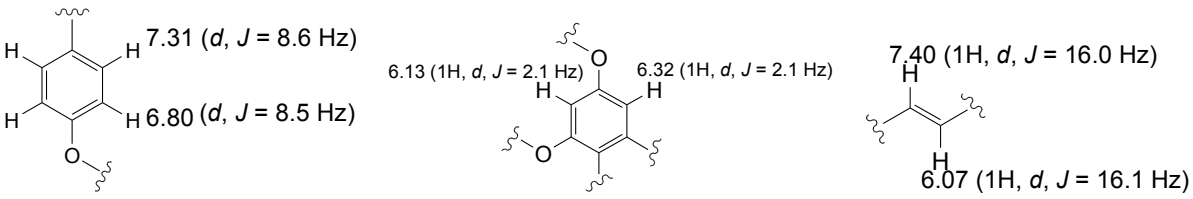
II.1.2.2/ *Trans*-tiliroside (LP13).

Isolé sous forme de poudre jaunâtre du système de solvant CH_2Cl_2-MeOH (37:3), il donne une coloration rouge au test de Shinoda, verdâtre au test de chlorure ferrique et une couronne violette au test de Molish caractéristique respectivement des flavonols, des fonctions phénoliques et des sucres. Le spectre de RMN ^{1}H (Fig. 43) exhibe des signaux à δ(H) 7.99 (2H, *d*, *J* = 8.9 Hz) et 6.82 (2H, *d, J* = 8.9 Hz) caractéristiques d'un système aromatique para-substitué. De plus, les protons à δ(H) 6.82 sont adjacents à un hétéroatome car ils sont plus blindés.[89]

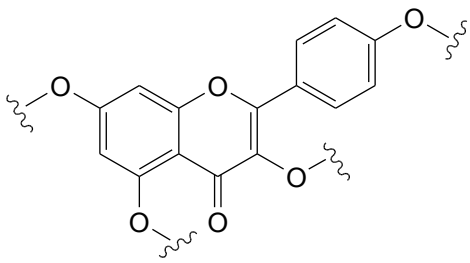


Plusieurs autres informations ont été observées telles qu'un second système AA'BB' à δ(H) 7.31 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz) et 6.80 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz), un fragment aromatique avec des protons méta positionnés resonnant à δ(H) 6.13 (1H, *d*, *J* = 2.1 Hz) et 6.32 (1H, *d*, *J* = 2.1 Hz), des protons d'une double liaison de configuration *trans* à δ(H) 6.07 (1H, *d*, *J* = 16.1 Hz) et 7.40 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz). De plus, le système oléfinique *trans* pourra être celui d'un système *α,β*-insaturé car un des protons est plus déblindé que l'autre;[90] On observe un proton à δ(H) 5.25

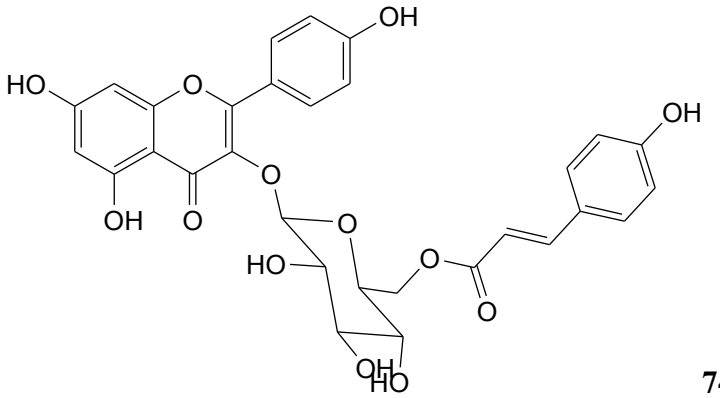
(*d*, *J* = 7.3 Hz) attribuable au proton anomérique de la partie glycosidique. La constante de couplage nous permet de suggérer que notre sucre est le *β*-D-glucopyranoside.



Le spectre APT (Fig. 44) présente un ensemble de 5 pics caractéristiques du glucose entre 64.3 (oxyméthylène) et 78.0 ainsi que le carbone anomérique à *δ*(H) 103.9. On observe également deux carbonyles à *δ*(H) 168.8 correspondant aux carbonyles des systèmes *α,β*-insaturés[90] et à *δ*(H) 179.4 attribuable au carbone C(4) des dérivés de flavonols.89 Partant de l'existence de deux systèmes AA'BB' et des différents fragments, nous pouvons suggérer la sous-structure ci-dessous.



Le carbone C(3) des flavonols apparaissant à δ(C) 135.2 ppm[90] et nous constatons que le proton anomérique entretient une corrélation avec ce carbone suggérant que le glucose est lié à l'aglycone par la fonction éther (C(3)-C(1'')). Une autre corrélation observée entre les protons géminés à *δ*(H)/*δ*(C) 4.30 (1H, m, H-6''a)/64.3, 4.20 (1H, *m*, H-6''b)/64.3 et le carbonyle à *δ*(C) 168.8 montre que le dérivé *α,β*-insaturé a estérifié la partie sucre en position C(6''). Le proton *β* à *δ*(H) 7.40 corrèle avec les carbones aromatiques à *δ*(C) 127.1 et à 131.2. Ce dernier carbone porte le proton à 7.32 ppm qui appartient au second système AA'BB' ainsi, le dérivé estérifiant le sucre est identifié comme étant la coumaroyl. L'ensemble des données spectrales associées à celles de la littérature ont permis d'identifier **LP13** à la *trans*-tiliroside isolé pour la première fois de *Tilia argenta* (Tiliaceae).[90]



74

Tableau 15: Données de RMN ^{1}H (*CD_3OD*, 250 MHz) et ^{13}C (APT) (*CD_3OD*, 62.5 MHz) de *trans*-tiliroside (**LP13)**. (*[a]5: C_5-OH chélaté échangeable au D_2O*).

Position	δ(H)	δ(C)	Littérature[90]
1	-	-	
2	-	159.4	156.2
3	-	135.2	133.0
4	-	179.4	177.2
4a	-	105.6	104.0
5	-	163.0	161
6	6.13 (*d*, *J* = 2.1 Hz)	100.0	98.6
7	-	165.9	164.0
8	6.32 (*d*, *J* = 2.1 Hz)	94.8	93.5
8a	-	158.4	156.3
1’	-	122.7	120.7
2’, 6’	7.99 (2H, *d*, *J* = 8.9 Hz)	132.2	130.5
3’, 5’	6.82 (2H, *d*, *J* = 8.9 Hz)	116.0	114.9
4’	-	161.5	159.8
Glucosyl			
1’’	5.25 (*d*, *J* = 7.3 Hz)	103.9	101.0
2’’	3.50	75.8	74.0
3’’	3.48	78.0	76.2
4’’		75.8	69.9
5’’		71.8	74.1
6’’a ou 6’’b	4.30	64.3	62.8
6’’b ou 6’’a	4.20	64.3	62.8

Coumaroyl			
C=O	-	168.8	165.9
C(α)	6.10 (d, J = 16.0 Hz)	114.7	113.6
C(β)	7.40 (d, J = 16.1 Hz)	146.5	144.2
1’’’	-	127.1	124.8
2’’’, 6’’’	7.32 (2H, d, J = 8.6 Hz)	131.2	129.8
3’’’, 5’’’	6.80 (2H, d, J = 8.5 Hz)	116.8	115.6
4’’’	-	161.2	159.5

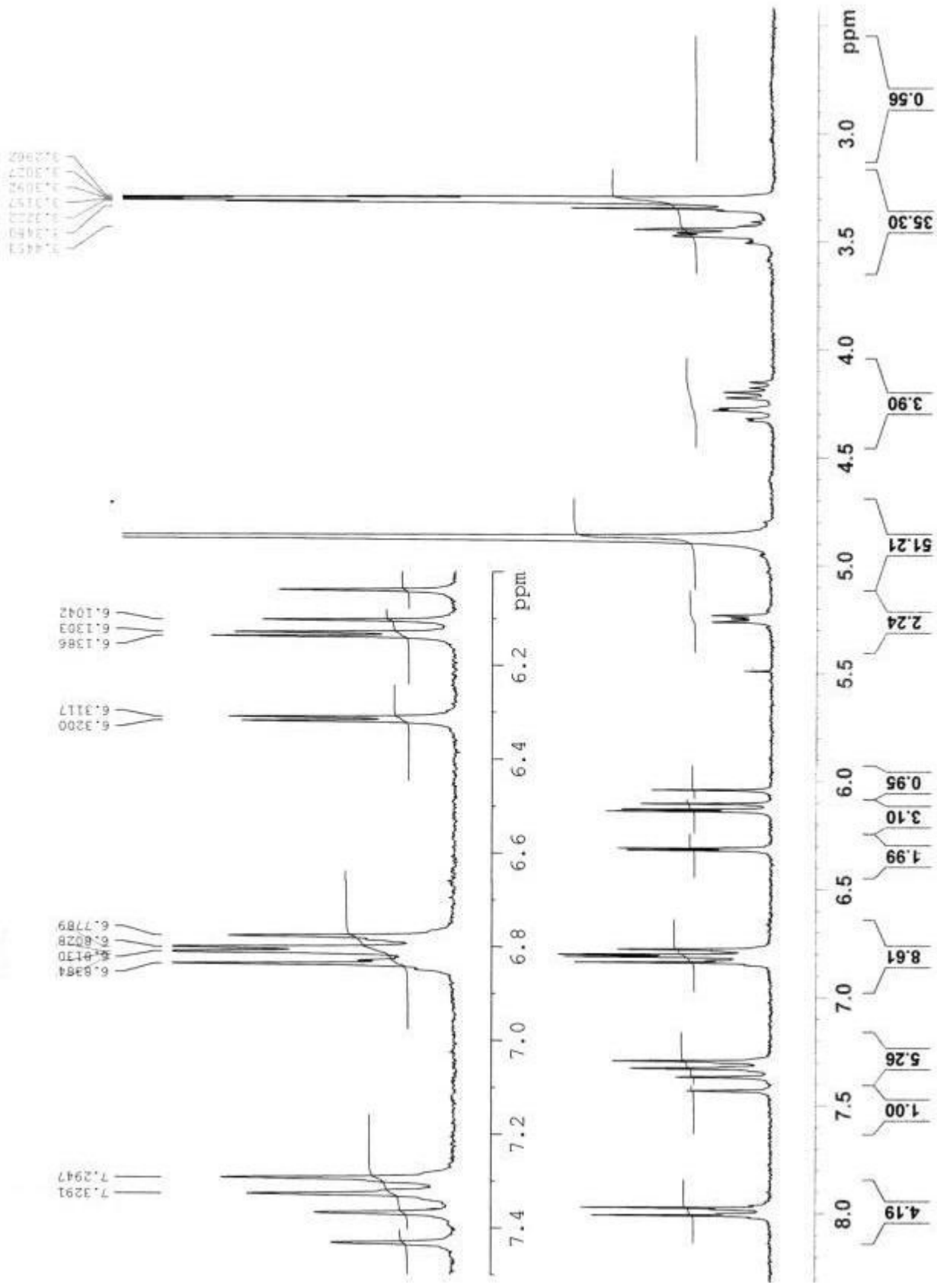


Figure 43: Spectre de RMN ^{1}H (CD_3OD, 250 MHz) de **LP13**

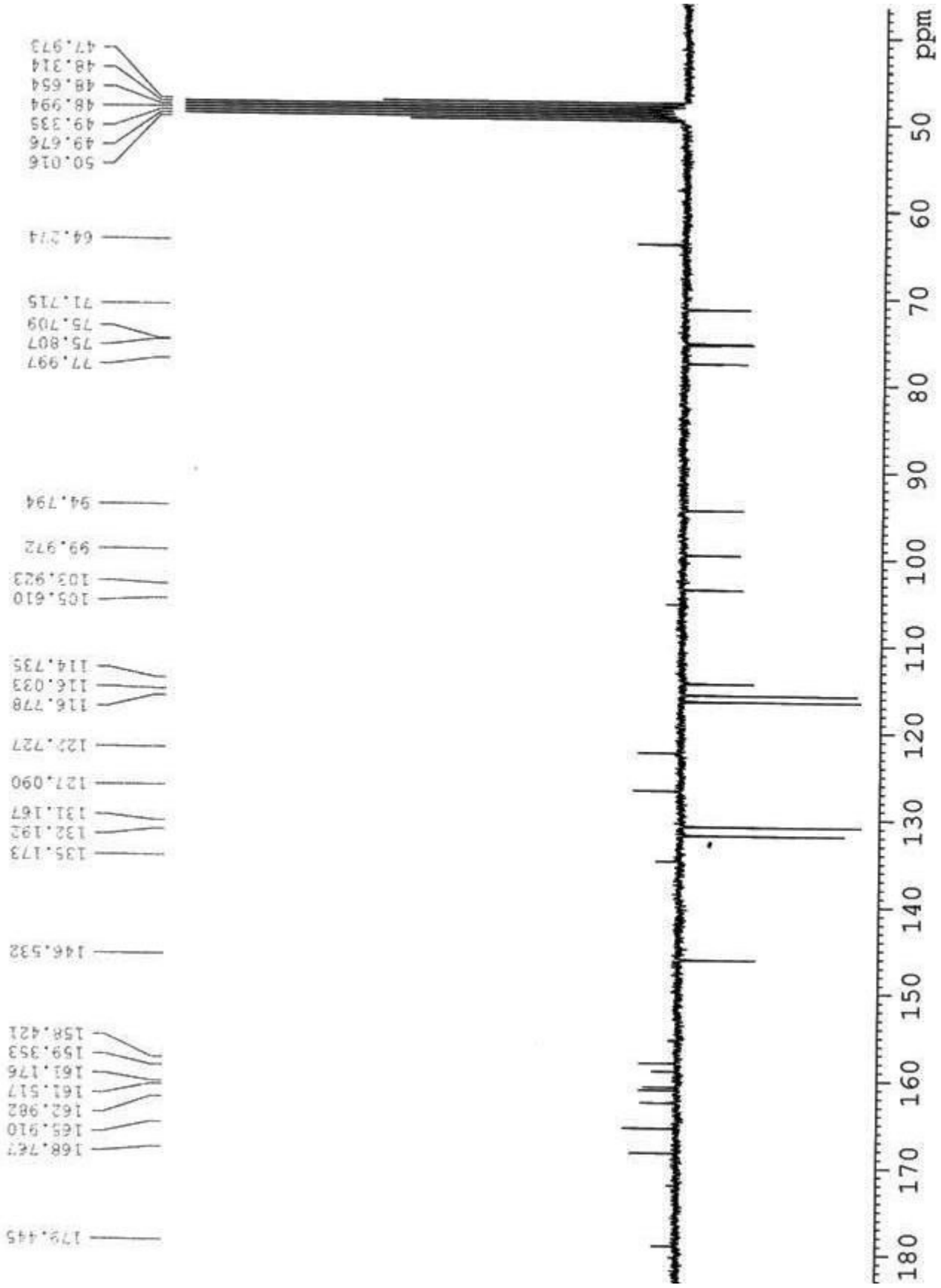


Figure 44: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (CD_3OD, 62.5 MHz) de **LP13**

II.1.2.3/ Triumfettostérol Id (LP14).

Ce composé a été isolé sous forme d'un solide amorphe du mélange de solvants cyclohexane-CH_2Cl_2-AcOEt (92.5-7-0.5). Il donne une coloration bleu vert au test de Liebermann-Burchard caractéristique des stéroïdes. Son spectre IR (Fig. 45) présente des bandes d'absorption intense à 1738 (C=O), 1240 (C-O) cm^{-1} caractéristiques des fonctions carboxyliques.[91]

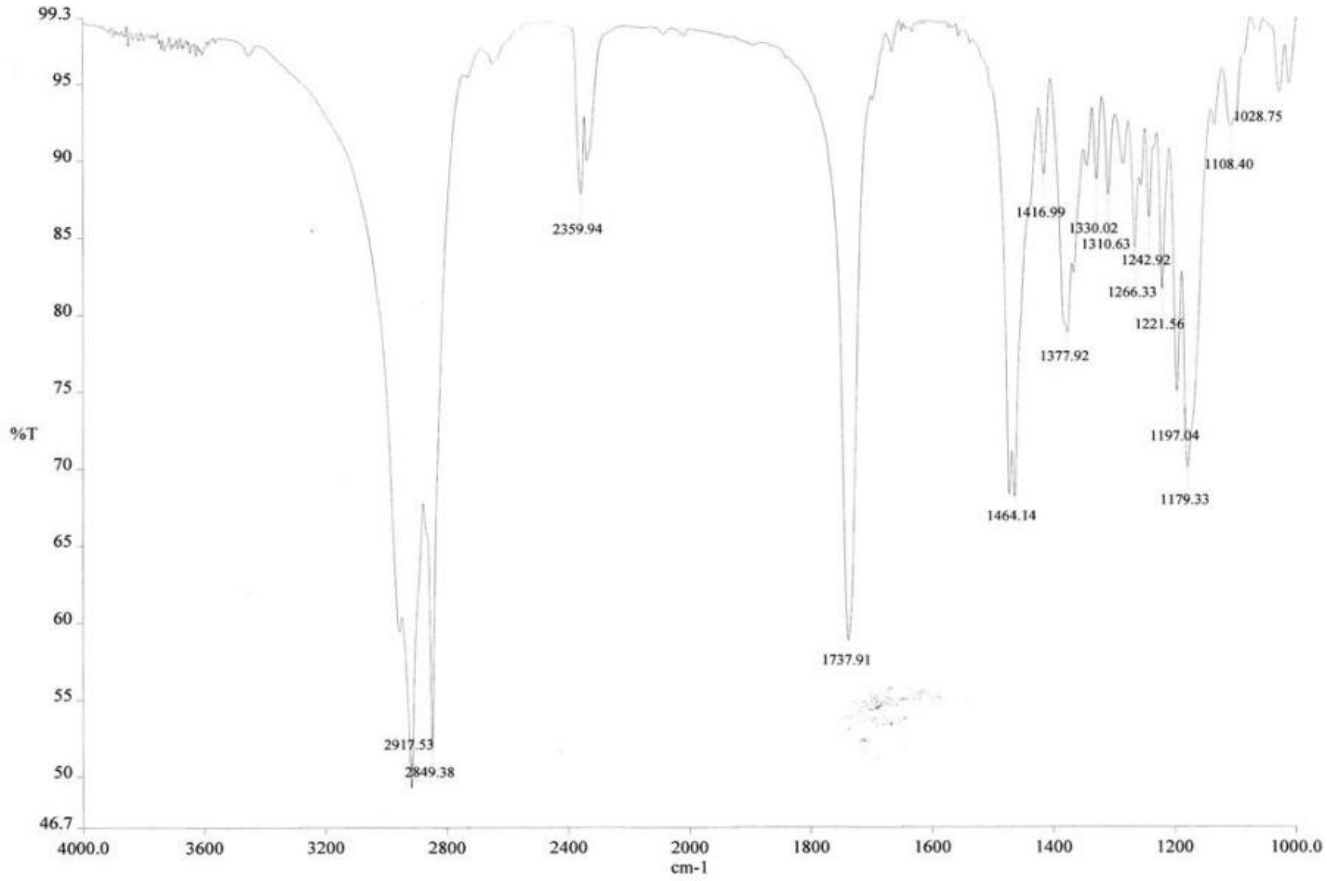


Figure 45: Spectre d'IR de **LP14**

Les spectres RMN ^1H (Fig. 46) et ^{13}C (APT) (Fig. 47) montrent trois signaux caractéristiques et identiques aux signaux des $\Delta^{5,22}$ stéroïdes à δ(H)/δ(C) 5.38 (*sl*, *J* = 5.0 Hz; H-C(6))/122.3; 5.16 (*dd*, *J* = 10.0, 16.7 Hz, H-C(22))/129.4; 5.02 (*dd*, *J* = 10, 16.7 Hz, H-C(23))/137.6; 4.55-4.70 (*m*, H-C(3))/73.7; 1.11-1.20 (*m*, H-C(17))/56.0; 1.02-1.10 (*m*, H-C(14))/56.7; 1.05-1.09 (*m*, H-C(9))/50.0 et 0.95-0.98 (*m*, H-C(24))/45.8.[92] En plus d'un proton deblindé à δ(H)/δ(C) 4.55-4.70/73.7 apparaissant sous forme d'un multiplet et attribuable au proton H-C(3), un autre est observé à δ(H)/δ(C) 4.05 (*t*, *J* = 6.5 Hz)/64.4 indiquant que toutes les deux fonctions alcools seraient liés aux groupements attracteurs. Partant des données ci-dessus, nous pouvons suggérer que le composé **LP14** serait un diester stéroïdique d'acide

gras. L'oxyméthylène à δ(H)/δ(C) 4.05 (*t*, *J* = 6.5 Hz)/64.4 à été localisé sur la base de sa multiplicité car il apparait sous forme d'un triplet et la position C(29) des dérivées de squelette de type stigmasta-5,22-diene serait la seule où un proton pourra apparaitre sous forme d'un triplet. On observe également sur le spectre de RMN ^{1}H les protons des méthyles angulaires H-C(18), H-C(19) à δ(H) 0.80 (*s*) et 1.01 (*s*) respectivement. L'apparition des protons H-C(3), H-C(29) dans les champs faibles suggère que les fonctions alcools sont protégées par des groupements attracteurs. Le manque d'une bande d'absorption autour de 3400 cm^{-1} indique qu'il n'y a pas de fonction alcool libre dans la molécule; de plus la présence des bandes à 1738 et 1240 cm^{-1} confirme que ces fonctions sont estérifiées. Les informations observées sur les spectres RMN ^{1}H et APT viennent appuyer les données présentées précédemment. En effet, on observe des signaux identiques à ceux d'une chaine aliphatique d'acide gras saturé: un triplet à δ(H)/δ(C) [(*t*, 0.70, *J* = 6.7Hz/14.1) Me terminal]; un singulet large [(1.20-1.42/29.0-30.0 $(CH_2)_n$] et deux multiplets [(*t*, 2.27, *J* = 6.8Hz)/33.9 α-methylene]; [(*m*, 1.62)/25.1 β-methylene].[93]

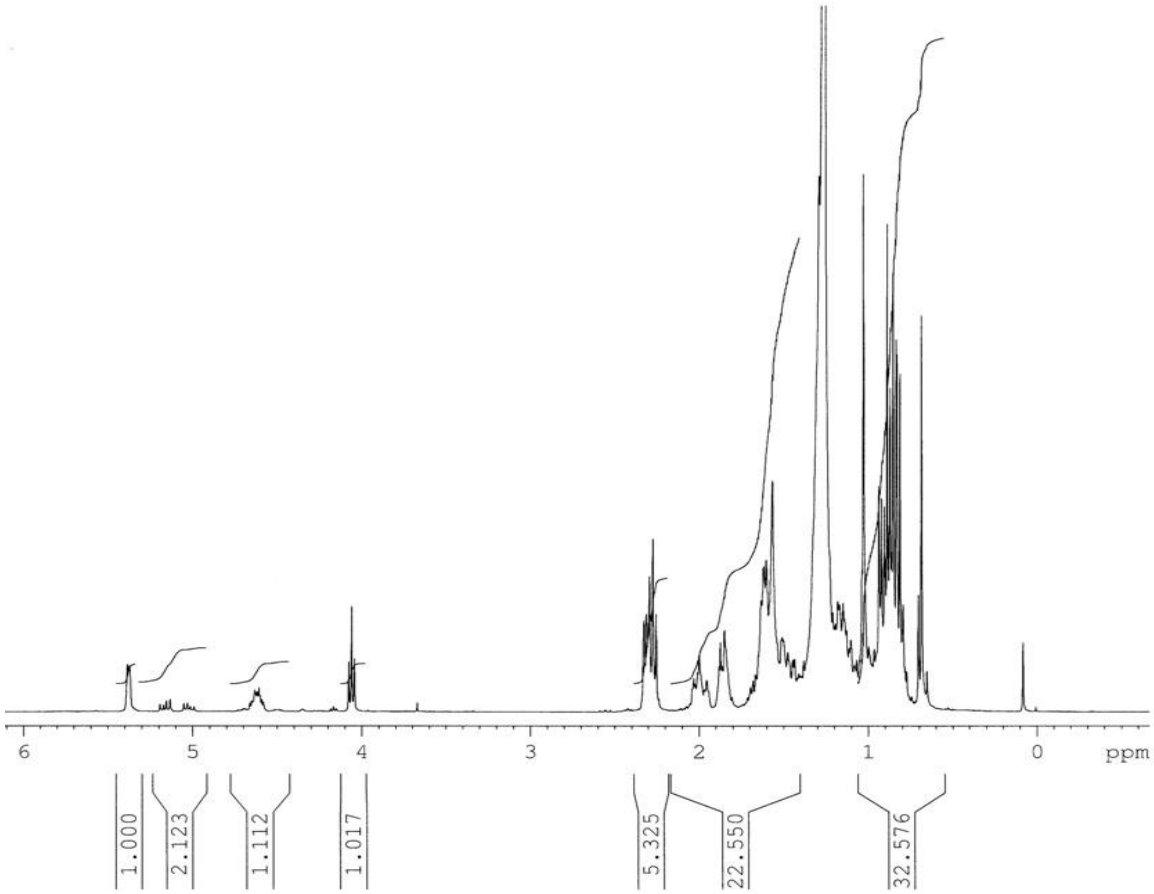


Figure 46: Spectre de RMN ^{1}H de **LP14**

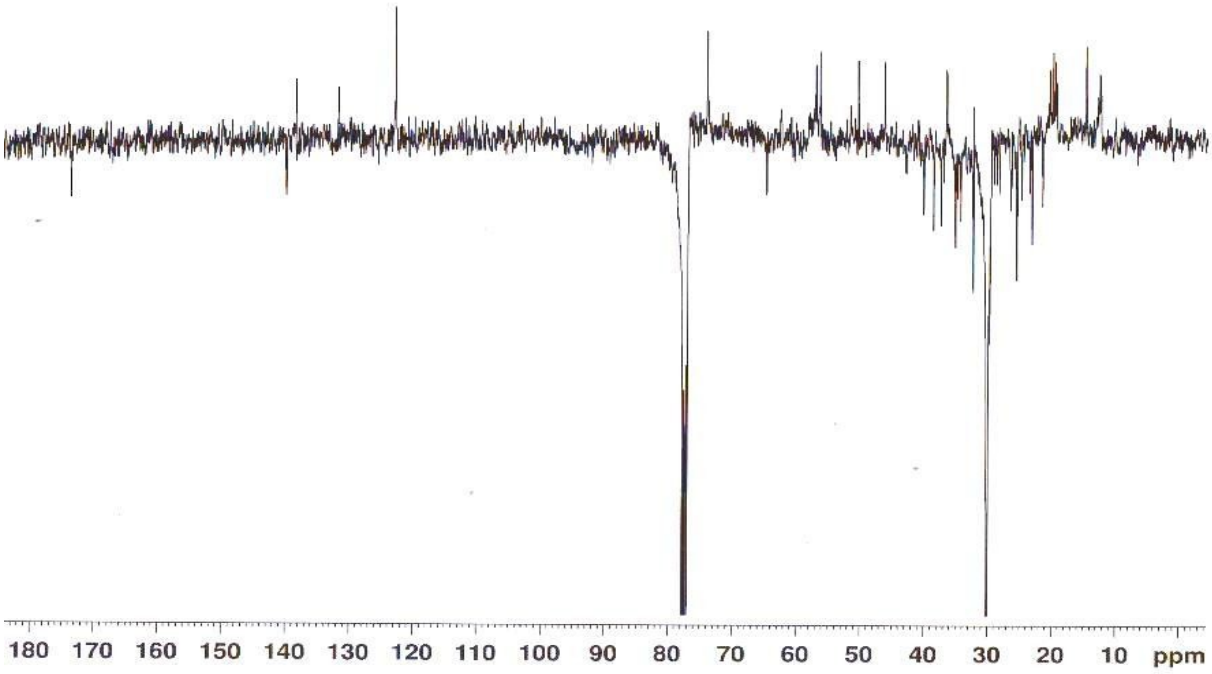


Figure 47: Spectre de RMN ^{13}C (APT) de **LP14**

Quelques corrélations importantes ont été observées sur les spectres de HMBC (Fig. 48) et COSY (Fig. 49) lesquels montrent une interaction entre l'oxymethylène à δ(H)/δ(C(29)) 4.05/64.4 et le carbonyle à δ(C) 173.3 confirmant que le carbone C(29) est estérifié. Les protons H-C(6) à δ(H) 5.38 et H-C(3α) à δ(H) 4.62 donne une corrélation avec celui à δ(H) 2.32 correspondant au proton H-C(4); H-C(6) corrèle avec le proton H-C(7β) à δ(H) 2.00; H-C(3α) donne aussi une tâche de corrélation avec H-C(2α) à δ(H) 1.62 et H-C(2β) à δ(H) 1.79. Les corrélations entre H-C(29) à δ(H) 4.05 avec les protons H-C(28α) à δ(H) 1.62 et H-C(28β) à δ(H) 1.32 confirment le fait que la fonction carbonyle ne soit pas dans le squelette stéroïdique mais plutôt dans une longue chaine aliphatique greffée à ce squelette. Cette observation est appuyée par les corrélations observées à la fois entre le méthylène des acides gras et le carbonyle ainsi qu'avec l'amas de méthylènes qui à son tour corrèle avec le méthyle terminal.

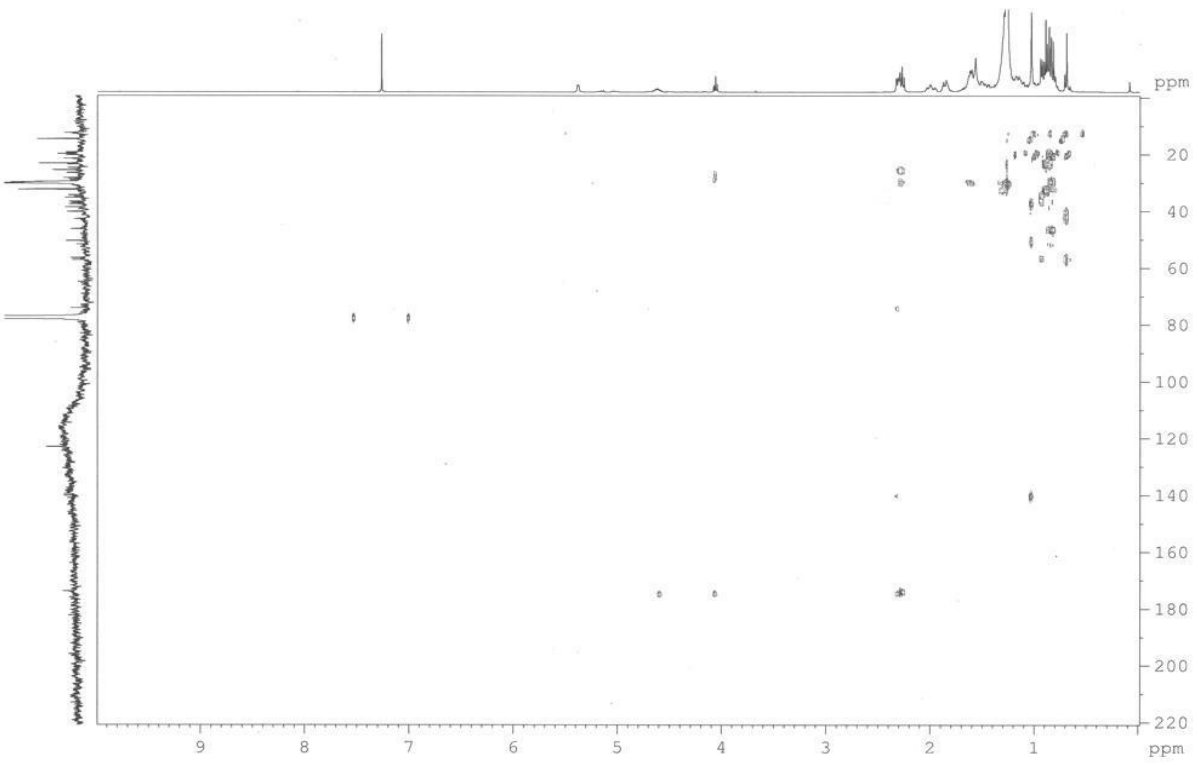


Figure 48: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMBC) de **LP14.**

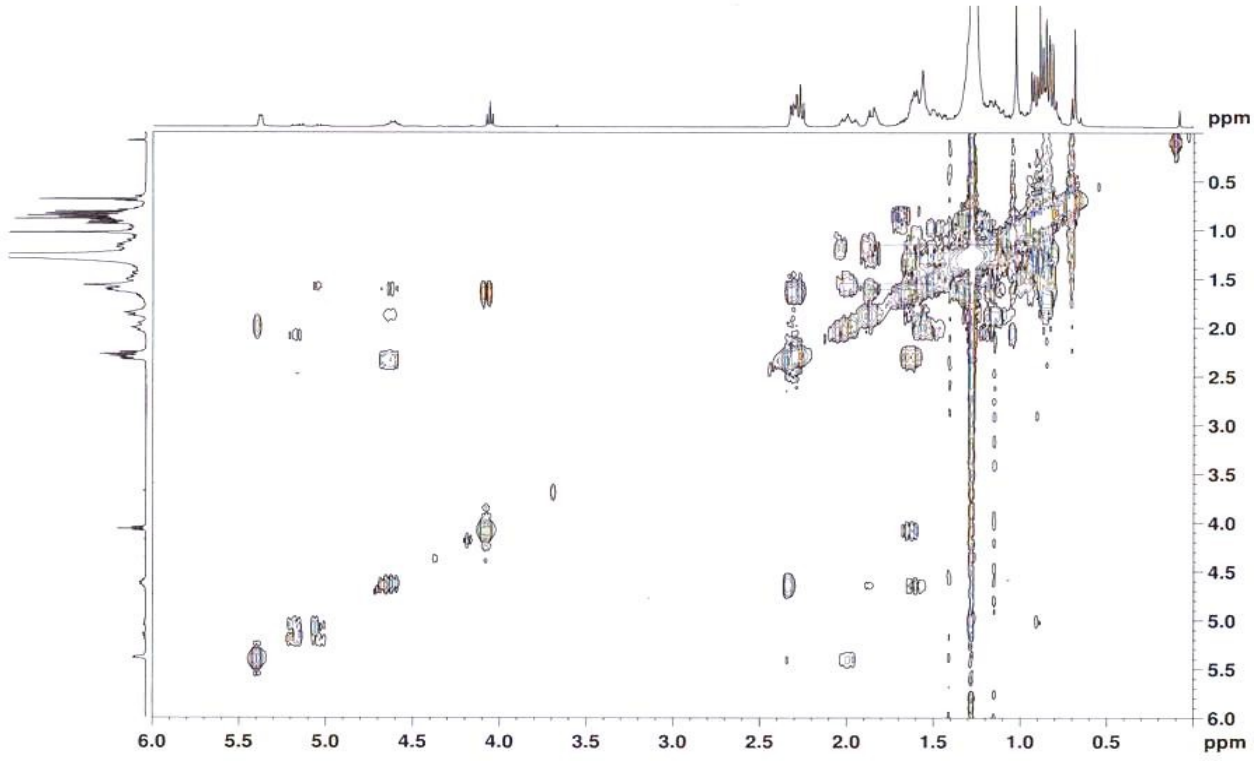


Figure 49: Spectre de corrélation ^{1}H-^{1}H (COSY) de **LP14**

Pour vérifier la structure de base stéroïdique et identifier les chaines aliphatiques d'acide gras, une méthanolyse (0.9 N HCl-MeOH/70°C/18h)[90] a été faite donnant l'ester méthylique d'acide gras et une stéroïde. Les constituants du mélange ont été identifiés par LC-ESISM (Fig. 50) comme étant l'acide triacontanoate de méthyle et le stigmasta-5,22-diene-3β,29-diol. La seconde chaine a été déduite comme étant un ester propanoyle.

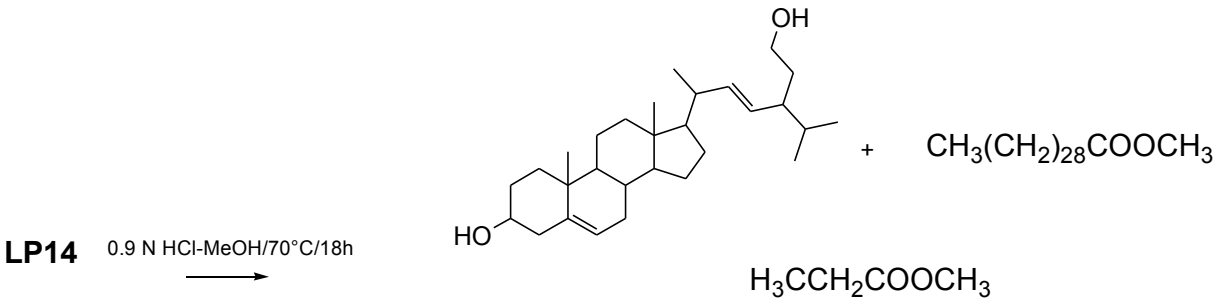


Schéma 16: Réaction de méthanolyse de **LP14**

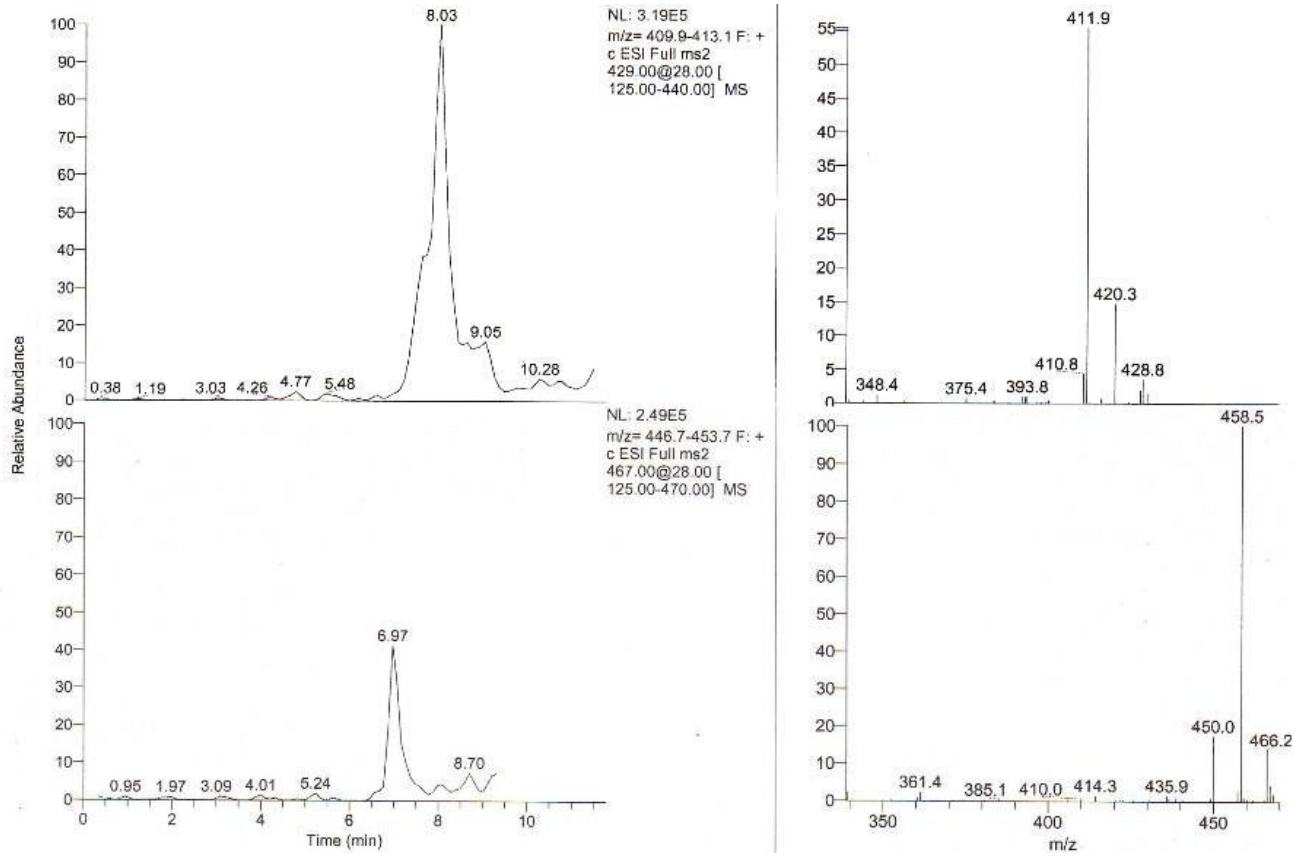


Figure 50: Spectre de LC-ESI de la phase organique issue de la méthanolyse de **LP14**

LP14 a été soumis à une coupure oxydative (schéma 16) (OsO_4 quantité catalytique-$NaIO_4$ 4eq/pyridine 2 eq, dioxane-eau 3:1)[94] pour définir la position exacte des deux acides.

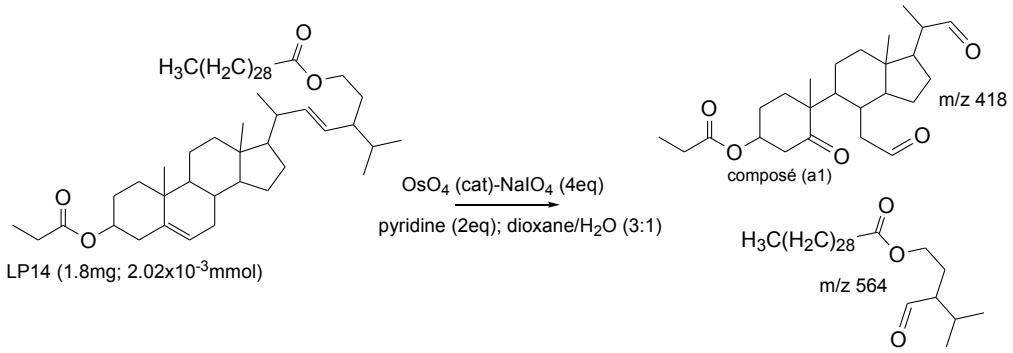


Schéma 17: Coupure oxydative de **LP14** par OsO_4-$NaIO_4$

L'analyse par spectrométrie de masse (DIC et MALDI-TOF) (Fig. 51) de la phase organique obtenue après traitement de la réaction, nous a donnée trois pics à *m/z* 419 $[418+H]^+$, 441 $[418+Na]^+$ et 457 $[418+K]^+$ montrant que la longue chaine d'acide gras est liée à la chaine latérale du stigmata-5,22-diene-3*β*,29-diol et le fragment propanoyl en position 3.

