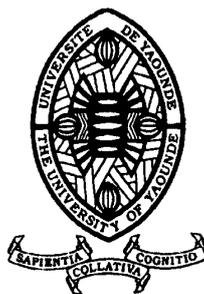


REPUBLIQUE DU CAMEROUN

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

**CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE D'UN
CHAMPIGNON ENDOPHYTE ISOLE D'UNE
PLANTE MEDICINALE CAMEROUNAISE
ALLANBLACKIA FLORIBUNDA (CLUSIACEAE)
; ISOLEMENT, CARACTERISATION ET TEST DE SENSIBILITE.**

Mémoire rédigé et présenté en exigences des conditions requises pour
l'obtention du Diplôme de Professeur de l'Enseignement Secondaire 2ème
Grade (DIPESII)

Par :

KAMOU NOUBISSIE JEANNETTE
Licenciée en Sciences

Sous la direction
Pr. KOUAM FOGUE SIMEON
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

CERTIFICATION

Je soussigné **Pr KOUAM FOGUE Siméon**, certifie que les travaux effectués par l'étudiante **KAMOU NOUBISSIE Jeannette**, matricule 10T0143, dans le cadre de son mémoire de DIPES II portant sur : CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE D'UN CHAMPIGNON ENDOPHYTE ISOLE D'UNE PLANTE MÉDICINALE CAMEROUNAISE *ALLANBLACKIA FLORIBUNDA* (CLUSIACEAE); ISOLEMENT, CARACTERISATION ET TEST DE SENSIBILITE, sont ses propres travaux et qu'ils ont été réalisés sous ma supervision au laboratoire de chimie organique de l'Ecole normale Supérieure de Yaoundé.

En foi de quoi, la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé le.....

Le Directeur de Mémoire

Pr. Kouam Fogué Siméon

DEDIDACE

Je dédie ce mémoire

A mon feu père **NOUMBISSIE Gaston**

A ma mère **NOUSSIDYAWÉ Rebecca**

A mon oncle **TAFOU Rigobert**

A tous **mes frères et sœurs**

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, j'ai l'honneur et le plaisir de remercier:

- ❖ Mon encadreur **le Pr KOUAM FOGUE Siméon** qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui, malgré ses multiples occupations m'a confié ce travail et l'a suivi de bout en bout avec beaucoup d'intérêt et de patience. Sa disponibilité, sa rigueur, et son goût pour le travail bien fait m'ont marqué d'une empreinte indélébile.
- ❖ **Pr FON ABI Charles Chef de Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé**, pour leur dévouement à la bonne marche de ce Département et pour tous les efforts qu'ils fournissent pour la formation académique des étudiants.
- ❖ **Tous les enseignants du Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé**, mes pensées vont vers les professeurs **KAPCHE Deccaux, WAFO Pascal, LAMBI John, LENTA Bruno, NGANSOP René, GOUET Bebga**, pour les enseignements et la qualité de la formation reçue qui ont été une source lumineuse pour moi dans la réalisation de ce travail.
- ❖ Mes aînés de laboratoire: **Dr. TATUEDOM Ostend, Dr NGOUONPE Alain, MOUNTESSOU Youssouf, HAPPI Gervais, TCHAMGOUE Joseph, WOUAMBA Steven, MBOBDA Sylvain, KEMGNI Mireille** pour m'avoir initié aux techniques de laboratoire, les critiques constructives et la documentation sans lesquelles je n'aurais pu réaliser ce travail
- ❖ **Monsieur GUIFFO Rodrigue** pour les efforts qu'il fournit pour l'appareillage et le bon fonctionnement du laboratoire, mais aussi pour ses conseils et sa familiarité.
- ❖ **Mes amis de laboratoire et de promotion** pour leur affection, leur soutien permanent et leurs encouragements.
- ❖ **Mes oncles et tantes TAFOU Rigobert, DEUDJUI Albert, KELEKO Marthe, YAMBOU Ghislaine, CHAYE Marcella** pour le soutien, les conseils et les encouragements.
- ❖ Mes amis de promotions **OHANDJA Robert, FOTSO Armel** en particulier au délégué **MBEGA Albert** pour leur esprit d'équipe et de partage.
- ❖ Mes amis **DOUNGUE Jimmy, TAKEU Fabrice, MBAH Steve, TEJIO Carole** pour leur aide tant matérielle que financière et surtout pour leur prière.
- ❖ **Les membres du mouvement «JEC»** pour leur collaboration, leurs conseils, leur fraternité et la disponibilité dont ils ont toujours fait preuve à mon égard.

- ❖ **Les fondations internationales: DAAD, TWAS, IFS, Humboldt, INFU** pour leur support matériel et financier.
- ❖ **Tous ceux qui de près ou de loin** m'ont aidé à divers degrés dans la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

CERTIFICATION.....	ii
DEDIDACE	iii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIERES	vi
RESUME.....	x
ABSTRACT	xi
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES SCHEMAS.....	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	2
I. REVUE SUR LA PLANTE <i>ALLANBLACKIA FLORIBUNDA</i>	2
I.1. APERCU BOTANIQUE.....	2
I.1.1. La famille des Clusiaceae (Guttifereae)	2
I.1.2. Le genre <i>Allanblackia</i>	3
I.1.3. L'espèce <i>Allanblackia floribunda</i>	4
I.1.3.1. Description botanique	4
I.1.3.2. Position systématique.....	4
I.1.3.3. Répartition géographique.....	5
I.1.3.4. Synonymes et noms vernaculaires	5
I.1.4. Usages des plantes du genre <i>Allanblackia</i>	5
I.1.4.1. Domaine alimentaire	5
I.1.4.2. Domaine industriel.....	6
I.1.4.3. En pharmacopée traditionnelle.....	6

I.2. TRAVAUX CHIMIQUES ANTERIEURS SUR LE GENRE <i>ALLANBLACKIA</i>	6
I.2.1. Les flavonoïdes	7
I.2.2. Les xanthones	8
I.2.3. Les benzophénones	10
I.3. REVUE SUR LES ENDOPHYTES	11
I.3.1. APERÇU FONGIQUE	11
I.3.1.1. Définition et biodiversité des endophytes	11
a. Définition du terme endophyte	12
b. Biodiversité des endophytes	12
I.3.1.2. Relations plante hôte-endophyte	13
I.3.2. Quelques intérêts liés à l'exploitation des endophytes	13
I.3.2.1. Intérêts écologiques	14
I.3.2.2. Intérêts thérapeutiques	14
I.3.3. Travaux chimiques antérieurs sur les endophytes	15
I.3.4. Revue sur les stéroïdes.....	17
I.3.4.1. Introduction.....	18
I.3.4.2. Origine biosynthétique.....	18
I.3.5. Quelques inconvénients liés à l'exploitation des endophytes	21
I.3.5.1. Sur le plan humain et agricole	21
I.3.5.2. Sur le plan financier	22
I.4. REVUE SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (GC-MS).....	22
I.4.1. Définition.....	22
I.4.2. Principe de base de la GC-MS.....	23
I.4.2.1. Introduction de l'échantillon	23
I.4.2.2. Ionisation.....	23
I.4.2.3. Séparation des ions	23

I.4.2.4. Détection des ions	23
I.4.3. Caractéristiques de la GC-MS	24
I.4.3.1. Spécifications Techniques.....	24
I.4.3.2. Application.....	24
I.4.3.3. Avantages.....	24
I.4.3.4. Inconvénients	24
I.4.4. Différences entre les GC-MS et LC-MS	Erreur ! Signet non défini.
CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION	26
II.1. INTRODUCTION	26
II.2. ANALYSE STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLES	29
II.2.1. Prescreening et Test de sensibilité des extraits	29
II.2.2. Analyse structurale du composé FS2	29
II.2.2. Analyse structurale du composé FS1	37
INTERETS PEDAGOGIQUES	43
INTERETS PEDAGOGIQUES	43
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	43
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	44
CHAPITRE III: PARTIE EXPERIMENTALE	45
III.1. APPAREILLAGE ET MATERIEL VEGETAL	45
III.1.1. Appareillage	45
III.1.2. Matériel Végétal.....	46
III.2. ISOLEMENT DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES	46
III.2.1. Etude bio-guidée pour la fermentation à grande échelle des souches champignons potentiels	48
III.2.2. Procédé de fermentation solide à grande échelle.....	50
III.3. Extraction, Isolement Et Purification Des Composés	50
III.3.1. Extraction	50

III.3.2. Isolement.....	51
III.4. CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES COMPOSES ISOLES.....	53
III.4.1. Composé FS1: Ergostérol	53
III.4.3. TESTS CARACTERISTIQUES	53
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	55

RESUME

Le présent travail consiste en la contribution à l'étude chimique d'un champignon endophyte isolé d'une plante médicinale Camerounaise *Allanblackia floribunda* (Clusiaceae).

Quatre souches de champignons endophytes ont été isolées en utilisant la technique de Petrini et *al en* 1986. Grâce aux tests de sensibilité antibiotique, nous avons choisi une souche pour étude et l'investigation de son extrait à l'hexane par des techniques chromatographiques usuelles (CC, CCM) nous ont permis d'isoler deux composés. Ceux-ci ont été identifiés à partir de la GC-MS à un mélange de quatre (04) stéroïdes (Ergostérol, campestérol, stigmastérol et - sitostérol) et à l'Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (3 , 22E) respectivement. Les techniques spectroscopiques RMN ¹H et RMN ¹³C suivi de la comparaison de ses données spectrales avec celles décrites dans la littérature nous ont permis de confirmer la structure de l'ergosta-5,7,22-trien-3-ol (3 , 22E).

Mots clés: champignon endophyte, *Allanblackia floribunda*, GC-MS, plante médicinale et CCM.

ABSTRACT

The present work deals with a contribution to the chemical study of endophytic fungi isolated from a Cameroonian medicinal plant named *Allanblackia floribunda* (Clusiaceae). Four endophytic fungi have been isolated using Petrini and *al* in 1986. Based on their single chemical screening and Antibiotic Sensibility test, one strain was selected for further study and the investigation of its hexane extract using usual chromatographic methods CC, TLC and GC-MS, enabled us to isolate two compounds which have been identified by spectroscopic techniques (MS, NMR¹H, NMR¹³C) to the mixture of four steroids (ergostérol, campestérol, stigmastérol and β -sitostérol) and Ergosta-5,7,22-trien-3-ol(3 β , 22E) respectively. The structure of ergosta-5,7,22-trien-3-ol(3 β , 22E) has been confirmed by comparison of its spectral data with those described in the literature.

Keywords: endophytic fungi, *Allanblackia Floribunda*, GC-MS, medicinal plant and TLC.

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

A	<i>Allanblackia</i>
AE	Acétate d'Ethyle
CC	Chromatographie sur Colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI50	Concentration inhibitrice 50%

EI	<i>Electronic Ionization</i>
FAFS	Fruit de <i>Allanblackia floribunda</i> Souche
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
Hex	Hexane
MHz	Mégahertz
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
MS (ou SM)	<i>Mass Spectrometry</i> (ou Spectrométrie de masse)
N.A	Nutrient Agar
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
Ppm	Partie par Million
RMN ¹ H	Résonnance Magnétique Nucléaire du proton
RMN ¹³ C	Résonnance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
RMN 1D	Résonnance Magnétique Nucléaire à une dimension
RT	<i>Retention time</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Spectre de masse de FS2 superposé au Spectre de masse de l'ergostérol dans la banque de données	30
Figure 2: Chromatogramme et spectre de masse de FS2	31
Figure 3: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃).....	34
Figure 4: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃).....	35
Figure 5: Profil Chromatographique GC de FS2	38
Figure 6: Spectre de masse de FS1 et banque des données du campestérol	39
Figure 7: Spectre de masse de FS1 et banque des données du stigmastérol	40
Figure 8: Spectre de masse de FS1 et banque des données du γ -sitostérol.....	41
Figure 9: Section de 1 cm ² des parties de <i>A. floribunda</i> lavés dans des solutions stérilisées	47
Figure 10 : Isolement des champignons endophytes dans les boîtes de pétri stérilisées et contenant le milieu PDA.....	48
Figure 11: Fermentation de la souche FAFS ₁ dans du riz (Culture à grande échelle)	50
Figure 12: Obtention de l'extrait brut de la souche FAFS ₁	51

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 Biosynthèse des triterpènes et stéroïdes végétaux	20
Schéma 2: Principaux enchaînements stéroïdiques de base rencontrés chez les végétaux	21
Schéma 3: Protocole d'isolement et de fermentation des endophytes	27
Schéma 4: Protocole d'isolement et de caractérisation des composés	28
Schéma 5: Fragmentation de l'Ergosterol	32

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Répartition des Clusiaceae (Guttifereae) en sous-familles, en tribus et en genres... 3	3
Tableau 2 : Position systématique de <i>Allanblackia floribunda</i> 4	4
Tableau 3 : Quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Allanblackia</i> 7	7
Tableau 4 : Quelques xanthones isolés du genre <i>Allanblackia</i> 8	8
Tableau 5: Quelques benzophénones isolées du genre <i>Allanblackia</i> 10	10
Tableau 6 : Composés d'intérêts thérapeutiques associés à la plante hôte et isolés des endophytes..... 15	15
Tableau 7: Données spectrales de RMN ¹³ C (100 MHz) et ¹ H (400 MHz) de l'ergostérol, et de RMN ¹³ C (125 MHz) et ¹ H (500 MHz) de FS2 dans CDCl ₃ 36	36
Tableau 8: Les quatre (04) stéroïdes identifiés de FS2 42	42
Tableau 9: Chromatogramme de l'extrait à l'hexane de la souche FAFS ₁ 51	51

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les investigations chimiotaxonomiques, ethnopharmacologiques, et pharmacologiques menées sur les plantes médicinales ont pour but d'isoler et caractériser les principes actifs de ces dernières (utilisées en médecine traditionnelle), pour faire face aux nombreuses maladies qui affectent la société tels que : la dysenterie, les maux de dents, les infections respiratoires.

En vue de développer de nouvelles opportunités permettant d'obtenir des composés bioactifs naturels ayant une forte efficacité et faible toxicité, les chercheurs ont développé cette dernière décennie les travaux chimiques et pharmacologiques sur les microorganismes endophytes, généralement isolés des tissus internes des plantes (Bobery et *al.* 2011). Ces endophytes ont prouvé leur capacité à produire des métabolites secondaires ayant un grand potentiel pharmaceutique qui dans certains cas peuvent être identiques ou proches de ceux produits par leurs hôtes, à l'instar des composés tels que le taxol, l'hypericine ou la camptotécine ayant des propriétés anticancéreuses (Hyde et Soyong 2008).

C'est dans l'optique d'apporter notre contribution à la production des métabolites secondaires et à la découverte de nouvelles molécules antimicrobienne que nous nous sommes proposés dans le cadre de ces travaux de recherche devant conduire à l'obtention du DIPES II, de l'étude chimiques d'un champignon endophyte isolé de *Allanblackia floribunda* . Le but de cette étude est d'isoler les métabolites secondaires d'un champignon endophyte isolé de *Allanblackia floribunda* et les caractériser par des méthodes spectroscopiques.

Ce mémoire qui résume l'essentiel de nos travaux est divisé en quatre parties: une revue de la littérature, résultats et discussion, matériels et méthodes expérimentales utilisés et en fin la bibliographie consultée.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I. REVUE SUR LA PLANTE ALLANBLACKIA FLORIBUNDA

I.1. APERCU BOTANIQUE

I.1.1. La famille des Clusiaceae (Guttifereae)

Le terme Guttifereae vient du terme malais «getha» qui signifie gomme. Les Clusiaceae ou Guttifereae forment l'une des familles les plus importantes des spermaphytes (Aubreville 1959, Berthaut 1975). Cette famille est constituée d'arbres, d'arbustes, des herbes et rarement des lianes. Les plantes de cette famille se reconnaissent facilement grâce au latex résineux jaune, orange, plus rarement blanc jaune qui s'écoule des entailles (blessures) des écorces, des fleurs et des fruits (Troupin 1982).

Leurs feuilles sont opposées, sans stipules, simples, parfois verticillées ou alternes et souvent munies de glandes opaques ou translucides ;

Les fruits ressemblent à des drupes ; les fleurs très unisexuées, possèdent 2 à 6 sépales, 4 à 5 pétales tordus en spirale rarement disposés en cercle et les étamines nombreuses sont insérées plus bas que l'ovaire; Les graines dépourvues d'albumen sont quelquefois entourées d'une excroissance (Troupin 1982).

La famille des Clusiaceae est pantropicale à l'exception du genre *Hypiéricum* qui est largement répandu dans le monde. S'étendant jusqu'aux régions tempérées de l'hémisphère nord, les guttifereae comprennent six sous familles, chacune d'elles subdivisée en tribus et chaque tribu en espèces comme le montre le tableau de classification fait par Engler Syllabus (Aubreville 1959, Berthaut 1975).

Tableau 1: Répartition des Clusiaceae (Guttifereae) en sous-familles, en tribus et en genres (Aubreville 1959, Berthaut 1975).

Sous famille	Tribus	Genres
Kielmeyeroïdeae	Kielmeyereae	<i>Kielmeyera</i> , <i>Mahurea</i>
	Caraipeae	<i>Caraipa</i> , <i>Haploclathra</i>
	Bonnetiaceae	<i>Bonnetia</i> , <i>Archytea</i>
Clusioïdeae	Clusioïdeae	<i>Clusia</i> , <i>Tovomitia</i>
	Garcineae	<i>Allanblackia</i> , <i>Garcinia</i> , <i>Rheedia</i> , <i>Pantaphalanguim</i>
Lorostemonoïdeae		<i>Lorostemon</i>
Moronoboïdeae		<i>Platonia</i> , <i>Symphonia</i> , <i>Moronobia</i> ,
Hypérycoïdeae	Cratoxyleae	<i>Cratoxylum</i>
	Hypericeae	<i>Hypericum</i>
	Vismeae	<i>Vismia</i> , <i>Harungana</i> , <i>Psorospermum</i>
Calophylloïdeae	Calophyleae	<i>Calophyllum</i> , <i>Kayea</i> , <i>Mammea</i> , <i>Mesua</i> , <i>Ochrocarpus</i>

Cette famille végétale est représentée par environ 1350 espèces réparties en 49 genres et se rencontre dans les forêts denses sempervirentes et humides, les forêts marécageuses, les bordures des rivières ainsi que dans les hautes montagnes (Troupin 1978).

