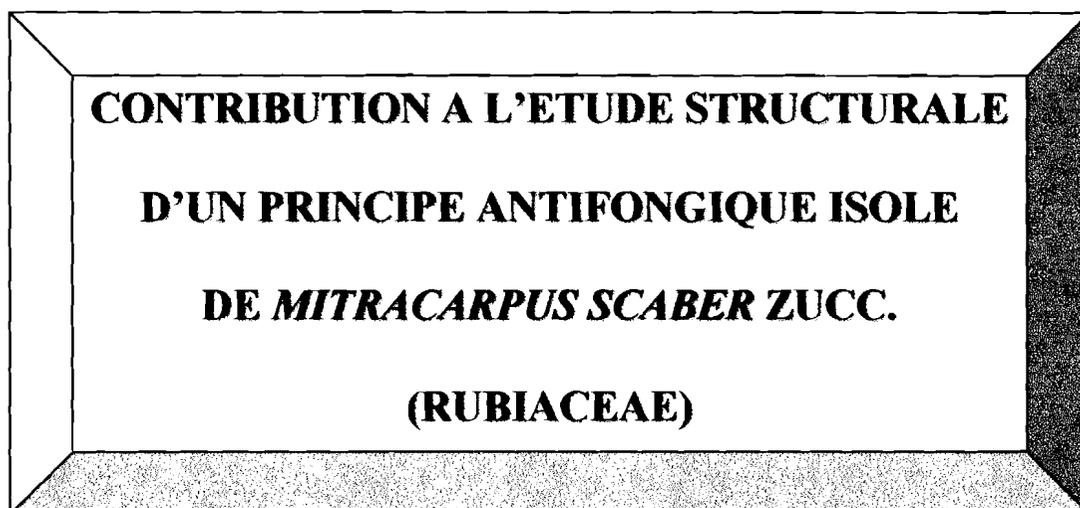


BURKINA FASO
UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU
Faculté des Sciences de la Santé
(F.S.S)

Année Universitaire 1999-2000

Thèse N°33



THESE

Présentée et soutenue publiquement le 17 Novembre 1999
Pour l'Obtention du
Grade de DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

Par

KABORE WENDMINIM NICOLE RACHEL
Née le 21 juin 1972 à Ouagadougou (Burkina Faso)

JURY :

Directeur de Thèse :
Pr. Blaise KOUDOGBO
Co - Directeur :
Dr. Jean Baptiste NIKIEMA

Président : **Pr. I Pierre GUISSOU**
Membres : **Pr. Blaise KOUDOGBO**
: **Pr. Adama SABA**
: **Pr. Odile NACOULMA**
: **Dr. Jean Baptiste NIKIEMA**

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

Faculté des Sciences de la Santé
(F.S.S.)

LISTE DU PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen	Pr. Robert B. SOUDRE
Vice-Doyen Chargé des Affaires Académiques et Directeur de la Section Pharmacie (VDA)	Pr. I. Pierre GUISSOU
Directeur de la Section Technicien Supérieur de Santé	Pr. Blaise KOUDOGBO
Vice-Doyen à la Recherche et à la vulgarisation (VDR)	Pr. Ag. Jean KABORE
Directeur des Stages de la Section Médecine	Pr. Ag. Y. Joseph DRABO
Directeur des Stages de la Section de Pharmacie	Dr Rasmata OUEDRAOGO/TRAORE
Coordonnateur C.E.S. de Chirurgie	Pr. Amadou SANOU
Secrétaire Principal	Mr Fakouo TRAORE
Chef de Service Administratif et Financier (CSAF)	Mme Christine NARE
Conservateur de la Bibliothèque	Mr Salif YADA
Chef de la Scolarité	Mme Kadi ZERBO
Secrétaire du Doyen	Mme Mariama DICKO
Secrétaire du VDA	Mme KABRE Hakiéta
Secrétaire du VDR	Mme Edwige BONKIAN

Audiovisuel	Mr Alain Pascal PITROIPA
Reprographie	Mr Philippe BOUDA
Service Courrier	Mr Ousmane SAWADOGO

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA F.S.S.

ENSEIGNANTS PERMANENTS

Professeurs titulaires

Rambré Moumouni OUIHINGA	Anatomie organogénèse et chirurgie
Hilaire TIENDREBEOGO	Sémiologie et Pathologies médicales
Tinga Robert GUIGUEMDE	Parasitologie
Bobilwindé Robert SOUDRE	Anatomie-Pathologique
Amadou SANOU	Chirurgie Générale et Digestive
Innocent Pierre GUISSOU	Pharmacologie & Toxicologie
Bibiane KONE	Gynécologie - Obstétrique
Alphonse SAWADOGO	Pédiatrie

Professeur associé

Blaise KOUDOGBO	Toxicologie
-----------------	-------------

Maitres de Conférences

Julien YILBOUDO	Orthopédie -Traumatologie
Kongoré Raphaël OUEDRAOGO	Chirurgie -Traumatologie
François René TALL	Pédiatrie
Jean KABORE	Neurologie
Joseph Y. DRABO	Médecine Interne/Endocrinologie
Blaise SONDO	Santé Publique

Jean LANKOANDE	Gynécologie-Obstétrique
Issa SANOU	Pédiatrie
Ludovic KAM	Pédiatrie
Adama LENGANI	Néphrologie
Oumar TRAORE N°1	Orthopédie-Traumatologie
Kampadilemba OUOBA	Oto Rhino Laryngologie
Piga Daniel ILBOUDO	Gastro-entérologie
Albert WANDAOGO	Chirurgie Pédiatrique

Assistants associés

Caroline BRIQUET	Chimie -Analytique, Pharmacologie et Toxicologie
Valérie MURAILLE	Galénique et Chimie-Analytique

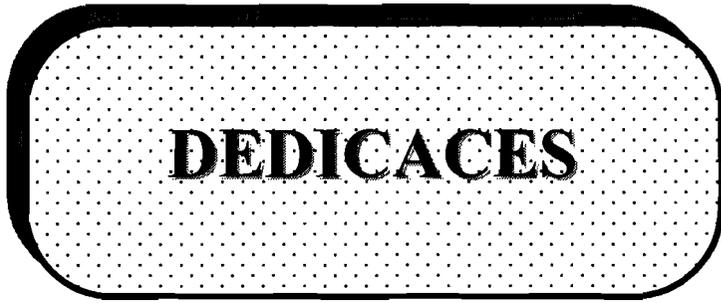
Maîtres-Assistants

Lady Kadidiatou TRAORE	Parasitologie
Mamadou SAWADOGO	Biochimie
Si Simon TRAORE	Chirurgie
Adama TRAORE	Dermatologie Vénérologie
Abdoulaye TRAORE	Santé Publique
Daman SANOU	Chirurgie Générale
Arouna OUEDRAOGO	Psychiatrie
Joachim SANOU	Anesthésie-Réanimation
Patrice ZABSONRE	Cardiologie
Jean Gabriel OUANGO	Psychiatrie
Georges KI-ZERBO	Maladies Infectieuses

Théophile L. TAPSOBA	Biophysique - Médecine Nucléaire
Rabiou CISSE	Radiologie
Blami DAO	Gynécologie Obstétrique
Alain BOUGOUMA	Gastro-Entérologie
Boubacar TOURE	Gynéco-Obstétrique
Michel AKOTIONGA	Gynécologie-Obstétrique
Rasmata OUEDRAOGO/TRAORE	Bactério-Virologie
Alain ZOUBGA	Pneumologie
Boubacar NACRO	Pédiatrie
Abel KABRE	Neuro-Chirurgie

Assistants Chefs de cliniques

Timothée KAMBOU	Chirurgie
T.Christian SANOU (in memoriam)	Oto Rhino Laryngologie
Doro SERME (in memoriam)	Cardiologie
Hamadé OUEDRAOGO	Anesthésie-Réanimation physiologie
Alexis ROUAMBA	Anesthésie-Réanimation physiologie
M. Théophile COMPAORE	Chirurgie
Y. Abel BAMOUNI	Radiologie
Maïmouna OUATTARA / DAO	ORL
André K. SAMANDOULOGOU	Cardiologie
Nicole Marie ZABRE / ZABRE	Maladies Infectieuses
Rigobert THIOMBIANO	Maladies Infectieuses



*MERCI SEIGNEUR POUR TON
AMOUR INFINI*

*JE TE RENDS GRACE POUR
L'ETERNITE.*

A mon père

Tu constitues pour nous un exemple de dignité, d'humilité, et de sagesse. Puisses-tu trouver ici le fruit de tes nombreux sacrifices.
Affectueux attachement.

A ma mère

Pour le réconfort, le soutien et l'affection sans cesse manifestés.
Profonde affection.

A mon frère Nicolas (in memoriam) et à mes sœurs Judith, Rebecca, Gisèle, Rolande et Joelle.
Que nos liens se raffermissent davantage.

A mon neveu Yoann

Aux grandes familles Kabore et Sawadogo

A tous mes oncles et tantes; à tous mes cousins et cousines

Pour votre soutien de tous les jours.

A mes amis

Appoline, Biton Isaïe, Claire, Cyrille, Emma, Henriette, Germain, Jean-Marc, Joséphine, Sonia, Tamboura, Yolande.

A mes camarades de promotion

Appoline et Alphonse(in memoriam), Azize, Charles, Claudette, Modeste, Moussa, Nao, Raïssa, Sanfo, Sangaré, Zada.

A NOS MAITRES ET JUGES

A Notre Maître et Président du jury

Professeur Innocent Pierre GUISSOU
Professeur titulaire de Pharmacologie - Toxicologie

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse, en dépit de vos nombreuses sollicitations.
Votre rigueur dans le travail, ainsi que vos qualités scientifiques sont reconnues de tous.
Sincères remerciements pour l'enseignement reçu tout au long de nos études
Veuillez trouver ici notre respectueuse considération.

A Notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Blaise KOUDOGBO
Professeur titulaire de Toxicologie

Vous nous avez accordé le privilège et l'honneur de nous inspirer et de diriger ce travail.
Votre simplicité, vos qualités scientifiques et humaines sont aussi bien reconnues que votre amour pour le travail bien fait.
Nous vous exprimons notre profonde gratitude et notre attachement respectueux.

A Notre maître et juge

Professeur Odile NACOULMA
Professeur de Biochimie

Nous vous sommes gré, de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.
Nous sommes convaincus qu'il gagnera en qualité après avoir été soumis à vos jugements et conseils.
Permettez nous de vous exprimer notre profonde gratitude.

A Notre maître et juge

Professeur Adama SABA
Professeur de Chimie Organique à la FAST.

Nous avons bénéficié de votre enseignement et de votre encadrement pendant nos études et lors de la réalisation de ce travail.

Votre simplicité et votre disponibilité ne cessent de nous émerveiller.

Permettez nous de vous adresser notre sincère reconnaissance et nos vifs remerciements.

A Notre Maître et Co - directeur

Docteur Jean-Baptiste NIKIEMA
Enseignant de Pharmacognosie

Vous avez permis par vos qualités humaines, scientifiques et votre disponibilité l'aboutissement de ce travail.

Vos conseils et votre soutien nous ont été d'un apport inestimable.

Infiniment merci pour tout et puisse le Seigneur exaucer vos vœux.



REMERCIEMENTS

Sincères remerciements à :

Tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

- Le laboratoire de spectrométrie et de dynamique moléculaire de Marseille
- Le laboratoire de chimie bio-organique et de phytochimie de la Fast
- Tantie Béatrice et tonton Amado
- Mr Sere Yacouba
- Dr Kambou Sonia
- Melle Naré Valérie
- Mr et Mme Belemkoabga
- Mme Belem et Mr Ouattara de l'IRBET
- Roger, Jean-Noel, et Andi de la FAST..

Pr Soudré Robert

Personnel du laboratoire de biologie du CHNYO, en particulier celui du laboratoire de bactériologie (Dr Ouedraogo, Dr Sanou, Dr Nikièma, Mme Ilboudo, Diabaté, Lompo, Tamboura).

Mr Seli et Mr Pitroipa pour les photos.

Tout le personnel du laboratoire de la Brakina pour leur accueil

Dr Seydou Sawadogo et le personnel de la pharmacie de la Fraternité.

Par délibération, la Faculté des Sciences de la Santé a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

SOMMAIRE

	PAGES
I INTRODUCTION	01
II GENERALITES	04
II 1 Généralités sur la plante	04
II.1.1 Historique	04
II.1.2 Appellation scientifique et synonymes	04
II.1.3 Noms en langues locales	04
II.1.4 Situation de <i>Mitracarpus scaber</i> dans le règne végétal	05
II.1.5 Description botanique	07
II.1.6 Distribution géographique	07
II.1.7 Utilisation en thérapeutique traditionnelle	07
II.1.7.1 Usage externe	07
II.1.7.2 Usage interne	08
II 2 Identification des composés organiques par les méthodes spectrales	11
II.2.1 Spectroscopie UV visible	11
II.2.2 Spectroscopie infrarouge (IR)	12
II.2.3 Spectroscopie de masse (SM)	13
II.2.4 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	13
III OBJECTIFS	15
III.1 Objectif général	15
III.2 Objectifs spécifiques	15
IV MATERIEL ET METHODES	16
IV.1 Cadre d'étude	16
IV.2 Matériel d'étude	16
IV.2.1 Matériel végétal	16
IV.2.2 Matériel pour l'extraction	16
IV.2.3 Phases mobiles pour la CCM et la CC	16
IV.2.4 Matériel de fractionnement et de purification	17
IV.2.5 Matériel pour la détermination du point de fusion	17
IV.2.6 Matériel pour l'étude spectrale	17
IV.3 Méthodes	18
IV.3.1 Extraction	18
IV.3.1.1 Extraction à l'éther de pétrole	18
IV.3.1.2 Extraction par le dichlorométhane	18
IV.3.2 Fractionnement de l'extrait au dichlorométhane	18
IV.3.3 Purification et isolement de la substance antifongique contenue dans la Fraction F ₃	19
V RESULTATS	22
V.1 Propriétés physico-chimiques	22

V.2 Résultats de la CCM de gel de silice G₆₀F₂₅₄	22
V.3 Description des spectres du composé 1	25
V.3.1 Spectrométrie UV-Visible	34
V.3.2 Spectrométrie IR	34
V.3.3 Spectrométrie de masse	34
V.3.4 Spectrométrie RMN ¹ H	34
V.3.5 Spectrométrie RMN ¹³ C	36
V.4 Interprétation des résultats et proposition d'une structure moléculaire	36
V.4.1 La CCM	36
V.4.2 Etude des spectres électroniques	37
V.4.3 Spectrométrie IR	38
V.4.4 Analyse du spectre RMN ¹ H	39
V.4.5 Analyse du spectre RMN ¹³ C	39
V.4.6 Spectrométrie de masse	41
VI DISCUSSION	42
VII CONCLUSION	47
VIII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	48

ABREVIATIONS

<i>BB :</i>	<i>Broad Band</i>
<i>CCM :</i>	<i>Chromatographie sur couche mince</i>
<i>DEPT :</i>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<i>FSS :</i>	<i>Faculté des sciences de la santé</i>
<i>FAST :</i>	<i>Faculté des Sciences et Techniques</i>
<i>IR :</i>	<i>Infra rouge</i>
<i>Rf :</i>	<i>Référence frontale</i>
<i>RMN :</i>	<i>Résonance magnétique nucléaire</i>
<i>ppm :</i>	<i>partie par million</i>
<i>SM :</i>	<i>Spectrométrie de masse</i>
<i>UV :</i>	<i>Ultra-violet</i>

I INTRODUCTION

Le Burkina Faso est un pays enclavé de l'Afrique de l'Ouest n'ayant aucun débouché sur la mer.