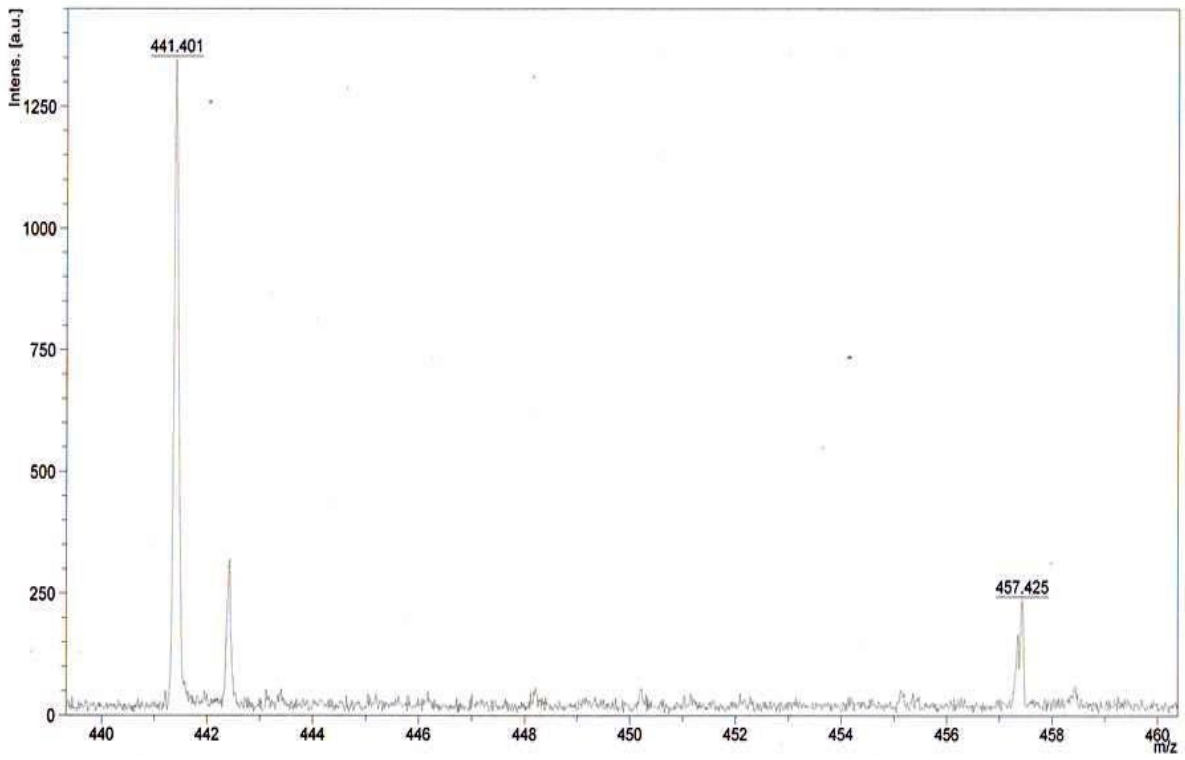
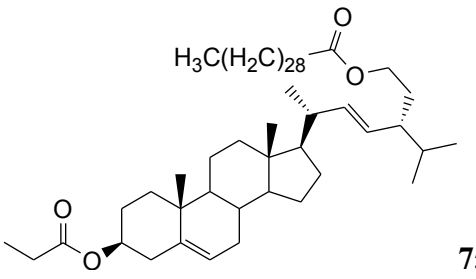


Figure 51: Spectre de masse MALDI-TOF de la phase organique issue de la coupure oxydative de **LP14**

Le spectre LC-ESISM (Fig. 52) du composé montre le pic à 918 correspondant au temps de rétention 9.78 minutes. Ce spectre apporte une information qui, ajoutée à l'ensemble des données présentées ci-dessus permettent d'identifier le diester stéroïdique, comme étant le 29-triacontanoyl-3*β*-propanoylstigmasta-5,22-diene-3,29-diol encore appelé triumfettostérol isolé ici pour la première fois.



75

Tableau 16: Données de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 400 MHz) du composé **LP14**

Position	*δ (H)*	Position	*δ (H)*	Position	*δ (H)*
1	1.90-2.00 (*m*)	12	1.98-2.20 (*m*)	23	5.02 (*dd*, *J* = 10.0; 16.7 Hz)
	1.00-1.20 (*m*)		1.10-1.20 (*m*)	24	1.59-1.61 (*m*)
2	1.80-1.90 (*m*)	13	-	25	1.40-1.60 (m)
	1.55-1.64 (*m*)	14	1.00-1.05 (*m*)	26	0.90 (*d*, *J* = 9.7 Hz)
3	4.55-4.70 (*m*)	15	0.80-0.90 (*m*)	27	0.83 (*d*, *J* = 9.7 Hz)
4	1.55-1.65(*m*) 2.30-2.34 (*m*)		1.30-1.40 (*m*)	28	1.15-1.20 (*m*)
5	-	16	1.10-1.30 (*m*)		1.35-1.45 (*m*)
6	5.40 (br *d*, *J* = 5.0 Hz)		1.62-1.75 (*m*)	29	4.05 (*t*, *J* = 6.5 Hz)
7	2.01-2.04 (*m*)	17	1.12 (br *s*)	*Fatty acyl*	
	1.42-1.45 (*m*)	18	0.80 (*s*)	1’ and 1’’	-
8	1.30-1.50 (*m*)	19	1.01 (*s*)	2’ and 2’’	2.27 (*t*, *J* = 4.2 Hz)
9	1.05-1.09 (*m*)	20	1.95-2.00 (*m*)	3’ and 3’’	1.62-1.65 (*m*)
10	-	21	1.00-1.10 (*m*)	$(CH_2)_n$	1.20-1.42 (br *s*)
11	1.40-1.50 (*m*) 1.52-1.55 (*m*)	22	5.16 (*dd*, *J* = 10.0; 16.7 Hz)	30’’	0.70 (*t*, *J* = 6.7 Hz)

Tableau 17: Déplacements chimiques de RMN ^{13}C (*$CDCl_3$*, 100 MHz) du composé **LP14**

Position	*δ (C)*	Position	*δ (C)*	Position	*δ (C)*	Position	*δ (C)*	Position	*δ (C)*
1	37.0	**8**	31.9	**15**	24.3	**22**	137.6	**29**	64.4
2	31.9	**9**	50.0	**16**	28.2	**23**	129.4	***Acide gras***	
3	73.7	**10**	36.6	**17**	56.0	**24**	45.8	**1’ et 1’’**	173.3
4	31.9	**11**	21.0	**18**	11.8	**25**	29.1	**2’ et 2’’**	33.9
5	139.7	**12**	39.7	**19**	19.3	**26**	19.8	**3’ et 3’’**	25.1
6	122.6	**13**	42.3	**20**	36.1	**27**	19.0	**$(CH_2)_n$**	29.1-29.7
7	31.9	**14**	56.7	**21**	18.8	**28**	27.8	**30’’**	14.2

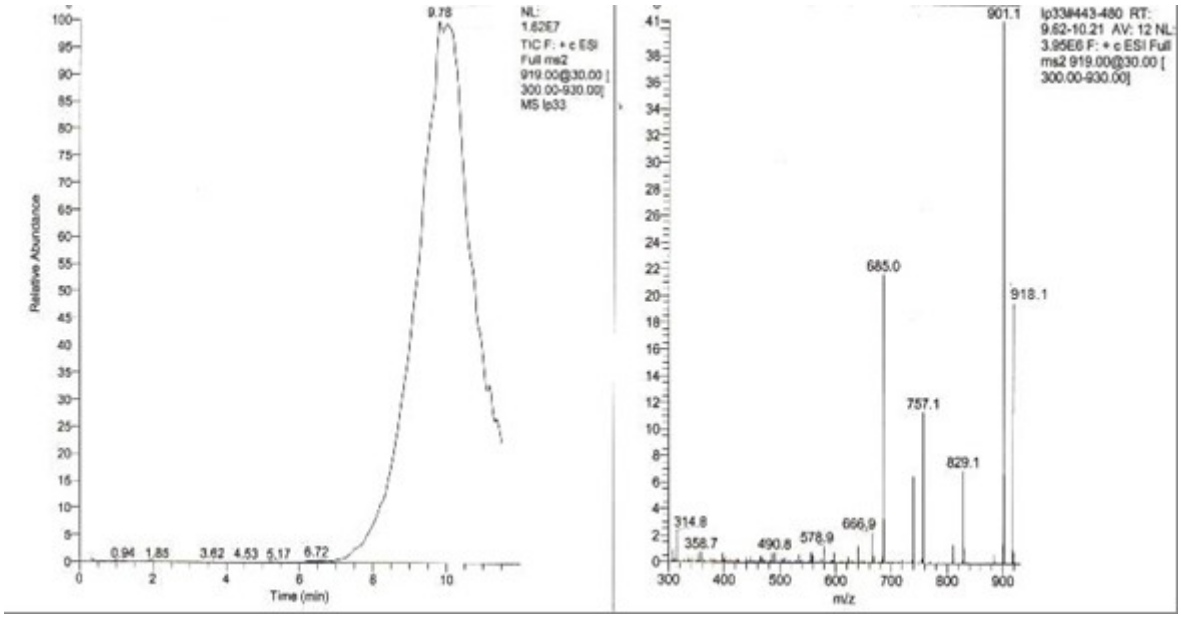


Figure 52: Spectre de LC-ESI de **LP14**

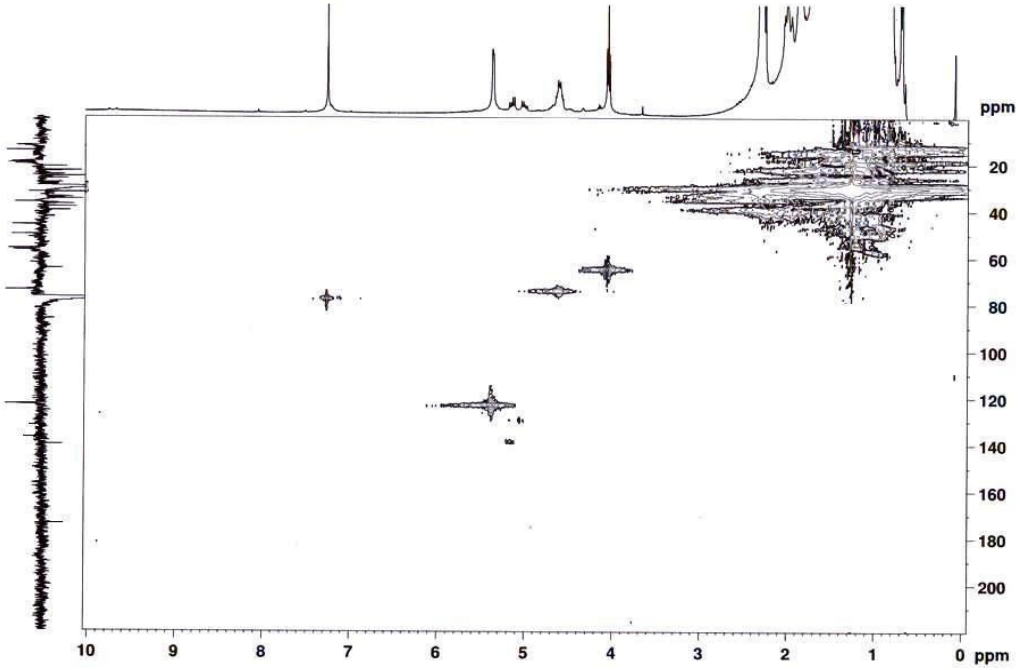


Figure 53: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMQC) de **LP14**

II.1.2.4/ Triumfettosaponine (LP15).

LP15 a été isolé sous forme de poudre blanche du mélange CH_2Cl_2-MeOH (7-1). Il répond positivement aux tests de Liebermann-burchard et de Molish caractéristiques des triterpènes saponines. Son spectre de masse à haute résolution ESI-FTICR (Fig. 54) exhibe le pic de l'ion *pseudo*-moléculaire à *m/z* 1369.8031 (masse théorique calculée: 1369.8031) en mode positif correspondant à la formule brute $[C_{75}H_{116}O_{22}+H]^+$ comptant pour 18 degrés d'insaturation.

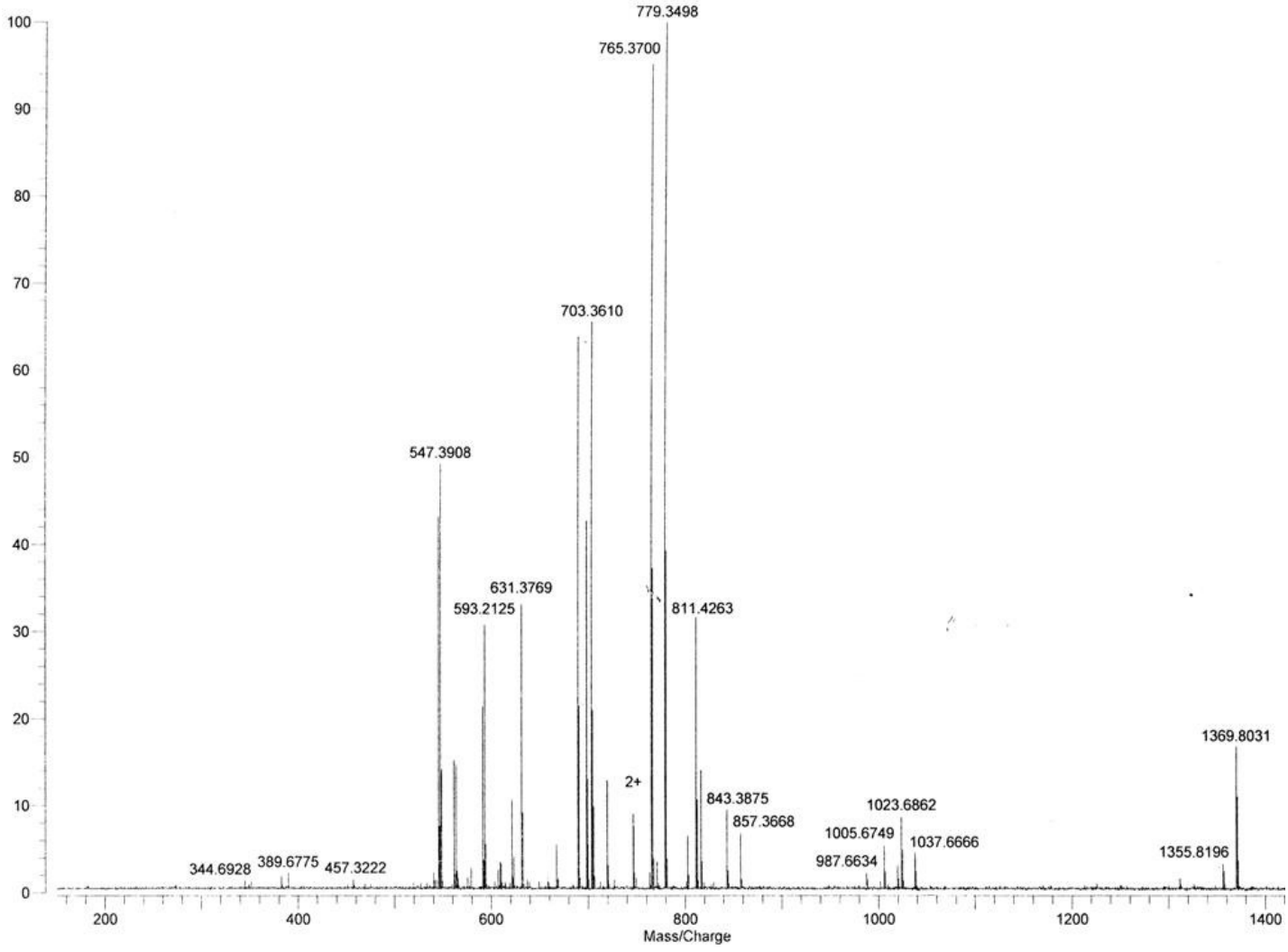


Figure 54: Spectre de masse à haute résolution en ESI-FTICR de **LP15**

La présence des hydroxyles (3396 cm^{-1}), des fonctions esters (1734 cm^{-1}), liaisons oléfiniques (1648 cm^{-1}) a été observée sur le spectre IRTF (Fig. 55).

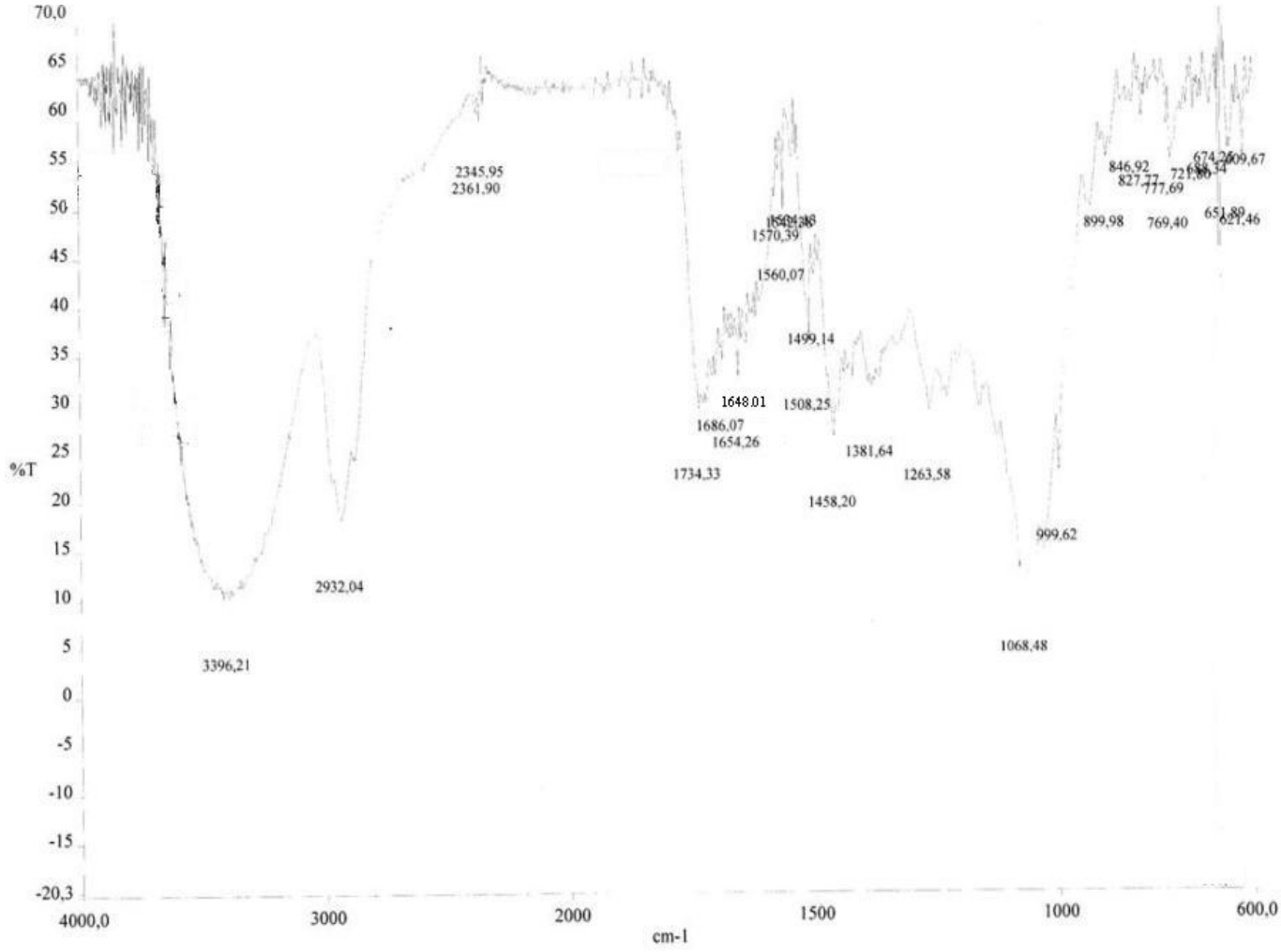
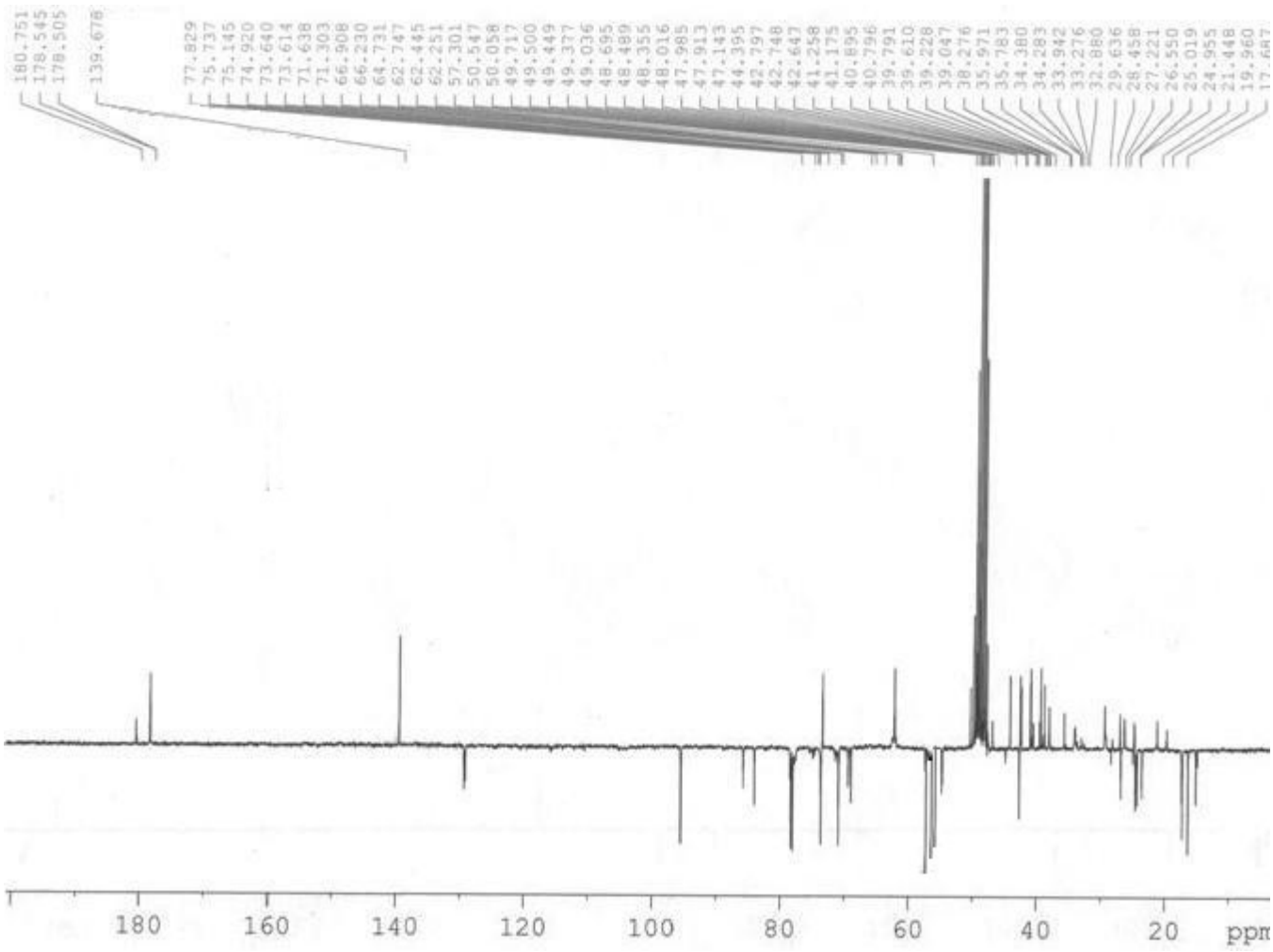
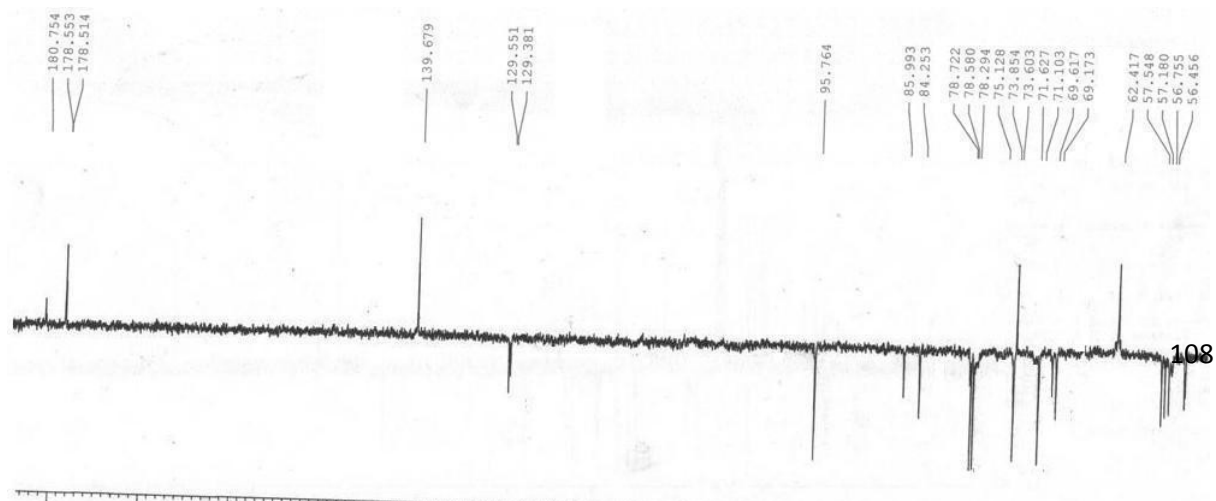


Figure 55: Spectre IR de **LP15**

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 56) montre la plupart des pics en pair et d'autres avec une forte intensité suggérant que le composé **LP15** serait un dimère de triterpène. Ses spectres de RMN-^{1}H (Fig. 57) et APT montrent neuf singulets de méthyle et trois doublets de méthyle (J = 7.6 Hz). De plus quatre doublets à δ(H)/δ(C) 5.39 (1H, J = 9.6 Hz)/95.8, 5.38 (1H, J = 9.6 Hz)/95.8, 5.32 (1H, J = 2.4 Hz)/129.6 et 5.30 (1H, J = 2.4 Hz)/129.4 sont observés suggérant la présence de deux protons anomériques[95] et de deux protons oléfiniques dans la partie aglycone. Ces spectres révèlent aussi la présence de trois méthoxyles entre 3.76-3.83 ppm/δ(C) 57.5, 57.2, 56.8 liés à la molécule par des liaisons éther[96] car ceux-ci seraient apparus autour de 51 ppm s'ils étaient liés à la molécule par une fonction ester.95 Quatre fonctions carboxyliques à δ(C) (178.5, 178.6, 178.6, 180.8), un signal intense de carbone

quaternaire à δ(C) 139.7 couplé au doublet de carbones Sp2 δ(C) 129.4 et 129.6 sont également observées suggérant que **LP15** est un dimère de Δ^{12} ursène ayant trois méthoxyles et deux β-D-glucosyles.


180.751
178.545
178.505
139.678
77.829
75.737
75.145
74.920
73.640
73.614
71.638
71.303
66.908
66.230
64.731
62.747
62.445
62.251
57.301
50.547
50.058
49.717
49.500
49.449
49.377
49.036
48.695
48.489
48.355
48.016
47.985
47.913
47.143
44.395
42.797
42.748
42.647
41.258
41.175
40.895
40.796
39.791
39.610
39.228
39.047
38.276
35.971
35.783
34.380
34.283
33.942
33.276
32.880
29.636
28.458
27.221
26.550
25.019
24.955
21.448
19.960
180
160
140
120
100
80
60
40
20
ppm


180.754
178.553
178.514
139.679
129.551
129.381
95.764
85.993
84.253
78.722
78.580
78.294
75.128
73.854
73.603
71.627
71.103
69.617
69.173
62.417
57.548
57.180
56.755
56.456

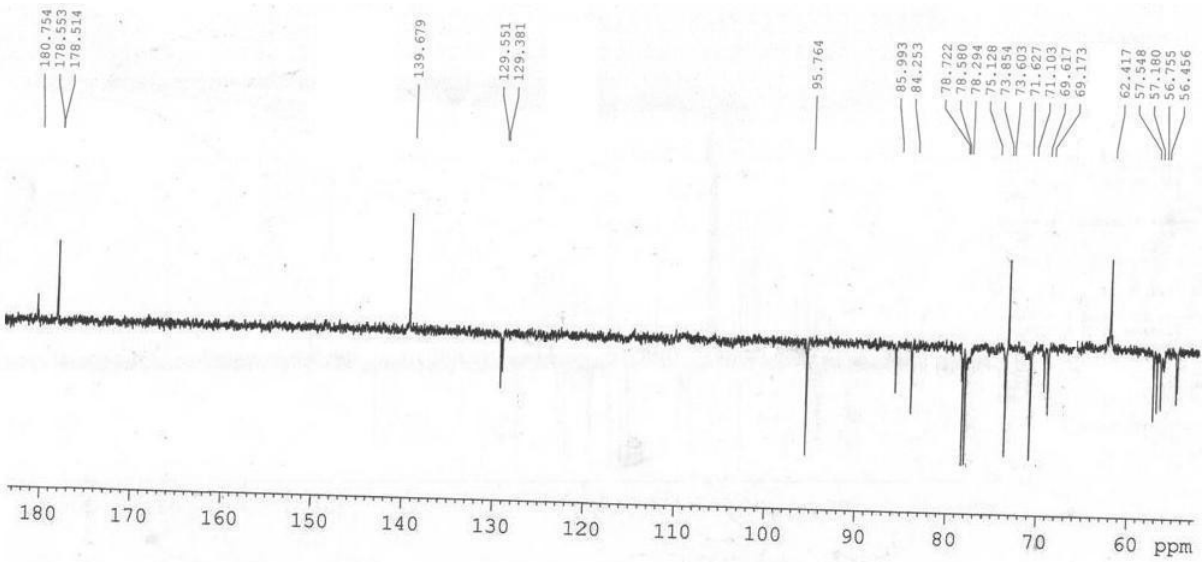
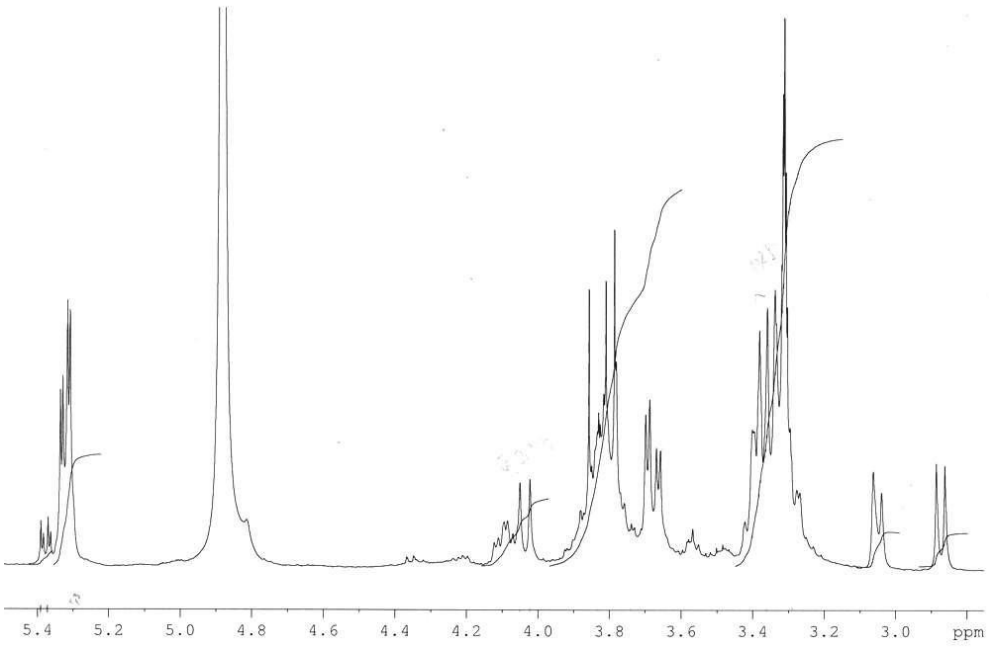


Figure 56: Spectre APT de **LP15**



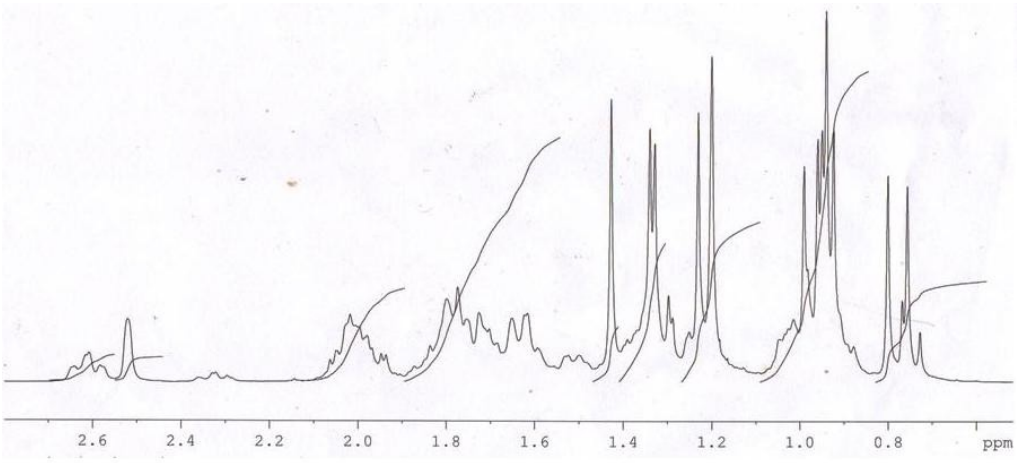


Figure 57: Spectre de RMN ^{1}H de **LP15**

Le spectre HMBC (Fig. 58) présente des corrélations importantes entre le signal de proton à δ(H)/δ(C) 2.90 (1H, *d*, *J* = 9.7 Hz)/84.3 et les carbones à δ(C) 69.2, à δ(C) 180.8 et à δ(C) 24.6; le signal du proton à δ(H)/δ(C) 3.05 (1H, *d*, *J* = 9.7 Hz)/86.0 montre une tache de corrélation avec l'oxyméthine à δ(C) 69.6 et le méthyle à δ(C) 23.8 suggérant que les deux unités triterpèniques sont des dérivées de l'acide 2α,3β-dihydroxyurs-12-ene-24,28-dioique[97] liées par une fonction ester entre l'oxyméthine à δ(C) 84.3 et le carbonyle à δ(C) 180.8. En plus de ces corrélations, d'autres sont observées entre les protons anomériques et les fonctions carbonyles à δ(C) 178.6, entre le singulet large à δ(H) 2.52 et l'alcool tertiaire à δ(C) 73.6 correspondant au carbone C(19α) des dérivés de l'acide tormentique.97

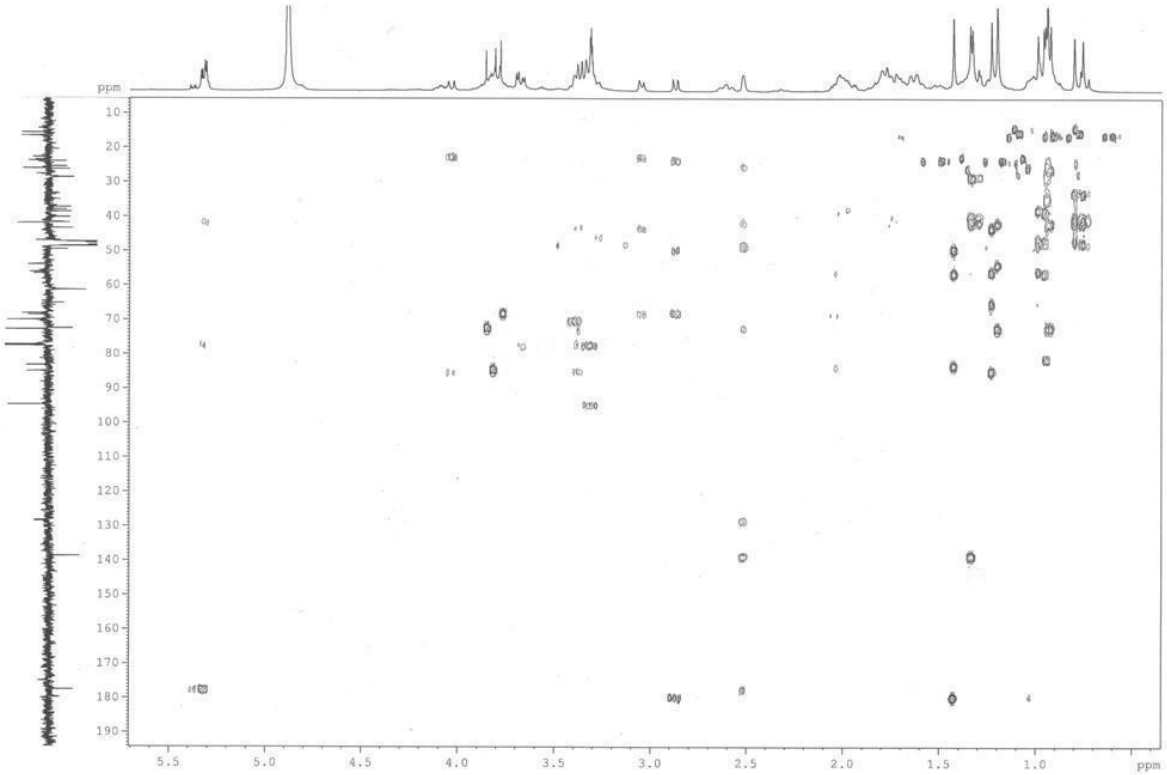


Figure 58: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMBC) de **LP15**

La position des unités de sucre a été définie grâce aux informations obtenues sur le spectre de masse. En effet, le spectre de masse à haute résolution en ESI montre des pics importants à *m/z* 779.3498 $[C_{39}H_{54}O_{16}+H]^+$ (masse théorique calculée: 779.3485) et 765.3700 $[C_{39}H_{56}O_{15}+H]^+$ (masse théorique calculée: 765.3692) justifiant que les deux unités de sucres sont estérifiées sur la même unité de triterpène en position C(24) et C(28) (schéma 20). Le mécanisme Retro-Diels-Alder (schéma 21) appliqué à la molécule donne l'ion fragment à *m/z* 259.1703 $[C_{17}H_{23}O_2]^+$ (calcul: 259.1693) confirmant la présence de la fonction éther en position C(19α).

Afin d'identifier les deux triterpènes liés par une fonction ester, **LP15** a été saponifié par une solution aqueuse de $LiOH.H_2O$ 1 N dans le mélange THF/MeOH (6:1) donnant trois composés qui ont été détectés respectivement à *m/z* (temps de rétention: minute) 181.0 (11.03), 502.1 (8.47) et 560.4 (10.28) par chromatographie liquide haute performance liée à un spectromètre de masse et identifiés au glucose, à l'acide 2α,3β-dihydroxyurs-12-ene-24,28-dioique et à l'acide 2α,3β,19α-trimethoxyurs-12-ene-24,28-dioique.

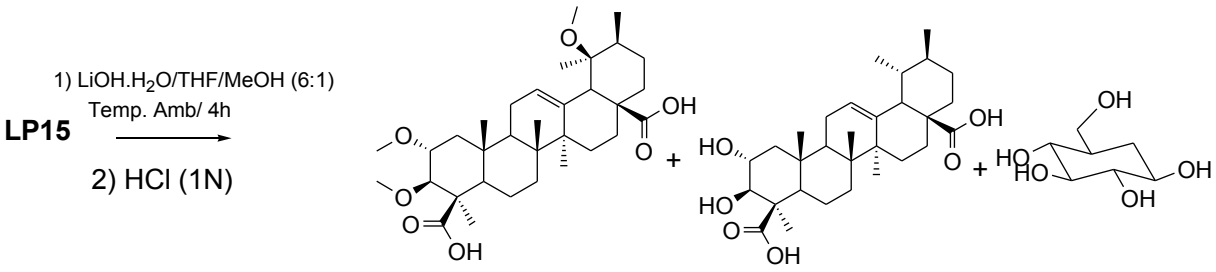
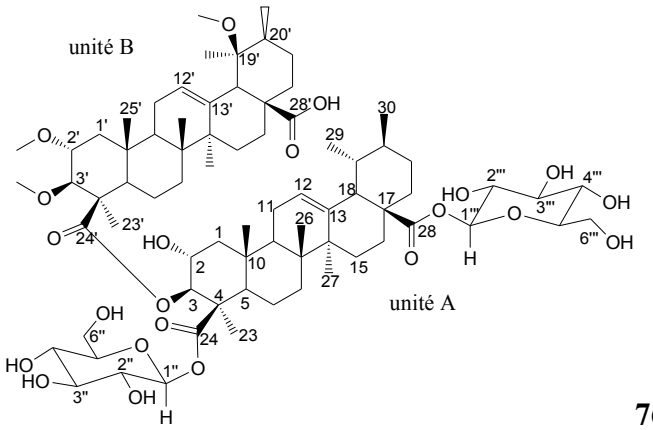


Schéma 18: Réaction de saponification de **LP15**

La combinaison de toutes ces données permet d'identifier ce composé comme étant l'acide 2*α*,3*β*,19*α*-trimethoxyurs-12-ene-24,28-dioique-24-[(2*α*,3*β*)-24,28-bis(*β*-*D*-glucopyranosyloxy)-2-hydroxy-24,28-dioxours-12-en-3-yl] ester ou triumfettosaponine isolé ici pour la première fois.