I.1.2. Le genre *Allanblackia*

Le genre *Allanblackia*, qui appartient à la famille des Clusiaceae, est un arbre de moyenne grandeur, sempervirent, atteignant 30 m de haut. Le fût est assez court, rectiligne. Et cylindrique, dépourvu de contreforts mais avec parfois une base épaissie. La surface de l'écorce brun rougeâtre à noirâtre est à petites écailles irrégulières. L'écorce interne est granuleuse, rougeâtre ou brune, exsudant un peu de sève claire. Les feuilles sont opposées et blanchâtres, avec des fleurs parfumées. Les fruits contiennent des graines brunes (Munjuga

et al. 2008). Le genre *Allanblackia* comprend plusieurs espèces parmi lesquels l'espèce *Allanblackia monticola*, *Allanblackia gabonensis*, *Allanblackia floribunda*.

I.1.3. L'espèce *Allanblackia floribunda*

I.1.3.1. Description botanique

Allanblackia floribunda est un arbre atteignant 30 m de haut et 80 cm de diamètre. Sa base est légèrement empâtée et cannelée. Son fût est droit et cylindrique la cime et les branches sont courtes, horizontales et nombreuses, rayonnant dans toutes les directions et donnant à l'arbre un port caractéristique en «écouvillon». L'écorce est brune, rugueuse et écailleuse, se desquamant en petites plaques, tranches minces, cassante et exsudant un latex jaune abondant (Eyog et al. 2006).

Les feuilles sont opposées, simples à inflorescences en grappes pluriflores (Eyog et al. 2006).

Les fleurs sont grandes, unisexuées, pentamères, blanches, roses ou rouges, longuement pédicellées et odorantes (Eyog et al. 2006).

Les Fruits sont des baies ellipsoïdes, grandes, atteignant 40 × 15 cm avec plus ou moins 5 côtes longitudinales, de couleur brun clair piquetées de châtain, pendantes à l'extrémité d'un pédoncule, laissant exsuder un latex jaune abondant.

Les graines sont nombreuses, de 4 à 100 brunes, noyées dans une pulpe rosâtre mucilagineuse. (Eyog et al. 2006).

I.1.3.2. Position systématique

La position systématique de l'espèce *Allanblackia floribunda* est donnée par le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Position systématique de *Allanblackia floribunda* (Angiospermphylogeny groups 2009).

Règne	Plantea
Ordre	Malpighiale

Famille	Clusiaceae
Genre	<i>Allanblackia</i>
Espèce	<i>Allanblackia floribunda</i>

I.1.3.3. Répartition géographique

Allanblackia floribunda est une espèce que l'on rencontre dans la zone forestière pluviale, du Nigéria jusqu'à la Centrafrique et la partie orientale de la République Démocratique du Congo, du Sud jusqu'au Nord de l'Angola (Van et *al.* 2003). C'est une espèce de l'Afrique tropicale, commune des forêts denses côtières, elle est répandue de la Sierra Leone ; au Cabinda (Angola) et à l'Ouganda. Au Cameroun, elle se rencontre en forêt sempervirente de basse altitude, plus rarement en forêt caducifoliée (Tabuna 1999).

I.1.3.4. Synonymes et noms vernaculaires

Allanblackia parviflora A. Chev. Encore appelé *Allanblackia floribunda* (Carriere 2000). Outre le nom scientifique, *Allanblackia floribunda* a d'autres noms qui lui ont été attribué par la population Africaine et occidentale parmi lesquels: «biandji» chez les pygmées de Baka, «nangomo» chez les Ewondo, «eboungo» chez les Douala (Carriere 2000). D'autres appellation telles que: Bouandjo, Ouotéra (France); Vegetable tallow tree (Angleterre); Kionzo (Portugal) Sont également utilisés (Carriere 2000).

I.1.4. Usages des plantes du genre *Allanblackia*

Les plantes du genre *Allanblackia* sont largement exploitées tant en pharmacopée traditionnelle que dans les domaines alimentaires et industriels.

I.1.4.1. Domaine alimentaire

La matière grasse fournie par les graines, appelée "Allanblackia fat" ou "beurre de bouandjo" au Congo, est employée pour la cuisine et est comestible au Cameroun dans la région de Yokadouma (Vivien et Faure 1995). Les graines et les fruits sont comestibles et depuis peu, l'industrie alimentaire internationale s'intéresse à cette matière grasse comme composant solide naturel des margarines et produits analogues. Les graines sont consommées en périodes de disette et sont également employées comme appât dans les pièges pour petit

gibier. La pulpe mucilagineuse des fruits peut servir à faire des confitures et des gelées. En Amani (Tanzanie), les graines ont été largement utilisées comme un substitut du beurre dans la fabrication du chocolat au cours de la première guerre mondiale (Vivien et Faure 1995).

I.1.4.2. Domaine industriel

Les plantes du genre *Allanblackia* produisent un bois assez durable adapté pour une utilisation dans des conditions humides en particulier dans les ports, les ponts, les quais et les bois de mine. Le bois est résistant aux tarets. Au Nigeria, on l'utilise dans la construction des cases locales. Les graines fournissent une matière grasse comestible utilisée dans la cuisine, dans la fabrication du savon et dans l'industrie des cosmétiques. Actuellement, une filière commerciale internationale pour les graines et la matière grasse de *Allanblackia floribunda* se met en place au Nigéria. On estime que le Nigeria a produit en 2006 environ 50 tonnes de beurre de bouandjo (Vivien et Faure 1995).

I.1.4.3. En pharmacopée traditionnelle

Au Ghana, l'écorce pilée est utilisée comme analgésique pour les maux de dents et contre la diarrhée. Au Gabon, on emploie une décoction d'écorces internes pour traiter la dysenterie et en bain de bouche contre les maux de dents. Au Congo la plante sert à traiter les maux d'estomac. En République Démocratique du Congo, on prend une décoction d'écorces ou de feuilles pour traiter l'asthme, la bronchite et la toux. La sève pressurée de l'écorce est un composant d'un médicament employé pour traiter l'incontinence urinaire. Les petits rameaux sont employés comme cure-dents (Orwa et Munjuga 2007). Au Cameroun, la décoction des écorces de tiges est utilisée pour soigner la dysenterie et les maux de dents. Les graines sont utilisées dans la fabrication de pommade pour les démangeaisons. Les extraits des feuilles, des écorces de tiges, des racines sont utilisés seuls ou associés à d'autres plantes dans plusieurs pays d'Afrique tel que : le Gabon, le Congo, et le Cameroun pour traiter les infections respiratoires, la dysenterie, la diarrhée et les maux de dents (Vivien et Faure 1979).

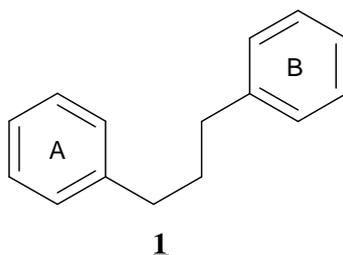
Les différents usages traditionnels et pharmacologiques des plantes du genre *Allanblackia* ont suscité des recherches phytochimiques afin d'isoler, d'identifier et de caractériser les métabolites secondaires actifs de ces plantes.

I.2. TRAVAUX CHIMIQUES ANTERIEURS SUR LE GENRE ALLANBLACKIA

Plusieurs études chimiques ont déjà été menées sur les espèces du genre *Allanblackia*. Elles ont conduit à l'isolement et à la caractérisation de plusieurs familles de composés parmi lesquels : les benzophénones polyisoprénylées (Lenta et al. 2007); les xanthones prénylées (Nkengfack et al. 2002, Menasria et al. 2008), les flavonoïdes plus généralement les biflavonoïdes (Kuete et al. 2011); et les triterpénoïdes (Azebaze et al. 2008).

I.2.1. Les flavonoïdes

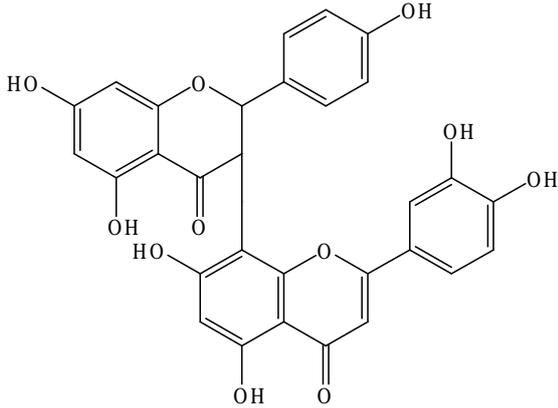
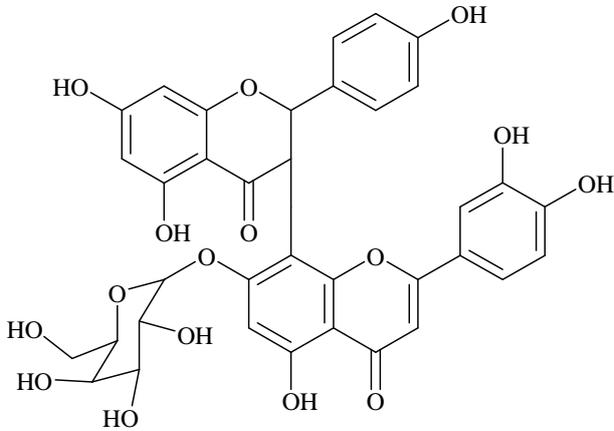
Les flavonoïdes et les biflavonoïdes sont des pigments des végétaux responsables de la coloration de toutes les parties d'une plante à l'exception des feuilles qui déclinent souvent cette règle (Bruneton 1987). Ils constituent une grande classe de composés naturels très répandus dans le règne végétal et sont des composés aromatiques dont le squelette de base **1** est C₆-C₃-C₆. Les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C et selon la nature de son hétérocycle oxygéné, on peut distinguer quelques dérivés des flavonoïdes parmi lesquels : les anthocyanosides ; les chalcones et les isoflavonoïdes.



Le tableau 3 donne les structures de quelques flavonoïdes isolés du genre *Allanblackia*.

Tableau 3 : Quelques flavonoïdes isolés du genre *Allanblackia*

Structures et Noms	Source	Activités biologiques	Références

 <p>Morelloflavone 2</p>	<p>Racines d'A. <i>floribunda</i></p>	<p>Actif sur quelques bacteries gram</p>	<p>Nkengfack et al. 2002</p>
 <p>7-O-glucoside de morelloflavone 3</p>	<p>Fruits d'A. <i>monticola</i></p>	<p>negatif et gram positif</p>	

I.2.2. Les xanthones

Les xanthones sont des pigments jaunes dont la distribution est relativement limitée. Elles ont été identifiées dans une vingtaine de familles de plantes supérieures. Ainsi que dans des fougères, mais c'est essentiellement dans les Clusiaceae et les Gentianaceae qu'on les retrouve (Urbain 2007).

les structures de quelques flavonoides isolés du genre *Allanblackia*.sont regroupés dans le tableau 4 .

Tableau 4 : Quelques xanthones isolés du genre *Allanblackia*

Structures et Noms	Sources	Activités biologiques	Références
--------------------	---------	-----------------------	------------

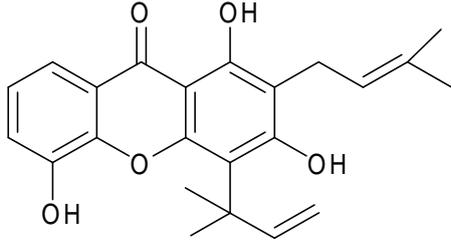
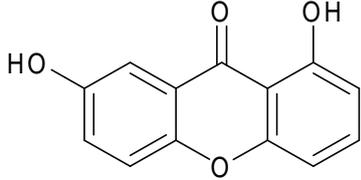
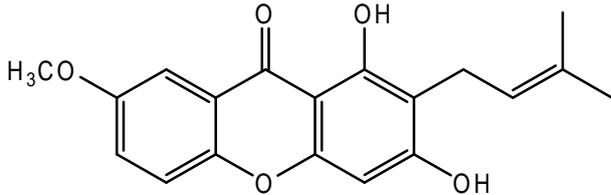
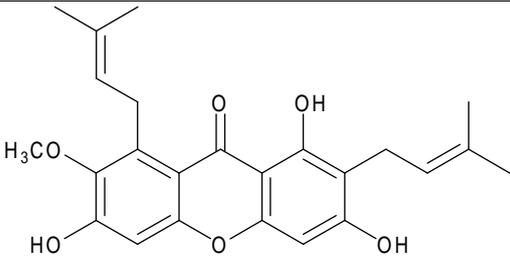
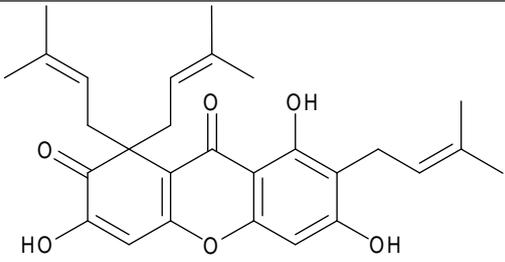
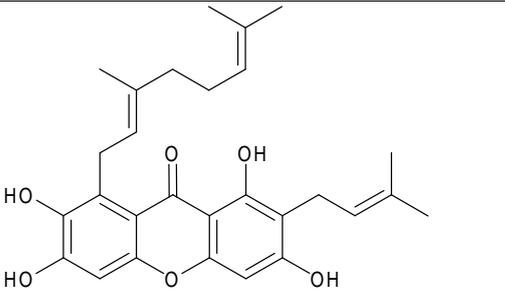
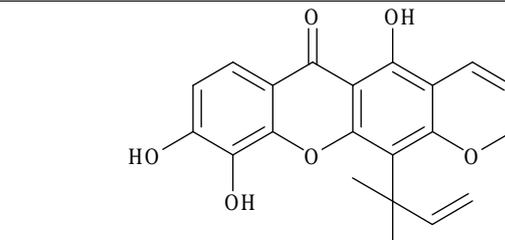
 <p>Allanxanthone A 4</p>	<p>Fruits d' A. <i>Monticola</i></p>	<p>Activités Leishmanicidal et inhibitrices Cholinesterase</p>	<p>Lenta et <i>al.</i> 2007</p>
 <p>1,7-dihydroxyxanthone 5</p>	<p>Racines d'A. <i>gabonensis</i></p>	<p>Activités antitumorale, Antimycobactérienne, antibactérienne, , antifongique et antioxydante</p>	<p>Menasria et <i>al.</i> 2008</p>
 <p>1,3-dihydroxy-7-méthoxy-2-(3-méthylbut-2-ényl)xanthone 6</p>	<p>Tronc d' A. <i>monticola</i></p>		

Tableau 4 : Quelques xanthones isolés du genre *Allanblackia* (suite)

Structures et Noms	Sources	Références
 <p>-mangostine 7</p>	<p>Tronc d' A. <i>monticola</i></p>	

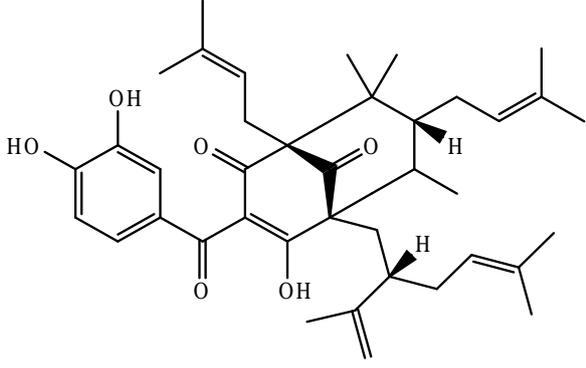
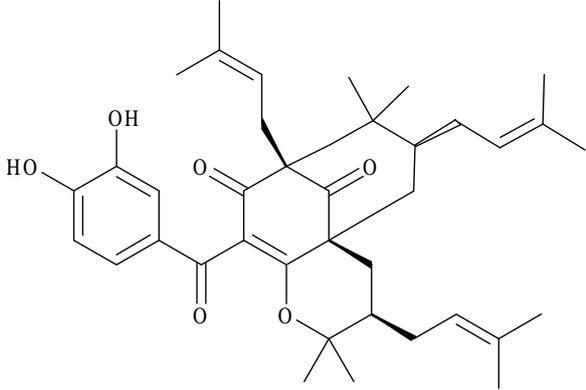
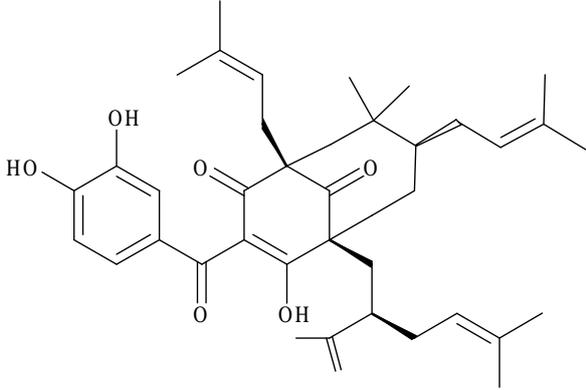
 <p>Allanxanthone C 8</p>	<p>Fruits d'A. <i>Monticola</i></p>	<p>Menasria et al. 2008</p>
 <p>Norcowanine 9</p>	<p>Fruits d' A. <i>monticola</i></p>	
 <p>Macluraxanthone 10</p>	<p>Fruits d' A <i>floribunda</i></p>	

I.2.3. Les benzophénones

Le tableau suivant donne les structures de quelques flavonoïdes isolés du genre *Allanblackia*.