Le Produit National Brut (PNB) par habitant est inférieur à 400\$ US ; ce qui place ce pays parmi les moins avancés sur le plan du développement économique. La grande majorité des médicaments utilisés dans le système moderne de santé est importée. La disponibilité des médicaments essentiels reste ainsi tributaire des fluctuations monétaires, et cette difficulté majeure s'est accrue depuis la dévaluation du franc CFA en 1994, qui a entraîné un renchérissement du prix des produits importés.

C'est pourquoi, en dépit des efforts du gouvernement (application de l'initiative de Bamako concernant les soins de santé primaire avec l'introduction massive des médicaments essentiels génériques), les médicaments essentiels restent inaccessibles (financièrement et géographiquement) à une grande majorité de la population; celle-ci demeurant essentiellement rurale et d'une extrême pauvreté.

C'est dans ce contexte que la population rurale (plus de 80%), a recours en première intention, à l'heure actuelle, à la médecine traditionnelle et aux médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle pour la couverture de ses besoins sanitaires [30].

Cependant, la médecine traditionnelle, malgré le succès qu'elle enregistre auprès des populations, pose toujours des problèmes de standardisation et d'innocuité.

La mise au point de nouveaux médicaments standardisés et efficaces, à partir de la pharmacopée traditionnelle devient de ce fait une condition importante pour la couverture des besoins sanitaires de la population.

Cette mise au point est une entreprise pluridisciplinaire faisant intervenir des tradithérapeutes, des botanistes, des pharmacognosistes, des chimistes, biochimistes, des pharmacologues, des galénistes, des toxicologues, des cliniciens, etc.

Les étapes suivantes doivent être effectuées à cet effet :

- Récolte des informations sur l'usage traditionnel des plantes (enquêtes ethnobotaniques);
- Identification des plantes utilisées ainsi que leurs zones de peuplement naturel. (botaniste systématicien);

- Récolte et études phytochimiques (pharmacographe et chimiste);

- Extraction, purification et isolement des principes actifs,
- Identification des principes actifs,
- Hémisynthèse et ou synthèse totale au laboratoire.

-Etudes pharmaco-cliniques parallèlement aux études phytochimiques et galéniques, en vue de la séparation des principes actifs

- Mise en forme galénique,
- Etudes toxicologiques,
- Etudes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.
- Essais cliniques.

Le but de notre travail est de contribuer à la mise au point d'un nouveau médicament utilisable en médecine moderne et cela à partir d'une préparation traditionnelle à base de drogues végétales.

La plante médicinale qui entre dans le cadre de cette étude est *Mitracarpus scaber*, une plante utilisée en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour le traitement des mycoses superficielles [21; 28].

Une étude menée récemment par Kambou sur l'activité antifongique de cette plante a permis d'isoler par fractionnement un principe actif qui serait de nature triterpénique [21].

Dans le cadre de notre travail, une suite logique de cette étude, nous nous limiterons à l'étude structurale de ce principe actif de *Mitracarpus scaber* à l'aide des méthodes spectroscopiques de RMN, de masse, d'IR et d'UV.

L'objectif principal de notre étude est d'apporter une contribution à l'identification de ce principe actif. Cette identification permettra par la suite, d'entreprendre des essais pharmacologiques, toxicologiques et cliniques en vue de permettre la mise au point d'une nouvelle forme galénique à base du principe antifongique isolé de *Mitracarpus scaber*.

Notre travail peut ainsi être divisé en deux grandes parties :

- La première partie est consacrée aux généralités sur *Mitracarpus scaber* Zucc. ainsi que sur les méthodes d'analyse spectrales.

- La deuxième partie concerne l'isolement et l'identification du principe antifongique grâce à des relevés spectroscopiques (UV, IR, masse et RMN). Ces relevés permettront de proposer une structure chimique pour la substance.

II GENERALITES

II-1 GENERALITES SUR LA PLANTE

II-1.1 Historique [40]

Mitracarpus scaber fut à l'origine de querelles entre botanistes, notamment Schumacher et Zuccarini.

Le problème était de savoir si la date de publication de Schumacher et Thonning était 1827 ou 1829.

La priorité de l'épithète de l'espèce a été accordée à Zuccarini qui a publié en 1827.

Mitracarpus scaber Zucc est défini par le mode de déhiscence de son fruit qui se fait selon Brown par ouverture en anneau et la partie supérieure de la capsule ressemble à une mitre. C'est de ce mot que dérive le genre *Mitracarpus*.

L'épithète *scaber* est due au fait que les feuilles de la plante sont lisses au dessous et scabres au dessus.

II-1.2 Appellation scientifique et synonymes [28,40]

- *Mitracarpus scaber* (Zucc) 1827

- Synonymes

- *Mitracarpus verticillatus* (Schumacher-Thonning) Vatke 1876
- *Mitracarpus villosus* (SW) DC
- *Staurospermum verticillatum* (Schumacher-Thonning) 1829
- *Mitracarpus senegalense* DC
- *Oldenlandia verticillata* Bacle.

II-1.3 Nom en langues locales [1,2,3,4,5,28,40]

Bambara/Dioula	: kuguruba
Hausa	: ardi
Moré	: yod-pèelga
Yoruba	: alekou
Wolof	: Ndotükan

II-1.4 Situation de *Mitracarpus scaber* Zucc dans le règne végétal [21]

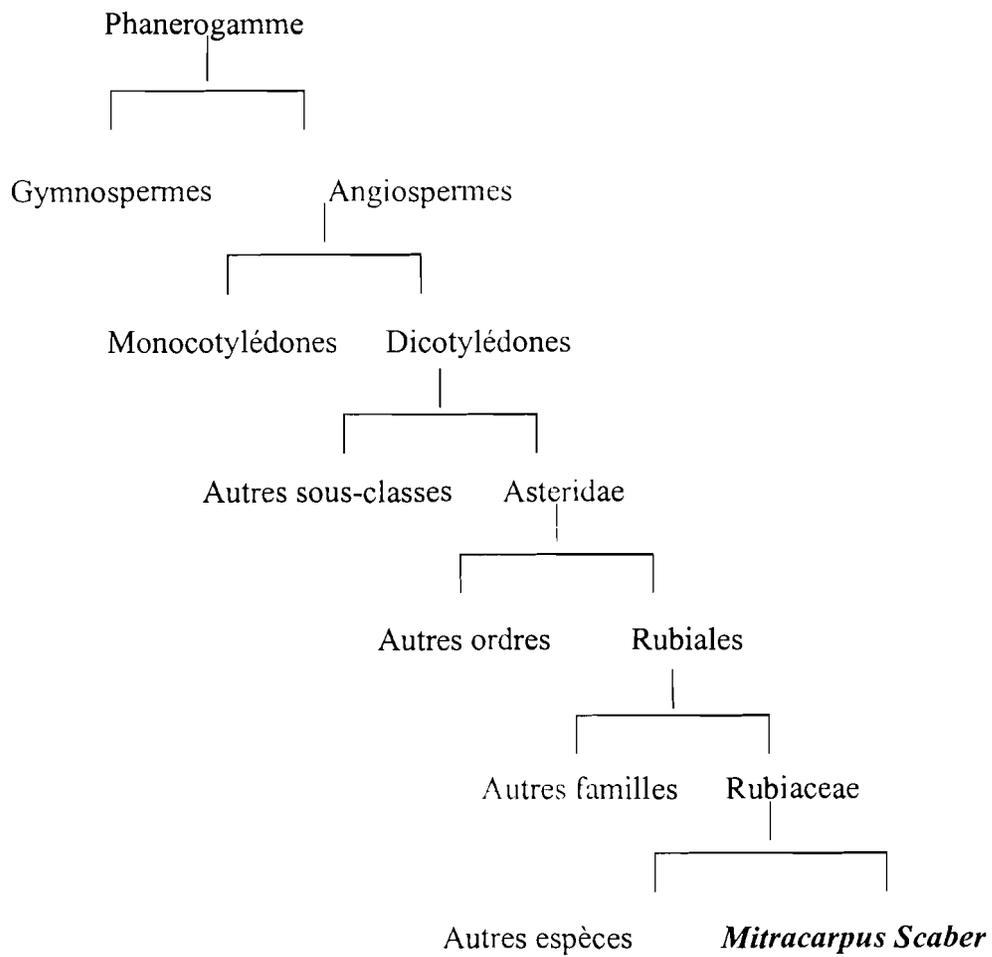




Figure 1 : Mitracarpus scaber Zucc. (Rubiaceae) (photo prise à Ouagadougou)

II 1.5 Description botanique [1,2,3,4,5]

-Port : *Mitracarpus scaber* est une plante herbacée annuelle à tiges pubérulentes, ramifiées, évasées, rondes, blanchâtres ou jaunâtres, hautes de 10-30 cm.

-Feuilles : elles sont lancéolées, subaiguës de 3-6 cm de longueur et de 1 cm de large. Elle sont glabres ou glabrescentes au dessous et scabres au dessus.

-Fleurs : elles sont blanches, très petites 2-3 mm en glomérules à l'aisselle des feuilles.

-Graines : elles sont chagrinées dorsalement, la face supérieure ayant comme l'empreinte d'une patte de chien.

-Reproduction : elle se fait par les graines.

II-1.6. Distribution géographique

Mitracarpus scaber est une espèce commune à toute l'Afrique intertropicale présente dans les cultures, sur les terrains vagues, le long des routes et des pistes.

II-1.7. Utilisation en thérapeutique traditionnelle

II-1.7-1 Usage externe

- Au Burkina Faso, *Mitracarpus scaber* est utilisée dans le traitement des dartres, des teignes et de la gale. Pour le traitement antifongique, la plante peut être utilisée à l'état frais ou après séchage [21,28].

- Au Togo, la pulpe des tiges feuillées est appliquée en cataplasme seule ou additionnée de carbonate de potassium sur les lésions. On peut également appliquer un mélange de poudre de feuilles sèches et d'huile de karité sur les lésions après un bain avec le décocté de la tige feuillée [5].

- Au Bénin, le suc des jeunes feuilles est instillé dans les yeux lors des convulsions hyperpyrétiques. Le macéré aqueux de la plante entière est appliqué localement dans les dermatoses. Dans les céphalées rebelles on frotte la tête rasée avec des feuilles de *Pupalia lappacea* et on applique la pulpe de la plante entière délayée dans du pétrole en association avec les gousses d'*Aframomum melegueta* [1].

- En Côte d'Ivoire, les branchages feuillés de *Mitracarpus scaber* sont écrasés et le jus appliqué sur les mycoses. L'application est renouvelée 2, 3 fois par jour jusqu'à disparition des mycoses [33].

II-1.7.2 Usage interne

Au Bénin, le décocté aqueux des parties aériennes de *Mitracarpus scaber* est administré per os dans les affections hépatiques, les dyspepsies, la constipation et les candidoses bucco-orales et digestives en association avec des fruits de *Xylopiya aethiopica*. Dans les aménorrhées, on utilise le macéré de pulpe des parties aériennes par voie orale en association avec des fruits de *Garcinia kola* [1].

Ainsi, *Mitracarpus scaber* est une plante très connue dans toute l'Afrique intertropicale et utilisée en usage interne et externe surtout comme antispasmodique, antiseptique, antifongique, antibactérien, antalgique etc.

II-1.8. Rappels sur la chimie de *Mitracarpus scaber*

Les études chimiques sur *Mitracarpus scaber* sont peu nombreuses :

- Kerharo et Adam rapportent la présence des saponosides, d'alcaloïdes, de triterpènes et de stérols dans *Mitracarpus scaber* [22].

- Ekpendu et Coll ont identifié 26 composés dont 11 acides gras libres par chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse à partir des parties aériennes de *Mitracarpus scaber*. Le composé le plus abondant est l'acide hexadécanoïque (51,2%) suivi de l'acide pentadécanoïque [15].

- Baoua et Coll ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, d' alcaloïdes, de tanins, de triterpènes et de stérols [8].

- Kambou par screening phytochimique sur les extraits de *Mitracarpus scaber* a mis en évidence un principe de nature triterpénoïde, des triterpènes et stéroïdes , ainsi que des tanins et des flavonoïdes [21].

- Harouna et Coll ont pu isoler à partir de la plante fraîche un principe actif, l'harounoside qui est la pentalongine hydroquinone diglycoside [19].

II-1.9. Rappels sur la pharmacologie de *Mitracarpus scaber*

- Au Burkina Faso, Kambou a retrouvé une activité antifongique in vitro de l'extrait à l'acétate d'éthyle et au n-hexane contre *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton Soudanense*, *Trichophyton Interdigitale* et *Microsporum langeronii*.

- Au Nigéria, Irobi et Coll ont mis en évidence in vitro, une activité de l'extrait éthanolique sur *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Fasarium salani*. Ils ont mis en évidence lors d'un screening phytochimique de la plante la présence de substances phénoliques, d'hémolysines et de sesquiterpènes [20].

Ekpendu et Coll ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire et antimicrobienne de l'extrait à l'éther de pétrole de *Mitracarpus scaber*. L'activité antimicrobienne concerne les germes suivants : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *staphylococcus aureus*. Ils n'ont cependant pas identifié les substances actives [16].

- Au Mali, Sanogo et Coll ont testé in vitro l'activité antimicrobienne de *Mitracarpus scaber*. Il est ressorti de l'étude, que l'extrait à l'éther de pétrole obtenu à partir de l'extrait hydro-alcoolique exerce une activité antimicrobienne sur plusieurs souches de staphylocoques et de candida. Le screening phytochimique effectué a mis en évidence dans la plante la présence de flavonoïdes de tanins et de triterpènes[35].