76

Tableau 18: Données de RMN ^{1}H (*CD_3OD*, 400 MHz) du Composé **LP15**

[a]1	2.02-2.10 (1H, *m*),	18	2.55 (1H, *s*)	[a]1'	2.00-2.10 (1H, *m*),	18'	3.05 (1H, *d*, *J* = 9.6 Hz)
	0.92 (1H, *dd*, *J* = 3.8, 15.2 Hz)	20	1.35-1.40 (1H, *m*)		0.92 (1H, *dd*, *J* = 3.8, 15.2 Hz)	19'	1.39 (br *d*, *J* = 3.8 Hz)
2	3.70-3.80 (1H, *m*)	21	1.45-1.50 (1H, *m*); 1.78-1.80 (1H, *m*)	2'	4.09 (1H, *ddd*, *J* = 4.8, 9.6, 9.6 Hz)	20'	1.31 (br *d*, *J* = 3.8 Hz)
3	3.05 (1H, *d*, *J* = 9.6 Hz)	22	1.74-1.76 (1H, *m*)	3'	2.90 (1H, *d*, *J* = 9.6 Hz)	21'	1.32-1.40 (1H, *m*)
[b]5	0.96-1.05 (1H, *m*)	23	2.02 (3H, *s*)	[b]5'	0.92-1.05 (1H, *m*)	22'	1.30-1.40 (1H, *m*);
6	1.75-1.82 (1H, *m*)	25	1.02 (3H, *s*)	6'	1.29-1.32 (1H, *m*)	[a]23'	1.43 (3H, *s*)
7	1.29-1.35 (1H, *m*); 1.36-1.42 (1H, *m*)	26	0.82 (3H, *s*)	7'	1.25-1.40 (1H, *m*); 1.54-1.69 (1H, *m*)	25'	1.23 (3H, *s*)
9	1.90-2.00 (1H, *m*)	27	1.35 (3H, *s*)	9'	1.72-1.80 (1H, *m*)	27'	1.34 (3H, *s*)
11	1.90-2.00 (2H, *m*)	29	1.21 (3H, *s*)	11'	1.90-2.05 (1H, *m*)	29'	1.01-1.04 (3H, *m*)
12	5.32 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz)	30	0.93 (3H, br *s*)	12'	5.30 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz)	30'	0.77 (3H, br *s*)
15	1.78-1.82 (1H, *m*),	[c]2-OCH_3	3.80 (3H, *s*)	15'	1.20-1.30 (1H, *m*); 2.01-2.10 (1H, *m*)		
16	1.64 (1H, *br. d*, *J* = 11.4 Hz)	[c]3-OCH_3	3.85 (3H, *s*)	16'	1.75-1.82 (1H, *m*); 2.10-2.10 (1H, *m*)		
		[c]19-OCH_3	3.87 (3H, *s*)				
Glucosyl							
1''	5.39 (1H, *d*, *J* = 9.6 Hz)			1'''	5.38 (1H, *d*, *J* = 9.6 Hz)		
[d]2''	3.35 (1H, *dd*, *J* = 9.6, 9.2 Hz)			[d]2'''	3.35 (1H, *dd*, *J* = 9.6, 9.2 Hz)		

3''	3.43 (1H, br *d*, *J* = 9.2 Hz)	3'''	3.39 (1H, *dd*, *J* = 9.2 Hz)
[a]4''	3.40 (1H, br *d*, *J* = 9.2 Hz)	[c]4'''	3.40 (1H, br *d*, *J* = 9.2 Hz)
5''	3.34 (1H, br *d*, *J* = 9.2 Hz)	5'''	3.33 (1H, br *d*, *J* = 9.2 Hz)
[c]6''	3.80-3.90 (1H, *m*)	[c]6'''	3.80-3.90 (1H, *m*)
	3.68 (1H, *dd*, *J* = 4.8, 12.0 Hz)		3.68 (1H, *dd*, *J* = 4.8, 12.0 Hz)

[a ,b,c,d] *signaux chevauchants*

Tableau 19: Données de RMN ^{13}C (*CD_3OD*, 100 MHz) du Composé **LP15**

Position	δ (C) unité A	Position	δ (C) unité A	Position	δ (C) unité B	Position	δ (C) unité B
1	47.9	18	55.1	1'	47.1	16'	26.5
2	69.6	19	73.6	2'	69.2	17'	49.4
3	86.0	20	42.8	3'	84.3	18'	55.2
4	50.5	21	27.3	4'	49.7	19'	42.8
5	56.8	22	39.0	5'	56.5	20'	42.7
6	21.4	[a]23	23.8	6'	20.0	21'	26.6
7	34.4	24	180.8	7'	34.3	22'	36.0
8	41.3	25	17.8	8'	41.2	[a]23'	24.6
9	47.2	26	17.7	9'	46.7	24'	178.6
10	39.0	27	25.0	10'	38.3	25'	15.2
11	25.0	28	178.5	11'	25.0	26'	16.7
12	129.6	29	27.2	12'	129.4	27'	24.8
13	139.7	30	16.6	13'	139.7	28'	178.6
14	42.7	2-OCH_3	57.2	14'	42.6	29'	16.7
15	29.6	3-OCH_3	57.3	15'	29.6	30'	24.8
16	27.2	19-OCH_3	57.8				
17	49.5						
Glucosyl							
[a]1''	95.8			[a]1'''	95.8		
[b]2''	73.6			[b]2'''	73.6		
[c]3''	78.7			3'''	78.0		
[d]4''	71.3			[d]4'''	71.3		
[c]5''	78.7			[c]5'''	78.7		
[c]6''	62.4			[c]6'''	62.4		

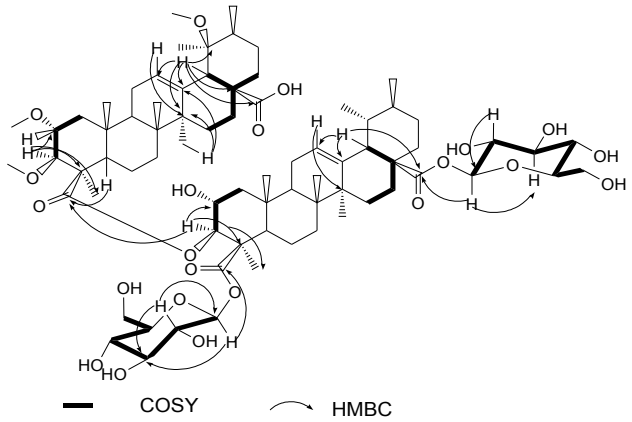


Schéma 19: Quelques corrélations proton-proton et proton-carbone à distance

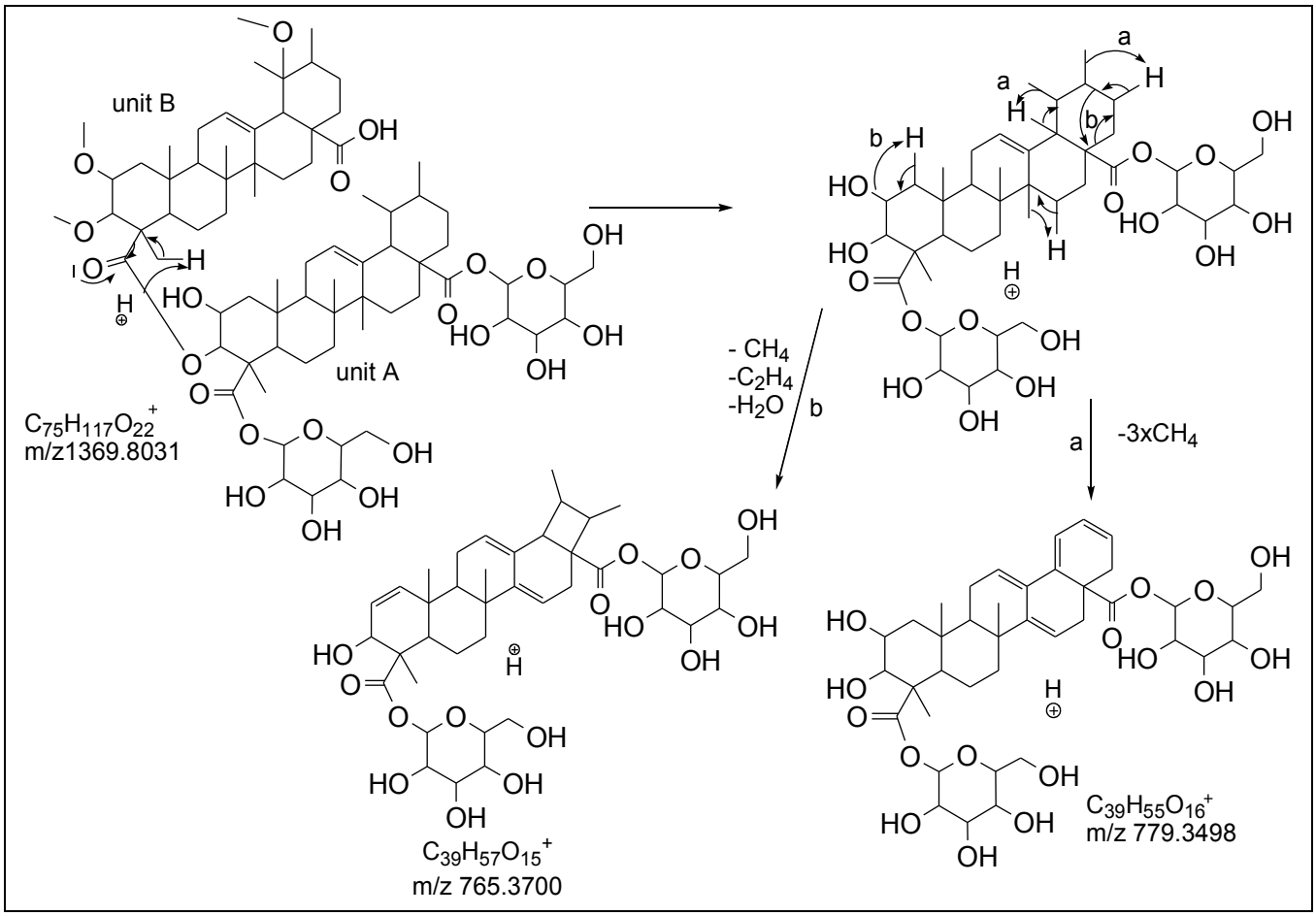


Schéma 20: Ions fragments donnant la position des sucres.

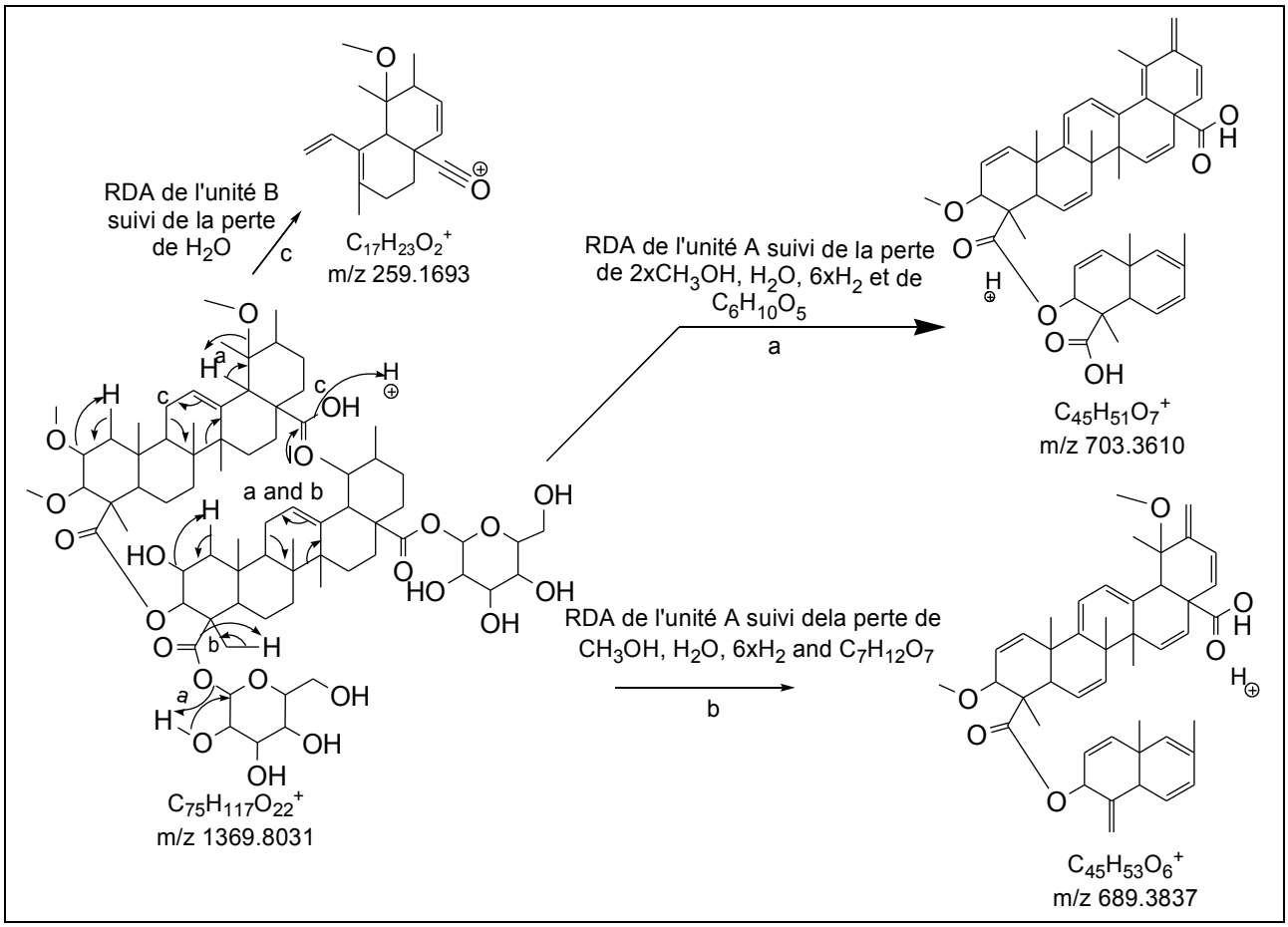


Schéma 21: Quelques ions fragments issus de masse en tandem 1369.

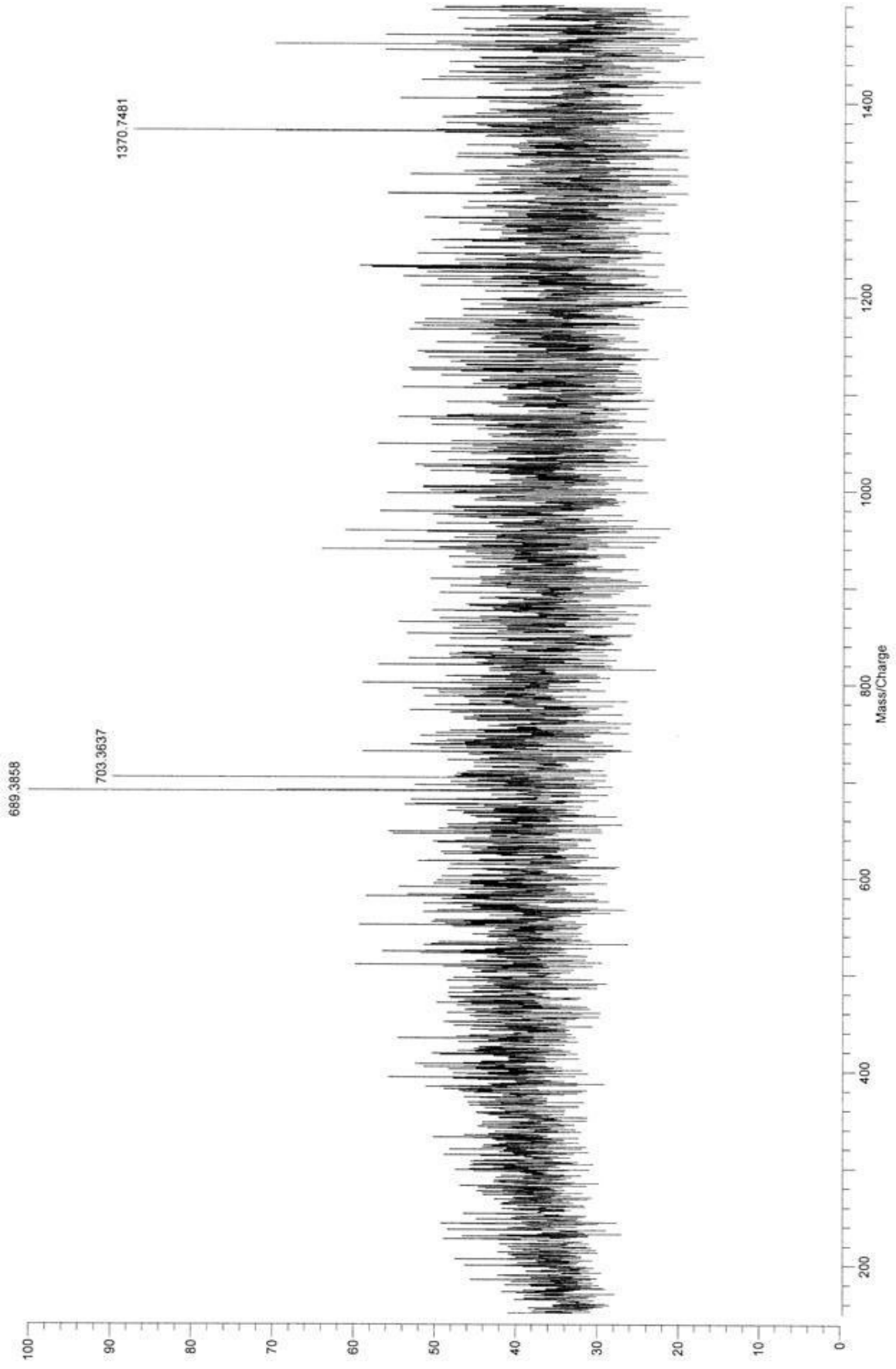


Figure 59: Spectre de masse en tandem du pic à m/z 1369.8031 de **LP15**

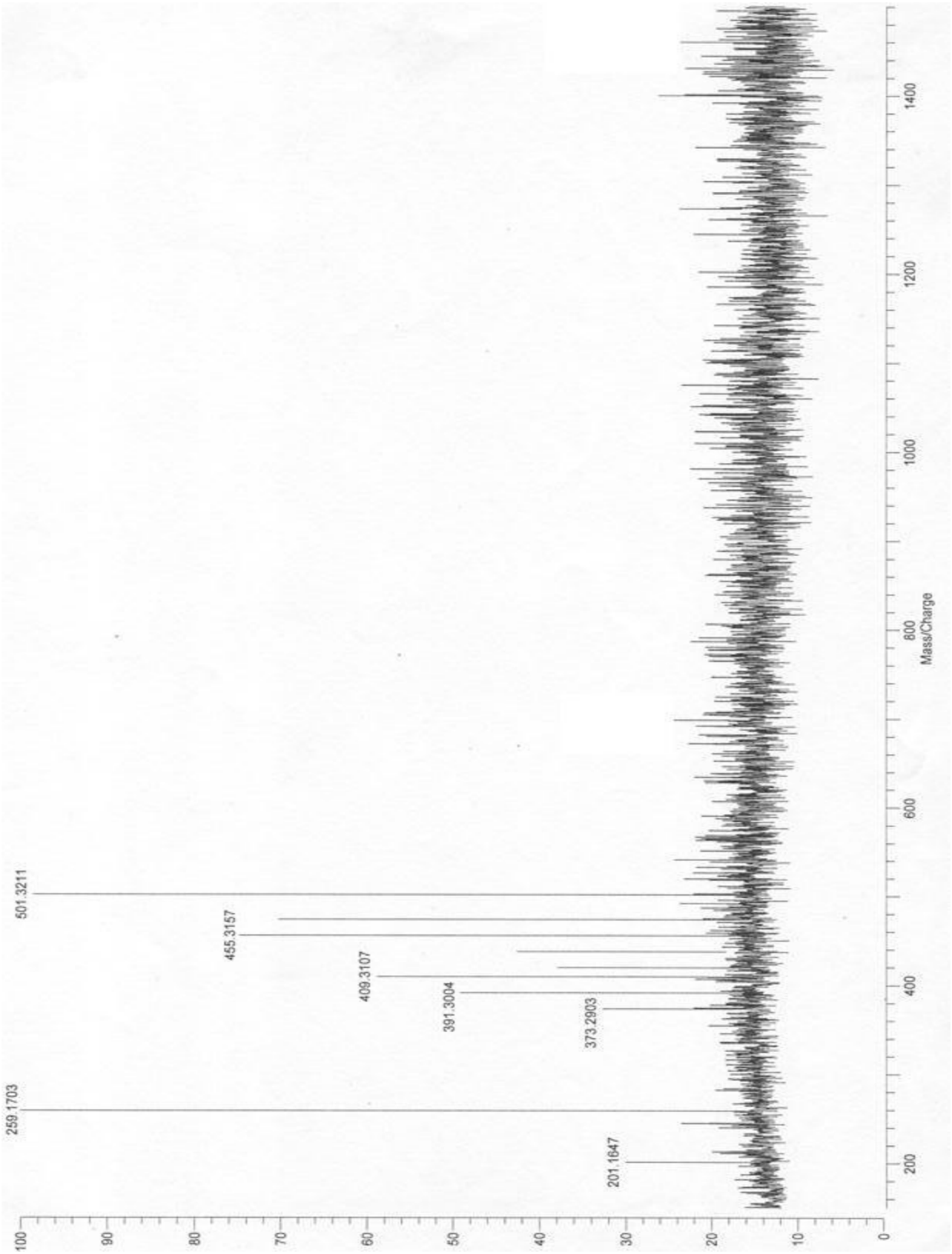


Figure 60: Spectre de masse en tandem du pic à m/z 1369.8031 de **LP15**

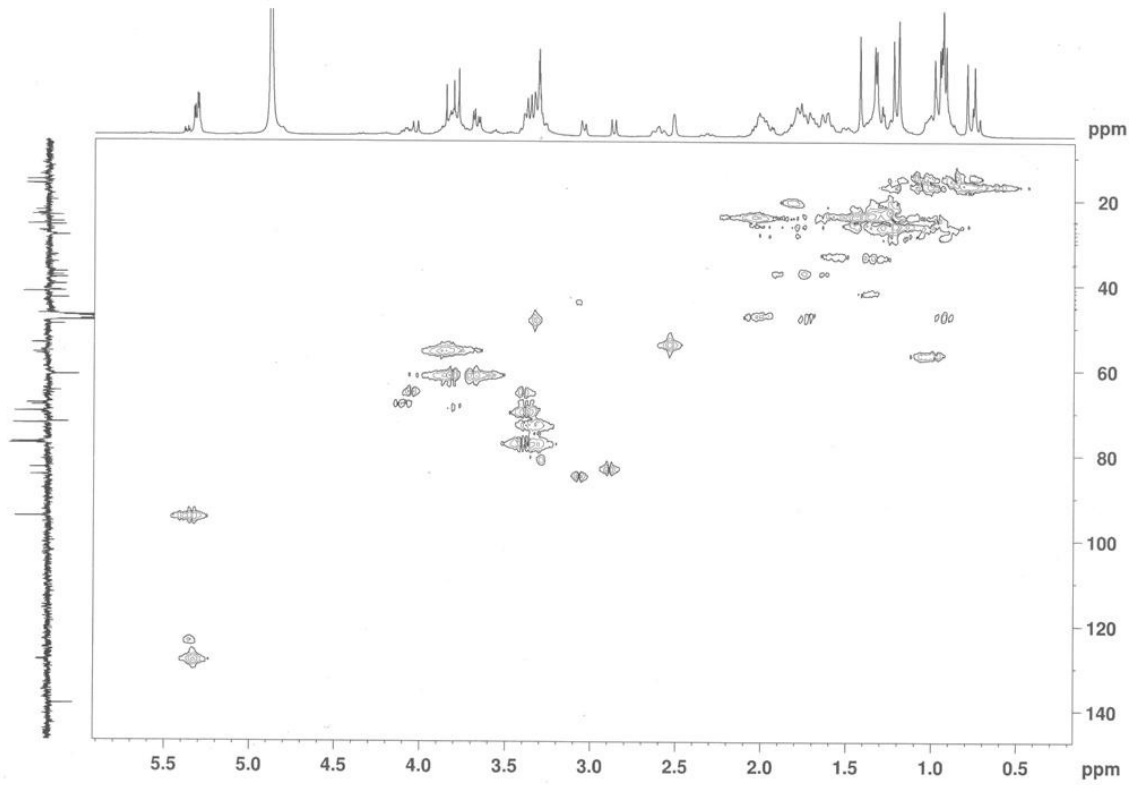


Figure 61: Spectre de corrélation ^{1}H-^{13}C (HMQC) de **LP15**

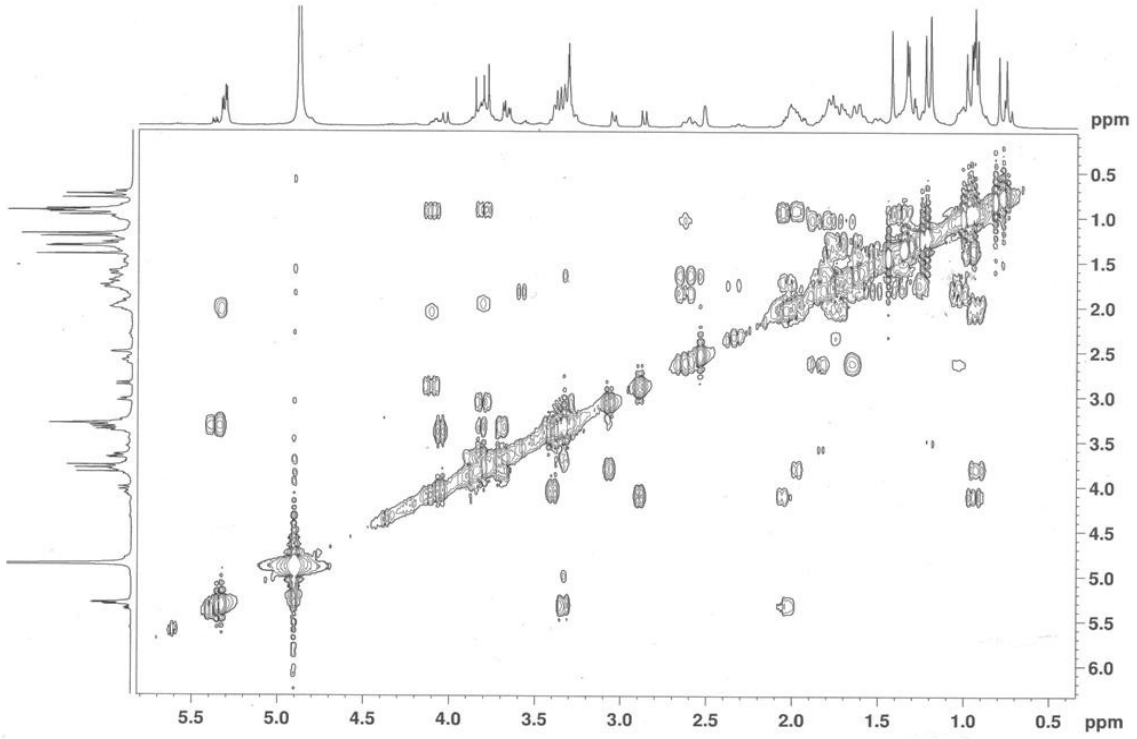


Figure 62: Spectre de corrélation ^{1}H-^{1}H (COSY) de **LP15**

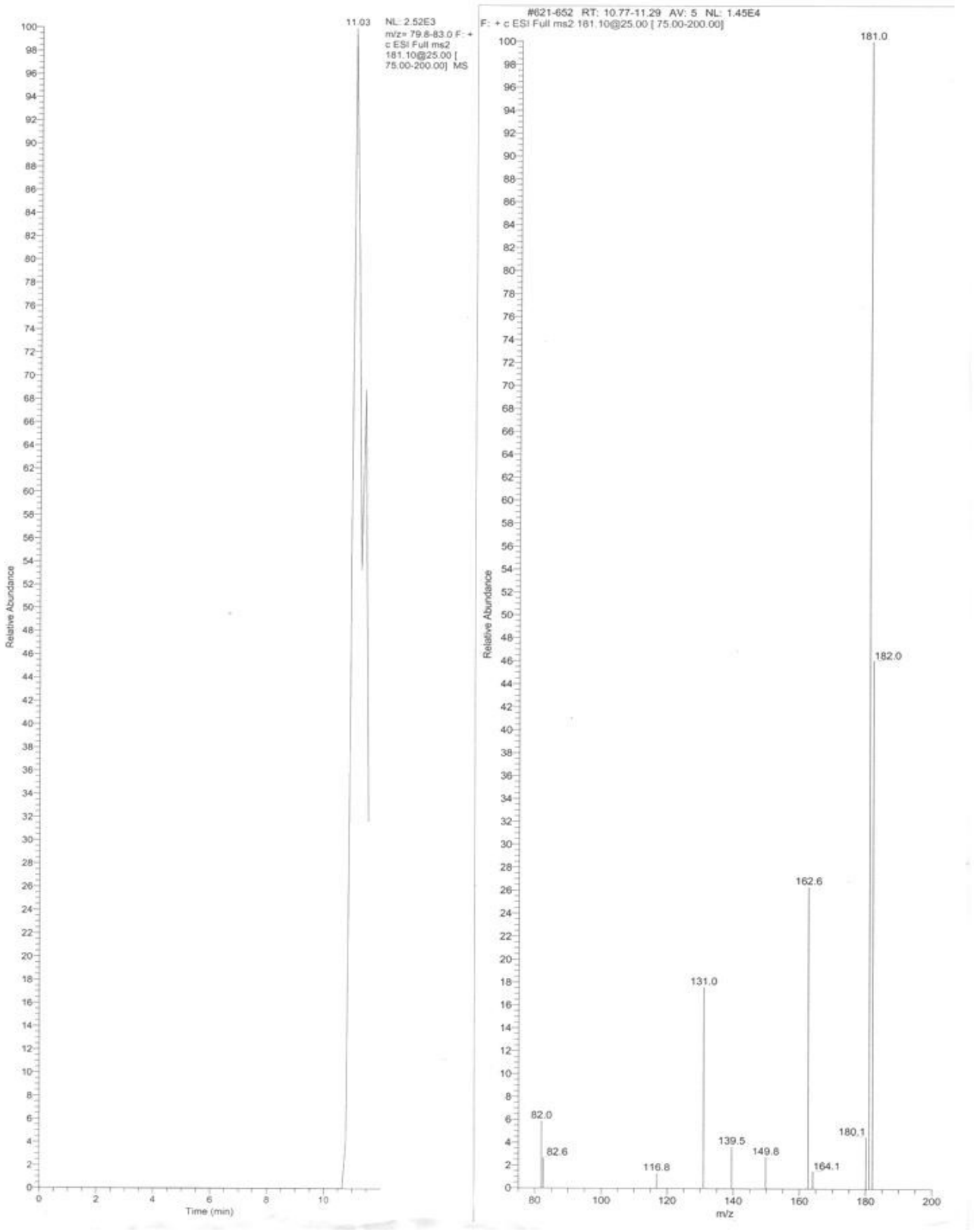


Figure 63: Spectre de LC-ESI de la solution issue de l'hydrolyse alcaline

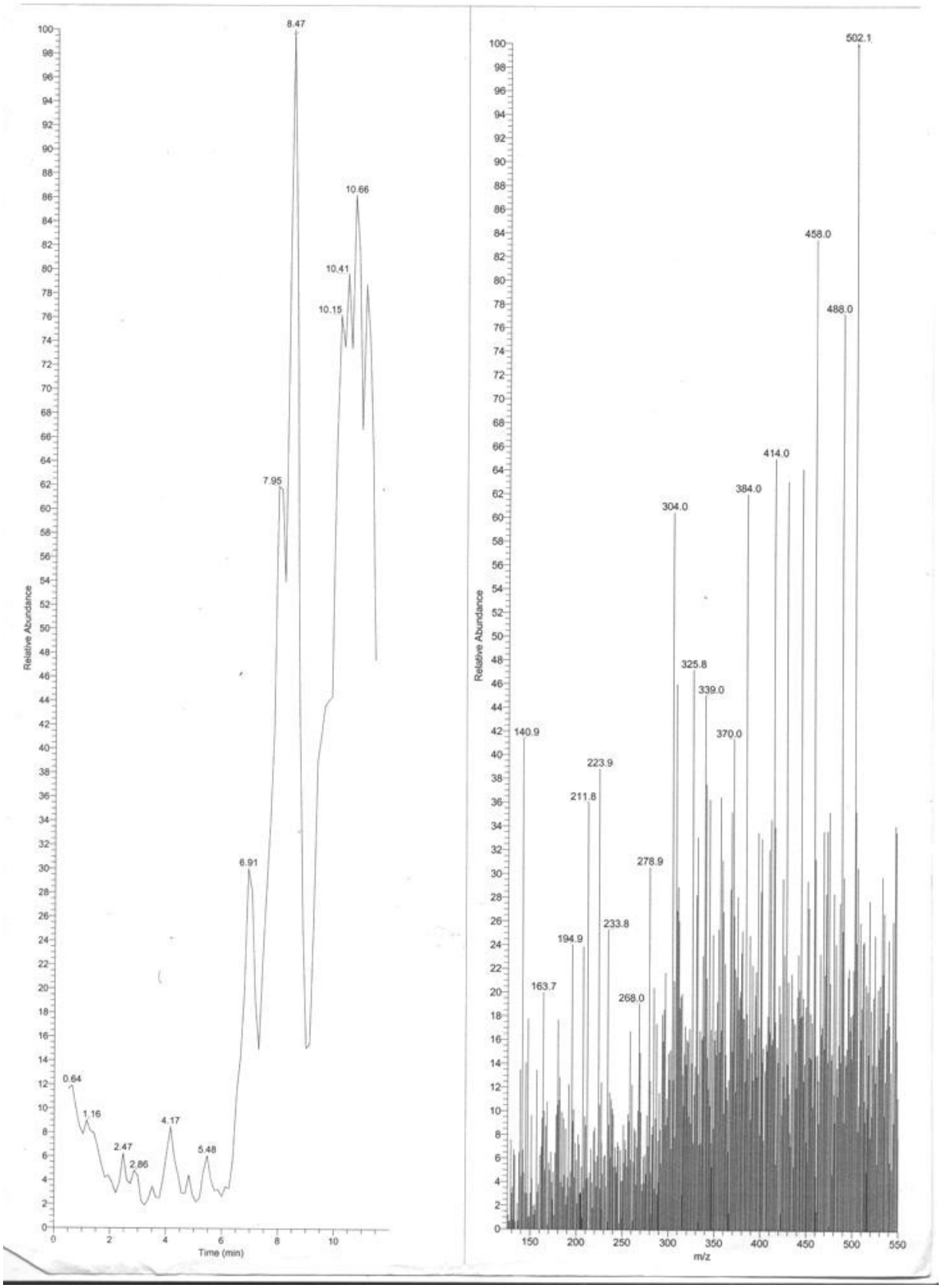


Figure 64: Spectre de LC-ESI de la solution issue de l'hydrolyse alcaline

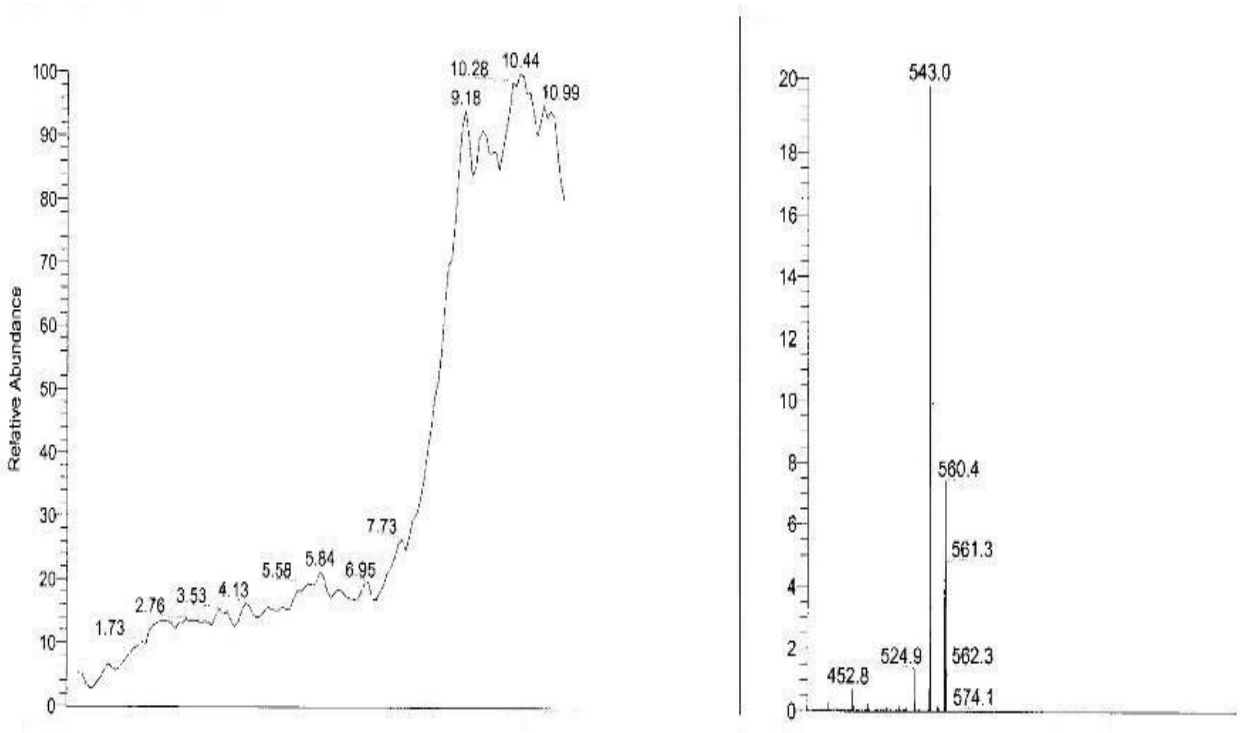


Figure 65: Spectre de LC-ESI de la solution issue de l'hydrolyse alcaline

II.2/ Composés isolé de l'espèce cultivée de *Triumfetta cordifolia*

Les tiges et les feuilles de l'espèce cultivée de *Triumfetta cordifolia* ont été récoltées le 12 janvier 2007 à Nkongsamba dans la province du littoral (Cameroun).

La poudre obtenue (5 kg) après découpage, séchage et broyage a été extraite par macération dans le mélange de solvant CH_2Cl_2-MeOH (1:1). Cette extraction s'est faite deux fois durant 48 h par tour d'extraction. L'extrait organique (247 g) était soumis à la chromatographie flash sur gel de silice suivant l'ordre de polarité croissante de cyclohexane et d'acétate d'éthyle. 7 fractions sont recueillies et indexées de F1'' à F7''; leur étude phytochimique (schéma 20) a conduit à l'isolement de 7 composés **LP8**, **LP9**, **LP10**, **LP16** à **LP19**. Trois de ces composés ont été déjà isolés de l'espèce sauvage.

Après découpage et séchage, les feuilles ont été broyées pour donner 1.8 kg de poudre. Cette poudre a été extraite deux fois par macération dans le mélange CH_2Cl_2-MeOH (1:1) et chaque tour d'extraction durait 48 h. L'extrait brut (183 g) a été dégrossi par chromatographie flash et 6 fractions ont été recueillies. Indexées de A à F, les fractions A, D, E, F ont été chromatographiées et 3 composés ont été isolés avec un identique à un métabolite secondaire déjà isolé de l'espèce sauvage.

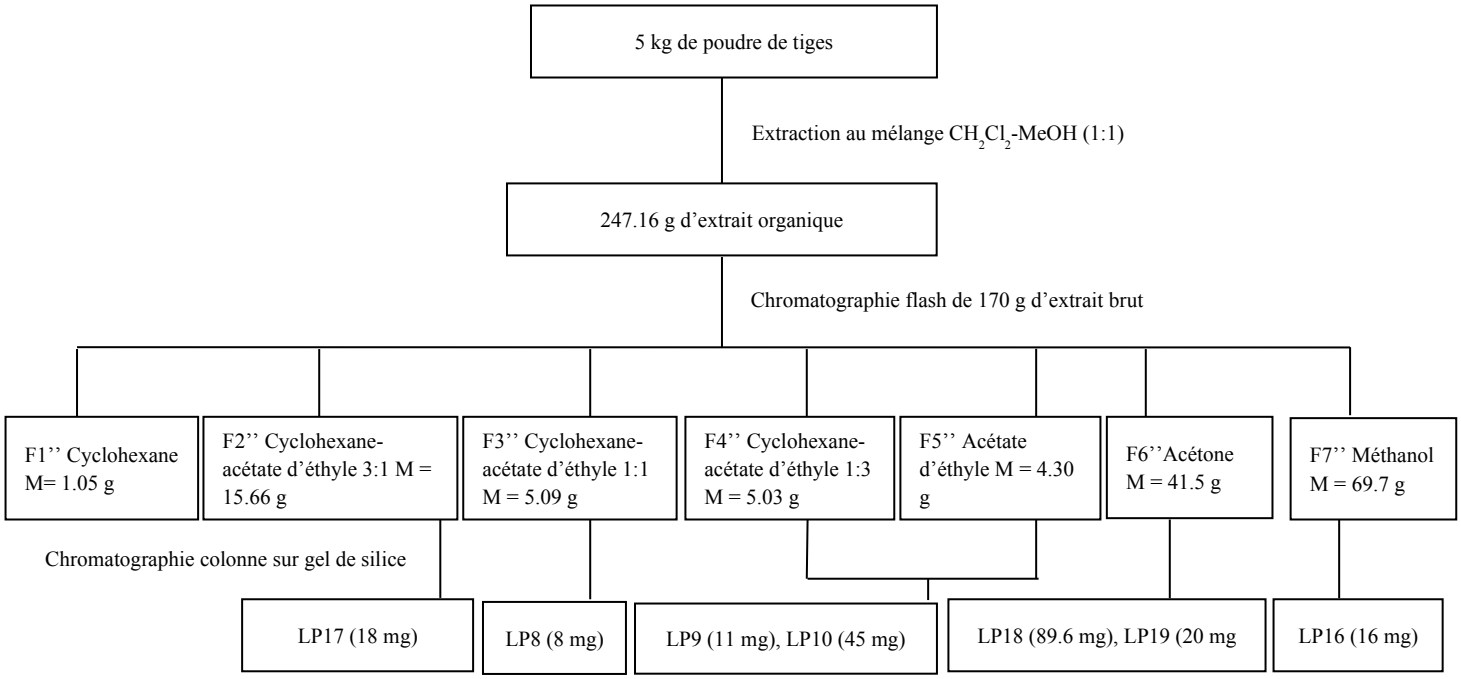


Schéma 22: Protocole d'extraction et d'isolement des métabolites secondaires des tiges de l'espèce cultivée de *T. cordifolia* A Rich.

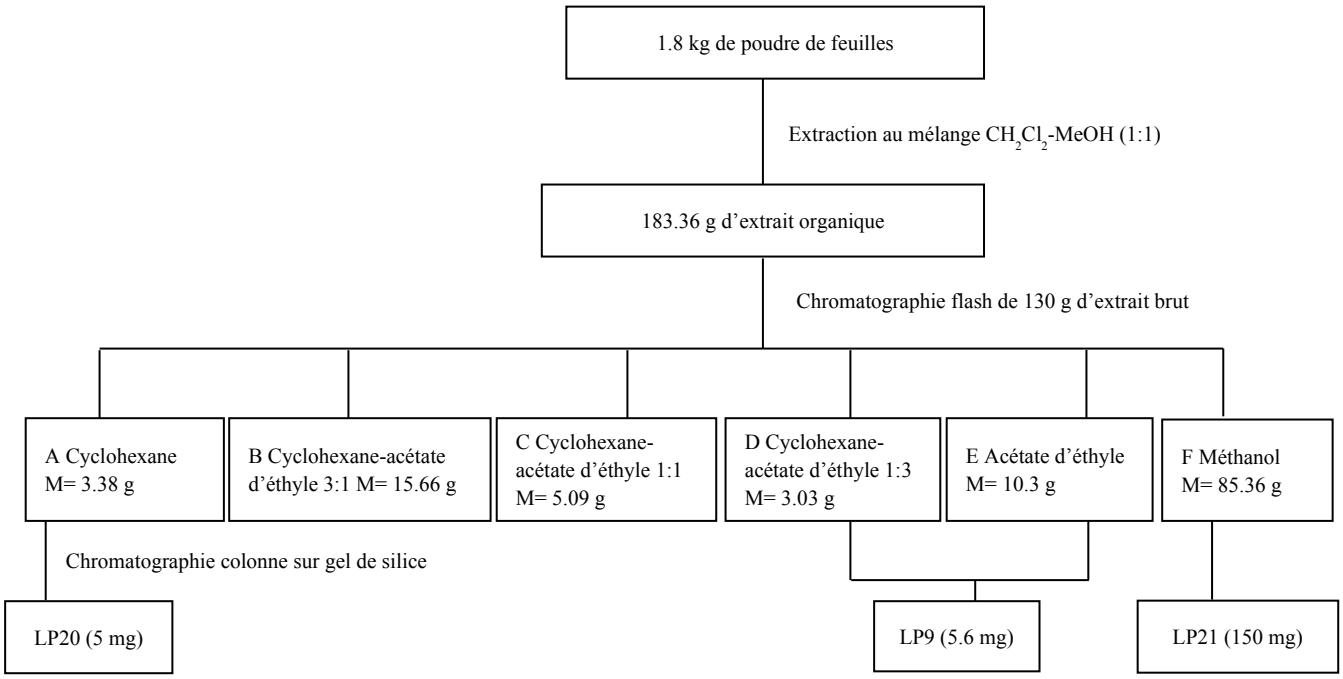


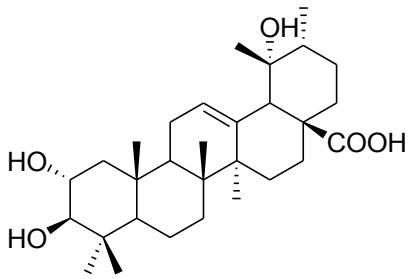
Schéma 23: Protocole d'extraction et d'isolement des métabolites secondaires des feuilles de l'espèce cultivée de *T. cordifolia* A Rich.

II.2.1/ composés isolés des tiges de l'espèce cultivée de *T. cordifolia*.

II.2.1.1/ Acide tormentique (LP16).

