

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

ORGANIQUE

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE
EN SCIENCES, TECHNOLOGIE ET
GEOSCIENCES

LABORATOIRE DES SUBSTANCES
NATURELLES ET VALORISATION



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ORGANIC

CHEMISTRY

POSTGRADUATE SCHOOL OF
SCIENCE, TECHNOLOGY AND
GEOSCIENCES

LABORATORY OF NATURAL
PRODUCTS AND
VALORIZATION

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE VITELLARIA PARADOXA
C. F. GAERTN (SAPOTACEAE), TRANSFORMATIONS
CHIMIQUES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES CONTRE LES
MALADIES NEURODEGENERATIVES ET LE CANCER**

Thèse présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du
Diplôme de Doctorat/Ph.D en Chimie Organique

Par : **Guérisson BAIRY**
Master en Chimie Organique

Sous la direction de
Kenneth OBEN EYONG
Maître de Conférences
Université de Yaoundé I
Gabriel NGOSONG FOLEFOC
Maître de Conférences
Université de Yaoundé I

Année Académique : Année 2020



INTRODUCTION GENERALE

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 12 Juin 2020

ADMINISTRATION

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

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

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

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

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

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Inspecteur de Service MINESUP</i>

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

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

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	<i>Chef Div. UBA</i>
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

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

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

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

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

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste

21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)

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

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

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	<i>CS/ ENS Bertoua</i>
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste

28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	<i>CT/ MINFEM</i>
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIÉ A.	Chargée de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
33	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

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

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>Chef Service/MINESUP</i>
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Sous/Direct. MINERESI</i>
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUNBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

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

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	<i>C/D Enset. Ebolowa</i>
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes & Diplômes</i>
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINPLAMAT</i>
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste

12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9-DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste

4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous-Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen Univ/Bda</i>
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOUA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	<i>MINERESI</i>
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous-Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	<i>DA/Univ Inter Etat/Sangmalima</i>
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

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

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

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste

4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	<i>DAAC/Uma</i>
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

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

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS

DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	39 (18)
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	46 (14)
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (1)	9 (02)	12 (02)	03 (0)	34 (5)
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	35(7)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	25 (2)
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	40 (5)
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	43(7)
Total	69 (4)	99 (28)	130 (33)	45 (10)	343 (75)

Soit un total de **344 (75)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **99 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

() = Nombre de Femmes **75**

SOMMAIRE

Liste protocole des Enseignants.....	I
Sommaire.....	XI
Dédicace.....	XVI
Remerciements.....	XVII
Liste des abréviations et symboles.....	XIX
Liste des tableaux.....	XXII
Liste des figures.....	XXIII
Liste des schémas.....	XXVI
Liste des photographies.....	XXVII
Résumé.....	XXVIII
Abstract.....	XXX
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : APERÇU BOTANIQUE ET GENERALITES SUR L'INFLAMMATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES ET LE CANCER.....	3
I.1. Aperçu botanique.....	3
I.1.1. Aperçu botanique de la famille de Sapotaceae.....	3
I.1.2. Aperçu botanique sur le genre <i>Vitellaria</i>	4
I.1.3. Aspects botaniques sur <i>Vitellaria paradoxa</i>	4
I.1.3.1. Les aires de distribution.....	4
I.1.3.2. Etude botanique et position systématique.....	5
I.1.3.3. Description botanique de <i>Vitellaria paradoxa</i>	6
I.1.3.4. Données phytochimiques et pharmacologiques.....	6
I.1.3.5. Aspects physiologiques et environnementaux.....	6
I.1.4. Quelques usages de <i>Vitellaria paradoxa</i>	7
I.1.5. Etudes phytochimiques antérieures et activités biologiques.....	9
I.1.5.1. L'alcaloïde.....	9
I.1.5.2. Les polyphénols.....	9
I.1.5.2.1. Les flavonoïdes.....	10
I.1.5.2.2. Les non-flavonoïdes.....	13
I.1.5.3. Les tocophérols.....	15
I.1.5.4. Les phytostérols.....	16
I.1.5.5. Les terpènes.....	16
I.2. APERÇU SUR LES TRITERPENES PENTACYCLIQUES.....	17
I.2.1. Généralités sur les triterpènes.....	17
I.2.2. Les monoterpènes.....	18

I.2.3. Les diterpènes.....	18
I.2.4. Les triterpènes.....	18
I.2.4.1. Voies de biosynthèse des triterpènes diphosphonate d'isopentényle.....	19
I.2.4.2. Origine des triterpènes pentacycliques.....	19
I.2.5. Quelques exemples des types de triterpènes pentacycliques.....	20
I.2.5.1. Le type ursane (l'acide ursolique).....	21
I.2.5.2. L'acide oléanolique.....	22
I.2.5.3. L'acide bétulinique.....	22
I.2.6. Quelques méthodes de détermination des structures des terpènes.....	24
I.3. L'INFLAMMATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES.....	25
I.3.1. L'inflammation.....	25
I.3.1.1. Définition de l'inflammation.....	25
I.3.1.2. La douleur dans les maladies neurodégénératives.....	26
I.3.1.3. Rappel sur le système nerveux central.....	26
I.3.1.4. Le vieillissement cérébral.....	28
I.3.1.5. Les cellules microgliales et inflammation-méiateur neurodégénération.....	28
I.3.1.6. Les activations des cellules microgliales.....	29
I.3.1.7. L'activation des cellules microgliales dans la maladie d'Alzheimer.....	29
I.3.1.8. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	29
I.3.1.9. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.....	31
I.3.1.10. Quelques plantes utilisées en médecine traditionnelle contenant des activités anti-inflammatoires.....	32
I.3.2. Les maladies neurodégénératives.....	33
I.3.2.1. Définition et types des maladies neurodégénératives.....	33
I.3.2.2. La maladie d'Alzheimer et son historique.....	33
I.3.2.3. L'épidémiologie, les facteurs de risque et le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.....	34
I.3.2.3.1. L'épidémiologie de la maladie d'Alzheimer.....	34
I.3.2.3.2. Les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer.....	34
I.3.2.3.3. Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.....	35
I.3.2.4. Le traitement ou molécules disponibles.....	35
I.4. LE CANCER.....	37
I.4.1. Historique du cancer.....	37
I.4.2. Définition du cancer.....	37
I.4.3. Définition et caractère d'une tumeur.....	38
I.4.4. Les agents promoteurs de carcinogénèse.....	39

I.4.5. La prise en charge du cancer.....	39
I.4.5.1. Les médicaments anticancéreux.....	39
I.4.5.2. Les principales méthodes de traitement des cancers.....	41
I.4.6. Le mode d'action des cibles moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose.....	42
I.4.7. L'implication du génome mitochondrial dans les maladies communes.....	42
I.4.8. Le lien entre les cancers et les maladies neurodégénératives.....	43
I.4.8.1. Les données épidémiologiques.....	43
I.4.8.2. La maladie de Huntington et le cancer du sein.....	43
I.4.9. Les mécanismes d'oncogenèse des glioblastomes.....	44
I.4.10. Les cellules souches cancéreuses du gliome humain.....	44
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION.....	46
II.1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE.....	46
II.1.1. Les extractions et la purification.....	46
II.1.2. La LC-MS des extraits bruts et fractionnés.....	47
II.1.3. Etude des propriétés anti-inflammatoires des extraits des racines, écorces de tronc et graines de <i>Vitellaria Paradoxa</i>	47
II.1.4. Etude de l'activité antiproliférative des extraits des racines, écorces de tronc et graines de <i>Vitellaria Paradoxa</i>	52
II.1.5. La purification.....	52
II.2. CARACTERISATIONS DES COMPOSES ISOLEES DES RACINES, ECORCES DE TRONC, GRAINES ET COMPOSES DE TRANSFORMATIOS DE <i>VITELLARIA PARADOXA</i>	56
A. COMPOSES ISOLEES.....	56
II.2.1. Elucidation structurale des triterpènes isolés.....	56
II.2.1.1. Identification et caractérisation du composé VP3.....	56
II.2.1.2. Identification et caractérisation du composé VP4 (nouveau dérivé).....	63
II.2.1.3. Identification et caractérisation du composé VP5 (nouveau dérivé).....	73
II.2.1.4. Elucidation du composé VP11.....	79
II.2.1.5. Elucidation du composé VP2.....	84
II.2.2. Les composés polyphénoliques.....	88
II.2.2.1. Caractérisation structurale du composé VP5-1.....	88
II.2.2.2. Caractérisation structurale du composé VP7.....	92
II.2.2.3. Identification du composé VP17.....	95
II.2.3. Le cycloalcane (cyclotol) VP6.....	98
II.2.4. L'acide gras VP18.....	101
B. COMPOSES DE TRANSFORMATIONS CHIMIQUES.....	104

II.2.5. Caractérisations des composés d'hémisynthèse.....	104
II.2.5.1. Dérivé du composé VP4-Me (<u>126</u> -méthylation).....	104
II.2.5.2. Dérivé du composé VP5-Me (<u>127</u> -méthylation).....	105
II.2.5.3. Dérivés du composé VP3-Me (Dérivé 1, <u>91</u>).....	107
II.2.5.4. Composé VP3-H1 (Dérivé 2, <u>91</u>).....	109
II.2.5.5. Composé VP3-V1 (Dérivé 3, <u>91</u>).....	109
II.3. RELATION STRUCTURE ACTIVITE DES TRITERPENES ET LEURS DERIVES.....	110
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	113
CAPITRE III : ETUDE EXPERIMENTALE.....	114
III.1. MATERIEL ET METHODES.....	114
III.1.1. Appareillage.....	114
III.1.2. Matériel végétal..... ; ;.....	116
III.1.3. L'extraction.....	117
III.1.3.1. Le bain ultrason ou le sonicateur.....	117
III.1.3.2. Le Soxhlet.....	118
III.1.3.3. La macération à température ambiante (72 heures).....	118
III.1.4.4. La macération avec agitateur mécanique.....	118
III.2. ETUDES DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DES EXTRAITS DES ECORCES DE TRONC DE <i>VITELLARIA PARADOXA</i> CHEZ LES RATS ALBINOS.....	120
III.2.1. Matériel animal.....	120
III.2.2. Evaluation des propriétés anti-inflammatoires.....	121
III.2.2.1. Inflammation aigüe induite par la carragénine.....	121
III.2.2.2. Inflammation chronique induite par l'adjuvant complet de Freund.....	122
III.2.2.3. Mesure de la taille de l'arthrite.....	122
III.2.2.4. Détermination du score de l'arthrite.....	122
III.2.2.5. Mesure du poids des animaux.....	123
III.2.2.6. Mesure de l'activité locomotrice.....	123
III.2.2.7. Mesure de l'effet nociceptif.....	124
III.2.2.8. Mesure du poids des organes.....	124
III.2.2.9. Détermination des paramètres sanguins.....	125
III.2.2.10. Réalisation des coupes histologiques.....	125
III.3. SEPARATION ET CARACTERISTIQUES DES COMPOSES.....	127
III.3.1. Séparation.....	127
III.3.2. Quelques tests caractéristiques des composés.....	129
III.3.2.1. Test des stérols et des terpénoïdes.....	129
III.3.2.2. Test des flavonoïdes.....	129

III.3.3. Technique d'extraction et séparation par le bain ultrason.....	130
III.4. HEMISYNTHESE DES DERIVES DES COMPOSES ISOLEES.....	130
III.4.1. Aperçu bibliographique sur l'acide bétulinique.....	130
III.4.2. Réactifs et produits utilisés pour la synthèse.....	131
III.4.3. Conditions opératoires d'hémisynthèse des dérivés de l'acide bétulinique.....	132
III.5. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES.....	132
III.5.1. Composé VP3.....	132
III.5.2. Composé VP4.....	133
III.5.3. Composé VP5.....	133
III.5.4. Composé VP11.....	133
III.5.5. Composé VP2.....	133
III.5.6. Composé VP5-1.....	133
III.5.7. Composé VP7.....	134
III.5.8. Composé VP17.....	134
III.5.9. Composé VP6.....	134
III.5.10. Composé VP18.....	134
III.5.11. Composé VP4-Me.....	134
III.5.12. Composé VP5-Me.....	135
III.5.13. Composé VP3-Me.....	135
III.5.14. Composé VP3-H1.....	135
III.5.15. Composé VP3-V1.....	135
III.6. ETUDE D'ACTIVITE ANTICANCEREUSE DES COMPOSES.....	135
III.6.1. Culture cellulaire.....	136
III.6.2. Evaluation de l'activité cytotoxique.....	136
III.6.3. Calcul de pourcentage.....	136
III.6.4. Induction d'apoptose.....	136
REFERENCES.....	137
ANNEXES.....	148

DEDICACE

*A mes parents, **BAIRI Raymond** et **ZENABOU Sidonie***

REMERCIEMENTS

L'union fait la force, c'est ici l'occasion à jamais pour moi de couronner tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à mon épanouissement, de bout à bout. Ainsi, j'exprime ma reconnaissance :

A l'Etat Camerounais.

*Au Professeur **Gabriel NGOSONG FOLEFOC** qui a bien voulu m'accueillir à bras ouverts dans son équipe de recherche. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour son dynamisme, son dévouement et tous ses efforts qu'il déploie pour la bonne marche du laboratoire. Que Dieu lui donne une prompte guérison.*

*Au Professeur **Kenneth OBEN EYONG**, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait découvrir le merveilleux monde de la chimie organique des produits naturels. Mes sincères remerciements et mon infinie reconnaissance pour votre exigence pour le travail bien fait, vos qualités scientifiques et sociales font de vous un homme estimé et respecté.*

*Je remercie spécialement Professeur **Harquin Simplicie FOYET** de l'Université de Maroua pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée dans la réalisation de cette thèse, notamment, la récolte et la réalisation des activités anti-inflammatoire et antineurodégénérative.*

*Au Docteur **Marc LAMSHÖFT** de Bayer CropScience en Allemagne, qui a également contribué activement à la réalisation de cette thèse, notamment, l'enregistrement de la majorité des spectres.*

*Au même titre, au Professeur **Daniel ROMO** de l'Université Baylor aux Etats-Unis pour sa contribution à la réalisation de l'activité cytotoxique, Professeur **Pierre WAFFO-TEGUO** (ISVV, Bordeaux), Professeur **Jean-Michel MERILLON** (ISVV, Bordeaux) et Professeur **Philippe VINCENDEAU** (CHU Bordeaux) pour leur accueil chaleureux et leurs idées ingénieuses pendant mon séjour à Bordeaux (France).*

*Je remercie particulièrement Docteur **Pantaléon AMBASSA** de l'Université de Yaoundé 1, Docteur **Romarc NZOUMBOU-BOKO** de l'Université de Bangui et Monsieur **Phélias KEÏNINGA**, professeur de lycée, certifié de français (RCA) pour la lecture de cette thèse.*

*Je remercie également le Chef de Département de Chimie Organique, Professeur **Augustin Ephrem NKENGFACK**, pour ses multiples encouragements et ses précieux conseils.*

Au corps professoral du Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I pour sa qualité dans la formation.

*Je remercie **Bruno WILS**, Attaché Culturel à l'Ambassade de France à Bangui, pour leur bonne collaboration, assistance à l'aboutissement de ce travail.*

Au Docteur Lazare SIDJIU SIDJUI, Monsieur Hervé Landry KETSEMEN, Mademoiselle Salomé GHANSENYUY et tous les autres membres du labo 263, pour leurs soutiens, échanges et encouragements.

Je tiens également à remercier l'unité MIB de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin de Bordeaux (France), qui m'a apporté leurs soutiens indéfectibles aux techniques du laboratoire.

J'apprécie sincèrement le soutien financier de l'Ambassade de France à Bangui et le bon sens d'aider le chercheur à s'épanouir en créant une ambiance de travail propice à la réalisation de ce travail.

Je n'oublie pas Messieurs Alain BELPOU, Gérard Joseph TAM-NIMI, DOUMIA Benoît, Stéphane NABAH, Méthusela MONKOGOLORA, Victor SIOBOUA, Anselme YAPELE-MBASSANA, Narcisse Tanguy BAIRY, Emagil BELAHODA, Josias SARKI, Benjamin AMBOUTOUNI et Alexis MAÏNA-ABABA pour leurs encouragements et leurs soutiens.

Aux Mesdames Marie Josée MAÏMOUNA, Georgine HEDI pour leurs précieux conseils.

Aux couples Max Henri ZIBAYA, Jacques YANGANG, Elhady Ossen BENDOUNGA et Modeste SALASSENGUE. Que Dieu vous bénisse et vous comble de sa grâce.

A toutes les familles Serge WADEMBA, Nathanaël YAPELE, Benoît M'BOROHOU, Enoch BENDOUNGA, Noé NGROUNDALYA, Noé NANG-HI, Nephtali YAPOULE, Joël ZIBAYA et Oscar NGUEREMI sans exception. Qu'elles reçoivent ici l'expression de mes sentiments et à toutes les familles qui m'ont tout donné sans rien en retour.

A ma chère épouse Ornella Diana BAN WADEMBA, à mes enfants Gypsie Claué Abigaëlle BAIRY II et Guérisson-Fils Jacques BAIRY II et à mes sœurs Grâce Esther KOLAYA et Larose RING-DIMI YAPELE d'avoir supporté mon absence dans le foyer.

Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

- # : Statistiquement significatif par rapport au normal
- * : Statistiquement significatif par rapport au témoin
- [**M-H**]⁺ : Ion pseudomoléculaire
- ¹³C : carbone
- ¹H : proton
- ACF** : Adjuvant Complet de Freund
- AcOEt** : Acétate d'éthyle
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdiens
- AIS** : anti-inflammatoires stéroïdiens
- ALS-4** : sclérose latérale amyotrophique type 4
- AVC** : accident vasculaire cérébral
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- CD₃OD** : Méthanol deutéré
- CDCl₃** : Chloroforme deutéré
- CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance
- COSY** : *Correlation Spectroscopy*
- CSC** : Cellules Souches Cancéreuses
- CC** : Chromatographie sur Colonne
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- CCM-p** : Chromatographie sur Couche Mince préparative
- DCI** : Dénomination Commune Internationale
- DEPT** : *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
- DMAP** : Diméthylaminopyridine
- DMAPP** : diphosphate de diméthylallyle
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- EGF** : cellules de cancer du sein
- ER+** : œstrogènes
- FDA** : *Food and Drug Administration*

Hb : Hémoglobine

HeLa : le carcinome épithélioïde du col de l'utérin humain

HER2 : *human epidermal growth factor receptor 2*

HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*

HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane

IG₅₀ : concentration à 50% d'inhibition de la croissance des cellules

IPP : diphosphate d'isopentényle

IR : Spectrométrie Infrarouge

IUPAC : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

J : Constante de couplage

LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

m/z : Rapport masse sur charge atomique

MCF-7 : les lignées cellulaires du cancer du sein humain

MDA-MB-231 : L'adénocarcinome mammaire caucasien humain

MeOH : Méthanol

MHz : Mégahertz

NCI-H460 : la lignée cellulaire du cancer du poumon à petites cellules

NOESY : *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PC3 : la lignée cellulaire du cancer de la prostate humaine prostate

ppm : partie par million

PR+ : progestérone

RB : rétinoblastome

RBC : *Red Blood Cells*

RCA : République Centrafricaine

RDC : République Démocratique du Congo

RE : réticulum endoplasmique

RH+ : récepteurs hormonaux positifs

RMN 1-D : Résonance Magnétique Nucléaire à une dimension

RMN 2-D : Résonance Magnétique Nucléaire à deux dimensions

ROESY : *Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy*

RSA : Relation Structure-Activité

SRB : sulforhodamine

TERT : *Telomerase reverse transcriptase*

TkrC : récepteur à dépendance

TOCSY : *Total Correlation Spectroscopy*

UV : Spectrométrie Ultra-violet

VHB : virus d'hépatite B

VHC : virus d'hépatite C

VP : *Vitellaria paradoxa*

VPAE : extrait aqueux de *Vitellaria paradoxa*

VPEE : extrait d'acétate d'éthyle de *Vitellaria paradoxa*

VPH : virus du papillome humain

VPME : extrait au méthanol de *Vitellaria paradoxa*

WBC : *White Blood Cells*

δ : Unité du déplacement chimique

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Usages de <i>Vitellaria paradoxa</i>	7
Tableau 2 : Les dérivés de l'acide benzoïque.....	14
Tableau 3 : Les dérivés de l'acide cinnamique.....	14
Tableau 4 : Tocophérols isolés des fruits de <i>Vitellaria paradoxa</i>	16
Tableau 5 : Activité antitumorale <i>in vitro</i> de l'acide bétulinique.....	24
Tableau 6 : Principales classes d'anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	30
Tableau 7 : Exemples de plantes médicinales à activités anti-inflammatoire.....	32
Tableau 8 : Bilan d'extraction.....	46
Tableau 9 : Effets des extraits aqueux (VP AE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur le poids de la rate, le poids du foie et le poids du thymus après 14 jours de traitement.....	50
Tableau 10 : Données spectrales RMN ¹ H et ¹³ C (CD ₃ OD, 600 et 150 MHz) du composé VP3.....	62
Tableau 11 : Données spectrales RMN ¹ H, ¹³ C et HMBC du composé VP4.....	72
Tableau 12 : Données spectrales de VP11.....	83
Tableau 13 : Récapitulatif des données spectrales VP2.....	87
Tableau 14 : Données spectrales protons, carbones et HMBC du composé VP17.....	98
Tableau 15 : récapitulatif des données spectrales protons, carbones et HMBC du composé VP6.....	101
Tableau 16 : Données spectrales du composé VP18.....	103
Tableau 17 : IC ₅₀ valeurs calculées de figure 93 pour les composés indiqués lors d'une exposition de 3 jours aux cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.....	111
Tableau 18 : Profil chromatographique des extraits des écorces.....	120
Tableau 19 : Score de l'arthrite en fonction de la morphologie de la patte infectée.....	123
Tableau 20 : Profil chromatographique sur colonne de 17g de VPEE des écorces de tronc.....	127
Tableau 21 : Profil chromatographique sur colonne de 22,6g de VPEE des racines.....	128
Tableau 22 : Profil chromatographique sur colonne de 8g de VPEE des racines.....	129
Tableau 23 : Réactifs et produits de synthèse.....	131

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Aire de répartition géographique du <i>Vitellaria paradoxa</i> en Afrique.....	4
Figure 2 : Système nerveux.....	27
Figure 3 : Phénomène invasif du cancer en image.....	38
Figure 4 : Représentation schématique des différentes voies moléculaires de l'apoptose.....	42
Figure 5 : Chromatogramme de l'extrait d'acétate d'éthyle (250-750 m/z).....	47
Figure 6 : Spectre de masse de l'extrait d'acétate d'éthyle.....	47
Figure 7 : Effets des extraits aqueux, à l'acétate d'éthyle et au méthanol sur l'inflammation induite par la carragénine.....	48
Figure 8 : Effets des extraits aqueux, à l'acétate d'éthyle, au méthanol et au diclofénac sur l'inflammation induite par l'Adjuvant Complet de Freud.....	49
Figure 9 : Effets des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur le diamètre des articulations des rats après 14 jours de traitement.....	49
Figure 10 : Effets des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur le score arthritique après 14 jours de traitement.....	50
Figure 11 : Effet traitement chronique des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), Au méthanol (VPME) et au diclofénac sur WBC (A), RBC (B), ESR (C) et hémoglobine (D) après 14 jours de traitement.....	51
Figure 12 : Structures histologiques des articulations et du cartilage de rats traités et non-traités.....	51
Figure 13 : Protocole d'extraction et isolement des composés obtenus des écorces de tronc de <i>Vitellaria paradoxa</i>	53
Figure 14 : Protocole d'extraction et isolement des composés obtenus des racines de <i>Vitellaria paradoxa</i>	54
Figure 15 : Protocole d'extraction et isolement des composés obtenus des graines de <i>Vitellaria paradoxa</i>	55
Figure 16 : Spectre IR du composé VP3.....	56
Figure 17 : Spectre LCMS du composé VP3.....	57
Figure 18 : Spectre de masse (APCI) du composé VP3.....	57
Figure 19 : Spectre de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) du composé VP3.....	58
Figure 20 : Spectre de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) du composé VP3.....	58
Figure 21 : Spectre de DEPT-135 (CD ₃ OD, 150 MHz) du composé VP3.....	59
Figure 22 : Spectre COSY du composé du composé VP3.....	60
Figure 23 : Spectre HSQC du composé VP3.....	60
Figure 24 : Spectre HMBC du composé VP3.....	61
Figure 25 : Spectre IR du composé VP4.....	63

Figure 26 : Spectre LCMS du composé VP4.....	63
Figure 27 : Spectre de masse (APCI) du composé VP4.....	64
Figure 28 : Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) de composé VP4.....	64
Figure 29 : Spectre RMN ¹ H élargi (CD ₃ OD, 600 MHz) de composé VP4.....	65
Figure 30 : Spectre RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) du composé VP4.....	66
Figure 31 : Spectre RMN ¹³ C élargi (CD ₃ OD, 150 MHz) du composé VP4.....	66
Figure 32 : Spectres DEPT-135 élargis (CD ₃ OD, 150 MHz) du composé VP4.....	67
Figure 33 : Spectre COSY du composé VP4.....	68
Figure 34 : Spectre HSQC du composé VP4.....	69
Figure 35 : Spectre HSQC élargi du composé VP4.....	69
Figure 36 : Spectre HMBC de composé VP4.....	70
Figure 37 : Spectre NOESY de composé VP4.....	70
Figure 38 : Spectre IR du composé VP5.....	73
Figure 39 : Chromatogramme LC-MS du composé VP5.....	73
Figure 40 : Spectre de masse (APCI) du composé VP5.....	74
Figure 41 : Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) du composé VP5.....	74
Figure 42 : Spectre RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) du composé VP5.....	75
Figure 43 : Spectre DEPT (CD ₃ OD, 150 MHz) du composé VP5.....	75
Figure 44 : Spectre COSY du composé VP5.....	76
Figure 45 : Spectre TOCSY du composé VP5.....	76
Figure 46 : Spectre HSQC du composé VP5.....	77
Figure 47 : Spectre HMBC du composé VP5.....	78
Figure 48 : Spectre HSQC-TOCSY du composé VP5.....	78
Figure 49 : Spectre NOESY de composé VP5.....	79
Figure 50 : Spectre proton du composé VP11.....	80
Figure 51 : Spectre COSY du composé VP11.....	80
Figure 52 : Spectre COSY élargi du composé VP11.....	81
Figure 53 : Spectre HQSC du composé VP11.....	81
Figure 54 : Spectre HMBC du composé VP11.....	82
Figure 55 : Spectre HMBC élargi du composé VP11.....	82
Figure 56 : Spectre RMN proton du composé VP2.....	84
Figure 57 : Spectre COSY du composé VP2.....	85
Figure 58 : Spectre HSQC du composé VP2.....	85
Figure 59 : Spectre HMBC du composé VP2.....	86
Figure 60 : Spectre de masse (APCI) du composé VP5-1.....	88
Figure 61 Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) du composé VP5-1.....	89

Figure 62 : Spectre RMN ¹ H élargi (CD ₃ OD, 500 MHz) du composé VP5-1.....	89
Figure 63 : Spectre RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) du composé VP5-1.....	90
Figure 64 : Spectre COSY du composé VP5-1.....	91
Figure 65 : Spectre HSQC du composé VP5-1.....	91
Figure 66 : Spectre de masse (APCI) du composé VP7.....	92
Figure 67 : Spectre RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) du composé VP7.....	93
Figure 68 : Spectre RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) du composé VP7.....	93
Figure 69 : Spectre COSY du composé VP7.....	94
Figure 70 : Spectre proton du composé VP17.....	95
Figure 71 : Spectre COSY du composé VP17.....	96
Figure 72 : Spectre HSQC du composé VP17.....	96
Figure 73 : Spectre HMBC du composé VP17.....	97
Figure 74 : Spectre ROESY du composé VP17.....	97
Figure 75 : Spectre proton du composé VP6.....	99
Figure 76 : Spectre COSY du composé VP6.....	99
Figure 77 : Spectre HSQC du composé VP6.....	100
Figure 78 : Spectre HMBC du composé VP6.....	100
Figure 79 : Spectre proton du composé VP18.....	101
Figure 80 : Spectre COSY du composé VP18.....	102
Figure 81 : Spectre HSQC du composé VP18.....	102
Figure 82 : Spectre HMBC du composé VP18.....	103
Figure 83 : Spectre IR du composé VP4-Me.....	104
Figure 84 : Spectre RMN ¹ H du composé VP4-Me	104
Figure 85 : Spectre RMN ¹³ C du composé VP4-Me	105
Figure 86 : Spectre IR du composé VP5-Me	106
Figure 87 : Spectre RMN ¹ H du composé VP5-Me	106
Figure 88 : Spectre ¹³ C du composé VP5-Me	106
Figure 89 : Spectre IR du composé VP3-Me	107
Figure 90 : Spectre RMN ¹ H du composé VP3-Me	108
Figure 91 : Spectre RMN ¹³ C du composé VP3-Me	108
Figure 92 : Spectre RMN ¹ H du composé VP3-H1.....	109
Figure 93 : Spectre RMN ¹ H du composé VP3-V1	110
Figure 94 : Activité cytotoxique des triterpénoïdes sur les cellules cancéreuses de cancer du sein MDA-MB-231 (TNBC).....	111
Figure 95 : Induction d'apoptose des triterpènes <u>91</u> (2) et <u>135</u> (5).....	112

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Structure chimique de l'allantoin.....	9
Schéma 2 : Les types squelettes des flavonoïdes.....	10
Schéma 3 : Structures chimiques de myricétine, isorhamnétine, quercétine et kaempférol.....	11
Schéma 4 : Les flavones : apigénine, lutéoline et chrysin.....	11
Schéma 5 : Structures des flavan-3-ols.....	12
Schéma 6 : Les principales structures des anthocyanidines.....	12
Schéma 7 : Structures des flavanones naringénine et naringine.....	13
Schéma 8 : Structures chimiques des isoflavones.....	13
Schéma 9 : La structure de base de l'acide benzoïque.....	14
Schéma 10 : Les structures des isomères de l'acide cinnamique.....	14
Schéma 11 : Les structures des stilbènes <i>trans</i> - et <i>cis</i> -resvératrol et leurs dérivés glycosylés et, phénanthrènes.....	15
Schéma 12 : Squelette de base d'un tocophérol.....	15
Schéma 13 : Quelques phytostérols isolés des fruits de karité.....	16
Schéma 14 : Quelques triterpènes isolés des fruits de <i>Vitellaria paradoxa</i>	17
Schéma 15 : Les monoterpènes myrcène, α -terpinéol et terpinen-4-ol.....	18
Schéma 16 : Quelques diterpènes (Kueté, 2013).....	18
Schéma 17 : Les principaux types de squelettes des triterpénoïdes pentacycliques.....	19
Schéma 18 : Structures planes de précurseurs biosynthétiques des triterpénoïdes pentacycliques.....	19
Schéma 19 : Voie de biosynthèse des structures de base des triterpènes pentacycliques.....	20
Schéma 20 : Structure plane de l'acide ursolique.....	21
Schéma 21 : Structure plane de l'acide oléanolique.....	22
Schéma 22 : Structure plane de l'acide bétulinique.....	22
Schéma 23 : Exemples des dérivés de l'acide bétulinique	23
Schéma 24 : Synthèse de l'acide bétulinique à partir du bétulinol par oxydation non-sélective.....	23
Schéma 25 : Structure de l'antibactérien	23
Schéma 26 : Structures chimiques de quelques anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	30
Schéma 27 : Quelques dérivés des corticostéroïdes naturels.....	31
Schéma 28 : Les structures des différents anticholinestérasiques.....	35
Schéma 29 : Structures des dimères ou hybrides des anticholinestérasiques et l'antagoniste du glutamate.....	36
Schéma 30 : Structures chimiques de quelques produits pharmaceutiques palliatifs aux maladies neurodégénératives.....	36
Schéma 31 : Structures de quelques médicaments anticancéreux.....	40
Schéma 32 : Structure du composé <u>91</u>	61

Schéma 33 : La structure du composé <u>126</u>	71
Schéma 34 : Structure du composé <u>127</u>	79
Schéma 35 : Structure du composé <u>128</u>	83
Schéma 36 : Structure chimique du composé <u>129</u>	86
Schéma 37 : Structure du composé <u>23</u>	92
Schéma 38 : Structure du composé <u>22</u>	94
Schéma 39 : Structure du composé <u>130</u>	98
Schéma 40 : Structure du cyclitol <u>131</u>	101
Schéma 41 : Structure du composé <u>132</u>	103
Schéma 42 : Structure du composé <u>133</u>	105
Schéma 43 : Structure du composé <u>134</u>	107
Schéma 44 : Structure du composé <u>135</u>	108
Schéma 45 : Structure du composé <u>136</u>	109
Schéma 46 : Structure du composé <u>137</u>	110
Schéma 47 : Structures des triterpènes et leurs dérivés estérifiés.....	110
Schéma 48 : Fonctionnalisation de COOH.....	130
Schéma 49 : Hémisynthèse sur OH de VP3 en C-3.....	132

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Ecorce du tronc, fruit-feuilles et arbre entier de <i>Vitellaria Paradoxa</i>	5
Photographie 2 : Appareil de résonance magnétique nucléaire.....	116
Photographie 3 : Racines, graines et écorces de tronc de karité.....	117
Photographie 4 : Le bain ultrason (le sonicateur).....	118
Photographie 5 : Les extraits à l'acétate d'éthyle et aqueux.....	119
Photographie 6 : Rats blancs de souche Swiss albinos de sexe féminin.....	120
Photographie 7 : Pied à coulisse électronique.....	121
Photographie 8 : Balance de précision..... ;.....	123
Photographie 9 : Un rat dans un labyrinthe à champ ouvert.....	124
Photographie 10 : Dispositif de plaque chauffante.....	124
Photographie 11 : Automate d'hématologie.....	125

RESUME

Notre travail est basé sur l'étude bioguidée des activités antineurodégénérative et cytotoxique des graines, des racines et des écorces du tronc de *Vitellaria paradoxa*, et également quelques transformations chimiques sur les composés actifs dans le but d'étudier la relation structure-activité (RSA).

Les différentes parties de *Vitellaria paradoxa* ont été extraites séquentiellement et successivement aux solvants à polarité croissante (hexane, acétate d'éthyle, méthanol et eau) à l'aide du sonicateur. Ces extraits ont fait l'objet d'analyse LCMS et au screening biologique contre l'inflammation et la cytotoxicité. Les résultats obtenus ont révélé que les extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol sont actifs et abondants en métabolites secondaires.

- La LCMS a montré que l'extrait à l'acétate d'éthyle est le plus riche en constituants chimiques notamment les triterpènes.
- L'activité anti-inflammatoire (*in vivo*) des extraits (acétate d'éthyle, méthanolique et aqueux) a été évalué sur l'inflammation aiguë induite par la carragénine et sur l'inflammation chronique induite par l'adjuvant complet de Freund (ACF) à la même dose de 150 mg/kg. Du 19 au 28^{ème} jour de traitement, le pourcentage inflammatoire maximum était entre 9,60 et 8,91 pour l'extrait à l'acétate d'éthyle comparé à 30,91-24,29% aux contrôles. Tous les extraits ont réduit de manière significative les scores de l'arthrite, mais la réduction maximale a été obtenue avec l'extrait à l'acétate d'éthyle le 24^{ème} jour de l'expérimentation.
- Concernant l'activité antiproliférative, l'extrait brut au méthanol des écorces du tronc est actif sur les quatre lignées cellulaires NCI-H460, MCF-7, PC3 et Hela testées avec des valeurs de GI₅₀ variant de 24,00 à 66,46 µg/mL.

Tous ces résultats nous ont amené à procéder de façon systématique la recherche des composés responsables des activités observées dans ces extraits.

La purification de ces différents extraits des racines, écorces de tronc et graines en utilisant les méthodes chromatographiques (CC, CCM, CCM-p et Sephadex) et spectroscopiques (RMN 1D : ¹H, ¹³C, DEPT ; 2D : HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, HSQC-TOCSY, ROESY, NOESY ; UV ; IR ; LCMS et MS) usuelles nous ont permis d'obtenir seize composés dont dix sont entièrement caractérisés et regroupés en 4 classes des métabolites secondaires à savoir : cinq triterpénoïdes dont deux sont nouveaux. Il s'agit de : l'acide 1 α ,2 β ,3 β ,19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oïque **126** (nouveau), l'acide 2 β ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oïque **127** (nouveau), l'acide bétulinique **91**, l'acide 3 β -acétoxy-1 α ,2 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oïque **128** et ester 3 β -(cinnamoyloxy)-11-méthoxy-urs-11,12-enoate d'éthyle **129** ; trois flavonoïdes : épicatechine **23**, catéchine **22**, (2R, 3S)-dihydrokaempférol **130** ; un protoquercitol **131** et un acide gras : acide pentadécanoïque **132**.

Après avoir caractérisé les composés isolés, certains triterpènes (**126**, **127** et **91**) ont été évalués pour leur cytotoxicité sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 de cancer du sein (TNBC). Les résultats obtenus ont montré que l'acide bétulinique **91** était le plus actif avec une valeur IC₅₀ de l'ordre de 19,90 µM (17,20-23,10 µM, IC 95%). Dans le but d'étudier la relation structure-activité (SAR) de ces trois triterpènes en général et l'acide bétulinique en particulier, nous avons effectué une estérification de fonction COOH de ces triterpènes (**91**, **126** et **127**) en utilisant du diazométhane généré *in situ* à partir de 1-méthyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine pour obtenir après l'estérification leurs esters méthylés (**134**, **133** et **135**) correspondants. Estérification de la fonction OH de l'acide bétulinique **91** a été réalisée en utilisant les anhydrides valérique et heptanoïque en présence de pyridine anhydre et de DMAP pour obtenir une poudre blanche amorphe des composés **136** et **137**. En général, l'activité des ester-méthylés **134** (32,90 µM), **133** (43,00 µM) et **135** (46,70 µM) contre la lignée cellulaire MDA-MB-231 était plus active que leurs triterpènes initiaux **91** (19,90 µM), **126** (63,50 µM) et **127** (230,00 µM) à l'exception de l'acide bétulinique. Cette amélioration d'activité peut être due à une plus grande perméabilité cellulaire des dérivés esters hydrophobes. Les tests d'efficacité de l'acide bétulinique et son ester-méthylé ont été réalisés sur les cellules cancéreuses. Les résultats ont montré que seules les cellules cancéreuses sont toutes détruites par induction d'apoptose. La présente étude a permis de corroborer l'utilisation de *Vitellaria paradoxa* en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire de l'extrait de l'acétate d'éthyle et cytotoxique des triterpènes isolés. Nous souhaiterons approfondir cette étude.

Mots-clés : Sapotaceae, *Vitellaria paradoxa*, métabolites secondaires, estérification, anti-inflammatoire, antiarthritique, cytotoxique.

ABSTRACT

Our work is based on a bio guided anti-neurodegenerative and cytotoxic study of the seeds, roots and stem barks of *Vitellaria paradoxa* and also some chemical transformations on the active compounds in order to study their structure-activity relationship (SAR).

The various parts of *Vitellaria paradoxa* were extracted sequentially and successively with solvents of increasing polarity (hexane, ethyl acetate, methanol and water) using a sonicator bath. These extracts were subjected to LCMS analysis and to biological screening against inflammation and cytotoxicity. The results obtained revealed that the ethyl acetate and methanol extracts were the most active and abundant in secondary metabolites.

- The LCMS analysis has shown that the ethyl acetate extract is the richest in natural substances, in particular the triterpenes.
- The *in vivo* (anti-inflammatory) activity of these extracts (ethyl acetate, methanolic and aqueous) was evaluated on acute inflammation induced by carrageenan and on chronic inflammation induced by Freund's Complete Adjuvant (FCA) at the same dose of 150 mg/kg. On days 19-28, the maximum inflammatory percentage was between 9.60 and 8.91 for the ethyl acetate extract compared to 30.91-24.29% for the controls. All extracts significantly reduced arthritis scores but the maximum reduction was achieved with ethyl acetate extract on day 24th of experiment.
- Concerning the antiproliferative activity, the crude methanol extract of stem bark is active on four cell lines NCI-H460, MCF-7, PC3 and Hela tested with GI₅₀ values varying from 24.00 to 66.46 µg/mL.

All these results prompted a systematically search for the compounds responsible for the activities observed in these extracts.

The purification of these different extracts from the roots, seeds and stem barks using the usual chromatography and spectroscopic methods lead to the isolation of sixteen compounds of which ten have been fully characterized and grouped into four classes of secondary metabolites. Namely : five triterpenoids, two of which are new. It is, 1 α ,2 β ,3 β ,19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid **126** (new) and 2 β ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid **127** (new), betulinic acid **91**, 3 β -acetoxy-1 α ,2 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid **128** and 3 β -(cinnamoyloxy)-11-methoxy-urs-11,12-enoate ethyl ester **129** ; three flavonoids : epicatechin **23**, catechin **22**, (2R, 3S)-dihydrokaempferol **130** ; a cyclitol **131** and a fatty acid : pentadecanoic acid **132**.

After having characterized the isolated compounds, some triterpenes (**126**, **127** and **91**) were evaluated for their cytotoxicity on breast cancer cell line (TNBC). The results obtained showed that betulinic acid **91** was the most active with an IC₅₀ value of the order of 19.90 µM and 95% CI of 17.20-23.10 µM. In

order to study the structure-activity relationship of these three triterpenes (**91**, **126** and **127**) in general and betulinic acid in particular, we carried out esterification of their COOH function using diazomethane generated *in situ* from 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine to obtain their corresponding methylated esters (**134**, **133** and **135**). Esterification of the OH function of betulinic acid using valeric and heptanoic anhydrides in the presence of pyridine and DMAP afforded compounds **136** and **137**, as white amorphous substances. In general, the activity of methylated esters **134** (32.90 μM), **133** (43.00 μM) and **135** (46.70 μM) against the MDA-MB-231 breast cancer cell line was more active than their initial triterpenes **91** (19.90 μM), **126** (63.50 μM) and **127** (230.00 μM) except for betulinic acid. This improvement in activity may be due to greater cell permeability of the more esters hydrophobic derivatives. The efficacy tests for betulinic acid and its methylated ester were carried out on the cancerous cells with Annexin V as reference drug. The results showed that only the cancerous cells were killed by induction of apoptosis. The present study corroborated the use of *Vitellaria paradoxa* in traditional medicine as an anti-inflammatory of the ethyl acetate extract and cytotoxic of isolated triterpenes. We would like to continue with an in deep to this study.

Keywords : Sapotaceae, *Vitellaria paradoxa*, Secondary metabolites, esterification, anti-inflammatory, antiarthritic, cytotoxic activities.

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies neurodégénératives et les cancers sont les maladies qui causent chaque année à travers le monde, un nombre important de décès. Elles constituent avec les infections virales et les facteurs de risque un véritable problème de santé publique. Les ravages causés par ces maladies sont ressentis avec beaucoup plus d'acuité dans les pays industrialisés et les pays en voie de développement. Les statistiques cumulées pour ces maladies neurologiques sont inquiétantes. Selon Ferlay et ses collaborateurs (2004), des millions de personnes en souffrent aux Etats-Unis et plus d'un million de français sont soignés chaque année pour de telles maladies, 10 millions de cas de cancers ont été signalés avec 6,5 millions de décès en Afrique (OMS, 2018). Or, la dopamine isolée de *Mucuna repens* a été identifiée comme agent antineurodégénératif puissant. Tandis que le taxol isolé de l'écorce du tronc de *Taxus brevifolia* est actuellement l'un des agents thérapeutiques les plus utilisés en chimiothérapie anticancéreuse pour le traitement du cancer du sein, des poumons et des ovaires (Cragg *et al.*, 2005) avec des ventes plus onéreuses. Malgré les efforts consentis par la communauté scientifique, les traitements actuels ne sont pas efficaces sur les maladies neurologiques. Le manque de sensibilisation éducative à la santé et à l'hygiène de vie, ainsi que l'accès aux soins médicaux de qualité accentuent ces fléaux. La prise en charge vise uniquement à atténuer les symptômes généralement associés pendant une période de temps, de ralentir la progression de la maladie ou de détruire les cellules corrompues. Certains pays s'apprêtent à renier au remboursement des médicaments anti-Alzheimer comme la France sur l'assurance maladie. Et si on ajoute la communauté scientifique fataliste au cours des dix dernières années, la vie des patients se réduit à quelque chose de très négligeable.

Ces pathologies sont accentuées par le phénomène des chimiorésistances, multifactoriel pouvant impliquer de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires (Gottesman, 2002) qui suscitent la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives tant pour le traitement de cancer que pour les maladies neurodégénératives, efficaces, de moindre coûts, relativement non toxiques s'avère indispensable et surtout avec des mécanismes d'action différents de ceux qui sont sur le marché.

L'homme sait, depuis fort longtemps, que la nature est porteuse d'une richesse médicinale. Elle constitue une solution alternative. La population mondiale a tiré profit des propriétés biologiques des extraits végétaux pour se soigner (OMS, 2003). Pour inverser la tendance, une approche que nous avons appliquée dans la présente thèse consiste à faire l'étude phytochimique et pharmacologique de *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae).

L'objectif général de ce travail est de procéder à l'étude phytochimique des graines, racines et écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* de la famille des Sapotaceae, à l'évaluation d'activités antineurodégénérative et cytotoxique, et entrepris quelques transformations chimiques de certains composés isolés.

A cet égard, la diversité de la flore africaine représente une source prometteuse de nouveaux agents antipathologiques. *Vitellaria paradoxa* de la famille des Sapotaceae possède-t-elle des potentialités biologiques antineurodégénérative et cytotoxique ? La population mondiale utilise très longtemps *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn (arbre à beurre) en médecine traditionnelle pour traiter de diverses infections, y compris l'inflammation, les irritations cutanées, la dermatite, les coups de soleil, le rhumatisme, la diarrhée, les maux d'estomac, les ulcères, le mal de nerf, les maux de cœur et de dents, la stérilité et le cancer (Moore, 2008, Foyet *et al.*, 2015, Orwa *et al.*, 2009, Jiofack *et al.*, 2010). Toutes les parties de la plante sont sollicitées : les écorces de la racine, les écorces du tronc, les feuilles. Le mode de préparation est la décoction, l'infusion, la macération et l'extraction. Le mode d'administration que l'on peut citer : la boisson, l'application, le lavement et le massage avec différentes catégories d'utilisation comme les blessures, des troubles digestifs, musculosquelettiques, cutanés, respiratoires et de grossesse-naissance. Cependant, force est de constater que la méconnaissance des composés chimiques responsables d'activités biologiques des plantes médicinales utilisées cause d'énormes préjudices aux prescripteurs. Les doses administrées restent imprécises (Bruneton, 2009).

Ces dernières décennies, l'utilisation des produits naturels pour la découverte de médicaments a diminué au profit des méthodes combinatoires qui peuvent générer rapidement de grandes bibliothèques de composés potentiellement bioactifs. Dans leur perspective, Paterson et Anderson en 2005 suggèrent qu'il pourrait être temps pour revisiter le dogme dominant et examiner les façons dont les produits naturels peuvent continuer à inspirer le développement de nouveaux médicaments.

L'extrait au méthanol des écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* a été testé contre certains types de cancer (Tagne *et al.*, 2014) et les résultats ont été très concluants. Ces résultats des études préliminaires et l'absence d'enquête ethnopharmacologique, en particulier sur les racines et écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* nous contraignent d'exécuter des expériences plus complètes pour isoler et caractériser les composés bioactifs responsables des effets inflammatoire et cytotoxique observés.

Trois chapitres structurent cette thèse :

Le premier chapitre intitulé aperçu botanique et généralités sur l'inflammation dans les maladies neurodégénératives et le cancer ;

Le deuxième chapitre met en évidence les résultats expérimentaux obtenus au cours de ces études : extraction, activités biologiques des extraits et composés, isolement, caractérisations et quelques transformations chimiques des composés purs isolés ;

Le troisième chapitre rassemble le matériel et les méthodes utilisés pour la purification et l'évaluation des activités biologiques antineurodégénérative et cytotoxique des différents extraits et composés isolés de *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae).

Et enfin, une liste de la littérature consultée pour la rédaction de cette thèse est présentée à la fin de ce document, puis en annexe une liste de publications issues de cette thèse donnée.

CHAPITRE I : APERÇU BOTANIQUE ET GENERALITES SUR L'INFLAMMATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES ET LE CANCER

Les progrès scientifiques, couplés à leurs applications technologiques dans le domaine des technologies médicales, bouleversent le monde que l'être humain pouvait imaginer. Les recherches médicales et scientifiques publiques ainsi que les progrès de l'éducation et des conditions de vie ont considérablement réduit le risque qu'une pandémie soit causée par un agent infectieux. Mais ce domaine de la santé connaît bien des défis. Les maladies neurodégénératives et le cancer ne cessent de bouleverser le monde. Elles sont deux problèmes importants de santé publique accrue (Abramson *et al.*, 2010 ; Herrinton *et al.*, 2007). Les causes de ces maladies sont inconnues et probablement multifactorielles associant le processus inflammatoire qu'une infection virale peut être la cause du début de ces maladies comme la sclérose latérale amyotrophique type 4 (ALS 4) et à la dégénérescence cancéreuse. Les maladies neurodégénératives sont le résultat d'accumulation de certaines protéines anormales dans le cerveau et la moelle épinière. Le cancer, lui, résulte d'un processus pathologique complexe par la multiplication incontrôlée des cellules dans l'organisme. La chronicité et l'incurabilité sont deux éléments caractéristiques et leur prise en charge nécessite un suivi à long terme. C'est ainsi que la population mondiale utilisait, par exemple, les décoctions d'écorces de karité afin de traiter les infections ou soigner les maladies neurologiques.

I.1. APERÇU BOTANIQUE

I.1.1. Aperçu sur les Sapotaceae

La famille des Sapotaceae est une famille de plantes dicotylédones numériquement dominante dans la flore et aussi bien dans la végétation (Emberger, 1960 ; Berhaut, 1967 ; Adjanohoun *et al.*, 1973). Chaque année, de nouvelles espèces sont explorées et estimées à plus de 800 espèces réparties en plus de 53 à 57 genres. Les Sapotaceae sont des arbres ou des arbustes, persistants ou caducs de taille moyenne de 6 à 12 mètres, au fût court et noueux, et, pour une espèce, une liane ligneuse. Les feuilles sont simples alternes, rarement sub-opposées, avec de latex blanc collant, sans stipules, aux marges entières ou très rarement dentées, fréquemment groupées à l'extrémité des rameaux. Le limbe, souvent coriace, a une nervation pennée (Vuillet, 1911). Les Sapotaceae sont aussi caractéristiques des plantes à fleurs, qui ont des fruits à baie à pulpe comestible. Dans les Sapotaceae, nous pouvons citer les quatre genres à distribution circumtropicale : *Manilkara*, *Sidéroxylon*, *Pouteria* et *Chrysophyllum* (Pennington, 1991).

Cette famille colonise des diverses classes de composés chimiques comme des saponines, des flavonoïdes, des composés polyphénoliques, des stéroïdes et des terpénoïdes. Ces importants métabolites secondaires sont des molécules naturelles potentiellement bioactives comme une alternative pour le traitement contre beaucoup de maladies infectieuses et autres.

I.1.2. Aperçu sur le genre *Vitellaria*

Vitellaria est considéré comme un genre mono-spécifique (Bonkougou, 1987). Il n'existe donc pas d'espèce du même genre que le karité. C'est un arbre poussant dans les savanes arborées de l'Afrique de l'Ouest (Mali, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Ghana, Guinée, Nigeria, Bénin, Sénégal) mais aussi également en République du Congo, République Démocratique du Congo (RDC), République Centrafricaine (RCA), Soudan et en Ouganda (DFSC, 2000) (figure 4, couleur verte) ainsi qu'au Cameroun (Aubreville, 1950, 1960), principalement au nord où quelques individus sont présents sur les hauts plateaux de l'Adamaoua à 1200 m d'altitude et au-delà.



Figure 1 : Aire en vert de répartition géographique du *Vitellaria paradoxa* en Afrique (Allal *et al.*, 2008).

I.1.3. Aspects botaniques sur *Vitellaria paradoxa*

Vitellaria paradoxa décrit par Carl Friedrich Von Gaertner en 1805 (Ruysen, 1957) est communément appelé karité. Le nom « karité » signifie « arbre à beurre » en wolof (Sénégal). On l'appelle aussi *si yiri* (prononcer "shi yiri") en bambara (Mali) (d'où son nom anglais, « shea tree »). Au Bénin on l'appelle *Tangue* en Biali, *Balawa* en Sango (RCA) et *Di soro* en Mboum (RCA, Tchad et Cameroun). Le karité est un oléagineux non conventionnel appartenant à la famille de Sapotaceae.

I.1.3.1. Les aires de distribution

L'arbre à beurre, le karité sous son ancienne appellation *Butyrospermum parkii* est la seule et l'unique espèce de *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertner selon la classification phylogénétique appartenant au genre *Vitellaria* et à la famille des Sapotaceae (Hall *et al.*, 1996). Les aires écologiques du karité sont très étendues. Cet arbre sacré se trouve essentiellement en Afrique (Matig *et al.*, 2006) ; Sanou et Lamien 2011 ; Kassamba, 1997), en savane arborée et, dans la zone qui

s'étend de la frontière Sénégal-guinéenne pour s'enfoncer vers l'Afrique Centrale à travers le Mali, le Nord de la Côte d'Ivoire, le Burkina-Faso, le Nord du Ghana, du Togo, du Bénin puis du Nigeria ou du moins, les zones soudaniennes et sahéliennes au Nord de l'équateur (Pehaut, 1976 ; Chevalier, 1946) (figure 1).

Cette espèce est utilisée en alimentation humaine (exemples : graisse pour la cuisine, adjuvant en chocolaterie), en médecine traditionnelle (cicatrisant, gastrite, hémorroïde, céphalée, antivenimeux), pour l'affouragement du bétail, pour l'artisanat et pour couvrir les besoins énergétiques. Sur le plan thérapeutique, la plante *Vitellaria paradoxa* a aussi de nombreuses utilisations dans la médecine traditionnelle, en particulier la décoction des écorces, des racines et des feuilles.

I.1.3.2. Etude botanique et position systématique

D'après la nomenclature binomiale des espèces, on classe *Vitellaria paradoxa* dans le règne végétal, sous règne des *Angiospermes*, classe des *Magnoliopsida*, sous-classe des Gamopétales appartenant à la famille des Sapotaceae.



écorce du tronc



fruit-feuilles



arbre entier



récolte



racines

Photographie 1 : Ecorce du tronc, fruit-feuilles et arbre entier de *Vitellaria Paradoxa* (BAIRY, 2012 et 2016).

I.1.3.3. Description botanique de *Vitellaria paradoxa*

Vitellaria paradoxa est un arbre de croissance lente qui peut atteindre une quinzaine de hauteur. Son écorce grise foncée profondément fissurée et découpée régulièrement (photographie 1), produit un peu de latex blanc peu collant lorsqu'elle est coupée (Adu-Ampomah *et al.*, 1995), ses feuilles sont simples et oblongues aux bords ondulés caractéristiques de 12 à 30 cm sur 4 à 10 cm (Matig *et al.*, 2006). Des fleurs blanches longues de 22 cm, à calice rouge à 8 lobes, corolle en cloche de 8 lobes. Ces fruits ovoïdes présentent une seule graine de forme variable, de couleur verte à jaune à la maturité, 4 à 5 cm de long et contient très souvent une seule graine noyée dans une pulpe sucrée et sa graine brune de 3 cm de long environ, à la coquille luisante, appelée la noix de karité. La récolte est réservée aux femmes d'où le qualificatif « *d'or des femmes* ». Les fruits de karité sont consommés directement et le beurre extrait de l'amande constitue la principale source de lipides végétaux en milieu rural (MEA, 2009 ; Carette *et al.*, 2009).

I.1.3.4. Données phytochimiques et pharmacologiques

Les essais chimiques des extraits de toutes les parties de *Vitellaria paradoxa* ont permis de caractériser la composition chimique du végétal. Ces résultats ont montré la présence : des alcaloïdes, des stéroïdes, des saponines, des tanins, de l'acide cinnamique, des tocophérols (vitamine E), des glucides et des sucres simples (Ndukwe *et al.*, 2007). Leurs activités biologiques (dépresseur ou stimulant, sympathomimétique) s'exercent dans les domaines les plus variés : anti-inflammatoires, antiarthritiques et anticancéreux (Tagne *et al.*, 2014 ; Orwa *et al.*, 2009 ; Moore, 2008 ; Foyet *et al.*, 2015 ; Jiofack *et al.*, 2010).

I.1.3.5. Aspects physiologiques et environnementaux

Les ressources naturelles en général et en particulier le karité de la zone des savanes guinéennes et soudaniennes connaissent une dégradation excessive et continue due au dérèglement climatique et aux activités anthropiques (Pontanier, *et al.*, 1995) ainsi qu'à la sécheresse, le parasitisme, l'attaque des insectes, les feux de brousse et à la dégradation des sols liée aux techniques culturales (Maïga, 1990 ; Boussim, 1991 ; Lamien, 2006). Un constat amer sur l'utilisation des pesticides comme les herbicides les plus utilisés au nord du Cameroun pour les cultures de maïs, du mil, de haricot et de l'arachide provoque la perte considérable de l'espèce. Cette mauvaise pratique s'étend jusqu'aux villages voisins faisant frontière entre la Centrafrique et le nord du Cameroun. L'association de certaines pratiques rudimentaires comme la coupe du bois de chauffe, le surpâturage (éleveurs peulhs), les longues phases de mise en culture permanente, la réduction de la durée des jachères (Oldeman, *et al.*, 1991) accentue la disparition massive de l'espèce *Vitellaria paradoxa*. Le karité s'adapte bien au sol sec et non argileux humide, siliceux, marécageux ou des zones d'inondations (Zerbo, 1987). Ces indices peuvent servir des pistes pour le reboisement du karité qui constitue aujourd'hui une importance économique mais également un grand intérêt pharmacologique. La

sylviculture pourrait être avantageuse malgré la croissance lente de cette espèce oléagineuse. Nombreux projets sont initiés sur la multiplication des jeunes plants mais demeurent peu exploitables.

I.1.4. Quelques usages de *Vitellaria paradoxa*

Des parties aériennes jusqu'aux racines de *Vitellaria paradoxa* ont été longtemps utilisées par la population rurale de l'Afrique tropicale et de l'Afrique sahélienne pour traiter les inflammations, le cancer et certaines pathologies. Sur le plan socioculturel et économique, le karité joue un rôle très important, surtout ses fruits font l'objet d'un commerce intense comme le troisième produit d'exportation dans l'économie Burkinabé. La période de production du karité est généralement de mai à août. Cette période coïncide avec la saison des pluies et après la récolte, les graines de karité sont transformées de façon traditionnelle en huiles végétales par des procédés simples à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Vu l'importance d'utilisations des graines, certains chercheurs se sont consacrés aux études de conservation en vue d'éviter les pertes pendant les périodes de production. Les connaissances scientifiques aussi bien sur cette plante comme les racines et les écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* restent hélas, encore mal élucidées.

L'expérience a toujours montré que de tels usages contribuent à la disparition progressive de l'espèce. De ce fait, ces essences à utilisations diverses et aux indices élevés d'utilisation méritent des regards particuliers dans les stratégies de gestion des espèces spontanées.

Tableau 1 : Usages de *Vitellaria paradoxa* (Nafan *et al.*, 2001 ; UNIFEM, 1997 ; PAF 1999 ; Booth *et al.*, 1988 ; Adoum, 1996 ; Asubiojo *et al.*, 1982).

Propriétés Partie de la plante	Pharmaceutiques et médicales	Cosmétiques et autres usages
Noix (graine)	<ul style="list-style-type: none"> • Soins des entorses • Massage • Cicatrisant • Revitalisant (fatigue) • Adjuvant en chocolaterie • Collyre (soins des yeux) • Antivenimeux • Diarrhée 	<ul style="list-style-type: none"> • Huile de cuisine • Conservation des aliments (viandes en particulier) • Crème dermatologique • Défrisant • Pommade de beauté • Savonnerie traditionnelle • Combustible pour les lampes • Enduits pour les cérémonies traditionnelles • Etanchéité (habitations)
Feuilles	<ul style="list-style-type: none"> • Antalgique (tête, ventre, yeux, ...) • Soins des œdèmes, baisse de la vue, ulcères de l'estomac • Rétablit les menstrues 	<ul style="list-style-type: none"> • Pratiques occultes (désenvoutement des maisons, cérémonies funestes) • Augmentation du rendement en huile de karité

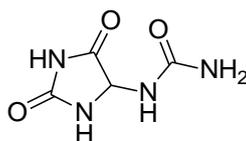
	<ul style="list-style-type: none"> • Ictère, nausées, diarrhée, constipation • Céphalée, fièvre • Trachome, conjonctivite 	<ul style="list-style-type: none"> • Emballage alimentaire • Aliment du bétail
Racines	<ul style="list-style-type: none"> • Soins de l'ictère, du rhumatisme, des maux de ventre, etc. • Rétablit les menstrues • Gastrite, stérilité • Cancer du foie 	
Guis (Tapinanthus sp.)	<ul style="list-style-type: none"> • Lutte contre le cancer du sein • Antibiotique (dysenterie) • Antipyrétique infantile • Antalgique • Facilite les accouchements (psychoprophylactiques) • Soins de l'ictère • Soins des rhumatismes • Augmentation de la fertilité (humaine et animale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisé pour le dressage des chiens • Augmente la fortune • Augmente la productivité des cultures • Séduction
Ecorces et latex	<ul style="list-style-type: none"> • Soigne des maux de cœur et de dents • Lutte contre le cancer du sein • Antitussif • Soigne l'ictère, les saignements de gencive, l'ulcère d'estomac, etc. • Désinfecte les plaies et guérit les morsures de scorpion • Dysenterie, toux • Hémorroïde 	<ul style="list-style-type: none"> • Teinturerie
Bois		<ul style="list-style-type: none"> • Biomasse (bois de chauffage, charbon, ...) • Bois d'œuvre • Sculpteurs et tambours
Tourteaux et épicarpe		<ul style="list-style-type: none"> • Source de potasse pour les savonneries • Combustibles de cuisine • Lutte contre les termites
Fleur		<ul style="list-style-type: none"> • Apiculture

I.1.5. Etudes phytochimiques antérieures et activités biologiques

Plusieurs études chimiques montrent que le karité est une source potentielle de lipides. En effet, le karité produit des fruits dont l'amande interne recèle une matière grasse (beurre) pour environ une moitié de son poids. Il est couramment utilisé en industries agroalimentaire et cosmétique (Wallace *et al.*, 1995 ; Goreja, 2004). Ces travaux presque axés sur le fruit de karité ont permis d'isoler un certain nombre considérable de métabolites secondaires comme les alcaloïdes (Warra, 2011), les polyphénoliques, les phytostérols, les tocophérols et les triterpènes (Zhang *et al.*, 2014).

I.1.5.1. L'alcaloïde isolé du fruit

Composés azotés, basiques, quasi totalement hétérocycliques dont les plantes sont considérées comme une source riche en alcaloïdes qui peut être utilisée pour le développement de médicaments. Incomparables vertus thérapeutiques qui sont jugées nécessaires de prévenir l'apparition de diverses maladies neurodégénératives, des radicaux libres ou le stress oxydatif. De nombreuses études ont été menées sur l'espèce *Vitellaria paradoxa*. Les tests biologiques des extraits ont révélé que le karité contient des alcaloïdes dont l'identification structurale est peu connue. Seuls les travaux de Warra en 2011 ont permis d'isoler et caractériser l'allantoin **1**.



1

Schéma 1 : Structure chimique de l'allantoin

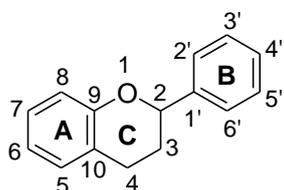
I.1.5.2. Les polyphénols

Les composés polyphénols ou phénoliques représentent tout un large spectre des substances naturelles. Généralement des dérivés benzoïques qui sont des dérivés simples de l'acide phénolique comme l'acide gallique (Qureshi *et al.*, 1981) et des dérivés de l'acide cinnamique, en plus, les flavonoïdes appartiennent aux polyphénols. Ils sont une source potentielle de l'alimentation humaine (Brat *et al.*, 2006). Ils sont présents dans des fruits et légumes ainsi que dans boissons à priori le vin, le jus de fruits, les raisins ou le maïs bleu. La teneur en flavonoïdes de la pulpe de fruits varie selon le degré de maturité et en fonction des critères génotypiques plus complexes. Du coup, ceci rend une diverse activité biologique des composés phénoliques telle que des propriétés antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires, antivirales et anticancéreuses, présents dans certaines cultures ou les fruits et, en raison de leurs propriétés, les plantes ont attiré l'attention des chercheurs. La présence notoire d'au moins un noyau benzénique dans la molécule est souvent greffé, relativement un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils possèdent des méthodes d'extraction spécifiques qui génèrent un certain nombre considérable des composés. L'étude des propriétés principales des

polyphénols, y compris les relations entre leur activité biologique et structure chimique ont permis de classer en deux grandes familles : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes. Leur origine biosynthétique mixte vient de l'acide shikimique et triacétate.

1.1.5.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes étant définis comme des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont presque toujours hydrosolubles et sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont caractérisés par un squelette de base à 15 carbones de structure C₆-C₃-C₆. Parmi les flavonoïdes, on trouve principalement en abondance : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les isoflavones, les anthocyanidines (Said *et al.*, 2009) (Schéma 8). Tandis que les dihydroflavonols, les chalcones, dihydrochalcones, les aurones ainsi que les coumarines sont présents à de faibles concentrations dans les céréales et les microorganismes.



Squelette de base de flavonoïde **2**

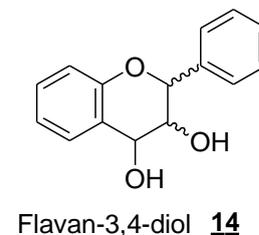
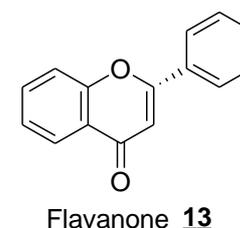
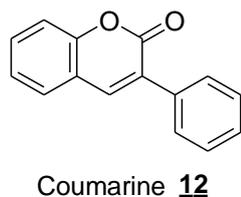
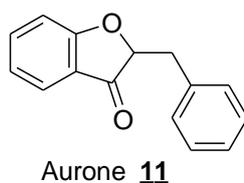
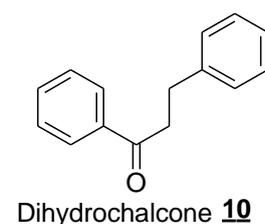
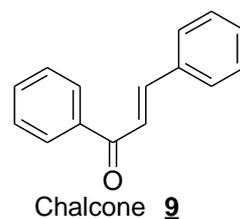
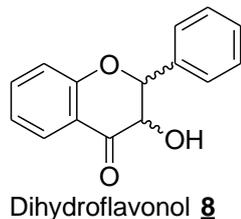
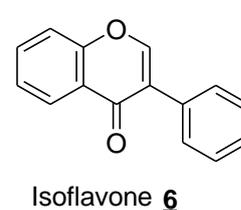
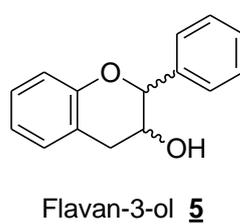
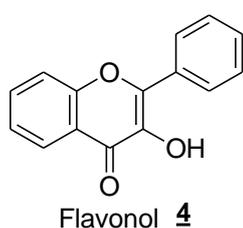
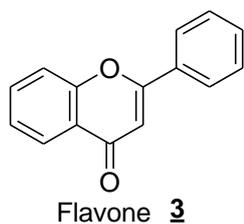


Schéma 2 : Les types squelettes des flavonoïdes.

- Les flavonols

Les flavonols sont sans doute la molécule la plus répandue des flavonoïdes dans le règne végétal. Ils sont dispersés dans des végétaux à l'exception de champignons et d'algues. La distribution et la structurale des variations de flavonols sont vastes et ont été bien documentées. Les flavonols tels que la myricétine, l'isorhamnétine, la quercétine et le kaempférol (schéma 3) se trouvent habituellement sous formes des aglycones ou *O*-glycosides.

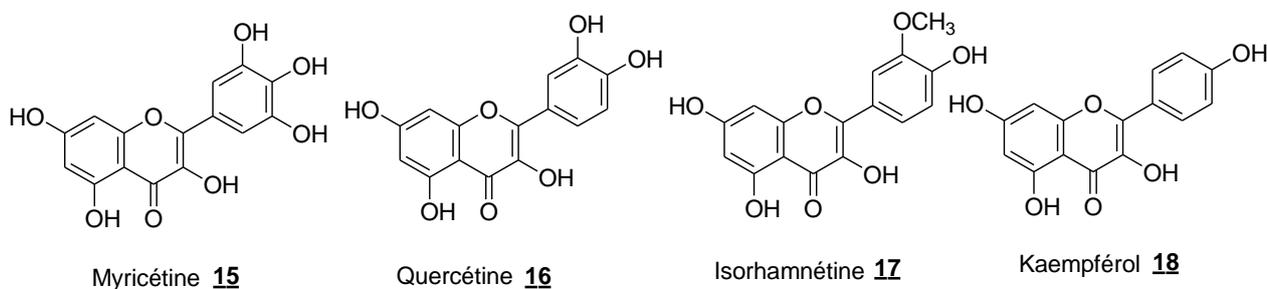


Schéma 3 : Structures chimiques de myricétine, isorhamnétine, quercétine et kaempférol.

- Les flavones

Les flavones ont une relation structurale très étroite aux flavonols (schéma 4). Ils sont très substitués par l'hydroxylation, la méthylation, *O*- et *C*-alkylation, ainsi que la glycosylation. Mais ils sont rarement distribués par rapport aux flavonols dans des végétaux.

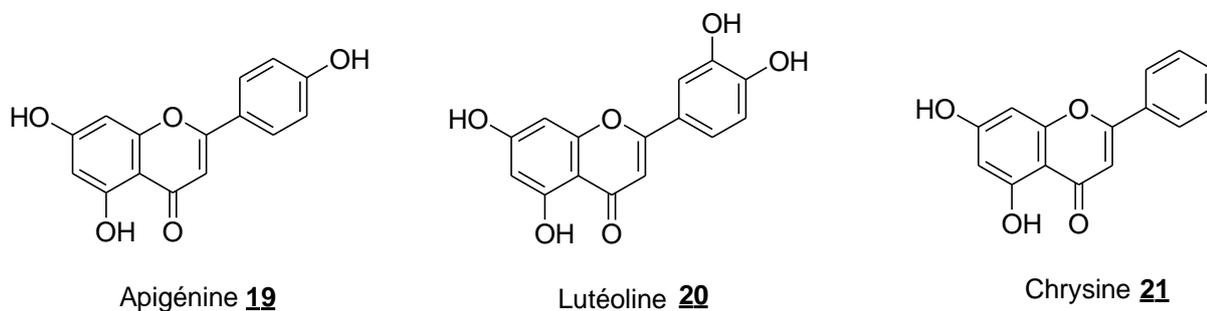


Schéma 4 : Les flavones : apigénine, lutéoline et chrysine (Zhang *et al.*, 2014).

- Les flavan-3-ols

Les flavan-3-ols sont la sous-classe plus complexe des flavonoïdes allant de monomères simples comme la catéchine et son isomère (-)-épicatéchine, pour les proanthocyanidines oligomères et polymères, qui sont aussi appelés tanins condensés (schéma 5). Au regard de la stéréochimie, ils sont des molécules planes, contrairement aux flavones, flavonols, isoflavones et anthocyanidines. La (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, sont très répandus dans la nature tandis que (-)-catéchine et (+)-épicatéchine sont relativement rares (Clifford, 1986). Eventuellement une possible transformation peut également se produire au cours de l'agroalimentaire (Seto *et al.*, 1997).

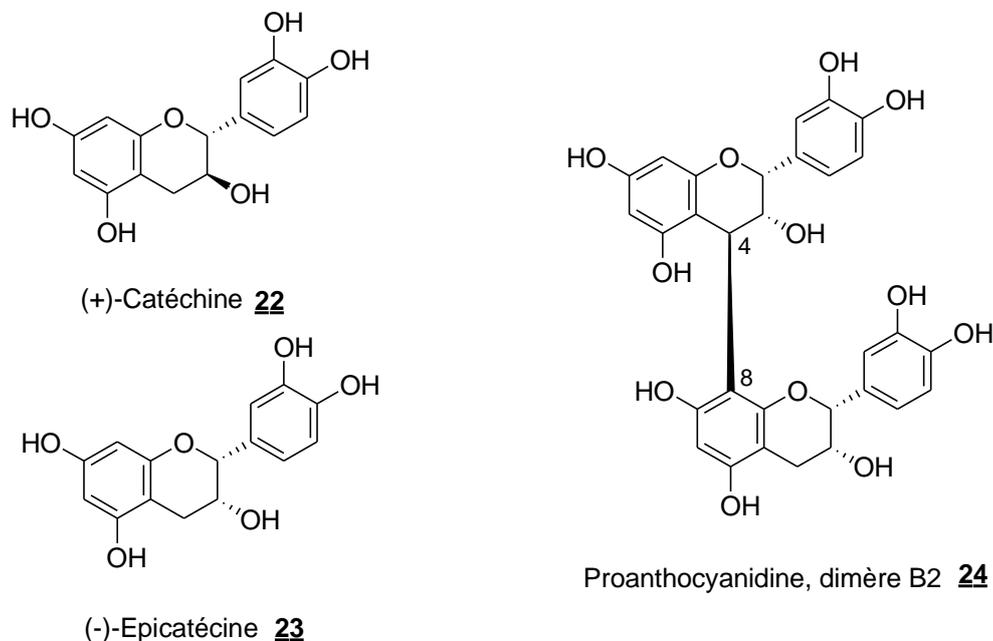


Schéma 5 : Structures des flavan-3-ols.

- Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont aussi l'un des composés flavonoïdes les plus abondants. Ils sont principalement comme leurs dérivés conjugués, anthocyanes et sont dispersés dans toutes les parties du règne végétal, particulièrement évident dans les tissus de fruits et de fleurs où ils sont responsables des couleurs rouges, bleu et violets. Ces couleurs sont dues à l'absorption de la lumière.

Plusieurs études supposent que les anthocyanidines ont des activités anticancérogènes, anti-inflammatoires, fournissent la prévention de maladies cardiovasculaires et autres. Les anthocyanidines plus courantes sont pélargonidine, cyanidine, delphinidine, péonidine, pétunidine et malvidine (schéma 6).

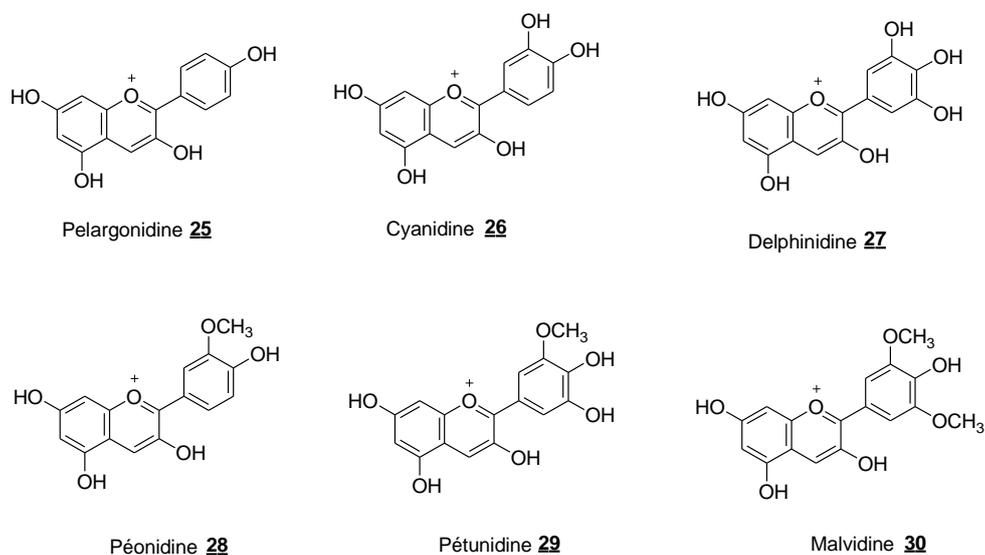


Schéma 6 : Les principales structures des anthocyanidines.

- Les flavanones

Les flavanones ont un centre chiral en C2. Dans la majorité des flavanones naturels, le cycle C est attaché au cycle B en α -configuration à la position C2. L'édifice de flavanone est très réactif et permet de synthétiser très facilement les dérivés hydroxylés, glycosylés et *O*-méthylés.

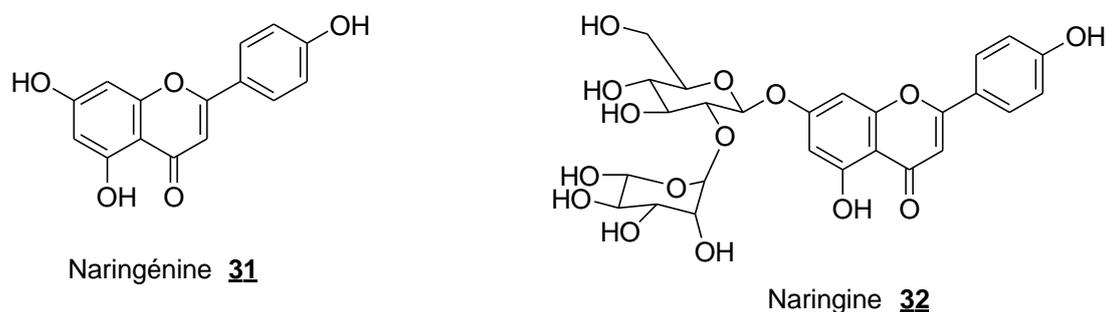


Schéma 7 : Structures des flavanones naringénine et naringine.

- Les isoflavones

Les isoflavones sont des isoflavonoïdes caractérisés par le cycle B attaché au carbone C3 plutôt que la position de carbone C2 par rapport aux flavanones. Cette particularité donne aux isoflavones une structure ressemblant aux œstrogènes d'où l'appellation phyto-œstrogènes. Elles se trouvent presque exclusivement dans les légumineuses avec les plus hautes concentrations que l'on retrouve chez le soja. Le schéma 14 suivant présente certaines structures des isoflavones.

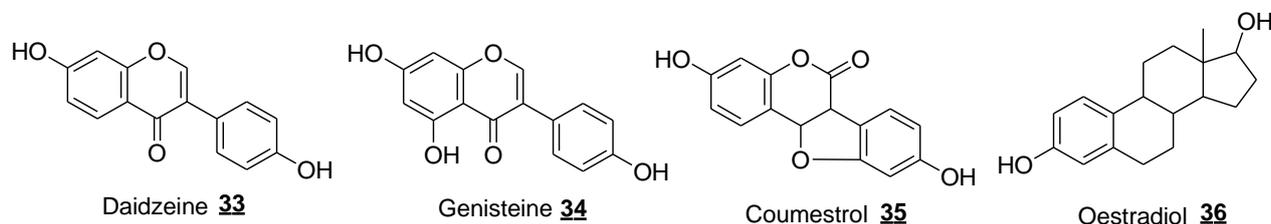


Schéma 8 : Structures chimiques des isoflavones.

1.1.5.2.2. Les non-flavonoïdes

Les non-flavonoïdes sont presque divisés en trois groupes : les acides phénoliques C6-C1, plus particulièrement l'acide gallique, vanillique, ..., les hydroxycinnamates de structure C6-C3 et leurs dérivés conjugués, ainsi que les stilbènes caractérisés par un squelette de base à 14 carbones de structure C6-C2-C6.

- Les acides phénoliques

Ces acides phénoliques sont également connus sous le nom des dérivés benzoïques, ils sont des dérivés simples comme l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique et l'acide syringique. Le tableau 2 ci-après retrace la structure des acides phénoliques avec différents substituants.