- En Côte d'Ivoire, Moubé et Coll ont montré que l'huile de *Mitracarpus verticillatus* obtenu à partir de l'extrait éthanolique traité au Soxhlet dans de l'hexane est active sur *Trichophyton rubrum* [27].

Bonga et Coll ont montré l'activité de la fraction éthanolique de *Mitracarpus verticillus* sur *Cryptococcus neoformans*.

Cette fraction a été obtenue après chromatographie de filtration sur colonne SEPHADEX G50. Des réactions colorées ont mis en évidence la présence de phytostérols dans cette fraction [10].

En conclusion : une activité antifongique de *Mitracarpus scaber* a été retrouvée avec les extraits éthanoliques et lipidiques (éther de pétrole, hexane). Des tentatives d'explication de cette activité ont été faites en référence à la composition chimique établie par screening des extraits.

II.2 IDENTIFICATION DES COMPOSES ORGANIQUES PAR LES METHODES SPECTRALES

INTRODUCTION

L'identification de la structure chimique des principes actifs est une étape importante dans la mise au point des nouveaux médicaments. En effet la connaissance de cette structure chimique permet d'établir les réactions de caractérisation et de dosage ; ce qui conditionne les méthodes de contrôle de qualité du produit fini (contrôles qualitatifs et quantitatifs). Il en est de même pour l'évaluation de la biodisponibilité.

L'identification du composé chimique consiste à réunir le maximum d'information en vue de proposer une structure moléculaire. Parmi les méthodes utilisées et qui apportent un maximum d'informations sur la structure, nous avons les analyses spectroscopiques de masse et de résonance magnétique nucléaire (RMN). Les spectroscopies UV et IR apportent dans la plupart du temps une contribution peu significative. Cependant, ces méthodes peuvent se révéler importantes pour un certain nombre de groupes chimiques pour l'UV et de groupements fonctionnels pour l'IR. C'est ainsi que la spectroscopie UV peut apporter une contribution décisive à l'identification des flavonoïdes [11].

II-2.1 Spectroscopie UV visible [18,31,34]

La spectroscopie UV est fondée sur l'absorption d'énergie électromagnétique par les électrons de valence. On parle aussi de spectroscopie électronique.

Les spectres UV traduisent au mieux la structure des systèmes à électrons délocalisables et particulièrement les composés aromatiques. Le domaine spectral concerné est divisé en trois plages :

- UV lointain : $100 < \lambda < 190-200$ nm
- UV proche : $200 < \lambda < 350-400$ nm
- UV visible : $350-400 < \lambda < 800$ nm

En pratique on opère dans l'UV proche et le visible : $190 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$.

Le spectre UV correspond au tracé de la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

Ainsi, le spectre UV-visible est obtenu par irradiation de l'échantillon à l'aide de faisceaux électromagnétiques de longueurs d'onde différentes.

L'absorbance est fonction de la concentration des molécules qui absorbent.

$$\% \text{ Transmittance} = (100)I/I_0$$

$$\text{Loi de Beer- Lambert : } \log I/I_0 = -\epsilon lc$$

I = intensité de lumière transmise

I_0 = intensité de la lumière incidente

l = longueur du trajet optique

ϵ = coefficient d'extinction molaire.

II-2.2 Spectroscopie infrarouge (IR) [6,11,12,18,29,31,34,36]

Le spectre IR provient de variations d'énergie dues à la vibration des liaisons entre atomes constitutifs de la molécule, ou à la rotation des molécules dans le domaine de l'IR moyen. Les spectres IR sont donc des spectres de vibration / rotation permettant une analyse fonctionnelle des molécules organiques.

Le spectre IR traduit l'absorption par l'échantillon radiations électromagnétiques de longueurs d'onde comprises entre 1 et 1000 μm . Le moyen IR (2,5 - 25 μm) fournit le plus d'informations sur les composés examinés permettant ainsi de déduire des particularités structurales.

Le spectre IR permet l'analyse fonctionnelle des molécules organiques, la détermination des structures et la vérification des isoméries.

II-2.3. Spectroscopie de masse (SM)

La spectroscopie de masse est une méthode d'analyse basée sur la fragmentation des molécules et la détermination de la masse relative m/z de ces fragments moléculaires.

Elle se fonde sur l'ionisation et la fragmentation des molécules. L'ionisation entraîne, en effet, une accumulation d'énergie qui en se dissipant peut provoquer la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à des fragments caractérisés par le rapport masse/charge (m/z).

Les différents fragments ainsi produits, s'ils sont chargés positivement ou négativement sont accélérés avant de parvenir à un analyseur appelé parfois filtre de masse qui les sépare en fonction du rapport m/z .

Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre caractéristique appelé spectre de masse.

Le spectre de masse représente sous forme graphique l'abondance des ions sur la base de leur rapport masse/charge.

La spectroscopie de masse fournit donc des renseignements sur la masse moléculaire, la formule et sur la disposition des groupes spécifiques dans la molécule.

II-2.4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Outre les méthodes spectrales faisant intervenir des transitions électroniques ou des variations de l'énergie de vibration – rotation, il existe d'autres moyens d'études fines de la structure des molécules; de découverte plus récente. Ils mettent en œuvre, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

L'échantillon à étudier est introduit dans un champ magnétique H_0 continu et orienté suivant un axe O_z qui réalise la séparation en deux (ou n) niveaux énergétiques. L'énergie nécessaire pour provoquer la résonance est fournie par un champ H_1 sinusoïdal de radiofréquence γ monochromatique et orienté perpendiculairement au premier champ suivant un axe O_y .

L'échantillon subit un balayage de champ magnétique. Quand ΔE (la quantité d'énergie fournie) correspond à l'énergie de transition pour un noyau donné, il y a absorption de l'énergie émise se traduisant par un pic d'absorption.

Tout noyau ayant un numéro atomique ou un nombre de masse impair, possède un moment magnétique appelé spin non nul et pourra être étudié en RMN.

La RMN peut ainsi intéresser de nombreux atomes. Les plus classiquement étudiés sont le proton ^1H qui est l'élément le plus abondant dans la nature et le carbone ^{13}C .

Le spectre de RMN d'un composé nous fournit quatre types d'informations :

- Le déplacement chimique d'un multiplet nous renseigne sur l'environnement du proton correspondant ;
- La surface des signaux nous renseigne sur le nombre de protons mis en jeu.
- La multiplicité nous indique le nombre de protons au voisinage du proton considéré.
- La constante de couplage nous renseigne sur le type et le degré de relation entre deux protons.

Au total, la spectroscopie de RMN permet l'établissement de la structure moléculaire d'un composé par la détermination de la nature et de l'environnement des atomes en résonance.

III OBJECTIFS

III-1 OBJECTIF GENERAL

L'objectif général de cette étude est de contribuer à la mise au point d'un nouveau médicament par l'identification d'un principe antifongique isolé de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiaceae).

III-2 OBJECTIFS SPECIFIQUES

D'une manière spécifique, l'étude devra permettre d'atteindre les objectifs suivants :

III-1. Analyser la substance antifongique par spectrométrie UV-Visible.

III-2. Procéder au relevé spectrométrique IR.

III-3. Procéder au relevé spectrométrique de masse (impact électronique).

III-4. Procéder au relevé spectrométrique de RMN ^1H et ^{13}C .

III-5. Proposer une structure pour la substance antifongique isolée de *Mitracarpus scaber*.

IV MATERIEL ET METHODES

IV-MATERIEL ET METHODES

IV-1 Cadre d'Etude

Notre étude a été réalisée au laboratoire de Pharmacognosie et de Valorisation de la Médecine et Pharmacopée Traditionnelle de la FSS; ainsi que dans le laboratoire de Chimie Bio-organique et Phytochimie de la FAST, et dans le Laboratoire de spectrométrie et de dynamique moléculaire de Marseille.

IV-2 Matériel d'Etude

IV-2-1 Matériel végétal

Les tiges feuillées de *Mitracarpus scaber* (Zucc) ont été récoltées en janvier 1999 dans la ville de Ouagadougou. La drogue végétale est séchée à la température ambiante, à l'abri de la lumière avant d'être broyée finement.

La poudre obtenue est conservée dans des flacons bruns jusqu'à la mise en route de l'étude phytochimique.

IV-2-2 Matériel pour l'extraction

- Ampoule à macération (2l)
- Percolateur (1l)
- Rotavapor Buchii
- Verrerie
- Solvants : éther de pétrole, chlorure de méthylène

IV-2-3 Phases mobiles pour la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne

S₁ : Dichlorométhane–Toluène–Méthanol (5 ; 4 ; 1)

S₂ : Dichlorométhane–Toluène–Méthanol–Ammoniaque (5 ; 4 ; 1 ; 0,1)

- S₃ : Dichlorométhane–Acétone (9,5 ; 0,5)
S₄ : Dichlorométhane
S₅ : Dichlorométhane-Méthanol (95-5 V/V)
S₆ : Dichlorométhane-Méthanol (92,5-7,5 V/V)
S₇ : Dichlorométhane-Méthanol (90-10 V/V)

IV-2-4. Matériel de fractionnement et de purification

- Chromatoplaques gel de silice G₆₀F₂₅₄ (10x5 ; 10x10 ; 20x20).
- Colonnes chromatographiques (1mx3cm ; 1mx1,5cm)
- Gel de silice G60 pour colonne

IV-2-5 Matériel pour la détermination du point de fusion

Le point de fusion est relevé avec un appareil Electrothermal IA 9000.

IV-2-6 Matériel pour l'étude spectrale

- Spectrométrie UV - visible

Le spectre a été relevé dans le chloroforme. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre SAFAS Double Energy System, entre 200 et 600 nm.

- Spectrométrie Infra-rouge

Le spectre IR a été obtenu en pastilles KBr à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer 840.

- Spectrométrie de RMN

L'échantillon est dissous dans du méthanol deutérié. Le tétraméthylsilane est utilisé comme standard interne et est directement dissous dans le solvant. Le spectre RMN ¹H a été relevé à l'aide d'un spectrophotomètre BRUKER AMX 400 Le spectre ¹³C est quant à lui enregistré sur BRUKER AC 80.

IV-3 Méthodes

IV-3-1 Extraction

La méthode d'extraction utilisée est la percolation. La matière végétale, introduite dans le percolateur est soumise à un épuisement successif à l'aide de deux solvants de polarité croissante; il s'agit de l'éther de pétrole et du dichlorométhane.

IV-3-1-1 Extraction par l'éther de pétrole

La poudre des feuilles de *Mitracarpus scaber* (2kg) est introduite dans une ampoule à macération. L'éther de pétrole (4l) est ajouté et le mélange est laissé en macération pendant 24 heures. A la fin de la macération, une percolation est effectuée à l'aide d'1l d'éther de pétrole. La solution est recueillie à raison de 1ml/mn et évaporée sous pression réduite. Le résidu de l'extraction est conservé à l'abri de la lumière. Le marc est séché et gardé pour les extractions suivantes.

IV-3-1-2 Extraction par le dichlorométhane

Le marc issu de l'extraction à l'éther de pétrole est séché puis introduit dans l'ampoule à macération. L'ensemble est mis à macérer pendant 24 heures avec 4l de dichlorométhane. Une percolation est ensuite réalisée à l'aide de 2l de dichlorométhane. La solution recueillie est ensuite évaporée sous pression réduite. L'extrait obtenu est conservé à l'abri de la lumière.

IV-3-2 Fractionnement de l'extrait au dichlorométhane

L'extrait au dichlorométhane a été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice.

La colonne (1m sur 3cm de diamètre) est remplie aux 2/3 à l'aide d'une suspension de silice pour colonne dans le dichlorométhane. L'extrait à fractionner est dissout dans le dichlorométhane et déposé au sommet de la colonne de silice.

La phase mobile est ensuite introduite. Cette phase mobile est constituée de dichlorométhane contenant des proportions croissantes de méthanol (0 ; 5 ; 7,5 ; 10%). Chaque palier du gradient correspond à 500ml de phase mobile.

Des fractions de 25 ml sont récoltées et analysées par CCM de gel de silice $G_{60}F_{254}$ en utilisant le système de solvant S_1 comme phase mobile.

La révélation est faite par chauffage de la chromatoplaque à 110°C pendant 10 min après pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique à 3% dans de l'éthanol.

Les fractions qui présentent un chromatogramme similaire sont regroupées et évaporées sous pression réduite.

Quatre fractions ont ainsi été réunies : F_1 , F_2 , F_3 , F_4 .

La substance antifongique préalablement isolée par Kambou a été retrouvée dans la fraction F_3 . C'est cette fraction F_3 qui sera soumise à la purification puis à l'identification du principe dit antifongique.

IV-3-3 Purification et isolement de la substance antifongique contenue dans la fraction F_3

La fraction F_3 a été évaporée sous pression réduite pour donner un résidu sec. Cet extrait a été purifié sur une colonne de gel de silice de 1m sur 1,5 cm.

Cette colonne a été éluée successivement par une phase mobile constituée du mélange dichlorométhane – méthanol dans les proportions 0% ; 5% ; 7,5 % et 10 %.

Des fractions de 5 ml sont récoltées et analysées par CCM de gel de silice $G_{60}F_{254}$ en utilisant le mélange S_1 comme phase mobile.

Les fractions similaires sont regroupées, ce qui a permis de recueillir 3 fractions T_1 , T_2 , T_3 .

La substance supposée être antifongique isolée par Kambou a été ainsi concentrée dans la fraction T_2 .

La purification de cette substance a été terminée par chromatographie sur couches minces préparative de gel de silice $G_{60}F_{254}$ en utilisant le système S_3 comme phase mobile.

Dans ces conditions, la bande correspondant, à la substance antifongique est grattée puis éluée à l'aide de dichlorométhane.

