



## Article original

## Identification des Familles de Composés Bioactifs et Métabolites Secondaires de *Trichoscypha Odonii* de Wild Justifiant son Usage en Médecine Traditionnelle

*Identification of families of bioactive compounds and secondary metabolites justifying the use of *Trichoscypha odonii* De Wild in traditional medicine*

Nnanga Nga<sup>1,2,4</sup>, Soppo LV<sup>1</sup>, Nokam ABE<sup>1</sup>, Nyangono NM<sup>1,2\*</sup>, Ondoua MO<sup>1</sup>, Benga MF<sup>1</sup>, Maniepi JS<sup>1</sup>, Eba OY<sup>1</sup>, Yaka NR<sup>1,2</sup>, Dassaou YC<sup>1</sup>, Obono FMP<sup>1</sup>, Betote DPH<sup>1,2,4</sup>, Nko'o MJ<sup>2</sup>, Ngo NJ<sup>2</sup>, Ngolsou F<sup>1</sup>, Ibrahim N<sup>1</sup>, Mpondo ME<sup>1,2</sup>, Ndom JC<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé I Cameroon

<sup>2</sup> Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, PO Box 2701, Douala, Cameroon

<sup>3</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Douala, Cameroon

<sup>4</sup> Centre For Research on Medicinal Plants and Traditional Medicine, IMPM, P.O. Box 13033, Cameroon

**\*Auteur correspondant :**

Nyangono Ndongo Martin.

E-mail :

[nyangonondongo@gmail.com](mailto:nyangonondongo@gmail.com)

Tel : (+237) 695390478

**Mots clés :** *Trichoscypha odonii* De Wild, composés bioactifs, screening phytochimique, RMN,  $\Delta 7$  tirucallene z-schinol.

**Keys word :** *Trichoscypha odonii* De Wild, bioactive compounds, phytochemical screening, NMR,  $\Delta 7$  tirucallene z-schinol, traditional medicine.

### RÉSUMÉ

**Objectif.** Décrire les composants qui justifient l'utilisation en médecine traditionnelle de *Trichoscypha odonii* De Wild (*T. odonii*) dans le traitement de certaines pathologies tels que les dysménorrhées, la constipation, l'asthénie générale, les hémorragies et l'anémie. **Matériels et méthodes.** Le screening phytochimique a été réalisé à partir d'extraits méthanolique obtenus de 4,1 Kg de poudre d'écorces de tronc de l'arbuste. L'isolement des composés bioactifs, leur purification et caractérisation ont été réalisés par chromatographie sur colonne couplée aux techniques de chromatographie sur couche mince, de spectroscopie de masse et résonance magnétique nucléaire (COSY, NOESY, HMBC). **Résultats.** Les familles de composés identifiés ont été : les stérols, les terpénoïdes, les terpènes, les composés réducteurs, les phénols, les flavonoïdes, les coumarines et les saponines. Un métabolite secondaire a été isolé, purifié et caractérisé. Il possède la structure basique des  $\Delta 7$  tirucallane : Le *Z-shinol*. **Discussion.** Les familles de composés identifiés possèdent des activités anti-inflammatoires, antibactériennes et anti oxydants déjà justifiés. Le *Z-shinol* répond positivement au test de Liberman Buchard ; caractéristique des triterpènes ; une famille de composés habituellement anti-inflammatoire. Son spectre de masse lui suggère la formule brute  $C_{30}H_{46}O_3$  renfermant huit degrés d'insaturations. **Conclusion.** L'écorce de tronc de *T. odonii* contient des familles de métabolites secondaires biologiquement actifs. Un des composés bioactifs a été isolé ; le *Z-shinol*. Les études in-silico révèlent qu'il peut être responsable d'activité anti-inflammatoire. Les familles de composés identifiés dans l'écorce de tronc peuvent justifier son usage traditionnel.