Tableau 5: Quelques benzophénones isolées du genre *Allanblackia*

Structures et Noms	Sources	Activités biologiques	Références

 <p>Garcinol 11</p>	Fruits d'A. <i>monticola</i>	Activités <i>Leishmanicidal</i> et inhibitrices <i>Cholinesterase</i>	Lenta et al. 2007
 <p>30-<i>epi</i>-cambogine 12</p>	Fruits d'A. <i>monticola</i> . Ecorces d'A. <i>ulugurensis</i>	Activités antitumorale, antimycobactérienne, antibactérienne, antifongique et antioxydante	
 <p>Guttiferone F 13</p>	Fruits d'A. <i>monticola</i>	Plus active (CI50 = 3,50 µM) sur BChE que galanthamine (CI50 = 8,50 µM); Faible activité anti-VIH sur l'essai de protéase (protéinase)	Lenta et al. 2007, Magadula 2012

Vue les nombreux usages des plantes du genre *Allanblackia* et de la relations qu'entretiennent les plantes et les endophytes nous avons envisagés l'étude des champignons endophytes isolés de *A. Floribunda*.

I.3. REVUE SUR LES ENDOPHYTES

I.3.1. APERÇU FONGIQUE

I.3.1.1. Définition et biodiversité des endophytes

a. Définition du terme endophyte

Un endophyte est avant tout un microorganisme. Ce dernier est communément appelé microbe, c'est un organisme vivant, généralement invisible à l'œil nu et qui ne peut être observé qu'à l'aide d'un microscope.

Tous les micro-organismes sont représentés par diverses formes de vie dont les bactéries, certains champignons microscopiques, les archéobactéries, les protistes, les plantes microscopiques (appelées algues vertes) et des animaux tels que le plancton, la planaire et l'amibe. Les micro-organismes peuvent être la cause de plusieurs maladies infectieuses (Nasser 2005).

Littéralement, le mot endophyte vient du mot grec («*Endon*» qui signifie «dans» ou à «l'intérieur» et «*phyton*» qui signifie plante). Les endophytes sont des micro-organismes vivants dans les tissus internes des plantes sans causer aucun symptôme apparent chez leur hôte (Véga et *al.* 2008). Ce sont des microbes saprophytes, généralement des bactéries et dont les plus isolées sont des champignons (Strobel et *al.* 2004). Les champignons endophytes peuvent croître sous la couche des cellules épidermiques (Morrica et *al.* 2008). Ils sont présents et ont été isolés de toutes les plantes jusqu'ici investiguées pour leur recherche (Hyde et Soyong. 2008). Leur façon de croître asymptomatiquement dans les tissus de plantes a induit que leurs relations avec leur hôtes ont été qualifiées de mutualisme et de symbiose (Strobel et *al.* 2004).

b. Biodiversité des endophytes

Les endophytes représentent un groupe très diversifié (Zabalgageazcae 2008), avec une estimation de 1,5million d'espèces (Fernandez et *al.* 2009), et une moyenne d'environ 50 espèces par espèce de plante étudiée. Ils sont présents dans tous les niches de la terre (Hassan et *al.* 2011). Ils peuvent être transmis d'une plante à une autre via les spores ou d'une plante à sa descendance via les graines (Zéroung et *al.* 2011). Les endophytes les plus présents dans les plantes sont des champignons qui appartiennent pour la plupart à l'embranchement des Ascomycètes. On les retrouve dans toutes les parties de la plante (feuilles, graines, racines, fruits, troncs), dans l'eau, le sol et l'air.

Les bactéries et/ou les champignons endophytes peuvent être omniprésents dans le règne végétal. Ces champignons microscopiques infectent la plupart des plantes dans les écosystèmes naturels sans que la plante ne développe aucune pathologie d'origine fongique (Arnold 2003). Ces micro-organismes identifiés comme saprophytes au cours de leur cycle

de vie sont taxonomiquement variés. Mais ils partagent tous le même caractère: Coloniser les tissus internes des végétaux sans causer de mal apparent à leur hôte (Arnold 2001). Historiquement, sur la base de la phylogénie (ou phylogénèse) et en fonction des traits de vie, la distinction de deux principaux groupes d'endophytes fongiques a été faite : La famille des *Clavicipitaceae* (C) et la famille des non *Clavicipitaceae* (NC).

Les champignons endophytes à l'heure actuelle restent un nouveau domaine d'exploitation des métabolites secondaires et leur relation avec la plante hôte varie en fonction de plusieurs facteurs.

I.3.1.2. Relations plante hôte-endophyte

Les champignons possèdent différents modes de vie, donnant différentes interactions qui sont variables d'une hôte à l'autre et d'un endophyte à l'autre. Ces modes de vie dépendent des facteurs abiotiques, des interactions avec d'autres espèces, de la géographie, de la phylogénie et varie de l'antagonisme au mutualisme (Arnold et Lutzoni 2007).

La relation entre la plante hôte-endophyte peut être une relation d'antagonisme équilibrée au cours de laquelle un endophyte évite de priver son hôte des métabolites toxiques, et réussit à se développer dans la plante sans causer aucune manifestation d'infection ou de maladie. La plante fournit aux endophytes des nutriments et les endophytes à leur tour protègent la plante contre toute attaque pathogène en production des métabolites secondaires toxiques. C'est pour cela que la relation est qualifiée de symbiose ou de mutualisme. Dans ce cas, la colonisation est asymptomatique et est qualifiée comme un équilibre entre plante hôte-endophyte. Les endophytes et les microbes pathogènes possèdent tous des facteurs virulents qui sont contrôlés par des mécanismes de défense de la plante. Si la virulence fongique et la défense par la plante sont équilibrées, alors la relation demeure apparemment asymptomatique et non virulente. Si les mécanismes de défense par la plante contrecarrent complètement les facteurs virulents du champignon, ce dernier sera vaincu. Réciproquement, si la plante fléchit à la virulence fongique, une relation plante hôte- microbe pathogène conduirait à la maladie de la plante (Kusari 2012).

I.3.2. Quelques intérêts liés à l'exploitation des endophytes

Les endophytes présentent outre l'intérêt lié à la préservation écologique, plusieurs intérêts thérapeutiques et la découverte de nouvelles voies biosynthétiques. L'étude des endophytes est avantageuse en ce sens que les métabolites secondaires produits par ces derniers peuvent être modifiés. Ceci passe par les modifications et par un contrôle apporté aux

conditions de culture (type de milieu, sa composition, aération, pH, température, P_{O2}, P_{CO2}, agitation, prélèvement) afin de produire de nombreux composés nouveaux ou connus (Zabalgogezcoa 2008).

I.3.2.1. Intérêts écologiques

Les champignons endophytes reçoivent la nutrition, la protection, et la possibilité de se propager grâce à leurs hôtes. En retour, la plante hôte bénéficie aussi de certains avantages procurés par l'endophyte. Contrairement à l'étude phytochimique au cours de laquelle on isole les métabolites secondaires d'une plante de l'écosystème naturel après avoir enlevé une quantité importante de la plante qui a pour conséquence la destruction de l'écosystème naturel avec la disparition d'espèces, l'étude des endophytes pour la même cause utilise de faibles quantités d'espèces écologiques ce qui permet de préserver l'environnement. (Kusari et al. 2009).

I.3.2.2. Intérêts thérapeutiques

Les champignons endophytes sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (Kusari et al. 2010). Plusieurs autres métabolites produits par les plantes ont été aussi produits par les endophytes qui leurs sont associés. Parmi ces métabolites nous avons:

La Camptothécine **14** qui est un antinéoplasique et ses analogues à l'instar de la déoxypodophyllotoxine, la podophyllotoxine qui sont des médicaments pro-anticancéreux (Clay et al. 2002).

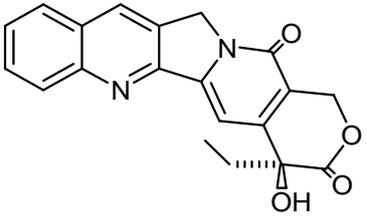
- La Vinblastine **15** et ses analogues qui sont des agents anticancéreux (Strobel et al. 2004).
- L'Hypericine **17** et l'émodine, des médicaments antidépresseurs et l'azadirachtine A et B, des insecticides (Zhao et al. 2010).
- Les Echinocantines tel que la caspofongine qui est un médicaments antifongiques, les alcaloïdes d'ergot, pour le traitement de la migraine (Nai-Yun et al. 2013).
- L'oxysporidinone **19** qui est présentant des activités antimicrobienne et cytotoxique contre la lignée cellulaire A 549 (Quan-Xin et al. 2011).
- La cyclosporine, un médicament immunosuppressi), la Lovastatine, pour baisser le taux de cholestérol

- Le Taxol **20** qui est un anticancéreux contre le cancer du sein humain (Pandi et al. 2011).

I.3.3. Travaux chimiques antérieurs sur les endophytes

Les champignons endophytes donne une variété de métabolites secondaires avec des structures et d'importantes activités biologiques ; à l'instar des stéroïdes, des pyrones, alcaloïdes et des polycétones (Zhao et al. 2010).

Tableau 6 : Composés d'intérêts thérapeutiques associés à la plante hôte et isolés des endophytes

Structure et Nom(s)	source et/ou champignon	Références
 Camptotécine; 14	<i>Nothapodytes foetida</i> et <i>Entrophosphora infrequens</i>	Arora et al. 2010

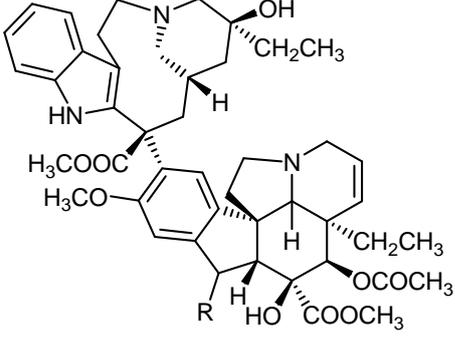
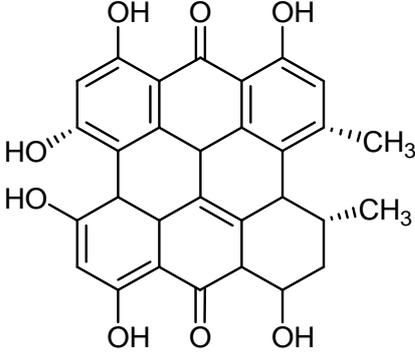
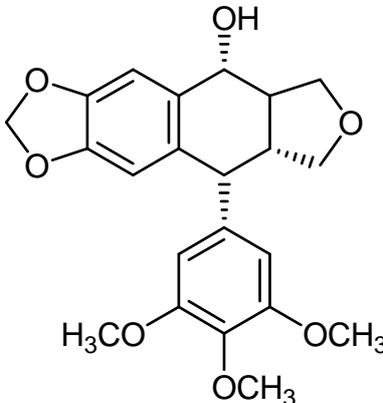
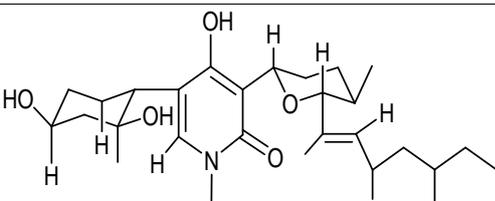
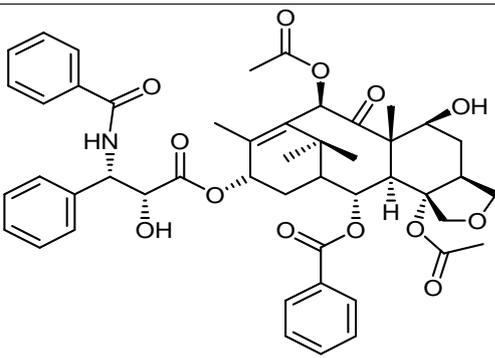
 <p>R=CH₃ Vinblastine; 15 R=CHO Vincristine; 16</p>	<p><i>Catharanthus roseus</i> et <i>Alternaria sp</i></p>	<p>Strobel et al . 2004</p>
 <p>Hypericine; 17</p>	<p><i>Hypericum perforatum</i> et <i>Chetomium globosum</i></p>	<p>Abu-Darwish et al. 2008 et Wilson 1966</p>

Tableau 6 : Composés d'intérêts thérapeutiques associés à la plante hôte et isolés des endophytes (suite)

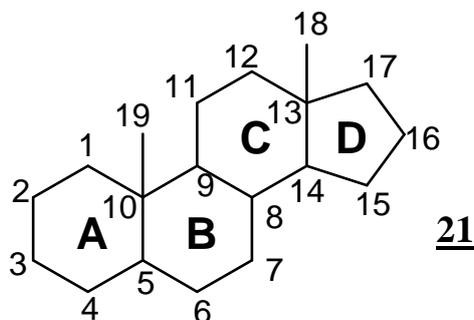
structure et Nom(s)	source et/ou champignon	Références
 <p>Podophyllotoxine 18</p>	<i>Dyosma Veitchii</i> et <i>Penicillium implication</i>	Nai-Yun et al. 2013
 <p>Oxysporidinone 19</p>	Ecorces <i>Cinnamomum</i> <i>Kanehirae</i> et <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	Nai-Yun et al. 2013
 <p>Taxol 20</p>	<i>Morinda Citrifolia</i> et <i>Lasiodiplodia</i> <i>Theobromae</i>	Zhang et al. 2010

Les stéroïdes constituent l'une des principales classes de molécules terpéniques isolées des champignons endophytes. Il est alors indispensable pour nous d'élargir notre investigation sur cette classe de composés.

I.3.4. Revue sur les stéroïdes

I.3.4.1. Introduction

A l'origine le nom de « stérol » (du grec stéréos qui signifie solide) a été donné aux alcools solides issus de l'insaponifiable des extraits lipidiques des tissus végétaux. Le nom général de « stéroïde » fut introduit en 1936 pour couvrir tous les composés dont le squelette est du type stérol, appelé perhydrocyclopenténophénanthrène (Klyne 1966).



Les stéroïdes constituent une grande famille de composés largement répandus dans la nature, aussi bien dans le monde végétal qu'animal. Dans la nature, on distingue le stigmastérol, l'ergostérol, le cholestérol (Geoffrey 1998). Les stéroïdes végétaux se distinguent par une grande diversité structurale. Ceci induit des composés aussi différents quant à leurs propriétés que les phytostérols, les saponosides, les ecdystéroïdes, les glycosides cardiotoniques ou les alcalamines stéroïdiques (Bruneton 1999)

I.3.4.2. Origine biosynthétique

Les stéroïdes et les triterpènes ont la même origine biosynthétique. Donc issus de la voie acétate, à partir de l'acétyl-CoA l'unité isoprénique constitue le motif de base. Il existe deux routes de biosynthèse de l'unité isoprène, la route de l'acide mévalonique (MVA pour « mevalonic acid ») et celle du 2-désoxyxylulose (Rodney et al. 2000). Les deux voies partent du glucose et utilisent l'acide pyruvique comme intermédiaire et passent par le squalène.

Cyclisation du squalène

De la conformation initiale de 2,3-époxydosqualène, dépend l'orientation de la biosynthèse vers les stéroïdes d'une part, et les triterpènes tétracycliques (Huang et al. 2007), d'autre part, il apparaît ainsi:

- Si l'époxydosqualène est maintenu dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostane qui réarrange ensuite en cycloarténol, par l'intermédiaire du cycloeucaalénol et de l'obtusifoliol. Celui-ci conduit aux phytostérols

(Bruneton 1999).

• Si l'époxysqualène est maintenu dans une conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation dammarane, ce dernier peut subir un réarrangement, formant un cycle supplémentaire qui conduit aux triterpènes pentacycliques (Bruneton 1999). Ces deux processus de cyclisation sont illustrés dans la figure 1 :

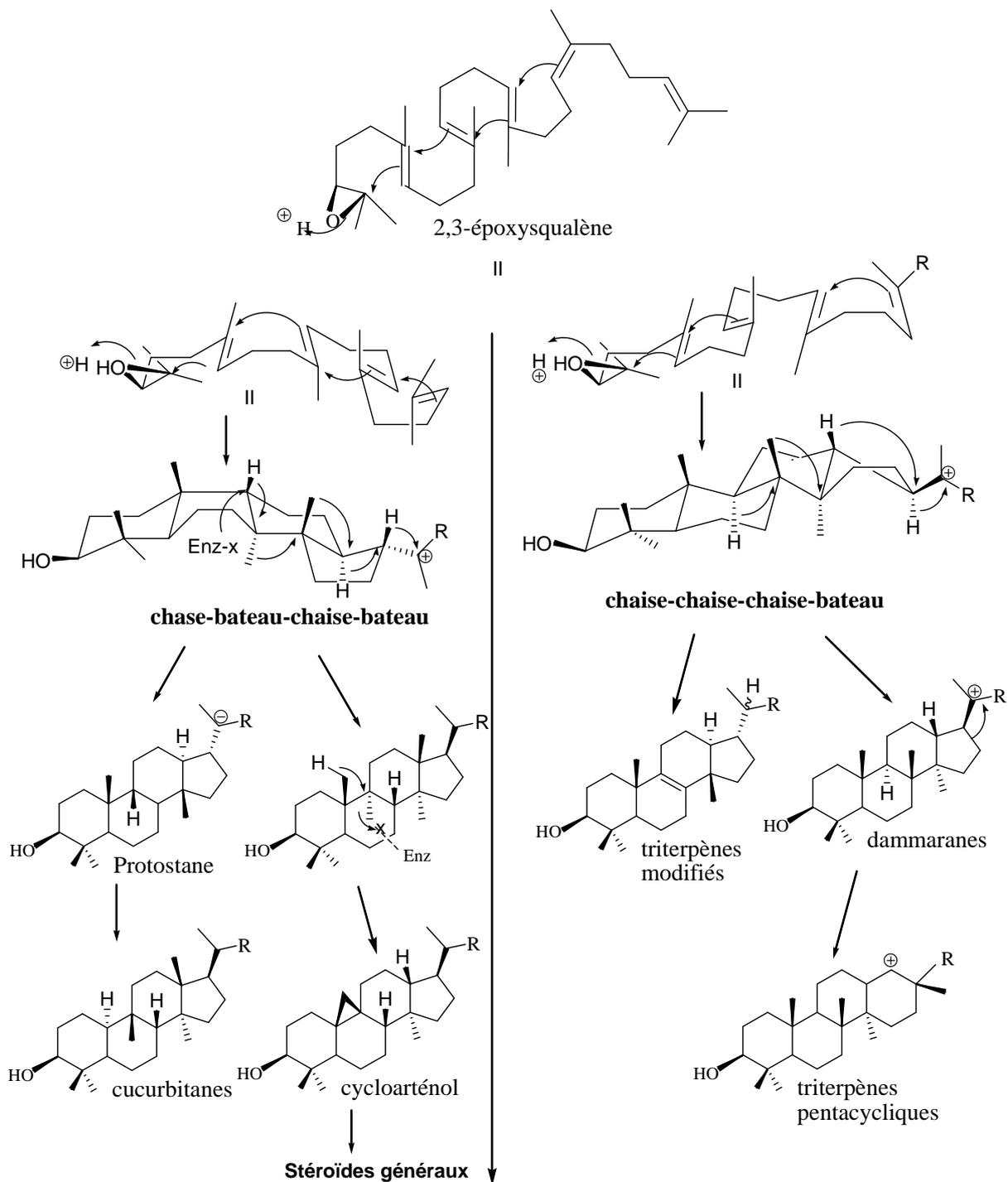


Schéma 1 Biosynthèse des triterpènes et stéroïdes végétaux (Bruneton 1999).

