

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
ECOLE NORMALE SUPERIEURE
DEPARTEMENT DE CHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
HIGHER TEACHER TRAINING COLLEGE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ETUDE CHIMIQUE DES FEUILLES D'UNE PLANTE MEDICINALE DU CAMEROUN : CNESTIS FERRUGINEA (CONNARACEAE)

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de l'Enseignement
Secondaire deuxième grade
Mémoire de D.I.P.E.S II

Par :

MALEU Thérèse Christelle
Licenciée ès Chimie

Sous la direction
WANDJI Jean
Professeur



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

DEDICACE

A ma mère Jeanne TCHUENDEM

A mon fils Josias NKENMEGNE

CERTIFICATION

Je soussigné, **Pr WANDJI Jean**, certifie que les travaux effectués par l'étudiante **MALEU Thérèse Christelle**, matricule **09T0114**, portant sur l'étude chimique d'une plante médicinale du Cameroun: *Cnestis ferruginea* (Connaraceae), sont ses propres travaux et ont été faits sous ma supervision au Laboratoire de Produits Naturels et de Synthèse des Hétérocycles de l'Université de Yaoundé I.

WANDJI Jean

Professeur

Département de Chimie Organique

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à rendre grâce à DIEU tout puissant sans qui rien de tout ceci ne serait possible ; que la gloire lui revienne d'éternité en éternité.

Au moment où j'écris ce mémoire, je suis animée par la pensée de gratitude que je porte envers tous ceux qui n'ont pas manqué d'apporter leur pierre à l'édifice de ce travail.

Ces remerciements s'adressent :

- **Au professeur J. WANDJI**, Responsable du « Laboratoire de Produits Naturels et de Synthèse des Hétérocycles » et enseignant au Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I pour la confiance qu'il m'a accordée et l'accueil chaleureux au sein de son équipe de recherche. Son dynamisme, sa disponibilité, sa gentillesse, sa bonne humeur, ses précieux conseils, ses connaissances scientifiques m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches. Ce mémoire est le témoignage de ma reconnaissance et mon estime en vers ce professeur ;
- **Au Pr C. D. MBAZOA**, Maître de conférences à Université de Yaoundé I, pour les conseils, les encouragements, son attention toujours présente et l'intérêt qu'elle a porté à ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance ;
- **Au Dr S. V. FANNANG**, Chargée de Cours à l'université de Douala, pour les conseils et les encouragements malgré la distance qui nous sépare (Douala-Yaoundé). Qu'elle trouve ici le fruit de tous ses efforts ;
- **Au Professeur C. FON ABI Chef de Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieur de Yaoundé** pour ses multiples conseils et tous les efforts qu'il consent afin d'assurer la formation et la réussite des étudiants du Département ;
- **A tous les Enseignants du Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieur de Yaoundé**, dont les multiples conseils et encouragements m'ont réconforté sur ce chemin de l'initiation à la recherche ;
- **Au Botaniste Mr. V. NANA**, pour la récolte et l'identification de la matière végétale ;
- **Aux Professeurs S. Michel, C. LALLEMAND** et au Dr. **H. TRINH VAN-DUFAT** de la Faculté des Sciences Pharmaceutique et Biologique de

l'Université de Paris Descartes en France, pour l'enregistrement des spectres des composés isolés ;

- **Aux aînés de l'équipe de recherche: G. FOUDDJO, V. CHIMEZE, B. WAKEU, G. GAKOU, S. DJEUKENG, V. SILINOU**, pour leur chaleureux accueil, leurs conseils, leur sympathie, et pour l'esprit de convivialité qui règne au laboratoire ;
- **A mes camarades de promotion**, pour d'innombrables échanges fructueux tout au long de notre formation ;
- **A mes parents**, pour la confiance qu'ils ont à mon égard, les somptueux conseils et leur soutien qu'ils ne cessent de m'en procurer, leur présence à tout moment, pour m'avoir donné les moyens de faire les études de mon choix et élaborer mes projets de vie à travers le monde. Que ce mémoire leur apporte de plus en plus le zèle de continuer ainsi ;
- **A mes frères et sœurs**, pour l'entente, l'harmonie qui règne entre nous me permettant de travailler avec gaité ;
- **A tous mes oncles et tantes**, pour tout leur soutien moral et financier, et pour tous les efforts consentis à mon endroit ;
- **A mes cousins et cousines**, pour leurs encouragements et toute leur affection ;
- **A toute ma grande famille**, sans exception pour toutes leurs prières, leur soutien multiforme. Qu'ils trouvent ici le fruit de tous leurs efforts ;
- **A mes amis**, pour le soutien infailible dans les bons comme dans les mauvais moments, qui me suivent de près ou de loin dans les différentes étapes de ma vie et mes projets outremer. Comme précédemment je ne les cite pas mais ils se reconnaîtront. Je leur adresse mes plus affectueuses pensées.
- **Aux membres du groupe parole de Dieu du Centre Catholique Universitaire**, pour les conseils, les prières et les encouragements qu'ils n'ont cessé de porter à mon endroit.

A vous tous, croyez-moi s'il n'y a pas de places citées ici pour vous, il y en a assez dans mon cœur pour vous garder.

SOMMAIRE

DEDICACE	i
CERTIFICATION	ii
REMERCIEMENTS	iii
SOMMAIRE	v
RESUME	vii
ABSTRACT	viii
ABREVIATIONS ET SYMBOLES	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES SCHEMAS	xiii
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
I-1) APERÇU BOTANIQUE	5
I-1.1) LES CONNARACEAE	5
I-1.2) LE GENRE <i>CNESTIS</i>	5
I-1.3) L'ESPECE <i>CNESTIS FERRUGINEA</i>	5
I-1.4) REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE L'ESPECE <i>CNESTIS FERRUGINEA</i> EN AFRIQUE	7
I-2) USAGES DE L'ESPECE <i>CNESTIS FERRUGINEA</i>	8
I-2.1) En médecine traditionnelle.....	8
I-2.2) Dans le domaine alimentaire.....	8
I-3) TRAVAUX CHIMIQUES ANTERIEURS SUR L'ESPECE <i>CNESTIS</i> <i>FERRUGINEA</i>	8
I-3.1) ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES	8
I-3.2) CAS PARTICULIER DES ACIDES CINNAMIQUES	11
I-3.3) DIFFERENTS COMPOSES PHENOLIQUES ISOLES DE <i>CNESTIS</i> <i>FERRUGINEA</i>	14
I-3.4) ETUDE DES TERPENOIDES	16
I-4) INTERETS BIOLOGIQUES DE <i>CNESTIS FERRUGINEA</i>	23

I-4.1) Activité anti-oxydante.....	24
I-4.2) Activité anti-diabétique.....	24
I-4.3) Activité anti-microbienne	24
I-4.4) Activité anti-fongique	24
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION.....	26
II-1) RESULTATS... ..	27
II-2) IDENTIFICATION DES COMPOSES ISOLEES DES FEUILLES DE CNESTIS FERRUGINEA.....	29
II-2.1) ELUCIDATION DE CFf ₅	29
II-2.2) Identification de CFf ₃	36
II-2) DISCUSSION.....	40
INTERETS PEDAGOGIQUES	41
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	44
CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE	46
III-1) APPAREILLAGE.....	47
III-2) MATERIEL VEGETAL	47
III-2.1) Obtention de la matière végétale	47
III-2.2) Extraction et isolement des composés de Cnestis ferruginea.....	48
III-2.3) Traitement des séries et des fractions.....	49
III-3) Caractéristiques physico-chimiques des composés isolés.....	51
III-3.1) Caractéristiques de CFf ₅	51
III-3.2) Caractéristiques de CFf ₃	51
III-4) TEST CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLEES	52
III-4.1) Test de LIBERMANN BURCHARD	52
III-4.2) Test de MOLISH	52
III-4.3) Test au chlorure ferrique	53
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54

RESUME

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'étude chimique des feuilles d'une plante médicinale Camerounaise: *Cnestis ferruginea*, une plante de la famille des Connaraceae. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour lutter contre plusieurs maladies notamment le diabète, la gonorrhée, les infections dentaires etc...

Ses feuilles séchées, ont subi une macération dans le mélange chlorure de méthylène-méthanol (1/1) pendant 72 heures. L'investigation chimique de cet extrait grâce aux méthodes chromatographiques usuelles a conduit à l'isolement et à la purification de cinq composés indexés de Cff₁ à Cff₅.

Sur la base des méthodes d'analyses spectroscopiques usuelles à une dimension (RMN¹H, RMN¹³C et DEPT) et à deux dimensions (COSY, HMBC, HMQC), deux de ces composés indexés Cff₅ et Cff₃ ont été caractérisés et identifiés respectivement à un dérivé d'acide cinnamique, **(1E, 6E)-1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl) -4, 5-dihydroxyhepta-1,6-diène-3-one** et un glucoside de stérol, **(24 R)-sito-5-ène-3-O-β-D-glucopyranoside**.

Mots clés : *Cnestis ferruginea*, Connaraceae, acide cinnamique, glucoside de stérol

ABSTRACT

The work presented in this dissertation focuses on the chemical study of the leaves of a medicinal plant of Cameroon: *Cnestis ferruginea*, plant of the Connaraceae family. It is used in traditional medicine to fight against many diseases including diabetes, gonorrhoea, dental infections etc...

Its dried leaves underwent the maceration in the mixture of methylene chloride-methanol (1/1) in 72 hours. The chemical investigation of this extract using the usual chromatographic methods led to the isolation and purification of five compounds indexed Cff₁ to Cff₅.

Based on the usual one dimensional (¹H NMR, ¹³C NMR and DEPT) and two-dimensional (COSY, HMBC, HMQC) spectroscopic analyses, two of these compounds indexed Cff₅, Cff₃ were characterized and identified respectively to be a derivative of cinnamic acid, **(1E, 6E) -1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) -4, 5-dihydroxyhepta-1,6-dien-3-one** and a sterol glucoside, **(24 R) -sito-5-ene-3-O-β-D-glucopyranoside**,

Keys words: *Cnestis ferruginea*, Connaraceae, cinnamic acid, sterol glucoside

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ATP : Adénosine triphosphate

CC : Chromatographie sur Colonne

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CFf : *Cnestis ferruginea* feuille

CoA : Coenzyme A

COSY: Correlation Spectroscopy

d : Doublet

dd : Doublet dédoublé

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HMG : β -Hydroxy- β -méthyl-glutaryl

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

Hz: Hertz

IPP: Isopentenylpyrophosphate

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

J : Constante de couplage

m: Multiplet

MHz : Mégahertz

mL : Millilitre

NADPH : Nicotinamide Adémine Dinucléotide Phosphate

ppm : Partie Par Million

RMN ¹³ C : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone

RMN ¹ H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

S : Singulet

UV : ultraviolet

δ : Echelle de déplacement chimique

μm : Micromètre

LISTE DES FIGURES

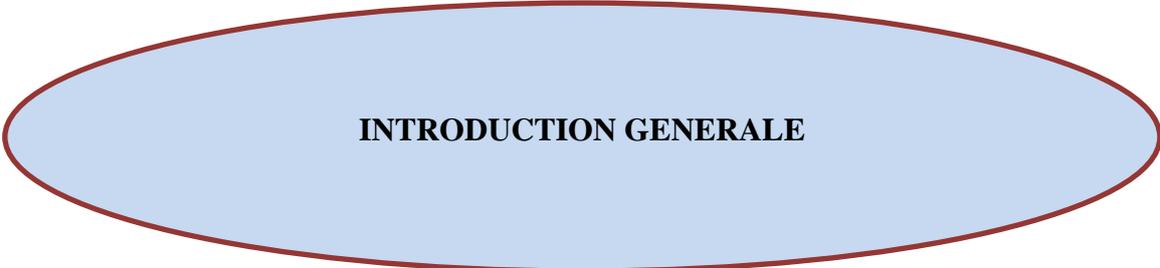
Figure 1 : Différentes parties de <i>Cnestis ferruginea</i>	6
Figure 2 : Feuilles et fruits de <i>Cnestis ferruginea</i> à la récolte.....	7
Figure 3 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD 100 MHz) de CFf_5	29
Figure 4 : Spectre HMQC (CD_3OD 100 MHz) de CFf_5	30
Figure 5 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD 400 MHz) de CFf_5	31
Figure 6 : Spectre COSY (CD_3OD 400 MHz) de CFf_5	31
Figure 7 : Spectre HMBC (CD_3OD 1000 MHz) de CFf_5	34
Figure 8 : Spectre RMN ^1H (pyridine- d_6 400 MHz) de CFf_3	37
Figure 9 : Spectre RMN ^{13}C (pyridine- d_6 100 MHz) de CFf_3	38
Figure 10 : Spectre DEPT 135 de CFf_3	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification scientifique de <i>Cnestis ferruginea</i>	6
Tableau II : Répartition géographique de <i>Cnestis ferruginea</i> en Afrique	7
Tableau III : Quelques composés phénoliques isolés de <i>Cnestis ferruginea</i>	15
Tableau IV : Quelques triterpènes isolés de <i>Cnestis ferruginea</i>	20
Tableau V : Quelques stérols isolés de <i>Cnestis ferruginea</i>	22
Tableau VI : Autres composés isolés de <i>Cnestis ferruginea</i>	23
Tableau VII : Données de RMN ¹³ C (CD ₃ OD 100 MHz) et RMN ¹ H (CD ₃ OD 400 MHz) de CF _f ₅	36
Tableau VIII : Données de RMN ¹³ C (Pyridine-d ₆ 400 MHz) de CF _f ₃	39
Tableau IX : Chromatogramme du fractionnement de CF	48
Tableau X : Chromatogramme du fractionnement de la série D	50

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Biosynthèse des composés phénoliques	10
Schéma 2 : Biosynthèse de l'acide cinnamique et ses dérivés	12
Schéma 3 : Equilibre entre les formes <i>trans</i> - et <i>cis</i> - de l'acide cinnamique.....	13
Schéma 4 : Equation générale de synthèse de l'acide cinnamique	13
Schéma 5 : Mécanisme de synthèse de l'acide cinnamique	14
Schéma 6 : Biosynthèse des différentes classes des terpènes	17
Schéma 7 : Biosynthèse du squalène.....	18
Schéma 8 : Cyclisation du squalène	19
Schéma 9 : Déméthylation des triterpènes en C-4	22
Schéma 10 : Protocole d'extraction et d'isolement des composés des feuilles de <i>Cnestis ferruginea</i>	28



INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes pour se soigner. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle (Newmann *et al.*, 2007). Seul un tiers des médicaments commercialisés possède donc une origine purement synthétique. De plus, sur les espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2002), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

Malheureusement, l'apparition de nouveaux types de tumeurs, de microbes, de virus résistants aux traitements actuels, font de la recherche de nouvelles molécules bioactives un réel sujet d'actualité. De nos jours, la recherche de nouvelles espèces végétales susceptibles de produire des substances naturelles d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique passe par diverses étapes chronologiques. Il faut dans un premier temps réaliser un inventaire des plantes, de leurs éventuelles utilisations en médecine traditionnelle, les récolter et confirmer leur identification avant d'en étudier les propriétés biologiques. L'étude des capacités bioactives de ces végétaux consiste par la suite en une série de tests biologiques à l'encontre de diverses cibles susceptibles de provoquer des pathologies (bactéries, champignons, cellules cancéreuses etc...) ou d'intervenir dans des processus biochimiques à l'origine du vieillissement de la peau par exemple (élastase, xanthine oxydase).

C'est dans ce sens que le Laboratoire de Produits Naturels et de Synthèse des Hétérocycles (L.P.N.S.H) de l'Université de Yaoundé I, en collaboration avec plusieurs équipes multidisciplinaires nationales et internationales et les capacités matérielles et humaines au sein de ce laboratoire, nous ont permis de mettre en place la même stratégie de recherche. Ce travail est consacré à l'exploitation des feuilles de *Cnestis ferruginea* une plante de la famille des Connaraceae, une espèce très répandue en Afrique et dont la majeure partie se développe dans les zones tropicales (Lewis *et al.*, 2003). Ce choix est fait suite à des multiples utilisations de cette plante en médecine traditionnelle en Afrique, notamment dans le traitement du diabète, de la gonorrhée et le mal de gencive et de plus aucune étude chimique de cette plante n'a encore été explorée au Cameroun.

Inscrit dans ce contexte général, ce travail vise à évaluer les différents métabolites secondaires contenus dans cette plante. Pour ce faire, nous nous sommes proposés d'isoler, de purifier, de caractériser les composés isolés.

Etude chimique de Cnestis ferruginea

Après une présentation botanique de *Cnestis ferruginea* et de sa place dans les classifications phylogéniques, une synthèse bibliographique permettra de décrire les principales études chimiques antérieures relatives à cet espèce afin d'introduire la partie principale de ce travail. Cette partie concerne en effet la description des molécules obtenues lors de l'étude chimique des feuilles de *Cnestis ferruginea*. Le dernier volet est consacré à la présentation des techniques chromatographiques, ainsi qu'aux différents protocoles employés pour les tests caractéristiques.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I-1) APERÇU BOTANIQUE

I-1.1) LES CONNARACEAE

La famille des Connaraceae est une famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 350 espèces réparties en 16 genres dont environ 180 espèces des régions tropicales d'Afrique et d'Asie (Wiert, 2006). Ce sont des arbres, des arbustes, ou des lianes des zones tropicales à feuilles composées, imparipennés, parfois réduites à des épines sans stipules. La classification phylogénétique place cette famille dans l'ordre des oxalides. Plusieurs genres sont rencontrés en Afrique tels que : *Connarus*, *Aagelaea*, *Burtia*, *Cnestidium*, *Rourea* et *Cnestis* qui a fait l'objet de notre travail. (Wiert, 2006).