### ABSTRACT

**Objective.** To describe compounds which justify the use of *Trichoscypha odonii* De Wild (*T. odonii*) in the treatment of dysmenorrhea, constipation, asthenia, hemorrhage and anemia by traditional doctors. **Material and methods.** Phytochemical screening was carried out from the methanolic extract of 4,1 Kg of the trunk powder. The separation, purification and characterization of the pure compounds were done by column chromatography, thin layer chromatography and spectroscopy methods (COSY, NOESY, HMBC). **Results.** The following compounds were identified: sterols, terpenoids, terpenes, reducing compounds, phenols, flavonoids, coumarins and saponins. One secondary metabolite was isolated and purified. It had the basic structure of  $\Delta 7$  tirucallene : *Z-shinol*. **Conclusion.** *T. odonii* trunk bark contains biologically active secondary metabolites. In silico test reveals that *Z-shinol* has anti-inflammatory properties. Families of compound identified in the trunk bark can explain its use by traditional doctors

### INTRODUCTION

La recherche en phytochimie et phytopharmacologie clinique est une alternative pour développer les soins de santé dans les pays en développement [1]. La pharmacopée traditionnelle découverte par les premiers explorateurs de l'Afrique a déjà été introduite dans de nombreux médicaments en Europe. Elle a ainsi donné lieu

à de grandes découvertes comme la réserpine du *Rauwolfia vomitoria*, produit de départ des neurosédatifs. L'utilisation des plantes pour des fins thérapeutiques (phytothérapie) est donc très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits

d'extraction qu'elles fournissent. Dans le contexte socio-économique des pays Africains, l'efficacité scientifique associée à des connaissances traditionnelles aboutira certainement à l'obtention d'une réponse thérapeutique adéquate et une acceptabilité culturelle optimale. La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments traditionnels améliorés. Les mots clés, dans ce domaine, doivent être : sécurité, efficacité et qualité. Le choix porté sur l'espèce étudié ici a été motivé d'une part, par l'usage en médecine traditionnelle de certaines espèces du genre *Trichoscypha* notamment, comme anti-inflammatoire [7], pour le traitement des pathologies tels que : stérilité, bronchites, céphalées, dysménorrhées, maladies vénériennes [2-7] par les peuples du nord et du sud du Gabon. D'autre part, l'espèce *T. odonii*, localisé dans les régions du nord-ouest, du centre et du Sud du Cameroun, est utilisé en médecine traditionnelle par les peuples du Sud pour traiter les dysménorrhées, les hémorragies pendant la grossesse et la constipation chez le nourrisson. La volonté d'apporter des bases scientifiques pertinentes justifiant l'usage de cette espèce nous a conduit à effectuer un screening phytochimique, ensuite un isolement des métabolites secondaires suivi de leur caractérisation.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Récolte et obtention de l'extrait

Les écorces de tronc de *T. odonii* ont été récoltées entre 08 et 13 heures du matin, séchées à l'abri du soleil pendant 14 jours puis pulvérisées au broyeur-mélangeur.

## RÉSULTATS

### Rendement

Nous avons obtenu un rendement de 4,1/39 (10,51%) de poudre d'écorce sur une récolte de 39 kg de matière végétale fraîche. Le rendement de l'extrait brut obtenu de la macération de la poudre d'écorce a été de 236/4100 (5,75%).

### Screening phytochimique

Type de test	Famille de composés	Observation	Résultat
<b>Test de Dragendorff</b>	Alcaloïdes	Pas de précipité jaune orangé	---
<b>Liberman-Buchard</b>	Stérol, terpènes et terpénoïdes	Coloration jaune	+
<b>Test au FeCl<sub>3</sub></b>	Phénol	Coloration bleu violacé	+++
<b>Test à la liqueur de Fehling</b>	Composés réducteurs	Précipité rouge brique	+++
<b>Shinoda</b>	Flavonoïdes	Coloration orangée	+++
	Coumarines	Virage du Bleue au jaune	+
	Saponines	Persistence de la mousse	+++
+++ : présence très marquée. + : présence moindre. --- : absence			

Le screening phytochimique (tableau I) a révélé la présence de 06 groupes de métabolites secondaires : les stérols, des terpénoïdes, les terpènes, les composés réducteurs, des phénols, des flavonoïdes, des coumarines et des saponines.

### Isolation et purification

110.29 g de l'extrait brut ont été fixé sur 250g de silice et monté sur une colonne de chromatographie dans le système de solvants (Hex/AcOEt et AcOEt/MeOH) de polarité croissante. 750 fractions de 100 ml chacune ont été recueillies, concentrées et regroupées sur la base de la CCM.