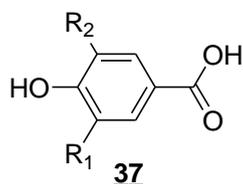


Schéma 9 : La structure de base de l'acide benzoïque.

Tableau 2 : Les dérivés de l'acide benzoïque

Structures de divers acides	R ₁	R ₂	Composés	Références
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	H	38	Qureshi <i>et al.</i> , 1981
Acide protocatéchique	OH	H	39	
Acide vanillique	OCH ₃	H	40	
Acide syringique	OCH ₃	OCH ₃	41	Qureshi <i>et al.</i> , 1981 ; Bruneton, 1993
Acide gallique	OH	OH	42	

- Les hydroxycinnamates

Appelés encore dérivés de l'acide cinnamique présentent un squelette carboné C6-C3 donc l'isomère *Trans* **43** prédomine sur celui de *Cis* **44**. L'acide cinnamique (tableau 5) est en principe complexé à une multitude de molécules (acides hydrocinnamiques) dans le but de diminuer ou éradiquer totalement sa toxicité accentuée.

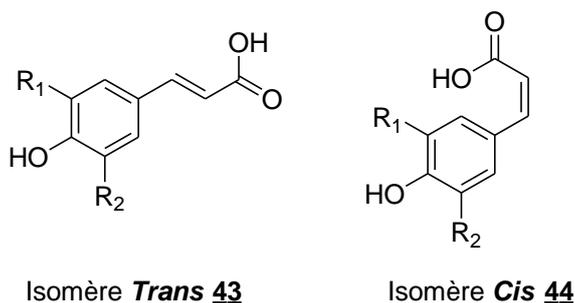


Schéma 10 : Les structures des isomères de l'acide cinnamique.

Tableau 3 : Les dérivés de l'acide cinnamique

Diverses molécules	R1	R2	Composés	Références
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H	45	(Crozier <i>et al.</i> , 2006)
Acide caféique	OH	H	46	
Acide ferulique	OCH ₃	H	47	
Acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃	48	

- Les Stilbènes

Les stilbènes ont également la structure à C6-C2-C6 comme les flavonoïdes. Les membres de cette famille constituent une diversité de molécules des composés polyphénoliques. Le resvératrol est la plus courante stilbène, de la configuration stérique (*trans* ou *cis*). Ces isomères sont présents dans les tissus végétaux principalement comme *trans*-resvératrol-3-O-glucoside. Ils sont produits dans des nombreuses familles de plantes et sont souvent impliqués dans leurs mécanismes de défense. Leurs

effets anti-inflammatoires ont un impact sur les fonctions cognitives chez l'homme et ne permettent pas de définir les mécanismes d'actions de ces molécules sur le vieillissement du cerveau tant normal que pathologique.

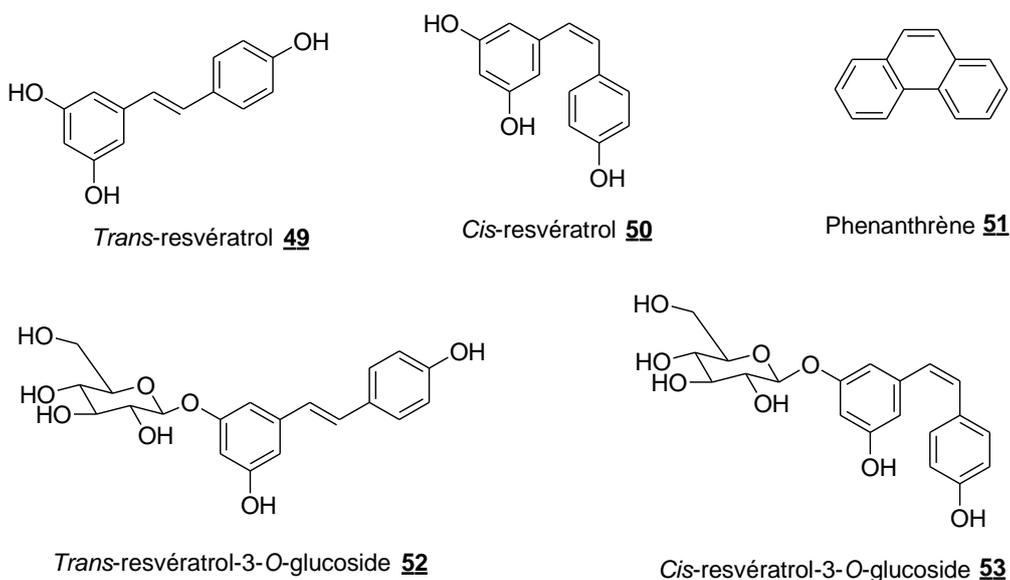


Schéma 11 : Les structures des stilbènes *trans*- et *cis*-resvératrol et leurs dérivés glycosylés et, phénanthrènes.

I.1.5.3. Les tocophérols

Appelés encore Vitamines E, les tocophérols sont des vitamines liposolubles dont l'intérêt bat le record tant dans les industries médicales et de la beauté. Ils jouent principalement le rôle d'antioxydant dans les membranes biologiques. En plus, les tocophérols évitent les thromboses et assurent la protection des globules rouges. Ils pourraient prévenir certaines maladies comme le cancer. Mais l'excès des tocophérols est aussi dangereux en complément de traitements antidépresseurs (Steven *et al.*, 2003 ; Badifu *et al.*, 1999).

Le terme vitamine E a vu le jour grâce aux travaux d'Herbert Evans et Katharine Bishop en 1924. Il recouvre un ensemble de huit molécules organiques dont quatre tocophérols et quatre tocotriénols. De ces huit formes naturelles, les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois (3) doubles liaisons sur la chaîne latérale à 16 atomes de carbone, substituée à un noyau chromanol (schéma 12). Le tableau 6 ci-dessous donne les tocophérols isolés des fruits de *Vitellaria paradoxa*.

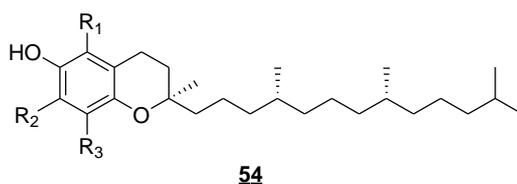


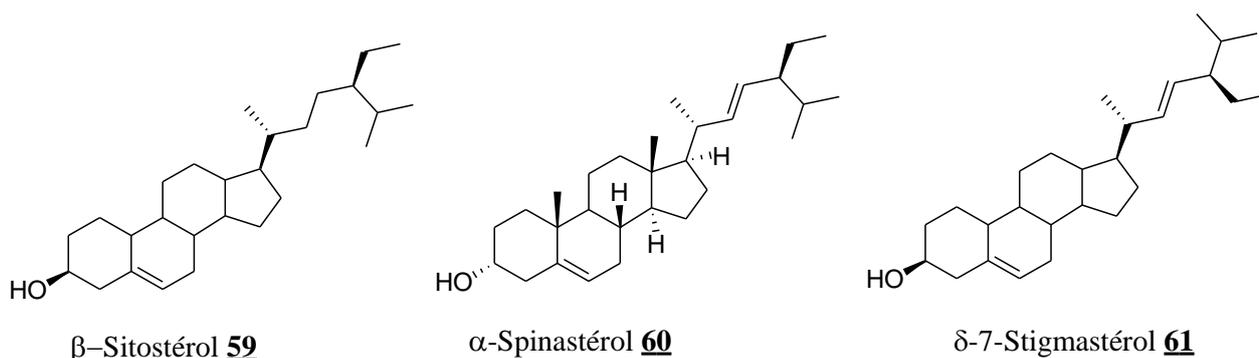
Schéma 12 : Squelette de base d'un tocophérol.

Tableau 4 : Tocophérols isolés des fruits de *Vitellaria paradoxa*.

Noms	R ₁	R ₂	R ₃	Composés
α -tocophérol	CH ₃	CH ₃	CH ₃	<u>55</u>
β -tocophérol	CH ₃	H	CH ₃	<u>56</u>
γ-tocophérol	H	CH ₃	CH ₃	<u>57</u>
δ-tocophérol	H	H	CH ₃	<u>58</u>

I.1.5.4. Les phytostérols

Les stérols dérivent essentiellement des terpènes. Chez les végétaux, ils sont identifiés aux phytostérols, ceux des animaux sont appelés zoostérols. Ces composés naturels sont semblables aux triterpènes tétracycliques en tirant leur précurseur biogénétique de squalène. Ils ont des propriétés cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires et analgésiques très marquées. Les stérols isolés (Steven *et al.*, 2003 ; Badifu, 1999) des fruits de *Vitellaria paradoxa* sont représentés dans le schéma 18 ci-après.

**Schéma 13 :** Quelques phytostérols isolés des fruits de *Vitellaria paradoxa*.

I.1.5.5. Les terpènes

Les terpénoïdes constituent un ensemble de métabolites secondaires issus des végétaux. Nombreuses études suggèrent qu'ils sont des ingrédients biologiquement actifs. Des triterpènes sont les composés principaux de certains fruits comme le butyrospermol 62 isolé de beurre de karité tandis que la β-Amyrine 63 de la feuille (Steven *et al.*, 2003), l'acide 5,6-dihydrobassique 64, l'acide 16α-hydroxybassique 65, l'acide 5,6-dihydro-16α-hydroxybassique 66 et l'acide 16α-hydroxyprotobassique 67 isolés par Zhang et collaborateurs (Zhang *et al.*, 2014). La plupart des terpènes isolés du genre *Vitellaria* appartiennent au groupe des triterpènes.

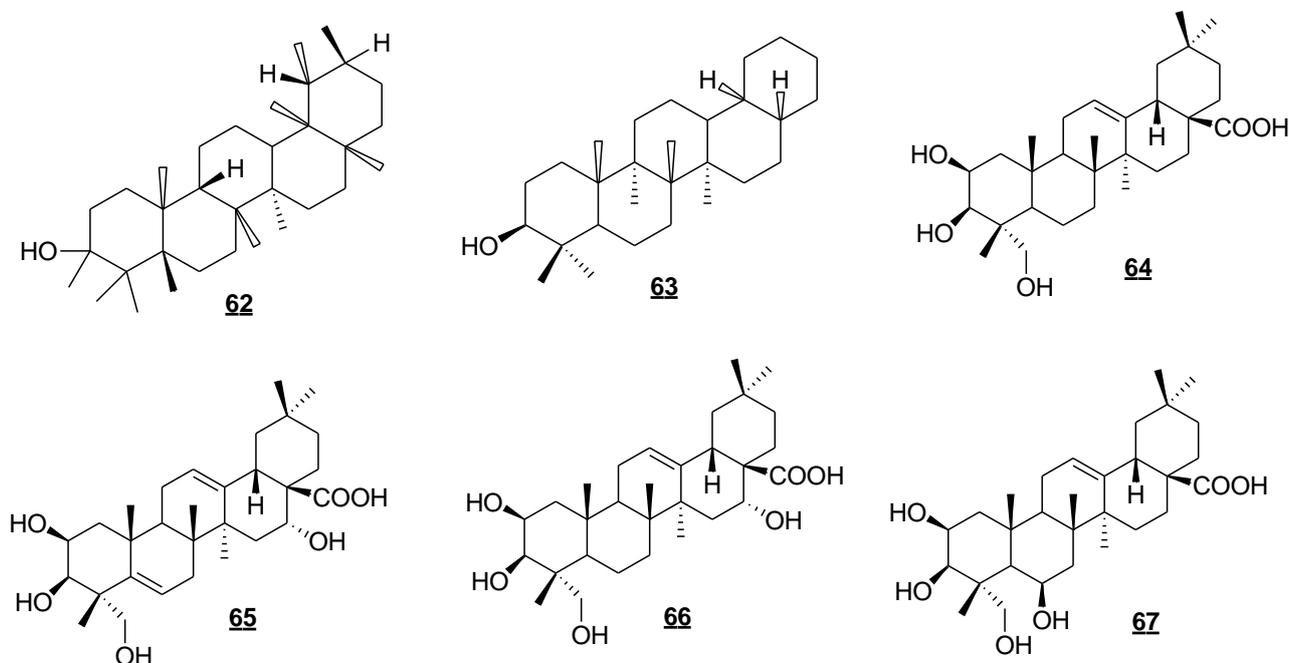


Schéma 14 : Quelques triterpènes isolés des fruits de *Vitellaria paradoxa* (Zhang *et al.*, 2014).

Il ressort d'une étude récente que les triterpènes pentacycliques sont majoritairement abondants dans *Vitellaria paradoxa* d'où ils méritent une attention particulière. Les triterpènes pentacycliques sont abordés dans les pages suivantes.

I.2. APERÇU SUR LES TRITERPENES PENTACYCLIQUES

Les triterpènes constituent un groupe large et biologiquement intéressant de terpénoïdes et incluent une grande diversité structurale des métabolites secondaires avec un certain nombre de squelettes de carbone identifiés des organismes vivants terrestres et marins. Les triterpénoïdes regroupent des triterpènes, des stéroïdes, limonoïdes, quassinoides, et saponines triterpenoidales et stéroïdales. Plus de 30 000 composés sont dérivés de cette classe des produits naturels. Ces composés ont attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la chimie des produits naturels.

I.2.1. Généralités sur les triterpènes

D'abord le terme terpène est en référence à la térébenthine qui, en plus des acides résiniques, contient aussi des hydrocarbures (Stradonitz, 1865 ; Wallach, 1910 et Ruzicka, 1945). Les règles de numérotation des carbones et dénomination des cycles des triterpènes pentacycliques requièrent la section F des recommandations de nomenclature de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) (Giles, 1999). Les clés de cette nomenclature ont longtemps été formulées par Allard et Ourisson (1957).

Les terpènes sont biosynthétisés à la suite du couplage de 2 entités au moins à 5 carbones dont la structure est celle de l'isoprène ou 2-méthylbuta-1,3-diène. Selon le nombre de ces unités, les

terpènes sont classés en monoterpènes à 10 atomes de carbone, diterpènes à 20 atomes de carbone, triterpènes à 30 atomes de carbone, tétra, etc. (Qureshi *et al.*, 1981 et Bruneton, 1993).

I.2.2. Les monoterpènes

Les monoterpènes sont une classe des terpènes qui se composent de deux unités d'isoprène et ont la formule moléculaire C₁₀H₁₆. Ils sont principalement des produits du métabolisme secondaire des plantes, bien que les classes spécialisées se produisent dans certains animaux et micro-organismes, et sont habituellement isolés dans les huiles essentielles obtenues par distillation par la vapeur ou extraction par solvants des feuilles, fruits, quelques duramens mais rarement dans les racines et écorces. Ils sont connus pour leurs activités biologiques telles que le cancer, et anticandidal, antimicrobiens, hypotendus, anti-inflammatoires, antiplasmodiques, etc.

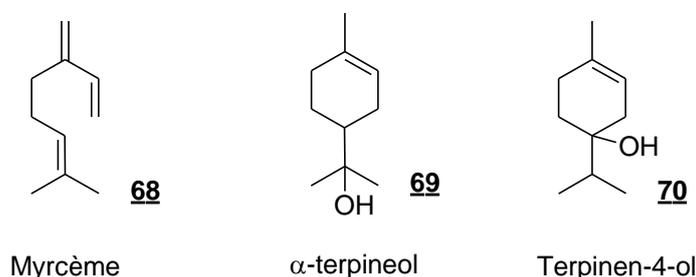


Schéma 15 : Les monoterpènes myrcène, α-terpinéol et terpinen-4-ol.

I.2.3. Les diterpènes

Métabolites secondaires contenant 20 atomes de carbone qui dérivent de la condensation de quatre unités d'isoprényle. Biosynthétiquement le diphosphate de geranylgeranyl forme les diterpènes acycliques, bicycliques, tricycliques, tétracycliques et macrocycliques. On observe des activités allelopathique et cytotoxique chez les diterpènes.

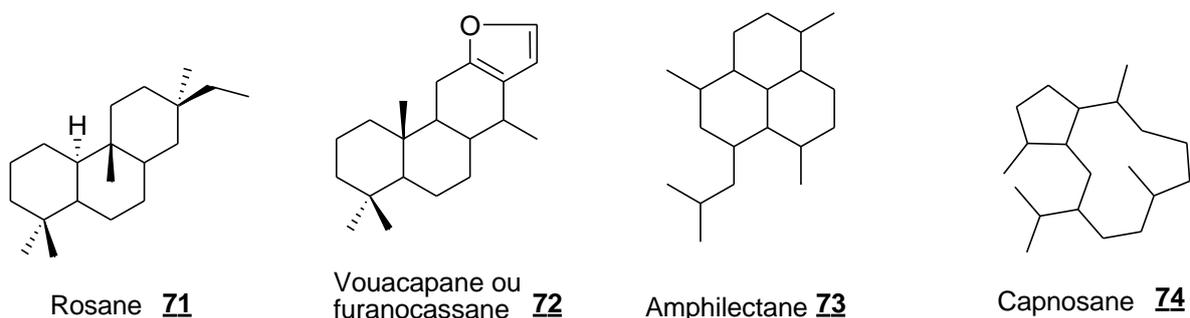


Schéma 16 : Quelques diterpènes (Kuete, 2013).

I.2.4. Les triterpènes

Les triterpénoïdes foisonnent les plantes comestibles et médicinales. On les retrouve également dans n'importe quels animaux et organismes marins. Ces substances naturelles sont structurellement diverses et complexes, elles sont caractérisées par un squelette de base de 30 atomes de carbone.

Dans les végétaux, les triterpénoïdes sont synthétisés par la voie d'acétate mévalonate. Selon les résultats de l'examen biologique des triterpénoïdes, il ressort que les triterpènes sont un groupe important de métabolites secondaires d'intérêts potentiels, présentant des activités pharmacologiques telles que antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, antivirale, hépatoprotecteur, immunorégulateur cardioprotective, hypolipidénique, gastroprotective, anticancéreuse jouent ainsi un rôle dans la prévention du cancer. Les enquêtes documentaires révèlent que les propriétés biologiques et pharmacologiques des triterpénoïdes et ses dérivés ont conduit à leur utilisation extensive de nos jours.

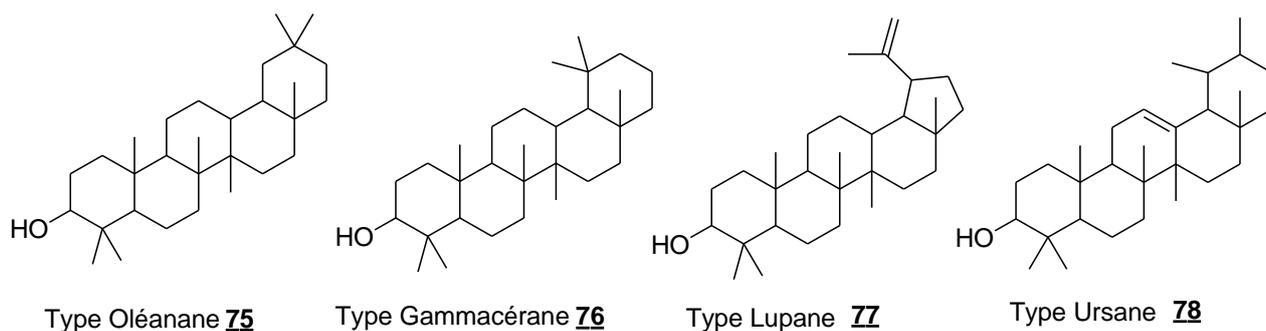


Schéma 17 : Les principaux types de squelettes des triterpénoïdes pentacycliques.

I.2.4.1. Voies de biosynthèse des triterpènes diphosphonate d'isopentényle

Seuls le diphosphate d'isopentényle (IPP) **79** et le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) **80** (Schéma 23), demeurent et représentent les équivalents biologiques de l'isoprène. Cependant, il existe deux voies de biosynthèse, tout à fait différentes, aboutissant à l'IPP : la voie du mévalonate **81** et la voie du méthylérythritol phosphate **82**. Ils sont formés par condensation de 6 unités isopréniques, appelée squalène pour donner une structure carbonée à 30 atomes de carbone. Selon la biogénèse, ces triterpènes sont presque toujours hydroxylés en C₃ (carbone 3) et se subdivisent en trois (3) grandes classes des triterpènes à savoir : les triterpènes tricycliques, les triterpènes tétracycliques et les triterpènes pentacycliques.

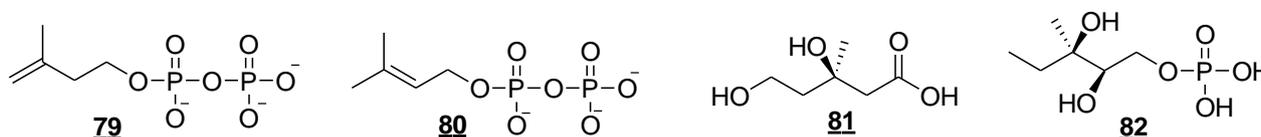


Schéma 18 : Structures planes de précurseurs biosynthétiques des triterpénoïdes pentacycliques.

I.2.4.2. Origine des triterpènes pentacycliques

Selon les travaux de Ruzicka sur les mécanismes (Ruzicka, 1959) et l'éclairage des critères stéréo électroniques, en particulier à propos des cyclisations du squalène **83** ou de l'époxyde squalène **84** conduisent aux différents squelettes triterpéniques (Kuete, 2013 ; Abe *et al.*, 1993) ; Wendt et Schulz, 1998 ; Giles, 1999). La diversité des structures tridimensionnelles connues, par extension, sont issues

de chacune de ces familles ci-après (Schéma 19). Très souvent, les oses sont greffés sur une fonction alcool de ces structures de stéroïdes ou triterpénoïdes pentacycliques appelées l'aglycone.

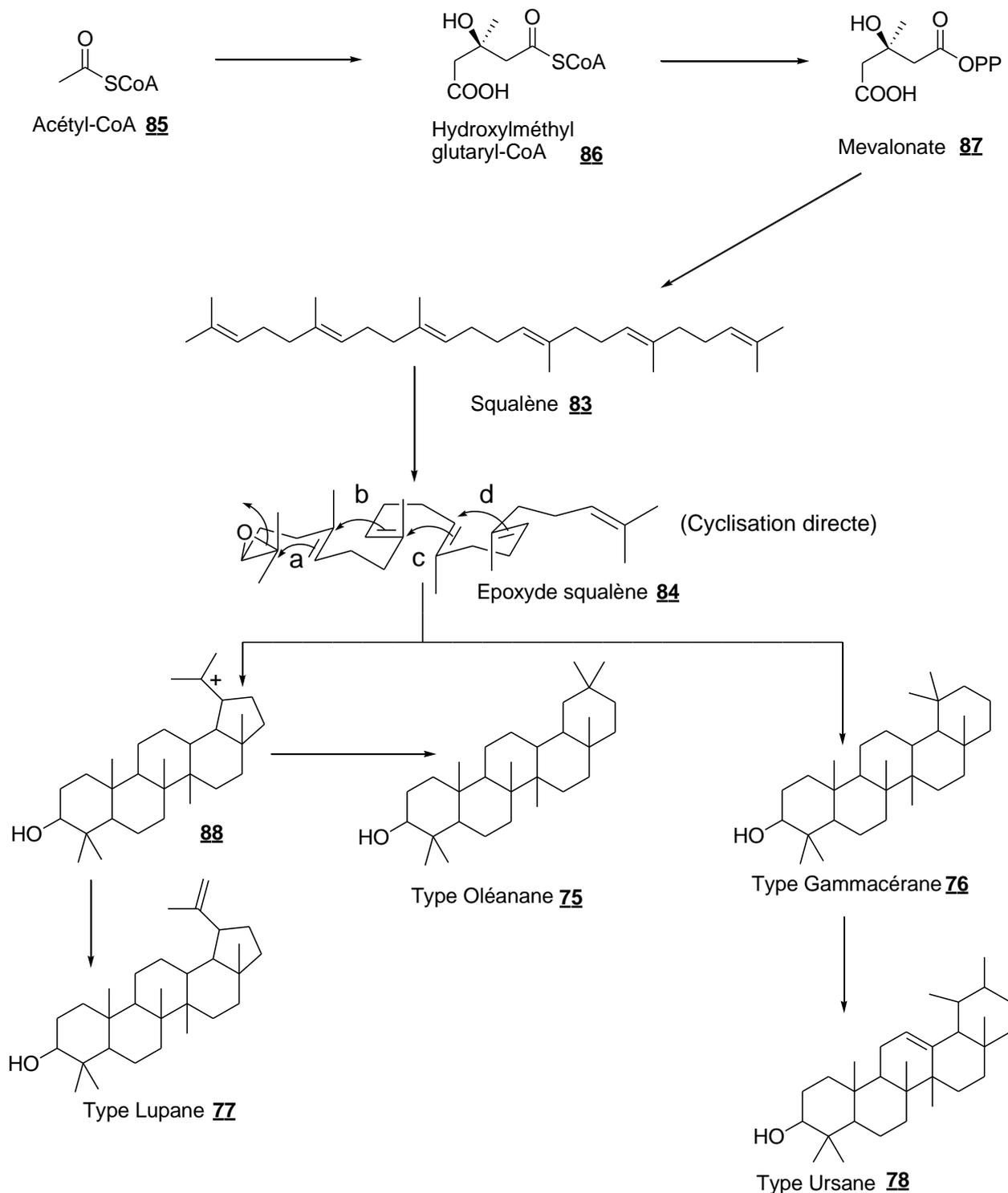


Schéma 19 : Voie de biosynthèse des structures de base des triterpènes pentacycliques.

I.2.5. Quelques exemples des types de triterpènes pentacycliques

Les triterpènes pentacycliques sont généralement des acides carboxyliques très difficiles à volatiliser ou à entraîner par la vapeur d'eau. Leur solubilité dans l'eau, s'ils sont associés aux sucres (saponosides). Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires fréquemment rencontrés chez les végétaux. Ils tirent leur nom du latin *sapo* signifiant savon en raison de leur

propriété à former des solutions moussantes en présence d'eau. Ce phénomène est souvent observé en évaporation sous pression réduite dans le ballon à concentrer. Du point de vue pharmacocinétiques, les saponosides peuvent dans certains cas, restreindre ou inhiber la diffusion de la molécule à travers la membrane cellulaire. Autres conséquences, ils influencent fortement le transport à travers les barrières biologiques importantes comme la barrière hémato-encéphalique et bloquent ainsi l'entrée de plusieurs composés essentiels à l'intérieur du tissu cervical. Cependant, les triterpènes pentacycliques simples sont pratiquement insolubles dans l'eau (Jäger *et al.*, 2009). Ils sont extractibles par des solvants organiques comme méthanol, n-butanol, chloroforme, éther, acétate d'éthyle et benzène, par leur distribution sur tous les organes végétatifs.

Parmi ces triterpénoïdes pentacycliques, nous pouvons souligner les faits marquants de l'acide ursolique, l'acide oléanolique et l'acide bétulinique.

I.2.5.1. Le type ursane (l'acide ursolique)

L'acide ursolique **87** est un exemple le plus courant de type ursane, connu sur le nom de l'acide 3 β -hydroxyurs-12-en-28-oïque a été extrait pour la première fois par Trommsdorff en 1854 à partir des feuilles d'*Arctostaphylos uva-ursi* (Busserole ou Raisin d'ours, arbuste de la famille des Éricacées) ; lui donna le nom d'urson (Gintl, 1893). Les Plantes aromatiques ou des plantes utilisées en ethnopharmacologie en regorgent. Les recherches scientifiques ont révélé et confirmé plusieurs effets pharmacologiques à savoir : les effets anti-infectieux de cette molécule : antibactérien (Setzer *et al.*, 2006), antiviral (Xu *et al.*, 1996), antifongique, antiparasitaire (Germonprez *et al.*, 2005), antitumoral (Bishayee *et al.*, 2011 ; Kwon *et al.*, 2010), hépatoprotecteur (Wu *et al.*, 2011), antioxydant (Ismaili *et al.*, 2004), antiulcéreux, anti-hypertenseur (Somova *et al.*, 2003), antidiabétique (Ramirez-Espinosa *et al.*, 2011), hypolipémiant (Somova *et al.*, 2003), anti-inflammatoire (Baricevic *et al.*, 2001), etc. Récemment une activité potentielle thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer a été décrite (Wilkinson *et al.*, 2011). Tout ceci se résume par la capacité de l'acide ursolique à interagir avec les systèmes enzymatiques (Ali *et al.*, 2006), les acides nucléiques ou les membranes biologiques (Han *et al.*, 1997).

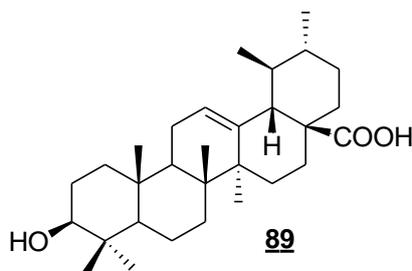


Schéma 20 : Structure plane de l'acide ursolique.

I.2.5.2. L'acide oléanolique

L'acide 3 β -hydroxyolean-12-en-28-oïque **90** selon la nomenclature de l'IUPAC comme l'acide ursolique est le terme plus fréquent de type Oléane. L'acide oléanolique est très répandu dans plusieurs familles de Myrtacées et Olécées. Il présente un point similaire avec l'acide ursolique vis-à-vis des activités biologiques. Il a de nombreux phénomènes biologiquement actifs comme antipaludéen (He *et al.*, 2005) et antibactérien (Liu, 2005), etc.

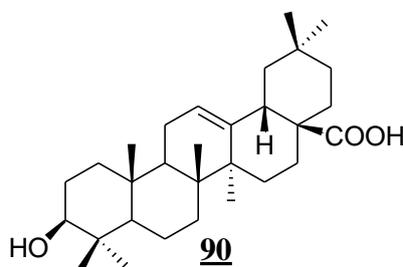


Schéma 21 : Structure plane de l'acide oléanolique.

I.1.5.3. L'acide bétulinique

L'acide bétulinique **91**, de la famille des triterpènes pentacycliques du lupane fut découvert par Soliman durant ses travaux de thèse sous le nom d'acide cornoliic et rebaptisé la même année par Robertson et ses collaborateurs, l'acide bétulinique (Robertson *et al.*, 1939). Désormais ce dernier lui convient et lui reste familier de divers dérivés comme l'acide lup-20(29)-en-28-oïque et 3 α H-cyclopenta[α]chrysène. Comme ses voisins de ces types de composés précédemment amorcés, il semblerait englober toutes les activités biologiques : inducteur d'apoptose (Thurnher *et al.*, 2003), immunomodulateur (Yi *et al.*, 2010 ; Yun *et al.*, 2003), antidiabétique (Genet *et al.*, 2010) et bien d'autres comme l'antibactérien (Setzer *et al.*, 2000). L'acide bétulinique et ses analogues structuraux ont fait l'objet de plusieurs études concernant leurs propriétés médicinales variées. L'acide bétulinique est la molécule la plus étudiée de cette série et possède une activité anticancéreuse *in vitro* sur un large éventail de tumeurs. Il est peu toxique et possède une sélectivité vis-à-vis des mélanomes. Toutefois, sa faible hydrosolubilité est un obstacle majeur pour le développement des études de phase préclinique.

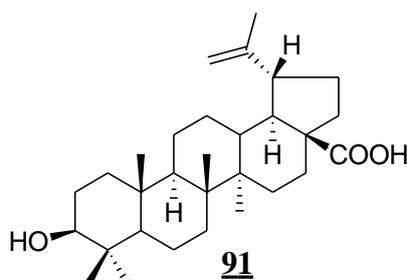


Schéma 22 : Structure plane de l'acide bétulinique.

Vu d'importants intérêts potentiels des activités biologiques et pharmacologiques que présente l'acide bétulinique a suscité l'intérêt des chercheurs à se lancer dans des différentes méthodes de synthèse ou de relation structure-activité pour augmenter sa biodisponibilité et/ou l'obtention des dérivés plus actifs (Kim *et al.*, 1998) ; Genet *et al.*, 2010) (schéma 28). Comme le bétulinol, une molécule très proche de la même famille, extraite de l'écorce du bouleau blanc (*betula papyrifera*), peut être transformée relativement et facilement en acide bétulinique **91** (Schéma 23). Ce dernier montre une sélectivité très forte envers les mélanomes, par rapport à d'autres lignées de cellules cancéreuses. Le tableau 6 de la page suivante présente les activités antitumorales *in vitro* de l'acide bétulinique.

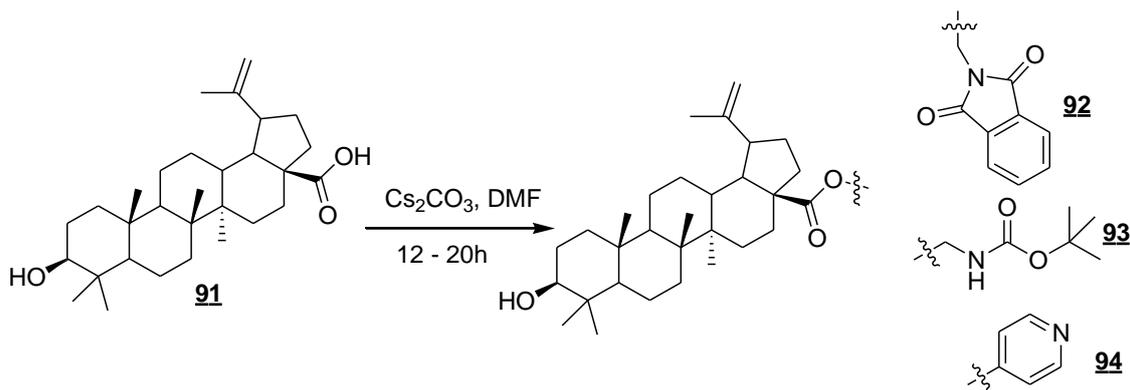


Schéma 23 : Exemples des dérivés de l'acide bétulinique effectués par Genet *et al.* en 2010.

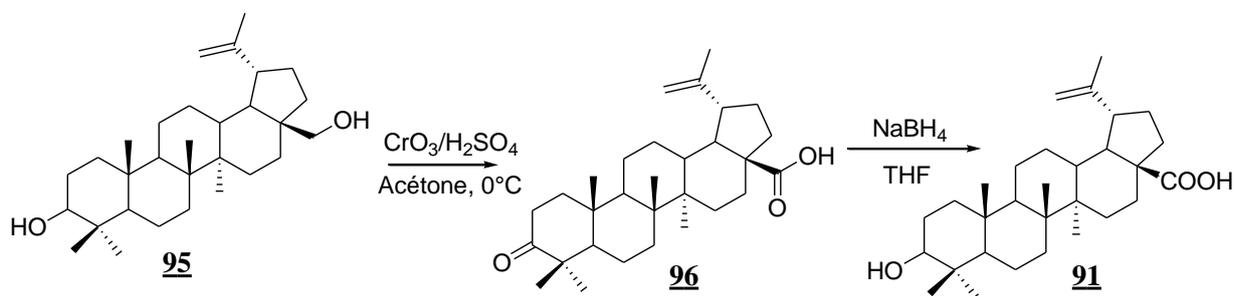
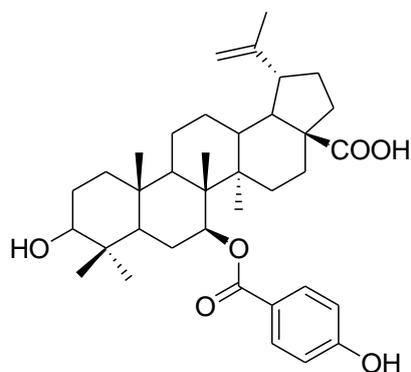


Schéma 24 : Synthèse de l'acide bétulinique à partir du bétulinol par oxydation non-sélective (Kim *et al.*, 1997).



Acide 7b-(4-hydroxybenzoyloxy)-bétulinique **97**

Schéma 25 : Structure de l'antibactérien (Setzer *et al.*, 2000).

Tableau 5 : Activité antitumorale *in vitro* de l'acide bétulinique **91**

Tissus	Lignée cellulaire	IC ₅₀ (µg/ml)	Référence
Cerveau	XF498	3,8	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Colon	COL-2	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	HT-29	> 100	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
	HCT15	3,7	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Epithélium	KB	> 20	(Miles <i>et al.</i> , 1974) (Pisha <i>et al.</i> , 1995) (Jeong <i>et al.</i> , 1999)
Fibrosarcome	HT-80	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
Foie	Hep-G2	15,5	(Setzer <i>et al.</i> , 2000)
Glioblastomes	U373	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	A172, U118MG, U138MG, U251MG, U343, U373, SK14, SK17, SK19, SK22, SK37, SK49, SK51, SK55, SK60.	5-16	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
	T98G	11,4	(Wick <i>et al.</i> , 1999)
Medulloblastome	Daoy, D283 Med, D341 Med, MHH1, MHH3, MHH4, MEB1.	3-15	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
Neuroblastome	SHEP, IMR-32, Kelly, LAN5.	3-10	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
Ovaire	SK-OV-3	3,8	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Peau	MEL1, MEL2, MEL3, MEL4	1,1-4,8	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	SK-MEL-3	2,5	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
	A431	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
Poumon	LU-1	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	H-146	> 100	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
	A549	2,0	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Prostate	LNCaP	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
Sarcomes d'Ewing	A17/95, TC83	2-7	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
Sein	BC-1	> 20	(Pisha <i>et al.</i> , 1995)
	MCF-7	> 100	(Fulda <i>et al.</i> , 1999a)
	MDA-MB-231	4,4	(Setzer <i>et al.</i> , 2000)

L'épineuse question à élucider reste d'actualité sur le mécanisme d'action malgré de nombreuses études dans ce sens et nous permet d'aborder dans la section qui suit, quelques-unes des méthodes qui sont aujourd'hui indispensables à la détermination structurale des composés triterpéniques.

I.2.6. Quelques méthodes de détermination des structures des terpènes

Les méthodes couramment utilisées dans l'identification sont des méthodes chimiques et spectroscopiques.

Les méthodes chimiques sont actuellement dépassées dans la détermination de la structure d'une molécule organique comme les terpènes. Ces méthodes sont lentes, parce qu'elles exigent des séries des réactions avec toutes les séparations et les analyses qu'elles nécessitent telles que la dégradation

oxydante, la déshydratation, la bromation (halogénéation), l'hydrolyse, l'hydratation, l'acétylation et la méthylation pour mettre en évidence certains groupements et squelettes de la molécule à identifier.

Seules les méthodes spectroscopiques sont considérablement envisagées et peuvent accélérer la détermination des structures, des groupements fonctionnels et mêmes des radicaux présents dans une molécule. Des élucidations complètes des structures chimiques sont, à priori, basées sur le proton (^1H) et le carbone (^{13}C) des expériences Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à une dimension (1-D) et à deux dimensions (2-D) telles que DEPT 135, COSY, NOESY, HSQC, HMBC et TOCSY sont rigoureusement appliquées. Cette technique efficace permet de lever certaines ambiguïtés des corrélations (signaux : multiplet, singulet, doublet, triplet, complexe, etc.) entre les différents atomes présents dans la molécule et de déterminer ainsi la position de chaque substituant. La 2-D demeure complémentaire. Toutefois, l'association de certaines techniques est une évidence dans la détermination structurale d'un composé organique comme la Spectrométrie de Masse (SM), la Rotation Moléculaire, la Cristallographie aux Rayons X, les Spectrométries Infrarouge (IR) et Ultra-violet (UV), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Les études phytochimiques axées dans la littérature portent sur les fruits du genre *Vitellaria*. Nous orientons la présente étude sur les racines et écorces de tronc de plante *Vitellaria paradoxa*, afin de déceler les compositions chimiques responsables des activités antineurodégénératives et anticancéreuses.

I.3. GENERALITES SUR L'INFLAMMATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES

I.3.1. L'inflammation

I.3.1.1. Définition de l'inflammation

L'inflammation est une réponse biologique complexe des tissus vasculaires aux stimuli nocifs. On le considère généralement comme la réponse des organismes à la présence des dommages d'agents pathogènes, chimiques ou mécaniques. Les divers composants de la réaction inflammatoire qui peuvent contribuer aux symptômes associés et aux effets préjudiciables de tissu (Maldini *et al.*, 2009). Autrement dit, l'inflammation est une réaction localisée d'un tissu, consécutive à une agression. Elle se manifeste par quatre signes principaux à savoir : rougeur, chaleur, tuméfaction (œdème) et douleur. Cette dernière est un symptôme fréquent appartenant à bon nombre de pathologies. La douleur se rencontre à tout âge et peut se manifester sous forme de crampes, de sensations de brûlures, de tiraillements, de coups de poignard ou encore être progressive, intermittente, constante, lancinante, sourde, légère, intense, récurrente, aiguë (la réponse immédiate et précoce à l'agression), chronique (stimulation persistante), etc. La douleur est associée à des

besoins tissulaires réels ou potentiels, ou décrite comme si les lésions y existaient. Différents symptômes peuvent l'accompagner comme la nausée, les vomissements, la fièvre, la diarrhée, le ballonnement abdominal ou la difficulté à uriner.

I.3.1.2. La douleur dans les maladies neurodégénératives

La douleur constitue une caractéristique essentielle ou fréquente dans les maladies neurodégénératives à n'importe quel stade évolutif de la maladie. Il existe deux grands types de douleurs : les douleurs nociceptives et les douleurs neuropathiques à savoir :

- les douleurs nociceptives (système immunitaire inné), d'évolution aiguë correspondent à l'accumulation de cellules gliales, passive, notamment de la microglie et d'astrocytes, immédiatement après l'agression, chronique si la persistance de l'agression aboutit à l'accumulation des cellules mononuclées (brûlures, traumatismes, infections, tumeurs, intervention chirurgicale).
- Les douleurs neuropathiques (système immunitaire adaptatif ou acquis) qui sont des douleurs secondaires à des lésions cérébrales du système nerveux périphérique ou central telles que : zona, sida, lésions traumatiques, accident vasculaire cérébral (AVC), neuropathies périphériques du diabète, etc. sont de nature très chronique, de longue durée, des mois voire des années.

Pour combattre cette inflammation, des médicaments symptomatiques qui n'agissent pas sur les causes de l'inflammation sont utilisés tels que : les anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens. Ces anti-inflammatoires sont indiqués quand l'inflammation, le processus normal de défense contre les agressions devient gênante, notamment à cause de la douleur que l'inflammation provoque. Les anti-inflammatoires s'administrent par voie orale, injectable ou locale. En plus, quelques plantes qui en possèdent par rapport à leurs activités pharmacologiques significatives et variées sont consommées (Bruneton, 1993). Les maladies neurodégénératives affectent principalement le cerveau et la moelle épinière, par conséquent, il est judicieux de faire un bref aperçu sur le système nerveux.

I.3.1.3. Rappel sur le système nerveux central

Le système nerveux central renferme les centres nerveux : l'encéphale et la moelle épinière qui se trouvent à l'intérieur de la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Les deux parties capitales du système nerveux central sont dotées d'énormes organes capables d'interagir entre eux pour contrôler, réguler et coordonner toutes les fonctions de l'organisme. Il assure le bon fonctionnement des activités végétatives et motrices (systèmes nerveux périphériques) comme la barrière hémato-encéphalique qui est la barrière de diffusion essentielle pour la fonction normale du système nerveux central. Cette distinction est arbitraire car le système nerveux forme un tout qui, chez l'homme, n'est pas découpé en organes séparés (figure 2). Comme toute sensation, la douleur cutanée nécessite pour

se manifester des récepteurs sensitifs périphériques excités de façon adéquate ; des fibres nerveuses transmettent cette excitation vers les centres nerveux, enfin, des centres spéciaux dans le cerveau où les informations circulent sous forme des messages électriques, appelés influx nerveux. Les synapses constituent les zones d'échanges d'information, sous forme de messages chimiques, entre les neurones vont s'interpréter et utiliser ce message, donnant naissance aux signes organiques et à la sensation consciente de la douleur (Chaudard *et al.*, 1981). Ces substances chimiques, appelées neurotransmetteurs (la sérotonine ou la noradrénaline) sont libérées par les neurones récepteurs comme réponse immunitaire.

Les maladies liées au système nerveux central sont : la migraine (crises récidivantes chroniques, hémicrâniennes), les céphalées (mal de tête, AVC, traumatisme crânien), les syndromes méningés (infection virale, bactérienne, ...), la maladie d'Alzheimer (détérioration progressive et durable des fonctions cognitives), la sclérose en plaque (destruction de la gaine de myéline) et bien d'autres maladies apparentées. Si le vieillissement cérébral est un phénomène normal de la vieillesse plus qu'une réalité médicale ou bien les maladies neurodégénératives touchent principalement les personnes âgées, il est essentiel de prendre soin du cerveau face aux pathologies qui portent considérablement atteintes à son bon fonctionnement.

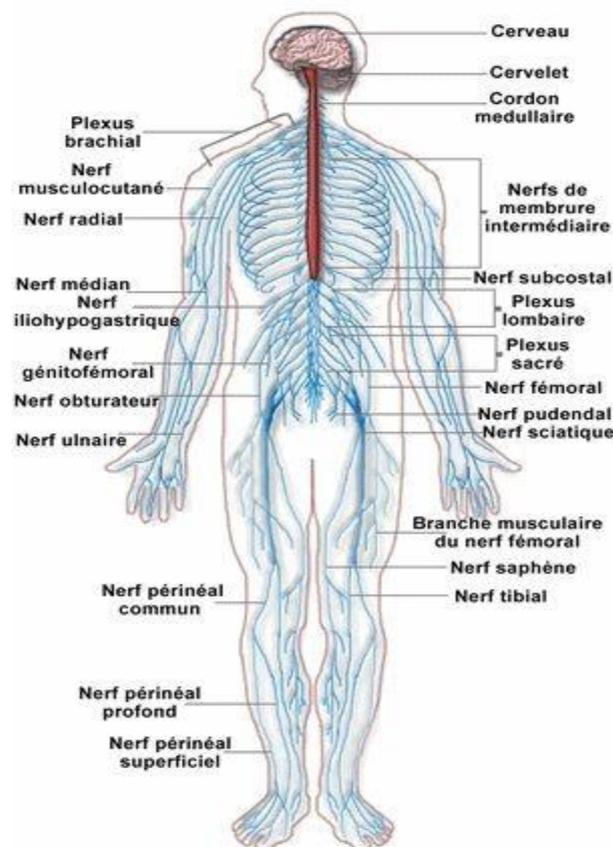


Figure 2 : Système nerveux.

(<http://www.actea-sante.fr/wp-content/uploads/1-SNC.pdf>)

I.3.1.4. Le vieillissement cérébral

Le vieillissement représente les processus physiologique et psychologique modifiant les structures organiques et leurs fonctions. Le vieillissement cérébral est aussi souvent présenté comme une catastrophe, et un ticket d'entrée presque obligé pour la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, il est crucial d'établir la frontière entre le déclin naturel lié au vieillissement de l'organisme et l'état pathologique dû aux démences.

Comme tous les organes, le cerveau qui vieillit, se traduit par une diminution du poids du cerveau d'environ 2% par décennie. Le vieillissement normal présente les symptômes des troubles intellectuels, émotionnels, moteurs et autres (cécité, incontinence urinaire) tandis que le vieillissement pathologique résulte des altérations aberrantes des capacités cognitives intellectuelles ou neuropsychologiques, émotionnelles et motrices. Si la cause de cette pathologie n'est pas encore connue, la cascade des événements biologiques à son origine constitue le cœur de cible de la recherche thérapeutique. Du point de vue des interventions thérapeutiques, elles se résument aux anti-inflammatoires et certains médicaments (Aricept, Ebixa, Exelon, Reminyl) ainsi que quelques plantes susceptibles de traiter les symptômes.

I.3.1.5. Les cellules microgliales et l'inflammation-médiateur neurodégénération

Les microgliales sont des principales cellules immunitaires du système nerveux central comme les astrocytes les plus abondantes, des oligodendrocytes dites petites cellules de la formation de gaine de myéline et les péricytes, cellules ramifiées intégrées dans la membrane basale des capillaires et des veinules postcapillaires. Ces cellules ne sont autres que des cellules gliales qui représentent environ 50% du volume cérébral et les cellules nerveuses (neurones) représentatives des différents types de cellules présentes dans le système nerveux central. Les fonctions des cellules microgliales ne sont pas à démontrer, elles permettent le lien entre les vaisseaux sanguins et les neurones, et ravitaillent les cellules du système nerveux central des nutriments essentiels et leur fonctionnement métabolique.

Les cellules microgliales semblent impliquées fortement dans l'inflammation-médiateur neurodégénération. Elles se situent dans la matière grise du cerveau et beaucoup plus concentrées dans l'hippocampe, le télencéphale olfactif et les noyaux gris centraux (Graeber *et al.*, 1994 ; Block *et al.*, 2007). Le système immunitaire permet à l'organisme de se défendre contre les pathogènes et les cellules cancéreuses constituant des composantes naturelle (ou innée) et acquise (ou adaptative). Une réaction immunitaire est donc complexe, impliquant plusieurs types cellulaires différents qui interagissent en synergie afin d'éliminer les pathogènes de l'organisme.

I.3.1.6. Les activations des cellules microgliales

Les cellules de la microglie sont une caractéristique essentielle d'activation immédiate en réponse aux événements pathologiques mineurs intracérébraux dans le but du nettoyage et fondamentalement dans les processus de réparation et régénération neuronaux. Il est possible que des populations particulières de neurones soient plus sensibles aux molécules inflammatoires et que les cellules microgliales et les facteurs qu'elles sécrètent soient néfastes pour certaines cellules neuronales, par exemple la production des substances cytotoxiques comme du monoxyde d'azote (NO), les radicaux libres oxygénés, des protéases, etc. Suite à une agression du tissu nerveux, les cytokines sont produites immédiatement par les cellules microgliales comme le TNF- α et l'IL-1 β , deux principales cytokines de la microglie du parenchyme cérébral adjacent au site lésionnel. Ces cytokines ainsi produites pourraient proliférer et exprimer plusieurs marqueurs moléculaires facilitant les processus de neurodégénérescence (Adle-Biassette *et al.*, 1999 ; Buttini *et al.*, 1996 ; Sippy *et al.*, 1995) par rapport à leurs effets dans les processus de demyélinisation et remyélinisation qui sont très complexes (Pouly *et al.*, 2000).

I.3.1.7. L'activation des cellules microgliales dans la maladie d'Alzheimer

Bien que l'activation des cellules microgliales pour lutter contre l'agression, a un rôle essentiel dans son contrôle et la réparation lésionnelle (l'homéostasie), et la défense des tissus contre les pathogènes. Les éléments libérés par la microglie peuvent se révéler rapidement délétères et contribuer au dysfonctionnement cérébral et aux dommages. Dans certains cas physiopathologiques, les cytokines sont à l'origine des dommages secondaires dans le cerveau (Ross *et al.*, 1994) aboutissant à des lésions neurotoxiques et neurodégénératives, comme l'expression du TNF- α très élevé au cours de processus dégénératif, en particulier, l'augmentation de la sensibilité aux infections secondaires mais également celle de l'expression du précurseur de la protéine amyloïde et du dépôt de la protéine β -amyloïde qui joue un rôle potentiel dans la maladie d'Alzheimer.

I.3.1.8. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que : la phénylbutazone, l'indométhacine, le diclofénac dérivés de l'acide propionique, les oxicams, appartiennent tous à diverses catégories mais sont tous capables de bloquer la formation de certaines substances comme les prostaglandines, médiateurs chimiques nécessaires au développement de l'inflammation aiguë. Les AINS sont la plupart des acides organiques faibles (pk 3-5). Tous présentent des propriétés pharmacocinétiques similaires.

Un grand nombre d'AINS, appartenant à huit principales classes chimiques est actuellement commercialisé. Ces AINS possèdent approximativement les mêmes effets indésirables. Concernant la demi-vie plasmatique, les AINS peuvent être divisés en trois groupes souvent administrés : les produits à demi-vie courte (4 heures ou moins : diclofénac, kétoprofène), ceux à demi-vie plus longue

(12 heures ou plus : tenoxicam) et les AINS à demi-vie intermédiaire (entre 5 et 12 heures : kétorolac, indométhacine). Le tableau 6 ci-après donne les principales classes d'AINS ainsi que le schéma 1 qui en présente quelques principales structures chimiques.

Tableau 6 : Principales classes d'anti-inflammatoires non stéroïdiens

Famille chimique	DCI	Nom commercial	Posologies (adultes)
Salicylés	-Acide acétyle salicylique 98	-Aspirine®	6 mg
Pyrazolés	-Phénylbutazone 100 -Phénylbu-piperzine	-Butazolidine® -Carudol	600mg 750mg
Indoles	-Indométhacine 99 -Sulindac	-Indocid® -Arthrocline®	150mg 400mg
Propionique	-Kétoprofène 105 -Naproxène -Ibuprofène 104	-Profenid® -Naprosyne®	300mg 1g
Oxicams	-Piroxicam -Tenoxicam	-Feldene® -Tilcotil®	30mg 20mg
Aryl acétates	-Diclofénac 103 -Fentiazac	-Voltarene® -Fentac®	150mg 900mg
Fenamates	-Acide niflumique 101 -Acide méfénamique 102	-Nifluril® -Ponstyl®	1500mg 1500mg
Sulfamide	-Nimesulide	-Nexen®	

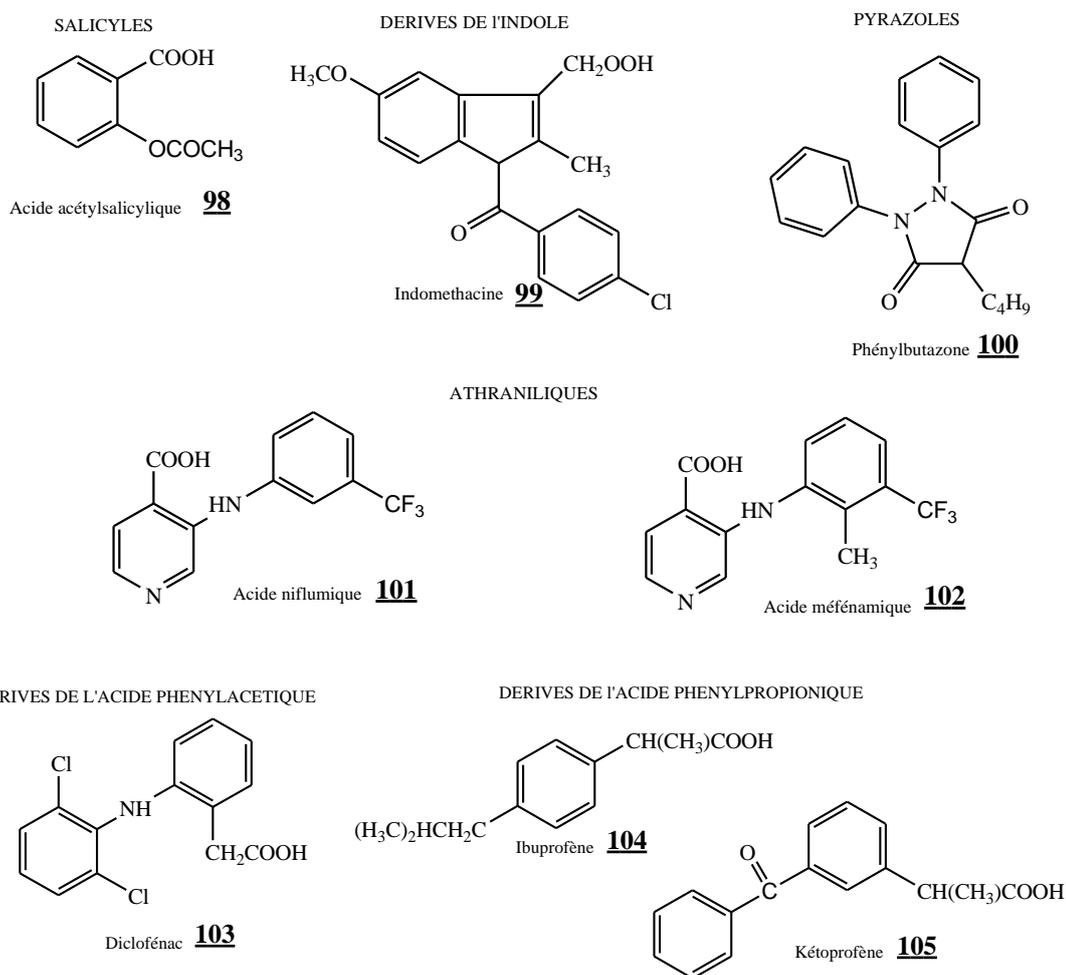


Schéma 26 : Structures chimiques de quelques anti-inflammatoires non stéroïdiens.

I.3.1.9. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) également appelés corticostéroïdes : la prednisone, la prednisolone, la bétaméthasone, sont des dérivés des corticostéroïdes naturels, hormones secrétées par les glandes surrénales. Ils sont très puissants et permettent de contrôler l'inflammation quand elle devient sévère ou lorsqu'elle se déclenche sans les maladies apparentes, comme dans les maladies dites inflammatoires : les polyarthrites, les rhumatoïdes, les allergies, etc.

Ils sont des glucocorticoïdes naturels. La cortisone **106** est transformée dans le foie en un dérivé hydroxylé, le cortisol ou l'hydrocortisone **107**.

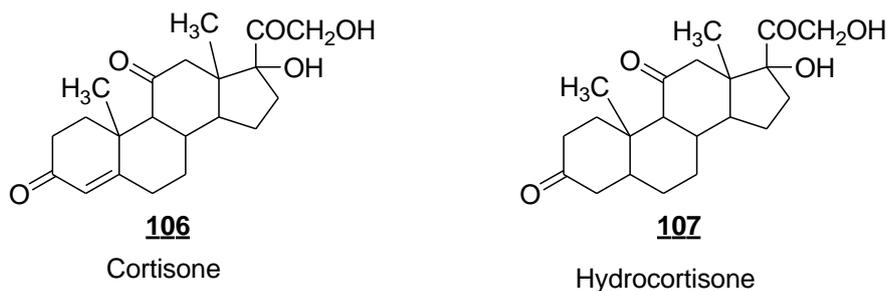


Schéma 27 : Quelques dérivés des corticostéroïdes naturels

I.3.1.10. Quelques plantes utilisées en médecine traditionnelle contenant des activités anti-inflammatoires

Important patrimoine culturel, les plantes médicinales sont beaucoup sollicitées pour corriger une activité génétique défaillante, à visée non curative, dans le traitement des maladies inflammatoires ou neurodégénératives. Le tableau 7 ci-après ressort quelques plantes utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires.

Tableau 7 : Exemples de plantes médicinales à activités anti-inflammatoires

Noms scientifiques	Familles	Parties utilisées	Noms communs	Remèdes
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Gingembre	Arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Helleborus orientalis</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	Cédèmes, douleurs rhumatismales
<i>Urticadioica</i>	Urticaceae	Feuilles Racines	Ortie	Rhinite allergique, eczéma goutte. Douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis R</i>	Rosaceae	Feuilles	Laurier	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Curcuma	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
<i>Nertum oleander L.</i>	Apocynaceae	Fleurs	Laurier rose	Douleurs, maux de tête
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pedaliaceae	Tubercule	Griffe du diable	Arthrose, lombalgie, névralgie, maux de tête, fièvre
<i>Rhododendron ponticum L.</i>	Ericaceae	Feuilles	Rhododendron pontique	Cédèmes, états grippaux, mal de dents
<i>Juglansregia L.</i>	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Noyer commun	Douleurs rhumatismales, eczéma, fièvre, malaria
<i>Oenother abiennis</i>	Onagraceae	Graines	Onagre bisannuelle	Douleurs rhumatismales
<i>Arnica montana</i>	Asteraceae	Feuilles, fleurs	Quinquina des pauvres	Traumatismes, douleurs musculaires, troubles cardiaques et respiratoires
<i>Phyllanthus emblica</i>	Euphorbiaceae	Feuilles, fruits, racines	Amla, groseille indienne	Maux de gorge et ventre
<i>Cassia occidentalis</i>	Caesalpiniaceae	Plante entière	Balambala, café nègre	Rhumatisme, maux de ventre et tête, œdèmes
<i>Colchicum autumnale</i>	Liliaceae	Plante entière	Colchicum, safran des prés	Arthrose, douleurs, névralgie, fièvre
<i>Vitellaria paradoxa</i>	Sapotaceae	Guis, écorces, racines, fruits, feuilles	Karité, balawa, tangué, shea tree, di-soro	Ulcères, rhumatisme, maux de ventre et tête, œdèmes, dysenterie

Dès 1992, McGeer et Rogers ont posé comme hypothèse que des traitements anti-inflammatoires peuvent être une cible thérapeutique potentielle de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, *Vitellaria paradoxa* a été choisie en raison de son utilisation en médecine traditionnelle pour baisser les inflammations, calmer la douleur et bien d'autres maladies, telles que : les ulcères de l'estomac, le cancer et les maladies neurodégénératives que nous allons explorer un peu plus loin.

I.3.2. Les maladies neurodégénératives

I.3.2.1. Définition et types des maladies neurodégénératives

Une maladie neurodégénérative est une affection du cerveau, du fait qu'elle entraîne une disparition progressive des neurones, qui a pour conséquence l'altération des facultés cognitives : la perte de la reconnaissance des visages connus, mémoire ou raisonnement (agnosie), déficit du langage (aphasie), déficit du comportement ou l'habileté gestuelle (apraxie). L'ensemble de façon variable entraîne une perte de l'autonomie physique ou intellectuelle dans la vie quotidienne et sociale. Autrement dit, ce sont des pathologies neurologiques des dysfonctionnements génétiques et/ou métaboliques qui conduisent à la mort de groupes de neurones spécifiques. A ce stade, le patient nie ses troubles ou les minimise. Généralement, les maladies neurodégénératives apparaissent plus souvent chez les personnes âgées, mais elles ne sont pas une conséquence normale du vieillissement (à partir de 60 ans).

Il importe de noter que ces maladies neurodégénératives génétiques ou acquises de révélation tardive ou de très longue durée demeurent comme un mystère. Le système immunitaire échappe à son contexte protecteur et réparateur pour occasionner d'importants dommages tissulaires caractéristiques de la gravité de ces maladies. Jusqu'à présent, elles sont difficiles à classer, seule une nouvelle approche nosologique semble performante et mieux adaptée (Goldbach-Mansky *et al.*, 2006 ; Kanzler *et al.*, 2007). Les plus fréquentes sont subdivisées en amyloïdopathies (maladie d'Alzheimer, maladies à prions) (De la Monte *et al.*, 2005 ; MacRaid *et al.*, 2004), en alpha-synucléinopathies (maladie de parkinson, maladie à corps de Lewy, atrophie multisystématisée) (Lavestone *et al.*, 2002 ; Wenning *et al.*, 2004) et en tauopathies (démence fronto-temporale, paralysie supra-nucléaire progressive, dégénérescence cortico-basale) (Ritchie *et al.*, 2002 ; Goedert *et al.*, 2005).

Parmi les maladies neurodégénératives, la maladie d'Alzheimer affiche le plus fort taux d'incidence ou de progression. Pour mieux les cerner en profondeur, la maladie d'Alzheimer va être abordée dans les paragraphes suivants.

I.3.2.2. La maladie d'Alzheimer et son historique

La maladie d'Alzheimer est considérée, à l'heure actuelle comme un véritable problème de santé publique souvent rapporté au vieillissement de la population. Sa prévalence croît d'une manière exponentielle avec l'âge. Le souci crucial actuel du clinicien est de mettre en place une méthode de détection précoce permettant une prise en charge rapide et adaptée, au pire des cas, il doit limiter la propagation de cette maladie dans l'organisme.

Cette maladie porte le nom de maladie d'Alzheimer, à l'initiative du père fondateur de la psychiatrie scientifique qu'on peut le dire, Emil Kraepelin, suite à la publication en 1907 d'Alois Alzheimer

(Maurer *et al.*, 1997). Tant d'autres chercheurs se sont lancés dans cette voie pendant la période gréco-romaine tels que : le physicien grec Pythagore, qui attribuait cela au déclin mental relatif à l'âge (Berchtold *et al.*, 1998), Hippocrate (460-377 avant Jésus-Christ) et le Moine Franciscain Frère Roger Bacon (1214-1294), pour ne citer que ceux-là. Ils ont aussi exploré ce domaine sous différentes appellations : la démence sénile ou les désordres mentaux. Dans cette optique, Alzheimer donna la définition des dégénérescences neurofibrillaires associées, qui plus est, sur une personne aussi jeune. C'est ainsi dans la nuit des temps, le diagnostic des maladies neurologiques montre que la maladie d'Alzheimer devient alors l'une des plus fréquentes maladies neurologiques. Pour faire face à ce fléau, les chercheurs ont mis sur pied des molécules antineurodégénératives : la tacrine, le donépézil, la mémantine et même la voie de prévention par le moyen de la vaccination ont été envisagés. Hélas ! Ces voies furent vite stoppées à cause d'effets indésirables (Wilkinson, 1999 ; Schenk *et al.*, 1999 ; Orgogozo *et al.*, 2003).

I.3.2.3. L'épidémiologie, les facteurs de risque et le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

I.3.2.3.1. L'épidémiologie de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la première cause de mortalité à l'âge de 60 ans et plus (Alzheimer Disease International, 2013). Les lésions neuropathologiques, extracellulaires (peptides beta-amyloïdes) et intracellulaires (protéine Tau) mais aussi les plaques séniles constituent les marqueurs histologiques des démences neurofibrillaires de la maladie. C'est une caractéristique grave du cortex cérébral. Cette démence est la plus fréquente et elle serait responsable de nombreux cas de décès dans les pays en voie de développement et des pays industrialisés. Il est très difficile d'avoir des données exactes sur la prévalence mondiale d'un pays.

I.3.2.3.2. Les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

L'identification des causes de cette maladie demeure méconnue mais les circonstances atténuantes favorisant le développement de la maladie semblent épluchées. C'est ce qu'on appelle « *facteurs de risques* » ou facteurs environnementaux et génétiques (Maldini *et al.*, 2009) y contribuent comme l'âge, le sexe, les facteurs de risques vasculaires, les traumatismes crâniens, les antécédents familiaux, l'allèle de l'apolipoprotéine E et le manque d'activité physique ou sportive. Tous ces facteurs sont non négligeables. Et il n'est pas de solution préventive « *miracle* », par conséquent, il suffit de suivre les recommandations des médecins pour enfin réduire le risque de développer la maladie. Il n'existe pas actuellement de traitement efficace permettant de guérir les maladies ou de stopper leur évolution. Seule une prise en charge pluridisciplinaire reste efficace au détriment des soins curatifs des patients. A ce titre, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimerait qu'en 2050, les plus de 60 ans de la population mondiale seront victimes des dégénérescences neurofibrillaires (OMS, 2014).

I.3.2.3.3. Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

L'examen anatomopathologique reste le diagnostic approprié. Il est souvent associé aux examens complémentaires biologiques et d'imagerie par résonance magnétique qui permettent généralement d'éliminer d'autres causes de démence. De nombreux critères de classification de types de maladie d'Alzheimer ont été proposés (Amieva *et al.*, 2007). Les données sur les pathologies et les causes de décès ont été codifiées selon la « *Classification Statistique Internationale des maladies et des problèmes de santé connexes, 10^{ème} révision* » : maladie d'Alzheimer (code G30), maladie de Parkinson (code G20), Sclérose en plaques (code G35), maladies du motoneurones (code G12.2) et Chorée de Huntington (code G10) (OMS, 2010).

I.3.2.4. Le traitement ou molécules disponibles

Nombreuses molécules disponibles sont pour des traitements symptomatiques. Ces traitements médicamenteux spécifiques agissent sur les conséquences des lésions, mais non sur leurs causes. Ils sont prescrits pour limiter le déficit en neurotransmetteurs et/ou stopper l'évolution progressive de la maladie. Quatre médicaments sont actuellement disponibles sur le marché : le chlorhydrate de donépézil **108** (Aricept[®]), la galanthamine **109** (Reminyl[®] ou Razadyne[®]), la rivastigmine **110** (Exelon[®]) et la tacrine **111** (Cognex[®]) en voie de disparition sur le marché par rapport aux effets hépatotoxiques. Le schéma 3 suivant présente ces anticholinestérasiques administrés à l'heure actuelle.

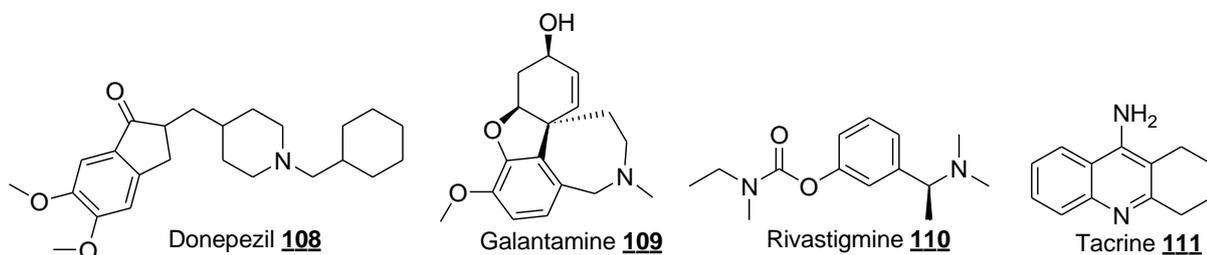
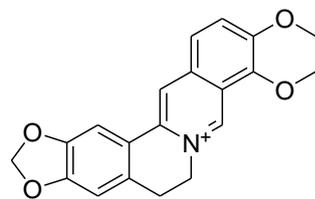
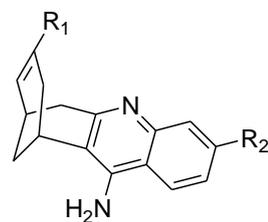


Schéma 28 : Les structures des différents anticholinestérasiques (Silva *et al.*, 2014)

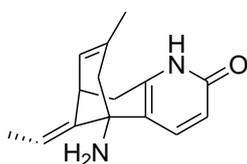
En plus de ces composés naturels, certains composés comme dimères ou hybrides des anticholinestérasiques sont utilisés pour combattre cette maladie (schéma 29). Ajoutons à cela, une nouvelle classe thérapeutique commercialisée comme des antiglutamatergiques. Ces traitements à visée symptomatique, sont réservés aux formes modérément sévères et sévères de la maladie.



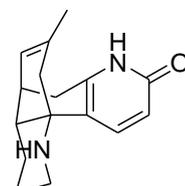
Berberine **112**



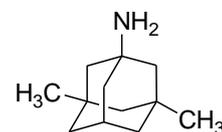
Structure générale des huprines **113**



Huperzine A **114**



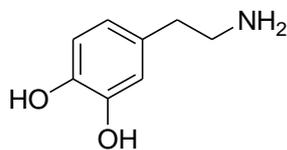
Huperzine B **115**



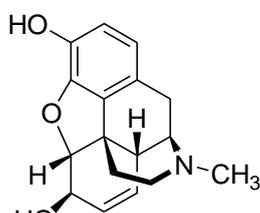
Mémantine **116**

Schéma 29 : Structures des dimères ou hybrides des anticholinestérasiques et l'antagoniste du glutamate (Silva *et al.*, 2014)

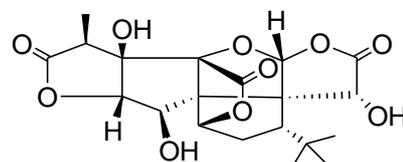
Malgré cet arsenal pharmaceutique pour la prise en charge de ces maladies, la lutte continue. Certaines études en cours devront déterminer dans l'avenir des traitements efficaces, non seulement sur les symptômes mais aussi des traitements préventifs et curatifs de la maladie d'Alzheimer (Clinical Trials.gov.). Dans cette optique, certaines plantes médicinales sont consommées par des patients en bonification des antioxydants (mitoquinone), le *Ginkgo biloba* et certains polyphénols naturels présents dans le thé, le vin rouge comme palliatifs à l'hypothèse inflammatoire. Ces substances médicamenteuses sont susceptibles de retarder l'évolution de la maladie telles que les corticoïdes et d'autres dérivés (la dopamine **117**, la morphine **118**, le ginkgolibe B **119**) qui sont tous capables de bloquer la formation de certaines substances présentant des propriétés pharmacocinétiques similaires impliquant dans la réaction des médiateurs chimiques nécessaires (les prostaglandines) au développement de l'inflammation aiguë.



Dopamine **117**



Morphine **118**



Ginkgolibe B **119**

Schéma 30: Structures chimiques de quelques produits pharmaceutiques palliatifs aux maladies neurodégénératives.

I.4. LE CANCER

Le cancer se réfère à l'un d'un groupe de plus de 100 maladies distinctes qui sont caractérisées par la prolifération incontrôlée de cellules anormales dans le corps. La diversité génotypique et phénotypique entre tumeurs provenant des organes distincts et par le biais des mutations distinctes nécessitent la poursuite du développement de nouvelles molécules cytotoxiques, ainsi que la caractérisation de produits naturels avec propriétés cytotoxiques. Malgré une attention réduite sur les produits naturels, récemment, isolé à l'origine de sources naturelles rendent une importante contribution au paysage d'agents pharmaceutiques (Harvey *et al* 2015 ; Gennari *et al.*, 2007) approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis. En outre, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que 25 % des produits pharmaceutiques sont dérivés de plantes connues pour efficacité chez les praticiens de médecine traditionnelle (OMS, 2003).

I.4.1. Historique du cancer

Le cancer, aussi vieux qu'on le pensait, fut découvert à l'âge de la pierre taillée. La maladie du cancer est aussi ancienne que l'humanité, elle existe bien chez les plantes que chez les animaux (Olson, 1989). Le cancer n'est pas une maladie contagieuse mais plonge le monde scientifique dans l'impuissance d'apporter une solution alternative. Il présente un point similaire avec les maladies neurodégénératives par rapport à leur mode de développement et une inefficacité de l'apoptose, de quelques semaines à plusieurs années. Les maladies neurodégénératives se manifestent par une réaction localisée d'un tissu, consécutive à une agression. Cependant, le cancer est un dérèglement des mécanismes (canaux lymphatiques) qui régissent le comportement normal de la cellule entraînant une prolifération cellulaire anarchique ininterrompue, l'invasion et la métastase des cellules (Harvey *et al.*, 2015 ; Gennari *et al.*, 2007) à savoir :

- la cellule va devenir immortelle ;
- résister à l'apoptose ou la mort cellulaire programmée ;
- perdre le contrôle de son cycle cellulaire, le renouvellement des cellules filles ;
- diminuer ses besoins nutritifs ;
- avoir des altérations géniques.

I.4.2. Définition du cancer

L'organe d'un humain est composé de milliards de cellules dont les informations nécessaires se situent dans le code génétique propre. Chaque jour, le système de régulation du fonctionnement normal de l'organisme s'active de manière automatique, l'état homéostatique des tissus. Ce qu'on appelle cycle cellulaire qui se déclenche de façon adéquate et permanente, le résultat d'un déséquilibre entre la mort des cellules et leur renouvellement. Le code génétique est recopié pour être transmis aux cellules filles. Autrement dit, des mutations du matériel génétique, peuvent avoir des conséquences délétères sur l'organisme. Ces mutations peuvent être germinales ou somatiques. Ces

dernières sont une cause importante de cancers. Le plus souvent, le gène muté est réparé ou détruit. C'est un phénomène de vieillissement qui permettrait au fur et à mesure de corriger les erreurs produites et de déclencher automatiquement le processus de réparation. L'initiation du processus cancéreux surgit lorsqu'une erreur échappe aux systèmes de régulation de cellules de manière irrémédiable. Le cancer apparaît et puise sa source dans la nature biologique précise de cellule d'où le clone et non de l'organe. L'invasion destructive et proliférative des tissus voisins de la tumeur donne naissance aux métastases (figure 3).

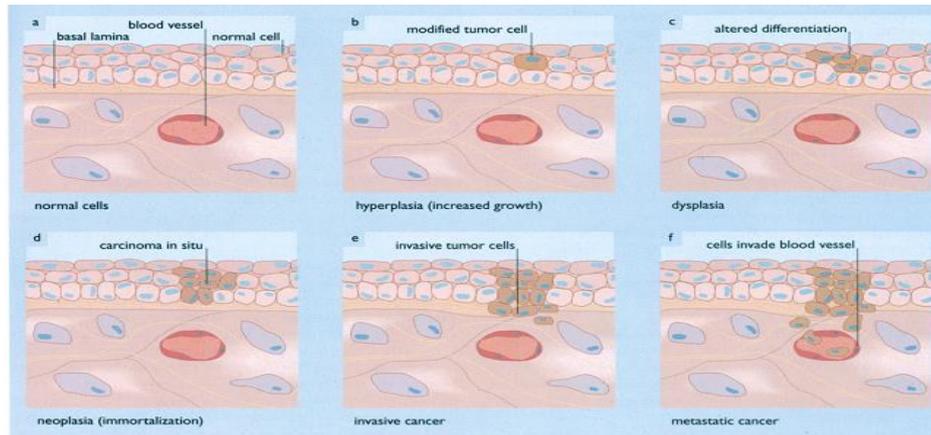


Figure 3 : Phénomène invasif du cancer en image.

<http://www.usamvcluj.ro/fiziopatologie/images/franceza/curs/Cours%2012-13%20-%20Physiopathologie%20I%20-%202016-2017.pdf>

I.4.3. Définition et caractère d'une tumeur

Le terme « *tumeur* » désignait autrefois le « *gonflement* » pathologique localisé déformant un organe ou une partie de l'organisme. Ce terme évolue actuellement à la prolifération cellulaire excessive provoquée par une ou plusieurs cellules anormales. C'est la notion de clonalité. On appelle *poly*, *oligo* et *monoclonale* respectivement, une tumeur qui se développe à partir de plusieurs cellules, de quelques cellules et une seule cellule. Il est plus judicieux de rappeler que le corps humain est constitué d'innombrables organes et que ces organes renferment des différents tissus dans lesquels abrite une kyrielle de cellules. Cette cellule est le siège des maladies. Il existe donc deux types de tumeurs à savoir :

- la tumeur bénigne qui est sans gravité, d'évolution favorable ;
- et la tumeur dite maligne qui est formée par la multiplication désordonnée des cellules d'un tissu ou d'un organe.

I.4.4. Les agents promoteurs de carcinogénèse

Le cancer représente un facteur croissant de morbidité et de mortalité accru dans le monde entier. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la consommation de tabac est la première cause de décès inévitable dans le monde (Wald *et al.*, 1996) ; Word, 2014) et l'interaction avec d'autres facteurs de risques comme la nutrition, la consommation d'alcool, les agents hormonaux, les facteurs de risque professionnels comme l'exposition à l'amiante et aux rayonnements ionisants (pesticides, silice, pollutions chimiques, champs vibratoires et programmes psychiques) sont des agents promoteurs de carcinogénèse (Levi, 1999) et aussi des infections virales tels que les virus du papillome humain (VPH), les virus d'hépatite B (VHB) et C (VHC) sont les principaux agents infectieux associés au cancer. Le processus tumoral prend naissance lorsque le pathogène cause des modifications aberrantes de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou pour donner suite à la production de protéines interagissant avec les protéines de contrôle de la multiplication cellulaire (exemple des papillomavirus produisant des protéines anormales peuvent détruire la protéine p53). En 2008, le cancer est la cause immédiate de mortalité estimée à environ 7,6 millions (OMS, 2013) et 13,1 millions de personnes en décèderont à l'horizon 2030 (GLOBOCAN, 2008 ; IARC, 2010, 2013). Un constat : le nombre de nouveaux cas de cancer continue de croître de façon soutenue à mesure que la population augmente et vieillit (Rastogi *et al.*, 2004).

Le sujet sera traité ici uniquement par rapport au cancer, de savoir identifier les principales classes des composés antineurodégénératifs et anticancéreux, bien que le tabagisme entraîne un grand nombre de maladies cardiovasculaires et respiratoires.

Il convient tout de même de préciser les formes du cancer les plus fréquentes. Toutefois, on peut retenir par ordre décroissant les cancers les plus répandus : le cancer du sein (MCF7), le cancer de la prostate (PC3), le cancer du poumon (NCI-H460), le cancer colorectal (CCR) et le cancer du foie (Tulkens, 2008).

