

RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTÉ DES SCIENCES

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

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN CHIMIE ET APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POSTGRADUATE SCHOOL OF SCIENCE,  
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES

RESEARCH AND POSTGRADUATE TRAINING  
UNIT FOR CHEMISTRY AND APPLICATIONS

DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE  
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

LABORATOIRE DE SUBSTANCES NATURELLES ET DE SYNTHÈSE ORGANIQUE  
LABORATORY OF NATURAL SUBSTANCES AND ORGANIC SYNTHESIS

**Métabolites secondaires des extraits des écorces du tronc  
et des racines d'*Anonidium mannii* Engl. & Diels  
(Annonaceae) : Évaluation de leurs activités  
antischistosomiasés**

**THÈSE**

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

Par

**MATCHI TOUSSI Josette Linda**

Matricule : 06T200

Master en Chimie Organique

Sous la direction de  
**NOUNGOUE TCHAMO Diderot**

*Maître de Conférences*



Année 2021

RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTÉ DES SCIENCES

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

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN CHIMIE ET APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POSTGRADUATE SCHOOL OF SCIENCE,  
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES

RESEARCH AND POSTGRADUATE TRAINING  
UNIT FOR CHEMISTRY AND APPLICATIONS

DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE  
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION

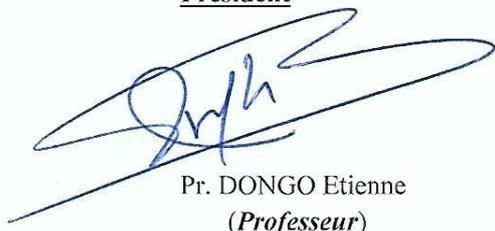
**Titre de la thèse :** « Métabolites secondaires des extraits des écorces du tronc et des racines d'*Anonidium mannii* Engl. & Diels (Annonaceae) : Evaluation de leurs activités antischistosomiales »

Nous, Professeurs DONGO Etienne, NGNOKAM David, MBAZOA DJAMA Céline, EFFA Pierre, WAGNER Alain et NOUNGOUE TCHAMO Diderot attestons que la candidate MATCHI TOUSSI Josette Linda (Matricule : 06T200), a bel et bien pris en compte dans la mouture finale toutes les corrections qui lui ont été faites conformément aux recommandations du jury.

En foi de quoi nous lui délivrons cette attestation de correction pour servir et valoir ce que de droit.

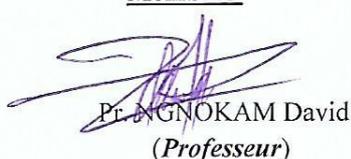
Fait à Yaoundé, le

Président



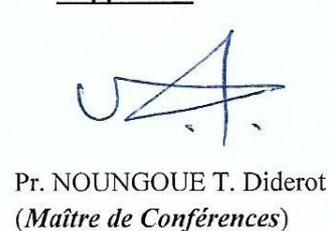
Pr. DONGO Etienne  
(Professeur)

Membres



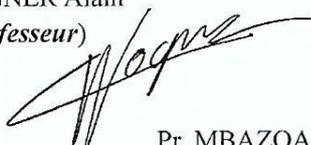
Pr. NGNOKAM David  
(Professeur)

Rapporteur



Pr. NOUNGOUE T. Diderot  
(Maître de Conférences)

Pr. WAGNER Alain  
(Professeur)



Pr. EFFA Pierre  
(Maître de Conférences)



Pr. MBAZOA Céline  
(Maître de Conférences)



---

## CERTIFICATION

Je soussigné, **Pr NOUNGOUE TCHAMO Diderot**, Directeur de thèse de Doctorat/Ph.D de Madame **MATCHI TOUSSI Josette Linda**, Master en Chimie Organique, Matricule 06T200, certifie que le présent travail a été effectué par la candidate au Laboratoire de Substances Naturelles et de Synthèse Organique (LSNSO) du Département de Chimie Organique, Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I (Cameroun) d'une part et au Laboratoire de Chimie Bio Fonctionnelle (BFC), Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg (France) d'autre part.

Ce travail n'a encore fait l'objet d'aucune présentation pour l'acquisition de quelque diplôme académique que ce soit.

**NOUNGOUE TCHAMO Diderot**  
**Habilité à Diriger des Recherches**  
**Maître de Conférences**  
**Université de Yaoundé I**

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

FACULTÉ DES SCIENCES

Division de la Programmation et du  
Suivi des Activités Académiques

**LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS**



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

Division of Programming and Follow-  
up of Academic Affairs

**LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF**

**ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION : 22 septembre 2021**

**ADMINISTRATION**

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

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

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

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

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

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Sclolarité et de la Recherche DAASR :**

AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)**

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

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste

14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

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

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

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

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

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

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste

30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

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

### **3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)**

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

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste

10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
11	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

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

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

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

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

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

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

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

#### 5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UYI
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/</i> Chef de Département
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste

24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

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

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

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

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

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

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

### 7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

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

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

11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule
----	-------------------------------	-----------------	--------------

			MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

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

### **8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)**

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

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

8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

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

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

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

## 10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste

4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

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

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	CD/Uma
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste

---

35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (02)	<b>38 (18)</b>
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	05 (02)	<b>46 (14)</b>
BPV	07 (01)	10 (01)	9 (06)	07 (01)	<b>33 (9)</b>
CI	10 (01)	10 (02)	10 (02)	03 (0)	<b>33 (5)</b>
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	02 (0)	<b>34(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	<b>25 (2)</b>
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	<b>30 (3)</b>
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	<b>18 (5)</b>
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	02 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	<b>42(7)</b>
<b>Total</b>	<b>75 (5)</b>	<b>105 (29)</b>	<b>116 (31)</b>	<b>43 (10)</b>	<b>339 (75)</b>
Soit un total de		<b>339 (75) dont :</b>			
-	Professeurs	<b>75 (5)</b>			
-	Maîtres de Conférences	<b>105 (29)</b>			
-	Chargés de Cours	<b>116 (31)</b>			
-	Assistants	<b>43 (10)</b>			
()		<b>75</b>			

## DÉDICACE

*Je dédie cette thèse à :*

*Ma feuè mère MBA DJEUMBONG Gilberte*

*Mes parents Monsieur et Madame TOUSSI*

*Mon très cher époux TSOBGNI Yves*

*Mon adorable princesse TSOBGNI Clara*

## REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas été possible sans la contribution, l'aide multiforme et les conseils de nombreuses personnes. A cet effet, je tiens à témoigner ma profonde gratitude :

- Au Professeur D. TCHAMO NOUNGOUE, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour sa simplicité, ses contributions, ses précieux conseils et remarques tout au long de ce travail. Je lui exprime ma reconnaissance pour sa disponibilité, sa constante sollicitude et son suivi pour mener à terme ce travail.
- Au Professeur A. WAGNER, pour l'accueil chaleureux que vous m'avez toujours réservé au sein de votre équipe de recherche et permis d'accomplir ce travail, pour ses encouragements et précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude. Je souhaite que cette collaboration initiée se poursuive.
- Au Professeur S. NGOUELA, Chef de notre laboratoire, pour son encadrement et ses précieux conseils tout au long de ce travail.
- A I. KUHN et H. MULLER, biologistes, pour m'avoir bien accueillie dans leur laboratoire et appris avec rigueur les tests d'inhibition sur les enzymes.
- Au Professeur J. BOISSIER, pour m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherche afin de pouvoir réaliser les tests parasitaires, pour sa disponibilité, son amabilité et son encadrement.
- Au Professeur A. E. NKENGFACK, Chef de Département de Chimie Organique, pour son dynamisme au sein du département, ses multiples encouragements et ses précieux conseils.
- Au Professeur C. VONTHRON-SENECHAU, pour son aide constante, sa disponibilité, sa bienveillance et ses précieux conseils lors de mes séjours.
- Aux membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.
- À tous les enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I pour la formation de base qu'ils m'ont fait acquérir.
- À mes aînés de laboratoire, Dr F. TANTANGMO, Dr J. J. BANKEU, Dr A. AWANTU, Dr B. MBA'NING, L. M. KAMDEM, Dr E. DONGFACK, Dr Y. FONGANG, Dr R. NGAMGOUE, Dr J. NGATCHOU, Dr A. T. TCHEUNMOGNE,

Dr E. J. ATEBA, Dr S. DIETAGOUM, Dr F. ESSOUNG, pour leur collaboration, leurs conseils et leurs suggestions.

- Au Docteur S. URSUEGUI pour son accueil dès mon arrivée à Strasbourg, ses conseils, sa disponibilité et son aide constante.
- Au Docteur G. CHAUBET pour sa disponibilité, ses contributions et son esprit d'équipe.
- A toute ma grande famille notamment les familles FOTSING, TAKOUDOUM, MBANGUE, ANDAFE, FOSSO, TCHINDE, KUETCHE, TSOBGNI pour leur encouragement et leur soutien multiforme.
- A tous mes camarades de laboratoire et de promotion en particulier M. TCHIENEHOM, Dr C. WALEGUELE, Dr D. KAGHO, C. GOUNI, K. DONGMO, S. CHOUNA pour leur esprit d'équipe, leurs encouragements et les moments chaleureux passés ensemble.
- A l'ensemble des membres de l'équipe de Chimie Bio Fonctionnelle à Strasbourg notamment C. SORNAY, E. TOBALDI, T. RADY, V. LEHOT, F. HERMAL, M. WANTZ pour m'avoir gentiment accueillie parmi eux, leur esprit d'équipe, leur sympathie et les moments chaleureux passés ensemble.
- A l'équipe de la Plateforme d'analyse chimique de Strasbourg-Illkirch, notamment D. GARNIER pour sa gentillesse, sa compétence dans le domaine de la RMN.
- À mes amis pour leur soutien permanent, leurs prières et la disponibilité dont ils ont toujours fait preuve. Je pense à C. MATENE, N. MBABI, I. DJIDJOU, E. TOUNOUKEU, B. DEUMO, G. NJIFENJOU.
- À Monsieur V. NANA, botaniste à l'Herbier National du Cameroun pour sa contribution dans la récolte et l'identification des plantes qui ont fait l'objet de ce travail.
- À mes frères et sœurs, en témoignage de ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour tous les efforts consentis, leur affection, leur soutien indéfectible et leurs encouragements.
- Aux organismes internationaux qui ont financé notre laboratoire pendant la réalisation de ce travail notamment l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) et la

## Remerciements

---

Fondation pour la Recherche en Chimie (FRC) pour le financement lors de mes séjours à Strasbourg (France).

Que tous ceux qui n'ont pas vu leurs noms cités trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

---

## TABLE DE MATIERES

CERTIFICATION-----	i
LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES-----	ii
DÉDICACE -----	xvii
REMERCIEMENTS -----	xviii
TABLE DE MATIERES -----	xxi
RÉSUMÉ -----	xxv
ABSTRACT-----	xxvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES -----	xxix
LISTE DES TABLEAUX-----	xxxii
LISTE DES FIGURES-----	xxxiii
LISTE DES SCHÉMAS-----	xxxvi
INTRODUCTION GÉNÉRALE -----	1
CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE -----	6
I.1- LA FAMILLE DES ANNONACEAE-----	7
I.1.1- Le genre <i>Anonidium</i> -----	7
I.1.1.1- L'espèce <i>Anonidium mannii</i> (Oliv) Engl. &Diels -----	8
I.1.1.2- Position dans la systématique -----	8
I.1.1.3- Description botanique -----	9
I.1.1.4- Synonymes et noms vernaculaires-----	10
I.1.1.5- Répartition géographique d' <i>Anonidium mannii</i> en Afrique-----	11
I.1.2- Les usages de l'espèce <i>Anonidium mannii</i> -----	11
I.1.2.1- En médecine naturelle -----	11
I.1.2.2- Sur le plan culturel -----	13
I.2- ÉTUDES CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE ANTÉRIEURES -----	13
I.2.1- Quelques études chimiques antérieures sur la famille des Annonaceae-----	13
I.2.2- Études chimiques antérieures sur <i>Anonidium mannii</i> -----	16
I.2.3- Quelques généralités sur les alcaloïdes et alcaloïdes indoliques -----	21
I.2.3.1- Définition-----	22
I.2.3.2- Biosynthèse des indoles -----	22
I.2.3.3- Propriétés chimiques des indoles -----	24
I.2.3.4- Méthodes spectroscopiques de détermination structurale des indoles-----	24
I.2.3.5- Quelques propriétés biologiques des indoles-----	25

---

I.2.4- Études pharmacologiques antérieures sur <i>Anonidium mannii</i> -----	26
I.3- GÉNÉRALITÉS SUR LA SCHISTOSOMIASE ET SUR LES ENZYMES -----	27
I.3.1- La schistosomiase -----	27
I.3.1.1- Historique et Définition -----	27
I.3.1.2- Cycle évolutif de <i>Schistosoma</i> -----	28
I.3.1.3- Manifestations, épidémiologie -----	31
I.3.1.4- Diagnostic de la schistosomiase -----	34
I.3.1.5- Prévention de la schistosomiase -----	34
I.3.1.6- Traitement de la schistosomiase -----	35
I.3.2- Les enzymes-----	36
I.3.2.1- Généralités -----	36
I.3.2.2- L'enzyme <i>SmNACE</i> -----	38
I.3.2.3- Inhibiteur enzymatique -----	39
CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION -----	42
II.1-ÉTUDE CHIMIQUE D'ANONIDIUM MANNII-----	43
II.1.1- Matériel végétal, extraction et isolement des composés -----	43
II.2- DÉTERMINATION STRUCTURALE DES COMPOSÉS ISOLÉS -----	46
II.2.1- Les alcaloïdes -----	46
II.2.1.1- Élaboration structurale d'AMR8 (Composé nouveau : Manniindole)-----	46
II.2.1.2- Identification d'AME3 ou AMR6-----	54
II.2.1.3- Identification d'AME5 ou AMR9 -----	63
II.2.1.4- Identification d'AMR7 -----	70
II.2.2- Les flavonoïdes -----	75
II.2.2.1- Identification d'AME6 -----	75
II.2.3- Les triterpènes pentacycliques-----	80
II.2.3.1- Identification d'AMR4 ou AME2 -----	80
II.2.3.2- Identification d'AME7 ou AMR3 -----	88
II.2.3.3- Identification d'AMR5 ou AME8 -----	94
II.2.3.4- Identification d'AMR2 -----	98
II.2.4- Les stéroïdes -----	101
II.2.4.1- Identification d'AME1 -----	101
II.2.4.2- Identification d'AMR1 -----	104
II.2.5- Les acides phénoliques -----	106
II.2.5.1- Identification d'AME4 -----	106

---

II.3- TRANSFORMATIONS CHIMIQUES D'AME3 ET D'AME5 -----	109
II.3.1- Acétylation d'AME3-----	113
II.3.2- Acétylation d'AME5-----	109
II.4- ACTIVITÉS ENZYMATIQUE, ANTISCHISTOSOMIALE ET CYTOTOXIQUE DES EXTRAITS, DE QUELQUES COMPOSÉS ISOLÉS D' <i>A. MANII</i> ET DES DÉRIVÉS HÉMISYNTHÉTIQUES -----	116
II.4.1- Screening préliminaires de quelques plantes -----	116
II.4.1.1- Screening biologique-----	116
II.4.1.1- Screening chimique-----	119
II.4.2- Test enzymatique sur <i>SmNACE</i> -----	120
II.4.3- Test anti- <i>Schistosoma mansoni</i> -----	124
II.4.4- Test de toxicité cellulaire-----	126
II.4.5- Étude de la relation structure–activité des lactames obtenus contre <i>Schistosoma mansoni</i> -----	130
CONCLUSION ET PERSPECTIVES-----	135
CHAPITRE III : PARTIE EXPÉRIMENTALE -----	139
III.1- GÉNÉRALITÉS -----	140
III.1.1- Les techniques chromatographiques-----	140
III.1.2- Méthodes physico-chimiques et appareillage -----	140
III.1.2.1- Spectre de masse -----	140
III.1.2.2- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) -----	141
III.1.2.3- Spectrométrie infrarouge-----	141
III.1.2.4- Pouvoir rotatoire -----	141
III.1.2.5- Point de fusion-----	141
III.1.3- Tests de caractérisation chimique-----	142
III.1.3.1- Test de Dragendorff (identification des alcaloïdes)-----	142
III.1.3.2- Test de Shinoda (identification des flavonoïdes)-----	142
III.1.3.3- Test au chlorure ferrique (identification des composés phénoliques) -----	142
III.1.3.4- Test de Liebermann-Burchard (identification des terpénoïdes et des stérols) -----	142
III.2- EXTRACTION ET ISOLEMENT DES COMPOSÉS -----	143
III.2.1- Matériel végétal -----	143

---

---

III.2.2- Extraction-----	143
III.2.3- Isolement des composés-----	143
III.2.3.1- Isolement des composés des écorces du tronc d' <i>A. mannii</i> -----	143
III.2.3.1.1- Chromatographie de la série F <sub>B</sub> -----	144
III.2.3.1.2- Chromatographie de la série F <sub>C</sub> -----	144
III.2.3.1.3- Purification de la fraction D -----	145
III.2.3.1.4- Purification de la fraction E -----	146
III.2.3.2- Isolement des composés des racines d' <i>A. mannii</i> -----	146
III.2.3.2.1- Chromatographie de la fraction F3 -----	147
III.2.3.2.2- Chromatographie de la fraction F6 -----	147
III.2.3.2.3- Chromatographie de la fraction F9 -----	147
III.2.3.2.4- Etude de la fraction F10-----	147
III.3. TRANSFORMATIONS CHIMIQUES SUR QUELQUES COMPOSÉS ISOLÉS	148
III.3.1- Acétylation d'AME3-----	148
III.3.2- Acétylation d'AME5-----	149
III.4- ÉVALUATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES -----	149
III.4.1- Évaluation de l'activité antischistosomiale-----	149
III.4.1.1- Préparation des solutions à tester -----	149
III.4.1.2- Préparation des parasites -----	149
III.4.1.3- Évaluation de l'activité <i>in vitro</i> -----	150
III.4.2- Évaluation de l'activité enzymatique-----	151
III.4.3- Évaluation de la toxicité-----	150
III.5- CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSÉS ISOLÉS---	154
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES-----	158
ANNEXE: PUBLICATIONS-----	170

## RÉSUMÉ

Le présent projet, dont l'approche est la mise en œuvre d'une démarche différente de celles déjà élaborées jusqu'à présent, porte sur l'étude chimique et l'évaluation des propriétés antischistosomiale et inhibitrice d'enzymes des extraits et des constituants chimiques d'une espèce végétale camerounaise : *Anonidium mannii* (Annonaceae). Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement du paludisme, du cancer, de la schistosomiase et/ou de leurs symptômes.

L'investigation phytochimique, grâce aux méthodes chromatographiques usuelles, a conduit à l'isolement de 8 métabolites secondaires des écorces du tronc et par la suite 9 des racines. En fin de compte, 12 composés ont été entièrement caractérisés à l'aide des techniques spectroscopiques (UV, IR, SM, RMN 1D et 2D) et par comparaison de certaines données physiques et spectrales avec celles décrites dans la littérature. Un de ces composés est isolé pour la première fois. Il s'agit d'un alcaloïde : manniindole. Les onze autres composés, tous connus, appartiennent à diverses classes de substances naturelles, parmi lesquelles : trois alcaloïdes (aristolactames) (aristolactam AII, aristolactam BII, piperolactam D), un flavonoïde (épicatechine), un acide phénolique (acide gallique), quatre triterpènes pentacycliques (polycarpol,  $\alpha$ -amyrine, lupéol, lanosta-7,9(11),23-triène-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol), deux stéroïdes ( $\beta$ -sitostérol et stigmastérol). De plus, l'acétylation des aristolactames AII et BII ont conduit à l'obtention de deux dérivés : aristolactam AII diacétylé, aristolactam BII acétylé, respectivement. Parmi ces deux dérivés, l'aristolactam BII acétylé est décrit pour la première fois. De même, en dehors du polycarpol, du lanosta-7,9(11),23-triène-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol, du stigmastérol et du  $\beta$ -sitostérol, tous les autres composés, bien que connus dans la littérature, ont été isolés pour la première fois du genre *Anonidium*.

Par ailleurs, les extraits des écorces du tronc et des racines d'*A. mannii* et certains composés isolés (Manniindole, Aristolactam AII, Aristolactam BII, Acide gallique, Aristolactam BII acétylé, piperolactam D) ont été testés pour leurs propriétés antischistosomiales sur *Schistosoma mansoni*. Il ressort de ces tests que les extraits des écorces du tronc (AME) et de racines d'*A. mannii* (AMR) ont montré une bonne activité sur *Schistosoma mansoni* avec un taux de mortalité supérieur à 60%. L'acide gallique et l'aristolactam AII ont montré une activité importante sur *S. mansoni*, notamment l'acide gallique qui a montré un taux de survie nul à 100  $\mu$ M comparé à celui du praziquantel pris comme référence.

De même, certains composés isolés ont été testés pour leurs propriétés inhibitrices de l'enzyme découverte en 2006 qui est la *Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup> Catabolysing Enzyme (*SmNACE*) (E.C 3.3.2.5) Cette enzyme est exprimée à la surface du tégument de *Schistosoma mansoni* et pourrait être une bonne cible thérapeutique pour de futurs médicaments contre la schistosomiase.

Certains de ces composés testés se sont montrés potentiellement actifs à l'instar du piperolactam D qui a montré une bonne activité (CI<sub>50</sub> = 10-20 µM) comparée à la référence qui est la cyanidine (CI<sub>50</sub> = 2,3 µM).

**Mots Clés :** *Anonidium manni* – Alcaloïde - Mannindole - Aristolactam BII acétylé-  
Activité antischistosomiale - Inhibiteur enzymatique- Cytotoxicité

## ABSTRACT

The present work relates to the chemical study and evaluation of the antischistosomal and inhibitory properties of enzymes of extracts and chemical constituents of a Cameroonian plant species: *Anonidium mannii* (Annonaceae). This plant is used in traditional medicine for the treatment of malaria, cancer, schistosomiasis and/or their symptoms. Their extracts (stem barks and roots) showed interesting antischistosomal and enzymatic activities *in vitro* during the preliminary screening on *Schistosoma mansoni* and on SmNACE.

Phytochemical investigation, using the usual chromatographic methods, led to the isolation of eight compounds from the stem barks and nine other from the roots. At last, twelve compounds have been fully characterized using spectroscopic techniques (UV, IR, SM, 1D and 2D NMR) and by comparison of some physical and spectral data with those described in the literature. One of these compounds is isolated for the first time. It is an alkaloid: manniindole. The eleven other compounds, all known, belong to various classes of natural substances, among which: three alkaloids (aristolactams) (aristolactam AII, aristolactam BII, piperolactam D), a flavonoid (epicatechin), a phenolic acid (gallic acid), four pentacyclic triterpenes (polycarpol,  $\alpha$ -amyrin, lupeol, lanosta-7,9-(11),23-triene-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol), two steroids ( $\beta$ -sitosterol and stigmasterol). Furthermore, the acetylation of the aristolactams AII and BII led to the production of two derivatives: aristolactam AII diacetylated, aristolactam BII acetylated, respectively. Among these two derivatives, acetylated aristolactam BII is obtained for the first time. Similarly, apart from polycarpol, lanosta-7,9(11),23-triene-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, all the other compounds, although known in the literature, were isolated for the first time of the genus *Anonidium*.

The stem barks and roots extracts and some isolated compounds have been tested for their antischistosomal properties on *Schistosoma mansoni*. It emerged from these tests that the extracts of the stem bark and roots of *A. mannii* showed good activity on *Schistosoma mansoni* with mortality rate greater than 60%. Some compounds were shown good activity on *Schistosoma mansoni*, in particular gallic acid that showed zero survival rate à 100  $\mu$ M compared to that of praziquantel taken as an internal reference.

In addition, some isolated compounds (Manniindole, Aristolactam AII, Aristolactam BII, Acide gallique, Aristolacta, BII acétylé, piperolactam D) have been tested for their inhibitory properties of the new SmNACE enzyme. This enzyme is expressed on the outer surface of *Schistosoma mansoni*. Some of these tested compounds were shown to be potentially active

on *SmNACE* like piperolactam D which showed the best activity ( $IC_{50} = 10-20 \mu M$ ) in comparison to the reference which is cyanidine ( $CI_{50} = 2.3 \mu M$ ).

**Keywords:** *Anonidium manni* - Alkaloid - Manniindole - Aristolactam BII acetylate- Antischistosomal activity - Enzyme inhibitor - Cytotoxicity

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

ADPRc	:	Adénosine Diphosphate Ribosyl Cyclase
AE	:	Acétate d'éthyle
<i>A. manni</i>	:	<i>Anonidium manni</i>
AME	:	<i>Anonidium manni</i> Écorces
AMR	:	<i>Anonidium manni</i> Racines
ANOFEL	:	Association Française des Enseignants de Parasitologie et de Mycologie
APG	:	<i>Angiosperms Phylogeny Group</i>
APT	:	<i>Attached Proton Test</i>
CC	:	Chromatographie sur Colonne
CCM	:	Chromatographie sur Couche Mince
C <sub>eff50</sub> ou CE50	:	Concentration efficace à 50%
CI <sub>50</sub>	:	Concentration Inhibitrice à 50 %
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
COSY	:	<i>Correlation SpectroscopY</i>
d	:	Doublet
dd	:	Doublet de doublets
dl	:	Doublet large
DEPT	:	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMEM	:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DO	:	Densité Optique
<i>E. aerogenes</i>	:	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
ESI	:	<i>ElectroSpray Ionisation</i>
ESI-HR	:	<i>ElectroSpray Ionization-High Resolution</i>
FS	:	Faculté des Sciences
Hex	:	Hexane
HPLC	:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

HSQC	:	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
GBIF	:	<i>Global Biodiversity Information Facility</i>
IE	:	Ionisation par Impact Electronique
IR	:	Infra Rouge
<i>K. pneumoniae</i>	:	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
m	:	multiplet
MHz	:	MégaHertz
NAD	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADPH	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate H</i>
NOESY	:	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P. aeruginosa</i>	:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P. F.	:	Point de Fusion
PM	:	Poids moléculaire
ppm	:	Partie par million
PZQ	:	Praziquantel
Q	:	Quartet
RMN 1D et 2D	:	Résonance Magnétique Nucléaire à une et à deux Dimensions
RMN <sup>13</sup> C	:	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
RMN <sup>1</sup> H	:	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RPMI	:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	:	Singulet
<i>sl</i>	:	Singulet large
SM	:	Spectrométrie de Masse
t	:	Triplet
TFA	:	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
UV	:	Ultra Violet
WHO	:	<i>World Health Organization</i>
m/z	:	<i>Rapport masse / charge atomique</i>
<i>J</i>	:	Constante de couplage
$\delta$	:	<i>Échelle de déplacement chimique en ppm</i>
$\lambda_{\max}$	:	Longueur d'onde maximale

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Répartition géographique d' <i>Anonidium mannii</i> au Cameroun .....	11
Tableau II : Quelques acétogénines isolés de la famille des Annonaceae. ....	14
Tableau III : Quelques flavonoïdes isolés de la famille des Annonaceae.....	15
Tableau IV : Quelques stéroïdes isolés de la famille des Annonaceae. ....	16
Tableau V : Quelques alcaloïdes isolés de l'espèce <i>Anonidium mannii</i> . ....	17
Tableau VI : Quelques triterpènes isolés de l'espèce <i>Anonidium mannii</i> . ....	19
Tableau VII : Quelques stéroïdes isolés de l'espèce <i>Anonidium mannii</i> . ....	20
Tableau VIII: Répartition géographique des schistosomiasis humaines en fonction des organes atteints et de l'espèce du parasite.....	32
Tableau IX : Données de RMN d'AMR8 [ <sup>13</sup> C (125 MHz) et <sup>1</sup> H (500 MHz) dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ]. ....	54
Tableau X: Données de RMN d'AME3 [ <sup>13</sup> C (125 MHz) et <sup>1</sup> H (500 MHz) dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ] comparées à celles de l'aristolactam BII. ....	62
Tableau XI : Données de RMN d'AME5 [ <sup>13</sup> C (125 MHz) et <sup>1</sup> H (500 MHz) dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ] comparées à celles de l'aristolactam AII.....	69
Tableau XII : Données de RMN d'AMR7 [ <sup>13</sup> C (125 MHz) et <sup>1</sup> H (500 MHz) dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ] comparées à celles de la piperolactam D.....	74
Tableau XIII : Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) et <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 100 MHz) de AME6 comparées à celles de l'épicatéchine ( <sup>1</sup> H, 300 MHz et <sup>13</sup> C, 75 MHz) dans le CD <sub>3</sub> OD . ....	79
Tableau XIV : Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) dans le CDCl <sub>3</sub> d'AMR4 comparées à celles du polycarpol ( <sup>1</sup> H, 400 MHz et <sup>13</sup> C, 100 MHz) dans le CD <sub>3</sub> OD . ....	87
Tableau XV : Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) dans le MeOD d'AME7 comparées à celles de l'Anomanol A ( <sup>1</sup> H, 600 MHz et <sup>13</sup> C, 150 MHz) dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	93
Tableau XVI : Données spectrales de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz) dans le CDCl <sub>3</sub> d'AMR5 comparées à celles de l' $\alpha$ -amyrine (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	97
Tableau XVII : Données spectrales de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) d'AMR2 comparées à celles du lupéol (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz).....	101
Tableau XVIII: Données de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz) et <sup>1</sup> H (500 MHz) d'AME4 comparées à celles de l'acide gallique [RMN <sup>13</sup> C (100 MHz) et <sup>1</sup> H (400 MHz)] dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	107

Tableau XIX : Données de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz) et $^1\text{H}$ (500 MHz) d'AME3a dans le $\text{CDCl}_3$ . .....	113
Tableau XX : Résultats du screening antischistosomial et enzymatique des extraits sur <i>Schistosoma mansoni</i> et SmNACE.....	119
Tableau XXI : Synthèse du test enzymatique effectué sur l'extrait AMR et ses fractions. ...	123
Tableau XXII : Valeurs de $\text{CI}_{50}$ des composés testés sur SmNACE. ....	124
Tableau XXIII : Comparaison de l'activité antischistosomiale <i>in vitro</i> des lactames testés. ....	133
Tableau XXIV : Chromatogramme de l'extrait des écorces du tronc d' <i>A. mannii</i> . ....	144
Tableau XXV : Chromatogramme de la série F <sub>B</sub> . ....	144
Tableau XXVI : Chromatogramme de la série F <sub>C</sub> . ....	145
Tableau XXVII : Chromatogramme de la série F <sub>D</sub> . ....	145
Tableau XXVIII: Chromatogramme de l'extrait des racines d' <i>A. mannii</i> . ....	146
Tableau XXIX : Chromatogramme de la fraction F10. ....	147

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Position dans la systématique d' <i>Anonidium manni</i> .....	9
Figure 2 : Feuilles (a), Graines (b) et Fruits (c) d' <i>Anonidium mannii</i> . .....	10
Figure 3 : Cycle de vie hétéroxène de <i>Schistosoma mansoni</i> . .....	29
Figure 4 : Migration du parasite <i>Schistosoma mansoni</i> dans son hôte vertébré (étapes 1 à 7).. .....	31
Figure 5: Distribution globale des différentes espèces de schistosomes pathogènes pour l'Homme .....	33
Figure 6 : Enzyme <i>SmNACE</i> .....	39
Figure 7 : Spectre de masse ESI <sup>+</sup> à haute résolution d'AMR8 .....	47
Figure 8: Spectre IR d'AMR8 .....	47
Figure 9: Spectre de RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) d'AMR8.....	48
Figure 10: Spectre DEPT 135 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) d'AMR8.....	49
Figure 11: Spectre HSQC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AMR8 .....	49
Figure 12: Spectre de RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) d'AMR8.....	50
Figure 13: Spectre COSY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AMR8 .....	52
Figure 14: Spectre HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AMR8 .....	52
Figure 15: Spectre NOESY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AMR8.....	53
Figure 16: Spectre de masse ESI <sup>+</sup> à haute résolution d'AME3.....	55
Figure 17: Spectre de RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) d'AME3.....	56
Figure 18: Spectre de RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) d'AME3 .....	57
Figure 19: Spectre HSQC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME3.....	57
Figure 20 : Spectre COSY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME3.....	59
Figure 21: Spectre HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME3 .....	60
Figure 22 : Spectre NOESY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME3 .....	61
Figure 23: Spectre de masse ESI <sup>+</sup> à haute résolution d'AME5.....	63
Figure 24 : Spectre de RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) d'AME5.....	64
Figure 25 : Spectres comparés de RMN <sup>1</sup> H d'AME5 (a) et d'AME3 (b), (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) .....	65
Figure 26 : Spectre de RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) d'AME5.....	66
Figure 27 : Spectre HSQC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME5.....	67
Figure 28 : Spectre HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME5 .....	67
Figure 29 : Spectre NOESY (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME5 .....	68
Figure 30 : Spectre de masse ESI <sup>+</sup> à haute résolution d'AMR7 .....	70

---

Figure 31 : Spectre de RMN $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) d'AMR7.....	71
Figure 32 : Spectres comparés de RMN $^1\text{H}$ d'AMR7 (a) et d'AME3 (b), respectivement (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	71
Figure 33 : Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ ) d'AMR7 .....	72
Figure 34 : Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ ) d'AMR7 .....	73
Figure 35 : Spectre NOESY (DMSO- $d_6$ ) d'AMR7.....	73
Figure 36 : Spectre de RMN $^1\text{H}$ d'AME6 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz).....	76
Figure 37 : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ d'AME6 (DMSO- $d_6$ , 100 MHz).....	77
Figure 38 : Spectre COSY d'AME6 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) .....	77
Figure 39 : Spectre HMBC d'AME6 (DMSO- $d_6$ ) .....	78
Figure 40 : Spectre de masse ESI $^+$ à haute résolution d'AMR4 .....	80
Figure 41 : Spectre de RMN $^1\text{H}$ (CDCl $_3$ , 500 MHz) d'AMR4 .....	81
Figure 42 : Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ d'AMR4 (CDCl $_3$ , 125 MHz).....	82
Figure 43 : Spectre DEPT 135 (CDCl $_3$ , 125 MHz) d'AMR4 .....	83
Figure 44 : Spectre COSY (CDCl $_3$ , 500 MHz) d'AMR4.....	85
Figure 45 : Spectre HSQC (CDCl $_3$ ) d'AMR4.....	85
Figure 46 : Spectre HMBC (CDCl $_3$ ) d'AMR4.....	86
Figure 47 : Spectre de masse ESI $^+$ à haute résolution d'AME7.....	88
Figure 48 : Spectre de RMN $^1\text{H}$ (MeOD, 500 MHz) d'AME7 .....	89
Figure 49 : Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (MeOD, 125 MHz) d'AME7.....	90
Figure 50 : Spectre DEPT (CDCl $_3$ , 125 MHz) d'AME7.....	90
Figure 51: Spectre HSQC (MeOD) d'AME7.....	91
Figure 52: Spectre COSY (MeOD, 500 MHz) d'AME7.....	92
Figure 53 : Spectre HMBC (MeOD) d'AME7.....	93
Figure 54 : Spectre de RMN $^1\text{H}$ (CDCl $_3$ , 400 MHz) d'AMR5 .....	95
Figure 55 : Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (CDCl $_3$ , 100 MHz) d'AMR5 .....	96
Figure 56 : Spectre de RMN $^1\text{H}$ (CDCl $_3$ , 500 MHz) d'AMR2 .....	98
Figure 57 : Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (CDCl $_3$ , 125 MHz) d'AMR2 .....	99
Figure 58 : Spectre DEPT 135 (CDCl $_3$ , 125 MHz) d'AMR2 .....	100
Figure 59 : Spectre de masse sous impact électronique du composé AME1 .....	102
Figure 60 : Spectre de RMN $^1\text{H}$ (CDCl $_3$ , 500 MHz) d'AME1 .....	103
Figure 61 : Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (CDCl $_3$ , 125 MHz) d'AME1 .....	103
Figure 62 : Spectre de masse ESI $^+$ à haute résolution d'AMR1 .....	104
Figure 63 : Spectre de RMN $^1\text{H}$ d'AMR1 (Pyridine- $d_5$ , 300 MHz).....	105
Figure 64 : Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ d'AMR1 (Pyridine- $d_5$ , 75 MHz).....	105

---

Figure 65 : Spectre de masse ESI <sup>+</sup> à haute résolution d'AME4.....	106
Figure 66 : Spectre de RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) d'AME4.....	107
Figure 67 : Spectre de RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz) d'AME4.....	108
Figure 68 : Spectre HSQC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME4.....	108
Figure 69 : Spectre HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) d'AME4.....	109
Figure 70 : Spectre de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) d'AME3a.....	110
Figure 71 : Spectres comparés de RMN <sup>1</sup> H d'AME3a (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) et d'AME3 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz), respectivement.....	111
Figure 72 : Spectre de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) d'AME3a.....	112
Figure 73 : Spectres comparés de RMN <sup>13</sup> C d'AME3a (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) et d'AME3 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz), respectivement.....	112
Figure 74 : Spectre de masse ESI <sup>+</sup> à haute résolution d'AME3a.....	113
Figure 75 : Spectre de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) d'AME5a.....	114
Figure 76 : Spectres comparés de RMN <sup>1</sup> H d'AME5a (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) et d'AME5 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz), respectivement.....	115
Figure 77 : Spectre NOESY (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) d'AME5a.....	116
Figure 78 : Pourcentage d'inhibition des différents extraits.....	117
Figure 79 : Concentration létale 50 (CL <sub>50</sub> ) des extraits hydroalcooliques des différentes plantes.....	118
Figure 80 : Screening phytochimique effectué sur les écorces du tronc d' <i>A. mannii</i> .....	120
Figure 81 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait AMR et de ses fractions (Test fluorimétrique).....	121
Figure 82 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait AMR et de ses fractions (Test HPLC).....	122
Figure 83 : Composés testés sur <i>SmNACE</i> et valeurs de leurs CI <sub>50</sub> .....	124
Figure 84 : Pourcentage de survie parasitaire des extraits AME et AMR.....	125
Figure 85 : Pourcentage de survie parasitaire des fractions d'AMR et d'AME.....	126
Figure 86 : Pourcentage de survie parasitaire de quelques composés isolés.....	126
Figure 87 : Cytotoxicité des extraits AME, AMR et des fractions sur les cellules Huh7 et A549.....	129
Figure 88 : Cytotoxicité de quelques composés isolés sur les cellules Huh7(a) et A549 (b).....	131

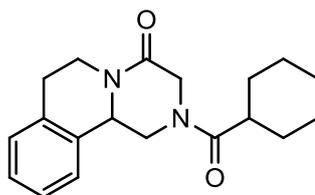
## LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1: Voie de biosynthèse des indoles .....	24
Schéma 2: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des écorces du tronc d' <i>A. mannii</i> .....	44
Schéma 3: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des racines d' <i>A. mannii</i> .....	45
Schéma 4 : Quelques corrélations HMBC d'AMR8 .....	54
Schéma 5 : Quelques corrélations HMBC d'AME3 .....	62
Schéma 6: Quelques corrélations HMBC d'AME5 .....	68
Schéma 7 : Quelques corrélations HMBC d'AMR7 .....	74
Schéma 8 : Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC d'AME6 .....	79
Schéma 9: Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC d'AMR4 .....	86
Schéma 10 : Acétylation d'AME3 .....	109
Schéma 11 : Acétylation d'AME5 .....	113

**INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Les populations africaines continuent de faire face à l'émergence des parasitoses chroniques dont le suivi et le traitement constituent pour elles un problème économique et social. Parmi celles-ci, nous pouvons citer le paludisme et la schistosomiase. Cette dernière, encore appelée bilharziose, est une maladie chronique qui, en importance de santé publique et d'impact socioéconomique, est considérée par l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) comme la deuxième endémie parasitaire après le paludisme. En effet, dans les années 2000, l'OMS estimait le nombre annuel de décès à 200 000 dans le monde (OMS, 2004). Comme le paludisme, la zone de prévalence de la schistosomiase se situe dans les régions tropicales et subtropicales, notamment dans les communautés démunies qui n'ont pas accès à une eau de boisson salubre et à un assainissement satisfaisant. Plus alarmant, il est estimé qu'au moins 92% des personnes qui ont besoin d'un traitement contre la schistosomiase habitent en Afrique (OMS, 2020). Au Cameroun, l'incidence est de 1000 à 1500 cas par an. Dans les années 2000, on a noté environ 1,7 millions de personnes infectées de schistosomiase (Brooker et al., 2003) dont 80% des cas dans les régions septentrionales (Ratard et al., 1990).

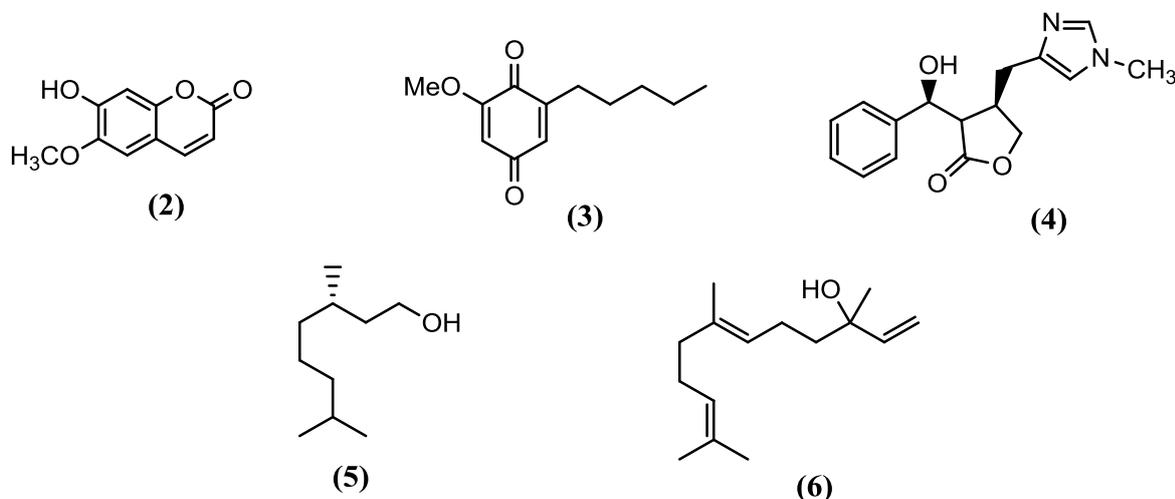
Longtemps ignorée par les bailleurs de fonds et les grandes firmes pharmaceutiques, cette parasitose est considérée comme une « *maladie tropicale négligée* » (OMS, 2010). En effet, aucun vaccin contre cette maladie hydrique n'a encore été découvert jusqu'ici, malgré quelques rares études menées (Tran et al., 2006 ; Hotez et al., 2010). La chimio prévention et la sensibilisation restent les seuls moyens permettant de la contrôler. La voie thérapeutique contre la schistosomiase, notamment en Afrique, ne s'appuie massivement, depuis une quarantaine d'années, que sur un seul médicament : *le Biltricide*<sup>®</sup> dont le principe actif est le *praziquantel (PZQ)* (1). En plus du praziquantel, il existe d'autres molécules commercialisées ayant des propriétés schistosomicides comme l'*artémisinine* ou l'*oxamniquine*, qui est exclusivement vendu au Brésil du fait notamment de son coût très élevé. Malheureusement, le phénomène de résistance développé par le parasite conduit à une inefficacité croissante du praziquantel (Fallon et Doenhoff, 1994, Caffrey, 2015).



(1)

Parallèlement à la médecine dite moderne, la pharmacopée traditionnelle en Afrique reposant sur des ressources végétales offre une grande opportunité pour vaincre cette endémie. En effet, les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable dont l'usage est connu. Dans les pays en voie de développement, entre 70 et 95% de la population ont recours aux plantes médicinales pour les soins primaires par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité (OMS, 2011). A cet effet, certaines espèces ont été évoquées dans le traitement de la bilharziose : Les rhizomes d'*Imperata cylindrica* (Gramineae) d'Afrique Centrale sont létaux pour les schistosomes. Quant à *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) d'Afrique de l'Ouest, il a des propriétés anti-schistosomiales (Muyak et al., 2014). Malheureusement, l'administration de ces potions aux malades peut être la cause de problèmes dès lors que l'activité pharmacologique des extraits végétaux est mal maîtrisée par les tradipraticiens. En effet, beaucoup d'incidents et d'accidents (intoxications graves) leur ont été souvent imputés.

Au-delà des mesures prophylactiques, le traitement de la bilharziose, que ce soit par la médecine moderne ou traditionnelle, a montré ses limites (phénomène de résistance, de nombreux effets secondaires). Par ailleurs, il est communément admis que la nature est dotée d'un potentiel thérapeutique colossal et les plantes ont toujours été une source majeure de composés biologiquement actifs. Un survol bibliographique nous a permis de répertorier quelques composés à activité antischistosomiale précédemment isolés des plantes comme la scopolétine (2) (Adewunmi, 1984), le primin (3) ( $IC_{50} = 7,08 \mu\text{g/mL}$ ) (Viegas et al., 2017), l'épiisopiloturine ( $CL_{50} = 300 \mu\text{g/mL}$ ) (4) (Veras et al., 2012), le dihydrocitronellol (Valeurs de  $CI_{50}$  comprises entre 13-52  $\mu\text{M}$ ) (5) (Mafud et al., 2016), le nérolidol ( $CL_{50} = 84,99 \mu\text{M}$ ) (6) (Silva et al., 2017).



Toutefois, une carence prononcée dans la recherche des antagonistes de schistosomes subsiste. Il serait donc intéressant pour les chercheurs d'exploiter cette démarche en poursuivant d'autres criblages et évaluations des extraits de plantes afin de développer de nouveaux arsenaux de traitements plus efficaces contre ces vers parasitaires.

La question de recherche est celle de savoir si les extraits, les fractions et/ou les composés issus des écorces du tronc et des racines d'*A. mannii*, peuvent-ils être plus efficaces que le praziquantel, seule molécule, en ce moment, utilisée massivement en Afrique contre la schistosomiase.

C'est dans un schéma multidisciplinaire que de nombreux laboratoires de par le monde s'intéressent, pour une cible biologique donnée, à l'extraction, l'isolement, l'identification des métabolites secondaires issus des plantes potentiellement actives et aux tests pharmacologiques de ces extraits totaux ou de ces composés purs. Cette approche dans la valorisation des plantes médicinales constitue l'un des axes privilégiés de recherche au Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I depuis des décennies.

Ainsi, fruit d'une collaboration entre le Laboratoire de Substances Naturelles et de Synthèse Organique de l'Université de Yaoundé I (Cameroun) et le Laboratoire de Chimie Bio fonctionnelle de l'Université de Strasbourg (France), ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre général des travaux visant à potentialiser des ressources naturelles d'origine végétale et antischistosomiale du Cameroun.

Dans le cadre de nos travaux de recherche en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat/Ph. D en Chimie Organique, nous avons entrepris les études chimique et biologique d'*Anonidium mannii*, une plante médicinale du Cameroun appartenant à la famille des Annonaceae.

Le choix de cette plante a été motivé par ses nombreux usages en médecine naturelle notamment dans le traitement de la schistosomiase (**Projet de partenariat CE-FAO, 1999 ; Kana, 2012 ; Mbita Messi, 1999**), ensuite par l'étude chimique partielle de cette plante (**Achenbach et Renner, 1985 ; Ngangoue et al., 2020**) et enfin par son screening biologique.

L'hypothèse du travail repose sur le fait que la plante étudiée, a un recul d'utilisation en médecine traditionnelle pour la maladie ciblée, et par la suite dans le traitement, entre

autres, de la schistosomiase, de même que les tests préliminaires effectués sur les extraits des écorces du tronc et des racines d'*A. mannii* ont été intéressants.

L'objectif global était de rechercher à partir d'une séparation partiellement bioguidée de cette plante, des fractions et des molécules actives sur *Schistosoma mansoni* et sur une enzyme du parasite identifiée qui est la *Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup>catabolizing enzyme (*SmNACE*). Ces fractions et molécules pourront également servir de matières premières dans l'élaboration de nouveaux médicaments pour le traitement de la schistosomiase.

Les objectifs spécifiques étaient :

- D'identifier, de récolter et d'obtenir des extraits des parties de la plante qui seront évalués pour leurs activités antischistosomiale et/ou enzymatique
- Fractionner et purifier les métabolites secondaires des extraits actifs
- Caractériser les composés isolés
- Enfin évaluer les activités antischistosomiale et enzymatique des composés obtenus.

La présentation de notre travail s'articulera autour de trois chapitres :

Le premier chapitre, consacré à la revue de la littérature, présente un aperçu botanique sur la plante choisie et quelques travaux chimiques et pharmacologiques antérieurs s'y reportant. De même, les généralités sur la schistosomiase et les enzymes y sont évoquées.

Le deuxième chapitre présente les résultats obtenus et la discussion, suivis d'une conclusion générale et des perspectives.

Le troisième et dernier chapitre est réservé à la description du matériel et des méthodes qui ont conduit à l'obtention de nos résultats et nous terminerons le document par la présentation de la bibliographie consultée.

## CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## **I.1- LA FAMILLE DES ANNONACEAE**

La famille des Annonaceae est la plus représentative et la plus diversifiée parmi les Angiospermes primitives. Elle a été décrite en 1789 par Jussieu (**Jussieu et al., 1789**). Selon **Chatrou et al., 2012**, cette famille comprend plus de 135 genres et 2500 espèces. Elle est rencontrée de manière quasi-exclusive sous les tropiques et est particulièrement caractéristique des forêts de basse altitude. D'après les études phytogéographiques et morphologiques florales de Le Thomas, cette famille serait d'origine sud-américaine et africaine (**Le Thomas A., 1983**).

La famille des Annonaceae appartient à l'ordre des Magnoliales, à la sous-classe des Magnoliidae de la classe des Dicotylédones. Sur la base de la morphologie et de l'habitat, c'est une famille très homogène, présentant un grand nombre de caractéristiques primitives et archaïques et conduisent à considérer ce groupe comme des fossiles vivants au sens Darwinien (**Takhtajan, 1997**).

Les Annonaceae sont des plantes à fleurs composées d'arbres, d'arbustes ou rarement de lianes (**Le Thomas A., 1980**). Elles sont très abondantes dans les régions pluviales de l'Afrique de l'Ouest, mais plus rares dans les régions de savane adjacente plus élevées, sauf au bord des rivières. Certaines sont cultivées pour la valeur nutritive de leurs fruits et d'autres utilisées dans des pharmacopées traditionnelles.

Les plantes de la famille des Annonacées ont un feuillage sans stipules, avec des pétioles et dont les feuilles sont alternées, simples, pennées ou veinées, avec une inflorescence composée ou terminale pour la plupart. Les fleurs distillent un parfum entêtant. Elles sont bisexuelles ou unisexuelles généralement trimères, laissant la place à des fruits distincts sous forme de baies ou de syncarpe succulent. Ces fruits renferment des graines avec un à plusieurs pistils recouverts par une enveloppe de teinte vive (**Le Thomas A., 1980**).

Plusieurs genres de cette famille produisent des fruits comestibles notamment les genres *Rollinia*, *Asiminia*, *Annona* et *Anonidium*.

### **I.1.1- Le genre *Anonidium***

Natif d'Afrique tropicale, le genre *Anonidium* regroupe des arbres ou des arbustes. Sur ces arbres, les ramules sont couvertes de poils simples. Les feuilles sont alternes, simples et entières. Les fleurs sont grandes, les unes bisexuées (hermaphrodites), les autres, en plus grand nombre, unisexuées. Elles se composent de 3 sépales libres et valvaires, de 6 pétales valvaires, bisériées et imbriquées, de nombreuses étamines libres et d'un ovaire constitué de nombreux carpelles libres et uniovulés. Les fruits, ayant une forme cylindrico-ovoïde, sont réticulés et peuvent atteindre 40 cm. Chaque fruit contient de nombreuses graines un peu aplaties d'environ 5,5 x 2,5 x 1,5 cm.

Il existe environ 80 graines dans un fruit *d'Anonidium mannii* (Pellegrin, 1947).

Ce genre compte 5 espèces: *Anonidium floribundum*, *Anonidium friesianum*, *Anonidium letestui*, *Anonidium usambarense* et *Anonidium mannii*.

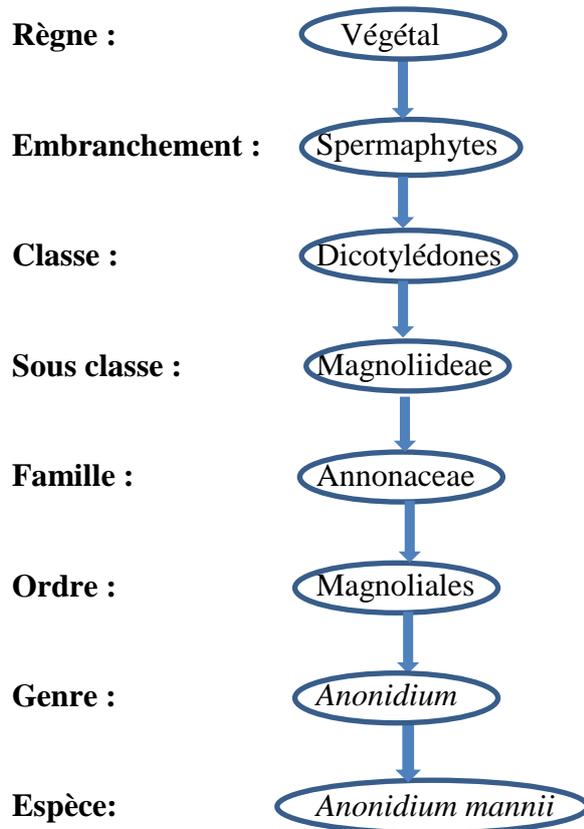
L'espèce *Anonidium mannii*, l'une des espèces retrouvées au Cameroun, fait l'objet de notre étude.

#### **I.1.1.1- L'espèce *Anonidium mannii* (Oliv) Engl. &Diels**

*Anonidium mannii* est une plante tropicale utilisée en médecine traditionnelle pour soulager plusieurs affections et symptômes telles que la dysenterie, la gastro-entérite, la bronchite, la syphilis, la diarrhée, le paludisme et la schistosomiase. Elle renferme plusieurs classes de métabolites secondaires et ayant montré des activités biologiques sélectives (**Projet de partenariat CE-FAO, 1999 ; Djeussi et al., 2013**).

#### **I.1.1.2- Position dans la systématique**

L'espèce *Anonidium mannii* occupe la position indiquée par la figure 1 dans la systématique des plantes supérieures :

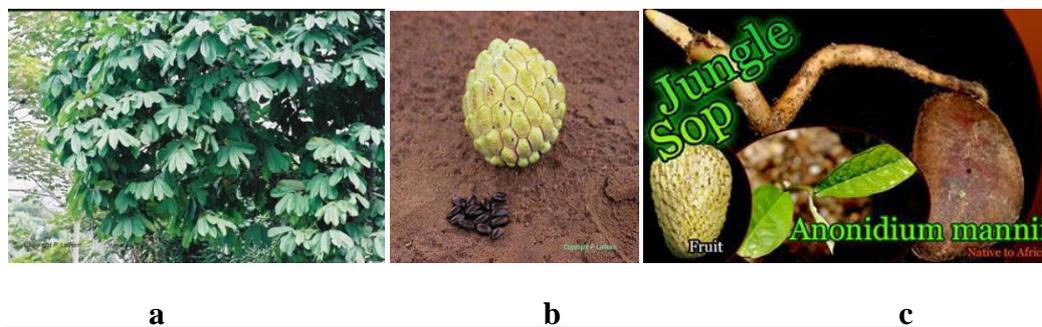


**Figure 1:** Position dans la systématique d'*Anonidium mannii*

### I.1.1.3- Description botanique

Communément appelée « Junglesop », l'espèce *Anonidium mannii* (Oliv). Engler & Diels est une plante tropicale à croissance rapide de taille moyenne qui pousse naturellement en Afrique Centrale. C'est un arbre de 8 à 30 m de hauteur et de 40 à 80 cm environ de diamètre. Ses feuilles sont persistantes, alternes et simples d'environ 45 cm de long et 18 cm de large. Ses fleurs sont de couleur vert-pale, portées sur des branches sans feuilles. Cet arbre produit des fruits après environ 10 ans. Le fruit qu'il produit, peut être aussi long que l'avant-bras d'un homme et aussi épais que les jambes d'un homme (jusqu'à 30 cm de long) (Hutchinson et Dalziel, 1954 ; Vivien et Faure, 1996 ; Lejoly et al., 2010). Il pèse entre 4 et 6 kilogrammes mais des masses allant jusqu'à 15 kilogrammes ont été rapportées. Ce fruit, à la chair jaune, est bien charnu et comestible avec un goût riche, doux et aromatique. Il est souvent vendu à des prix élevés en raison de la forte demande. Cette plante est localement

utilisée en médecine traditionnelle. La figure 2 donne un aperçu de quelques parties d'*Anonidium mannii*.



**Figure 2 :** Feuilles (a), Graines (b) et Fruits (c) d'*Anonidium mannii* (Sillans, 1953; Worldplantsmarket., n.d)

#### I.1.1.4- Synonymes et noms vernaculaires

##### ➤ Synonymes

Le nom d'*Anonidium mannii* (Oliv.) Engl. & Diels donné à l'espèce que nous étudions possède trois synonymes répertoriés :

- *Annona laurentii* Engl. & Diels
- *Uvaria crassipetala* Engl.
- *Annona mannii* Oliv.

##### ➤ Noms vernaculaires (Burkill, 1985)

Le nom vernaculaire est donné en fonction de la position géographique de l'espèce dans le monde. Ainsi, plusieurs noms vernaculaires couramment utilisés ont pu être répertoriés :

**Cameroun :** Ebome, Npole, Wapo'o (Pygmées Bakola), Ngbe (Baka), Ebom Afan (Ewondo et Bulu)

**RD Congo:** Mbombi, Bodzingo, Bob

**Gabon:** Ebom, Yinda

**Ghana:** Asumpa (Akan-Asante)

**Nigeria:** Ogedegbo, Imido (Igbo), Ewura-igbo (Yoruba)

#### **I.1.1.5- Répartition géographique d'*Anonidium mannii* en Afrique**

L'espèce *Anonidium mannii* est retrouvée au Cameroun, au Gabon, au Nigeria, au Ghana, en République Démocratique du Congo, en République Centrafricaine, en Angola (Burkill, 1985 ; Tsabang et al., 2012).

D'après les données recueillies à l'Herbier National du Cameroun, l'espèce *A. mannii* a été récoltée dans au moins deux régions (Tableau I).

**Tableau I:** Répartition géographique d'*Anonidium mannii* au Cameroun

<b>Lieux géographiques</b>	<b>Régions</b>
Mont Eloundem, Mont Kala, Nanga Eboko, Makak, Bankomo, Ndikinemeki, Makénééné	Centre
Bafoussam	Ouest
Kribi	Sud
Dans la subdivision de Bertoua près du village Letta	Est

#### **I.1.2- Les usages de l'espèce *Anonidium mannii***

Différentes parties de cette espèce sont utilisées tant en médecine naturelle que sur le plan culturel.

##### **I.1.2.1- En médecine naturelle**

- En République Démocratique du Congo :
  - L'infusion des écorces d'*Anonidium mannii* est utilisée pour traiter les dermatoses (Mbula et al., 2015).

- Les écorces d'*A. mannii* servent à soigner les affections gastro-intestinales, les diarrhées dysentériques et les troubles ovariens : le liquide obtenu par décoction aqueuse des écorces coupées en morceaux est donné aux malades par doses fractionnées durant la journée. Ce breuvage est parfois prescrit comme calmant de la toux.
- La poudre des écorces d'*A. mannii* ou sa décoction est appliquée par voie topique sur les plaies ouvertes ; la cendre de l'écorce est appliquée localement pour traiter les hémorroïdes. La décoction d'écorces des tiges se boit contre la diarrhée et les spasmes intestinaux (**Musuyu Muganza et al., 2012**).
- Au Congo-Brazzaville, lorsqu'on souffre de courbatures fébriles, d'œdèmes plus ou moins localisés, de rhumatisme, il faut racler les écorces, les passer au-dessus du feu, après les avoir enfermées dans une feuille de Marantacée, pour les ramollir, ajouter du « tukula » et s'en servir comme cataplasme ; on peut aussi les délayer dans de l'eau bouillante et, enveloppé d'une couverture, se soumettre à l'action bienfaisante de la vapeur (**Bouquet, 1969**).
- Au Nigéria, *A. mannii* est utilisé comme antidotes (piqûres venimeuses, morsures), dans le traitement des cas d'arthrite, de rhumatisme, diarrhée, dysenterie, en général cicatrisation, cycle menstruel, analgésique, paralysie, épilepsie, convulsions, spasmes, problèmes d'estomac (**Erhenhi et Obadoni, 2015**).
- Au Gabon, la décoction des écorces du tronc d'*A. mannii* et de *Carica papaya* est utilisée pour traiter la gonorrhée (**Betti et al., 2013**).
- Au Cameroun :
  - La décoction des écorces du tronc d'*A. mannii* est utilisée pour traiter l'infertilité masculine (oligospermie), les abcès, la schistosomiase. Elle est également administrée lors des complications de grossesse et de l'accouchement (**Noumi et Eloumou, 2011 ; Kana, 2012**).
  - Les décoctions de la tige, des écorces du tronc et des feuilles d'*A. mannii* sont utilisées traditionnellement pour traiter les symptômes tels que l'érythème fessier, la rougeole, la fièvre, la diarrhée. De même, l'extrait concentré obtenu par macération des écorces d'*A. mannii* (500 g dans trois litres d'eau) est administré au patient par voie orale. (**Tsabang et al., 2012**).

- Les feuilles d'*Anonidium mannii* sont utilisées pour le traitement du rhumatisme. Le traitement se fait par pulvérisation de la préparation sur la zone suivie d'un massage (**Etamé-Loe et al., 2018**). Elles sont également utilisées dans le traitement des morsures d'araignées et de serpents, la bronchite, la dysenterie, la gonorrhée, la diarrhée, le paludisme, l'inflammation cutanée, l'infertilité féminine et le cancer (**Thomas et al., 2003 ; Betti, 2004 ; Tsabang et al., 2012**).

#### **I.1.2.2- Sur le plan culturel**

- ✓ En République Démocratique du Congo, *Anonidium mannii* a la réputation d'éloigner les revenants et les mauvais esprits, d'empêcher les cauchemars. Pour protéger la maison et ses habitants, il suffit d'asperger la case avec le décocté des écorces, de mettre des feuilles sur le toit, ou d'enterrer un morceau du tronc sous le seuil.
- ✓ Comme protection individuelle, il faut se laver avec de l'eau dans laquelle on aura fait macérer des morceaux d'écorces, ou mettre des feuilles sous son matelas. C'est en raison de ce pouvoir magique que beaucoup de féticheurs, avant de récolter les feuilles ou écorces, font une offrande à l'arbre et lui adressent une courte prière. (**Bouquet, 1969**).

Compte tenu des multiples usages, notamment médicaux des plantes de la famille des Annonaceae en général et de ceux d'*Anonidium mannii* en particulier, quelques équipes de recherche se sont intéressées à leurs compositions chimiques et à leurs propriétés pharmacologiques.

## **I.2- ÉTUDES CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE ANTÉRIEURES**

Le genre *Anonidium* ayant fait l'objet de très peu d'étude chimique, quelques exemples de métabolites secondaires isolés de la famille des Annonaceae, notamment des acétogénines, flavonoïdes et stérols ont été reportés.

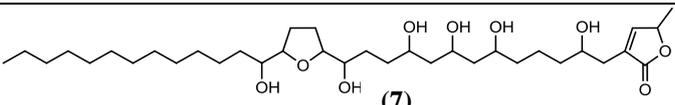
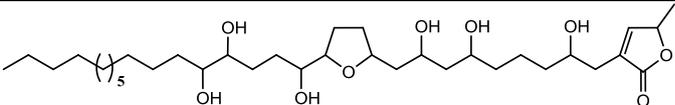
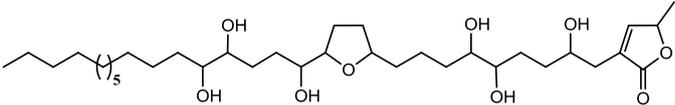
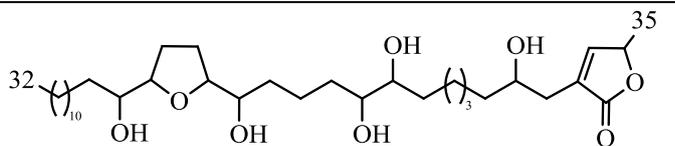
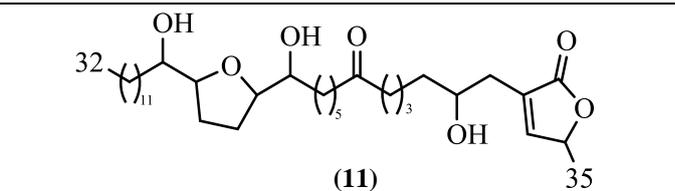
### **I.2.1- Quelques études chimiques antérieures sur la famille des Annonaceae**

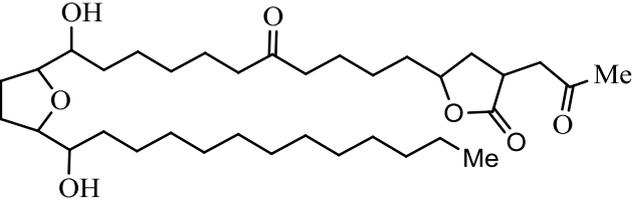
- **Les acétogénines**

Les acétogénines sont des polycétides dérivés d'acides gras trouvés dans les plantes de la famille des Annonaceae. Ce sont des composés ayant C35-C38 atomes de carbone, possédant un ou deux cycles tétrahydrofurane et une  $\gamma$ -lactone (saturée ou insaturée), impliquant généralement une chaîne à trois carbones attachée à une longue chaîne aliphatique, et ayant de longues régions aliphatiques non ramifiées qui sont diversement hydroxylées, acétoxyloées ou cétonisées (**Kent et al., 1990**).

Le tableau II regroupe les structures de quelques acétogénines isolés de quelques espèces de la famille des Annonaceae.

**Tableau II : Quelques acétogénines isolés de la famille des Annonaceae.**

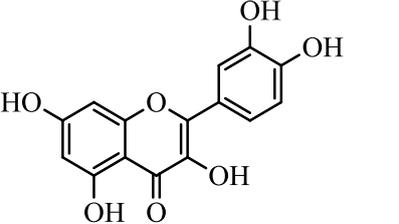
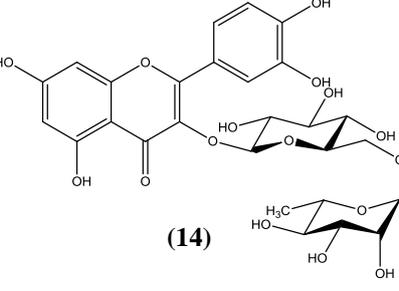
Structure	Nom	Source	Référence
 (7)	Annohexocine	Feuilles d' <i>Annona muricata</i>	(Zeng et al., 1995)
 (8)	Muricoreacine		(Kim et al., 1998)
 (9)	Murihexocine C		
 (10)	Annomuricine E		(Ragasa et al., 2012)
 (11)	Annoreticuin- 9-one		

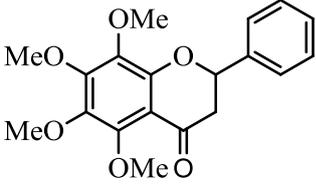
 <p style="text-align: center;">(12)</p>	Squamone	Écorces d' <i>Annona squamosa</i>	(Moeschler et al., 1987)
---	----------	--------------------------------------	-----------------------------

### - Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une très large classe de produits naturels dérivés des plantes et présentant une exceptionnelle diversité. Ces métabolites secondaires, molécules aromatiques polysubstituées de la famille des polyphénols, possèdent un squelette à 15 atomes de carbone de type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Le tableau III présente quelques flavonoïdes isolés des espèces de la famille Annonaceae.

**Tableau III :** Quelques flavonoïdes isolés de la famille des Annonaceae.

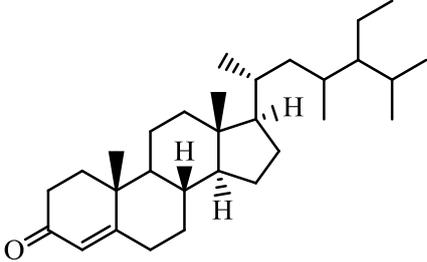
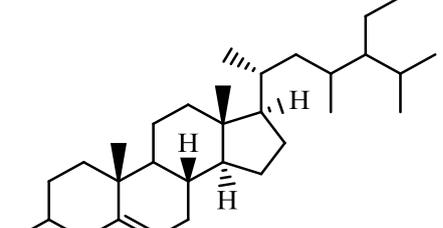
Structure	Nom	Source	Référence
 <p style="text-align: center;">(13)</p>	Quercétine	Feuilles d' <i>Annona glabra</i>	(Hegnauer, 1964)
 <p style="text-align: center;">(14)</p>	Rutine (Quercétine-3- rhamnoglucoside)	Feuilles d' <i>Annona senegalensis</i>	(MacKie et Ghatge, 1958)

 <p>(15)</p>	<p>Kanakugine (5,6,7,8-tétraméthoxy- flavanone)</p>	<p>Fruits de <i>Monanthataxis cauliflora</i></p>	<p>(Waterman et Pootakahn, 1979)</p>
---	---	--	--

- **Les stéroïdes**

Les stéroïdes sont des alcools secondaires d'origine animale et végétale, dont le squelette de base varie de C<sub>27</sub> à C<sub>29</sub>. Le tableau IV présente quelques stéroïdes isolés des espèces de la famille des Annonaceae.

**Tableau IV : Quelques stéroïdes isolés de la famille des Annonaceae.**

Structure	Nom	Source	Référence
 <p>(16)</p>	<p><math>\beta</math>-sitostérone</p>	<p>Fruits d' <i>Annona muricata</i></p>	<p>(Ragasa et <i>al.</i>, 2012)</p>
 <p>(17) R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COO (18) R = OH</p>	<p>Ester d'acide gras de <math>\beta</math>- sitostérol</p> <p><math>\beta</math>-sitostérol</p>		

**I.2.2- Études chimiques antérieures sur *Anonidium mannii***

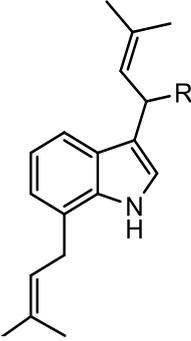
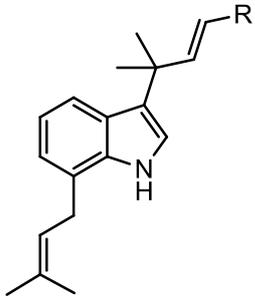
Malgré la grande utilisation d'*A. mannii* dans la pharmacopée traditionnelle, très peu d'étude à notre connaissance a été menée sur cette espèce dans le but d'isoler et de caractériser ses constituants biologiquement actifs. En 1985, **Achenbach et Renner** ont

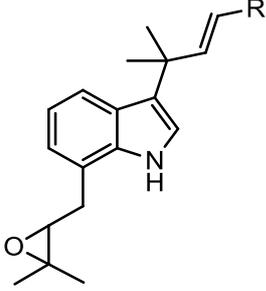
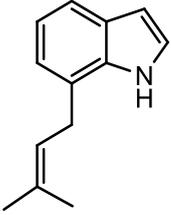
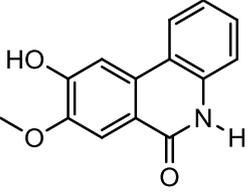
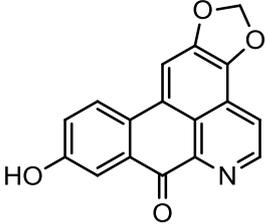
entrepris l'étude des écorces du tronc d'*A. mannii* provenant du Ghana. Cette étude a conduit à l'isolement de sept composés appartenant à 2 classes de métabolites secondaires ; il s'agit des alcaloïdes (alcaloïdes indoliques) et des triterpènes. Une récente étude menée sur les racines d'*A. mannii* par **Ngangoue et al., (2020)**, a conduit à l'isolement de huit composés appartenant aux classes des alcaloïdes, triterpènes, acide phénolique et stéroïdes. De plus, **Djeussi et al. (2013)** ont effectué un screening phytochimique de l'extrait méthanoïque des feuilles d'*A. mannii* qui a révélé la présence des alcaloïdes, des phénols, des polyphénols, des saponines, des triterpènes, des stérols et des tanins.

- **Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes constituent la principale classe de métabolites secondaires isolés d'*A. mannii*. Le tableau V regroupe les structures de quelques alcaloïdes isolées de l'espèce *Anonidium mannii*.

**Tableau V : Quelques alcaloïdes isolés de l'espèce *Anonidium mannii*.**

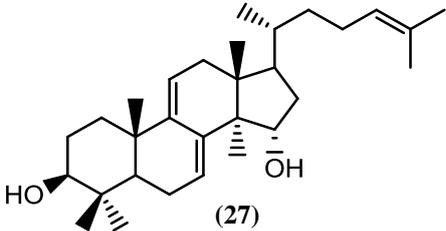
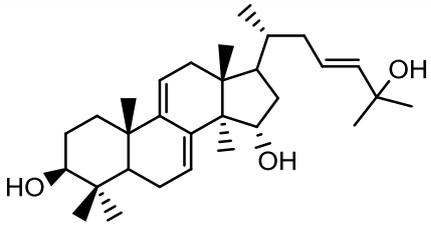
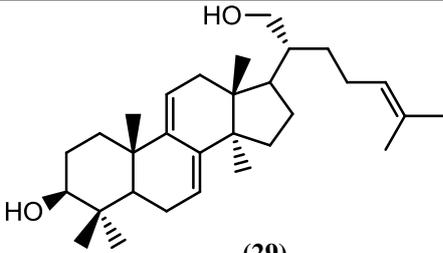
Structure	Nom	Source	Référence
 <p>(19) R = 7-indolyl (20) R = 3-indolyl</p>	3-[1-(7-Indolyl)-3-méthyl-2-butényl]-7-(3-méthyl-2-butényl)-indole  (Annonidine A)	Écorces du tronc <i>d'Anonidium mannii</i>	<b>(Achenbach et Renner, 1985)</b>
	3-[1-(3-Indolyl)-3-méthyl-2-butényl]-7-(3-méthyl-2-butényl)-indole  (Annonidine B)		
 <p>(21) R = 7-indolyl (22) R = 6-indolyl</p>	(E)-3-[3-(7-Indolyl)-1,1-diméthyl-2-propényl]-7-(3-méthyl-2-butényl)-indole  (Annonidine C)		
	(E)-3-[3-(6-Indolyl)-1,1-diméthyl-2-propényl]-7-(3-méthyl-2-butényl)-indole  (Annonidine D)		

 <p>(23) R = 7-indolyl</p>	<p>(E)-3-[3-(7-Indolyl)-1,1-diméthyl-2-propényl]-7-(3-éthyl-2,3-époxybutyl)-indole (Annonidine E)</p>		<p>(Achenbach et Renner, 1985)</p>
 <p>(24)</p>	<p>7-(3-méthyl-2-butényl)-indole</p>	<p>Écorces du tronc</p>	
 <p>(25)</p>	<p>9-hydroxy-8-méthoxyphénanthridin-6(5H)-one</p>		<p>(Ngangoue et al., 2020)</p>
 <p>(26)</p>	<p>Oxoanolobine</p>	<p>Racines d'<i>Anonidium manni</i></p>	

- Les triterpènes

Les triterpènes sont des composés naturels en C<sub>30</sub> issus de la cyclisation du squalène (**Bruneton, 1999**). Trois triterpènes ont été rapportés de l'espèce *Anonidium mannii* (Tableau VI).