La solution recueillie est filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner une substance qui sera soumise à l'analyse spectrale pour en déterminer la structure

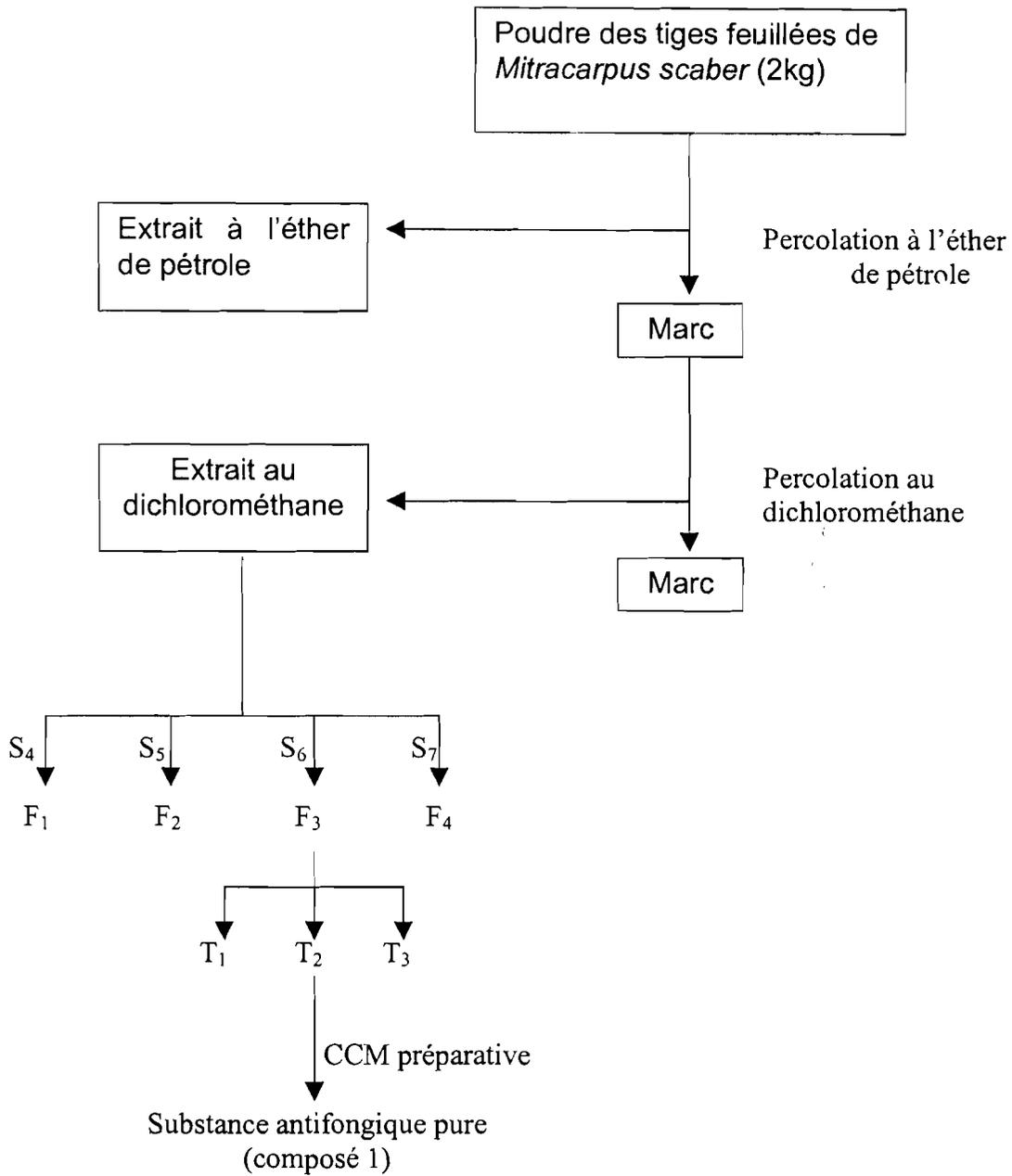


FIGURE 2 : Schéma d'extraction, de fractionnement et de purification des extraits de Mitracarpus scaber

RESULTATS

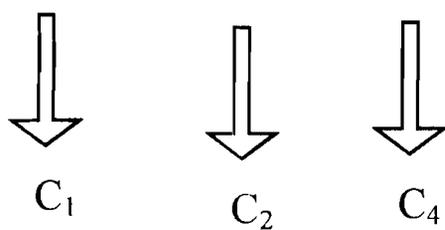
V-1 . Propriétés physico-chimiques

Le composé 1 isolé de *Mitracarpus scaber* est une poudre blanche amorphe, soluble dans les solvants organiques chlorés, très soluble dans le mélange dichlorométhane-méthanol (95 –5 V/V), insoluble dans l'eau. Le point de fusion est entre 220 et 222°C.

V-2. Résultats de la chromatographie sur couche mince de gel de silice G₆₀F₂₅₄

Le composé 1 analysé par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant le système S₁ comme phase mobile, donne après révélation par l'acide sulfurique à 3 % dans l'éthanol suivi d'un chauffage à 110° pendant 10 min, un spot de couleur violette persistante ; ce spot se situe à une valeur R_f de 0,34 (figure 3).

Le betulinol et l'α-amyrine analysés dans les mêmes conditions se situent respectivement à des valeurs R_f de 0,44 et 0,7. Le composé 1 analysé par CCM de gel de silice en utilisant le système S₂ comme phase mobile entraîne une faible migration. Dans ces conditions, la valeur R_f de ce composé est de 0,1, alors que celles du betulinol et de l'α-amyrine reste respectivement à 0,44 et 0,7 (figure 4).



**Figure 3 : Chromatogramme sur couche mince du composé 1 (C₁), de l'alpha-amyrine (C₂) et du betulinol (C₄).
Phase mobile : système S₁.**



↓ ↓ ↓
C₁ C₂ C₄

Figure 4: Chromatogramme sur couche mince du composé 1 (C₁), de l'alpha-amyrine (C₂) et du betulinol (C₄).
Phase mobile : système S₂.

V. Description des spectres du composé 1

Les spectres électronique, infrarouge, RMN du proton et du carbone 13 du composé 1 sont représentés respectivement par les figures 5,6,7,8,9,10,11 et 12.

Le spectre de masse est représenté par la figure 13.

S5/Chloroforme

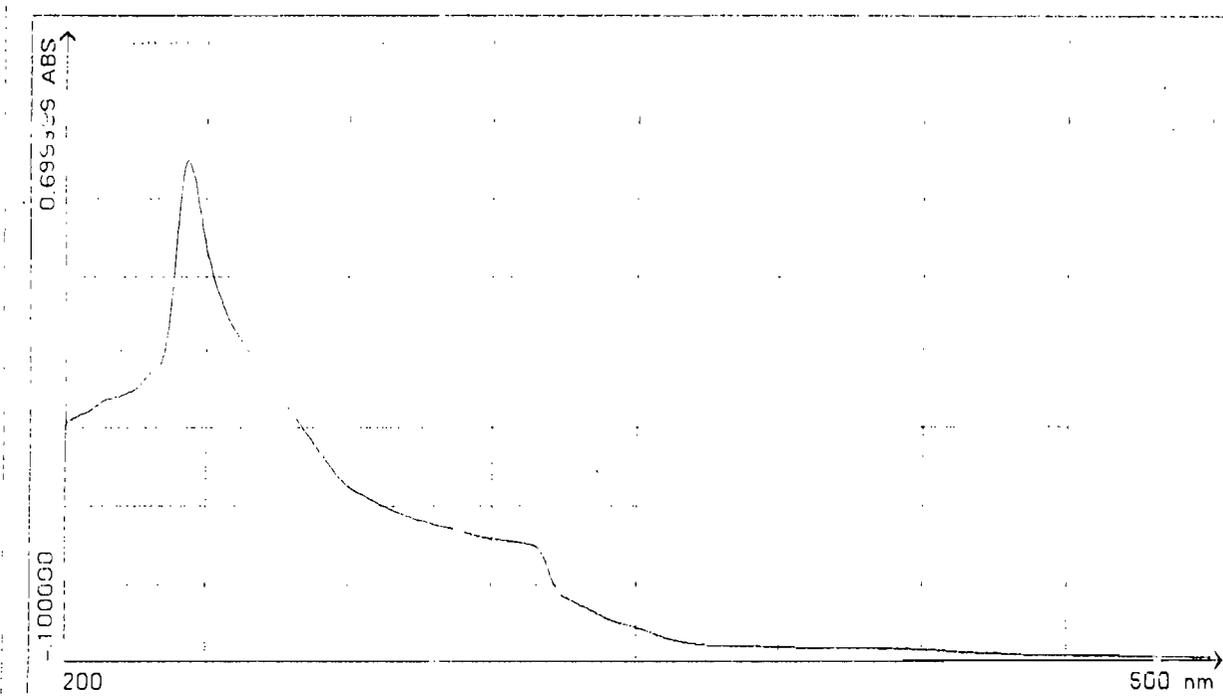
2 PIC(S) DETECTE(S) :

Pic 1: LO= 200.00 nm - ABS =0.225904

Pic 2: LO= 243.50 nm - ABS =0.562924

SAFAS

SPECTROPHOTOMETRE SAFAS DOUBLE ENERGY SYSTEM® //



Spectre S5/Chloroforme : de 200 à 600nm

Pas: 0.50nm / Bande Passante: 1nm/Moy:0.40 sec/pt

Lissage: 9 / Amt Intelligent: Seuil en %=1.500000-Seuil en A=0.100000

Commul.sources: 370nm / Filtre IR: 550nm/GrilleX= 50nm/GrilleY=0.100000A

Imprimé le 07-08-1999, à 09:45:24

n° 1: S5/Chloroforme SPECTRE ordre 0

Figure 5 : Spectre UV du composé 1 isolé de *Mitracarpus scaber*.

Figure 6 : Spectre IR du composé 1.

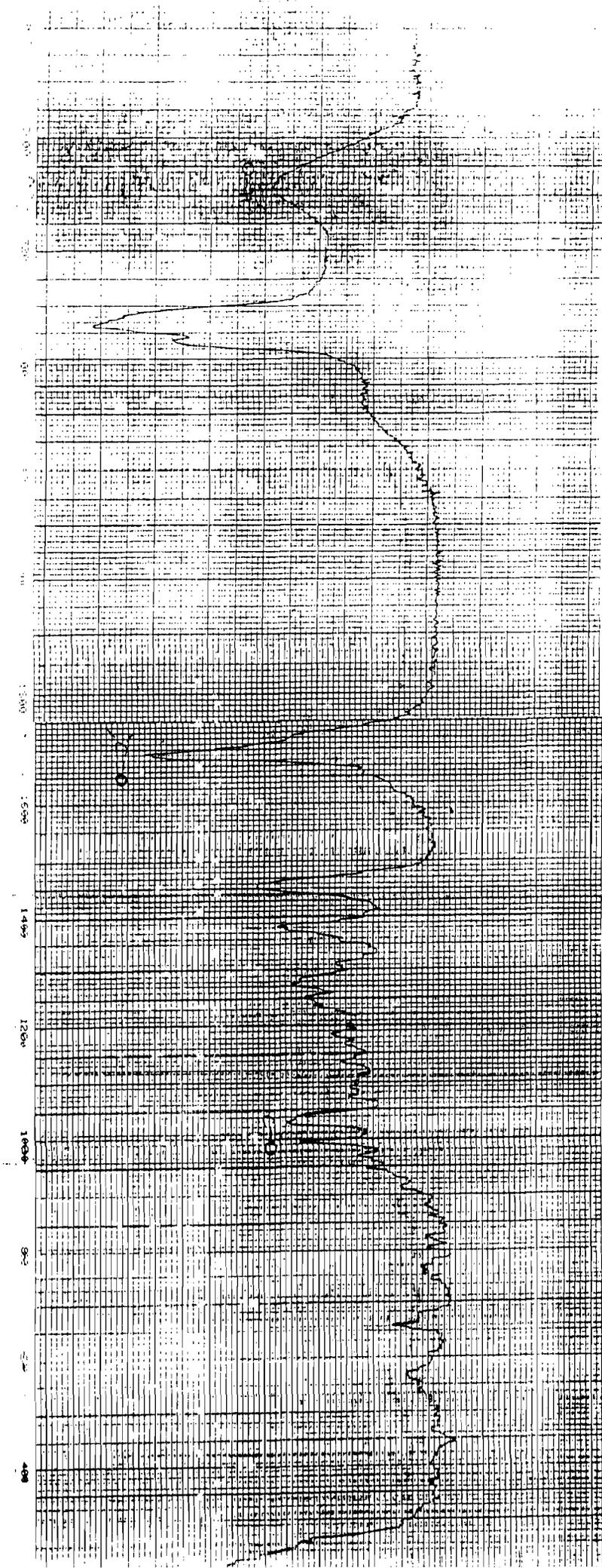
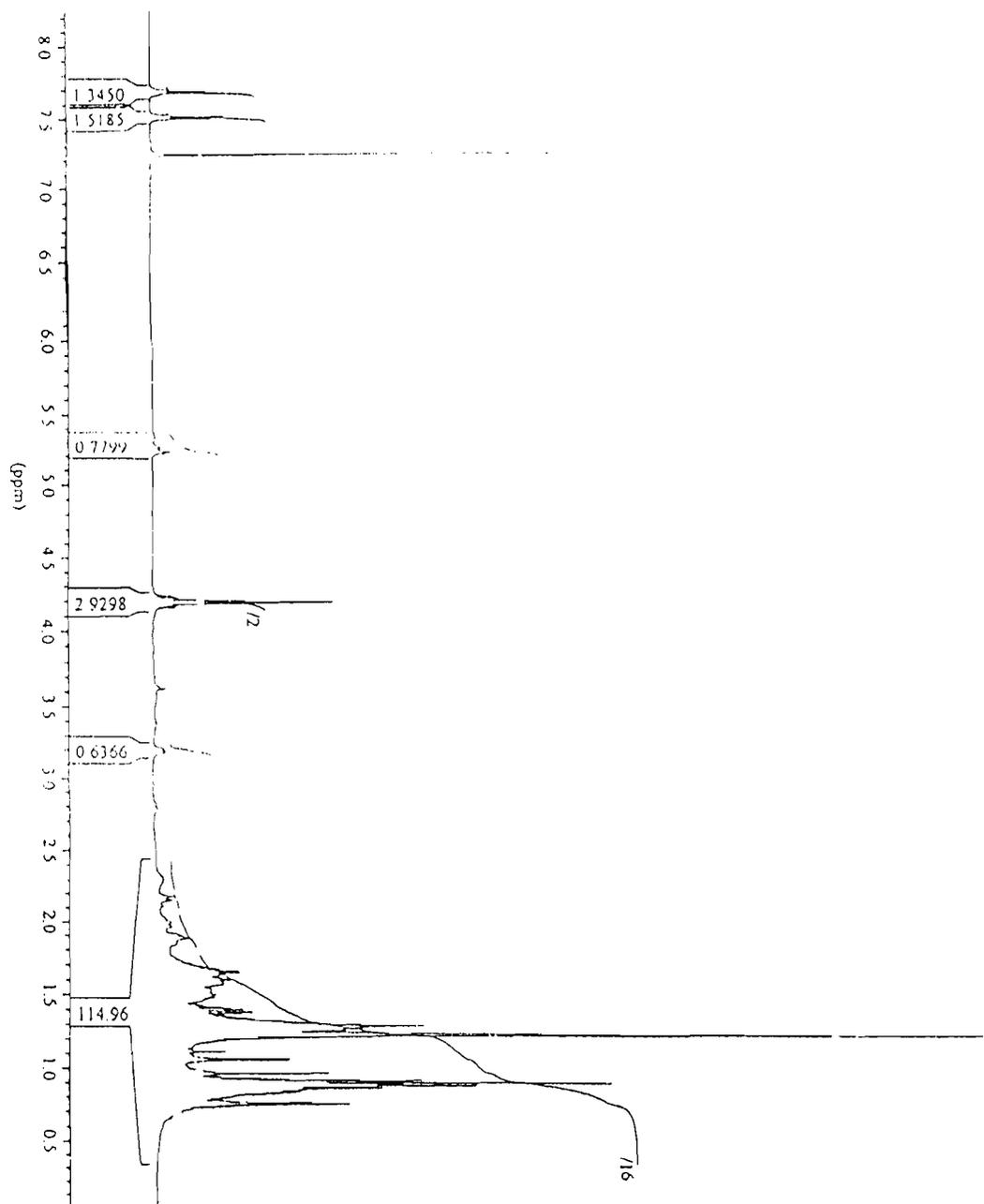