I.4.5. La prise en charge du cancer

I.4.5.1. Les médicaments anticancéreux

Comprendre la maladie pour mieux la traiter, on peut traiter un cancer si le diagnostic s'avère important et dans de nombreux cas des découvertes du cancer, le dépistage reste et demeure le seul outil indispensable d'indexer la maladie. Au nom du dépistage, la plupart des cancers sont découverts grâce au dépistage. On peut argumenter que le dépistage détermine l'évolution des patients si le traitement serait bénéfique, efficace ou inutile comme pour certains patients. S'ils n'avaient pas été traités, leur état n'aurait rien changé. Ceci amène à décrypter l'ensemble des mécanismes par lesquels les cancers résistent aux traitements : une étude extrêmement difficile à mener. Généralement, on se focalise sur le type histologique correspondant à la cellule normale dont la tumeur semble dérivée. L'examen anatomopathologique d'une tumeur a pour objectif d'établir le type, le grade histologique

et le stade et d'évaluer le pronostic ; ce qui contribue favorablement à déterminer le traitement le plus approprié pour un patient donné. Compte tenu de l'intérêt considérable porté à l'amélioration de l'impact des maladies sur la population, une gamme variée de médicaments est explorée à visée palliative.

Les médicaments anticancéreux constituent une vaste famille dont l'administration reste historique. Ces anticancéreux sont utilisés seuls ou en association, dans le traitement de certains cancers. Il n'existe pas de traitement spécifique mais très souvent, on adopte un traitement plus adapté au type de cancers. Mais non seulement, fort de constater qu'il existe plusieurs cas d'un type de cancer comme le cancer du sein. Ces agents anticancéreux ont des actions différentes sur l'ADN et sont classés selon leurs actions sur le cycle cellulaire. On distingue plusieurs types d'agents (Le Pecq, 1978) :

- les agents alkylants ;
- les antimétabolites ;
- les inhibiteurs de topoisomérase 1 et 2 et autres ;
- les poisons du fuseau ;
- les immunosuppresseurs et ;
- les antiœstrogènes et antiandrogènes.

Parmi ces anticancéreux, nous pouvons citer, entre autres : le 5-fluorouracil **120**, gemzar, melphelan **121**, vincristine **122**, doxorubicin **123**, gleevec **124** et le taxol **125**.

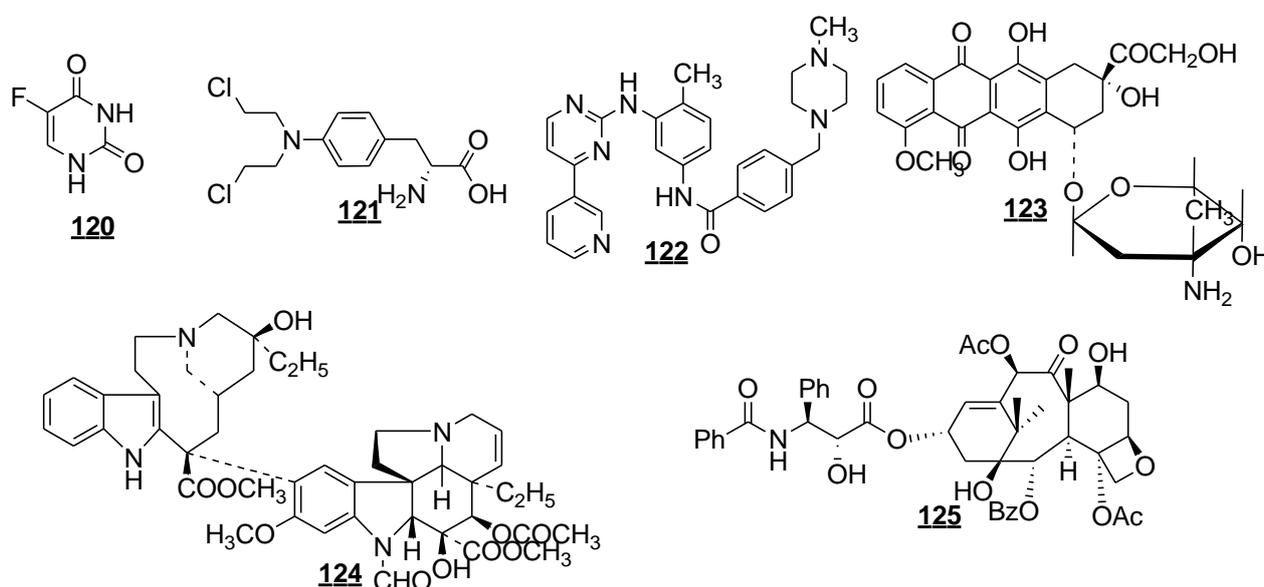


Schéma 31 : Structures de quelques médicaments anticancéreux.

I.4.5.2. Les principales méthodes de traitement des cancers

Devant des obstacles difficiles à surmonter ou du moins à contourner, les chercheurs proposent de très nombreuses possibilités permettant de traiter le cancer. On distingue ainsi deux types ou groupes de méthodes de traitement de cancer à savoir : les méthodes classiques et alternatives.

- Les méthodes classiques telles que :
 - la chirurgie qui consiste à l'excision de la tumeur (ganglion) ou l'ablation pour empêcher le phénomène d'invasion et de la métastase cellulaire (Lefferts *et al.*, 2008), l'intervention chirurgicale souvent, à la suite, aux traitements complémentaires ;
 - la chimiothérapie réside sur l'administration des métabolites chimiques, cytotoxiques pour stopper, bloquer, diminuer et/ou réduire l'évolution de la prolifération des cellules cancéreuses ;
 - la radiothérapie est sans doute l'utilisation d'un appareil capable de détruire la tumeur par des rayonnements ionisants. Elle peut être curative, palliative ou symptomatique après la chirurgie ;
 - l'immunothérapie existe sous trois formes : passive, active et adoptive. Il sert à renforcer les défenses naturelles, spécifiques ou non, du patient contre la tumeur (Old, 1996);
 - l'hormonothérapie qui consiste à agir sur la synthèse des hormones de la multiplication des cellules tumorales.

- Les méthodes alternatives comme :
 - l'enzymothérapie, il s'agit notamment de l'utilisation couplée des enzymes protéolytiques dans le traitement biologique du cancer ;
 - la thérapie génique est de modifier les séquences de l'ADN en introduisant de cellule cible, des gènes impliqués dans la prolifération tumorale par exemple le gène p53.

A ces méthodes alternatives, on peut toutefois citer sommairement l'orthomoléculaire, l'hyperthermie et autres méthodes qui sont des thérapies complémentaires.

Chaque méthode peut être curative ou palliative, conservatrice ou radicale avec réparation. Parfois le traitement exige l'association de deux méthodes dans le but d'éviter la contamination de l'organisme ou pour un soin adapté à un patient. Dans d'autres cas, le couplage des méthodes permet, soit de diminuer la dose du traitement et la cellule volumineuse, soit pour corriger les effets secondaires et améliorer les résultats.

I.4.6. Le mode d'action des cibles moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose

On appelle voie de signalisation un ensemble complexe de molécules qui interagissent les unes avec les autres pour assurer le transport de l'information d'une région de cellule vers une autre région, ce qui permet des modifications de la fonction cellulaire. Il n'est pas à démontrer que de nos jours, plusieurs voies sont explorées et documentées mettant en jeu la mitochondrie. Elle occupe une place centrale dans les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire (figure 4).

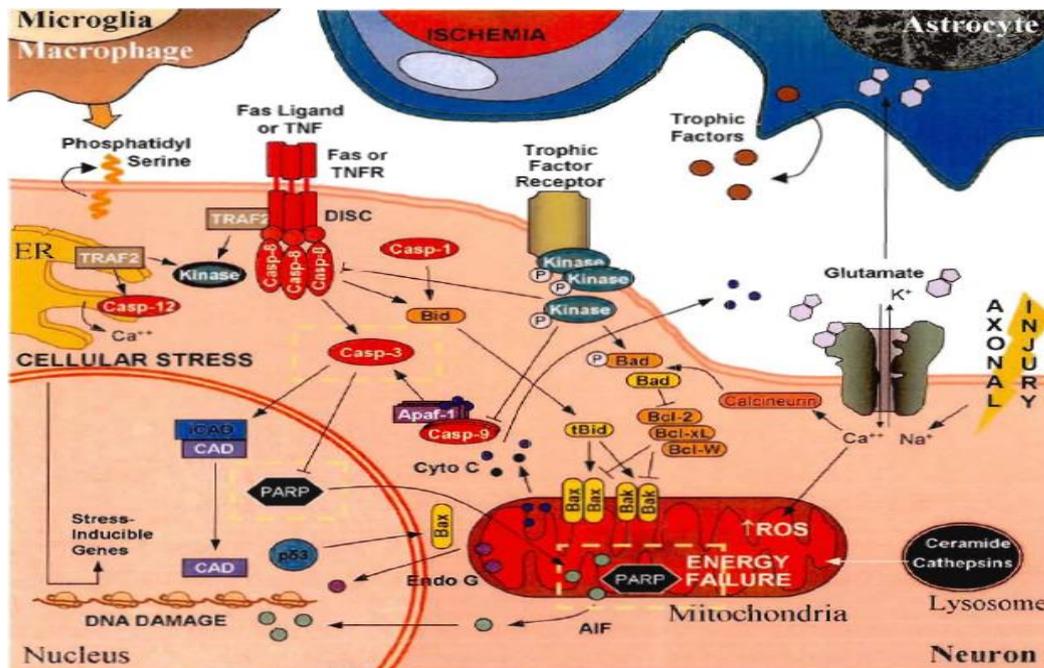


Figure 4 : Représentation schématique des différentes voies moléculaires de l'apoptose (Zhang *et al.*, 2005).

La signalisation cellulaire conduisant à l'apoptose fait intervenir des mécanismes complexes. La mitochondrie, le réticulum endoplasmique et les récepteurs du signal de mort cellulaire sont les trois principales voies de signalisation conduisant à l'apoptose pour donner suite à l'activation des caspases initiateuses : la caspase 8 et la caspase 10 pour la voie extrinsèque et la caspase 9 activée via l'apoptosome pour la voie intrinsèque. Les caspases initiateuses activent alors des caspases dites d'exécution (caspase 3), qui vont cliver divers substrats (ICAD, PARP, etc.). Dans le cas du réticulum endoplasmique (RE), l'activation de la caspase 12 pourrait survenir à la suite de l'activation de la caspase 7. Il peut y avoir interaction entre ces trois voies, par le clivage de BID (membre de la famille Bcl2), qui va activer la voie mitochondriale et amplifier le signal apoptotique : figure adaptée par Zhang et ses collaborateurs.

I.4.7. L'implication du génome mitochondrial dans les maladies communes

Le lien entre ces deux maladies neurologiques est un sujet tabou car il est difficile de mettre en évidence l'origine qui peut impliquer les mécanismes des mutations des gènes. Dans les deux cas, un dysfonctionnement mitochondrial est rapporté, une caractéristique pouvant être le siège capital commun aux maladies neurodégénératives et au cancer comme la protéine kinase mitochondriale

PINK1 responsable, lorsqu'elle est mutée. Cette mutation destructive est la résultante des facteurs environnementaux, mitochondriaux et nucléaires par la production des radicaux libres. Ces derniers engendrent le stress oxydatif chronique qui provoque relativement le dysfonctionnement mitochondrial. A ce stade, l'évidence s'avère sur la susceptibilité de la maladie.

I.4.8. Le lien entre les cancers et les maladies neurodégénératives

I.4.8.1. Les données épidémiologiques

Il est très difficile de préciser avec exactitude le lien possible entre les patients atteints de maladies neurodégénératives pouvant développer un cancer peu importe l'âge. Certains patients atteints de la maladie de Parkinson développent aussi moins de cancers non liés au tabac comme le cancer colorectal mais une incidence plus élevée du cancer de la peau. Malgré qu'ils puisent leur origine commune dans la crête neurale.

Quant à la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées, de nombreuses questions restent à élucider.

I.4.8.2. La maladie de Huntington et le cancer du sein

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire causée par la protéine huntingtine mutée mais également impliquée dans la progression et l'agressivité des tumeurs mammaires. A l'intérieur de la cellule, la protéine huntingtine mutée, la forme anormale ou le récepteur particulier empêche généralement le bon fonctionnement du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) ou en anglais : human epidermal growth factor receptor 2 dans les cellules de cancer du sein (EGF). La huntingtine se retrouve presque dans toutes les cellules et tissus. Mais leur surexpression conduit à une multiplication des cellules tumorales et à une survenue plus fréquente des métastases (Liu *et al.*, 2001).

Il existe différents types de cancers mammaires et selon la classification proposée par Pierre Denoix (Bieche *et al.*, 1999), on peut sommairement classier le cancer du sein selon l'état des récepteurs qu'on appelle les cancers à récepteurs hormonaux positifs (RH+) qui, sont les récepteurs :

- aux œstrogènes (ER+) ;
- à la progestérone (PR+) ;
- aux ostéogènes et à la progestérone.

Lorsque ces récepteurs sont présents, les hormones femelles vont encourager le développement rapide du cancer (Slamon *et al.*, 1987 ; 1989). Cela nous apprend aussi que l'hormonothérapie est indispensable pour ce genre de cancers.

I.4.9. Les mécanismes d'oncogenèse des glioblastomes

L'étude des mécanismes de l'oncogenèse (*oncos* signifie « tumeur » en grec), l'évolution d'une cellule normale en cellule anormale. Les glioblastomes ont des propriétés invasives. Ils sont des tumeurs cérébrales les plus courantes et les plus agressives des grades III et IV, selon l'OMS tout comme les gliomes : astrocytomes anaplasiques et oligodendrogliomes anaplasiques du système nerveux central (le cerveau et la moelle épinière) issues des cellules gliales (Behin *et al.*, 2003). Les glioblastomes surviennent à tout âge mais dans 70% des cas entre 45 et 70 ans avec un pic à 58 ans (Ohgaki et Kleihues, 2005). Leurs causes possibles sont inconnues et le traitement de ce cancer associe la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie respectivement selon la gravité de la maladie. Malgré un traitement chirurgical et autres traitements bien menés, il n'est pas rare que des rechutes surviennent.

L'utilisation des méthodes de la biologie et de la génétique moléculaires montrent que dans la majorité des glioblastomes, leurs mutations affectent deux (2) gènes : le gène du rétinoblastome RB et le gène TERT (Telomerase reverse transcriptase) ou la sous-unité protéique. Mais aussi ces glioblastomes sont fortement marqués par une mutation ou délétion du gène suppresseur de tumeur p53, une protéine qui joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire (Furnari *et al.*, 2007).

Bien qu'on suspecte les glioblastomes d'être à l'origine de la perturbation de manières considérables des cellules gliales mais il existe aussi des mutations des cellules nerveuses dues aux deux pathologies de Parkinson et d'Alzheimer altérant également les mêmes voies de signalisation. Un constat amer est la présence des cellules souches dans les gliomes qui pourraient être les causes directes de la chimiorésistance.

I.4.10. Les cellules souches cancéreuses du gliome humain

Au cours des dernières années, de nombreuses recherches ont été menées sur l'existence des cellules souches tumorales au sein des glioblastomes. Il est possible que des mutations liées à la tumorigénèse activent le potentiel migratoire des cellules souches cancéreuses (CSC), comme ayant la capacité proliférative d'auto-renouvellement de ces cellules et la résistance tumorales ainsi responsables des rechutes. Ces cellules souches cancéreuses se situent préférentiellement à la surface cellulaire, confèrent une imperméabilité face aux médicaments d'atteindre le milieu extracellulaire. Elles influencent donc directement le pronostic clinique. La stratégie thérapeutique actuelle serait d'adopter des futures modalités de traitements de ces cellules souches tumorales ce qui les rendraient sensibles à la chimiothérapie dans le but de les éradiquer afin de mettre fin à leurs propriétés de cellules souches saines, d'auto-renouvellement et de protection. Toutefois, même dans les cellules souches saines, ces gènes de cellules souches sont encore mal connus et associent l'excès en oligoéléments ou éléments traces par exemples : le fer, le zinc et le sélénium à l'ensemble des

pathologies, la gravité est évidente. Même des études récentes ont indexé le récepteur à dépendance TkrC, l'implication dans le neurodéveloppement et la tumorigénèse du neuroblastome.

Malgré l'arsenal pharmaceutique pour lutter contre ces différentes maladies, les produits pharmaceutiques n'ont pas démontré leur efficacité. La recherche biologique indépendante pour reconstituer les cellules endommagées ou une analyse digitale des cellules tumorales permet d'améliorer l'accès à des soins novateurs et de répondre à des questions de santé publique. Ceci échappe, le plus souvent, à la logique de l'industrie pharmaceutique. Mais les laboratoires travaillent en ce sens depuis des décennies. On pourrait y parvenir à vaincre les maladies neurodégénératives et le cancer par des possibles technologies médicales comme la thérapie génétique voire même la phytothérapie.

Dans les pages qui suivent sont développés nos résultats des études phytochimiques entreprises et réalisées sur les racines et écorces de tronc de l'espèce *Vitellaria paradoxa*.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE

II.1.1. Les extractions et la purification

Les écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* ont été récoltées à Garoua dans la région du Nord Cameroun, en juillet 2012. La plante a été identifiée par Monsieur Jean Paul BAMBA, Taxonomiste à l'Herbier de l'Ecole de Faune de Garoua, en comparaison avec un échantillon enregistré sous le numéro HEFGN 6276. Quant aux racines, graines et aussi bien que les écorces, elles ont été récoltées en République Centrafricaine en octobre 2016 et juillet 2018 dans des localités bien différentes. Identifiées et enregistrées au Centre d'Etudes et de Recherche sur la Pharmacopée et la Médecine Traditionnelles Africaines (CERPHAMETA) à l'Université de Bangui sous le numéro N°054/UB/CER/D.16.

Les différentes parties de *Vitellaria paradoxa* ont été extraites séquentiellement et successivement aux solvants à polarité croissante (hexane, acétate d'éthyle, méthanol et eau) à l'aide des méthodes suivantes : la macération à température ambiante, la macération avec agitateur mécanique, le Soxhlet et le sonicateur (tableau 8).

Tableau 8 : Bilan d'extraction

Parties de la plante	Poudre	Macération (MeOH/CH ₂ Cl ₂ 1 : 1) 72h (25°C)	Soxhlet (MeOH à chaud)	Macération (Agitateur mécanique) 1,5 Kg, 2h, 25°C			Sonicateur (Extraction séquentielle à polarité croissante)			
				Hexane	AcOEt	Aqueux	Hexane	AcOEt	MeOH	Eau
Ecorces de tronc du VP	3,5 Kg	192,3 g	512,2 g	19,2 g	16,4 g	30,7 g	120 g	140 g	530,4 g	80 g

Il ressort de ce tableau que le bain ultrason (MeOH/CH₂Cl₂ 1:1) extrait mieux que la macération et le Soxhlet, avec un rendement de 24,17% pour 3,5 Kg de poudre. Beaucoup plus avantageux avec l'extraction séquentielle à polarité croissante, un rendement global de 24,55%.

Ces différents extraits ont fait l'objet d'analyse LCMS et au screening contre l'inflammation et la cytotoxicité pour la recherche des extraits actifs. L'extrait hexanique n'a pas été testé pour son insolubilité au méthanol utilisé.

II.1.2. La LC-MS des extraits bruts et fractionnés

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a révélé que les extraits sont riches en composés polyphénoliques ainsi que des composés triterpéniques (Figures 5 et 6).

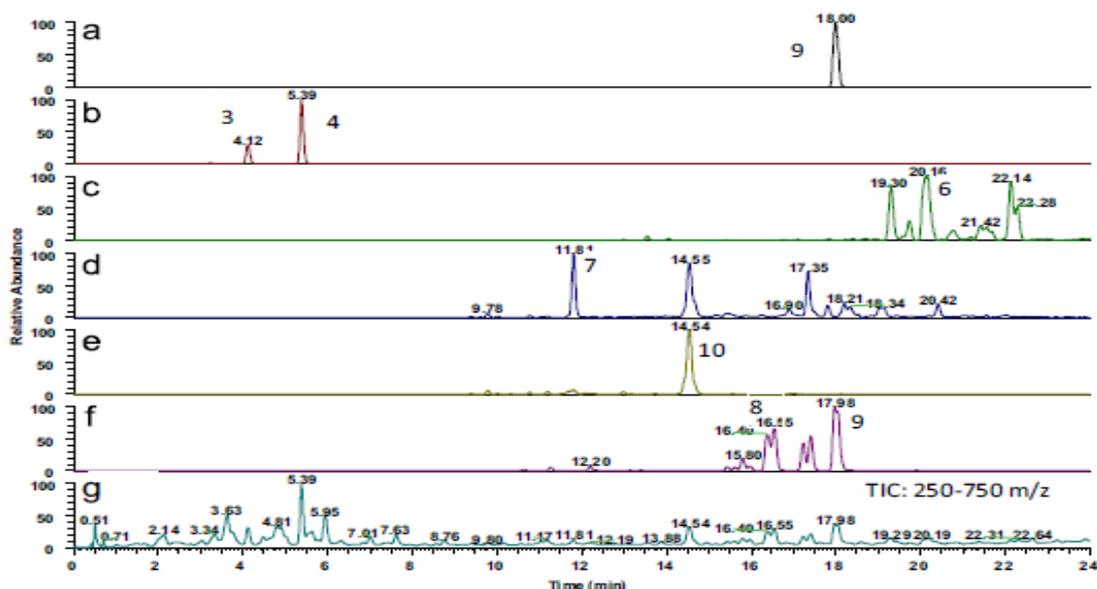


Figure 5 : Chromatogramme de l'extrait d'acétate d'éthyle (250-750 m/z).

Le chromatogramme ionique extrait (a) du composé 9 isolé et le chromatogramme ionique extrait (b)-(f) des composés (3, 4, 6, 7, 8, 9) identifiés dans *Vitellaria paradoxa* extrait AcOEt (VPEE) de leurs ions quasi moléculaires $[M+H]^+$ avec déviation de 2 ppm et chromatogramme à balayage complet (g) (250-750 m/z) de VPEE. Et il ressort que beaucoup sont des triterpènes (Figure 6).

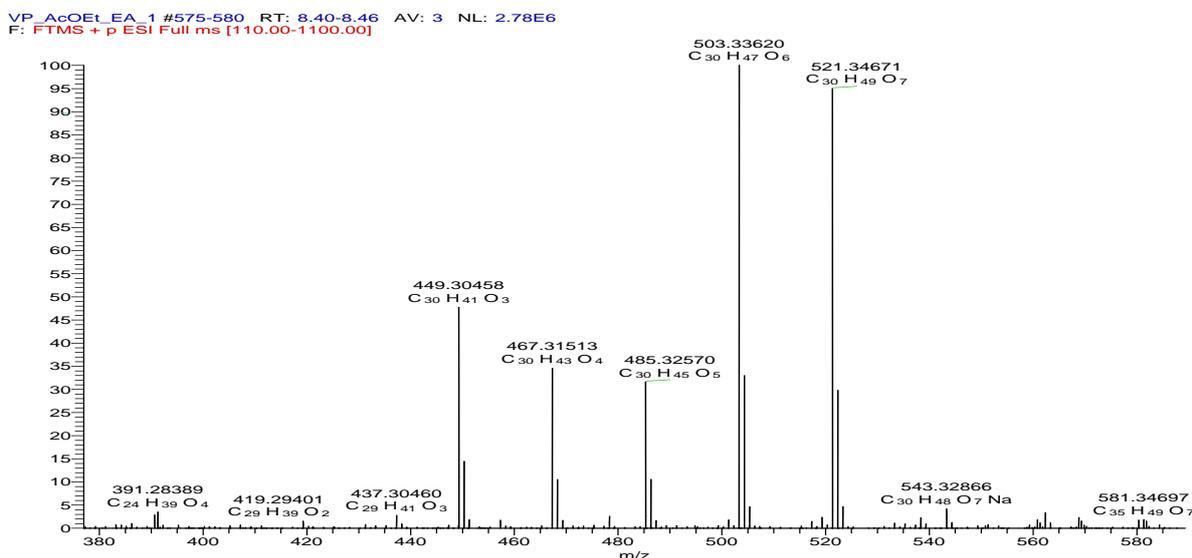


Figure 6 : Spectre de masse de l'extrait d'acétate d'éthyle.

II.1.3. Etude des propriétés anti-inflammatoires des extraits des racines, écorces de tronc et graines de *Vitellaria paradoxa*

Pour rechercher l'activité spécifique, 3,5 Kg de la poudre des écorces du tronc ont été extraits à l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol et l'eau donnant respectivement 120 g, 140 g, 530,4 g et

80 g. Les extraits méthanolique brut, à l'acétate d'éthyle et aqueux ont été soumis aux tests anti-inflammatoires. Cette analyse biologique a montré une activité anti-inflammatoire intéressante.

Nous avons évalué les effets de l'extrait au méthanol de l'écorce de *Vitellaria paradoxa* sur l'inflammation aiguë induite par la carragénine et sur l'inflammation chronique induite par l'adjuvant complet de Freund (ACF). Nous avons également évalué l'effet analgésique de ces extraits sur la douleur induite par la plaque chauffante et enfin nous avons réalisé des coupes histologiques afin d'évaluer l'effet des extraits sur quelques tissus arthritiques des animaux.

Les analyses statistiques des données ont été réalisées par le test de l'analyse de la variance à une voie suivi du post test à comparaison multiple de Newman-Keuls. Nous avons utilisé le logiciel Graph Pad Prism version 5.00 for Windows, Graph Pad Software, San Diego California USA (www.graphpad.com).

Les différences entre les groupes d'animaux étaient considérées comme significatives pour $p < 0,05$. Dans le modèle d'inflammation aiguë induite par la carragénine, les groupes ont été comparés par rapport au lot témoin négatif et dans le modèle d'inflammation chronique induite par l'ACF les groupes ont été comparés par rapport au lot témoin négatif et au lot normal. La dose de 150 mg /Kg des extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol des écorces réduits significativement l'œdème de la patte de la souris induit par la carragénine et la plaque chauffante par une diminution de l'inflammation par rapport au diclofénac respectivement. Les résultats de tous les tests biologiques sont représentés dans les figures 8 à 13 et tableau 8.

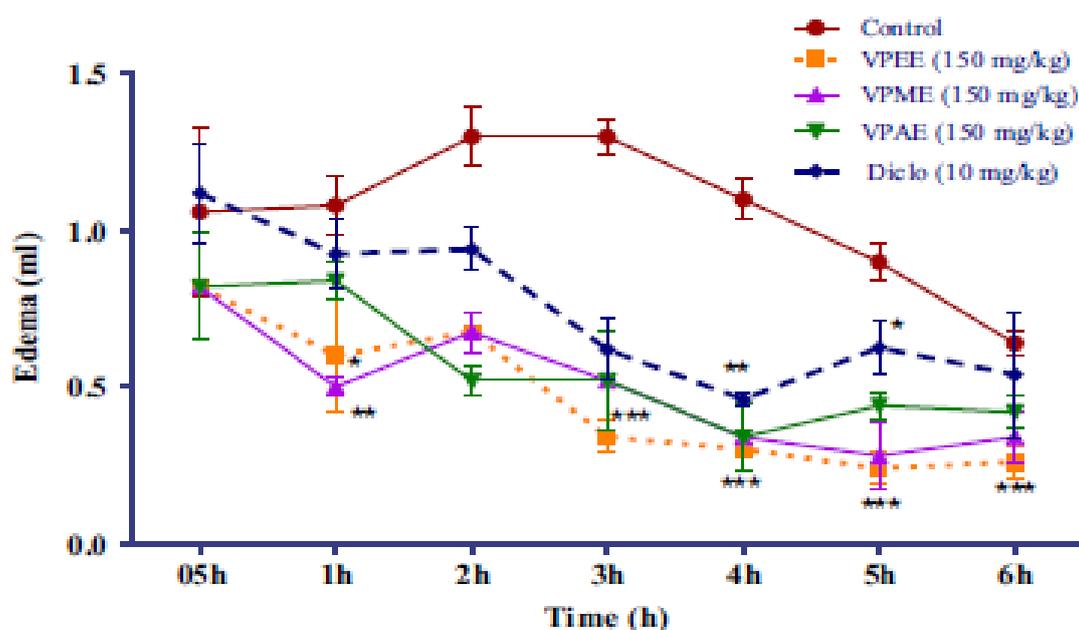


Figure 7 : Effets des extraits aqueux, à l'acétate d'éthyle et au méthanol sur l'inflammation induite par la carragénine.

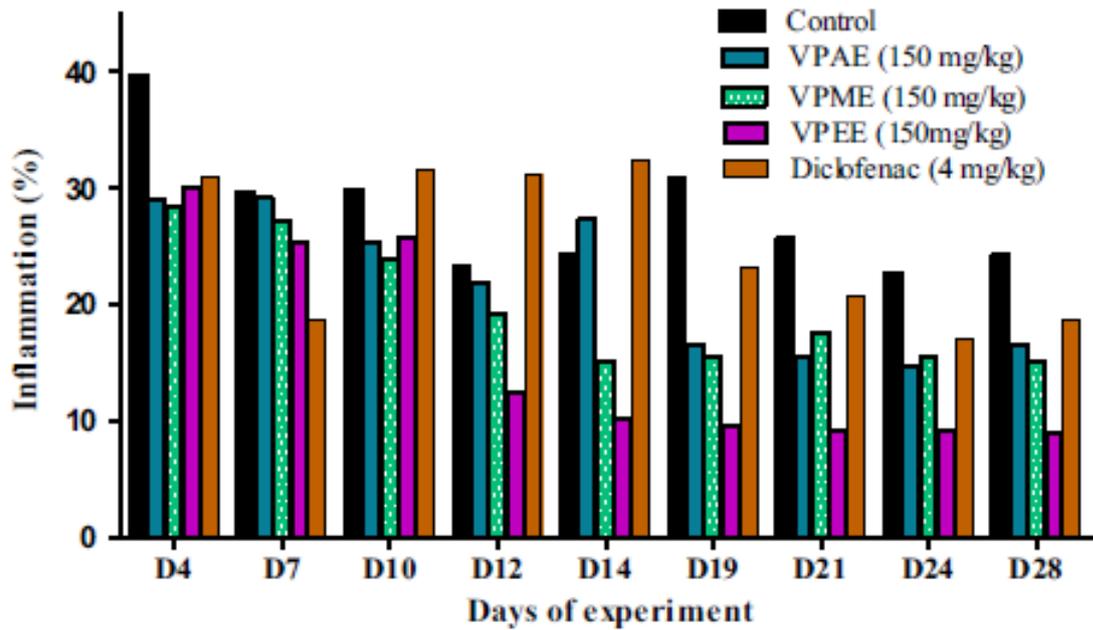


Figure 8 : Effets des extraits aqueux, à l'acétate d'éthyle, au méthanol et au diclofénac sur l'inflammation induite par l'Adjuvant Complet de Freud.

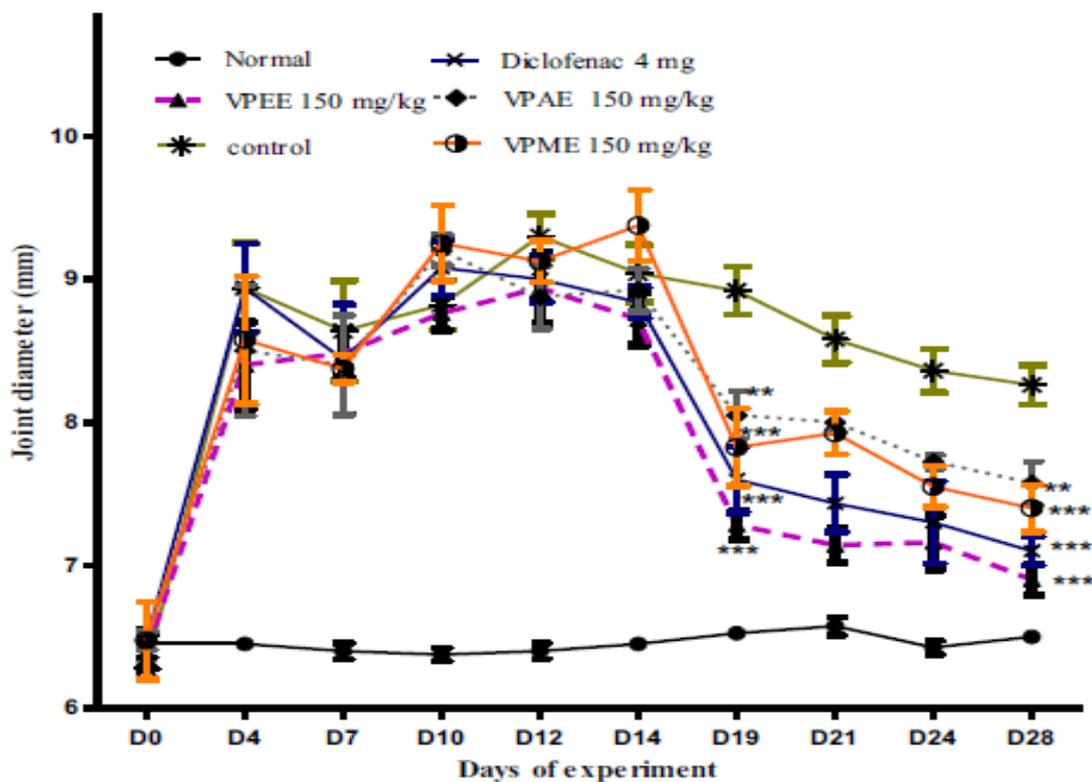


Figure 9 : Effets des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur le diamètre des articulations des rats après 14 jours de traitement.

Tableau 9 : Effets des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur le poids de la rate, le poids du foie et le poids du thymus après 14 jours de traitement.

Traitements	Doses (mg/Kg)	Poids des organes (g)		
		Rate	Foie	Thymus
Normal	-	0.65 ± 0.12	6.85 ± 0.64	0.63 ± 0.09
Contrôle	-	1.70 ± 0.40*	7.67 ± 1.20	0.41 ± 0.05**
Extrait aqueux	150	0.98 ± 0.52	7.58 ± 0.51	0.53 ± 0.27 [#]
Extrait MeOH	150	0.93 ± 0.24	6.93 ± 0.50	0.45 ± 0.07
Extrait AcOEt	150	0.73 ± 0.86 [#]	6.97 ± 0.67	0.60 ± 0.02 ^{##}
Diclofénac	4	0.82 ± 0.16 [#]	6.54 ± 1.97	0.53 ± 0.09 [#]

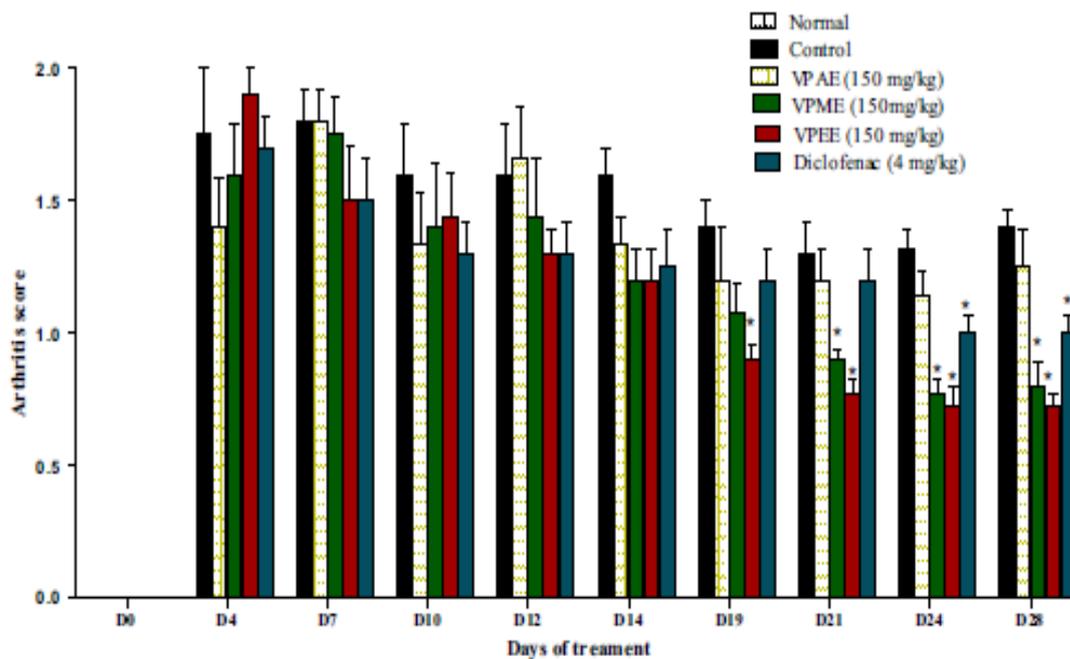


Figure 10 : Effets des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur le score arthritique après 14 jours de traitement.

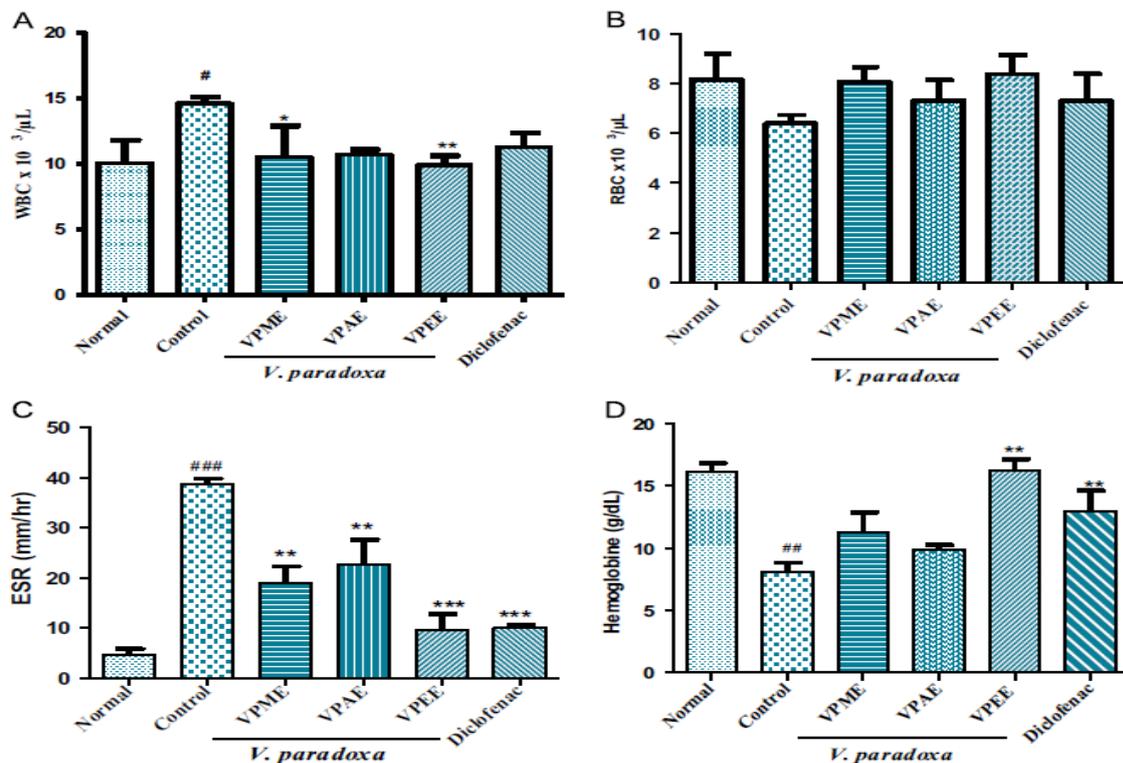


Figure 11 : Effet traitement chronique des extraits aqueux (VPAE), à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol (VPME) et au diclofénac sur WBC (A), RBC (B), ESR (C) et hémoglobine (D) après 14 jours de traitement.

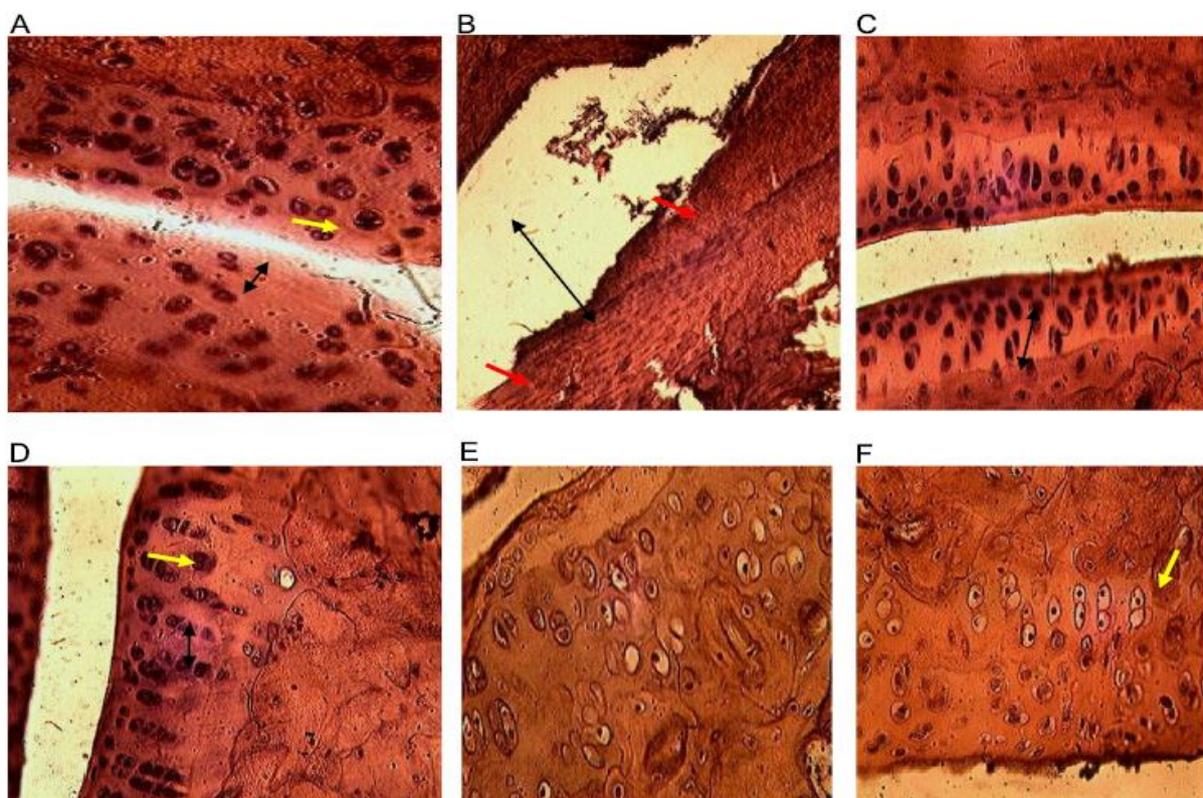


Figure 12 : Structures histologiques des articulations et du cartilage de rats traités et non-traités.

Ces coupes histologiques précédentes montrent que chez les animaux souffrants de polyarthrite, les cellules cartilagineuses ont bien été détruites (diminution). On peut y remarquer qu'il n'y a absence d'activité mitotique (mitose). Les anomalies observées chez les animaux malades ont été corrigées chez le sujet traité à l'extrait brut au méthanol (C) de l'écorce de *Vitellaria paradoxa*. On remarque une prolifération des cellules cartilagineuses notamment des chondrocytes bien différenciées chez le rat normal (A), et le rat traité à l'extrait au méthanol (C). Chez ceux traités aux extraits d'acétate d'éthyle (D) et aqueux (E), ces cellules sont présentes mais moins abondantes. On peut y noter un processus mitotique destiné à leur régénération.

II.1.4. Etude de l'activité antiproliférative des extraits des racines, écorces de tronc et graines de *Vitellaria Paradoxa*

Les travaux de Tagne et ses collaborateurs en 2014 ont montré que l'activité antiproliférative de l'extrait au méthanol des écorces du tronc de *Vitellaria paradoxa* sur différentes cellules donnent les résultats suivants avec concentration à 50% d'inhibition de la croissance des cellules (GI_{50}) : NCI-H460 (27,00 $\mu\text{g/mL}$), MCF-7 (24,00 $\mu\text{g/mL}$), PC3 (67,00 $\mu\text{g/mL}$) et Hela (66,46 $\mu\text{g/mL}$). De même, ceux effectués (Zhang *et al.*, 2014) sur les noyaux des graines ont montré que ces extraits des noyaux de graines de *Vitellaria paradoxa* présentent de potentielles activités anti-inflammatoires et anticancéreuses.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse des différents extraits révèle que l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines et des écorces du tronc est riche en composés triterpéniques ainsi que polyphénoliques. Le screening préliminaire sur les extraits au méthanol, à l'acétate d'éthyle et aqueux a montré une activité anti-inflammatoire intéressante notamment l'extrait à l'acétate d'éthyle. L'activité anti-inflammatoire (*in vivo*) des extraits (acétate d'éthyle, méthanolique et aqueux) a été évalué sur l'inflammation aiguë induite par la carragénine et sur l'inflammation chronique induite par l'adjuvant complet de Freund à la même dose de 150 mg/kg.

II.1.5. La purification

Les différents extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol ou butanol ont été soumis à des chromatographies sur colonne au gel de silice, éluées, soit au mélange hexane-acétate d'éthyle, soit au mélange acétate d'éthyle-méthanol ou encore au mélange chlorure de méthylène-méthanol, tous de polarité croissante. Le mélange des composés est purifié sur sephadex avec un système chlorure-méthanol et/ou sur les plaques préparatives au total 23 composés ont été isolés des racines, des écorces du tronc et des graines. Après analyses des spectres de ces composés, nous avons constaté sur la base de la CCM, des données physiques et spectroscopiques, que 7 couples de composés étaient identiques : VP2, VP3, VP4, VP5-1, VP7, VP10, VP11. Les figures 13, 14 et 15 résument les différents protocoles d'extraction et de purification des extraits actifs.

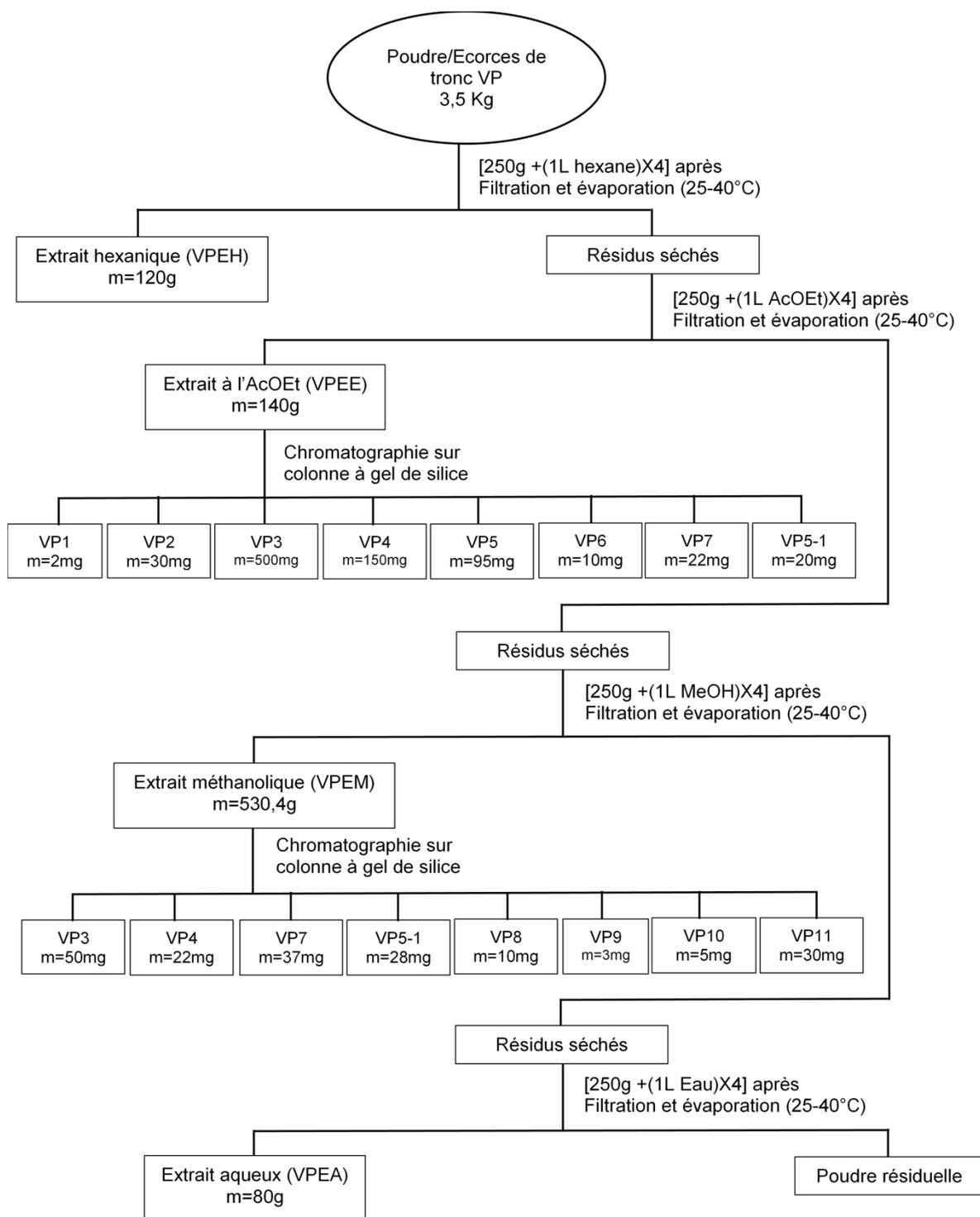


Figure 13 : Protocole d'extraction et isolement des composés obtenus des écorces du tronc de *Vitellaria paradoxa*.

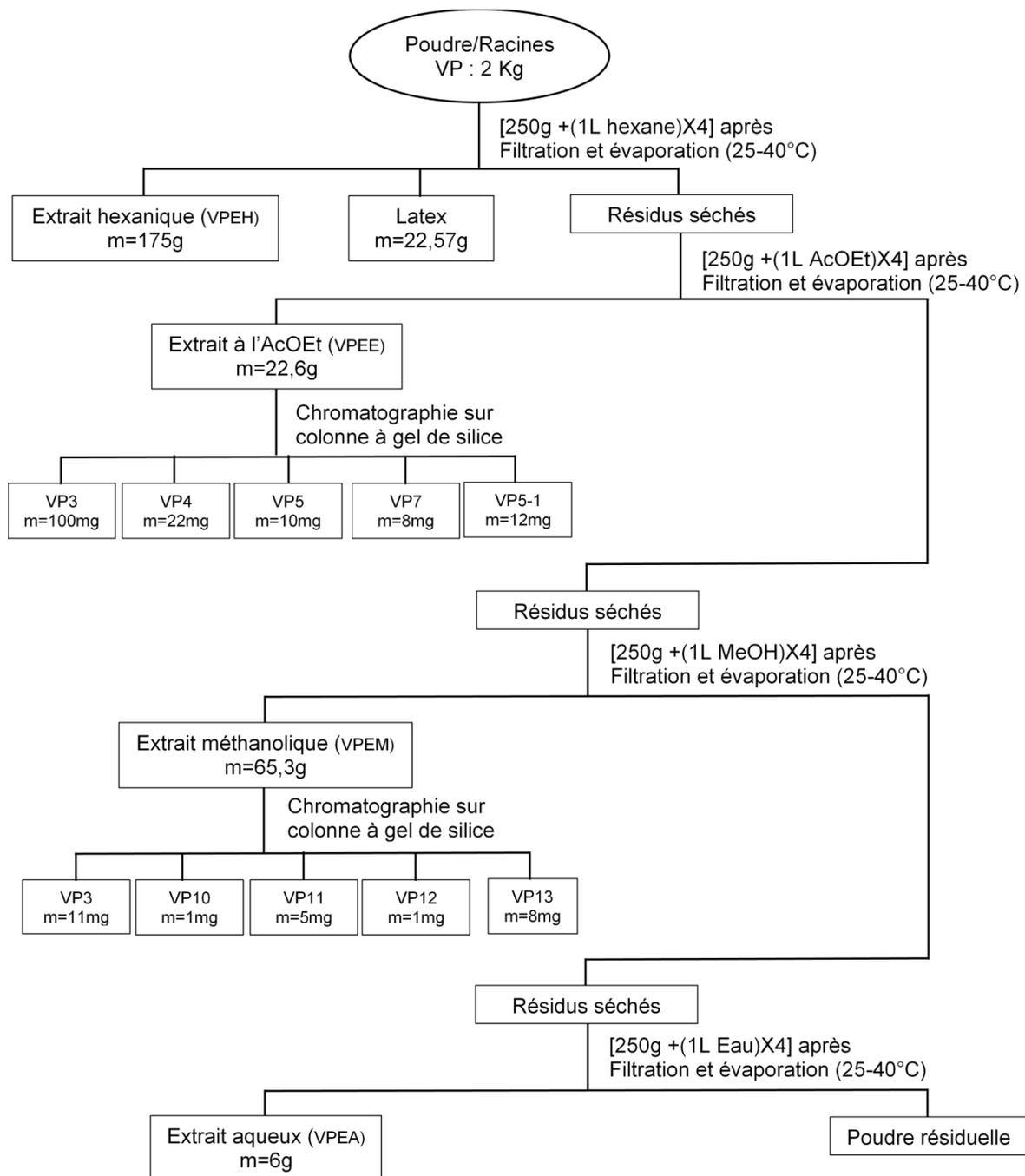


Figure 14 : Protocole d'extraction et isolement des composés obtenus des racines de *Vitellaria paradoxa*.

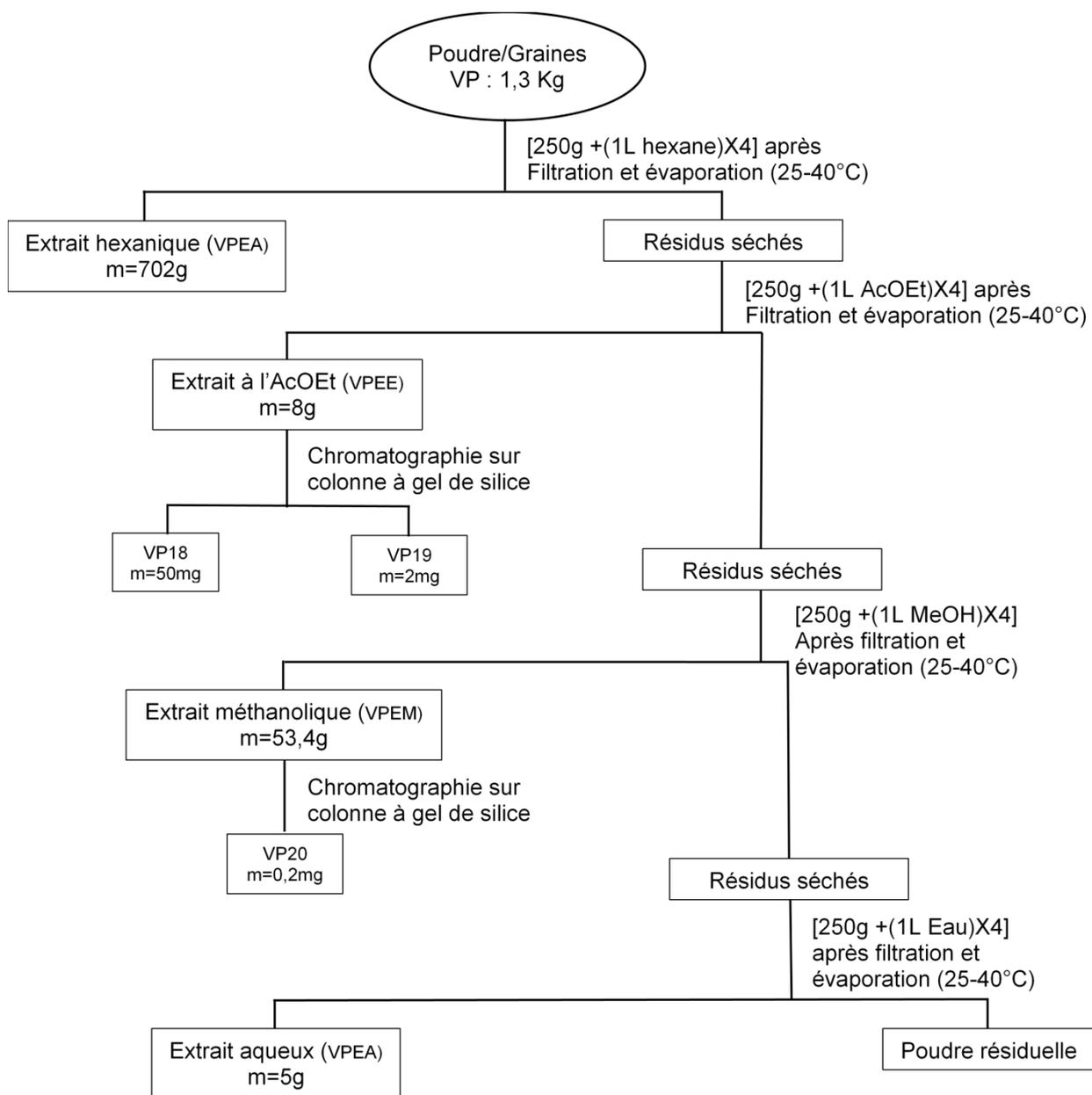


Figure 15 : Protocole d'extraction et d'isolement des composés obtenus des graines de VP.

Après purification, seize (16) composés ont été obtenus dont dix (10) ont été caractérisés grâce aux méthodes spectroscopiques modernes. Ces composés appartiennent à plusieurs classes de substances naturelles parmi lesquelles, on distingue cinq triterpènes comme produits majoritaires, trois composés polyphénoliques (flavonoïdes), un cycloalcane et un acide gras. Parmi ces différents composés, onze (11) ont été obtenus des écorces de tronc, neuf (9) des racines et trois (3) des graines que nous allons décrire dans les pages suivantes.

II.2. CARACTERISATIONS DES COMPOSES ISOLES DES RACINES, ECORCES DE TRONC ET GRAINES DE *VITELLARIA PARADOXA*

A. COMPOSES ISOLES

II.2.1. Elucidation structurale des triterpènes isolés

II.2.1.1. Identification et caractérisation du composé VP3

Isolé de racines et écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa*, il a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (25-27,5 %). Il est soluble dans le méthanol et fond entre 282-285°C. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption à ν_{\max} : 3435 cm^{-1} (O-H), 2927 cm^{-1} (C-H), 1688 cm^{-1} (C=O) et 1455 et 1378 cm^{-1} de diméthyle géminé (figure 16) et ses spectres LCMS et de masse respectivement figure 17 et figure 18, tandis que ce dernier donne un pic pseudomoléculaire $[\text{M}-\text{H}]^+$ à 455,3 nous permet d'attribuer une formule brute correspond à $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_3$.

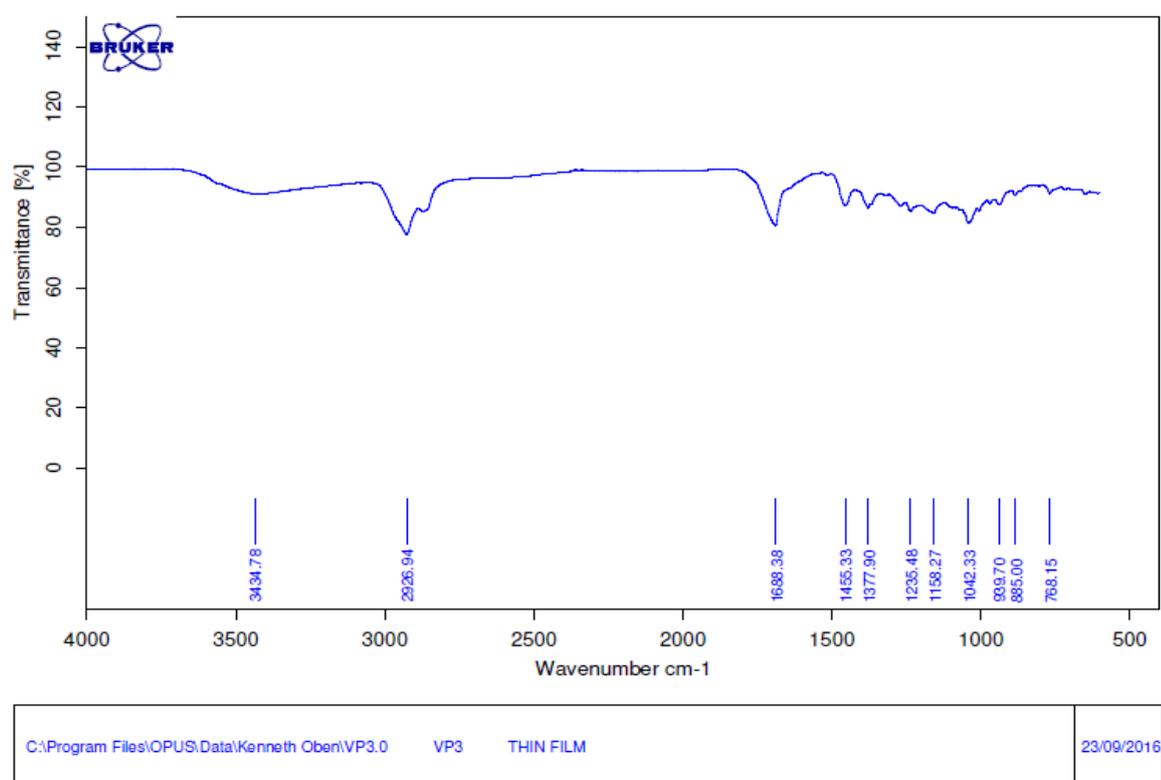


Figure 16 : Spectre IR du composé VP3.

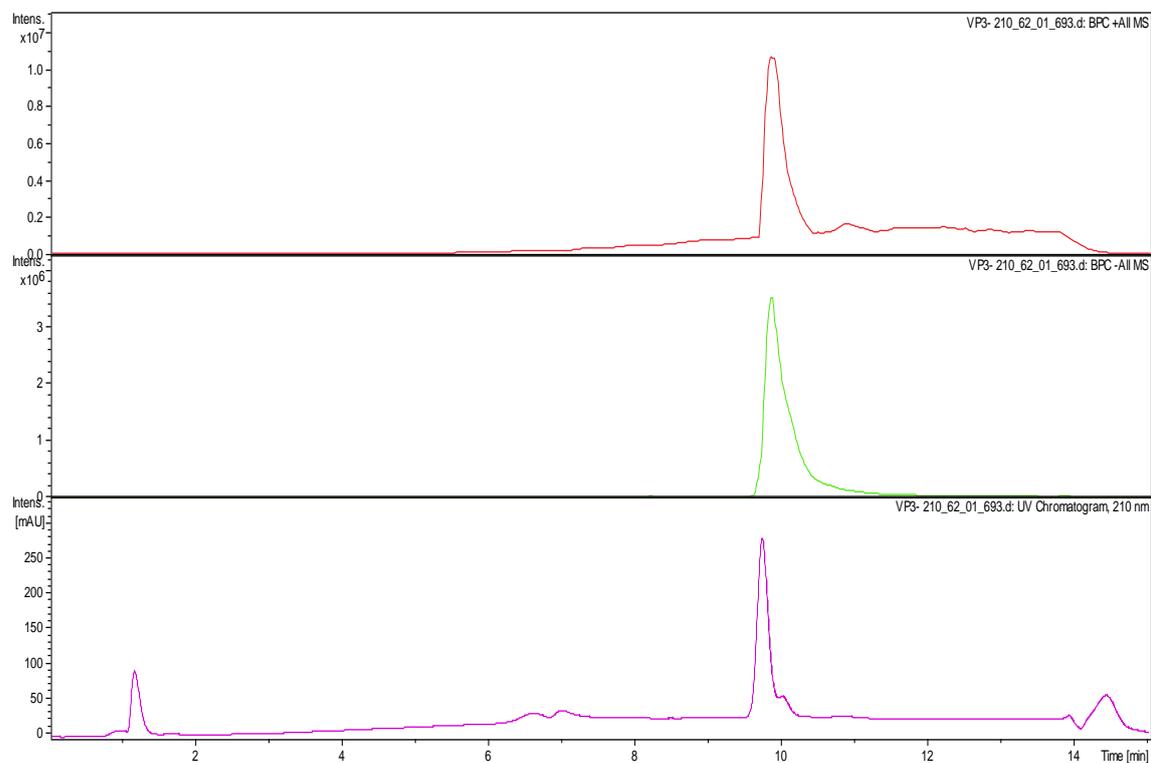


Figure 17 : Spectre LCMS du composé VP3.

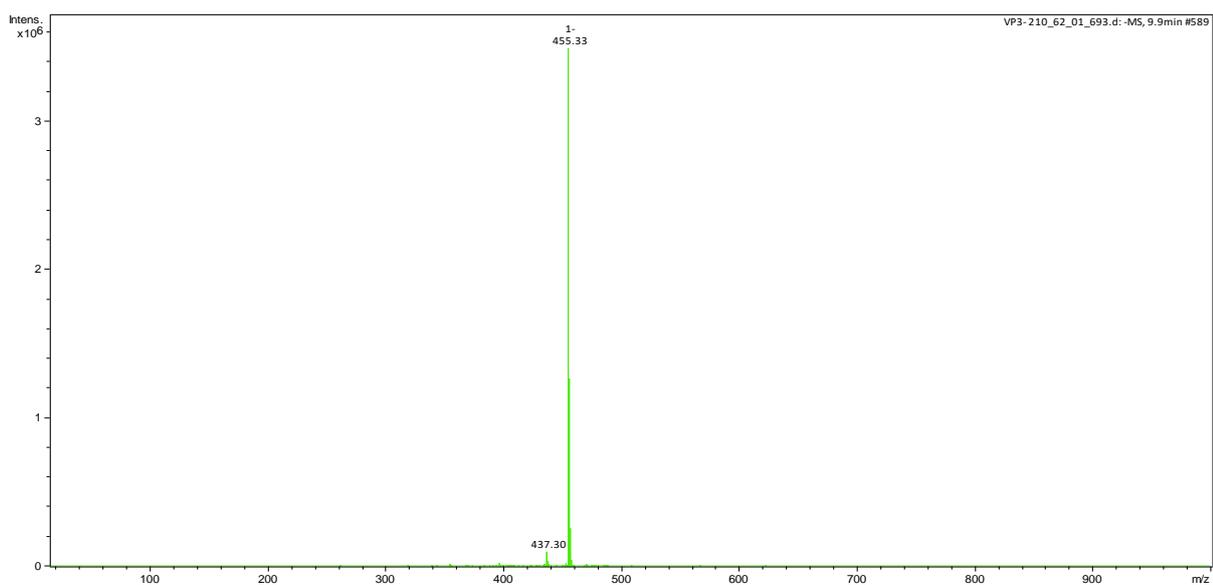


Figure 18 : Spectre de masse (APCI) du composé VP3.

Sur son spectre de RMN¹H (CD₃OD, 600 MHz) (figures 19), on observe des signaux de proton à δ 4,71 (1H, d, 4,0 Hz, H-29a), 4,60 (1H, d, 4,0 Hz, H-29b), 3,13 (1H, m, H-19) et 3,02 (1H, m, H-3).

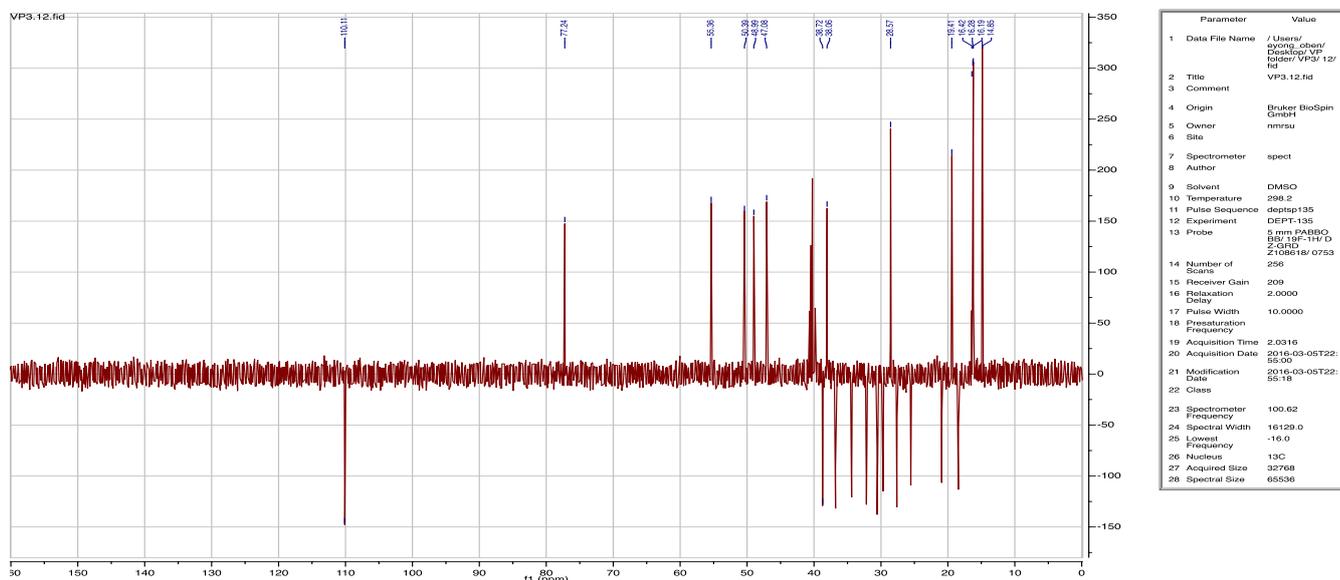


Figure 21 : Spectre de DEPT-135 (CD₃OD, 150 MHz) du composé VP3.

Son spectre COSY (figure 22) montre les différentes corrélations entre :

- le proton déblindé à 4,70 ppm (H-29a) et un proton à 4,57 ppm (H-29b).
- le proton déblindé à 4,57 ppm (H-29b) et trois protons à 1,65 ppm (H-30).

Le spectre HSQC (figure 23) montre les corrélations $J^1\ ^{13}\text{C}-^1\text{H}$. Sur ce spectre, on observe une série de corrélations entre :

- les protons respectivement à 4,70 et 4,57 ppm (H-29a, H-29b) et le carbone à 110,1 (C-29) ppm.
- le proton à 3,00 ppm (H-19) et le carbone (C-19) à 47,1 ppm.
- le proton à 2,98 ppm (H-3) et le carbone (C-3) à 77,2 ppm.
- le proton à 0,65 ppm (H-5) et le carbone à 55,4 ppm (C-5).

Le spectre HMBC (figure 24) présente les corrélations en $J^{2-3}\ ^{13}\text{C}-^1\text{H}$. Sur ce spectre :

- les protons respectivement à 4,70 et 4,57 ppm (H-29a, H-29b) corrélient avec les carbones à 47,1 et 19,4 ppm (C-19 et C-30).

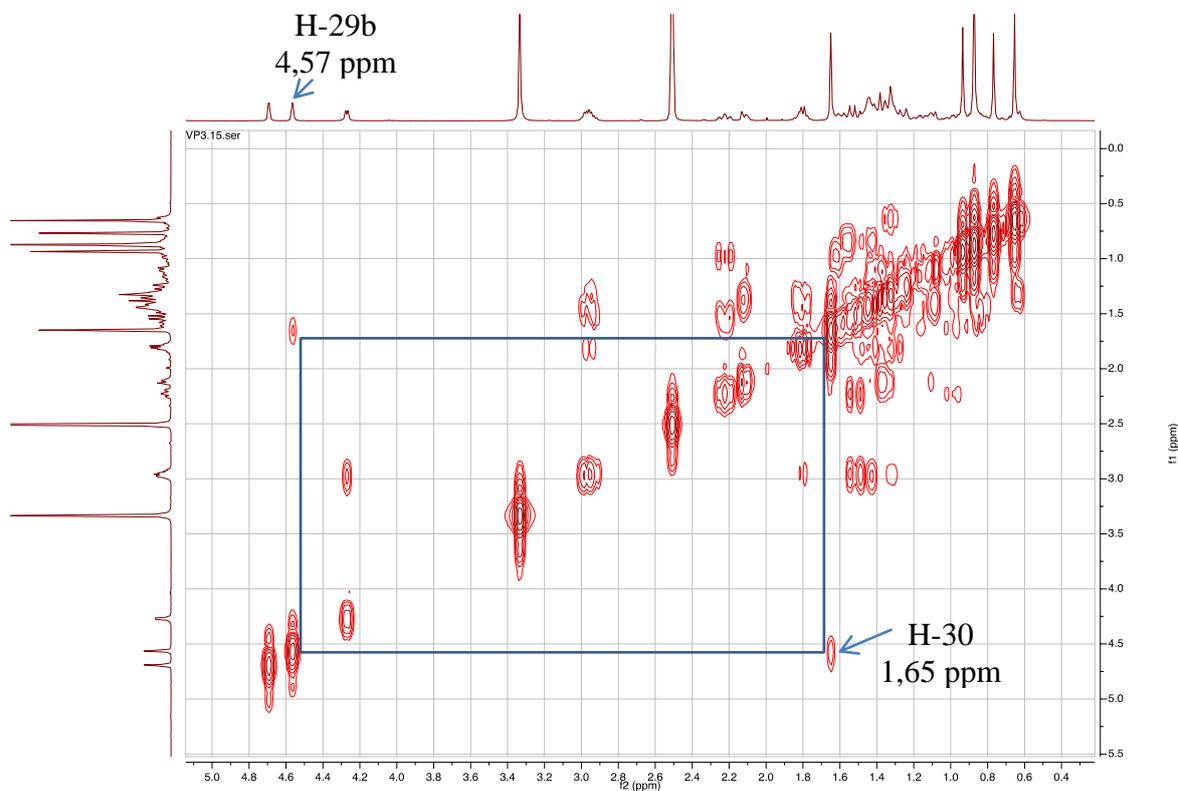


Figure 22 : Spectre COSY du composé du composé VP3.

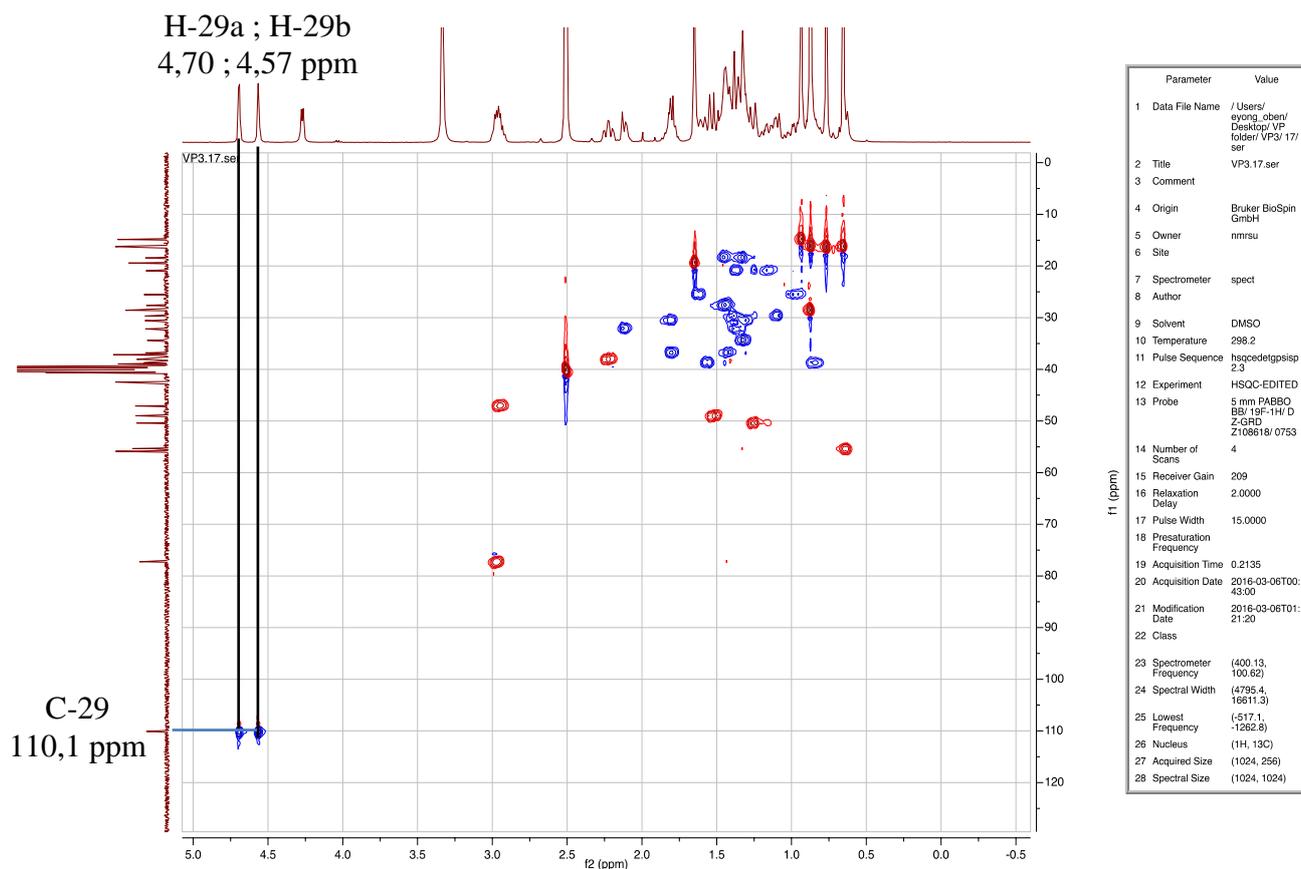


Figure 23 : Spectre HSQC du composé VP3.

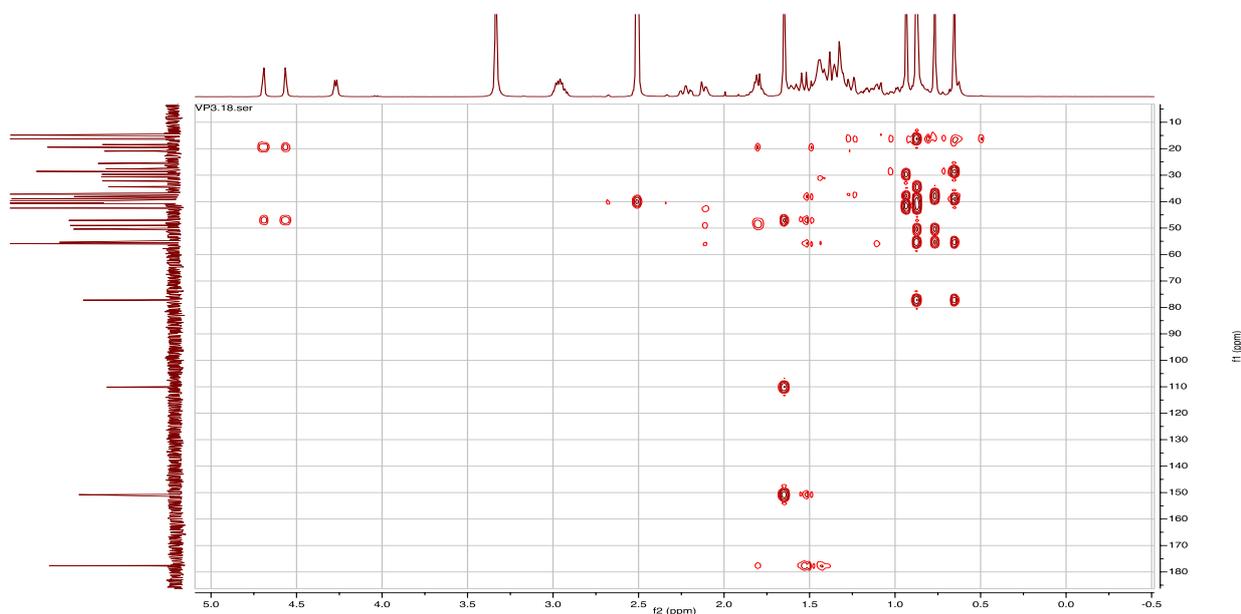


Figure 24 : Spectre HMBC du composé VP3.