I-1.2) LE GENRE CNESTIS

Les plantes du genre *Cnestis* sont généralement des lianes ou des arbustes lianescents de petite taille. Les tiges peuvent atteindre 4 cm de diamètres, finement striées et lenticellées, sans latex. Les feuilles sont composées de 5 à 9 paires de folioles dont les rachis peuvent atteindre 25 cm de long (Fleischmann, 1983). Les fleurs sont généralement hermaphrodites, pentamères ou parfois tétramères, avec une andocée diplostémone. Elles comportent également 10 étamines et 5 carpelles couverts de poils. Les fruits sont des follicules piriformes avec reste du périanthe persistant à la base. Les graines sont une seule par follicule, elliptique et noirâtre ornée d'un arille à la base. Le genre *Cnestis* comprend environ 13 espèces parmi lesquelles : *Cnestis glabra*, *Cnestis palala*, *Cnestis polyphylla*, *Cnestis urens*, *Cnestis ferruginea* etc (Fleischmann, 1983). La suite de nos recherches a porté sur l'étude de cette dernière espèce.

I-1.3) L'ESPECE CNESTIS FERRUGINEA

Cnestis ferruginea encore localement appelé *Gboyin Akara-aje* au NIGERIA ; *omu-aje* par les YORUBA ; *Ukpe Ibi-tka* par les BINIS ; *Usiere-ebua* par les EFIKS (Irvine, 1961), est un petit amas d'arbuste quelques fois grimpant avec 2,5 m de haut. Cette plante dispose d'une large diffusion en Afrique et est spécialement trouvée dans les broussailles à feuilles caduques. Les fruits sont de couleur rouge-orangé avec des poils veloutés sur le follicule. Les feuilles ferrugineuses pubescentes, possèdent dix pouces de long avec huit paires de folioles et des fleurs blanches qui portent des sépales ferrugineuses (Lebrun et al., 1993).

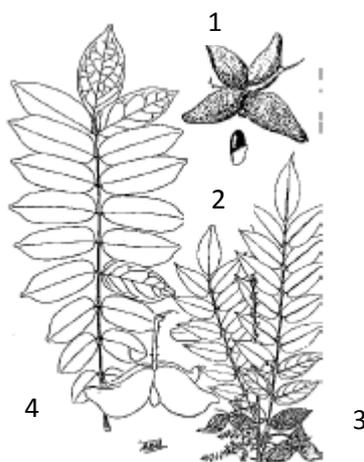
Etude chimique de *Cnestis ferruginea*

Tableau I : Classification scientifique de *Cnestis ferruginea* (Lebrun et al., 1993)

Règne	Plantea
Sous-embranchement	<i>Angiospermea</i>
Classe	<i>Eudicots</i>
Sous-classe	<i>Rosidea</i>
Ordre	<i>Oxalidales</i>
Famille	<i>Connaraceae</i>
Genre	<i>Cnestis</i>
Espèce	<i>Cnestis ferruginea</i>

Nom binomial: *Cnestis ferruginea*

Nom vernaculaire : *Wusien Blakassa*



Cnestis ferruginea: 1(fruit); 2 (graine); 3 (Rameau avec inflorescence) ; 4 (feuille)

(Lebrun et al., 1993)

Figure 1: Différentes parties de *Cnestis ferruginea*



Feuilles avec fluorescent

Branches feuilletés avec des fruits

Figure 2 : Feuilles et fruits de *Cnestis ferruginea* à la récolte par Maleu en 2013

I-1.4) REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE L'ESPECE *CNESTIS*

FERRUGINEA EN AFRIQUE

L'espèce *Cnestis ferruginea* a été découverte pour la première fois en Afrique ; elle est connue comme meilleure des plantes médicinales pour son usage en médecine traditionnelle, on la retrouve généralement dans les zones tropicales (tableau II) (Lewis et al., 2003).

Tableau II : Répartition géographique de *Cnestis ferruginea* en Afrique (Herbier Nationale du Cameroun)

Pays	Localité
Sénégal	Mampalago, casamance
Gambie	Koto
Portugal	Santo
Libie	Monnovia, balleyela
Côte d'ivoire	Abidjan
Cap vert	Kumasi
Togo	Lomé
Dahomey	Burton
Nord du Nigéria	Patti lokaja
Sud du Nigéria	Idanre
Cameroun	Kribi

I-2) USAGES DE L'ESPECE CNESTIS FERRUGINEA

Cnestis ferruginea est une plante à usages multiples par les populations. Ces usages s'étendent sur plusieurs parties de la plante et sont enregistrés dans plusieurs domaines à l'instar de la médecine traditionnelle, l'agroalimentaire.

I-2.1) En médecine traditionnelle

Dans le domaine de la médecine traditionnelle les différentes parties de l'espèce s'illustrent de façon remarquable. En effet, en Afrique de l'Ouest, le jus de fruit amer de cet espèce est largement utilisé pour le traitement des infections dentaires, et de la peau (Boakye et *al.*, 1975), est aussi appliqué pour le traitement de morsure de serpent au Nigeria et au Ghana (Dalziel, 1955). Ses racines et ses feuilles sont employées dans le traitement de la dysménorrhée (Hutchinson et *al.*, 1958). Une décoction des écorces est utilisée dans le traitement des infections de la gencive et également celle des autres parties de la plante est aussi utilisée pour aider les enfants faibles à marcher (Dalziel, 1955). Les fruits sont utilisés contre les pathologies des yeux comme la conjonctivite et contre plusieurs autres maladies comme les bronchites ou la tuberculose (Kerharo, 1974; Jongkind et *al.*, 1989).

I-2.2) Dans le domaine alimentaire

L'extrait des fruits frais écrasés ou bouillis avec le vin de palme est habituellement consommé par la population au Nigeria et au Ghana (Dalziel, 1955). C'est ainsi que certains chercheurs s'y sont intéressés et y ont fait des études.

I-3) TRAVAUX CHIMIQUES ANTERIEURS SUR L'ESPECE CNESTIS FERRUGINEA

L'espèce *Cnestis ferruginea* contient en grande majorité les composés phénoliques et les terpénoïdes dont nous allons faire une étude (Ames et *al.*, 1993).

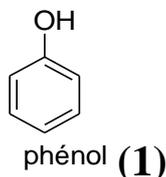
I-3.1) ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES

I-3.1.1) Définition

Les composés phénoliques sont des substances naturelles appartenant aux métabolites secondaires. Ils correspondent à une large série des structures chimiques qui ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant un hydroxyle (phénol simple (1) ou plusieurs groupements hydroxyles).

Les polyphénols présentent alors des structures très variées. Il existe des molécules de structure très simple, de forme phénolique avec un cycle benzénique sur lequel sont fixés des

groupements hydroxyles : les acides coumariques, caféiques, féruliques, cinnamiques. Il existe également des composés plus complexes qui sont les flavonoïdes et les anthocyanes. Leur structure est toujours constituée de cycles benzéniques substitués par des groupements hydroxyles.



I-3.1.2) Classification

D'après Macheix et Collaborateurs, les composés phénoliques sont regroupés en plusieurs classes qui se différencient par :

- Les voies biosynthétiques ;
- La complexité du squelette de base (de simple C₆ à des formes polymérisées) ;
- Les degrés de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation ...).
- Liaison possible de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, et d'autres métabolites secondaires qui peuvent être des composés phénoliques).

I-3.1.3) Biosynthèse des composés phénoliques par la voie d'acide shikimique

La plupart des molécules phénoliques chez les végétaux sont formées à partir des sucres simples issus du métabolisme primaire par la voie de l'acide shikimique. La désamination de la phénylalanine donne naissance au précurseur direct des phénols : l'acide cinnamique qui conduit à de nombreuses classes de composés phénoliques selon le schéma 1 ci-dessous (Macheix et *al.*, 2005).

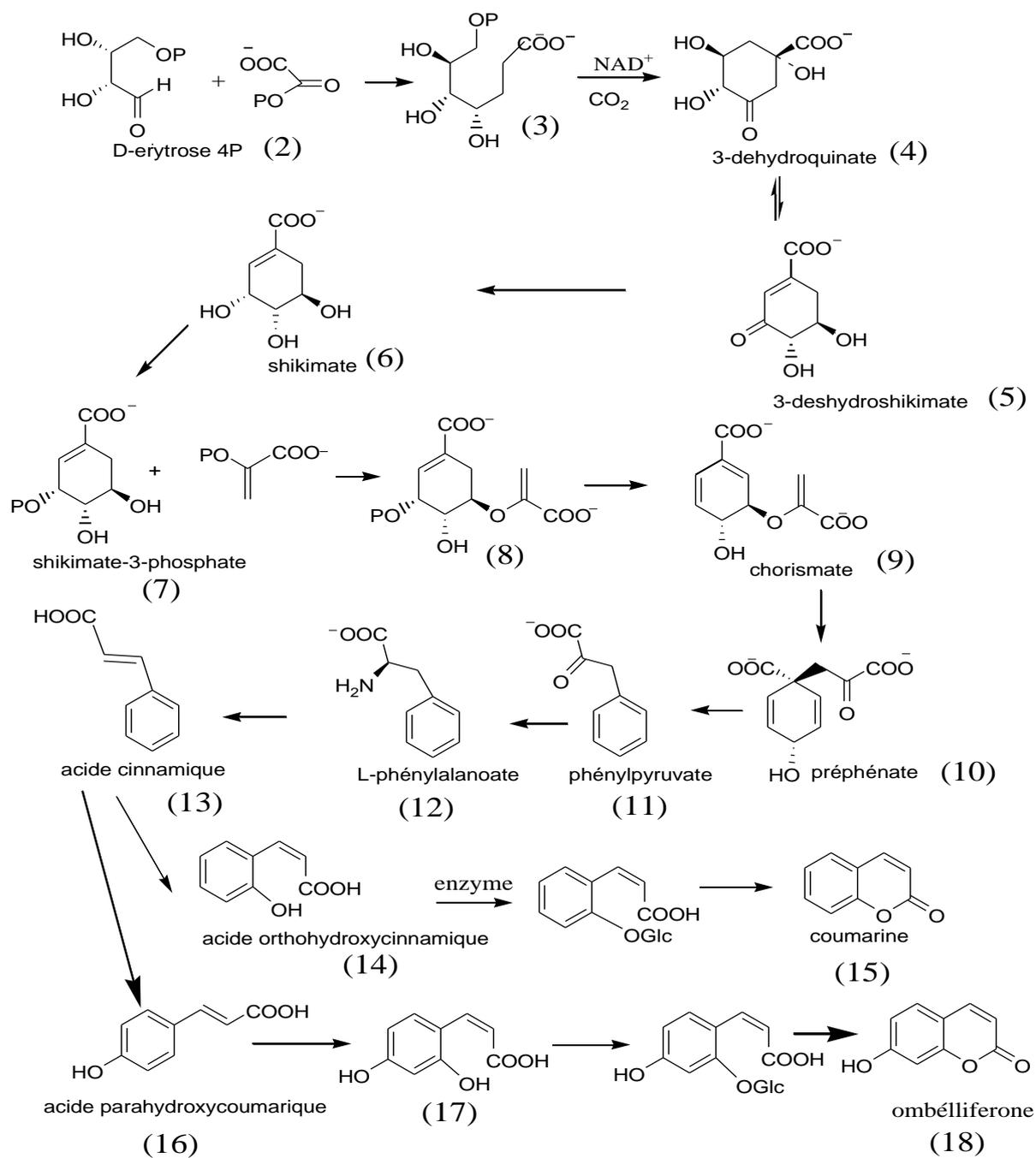
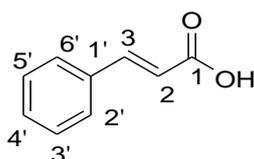


Schéma 1 : Biosynthèse des composés phénoliques

I-3.2) CAS PARTICULIER DES ACIDES CINNAMIQUES

I-3.2.1) Définition

L'acide cinnamique de formule brute $C_9H_8O_2$ est un acide organique qui se présente sous la forme d'une poudre blanche inodore, avec une faible solubilité dans l'eau (Macheix et *al.*, 2005)..



(13)

Structure plane de l'acide cinnamique : acide (E)-3-phényl-prop-2-énoïque

L'acide cinnamique a été découvert et purifié par Péligot et Dumas en 1834. Il est obtenu à partir de l'extrait de la cannelle ou de certains arbustes balsamiques. Ses esters sont présents dans le styrax. Il est principalement utilisé dans l'industrie du parfum, où ses esters de méthyle, d'éthyle et de benzyle sont odorants et recherchés. Il sert aussi pour la composition d'exhausteurs de goût, d'indigo synthétique et de certains produits pharmaceutiques. L'acide cinnamique est aussi un intermédiaire dans la voie de biosynthèse de l'acide shikimique, ainsi que de tous les phénylpropanoïdes.

I-3.2.2) Origine biosynthétique

L'acide cinnamique est biosynthétisé par une grande partie des végétaux. C'est un des éléments de la voie des phénylpropanoïdes; il est produit par la phénylalanine. Il est ensuite transformé en acide paracoumarique par l'action de la cinnamate 4-hydroxylase, qui conduit à une grande série d'autres composés que nous avons cités plus haut. Biosynthèse de l'acide cinnamique simple par voie shikimique (Herbert, 1989).

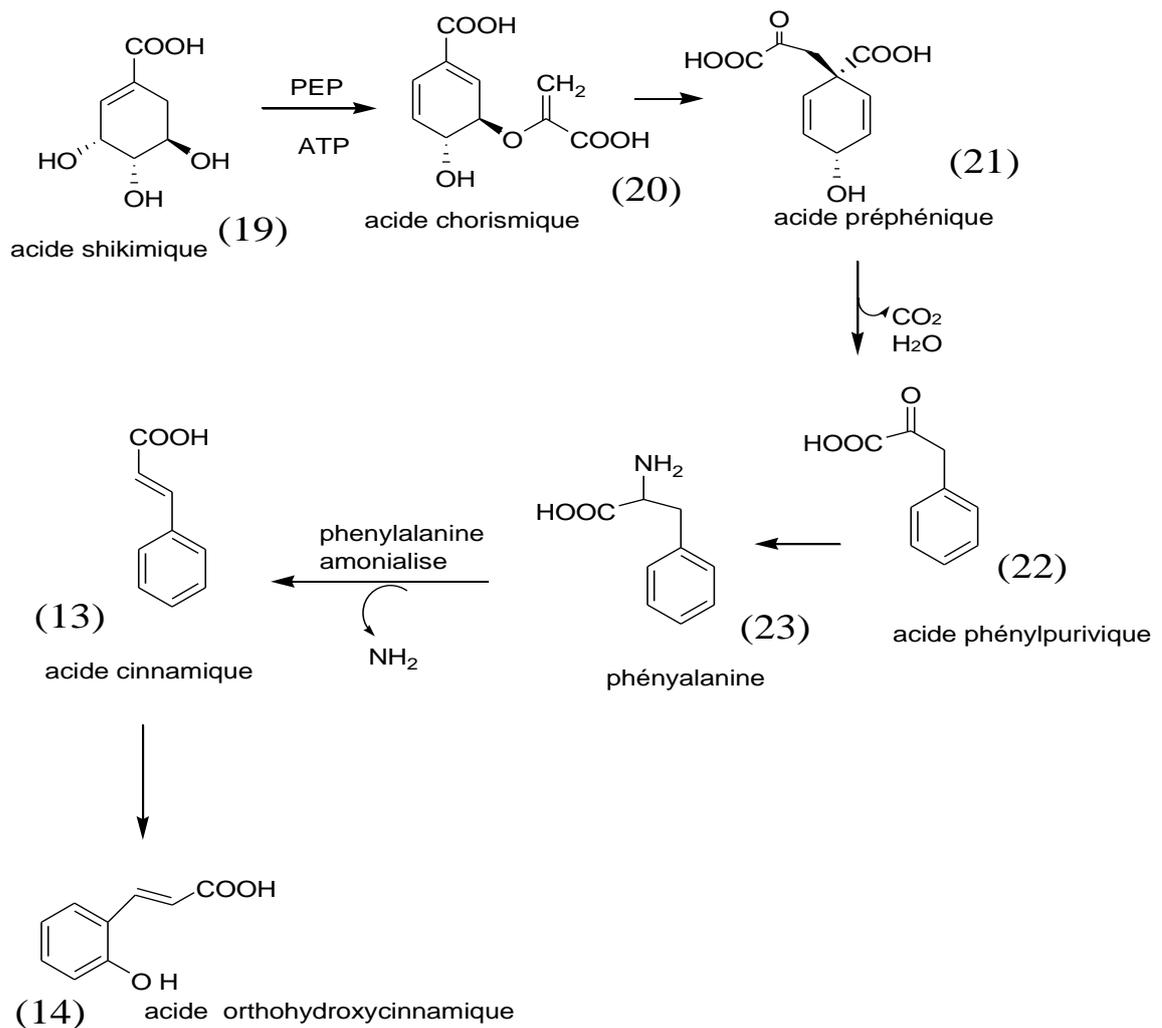


Schéma 2 : Biosynthèse de l'acide cinnamique et ses dérivés

I-3.2.3) Propriétés physique de l'acide cinnamique

L'acide cinnamique se présente sous deux formes isomériques *trans* et *cis* ou (*E* et *Z* en nomenclature IUPAC). L'isomère *trans* est synthétisé dans les plantes à partir de la L-phénylalanine et constitue le précurseur d'un grand nombre de composés phénoliques.