Figure 7 : Spectre RMN ¹H du composé 1



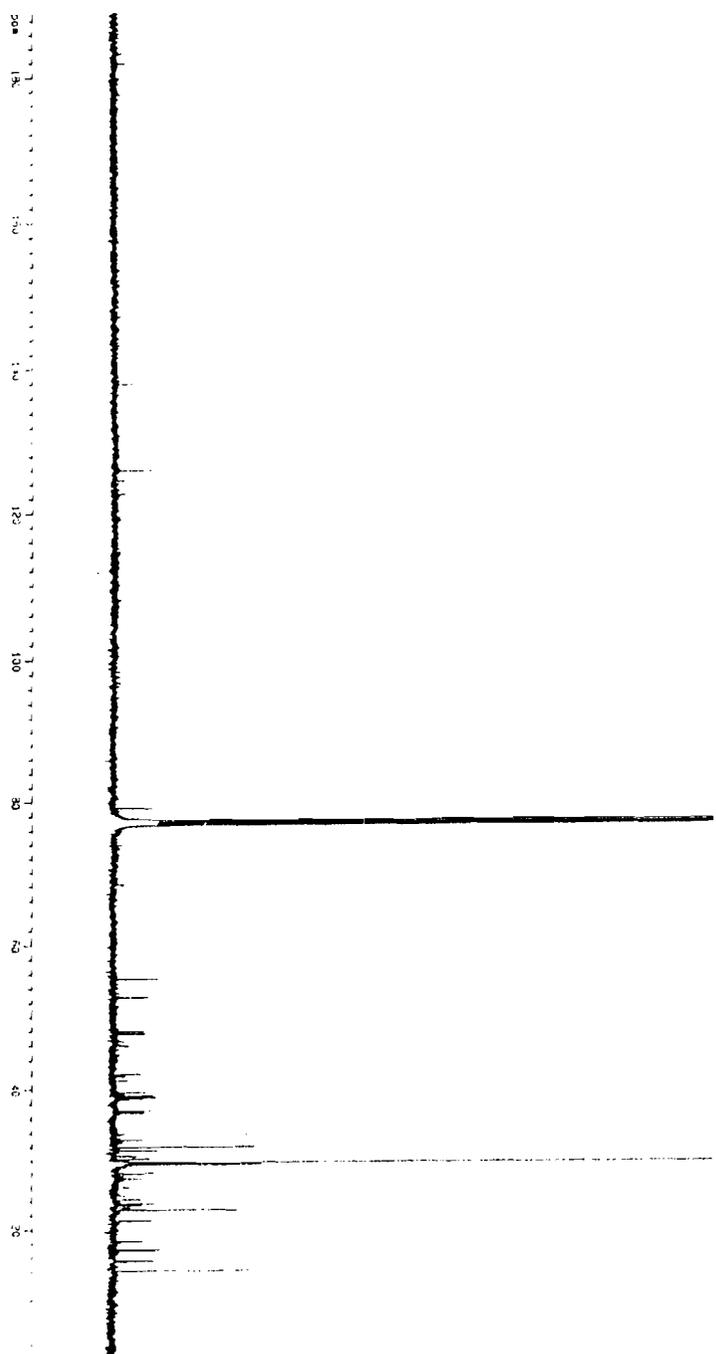


Figure 8 : Spectre RMN ¹³C (BB) du composé 1.

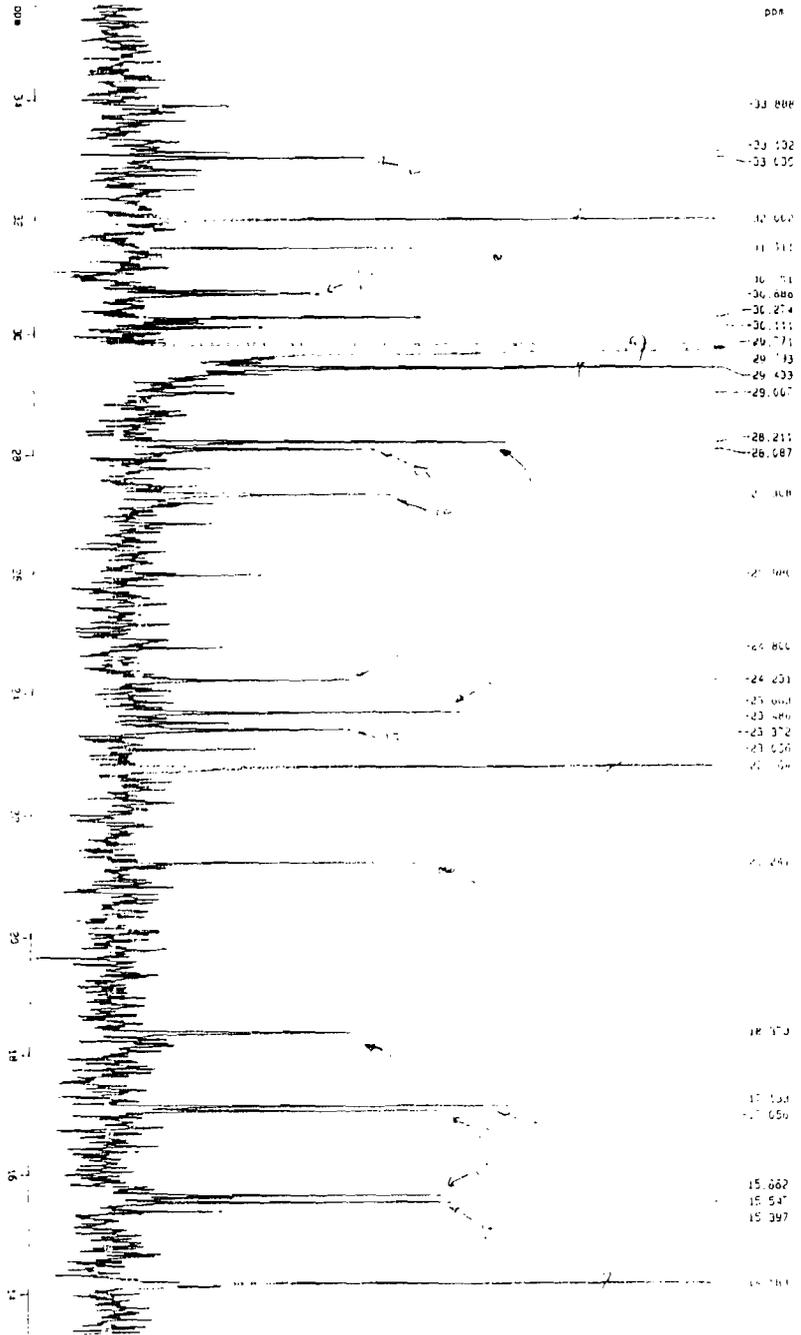


Figure 9 : Spectre RMN ¹³C (Étalement de la zone comprise entre 14 et 34 ppm).

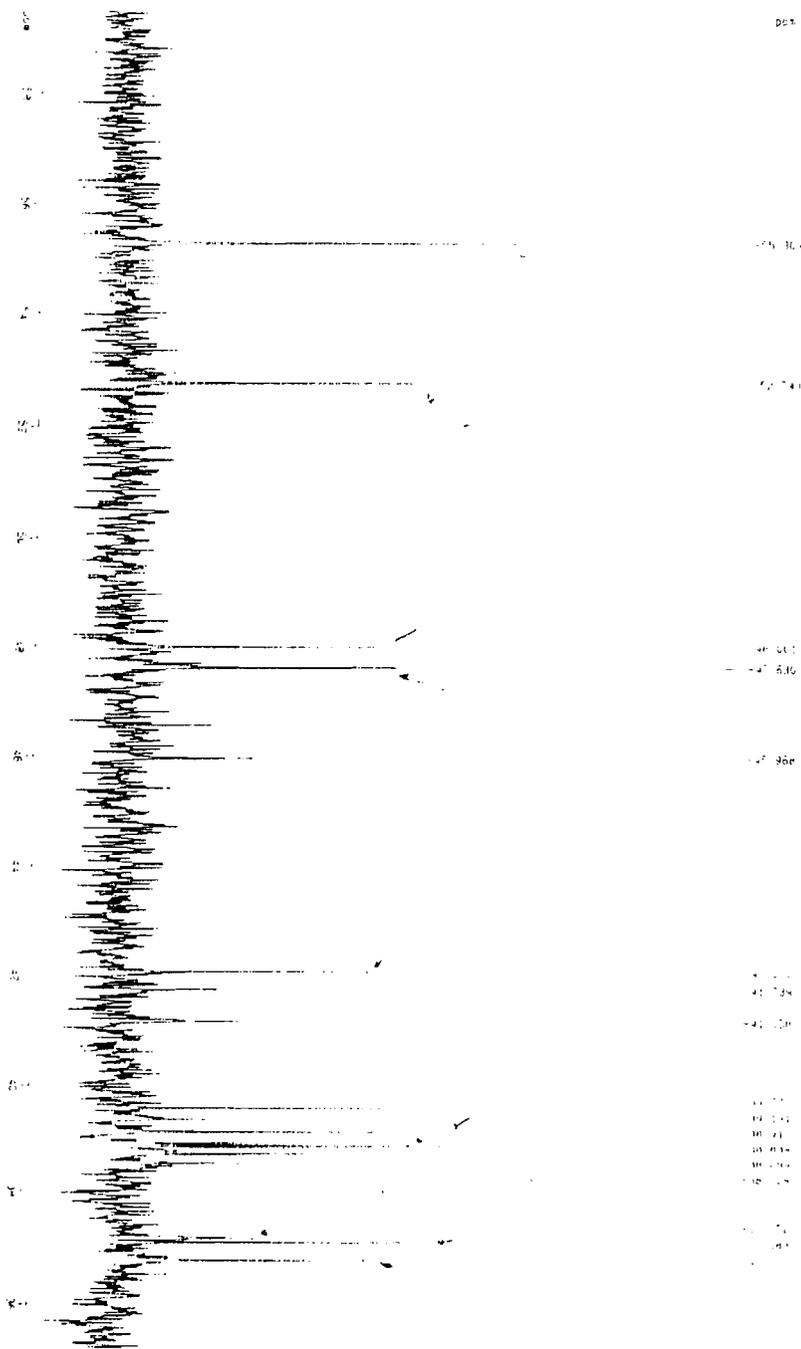


Figure 10 : Spectre RMN¹³ C (Etalement de la zone comprise entre 36 et 58 ppm).

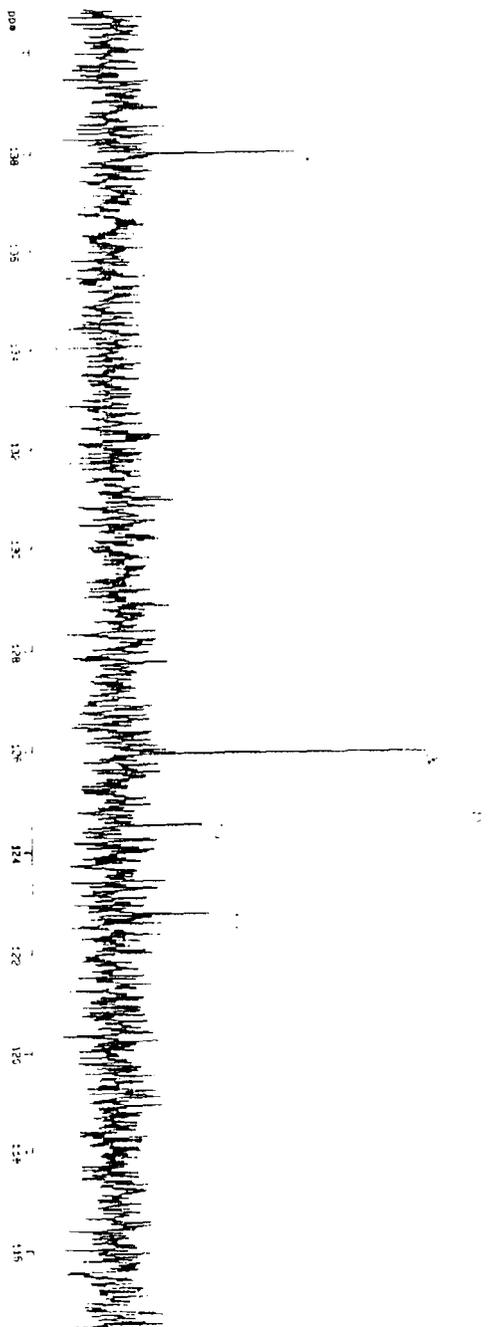


Figure 11 : Spectre RMN ^{13}C (Etallement de la zone comprise entre 118 et 144ppm).

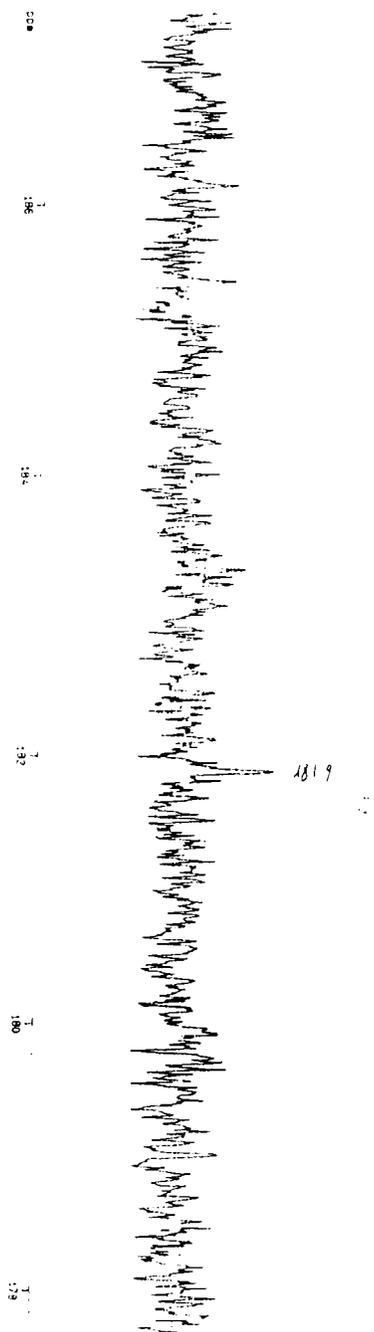


Figure 12 : Spectre RMN ¹³C (Étalement de la zone comprise entre 178 et 186 ppm).