L'ensemble de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites de la littérature (Peng *et al.*, 1998) ont permis d'identifier VP3 à la structure **91**, qui est celle de l'acide (3 β)-3-Hydroxy-lup-20(29)-en-28-oïque ou l'acide bétulinique, première fois isolé des racines et des écorces du tronc de *Vitellaria paradoxa* et précédemment isolé par Soliman de l'écorce du bouleau blanc (*Betula papyrifera*) (Robertson *et al.*, 1939).

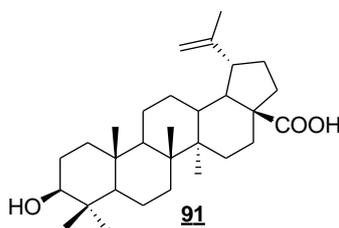


Schéma 32 : Structure du composé **91** (acide bétulinique).

Tableau 10 : Données spectrales RMN ^1H et ^{13}C (CD_3OD , 600 et 150 MHz) du composé VP3.

N°	Composé 91		Acide bétulinique (Mahato <i>et al.</i> , 1997)
	^1H	^{13}C	^{13}C
1	0,88 (1H, m) 1,55 (1H, m)	38,7	38,7
2	1,75 (2H, m)	27,6	27,4
3	3,13 (1H, m)	77,2	78,9
4	-	39,0	38,8
5	0,65 (1H, m)	55,4	55,3
6	1,45 (1H, m) 1,40 (1H, m)	18,4	18,3
7	1,40 (2H, m)	34,4	34,3
8	-	40,7	40,7
9	1,33 (1H, m)	50,4	50,5
10	-	37,2	37,2
11	1,42 (1H, m) 1,21 (1H, m)	20,9	20,8
12	1,00 (1H, m) 1,89 (1H, m)	25,6	25,5
13	2,26 (1H, td, 4,0, 12,0)	38,1	38,4
14	-	42,5	42,4
15	1,26 (1H, m) 1,85 (1H, m)	30,6	30,5
16	1,55 (1H, m) 2,19 (1H, m)	32,2	32,1
17	-	55,9	56,3
18	1,55 (1H, m)	49,0	46,8
19	3,00 (1H, m)	47,1	49,2
20	-	150,8	150,3
21	1,22 (1H, m) 1,45 (1H, m)	29,7	29,7
22	1,45 (1H, m) 1,82 (1H, m)	36,8	37,0
23	0,94 (3H, s)	28,6	27,9
24	0,77 (3H, s)	16,2	15,3
25	0,65 (3H, s)	16,3	16,0
26	0,87 (3H, s)	16,4	16,1
27	0,88 (3H, s)	14,9	14,7
28	-	177,7	180,5
29	4,70 (1H, d, 4,0 Hz) 4,57 (1H, d, 4,0 Hz)	110,1	119,6
30	1,65 (3H, s)	19,4	19,4

Le karité constitue une source beaucoup plus profitable pour s'approvisionner en acide bétulinique. Avec 1,5 Kg d'écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa*, on obtient 200 mg d'acide bétulinique.

II.2.1.2. Identification et caractérisation du composé VP4 (nouveau dérivé)

Le composé VP4 cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (60 : 40) et fond entre 238-239°C. Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'Iode. Ses spectres IR et LCMS présentent entre autres des bandes d'absorption respectivement figure 23 et figure 24. Celui d'IR donne à ν_{\max} : 3412 cm^{-1} (O-H), 2927 cm^{-1} (C-H) et 1688 cm^{-1} (C=O) et sur son spectre de masse en ESI (figure 27) présente le pic de l'ion moléculaire à m/z . 503,35084 dont l'analyse à haute résolution m/z 503,4 permet de lui attribuer la formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_6$ (calc. 503,3) renfermant sept degrés d'insaturation.

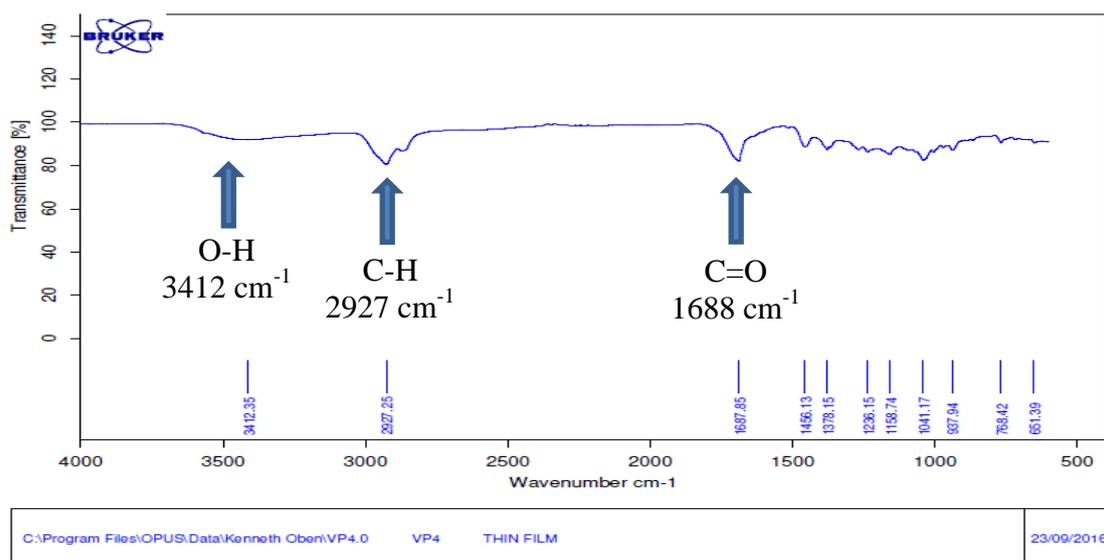


Figure 25 : Spectre IR du composé VP4.

Son chromatogramme du spectre LCMS enregistré à différentes longueurs d'onde permet d'apprécier le degré de pureté.

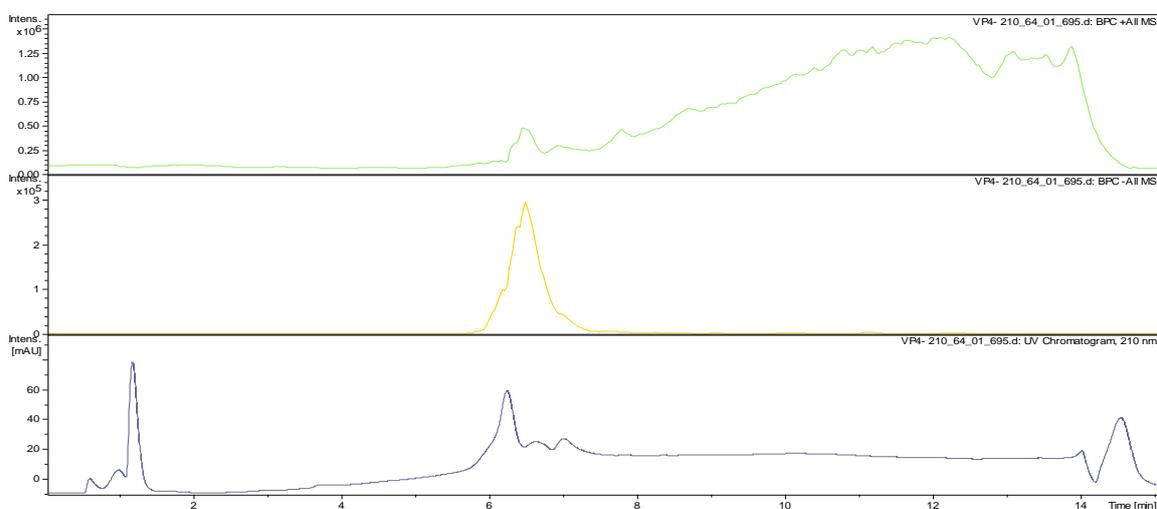


Figure 26 : Spectre LCMS du composé VP4.

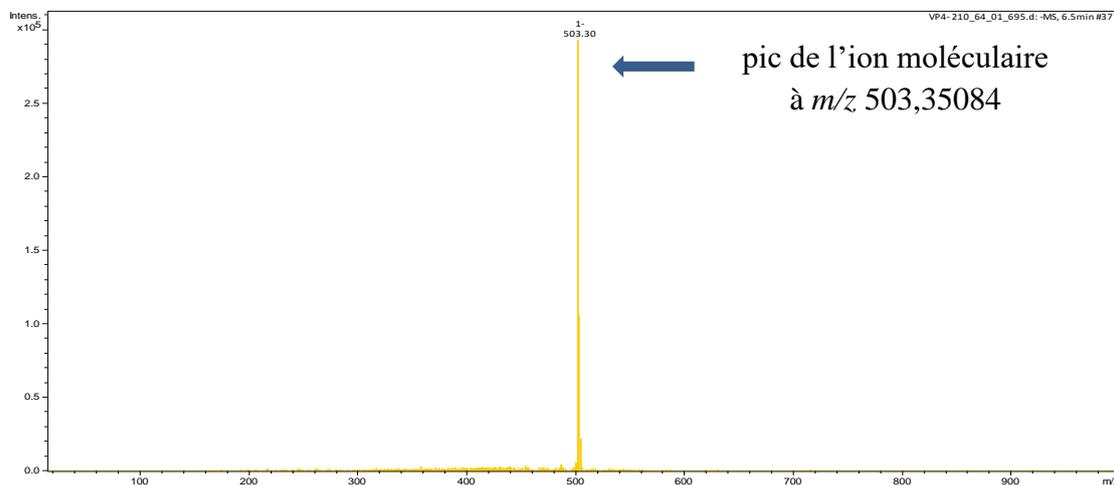


Figure 27 : Spectre de masse (ESI) du composé VP4.

Sur ses spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C élargi respectivement figures 28 et 29 (CD_3OD , 600 MHz), on observe :

- un ensemble de pics des protons entre δ 2,5 et 0,77 correspondant aux groupements méthyles déblindés et méthylènes caractéristiques des triterpènes de type ursane.
- un doublet de doublets d'un proton à δ 3,63 (1H, dd, 3,5 ; 12,0 Hz) correspondant au proton H-2, un doublet d'un proton à δ 3,45 (1H, d, 12,0 Hz) et 3,39 (1H, d, 3,5 Hz) correspondant aux trois groupes hydroxyles attachés au noyau A en l'occurrence les protons méthines respectivement H-1 et H-3.
- un multiplet d'un proton à δ 5,29 caractéristique au proton oléfinique H-12 des triterpènes.

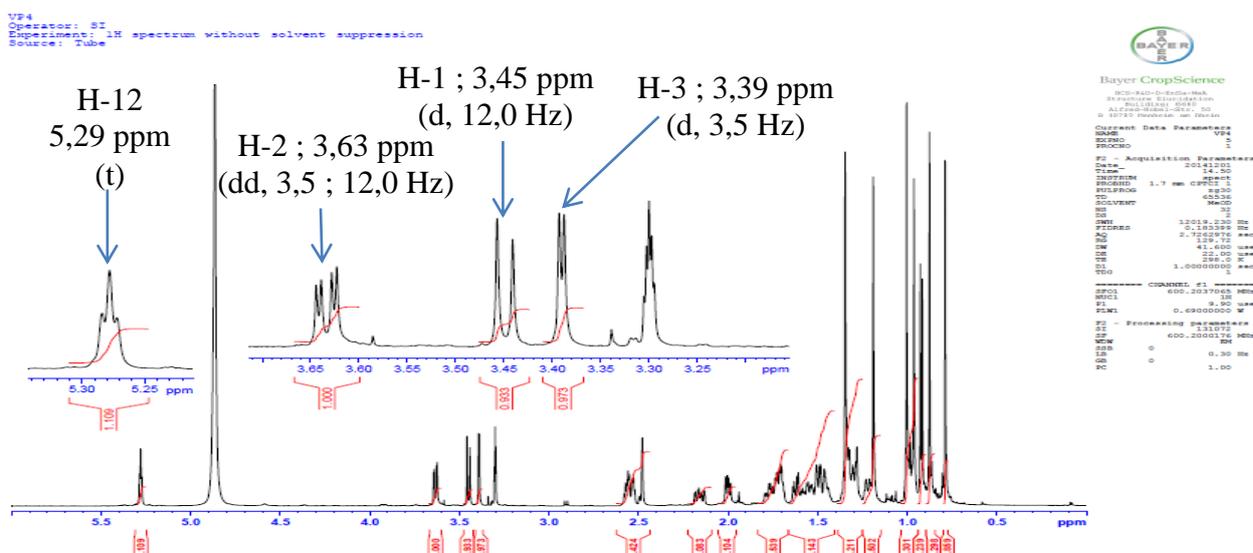


Figure 28 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) de composé VP4.

VP4
 Operator: ST
 Experiment: 1H spectrum without solvent suppression
 Source: Tube

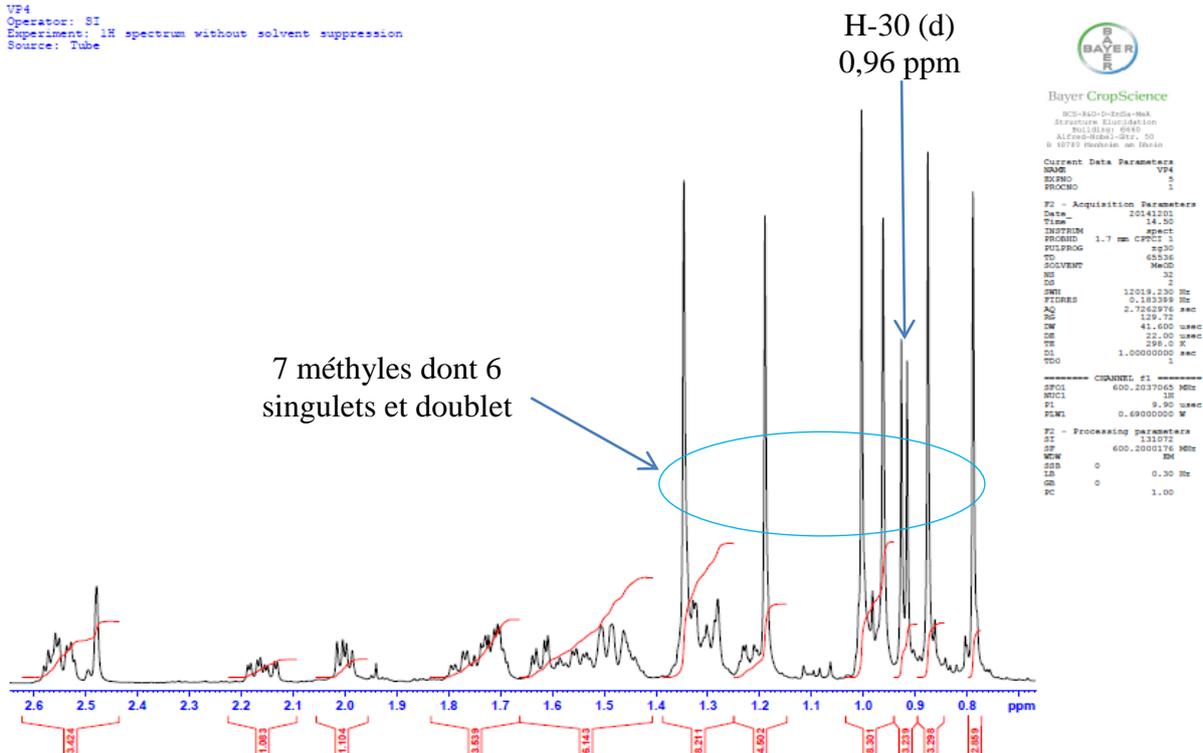


Figure 29 : Spectre RMN 1H élargi (CD₃OD, 600 MHz) de composé VP4.

Ses spectres RMN ¹³C et DEPT-135 élargis des figures 30 à 31 (CD₃OD, 150 MHz) montrent trente pics et confirment la présence des groupements de carbones. Ces pics apparaissent à des fréquences caractéristiques suivantes :

- à δ 182,5 indiquant la présence d'un carbone carbonyle.
- les signaux à δ 138,9 et 130,8 correspondant aux carbones oléfiniques.
- les signaux à δ 81,4 ; 80,9 ; 73,6 et 71,9 sont attribuables aux carbones sp^3 portant un atome d'oxygène.
- les signaux entre δ 54,9 et 13,1 attribuables aux carbones méthines, méthylènes et méthyles.

Son spectre COSY, la figure 33 montre les différentes corrélations :

- une corrélation entre le proton déblindé à 5,29 ppm (H-12) et les protons à 2,55 et 2,17 ppm respectivement H-11a et H-11b.
- une corrélation entre le proton à 2,50 ppm (H-16a) ; 1,51 ppm (H-16b) et 1,77 ppm (H-15a) ; 1,00 ppm (H-15b).

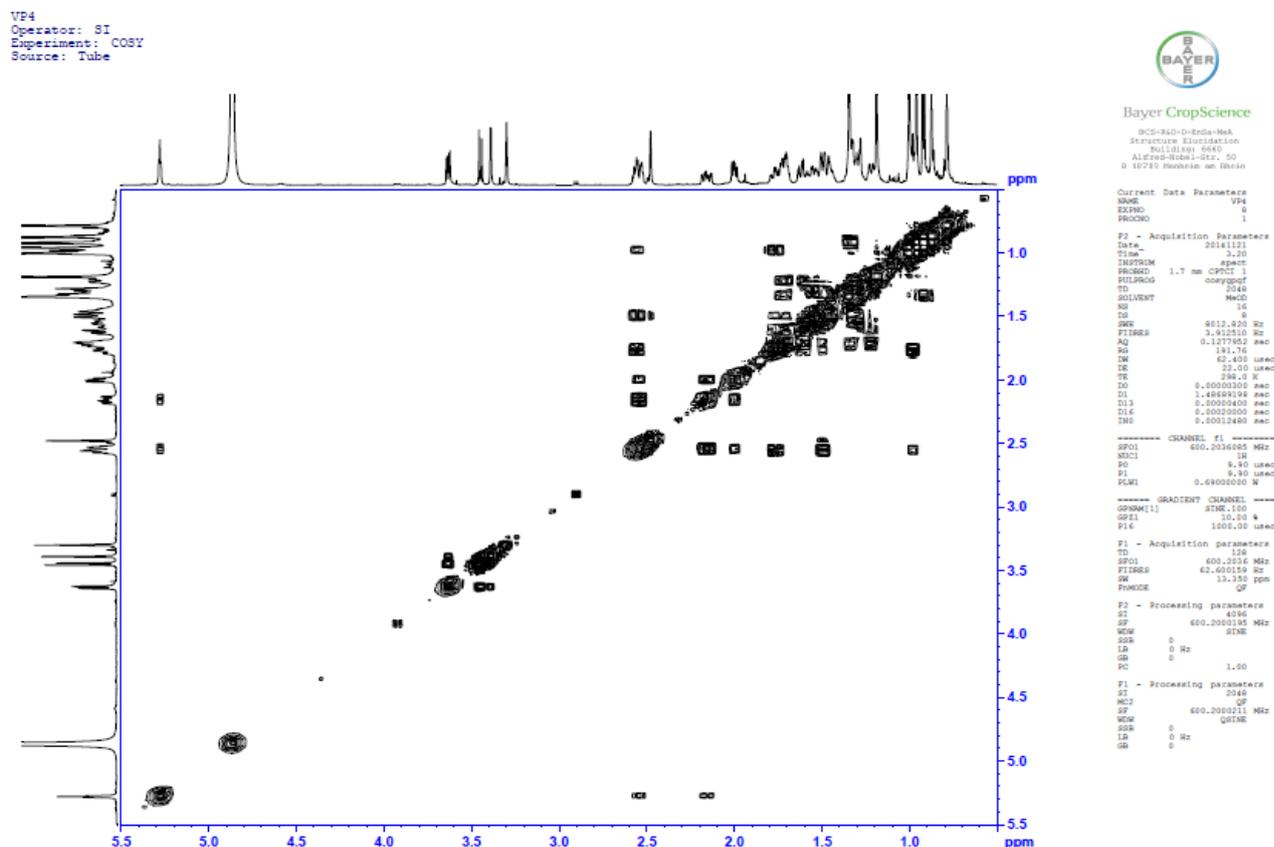


Figure 33 : Spectre COSY du composé VP4.

Les spectres HSQC (figures 34 et 35) montrent les corrélations $J^1 \text{ }^{13}\text{C-}^1\text{H}$. Sans ambiguïté sur ces spectres, on observe des corrélations suivantes entre les protons et les carbones à δ : 5,29 (H-12) et 130,8 (C-12) ; 3,63 (H-2) et 71,7 (C-2) ; 3,39 (H-3) et 80,9 (C-3) ; 3,43 (H-1) et 81,4 (C-1) ; 2,55 et 2,17 respectivement (H-11a, H-11b) et, 28,4 (C-11) ; 2,50 et 1,51 respectivement (H-16a, H-16b) et, 26,8 (C-16) et 2,48 (H-18) et 55,1 (C-18).

VP4
Operator: SI
Experiment: HSQC
Source: Tube



Bayer CropScience

BCS-943-D-Enda-Mak
Structure Elucidation
NMR/MS/MS
Alfrod-1001-01r_01
D 10773 Structure au Brésil

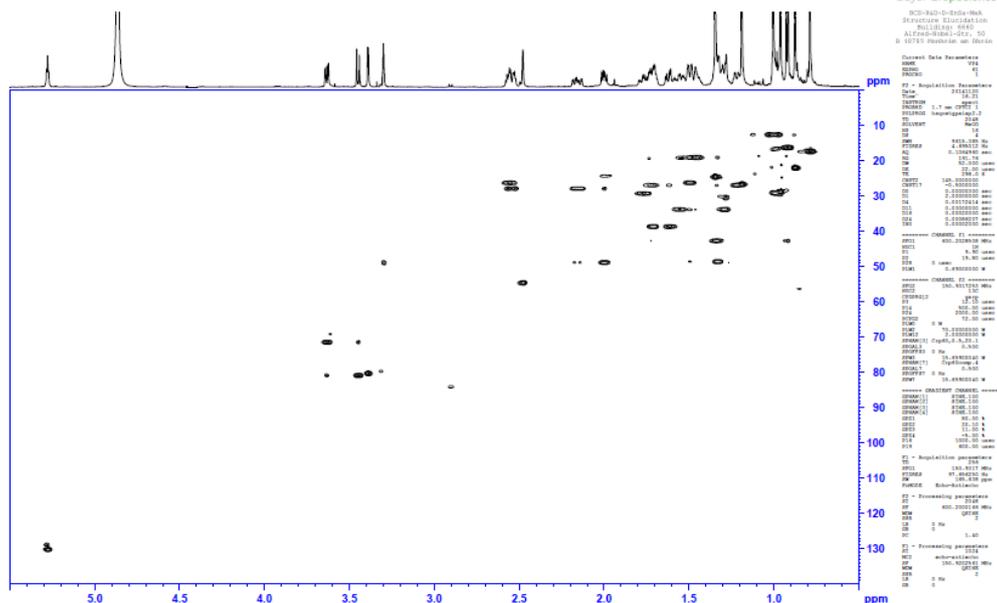


Figure 34 : Spectre HSQC du composé VP4.

VP4
Operator: SI
Experiment: HSQC
Source: Tube



Bayer CropScience

BCS-943-D-Enda-Mak
Structure Elucidation
NMR/MS/MS
Alfrod-1001-01r_01
D 10773 Structure au Brésil

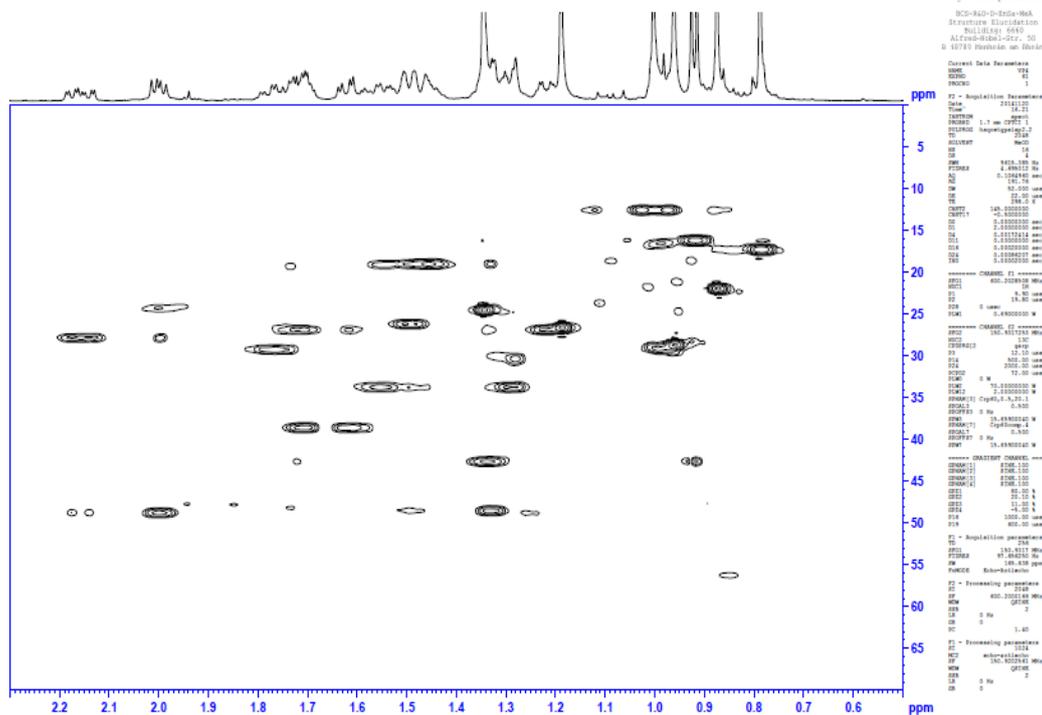


Figure 35 : Spectre HSQC élargi du composé VP4.

Sur son spectre HMBC (figure 36 et tableau 11) présente des corrélations en J^{2-3} entre les protons et les carbones comme le proton H-12 à δ 5,29 et les carbones à δ 138,9 (C-13) ; 73,6 (C-19) ; 55,1 (C-18) ; 49,4 (C-9) ; 38,9 (C-14) et 28,4 (C-11).

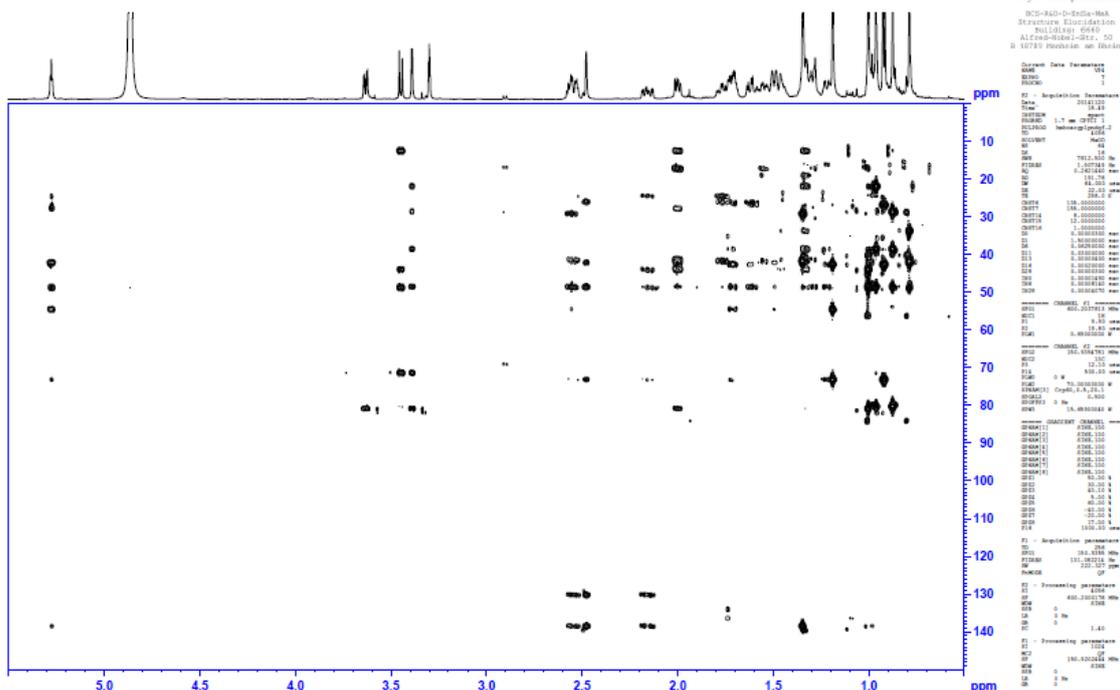


Figure 36 : Spectre HMBC de composé VP4.

Le spectre proton-proton bidimensionnel (NOESY) (Figure 37) montre que les paires de protons suivantes sont proches l'un de l'autre dans l'espace : H-2 (3,63 ppm) et H-3 (3,39 ppm) ; H de méthyle-29 (0,97 ppm) et H-20 (1,34 ppm) suggérant des orientations cis.

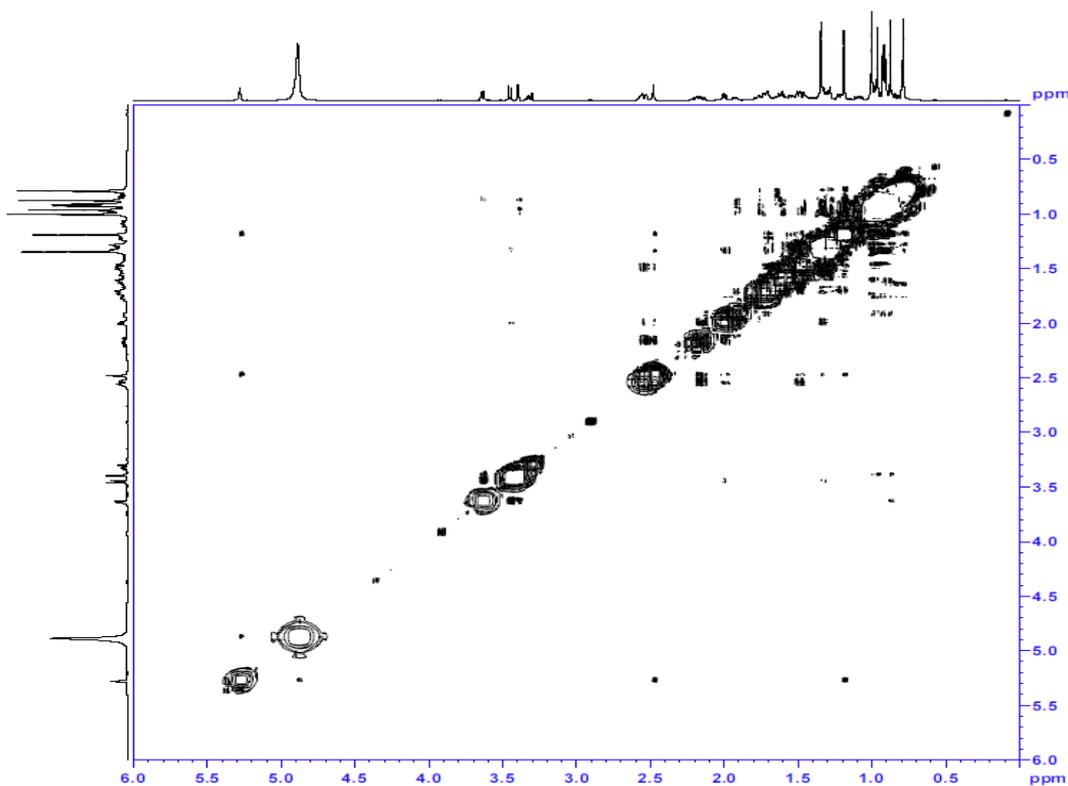


Figure 37 : Spectre NOESY de composé VP4

Toutes ces données physiques et spectroscopiques nous ont permis d'assigner au composé VP4, la structure **126** qui est celle de l'acide $1\alpha,2\beta,3\beta,19\alpha$ -tetrahydroxyurs-12-en-28-oïque pour la première fois isolé des racines et des écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* et caractérisé.

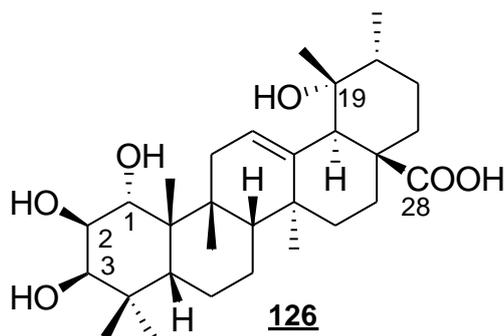


Schéma 33 : La structure du composé **126**.

Tableau 11 : Données spectrales RMN ^1H , ^{13}C et HMBC du composé VP4.

Position	Composé VP4 (126) (CD ₃ OD, 600 et 150 MHz)			Kouno <i>et al.</i> , 1988
	^1H (J en Hz)	^{13}C	Corrélations HMBC	^{13}C
1	3,45 (1H, d, 12,0)	81,4	13,1 ; 44,4 ; 49,1 ; 71,9	74,7
2	3,63 (1H, dd, 3,5, 12,0)	71,7	80,9	77,0
3	3,39 (1H, d, 3,5)	80,9	22,5 ; 29,3 ; 49,1 ; 71,9 ; 81,4	79,9
4	-	42,5		40,6
5	1,34 (1H, br, d)	49,1	13,1 ; 19,6 ; 22,5 ; 29,3 ; 34,3 ; 42,5	53,2
6	1,78 (1H, m) 0,94 (1H, br)	19,6	43,2 ; 49,1	17,9
7	1,58 (1H, m) 1,29 (1H, m)	34,3	19,6 ; 41,8	32,8
8	-	41,8		41,2
9	2,00 (1H, m)	49,4	13,1 ; 17,8 ; 28,4 ; 41,8 ; 44,4 ; 81,4	48,0
10	-	44,4		37,4
11	2,55 (1H, m) 2,17 (1H, dd, 4, 12)	28,4	49,4 ; 130,8 ; 138,9	24,6
12	5,29 (1H, m)	130,8	28,4 ; 41,8 ; 49,4 ; 55,1 ; 73,6 ; 138,9	130,1
13	-	138,9		137,2
14	-	38,9		41,2
15	1,00 (1H, m) 1,77 (1H, m)	29,8	26,8 ; 38,9	29,8
16	1,51 (1H, m) 2,50 (1H, m)	26,8	29,8 ; 49,0	26,1
17	-	49,0		48,5
18	2,48 (1H, s)	55,1	26,8 ; 43,2 ; 49,0 ; 73,6 ; 130,8 ; 138,9	52,6
19	-	73,6		73,2
20	1,34 (1H, m)	43,2	27,5 ; 73,6	42,9
21	1,51 (1H, m) 1,48 (1H, m)	27,5	39,2 ; 43,2	26,9
22	1,72 (1H, m) 1,62 (1H, m)	39,2	27,5 ; 49,0	38,1
23	1,17 (3H, s)	29,3	42,5 ; 49,1 ; 80,9	28,3
24	0,86 (3H, s)	22,5	42,5 ; 49,1 ; 80,9	16,1
25	1,00 (3H, s)	13,1	44,4 ; 49,4 ; 81,4	11,4
26	0,77 (3H, s)	17,8	34,3 ; 41,8 ; 49,4	16,9
27	1,33 (3H, s)	25,1	29,8 ; 38,9 ; 41,8 ; 138,9	25,6
28	-	182,4		174,4
29	0,97 (3H, s)	27,2	43,2, 55,1, 73,6	27,4
30	0,92 (3H, d, 8,0)	16,8	27,5, 43,2, 73,6	17,1

II.2.1.3. Identification et caractérisation du composé VP5 (nouveau dérivé)

Isolé des racines et des écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa*, il a été obtenu sous forme de poudre blanche de chromatographie sur colonne au gel de silice dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (45 : 55). Il est soluble dans le méthanol et fond entre 260-262°C. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption caractéristiques à ν_{\max} 3413 cm^{-1} (O-H), 2929 cm^{-1} (C-H), 1688 cm^{-1} (C=O) (figure 38). Son spectre LCMS corrobore avec celui de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) respectivement les figures 38 et 39 ont donné un pic pseudomoléculaire $[\text{M}-\text{H}]^+$ à 489,17. Ceci nous a permis d'attribuer une formule brute correspondant à $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$ avec sept degrés d'insaturation.

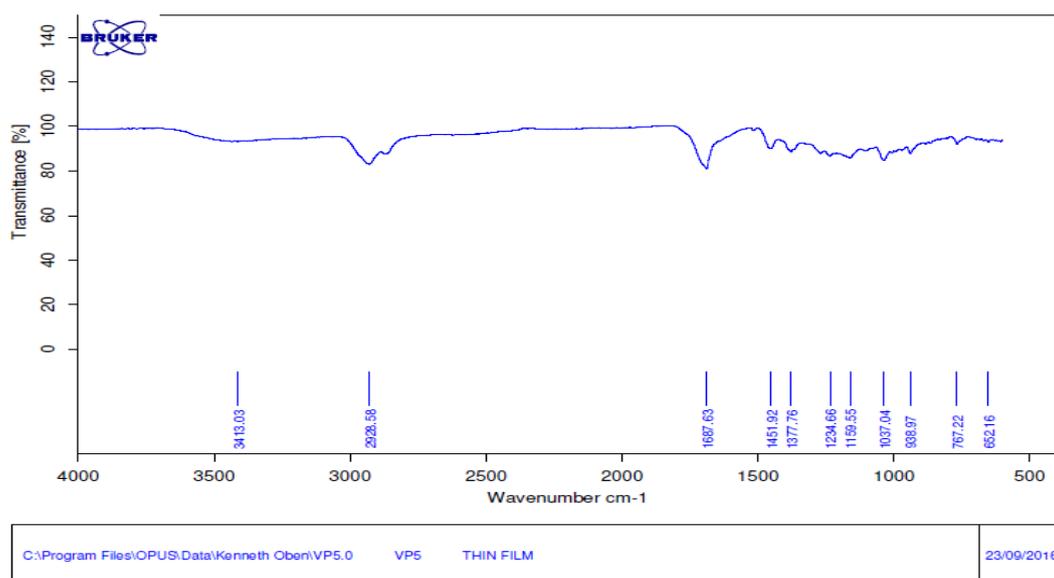


Figure 38 : Spectre IR du composé VP5.

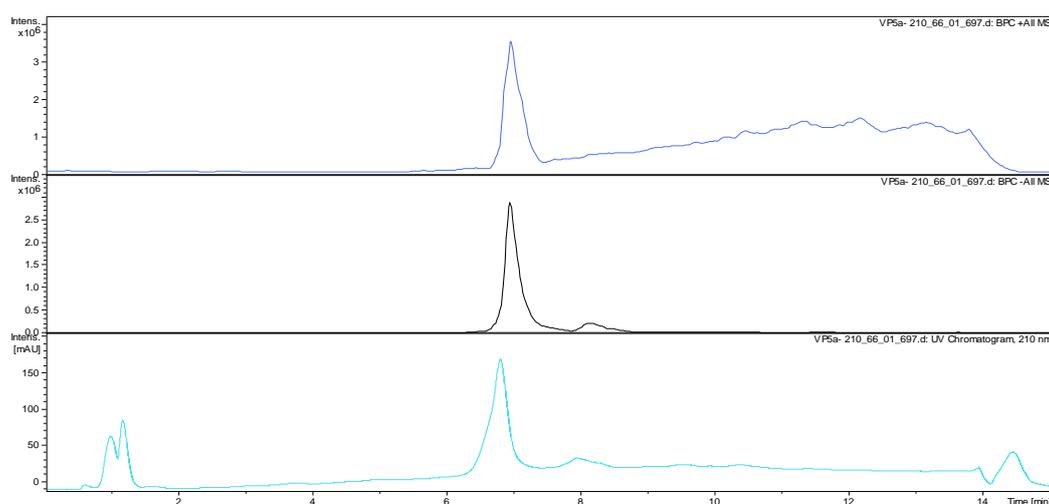


Figure 39 : Chromatogramme LC-MS du composé VP5.

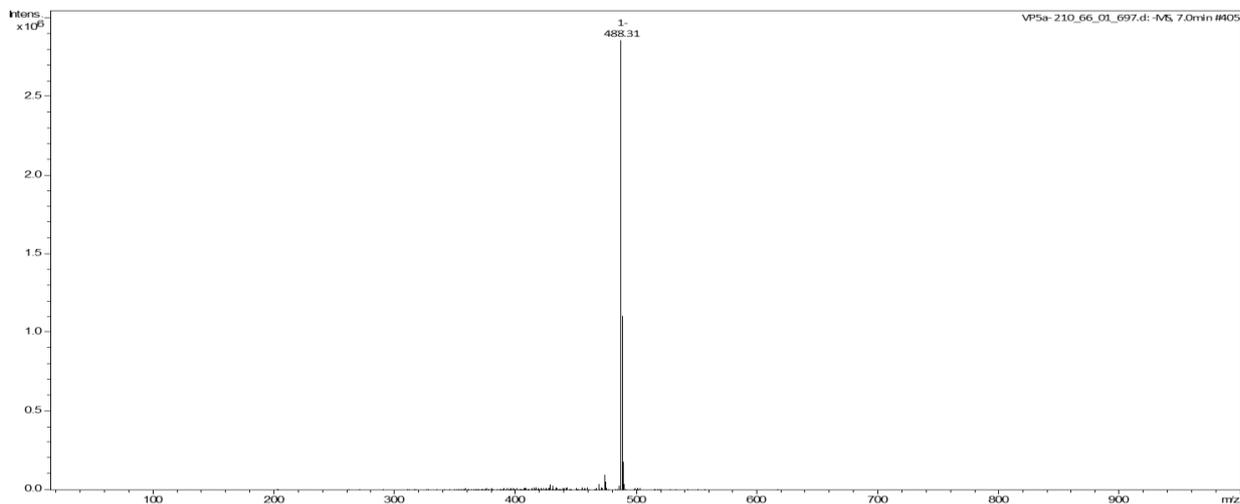


Figure 40 : Spectre de masse (APCI) du composé VP5.

Son spectre RMN ^1H (figure 41) (CD_3OD , 600 MHz) présente des séries de protons à savoir :

- à 5,32 ppm un triplet d'un proton attribuable à un proton oléfinique (H-12) des triterpènes.
- à 3,95 ppm un doublet de triplet d'un proton attribuable à un groupement méthine lié à un hétéroatome (H-2).
- à 3,35 ppm un doublet également un proton attribuable à un groupement méthine lié à un hétéroatome (H-3).
- entre 0,81 et 1,40 ppm, on observe des signaux caractéristiques de protons méthyles à δ 1,37 (3H, s), 1,22 (3H, s), 1,04 (3H, s), 1,01 (3H, s), 0,96 (3H, d, 12,0 Hz), 0,89 (3H, s) et 0,81 (3H, s) dans la région des champs forts.

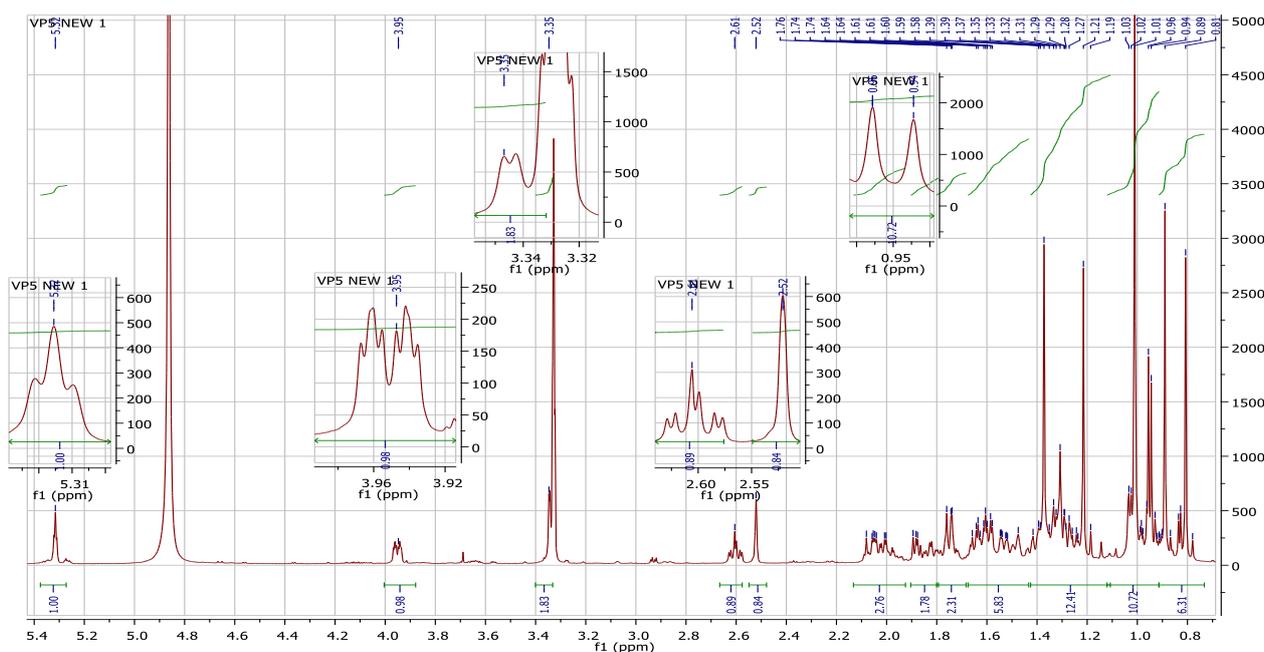


Figure 41 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) du composé VP5.

Sur son spectre de RMN ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) (figure 42) et DEPT-135 (figure 43), présentent les signaux de 30 atomes de carbones assignés aux :

- sept (7) groupements méthyles à δ 27,6 ; 25,7 ; 23,5 ; 21,1 ; 16,1 ; 15,5 ; 15,2.
- huit (8) méthylènes à δ 44,1 ; 37,6 ; 32,7 ; 28,2 ; 26,0 ; 25,2 ; 23,3 ; 17,9.
- sept (7) méthines parmi lesquels, on dénombre : deux (2) méthines oxygénés à δ 78,7 ; 65.8 ($-\text{CH}(\text{OH})$), quatre (4) méthines à δ 53,7 ; 48,0 ; 46,8 ; 41,7 ($-\text{CH}$) et un méthine oléfinique à δ 128,0 ($=\text{CH}$).
- huit (8) carbones quaternaires parmi lesquels, les carbones hybridés sp^2 à δ 180,8 ; 138,7 et 72,2 correspondent respectivement aux carbones porteurs des groupes carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) ; alcène ($\text{C}=\text{C}$) et un carbone oxygéné ($\text{C}-\text{OH}$).

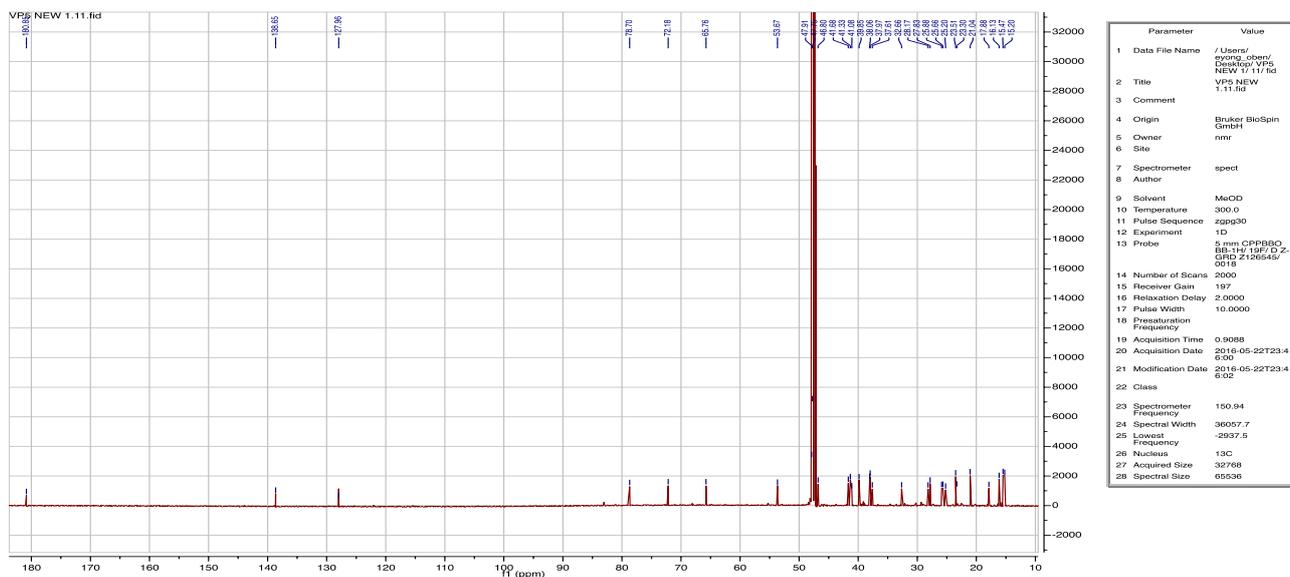


Figure 42 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) du composé VP5.

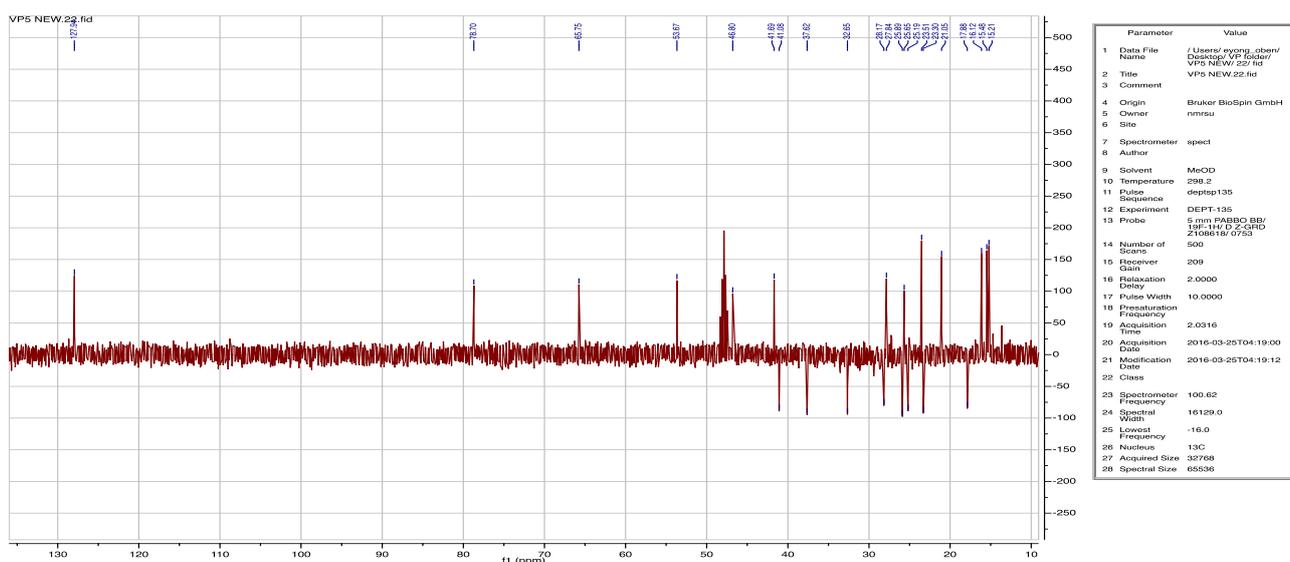


Figure 43 : Spectre DEPT (CD_3OD , 150 MHz) du composé VP5.

L'analyse de ses spectres COSY (figure 43) et TOCSY (figure 45) montrent les différentes corrélations :

- entre le proton H-2 (δ 3,95, dt, $J = 6,0, 12,0$ Hz) et H-3 (δ 3,35, d, $J = 6,0$ Hz) avec une constante de couplage $^3J_{H2,H-3} = 6,0$ Hz suggérant un couplage *CIS* (Minch 1994).
- une corrélation entre les protons H-12 (δ 5,32, t, 6,0 Hz) et H-11 (δ 2,00, m, 2H) avec une constante de couplage 6,0 Hz.

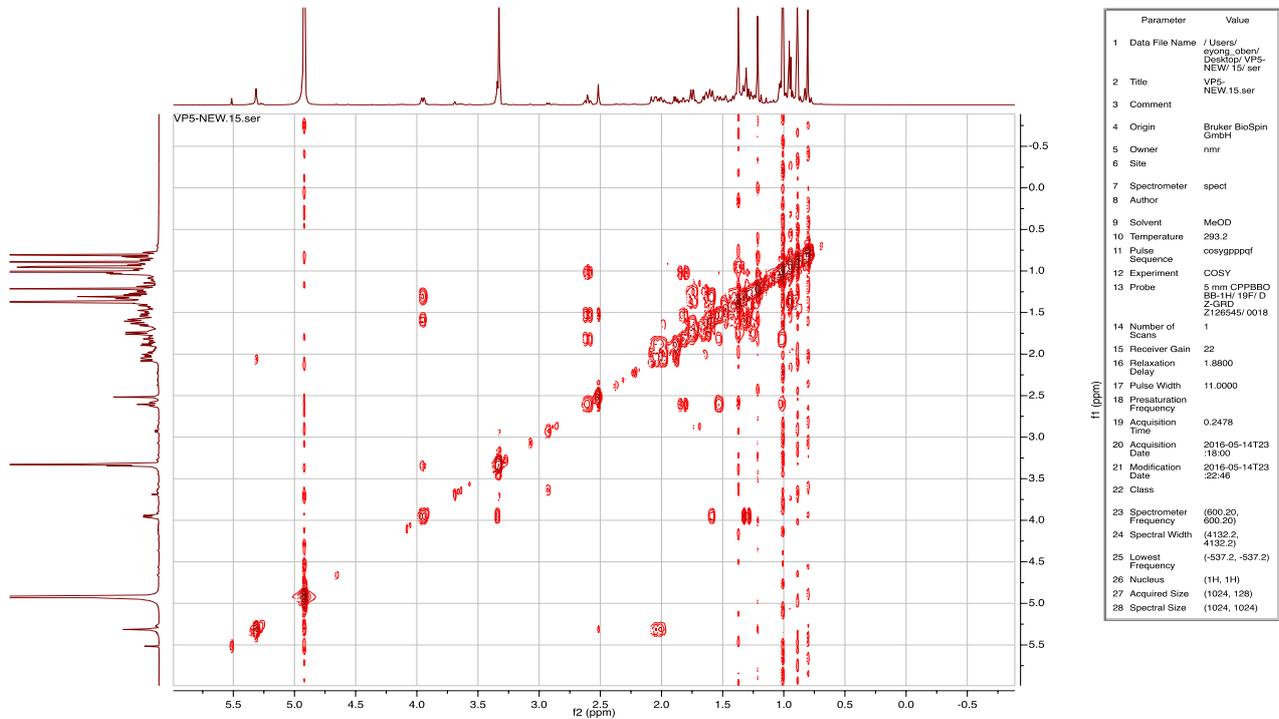


Figure 44 : Spectre COSY du composé VP5.

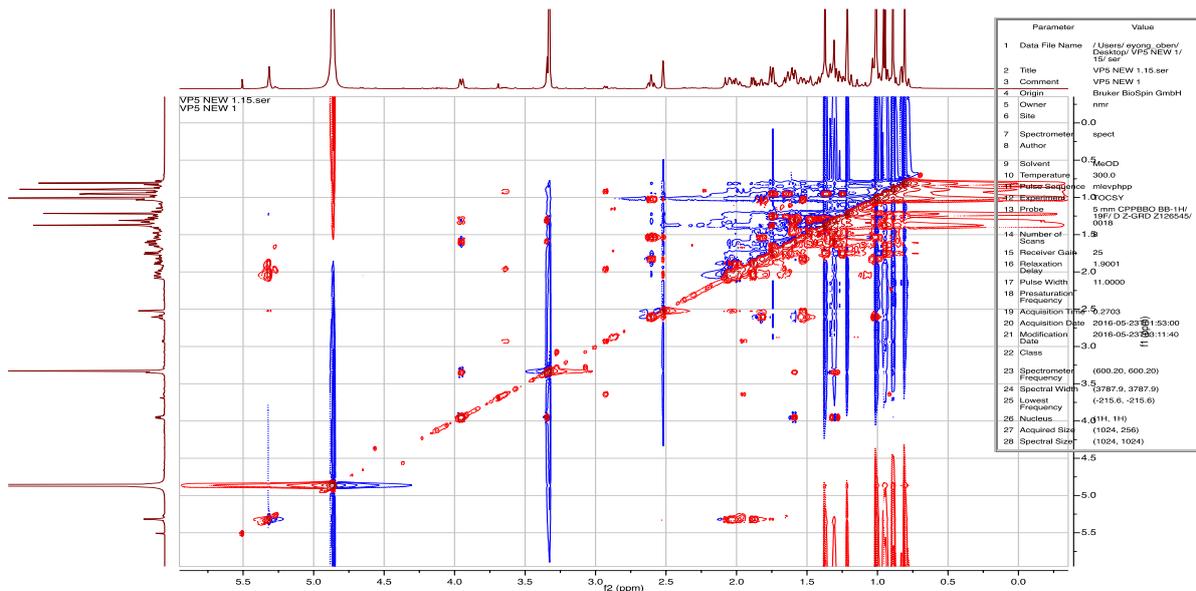


Figure 45 : Spectre TOCSY du composé VP5.

Sur son spectre HSQC (Figure 46) présente les corrélations en J' ^{13}C - ^1H entre carbone et proton à savoir :

- H-12 à 5,32 ppm et C-12 à 128,0 ppm.
- H-2 à 3,95 ppm et C-2 à 65,8 ppm.
- H-3 à 3,35 ppm et C-3 à 78,9 ppm.
- H-18 à 2,52 ppm et C-18 à 53,7 ppm.
- H-16a et H-16b respectivement à 2,62 et 1,52 ppm et C-11 à 25,9 ppm.

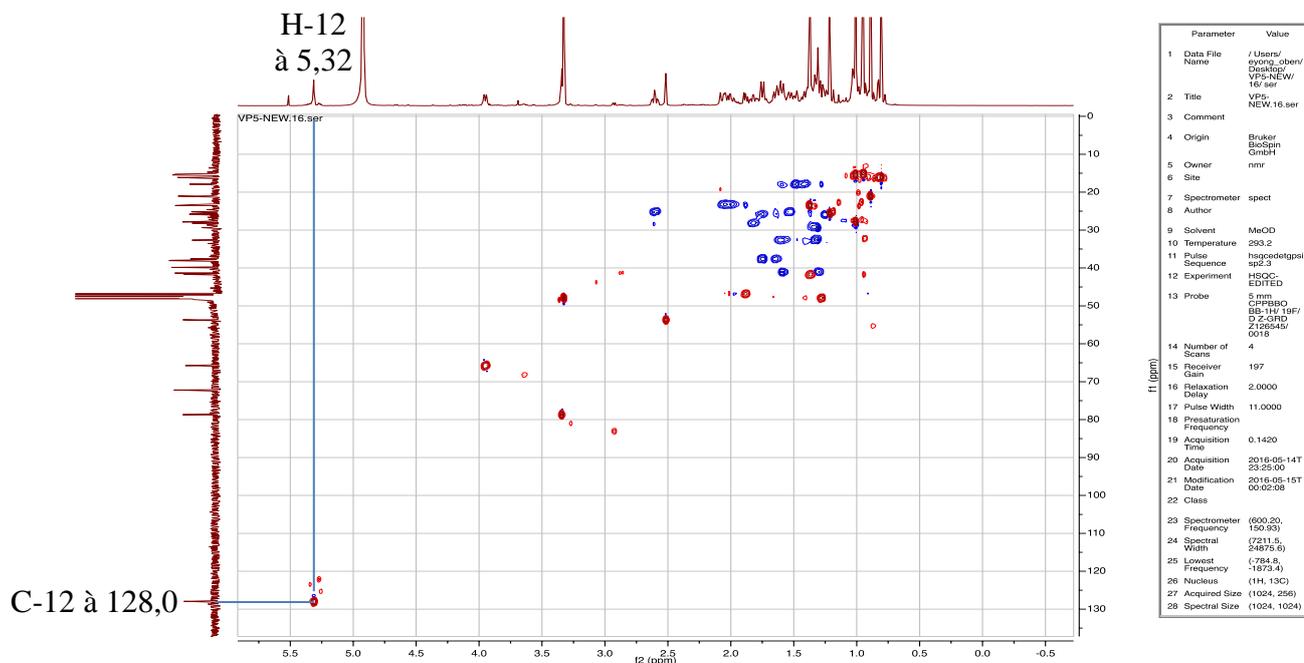


Figure 46 : Spectre HSQC du composé VP5.

Son spectre HMBC (figure 47) a permis d'assigner les corrélations entre H-12 (δ 5,32) avec C-11 (δ 23,3), C-14 (δ 41,3), C-9 (δ 46,8), C-18 (δ 53,7). On observe également sur spectre HMBC des corrélations entre H-16b (δ 2,62) avec C-15 (δ 28,2), C-17 (δ 47,91), C-18 (δ 53,7) et C-28 (δ 180,8).

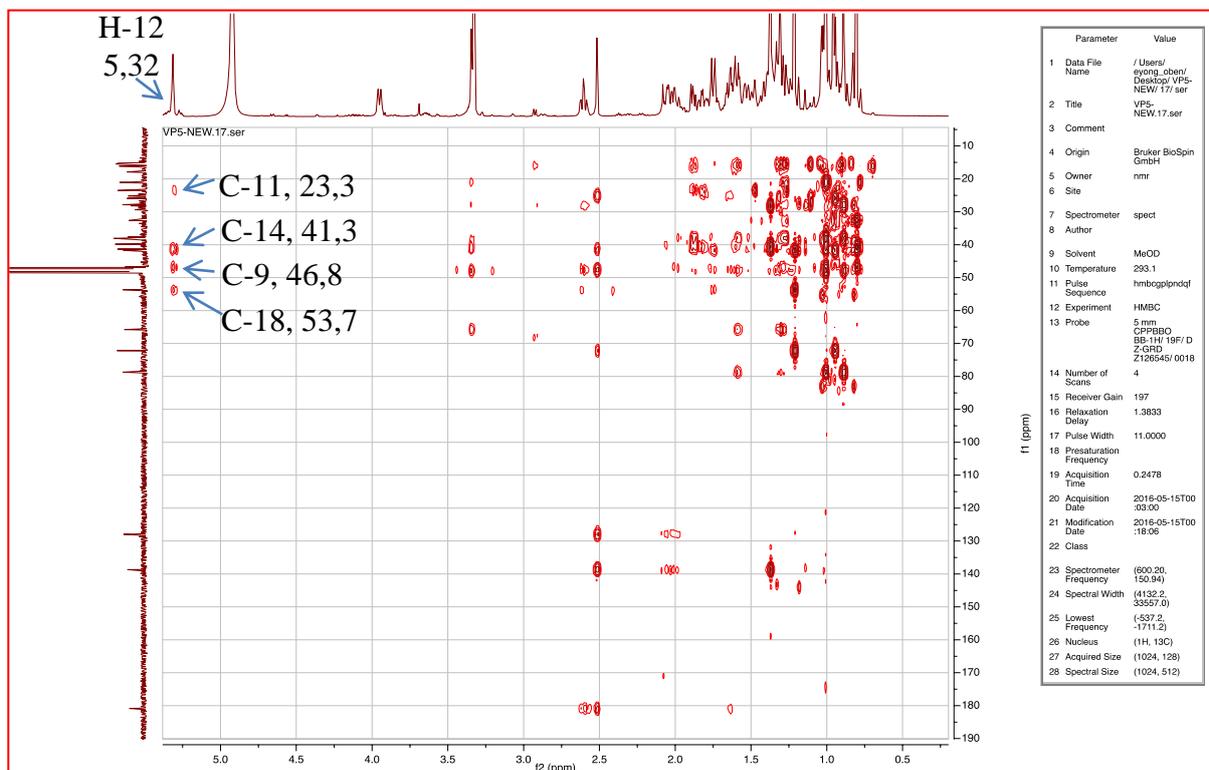


Figure 47 : Spectre HMBC du composé VP5.

Son spectre HSQC-TOCSY (Figure 48) présente des corrélations entre proton et carbone dans un même système de spin par transfert de polarisation comme les corrélations des noyaux A et B. Sur le noyau A, on observe des corrélations entre le proton H-2 (δ 3,95) et les carbones C-1 (δ 41,1), C-2 (δ 65,8) et C-3 (δ 78,7). Tandis que le noyau B présente des corrélations similaires entre H-7a (δ 1,65) et C-6 (δ 17,9), C-7 (δ 32,7) et C-5 (δ 48,7).

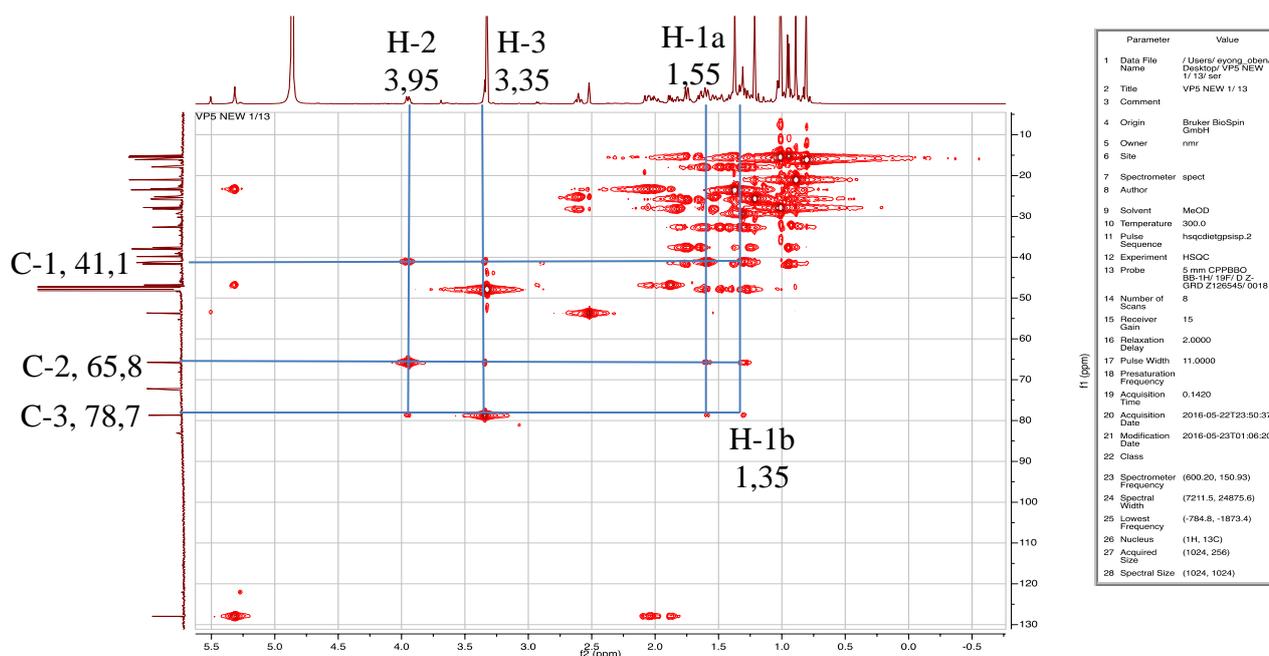


Figure 48 : Spectre HSQC-TOCSY du composé VP5.

Cependant, le spectre NOESY présente des corrélations entre H-18 (δ 2,52) avec H-27 (δ 1,21); H-2 (δ 3,95) avec H-3 (δ 3,35) et H-5 (δ 1,23) avec H-9 (δ 1,85) qui confirment la configuration relative des carbones C-2, C-3, C-5, C-9 et C-18 (figure 49).

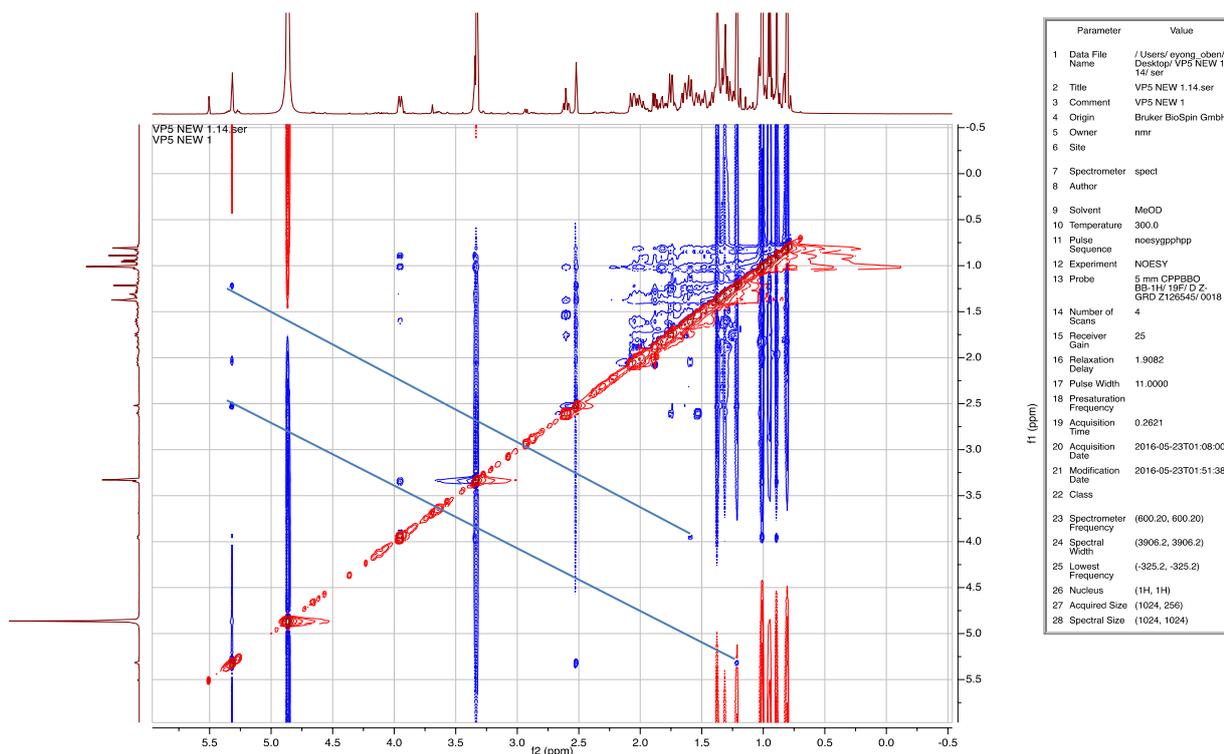


Figure 49 : Spectre NOESY de composé VP5.

L'ensemble de toutes ces données spectrales nous a permis d'identifier le composé VP5 à la structure **127** comme l'acide 2 β ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oïque pour la première fois, isolé et caractérisé entièrement.

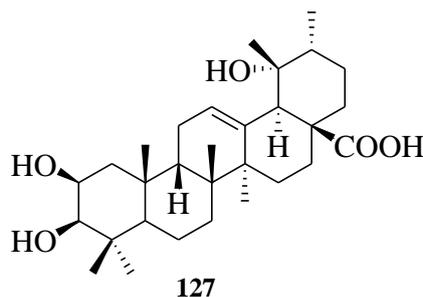


Schéma 34 : Structure du composé **127**.

II.2.1.4. Elucidation du composé VP11

Le composé VP11 cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (80-90 %). Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'Iode. Les analyses spectrales rigoureuses en comparaison avec les spectres proton, COSY et HSQC de composé VP11 permettent de lui attribuer la formule brute C₃₂H₅₀O₇ (calc. 535,3) renfermant huit degrés d'insaturation. Le

signal d'un singulet observé à 2,58 ppm sur le spectre du proton fait suggérer au groupe méthyle substitué à un carbonyle.

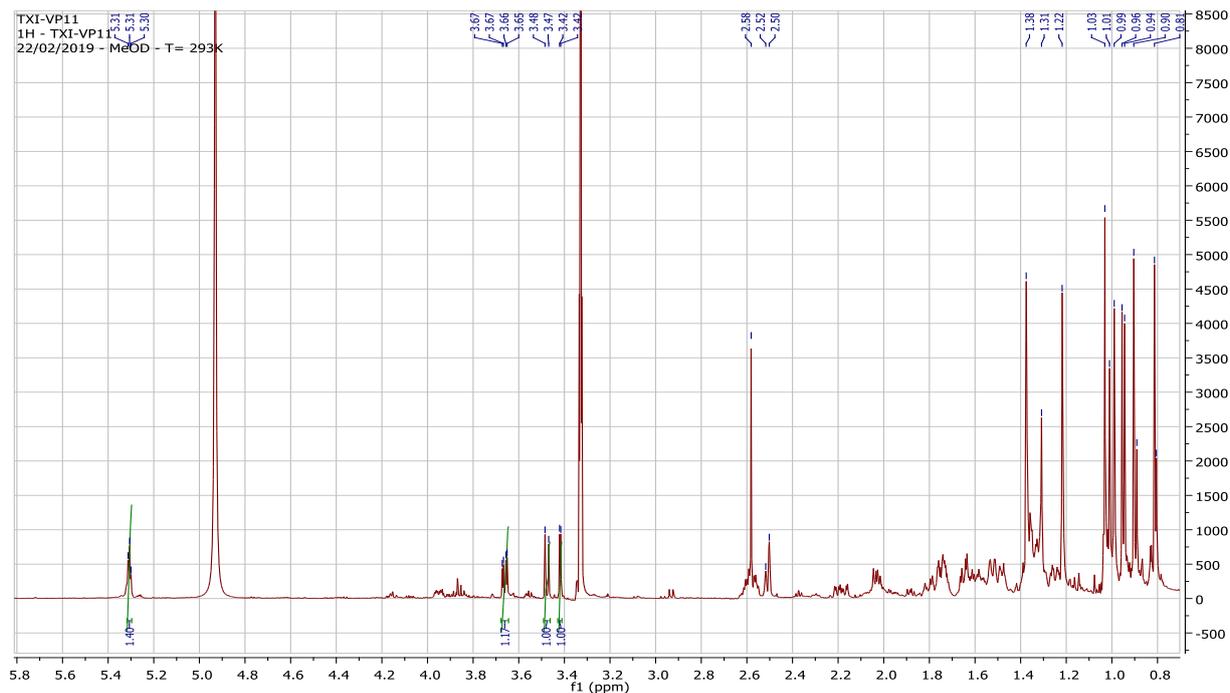


Figure 50 : Spectre proton du composé VP11.

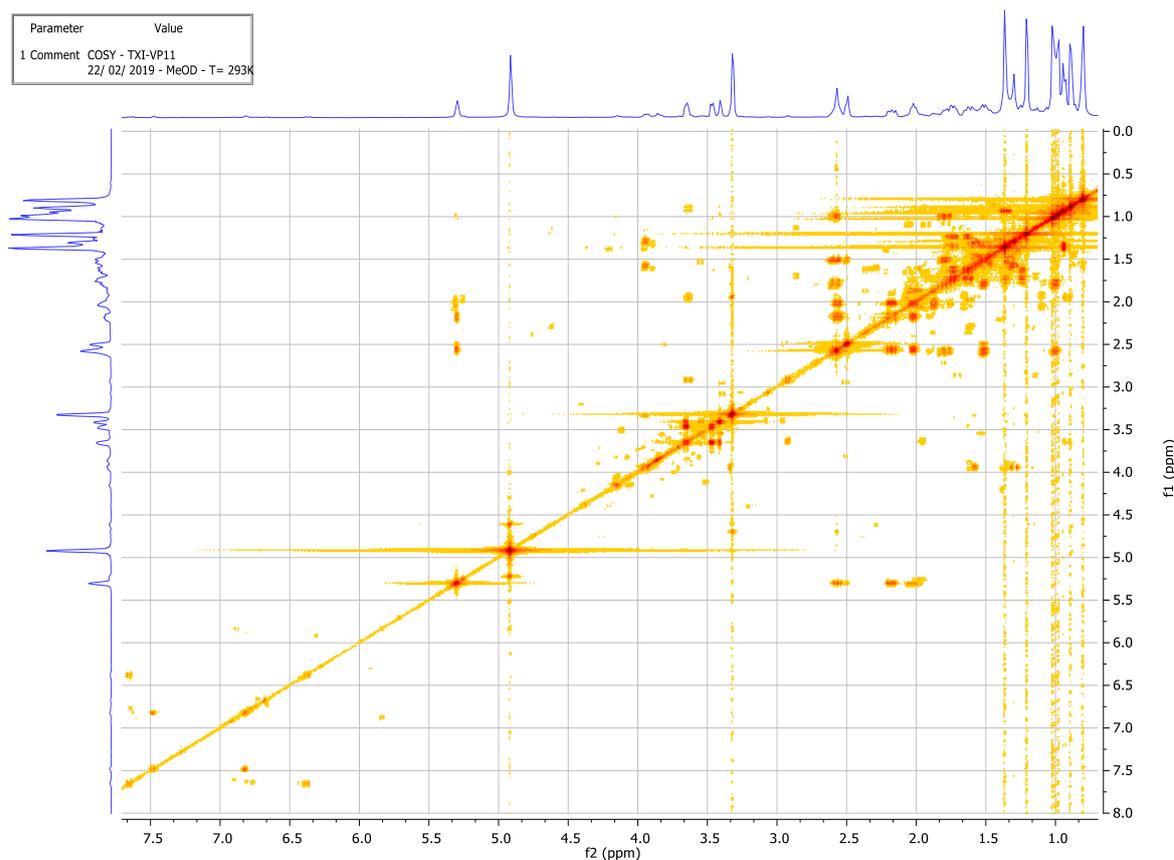


Figure 51 : Spectre COSY du composé VP11.

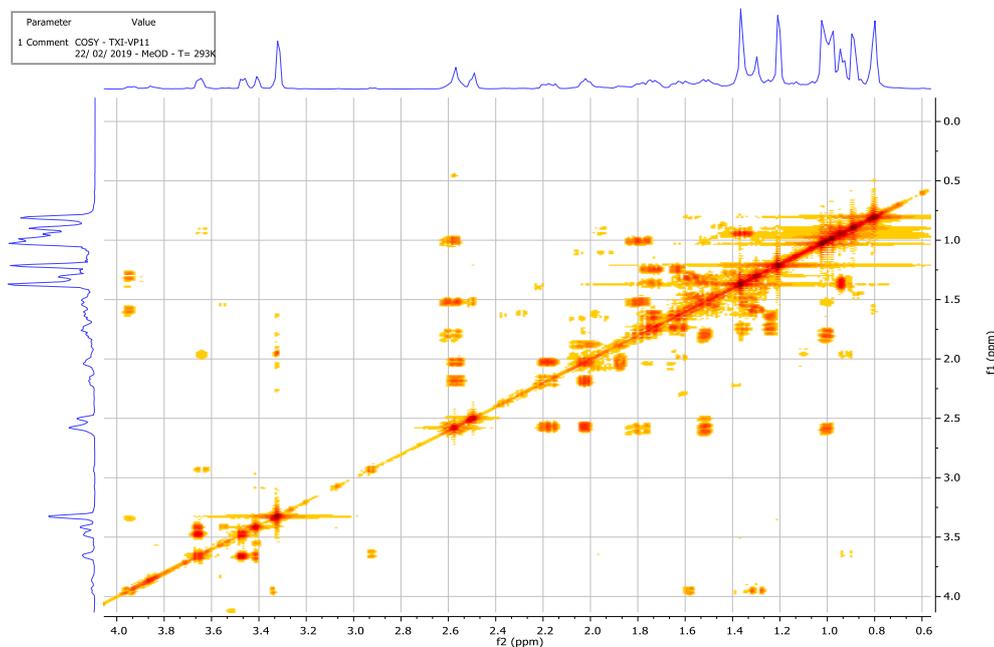


Figure 52 : Spectre COSY élargi du composé VP11.