LP16 est une poudre noire isolée des sous-fractions éluées au mélange de solvants CH_2Cl_2-MeOH (95:5). Ces sous-fractions sont issues de la fraction au méthanol de la chromatographie flash. Le composé **LP16** répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Les spectres de RMN ^{1}H (Fig. 67) et APT (Fig. 68) présentent des pics attribuables aux carbones oléfiniques $\Delta^{12(13)}$ à δ(H)/δ(C) 5.23 (1H, s)/126.9 et δ(C) 138.6 caractéristiques des triterpènes de la classe des urs-12-ene.78 On observe également les oxymethines C(2α), C(3β) à δ(C) 67.1 et 82.6 respectivement78, ainsi que deux carbones quaternaires à δ(C) 178.9 et 71.5 correspondant respectivement à C(28) carbonyle et au carbone C(19) des dérivés de l'acide ursolique 19α-hydroxylés. L'ensemble de ces donnés spectrales comparé à celles de la littérature[98] ont permis de donner à **LP16** la structure ci-dessous qui est celle de l'acide tormentique ou acide 2α-19α-dihydroxyursolique.



77

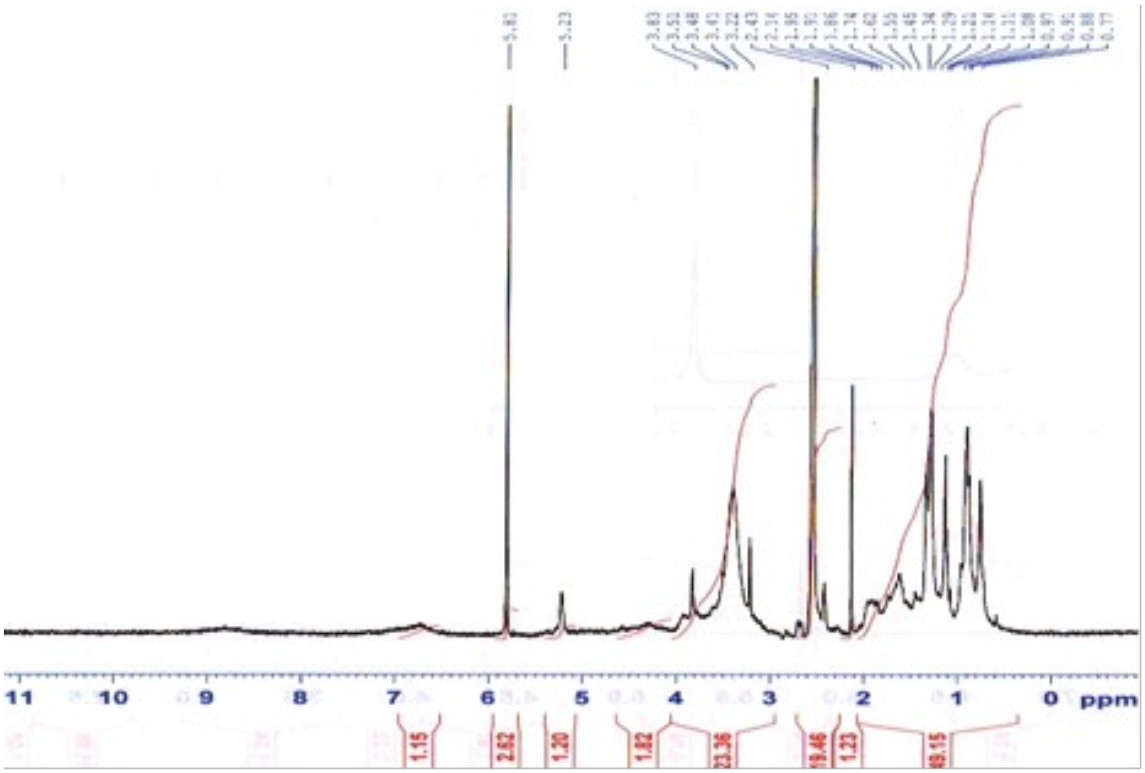


Figure 66: Spectre de RMN ^{1}H (*CD_3OD*, 250 MHz) de **LP16**

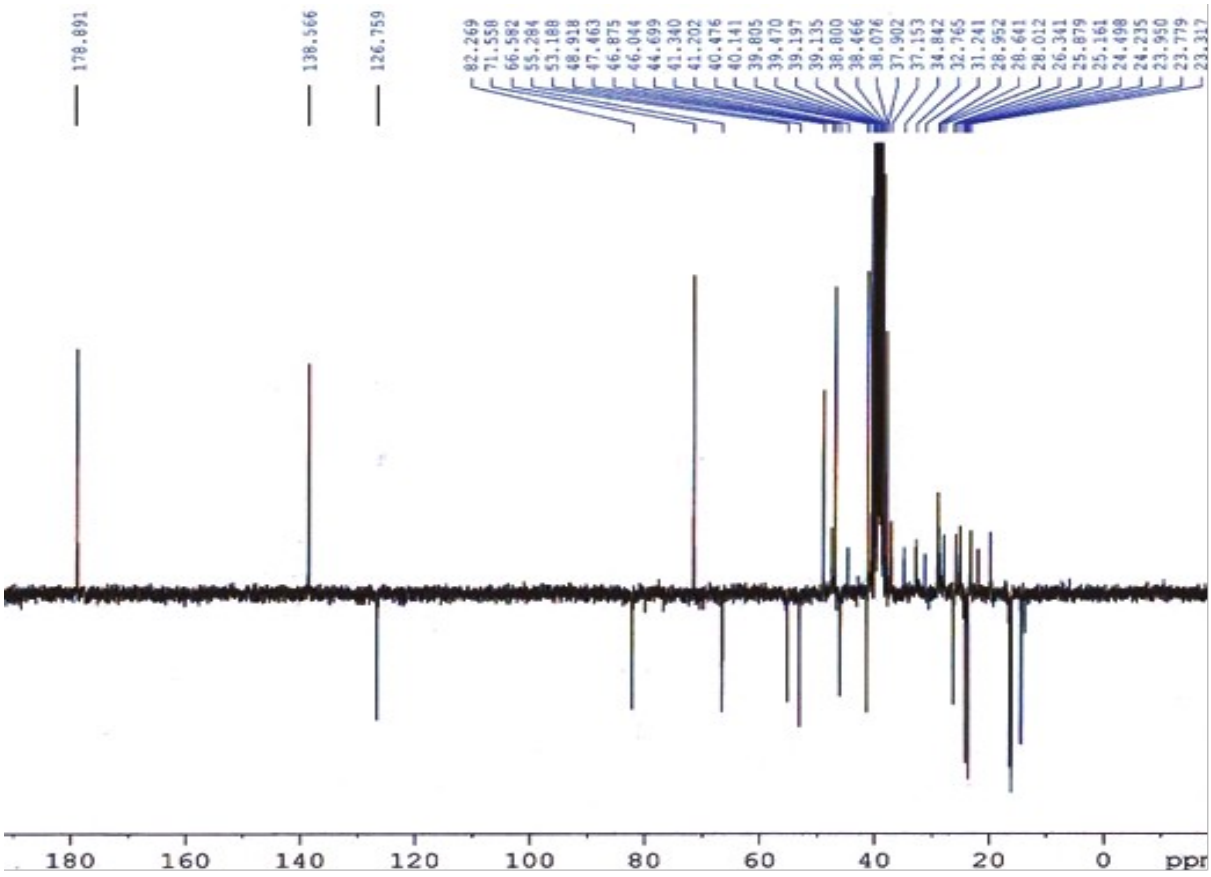
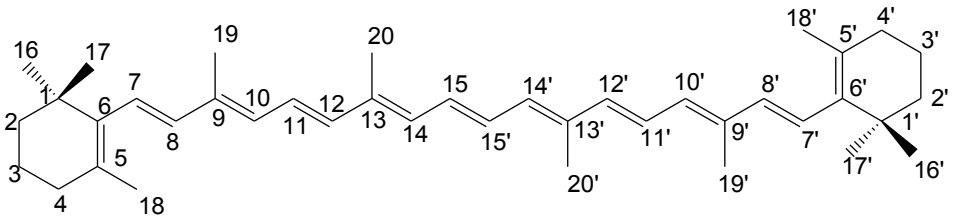


Figure 67: Spectre de RMN ^{13}C (APT) (*CD_3OD*, 62.5 MHz) de **LP16**

II.2.2/ Composés isolés des feuilles de l'espèce cultivée de *T. cordifolia*.

II.2.2.1/ *β*-carotène (LP20).

Isolé sous forme de poudre rouge orangé, le composé **LP20** a été isolé du mélange de solvant éther de pétrole-CH_2Cl_2 (97:3). L'absorption dans le visible et la décoloration de l'eau de brome indique que le composé a des doubles liaisons carbone-carbone conjuguées. Son spectre de RMN ^{1}H (Fig. 68) présente un ensemble de signaux entre δ(H) 0.70-1.97 parmi lesquels il y a quatre singulets dont deux intenses, deux multiplets entre δ(H) 1.30-1.50 et 150-1.61 et un doublet de doublets à δ(H) 0.76. On observe également plusieurs signaux chevauchant entre δ(H) 6.00-6.90 attribuables soit aux protons aromatiques soit aux protons éthyléniques[99]. L'exploitation du spectre APT (Fig. 69) nous indique que ce composé comporte dans son squelette, plusieurs doubles liaisons de configuration *trans*[100] et son caractère visible seraient dus à la conjugaison de celles-ci. En effet, la même distribution de signaux est observée et présente un amas de signaux entre δ(H) 123.8-137.8 dont les pics sont bien distincts et un ensemble de pics entre δ(H) 12.1-40.7. L'absence de carbone lié aux hétéroatomes suggère que le composé **LP20** serait de type caroténoïde. La présence parmi les signaux de carbones éthyléniques, de 8 carbones quaternaires et 14 méthines indique que ce composé est la beta carotène.



78

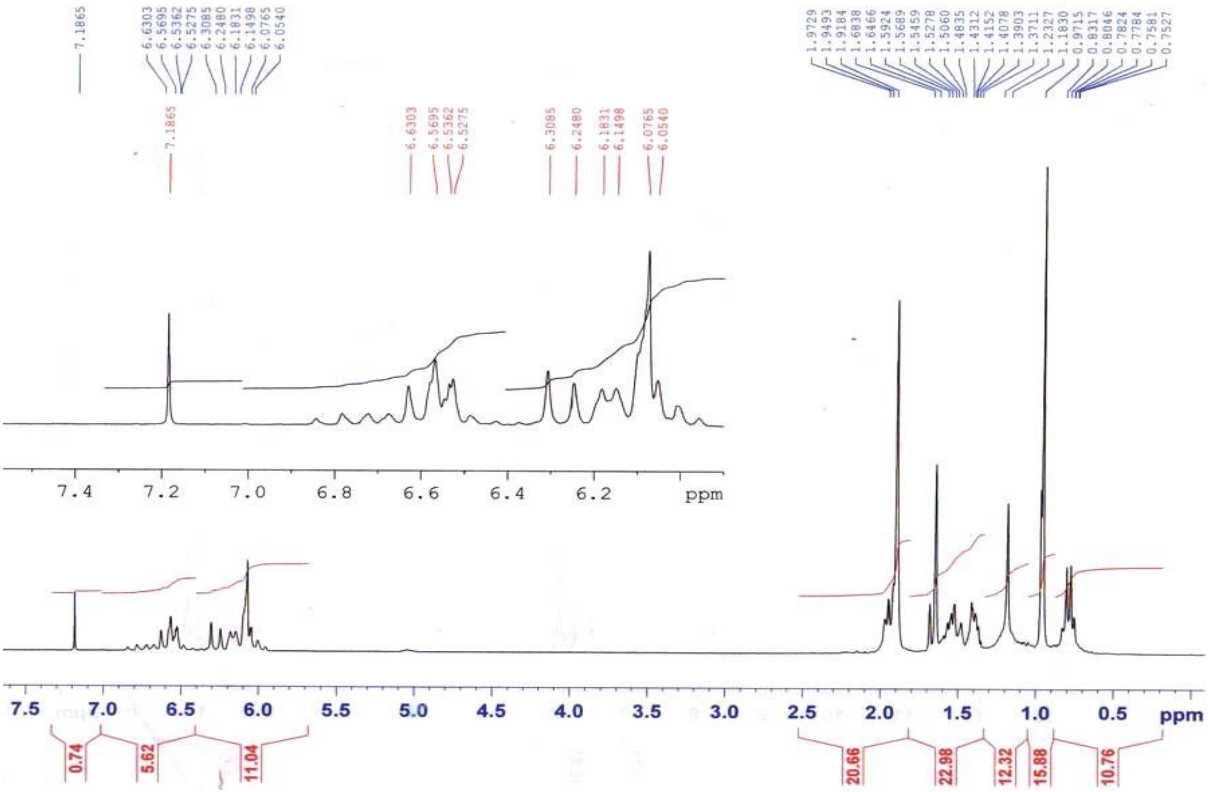


Figure 68: Spectre de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz) de **LP20**

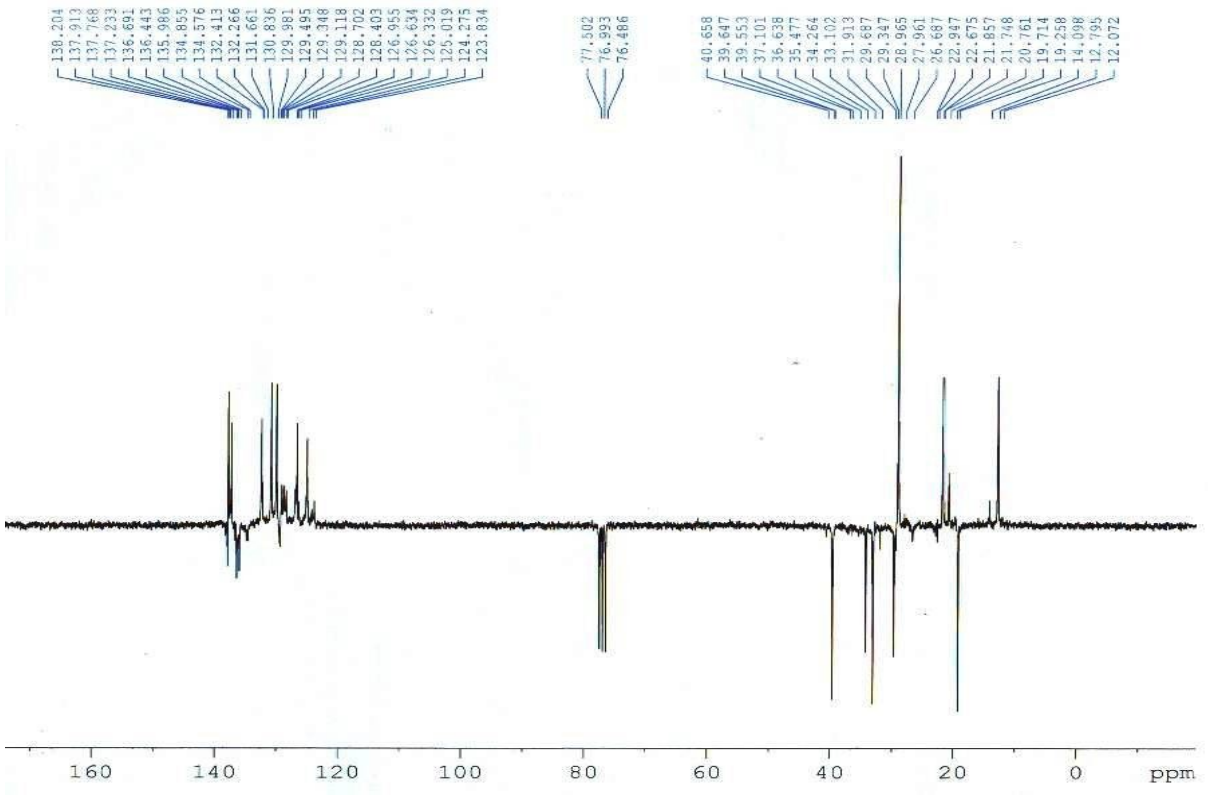
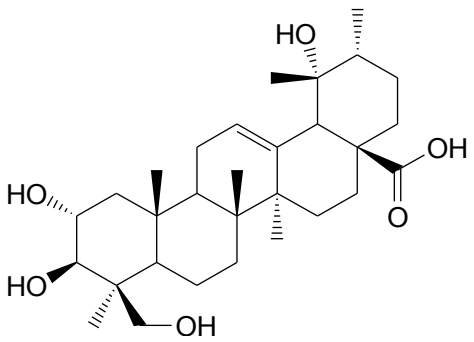


Figure 69: Spectre d'APT ($CDCl_3$, 62.5 MHz) de **LP20**

II.2.2.2/ Acide 24-hydroxytormentique (LP21)

Isolé sous forme de poudre marron du système de solvants CH_2Cl_2-MeOH (9:1), **LP21** répond positivement au test de Liebermann-burchard caractéristique des triterpènes. Les spectres de RMN ^{1}H (Fig. 70) et APT (Fig. 71) présentent des signaux caractéristiques de l'acide tormentique[101]; En effet on observe, un singulet à δ(H)/δ(C) 5.30/128.0, un triplet de doublet à δ(H)/δ(C) 3.79 (J = 5.5, 11.0 Hz)/69.6 et un doublet à δ(H)/δ(C) 3.07 (J = 11.0 Hz)/86.0 qui sont respectivement attribuables aux signaux des protons portés par les carbones C(12), C(2α) et C(3β). Des signaux de carbones quaternaires sont observés sur le spectre APT à δ(C) 73.6, 140.1 et 182.2 correspondant respectivement aux signaux de carbones C(19α), C(13) et C(28) de l'acide tormentique.101 Cinq singulets et un doublet sont également observés sur le spectre ^{1}H à δ(H) 1.34 (s), 1.24 (s), 1.19 (s), 0.99 (s), 0.78 (s) et 0.93 (*d*, J = 6.7 Hz) attribuables respectivement aux signaux des protons portés par les carbones angulaires C(27), C(29), C(23), C(26), C(25) et C(30). L'absence d'un des singulets de méthyles angulaires se justifierait par la présence d'un oxymethylène dont les deux protons apparaissent sous forme de doublet à δ(H)/δ(C) 4.03 (J = 11.0 Hz)/65.1 et à 3.40 (J = 11.0 Hz)/65.1. Ces données comparées à celles de la littérature[101], ont permis d'identifier **LP21** à l'acide 24-hydroxytormentique.



79

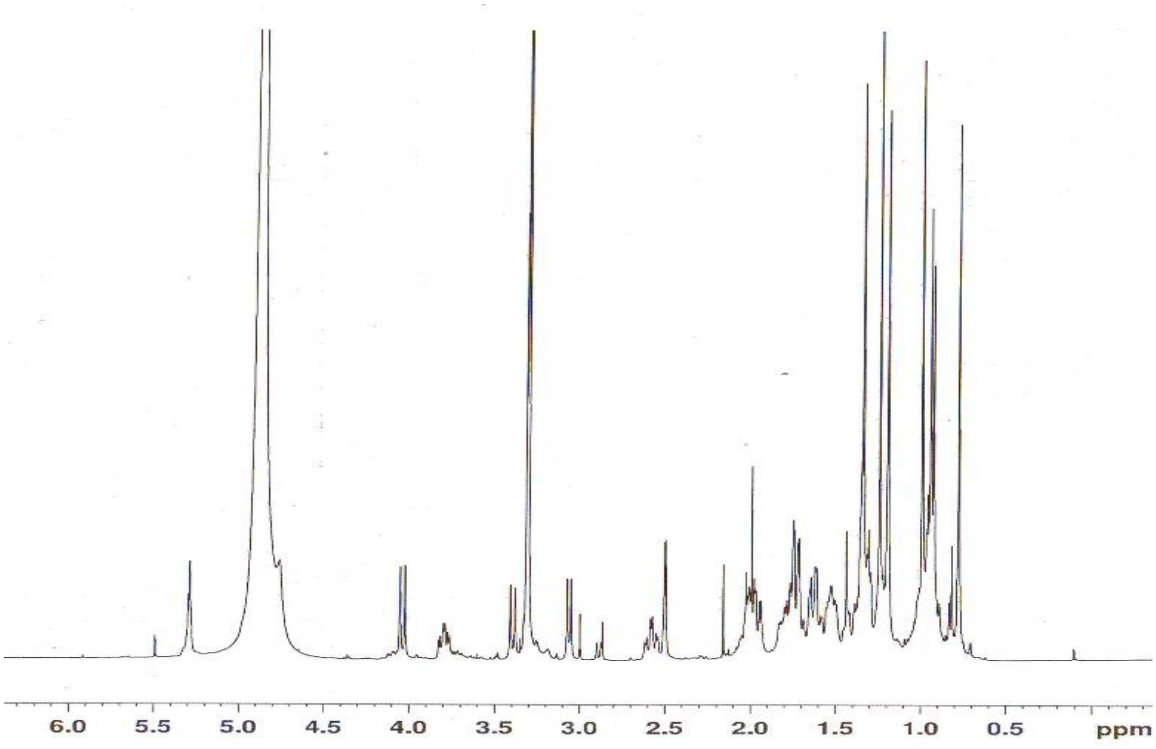


Figure 70: Spectre de RMN ^{1}H (*MeOD*, 400 MHz) de **LP21**

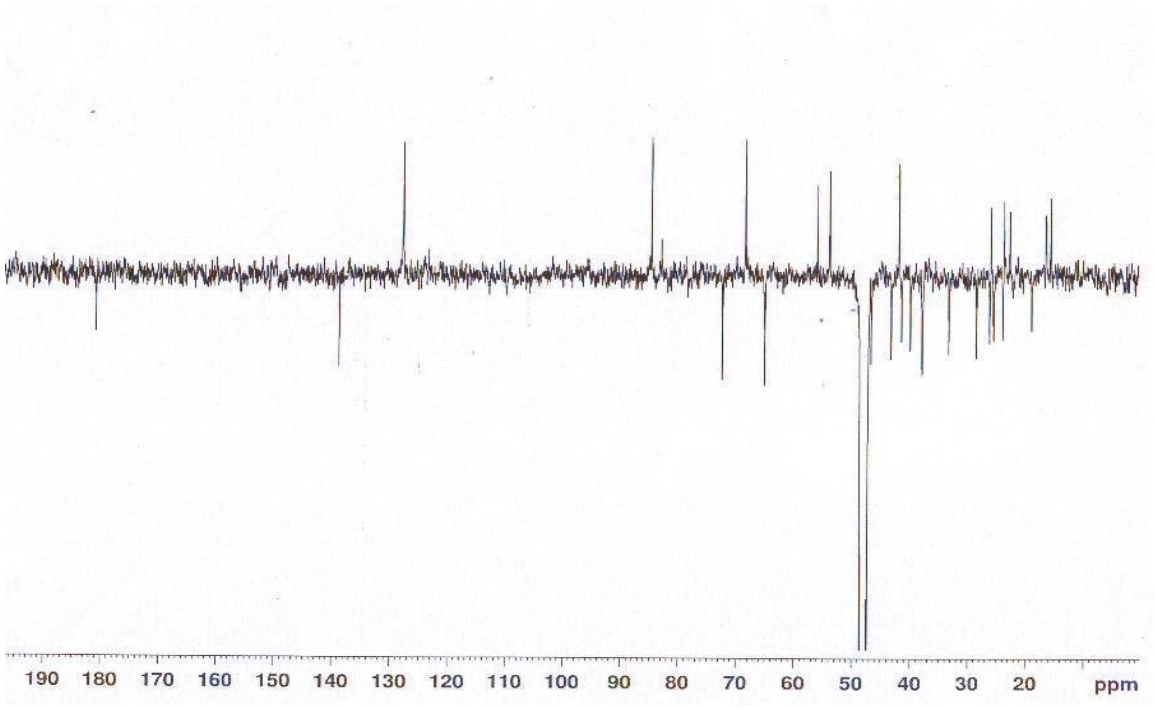


Figure 71: Spectre de RMN ^{13}C (*MeOD*, 100 MHz) de **LP21**

II.3/ Transformations chimiques

La majorité des stéroïdes utilisés en médecine est issue de l'hémisynthèse des produits naturels tels que les saponines et les phytostérols.[102] De plus, des études récemment faites sur quelques dérivés de stéroïdes poly hydroxylés ont montré qu'ils avaient d'intéressantes propriétés cytotoxiques sur les cellules cancéreuses.[103] Il a été aussi décrit que certains triterpènes azotés étaient des inhibiteurs de l'enzyme acétyl-cholinesterase.[104] Voilà pourquoi l'oxydation du stigmastérol sera faite suivant plusieurs voies de synthèse ($KMnO_4$, Oxone, CrO_3). De même, l'amination de la friedeline sera et le potentiel cytotoxique de tous les produits de réaction sera mesuré.

II.3.1/ Réaction d'Oxydation.

II.3.1.1/ Réaction d'oxydation au $KMnO_4$

II.3.1.1.1/ Généralités.[105]

La méthode utilisée est celle développée par Baskaran et *al*. qui convertit les oléfines en époxydes, *α*-dicétones ou *α*-hydroxycétones. Cette conversion se fait en milieu hétérogène (CH_2Cl_2/*ter*-BuOH/H_2O) et en présence de $KMnO_4/CuSO_4.5H_2O$ à température ambiante. Le produit varie selon qu'on a une oléfine cyclique, acyclique, monosubstituée, disubstituée ou trisubstituée. Les oléfines cycliques disubstituées donnent les *α*-dicétones ou *α*-hydroxycétones. Celles qui sont acycliques et disubstituées sont clivées pour donner soit des aldéhydes ou des acides carboxyliques. Les doubles liaisons trisubstituées acycliques produisent un mélange d'époxyde et de *α*-hydroxycétone. Par contre les composés cycliques trisubstitués (cholestérol) donnent uniquement des époxydes.

II.3.1.1.2/ Application.

La réaction a été faite sur le stigmastérol après acétylation de l'alcool en position 3. Seule la double liaison C(5)-C(6) a été oxydée et celle présente dans la chaine latérale en position C(22)-C(23) n'a pas été touchée. La réaction est marquée par l'apparition sur le

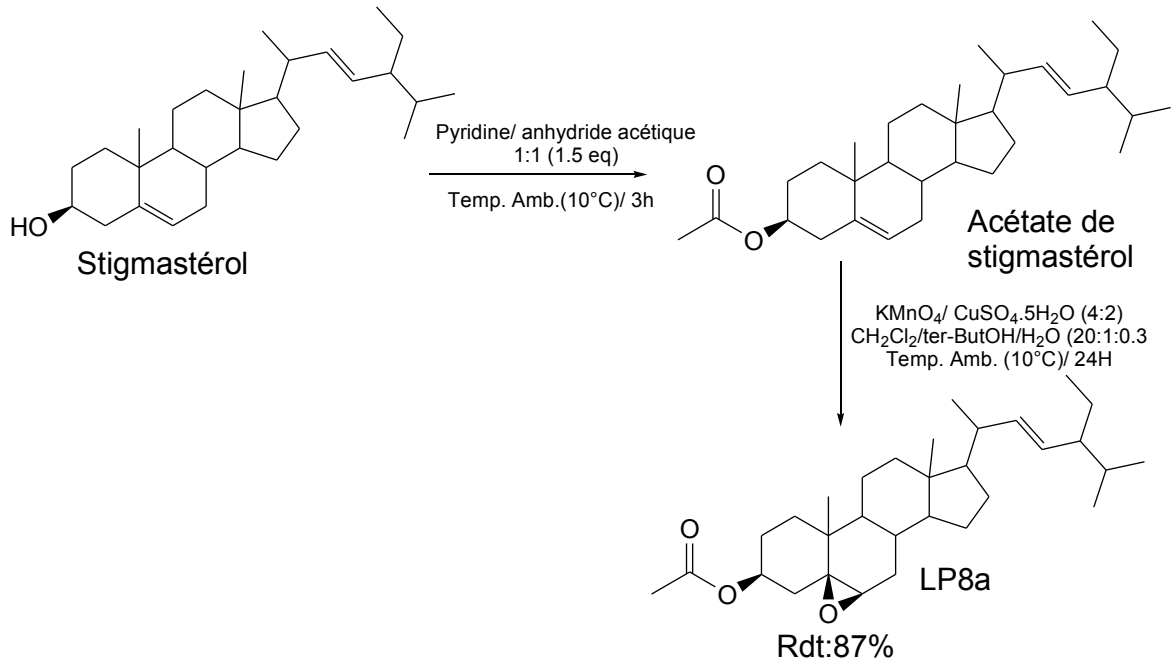


Schéma 24: Réaction d'oxydation du stigmastérol après acétylation.

spectre de RMN ^{1}H des signaux à δ(H) 4.70 (m) et 3.01 (singulet large) attribuables respectivement aux protons H-C(3) de l'oxyméthine acétylé et H-C(6). De plus, sur ce même spectre de RMN ^{1}H, on note la disparition du proton éthylénique H-C(6) précédemment apparu à δ(H) 5.30.

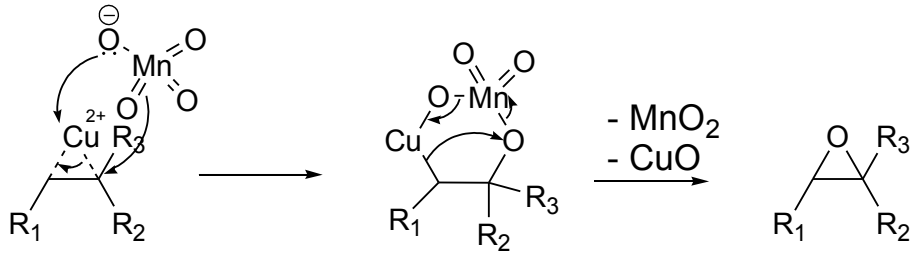


Schéma 25: Mécanisme d'oxydation au permanganate de potassium en phase hétérogène.

La mono époxydation pourrait s'expliquer par la regiosélectivité de l'oxydant qui oxyde facilement les doubles liaisons trisubstituées. La facilité de la liaison oléfinique C(5)=C(6) à réagir avec l'oxydant peut s'expliquer aussi par sa tendance à retrouver la configuration chaise qui est la configuration la plus stable. La stéréochimie adoptée au schéma 23 ci-dessous a été définie grâce aux déplacements chimiques du 3-*O*-mesyl-5,6-epoxystigmastan-22-en-3β-ol décrit par J. A. Ramírez et *al*. en 2000.[106] Ce composé est un dérivé de stigmastérol avec un époxyde en position C(5) et C(6) dont les carbones apparaissent à δ(C) 62.4 C(5) et δ(C) 63.3 C(6).

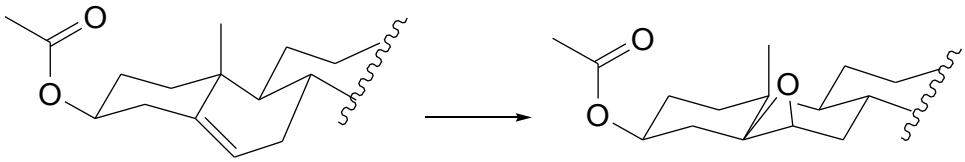


Schéma 26: Passage d'un cycle tendu à une configuration chaise.

Tableau 20: Déplacements chimiques de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62.5 MHz) du mélange **LP8a** (3-*O*-acétyl-5*β*,6*β*-epoxystigmastan-22-en-3*β*-ol).

Position	**LP8a**	Multiplicité
1	37.8	CH_2
2	32.2	CH_2
3	71.3	CH
4	42.4	CH_2
5	63.4	C
6	63.6	CH
7	31.2	CH_2
8	31.4	CH
9	50.9	CH
10	36.5	C
11	21.7	CH_2
12	39.8	CH_2
13	42.4	C
14	56.4	CH
15	24.2	CH_2
16	28.2	CH_2
17	56.2	CH
18	11.9	CH_3
19	20.1	CH_3
20	40.4	CH
21	21.4	CH_3
22	138.1	CH
23	129.3	CH
24	51.2	CH
25	31.8	CH
26	21.1	CH_3
27	19.0	CH_3
28	25.4	CH_2
29	11.7	CH_3
1'	170.6	C=O
2'	21.4	CH_3

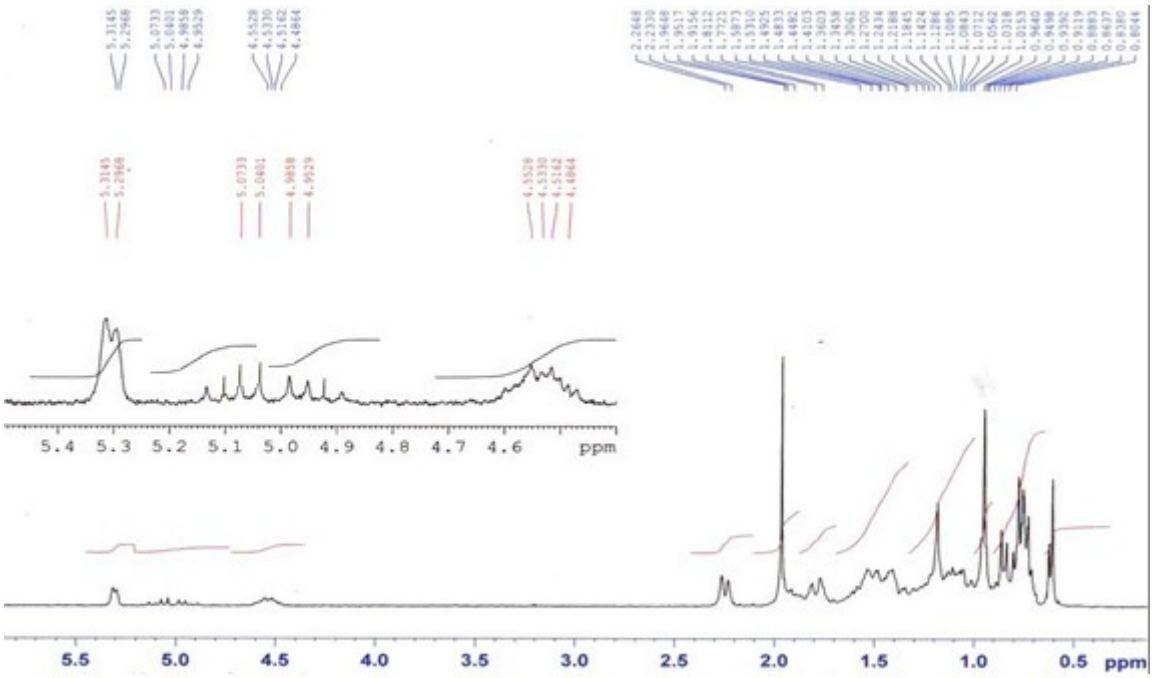


Figure 72: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) de l'acétate de stigmastérol.

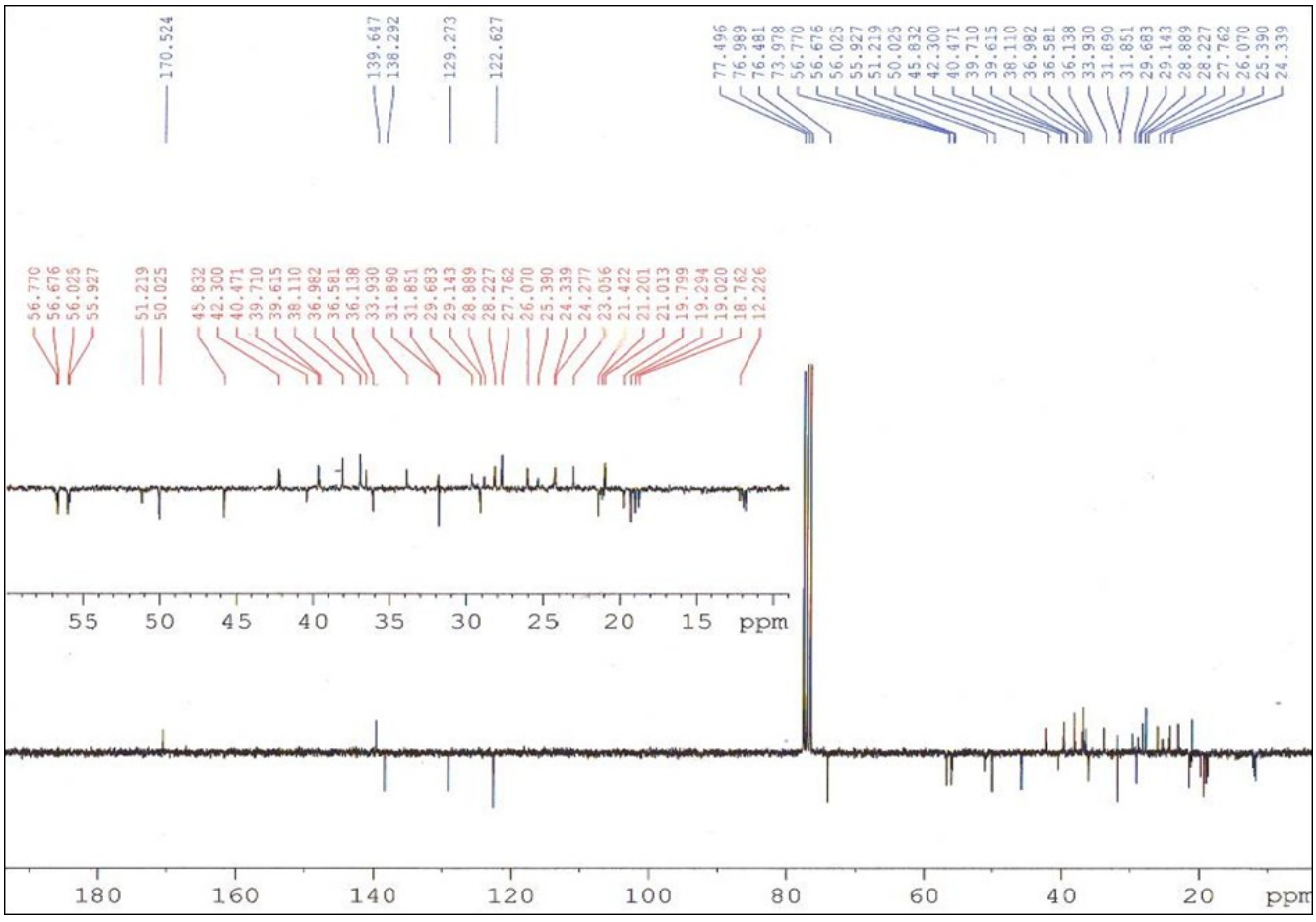


Figure 73: Spectre d'APT (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de l'acétate de stigmastérol.

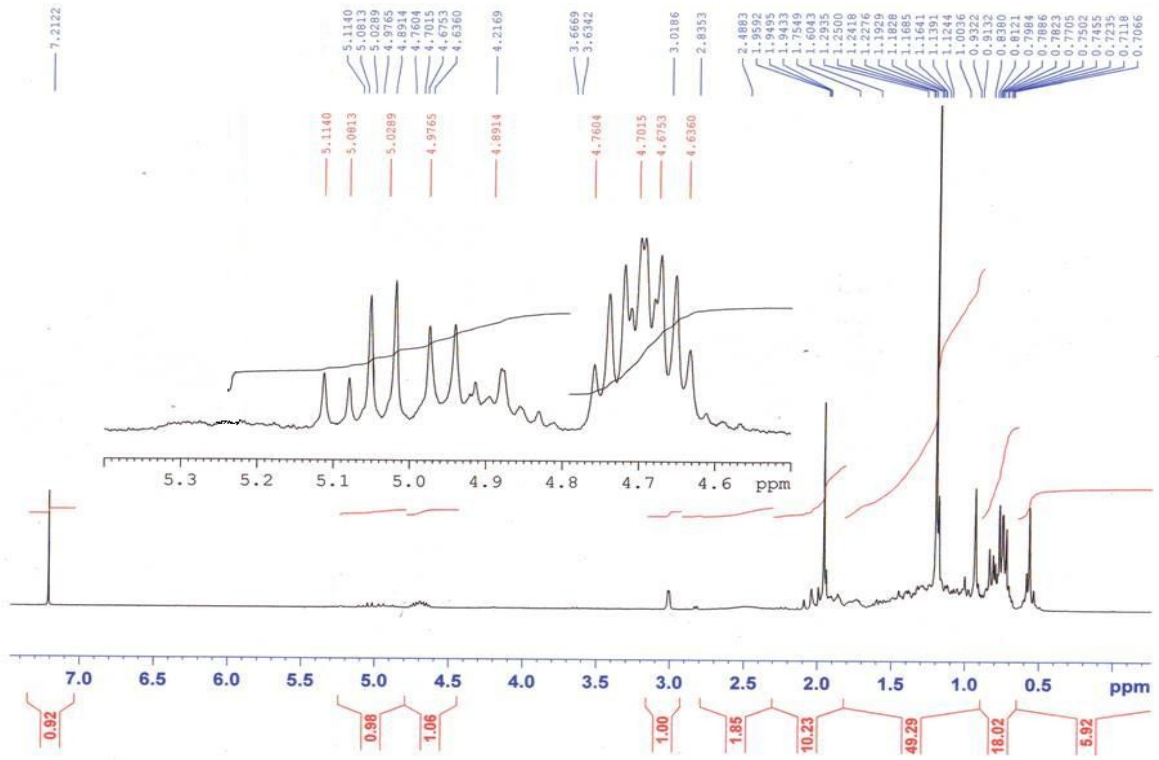


Figure 74: Spectre de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz) de 3-*O*-acétyl-5,6-epoxydestigmastan-22-en-3β-ol.

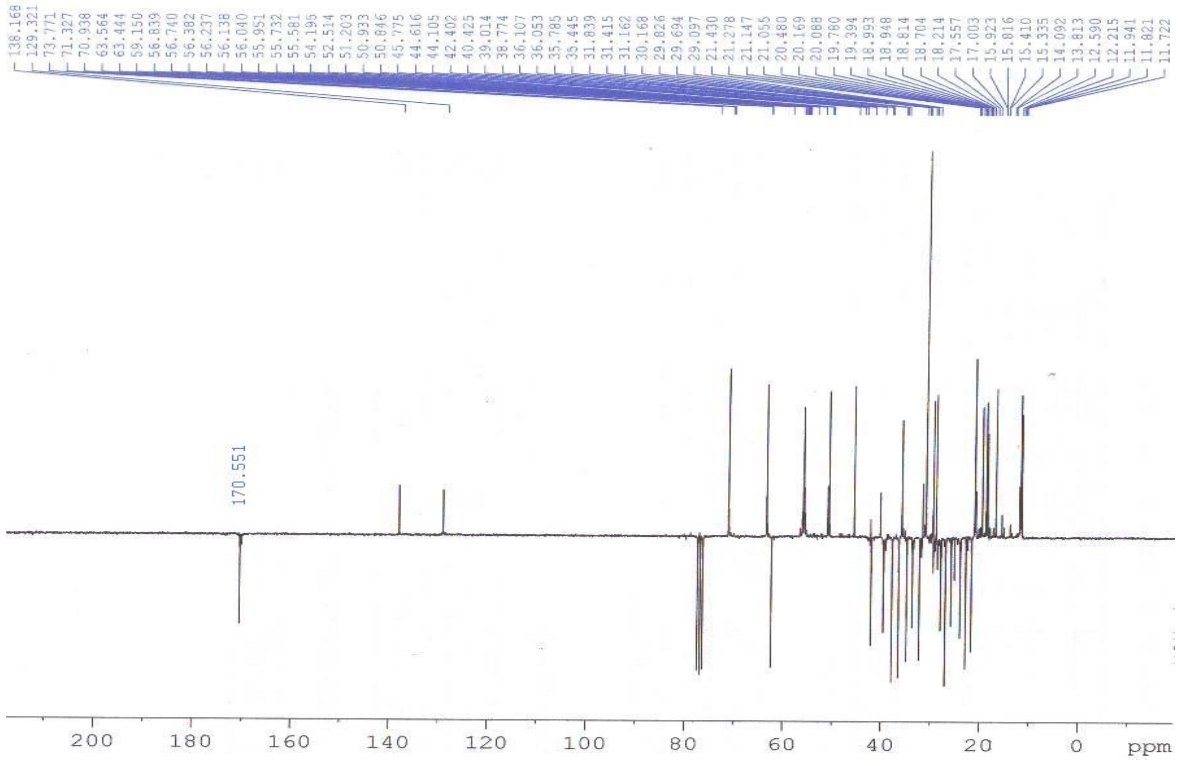


Figure 75: Spectre de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62.5 MHz) de 3-*O*-acétyl-5β,6β-epoxystigmastan-22-en-3β-ol

II.3.1.2/ Réaction d'oxydation par l'Oxone®.