Titre: FOURASTE/FABRE REF Mit1T (CHCl3) EI
Fichier: C:\ONYX\FICH\99050404 Date: 4/5/1999 Heure:10:23:53
DS=30 FS=699 DA=30 FA=530 N=0 S=0.00000 Fact[292->555]*16
Soy[20+21] Bp=43 Ib=0.3199 Net=00:00:37

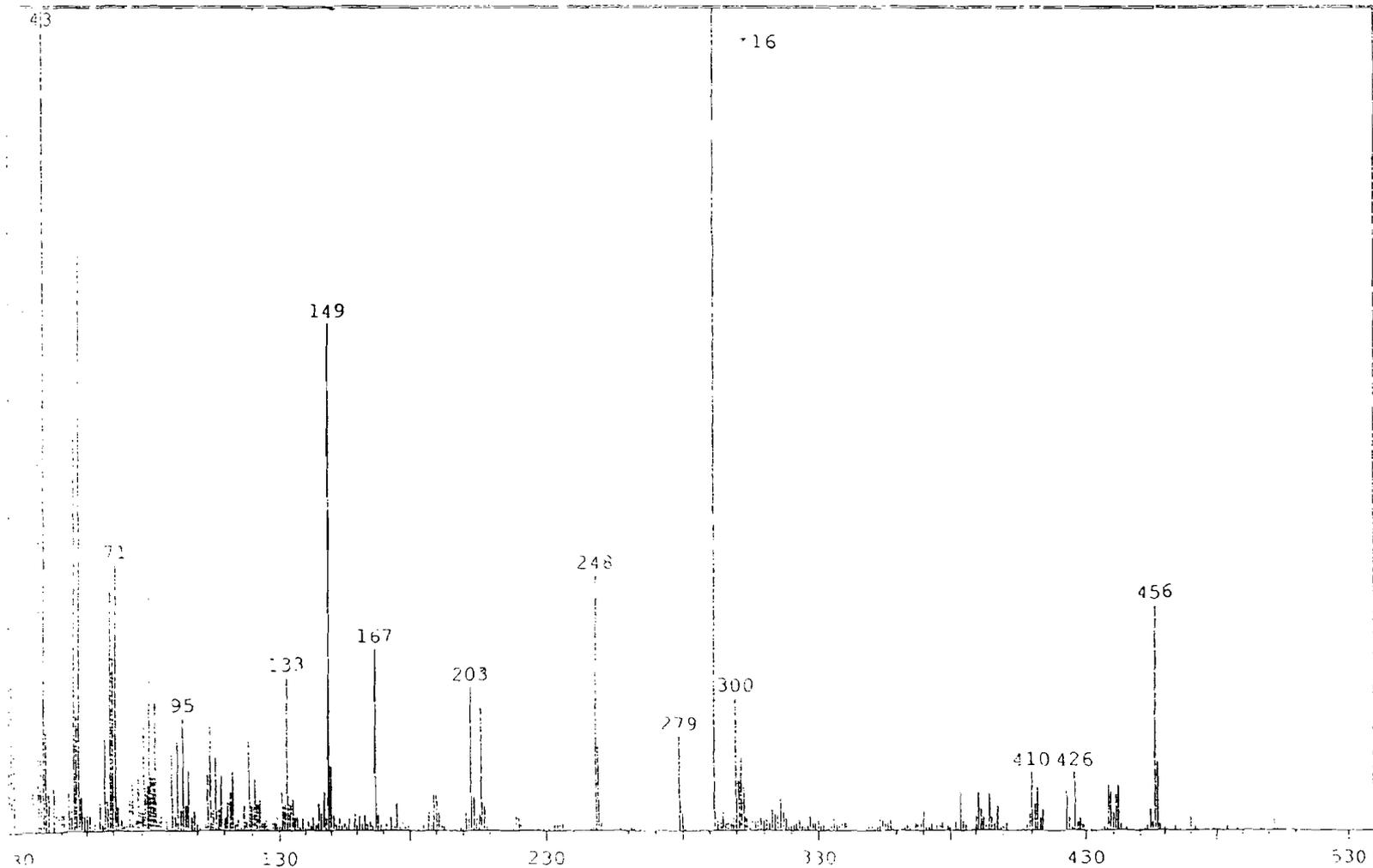


Figure 13 : Spectre de masse composé 1.

V-3.1 Spectrométrie UV- Visible

Ce spectre indique la présence d'un maximum situé à 244 nm (Figure 5).

V-3.2 Spectrométrie IR

Ce spectre (Figure 6) indique la présence de trois pics caractéristiques : à 1690cm^{-1} , à 1030cm^{-1} et à 3425cm^{-1} .

V-3.3. Spectrométrie RMN du ^1H

Le spectre RMN ^1H est présenté dans la figure 7.

On peut noter la présence d'un proton vinylique apparaissant sous forme d'un triplet centré à 5,25 ppm, ainsi que d'un multiplet centré à 3,2ppm.

Ce spectre présente également trois multiplets : le premier centré à 4,2 ppm, le deuxième centré à 7,5 ppm et le troisième centré à 7,7ppm. Cependant, l'intégration de ces protons nous laisse penser qu'il pourrait s'agir d'impuretés.

Le spectre comporte en outre sept méthyles résonnant entre 0,5 et 1,2 ppm.

V-3.4. Spectrométrie RMN ^{13}C .

Le spectre RMN ^{13}C obtenu en mode Broad Band (BB) est représenté par la figure 8.

Les figures 9, 10, 11 et 12 constituent des étalements de ce spectre.

Le spectre RMN ^{13}C BB présente 3 carbones caractéristiques; Le premier résonnant à 80 ppm, le deuxième à 126 ppm et le troisième à 138 ppm. On note également la présence d'un signal résonnant à 180 ppm, caractéristique d'un groupe carbonyle.

En ce qui concerne le spectre RMN ^{13}C DEPT on observe la présence d'un signal attribuable à un CH à 80 ppm et un CH vinylique caractéristique à 126 ppm.

V-3.5 Spectrométrie de masse.

Le spectre de masse du composé 1 (Figure 13), obtenu par impact électronique, présente un ion moléculaire à m/z 456.

Ce spectre présente deux fragments de base m/z 43 (100 %) et m/z 292. Deux fragments paraissent également caractéristiques à ce produit ; il s'agit des pics apparaissant à m/z 248 et m/z 203.

V.4 Interprétation des résultats et proposition d'une structure moléculaire.

V.4.1 La chromatographie sur couche mince

L'analyse par CCM de gel de silice G₆₀ F₂₅₄ indique après révélation avec l'acide sulfurique à 3 % dans l'éthanol, suivi du chauffage à 110° pendant 10 mn, la présence d'un spot de couleur violacée persistante. Ceci est en faveur de la présence d'un triterpène pentacyclique.

En effet dans les mêmes conditions, les triterpènes tétracycliques ainsi que les stéroïdes donnent une coloration violacée qui vire rapidement au bleu.

Le composé 1 chromatographié sur couche mince de gel de silice en utilisant le système S₁ se situe à une valeur R_F de 0,34.

Dans les mêmes conditions, des triterpènes pentacycliques tels que l' α -amyrine (composé 2) ou le lupéol (composé 3) se situent à une valeur R_F de 0,7.

La betuline, (composé 4), se situe, quant à elle, à une valeur R_F de 0,44.

Nous pouvons donc supposer que le composé 1 est probablement de nature triterpénique possédant dans sa structure, un nombre plus important de groupements polaires en comparaison avec les composés 2, 3 et 4.

Le composé 1 analysé par CCM de gel de silice G₆₀ F₂₅₄ en utilisant le système S₂ comme phase mobile donne également un spot de coloration violacée persistante mais se situant à une valeur R_F de 0,1. La présence d'ammoniaque dans la phase mobile entraîne, un ralentissement de la migration de la substance étudiée.

Ainsi, il est possible dès à présent, d'émettre l'hypothèse selon laquelle au moins une des fonctions polaires de la molécule en étude serait une fonction acide carboxylique (COOH).

De ce fait, la présence d'ammoniaque dans la phase mobile entraîne une ionisation de cette fonction ; ce qui conduit à des interactions plus importantes avec le gel de silice et une forte diminution du R_F.

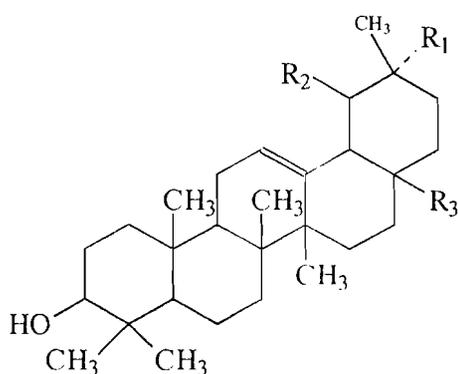


Figure14 : Structure de l' α -amyrine, de la β -amyrine de l'acide ursolique et de l'acide arjunolique :

Légende

α -amyrine: R₁ = H ; R₂ =CH₃ ; R₃ =CH₃ .

β -amyrine: R₁ =CH₃ ; R₂ =H ; R₃ = CH₃

acide ursolique : R₁ =H ; R₂ =CH₃ ; R₃ =CO₂H

acide arjunolique : R₁ =CH₃ ; R₂ =CH₃ et R₃ =CO₂H

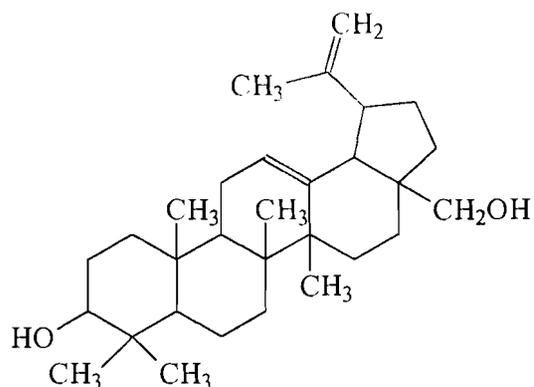


Figure15 : Structure du Bétulinol

V-4.2. Etude du spectre électronique

Le spectre électronique du composé 1 enregistré entre 200 et 600 nm présente une bande d'absorption à 244 nm. Elle pourrait facilement être attribuée à une fonction

comme c'est généralement le cas des triterpènes. On peut noter les particularités suivantes :

-Présence d'un triplet à 5,25 ppm qui semble confirmer l'existence d'un groupe éthylénique trisubstitué ; il peut être attribué à H₁₂.

-Présence d'un doublet à 2,2 ppm pouvant être attribué au proton tertiaire comme celui lié au carbone 18 soit H₁₈. En effet seul ce proton en α d'une double liaison est couplé à un seul proton , notamment celui lié à C₁₉.

- Dans la zone allant de 0,5 à 2,5 ppm , on distingue facilement 7 singulets attestant de la présence de 7 groupes méthyles .

En comparant les spectres ainsi décrits à celui de l' α -amyrine , il apparaît que le composé 1 est bien un triterpène, qui présente à la fois une fonction alcool , une fonction acide carboxylique, un groupe éthylénique et 7 groupes méthyles.

Le spectre ayant été enregistré entre 0 et 10 ppm, la résonance du proton acide n'a pas été mis en évidence.

Quant au proton de la fonction alcool , il pourrait bien être dans la partie complexe du spectre, entre 1 et 2,5 ppm. Le spectre du carbone 13 pourrait ainsi permettre d'identifier définitivement le composé 1.

V-4.5. Analyse du spectre RMN du carbone 13

Dans la série des triterpènes soupçonnés, seuls les acides ursolique et arjunolique sont dotés à la fois d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction alcool chacun. Ainsi la comparaison du spectre RMN du carbone 13 du composé 1 avec ceux des acides ursolique et arjunolique , a permis d'identifier ce composé comme étant l'acide ursolique. La similitude des spectres ne laisse aucun doute.

L'acide ursolique a en effet été étudié par S. B. Manato et al [25] et surtout par R. W. Kriwacki et al [24]. Ces derniers ont appliqué les techniques les plus éprouvées à l'élucidation de la structure de l'acide ursolique : RMN du proton , du carbone 13 à simple et double dimension, avec aussi bien l'utilisation des couplages hétéronucléaires que la séquence DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) Cette technique permet d'identifier les carbones de type CH₃, CH₂ , CH ou C, c'est-à-dire qu'elle permet de révéler le caractère primaire (CH₃), secondaire (CH₂) , tertiaire(CH) ou quaternaire des carbones du composé.

Tableau I : Les attributions des signaux du spectre RMN du carbone 13 réalisés.

Carbones	Attribution de R. W.Kriwacki et al [24]	Attribution de S. B. Mahato et al [25]	Nos résultats
C ₁	39,1	38,8	38,5
C ₂	28,1	27,31	27,31
C ₃	78,1	78,8	79,10
C ₄	39,5	38,8	38,8
C ₅	55,8	55,4	55,3
C ₆	18,8	18,4	18,4
C ₇	33,6	33,0	33,0
C ₈	40,0	39,6	39,6
C ₉	48,1	47,5	47,6
C ₁₀	37,3	37,0	37,0
C ₁₁	23,6	23,3	23,4
C ₁₂	125,5	125,7	125,9
C ₁₃	139,3	138,0	138,0
C ₁₄	42,5	42,0	42,1
C ₁₅	28,7	28,2	28,1
C ₁₆	24,9	24,3	24,3
C ₁₇	48,1	48,1	48,0
C ₁₈	53,6	52,8	52,7
C ₁₉	39,5	39,1	39,1
C ₂₀	39,4	38,8	38,9
C ₂₁	31,1	30,7	30,7
C ₂₂	37,5	36,8	36,8
C ₂₃	28,8	28,2	28,2
C ₂₄	16,5	15,5	15,5
C ₂₅	15,7	15,7	15,7
C ₂₆	17,5	16,9	17,1
C ₂₇	23,9	23,6	23,6
C ₂₈	179,8	–	181,9
C ₂₉	17,5	16,9	17,1
C ₃₀	21,4	21,2	21,2

NB :Les résultats de Manato et al ont été obtenus sur l'ester méthylique de l'acide ursolique

V-4.6. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse présente une fragmentation caractéristique du noyau ursane figure13.