Le passage d'un squelette en C₃₀ à un squelette en C₂₈, c'est-à-dire aux stéroïdes, implique au minimum une déméthylation progressive en C-4 et en C-14. On note également une rupture du cyclopropane du cycloarténol et un déplacement de la double liaison engendrée par cette rupture. Les deux méthyles en C-4 sont perdus par une décarboxylation. Une oxydation préalable de l'hydroxyle en C-3 conduit à un -cétoacide, ce qui facilite la

décarboxylation finale. Le méthyle en C-14 est éliminé après oxydation sous forme d'acide formique (Bruneton 1999). Les principaux enchaînements stéroïdiques de base rencontrés chez les végétaux sont représentés dans la figure 2 :

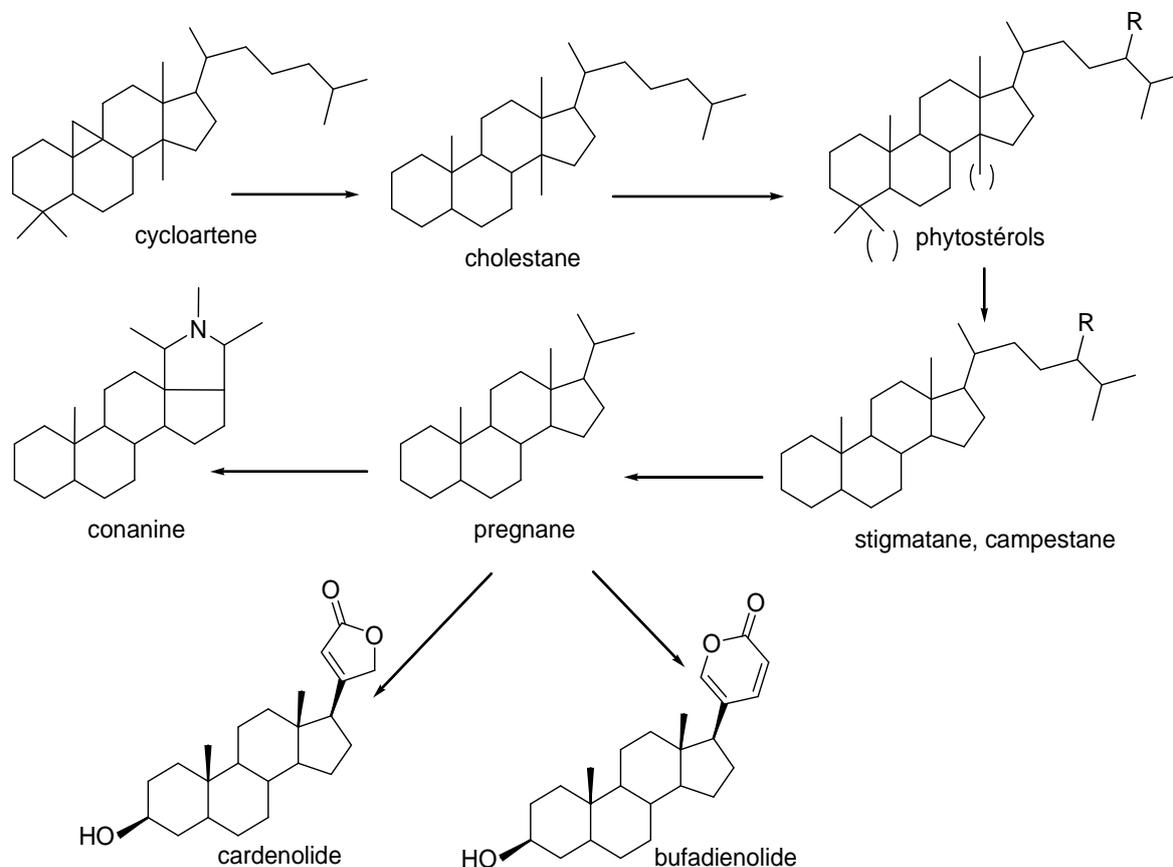


Schéma 2: Principaux enchaînements stéroïdiques de base rencontrés chez les végétaux (Bruneton 1999).

I.3.5. Quelques inconvénients liés à l'exploitation des endophytes

L'exploitation des champignons endophytes a beaucoup d'inconvénients.

I.3.5.1. Sur le plan humain et agricole

Ils peuvent coloniser différents types de substrats: les céréales, le lait, la viande, l'eau, le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition entraînant la perte des propriétés organoleptiques et constituant un poison pour la consommation (Cristina 2007). Ainsi leur isolement au laboratoire peut se révéler fatale pour l'homme.

Les infections causées par *Penicillium* sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores systématiques touchant la peau et les organes profonds tels que le foie, la rate, les ganglions, l'os etc (Cristina 2007). L'invasion des *Trichoderma* chez l'être humain

peut engendrer des tumeurs inflammatoires, des péritonites, des hématomes péri-hépatites, des abcès cérébraux, les septicémies, des infections épidermiques et sous cutanées et des kératites fongiques (Mohamed 2006).

I.3.5.2. Sur le plan financier

Les appareils utilisés sont très coûteux et révèlent une utilisation complexe et détaillée. De plus les milieux de culture et les solvants utilisés ne sont pas à la portée de tout le monde.

L'utilisation des techniques spectroscopiques modernes a largement facilité la détermination des structures des substances naturelles. Les techniques les plus usuels sont les spectroscopies RMN ¹³C et RMN ¹H ainsi que la spectrométrie de masse. On fait également recours aux méthodes de couplage tel que la GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse).

I.4. REVUE SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (GC-MS)

I.4.1. Définition

Il existe plusieurs techniques pour séparer et identifier différents composés présents dans un échantillon. La chromatographie est un exemple de technique de séparation. Cette technique repose sur les différences d'affinité des composés d'un mélange avec deux phases non miscibles : la phase stationnaire et la phase mobile. La chromatographie en phase gazeuse (GC) est l'un des principaux types de chromatographie (Ambrose 1961). La spectrométrie de masse quand elle est une technique de détection, d'identification et de quantification des composés.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (en anglais *Gas chromatography-mass spectrometry* ou GC-MS) est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge et des bases de données. Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces. La création du premier bon spectromètre de

masse pour un système chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse a été conçu par Bill Kelley et Ted Adlard dans leurs laboratoires de recherche (Haleem, 2001).

I.4.2. Principe de base de la GC-MS

I.4.2.1. Introduction de l'échantillon

Dans un premier temps, cette technique démarre comme une chromatographie en phase gazeuse normale. Un échantillon (sous forme de liquide volatil), est introduit en tête de la colonne dans l'injecteur par une microseringue. La colonne, balayée en continu par un gaz porteur, va entraîner les différentes composantes de l'échantillon et ainsi les amener à se détacher les unes des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire (Acree et William 1998). Une fois séparées, ces différentes composantes sont détectées en sortie de colonne par un détecteur, le spectromètre de masse. Les composantes sont alors introduites directement dans ce dernier qui est relié au chromatographe.

I.4.2.2. Ionisation

Une fois à l'intérieur de l'appareil, une source ionise et vaporise les différentes molécules. La source la plus utilisée est l'ionisation électronique (IE) (Manfred et al. 1997). Pour ce type d'ionisation, la source est un réseau électrique à deux entrées et sorties permettant le transfert d'énergie. Un courant s'écoule au travers de la source ce qui induit perpendiculairement un courant électronique entre un filament chaud (la cathode) et une anode. Les molécules sont alors bombardées par des électrons libres émis par ce filament. L'interaction des électrons et de ces molécules neutres génère des ions moléculaires chargés positivement. Les molécules qui ne sont pas ionisées sont éloignées de la source par le vide poussé. Les ions moléculaires produits dans la source sont maintenant accélérés et focalisés (Harold et James 2011).

I.4.2.3. Séparation des ions

La séparation des ions se fait dans l'analyseur de masse à quadripôle. Sous l'effet d'un champ magnétique, les ions vont osciller le long de l'axe des z du filtre quadripolaire à une tension continue (U) et une tension alternative (V) réglées par l'appareil afin que seuls les ions de rapport masse sur charge (m/z) choisi puisse traverser le filtre quadripolaire et se rendre jusqu'au détecteur (Manfred et al. 1997).

I.4.2.4. Détection des ions

La dernière étape est la détection des ions. À ce moment-là, les ions sont récoltés sur un multiplicateur d'électrons. D'une part, le détecteur convertit les ions en signal électrique (plus il y a d'ions, plus le courant est important). D'autre part, le détecteur amplifie le signal obtenu ce qui permet le traitement informatique, c'est-à-dire l'obtention de spectre (Robert et *al.* 2005).

I.4.3. Caractéristiques de la GC-MS

I.4.3.1. Spécifications Techniques

Signaux détecté : ions moléculaires & ions fragments caractéristiques

Éléments détectés : ions moléculaires jusqu'à 800 m/z

Seuils de détection : 40 mg (balayage complet) 10 mg (dégazage)

I.4.3.2. Application

- ❖ Identifier et quantifier les composés organiques volatiles dans les mélanges
- ❖ Études de dégazage
- ❖ Tests pour solvants résiduels Injection de liquides et de gaz
- ❖ Évaluer les extraits des plastiques Évaluer les contaminants sur les wafers (substrats) des semi-conducteurs (désorption thermique) (Manfred et *al.* 1997).

I.4.3.3. Avantages

- ❖ Permet d'identifier les composantes organiques en scindant les mélanges complexes
- ❖ Permet l'analyse quantitative des composés
- ❖ Permet la détermination du niveau de trace de la contamination organique (Dynamic Headspace Analysis) (Manfred et *al.* 1997).

I.4.3.4. Inconvénients

Les échantillons doivent être soit volatiles et thermiquement stable., soit susceptible de dérivation

Si l'échantillon n'est pas volatile (comme dans l'espace de tête, la pyrolyse ou la sonde directe), alors le matériel analysé doit être volatile (Robert et *al.* 2005).

Les échantillons sont généralement analysés sous forme de solutions organiques, par conséquent, des matériaux d'intérêt (par exemple, les sols, les sédiments, les tissus, etc.) doivent être extraites avec des solvants et l'extrait soumis à diverses techniques «chimique humide» avant que l'analyse GC / MS soit possible (Robert et *al.* 2005).

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. INTRODUCTION

Les fruits de *Allanblackia floribunda* ont été récoltés le 10 novembre 2014 à Kye-Ossi Département de la vallée du Ntem, région du Sud Cameroun. L'identification de cette espèce a été faite par M. VICTOR NANA, botaniste à l'Herbier National du Cameroun. Ces fruits ont été lavés pour se débarrasser de toute saleté puis séchées sur papier filtre. Le Nutrient Agar a été utilisé pour isoler les endophytes et cinq souches différentes ont été identifiées sur la base de leur aspect physique et de leur morphologie. Il s'agit de (FAFS₁, FAFS₃, FAFS₅, FAFS₆ et FAFS₁₀ (des graines)). Ils ont ensuite subi chacun une fermentation à petite échelle et le test de susceptibilité antibiotique (AST) à permis de choisir la souche FAFS₁ pour la fermentation à grande échelle dans le riz (milieu solide). L'extraction faite à l'aide de l'acétate d'éthyle a permis d'obtenir 125,5 g d'extrait brut. 120 g de cet extrait ont subi un partitionnement et 78,8 g de la fraction à l'hexane ont été fixées sur une masse équivalente de silice puis chromatographies sur une colonne de gel de silice et éluées au système Hexane/Acétate d'Ethyle de polarité croissante. Le protocole d'isolement, de fermentation et de caractérisation de FS₁ et FS₂ est résumé dans les figures 3 et 4 ci-dessous.