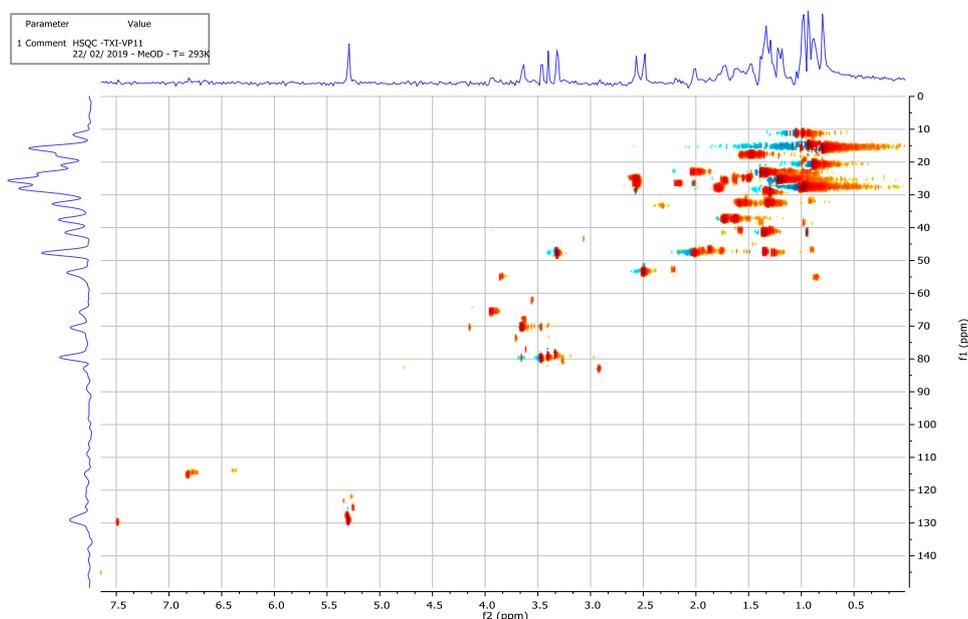


Figure 53 : Spectre HMQC du composé VP11.

Sur son spectre HMBC (figure 54 et tableau 12) présente des corrélations en J^{2-3} entre les protons et les carbones comme le proton H-12 à δ 5,25 et les carbones à δ 139,0 (C-13) ; 71,0 (C-19) ; 54,5 (C-18) ; 49,1 (C-9) ; 38,5 (C-14) et 28,0 (C-11). L'analyse complète des spectres en comparaison avec les données spectrales du composé permet d'attribuer le composé VP11 au dérivé de composé VP4, la structure **128** : acide 3 β -acétoxy-1 α ,2 β),19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oïque (Schéma 35).

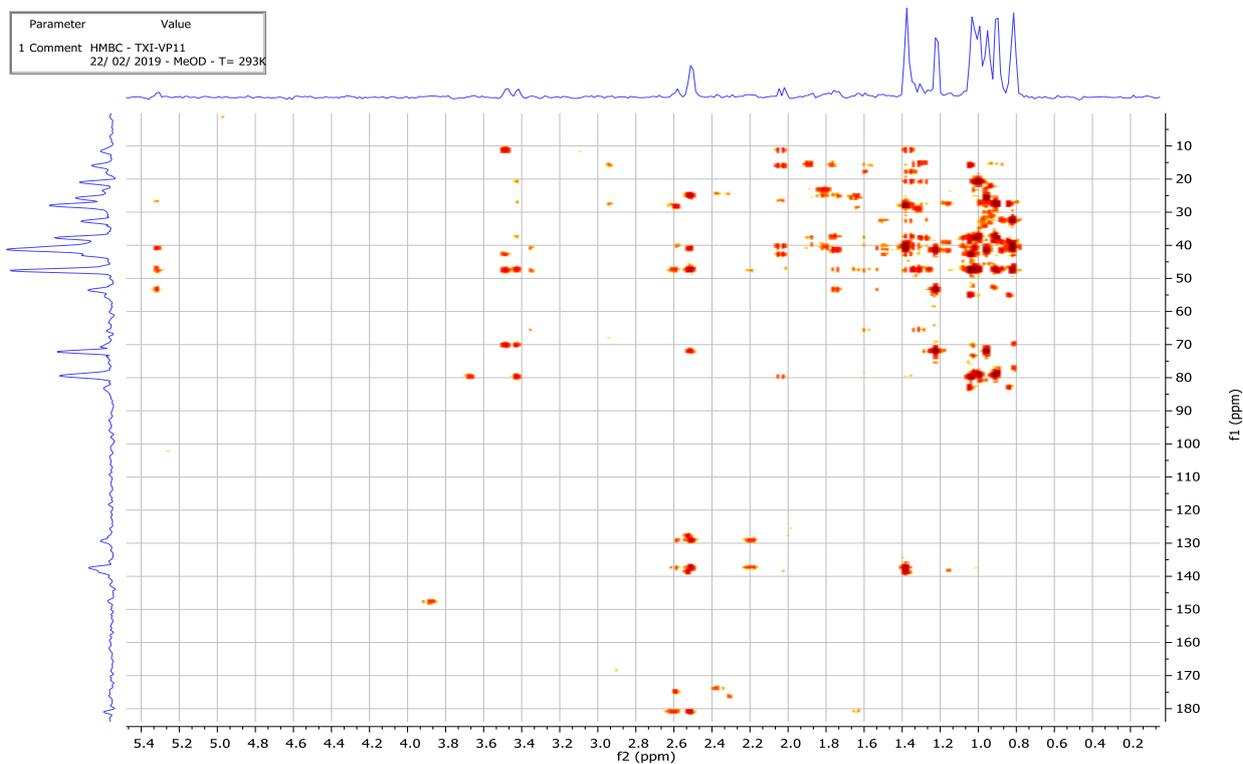


Figure 54 : Spectre HMBC du composé VP11.

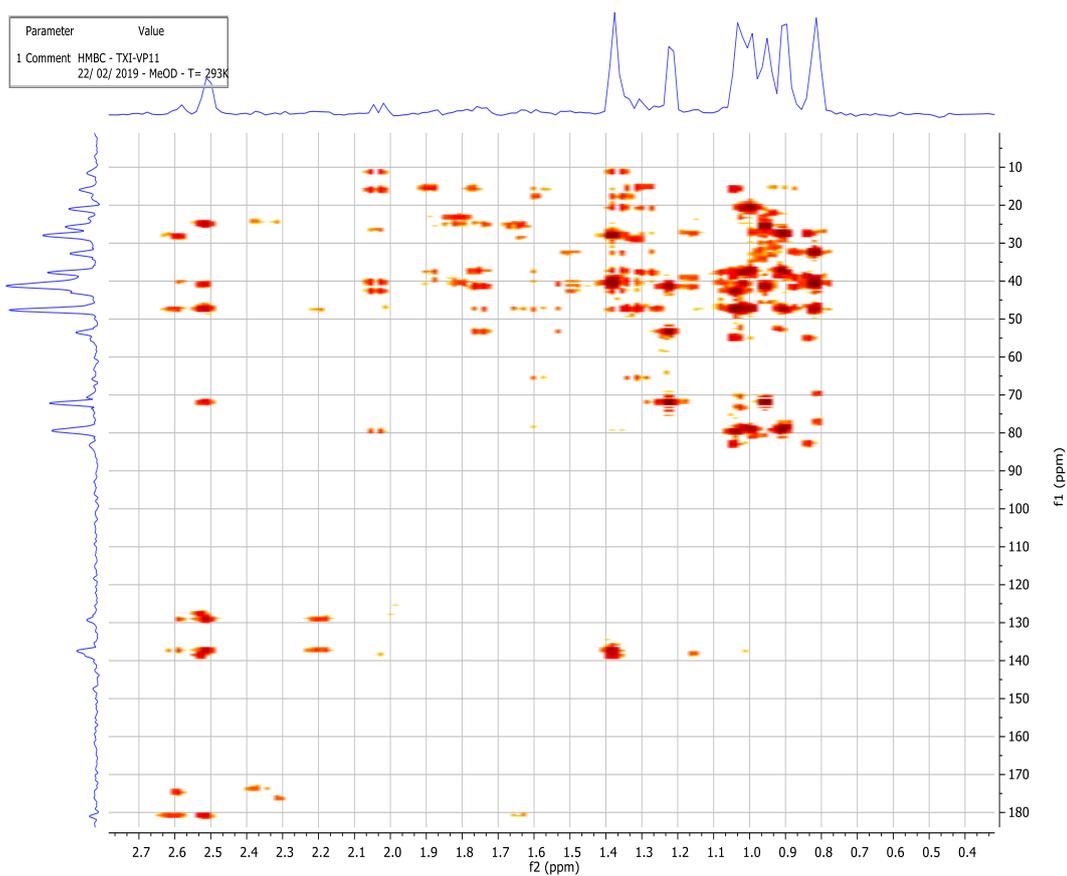


Figure 55 : Spectre HMBC élargi du composé VP11.

Tableau 12 : Données spectrales de **128**

Position	128 (CD ₃ OD, 600 et 150 Hz)			126
	δ_H (J en Hz)	δ_C	Corrélations HMBC	δ_C
1	3,42 (1H, d, 6,0)	70,0	80,0	81,4
2	3,66 (1H, dd, 6,0)	80,0	80,0 ; 70,0 ; 48,0	71,7
3	3,48 (1H, d, 6,0)	80,0	70,0 ; 48,0	80,9
4		48,0		42,5
5	1,54 (1H, m, 6,0 et 12,0 Hz)	48,2		49,1
6	1,40 (1H, m), 1,35 (1H, m)	17,6		19,6
7	1,50 (1H, m), 1,23 (1H, m)	33,2		34,3
8		39,9		41,8
9	1,80 (1H, m)	49,1		49,4
10		41,0		44,4
11	2,20 (1H, m), 1,39 (1H, m)	28,0	129,0 ; 139,0 ; 41	28,4
12	5,25 (1H, t)	129,0	28,0 ; 38,5 ; 49,1 ; 54,5 ; 71,0 ; 139,0	130,8
13		139,0		138,9
14		38,5		38,9
15	1,90 (1H, m), 1,04 (1H, m)	29,1		29,8
16	1,50 (1H, m), 2,59 (1H, m)	24,5	181,0 ; 139,0 ; 129,0 ; 71,0 ; 48,0 ; 41,0 ; 29,0	26,8
17		48,0		49,0
18	2,50 (1H, s)	54,5	181,0 ; 139,0 ; 129,0 ; 71,0 ; 48,0 ; 41,0 ; 25,0	55,1
19	1,65 (1H, br)	71,0		73,6
20	1,34 (1H, br)	41,0		43,2
21	1,45 (1H, m), 1,01 (1H, m)	25,0		27,5
22	1,03 (1H, m), 0,98 (1H, m)	41,0		39,2
23	1,22 (3H, s)	29,0		29,3
24	0,92 (3H, s)	21,0		22,5
25	1,03 (3H, s)	12,4		13,1
26	0,81 (3H, s)	15,0		17,8
27	1,38 (3H, s)	26,1		25,1
28		181,0		182,4
29	0,99 (3H, s)	25,0		27,2
30	0,95 (3H, d, 12)	15,1		16,8
1'		173,0		-
2'	2,58 (3H, s)	25,2		-

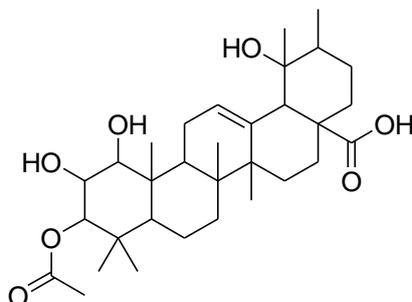


Schéma 35 : Structure du composé **128** (acide 3 β -acétoxy-1 α ,2 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oïque)

II.2.1.5. Elucidation du composé VP2

Le composé VP2 cristallise sous forme de cristaux blancs dans l'acétate d'éthyle (100 %). Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'Iode.

Son spectre RMN ^1H (figure 55) (CD_3OD , 600 MHz) donne des séries de protons à savoir :

- deux signaux δ_{H} 6,55 et 7,71 avec chacun une constante $J = 16,2$ Hz attribuable aux protons oléfiniques de couplage *Trans*.
- entre δ_{H} 6,42 et 7,63, cinq signaux caractéristiques de protons aromatiques qui font suggérer la présence d'un noyau benzénique au sein de la structure.
- à δ_{H} 5,19 un triplet d'un proton attribuable à un proton oléfinique (H-12) des triterpènes.
- à δ_{H} 4,45 un amas des signaux d'un proton attribuable à un proton H-3 des triterpènes.
- à δ_{H} 3,67 un doublet également un proton attribuable à un groupement méthine lié à un hétéroatome (H-11).
- entre δ_{H} 0,85 et 1,18, on observe sept signaux caractéristiques de protons de méthyles dans la région des champs forts.

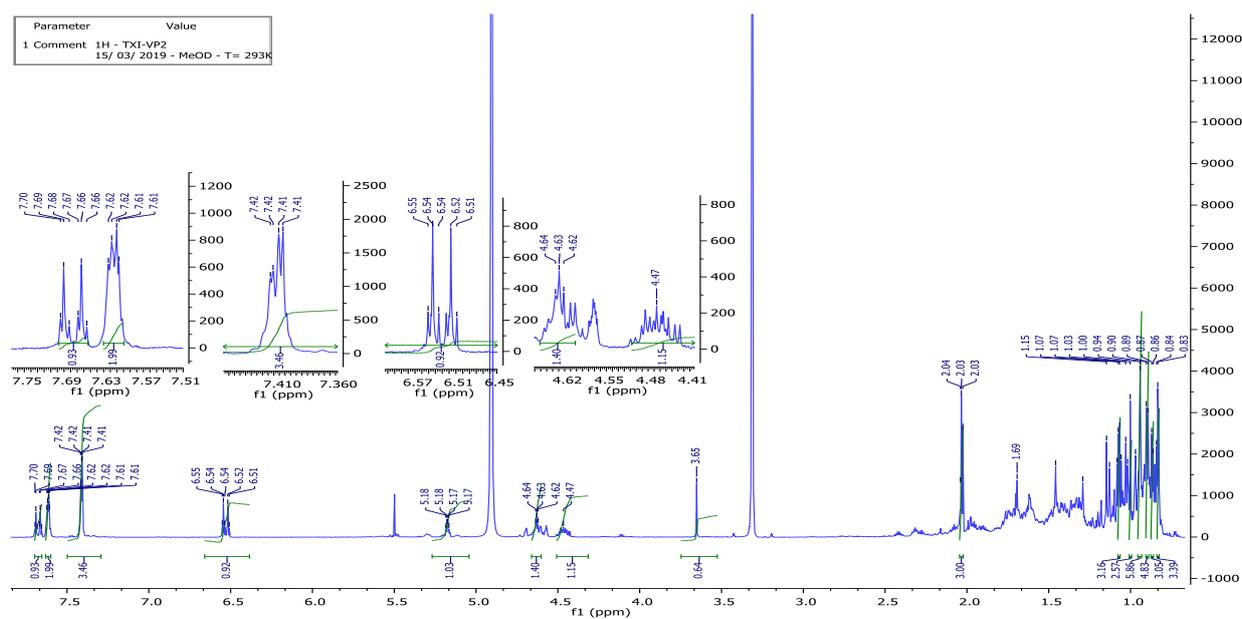


Figure 56 : Spectre RMN proton du composé VP2.

L'analyse de son spectre COSY (figure 57) montre les différentes corrélations :

- entre le proton H-3 (δ 4,45, br) et H-1, H-2 (δ 1,54, 1,52, m).
- on peut également observer les différentes corrélations entre les protons aromatiques (δ 6,42 à 7,63).
- une corrélation entre les protons H-7' (δ 7,71, t, 12,0 Hz) et H-8' (δ 6,55, dt, 12,0 Hz). Cette analyse suppose qu'une double liaison est liée au noyau benzénique.
- une corrélation entre le proton H-29 (δ 1,18) et le proton méthylique H-30 est une caractéristique directe de triterpène de type ursane.

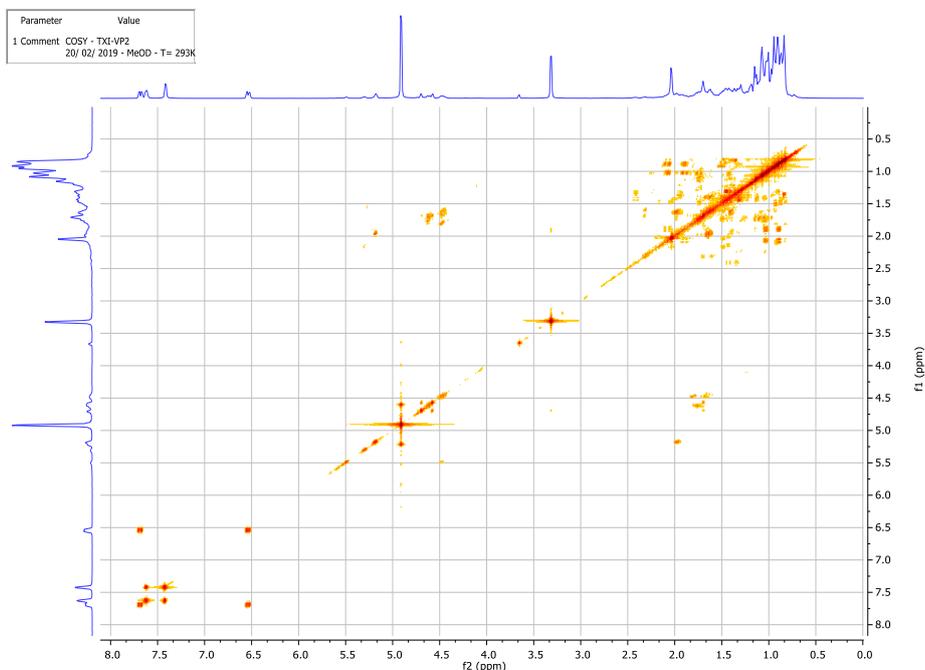


Figure 57 : Spectre COSY du composé VP2.

Son spectre HSQC (Figure 58) présente les corrélations peu similaires comme le composé VP5. Mais on constate les corrélations supplémentaires J^I , ^{13}C - ^1H entre carbone et proton :

- les protons (H-2', H-6') à 7,63 ppm et les carbones (C-2', C-6') à 128,3 ppm.
- le proton (H-3', H-5') à 7,42 ppm et les carbones (C-3', C-5') à 130,0 ppm.
- le proton (H-4') à 7,43 ppm et le carbone (C-4') à 128,9 ppm.

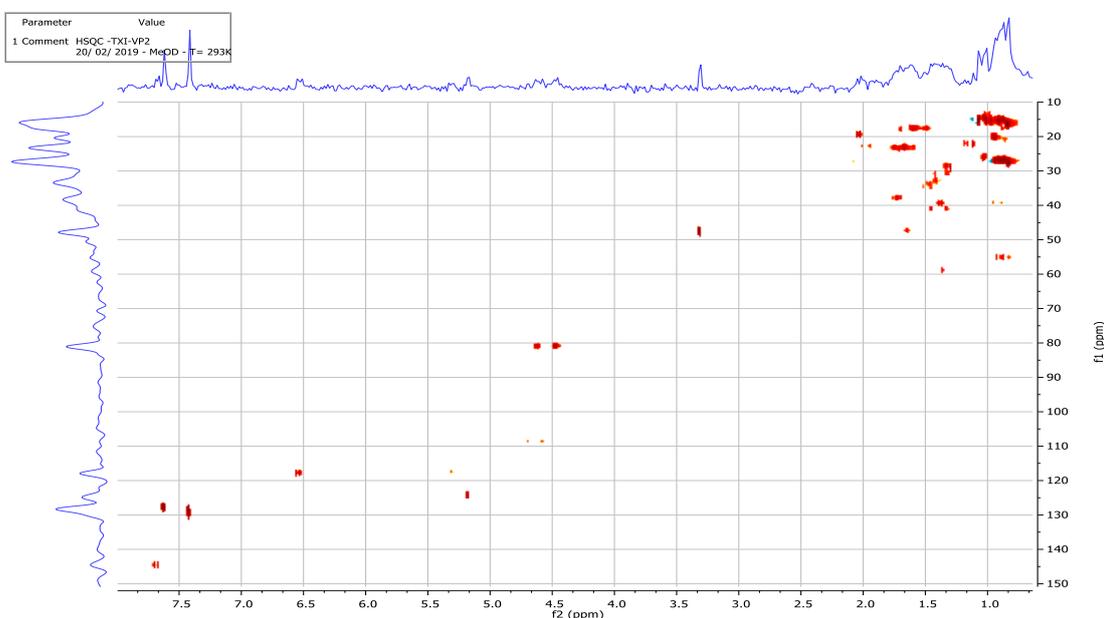


Figure 58 : Spectre HSQC du composé VP2.

Le spectre HMBC (figure 59) a permis d'assigner et de confirmer la position de la double liaison sur le noyau benzénique, les corrélations entre H-7' (δ 7,71) avec C-2', C-6' (δ 128,3) et C-9' (δ 166,8) ; H-8' (δ 6,55) avec C-1' (δ 134,5).

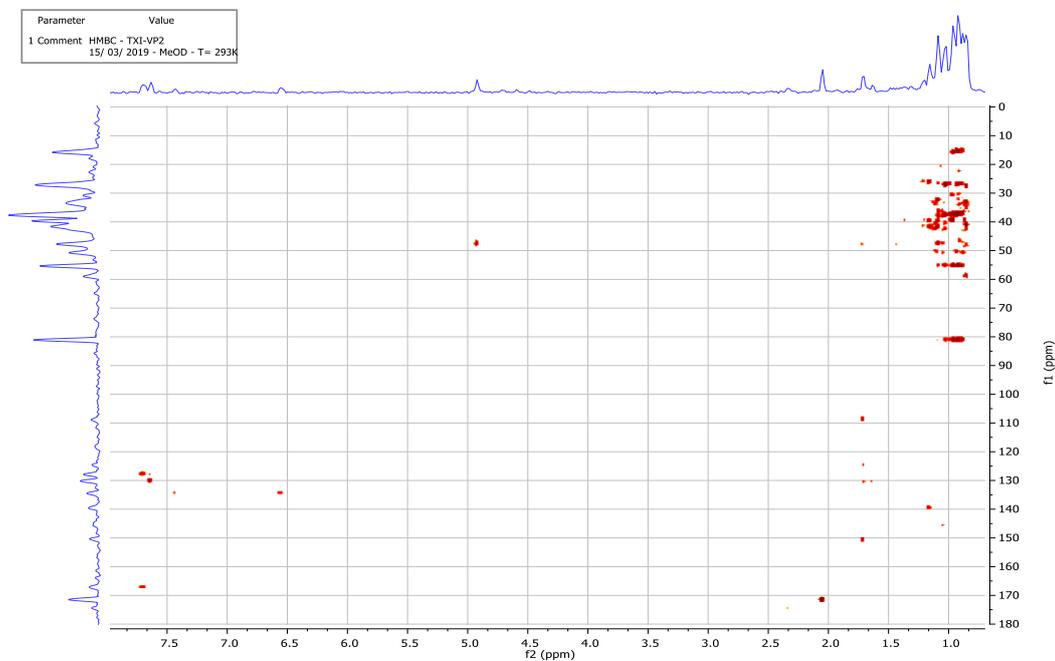


Figure 59 : Spectre HMBC du composé VP2.

L'analyse rigoureuse des données spectrales comparées à la littérature permet d'assigner au composé VP2, la structure chimique relative **129** (ester 3 β -(cinnamoyloxy)-11-méthoxy-urs-11,12-enoate d'éthyle) suivante.

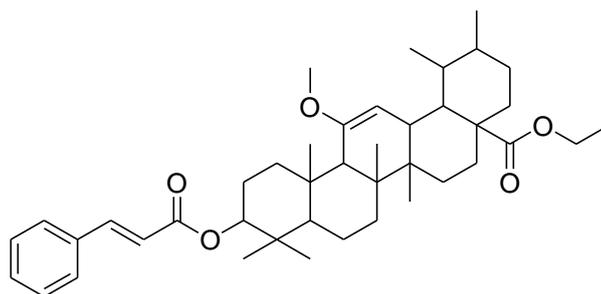


Schéma 36 : Structure chimique du composé **129**.

Tableau 13 : Récapitulatif des données spectrales VP2

Position	VP2 129 (CD ₃ OD, 600 Hz)		
	δ_H (J en Hz)	δ_C	Corrélations HMBC
Partie triterpénique (Ursane)			
1	1,54 (1H, m), 1,52 (1H, m)	48,2	
2	1,54 (1H, m), 1,52 (1H, m)	24,8	
3	4,45 (1H, br)	81,4	47,8 ; 19,0
4		47,8	
5	1,54 (1H, m, 6,0 et 12,0 Hz)	48,2	
6	1,40 (1H, m), 1,35 (1H, m)	17,6	
7	1,61 (1H, m) 1,33 (1H, m)	34,6	
8		39,9	
9	1,80 (1H, m)	49,1	
10		37,8	
11		149,5	
12	5,19 (1H, m)	128,3	
13	3,67 (1H, d)	49,9	128,3 ; 149,5
14		47,8	
15	1,9 (1H, m), 1,04 (1H, m)	27,1	
16		40,5	
17		48,4	
18	2,02 (1H, br s)	51,0	15,0 ; 40,5 ; 48,4 ; 128,3 ; 171,0
19	1,65 (1H, br)	39,0	
20	1,34 (1H, br)	38,0	
21	1,45 (1H, m), 1,01 (1H, m)	28,0	
22	1,03 (1H, m), 0,98 (1H, m)	32,5	
23	1,18 (3H, s)	26,6	
24	0,95 (3H, s)	21,0	
25	1,01 (3H, s)	16,1	
26	0,85 (3H, s)	16,1	
27	1,09 (3H, s)	26,1	
28		171,0	
29	1,08 (3H, d)	15,0	
30	0,92 (3H, d, 12,0 Hz)	15,1	
Partie cinnamique			
1'		134,5	
2'	7,63 (1H, br)	128,3	
3'	7,42 (1H, br)	130,0	
4'	7,43 (1H, br)	128,9	
5'	7,42 (1H, br)	130,0	
6'	7,63 (1H, br)	128,3	
7'	7,71 (1H, t, $J=16,2$ Hz)	145,0	128,0 ; 166,8
8'	6,55 (1H, dt, 16,2 Hz)	118,9	134,5
9'		166,8	
Partie acétylique			
1''	4,45 (1H, br), 4,47 (1H, br)	81,4	
2''	1,80 (1H, m), 1,65 (1H, m), 1,64 (1H, m)	19,5	

II.2.2. Les composés polyphénoliques

II.2.2.1. Caractérisation structurale du composé VP5-1

Le composé VP5-1 précipite sous forme de cristaux jaunes dans le mélange hexane-acétate d'éthyle (1 : 1) et fond entre 212-214°C. Il est soluble dans le MeOH et visible à l'UV ($\lambda = 254$ et 366 nm). Il répond positivement au test caractéristique des flavonoïdes. Son spectre de masse exploité (Figure 60) donne un pic pseudo moléculaire $[M-H]^+$, m/z à 291,09.

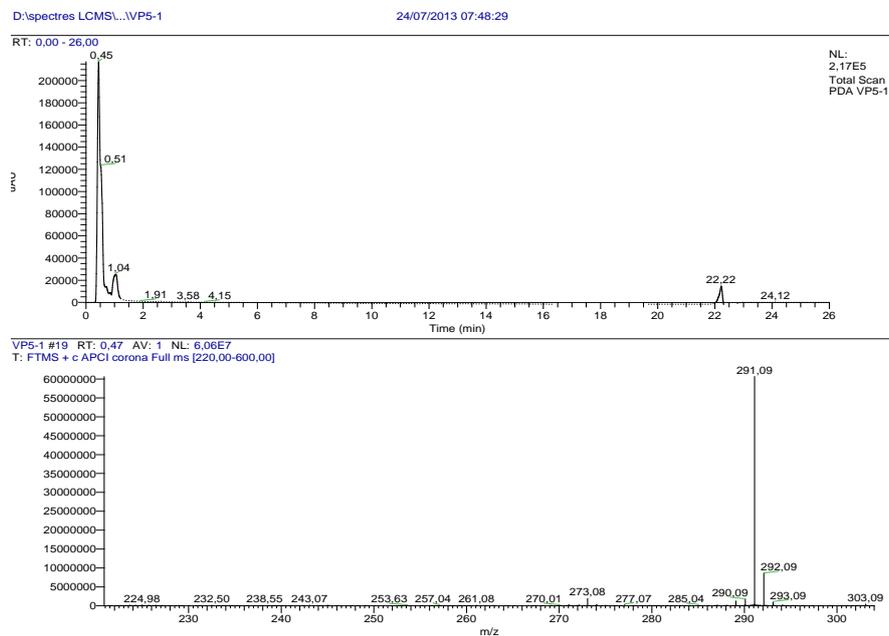


Figure 60 : Spectre de masse (APCI) du composé VP5-1

Sur son spectre RMN¹H et élargi (CD₃OD, 500 MHz) respectivement figures 61 et 62, on observe 9 séries de protons à savoir comme entre δ 2,73 (H-4a, dd) et δ 2,81 (H-4b, dd), dans la région des champs forts, des protons caractéristiques de deux protons aliphatiques sp^3 liés à un carbone déblindé (C-4). Ensuite à δ 4,79 et δ 4,15 un triplet des protons H-3 et H-2 liés au groupement méthine des flavonoïdes. Et nous remarquons respectivement à δ 5,88 (2H, m), 6,95 (2H, m) et 6,99 (1H, s) qui correspondent aux signaux des protons d'un système benzénique.

L'analyse de ces données spectrales avec cinq protons aromatiques nous suggèrent la présence des noyaux aromatiques.

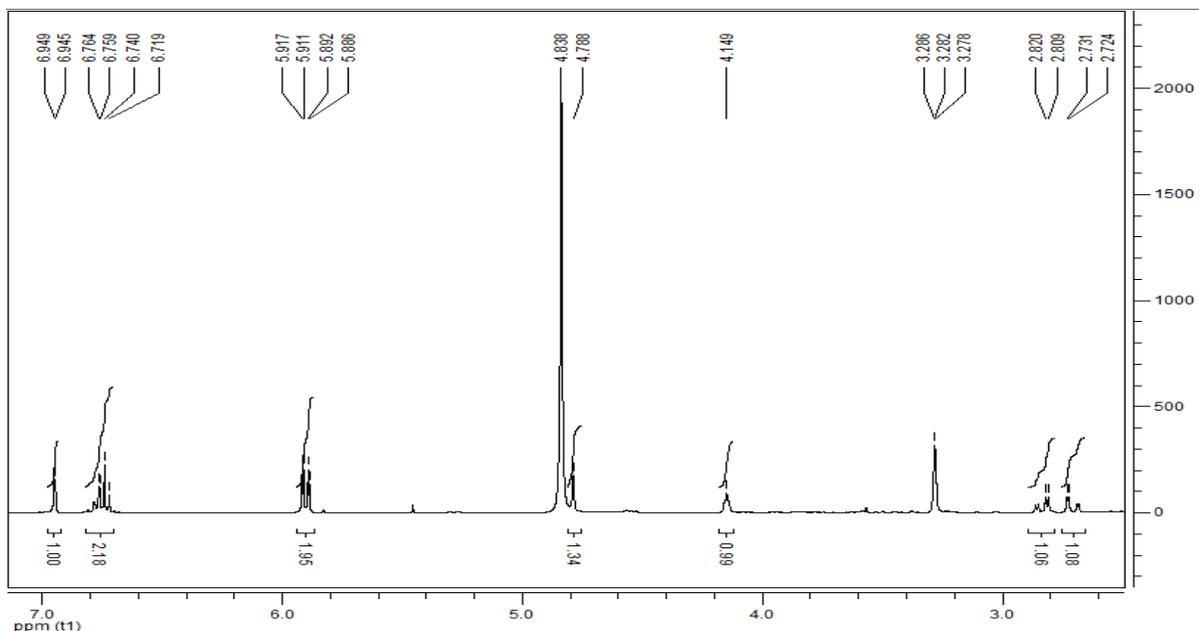


Figure 61 Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500MHz) du composé VP5-1.

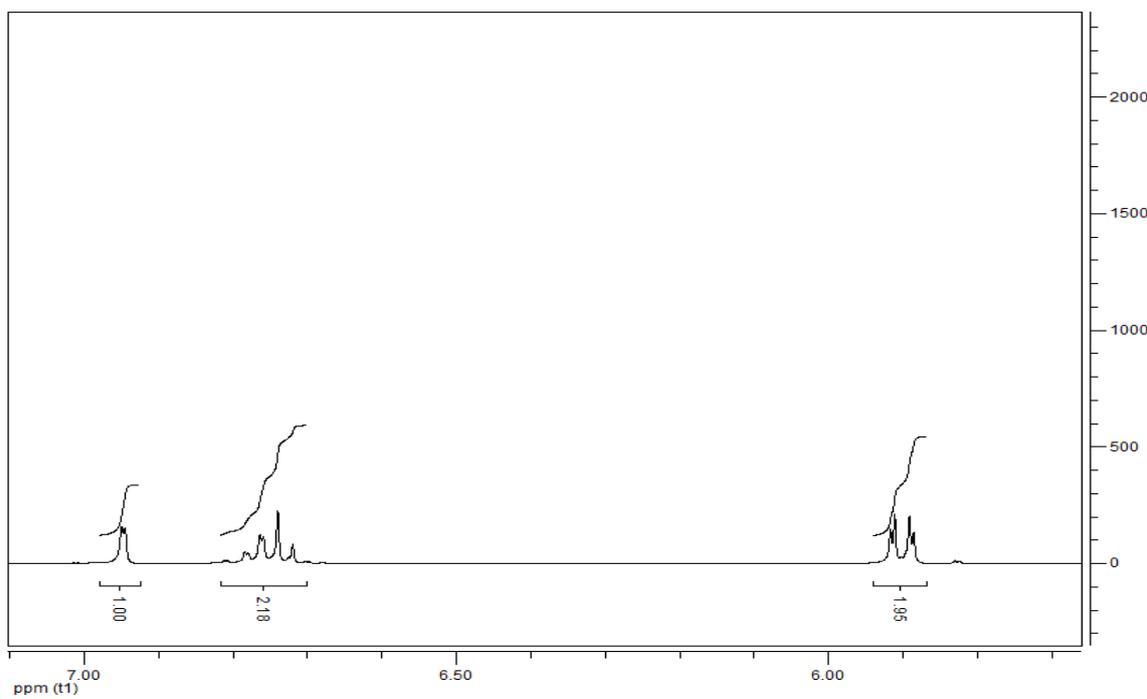


Figure 62 : Spectre RMN ^1H élargi (CD_3OD , 500 MHz) du composé VP5-1.

Son spectre de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) (figure 63) montre quinze atomes de carbones ^{13}C à δ 27,8 ; 65,9 ; 78,4 ; 94,4 ; 94,9 ; 98,6 ; 113,8 ; 114,4 ; 117,9 ; 130,8 ; 144,3 ; 144,4 ; 155,9 ; 156,2 et 156,5.

L'analyse spectrale du carbone montre 12 carbones sp^2 entre δ 94,0 et 156,0 attribuables aux deux noyaux aromatiques A et B caractéristiques principales d'un squelette de type $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ des flavonoïdes.

Deux signaux de carbones à δ 65,9 (C-3) et 78,4 (C-2) confirment la présence de deux carbones sp^3 liés au groupement hydroxyle.

La présence d'un seul carbone aliphatique à δ 27,8 (C-4) au sein de notre molécule nous suggère que les deux protons à δ 2,73 et 2,81, sont portés par ce même carbone. Ils sont de nature diastéréotopique (un CH_2 lié au moins à un centre asymétrique).

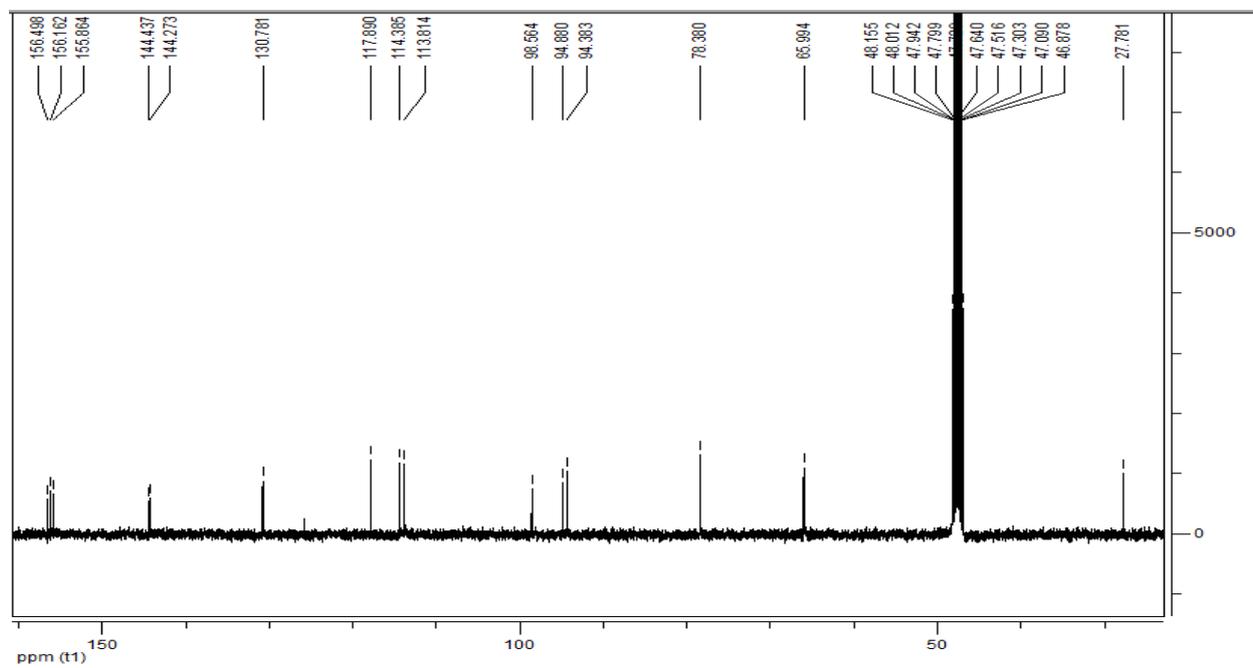


Figure 63 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) du composé VP5-1.

L'interprétation de spectres de 1H et ^{13}C corroborés avec son spectre de masse à haute résolution nous permet d'attribuer une formule brute correspond à $C_{15}H_{14}O_6$ renfermant neuf degrés d'insaturation.

Son spectre COSY (Figure 64) montre les différentes corrélations entre H-2 (δ 4,79, m) et H-3 (δ 4,15, d) déblindés. Le proton déblindé à δ 4,15 (H-3) et deux protons de méthylène de nature diastéréotopique à δ 2,81 (H-4a) et δ 2,73 (H-4b), confirment les caractéristiques du noyau C des flavonoïdes.

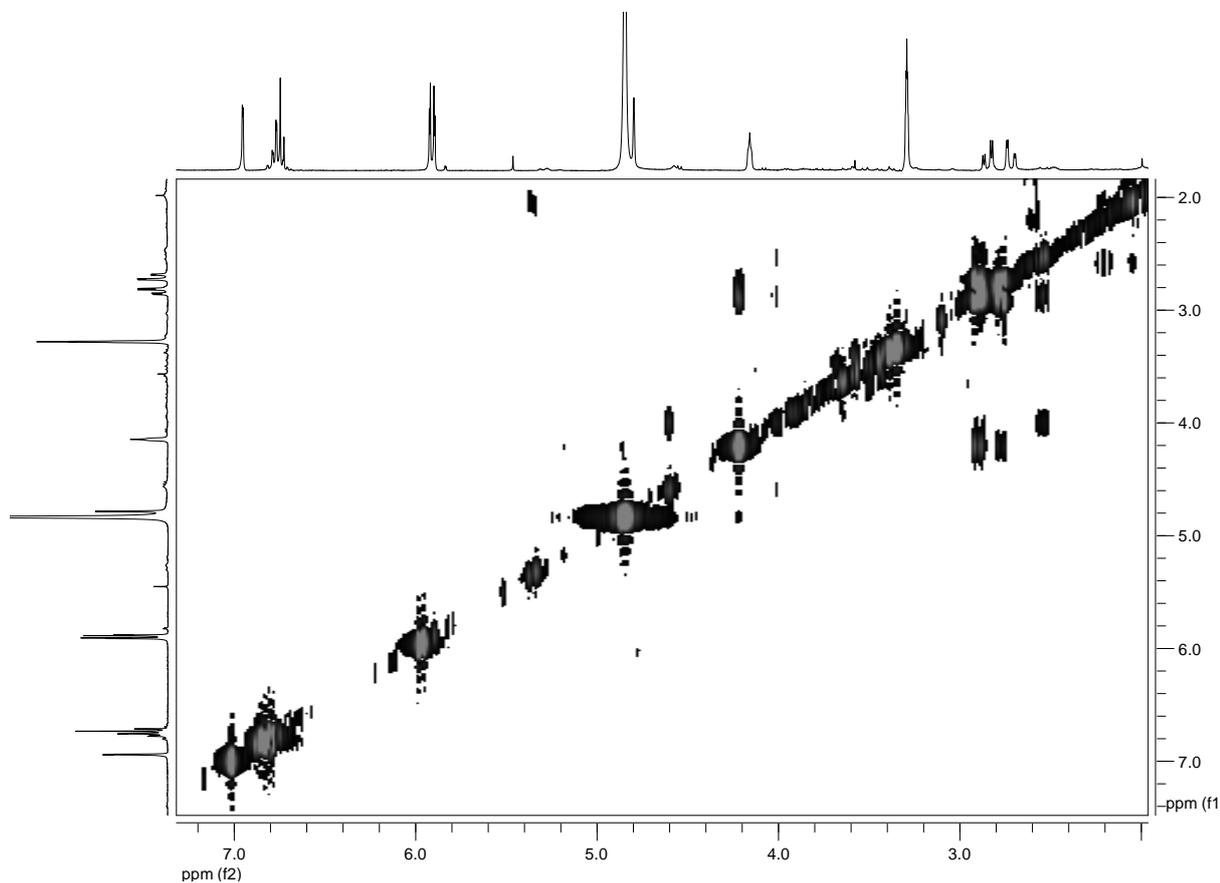


Figure 64 : Spectre COSY du composé VP5-1.

Le spectre HSQC (Figure 65) montre les corrélations J^I ^{13}C - ^1H . Sur ce spectre se présentent des corrélations entre les protons à δ 2,81 (H-4a) et à δ 2,73 et le carbone à δ 27,8 ; le proton à δ 4,15 (H-3) et le carbone (C-3) à δ 65,9 ; le proton (H-2) à δ 4,79 ppm et le carbone (C-2) à δ 78,4 ; les protons à δ 5,88 et 5,91 et les carbones à δ 94,4 et 94,9 respectivement et également ceux des protons à δ 6,75 ; 6,82 ; 6,95 et les carbones respectivement à δ 114,4 ; 117,9 ; 113,8.

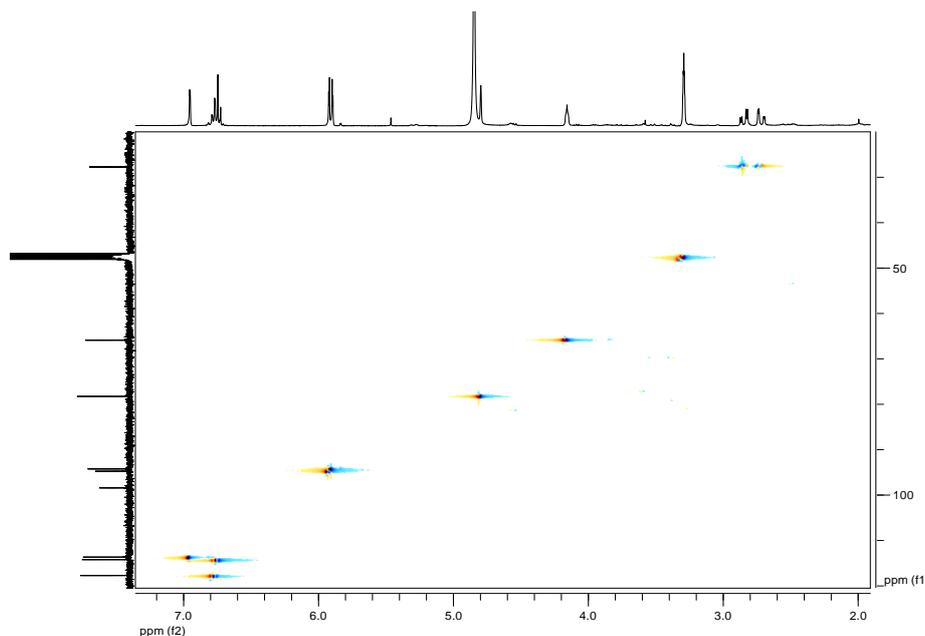


Figure 65 : Spectre HSQC du composé VP5-1.

L'ensemble de toutes ces données spectrales nous permet d'identifier le composé VP5-1 à la structure **23** comme le 3,4-dihydro-2-(3',5'-dihydroxyphenyl)-2-chromène-3,5,7-triol ou épicatechine.

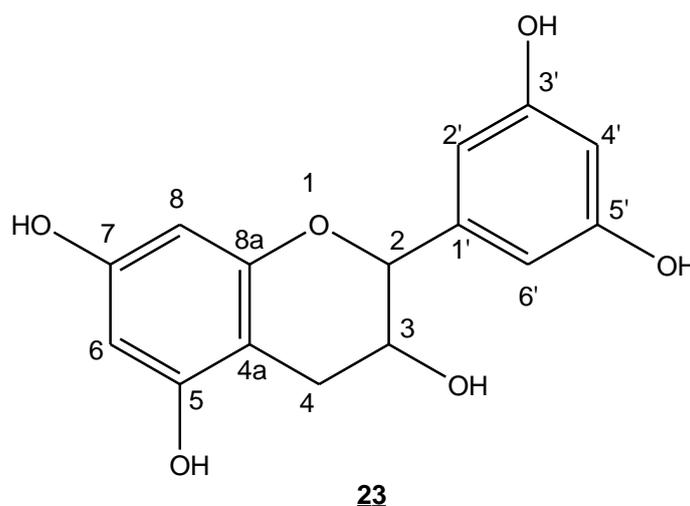


Schéma 37 : Structure du composé **23**.

II.2.2.2. Caractérisation structurale du composé VP7

Le composé VP7 a été obtenu sous forme de cristaux jaunâtres dans le mélange Hexane/AcOEt (1 : 9) et fond entre 196-198°C. Il est soluble dans le méthanol et visible à l'UV ($\lambda = 254$ et 366 nm). Il répond positivement au test caractéristique des flavonoïdes.

Son spectre de masse (figure 66) présente en mode positif et à haute résolution, le pic de l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 291,09 correspondant à la formule brute $C_{15}H_{14}O_6$ renfermant neuf insaturations.

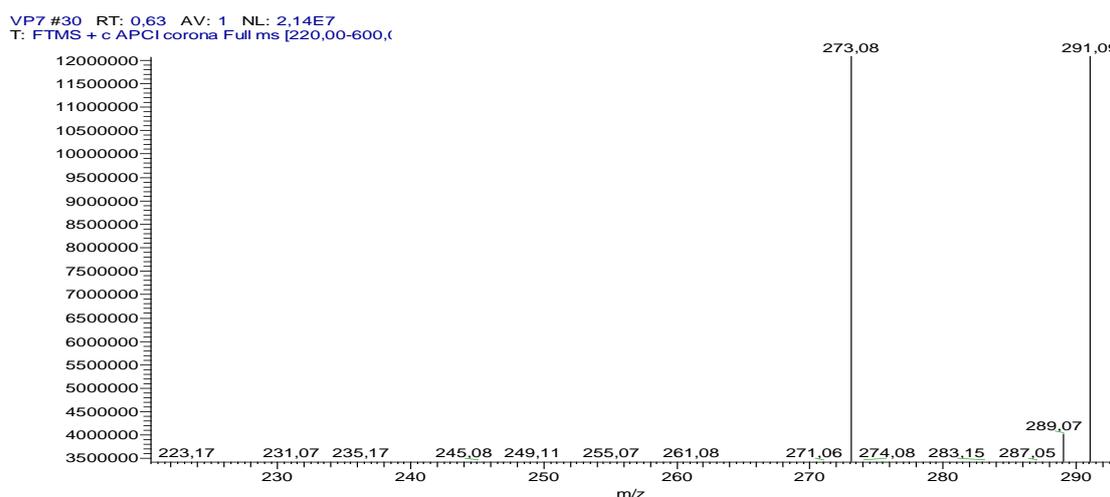


Figure 66 : Spectre de masse (APCI) du composé VP7.

Son spectre RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz, figure 67) présente des signaux constitués d'un ensemble des protons aromatiques entre δ 7,25 et 5,93. Ensuite, un singulet à δ 5,46 et un triplet d'un proton à δ

4,64 caractéristique d'un méthine lié à un atome d'oxygène et enfin, un multiplet de deux protons à δ 2,79, caractéristiques des protons méthyléniques.

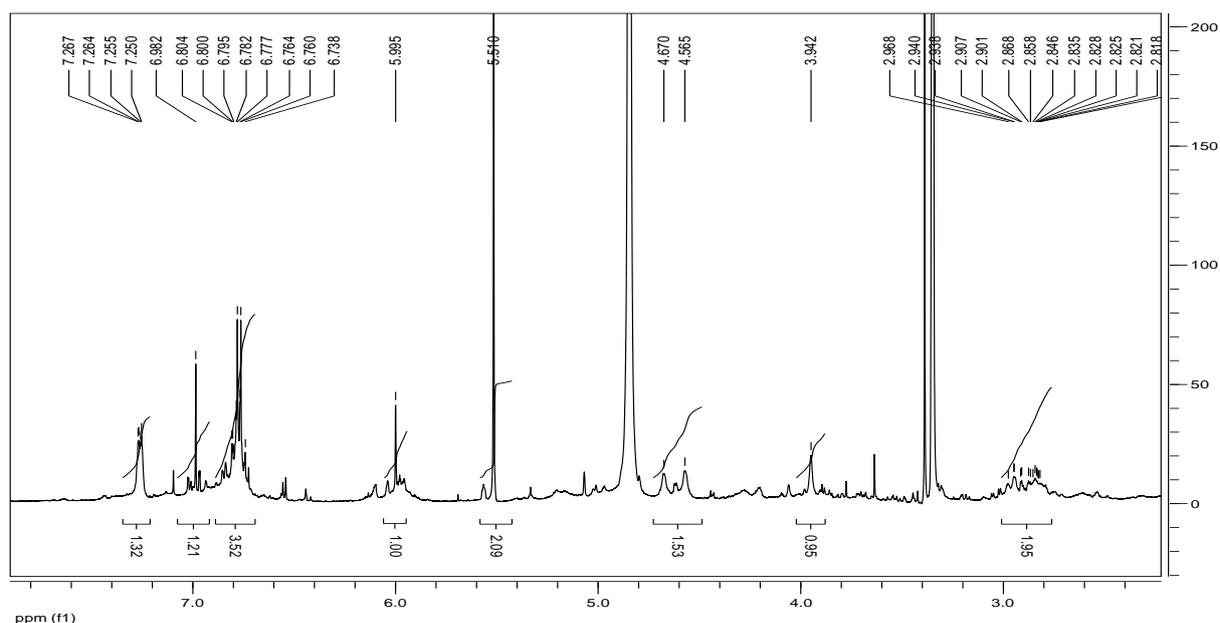


Figure 67 : Spectre RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) du composé VP7.

Sur son spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 125MHz, Figure 68), on observe 15 signaux correspondant aux carbones au sein de la molécule **23**, à savoir des signaux des carbones à δ : 156,3 ; 144,8 ; 144,1 ; 127,7 ; 127,6 ; 114,4 ; 114,3 ; 114,2 ; 113,8 ; 98,9 ; 75,7 ; 72,0 ; 53,3 et 35,7. L'analyse rigoureuse de ces signaux révèle la présence des signaux de dix carbones aromatiques entre δ 156,3 et 98,9 parmi lesquels, les carbones à δ 156,3 ; 144,8 et 144,1 sont des carbones oxygénés ; deux signaux de carbones sp^3 oxygénés à δ 75,7 et 72,0 ; un signal de carbone caractéristique d'un carbone méthine aliphatique à δ 55,3 et également un pic de carbone à δ 35,7 observé et attribuable au carbone méthylène C-4, aliphatique, porteur de deux protons de nature diastéréotopique.

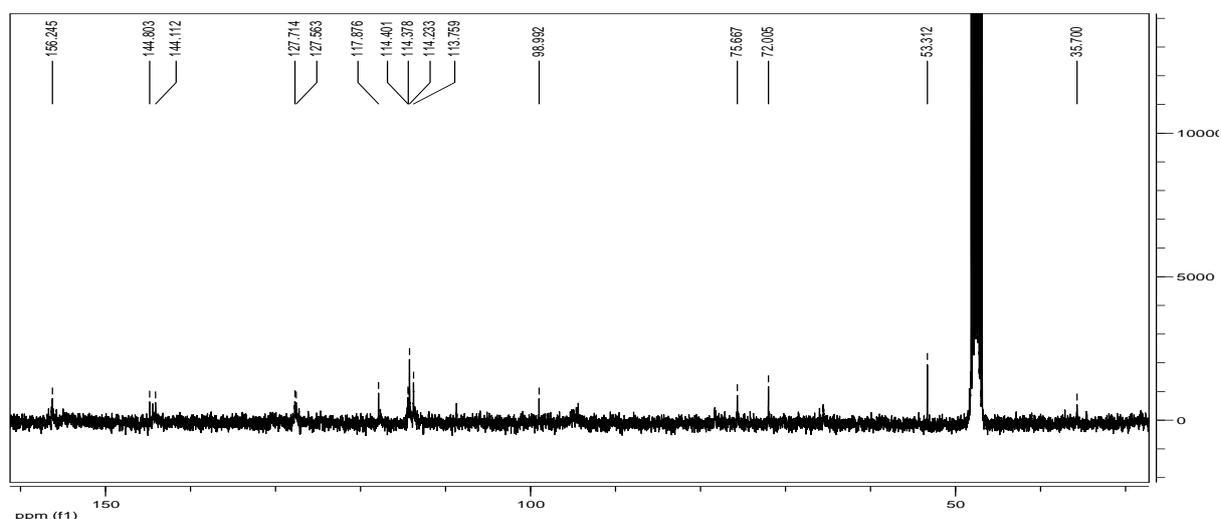


Figure 68 : Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) du composé VP7.

Son spectre COSY (Figure 69) montre les corrélations ^1H - ^1H comme la corrélation entre les protons à δ 7,26 (H-2') et 6,76 (H-3') avec une constante de couplage 8,6 Hz caractéristique des couplages *ortho* du noyau B des flavonoïdes.

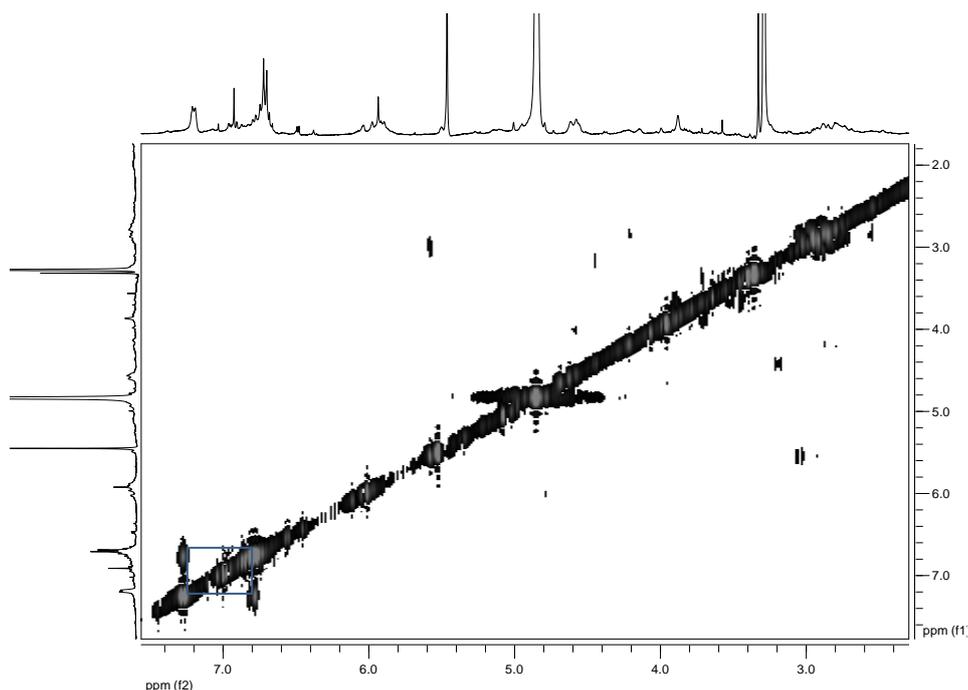


Figure 69 : Spectre COSY du composé VP7.

Ces indications ont trait à une structure apparentée des flavonoïdes. Ces données comparées avec celles du composé VP5-1 (**23**), le composé VP7 diffère de celui de VP5-1 (**23**) par les positions des hydroxyles sur le cycle B. Par conséquent la structure **22** a été attribuée au composé VP7 comme 3,4-dihydro-2-(3',4'-dihydroxyphényl)-2-chromène-3,5,7-triol ou catéchine (Lewis *et al.*, 1999).

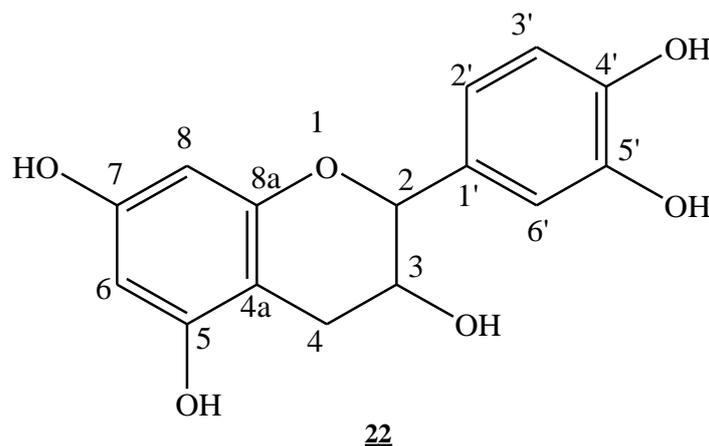


Schéma 38 : Structure du composé **22**.

II.2.2.3. Identification du composé VP17

Le composé **1** VP17 a été obtenu sous forme de cristaux jaunâtres dans l'acétate d'éthyle pur. Il est soluble dans le méthanol et visible à l'UV ($\lambda = 254$ et 366 nm). Il répond positivement au test caractéristique des flavonoïdes.

Son spectre RMN¹H (CD₃OD, 600 MHz, figure 70), on observe des séries de protons à savoir entre δ 4,98 (H-2, d, 12,0 Hz) et δ 4,55 (H-3, d, 12,0 Hz). Et nous pouvons également remarquer entre δ 5,88 et 7,36, six signaux correspondant aux protons d'un système benzénique.

L'analyse de ces données spectrales avec six protons aromatiques nous suggèrent la présence de deux noyaux aromatiques dans la structure à élucider.

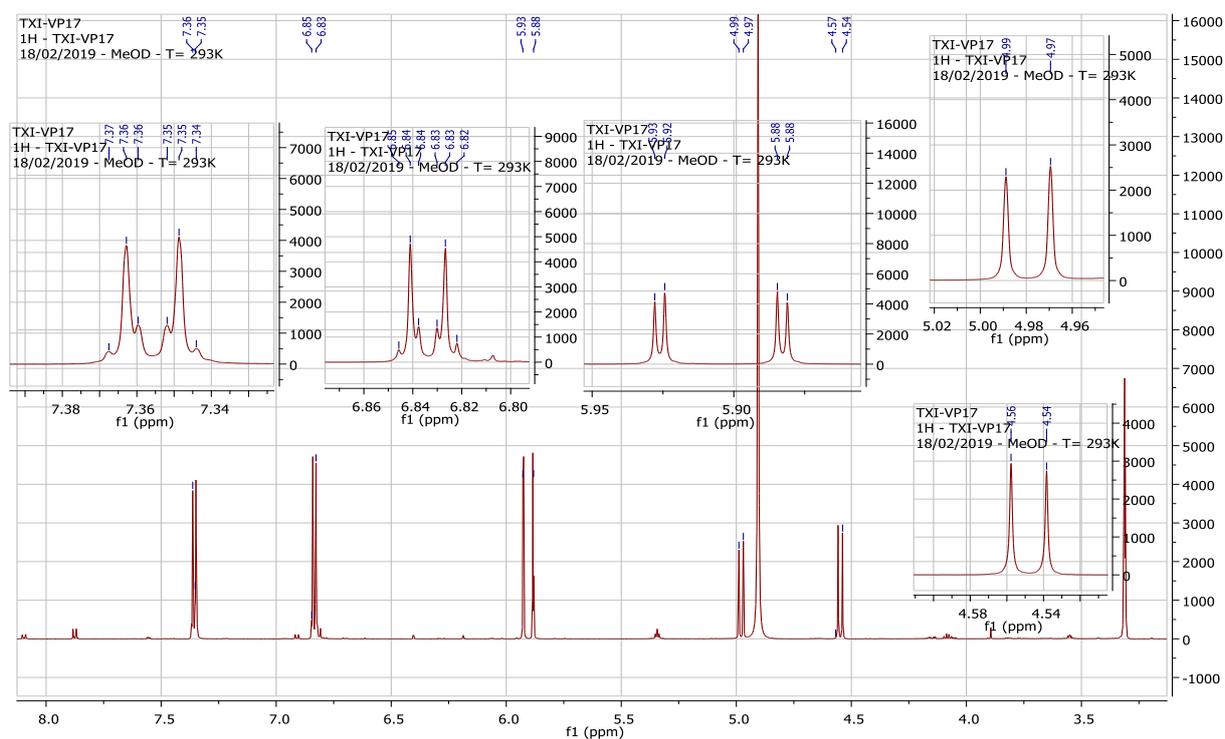


Figure 70 : Spectre proton du composé VP17.

Sur son spectre COSY (Figure 71) montre les corrélations ¹H-¹H comme la corrélation entre les protons à δ 4,98 (H-2, d) et δ 4,55 (H-3, d) avec une constante de couplage 12,0 Hz caractéristique des couplages *Trans* du noyau B des flavonoïdes.

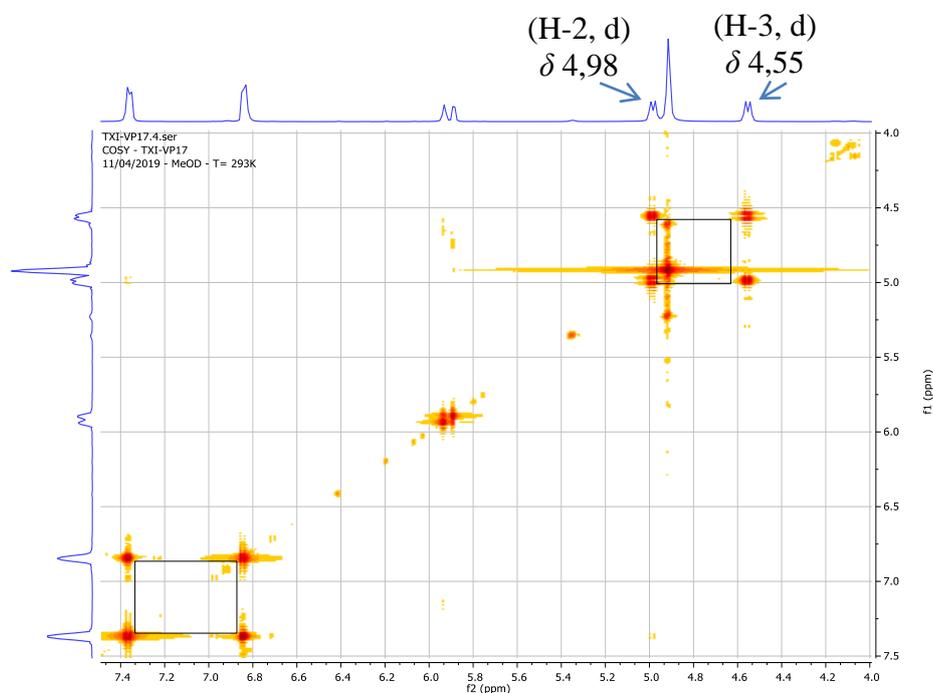


Figure 71 : Spectre COSY du composé VP17.

Son spectre HSQC (Figure 72, tableau 14) met en relief les corrélations J^I , $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ entre carbone et proton suivantes :

- le proton (H-2) à δ 4,98 et le carbone (C-2) à δ 83,4.
- le proton (H-3) à δ 4,55 et le carbone (C-3) à δ 72,0.

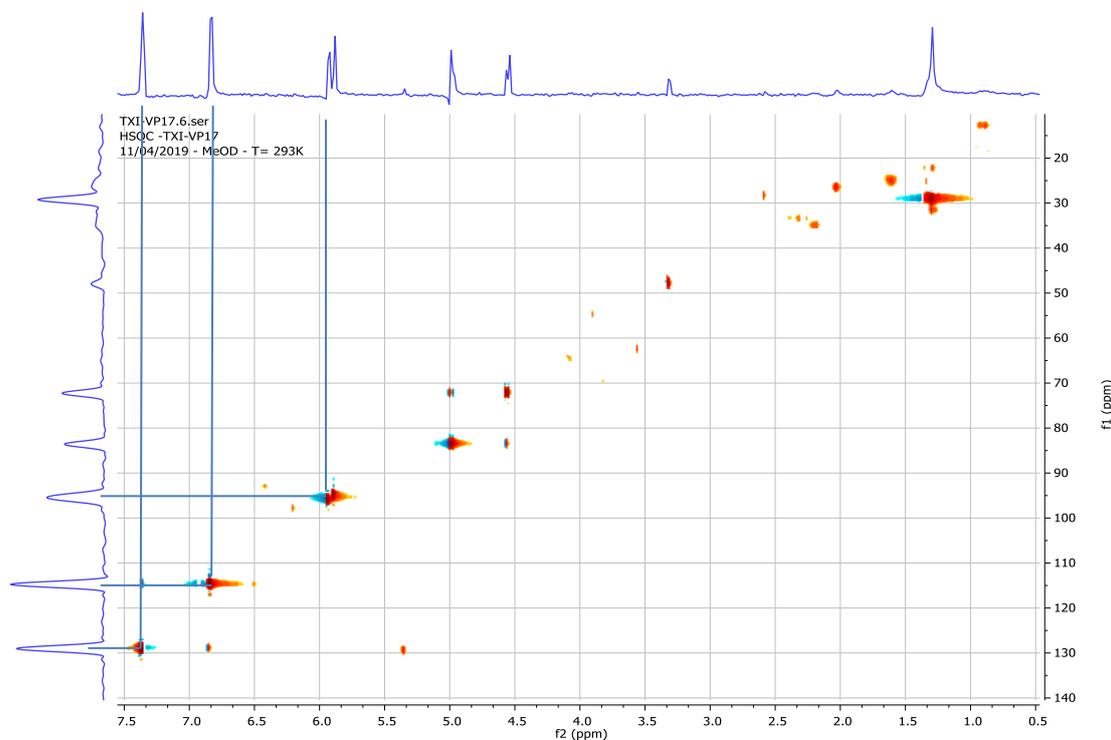


Figure 72 : Spectre HSQC du composé VP17.

Le spectre HMBC (figure 73, tableau 14) révèle les corrélations entre H-2 (δ 4,98) avec C-3 (δ 72,0), C-2' (δ 128,8) et C-4 (δ 197,2) ; H-3 (δ 4,55) avec C-2 (δ 83,4), C-1' (δ 127,8) et C-4 (δ 197,2).

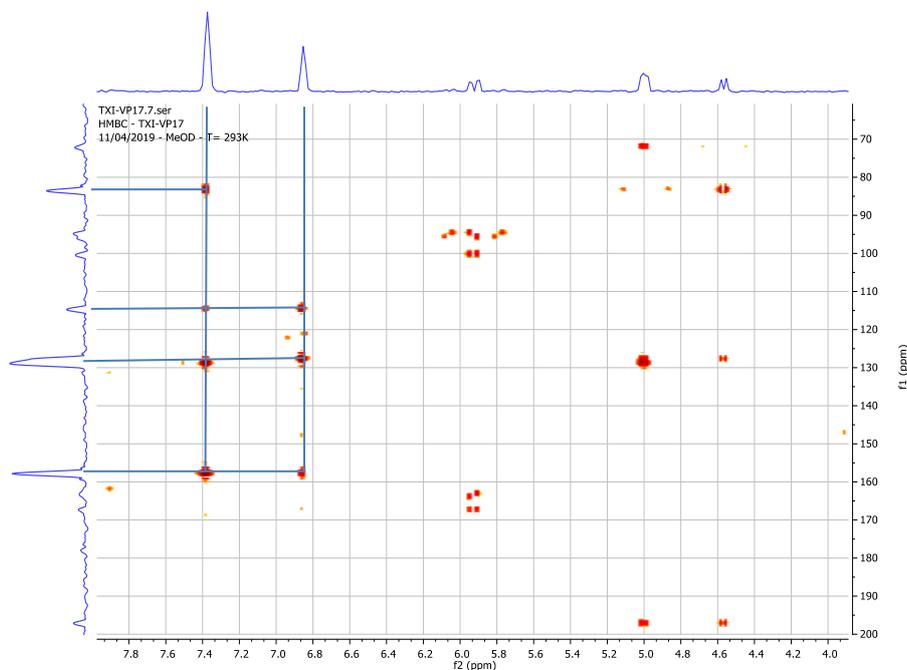


Figure 73 : Spectre HMBC du composé VP17.

Le spectre ROESY (figure 74) montre les corrélations entre H-2 (δ 4,98) avec H-3 (δ 4,55) et les protons à δ 6,83 et δ 7,36.

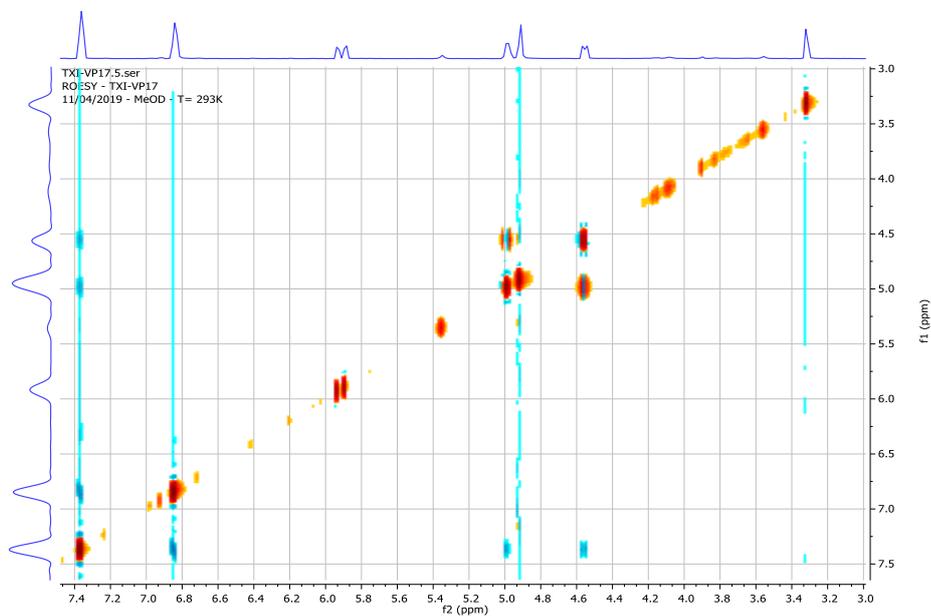


Figure 74 : Spectre ROESY du composé VP17.

La combinaison des données spectrales permet d'attribuer au composé VP17, la structure **130**, un flavonoïde : 2,3-dihydroflavonol ou (2R, 3S)-dihydrokaempférol.

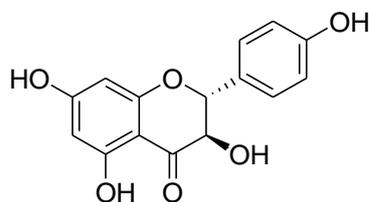


Schéma 39 : Structure du composé **130**.

Tableau 14 : Données spectrales protons, carbones et HMBC du composé VP17.

Position	130 (CD₃OD, 600 MHz)		
	δ_H (J en Hz)	δ_C	Corrélations HMBC
1	-	-	-
2	4,98 (1H, d, 12,0)	83,4	72,0 ; 128,8 ; 197,2
3	4,55 (1H, d, 12,0)	72,0	83,4 ; 127,8 ; 197,2
4	-	197,2	-
5	-	167,1	-
6	5,93 (1H, d, 6,0)	95,9	167,1 ; 163,9 ; 100,4 ; 94,6
7	-	167,1	-
8	5,88 (1H, d, 6,0)	94,6	167,1 ; 163,9 ; 100,4 ; 95,9
9	-	163,9	-
10	-	100,4	-
1'	-	127,8	-
2'	7,36 (1H, t, 6, 12,0)	128,8	83,4 ; 115,0 ; 128,8 ; 157,8
3'	6,83 (1H, t, 6, 12,0)	115,0	127,8 ; 115,0 ; 157,8
4'	-	157,8	-
5'	6,83 (1H, t, 6, 12,0)	115,0	127,8 ; 115,0 ; 157,8
6'	7,36 (1H, t, 6, 12,0)	128,8	83,4 ; 115,0 ; 128,8 ; 157,8

II.2.3. Le cycloalcane (cyclitol) VP6

Le composé VP6 a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange acétate d'éthyle-méthanol (7 : 3). Il est soluble dans l'eau, non visible à l'UV ($\lambda = 254$ et 366 nm) et à l'iode.

Sur son spectre RMN¹H (D₂O, 600 MHz, figure 74), on observe deux séries de protons à savoir comme entre δ 3,86 (H-1, m), 3,77 (H-2, t), 3,55 (H-3, dd), 3,40 (H-4, t) et 3,59 (H-5, m) caractéristiques des protons liés aux carbones oxygénés. Et deux protons caractéristiques de protons aliphatiques *sp*³ liés à un carbone déblindé (C-6) dans la région des champs forts, δ 1,86 (H-6a, m) et δ 1,66 (H-6b, m).

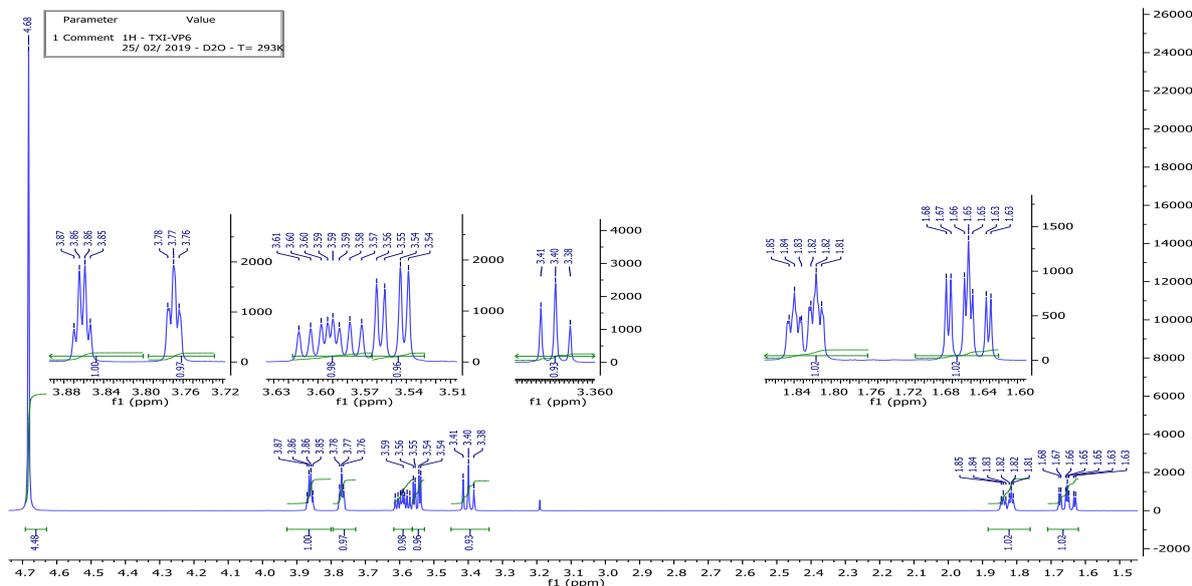


Figure 75 : Spectre proton du composé VP6.

L'analyse spectrale COSY (figure 76) montre les différentes corrélations ^1H - ^1H entre les protons H-1 (δ 3,86, m) et H-2 (δ 3,77, t), H-6 (δ 1,86 et 1,66, m) ; H-2 (δ 3,77, t) et H-3 (δ 3,55, dd) ; H-3 (δ 3,55, dd) et H-4 (δ 3,40, t) ; H-5 (δ 3,59, m) et H-4 (δ 3,40, t), H-6 (δ 1,86 et 1,66, m).

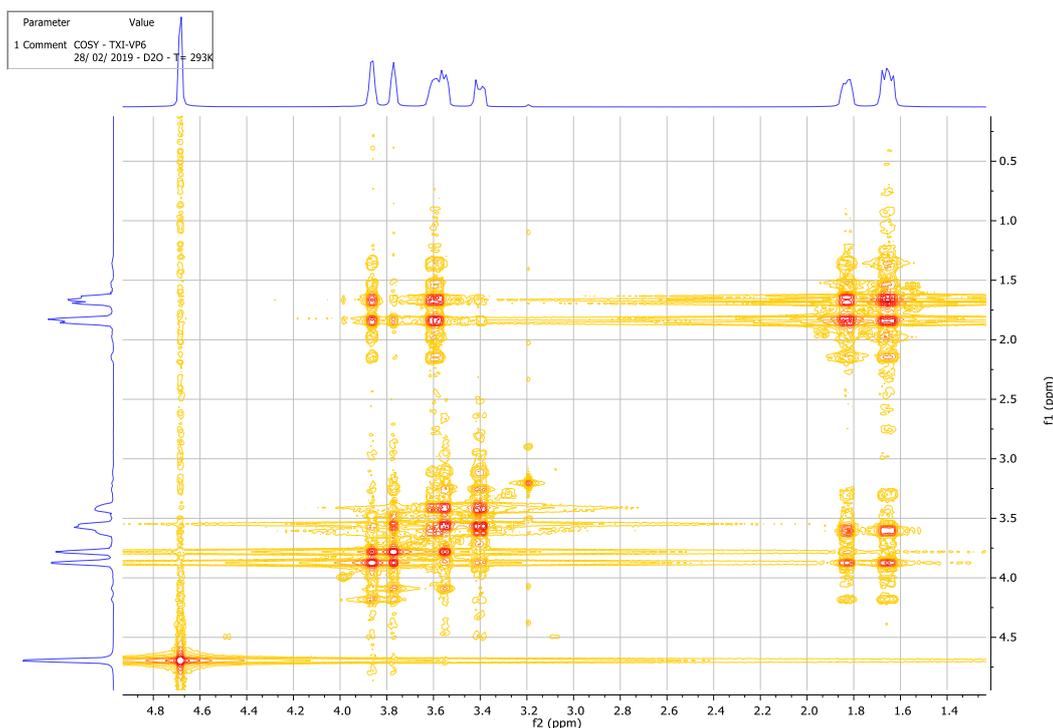


Figure 76 : Spectre COSY du composé VP6.

L'exploitation minutieuse de spectre HSQC présente des corrélations entre carbone et proton directement lié à des déplacements chimiques suivants : H-1 (δ 3,86) et C-1 (δ 68,7) ; H-2 (δ 3,77) et C-2 (δ 72,5) ; H-3 (δ 3,55) et C-3 (δ 71,5) ; H-4 (δ 3,40) et C-4 (δ 74,9) ; H-5 (δ 3,59) et C-5 (δ 68,7) ; H-6a (δ 1,86), H-6b (δ 1,66) et C-6 (δ 33,2).