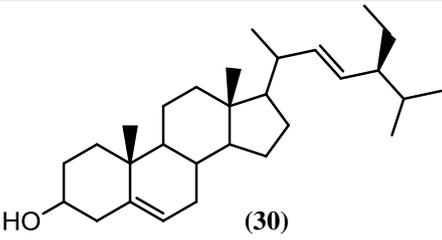
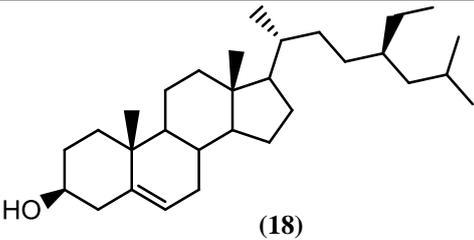
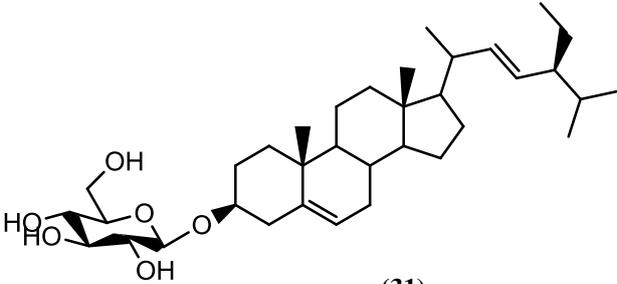
**Tableau VI :** Quelques triterpènes isolés de l'espèce *Anonidium mannii*.

Structure	Nom	Source	Référence
 <p>(27)</p>	Polycarpol	Écorces du tronc	(Achenbach et Renner, 1985)
 <p>(28)</p>	Lanosta-7,9(11),23-triène-3β,15α-diol	Racines d' <i>Anonidium mannii</i>	(Ngangoue et al., 2020)
 <p>(29)</p>	Lanosta-7,9(11),24-triène-3β,21-diol		

- **Les stéroïdes**

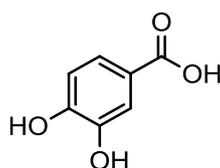
Les stéroïdes sont des alcools secondaires d'origine animale et végétale, dont le squelette de base varie de C<sub>27</sub> à C<sub>29</sub>. Trois stérols ont été rapportés de l'espèce *Anonidium manni* (Tableau VII).

**Tableau VII :** Quelques stérols isolés de l'espèce *Anonidium manni*.

Structure	Nom	Source	Référence
 <p>(30)</p>	Stigmastérol	Racines d' <i>Anonidium manni</i>	(Ngangoue et al., 2020)
 <p>(18)</p>	$\beta$ -sitostérol		
 <p>(31)</p>	3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -stigmastérol		

### - Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Un acide phénolique a été rapporté des racines d'*Anonidium mannii* par **Ngangoue et al., 2020**. Il s'agit de l'acide 3, 4-dihydroxybenzoïque (32).



(32)

Le dérivé nouveau isolé dans le cadre des travaux présentés dans ce document appartient à la famille des alcaloïdes indoliques, d'où la nécessité de présenter brièvement ses généralités.

#### I.2.3- Quelques généralités sur les alcaloïdes et alcaloïdes indoliques

Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées basiques d'origine végétale (rarement animale) de faibles poids moléculaires et douées de propriétés physiologiques remarquables (toxiques ou thérapeutiques) (**Bruneton, 1999**). Ils se retrouvent dans environ 20% de toutes les espèces de plantes (**Zhang et Björn, 2009**). Ils sont utilisés comme antalgiques majeurs (morphine), antipaludéen (quinine), pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine), comme substance paralysante (curare), comme antimicrobien (imidazole, chloroquine), comme poisons (strychnine, nicotine), comme stupéfiants (cocaïne), comme cholinergique (pilocarpine) ou comme anticancéreux (vinblastine, vincristine). Ils sont des précurseurs de nombreux médicaments. On les divise en sous-groupes structuraux que sont les tropanes, les pyrrolizidines, les pyridines, les tropolones, les isoquinoléines, les indoles, les purines, les imidazoles et les alcalamines. (**Bruneton, 2009**).

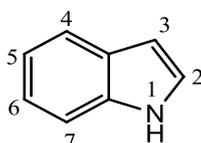
Parmi les alcaloïdes, nous nous intéresserons à la classe des indoles.

### I.2.3.1- Définition

Le nom indole noté [*1H*-indole] provient de la combinaison des mots indigo (colorant) et oléum (acide sulfurique fumant). C'est à partir de ces deux composés que Baeyer a élucidé sa structure en 1869 (**Baeyer et Emmerling, 1869**).

L'indole, aussi appelé benzopyrrole, est un hétérocycle bicyclique composé d'un cycle benzénique à six chaînons fusionné à un cycle pyrrole contenant de l'azote à cinq chaînons.

Les indoles sont une classe omniprésente de composés trouvés en abondance dans des composés pharmaceutiques, des produits agrochimiques et des alcaloïdes.



#### Squelette de base des indoles

Les indoles sont une classe importante d'hétérocycles non seulement parce qu'ils sont parmi les composés les plus omniprésents dans la nature, mais aussi parce qu'ils ont un large éventail d'activités biologiques. Les dérivés de l'indole constituent une classe importante des agents thérapeutiques en chimie médicinale, notamment antihypertenseurs, antiprolifératifs, antiviraux, antitumoraux, analgésiques, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antifongiques, (**Kaushik et al., 2013**).

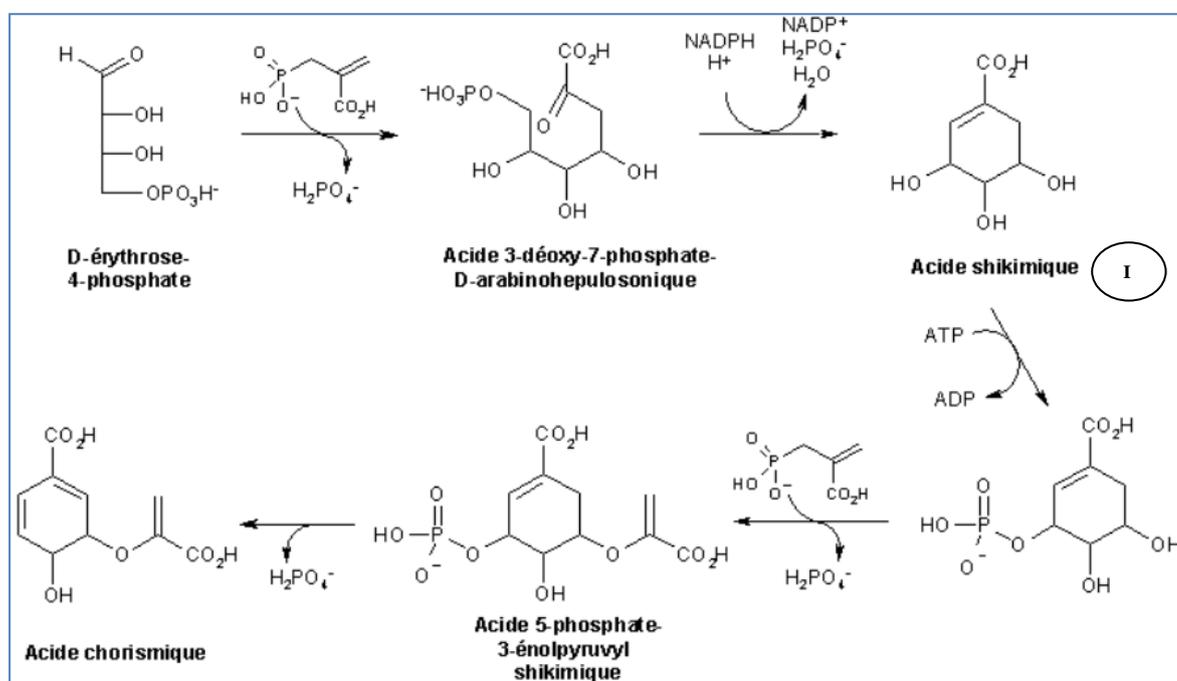
### I.2.3.2- Biosynthèse des indoles

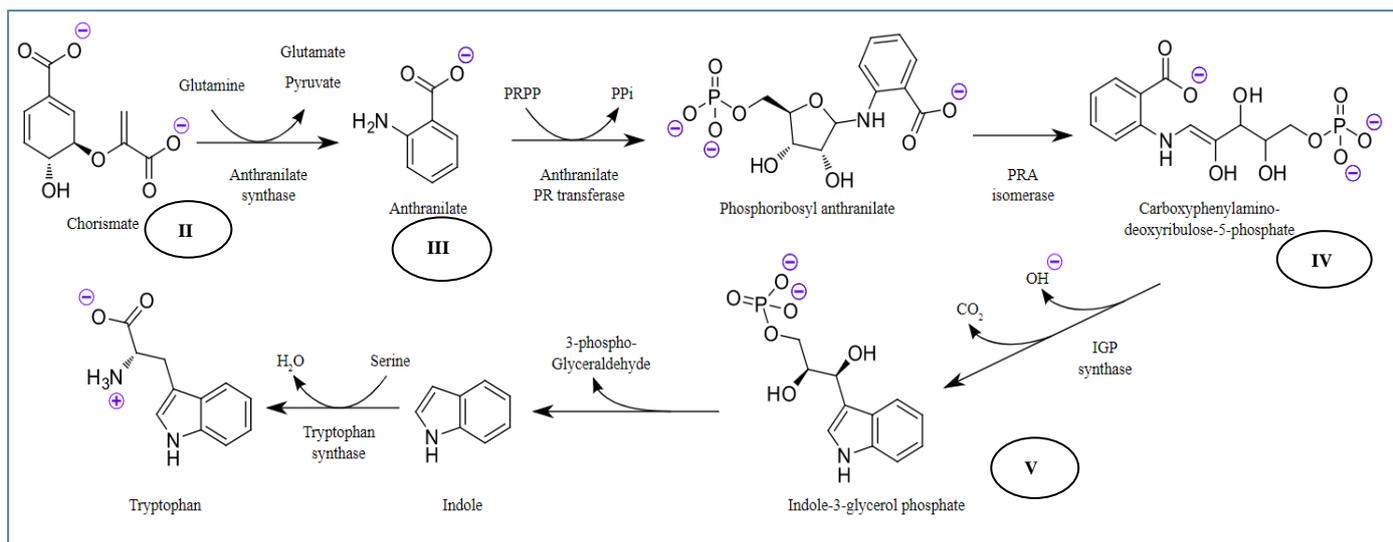
La plupart des précurseurs de l'indole sont apparentés au L-tryptophane, espèce contenant l'indole la plus abondante dans la cellule.

Ainsi par biosynthèse, le squelette indolyle retrouvé dans les alcaloïdes indoliques serait métabolisé par la voie de l'acide schikimique (**I**). Dans ce processus, l'acide shikimique serait initialement formé à partir d'une réaction de condensation impliquant le D-érythrose-4-phosphate et l'acide phosphoénol pyruvique (PEP). Ceci va être suivi par la formation de l'acide chorismique (**II**) à partir de l'acide shikimique dont l'amination donnerait l'acide anthranilique (**III**). Ce dernier, lors du couplage à médiation enzymatique avec le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate formerait un nucléotide, qui serait alors converti en indole-

3-glycérylphosphate (V) via la base de Schiff (IV). L'expulsion du glycéraldehyde-3-phosphate de V donnerait le squelette indole (Schéma 1).

L'indole est biosynthétisé par la voie schikimate via l'antranilate (Nelson et Cox, 2005) : C'est un intermédiaire dans la biosynthèse du tryptophane, où il reste à l'intérieur de la molécule de tryptophane synthase entre l'élimination du 3-phosphoglycéraldéhyde et la condensation avec la sérine. Lorsque l'indole est nécessaire dans la cellule, il est généralement produit à partir du tryptophane par la tryptophanase (Stephanopoulos et al., 1998).





**Schéma 1: Voie de biosynthèse des indoles**

### I.2.3.3- Propriétés chimiques des indoles

Contrairement aux amines classiques, l'indole est une base faible. Il peut facilement subir une substitution électrophile. Du fait de son aromaticité, l'indole a un caractère nucléophile marqué. Ainsi, l'atome de carbone en position 3 (C-3) est la plus nucléophile, suivie des positions N et C-2 (**Saracoglu, 2007**).

### I.2.3.4- Méthodes spectroscopiques de détermination structurale des indoles

La détermination des structures des indoles se fait, comme pour les autres classes de composés, à l'aide des techniques spectroscopiques usuelles à savoir l'IR, l'UV, les RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , la RMN à deux dimensions (COSY, TOCSY, NOESY, HMBC, HMQC) et la spectrométrie de masse.

#### ➤ Spectres UV et IR

Le spectre UV des indoles présente des bandes d'absorptions à 217 et 287 nm. Le spectre IR, quant à lui, montre des bandes d'absorption à  $3406\text{ cm}^{-1}$  attribuables au pic N-H ; entre  $3022\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la liaison C-H, entre  $1508\text{-}1577\text{ cm}^{-1}$  attribuables aux liaisons C=C du noyau aromatique et  $1456\text{-}1616\text{ cm}^{-1}$  attribuables aux liaisons C-C (cycle) (**Kumar et al., 2015**).

➤ **Résonance magnétique nucléaire du proton**

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  des alcaloïdes indoliques fait ressortir lorsqu'il n'y a pas de substitution sept familles de protons dont six doublets de protons aromatiques entre 6,50 et 7,65 ppm avec des constantes de couplage variant entre  $J = 7-8$  Hz généralement et un proton N-H du squelette de l'indole à 7,81 ppm. Les groupements méthyles, s'ils sont présents, apparaissent entre 2,00 et 3,00 ppm sous forme de singulet ou de doublet de trois protons (Chen *et al.*, 2015).

➤ **Résonance magnétique nucléaire du carbone 13**

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  présentent généralement pour leur squelette de base, 08 signaux dont les déplacements chimiques compris entre 100 et 140 ppm sont repartis en deux signaux de carbones quaternaires et six signaux de carbones tertiaires. (Morales-Rio *et al.*, 1987).

### **I.2.3.5- Quelques propriétés biologiques des indoles**

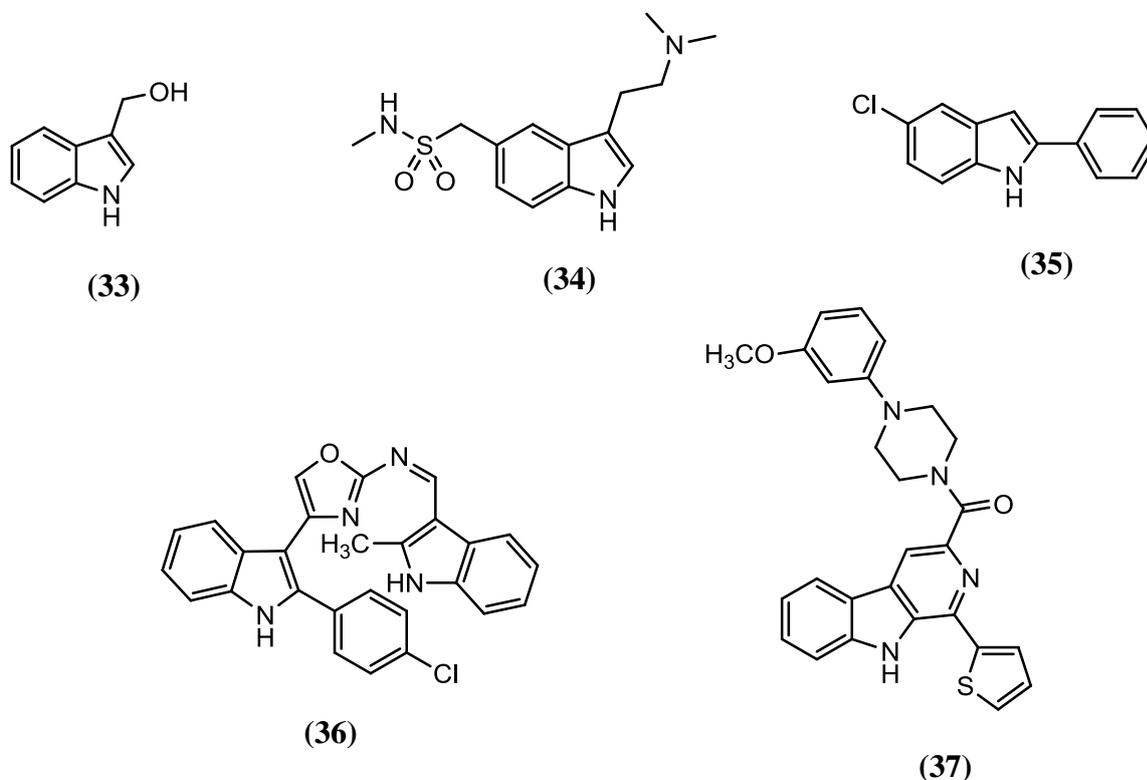
Les tests d'activités biologiques effectués sur les indoles ont montré que ces métabolites secondaires sont doués de nombreuses propriétés : anti-inflammatoires, analgésiques, antimicrobiennes, antihypertensives, antivirales, antifongiques et antitumorales (Kumar *et al.*, 2012).

C'est ainsi que les travaux de Tsai *et al.* (2010) ont démontré que l'Indole-3-carbinol (33) a des effets anti inflammatoires en inhibant la production de monoxyde d'azote (NO), de Facteur de nécrose tumoral (TNF) et d'Interleukine (IL-10) dans les macrophages RAW 264,7 stimulés par des lipopolysaccharides (LPS). Le Sumatriptan (34) a été reporté pour le traitement de la migraine (Connor *et al.*, 1992).

Pour sa part, le 5-chloro-2-phénylindole (35) a montré une activité significative contre les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptomyces thermotrophicans* (Mehta *et al.*, 2005).

Le dérivé 3-(20- indolidène amino oxazole-40 -yl)-2-(4-chlorophényl) indole (36) a montré une forte activité antiinflammatoire de 53.3% et analgésique de 51.4% sur les rats à une dose administrée par voie orale de 50 mg/kg (Singh *et al.*, 2008).

Le dérivé (4-(3-méthoxyphényl) pipérazin-1-yl) (1-(thiophén-2-yl)- 9H-pyrido[3,4-b]indol-3-yl)méthanone (**37**) a montré une activité anti-VIH sur la souche HIV-1IIIIB (lignée cellulaire C8166) avec une concentration  $CE_{50}$  de 1.1  $\mu$ M (Ashok et al., 2014).



Certains composés isolés de l'espèce *Anonidium mannii* ainsi que les extraits dont ils proviennent, ont présenté des propriétés biologiques justifiant de leurs usages dans la médecine traditionnelle (Ngangoue et al., 2020).

#### I.2.4- Études pharmacologiques antérieures sur *Anonidium mannii*

Les espèces du genre *Anonidium*, plus précisément l'espèce *Anonidium mannii* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour les multiples propriétés biologiques qu'elles possèdent. Les études effectuées sur ces plantes ont montré diverses activités pharmacologiques.

- L'extrait de méthanol de feuilles d'*Anonidium mannii* a montré une activité antibactérienne sélective contre diverses souches de bactéries à Gram négatif parmi lesquelles *E. Coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae* et *P. aeruginosa* avec des valeurs de CMI variant de 512 à 1024  $\mu$ g/mL (Djeussi et al., 2013).

- Les indoles prenylés et les alcaloïdes bisindole isolés des écorces de *A. mannii* ont montré des activités biologiques suivantes : antibactérien, immunosuppresseur et piégeage radicalaire (**Southon et al., 1989**).
- Les résultats précédents des tests antibactériens effectués sur les extraits méthanoliques d'*A. mannii* par **Djeussi et al.** en 2013 n'ont montré aucune activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* et *Pseudomonas aeruginosa*.
- Les résultats des tests anticancéreux effectués sur l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. mannii* ont montré une activité avec une valeur de CMI de 9,14 µg/mL contre les cellules U87MG.ΔEGFR. A 40 g/mL, l'extrait *A. mannii*, lorsqu'il est utilisé pour dépister la leucémie, entraîne une diminution de la croissance des cellules CCRF-CEM d'environ 31% (**Kuete et al., 2013**).
- L'espèce *A. mannii* a également montré des activités antipaludique et antifongique (**Djeussi et al., 2013**).
- Les racines d'*A. mannii* ont montré, quant à elles, une bonne activité contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC11296 avec une valeur de CMI de 64 µg/mL (**Ngangoue et al., 2020**).

Les études pharmacologiques antérieures sur la famille Annonaceae, de même que sur les espèces du genre *Anonidium* ont montré un large spectre d'activités biologiques des extraits et des molécules isolées de ces plantes. Cependant, certaines activités antiparasitaires n'ont pas encore été évaluées. La schistosomiase étant la maladie cible de ce travail, il nous semble opportun de faire une brève revue de la littérature sur cette maladie et sur les enzymes dans les lignes qui suivent.

### **I.3- GÉNÉRALITÉS SUR LA SCHISTOSOMIASE ET SUR LES ENZYMES**

#### **I.3.1- La schistosomiase**

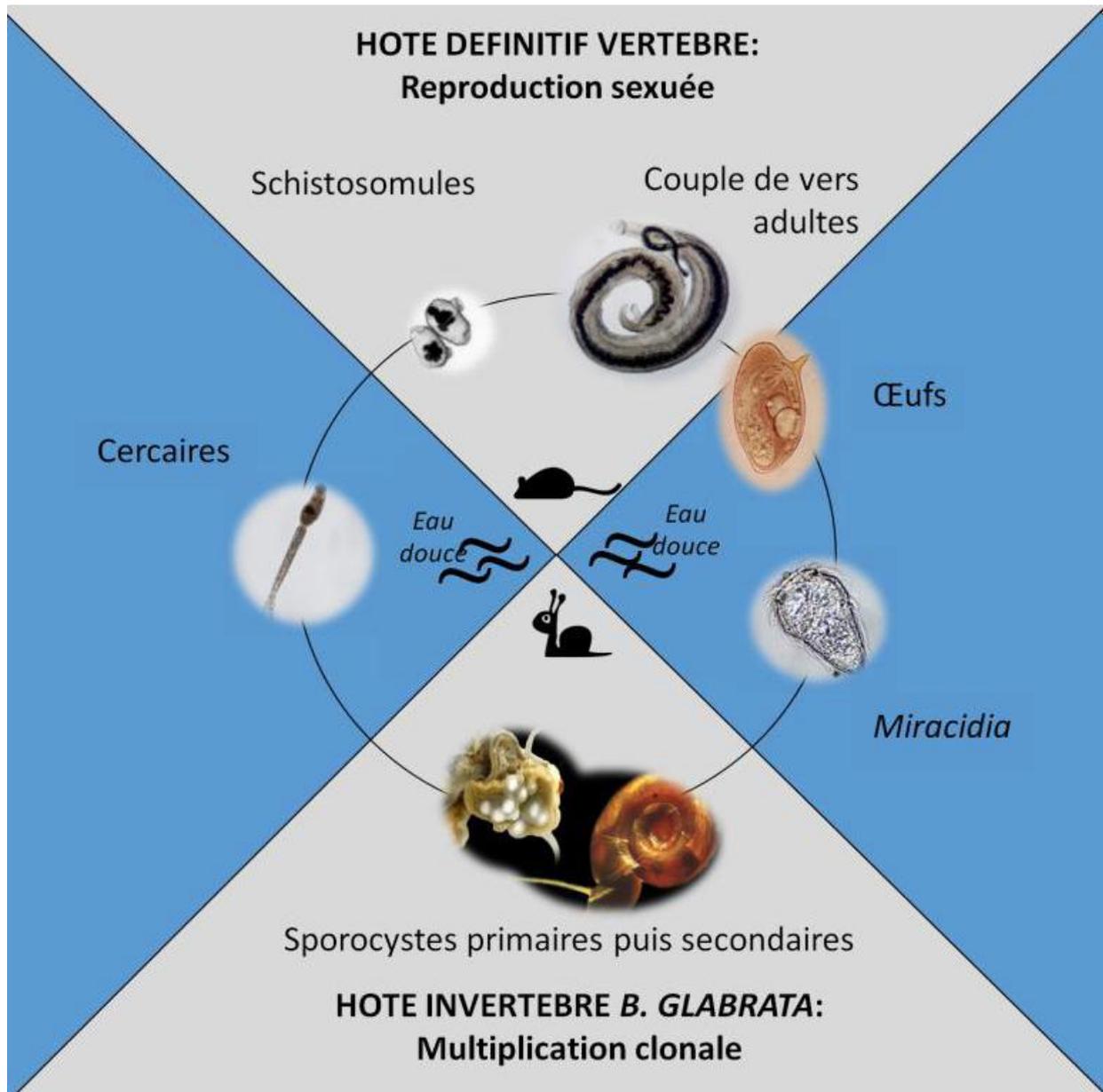
##### **I.3.1.1- Historique et Définition**

C'est en 1852 que Theodor Bilharz décrit pour la première fois la bilharziose, appelée plus tard la schistosomiase (**Tan et Ahana, 2007**). Cette maladie, causée par des vers plats parasites du genre *Schistosoma*, est aujourd'hui la deuxième endémie parasitaire mondiale après le paludisme en termes de mortalité, morbidité, aussi de nombre de personnes infectées et de celles exposées au risque de contracter cette maladie (**Aubry et Gauzere, 2019**).

Il existe six espèces de schistosomes pathogènes pour l'homme qui, selon la nature des organes touchés, peuvent être responsables de trois types de bilharziose : *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* et *S. mekongi* sont responsables de la bilharziose intestinale, *S. haematobium* de la forme urogénitale de la maladie, *S. intercalatum* et *S. guineensis* de la schistosomiase rectale et génitale (OMS, 2020).

### **I.3.1.2- Cycle évolutif de *Schistosoma***

Les schistosomes possèdent un cycle de vie complexe, ou hétéroxène [c'est à dire que le parasite alterne les phases de reproduction sexuée (dans l'hôte définitif) et de multiplication asexuée (dans l'hôte intermédiaire)], caractérisé par l'alternance de quatre stades : deux phases larvaires libres en eau douce et deux stades parasitaires : dans l'hôte intermédiaire mollusque et dans l'hôte définitif vertébré (figure 3).

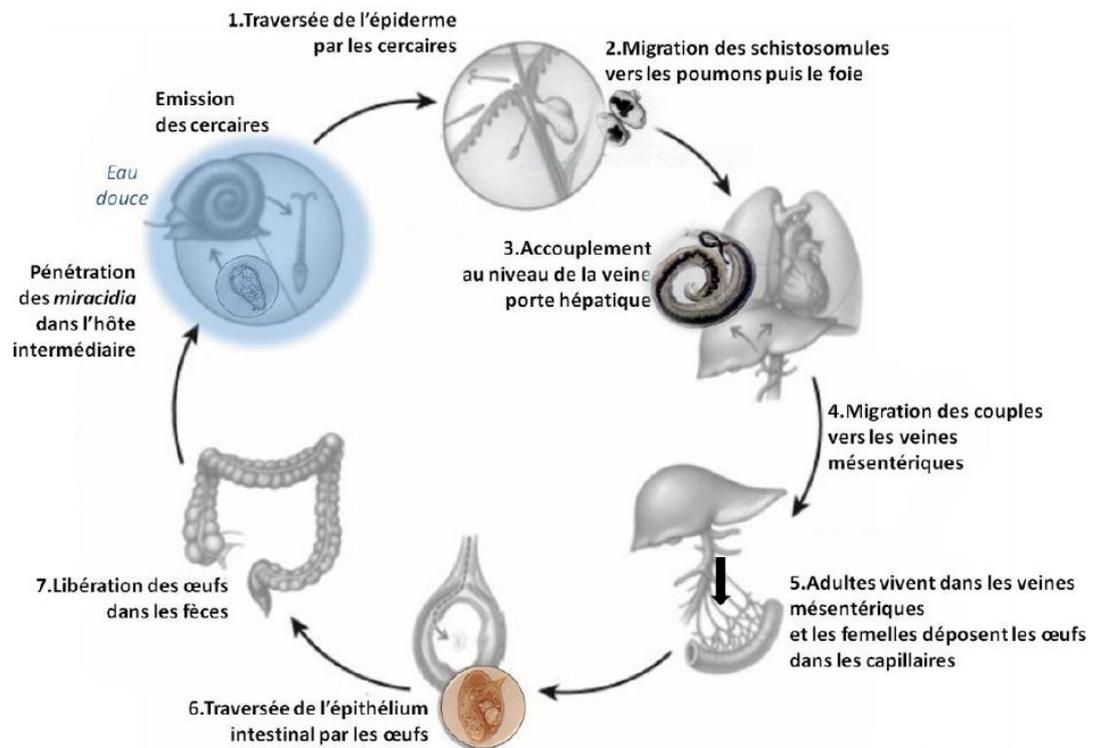


**Figure 3 :** Cycle de vie hétéroxène de *Schistosoma mansoni* (Combes et al., 1991)

Chez *Schistosoma mansoni*, comme chez les autres schistosomes, la reproduction sexuée générant les œufs a lieu dans l'hôte définitif vertébré. Ces œufs sont libérés hors de l'hôte *via* les fèces. En eau douce, la diminution de température et la luminosité entraînent l'éclosion de ces œufs d'où émerge la forme larvaire ciliée appelée miracidium (de 150 à 200  $\mu\text{m}$ ). Les miracidia pénètrent l'hôte intermédiaire qui est une planorbe du genre *Biomphalaria* (Leiper et Atkinson, 1915). Ils se transforment en sporocystes, subissant deux vagues de multiplication asexuée (succession de mitoses) sous forme de sporocystes primaires puis secondaires (Pan, 1965). Dans les sporocystes secondaires, les nouvelles larves se différencieront en cercaires (de 400 à 600  $\mu\text{m}$ ) qui seront à nouveau émises en eau douce. Un

miracidium peut ainsi générer des milliers de cercaires clonales (Figure 3). Ces cercaires munies d'une queue fourchue (*i.e.* furcocercaires), cherchent et pénètrent activement l'hôte vertébré au niveau de la peau. La traversée de l'épiderme est facilitée par le relargage du contenu enzymatique des glandes de pénétration, et sera marquée par le détachement de la queue (Figure 4, étape 1). Le nouvel individu ainsi transformé se nomme schistosomule. Il lui faut en moyenne trois jours pour rejoindre un vaisseau, veineux ou lymphatique, et y pénétrer afin de migrer jusqu'au cœur droit. Il atteint ensuite les poumons entre le cinquième et le huitième jour (**Wilson et Coulson, 1986**) où il se développe (**Faust et Hoffman, 1934**). Deux semaines après l'infestation et un nouveau passage dans le cœur gauche cette fois, il continue sa migration vers la veine porte-hépatique (Figure 4, étape 2). C'est là que mâles et femelles (mesurant environ 8 et 25 mm respectivement) vont s'accoupler : le mâle possède une structure spécifique appelée canal gynécophore, destinée à recueillir la femelle (Figure 4, étape 3).

Dans le cas des bilharzioses intestinales, le couple va migrer à contre sens du flux sanguin vers les veines mésentériques aux alentours de la 5<sup>ème</sup> semaine (Figure 4, étape 4). La femelle quittera alors régulièrement le canal gynécophore du mâle afin d'aller libérer un oeuf unique à l'extrémité des veinules, au plus près de l'épithélium mésentérique : 200 à 300 fois par jour (Figure 4, étape 5). Les œufs sont ovales et munis d'un éperon latéral qui leur permet de traverser la barrière intestinale et d'atteindre la lumière du tube digestif afin d'être libérés dans les fèces (Figure 4, étape 6 et 7). L'œuf de *S. mansoni* mesure entre 130 et 160 µm de long, et 40 à 60 µm de large. Il possède une coque transparente et un éperon latéral. Malgré cette structure spécialisée, il arrive que les œufs ne parviennent pas à traverser l'épithélium intestinal et soient alors emportés par le flux sanguin vers le foie. Ils s'enkysteront alors dans le tissu hépatique générant une inflammation.



**Figure 4 : Migration du parasite *Schistosoma mansoni* dans son hôte vertébré (étapes 1 à 7). (Hagen et al., 2014)**

### I.3.1.3- Manifestations, épidémiologie

#### -Manifestations

Les manifestations cliniques de la schistosomiase sont diverses et dépendent de l'espèce impliquée, de la densité parasitaire dans le sang et de la localisation des pontes de femelles.

La **bilharziose urogénitale à *Schistosoma haematobium*** se manifeste par une hématurie, une atteinte vésicale. Elle s'accompagne de signes d'irritation vésicale : douleurs mictionnelles, irradiant vers les bourses et le périnée, pollakiurie (envie fréquente d'uriner). Parfois ce sont des crises de coliques néphrétiques qui attirent l'attention (ANOFEL, 2014).

La **bilharziose intestinale à *Schistosoma mansoni*** est une maladie chronique qui caractérisée par un tableau clinique relativement aspécifique : douleurs abdominales, diarrhées et sang dans les selles. A un stade avancé, il est fréquent d'observer au niveau systémique une anémie, et au niveau organique une hépto-splénomégalie (augmentation anormale du volume du foie et de la rate), de l'ascite (épanchement de liquide dans

l'abdomen) et une hypertension portale (pression anormalement élevée de la veine porte en amont du foie). Dans les cas les plus

sévères, cette maladie parasitaire peut même entraîner des dysfonctions cognitives et un retard de croissance. [Description basée sur un travail du *Scientific Working Group (SWG) on Schistosomiasis*, (Coon, 2005)]. Si l'anémie peut être expliquée par le mode de nutrition hématophage des schistosomes, les autres symptômes sont dûs au passage de certains œufs à travers l'épithélium intestinal ou à leur accumulation dans les tissus, ainsi qu'à la pathogénicité des vers adultes. Si l'individu est porteur d'un seul couple de parasites, la maladie peut éternellement rester silencieuse ; alors que dans les cas de charge infectieuse importante, les symptômes lourds peuvent rapidement apparaître. En effet, ce sont essentiellement les œufs des parasites, extrêmement nombreux (300/jour), qui sont à l'origine des lésions anatomiques et par conséquent des troubles cliniques graves observés chez l'homme.

### **-Epidémiologie**

En 2009 un rapport de l'OMS estimait que, deux ans auparavant, 235 millions de personnes étaient atteintes par cette maladie parasitaire (*S. mansoni* et *S. haematobium* étant les espèces les plus répandues) et que 732 millions de personnes y étaient exposées dans 78 pays à travers le monde (Tableau VIII et Figure 5). En 2012, 52 de ces pays présentaient un risque de transmission modéré à élevé, qui aurait justifié le traitement préventif de 249 millions de personnes. Seuls 42,1 millions en ont réellement bénéficié (OMS, 2014). De plus, de part son mode de transmission par l'eau, cette maladie est en relation directe avec les conditions de pauvreté des pays tropicaux et subtropicaux : l'absence d'eau potable, de sanitaires, la chaleur expose inévitablement les populations à l'eau contaminée des rivières et des lacs.

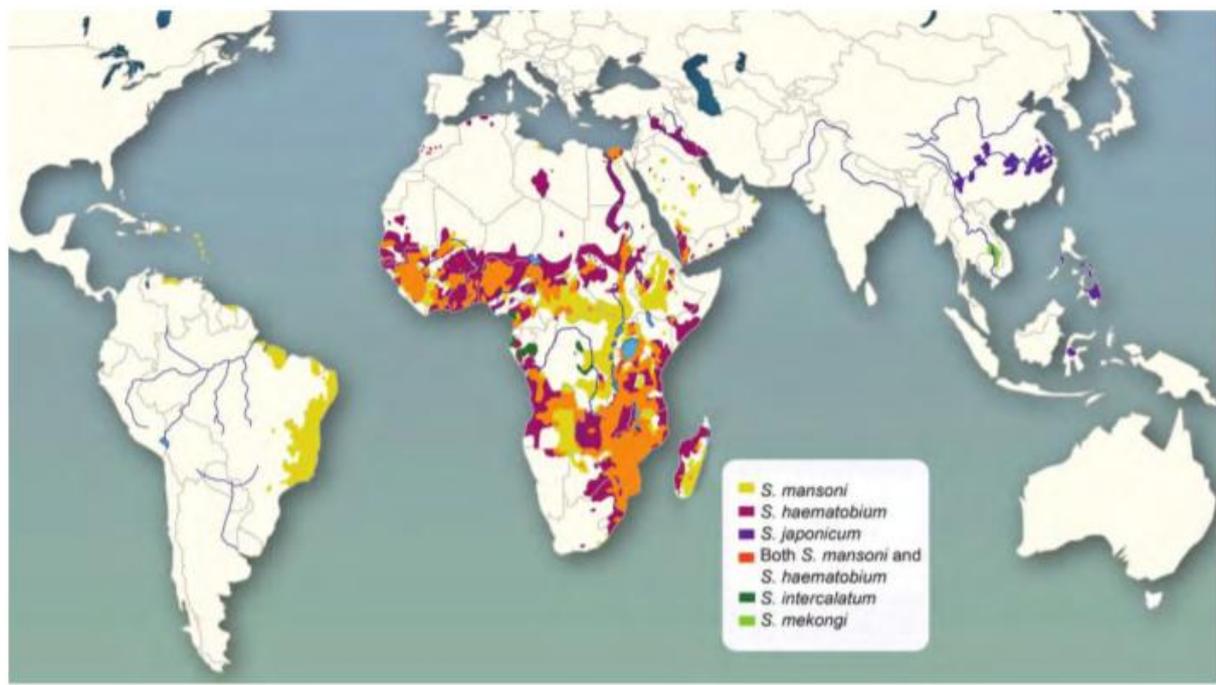
La figure 5 présente la répartition des cas de schistosomiase dans le monde.

**Tableau VIII: Répartition géographique des schistosomiasis humaines en fonction des organes atteints et de l'espèce du parasite (OMS, 2020).**

Type de schistosomiase (en fonction du principal organe atteint)	Espèce de schistosomes	Répartition géographique
	<i>Schistosoma mansoni</i>	Afrique, Péninsule Arabique, Caraïbes, Brésil, Venezuela,

Schistosomiase intestinale	<i>Schistosoma japonicum</i>	Suriname Chine, Indonésie, Philippines
	<i>Schistosoma mekongi</i>	Plusieurs districts du Cambodge et de la République démocratique populaire du Laos.
	<i>Schistosoma intercalatum</i> <i>Schistosoma guineansis</i>	Zones des forêts tropicales humides en Afrique Centrale
Schistosomiase urogénitale	<i>Schistosoma haematobium</i>	Afrique, Moyen-Orient

En gris, l'espèce qui fait l'objet de notre étude et qui est la plus répandue : *S. mansoni*



**Figure 5:** Distribution globale des différentes espèces de schistosomes pathogènes pour l'Homme (Weerakoon et al., 2015).

De plus en plus, cette maladie s'étend en Europe : h cas de la Corse en France (OMS, 2020).

Des six espèces pathogènes pour l'Homme, trois sont présentes au Cameroun : *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum*. Au Cameroun, l'incidence est de 1000 à 1500 cas par an. En l'an 2000, on notait environ 1,7 millions de personnes infectées (Brooker et al., 2003) de schistosomiase dont 80% des cas dans les régions septentrionales (Ratard et al., 1990).

#### **I.3.1.4- Diagnostic de la schistosomiase**

Le diagnostic standard de la schistosomiase se fait par une observation microscopique des excréta (fèces ou urines) à la recherche d'œufs du parasite. Un comptage permettra ensuite d'estimer la charge parasitaire. Il s'agit de la technique de diagnostic la plus aisée à mettre en place du fait de son faible coût et de l'absence de besoin de matériel spécifique pour la réaliser. Des antigènes présents dans les échantillons de selles ou d'urines sont également des indicateurs de l'infection.

Pour la schistosomiase urogénitale, une technique de filtration avec des filtres en nylon, papier ou polycarbonate est la norme. Les enfants porteurs de *S. haematobium* ont presque toujours une micro-hématurie détectable au moyen de bandelettes réactives.

En cas de schistosomiase intestinale, on met en évidence les œufs dans les échantillons de matières fécales au moyen de feuilles de cellophane enduites de glycérine colorée au bleu de méthylène et de lames de verre (technique de Kato-Katz) (OMS, 2020).

Pour les personnes venant de zones exemptes de l'endémie ou de faible transmission, les techniques sérologiques et immunologiques peuvent s'avérer utiles pour mettre en évidence une exposition à l'infection et la nécessité de procéder à des analyses plus poussées et de traiter (OMS, 2020).

#### **I.3.1.5- Prévention de la schistosomiase**

La prophylaxie repose sur :

- **L'éducation sanitaire et les préventions de la contamination des plans d'eau par les matières fécales et les urines.**

La protection des individus contre les eaux parasitées en zone d'endémie se heurte à des habitudes ancestrales et à des impératifs de la vie quotidienne. Elle demeure fonction de l'amélioration du niveau de vie (multiplication des points de distribution d'eau potable).

- **La chimiothérapie des populations affectées.**

Le traitement médical est relativement efficace sur le plan individuel, il ne peut être généralisé dans l'état actuel de la thérapeutique. D'une part, les sujets traités vivant en zone d'endémie sont soumis à des réinfestations plus ou moins constantes, d'autre part, l'existence d'un

réservoir animal en limite l'intérêt dans la bilharziose intestinale.

- **Des modifications écologiques**

La lutte est actuellement orientée contre les mollusques vecteurs : le point le plus vulnérable de la chaîne épidémiologique. L'emploi de molluscicides est une technique susceptible d'une application systématique. En fait, dans la pratique, les difficultés sont immenses pour des raisons diverses : les mollusques sont des vecteurs fuyants ; leurs habitats aquatiques sont constamment modifiés ; certains molluscicides n'épargnent pas les poissons, base importante de l'alimentation. Des méthodes écologiques peuvent être utilisées comme l'assèchement périodique des canaux d'irrigation ; la destruction des végétaux dont se nourrissent les mollusques. L'utilisation de mollusques compétiteurs des hôtes intermédiaires a fait ses preuves dans certaines régions (Brésil) mais reste aléatoire. L'utilisation de prédateurs est actuellement testée : Anatidae (canards) et mollusques carnivores.

Ces programmes de lutte sont freinés par les habitudes ancestrales (réinfestations), le mode de vie et le niveau de développement socio-économique.

A titre individuel, il est fortement déconseillé de se baigner en eaux douces ou stagnantes, même pour de très courtes et très partielles immersions (ANOFEL, 2014).

### **I.3.1.6- Traitement de la schistosomiase**

Le Biltricide, dont le principe actif est le praziquantel (**1**), est le principal médicament utilisé dans le traitement de la bilharziose, notamment en Afrique, depuis les années 1980. Certains avantages (biodisponibilité, une seule prise orale, faible coût...) permettent son utilisation à grande échelle (Cioli et al., 2014).

- Avec une biodisponibilité de 80%, le praziquantel est rapidement absorbé par voie orale, la [C]max (concentration maximale de la molécule dans le sang) est atteinte en 1-2 heures. Il est actif sur toutes les espèces mais est actif uniquement sur les formes matures de 5 semaines ou plus. Il agit sur les deux sexes mais devient moins actif lorsque le mâle et la femelle sont séparés (Gonnert et Andrews, 1977).
- Son mode d'administration orale non invasif est un second avantage de cette chimiothérapie. Son mode d'action est aujourd'hui encore relativement méconnu mais il agirait vraisemblablement sur les canaux calciques du parasite qu'il rendrait plus perméables (Doenhoff et al., 2008). Cela provoquerait des contractions musculaires

anarchiques et une altération tégumentaire des vers adultes. Il n'a cependant aucune action sur les stades précoces et cela constitue une de ses limites. Par ailleurs, il ne prévient pas la ré-infestation ; ce qui est un inconvénient majeur car les populations sont sans cesse réexposées. Toutefois des traitements réguliers aident à prévenir les risques de développer une forme sévère de la maladie : ce qui justifie sa distribution à grande échelle.

- Actuellement, aucun vaccin n'est disponible (CDC, 2020).
- L'existence d'un seul traitement n'est pas suffisante car, de façon générale, l'apparition de résistance aux anti-infectieux est connue pour être favorisée dans ces conditions. Il s'est déjà observé dans le cas du praziquantel (Doenhoff et al., 2008). Ainsi, il apparaît important aujourd'hui d'anticiper la possibilité d'une amplification de ces cas de résistance. De plus, on a pu observer lors de la prise du Biltricide, des effets secondaires non négligeables : céphalées, pics fébriles, convulsions, diarrhée parfois sanglante, trouble du rythme cardiaque (<http://www.doctissimo.fr/medicament-BILTRICIDE.htm>).
- En tout état de cause, de rares travaux de recherche sont menés ici et là. Afin de mieux contrôler la schistosomiase, l'un des fers de lance actuel est le développement de cibles vaccinales et thérapeutiques, notamment le développement d'inhibiteurs d'enzymes.

### **I.3.2- Les enzymes**

#### **I.3.2.1- Généralités**

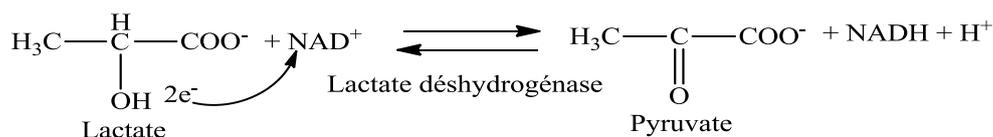
Les enzymes, substances produites par les cellules, sont des catalyseurs des réactions chimiques spécifiques dans le métabolisme d'une cellule.

Une enzyme a une spécificité de substrat et une spécificité d'action c'est à dire qu'elle agit, transforme un seul type de substrat et catalyse un seul type de réaction. Le substrat se lie à l'enzyme en se fixant sur le site actif de l'enzyme. L'activité d'une enzyme peut être modifiée par des facteurs tels que la température, le pH et les inhibiteurs.

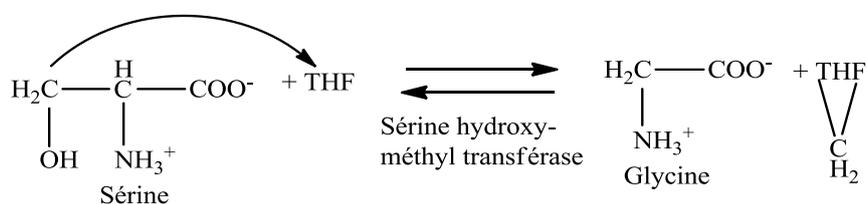
La nomenclature des enzymes se fait généralement par ajout du suffixe 'ase' sur le nom commun du substrat sur lequel elles agissent. Exemple : amidon = amylase, urée = uréase. Les enzymes peuvent également être nommées suivant la classe à laquelle elles

appartiennent. C'est ainsi qu'on distingue six classes d'enzymes correspondant à six grandes catégories de réactions (un exemple est donné pour chaque catégorie) :

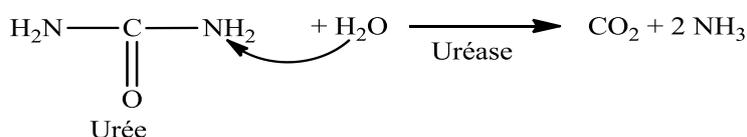
- **E.C. 1 : Les oxydoréductases qui catalysent les réactions d'oxydoréduction.**



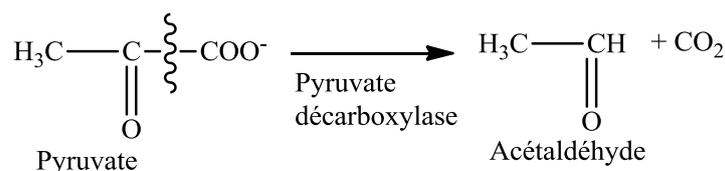
- **E.C. 2 : Les transférases qui catalysent les réactions de transfert de groupes.**



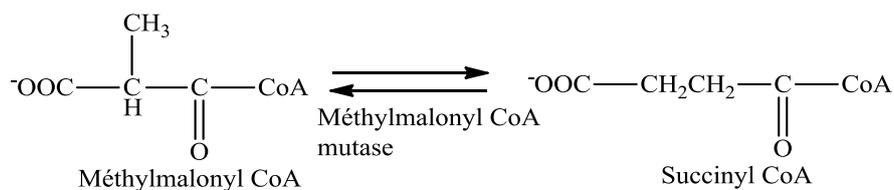
- **E.C. 3 : Les hydrolases qui catalysent les réactions d'hydrolyse.**



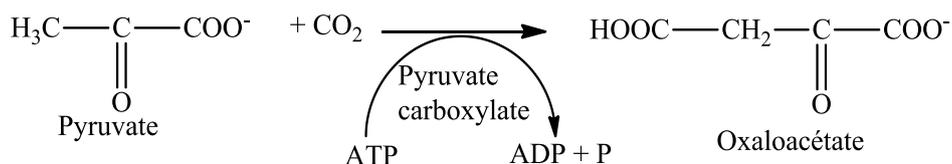
- **E.C. 4 : Les lyases qui catalysent les réactions de coupure.**



- **E.C. 5 : Les isomérases (synthétases) qui catalysent les réactions d'isomérisation.**



- **E.C. 6 : Les ligases qui catalysent les réactions de formation d'une liaison simple avec couplage énergétique obligatoire.**



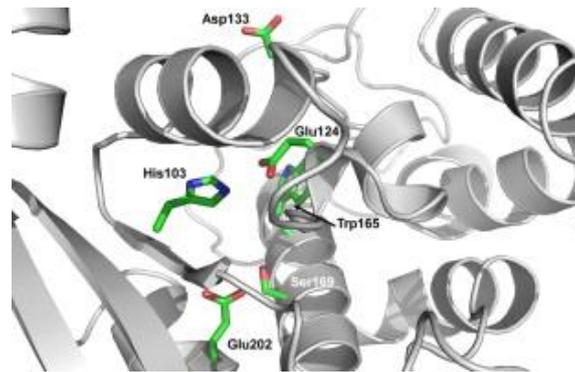
De nos jours, les enzymes sont largement utilisées en médecine et dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. Cependant de nombreux problèmes liés à leur stabilité limitent leur utilisation. L'étude de ces enzymes est d'une importance capitale dans le traitement de nombreuses infections et des cancers. Nous présentons dans ce document un bref aperçu de la *Schistosoma mansoni* Catabolising Enzyme (*SmNACE*), enzyme nouvellement découverte et ayant été inhibée par certains composés isolés des extraits au mélange hydroalcoolique des écorces d'*A. mannii*, espèce étudiée.

### I.3.2.2- L'enzyme *SmNACE*

Découverte en 2005, la *SmNACE* (*Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup> Catabolising Enzyme) (glycohydrolase, E.C. 3.2.2.5) est une enzyme à ancrage GPI (Glycosylphosphatidylinositol) présente à la surface externe du tégument du schistosome adulte (**Goodrich et al., 2005**).

C'est une protéine de 256 acides aminés, d'environ 40 kDa et contenant 4 sites de *N*-glycosylation. Elle appartient à la famille du CD38/ADP-ribosyl cyclase ; enzymes clés dans la production des messagers mobilisant les ions Ca<sup>2+</sup> (**Lee, 2000**). Comme le CD38, elle peut également hydrolyser le β-NAD<sup>+</sup>. Cependant, *SmNACE* (Figure 6) a la particularité d'être dépourvu de l'activité ADP-ribosyl cyclase, elle est incapable de produire de l'ADPRc (**Goodrich et al., 2005**).

Chez l'homme, l'ADPRc produit par le CD38 est un métabolite impliqué dans la réponse chimiotactique des neutrophiles humains et monocytes à des chimiokines inflammatoires. En conséquence, il est tentant de postuler que *SmNACE* agit comme une molécule « d'évasion immunitaire » pour *S. mansoni* en diminuant le substrat disponible pour CD38 et empêchant les cellules hôtes exprimant le CD38 de produire de l'ADPRc.



**Figure 6 : Enzyme *SmNACE* (Kuhn et al., 2013)**

Pour mieux caractériser la fonction *SmNACE* et éventuellement valider son potentiel en tant que cible pharmacologique pour l'activité antischistosomiale, nous avons cherché à identifier les inhibiteurs de son activité enzymatique.

### **I.3.2.3- Inhibiteur enzymatique**

Un inhibiteur enzymatique est une molécule capable de se fixer au site actif de l'enzyme, souvent par une liaison covalente, sans provoquer de réaction et ne subissant pas de transformation. Il peut bloquer le site actif et rendre non fonctionnelle l'enzyme, de ce fait, il entraîne une diminution de l'activité enzymatique. L'inhibition des enzymes joue un rôle important dans le contrôle des mécanismes biologiques, notamment dans la régulation des voies métaboliques. Puisque l'inhibition d'une enzyme peut tuer un pathogène ou corriger un déséquilibre métabolique, des applications existent dans de nombreux domaines. Plusieurs médicaments, pesticides ou insecticides sont des inhibiteurs enzymatiques; leur découverte et leur amélioration est un domaine de recherche actif en biochimie et en pharmacologie. En enzymologie, les inhibiteurs sont très utilisés pour déterminer le mécanisme d'action d'une enzyme.

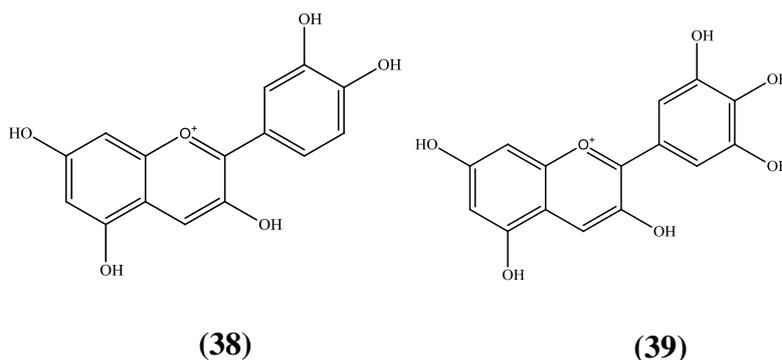
Un médicament inhibiteur d'enzyme est souvent évalué par sa spécificité (l'absence de liaison à d'autres protéines) et son affinité. L'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme est donnée par la constante d'inhibition  $K_i$ , qui représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés. Ainsi, l'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus grande que le  $K_i$  est petit.

La liaison d'un inhibiteur peut empêcher un substrat de se fixer au site actif de l'enzyme et/ou l'enzyme de catalyser sa réaction. Cette inhibition peut être réversible ou irréversible. Les inhibiteurs irréversibles réagissent généralement avec l'enzyme et la modifient chimiquement.

Ils se fixent de manière covalente et modifient des résidus amino-acides clés, nécessaires à l'activité enzymatique. En revanche, les inhibiteurs réversibles se lient de façon non covalente et différents types d'inhibition en résultent selon que ces inhibiteurs lient l'enzyme, le complexe enzyme-substrat (ES) ou les deux.

Les inhibiteurs ne sont pas seulement utiles dans le maintien des paramètres physiologiques, mais sont également des agents prometteurs dans la chimiothérapie de certains cancers.

La *SmNACE*, extrêmement intéressante du fait de son accessibilité aux médicaments, est donc une cible privilégiée pour la conception de futurs agents thérapeutiques. Récemment, un criblage de près de 14300 molécules à haut débit de chimiothèque a permis d'identifier deux produits naturels appartenant à la famille des flavonoïdes : cyanidine (**38**) et delphinidine (**39**), qui peuvent inhiber la *SmNACE* avec une valeur d' $IC_{50}$  inférieure au micromolaire. Bien que ces flavanols soient de bons ligands, ils se lient malheureusement à d'autres enzymes et récepteurs vitaux à l'Homme, comme le CD38 humain et sont pour cette raison inappropriés pour développer un médicament. Par ailleurs, l'activité de la *SmNACE* n'est pas inhibée par le praziquantel (Marcou et Rognan, 2007).



Au regard des usages de l'espèce *Anonidium mannii* dans la médecine traditionnelle, de la diversité des activités biologiques présentées par ses extraits et compte tenu du fait que cette espèce reste relativement peu étudiée, nous avons entrepris dans le cadre de nos travaux de recherche, l'investigation chimique de cette plante médicinale ainsi que l'évaluation des

propriétés antischistosomiale et notamment inhibitrice de *SmNACE* de ses extraits et constituants chimiques.

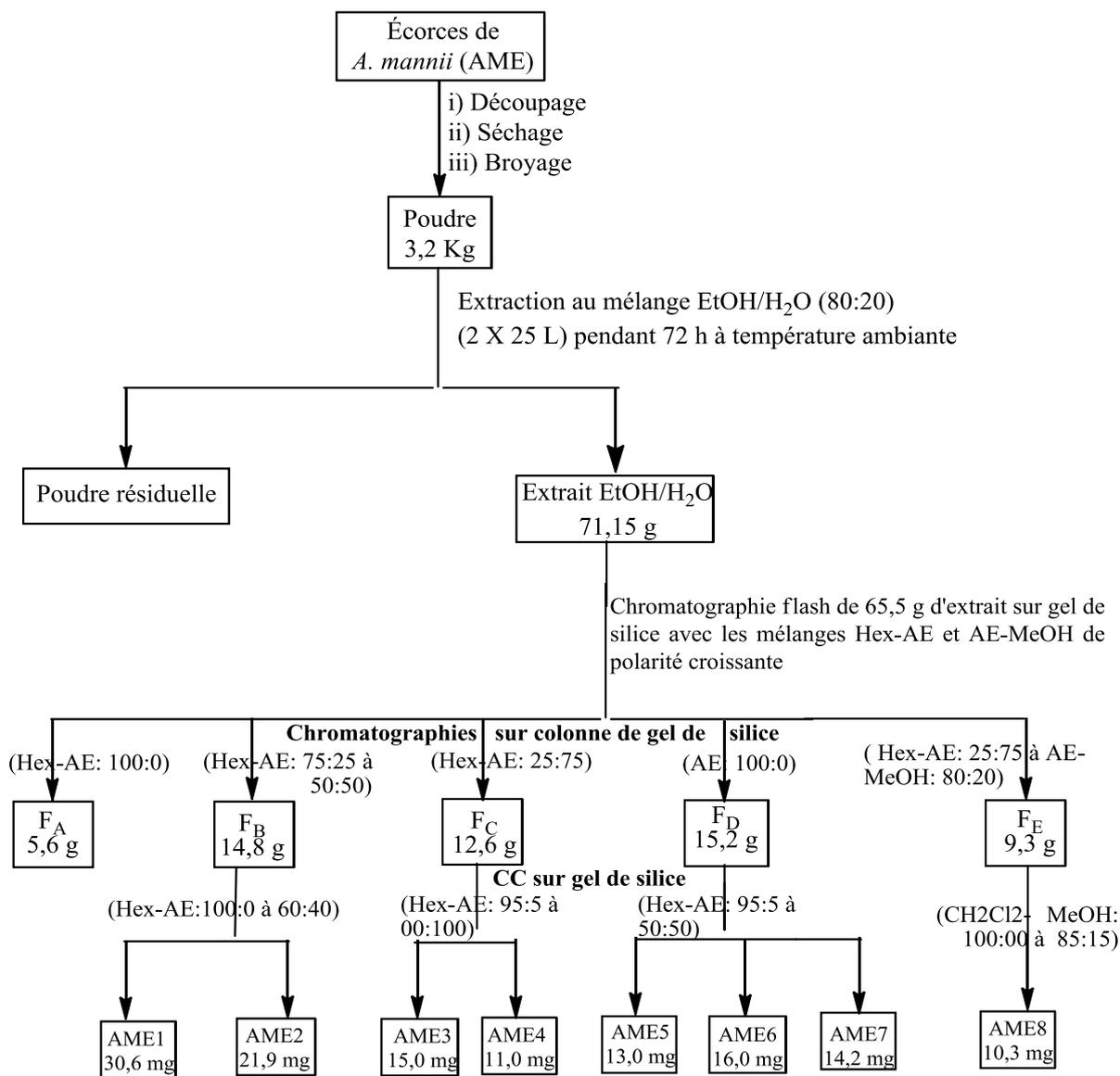
## **CHAPITRE 2 : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## **II.1-ÉTUDE CHIMIQUE D'ANONIDIUM MANNII**

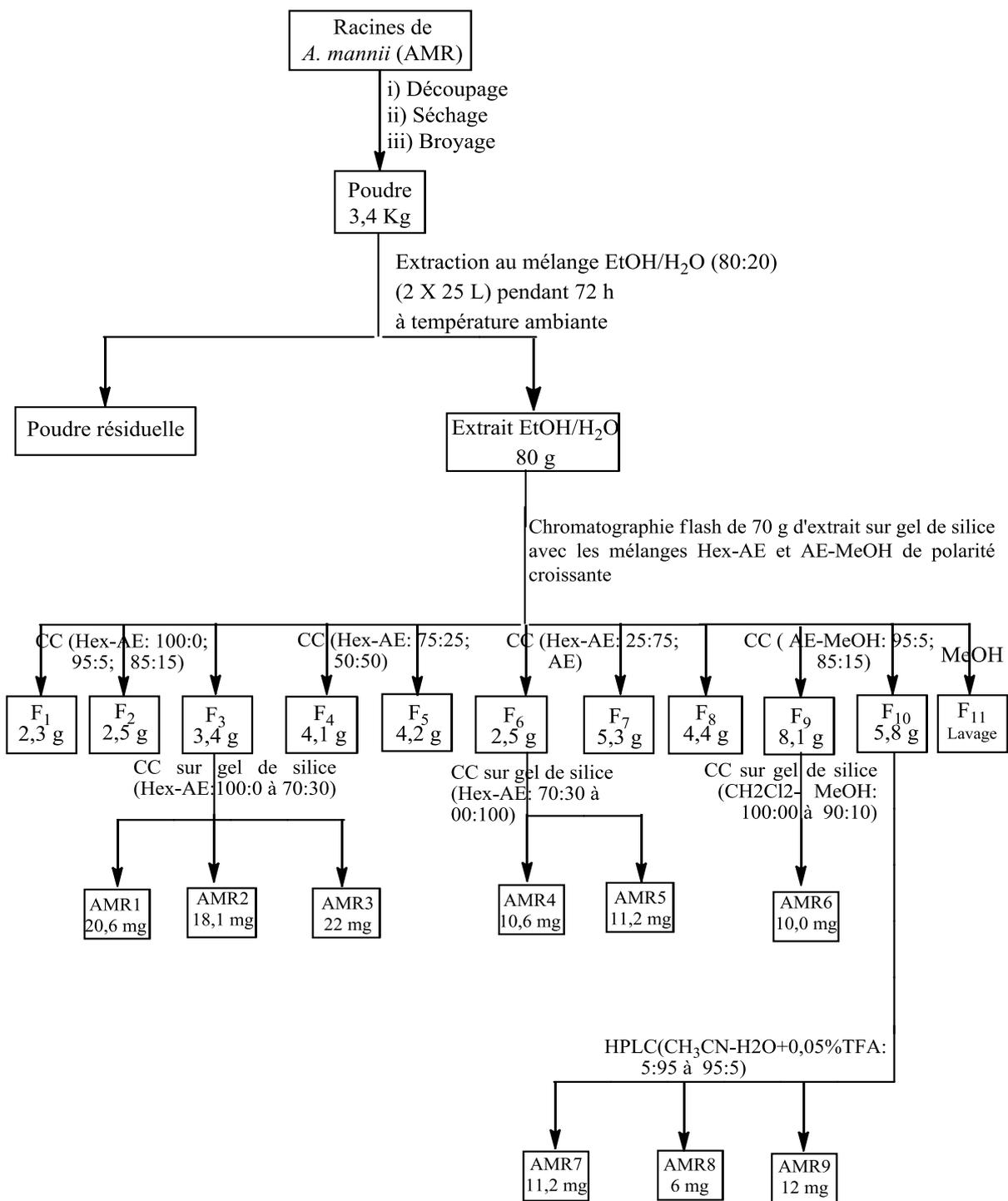
### **II.1.1- Matériel végétal, extraction et isolement des composés**

Les écorces du tronc et les racines d'*A. mannii* (Oliv.) Diels (Annonaceae) ont été récoltées au Mont Kala dans la Région du Centre Cameroun, en Janvier 2016. L'identification de cette espèce a été réalisée par M. NANA Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun, par comparaison à un échantillon conservé sous le numéro 45582HNC.

Les écorces du tronc et les racines ont été découpées, séchées puis broyées. Les poudres obtenues ont été soumises à l'extraction au mélange hydroalcoolique Ethanol/Eau (80/20) à température ambiante, pendant 72 heures. Les extraits ainsi obtenus ont d'abord subi des tests antiparasitaire et enzymatique ensuite ont été fractionnés par chromatographie flash sur gel de silice, puis les fractions résultantes ont subi des chromatographies successives sur colonne ouverte pour donner des produits purs. C'est ainsi que de l'extrait des écorces du tronc ont été isolés 8 composés et de celui des racines ont été obtenus 9 métabolites secondaires (Schémas 2 et 3).



**Schéma 2:** Protocole d'extraction et d'isolement des composés des écorces du tronc d'*A. mannii*



**Schéma 3: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des racines d'*A. mannii***

Des extraits au mélange hydroalcoolique des écorces du tronc et des racines d'*A. mannii*, des métabolites secondaires différents ont été obtenus. Ces derniers ont été caractérisés et regroupés en cinq classes : 04 alcaloïdes [(AME3 (identique à AMR6), AME5 (identique à AMR9), AMR7 et AMR8)], 04 triterpènes pentacycliques [AMR2, AMR4 (identique à AME2), AMR5 (identique à AME8) et AME7 (identique à AMR3)], 01 acide phénolique (AME4), 01 flavonoïde (AME6) et 02 stéroïls (AME1 et AMR1).

## II.2- DÉTERMINATION STRUCTURALE DES COMPOSÉS ISOLÉS

La détermination structurale des composés isolés a été faite par analyse de leurs données spectrales et pour les composés connus, par comparaison de leurs données spectroscopiques et physiques avec celles décrites dans la littérature ou par comparaison avec des échantillons purs disponibles dans notre laboratoire. Ces composés appartiennent à cinq classes de substances naturelles :

### II.2.1- Les alcaloïdes

#### II.2.1.1- Éluclidation structurale d'AMR8 (Composé nouveau : Manniindole)

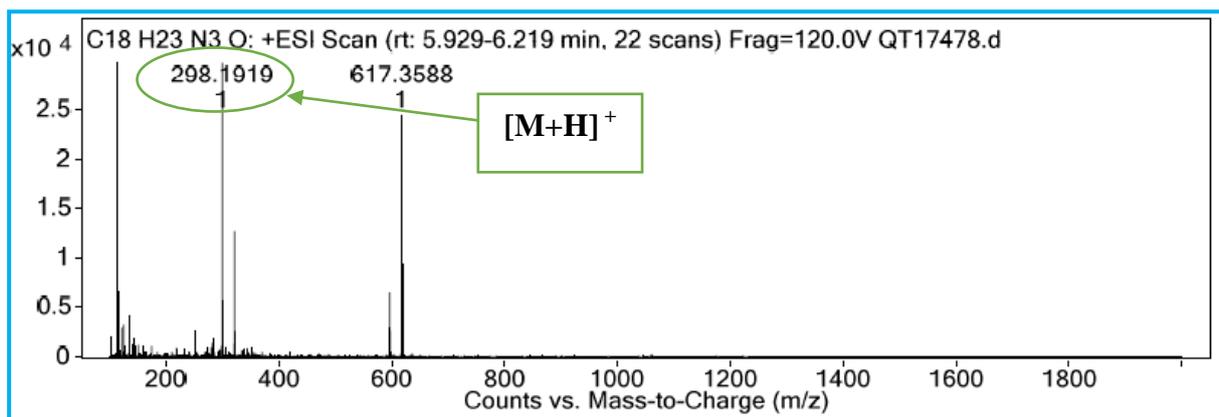
Soluble dans le dichlorométhane, le composé AMR8 a été isolé sous forme d'une poudre amorphe jaune-orange (par HPLC en utilisant le gradient 5-95% Acétonitrile). Il répond positivement au test de Dragendorff indiquant sa nature alcaloïdique.

Son spectre de masse sous ionisation électrospray à haute résolution et en mode positif (Figure 7) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 298,1924$  (calc. 298,1919), cette masse impaire confirme la présence d'au moins un atome d'azote au sein de la molécule pour laquelle la formule brute est compatible à  $C_{18}H_{24}N_3O$  soit neuf degrés d'insaturation.

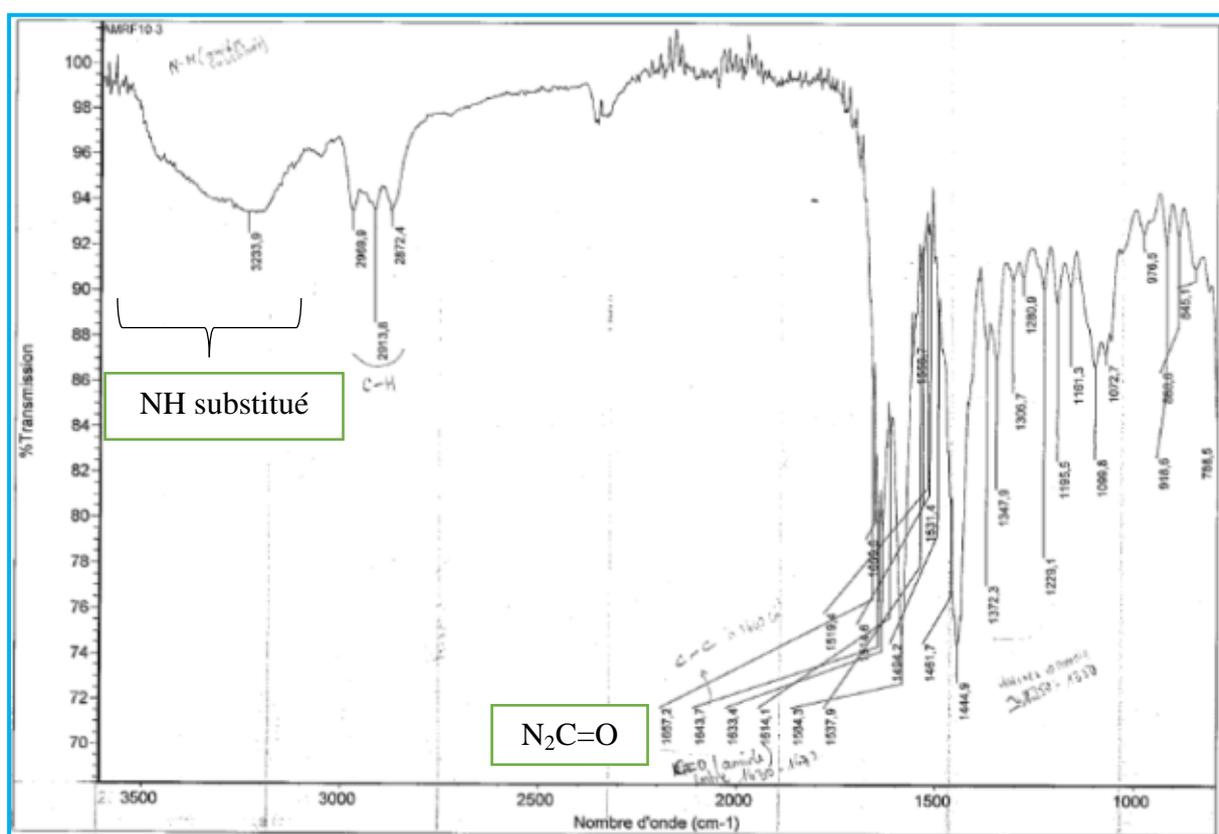
Son spectre UV enregistré dans le méthanol présente des bandes d'absorption de noyaux aromatiques à  $\lambda_{max}$  200, 221 et 279 nm.

Son spectre IR (Figure 8) affiche une bande d'absorption autour de  $3480\text{ cm}^{-1}$  qui pourrait être due à une vibration du groupe NH pour un squelette d'indole (Benesova et al., 1969). On peut également observer des absorptions attribuables à la N-carbamoylpyrrolidine à ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3270 et 3100 ( $\text{NH}_2$ ) ; 1651 (carbonyle,  $\text{N}_2\text{C}=\text{O}$ ) ; 1519, 1494 (N-CO-N) (D'Ambrosio et al.,

1985).



