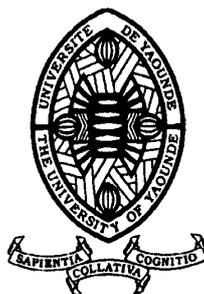


REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
ECOLE NORMALE SUPERIEURE
DEPARTEMENT DE DÉPARTEMENT DE
CHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
HIGHER TEACHER TRAINING COLLEGE
DEPARTMENT OF DEPARTMENT OF
CHEMISTRY

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES METABOLITES SECONDAIRES DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE DES TIGES D'OCIMUM GRATISSIMUM(LAMIACEAE)

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de
l'Enseignement Secondaire 2ieme Grade (DI.P.E.S.II)

Par :

TCHEUZE NDE Liliane Cinclaire
Licenciée en Chimie(UYI)

Sous la direction
WAFO Pascal
Maître de conférences



Année Académique
2015-2016



AVERTISSEMENT

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

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

Contact : biblio.centrale.uyi@gmail.com

WARNING

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

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

Contact: biblio.centrale.uyi@gmail.com

DEDICACES

A ma feuè mère NGUEGANG Delphine

A mon époux FOPA Tertulien

A mes enfants : FOPA Milène, FOPA Edy, FOPA Marina, FOPA Nelly

A mon père NDE Samuel

CERTIFICATION DU DIRECTEUR

Je soussigné, **Pr WAFO Pascal**, certifie que les travaux effectués par l'étudiante **TCHEUZE NDE Liliane Cinlaire**, matricule **04Y124**, portant sur **L'ISOLEMENT ET LA CARACTERISATION DES METABOLITES SECONDAIRES DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE DES TIGES D'OCIMUM GRATISSIMUM**, sont ses propres travaux et ont été faits sous ma supervision au Laboratoire de Chimie Organique de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I.

Fait à Yaoundé le 02/06/2016

Le Directeur du mémoire

WAFO Pascal

Maître de Conférences

Département de Chimie

E.N.S.-UYI

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser ma profonde gratitude à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'édification du présent ouvrage. Je pense :

Au **Pr WAFO Pascal** pour m'avoir accepté dans son laboratoire, m'a été d'un grand appui par le suivi de ce travail et pour le matériel mis à ma disposition.

Au **Pr KAPCHE Deccaux** pour ses conseils multiformes.

A tous les enseignants du Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé I pour tous les efforts qu'ils consentent dans le but d'assurer la formation et la réussite des étudiants.

A tous mes aînés de laboratoire Messieurs **MAFFO Timoléon**, **MELONG Radius**, **ATEBA Joël** pour mon initiation aux techniques de laboratoire, pour leurs conseils et leur assistance.

A **M. et Mme KOGHENE** pour le soutien inconditionnel qu'ils m'ont apporté. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A **M. et Mme NGUELLA** pour leur soutien.

A **DOUANLA Pascal** pour tout le soutien qu'il m'a apporté pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

A tous mes frères **MELONG Théophile**, **NZOKEM Vidal**, **NOMI Rossant**, **YONTA Eloge**, **MELANGUI Rolin**, **MELI Delore**, **NZEDJOU Bossis** pour tous les encouragements, les conseils et les grands moments passés ensemble.

A **M. et Mme TETIA** qui m'ont toujours soutenu et encouragé.

A maman **DJOUSI Anne** pour son soutien moral.

A maman **TCHINDA Marie** pour son soutien moral.

A **DONGMO Rachel** pour son soutien et son assistance.

A **NANGUE Alexis** pour l'aide apportée.

A mes amies **TCHINDA YMENE Nadine**, **LEKANE Nadège**, **KEUBENG Sidonie**, **TEGASNE Cathérine**, **MEUFFETO Dominique**, **KEMEGO Grace** pour les encouragements, les conseils et l'assistance. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma plus grande considération.

A **MANFOUO François, ETALIE Beaugélé, MELI Gabriel, SAHO Raoul** pour le soutien.

A toutes les dames du **Cérame** pour le soutien moral.

A **DONGMO Léonie** pour les encouragements.

A mes camarades de laboratoire **SAHADIO Roméo et MADOPSI** pour leur esprit de collaboration.

A tous mes camarades de promotion pour leur esprit de collaboration.

ABREVIATIONS UTILISEES

AE :	Acétate d'éthyle
δ :	Déplacement chimique
C_x :	Carbone numéro x
¹³C :	Carbone 13
CC :	Chromatographie sur Colonne
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
d :	Doublet
dd :	Doublet dédoublé
¹H :	Proton
H_x :	Proton numéro x
Hz :	Hertz
Hex :	Hexane
RMN ¹H :	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
RMN ¹³C :	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
DEPT :	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert
J :	Constance de couplage
m :	Multiplet
s :	Singulet
UV :	Ultra –Violet
t :	Triplet
O. :	<i>Ocimum</i>
ORTEP :	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot

TABLE DE MATIERES

DEDICACES	i
CERTIFICATION DU DIRECTEUR	ii
REMERCIEMENTS	iii
ABREVIATIONS UTILISEES	v
SOMMAIRE	Erreur ! Signet non défini.
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SCHEMAS	ix
LISTE DES TABLEAUX	x
RESUME	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE	2
I.1 Aperçu botanique	3
I.1.1 Aperçu botanique sur les Lamiaceae.....	3
I.1.2 Aperçu botanique sur le genre <i>Ocimum</i>	3
I.1.3 Aperçu botanique sur <i>Ocimum gratissimum</i>	4
I.1.3.1 Description botanique.....	4
I.1.3.2 Répartition géographique	4
I.2. Usage des plantes du genre <i>Ocimum</i>	5
I.3-Travaux chimiques antérieurs sur le genre <i>Ocimum</i>	6
I.3.1 Les flavonoïdes	6
I.3.2. Les stéroïdes	9
I.3.3 Les composés phénoliques	10
I.3.4. Les acides gras	11
I.3.5 Les terpénoïdes.....	12
I.3.5.1 Les monoterpènes	13
I.3.5.2 Les sesquiterpènes	14
I.3.5.3 Les triterpènes	16

I.3.5.3.1 Définition et activité biologique	16
I.3.5.3.2 Biosynthèse des triterpènes	17
I.3.5.3.3 Caractéristiques spectroscopiques des triterpènes	18
CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION	20
II-1 Introduction	21
II.2 Identification des composés isolés	23
II.2.1 Identification du composé OGT 1	23
II.2.2 Identification du composé OGT 4	26
II.2.3 Identification du composé OGT 3	29
INTERET PEDAGOGIQUE DU MEMOIRE	31
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	32
CHAPITRE III: PARTIE EXPERIMENTALE	33
III.1 Appareillage et materiel vegetal	34
III.1.1 Appareillage	34
III.1.2 Matériel végétal	34
III.2 Extraction et isolement des produits	34
III.2.1 Extraction des produits	34
III.2.2 Isolement des composés	35
III.2.2.1 Dégrossissement par flash chromatographique	35
III.2.2.2 Chromatographie sur colonne de la fraction Fb	35
III.2.2.3 Chromatographie sur colonne la fraction Fc	36
III.2.3 Traitement des fractions	36
III.3 Caractéristiques physico-chimiques et spectroscopiques des composés isolés des tiges de <i>O. Gratissimum</i>	37
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	39

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Tiges et feuilles d' <i>Ocimum gratissimum</i> (TCHEUZE, 2015)	4
Figure 2 : Spectre RMN ¹ H (Acétone, 400MHz) d'OGT 1	24
Figure 3: Spectre RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) d'OGT 1	24
Figure 4: Spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) d'OGT4.....	26
Figure 5: Spectre RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) d'OGT4.....	27
Figure 6 : Spectre DEPT 135 (MeOD, 100MHz) d'OGT 4.....	27
Figure 7 : Image ORTEP du composé OGT 3	30

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Cyclisation du squalène en triterpènes pentacycliques..... 17
Schéma 2: Protocole d'extraction des tiges d'*Ocimum gratissimum*..... 22

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition géographique d' <i>Ocimum gratissimum</i> au Cameroun	5
Tableau 2: Quelques flavonoïdes (flavones) isolés des plantes du genre <i>Ocimum</i>	8
Tableau 3 :Quelques stérols isolés des plantes du genre <i>Ocimum</i>	10
Tableau 4: Quelques composés phénoliques isolés des plantes du genre <i>Ocimum</i>	11
Tableau 5: Quelques acides gras isolés des plantes du genre <i>Ocimum</i>	12
Tableau 6: Quelques monoterpènes isolés des plantes du genre <i>Ocimum</i>	13
Tableau 7: Quelques sesquiterpènes isolés des plantes du genre <i>Ocimum</i>	15
Tableau 8: Quelques triterpènes pentacycliques isolés des plantes du genre <i>Ocimum</i>	16
Tableau 9: Tableau de comparaison des données RMN ¹³ C de OGT 4 et celles de la littérature (Mahato et Kundu, 1994)	28
Tableau 10: Chromatogramme du fractionnement de l'extrait brut au méthanol des tiges d' <i>O. gratissimum</i>	35
Tableau 11: Chromatogramme de purification de la fraction Fb	36
Tableau 12: Chromatogramme de purification de la fraction Fc	36

RESUME

Le présent travail porte sur l'isolement et la caractérisation des métabolites secondaires de l'extrait méthanolique des tiges d'*Ocimum gratissimum* (Lamiaceae), une plante médicinale du Cameroun utilisée pour soigner le mal de tête, la toux. De ces travaux, nous avons isolé grâce aux différentes techniques chromatographiques usuelles (CC, CCM) quatre composés indexés OGT1, OGT2, OGT3 et OGT4. Seules les structures de OGT1, OGT3 et OGT4 ont été élucidées au moyen des techniques d'analyses spectroscopiques (RMN 1D), l'analyse au rayons x et par comparaison de leurs données spectrales avec celles décrites dans la littérature. Ainsi ces composés ont été identifiés respectivement au mélange -sitostérol et -stigmastérol, l'acide 3- -acétyloléanolique et l'acide oléanolique.

Mots clés : *Ocimum gratissimum*, -sitostérol et -stigmastérol, acide 3- -acétyloléanolique , acide oléanolique

ABSTRACT

This report concerns the isolation and characterization of secondary metabolite from the methanolic extract of the stem of *Ocimum gratissimum*, a Cameroonian medicinal plant from the Lamiaceae family. This plant is used in Cameroon to treat various diseases such as headache and cough. Using chromatographic methods, four compounds labeled OGT1, OGT2, OGT3 and OGT4 were isolated from this extract. Three of these compounds labeled OGT1, OGT3 and OGT4 were analyzed using spectroscopic methods (NMR 1D). On the basis of their spectroscopic data and those reported in the literature, those three compounds were respectively identified as the mixture of β -sitosterol and β -stigmasterol, 3-O-acetyloleanolic acid and oleanolic acid.

Key words: *Ocimum gratissimum*, β -sitosterol and β -stigmasterol, 3-O-acetyloleanolic acid, oleanolic acid.

INTRODUCTION GENERALE

L'usage de la pharmacopée naturelle est toujours d'actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la biotechnologie et la chimie computationnelle. Cela tient principalement du fait que le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible au plus grand nombre. Dans le monde, 80% des populations ont recours aux plantes médicinales pour se soigner. En effet, ces plantes renferment des métabolites secondaires qui sont des molécules organiques, qui seraient responsables des propriétés thérapeutiques des dites plantes.

Malgré le progrès de la médecine en général, de nouvelles maladies font leur apparition et les microbes deviennent de plus en plus résistants face aux médicaments existants. Or l'usage de la médecine naturelle se confronte aux problèmes de posologie et de toxicité, d'où la nécessité de rechercher de nouveaux principes actifs et de rationaliser l'utilisation des plantes médicinales, afin de mettre sur pieds de nouveaux médicaments ou alors des médicaments naturels améliorés.

Dans le soucis de contribuer à la valorisation de nos essences médicinales, nous avons entrepris dans le cadre de la recherche devant aboutir à l'obtention du Diplôme de Professeur d'Enseignement Secondaire Deuxième Grade (DI.P.E.S.II), à l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé I, d'isoler les constituants chimiques des tiges d'*O. gratissimum*, une plante médicinale du Cameroun et de caractériser les constituants isolés en déterminant leurs structures chimiques. Le choix de cette plante a été motivé par le fait qu'elle soit largement utilisée en médecine naturelle dans les régions du Centre et de l'Ouest du Cameroun pour le traitement de nombreuses maladies à l'instar du mal de tête, la toux, des problèmes fongiques chez les enfants (**Kamtchueng**, 2003).

Après une revue de la littérature sur la famille des Lamiaceae, le genre *Ocimum* et l'espèce *Ocimum gratissimum*, nous allons tour à tour présenter, discuter les résultats obtenus et décrire les méthodes expérimentales utilisées.

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE

I.1 Aperçu botanique

I.1.1 Aperçu botanique sur les Lamiaceae

Les «Lamiaceae» forment une importante famille de plantes dicotylédones comprenant environ 6000 espèces et près de 210 genres. Les plantes de cette famille possèdent souvent des poils glanduleux et des glandes sous-épidermiques à huiles essentielles les rendant très odorantes (**Huctchinson et al.**, 1974; **Nait**, 2007)

Ce sont généralement des plantes herbacées, des arbustes ou rarement des arbres ou des lianes productrices d'huiles essentielles (**Troupin et al.**, 1982).

Les feuilles sont souvent opposées, disposées en paire se croisant d'un nœud à l'autre (décussé), dépourvues de stipules, à limbes généralement denté. Les feuilles et les fleurs sont couvertes de poils sécréteurs d'une matière oléagineuse aromatique. Les fleurs sont la plupart de temps zygomorphes à symétrie bilatérale, mais parfois presque radiaire et généralement hermaphrodites. Les tiges ont une section carrée. Les étamines 2 ou 4 sont inversées sur le tube de la corolle. Les fruits ont généralement 4 méricarpes d'une seule graine. (**Troupin et al.**, 1982).

Quelques genres rencontrés dans les «Lamiaceae» sont: *Acinos*, *Lamium*, *Mentha*, *Ocimum* (**Huctchinson et al.**; 1974). Nous nous intéresseront particulièrement au genre *Ocimum*.

I.1.2 Aperçu botanique sur le genre *Ocimum*

Ce sont des buissons, plantes plus ou moins robustes. Les tiges sont quadrangulaires, en général ligneuses à leur base et très ramifiées. Les feuilles sont pétiolées, opposées, à lymbe crénelé. Calice ovoïde ou campanulé, bilabié. Quatre étamines en deux paires de longueur inégale, déclinantes, saillantes (**Troupin et al.**, 1982).

Le genre *Ocimum* compte environ 150 espèces de plantes herbacées ou buissonnantes, annuelles ou vivaces, généralement aromatiques, dont la plus connue est le basilic commun (*Ocimum basilicum*). Parmi les espèces décrites de *Ocimum*, nous pouvons citer: *O. americanum*, *O. basilicum*, *O. suave*, *O. canum*, *O. gratissimum*. Au Cameroun, on rencontre généralement trois espèces d'*Ocimum* à savoir: *O. basilicum*, *O. suave* et *O. gratissimum* (**Hutchinson et al.**, 1963).

I.1.3 Aperçu botanique sur *Ocimum gratissimum*

I.1.3.1 Description botanique

C'est une plante herbacée, dressée de 1 à 2 mètres de haut. Les tiges sont très ramifiées et généralement ligneuses à leurs bases. Les feuilles laineuses et très odorantes sont opposées, ovales et grossièrement dentelées. Les fleurs, par petit groupe sont blanches avec un calice de petite taille et disposées régulièrement sur une inflorescence terminale. La corolle est blanche et deux fois plus longue que le calice. Les fruits sont formés de quatre capsules sphériques (**Berhaut**, 1975).

Cette plante est communément appelée «messep» dans le Sud et le Centre du Cameroun. La **figure 1** ci-dessous représente les photographies des parties aériennes de *Ocimum gratissimum*



Figure 1 : Tiges et feuilles d'*Ocimum gratissimum* (TCHEUZE, 2015)

I.1.3.2 Répartition géographique

Ocimum gratissimum est très répandue en Afrique principalement au Sénégal, en Guinée, en Sierra Leone, Libéria, Côte d'Ivoire, Ghana, Nigéria, Gabon, au Cameroun... (**Berhaut**, 1975). Au Cameroun, sa présence est signalée dans plusieurs régions indiquées dans le **tableau 1** ci-dessous (**Herbier National**).

Tableau 1 : Répartition géographique de *O. gratissimum* au Cameroun

Régions	Localités
Centre	-Ngan (25Km au Nord de Bafia) -Soa (Nkom) -Yaoundé
Littoral	-près de Banga -Douala -Manjo
Nord-Ouest	-Mbui
Ouest	-Km 31, route Bafang-Bafoussam -Bandjoun
Sud	-Eyack -Kribi (à Mboa-Manga) -reserve du Dja
Sud-Ouest	-Limbé

I.2. Usage des plantes du genre *Ocimum*

➤ **Sur le plan alimentaire**

Les feuilles de *O. gratissimum* (Messep) sont utilisées pour assaisonner les sauces grâce à leur arôme. De même, *O. canum* (cotimajo) est aussi utilisé comme épice. Les feuilles et les fleurs de *O. gratissimum* sont utilisées dans la préparation des thés et infusion. (Rabelo et al.; 2003).

➤ **En pharmacopée naturelle**

Au Nigéria, ces plantes sont utilisées pour le traitement de l'épilepsie, de fortes fièvres, et de la diarrhée. (Effraim et al.; 2003). Les décoctions des feuilles sont utilisées pour le traitement des maladies mentales. (Akinmoladun et al., 2007). *O. gratissimum* est utilisée par les *Ibos* au Nigéria pour stériliser le cordon ombilical des bébés. . *O. gratissimum* est également utilisée pour le traitement des infections fongiques, le rhume (Ijeh et al., 2005).

Au Kenya et en Afrique subsaharienne, les feuilles de *O. gratissimum* sont utilisées pour le traitement du rhume. On les utilise pour le traitement des douleurs abdominales, les

infections des oreilles, la toux, la stérilité, la fièvre, les convulsions, régulation des menstruations (**Matasyoh et al.**, 2007).

En Inde, la plante est utilisée pour le traitement du mal de tête et pour soigner les convulsions (**Prajapati et al.**, 2003).

Au Cameroun et au Benin, la plante est utilisée pour traiter les infections cutanées causées par les champignons (**Kamtchueng**, 2003).

Les feuilles de *O. basilicum* sont utilisées comme vermifuge, l'infusion de ces feuilles est un bon traitement pour la nausée, les flatulences et la dysenterie. L'huile de cette plante a un effet bénéfique sur la fatigue mentale, le spasme, la rhinite (**Baytop**, 1984).

Au regard de toutes ces diverses utilisations, de nombreuses études chimiques ont été faites sur les plantes du genre *Ocimum*.

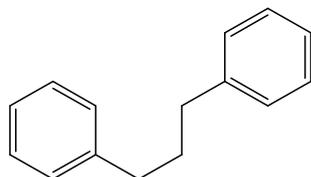
I.3-Travaux chimiques antérieurs sur le genre *Ocimum*

Les plantes du genre *Ocimum*, de part leurs intérêts thérapeutiques ont fait l'objet de nombreuses études chimiques. Ainsi ces études ont conduit à l'isolement et la caractérisation des terpénoïdes (monoterpènes, sesquiterpènes et les triterpènes pentacycliques), des stérols, des flavonoïdes et des acides gras.

I.3.1 Les flavonoïdes

➤ Définition et activité biologique

Les flavonoïdes sont des composés dont le squelette de base a 15 atomes de carbones caractérisés par un enchaînement C₆-C₃-C₆. La formule semi-développée des flavonoïdes est représentée par la structure (**1**) ci-dessous:

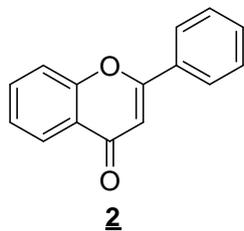


1

Squelette des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont constitués de plusieurs classes de composés à l'instar :des flavones, les flavanones et les flavanes (**Kamdem**, 2000).

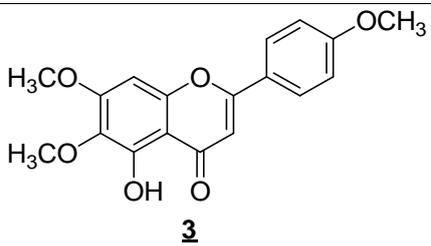
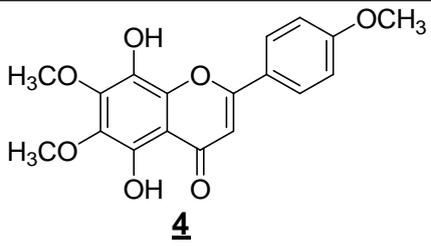
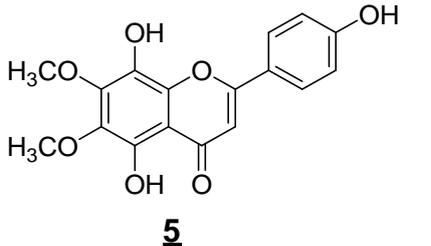
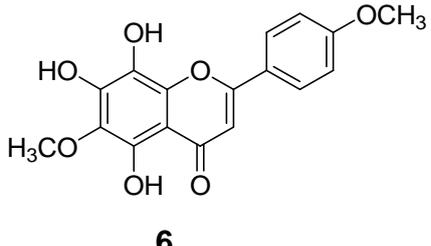
Ce sont des pigments présents dans la quasi-totalité des végétaux et constituent donc une très grande classe de composés phénoliques très répandue dans le règne végétal. (**Bruneton**, 1999). Seules quelques flavones (**2**) ont été isolées dans les plantes du genre *Ocimum*.



Squelette des flavones

Les composés de cette classe présentent plusieurs activités biologiques: nous pouvons citer les activités antimicrobiennes, antioxydantes et cytotoxiques (**Akroum**, 2011), les propriétés vasculoprotectrices, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-ulcéreuses et même anti-tumorales significatives (**Ghedira**, 2005). Le **tableau 2** ci-dessous dresse la liste de quelques flavones isolées des plantes du genre *Ocimum*.

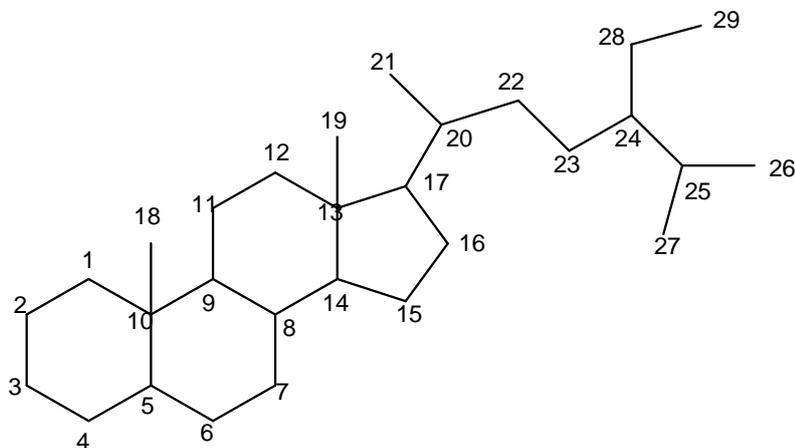
Tableau 2: Quelques flavonoïdes (flavones) isolés des plantes du genre *Ocimum*

Structures et noms	Sources	Références
 <p style="text-align: center;">3</p> <p>Salvigenine</p>	<i>O. americanum</i>	Grayer et al., 2001
 <p style="text-align: center;">4</p> <p>Pendunculine</p>	<i>O. americanum</i>	Viera et al., 2003
 <p style="text-align: center;">5</p> <p>Isothymusine</p>	<i>O. americanum</i> <i>O. gratissimum</i>	
 <p style="text-align: center;">6</p> <p>Pilosine</p>	<i>O. americanum</i> <i>O. pilosum</i>	Kamtchueng, 2003 Grayer et al., 2001

I.3.2. Les stéroïdes :

➤ Définition et activité biologique

Un **stérol** est un lipide possédant un noyau de sterane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. Le squelette des stérols est donné par la structure **7** ci-dessous :

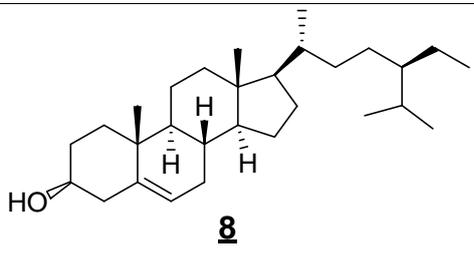
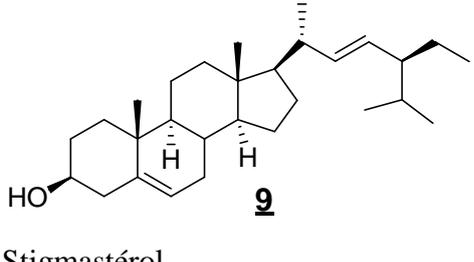


Squelette des stérols (7)

Les stérols sont considérés comme une sous-classe des stéroïdes. Le plus répandu est le cholestérol que l'on retrouve à la fois dans le règne animal et dans le règne végétal. Chez les végétaux on les appelle généralement phytostérol.

Les stéroïdes sont très recherchés en industrie pharmaceutique pour la synthèse des contraceptifs, des anabolisants et pour leurs propriétés antifongiques, cardiotoniques, antibactériennes et hormonales (**Bruneton**, 1993). Les phytostérols inhibent l'absorption du cholestérol dans les voies digestives en se fixant sur ses transporteurs intestinaux (**Vergès**, 2009), ce qui permet de réduire son absorption de l'ordre de 10 à 15 % (**Law**, 2000; **Katan et al.**, 2003) conduisant à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires d'environ 25 % (**Law**, 2000). Le **tableau 3** présente deux stérol isolés des plantes du genre *Ocimum* :

Tableau 3: Quelques stérols isolés des plantes du genre *Ocimum*

Structures et noms	Sources	Références
 <p style="text-align: center;">8</p> <p>-sitostérol</p>	<i>O. suave</i>	Kamtchueng, 2003
 <p style="text-align: center;">9</p> <p>Stigmastérol</p>		Kamtchueng, 2003 Chogo et al., 1981

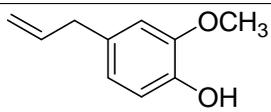
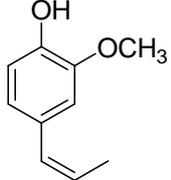
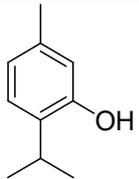
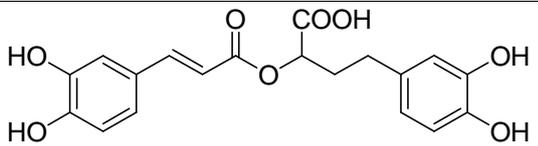
I.3.3 Les composés phénoliques

➤ Définition et activité biologique

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (**Bruneton; 1993**). Plusieurs composés phénoliques ont été isolés des plantes du genre *Ocimum*

L'eugénol isolé de *O. gratissimum* et de *O. suave* est doté d'activités antimicrobiennes, antiseptiques et anesthésiantes. Il protège les graines conservées contre la contamination par *Sitophilus granarius* (**Kamtchueng, 2003**). Grâce à son action antiseptique, il a été préconisé en tant que traitement de la tuberculose et de la gangrène pulmonaire (**Offiah, 1999**). Le **tableau 4** ci-dessous nous montre quelques composés phénoliques isolés des plantes du genre *Ocimum*.

Tableau 4: Quelques composés phénoliques isolés des plantes du genre *Ocimum*

Structures et noms	Sources	Référence
 <p style="text-align: center;">10</p> <p>Eugénol</p>	<i>O. gratissimum</i> <i>O. suave</i>	Kamtchueng, 2003 Khosla et al., 1989
 <p style="text-align: center;">11</p> <p>Isoeugénol</p>	<i>O. gratissimum</i>	Khosla et al., 1989
 <p style="text-align: center;">12</p> <p>Thymol</p>	<i>O. gratissimum</i> <i>O. viride</i>	Kamtchueng, 2003 Khosla et al., 1989
 <p style="text-align: center;">13</p> <p>Acide rosmarinique</p>	<i>O. basilicum</i>	Kamtchueng, 2003

I.3.4. Les acides gras

➤ Définition et activité biologique

Les acides gras sont des acides carboxyliques à longue chaîne carbonée et possédant un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe.

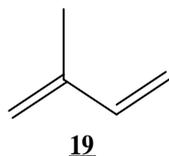
L'acide oléique et l'acide stéarique isolés de *O. sanctum*, l'acide linoléique, l'acide linoléinique et l'acide palmitique isolés de *O. sanctum* et de *O. suave* ont révélé un effet protecteur contre les troubles mentaux chez les rats. De nombreux acides gras ont été isolés des plantes du genre *Ocimum* et certains sont regroupés dans le **tableau 5** ci-dessous :

Tableau 5: Quelques acides gras isolés des plantes du genre *Ocimum*.

Structures et noms	Sources	Références
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 14 Acide oléique	<i>O. sanctum</i>	Sigh et al. , 1996
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ 15 Acidestéarique		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ 16 Acide linoléique	<i>O. sanctum</i> <i>O. suave</i>	Sigh. et al. , 1996 Kamtchueng , 2003
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 17 Acide linoléique		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ 18 Acide palmitique		

I.3.5 Les terpénoïdes

Les terpénoïdes sont construits à partir d'unité isopréniques dont la structure **19** représente l'isoprène. (**Lamarti et al.** 1994)



Structure **19** : Structure d'une unité isoprénique

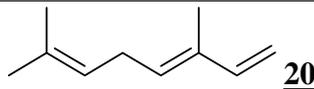
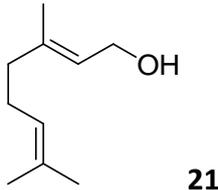
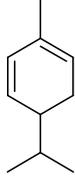
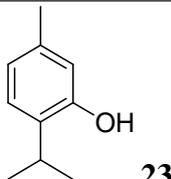
Suivant le nombre d'unités isopréniques incorporés dans la structure des composés, on a: les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les sesterterpènes et les triterpènes. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation «tête à queue» d'un nombre variable d'unités isopréniques (**Yimdjo**, 2000)

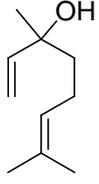
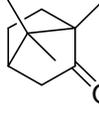
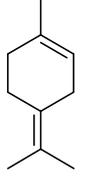
I.3.5.1 Les monoterpènes

➤ Définition et activité biologique

Les monoterpènes sont volatiles, d'odeur souvent agréable et représente la majorité des constituants des huiles essentielles (**Bruneton**, 1993). Généralement des stimulants, les monoterpènes agissent sur les glandes mucipares, le système vasculaire notamment le système veino-lymphatique (ils jouent ainsi le rôle de vasoconstricteur), et sur les glandes exocrines (au niveau digestif). Elles sont cortisone-like (stimulant de la glande endocrinienne), antalgiques (par la voie transcutanée) et antiseptiques (par la voie anale). (**Larmati et al.**, 1994). Le **tableau 6** ci-dessous regroupe quelques monoterpènes isolés des plantes du genre *Ocimum*.

Tableau 6: Quelques monoterpènes isolés des plantes du genre *Ocimum*

Structures et noms	Sources	Référence
 <p>20 Ocimene</p>	<i>O. gratissimum</i> <i>O. basilicum</i>	Larmati et al. , 1994 Prabhu et al. , 2009
 <p>21 Géraniol</p>	<i>O. basilicum</i>	Larmati et al. , 1994
 <p>22 Phéllanodrène</p>	<i>O. gratissimum</i> <i>O. suave</i> <i>O. viride</i>	Kamtchueng , 2003 Khosla et al. 1989
 <p>23 Thymol</p>	<i>O. gratissimum</i> <i>O. viride</i>	Kamtchueng , 2003 Bruneton , 1993

 <p style="text-align: right;">24</p> <p>Linalol</p>	<p><i>O. gratissimum</i></p> <p><i>O. suave</i></p> <p><i>O. basilicum</i></p>	<p>Larmati et al., 1994</p> <p>Manns 1995</p> <p>Grayer et al. 1996</p>
 <p style="text-align: right;">25</p> <p>Camphor</p>	<p><i>O. gratissimum</i></p> <p><i>O. basilicum</i></p>	<p>Bruneton, 1993</p> <p>Pauptin et al., 1980</p>
 <p style="text-align: right;">26</p> <p>Terpinolène</p>	<p><i>O. gratissimum</i></p>	<p>Prabhu et al., 2009</p>

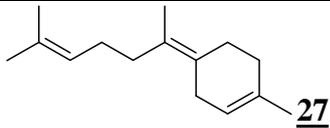
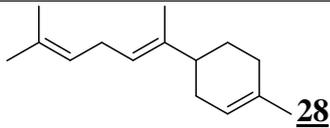
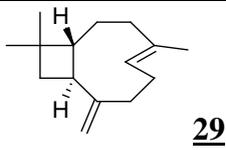
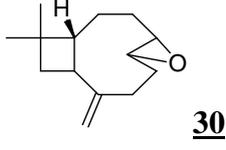
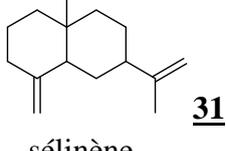
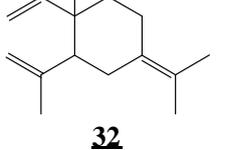
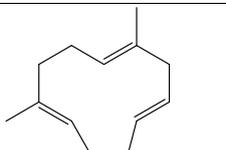
I.3.5.2 Les sesquiterpènes

➤ Définition et activité biologique

Ce sont des composés à trois unités isopréniques, formant un enchaînement acyclique simple et condensé. Parfois plusieurs cycles imbriqués sont eux aussi apparentés aux hydrocarbures insaturés C₁₅H₂₄ (**Lamarti et al., 1994**).

Les sesquiterpènes sont anti-inflammatoires (notamment antihistaminiques) et sont recommandés dans les crises d'asthme. Elles sont également hormon-like et agissent sur l'axe hypophyso-ovarien. Ces molécules sont irritantes pour la peau et néphrotoxiques (toxicité sur le rein)(**Lamarti et al., 1994**). Le **tableau 7** ci-dessous donne la structure de quelques sesquiterpènes isolés du genre *Ocimum* :

Tableau 7: Quelques sesquiterpènes isolés des plantes du genre *Ocimum*

Structures et noms	Sources	Référence
 <p>27 -bisabolène</p>	<i>O. basilicum</i>	Verscheur et al., 2002
 <p>28 γ-bisabolène</p>		
 <p>29 Caryophyllène</p>	<i>O. basilicum</i> <i>O. suave</i> <i>O. gratissimum</i> <i>O. viride</i>	Kamtchueng, 2003 Khosla et al., 1989 Verscheur et al., 2002
 <p>30 Oxyde de Caryophyllène</p>	<i>O. suave</i> <i>O. gratissimum</i> <i>O. viride</i>	
 <p>31 -sélénène</p>	<i>O. suave</i> <i>O. gratissimum</i>	
 <p>32 -élemène</p>	<i>O. suave</i>	Kamtchueng, 2003 Khosla et al., 1989
 <p>33 γ-humelène</p>	<i>O. gratissimum</i>	Prabhu et al., 2009

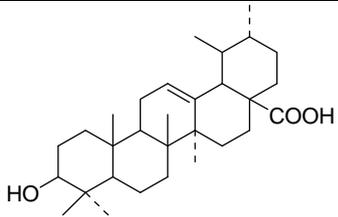
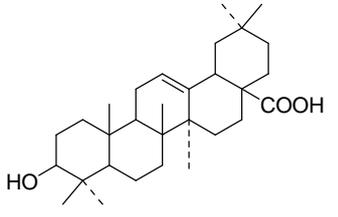
I.3.5.3 Les triterpènes

I.3.5.3.1 Définition et activité biologique

Les triterpènes sont des composés renfermant dans leurs squelettes de base trente d'atomes de carbones. Ils sont issus de la cyclisation du squalène (C₃₀H₅₀) dérivant de la condensation de 6 unités isopréniques.

Sur le plan biologique, les triterpènes pentacycliques favorisent la germination, la croissance, le développement et la défense des plantes contre certaines agressions extérieures (Wansi, 2000). Les triterpènes présentent une activité cytotoxique, bactéricide, anti-inflammatoire, antivirale, anti-ulcéreuse, molluscicide et antifongique (Kapche, 2000), (Guedem, 2004). Chez l'homme, les triterpènes pentacycliques ont des activités antifongiques, antitumorales, antiulcéreuses, antirhumatismales, antiasthmatique, anti-oedémateuses. Mais ils peuvent avoir comme effet indésirable les nausées et les vomissements (Maffo, 2006). Les triterpènes isolés des plantes du genre *Ocimum* sont pentacycliques et certains sont consignés dans le **tableau 8** ci-dessous

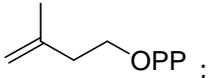
Tableau 8: Quelques triterpènes pentacycliques isolés des plantes du genre *Ocimum*

Structures et noms	Sources	Références
 <p>34 Acide ursolique</p>	<i>O. sanctum</i>	Kamtchueng, 2003
 <p>35 Acide oléanolique</p>	<i>O. gratissimum</i> <i>O. suave</i>	

I.3.5.3.2 Biosynthèse des triterpènes

La biosynthèse des triterpènes se fait généralement en quatre étapes : la première consiste en la synthèse de l'isopentenyl pyrophosphate (IPP), la seconde en la condensation des unités isopréniques, la troisième réside dans la cyclisation du squalène suivie des modifications secondaires comme dernière phase (Bruneton; 1993).

- **Synthèse de l'IPP:** elle se fait par voie de l'acide mévalonique suite à la condensation successive de trois molécules d'acétyl-coenzyme A, et aboutit à la formation de l'IPP

de formule  ;

- **La condensation des unités isopréniques:** elle conduit à la formation des différents types de triterpènes dont le triterpène linéaire (squalène) ;
- **La cyclisation du squalène :** elle permet d'obtenir, à partir des différentes conformations que peut adopter le substrat acyclique d'une part et les différentes interactions enzyme/substrat dans le site actif d'autre part (Brown, 1998), plusieurs types de triterpènes cycliques suivant le schéma 1

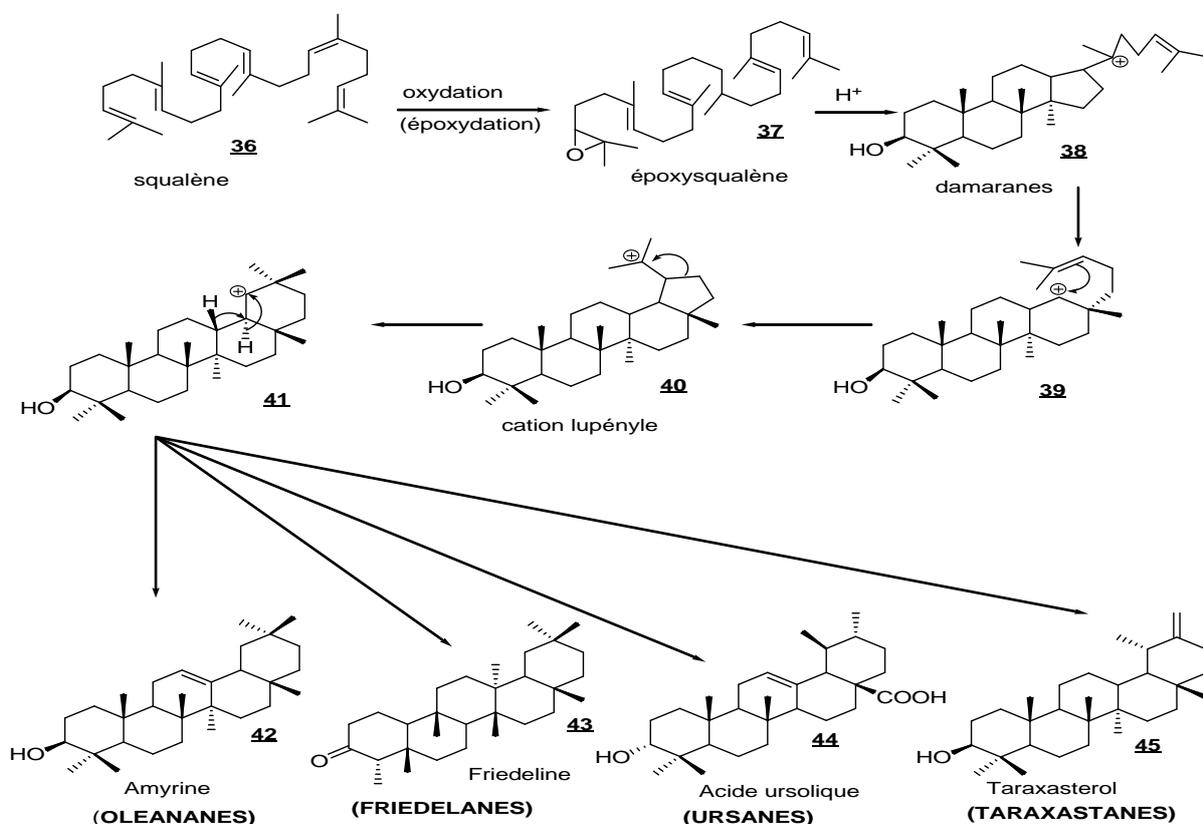


Schéma 1 : Cyclisation du squalène en triterpènes pentacycliques

- **Les modifications secondaires** : Elles peuvent porter sur le squalène (**36**) ou sur les dérivés cyclisés, et sont en général des oxydations, des éliminations ou l'addition d'autres classes de composés (sucres et autres) ou groupements fonctionnels.

I.3.5.3.3 Caractéristiques spectroscopiques des triterpènes

❖ La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de proposer à partir de quelques pics caractéristiques observés sur le spectre, le squelette des triterpènes, la position de la double liaison ainsi que la nature des substituants (**Mahato et al.**, 1994). Les composés saturés de type ursane ne présentent aucun pic important dans la région de l'ion moléculaire, à l'exception des pics correspondant aux groupements fonctionnels tels que M-CH₃, M-60 dans le cas d'un acétate, ou alors M-H₂O.

❖ La Résonance Magnétique Nucléaire du proton

Les spectres RMN du ¹H des triterpènes pentacycliques sont très caractéristiques. Ils permettent de distinguer facilement les dérivés de l'oléanène, de l'ursène et de ceux du lupène (**Cheung et al.**, 1969).

En effet, les dérivés de l'oléanène et de l'ursène présentent généralement en RMN ¹H, un large triplet entre 5,10 et 5,50 ppm, avec une constance de couplage de l'ordre de 3 Hz caractéristique du proton vinylique H – 12. Quant aux dérivés du lupène, ils présentent généralement un singulet de deux protons entre 4,20 et 5,00 ppm caractéristiques de deux protons vinyliques portés par le carbone 29 (**Cheung et al.**, 1969).

Les signaux des méthyles généralement groupés entre 0,5 et 2,0 ppm permettent également de différencier les types de squelette des triterpènes pentacycliques. Par exemple, les triterpènes non oxydés des séries des oléan-12-ène et lup-20(29)-ène présentent respectivement 8 et 7 singulets attribuables à 8 et 7 méthyles tertiaires, alors que ceux de la série urs-12-ène présentent six singulets et 2 doublets attribuables respectivement à 6 méthyles tertiaires et 2 méthyles secondaires (**Cheung et al.**, 1969).

❖ La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13

La RMN ¹³C est l'une des techniques les plus utilisées, elle permet d'attribuer sans ambiguïté les signaux de carbone même dans les régions les plus encombrées du spectre. C'est

une technique qui permet de déterminer simultanément les différents types et le nombre total d'atomes de carbone que possède le triterpène. La différenciation des séries oléan-12-ène et urs-12-ène se fait par leurs nombre d'atomes de carbones quaternaires et les déplacements chimiques des carbones vinyliques 12 et 13. Ainsi, les squelettes des dérivés d'oléan-12-ène et d'urs-12-ène renferment respectivement 6 et 5 atomes de carbones quaternaires. Leurs carbones 12 et 13 résonnent respectivement à 122,5 ppm et à 143,5 ppm pour les premiers, et à 124,5 ppm et 138,0 ppm pour les seconds. Cependant il existe des exceptions suite aux différentes configurations que pourraient adopter les cycles (**Dodrell et al**, 1974).

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION

II-1 Introduction

Les tiges de *O. gratissimum* ont été récoltées le 05 Mars 2015 à Manjo dans la région du Littoral-Cameroun. Après découpage, séchage et broyage, on a obtenu 2732 g de poudre. Cette dernière a subi une extraction par macération à température ambiante dans le méthanol pendant 48 heures. Le filtrat obtenu a subi une évaporation sous pression réduite et a donné 132,8 g d'extrait brut.

Une partie de cet extrait brut soit 90 g a subi une chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant l'hexane, suivi du mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante et du mélange acétate d'éthyle-méthanol (1/1). Par la suite deux des sept fractions obtenues ont subi la chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme solvant d'élution l'hexane suivi du mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante comme le montre le **schéma 2** ci-dessous:

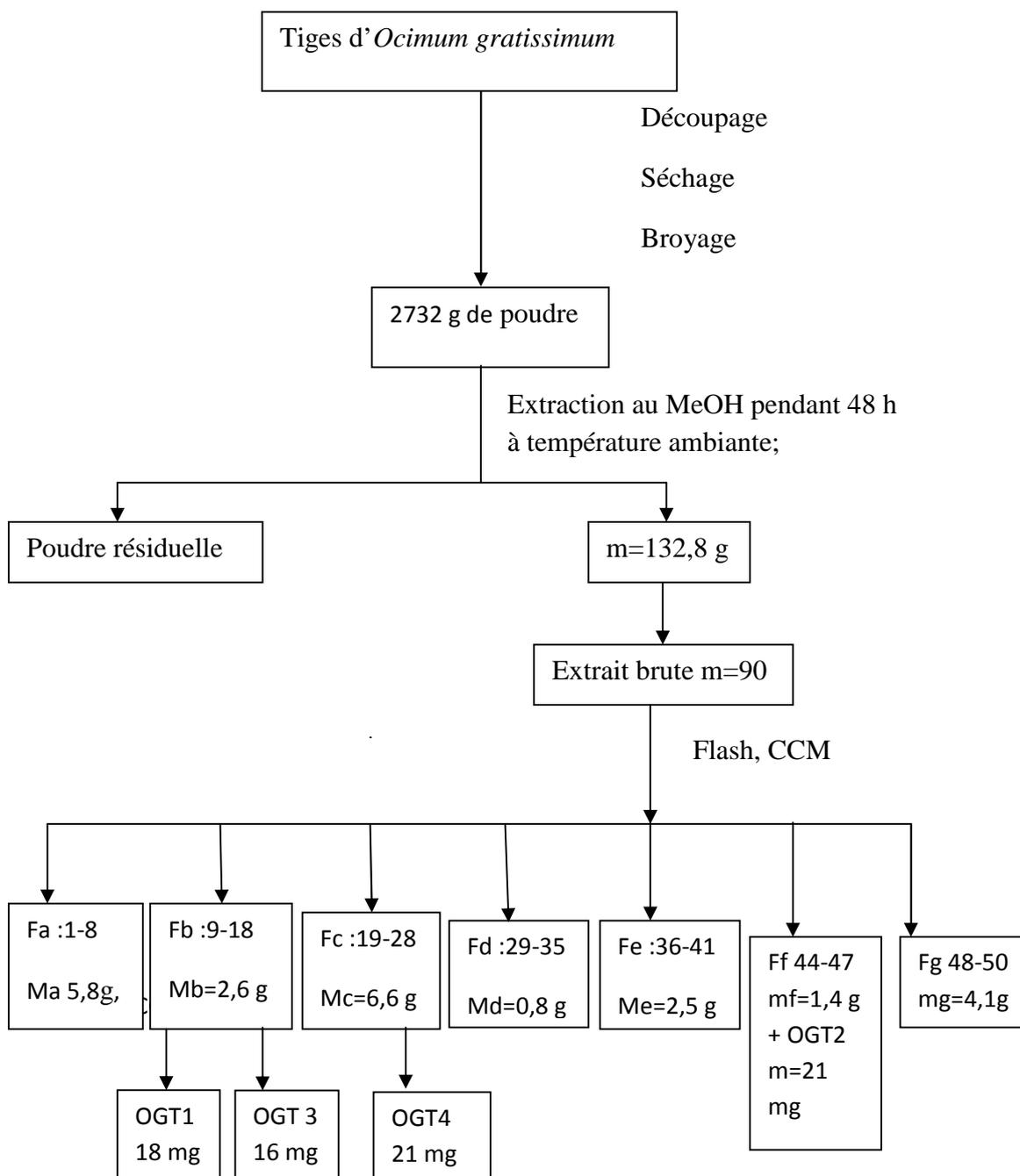


Schéma 2: Protocole d'extraction et d'isolement des composés des tiges d'*Ocimum gratissimum*

II.2 Identification des composés isolés

II.2.1 Identification du composé OGT 1

Le composé OGT 1 précipite sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane acétate d'éthyle 9 :1. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Libermann-Burchard en donnant une coloration bleu-verdâtre caractéristique des stérols.

Sur le spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CHCl_3) d'OGT 1 (fig 3), on observe à 140,7 et 121,7 ppm des signaux attribuables respectivement aux carbones C-5 et C-6, caractéristique d'un squelette de type stérol. Ceci est confirmé par la présence sur le spectre de RMN ^1H d'un proton sous forme de triplet à 5,32 ppm (1 H, t, $J = 4,8$ Hz), attribuable au proton vinylique H-6. On y observe également deux signaux à 138,3 et 129,7 ppm, attribuables respectivement aux carbones C-22 et C-23, caractéristique d'un squelette de type 22 stérol. Le signal observé à 71,0 ppm est caractéristique de l'oxyméthine en C-3. Ces informations structurales sont étayées par la présence sur son spectre RMN ^1H (fig 2), de deux protons apparaissant sous forme de doublets dédoublés à ^1H 5,13 ppm (1 H, dd, $J = 15,0$ Hz et 8,4 Hz) ; 5,00 ppm (1H, dd, $J = 15,0$ et 8,4 Hz), attribuables aux protons éthyléniques H-22 et H-23 en position trans, par ailleurs, on remarque sur ce même spectre la présence d'un multiplet à ^1H 3,50 ppm, attribuable au proton H-3 de l'oxyméthine sus-évoqué (**Kamboj et Saluja, 2011**).

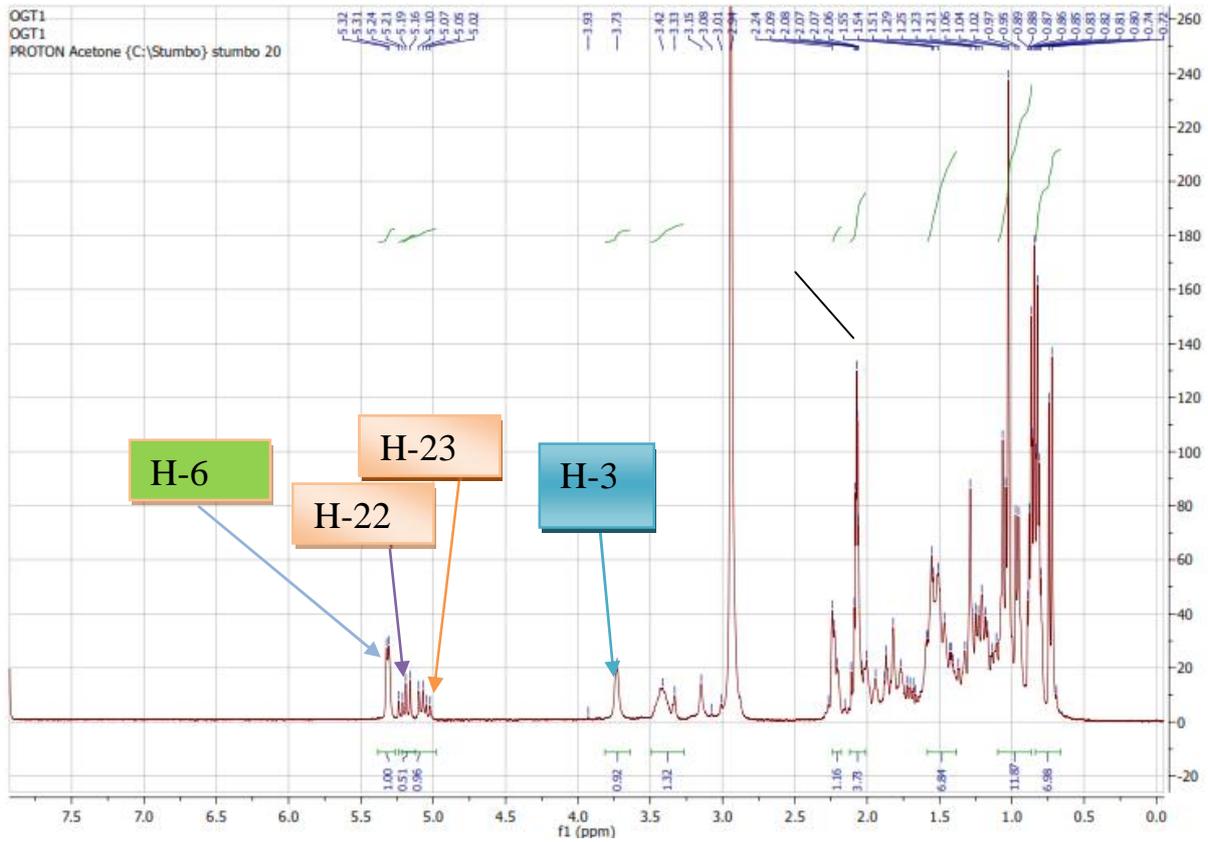


Figure 2 : Spectre RMN ^1H (Acétone, 400MHz) d'OGT 1

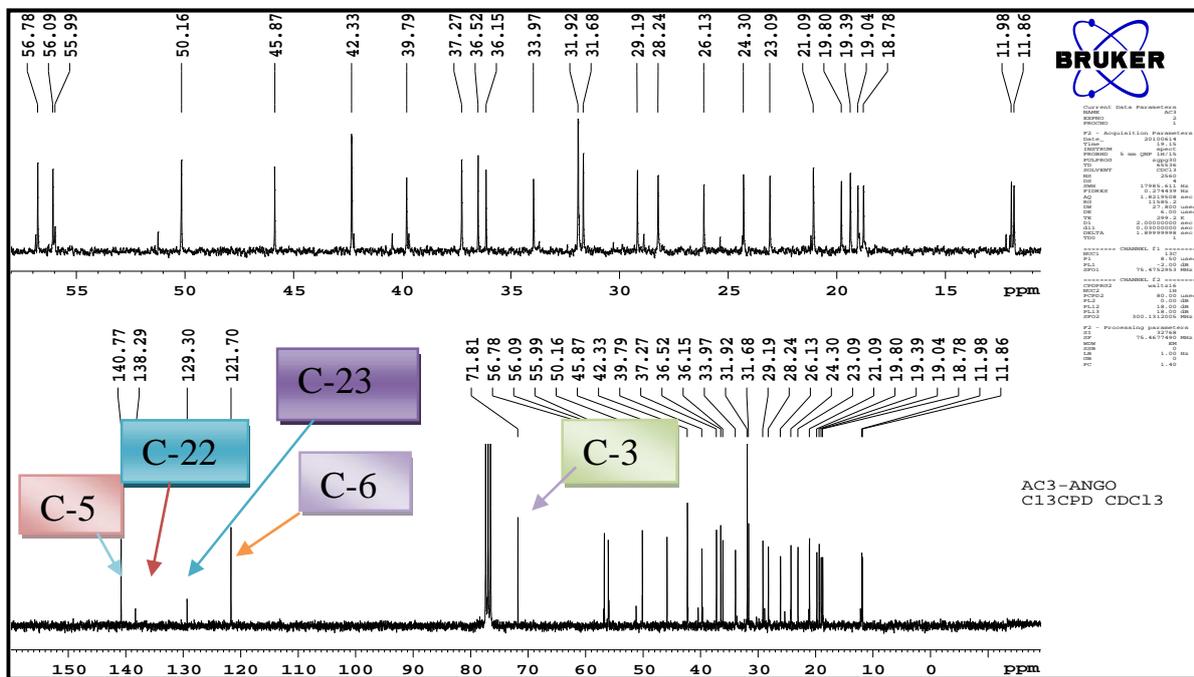
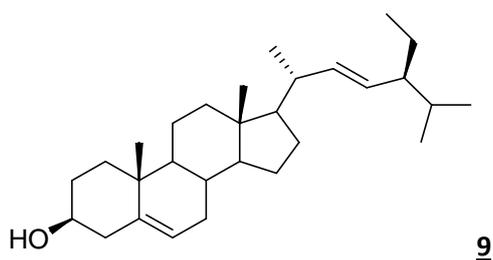
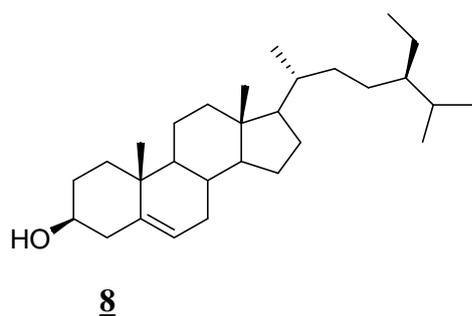


Figure 3: Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) de OGT 1

Ces données permettent d'attribuer à OGT 3 les structures (**8** et **9**) suivantes qui sont celles de la β -sitostérol et de la β -stigmastérol



Le β -sitostérol est un hypotensif, antiulcéreux et limite l'accumulation du cholestérol sur les parois des vaisseaux sanguins (Pegel, 1997). Plusieurs études montrent l'intérêt du β -sitostérol dans le traitement de l'hyperplasie de la prostate (Dae-Sup et al. 2004).

En plus, le β -sitosterol présente des effets anti-inflammatoire, anti-prostatique, antipyrétique, antiarthritique, anti-ulcère, insuline releasing et oestrogénique et inhibition de la spermatogénèse. Il réduit le risque de cancer et d'oxydation par son activité anti-oxydante (Rasoanaivo et al.2014).

II.2.2 Identification du composé OGT 4

Le composé OGT4 soluble dans le chloroforme, précipite dans le mélange hexane – acétate d'éthyle 85:15 sous forme de poudre blanche. Il fond entre 305-306° C et donne une réaction positive au test de Libermann-Burchard avec une coloration rose caractéristique des triterpènes.

Son spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) (fig 4) montre les signaux de 7 méthyles angulaires apparaissant sous forme de singulet à δ_{H} 1,09 ; 0,90 ; 0,88 ; 0,87 ; 0,85 ; 0,72 et 0,68 ppm. Le signal à δ_{H} 3,00 ppm (1H, m) est caractéristique d'un proton géminé à un hydroxyle, probablement le proton en position 3. Celui très déblindé à δ_{H} 5,16 ppm (1H, t) correspond au proton vinylique porté par le carbone C_{12} .

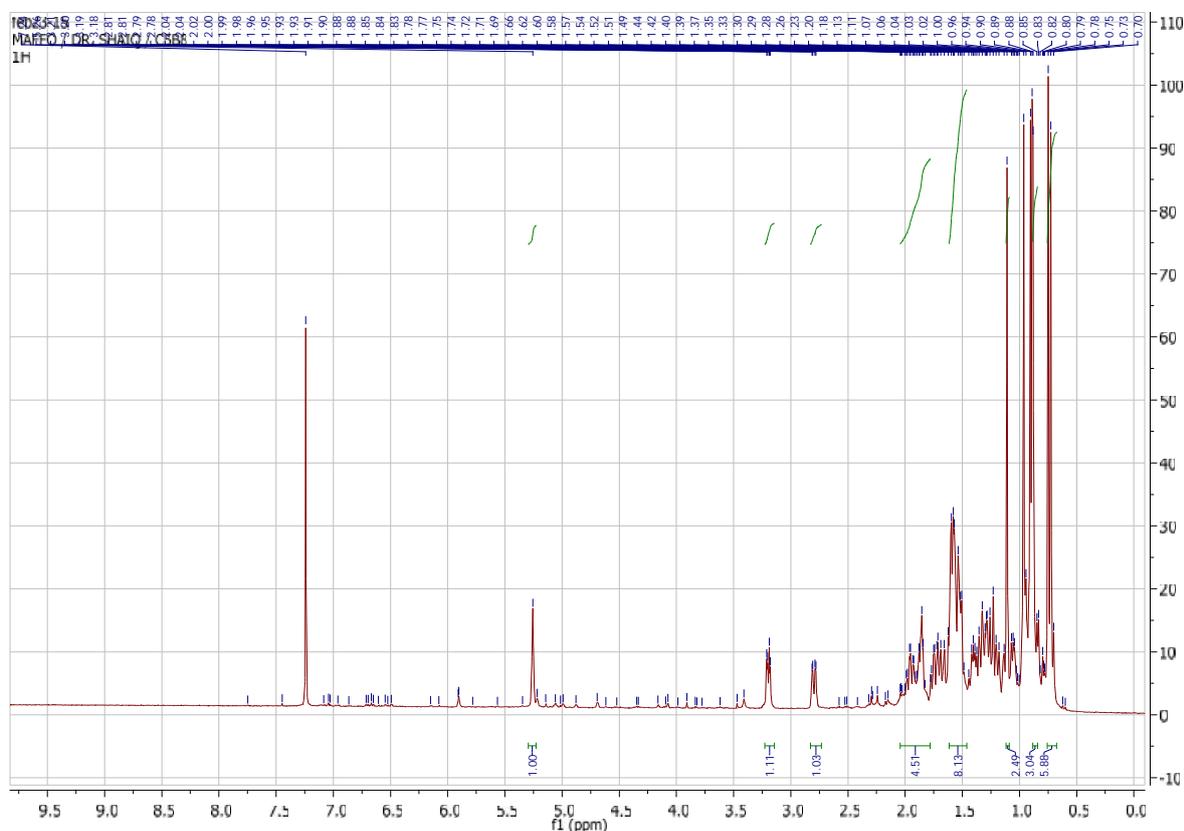


Figure 4: Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de OGT4

Ses spectres de RMN ^{13}C découplé large bande et de DEPT permettent de déceler 30 signaux attribuables à 30 carbones d'un squelette triterpénique. On peut citer à δ_{C} 77,2 ppm le signal attribuable au carbone C-3. L'existence du groupe carbonyle est confirmée par l'observation sur le spectre RMN ^{13}C de OGT 4 d'un signal à δ_{C} 181,0 ppm. De même, on

peut identifier sur ce spectre deux pics de carbones éthyléniques à δ_c 122,2 et 143,4 ce qui traduit l'existence d'une double liaison et indiquant que OGT 4 est de la série Oléan-12-ène (Mahato et Kundu 1994).

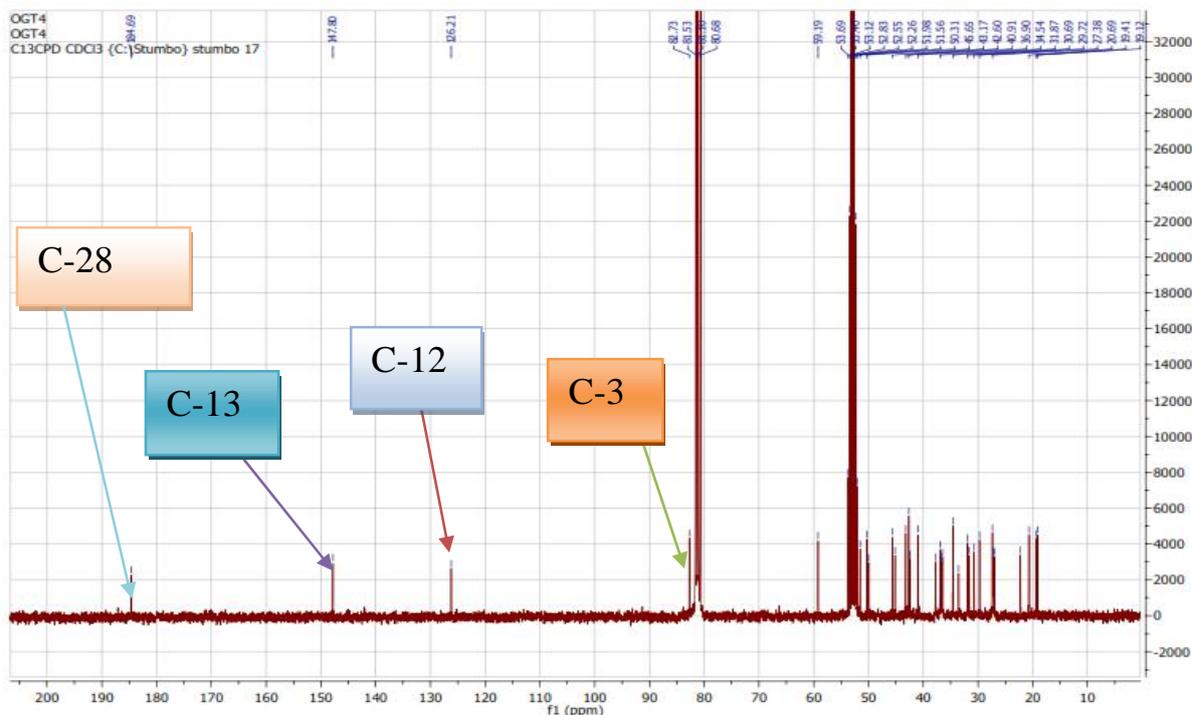


Figure 5: Spectre RMN¹³C (CDCl₃, 100MHz) de OGT4

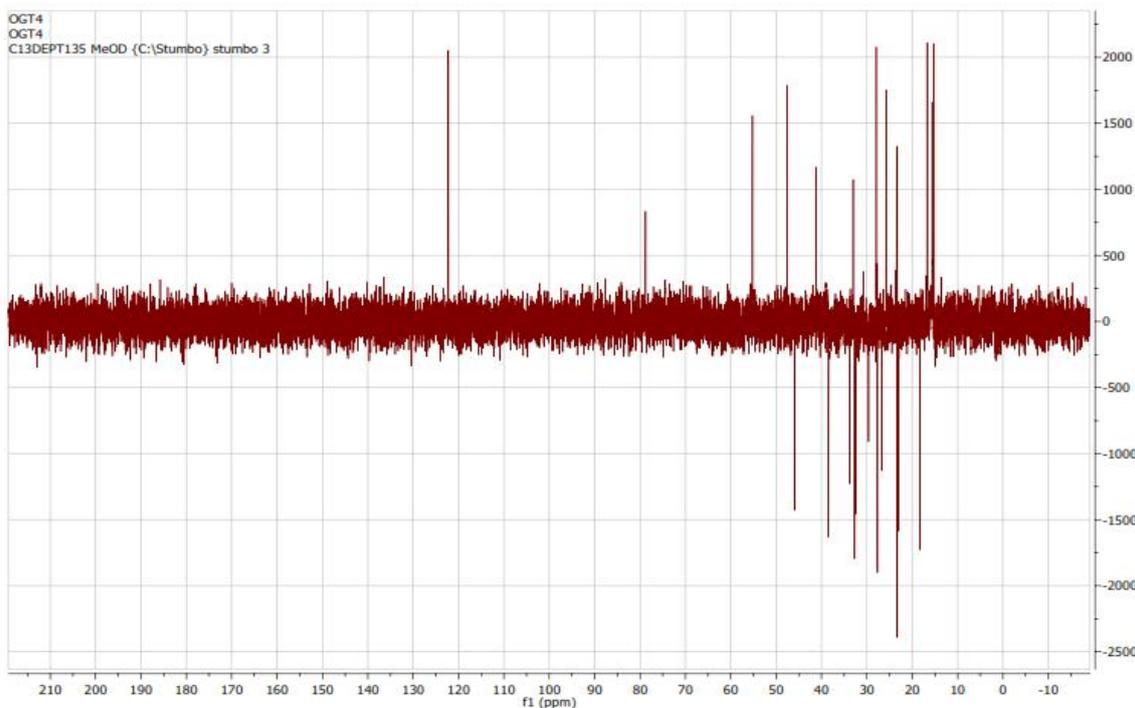


Figure 6: Spectre DEPT 135 (CD₃OD, 100MHz) de OGT 4

Les données spectrales (**tableau 9**) ainsi que leur comparaison avec les données de la littérature (**Mahato et al.**, 1994) permettent d'attribuer à OGT 4 la structure **35** qui est celle de l'acide oléanolique.

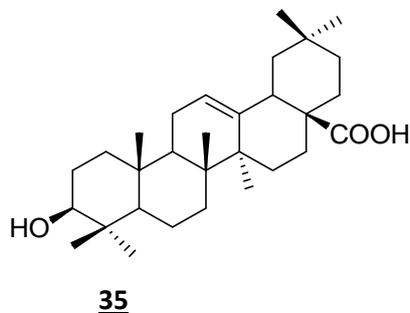


Tableau 9: Tableau de comparaison des données RMN ¹³C de OGT 4 et celles de la littérature (Mahato et Kundu, 1994)

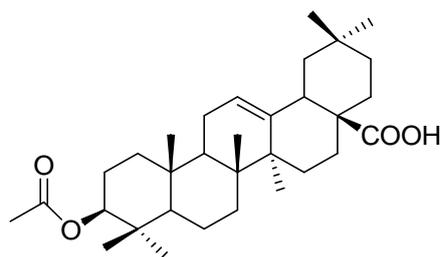
Positions	Acide oléanolique	OGT 4 (CDCl ₃ , 100 MHz)
1	38,5	38,2
2	27,6	27,6
3	78,7	78,7
4	38,7	38,7
5	55,2	55,2
6	18,3	18,3
7	32,6	32,7
8	39,3	39,2
9	47,6	47,6
10	37,0	36,9
11	23,1	23,3
12	122,1	122,2
13	143,4	143,8
14	41,6	41,7
15	27,7	27,9
16	23,4	23,4
17	46,6	46,3

18	41,3	41,2
19	45,8	45,9
20	30,6	30,6
21	33,8	33,8
22	32,3	32,5
23	28,1	27,9
24	15,6	15,5
25	15,3	15,2
26	16,8	16,8
27	26,0	25,8
28	181,0	181,0
29	33,1	32,9
30	23,6	23,3

II.2.3 Identification du composé OGT 3

Le composé OGT3 précipite dans le mélange hexane acétate d'éthyle 9:1 sous forme de cristaux blancs. Il est soluble dans le chloroforme et réagit positivement au test de Libermann-Burchard en donnant une coloration rouge violacée caractéristique des triterpènes.

L'analyse aux rayons X d'un monocristal permet de donner la formule empirique $C_{32}H_{50}O_4$ renfermant 8 insaturations. L'image ORTEP du composé OGT 3 représentée par la **figure 7** permet de l'identifier à l'acide 3- -acétyloléanolique.



46

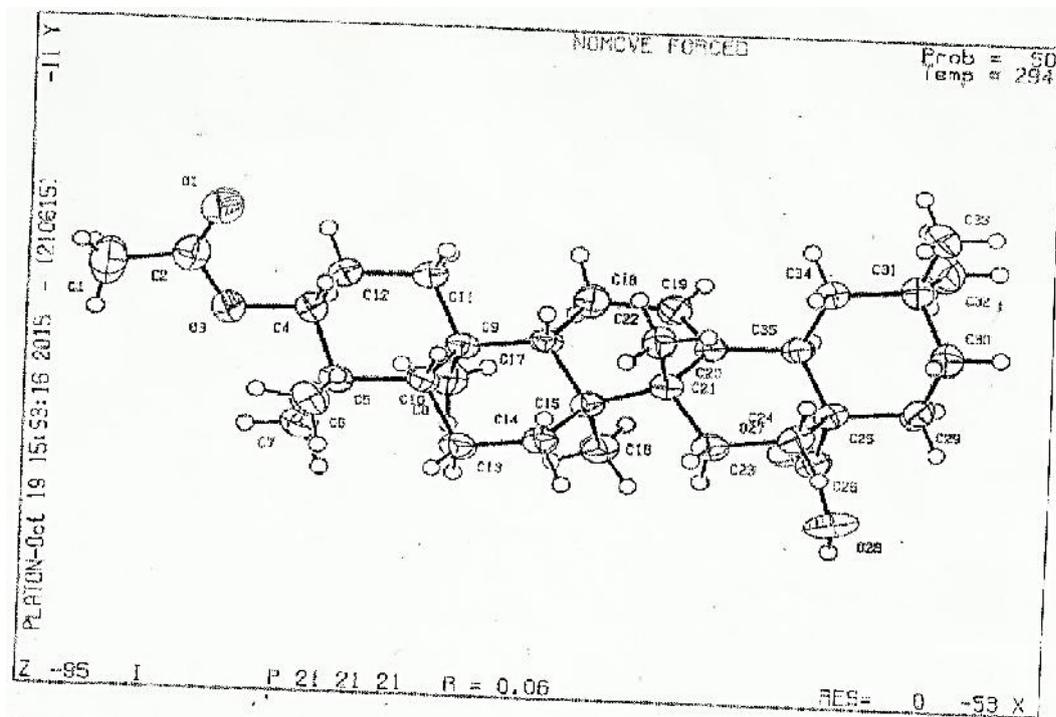


Figure 7 : Image ORTEP du composé OGT 3

INTERET PEDAGOGIQUE DU MEMOIRE

Le présent travail, par ces multiples étapes, a contribué à améliorer et développer nos capacités en tant que futur enseignant, ainsi que l'esprit d'équipe entre le futur enseignant et les apprenants.

Ainsi, la recherche bibliographique et l'exploitation des données de la littérature nous ont permis de nous familiariser avec la recherche afin de pouvoir préparer de manière efficace nos leçons au lycée et d'initier les apprenants à la recherche sur internet.

La recherche des métabolites secondaires de l'espèce étudiée nous a conduit à l'identification des différentes classes de composés à l'instar des triterpènes renfermant plusieurs groupements fonctionnels tels que les alcools, les carbonyles, les doubles liaisons, qui peuvent être caractérisés par des tests d'identification (réactif de Lucas, réactif de Schiff, liqueur de Fehling, test à l'eau de brome), contenus dispensés dans les programmes du secondaire.

Les techniques de laboratoire (chauffage, extraction, distillation, chromatographie etc) apprises dans le cadre de la recherche pour la rédaction de ce mémoire seront mises à profit pendant les séances de travaux pratiques au lycée.

La rédaction du mémoire nous a enfin permis de mettre en évidence l'esprit de synthèse, qualité indispensable pour les futurs enseignants. Nous devons en tant qu'enseignants transmettre cet esprit de synthèse aux apprenants, ce qui les aidera dans toutes les disciplines.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

De l'étude phytochimique de l'extrait au méthanol des tiges de *O. gratissimum*, quatre composés indexés OGT 1, OGT 2, OGT 3 et OGT 4 ont été isolés grâce aux techniques chromatographiques usuelles. OGT 1, OGT 3 et OGT 4 ont été identifiés respectivement au mélange de -sitostérol et -stigmastérol, à l'acide 3- -acétyloléanolique et enfin l'acide oléanolique par interprétation de leurs données spectroscopiques et par comparaison de ces données de à celles décrites dans la littérature.

Les composés OGT3 et OGT4 sont des triterpènes, OGT1 est un mélange de deux stérols. Dans la suite de nos travaux, nous envisagerons d'achever l'élucidation structurale d'OGT2. Ensuite étudier les fractions restantes de l'extrait au méthanol des tiges de *O. gratissimum* et enfin étendre notre étude sur les autres parties de la plante en vue d'une disponibilité accrue et diversifiée des métabolites secondaires biologiquement actifs.

CHAPITRE III: PARTIE EXPERIMENTALE

III.1 Appareillage et matériel végétal

III.1.1 Appareillage

Les masses des composés ont été mesurées grâce à une balance électronique (COBOS-D-6000-SX) de précision 1/10.

La chromatographie sur colonne a été réalisée en utilisant un gel de silice de fabrication MERCK F₂₅₄ de type 60, de granulométrie 0.063-0.200 nm.

Les fractions ont été concentrées sur évaporateur rotatif de type HEIDOLPH VV2000.

Les CCM ont été réalisées sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 (plaques préfabriquées de type MERCK, de dimensions 20×20 cm et d'épaisseur 0,2 mm).

Les spots de CCM ont été révélés à l'UV par l'appareil BENDA Ultra-violette strahler D-69168 Wielsloch opérant aux longueurs d'onde 254 et 366 nm, ensuite par pulvérisation à la vapeur d'iode ou de l'acide sulfurique concentré, suivi d'une calcination effectuée dans l'étuve.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur un appareil de type BRUCKER AVANCE. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

III.1.2 Matériel végétal

Les tiges d'*O. gratissimum* ont été récoltées le 05 Mars 2015 dans la région du Littoral-Cameroun, dans le département du Mounjo et plus précisément dans l'arrondissement de Manjo.

III.2 Extraction et isolement des produits

III.2.1 Extraction des produits

Les tiges d'*O. gratissimum* récoltées, découpées, séchées puis broyées ont donné une masse de 2732 g. L'extraction effectuée par macération au MeOH pendant 48 heures a donné une masse de 132,8g d'extrait brut après concentration du filtrat au rota-vapeur. Une partie de cet extrait brute a subi une chromatographie flash suivie des chromatographies sur colonne.

III.2.2 Isolement des composés

III.2.2.1 Dégrossissement par flash chromatographique

De l'extrait brut 132,8 g, 90 g ont été fixés sur 180 g de silice pour subir un flash chromatographique avec comme éluant l'hexane, les mélanges Hex-AE de polarité croissante, les mélanges AE-MeOH. Au terme de ce processus, 50 fractions ont été obtenues et regroupées en 7 grandes fractions sur la base des CCM à savoir: Fa, Fb, Fc, Fd, Fe, Ff, Fg. Le **tableau 10** ci-dessous représente ces différents fractionnements.

Tableau 10: Chromatogramme du fractionnement de l'extrait brut au méthanol des tiges d'*O. gratissimums*

Eluant	Fractions	Observations	Regroupements
Hex pur	1-6	Mélange huileux	Fa 1-6; ma = 5,8 g
Hex-AE:9/1	7-14	Mélange de composés	Fb 9-14; mb = 2,6 g
Hex-AE: 8/2	15-26	Mélange de plusieurs composés	Fc 19-26; mc = 6,6 g
Hex-AE: 7/3	27-35	Mélange de composés	Fd 27-35; md = 0,8 g
Hex-AE 1/1	36-41	Mélange de composés	Fe 36-41; me = 2,5 g
AE: pur	42-46	OGT 2 + traînées	Ff 44-46; mf = 1,4g
AE-MeOH:1/1	47-50	traînées	Fg 48-50; mg = 4,1 g

Après le flash, deux de ces fractions à savoir Fb et Fc, ont subi une chromatographie sur colonne à la suite de laquelle nous avons obtenu trois produits indexés OGT1, OGT3 et OGT4

III.2.2.2 Chromatographie sur colonne de la fraction Fb

Cette fraction de masse 2,6 g a été fixée sur 5,2 g de silice et a subi une chromatographie sur colonne avec comme éluant l'hexane et le mélange Hex-AE de polarité croissante. Le **tableau 11** ci-dessous représente ces différents fractionnements.

Tableau 11: Chromatogramme de purification de la fraction Fb

Eluant	Fractions	Observations
Hex pur	1-12	Mélange huileux
Hex/AE:97,5/2,5	13-40	-Mélange de deux produits (OGT1) -Mélange contenant OGT3
Hex/AE: 95/5	41-44	OGT3 + traînées
Hex/AE:92,5/7,5	45-48	Traînées
Hex/AE:9/1	49-52	Traînées

De même la fraction Fc a subi une chromatographie sur colonne et nous avons obtenu un produit indexé OGT4

III.2.2.3 Chromatographie sur colonne la fraction Fc

De masse 6,6 g, cette fraction a été fixée sur 13.2 g de silice et a subi une chromatographie sur colonne avec comme éluant l'hexane et le mélange Hex-AE de polarité croissante. Le **tableau 12** ci-dessous résume les différentes opérations effectuées.

Tableau 12: Chromatogramme de purification de la fraction Fc

Eluant	Fractions	Observations
Hex pur	1-5	Traînées
Hex/AE: 95/5	6-9	Traînées
Hex/AE: 9/1	10-44	Mélange de composés + OGT4
Hex/AE: 85/15	45-54	Traînées
Hex/AE: 4/1	55-63	Traînées
Hex/AE: 1/1	64-66	Traînées

III.2.3 Traitement des fractions

1) Traitement des fractions 15-40 de Fb

Exposés à température ambiante pendant 72 heures, des précipités se sont formés dans les flacons 21-30. Ces précipités ont été lavés à l'hexane puis filtrés. Le précipité en forme de

poudre blanche ainsi obtenue est soluble dans le chlorure de méthylène, présente une tache en CCM et est indexée OGT1.

De même, les fractions 35-44 laissées à température ambiante pendant 48 heures laissent apparaître des cristaux. Ces cristaux ont été lavés à l'hexane puis filtrés. Les cristaux blancs obtenus sont solubles dans le chloroforme et présentent une tache en CCM. Ce composé est indexé OGT 3.