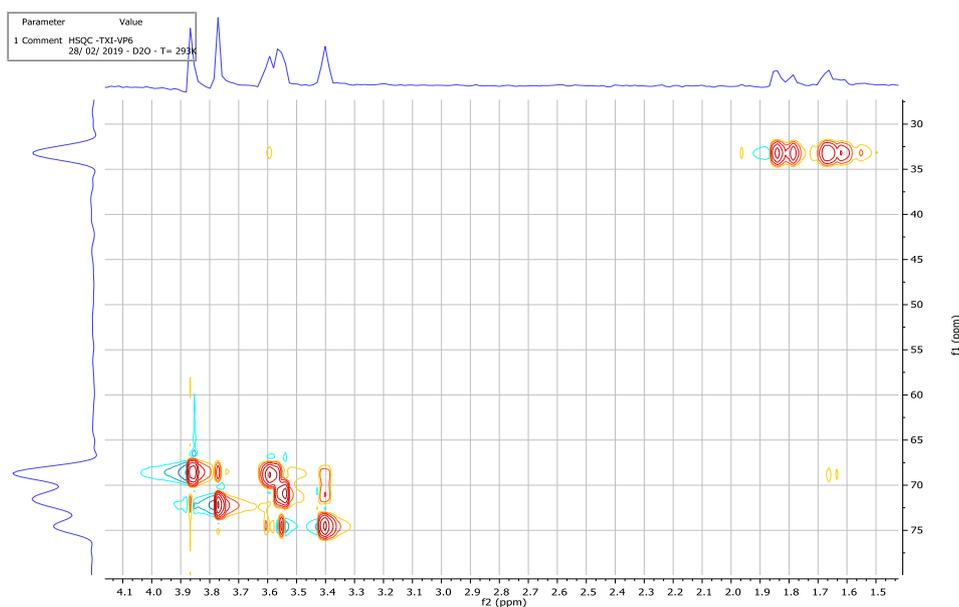


Figure 77 : Spectre HSQC du composé VP6.

L'expérience HMBC (figure 78, tableau 15) souligne que les protons et carbones suivants corrélient entre eux, par exemples : H-2 (δ 3,77) avec C-4 (δ 74,9), C-3 (δ 71,5) et C-6 (δ 33,2) ; H-3 (δ 4,55) avec C-5 (δ 68,7) et C-1 (δ 68,7).

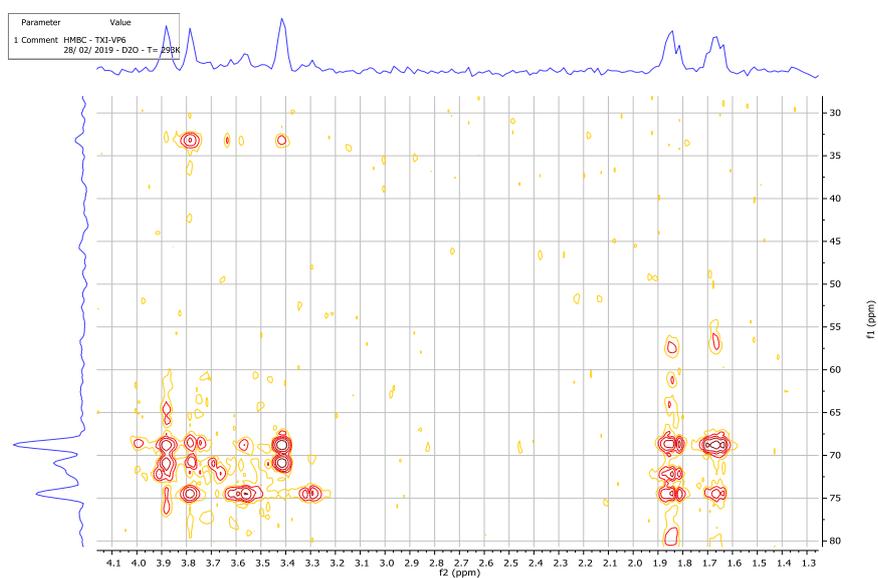


Figure 78 : Spectre HMBC du composé VP6.

L'ensemble de toutes ces données spectrales permet d'assigner au composé VP6 à la structure **131** comme le cyclotol : cyclohexan-1,2,3,4,5-pentanol (Zhang *et al.*, 2014).

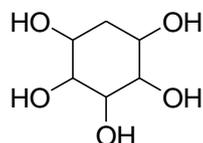


Schéma 40 : Structure du cyclitol **131**.

Tableau 15 : récapitulatif des données spectrales protons, carbones et HMBC du composé VP6.

Position	VP6 131 (D ₂ O, 600 MHz)		
	δ_H	δ_C	Corrélations HMBC
1	3,86 (1H, m)	68,7	68,7 ; 71,5
2	3,77 (1H, t)	72,5	74,9 ; 71,5 ; 68,7 ; 33,2
3	3,55 (1H, dd)	71,5	68,7 ; 72,5 ; 74,9
4	3,40 (1H, t)	74,9	71,5 ; 68,7 ; 33,2
5	3,59 (1H, m)	68,7	68,7 ; 72,1 ; 74,9
6	1,86 (1H, m), 1,66 (1H, m)	33,2	68,7 ; 72,5 ; 74,9

II.2.4. L'acide gras VP18

Le composé VP18 a été obtenu sous forme de poudre blanche amorphe dans le mélange Hexane/AcOEt (95 : 5). Il est soluble dans le dichlorométhane et visible à l'UV ($\lambda = 254$ et 366 nm).

Sur son spectre proton réalisé dans le CDCl₃, les signaux apparaissent tous dans la région du champ fort remarquablement les protons à :

- δ 0,90 un triplet identifiable au groupe méthyle (CH₃).
- δ 1,20 un amas de pics caractéristique des protons méthyléniques (CH₂).
- δ 1,65 un quintuplet et δ 2,36 un triplet à des protons assimilables aux protons en β et α de la fonction acide carboxylique.

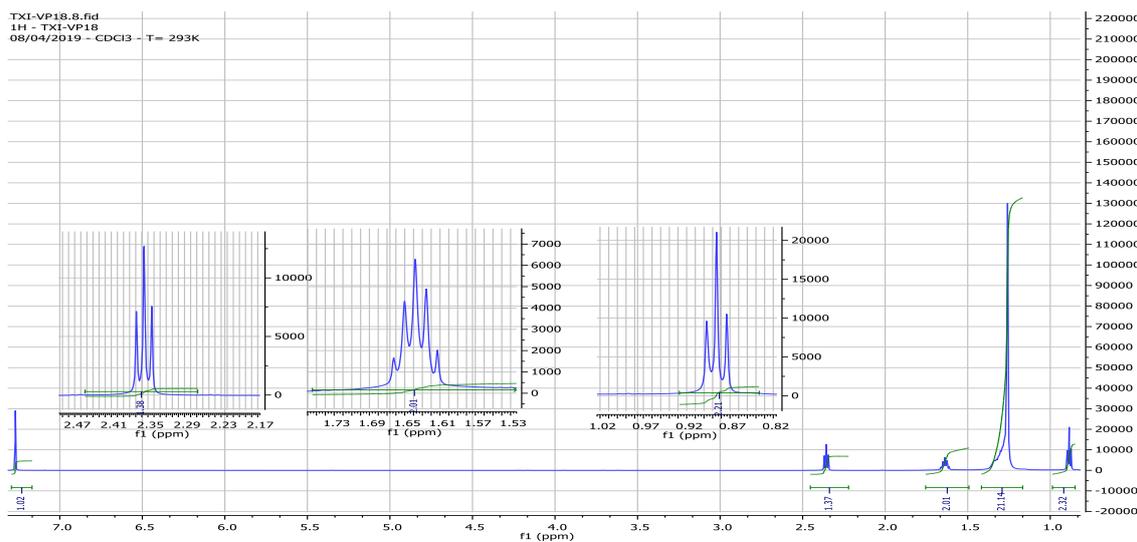


Figure 79 : Spectre proton du composé VP18.

L'expérience COSY met en évidence les corrélations entre les différents protons comme les protons : H-2a (δ 2,37, d, 12,0 Hz), H-2b (δ 2,35, d, 12,0 Hz) et H-3a (δ 1,66, d, 12,0 Hz), H-3b (δ 1,65, d, 12,0 Hz).

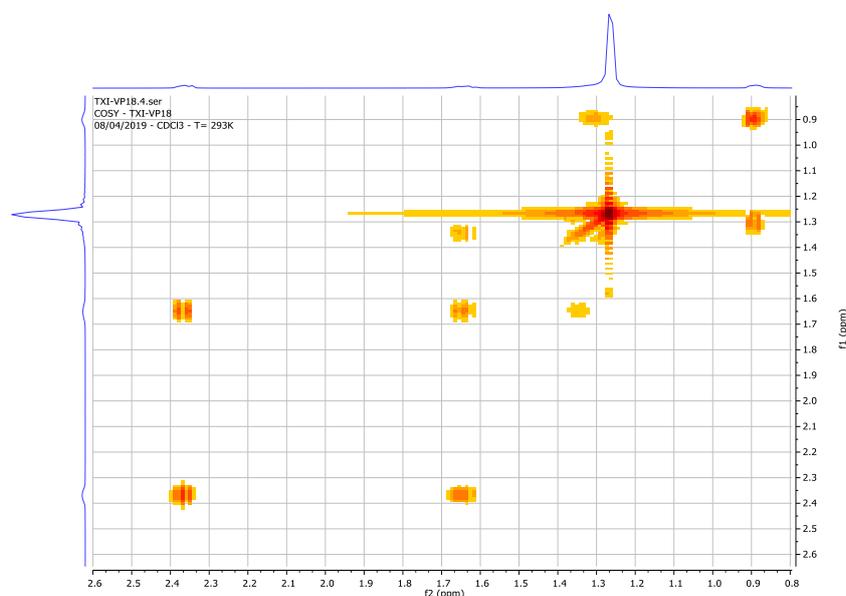


Figure 80 : Spectre COSY du composé VP18.

L'analyse de son spectre HSQC (figure 81) suivant montre que ces protons et carbones se corrélient entre eux (tableau 16) tels que : H-2a (δ 2,37), H-2b (δ 2,35) et C-2 (δ 34,5) ; H-3a (δ 1,66), H-3b (δ 1,65) et C-3 (δ 24,9) ; H-15 (δ 0,90) et C-15 (δ 14,0).

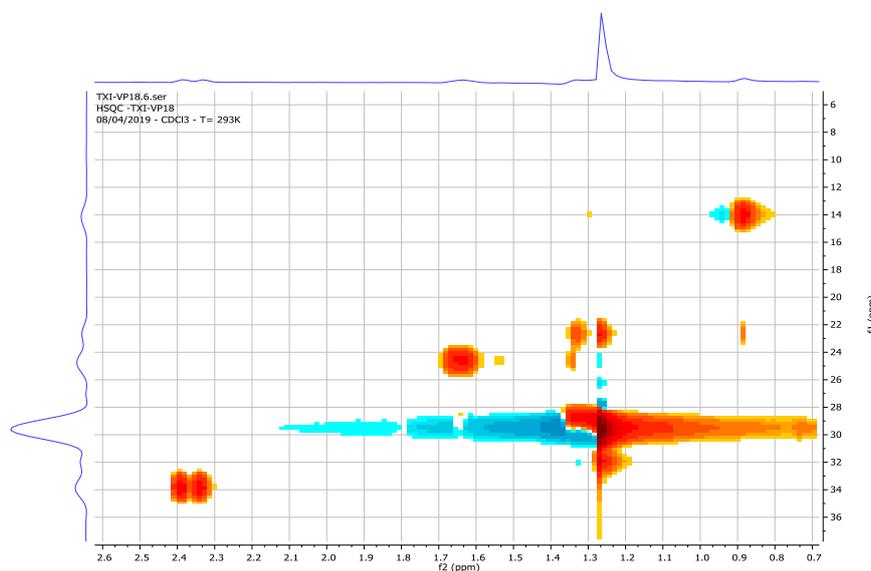


Figure 81 : Spectre HSQC du composé VP18.

L'analyse spectrale HMBC (figure 82, tableau 16) corrobore bien avec les spectres précédemment exploités. Les protons et carbones suivants corrélient entre eux : H-2a (δ 2,37), H-2b (δ 2,35) et C-4 (δ 29,5), C-3 (δ 24,9), C-1 (δ 179,5) ; H-15 (δ 0,90) et C-14 (δ 22,0), C-13 (δ 31,0).

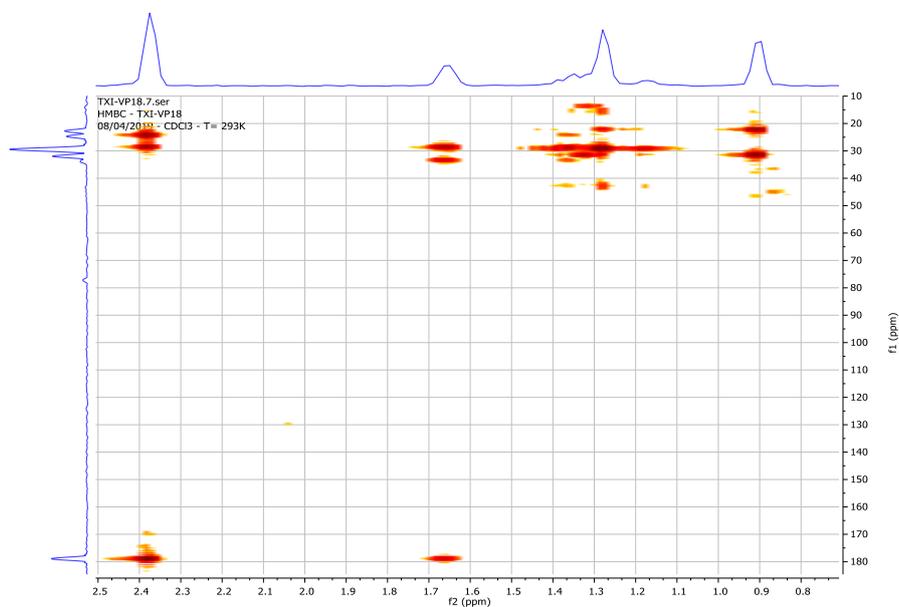


Figure 82 : Spectre HMBC du composé VP18.

Toutes ces données réunies permettent de caractériser le composé VP18 à la structure **132** qui est celle de l'acide gras saturé principalement dans la graisse de beurre : acide pentadécanoïque.

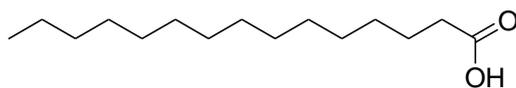


Schéma 41 : Structure du composé **132**.

Tableau 16 : Données spectrales du composé VP18.

Position	VP18 132 (CD ₃ OD, 600 MHz)		
	δ_H (J en Hz)	δ_C	Corrélations HMBC
1	-	179,5	-
2	2,37 (1H, d, 12,0) ; 2,35 (1H, d, 12,0)	34,5	29,5 ; 24,9 ; 179,5
3	1,66 (1H, d, 12,0) ; 1,65 (1H, d, 12,0)	24,9	29,5 ; 34,5 ; 179,5
4-12	1,36 (1H, d, 12,0) ; 1,27 (1H, d, 12,0)	29,5	29,5 ; 24,9 ; 179,5
13	1,25 (1H, d, 12,0) ; 1,30 (1H, d, 12,0)	31,0	29,5 ; 22,0 ; 14,0
14	1,20 (2H, d, 12,0)	22,0	29,5
15	0,90 (CH ₃)	14,0	22,0 ; 31,0

B. COMPOSES DE TRANSFORMATIONS CHIMIQUES

II.2.5. Caractérisations des composés d'hémisynthèse

II.2.5.1. Dérivé du composé VP4-Me (126-méthylation)

Le composé VP4-Me, produit d'hémisynthèse se cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (65%) et fond entre 155-157°C. Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'iode. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption figure 82 à ν_{\max} : 3435, 2929, 2871, 1700, 1454 et 1378 de formule brute $C_{31}H_{51}O_6$ (calc. 519,4). Les spectres RMN 1H (600 MHz, figure 83) et ^{13}C (150 MHz, figure 84) dans le méthanol deutéré ont montré des caractéristiques similaires avec le composé VP4 du départ. A l'exception, l'apparition de nouveau pic de méthyle à δ 3,60 (3H, s) sur le RMN 1H et à δ 50,7 RMN ^{13}C .

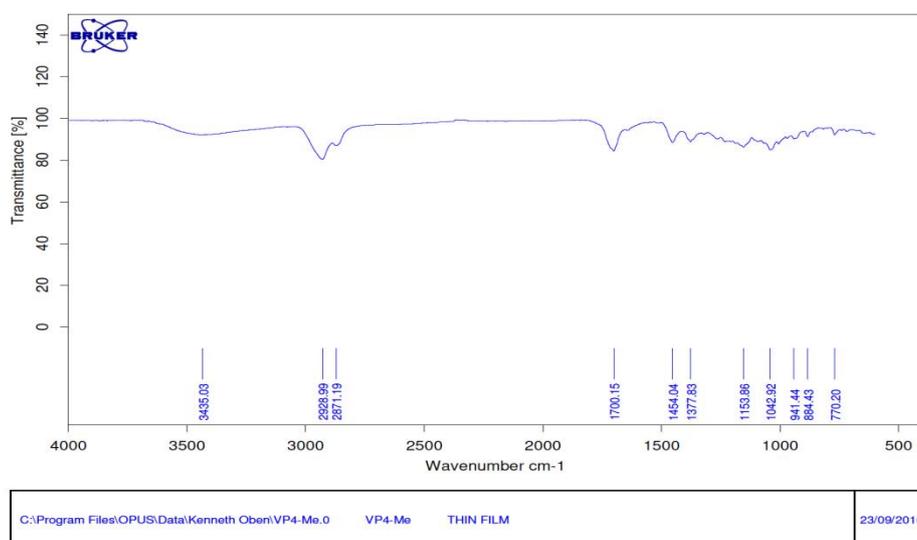


Figure 83 : Spectre IR du composé VP4-Me.

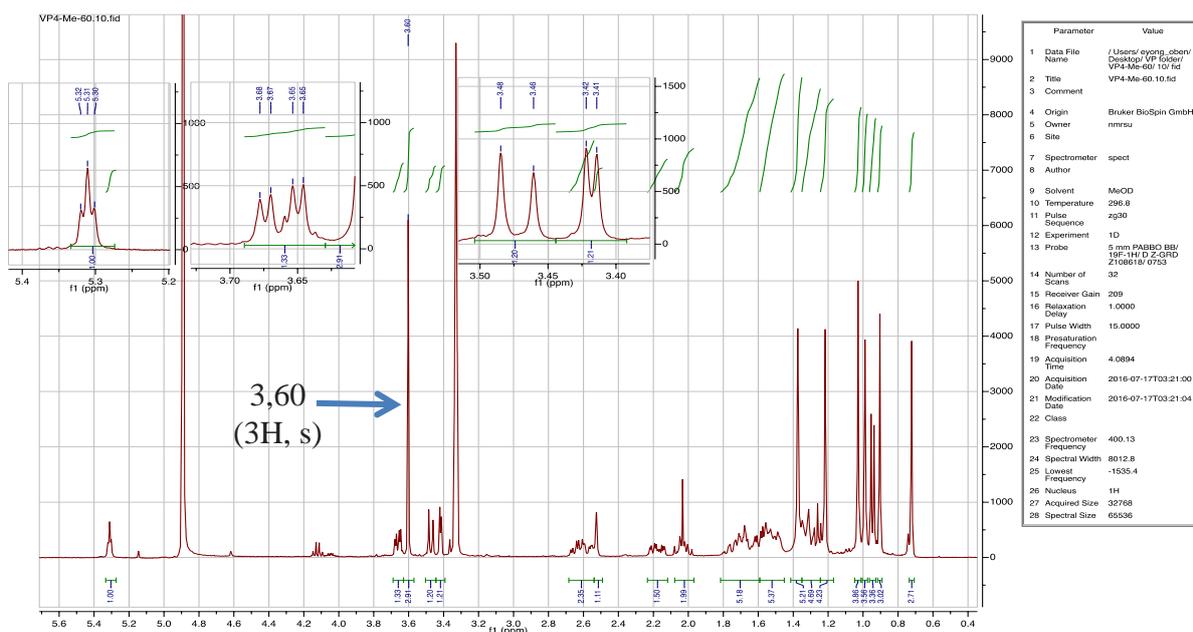


Figure 84 : Spectre RMN 1H du composé VP4-Me.

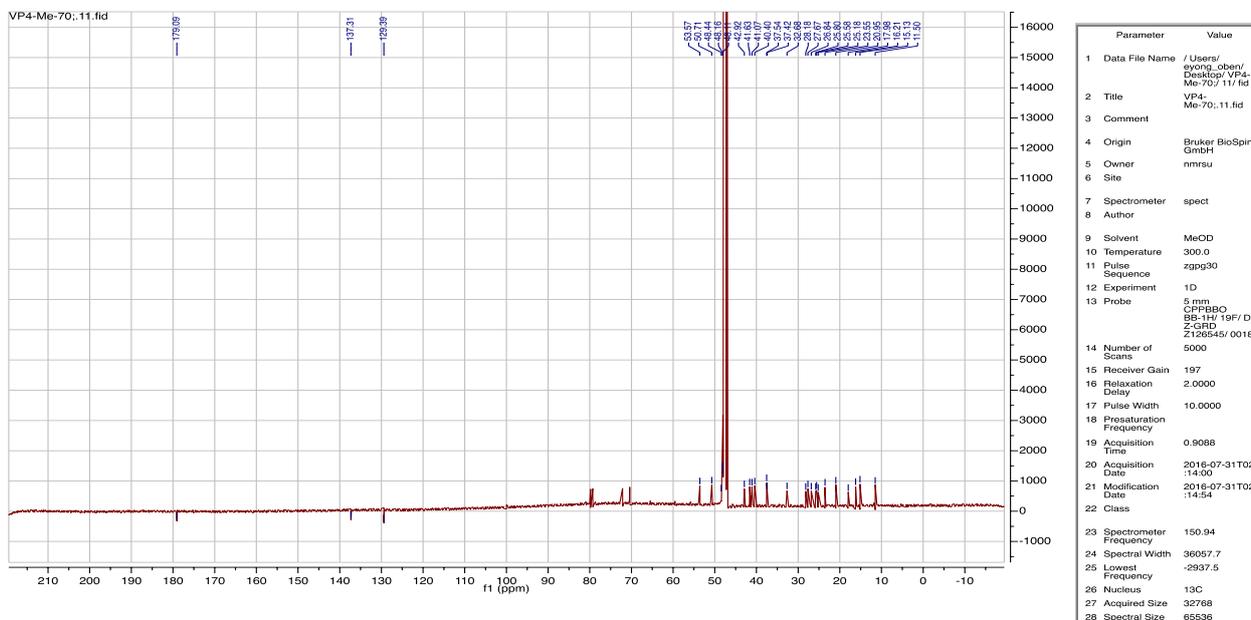


Figure 85 : Spectre RMN ^{13}C du composé VP4-Me.

Toutes ces données permettent de confirmer la méthylation de composé VP4 au composé VP4-Me (**133**) (dérivé).

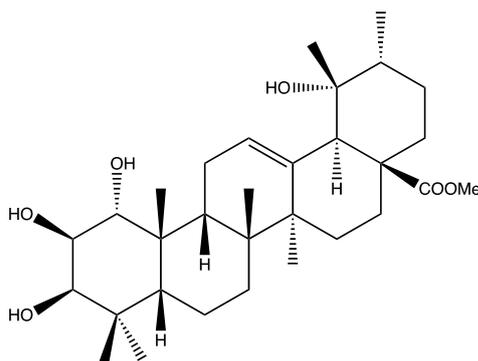


Schéma 42 : Structure du composé **133**.

II.2.5.2. Dérivé du composé VP5-Me (**127**-méthylation)

Le composé VP5-Me n'est autre que le produit d'hémisynthèse. Il se cristallise sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (50%) et fond entre 103-105°C. Il est soluble dans le méthanol et se révèle à l'UV et à l'iode. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption figure 83 à ν_{max} : 3438, 2928, 2873, 1708, 1456 et 1378 de formule brute $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_5$ (calc. 503.4). Les spectres RMN ^1H (600 MHz, figure 86) et ^{13}C (150 MHz, figure 87) dans le méthanol deutéré ont montré des caractéristiques similaires avec le composé VP5 (**127**) du départ. A l'exception, l'apparition d'un nouveau singulet caractéristique de méthyle d'ester à δ 3,60 (3H, s) sur le RMN ^1H et à δ 50,7 RMN ^{13}C .

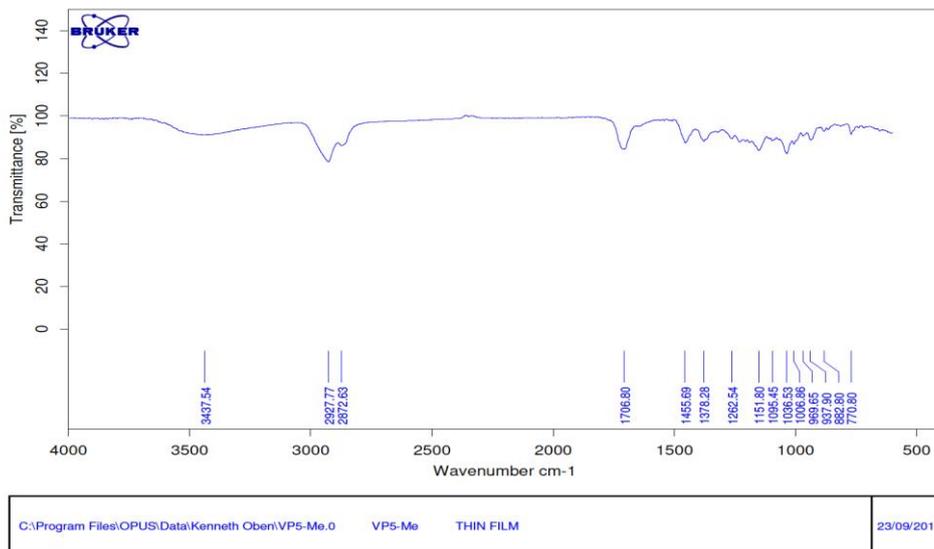


Figure 86 : Spectre IR du composé VP5-Me.

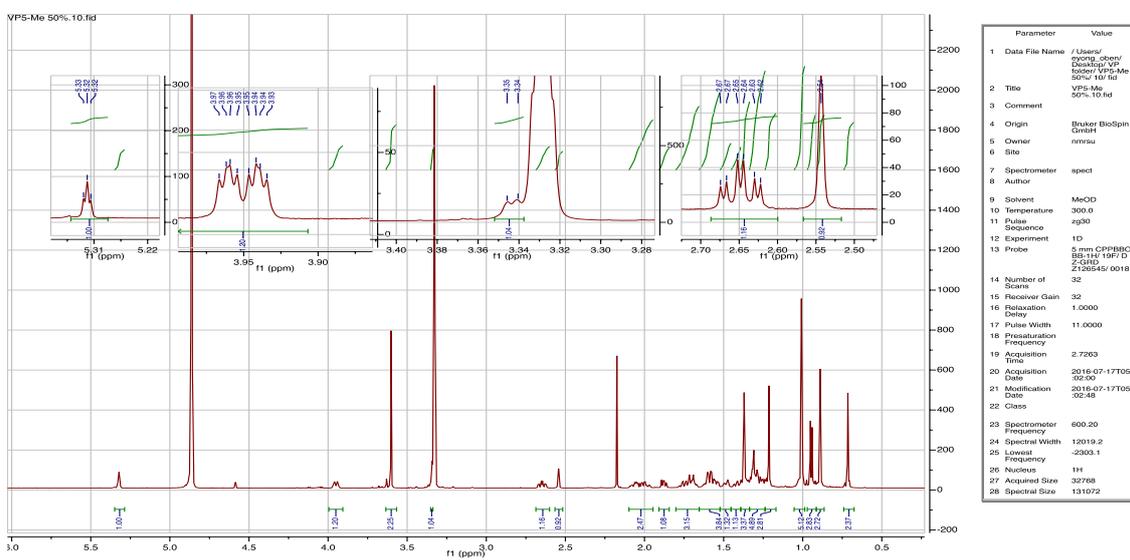


Figure 87 : Spectre RMN ¹H du composé VP5-Me.

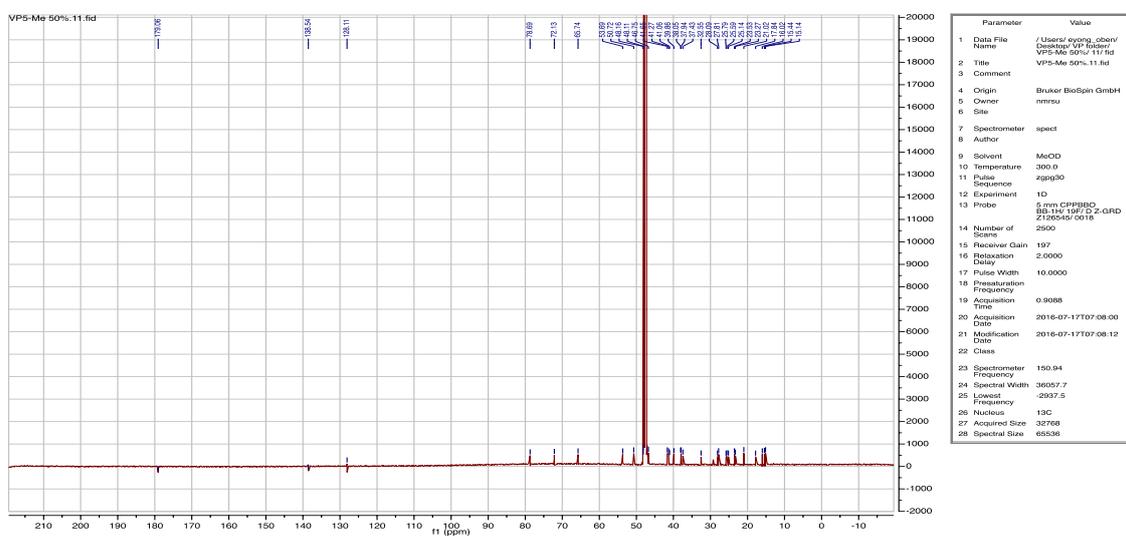


Figure 88 : Spectre ¹³C du composé VP5-Me.

L'ensemble des données spectrales d'assigner au composé VP5-Me à la structure **134** comme le dérivé méthylé du composé VP5 (**127**).

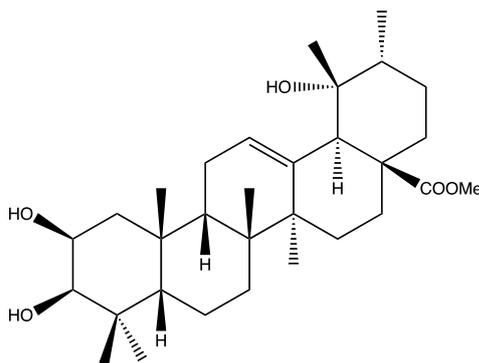


Schéma 43 : Structure du composé **134**.

II.2.5.3. Dérivés du composé VP3-Me (Dérivé 1, **91**)

Le composé VP3-Me résulte d'une transformation chimique de l'acide bétulinique. Il se présente sous forme de poudre blanche dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (20%) et fond entre 205-207°C. Il est soluble dans le dichlorométhane et se révèle à l'iode. Son spectre IR présente entre autres des bandes d'absorption figure 88 à ν_{\max} : 3437, 2927, 1698, 1452 et 1378 de formule brute $C_{31}H_{51}O_3$ (calc. 471,4). Ses spectres RMN 1H (600 MHz, figure 89) et ^{13}C (150 MHz, figure 90) dans le dichlorométhane deutéré ont montré des caractéristiques similaires avec l'acide (3 β)-3-hydroxy-lup-20(29)en-28-oïque **91** du départ. Un constat, l'apparition d'un nouveau singulet caractéristique de méthyle d'ester à δ 3,60 (3H, s) sur le RMN 1H et à δ 51,3 RMN ^{13}C .

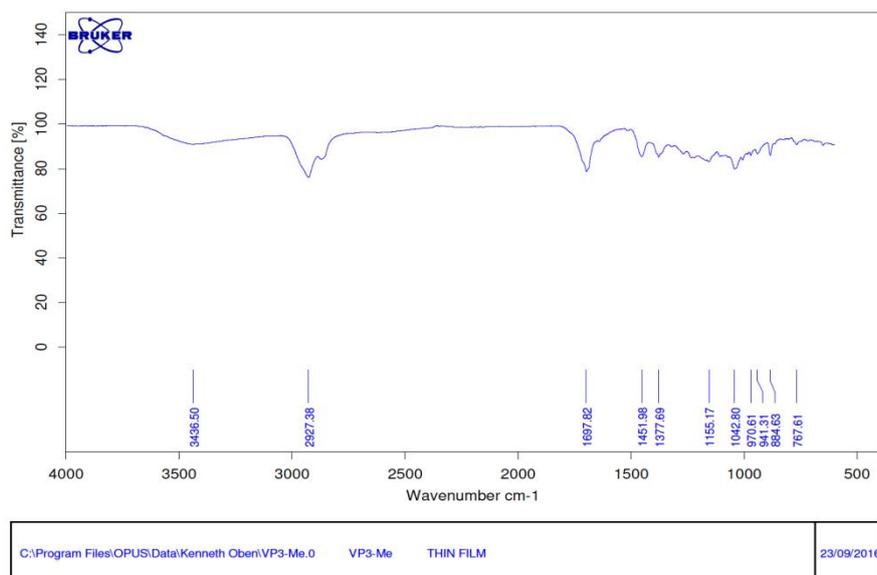


Figure 89 : Spectre IR du composé VP3-Me.

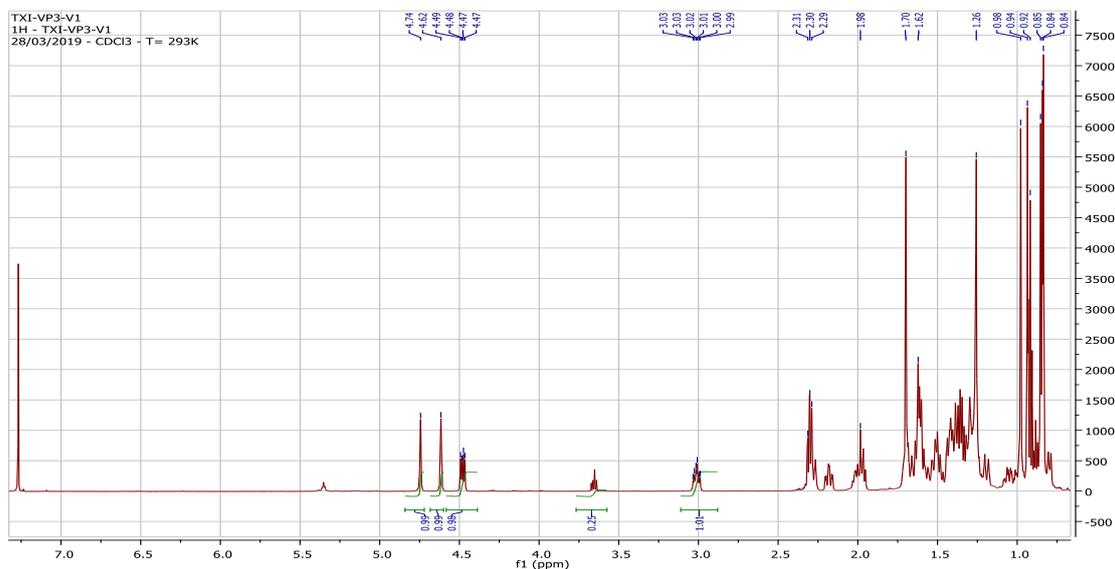


Figure 93 : Spectre RMN 1H du composé VP3-V1.

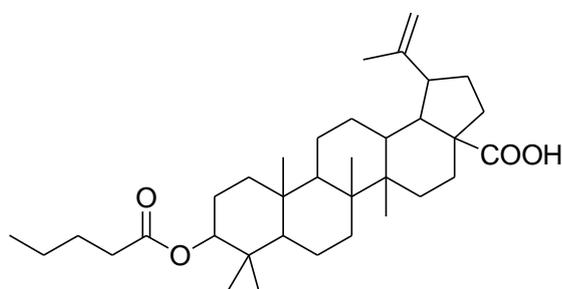


Schéma 46 : Structure du composé 137.

II.3. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES TRITERPENES ET LEURS DERIVES

Les triterpènes isolés ont été évalués pour l'activité anticancéreuse sur des souches du cancer du sein. Il en existe de 3 types dépendant des marqueurs : Les tumeurs à l'œstrogène ou à la progestérone, Les tumeurs HER2 positives et Les tumeurs triples négatives (TNBC). Le choix est porté sur ce dernier type (TNBC) car l'absence des marqueurs fait qu'elle est très maligne et son diagnostic est généralement tardif quand la tumeur est déjà à un stade final.

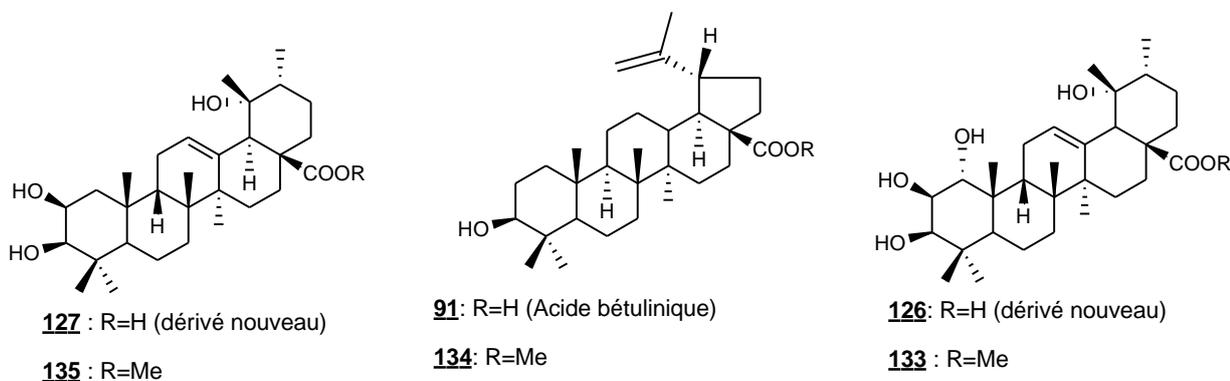


Schéma 47 : Structures des triterpènes et leurs dérivés estérifiés.

Les résultats de l'activité cytotoxique sur ces triterpènes et leurs dérivés montrent que l'acide bétulinique **91** et les dérivés méthylés (**133**, **134** et **135** estérifiés) sont actifs, figure 94 et tableau 17 ci-après.

Ce gain d'activité observé sur les dérivés estérifiés peut s'expliquer par un des principes de Drug Design qui stipule que, les composés hydrophobes sont plus facilement pénétrables dans les membranes lipidiques cellulaires.

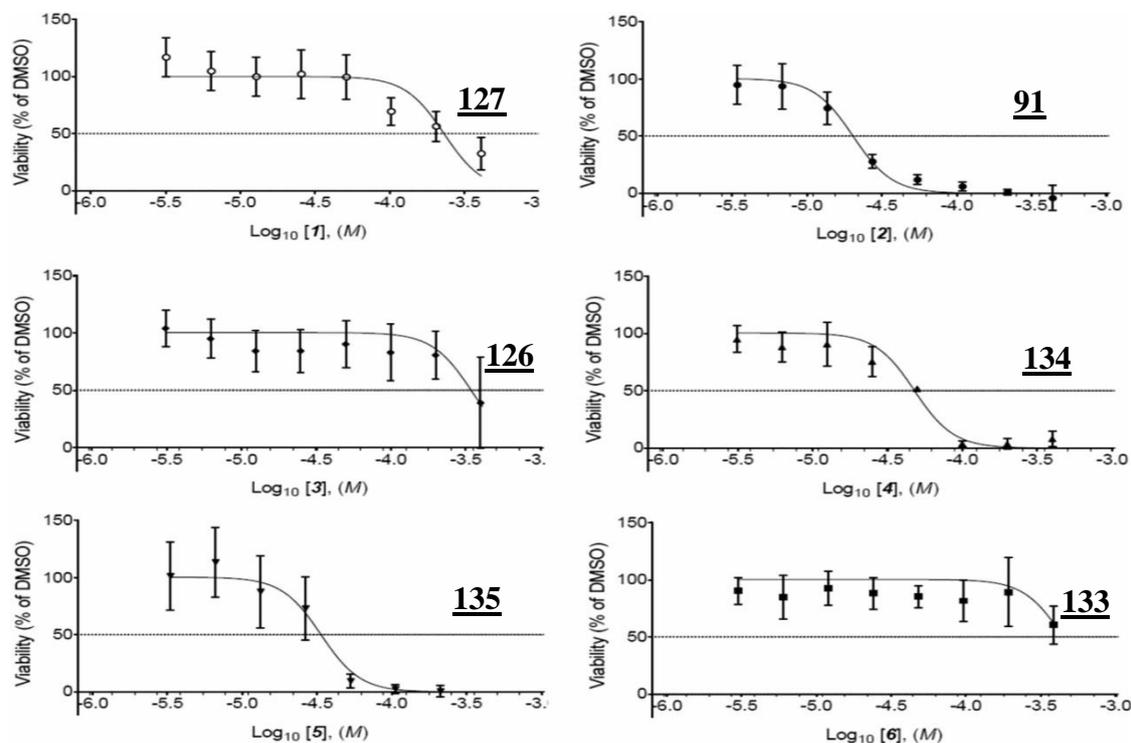


Figure 94 : Activité cytotoxique des triterpénoïdes sur la cellule cancéreuse de cancer du sein MDA-MB-231 (TNBC).

Tableau 17 : IC₅₀ valeurs calculées de figure 93 pour les composés indiqués lors d'une exposition de 3 jours aux cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.

Composés	127	91	126	134	135	133
IC ₅₀ (μM)	230	19,9	63,5	46,7	32,9	43,0
95% confidence intervals (μM)	179-295	17,2-23,1	51,5-78,3	39,8-54,9	24,9-43,4	328-564

Les tests d'efficacité réalisés (**91** et **135**) sur les cellules cancéreuses montrent que ces cellules meurent toutes par induction d'apoptose, c'est-à-dire les cellules sont détruites (figure 94).

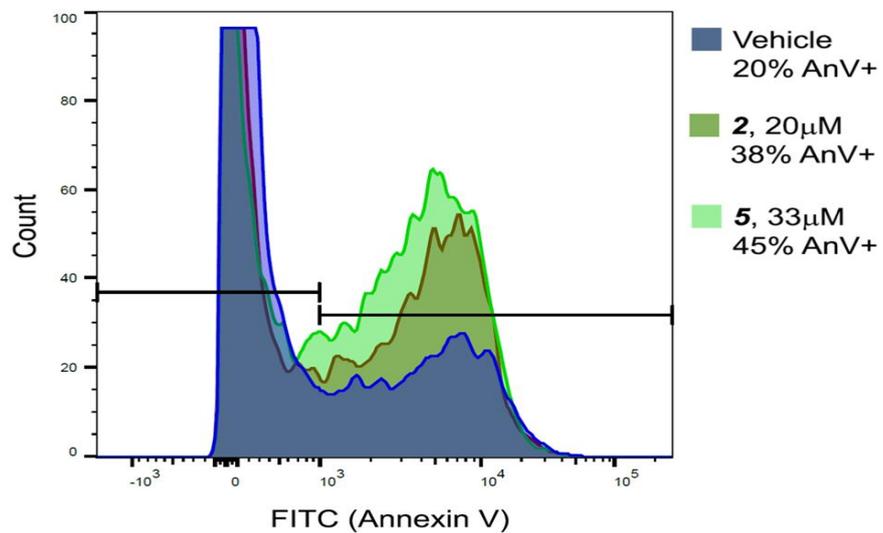


Figure 95 : Induction d'apoptose des triterpènes 91 (2) et 135 (5).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nous avons dans cette thèse procédé à l'étude phytochimique des racines, graines et écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* de la famille des Sapotaceae, à l'évaluation d'activités antineurodégénérative et cytotoxique, et entrepris quelques transformations chimiques de certains composés isolés.

A l'heure actuelle, l'humanité se heurte aux maladies neurodégénératives et cancers. Bien que le taux de prévalence de ces maladies soit en croissance perpétuelle, chimistes et cliniciens creusent chaque jour davantage pour une solution alternative dans ce sens.

L'étude bioguidée est envisagée sur *Vitellaria paradoxa*. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) révèle que l'extrait brut au méthanol des écorces du tronc est riche en composés polyphénoliques. Les tests biologiques réalisés sur l'extrait brut au méthanol, et sur les extraits fractionnés notamment l'extrait à l'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux ont montré une activité anti-inflammatoire intéressante.

En effet, l'extrait brut au méthanol des écorces de tronc a permis de soigner les rats souffrants de polyarthrites. Cette activité diminue lorsqu'on soumet les mêmes rats malades aux extraits à l'acétate d'éthyle et aqueux. L'extrait épuisé à l'acétate d'éthyle est plus actif que celui à l'extrait aqueux et a été purifié par les différentes méthodes chromatographiques permettant d'obtenir seize composés dont dix sont entièrement caractérisés. De ces dix composés, on dénombre cinq triterpènes, trois flavonoïdes, un cyclitol et un acide gras. Parmi ces différents composés, deux sont des dérivés triterpènes nouveaux notamment l'acide $1\alpha,2\beta,3\beta,19\alpha$ -tetrahydroxyurs-12-en-28-oïque **126** et l'acide $2\beta,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oïque **127**. L'activité cytotoxique des triterpènes de *Vitellaria paradoxa* en général et en particulier, de ces nouveaux dérivés a été explorée.

Les résultats de l'activité cytotoxique sur les triterpènes isolés **91**, **126**, **127** et leurs dérivés **133**, **134**, **135** montrent que l'acide bétulinique **91** et les dérivés méthylés (estérifiés) sont plus actifs. Cette amélioration d'activité observée sur les dérivés estérifiés peut s'expliquer par un des principes de Drug Design qui stipule que, les composés hydrophobes pénètrent facilement dans les membranes lipidiques cellulaires. On remarque que les cellules affectées par l'acide bétulinique **91**, meurent toutes par apoptose, un mécanisme complexe de mort cellulaire programmée. Cela appuie l'hypothèse que la mitochondrie est le site d'action du composé. Elle permet, en effet, de sélectionner et d'éliminer les cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme, les cellules surnuméraires et les cellules dysfonctionnelles (Pisha, E. *et al.*, 1995). Il est intéressant de noter que des souris saines ont été traitées avec de très fortes doses d'acide bétulinique **91** sans observer une quelconque toxicité. La forte activité antitumorale de l'acide bétulinique **91** a motivé l'équipe de chercheurs à protéger l'utilisation de ce composé et à synthétiser certains dérivés (Genet *et al.*, 2010, Das Gupta, T.K. et Pezzuto, J. M., 1997; Pezzuto, J. M. *et al.*, 1999a et Pezzuto, J. M. *et al.*, 1999b). La co-solvation du **91** est aussi amorcée, l'exemple de DMSO permettant d'augmenter l'hydrosolubilité de 30 à 50 et

l'activité antitumorale de 1,5 à 3 de l'acide bétulinique (Jeong, H. J. *et al.*, 1999) voire la vectorisation.

Pour la suite de nos travaux, nous envisageons de :

- identifier et caractériser les autres composés ;
- récolter, extraire et purifier les extraits à l'acétate d'éthyle des écorces de tronc dans le but d'obtenir les quantités analysables de certains composés et aussi sur les fractions non purifiées ;
- soumettre les différents composés décrits au criblage biologique par rapport à l'activité anti-inflammatoire ou antineurodégénérative ;
- expliciter le mécanisme d'action des composés actifs par rapport à leur activité cytotoxique ;
- déterminer la configuration absolue du composé **127** ;
- une dérivatisation plus poussée de ces triterpénoïdes pourrait conduire à une meilleure compréhension des relations structure-activité pour cette classe de produits naturels ;
- faire un screening supplémentaire contre une plus large gamme de lignées cellulaires cancéreuses pour révéler une utilité supplémentaire de ces composés en tant que leads ;
- rechercher les récepteurs cellulaires putatifs et la compréhension au niveau moléculaire de leur mode d'action.

CAPITRE III : ETUDE EXPERIMENTALE

III.1. MATERIEL ET METHODES

III.1.1. Appareillage

Tous les points de fusion sont mesurés sur un appareil de marque Electrothermal 9100 (Max 400°C).

Une balance électronique de marque Sartorius, type 1265001 a été utilisée pour effectuer les pesées tout au long de notre étude expérimentale.

Les spectres RMN ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de type BRUKER (Photographie 2) en utilisant comme solvant le MeOH deutéré (CD₃OD) à des fréquences de l'ordre de 500 à 600 MHz pour la RMN¹H et 125 à 150 MHz pour la RMN¹³C.

Les chromatogrammes sur couche mince (CCM) sont réalisés sur plaques constituées de feuilles d'aluminium et plastique de dimension 20 x 20 Cm et recouvertes d'environ 0,2 mm d'épaisseur de silice G60, de type 254 MERCK. Ces plaques ont été développées dans les cuves contenant un système hexane/acétate d'éthyle de polarités variées. La détection des composés aux cours des différentes CCM a été faite soit par visualisation des plaques à la lampe UV ($\lambda = 254 ; 366$ nm), soit par pulvérisation des celles-ci par des réactifs spécifiques (H₂SO₄ dilué, des vapeurs d'iode et autres). La concentration des fractions a été faite sous pression réduite au moyen des évaporateurs rotatifs (rotavapors) de type Heidoph VV2000.

Les colonnes en verre de dimensions 1 à 5 cm de diamètre et 32 à 86 cm de hauteur ont servi valablement de réaliser les chromatographies sur colonne sous pression atmosphérique. Le gel de silice utilisé pour la chromatographie sur colonne est de fabrication MERCK a pour la granulométrie 0,025-0,06 mm.

L'appareil CAMAG a permis de réaliser la plaque préparative de CCM pour la purification des composés et le gel de silice utilisé est de type 0,02 mm de granulométrie.

L'appareil BÜCHI Recirculating Chiller B-740 réglable nous a aidé de faire circuler l'eau à une température désirée dans les réfrigérants des dispositifs et la pompe de type BÜCHI, VAC[®] V-500 servant de concentrer sous pression réduite.



Photographie 2 : Appareil de résonance magnétique nucléaire (BAIRY, 2019, Bordeaux, France).

III.1.2. Matériel végétal

Les écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* ont été récoltées à Garoua dans la région du Nord Cameroun, en juillet 2012. La plante a été identifiée par Monsieur Jean Paul BAMBA, Taxonomiste à l'Herbier de l'Ecole de Faune de Garoua, en comparaison avec un échantillon enregistré sous le numéro HEFGN 6276.

Aussi les racines, les graines et écorces de tronc ont été récoltées en République Centrafricaine. Les racines ont été récoltées à PK27 route de Boali dans la préfecture de l'Ombella MPoko. Les écorces de tronc au quartier Ngakassa en octobre 2016, dans la sous-préfecture de Bimbo aux environs de l'aéroport international de Bangui M'Poko. Tandis que les graines sont achetées directement sur le marché à Bossangoa (RCA), ville située à 305 Km de la capitale. La sous-préfecture de Bossangoa, chef-lieu de la préfecture de l'Ouham abonde le karité. Ces différents organes sont identifiés et enregistrés au Centre d'Etudes et de Recherche sur la Pharmacopée et la Médecine Traditionnelles Africaines (CERPHAMETA) à l'Université de Bangui sous le numéro N°054/UB/CER/D.16.

Ces essences végétatives sont séchées à l'ombre au laboratoire pour une durée de 14 à 21 jours. Elles ont été pulvérisées en vue d'éviter les moisissures.



Jeune pied de karité



racines



Tronc d'arbre



feuilles, fruit et graines



graines

Photographie 3 : Racines, graines et écorces de tronc de karité (2012 et 2016)

III.1.3. L'extraction

Trois techniques d'extraction ont été utilisées pour extraire les poudres de *Vitellaria paradoxa* : le bain ultrason, le Soxhlet et la macération. Les racines, les graines et écorces ont été séchées au laboratoire, découpées et broyées le même jour après le séchage. Les poudres obtenues ont été extraites séquentiellement et/ou successivement à polarité croissante : l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol ou n-butanol et à l'eau.

III.1.3.1. Le bain ultrason ou le sonicateur

500g de poudre (écorces) sont introduits dans un erlenmeyer de 2 litres. Le contenu est additionné d'un (1) litre de solvant et porté dans le sonicateur (photographie 4). Le temps d'extraction est fixé entre 30 à 120 minutes. La température est contrôlée, inférieure ou égale à 40°C. L'arrêt automatique de l'appareil, le contenu d'erlenmeyer est filtré et évaporé à l'évaporateur rotatif sous pression réduite à 40°C. Les résidus obtenus constituent l'extrait brut. Cette opération est répétée 3 à 4 fois jusqu'à l'épuisement total de poudre. Les résidus sont repris par un autre solvant après séchage sous la hotte et l'élimination complète des traces du solvant précédent (3,5 Kg extraits pendant 4 jours).



Photographie 4 : Le bain ultrason (le sonicateur).

III.1.3.2. Le Soxhlet

Généralement, on utilise du méthanol à chaud. 100 g de poudre (écorces) a été introduit dans une cartouche et placée dans l'appareil de Soxhlet. Cette quantité a été extraite avec un (1) litre de méthanol. Après cinq (5) siphonages, la solution devient limpide. Le contenu du ballon est concentré au rotavapor à 40°C. Au total 3,5 Kg de poudre ont été extraits pendant 12 jours (300 g/jour). Les extraits recueillis et réduits après l'évaporateur rotatif sous pression réduite ont conduit à l'extrait brut au méthanol. Ce dernier est partitionné (fractionné) à polarité croissante, successivement à l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol ou au n-butanol et la phase aqueuse est lyophilisée pour donner respectivement les extraits fractionnés : VPHE (m = 120 g), VPEE (m = 140 g), VPME (m = 530,4 g) et VPAE (m = 80 g).

III.1.3.3. La macération à température ambiante (72 heures)

3,5 Kg de poudre sont extraits (écorces) par le mélange méthanol/dichlorométhane (1 : 1) pendant 72 heures à 25°C dans un récipient à verre fermé. Le contenu du récipient est filtré sur papier filtre et évaporé constitue l'extrait brut. L'action est répétée 3 fois (72 heures X 3), soit 9 jours. Les extraits recueillis et réduits après l'évaporateur rotatif sous pression réduite ont conduit à l'extrait brut au méthanol/Chlorure (m = 192,3g). Ce dernier est partitionné à polarité croissante, successivement à l'hexane, à l'acétate d'éthyle, au méthanol ou au n-butanol et la phase aqueuse est lyophilisée pour donner respectivement les extraits fractionnés : VPHE (m = 22g), VPEE (m = 22,6g), VPME (m = 17g) et VPAE (m = 27g).

III.1.3.4. La macération avec agitateur mécanique

1,5 Kg de poudre des écorces de tronc sont extraits avec 7,5 litres de n-heptane (délipidation) dans un gros bûcher de 10 litres en utilisant un agitateur mécanique pendant 2 heures à température ambiante. Le contenu du récipient est filtré sur coton/linge puis sur papier filtre. Le filtrat est évaporé sous pression réduite à 39°C. Cette manipulation est reprise 3 fois avec les résidus pour donner 19,18 g

d'extrait à n-heptane. Les résidus sont séchés sous la hotte toute la nuit. L'extrait au méthanol est amorcé le lendemain.

L'extraction au méthanol : Après la délipidation de 1,5 Kg, les résidus séchés sont repris avec 5 litres de méthanol. Même opération avec n-heptane, cependant, l'extrait total au méthanol est réduit considérablement en un volume de 100ml. Ce volume est transvasé dans une éprouvette de 1000 ml et ajusté d'eau à 900 ml. Le contenu est ensuite transvasé dans l'ampoule à décanter (2000 ml) et partitionné avec 900 ml d'acétate d'éthyle. Après l'épuisement total, la phase organique (acétate d'éthyle) est évaporée sous pression réduite à 39°C (réglage de pression automatique). Un volume réduit est ajouté de 50 ml d'eau et évaporé à nouveau pour éliminer complètement l'acétate d'éthyle. Enfin, le ballon est refroidi dans l'azote liquide pour le congeler et lyophilisé pendant 4 jours pour donner l'extrait à l'acétate d'éthyle, $m = 16,4$ g (Photographie 5).

La phase aqueuse ($m = 30,7$ g) quant elle, est passée à l'évaporateur à 40°C dans l'objectif d'éliminer les traces de l'acétate d'éthyle mais également de réduire le volume de la phase aqueuse avant de la congeler et de la lyophiliser.



Extrait Acétate d'éthyle

Extrait aqueux

Photographie 5 : Les extraits à l'acétate d'éthyle et aqueux (2019)

Les différents extraits ont subi une chromatographie sur couche mince analytique (tableau 18) avant d'être exécutés à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS), passés à l'étude des propriétés respectives d'anti-inflammatoires et chromatographiés sur colonne.

Tableau 18 : Profil chromatographique des extraits des écorces

Extraits	Eluants	Observations sur les chromatogrammes
MeOH	Hex/AcOEt (90 : 10)	3 taches + traînées
Hexane	Hex/AcOEt (95 : 5)	4 taches
AcOEt	Hex/AcOEt (90 : 10)	7 taches
Aqueux	Hex/AcOEt (90 : 10)	2 taches + traînée

III.2. ETUDES DES PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DES EXTRAITS DES ECORCES DE TRONC DE *VITELLARIA PARADOXA* CHEZ LES RATS ALBINOS

III.2.1. Matériel animal

Les effets anti-inflammatoires de *Vitellaria paradoxa* ont été évalués chez les rats blancs de souche Swiss albinos de sexe féminin (Photographie 6). Ces animaux âgés de 3 mois environ et pesant entre 150 et 300 g, ont été préalablement élevés à l'Animalerie de l'Ecole Normale Supérieure de Maroua Cameroun dans les conditions de température ambiante et d'aération suffisante. Leur alimentation était composée de 34 Kg de maïs, de 4 Kg de farine de soja, 6 Kg de tourteaux de coton, 5 kg de poudre de poisson, 1 Kg de poudre d'os et 1,5 Kg de sel de cuisine, soit un mélange de 51,5 Kg pour une valeur nutritionnelle de 56,62% de glucides, 18,68% de protides, 10,6% de lipides, 12,1% de sels minéraux et 2% de vitamines. La préparation de l'aliment consistait à macérer chaque jour une quantité suffisante de ce mélange avec un peu d'eau, à former des boules et à les déposer au-dessus des cages. L'eau de boisson était servie à volonté dans des biberons.



Photographie 6 : Rats blancs de souche Swiss albinos de sexe féminin

III.2.2. Evaluation des propriétés anti-inflammatoires

Les extraits à l'acétate d'éthyle (VPEE), au méthanol ou n-butanol (VPEM) et aqueux ont été étudiés pour les propriétés anti-inflammatoires sur les rats blancs de souche Swiss de sexe féminin (*in vivo*).

III.2.2.1. Inflammation aigüe induite par la carragénine (Saha *et al.* ; 2011)

Le modèle décrit par Saha *et al.* (2011) a été utilisé. Les rats ont été répartis en cinq lots de cinq animaux chacun. Les rats du premier lot ont été traités au DMSO 10% (10 mL/Kg ; *p.o*), ceux du deuxième lot au diclofénac de sodium (10 mg/Kg *p.o*) et ceux des neuf derniers lots aux différents extraits de *Vitellaria paradoxa* de différentes doses (75, 150 et 300 mg/Kg), à raison de 3 lots par type d'extrait. Une heure après ce traitement, l'œdème de la patte a été induit par injection de 0,1 ml de carragénine (1%) sous l'aponévrose plantaire gauche de tous les animaux. L'augmentation du volume de la patte gauche a été mesurée 30 minutes après l'induction de l'inflammation, puis toutes les heures et ce pendant 6 heures à l'aide du pied à coulisse électronique de marque « Fischer scientific » (Photographie 7). La patte enflée a été prise entre les deux dents du pied à coulisse préalablement ouvertes et refermées sur elle. La taille de l'œdème est lue sur le cadran digital du pied à coulisse.



Photographie 7 : Pied à coulisse électronique.

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation a été calculé suivant la formule :

$$PI (\%) = (1 - V / Vt) \times 100$$

V = Volume moyen de l'œdème de la patte des rats traités au diclofénac ou à l'extrait.

Vt = Volume moyen de l'œdème de la patte des rats traités uniquement à une solution de DMSO 10%.

III.2.2.2. Inflammation chronique induite par l'adjuvant complet de Freund (Foyet *et al.*, 2011)

Six groupes de 5 animaux chacun ont été utilisés et divisés en 2 grands groupes répartis comme suit :

A) Un lot dit normal où les animaux ne subissent aucune injection d'adjuvant complet de Freund mais sont traités à la solution de DMSO 10%.

B) Les animaux ayant reçu par injection sous l'aponévrose plantaire de 0,1 mL d'adjuvant complet de Freund et subdivisés en 5 lots comme suit :

- un lot témoin traité à la solution de DMSO 10%, 10 mL/Kg *p.o* ;
- neuf lots essais recevant par voie orale l'extrait au méthanol, l'extrait à l'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux des feuilles de *Vitellaria paradoxa* aux doses de 75, 150 et 300 mg/Kg ;
- un lot témoin positif recevant par voie orale le diclofénac à la dose de 4 mg /Kg.

Les jours 0, 4, 7, 10, 12, 14, 19, 21, 24 et 28, le poids corporel des animaux a été mesuré et l'activité antiarthritique de *Vitellaria paradoxa* a été évaluée grâce aux paramètres suivants : le diamètre de l'articulation, le temps de latence face au stimulus thermique, le score de l'arthrite.

Au 28^{ème} jour, le sang des animaux a été collecté après sacrifice des animaux par overdose du phentobarbital. Les analyses suivantes ont été réalisées : la détermination du taux de globules blancs, la détermination du taux globules rouges, la détermination du taux d'hémoglobine. Des coupes histologiques du tissu suivants ont été réalisées : le cartilage hyalin, le tissu cutané et le tissu osseux, le poids des organes lymphoïdes (rate, foie, thymus) a été mesuré.

III.2.2.3. Mesure de la taille de l'arthrite

La taille de l'arthrite a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse électronique. L'articulation de la patte enflée a été prise entre les deux dents du pied à coulisse préalablement ouvertes et refermées sur elle. Le diamètre ou la taille de l'articulation est lu sur le cadran digital du pied à coulisse.

III.2.2.4. Détermination du score de l'arthrite

Les modifications morphologiques telles que la rougeur, le gonflement et les érythèmes ont été évaluées visuellement et par attribution des scores selon les critères du tableau 10 ci-dessous (Patil *et al.*, 2012).

Tableau 19 : Score de l'arthrite en fonction de la morphologie de la patte infectée

Morphologie	Scores
Patte normale (pas de gonflement, ni d'érythème)	0
Faible gonflement et d'érythème confiné au niveau des doigts	1
Gonflement et d'érythème au niveau des doigts	2
Gonflement sévère et d'érythème	3
Grosse déformation et impossibilité d'utiliser la patte	4
Le score maximal	8

III.2.2.5. Mesure du poids des animaux

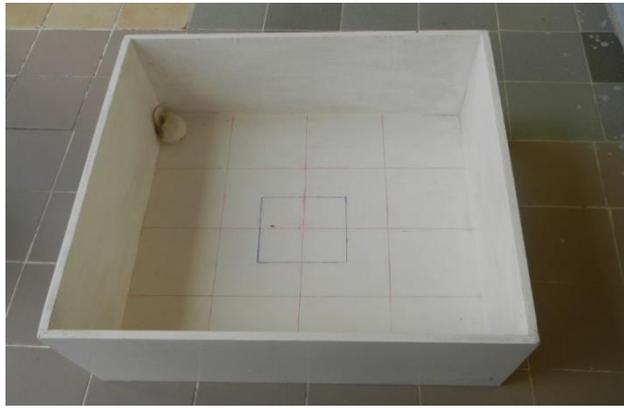
Chaque animal a été pesé sur une balance à précision de marque « Precisa 12000 D SCS » (Photographie 8 ci-après). Chaque animal était placé au centre du plateau de la balance et son poids s'affichait automatiquement sur le cadran de l'appareil.



Photographie 8 : Balance de précision.

III.2.2.6. Mesure de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice a été mesurée par le test du labyrinthe à champ ouvert illustré dans la photographie 9 ci-dessous. Chaque animal était placé au centre de l'arène et laissé pendant 5 minutes. Le nombre de lignes traversées (mouvement horizontal) et le nombre de dressage ont été pris comme indicateurs de l'activité locomotrice des animaux. Ce test permet de mesurer non seulement l'activité locomotrice des animaux, mais également le comportement anxiolytique.



Photographie 9 : Un rat dans un labyrinthe à champ ouvert

III.2.2.7. Mesure de l'effet nociceptif

Nous avons utilisé une plaque chauffante constituée d'un bain marie maintenue à $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ au-dessus duquel était posé un plateau métallique ne permettant pas à l'animal de se soustraire de l'arène (photographie 10). Chaque animal a été déposé sur la plaque et le seuil de la douleur a été déterminé par le temps de latence de la réponse algésique (retrait ou léchage de la patte douloureuse). Un « cut-off » time de 15 secondes a été observé pour tous les sujets.



Photographie 10 : Dispositif de plaque chauffante

III.2.2.8. Mesure du poids des organes

A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Quelques organes lymphoïdes (thymus, rate, foie) ont été prélevés sur chaque animal et pesés.

III.2.2.9. Détermination des paramètres sanguins

Quelques paramètres hématologiques (taux de globules blancs (WBC), taux de globules rouges (RBC), taux d'hémoglobine (Hb)) ont été évalués à partir du sang recueilli dans des tubes à NFS de 5 ml contenant un anticoagulant, l'EDTA K3. Ces paramètres ont été déterminés grâce à l'automate d'hématologie de marque « Sysmex KX -21 N » dont le principe est basé sur la variation d'impédance (principe Coulter) qui est la mesure de la variation de résistance électrique au passage d'une cellule : le liquide de dilution étant plus conducteur que ne sont les cellules, chaque passage correspond à une baisse de conductivité électrique. La chute de tension électrique est proportionnelle à la taille de la cellule.



Photographie 11 : Automate d'hématologie

III.2.2.10. Réalisation des coupes histologiques

Les coupes histologiques ont été réalisées sur le cartilage hyalin, le tissu cutané et le tissu osseux des animaux selon la méthode décrite par Paquet en 2000. Les étapes des analyses histologiques sont les suivantes :

- La fixation : la fixation s'est faite grâce au formol 10%.

- La décalcification : la décalcification a été réalisée par immersion des organes dans une solution d'acide chlorhydrique à 5% réalisée avec le fixateur pendant une durée de 3 jours.
- Le « Trimming » : après fixation, les organes ont été prélevés et déposés sur du papier absorbant le formol. A l'aide d'une coupelle à lame de rasoir, les organes ont été coupés avec une orientation précise et rangés dans des cassettes bien étiquetées.
- La déshydratation : ce procédé a consisté à faire séjourner les cassettes contenant les tissus successivement dans des bains d'alcool de concentration croissante pendant un temps bien précis : l'éthanol à 50% (1h), puis à 70% (1h), ensuite à 95% (1h dans le 1^{er} bac, 1h30 min dans 2^{ème} bac) et enfin à 100% (1h dans le 1^{er} bac, 1h30 min dans le 2^{ème} bac et 2h dans le 3^{ème}).
- L'éclaircissement : il s'agit de remplacer la solution de déshydratation par un solvant miscible dans le milieu d'inclusion. Cette étape consiste au passage des cassettes contenant les tissus dans des bacs de xylène (1h dans le 1^{er} et 1h30 dans le 2^{ème}).
- L'imprégnation : l'imprégnation a permis de faire séjourner les cassettes contenant les tissus dans des bains de paraffine en fusion (étuve à 60°C) ; 1h dans le 1^{er} bain, 1h30 min dans le 2^{ème} et 2h dans le 3^{ème}.
- L'inclusion : les tissus ont été placés dans des moules remplis de paraffine en fusion qui était mise à solidifier sur une surface froide après orientation appropriée du tissu dans le bloc.
- Les coupes : les blocs obtenus ont été coupés à l'aide d'un microtome volant de marque « Reichert-Jung 2030 ». Des rubans de coupes (5 µm) d'organes obtenus ont été étalés dans un bain marie contenant de l'eau gélatinée. Au moyen de lames porte-objet propre et étiquetées, les coupes ont été recueillies et séchées à l'étuve à 45 °C pendant 24 heures.
- La coloration : les colorations ont permis de visualiser les constituants cellulaires et tissulaires en leur faisant capter et fixer les colorants de façon plus ou moins sélective. Les coupes ont subi dans un premier temps une étape de déparaffinage. Il s'agissait de faire séjourner les coupes 5 à 10 min dans des bains de xylène (2 bacs), puis dans 3 bacs d'éthanol de concentration décroissante (100%, 95% et 70%). Les lames ont été ensuite rincées 5 à 10 min à l'eau distillée avant de commencer la coloration proprement dite. Deux colorations ont été utilisées à savoir la coloration à l'hématoxyline-éosine et la coloration de trichrome de masson.
- Le montage : le montage a permis de protéger les coupes par une fine lamelle de verre et de les conserver. Le milieu de montage était la résine synthétique non miscible à l'eau, par conséquent, les coupes ont été déshydratées et éclaircies avant d'être montées. L'observation s'est faite au microscope « Olympus Japan 5119 ».

III.3. SEPARATION ET CARACTERISTIQUES DES COMPOSES

III.3.1. Séparation

La séparation des métabolites secondaires est basée sur la chromatographie classique sur colonne, la plaque CCM préparative et le sephadex sont utilisés pour la purification des fractions issues des dégrossissements. Les colonnes en verre de dimensions 1 à 5 Cm de diamètre et 32 à 86 Cm de hauteur ont servi valablement de réaliser les chromatographies sur colonne sous pression atmosphérique ; le gel de silice utilisé comme adsorbant pour la chromatographie sur colonne est de fabrication MERCK ayant pour la granulométrie 0,025-0,06 mm.

Les colonnes ont été éluées avec un gradient ou système de polarité croissante : hexane, hexane/acétate d'éthyle, acétate d'éthyle, acétate d'éthyle/méthanol et méthanol. Entre autres, 150 à 230 fractions de 100 à 200 ml chacun, ont été recueillies, concentrées et regroupées sur la base de la chromatographie sur couche mince (CCM).

Certaines fractions précipitaient, d'autres ont été filtrées directement suivies d'une recristallisation ou purifiés. Les différents composés sont révélés sur la CCM à l'UV qu'après pulvérisation à l'iode et indexés VP1 à VPn.

- Chromatographie sur colonne de 17g de VPEE des écorces de tronc de *Vitellaria paradoxa* 17 g de VPE_A a été fixé avec 17 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur colonne de 4 cm de diamètre et 0,76 cm de hauteur en utilisant comme adsorbant le gel de silice (100 g) de même granulométrie. Cette colonne a été éluée avec un gradient de polarité croissante Hex/AcOEt et enfin le MeOH. En tout 223 fractions de 100 ml, chacune ont été recueillies, concentrées et regroupées sur la base de la CCM, voir le tableau 20 ci-dessous.

Tableau 20 : Profil chromatographique de 17 g de l'extrait VPEE

Eluants	Fractions	Eluants pour CCM	Observations sur les Chromatogrammes
Hex (100%)	1 - 11	Hex/AcOEt (97,5 : 2,5)	2 taches (T)
Hex/AcOEt (99 : 1)	12 -18	Hex/AcOEt (97,5 : 2,5)	2T
Hex/AcOEt (98 : 2)	19 - 25	Hex/AcOEt (95 : 5)	19-20 : 2T ; 21 : 1T(VP1) ; 22-24 : 2T ; 25 : 1T (VP2)
Hex/AcOEt (97 : 3)	26 - 35	Hex/AcOEt (93: 7)	1T (VP2)
Hex/AcOEt (96 : 4)	36 - 45	Hex/AcOEt (92,5 : 7,5)	2T
Hex/AcOEt (95 : 5)	46 - 54	Hex/AcOEt (92 : 8)	46-50 : 3T ; 51-52 : 1T ; 53-54 : 2T
Hex/AcOEt (94 : 6)	55 - 66	Hex/AcOEt (90 : 10)	55-61 : 3T ; 62 : 1T ; 63-64 : 2T ; 65-66 : 4T
Hex/AcOEt (93 : 7)	67 - 83	Hex/AcOEt (85 : 15)	67-69 : 4T ; 70-73 : 3T ; 74-83 : 2T
Hex/AcOEt (92 : 8)	84 - 93	Hex/AcOEt (85 : 15)	2T
Hex/AcOEt (90 : 10)	94 - 103	Hex/AcOEt (80 : 20)	2T

Hex/AcOEt (85 : 15)	104 - 113	Hex/AcOEt (85 : 15)	104-106 : 4T ; 110-113 : 1T (VP3)
Hex/AcOEt (80 : 20)	114 - 123	Hex/AcOEt (85 : 15)	1T (VP3)
Hex/AcOEt (75 : 25)	124 - 131	Hex/AcOEt (80 : 20)	124-126 : (VP3)+2T ; 127-131 : 2T
Hex/AcOEt (70 : 30)	132 - 141	Hex/AcOEt (80 : 20)	132-134 : 5T ; 135-136 : 3T ; 137 : 1T(VP6) ; 138-139 : 2T ; 140-141 : 1T
Hex/AcOEt (65 : 35)	142 - 150	Hex/AcOEt (70 : 30)	142-148 : 3T ; 149-150 : 1T (VP4)
Hex/AcOEt (60 : 40)	151 - 158	Hex/AcOEt (70 : 30)	(VP4) + 2T
Hex/AcOEt (55 : 45)	159 - 168	Hex/AcOEt (70 : 30)	159-163 : 2T ; 164-165 : 1T ; 166-168 : 2T
Hex/AcOEt (50 : 50)	169 - 178	Hex/AcOEt (65: 35)	169-175 : 3T ; 176-178 : 1T (VP5)
Hex/AcOEt (45 : 55)	179 - 187	Hex/AcOEt (65: 35)	(VP5) + T
Hex/AcOEt (40: 60)	188 - 195	Hex/AcOEt (20 : 80)	2T
Hex/AcOEt (20 : 80)	196 - 205	AcOEt (100)	196-197 : (VP7) + T ; 198 : 1T (VP5-1) ; 199-205 : traînée
AcOEt (100)	206 - 215	AcOEt/MeOH (90 : 10)	Une traînée
AcOEt/MeOH (90 : 10)	216 - 223	AcOEt/MeOH (90 : 10)	Une traînée

Tableau 21 : Profil chromatographique sur colonne de 22,6g de l'extrait VPEE des racines

Eluants	Fractions	Eluants pour CCM	Observations sur les Chromatogrammes
Hexane (100%)	1 - 11	Hex (100%)	1-7 : 1 taches (T) ; 8-11 : 2T
Hex/AcOEt (98 : 2)	12 -23	Hex/AcOEt (97 : 3)	12-13 : 2T ; 14-16 : 1T ; 17-21 : 0T ; 22-23 : 3T
Hex/AcOEt (98 : 4)	24 - 34	Hex/AcOEt (97 : 3)	24-26 : 3T ; 27-34 : 2T
Hex/AcOEt (94 : 6)	35 - 44	Hex/AcOEt (95 : 5)	35-44 : 2T
Hex/AcOEt (90 : 10)	45 - 55	Hex/AcOEt (95 : 5)	45-49 : 2T ; 50-55 : 1T
Hex/AcOEt (85 : 15)	56 - 64	Hex/AcOEt (95 : 5)	56-64 : 1T
Hex/AcOEt (80 : 20)	65 - 76	Hex/AcOEt (90 : 10)	65-76 : 1T
Hex/AcOEt (75 : 25)	77 - 87	Hex/AcOEt (85 : 15)	77-87 : 1T
Hex/AcOEt (70 : 30)	88 - 95	Hex/AcOEt (60 : 40)	88-95 : 1T
Hex/AcOEt (65 : 35)	96 - 101	Hex/AcOEt (60 : 40)	96-101 : 1T
Hex/AcOEt (60 : 40)	102 - 124	Hex/AcOEt (45 : 55)	102-103 : 2T ; 104-108 : 3T ; 109-124 : 2T
Hex/AcOEt (55 : 45)	125 - 133	Hex/AcOEt (45 : 55)	125-133 : 1T
Hex/AcOEt (50 : 50)	134 - 152	Hex/AcOEt (45 : 55)	134-152 : 1T
Hex/AcOEt (40 : 60)	153 - 163	Hex/AcOEt (40 : 60)	153-160 : 2T ; 161-163 : 1T
Hex/AcOEt (20 : 80)	164 - 173	Hex/AcOEt (40 : 60)	164-170 : 1T ; 171-173 : 1T+traînée
AcOEt (100%)	174 - 185	AcOEt (100%)	174-182 : 1T+traînée ; 183-185 : traînée
A/MeOH (90 : 10)	186 - 193	AcOEt (100%)	186-193 : traînée
MeOH (100%)	194 - 200	A/MeOH (90 : 10)	194-200 : traînée

Tableau 22 : Profil chromatographique sur colonne de 8 g de l'extrait VPEEG des graines.

Eluants	Fractions	Eluants pour CCM	Observations sur les Chromatogrammes
Hexane (100%)	1 - 6	Hex/AcOEt (85 : 15)	1-2 : Otaches (T) ; 3 : 1T ; 4-6 : 0T
Hex/AcOEt (95 : 5)	7 - 9		7-9 : 0T
Hex/AcOEt (90 : 10)	10 - 18		10 : 0T ; 11-12 : 6T ; 13 : 3T + trainée ; 14-18 : 1T (VP18) + trainée
Hex/AcOEt (85 : 15)	19 - 23	Hex/AcOEt (70 : 30)	19-22 : 1T + trainée ; 23 : trainée
Hex/AcOEt (80 : 20)	24 - 28		24-28 : trainée
Hex/AcOEt (75 : 25)	29 - 34		29-34 : 1T
Hex/AcOEt (70 : 30)	35 - 39	Hex/AcOEt (50 : 50)	35-37 : trainée + 1T ; 38-39 : 1T
Hex/AcOEt (65 : 35)	40 - 44		40-44 : 1T
Hex/AcOEt (60 : 40)	45 - 48		45-48 : 1T
Hex/AcOEt (50 : 50)	49 - 51		49-51 : 2T
Hex/AcOEt (35 : 65)	52 - 56		52-56 : 2T
Hex/AcOEt (20 : 80)	57 - 63	AcOEt (100%)	57-95 : trainée
AcOEt (100%)	64 - 72		
A/MeOH (90 : 10)	73 - 80		
MeOH (100%)	81 - 95		

III.3.2. Quelques tests caractéristiques des composés

III.3.2.1. Test des stérols et des terpénoïdes

Réactif : 1 ml de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré, 20 ml d'anhydride acétique, 50 ml de CHCl₃.

Manipulation : Dans un tube à hémolyse, on dissout une petite quantité de produit à l'aide d'un solvant approprié (de préférence). A la solution obtenue, on ajoute quelques gouttes de réactifs de Libermann-Buchard, les triterpènes donnent avec le réactif, une coloration violacée et les stérols une coloration vert-bleuâtre.

III.3.2.2. Test des flavonoïdes

Dans un tube à essai, on introduit 0,5g d'extrait ou fraction de plante dans 5ml de méthanol. On ajoute quelques copeaux de Magnésium et de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré, ceci goutte à goutte. On observe une effervescence de la solution qui vire au rouge indiquant ainsi la présence des flavonoïdes.

III.3.3. Technique d'extraction et séparation par le bain ultrason

Au cours de ces travaux, le sonicateur (Digital ultrasonic cleaner) est retenu pour les extractions. Il présente l'avantage de fournir un bon rendement par rapport à la macération tout en évitant la dégradation des composés qu'on observe avec le Soxhlet, ainsi que la réduction du temps d'extraction. Ceci nous a permis d'obtenir des extraits en quantité suffisante afin de réaliser les analyses RMN et les activités biologiques.