II.3.1.2.1/ Généralités.

L'oxone® est la forme stable de l'acide de Caro ou encore acide permonosulfurique (H_2SO_5). Il est préparé par réaction du peroxyde d'hydrogène sur l'acide sulfurique concentré suivi de la neutralisation du milieu par le carbonate de potassium. Comme l'acide de Caro, l'anion permonosulfate ($KHSO_5$) est un oxydant fort.[107] La réaction utilise les dioxiranes comme médiateur d'oxydation. Ce sont des peroxydes cycliques à trois chainons qui sont générés *in situ* à partir de l'oxone® ($2KHSO_5$, $KHSO_4$, K_2SO_4) et d'une cétone. La réaction est faite à température ambiante et pour 1 équivalent de substrat, on ajoute 0.2 ou 0.3 équivalent de cétone, 5 équivalents d'oxone®, et 15 équivalents de $NaHCO_3$.[108] Le produit d'oxydation obtenu dépend du pH du milieu. S'il est neutre le produit obtenu est l'époxyde et ce cycle s'ouvre pour donner le diol si le milieu est basique ou acide. Dans le dernier cas, les diols peuvent s'oxyder pour donner les α-hydroxycétones ou les α-dicétones.[105]

II.3.1.2.2/ Application.

Après acétylation du stigmastérol, le produit de réaction a été oxydé pour donner un mélange de deux produits.

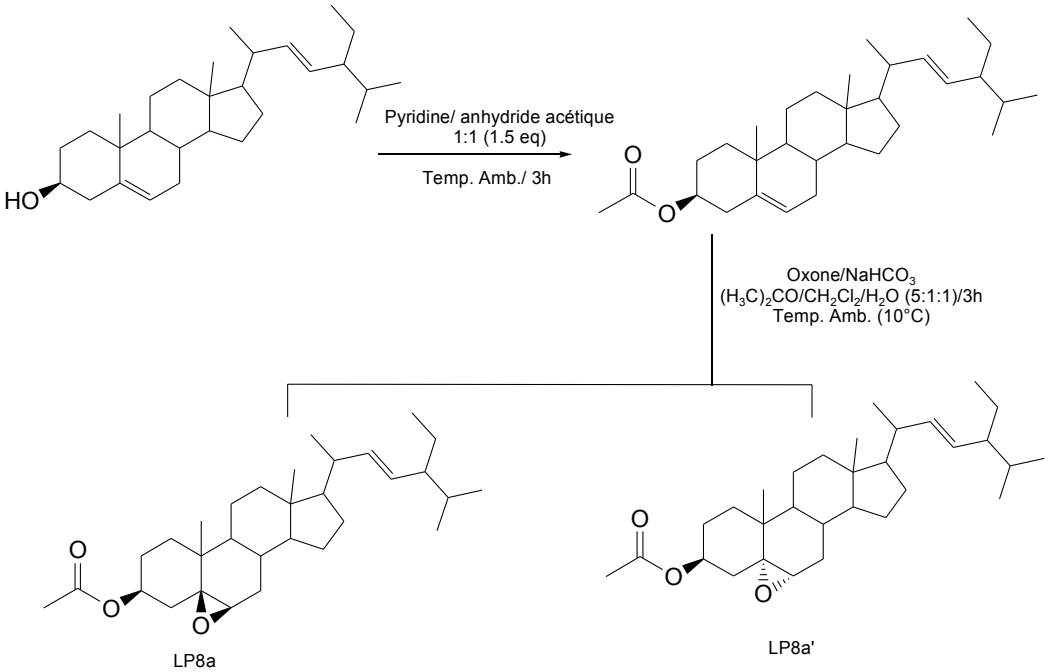


Schéma 27: Réaction d'oxydation de l'acétate de stigmastérol par l'oxone®.

Tableau 21: Déplacements chimiques de RMN ^{13}C (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) du mélange **LP8a** et **LP8b**

Position	**LP8a**	**LP8a'**	LP8b	Multiplicité
1	38.0	36.6	38.0	CH_2
2	32.1	32.4	32.1	CH_2
3	71.3	71.4	71.3	CH
4	42.3	42.4	42.3	CH_2
5	62.5	65.2	62.5	C
6	63.6	59.2	63.6	CH
7	28.8	28.7	29.1	CH_2
8	31.9	31.9	31.9	CH
9	51.0	51.2	51.2	CH
10	35.0	35.0	35.0	C
11	21.9	21.3	21.3	CH_2
12	39.3	39.2	39.8	CH_2
13	42.3	42.2	42.3	C
14	56.9	56.8	56.3	CH
15	24.2	24.2	24.2	CH_2
16	28.1	28.1	28.1	CH_2
17	56.3	56.2	56.2	CH
18	11.9	11.7	12.0	CH_3
19	19.3	19.8	19.8	CH_3
20	40.4	39.7	40.4	CH
21	21.4	21.2	21.3	CH_3
22	138.2	138.2	138.2	CH
23	129.3	129.3	129.4	CH
24	55.8	55.6	56.1	CH
25	31.9	29.8	31.9	CH
26	18.7	17.0	17.0	CH_3
27	19.0	19.3	19.0	CH_3
28	25.4	26.0	26.0	CH_2
29	11.7	12.0	11.7	CH_3
1'	170.5	170.2	170.5	C=O

2’	21.1	20.6	21.3	CH_3

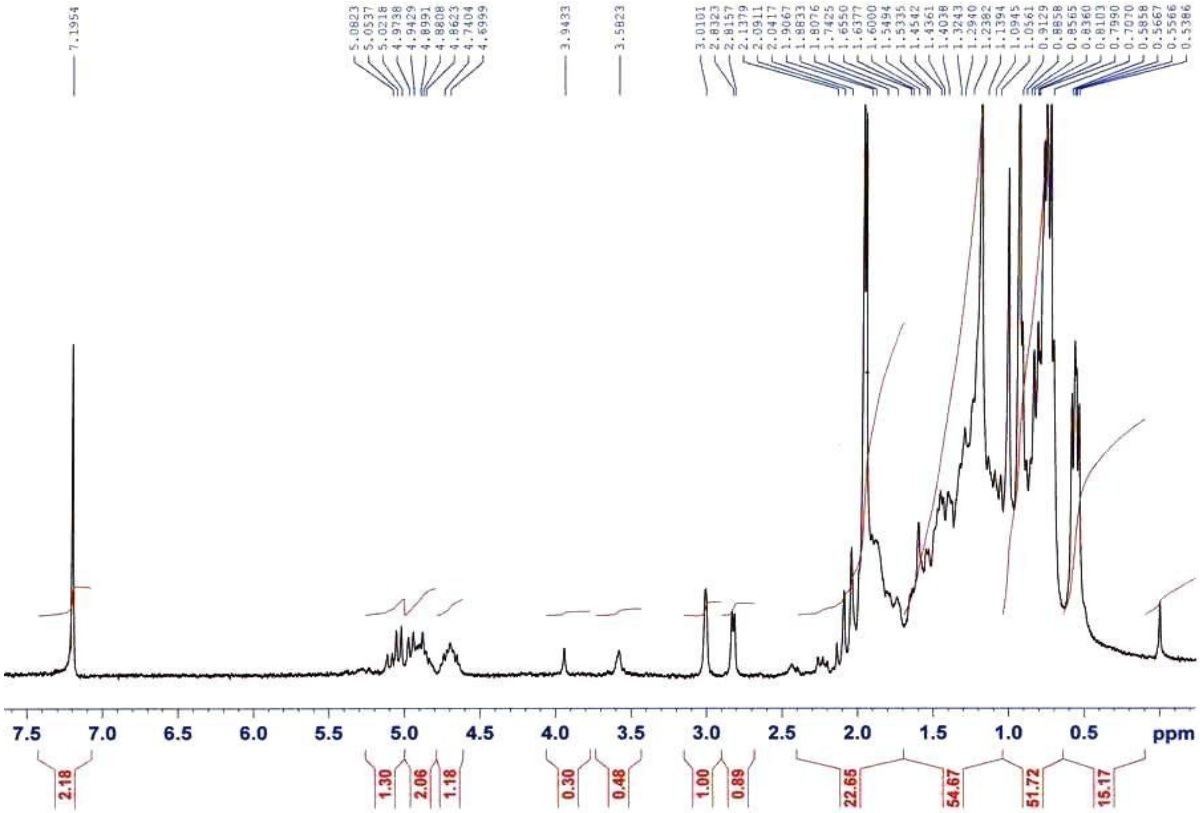


Figure 76: Spectre de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz) du mélange de produits d’oxydation.

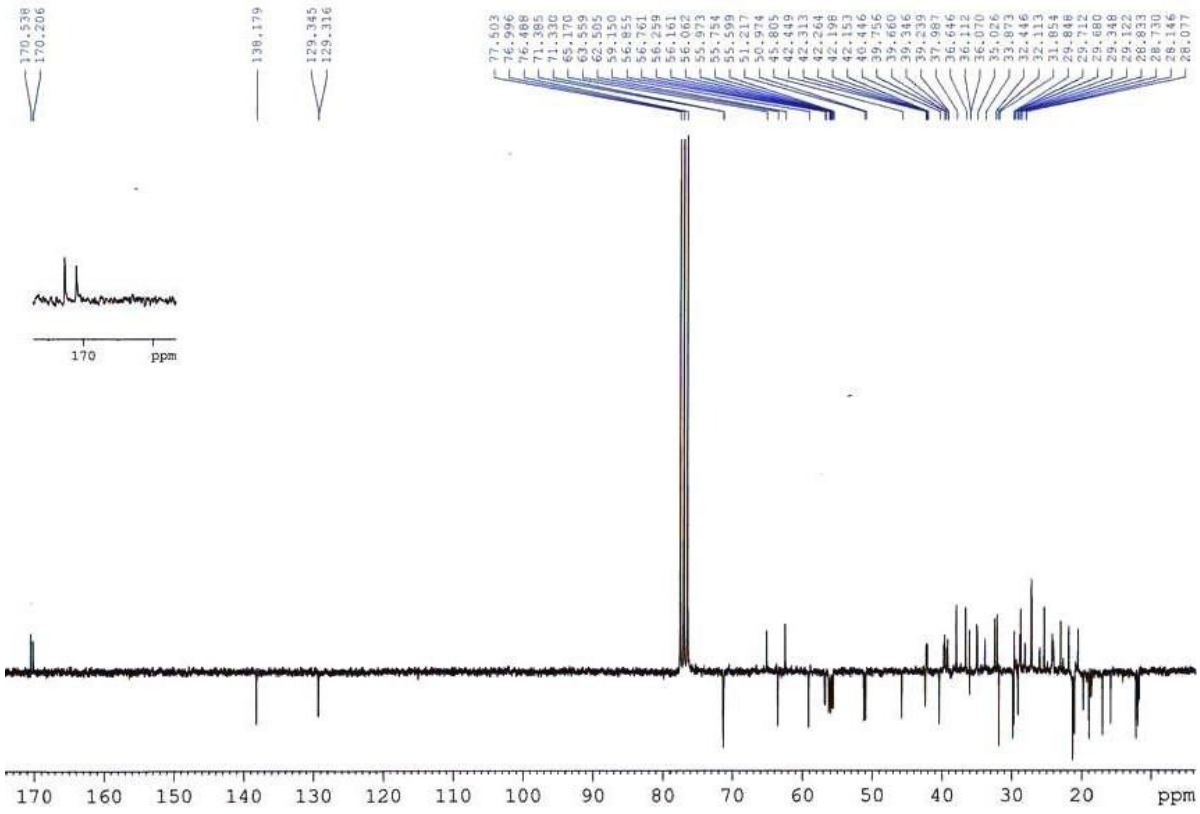


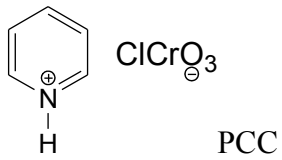
Figure 77: Spectre APT (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) du mélange de produits d'oxydation.

II.3.1.3/ Réaction d'oxydation par le PCC

II.3.1.3.1/ Généralités.

Le PCC est un oxydant préparé en ajoutant 1 équivalent d'oxyde de chrome dans une solution quantitative d'acide chlorhydrique 6 M. 1 équivalent de pyridine est versé goutte à goutte pendant 10 minutes dans la solution précédente maintenue à 40 °C. Cette solution est refroidie à 0 °C pendant 15 à 20 minutes pour donner des cristaux de couleur orange (PCC) qui sont récupérés par filtration sous vide.[109] Le mélange au lieu d'être refroidi, peut être aussi fixé sur alumine en y ajoutant une quantité suffisante d'alumine neutre de manière à avoir 1 mmol de PCC/g d'alumine, ensuite concentrer l'ensemble à pression réduite sous évaporateur rotatif pour diminuer la quantité d'eau et sécher la poudre orange obtenue dans un dessicateur pendant 24 heures. La grande facilité de l'oxydation par usage du PCC sur alumine est la récupération facile du produit d'oxydation.[110] L'ordre de mélange des réactifs pour la préparation du PCC est important car la méthode ci-dessus décrite par E. J. Corey et *al*., conduit à la formation du chlorure de chromyle (CrO_2Cl_2) qui est un produit secondaire très dangereux. Pour éviter la formation de ce produit, Agarwal et *al*., partent de la pyridine qu'ils

mélangent à une solution d'acide chlorhydrique 6 M et ensuite il ajoute de l'oxyde de chrome.[111] L'oxydant doux obtenu transforme les alcools primaires et secondaires en aldéhyde et cétone; il n'entraine pas les suroxydations par conséquent pas de formation d'acide carboxylique dans le cas des alcools primaires.109 Il oxyde le méthylène allylique des oléfines en alcool puis en cétone.[112] Cet oxydant transforme les 2-furyl carbinols en pyranne; il déprotège facilement les éthers allyliques et les éthers benzyliques et transforme les alcools résiduels en cétone ou aldéhyde. Il transforme également les trialkylboranes en aldéhyde correspondant.[113]



PCC

II.3.1.3.2/ Applications.

Le chlorochromate pyridinium oxyde uniquement la double liaison trisubstituée C(5)=C(6) du stigmastérol en époxyde.

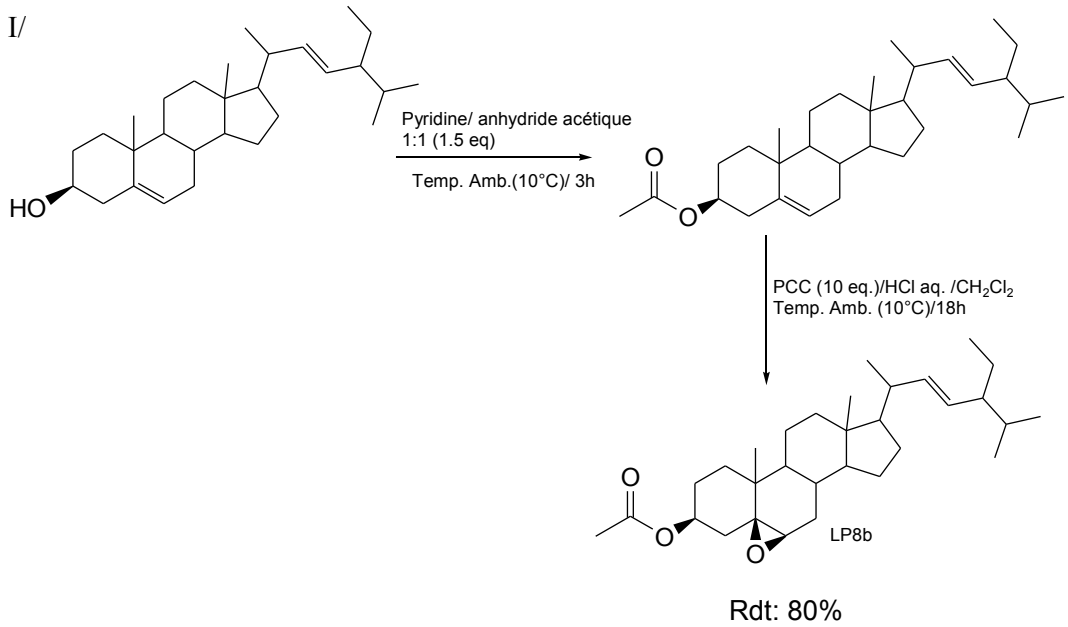


Schéma 28: Réaction d'oxydation de l'acétate de stigmastérol avec PCC en milieu acide.

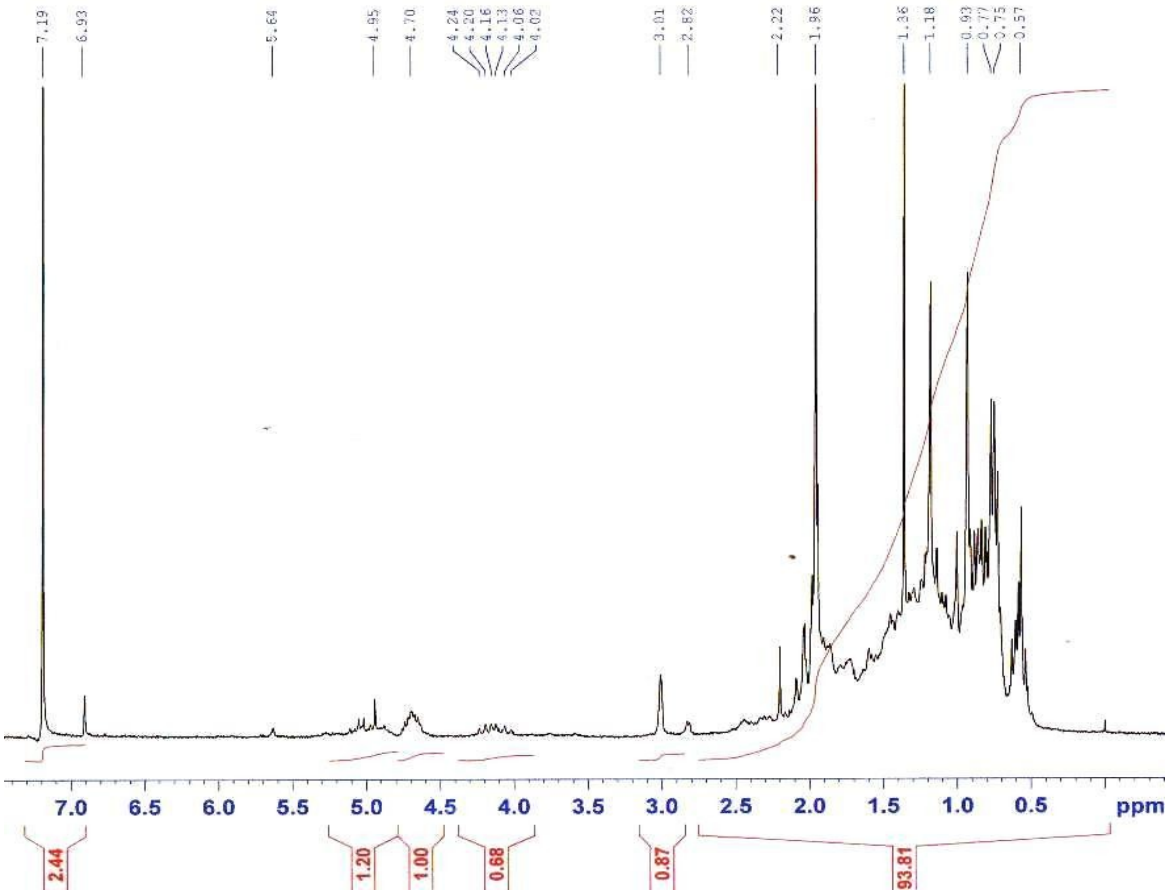


Figure 78: Spectre de RMN ^{1}H de 3-*O*-acétyl-5β,6β-epoxystigmastan-22-en-3β-ol

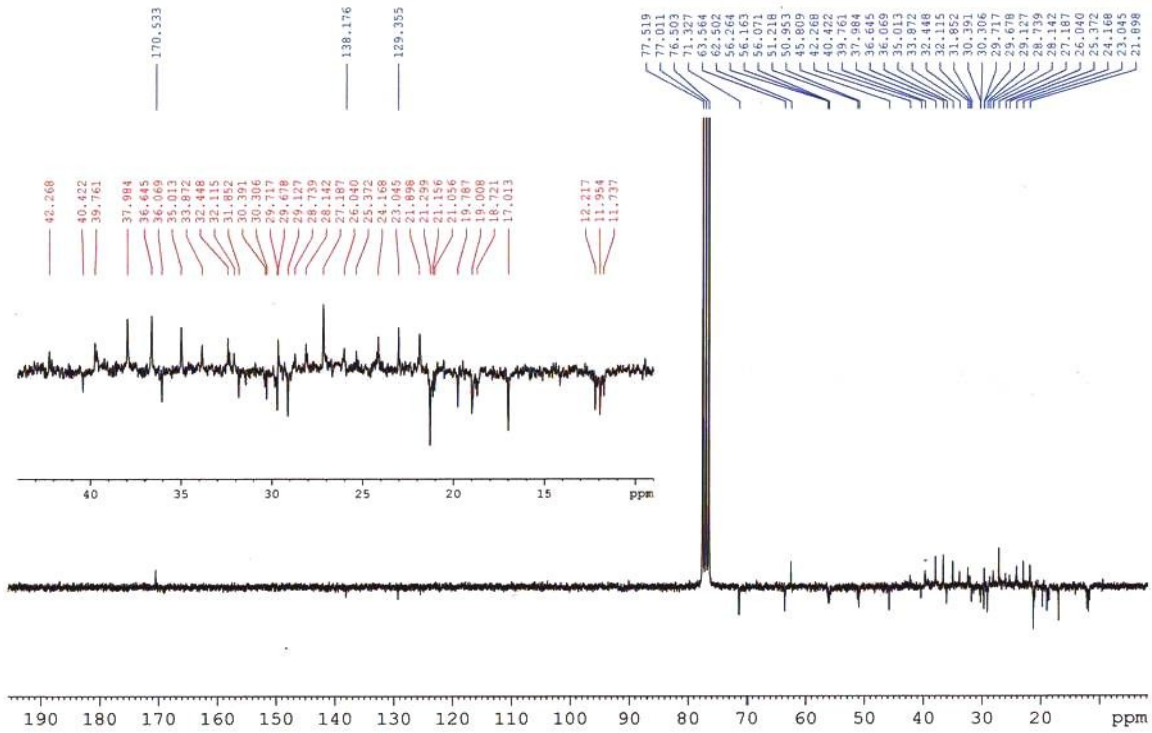


Figure 79: Spectre de RMN ^{13}C de 3-*O*-acétyl-5*β*,6*β*-epoxystigmastan-22-en-3*β*-ol

.

II/

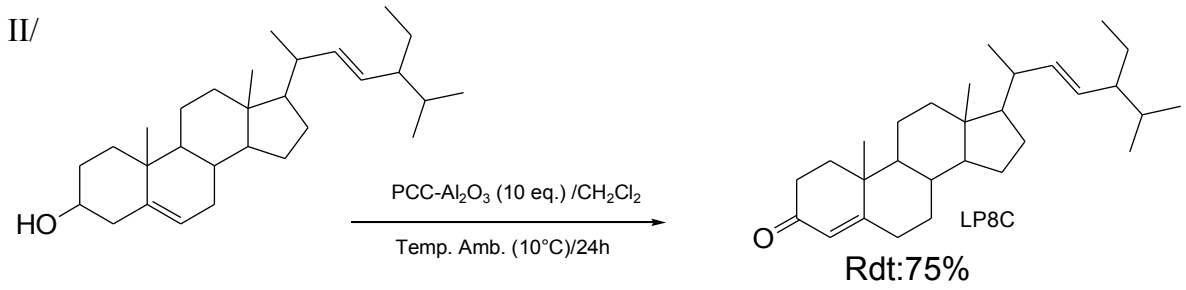


Schéma 29: Réaction d'oxydation du stigmastérol par PCC.

Tableau 22: Données de RMN ^{13}C (*CDCl₃*, 62.5 MHz) de stigmasta-4,22-dien-3-one.

Position	**LP8C**	Multiplicité
1	37.8	CH_2
2	32.2	CH_2
3	200.4	C=O
4	125.4	CH
5	168.5	C
6	46.9	CH_2
7	31.2	CH_2
8	31.4	CH
9	50.9	CH
10	36.5	C
11	21.7	CH_2
12	39.8	CH_2
13	42.4	C
14	56.4	CH
15	24.2	CH_2
16	28.2	CH_2
17	56.2	CH
18	11.9	CH_3
19	20.1	CH_3
20	40.4	CH
21	21.4	CH_3
22	137.8	CH
23	129.5	CH
24	51.2	CH
25	31.8	CH
26	21.1	CH_3
27	18.3	CH_3
28	25.4	CH_2
29	11.9	CH_3

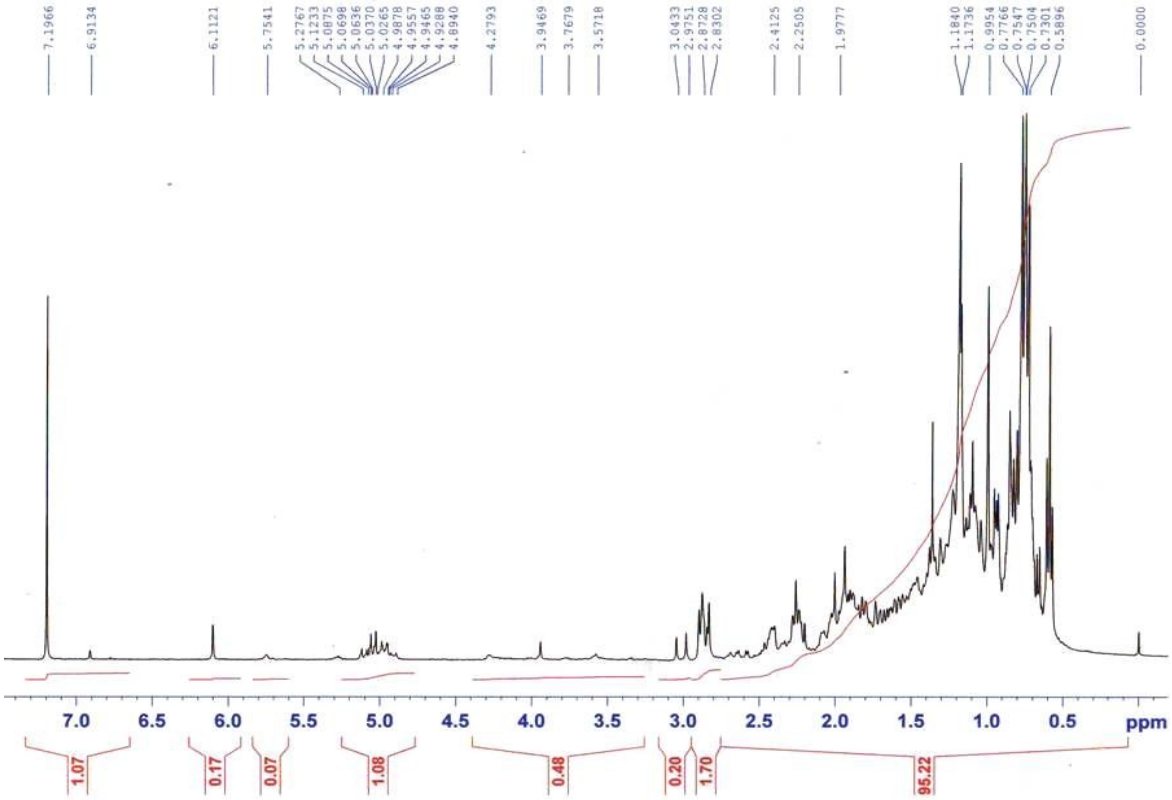


Figure 80: Spectre de RMN ^{1}H de stigmasta-4,22-dien-3-one.

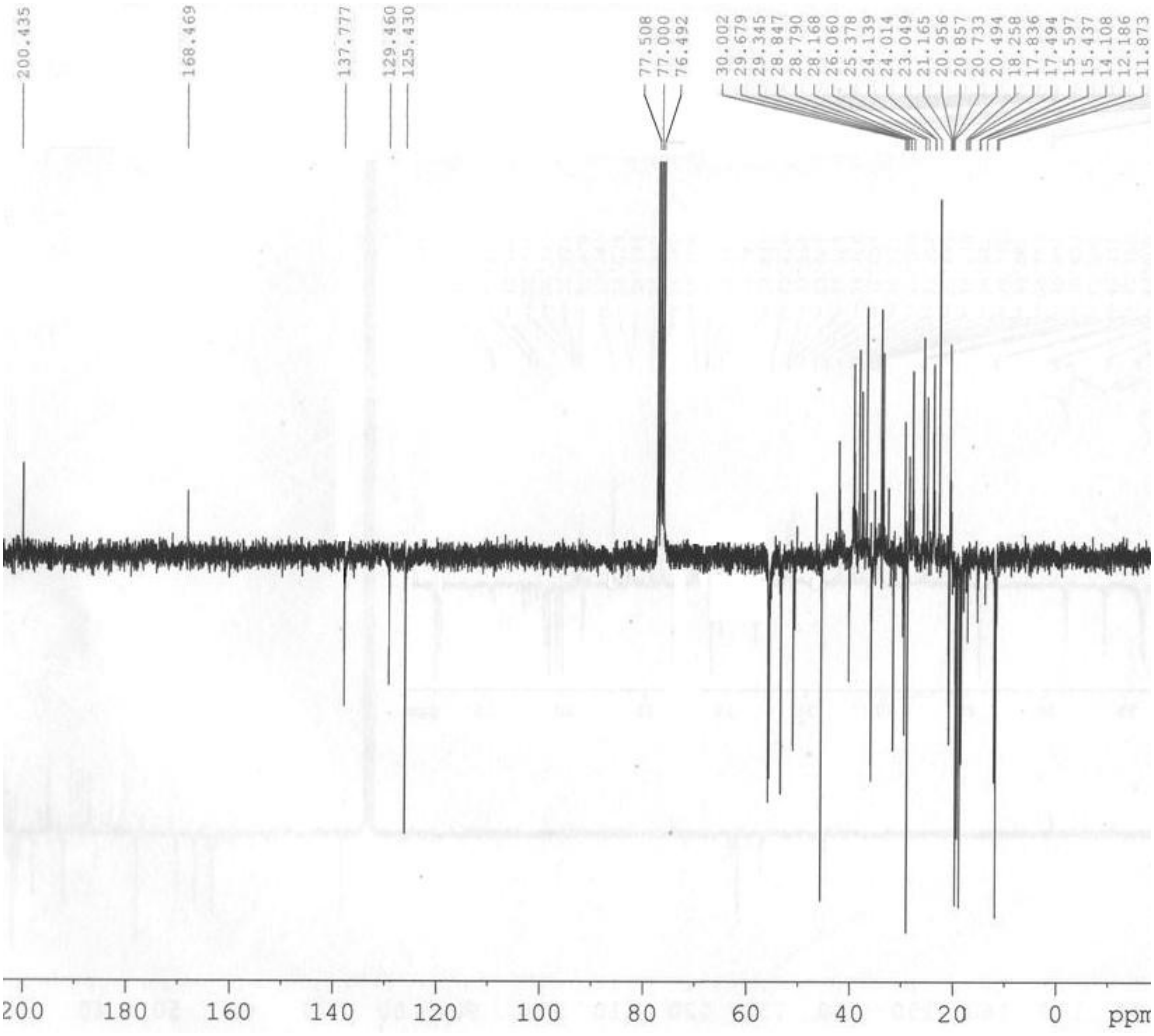


Figure 81: Spectre de RMN ^{13}C de stigmasta-4,22-dien-3-one.

III/

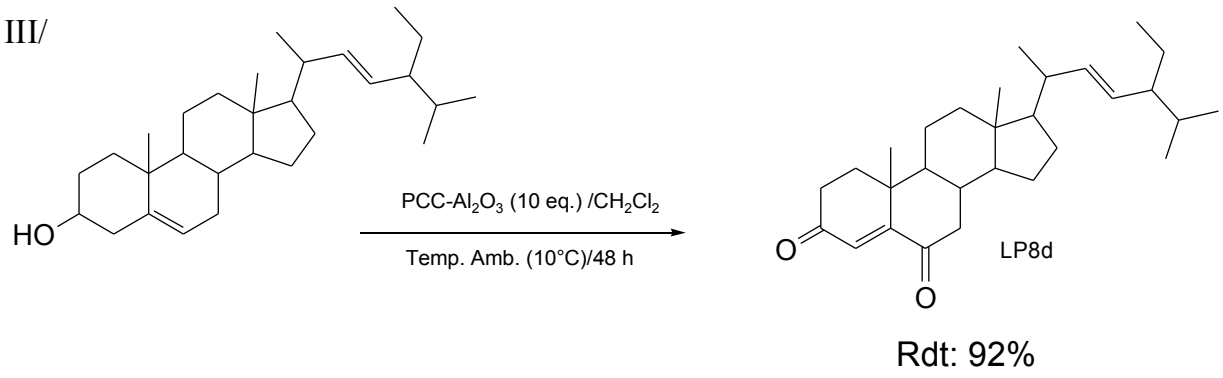
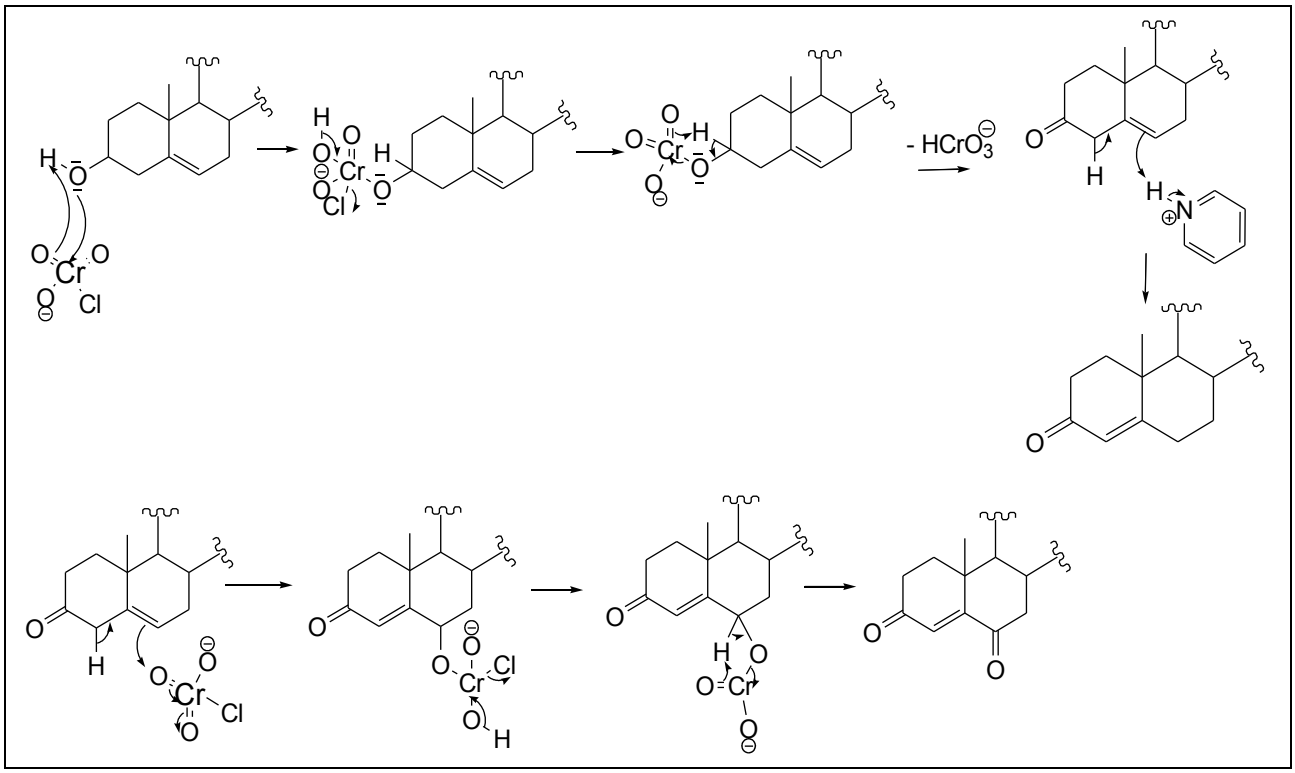


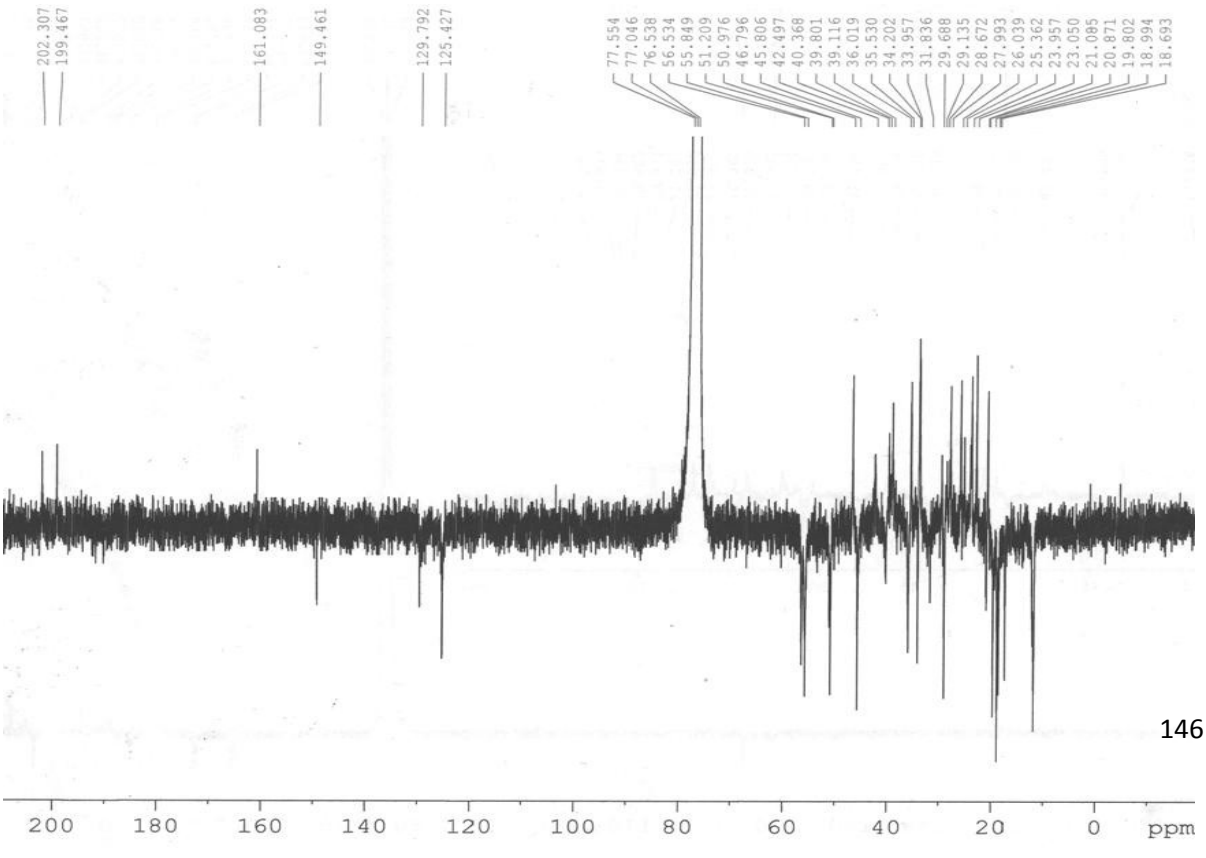
Schéma 30: Réaction d'oxydation du stigmastérol par le PCC.

Tableau 23: Données de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62.5 MHz) de stigmasta-4,22-diene-3,6-dione (comparaison avec les déplacements chimiques du produit de réaction issu du cholestérol)

Position	**LP8d**	Multiplicité	Bibliographie [114]
1	34.2	CH_2	34.3
2	34.0	CH_2	34.0
3	202.3	C=O	202.1
4	125.4	CH	125.5
5	165.5	C	161.1
6	199.5	C=O	199.3
7	46.8	CH_2	46.8
8	34.2	CH	35.7
9	51.0	CH	51.1
10	39.1	C	39.3
11	20.9	CH_2	21.1
12	39.8	CH_2	39.9
13	42.5	C	42.6
14	56.5	CH	56.7
15	24.0	CH_2	24.0
16	28.0	CH_2	28.0
17	55.8	CH	56.1
18	12.0	CH_3	11.9
19	17.5	CH_3	17.9
20	36.0	CH	35.7
21	18.7	CH_3	18.7
22	149.5	CH	39.1
23	129.8	CH	24.0
24	51.2	CH	46.8
25	28.7	CH	28.0
26	21.1	CH_3	22.6
27	21.1	CH_3	22.8
28	25.4	CH_2	-
29	17.5	CH_3	-

II.3.1.3.3/ Mécanisme d’oxydation au PCC.


- HCrO3⊖


202.307
199.467
161.083
149.461
129.792
125.427
77.554
77.046
76.538
56.534
55.849
51.209
50.976
46.796
45.806
42.497
40.368
39.801
39.116
36.019
35.530
34.202
33.957
31.836
29.688
29.135
28.672
27.993
26.039
25.362
23.957
23.050
21.085
20.871
19.802
18.994
18.693
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ppm

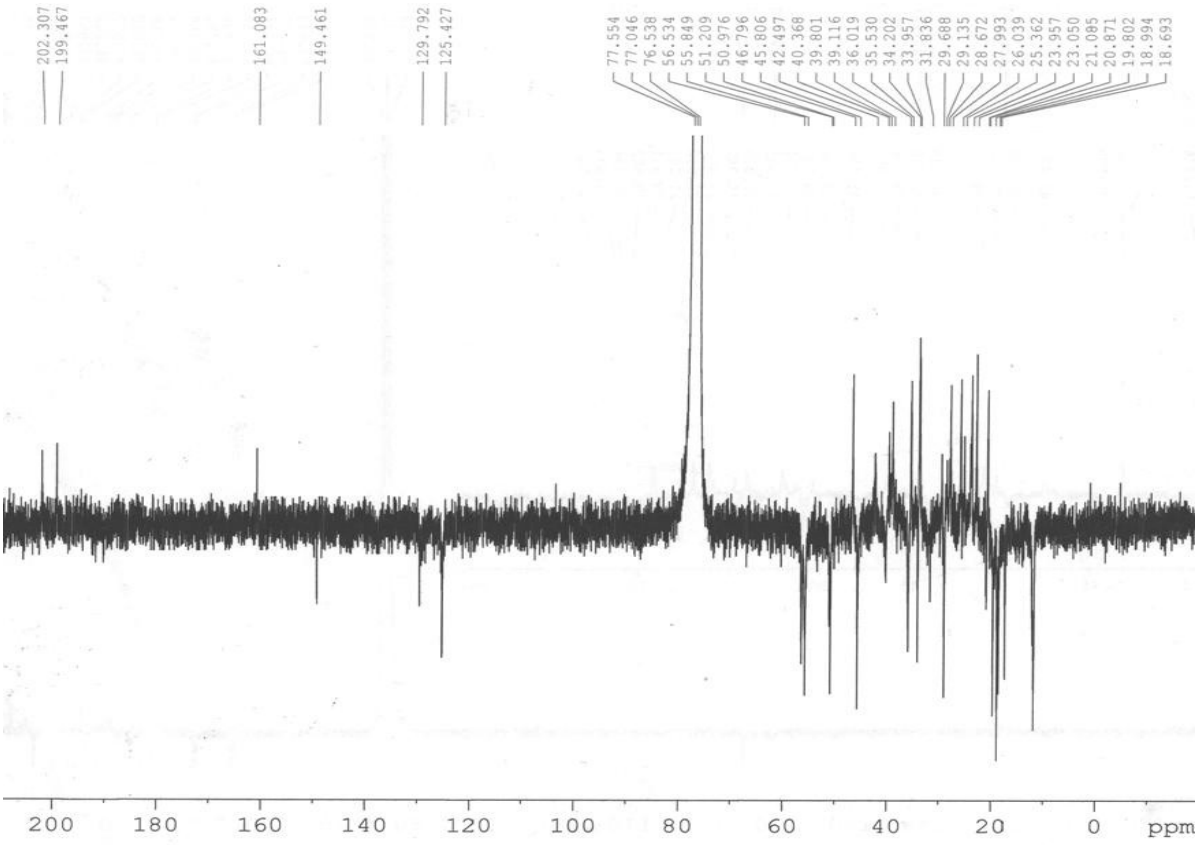


Figure 82: Spectre de RMN ^{13}C de stigmasta-4,22-diene-3,6-dione.