L'isomère *cis* a été synthétisé et ses propriétés biologiques étudiées dès les années 1935. Il possède des propriétés de régulation de la croissance des plantes (activités d'élongations-promotions, inhibition de la croissance des racines de céréales, rôle dans le murissement des bananes ou la germination des graines). Ces nombreuses activités biologiques l'opposent à la forme *trans* qui est considérée comme physiologiquement peu active (Waishing, 2005). La forme *cis* était considérée comme très rare dans la nature, jusqu'en 2003 où elle fut trouvée

dans le chou *Brassica parachinensis* (Yin et al., 2003). D'autres formes *cis* ont été trouvées chez les phénylpropanoïdes : les acides *cis* p-coumarique, *cis* férulique, et *cis* caféique.

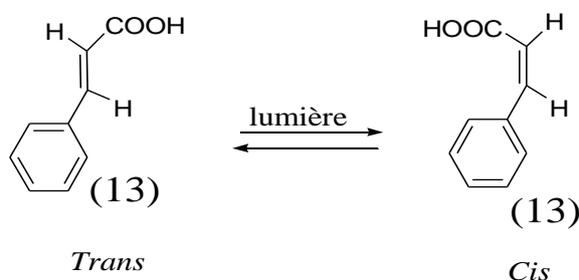


Schéma 3 : Equilibre entre les formes *trans*- et *cis*- de l'acide cinnamique

I-3.2.4) Synthèse de l'acide cinnamique

De nombreuses méthodes de synthèse de ce composé important ont été mises au point. La synthèse la plus ancienne a été réalisée en 1856 par Cesare Bertagnini à partir du benzaldéhyde et du chlorure d'éthanoyle. On peut également le synthétiser à partir de la réaction de Döbner-Knövenagel (Vollhart, 2004) dont l'équation générale et le mécanisme sont illustrés dans les schémas 4 et 5 ci-dessous.

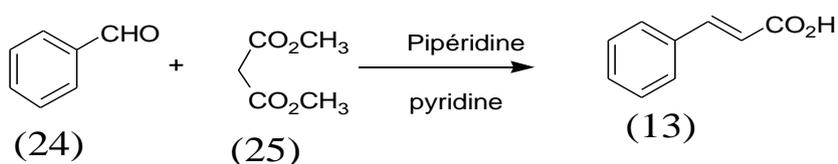


Schéma 4 : Equation générale de synthèse de l'acide cinnamique

Mécanisme

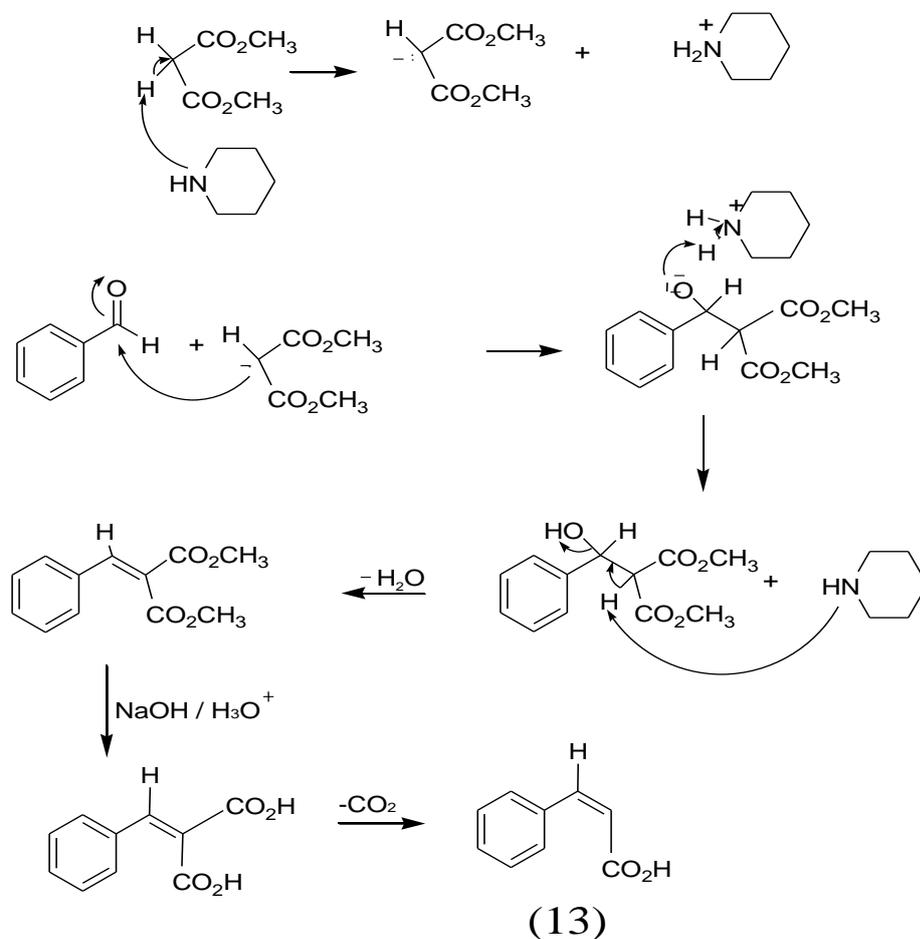


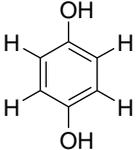
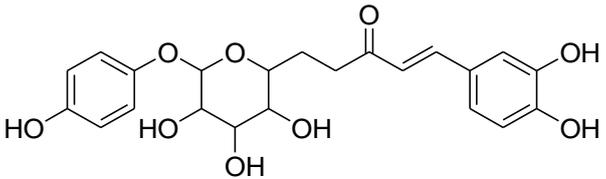
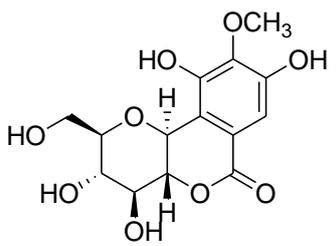
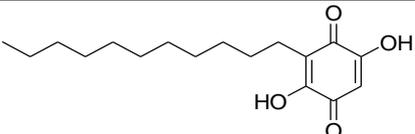
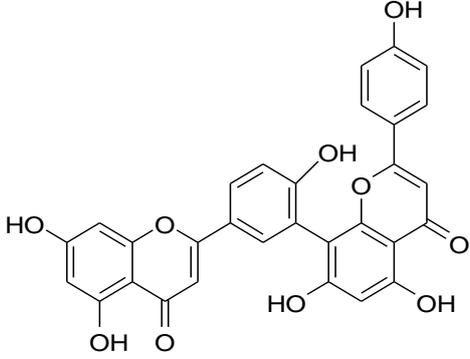
Schéma 5 : Mécanisme de synthèse de l'acide cinnamique

I-3.3) DIFFERENTS COMPOSES PHENOLIQUES ISOLEES DE *CNESTIS*

FERRUGINEA

L'étude chimique de *cnestis ferruginea* a révélé la présence de la coumarine, des flavonoïdes, para-hydroxyphénol dans diverses parties de la plante comme dans le tableau III suivant (Olugbade et *al.*,1982).

Tableau III : Quelques composés phénoliques isolés de *cnestis ferruginea*

Structures et Noms	Partie de la Plante	Sources
 <p style="text-align: center;">Para-hydroxyphénol (26)</p>	Feuille	(Adisa et <i>al.</i> , 2011)
 <p style="text-align: center;">robustaside ou 6'- (3''-4''-dihydroxycinnamoyl) (27)</p>		
 <p style="text-align: center;">Bergenin (28)</p>	Tige	(Olugbade et <i>al.</i> ,1982)
 <p style="text-align: center;">Rapanone (29)</p>		
 <p style="text-align: center;">amentoflavone (30)</p>	Racine	(Rampe et <i>al.</i> , 2004)

I-3.4) ETUDE DES TERPENOIDES

I-3.4.1) Définition

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. Leur formule brute est $(C_5H_8)_n$ dont n peut prendre les valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (exemple de caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.)

I-3.4.2) Classification

Dans le règne végétal les terpènes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base isoprénique. Ils existent sous forme d'hémiterpènes (C_5), monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), triterpènes (C_{30}), tétraterpènes (C_{40}), etc... (Dewick, 2002 ; Banthorpe, 1991) comme résumé dans le schéma 6 ci-après.

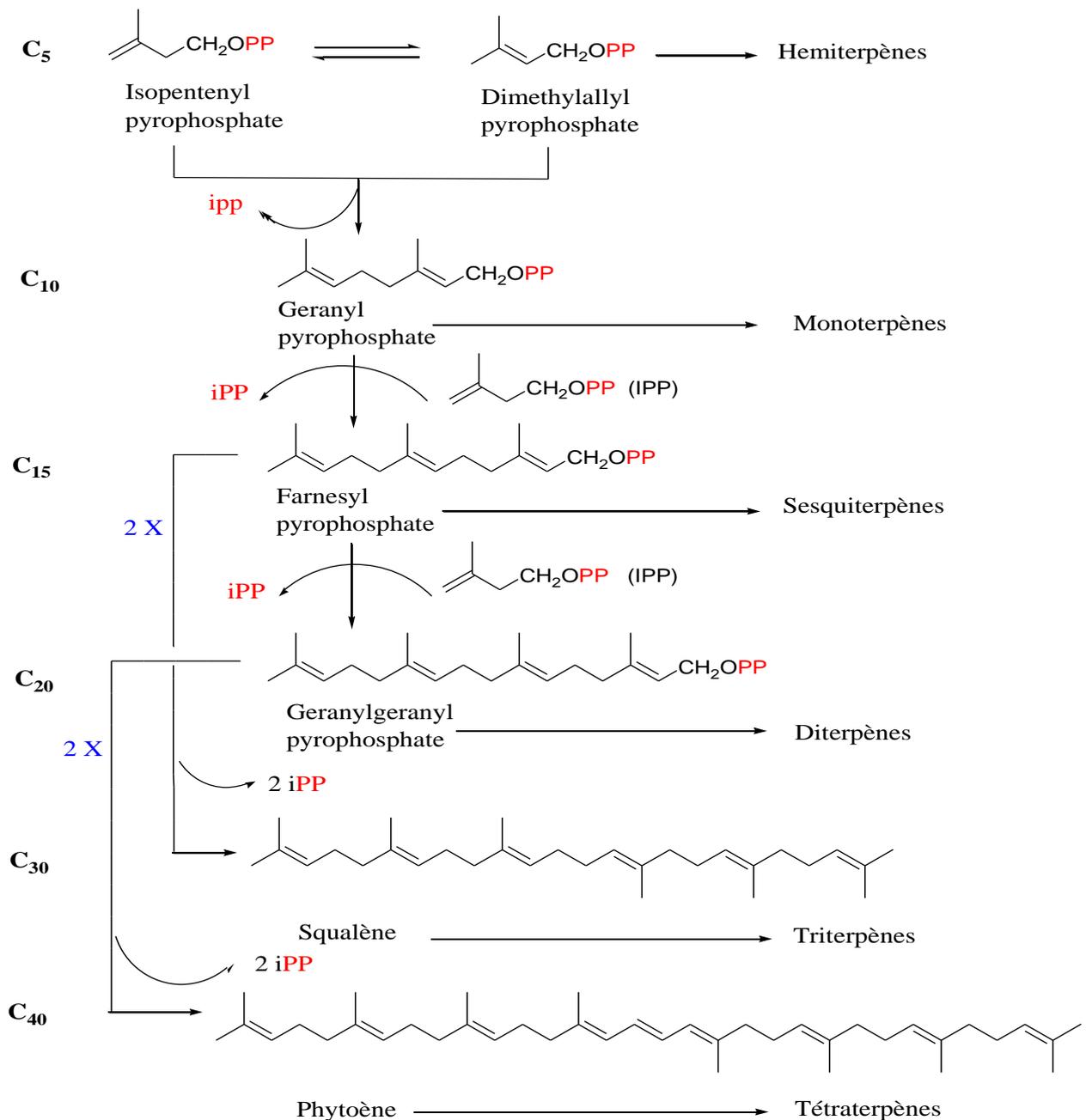
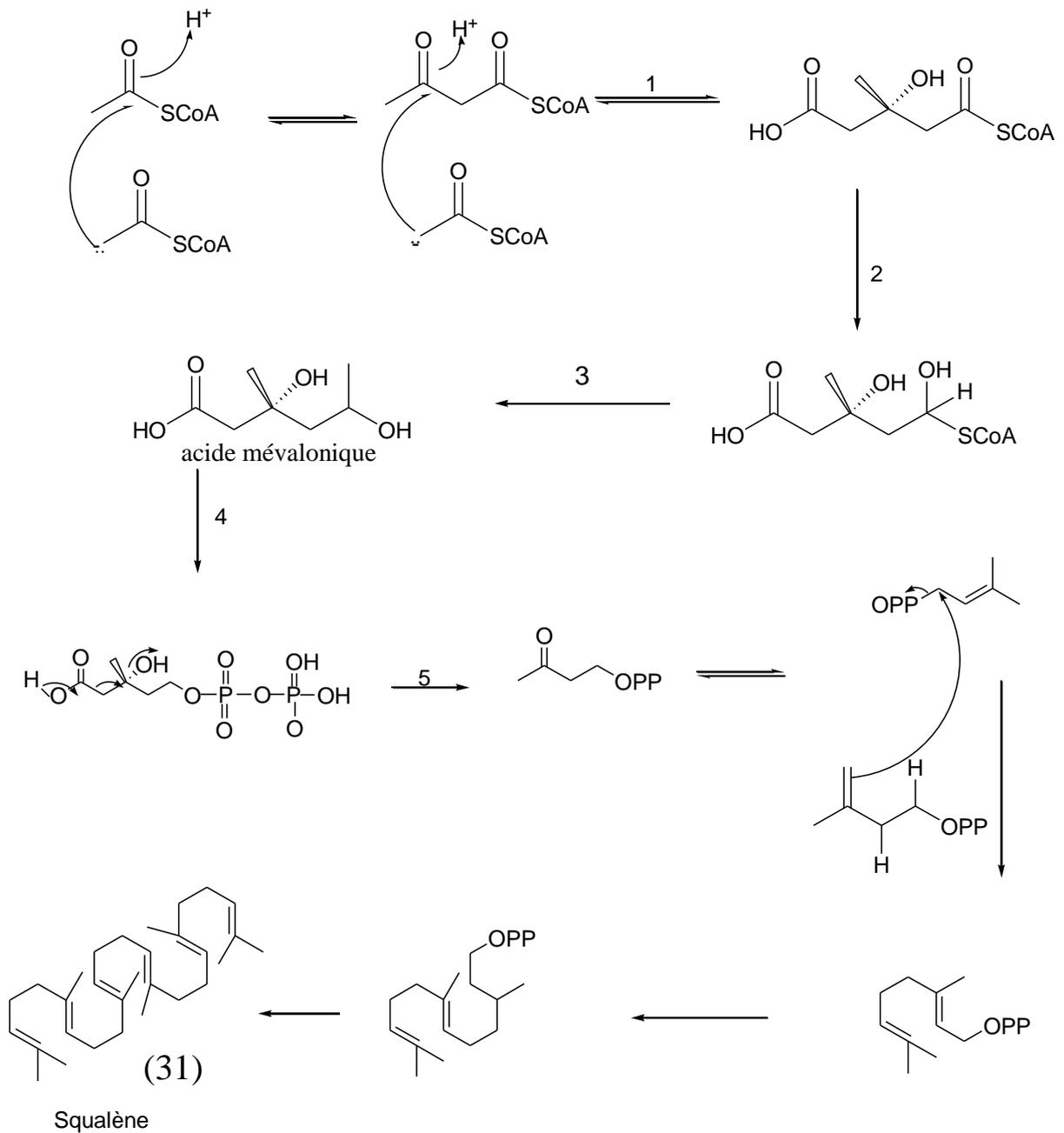


Schéma 6 : Biosynthèse des différentes classes des terpènes

I-3.4.3) Biosynthèse des triterpènes

Les triterpénoïdes forment un groupe de métabolites secondaires très répandus dans les végétaux. Ce sont des composés renfermant trente atomes de carbones dans leur squelette principal et résultant de la cyclisation du (3S)-2,3-époxy squalène ou du squalène lui-même obtenu par voie mévalonique, dont la biosynthèse est présentée ci-dessous (schéma 7) (Dewick, 2002 ; Banthorpe, 1991).