**Figure 7 :** Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AMR8



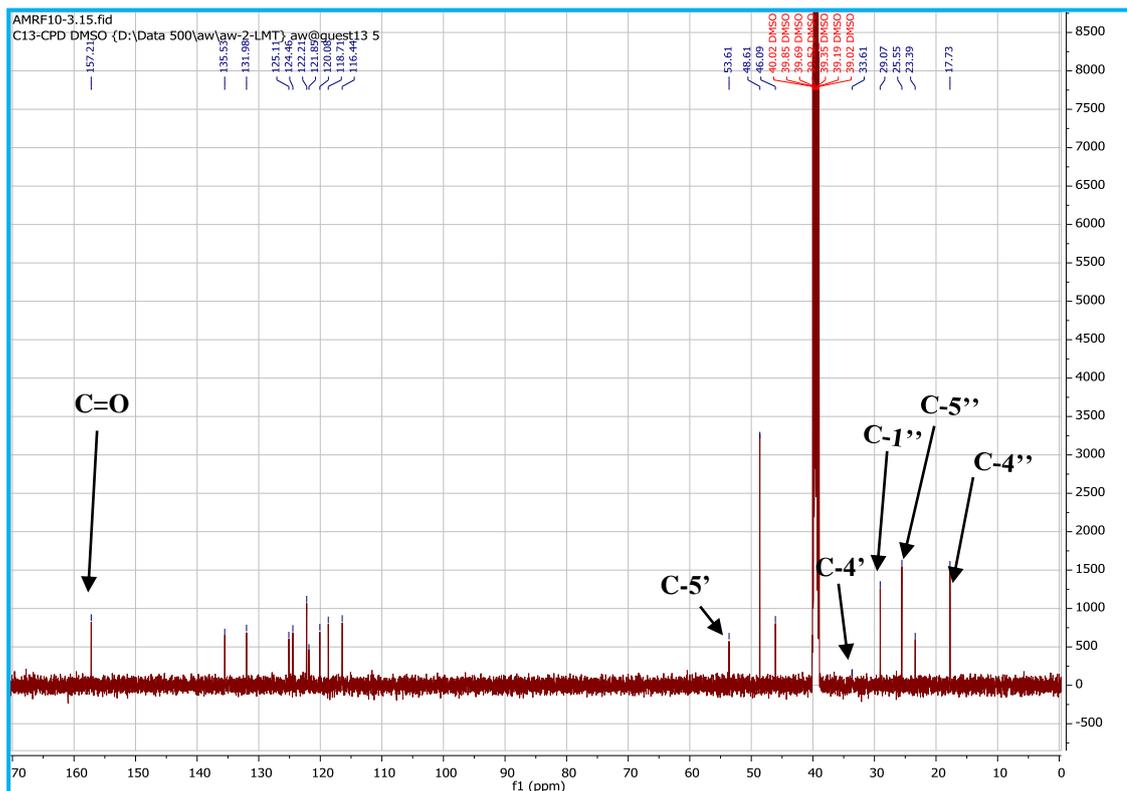
**Figure 8 :** Spectre IR d'AMR8

Le spectre RMN <sup>13</sup>C complètement découplé (Figure 9), combiné aux spectres DEPT 135 (Figure 10) et HSQC (Figure 11) révèlent la présence de 18 atomes de carbone, repartis en :

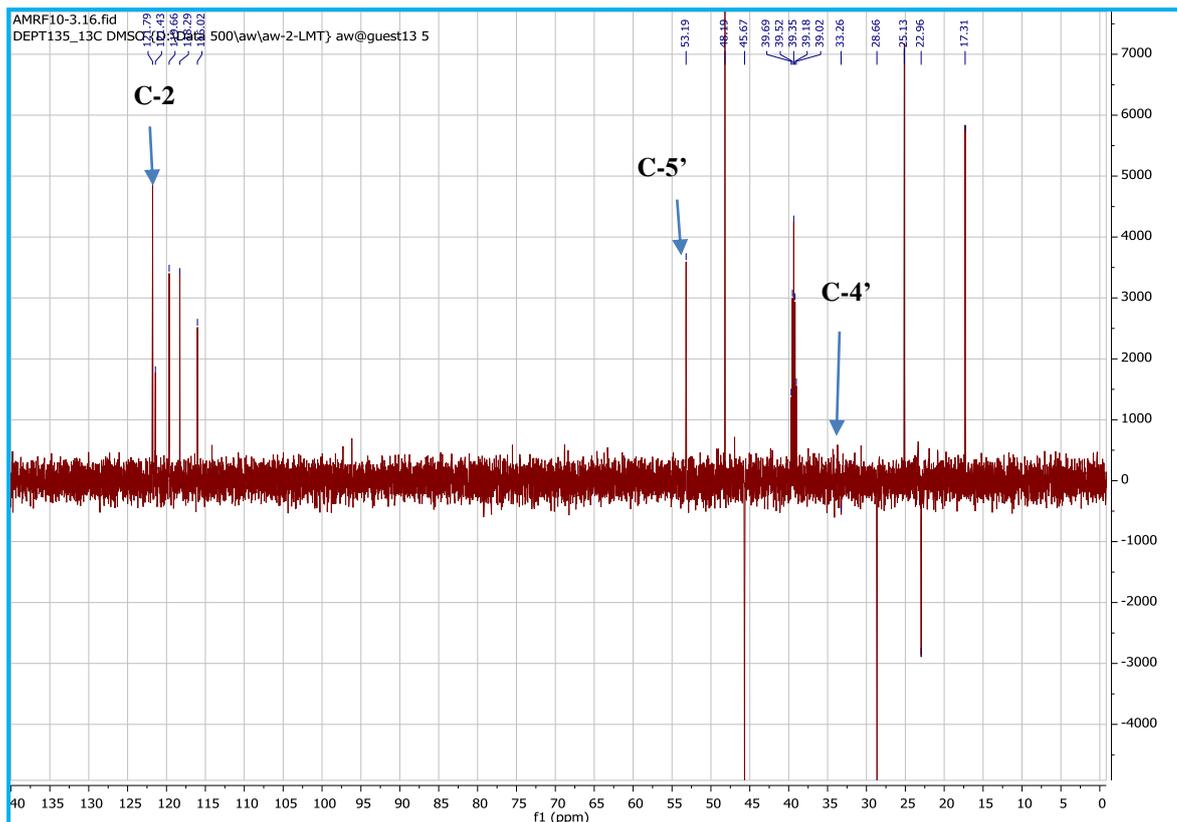
- deux carbones de groupement méthyle à  $\delta_C$  25,6 (C-5'') et 17,7 (C-4'')
- quatre carbones sp<sup>3</sup> de groupement méthylène à  $\delta_C$  46,1(C-2'') ; 33,7 (C-4') ; 29,1 (C-1'') et 23,4 (C-3'')

-six carbones portant chacun un proton parmi lesquels trois aromatiques à  $\delta_C$  119,7 (C-6) ; 118,7 (C-5) et 116,4 (C-4), deux oléfiniques à  $\delta_C$  121,8 (C-2) ; 122,2 (C-2'') et un carbone  $sp^3$  à  $\delta_C$  53,6 (C-5')

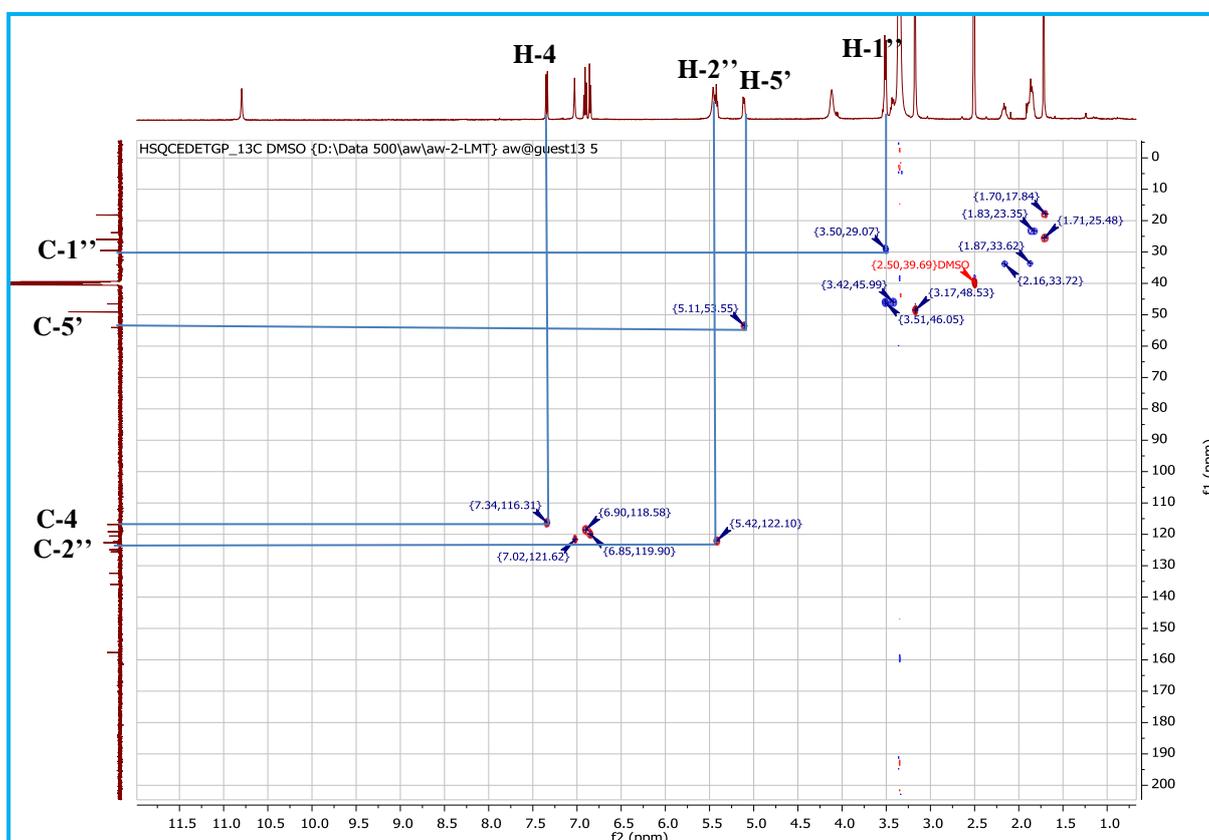
-six carbones quaternaires hybridés  $sp^2$  dont 3 aromatiques à  $\delta_C$  135,5 (C-7a) ; 125,1 (C-3a) et 124,5 (C-7) ; deux oléfiniques à  $\delta_C$  131,9 (C-3'') et 117,8 (C-3), et un carbonyle à  $\delta_C$  157,2 caractéristique d'un groupement carboxyle.



**Figure 9:** Spectre de RMN  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) d'AMR8



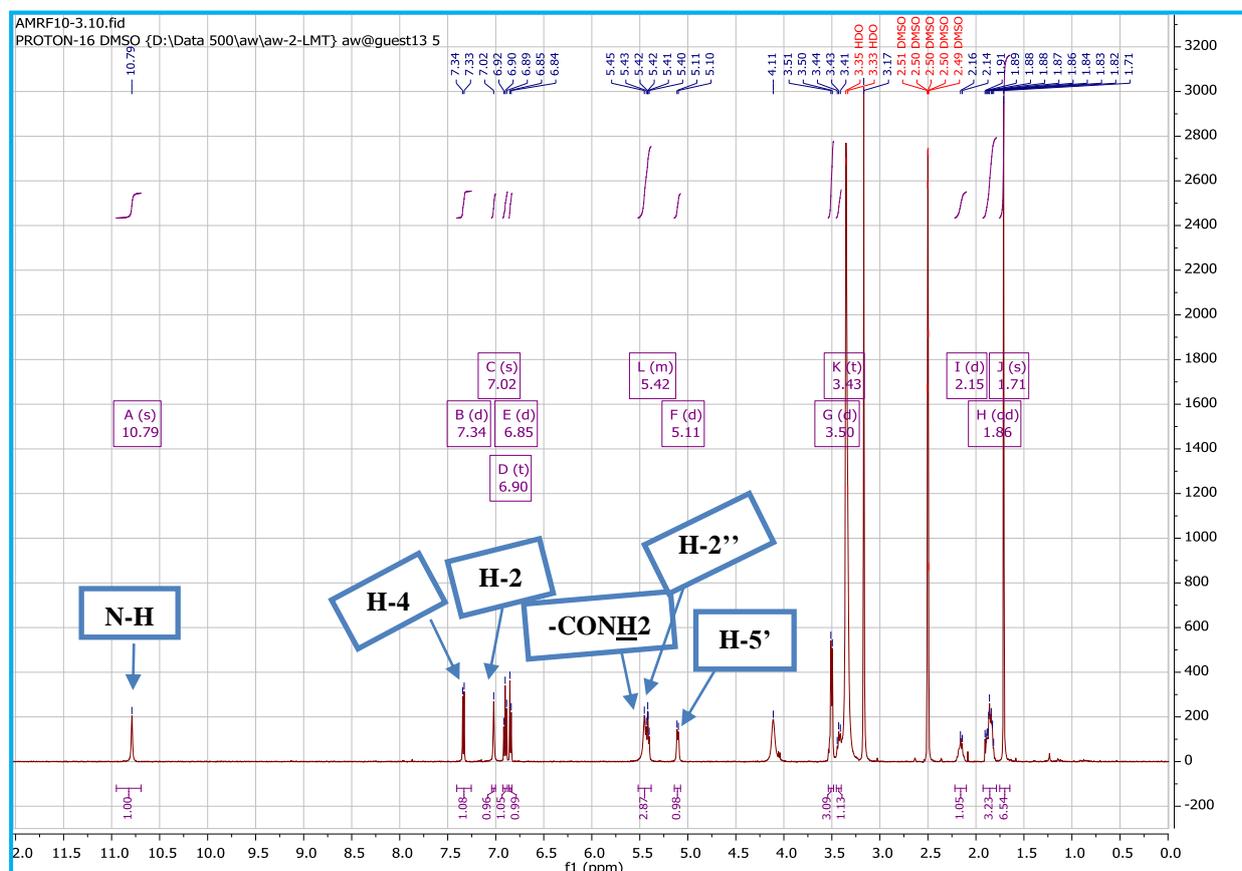
**Figure 10:** Spectre DEPT 135 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) d'AMR8



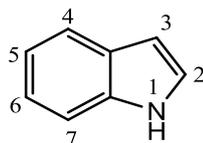
**Figure 11:** Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ ) d'AMR8

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  d'AMR8 (Figure 12) a montré dans la région des champs faibles, deux singulets larges à  $\delta_{\text{H}}$  10,80 et 7,03 qui pourraient confirmer l'existence dans AMR8 des protons indoyle NH et oléfinique (H-2) respectivement (Benesova et al., 1969).

En outre, il a présenté également trois protons aromatiques couplés entre eux à  $\delta_{\text{H}}$  7,34 (1H, bd,  $J = 7,8$  Hz, H-4),  $\delta_{\text{H}}$  6,90 (1H, (1H, t,  $J = 7,5$  Hz, H-5) et  $\delta_{\text{H}}$  6,85 (1H, bd,  $J = 7,0$  Hz, H-6), ceci nous a permis de supposer que le cycle aromatique unique d'AMR8 était trisubstitué. De plus, ce spectre a montré les résonances caractéristiques d'un groupement 3,3-diméthylallyle à  $\delta_{\text{H}}$  5,43 (1H, m, H-2'') ; 3,50 (2H, d,  $J = 7,4$  Hz, H-1 ") et 1,71 (6H, s, H-4 " et H-5 "). Des protons aliphatiques ont pu aussi être observés à  $\delta_{\text{H}}$  5,11 (1H, bd,  $J = 7,2$  Hz ; H-5 ' ) ; 3,51 (1H, m, H-2'b) ; 1,86 (2H, m, H-3 ' ) ; 3,43 (1H, m, H-2'a) ; 2,17 (1H, m, H-4'b) et 1,89 (1H, m, H-4'a) conjointement avec des protons de l'amide ( $\text{CONH}_2$ ) à  $\delta_{\text{H}}$  5,45 (2H, s,). Selon sa formule moléculaire, toutes ces données corroborent la présence dans AMR8 d'un groupe N-carbamoylpyrrolidine. L'analyse combinée de ces données ci-dessus a indiqué que le composé AMR8 avait une structure d'un alcaloïde de type indole qui était respectivement substitué par des groupes prényle et N-carbamoylpyrrolidine.

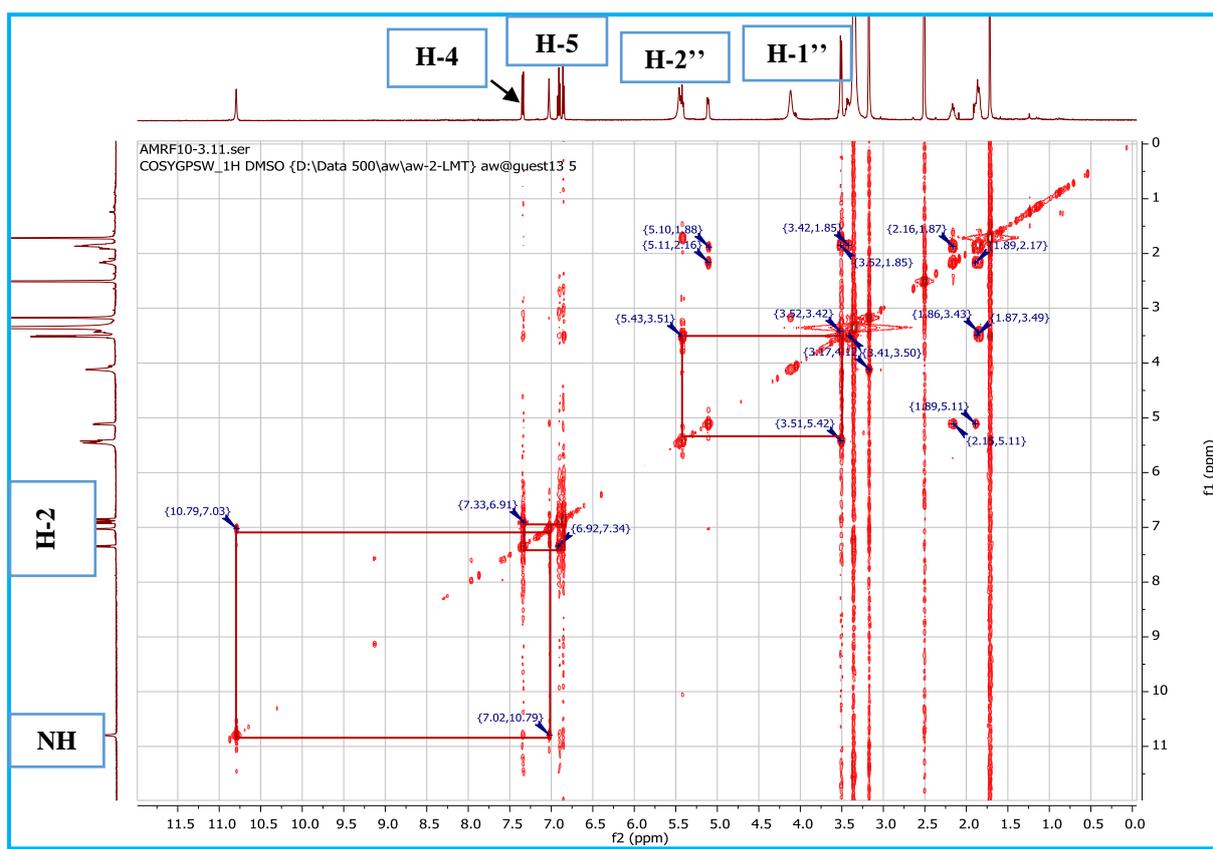


**Figure 12:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) d'AMR8

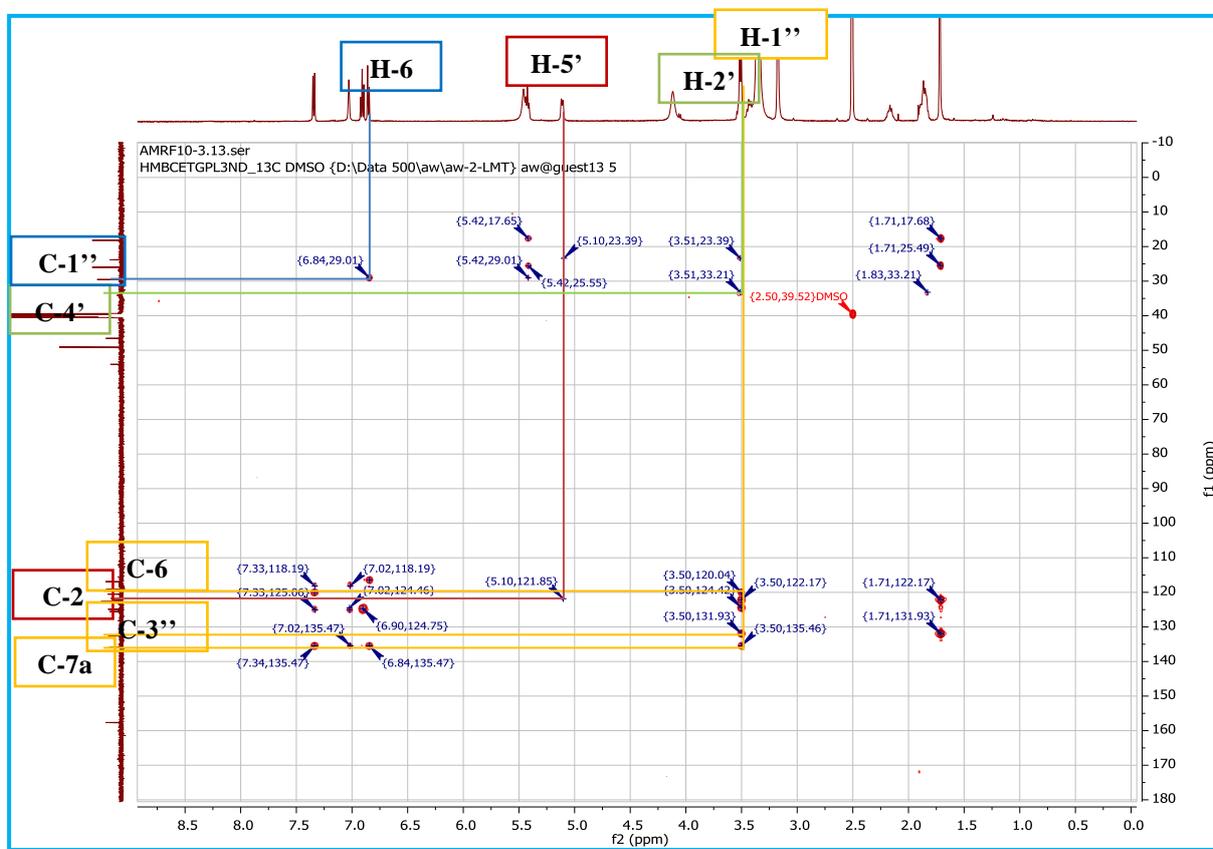


### Squelette de base des indoles

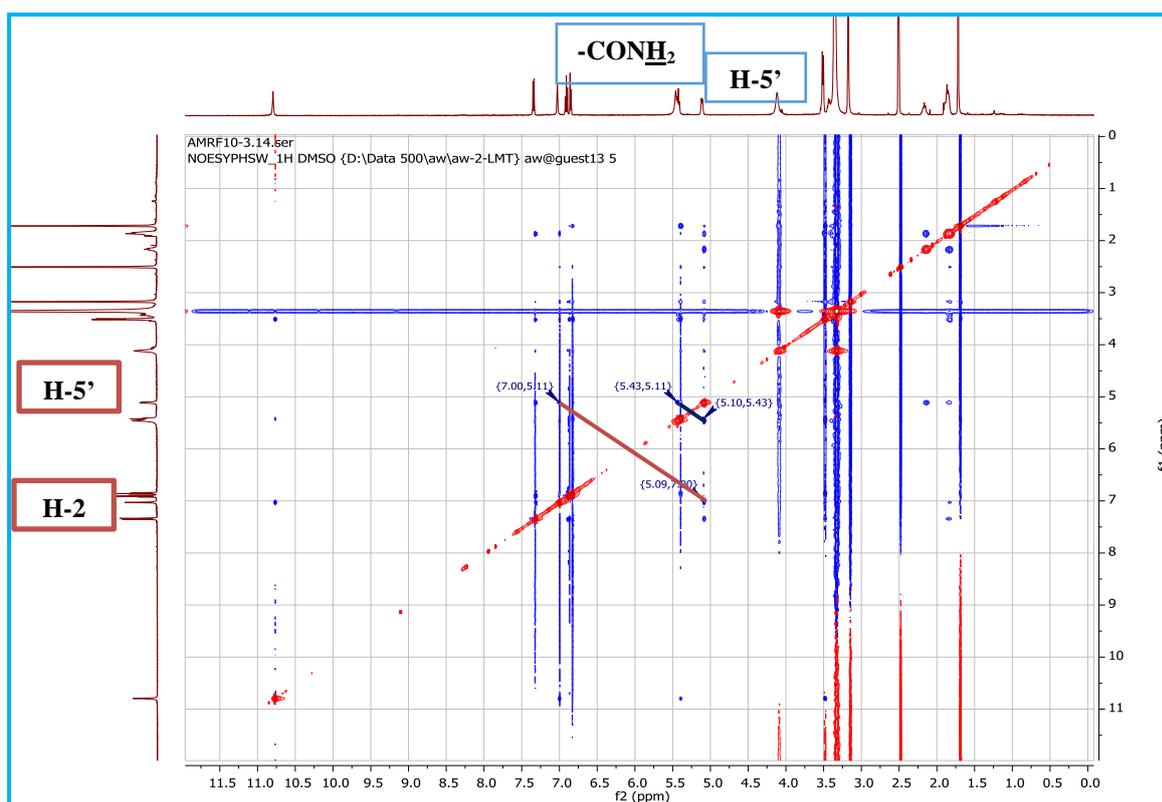
Sur son spectre 1H-1H COSY (Figure 13), un couplage a été observé entre le proton oléfinique (H-2) et le proton NH du cycle pyrrole du groupement indole. Cela suppose que le carbone C-3 a été substitué ; De plus, le spectre HMBC (Figure 14 et Schéma 4) a révélé la connectivité du cycle pyrrolidine (respectivement C-2', C-3', C-4'et C-5') et prényle (C-1'', C-2'' et C-4'' / 5'' respectivement). Les corrélations clés HMBC entre les protons aliphatiques (H-2''et H-1'') du fragment 3,3-diméthylallyle et les carbones aromatiques (C-7 et C-6 ; C-7a respectivement) du squelette indole nous ont permis de fixer le groupe prényle sur C-7 ; De même, l'interaction observée sur le spectre HMBC entre H-5'et C-2 nous a permis de fixer la N-carbamoylpyrrolidine sur le carbone C-3. Ceci a été confirmé par ses corrélations NOESY (Figure 15) observées entre les protons H-5'et H-2 ; H-5' et (CONH<sub>2</sub>) respectivement. En raison de son carbone chiral (C-5), le composé AMR8 a montré une activité optique, qui a dévié la lumière polarisée vers la gauche (lévogyre) sur la base de la polarimétrie réalisée ( $[\alpha]_D^{25} = -37,5$  ( $c = 0,4$ ; EtOH)).



**Figure 13:** Spectre COSY (DMSO- $d_6$ ) d'AMR8

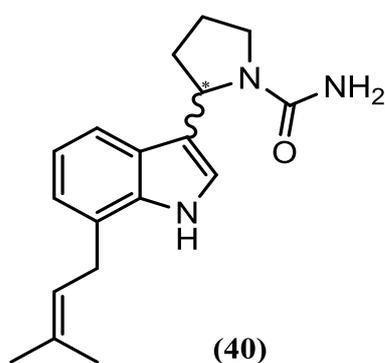


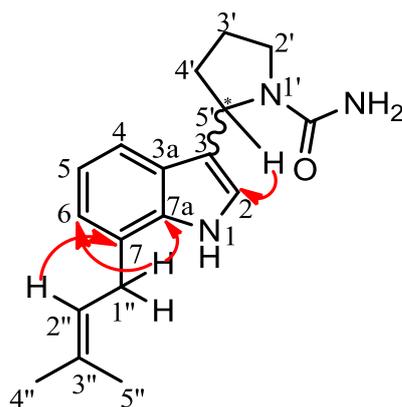
**Figure 14:** Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ ) d'AMR8



**Figure 15:** Spectre NOESY (DMSO-*d*<sub>6</sub>) d'AMR8

Toutes ces informations ont conduit à l'identification structurale du composé AMR8 comme étant (-)-3-(5'-N-carbamoylpyrrolidine)-7-(3''-méthyl-2''-butényl)indole auquel nous avons donné le nom trivial manniindole (**40**) (voir Tableau IX).




**Schéma 4** : Quelques corrélations HMBC d'AMR8

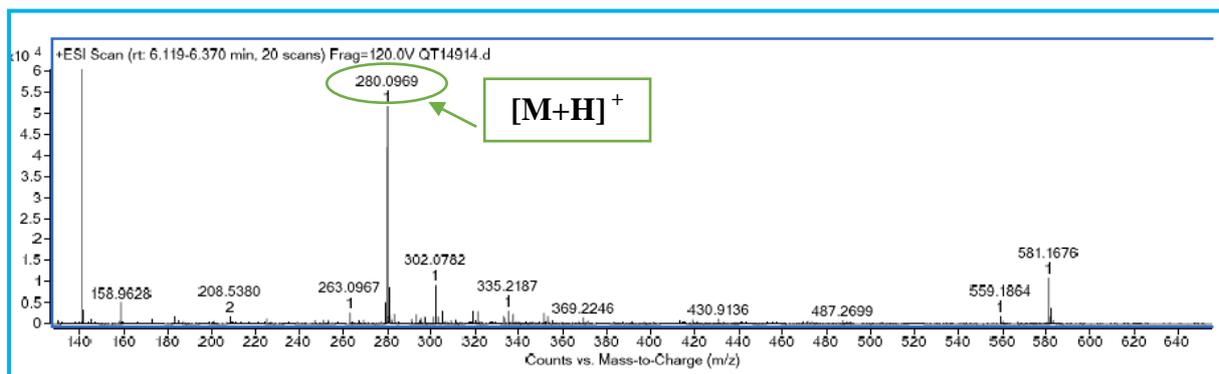
**Tableau IX** : Données de RMN d'AMR8 [ $^{13}\text{C}$  (125 MHz) et  $^1\text{H}$  (500 MHz) dans le  $\text{DMSO-}d_6$ ].

Attributions	AMR8	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (nH, mult., $J$ (Hz))
<b>1</b>	-	10,79 (1H, s)
<b>2</b>	121,8	7,02 (1H, s)
<b>3</b>	117,8	-
<b>3a</b>	125,1	-
<b>4</b>	116,4	7,34 (1H, d, $J = 7,8$ )
<b>5</b>	118,7	6,90 (1H, t, $J = 7,5$ )
<b>6</b>	119,7	6,85 (1H, d, $J = 7,0$ )
<b>7</b>	124,5	-
<b>7a</b>	135,5	-
<b>1'</b>	-	-
<b>N-CO-NH<sub>2</sub></b>	157,2	5,45 (2H, s)
<b>2'</b>	46,1	3,43 (1H, m, 2'a) 3,51 (1H, m, 2'b)
<b>3'</b>	23,4	1,86 (2H, m)
<b>4'</b>	33,7	1,89 (1H, m, 4'a) 2,17 (1H, m, 4'b)
<b>5'</b>	53,6	5,11 (1H, bd, $J = 7,2$ )
<b>1''</b>	29,1	3,50 (2H, d, $J = 7,4$ )
<b>2''</b>	122,2	5,43 (1H, dd, $J = 16,1 ; 8,7$ )
<b>3''</b>	131,9	-
<b>4''</b>	25,6	1,71 (3H, s)
<b>5''</b>	17,7	1,71 (3H, s)

### II.2.1.2- Identification d'AME3 ou AMR6

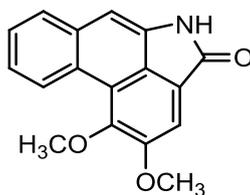
Le composé AME3 précipite sous forme de poudre jaune pâle dans le mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle (2 : 8). Il fond entre 258-259 °C et est soluble dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Il réagit positivement au test de Dragendorff indiquant sa nature alcaloïdique.

Son spectre de masse ESI en mode positif à haute résolution (Figure 16) montre le pic de l'ion pseudomoléculaire [M+H]<sup>+</sup> à  $m/z = 280,0969$  correspondant à la formule brute C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>, renfermant 12 insaturations (calc. 280,0973 pour C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>).



**Figure 16:** Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AME3

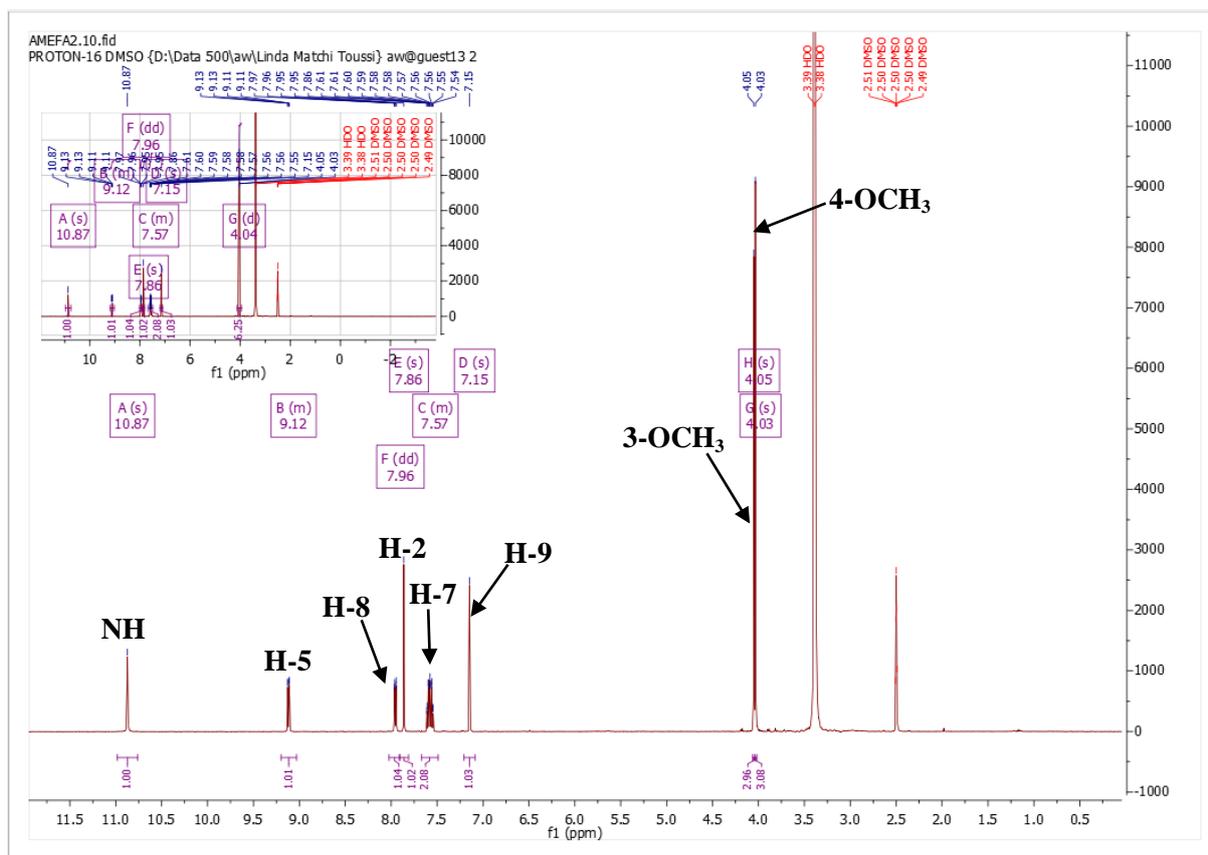
L'interprétation des données physiques et spectroscopiques nous a permis d'attribuer à ce composé la structure (41)



(41)

En effet, sur son spectre de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Figure 17), on observe la présence :

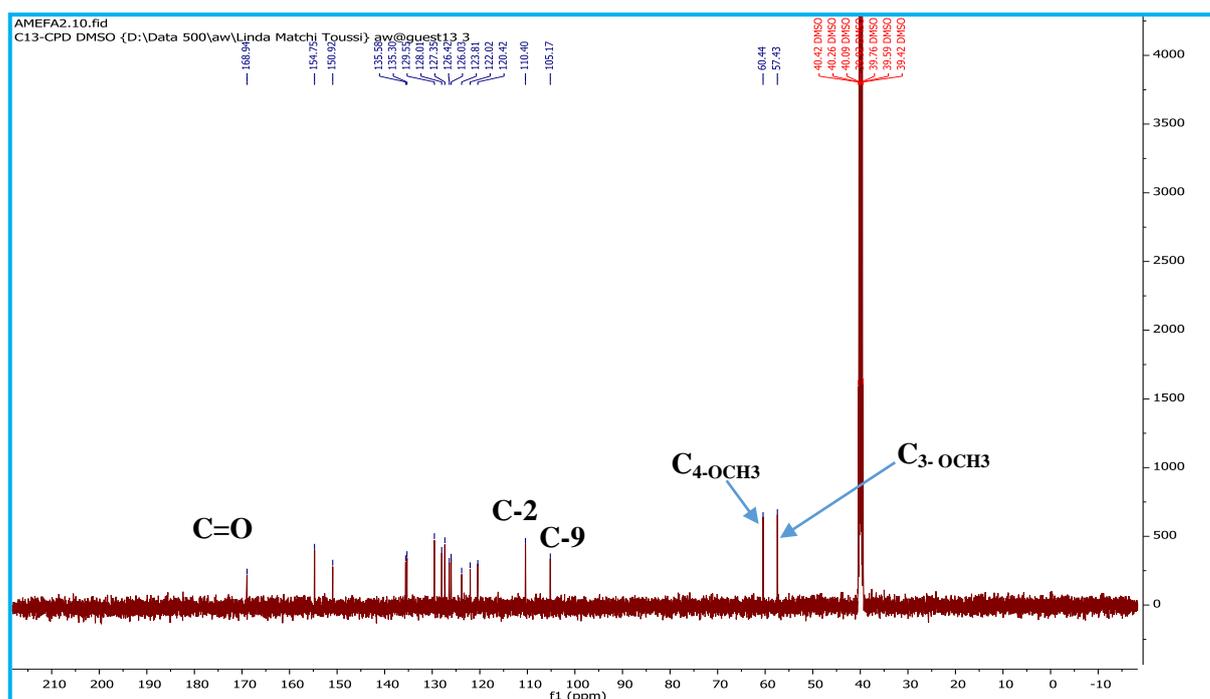
- D'un signal à  $\delta_{\text{H}}$  10,87 (s) qui serait celui du proton d'un amide.
- D'un groupe de protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  9,12 (H-5, m) ; 7,96 (H-8, dd,  $J = 7,7 ; 1,7$  Hz) et 7,57 (H-6 et H-7, m) attribuables à un système AMX.
- De deux autres protons aromatiques sortant sous forme de singulet à  $\delta_{\text{H}}$  7,86 (H-2, s) et 7,15 (H-9, s).
- De deux singulets intenses à  $\delta_{\text{H}}$  4,05 (H-3, (-O-CH<sub>3</sub>), s) et 4,03 (H-4, (-O-CH<sub>3</sub>), s) caractéristiques des groupements méthoxyles.



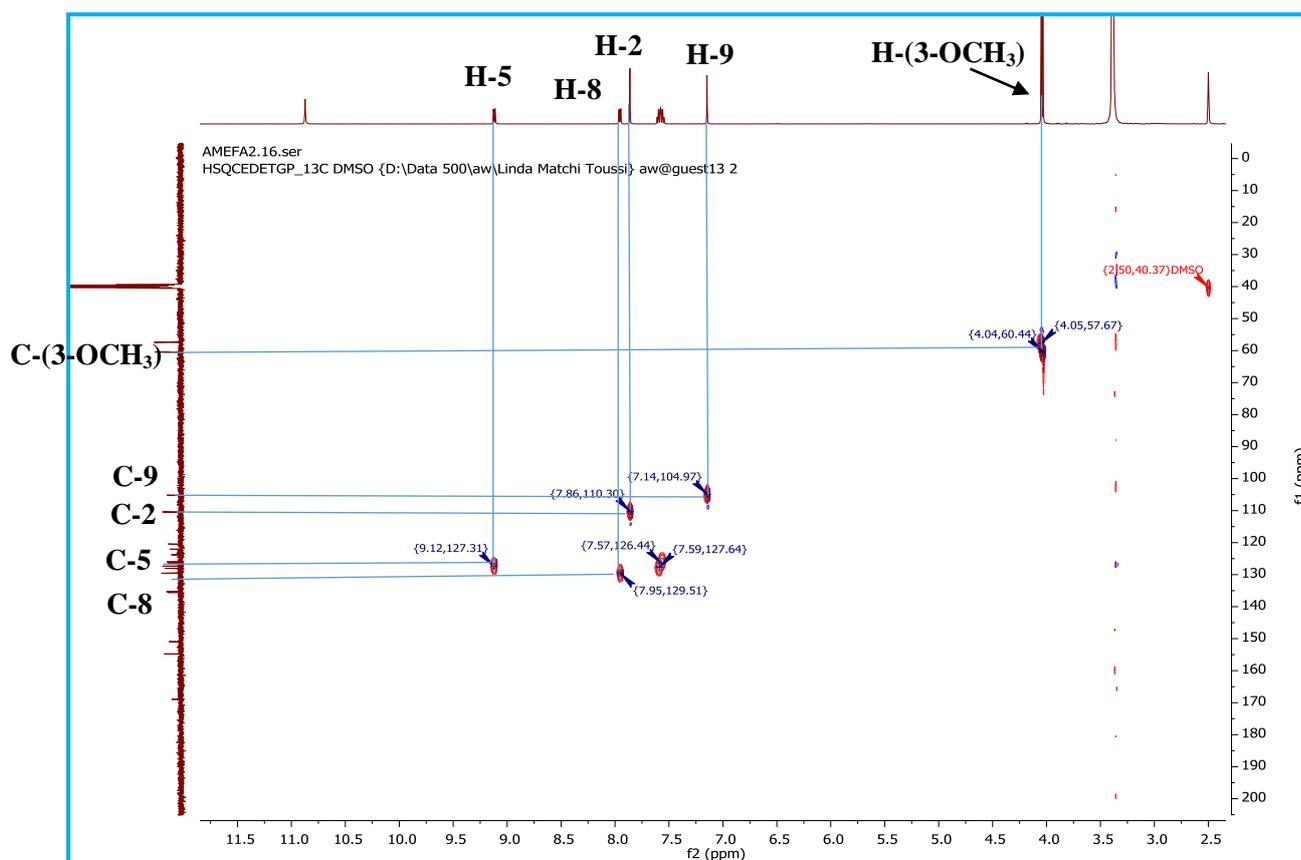
**Figure 17:** Spectre de RMN<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) d'AME3

Son spectre de RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) (Figure 18), en accord avec les taches de corrélations observées sur le spectre HSQC (Figure 19), met en évidence 17 atomes de carbones dont :

- Quatorze aromatiques, parmi lesquels deux carbones oxygénés à  $\delta_C$  154,7 (C-3) et 150,8 (C-4) et six carbones portant chacun un proton, à 110,4 (C-2), 128,0 (C-5), 126,0 (C-6), 127,3 (C-7), 129,5 (C-8), 105,1 (C-9)
- Deux méthoxyes à  $\delta_C$  60,4 (4-OCH<sub>3</sub>) et 57,4 (3-OCH<sub>3</sub>),
- Et un carbonyle à  $\delta_C$  168,9, confirmant ainsi la présence d'un groupe amide au sein d'AME3.



**Figure 18:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) d'AME3



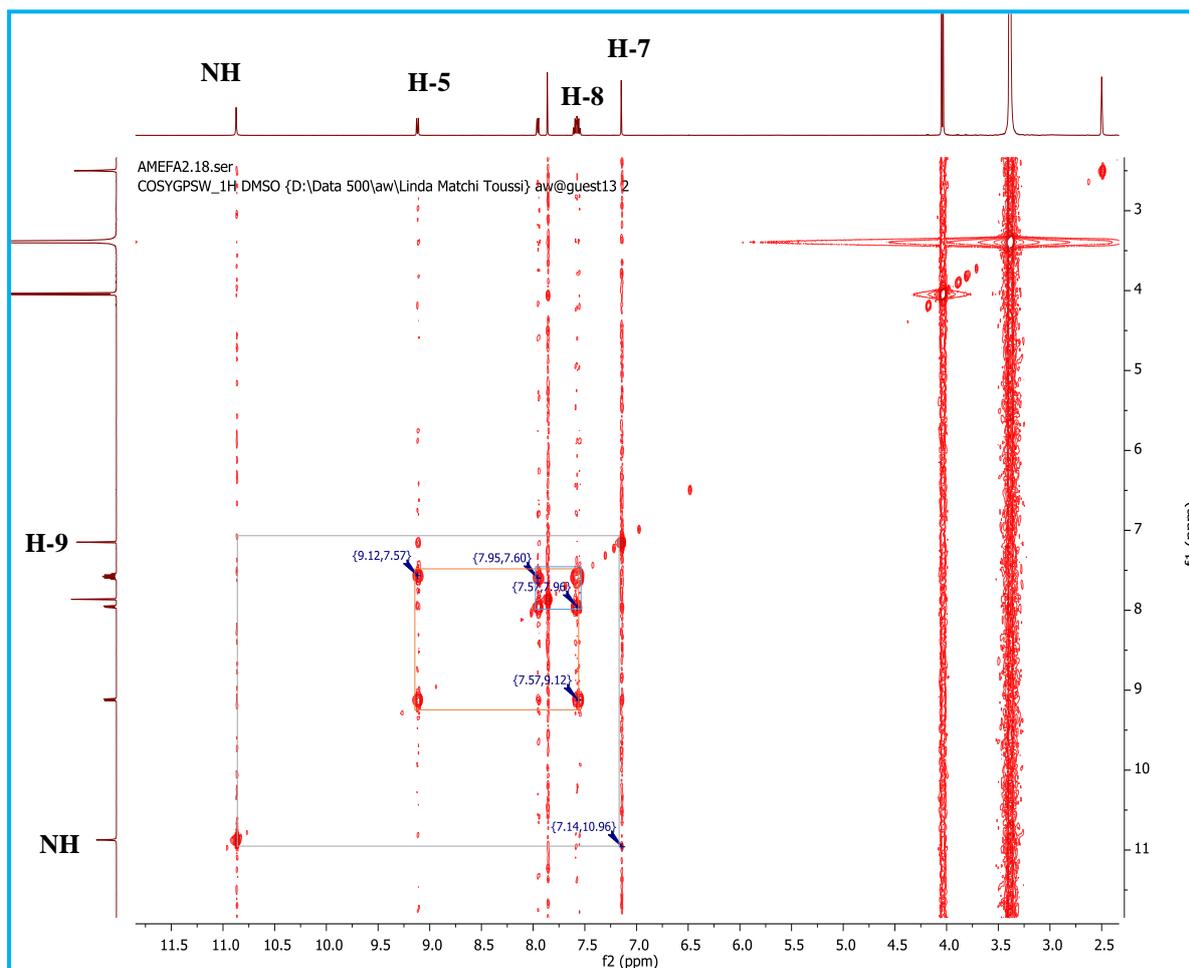
**Figure 19:** Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ ) d'AME3

Par ailleurs, son spectre COSY (Figure 20) met en évidence les couplages entre le proton à  $\delta_H$  7,57 (H-6 et H-7, m) et le proton à  $\delta_H$  9,12 (H-5, m) et entre le proton à  $\delta_H$  7,57 (H-6 et H-7, m) et le proton à  $\delta_H$  7,96 (H-8, dd,  $J = 7,7 ; 1,7$  Hz).

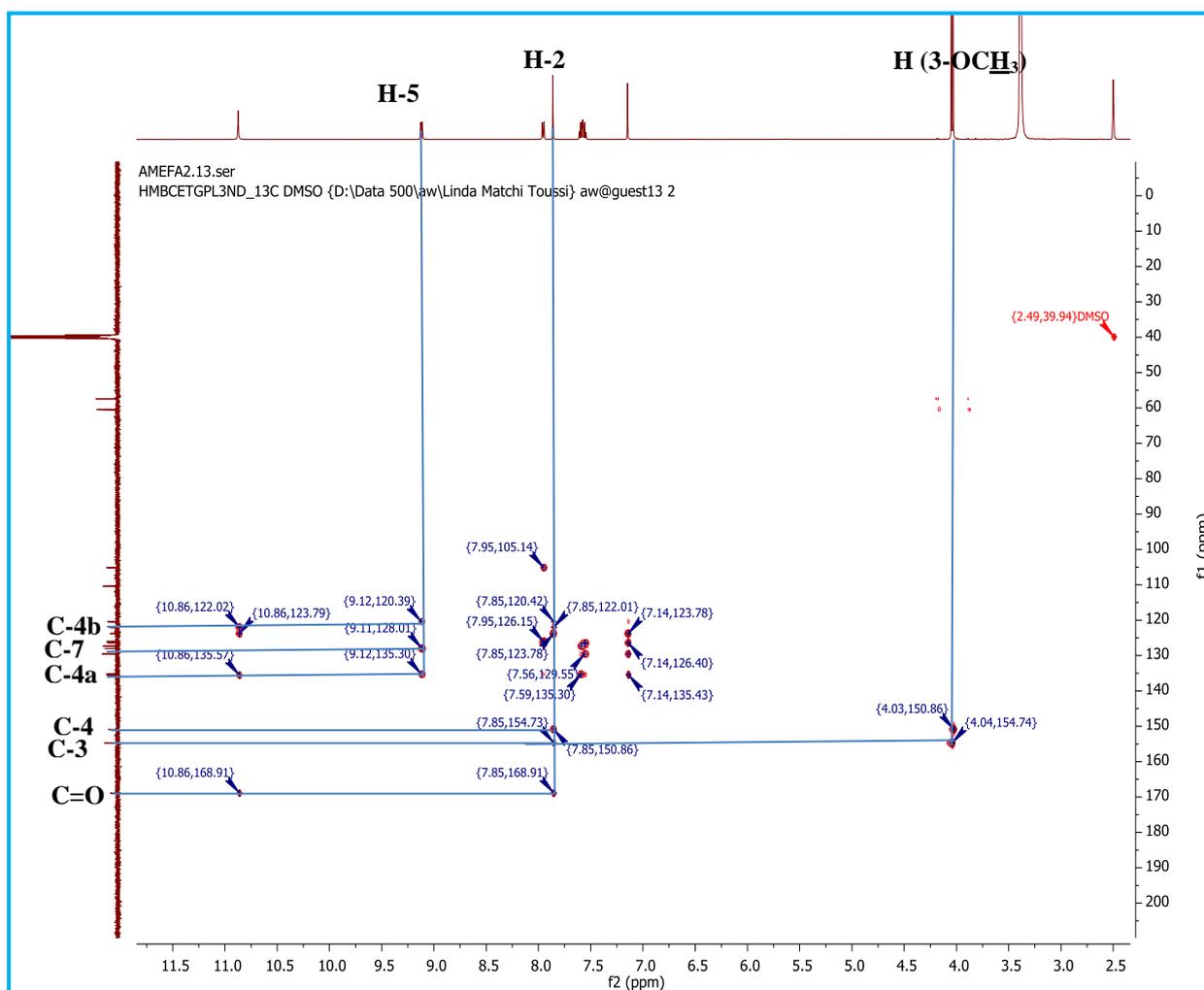
De plus, sur le spectre HMBC (Figure 21), on a observé des interactions (Schéma 5) entre :

- Le proton H-2 ( $\delta_H$  7,86) et les carbones C-3 ( $\delta_C$  154,7), C-4 ( $\delta_C$  150,8), C-10a ( $\delta_C$  123,8) et C=O ( $\delta_C$  168,9).
- Le proton H- 5 ( $\delta_H$  9,12) et les carbones C-4a ( $\delta_C$  135,6), C-4b ( $\delta_C$  120,4) et C-7( $\delta_C$  127,3).
- Les protons H-6 and H-7 ( $\delta_H$  7,57) et les carbones C-5 ( $\delta_C$  128,0), C-9 ( $\delta_C$  105,1), C-7 ( $\delta_C$  127,3) et C-8 ( $\delta_C$  129,5).
- Le proton H-8 ( $\delta_H$  7,96) et les carbones C-7 ( $\delta_C$  127,3) et C-9 ( $\delta_C$  105,1).
- Le proton H-9 et les carbones C-8 ( $\delta_C$  129,5), C-8a ( $\delta_C$  126,4), C-10 ( $\delta_C$  135,3) et C-10a ( $\delta_C$  123,8).
- Le proton de l'amide et les carbones C-1, C-10 et C-10a.

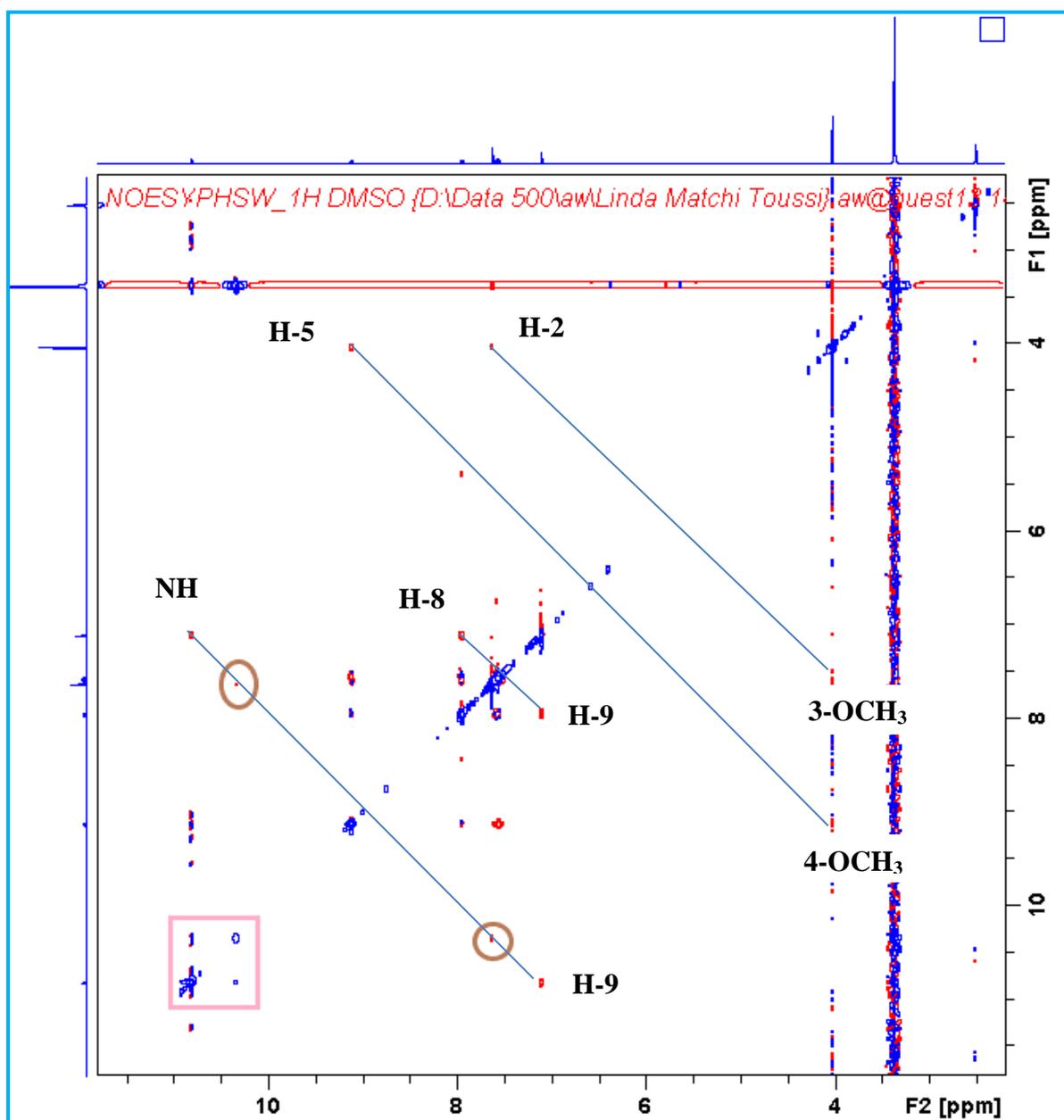
Son spectre NOESY (Figure 22), quant à lui, nous permet de fixer sans ambiguïté les groupements méthoxyles 3-OCH<sub>3</sub> ( $\delta_C$  57,4) et 4-OCH<sub>3</sub> ( $\delta_C$  60,4) sur les carbones C-3 ( $\delta_C$  154,7) et C-4 ( $\delta_C$  150,8) respectivement. En effet, on peut y observer une interaction dipolaire entre le proton aromatique H-5 ( $\delta_H$  9,12) et le méthoxyle 4-OCH<sub>3</sub>. Ceci est confirmé par la littérature montrant une affectation similaire dans d'autres squelettes de type 3, 4-diméthoxyphénanthrène lactame, qui a proposé que le déplacement chimique du C-3 soit légèrement haut par rapport à celui de C-4 en raison de la nature non planaire du groupe méthoxyle en C-4 (Talapatra *et al.*, 1988 ; Priestap, 1985).



**Figure 20** : Spectre COSY (DMSO- $d_6$ ) d'AME3

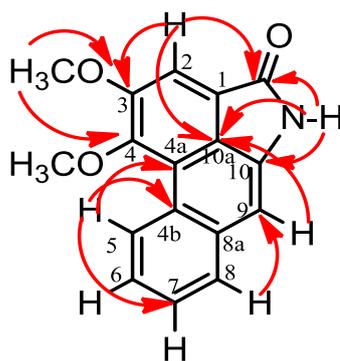


**Figure 21:** Spectre HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) d'AME3



**Figure 22 :** Spectre NOESY (DMSO-*d*<sub>6</sub>) d'AME3

Toutes ces données spectrales comparées à celles de la littérature nous ont amenés à dire que le composé AME3 est l'aristolactam BII (Lactame d'acide 10-amino-3,4-diméthoxyphénanthrène-1-carboxylique) (41) déjà isolé des écorces du tronc de *Goniothalamus velutinus* (Annonaceae) (Voir Tableau X).



**Schéma 5 :** Quelques corrélations HMBC d'AME3

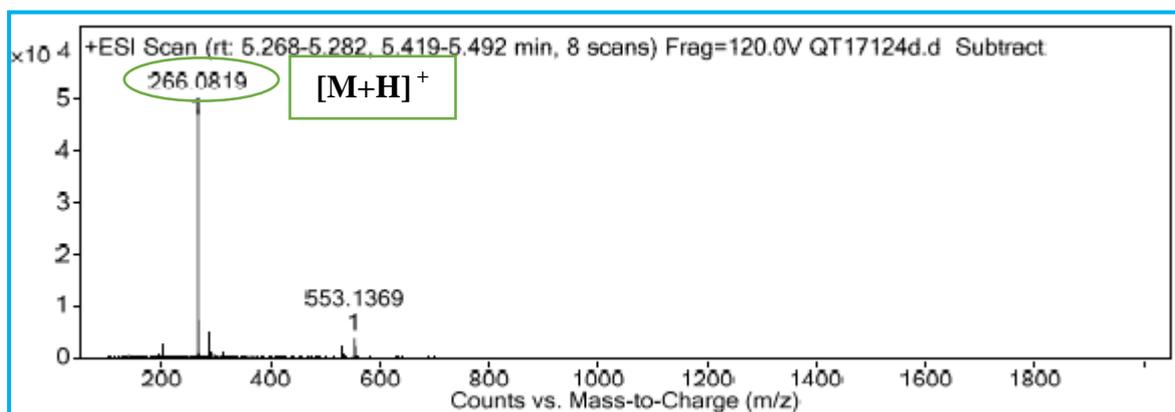
**Tableau X:** Données de RMN d'AME3 [ $^{13}\text{C}$  (125 MHz) et  $^1\text{H}$  (500 MHz) dans le DMSO- $d_6$ ] comparées à celles de l'aristolactam BII.

Position du carbone	AME3 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz RMN $^1\text{H}$ , 125 MHz RMN $^{13}\text{C}$ )		Aristolactam BII (Iqbal. E et <i>al.</i> , 2017) (DMSO- $d_6$ , 600 MHz RMN $^1\text{H}$ , 150 MHz RMN $^{13}\text{C}$ )	
	$^1\text{H}$ (m, $J$ en Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (m, $J$ en Hz)	$^{13}\text{C}$
1	-	121,8	-	121,7
2	7,86 (s, 1H)	110,4	7,84 (s, 1H)	110,8
3	-	154,7	-	155,3
4	-	150,8	-	150,7
4a	-	135,6	-	135,2
4b	-	120,4	-	120,2
5	9,12 (m, 1H)	128,0	9,11 (dd, 1,1 ; 5,2 ; 7,8, 1H)	127,7
6	7,57 (m, 1H)	126,0	7,55 (dddd, 1,2 ; 7,2 ; 6 ; 8,4, 1H)	125,7
7	7,57 (m, 1H)	127,3	7,55 (dddd, 1,2 ; 7,2 ; 6 ; 8,4, 1H)	127,1
8	7,96 (dd, $J=7,7 ; 1,7$ Hz, 1H)	129,5	7,92 (dd, 0,6 ; 8,4 ; 7,8, 1H)	129,3
8a	-	126,4	-	126,2
9	7,15 (s, 1H)	105,1	7,12 (s, 1H)	104,9
10	-	135,3	-	135,1
10a	-	123,8	-	123,5
C=O	-	168,9	-	168,6
NH	10,87 (s, 1H)	-	10,81 (s, 1H)	-
3-OCH <sub>3</sub>	4,05 (s, 3H)	57,3	4,03 (s, 3H)	57,0
4-OCH <sub>3</sub>	4,03 (s, 3H)	60,3	4,02 (s, 3H)	60,1

### II.2.1.3- Identification d'AME5 ou AMR9

Le composé AME5 précipite sous forme de poudre jaune orange dans le mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle (3 : 7). Il fond entre 271-272 °C et est soluble dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Il réagit positivement aux tests au chlorure ferrique et de Dragendorff indiquant sa double nature phénolique et alcaloïdique.

Son spectre de masse ESI en mode positif à haute résolution (Figure 23) montre le pic de l'ion pseudomoléculaire [M+H]<sup>+</sup> à  $m/z = 266,0819$  correspondant à la formule brute C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>, renfermant 12 insaturations (calc. 266,0817 pour C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>). A partir de ce qui précède, AME5 possède les mêmes éléments atomiques qu'AME3, à la différence qu'AME5 a 14 uma de moins, ce qui présagerait qu'un méthyle (CH<sub>3</sub>) dans AME3 a été remplacé par un hydrogène (H) pour donner AME5.



**Figure 23:** Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AME5

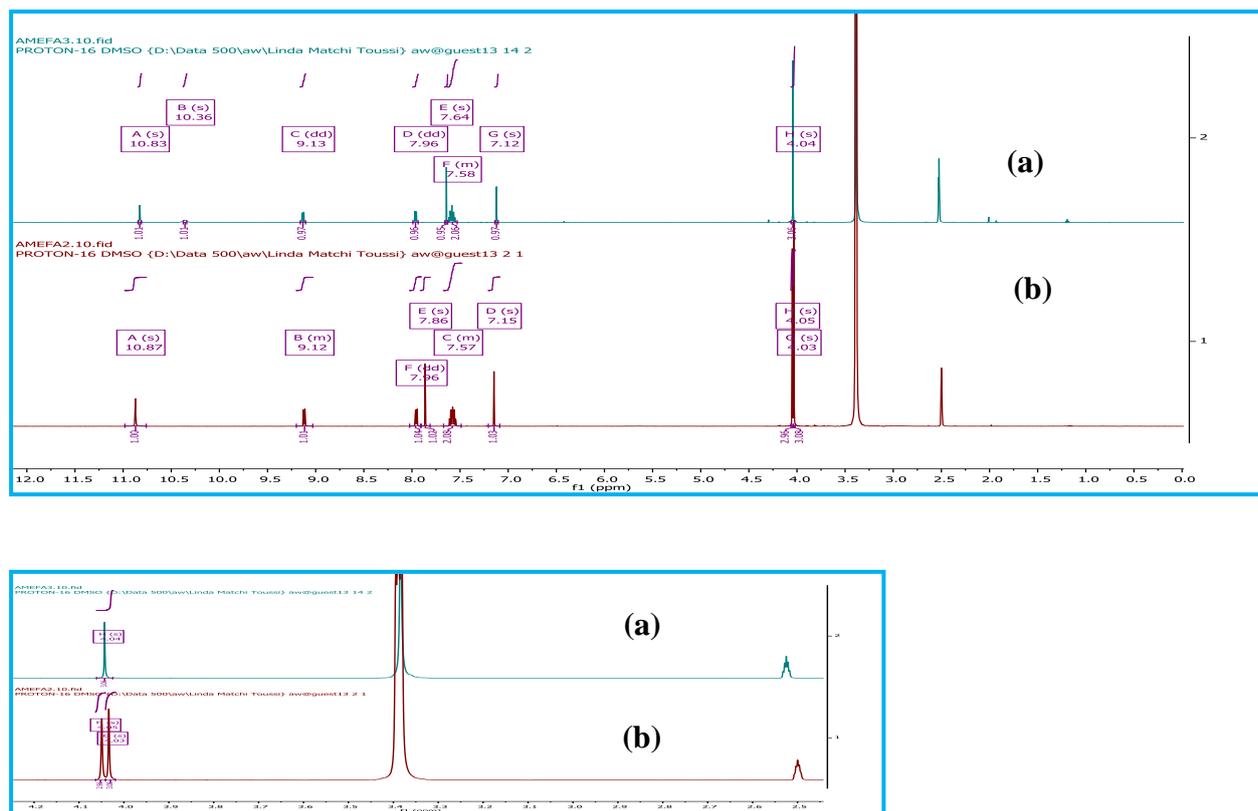
L'analyse des données physiques et spectroscopiques d'AME5 nous a permis d'attribuer à ce composé la structure (42)



(42)

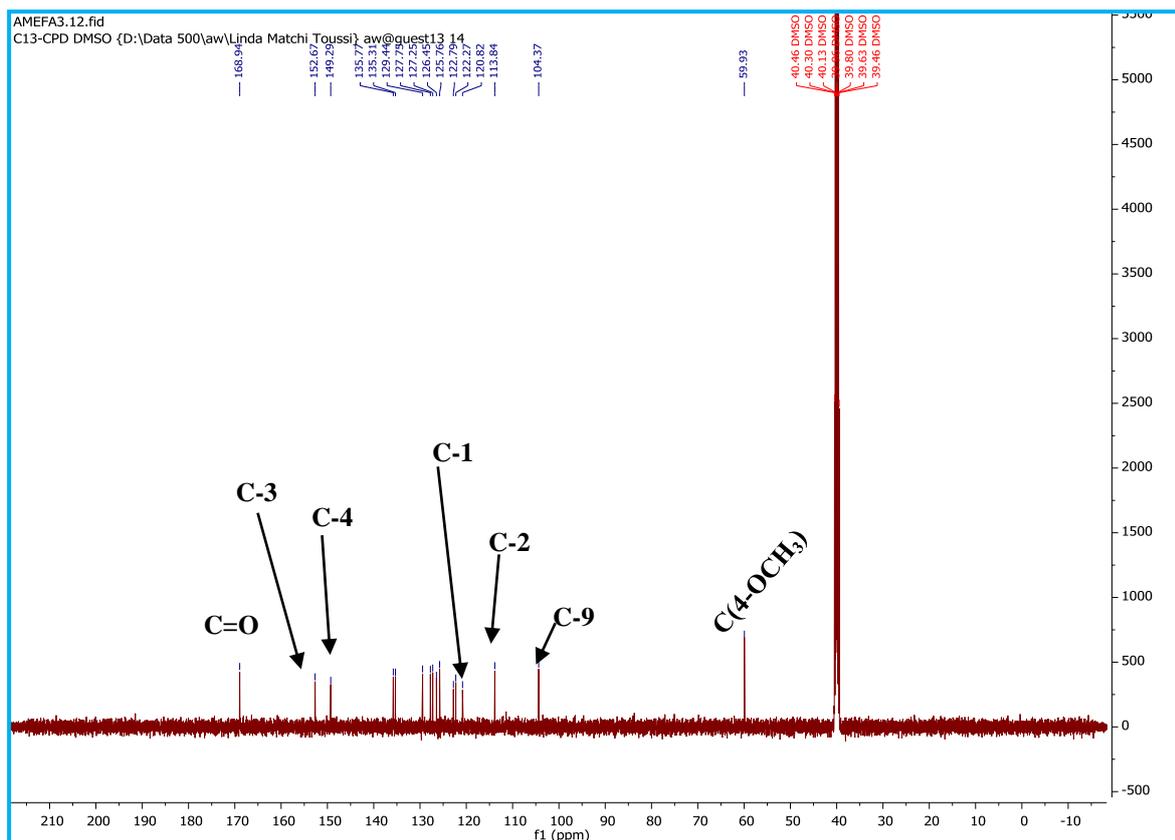
En effet, l'observation et l'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure 24) d'AME5 mettent en évidence une similitude entre son profil spectral et celui d'AME3. L'étude comparée des deux spectres nous fait savoir que, contrairement au spectre AME3, on observe sur celui de AME5 l'absence d'un des deux groupements méthoxyles et l'apparition d'un signal à □<sub>H</sub>





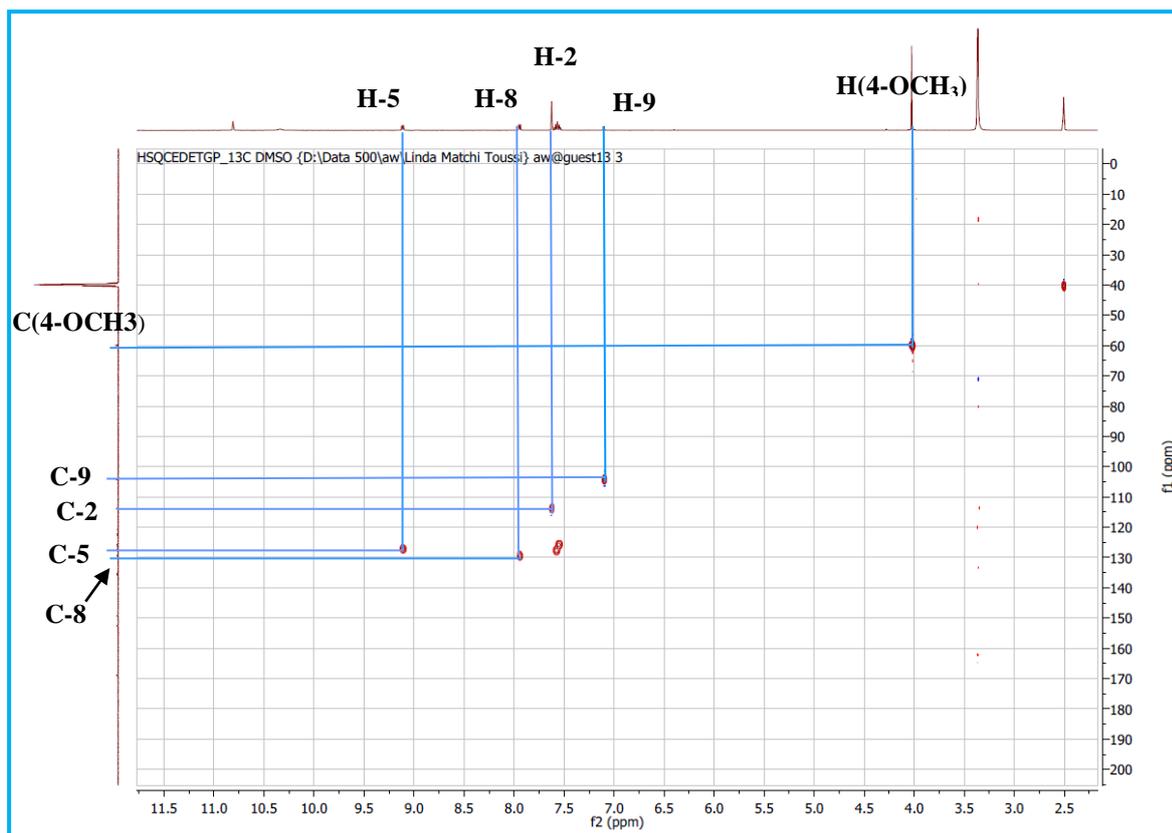
**Figure 25 :** Spectres comparés de RMN  $^1\text{H}$  d'AME5 (a) et d'AME3 (b), (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

De même, son spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 26) est semblable à celui d'AME3 et montre un ensemble de seize atomes de carbones au lieu de dix-sept pour AME3. Cette différence confirme par la perte d'un groupement méthoxyle qui aurait été remplacé par un -OH dans AME5.

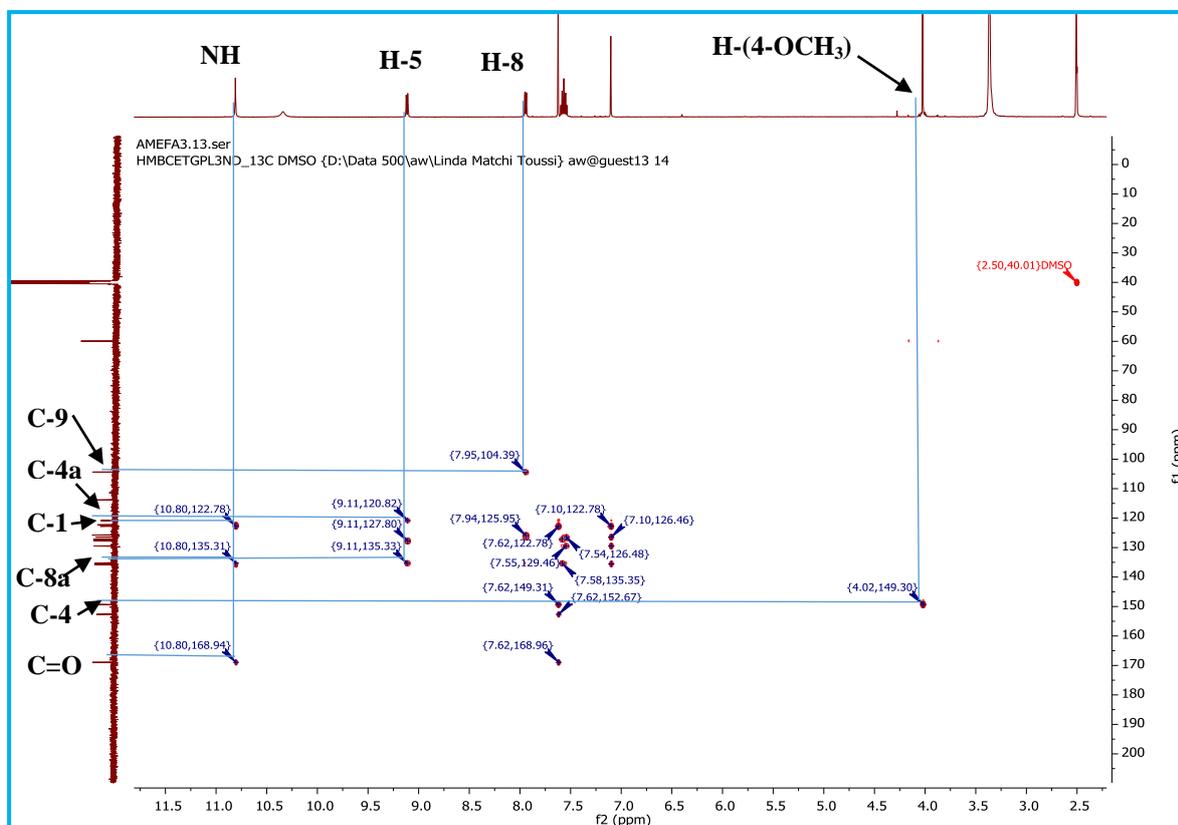


**Figure 26 :** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) d'AME5

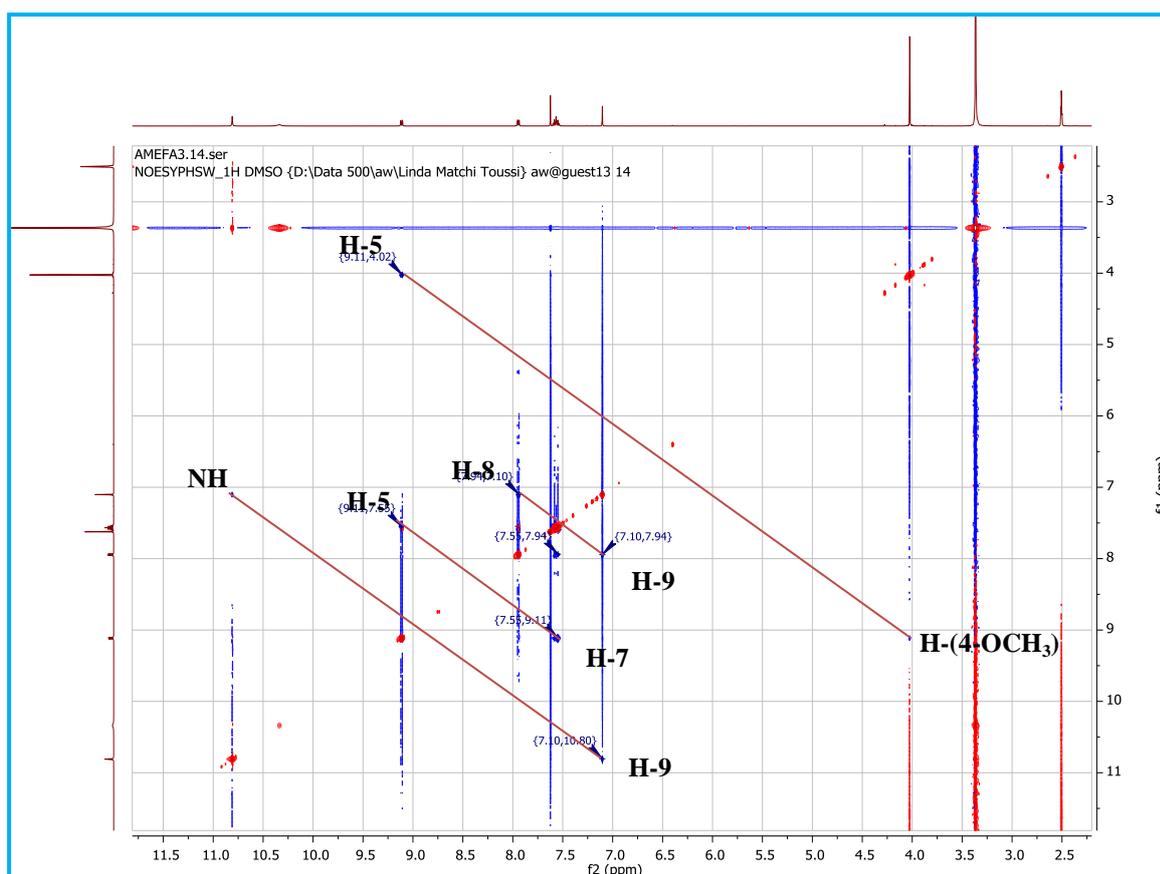
Le groupe hydroxyle (-OH) a été fixé sur le carbone C-3 sur la base du déplacement chimique du carbone en C-2 qui, en présence du groupe -OH, résonne dans les champs forts à  $\delta_{\text{C}}$  113,8 en raison de son effet de blindage. De plus, grâce à l'exploitation conjointe des spectres HSQC (Figure 27) et HMBC (Figure 28, Schéma 6), des corrélations ont été observées entre le C-4a et le proton H-5 d'une part et entre le carbone C-4 et le proton de 4-OCH<sub>3</sub> d'autre part. La fixation d'un groupe méthoxyle en C-4 était également en accord avec le spectre NOESY (Figure 29) qui montre une corrélation entre les protons OCH<sub>3</sub> et H-5.