Le pic moléculaire (M^+) est m/z 456 (1,76 %), ce qui correspond à la masse molaire attendue pour l'acide ursolique.

On observe aussi 3 fragments ayant respectivement une masse m/z de 248 (31,23 %), 203 (17,61 %) et 189 (5,04 %). Cette fragmentation est typique d'un rétro-Diels-Alder du noyau C. Le pic de base est obtenu à m/z 43 (100 %).

Pour une structure voisine tel que l' α -amyrine, le spectre de masse présente un fragment à m/z 218 qui correspond, dans l'acide ursolique, au fragment de valeur m/z 248. Ce fragment à m/z 248 est dû à la présence de la fonction COOH à la place du méthyle en position 28. Le composé 1 est bien l'acide ursolique.

La fragmentation du noyau A explique la présence d'un pic de base à m/z 43.

Nous pouvons donc confirmer que le composé 1 dérive du noyau ursane. L'ion moléculaire, à m/z 456 est celui de l'acide ursolique résultant de l'oxydation de l' α -amyrine au niveau du carbone 28.

Ce spectre de masse, déjà décrit par ailleurs par Kriwacki et al., permet de confirmer davantage les résultats obtenus.

Les fragments les plus significatifs sont illustrés dans le tableau II ci-dessous :

Tableau II : Principaux fragments identifiés du composé 1 en spectrométrie de masse.

Fragment	M/z	%
M^+	456	1,73
$C_{15}H_{23}$	203	17,69
$C_3H_7^+$	43	100



VI DISCUSSION

L'étude phytochimique menée sur les extraits de *Mitracarpus scaber* Zucc, en parallèle avec la recherche de l'activité pharmacologique a permis d'isoler une substance qui serait responsable de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber*.

L'étude spectrale que nous avons entreprise a permis d'identifier cette substance comme étant l'acide ursolique. A notre connaissance, c'est la première fois que l'acide ursolique est isolé de *Mitracarpus scaber*. Il en est de même pour l'activité antifongique de cette plante qui pourrait être due à la présence de l'acide ursolique.

Une étude phytochimique récente menée à partir de la plante fraîche a permis d'isoler l'harounoside comme étant la structure responsable de l'activité [19]. Cette étude a également montré que le séchage de la drogue conduisait à une dégradation de l'harounoside.

Notre travail a pu montrer que dans la drogue sèche, il existe d'autres substances, en l'occurrence l'acide ursolique qui aurait également une activité antifongique.

Ainsi, la présence de l'acide ursolique dans les parties aériennes de *Mitracarpus scaber* confirme l'utilisation traditionnelle de la drogue sèche.

En effet, en plus de l'activité anti-inflammatoire de l'acide ursolique relatée dans la littérature [35], l'association de ces deux activités biologiques est en faveur de l'efficacité thérapeutique de cette plante utilisée pour le traitement des teignes.

Des études complémentaires ayant trait à la galénique, aux essais cliniques et toxicologiques permettront de mettre au point un nouveau médicament antifongique à partir de *Mitracarpus scaber*.

Aussi, l'identification de l'acide ursolique permettra d'élaborer plus aisément les méthodes analytiques de contrôle de qualité du nouveau médicament.

De très nombreuses études ont déjà été réalisées sur les activités antibactériennes, anti-inflammatoires et antifongiques d'extraits isolés de *Mitracarpus scaber* [7,15,16,19,21,31,34,40]. Cependant, très peu d'entre elles font état de l'identification des molécules responsables de ces activités [16,19,31].

D'autre part, avant la purification par CCM préparative de la fraction F₃ obtenue par colonne, nous avons enregistré le spectre du proton de cette fraction; les spectres de

RMN du proton et du carbone 13 de F₃ nous a révélé la présence dans le mélange d'un composé aromatique.

En effet, le spectre RMN du proton présenté dans la figure 16 montre clairement deux multiplets caractéristiques d'un noyau phényle à 7,51 ppm et 7,69 ppm ainsi qu'un septuplet à 4,2 ppm.

De même, dans le spectre RMN du carbone 13 de cette fraction (figure 17), dans la zone comprise entre 100 et 140 ppm, on observe les signaux de ce composé aromatique, dont tout laisse à croire qu'il pourrait s'agir de l'azaanthraquinone [31].

Après purification par CCM préparative, les signaux de ce composé ont disparu et on n'obtient plus principalement que ceux de l'acide ursolique.

Cette constatation montre qu'il est possible d'isoler d'autres composés en affinant nos méthodes de travail.

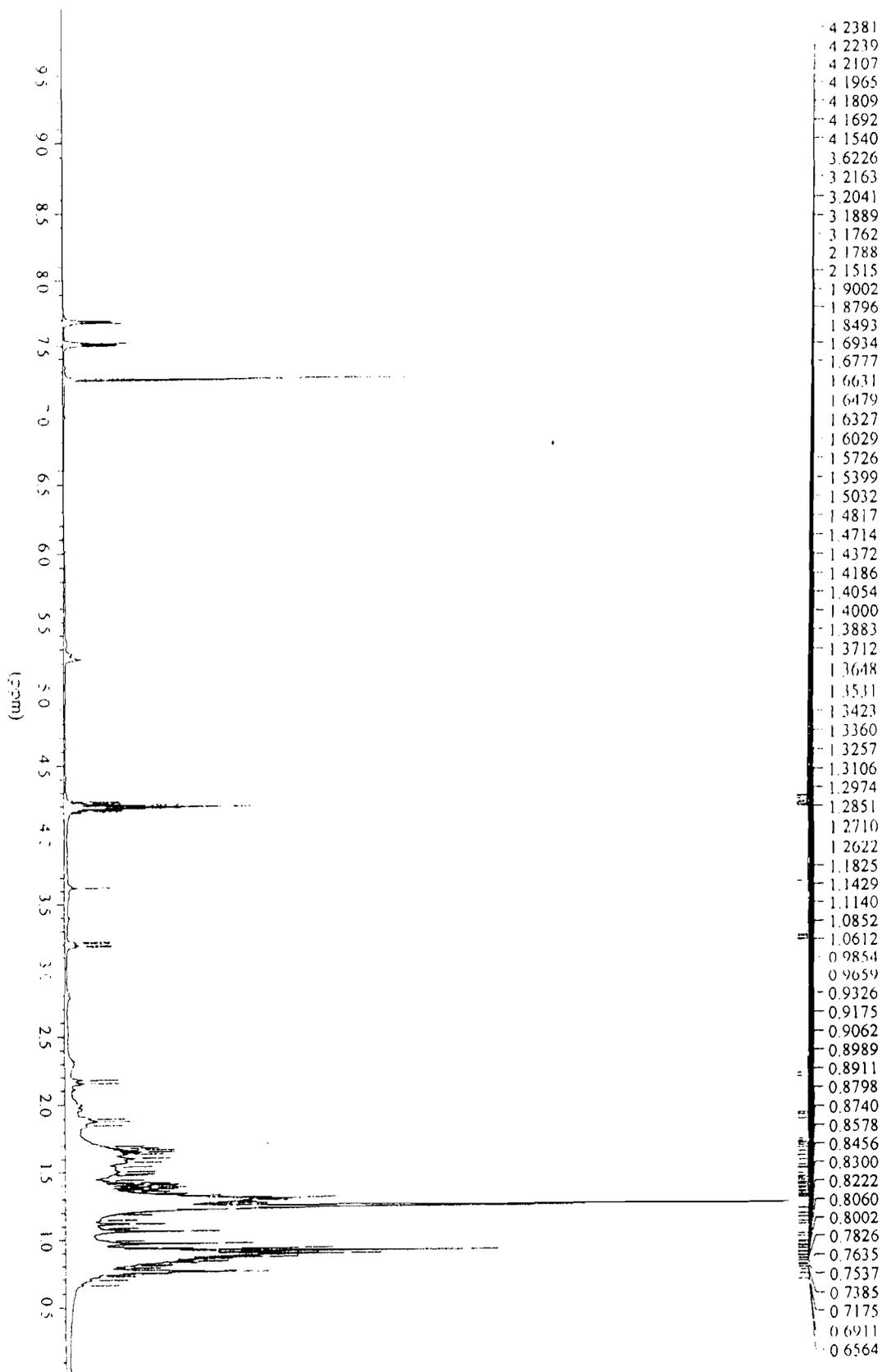


Figure 16 : Spectre RMN¹H du composé 1

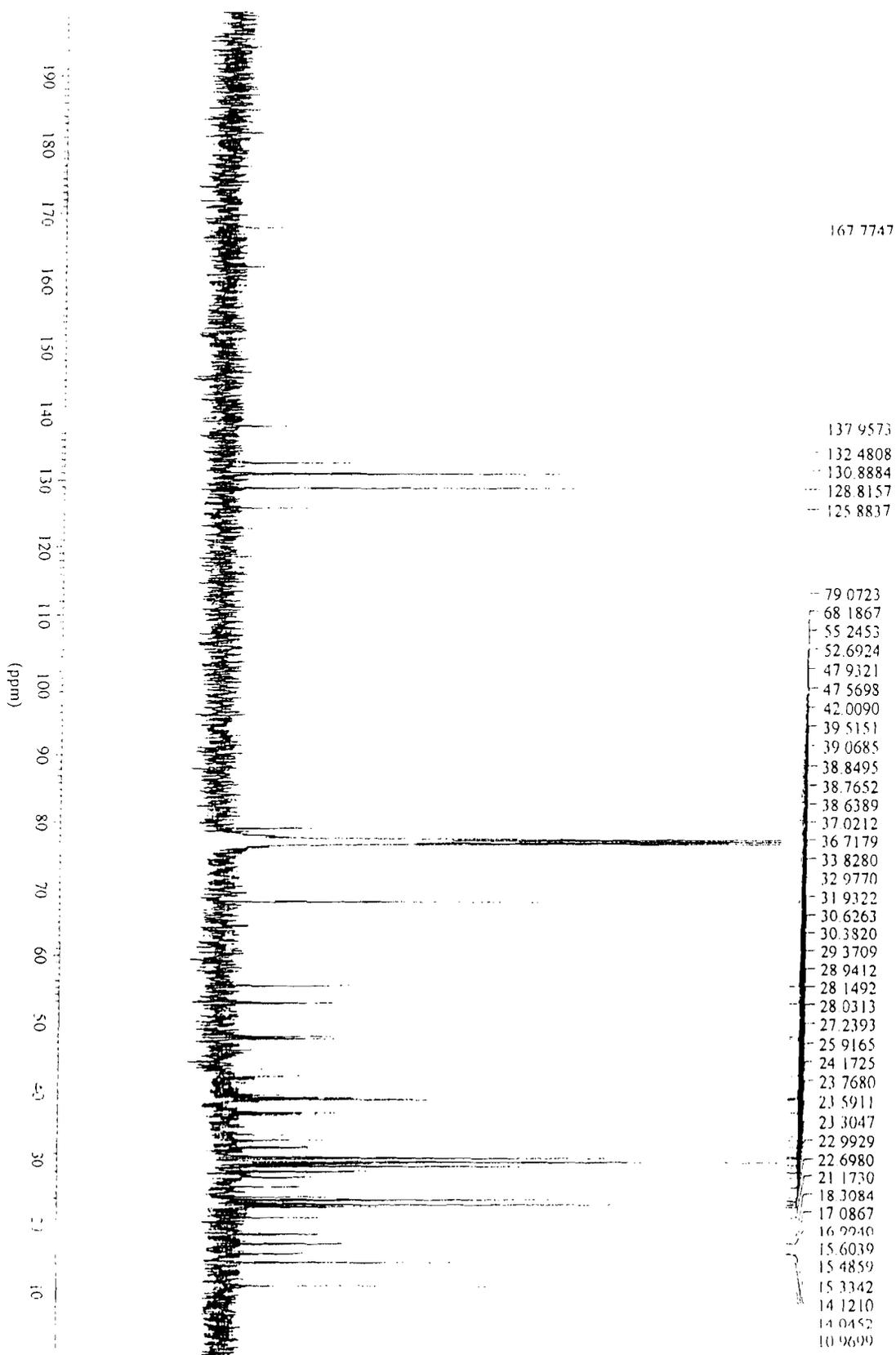


Figure 17 : Spectre RMN ¹³C du composé 1

Les triterpènes constituent des substances largement répandues dans la nature. Leur utilisation en thérapeutique reste cependant très restreinte mais il existe quelques spécialités à base de ces principes actifs (Madécassol^R). Des études récentes ont montré un regain d'intérêt à leur égard. Il a ainsi été démontré que ces molécules pourraient se révéler intéressantes dans le traitement de pathologies telles que les cancers, les affections virales, l'inflammation, etc [37,38,39,41].

A ce titre, l'acide bétulinique a montré une activité anti- VIH dont il bloque l'entrée au niveau des cellules cibles. Dans le même sens, la glycyrrhizine s'est révélée être un inhibiteur viral [41]. C'est pour cette raison qu'un volet important de la recherche sur l'identification de nouvelles molécules anti-VIH concerne les triterpènes.

La recherche que nous avons entreprise dans le cadre de ce travail montre bien qu'il est possible de mener dans un pays comme le Burkina, une étude complète sur l'identification de nouvelles molécules d'origine naturelle et d'intérêt thérapeutique.

Cela a été rendu possible grâce à une collaboration entre institutions de recherche à l'intérieur du Burkina et avec des partenaires extérieurs (Laboratoire de spectrométrie et de dynamique moléculaire de Marseille).

Cette collaboration est indispensable pour une meilleure valorisation de la médecine traditionnelle et la mise au point de médicaments modernes issus de la pharmacopée traditionnelle.

VII CONCLUSION ET SUGGESTIONS

L'étude phytochimique que nous avons entreprise au cours de ce travail a permis d'identifier un principe antifongique isolé de *Mitracarpus scaber*.

Le comportement chromatographique de cette substance ainsi que les données spectroscopiques de RMN et de masse ont permis de l'identifier comme étant l'acide ursolique.