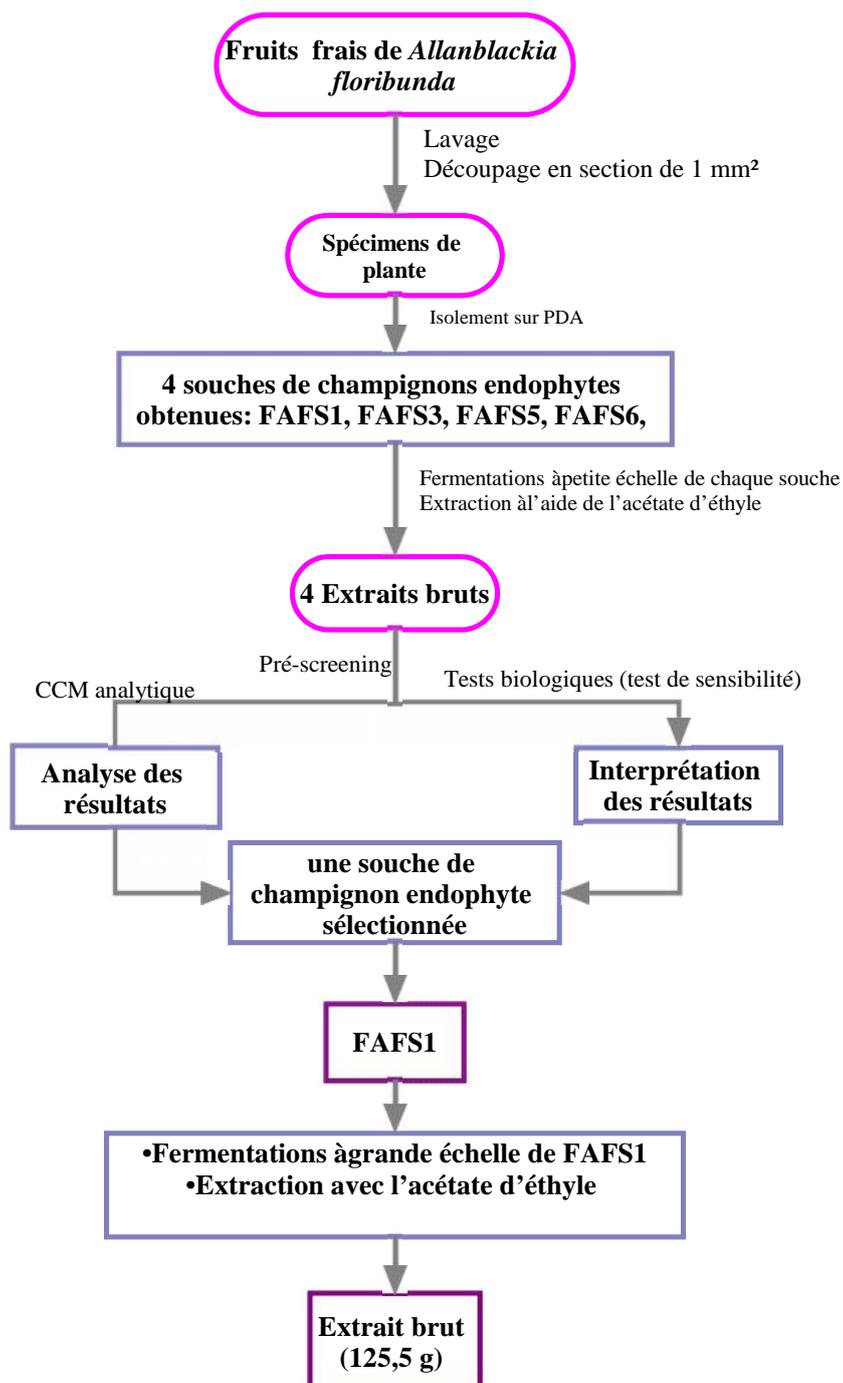


Schéma 3: Protocole d'isolement et de fermentation des endophytes

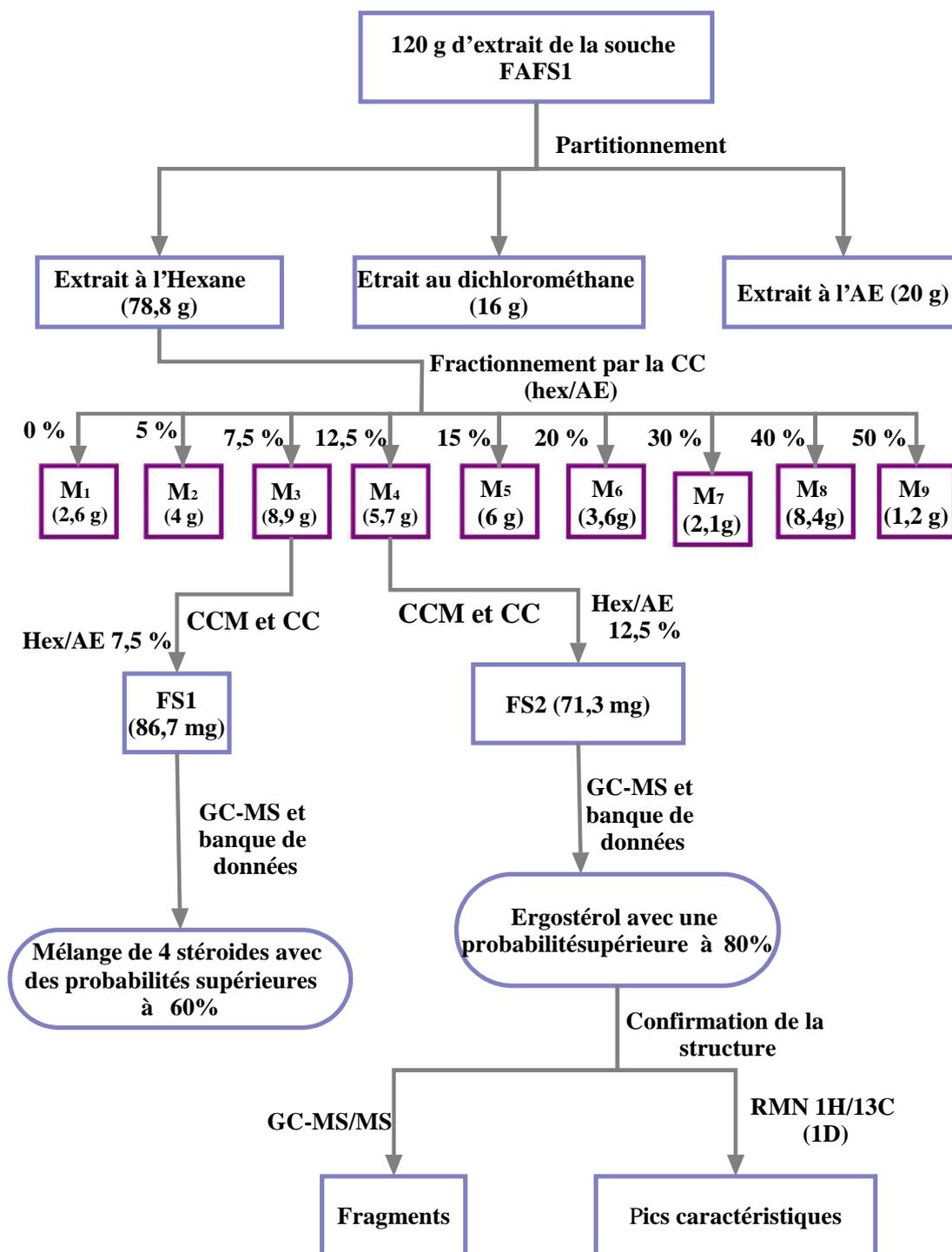


Schéma 4: Protocole d'isolement des composés

Prescreening et Test de sensibilité des extraits

Au cours des travaux réalisés sur les endophytes fongiques isolés des fruits de *A. floribunda*, 04 souches principales ont été isolés. Après fermentation à petite échelle, le prescreening consistait en l'analyse de chromatographie CC (CCM) des 04 extraits obtenus ; mais surtout en des tests de sensibilité des 04 extraits produits par ces endophytes sur 10 souches bactériennes à savoir Ae (*Aeromonassp*), CA (*Candida albicans*), Ci (*Citromonas sp.*), EC (*Escherichia coli*), KP (*Klebsiella pneumoniae*), PA (*Pseudomonas aeruginosa*), SA (*Staphylococcus aureus*), SO (*Serratia oxytoca*), SP (*Streptococcus pneumonia*), Staph (*Staphylococcus sp.*).

L'interprétation des résultats a permis d'observer que les extraits bruts produits les quatre souches fongiques sont active sur 6 souches de bactéries (Ae, CA, Ci, EC, SO, et Staph) montrant une zone claire ou zone d'inhibition (ZOI), autour des disques. La souche FAFS₁ à été choisie par combinaison des résultats des deux analyses chimiques et biologiques, révélant une aptitude de la souche FAFS₁ à produire un large nombre de métabolites ayant une bonne activité antibactérienne.

II.2. ANALYSE STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLEES

II.2.1. Analyse structurale de FS2

FS2 cristallise sous forme d'aiguilles blanches dans le mélange Hexane/Acétate d'éthyle (87,5:12,5), fond à 159°C. Il est soluble dans le chlorure de méthylène (CH₂Cl₂) et réagit positivement au test de Liebermann Burchard, donnant une coloration bleue qui vire rapidement au vert foncé, caractéristique des stérols.

Sur son spectre de masse GC-MS, la résolution du pic apparaissant au temps de rétention RT=17,96 min a permis d'avoir le spectre de masse obtenu par ionisation par impact électronique (IE) qui laisse entrevoir un ensemble de pics dont celui de l'ion moléculaire à $m/z = 396,339$. La comparaison de ce spectre à celui présent dans la banque des données de la GC-MS s'est fait en superposant le spectre de masse obtenu et le spectre de masse présent dans la banque de données. Les correspondances entre les pics permet d'avoir un tableau de probabilité Fig 5 dans lequel toutes les probabilités supérieures à 80% correspondent à l'ergosterol. La structure de l'ergosterol est obtenue avec une probabilité égale à 83% (Figure 1).

La confirmation de la structure proposée par l'analyse GC-MS s'est faite par deux méthodes dont une méthode spectroscopique incluant l'analyse des fragments obtenus par GC-MS/MS et une spectroscopique spécifiant les valeurs de RMN ^1H et ^{13}C du composé FS2.

En analyse GC-MS, le composé à RT = 25,77 min (Figure 2) correspond au spectre de masse ressortant sept pics qui correspondent aux différents ions produits par ionisation et la fragmentation de l'ion moléculaire à savoir m/z 396,4 ; 378,4 ; 362,4 ; 336,4 ; 270,3 ; 252,3 et 212,3. Les différents fragments correspondant aux masses produites ont permis de confirmer la structure de FS2 comme étant celle de l'ergostérol (schema 5).

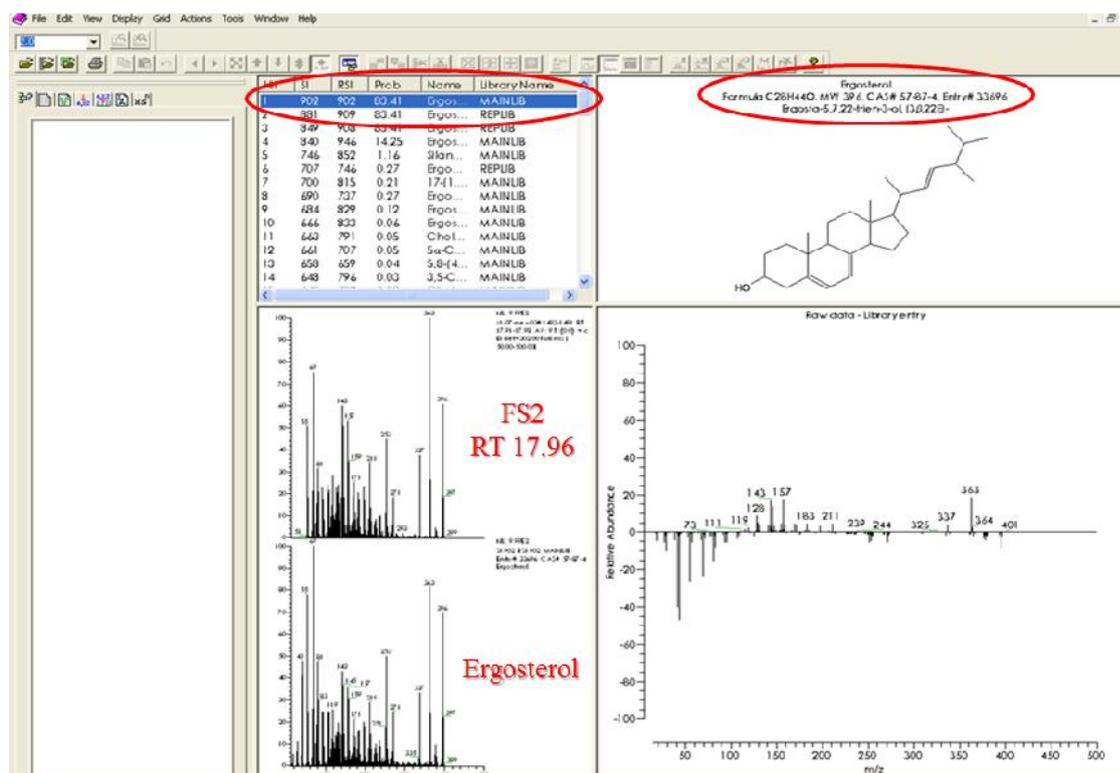


Figure 1: Spectre de masse de FS2 superposé au Spectre de masse de l'ergostérol dans la banque de données

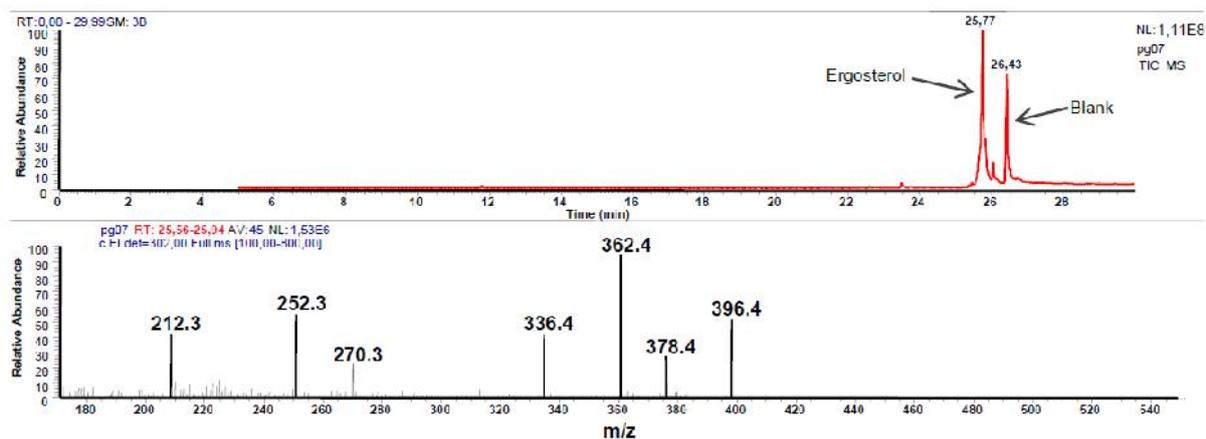


Figure 2: Chromatogramme et spectre de masse de FS2

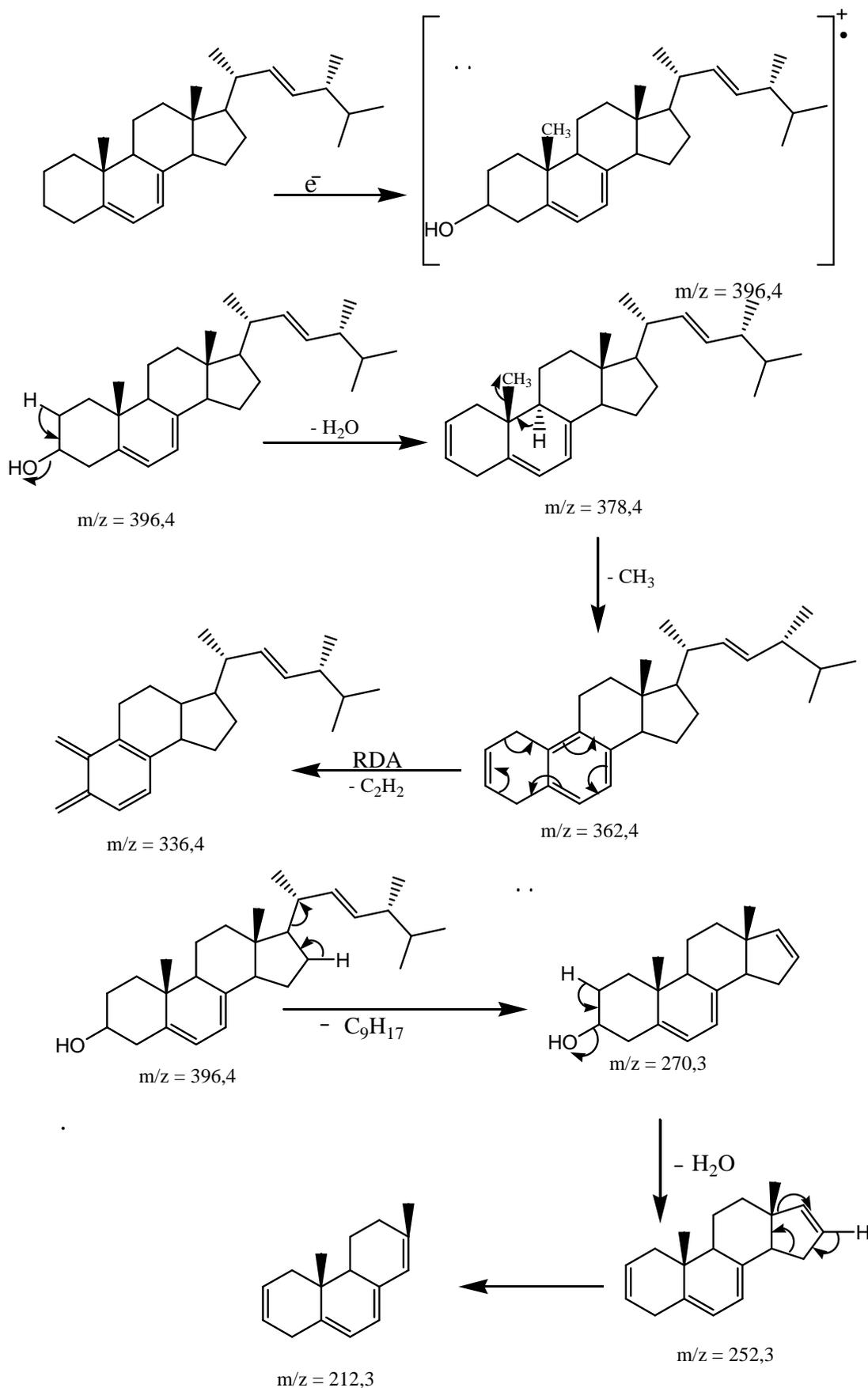


Schéma 5: Fragmentation de l'ion moléculaire

En outre de l'analyse GC-MS, d'ample confirmées ont été donnée par l'analyse des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C de FS2

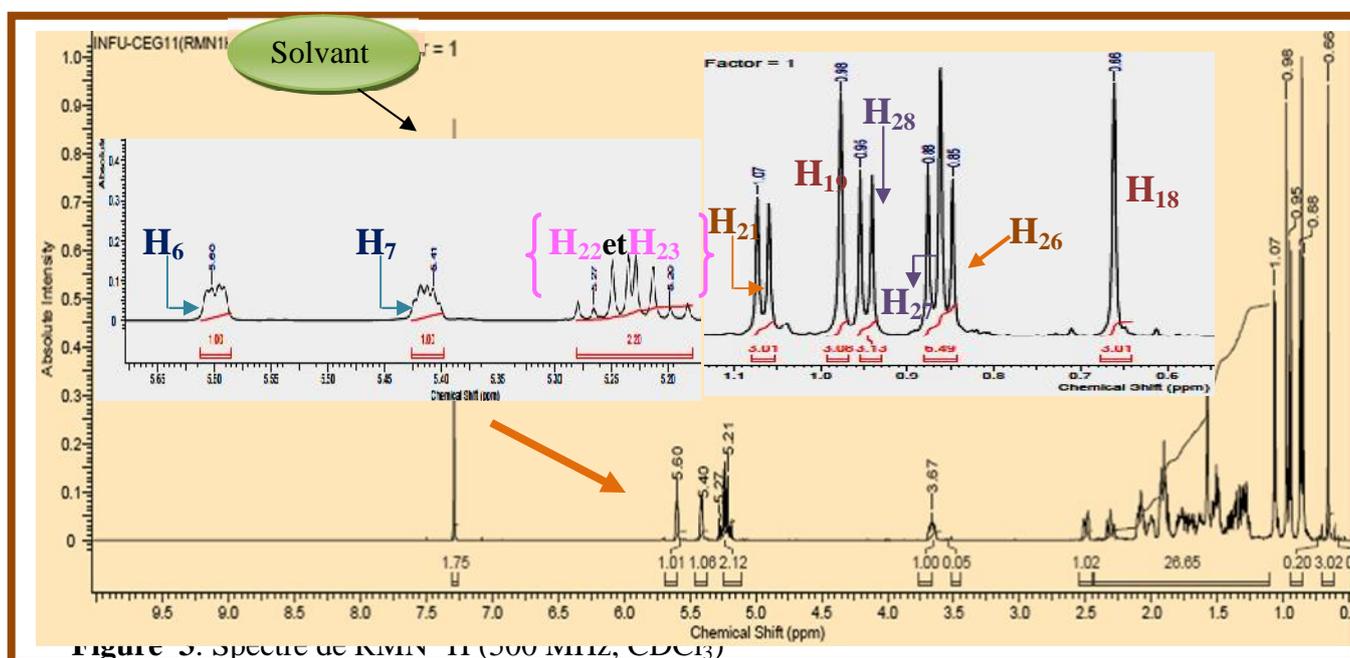
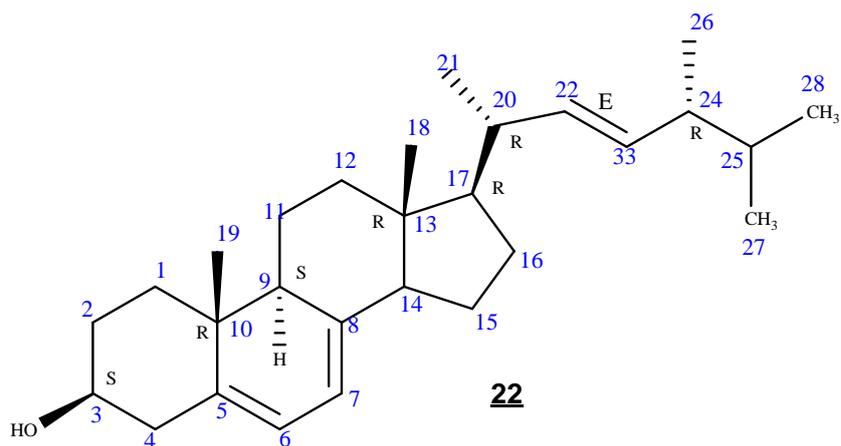
Sur le spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (figure 8) on observe :