II.3.2/ Préparation des amines.

II.3.2.1/ Généralités.

La substitution du brome par l'azide se fait par un mécanisme SN_2. Cette réaction est plus rapide avec de meilleur rendement lorsqu'elle est faite dans un microonde que par chauffage direct.[115] L'azidure est transformé en amine par action du couple (Zn/NH_4Cl) qui est un agent réducteur doux. Lors de la réaction, les doubles liaisons C=C styrènes et autres sont tolérées contrairement aux réactions de réduction en présence du palladium ou du Nickel qui réduirait certaines de ces liaisons ou toutes. Ce système réducteur donne de meilleur rendement que le système Fe/NH_4Cl dans les mêmes conditions et le temps de réaction est relativement plus court que dans le second cas.[116]

II.3.2.2/ Application.

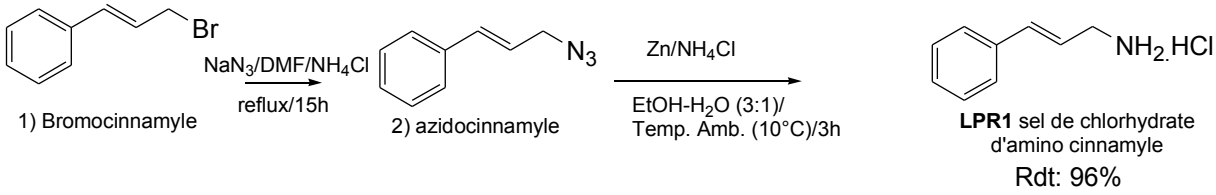


Schéma 31: Réaction de préparation de l'aminocinnamyle

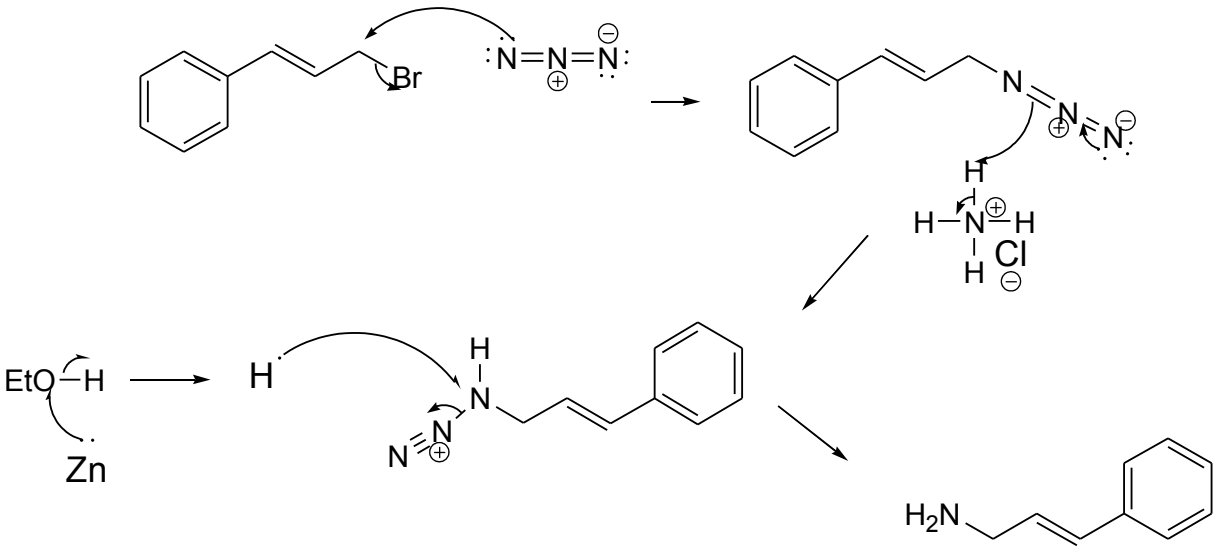


Schéma 32: mécanisme de préparation d'aminocinnamyle partant de l'azidocinnamyle

Tableau 24: Données de RMN ^{1}H (*DMSO-d_6*, 250 MHz) de l'aminocinnamyle

Position	δ(H) **LPR1**	δ(H) (1)	δ(H) (2)	Multiplicité
1	-	-	-	C
2	7.20-7.42 (*m*)	7.26-7.53 (*m*)	7.25-7.45 (*m*)	CH
3	7.20-7.42 (*m*)	7.26-7.53 (*m*)	7.25-7.45 (*m*)	CH
4	7.20-7.42 (*m*)	7.26-7.53 (*m*)	7.25-7.45 (*m*)	CH
5	7.20-7.42(*m*)	7.26-7.53 (*m*)	7.25-7.45 (*m*)	CH
6	7.20-7.42 (*m*)	7.26-7.53 (*m*)	7.25-7.45 (*m*)	CH
1'	6.61 (*d*, *J* = 16.0 Hz)	6.67 (*d*, *J* = 25.0 Hz)	6.67 (*d*, *J* = 15.8 Hz)	CH
2'	6.31 (*m*, *J* = 12.4, 16.0 Hz)	6.45 (*m*)	6.26 (*m*, *J* = 15.8, 13.2 Hz)	CH
3'	3.50 (d, J=6.2)	4.20 (d, J=2.0 Hz)	3.95 (*d*, *J* = 6.6 Hz)	CH_2

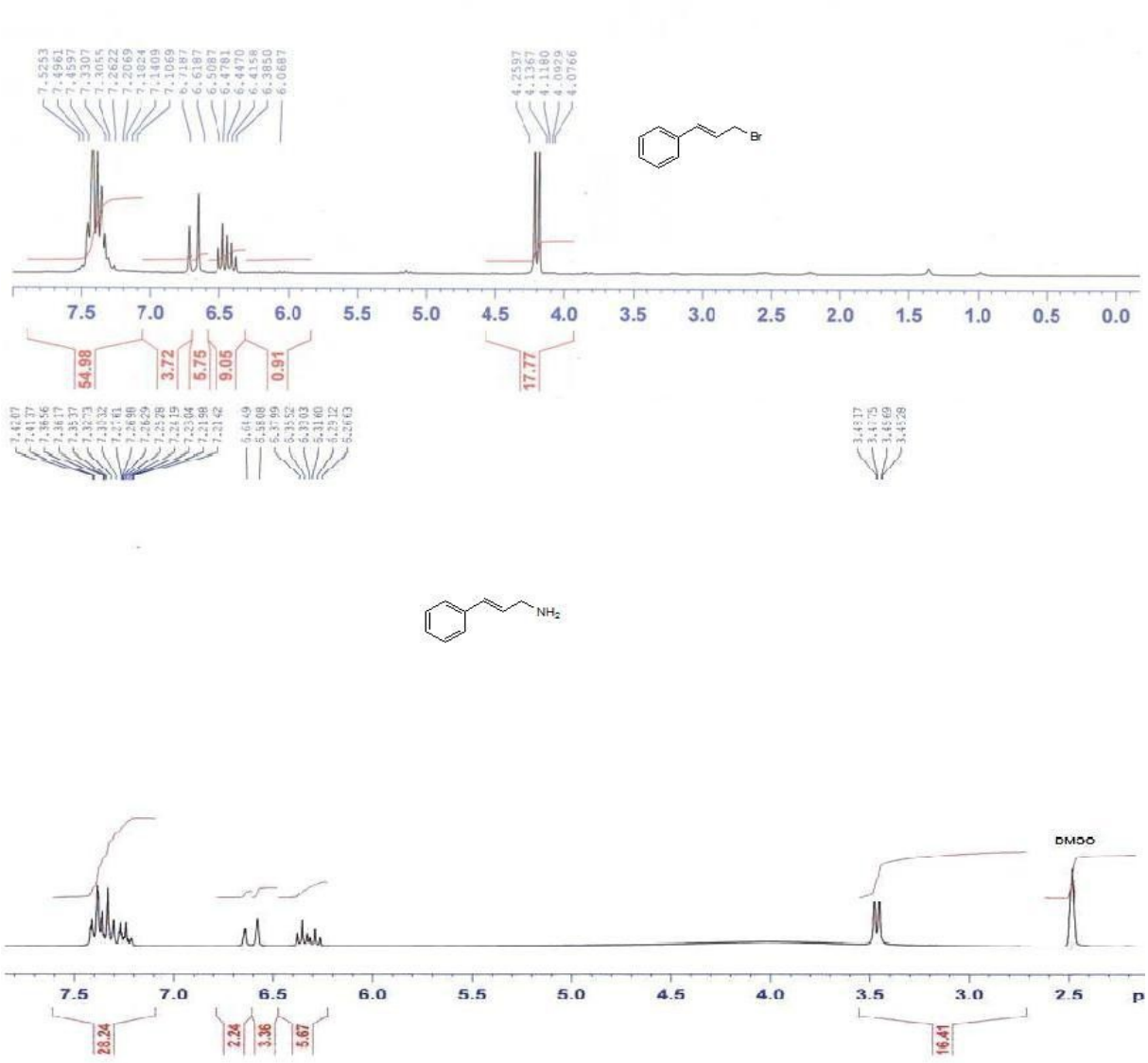


Figure 83: Spectres comparatifs de RMN ^{1}H du bromocinnamyle et de l'aminocinnamyle

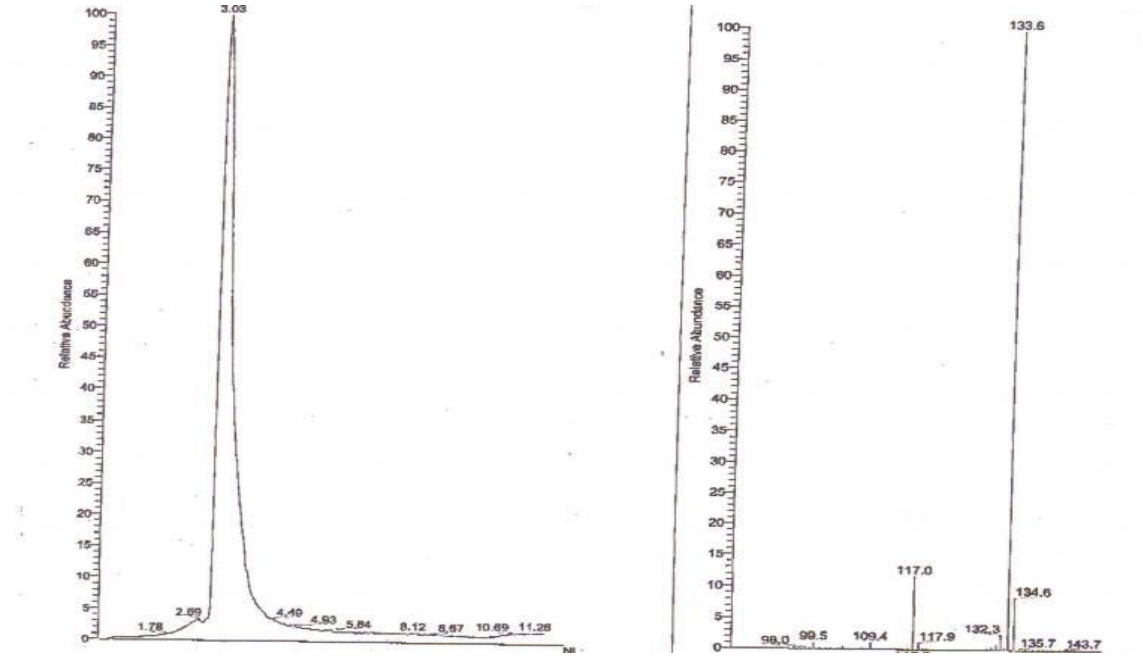


Figure 84: Spectre de LC-ESI de l'aminocinnamyle

II.3.3/ Imination.

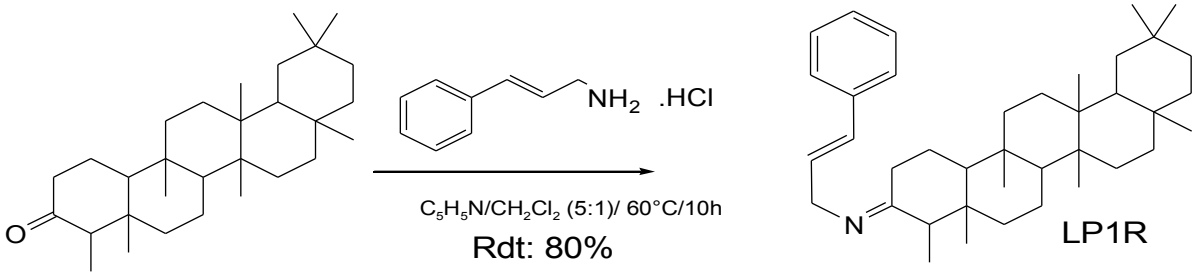


Schéma 33: Réaction d'imination de la friedeline

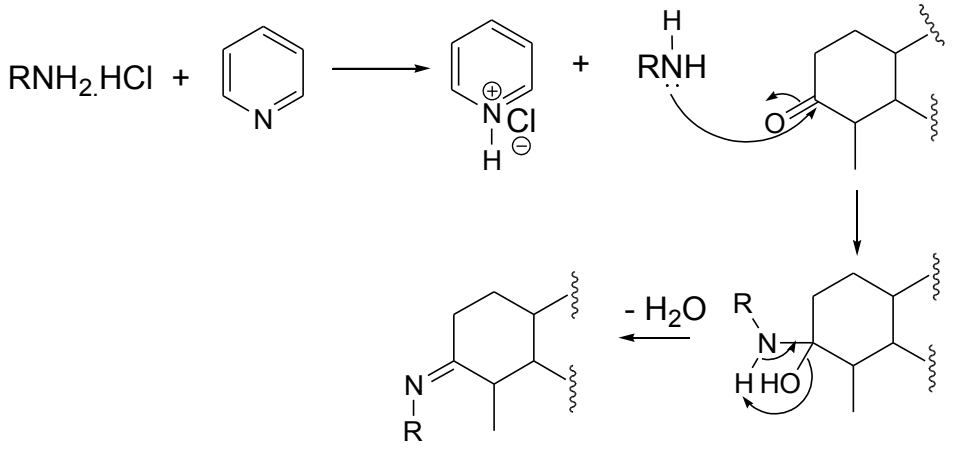


Schéma 34: mécanisme d'imination.

Tableau 25: Données de RMN ^{13}C (*$CDCl_3$*, 50 Mhz) du produit d'imination (**LP1R**)

Position	δ(C)	Multiplicité
1	22.3	CH_2
2	41.6	CH_2
3	169.9	C
4	58.3	CH
5	42.2	C
6	41.3	CH_2
7	18.3	CH_2
8	53.1	CH
9	37.5	C
10	59.5	CH
11	35.6	CH_2
12	30.5	CH_2
13	39.7	C
14	38.3	C
15	32.4	CH_2
16	36.0	CH_2
17	30.0	C
18	42.8	CH
19	35.4	CH_2
20	28.2	C
21	32.8	CH_2
22	39.3	CH_2
23	6.9	CH_3
24	14.7	CH_3
25	18.0	CH_3
26	20.2	CH_3
27	18.7	CH_3
28	32.1	CH_3
29	35.1	CH_3
30	31.8	CH_3

Cinnamyle		
1	132.3	C
2	126.4	CH
3	128.7	CH
4	117.8	CH
5	128.7	CH
6	126.4	CH
1’	136.5	CH
2’	125.5	CH
3’	41.8	CH_2

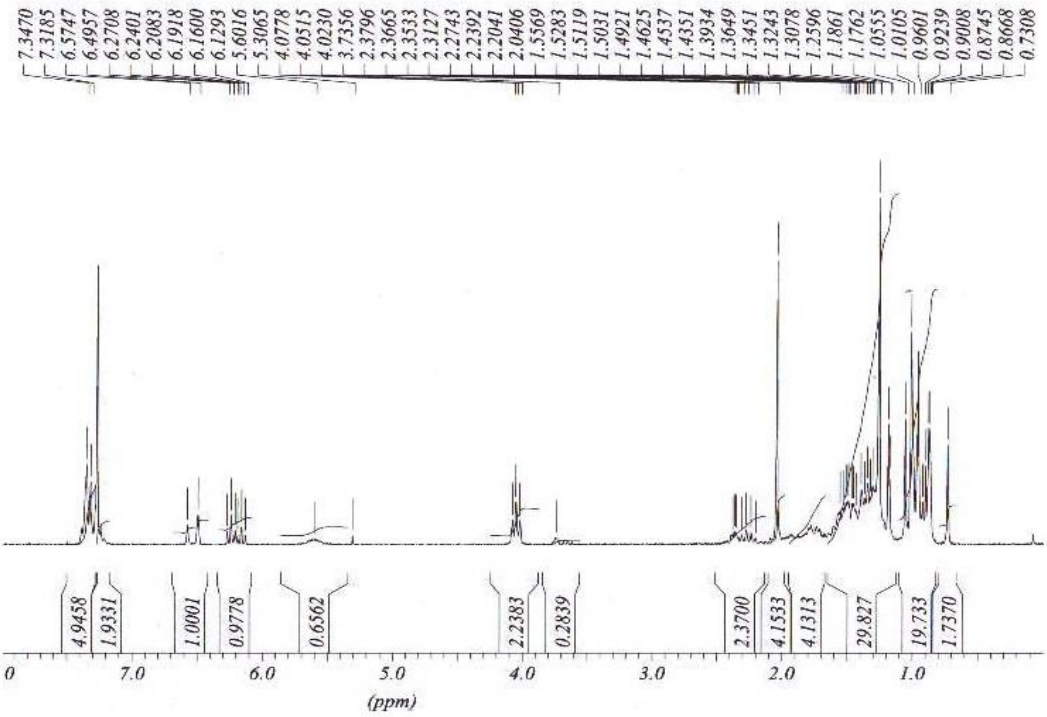


Figure 85: Spectre de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 200 MHz) du produit de l’imination.

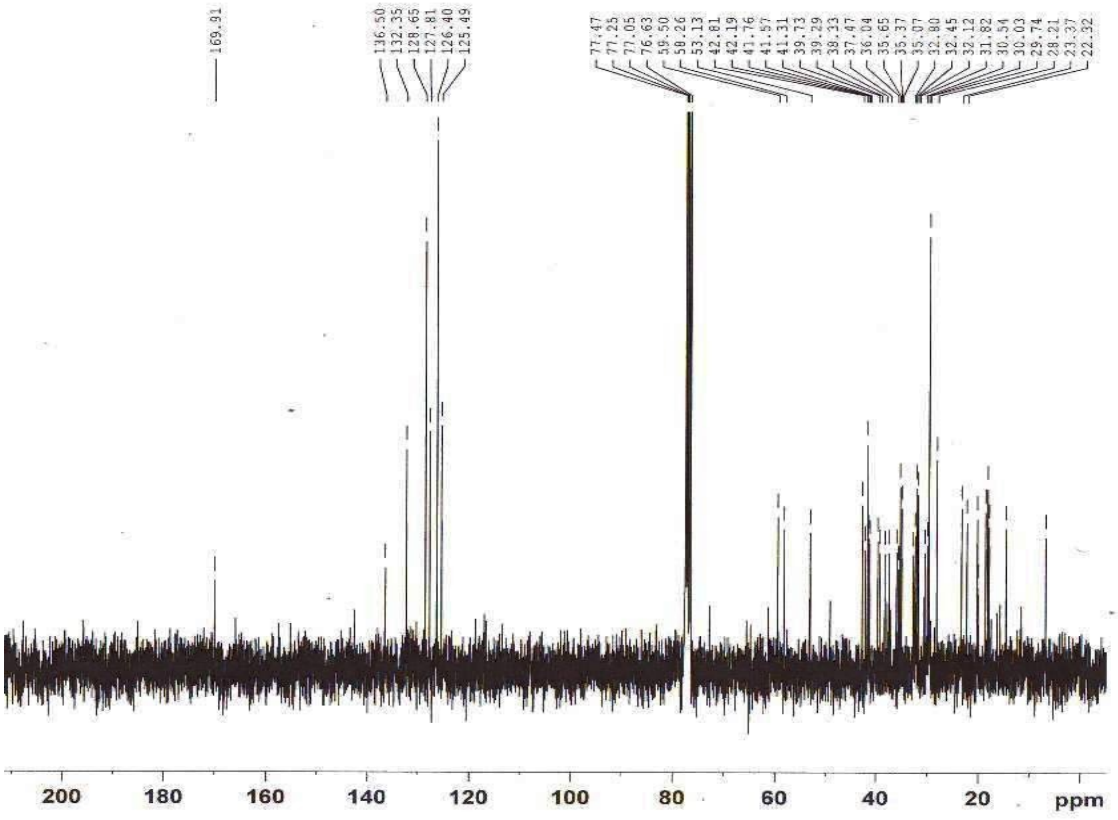


Figure 86: Spectre de RMN ^{13}C (*$CDCl_3$*, 50 MHz) du produit de l'imination.

II.3.4/ Glucosylation de l'aminocinnamyle.

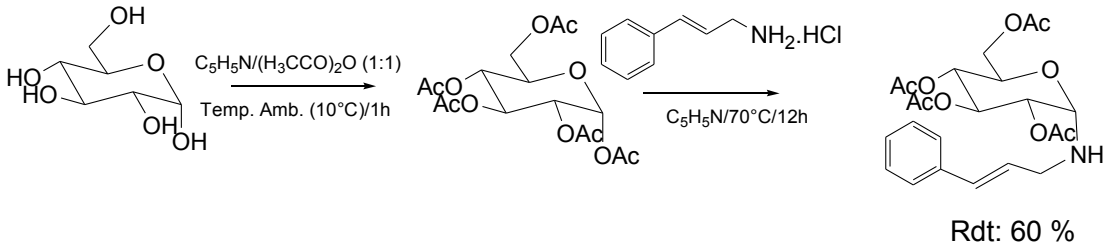


Schéma 35: Réaction de glucosylation de l'aminocinnamyle.

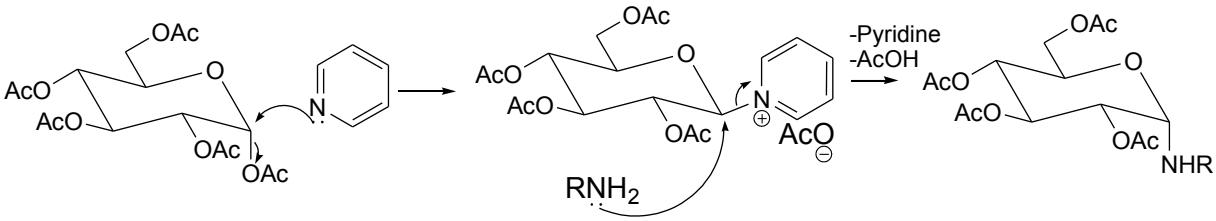


Schéma 36: mécanisme de synthèse de glucosylation.

Tableau 26: Données de RMN ^{1}H (*$CDCl_3$*, 250 MHz) et de ^{13}C (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz) de produit de glucosylation

Position	δ(H) **LPR2**	δ(C) **LPR2**	Multiplicité
1	-	136.5	C
2	7.23-7.36 (*m*)	128.6	CH
3	7.23-7.36 (*m*)	126.3	CH
4	7.23-7.36 (*m*)	127.7	CH
5	7.23-7.36 (*m*)	126.3	CH
6	7.23-7.36 (*m*)	128.6	CH
1’	6.51 (*d*, *J* = 15.9 Hz)	132.2	CH
2’	6.18 (*d*, *J* = 12.6, 15.9 Hz)	125.5	CH
3’	4.00-4.20 (*m*)	41.7	CH_2
Glucosyl			
1	6.32 (*d*, *J* = 3.7 Hz)	89.0	CH
2	5.09 (*dd*, *J* = 3.7, 10.3 Hz)	69.8	CH
3	5.47 (*t*, *J* = 9.9 Hz)	69.1	CH
4	4.00-4.20 (*m*)	67.7	CH
5	4.25 (*dd*, *J* = 8.4, 9.4 Hz)	67.9	CH
6	4.10-4.28 (*m*)	61.4	CH_2
Acétyl			
1	-	170.2, 169.8, 169.6, 168.7	C=O
2	2.02, 2.03, 2.04, 2.09 (*s*)	20.4, 20.5, 20.7, 20.8	CH_3

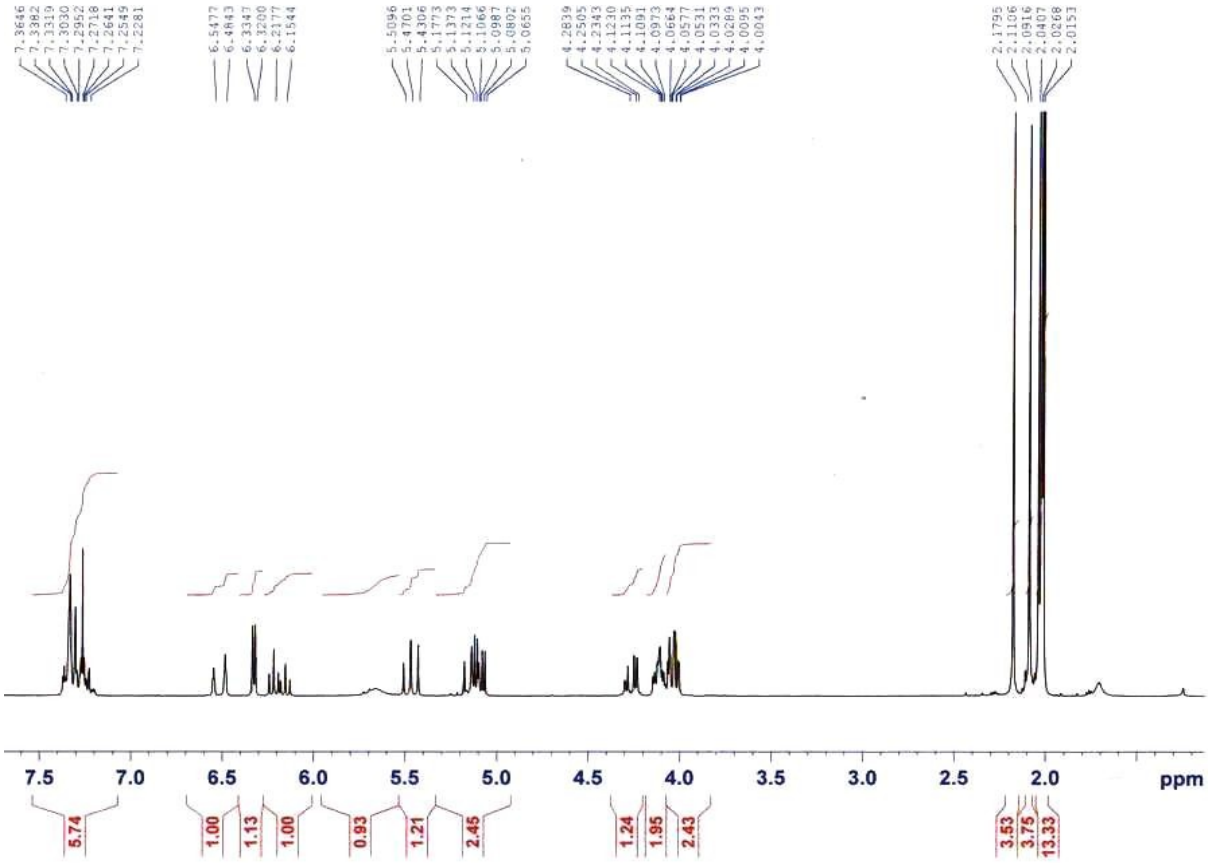


Figure 87: Spectre de RMN ^{1}H de amino cinnamyl-2,3,4,6-*O*-tétraacétyl-α-D-glucopyranoside

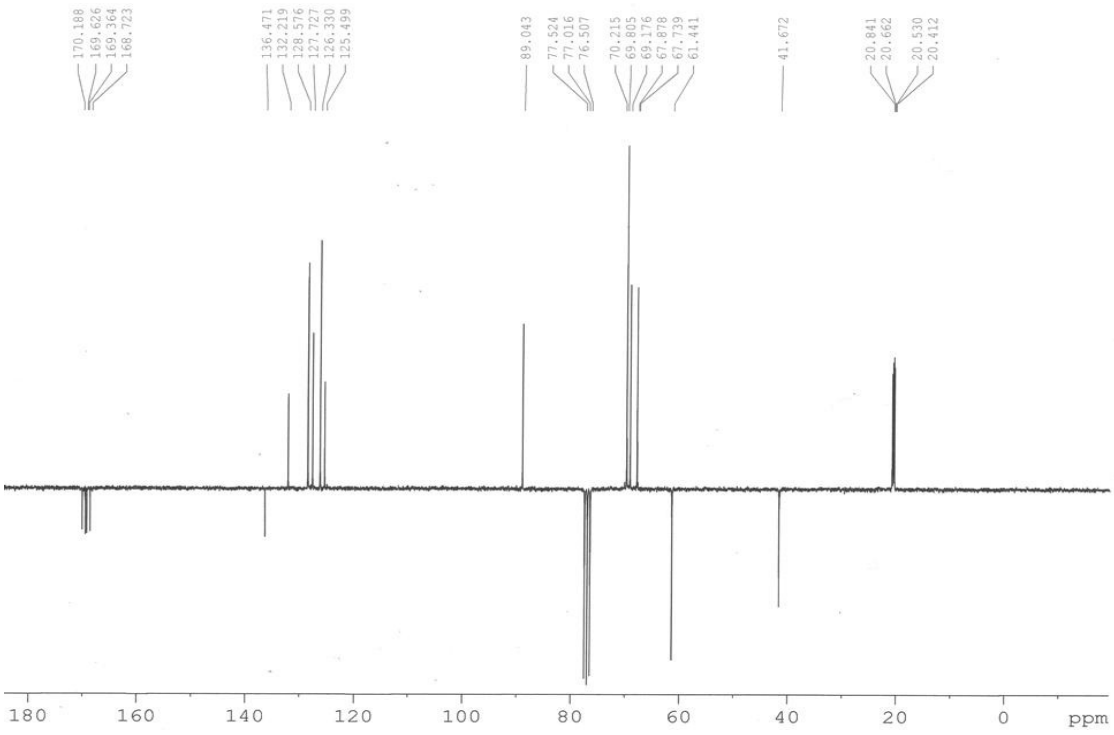


Figure 88: Spectre APT de amino cinnamyl-2,3,4,6-*O*-tétraacétyl-α-D-glucopyranoside

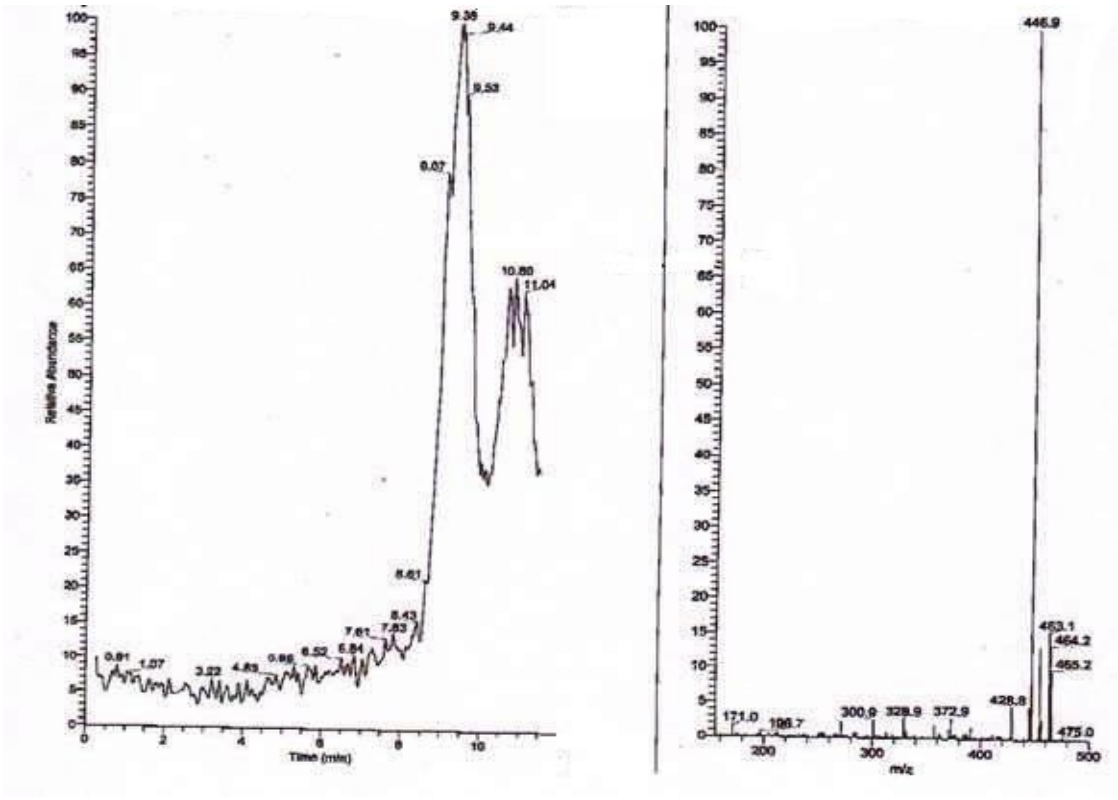


Figure 89: Spectre de LC-ESI du produit de glucosylation à *m/z* 463 (Temps de rétention: 10.8 min)

CHAPITRE III
EVALUATION BIOLOGIQUE

III.1/ Etude du pouvoir antioxydant des fractions et de quelques composés isolés.

III.1.2/ Méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).

C'est une méthode qui avait été développée initialement pour tester la capacité antioxydante du plasma et aujourd'hui, elle est utilisée pour évaluer cette propriété chez les plantes (les extraits organiques et composés isolés) ou les produits de synthèse. Le potentiel antioxydant total d'un échantillon est déterminé grâce à son pouvoir réducteur du fer^{III} en fer^{II}. La manipulation se fait sur un spectrophotomètre à l'absorbance 593 nm à 37 °C et les mesures du FRAP sont obtenues en comparant le changement de l'absorbance à 593 nm du milieu réactionnel avec celle du milieu où il n'y a que du fer^{II} de concentration connue. Le milieu réactionnel passe de la coloration bleue due au complexe Fe^{III}-TPTZ (TriPyridylTriaZine) à limpide dû à la présence du Fe^{II} dans le cas où notre drogue ou extrait a une capacité antioxydante. Le potentiel antioxydant est comparé à des molécules de référence telles que le Trolox (dérivé de la vitamine E), le α-tocophérol, l'acide urique, la bilirubine ou l'acide ascorbique dont l'activité antioxydante est connue.[117]

III.1.3/ Mode opératoire.

Deux réactifs entrent dans la préparation du réactif de FRAP; il s'agit du mélange de 10 ml de tampon acétate + 1 ml de TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazine) + 1 ml de $FeCl_3$.

- Tampon acétate: 4.1 g de $CH_3COONa.3H_2O$ pour 1,6 ml de H_3CCOOH 99.88%. A compléter à 1 L avec de l'eau distillée. Le pH doit être ajusté à 3.6 avec NaOH ,1M.
- TPTZ: 3.1 mg de TPTZ dans 1mL de HCl à 40 mM.

5.4 mg de $FeCl_3$ est dissout dans 1 mL d'eau distillée.

Une gamme est préparée avec 10 tubes contenant des concentrations croissantes de $FeSO_4$ (0.5 mM) en variant juste le volume de manière croissante et avec une amplitude de 20 µL (cf. tableau 38). Le volume de chaque échantillon est complété à 200 µL avec de l'eau distillée de manière décroissante et d'amplitude 20 µL. 20 µL de chaque échantillon sont prélevés et complétés à 80 µL avec 60 µL d'eau distillée. Le réactif FRAP est apprêté en mélangeant 20 ml de tampon acétate à 2 mL de TPTZ (10.7 mg TPTZ dissout dans 3.45 mL HCl, 40 mM) et 2 ml de solution de $FeCl_3$ (16.8 mg de $FeCl_3$ dissout dans 3.11 mL d'eau). Le réactif est incubé dans le bain marie pendant 30 minutes à 37 °C à l'obscurité. Ensuite 600 µl de celui-ci est ajouté aux dix échantillons ci-dessus de 80 µL à intervalle de temps régulier de 40 secondes entre chaque tube. Après avoir homogénéisé les tubes au vortex, ils sont incubés à

37 °C pendant 30 minutes. Au bout des 30 minutes d'incubation, l'absorbance de chaque tube est mesurée à 593 nm.

Tableau 27: Récapitulatif du mode opératoire de la technique FRAP

[$FeSO_4$] (nmol)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$FeSO_4$ à 0,5mM (µl)	—	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Eau distillée (µl)	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	—
Mettre 20 µl de chaque solution dans un autre tube à hémolyse											
Gamme ou échantillon	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Eau distillée	60 µl										
Réactif FRAP (µl)	600 µl Toutes les 40 secondes										

Pour ce qui est de la Détermination du pouvoir antioxydant des molécules **LP10**, **LP7**, **LP8a**, **LP13**, **LPR2** et **LP1R** par la technique FRAP. Le principe reste le même. Le trolox a été utilisé comme composé de référence et les différents échantillons de composés **LP** ont été préparés.

- Trolox: il a été préparé à 12 µM final à partir d'une solution mère à 50 mM: 1 µl trolox (50 mM) + 99 µl DMSO → trolox 0.5 mM; nous avons prélevé ensuite 16.32 µl de trolox à 0.5 mM auquel nous avons ajouté 3,68 µl de DMSO pour obtenir les 20 µl de trolox. Pour le Vf = 680 µl, cette concentration du trolox sera de 12 µM.

- Produits LP: chaque produit LP était dilué dans un certain volume de DMSO pour obtenir des solutions mères à 50 mM:

LP10: M = 695 g/mol m = 1.91 mg C_f = 50mM

$$V = \frac{m}{M.C} = \frac{1{,}91.10^{-3}}{695.50.10^{-3}} = 5.4964.10^{-5}\,l \text{ soit } 52.25\ \mu l$$

LP7: MM = 735 g/mol m = 1.92 mg C_f = 50 mM

V = 52.25 µ l

LP8a: MM = 470 g/mol m = 1.61 mg C_f = 50 mM

V = 68.51 µl

LP13: MM = 594 g/mol m = 1.28 mg C_f = 50 mM

V = 43.10 µl

LPR2: MM = 463 g/mol m = 1.31 mg C_f = 50 mM

V = 56.59 µl

LP1R: MM = 169 g/mol m = 3.46 mg C_f = 50 mM

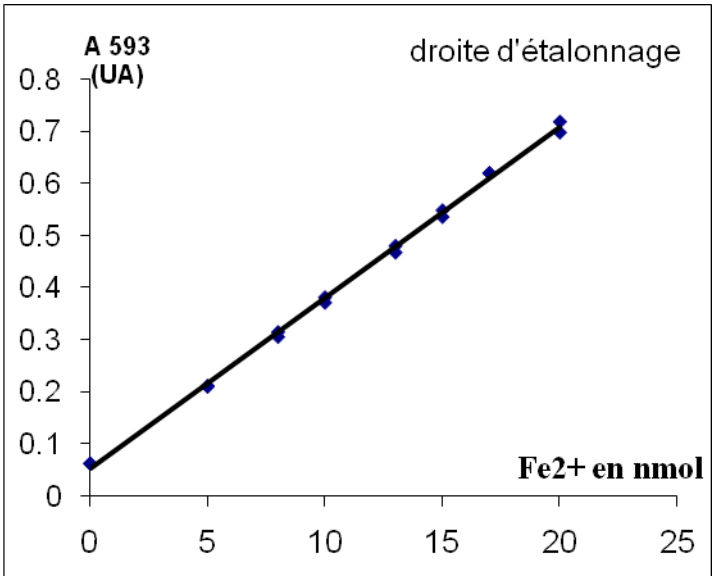
V = 409.47 µl

Une fois ces solutions mères à 50 mM obtenues, une seconde dilution sera faite au niveau de chaque tube à essai de façon à avoir 12 µM final, soit 16,32 µl d'échantillon LP (50 mM) dans 3,68 µl de solvant.

Mode opératoire: le protocole est celui de la technique FRAP classique. Dans 20 µl de produit on ajoute 60 µl d'eau distillée puis 600 µl de réactif FRAP préincubé 30 minutes à 37 °C. L'ensemble est laissé pendant 30 mn d'incubation à 37 °C et ensuite la densité optique de chaque tube est mesurée. La gamme a été faite en double, ainsi que les tubes de trolox et ces échantillons. En guise de contrôle, une série de tubes en double ont été introduit dans la gamme contenant uniquement le solvant (DMSO).

Tableau 28: Absorbance des composés LP

x = Fe2+ nmol	y = A593 (UA)
0	0,0472
0	0,0485
5	0,2171
5	0,2194
8	0,3097
8	0,3174
10	0,367
10	0,3766
13	0,4767
13	0,5616
15	0,5609
15	0,5459
17	0,6123
17	0,6229
20	0,7261



Echantillon	Dilution	prise d'essai (µl)	Abs	Nombre de mole déduit (nmol)	Conc. finale en mM	**Conc. finale en mM**	C.V.
LP10 - 12 µM		20	0,066	0,58	0,029	**0,03**	4,8
		20	0,068	0,64	0,032		
LP7 - 12 µM		20	0,073	0,79	0,039	**0,04**	7,0
		20	0,077	0,90	0,045		
LP8a - 12 µM		20	0,566	15,25	0,762	**0,78**	2,1
		20	0,588	15,89	0,795		
LP13 - 12 µM		20	0,049	0,08	0,004	**0,01**	42,0
		20	0,053	0,20	0,010		
LPR2 - 12 µM		20	0,053	0,20	0,010	**0,01**	18,2
		20	0,056	0,29	0,014		
Trolox - 12 µM		20	0,583	15,75	0,787	**0,79**	0,6

		20	0,590	15,95	0,798		

On a ci-dessous l'histogramme récapitulant le calcul des rapports $N_{FerII}/N_{produit}$ pour les échantillons et pour le trolox pour une meilleure comparaison de l'activité entre les produits.

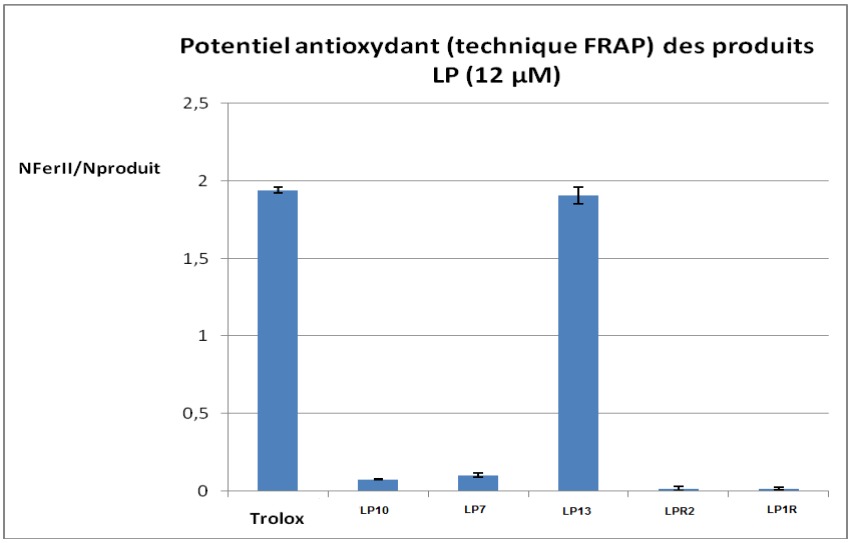


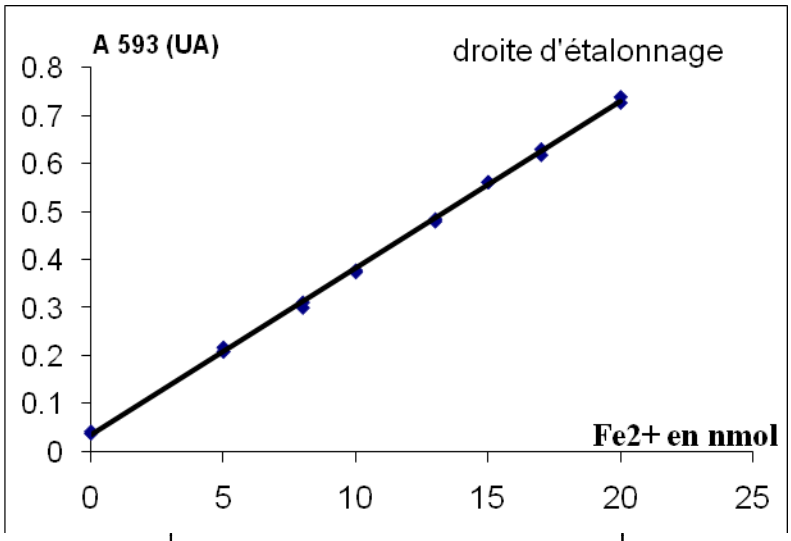
Figure 90: représentation du potentiel antioxydant des différents produits LP dissous dans le DMSO

Les activités sont très faibles pour tous les échantillons sauf pour **LP13**. Pour **LP10**, **LP7** et **LPR2** le pouvoir antioxydant est presque nul. Pour **LP13**, il est évident que son pouvoir antioxydant se rapproche considérablement de celui du trolox.

Le même travail a été fait sur les fractions issues de la chromatographie flash et les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 29: Absorbance des fractions issues de la chromatographie flash

x = Fe^{2+} nmol	y = A593 (UA)
0	0,0521
0	0,0568
5	0,1998
5	0,2079
8	0,3035

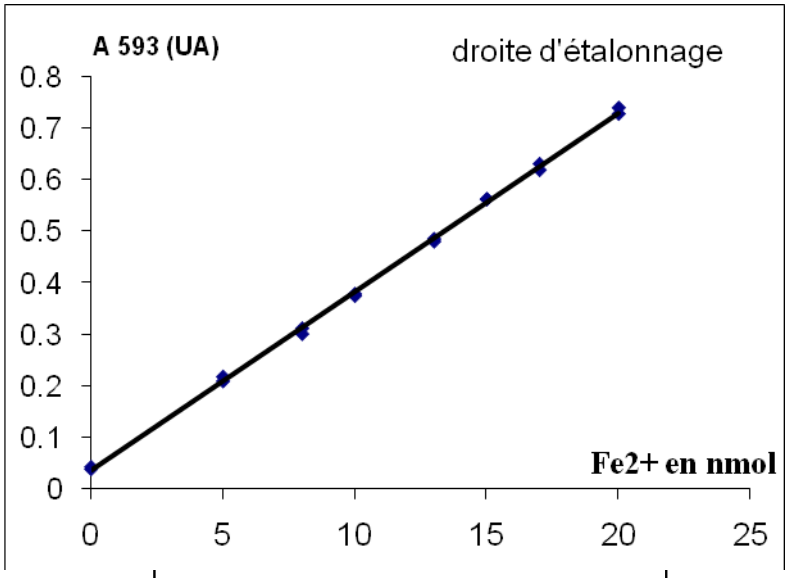


R = 0,9995

Echantillon	Dilution	prise d'essai (µl)	Abs	Nombre de mol déduite (nmol)	Conc. finale en mM	**Conc. finale en mM**	C.V.	Verdict
Extrait 1 ou extrait Hex-AE 3:1 des tiges		20	0,365	9,81	0,491	**0,49**	0,8	correct
		20	0,370	9,97	0,498			
Extrait 2 ou extrait Hex-AE 1:1 des tiges		20	0,415	11,36	0,568	**0,60**	5,8	accepté
		20	0,460	12,76	0,638			
Extrait 3 ou extrait MeOH des tiges		20	0,581	16,52	0,826	**0,83**	0,7	correct
		20	0,589	16,77	0,838			
Extrait 4 ou extrait Hex-AE 3:1 des feuilles		20	0,401	10,93	0,546	**0,55**	0,1	correct
		20	0,402	10,96	0,548			
Extrait 5 ou extrait Hex-		20	0,409	11,18	0,559	**0,55**	2,4	correct
		20	0,392	10,65	0,532			

AE 1:1 des feuilles								
Extrait 7 ou extrait MeOH des feuilles		20	0,412	11,27	0,564	**0,56**	0,7	correct
		20	0,407	11,12	0,556			
Trolox - 12 µM		20	0,582	16,55	0,827	**0,83**	0,6	correct
		20	0,588	16,74	0,837			

x = Fe2+ nmol	y = A593 (UA)
0	0,0428
0	0,0386
5	0,2178
5	0,2091
8	0,3007



R = 0,9995

Echantillon	Dilution	prise d'essai (µL)	Abs	nmol déduite	Conc. finale en mM	**Conc. finale en mM**	C.V.	Verdict
Extrait 6 ou extrait AE des feuilles		20	0,431	11,39	0,569	**0,57**	0,9	correct
		20	0,438	11,59	0,580			
Trolox - 12 µM		20	0,582	15,74	0,787	**0,79**	0,5	correct
		20	0,588	15,92	0,796			

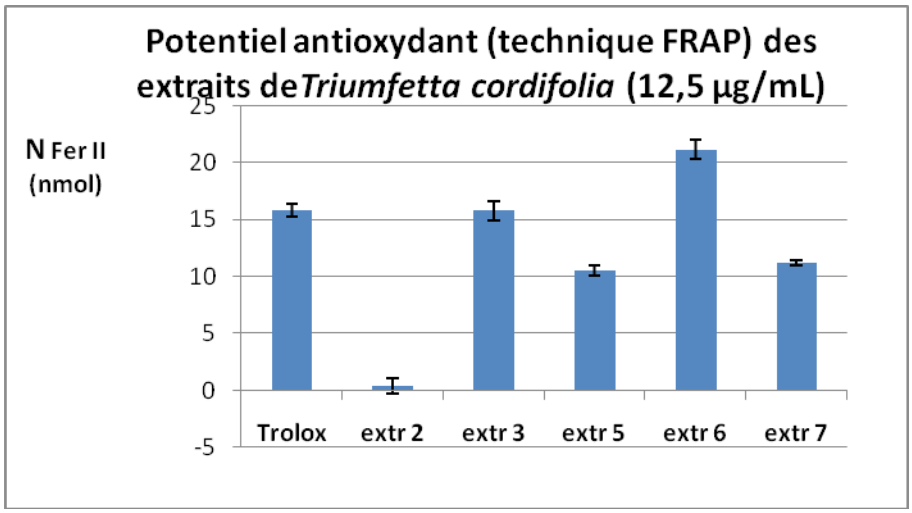


Figure 91: Histogramme representant le potentiel antioxydant des différentes fractions issues du flash de l'espèce sauvage

Si l'on compare les résultats d'un point de vue absorbance, on remarque que presque toutes les fractions présentent une activité antioxydante. Notons que la fraction 6 a l'activité la plus élevée car l'absorbance est d'environ 0,43 pour une concentration 2 fois moins élevée que celle des autres fractions. Ceci se justifierait par la présence du **LP13** dans cet extrait. Car c'est un composé qui présente aussi une importante activité antioxydante.

III.2/ Evaluation du potentiel cytotoxique de quelques drogues isolées.

Les cellules utilisées sont une lignée de cellules de fibrosarcome humain. Elles sont cancérigènes et nommées HT1080. En histologie, on observe des cellules fusiformes et d'architecture fasciculaire; ces faisceaux sont dans l'ensemble long et ayant parfois un aspect

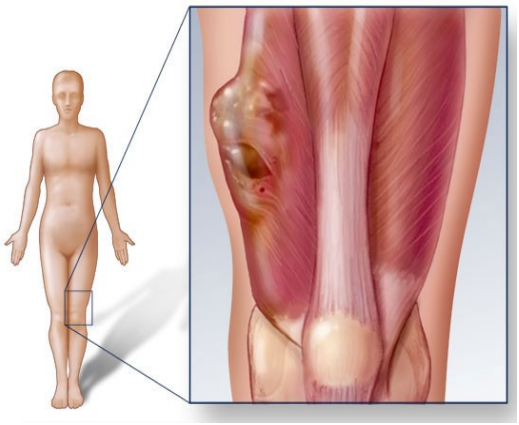


Figure 92: Fibrosarcome de la cuisse

d'arête de poisson. Cliniquement, le fibrosarcome (tissus nerveux) se développe au niveau des membres, du torse ou sur la face. Il peut être une seconde tumeur après l'irradiation ou s'intégrer dans le contexte d'une neurofibromatose. S'il est de type infantile, il est congénital ou alors survient dans les deux premières années de la vie. Son traitement peut être chirurgical et selon l'âge de l'enfant, une chimiothérapie peut être envisagée.[118]

La culture des ces cellules se fait à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 dans une enceinte de Dulbecco modifié et en présence d'un supplément de 10 % de sérum fœtal bovin avec de la pénicilline (100 µg/ml), de la streptomycine (100 U/ml), du glutamax (1 % v/v). Les cellules sont ensemencées dans 12 puits à raison de 5.10^4 cellules par puits. Après 24 heures, 1 ml de chaque drogue à tester est ajouté aux puits à des concentrations appropriées (les drogues sont dissoutes à des concentrations bien définies et conservées à -20 °C). Les cellules sont incubées pendant 48 heures et la viabilité cellulaire est analysée par cytométrie de flux. Cette analyse montre que la mort cellulaire (type I: apoptose, types II: autophage, type III: nécrose) est déclenchée par la perméabilité de la mitochondrie.[119] La mort globale (nombre de cellules mortes quelque soit le mécanisme de décès) des cellules est ainsi définie par une perte du potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi m$). Cette perte se caractérise par la chute de fluorescence verte du $DiOC_6(3)$ qui est une teinture lipophilique cationique.[120] Pour différencier les types de mort cellulaire, une autre analyse est faite prenant en compte l'intégrité de la membrane plasmique. La perte de l'intégrité de la membrane plasmique est une conséquence de la nécrose car dans cette analyse le

fluorochrome utilisé est l'iodure de propinium (IP) qui pénètre dans la cellule et donne une fluorescence rouge.

14 composés ont été testés et cinq d'entre eux présentent une forte activité cytotoxique, quatre une activité modérée et cinq une activité presque nulle. Après avoir mené le même travail après 48 H, les composés **LP8a**, **LPR2** et **LP9** induisaient un pourcentage de mort cellulaire supérieure à 50%.

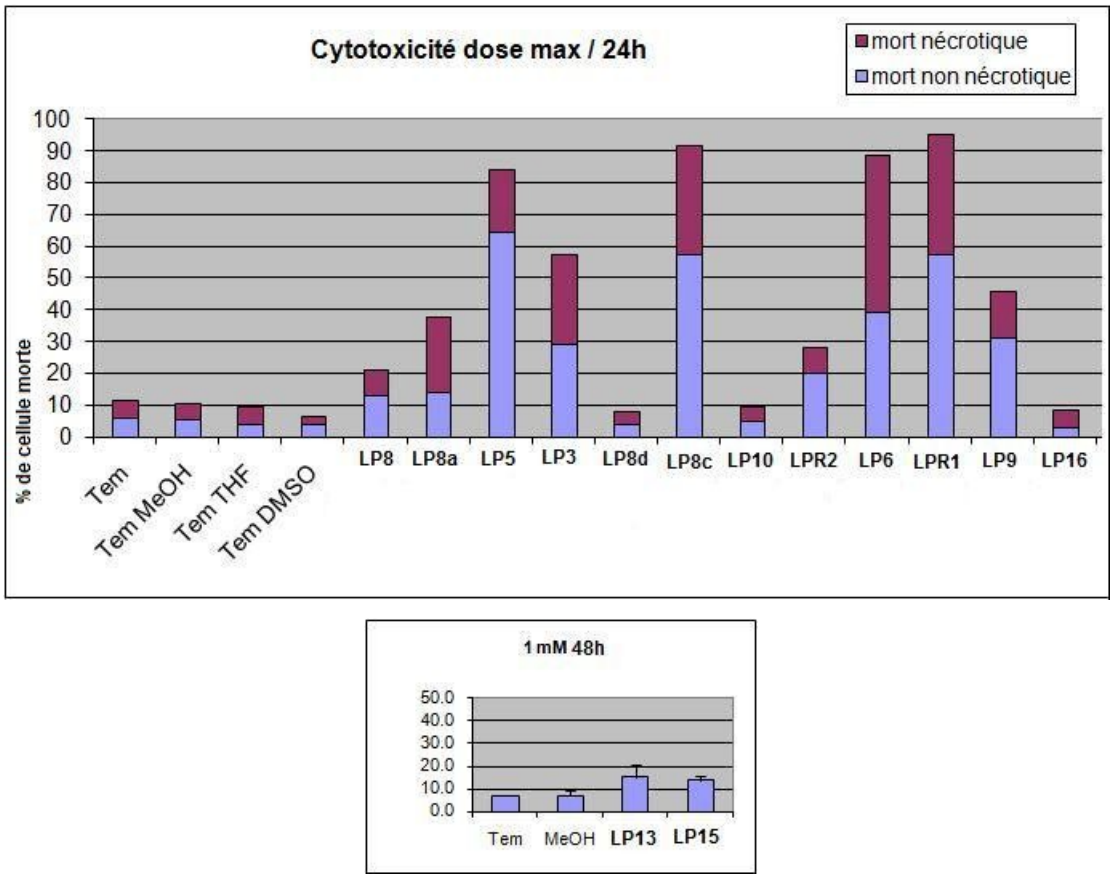
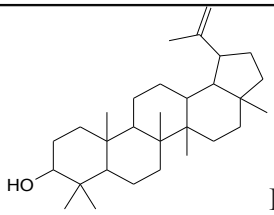
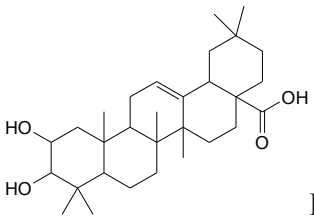
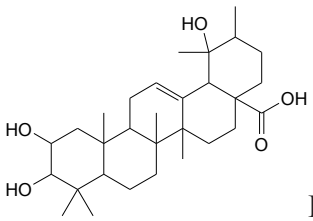
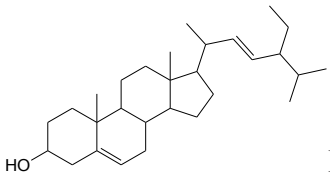
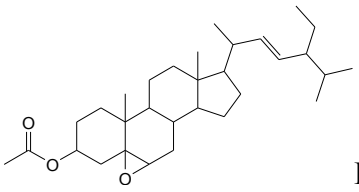
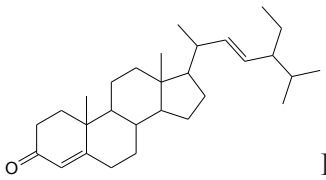
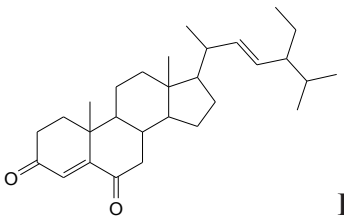
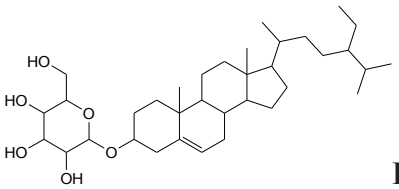
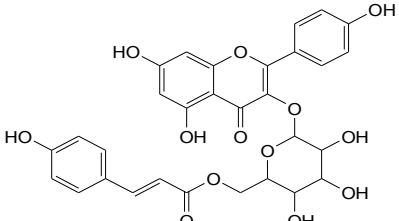


Figure 93: Pourcentage globale de mort de cellules et pourcentage de mort cellulaire non nécrotique et nécrotique.

Les résultats des tests obtenus sont consignés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 30: IC50 des composés testés

Structure	IC50
 **LP3**	1.1 mM (48 H)
 **LP6**	0.075 mM (48 H)
 **LP16**	Toxicité < 50% à dose max de 100 µM
 **LP8**	Toxicité < 50% à dose max de 100 µM
 **LP8a**	0.54 mM (48 H)
 **LP8c**	0.3 mM
 **LP8d**	Toxicité < 50% à dose max de 100 µM
 **LP9**	Toxicité < 50% à dose max de 100 µM
	Toxicité < 50% à dose max de 100 µM

CHAPITRE IV
PARTIE EXPERIMENTALE

Généralités sur les méthodes utilisées.- Les spectres IR ont été enregistrés sur le Perkin-Elmer (FT-IR system spectrum BX spectrometer) utilisant le disque KBr. Le Brucker DRX-400 MHz a servi pour les analyses de spectres RMN 1D et 2D. Les points de fusion étaient mesurés par l'appareil Stuart Scientific Melting Point apparatus SMP_3. Les matrices utilisées pour l'analyse de spectrométrie de masse (MALDI-FTICRMS et MALDI-TOFMS) étaient saturées de la solution d'acide 2,5-Dihydroxybenzoique (2,5-DHB) dans 50 % d'alcool méthylique, 0.1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) pour le MALDI-FTICRMS et une solution d'acide 2,5-Dihydroxybenzoique (2,5-DHB) (1 M) dans 50% acétonitrile, 50% d'eau ultrapure, 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA) respectivement. Tous les prélèvements et les dépôts étaient faits en utilisant la méthode sèche de droplet. Les mesures de MALDI-FTICRMS étaient mises au point sur un IonSpec Explorer Fourier Transform Mass Spectrometer 9.4 T équipé d'un ProMALDI module (IonSpec, Lake Forest, USA) menu d'une Orion refroidisseur d'air Nd:YAG System (355 nm, New wave research, Fremont, USA). La masse en tandem était faite par Sustained Off-Resonance Irradiation Collision Induced Dissociation (SORI-CID) directement dans une cellule à résonance d'ion cyclotron. Dans cette expérience de SORI-CID-MALDI-FTICRMS le temps d'activation était de 20 minutes, ce qui signifie que les ions étaient excités et pouvaient entrer en collision avec les molécules de gaz pendant 20 minutes, conduisant à la fragmentation. Ainsi tous les ions sont refroidis dans la cellule et peuvent être détectés. La technique MALDI-TOFMS était réalisée sur un Bruker Reflex IV menu d'un analyseur à temps de vol (TOFMS) (Bruker-Daltonic, Bremen, Germany) équipé d'un SCOUT 384 sonde à ions, utilisant une impulsion laser (337nm, model VSD-337ND, Laser Science Inc., Boston, MA) ayant une énergie de 400μJ/impulsion. Les chromatographies colonne sous pression réduite et sous pression atmosphérique ainsi que celles sur couche mince ont été respectivement faites avec du gel de silice 60H (taille des particules 90% < 45μm), 200-300 mesh et GF254. Le pouvoir rotatoire des composés ayant des centres asymétriques était mesuré sur le polarimètre Perkin Elmer model 341 à 589 nm.

Matériel végétal. L'espèce sauvage de *T. cordifolia A. Rich*. A été récoltée à Yaoundé, région du centre du Cameroun et l'espèce cultivée à Nkongsamba région du littoral. Les deux échantillons ont été identifiés à l'herbier national de Yaoundé par Monsieur Nana et enregistrés sous le numéro 12830SRF/Cam.

Extraction et isolement.- Les tiges de l'espèce sauvage de *T. cordifolia A. Rich.* étaient découpées, séchées et broyées; 3.93 kg de poudre obtenue étaient extraites avec du MeOH à

chaud. L'extrait au méthanol (80 g) était concentré sous vide et partitionné entre l'eau et l'acétate d'éthyle. Les deux phases concentrées sous vide ont donné 40 g d'extrait organique et 39 g d'extrait aqueux. L'extrait à l'acétate d'éthyle était soumis à la chromatographie flash (gel de silice, cyclohexane, cyclohexane-EtOAc 3:1; 1:1; 1:3, EtOAc, dans l'ordre de polarité croissante) donnant 5 fractions. La fraction au mélange cyclohexane-EtOAc (3:1) était purifiée par chromatographie colonne avec différents mélanges de cyclohexane-EtOAc donnant 217 fractions. Les fractions 22-32 éluées avec le mélange cyclohexane-EtOAc (93:7) donnait la 3-friedelanone (46.4 mg). La même fraction éluée de nouveau avec le mélange cyclohexane-EtOAc (23:2) donnait l'acide heptadecanoïque (72.4 mg) et le lupeol (32.0 mg) dans le mélange cyclohexane-EtOAc (9:1). Les fractions 40-52 étaient éluées par le mélange cyclohexane-EtOAc (17:3) et donnaient la bétuline (45 mg). La chromatographie flash de la fraction issue du système de solvants cyclohexane-EtOAc (1:1) donnait le mélange de stérols (11.0 mg) dans le système de solvants cyclohexane-EtOAc (17:3), l'acide 2-hydroxyoleanolique ou acide maslinique (32.5 mg) était isolé du système cyclohexane-EtOAc (3:1), l'acide 2-hydroxyursolique ou acide corosolique (5.0mg) était obtenu du mélange de solvants cyclohexane-EtOAc (2.9:1.1). La fraction obtenue de mélange cyclohexane-EtOAc (1:3) du flash était éluée avec le système CH_2Cl_2-MeOH dans l'ordre de polarité croissante. Des fractions 20-36 éluées avec le mélange CH_2Cl_2-MeOH (19:1), triumfettamide était isolé (50.0 mg); le même système de solvants donnait la 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside de *β*-sitostérol (11.0 mg) dans les fractions 54-59. La phase aqueuse séchée était épuisée à l'acétone donnant 30.1 mg d'extrait qui, élué et purifié grâce au mélange EtOAc-MeOH dans l'ordre de polarité croissante, donnait 114 fractions. Les fractions 74-80 purifiées avec le système EtOAc-MeOH (9:1) donnaient le triumfettoside Ic (30 mg).

1.87 kg de poudre de feuilles de l'espèce sauvage ont été extraits au mélange MeOH-CH_2Cl_2 1:1. L'extrait organique (93 g) obtenu a été fractionné par chromatographie flash au Cyclohexane, suivant une polarité croissante du mélange de solvants cyclohexane-AcOEt 3:1, cyclohexane-AcOEt 1:1, cyclohexane-AcOEt 1:3, ensuite à l'AcOEt et au MeOH. Toutes les fractions étaient purifiées sur gel de silice et par chromatographie sur colonne. La fraction obtenue au cyclohexane éluée au système Cyclohexane-AcOEt (23:2) donnait l'acide héneicosanoïque (56 mg) **LP12**. La fraction à 25% de mélange cyclohexane-AcOEt était purifiée donnant 217 fractions. Les fractions de 22 à 32 issues du mélange cyclohexane-AcOEt (9:1) ont été mélangées et purifiée de nouveau par des systèmes ternaires de cyclohexane-CH_2Cl_2-AcOEt suivant une polarité croissante en variant le volume du

dichlorométhane. Ainsi le composé **LP14** (12 mg) a été isolé de ce mélange du système 92.5:7:0.5. Le mélange de stérols **LP8** (654 mg) a été isolé de la fraction à 50% après élution au système de solvants cyclohexane-AcOEt 92.5:7.5. Les fractions issues du flash à 75% et à l'acétate d'éthyle ont été mélangées sur la base d'une CCM comparative. Elles ont été éluées au système CH_2Cl_2-MeOH suivant une polarité croissante donnant 150 fractions. Les fractions 20 à 50 éluées par ce système dans les proportions 95:5 ont donné le composé **LP9** (3*β*-*O*-D-glucopyranoside de sitostérol; 10.2 mg). Les fractions 53-59 éluées par le système CH_2Cl_2-MeOH 92.5:7.5 ont donné le composé **LP13** (*trans*-tiliroside; 74.8 mg). La fraction au méthanol (54 g) a été partitionnée entre l'eau et le n-butanol, 8.31 g d'extrait organique obtenus ont été purifiés par le mélange de solvants CH_2Cl_2-MeOH dans l'ordre de polarité croissant. 15 mg de Triumfettosaponine (**LP15)** étaient isolés des fractions 35-70 du système 87.5:12.5.

La poudre (5 kg) des tiges de l'espèce cultivée a été extraite au mélange CH_2Cl_2-MeOH 1:1 donnant 247.16 g d'extrait organique. 170 g de celui-ci ont été soumis à une chromatographie flash au cyclohexane, aux mélanges de cyclohexane-AcOEt suivant une polarité croissante (3:1; 1:1; 1:3), à l'AcOEt, à l'acétone et au MeOH. La fraction à 25% (15.66 g) éluée au mélange de solvants de cyclohexane-AcOEt suivant une polarité croissante a donné 120 sous fractions. Les fractions 80-86 éluées au système 87.5:12.5 ont donné 18 mg de **LP17.** Le mélange de stérols **LP8** (8 mg) a été isolé de la fraction à 50% après élution au système de solvants cyclohexane-AcOEt 92.5:7.5. Les fractions issues du flash à 75% et à l'acétate d'éthyle ont été mélangées sur la base d'une CCM comparative. Elles ont été éluées au système CH_2Cl_2-MeOH suivant une polarité croissante donnant 100 fractions. Des fractions éluées par ce système dans les proportions 17:1, **LP10** (45 mg) a été isolé des fractions 20-25 et **LP9** (11 mg) des fractions 30-39. La fraction à l'acétone (41.5 g) éluée au mélange de solvants CH_2Cl_2-MeOH suivant une polarité croissante donnant 90 sous fractions. Le composé **LP18** (89.6 mg) a été isolé des fractions 9 à 29 et du système CH_2Cl_2-MeOH 17:1 quant à **LP19** (63.7 mg), il est isolé des fractions 66-87 éluées au mélange CH_2Cl_2-MeOH 9:1. Le composé **LP16** (12 mg) a été isolé de la fraction au méthanol des sous fractions 1 à 5 éluées au système de solvants CH_2Cl_2-MeOH 17:1.

La poudre (1.80 kg) des feuilles de la seconde espèce a été extraite au mélange CH_2Cl_2-MeOH 1:1 donnant 183.36 g d'extrait organique. 130 g de cet extrait a chromatographié sous pression réduite au cyclohexane, aux mélanges de cyclohexane-AcOEt suivant une polarité croissante (3:1; 1:1; 1:3), à l'AcOEt et au MeOH. La fraction au cyclohexane (3.38 g) éluée

au mélange de solvants d'ether de pétrole-CH_2Cl_2 suivant une polarité croissante a donné 99 sous fractions. Les sous fractions 28-48 éluées au mélange Ether de pétrole-CH_2Cl_2 24-1 ont donné le composé **LP20** (5 mg). La fraction au méthanol éluée au système CH_2Cl_2-MeOH de polarité croissante a donné **LP21** (150 mg) dans les sous fractions 42-83 éluées dans les proportions de 5% du système ci-dessus.

Triumfettamide: Poudre incolore; $C_{43}H_{85}NO_5$, **[α]** $^{27}_{D}$7.36 (*c* 0.095, C_5H_5N); **P.F.** [135-137]°C; **IR** ν_{max}. cm^{-1}; 3336, 3210,1622, 1545, 1466. **RMN ^{1}H** (*C_5D_5N*, 400 MHz) et **^{13}C** (*C_5D_5N*, 100 MHz) voir tableau 21. **HRMALDI-FTICRMS** m/z (rel. int.) 718.6315 $[M+Na]^+$ (14.5) calculé à 718.6320; 704.6156 $[M+Na-CH_2]^+$ (56.2), 690.6009 $[M+Na-C_2H_4]^+$ (40.0), 676.5854 $[M+Na-C_3H_6]^+$ (38.0), 664.6234 $[M-CH_3O]^+$ (100). 650.6071 $[M-CH_3O-CH_2]^+$ (71.8), 632.5976 $[M-CH_3O-CH_2-H_2O]^+$ (20.0). **SORI-MALDI-FTICRMSMS** du pic à m/z 664 donnait: m/z 415 $[C_{26}H_{54}O_3 + H]^+$ (6), 384 $[C_{25}H_{51}O_2 + H]^+$ (6.5), 311 $[C_{22}H_{46} + H]^+$ (6), 283 $[C_{17}H_{33}O_2N]$ (6.5).

Triumfettoside Ic: Poudre incolore; $C_{42}H_{73}NO_9$, **[α]** $^{30}_{D}$ +35.64 (*c* 0.27, MeOH); **P.F.** [172-173]°C; **IR** ν_{max}. cm^{-1} 3350; 1637; 1542; 1467; 1074. **RMN ^{1}H** (*MeOD*, 400 MHz) et **^{13}C** (*MeOD*, 100 MHz) voir tableau 22. **HRMALDI-FTICRMS**. m/z (rel. int.) 736.5327 $[M+H]^+$ (100) calculé 736.5358, 718.5753 $[M+H-H_2O]^+$ (30), 574.4991 $[M+H-C_6H_{11}O_5]^+$ (56), 556.4867$[M-C_6H_{11}O_6]^+$ (76), 510.3301 $[M-C_6H_{11}O_6-CH_3OH-CH_2]^+$ (30), 482.3205 $[M-C_6H_{11}O_6-CH_3OH-3xCH_2]^+$ (100), 156.0417 $[C_{11}H_{24}]$ (4), 287.2401 $[C_{20}H_{31}O]^+$ (20), 449.3070 $[C_{22}H_{42}O_8N+H]^+$ (30).

Les réactions d'acétylation et d'oxydation. 1 mg (1.44 µmol) du composé **LP10** et 1.1 mg (1.5µmol) de **LP11** étaient séparément dissouts dans 1 ml de pyridine sous agitation magnétique et 5 minutes plus tard, 1.5 ml d'anhydride acétique était ajouté. La réaction était suivie par CCM dans le système cyclohexane-EtOAc 9:1 et les produits acétylés étaient formés après 1 h. les deux solutions (a) étaient concentrées sous pression réduite et les résidus obtenus, étaient dissouts dans le mélange CH_2Cl_2 (2 ml)/acétone (10 ml) (b). 1 ml de solution aqueuse de $NaHCO_3$ (0.011 g, 0.13 mmol) et 1 ml de solution aqueuse d'oxone (0.03 g, 0.05 mmol) étaient préparées deux fois et ajoutées dans différentes solutions (b). Les deux milieux réactionnels sont portés sous agitation magnétique pendant 3 h et à température ambiante. Ils sont ensuite concentrés sous vide et soumis séparément à une extraction liquide-liquide entre l'eau et l'acétate d'éthyle. Les deux phases organiques sont concentrées sous vide donnant les

composés **1'** et **2'** lesquels sont identifiés par spectrométrie de masse par ionisation douce (MALDI-TOF).

La méthanolyse: Les composés **LP10** et **LP11** (1.2 mg) étaient séparément portés à reflux à 70°C pendant 18 h dans 2.5 ml de méthanol contenant 1.5 ml de 0.9 N HCl sous agitation magnétique. Les deux milieux réactionnels étaient neutralisés avec une solution aqueuse de sodium carbonate et extraits au chloroforme. L'analyse en spectrométrie de masse utilisant l'ionisation douce (MALDI-TOF) montrait seulement le pic correspondant à la longue chaine de base de chaque céramide: $[M+H]^+$ à m/z 452 pour **LP10** et 386 pour **LP11**.

Acide heptadecanoïque: Poudre amorphe; $C_{17}H_{34}O_2$; **RMN** de **^{1}H** (*$CDCl_3$*, 250 MHz): 2.29 (H-2, *t*, *J* = 5.8 Hz), 1.56 (H-3, *s* large), 1.20 [(H-4)-(H-16), *s* large], 0.81 (H-17, *s* large); **RMN** de **^{13}C** (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz): C-1 (179.0), C-2 (33.9), C-3 (31.9), (C-4)-(C-14) (29.1-29.7), C-15 (24.7), C-16 (22.7), C-17 (14.1).

Acide henéicosanoïque: Solide amorphe; $C_{21}H_{42}O_2$; **RMN** de **^{1}H** (*$CDCl_3$*, 250 MHz)**:** 2.28 (H-2, *t*, *J* = 6.6 Hz), 1.49-1.65 (H-3, m), 1.18 [(H-4)-(H-20), *s* large], 0.81 (H-21, *t*, *J* = 6.6 Hz); **RMN** de **^{13}C** (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz): C-1 (179.0), C-2 (33.8), (C-4)-(C-18) (29.1-29.7), C-19 (24.7), C-20 (22.7), C-21 (14.1).

Mélange de stérols (***β*-sitostérol** et **stigmastérol**): Poudre amorphe; $C_{29}H_{50}O$ et $C_{29}H_{48}O$; **RMN** de **^{1}H** (*$CDCl_3$*, 250 MHz): 5.35 (H-6, *d*, *J* = 4.9 Hz), 5.12 (H-22, *m*), 5.01 (H-23, *m*), 3.52 (H-3, *m*), 2.27 (H-4, *m*), 1.01 (H-18, *s*), 0.81 (H-19, *s*); **RMN** de **^{13}C** (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz)**:** ***β*-sitostérol** C-5 (140.7), C-6 (121.7), C-3 (71.8), C-14 (56.7), C-17 (55.9), C-9 (50.1), C-24 (45.8), C-4 (42.3), C-13 (42.3), C-12 (39.7). ***Stigmastérol*** C-5 (140.7), C-6 (121.7), C-3 (71.8), C-14 (56.8), C-17 (56.0), C-24 (51.2), C-9 (50.1), C-4 (42.3), C-13 (42.3), C-12 (39.8).

β*-sitostérol glucopyranoside**: Poudre blanche; $C_{35}H_{60}O_6$; **P.F.** [257-258]°C; **RMN** de **^{13}C** (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz): ***Aglycone: C-5 (140.9), C-6 (121.7), C-3 (77.3), C-14 (56.6), C-17 (55.9), C-9 (50.0), C-24 (45.6), C-13 (42.3), C-12 (39.9), C-1 (37.3), C-10 (36.7), C-22 (36.7), C-20 (35.9), C-4 (33.2), C-8 (31.9), C-2 (31.8), C-7 (31.8), C-25 (29.1), C-16 (28.3), C-23 (25.8), C-11 (25.8), C-15 (24.3), C-27 (20.2), C-28 (21.0), C-26 (19.3), C-21 (19.1), C-19 (19.4), C-18 (12.2), C-29 (12.1); ***glucopyranosyl***: C-1' (101.2), C-3' (77.2), C-5' (77.2), C-2' (73.9), C-4' (70.5), C-6' (61.5).

Friedelanone: Poudre blanche; $C_{30}H_{50}O$; **P.F.** [266-268]°C; **RMN** de ^{13}C (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz); C-3 (213.2), C-10 (59.5), C-4 (58.2), C-8 (53.1), C-18 (42.8), C-5 (42.1), C-6 (41.3), C-2 (41.5), C-13 (39.7), C-22 (39.2), C-14 (38.3), C-9 (37.4), C-16 (36.0), C-11 (35.6), C-19 (35.3), C-29 (35.0), C-21 (32.8), C-15 (32.4), C-28 (32.1), C-30 (31.8), C-12 (30.5), C-17 (30.0), C-20 (28.2), C-1 (22.3), C-26 (20.2), C-7 (18.2), C-27 (18.7), C-25 (17.9), C-24 (14.6), C-23 (6.8),

Lupeol: Poudre blanche; $C_{30}H_{50}O$; **P.F.** 213°C; **RMN** de **^{13}C** (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz)**:** C-20 (151.0), C-29 (109.3), C-3 (79.0), C-5 (55.3), C-9 (50.4), C-18 (48.3), C-19 (47.8), C-17 (47.8), C-14 (42.8), C-8 (40.8), C-22 (40.0), C-4 (38.8), C-1 (38.7), C-13 (38.1), C-10 (37.2), C-7 (34.3), C-21 (29.8), C-16 (29.7), C-23 (28.0), C-2 (27.4), C-15 (27.4), C-12 (25.1), C-11 (20.9), C-6 (18.3), C-24 (16.0), C-25 (16.1), C-26 (16.0), C-27 (16.0), C-28 (18.0), C-30 (19.3).

Bétuline: Poudre blanche; $C_{30}H_{50}O_2$; **P.F.** [256-257] °C ;**RMN** de **^{13}C** (*Acétone-d_6***,** 75 MHz)**:** C-20 (150.8), C-29 (109.1), C-3 (77.7),C-28 (58.8), C-5 (55.4), C-18 (48.6), C-9 (48.6), C-19 (47.9), C-17 (47.8), C-14 (42.5), C-8 (40.8), C-4 (38.7), C-1 (38.6), C-13 (37.3), C-10 (37.0), C-22 (34.2), C-7 (34.2), C-21 (29.7), C-16 (29.7), C-23 (27.7), C-15 (27.4), C-12 (25.3), C-2 (25.3), C-11 (20.7), C-6 (18.4), C-24 (15.5), C-25 (15.7), C-26 (15.2), C-27 (14.2), C-30 (18.4).

Acide oléanolique: Poudre blanche; $C_{30}H_{48}O_3$; **P.F.** 170 °C; **RMN** de **^{13}C** (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz): C-28 (182.7), C-13 (143.6), C-12 (122.6), C-3 (79.0), C-5 (55.2), C-9 (47.6), C-17 (46.5), C-19 (45.9), C-14 (41.6), C-18 (41.0), C-8 (39.2), C-4 (38.7), C-1 (38.4), C-10 (37.0), C-21 (33.8), C-29 (33.0), C-7 (32.6), C-22 (32.4), C-20 (30.7), C-23 (28.1), C-15 (27.7), C-2 (27.1), C-27 (25.9), C-30 (23.6).C-16 (23.4), C-11 (23.0), C-6 (18.3), C-26 (17.1), C-24 (15.5), C-25 (15.3).

Acide maslinique ou **acide 2*α*-hydroxyoleanolique**: Poudre blanche; $C_{30}H_{48}O_4$; **P.F.** [241-245] °C; **RMN** de **^{13}C** (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz): C-28 (178.5), C-13 (143.9), C-12 (121.4), C-3 (82.2), C-2 (67.1), C-5 (54.7), C-9 (47.0), C-1 (46.8), C-17 (46.8), C-19 (45.6), C-14 (41.3), C-18 (40.7), C-4 (39.1), C-8 (39.1), C-10 (38.4), C-7 (32.8), C-29 (32.8), C-22 (32.1), C-21 (32.0), C-15 (30.3), C-20 (30.3), C-23 (28.7), C-27 (25.6), C-30 (23.3), C-11 (23.3), C-16 (22.5), C-6 (18.0), C-24 (16.8), C-25 (17.1), C-26 (16.2).

Acide corosolique ou **acide 2*α*-hydroxyursolique**: Poudre blanche; $C_{30}H_{48}O_4$; **P.F.** [253-254] °C; **RMN** de **^{13}C** (*DMSO-d_6*, 62.5 MHz)**:** C-28 (178.3), C-13 (138.2), C-12 (124.4), C-3 (82.1), C-2 (67.1), C-5 (54.7), C-18 (52.3), C-9 (47.0), C-1 (46.8), C-17 (47.0), C-14 (41.6), C-8 (39.7), C-19 (39.4), C-4 (38.9), C-20 (38.9), C-10 (38.3), C-22 (37.5), C-7 (33.2), C-23 (33.2), C-21 (30.3), C-27 (28.7), C-15 (27.1), C-29 (23.3), C-16 (23.0), C-11 (22.5), C-30 (21.0), C-6 (18.0), C-24 (17.1), C-25 (16.9), C-26 (16.8)**.**

Trans*-tiliroside** ou **kaempferol 3-O-*β*-(6'''-O-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside**: Poudre jaune; $C_{30}H_{26}O_{13}$; **P.F.** 210 °C; **RMN** de **^{1}H** (*CD_3OD*, 250 MHz)**:** ***kaempferol, 7.99 (2H, *d*, *J* = 8.9 Hz, H-2', H-6'), 6.82 (2H, *d*, *J* = 8.9 Hz, H-3', H-5'), 6.32 (*d*, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.13 (*d*, J = 2.1 Hz, H-6)**,** ***glucopyranosyl***, 5.30, 3.50, 3.48, 4.30, 4.20 ***coumaroyl*,** 7.40 (*d*, *J* = 16.1 Hz, C-*β*), 7.32 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-2''', H-6'''), 6.80 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-3''', H-5'''), 6.10 (*d*, *J* = 16.0 Hz, C-*α*) **RMN** de **^{13}C** (*CD_3OD*, 62.5 MHz)**:** ***kaempferol***, C-4 (179.4), C-7 (165.9), C-5 (163.0), C-4' (161.5), C-2 (159.4), C-8a (158.4), C-3 (135.2), C-2',6' (132.2), C-1' (122.7), C-3', 5' (116.0), C-4a (105.6), C-6 (100.0), C-8 (94.8), ***glucopyranosyl*,** C-1 (103.9), C-3 (78.0), C-2 (75.8), C-4 (75.8), C-5 (71.8), C-6 (64.3), ***coumaroyl***, C=O (168.8), C-4''' (161.2), C-*β* (146.5), C-2''',6''' (131.2), C-1''' (127.1), C-3''',5''' (116.8), C-*α* (114.7).

29-triacontanoyl-3-propanoylstigmasta-5,22-diene-3*β*,29-diol. Solide amorphe blanc; $C_{62}H_{110}O_4$; **[α]** $^{20}_{D}$ -9:5 (*c* 0:06, $CHCl_3$); **P.F.** 79°C; **IR** (KBr) ν_{max}. cm^{-1} 2917 (=C-H), 2849 (C-H), 1738 (C=O), 1464 (C-O), 1378, 1179, 1028; **RMN de ^{1}H** (*$CDCl_3$*, 400 MHz) **et ^{13}C** (*$CDCl_3$*, 100 MHz): voir tableau 24 et 25; LC-ESI indique la masse de la molécule à m/z 918 avec un temps de rétention de 9.78 min;

Méthanolyse: Le composé **LP14** (1.5 mg) était porté à reflux à 70°C pendant 18 h dans 2.5 ml de méthanol contenant 1.5 ml de 0.9 N HCl sous agitation magnétique. Le milieu réactionnel était neutralisé avec une solution aqueuse de sodium carbonate et extrait au chloroforme. L'analyse LC-ESI a permis d'identifier les constituants du mélange comme étant l'ester méthylique de l'acide triacontanoïque [m/z 466 (temps de rétention: 6.97 minutes)] et le stigmasta-5,22-diene-3*β*,29-diol [m/z 429 $M+H^+$ (temps de rétention: 8.03 minutes)]. La seconde chaine a été déduite comme étant un ester propanoyle.