Éluant CC	Séries	Éluant CCM	Observations	Composé pure
Hex/EtOAc 12,5%	S1a =S1'	12,5%	Mélange de 2 composés	/
Hex/EtOAc 20,0%	S1d+S1e+S1f= S1'	Hex/EtOAc 20,0%		/
Hex/EtOAc 65,0%	S2b	Hex/EtOAc 65,5%		/
Hex/EtOAc 80,0%	S3b	Hex/EtOAc 80,0%		Z-schinol

### Caractérisation et élucidation du métabolite secondaire isolé : le Z-schinol.

Le Z-schinol a été obtenu dans les fractions d'éluion Hex/EtOAc 80 :20 sous forme des cristaux blancs dans un mélange d'hexane - acétate d'éthyle aux proportions 80/20, il est soluble dans le méthanol à chaud et fond entre 144 et 146°C. Il répond positivement au test de LIBERMANN BURCHARD (coloration rouge violacée), caractéristique des triterpènes.

Sur son spectre de masse, obtenu par électro-spray (Fig. 1) en mode négatif (ESI<sup>-</sup>), on observait un pic de l'ion quasi moléculaire à m/z 455,2[M-H]<sup>-</sup> suggérant une masse molaire de 456 g/mol.

L'analyse de son spectre RMN<sup>13</sup>C présentait 30 signaux. Les informations obtenues du spectre de masse couplés à ceux du spectre RMN<sup>13</sup>C nous ont permis d'attribuer à la molécule la formule brute C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> renfermant sept degrés d'insaturation.

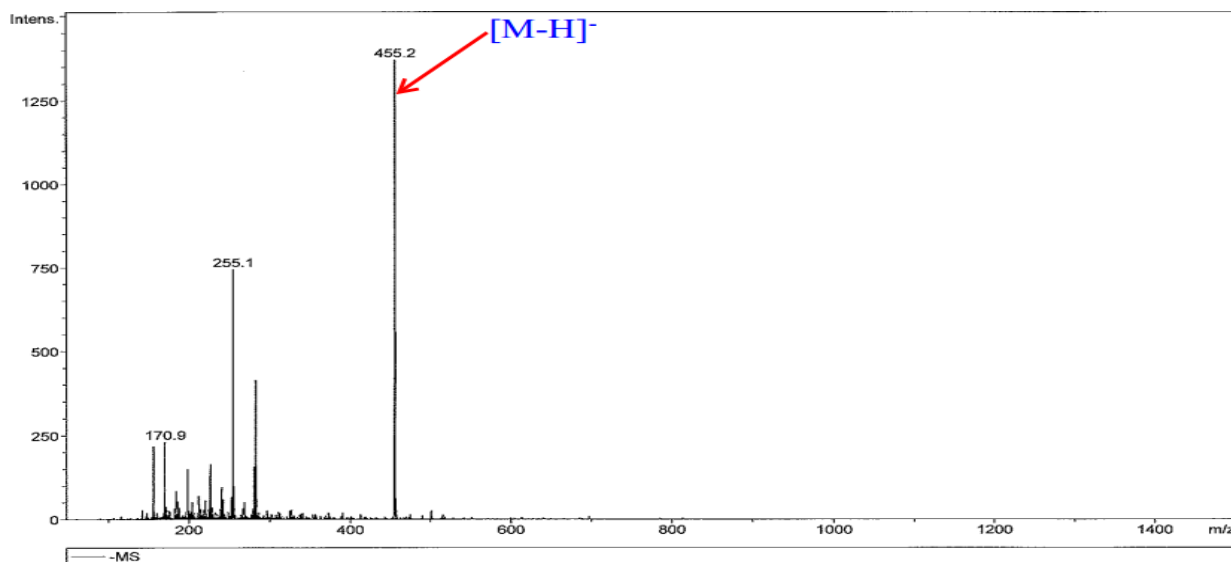


Figure 1: Spectre de masse

Le spectre DEPT 135 a permis de distinguer comme suit :

- 07 groupements méthyle.
- 09 groupements méthylènes.
- 07 groupements méthynes, dont deux apparaissant à  $\delta$  118,3 et  $\delta$  142,4 qui sont caractéristiques de deux carbones oléfiniques ; celui à  $\delta$  75,03 est caractéristique à un carbone lié à une fonction hydroxyle.
- 04 carbones quaternaires.
- 02 carbones oléfiniques à  $\delta$  146,1 et  $\delta$  128,3.

Ces deux signaux sont caractéristiques des triterpène de type- Delta 7- tirucallane et nous permettent d'attribuer la position C-8 au signal à 146,1 et la position C-7 au signal à 128,3.