- Un multiplet d'un proton à $\delta_{\text{H}} 3,67$ (1H, m), attribuable au proton oxyméthine en position 3 des stérols (Jimming et *al.* 2001) ;
- Dans la région des champs fort, deux singulets de trois protons chacun à $\delta_{\text{H}} 0,66$ (s, CH_3 -18) et à $\delta_{\text{H}} 0,98$ (s, CH_3 -19) attribuable aux méthyles tertiaires des stérols. Puis trois doublet ayant également trois protons à $\delta_{\text{H}} 0,85$ (d, $J=7,2\text{Hz}$, CH_3 -26), $\delta_{\text{H}} 0,88$ (d, $J=7,2\text{Hz}$, CH_3 -27), $\delta_{\text{H}} 0,95$ (d, $J=6,8\text{Hz}$, CH_3 -28) et $\delta_{\text{H}} 1,07$ (d, $J=6,6\text{Hz}$, CH_3 -21) attribuables aux méthyles secondaires sur la chaîne aliphatique des stérols (Jimming et *al.* 2001) ;
- Deux doublets dédoublés intégrant pour un proton chacun à $\delta_{\text{H}} 5,20$ (dd, $J=15,6\text{Hz}$ et $J=8,0\text{Hz}$), et $\delta_{\text{H}} 5,27$ (dd, $J=15,3\text{Hz}$ et $J=6,8\text{Hz}$), attribuables aux protons vinyliques en position C-22 et C-23 des stérols et un doublet dédoublé d'un proton à $\delta_{\text{H}} 5,60$ (dd, $J=5,3\text{Hz}$ et $J=2,6\text{Hz}$), attribuables au proton oléfinique en position 6 des stérols (Jimming et *al.* 2001) ;
- Un proton à $\delta_{\text{H}} 5,38$ (1H, m), attribuable au proton oléfinique en position 7 des stérols (Jimming et *al.* 2001) ;

Sur le spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (figure 9) on observe à $\delta_{\text{C}} 140,1$ et $\delta_{\text{C}} 119,9$ des signaux attribuables respectivement aux carbones C-5 et C-6 d'un squelette de type 5 des stérols. On y observe aussi des pics à $\delta_{\text{C}} 135,9$; $\delta_{\text{C}} 132,4$; $\delta_{\text{C}} 116,6$ et $\delta_{\text{C}} 141,7$, attribuables respectivement aux carbones C-22 , C-23, C-7 et C-8 caractéristiques des squelettes de type 22 et 7 des stérols (Jimming et *al.* 2001);

Le signal observé à $\delta_{\text{C}} 70,5$ est caractéristique de oxyméthine en position C-3 des stérols (Jimming et *al.* 2001);

L'ensemble de toutes ces données spectrales comparées à celle décrites dans la littérature, a permis d'attribuer à la structure **22** qui est celle de l'*Ergosta-5,7,22-trién-3-ol(3,22E)* décrit précédemment par Haque et *al.* (2005).



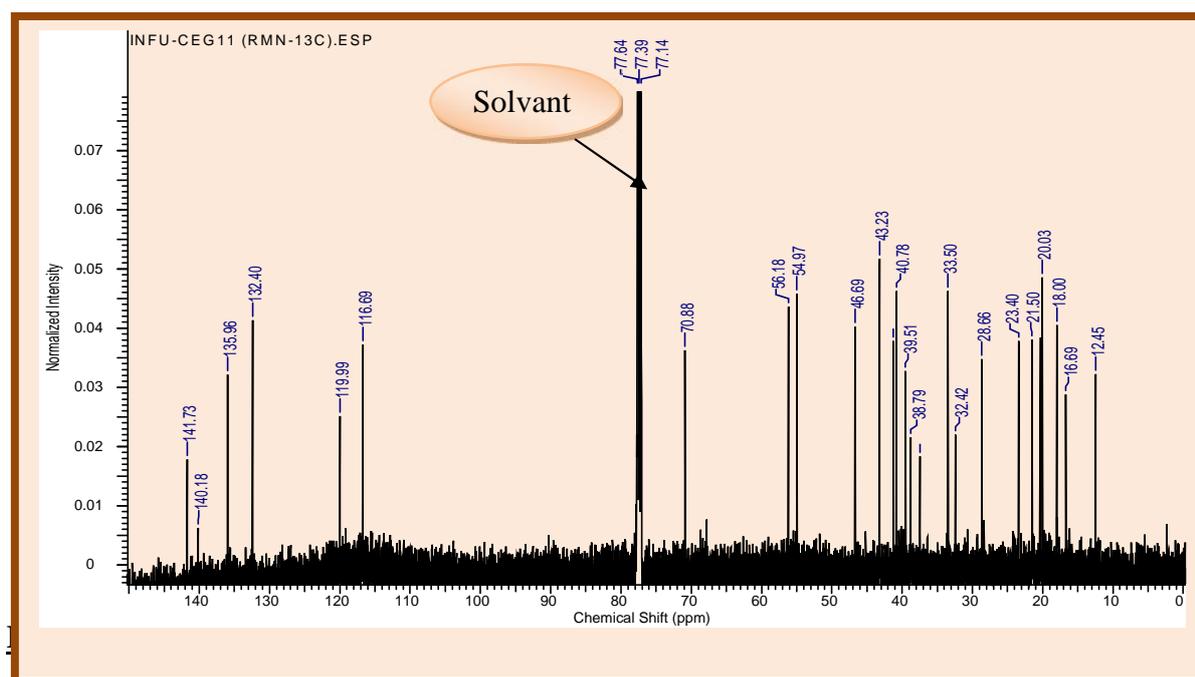


Tableau 7: Données spectrales de RMN ¹³C (100 MHz) et ¹H (400 MHz) de l'ergostérol (Haque et al. 2005), et de RMN ¹³C (125 MHz) et ¹H (500 MHz) de FS2 dans CDCl₃

N° C	<i>Ergosta-5,7,22-trién-3-ol(3β,22E)</i>		FS2	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) ; (m ;J(Hz) ;nH)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) ; (m ;J(Hz) ;nH)
1	38,4		38,7	1,33; (m; 2H)
2	32,0		32,4	1,50; (m; 2H)
3	70,5	3,63; (m; 1H)	70,5	3,67; (m; 1H)
4	40,8		41,2	2,51; (dd; 2,2; 2,6; 2H)
5	139,8	-	140,0	-
6	119,6	5,56;(dd; 5,8; 2,6; 2H)	119,2	5,60; (dd; 5,4; 2,3; 2H)
7	116,3	5,38; (m; 1H)	116,0	5,42; (m; 1H)
8	141,4	-	141,7	-
9	46,3	-	46,6	1,93; (m; 1H)
10	37,1	-	37,4	-
11	21,2	-	21,5	-
12	39,1	-	39,5	-
13	42,9	--	43,2	-

Tableau 7 : Données spectrales de RMN ^{13}C (100 MHz) et ^1H (400 MHz) de l'ergostérol (Haque et al. 2005), et de RMN ^{13}C (125 MHz) et ^1H (500 MHz) de FS2 dans CDCl_3

(suite)

N° C	<i>Ergosta-5,7,22-trién-3-ol(3β,22E)</i>		FS2	
	c (ppm)	H (ppm) ; (m ;J(Hz) ;nH)	c (ppm)	H (ppm) ; (m ;J(Hz) ;nH)
14	23,0	-	23,4	-
15	23,0	-	23,4	-
16	28,3	-	28,6	-
17	55,8		56,1	1,30; (m; 1H)
18	12,1	0,66; (s; 3H)	12,4	0,66; (s; 3H)
19	16,3	0,94; (s; 3H)	16,1	0,98; (s; 3H)
20	40,4	-	40,7	-
21	21,1	1,04; (d; 6,6; 3H)	20,8	1,06; (d; 6,5; 3H)
22	135,6	5,17; (m; 1H)	135,1	5,20; (m; 1H)
23	132,0	5,21; (m; 1H)	131,9	5,27; (m; 1H)
24	42,9		43,2	1,88; (m; 1H)
25	33,1		33,5	1,53; (m; 1H)
26	20,0	0,82; (d; 6,9; 3H)	19,8	0,85; (d; 7,2; 3H)
27	19,7	0,84; (d; 7,0; 3H)	19,2	0,88; (d; 7,2; 3H)
28	17,6	0,90; (d; 6,8; 3H)	17,7	0,95; (d; 6,8; 3H)

II.2.2. Analyse structurale de FS1

L'analyse du chromatogramme de FS1 (Figure 5) montre 04 pics majeurs suggérant la présence d'au moins 04 composés dans FS1 qui cristallise dans le mélange Hex/AE (92,5:7,5) sous forme d'aiguilles blanches avec des points de fusions variant entre 158°C et 161°C.

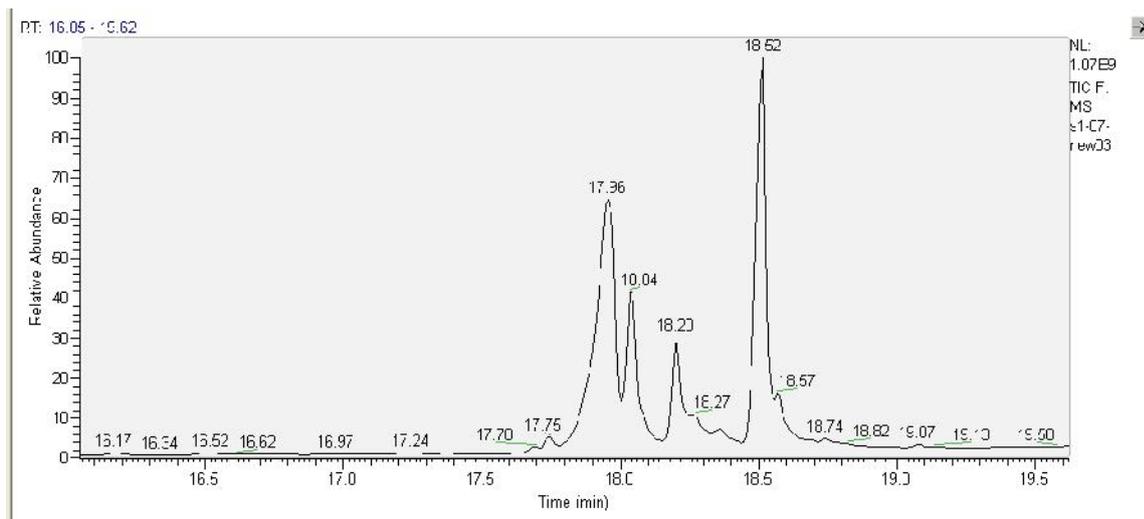


Figure 5: Profil Chromatographique GC de FS2

La résolution du pic ayant le temps de rétention RT = 17,96 min donne la structure de l'ergostérol avec une probabilité de 83,4% précédemment décrit comme FS1.

Pour le pic apparaissant à RT = 18,04 min le spectre de masse montre le pic de l'ion moléculaire de rapport masse sur charge (m/z) 400. La superposition de ce spectre avec celui trouvé dans la banque de données nous montre qu'il ya beaucoup de similitudes ; avec la table de probabilité on peut voir que tous les composés résultant de la superposition des deux spectres avec une probabilité supérieure à 60% correspondent à la Campestérol dont la structure est dans le tableau 8.

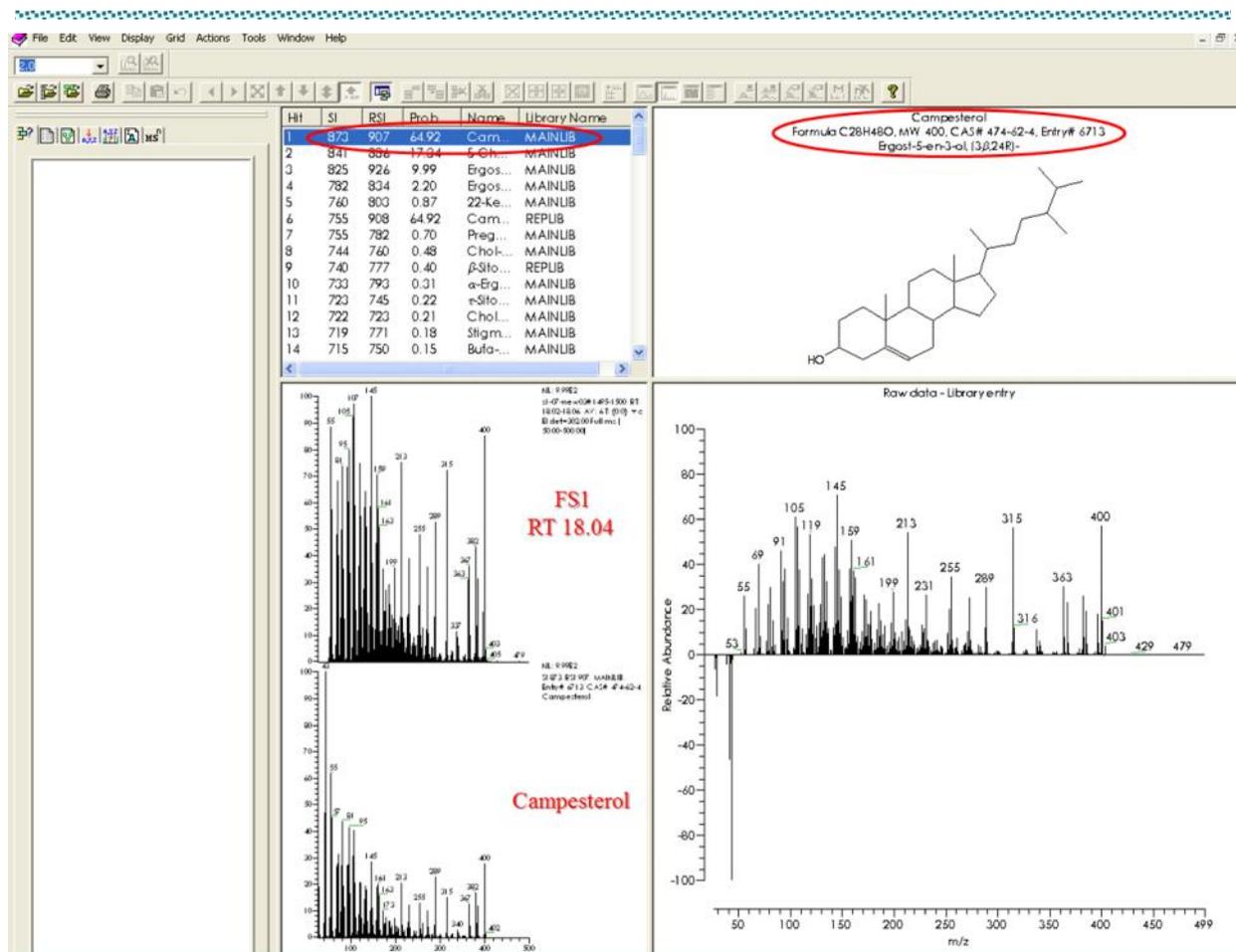


Figure 6: Spectre de masse et banque des données du campesterol

Pour le pic apparaissant à RT = 18,20 min le spectre de masse montre le pic de l'ion moléculaire de rapport masse sur charge (m/z) 412. En superposant ce spectre avec celui trouvé dans la banque de données nous remarquons une très grande ressemblance entre les pics; avec la table de probabilité on peut voir que tous les composés résultant de la superposition des deux spectres avec une probabilité supérieure à 60% correspondent à la stigmastérol dont la structure est dans le tableau 8.

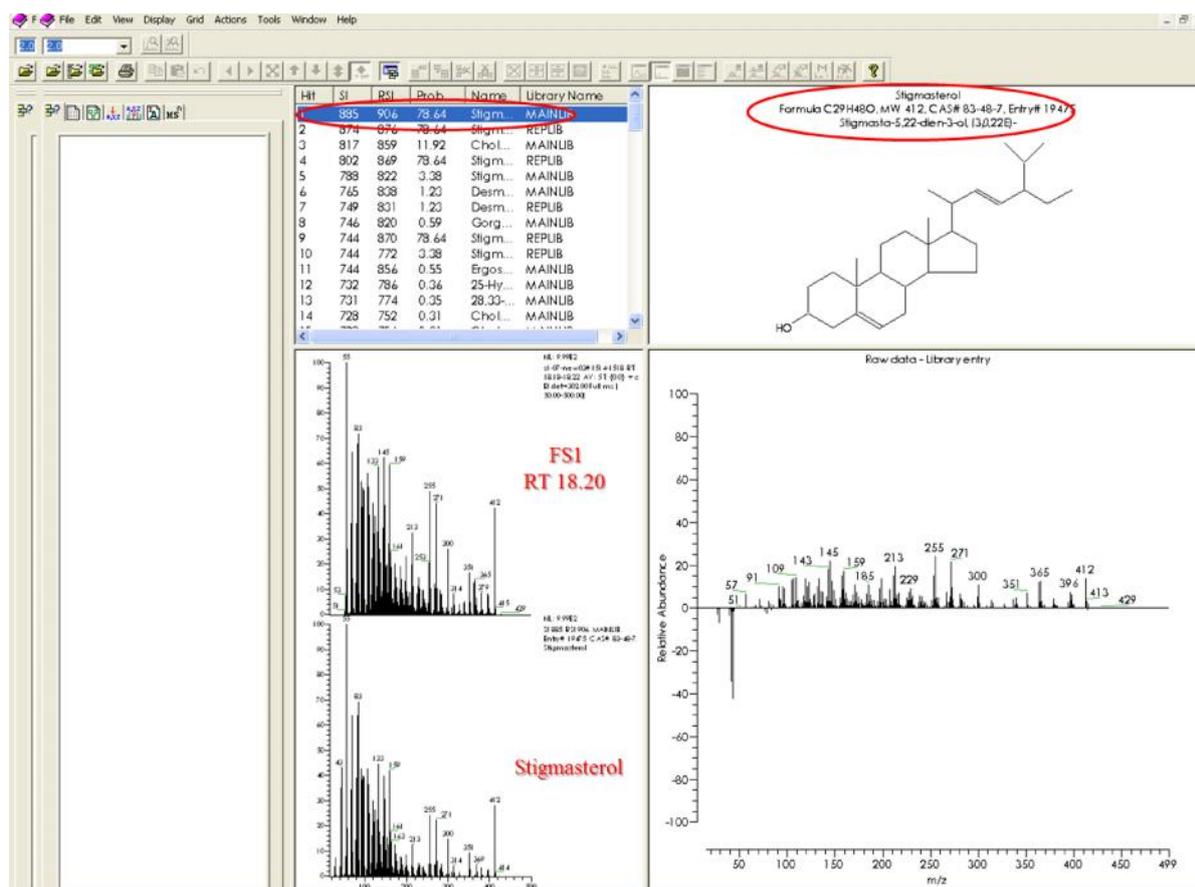


Figure 7: Spectre de masse et banque des données du stigmasterol

Pour le pic apparaissant à RT = 18,52 min le spectre de masse montre le pic de l'ion moléculaire de rapport masse sur charge (m/z) 414. La superposition de ce spectre avec celui trouvé dans la banque de données nous montre qu'il y a beaucoup de similitudes ; avec la table de probabilité on peut voir que tous les composés résultant de la superposition des deux spectres avec une probabilité supérieure à 60% correspondent à la -sitostérol dont la structure est dans le tableau 8.

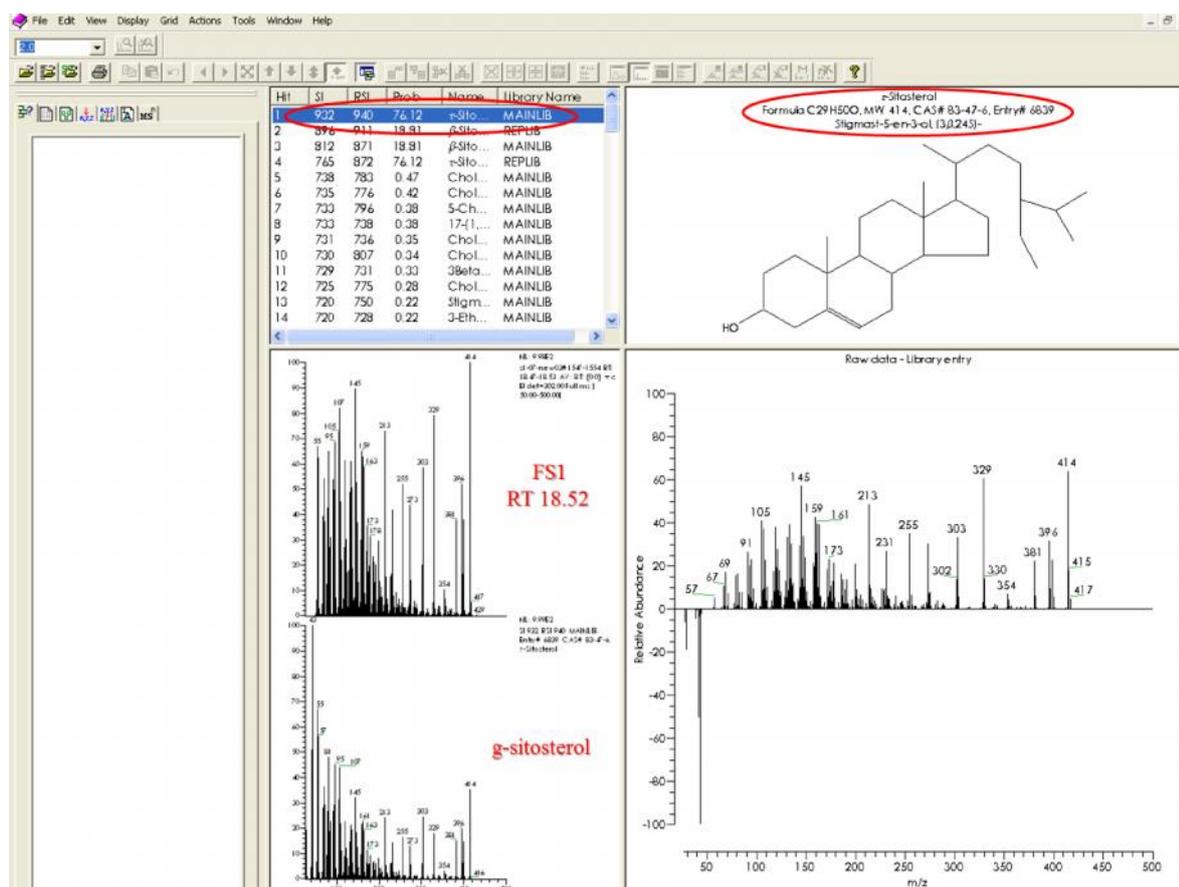
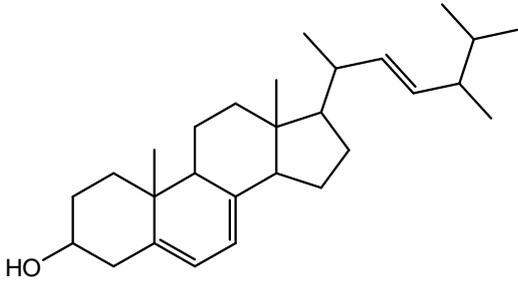
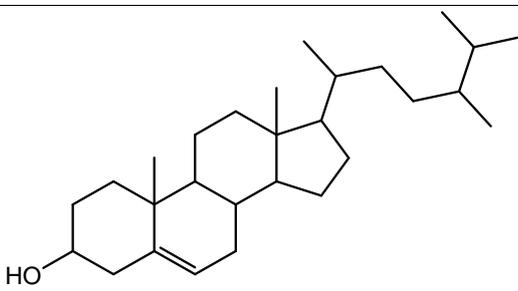
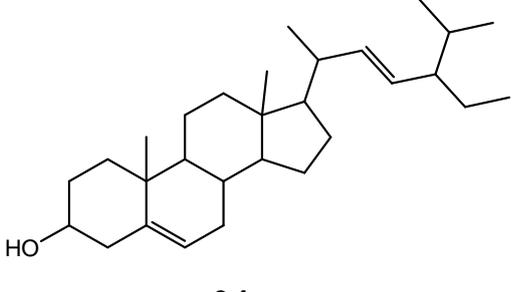
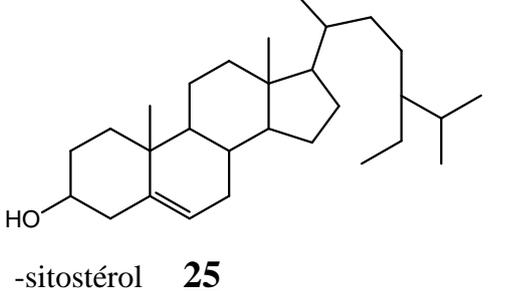


Figure 8: Spectre de masse et banque des données du α -sitostérol

En somme FS1 est un mélange constitué majoritairement de 4 de stéroïdes respectivement identifiés comme : Ergosterol, Campesterol, Stigmasterol et α -sitosterol , qui cristallisent sous forme de poudres blanches dans le mélange Hex/AE (82,5: 7,5) ; avec les températures de fusion variant entre 158°C et 161°C. Ils sont soluble dans le chlorure de méthylène (CH₂Cl₂) et réagissent positivement au test de Liebermann Burchard, donnant une coloration bleue qui vire rapidement au vert foncé, caractéristique des stérols.

Tableau 8: Les quatre (04) stéroïdes identifiés de FS2

Temps de retention	Probabilités	m/z	Structure des composés
17,96	83,41%	396,4	 <p>Ergostérol <u>22</u></p>
18,04	64,92%	400	 <p>Campesterol <u>23</u></p>
18,20	78,64%	412	 <p>Stigmastérol <u>24</u></p>
18,52	76,12%	414	 <p>-sitostérol <u>25</u></p>



INTERETS PEDAGOGIQUES

INTERETS PEDAGOGIQUES

Il est question pour nous ici de montrer l'apport de tout exercice lié à la rédaction du mémoire de la fin de notre formation à l'Ecole Normale Supérieure.

La réalisation de la partie théorique nous a permis d'une part à nous familiariser à la recherche sur internet qui est de nos jours la plus fournie et la plus actualisée et d'autre part de pouvoir apprendre la synthèse des documents scientifiques.

La recherche des métabolites secondaires sur les souches de champignons isolées nous a conduites :

- ❖ L'identification des composés renferment plusieurs groupes fonctionnels tels que les alcènes, les alcools, les carbonyles qui peuvent être caractérisés par des tests caractéristiques (test de Lucas, liqueur de Fehling...) qui sont des cours dispensés dans les classes de terminales C, D et E (**les alcools ; les aldéhydes et les cétones**).
- ❖ De faire une comparaison entre les métabolites secondaires issus de la plante et ceux issus des endophytes.
- ❖ De nous familiariser aux techniques de laboratoires tels que : l'extraction, la filtration, la préparation des solutions... Et de bien maîtriser les règles du laboratoire, qui nous permettrons de mieux aborder les leçons.
- ❖ De plus, ce mémoire nous a permis de mettre en évidence l'esprit de synthèse (introduction, résumé, utilisation de différentes méthodes d'analyse) et de curiosité, qualité indispensable pour les futurs enseignants que nous sommes.

Ce qui nous a permis de développer des aptitudes pratiques intéressantes pour tout enseignant de discipline scientifique. Ces habiletés ajoutées aux habiletés nous permettrons dans l'exercice de nos fonctions de faire de la chimie une science expérimentale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude d'un champignon endophyte isolé de *Allanblackia Floribunda* nous a permis d'isoler les champignons endophytes indexés FAFS₁, FAFS₃, FAFS₅ et FAFS₁₀. La souche FAFS₁ a été choisie pour étude.

Ce champignon endophyte a été isolé à l'aide de l'Agar Nutritif puis purifié en milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et cultivé dans le riz qui constitue le milieu solide. L'étude chromatographique de 78,8 g d'extrait à l'hexane sur les 125,5 g obtenu de *Allanblackia floribunda* et la GC-MS nous ont permis d'isoler deux composés indexés FS et FS2 correspondant respectivement à un mélange de 04 stéroïdes (Ergostérol, campestérol, stigmastérol et γ -sitostérol) et à l'Ergosta-5,7,22-trien-3-ol(3 β , 22E). La caractérisation de ces composés a été faite aux moyens des techniques spectroscopiques RMN-1D (RMN ¹H et RMN ¹³C), et par comparaison aux données spectrales de la littérature.

D'autres parts ces deux composés n'ont pas encore été isolés de leur hôte selon les données de la littérature. Ces résultats pourraient accroître la recherche des métabolites secondaires biologiquement actifs, en plus plutôt en utilisant les champignons endophytes comme sources alternatives de ces composés, au lieu des plantes comme dans plusieurs laboratoires du Cameroun.

Dans la suite de nos travaux, nous nous proposons:

- ✓ Soumettre les composés obtenus aux tests biologiques
- ✓ D'optimiser la production des composés en variant les milieux de cultures
- ✓ De faire une étude chimique et biologique des autres fractions, ainsi que des autres champignons isolés.

CHAPITRE III: PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. APPAREILLAGE ET MATERIEL VEGETAL

III.1.1. Appareillage

Les extraits après filtration avec du papier filtre ont été concentrés à l'aide des évaporateurs rotatifs de type «Heidolph» connectée à un réfrigérant du fabricant LAUDA type WKL 230 et une pompe à vide vacuubrand GMBH/CVC/3000/PC 500 Séries.

La mesure des différentes masses pour notre manipulation a été faite à l'aide des balances de marque «COBOS», model «D-6000-SX», et «SARTORIUS WERKER»; type; 242, fabrication N^o401088; précision 0,001.

Pour le stockage des échantillons (Fruit de *A. floribunda* et les souches de champignons) on a utilisé un réfrigérateur de marque «LIEBHERR».

Une hotte biologique de type «MSC 1.2» constitué du milieu de travail ayant un volume de 1200×780×465 puis connecté à une bouteille de gaz propane/butane 33/35Kg, a été utilisée pour la stérilisation des surfaces de culture.

Le maintien des souches des champignons endophytes des fruits de *Allanblackia floribunda* à la température de croissance et à l'abri de toute contamination a été assuré dans un incubateur de type «modell 100-800».

La fermentation des champignons en milieu liquide a été faite à l'aide de l'agitateur de marque «HEIDOLPH» et les boîtes de pétri de 4 cm de diamètre.

Un autoclave de type «VB-55» de volume 60 L a servi pour autoclaver les milieux de culture des champignons et la macération de culture des souches de champignons a été faite à l'aide des larges dessiccateurs en verre de plus de 3 – 5 L.

La GC- MS associée au programme X-calibur.

La banque de données de GC-MS qui permet de détecter les composés present dans un extrait analysé à partir de sa masse.

La silice de type 60 F254 de fabrication MERCK et de granulométrie 0,04 – 0,06 mm a été utilisée. Nous avons utilisé les plaques CCM en verre et en aluminium, recouvertes de gel de silice, d'épaisseur 0,2 nm. Les révélateurs utilisés pour visualiser les taches en CCM sont: l'acide sulfurique (dilué à 50%) et la lampe UV (254 et 366 nm). Les plaques CCM utilisées ont été pulvérisées sous la hotte et calcinées à l'étuve à une température avoisinant 100 °C.

III.1.2. Matériel Végétal

Les fruits d'*Allanblackia floribunda* ont été récoltés le 10 novembre 2014 à Kye-Ossi Département de la vallée du Ntem, région du Sud Cameroun. Son identification a été faite par M. NANA Victor botaniste à l'herbier National du Cameroun et identifié où un échantillon a été déposé.

III.2. ISOLEMENT DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

Généralement pour l'étude des micro-organismes vivants à partir d'une espèce végétale, l'on a besoin du matériel frais ; et pour cette raison les fruits frais (graine et cabosses) de la plante ont été récoltés. Les investigations sur les fruits d'*Allanblackia floribunda* pour la recherche des potentiels champignons endophytes ont été élaborées comme suit :

Les fruits frais de *A. floribunda*, après récolte ont été conservées dans le réfrigérateur et le protocole suivant a été effectué:

Les fruits (graines et cabosses) de la plante ont été découpés (en section de 1 cm² environ) à l'aide des ciseaux puis lavés séparément avec de l'eau du robinet pendant 10 min. Ensuite ces spécimens ont été stérilisés en trempant consécutivement dans l'éthanol 95% pendant 30 s, puis dans une solution d'eau de javel 12% pendant 5 min et enfin dans l'éthanol 70% pendant 2 min. Les échantillons stérilisés ont été lavés trois fois de suite avec l'eau distillée stérilisée et en suivant la méthode de (Schwalz et al. 1993). La dernière eau distillée de rinçage a été réservée pour les tests témoins et qui après 24 h a montré l'absence de toute croissance bactérienne (Figure 9).



Figure 9: Section de 1 cm² des parties de *A. floribunda* lavés dans des solutions stérilisées

Les milieux de culture des champignons endophytes choisis est le milieu PDA (*Potato-Dextrose-Agar*) qui a été préparé comme suit: 200 g de pomme + 100 g de carotte ont été complètement lavés à l'eau du robinet, ensuite ont été découpés et préparés dans 1 L. Après 1 h de cuisson, le mélange a été extrait et filtré à l'aide d'un tissu, puis a été complété avec de l'eau distillée pour obtenir 1 L de solution aqueuse. Ensuite 15 g de sucre (dextrose) et 20 g d'agar sont ajoutés à cette solution aqueuse et le mélange a été complètement homogénéisé et enfin autoclavé pendant 2 h pour donner le milieu PDA.

Le milieu PDA a été introduit dans des boîtes de pétri stérilisés ; à raison de 4 mm de profondeur par boîte. Après que le milieu s'est solidifié sous une surface stérilisée (hote biologique), 8 à 12 spécimens des échantillons ont déposés dans chaque boîte. Les boîtes ont été scellées à l'aide de la paraffine (Fig10) et ensuite ont été étiquetées correctement, puis stockées dans à température ambiante (27-29°C à laboratoire n°3 de chimie à l'ENS de Yaoundé au mois novembre 2014).



Figure 10 : Isolement des champignons endophytes dans les boîtes de pétri stérilisées et contenant le milieu PDA

Après 3 jours, chaque colonie de champignon identifiée à l'œil nu en se basant sur leur morphologie de croissance a été collectée avec une loupe puis inoculée dans d'autres boîtes contenant le PDA. Cette méthode s'est poursuivie jusqu'à la purification de chaque champignon, identifié par leur couleur et sa morphologie. A la fin de la procédure de purification, au moins 5 souches de champignons endophytes sont isolés : 4 des graines fraîches (FAFS₁, FAFS₃, FAFS₅, et FAFS₁₀); un de la coque (FAFF₁). Tous les isolats purs de champignons ont été stockés au frigo pour des investigations supplémentaires.

III.2.1. Etude bio-guidée pour la fermentation à grande échelle des souches champignons potentiels

Afin de procéder à une étude bio-guidé pour le choix d'un potentiel champignon endophyte, des fermentations à petites échelles ont été faites sur chaque isolat dans un milieu solide fait à base de riz. Le protocole suivant a été adopté :

A partir des boîtes en verre d'un litre, 80 g de riz + 80 mL d'eau distillée y ont été introduits, puis autoclavées à 121 °C sous pression de 15 bars afin de stériliser les milieux. Une fois les milieux refroidis sous Clean bench, chaque isolat fongique a été inoculé à l'aide d'une loupe puisensemencé dans les boîtes. Ensuite, les boîtes ont été fermées et stockées à 27 – 29 °C (température ambiante à l'ENS de Yaoundé).

Après 14 jours de fermentation, chaque culture a été extraite avec AcOEt et après, deux techniques d'analyses notamment la chromatographie sur couche mince (CCM) et le test

de susceptibilité antibiotique (AST) ont été évaluées en parallèle pour la fermentation à grande échelle.

L'AST: la sensibilité de chaque microorganisme test à un chacun des extraits des cultures fongiques a été vérifiée par la méthode de Kirby-Bauer. Le procédé consiste à vérifier si un micro-organisme isolé chez un patient est sensible à un antibiotique ou une série d'extraits; et les résultats ont servi de guide pour choisir une souche fongique potentielle afin de faire des fermentations à grande échelle. À cet effet, de petits disques (encore appelés papier Wattmann) imbibés avec chaque extrait sont placés dans des milieux sur lesquels chacune des 10 bactéries suivantes croit : Ae (*Aeromonas*), CA (*Candida albicans*), Ci (*Citromonas sp.*), EC (*Escherichia coli*), KP (*Klebsiella pneumoniae*), PA (*Pseudomonas aeruginosa*), SA (*Staphylococcus aureus*), SO (*Serratia oxytoca*), SP (*Streptococcus pneumonia*), Staph (*Staphylococcus sp.*). Nous avons adopté la procédure suivante pour cette expérience

- Treize (13) solutions des 13 extraits de cultures fongiques ont été préparées par dilution standard. Ensuite deux milieux différents constitués de 500 mL et de 100 mL ont été préparés séparément en dissolvant respectivement 19 g de MHA et de 0,8 g de bouillon nutritif (NB) dans l'eau distillée. Les milieux ont été stérilisés en les autoclavant à 121°C sous une pression de 15bar. Enfin le MHA a été introduit dans les boîtes de pétri non compartimentées de 90 mm de diamètre de telle sorte que chaque boîte contienne environ 22 mL de MHA avec une profondeur de 4 mm.
- Chacune des 10 souches bactériennes a été inoculée (à l'aide coton tiges) dans les 10 mL de NB contenues dans des tubes à essais. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 h afin de réveiller les bactéries.
- Après que l'agar s'est solidifié dans les boîtes de Pétri, 100 μ L de cultures bactériennes a été inoculée dans chaque boîte à l'aide des cotons tiges stériles suivant la technique de diffusion standard de boîtes. Ensuite les boîtes ont été stockées à 4°C pendant 2 h.
- Pour la technique de diffusion sur disque : 20 μ L de chaque extrait a été imprégné sur les disques de 6.0 mm puis séché sous Clean Bench. Ces disques ont été placés sur des milieux inoculés de bactéries puis, les boîtes ont été incubées à 37 °C. Après 24 h d'incubation, des zones respectives d'inhibitions ont été observées autour des disques contenant quatre (04) extraits de cultures fongiques à savoir FAFS₁, FAFS₃, FAFS₅ et FAFS₁₀ dans les boîtes où chacune des six (06) bactéries suivantes a été inoculé : Ae, CA, Ci, EC, SO, Staph.

L'interprétation de ces résultats obtenus était que chacune de ces 6 bactéries est sensible à chacun des 4 extraits de cultures fongiques, puisqu'une zone claire ou zone

d'inhibition (ZOI), était observé autour du disque indiquant une faible croissance des bactéries concernées.

En parallèle la CCM de chaque extrait de culture fongique a été réalisée afin de compter ou de savoir le type de métabolites secondaires susceptibles d'être produits par chaque extrait. Pour cela trois (03) champignons endophytes (FAFS₁, FAFS₃, et FAFS₁₀) ont encore été choisis.

Les résultats d'AST et de ceux de CCM ont conduit au choix de 4 champignons endophytes pour les fermentations à grande échelle notamment : **FAFS₁, FAFS₃, FAFS₅, FAFS₁₀**.

III.2.2. Procédé de fermentation solide à grande échelle

Le protocole de fermentation suivant a été adopté :

A partir de boîtes en verre d'un litre, 80 g de riz + 80 mL d'eau distillée y ont été introduits, puis autoclavées à 121 °C sous pression de 15 lbs afin de stériliser les milieux.

Après refroidissement du milieu sous clean bench, les souches de champignons ont été introduites dans le milieu à raison de 4 souches par boîte pour une durée d'incubation de 42 jours (**Fig11**).



Figure 11: Fermentation de la souche FAFS1 dans du riz (Culture à grande échelle)

III.3. Extraction, Isolement Et Purification Des Composés

III.3.1. Extraction

Après 42 jours de fermentation dans le riz, le milieu PDA, l'AcOEt a été introduits dans les cultures (en milieu solide).

Les phases organiques ont été obtenues par filtration (Figure 12). Les filtrats ont été concentrés à l'aide des évaporateurs rotatifs. Plusieurs extractions à l'acétate d'éthyle ont été faites pendant 72 heures à fin de maximiser la quantité d'extrait brut. Après filtration 2000 mL de filtrat ont été obtenu qui, après concentration ont conduit à 125,5 g d'extrait brut pour la souche FAFS₁.



Milieu de culture d'*A. Floribunda* après 21 jours de fermentation

Figure 12: Obtention de l'extrait brut de la souche FAFS₁

III.3.2. Isolement

120 g de L'extrait brut (FAFS₁) ont subi une solubilisation différentielle qui a permis de fractionner l'extrait en 3 fractions : la fraction à l'hexane ; la fraction au dichlorométhane et la fraction à l'acétate d'éthyle. la fraction à l'hexane à été séparée par chromatographie sur colonne en utilisant un mélange nhexane/acétate d'éthyle (Hex/AE) de polarité croissante. Les fractions ont été récupérées puis regroupées sur la base de la CCM analytique. Ce qui a conduit à l'obtention de 9 fractions indexés de M₁ à M₉ regroupées dans le tableau suivant:

Tableau 9: Chromatogramme de l'extrait à l'hexane de la souche FAFS₁

Fractions	Système de solvant (éluant)	Observations
1-5 (M ₁)	Hex/AE (100:0)	Mélange Huileux
6-12(M ₂)	Hex/AE (95:5)	Mélange de produits
13-16(M ₃)	Hex/AE (92,5:7,5)	Mélange de produits contenant FS2
17-20(M ₄)	Hex/AE (87,5:12,5)	Mélange de produits dont

		FS1
21-25(M ₅)	Hex/AE (85:15)	Mélange de produits
26-31(M ₆)	Hex/AE (80:20)	Mélange de produits
32-35(M ₇)	Hex/AE (70:30)	Mélange de produits
36-42(M ₈)	Hex/AE (60:40)	Mélange de produits
43-44(M ₉)	Hex/AE (50:50)	Mélange de produits

III.4. CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES COMPOSES ISOLES

III.4.1. FS1: Ergostérol

Aspect physique : aiguilles blanches

Formule brute : $C_{28}H_{44}O$

Masse molaire : 396,3392 g/mol

Solvant de solubilité : chlorure de méthylène (CH_2Cl_2)

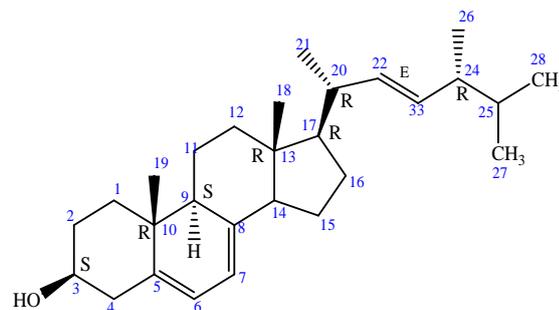
Point de fusion : $159^{\circ}C$

Test de Liebermann Burchard : positif

Spectre RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) (Figure 3)

Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) (Figure 4)

Données spectroscopiques : Tableau 7



III.4.2. FS2 : Mélange de 4 stéroïdes

Aspects physiques : aiguilles blanches

Formules brutes : $C_{28}H_{44}O$; $C_{28}H_{48}O$; $C_{29}H_{48}O$; $C_{29}H_{50}O$

Masses molaires : 396,4 g/mol ; 400 g/mol ; 412 g/mol ; 414 g/mol

Solvant de solubilité : chlorure de méthylène (CH_2Cl_2)

Point de fusion : variant entre $158^{\circ}C$ et $161^{\circ}C$

Test de Liebermann Burchard : positif

III.4.3. TESTS CARACTERISTIQUES

Test de Liebermann-Burchard (Bruneton 1999).

But : Identification des triterpènes et des stérols.

Réactifs : CHCl_3 , Ac_2O , H_2SO_4 concentré.

Mode opératoire : dissoudre une petite quantité de produit dans le CHCl_3 , y ajouter quelques gouttes de Ac_2O puis quelques gouttes de H_2SO_4 concentré.

Résultat et interprétation : la présence des triterpènes se manifeste par la coloration rouge violacée et celles des stérols par une coloration bleue verdâtre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu-Darwish M. S., Mazen A. A. (2008).** The Pharmacological and pesticidal Actions of Naturally Occurring 1,8-dihydroxyanthraquinones Derivatives. *World J. of Agric. Science* **4**, 495–505.
- Angiosperm Phylogeny group. (2009).** Une mise à jour de la classification des angiosperms phylogeny Group pour les commandes et les familles de plantes à fleurs. *Botanical J. Lin. society* **161**, 105–121.
- Arnold A.E. (2007).** Understanding the diversity of foliar endophytic fungi progress, changes, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* **21**, 51–66.
- Arnold A. E. L. C., Mejia D., Kylo E.I., Rajas,Z., Maynard N., Robbins, Herre E. A. (2003).** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree PNAS USA, **100**, 15649–15654.
- Arnold A. E., Lutzoni F. (2007).** “Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hot spots “ *Ecology* **88**, 541–549.
- Arora R., Chawla R., Dhaker A. S., Adhikari M., Sharma J., Jaiswal S., Gupta D., Anna T., Puri S. C. Kumar R., Sharma R. K. Tripathi R. P. (2010).** Pro-antioxidant activities of fractions of a novel camptothecin-producing endophyte (*entrophosphorquinifreus*). *Trakia J. Science* **8**, 1–15.
- Aubreville A. (1959).** «Flore forestière de la côte d’ivoire». Centre technique forestier, 2^{ème} Ed. Révisée, Paris, 325 – 329.
- Azebaze A. G. B.; Ouahouo B. M. W., Vardamides J. C., Valentin A., Kuete V., Acebe L., Beng V. P., Nkengfack A. E., Meyer M. (2008).** “Antimicrobial and antileishmanial xanthenes from the stem bark of *Allanblackia gabonensis* (Guttiferae)” . *Chem. Nat. Compds.* **44**, 333–341.
- Berthaut J. (1975).** Flore illustrée du Sénégal. Tome **2**, 83.
- Bobery J. B., Thrmark K. Lindahl B. D. (2011).** Decomposing capacity of fungi commonly detected in *Pinus Sylvestris* needle *Litt. Fungal Ecol.***4**, 110–114.



- Carriere M. (2000).** «Flore de Guinée: Application Vernaculaires et usages traditionnels de quelques plantes». 130
- Clay K., Schardl C. L. (2002).** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am. Nat.* **160**, 99–S27.
- Eyog M. O., Ndoye O., Kengue, J., Awono A. (2006).** «Les fruitiers forestiers comestibles du Cameroun». SAFORGEN (Sub-Saharan Africa Forest Genetic Resources Programme). 220.
- Hassan A. A., Abdessamad D., Peter P. (2011).** Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbial Biotech.* **90**, 1829–1845.
- Hawksworth D. L. (2001).** The magnitude of fungal diversity the 1,5 million species estimate revisited *Mycol. Res.* **105**, 1422–1431.
- Hyde K. D., Soyong K. 2008.** Fungal endophyte dilemma *Fungal Divers. J. Microbiol.* **33**, 166–173.
- Jimming G., Lin H., Jikai L. (2001).** A novel sterol from chinese truffles *Tur indicum*, *Steroids* **66**, 771 – 775.
- Kuete V., Azebaze A. G. B., Mbaveng A. T., Nguemfo E. L., Tshikalange E. T., Chalard P., Nkengfac, A. E. (2011).** Antioxidant, antitumor and antimicrobial activities of the crude extract and compounds of the root bark of *Allanblackia floribunda*.
- Kusar, S., Hertweeck C. Spiteller M. (2009).** Chemical ecology of endophytic fungi: origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology* **19**, 1313–1323.
- Kusari S., Spiteller M. (2012).** Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*, Roessner, U., ed. Rijeka, Croatia: In Tech, 241–266.
- Lenta N. B., Vonthron-Sénécheau C., Weniger B., Devkota P. K., Ngoupayo J., Kaiser M., Naz Q., Choudhary I. M., Tsamo E. Sewald N. (2007).** Leishmanicidal and Cholinesterase Inhibiting Activities of Phenolic Compounds From *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. *Molecules* **12**, 1548–1557.



- Magadula J. J. (2012).** Bioactive mammea-type Coumarins and Benzophenones from Clusiaceae plants . *J. Pharm. Sci. Innov.* **1**, 31–33.
- Mkouna P. (2003).** «Composés phénoliques de *Symphonia globulifera* (Guttifereae), plante médicinale du Cameroun et synthèse totales de quelques Xanthonnes prenylées,». Thèse de Doctorat/PhD, Université de Yaoundé I. Cameroun.
- Mohamed A., Hany M., Yehia, Peter P. (2011).** Utilization of agro-industrial by products for production of bioactive natural products from endophytic fungi, *J. Nat. Prod.* **4**, 108–114.
- Munjuga M., Ofori D., Sawe C., Asaah E., Anegbeh p., Pepraah T., Mpanda M., Mwaura L., Mtui E., Siritoc, Atangana A., Hensch, S., Tchoundjeu Z., Jamnadass R., Simons A. J. (2008).** *Allanblackia* propagation protocol World Agroforestry Centre: Transforming Lives and Landscapes, ISBN: 978-92-9059-231-0.
- Nkengfack A. E., Azebaze G. A., Vardamides J. C., Fomum Z. T., Van Heerden F. R. A. (2002).** A prenylated xanthone from *Allanblackia floribunda*. *Phytochemistry* **60**, 381–384.
- Nai-Yun, Liu H. X., Feng-Ping M., Ming-Feng Q. (2013).** A severin, a new Alkaloid from an Algicolous strain of *Aspergillus versicolor*. *Org. Lett.* **15**, 2327–2329
- Nasser S. (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, cours, 6^{ème} Ed., Dunold. paris 138
- Orwa C., Munjuga M. (2007).** *Allanblackia floribunda* Oliv.: Dans: Van der Vossen HAM & Mkamilo GS. eds. 2007. Plante des ressources de l'Afrique tropicales 14. huiles végétales. Wageningen: Fondation PROTA, 25-29
- Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., Anthony A. (2009).** Database Agroforestree: une référence de l'arbre et guide de sélection version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>), consulté le 11 novembre 2015 à 17h15min
- Pandi M., Kumaran R. S., Choi Y., Kim H. J., Muthumary J. (2011).** Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. *Med. Bull.* **10**, 187–192.
- Quan-Xin W., Sai-Fei Li Feng Z., Huan-Qin D., Li, B., Rong D., Hao G., Li-Xin Z., Hua-An W., Hong-wei L. (2011).** Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* *Fitoterapia* **82**, 777–7781.



- Saikkonen K., Wali P., Helander M., Faeth S. H. (2004).** Evolution of endophytes-plant symbioses trends. *Plant Science* **9**, 275–280.
- Strobel G. B., Daisy U. Castillo., Harper J. (2004).** Natural products from endophytes microorganism. *J. Nat. prod.* **67**, 257–268.
- Tabuna H. (1999).** «Le marché des produits forestiers non ligneux de l'Afrique centrale en France et en Belgique. Produits, acteurs, circuits de distribution et débouchés actuels. CIFOR occasional paper n°». **19**. 219–230.
- Troupin G. (1978).** «Flore du Rwanda: Spermaphytes». Institut National de Recherche Scientifique. Butare République Rwandaise, **1**, 297 – 307.
- Troupin G. (1982).** «Flore des plantes ligneuses Rwanda: Spermaphytes». Institut National de Recherche Scientifique. Butare République Rwandaise, **21**, 210 – 212.
- Urbain A. (2007).** Isolement de xanthonés et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de *Gentianella campestris* (L.) Börner et *Gentianella amarella* (L.) Börner ssp. *acuta* (Michx.) Gillett, J. M. (Gentianaceae), et *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch (Apiaceae). Thèse (N° 3934) de Doctorat ès sciences, mention interdisciplinaire. Université de Genève, suisse
- Van Rompaey R. (2003).** Distribution and ecology of *Allanblackia* spp. (Clusiaceae) in African rain forests. Report to Unilever Research Laboratories, Vlaardingen. Accessed July 2015.
- Vivien J., Faure J. J. (1995).** «Fruitiers sauvages d'Afrique-espèces du Cameroun». Ed Ngulakerou, France, 416.
- Vivien J., Faure J. J. (1979).** «Arbre des forêts d'Afrique Centrale. Espèce du Cameroun». Paris. 212–213.
- Wilson D. (1966).** Endophyte, The evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos*, **73**, 274–276.
- Zabalgogezazcoa I. (2008).** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish J. Agric. Res.*, **6**, 138–146.
- Zerroung A. (2011).** Métabolites secondaires bioactifs des champignons isolés de *Retama raetam* (Forsk). Université de Ferhat Abbas-Setif. 1–89.
- Zhao J., Zhou L., Wang J., Shan, T., Zhong L., Liu X., Gao X. (2010).** Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. Technology and Education Topics in applied Microbiol. *Microb. Biotechnol. Curr.Res.* **8**, 198



*Contribution à l'étude chimique d'un champignon endophyte isolé d'une plante médicinale
Camerounaise Allanblackia floribunda (Clusiaceae) ; isolement, caractérisation et test de sensibilité.*

Zhang H.W., Zhang J., Hu S., Zhang Z. J., Zhu C. J., Tan R. X. (2010). Evaluation of antimicrobial activities of extracts of endophytic fungi from *Artemisia annua*. *plant Med.* **76**, 1616–1621.