- 1) HMG CoA synthétase
- 2) NADPH, HMG CoA réductase
- 3) NADPH
- 4) 2 ATP
- 5) ATP -CO₂

Schéma 7 : Biosynthèse du squalène

La cyclisation du squalène (31) ou de 2,3-époxy squalène (34) conduit aux composés triterpéniques de squelettes tétracycliques ou pentacycliques comme présenté dans le schéma 8 ci-contre (Bruneton, 2009)

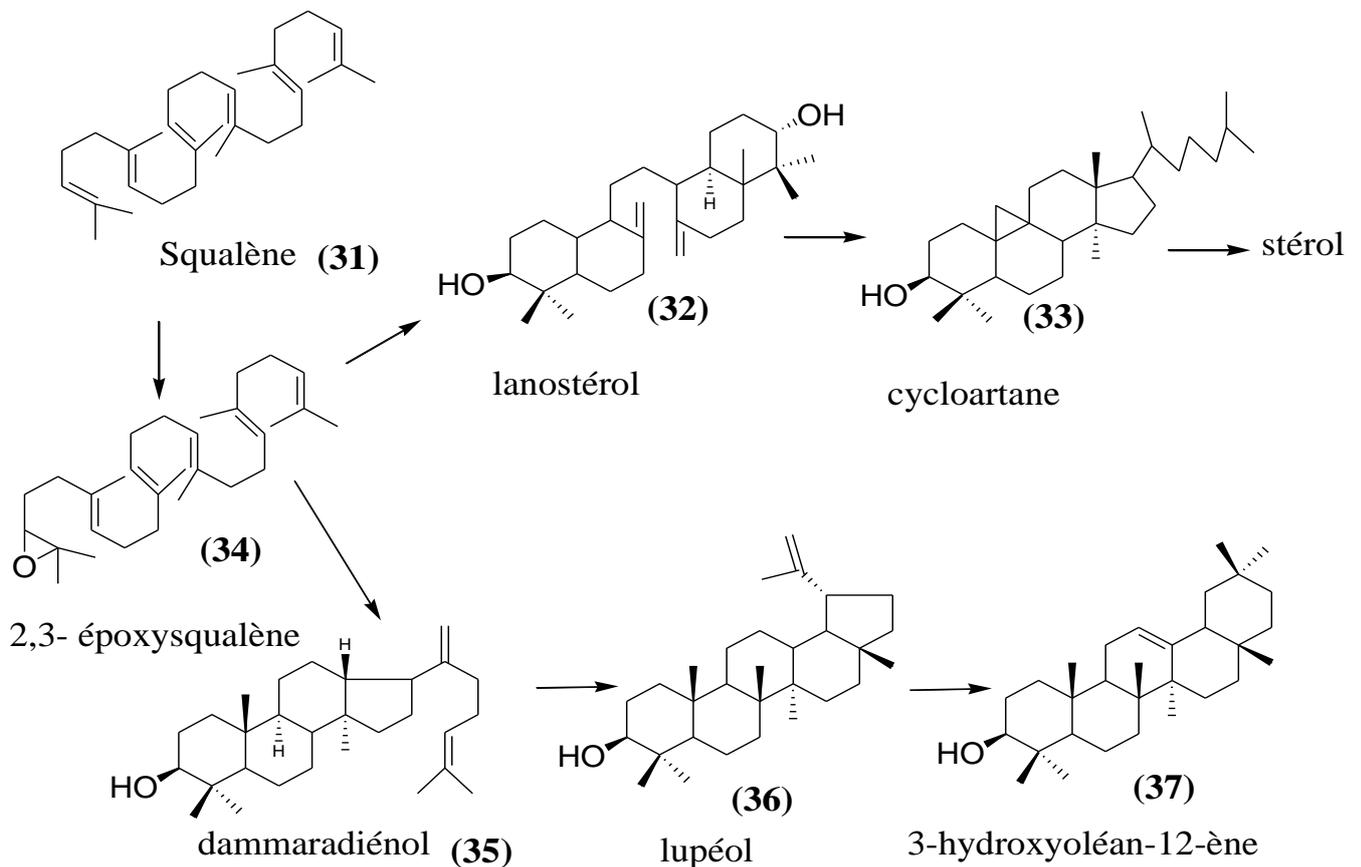


Schéma 8 : Cyclisation du squalène

Les études chimiques recensées de *cnestis ferruginea* révèlent principalement les triterpènes pentacycliques regroupés dans le tableau IV suivant.

Tableau IV : Quelques triterpènes isolés de *cnestis ferruginea*

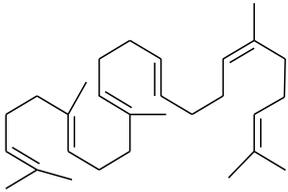
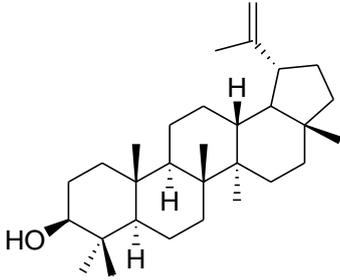
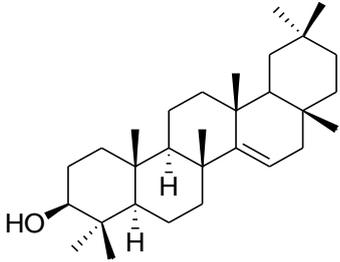
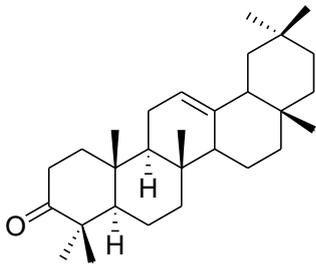
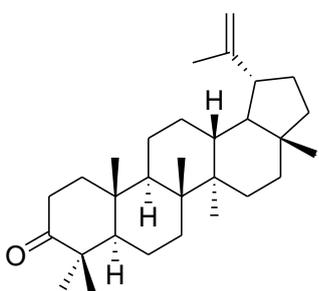
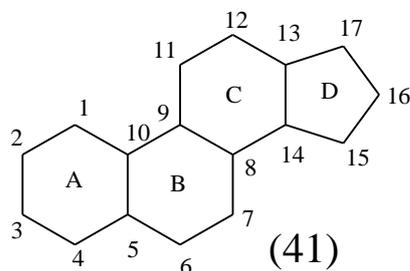
Structures et Noms	Partie de la Plante	Sources
 <p style="text-align: center;">Squalène (31)</p>	Racine	(Olugbade et al., 1982)
 <p style="text-align: center;">Lupéol (36)</p>	Ecorce	(Oliveira et al., 2010)
 <p style="text-align: center;">Taraxérol (38)</p>		
 <p style="text-align: center;">β-amyrénone (39)</p>	Branche	

Tableau IV (suite et fin): Quelques triterpènes isolés de *cnestis ferruginea*

 <p>Lupénone (40)</p>	Feuille	(Oliveira et al., 2010)
--	---------	-------------------------

I-3.4.4) Biosynthèse des stéroïdes

Le nom stéroïde est donné à tous les composés dont le squelette de base comporte le noyau perhydrocyclopentanophénanthrène et la numérotation des cycles est standardisée comme l'indique la structure de base (41) suivante.



Tout comme les triterpènes, les stéroïdes sont synthétisés par voie mévalonique qui débute avec l'acétyl CoA (forme active de l'acide acétique) et qui aboutit au squalène, ensuite c'est la cyclisation du squalène plus précisément celle de l'époxy-2,3-squalène qui, après réarrangement conduit aux triterpènes cycliques généralement hydroxylés en C-3 puis aux stérols.

Le passage d'un triterpène tétracyclique (C-30) à un stérol (C-28) nécessite une déméthylation progressive des carbones C-4 et C-14. Les deux méthyles en C-4 sont perdus par une suite d'oxydation terminée par une décarboxylation. Le méthyle en C-14 est d'abord

oxydé puis éliminé sous forme d'acide formique (Bruneton, 1993). Le mécanisme est présenté dans le schéma 9 suivant :

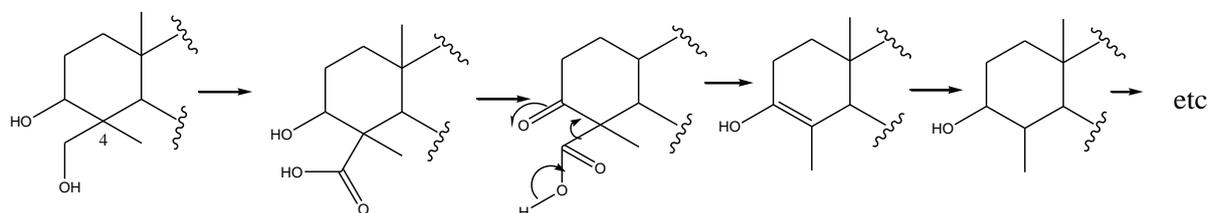
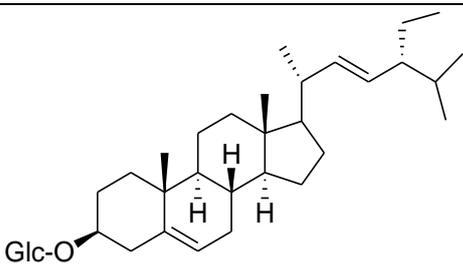


Schéma 9 : Déméthylation des triterpènes en C-4

Tableau V : Quelques stérols isolés de *cnestis ferruginea*

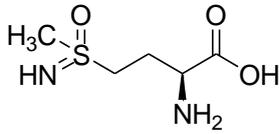
Structures et Noms	Partie de la Plante	Sources
<p>β-sitostérol (42)</p>	Branche	(Oliveira et <i>al.</i> , 2010)
<p>β-stigmastérol (43)</p>	Feuille	(Olugbade et <i>al.</i> , 1982)
<p>β-sitostérol-3-O-β-D-glycopyranoside (44)</p>		

Tableau V (suite et fin) : Quelques stérols isolés de *cnestis ferruginea*

Structures et Noms	Partie de la Plantes	Sources
 <p>Stigmastérol-3-O-β-D-glucopyranoside (45)</p>	Branche	(Olugbade et <i>al.</i> , 1982)

Outre les métabolites secondaires sus-déterminés, des travaux entérieurs ont permis d'isoler de l'espèce *Cnestis ferruginea* d'autres composés de classes différentes que celles citées plus haut (Dalziel, 1955).

Tableau VI: Autres composés isolés de *Cnestis ferruginea*

Structures et Noms	Partie de la Plante	Sources
 <p>L-Methionine sulphoximine (46)</p>	Racine	(Olugbade et <i>al.</i> , 1982)
$\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_2\text{-OH}$ Triacontanol (myricyl alcohol) (47)		
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{CH}_3$ Methyl ester (48)		

Les différents métabolites secondaires ainsi recensés sont responsables des propriétés biologiques marquées, que présentent les extraits de l'espèce *cnestis ferruginea*.

I-4) INTERETS BIOLOGIQUES DE CNESTIS FERRUGINEA

Les dernières décennies de notre ère ont été marquées par une évolution dans le domaine de l'étude chimique des plantes médicinales. Par ailleurs, il y a un regain d'intérêt dans l'enquête des produits naturels pour la découverte des nouvelles substances bioactives avec de meilleures activités pharmacologiques (antioxydants, anticancéreux...). Ces

médicaments pourraient servir de substituts aux effets néfastes de la drogue synthétique (Kim et al., 1998). C'est ainsi que diverses revues de littératures révèlent les intérêts biologiques de l'espèce *Cnestis ferruginea* dans plusieurs domaines.

I-4.1) Activité anti-oxydante

Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides cinnamiques, les coumarines isolés de diverses parties de la plante présentent des propriétés antioxydantes (Nijveldt et al., 2001). Plusieurs rapports ont montré que ces substances sont efficaces contre les myriades de stress oxydatif des pathologies induites par le cancer, les maladies neurodégénératives, et le vieillissement (Ames et al., 1993).

I-4.2) Activité anti-diabétique

En 2011, une fraction au mélange d'acétate d'éthyle /méthanol des racines de *Cnestis ferruginea* a confirmé contenir des principes hypoglycémifiants très puissants capables d'atténuer les complications secondaires du diabète, comme l'athérosclérose, l'insuffisance rénale et l'hépatite (Adisa et al., 2011).

I-4.3) Activité anti-microbienne

Un glucoside isoflavones (afromosine-7-O-beta-D-galactoside) isolé dans le testa de fruits de *Cnestis ferruginea* présente une activité anti-microbienne contre *Staphylococcus aureus* (Parvez et al., 1992). L'extraction aqueuse et au méthanol des racines, feuilles et tiges révèlent les propriétés anti-microbiennes de *Cnestis ferruginea* (Boakye et al., 1975).

I-4.4) Activité anti-fongique

Les composés isoflavones (amentoflavone) isolés de la plante possèdent aussi des effets antifongiques contre *Candida albicans*. L'extrait des racines, des tiges et des feuilles de *Cnestis ferruginea* ont les activités anti-bactériennes et anti-convulsivantes (Declume et al., 1984). Les extraits au méthanol des feuilles de *C. ferruginea* inhibe la glycosylation de l'hémoglobine *in vitro* (Adisa et al., 2010).

Au regard de Toutes ces activités aussi bien intéressantes que variées, il ne fait nul doute que l'espèce *Cnestis ferruginea* occupent une place très importante dans le domaine de la pharmacologie. Elle mérite de ce fait qu'une attention particulière lui soit accordée. Cependant, aucune étude chimique de cette plante n'a encore été explorée au Cameroun. Afin de contribuer aux avancées chimiotaxonomiques de *Cnestis ferruginea*, nous avons entrepris l'étude chimique des feuilles de *Cnestis ferruginea*, une espèce reconnue et utilisée dans le

domaine de la médecine traditionnelle. Les résultats obtenus à l'issu de ce travail sont donnés dans la suite.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II-1) RESULTATS

Le chapitre précédent nous a permis, d'évaluer entre autre l'intérêt dans le domaine médical ou cosmétique d'une espèce végétale du Cameroun : *Cnestis ferruginea*. Plante médicinale récoltée le 9 décembre 2013 à Londji 1 dans la ville de Kribi situé à 3 Km de la mer dans la région du sud ; les feuilles de *Cnestis ferruginea* séchées ont subi trois extractions par macération au mélange chlorure de méthylène-méthanol (1 /1) pendant 72 heures.

Plusieurs techniques chromatographiques ont été effectuées sur l'extrait brut obtenu. A l'issu de ces expériences, nous avons isolé cinq composés indexés de Cff₁ à Cff₅ dont les analyses structurales ont donné des résultats interprétables pour deux de ces composés. Deux grandes classes de métabolites secondaires ont été identifiées, les terpènes (stérols) et les composés phénoliques (dérivé de l'acide cinnamique). Les deux composés ont été caractérisés grâce aux méthodes spectroscopiques usuelles à une dimension (RMN ¹H, RMN¹³C, et DEPT) et à deux dimensions (COSY, HMBC et HMQC). A cet effet, la suite de notre travail décrit le protocole d'extraction, d'isolement et d'analyse structurale de ces composés.

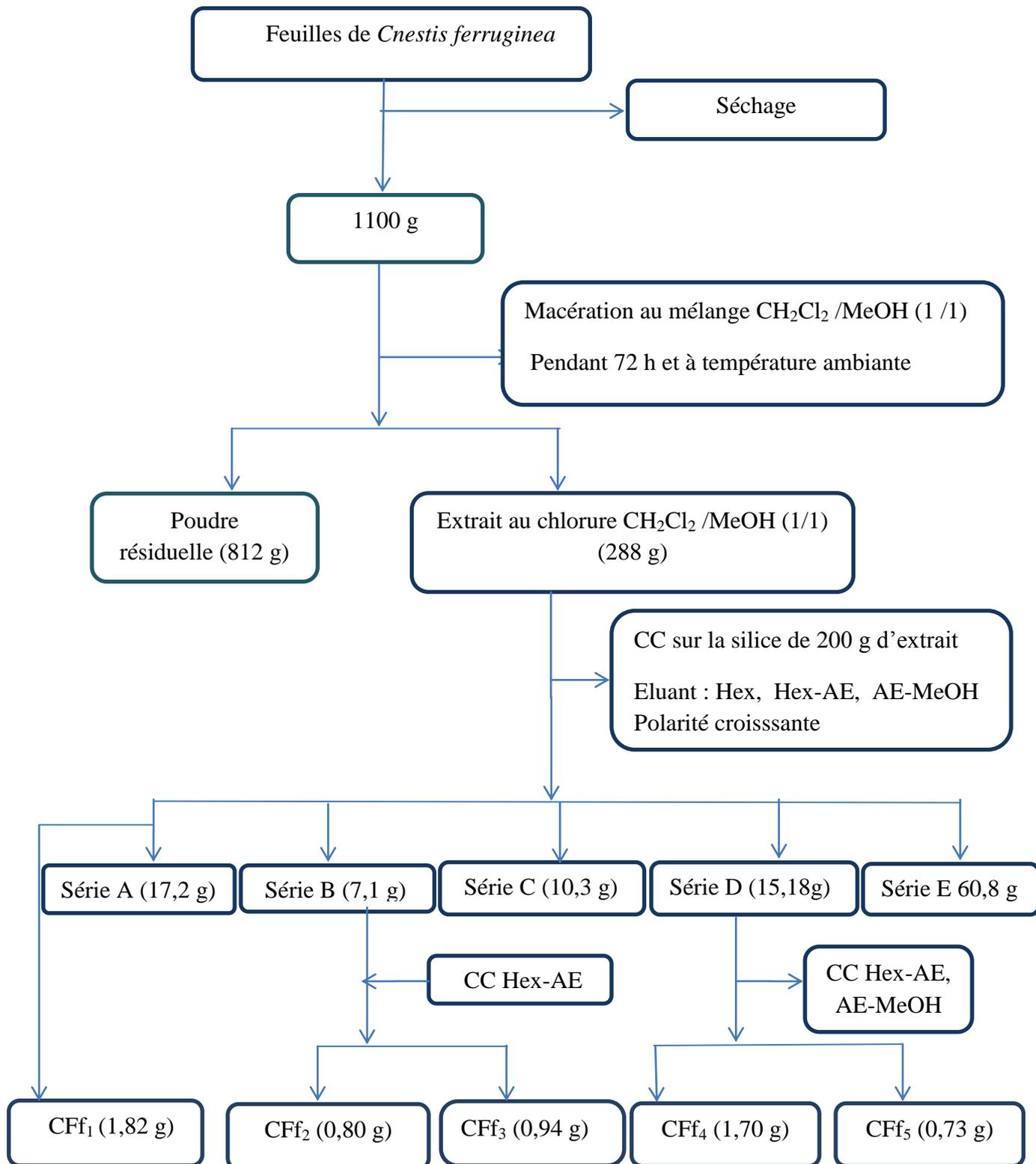


Schéma 10 : Protocole d'extraction et d'isolement des composés des feuilles de *Cnestis ferruginea*

II-2) IDENTIFICATION DES COMPOSES ISOLEES DES FEUILLES DE *CNESTIS FERRUGINEA*

II-2.1) ELUCIDATION DE CFf_5

Le composé CFf_5 a été isolé sous forme de poudre beige dans un mélange AE/MeOH (95/05). Il est soluble dans le méthanol.

L'analyse des spectres RMN ^{13}C , HMQC et RMN ^1H permet de lui attribuer la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$ renfermant onze degrés d'insaturations.

Son spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) découplé large bande (Figure 3), fait ressortir 12 signaux, ce qui entraîne à dire qu'il existe des carbones isochrones dans la molécule. On observe sur ce spectre 9 signaux très intenses, ce qui suggère que ses carbones sont doublés. On distingue sur ce spectre un carbonyle de cétone à 184,8 ppm, cinq méthynes doublés hybridés sp^2 dont trois appartiennent au cycle aromatique à (111,7 ; 116,5 et 124,1 ppm) et deux autres appartenant au système éthylénique à (122,2 et 142,1 ppm) ; on observe également deux méthynes oxygénés hybridés sp^3 à (62,2 et 73,5 ppm) ; un méthoxy doublé situé sur le cycle aromatique à 56,4 ppm et trois carbones quaternaires doublés tous appartenant au cycle aromatique dont deux sont oxygénés à (149,4 et 150,4 ppm) et l'autre à 128,4 ppm.

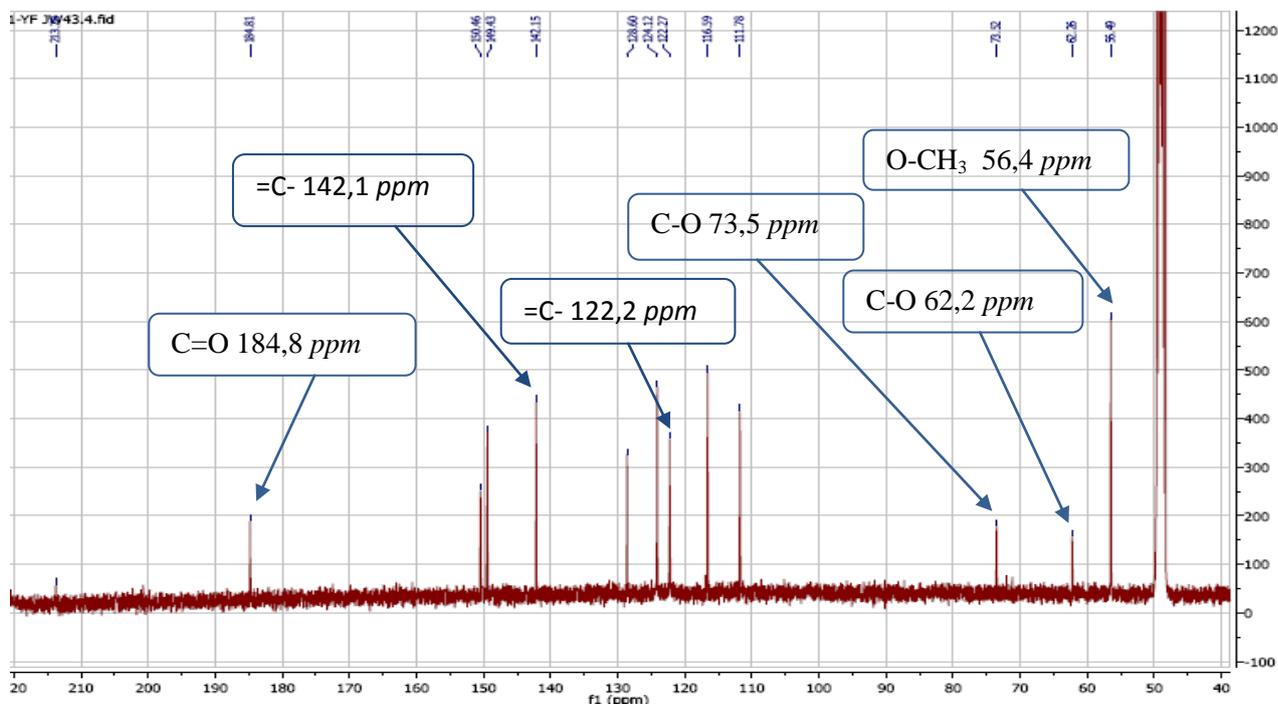


Figure 3 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de CFf_5

L'analyse du spectre HMQC (Figure 4) montre que les carbones du système éthylénique (122,2 et 142,1 ppm) portent respectivement les protons H-2 et H-1. Les protons H-4 et H-5 sont respectivement liés aux carbones hybridés sp^3 à 73,5 ppm et à 62,2 ppm

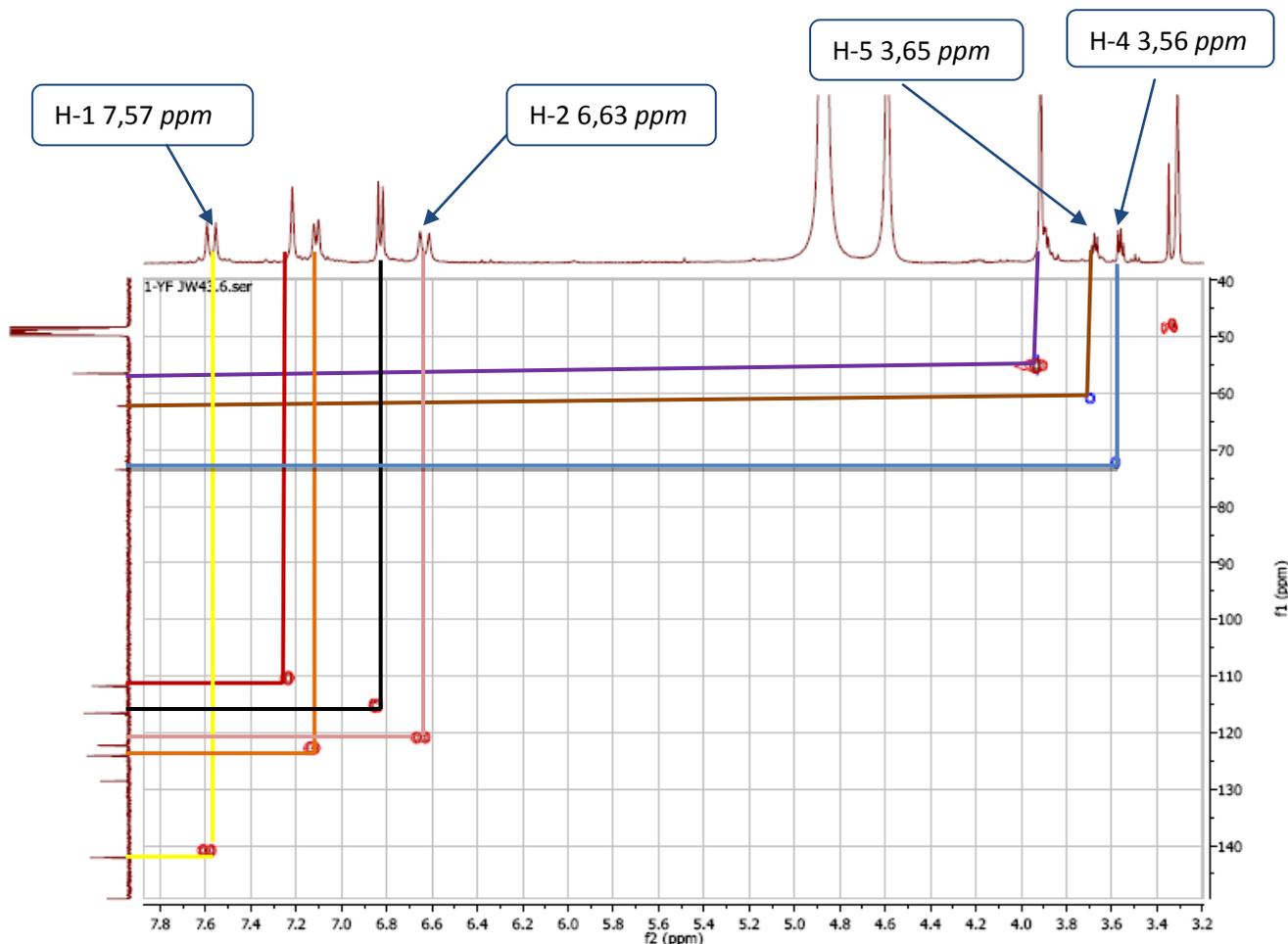


Figure 4 : Spectre HMQC (CD_3OD , 100 MHz) de Cf_5

Le spectre RMN 1H (Figure 5) révèle la multiplicité de ces différents protons. De ce fait, les protons du système éthylénique (H-1 et H-2) sont des doublets (1H, $J=16$ Hz), les protons H-4 et H-5 sont des triplets. Ce spectre présente deux signaux singulets intenses dont l'une à 3,91 ppm correspondant aux protons du groupement méthoxy et l'autre à 4,60 ppm correspondant aux protons liés aux atomes d'oxygène. La corrélation de ces protons est confirmée par le spectre COSY (Figure 6).

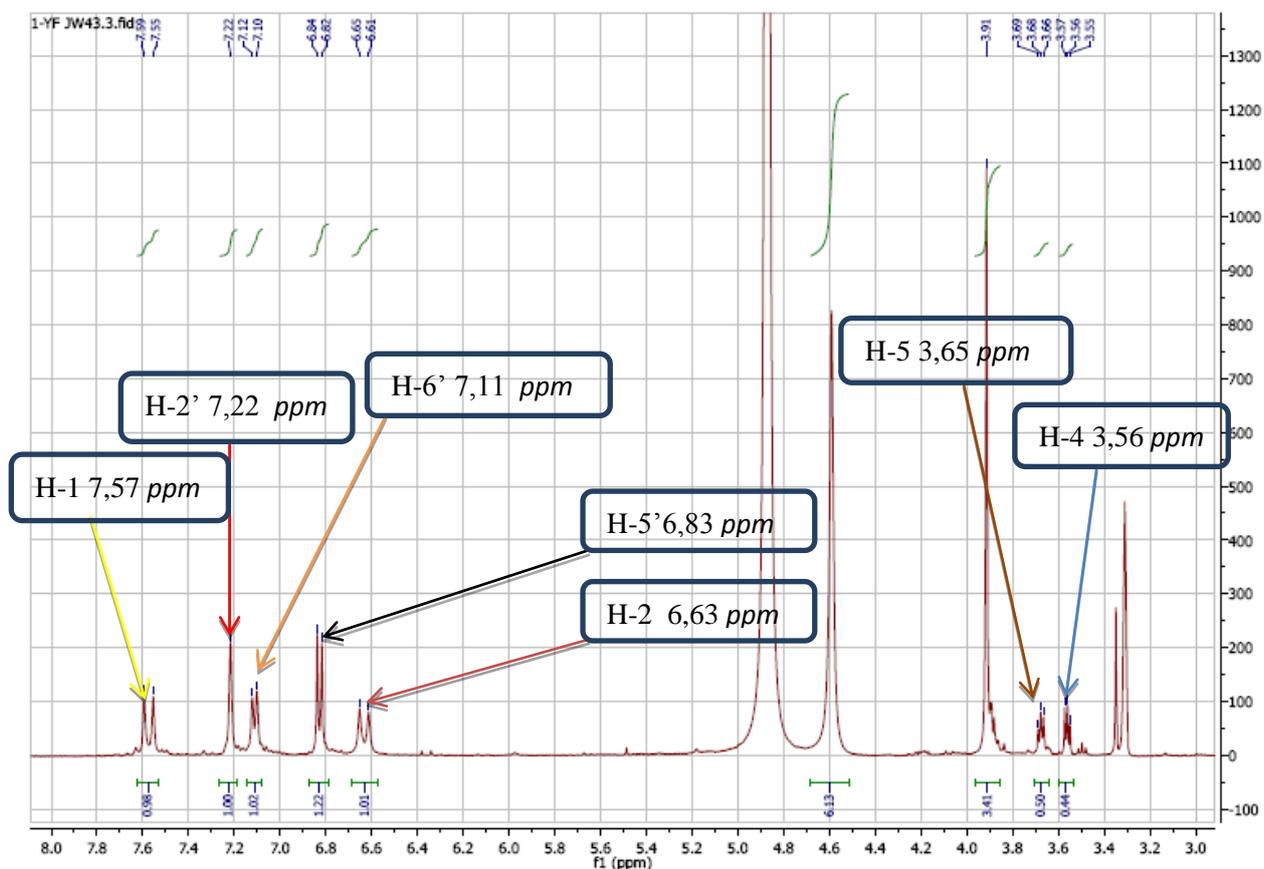


Figure 5 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) de Cff_5

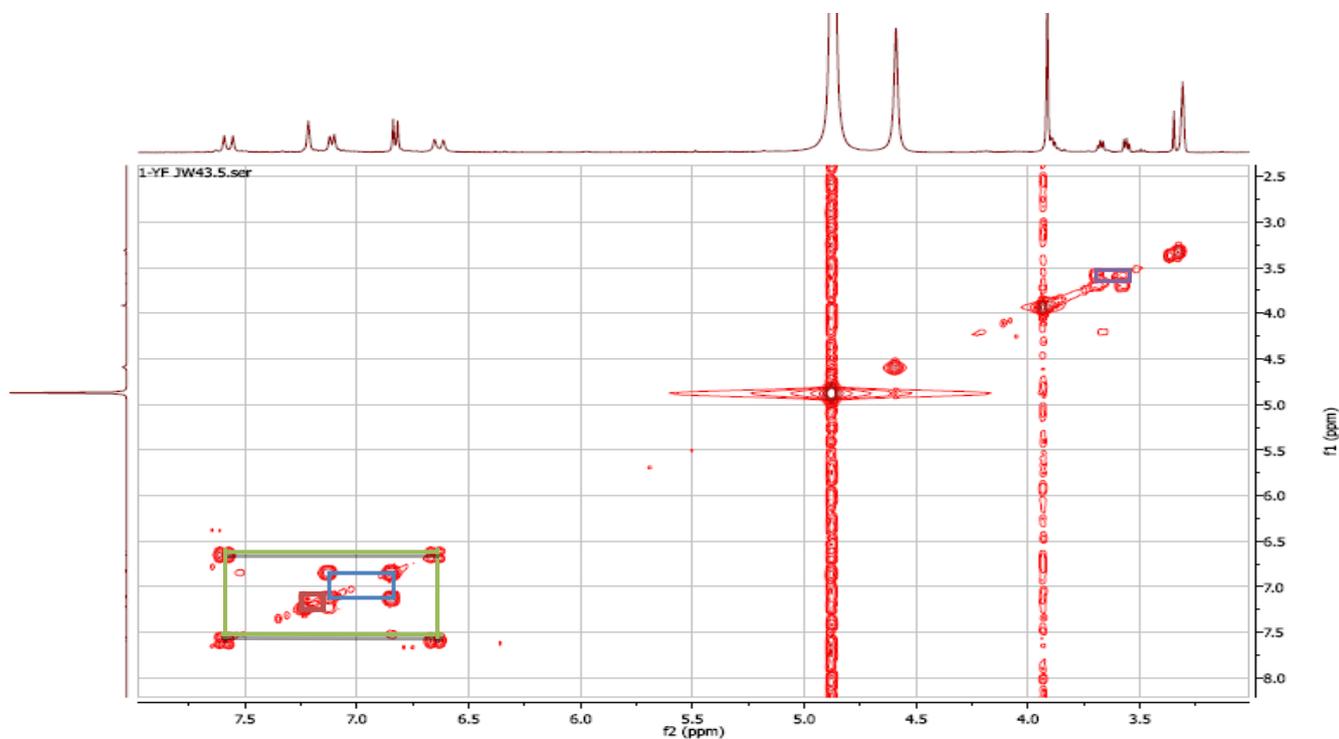
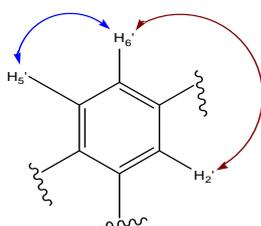


Figure 6 : Spectre COSY (CD_3OD , 400 MHz) de Cff_5

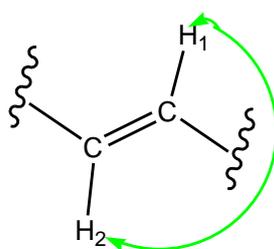
L'analyse de son spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) combinée à celle des techniques HMQC (100 MHz, CD_3OD) et ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CD_3OD) nous a permis d'établir clairement trois sous-structures notées A, B et C.