01 carbone à 170,3 caractéristique du carbone de l'acide carboxylique.

Sur son spectre RMN<sup>1</sup>H, la présence de tritèrperne tétracyclique a été confirmée par l'exhibition des signaux caractéristiques des protons de sept groupements méthyles entre  $\delta$  0,85 à 2,23. En effet, six signaux de groupement méthyle tertiaire ont été respectivement observés à  $\delta$  0,95 ; 1,05 ; 0,85 ; 0,86 ; 1,96 et 2,23 apparaissant sous forme de singulet chacun et celui à 0,87 apparait sous forme de doublet.

Nous avons aussi observé deux signaux de protons oléfiniques à  $\delta$  6,02(t, J= 6.5 Hz, H-23) et  $\delta$  5,37 (t, H-7). Ainsi le proton de l'oxyméthine est observé à  $\delta$  3,60 (t, H-3), le triplet d'un proton oléfinique à 6,02 et le triplet large d'un proton oléfinique à 5,37, attribuables respectivement aux positions 23 et 7 étaient caractéristiques des triterpènes de la série des tirucallanes.

L'analyse de son spectre HMQC a montré des corrélations géminées <sup>1</sup>J entre les carbones et les protons directement liés. La corrélation entre le proton H-24 et le carbone C24 nous a permis d'attribuer les valeurs 6.02 au proton H-24 et 142.6 au carbone C24 [9].

Nous avons également observé une corrélation entre le proton H-7 et le carbone C7. Ce qui nous a permis d'attribuer le signal à 5.37 au proton H-7 et 118.3 au carbone C7. de la même façon, la corrélation observée entre le proton H-3 et le carbone C3 nous a permis d'attribuer le signal 3.60 au proton H-3 et 75.03 au carbone C3.

L'analyse de son spectre HMBC a fait ressortir les corrélations scalaires à J2, J3 et même J4. Nous avons ainsi pu justifier les positions des substituants et des fonctions du composé isolé sur le squelette des triterpènes de type tirucallane. La position de la double liaison acyclique se justifiait d'une part par les corrélations <sup>3</sup>J observées entre le proton H-24 et le carbone C-27 et d'autre part par une corrélation <sup>2</sup>J entre les protons du groupement méthyle H-26 et le carbone C-25 et <sup>3</sup>J entre le proton H-26 et le carbone C-24. Ainsi, la position du groupement acide carboxylique était en rapport avec la corrélation <sup>3</sup>J observée entre le proton H-26 et le carbone C-27. En ce qui concerne la double liaison en 7-8, sa position a été déduite des valeurs du

déplacement chimique de ses carbones comparées à celles de Wansi et al [14] d'une part, et d'autre part par des corrélations  $^3J$  observées entre le proton H-7 et les carbones C-5 et C-14.

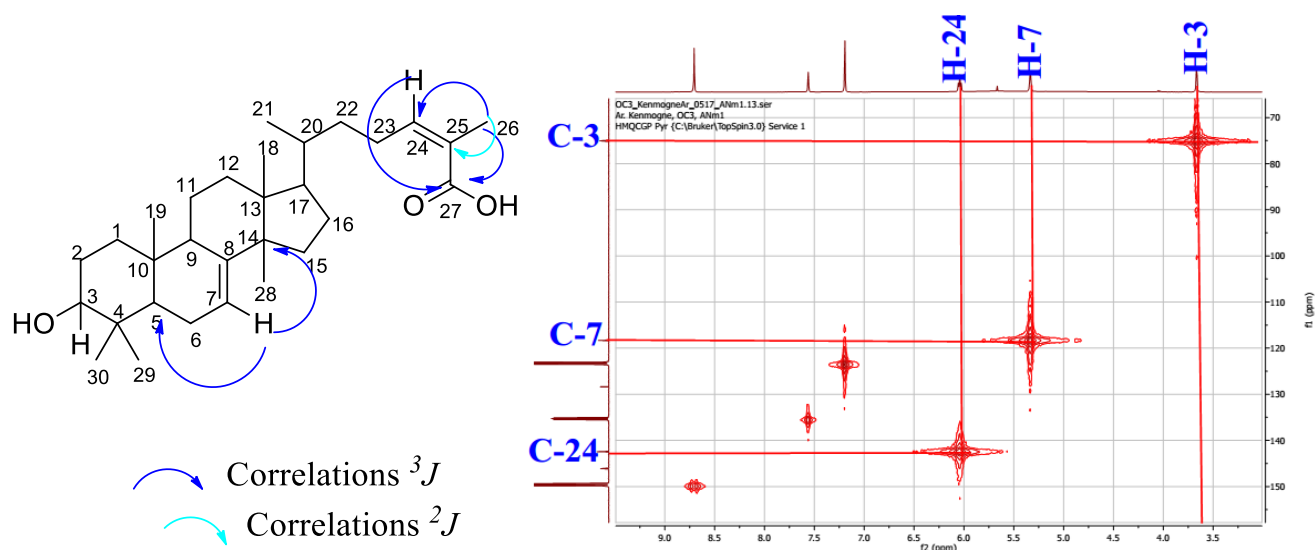


Figure 2 : Corrélation HMBC (pyridine- $d_5$ , 500 MHz) du composé acide, 3 $\alpha$ -Hydroxytirucalla-7,24Z-dien-27-oïque isolé des écorces de tronc de *T. odonii*

Tableau III : Comparaison des déplacements chimiques entre le Z-schinol et ANm1.

Position	Z-schinol (CDCl <sub>3</sub> )		ANm1(pyridine)	
	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)
1	36.20	1.46	34.90	-
2	36.40	2.04	36.24	-
3	76.40	3.46	75.03	3.60
4	37.40	-	37.70	-
5	44.50	1.91	44.66	-
6	24.30	1.90	24.12	-
7	117.80	5.28	118.3	5.37
8	146.00	-	142.40	-
9	48.600	2.50	48.88	2.49
10	35.60	-	33.80	-
11	18.50	1.560	18.10	-
12	34.70	1.590	31.60	-
13	43.90	-	43.50	-
14	51.60	-	51.30	-
15	34.00	1.43	28.50	-
16	28.20	1.97	27.27	-
17	53.30	1.42	52.90	1.55
18	21.40	0.83	21.83	0.85
19	13.00	0.77	13.21	0.77
20	36.20	1.39	36.00	-
21	18.70	0.89	18.30	0.87
22	36.10	1.37	34.15	1.49
23	26.90	2.46	26.34	-
24	146.10	6.30	146.12	6.03
25	125.70	-	128.37	-
26	20.60	2.05	21.28	2.18
27	173.60	-	170.39	-
28	28.20	0.93	28.24	1.05
29	22.50	0.90	21.94	0.95
30	27.40	1.95	26.92	-

## DISCUSSION

Les résultats du screening se rapprochent de ceux de Robert et al. [9] à la différence de l'absence de deux familles de composés : Les coumarines et les saponines. Cette différence pourrait s'expliquer par la nature de la drogue, à savoir qu'ils aient réalisés leur extraction sur le fruit de *T. odonii*, ou la méthode d'extraction des composés.

Les familles de composés identifiés possèdent des activités anti-inflammatoires, antibactériennes et anti oxydants déjà justifiés. Le *Z-schinol* répond positivement au test de Liberman Buchard ; caractéristique des triterpènes ; une famille de composés habituellement anti-inflammatoire. Son spectre de masse lui suggère la formule brute  $C_{30}H_{46}O_3$  renfermant huit degrés d'insaturations.

Grace au spectre RMN<sup>1</sup>H, la présence de triterpène tétracyclique est confirmée par l'exhibition des signaux caractéristiques des protons de sept groupements méthyles entre  $\delta$  0,85 à 2,23. En effet, six signaux de groupement méthyle tertiaire sont respectivement observés à  $\delta$  0,95 ; 1,05 ; 0,85 ; 0,86 ; 1,96 et 2,23 apparaissant sous forme de singulet chacun et celui à 0,87 apparaît sous forme de doublet. Ces résultats corroborent les travaux de Ngeufa et al [11] et ceux de Tang et al [12].

Les corrélations mises en évidence par les spectres HMQC et HMBC corroborent ceux de Shu-Ming Y. et al [13].

La structure de l'acide, 3 $\alpha$ -Hydroxytirucalla-7,24Z-dien-27-oïque encore appelé *Z-schinol* est un composé précédemment isolé de *Schinus terebinthifolius* par Thiago R.M en 2014 [10]. La différence observée entre les valeurs des déplacements chimiques obtenus par Thiago R, et al et ceux du Tableau. III s'explique par la différence des solvants qui ont permis d'effectuer la RMN.