**Figure 27** : Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ ) d'AME5

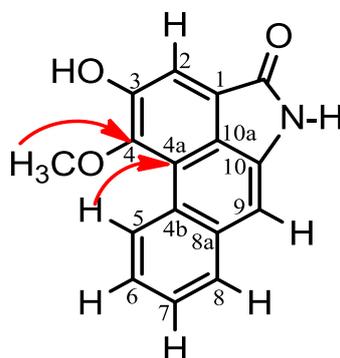


**Figure 28** : Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ ) d'AME5



**Figure 29** : Spectre NOESY (DMSO- $d_6$ ) d'AME5

De toutes les informations qui précèdent, le composé AME5 a été identifié comme étant l'Aristolactam AII (lactame d'acide 10-amino-3-hydroxy-4-méthoxyphénanthrène-1-carboxylique) (**42**), déjà isolé des écorces du tronc de *Goniothalamus velutinus* (Annonaceae) (Iqbal *et al.*, 2017) (Voir Tableau XI).



**Schéma 6**: Quelques corrélations HMBC d'AME5

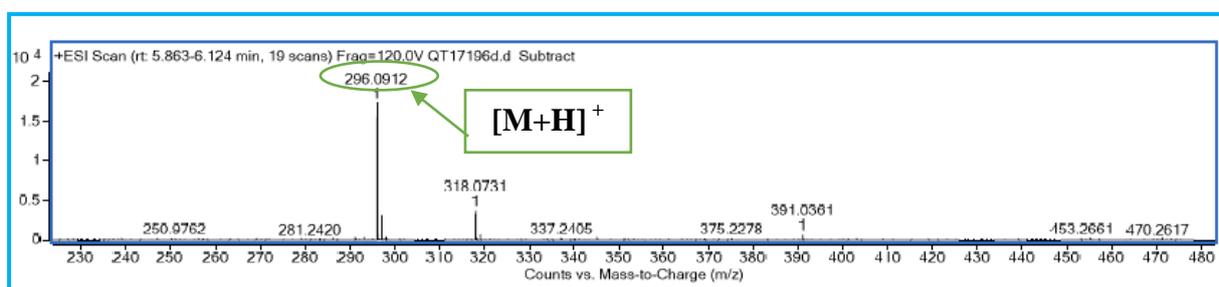
**Tableau XI : Données de RMN d'AME5 [<sup>13</sup>C (125 MHz) et <sup>1</sup>H (500 MHz) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>] comparées à celles de l'aristolactam AII.**

Position du carbone	AME5 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz RMN <sup>1</sup> H, 125 MHz RMN <sup>13</sup> C)		Aristolactam AII (Iqbal. E et al., 2017) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz RMN <sup>1</sup> H, 150 MHz <sup>13</sup> C)	
	<sup>1</sup> H (m, <i>J</i> en Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (m, <i>J</i> en Hz)	<sup>13</sup> C
1	-	122,3	-	121,8
2	7,62 (s, 1H)	113,8	7,59 (s, 1H)	113,4
3	-	152,6	-	155,2
4	-	149,3	-	148,8
4a	-	120,8	-	121,8
4b	-	126,4	-	126,0
5	9,11 (dd, <i>J</i> = 7,9 ; 1,6 Hz, 1H)	127,2	9,09 (dd , 2 ; 7,8, 1H)	126,8
6	7,57 (m,1H)	127,7	7,55 (dddd, 1,2 ; 5,8 ; 7,2 ; 6,3 ; 2,94 ; 6,9, 1H)	127,3
7	7,57 (m,1H)	125,7	7,55 (dddd, 1,2 ; 5,8 ; 7,2 ; 6,3 ; 2,94 ; 6,9, 1H)	125,3
8	7,94 (dd, <i>J</i> = 7,5 ; 1,8 Hz, 1H)	129,4	7,92 (dd , 1,2 ; 7,2 ; 8,4, 1H)	129,0
8a	-	135,8	-	135,3
9	7,10 (s,1H)	104,4	7,08 (s, 1H)	103,9
10	-	135,3	-	134,8
10a	-	122,8	-	122,3
C=O	-	168,9	-	168,5
NH	10,81 (s,1H)	-	10,77 (s, 1H)	-
4-OCH <sub>3</sub>	4,02 (s, 3H)	60,3	4,01 (s, 3H)	59,5
3-OH	10,34 (s, 1H)		10,30 (s, 1H)	

### II.2.1.4- Identification d'AMR7

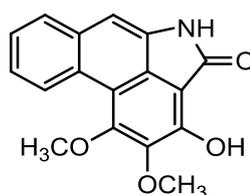
Le composé AMR7 précipite sous forme de poudre jaune pâle. Obtenue par HPLC, il fond entre 222-224 °C et est soluble dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Il réagit positivement aux tests au chlorure ferrique et de Dragendorff indiquant sa double nature phénolique et alcaloïdique.

Son spectre de masse ESI en mode positif à haute résolution (Figure 30) montre le pic de l'ion pseudomoléculaire [M+H]<sup>+</sup> à  $m/z = 296,0912$  correspondant à la formule brute C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>, renfermant 12 insaturations (calc. 296,0839 pour C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>). En comparaison à AME3, AMR7 possède 16 uma de plus, indiquant la présence d'un atome d'oxygène supplémentaire.



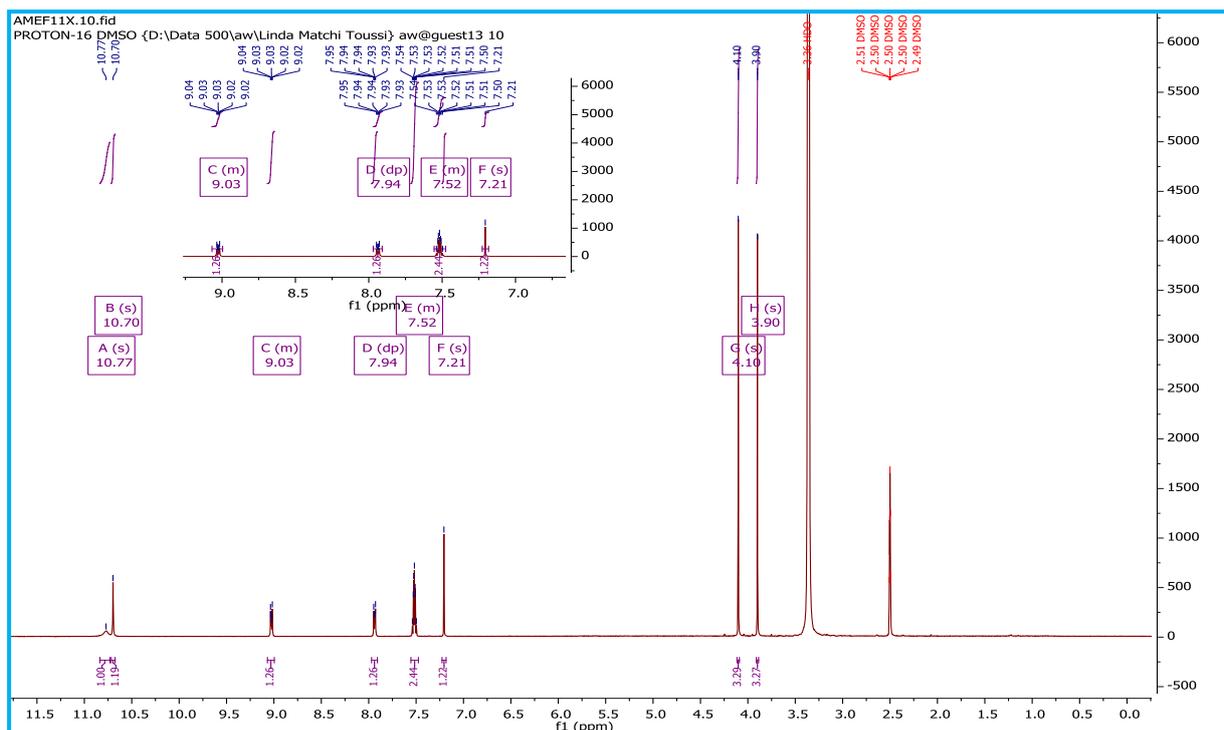
**Figure 30** : Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AMR7

L'étude des données physiques et spectroscopiques d'AMR7 nous a permis d'attribuer à ce composé la structure (43)

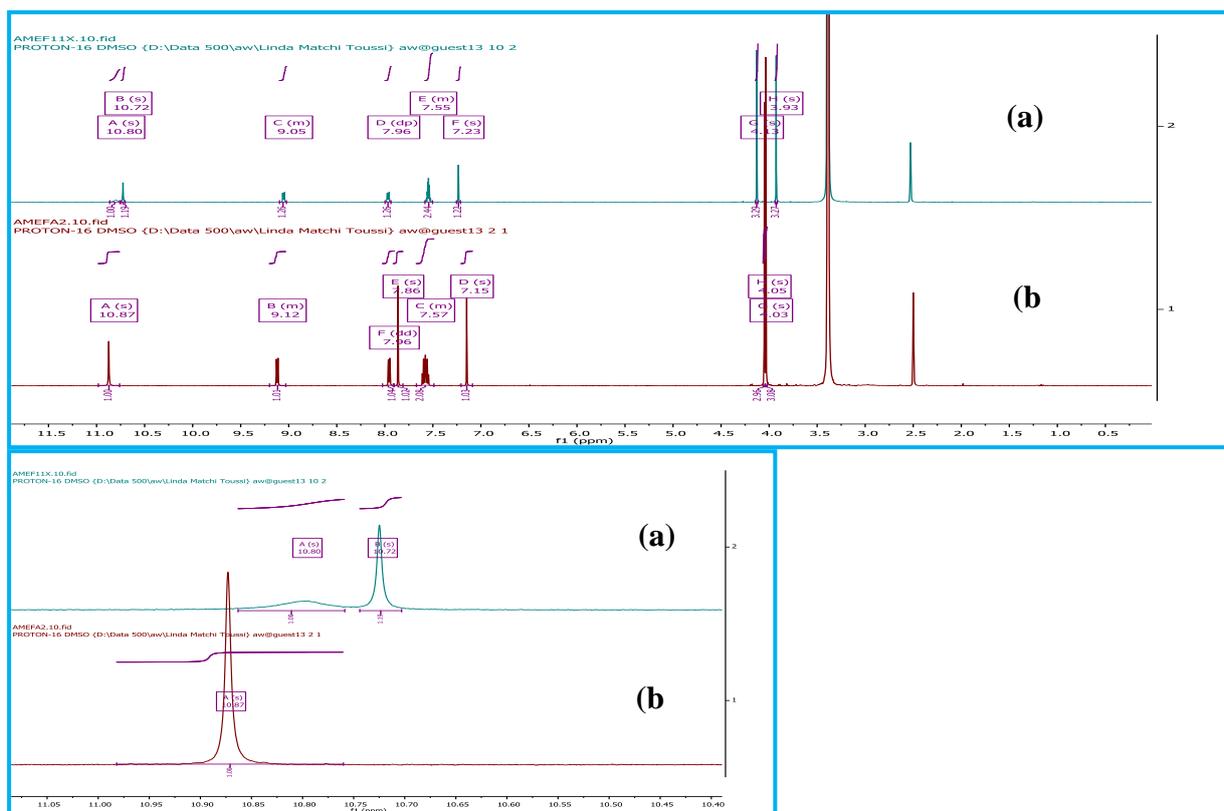


(43)

En effet, l'observation et l'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure 31) d'AMR7 mettent en évidence une ressemblance entre son profil spectral et celui d'AME3. Bien que son spectre intègre pour treize atomes comme celui de AME3, on y observe cependant l'apparition d'un signal à  $\delta_H$  10,77 attribuable à un proton d'un OH phénolique (Figure 32). Par ailleurs, le déblindage d'un des deux méthoxy à  $\delta_H$  3,90 (3-OCH<sub>3</sub>) pourrait s'expliquer par l'effet mésomère donneur d'un oxygène vicinal additionnel qui serait l'hydroxyle évoqué plus haut.



**Figure 31 :** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) d'AMR7

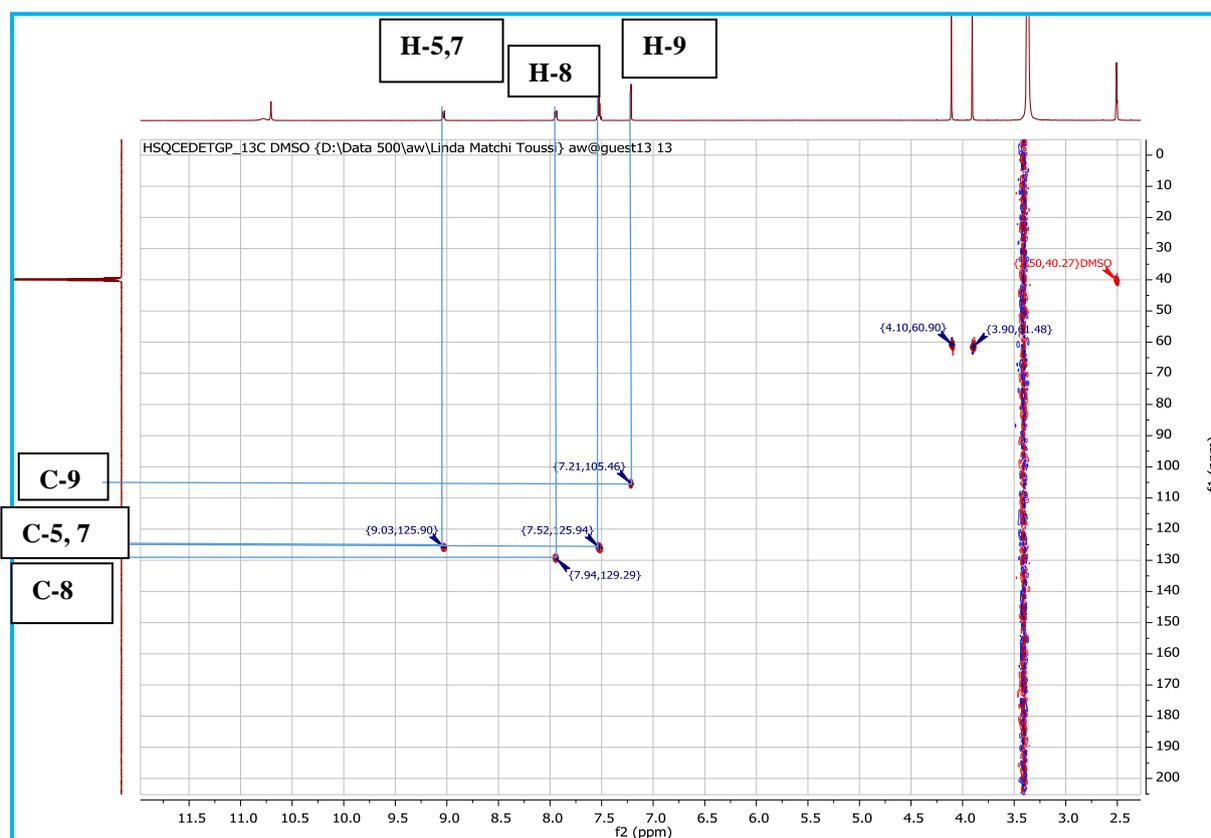


**Figure 32 :** Spectres comparés de RMN  $^1\text{H}$  d'AMR7 (a) et d'AME3 (b), respectivement (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

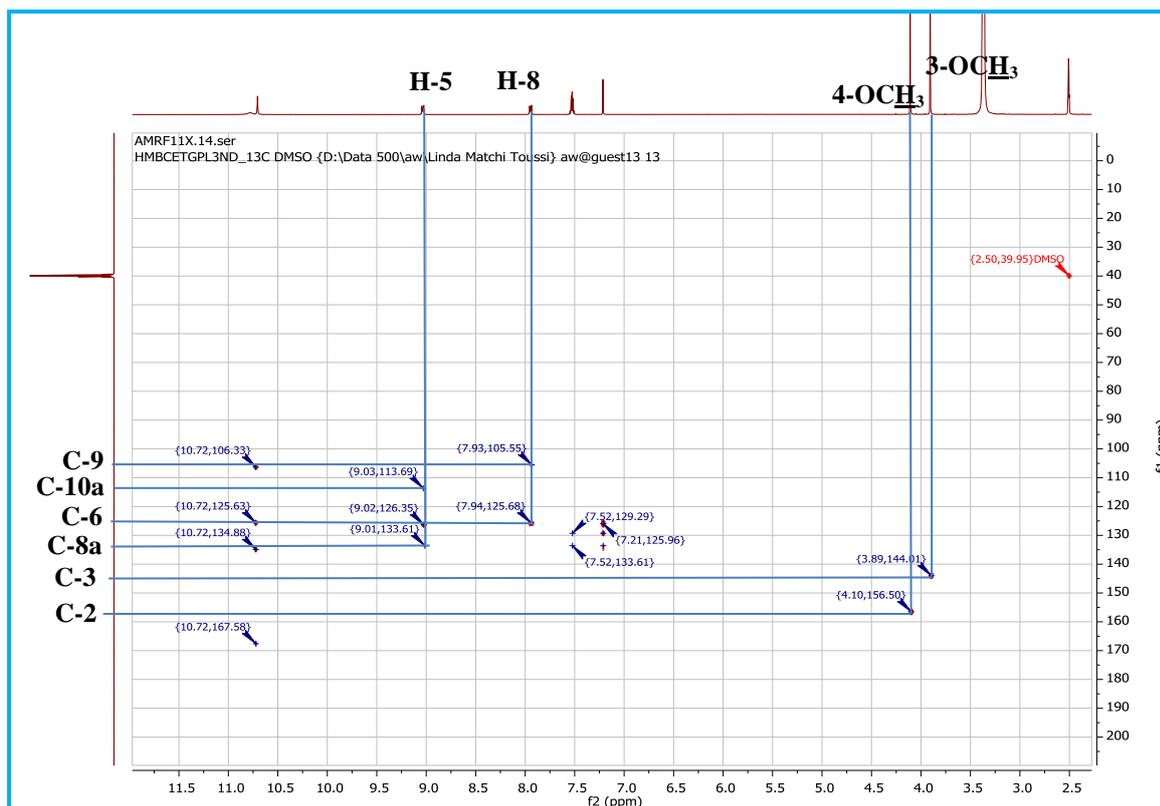
De même, son spectre RMN  $^{13}\text{C}$  a la même allure que celle d'AME3 et fait ressortir un ensemble de dix-sept atomes de carbone dont :

- Quatorze aromatiques, parmi lesquels trois carbones oxygénés à  $\delta_{\text{C}} 156,4$  (C-2), 144,0 (C-3) et 151,3 (C-4) et cinq carbones portant chacun un proton, à 125,9 (C-5), 125,9 (C-6), 125,9 (C-7), 129,3 (C-8) et 105,5 (C-9)
- Deux méthoxyles à  $\delta_{\text{C}} 60,3$  (4-OCH<sub>3</sub>) et 61,5 (3-OCH<sub>3</sub>),
- Et un carbonyle à  $\delta_{\text{C}} 167,6$ .

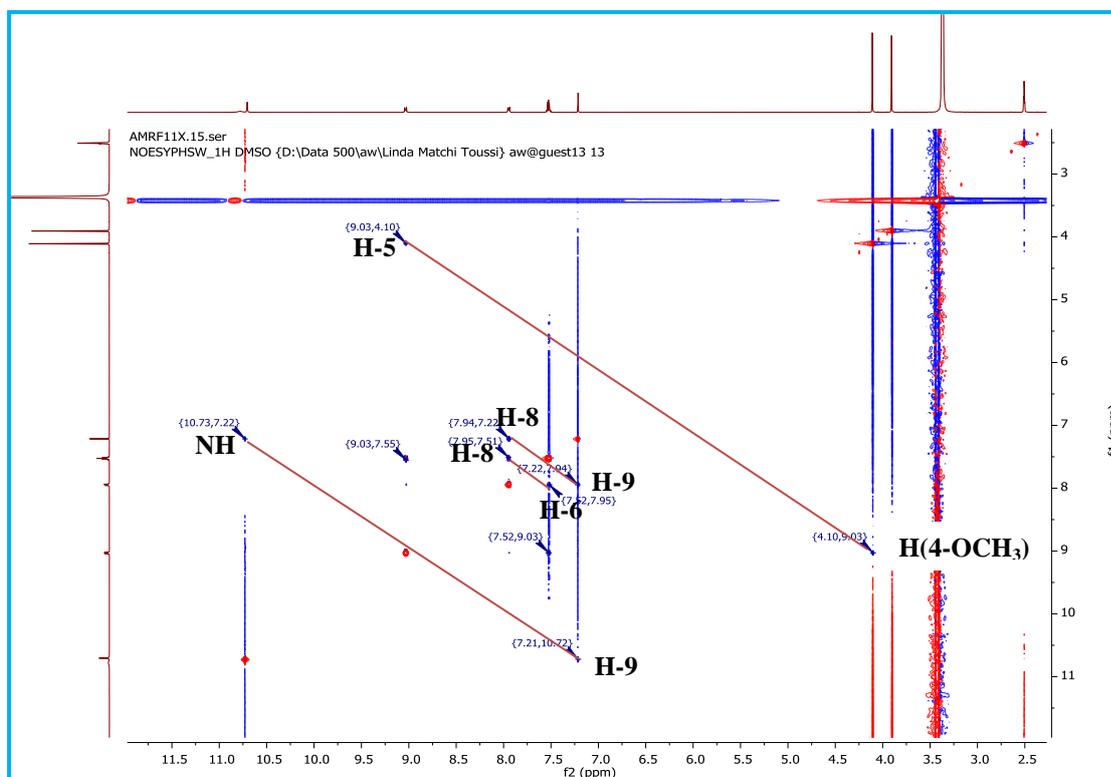
De plus, l'exploitation conjointe des spectres HSQC (Figure 33), HMBC (Figure 34, Schéma 7) et NOESY (Figure 35) nous a permis de fixer les substituants du noyau phénantrénique d'AMR7. Notamment, l'emplacement du groupe méthoxyle en C-4 a été corroboré par le spectre qui montre une corrélation entre les protons 4-OCH<sub>3</sub> et H-5.



**Figure 33** : Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ ) d'AMR7

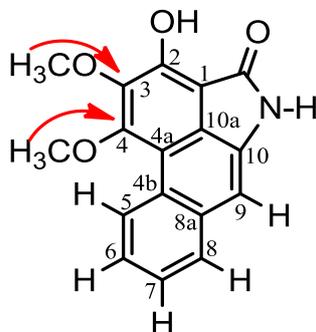


**Figure 34 :** Spectre HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) d'AMR7



**Figure 35 :** Spectre NOESY (DMSO-*d*<sub>6</sub>) d'AMR7

Toutes ces informations comparées à celles de la littérature ont permis d'attribuer à AMR7 la structure (43) qui est celle du Piperolactam D (Lactame d'acide 10-amino-2-hydroxy-3,4-diméthoxyphénanthrène-1-carboxylique) déjà isolée des écorces du tronc de *Goniothalamus velutinus* (Piperaceae) (Desai *et al.*, 1990) (Voir Tableau XII).



**Schéma 7 :** Quelques corrélations HMBC d'AMR7

**Tableau XII :** Données de RMN d'AMR7 [ $^{13}\text{C}$  (125 MHz) et  $^1\text{H}$  (500 MHz) dans le  $\text{DMSO}-d_6$ ] comparées à celles du piperolactam D.

Position du carbone	AMR7 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz RMN $^1\text{H}$ , 125 MHz RMN $^{13}\text{C}$ )		Piperolactam D (Desai <i>et al.</i> , 1990) ( $\text{DMSO}-d_6$ , 600 MHz RMN $^1\text{H}$ ) ; (Ee <i>et al.</i> , 2008) (D-acétone, 100MHz RMN $^{13}\text{C}$ )	
	$^1\text{H}$ (m, J en Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (m, J en Hz)	$^{13}\text{C}$
1	-	106,3	-	106,37
2	-	156,4	-	154,67
3	-	144,0	-	140,04
4	-	151,3	-	153,75
4a	-	126,3	-	127,26
4b	-	126,0	-	127,64
5	9,03 (m, 1H)	125,9	9,26 (m,1H)	127,83
6	7,52 (m,1H)	125,9	7,53 (m,1H)	126,71
7	7,52 (m,1H)	125,9	7,53 (m,1H)	125,69
8	7,94 (dd, J = 8,8, 2,8 Hz, 1H)	129,3	7,95 (m,1H)	129,21
8a	-	133,6	-	134,24
9	7,21 (s,1H)	105,5	7,23 (s,1H)	105,84
10	-	134,9	-	135,52
10a	-	113,7	-	112,23
C=O	-	167,6	-	167,53
NH	10,70 (s,1H)	-	10,86 (s,1H)	-
4-OCH <sub>3</sub>	4,10 (s, 1H)	60,3	4,40 (s,1H)	62,90
3-OCH <sub>3</sub>	3,90 (s, 1H)	61,5	3,85 (s,1H)	61,89

2-OH	10,77 (s, 1H)	-	10,78 (s, 1H)	
------	---------------	---	---------------	--

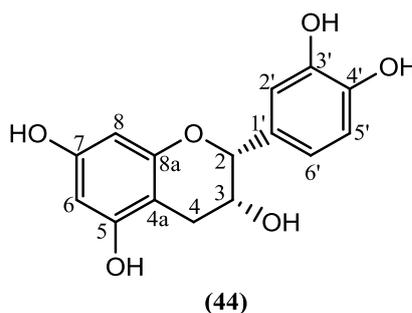
## II.2.2- Les flavonoïdes

### II.2.2.1- Identification d'AME6

AME6 a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane-acétate (1:1). Il est soluble dans le DMSO et fond entre 241-242 °C. Il réagit positivement aux tests au chlorure ferrique et de SHINODA, caractéristiques des composés phénolique et flavonoïdique, respectivement.

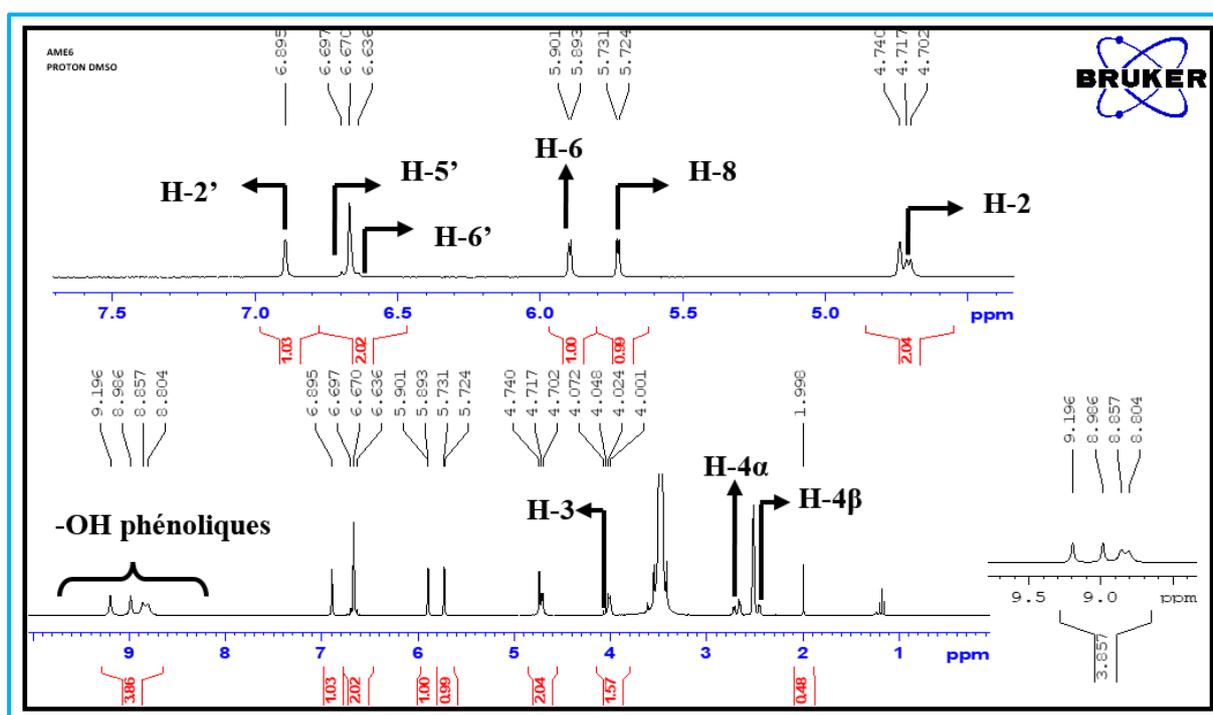
Son spectre de masse ESI en mode positif montre le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$ , à  $m/z = 291,1$ . La combinaison de ces données à celles de ses spectres de RMN 1D et 2D a permis de lui attribuer la formule brute  $C_{15}H_{15}O_6$  renfermant 9 degrés d'insaturation.

L'interprétation des données physiques et spectroscopiques nous a permis d'attribuer à ce composé la structure (44).



En effet, le spectre RMN  $^1H$  de AME6 (Figure 36) fait ressortir les signaux de :

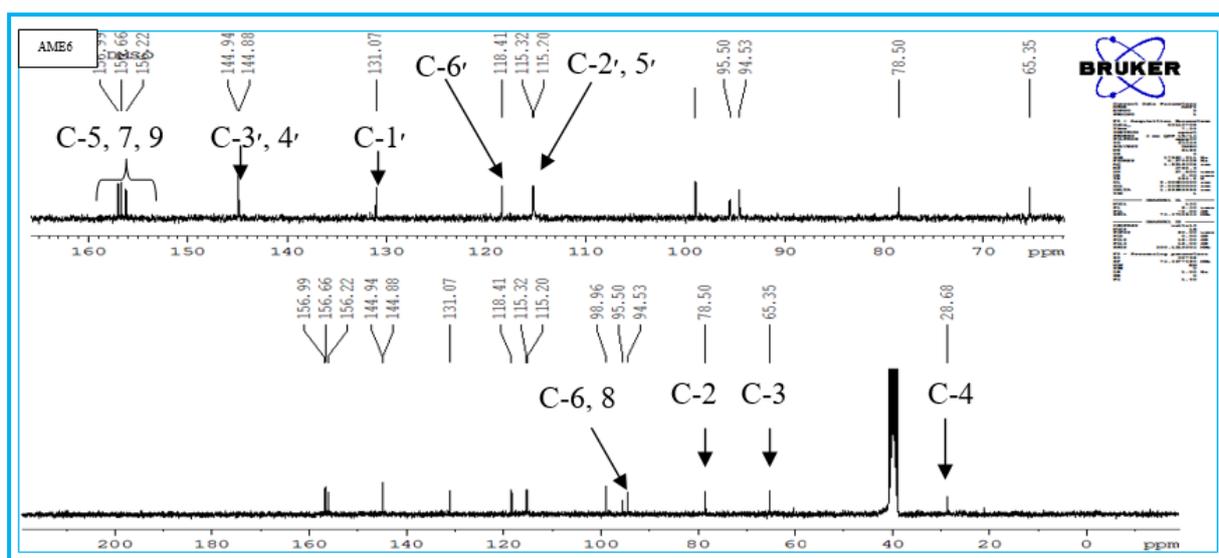
- Deux doublets de deux protons aromatiques *mé*ta-couplés à  $\delta_H$  5,90 (1H, d,  $J = 2,1$  Hz, H-6) et 5,73 (1H, d,  $J = 2,1$  Hz, H-8).
- Des protons aromatiques d'un système 1,3,4-trisubstitué à  $\delta_H$  6,63 (1H, dd,  $J = 8,2$  et 1,5 Hz, H-6'), 6,69 (1H, d,  $J = 8,2$  Hz, H-5'), et 6,89 (1H, sl,  $J = 1,5$  Hz, H-2').
- Deux doublets larges d'un proton chacun à  $\delta_H$  2,70 (1H, dd,  $J = 15,9$  et 5,4 Hz, H-4 $\alpha$ ) et 2,48 (1H, dd,  $J = 15,9$  et 8,4 Hz, H-4 $\beta$ ) attribuables à deux protons diastéréotopiques d'un groupement méthylène.
- Deux oxyméthines à  $\delta_H$  4,04 (1H, m, H-3) et 4,71 (1H, dl,  $J = 6,9$  Hz, H-2).
- Quatre singulets à  $\delta_H$  8,80 ; 8,86 ; 8,99 et 9,20, attribuables à des hydroxyles phénoliques.



**Figure 36 :** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  d'AME6 ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz)

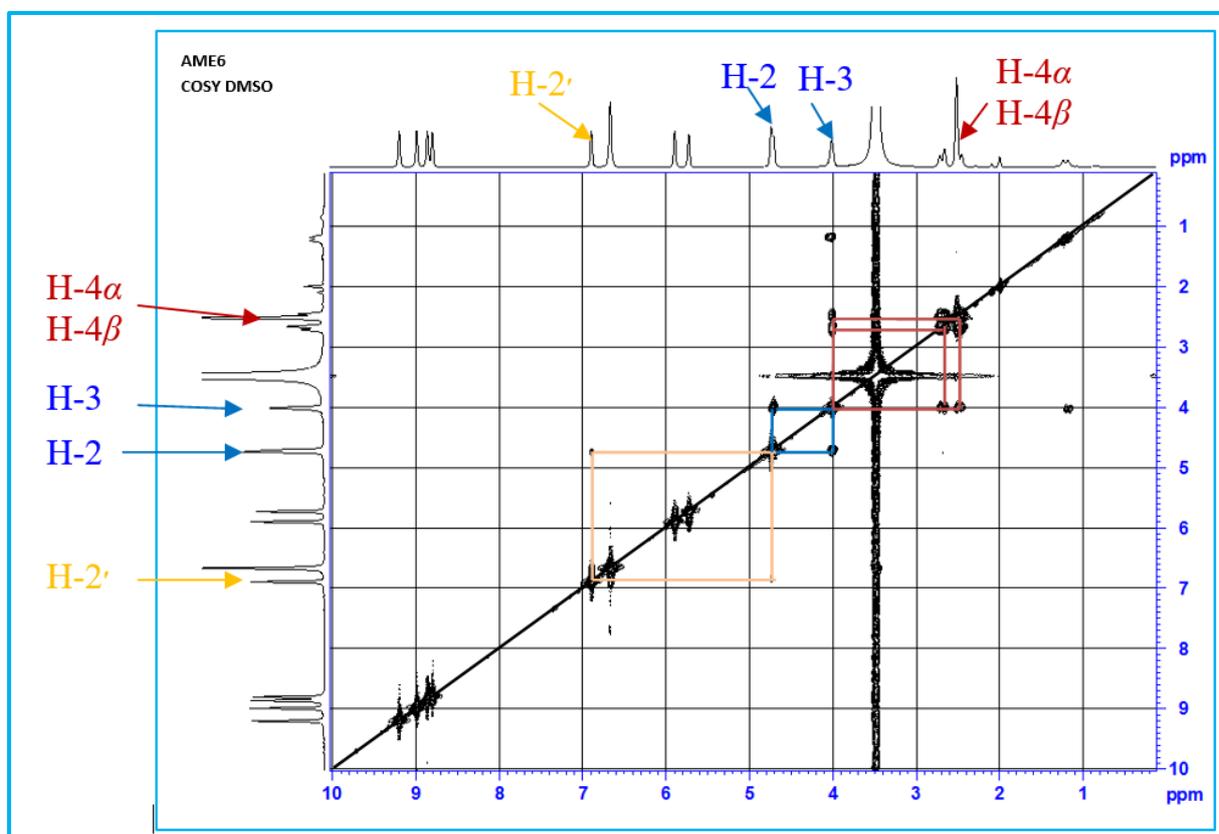
Pour sa part, son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 37) montre les signaux de quinze atomes de carbone qui ont été distingués grâce aux techniques HSQC et DEPT en :

- sept carbones quaternaires aromatiques dont quatre liés à un groupement hydroxyle à  $\delta_{\text{C}}$  157,0 (C-7), 156,6 (C-5), 144,9 (C-3') et 144,8 (C-4'), les autres à  $\delta_{\text{C}}$  156,2 (C-9), 99,0 (C-10) et 131,1 (C-1').
- sept carbones de groupement méthine dont deux oxyméthines à  $\delta_{\text{C}}$  65,3 (C-3) et 78,5 (C-2), et les autres à  $\delta_{\text{C}}$  115,3 (C-5'), 118,4 (C-6'), 115,2 (C-2'), 94,5 (C-8) et 95,5 (C-6).
- un carbone de groupement méthylène à  $\delta_{\text{C}}$  28,7 (C-4).



**Figure 37 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'AME6 (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)

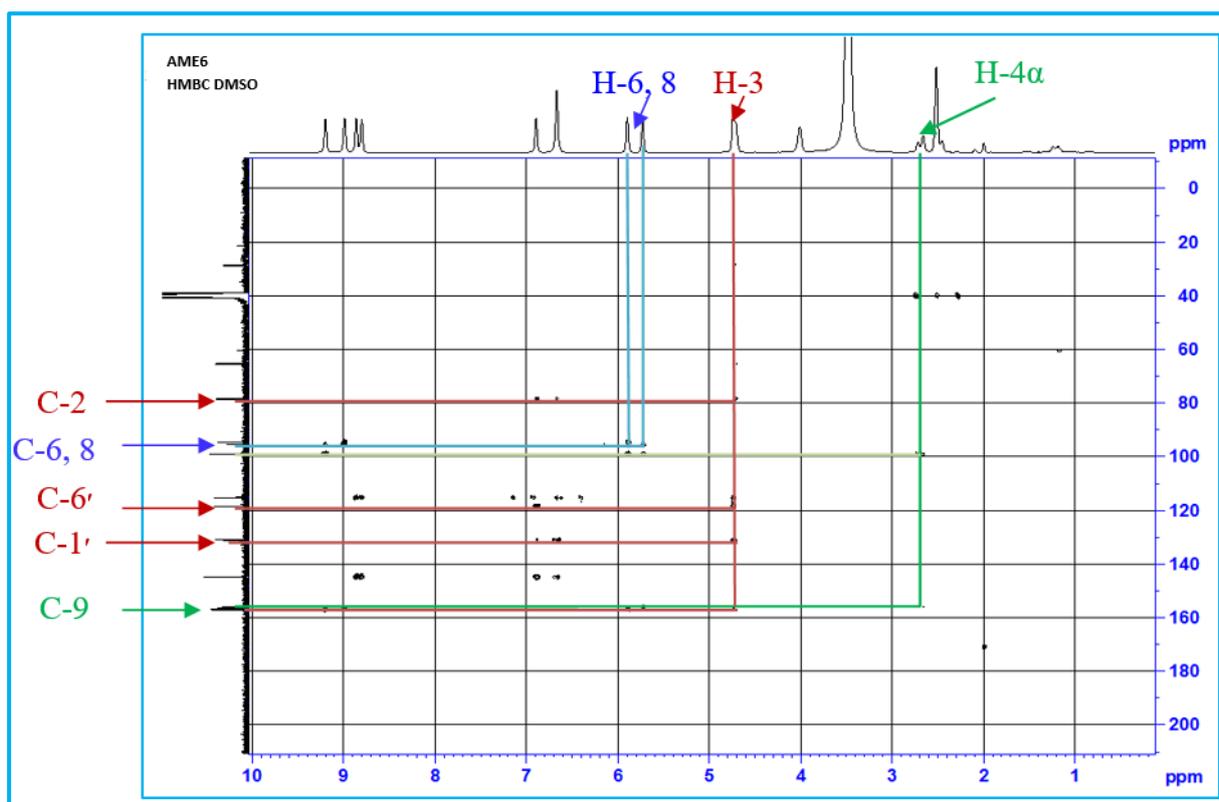
Sur le spectre COSY de AME6 (Figure 38), on observe des corrélations entre les protons des oxyméthines à  $\delta_{\text{H}}$  4,71 (H-2) et 4,04 (H-3) ; entre les protons à  $\delta_{\text{H}}$  4,04 (H-3) et les protons du méthylène à  $\delta_{\text{H}}$  2,48 (H-4 $\beta$ ) et 2,70 (H-4 $\alpha$ ). Sur ce même spectre, on peut noter des corrélations entre les protons à  $\delta_{\text{H}}$  6,69 (H-5') et 6,63 (H-6).



**Figure 38 :** Spectre COSY d'AME6 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)

Par ailleurs, les différentes jonctions ont été établies grâce aux corrélations observées sur son spectre HMBC (Figure 39, Schéma 8). En effet, sur ce spectre on observe les interactions entre :

- Le proton à  $\delta_H$  4,04 (H-3) et les carbones à  $\delta_C$  78,5 (C-2) et 131,1 (C-1').
- Le proton à  $\delta_H$  4,71 (H-2) et les carbones à  $\delta_C$  28,7 (C-4), 65,3 (C-3), 115,2 (C-2'), 131,1 (C-1'), 118,4 (C-6') et 156,2 (C-8a).
- Le proton à  $\delta_H$  5,73 (H-8) et les carbones à  $\delta_C$  156,6 (C-7), 95,5 (C-6), 156,2 (C-8a) et 99,0 (C-4a).
- Le proton à  $\delta_H$  5,90 (H-6) et les carbones à  $\delta_C$  94,5 (C-8), 99,0 (C-4a), 156,9 (C-5) et 156,6 (C-7).
- Le proton à  $\delta_H$  6,69 (H- 5') et les carbones à  $\delta_C$  118,4 (C-6'), 131,1 (C-1'), 144,8 (C-3') et 144,9 (C-4').
- Le proton à  $\delta_H$  6,89 (H-2') et les carbones à  $\delta_C$  78,5 (C-2), 131,1 (C-1'), 144,8 (C-3') et 144,9 (C-4').

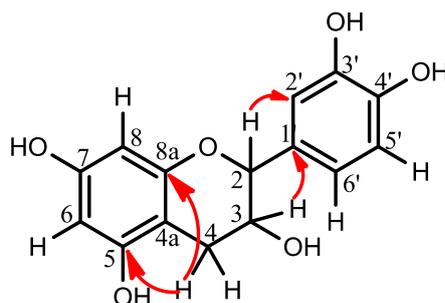


**Figure 39 :** Spectre HMBC d'AME6 (DMSO- $d_6$ )

Toutes ces données nous permettent de dire qu'AME6 est une flavane pentahydroxylée.

La constante de couplage,  $J = 6,9$  Hz, observée entre les protons H-2 et H-3 indique que cette unité de flavane a une configuration 2,3 *cis* (*axial-équatorial*) (Ganapaty et al., 2008).

L'ensemble de toutes ces données, comparées à celles décrites dans la littérature (Tableau XIII), nous a permis d'attribuer au composé AME6 la structure (44), qui est celle de l'épicatéchine précédemment isolé des fruits de *Asiminia triloba* (Brannan et al., 2015).



**Schéma 8** : Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC d'AME6

**Tableau XIII** : Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) de AME6 comparées à celles de l'épicatéchine ( $^1\text{H}$ , 300 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz) dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Brannan et al., 2015).

Position du carbone	AME6		Epicatechine	
	$\delta$ $^1\text{H}$ (m, $J$ )	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ (m, $J$ )	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2	4,71 (1H, d, $J = 6,9$ Hz)	78,5	4,55 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)	82,8
3	4,04 (1H, m)	65,4	3,96 (1H, m)	68,8
4	2,70 (1H, dd, $J = 15,9$ et 5,4 Hz, H-4 $\alpha$ ) 2,48 (1H, dd, $J = 15,9$ et 8,4 Hz, H-4 $\beta$ )	28,7	2,84 (1H, dd, $J = 15,9$ et 5,4 Hz, H-4 $\alpha$ ) 2,49 (1H, dd, $J = 15,9$ et 8,4 Hz, H-4 $\beta$ )	28,5
5	/	156,9	/	156,9
6	5,90 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)	95,5	5,91 (1H, d, $J = 1,8$ Hz)	96,3
7	/	156,6	/	157,6
8	5,73 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)	94,5	5,84 (1H, d, $J = 1,8$ Hz)	95,5
8a	/	156,2	/	157,8
4a	/	99,0	/	100,8
1'	/	131,1	/	132,2
2'	6,89 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)	115,2	6,82 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)	115,2
3'	/	144,8	/	146,2
4'	/	144,9	/	146,2
5'	6,69 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz)	115,3	6,75 (1H, d, $J = 8,2$ Hz)	116,1

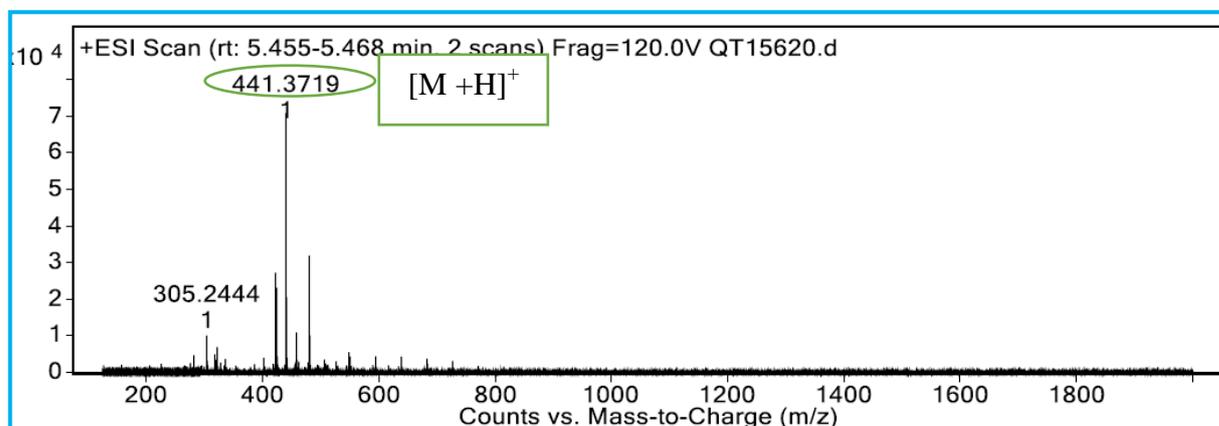
6'	6,63 (1H, dd, $J = 8,2$ et $1,5$ Hz)	118,4	6,70 (1H, dd, $J = 8,2$ et $1,5$ Hz)	120,0
----	--------------------------------------	-------	--------------------------------------	-------

## II.2.3- Les triterpènes pentacycliques

### II.2.3.1- Identification d'AMR4 ou AME2

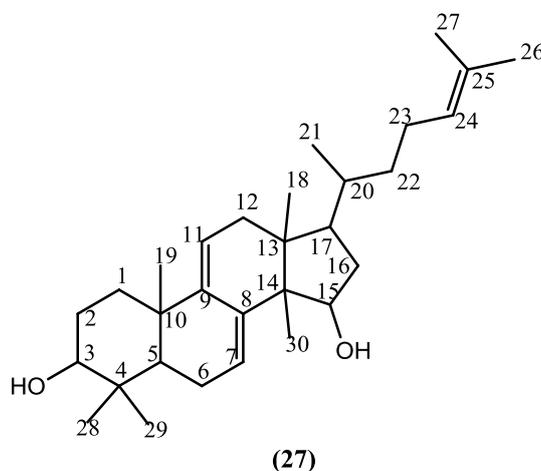
Le composé AMR4 a été obtenu sous forme de poudre blanchâtre. Il fond entre 173-174 °C et est soluble dans le MeOH. Il réagit positivement au test de Liebermann Burchard donnant une coloration rouge violacée, caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse ESI-HR (Figure 40) montre le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M + H]^+$  à  $m/z = 441,3719$  compatible à la formule brute  $C_{30}H_{49}O_2$ , correspondant à sept degrés d'insaturation.



**Figure 40 :** Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AMR4

L'étude des données physiques et spectroscopiques d'AMR4 nous a permis d'attribuer à ce composé la structure (27)

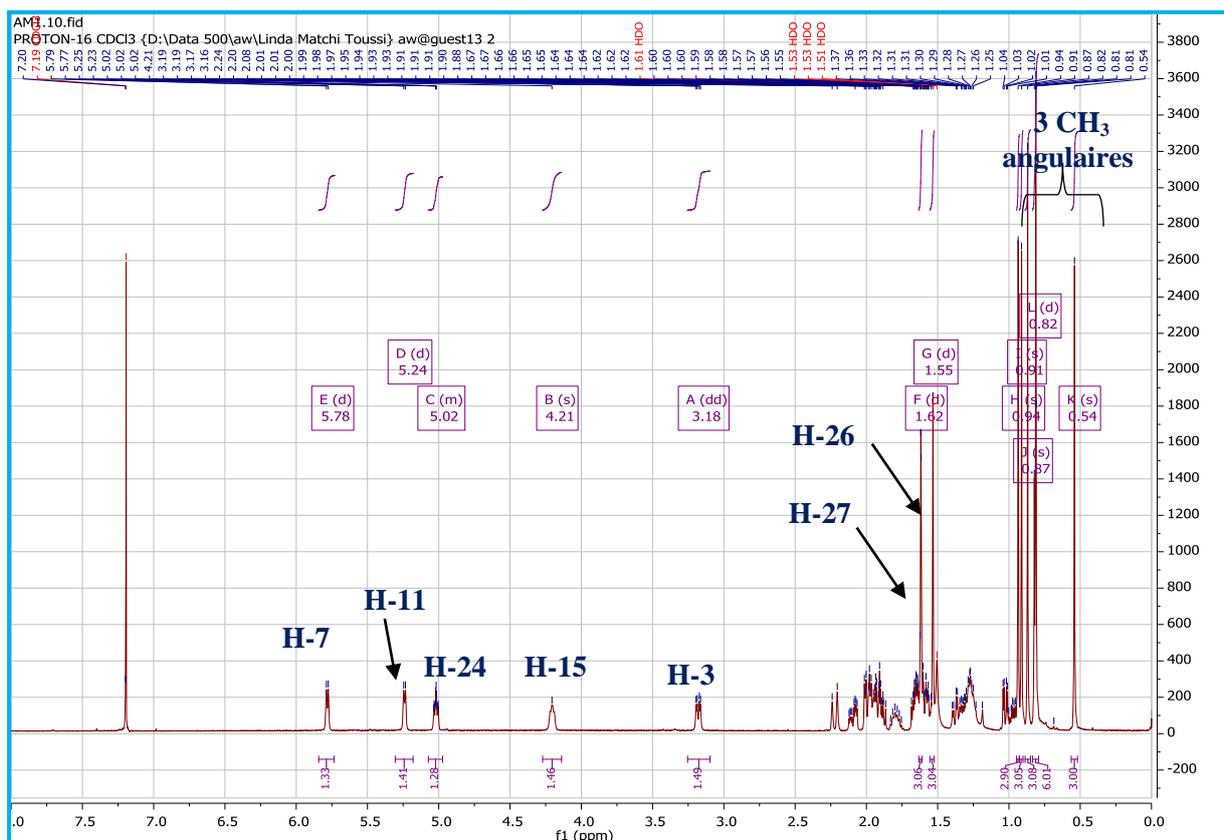


Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Figure 41) met en exergue, des champs faibles vers les champs forts, les signaux caractéristiques :

- de trois protons oléfiniques dont deux sous forme de doublet large et résonant respectivement à  $\delta_{\text{H}}$  5,78 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz, H-7) et 5,24 (1H, d,  $J = 6,4$  Hz, H-11) et le troisième sortant sous forme de triplet à  $\delta_{\text{H}}$  5,02 (1H, t,  $J = 7,1$  Hz, H-24).

- de deux protons déblindés résonant respectivement sous forme de multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  4,20 (1H, m, H-15) et de doublet dédoublé à  $\delta_{\text{H}}$  3,18 (1H, dd,  $J = 11,5, 4,3$  Hz, H-3) et attribuables aux protons portés par des oxycarbones.

- de huit groupements méthyles dont un résonant sous forme de doublet à  $\delta_{\text{H}}$  0,84 (1H, d,  $J = 5,2$  Hz, H-21), trois méthyles angulaires à  $\delta_{\text{H}}$  0,94 (s, H-19), 0,91 (s, H-30) et 0,54 (s, H-18) et quatre autres à  $\delta_{\text{H}}$  1,61 (s, H-27), 1,53 (s, H-26), 1,19 (s, H-29) et 0,86 (s, H-28).

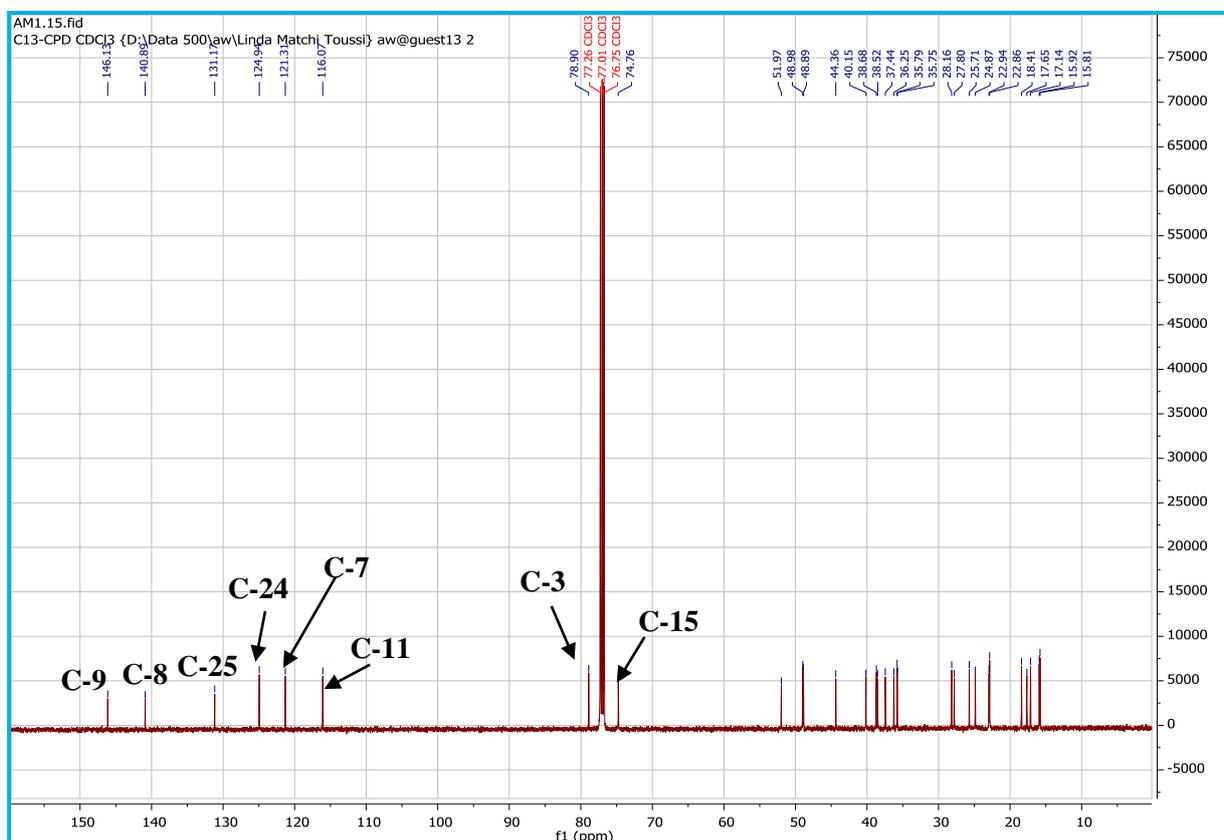


**Figure 41 :** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) d'AMR4

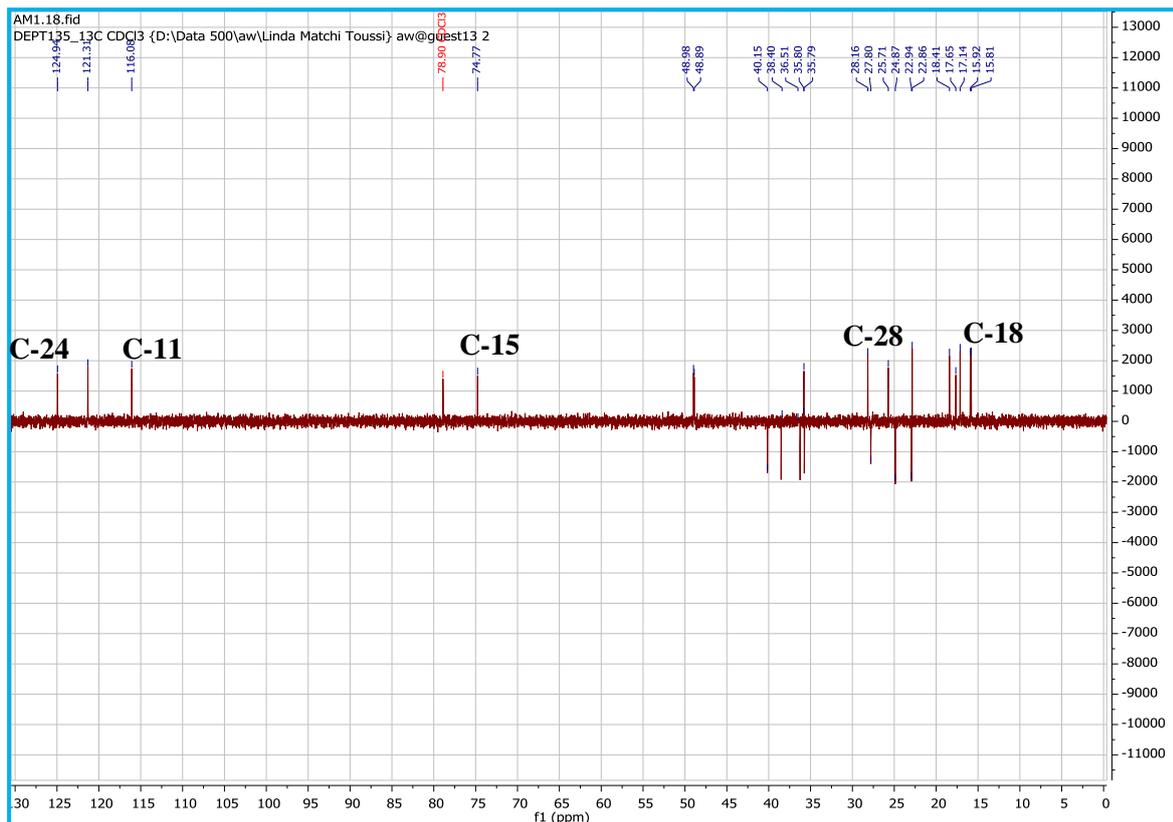
Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'AMR4 (Figure 42) complètement découplé associé à celui du DEPT 135 (Figure 43), fait ressortir des signaux de 30 atomes de carbone répartis en :

- Huit méthyles évoqués plus haut à  $\delta_C$  28,1 (C-28), 25,7 (C-27), 22,9 (C-19), 18,4 (C-21), 17,6 (C-26), 17,1 (C-30), 15,9 (C-18), 15, 8 (C-29),
- Sept méthylènes à  $\delta_C$  40,1 (C-16), 38,5 (C-12), 36,2 (C-22), 35,8 (C-1), 27,8 (C-2), 24,9 (C-23), 22,9 (C-6),
- Huit méthines dont trois hybridés  $sp^2$  à  $\delta_C$  124,9 (C-24), 121,3 (C-7) et 116,7 (C-11), deux oxyméthines observables à  $\delta_C$  78,9 (C-3) et 74,8 (C-15) et le reste à 48,9 (C-17), 48,7 (C-5) et 35,8 (C-20),

Et sept atomes de carbone quaternaire dont trois  $sp^2$  à  $\delta_C$  146,1 (C-9), 140,9 (C-8) et 131,1 (C-25).



**Figure 42** : Spectre de RMN  $^{13}C$  d'AMR4 ( $CDCl_3$ , 125 MHz)



**Figure 43 :** Spectre DEPT 135 (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) d'AMR4

L'analyse des données précédentes (formule brute, données spectrales) nous fait penser que le composé AMR4 est un triterpène tétracyclique ayant dans sa structure des fonctions hydroxyles (deux), éthyléniques (trois).

L'attribution complète des carbones et des protons ainsi que les différentes connectivités du composé AMR4 ont été principalement réalisées grâce à l'étude du spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Figure 44), et confirmées par les expériences HSQC (Figure 45) et HMBC (Figure 46, Schéma 9). En effet, les considérations biogénétiques nous ont permis de fixer l'un des deux groupements hydroxyles sur le carbone C-3 du cycle A des terpénoïdes. De plus, des corrélations observables sur son spectre HMBC, mettent en évidence une interaction entre les protons des deux méthyles géminés d'une part, et les protons diastéréotopiques à  $\alpha_{\text{H}}$  1,61 (H-2) et  $\alpha_{\text{H}}$  1,54 (H-2) avec l'oxycarbone C-3 d'autre part.

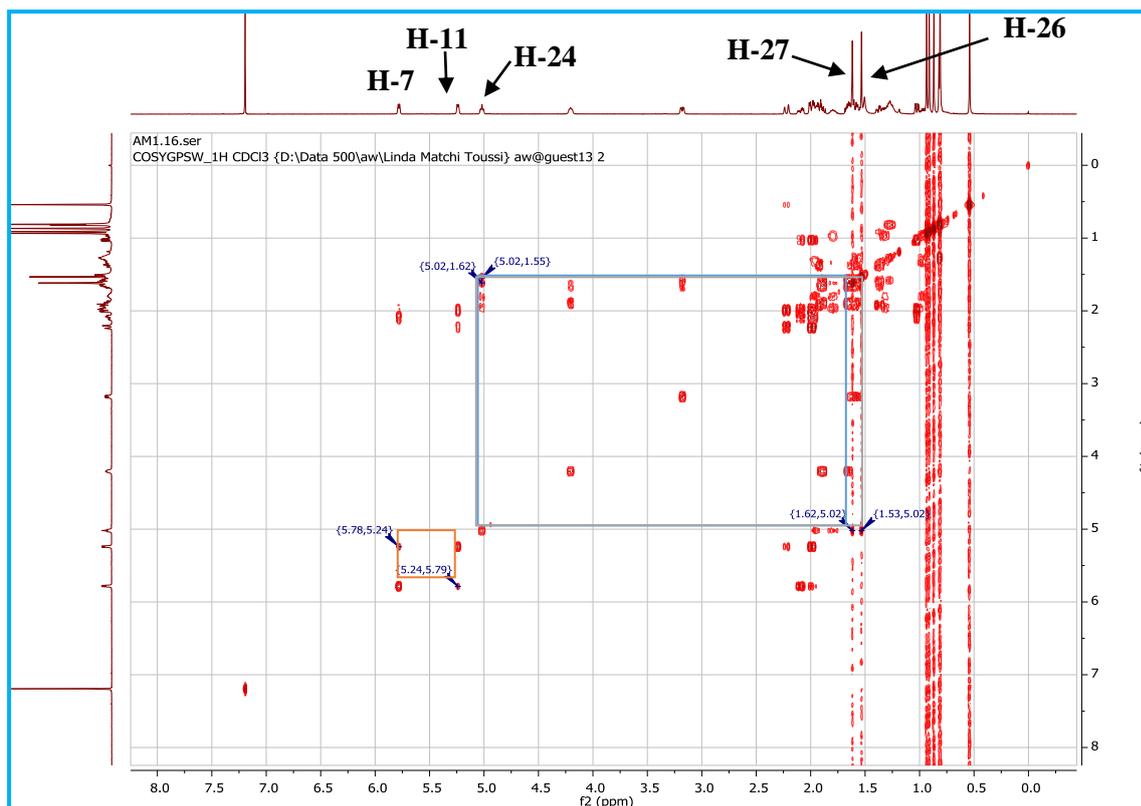
Par ailleurs, son spectre COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H nous fait constater que deux des trois doubles liaisons sont conjuguées et sont contenues dans les cycles B et C entre les carbones C-7 et C-8 ( $\Delta^{7-8}$ ), C-9 et C-11 ( $\Delta^{9-11}$ ) respectivement. En effet, sur ce spectre, nous observons un couplage longue distance entre les protons éthyléniques H-7 et H-11. D'autres corrélations sont observées entre le proton H-7 et les protons diastéréotopiques à  $\alpha_{\text{H}}$  2,11 (H-6) et 2,01

(H-6). Ces derniers couplent aussi avec le proton H-5. De plus, le couplage entre H-11 et le méthylène à  $\delta_{\text{H}} 2,24$  (H-12) a été observée sur ce spectre.

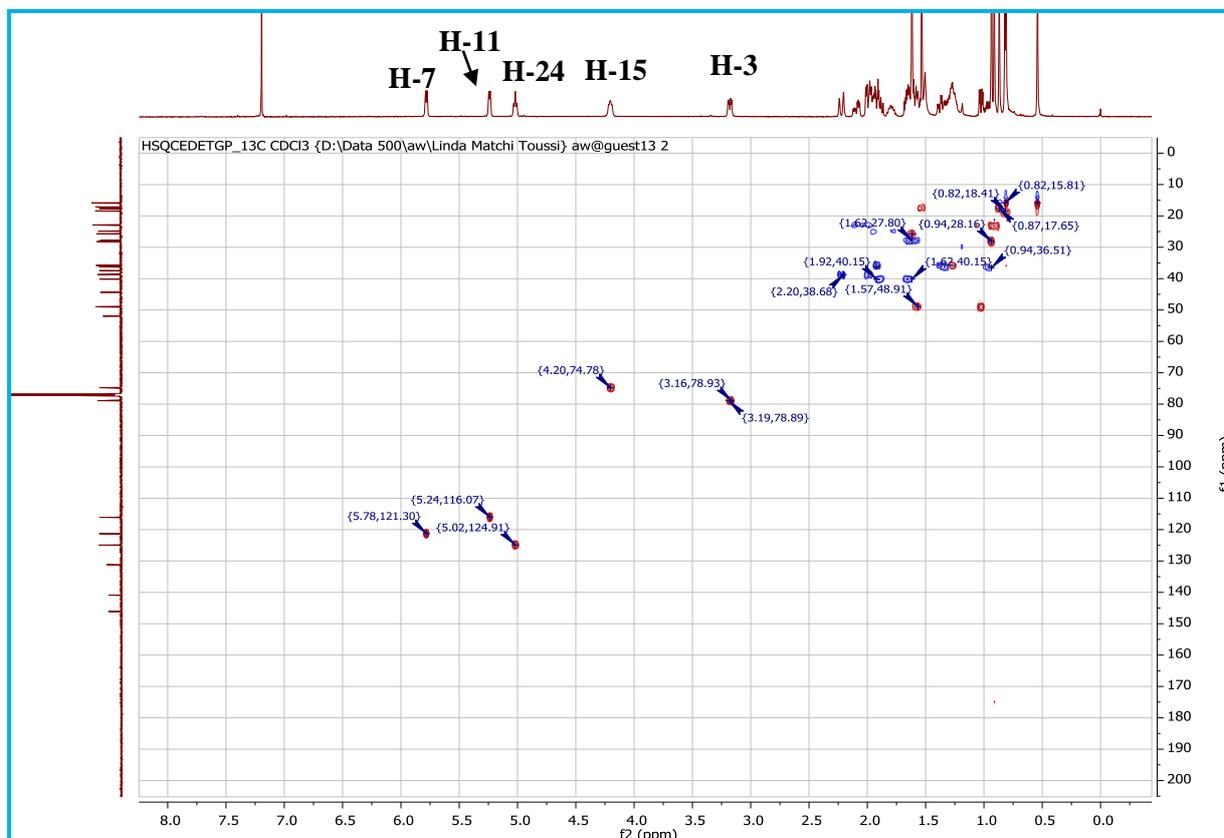
La confirmation de la jonction des cycles A et B s'est faite grâce aux taches de corrélation observées sur le spectre HMBC entre le proton oléfinique H-7 et le méthine C-5 ; entre les méthyles géminés H-28 et H-29 et le méthine C-5. L'analyse de ce même spectre nous a permis de lier les cycles B et C grâce à des interactions observées entre le proton H-11 et le carbone C-8 et celles entre le proton H-7 et le carbone C-9.

La position du second groupement hydroxyl -OH a été localisée sur le 4<sup>ème</sup> cycle D (précisément sur le carbone C-15), de par les corrélations observées sur le spectre HMBC, entre le proton H-15 et le carbone C-14 d'une part et entre le proton H-7 et le carbone C-14 d'autre part.

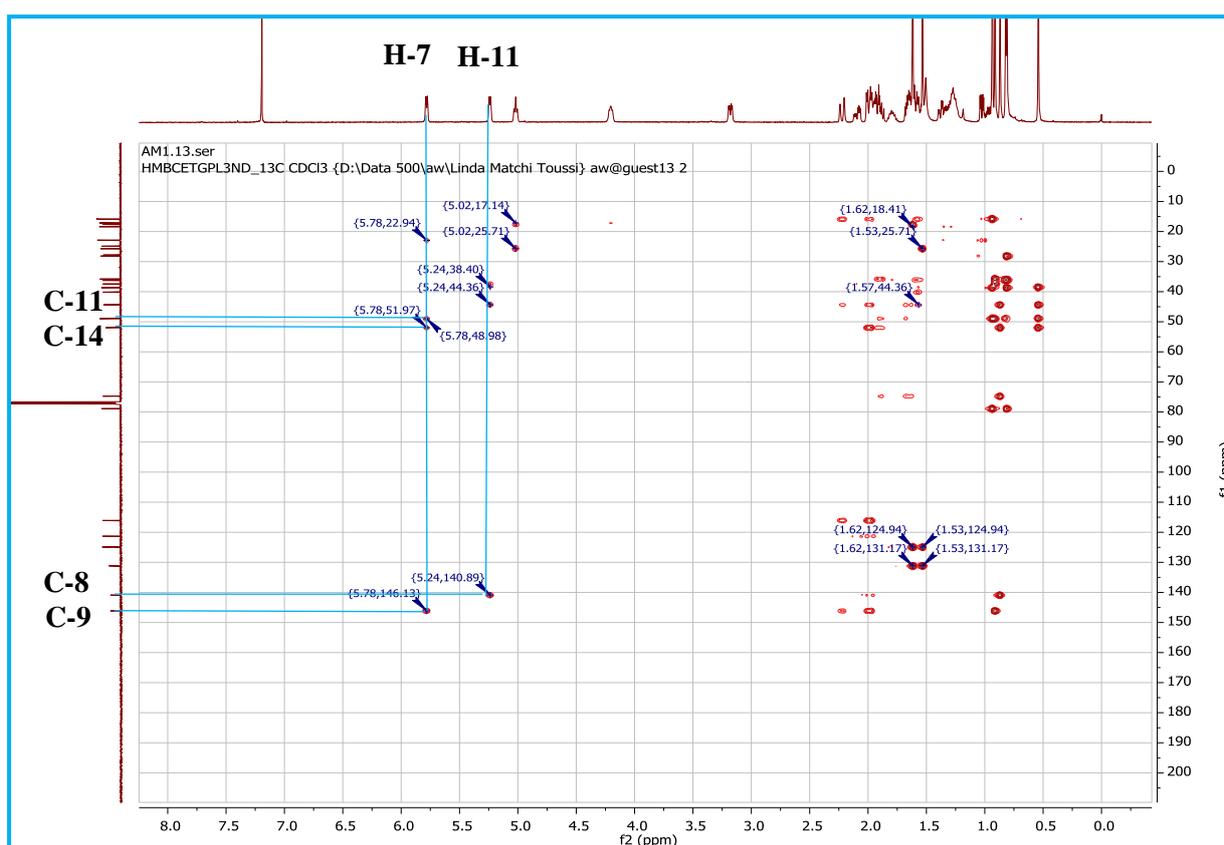
Par ailleurs, la position du troisième groupe éthylénique trisubstitué a pu être confirmée sur la chaîne latérale et localisé entre les carbones C-24 et C-25, grâce à l'observation, sur ce même spectre, des taches de corrélation entre les protons des groupements méthylènes à  $\delta_{\text{H}} 1,95$  (H-23) et 1,77 (H-22) et le carbone C-24 d'une part ; entre les protons des groupements méthyles à  $\delta_{\text{H}} 1,61$  (H-27) et 1,53 (H-26) et le carbone C-24 d'autre part. De plus, la tache de corrélation observée entre les protons du groupement méthyle en position 21 et le carbone C-17 nous a permis de fixer la chaîne latérale sur le carbone C-17 du cycle D.



**Figure 44 :** Spectre COSY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) d'AMR4

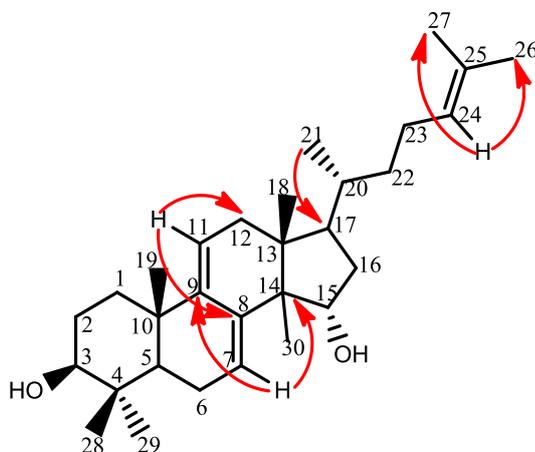


**Figure 45 :** Spectre HSQC (CDCl<sub>3</sub>) d'AMR4



**Figure 46 :** Spectre HMBC (CDCl<sub>3</sub>) d'AMR4

L'ensemble de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites dans la littérature ont permis d'attribuer au composé AMR4 la structure (27), qui est celle du polycarpol (Lanostan-7,9(11),24-triène-3,15-diol), déjà isolé des écorces du tronc d'*Unonopsis guatteroides* (Annonaceae) (Felipe *et al.*, 2012) (Voir Tableau XIV).



**Schéma 9:** Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC d'AMR4

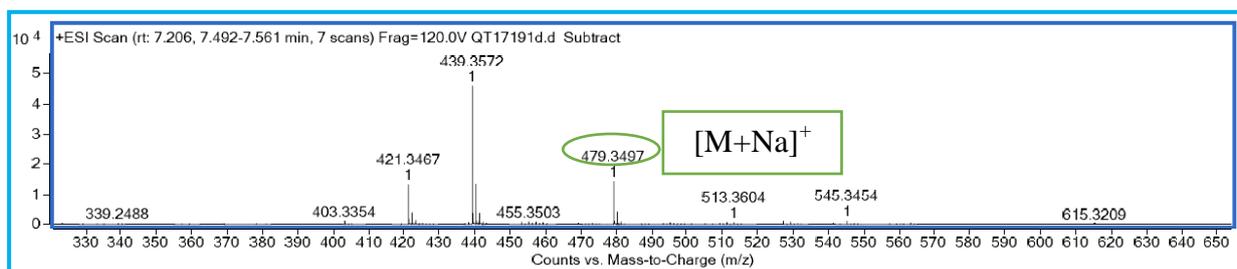
**Tableau XIV** : Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) dans le  $\text{CDCl}_3$  d'AMR4 comparées à celles du polycarpol ( $^1\text{H}$ , 400 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz) dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Felipe et al., 2012).

Position du Carbone	AMR4		Polycarpol ( Felipe et al., 2012)	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1		35,7		35,7
2		27,8		27,7
3	3,18 (dd, $J = 11,5, 4,3$ Hz)	78,9	3,29-3,21 (m)	78,9
4		38,7		38,7
5		48,7		48,8
6		22,9		22,9
7	5,78 (d, $J = 6,8$ Hz)	121,3	5,85 (d, $J = 6,1$ Hz)	121,3
8		140,9		140,8
9		146,1		146,1
10		37,4		37,4
11	5,24 (d, $J = 6,4$ Hz)	116,7	5,32 (d, $J = 6,0$ Hz)	116,0
12		38,5		38,5
13		44,3		44,3
14		51,9		51,9
15	4,20 (m)	74,8	4,24- 4,31 (m)	74,7
16		40,1		40,1
17		48,9		48,9
18	0,54 (s)	15,9	0,61 (s)	15,9
19	0,94 (s)	22,9	0,98 (s)	22,8
20		35,8		35,7
21	0,84 (d, $J = 5,2$ Hz)	18,4	0,88 (d, $J = 6,2$ Hz)	18,4
22		36,2		35,8
23		24,9		24,8
24	5,02 (t, $J = 7,1$ Hz)	124,9	5,09 (t, $J = 7,0$ Hz)	124,9
25		131,1		131,1
26	1,53 (s)	17,6	1,61 (s)	17,6
27	1,61 (s)	25,7		25,7
28		28,2		28,1
29	1,19 (s)	15,8	1,01 (s)	15,8
30	0,94 (s)	17,1	0,94 (s)	17,1

### II.2.3.2- Identification d'AME7 ou AMR3

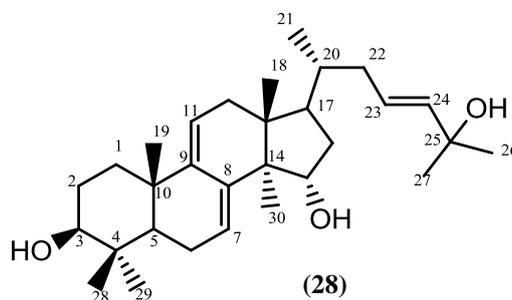
Le composé AME7 a été obtenu sous forme de poudre beige. Il est soluble dans le MeOH et fond entre 217–219 °C. Il réagit positivement au test de Liebermann Burchard, caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse ESI-HR (Figure 47) montre le pic de l'adduit sodique  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 479,3497$  (*calcd.* 479,3497) compatible à la formule brute  $C_{30}H_{48}O_3Na$ , comportant sept degrés d'insaturation.



**Figure 47 :** Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AME7

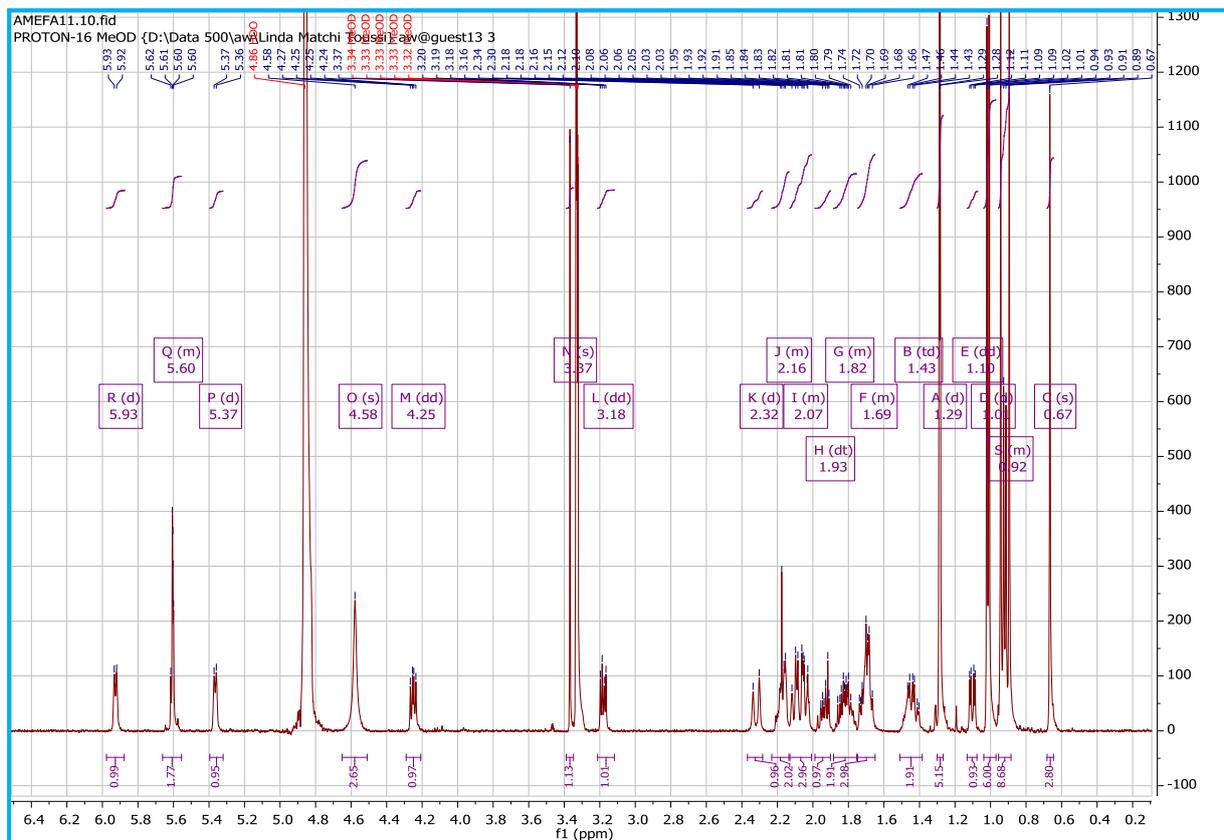
L'interprétation des données physiques et spectroscopiques nous a permis d'attribuer à ce composé la structure (28).



En effet, son spectre de RMN <sup>1</sup>H (Figure 48) met en exergue les signaux de :

- Sept groupes méthyles tertiaires sous forme de singulets résonant entre  $\delta_H$  0,67 et 1,30.
- Un méthyle sous forme de doublet à  $\delta_H$  0,94 (3H, d, 5 Hz, H-21).
- Protons oléfiniques dont deux à  $\delta_H$  5,93 (1H, d, 5 Hz, H-7) et 5,37 (1H, d, 5 Hz, H-11) attribuables aux protons des doubles liaisons entre les carbones C-7, C-8 et C-9, C-11 ( $\Delta^{7,9}$ ) (Silva *et al.*, 2012 ; Xia *et al.*, 2014) ; Et deux autres protons visibles sur la double liaison  $\Delta^{23}$  à  $\delta_H$  4,25 (1H, dd, 5 ; 15 Hz, H-23) et 5,60 (1H, d, 15 Hz, H-24) (Leong et Harrison, 1999).

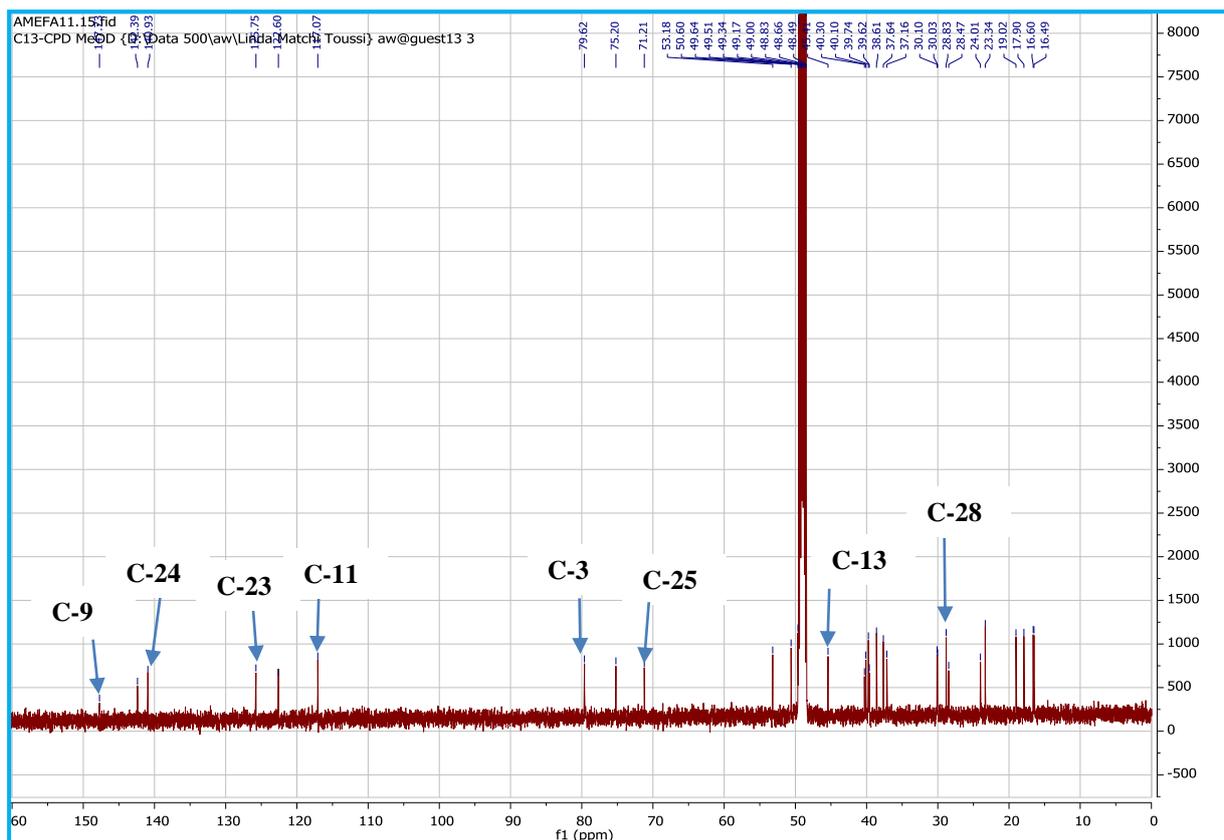
- Protons de groupes méthyles géminés apparaissant à  $\delta_{\text{H}}$  1,29 (6H, s, H-26 et H-27) attribuables aux protons des groupes méthyles C-26 et C-27 respectivement.



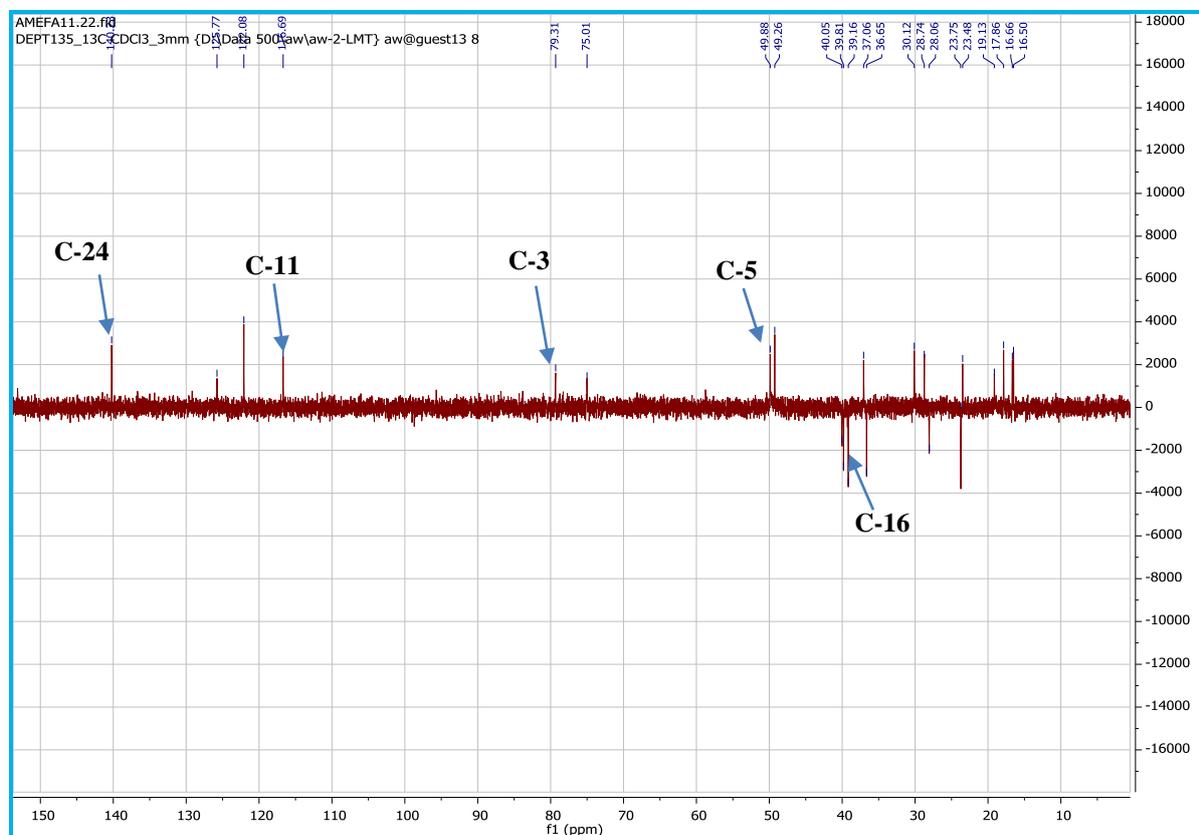
**Figure 48** : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (MeOD, 500 MHz) d'AME7

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'AME7 (Figure 49) complètement découplé associé à celui du DEPT 135 (Figure 50) et HSQC (Figure 51), fait ressortir des signaux de 30 atomes de carbone répartis en :

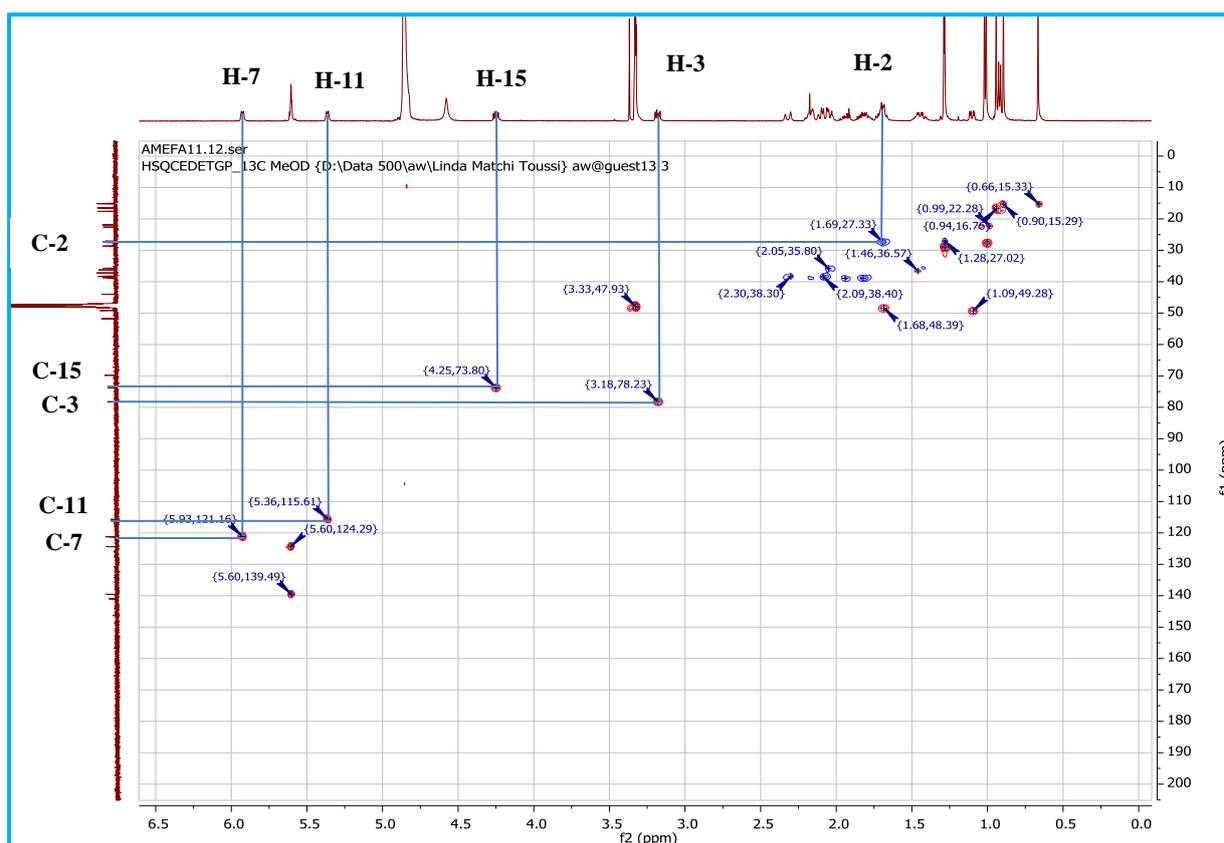
- Six atomes de carbone oléfiniques à  $\delta_{\text{C}}$  117,1 (C-11), 122,6 (C-7), 125,7 (C-23), 140,9 (C-24), 142,4 (C-8) et 147,7 (C-9) nous laissant penser à ceux des dérivés du lanosta-7, 9, 23-triène rapportés dans la littérature (Silva et al., 2012).
- Huit méthyles à  $\delta_{\text{C}}$  16,4 (C-18), 24,0 (C-19), 19,0 (C-21), 30,0 (C-26), 30,1 (C-27), 28,9 (C-28), 16,6 (C-29), 17,9 (C-30).
- Six méthylènes à  $\delta_{\text{C}}$  37,1 (C-1), 28,5 (C-2), 23,3 (C-6), 40,0 (C-12), 38,6 (C-16), 40,3 (C-22).
- Cinq méthines comprenant deux oxyméthines à  $\delta_{\text{C}}$  79,6 (C-3) et 75,2 (C-15) et les autres à  $\delta_{\text{C}}$  50,6 (C-5), 49,6 (C-17), 37,6 (C-20).
- Cinq carbones quaternaires dont un oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  71,2 (C-25) et les autres à  $\delta_{\text{C}}$  39,6 (C-10), 39,7 (C-4), 45,4 (C-13), 53,2 (C-14).



**Figure 49 :** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD, 125 MHz) d'AME7



**Figure 50 :** Spectre DEPT ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) d'AME7



**Figure 51:** Spectre HSQC (MeOD) d'AME7

Les oxyméthines ont été attribués à C-3 et C-15 respectivement, sur la base de considérations biogénétiques et les corrélations HMBC (entre les protons H-28/29 ( $\delta_H$  1,02 / 0,89) et le carbone C-3 ( $\delta_C$  79,6) et entre le proton H-30 ( $\delta_H$  0,91) non seulement avec le carbone C-15 ( $\delta_C$  75,2) mais aussi avec les carbones C-14 ( $\delta_C$  53,2) et C-8 ( $\delta_C$  142,4).

Sur le spectre COSY (Figure 52), une corrélation a été observée entre les protons H-7 et H-11, les protons H-22 et H-23.

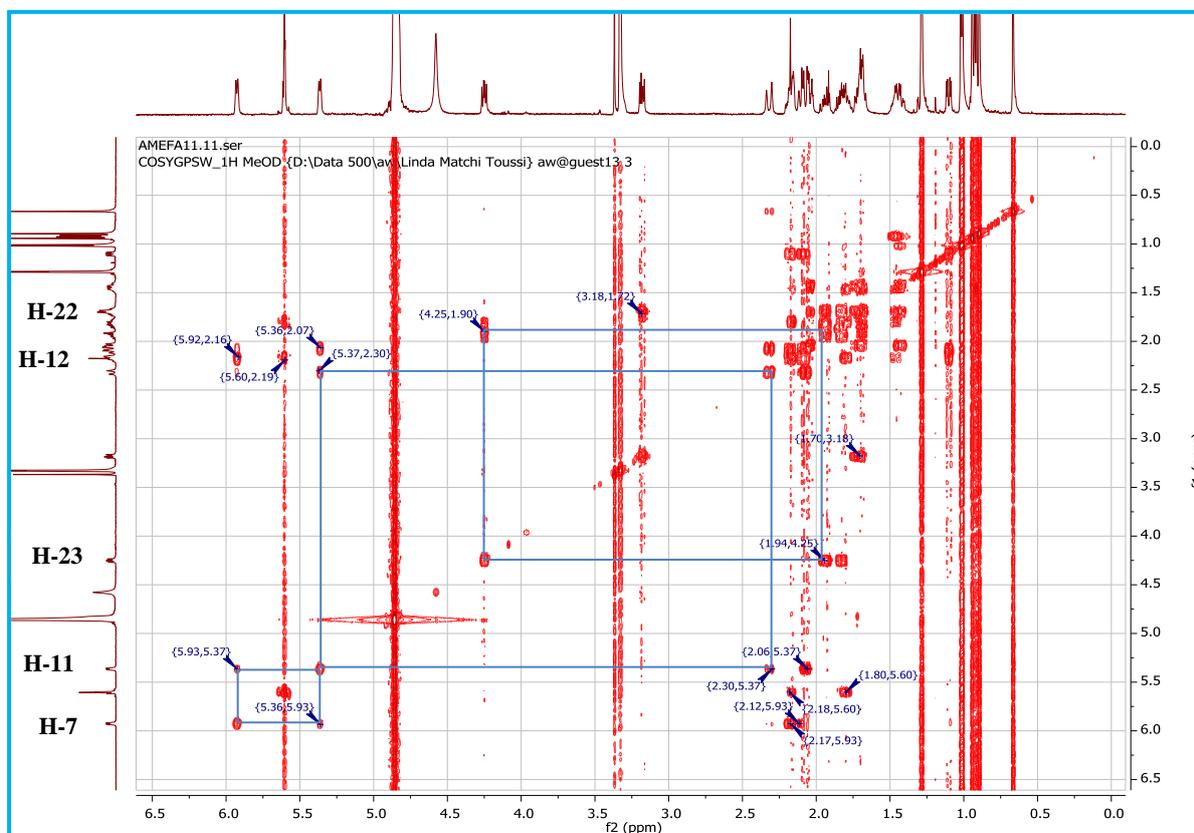
Des signaux de double liaison  $\Delta^{23}$  (Leong et Harrison, 1999) ont été observés à  $\delta_H / \delta_C$  [4,25 (1H, dd, 5 ; 15 Hz) et 5,60 (1H, d, 15 Hz)]. La constante de couplage  $J = 15$  Hz observée montre que les deux protons oléfiniques sont en position *trans* sur la chaîne latérale d'AME7. Les protons à  $\delta_H$  1,29 (6H, s) ont été attribués aux méthyles C-26 et C-27 en fonction des taches de corrélation observées, sur le spectre HMBC (Figure 53), entre ces protons et les carbones C-25 (71,2) et C-24 de la double liaison  $\Delta^{23}$  à 140,9 ppm.

D'autres corrélations HMBC ont été observées entre :

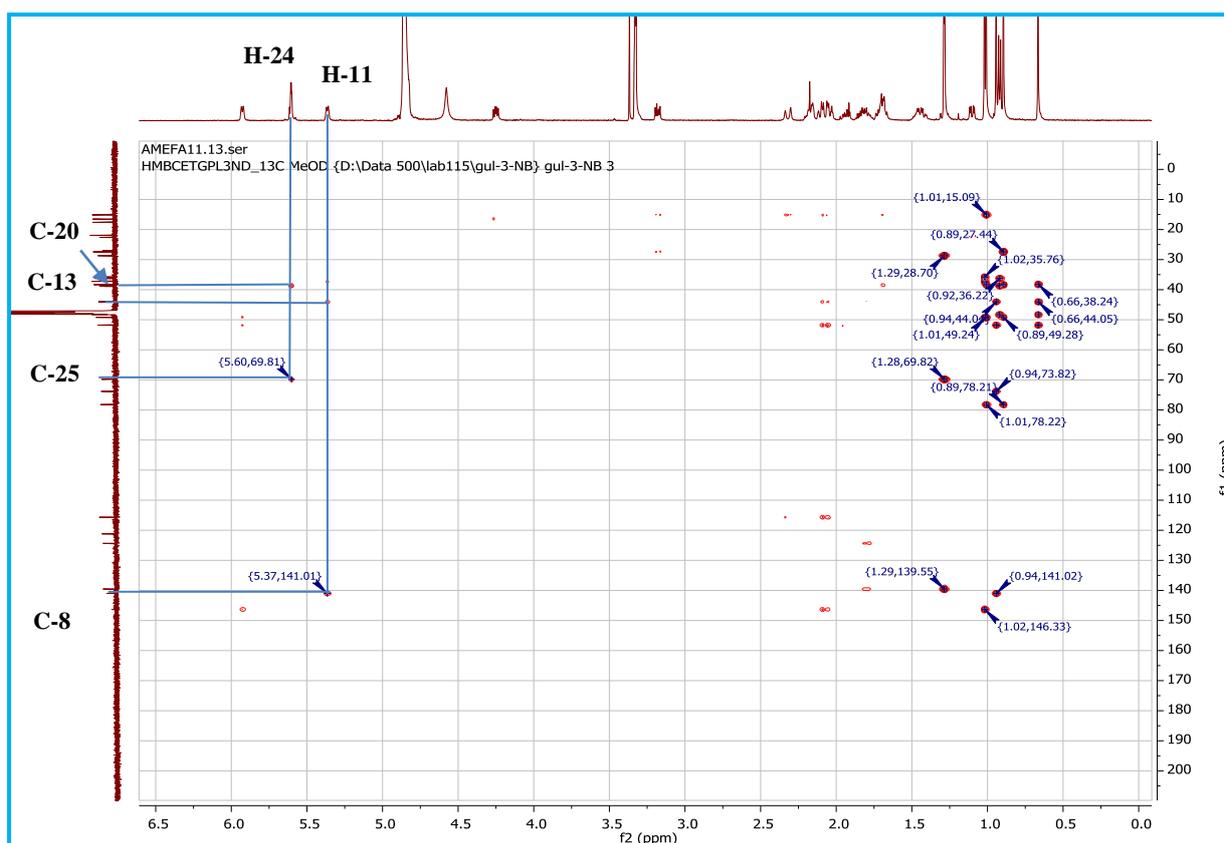
- les protons du groupement méthyle en position 30 (CH<sub>3</sub>-30) à  $\delta_H$  0,91 avec des carbones à  $\delta_C$  45,4 (C-13), 53,2 (C-14) et 142,4 (C-8) ;

-les protons du groupement méthyle en position 21(CH<sub>3</sub>-21) à  $\delta_H$  0,94 et les carbones à  $\delta_C$  37,6 (C-20) et 40,3 (C-22).

-les protons oléfiniques à  $\delta_H$  4,25 (H-23) et  $\delta_H$  5,60 (H-24) et le carbone à  $\delta_C$  40,3 (C-22) d'une part et les carbones à  $\delta_C$  30,1 (C- 26) et 71,2 (C- 25) d'autre part confirmant la position  $\Delta^{23}$  de la double liaison de la chaîne latérale.



**Figure 52:** Spectre COSY (MeOD, 500 MHz) d'AME7



**Figure 53** : Spectre HMBC (MeOD) d'AME7

Toutes ces informations comparées à celles décrites dans la littérature nous ont permis d'identifier le composé **(28)** à l'Anomanol A (lanosta-7,9(11),23-triène-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol) récemment isolé de la même plante *Anonidium mannii* par **Ngangoue et al. (2020)** (Voir Tableau XV).

**Tableau XV** : Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) dans le MeOD d'AME7 comparées à celles de l'Anomanol A ( $^1\text{H}$ , 600 MHz et  $^{13}\text{C}$ , 150 MHz) dans le DMSO- $d_6$ .

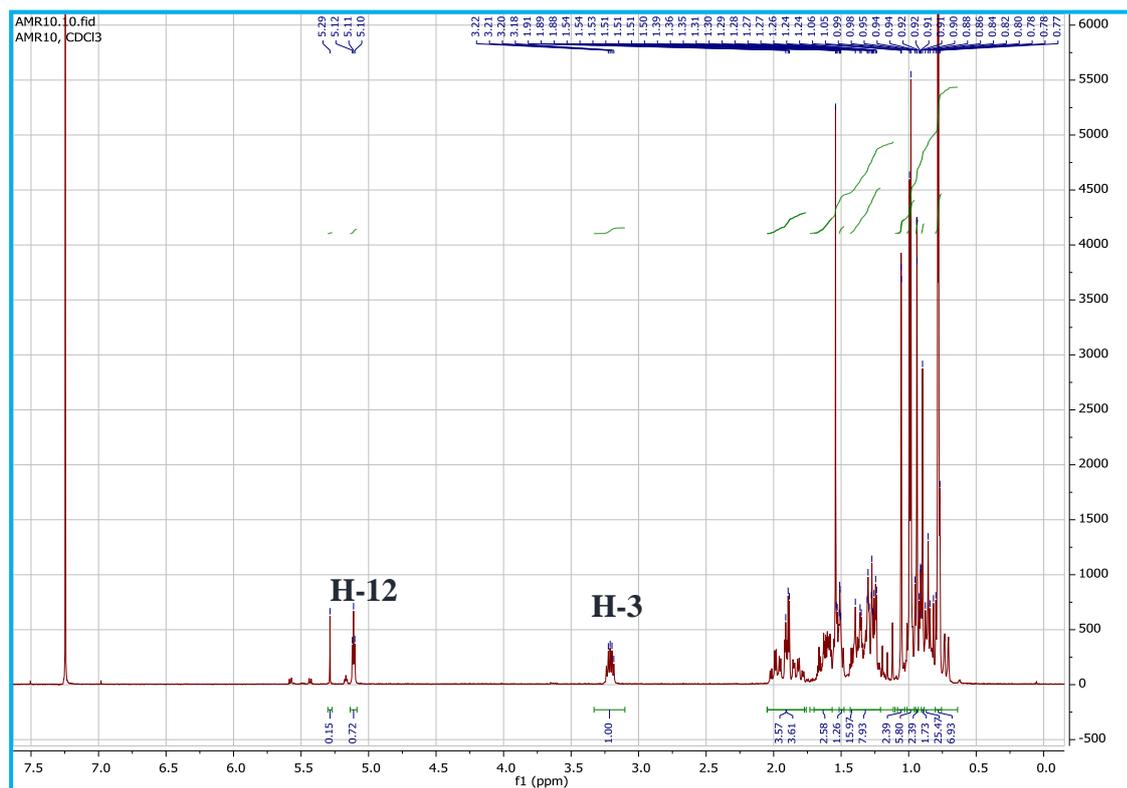
Position du carbone	AME7		Anomanol A (Ngangoue et al., 2020) (DMSO- $d_6$ , 600 MHz RMN $^1\text{H}$ , 150 MHz RMN $^{13}\text{C}$ )	
	$\square$ $^1\text{H}$ (m, J en Hz)	$\square$ $^{13}\text{C}$	$\square$ $^1\text{H}$ (m, J en Hz)	$\square$ $^{13}\text{C}$
<b>1</b>	1,72 (2H, m)	37,1	1,55 (2H, m)	35,4
<b>2</b>	1,43 (1H, m, H-2a) 2,12 (1H, m, H-2b)	28,5	1,17 (1H, m, H-2a) 1,97 (1H, m, H-2b)	27,6
<b>3</b>	3,18 (1H, q, J = 5 Hz)	79,6	3,01 (1H, q, J = 4,8 Hz)	76,8
<b>4</b>	-	39,7	-	38,3

5	1,10 (1H, dd, $J = 5$ Hz, 15 Hz)	50,6	0,96 (1H, dd, $J = 3,6$ Hz, 12,0 Hz)	48,8
6	2,16 (2H, m)	23,3	2,00 (2H, t, $J = 3,6$ Hz)	22,5
7	5,93 (1H, d, $J = 5$ Hz)	122,6	5,90 (1H, d, $J = 6,6$ Hz)	120,9
8	-	142,4	-	140,9
9	-	147,7	-	146,0
10	-	39,6	-	37,8
11	5,37 (1H, d, $J = 5$ Hz)	117,1	5,28 (1H, d, $J = 6,6$ Hz)	115,3
12	2,08 (1H, m, H-12a) 2,32 (1H, d, $J = 20$ Hz, H-12b)	40,0	1,96 (1H, m, H-12a) 2,20 (1H, d, $J = 17,4$ Hz, H-12b)	38,5
13	-	45,4	-	43,6
14	-	53,2	-	51,4
15	3,37 (1H,s)	75,2	4,07 (1H, m)	72,4
16	2,05 (1H, m, H-16a) 1,93 (1H, dt, $J = 10$ Hz, H-16b)	38,6	1,93 (1H, t, $J = 7,2$ , H-16a) 1,78 (1H, m, H-16b)	36,2
17	1,79 (1H, m)	49,6	1,60 (1H, m)	47,9
18	0,67 (3H, s)	16,4	0,56 (3H, s)	15,8
19	1,01 (3H, s)	24,0	0,91 (3H, s)	22,7
20	1,66 (1H, m)	37,6	1,33 (1H, m)	35,9
21	0,94 (3H, d, $J = 5$ Hz)	19,0	0,83 (3H, d, $J = 6,6$ Hz)	18,3
22	1,82 (1H, m, H-22a) 2,03 (1H, m, H-22b)	40,3	1,69 (1H, m, H-22a) 1,79 (1H, m, H-22b)	39,2
23	4,25 (1H, dd, $J = 5, 15$ Hz)	125,7	5,52 (1H, d, $J = 15,0$ Hz)	123,1
24	5,60 (1H, m)	140,9	5,46 (1H, dd, $J = 5,4, 15,0$ Hz)	140,8
25	-	71,2	-	68,9
26	1,29 (3H, s)	30,0	1,15 (3H, s)	30,2
27	1,29 (3H, s)	30,1	1,15 (3H, s)	30,2
28	1,02 (3H, s)	28,8	0,92 (3H, s)	28,3
29	0,89 (3H, s)	16,6	0,78 (3H, s)	16,1
30	0,91 (3H, s)	17,9	0,82 (3H, s)	17,4

### II.2.3.3- Identification d'AMR5 ou AME8

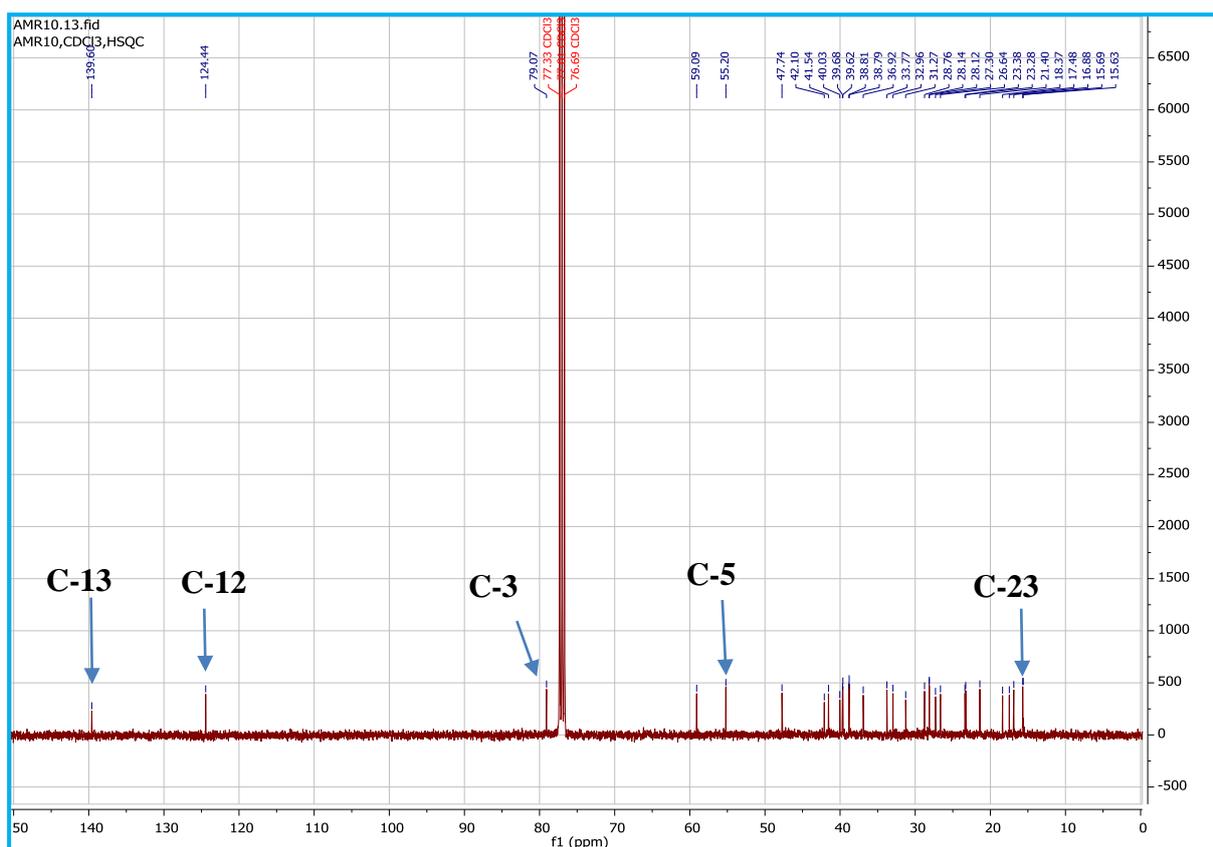
Le composé AMR5 se présente sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (75 :25). Il fond entre 184-185 °C et est soluble dans le chlorure de méthylène et répond positivement au test de Liebermann Burchard en donnant une coloration rouge violacée, caractéristique des triterpènes. Son spectre de masse ESI<sup>+</sup> donne le pic de l'adduit sodique  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 449, 01$ . La combinaison des données de ce spectre à celles des spectres de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C a permis de lui attribuer la formule brute C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>ONa, renfermant six degrés d'insaturation.

Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (Figure 54) présente six signaux de méthyles angulaires (singulets) entre  $\delta_{\text{H}}$  0,70 et  $\delta_{\text{H}}$  1,10 et ceux sortant sous forme de doublet caractéristiques, attribuables à deux méthyles résonant à  $\delta_{\text{H}}$  0,78 (d,  $J = 6.0$  Hz) et 0,99 (d,  $J = 5.0$  Hz), ceci nous faisant penser à la présence d'un squelette triterpénique de type ursane. Par ailleurs, les signaux tous aussi caractéristiques à  $\delta_{\text{H}}$  3,20 (1H, dd,  $J = 10,9$  et  $5,4$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  5,11 (1H, t,  $J = 3,7$  Hz) sont ceux du proton H-3 $\alpha$  des triterpènes pentacycliques hydroxylés en C-3 et du proton vinylique H-12, respectivement (Dias *et al.*, 2011).



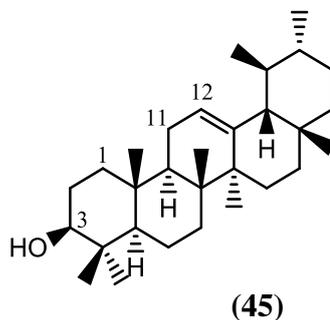
**Figure 54 :** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) d'AMR5

De même, l'observation des données RMN  $^{13}\text{C}$  d'AMR5 (Figure 55), notamment les déplacements chimiques caractéristiques des carbones C-29 ( $\delta_{\text{C}}$  17,5), C-30 ( $\delta_{\text{C}}$  21,5), C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  124,4) et C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  139,6) indiquent également un squelette de type ursane ; De plus, ces déplacements sont clairement en faveur d'une structure de type  $\alpha$ -amyrine.



**Figure 55 :** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) d'AMR5

L'ensemble de toutes ces données spectrales, comparées à celles décrites dans la littérature, permet d'identifier le composé AMR5 à l' $\alpha$ -amyrine (**45**) présent dans plusieurs familles de plantes médicinales (Mahato et Kundu, 1994 ; Dias *et al.*, 2011) (Voir Tableau XVI).



**Tableau XVI : Données spectrales de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) dans le  $\text{CDCl}_3$  d'AMR5 comparées à celles de l' $\alpha$ -amyrine ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).**

Position du carbone	AMR5 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz RMN $^{13}\text{C}$ )	$\alpha$ -amyrine (Mahato et Kundu, 1994)
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	38,8	38,7
2	27,3	27,2
3	79,1	78,3
4	38,8	38,7
5	55,2	55,2
6	18,4	18,3
7	32,9	32,9
8	40,0	40,0
9	47,7	47,7
10	36,9	36,9
11	23,4	23,3
12	124,4	124,3
13	139,6	139,3
14	42,1	42,0
15	28,7	28,7
16	26,6	26,6
17	33,7	33,7
18	59,1	58,9
19	39,6	39,6
20	39,7	39,6
21	31,2	31,2
22	41,5	41,5
23	28,1	28,1
24	15,6	15,6
25	15,6	15,6
26	16,9	16,8
27	23,3	23,3
28	28,1	28,1
29	17,5	17,4
30	21,4	21,3

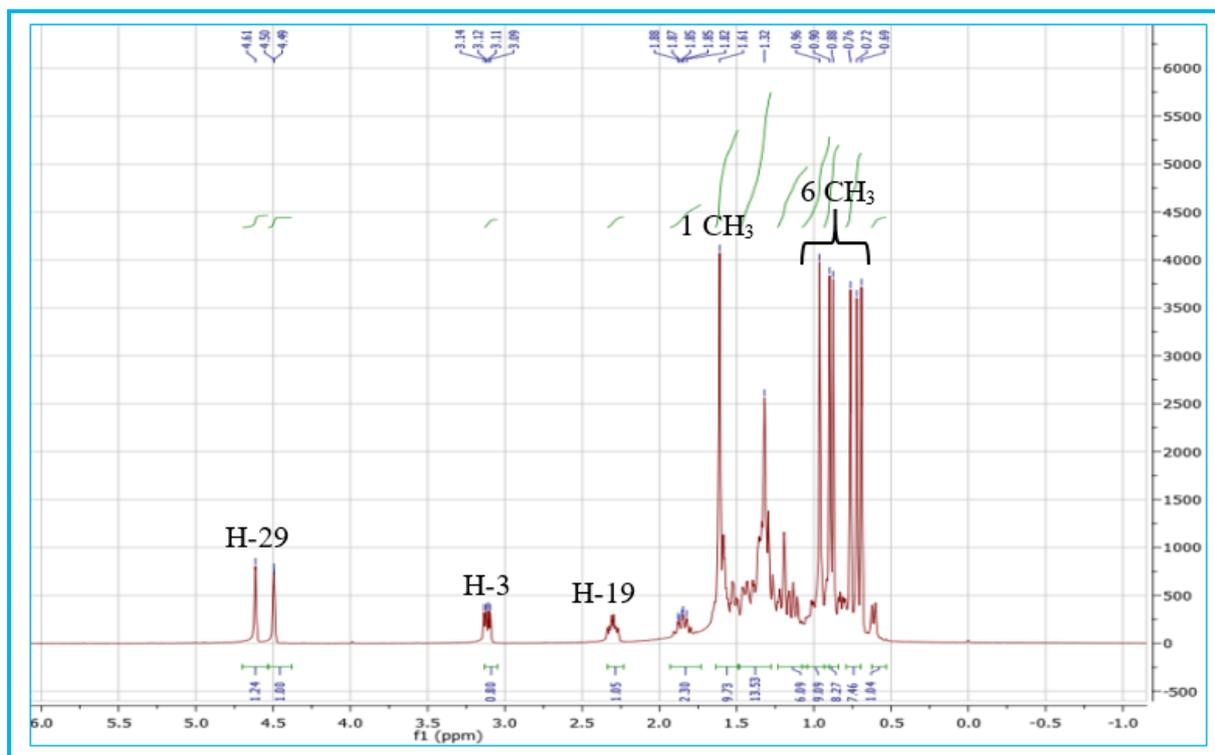
### II.2.3.4- Identification d'AMR2

Le composé AMR2 a été obtenu sous forme de paillettes blanches dans le mélange Hexane/Acétate d'éthyle (95:05). Il est soluble dans le chlorure de méthylène et répond positivement au test de Liebermann-Burchard, caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution montre le pic de l'adduit sodique [M+Na]<sup>+</sup> à  $m/z$  449,3748, compatible avec la formule brute C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>ONa et comportant six degrés d'insaturation.

Sur son spectre de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) (Figure 56), on observe :

- les singlets de sept groupements méthyles entre  $\delta_H$  0,69 et 1,61. Le signal à  $\delta_H$  1,61 est attribuable au méthyle vinylique en C-20 des triterpènes de type lup-20(29)-ène.
- un multiplet à  $\delta_H$  2,25 pouvant correspondre à la résonance du proton H-19.
- un doublet dédoublé à  $\delta_H$  3,10 (1H, dd,  $J = 10$  et  $10$  Hz) attribuable à un proton géminé à un groupement hydroxyle (H-3).
- deux singlets à  $\delta_H$  4,49 et 4,61 attribuables à deux protons (H-29) d'un carbone éthylénique terminal.

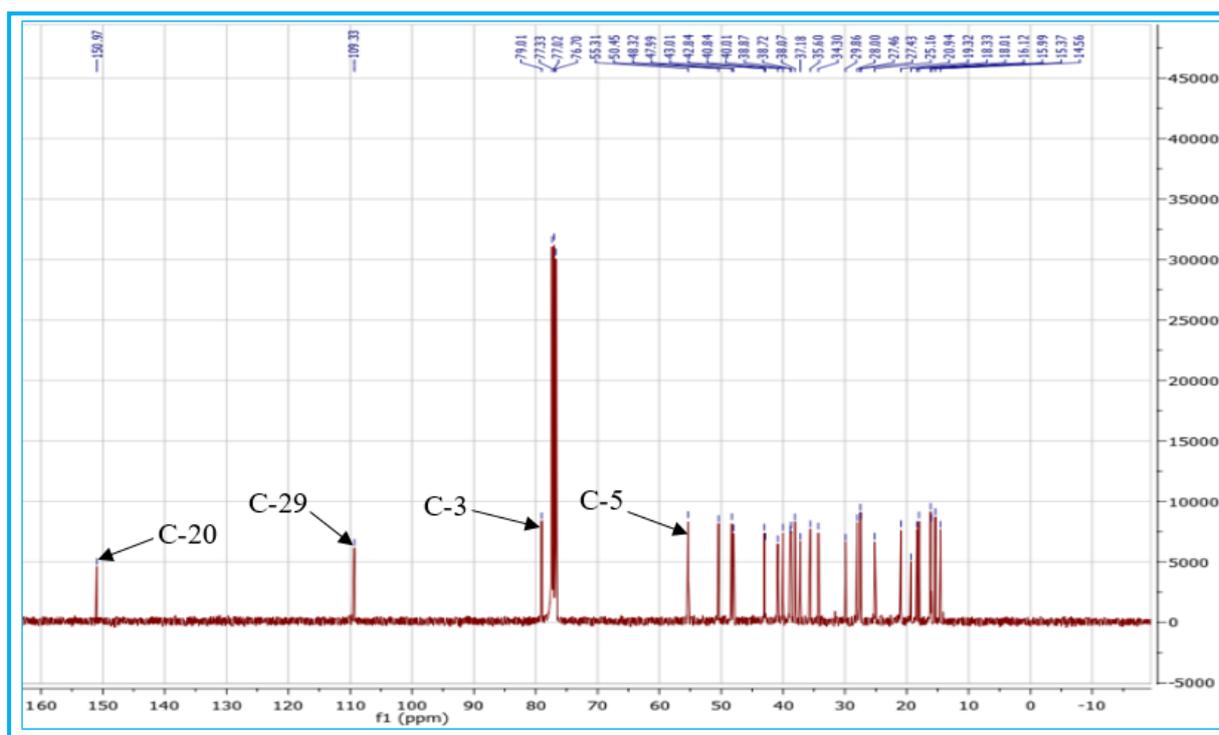


**Figure 56** : Spectre de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) d'AMR2

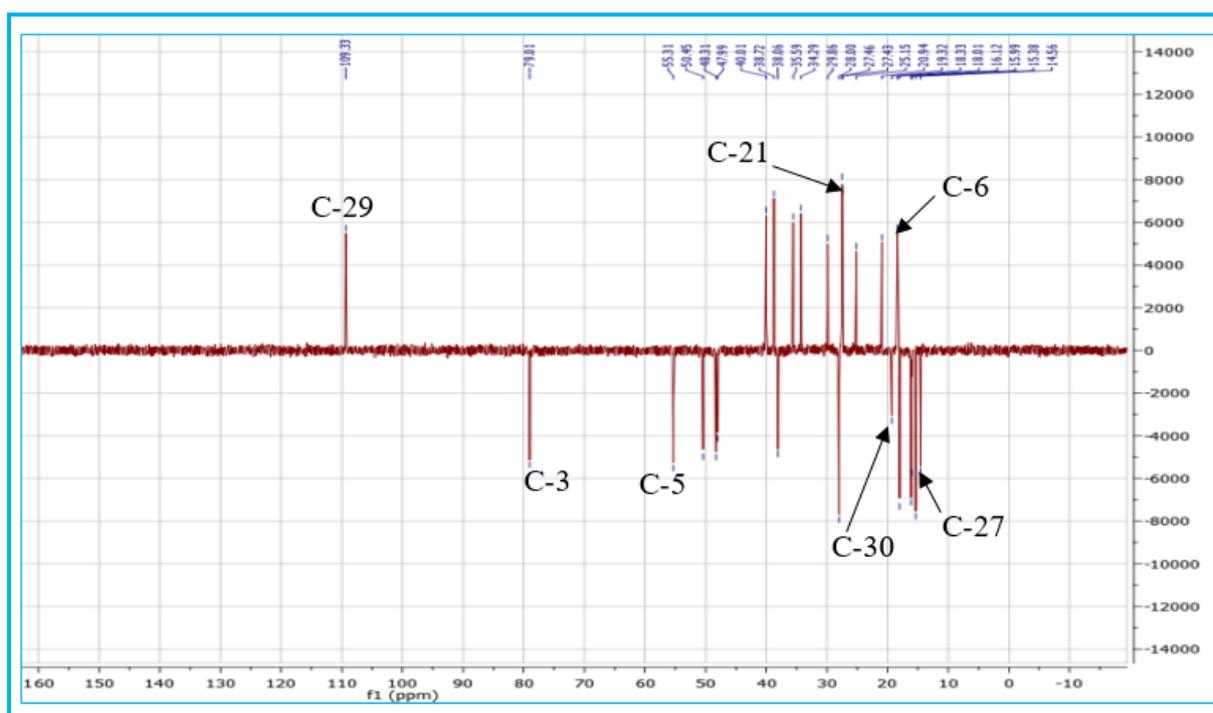
L'analyse de son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  complètement découplé large bande ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) (Figure 57) présente les signaux de trente atomes de carbone distingués grâce au spectre DEPT 135 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) (Figure 58) en :

- sept carbones de groupements méthyles à  $\delta_{\text{C}}$  14,5 ; 15,3 ; 15,9 ; 16,1 ; 18,0 ; 19,3 et 28,0.
- onze carbones de groupements méthylènes à  $\delta_{\text{C}}$  18,3 ; 20,9 ; 25,1 ; 27,4 ; 27,4 ; 29,8 ; 34,2 ; 35,5 ; 38,7 ; 40,0 et 109,3.
- six carbones de groupements méthines à  $\delta_{\text{C}}$  38,0 ; 47,9 ; 48,3 ; 50,4 ; 55,3 et 79,0.
- six carbones quaternaires à  $\delta_{\text{C}}$  37,2 ; 38,9 ; 40,8 ; 42,8 ; 43,0 ; 150,9.

Les signaux à  $\delta_{\text{C}}$  109,3 ; 150,9 et 79,0 sont attribuables aux carbones C-29, C-20 et C-3 respectivement, et sont caractéristiques des triterpènes de type lup-20(29)-ène (**Mahato et Kundu, 1994**).

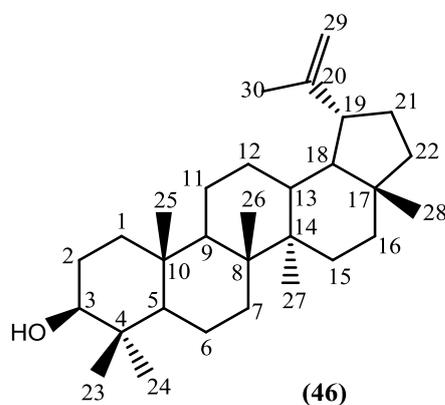


**Figure 57 :** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) d'AMR2



**Figure 58** : Spectre DEPT 135 (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) d'AMR2

L'ensemble des données spectroscopiques d'AMR2 est en accord avec celles décrites dans la littérature pour le lupéol (**46**), déjà isolé de plusieurs espèces végétales (**Mahato et Kundu, 1994**) (Voir Tableau XVII).



**Tableau XVII : Données spectrales de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) d'AMR2 comparées à celles du lupéol ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).**

Position du carbone	AMR2	Lupéol (Mahato et Kundu, 1994)
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	38,7	38,7
2	27,4	27,4
3	79,0	78,9
4	38,9	38,8
5	55,3	55,3
6	18,3	18,3
7	34,3	34,3
8	40,8	40,8
9	50,4	50,4
10	37,2	37,1
11	20,9	20,9
12	25,2	25,1
13	38,1	38,0
14	42,8	42,8
15	27,5	27,4
16	35,6	35,5
17	43,0	43,0
18	48,3	47,9
19	48,0	48,4
20	150,9	150,9
21	29,9	29,8
22	40,0	40,0
23	28,0	28,0
24	15,4	15,4
25	16,1	16,1
26	16,0	15,9
27	14,6	14,5
28	18,0	18,0
29	109,3	109,3
30	19,3	19,3

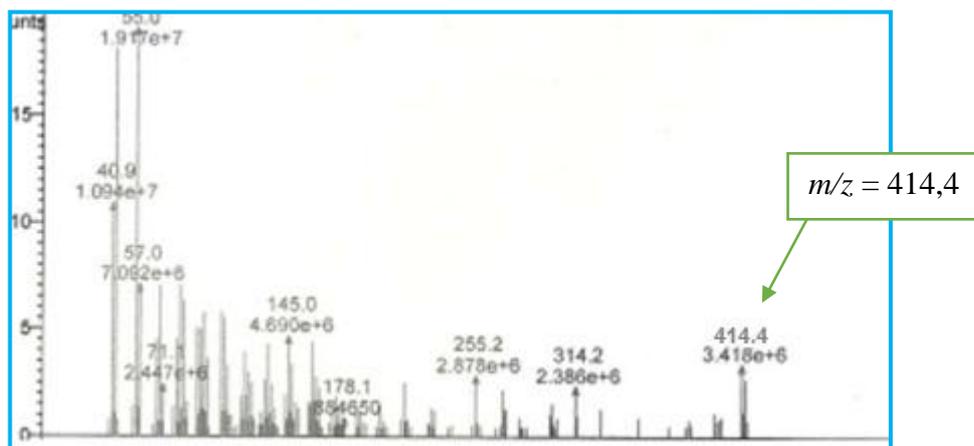
## II.2.4- Les stéroïdes

### II-2.4.1- Identification d'AME1

Le composé AME1 se présente sous forme de paillettes blanches dans le mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle (85:15) et est soluble dans le chloroforme. Il réagit positivement au

test de Liebermann-Burchard, en donnant une coloration bleue qui vire rapidement au vert foncé, caractéristique des stérols.

Son spectre de masse sous impact électronique (Figure 59) montre le pic de l'ion moléculaire à  $m/z$  414,4. La combinaison des données de ce spectre avec celles de RMN  $^1\text{H}$  permet de lui assigner la formule brute  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ , comportant cinq degrés d'insaturation.



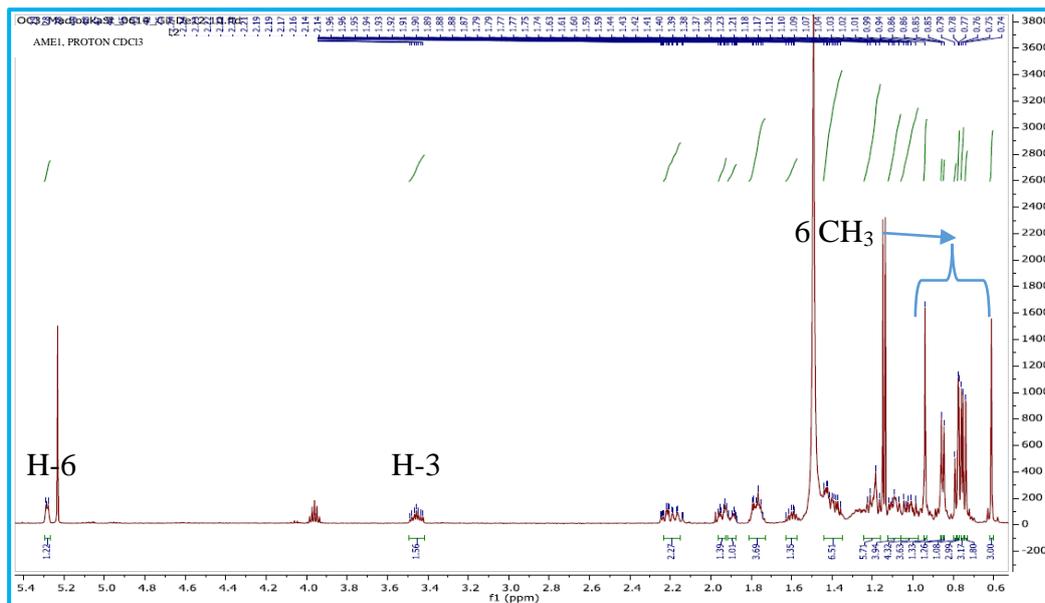
**Figure 59** : Spectre de masse sous impact électronique du composé AME1

Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) (Figure 60) montre entre autres, les signaux de résonance de :

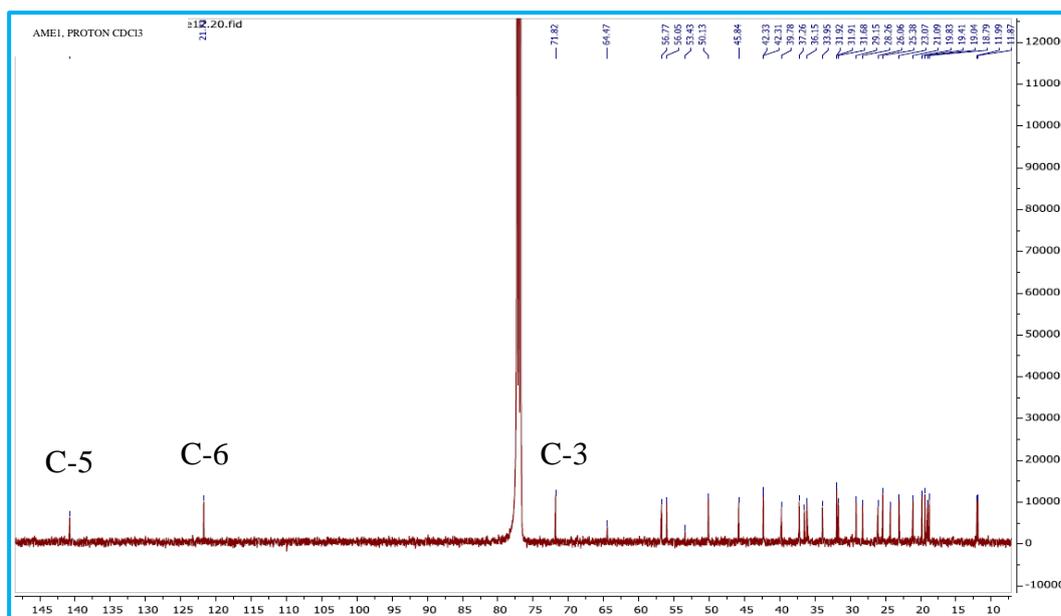
- six groupements méthyles entre  $\delta_{\text{H}}$  0,60 et 1,00.
- de deux multiplets caractéristiques et intégrant chacun pour un proton à  $\delta_{\text{H}}$  3,45 et 5,29 attribuables respectivement à H-3 porté par l'oxyméthine et à H-6 fixé sur le carbone vinylique similaire à ceux d'un  $\beta$ -sitostérol.

De même, son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 61), présente des signaux parmi lesquels ceux :

- d'un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  71,8 laissant penser au carbone de l'oxyméthine en position 3 sur la structure du  $\beta$ -sitostérol
- de deux carbones éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  140,8 et 121,7 attribuables aux carbones C-5 et C-6, respectivement et semblables aux carbones de la double liaison existante dans la structure du  $\beta$ -sitostérol.



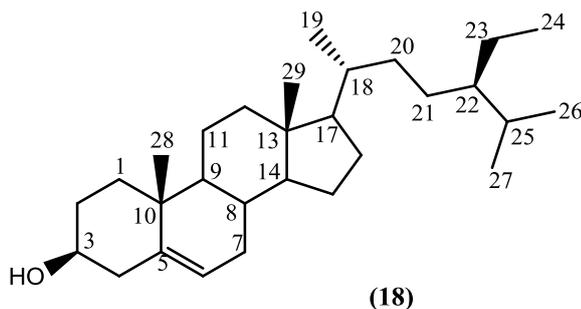
**Figure 60 :** Spectre de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHZ) d'AME1



**Figure 61 :** Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHZ) d'AME1

L'ensemble de toutes ces données spectrales, combinées à la CCM comparative avec un échantillon disponible au laboratoire nous ont conduit à attribuer au composé AME1 la structure (**18**) qui est celle du  $\beta$ -sitostérol, déjà isolé de plusieurs espèces végétales.

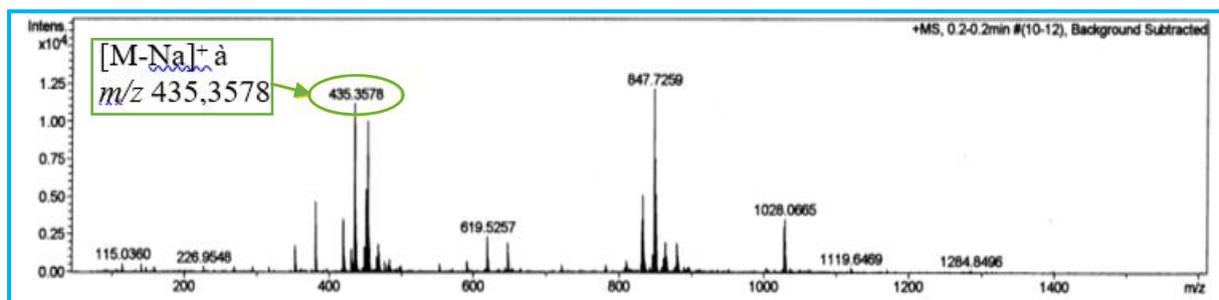
Plusieurs travaux biologiques effectués sur le  $\beta$ -sitostérol ont montré que ce composé possède des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses (Pegel, 1997; Donald et al., 1997).



### II.2.4.2- Identification d'AMR1

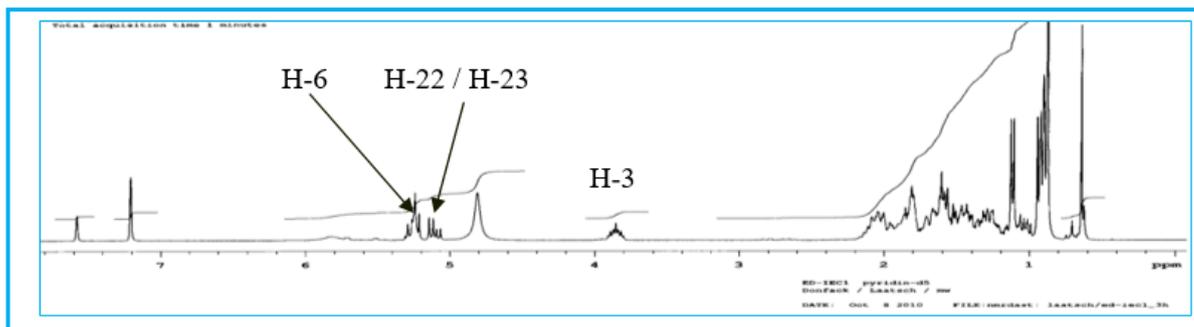
Le composé AMR1 se présente sous forme de paillettes blanches dans le mélange Hexane-Acétate d'éthyle (85:15) et est soluble dans le chloroforme. Il réagit positivement au test de Liebermann-Burchard, en donnant une coloration bleue qui vire rapidement au vert foncé, caractéristique des stérols.

Son spectre de masse ESI en mode positif à haute résolution (Figure 62) montre le pic de l'adduit sodique  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 435,3578$  (calc. 435,3605 pour  $C_{29}H_{48}ONa$ ), compatible à la formule brute  $C_{29}H_{48}O$ , renfermant 6 insaturations.

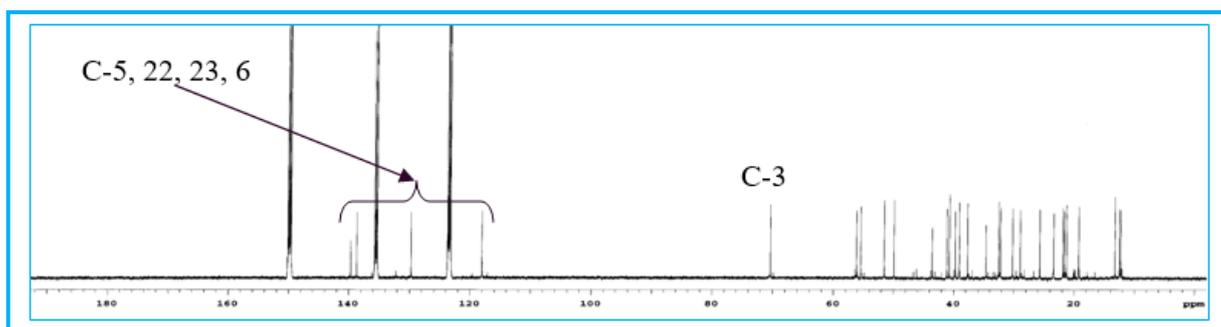


**Figure 62 :** Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AMR1

Sur son spectre de RMN  $^1H$  (Figure 63), on observe les signaux à  $\delta_H$  5,25 (H-6), 3,85(H-3) et les signaux des protons H-22 et H-23 en position *trans* du stigmastérol à  $\delta_H$  5,11 (1H, dd,  $J = 15,2$  Hz et  $J = 8,6$  Hz) et 5,25 (1H, dd,  $J = 15,2$  Hz et  $J = 8,7$  Hz). Ceci a été confirmé par son spectre de RMN  $^{13}C$  (Figure 64) sur lequel on observe les signaux des carbones éthyléniques à  $\delta_C$  140,7 (C-5), 121,7 (C-6), 138,3 (C-22) et 129,3 (C-23), ainsi que le signal du carbone d'un oxyméthine à  $\delta_C$  71,8 (C-3) (Sarwar et al., 1996).

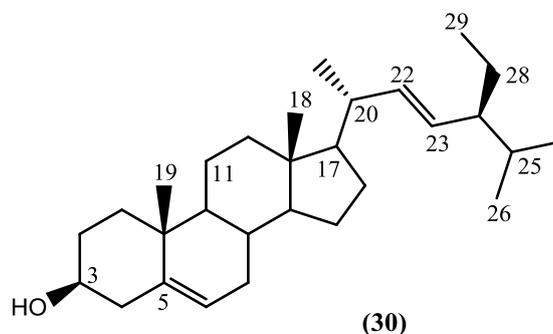


**Figure 63 :** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  d'AMR1 (Pyridine- $d_5$ , 300 MHz)



**Figure 64 :** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  d'AMR1 (Pyridine- $d_5$ , 75 MHz)

AMR1 a donc été identifié au stigmasterol (**30**) grâce à ses données spectroscopiques, physiques et en comparaison par CCM avec un échantillon disponible dans notre laboratoire.

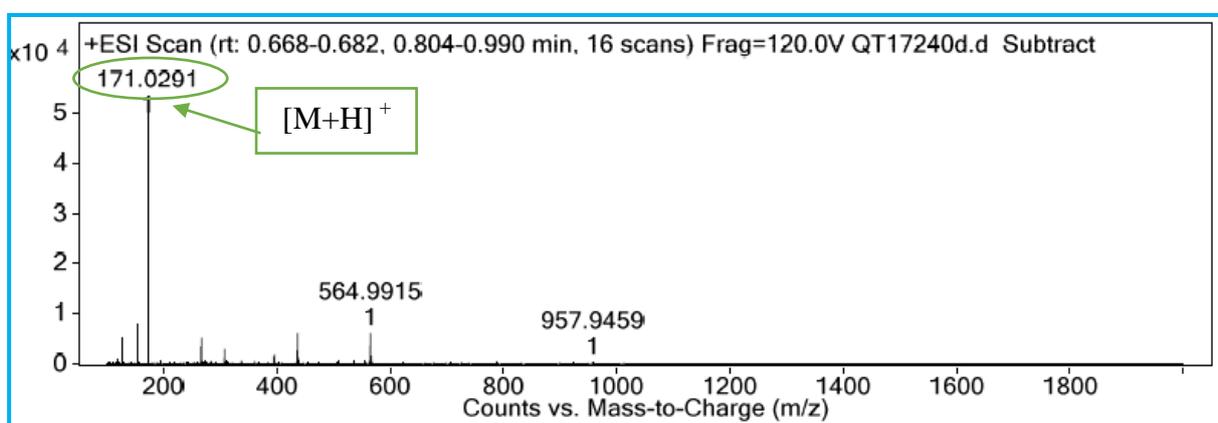


## II.2.5- Les acides phénoliques

### II.2.5.1- Identification d'AME4

Le composé AME4 précipite dans le mélange Hexane-Acétate d'éthyle (1:1) sous forme de poudre blanchâtre. Il est soluble dans le méthanol et réagit positivement aux tests au chlorure ferrique indiquant sa nature phénolique.

Son spectre de masse ESI en mode positif (Figure 65) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 171,0291$  correspondant à la formule brute  $C_7H_7O_5$ , renfermant cinq degrés d'insaturation.



**Figure 65** : Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AME4

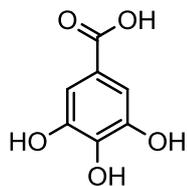
Le spectre de RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) (Figure 66) montre un singulet dans la zone aromatique intégrant pour deux protons à  $\delta_H$  6,91 et un singulet attribuable au groupement hydroxyle à  $\delta_H$  9,15 attribuable à un proton d'un acide carboxylique.

Son spectre de RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) (Figure 67), associé au spectre HSQC (Figure 68) présentent les signaux de :

- cinq carbones quaternaires dont celui résonant à  $\delta_C$  167,9 confirmant ainsi la présence d'un groupe carboxyle au sein d'AME4, de même quatre carbones aromatiques parmi lesquels 3 oxygénés à  $\delta_C$  145,9 (C-3/C-5) et 138,4 (C-4), et celui à  $\delta_C$  120,9 (C-1).
- deux carbones aromatiques portant chacun un proton à  $\delta_C$  109,2 (C-2/C-6).

Au regard de sa formule brute, AME4 serait un acide phénolique ayant un plan de symétrie. En effet sur son spectre HMBC (Figure 69), on observe les corrélations entre les protons à  $\delta_H$  6,91 (H-2/H-6) et les carbones à  $\delta_C$  167,9 (COOH), 145,9 (C-3/C-5) ; 138,4 (C-4) et 120,9 (C-1).

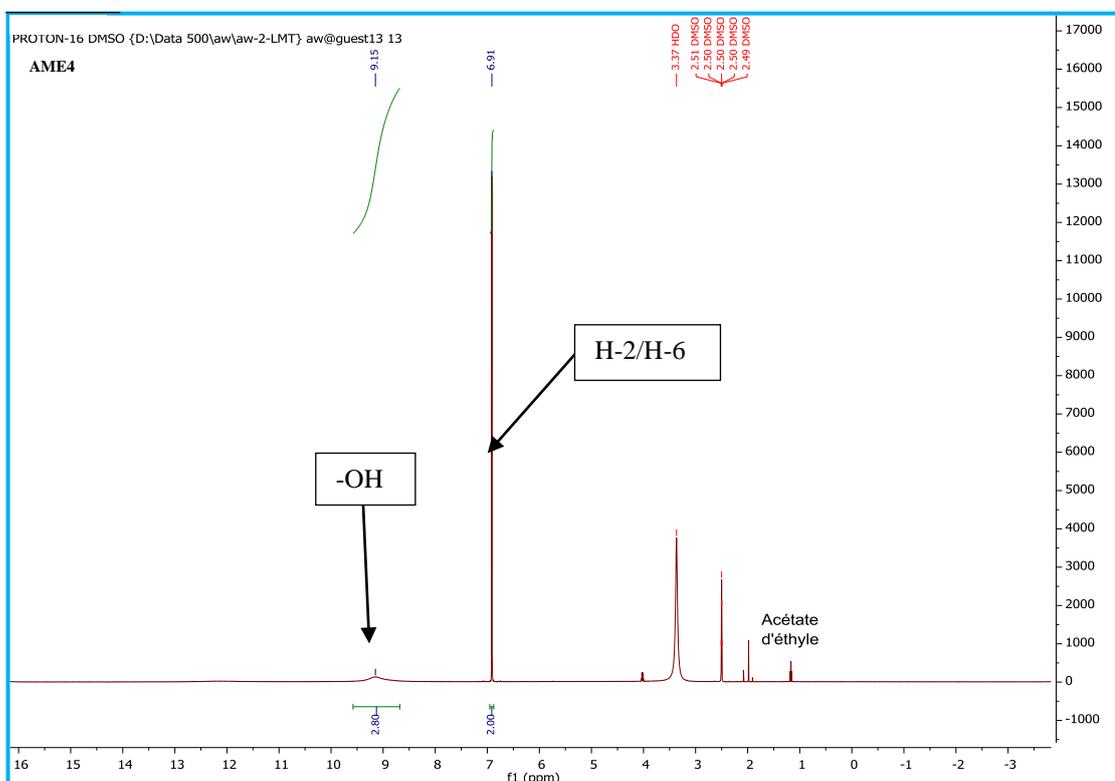
Toutes ces données spectroscopiques sont en accord avec celles décrites dans la littérature pour l'acide gallique (47) (Du et al., 2004) (Voir Tableau XVIII).



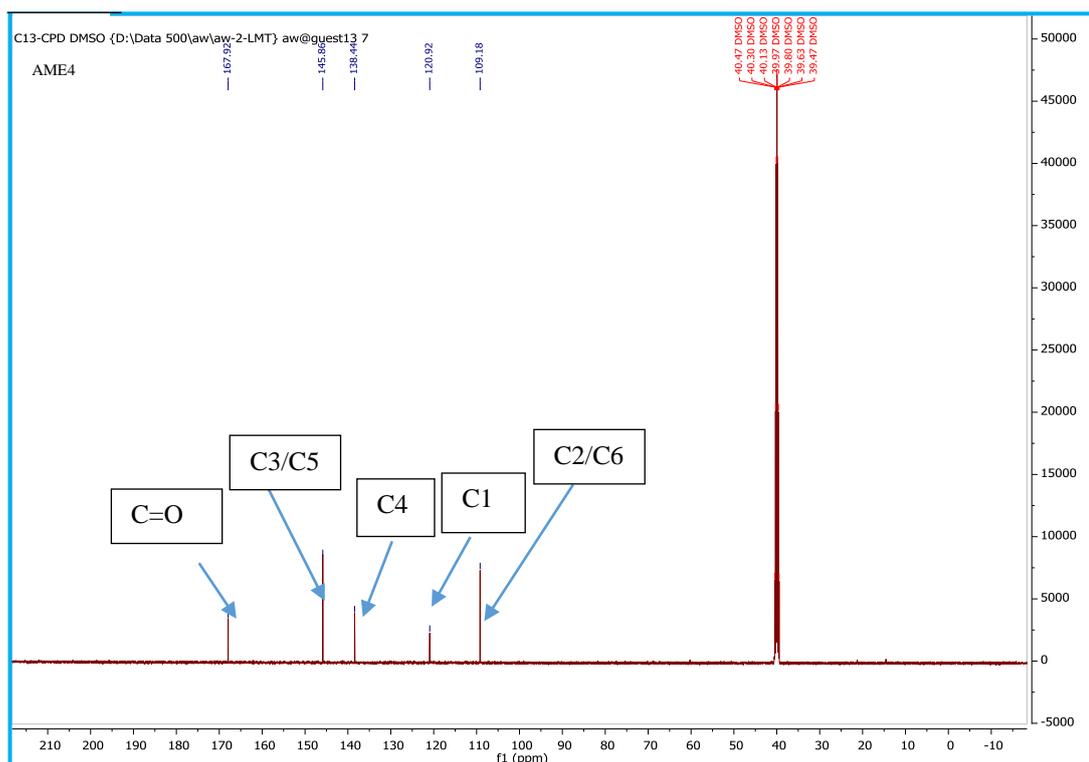
(47)

**Tableau XVIII:** Données de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) et  $^1\text{H}$  (500 MHz) d'AME4 comparées à celles de l'acide gallique [RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) et  $^1\text{H}$  (400 MHz)] dans le DMSO- $d_6$ .

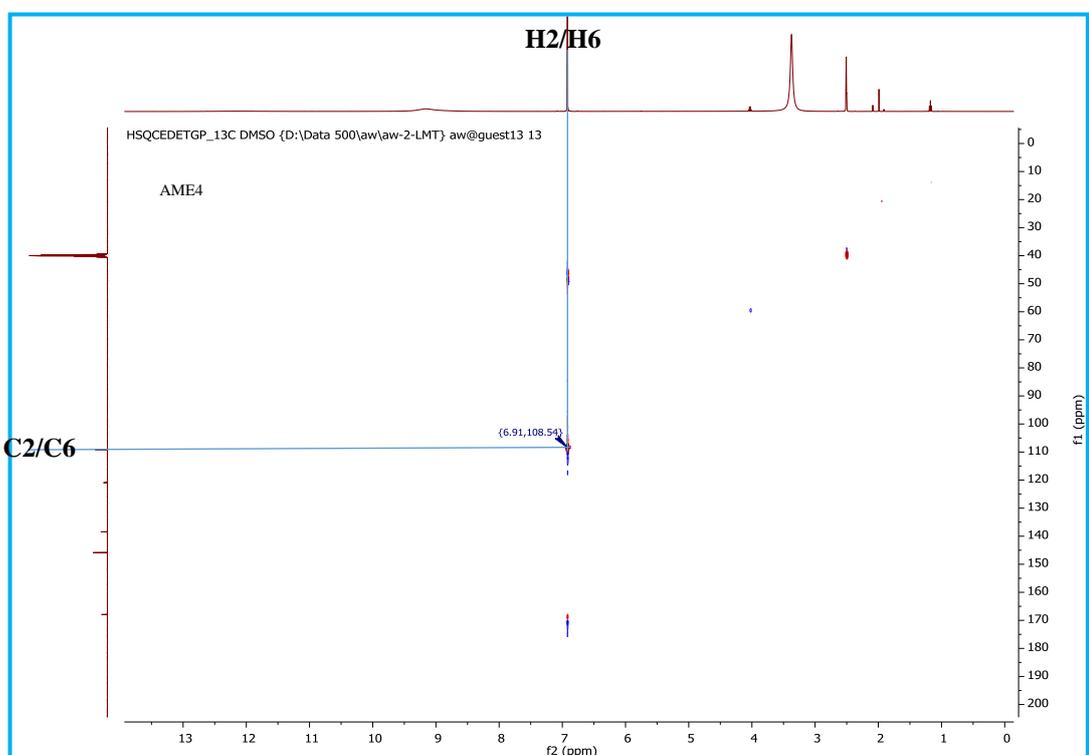
Position du carbone	AME4		Acide gallique (Du et al., 2004)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (nH, m)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (nH, m)
1	120,9	-	120,2	-
2; 6	109,1 (2C)	6,91 (2H, s)	109,1 (2C)	7,02 (2H, s)
3; 5	145,9 (2C)	-	145,2 (2C)	-
4	138,4	-	138,4	-
C=O	167,9	-	166,2	-



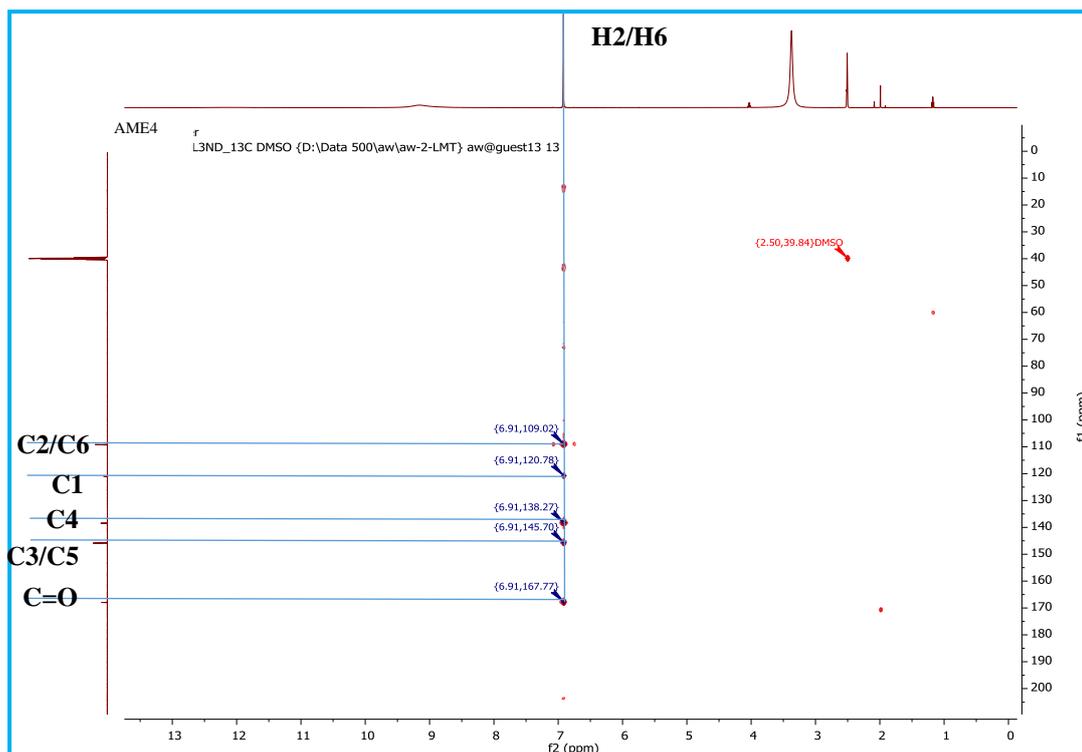
**Figure 66 :** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) d'AME4



**Figure 67 :** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) d'AME4



**Figure 68 :** Spectre HSQC (DMSO- $d_6$ ) d'AME4

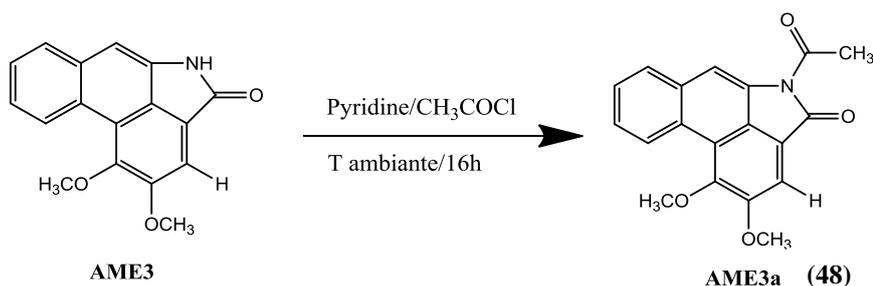


**Figure 69** : Spectre HMBC (DMSO- $d_6$ ) d'AME4

## II.3- TRANSFORMATIONS CHIMIQUES D'AME3 ET D'AME5

### II.3.1- Acétylation d'AME3

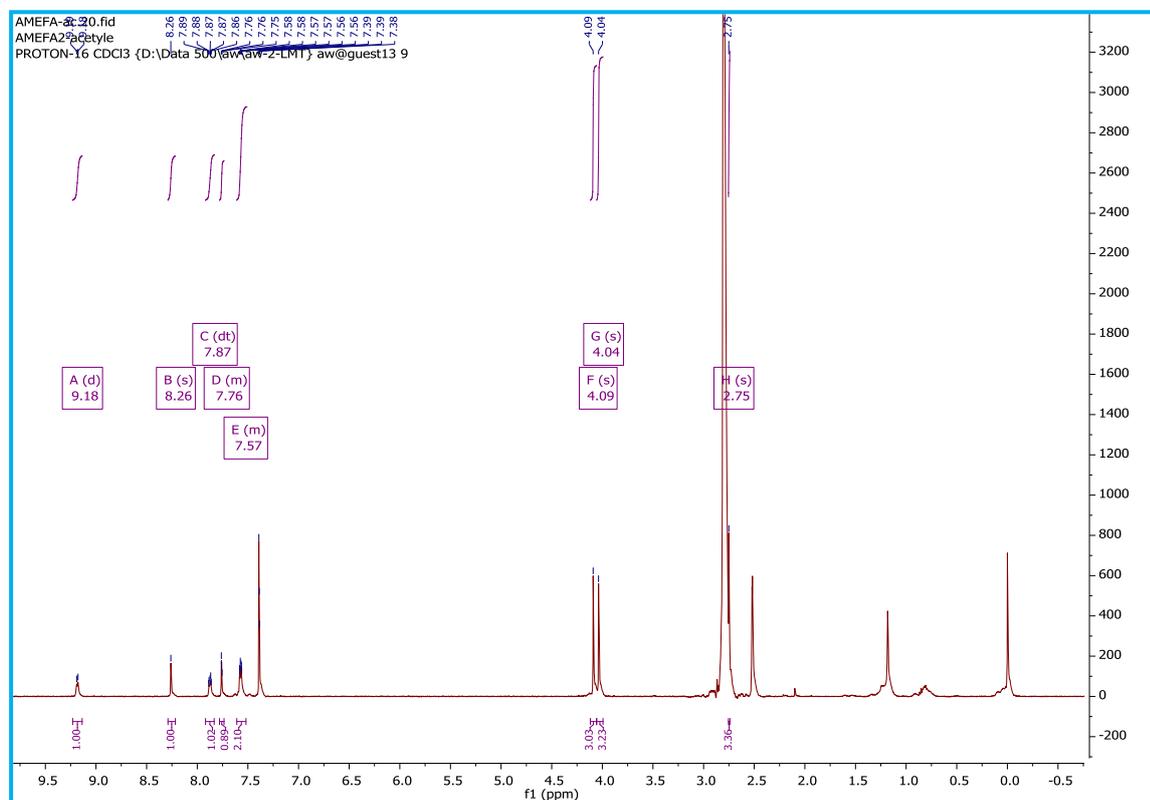
L'acétylation d'AME3 a été réalisée suivant le schéma réactionnel ci-après (Schéma 10) :



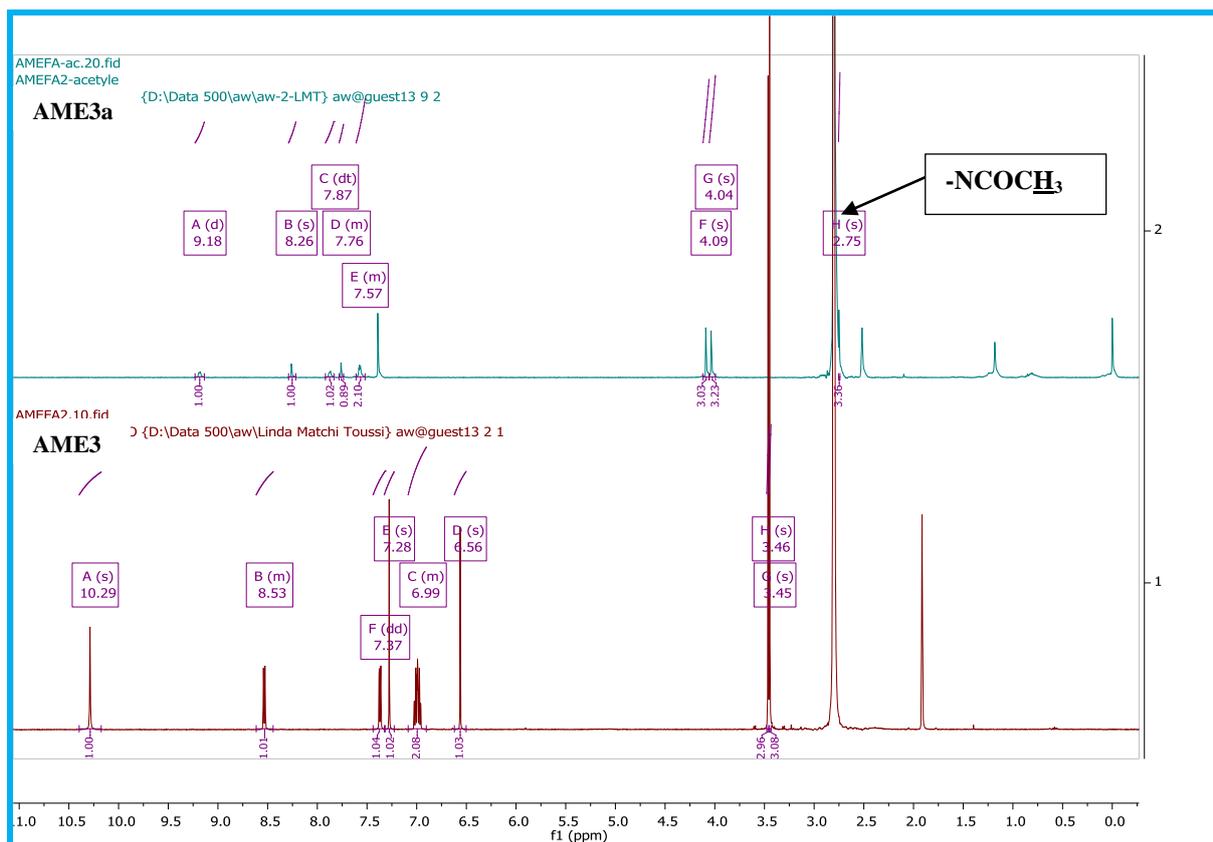
#### **Schéma 10** : Acétylation d'AME3

La réaction d'AME3 avec le chlorure d'acétyle dans la pyridine a conduit à AME3 acétylé avec un rendement de 89%. Ce composé a été obtenu sous forme de poudre jaunâtre soluble dans le dichlorométhane. Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Figure 70) diffère de celui d'AME3 par l'absence du signal de -NH et l'apparition du signal d'un méthyle de groupement

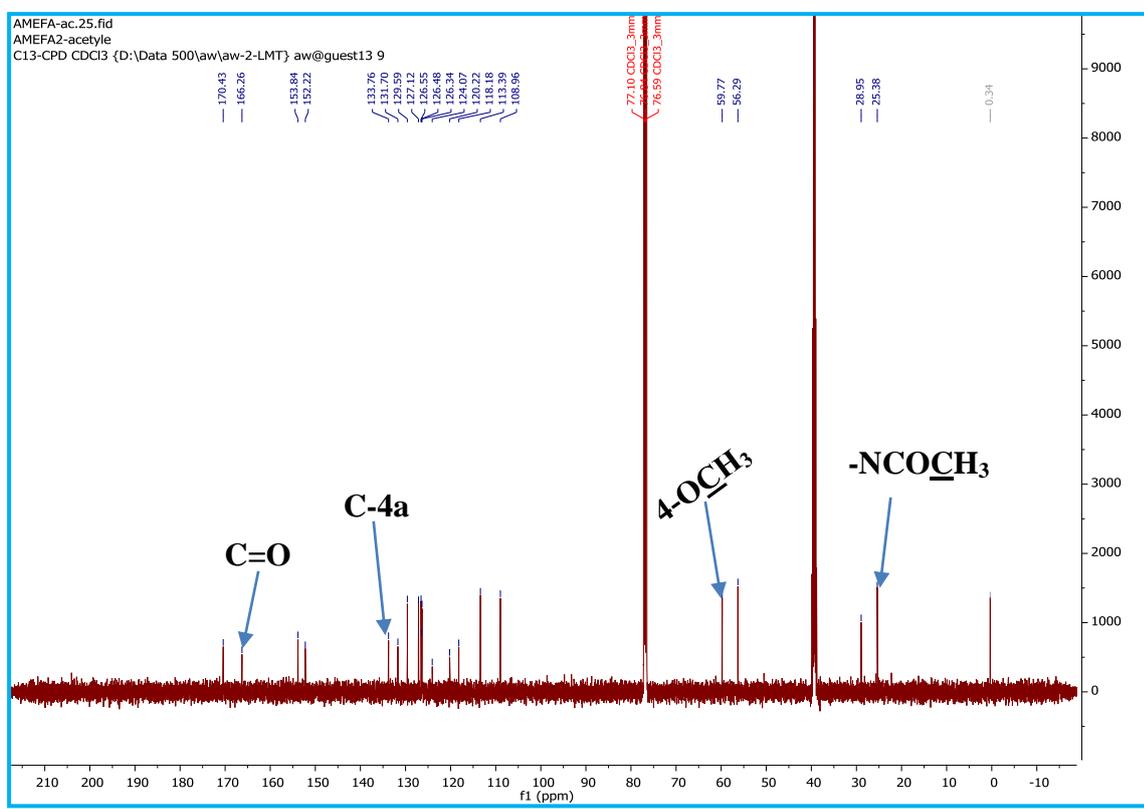
acétyle (-NCOCH<sub>3</sub>) (Figure 71). Ces observations ont été confirmées, sur son spectre de RMN <sup>1</sup>H et sur son spectre de RMN <sup>13</sup>C (Figure 72), par la présence de deux signaux de carbone de plus (un carbonyle d'amide et un méthyle), confirmant ainsi la présence d'un groupement acétyle sur AME3 (Figure 73).



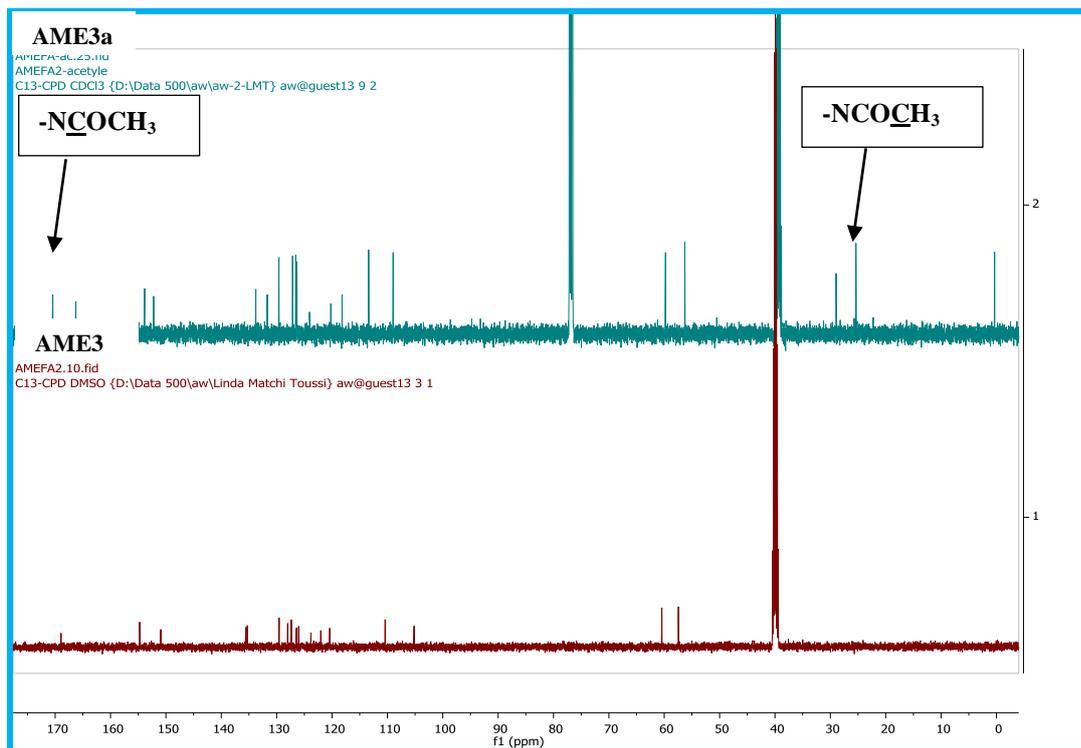
**Figure 70** : Spectre de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) d'AME3a



**Figure 71 :** Spectres comparés de RMN <sup>1</sup>H d'AME3a (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) et d'AME3 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz), respectivement.

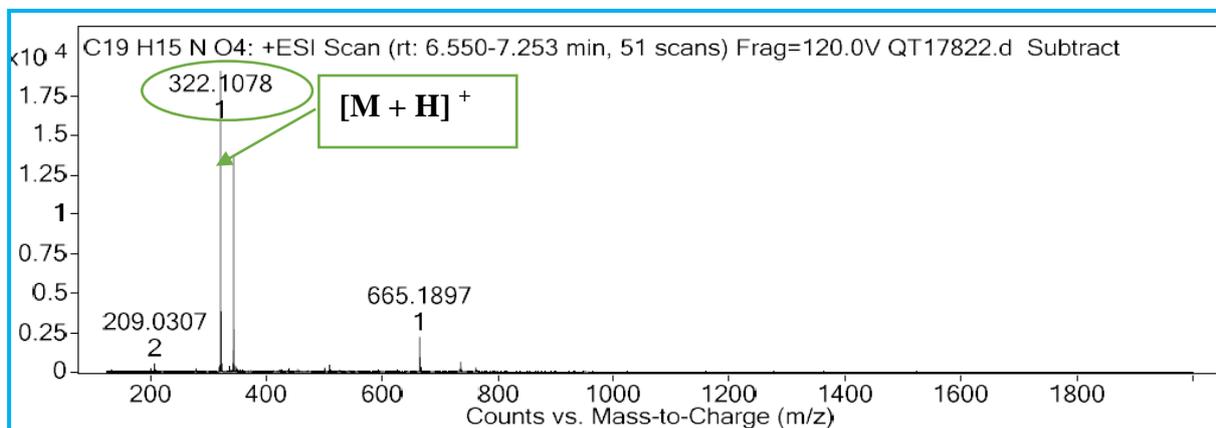


**Figure 72 :** Spectre de RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) d'AME3a



**Figure 73 :** Spectres comparés de RMN<sup>13</sup>C d'AME3a (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) et d'AME3 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz), respectivement.

L'ensemble de ces données, comparées à celles d'AME3, permet d'attribuer au composé AME3a, la structure **(48)**, qui est celle de l'aristolactam BII acétylé, nouveau composé de synthèse (Voir Tableau XIX). Cette structure est corroborée par son spectre de masse ESI en mode positif (Figure 74) qui montre le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 322,1078$ , correspondant à la formule brute C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub> et renfermant 13 degrés d'insaturation.



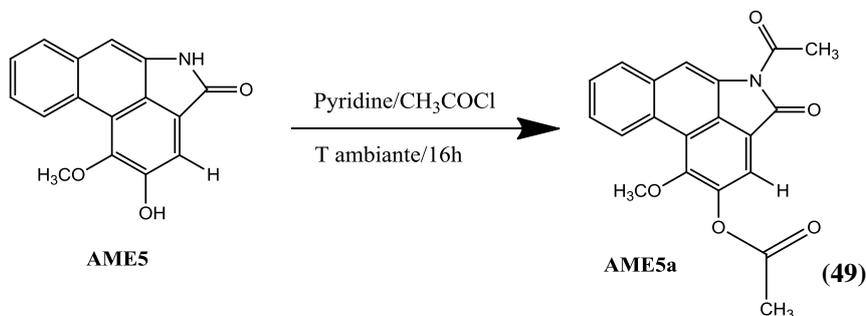
**Figure 74** : Spectre de masse ESI<sup>+</sup> à haute résolution d'AME3a

**Tableau XIX** : Données de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) et <sup>1</sup>H (500 MHz) d'AME3a dans le CDCl<sub>3</sub>.

Position du carbone	AME3a	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (nH, mult., J (Hz))
1	120,2	-
2	113,4	7,76 (1H, s)
3	153,5	-
4	151,9	-
4a	133,8	-
4b	118,1	-
5	126,5	9,18 ( 1H, d, J = 6,5 Hz)
6	127,1	7,57 (1H, m )
7	126,4	7,57 (1H, m)
8	129,6	7,87 (1H, d, J = 6,5 Hz)
8a	126,3	-
9	109,0	8,26 (1H, s)
10	131,7	-
10a	124,0	-
C=O	166,3	-
NCOCH <sub>3</sub>	170,5	-
NCOCH <sub>3</sub>	25,4	2,75 (3H, s)
MeO-3	56,3	4,04 (3H, s)
MeO-4	59,8	4,09 (3H, s)

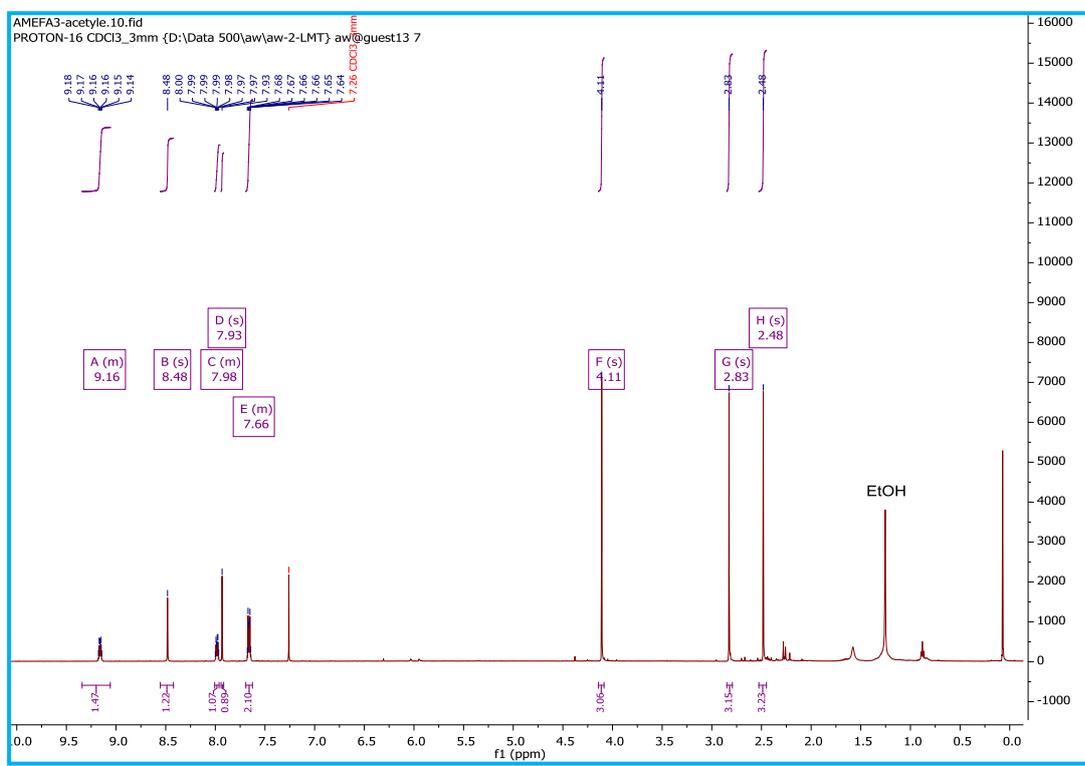
### II.3.2- Acétylation d'AME5

L'acétylation d'AME5 a été réalisée suivant le schéma réactionnel ci-après (Schéma 11) :

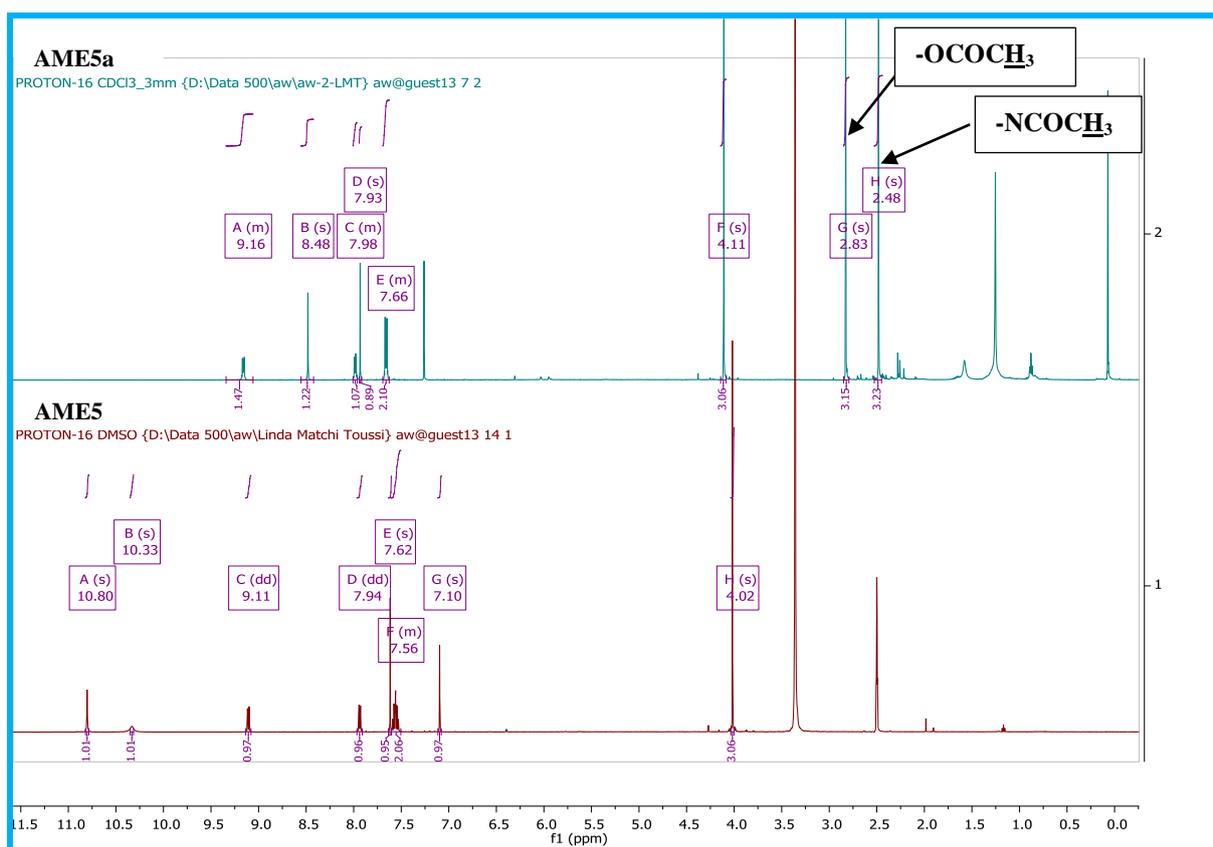


**Schéma 11** : Acétylation d'AME5

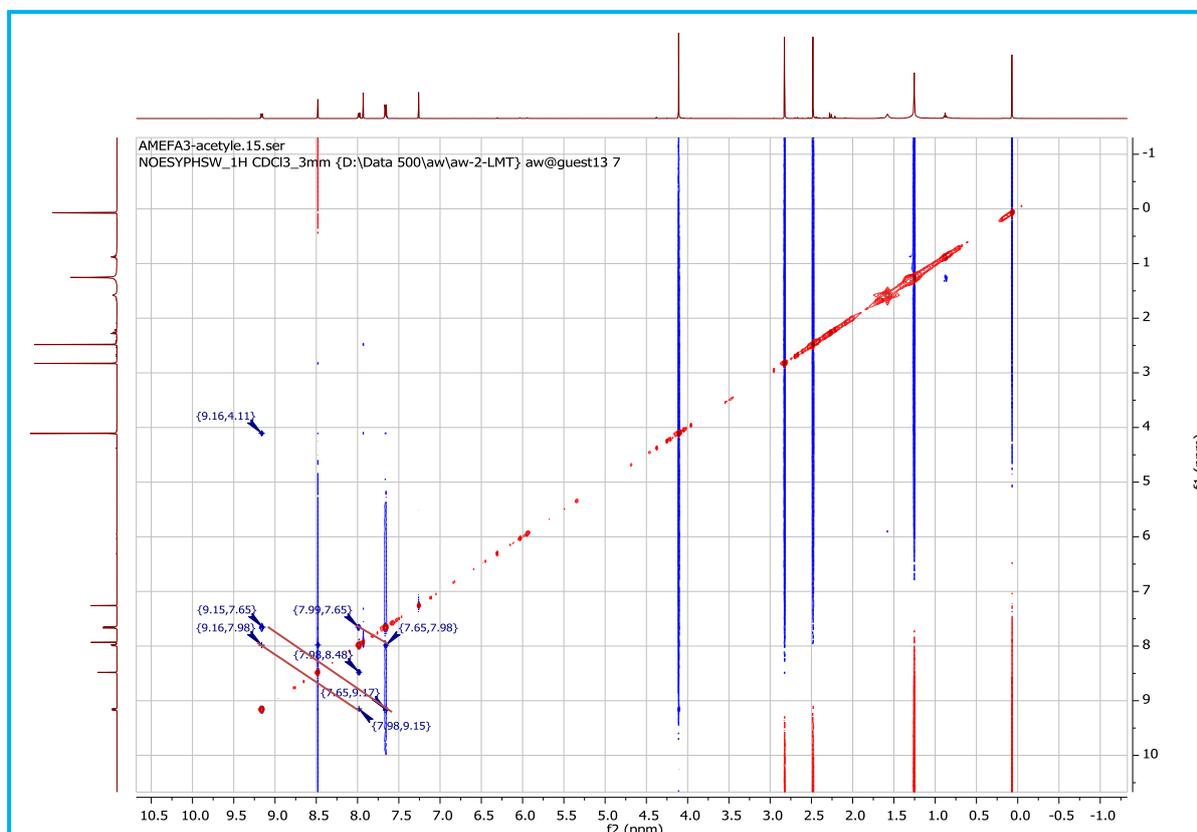
La réaction d'AME5 avec le chlorure d'acétyle dans la pyridine, à température ambiante, a conduit à AME5 diacétylé avec un rendement de 73%. Ce composé a été obtenu sous forme de poudre jaune soluble dans le dichlorométhane. Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Figure 75) diffère de celui de AME5 par l'absence des signaux de protons de groupement hydroxyle et de -NH et l'apparition de signaux de deux méthyles de groupement acétyle (-NCOCH $_3$ ) et (-OCOCH $_3$ ) (Figure 76). Egalement, sur le spectre NOESY d'AME5 diacétylé (Figure 77), des corrélations sont observées confirmant ainsi la présence de deux groupements acétyles sur AME5.



**Figure 75 :** Spectre de RMN $^1\text{H}$  (CDCl $_3$ , 500 MHz) d'AME5a



**Figure 76 :** Spectres comparés de RMN  $^1\text{H}$  d'AME5a ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) et d'AME5 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz), respectivement.



**Figure 77 : Spectre NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) d' AME5a**

L'ensemble de ces données, comparées à celles de AME5, permet d'attribuer au composé AME5a, la structure (**49**), qui est celle de l'aristolactam AII diacétylé, déjà décrit par **Tsuruta et al., 2002**. Cette structure est corroborée par son spectre de masse ESI en mode positif qui montre le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  350,15 ; correspondant à la formule brute C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub> et renfermant 14 degrés d'insaturation.

## **II.4- ACTIVITES ENZYMATIQUE, ANTISCHISTOSOMIALE ET CYTOTOXIQUE DES EXTRAITS, DE QUELQUES COMPOSÉS ISOLÉS D'A. MANNII ET DES DÉRIVÉS HÉMISYNTHÉTIQUES**

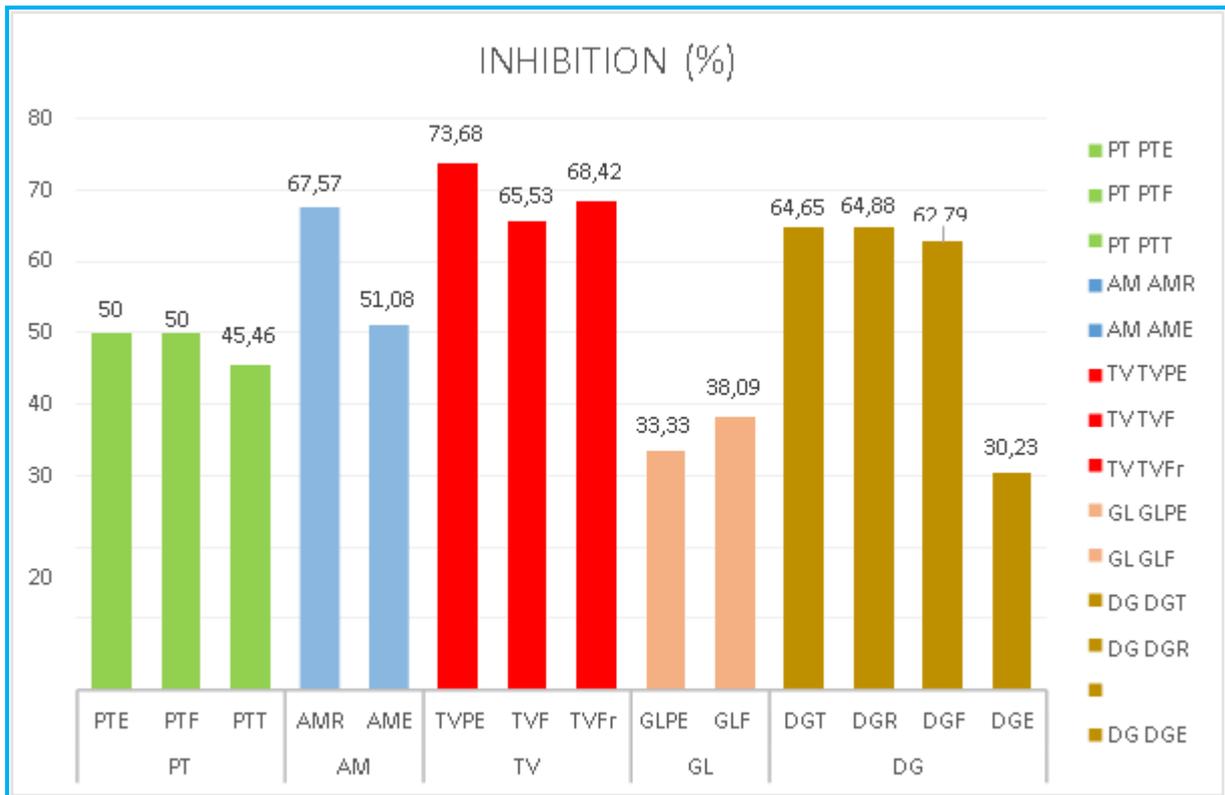
Dans le but de valider l'usage d'*A. manni* dans la médecine traditionnelle, des tests d'activités antiparasitaire et enzymatique ont été entrepris sur des extraits, des fractions et certains des composés isolés de cette plante choisie sur la base des résultats positifs du screening antischistosomial préliminaire.

### **II.4.1- Screening préliminaires réalisés sur quelques plantes**

#### **II.4.1.1- Screening biologique**

Un screening préliminaire a été réalisé sur différents extraits des plantes afin d'évaluer leurs propriétés antischistosomiale et enzymatique *in vitro* respectivement sur *Schistosoma mansoni* et sur l'enzyme SmNACE (Tableau XX), ceci dans le but de sélectionner les plantes à étudier. L'évaluation a été faite selon les méthodes décrites brièvement ci-dessous. Les résultats sont consignés dans le graphe ci-contre :

Partis de 14 extraits obtenus de différentes parties de 5 plantes, nous avons évalué tout d'abord l'activité enzymatique de ceux-ci (Figure 78).

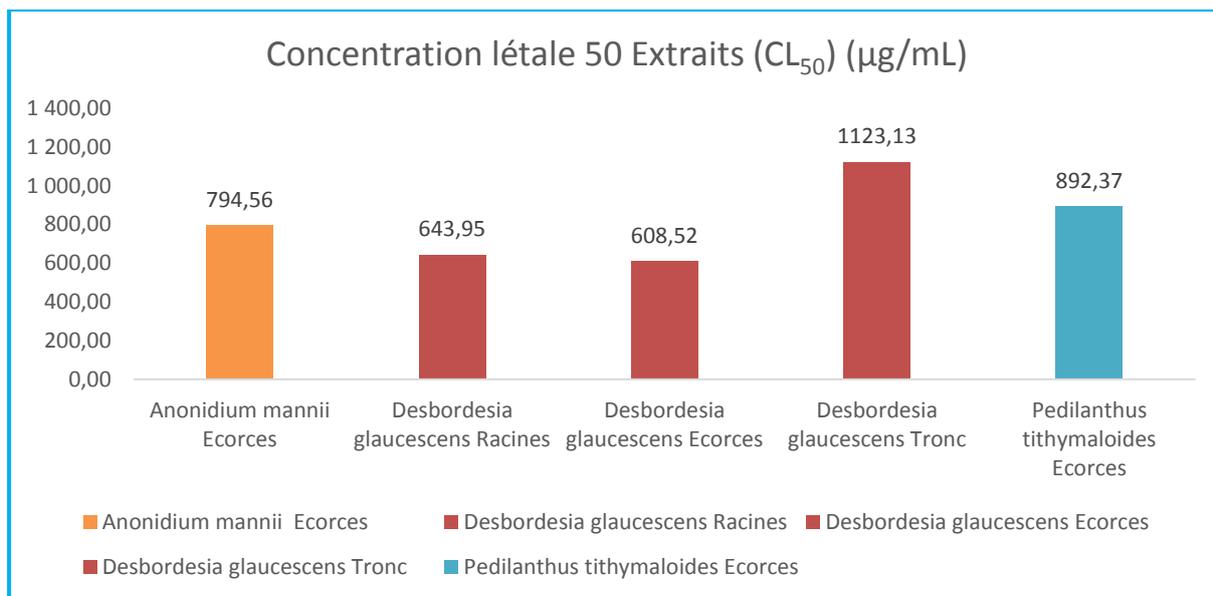


**Figure 78 : Pourcentage d'inhibition des différents extraits**

Le test enzymatique est un test fluorimétrique. Cette technique repose sur l'utilisation d'un analogue fluorescent du substrat : l' $\epsilon$ -NAD<sup>+</sup> (nicotinamide-1,N<sup>6</sup>-éthénoadénine dinucléotide). L'hydrolyse de l' $\epsilon$ -NAD<sup>+</sup> par l'enzyme se traduit par une forte amplification de la fluorescence. Cette augmentation de fluorescence visible permet de déterminer l'activité enzymatique de la protéine. Pour évaluer les inhibitions des extraits, nous avons comparé les activités enzymatiques en présence et en absence d'inhibiteurs.

Pour sa part, le test parasitaire effectué sur les extraits avait pour but d'étudier la mortalité et la motilité du parasite. Il a été question de vérifier également la parité des vers mâle et femelle au départ. Cette étude s'est faite en 24 h et à l'issue, la concentration létale CL<sub>50</sub> a été déterminée. Le milieu de culture étant aqueux, les extraits ont été dissous soit dans de l'eau, soit en utilisant du DMSO à des concentrations de 0,5%, à des doses variables.

Les taux de mortalité des schistosomes adultes après 48 heures d'incubation dans l'extrait hydroalcoolique de différentes plantes aux concentrations de 62,5 à 2000 µg/mL sont présentés sur la figure 79.



**Figure 79 :** Concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) des extraits hydroalcooliques des différentes plantes

Il en ressort qu'une augmentation statistiquement significative du taux de mortalité de façon concentration-dépendante est notée après administration des racines ou des écorces de *Desbordesia glaucescens*. Seules les écorces aussi bien d'*Anonidium mannii* que de *Pedilanthus tithymaloides* exhibent des taux de mortalité statistiquement significatifs à toutes les concentrations (de 62,5 à 2000 µg/mL).

Les fruits de *Tephrosia vogelii* ont montré des taux de mortalité statistiquement non significatifs à toutes les concentrations. Seul le taux de mortalité enregistré avec la plante entière a été statistiquement significatif à la concentration de 2000 µg/mL.

A la plus grande concentration de 2000 µg/mL, les taux de mortalité enregistrés étaient par ordre décroissant : 100% (*Desbordesia glaucescens* Racines) > 89,43% (*Desbordesia glaucescens* Tronc) > 82,61% (*Pedilanthus tithymaloides* Ecorces) > 76,60% (*Desbordesia glaucescens* Ecorces) > 62,61% (*Anonidium mannii* Ecorces) > 28,52% (*Tephrosia vogelii* Plante entière) > 16,19% (*Tephrosia vogelii* Fruits).

Les résultats des tests enzymatique et antiparasitaire ont été regroupés dans le tableau XX ci-dessous :

**Tableau XX : Résultats du screening antischistosomial et enzymatique des extraits sur *Schistosoma mansoni* et SmNACE.**

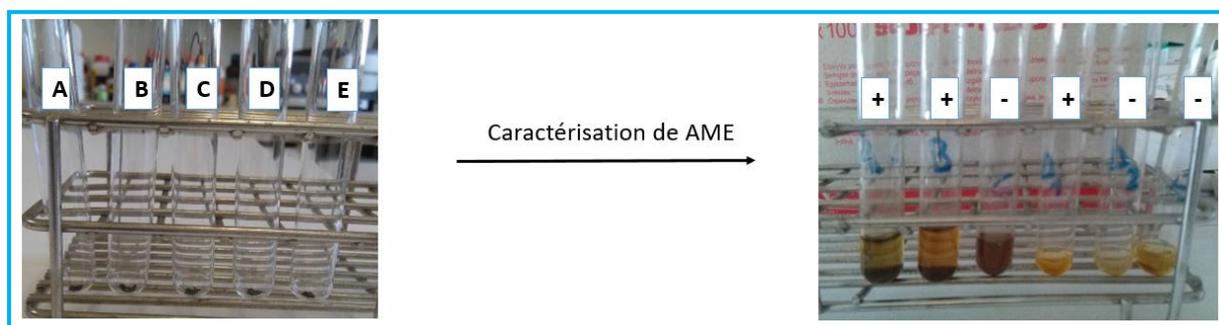
Nom des plantes	Partie de la plante (Code)	Activités biologiques des extraits	
		Parasites ( <i>in vitro</i> )	Enzyme ( <i>in vitro</i> )
<i>Pedilanthus tithymaloïdes</i>	écorces (PTE)	Actif	Non actif
	Tronc (PTT)	Non actif	Non actif
<i>Anonidium manni</i>	Ecorces (AME)	Actif	Actif
	Racines (AMR)	Actif	Actif
<i>Desbordesia glaucescens</i>	Ecorces (DGE)	Actif	Non actif
	Feuilles (DGF)	Non actif	Actif
	Tronc (DGT)	Non actif	Actif
	Racines (DGR)	Non actif	Actif
<i>Tephrosia vogelii</i>	Feuilles (TVF)	Non actif	Actif
	Fruits (TVFr)	Non actif	Actif
	Reste de la plante (TVPE)	Non actif	Actif
<i>Gouania longispicata</i>	Feuilles (GLF)	Non actif	Non actif
	Reste de la plante (GLPE)	Non actif	Non actif

De cette évaluation, il en ressort que : 10 extraits ont montré un taux d'inhibition supérieur à 50% et 4 extraits ont montré un taux de mortalité des schistosomes particulièrement significatif.

Seuls, deux extraits [Ecorces (AME) et Racines (AMR)] appartenant à l'espèce *Anonidium manni* ont montré une activité importante à la fois sur le parasite et sur l'enzyme, qui sont les deux cibles biologiques entrant dans notre projet d'étude.

Considérés comme références internes, les antagonistes les plus actifs des deux cibles biologiques que sont le praziquantel et la cyanidine appartiennent respectivement aux familles des alcaloïdes et des flavonoïdes. Pour se faire, afin d'estimer les différentes familles de composés dans les écorces et les racines d'*Anonidium mannii*, nous avons effectué un screening chimique (AME, Figure 80) qui nous a permis de constater que les principaux métabolites secondaires de ces parties sont les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes et les terpènes.

#### II.4.1.2- Screening chimique



**A** : Tanins (MeOH, Eau distillée + gouttes de FeCl<sub>3</sub> 1%) : **B** : Flavonoïdes (EtOH, HCl concentré + copeaux de Mg) : **C** : Anthocyanes (EtOH, HCl concentré, NH<sub>3</sub>) : **D** : Alcaloïdes (eau +HCl) D1 : réactif de Dragendorff ; D2 : réactif de Mayer) : **E** : Saponosides (Eau + agitation 15min)

#### **Figure 80** : Screening phytochimique effectué sur les écorces du tronc d'*A. mannii*

Ces résultats sont en accord avec les études antérieures menées sur *A. mannii* par **Djeussi et al., (2013)**.

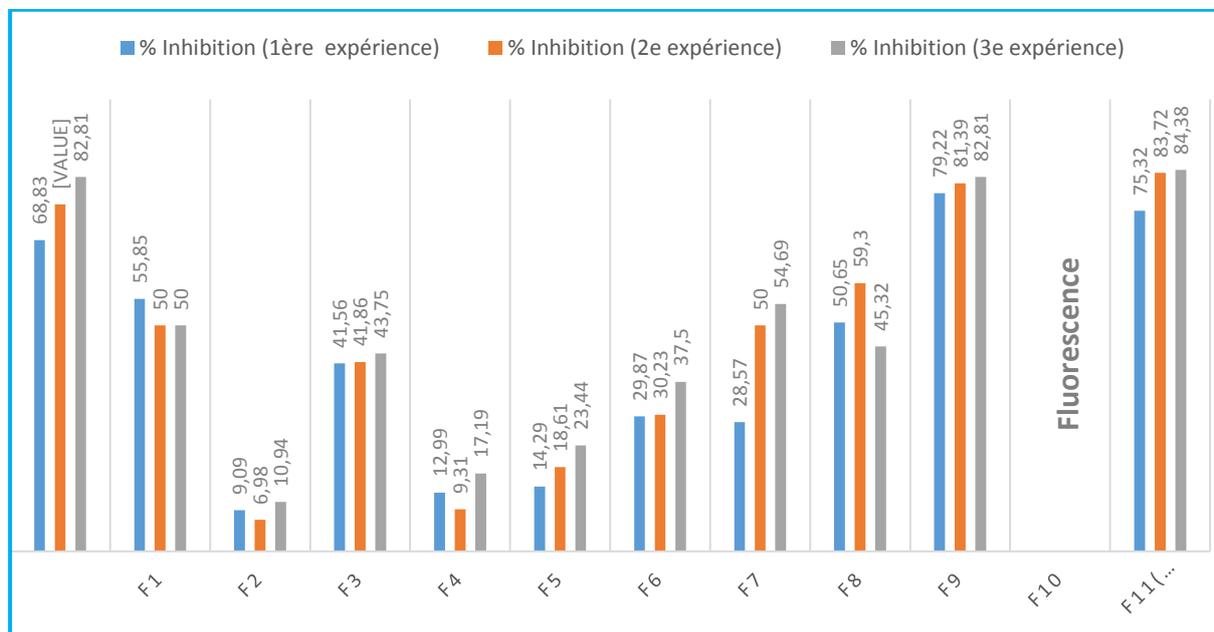
Par la suite, les fractions de même que certains des composés isolés ont été testés *in vitro* pour leurs propriétés antischistosomiales contre *Schistosoma mansoni*. De même, leurs propriétés enzymatiques sur *SmNACE* et cytotoxiques sur les cellules A549 et Huh7 ont été évaluées.

#### II.4.2- Test enzymatique sur *SmNACE*

L'inhibition de certaines enzymes dans l'organisme joue un important rôle dans le traitement de nombreuses affections aussi bien dans le traitement des cancers que des maladies parasitaires.

Pour l'instant, la cyanidine et la delphinidine sont les inhibiteurs les plus actifs sur *SmNACE* (CI<sub>50</sub> = 2,3 et 6,0 µM, respectivement) et appartiennent à la famille des flavonoïdes.

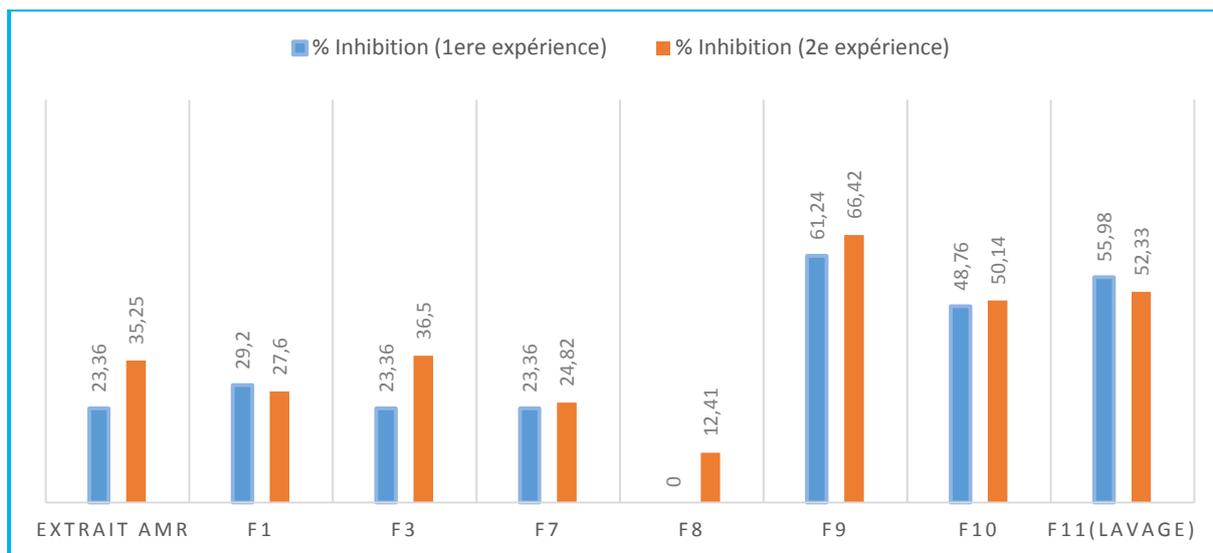
A la recherche des inhibiteurs de cette enzyme, des mesures d'activité ont été effectuées sur l'extrait AMR et sur ses différentes fractions (tests fluorimétrique et HPLC) en vue de déterminer les fractions les plus inhibitrices de l'enzyme *SmNACE* (Figures 81 et 82) :



**Figure 81** : Pourcentage d'inhibition de l'extrait AMR et de ses fractions (Test fluorimétrique)

De cette figure, il en ressort que les fractions F1, F3, F7, F8, F9, F10 et F11 semblent inhiber l'enzyme à un taux d'inhibition supérieur à 40%.

Ces résultats ont par la suite été vérifiés en HPLC.



**Figure 82** : Pourcentage d’inhibition de l’extrait AMR et de ses fractions (Test HPLC)

Après vérification en HPLC, nous avons pu conclure que les fractions F9, F10 et F11 semblent être les fractions les plus inhibitrices.

Des CCM ont également été faites en vue de connaître la composition en métabolites secondaires de ces différentes fractions en utilisant comme système d’élution : Cyclohexane/Acétate d’éthyle 30% et 80% ; AE/MeOH 10% et DCM/ MeOH 10%.

De ces CCM, nous avons constaté que les fractions F1, F2 et F3 ont environ deux composés en commun dont un fluorescent ; de même, les fractions F9, F10 et F11 possèdent au moins trois composés fluorescents en commun. Ce constat pourrait expliquer leur taux d’inhibition proche.

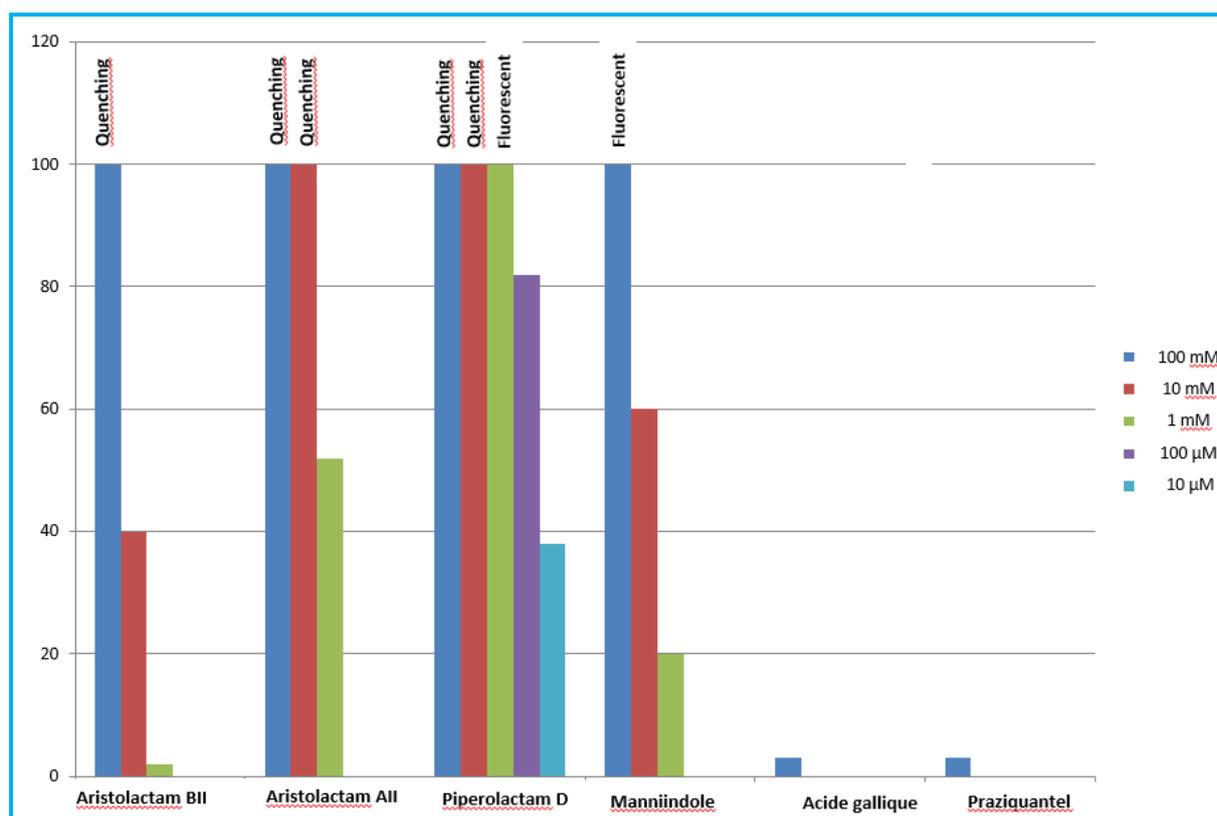
Par ailleurs, afin de déterminer les fractions contenant ou non les flavonoïdes, nous avons effectué un test de caractérisation des flavonoïdes sur l’extrait AMR et ses fractions.

Ces résultats ont été synthétisés dans le tableau XXI ci-dessous :

**Tableau XXI : Synthèse du test enzymatique effectué sur l'extrait AMR et ses fractions.**

FRACTIONS	TEST FLUORIMETRIQUE (% Inhibition)		TEST HPLC (% Inhibition)		CARACTERISATION FLAVONOÏDES	CCM
<b>AMR</b>	Fluorescence	76,13	Inhibition	29,30	+	
<b>F1</b>	Fluorescence	51,95	Inhibition	28,4	-	≈Deux composés communs l'un non fluorescent L'autre fluorescent
<b>F2</b>	Inhibition	9,00	NT		-	
<b>F3</b>	Fluorescence	42,39	Inhibition	29,93	-	
<b>F4</b>	Inhibition	13,16	NT		-	
<b>F5</b>	Inhibition	18,78	NT		-	
<b>F6</b>	Inhibition	32,53	NT		+	
<b>F7</b>	Fluorescence	44,42	Inhibition	24,09	+	
<b>F8</b>	Fluorescence	51,76	Inhibition	6,20	+	≈3 composés fluorescents communs
<b>F9</b>	Fluorescence	81,14	Inhibition	63,83	+	
<b>F10</b>	Fluorescence		Inhibition	49,45	+	
<b>F11 (Lavage)</b>	Fluorescence	81,14	Inhibition	54,15	+	

Par la même méthode d'évaluation, des tests d'inhibition *in vitro* de l'enzyme *SmNACE* ont été réalisés sur certains composés isolés de *A. manni* (Figure 83 ; Tableau XXII). Ces tests ont été effectués dans le but de rechercher de nouveaux agents pouvant inhiber cette enzyme qui est située sur la surface externe du tégument du schistosome ; et ce faisant cette enzyme serait une cible thérapeutique importante.



**Figure 83 :** Composés testés sur *SmNACE* et valeurs de leurs  $CI_{50}$

**Tableau XXII :** Valeurs de  $CI_{50}$  des composés testés sur *SmNACE*.

Composés (No.)	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )
Aristolactam BII acétylé (48)	NT
Manniindole (40)	> 100
Aristolactam AII (42)	> 100
Aristolactam BII (41)	> 100
Acide gallique (47)	> 100
Piperolactam D (43)	10-20
Cyanidine*	2,3
Delphinidine*	6,0

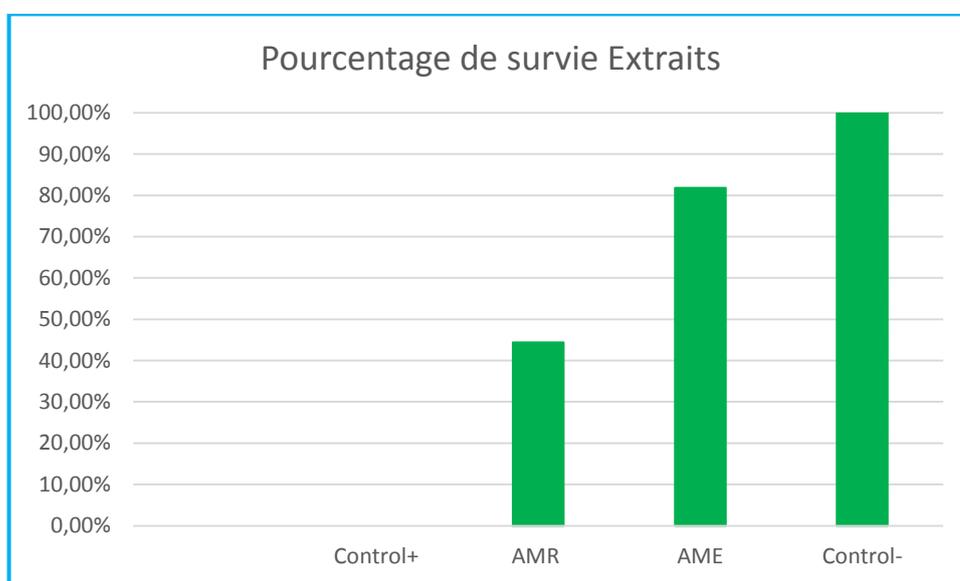
\*Cyanidine et Delphinidine sont des inhibiteurs de référence issus de produits naturels (Kuhn et al., 2010).

Sur la base des valeurs de  $CI_{50}$  obtenues, nous avons constaté que seul la piperolacatam D (**43**) a présenté une activité comparable aux inhibiteurs *SmNACE* de référence (cyanidine et

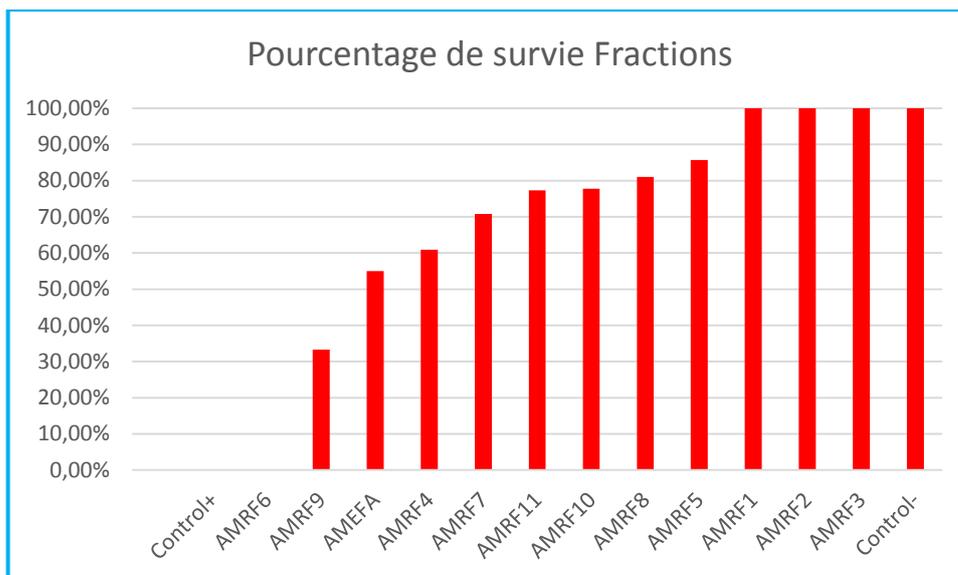
delphinidine) avec une valeur  $CI_{50}$  d'environ 10-20  $\mu$ M, tandis que les autres composés testés ont présenté des valeurs de  $CI_{50}$  non significatives.

#### II.4.3- Test anti-*Schistosoma mansoni*

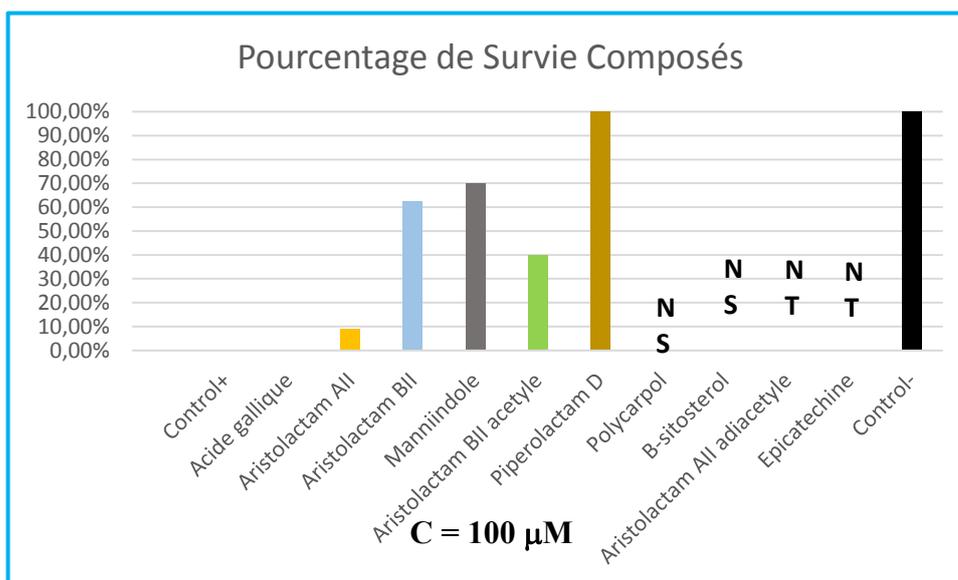
Les extraits, fractions et quelques composés ont été également testés *in vitro* sur *Schistosoma mansoni* : ceci dans le but de déterminer le taux de survie des parasites (Figures 84, 85 et 86).



**Figure 84:** Pourcentage de survie parasitaire des extraits AME et AMR



**Figure 85 :** Pourcentage de survie parasitaire des fractions d'AMR et d'AME



NS= Non Soluble

NT= Non Testé

**Figure 86 :** Pourcentage de survie parasitaire de quelques composés isolés

Les résultats du test parasitaire des composés isolés montrent que l'acide gallique (47) a présenté la plus intéressante activité antischistosomiale sur *S. mansoni* et comparable à celle de la référence, avec un taux de survie nul après 6 heures à des concentrations de 100, 50 et 10 µM. L'aristolactam AII (42) a présenté quant à elle une bonne activité antischistosomiale avec un taux de survie parasitaire de 9,1%. Par contre, le composé obtenu par hémisynthèse, l'aristolactam BII acétylé (48), a montré un faible taux de mortalité des vers d'une valeur de

40% à la concentration de 100  $\mu$ M. Les autres composés testés [(manniindole (**40**), aristolactam BII (**41**), piperolactam D (**43**)] se sont avérés faiblement actifs. D'autres composés n'ont pas pu être testés car non solubles dans le DMSO.

En somme, tous les composés testés, à part l'acide gallique, se sont révélés moins efficaces que le praziquantel. Le praziquantel, molécule de référence dans le traitement de la schistosomiase, a été utilisé comme témoin positif et le RPMI comme témoin négatif.

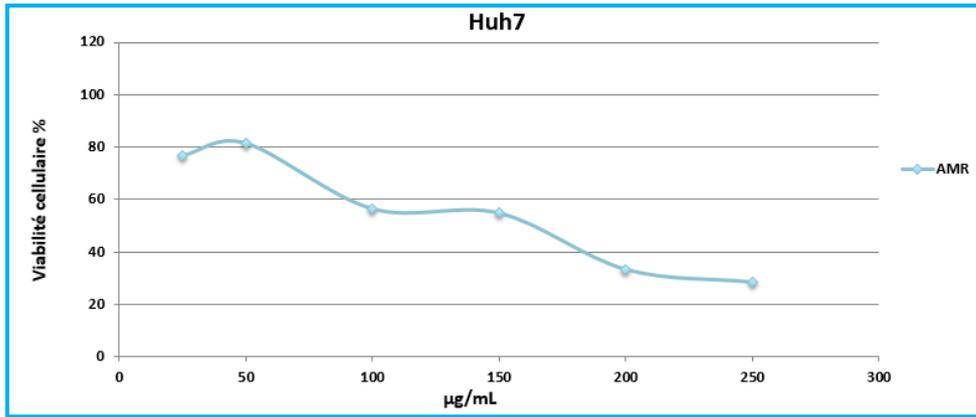
A notre connaissance, c'est la première fois que l'acide gallique se révèle être un puissant antagoniste contre *S. mansoni*. Ces résultats pourraient rendre compte de l'utilisation traditionnelle d'*A. mannii* dans le traitement de la schistosomiase ou ses symptômes, car au moins une molécule présentant une activité antischistosomiale intéressante y a été isolée.

#### II.4.4- Test de toxicité cellulaire

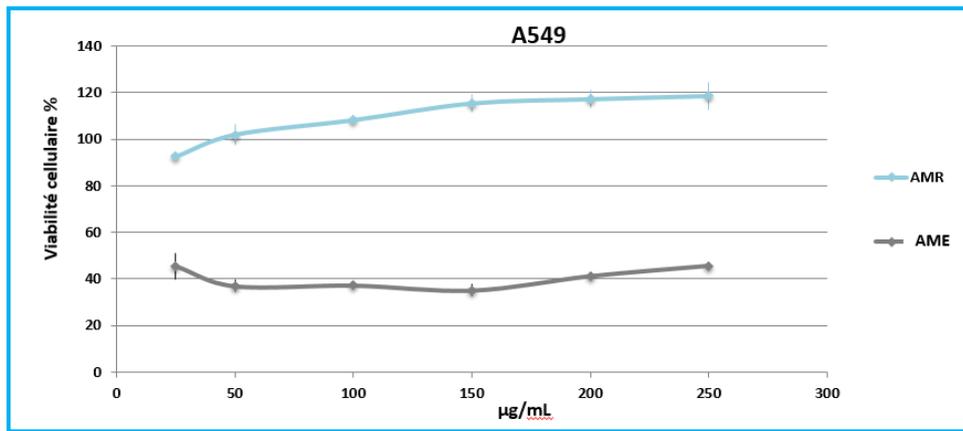
Les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur les extraits des écorces du tronc et des racines d'*A. mannii*, sur les fractions d'AMR de même que sur quelques composés. En raison du fait que les poumons et le foie sont des organes les plus touchés lors des manifestations cliniques de la schistosomiase (**De Oliveira, 2013**), les cellules Huh7 et A549 ont été choisies pour cette étude.

De ces tests, l'extrait des racines d'*A. mannii* a montré un taux de viabilité cellulaire de 56 % (Huh7), 100% (A549) ; celui des écorces du tronc d'*A. mannii* n'a pas pu être testé sur les cellules Huh7 mais a montré un taux de viabilité cellulaire de 37% sur les cellules A549 à une concentration de 100  $\mu$ g/mL.

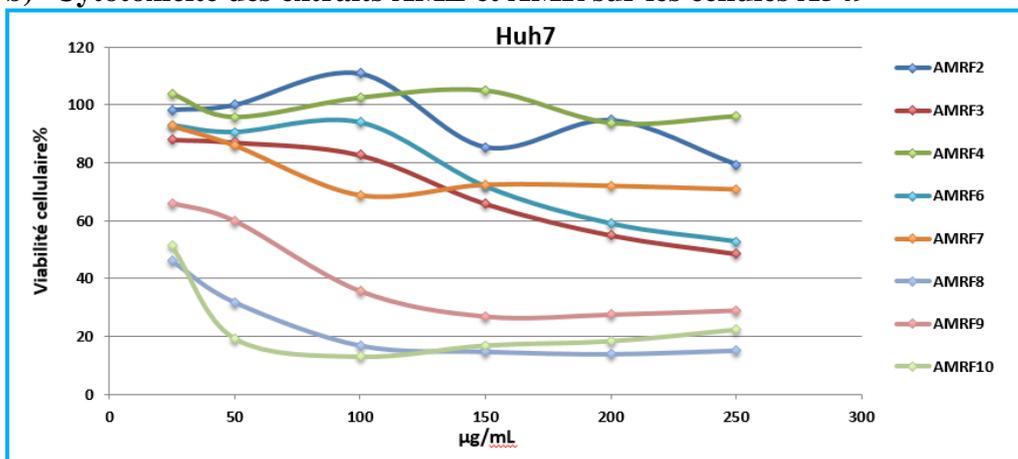
Les tests de cytotoxicité réalisés sur les fractions ont montré que les fractions AMRF2, AMRF3, AMRF4, AMRF6 et AMRF7 étaient non toxiques sur les cellules Huh7. Aussi, la fraction AMRF6 n'a montré aucune cytotoxicité sur les cellules A549 à 100  $\mu$ g/mL (Figure 87).



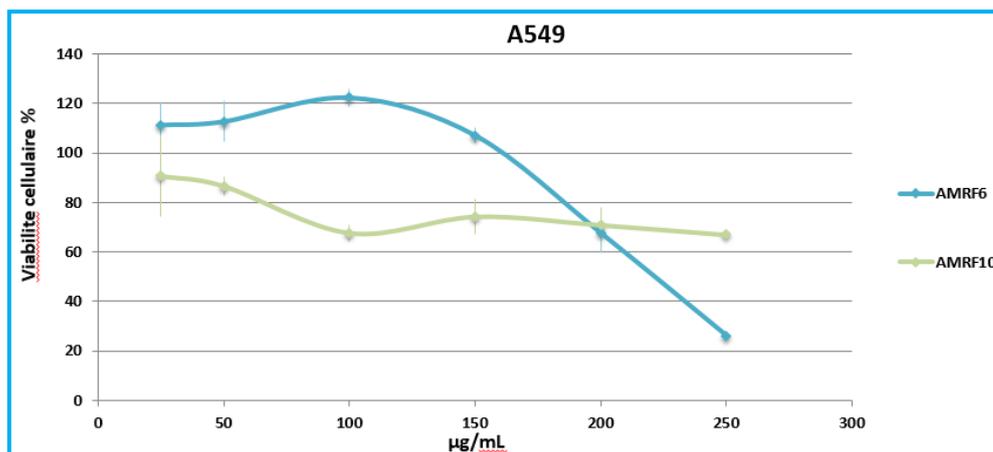
a) Cytotoxicité de l'extrait AMR sur les cellules Huh7



b) Cytotoxicité des extraits AME et AMR sur les cellules A549



c) Cytotoxicité des fractions de l'extrait AMR sur les cellules Huh7



d) Cytotoxicité de quelques fractions de l'extrait AMR sur les cellules A549

**Figure 87 :** a), b), c) et d) ; Cytotoxicité des extraits AME, AMR et des fractions sur les cellules Huh7 et A549

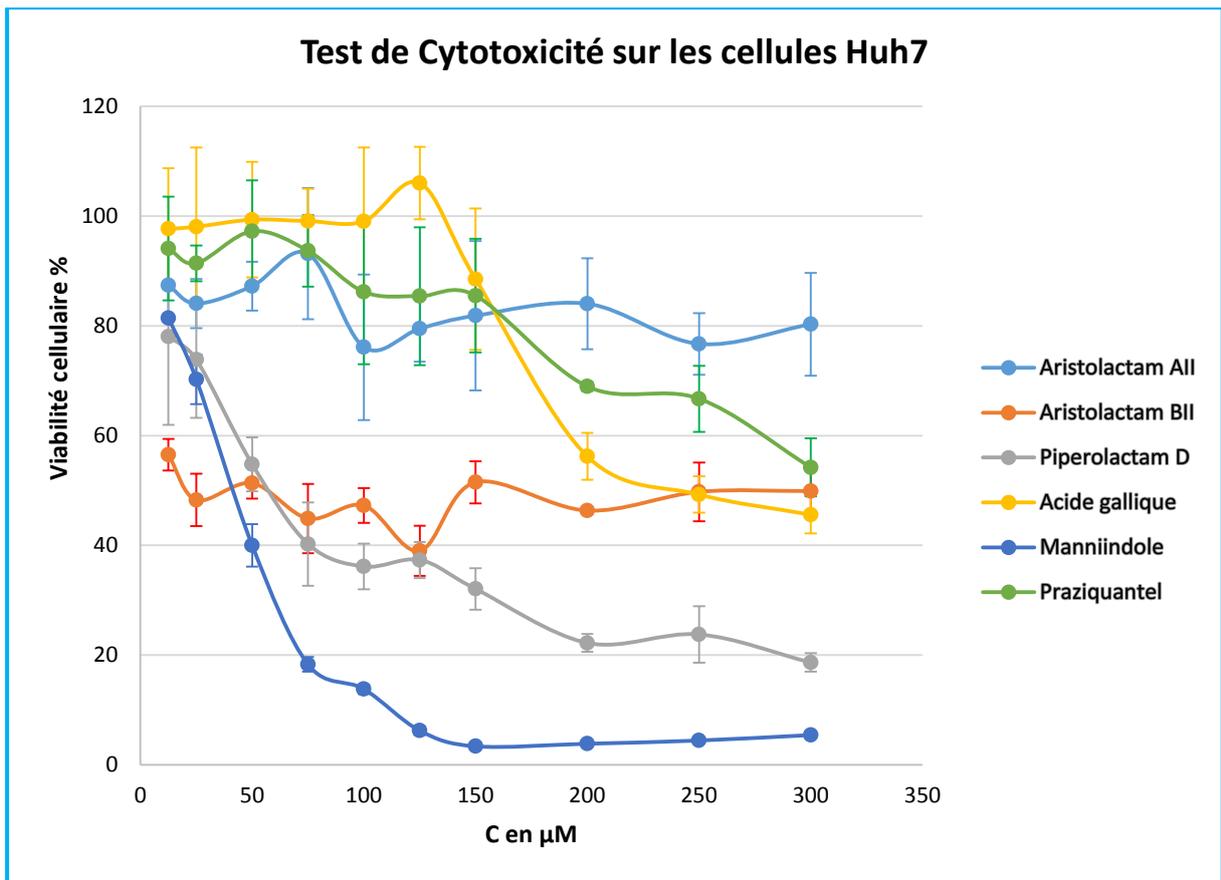
Pour ce qui est des composés obtenus, leur pourcentage de viabilité cellulaire sur les cellules Huh7 était de 76% pour l'aristolactam AII (**42**), 47% pour l'aristolactam BII (**41**), 36% pour le piperolactam D (**43**), 99% pour l'acide gallique (**47**) et 14% pour le mannindole (**40**), comparé à celui du médicament de référence (Praziquantel (**1**), 86%).