La sous-structure A est constituée du cycle aromatique portant trois protons dont un doublet dédoublé (1H, dd, $J= 8,0$ et $2,4$ Hz) à δ_{H} 7,11, un doublet (1H, d, $J= 8,0$ Hz) à δ_{H} 6,83 et un doublet (1H, d, $J= 2,4$ Hz) à δ_{H} 7,22 correspondant respectivement aux protons H-6', H-5' et H-2'. On distingue sur le spectre COSY une corrélation entre les protons H-5' et H-6' également celle entre les protons H-6' et H-2' conduisant à la sous structure A.



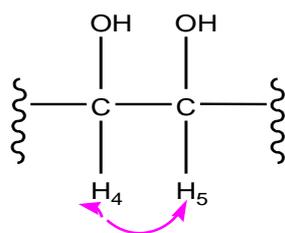
(A)

La sous structure B est un système constitué de deux protons éthyléniques doublet dédoublé (1H, $J=16\text{Hz}$) à δ_{H} 7,57 et δ_{H} 6,63 correspondant respectivement aux protons H-1 et H-2 lesquels corrélient entre eux sur le spectre COSY. La constante de couplage de ces protons qui est de 16 Hz nous permet de les placer en trans.



(B)

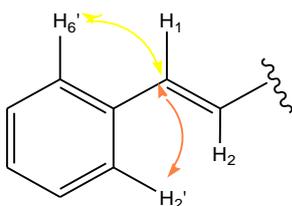
La sous structure C est constituée de deux protons aliphatiques tous deux des triplets à δ_{H} 3,56 et à δ_{H} 3,68, correspondant respectivement aux protons H-4 et H-5. Les valeurs à champ faible de ces déplacements chimiques signifient que ces protons sont portés par des carbinols.



(C)

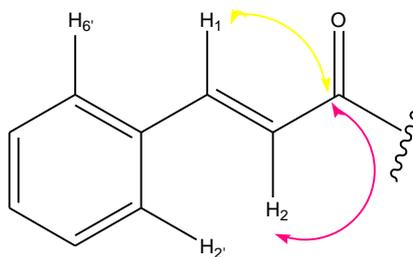
La jonction établie entre ces différentes sous-structures a été faite par l'analyse du spectre et HMBC. Ainsi, la sous structure A a été reliée à celle de B grâce aux corrélations observées sur le spectre.

Sur le spectre HMBC (Figure 7), nous observons des corrélations (3J) entre les protons H-2' et H-6' avec le carbone C-1 à 142,1 ppm; ceci conduit à la sous structure D:



(D)

De plus, nous observons sur ce même spectre une corrélation entre les protons H-1 et H-2 et le carbone du carbonyle à 184,8 ppm pour conduire à la sous structure E.



(E)

La présence d'autres corrélations sur le spectre HMBC telles que :

La corrélation entre les protons du méthoxy et le carbone C-3' (δ_C 150,4), celle entre le proton H-5' et les carbones C-4' (δ_C 149,4), C-3' (δ_C 150,4) et C-1' (δ_C 128,4) et entre le proton H-2' et les carbones C-6' (δ_C 124,1), C-1 (δ_C 142,1), C-4' (δ_C 149,4) et C-3' (δ_C 150,4) nous conduisent au squelette suivant.

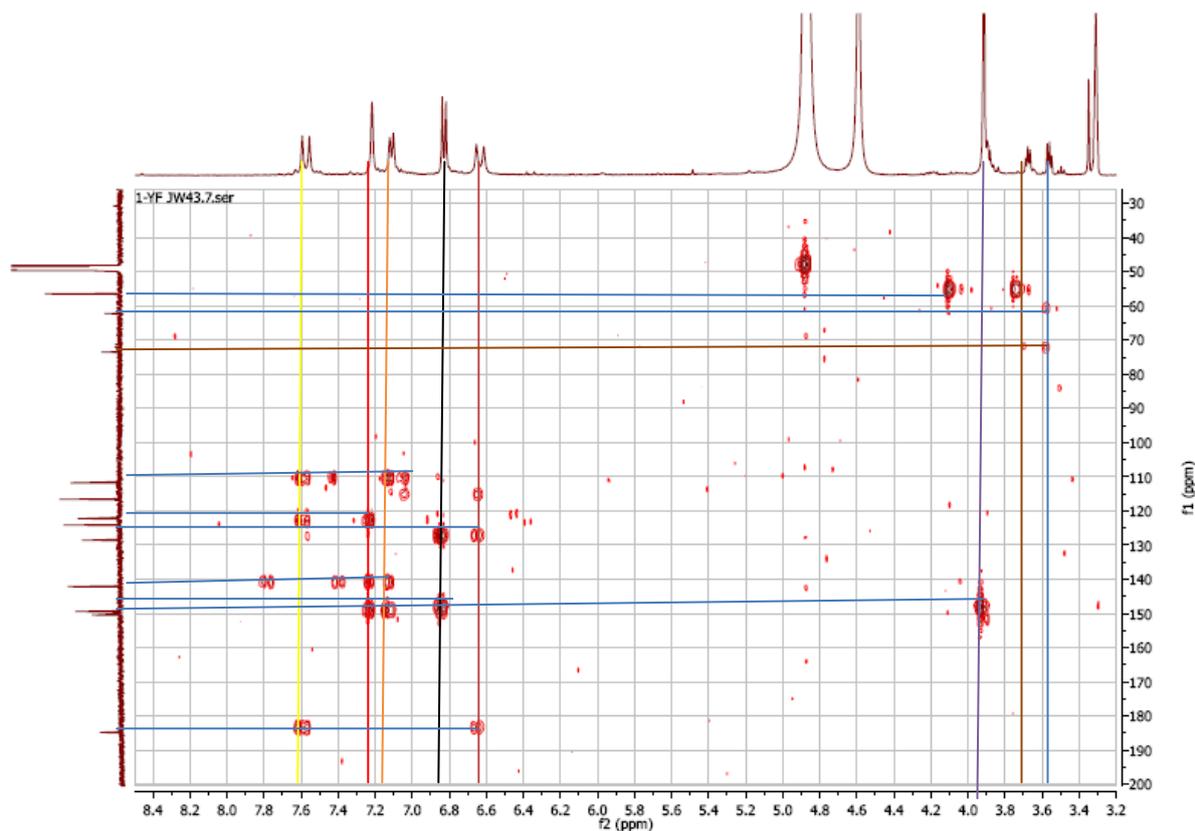
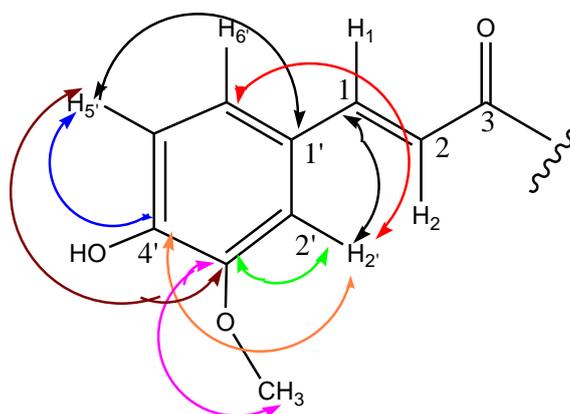
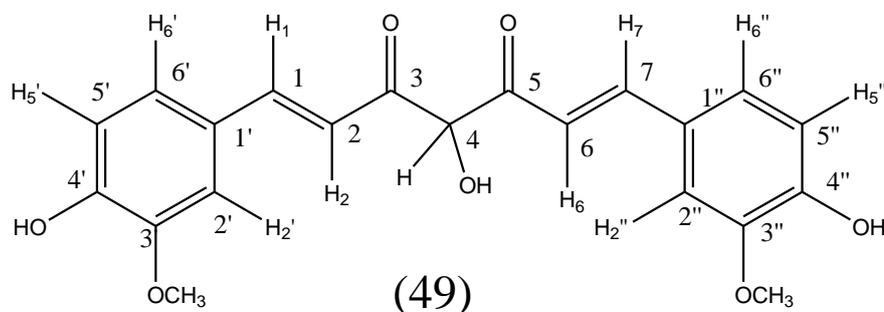
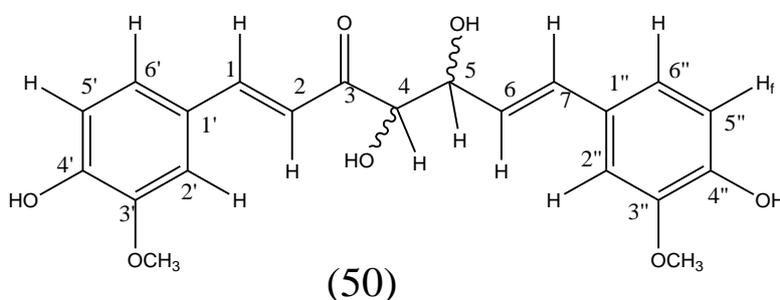


Figure 7: Spectre HMBC (CD₃OD, 100 MHz) de CFf₅

Le spectre RMN ^1H montre des intégrations doubles pour les protons H-1, H-2, H-2', H-5', H-6' et les protons du groupement méthoxy. Ces observations ont permis de suggérer l'existence d'une symétrie totale dans la molécule qui conduirait à la structure (49) suivante :



Cependant, le spectre RMN ^1H ne montre aucun singulet autour de δ_{H} 3,50. Par contre, nous présente deux groupes de protons sous forme de triplets couplant entre eux et confirmés par leur corrélation sur le spectre COSY. Ce qui nous fait penser qu'il y aurait eu une transformation biosynthétique dans la plante. Par conséquent un groupement carbonyle aurait subi une énolisation suivie d'une réduction biosynthétique pour conduire finalement à la structure (50) suivante :



Sur la base de toutes ces données spectrales, la structure (50) ci-dessus a été attribuée au composé CF_5 qui serait un dérivé nouveau d'acide cinnamique dont le nom systématique est : **(1E, 6E)-1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-4,5-dihydroxyhepta-1,6-diène-3-one**. La stéréochimie autour des carbones asymétriques C-4 et C-5 est encore en cours de détermination.

Tableau VII : Données de RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) et RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) de CFf_3

N°	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	multiplicité	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	COSY : $\delta^1\text{H}$	HMBC : $\delta^{13}\text{C}$
1	142,1	d	7,57 (d)	6,63	111,7; 124,1 ; 184,8
2	122,2	d	6,63 (d)	7,57	128,4 ; 184,8
3	184,8	s			
4	73,5	d	3,56 (t)	3,68	62,2
5	62,2	d	3,68 (t)	3,56	73,5
6	122,2	d	6,63 (t)	7,57	128,4 ; 184,8
7	142,1	d	7,57 (d)	6,63	111,7 ; 124,1 ; 184,8
1' et 1''	128,4	s			
2' et 2''	111,7	d	7,22 (s)	7,11	124,1 ; 142,1 ; 149,4
3' et 3''	150,4	s			
4' et 4''	149,4	s			
5' et 5''	116,5	d	6,83 (d)	7,11	128,4 ; 149,4
6' et 6''	124,1	d	7,11 (dd)	6,83 ; 7,22	111,7 ; 142,1 ; 149,4
3'-O-CH ₃ 3''-O-CH ₃	56,4	d	3,91 (s)		150,4

II-2.2) Identification de CFf_3

CFf_3 est un composé obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange Hex/AE (20/80) et est soluble dans la pyridine. Il répond positivement au test de Liebermann - Burchard donnant une coloration bleue caractéristique des stéroïdes. Il répond également au test de Molish donnant une coloration violette caractéristique des sucres.

Son spectre de masse en Impact Electronique donne le pic de l'ion moléculaire M^+ à $m/z = 574$. Les données de ce spectre, couplées à l'analyse des spectres RMN ^{13}C ^1H et DEPT nous ont permis d'attribuer au composé CFf_3 la formule brute $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$ renfermant 6 degrés d'insaturations.

On observe sur son spectre Infra Rouge une large bande de vibration entre 3450 cm^{-1} et 3420 cm^{-1} caractéristique des groupements hydroxyles et deux bandes de vibrations dont l'une

à 3025 cm^{-1} et l'autre entre $1650\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ attribuable respectivement à la liaison $=\text{C-H}$ et $\text{C}=\text{C}$. On observe aussi entre 1070 cm^{-1} et 1150 cm^{-1} une bande caractéristique de la liaison C-O des glucosides.

Le spectre de RMN ^1H de CFf_3 (Figure 8) montre un multiplet à $4,01\text{ ppm}$ attribuable au proton H-3 situé au pied du carbone oxygéné, un doublet (1H , $J=12\text{ Hz}$) à $5,09\text{ ppm}$ attribuable au proton H-6 du $\Delta^5(6)$ stérol. On observe également un large signal d'un triplet (2H , $J=12\text{ Hz}$) à $4,33\text{ ppm}$ attribuable au proton H-6' du glucose avec son proton anomérique apparaissant sous forme de doublet (1H , $J=8\text{ Hz}$) à $4,10\text{ ppm}$. Toutes ces données nous ramènent à une structure avec un aglycone stéroïde et un glucoside.

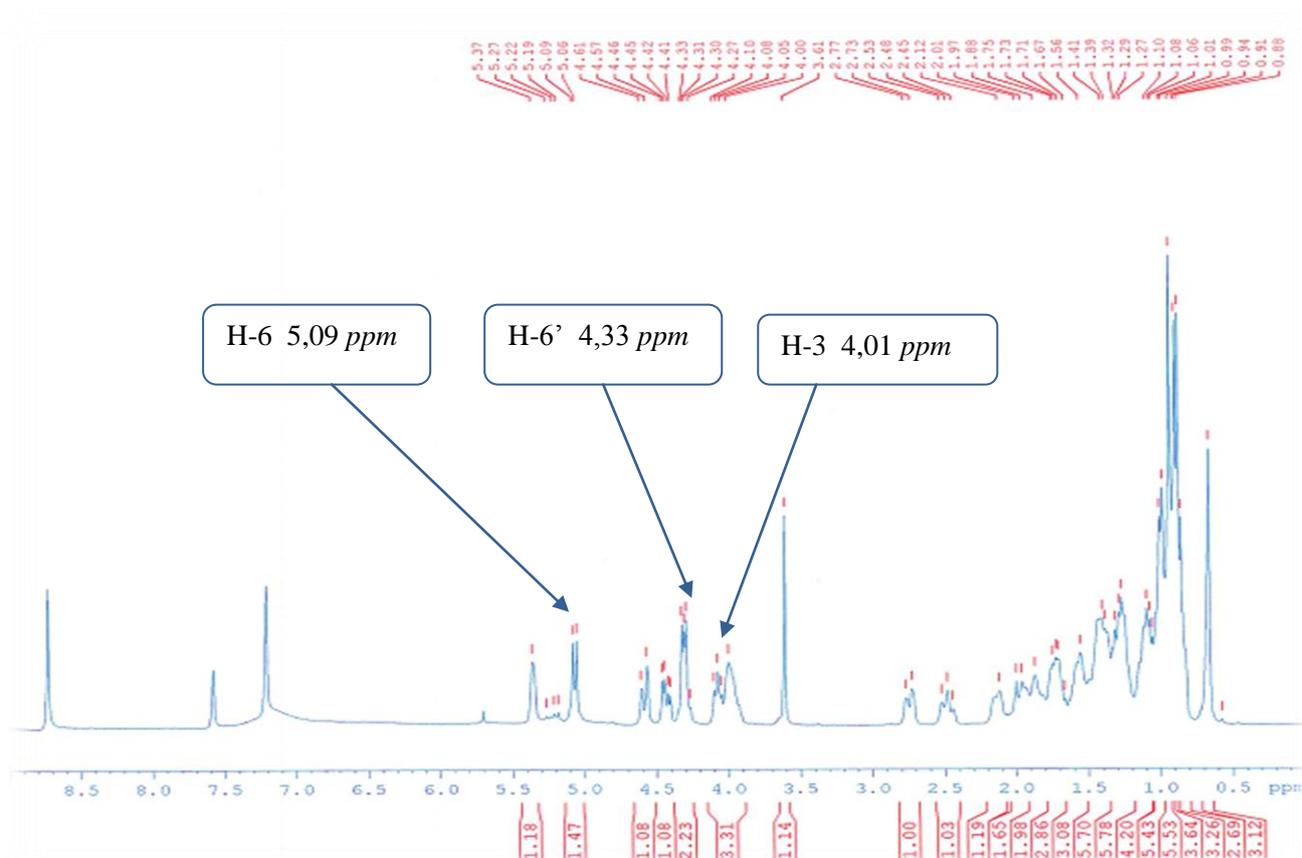


Figure 8 : Spectre RMN ^1H (pyridine- d_5 400 MHz) de CFf_3

Cette structure est confirmée par le spectre de RMN ^{13}C totalement découplé (Figure 9) couplé au spectre DEPT (Figure 10) de CFf_3 qui montre 35 signaux dont deux apparaissent à δ_{C} 142,1 et 123,2 attribuables aux carbones sp^2 d'un squelette $\Delta^5(6)$ -stérol (Tandon et *al.*,

1990). On observe également à δ_C 103,8 un signal attribuable au carbone anomérique et cinq autres entre δ_C 64,1–79,7 attribuables aux carbones oxygéné du glucose.