## CONCLUSION

Il a été identifié dans les écorces de tronc de *T. odonii* la présence de flavonoïdes, saponines, composés réducteurs et coumarines et saponines. Ces familles de composés bioactifs possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antispasmodiques.

Le composé Anm1 (*z-schinol*) a été isolé dans un système de solvant Hex/EtOAc dans les proportions 80/20.

Le *z-schinol*, isolé des écorces de tronc de *T. odonii* a présenté in-silico un effet antiparasitaire et s'est révélé être en hémisynthèse, un composé très prometteur dans la recherche de nouveaux candidats médicaments [10]. Cet ensemble d'informations peut expliquer l'utilisation de *T. odonii* De Wild dans la médecine traditionnelle camerounaise.

## CONFLITS D'INTÉRÊT

Aucun

## REMERCIEMENTS

- Au laboratoire de Pharmacie Galénique et de Législation Pharmaceutique de la Faculté de Médecine et de Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé 1 ;
- Au laboratoire de Chimie Organique de la faculté des Sciences de l'Université de Douala ;
- Au laboratoire de chimie de l'Université de Bielfeld.

## SOURCE DE FINANCEMENT

Cette recherche n'a pas reçu de subvention d'organismes de financement des secteurs public, commercial ou sans but lucratif.

## RÉFÉRENCES

- [1]. Jiofack T et al. *African Journal of Pharmacy and pharmacology*. 2009 Avr; 3(4): 144-150
- [2]. Nkounkou-L et al. *Phytothérapie*. 2005 ;(6) :252-259
- [3]. Dalziel JM. (1956). *Useful Plants of West Tropical Africa*, Crown Agents for Overseas Government, London.
- [4]. Robert F, Muyonga J, Kaaya A, Okia C, Juius C, Tieguhong, et al. Nutrients and bioactive compounds content of *Baillonella toxisperma*, *Trichoscypha abut* and *Pentaclethra macrophylla* from Cameroon. *Food Science*
- [5]. Peter G, Christiana N, Doyle B and J. Stephen G. African Rainforest Vegetation and Rumen Microbes: Phenolic Compounds and Nutrients as Correlates of Digestibility. *Oecologia (Bed.)* (1980)47, 22-33
- [6]. Eyog M, Ndoye O, Kengue J. et Awono O. Les fruits forestiers comestibles du Cameroun. International Plant Genetic Resources Institute. Cotonou, Bénin: IPGRI; 2006. 204p
- [7]. Morton C. Atlas of medicinal plants of middle America: Bahamas to Yucatan 1981 pp.1448
- [8]. N'Guessan K et al. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature Vol. 6 N°1:1-5* (2009)
- [9]. Robert F. et al. Nutrients and bioactive compounds content of *Baillonella toxisperma*, *Trichoscypha abut* and *Pentaclethra macrophylla* from Cameroon. *Food Science*
- [10]. Jin-Feng H, et al. Acuminatanol, the first 2',2''-bis-dihydrobiflavonol from the aqueous extract of *Trichoscypha acuminata*. *Tetrahedron Letters* 48 (2007) : p.5747-5749
- [11]. Ngeufa E, et al. Tirucallane triterpenoids from the stem bark of *Araliopsis synopsis*. *Phytochemistry Letters* 5 (2012) 423-426. DOI: [10.1016/j.phytol.2012.03.014](https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.03.014)
- [12]. Tang J et al. Novel tirucallane triterpenoids from the stem bark of *Toona sinensis*. FITOTE3113. Volume 112, July 2016, p97-103. [On line]. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.009>
- [13]. Shu-Ming Y, et al. Two New Tirucallane Triterpenes with Six-Membered Hemiacetal from *Amoora dasyclada*. *A Journal of Chemical science*. V52, sept 2004. Published Online: 2014-06-02. DOI: <https://doi.org/10.1515/znb-2004-0921>
- [14]. Wansi J. D et al. Tirucallane triterpenoids from the stem bark of *Araliopsis synopsis*. *Phytochemistry Letters*. Volume 5, Issue 3, September 2012, Pages 423-426. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.03.014>
- [15]. Thiago RM et al. Antiparasitic Activity of Natural and Semi-Synthetic Tirucallane Triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships. *Molecules* 2014, 19, 5761-5776.