2) Traitement des fractions 10-18 de Fc

Laissés à température ambiante pendant 48 heures, des précipités se sont formés dans les flacons 21-34. Ces précipités ont été lavés à l'hexane puis filtrés. La poudre blanche ainsi obtenue est soluble dans le chloroforme et présente une tache en CCM et est indexé OGT4.

III.3 Caractéristiques physico-chimiques et spectroscopiques des composés isolés des tiges d'*O. Gratissimum*

OGT 1: mélange de β -sitostérol et de β -stigmastérol

Formules brutes: $C_{29}H_{48}O$ et $C_{29}H_{50}O$

Etat physique: **poudre blanche**

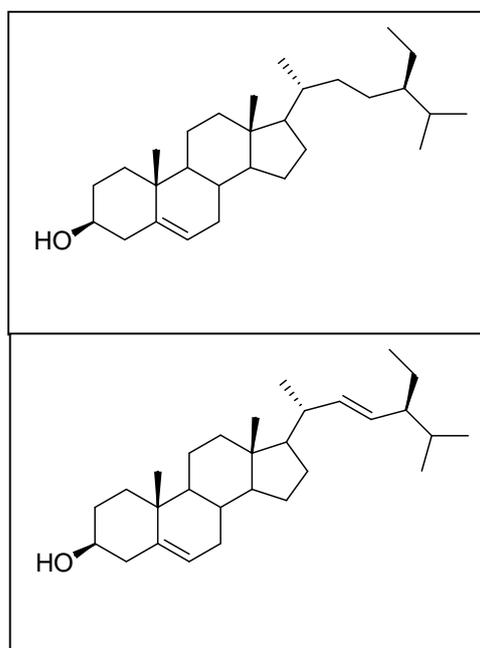
Solvant de cristallisation: **mélange Hex/AE 9:1**

Quantité: **18 mg**

Spectre RMN ^{13}C (**figure 3**)

Spectre RMN 1H : (**figure 2**)

Test de Libermann-Burchard: **positif**



OGT 3: Acide 3- β -acétyloléanolique

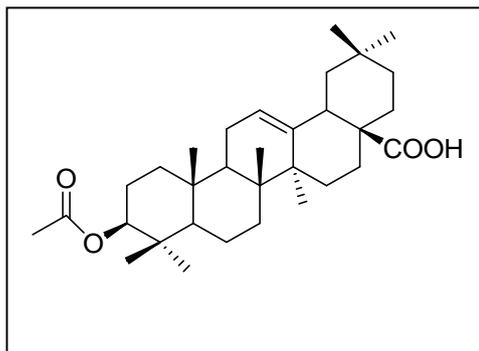
Formule brute: $C_{32}H_{50}O_4$

Etat physique: **cristaux blancs**

Solvant de cristallisation: **mélange Hex/AE 9: 1**

Quantité: **16 mg**

Test de Libermann-Burchard: **positif**



OGT 4: acide oléanolique

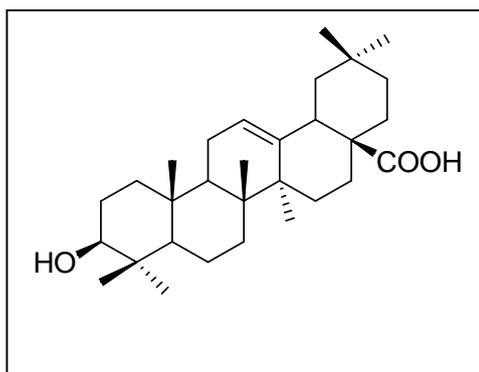
Formule brute: $C_{30}H_{48}O_3$

Etat physique: **poudre blanche**

Spectre RMN ^{13}C : (**figure 5**)

Spectre RMN 1H : (**figure.4**)

Test de Libermann-Burchard: **positif**



Test de Libermann-Burchard

Dans un tube à essai contenant une petite quantité de l'extrait, on y ajoute les mêmes quantités de chloroforme et d'anhydride acétique, ensuite quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. L'apparition de la coloration rouge violacée montre la présence des triterpènes et la coloration bleu-verdâtre caractéristique des stérols.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akinmoladun A., Ibukun E., Emmanuel A., Obuotor E., Farombi E.** (2007). phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from leaves of *Ocimum gratissimum*. *Scientific Research and Essays*, **2**, 163-166.
- Akroum S.** (2011) «Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels ». Thèse de Doctorat ; Université de Mentouri de Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
- Baytop T.** (1984) Treatment with plants in Turkey, Istamboul, Turkey, Istamboul University Publication, N₀ 3255.
- Berhaut J.** (1975) «Flore illustrée du Sénégal» Thome IV, Dicotylédones Ficoidées à légumineuses, 209.
- Bruneton J.** (1993) « Pharmacognosie, phytochimie et plante médicinale» 2^{ème} Edition, Technique et Documentation Lavoisier, 197 et de 398-433.
- Bruneton J.** (1999) «Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales ». 3^{ème} Edition. Rue Lavoisier, France: Technique et Documentation, 279-283.
- Brown G.** (1998). The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Report*, **7**, 653-678
- Cheung, R., Liang, J.-Y., Lu, H.-Y., Yang Y., Liu, R,** 2007, “Study on Chemical Constituents of the Leaves of *Canarium album* (Lour.) Raeusch”; *Chemistry and Industry of Forest Products*
- Chogo J.B., Grank G.** (1981) «Chemical composition and biological activity of the Tanzanian plant *Ocimum. Suave*», *Journal of Natural Products*, **43**, 308-311.
- Dae-Sup, P., Choi, S. Z., Ran, K. K., Mee, L. S., Ro, L. K., Suhkneung, P.** (2004) Immuno modulatory activity of triterpenes and phenolic compounds from *Viscum album L.* *Journal of Applied Pharmacology*, **11**, 1-4.
- EffraimK. D., Jack T.W., SodipoO.A.** (2003)Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. *African Journal of Biomedical Research* **6**, 21-25.

- Ghedira K.** (2005). Les Flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emploi en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4**, 162-169.
- Guedem N. A.**(2004) «Contribution à l'étude phytochimique des brindilles de *Thecaroris batesii* (Euphorbiaceae)», Mémoire de D.E.A. Chimie Organique, Université de Yaoundé I, 12.
- Grayer R.J., Veitch N.C., Kite G.C., Price A.M., Kokubum T.** (2001) «Distribution of 8-oxygenated leaf-surface flavones in the genus *Ocimum*», *Phytochemistry*, **56**, 559-567.
- Hutchinson, LL. D., F. R. S., V.M.H. and Dalziel J. M., M. D., B. Sc., F. L. S.** (1963) «Flora of West Tropical Africa ». **II**, 451-452.
- Hutchinson, Dalziel J. M.,** (1974) «Flore du Rwanda»,**III**, part 1, 322-326.
- Ijeh II Omo damiro O. D., Nwanna I.J.** (2005) Antimicrobial effects of aqueous and ethanolic fractions of two species, *Ocimum gratissimum* and *Xylopiya ethiopica*. *African Journal of Biotechnology* **4**, 953-956.
- Kamboj A., Saluja A.;** (2011) Isolation of stigmastérol and -stigmasterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences* **3**, 94-96.
- Kamdem W.A.F.** (2000) «Contribution à l'étude chimique d'une Papilionaceae: *Erythrina indica* et quelques hémisynthèses», Thèse de Doctorat de Troisième Cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé I.
- Kamtchueng F. D.** (2003) «Etude phytochimique des feuilles de *Ocimum suave* (Lamiaceae)», Mémoire de D.E.A. Chimie Organique, Université de Yaoundé I, 4-19.
- Kapche W F. G. D.** (2000) «Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales du Cameroun: *Dorstenia poinsettiiifolia* et *Dorstenia psilurus* (Moraceae) et hémisynthèses de quelques flavanones», Thèse de Doctorat de Troisième Cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé I.
- Katan et al.** (2003) Efficacy and safety of plant stérols in the management of blood cholesterol levels, *Mayo Clinic Proceedings*, **78**, 965-978.
- Khosla M.K., Sobti S. N., Atal C.K.** (1989) «Genetic studies on the inheritance pattern of different or essential oil constituents of *Ocimum* species», *Indian perfumer*, **29**, 151-160.

- Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Cadre J. P.** (1994) «Biognèse des monoterpènes : la chaîne isoprénique», *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, **133**,79-99.
- Law M.** (2000). Plant sterol and stanol margarines and health.*British Medical Journal*, **320**, 861-864.
- Maffo T.** (2006) « Contribution à l'étude phytochimique de *Buchholzia coriacea* : plante médicinale du Cameroun de la famille des Capparidaceae», Mémoire de D.E.A. Chimie Organique, Université de Yaoundé I, 9-10.
- Mahato S. B. et Kundu A. P.,** (1994) « ¹³C NMR Spectra of : pentacyclic triterpenoids A compilation and somme salient feature », *Phytochemistry*, **37**, 1517-1575.
- Manns D.** (1995) « Linalool and cineol type glucosides from *Cunilla spicata* », *Phytochemistry*, **39**, 1115-1118.
- Matasyoh L. G., Josphat C. M., Francis N. W., Miriam G. K., Anne W. T. M., Titus K. M.** (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *African Journal of Biotechnology*, **6**, 760-765.
- Nait N.S.** (2007) «Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes: *Pituranthos chloranthus* et *Marrubium vulgare*», Memoire Master Option Chimie Organique, Université El-Hadj Lakhdar-Batna, 7.
- Offiah V. N., Chikwendu U. A** (1999) « Antidiarrhoeal effect of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animals», *Journal of Ethno pharmacology*,. **68**, 327-330.
- Pauptin R.A. and Trotter J.** (1980) « Crystal structure of Camphor-1, 4-homoennol-p-bromobenzoate », *Canadian Journal of Chemistry*, **58**, 2805-2807.
- Pegel K.;** (1997). « The importance of sistosterol and sistosterolin in human and animal nutrition», *South African of Science*, **93**, 293-299
- Prajapati N. D., Purohit SS., Sharma AK., Kumar T.** (2003) Agro's dictionary of medinal plants, 1st ed. Agrobios : India
- Rabelo M., Souza EP., Soares P.M.G., et al.**(2003) Anti nociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; **36** ,521-524.
- Rasoanaivo L. H., Wadouachi A., Andriamampianina T. T., Andriamalala S. G., Razafindrakoto E. J. B., Raharisololalao A., Randimbivololona F.** (2014)

- Triterpenes and steroids from the stem bark of *Gambeya boiviniana* Pierre. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **3** (1), 68-72.
- Sigh S., Majumdar D.K., Yadav R. M.** (1996) «Chemical and pharmacological studies on fixed oil of *Ocimum sanctum* », *Indian Journal of Experimental Biology*, **34**, 1212-1215.
- Troupin G. et Bridson D. M.**, (1982) «Flore des plantes ligneuses du Rwanda» République du Rwanda N°21, 350.
- Verscheur G. D., Lognay G., Marlier M.** (2002) «Revue bibliographie: les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons», *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, **6**, 131-142.
- Viera R. F., Grayer R.J., Platon A. J.** (2003) «Chemical profiling of *Ocimum americanum* using external flavonoids», *Phytochemistry*, **63**, 555-567.
- Wansi D. J.** (2000) «Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales du Cameroun : *Gambeya africana* (Sapotaceae); *Drypetes molunduana* (Euphorbiacées)», Thèse de Doctorat de Troisième Cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, 21-85.
- Yimdjo M. C.**(2000) «Contribution à l'étude phytochimique d'une plante medicinale du Cameroun: *Cycliodiscus gabunensis* (Legumineuse Mimosoidee)», Mémoire de Maitrise Chimie Organique, Université de Yaoundé I, 12-13.