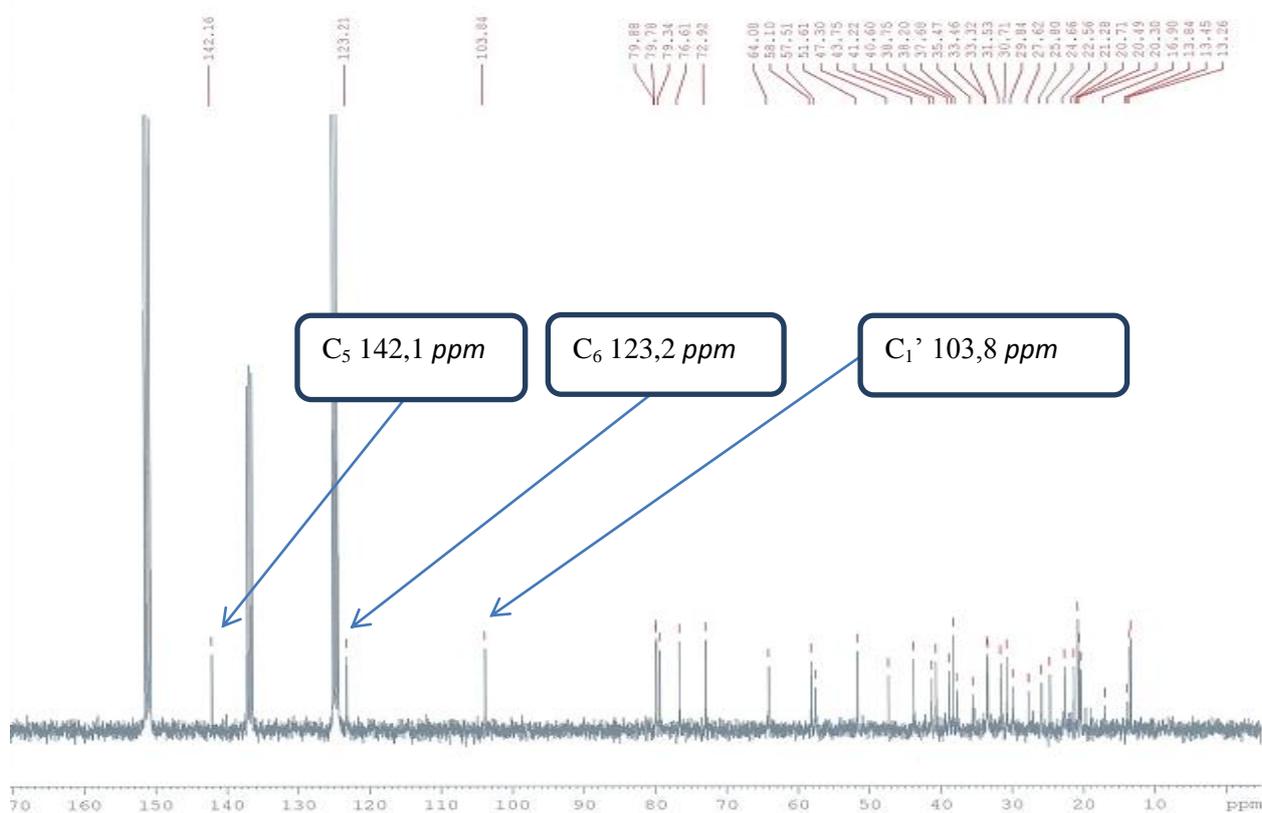


Figure 9 : Spectre RMN ^{13}C (pyridine- d_5 100 MHz) de CFf_3

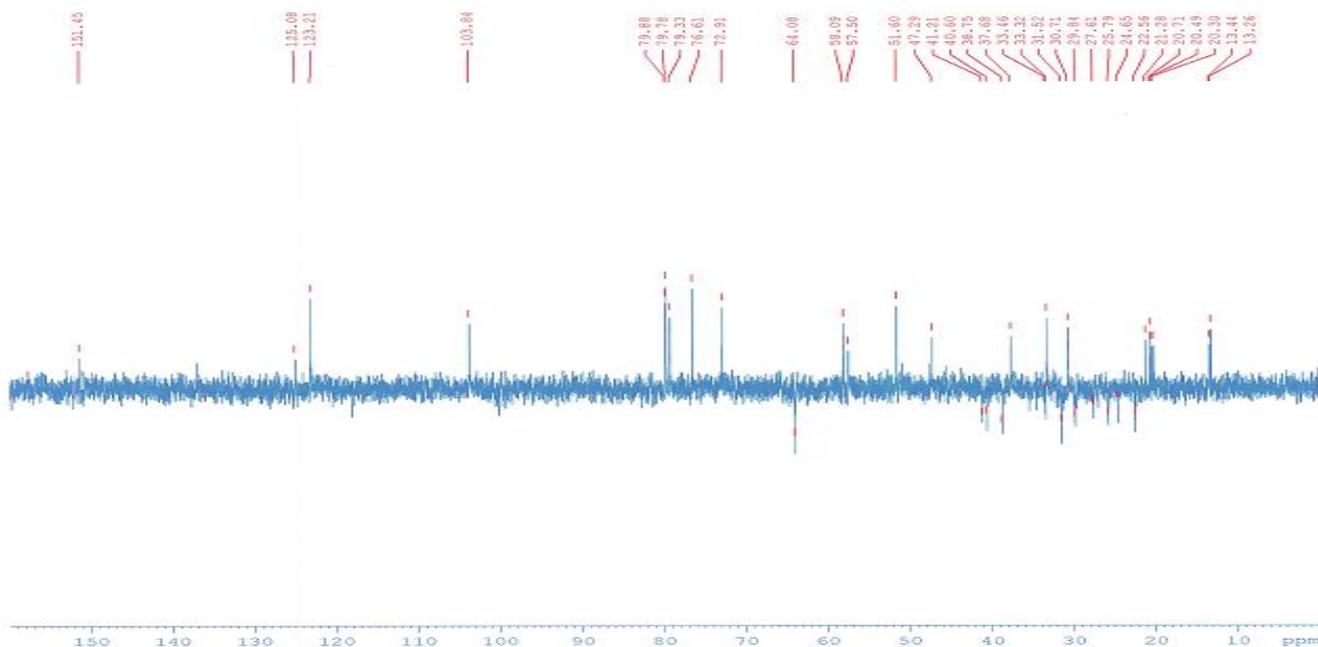


Figure 10 : Spectre DEPT 135 de CFf_3

Toutes ces données physiques et spectroscopiques en accord avec celles décrites dans la littérature nous ont permis d'identifier la structure de CFF₃ à celle du **(24 R)-sito-5-ène-3- O-β-D- glucopyranoside (44)** (Chi, 2006).

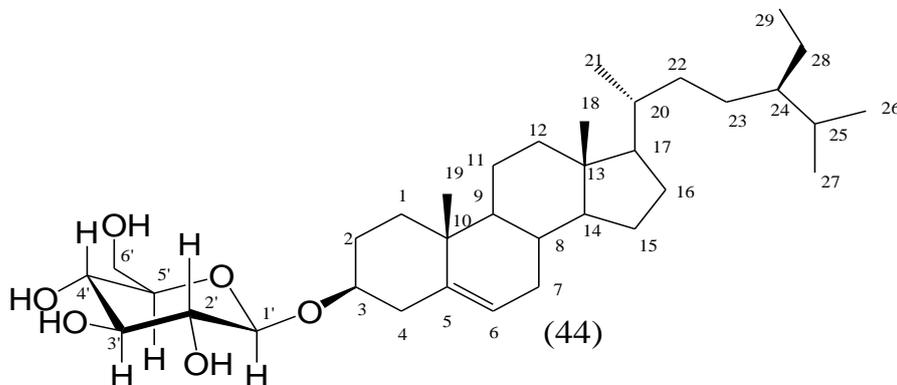


Tableau VIII : Données de RMN ¹³C (Pyridine-d₅, 100 MHz) de CFF₃ comparées à celles de la littérature (Chi, 2006)

C	¹³ C (ppm) de CFF ₃	¹³ C (ppm) Lit	C	¹³ C (ppm) de CFF ₃	¹³ C (ppm) Lit
1	37,6	37,2	19	16,9	19,4
2	29,8	30,0	20	40,6	36,4
3	79,8	78,3	21	20,3	19,0
4	38,7	39,7	22	37,6	36,5
5	142,1	140,7	23	27,6	26,2
6	123,2	127,9	24	51,6	45,8
7	31,5	31,9	25	29,9	29,6
8	33,3	31,8	26	20,7	20,1
9	51,6	50,1	27	20,4	19,2
10	35,4	37,2	28	25,8	23,2
11	21,2	21,0	29	13,4	11,9
12	38,7	39,7	1'	103,8	102,3
13	41,2	42,8	2'	76,7	75,1
14	58,10	56,3	3'	79,7	78,3
15	24,6	24,2	4'	72,9	71,5
16	30,7	29,2	5'	79,3	78,2
17	57,5	56,3	6'	64,0	62,6
18	13,2	11,8			

II-2) DISCUSSION

A partir des informations données dans la littérature, il serait intéressant de comparer les résultats obtenus dans cette étude.

D'un point de vue structural, les classes de composés isolés de cette plante sont en parfaite concordance avec celles décrites dans la littérature (Tableau III et V). Sur le plan chimiotaxonomique la classe de composé la plus représentée de *Cnestis ferruginea* est la classe des flavonoïdes. En plus de cette dernière, les autres métabolites secondaires recensés à l'issue des travaux antérieurs sont principalement les dérivés d'acide cinnamiques, les triterpènes et les stérols (Olugbade et *al.*, 1982). Ce pendant les résultats obtenus à l'issue du présent travail ne font pas parti des flavonoïdes mais montrent l'existence d'un stérol et d'un dérivé nouveau d'acide cinnamique qui constitue donc une avancée considérable dans la chimiotaxonomie de cette espèce et en conséquence, celle du monde.

Pour ce qui est de la contribution au domaine pharmacologique, les tests biologiques des composés identifiés sont encore en cours d'exécution. Ces composés sont aussi d'excellents précurseurs synthétiques. Par ailleurs, les travaux antérieurs sur le β -sitostérol attestent qu'il est doué de propriétés pharmacologiques éminentes.

Le β -sitostérol très abondant dans les végétaux joue un rôle essentiel dans la régulation du taux de cholestérol sanguin. Il atténue l'hypertrophie bénigne de la prostate et est très actif contre le venin du serpent. Par ailleurs, c'est un puissant anti-inflammatoire et analgésique. En effet, il a été connu comme agent hypocholestérolémiant (Peterson, 1951). Sur le plan de la cancérogenèse, la consommation de β -sitostérol chez le rat, associée à l'administration des carcinogènes diminue l'incidence des tumeurs coliques comparativement au carcinogène seul (Raicht et *al.*, 1980).

INTERETS PEDAGOGIQUES

La tradition d'excellence des Ecoles Normales Supérieures est de former les cadres de l'Enseignement Secondaire dans le monde. Ce sont des grandes Ecoles Universitaires, qui regroupent de nombreuses disciplines. Cependant la recherche en Education est au cœur de leurs activités plus précisément, former les étudiants à bien mener leur métier qui est celui d'enseigner. Ceci étant, les enseignements qui y sont dispensés à travers les Unités d'Enseignement, le stage pratique et le mémoire, concourent tous à cet idéal et présentent par conséquent des intérêts pédagogiques.

Dans le cas du mémoire, le présent travail permet aux enseignants de chimie du secondaire de se familiariser aux techniques de laboratoire, à l'outil informatique, à la recherche bibliographique et à l'exploitation des données de la littérature; ce qui contribuera à une bonne élaboration et dispensation des cours de Chimie et de Physique des différentes classes dans les lycées.

L'étude des feuilles de *Cnestis ferruginea* a conduit à l'isolement et à l'identification des métabolites secondaires de différentes classes des composés tels que : les composés phénoliques (dérivé d'acide cinnamique) et les stérols (glycoside de sitostérol). Ces deux classes de composés renferment plusieurs groupements fonctionnels notamment les phénols, les carbonyles, les doubles liaisons, qui peuvent être caractérisés par des tests d'identification (test au FeCl_3 , test à la 2,4-DNPH, test à l'eau de brome). Ces groupements fonctionnels font partie du contenu des programmes dispensés au secondaire. Les techniques de laboratoire (chauffage, extraction, filtration, distillation, chromatographie, décantation) acquises dans le cadre de ce travail seront mises à profit pendant les séances de Travaux Pratiques, de même que les règles de sécurité que nous avons apprises au laboratoire.

La rédaction du mémoire nous a permis d'approfondir la connaissance et la maîtrise de l'outil informatique (les logiciels tel que word et Chemdraw) ce qui nous permettra de bien concevoir les sujets d'évaluation au lycée.

De plus, ce travail nous a permis de mettre en évidence l'esprit de synthèse à travers l'exploitation des données de la littérature, qualité indispensable pour les futurs enseignants que nous sommes car il importe de ne retenir que l'essentiel afin de ne pas surcharger inutilement les apprenants. Ce qui concourt à une meilleure qualité de l'enseignement. La partie bibliographique de ce travail a nécessité une recherche très approfondie et répétée via internet au moyen de divers moteurs de recherche, mais aussi dans les supports imprimés. L'Enseignant de Chimie à travers cet exercice de collecte de données sait que la Science

évolue et que la mise à jour nécessite des remises en question et des recherches permanentes. Ceci lui évite de dispenser le même cours durant toute sa carrière professionnelle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Après avoir inventorié les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle au Cameroun, puis réalisé une sélection de plante potentiellement pharmaceutique, une plante a été récoltée au sud du Cameroun. Une revue de la littérature sur les composés isolés de l'espèce *Cnestis ferruginea* nous a permis de constater que cet espèce est riche en composé phénolique notamment les acides cinnamiques et ses dérivés, les coumarines, les flavonoïdes. Une étude chimique des feuilles de *Cnestis ferruginea* (Connaraceae) a été alors menée afin d'identifier les molécules d'intérêts biologiques responsables des activités biologiques entre autres activités anti-microbiennes, anti-biotiques anti-fongiques anti-diabétique. A cet effet, nous avons abouti à l'isolement de cinq composés indexés de Cff₁ à Cff₅ dont deux Cff₅ et Cff₃ ont été caractérisés respectivement à **(1E, 6E)-1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-4,5-dihydroxyhepta-1,6-diène-3-one** et à **(24 R)-sito-5-ène-3- O-β-D glucopyranoside**. Ces composés ont été isolés grâce à des techniques chromatographiques classiques et leurs structures identifiées à partir de l'analyse de leurs spectres RMN à une dimension (RMN ¹H, RMN¹³C, DEPT) et à deux dimensions (COSY, HMQC, HMBC). L'une des structures (Cff₃) a été confirmée par comparaison de ses données physiques et spectrales avec celles de la littérature et l'autre (Cff₅) serait un dérivé nouveau de l'acide cinnamique. Les analyses structurales des trois autres composés Cff₁ ; Cff₂ et Cff₄ sont encore en cours.

Compte tenu de l'intérêt pharmacologique de *Cnestis ferruginea* dans la médecine traditionnelle, nous envisageons dans l'optique de poursuivre et de mener à son terme l'étude amorcée de :

- ➡ Déterminer la stéréochimie des carbones asymétriques C₄ et C₅ de Cff₅, afin de confirmer sa structure en utilisant les rayons X,
- ➡ D'élucider les trois autres composés isolés,
- ➡ De purifier les fractions restantes au laboratoire afin d'isoler d'autres composés,
- ➡ D'effectuer les tests biologiques sur ces composés en vue de trouver les substances responsables des activités anti-microbiennes, anti-virales, anti-inflammatoires, etc...,
- ➡ D'étendre nos études sur d'autres parties de la plante et d'autres espèces du même genre.

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

III-1) APPAREILLAGE

La mesure des différentes masses s'est faite par pesée sur une balance électronique de type ACCULAB Startorius Group à 10^{-3} près.

Plusieurs types de matériels ont été utilisés pour effectuer les différentes techniques chromatographiques:

- Une grosse colonne en verre fritté de dimension 4 cm de diamètre sur 77cm de hauteur utilisée pour la chromatographie sur colonne ;
- Les petites colonnes ont été utilisées pour la purification des composés ;
- L'hyflosupersel, utilisé pour fixer les extraits ;
- Le gel de silice de fabrication MERK de granulation variant entre 0.063 et 0,400 μm a été utilisé pour effectuer les différentes chromatographies sur colonne ;
- Les plaques préfabriquées sur feuille d'aluminium de type MERK ont été utilisées pour la chromatographie sur couche mince.

Le développement des plaques s'est fait dans les cuves chromatographiques de formes cylindriques ou parallélépipédiques contenant des systèmes de solvants différents.