***Coupure oxydative de la double liaison C(22)-C(23) de* LP14.** 1.8 mg ($2.02x10^{-3}$mmol) du composé **LP14** était dissout dans 4 ml du mélange dioxane/water (3:1); 2 équivalents de pyridine, de gouttes de 4% en masse d'une solution aqueuse de OsO_4 et 4 équivalents de

$NaIO_4$ étaient ajoutés. La réaction était laissée sous agitation magnétique pendant 3 h à température ambiante. La réaction a été stoppée en ajoutant 10 ml de solution aqueuse de thiosulfate de sodium dans le milieu et en laissant agiter pendant 20 min. Le milieu est ensuite partitionné entre l'eau et le CH_2Cl_2 la phase organique extraite trois fois est analysée par spectrométrie de masse pour définir la position exacte des deux acides. Cette analyse (DIC et MALDI-TOF) donne trois pics à m/z 419 $[418+H]^+$, 441 $[418+Na]^+$ et 457 $[418+K]^+$ correspondant à la stéroïde avec l'une de chaine d'acide gras.

Acide 2*α*,3*β*,19*α*-trimethoxyurs-12-ene-24,28-dioique-24-[(2*α*,3*β*)-24,28-bis(*β*-*D*-glucopyranosyloxy)-2-hydroxy-24,28-dioxours-12-en-3-yl] ester. Poudre blanche. $C_{75}H_{116}O_{22}$ **[α]** $^{20}_{D}$ +12.86 (*c* 0.14, MeOH); **P.F.** décomposition à 215 °C; IR (KBr) ν_{max}. cm^{-1} 3396.2 (OH), 2932.0 (C-H), 1734.3 (C=O), 1654 (C=C), 1508, 1458.2 (C-O); **RMN de ^{1}H** (*CD_3OD*, 400 MHz) **et ^{13}C** (*CD_3OD*, 100 MHz): voir tableau 25 et 26; **HRESI-FTICRMS m/z (rel. int.)**: 1369.8031 $[C_{75}H_{116}O_{22}+H]^+$ (17), 1037.6666 $[C_{64}H_{93}O_{11}+H]^+$ (5), 779.3498 $[C_{39}H_{54}O_{16}+H]^+$ (100), 765.3700 $[C_{39}H_{56}O_{15}+H]^+$ (95), 703.3610 $[C_{45}H_{51}O_7]^+$ (66); **HRESI-FTICRMSMS** de 1369: 703.3610 $[C_{45}H_{51}O_7]^+$ (90), 689.3858 $[C_{45}H_{53}O_6]^+$ (100); **HRESI-FTICRMSMS** de 779: 719.3284, $[C_{37}H_{51}O_{14}]^+$ (61), 617.2965 $[C_{33}H_{45}O_{11}]$+ (35), 557.2780 $[C_{31}H_{41}O_9]^+$ (100), 539.2679 $[C_{31}H_{39}O_8]^+$ (80).

Hydrolyse en milieu alcalin. 2.5 mg (1.83 µmol) du composé **LP15** a été dissout dans 3.5 ml du mélange THF/MeOH (6:1); 1 ml de solution aqueuse de $LiOH.H_2O$ 1 N est ajouté à cette solution. Le tout est porté sous agitation magnétique à température ambiante pendant 4 h. Le milieu réactionnel est neutralisé par ajout de 1 ml d'acide chlorhydrique 1 N, complété à l'eau distillée pour donner 10 ml de solution afin d'être extrait au n butanol. La phase organique obtenue est concentrée sous pression réduite et analysée par chromatographie liquide liée à une source d'ionisation electrospray. Trois composés sont détectés respectivement à m/z 181.0 $M+H^+$, 502.1 et 560.4 et identifiés au glucose, à l'acide 2*α*,3*β*-dihydroxyurs-12-ene-24,28-dioïque et à l'acide 2*α*,3*β*,19*α*-trimethoxyurs-12-ene-24,28-dioïque avec les temps de rétention (minutes) respectivement égales à 11.03, 8.47 et 10.28

Acide tormentique ou **acide 2*α*,19*α*-dihydroxyursolique**: Poudre blanche; $C_{30}H_{48}O_5$; **P.F.** [267-268] °C; **RMN** de **^{13}C** (*MeOD*, 62.5 MHz)**:** C-28 (178.9), C-13 (138.6), C-12 (126.9), C-3 (82.6), C-19 (71.5), C-2 (67.1), C-5 (55.7), C-18 (54.9), C-17 (48.9), C-9 (47.5), C-1 (46.9), C-20 (42.9), C-14 (41.2), C-8 (40.5), C-4 (39.8), C-10 (38.5), C-22 (37.2), C-7

(32.8), C-23 (30.6), C-15 (29.0), C-21 (28.0), C-29 (26.3), C-16 (25.9), C-27 (24.7), C-11 (24.0), C-6 (20.0), C-24 (16.6), C-25 (16.2), C-26 (16.2), C-30 (14.8),

***β*-carotène**: Poudre rouge-orangé. $C_{40}H_{56}$; **P.F.** [180-182] °C; **RMN** de **^{13}C** (*$CDCl_3$*, 62.5 MHz): C-1 (34.3), C-2 (39.6), C-3 (19.3), C-4 (33.1), C-5 (129.5), C-6 (138.2), C-7 (127.0), C-8 (137.8), C-9 (136.4), C-10 (132.4), C-11 (126.3), C-12 (137.8), C-13 (136.7), C-14 (132.4), C-15 (131.7), C-16 (29.0), C-17 (29.0), C-18 (21.9), C-19 (12.1), C-20 (12.1), C-1' (34.3), C-2' (39.6), C-3' (19.3), C-4' (33.1), C-5' (129.3), C-6' (137.9), C-7' (126.6), C-8' (137.2), C-9' (136.0), C-10' (132.3), C-11' (126.6), C-12' (137.8), C-13' (136.7), C-14' (132.4), C-15' (130.8), C-16' (29.0), C-17' (29.0), C-18' (21.7), C-19' (12.1), C-20' (12.1).

Acide 24-hydroxytormentique. Poudre amorphe maronne. **P.F.** 285 °C; $C_{30}H_{48}O_6$; **RMN** de **^{13}C** (*MeOD*, 100 MHz): C-28 (182.2), C-13 (139.1), C-12 (129.1), C-3 (86.0), C-19 (73.6), C-2 (69.6), C-24 (66.2), C-5 (57.2), C-18 (55.0), C-17 (48.3), C-9 (47.9), C-1 (47.8), C-14 (42.7), C-20 (42.7), C-8 (41.1), C-4 (39.6), C-10 (39.0), C-22 (39.0), C-7 (34.4), C-15 (29.6), C-23 (24.6), C-21 (27.0), C-29 (27.0), C-16 (26.6), C-11 (24.6), C-27 (24.6), C-25 (17.5), C-6 (17.5), C-26 (17.3), C-30 (16.6)

Mode opératoire des réactions de transformation.

Oxydation au $KMnO_4$. 0.153 g (0.3713 mmol) de stigmastérol a été acétylé dans 0.045 ml de pyridine et 0.045 ml d'anhydride acétique pendant 3h. Le produit de réaction a été récupéré par concentration sous pression réduite et en ajoutant le toluène dans le milieu réactionnel afin de faire partir totalement la pyridine (protocole A). Ce produit est ensuite dissout dans un mélange de 20 ml de DCM, 1 ml de *ter*-butanol et 0.3 ml de H_2O puis mis sous agitation magnétique à température ambiante. Au mélange, on ajoute 1.6 g de $KMnO_4$ et 0.8 de $CuSO_4.5H_2O$. la réaction est laissée pendant 24h sous atmosphère d'azote. On ajoute au milieu réactionnel 25 ml de DCM et l'ensemble est filtré sous pression réduite sur célite. Le filtrat est concentré sous pression réduite dans un ballon préalablement pesé et ainsi le produit d'époxydation est récupéré sous forme de pâte blanche (0.152 g, 87%). **RMN ^{13}C** Voir tableau 21.

Oxydation par l'oxone. 0.015 g (0.037 mmol) de stigmastérol est dissout dans 0.045 ml de pyridine suivi de l'addition de 0.045 ml d'anhydride acétique. Le tout est mis sous agitation pendant 3h et le produit est récupéré suivant le protocole A ci-dessus. L'acétate de stigmastérol est dissout dans 2 ml de DCM et on ajoute 10 ml d'acétone pour faciliter l'homogénéité du milieu. 0.08 g d'oxone et 0052 g de $NaHCO_3$ sont dissouts dans 2 ml d'eau et ajoutés au mélange de produit qui est sous agitation magnétique. L'ensemble est laissé à température ambiante et l'évolution de la réaction est contrôlée par CCM comparative avec l'acétate de stigmastérol. Au bout de 3h, l'agitation est stoppée et l'ensemble est filtré sur célite. Le filtrat obtenu (0.014 g, 80%) est concentré et le produit est récupéré sous forme de solide amorphe. **RMN ^{13}C** Voir Tableau 22.

Réaction d'oxydation par le PCC. **a**) 0.082 mmol d'acétate de stigmastérol sont dissouts à 10 ml de DCM et à cette solution s'ajoute 0.18 g (0.82 mmol) de PCC. Le tout est porté sous agitation magnétique à température ambiante pendant 18h. La réaction est contrôlée par CCM comparative et le produit (0.0309 g, 80%) est récupéré par chromatographie sur colonne de gel de silice sous forme de poudre blanche.

b) 0.034 g (0.082 mmol) de stigmastérol et 0.75 g de PCC/Al_2O_3 sont dissouts dans le DCM et soumis à l'agitation magnétique à température ambiante pendant 24h. Le produit de réaction (0.025 g, 75%) de couleur brune est obtenu en filtrant l'ensemble sur célite et concentrant le filtrat.

c) 0.034 g (0.082 mmol) de stigmastérol est soumis aux mêmes conditions de réaction qu'en **b**) à la seule différence que la réaction est laissée sous agitation pendant 48h. Le produit est obtenu (0.032 g, 92%) de la même façon que précédemment. **RMN ^{13}C** Voir les tableaux 23 et 24.

Préparation des amines. (1) ***Azidocinnamyle***: 6 ml (0.04 mol) de bromocinnamyle sont dilués dans 10 ml de DMF à cette solution, on ajoute 6.8 g (2.6 eq) d'azidure de sodium et 2.9 g (1.3 eq) de NH_4Cl. L'ensemble est porté à reflux (30°C) sous agitation magnétique pendant 15h. L'ensemble réactionnel est partitionné entre l'eau et le DCM pour éliminer les sels et la DMF. Le lavage à l'eau est fait trois fois, la phase organique est concentrée pour donner un sirop rouge.

(2) ***Aminocinnamyle***: le sirop est dilué dans 100 ml du mélange de solvants éthanol-eau (3:1) à ça s'ajoute 4 g de Zn et 4.3 g (2eq) de NH_4Cl. L'ensemble est mis sous agitation en 3h à

température ambiante. Après filtration sur célite et concentration le produit est récupéré sous forme de liquide dense rougâtre et sous forme de paillette blanche (sel de chlorhydrate: 0.0065 g, 96%).

(3) ***Imine***. 56 mg (0.132 mmol) de friedeline sont dissouts dans 2 ml de DCM à cette solution, s'ajoute 22.3 mg (0.132 mmol) de sel de chlorhydrate d'aminocinnamyle. 10 ml de pyridine sont ajoutés au milieu réactionnel et l'ensemble est porté à reflux (60°C) sous agitation magnétique pendant 10h. Le produit de réaction (57.18 g, 80%) est récupéré par chromatographie sur colonne de gel de silice (élution avec le mélange cyclohexane-AcOEt 9:1, ensuite avec le DCM) sous forme d'une poudre maronne. **RMN ^{13}C** Voir tableau 25.

Glucosylation. 62.4 mg (0.35 mmol) de α-glucose dans 1 ml de pyridine est porté sous agitation magnétique. 1 ml d'anhydride acétique est ajouté au milieu et le produit d'acétylation est récupéré après une heure sous forme de poudre blanche. Celle-ci est dissoute dans la pyridine et est mise sous agitation. 59.4 mg de chlorhydrate d'aminocinnamyle est ajoutée à cette solution et porté à 70°C pendant 12h. Le produit de réaction est obtenu après une chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant au mélange CH_2Cl_2-MeOH de polarité croissante. Le produit de réaction (97.27 g, 60%) précipite sous forme de poudre marron dans les fractions éluées au système 9:1 du mélange DCM-MeOH. **RMN ^{1}H** et **^{13}C** Voir tableau 26.

CONCLUSION GENERALE

Le travail était porté sur l'étude phytochimique et biologique des composés isolés de deux individus végétales appartenant à la même espèce et récoltés dans des conditions où l'un est sauvage et l'autre cultivé. L'individu sauvage bien qu'utilisé en pharmacopée traditionnelle congolaise, est une plante comestible au Cameroun comme son homologue cultivé. Voilà pourquoi l'objectif majeur de ce travail était de montrer que même par l'alimentation on peut bien prévenir ou guérir des maladies. C'est ainsi que l'étude des feuilles et tiges des deux entités ont conduit grâce aux méthodes chromatographiques et spectrométriques, à l'isolement de 21 composés parmi lesquels dix huit ont été identifiés (quatre nouvelles structures et quatorze de structure connue). Il s'agit:

- Deux sphingoïdes: **(2*R*,6*Z*)-2-hydroxy-*N*-[(2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxyhexacosan-2-yl]heptadec-6-enamide (triumfettamide), (2*R*)-*N*-{(1*S*,2*R*,3*E*,6*Z*,9*Z*,*12*Z,*15*Z)-1-[(*β*-D-glucopyranosyloxy)methyl]-2-hydroxyheneicosa-3,6,9,12,15-pentaen-1-yl}-2-hydroxytetradecanamide (triumfettoside Ic).**

- Trois stéroïdes: mélange de stérols (stigmastérol et *β*-sitostérol), 3-O-*β*-D glucopyranoside de sitostérol, **29-triacontanoyl-3-propanoylstigmasta-5,22-diene-3*β*,29-diol (triumfettosterol Id).**

- Neuf triterpènoïdes: friedeline, lupéol, bétuline, acide oléanolique, acide maslinique, acide corosolique, acide tormentique, acide 24-hydroxytormentique, **acide 2*α*,3*β*,19*α*-trimethoxyurs-12-ene-24,28-dioique-24-[(2*α*,3*β*)-24,28-bis(*β*-*D*-glucopyranosyl oxy)-2-hydroxy-24,28-dioxours-12-en-3-yl] ester (triumfettosaponine).**

- Deux acides gras: l'acide heptadecanoïque, l'acide henéicosanoïque.

- Un flavonoïde: *Trans*- tiliroside.

- Un carotènoïde: *β*-carotène.

Parmi les métabolites secondaires obtenus, les triterpènes pentacycliques ont été isolés de ce genre pour la première.

Des transformations chimiques (oxydations diverses) ont été faites sur le stigmastérol. L'amine primaire, l'imine triterpènique et un aminoglucoside ont été préparés. Au bout de ce travail, 7 produits de réaction ont été obtenus.

Il ressort de ces résultats que plusieurs des composés ci-dessus ont des propriétés biologiques confirmées tels que le mélange de stérols avec ses propriétés analgésiques, les flavonoïdes présentant des activités anti-HIV1 etc… Au vue de ceci, nous avons soumis certains composés et des fractions issues du flash aux tests biologiques. La première évaluation biologique était la mesure du potentiel antioxydant: la *trans*-tiliroside et la fraction la contenant ont présenté une activité plus élevé que la molécule de référence. Pour ce qui est des tests de cytotoxicité sur les cellules de fibrosarcome, plusieurs composés isolés et d'hemisynthèse ont présenté des activités intéressantes. Tous ces résultats biologiques viennent montrer qu'effectivement *T. cordifolia* peut être utilisé pour la prévention des stress oxydatifs et que d'autres études peuvent être entreprises pour donner aux composés **LP5**, **LP8c**, **LP6** et **LPR1** la propriété d'inducteur d'apoptose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] / D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, The influence of natural products upon drug discovery, *Natural Products Report*, **2000**, 17, 215-234.

[2]/ D. Canet, La RMN: concepts et méthodes, Inter éditions, Paris, p1-20, **1991**.

[3]/ H. Gunther, La spectroscopie de RMN, Masson, Paris, p10-18, **1994**.

[4] / www.biophyresearch.com/pdf/ftir.pdf '*Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier'* consulté le 4 avril 2008 à 9H

[5] / www.spectropole.u-3mrs.fr/Spectro/MS/SM-MALDI-ToF_fr-3.htm '*MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)*'consulté le 20 mai 2007 à 10H34'

[6] / http://www.icsn.cnrs-gif.fr/IMG/pdf/chapitre4.pdf '*La spectroscopie de Masse en tandem ou (MS/MS)*'consulté le 20 avril 2008 à 15H30'.

[7] / M. Linscheid, D. G. Westmoreland, Application of liquid chromatography-mass spectrometry, *Pure &Applied Chemistry,* **1994**, 66, 1913-1930.

[8] / P. Arpino, Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part III. Applications of thermospray, *Mass Spectrometry Reviews*, **1992**, 11, 3-40.

[9] / M. S. Lee, E. H. Kerns, LC/MS applications in drug development, *Mass Spectrometry Reviews*, **1999**, 18, 187-279.

[10] / R. Letouzey, Manuel botanique forestier, Tome 2A, famille (1ere partie), p 127-131, **1982**.

[11] / A. Barry-Lenger, R. Evrard, P. Gathy, la forêt, 4e edition, Edition du Perron, Liège, p 122, **1999**.

[12] / http://www.123bio.net/cours/bv/bv4.html 'Biologie et recherche'consultée le 06 septembre 2006 à 21h 26'

[13] / H.-T. Chang, R.-H. Miau, Tiliaceae. In: Chang Hung-ta, ed., Fl. Republ. Popularis Sin. Vol 49, p 47-123, **1989.**

[14] / G. Troupin: «flore des plantes religieuses du Rwanda», Musée royal de l'Afrique centrale, Tervuren (Belgique). p 674, **1982**.

[15] / J. Vivien, J. J. Faure: Arbres des forêts denses d'Afrique Centrale: Espèce du Cameroun. Editeur: Ministère des relations extérieures, coopération et développement. p 323-325, **1985**.

[16] / http://www.herb.umb.umich.edu/herb/search.pl?searchstring=Tilia%20 Americana and search limit=100. '*Tilia americana*', Consulté le 22 août 2006 à 21h10'.

[17] / www.iepf.org «rapport de synthèse sur l'accès au ressource génétique et le partage équitable des avantages résultant de leur utilisation: enjeux et perspectives» consulté le 16 mai 2008 à 21h30'.

[18] / D. P. Kisangau, H. V. Lyaruu, K. M. Hosea, C. C. Joseph, Use of traditional medicines in the management of HIV/AIDS opportunistic infections in Tanzania: a case in the Bukoba rural district, *Journal of ethnobiology and ethnomedecine*, **2007**, 3, 1-8.

[19] / A. Jain, S. S. Katewa, P. K. Galav, P. Sharma, Medicinal plant diversity of Sitamata wildlife sanctuary, Rajasthan, India, *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 102, 143-157.

[20] / E. Noumi, A. Yomi, Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central Province, Cameroon, *Fitoterapia*, **2001**, 72, 246-254.

[21] / http://www.ormenis.com/catalog/article_info.php?articles_id=7 'plantes et produits naturels' consulté le 28 octobre 2006 à 15h 37'

[22] / M. Coleta, M. G. Campos, M. D. Cotrim, A. P. da Cunha, Comparative Evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the Elevated Plus Maze Anxiety Test, *pharmacopsychiatry*, **2001**, 34, 20-21.

[23] / M. L. B. Arcos, G. Cremaschi, S. Werner, J. Coussio, G. Ferraro, C. Anesini, *Tilia cordata* Mill. Extracts and scopoletin (isolated compound): differential cell growth effects on lymphocytes, *Phytotherapy research*, **2006**, 20, 34-40.

[24] / E. Aguirre-Hernandez, A. L. Martınez, M. E. Gonzalez-Trujano, J. Moreno, H. Vibrans, M. Soto-Hernandez, Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, 109, 140-145.

[25] / J. P. Mevy, J. M. Bessiere, J. Rabier, M. Dherbomez, M. Ruzzier, J. Millogo, J. Viano, Composition and antimicrobial activities of the essential oil of *Triumfetta rhomboidea* Jacq., *Flavour and fragrance journal*, **2006**, 21, 80-83.

[26] / C. Clarkson, V. J. Maharaj, N. R. Crouch, O. M. Grace, P. Pillay, M. G. Matsabisa, N. Bhagwandin, P.J. Smith, P. I. Folb, In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa, *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 92, 177-191.

[27] / Z. A. Zakaria, M. R. Sulaiman, H. K. Gopalan, Z. D. F. Abdul Ghani, R. N. S. Raden Mohd. Nor, A. M. Mat Jais, F. C. Abdullah, Antinociceptive and Anti-inflammatory Properties of *Corchorus capsularis* Leaves Chloroform Extract in Experimental Animal Models*, Yakugaku Zasshi* (*The pharmaceutical society of Japan*)*,* **2007**, 127, 359-365.

[28] / D. K. Pal, M. Mandal, G. P. Senthilkumar, A. Padhiari, Antibacterial activity of *Cuscuta reflexa* stem and *Corchorus olitorius* seed, *Fitoterapia*, **2006**, 77, 589-591.

[29] / P. Pithayanukul, P. Ruenraroengsak, R. Bavovada, N. Pakmanee, R. Suttisri, S. Saen-oon, Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols, *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 97, 527-533.

[30] / S. Badami, P. Vijayan, N. Mathew, R. Chandrashekhar, A. Godavarthi, S. A. Dhanaraj, B. Suresh, In vitro cytotoxic properties of Grewia Tiliaefolia bark and lupeol, *Indian journal of pharmacology*, **2003**, 35, 250-251.

[31] / C Ma, H. J. Zhang, G. T. Tan, N. V. Hung, N. M. Cuong, D. D. Soejarto, H. H. S. Fong, Antimalarial Compounds from *Grewia bilamellata, Journal of Natural Products*, **2006**, 69, 346-350.

[32] / A. B. Awad, C. S. Fink, Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action, *Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 2127-2130.

[33] / I. M. Villasenor, J. Angelada, A. P. Canlas, D. Echegoyen, Bioactivity studies on β-sitosterol and its glucoside, *Phytotherapy Research*, **2002**, 16, 417-421.

[34] / I. P. Singh, S. B. Bharate, K. K. Bhutani, Anti-HIV natural products, *Current Science*, **2005**, 89, 269-290.

[35] / T. Miura, N. Ueda, K. Yamada, M. Fukushima, T. Ishida, T. Kaneko, F. Matsuyama, Y. Seino, Antidiabetic Effects of Corosolic Acid in KK-Ay Diabetic Mice, *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* **2006**, 29, 585-587.

[36] / J. Patocka, Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification, *Journal of Applied Biomedicine*, **2003**, 1, 7-12.

[37] / J. Bruneton, Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, 2e Ed., Lavoisier, Londres, New-York, **1993**, 625-642.

[38] / V. Piironen, D. G. Lindsay, T. A. Miettinen, J. Toivo, Anna-Maija Lampi, Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition, *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **2000**, 48, 939-966.

[39] / Q. Chen, Lee Steinhauer, J. Hammerlindl, W. Keller, J. Zou, Biosynthesis of Phytosterol Esters:Identification of a Sterol O-Acyltransferase in Arabidopsis1[OA], *Plant Physiology*, **2007**, 145, 974-984.

[40] / R. Xu, G. C. Fazio, S. P. T. Matsuda, On the origins of triterpenoid skeletal diversity, *Phytochemistry,* **2004**, 65, 261-291.

[41] / C. Fernandez, Y. Suarez, A. J. Ferruelo, D. Gomez-Coronado, M. A. Lasuncion, Inhibition of cholesterol biosynthesis by Δ22-unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol Δ24-reductase in mammalian cells, *Biochemistry Journal*, **2002**, 366, 109-119.

[42] / R. Kapetanovic, D. Sladic, S. Popov, M. Zlatovic, Z. Kljajic, M. J. Gasic, Sterol composition of the Adriatic Sea algae Ulva lactuca, Codium ichotomum, Cystoseira adriatica and Fucus virsoides, *Journal Serbian Chemical Society*, **2005**, 70, 1395-1400.

[43] / Z. U. Babar, A. Ata, M. H. Meshkatalsadat, New bioactive steroidal alkaloids from *Buxus hyrcana, Steroids*, **2006**, 71, 1045-1051.

[44] / Y. Mohammed, K. Javed, M. Hasnain, α-amyrin derivatives from *Corchorus depressus Phytochemistry*, **1991**, 30, 1989-1992.

[45] / B. Ahmed, M. A. Al-Yahya, A. J. AL-REHAILY, Triumfettoside, a new alkaloidal steroid glycoside and triumfettosterol, a new sterol from Triumfetta flavescens, *Pharmazie*, **2002**, 57, 709-713.

[46] / Y. Nishiyama, M. Moriyasu, M. Ichimaru, A. Kato, S. G. Mathenge, J. N. Nganga, F. D. Juma, Absolute configurations of two acyclic triterpenoids from *Ekebergia capensis*, *Phytochemistry*, **1999**, 52, 1593-1596.

[47]/ J. D. Connolly, R. A. Hill, Triterpenoids**,** *Natural Products Report*, **2002**, 19, 494-513.

[48] / G. A. Van Der Doelen, K. J. Van Den Berg, J. J. Boon, N. Shibayama, E. R. de la Rie, Wim J. L. Genuit, Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1998**, 809, 21-37.

[49] / M. Franz-Josef, A. Freyer, J. Lex, Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*, *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3709-3712.

[50] / V. P. Papageorgiou, M. N. Bakola-Christianopoulou, K. K. Apazidou, E. E. Psarros, Gas chromatographic–mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum, *Journal of Chromatography A*, **1997**, 769**,** 263-273.

[51] / P. Jian-Xin, H. Sheng-Xiong, J. Ren, X. Wei-Lie, L. Li-Mei, L. Rong-Tao, L. Liang-Bo, L. Tou-Gen, L. Li-Guang, Z. Hua-Jie, S. Han-Dong, Isolation and Structure Elucidation of Kadlongilactones C-F from *Kadsura longipedunculata* by NMR Spectroscopy and DFT Computational Methods, *Journal of Natural Products,* **2007,** 70*,* 1706-1711.

[52] / M. Zahid, A. Ali, O. Ishurd, A. Ahmed, Z. Ali, V. U. Ahmad, Y. Pan**,** New Cycloartane and Flavonol Glycosides from *Corchorus depressus, Helvetica Chimica Acta*, **2002**, 85, 689-697.

[53] / A. Ahmed, M. Asim, M. Zahid, A. Ali, V. U. Ahmad, New Triterpenoids from *Corchorus trilocularis*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2003**, 51**,** 851-853.

[54] / J. C. A. Tanaka, G. J. Vidotti, C. C. da Silva, A New Tormentic Acid Derivative from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae), *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2003**, 14, 475-478.

[55] / G. P. Moss, Nomenclature of lignans and neolignans, *Pure and applied chemistry*, **2000**, 72, 1493-1523.

[56] / C. Ma, H. J. Zhang, G. T. Tan, N. V. Hung, N. M. Cuong, D. D. Soejarto, H. H. S. Fong. Antimalarial Compounds from *Grewia bilamellata*, *Journal of Natural Products,* **2006,** *69,* 346-350.

[57] / http://fr.wikipedia.org/wiki/Alcalo%C3%AFde '*Alcaloïdes'* consulté le 17 mars 2008 à 15H30'.

[58] / K. A. N. P. Bandara, V. Kumar, U. Jacobsson, M. Louis-Pierre, Insecticidal piperidine alkaloid from *Microcos paniculata* stem bark, *Phytochemistry*, **2000**, *54*, 29-32.

[59] / A. M. Aguinaldo, R. W. Read, A major piperidine alkaloid from *Microcos Philippinensis*, *Phytochemistry* , **1990**, *29*, 2309-2313.

[60] / http://membres.lycos.fr/mourad/flavonoides.html '*Flavonoïdes'* consulté le 17 mars 08 à 18H30'

[61] / H. Hisashi, K. Kujofumi, H. Hiroshi, M. Yoshikawa, Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action, *Bioorganic and medicinal chemistry,* **2002**, 10, 707-712.

[62] / A. G. R. Nair, T. R. Seetharaman, B. Voirin, J. Favre-Bonvin, True structure of triumboidin, a flavone glycoside from *Triumfetta rhomboidea*, *Phytochemistry*, **1986**, 25, 768-769.

[63] / http://www.sfa-site.com/?q=ingredients_rech/Polyph%C3%A9nols '*Acide chlorogénique polyphenols*' consulté le 17 mars 08 à 13H28'.

[64] / K. Azuma, M. Nakayama, M. Koshioka, K. Ippoushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamauchi, H.Ito, H. Higashio, Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Corchorus olitorius* L., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1999**, 47, 3963-3966.

[65] / B. Gillet, S. Bléneau, J. C. Beloeil, Acide gras, *Analusis Magazine*, EDP Sciences, Wiley-VCH**, 1998,** 26**,** 26-33**.**

[66] / http://fr.wikipedia.org/wiki/Prostaglandine '*Prostaglandine'* consulté le 14 juin 2008 à 10H40'

[67] / K. M. Hosamani, H. S. Ramesh, Industrial utilization of *Triumfetta pilosa*, Roth seed oil: A moderate source of oil and cyclopropenoid fatty acids, *Industrial Crops and Products*, **2003**,

17, 53-56.

[68] / J. P. Mevy, J. M. Bessiere, J. Rabier, M. Dherbomez, M. Ruzzier, J. Millogo, J. Viano, Composition and antimicrobial activities of the essential oil of *Triumfetta rhomboidea* Jacq., *Flavour Fragrance Journal,* **2006**; 21: 80-83.

[69] / www.lipidlibrary.co.uk «*Sphingolipids: Introduction to sphingolipids and rafts*» consulté le 13 mai 2008 à 9h30'.

[70] / K. Hanada, Sphingolipids in Infectious Diseases, *Japan Journal of Infectious Diseases,* **2005**, 58, 131-148.

[71] / X. Li Guan, M. R. Wenk, Mass spectrometry-based profiling of phospholipids and sphingolipids in extracts from *Saccharomyces cerevisiae, Yeast*, **2006**; 23: 465-477.

[72] / C. Beckmann, J. Rattke, P. Sperling, E. Heinz, W. Boland, Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide Δ4-desaturase/hydroxylase from *Candida albicans;* a key enzyme of sphingolipid metabolism, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2003**, 1, 2448-2454.

[73] / T. Ishii, T. Okino, Y. Mino, A Ceramide and Cerebroside from the Starfish *Asterias amurensis* Lütken and Their Plant-Growth Promotion Activities, *Journal of Natural Products,* **2006**, 69*,* 1080-1082.

[74] / M. A. Chester, Nomenclature of glycolipids, *Pure and Applied Chemistry*, **1997**, 69**,** 2475-2487.

[75] / www.educ.neker.fr/cours/anatomiepathologique/pathocell.pdf '*Elément de pathologie cellulaire: Apoptose*' consulté le 30 juin 2008 à 10H36'.

[76] / M. Dominguez, A. Nieto, J. C. Marin, K. Anna-Sigrid, E. Jeffery, C. L. Cespedes, Antioxidant Activities of Extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae), *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* **2005,** 53, 5889-5895.

[77] / D. Cerne, J. Lukac-Bajalo, Oxidative stress assays for disease risk stratification, *Acta Pharmaceutica.* **2006**, 56, 1-17.

[78] / S. B. Mahato, A. P. Kundu, ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features, *Phytochemistry*, **1994**, 37, 1517-1575.

[79]/ Y. Luo, Y. Liu, H. Qi, Z. Wu, G. Zhang, Steryl esters and phenylethanol esters from *Syringa komarowii, Steroids*, **2006**, 71, 700-705.

[80] / W. De-Eknamkul, B. Potduang, Biosynthesis of β-sitosterol and stigmasterol in Croton sublyratus proceeds via a mixed origin of isoprene units, *Phytochemistry*, **2003**, 62, 389-398.

[81] / S. Faizi, M. Ali, R. Saleem, Irfanullah, S. Bibi, Complete ^{1}H and ^{13}C NMR assignments of stigma-5-en-3-*O*-*β*-glucoside and its acetyl derivative, *Magnetic Resonance Chemistry*, **2001**, 39, 399-405.

[82] / N. Mukhtar, K. Iqbal, A. Malik, Novel Sphingolipids from *Conyza canadensis, Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2002**, 50**,** 1558-1560.

[83] / F. Cateni, J. Zilic, G. Falsone, G. Scialino, E. Banfi, New Cerebrosides from Euphorbia peplis L.: Antimicrobial Activity Evaluation, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, 13, 4345-4350.

[84] / H. Fong-Fu, J. Turk, Characterization of Ceramides by Low EnergyCollisional-Activated Dissociation Tandem Mass Spectrometry with Negative-ion Electrospray Ionization, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2001**, 12, 61-79.

[85] / Z. Weiming, T. Ford Warren, Oxidation of alkenes with aqueous potassium peroxymonosulfate and no organic solvent, *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, 56, 7022-7026.

[86] / J. Parish Edward, Q. Zhihai, Dioxirane oxidation of 3β-substituted Δ5-steroids, *Lipids*, **2004**, 39, 805-809.

[87] / S. Kawatake, K. Nakamura, M. Inagaki, R. Higuchi, Isolation and Structure Determination of Six Glucocerebrosides from the Starfish *Luidia maculata, Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2002**, 50, 1091-1096.

[88] / U. V. Babu, S. P. S. Bhandari, H. S. Garg, Temnosides A and B, Two New Glycosphingolipids from the Sea Urchin *Temnopleurus toreumaticus* of the Indian Coast1, *Journal of Natural Products*, **1997**, 60, 732-734.

[89] / J. Budzianowski, L. Skrzypczak, Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers, *Phytochemistry,* **1995**, 38, 997-1001.

[90] / N. Backhouse, C. Delporte, R. Negrete, S. A. San Feliciano, J. L. Lopez-Perez, Bioactive phenolic derivatives from *Acaena splendens* methanol extract, *Phytotherapy Research*, **2002**, 16, 562-566.

[91] / W. D. Xie, X. Gao, Z. J. Jia, A new C-10 acetylene and a new triterpenoid from Conyza canadensis, *Archives Pharmacal Research*, **2007**, 30, 547-551.

[92] / M. S. Alam, N. Chopra, M. Ali, M. Niwa, Oleanen and stigmasterol derivatives from *Ambroma augusta*, *Phytochemistry*, **1996**, 41, 1197-1200.

[93] / G. Fontana, G. Savona, B. Rodríguez, María C. De La Torre, Unusual 6'-fatty acid esters of (24*S*)-24-ethylcholesta-5,25-dien-3β-yl β-D-glucopyranoside from *Teucrium fruticans*, *Phytochemistry*, **1999**, 50, 283-285.

[94] / W. Yu, Yan Mei, Y. Kang, Z. Hua, Z. Jin, Improved Procedure for the Oxidative Cleavage of Olefins by OsO4-NaIO4, *Organic Letters*, **2004**, 6, 3217-3219.

[95] / W. Bin-Gui, Z. Wei-Ming, L. Xiao-Ming, J. Zhong-Jian, H. Xiao-Jiang, Rubupungenosides A and B, Two Novel Triterpenoid Saponin Dimers from the Aerial Parts of *Rubus pungens, Journal of Natural Products*, **2000**, 63, 851-854.

[96] / P. Jian-Xin, H. Sheng-Xiong, J. Ren, X. Wei-Lie, L. Li-Mei, L. Rong-Tao, L. Liang-Bo, L. Tou-Gen, L. Li-Guang, Z. Hua-Jie, S. Han-Dong, Isolation and Structure Elucidation of Kadlongilactones C−F from *Kadsura longipedunculata* by NMR Spectroscopy and DFT Computational Methods, *Journal of Natural Products*, **2007**, 70*,* 1706-1711.

[97] / N. Juan-Hwan, J. Hyun-Ju, L. A. Tapondjou, L. Kyung-Tae, J. Choi, K. Won-Bae, P. Hee-Juhn, The Anti-hyperlipidemic effect and constituents of the 19α-Hydroxyursane-type Triterpenoid fraction obtained from the leaves of *Rubus crataegifolius*, *Natural Product Sciences*, **2007**, 13, 152-159.

[98] / A. Namata, P. Yang, C. Takahashi, R. Fujiki, M. Nabae, E. Fujita, Cytotoxic Triterpenes from a Chinese Medicine, Goreishi, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1989**, 37, 648-

651.

[99] / G. Englert, NMR of carotenoids-new experimental techniques, *Pure and Applied Chemistry*, **1985**, 57, 801-821.

[100] / S. Okada, I. Tonegawa, H. Matsuda, M. Murakami, K. Yamaguchi, Braunixanthins 1 and 2, New Carotenoids from the Green Microalga *Botryococcus braunii, Tetrahedron,* **1997,** 53, 11307-11316.

[101] / X. H. Zhou, K. Kadsai, O. Ohtami, O. Tanaka, R. Nie, C. Yang, J. Zhou, K. Yamasaki, Oleanane and ursane glucosides from *Rubus species*, *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3642-3644.

[102] / I. Jastrzębska, K. S. Katryński, J. W. Morzycki, Further study on oxidation of pseudosapogenins, *Arkivoc*, **2002**, 4, 46-54.

[103] / L.M. Zeng, K.Q. Li, J.Y. Su, X. Fu, F.J. Schmitz, A new cytotoxic dihydroxysterol from the soft coral *Alcyonium patagonicum*. *Journal of Natural Products*, **1995**; 58, 296-298.

[104] / Z. U. Babar, A. Ata, M. H. Meshkatalsadat, New bioactive steroidal alkaloids from Buxus hyrcana, *Steroids*, **2006**, 71, 1045-1051.

[105] / S. Baskaran, J. Das, S. Chandrasekaran, Heterogeneous permanganate oxidations: an improved procedure for the direct conversion of olefins to .alpha.-diketones/.alpha.-hydroxy ketones, *Journal of Organic Chemistry*, **1989**, 54, 5182-5184.

[106] / J. A. Ramírez, E. G. Gros, L. R. Galagovsky. Effects on bioactivity due to C-5 heteroatom Substituents on synthetic 28-homobrassinosteroid analogs, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 6171-6180.

[107] / Z. Weiming, T. F. Warren, Oxidation of alkenes with aqueous potassium peroxymonosulfate and no organic solvent, *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, 56, 7022-7026.

[108] / E. J. Parish, Z. Qiu, Dioxirane oxidation of 3β-substituted Δ^5-steroids, *lipids*, **2004**, 39, 805-809.

[109] / E. J. Corey, W. Suggs, Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds, *Tetrahedron Letters*, **1975**, 16, 2647-2650.

[110] / http://www.faidherbe.org/site/cours/dupuis/alcools.htm, '*les alcools*', consulté le 17 décembre 2007 à 19H08'

[111] / S. Agarwal, H. P. Tiwari , J. P. Sharma, Pyridinium chlorochromate: an improved method for its synthesis and use of anhydrous acetic acid as catalyst for oxidation reactions, *Tetrahedron*, **1990**, 46, 4417-4420.

[112] / W. G. Lu, C. X. Zhang, J. Y. Su, L. M. Zeng, Synthesis of 24-methylene-cholest-5-ene-7-oxo-3*β*,19-diacetate, *Chinese Chemical Letters***, 2005,** 16, 604-606**.**

[113]/ R. A. Fernandes, PCC: Novel Oxidation Reactions, *Synlett*, **2003**, 5, 741-742.

[114] / L. Sheng-Hui, L. Tong-Shuang, Steroidal 5-en-3-ones, intermediates of the transformation of steroidal 5-en-3β-ols to steroidal 4-en-3,6-diones oxidized by pyridinium dichromate and

pyridinium chlorochromate, *Steroids*, **1998**, 63, 76-79.

[115] / D. Antonow, S. G. Mahler, G. L. Serra, E. Manta, V. L. Eifler-Lima, Synthesis of 2,4-disubstituted thiazole combinatorial unit on solid-phase: microwave assisted conversion of alcohol to amine monitored by FT-IR, *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2005**, 16, 477-481.

[116] / W. Lin, X. Zhang, Z. He, Y. Jin, L. Gong, A. Mi, Reduction Of Azides To Amines Or Amides With Zinc And Ammonium Chloride As Reducing Agent**,** *Synthetic Communications*, **2002**, 32, 3279-3284.

[117] / I. F. F. Benzie, J. J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, **1996**, 239**,** 70-76.

[118] / http://www.cancers-sarcomes.info/nat_sarc.html '*Les types de sarcome*' consulté lé 29 avril 2008 à 10H22.

[119] / M. Bras, B. Queenan, S. A. Susin, Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying, *Biochemistry*, **2005,** 70, 231-239.

120 / L. Galluzi, N. Zamzami, T. de La Motte Rouge, C. Lemaire, C. Brenner, G. Kroemer, Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis, *Apoptosis*, **2007**, 12, 803-813.

ANNEXE

I/ Tests caractéristiques.

I.1/ Test au chlorure ferrique ou test des phénols.

A une solution alcoolique du produit à analyser, on ajoute quelques gouttes de solution aqueuse de chlorure ferrique. La présence des phénols ou des énols est indiquée par un virement de la solution à la coloration bleue vert.

I.2/ Test de shinoda ou des test des flavonoïdes.

A une solution alcoolique du produit à analyser, on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et du copeau de magnésium. La présence des flavonols est indiquée par la coloration rouge du milieu, coloration rose pour les flavonone et orange pour les flavones.

I.3/ Test de Liebermann Burchard.

Dissoudre le composé dans du méthanol ou de l'acétone, ensuite y ajouter quelques gouttes d'anhydride acétique ainsi que l'acide sulfurique concentré. La coloration violette du milieu indique la présence de triterpènes ou des glycosides triterpèniques. Et la coloration bleue vert indique la présence de stéroïdes.

I.4/ Test de Molish.

Préparation du réactif de Molish: 50 ml de réactif se prépare en dissolvant 1 g de α-naphtol dans 50 ml d'éthanol.

Test: Dissoudre son produit dans un tube à essai, y ajouter 1 ml de réactif de Molish et en faisant couler lentement sur la paroi du tube 1 ml d'acide sulfurique. La formation d'un anneau violet marque la présence d'un sucre dans la molécule.

II/ Liste des publications

II.1/ **Louis Pergaud Sandjo**, Paul Hannewald, Mehdi Yemloul, Gilbert Kirsch, Bonaventure Tchaleu Ngadjui "Triumfettamide and Triumfettoside Ic, Two Ceramides and other secondary metabolites from the stems of wild *Triumfetta cordifolia* A. Rich *(*Tiliaceae*).*" *Helvetica Chimica Acta*, **2008**, 91, 1326-1335.

II.2/ **Louis Pergaud Sandjo**, Ingrid Konga Simo, Victor Kuete, Paul Hannewald, Mehdi Yemloul, Vincent Rincheval, Bonaventure Tchaleu Ngadjui, Gilbert Kirsch, François Couty, Serge Schneider "Triumfettosterol Id and Triumfettosaponin, a New (Fatty Acyl)-Substituted Steroid and a Triterpenoid Dimer Bis(β-D-glucopyranosyl) Ester from the Leaves of Wild *Triumfetta cordifolia* A. Rich (Tiliaceae)." *Helvetica Chimica Acta*, **2009**, 92, 1748-1759.