Au vu de ces résultats, le composé (**47**), bon antagoniste contre le schistosome, a été le moins toxique sur la lignée cellulaire Huh7 par rapport au praziquantel. Par contre, le composé (**40**) a été le plus toxique sur la lignée de cellules Huh7.

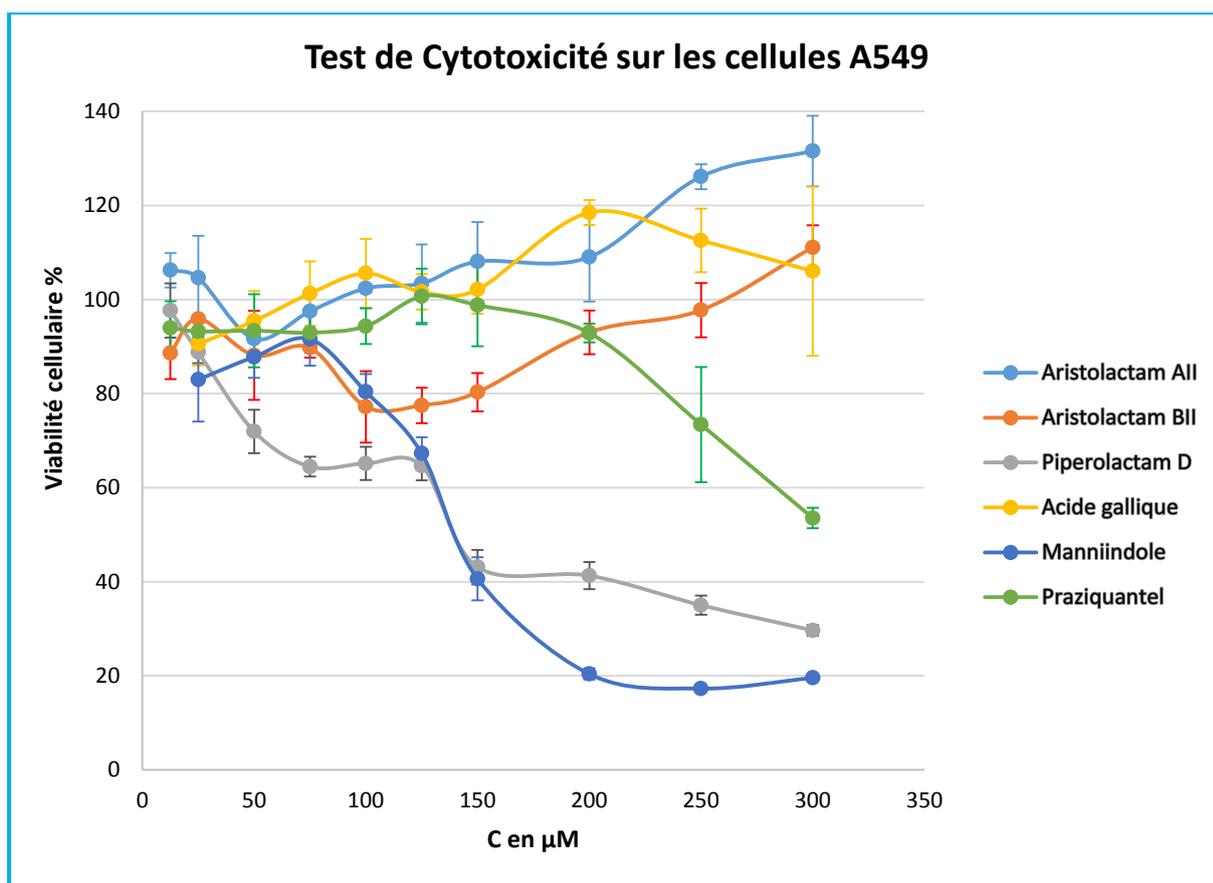
De même, sur la lignée cellulaire A549, le pourcentage de viabilité cellulaire des composés testés était de 100% pour l'aristolactam AII (**42**), 77% pour l'aristolactam BII (**41**),

65% pour le piperolactam D (**43**), 100% pour l'acide gallique (**47**) et 80% pour le mannindole (**40**), comparé à celui du médicament de référence (Praziquantel (**1**), 94%).

Cela a montré que tous ces composés ne présentaient pas d'activité cytotoxique évidente sur la lignée cellulaire A 549 (Figure 88), particulièrement l'acide gallique (**47**) qui a présenté une innocuité totale comparé au Praziquantel (**1**).



a) Cytotoxicité de quelques composés isolés sur les cellules Huh7



b) Cytotoxicité de quelques composés isolés sur les cellules A549

**Figure 88** : Cytotoxicité de quelques composés isolés sur les cellules Huh7(a) et A549 (b)

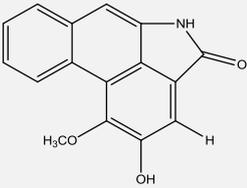
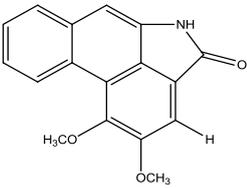
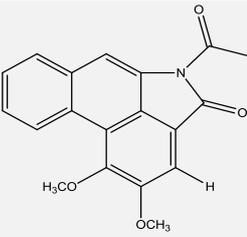
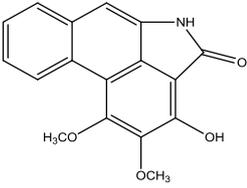
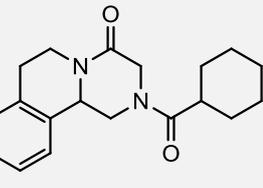
#### II.4.5- Étude de la relation structure-activité des lactames obtenus contre *Schistosoma mansoni*

L'étude des extraits des écorces du tronc et des racines d'*Anonidium mannii* nous a mené à l'isolement ; en dehors d'autres molécules, de trois lactames : l'aristolactam BII (**41**), l'aristolactam AII (**42**) et le piperolactam D (**43**). De plus, deux composés d'hémisynthèse ont été obtenus par acétylation des lactames (**41**) et (**42**) pour donner les dérivés de lactame : Aristolactam BII acétylé (**48**) et Aristolactam AII diacétylé (**49**). Excepté le composé (**49**), ces lactames ont été testés *in vitro* pour leurs activités antiparasitaires sur *S. mansoni* (Figure 89-Tableau XXIII).

Au regard des résultats obtenus, nous pouvons penser que la position des groupements présents module l'activité de ces composés. En effet, l'analyse de la relation structure-activité de ces composés a révélé que le composé plus actif était l'aristolactam AII (**42**) à la concentration de 100 µM. Cette activité diminue lorsque le groupement hydroxyle porté par le carbone C-3 de (**42**) est remplacé par un groupement méthoxyle (aristolactam BII (**41**)). Par ailleurs, l'activité sur le parasite disparaît totalement lorsque sur ce composé (**41**), l'hydrogène H-2 est substitué par un groupement hydroxyle (piperolactam D (**43**)). Par contre, une augmentation de l'activité de l'aristolactam BII (**41**) est observée lorsqu'on fixe un groupement acétyle sur l'azote du lactame (aristolactam BII acétylé (**48**)).

On peut également constater que la viabilité cellulaire des composés (**42**) (76 et 100%), (**41**) (47 et 77%) et (**43**) (36 et 65%), évaluée sur les lignées cellulaires Huh7 et A549 respectivement, est inversement proportionnelle à leur activité sur le parasite. Ainsi, plus le composé présente un antagonisme prononcé sur *Schistosoma mansoni*, moins il est toxique à l'égard des cellules Huh7 et A549.

**Tableau XXIII** : Comparaison de l'activité antischistosomiale *in vitro* des lactames testés.

Composé (No.)	Structure	Mobilité des vers après 6h d'incubation (%) [Concentration (100 µM)]
<b>Aristolactam AII</b> (42)		9,1
<b>Aristolactam BII</b> (41)		62,5
<b>Aristolactam BII acétylé</b> (48)		40
<b>Piperolactam D</b> (43)		100
<b>Praziquantel</b> (1)		0
<b>Control (RPMI)</b>		100

En définitive, ces tests biologiques, visant à chercher les antagonistes du *Schistosoma mansoni* et les inhibiteurs de l'enzyme récemment découverte *Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup> Catabolising Enzyme (*SmNACE*), nous ont permis pour la première fois de mettre en évidence : l'acide gallique (47), qui a une activité antiparasitaire aussi efficace que le

principal médicament qui est le praziquantel (**1**) ; et le piperolactam D (**43**) qui a montré une inhibition significative sur la *SmNACE*.

On se serait attendu à ce que le composé (**43**), qui présente une activité inhibitrice importante sur une enzyme issue du parasite, puisse afficher une activité antiparasitaire significative. Malheureusement ce n'est pas le cas. Cette situation pourrait s'expliquer par le fait que l'inhibiteur, en présence du schistosome, soit face à plusieurs sites et de ce fait n'agirait pas de manière spécifique sur l'enzyme *SmNACE*. Par ailleurs, le mécanisme d'action de la *SmNACE* chez le parasite, ni même son rôle physiologique, n'est pas encore bien connu et il serait tout à fait possible que l'inhibition de l'activité de cette enzyme soit importante sans pour autant avoir un effet visible ou mesurable sur le parasite. Inversement, le praziquantel agit sur le parasite sans que l'on connaisse aujourd'hui son mode d'action ou sa cible. Il serait donc important pour le futur de maîtriser le mécanisme d'action de ces inhibiteurs afin d'accroître leur spécificité.

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Le présent travail a porté sur les études phytochimique et pharmacologique d'*Anonidium mannii*, une plante du Cameroun.

Les objectifs visés étaient d'isoler les métabolites secondaires de cette plante, de les caractériser et d'évaluer les différents extraits ainsi que les composés obtenus pour leurs activités antischistosomiales (antiparasitaire et enzymatique).

Au terme de ce travail, nous avons obtenu, au moyen des méthodes chromatographiques usuelles, huit composés du tronc des écorces et neuf des racines. Au bout du compte, douze composés ont été caractérisés au moyen des techniques physico-chimiques et spectroscopiques usuelles (IR, UV, SM, RMN 1D et 2D) et par comparaison des données spectrales avec celles de la littérature pour les composés connus.

Un de ces composés est décrit ici pour la première fois, le manniindole (**40**).

Les autres composés ont été identifiés et comprennent :

- Trois alcaloïdes : l'aristolactam BII (**41**), l'aristolactam AII (**42**), le piperolactam D (**43**) ;
- Un flavonoïde : l'epicatéchine (**44**) ;
- Un acide phénolique : l'acide gallique (**47**) ;
- Quatre triterpènes pentacycliques : l' $\alpha$ - amyrine (**45**), le Lanosta-7,9(11),23-triène-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol (**28**), le polycarpol (**27**) et le lupéol (**46**) ;
- Deux stéroïdes : stigmastérol (**30**) et  $\beta$ -sitostérol (**18**).

Il est à noter que l'étude phytochimique de ces deux parties d'*A. mannii* a révélé une diversité structurale de leurs constituants, tout en mettant en exergue plusieurs classes de composés [(**40**), (**41**), (**42**), (**43**), (**44**) et (**47**)] jamais isolés notamment du genre *Anonidium*. Ce qui rend cette étude intéressante du point de vue taxonomique.

Bien plus, l'acétylation des composés (**41**) et (**42**) a conduit à l'obtention de deux dérivés acétylés : l'aristolactam BII acétylé (**48**) et l'aristolactam AII diacétylé (**49**), respectivement.

Certains de ces composés isolés ont été évalués *in vitro* pour leur potentiel antischistosomial sur les vers adultes de *Schistosoma mansoni* et sur une enzyme récemment découverte et isolée de ce parasite : la *Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup> Catabolyzing Enzyme.

En ce qui concerne le test antiparasitaire, il a mis en évidence, pour la première fois, l'activité de l'acide gallique (**47**) avec un taux de survie nul des parasites après 6 heures à une concentration de 100  $\mu$ M comparable à celui du praziquantel (**1**), pris comme référence et massivement utilisé pour combattre cette maladie invalidante, avec cependant de nombreux effets secondaires et l'observation d'une résistance des parasites. On peut noter que ce

composé (47) a montré un pourcentage de viabilité nettement meilleur que celui de cette référence sur les lignées cellulaires Huh7 (100 et 99% resp.) et A549 (94 et 86% resp.), localisées au niveau des poumons et du foie, organes les plus touchés lors des manifestations cliniques de la schistosomiase. Les autres composés testés ont montré des activités antiparasitaire et cytotoxique intéressantes.

Pour ce qui est des tests d'activité enzymatique sur *SmNACE*, il en ressort que parmi tous les composés obtenus, seul le piperolactam D (43) a présenté une inhibition significative avec une valeur de  $CI_{50}$  d'environ 10  $\mu M$  par rapport à la référence qui est la cyanidine ( $CI_{50} = 2,3 \mu M$ ). Cependant, il a présenté une innocuité relative par rapport aux lignées cellulaires Huh7 et A549, avec un taux de viabilité de 36 et 65% respectivement.

A notre connaissance, les activités antischistosomiales (antiparasitaire et enzymatique) effectuées sur les extraits, fractions et composés d'*A. manni* sont décrites ici pour la première fois.

Etant donné que les différents extraits, notamment celui des racines AMR, de même que tous les composés testés n'ont pas montré de toxicité marquée contre les lignées cellulaires cancéreuses Huh7 et A549 et au vu des résultats des tests d'activité antiparasitaire et enzymatique, l'utilisation des écorces du tronc et des racines d'*A. manni* pourrait être, sous réserve de certaines mesures à prendre [étude de toxicité approfondie, dosage (formulation)], introduite dans une large échelle en médecine traditionnelle pour le traitement de la schistosomiase.

Toutefois, les deux composés, à savoir : l'acide gallique (47) et le piperolactam D (43), ayant présenté chacun une activité importante sur leur cible biologique respective, pourraient être validés comme candidats «tête de série» pour un projet de développement de médicaments.

En définitive, l'ensemble des résultats obtenus constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel d'*A. manni* et confirme encore une fois la pertinence de certains remèdes traditionnels dans le traitement de nombreux maux. De ce qui précède, nous pouvons estimer que les objectifs ont été globalement atteints.

**Pour la suite de nos travaux, nous nous proposons :**

- ✓ D'étudier les autres fractions des racines afin de rechercher des molécules aussi actives que (47) et (43) sur nos deux cibles biologiques.

- ✓ De soumettre ces composés, évoqués plus haut, aux mêmes protocoles des tests biologiques afin d'évaluer leurs activités antischistosomiales.
- ✓ Grâce à l'expertise avérée de nos collaborateurs en France, d'étudier la cytotoxicité des extraits et des composés isolés *in vivo* afin de déterminer les doses thérapeutiques à administrer et les doses létales. La notion de dosage constituant un réel problème en médecine traditionnelle.
- ✓ À partir des résultats précédents, de standardiser l'extrait le plus actif (AMR) en vue de proposer aux populations un médicament traditionnel amélioré, efficace et sûr.
- ✓ D'optimiser les molécules les plus actives, en produisant des dérivés chimiques à partir, entre autres, des molécules **(47)** et **(43)** afin d'améliorer, grâce à des études relations structure-activité (RSA) , leur sélectivité et/ou leur efficacité.

## **CHAPITRE III : PARTIE EXPÉRIMENTALE**

## **III.1- GÉNÉRALITÉS**

### **III.1.1- Les techniques chromatographiques**

L'obtention des composés s'est faite grâce aux techniques chromatographiques, à savoir : la chromatographie flash, la chromatographie sur colonne et la chromatographie sur couche mince et l'HPLC semi-préparative.

Pour les chromatographies flash et sur colonne, le gel de silice de granulométrie 40-63  $\mu\text{m}$ , 70-230  $\mu\text{m}$  ou 230-400  $\mu\text{m}$  (Merck) a été utilisé comme phase stationnaire. Le diamètre de la colonne et la hauteur de la silice ont été choisis en fonction de la quantité d'extrait ou de fraction à traiter.

Les chromatographies analytiques sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub> (Merck, 20 × 20 cm ou 0,2 x 5m) sur feuilles d'aluminium et sur feuilles de plastique de 0,2 mm d'épaisseur. Ces plaques ont été découpées selon le nombre d'échantillons à y déposer et ont été développées dans des cuves chromatographiques contenant des systèmes de solvant tels que CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, Hex-EtOAc ou EtOAc-MeOH de différentes polarités. Les plaques CCM ont été révélées, soit par utilisation de la lumière ultraviolette (254 et 366 nm), soit après pulvérisation à l'aide d'une solution d'acide sulfurique diluée à 50 % ou d'une solution de vanilline sulfurique suivi d'un chauffage à l'étuve à 100°C.

La séparation par HPLC a été réalisée sur un appareil HPLC avec détecteur UV (2489 Uv/Vis Detector) utilisant une colonne C18 (SunFire™, 4,6x 250 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ).

### **III.1.2- Méthodes physico-chimiques et appareillage**

Les extraits bruts ont été concentrés sur des évaporateurs rotatifs Büchi et Heidolph. Les extraits aqueux ont été séchés grâce à l'utilisation d'un lyophilisateur de type FD16. Les différentes masses des extraits et des composés obtenus ont été mesurées à l'aide des balances électroniques de type « Acculab VIC-612 », « Acculab ACL-210.4 » et « Mettler Toledo XS105 ». Les composés isolés ont été analysés par différents appareils.

#### **III.1.2.1- Spectre de masse**

Les spectres de masse en ElectroSpray Ionisation haute résolution ont été enregistrés avec des spectromètres de masse *APEX III (Bruker Daltonik) 7 Tesla (ESI-FT-ICR-MS)*. Ceux en Impact Electronique basse et haute résolution ont été enregistrés avec des spectromètres de masse de type Finnigan MAT 95 à 70 eV avec le perfluorokérosène comme substance de référence et Apex III (Bruker Daltonik).

### **III.1.2.2- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, NOESY, HSQC et HMBC ont été enregistrés sur des appareils *Bruker AvanceAV-500 MHz* opérant à 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) et 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) et *Bruker AvanceAV-400 MHz* à 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) et 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Les échantillons ont été dissous dans du chloroforme, du méthanol ou du diméthylsulfoxyde deutérés. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm en prenant comme référence interne dans tous les cas, le tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage ( $J$ ) sont exprimées en Hertz (Hz).

### **III.1.2.3- Spectrométrie infrarouge**

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectromètre de type *JASCO FT/IR-410 spectrophotometer* ( $\nu_{\text{max}}$  en  $\text{cm}^{-1}$ ).

### **III.1.2.4- Pouvoir rotatoire**

L'activité optique des composés a été mesurée sur un polarimètre de type *JASCO P-2000* en solubilisant le produit dans l'éthanol.

### **III.1.2.5- Point de fusion**

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide de l'appareil Büchi (*Büchi melting point M-560*).

### **III.1.3- Tests de caractérisation chimique**

#### **III.1.3.1- Test de Dragendorff (identification des alcaloïdes)**

Sur un morceau de plaque CCM, un spot de produit a été déposé. Cette plaque a été développée avec le système EtOAc/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 50% (9:1:1). Après migration, les taches visibles à 365 nm ont été pulvérisées avec le réactif de Dragendorff (tétraiodobismuthate de potassium). La présence d'alcaloïdes a été signalée par l'apparition des taches orange.

#### **III.1.3.2- Test de Shinoda (identification des flavonoïdes)**

A une solution alcoolique du composé, quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré ont été ajoutées, puis quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes a été indiquée par une effervescence suivie d'un changement de coloration pouvant être violette ou rouge brique.

- **Anthocyanes**

A 5 ml d'infusé à 5% présentant une coloration plus ou moins foncée ; ajouter 5 mL d'acide sulfurique puis 5 mL de NH<sub>4</sub>OH. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure la présence d'anthocyane.

#### **III.1.3.3- Test au chlorure ferrique (identification des composés phénoliques)**

A une solution méthanolique ou éthanolique de produit, ont été ajoutées quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub>. La présence des phénols a été indiquée par un changement de coloration suite à la formation d'un ion complexe [Fe(ArO)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> de couleur violette ou bleue.

#### **III.1.3.4- Test de Liebermann-Burchard (identification des terpénoïdes et des stéroïdes)**

Quelques milligrammes de produit ont été dissous dans le dichlorométhane (1 mL) et à la solution obtenue, on y a ajouté quelques gouttes d'anhydride acétique, puis d'acide

sulfurique concentré. La présence des terpénoïdes a été indiquée par une coloration rouge violacée et celle des stérols par une coloration vert bleuâtre.

## **III.2- EXTRACTION ET ISOLEMENT DES COMPOSÉS**

### **III.2.1- Matériel végétal**

Les différentes parties (racines et écorces du tronc) d'*Anonidium mannii* ont été récoltées en Janvier 2016 au Mont Kala (Latitude 3° 30'. Nord, Longitude 11° 13'. Est) localisé à (Mbankomo, dans le département de la Mefou et Akono) (Yaoundé, Région du Centre Cameroun).

L'identification et la récolte de la plante ont été réalisées par M. Nana Victor, botaniste de l'Herbier National du Cameroun où des spécimens avaient été conservés et enregistrés sous le numéro 45582HNC.

### **III.2.2- Extraction**

Les racines et les écorces du tronc d'*Anonidium mannii* ont été découpées, séchées, puis broyées. Les poudres obtenues (3,4 kg de racines et 3,2 kg des écorces) ont été extraites séparément au mélange Ethanol/Eau (80/20) à température ambiante pendant 72 h. L'évaporation de l'éthanol suivie de la lyophilisation de l'extrait aqueux nous a permis d'obtenir 80 g et 71,15g d'extraits bruts respectivement (Schémas 2 et 3).

### **III.2.3- Isolement des composés**

#### **III.2.3.1- Isolement des composés des écorces du tronc d'*A. mannii***

65,5 g de l'extrait de ces écorces ont subi un fractionnement par chromatographie flash en utilisant des mélanges *n*-Hex/AE et AE/MeOH de polarités croissantes comme éluants. 75 fractions de 300 mL chacune ont été collectées et regroupées sur la base de CCM analytique en 5 fractions principales F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub>, F<sub>C</sub>, F<sub>D</sub> et F<sub>E</sub> (Tableau XXIV). L'étude de ces différentes fractions a conduit à l'isolement de huit composés : AME1, AME2, AME3, AME4, AME5, AME6, AME7 et AME8.

**Tableau XXIV : Chromatogramme de l'extrait des écorces du tronc d'*A. mannii*.**

Eluant	Fractions	Séries	Remarques
<i>n</i> -Hex	1-7	F <sub>A</sub> (5,6 g)	Mélange huileux
<i>n</i> -Hex/ AE (75:25) à (50:50)	8-23	F <sub>B</sub> (14,8 g)	Mélange d'au moins 7 composés
<i>n</i> -Hex/ AE (25:75)	24-35	F <sub>C</sub> (12,6 g)	Mélange d'au moins 5 composés
AE	36-52	F <sub>D</sub> (15,2 g)	Mélange d'au moins 4 composés
AE/MeOH (80:20)	53-75	F <sub>E</sub> (9,3 g)	Mélange complexe

### III.2.3.1.1- Chromatographie de la série F<sub>B</sub>

La série F<sub>B</sub> a été dissoute dans le dichlorométhane puis fixée sur la silice et chromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution au système *n*-Hex-AE de gradient de polarité a permis de collecter les fractions de 100 mL (85 au total) et de les regrouper sur la base de CCM analytiques. Les composés AME1 (30,6 mg) et AME2 (21,9 mg) ont précipité sous forme d'aiguillette blanche et de poudre blanche. Ils ont été obtenus après filtration simple et lavage dans les fractions correspondantes (Tableau XXV).

**Tableau XXV : Chromatogramme de la série F<sub>B</sub>.**

Eluant	Fractions	Remarques
<i>n</i> -Hex	1-25	Mélange d'au moins 4 produits dont AME1
<i>n</i> -Hex / AE(85:15)	26-62	
<i>n</i> -Hex / AE (75:25)	63-74	Mélange d'au moins 5 produits
<i>n</i> -Hex / AE (60:40)	75-85	Mélange d'au moins 5 produits dont AME2

### III.2.3.1.2- Chromatographie de la série F<sub>C</sub>

La fraction C a été dissoute dans un minimum de dichlorométhane et fixée sur la silice. Après évaporation complète du solvant, la poudre obtenue a été chromatographiée sur colonne de gel de silice. Les fractions de 100 mL recueillies, par élution au système Hex-AE de gradient de polarité, ont été concentrées et regroupées sur la base des CCM analytiques. Les résultats sont consignés dans le tableau XXVI.

**Tableau XXVI : Chromatogramme de la série F<sub>C</sub>.**

Eluant	Fractions	Remarques
<i>n</i> -Hex/AE (95:5) à (60:40)	1-18	Mélange de 2 produits + 1 traînée
	19-53	Mélange d'au moins 3 produits dont 1 fluorescent
<i>n</i> -Hex/AE (50:50) à (30:70)	54-64	Mélange d'au moins 3 produits dont 1 fluorescent
	65-78	Mélange d'environ 4 produits
	79-100	Mélange de 5 produits
<i>n</i> -Hex/AE (20:80) à AE	101-111	Mélange d'environ 5 produits
	112-121	

Par filtration simple :

- Le composé AME3 (15 mg) a précipité sous forme de poudre jaune orange dans les sous-fractions 19-53.
- Le composé AME4 (11 mg) a été obtenu sous forme de poudre blanche des sous-fractions 54-64.

### III.2.3.1.3- Purification de la fraction D

La série D a été dissoute dans le dichlorométhane puis fixée sur la silice et chromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution au système *n*-Hex /AE de gradient de polarité a permis de collecter les fractions de 100 mL (90 au total) et de les regrouper sur la base de CCM analytiques. Les composés AME5 (13 mg), AME6 (16 mg) et AME7 (14,2 mg) ont précipité sous forme de poudre jaune orange, poudre blanche et de poudre blanche respectivement. Ils ont été obtenus après filtration simple et lavage dans les fractions correspondantes (Tableau XXVII).

**Tableau XXVII : Chromatogramme de la série F<sub>D</sub>.**

Eluant	Fractions	Remarques
<i>n</i> -Hex/AE (95 :5-80 :20)	1-20	Mélange d'au moins 4 produits
<i>n</i> -Hex / AE (75:25)	21-40	Mélange d'au moins 5 produits dont AME5 et AME6

<i>n</i> -Hex / AE (70:30-60 :40)	41-74	Mélange d'au moins 5 produits
<i>n</i> -Hex / AE (55 :45-50:50)	75-90	Mélange d'au moins 4 produits dont AME7

### III.2.3.1.4- Purification de la fraction E

La fraction E a été dissoute dans du dichlorométhane et fixée sur la silice. Après évaporation complète du solvant, la poudre résultante est chromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution est faite avec le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de polarité croissante. Au terme de cette élution, un produit indexé AME8 (10,3 mg) a été obtenu par filtration simple. Il se présente sous forme de poudre blanche dans le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5).

La fraction A (huileuse) n'a pas été étudiée.

### III.2.3.2- Isolement des composés des racines d'*A. mannii*

70 g de l'extrait des racines d'*A. mannii* ont été fixés sur la silice et fractionnés par chromatographie flash. L'élution s'est faite avec les mélanges Hex-AE, puis AE-MeOH de polarités croissantes. Un total de 98 fractions de 300 mL chacune ont été recueillies et regroupées sur la base de la CCM analytique (Tableau XXVIII) pour donner 10 fractions F1 à F10. L'étude de ces fractions a conduit à l'isolement de 9 composés.

**Tableau XXVIII: Chromatogramme de l'extrait des racines d'*A. mannii*.**

Eluant	Fractions	Remarques	Regroupement
<i>n</i> -Hex	1-11	Mélange huileux	F1 (2,3 g)
<i>n</i> -Hex-AE (95:5)	12-20	Mélange d'au moins 5 composés et 1 traînée	F2 (2,5 g)
<i>n</i> -Hex-AE (85:15)	21-24	Mélange d'au moins 4 produits dont 1 fluorescent	F3 (3,4 g)
<i>n</i> -Hex-AE (75:25)	25-26	Mélange d'au moins 4 produits	F4 (4,1 g)
<i>n</i> -Hex-AE (50:50)	27-30	Mélange d'au moins 5 produits	F5 (4,2 g)
<i>n</i> -Hex-AE (25:75)	31-32	Mélange d'au moins 5 produits	F6 (2,5 g)
	33-48	Mélange d'au moins 5 produits	F7 (5,3 g)
AE	49-53	Mélange d'au moins 5 produits dont un fluorescent	F8 (4,4 g)
AE-MeOH (95:5)	54-72	Mélange complexe dont un fluorescent	F9 (8,1 g)
AE-MeOH (85:15)	73-95	Mélange complexe dont 2 fluorescents	F10 (5,8 g)

MeOH	96-98	Traînée	F11 (Lavage)
------	-------	---------	--------------

### III.2.3.2.1- Chromatographie de la fraction F3

La fraction F3 a été dissoute dans le méthanol, puis fixée sur la silice et rechromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution au système *n*-Hex-AE de gradient de polarité allant de 100 :00 à 70 :30, a conduit à l'obtention de trois composés purs indexés AMR1 (20,6 mg), AMR2 (18,1 mg) et AMR3 (22 mg).

### III.2.3.2.2- Chromatographie de la fraction F6

La fraction F6 a été dissoute dans le méthanol, puis fixée sur la silice et rechromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution au système *n*-Hex-AE de gradient de polarité allant de 70 :30 à 00 :100, a conduit à deux composés purs indexés AMR4 (10,6 mg) et AMR5 (11,2 mg).

### III.2.3.2.3- Chromatographie de la fraction F9

La fraction F9 a été dissoute dans le méthanol, puis fixée sur la silice et rechromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution faite avec le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH de polarité croissante (100 :0 à 90 :10), a conduit à l'obtention du composé AMR6 (10 mg).

### III.2.3.2.4- Etude de la fraction F10

La fraction F10 a été chromatographiée sur colonne de gel de silice et éluee avec le système AE-MeOH de polarité croissante. 50 fractions de 100 mL chacune sont recueillies et regroupées sur la base de la CCM analytique (Tableau XXIX).

**Tableau XXIX : Chromatogramme de la fraction F10.**

Système d'élution	Fractions	Observations
AE	1 - 2	Mélange d'environ 5 composés
AE/MeOH (95:5)	3 - 14	Mélange de 5 composés dont un fluorescent
AE/MeOH (90:10)	15 - 29	Mélange de 5 composés

	30 - 55	Mélange de 4 composés dont 2 fluorescents
AE/MeOH (85:15)	56 -58	Mélange de 6 composés dont 1 fluorescent + traînée

La fraction (30-55) (250 mg) a été dissoute dans le méthanol puis chromatographiée en phase liquide (HPLC semi-preparative) sur colonne C18 avec pour éluant le système CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O +0,05% TFA (5:95-95 :5) pendant 60 min. Au terme de cette élution, on a obtenu après lyophilisation, 3 composés indexés AMR7 (11,2 mg), AMR8 (6 mg) et AMR9 (12 mg).

La chromatographie de la fraction F2 n'a donné aucun produit. Les autres fractions n'ont pas été étudiées.

Au bout du compte, après analyse des données spectrales des 17 composés isolés des deux parties étudiées d'*Anonidium mannii*, nous avons noté une similitude des données de certains composés isolés des écorces du tronc et celles des composés obtenus des racines. Ainsi: AME2 = AMR4; AME3 = AMR6; AME5 = AMR9; AME7 = AMR3; AME8 = AMR5.

### III.3. TRANSFORMATIONS CHIMIQUES SUR QUELQUES COMPOSÉS ISOLÉS

#### III.3.1- Acétylation d'AME3

AME3 (3,12 mg, 11,2 µmol) a été dissous dans de la pyridine sèche (0,5 mL). La solution résultante a été refroidie à 0 °C avant d'ajouter du chlorure d'acétyle (0,5 mL) goutte à goutte. Après agitation à 0 °C pendant 10 min, le bain de glace a été retiré et le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 h (0,5 ml de pyridine a été ajouté après réchauffement à température ambiante pour dissoudre le mélange réactionnel qui s'était solidifié.). La solution marron foncé résultante a été diluée avec de l'éther diéthylique (10 mL), transférée dans un entonnoir de séparation et lavée 3 fois avec HCl 1,0 M (20 mL au total). Les phases aqueuses ont été extraites deux fois avec de l'éther diéthylique (20 mL au total) avant de combiner les phases organiques, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le brut résultant a été purifié par Chromatographie flash (gel de silice, 100% DCM) pour donner AME3 acétylé (AME3a) (3,20 mg, 9,96 µmol, 89%) sous la forme d'un solide jaunâtre.

Rf 0,86 (100% DCM)

### **III.3.2- Acétylation d'AME5**

AME5 (3,84 mg, 14,5  $\mu$ mol) a été dissous dans de la pyridine sèche (0,5 mL). La solution résultante a été refroidie à 0 ° C avant d'ajouter du chlorure d'acétyle (0,5 mL) goutte à goutte. Après agitation à 0 ° C pendant 10 min, le bain de glace a été retiré et le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 h (0,5 mL de pyridine a été ajouté après réchauffement à température ambiante pour dissoudre le mélange réactionnel qui s'était solidifié). La solution marron foncé résultante a été diluée avec de l'éther diéthylique (10 ml), transférée dans une ampoule à décanter et lavée 3 fois avec HCl 1,0 M (20 mL au total). Les phases aqueuses ont été extraites deux fois avec de l'éther diéthylique (20 mL au total) avant de combiner les phases organiques, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le brut résultant a été purifié par chromatographie flash (gel de silice, éther de pétrole 1 : 1 35-60 / DCM) pour donner AME5 diacétylé (AME5a) (3,70 mg, 10,6  $\mu$ mol, 73%) sous forme d'un solide légèrement orange.

Rf 0,53 (100% DCM)

## **III.4- ÉVALUATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES**

### **III.4.1- Évaluation de l'activité antischistosomiale**

#### **III.4.1.1- Préparation des solutions à tester**

Pour la détermination de l'activité contre les vers adultes, tous les extraits et composés ont été initialement testés à une concentration de 100  $\mu$ g/mL et 100  $\mu$ M, en utilisant des solutions mères de DMSO (concentration 10 mg/mL ; concentration finale de DMSO : 0,2) diluées dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) complété avec un volume final de 2 mL par puits. Deux essais ont été réalisés pour chaque concentration de composé.

#### **III.4.1.2- Préparation des parasites**

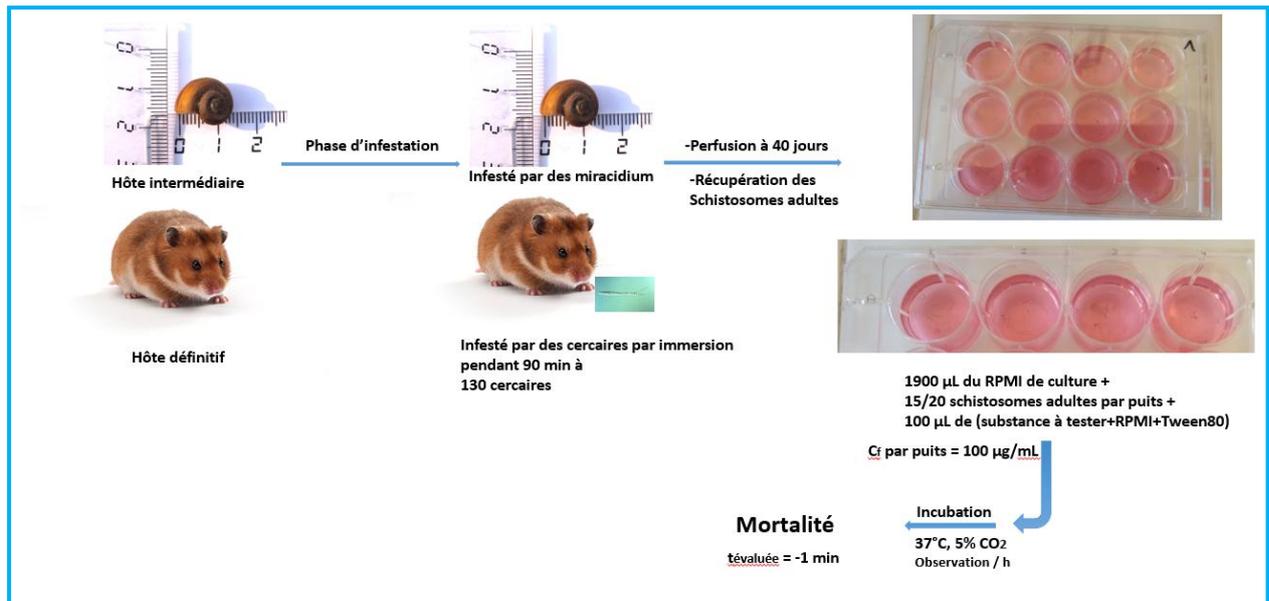
Le système hôte-parasite utilisé était une variété albinos de *Biomphalaria glabrata* du Brésil et une souche de *Schistosoma mansoni* de Porto Rico (souche NMRI). Des hamsters femelles (*Mesocricetus auratus* ; Janvier Labs ; Le genest-Saint-Isle, France) ont été exposés par voie percutanée à 400 cercaires suivant des procédures standard publiées précédemment (**Dumont et al., 2007**). Quarante jours après exposition, les vers adultes de *S. mansoni* ont été récupérés du système porte hépatique et des veines mésentériques par la technique de perfusion hépatique (**Boissier et al., 2003**). Les vers vivants ont été immédiatement déposés dans du milieu de culture RPMI 1640 (complété avec 5% de sérum de veau foetal inactivé (iFCS) et 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen, Carlsbad, CA)) à 37 °C dans une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub>.

### III.4.1.3- Évaluation de l'activité *in vitro*

Dix à douze vers avec un sex-ratio équilibré ont été déposés dans chaque puits de plaques à 24 puits. Pour la détermination de l'activité contre les vers adultes, tous les composés ont été initialement testés à une concentration de 100 µg/mL, en utilisant des solutions mères de DMSO (concentration 10 mg/mL ; concentration finale de DMSO : 0,2) diluées dans du milieu RPMI 1640 complété avec un volume final de 2 mL par puits. Les puits avec RPMI et DMSO dans le milieu ont servi de témoins négatifs. Le PZQ a servi de contrôle positif et des concentrations de 10, 50 et 100 µg/mL ont été utilisées pour évaluer la mortalité du shistosome. Chaque test a été effectué en double ou en triple. Des parasites ont ensuite été observés pour la contractilité corporelle et le mouvement toutes les heures pendant 6 heures. Les parasites ne montrant aucune contraction corporelle au cours d'une observation de 30 s ont été considérés comme morts (aucun ver n'a recommencé à se déplacer après 30 s sans activité motrice (**Boissier et al., 2009**)).

### Déclaration éthique

Le laboratoire, dans lequel les expériences ont été réalisées, a l'autorisation A66040 du Ministère de l'Enseignement supérieur de la Recherche et de l'Innovation (France) pour l'expérimentation animale. Les expérimentateurs possèdent le certificat d'expérimentation animale (autorisation 007083, décret 87-848 et 2012201-0008). Le logement, l'élevage et les soins aux animaux ont suivi les exigences éthiques nationales et européennes.



## Test Parasitaire (*In vitro*)

### III.4.2- Évaluation de l'activité enzymatique

#### Principe :

L'activité *Sm*NACE a été déterminée :

- ✓ Par un test fluorométrique en utilisant 1, N<sup>6</sup>-éthéno NAD<sup>+</sup> ( $\epsilon$ -NAD<sup>+</sup>, Sigma) comme substrat. Ce test consiste à mesurer l'apparition du produit de réaction  $\epsilon$ -ADP-ribose par l'augmentation de la fluorescence à  $\lambda_{em} = 410$  nm ( $\lambda_{exc} = 310$  nm) à 37 ° C dans du tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 7,4, contenant 0,05% (w/v) émulsifiant (1 mL de volume final) dans une cuve en quartz.
- ✓ Et par un test par HPLC. Ce test repose sur la quantification des produits de la réaction d'hydrolyse (NAD<sup>+</sup> et ADPR) à différents temps d'avancement. Ceci grâce à un détecteur UV (lampe UV au deuterium) réglé à 260 nm.

#### Protocole :

-Dans le spectrofluorimètre (Shimadzu RP-5301 PC), le tampon a été ajouté au réservoir à 37 °C et sous agitation. Le substrat a ensuite été ajouté ; sa concentration finale étant de 20 µM. Après cela, des inhibiteurs ont été introduits. Avant l'introduction de l'enzyme, le traçage a été lancé afin de déterminer la fluorescence de base F<sub>0</sub>. Une fois l'enzyme ajoutée, la cinétique a été exploitée à la fin du temps de mesure (2 minutes) à l'aide d'un programme de régression non linéaire (GraphPad, Prism) permettant ainsi la

détermination de l'activité catalytique. Tous les inhibiteurs ont été initialement testés à une concentration de 100 mM diluée dans du DMSO (moins de 2% ajoutés). Dans le cas où nous observions une fluorescence ou un quenching, les concentrations étaient réduites. Ainsi, des concentrations de 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM et 100 mM ont été utilisées. Chaque test a été effectué deux fois.

Les valeurs approximatives de  $CI_{50}$  ont été déterminées sur la base de concentrations donnant environ 50% d'inhibition.

-Dans un tube eppendorf, le milieu réactionnel, contenant le substrat et le tampon phosphate de potassium 10 mM pH 7,4 + 0,05% d'émulphogène, a été préparé (200  $\mu$ L de volume final). Après cela, l'inhibiteur a été introduit. L'enzyme a ensuite été ajoutée au milieu réactionnel, mélangée à 37 °C et le chronomètre déclenché. Aux temps 1, 2, 3 et 4 minutes, 50  $\mu$ L du milieu ont été prélevés et placés dans de nouveaux tubes eppendorf contenant chacun 10  $\mu$ L d'acide perchlorique à 10% (le rôle étant de dénaturer l'enzyme et de stopper la réaction).

Afin de neutraliser la réaction, 3  $\mu$ L de carbonate de potassium 3,5  $\mu$ M ont ensuite été ajoutés dans chaque tube. Chaque tube a été centrifugé pendant une minute environ afin de séparer le surnageant du culot ; et placé dans la carboglace jusqu'à son utilisation.

Sur un appareil HPLC (pompe L-2130 *Hitachi* et colonne C18-  $\mu$  ThermoScientific) à débit de 1mL/min, chaque surnageant a été injecté sur une durée de 12 à 15 minutes, afin de suivre l'avancement de la réaction et de déterminer le pourcentage d'ADPR formé en fonction du temps. L'exploitation de cette courbe a permis la détermination de l'activité enzymatique. Tous les inhibiteurs ont été initialement testés à une concentration de 10 mM diluée dans du DMSO (moins de 2% ajoutés).

### **III.4.3- Évaluation de la toxicité**

La cytotoxicité a été évaluée sur des lignées de cellules cancéreuses Huh7 et A549 en utilisant un test MTS.

Des cellules Huh7 (cellules de carcinome de l'hépatite humaine) ont été cultivées dans du milieu DMEM 1g / L de glucose (SIGMA), 2 mM de glutamine et 10% de FCS (sérum de veau fœtal, SIGMA). Les cellules A549 (cellules de tumeur pulmonaire humaine) ont été cultivées dans du milieu HamF12, de la glutamine 2 mM et du FCS 10%.

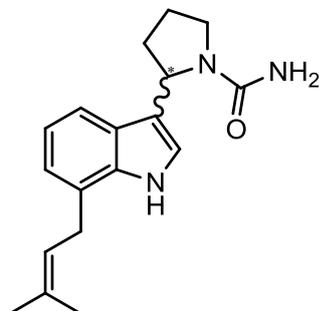
24 heures avant l'expérience de toxicité, les cellules sontensemencées dans une plaque à 96 puits (Nunc Edge 2.0, ThermoScientific) à raison de 4000 cellules/puits (Huh7) ; 6000 cellules / puits (A 549) dans 100 µL et cultivées dans un incubateur à 37 ° C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les extraits et composés à tester ont été dilués en milieu avec du sérum et ont été ajoutés à raison de 20µL/puits pour obtenir la concentration finale souhaitée. Tous les tests ont été effectués en triple. 48 heures après l'ajout des extraits, 20 µL de solution MTS (CellTiter 96R Solution aqueuse de prolifération cellulaire à une cellule, Promega) a été ajouté à chaque puits. Après 1 heure d'incubation à 37 °C, les DO ont été lues à 490 nm et 700 nm (Safas, Monaco).

La DO ou l'absorbance des extraits/composés à doser (490 nm) a été analysée après déduction de la DO à 700 nm, la DO du plastique, la DO des cellules seules.

Le praziquantel et le DMEM medium ont été utilisés comme témoins positifs et négatifs, respectivement.

### III.5- CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSÉS ISOLÉS

**AMR8 :** (-)-3-(5'-N-carbamoylpyrrolidine)-7-(3''-méthyl-2''-butényl)indole (Manniindole)  
(40)



Poudre jaune orange ; test de Dragendorff : positif ;

$[\alpha]_D^{25} = -37,5$  ( $c = 0,4$ ; EtOH).

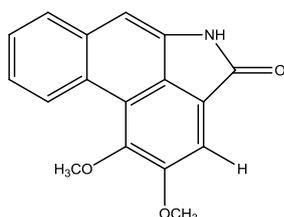
$C_{18}H_{23}N_3O$ ; PM: 297 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+H]^+$  à  $m/z = 298,1919$

Données de RMN  $^{13}C$  (125 MHz ; DMSO- $d_6$ ) et

$^1H$  (500 MHz ; DMSO- $d_6$ ), voir Tableau IX.

**AME3 ou AMR6 :** Lactame d'acide 10-amino-3,4-diméthoxyphénanthrène-1-carboxylique (Aristolactam BII) (41)



Poudre jaune pâle ; test de Dragendorff : positif ;

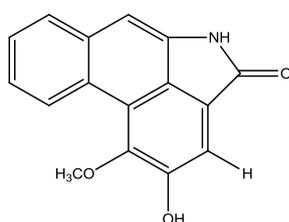
$C_{17}H_{13}NO_3$ ; PM: 279 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+H]^+$  à  $m/z = 280,0969$

Données de RMN  $^{13}C$  (125 MHz ; DMSO- $d_6$ ) et

$^1H$  (500 MHz ; DMSO- $d_6$ ), voir Tableau X.

**AME5 ou AMR9 :** Lactame d'acide 10-amino-3-hydroxy-4-méthoxyphénanthrène-1-carboxylique (Aristolactam AII) (42)



Poudre jaune orange ; test de Dragendorff : positif ;

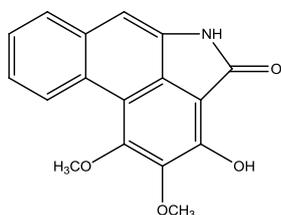
$C_{16}H_{11}NO_3$ ; PM: 265 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+H]^+$  à  $m/z = 266,0819$

Données de RMN  $^{13}C$  (125 MHz ; DMSO- $d_6$ ) et

$^1H$  (500 MHz ; DMSO- $d_6$ ), voir Tableau XI.

**AMR7** : Lactame d'acide 10-amino-2-hydroxy-3,4-diméthoxyphénanthrène-1-carboxylique (Piperolactam D) (**43**)



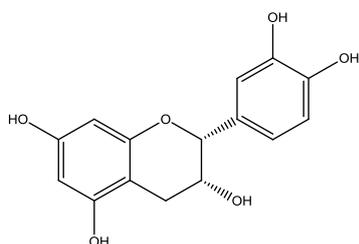
Poudre jaune pâle ; test de Dragendorff : positif ;

$C_{17}H_{13}NO_4$ ; PM: 295 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+H]^+$  à  $m/z = 296,0912$

Données de RMN  $^{13}C$  (125 MHz ; DMSO- $d_6$ ) et  $^1H$  (500 MHz ; DMSO- $d_6$ ), voir Tableau XII.

**AME6** : Épicatéchine (**44**)

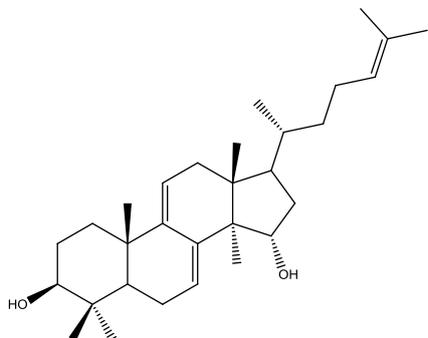


Poudre blanche ; test de chlorure ferrique et Shinoda : positifs ; PF : 241-242°C

$C_{15}H_{14}O_6$ ; PM: 290,27 g/mol;

Données de RMN  $^{13}C$  (100 MHz ; DMSO- $d_6$ ) et  $^1H$  (400 MHz ; DMSO- $d_6$ ), voir Tableau XIII.

**AMR4 ou AME2** : Lanostan-7,9(11),24-triène-3,15-diol (Polycarpol) (**27**)



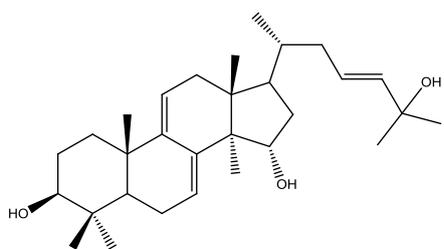
Poudre blanche ; test de Lieberman Burchard : positif ;

$C_{30}H_{48}O_2$ ; PM: 440 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+H]^+$  à  $m/z = 441,3512$

Données de RMN  $^{13}C$  (125 MHz ; DMSO- $d_6$ ) et  $^1H$  (500 MHz ; DMSO- $d_6$ ), voir Tableau XIV.

**AME7 ou AMR3**: Lanosta-7,9(11),23-triène-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diol (Anomanol A) (**28**)



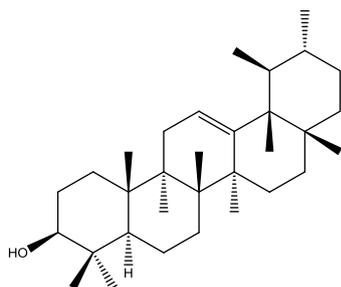
Poudre beige rose ; test de Lieberman Burchard : positif ;

$C_{30}H_{48}O_3$ ; PM: 456 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 479,3497$

Données de RMN  $^{13}C$  (125 MHz ; MeOD) et  $^1H$  (500 MHz ; MeOD), voir Tableau XV.

**AMR5 ou AME8 :  $\alpha$ -amyrine (45)**



Poudre blanche ; test de Lieberman Burchard : positif ;

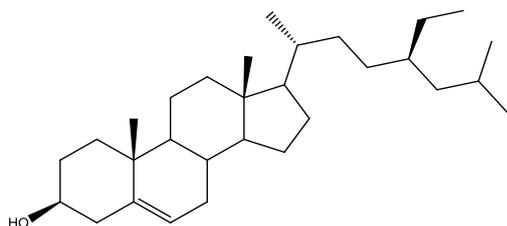
$C_{30}H_{50}O$ ; PM: 426,71 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 449,012$

Données de RMN  $^{13}C$  (100 MHz ;  $CDCl_3$ ) et

$^1H$  (400 MHz ;  $CDCl_3$ ), voir Tableau XVI.

**AME1 :  $\beta$ -sitostérol (18)**



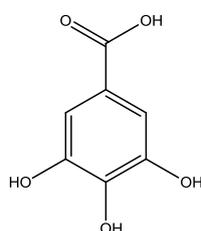
Paillettes blanches ; test de Lieberman Burchard :

positif ; P.F. 139-140°C

$C_{29}H_{50}O$ ; PM: 414,7 g/mol;

SMEI  $[M]^+$  à  $m/z = 414,4$

**AME4 : Acide gallique (47)**



Poudre blanche ; test de Lieberman Burchard : positif

;

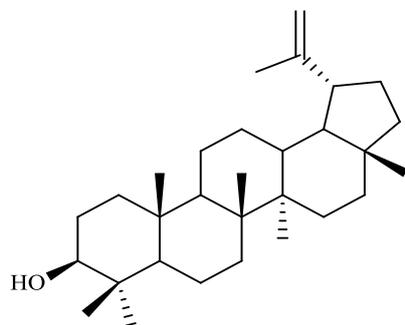
$C_7H_6O_5$ ; PM: 170,03 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+H]^+$  à  $m/z = 171,0291$

Données de RMN  $^{13}C$  (125 MHz ;  $DMSO-d_6$ ) et

$^1H$  (500 MHz ;  $DMSO-d_6$ ), voir Tableau XVIII

**AMR2 : Lupéol (46)**



Paillettes blanches ; test de Liebermann-

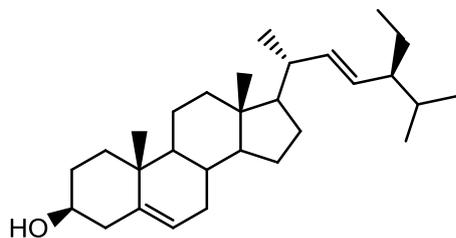
Burchard: positif;  $C_{30}H_{50}O$ ; PM: 426,71 g/mol;

(+)-SMESI-HR  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 449,3748$  ;

Données de RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ), voir

Tableau XVII

**AMR1 : Stigmastérol (30)**



Paillettes blanches ; test de Liebermann-

Burchard: positif;  $C_{29}H_{48}O$ ; PM: 412 g/mol;

PF : 139-140 °C ;  $[\alpha]_D$  : -57 ( $CHCl_3$ ) ;

(+)-SMESI-HR  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 435,3578$

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Achenbach H. and Renner C. (1985). Constituents of West African medicinal plants. XVIII: The Annonidines – A new class of prenylated bisindole alkaloids from *Anonidium mannii*. *Heterocycles*. 23, (8), 2075.
- Adewumi C.O. (1984). Natural Products as Agents of Schistosomiasis Control in Nigeria: A Review of Progress. *International Journal of Crude Research*. 22(4), pp. 161-166.
- ANOFEL (2014). Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. Polycopie National. Bilharzioses. Consulté le 20 Janvier 2021.  
<http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/bilharzioses/site/html/cours.pdf>
- Aubry P. et Gauzere B-A. (2019). Schistosomoses ou bilharzioses. Médecine tropicale. [www.medicinetropicale.com](http://www.medicinetropicale.com). Consulté en ligne le 20 Juillet 2020.
- Ashok P., Lu C.-L., Chander S., Zheng Y.-T., and Murugesan S. (2014). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 1-(thiophen-2-yl)-9H-pyrido[3,4-b] indole Derivatives as Anti-HIV-1 Agents. *Chemical Biology & Drug Design*. 85(6), 722-728.
- Baeyer A. and Emmerling A. (1869). Synthèse des Indols. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 2(1), 679-682.
- Benesova V., Samek Z., Herout V. and Sorm F. (1969). Isolation and structure of two new indole alkaloids from *Riccardia sinuata* (HOOK.) Trev. *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences*.
- Betti B. (2004). An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka Pygmies in the Dja Biosphere Reserve, Cameroon. *African Study Monographs*. 25, 1-27.
- Betti J.L., Yongo O. D., Mbomio D. O., Iponga D. M. and Ngoye A. (2013). An Ethnobotanical and floristical study of medicinal plants among the Baka Pygmies in the periphery of the Ipassa- Biosphere Reserve, Gabon. *European Journal of Medicinal Plants*. 3(2), 174-205.
- Boissier J., Chlichlia K., Digon Y., Ruppel A., and Moné H., (2003). Preliminary study on sex related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*. 91, 144-150.
- Boissier J., Cosledan F., Robert A., and Meunier B. (2009). In vitro activities of trioxaquines against *Schistosoma mansoni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 4903-4906.

- Bouquet A. (1969). Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville). Mémoires O.R.S.T.O.M. Paris. 36, p. 282.
- Brannan R. G., Peters P., Talcott S.T. (2015). Phytochemical analysis of ten varieties of pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) fruit pulp. *Food Chemistry*. 168, 656-661.
- Brooker S., Pratap S., Waikagul J., Suvanee S., Kojima S., Takeuchi T., Luong T. V., Looareesuwan S. (2003). Mapping soil-transmitted helminth infections in Southeast Asia and implications for parasite control. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 34, 24-35.
- Bruneton J. (1999). Flavonoïdes, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Edition 3 : Techniques et Documentation, Paris, pp. 279-785.
- Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Edition 4 : Techniques et Documentation, Lavoisier, p. 1269.
- Burkill (1985). In: The useful plants of West tropical Africa, 2nd edition. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- CDC (2020). Schistosomiasis. Consulté le 20 Janvier 2020.
- Caffrey C. R. (2015). Schistosomiasis and its treatment. *Future Medicinal Chemistry*, 7(6),675–676.
- Chatrou L. W., Erkens R. H. J., Richardson J. E., Saunders R. M. K., and Fay M. F. (2012). The natural history of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 169(1), 1-4.
- Chen S-J., Lu G-P. and Cai C. (2015). Iridium-catalyzed methylation of indoles and pyrroles using methanol as feedstock. *The Royal Society of Chemistry Advances*. 5(8),70329-70332.
- Cioli D., Pica-Mattoccia L., Basso A., & Guidi A. (2014). Schistosomiasis control: praziquantel forever. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 195(1), 23-29.
- Combes C., Després L., Establet D. A., Fournier J., Jourdan H., Mone S., Morand and Theron A. (1991). Schistosomatidae (Trematoda): Some Views on Their Origin and Evolution. *Research and Reviews in Parasitology*. 51, 25-28.

- Connor H.E., Feniuk W., Lloyd K. and Humphrey P. P. A. (1992). Migraine, serotonin and sumatriptan. *Vascular Medicine Review*. 3, 115-128.
- Coon D. R. (2005). Schistosomiasis: Overview of the history, biology, clinicopathology, and laboratory diagnosis. *Clinical Microbiology Newsletter*. 27(21), 163-168.
- D'Ambrosio M., Guerriero A. and Pietra F. (1986). Carbamoylpyrrolidine and 7-Chlorocavernicolone, Two new metabolites of the mediterranean sponge *Aplysina* (= *Verongia*) *cavernicola*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 83B (2), 309-312.
- De Oliveira R. B., Senger M. R., Vasques L. M., Gasparotto J., Dos Santos J. P., Pasquali M. A., Moreira J. C, Silva F. P. Jrand Gelain D. P.(2013). *Schistosoma mansoni* infection causes oxidative stress and alters receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and tau levels in multiple organs in mice. *International Journal of Parasitology*. 43(5), 371-379.
- Desai S. J., Chaturvedi R. and Mulchandani N. B. (1990). Piperolactam D, a New Aristolactam from Indian Piper Species. *Journal of Natural Products*. 53(2), 496-497.
- Dias M. M., Hamerski L., Pinto A. (2011). Separacao semipreparative de  $\beta$ -amyrin por cromatografía líquida de alta eficiencia, *Qumica Nova*. 34, 704-706.
- Djeussi. D. E., Noumedem. J. A. K., Seukep. J. A., Fankman. A. G., Voukeng. I. K., Tankeo. S. B., Nkuete. A. H. L and Kuete. V. (2013). Antibacterial activities of selected edible plant extracts against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary Alternative Medicine*. 13, 164-169.
- Doenhoff M. J., Cioli D., & Utzinger J. (2008). Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 21(6), 659-667.
- Donald P. R., Lamprecht J. H., Freestone M., Albrecht C. F., Bouic P. J., Kotze D., Van Jaarsveld P. P., (1997). A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glycoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1, 518-522.

- Du Z. Z., He H. P., Wu B., Shen Y. M., and Hao X. J. (2004). Chemical constituents from the pericarp of *Trewia nudiflora*. *Helvetica Chimica Acta*. 87, 758-763.
- Dumont M., Moné H., Mouahid G., Idris M. A., Shaban M., and Boissier, J., (2007). Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 101, 247-252.
- Ee G. C. L., Lim S. K., Lim C. M., Dzulkefly K. (2008). Alkaloids and carboxylic acids from *Piper nigrum*. *Asian Journal of Chemistry*. 20, 5931 – 5940.
- Erhenhi A. H. and Obadoni B. O. (2015). Known medicinal and aphrodisiac plants of Urhonigbe forest reserve, Edo State, Nigeria. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 3(4), 101-106.
- Etame-Loe G., Ngoule C. C., Mbome B., Pouka C. K., Ngene J. P., Yinyang J., Ebongue C. O., Ngaba G. P., Dibong S. D. (2018). Contribution à l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans le département du Lom et Djerem (Est, Cameroun). *Journal of Animal & Plant Sciences*. 35(1), 5560-5578.
- Fallon P. G. and Doenhoff M. J. (1994). Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51, 83-88.
- Faust E. C. and Hoffman W. A. (1934). Studies on *Schistosomiasis mansoni* in Puerto Rico III Biological studies. 1. The Extra-Mammalian phases of the life cycle. *The Puerto Rico Journal of public Health and Tropical Medicine*. 10, 1-47.
- Felipe M. A., Hector H. F., Andersson B., Afonso D. L. and Maria L. B. (2012). Steroids and triterpene from the bark of *Unonopsis guatterioides* R.E.FR. (Annonaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4.
- Ganapaty S., Pannakal S. T., Srilakshmi G. V. K., Lakshmi P., Watterman G. P. and Brun R. (2008). Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochemistry Letters*. 1, 175-178.
- Gönnert R., and Andrews P. (1977). Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 52(2), 129-150.
- Goodrich S. P., Muller-Steffner H., Osman A., Moutin M.-J., Kusser K., Roberts A.,

- Woodland D. L., Randall T. D., Kellenberger E., LoVerde P. T., Schuber F., and Lund F.E. (2005). Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry*. 44, 11082-11097.
- Hagen J., Young N. D., Every A. L., Pagel C. N., Schnoeller C., Scheerlinck J.P. Y., Gasser R. B. & Kalinna B. H. (2014). Omega-1 knockdown in *Schistosoma mansoni* eggs by lentivirus transduction reduces granuloma size in vivo. *Nature Communications*, 5(1).
- Hegnauer R. (1964). Annonaceae. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. 116-123.
- Hotez P. J., Bethony J. M., Diemert D. J., Pearson M., and Loukas, A. (2010). Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. *Nature Reviews Microbiology*. 8(11), 814-826.
- Hutchison J. and Dalziel J. M. (1954). Annonaceae. In: Keay RWJ, editor. *Flora of West Tropical Africa*. 2nd edition. London: Crown Agents for Oversea Governments and Administrations.
- Iqbal E., Lim L. B. L., Salim K. A., Faizi S., Ahmed A. and Mohamed A.J. (2017). Isolation and characterization of aristolactam alkaloids from the stem bark of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) and their biological. *Journal of King Saud University-science*. 30, 41-48.
- Jussieu A. L. (1789). *Genera Plantarum*. p. 283.
- Kana A. (2012). Inventaire des produits forestiers non ligneux d'origine végétale. Localité de Mbikiliki (Sud Cameroun) ; Arrondissement de Bipindi Lolodorf, département de l'Océan. Mémoire D.I.P.E.S. II, ENS, Université de Yaoundé.
- Kaushik N., Kaushik N., Attri P., Kumar N., Kim C., Verma A., and Choi E. (2013). Biomedical importance of Indoles. *Molecules*. 18(6), 6620-6662.
- Kent R. J., Yu-Hua H. and McLaughlin J. L. (1990). Annonaceous Acetogenins: A Review. *Journal of Natural Products*. 53(2). 237-278.
- Kim G-S., Lu Z., Feras A. L. L., Rogers L. L., Wu F-E., Sastrodihardjio S., McLaughlin J. L. (1998). Muricoreacin and murihexocin C, monotetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry*. 49, 565-71.

- Kuete V., Fankam A. G., Wiench B. and Efferth T. (2013). Cytotoxicity and Modes of Action of the Methanol Extracts of Six Cameroonian Medicinal Plants against Multidrug-Resistant Tumor Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-10.
- Kuhn I., Kellenberger E., Said-Hassane F., Villa P., Rognan D., Lobstein A., Haiech J., Hibert M., Schuber F. and Muller-Steffner H. (2010). Identification by high-throughput screening of inhibitors of *Schistosoma mansoni* NAD (+) catabolizing enzyme. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 18, 7900-7910.
- Kuhn I., Kellenberger E., Schuber F. and Muller-Steffner H. (2013). *Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup> catabolizing enzyme: Identification of key residues in catalysis. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1834, 2520-2527.
- Kumar D., Maruthi Kumar N., Ghosh S. and Shah K. (2012). Novel bis(indolyl)hydrazide–hydrazones as potent cytotoxic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 22(1), 212–215.
- Kumar T. M, Mohan R.T., Branton A., Trivedi D., Nayak G., Mishra R.K. and Jana S. (2015). Biofield Treatment: A Potential Strategy for Modification of Physical and Thermal Properties of Indole. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 02(04).
- Lee H. C. (2000). Enzymatic functions and structures of CD38 and homologues. *Chemical Immunology*. 75, 39-59.
- Leiper R. T. and Atkinson E. L. (1915). Observations on the spread of asiatic schistosomiasis. *British Medical Journal*. 1(2822), 201-192.
- Lejoly J., Ndjele M.B. and Geerink D. (2010). Catalogue – Flore des plantes vasculaires des districts de Kisangani et de la Tshopo (RD Congo), 4e édition Revue et augmentée, incluant les clés et la distribution pour 70 familles, publiées dans la taxonomania. 30, 1-308 (Bruxelles).
- Leong Y-W. and Harrison L. J. (1999). 20R,23E-Eupha-8,23-diene-3b,25-diol from *Tripetalum cymosum*. *Phytochemistry*. 50(5), 849-857.
- Le Thomas A. (1983). Morphologie et palynologie des Annonacées africaines : inter-relations phylogéniques. *Bothalia*. 14(3-4), 825-831.
- Le Thomas A. (1980). Ultrastructural characters of the pollen grains of African Annonaceae

- and their significance for the phylogeny of primitive angiosperms I. *Pollen and Spores*. 22, 267-342.
- Mackie A., and Ghatge N. (1958). Chemical investigation of the leaves of *Anona senegalensis*., II.-Carbohydrates, glycosides, proteins, amino-acids, sterols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 9(2), 88-92.
- Mafud A. C., Silva M. P. N., Monteiro D. C., Oliveira M. F., Resende J. G., Coelho M. L., de Sousa D. P., Mendonça R. Z., Pinto P. L. S., Freitas R. M., Mascarenhas Y. P. and de Moraes J. (2016). Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. *Chemico-Biological Interactions*. 244, 129-139.
- Mahato S. B. and Kundu A.P. (1994). <sup>13</sup>C NMR of pentacyclic triterpenoids: A compilation and some salient features. *Phytochemistry*. 37(6), 1517-1575.
- Marcou G. and Rognan D. (2007). Optimizing fragment and scaffold docking by use of molecular interaction fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 47, 195-207.
- Mbita Messi. (1999). Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cameroun : le cas des plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies parasitaires. Thèse doctorat 3è cycle, Université de Yaoundé I.....
- Mbula J. P., Kwembe J. T. K., Tshilanda D. D., Asimonio J., Toegaho A., Tshibangu D. S. T., Ngbolua K. N., Bokota M. T. and Mpiana P. T. (2015). Ethnobotanical Survey of Aromatic Plants of Masako Forest Reserve (Kisangani, DR CONGO). *Journal of Advanced Botany and Zoology*. 2 (3), 2348-7313.
- Mehta D. S., Sikotra K. H. and Shah H. V. (2005). Synthesis and biological screening of some new indole derivatives. *Indian Journal of Chemistry*. 44B, 2594-2597.
- Moeschler H., Pfluger W. and Wendish D. (1987). Pure annonin and process for the preparation. US Patent 4689232.
- Morales-Ríos, M. S., Espiñeira, J. and Joseph-Nathan, P. (1987). <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of indole derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 25(5), 377-395.
- Musuyu Muganza D., Fruth B.I., Nzunzu Lami J., Mesia G.K., Kambu O.K., Tona G.L., Cimanga Kanyanga R., Cos P., Maes L., Apers S. and Pieters L. (2012). In vitro

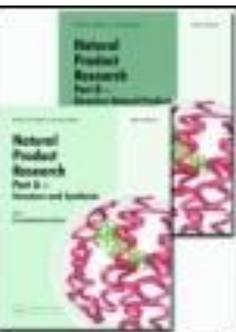
- antiprotozoal and cytotoxic activity of 33 ethonopharmacologically selected medicinal plants from Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*. 141, 301- 308.
- Muyak Tshoto K., Cioci C. C., Aseho M. M., Kalonji M., Byanga K., Kolonda E. and Simbi L., (2014). Survol ethnobotanique de quelques plantes utilisées contre la Schistosomiase urogénitale à Lubumbashi et environ. *Phytothérapie*. 12, 213-228.
- Nelson D. L. and Cox M. M. (2005). Principles of Biochemistry (4th edition.), New York: W. H. Freeman, ISBN 0-7167-4339-6.
- Ngangoue M. O., Ngameni B., Ambassa P., Chi G. F., Wamba B. E. N., Ombito J. O., Ngadjui, B. T. (2020). A phenanthridin-6(5H)-one derivative and a lanostane-type triterpene with antibacterial properties from *Anonidium mannii* (Oliv). *Engl. & Diels (Annonaceae). Natural Product Research*. 1-10.
- Noumi E. and Eloumou M. (2011). Syphilis ailment: prevalence and herbal remedies in Ebolowa subdivision (South region, Cameroon). *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2(1), 20-28.
- OMS. (2010). Agir pour réduire l'impact mondial des maladies tropicales négligées : premier rapport de l'OMS sur les maladies tropicales négligées. Genève.
- OMS. (2011). Relevé épidémiologique hebdomadaire. Aide-memoire 86, 257-268.
- OMS. (2014). Schistosomiase (Bilharziose). Aide-mémoire N°115. Genève.
- OMS. (2020). Schistosomiase. Consulté le 15 Mai 2020.
- OMS. (2004). Schistosomiase et géohelminthiases : prévention et lutte. OMS, Série de rapports techniques. 912, 77-85.
- Pan C. (1965). Studies on the host-parasit relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 14, 931-976.
- Pegel K. H. (1997). The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *South Africa Journal of Science*. 93, 263-268.
- Pellegrin F. (1947). Les Annonacées du Gabon, Bulletin de la Société Botanique de France. 94 (7-8), 253-258.

- Priestap H. A. (1985). Seven aristololactams from *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry*. 24, 849-852.
- Projet de partenariat CE-FAO (1998-2001). (1999). Données statistiques des produits forestiers non ligneux du Cameroun : Analyse et collecte des données pour l'Aménagement durable des forêts-Joindre les efforts nationaux et internationaux.
- Ragasa C. Y., Soriano G., Torres O. B., Don M.-J. and Shen C.-C. (2012). Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy Journal*. 4(32), 32-37.
- Ratard R. C., Kouemeni L. E., Ekani Bessala M.-M., Ndamkou C. N., Greer G. J., Spilsbury J. and Cline B. L. (1990). Human Schistosomiasis in Cameroon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42 (6), 561-572.
- Saracoglu N. (2007). Functionalization of indole and pyrrole cores via Michael-type additions. *Bioactive Heterocycles*. 5, 1-61.
- Sarwar A. M., Neeraj C., Mohammed A. and Masatake N. (1996). Oleanen and Stigmasterol derivatives from *Ambroma augusta*. *Phytochemistry*. 41, 1197-1200.
- Sillans R. (1953). Plantes ligneuses nouvelles d'Afrique tropicale. *Revue Internationale de Botanique Appliquée et d'Agriculture tropicale*. 33, 545-561.
- Silva M., Koolen H. H. F, Barison A., Souza A. and Pinheiro M. (2012). Steroids and triterpene from the bark of *Unonopsis guatteroides* R. E. FR. (Annonaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4, 522-523.
- Silva M. P., de Oliveira R. N., Mengarda A. C., Roquini D. B., Allegretti S. M., Salvadori M. C., Teixeira F. S., de Sousa D. M., Pinto P. L. S. and de Moraes, J. (2017). Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(3), 467-472.
- Singh N., Bhati S. K., and Kumar A. (2008). Thiazolyl/oxazolyl formazanyl indoles as potent anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 43(11), 2597-2609.
- Singh T. P., and Singh O. M. (2017). Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 18(1).

- Southon I. W. and Buckingham J. (1989). Dictionary of Alkaloids. Chapman and Hall/ CRC. London & New York.
- Stephanopoulos G. N., Aristidou A. A., Nielsen J. (1998). Metabolic Engineering: Principles and Methodologies. *Academic Press*, London.
- Takhtajan A. (1997). Diversity and Classification of flowering plants. New York, Columbia University Press: 643.
- Talapatra S. K., Basu D., Chattopadhyay P. and Talapatra B. (1988). Aristolactams of *Goniothalamus sesquipedalis* Wall. Revised structures of the 2-oxygenated aristolactams. *Phytochemistry*. 27, 903.
- Tan S. Y. and Ahana A. (2007). Theodor Bilharz (1825-1862): discoverer of Schistosomiasis. *Singapore Medical Journal*. 48, 184-185.
- Thomas J., Bahuchets S., Epelboin A., and Furniss S. (2003). Encyclopédie des Pygmées Aka : techniques, langage et société des chasseurs-cueilleurs de la forêt centrafricaine (*Sud-Centrafrique et Nord-Congo*), Peeters-SELAF, Paris, France.
- Tran M. H., Pearson M. S., Bethony J. M., Smyth D. J., Jones M. K., Duke M. and Loukas A. (2006). Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature Medicine*. 12(7), 835-840.
- Tsabang N., Fokou P. V. T., Tchokouaha L. R. Y., Noguem B., Bakarnga-Via I., Nguépi M. S. D. and Boyom F. F. (2012). Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*. 139(1), 171-180.
- Tsai J. T., Liu H. C. and Chen Y. H. (2010). Suppression of inflammatory mediators by cruciferous vegetable-derived indole-3-carbinol and phenylethyl isothiocyanate in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Mediators of Inflammation*. 2010, 293642.
- Tsuruta A. Y., Bomm M. D., Lopes M. N. and Lopes L. M. X. (2002). Aristolactams and Further constituents from *Aristolochia chamissonis*. *Ecletica Quimica Journal*. 27.
- Veras L. M., Guimarães M. A., Campelol Y. D., Vieiral M. M., Nascimento C., Lima D. F., Vasconcelos L., Nakano E., Kuckelhaus S. S., Batista M.C, Leitel J. R. and Moraes J. (2012). Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. *Current Medicinal Chemistry*. 19, 2051-2058.