La révélation des taches s'est faite de plusieurs manières:

- Utilisation de la lampe UV de type SPECTROLINE, model CC-80 de longueur d'onde 254 et 365 nm ;
- Pulvérisation des plaques à l'aide de l'acide sulfurique dilué à 50% ou avec de la vanilline dans l'acide sulfurique concentré suivi du chauffage.
- L'évaporation s'est faite à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque BUCHI.
- Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire du proton et du carbone ont été enregistrés sur les spectromètres de type BRUKER AC 300 et AC 400.

III-2) MATERIEL VEGETAL

III-2.1) Obtention de la matière végétale

Les feuilles de *Cnestis ferruginea* ont été récoltées à Kribi le 9 décembre 2013, puis identifiées par le botaniste M. V. NANA. Après séchage, nous avons obtenu une poudre de masse 1130 g et 1100 g ont été utilisées pour l'extraction et le reste réservé pour les tests biologiques.

III-2.2) Extraction et isolement des composés de *Cnestis ferruginea*

➤ Extraction

Les feuilles séchées ont été extraite au mélange CH₂Cl₂/MeOH (1/1) à température ambiante. Après concentration à l'évaporateur rotatif, 288 g d'extrait ont été récupérés.

➤ Isolement des composés des feuilles de *Cnestis ferruginea*

Séparation par chromatographie sur colonne

Une partie de l'extrait obtenu (200 g) a été fixé sur l'hyflosupercel, monté dans une colonne à gel de silice puis élué à l'hexane, au mélange hexane/acétate d'éthyle, à l'acétate d'éthyle, au mélange acétate d'éthyle/méthanol de polarité croissante jusqu'à 20% et enfin au méthanol. A l'issu de cela, 217 fractions ont été récupérées puis regroupées en 5 séries notées A, B, C, D et E. Le tableau 9 ci-dessous présente le chromatogramme du fractionnement.

Tableau IX : Chromatogramme du fractionnement des feuilles de CF

Système d'éluion	Fraction	Système de CCM	Série	Observation
Hex 100%	1-4	Hex/AE 95/05	Série A	Huile verte avec cristaux dans la fraction 4
Hex /AE 95/05	5-10			
Hex/AE 90/10	11-21			
Hex/AE 85/15	22-36	Hex/AE 80/20	Série B	Cristaux de couleur beige
Hex/AE 80/20	37-50			
Hex/AE 75/25	51-68			
Hex/AE 70/30	69-77			
Hex /AE 65/35	77-85			
Hex/AE 60/40	86-92	Hex/AE 75/25	Série C	Formation des cristaux de couleur vert foncée
Hex/AE 55/45	93-100			
Hex/AE 50/50	101-106			
Hex/AE 45/55	107-113			
Hex/AE 40/60	114-120			
Hex/AE 35/65	121-127			
Hex/AE 30/70	128-137			
Hex/AE 25/75	138-143			

Hex/AE 20/80	144-150			
Hex/AE 15/85	151-159	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95/05	Série D	Formation des cristaux de couleur jaune orangé
Hex/AE 10/90	160-169			
Hex/AE 05/95	170-182			
AE 100%	183-188			
AE/Me-OH 95/05	189-194			
AE/Me-OH 90/10	195-200			
AE/Me-OH 85/15	201-204			
AE/Me-OH 80/20	205-210	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95/05	Série E	Pâte collante
Me-OH 100%	211-217			

III-2.3) Traitement des séries et des fractions

III-2.3.1) Traitement de la série A

La série A constituée des fractions de 1 à 21 ont été regroupées sur la base de la CCM analytique. Laissées à température ambiante pendant 5 jours, on voit apparaître un composé sous forme de paillettes blanches qui, après recristallisation dans l'hexane pur, puis filtration, il est soluble dans le chloroforme et présente une tache sur la plaque chromatographique révélant la pureté du composé indexé CFf₁ de masse 1,82g.

III-2.3.2) Traitement de la série B

Les fractions de 22 à 85, regroupées sur la base de la CCM analytique, suivi d'une purification sur colonne, nous conduit à deux composés. Le premier composé de masse 0,8g indexé CFf₂ se présente sous forme de paillettes blanches et est soluble dans le chloroforme, après une CCM analytique il présente une tache pur. Le deuxième composé indexé CFf₃ de masse 0,94 g se présente sous forme de poudre blanche et est soluble dans la pyridine.

III-2.3.3) Traitement de la série D

Une masse de 15,18 g des fractions constituant la série D a été fixée sur l'hyflosupercel et laissée séchée puis montées dans une colonne à gel de silice et éluée au mélange

hexane/acétate d'éthyle de polarité croissante, à l'acétate d'éthyle et enfin au mélange acétate d'éthyle/méthanol de polarité croissante. A l'issue de cette étape, 61 fractions ont été récupérées puis regroupées en 3 sous-séries notées D1, D2 et D3. Le tableau 10 présente le chromatogramme du fractionnement de cette série.

Tableau X : Chromatogramme du fractionnement de la série D

Système d'élution	Fraction	Système de CCM	Sous-série	Observation
Hex/AE 30/70	1-5	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 98/02	D ₁	Formation des cristaux de couleur jaune orangé
Hex/AE 25/75	6-10			
Hex/AE 20/80	11-17			
Hex/AE 15/85	18-23			
Hex/AE 10/90	24-29	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 90/05	D ₂	Formation des cristaux de couleur Jaune avec cristaux
Hex/AE 05/95	30-35			
AE 100%	36-40			
AE/MeOH95/05	41-48			
AE/MeOH 90/10	49-55	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	D ₃	Pâte marron
AE/MeOH 85/15	56-61			

Les fractions de 1 à 23 regroupées sur la base de la CCM analytique puis laissées à température ambiante pendant trois jours, contiennent des cristaux de couleur jaune orangé. Après recristallisation dans un mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle puis filtration, ces cristaux présentent sur la plaque chromatographique une tâche, ce composé indexé CFf₄ de masse 1,70 g est soluble dans le méthanol.

Les fractions de 24 à 48 après 72 heures à l'air libre, forment une poudre de couleur beige. Après recristallisation dans un mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle puis filtration, cette poudre présente une seule tâche en CCM, révèle à l'UV et est soluble dans le méthanol. Ce composé de masse 0,73 g a été indexé CFf₅

La sous- série D₃ a été assimilable à la série E d'après l'aspect physique et la révélation de la plaque CCM ; ainsi nous avons mélangé et noté série E' qui serait une série constituée de tanin d'après la littérature.

III-3) Caractéristiques physico-chimiques des composés isolés

III-3.1) Caractéristiques de CFf₅

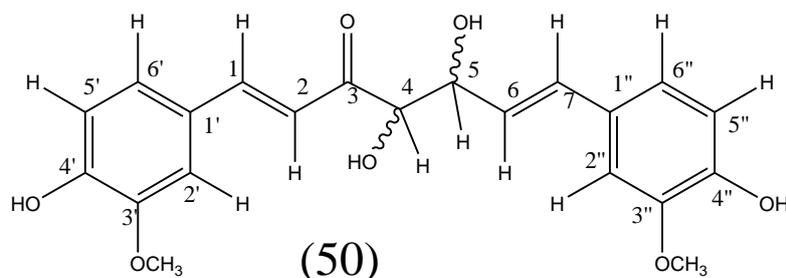
Formule brute : C₂₁H₂₂O₇

Aspect physique : poudre beige

Révélation : UV et H₂SO₄ (50%)

Solubilité : méthanol

Structure :



Nom scientifique : (1E, 6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-4,5-dihydroxyhepta-1,6-diène-3-one

Valeurs caractéristiques des déplacements chimiques:

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz): C₁ (δ_c 142,1) ; C₂ (δ_c 122,2); C₃ (δ_c 184,8)

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): H₁ (δ_H 7, 57); H₂ (δ_H 6, 63)

III-3.2) Caractéristiques de CFf₃

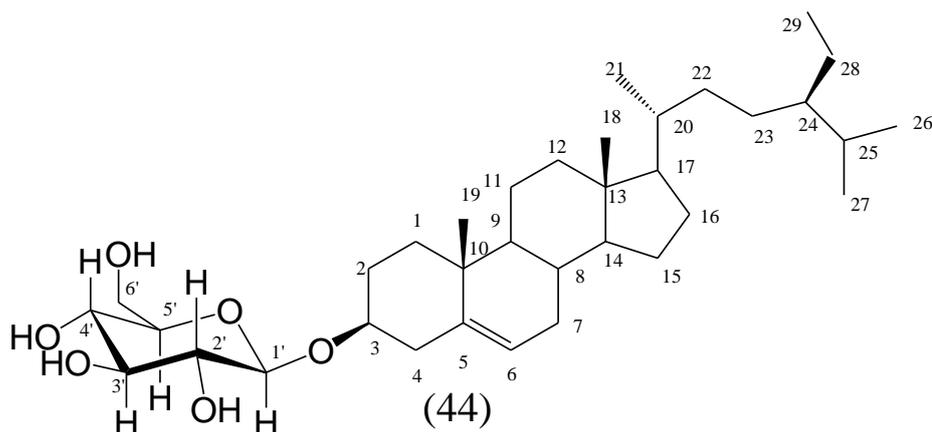
Formule brute : C₃₅H₆₀O₆

Aspect physique : poudre blanche

Révélation : H₂SO₄ (50%)

Solubilité : pyridine

Structure:



Nom scientifique : (24 R)-sito-5-ène-3-O-β-D-glucopyranoside

Valeurs caractéristiques des déplacements chimiques :

RMN ¹³C (pyridine-d₅, 100 MHz): C₅ (δ_c 142,1) ; C₆ (δ_c 123,2) ; C_{1'} (δ_c 103,8) C_{2'} (δ_c 79,7) ; C_{3'} (δ_c 79,7) ; C_{4'} (δ_c 72,9) ; C_{5'} (δ_c 79,3) ; C_{6'} (δ_c 64,0)

RMN ¹H (pyridine-d₅, 400 MHz): H₆ (δ_H 5,37); H_{1'} (δ_H 5,09)

III-4) TEST CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLEES

III-4.1) Test de LIBERMANN BURCHARD

But : identification des stérols

Mode opératoire :

Dans un tube à essai, nous avons dissout une petite quantité de produit dans 50 mL de dichlorométhane ; A cette solution nous avons ajouté 20 mL d'anhydride acétique et 1 mL d'acide sulfurique.

Résultats et interprétations :

La présence des stérols dans l'échantillon s'est révélée par l'apparition d'une couleur bleue.

III-4.2) Test de MOLISH

But : identification des sucres

Mode opératoire :

Nous avons tout d'abord préparé le réactif de Molish en dissolvant 1g de α -naphthol dans 50 mL d'éthanol, puis nous avons dissout une petite quantité de produit dans un tube à essai, en suite nous avons ajouté 1 mL du réactif de Molish et 1 mL d'acide sulfurique.

Résultats et interprétations :

Nous observons la formation d'un anneau violet marquant la présence d'un sucre dans la molécule.

III-4.3) Test au chlorure ferrique

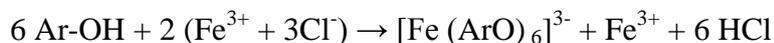
But : identification des phénols

Mode opératoire :

Dans une solution méthanolique, nous avons dissout le composé phénolique et ajouté quelques gouttes de chlorure ferrique

Résultats et interprétations :

Il s'est formé un complexe de type $[\text{Fe}(\text{OAr})_6]^{3-}$ de couleur bleue verdâtre . L'équation générale est la suivante :



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adisa R., Abass K., Oladosu A., Ajaz I., Choudhary A., Olorunsogo M. I., et Rahman A. (2011). Purification et caractérisation des composés phénoliques des feuilles de *Cnestis ferruginea* (De Candolle): Enquête de la propriété antioxydante. *Journal de Recherche Phytochimique*, **5**: 177–189

Adisa R., Choudhary E. et Adewoye O. (2010). Propriétés hypoglycémiques et biochimiques de *Cnestis ferruginea*. *Journal Africain de la Médecine Traditionnelle Alternative*, **7**: 185–194

Ames B.N., Shigenaga M. K. et Hagen T. M. (1993). Des oxydants, des anti-oxydants et les maladies dégénératives du vieillissement. *Débat Académique des Sciences Nationale USA*, **90**: 7915–7922.

Banthorpe D. V., (1991). Classification of Terpenoids and General Procedures for their Characterization in *Methods in plant Biochemistry*, Terpenoids, Dey, P. M. and Harbone, J. B., *Academic Press Ltd*, **7**: 1–42.

Boakye Y. K. et Konning R. (1975). Implications toxicologiques de la fraction alcaloïde brut des racines de *Cnestis ferruginea* DC. Foie indices de fonction de rats mâles. *Journal d'Institut Wistar des Sciences Biomédicale*, **5**: 145–156.

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, 2^{ème} Edition, Technique et documentation Paris, Lavoisier, 203–263 ; 389–620.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. 4^{ème} Edition, revue et augmentée, Techniques et Documentation - Editions médicinales internationales, Paris, 1288.

Chi S. J. (2006). Thèse Doctorat/Ph. D en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Faculté des Sciences, Cameroun.

Dalziel J. M. (1955). The Useful Plants of West Tropical Africa, Crown Agents for Oversea Governments and Administrations, London. **6**: 365–370

Declume C. et Assamoi A. (1984). Etude comparative de l'activité d'élimination des polyphénols évaluée par des méthodes différentes. *Journal Chimique d'Agriculture Alimentaire, Pub Med* , **47**: 425–431.

Dewick P. M. (2002). A Biosynthetic Approach, 2nd edition, New York: John Wiley and Sons. *Medicinal Natural Products*, 167–289.

Fleischmann J. (1983). Bulletin de la société royale de botanique de Belgique, **51** : 67.

Herbert R. B. (1989). The biosynthesis of secondary metabolites 2^{ème} edition Chapman and Halle, 11–115.

Hutchinson J. and Dalziel J. M. (1958). Flora of West Tropical Africa, Crown Agents for Oversea Governments and Administrations, London. **1**: 743.

Irvine F.R. (1961). Woody plants of Ghana. 1st Edition, Oxford University Press, London, **334**: 18–26.

Jongkind C. C. H., Lemmens R. H. M. J. (1989). The Connaraceae: A Taxonomic Study with Special Emphasis on Africa. Wageningen Papers 89. Agriculture University, p. 1–403.

Kerharo J., (1974). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques. Vigot, Paris, P.1012. [En ligne]. <http://www.ethnopharmacologie.org/bibliotheque>. Consulté le 26 mai 2016 à 19h 36 min.

Kim D. O., Chun O. K. et Lee C.Y., (1998). Quantification des polyphénols et leur capacité antioxydante dans les prunes fraîches. *Journal Chimique d'Agriculture Alimentaire*, **51**: 6509–6515.

Lebrun J. P. et Stork A. L. (1993-1997) Enumération des plantes à fleurs d'Afrique tropicale. Conservatoire & Jardin botaniques de Genève, vol 1–4.

Lewis W. H. and Elvin M. P., (2003). Medical botany plants affecting human health, 2nd Hoboken Wiley, 409.

Macheix J. J., Fleuri A. et Jay-Allemand C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Edition technique et documentation, Lavoisier.

Newmann D. and Cragg G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, **70**: 461–477.

Nijveldt R. J., Nood E. Hoorn, P., Boelens, G., et Pam Leeuwen (2001). La mesure de la protéine avec du phénol de Folin réactif. *Journal de Chimie Biologie*, **193**: 265–275.

Oliveira P. V. (2010). Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of north eastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *ParasitolRes*, **107**: 403–407.

Olugbade T.A., Oluwadiya J. O. et Yisak W.A. (1982). Constituants chimiques de *Cnestis ferruginea* DC. Fraction de l'éther de pétrole I. *Journal de l'Ethnopharmacologie*, **6**: 365–370.

Parvez M. and Rahman A. (1992). A novel antimicrobial Isoflavone Galactoside from *Cnestis ferruginea* (Connaraceae). *Journal the Chemical Society of Pakistan*, **14**: 221–223.

Peterson D. W. (1951). Effect of soy bean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol.

Raicht R. F., Cohen B. I., Fazzini E. P., Sarwal A. N. and Takahashi, M. (1980). Prospective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Research*, **40**: 908–13.

Rampe D., Wang L., Ringheim G. E. (2004). Receptor modulation of β -amyloid and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. *Journal of Neuroimmunology*, **147**: 56–61.

Verpoorte R. (2002). La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4^e congrès européen d'ethnopharmacologie. IRD Edition, Paris, 274

Vollhart S. (2004). Traité de chimie organique 4^{ème} édition française. [En ligne] <http://www.sudoc.fr/076452808>. Consulté le 28 mai 2016 à 16 h 12 min.

Waishong W. (2005). Study of *cis*-cinnamic acid in *Arabidopsis Thaliana*, *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**: 929–937.

Wiert C. (2006). Medicinal plants of Asia and Pacific. London: CRC Press. [En ligne] <http://www.nothingham.ac.uk/pharmacy>. Consulté le 26 mai 2016 à 19 h 39 min.

Yin Z. and Wong W. (2003). Biologically active *cis*-cinnamic acid occurs naturally in *Brassica parachinensis*, *Chinese Science Bulletin*, **48**: 555–558.