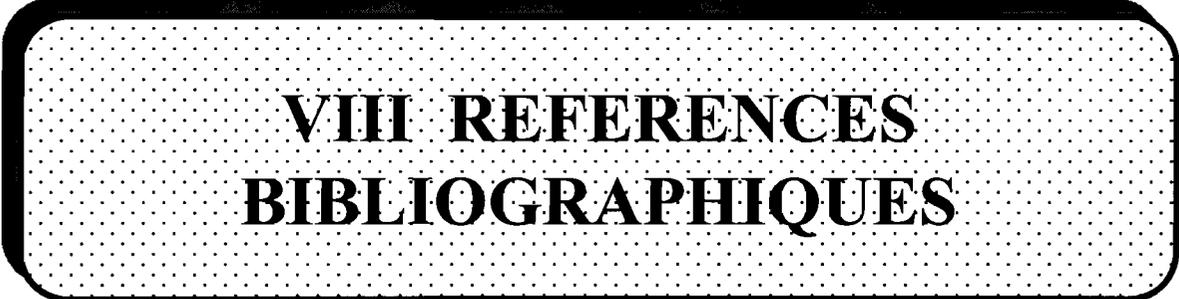
Le spectre RMN du proton a montré que l'acide ursolique était accompagné de traces d'acide arjunolique.

Nous avons montré que l'acide ursolique, un triterpène pentacyclique dont les propriétés anti-inflammatoires sont bien connues, est présente dans les feuilles sèches de *Mitracarpus scaber* et a aussi une activité antifongique.

Ceci pourrait ouvrir la voie à la mise au point d'un médicament antifongique dont la qualité pharmaceutique peut être contrôlée.

Aussi au terme de notre travail, nous suggérons que les recherches suivantes soient menées afin de permettre une exploitation thérapeutique des résultats ainsi obtenus :

- En ce qui concerne la pharmacologie, nous proposons qu'une étude de l'activité antifongique soit menée sur de l'acide ursolique de synthèse. Cela permettra de confirmer nos résultats et de juger de la part occupée par l'acide arjunolique dans l'activité antifongique de l'acide ursolique isolé de *Mitracarpus scaber*.
- Une étude concernant l'hémisynthèse d'antifongiques biologiquement plus actifs que l'acide ursolique. Cette étude peut commencer par des réactions simples comme l'acétylation de la fonction OH en 3 ou la méthylation de la fonction COOH en 28.
- En ce qui concerne les essais cliniques, nous proposons qu'une préparation dermatologique obtenue à partir d'un extrait apolaire de *Mitracarpus scaber* soit évaluée.



**VIII REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1- **Adjanohoun E.J., Adjakidje V., Ahyi M.R.A., Ake Assi L., Akoegninou A., D'Almeida J., Apovo F., Boukef K., Chadare M., Cusset G.**

Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République populaire du Bénin. Paris : ACCT, 1989 : 895

- 2- **Adjanohoun J.E., Aboubakar N., Dramane K., Ebot M.E., Ekpere J.A., Enow-Orock E. G., Focho D., Gbile Z. O., Kamanyi A., Kamsu Kom J., Keita A., Mbenkum T., Mbi C. N.**

Traditional Medicine and Pharmacopoeia : contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. CSTR.OUA 1996 :365

- 3- **Adjanohoun E. J., Floret J. J., Guinko S., Koumaré M., Ahyi M.R.A., Raynal J-L., Aké A. L.**

Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. 4^{ème} édition. Paris : ACCT 1986 : 20-64

- 4- **Adjanohoun E. J., Ahyi M.R.A, Ake A. L., Dan Dicko L., Daouda H., Delmas M., De Souza S. Garba M., Guinko S., Kayonga A., N'golo D., Raynal J-L., Saadou M.**

Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger. 2^{ème} édition. Paris : ACCT, 1985 : 142.

- 5- **Adjanohoun E.J., Ahyi M.R.A., Aké A. L., Akpagana K., Chibon P., El-Hadji A., Eyme J., Garba M., Gassita J-N., Gbeassor M., Goudote E., Guinko S., Hodouto K.-K., Houngnon P., Keita A., Keoula Y., Kluga-Ocloo W. P., Lo I., Siamevi K. M., Taffame K. K.**

Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. Paris : ACCT, 1986 : 671.

- 6- **Allinger cava, Johnson De Jongh, Lebel, Stevens.**
Mc Graw. Hill 1975-1976 : P7-115.
- 7- **Almagboul A. Z., Bashir A. K., Karim A., Shalih M.**
Antimicrobial activity of certain plants used in folkloric medicine. Screening for antifungal activity. *Fitotherapia* 1988, Vol. LIX n°5 : 393-396.
- 8- **Baoua M., Joël F., Bessière J. M.**
Essais phytochimiques préliminaires sur quelques plantes médicinales du Niger
plantes médicinales et phytothérapie 1976 ; tome x n°4 : 251-266
- 9- **Berhaut J.**
Flore du Sénégal. 2^{ème} édition. Dakar : Clairafrique, 1967 : 177-178.
- 10- **Bonga G. M., Vangha-Manda M., De Souza C., Guede – Guina F. R.**
Mise en évidence de phytostéroïdes antifongiques contre *cryptococcus neoformans*.
Revue Méd.Pharm. Afr. 1995 Vol 9, n°1 .
- 11- **Bruneton J.**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition, Paris : Technique et documentation, Lavoisier, 1993 : 915.
- 12- **Creswell J. C., Runquist O., Campbell M.**
Spectral analysis of organic compounds an introductory programmed text. 2nd edition Burgess 1972,328.
- 13- **De la Pradilla C-F.**
Les plantes médicinales contre douze parasitoses fréquentes. Ouagadougou IPA, 1980 : 64

14-- **De la Pradilla C-F.**

Des plantes qui nous ont guéris. Ouagadougou : petit séminaire de Pabré, 1982 : 208.

15- **Ekpendu T. O. E., Adesomoju A. A., Ekundayo O., Okogun J. I.**

Constituents of the volatile oil of *Mitracarpus scaber* Zucc. Flavour and Fragrance Journal 1993 ; Vol.8 : 269-271

16-**Ekpendu T. O. E., Adesomoju A. a., Akah B. A., Okogun J. I.**

Anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extracts. International journal of pharmacognosy. 1994 ; Vol 32, n°2 :191-196.

17- **Germain G., Mari R., Burnel D.**

Abrégé de chimie générale avec exercices et tests. 3^{ème} édition. Paris : Masson, 1985 : 285.

18- **Hamon M., Pellerin F., Guernet M., Mahuzier G.**

Abrégé de chimie analytique. Tome III. Méthodes spectrales et analyse organique 2^{ème} édition. Paris : Masson, 1990 : 266.

19- **Harouna H., Faure R., Elias R., Debrauwer L., Mahamane S., Balansard G., Boudon G.**

Harounoside a pentalongin hydroquinone diglycoside from *Mitracarpus scaber* Phytochemistry 1995 ; Vol. 39 : n°6 : 1483-1484.

20- **Irobi O. N., Daramola S. O.**

Antifungal activities of crude extracts of *Mitracarpus villosus* (Rubiaceae) Journal of ethnopharmacology. 1993 ; 40 : 137-140

21- Kambou Y. S. E.

Contribution à l'étude de l'activité antifongique de *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiaceae). Thèse Pharmacie, Université Ouagadougou, 1999, n°17 : 17-50

22-Kerharo J., Adam J-G.

La pharmacopée sénégalaise traditionnelle : plantes médicinales et toxiques. Paris : Vigot et frères, 1974 : 1019..

23-Kini F.

Etude qualitative d'extraction et de séparation de substances naturelles issues des plantes médicinales du Burkina Faso : cas de *Hyptis spicigera*. Lamiaceae. Thèse 3^{ème} cycle en chimie organique, option sciences naturelles. Ouagadougou. FAST (1993)

24 -Kriwacki W . R., Pitner T. P.

Current aspects of practical Two Dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy applications to structure elucidation. Pharmaceutical Research. 1989 : Vol 6, n 7 :531-554.

25- Mahato S. B., Nandy A. K.

¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids :Acompilation and some salient features..Phytochemistry.1994 :vol 37 ,n°6 :1517-1575.

26- Mahuzier G., Hamon M.

Abrégé de chimie analytique. Tome II. Méthodes de séparation. 2^{ème} édition. Paris : Masson, 1986 : 261.

27- Mobié M.,Bonga G. M.,Vangah-Manda M., De Souza C., Guede-Guina F. R.

Action antifongique d'une huile végétale sur *Trichophyton rubrum*
Revue Med Pharm.Afr.1997-1998 .vol.11-12 :185-192.

28- Nacoulma G. O.

Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles au Burkina Faso. Cas du plateau central. Tome II. Les Annexes. Doctorat es sciences naturelles. Université de Ouagadougou 1996 : 187-282.

29- Nikièma J-B.

Contribution à l'étude phytochimique et pharmacologique de *Leptadenia hastata*. Doctorat es sciences pharmaceutiques. Université Libre Bruxelles. 1997

30- Norman R., Olayiwola A., Audrey S. B.

Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'OMS. 1986, 64 (2) : 159-175.

31 –Okunade A. L. ,Clark A. M. Hufford C. D.,Oguntimein B. O.

Azaanthraquinone :An antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. Planta Medica.1999 : vol 65, n°5 :447-448.

32- Potapov V., Tatarintchik S.

Chimie organique. Moscou : MIR, 1981 : 519.

33- Pousset J-L.

Plantes médicinales africaines : utilisation pratique. Ellipses ACCT ; 1989 : 108-109

34- Rouessac E., Rouessac A.,

Analyse chimique : Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes. 2^{ème} édition Masson 1995 : 303.

35 –Sanogo R., Germano M .P., De Pasquale, Keita A. ,Bisignano G.

Selective antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* Zucc. Against *Candida* and *staphylococcus sp*. Phytomedicine.1996 : vol 2,n°3 :265-268

- 36- **Silverstein R. M., Bassier C. G., Terrence C. M.**
Spectrométric identification of organic compounds 4th edition John Wiley & Sons
19 : 181-310
- 37- **Singh S. et al**
Anti - inflammatory activity of lupeol. *Fitoterapia*. 1997 : Vol 68, n°1 : 9-16
- 38- **Toshihiro A., et al**
Triterpene alcohols from the flower of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, 1996 : vol 43, n°6 : 1255-1260
- 39- **Toshihiro F., et al**
Anti-aids agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products* : 1994, vol 57 n°2 : 243-247.
- 40- **Yaméogo A.M.**
(1827) Rubiaceae. Thèse pharmacie, université Dakar Contribution à l'étude d'une plante spontanée sénégalaise utilisée en médecine traditionnelle locale, *Mitracarpus scaber* Zucc, 1982 n° 29 :5-22.-
- 41- **Vlietinck A.J., De Bruyne T., Apers S., Pieters L.A.**
Plant. Derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) Infection. *Planta medica* : 1998, 64 : 97-109.

RESUME

Mitracarpus Scaber est une plante de 10 – 30 cm de haut, commune à toute l'Afrique intertropicale. Elle est utilisée traditionnellement au Burkina Faso pour le traitement des mycoses. Une étude menée récemment a permis d'isoler un triterpène ou un stéroïde comme étant responsable de l'activité antifongique .

Nous avons isolé et identifié par des méthodes de fractionnement et de spectrométrie d'UV, d'IR, de RMN, de masse la substance antifongique appelée composé 1.

La CCM a mis en évidence un triterpène pentacyclique dont la structure a été élucidée avec l'étude des spectres IR, UV, RMN ^1H , ^{13}C . Le spectre du proton du composé 1 a un groupement OH, un groupement COOH et 7 CH_3 .

Le spectre ^{13}C a permis de faire les différentes attributions des carbones du composé 1. Le pic moléculaire du spectre de masse situé à m/z 456 et son pic de base à m/z 43, nous a permis de conclure que le composé 1 est l'acide ursolique.

Nous avons ainsi isolé et identifié l'acide ursolique des parties aériennes de *Mitracarpus scaber* Zucc. L'acide ursolique est un triterpène pentacyclique ayant une activité anti-inflammatoire et anti - bactérienne reconnue. Cette nouvelle activité antifongique, si elle est confirmée pourrait justifier l'usage traditionnel de cette plante.

SUMMARY

Mitracarpus scaber is an annual plant used in Burkina Faso and in African traditional medicine for its antifungal and antiparasite activities.

Recently, a triterpene was isolated from the dry aerial parts of this plant and could be responsible for antifungal activity.

In our study, antifungal substance (compound 1 : C₁) was analysed by spectrometric methods :UV, IR, NMR and mass spectra with the intention to determine its structure.

The results of TLC of C₁ seem to be TLC results of acids triterpenes as ursolic acid and arjunolic acid. IR spectra showed an OH and COOH groupings.

NMR ¹³C and ¹H allowed to identify C₁ as ursolic acid.

The identity of compound 1 was confirmed by EI mass spectrum which displayed a molecular ion associated peak at m/z 456.

So, our study allowed to identify ursolic acid as an antifungal substance from *Mitracarpus scaber*.

Complementary studies will permit to create an antifungal drug which can be analysed in laboratory.

Key words : *Mitracarpus scaber*, Rubiaceae, NMR ¹H and ¹³C spectrometry, ursolic acid, antifungal.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples:

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accorde leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Titre : Contribution à l'étude structurale d'un principe antifongique isolé de *Mitracarpus scaber* Zucc. (Rubiaceae).

RESUME

Mitracarpus scaber est une plante herbacée de 10 – 30 cm de haut. Elle est connue dans toute l'Afrique intertropicale et est utilisée traditionnellement au Burkina Faso pour le traitement des mycoses superficielles.

Une étude phytochimique récente a permis d'isoler un triterpénoïde comme pouvant être responsable de l'activité antifongique de la drogue sèche.

Au cours de la présente étude, cette substance a été analysée par CCM et par des méthodes spectrométriques telles que l'UV, l'IR, la RMN et la masse.

Ces analyses avaient pour objectif de proposer une structure chimique à cette substance antifongique (composé 1)

Le comportement chromatographique du composé 1 sur gel de silice G₆₀F₂₅₄ est proche de celui des triterpènes acides comme l'acide ursolique et l'acide arjunolique.

La présence d'une fonction acide dans la structure du composé 1 a été confirmée par le spectre IR qui indique clairement la présence d'un OH secondaire.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont permis d'identifier le composé 1 comme étant l'acide ursolique. Les différentes attributions ont été ensuite effectuées et sont en conformité avec les données de la littérature.

L'ion moléculaire du spectre de masse est situé à m/z 456. On note la présence d'un pic de base à m/z 43 ; ce qui confirme les données fournies par la spectrométrie RMN ¹H et ¹³C

Ainsi notre étude a permis d'identifier l'acide ursolique comme étant une substance antifongique majeure de *Mitracarpus scaber*.

A notre connaissance, c'est la première fois que l'acide ursolique est isolée de la drogue sèche de *Mitracarpus scaber*.

Des études complémentaires permettront de mettre au point une préparation antifongique dont la qualité pharmaceutique peut être contrôlée.

Mots clés : *Mitracarpus scaber*, Rubiaceae, Spectrométrie RMN¹H, ¹³C, Acide ursolique, Antifongique