- Viegas F. P. D., de Castro A. T., Castro A. P., Siqueira I., Rosa W., Espuri P. F., Coelho L. F. L., Marques M. J. and Soares M. G. (2017). *In vitro* schistosomicidal activity of the crude extract, fractions and Primin, the major active benzoquinone constituent from the leaves of *Miconia willdenowii* (Melastomaceae). *South African Journal of Botany*. 111, 365-370.
- Vivien J. and Faure J. J. (1996). *Fruitiers Sauvages d'Afrique (Espèces du Cameroun)*. Editions. Nguila-Kerou, les presses de l'imprimerie Téqui Saint-cénééré. P 416.
- Waterman P. and Pootakahm K. (1979). Chemical Studies on the Annonaceae – VI. The Alkaloids of the Stem and Fruit of *Monanthes cauliflora*. *Planta Medica*. 37(11), 247–252.
- Weerakoon, K. G. A. D., Gobert, G. N., Cai, P., & McManus, D. P. (2015). Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(4), 939-967.
- Wilson R. A. and Coulson P. S. (1986). Lung-phase immunity to schistosomes: a new perspective on an old problem. *Parasitology Today*. 5, 274-278.
- Xia Q., Zhang H., Sun X., Zhao H., Wu L., Zhu D., Yang G., Shao Y., Zhang X., Mao X., Zhang L. and She G. (2014). A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma spp.* *Molecules*. 19(11), 17478-17535.
- Zeng L., Wu F-E. and McLaughlin J. L. (1995). Annohexocin, a novel monoTHF acetogenin with six hydroxyls, from *Annona muricata* (Annonaceae). *Bioorganic and medicinal Chemical Letters*. 5, 1865-8.
- Zhang W. J. and Björn L. O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*. 80, 207-218.

**ANNEXE: PUBLICATIONS**



## Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

# Manniindole, an indole derivative from the roots of *Anonidium manni* and combined antischistosomal and enzymatic activities

Josette Linda Toussi Matchi, Diderot Tchamo Nougoue, Isabelle Kuhn, Jérôme Boissier, Jean Claude Tchouankeu, Marc Nothisen, Guilhem Chaubet, Delphine Garnier, Sylvain Ursuegui, Silvère Augustin Ngouela & Alain Wagner

To cite this article: Josette Linda Toussi Matchi , Diderot Tchamo Nougoue , Isabelle Kuhn , Jérôme Boissier , Jean Claude Tchouankeu , Marc Nothisen , Guilhem Chaubet , Delphine Garnier , Sylvain Ursuegui , Silvère Augustin Ngouela & Alain Wagner (2020): Manniindole, an indole derivative from the roots of *Anonidium manni* and combined antischistosomal and enzymatic activities, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2020.1824227](https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1824227)

To link to this article:

<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1824227>

 View supplementary material 

 Published online: 28 Sep 2020.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>



## Manniindole, an indole derivative from the roots of *Anonidium mannii* and combined antischistosomal and enzymatic activities

Josette Linda Toussi Matchi<sup>a,b</sup>, Diderot Tchamo Nougoué<sup>a</sup>, Isabelle Kuhn<sup>b</sup>, Jerome Boissier<sup>c</sup>, Jean Claude Tchouankeu<sup>a</sup>, Marc Nothisen<sup>b</sup>, Guilhem Chaubet<sup>b</sup>, Delphine Garnier<sup>b</sup>, Sylvain Ursuegui<sup>b</sup>, Silvere Augustin Ngouela<sup>a</sup> and Alain Wagner<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon; <sup>b</sup>Laboratoire de Chimie Bio-Fonctionnelle, UMR 7199 CNRS, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch Cedex, France; <sup>c</sup>Interactions Hôtes-Pathogènes- Environnements, UMR 5244 CNRS, University of Perpignan, Perpignan, France

### ABSTRACT

A new alkaloid, manniindole 1, together with four known compounds: aristolactam AII 2, aristolactam BII 3, piperolactam D 4 and polycarpol 5 were isolated from the crude extract EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2) of the roots of *Anonidium mannii* by chromatographic separation. The structure elucidation was performed on the basis of a spectroscopic analysis (IR, HRESI MS, 1D and 2D NMR) as well as a comparison of their spectral data with those reported in the literature. For the first time, the crude extract and those isolated compounds were evaluated for their anti-schistosomal activity against *Schistosoma mansoni* and for cytotoxicity activity against Huh7 and A549 cells. Furthermore, they were also tested in vitro on the recent characterized *Schistosoma mansoni* NAD<sup>b</sup> catabolizing enzyme (SmNACE) for their impact on this enzyme which is localized on the outer surface of the adult parasite. Compound 2 displayed quite good worm killing capability, while 4 showed significant inhibition of SmNACE.

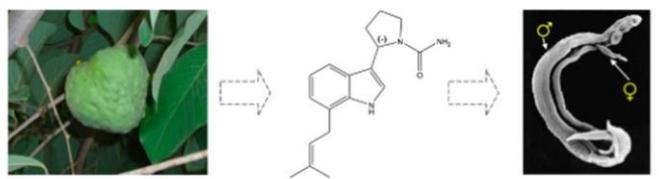
### ARTICLE HISTORY

Received 17 July 2020

Accepted 31 August 2020

### KEYWORDS

*Anonidium mannii*;  
Annonaceae; phytochemical and biological investigation;  
indole alkaloid; antischistosomal activity; enzymatic activity (SmNACE); cytotoxicity



## Introduction

The genus *Anonidium*, belonging to the Annonaceae family, comprises 7 tropical African tree and shrub species (Pellegrin 1947), but this genus is not well studied. *Anonidium mannii* (Oliv.) Engl. & Diels, is known to be located to Central Africa [Cameroon (Bankomo, Makenene, Ndikinemeki, Kribi), Gabon and Congo], and has been used in the respective countries of origin for the treatment of various ailments including female infertility (Abondo et al. 1991), treatment of abscess (Taffou et al. 2017), open wounds, hemorrhoids, intestinal

---

spasms, diarrhea (Musuyu Muganza et al. 2012), arthritis, rheumatism, dysentery, paralysis, epilepsy, convulsion, stomach trouble (Erhenhi and Obadoni 2015), cancer (Kuate et al. 2013) malaria (Betti 2004) and Schistosomiasis (Messi 1999). Otherwise, Schistosomiasis, also known as bilharzia, is a disease caused by parasitic worms infecting people worldwide. This neglected tropical disease (OMS 2010; Zhang et al. 2010) comes second after malaria as the most devastating parasitic disease in terms of impact. It is estimated that 600 million people are at risk of infection, 200 million people are infected, and at least 200 thousand deaths per year are associated with the disease (OMS 2014). The parasites that cause schistosomiasis live in certain types of freshwater snails, from which their infectious form, known as cercariae, can emerge into the water and infect humans through skin contact. In most human infections, acute schistosomiasis is caused by *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, or *S. japonicum*, and is characterized by fever, headache, myalgia, and respiratory symptoms, and occasionally by eosinophilia and painful hepato- and/or splenomegaly. No vaccine is currently available and the antiparasitic drug mostly used to treat schistosomiasis is Biltricide, which active ingredient (Praziquantel) belongs to the alkaloid family (OMS 2020; Doenhoff et al. 2009). However, it is only effective against adult worms and it has showed many side effects. More worrying, because the question of the reduction of the efficacy of praziquantel molecule was raised recently, it is thus urgent to find new, safe antischistosomal drugs and new therapeutic targets (Fallon and Doenhoff 1994). SmNACE is an ecto-enzyme recently discovered which has a favorable topology because it is one of the rare identified and characterized target on the tegument of adult schistosomes responsible for serious clinic troubles. In fact, SmNACE is extremely interesting due to its accessibility of drugs and thus a potential target for conception of future therapeutic agents (Goodrich et al. 2005; Kuhn et al. 2010; Jacques et al. 2015).

The Annonaceae family is known to contain acetogenins, alkaloids, essential oils, terpenoids, and some flavonoids (Leboeuf 1982). Previous phytochemical investigation on the specie *Anonidium mannii* revealed the presence of alkaloids, phenols, polyphenols, saponins, tannins and steroids (Djeussi et al. 2013; Ngangoue et al. 2020). Some prenylated indoles and bisindole alkaloids have been identified from the stem bark of *A. mannii* (Achenbach and Renner 1985) and some have been reported to have the following biological activities: antibacterial, immunosuppressive and radical scavenging (Southon and Buckingham 1989). As a part of our ongoing project on the structurally and biologically interesting secondary metabolites from *Anonidium mannii*, and based on previous reports on the antiparasitic

activity of this species, the aim of this work was to carry out a phytochemical and biological investigation on the roots of the plant collected from Cameroon.

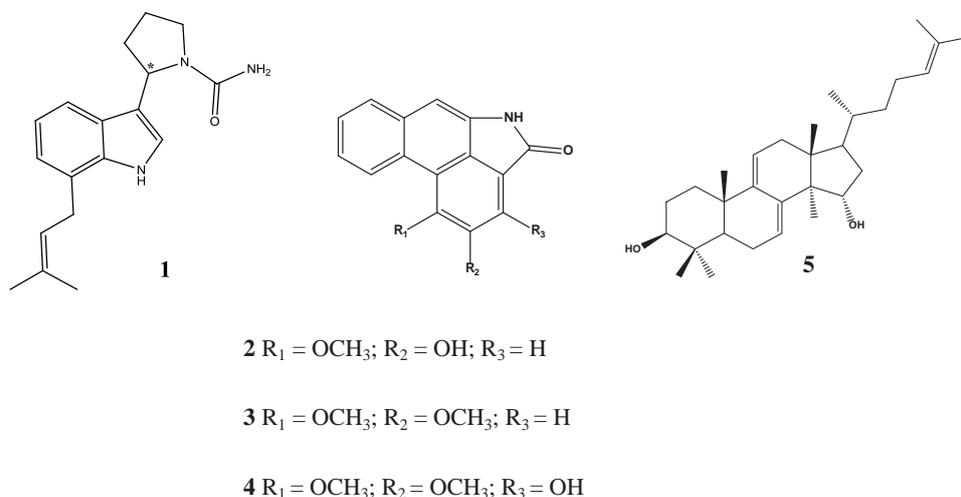


Figure 1. Chemical structures of compounds 1–5.

## Results and discussion

Herein report the isolation and characterization by the spectroscopies means, of the novel indole derivative 1, together with four known compounds identified as, aristolactam A II 2 (Sun et al. 1987), aristolactam B II 3 (Akasu et al. 1974), piperolactam D 4 (Desai et al. 1990) and polycarpol 5 (Hammoniere et al. 1976) respectively (Figure 1); and also their cytotoxicity, enzymatic and antischistosomal activities evaluation.

Compound 1 was isolated as a yellow-orange amorphous powder, which gave a positive Dragendorff test characteristic of alkaloid. Its molecular formula  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ , could be deduced from its positive high resolution electrospray ionization mass spectrum (HRESI-MS) which showed protonated molecule  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ion peak at  $m/z$  298.1924 (calc. 298. 1919), indicating nine degrees of unsaturation. Its infrared spectrum displayed maxima at around 3 480  $\text{cm}^{-1}$  which could be due by a vibration of the N–H group for an indole skeleton (Benesova et al. 1969), and we can also observe absorptions attributable to the N-carbamoylpyrrolidine at ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3270 and 3100 ( $\text{NH}_2$ ); 1651 (amid carbonyl,  $\text{N}_2\text{C}=\text{O}$ ); 1519, 1494 (N–CO–N) (D'Ambrosio et al. 1986).

The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (Table S1) displayed 18 carbon signals which were sorted by DEPT into two methyls, four  $\text{sp}^3$  methylenes, six methines (three aromatics, two olefinics and one  $\text{sp}^3$ ) five  $\text{sp}^2$  quaternary carbons and one carbonyl at  $\delta_{\text{C}}$  157.2 characteristic of N-carbamoyl group.

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 1 (Table S1) showed in the low field region, two broad singlets at  $\delta_{\text{H}}$  10.80 and 7.03 which might confirm the existence in 1 of an indoyl N-H and olefinic (H-2) protons respectively (Benesova et al. 1969), and furthermore it exhibited also three coupled aromatic protons each other at  $\delta_{\text{H}}$  7.34 (1H, bd,  $J = 7.8$  Hz, H4),  $\delta_{\text{H}}$  6.90 (1H, (1H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-5) and  $\delta_{\text{H}}$  6.85 (1H, bd,  $J = 7.0$  Hz, H-6), this assume that the single aromatic cycle of 1 was

trisubstituted. In addition, this spectrum showed the characteristic resonances of a 3,3-dimethylallyl moiety [ $\delta_{\text{H}}$  1.71 (6H, s, H4'' and H-5''); 3.50 (2H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-1'') and 5.43 (1H, m, H-2''). After all, we can also observe aliphatic protons at  $\delta_{\text{H}}$  [1.86 (2H, m, H-3'); 1.89 (1H, m, H-4a), 2.17 (1H, m, H-4b); 3.43 (1H, m, H-2a); 3.51 (1H, m, H-2b) and 5.11 (1H, bd,  $J = 7.2$  Hz; H-5')], together with amide protons ( $\text{CONH}_2$ ) at  $\delta_{\text{H}}$  5.45 (2H, s,); According to its molecular formula, all these data corroborate the presence in the compound 1 of a N-carbamoylpyrrolidine group. Combined analysis of these data above indicated that compound 1 had a framework of an indole type alkaloid which was substituted by prenyl and N-carbamoylpyrrolidine groups respectively. In its  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum, coupling was observed between olefinic proton (H-2) and N-H proton of the pyrrole ring of the indole moiety and this assume that C-3 was substituted, and associate with the HMQC, that spectrum revealed connectivity of pyrrolidine ring (C-2', C-3', C-4' and C-5' resp.) and prenyl group (C-1'', C-2'' and C-4''/5'' resp.). Key HMBC correlations between aliphatic protons (H-2'' and H-1'') of the 3,3-dimethylallyl moiety and aromatic carbons (C-7 and C-6; C-7a resp.) of the indole skeleton allowed us to fix the prenyl group on C-7, and interaction between H-5' and C-2 enabled us to attach N-carbamoylpyrrolidine on carbon C-3. This was confirmed by its NOESY correlations observed between H-5' and H-2 and ( $\text{CONH}_2$ ) protons respectively (Figure S2). The compound 1 was showed optical activity, due to its chiral carbon (C-5) which deflected the polarized light to the left (levorotatory) based on the polarimetry performed. Hence, its structure was identified as (-)-3-(5'-N-carbamoylpyrrolidine)-7(3''-methyl-2''-butenyl) indole and has been given the trivial name manniindole.

In the meantime, new compound 1, and compounds 2, 3 and 4 were subjected to antischistosomal, enzymatic and/or cytotoxicity activities, the results were quite encouraging. The human lung cancer cells (A549) and the human hepatocarcinoma cells (Huh7) were chosen for evaluating the cytotoxicity of compound 1 due to the fact that the lung and liver are the focal points of pathogenic insult and subsequent pathological damage in schistosomiasis (De Oliveira et al. 2013). At the concentration  $C = 100$  mM, the percentage of cell viability is

15% (Huh7 cells) and 80% (A549 cells). This showed that the compound 1 was toxic at this concentration for Huh7 cells line and no toxic for A549 cells line (Figure S3).

The new compound 1 and the compounds 2 and 3 were evaluated in vitro for their activity against adult *Schistosoma mansoni*. Only compound 2 displayed quite good worm killing capability after 6 h at the concentrations of 100 mM, Praziquantel was taken as positive control (Table S2).

The compounds 1, 2, 3 and 4 were also tested for their ability to inhibit the catalytic activity of recombinant SmNACE in vitro using 1,N<sup>6</sup>-etheno NAD<sup>+</sup> as substrate. This enzyme was chosen due to its expression on the outer surface of the *Schistosoma mansoni* adult worm tegument. In these sense, it could be an interesting pharmacological target for antischistosomal therapy (Goodrich et al., 2005). The IC<sub>50</sub> values were determined fluorometrically using 1,N<sup>6</sup>-etheno NAD<sup>+</sup> as substrate. Only the compound 4 showed a significant inhibition with a IC<sub>50</sub> value about 10–20 mM compared to the reference SmNACE inhibitor (Table S3).

## Experimental

### General methods

IR spectrum was obtained using a Thermo Electron (Nicolet 380) FT-IR spectrometer. Column chromatography was carried out using silica gel (Merck 60–120, 70–230 and 230–400 mesh). Rotating power was recorded on a P-2000 Jasco polarimeter. Thin layer chromatography was performed on percolated 0.5 mm thick Merck Si gel 60 F254 aluminium sheets. Separated compounds were visualized under UV light and by spraying with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>–EtOH (1:9, v/v) followed by mild heating for about 2–3 min. The mass spectra were recorded on an Agilent MS instrument (Agilent Technologies 6520, Accurate mass Q-ToF). NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-500 instrument operating at 500 MHz (<sup>1</sup>H) and 125 MHz (<sup>13</sup>C), using a deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d<sub>6</sub>) as solvent. Chemical shifts (δ) were quoted in parts per million (ppm) from internal standard tetramethylsilane (TMS) and the coupling constants (J) are given in Hz. Different mixtures of n-hexane, EtOAc, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH were used as eluting solvents. They were distilled prior to use.

### Plant material

Roots of *Anonidium mannii* were collected in 2016 at Mount Kalla (Latitude 3 30'. North, Longitude 11 13'. East), from Bankomo locality, Mefou et Akono Sub-division, Center

Region of Cameroon and identified by M. Victor NANA, a botanist of National Herbarium, Yaounde, Cameroon; where a voucher specimen is deposited under the voucher number 45582HNC.

### Extraction and isolation

The air-dried and powdered roots (3.4 kg) of *A. mannii* was macerated in 25 L of a mixture of EtOH-H<sub>2</sub>O (8:2) for 72 h at room temperature. After filtration and solvent evaporation, a residue

of 130.41 g was obtained. A part of the crude extract (100 g) was subjected to flash column chromatography (FCC) on silica gel employing a step gradient of hexane-ethyl acetate and ethyl acetate-methanol to afford ten fractions Fr1-Fr10 based on TLC monitoring.

Fraction Fr6 (2.51 g) was purified employing a step gradient of hexane (1:0) ethyl acetate (7:3) to yield polycarpol 5 (15.0 mg). A part of the fraction Fr9 (3.24 g), eluted with a gradient dichloromethane (1:0)-methanol (9.5:0.5) lead to aristolactam AII 2 (8 mg). Fraction Fr10 (9.1 g) was purified by flash chromatography (MPLC) over silica gel with a gradient ethyl acetate (1:0)-methanol (8.5:1.5) and subfractions [30–55] (250 mg) were purified by semi-preparative HPLC using a gradient (5–95% CH<sub>3</sub>CN, in 60 min) to give piperolactam D 4 (11.2 mg), aristolactam BII 3 (12 mg) and manniindole (1) (6 mg). For <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see [Table S2](#).

### Bioassay

#### Cytotoxicity activity

Cytotoxicity was tested against the Huh7 and A549 cells using a MTS assay. Huh7 cells (Human Hepato carcinoma cells) are cultured in DMEM medium 1 g/L glucose (SIGMA), 2 mM Glutamine and 10% FCS (fetal calf serum, SIGMA). The A549 cells (Human Lung Tumor cells) are cultured in HamF12 medium, 2 mM Glutamine and 10% FCS. 24 hours before the toxicity experiment, the cells are seeded in a 96-well plate (Nunc Edge 2.0, ThermoScientific) at the rate of 4000 cells/well (Huh7); 6000 cells/well (A 549) in 100 IL and cultured in an incubator at 37 C. with 5% CO<sub>2</sub>. The extracts to be tested are diluted in medium with serum and added at a rate of 20 IL/well to obtain the desired final concentration. All tests were done in triplicate. 48 hours after the addition of the extracts, 20 IL of MTS solution (Cell Titer 96 R Aqueous One Cell Proliferation Assay Solution, Promega) are added to each well. After 1 hour of incubation at 37 C., the ODs are read at 490 nm and 700 nm (Safas, Monaco).

The OD or absorbance of the extracts to be assayed (490 nm) are analyzed after deducting the OD at 700 nm, the OD of the plastic, the OD of the cells alone.

Praziquantel and DMEM medium were used as positive and negative controls, respectively.

#### Determination of activity against adult *Schistosoma mansoni* (in vitro)

The host-parasite system used was an albino variety of *Biomphalaria glabrata* from Brazil and a strain of *Schistosoma mansoni* from Puerto Rico (NMRI strain). Female hamsters (*Mesocricetus auratus*; Janvier Labs; Le genest-Saint-Isle, France) were percutaneously

exposed to 400 cercariae following standard procedures previously published (Dumont et al. 2007). Forty days' post-exposition adult *S. mansoni* were recovered from the hepatic portal system and mesenteric veins by hepatic perfusion technique (Boissier et al. 2003). Living worms were immediately deposited in RPMI 1640 culture medium (supplemented with 5% inactivated foetal calf serum (iFCS) and 100 U/mL penicillin and 100 lg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA)) at 37 C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Ten to twelve worms with equilibrated sex ratio were deposited in each well of 24 well plates. For the determination of activity against adult flukes all compounds were initially tested at a concentration of 100 lg/mL, using DMSO stock solutions (conc 10 mg/mL; final concentration of DMSO: 0.2) diluted in supplemented RPMI 1640 medium with a final volume of 2 mL per well. Wells with RPMI and DMSO in medium served as negative controls. PZQ served as positive control, and concentrations of 10, 50, and 100 lg/mL were used to evaluate the shistosome's mortality. Each test was performed in duplicate or triplicate. Parasites were subsequently observed for body contractility and movement each hour for 6 hours. Parasites showing no body contractions during a 30-s observation were considered dead [no worm started to move again after 30 s without motor activity (Boissier et al. 2009)].

#### Enzymatic activity (in vitro)

SmNACE activity was determined by a fluorometric assay using 1, N<sup>6</sup>-etheno NAD<sup>+</sup> ( $\epsilon$ -NAD<sup>+</sup>, Sigma) as substrate. This assay consists in measuring the appearance of the reaction product  $\epsilon$ -ADP-ribose by the increase of fluorescence at  $\lambda_{em} = 410$  nm ( $\lambda_{exc} = 310$  nm) at 37 C in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.05% (w/v) emulphogen (1 mL final volume) in a quartz tank.

In the spectrofluorimeter (Shimadzu RP-5301 PC), the buffer was added to the tank at 37 C and with stirring. The substrate was then added; its final concentration being 20 mM. After that, inhibitors were introduced. Before introducing the enzyme, the tracing was started in

order to see the basic fluorescence  $F_0$ . Once the enzyme has been added, the kinetics were exploited at the end of the measurement time (2 minutes) using a non-linear regression program (GraphPad, Prism) for the determination of catalytic activity. All the inhibitors were initially tested at a concentration of 100 mM diluted in DMSO (less than 2% added). In case that we observed fluorescence or quenching, the concentrations were decreased. So, concentrations of 10 mM, 100 mM, 1 mM, 10 mM and 100 mM were used. Each test was performed twice.

The approximate  $IC_{50}$  values were determined based on concentrations giving approximately 50% inhibition.

## Conclusion

In conclusion, phytochemical and biological investigation which was carried out on the roots of *Anonidium mannii* led to the isolation of five major compounds among which one, 1, was newly described. Though there are well known in the Annonaceae family, this is the first time that lactams were found in *A. mannii*. Those isolated compounds were submitted for the first time to the combined biologic tests on the schistosomes (parasitological and enzymatical tests). Two compounds, respectively 2 and 4, were potentially having good activity on adult *Schistosoma mansoni* in vitro and good inhibition of a member of the ADP-ribosyl cyclase family of enzymes (SmNACE) in the Platyhelminthes trematodes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*.

## Acknowledgments

The authors are thankful to AUF for providing a fellowship to J L T M.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Ethic statement

The laboratory where the experiments were done has permission A66040 from «Ministère de l'Enseignement supérieur de la Recherche et de l'Innovation (France)» for animal experimentation. Experimenters possess the certificate for animal experimentation

(authorization 007083, decree 87-848 and 2012201-0008). Housing, breeding and animal care followed the national and European ethical requirements.

## References

- Abondo A, Mbenkum F, Thomas D. 1991. Traditional medicinal plants. Dar Es Salaam University Press - Ministry of Health - Tanzania. p. 391.
- Achenbach H, Renner C. 1985. Constituents of West African medicinal plants. XVIII: The Annonidines – A new class of prenylated bisindole alkaloids from *Anonidium mannii*. Heterocycles – Elsevier. 23(8):2075.
- Akasu M, Itokawa H, Fujita M. 1974. (Aristolactam BII). Tetrahedron Lett. 15(41):3609–3612.
- Benesova V, Samek Z, Herout V, Sorm F. 1969. Isolation and structure of two new indole alkaloids from *Riccardia sinuata* (HOOK.) Trev. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences.
- Betti B. 2004. An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka Pygmies in the Dja Biosphere Reserve, Cameroon. Afr Study Monogr. 25:1–27.
- Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Mone H. 2003. Preliminary study on sex related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 91(2) : 144–150.
- Boissier J, Cosledan F, Robert A, Meunier B. 2009. In vitro activities of trioxaquines against *Schistosoma mansoni*. Antimicrob Agents Chemother. 53(11):4903–4906.
- D’Ambrosio M, Guerriero A, Pietra F. 1986. Carbamoylpyrrolidine and 7-Chlorocavernicolone, Two new metabolites of the Mediterranean sponge *Aplysina* (= *Verongia*) *cavernicola*. Comp. Biochem. Physiol. 83:309–312.
- De Oliveira RB, Senger MR, Vasques LM, Gasparotto J, D, Santos, JP, Pasquali MA, Moreira JC, Silva FP, Jr, Gelain DP. 2013. *Schistosoma mansoni* infection causes oxidative stress and alters receptor for advanced glycation end product (RAGE) and tau levels in multiple organs in mice. International J. Parasitol. 43(5):371–379.
- Desai SJ, Chaturvedi R, Mulchandani NB. 1990. Piperolactam D, a New Aristolactam from Indian *Piper* Species. J Nat Prod. 53(2):496–497.

- Djeussi DE, Noumedem JAK, Seukep JA, Fankam AG, Voukeng IK, Tankeo SB, Nkuete AHL, Kuete V. 2013. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complement Altern Med.* 13:164–169.
- Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Mattocchia L, Botros S, Coles G, Tchuem Tchuente LA, Mbaye A, Engels D. 2009. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology.* 136(13) :1825–1835.
- Dumont M, Mone H, Mouahid G, Idris MA, Shaban M, Boissier J. 2007. Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 101(2):247–252.
- Erhenhi AH, Obadoni BO. 2015. Known medicinal and aphrodisiac plants of Urhonigbe forest reserve, Edo State, Nigeria. *J Med Plants Stud.* 3:101–106.
- Fallon PG, Doenhoff MJ. 1994. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg.* 51(1):83–88.
- Goodrich SP, Muller-Steffner H, Osman A, Moutin MJ, Kusser K, Roberts A, Woodland DL, Randall TD, Kellenberger E, LoVerde PT, et al. 2005. Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry.* 44(33):11082–11097.
- Hammoniere M, Fournet A, Leboeuf M, Bouquet A, CavB A. 1976. Polycarpol. *C. R. Acad. Scz. Paris.* 242 :1045.
- Jacques SA, Kuhn I, Koniev O, Schuber F, Lund FE, Wagner A, Muller-Steffner H, Kellenberger E. 2015. Discovery of potent inhibitors of *Schistosoma mansoni* NAD catabolizing enzyme. *J Med Chem.* 58(8):3582–3592.
- Kuete V, Fankam AG, Wiench B, Efferth T. 2013. Cytotoxicity and modes of action of the methanol extracts of six Cameroonian medicinal plants against multidrug-resistant tumor cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:285903.
- Kuhn I, Kellenberger E, Said-Hassane F, Villa P, Rognan D, Lobstein A, Haiech J, Hibert M, Schuber F, Muller-Steffner H. 2010. Identification by high-throughput screening of inhibitors of *Schistosoma mansoni* NAD(+) catabolizing enzyme. *Bioorg Med Chem.* 18(22):7900–7910.

- Leboeuf M, Cave A, Bhaumik PK, Mukherjee B, Mukherjee R. 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*. 21(12) :2783–2813.
- Messi M. 1999. Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cameroun : le cas des plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies parasitaires. Thèse doctorat 3e cycle, Université de Yaoundé I.
- Musuyu Muganza D, Fruth BI, Nzunzu Lami J, Mesia GK, Kambu OK, Tona GL, Cimanga Kanyanga R, Cos P, Maes L, Apers S, Pieters L. 2012. In vitro antiprotozoal and cytotoxic activity of 33 ethnopharmacologically selected medicinal plants from Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 141(1):301–308.
- Ngangoue MO, Ngameni B, Ambassa P, C, Fru G, Wamba Nougan BE, Ombito Omollo J, Bojase Moleta G, Fotso Wabo G, Kuete V, Ngadjui Tchaleu B. 2020. A phenanthridin-6(5H)-one derivative and a lanostane-type triterpene with antibacterial properties from *Anonidium mannii* (Oliv). Engl. & Diels (Annonaceae). *Nat Prod Res.* 1–10.
- OMS. 2010. Agir pour réduire l'impact mondial des maladies tropicales négligées : premier rapport de l'OMS sur les maladies tropicales négligées. Genève.
- OMS. 2014. Schistosomiase (Bilharziose). Aide-mémoire N115. Genève.
- OMS. 2020. Schistosomiasis. Consulted online the 15 May 2020.
- OMS. 2004. Schistosomiase et géohelminthiases : prévention et lutte. OMS, Série de rapports techniques. 912, 77-85.
- Pellegrin F. 1947. Les Annonacées du Gabon. *Bulletin de la Société Botanique de France*. 94(7-8): 253–258. 8.
- Southon IW, Buckingham J. 1989. *Dictionary of alkaloids*. Chapman and Hall/CRC. London & New York.
- Sun NJ, Antoun M, Chang CJ, Cassady JM. 1987. Aristolactam A II. *J Nat Prod*. 50(5):843–846.
- Taffou T, Hounda Fokou JB, Zeuko'o Menkem E, Tchokouaha Yamthe LR, Ngoutane Mfopa A, Kamdem MS, Ngouana V, Kenfack Tsague IF, Boyom FF. 2017. Anti-yeast potential of some annonaceae species from Cameroonian biodiversity. *Int J Bio Chem Sci*. 11(1):15–31. ISSN 1997-342X (Online).
- Zhang Y, MacArthur C, Mubila L, Baker S. 2010. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. *BMC Med*. 8(1) :67.

**"Antischistosomal Evaluation of Stem Bark's Extract and Chemical Constituents from *Anonidium mannii* Against *Schistosoma mansoni*"**

Matchi T. J. L., Nougoue T. D., Chaubet G., Boissier J., Kuhn I., Tchouankeu J. C., Nothisen M., Ursuegui S., Ngouela S. A. and Wagner A. *Pharmacognosy Magazine*. (Accepted)

Type of Article: Original Article

Running Title: Extract and Chemical Constituents of *Anonidium mannii* Against *Schistosomiasis*

Antischistosomal Evaluation of Stem Bark's Extract and Chemical Constituents from *Anonidium mannii* Against *Schistosoma mansoni*

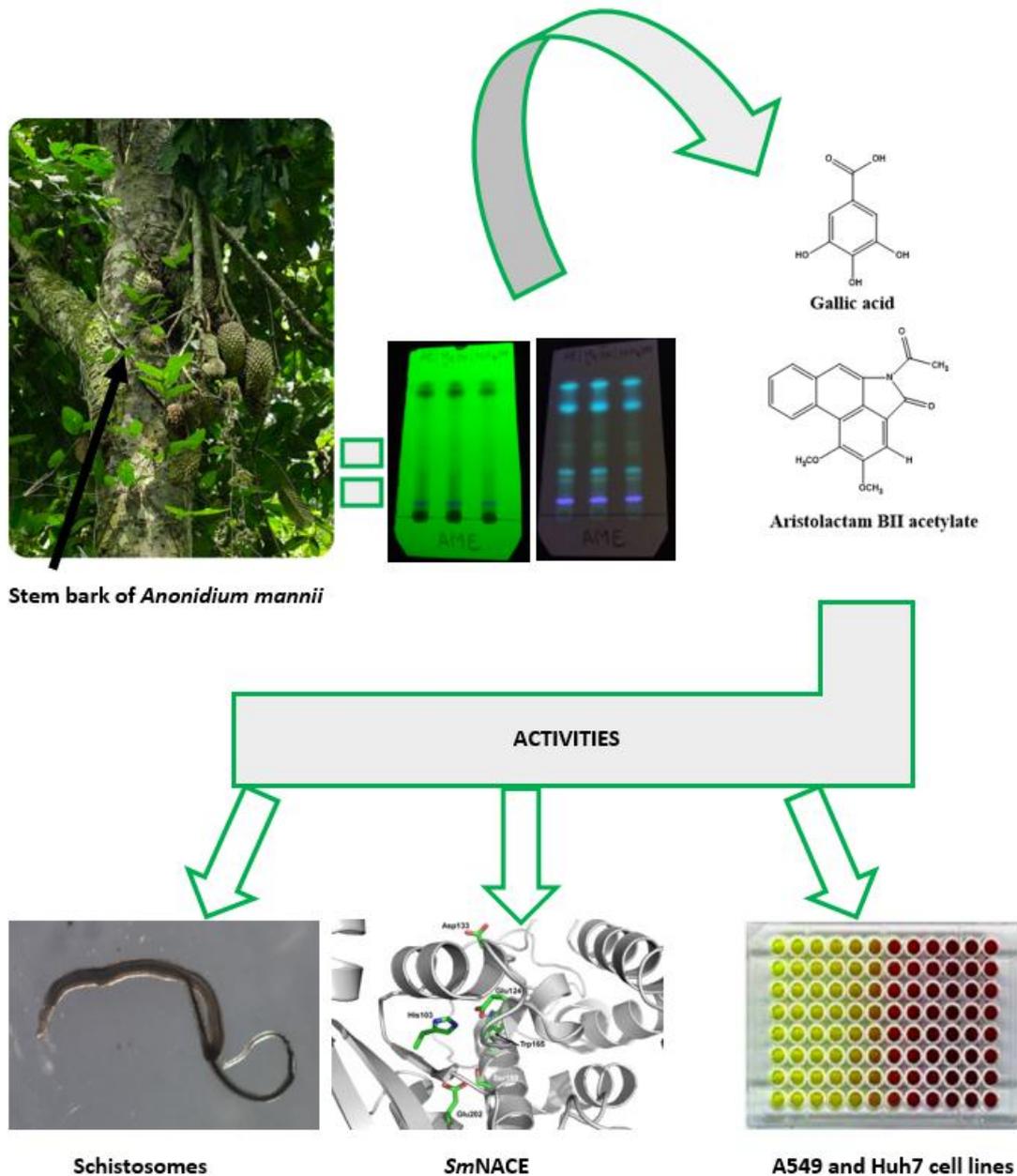
**ABSTRACT**

**Context:** *Anonidium mannii* (Annonaceae) has been traditionally used in Africa to treat stomach aches, schistosomiasis and many other illnesses. However, very little phytochemical and biological investigations have been conducted on this species, particularly none on schistosomiasis, a neglected tropical disease caused by a worm, and comes second after malaria as the most devastating parasitological infection. **Aim:** The goal of this study was to

evaluate the anti *Schistosoma mansoni* activity of fractions and constituents from *A. mannii*'s stem bark and also to search efficient inhibitors of a recently discovered ecto-enzyme of *Schistosoma mansoni* (*SmNACE*). **Materials and Methods:** The powdered stem bark of *A. mannii* was extracted with Ethanol/distilled water (80;20). The extract was then subjected to a partial bioguided separation by chromatography means. The structures of compounds were elucidated using modern spectroscopic techniques. Furthermore, isolated and semisynthetic compounds were evaluated for their antischistosomal and cytotoxic activities. **Results:** Chemical investigation led to the isolation and identification of eight compounds, in the majority, obtained for the first time from this genus. In addition, acetylation reactions were carried out to afford a new semisynthetic derivative. Preliminary biological screening of the extracts and compounds showed very good activities from antiparasitic and enzymatic tests and also very good percentage of cell viability evaluation. **Conclusion:** Like praziquantel drug, gallic acid exhibited full antihelminthic activity at concentration of 100  $\mu\text{M}$ . On the other hand, piperolactam D showed important inhibition on *SmNACE* ( $\text{IC}_{50}$  10  $\mu\text{M}$ ). Thus, standardization of bioactive fraction can help in improving traditional medicine. The optimization of those two compounds will enhance their selectivity/effectiveness and could be used as seed for the development of new remedies against schistosomiasis. Further, study will be focus on other pathogens species of *Schistosoma* genus.

**Key words:** *Anonidium mannii*, Antischistosomal (antiparasitic and enzymatic activity), Aristolactam BII acetylate, Cytotoxicity, Gallic acid, Semisynthetic reactions.

### **Graphical Abstract**



## INTRODUCTION

Schistosomiasis, also known as bilharzia, is a disease caused by parasitic worms infecting people in sub-tropical areas in the world. In terms of socioeconomic effect, this neglected tropical disease <sup>[1]</sup> represents the second global parasitosis after malaria. It is reported that this water-borne illness is responsible of 200 thousand deaths per year, 200 million people infections and 600 million people are in risk of contamination. <sup>[2]</sup>Those parasites were transmitted by specific freshwater mollusk intermediate hosts that depend on the species of the parasite concerned. Thus, the parasite's species mainly involved in the spread of human schistosomiasis are *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum*. Also, symptoms

---

that usually observed are fever, headache, myalgia, respiratory issues and often by painful hepato- and/or splenomegaly. At this moment, vaccine is not yet available. In Africa, the only medication used for the treatment of schistosomiasis is based on the pyrazino isoquinoline derivative, praziquantel, known as the common brand Biltricide.<sup>[3]</sup> Unfortunately, this drug has displayed many side effects. There is a recent increase of the resistance of the parasites from this late cure.<sup>[4]</sup> With this setback, studies have shown prominent deficiency in the search for antagonists of schistosomes. Unfortunately, a literature study highlights pronounced deficiency in the search for antagonists of schistosomes. While aiming for new therapeutic targets, there is also an urgent need to find new, safe and effective antischistosomal drugs for this reason, *Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup> catabolizing enzyme (*SmNACE*) is an ecto-enzyme newly discovered. It has a favorable topology due to its expression as a constitutively active ecto-enzyme in the tegument membrane of adult *S. mansoni*. To be precised, *SmNACE* is score high grades based on its accessibility of drugs and might represent a good drug target <sup>[5-7]</sup>.

As a part of our ongoing novel strategy for the search for bioactive constituents of plant origin against schistosomiasis disease,<sup>[8]</sup> we undertook the study of stem bark of *Anonidium mannii*. It is a tropical plant commonly known as *Junglesop*, belongs to Annonaceae family. This species is a fast-growing tree (8-30 m high), a girth of 2 m with leaves between 20-40 cm. Its flowers produce large fruits which can reach 15 kg.<sup>[9]</sup> Different parts of this plant are used in traditional medicine to relieve several ailments and symptoms such as dysentery, gastroenteritis, bronchitis, syphilis, diarrhea, malaria and schistosomiasis.<sup>[10-11]</sup> Very few previous phytochemical investigations of the *A. mannii* species revealed the presence of alkaloids, phenols, polyphenols, saponins, tannins and steroids.<sup>[12-14]</sup> Some of those compounds have been reported to possess antibacterial, immunosuppressive and radical scavenging activities.<sup>[13,14]</sup> In this study, we report the isolation and identification of structure of eight constituents from stem bark of *A. mannii*. We also processed with acetylation reactions on two isolated compounds. For the first time, the viability on Huh7 and A549 cancer cell lines were vetted. Plus, the crude extract and some compounds were tested for their antischistosomal (antiparasitic and enzymatic) activities.

## MATERIALS AND METHODS

### General methods

Column chromatography was carried out using silica gel (Merck 60-120, 70–230 and 230–400 mesh). HPLC was performed on a Dionex apparatus equipped with an ASI100, ultimate 3000 Pump, a diode array detector UVD 340S and a chromeleon software. A prepacked RP-C18 column (Phenomenex 250×15 mm, Luna 5  $\mu$ ) was used for semi-preparative HPLC. The eluting mobile phase consisted of H<sub>2</sub>O with TFA (0.0025%) and CH<sub>3</sub>CN with a flow rate of 17 mL/min and the chromatogram was monitored at 210 and 254 nm.

Thin layer chromatography was performed on percolated 0.5 mm thick Merck Si gel 60 F254 aluminum sheets. Separated compounds were visualized under UV light and by spraying with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>–EtOH (1:9, v/v) followed by mild heating for about 2-3 min. The mass spectra were recorded on an Agilent MS instrument (Agilent Technologies 6520, Accurate mass Q-ToF). NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-500 instrument operating at 500 MHz (<sup>1</sup>H) and 125 MHz (<sup>13</sup>C), using deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-*d*<sub>6</sub>) or deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) as solvent. Chemical shifts ( $\delta$ ) were quoted in parts per million (ppm) from internal standard tetramethylsilane (TMS) and the coupling constants (*J*) are given in Hertz. Different mixtures of n-hexane, EtOAc, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH were used as eluting solvents. They were distilled prior to use. The masses of the isolates were taken using an electronic balance, mark MELTER PC 2000.

### **Plant material**

Stem bark of *Anonidium mannii* were collected in January 2016 at Mount Kalla (Latitude 3° 30'. North, Longitude 11° 13'. East), from Bankomo locality, Mefou and Akono Sub-division, Center Region of Cameroon and identified by M. Victor NANA, a botanist of National Herbarium, Yaounde, Cameroon. A voucher specimen was deposited under the voucher number 45582HNC in the National Herbarium of Yaounde, Cameroon.

### **Extraction and Isolation**

Plant material was chopped and air-dried until a constant mass was obtained. Dried sample was ground into a fine powder and stored in desiccators until extracted.

Air-Dried and powdered stem bark of *A. mannii* (3.2 kg) was extracted with 25 L of a mixture of methanol/distilled water (8:2) for 72 h at room temperature. The hydroalcoholic extract was evaporated and freeze dried to give a crude extract (71.15 g). 65.5 g of the extract was subjected to flash CC on silica gel eluting with a gradient solvent system of Hexane-Ethyl

---

acetate (1:0 to 0:1) and Ethyl acetate (1:0)–Methanol (8.5:1.5) to obtain five fractions F<sub>A</sub>–F<sub>E</sub>. Fraction F<sub>B</sub> (14.8 g) was further purified by successive CC on silica gel eluting with Hexane-Ethyl acetate (1:0 to 3:2) to afford compounds **1** (30.6 mg) and **2** (11 mg), respectively. Fraction F<sub>C</sub> (12.6 g) resulting from Hexane-Ethyl acetate (2.5:7.5) was chromatographed by successive CC on silica gel using Hexane-Ethyl acetate (9.5:0.5 to 0:1) to afford compounds **3** (21.9 mg) and **4** (15 mg). Fraction F<sub>D</sub> (15.2 g) resulting from Hexane-Ethyl acetate (0:1) was chromatographed by successive CC on silica gel using Hexane-Ethyl acetate (9.5:0.5 to 0:1) to afford compound **5** (11 mg), **6** (13 mg) and **7** (16 mg). Fraction F<sub>E</sub> (15.2 g) resulting from Hexane-Ethyl acetate (0:1) was chromatographed by successive CC on silica gel using Dichloromethane-Methanol (9.5:0.5 to 8:2) to afford compound **6** (10.3 mg) and **8** (11.2 mg).

### General procedure for the acetylation of compounds **4** and **6**

Compounds **4** (3.12 mg, 11.2 μmol) and **6** (3.84 mg, 14.5 μmol) were dissolved respectively in dry pyridine (0.5 mL). The resulting solution was cooled down to 0°C before acetyl chloride (0.5 mL) was added dropwise. After stirring at 0°C for 10 min., the ice bath was removed and the mixture was allowed to stir at room temperature for 16 h (0.5 mL of pyridine was added after warming up to room temperature to dissolve the reaction mixture that had solidified). The resulting deep brown solution was then diluted with diethyl ether (10 mL), transferred to a separatory funnel and washed three times with 1.0 M HCl (20 mL in total). The aqueous layers were extracted two times with diethyl ether (20 mL in total) before the organic layers were combined, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified by flash chromatography (silica gel, 100% DCM or 1:1 petroleum ether 35-60/DCM, respectively) to afford compound **9** (3.20 mg, 9.96 μmol, 89%, *R<sub>f</sub>* 0.86 in 100% DCM) as a yellowish solid and compound **10** (3.70 mg, 10.6 μmol, 73%, *R<sub>f</sub>* 0.53 in 100% DCM) as a light orange solid, respectively.

### Bioassay

#### *In vitro* antischistosomal activity against adult *Schistosoma mansoni*

The *in vitro* investigation of the adult's blood fluke *S. mansoni* was conducted on the extract of *A. manni* and some of its compounds. *Schistosoma mansoni* (NMRI strain from Puerto Rico) worms were maintained in *Biomphalaria glabrata* snails (albino variety from Brazil) as intermediate hosts and *Mesocricetus auratus* hamsters (Janvier Labs; Le genest-Saint-Isle, France) as definitive hosts at the Laboratory of Ecology and Evolution Interactions (IHPE,

---

Perpignan, France). Female hamsters were infected by percutaneous exposition to 400 cercariae following standard procedures<sup>[15]</sup>. After 40 days, adult *S. mansoni* specimens were recovered from each hamster by hepatic perfusion technique.<sup>[16]</sup> Adult living schistosomes were washed in RPMI 1640 medium [supplemented with 5% inactivated fetal calf serum (iFCS) and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA)] at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Adult worm pairs [10-12, (male and female)] were incubated in a 24-well culture plate. All compounds were initially added to the culture at a concentration of 100 µg/mL, using a 10 mg/mL stock solution in RPMI 1640 containing dimethyl sulfoxide (DMSO) [final concentration of DMSO: 0.2]. The final volume in each well was 2 mL. The control worms were assayed in RPMI 1640 medium and DMSO in medium as negative control and Praziquantel as positive control. All the experiments were performed in duplicate or triplicate. The parasites were maintained for 6 hours and monitored every hour using a light microscope to evaluate their body contractility and movement. Parasite death was defined as no movement for at least 30 s of examination.<sup>[17]</sup>

### **Ethic Statement**

The experiment's laboratory was approved by the « Ministère de l'Enseignement supérieur de la Recherche et de l'Innovation (France) » (permission A66040 from for animal experimentation). Experimenters hold a certificate for animal experimentation (authorization 007083, decree 87-848 and 2012201-0008). Animal care (housing, breeding, ...) was strictly in accordance with national and European requirements.

### **Enzymatic activity *in vitro***

The enzymatic activity

on *SmNACE* was conducted *in vitro* on the stem bark's extract of *A. mannii* and some of its compounds. The activity was determined by a fluorometric assay using 1, N<sup>6</sup>-etheno NAD<sup>+</sup> ( $\epsilon$ -NAD<sup>+</sup>, Sigma) as substrate. This assay consists in measuring the appearance of the reaction product  $\epsilon$ -ADP-ribose by the increase of fluorescence at  $\lambda_{em} = 410$  nm ( $\lambda_{exc} = 310$  nm) at 37 °C in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.05 % (w/v) emulphogen (1 mL final volume) in a quartz tank.

Briefly, in a spectrofluorimeter (*Shimadzu RP-5301 PC*), substrate (with final concentration 20 µM) and inhibitors were added successively to the buffer contained in the tank at 37 °C and with stirring. In order to determine the initial fluorescence  $F_0$ , the tracing was performed before the introduction of the enzyme. The reaction was started by the addition of the enzyme

---

and followed for 2 minutes, measurement time. The kinetics were analysed at the end of this time using a non-linear regression program (GraphPad, Prism) for the determination of catalytic activity. All the inhibitors were initially tested at a concentration of 100  $\mu$ M diluted in DMSO (less than 2% added). The concentrations were decreased in case of the fluorescence changes (quenching or increase of fluorescence). Finally, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM and 100 mM were the concentrations used. Each test was performed twice.

The approximate IC<sub>50</sub> values were determined based on concentrations giving approximately 50% inhibition.

### **Cytotoxicity activity**

The *in vitro* cytotoxicity of the stem bark's extract of *A. mannii* and some of its isolated compounds against Huh7 and A549 cell lines was measured by a MTS assay.

Huh7 cells (Human Hepato carcinoma cells) were cultured in DMEM medium 1g/L glucose (SIGMA), 2 mM Glutamine and 10% FCS (fetal calf serum, SIGMA). The A549 cells (Human Lung Tumor cells) were cultured in HamF12 medium, 2 mM Glutamine and 10% FCS.

The extract and compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted with culture medium with serum. They were added, each at a time, at a rate of 20  $\mu$ L/well to obtain the desired final concentration. The cells, seeded in a 96-well plate (Nunc Edge 2.0, ThermoScientific), were treated with different concentrations (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 250  $\mu$ M) of stem bark's extract of *A. mannii* and its compounds at a density of 4000 cells/100  $\mu$ L per well (Huh7); 6000 cells/100  $\mu$ L per well (A549) and then, incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator. 48 hours after the addition of the extract/compounds, 20  $\mu$ L of MTS solution (CellTiter 96R Aqueous One Cell Proliferation Assay Solution, Promega) were added to each well. After 1 hour of incubation at 37 ° C, the absorbances were read at 490 nm and 700 nm (Safas, Monaco). All tests were carried out in triplicate.

The OD or absorbance of the extract/compounds to be assayed (490 nm) were analyzed after deducting the OD at 700 nm, the OD of the plastic, the OD of the cells alone.

The positive and negative controls used were Praziquantel and DMEM medium, respectively.

### **Characterization of compound 9**

#### ***Aristolactam BII acetylate (compound 9)***

Yellow powder. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ <sub>C</sub>120.2 (C-1), 113.4 (C-2), 153.5 (C-3), 151.9 (C-4), 133.8 (C-4a), 118.1 (C-4b), 126.5 (C-5), 127.1 (C-6), 126.4 (C-7), 129.6 (C-8), 126.3

(C-8a), 109.0 (C-9), 131.7 (C-10), 124.0 (C-10a), 166.3 (C=O), 170.5 (NCOCH<sub>3</sub>), 25.4 (NCOCH<sub>3</sub>), 56.3 (MeO-3), 59.8 (MeO-4). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 7.76 (1H, s, H-2), 9.18 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-5), 7.57 (2H, m, H-6 and H-7), 7.87 (1H, d, *J* = 6.5, H-8), 8.26 (1H, s, H-9), 2.75 (3H, s, NCOCH<sub>3</sub>), 4.04 (3H, s, MeO-3), 4.09 (3H, s, MeO-4). HR-ESI-MS *m/z*: = 322.1083 [M + H]<sup>+</sup>(calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>, 322.1079).

---

## RESULTS AND DISCUSSION

The hydroalcoholic extract of stem bark of *A. manni* was fractionated and purified by successive silica gel column chromatography, affording eight known compounds:  $\beta$ -sitosterol **1**,<sup>[18,19]</sup> stigmasterol **2**,<sup>[19]</sup> polycarpol **3**,<sup>[20]</sup> aristolactam BII **4**,<sup>[21]</sup> gallic acid **5**,<sup>[22]</sup> aristolactam AII **6**,<sup>[23]</sup> epicatechin **7**,<sup>[24]</sup> and piperolactam D **8**,<sup>[25]</sup> [ Figure 1]. Interestingly, all these compounds, except polycarpol, have been isolated from the genus *Anonidium* for the first time. In addition, two semisynthetic derivatives were obtained by acetylating compounds **4** and **6** [Scheme 1]: aristolactam BII acetate **9** and aristolactam AII diacetate **10**,<sup>[26]</sup> respectively. The former is described here for the first time.

Compound **9**, soluble in dichloromethane, was obtained as a yellow powder from the acetylation reaction of compound **4**. The molecular formula of this compound inferred to be  $C_{19}H_{15}NO_4$  based on its molecular ion at  $m/z = 322.1083$   $[M+H]^+$  in positive ion mode HR-ESI-MS (calcd. 322.1079) [Figure 1S]. The UV spectrum in methanol exhibited absorptions characteristics of phenanthrene chromophores with absorption at 208, 242, 260, 288, 331 and 394 nm<sup>[27-29]</sup> [Figure 2S]. The  $^{13}C$ , DEPT and  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC NMR spectra [Figure 3S, 4S and 5S resp.] showed resonance of nineteen carbons consisting of eight quaternary aromatic carbons at  $\delta_C$  153.5 (C-3); 151.9 (C-4); 133.8 (C-4a); 120.2 (C-1); 131.7 (C-10); 126.3 (C-8a); 124.0 (C-10a); 118.1 (C-4b), along with two carbonyl at  $\delta_C$  166.3 (acetyl group) and 170.5 (amide moiety); six  $sp^2$  carbons bearing one hydrogen each at  $\delta_C$  126.5 (C-5); 129.6 (C-8); 127.1 (C-6); 126.4 (C-7); 113.4 (C-2); 109.0 (C-9) and three methyl carbons at  $\delta_C$  25.4 (CH<sub>3</sub>CON); 56.3 (CH<sub>3</sub>O-3); and 59.8 (CH<sub>3</sub>O-4).  $^1H$  NMR spectrum [Figure 6S] indicated six aromatic proton signals at  $\delta_H$  9.18 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-5),  $\delta_H$  7.57 (2H, m, H-6 and H-7) and  $\delta_H$  7.87 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-8), showing also AMX coupling pattern, and two singlets appearing at  $\delta_H$  7.76 (1H, s, H-2), and  $\delta_H$  8.26 (1H, s, H-9). In addition, this spectrum confirmed the existence in **9** of three methyl groups at  $\delta_H$  2.75 (3H, s, CH<sub>3</sub>CON); 4.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-3) and 4.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-4). The connectivities between proton and carbon atoms were supported by the HMBC spectrum [Figure 7S];

Thus, we observed Key correlations,<sup>[29]</sup> first between hydrogen in position 2 with carbons C-3, C-4, C-10a, carbonyl ( $\delta_C$  166,3); also between hydrogen H-5 with carbons in position 4a, 4b, 7; between hydrogens in position 6 and 7 with carbons in 5, 8; between H-8 with carbons in position 7, 9; and between H-9 which correlated with C-8, C-8a, C-10, C-10a [Figure 2].

Moreover, examination of NOESY spectrum [Figure 8S] showed that the following pairs of protons are close to each other in space, ( $\delta_{\text{H}}$  4.04 CH<sub>3</sub>O-3 and  $\delta_{\text{H}}$  4.09 CH<sub>3</sub>O-4); ( $\delta_{\text{H}}$  4.04 CH<sub>3</sub>O-3 and  $\delta_{\text{H}}$  7.76 H-2) and ( $\delta_{\text{H}}$  4.09 CH<sub>3</sub>O-4 and  $\delta_{\text{H}}$  9.18 H-5), which helped us to confirm the position the positions of methoxyl groups at 3 and 4,) as it was observed in studies of the 3,4-dimethoxyphenanthrene lactam.<sup>[30,31]</sup> Besides the acetyl moiety observed in the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectrum of compound **9** and the absence of the characteristic proton of –NH group of lactam, all the spectral data were similar to those of Aristolactam BII described in the literature.<sup>[21,27,32]</sup> All the above information and data previously mentioned in literature allowed us to identify the compound **9** as aristolactam BII acetylate (10-acetylamino-3, 4-dimethoxyphenanthrene-1-carboxylic acid lactam): a new derivative of Aristolactam BII described for the first time.

The compound **9** together with compounds **4**, **5**, **6**, **7** and **8** were evaluated for their antischistosomal (antiparasitic and/or enzymatic) and/or cytotoxic activities.

#### **Antiparasitic assay *in vitro***

The extract and compounds **4**, **5**, **6**, **8** and **9** were tested for their antischistosomal activity against *Schistosoma mansoni*. The stem bark extract showed interesting worm killing capacity at concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$  with parasite rate survival of 81.8%. In addition, all compounds were less efficient than praziquantel (positive control) except gallic acid **5**, which exhibited same activity as the positive control after 6 h at the concentration of 100  $\mu\text{M}$  (Table 1). To the best of our knowledge, this is the first time that gallic acid showed to be a potent antagonist against *S. mansoni*; on the contrary, piperolactam D **8** showed no activity at this concentration. On the other hand, the new compound aristolactam BII acetylate **9** displayed weak worm killing capacity with a rate of 40% at the concentration of 100  $\mu\text{M}$  [Figure 3]. Meanwhile, the study of structure-activity relationship of lactam compounds revealed that the most active was **6** at the concentration of 100  $\mu\text{M}$ . This activity decreased when the hydroxyl group borne by carbon C-4 of **6** was replaced by a methoxyl (compound **4**) and when carbon C-2 was substituted by a hydroxyl group in **4**. However, an increase in activity was observed upon acetylation of the lactam nitrogen in **6** (compound **9**). All compounds, for which an antiparasitic activity had been determined, were further subjected to enzymatic and cytotoxic assays.

#### **Enzymatic assay *in vitro***

In 2010,<sup>[7]</sup> *SmNace* was used as a model in the context of screening for inhibitors, comprising thousands of molecules including natural products, using a High-Throughput Screening assay

easily applicable in the laboratory. The High-Throughput Screening revealed a more or less marked inhibitory effect of natural products on *SmNace* (although Cyanidin proved to be the best, but no specific). It was therefore interesting to test our extract and compounds on the activity of *SmNace* without presuming their action.

Results of enzymatic activity of some compounds are presented in Table 2. The stem bark extract was active on *SmNACE* with inhibition rate of 51.08% at 100 µg/mL. For isolated compounds, we noticed that only piperolactam D **8** presented a comparable activity to that of the reference *SmNACE* inhibitors Cyanidin and Delphinidin, while the rest of evaluated molecules were shown to possess less IC<sub>50</sub> values.

### Cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay was carried out with the same subset of extract and compounds (**4**, **5**, **6** and **8**) against Huh7 and A549 cells line. The human lung cancer (A549) and the human hepatocarcinoma (Huh7) cells line were chosen because lungs and liver are the focal points of pathogenic insult and subsequent pathological damage in schistosomiasis.<sup>[33]</sup> The results were consigned in Figure 4.

It showed that stem bark extract (AME) was not tested on Huh7 cells but showed toxicity on A549 cells line (with a percentage of cell viability of 37%). For isolated compounds, their percentage of cell viability on Huh7 cells were 47% for **4**, 99% for **5**, 76% for **6**, and 36% for **8** compared to reference drug (praziquantel, 86%). This revealed that gallic acid **5**, which was a good antagonist against *Schistosoma mansoni*, did not exhibit toxicity on Huh7 cells line contrary to praziquantel (reference drug). Similarly, on A549 cells line, the percentage of cell viability of the tested compounds were 77% for **4**, 100% for **5**, 100% for **6** and 65% for **8** compared to drug (praziquantel, 94%). These results showed also that gallic acid **5** exhibited very good viability (100%) on A 549 cell line.

### CONCLUSION

The chemical investigation of stem bark of *A. mannii* led to the isolation and identification of eight compounds: β-sitosterol **1**, stigmasterol **2**, polycarpol **3**, aristolactam BII **4**, gallic acid **5**, aristolactam AII **6**, epicatechin **7** and piperolactam D **8**. At the exception of compound **3**, all these compounds were isolated and characterized from the genus *Anonidium* for the first time. Meanwhile, acetylation reactions were carried out on isolated compounds **4** and **6** to afford

---

two semisynthetic derivatives: one known derivative aristolactam AII diacetylate **10** and one new aristolactam BII acetylate **9**. Antischistosomal (antiparasitic and enzymatic) activity and cytotoxicity of *A. mannii* extract and some isolated compounds were also evaluated *in vitro* for the first time. As praziquantel (positive control), the only molecule used in Africa to cure schistosomiasis, gallic acid **5** was exhibited very promising worm killing capacity on *Schistosoma mansoni* after 6 h at the concentrations of 100  $\mu\text{M}$  (all schistosomes were killed). Meanwhile, enzymatic activity testing on *SmNACE* revealed that compound **8** showed a significant inhibition with  $\text{IC}_{50}$  around 10  $\mu\text{M}$  compared to the Cyanidin ( $\text{IC}_{50} = 2.3 \mu\text{M}$ ), reference *SmNACE* inhibitor. Moreover, the stem bark extract of *A. mannii* which was not tested on Huh7 cells, showed less toxicity on A549 cells line. All tested isolated compounds (**4**, **5**, **6** and **8**) showed little or no cytotoxicity activity on Huh7 cells and A 549 cells line. Optimization of those two more bioactive compounds (**5** and **8**) could further improve their selectivity/effectiveness and so could be used as seed for the development of new remedies as well as the standardization of the stem bark extract of *Anonidium mannii* which could be used to improved traditional medicine. In the future, we plan to biologically evaluate those extract and compounds on the two other pathogens species of *Schistosoma*: *S. haematobium* and *S. japonicum*.

### **Acknowledgement.**

The authors are grateful to AUF for providing a fellowship to JLTM

### **Conflict of Interest**

The authors declared no conflicts of interest

### **Abbreviations**

1D: One dimension

2D: Two dimension

$^{13}\text{C}$ : Carbon 13

$^1\text{H}$ : Hydrogen

A549: Human lung cancer cells line

*A. mannii*: *Anonidium mannii*

Calcd.: calculated

$\text{CH}_3\text{CN}$ : Acetonitrile

DCM: Dichloromethane

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EtOAc: Ethyl Acetate

H<sub>2</sub>O: water

HPLC: High Performance Liquid chromatography

HR-ESI-MS: High Resolution-ElectroSpray Ionisation- Mass Spectrum

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy

Huh7: Human hepatocarcinoma cells line

MeOH: Methanol

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

NOE: Nuclear Overhauser Effect

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

OD: Optical Density

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

*S.*: *Schistosoma*

*SmNACE*: *Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup> Catabolizing Enzyme

TFA: Trifluoroacetic Acid

UV: Ultraviolet

## Summary

The stem bark of *Anonidium mannii* was examined for their bioactive constituents. This study led to the isolation and identification of eight known compounds:  $\beta$ -sitosterol **1**, stigmasterol **2**, polycarpol **3**, aristolactam BII **4**, gallic acid **5**, aristolactam AII **6**, epicatechin **7** and piperolactam D **8**. At the exception of compound **3**, all these compounds were isolated and characterized from the genus *Anonidium* for the first time. Interestingly, semisynthetic reactions were carried out on two isolated compounds (**4** and **6**) to give aristolactam AII diacetylate **10** and BII acetylate **9** respectively, the latter being a new compound and described here for the first time. All those structures were elucidated by 1D- and 2D-NMR spectroscopic methods as well as mass spectrometry. The cytotoxic activities of the extract and some compounds were evaluated against A549 and Huh7 cell lines. Extract, natural products and semisynthetic derivatives were also tested for antischistosomal (antiparasitic and enzymatic activity). As praziquantel (positive control), the only molecule used in Africa to cure schistosomiasis, compound **5** displaying very good worm killing capacity on

*Schistosoma mansoni*, while compound **8** showed significant inhibition on *Sm*NACE which is an ecto-enzyme newly discovered.

## REFERENCES

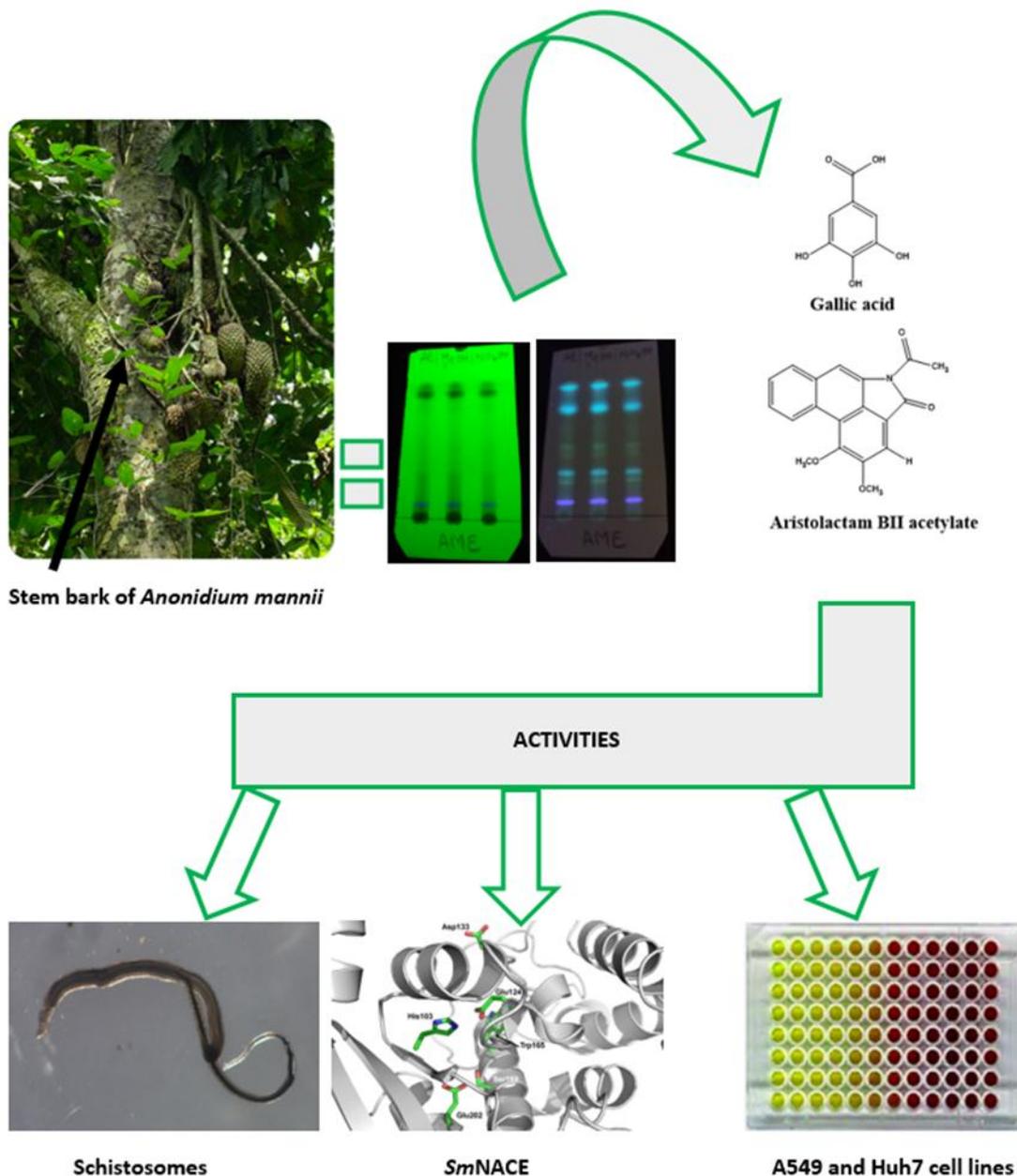
1. Zhang Y, MacArthur C, Mubila L, Baker S. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. *BMC Med.* 2010;8:67.
2. OMS[WHO]. Schistosomiase (Bilharziose). Aide-mémoire [Fact-sheet] N°115. 2014; Genève [Geneva].
3. OMS[WHO]. Schistosomiasis. Consulted online the 15 May 2020. [updated 2021 January 31; cited 2020 May 15]. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.
4. Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:83-88.
5. Goodrich SP, Muller-Steffner H, Osman A, Moutin MJ, Kusser K, Roberts A, *et al.* Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry.* 2005;44:11082-11097.
6. Jacques SA, Kuhn I, Koniev O, Schuber F, Lund FE, Wagner A, *et al.* Discovery of potent inhibitors of *Schistosoma mansoni* NAD<sup>+</sup> catabolizing enzyme. *J Med Chem.* 2015;58:3582-3592.
7. Kuhn I, Kellenberger E, Said-Hassane F, Villa P, Rognan D, Lobstein A, *et al.* Identification by high-throughput screening of inhibitors of *Schistosoma mansoni* NAD (+) catabolizing enzyme. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:7900-7910.
8. Matchi TJL, NOUNGUE TD, Kuhn I, Boissier J, Tchouankeu JC, Nothisen M, *et al.* Manniindole, an indole derivative from the roots of *Anonidium mannii* and combined antischistosomal and enzymatic activities. *Nat Prod Res.* 2020; <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2020.1824227>.
9. Latham P. Useful Plants of Bas-Congo Province, Democratic Republic of Congo, Department for International Development, London, UK. 2004..
10. MbitaMessi. Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cameroun : le cas des plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies parasitaires. Thèse doctorat 3<sup>e</sup> cycle, Université de Yaoundé I; [Contribution to the study of medicinal plants in Cameroon: case of plants used in traditional medicine for

- 
- the treatment of parasitic diseases. 3rd cycle doctoral thesis, University of Yaounde I] 1999.
11. Projet de partenariat CE-FAO (1998-2001). Données statistiques des produits forestiers non ligneux du Cameroun : Analyse et collecte des données pour l'Aménagement durable des forêts-Joindre les efforts nationaux et internationaux. [EC-FAO partnership project (1998-2001). Statistical data on non-timber forest products in Cameroon: Analysis and collection of data for sustainable forest management - Joining national and international efforts], Yaoundé; 1999.
  12. Achenbach H, Renner C. Constituents of West African medicinal plants. XVIII: The Annonidines – A new class of prenylated bisindole alkaloids from *Anonidium mannii*. Heterocycles. – Elsevier. 1985;23(8).
  13. Djeussi DE, Noumedem JAK, Seukep JA, Fankman AG, Voukeng IK, Tankeo SB, *et al.* Antibacterial activities of selected edible plant extracts against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. BMC Compl Alternative Med. 2013;13:164-169.
  14. Ngangoue MO, Ngameni B, Ambassa P, Chi Fru G, Wamba Nougan BE, Ombito Omollo J, *et al.* A phenanthridin-6(5H)-one derivative and a lanostane-type triterpene with antibacterial properties from *Anonidium mannii* (Oliv). Engl. & Diels (Annonaceae). Nat Prod Res. 2020 <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1758094>.
  15. Dumont M, Moné H, Mouahid G, Idris MA, Shaban M, Boissier J. Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res 2007;101:247-252.
  16. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H. Preliminary study on sex related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 2003;91:144-150.
  17. Boissier J, Cosledan F, Robert A, Meunier B. *In vitro* activities of trioxaquinones against *Schistosoma mansoni*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:4903-4906.
  18. Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. Phytochemistry. 1990;29:2351-2355.
  19. Ragasa CY, Galian RF, Shen C-C. Chemical constituents of *Annona muricata*. *Der Pharm Chem*. 2014;6:382-387.
  20. Hammonière M, Fournet A, Leboeuf Bouquet A, Cave A. Le polycapol, nouveau triterpène isolé de *Polyalthia oliveri* Engl. et de *Meiocarpidium lepidotum* Engl. Et

- 
- Diels*, Annonacées. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série [Polycapol, a new triterpene isolated from *Polyalthia oliveri* Engl. and *Meiocarpidium lepidotum* Engl. and *Diels*, Annonaceae. Reports from the Academy of Sciences Series] C1976; 282:1045-1047.
21. Akasu M, Itokawa H, Fujita M. Four new fluorescent components isolated from the callus tissue of *Stephania cepharanta*. Tetrahedron Lett. 1974;3609-3612.
  22. Sampath M. Isolation and identification of gallic acid from *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thawaites. Int J Pharm Biosci. 2013;4:966-972.
  23. Sun NJ, Antoun M, Chang CJ, Cassady JM. New cytotoxic aristolactams from *Pararistolochia flos-avis*. J Nat Prod. 1987;50:843.
  24. Lage GA, Medeiros FdaS, Furtado WdeL, Takahashi J A, Filho JD, de S, Pimenta LPS. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. Nat Prod Res. 2014;28:808-811.
  25. Desai SJ, Chaturvedi R. Mulchandani NB. Piperolactam D, a New Aristolactam from Indian Piper Species. J Nat Prod. 1990;53:496-497.
  26. Tsuruta AY, Bomm MD, Lopes MN, Lopes LMX. Aristolactams and Further constituents from *Aristolochia chamissonis*. Eclet Quim J. 2002;27: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702002000100009>.
  27. Omar S, Chee CL, Fasihuddin A, Ni JX, Jaber H, Huang J, *et al.* Phenanthrene lactams from *Goniothalamus velutinus*. Phytochemistry. 1992;31:4395-4397.
  28. Olsen CE, Tyagi OD, Boll PM, Hussaini FA, Parmar VS, Sharma NK, *et al.* An aristolactam from *Piper acutisleginum* and revision of the structures of piperolactam B and D. Phytochemistry. 1993;33:518-520.
  29. Iqbal E, Lim LB, Salim KA, Faizi S, Ahmed A, Mohamed AJ. Isolation and characterization of aristolactam alkaloids from the stem bark of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) and their biological activities. J King Saud Univ sci. 2017;30:41-48.
  30. Priestap HA. Seven aristolactams from *Aristolochia argentina*. Phytochemistry. 1985;24:849-852.
  31. Talapatra SK, Basu D, Chattopadhyay P, Talapatra B. Aristolactams of *Goniothalamus sesquipedalis* Wall. Revised structures of the 2-oxygenated aristolactams. Phytochemistry. 1988;27:903-906.
  32. MixD B, Guinaudeau H, Shamma M. The aristolochic acids and aristolactams, J Nat Prod. 1982;45:657-666.
-

33. De Oliveira RB, Senger MR, Vasques LM, Gasparotto J, Dos Santos JP, Pasquali MA, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection causes oxidative stress and alters receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and tau levels in multiple organs in mice. *Int J Parasitol.* 2013;43:371-379.

### Pictorial Abstract



### Tables and Legends

**Table 1:** *In vitro* evaluation of the antischistosomal activity of compounds 1, 2, 3, 5, 8, and 10 at various concentrations; unless otherwise indicated, experiments were done in triplicates; for each experiment, 10-12 worms were used with equilibrated sex-ratio.

Extract/Compound (No.)	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Mobile worm after 6 hrs of incubation (%)
Stem bark of <i>A.mannii</i> <sup>1</sup>	100	81.8
Gallic acid (5)	100*	0
	50*	53.6
	10*	92
Aristolactam AII (6)	100	9.1
	50	66.7
	10	71
Aristolactam BII (4)	100	62.5
	50	77.3
	10	94.4
Aristolactam BII acetylate (9)	100	40
	50	95
	10	100
Piperolactam D (8)	100	100
	50	Not Done
	10	Not Done
Praziquantel	100	0
	50	7
	10	Not Done
Control (RPMI)	-	100

<sup>1</sup>: concentration expressed in  $\mu\text{g}/\text{mL}$

\*Experiments were performed in duplicates.

**Table 2: IC<sub>50</sub> values for the inhibition of *Sm*NACE by compounds.**

Compound (No.)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
Aristolactam BII acetylate (9)	NT

---

Aristolactam AII (6)	> 100
Aristolactam BII (4)	> 100
Gallic acid (5)	> 100
Piperolactam D (8)	10-20
Cyanidin*	2.3
Delphinidin*	6.0

\*Cyanidin and Delphinidin are the natural products reference *SmNACE* inhibitors<sup>[7]</sup>.