III.4. HEMISYNTHESE DES DERIVES DES COMPOSES ISOLEES

Les triterpènes pentacycliques **127**, **126** et **91** ont subi des transformations chimiques sur la fonction carboxylique en C-28 (méthylation). Ils sont évalués pour des activités anticancéreuses et les résultats sont très concluants. L'acide bétulinique **91** était le plus actif et nous a permis d'envisager la synthèse des analogues structuraux.

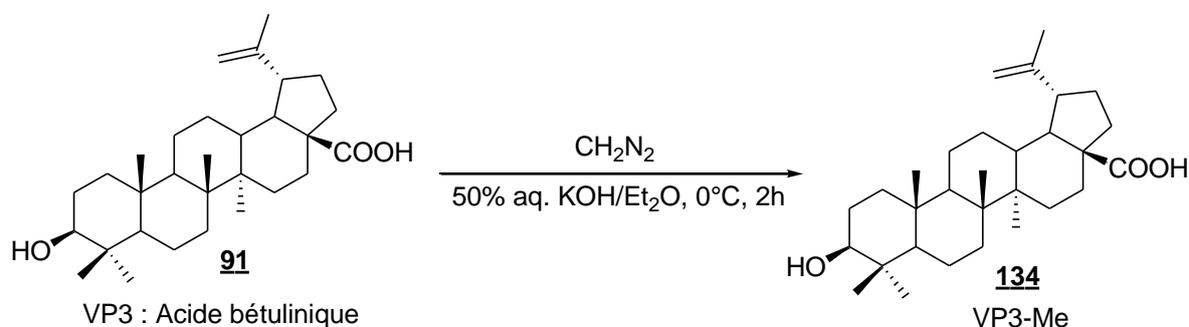


Schéma 48 : Fonctionnalisation de COOH (VP3)

III.4.1. Aperçu bibliographique sur l'acide bétulinique

L'acide bétulinique **91** est un composé naturel de la famille des triterpènes pentacycliques du lupane. Depuis sa découverte et en raison de ses activités biologiques très importantes contre beaucoup de pathologies, il a attiré l'attention de nombreux chercheurs à fonctionnaliser l'acide bétulinique pour obtenir de nouveaux dérivés avec l'activité biologique améliorée par l'amination, l'estérification, l'alkylation et autres (Kim *et al.*, 1998 ; 2001, Jeong *et al.*, 1999 ; Genet *et al.*, 2010). Cependant, l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique est considérée comme un problème majeur de sa biodisponibilité dans l'organisme vivant.

L'acide bétulinique comporte 3 positions fonctionnelles qui ont servi de cibles dans la synthèse des analogues : l'hydroxyle en position C-3, l'alcène en position C-20 et l'acide carboxylique en position C-28.

Nombreuses études menées sur l'acide bétulinique ont montré que :

- la fonction alcène en position C-20 n'est pas un site fonctionnel favorable à modifier pour augmenter la cytotoxicité.

- l'acide carboxylique en C-28 : cette fonction s'est avérée essentielle pour présenter l'activité cytotoxique. Toutefois, des conjugués d'acides aminés avec une hydrosolubilité supérieure : leucine, alanine, valine et glycine ont présenté des propriétés cytotoxiques similaires à l'acide bétulinique.
- la synthèse d'analogues en position C-3 : un nombre limité de structures a été évalué pour la cytotoxicité. L'ajout d'une fonction oxime sur cet hydroxyle n'a pas d'impact positif sur l'activité anticancéreuse, en plus de provoquer la perte de sélectivité (Hiroya *et al.*, 2002).
- l'attachement d'un sucre (glycosylation) en positions C-3 et C-28 augmente sensiblement son hydrosolubilité. En revanche, cela diminue considérablement sa réactivité (Kim *et al.*, 1998).

Dans l'organisme vivant, une modification de l'hydrosolubilité influence principalement les propriétés pharmacocinétiques. C'est-à-dire l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination du composé dans les fluides corporels, ainsi que le transport membranaire de la molécule. Donc, la glycosylation peut dans certains cas, restreindre ou inhiber la diffusion de la molécule à travers la membrane cellulaire. Autres conséquences d'influencer fortement le transport à travers des barrières biologiques importantes comme la barrière hémato-encéphalique et bloquer ainsi l'entrée de plusieurs composés essentiels à l'intérieur du tissu cervical.

L'objectif visé pour la synthèse des dérivés de l'acide bétulinique, était de faire un remplacement non réactif par approche conceptionnelle de médicaments basée sur le substrat (Substrate Based Drug Design) en fonctionnalisant l'hydroxyle en position C-3. Fort de ce qui précède, le choix d'un réactif à longue chaîne carbonée, l'un des principes caractéristiques de Drug Design. Ces dérivés seront facilement pénétrables dans les membranes cellulaires.

III.4.2. Réactifs et produits utilisés pour la synthèse

Les réactifs et produits qui ont fait de la modification chimique sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 23 : Réactifs et produits de synthèse

N°	Désignation	N° cas : Quantité	Nom du fabricant
01	Pyridine anhydre 99,8% (C ₅ H ₅ N) : M=79,10 ; d=0,983 ; bp=116°C	110-86-1 : 250ml	FLUKA
02	4-Diméthylamino-pyridine (DMAP) : C ₇ H ₁₀ N ₂ ; M=122,17 ; Fp=110°C ; mp=111°C	1122-58-3 : 25g	SIGMA
03	Acide chlorhydrique (HCl) ≥ 37% : M=36,46 ; bp >100°C	7647-01-0 : 1l	SIGMA- ALDRICH
04	Sodium sulfate anhydrous (Na ₂ SO ₄) ≥ 99% : M=142,04	7757-82-6 : 5Kg	FLUKA
05	Sodium Chloride (NaCl) : M=58,44 ;	7647-14-5 : 1Kg	SIGMA
06	Silice : 40 - 63 µm	7631-86-9 : 1	CHEMICALS

		Kg	
07	Valeric anhydride 97% (C ₁₀ H ₁₈ O ₃) : M=186,25 ; d=0,944 ; bp=228-230°C ; mp=-56°C	2082-59-9 : 100 ml	ALDRICH
08	Heptanoic anhydride 99% (C ₁₄ H ₂₆ O ₃) : M=242,36, d=0,917	626-27-7 : 100 ml	ACROS ORGANICS
09	Diazomethane (MNG)		

III.4.3. Conditions opératoires d'hémisynthèse des dérivés de l'acide bétulinique

50mg (0,11 mmol, 1,0 éq) de l'acide bétulinique sont dissous dans 0,5 ml de pyridine anhydre. On ajoute au mélange 116 μ L (0,44 mmol, 4,0 éq) d'anhydride heptanoïque ou valérique, 87 μ L (0,44 mmol, 4,0 éq) ou 26 mg (0,22 mmol, 2,0 éq) de DMAP respectivement. Le mélange réactionnel est porté au reflux sous l'azote pendant 10 heures. Le milieu réactionnel est ensuite acidifié avec HCl 5% et extrait avec 5ml de CHCl₃. La phase organique est lavée avec de l'eau et de NaCl (10%), séchée sur Na₂SO₃, et évaporée. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par la chromatographie sur colonne en utilisant la silice comme adsorbant et CHCl₃ (100%), l'éluant pour obtenir une poudre blanche amorphe avec un rendement de 60%.

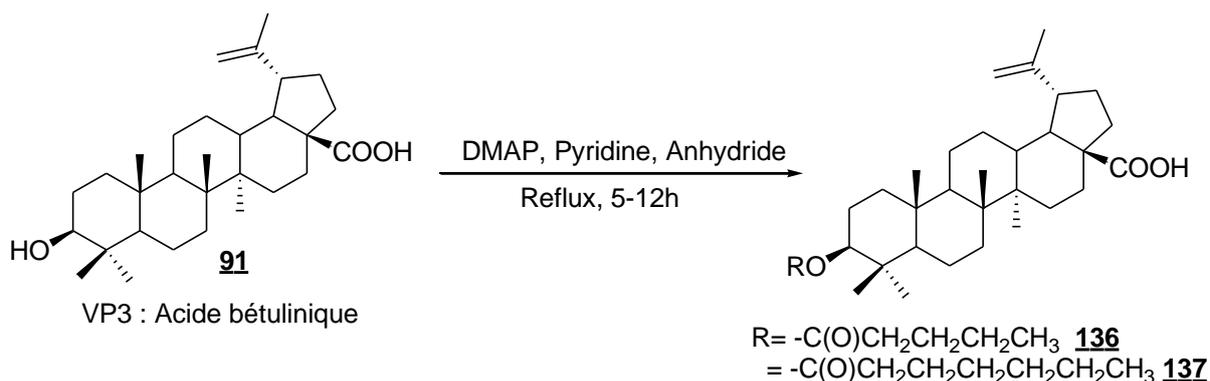
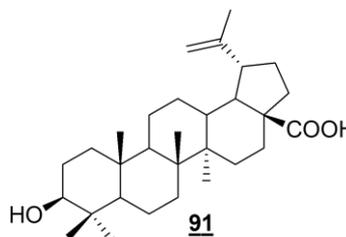


Schéma 49 : Hémisynthèse sur OH de VP3 en C-3

III.5. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES

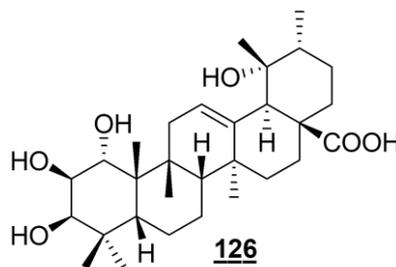
III.5.1. Composé VP3 (**91**)

- PF : 282-285°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C₃₀H₄₇O₃
- Masse molaire : 455 g/mol
- Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz, figure 19, tableau 10)
- Spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 150 MHz, figure 20, tableau 10)



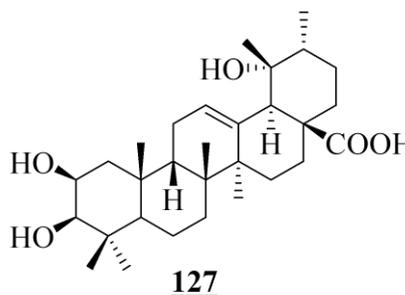
III.5.2. Composé VP4 (126)

- PF : 262-264°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : $C_{30}H_{47}O_6$
- Masse molaire : 503 g/mol
- Spectre RMN 1H (CD_3OD , 600 MHz, figure 28, tableau 11)
- Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz, figure 30, tableau 11)



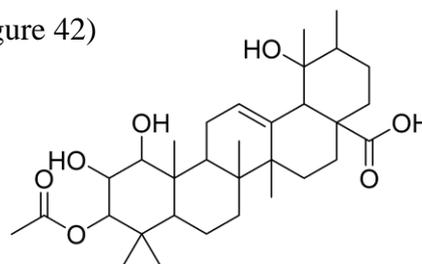
III.5.3. Composé VP5 (127)

- PF : 260-262°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : $C_{30}H_{48}O_5$
- Masse molaire : 489 g/mol
- Spectres RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz, figure 41)
- Spectre RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz, figure 42)



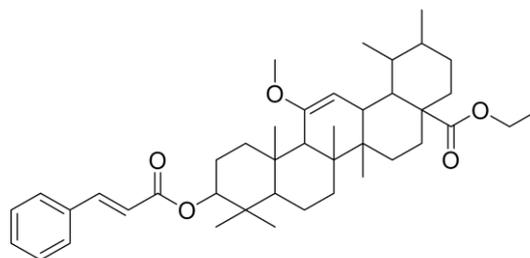
III.5.4. Composé VP11 (128)

- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : $C_{32}H_{50}O_7$
- Masse molaire : 535 g/mol
- Spectre RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz, figure 50, tableau 12)



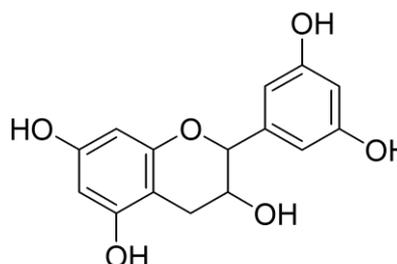
III.5.5. Composé VP2 (129)

- Aspect : Cristaux blancs
- Formule brute : $C_{41}H_{60}O_5$
- Masse molaire : 632 g/mol
- Spectre RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz, figure 56, tableau 13)



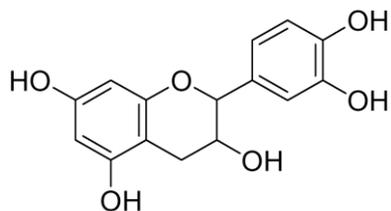
III.5.6. Composé VP5-1 (23)

- PF : 212-214°C
- Aspect : Cristaux jaunes
- Formule brute : $C_{15}H_{14}O_6$
- Masse molaire : 290 g/mol
- Spectre RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz, figure 61)
- Spectre de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz, figure 63)



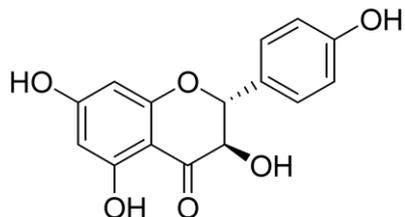
III.5.7. Composé VP7 (22)

- PF : 196-198°C
- Aspect : Cristaux jaunâtres
- Formule brute : C₁₅H₁₄O₆
- Masse molaire : 291 g/mol
- Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz, figure 67)
- Spectre de RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz, figure 68)



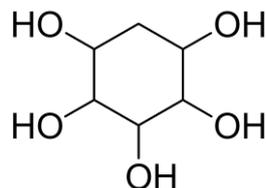
III.5.8. Composé VP17 (130)

- Aspect : cristaux jaunes
- Formule brute : C₁₅H₁₂O₆
- Masse molaire : 288 g/mol
- Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz, figure 70, tableau 14)



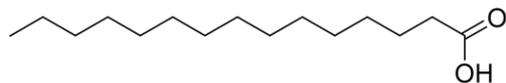
III.5.9. Composé VP6 (131)

- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C₆H₁₂O₅
- Masse molaire : 164 g/mol
- Spectre RMN ¹H (D₂O, 600MHz, figure 76, tableau 15)



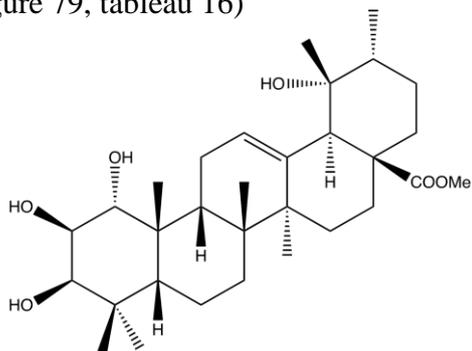
III.5.10. Composé VP18 (132)

- Aspect : Poudre blanche amorphe
- Formule brute : C₁₅H₃₀O₂
- Masse molaire : 242 g/mol
- Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz, figure 79, tableau 16)



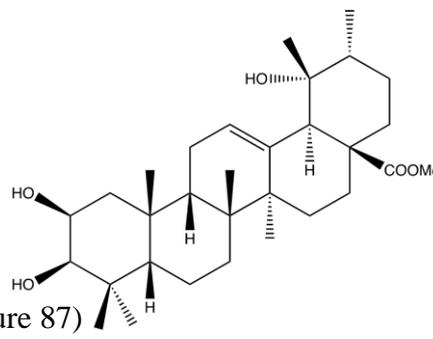
III.5.11. Composé VP4-Me (133)

- Point de fusion : 155-157°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C₃₁H₅₁O₆
- Masse molaire : 519 g/mol
- Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz, figure 84)
- Spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 150 MHz, figure 85)



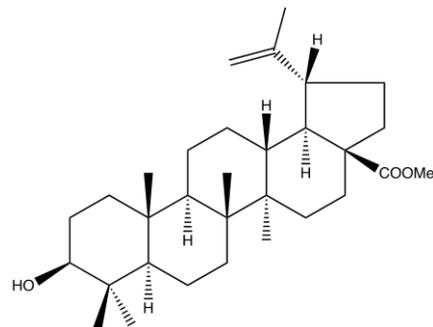
III.5.12. Composé VP5-Me (134)

- Point de fusion : 103-105°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C₃₁H₅₁O₅
- Masse molaire : 503 g/mol
- Spectre RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz, figure 87)
- Spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 150 MHz, figure 88)



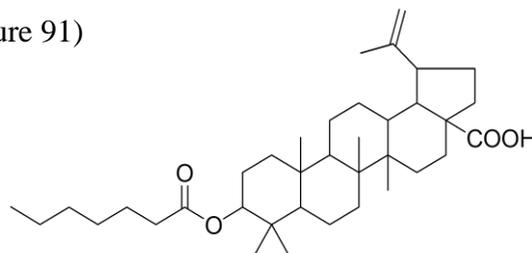
III.5.13. Composé VP3-Me (135)

- Point de fusion : 205-207°C
- Aspect : Poudre blanche
- Formule brute : C₃₁H₅₁O₃
- Masse molaire : 471 g/mol
- Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz, figure 90)
- Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz, figure 91)



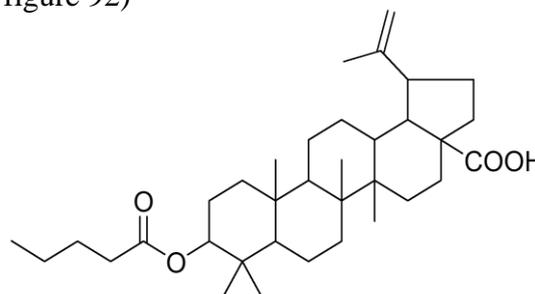
III.5.14. Composé VP3-H1 (136)

- Aspect : Poudre blanche amorphe
- Formule brute : C₃₇H₅₉O₄
- Masse molaire : 567 g/mol
- Spectre RMN ¹H d (CDCl₃, 600 MHz, figure 92)



III.5.15. Composé VP3-V1 (137)

- Aspect : Poudre blanche amorphe
- Formule brute : C₃₅H₅₅O₄
- Masse molaire : 539 g/mol
- Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz, figure 93)



III.6. ETUDE D'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES COMPOSES

Les essais biologiques ont été réalisés par l'équipe de Docteur Daniel ROMO du Département de Chimie et Biochimie, Synthèse CPRIT et Laboratoire Drug-Lead Discovery, Université Baylor, Waco, Texas aux Etats-Unis. Les conditions opératoires sont ci-après.

III.6.1. Culture cellulaire

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées dans le milieu d'aigle modifié de Dulbecco (Corning), supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (Gibco) et des antibiotiques (Lonza).

III.6.2. Evaluation de l'activité cytotoxique

Pour la détermination de la cytotoxicité, les cellules ont été plaquées dans des plaques à puits (Nid Scientifique) à une densité de 2000 cellules par puits dans 100µl de milieu par puits. Le lendemain, le milieu a été aspiré et 100µl de milieu dans lesquels une dilution en série de composés dissous dans DMSO (DMSO comme contrôle) a été ajouté aux puits en triple. Trois jours plus tard, le nombre relatif de cellules métaboliquement actives a été déterminé par l'ajout du réactif CellTiter-Glo (Promega) et la mesure de la chimioluminescence selon le protocole du fabricant en utilisant un Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific).

III.6.3. Calcul de pourcentage

Pour calculer le pourcentage de viabilité, le signal des puits de fond (milieu seulement) a été soustrait de chaque puits, puis la valeur de chimioluminescence restante a été normalisée pour signaler les puits avec quantités équivalentes de DMSO.

III.6.4. Induction d'apoptose

L'induction de l'apoptose a été mesurée en utilisant le kit de coloration à l'Annexine V/ iodure de propidium (BD Biosciences) selon les instructions du fabricant. Les analyses ont été effectuées en au moins trois exemplaires.

REFERENCES

- Abe, I., Rohmer, M., Prestwich, G.D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews*, 1993 : 2189-2206.
- Abramson, O., Durant, M., Mow, W., Finley, A., Kodali, P., Wong, A. Incidence, prevalence and time trends of pediatric inflammatory bowel disease in Northern California, 1996 to 2006. *The Journal of Pediatrics*, 2010 : 233-239.
- Adjanooun, E., De Souza, S., Guinko, S. Les ordres des Angiospermes. Principales familles et espèces caractéristiques. Cotonou, Université du Bénin (*ex. Dahomey*). 1973.
- Adle-Biassette, H., Chretien, F., Wingertsmann, L., Hery, C., Ereau, T., Scaravilli, F., et al. Neuronal apoptosis does not correlate with dementia in HIV infection but is related to microglial activation and axonal damage. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1999 : 123-133.
- Adoum. Technique artisanale d'extraction du beurre de karité au Moyen-Chari Sud du Tchad. In Siaka Kone (éd), Atelier International d'échanges sur « Oléagineux et petites technologies ». 23-27 septembre, Ngaoundéré, Cameroun. 1996.
- Adu-Ampomah, Y., Amponsah, J.D., Yidana, J.A. Collecting germplasm of Shea nut (*Vitellaria paradoxa*) in Ghana. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 1995 : 37-38.
- Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A. Alpha-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes ; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006 : 449-455.
- Allal, F., Vaillant, A., Sanou, H., Kelly, B., Bouvet, J.M. Isolation and characterization of new microsatellite markers in shea tree (*Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn). *Molecular Ecology Resources*, 2008 : 824.
- Allard, S., Ourisson, G. Remarques sur la nomenclature des triterpènes. *Tetrahedron*, 1957 : 277-283.
- Amieva, H., Andrieu, S., Berr, C., Buée, L., Checler, F., Clément, S., et al. Maladie d'Alzheimer : enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux. INSERM ; s.d.
<http://lara.inist.fr/handle/2332/1336> (consulté le 15 Septembre 2014).
- Asubiojo, O.I., Guinn, U.P., Okunuga, A. Multiement analysis of Nigerian chewing sticks by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical Chemistry*, 1982 : 149-156.
- Aubreville, A. Notes sur les Sapotacées de l'Afrique équatoriale. *Notulae Systematicae*, 1960 : 253p.

- Aubreville, A. Flore forestière soudano-guinéenne. Société d'Editions géographiques maritimes et coloniales. Paris, 1950.
- Badifu, G. Lipid composition of Nigerian *Butyrospermum paradoxum* kernel. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1999 : 238-244.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves : the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001 : 125-132.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., Delattre, J.Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 2003 : 323-331.
- Berchtold, N.C., Cotman, C.W. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease : Greco-Roman Period to the 1960s. *Neurobiology of Aging*, 1998 : 173-189.
- Berhaut, J. Flore du Sénégal, 2 éd. Clairafrique. Dakar, 1967.
- Bieche, I., Khodja, A., Lidereau, R. Deletion mapping of chromosomal region 1p32 in primary breast cancer. *Genes Chromosome Cancer*, 1999 : 255-263.
- Bishayee, A., Ahmed, S., Brankov, N., Perloff, M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in Bioscience. Journal Virtual Library*, 2011 : 980-996.
- Block, M.L., Zecca, L., Hong, J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007 : 57-69.
- Bonkougou, G.E. Monographie du karité, *Butyrospermum paradoxum* (GAERTN. f.) HEPPER, espèce agroforestière à usages multiples. *IRBET/CNRST – Ouagadougou*. 1987.
- Booth, S.F.M., Wickens, G.E. Non-timbers uses of selected arid zone trees and shrubs in Africa. *FAO conservation guide 19*, Rome (Italie), 1988.
- Brat, P., Georgé, S., Bellamy, A., Du Caffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., Amiot, M.J. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *Journal Nutrition*, 2006 : 2368-2373.
- Bruneton, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. 2 TEC DOC. Paris, 1993.
- Bruneton, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris: Technique et Documentation-Lavoisier, 2009.

- Buttini, M., Appel, K., Sauter, A., Gebicke-Haerter, P.J., Boddeke, H.W. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience*, 1996 : 1-16.
- Carette, C., Malotaux, M., Van Leewen, M., Tolkamp, M. Shea nut and butter in Ghana, opportunities and constraints for local processing. 2009. www.resilience-foundation.nl/docs/shea (consulté le 15 Avril 2014).
- Chaudard, P., MANGE, L. Timidité, volonté, activité. (Voir au-delà de la connaissance). 3ème Millénaire, 1981.
- Chevalier, A. Le karité ou arbre à beurre. Oléagineux, p.4. In Les oléagineux dans les pays d'Afrique occidentale associés au marché commun ; I la production, le commerce et la transformation des produits. Paris: Editions Champion, 1946.
- Clifford, M.N. Phenol-protein interactions and their possible significance for astringency. In G.G. Birch and M.G. Lindley (eds), Interaction of Food Components. *Elsevier Applied Science*, 1986 : 143-64.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 : 72-79.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. 2006.
- De la Monte, S.M., Wands, J.R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling and malfunction in the central nervous system: Relevance to Alzheimer's disease. *Journal Alzheimer's Disease*, 2005 : 45-61.
- DFSC (Danida Forest Seed Centre). *Vitellaria Paradoxa* Gaertn. F. Seed Leaflet, No. 50. 2000.
- Disease, International Alzheimer. *World Alzheimer Report 2013 Journey of Caring*. s.d. Alzheimer Disease International. [http://www.alz.co.uk/research/World Alzheimer Report 2013. pdf](http://www.alz.co.uk/research/World%20Alzheimer%20Report%202013.pdf) (consulté le 03 Mai 2014).
- Emberger, L. Les végétaux vasculaires - Traité de Botanique (systématique). Masson et Cie, 1960.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, M.D. GLOBOCAN 2002 cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC cancer base no. 5, version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004. **P**
- Foyet, H.S., Abdou Bouba, A., Ponka, R., Asongalem, A.E., Kamtchouing, P., Nastasa, V. Effets of Hibiscus asper leaves extracts on carrageenan induced oedema and complete Freund's adjuvant-induced arthritics in rats. *Journal of Cell and Animal Biology*, 2011 : 69-75.

- Foyet, H.S., Tsala, E.T., Zogo, E.B.J.C., Azanfack, N.C., Lissia, T.H., Eyong, K.O. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of a methanol extract from *Vitellaria paradoxa* stem bark. *Pharmacognosy Research*, 2015 : 1595.
- Fulda, S., Jeremias, L., Pietsch, T., Debatin, K.M. Betulinic acid : a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors, *Klinische Paediatric*. 1999a : 319-322.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., et al. Malignant astrocytic glioma : genetics, biology, and paths to treatment. *Gene & Development*, 2007 : 2683-2710.
- Genet, C., Strehle, A., Schmidt, C., Boudjelal, G., Lobstein, A., Schoonjans, K., et al. Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid, A Novel and Selective TGR5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010 : 178-190 .
- Gennari, C., Castoldi, D., Sharon, O. Natural products with taxol-like anti-tumor activity: synthetic approaches to eleutherobin and dictyostatin. *Pure and Applied Chemistry*, 2007 : 173-180.
- Germonprez, N., Maes, L., Van Puyvelde, L., Van Tri, M., Tuan, D.A., De Kimpe, N. In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005 : 32-37.
- Giles, P.M. Revised section F: Natural products and related compounds - IUPAC Recommendations 1999. *Pure and Applied Chemistry*, 1999 : 587-643.
- Gintl, W.H. Über das Ursol. Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly. 1893.
- Globocan 2008, IARC, 2010, 2013. *Cancer [WWW Document]*. WHO. s.d. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/index.html> (consulté le 9 Juillet 2013).
- Goedert, M., Jackes, R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005 : 40-50.
- Goldbach-Mansky, R., Dailey, N.J., Canna, S.W., Gelabert, A., Jones, J., Rubin, B.I. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *Neonatal-onset muN. The England Journal of Medicine*, 2006 : 581-592.
- Goreja, W.G. Shea Butter: The Nourishing Properties of Africa's Best-Kept Natural Beauty. Amazing HerbS Press. *New York, NY*. 2004.
- Gottesman, M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, 2002 : 615-627.

- Graeber, M.B., Bise, K., Mehraien, P. CR3/43, a marker for activated human microglia: application to diagnostic neuropathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1994: 406-408.
- Hall, J.B., Aebischer, D.P., Tomlison, H.F., Osei-Amang, E., Hindle, J.R. *Vitellaria paradoxa* a monograph. School of Agricultural and forest Sciences. *University of Wales. Bangor U.K.* 1996.
- Han, S.K., Ko, Y.I., Park, S.J., Jin, I.J., Kim, Y.M. Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids*, 1997 : 769-773.
- Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R.A., Quinn, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015 : 111-1129.
- He, Z.D., Ma, C.Y., Zhang, H.J., Tan, G.T., Tamez, P., Sydara, K., Bouamanivong, S., Southavong, B., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H. Antimalarial constituents from *Nauclea orientalis* (L.) L. *Chemistry & Biodiversity*, 2005 : 1378-1386.
- Herrinton, L.J., Liu, L., Lafata, J.E., Allison, J.E., Andrade, S.E., Korner, E.J., et al. Estimation of the period prevalence of inflammatory bowel disease among nine health plans using computerized diagnoses and outpatient pharmacy dispensing. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2007 : 451-461.
- Hiroya, K., Takahashi, T., Miura, N., Naganuma, A., Sakamoto, T. Synthesis of betulin derivatives and their protective effects against the cytotoxicity of cadmium. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002 : 3229-3236.
- <http://www.actea-sante.fr/wp-content/uploads/1-SNC.pdf>. s.d. (consulté le 12 Janvier 2019).
- <http://www.usamvcluj.ro/fiziopatologie/images/franceza/curs/Cours%2012-13%20-%20Physiopathologie%20I%20-%202016-2017.pdf>. s.d. (consulté le 20 Janvier 2019).
- Ismaili, H., Milella, L., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Camporese, A., Sosa, S., et al. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004 : 31-36.
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M., Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 2009 : 2016-2031.
- Jeong, H.J., Chai, H.B., Park, S.Y., Kim, D.S.H.L. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1999 : 1201-1204.

- Jiofack, T., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V., Fongnzossie, E., Nkongmeneck, B.A. Ethnobotanical uses of medicinal plants of two ethnoecological regions of Cameroon. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 2010: 60-79.
- Kanzler, H., Barrat, F.J., Hessel, E.M., Coffman, R.L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 2007 : 552-559.
- Kassamba, B. Synthèse des techniques connues d'extraction et de conditionnement du beurre de karité au Burkina Faso. Rapport Final, Projet filière karité du CECI-IRSAT, Ouagadougou. 1997.
- Kim, D.K., Baek, J.H., Kang, C.M., Yoo, M.A., Sung, J.W., Chung, H.Y., et al. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *International Journal Cancer*, 2000 : 629-636.
- Kim, D.S.H.L., Chen, Z., Nguyen, T., Pezzuto, J.M., Qiu, S., Lu, Z.Z. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synthetic Communications*, 1997 : 1607-1612.
- Kim, D.S.H.L., Pezzuto, J.M., Pisha, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998 : 1707-1712.
- Kuete, V. *Medicinal Plant Research in Africa. 1 ed.* 2013.
- Kwon, S.H., Park, H.Y., Kim, J.Y., Jeong, I.Y., Lee, M.K., Seo, K.I. Apoptotic action of ursolic acid isolated from Corni fructus in RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells. *Elsevier, Amsterdam*. 2010.
- Lavestone, S., McLoughlin, D.M. Protein aggregates and dementia: is there a common toxicity? *Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry*, 2002 : 152-161.
- Le Pecq, J.B. Chimiothérapie anticancéreuse : mécanismes d'action des substances antitumorales. *Coll. «Actualités scientifiques et industrielles, 1388»*. Paris: Hermann., 1978.
- Lefferts, A.C.L., Bartels, G., Tsongalis. Molecular oncology: current trends in diagnostics. *Future Oncology*, 2008 : 61-70.
- Liu, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005: 92-94.
- Liu, Y., Klimberg, V.S., Andrews, N.R., Hicks, C.R., Peng, H., Chiriva-Internati, M., Henry-Tillman, R., Hermonat, P.L. Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *Journal of Human Virology*, 2001 : 329-334.

- MacRaid, C.A., Stewart, C.R., Mok, Y-F., Gunzburg, M.J., Perugini, M.A., Lawrence, L.J., et al. Non-fibrillar components of amyloid deposits, mediate the self-association and tangling of amyloid fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 2004 : 21038-21045.
- Maldini, M., Sosa, S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balck, M.J., Pizza, C., Loggia, R.D. Screening of tropical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlov and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009 : 430-433.
- Matig, O.E., Ndoye, O., Kengue, J., Awono, A. Les fruitiers forestiers comestibles du Cameroun. 2006.
- Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H. Dossier: Alzheimer la maladie du siècle. *Recherche*, 1997 : 58.
- McGeer, P.L., Rogers, J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology*, 1992 : 447-449.
- MEA. 4e Rapport du Mali sur la Mise en Œuvre de la Convention sur la Diversité Biologique. Rapport. Bamako. 2009.
- Miles, D.H., Kokpol, U., Zalkow, L.H., Steindel, S.J., Nabors, J.B. Tumor inhibitors I : Preliminary investigation of antitumor activity of *Sarracenia flava*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1974 : 613-615.
- Moore, S. The role of *Vitellaria Paradoxa* in poverty reduction and food security in the Upper East region of Ghana. *Earth & Environment*, 2008 : 209-245.
- Mora, C., Robertson, D.R. Causes of latitudinal gradients in species richness : a test with the endemic shorefishes of the tropical eastern pacific. *Ecology*, 2005 : 1771-1782.
- Nafan, D., Abdourahamane, S., N'guessan, K.A. Le karité au Nord de la Côte d'Ivoire : Utilisations possibles, processus de transformation et analyse de la filière de commercialisation. 2001.
- Ndukwe, I.G., Amupitan, J.O., Isah, Y., Adegoke, K.S. Phytochemical and antimicrobial Screening of crude extracts from the stem bark, the root and leaves of *Vitellaria paradoxa* (GAERTN. F). *African Journal of Biotechnology*, 2007 : 1905-1909.
- Ohgaki, H., Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2005 : 479-489.
- Old, L. Immunotherapy for Cancer. *Scientific American -American Ed.*, 1996 : 136-143.

- Oldeman, L.R., Hakkeling, R.T.A., Sombroek, W.G. World Map of the Status of Human-Induced Soil Degradation : An Explanatory Note, UNEP and ISRIC, Wageningen. 1991.
- Olson, J.S. The history of cancer : an annotated bibliography. Coll. Bibliographies and indexes in medical studies, no. 3. *New York : Greenwood Press*, 1989.
- OMS. Faits et chiffres. Vieillesse et qualité de vie. 2014.
http://www.who.int/features/factfiles/ageing/ageing_facts/fr/ (consulté le 07 mars 2016).
- OMS. Cancer. 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/> (consulté le 21 Octobre 2015).
- OMS. Classification Statistique Internationale des maladies et des problèmes de santé connexes. 10ème révision, Genève : CIM-10, 2010.
- OMS. Fact Sheet, Traditional medicine. Geneva, 2003.
- OMS. Les principales causes de mortalité dans le monde, 1. 2018.
- Orgogozo, J.M., Gilman, S., Dartigues, J.F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A beta 42 immunization. *Neurology*, 2003 : 46-54.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Anthony, S. Orwa, C., et al. Agroforestry tree Database : a tree reference and selection guide version 4.0. 22 février 2009.
<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>. (consulté le 22 février 2018).
- PAF. Projet d'Appui aux Filières Bio-Alimentaires. La filière karité. Rapport Définitif, Sicarex, Ouagadougou. 1999.
- Paterson, I., Anderson, E.A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. *Science*, 2005 : 451-453.
- Patil, M.V.K., Kandhare, A.D., Bhise, S.D. Anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Xanthium strumarium* L, ethanol extract in complete Freund's adjuvant-induced arthritis. *Biomedicine & Aging Pathology*, 2012 : 6-15.
- Pehaut, Y. Les oléagineux dans les pays d'Afrique occidentale associés au marché commun : la production, le commerce et la transformation des produits. Paris : Editions Champion, 1976.
- Pennington, T.D. The genera of Sapotaceae. Royal Botanic Gardens, Kew and The New York Botanical Garden. 1991.

- Pisha, E., Chai, H., Lee, I.S., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N., Cordell, G.A., et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature Medicine*, 1995 : 1046-1051.
- Pontanier, R., M'hiri, A., Aronson, J., Akrimi, N., Le Floc'h, E. *L'homme peut-il refaire ce qu'il a défait? Colloques et Congrès, Science et changements*. 455 p. Paris: John Libbey, 1995.
- Pouly, S., Becher, B., Blain, M., Antel, J.P. Interferon γ modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2000 : 280-286.
- Qureshi N., Porter J.W. In biosynthesis of isoprenoids compound. *New York*, 1981 : 47-94.
- Ramirez-Espinosa, J.J., Rios, M.Y., Lopez-Martinez, S., Lopez-Vallejo, F., Medina-Franco, J.L., Paoli, P., Camici, G., Navarrete-Vazquez, G., Ortiz-Andrade, R., Estrada-Soto, S. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011 : 2243-2251.
- Rastogi, T., Hildesheim, A., Sinha, R. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. *Nature Review Cancer*, 2004 : 909-917.
- Ritchie, K., Lavestone, S. The dementias. *Lancet*, 2002 : 1759-1766.
- Robertson A., Soliman G., Owen E.C. Methods of manufacturing betulinic acid. *Journal of Chemistry Society*, 1939 : 1267-1273.
- Ross, S.A., Halliday, M.I., Campbell, G.C., Byrnes, D.P., Rowlands, B.J. The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *British Journal Neurosurgery*, 1994 : 419-425.
- Ruyssen, B. Le karité au Soudan. *Agronomie Tropicale*. 1957 : 143-172, 279-307.
- Ruzicka. History of the isoprene rule. Proc. Chem. Soc.p. (Faraday lecture). 1959.
- Saha, S., Subrahmanyam, E.V., Chandrashekar, K.S., Chastry, C.S. *In vivo* study for anti-inflammatory activity of *Bauhinia variegata* L. leaves. *Pharmaceutical Crops*, 2011 : 70-73.
- Said, A., Usama, W., Salwa, M.N., Rashed, K. Pharmacochimical methanolic extract of *Diospyros leaves*. *Research Journal of Phytochemistry*, 2009 : 1-12.
- Sanou, H., Lamien, N. *Vitellaria paradoxa*, karité. Conservation et utilisation durable des ressources génétiques des espèces ligneuses alimentaires prioritaires de l'Afrique subsaharienne. Bioersivity International : Rome Saforgen. 2011 : 12.

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature Publishing Group*, 1999: 173-177. .
- Seto, R., Nakamura, H., Nanjo, F., Hara, Y. Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1997 : 1434-1439.
- Setzer, W.N., Rozmus, G.F., Setzer, M.C., Schmidt, J.M., Vogler, B., Reeb, S., et al. Bioactive principles in the bark of *Pilidiostigma tropicum*. *Journal of Molecular Modeling*, 2006 : 703-711.
- Setzer, W.N., Setzer, M.C., Bates, R.B., Jackes, B.R. Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from paluma, north Queensland, Australia, *Planta Medica.*, 2000 : 176-177.
- Silva, T., Reis, J., Teixeira, J., Borges, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles : from natural products to drug prototypes. *Ageing Research Reviews*, 2014 : 116-145.
- Sippy, B.D., Hofman, F.M., Wallach, D., Hinton, D.R. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha receptors in the brains of patients with AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 1995 : 511-521.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. Human breast cancer : Correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. *Science*, 1987 : 177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., et al. Studies of the her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989 : 707-712.
- Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P., Nadar, A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003: 299-305.
- Steven, M., Wiesman, Z., Nissim, G. Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernel. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2003 : 6268-6273.
- Stradonitz, F.K.V. Sur la constitution des substances aromatiques. In Bulletin de la Société Chimique de Paris. 1865.

- Tagne, R.S., Telefo, B.P., Nyemb, J.N., Yemele, D.M., Njina, S.N., Goka, S.M.C., et al. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian plants medicinal. *Asian Pacific Journal Tropical Medicine*, 2014 : 442-447.
- Thurnher, D., Turhani, D., Pelzmann, M., Wannemacher, B., Knerer, B., Formanek, M., et al. Betulinic acid : a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck*. 2003 : 732-740.
- Trials.gov., Clinical. See studies on Map. s.d. Clinical Trials.gov.
[Shttps://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=Alzheimer](https://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=Alzheimer). (consulté le 10 août 2014).
- Trommsdorff, H. *Archiv der Pharmazie*. 1854.
- UNIFEM. Fonds de Développement des Nations Unies pour la Femme. Le karité l'or blanc des africaines. Bureau régional de Dakar, Sénégal. 1997.
- Vuillet, J. Le Karité et ses produits. Service de l'agriculture du Haut Sénégal-Niger. Paris : Emile LAROSE, 1911.
- Wald, N.J., Hackshaw, A.K. Cigarette smoking: an epidemiological overview. *British Medical Bulletin*, 1996 : 3-11.
- Wallace, J.L., McKnight, W., Del-Soldato, P., Baydoun, AR., Cirino, G. Anti-thrombotic effects of a nitric oxide-releasing, gastric-sparing aspirin derivative. *The Journal of Clinical Investigation*, 1995 : 2711-2718.
- Wallach, O. Alicyclic compounds. 1910. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/ (consulté le 12 Mars 2015).
- Warra, A.A. Cosmetic Potentials of African Shea Nut (*Vitellaria paradoxa*) Butter. *Current Research in Chemistry*, 2011 : 80-86.
- Wendt, K.U., Schulz, G.E. Isoprenoid biosynthesis : manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure*, 1998 : 127-133.
- Wenning, G.K., Tison, F., Seppi, K. Multiple system atrophy. *The Lancet Neurology*, 2004 : 93-103.
- Wick, W., Grimmel, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J., Weller, M. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999 : 1306-1312.

- Wilkinson, D.G. The pharmacology of donepezil : a new treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 1999 : 121-135.
- Wilkinson, K., Boyd, J.D., Glicksman, M., Moore, K.J., El Khoury, J. A high-content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid- β interactions with its receptor CD36. *The Journal of biological and Chemical Sciences*, 2011 : 34914-34922.
- Word. Word Cancer Report. IARC, 2014.
- Wu, H.Y., Chang, C.I., Lin, B.W., Yu, F.L., Lin, P.Y., Hsu, J.L., et al. Suppression of Hepatitis B Virus X Protein-Mediated Tumorigenic Effects by Ursolic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011 : 1713-1722.
- www.graphpad.com. s.d.
- Xu, H. X., Zeng, F.Q., Wan, M., Sim, K.Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *Journal of Natural Products*, 1996 : 643-645.
- Yi, J.E., Obminska-Mrukowicz, B., Yuan, L.Y., Yuan, H. Immunomodulatory effects of betulinic acid from the bark of white birch on mice. *Journal of Veterinary Science*, 2010 : 305-313.
- Yun, Y., Han, S., Park, E., Yim, D., Lee, S., Lee, C.K., et al. Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Archives of Pharmacal Research*, 2003 : 1087-1095.
- Zerbo, J. Expérimentations de techniques de production de plantes d'arbres utilisés en agroforesterie traditionnelle. Cas du karité, *Butyrospermum paradoxum* (Gaertn. F.). Mémoire IDR, Université de Ouagadougou. 1987.
- Zhang, J., Kurita, M., Shinozaki, T., Ukiya, M., Yasukawa, K., Shimizu, N., et al. Triterpene glycosides and other polar constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels and their bioactivities. *Phytochemistry*, 2014 : 157-170.
- Zhang, R., Luo D., Miao, R., Bai, Q.G., Sessa, W.C., Min, W. Hsp90-Akt phosphorylates ASK 1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene*, 2005 : 3954-3963.



A new ursane triterpenoic acid and other potential anti-inflammatory and anti-arthritic constituents from EtOAc extracts of *Vitellaria paradoxa* stem bark



Kenneth Oben Eyong^a, Harquin Simplicie Foyet^b, Guerisson Baïrys^a, Gabriel Ngosong Folefoc^a, Emanuel Acha Asongalem^d, Andreas Lagojda^c, Marc Lamshöft^{c,*}

^a Department of Organic Chemistry, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

^b Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Maroua, P.O. Box 46, Maroua, Cameroon

^c Bayer CropScience Aktiengesellschaft, Monheim, Germany

^d Department of Biomedical Science, Faculty of Health Sciences, University of Buea, P.O. Box 63, Buea, Cameroon

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2015

Received in revised form

14 August 2015

Accepted 17 August 2015

Available online 20 August 2015

Keywords:

Vitellaria paradoxa

Triterpenoids

Inflammation

Arthritis

Haematological parameters

Hyperalgesia

ABSTRACT

Objective: *Vitellaria paradoxa* (shea tree) is used in traditional medicine for the treatment of various ailments, including, inflammation and fever. Therefore the present research investigates the anti-inflammatory and anti-rheumatic effects of *V. paradoxa* stem bark extracts in rats and the isolation and characterization of its active constituents.

Methods: The anti-inflammatory activity of ethyl acetate extract of *V. Paradoxa* (VPEE) was evaluated by use of the carrageenan-induced paw oedema model in rats. Moreover, rheumatoid arthritis (RA) was induced by injection of Freund's Completed Adjuvant (FCA) into the subplantar surface of the hind paw of the male Wistar rats. Paw volume was measured plethysmometrically. Joint swelling was measured using electronic vernier caliper. Hot plate test was used to assess the effect of VPEE on hyperalgesia while open field was used to assess the locomotors activity. The relative weight of spleen, liver and thymus was obtained as well as some haematological parameters. Tibiotarsal joint was extracted for histopathology under light microscope. Chemical analysis was carried out by high resolution mass spectrometry and one and two-dimensional NMR techniques.

Results: LC–MS analysis of the EtOAc extract revealed the presence of a new triterpenoid and several known compounds. The structure of the novel compound was elucidated by means of LC–MS and selected 1D and 2D-NMR experiments. The biological effects of ethyl acetate (VPEE), methanol (VPME) and water extracts (VPWE) of *V. paradoxa* were tested on carrageenan model of acute inflammation and FCA-induced rheumatoid arthritis animal model. In the carrageenan-induced inflammation, VPEE (150 mg/kg) significant (66.67%) inhibited the first (after 1 h) and the second phase (4–6 h) of edema formation. On the Complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis, VPEE at the same dose showed a significantly protective effect. On days 19–28th of treatment, the maximum inflammatory percentage was between 9.60 and 8.91% for the VPEE compared to 30.91–24.29% for the controls. All the extracts significantly reduced the score of arthritis but the maximal reduction was obtained with the VPEE on day 24th of the experimentation. The altered haematological parameters in the arthritic rats were significantly recovered to near normal by the treatment with VPEE at the dose of 150 mg/kg. Further histological studies revealed the anti-arthritic activity by preventing cartilage destruction of the arthritic joints of adjuvant arthritic rats. The spleen hypertrophy induced by the FCA was also significantly inhibited.

Conclusion: These findings provide pharmacological basis for the application of the VPEE in inflammatory disorders.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammation is a complex biological response of vascular tissues to harmful stimuli such as pathogens, damaged cells, physical

* Corresponding author. Fax: +49 2173 384017

E-mail address: marc.lamshoef@bayer.com (M. Lamshöft).

or chemical irritants (Maldini et al., 2009). It is generally considered as a response of organisms to the presence of pathogens, chemical or mechanical injury. There are various components of an inflammatory reaction that can contribute to the associated symptoms and tissue damaging effects. Edema formation, leucocyte infiltration and granuloma formation represent typical features of inflammation (Chao et al., 2009; Hajhashemi et al., 2009; Wu et al., 2013). Although inflammation eliminates invading pathogens and initiates the healing process, uncontrolled inflammation can lead to injury of tissues and cells, chronic inflammation, chronic diseases and neoplastic transformation (Mantovani et al., 2008). The treatment of inflammation is one of the major challenges of ailments, wounds, trauma and pathologic diseases. At present, most inflammatory diseases are treated with conventional anti-inflammatory drugs, such as steroidal anti-inflammatory drugs (SAIDs) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). However, prolonged use of these drugs may produce many adverse effects, including gastrointestinal disorders (Nagatomi and Ando, 1984), immunodeficiency and humoral disturbances (Simon, 2003). We aimed to discover new anti-inflammatory agents with fewer adverse effects, and that could be developed for long-term administration.

A plant from the Sapotaceae family, *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn, recorded in the Pharmacopeia of Cameroon and commonly known as shea is generally protected and venerated because of the economic value of the shea butter extracted from the fermented kernel (Matig et al., 2006; Sanou and Lamien, 2011). Shea butter protects against sunburn, so is a useful ingredient in sun-protection or post-sun-exposure products. It also encourages wound healing and soothes skin irritation. Because of its stability, shea butter is traditionally used for the preparation of skin ointments, and to treat inflammation, rashes in children, dermatitis, sunburn, chapping, irritation (Orwa et al., 2009). *V. paradoxa*, is used in traditional medicine for the treatment of various ailments. A bark decoction is used in a bath to facilitate childbirth and to stimulate lactation after delivery while a bark infusion is used as eyewash and to neutralize the venom of the spitting cobra. Bark decoction have been taken for the treatment of inflammation, rheumatism, gastric problems as well as for diarrhoea and dysentery (Ziba and Yameogo, 2002; Orwa et al., 2009; Ayankunle et al., 2012).

Recent studies have shown that triterpene alcohols contained in shea butter in large quantities possessed anti-inflammatory activity by inhibiting pro-inflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression (Verma et al., 2012). From an ethno botanical survey, we noticed that the bark of the trunk and stems of *V. paradoxa* macerated in traditional alcoholic beverages was used for the treatment of pain and inflammation. As a consequence, a preliminary study on the methanol extract was carried out (Foyet et al., in press) and confirmed the use of the stem bark on hyperalgesia and acute inflammation. From these preliminary results, the need for a more comprehensive bio-guided study and deeper (haematological and histological) studies introducing new parameters to determine the most active fractions as well as the isolation of bioactive compounds responsible for the observed effects was inevitable.

The aim of the study was therefore to evaluate the anti-inflammatory properties of several extracts prepared from the stem bark of *V. paradoxa* and to examine the classes of compounds which may be responsible for the activity. For this purpose, the crude aqueous extract, ethyl acetate and methanolic fractions obtained from the stem bark of the plant was submitted to bioassay-guided processes by using *in vivo* carrageenan-induced hind paw edema model for anti-inflammatory activity and CFA-induced chronic inflammation.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

V. paradoxa stem barks were collected at Garoua (North Region, Cameroon) in July 2012, and identified by Mr. Bamba Jean Paul, plant taxonomist of the National School of Fauna, Garoua. Voucher specimen was deposited under the number HEFGN 6276 for further verification.

2.2. Extraction procedure

The plant material was cut in small pieces, air-dried in the shade for 3 weeks. The dried bark of *V. paradoxa* was reduced to a very fine powder and 3200 g was extracted by sonication, successively with hexane, ethyl acetate, methanol and water. To afford VPHE, VPPE, VPME and VPPE crude extracts.

2.3. Analytical measurements

The high resolution mass spectrometric screening of the extracts of *V. paradoxa* stem bark was carried out using an Orbitrap Fusion tribrid mass spectrometer. The system was equipped with an Agilent HPLC system consisting of LC-pump, PDA detector, auto-sampler and a column compartment. The ESI source was operated in positive ion mode. Nitrogen was employed as sheath gas (30 arbitrary units) and auxiliary gas (10 arbitrary units). The heated capillary was set to 275 °C. The separations were performed using a Macherey & Nagel Nucleodur C18 Gravity column (3 µm, 2 × 125 mm²) at 40 °C. Solvent A was a mixture of 0.1% formic acid in water and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile. The flow rate was set to 400 µL/min. Samples were analysed using a gradient programme as given: 5% solvent B for 1 min; followed by a linear gradient to 60% B within 24 min and a fast flushing step to 95% B within 2 min was conducted. After 5 min at 95% solvent B the start conditions were repositioned and the column was equilibrated for 6 min for the consecutive injection.

¹H and ¹³C NMR spectra respectively all correlation experiments were recorded with a Bruker Avance 600 spectrometer equipped with a TCI CryoProbe. Optical rotations were recorded by means of a PerkinElmer polarimeter 341 in MeOH at 20 °C.

2.4. Animals

Male Wistar rats weighing 120–180 g at the start of the experiment were used. The animals were housed in a temperature and light-controlled room (25 °C, natural 12-h cycle starting at 06:00 h) and were feed and allowed to drink water *ad libitum*. Rats were treated in accordance with the guidelines of the Cameroonian Bioethics Committee (Reg. no. FWA-IRB00001954) and in accordance with NIH-Care and Use of Laboratory Animals manual (8th Edition).

2.5. Chemicals

Diclofenac was used as the reference drug (positive control, a product of Merck, Darmstadt, Germany). Freund's Complete Adjuvant (FCA) was purchased from Sigma-Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals and reagents, unless specified otherwise, were from VWR BDH Prolabo (France).

2.6. Pharmacological studies

2.6.1. Carrageenan-induced acute inflammation

The method of carrageenan-induced paw edema in rats

described by Winter et al. (1962) was used to evaluate the anti-inflammatory activity. The treatment was done 30 min before the injection of 100 μ l of carrageenan (100 μ g) (kappa carrageenan type III) into the rat hind paw plantar surface. Paw volume was measured by plethysmography 30 min after and at 1 h intervals after carrageenan injection, for 6 h. The treatments were undertaken orally for rat with 150 mg/kg of ethyl acetate, methanolic or aqueous extract. This dose of extracts was selected after a dose response preliminary screening. The negative control group was treated with 5% DMSO-saline solution (10 ml/kg, p.o.) while the positive control group received Diclofenac (10 mg/kg, p.o.). The paw volume was measured plethysmometrically before and after the carrageenan injection.

2.6.2. Completed Freund's adjuvant induced arthritis

Thirty six animals were divided into six groups of six animals each as follows:

(A) Non-arthritic animals

- Group I: Normal animals: received aqueous solution of 5% DMSO (10 ml/kg, p.o.).

(B) Arthritic animals

- Group II: Control animals: received aqueous solution of 5% DMSO (10 ml/kg, p.o.).
- Group III: drug treated animals: received ethyl acetate extract (150 mg/kg, p.o.).
- Group IV: drug treated animals: received methanolic extract (150 mg/kg, p.o.).
- Group V: drug treated animals: received aqueous extract (150 mg/kg, p.o.).
- Group VI: drug treated animals: received Diclofenac (4 mg/kg, p.o.).

Arthritis was induced by the injection of 100 μ l of CFA, (containing 1 mg/ml of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin oil and mannide monooleate) into the sub plantar region of right hind paw of rat. The day of FCA injection was considered as day 1. The oral administration of the extracts, Diclofenac of vehicle of all the groups started from day 14 once daily until day 28. Anti-arthritic activity was evaluated on paw volume, and arthritic score on days 0, 4, 7, 10, 12, 14, 19, 21, 24 and day 28. The last day, all the animals were sacrificed under ether anesthesia and the blood obtained in the heparin tubes for biochemical parameters. The joints were also cut for histology.

2.7. Behavioural assessment

2.7.1. Arthritic score and joint diameter

The degree of arthritis was observed daily and scored visually by a single observer on a scale of 0–4 per paw for a maximal score of 8 per rat. The score assignment criteria were: normal paw=0, mild swelling and erythema of digits=1, swelling and erythema of the digits=2, severe swelling and erythema=3, gross deformity and inability to use the limb=4 on respective days. The joint diameters of right hind paw were measured using an electronic Vernier calliper (Fischer scientific, CON3417) on the above mentioned testing days after induction of arthritis (Patil et al., 2012).

2.8. Determination of haematological parameters

At the end of the experiment, blood was collected with anticoagulant (heparin) tubes. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was measured. The White blood cell (WBC), the Red blood cell (RBC), the plasma level of haemoglobin (Hb) and haematocrit were measured by the Sysmex KX-2IN automated haematology analyser with specific software for rat blood samples.

2.9. Histological study

For histological analyses, the paws of two animals per group were collected, and the skin was removed. Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, decalcified in 5% formic acid, and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were stained with haematoxylin-eosin and masson trichrome.

2.10. Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm S.E.M. of 6 animals, except for the haematological parameters, which are presented as the means of blood sample of three animals per group. The percentages of inflammation are reported as the mean obtained for each individual experiment. Statistical comparison of the data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls multiple comparison test, using Graph Pad Prism version 5.00 for Windows, Graph Pad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. *P*-values less than 0.05 ($P < 0.05$ or less) were considered significant.

3. Results

3.1. Preliminary phytochemical screening

Dried and pulverised stem bark of *V. paradoxa* (3.2 kg) successively underwent ultra-sonic extraction using the solvents n-hexane, ethyl acetate, methanol and water to obtain corresponding extracts: n-hexane (VPHE, 120 g), ethyl acetate (VPEE, 140 g), methanol (VPME, 530 g) and water (VPAE, 80 g). The hexane extract (VPHE) was neither soluble in MeOH nor acetonitrile, thus, not measured by LC–MS and tested for anti-inflammatory activity. VPEE was the most active fraction and analysis of its high resolution LC–MS revealed huge amount of different compounds. However, the major compounds identified were flavonoids of the type catechin (3 and 4), sterols, saponins and triterpenes (6–10) but not alkaloids (Fig. 1).

The different extracts were tested on acute inflammation induced by carrageenan and on chronic inflammation induced by complete Freund adjuvant. The haematological modifications were evaluated on arthritic rats after 14 days of treatment with the different extracts and finally histological assessments were conducted in order to evaluate the antiarthritic effect of extracts on rats.

3.2. Effects of the aqueous and organic extracts on carrageenan-induced edema

The subcutaneous injection of the carrageenan on the hind paw of the rat induced a topical and rapid inflammation of the hind paw with a maximum volume observed after 2 h post injection. Pre-treatment of the rats with aqueous and organic extracts (150 mg/kg) and Diclofenac (10 mg/kg) significantly inhibited the carrageenan-induced inflammation especially from the 3rd hour post-administration. However, VPEE and VPME extracts exhibited significance 60 min post-administration. VPEE extract was the most potent and had long lasting inhibitory effect on the second phase of inflammation (Fig. 2). One way ANOVA also revealed that at the 6th hour following carrageenan administration, the difference between inflammation of the different groups were significant ($F(4, 20)=2.86, P=0.04971$). However no difference was observed at this time between control and treated groups after the Newman–Keuls Multiple Comparison post-test.

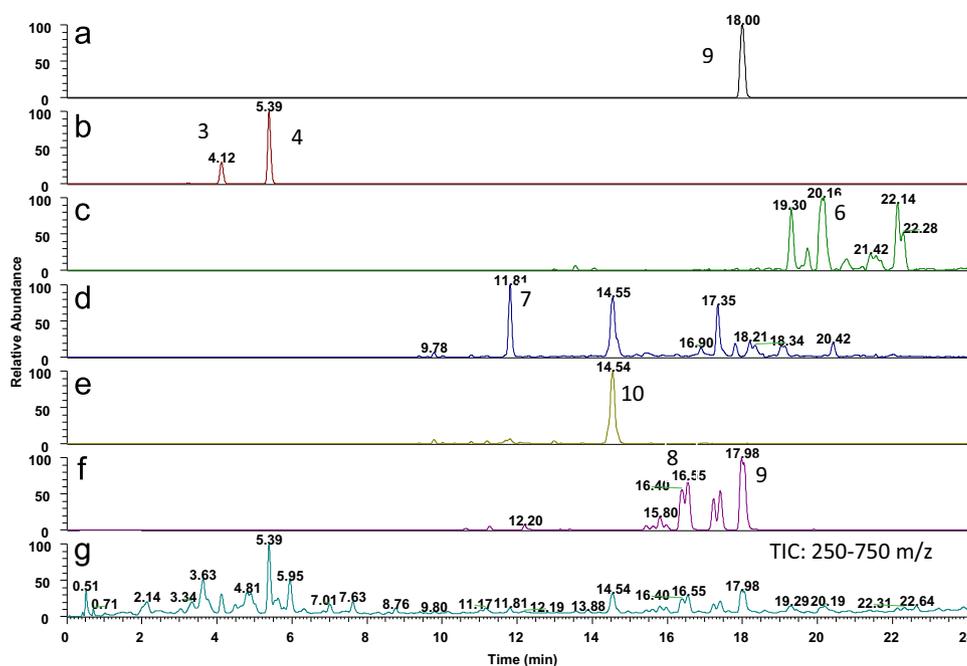


Fig. 1. Extracted ion chromatogram (a) of the isolated compound 9 and extracted ion chromatograms (b)–(f) of identified compounds (3, 4, 6, 7, 8, 9 and 10) in *Vitellaria paradoxa* EtOAc extract (VPEE) of their quasi molecular ions $[M+H]^+$ with mass deviation of 2 ppm and full scan chromatogram (g) (250–750m/z) of VPEE.

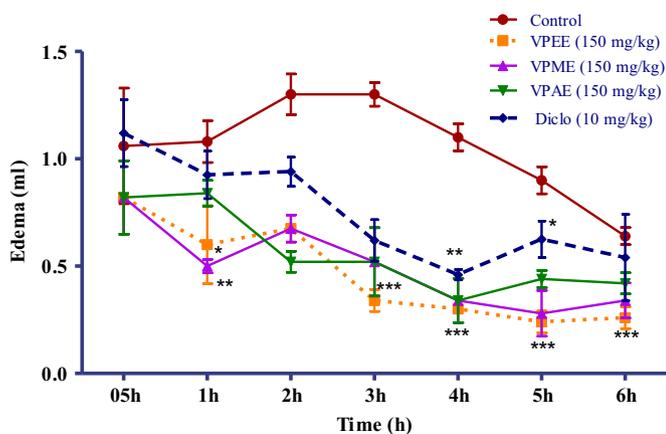


Fig. 2. Effects of aqueous, ethyl acetate and methanol extracts on inflammations induced by carrageenan. Data are expressed as mean \pm S.E.M. from 6 rats and analysed by one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls post-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared to control group animals.

3.3. Freund's complete adjuvant (FCA) induced arthritics

3.3.1. Effects of the aqueous and organic extracts on joint diameter

The VPEE (150 mg/kg) was the most potent extract that showed consistent anti-arthritic activity during the last seven days of the treatment. This was followed by VPME which was more potent than 10 mg/Kg Diclofenac but less than VPEE extract. VPAE extract and Diclofenac (4 mg/Kg) began showing significantly their anti-arthritic effects much later i.e. day 19 (Fig. 3). Five days after the beginning of the treatment (day 19th), all the extract as well as diclofenac significantly ($P < 0.05$) inhibited the increase of the joint diameter when compared to that of control arthritic group. However the VPEE was the more potent extract (Fig. 4).

3.3.2. Effects of extracts arthritic score

The Fig. 5 displays the results of the effect of the extracts on arthritis score. Again VPEE extract showed its most potent anti-arthritic properties via reduction of the arthritis score (0.62 ± 0.15)

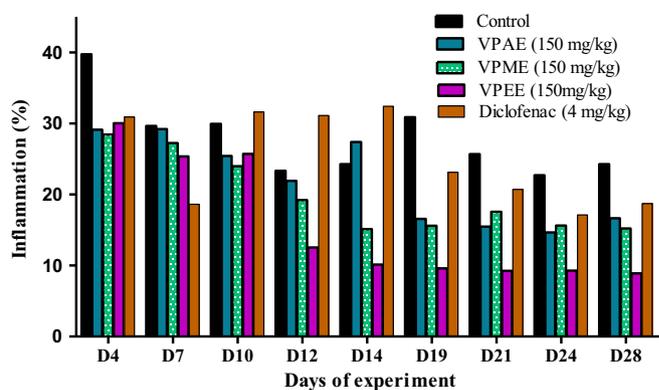


Fig. 3. Effects of aqueous extract (VPAE), ethyl acetate extract (VPEE), methanol extract (VPME) and Diclofenac on inflammations induced by CFA. Data represented the mean of 6 rats.

beginning from day 19. VPME extract followed suite with an arthritis score of 0.75 ± 0.09 , significantly observed from day 21 post-treatment. Both scores were lower compared to the negative control (1.40 ± 0.45) and 4 mg/kg Diclofenac (arthritic score here)

3.3.3. Effect of extracts on body weight

The body weights in the normal group gradually and significantly increased during the experiment ($p < 0.05$), whereas the control group had significant decrease ($p < 0.05$) in body weight starting from day 10 to day 28. With the treatment of the animals by the different extracts, the body weight of animals slowly increased but this was significant in the VPEE and VPME treated groups. Changes in body weight were not significant in VPAE and Diclofenac treated groups (data not showed).

3.3.4. Effect of extracts on various organ weights

At the end of the treatment period, there was a significant increase ($P < 0.05$) in the spleen weight (splenomegaly) and significant thymic involutions ($P < 0.01$) in control group as compared to the organs of normal group (Table 1). The treatment of the rats with the ethyl acetate extract significantly restored the

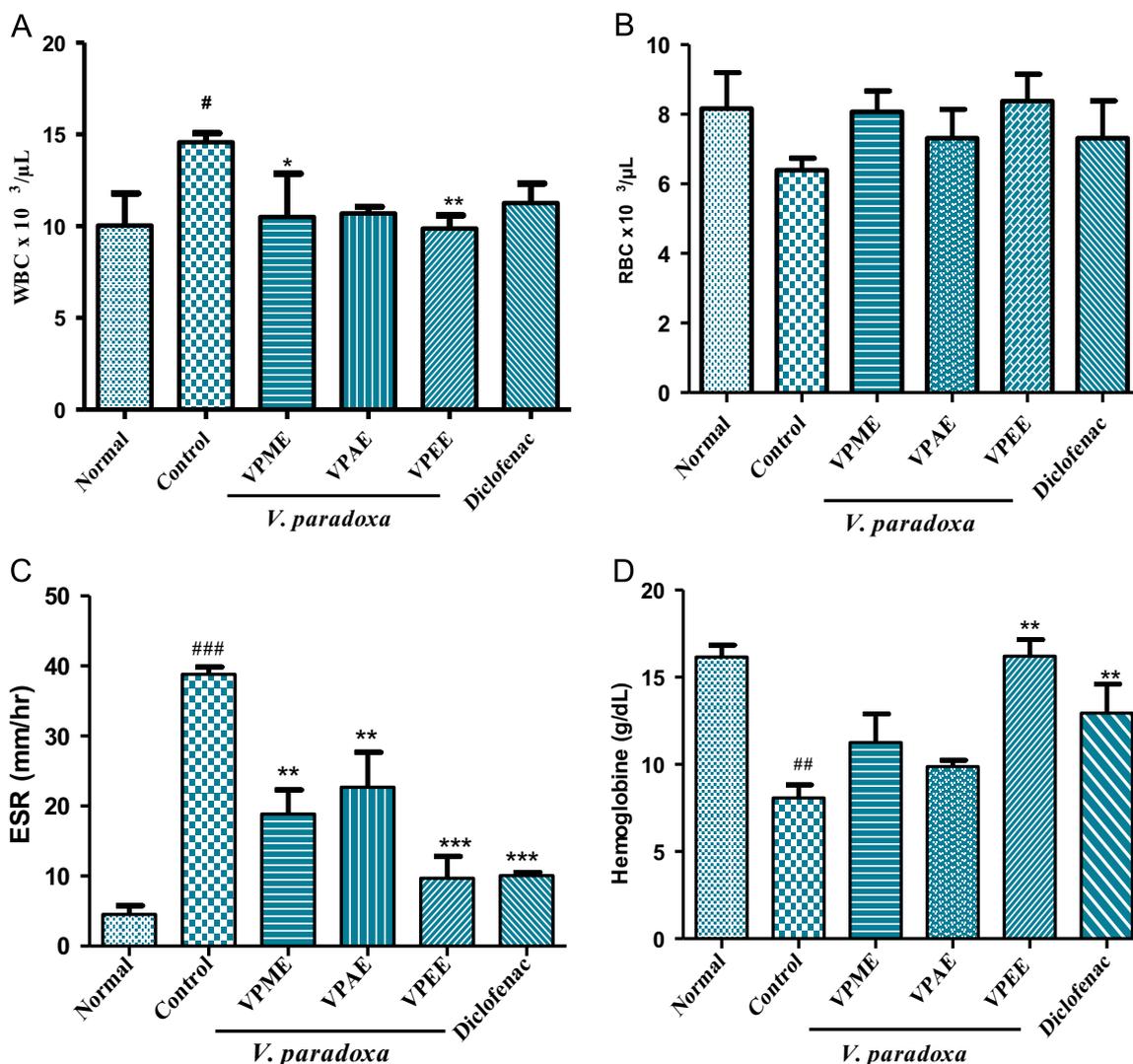


Fig. 6. Effect of chronic treatment of aqueous extract (VPAAE), methanol extract (VPME), ethyl acetate extract (VPPEE) and Diclofenac on WBC (A), RBC (B), ESR (C) and haemoglobin (D). Data are presented as Mean \pm ESM ($n=4$), analysed by ANOVA followed by the Newman–Keuls post-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ vs normal.

Sephadex LH-20 columns which led to the isolation of ten compounds (Fig. 7), 1–10. Amongst these compounds, nine were known compounds and identified as: β -sitosterol (1), stigmasterol (2), (–)-epicatechin (3), (+)-catechin (4), quercetin (5), 5,6-dihydrobassic acid (6), 16 α -hydroxybassic acid (7), 5,6-dihydro-16 α -hydroxybassic acid (8) and 16 α -hydroxyprotobassic acid (10) (Zhang et al., 2014) (Fig. 8).

The structures of these compounds were determined by comparison of MS, ¹H NMR, and ¹³C NMR spectroscopic and optical rotation data with corresponding literature data.

Compound 9 crystallizes as a white powder in Hex/EtOAc (6:4) mixture and melts between 238–239 °C. Analysis of its high resolution ESI mass spectrum gave a quasi-molecular ion at m/z 505.35084 [M+H]⁺, corresponding to the molecular formula C₃₀H₄₈O₆, supported by the ¹H NMR, ¹³C NMR and DEPT analysis. The full scan mass spectrum (see Supporting information Fig. S10) indicated the presence of four hydroxyl groups by showing a consecutive loss of four water molecules.

The optical activity measurement ($\lambda=589$ nm) of the isolated compound in MeOH ($c=0.25$; 20 °C) accounted for an optical rotation value of +42.8°. The ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) of compound 9 shows a doublet of a doublet for one proton at δ 3.63 (1H, dd, $J=12.0, 3.5$ Hz, H-2) and two doublets of one proton at δ 3.45

(1H, d, $J=12.0, H-1$) and δ 3.39 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-3), corresponding to three hydroxy groups which are all attached to the A ring of the molecule. A multiplet at δ 2.55, integrating for two methine protons is found (H-7 and H-11_a). The proton spectrum exhibits furthermore a multiplet of one proton at δ 5.29, which reveals the presence of an olefinic proton (1H, m, H-12) in the C ring of the triterpenoid. A singlet at δ 2.48 is detected for another methine proton (H-18). Doublets at δ 2.15 show the presence of H-11_b (1H, dd, 4.0, 14.0, 18.0 Hz, H-11_b). A multiplet is found for one proton at δ 2.00 (1H, m, H-9). A set of singlets between 1.80 and 0.77 show the presence of the characteristic methyl groups of a ursane triterpene (Kouno et al., 1988), in detail seven angular methyl groups are detected: δ 1.32 (s, 3H), δ 1.17 (s, 3H), δ 0.99 (s, 3H), δ 0.94 (s, 3H), δ 0.92 (d, 3H, $J=8.0$ Hz, H-30), δ 0.89 (s, 3H) and δ 0.78 (s, 3H) (Table 2).

The ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) and ¹³C DEPT135 spectra reveal 30 carbon atoms, which can be divided into 8 quaternary carbons (182.2, 138.9, 73.6, 54.9, 44.4, 42.5, 41.8, and 38.9), 8 methines (130.8, 81.4, 80.9, 71.9, 55.1, 49.4, 49.1, and 43.2), 7 methylenes (39.2, 34.3, 29.8, 28.4, 27.5, 26.8 and 19.6) and 7 methyls (29.2, 27.2, 25.1, 22.5, 17.9, 16.8 and 13.1). The signal at δ 182.4 (C-28) confirms the presence of a carboxylic acid group; the signals at δ 138.9 and 130.6 were assigned to the olefinic carbons C-13 and

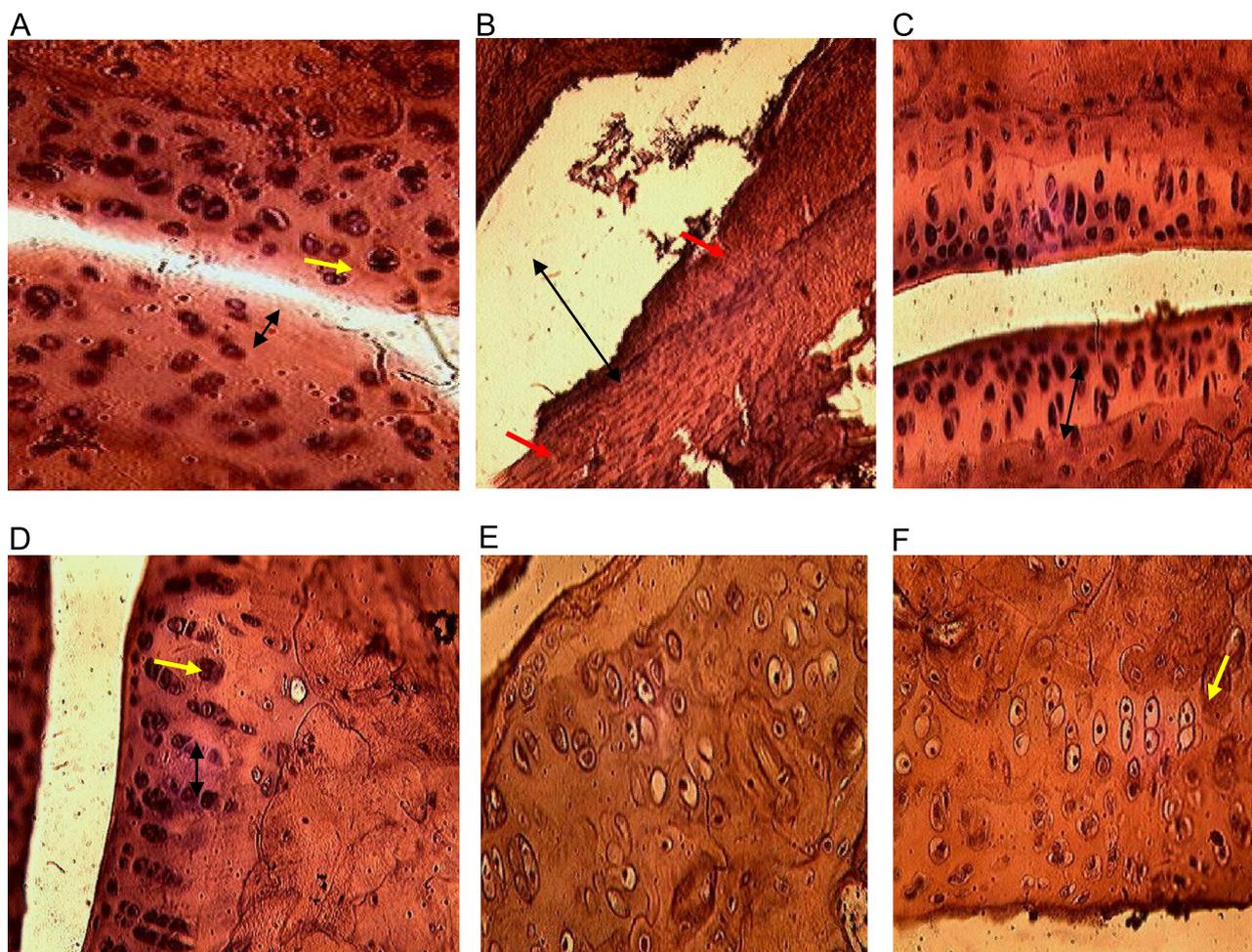


Fig. 7. Histological structures of joint and cartilage (H & E stain, 400 ×) from treated and non-treated rats. The control rat (A); the arthritic rat (B); MeOH treated rat 150 mg/kg (C), EtOAc treated rat 150 mg/kg (D), aqueous extract treated rat 150 mg/kg (E) and Diclofenac treated rat (F). The black arrow (in A–C) showed the joint space variation, the yellow arrow showed the chondrocytes in the cartilage tissue and red arrow showed cartilage erosion. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

C-12, respectively. The four signals at δ 81.4, 80.9, 73.6 and 71.9 correlate to four sp^3 carbons attached to an oxygen atom (C-3, C-1, C-19 and C-2, respectively). C-19 (73.6) is a quaternary carbon atom, while all other peaks correlate to methine carbons. The HMBC exhibits connections between C-1, C-2 and C-3 and in addition correlations to the neighbored methyl groups (C-23, C-24 and C-25) and quaternary C-atoms C-5 and C-10 (Table 2) and moreover the comparison with data for known compounds confirmed the new configuration of the ring A.

From the proton–proton correlation spectroscopy (1 H-1 H-COSY), the proton at δ 5.29 (1 H, m, H-12) is coupling to a pair of diastereotopic protons at δ 2.55 (1 H, m, H-11_a) and 2.17 (dd, 1 H, $J=4.0, 14.0, 18.0$; H-11_b). Both protons (H-11) coupled furthermore to proton H-9 at δ 2.00 (1H, m). Similar observations were made for the proton at δ 3.63 (1H, dd, $J=3.5, 12.0$ Hz, H-2), which is coupling with two protons at δ 3.45 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-1) and at δ 3.39 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-3). The obtained coupling constants of 3.5 Hz for protons H-2 and H-3 show axial-equatorial orientation, while protons H-2 and H-1 with a large coupling constant of 12.0 Hz suggests 1,2-diaxial relationship. The analysis of the HMBC exhibits correlations between H-18 and C-19, H-18 and C-28, H-20 and C-19, and H-20 and C-30 (methyl, δ 0.90), which confirm the proposed substitution of the E-ring with two methyl groups and one hydroxy group (Table 2). The two dimensional proton–proton spectrum (NOESY) (Fig. S7) shows, that the following pairs of protons are close to each other in space: H-2(δ 3.63) \leftrightarrow H-3(δ

3.39), Methy-29(δ 0.97) \leftrightarrow H-20(δ 1.34) suggesting cis orientations. Consequently compound **9** is a new ursane type triterpene named 1 α ,2 β ,3 β ,19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid.

4. Discussion

It is widely known that plant derivatives are an important resource for complementary medicine worldwide. Plant extracts, through the multiple active principles they contain are regularly used by people to prevent or to treat various diseases with some scientifically acceptable results.

In a previous investigation, the methanolic extract of stem bark of *V. paradoxa* showed analgesic and anti-inflammatory activities (Foyet et al., in press), but no active constituent was reported. In our present study, the major compounds identified in the stem bark of this plant are flavonoids of the type catechin, sterols, saponins, triterpenes and proteins but not alkaloids. Moreover, through a bio-guided pharmacological assay, a novel ursane triterpenoic acid derivative (**9**) named 1 α ,2 β ,3 β ,19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid, is reported to be one of the principal compounds present in the VPEE extract, the more potent anti-inflammatory and anti-arthritic extract.

The carrageenan-induced paw edema in rat is a preliminary and simple model for screening potential anti-inflammatory drugs (Arawwawala et al., 2012). The development of carrageenan-

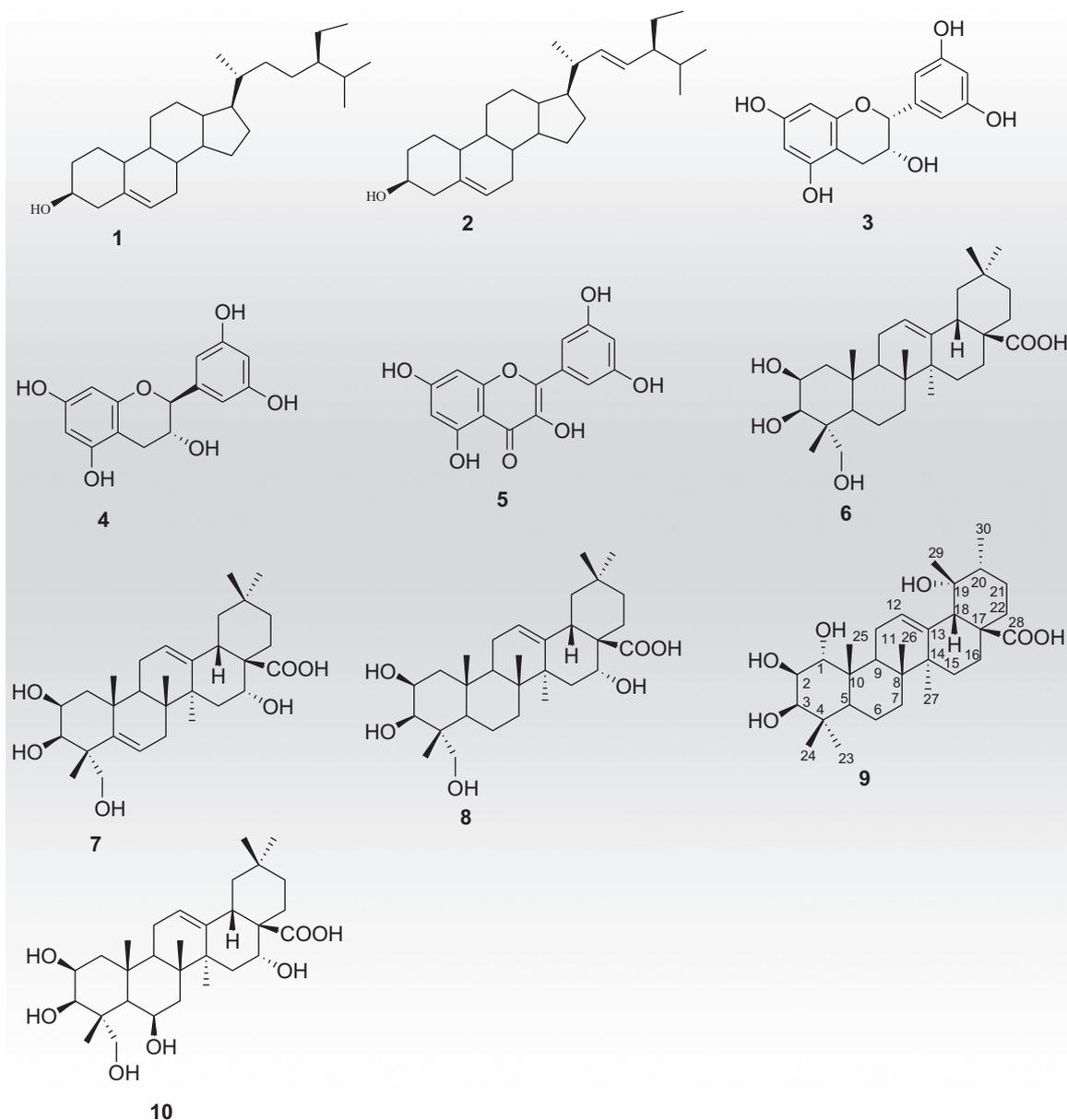


Fig. 8. Compounds from the ethyl acetate extract (VPEE) of *Vitellaria paradoxa*.

induced paw oedema is a biphasic biological process, of which the early phase (1–2 h) is mediated by release of histamine and serotonin (Cuzzocrea et al., 1998) while the second phase (3–4 h) is linked to the neutrophil infiltration, eicosanoid release, production of free radicals and also release of other neutrophil derived mediators (Cuzzocrea et al., 1998; Foyet et al., 2011). The oedema produced in between early and late phase is thought to be due to the release of kinin-like substances (e.g. bradykinin), which later induces the biosynthesis of prostaglandin and other autacoids (Olivera de Melo et al., 2006).

In the present study, the anti-inflammatory activity of aqueous and organic extracts was evaluated using the carrageenan-induced rat paw edema animal model. Oral administration of the extract suppressed the edematous response in the both first and second phase after carrageenan injection. However the maximum significant inhibitory activity was obtained in the late phase (4–5 h) ($P < 0.001$) with the ethyl acetate extract (VPEE). These results clearly suggested that the VPEE of the stem bark of *V. paradoxa* may inhibit serotonin and histamine expression and may inhibit

both Cyclooxygenase-1 (COX-1) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) which are key enzymes in the synthesis of prostaglandins. COX-1 is constitutively expressed and involved in the acute inflammatory response; whereas COX-2 is expressed in macrophages, monocytes, neutrophils or fibroblasts after stimulation COX-2-dependant PGE₂ is produced by inflammatory cells and increased in disease (Min et al., 2009).

The determination of paw swelling is simple, sensitive and quick procedure for evaluating the degree of inflammation and the therapeutic effects of drugs. The Freund's complete adjuvant model is chosen as it develops chronic swelling in multiple joints with influence of inflammatory cells with erosion of joint cartilage and bone destruction. Recent studies have revealed the key roles of pro-inflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1b (IL-1b), IL-6 and IL-8, GM-CSF, interferon's and PGDF in the pathogenesis of RA (Lam et al., 2004; Cai et al., 2005). The model of adjuvant induced arthritis in rats has been extensively used in the study of antiarthritic drugs (Barsante et al., 2005; Danquah et al., 2011). FCA induced a significant paw edema

Table 2

¹H (600 MHz) and ¹³C (150 MHz) NMR Spectroscopic data of compound 9 isolated from the stem bark extract EtOAc, detected HMBC correlations and ¹³C data of isomeric compound reported by Kounu et al.

Position	9 (CD ₃ OD)			
	δ _H (J in Hz)	δ _C	HMBC correlations	δ _C Ref. Kouno et al. (1988)
1	3.45 (d, 12.0)	81.4	13.1, 44.4, 49.1, 71.9	74.7
2	3.63 (dd, 12.0, 3.5)	71.9	80.9	77.0
3	3.39 (d, 3.5)	80.9	22.5, 29.3, 49.1, 71.9, 81.4	79.9
4		42.5		40.6
5	1.34 (br, d)	49.1	13.1, 19.6, 22.5, 29.3, 34.3, 42.5	53.2
6	1.78 (m), 0.94 (br)	19.6	43.2, 49.1	17.9
7	1.58 (m), 1.29 (m)	34.3	19.6, 41.8	32.8
8		41.8		41.2
9	2.00 (m)	49.4	13.1, 17.8, 28.4, 41.8, 44.4, 81.4	48.0
10		44.4		37.4
11	11a 2.55 (m), 11b 2.17 (dd, 4, 14, 18)	28.4	49.4, 130.8, 138.9	24.6
12	5.29 (m)	130.8	28.4, 41.8, 49.4, 55.1, 73.6, 138.9	130.1
13		138.9		137.2
14		38.9		41.2
15	1.77 (m), 1.00 (m)	29.8	26.8, 38.9	29.8
16	2.50 (m), 1.51 (m)	26.8	29.8, 49.0	26.1
17		49.0		48.5
18	2.48 (s)	55.1	26.8, 43.2, 49.0, 73.6, 130.8, 138.9	52.6
19		73.6		73.2
20	1.34 (m)	43.2	27.5, 73.6	42.9
21	1.51 (br), 1.48 (br)	27.5	39.2, 43.2	26.9
22	1.72 (m), 1.62 (br, d)	39.2	27.5, 49.0	38.1
23	1.17 (s)	29.3	42.5, 49.1, 80.9	28.3
24	0.86(s)	22.5	42.5, 49.1, 80.9	16.1
25	1.00 (s)	13.1	44.4, 49.4, 81.4	11.4
26	0.77 (s)	17.8	34.3, 41.8, 49.4	16.9
27	1.33 (s)	25.1	29.8, 38.9, 41.8, 138.9	25.6
28		182.4		174.4
29	0.97 (s)	27.2	43.2, 55.1, 73.6	27.4
30	0.92 (d, 8.0)	16.8	27.5, 43.2, 73.6	17.1

on 4th day in control group rats, which persisted till the 28th day. To the 19th to the 25th day, the percentages of inflammation in the ethyl acetate treated group have oscillated between 9.60% and 8.91% (versus 30.91 and 24.29% for the control group) for the same period. At the same time the treatment of the arthritic rats with the VPEE significantly ($P < 0.01$) reduced the score of the arthritis at the end of treatment period. Taking together, these results indicate that chronic administration of VPEE exhibits anti-arthritic effects in rats with Freund's adjuvant-induced arthritis.

Spleen is an important organ involved in the immune system of the body with a role in the antibody formation. One of the diagnostic characteristics of systemic inflammation in experimental arthritis is an increase of spleen weight and splenomegaly. Although the mechanism underlying splenomegaly still uncertain, it is consider that immunological abnormalities is one of the major factor (Patil et al., 2012, 2011). The spleen weight of arthritic rats was effectively reduced after 14 days administration of EtOAc extract of *V. paradoxa* (150 mg/kg, p.o.). This is an indication this extract has immune-suppressant activity. However, supplementary data are necessary to confirm this effect. In the other hand, thymus atrophy is reported in the animal model of FCA-induced arthritis. This reduction of thymus weight is similar to that observed with the steroidal anti-inflammatory drugs. In the present study, the treatment of arthritic rats with VPEE but not VPME brings the thymus weight near to their normal value. This

suggested that the antiarthritic effect of the EtOAc extract may not link with any steroidal anti-inflammatory mechanism (Suyog et al., 2014).

The decrease in RBC count and haemoglobin level represents the anaemic condition in arthritic non treated rats. This may be the result of the abnormal storage of iron in the reticulo-endothelial system and synovial tissue and the failure of bone marrow to respond to anaemia (Mowat, 1972). Only the VPEE succeeded to significantly ($P < 0.05$) restore the haemoglobin level of rats. On the other hand, the significant increase in white blood cell count in adjuvant-induced arthritic rats may be due to the stimulation of immune system against the invading antigens microbial infection (Selvarani and Viji Stella Bai, 2014) and the decrease in the VPEE-treated groups showed the immunomodulatory effect of this extract.

Erythrocyte sedimentation rate (ESR) is strongly related with the ability of red cells to aggregate into orderly stacks. Proteins are thought to affect the repellent surface charges on red cells and cause them to aggregate into rouleaux and hence the sedimentation rate increases (Grant et al., 1970). The increase of ESR level is a common diagnostic feature in patients with chronic arthritis (Mowat, 1972). In our studies, ESR of the FCA-treated group was very significantly high ($P < 0.001$) as compared to normal group. This increase has been remarkably counteracted by VPEE extract and standard drug Diclofenac, restoring back to near normal value thus justifying the significant role of this extract and Diclofenac in arthritic conditions.

CFA-arthritis animal model is characterized by polyarticular inflammation, marked bone resorption, periosteal bone proliferation and cartilage destruction. In this study, the histopathological examination of knee joints showed that the VPEE extract effectively protects the cartilage damage against the cocktail of pro-inflammatory mediators release after CFA injection. This gives supplementary argument on the anti-arthritic propensity of this extract on the chronic animal models of inflammation used in this study.

VPEE was the most effective active fraction in this study. Phytochemical investigations of this extract have shown the presence of (–)-epicatechin, (+)-catechin, quercetin, 5, 6-dihydrobassic acid, 16 α -hydroxybassic acid, 5,6-dihydro-16 α -hydroxybassic acid and 16 α -hydroxyprotobassic acid and a novel ursane triterpenoid acid. Flavonoids, sterols, and triterpenoids compounds have anti-inflammatory activity by inhibiting the 5-lipoxygenase pathway, which together with the COX-2 pathway, is very important in producing and maintaining inflammation. This previously has been shown (Suh et al., 1998; Mosquera et al., 2011; Bak et al., 2012).

5. Conclusion

The results obtained in this present study indicates that the VPEE has considerable potency in anti-inflammatory action and has prominent effects on adjuvant-induced arthritis by alleviating paw edema and haematological disorder associated with this condition. Hence, this extract may have great potential as an alternative to the therapeutic agents currently available for treatment of RA. Subsequent column chromatographic separation afforded ten compounds one of which was a new derivative named: 1 α ,2 β ,3 β ,19 α - tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid. Further experimentation is needed in order to understand the precise mechanism of action of this extract, and to know the biological spectrum of the new ursane triterpenoid acid.

Conflict of interest

The authors declare that they have no potential conflicts of interest to disclose.

Authors' contributions

FHS and EKO designed and carried out the experiments; FHS and EKO wrote the manuscript; EKO, BG carried out the HPLC study; AL and ML conducted the MS and NMR analysis; all authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Dr. Roger Ponka (The Higher Institute of the Sahel, Maroua, Cameroon) for plant collection and Prof. Dzeufiet Djomeni Désiré who carried out the histological study. The Government of Cameroon for financial support through the Fonds d'Appuis à la Recherche

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.014>.

References

- Arawwawala, L.D.A.M., Arambewela, L.S.R., Ratnasooriya, W.D., 2012. *Alpinia calcarata* Roscoe: a potent anti-inflammatory agent. *J. Ethnopharmacol.* 139, 889–892.
- Ayankunle, A.A., Kolawole, O.T., Adesokan, A.A., Akùbinu, M.O., 2012. Antibacterial activity and sub-chronic toxicity studies of *Vitellaria paradoxa* stem bark extract. *J. Pharmacol. Toxicol.* 7 (6), 298–304.
- Bak, M.J., Hong, S.G., Lee, J.W., Jeong, W.S., 2012. Red Ginseng Marc oil inhibits iNOS and COX-2 via NFκB and p38 pathways in LPS-Stimulated RAW 264.7 macrophages. *Molecules* 17, 13769–13786. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules171213769>.
- Barsante, M.M., Roffè, E., Yokoro, C.M., Tafuri, W.L., Souza, D.G., Pinho, V., Castro, M.S., Teixeira, M.M., 2005. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 516, 282–289.
- Cai, X., Zhou, H., Fan Wong, Y., Xie, Y., Qiu Liu, Z., Hong Jiang, Z., Xiang Bian, Z., Xu, X., Liu, L., 2005. Suppressive effects of QFGJS, a preparation from an anti-arthritis herbal formula, on rat experimental adjuvant-induced arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 586–594.
- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Hake, P., Salzman, A.L., Szabo, C., 1998. Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 450–459.
- Chao, J., Lu, T.-C., Liao, J.-W., Huang, T.-H., Lee, M.-S., Cheng, H.-Y., Ho, L.-K., Kuo, C.-L., Peng, W.-H., 2009. Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanol root extract of *Mahonia oiwakensis* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 125, 297–303.
- Danquah, C.A., Woode, E., Boakye-Gyasi, E., 2011. Anti-arthritis effects of an ethanolic extract of *Capparis erythrocarpos* Isert roots in Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Pharmacol. Toxicol.* 6, 201–217.
- Foyet, H.S., Abdou Bouba, A., Ponka, R., Asongalem, A.E., Kamtchouing, P., Nastasa, V., 2011. Effects of *Hibiscus asper* leaves extracts on carrageenan induced oedema and complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Cell Anim. Biol.* 5 (5), 69–75.
- Foyet H.S., Tsala E.T., Zogo E.B.J.C., Azanack N.C., Lissia T.H. and Eyong K.O. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of a methanol extract from *Vitellaria paradoxa* stem bark, *Pharmacogn. Res.*, <http://dx.doi.org/10.4103/0974-8490.159569>, in press.
- Grant, N.H., Alburn, H.E., Kryzanasuskas, C., 1970. Stabilization of serum albumin by anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* 19, 715–722.
- Hajhashemi, V., Sajjadi, S.E., Heshmati, M., 2009. Anti-inflammatory and analgesic properties of *Heracleum persicum* essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. *J. Ethnopharmacol.* 124, 475–480.
- Kouno, I., Baba, N., Ohni, Y., Kawano, N., 1988. Triterpenoids from *Agrimonia Pilosa*. *Phytochemistry* 27, 297–299.
- Lam, F.F., Wong, H.H., Ethel, S.K., 2004. Time course and substance P effects on the vascular and morphological changes in adjuvant induced monoarthritic rats. *Int. Immunopharmacol.* 4, 299–310.
- Maldini, M., Sosa, S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balick, M.J., Pizza, C., Loggia, R.D., 2009. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *J. Ethnopharmacol.* 122, 430–433.
- Matig, O.E., Ndoye, O., Kengue, J., Awono, A., 2006. Les fruitiers forestiers comestibles du Cameroun. IPGRI Regional Office for West and Central Africa, pp. 150–152.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
- Min, S.W., Kim, N.J., Baek, N.I., Kim, D.H., 2009. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation in mice. *J. Ethnopharmacol.* 125, 497–500.
- Mosquera, D.M.G., Ortega, Y.H., Kilonda, A., Dehaen, W., Pieters, L., Apers, S., 2011. Evaluation of the in vivo anti-inflammatory activity of a flavonoid glycoside from *Boldoa purpurascens*. *Phytochem. Lett.* 4, 231–234.
- Mowat, A.G., 1972. Hematologic abnormalities in rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1 (3), 195–219.
- Nagatomi, H., Ando, K., 1984. Studies on the anti-inflammatory activity and ulcerogenic adverse effect of thiazole derivatives, especially 2-amino-thiazoleacetic acid derivatives. *Arzneimittelforschung* 34, 599–603.
- Olivera de Melo, J.O., Truitt, M.C.T., Muscara, M.N., Bolonheis, S.M., Dantas, J.A., Caparroz-Assef, S.M., Cuman, R.K.N., Bersanti, C.A., 2006. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (11), 2241–2245.
- Orwa, C, A Mutua, Kindt R, Jamnadass R, S Anthony. 2009. Agroforestry. Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>).
- Patil, M.V.K., Kandhare, A.D., Bhise, S.B., 2012. Anti-arthritis and anti-inflammatory activity of *Xanthium strumarium* L. ethanolic extract in Freund's complete adjuvant induced arthritis. *Biomed. Aging Pathol.* 2, 6–15.
- Patil, K.R., Patil, C.R., Jadhav, R.B., Mahajan, V.K., Patil, P.R., Gaikwad, P.S., 2011. Anti-arthritis activity of bartogenic acid isolated from fruits of *Barringtonia racemosa* Roxb. (Lecythidaceae). *Evid.-Based Complement. Altern. Med.*, 7785245 <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep148>.
- Sanou, H., Lamien, N., 2011. Conservation et utilisation durable des ressources génétiques des espèces ligneuses alimentaires prioritaires de l'Afrique subsaharienne. *Saforgen. Vitellaria paradoxa* karité, pp. 2–4.
- Selvarani, K., Bai, G., Viji Stella, 2014. Anti-arthritis activity of *Cayratia pedata* leaf extract in Freund's adjuvant induced arthritic rats. *Int. J. Res. Plant Sci.* 4 (2), 55–59.
- Simon, R.A., 2003. Prevention and treatment of reactions to NSAIDs. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 24, 189–198.
- Suh, N., Honda, T., Finlay, H.J., Barchowsky, A., Williams, C., Benoit, N.E., Xie, Q.W., Nathan, C., Gribble, G.W., Sporn, M.B., 1998. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* 58, 717–723.
- Suyog, G., Deepti, B., Beautikumari, S., Patel, Ankita, 2014. Tannin rich fraction of *Punica granatum* Linn. Leaves ameliorate Freund's adjuvant induced arthritis in experimental animals. *Pharmacologia* 5, 19–31.
- Verma, N., Chakrabarti, R., Das, R.H., Gautam, H.K., 2012. Anti-inflammatory effects of shea butter through inhibition of iNOS, Cox2 and cytokines via the NF-κB Pathway in LPS-activated J774 macrophage cells. *J. Complement. Integr. Med.* 9 (4). <http://dx.doi.org/10.1515/1553-3840.1574>.
- Wu, X.L., Li, C.W., Chen, H.M., Su, Z.Q., Zhao, X.N., Chen, J.N., Lai, X.P., Zhang, X.J., Su, Z.R., 2013. Anti-inflammatory effect of supercritical-carbon dioxide fluid extract from flowers and buds of *Chrysanthemum indicum* Linné. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* . <http://dx.doi.org/10.1155/2013/413237>
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paws of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544–547.
- Zhang, J., Kurita, M., Shinozaki, T., Ukiya, M., Yasukawa, K., Shimizu, N., Tokuda, H., Masters, E.T., Akihisa, M., Akihisa, T., 2014. Triterpene glycosides and other polar constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels and their bioactivities. *Phytochemistry* 108, 157–170.
- Ziba, L., Yameogo, F., 2002. Les bienfaits du karité pour les populations rurales, les communautés et les pays. Actes de l'atelier organisé par l'ONU pour l'Alimentation et l'Agriculture, le Fonds commun pour les Produits de Base et le Centre de Suivi Ecologique, p. 80.

*Triterpenoids from the stem bark of
Vitellaria paradoxa (Sapotaceae) and
derived esters exhibit cytotoxicity against a
breast cancer cell line*

**Kenneth O. Eyong, Guerisson Bairy,
Anna A. Eno, Joseph Taube, Kenneth
G. Hull, Gabriel N. Folefoc, Harquin
S. Foyet & Daniel Romo**

Medicinal Chemistry Research

ISSN 1054-2523

Volume 27

Number 1

Med Chem Res (2018) 27:268-277

DOI 10.1007/s00044-017-2059-7



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Triterpenoids from the stem bark of *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) and derived esters exhibit cytotoxicity against a breast cancer cell line

Kenneth O. Eyong^{1,2} · Guerisson Bairy² · Anna A. Eno³ · Joseph Taube⁴ · Kenneth G. Hull¹ · Gabriel N. Folefoc² · Harquin S. Foyet⁵ · Daniel Romo¹

Received: 13 February 2017 / Accepted: 30 August 2017 / Published online: 14 September 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract A study of the chemical constituents of the stem bark of *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) has resulted in the isolation and characterization of a new ursane-type triterpenoid, 2 β ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**1**), together with seven known compounds: betulinic acid (**2**), 1 α ,2 β ,3 β ,19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid (**3**), β -sitosterol (**7**), sigmasterol (**8**), (-)-epicatechin (**9**), (+)-catechin (**10**) and quercetin (**11**). The structure of the novel, ursane-type acid **1** was elucidated on the basis of detailed spectroscopic analysis including IR, HRMS (ESI), 1D and 2D NMR and a comparison to previously described, related natural products. Preliminary cytotoxicity assays against the MDA-MB-231 breast cancer cell line indicated that betulinic acid **2** and its corresponding methyl ester **5** were the most active compounds tested with IC₅₀ values of 19.9 μ M (17.2–23.1 μ M, 95% CI) and 32.9 μ M

(24.9–43.4 μ M, 95% CI), respectively. Esterification of acids **1–3** afforded the corresponding methyl esters **4–6** for additional structure-activity relationship (SAR) analysis. In general, the activity against the MDA-MB-231 breast cancer cell line increased upon esterification of the triterpenoids screened.

Keywords *plant-derived natural products* · ursane family · isolation · structure elucidation · Apoptosis/necrosis assay

Introduction

Cancer refers to any of a group of more than 100 distinct diseases that are characterized by the uncontrolled proliferation of abnormal cells in the body. The genotypic and phenotypic diversity between tumors originating from distinct organs and through distinct mutations necessitate the continued development of novel cytotoxic molecules as well as the characterization of natural products with cytotoxic properties. Despite a diminished focus on natural products recently, compounds originally isolated from natural sources make a significant contribution to the landscape of pharmaceutical agents (Harvey et al. 2015, Gennari et al. 2007) approved by the US Food and Drug Administration (FDA). Furthermore, the World Health Organization estimates that 25% of pharmaceutical drugs are derived from plants known for efficacy among practitioners of traditional medicine (WHO 2003).

In recent years, the use of natural products for drug discovery has declined in favor of combinational methods

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00044-017-2059-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Kenneth O. Eyong
eyongkk@yahoo.com

- ¹ Department of Chemistry and Biochemistry and the CPRIT Synthesis and Drug-Lead Discovery Laboratory, Baylor University, Waco, Texas 76798, USA
- ² Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, PO Box 812, Yaounde, Cameroon
- ³ Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, PO Box 812, Yaounde, Cameroon
- ⁴ Department of Biology and Institute for Biomedical Studies, Baylor University, Waco, Texas 76798, USA
- ⁵ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Maroua, PO Box 46, Maroua, Cameroon

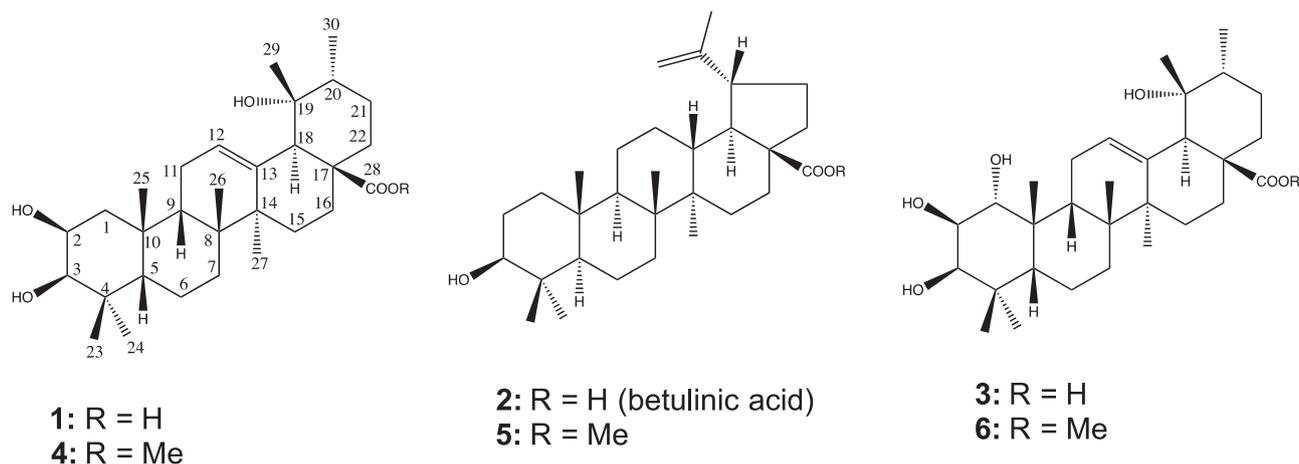


Fig. 1 Triterpenoid acids from *V. paradoxa* and their methyl ester derivatives

which can rapidly generate large libraries of potential lead compounds. In their perspective, Paterson and Anderson (Paterson and Anderson 2005) suggest that it may be time to revisit the prevailing dogma and consider ways in which natural products may continue to inspire the development of new drugs. One approach that we have applied in this report is to use bioactive natural products as a starting point for the design and synthesis of targeted therapeutic agents with specific structural modifications.

The diversity of flora in West Africa represents a promising source for novel anti-cancer agents. *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn (Sheanut tree) has long been used in traditional medicine for the treatment of various ailments, including inflammation, fever, skin irritations, dermatitis, sunburn, rheumatism, diarrhea, stomach ache and ulcers (Orwa et al. 2009, Moore 2008, Foyet et al. 2015). Moreover, according to an ethno-botanical survey, the bark of the trunk and stems of *V. paradoxa* has been used historically for the treatment of cancer (Jiofack et al. 2010). Following this survey, a preliminary antiproliferation screen of the methanol extract from *V. paradoxa* produced very low GI₅₀ values (concentration of the extract causing 50% growth inhibition of the cells) compared with four cancer cell lines (NCI-H460, MCF7, PC3 and HeLa) using a sulforhodamine B (SRB) assay (Tagne et al. 2014). The results from these preliminary studies compelled us to run more comprehensive experiments to isolate and characterize the bioactive compounds responsible for the observed cytotoxic effects.

Herein, we report the isolation and structure elucidation of a new ursane-type triterpenoid, 2 β ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**1**) from the air-dried stem bark of *V. paradoxa* along with seven known compounds. Triterpenoids **1–3** together with their corresponding derived methyl esters **4–6**, were evaluated for cytotoxic activity against the MDA-MB-231 breast cancer cell line.

Results and discussion

Isolation and characterization

A total of 3.2 kg of powdered stem bark of *V. paradoxa* was extracted by sonication, successively with hexanes, ethyl acetate, methanol and water. The MeOH extract was subjected to column chromatography eluting successively with hexanes, hexanes-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH and MeOH. Three triterpenoids (**1–3**, Fig. 1) were obtained together with five non-triterpenoids (**7–11**, Fig. 3). Esterification of acids **1–3** afforded their corresponding methyl esters **4–6** (Fig. 1).

Acid **1** was obtained as a white powder from silica gel column chromatography eluting with 55% EtOAc/hexanes. It is soluble in MeOH, stains on TLC with iodine or H₂SO₄ and has a melting point of 260–262 °C. The molecular formula was determined to be C₃₀H₄₈O₅ on the basis of HRMS (ESI), (*m/z* 489.1668 [M + H]⁺) indicating seven degrees of unsaturation. The IR spectrum of acid **1** confirmed the presence of a carboxylic acid group (carbonyl: 1687 cm⁻¹; broad O–H stretch; 2900–3400). Acid **1** displayed an optical rotation of [α]_D²⁶ + 25.5° (*c* 0.22, THF).

The ¹H NMR spectrum (600 MHz, MeOH-d₄) of compound **1** exhibited signals indicative of seven methyl groups at δ_{H} 1.37 (3H, s), 1.22 (3H, s), 1.04 (3H, s), 1.01 (3H, s), 0.96 (3H, d, 12 Hz), 0.89 (3H, s), and 0.81 (3H, s), twenty-four methylene and methine groups, two of which are attached to oxygen atoms at δ_{H} 3.97 (1H, dt, 6.0, 12.0 Hz) and 3.35 (1H, d, 6.0 Hz), and one olefinic proton at δ_{H} 5.32 (1H, t, 6.0 Hz) (Table 1). The ¹³C NMR spectrum (150 MHz, MeOH-d₄) exhibited 30 carbon signals that were assigned by a DEPT experiment as seven methyl (δ_{C} 27.6, 25.7, 23.5, 21.1, 16.1, 15.5, 15.2), eight methylene (δ_{C} 44.1, 37.6, 32.7, 28.2, 26.0, 25.2, 23.3, 17.9), seven methine,

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR Data (600 and 150 MHz) of compounds **1–6** (δ_{H} , CDCl_3 , MeOH-d_4 , J in Hz)

C#	1		2		3		4		5		6	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	1.55(1H, m)	41.1	0.88(1H, m)	38.7	3.45(1H, d, 12.0)	81.4	1.55(1H, m)	41.1	0.88(1H, m)	38.7	3.48 (1H, d, 8.0)	79.8
	1.35(1H, m)		1.55(1H, m)				1.32(1H, m)		1.65(1H, m)			
2	3.95 (1H, td, 6.0, 12.0Hz)	65.8	1.75 (2H, m)	27.6	3.63(1H, dd, 3.5, 12.0)	71.7	3.97 (1H, dt, 6.0, 12.0)	65.7	1.75 (2H, m)	27.4	3.68 (1H, dd, 4.0, 12)	70.4
3	3.35(1H, d, 6.0Hz)	78.7	2.98(1H, m)	77.2	3.39(1H, d, 3.5)	80.9	3.35(1H, d, 6.0)	78.7	3.13(1H, dd, 4.0, 12.0)	79.0	3.42(1H, d, 4.0)	79.3
4		38.1		39.0		42.5		38.1		38.7		41.1
5	1.23(1H, m)	48.7	0.65(1H, m)	55.4	1.34(1H, br, d)	49.1	1.20(1H, m)	48.1	0.65(1H, m)	55.4	1.35(1H, m)	48.2
6	1.45(1H, m)	17.9	1.45(1H, m)	18.4	1.78(1H, m)	19.6	1.53(1H, m)	17.9	1.45(1H, m)	18.3	1.78 (1H, m)	18.0
	1.40 (1H, m)		1.40 (1H, m)		0.94(1H, br)		1.48 (1H, m)		1.50 (1H, m)		0.94 (1H, m)	
7	1.65(1H, m)	32.7	1.40(2H, m)	34.4	1.58(1H, m)	34.3	1.62(1H, m)	32.6	1.40(2H, m)	34.3	1.58(1H, m)	32.6
	1.35(1H,m)				1.29(1H, m)		1.32(1H,m)				1.29(1H, m)	
8		38.9		40.7		41.8		41.3		40.7		40.4
9	1.85(1H, m)	46.8	1.33(1H, m)	50.4	2.00(1H, m)	49.4	1.89(1H, m)	46.8	1.25(1H, m)	50.6	2.05(1H, m)	48.4
10		38.0		37.2		44.4		39.9		37.2		42.9
11	2.00(2H, m)	23.3	1.42(1H, m)	20.9	2.55(1H, m)	28.4	2.00(2H, m)	23.4	1.45(1H, m)	20.9	2.67(1H, m)	26.9
			1.21(1H, m)		2.17(1H, dd, 4, 12)				1.25(1H, m)		2.22(1H, dd, 4, 12)	
12	5.32(1H, t, 6.0Hz)	128.0	1.00(1H, m)	25.6	5.29(1H, m)	130.8	5.32(1H, m)	128.1	1.00(1H, m)	25.5	5.32 (1H, t, 4)	129.4
			1.89(1H, m)						1.75(1H, m)			
13		138.7	2.26(1H, td, 4.0, 12.0)	38.1		138.9		138.6	2.13(1H, m)	38.3		137.4
14		41.3		42.5		38.9		41.7		42.4		37.4
15	1.00(1H, m)	28.2	1.26(1H, m)	30.6	1.00 (1H, m)	29.8	1.00(1H, m)	28.1	1.35(1H, m)	30.6	1.00 (1H, m)	28.2
	1.77(1H, m)		1.85(1H, m)		1.77(1H, m)		1.77(1H, m)		1.81(1H, m)		1.77(1H, m)	
16	1.52 (1H, m)	25.9	1.55 (1H, m)	32.2	1.51(1H, m)	26.8	1.52 (1H, m)	25.8	1.45 (1H, m)	32.2	1.51(1H, m)	25.2
	2.62 (1H, td, 6.0, 12 Hz)		2.19 (1H, m)		2.5(1H, m)		2.67 (1H, td, 6.0, 12)		2.18 (1H, m)		2.61(1H, m)	
17		47.9		55.9		49.0		48.1		56.6		48.1
18	2.52(1H, s)	53.7	1.55(1H, m)	49.0	2.48(1H, s)	55.1	2.54(1H, s)	53.7	1.55(1H, m)	49.5	2.53(1H, s)	53.6
19		72.2	3.00 (1H, m)	47.1		73.6		72.1	2.95 (1H, m)	47.0		72.1
20	1.35(1H, m)	41.7		150.8	1.34(1H, m)	43.2	1.32(1H, m)	41.7		150.1	1.34(1H, m)	41.6
21	1.35(2H, m)	25.2	1.22(1H, m)	29.7	1.51(1H, m)	27.5	1.65(1H, m)	25.2	1.20(1H, m)	29.7	1.51(1H, m)	25.8
			1.45(1H, m)		1.48(1H, m)		1.25(1H, s)		1.40(1H, m)		1.48(1H, m)	
22	1.65(1H, m)	37.6	1.45(1H, m)	36.8	1.72(1H, m)	39.2	1.65(1H, m)	37.4	1.45(1H, m)	37.0	1.72(1H, m)	37.5
	1.75(1H, m)		1.82(1H, m)		1.62 (1H, m)		1.75(1H, m)		1.86(1H, m)		1.62 (1H, m)	
23	1.40(3H, s)	23.5	0.94(3H, s)	28.6	1.17(3H, s)	29.3	1.37(3H, s)	23.5	0.89(3H, s)	28.0	1.22(3H, s)	27.7
24	0.89 (3H, s)	21.1	0.77 (3H, s)	16.2	0.86(3H, s)	22.5	0.89 (3H, s)	21.0	0.75 (3H, s)	15.4	0.90(3H, s)	21.0
25	1.02(3H, s)	15.5	0.65(3H, s)	16.3	1.00 (3H, s)	13.1	1.01(3H, s)	15.4	0.68(3H, s)	16.0	1.03 (3H, s)	11.5
26	0.81(3H, s)	16.1	0.87(3H, s)	16.4	0.77(3H, s)	17.8	0.71(3H, s)	16.0	0.89(3H, s)	16.1	0.72(3H, s)	16.2
27	1.21(3H, s)	25.7	0.88(3H, s)	14.9	1.33(3H, s)	25.1	1.21(3H, s)	25.6	0.84(3H, s)	14.7	1.37(3H, s)	23.6
28		180.8		177.7		182.4		179.1		176.7		179.1
29	1.01(3H, s)	27.6	4.70(1H, d, 4.0Hz)	110.1	0.97(3H, s)	27.2	1.01(3H, s)	27.8	4.69(1H, d, 4.0)	109.4	0.99(3H, s)	25.6
			4.57(1H, d, 4.0 Hz)						4.53(1H, d, 4.0)			
30	0.96 (3H, d, 12)	15.2	1.65 (3H, s)	19.4	0.92(3H, d, 8.0)	16.8	0.96 (3H, d, 12.0)	15.1	1.61 (3H, s)	19.4	0.95(3H, d, 8.0)	15.1
31							3.60(3H, s)	50.7	3.60(3H, s)	51.3	3.60(3H, s)	50.7

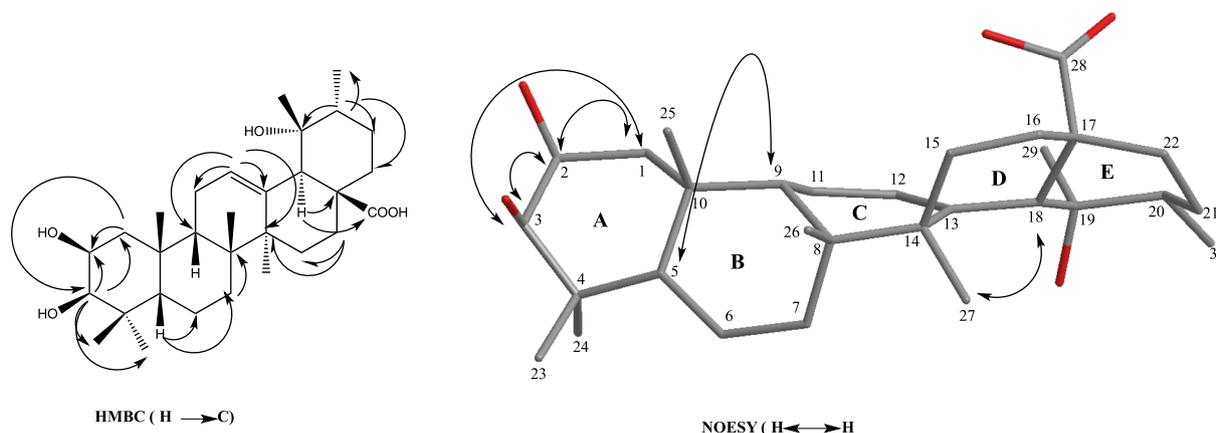


Fig. 2 Main HMBC and NOESY correlations of compound **1**

including two $-\text{CH}(\text{OH})$ (δ_{C} 78.7, 65.8), four $-\text{CH}$ (δ_{C} 53.7, 48.0, 46.8, 41.7) and three sp^2 -hybridized carbons (δ_{C} 180.8 ($\text{C}=\text{O}$), 138.7 ($\text{C}=\text{C}$), 127.9 ($=\text{CH}$), one tertiary alcohol (72.2 ($\text{C}-\text{OH}$)) and five quaternary carbons (δ_{C} 47.9, 41.3, 38.9, 38.1, 38.0) (Table 1). The above NMR data are characteristic of the triterpenoid class of natural products (Peng et al. 1998, Liu et al. 2016).

The presence of a methyl doublet assigned to proton H-20 (δ 0.96, d, 3H, $J = 12$ Hz) and a quaternary carbon atom at δ 72.2, attributed to C-19, are signals typical of an ursane-type triterpenoid (Eyong et al. 2015, Liu et al. 2016). The ^1H and ^{13}C NMR data (Table 1) were assigned using $^1\text{H}-^1\text{H}$ COZY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC and NOESY spectra (Supporting Information). In the $^1\text{H}-^1\text{H}$ COZY, correlations were observed between H-2 (δ 3.95, td, $J = 6.0$, 12.0 Hz) and H-3 (δ 3.35, d, $J = 6.0$ Hz) with a coupling constant $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 6.0$ Hz suggesting a cis coupling (Minch 1994). Also observed were correlations between H-2, H-3, H-1a (δ 1.55, m) and H-1b (δ 1.35, m) from the ring A nucleus. The ring A correlations were observed in the HSQC-TOCSY and TOCSY experiments. Additional $^1\text{H}-^1\text{H}$ -COZY correlations were identified between H-5 (δ 1.23, m), H-6a (1.45, m), H-6b (1.40, m), H-7a (1.65, m) and H-7b (1.35, m) in ring B, H-12 (δ 5.32, t, 6.0 Hz), H-11 (δ 2.00, m, 2H) and H-9 (δ 1.85, m) for ring C, H-16a (δ 2.62 td, 6.0, 12.0 Hz), H-16b (δ 1.52, m), H-15a (δ 1.77, m) and H-15b (δ 1.00, m) for ring D, and correlations between Me-30 (δ 0.96, d, 12), H-20 (1.35, m), H-21 (1.35, m), H-22a (1.75, m) and H-22b (1.65, m) for ring E. The HSQC-TOCSY correlations of H-12 (δ 5.32) with C-11 (δ 23.3), C-9 (46.8) and C-12 (128.0), H-2 (δ 3.97) with C-1 (δ 41.1), C-2 (65.8) and C-3 (78.7), H-16 β (δ 2.62) with C-16 (δ 25.9) and C-15 (δ 28.2) support our assignment. Typical in the HMBC spectrum are correlations of H-12 (δ 5.32) with C-11 (δ 23.3), C-14 (41.3), C-9 (46.8), and C-18 (53.7) supporting H-12 connectivity in 2J or 3J to these carbon atoms (Fig. 2). The HMBC correlations between H-16 β (δ 2.62)

with C-15 (δ 28.2), C-17 (47.91), C-18 (53.7) and C-28 (180.8) support the ring D connectivity. Moreover, the NOESY correlations between H-18 (δ 2.52) with H-27 (1.21), H-2 (3.95) with H-3 (3.35) and H-5 (1.23) with H-9 (1.85) confirmed the relative configuration of C-2, C-3, C-5, C-9 and C-18 in Fig. 2. The coupling constant between H-2, H-3 ($^3J_{\text{H-2,H-3}} = 6.0$ Hz) indicated a syn configuration of the two hydrogens and thus a syn diol as previously observed in similar triterpenoids (Eyong et al. 2015). Therefore, compound **1** was determined to be 2 β ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid.

Compound **2** was obtained as a white powder from a silica gel column eluting with 25 \rightarrow 27.5% EtOAc/hexanes. It is soluble in methanol, stains on TLC in iodine or H_2SO_4 , has a melting point of 282–285 $^\circ\text{C}$, and gave LRMS (APCI $^+$) Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_3$ ($\text{M}-\text{H}$) $^+$ 455.4, found m/z : 455.3. These properties along with the IR and NMR data (supplemental information) matched those previously reported for betulinic acid (Peng et al. 1998) (Fig. 1).

Compound **3** was obtained as a white powder from a silica gel column eluting with 70 \rightarrow 80% EtOAc/hexanes. It is soluble in methanol, stains on TLC in iodine or H_2SO_4 , has a melting point of 262–264 $^\circ\text{C}$ and gave LRMS (APCI $^+$) Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_6$ ($\text{M}-\text{H}$) $^+$ 503.4, found m/z : 503.3. These properties along with the IR and NMR data (SI) matched those previously reported to the known 1 α ,2 β ,3 β ,19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid (Eyong et al. 2015) (Fig. 1).

To obtain derivatives for structure activity relationship (SAR) studies, esterification was carried out on compounds **1–3** using diazomethane generated *in situ* from 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNG) (McKay 1948) to afford methyl esters **4–6** (Fig. 1).

After esterification of compound **1** with diazomethane, compound **4** was purified by column chromatography on silica gel using 50% EtOAc/hexanes (75% yield) and isolated as a white powder. It is soluble in MeOH, stains on

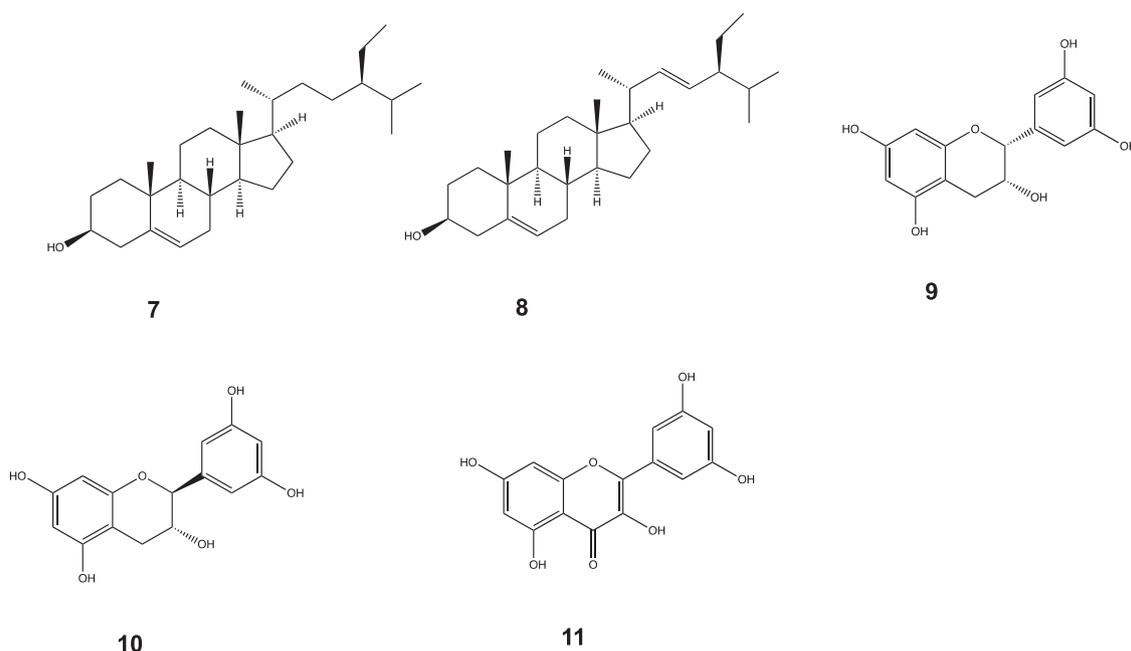
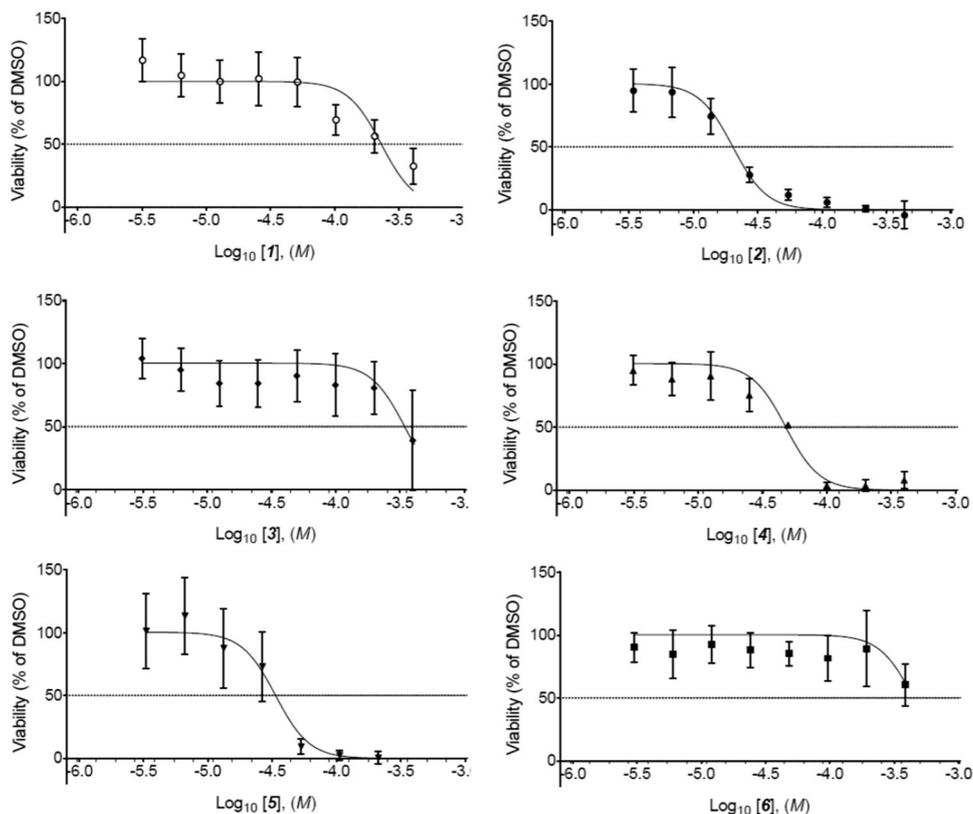


Fig. 3 Non-triterpenoids from the methanol extract of *V. paradoxa*

Fig. 4 Triterpenoids **2**, **4** and **5** display cytotoxic activity against MDA-MB-231 breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were plated at a density of 2000 cells per well and treated with the indicated compounds for 3 days followed by cell viability assay. Error bars indicate the standard deviation of three independent measurements. The curves indicate the best fit of a non-linear curve fitting the equation, $Y = 100/(1 + 10^{X - \log IC_{50}})$



TLC in iodine or H_2SO_4 and had a melting point of 103–105 °C. The IR spectrum showed λ_{max} : 3438, 2928, 2873, 1708, 1456, 1378 cm^{-1} and LRMS(APCI⁺) Calcd.

for $C_{31}H_{51}O_5$ ($M + H$)⁺ 503.4, found m/z : 503.18. The ¹H NMR (600 MHz) and ¹³C NMR spectrum of compound **4** in MeOH- d_4 was similar to compound **1** except for the

Table 2 IC₅₀ values calculated from Fig. 4 for the indicated compounds upon a 3 day exposure to MDA-MB-231 breast cancer cells

Compounds	1	2	3	4	5	6
IC ₅₀ (μM)	230	19.9	63.5	46.7	32.9	430
95% Confidence intervals (μM)	179–295	17.2–23.1	51.5–78.3	39.8–54.9	24.9–43.4	328–564

appearance of a new methyl singlet at δ 3.60 (3H, s) in the ¹H NMR and at δ 50.7 in the ¹³C NMR (Table 1).

After esterification of acid **2** with diazomethane, methyl ester **5** was purified by column chromatography on silica gel using 20% EtOAc/hexanes (95% yield) and isolated as a white powder. It is soluble in CH₂Cl₂, stains on TLC with iodine or H₂SO₄ and melts at 205–207 °C. An IR spectrum showed signals at 3437, 2927, 1698, 1452, 1378 cm⁻¹ and a low resolution LRMS(APCI⁺) was obtained: Calcd. for C₃₁H₅₁O₃ (M + H)⁺ 471.4, found *m/z*: 471.20. The ¹H NMR (600 MHz) and ¹³C NMR spectra of methyl ester **5** in CDCl₃ were similar to those of (3β)-3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (**2**) except for the appearance of a new methyl singlet at δ 3.60 (3H, s) for the ¹H NMR and at δ 51.3 for the ¹³C NMR (Table 1).

After esterification of compound **3** with diazomethane, compound **6** was purified by column chromatography on silica gel using 65% EtOAc/hexanes (75% yield) and isolated as a white powder. It is soluble in MeOH, stains on TLC with iodine or H₂SO₄ and exhibits a m.p. 155–157 °C. The IR spectrum showed signals at 3435, 2929, 2871, 1700, 1454, 1378 cm⁻¹ and a low resolution MS(APCI⁺) was obtained: Calcd. for C₃₁H₅₁O₆ (M + H)⁺ 519.4, found *m/z*: 519.16. The ¹H NMR (600 MHz) and ¹³C NMR spectra of ester **6** in MeOH-d₄ were similar to those of acid **3** except for the appearance of the new methyl peak at δ 3.60 (3H, s) in the ¹H NMR and at δ 50.7 in the ¹³C NMR (Table 1).

In addition to the triterpenoids, five non-triterpenes were obtained and include β-sitosterol (**7**), stigmasterol (**8**), (–)-epicatechin (**9**), (+)-catechin (**10**), and quercetin (**11**) (See Fig. 3) (Zhang et al. 2014).

Cytotoxic activity

We next sought to determine the cytotoxic activity of each of these compounds in the context of breast cancer. For this, we chose the triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cell line, commonly used for *in vitro* assays (Lacroix and Leclercq 2004). The compounds screened exhibited differential activity, with compounds **2**, **4** and **5** showing the highest cytotoxic activity against MDA-MB-231 cells (Fig. 4 and Table 2). To determine whether the compounds induced programmed cell death or necrosis, we next performed staining with annexin V and propidium iodide (PI). Necrosis was not observed with compounds **2** and **5** at the approximate IC₅₀ doses, however, the proportion of cells positive for annexin V increased (38 and 45%, respectively,

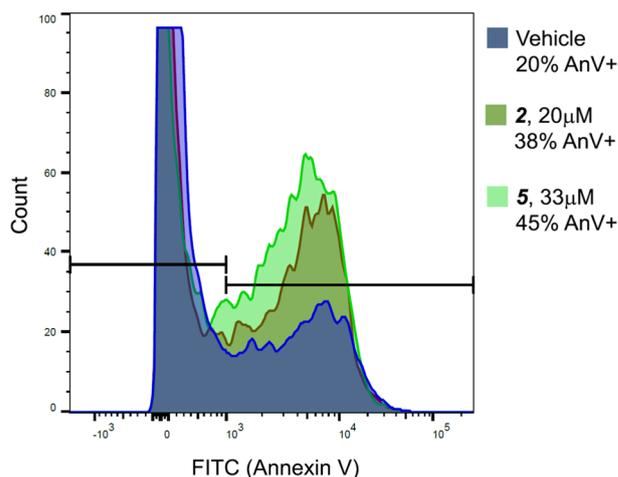


Fig. 5 Induction of apoptosis by triterpenoids **2**, and **5**. Cells treated with IC₅₀ doses of the indicated compounds for 24 h were stained with annexin V and propidium iodide (PI). Flow cytometry was performed and the proportion of cells positive for annexin V is indicated. Note that the y-axis is shortened to better indicate the differences in the annexin V-positive populations. The proportion of cells positive for annexin V is indicated in the legend

relative to 20% in vehicle-treated cells) indicating induction of apoptosis (Fig. 5).

Discussion

In the present investigation, the methanolic extract of the stem bark of *V. paradoxa* afforded eight compounds belonging to three main classes of natural products: triterpenoids (**1–3**), steroids (**7–8**) and flavonoids (**9–11**). Of the triterpenoids isolated, 2β,3β,19α-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**1**) is reported for the first time. Esterification of the triterpenoids was carried out for SAR studies and a general trend was determined. The methyl esters **4–6** were more active than the isolated carboxylic acids **1–3** against the MDA-MB-231 breast cancer cell line. This trend could be due to greater cell permeability of the more lipophilic ester derivatives. The carboxylic acid natural products carry a negative charge at physiological pH and this could hinder passive diffusion across cell membranes. Observed IC₅₀ values of these compounds are near the range of clinically useful chemotherapeutic agents such as cisplatin (IC₅₀ = 6.7 μM for MDA MB 231 cells, *data not shown*). Clinically, breast cancer can be divided into distinct subtypes that have

prognostic and therapeutic implications. Most breast cancer patients have a subtype defined by the expression of the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), or amplification of HER-2/Neu (Chave et al. 2010, Foulkes et al. 2010). These markers allow classification of breast cancer tumors as hormone receptor positive or HER-2/Neu amplified. However, a fourth type of breast cancer referred to as triple-negative breast cancer (TNBC) does not express ER, PR, or have HER-2/Neu amplification. The name of this cancer type, triple-negative is based on the lack of these three molecular biomarkers. Given the lack of validated molecular targets and the poor outcome of patients with TNBC, there is a clear need for a greater understanding of TNBC and for the development of novel therapies to treat this specific cancer type.

The transport of drugs across membranes involves one or more of the following processes: (1) passive diffusion, (2) filtration, (3) bulk flow, (4) active transport, (5) facilitated transport, (6) ion-pair transport, (7) endocytosis, and (8) exocytosis. Passive drug absorption depends on a number of physicochemical factors, the three most important of which are lipophilicity, solubility and charge (Alavijeh et al. 2005). The formation of methylesters from the corresponding carboxylic acids has a considerable impact on the net charge of these compounds since esters are neutral and acids are negatively charged at physiological pH. We also observed a considerable decrease in the melting points of the esters which corresponds with decreased polarity and intramolecular interactions (e.g. hydrogen bonding). These results suggest that esterification of the natural products may have improved their passive cell membrane permeability. Lipophilic substances that do not possess a charge tend to more readily diffuse passively across the hydrophobic cellular membranes. These substances are more hydrophobic with a tendency to be driven into cellular membranes from an aqueous environment.

Conclusion

Phytochemical studies on the methanol extract of the stem bark of *V. paradoxa* afforded a new ursane triterpenoid **1**, together with two known ursane (**3**) and lupeol-type (**2**) triterpenoids. Methylation of compounds **1–3** afforded their methyl esters **4–6**. In a general trend, the methyl esters were more active than the isolated natural triterpenoids **1–3** against the MDA-MB-231 breast cancer cell line. Further derivatization of these triterpenoids could lead to a better understanding of structure-activity relationships for this class of natural products. Additional screening against a broader range of cancer cell lines may reveal additional utility of these compounds as drug leads and may fuel

investigations into their putative cellular receptors and a molecular level understanding of their mode of action.

Experimental

Plant material

The stem bark of *V. paradoxa* was harvested in Garoua-Cameroon (July, 2012) and identified by Mr. Bamba Jean Paul (plant taxonomist) of the National School of Fauna, Garoua, where voucher specimens were deposited (HEFGN 6276). The stem bark was collected, cut into small pieces, dried at ambient temperature (~25 °C) and powdered.

Extraction and isolation

A total of 3.2 kg of powdered stem bark was extracted by sonication, successively with hexane, ethyl acetate, methanol and water. A portion (400 g) of the MeOH extract was then subjected to silica gel F60, 40–63 µm column chromatography using a hexanes, hexanes-ethyl acetate gradient, ethyl acetate, ethyl acetate-methanol gradient and finally methanol as eluent. Eight natural products: 2β,3β,19α-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**1**, 60 mg), betulinic acid (**2**, 700 mg), 1α,2β,3β,19α-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid (**3**, 200 mg), β-sitosterol (**7**, 100 mg), sigmasterol (**8**, 80 mg), (-)-epicatechin (**9**, 45 mg), (+)-catechin (**10**, 75 mg), and quercetin (**11**, 20 mg) were isolated.

2β,3β,19α-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (1)

White powder (MeOH) obtained from Hexane-EtOAc 55%; mp 260–262 °C; $[\alpha]_{25D} + 25.5$ (c 0.22, THF); IR ν_{\max} 2953, 1702, 1449 cm⁻¹. ¹H NMR (MeOH-d₄, 600 MHz): δ = 5.32 (1H, t, 6.0 Hz, H-12), 3.95 (1H, td, 6.0, 12.0 Hz, H-2), 3.35 (1H, d, 6.0 Hz, H-3), 2.62 (1H, td, 6.0, J = 12 Hz, H-16a), 2.52 (1H, s, H-18), 2.00 (2H, m, H-11), 1.85 (1H, m, H-9), 1.77 (1H, m, H-15a), 1.75 (1H, m, H-22a), 1.65 (1H, m, H-22b), 1.65 (1H, m, H-7a), 1.55 (1H, m, H-1b), 1.52 (1H, m, H-16b), 1.45 (1H, m, H-6a), 1.40 (1H, m, H-6b), 1.40 (3H, s, H-23), 1.35 (1H, m, H-1a), 1.35 (1H, m, H-7b), 1.35 (1H, m, H-20), 1.35 (2H, m, H-21), 1.23 (1H, m, H-5), 1.21 (3H, s, H-27), 1.02 (3H, s, H-25), 1.01 (3H, s, H-29), 1.00 (1H, m, H-15b), 0.96 (3H, d, J = 12.0 Hz, H-30), 0.89 (3H, s, H-24), 0.81 (3H, s, H-26) and ¹³C NMR (MeOH-d₄, 150 MHz): δ = 180.8 (C-28), 138.7 (C-13), 128.0 (C-12), 78.7 (C-3), 72.2 (C-19), 65.8 (C-2), 53.7 (C-18), 48.7 (C-5), 47.9 (C-17), 46.8 (C-9), 41.7 (C-20), 41.1 (C-1), 41.3 (C-14), 38.9 (C-8), 38.1 (C-4), 38.0 (C-10), 37.6 (C-22), 32.7 (C-7), 28.2 (C-15), 27.6 (C-29), 25.9 (C-16), 25.7 (C-27), 25.2 (C-21), 23.5 (C-23), 23.3 (C-11), 21.1 (C-24), 17.9 (C-6), 16.1 (C-26), 15.5

(C-25), 15.2(C-30), LRMS(APCI⁺) *m/z*: Calcd. for C₃₀H₄₇O₅ (M-H)⁺; 487.4. Found 487.3.

(3β)-3-Hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid or Betulinic acid (2)

White powder (MeOH) obtained from Hexane-AcOEt 25–27.5%. mp 282–285 °C. ¹H NMR (MeOH-d₄, 600 MHz): δ = 4.70(1H, d, 4.0 Hz, H-29a), 4.57(1H, d, 4.0 Hz, H-29b), 3.00 (1H, m, H-19), 2.98(1H, m, H-3), 2.26(1H, td, *J* = 4.0 12.0 Hz, H-13), 2.19 (1H, m, H-16a), 1.89(1H, m, H-12a), 1.85(1H, m, H-15a), 1.82(1H, m, H-22a), 1.75 (2H, m, H-2), 1.65 (3H, s, H-30), 1.55(1H, m, H-18), 1.55 (1H, m, H-16b), 1.55(1H, m, H-1a), 1.45(1H, m, H-6a), 1.45(1H, m, H-22b), 1.45(1H, m, H-21a), 1.42(1H, m, H-11a), 1.40 (1H, m, H-6b), 1.40(2H, m, H-7), 1.33(1H, m, H-9), 1.22 (1H, m, H-21b), 1.21(1H, m, H-11b), 1.00(1H, m, H-12b), 0.94(3H, s, H-23), 0.88(1H, m, H-1b), 0.88(3H, s, H-27), 0.87(3H, s, H-26), 0.65(3H, s, H-25), 0.65(1H, m, H-5) and ¹³C NMR (MeOH-d₄, 150 MHz): δ = 177.7(C-28), 150.8 (C-20), 110.1(C-29), 77.2(C-3), 55.9(C-17), 55.4(C5), 50.4 (C-9), 49.0(C-18), 47.1(C-19), 42.5(C-14), 40.7(C-8), 39.0 (C-4), 38.7 (C-1), 38.1(C-13), 37.2(C-10), 36.8(C-22), 34.4 (C-7), 32.2(C-16), 30.6(C-15), 29.7(C-21), 28.6(C-23), 27.6 (C-2), 25.6(C-12), 20.9(C-11), 19.4(C-30), 18.4(C-6), 16.4 (C-26), 16.3(C-25), 16.2(C-24), 14.9(C-27) LRMS(APCI⁺) *m/z*: Calcd. for C₃₀H₄₇O₃ (M-H)⁺; 455.4. Found 455.33

1α,2β,3β,19α-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid (3)

White powder (MeOH) obtained from Hexane-AcOEt 70%. mp 262 °C. ¹H NMR (MeOH-d₄, 600 MHz): δ = 5.29(1H, m, H-12), 3.63(1H, dd, *J* = 3.5, 12.0 Hz, H-2), 3.45(1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-1), 3.39(1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-3), 2.55(1H, m, H-11a), 2.50(1H, m, H-16a), 2.48(1H, s, H-18), 2.17 (1H, dd, *J* = 4, 12 Hz, H-11b), 2.00(1H, m, H-9), 1.78(1H, m, H-6a), 1.77(1H, m, H-15a), 1.72(1H, m, H-22b), 1.62 (1H, m, H-22a), 1.58(1H, m, H-7a), 1.51(1H, m, H-21a), 1.51(1H, m, H-16b), 1.48(1H, m, H-21b), 1.34(1H, m, H-20), 1.34(1H, br, H-5), 1.33(3H, s, H-27), 1.29(1H, m, H-7b), 1.17(3H, s, H-23), 1.00 (1H, m, H-15b), 1.00 (3H, s, H-25), 0.97(3H, s, H-29), 0.94(1H, br, H-6b), 0.92(3H, d, 8.0, H-30), 0.86(3H, s, H-24), 0.77(3H, s, H-26) and ¹³C NMR (MeOH-d₄, 150 MHz): δ = 182.4(C-28), 138.9(C-13), 130.8(C-12), 81.4(C-1), 80.9(C-3), 73.6(C-19), 71.7(C-2), 55.1(C-18), 49.4(C-9), 49.1(C-5), 49.0(C-17), 44.4(C-10), 43.2(C-20), 42.5(C-4), 41.8(C-8), 39.2(C-22), 38.9(C-14), 34.3(C-7), 29.8(C-15), 29.3(C-23), 28.4(C-11), 27.5(C-21), 27.2(C-29), 26.8(C-16), 25.1(C-27), 22.5(C-24), 19.6(C-6), 17.8(C-26), 16.8(C-30), 13.1(C-25); LRMS(APCI⁺) *m/z*: Calcd. for C₃₀H₄₇O₆ (M-H)⁺; 503.4. Found 503.30

2β,3β,19α-trihydroxyurs-12-en-28-oic methyl ester (4)

White powder (MeOH) obtained from hexane-AcOEt 50%. mp 103–105 °C. ¹H NMR (MeOH-d₄, 600 MHz): δ = 5.32 (1H, m, H-12), 3.97 (1H, dt, *J* = 6.0, 12.0 Hz, H-2), 3.60 (3H, s, H-31), 3.35(1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-3), 2.67 (1H, td, *J* = 6.0, 12 Hz, H-16a), 2.54(1H, s, H-18), 2.00(2H, m, H-11), 1.89(1H, m, H-9), 1.77(1H, m, H-15a), 1.75(1H, m, H-22a), 1.65(1H, m, H-22b), 1.65(1H, m, H-21a), 1.62(1H, m, H-7a), 1.55(1H, m, H-1a), 1.53(1H, m, H-6a), 1.52 (1H, m, H-16a), 1.48 (1H, m, H-6b), 1.37(3H, s, H-23), 1.32(1H, m, H-20), 1.32(1H, m, H-7b), 1.32(1H, m, H-1b), 1.25(1H, s, H21b), 1.21(3H, s, H-27), 1.20(1H, m, H-5), 1.01(3H, s, H-29), 1.01(3H, s, H-25), 1.00(1H, m, H-15b), 0.96 (3H, d, *J* = 12.0 Hz, H-30), 0.89 (3H, s, H-24), 0.71(3H, s, H-26), and ¹³C NMR (MeOH-d₄, 150 MHz): δ = 179.1(C-28), 138.6(C-13), 128.1(C-12), 78.7(C-3), 72.1(C-19), 65.7(C-2), 53.7(C-18), 50.7(C-31), 48.1(C-17), 48.1(C-5), 46.8(C-9), 41.7(C-20), 41.7(C-14), 41.3(C-8), 41.1(C-1), 39.9(C-10), 38.1(C-4), 37.4(C-22), 32.6(C-7), 28.1(C-15), 27.8(C-29), 23.5(C-23), 25.8(C-16), 25.6(C-27), 25.2(C-21), 23.4 (C-11), 21.0(C-24), 17.9(C-6), 16.0(C-26), 15.4(C-25), 15.1 (C-30); LRMS(APCI⁺) *m/z*: Calcd. for C₃₁H₅₁O₅ (M + H)⁺; 503.4. Found 503.18.

(3β)-3-Hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid methyl ester or Betulinic acid methyl ester (5)

White powder (CH₂Cl₂) obtained from Hexane-AcOEt 20%, mp 205–207 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 4.69(1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-29a), 4.53(1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-29b), 3.60(3H, s, H-31), 3.13(1H, dd, *J* = 4.0, 12.0 Hz, H-3), 2.95 (1H, m, H-19), 2.18 (1H, m, H-16a), 2.13(1H, m, H-13), 1.86(1H, m, H-22a), 1.81(1H, m, H-15b), 1.75 (2H, m, H-2), 1.75(1H, m, H-12a), 1.65(1H, m, H-1a), 1.61 (3H, s, H-30), 1.55(1H, m, H-18), 1.50 (1H, m, H-6a), 1.45 (1H, m, H-16b), 1.45(1H, m, H-6b), 1.45(1H, m, H-11a), 1.45 (1H, m, H-22b), 1.40(1H, m, H-21a), 1.40(2H, m, H-7), 1.35(1H, m, H-15a), 1.25(1H, m, H-11b), 1.25(1H, m, H-9), 1.20(1H, m, H-21b), 1.00(1H, m, H-12b), 0.89(3H, s, H-26), 0.89(3H, s, H-23), 0.88(1H, m, H-1b), 0.84(3H, s, H-27), 0.75 (3H, s, H-24), 0.68(3H, s, H-25), 0.65(1H, m, H-5) and ¹³C NMR (MeOH-d₄, 150 MHz): δ = 176.7(28), 150.1(20), 109.4(C-29), 79.0(C-3), 56.6(C-17), 55.4(C-5), 51.3(C-31), 50.6(C-9), 49.5(C-18), 47.0(C-19), 42.4(C-14), 40.7(C-8), 38.7(C-4), 38.7 (C-1), 38.3(C-13), 37.2(C-10), 37.0(C-22), 34.3(C-7), 32.2(C-16), 30.6(C-15), 29.7(C-21), 28.0(C-23), 27.4(C-2), 25.5(C-12), 20.9(C-11), 19.4(C-30), 18.3(C-6), 16.1(C-26), 16.0(C-25), 15.4(C-24), 14.7(C-27); LRMS(APCI⁺) *m/z*: Calcd. for C₃₁H₅₁O₃ (M + H)⁺; 471.4. Found 471.20.

1 α ,2 β ,3 β ,19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid methyl ester (6)

White powder (MeOH) obtained from Hexane-AcOEt 65%, mp 155–157 °C. ¹H NMR (MeOH-d₄, 600 MHz): δ = 5.32 (1H, t, J = 4 Hz, H-12), 3.68 (1H, dd, J = 4.0, 12 Hz, H-2), 3.60 (3H, s, H-31), 3.48 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1), 3.42 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-3), 2.67 (1H, m, H-11a), 2.61 (1H, m, H-16a), 2.53 (1H, s, H-17), 2.22 (1H, dd, J = 4, 12 Hz, H-11b), 2.05 (1H, m, H-9), 1.78 (1H, m, H-6a), 1.77 (1H, m, H-15a), 1.72 (1H, m, H-22a), 1.62 (1H, m, H-22b), 1.58 (1H, m, H-7a), 1.51 (1H, m, H-21a), 1.51 (1H, m, H-16b), 1.48 (1H, m, H-21b), 1.37 (3H, s, H-27), 1.35 (1H, m, H-5), 1.34 (1H, m, H-20), 1.29 (1H, m, H-7b), 1.22 (3H, s, H-23), 1.03 (3H, s, H-25), 1.00 (1H, m, H-15b), 0.99 (3H, s, H-29), 0.95 (3H, d, J = 8.0 Hz, H-30), 0.94 (1H, m, H-6b), 0.90 (3H, s, H-24), 0.72 (3H, s, H-26), and ¹³C NMR (MeOH-d₄, 150 MHz): δ = 179.1 (C-28), 137.4 (C-13), 129.4 (C-12), 79.8 (C-1), 79.3 (C-3), 72.1 (C-19), 70.4 (C-2), 50.7 (C-31), 53.6 (C-18), 48.4 (C-9), 48.2 (C-5), 48.1 (C-17), 42.9 (C-10), 41.6 (C-20), 41.1 (C-4), 40.4 (C-8), 37.5 (C-22), 37.4 (C-14), 32.6 (C-7), 28.2 (C-15), 27.7 (C-23), 26.9 (C-11), 25.8 (C-21), 25.6 (C-29), 25.2 (C-16), 23.6 (C-27), 21.0 (C-24), 18.0 (C-6), 16.2 (C-26), 15.1 (C-30), 11.5 (C-25); LRMS(APCI⁺) m/z : Calcd. for C₃₁H₅₁O₆ (M + H)⁺; 519.4. Found 519.16.

Analytical measurements

High resolution mass spectrometry (HRMS) was carried out using an Accela liquid chromatograph coupled to an Orbitrap Q-Exactive Focus mass spectrometer. Compounds were injected (5 μ L) into the LC system consisting of a 15 cm \times 2.1 mm (5 μ m) Eclipse Plus-C8 column at a constant flow rate of 350 μ L/min. A binary mobile phase gradient containing 0.1 % (v/v) formic acid in water (A) and acetonitrile (B) was applied as follows: 97% A for 5 min, to 98% B in 30 min, held for 5 min, back to 97% A in 1 min, and equilibrated for 5 min at 97% A. Analytes were introduced into the mass spectrometer using positive electrospray ionization (+ESI). Full-scan accurate mass spectra (m/z range: 50–750) of eluting compounds were obtained at high resolution (70,000 FWHM) on the Orbitrap mass analyzer using internal calibration (accuracy of measurements < 1 ppm) and processed using Xcalibur 4.0.27.10 software. Electrospray source conditions were as follows: sheath and auxiliary gas flow 49 and 12 arbitrary units (a.u.), respectively; electrospray voltage 3.5 kV; capillary temperature 300 °C; and S-Lens RF level 50 V.

Optical rotations were recorded on a polarimeter in MeOH at 26 °C. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra were recorded as thin films. 1D (¹H, ¹³C and DEPT) and 2D (¹H–¹H COZY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC, TOCSY, NOESY and ROESY) NMR spectra were recorded at 600

MHZ spectrometer equipped with a cryoprobe. The chemical shifts are quoted relative to TMS, and the coupling constants are provided in Hz. The chromatographic silica gel (450–550 mesh) purchased from SiliCycle, F60, 40–63 μ m 60 Å was used.

Chemicals

1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (wetted with ca. 50% water) a product of TGI, Lot. JBCSI-TA was used to generate diazomethane (McKay 1948). Potassium hydroxide and diethyl ether were purchased from Sigma-Chemical Co. (St Louis, MO, USA). MTS reagent (CellTiter 96 AQ Assay) was purchased from TCI (Mfr No: M0527).

Biological assays

MDA-MB-231 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Corning), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and antibiotics (Lonza). For the determination of cytotoxicity, cells were plated in 96-well plates (Nest Scientific) at a density of 2000 cells per well in 100 μ L of media per well. On the following day, the media was aspirated, and 100 μ L of media in which a serial dilution of DMSO-dissolved compound (or DMSO as a control) was added to wells in triplicate. 3 days later, the relative numbers of metabolically active cells was determined by addition of the CellTiter-Glo reagent (Promega) and measurement of chemiluminescence according to the manufacturer's protocol using a Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific). To calculate the percent viability, signal from background wells (media only) was subtracted from each well and then the remaining chemiluminescence value was normalized to signal from wells with the equivalent amounts of DMSO. Apoptosis induction was measured using the Annexin V / Propidium Iodide staining kit (BD Biosciences) per manufacturer's instructions. Assays were performed in at least triplicate.

Statistical analysis

Graphing was done using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). IC₅₀ values were calculated by fitting a non-linear curve using the "log-inhibitor vs normalized response" function given by the equation $Y = 100 / (1 + 10^{X - \log IC_{50}})$.

Methylation

Methylation of carboxylic acids **1–3** with diazomethane. To a stirred slurry of 50% aq. KOH (10 mL) in Et₂O (5.0 mL) at 0 °C, 1-methyl-3-nitro-1-nitroso guanidine (11.25 mg, 0.08 mmol) was added slowly. The resulting yellow colored organic layer containing diazomethane was separated, dried

over KOH pellets and added to acids **1–3** (0.04 mmol) in Et₂O (2 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at 0 °C to rt, excess CH₂N₂ was quenched with acetic acid and the solvent was removed under reduced pressure. Column chromatographic purification of the crude products over silica gel using hexanes-EtOAc gradient systems afforded methyl esters **4–6** (75–95% yield).

Acknowledgements The authors would like to acknowledge the council for International Exchange of Scholars (CIES) for the J. William Fulbright Visiting Scholar program to Dr Kenneth Eyong. The Baylor CPRIT Synthesis and Drug Lead Discovery Laboratory (supported by the Cancer Prevention and Research Institute of Texas R1309 and Baylor University, College of Arts and Sciences) and the Molecular Bioscience Center hosted Dr. Eyong. The Departments of Chemistry & Biochemistry and Department of Biology at Baylor University are acknowledged for infrastructure and financial support. The University of Yaounde I and the Government of Cameroon are acknowledged for financial support through the Fonds d'Appuis à la Recherche.

References

- Alavijeh MS, Chishty M, Qaiser Z, Alan M, Palmer AM (2005) Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx* 2:554–571
- Chave KJ, Garimella SV, Lipkowitz S (2010) Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis* 32(1–2):35–48
- Eyong KO, Foyet HS, Baïrys G, Gabriel GN, Asongalem EA, Lagojda A, Lamshöft M (2015) A new ursane triterpenic acid and other potential anti-inflammatory and anti-arthritic constituents from EtOAc extracts of *Vitellaria paradoxa* stem bark. *Ethnopharmacology* 174:277–286
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363:1938–48
- Foyet HS, Tsala DE, Bodo JCZE, Azanfack NC, Toussoumna LH, Eyong KO (2015) Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of a methanol extract from *Vitellaria paradoxa* stem bark. *Pharmacognosy Res* 7:367–377
- Gennari C, Castoldi D, Sharon O (2007) Natural products with taxol-like anti-tumor activity: synthetic approaches to eleutherobin and dictyostatin. *Pure Appl Chem* 79:173–180
- Harvey AL, Edrada-Ebel RA, Quinn RJ (2015) The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov* 14:111–129
- Jiofack T, Fokunang C, Guedje N, Kemeuze V, Fongnzossie E, Nkongmeneck BA, Mapongmetsem PM, Tsabang N (2010) Ethnobotanical uses of medicinal plants of two ethnoecological regions of Cameroon. *Int J Med Med Sci* 2:60–79
- Lacroix M, Leclercq G (2004) Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumors: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83(3):249–89
- Liu WJ, Hou XQ, Chen H, Liang JY, Sun JJ (2016) Chemical constituents from *Agrimonia pilosa* Ledeb. and their chemotaxonomic significance. *Nat Prod Res* 30(21):2495–2499
- McKay AF (1948) A new method of preparation of diazomethane. *J Am Chem Soc* 70(5):1974–1975
- Minch JM (1994) Orientational dependence of vicinal proton-proton NMR coupling constants: the Karplus relationship. *Concepts Magn Reson* 6:41–56
- Moore S (2008) The role of *Vitellaria Paradoxa* in poverty reduction and food security in the Upper East region of Ghana. *Earth Environ* 3:209–245
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Anthony S (2009) Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>.
- Peng C, Bodenhausen G, Qiu S, Fong HSH, Farnsworth RN, Yuan S, Zheng C (1998) Computer-assisted structure elucidation: application of CISOC-SES to the resonance assignment and structure generation of betulinic acid. *Magn Res Chem* 36:267–278
- Paterson I, Anderson EA (2005) The renaissance of natural products as drug candidates. *Science* 310(5747):451–453
- Tagne RS, Telefo BP, Nyemb JN, Yemele DM, Njina SN, Goka SM, Lienou LL, Kamdje AHN, Moundipa PF, Farooq AD (2014) Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pac J Trop Med* 7:S442–S447
- WHO (2003) Fact Sheet, Traditional medicine. Geneva
- Zhang J, Kurita M, Shinozaki T, Ukiya M, Yasukawa K, Shimizu N, Tokuda H, Masters ET, Akihisa M, Akihisa T (2014) Triterpene glycosides and other polar constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels and their bioactivities. *Phytochemistry* 108:157–170

CHAPITRE I : APERÇU BOTANIQUE ET GENERALITES SUR L'INFLAMMATION DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES ET LE CANCER

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CHAPITRE III : ETUDE EXPERIMENTALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES