

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

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

UNITE DE RECHERCHE DE FORMATION
DOCTORALE EN CHIMIE ET APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

POSTGRADUATE SCHOOL OF SCIENCE,
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES

DOCTORAL RESEARCH UNIT IN CHEMISTRY AND

APPLICATIONS

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

LABORATOIRE DES SUBSTANCES NATURELLES ET DE SYNTHÈSE
ORGANIQUE APPLIQUÉE

LABORATORY OF NATURAL PRODUCTS AND APPLIED ORGANIC SYNTHESIS

(LANAPOS)

Diversité Chimique et Activité Cytotoxique de *Stipularia africana* (Rubiaceae)

Mémoire présenté et soutenu publiquement en accomplissement partiel en vue de l'obtention
du diplôme de master de chimie organique

Par :

NOBE DJIE Kevine Blondelle

Matricule : 19G2163

Licenciée en Chimie



Sous la codirection de :

Dr FEUDJOU FOUATIO William

Chargé de Recherche, IMPM, MINRESI

Dr TSAMO TONTSA Armelle

Chargée de Cours, UYI

Année académique : 2023-2024

SOMMAIRE

SOMMAIRE	i
DEDICACES	iv
REMERCIEMENTS	v
ABREVIATIONS ET SYMBOLES	vii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SCHEMAS.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
RESUME.....	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
I.1.Généralités sur la famille des <i>Rubiaceae</i>	5
I.1.1. Classification des <i>Rubiaceae</i>	5
I.1.2. Répartition géographique des <i>Rubiaceae</i>	6
I.1.3. Intérêt économique et utilisation traditionnelle	6
I.2. Le Genre <i>Stipularia</i>	7
I.2.1. Caractères morphologiques des espèces du genre	7
I.2.2. Répartition des espèces du genre en Afrique.....	7
I.3. L'espèce <i>Stipularia africana</i>	8
I.3.1. Aperçu botanique.....	8
I.3.2. Position systématique de l'espèce <i>Stipularia africana</i>	10
I.3.3. Répartition géographique de l'espèce <i>Stipularia africana</i> au Cameroun.....	11
I.3.4. Usages de <i>Stipularia africana</i>	11
I.4. Travaux antérieurs sur les Rubiaceae.....	12
I.4.1. Travaux chimiques antérieurs.....	12

I.4.1.1. Généralités sur les alcaloïdes	12
I.4.1.2. Biosynthèse des alcaloïdes aporphiniques	17
I.4.1.3. Détermination structurale des alcaloïdes aporphiniques.....	18
I.4.1.4. Quelques alcaloïdes aporphiniques isolés de quelques espèces végétales.....	22
I.4.1.5. Composés non alcaloïdiques isolés des espèces de la famille des <i>Rubiaceae</i> .	22
I.4.2. Travaux pharmacologiques antérieurs sur les <i>Rubiaceae</i>	25
I.4.2.1. Potentiel cytotoxique des alcaloïdes aporphiniques isolés des espèces végétales	25
I.4.2.2. Autres activités pharmacologiques des alcaloïdes aporphiniques des <i>Rubiaceae</i>	26
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	28
II.1. Extraction et fractionnement.....	29
II.1.2. Extraction du matériel végétal.....	29
II.1.3. Fractionnement de l'extrait brut	29
II.2. Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits	30
II.2.1. Méthodes utilisées et lignées cellulaires	30
II.2.2. Critères de l'évaluation de l'activité cytotoxique.....	30
II.2.3. Résultats des tests cytotoxiques	30
II.3. Isolement et identification structurale des composés isolés.....	31
II.3.1. Isolement des composés	31
II.3.2. Identification des composés	31
II.3.2.1. Identification du composé SA.11	31
II.3.2.2. Identification du composé SA.12	33
II.3.2.3. Identification du composé SA.13	40
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	48
CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE	49
III.1. Récolte et identification du matériel végétal	50
III.2. Appareillages et matériels	50

Extraction de la poudre de <i>Stipularia africana</i>	51
III.4. Fractionnement de l'extrait brut par traitement alcaloïdique	52
III.5. Isolement et purification des composés	52
III.6. Evaluation de l'activité cytotoxique	55
III.7. Caractéristiques physico-chimiques des composés isolés	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	59

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents : **Joseph KONTCHOU** et **Philomène KENKOUO**,

Mon grand frère : **William Mathieu TEKEU**,

Mes autres frères et Ma sœur.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Je souhaite tout particulièrement adresser ma gratitude :

- **Au Professeur Emmanuel Dieudonné PEGNYEMB**, Chef du Département de Chimie Organique, pour son dynamisme, son dévouement et son engagement envers la bonne marche du département malgré ses multiples responsabilités.

- **Au Professeur Ephrem Augustin NKENGFAK**, pour ses enseignements d'une grande richesse, sa rigueur scientifique, et la solide équipe de recherche du LANAPOS qu'il a bâtie, au sein de laquelle j'ai eu le privilège de mener mes travaux de Master II.

- **Au Professeur Pierre MKOUNGA**, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et pour son appui inestimable qui m'a permis de mener à bien mes travaux. Je vous exprime ma profonde gratitude.

- **À mon superviseur de mémoire, le Dr Armelle TSAMO TONTSA**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce mémoire. Je lui suis profondément reconnaissante pour sa disponibilité, sa confiance, et ses précieux conseils tout au long de ce parcours.

- **À mon directeur de mémoire, le Dr William FEUDJOU FOUATIO**, Chargé de Recherche au Ministère de la Recherche Scientifique et de l'innovation, pour son encadrement rigoureux et ses conseils avisés. Je vous suis infiniment reconnaissante pour le temps et l'attention que vous m'avez accordés.

- **Aux Professeurs Carine MVOT AKAK et Blandine OUAHOUE**, pour leurs conseils et leur soutien bienveillant.

- **Au Professeur Jean Paul DZOYEM**, du Département de Biochimie de l'Université de Dschang, pour avoir réalisé les tests cytotoxiques des extraits décrits dans ce mémoire.

- **Au Dr Aristide MFIFEN MUNVERA**, pour son aide précieuse dans la collecte du matériel végétal et son accompagnement constant.

- **Au Dr Pamela NANGMO KEMDA**, pour ses conseils éclairés qui ont grandement contribué à structurer ce travail.

- **Au Dr Julio PAGNA**, pour son soutien moral, ses conseils avisés, et sa disponibilité durant les moments les plus difficiles de ce projet.

Mes remerciements s'adressent également à :

- **M. Paul MBARGA et Mme. Beauvarine KOUCHELE**, pour leur accueil chaleureux, leurs orientations et les connaissances pratiques qu'ils m'ont transmises.
- **M. Martial Lamère LITCHANG**, pour ses conseils méthodologiques et son aide précieuse dans l'analyse des données chimiques.
- **Mes aînés de laboratoire**, notamment **M. Kizerbo TAIZOUMBE**, **Mme Larissa KAMTCHOUM**, **Mme Clarisse LIBOMANE**, **Mme Christelle TOUKAM**, et **M. Boubakri Kosma**, pour leur soutien indéfectible et leur esprit de solidarité.
- **M. Espoir DAKSANA**, pour son infaillible disponibilité, ses multiples enseignements pratiques et théoriques, ainsi que son aide dans l'utilisation des logiciels d'analyse et de traitement de données.
- **M. Oscar BILONG**, pour son soutien constant et son assistance précieuse.

Je n'oublie pas :

- **Mes camarades de laboratoire**, en particulier **Oumarou Moubarak**, **Soumeya MFANGAM**, **Armel TCHOYI**, **Varelle NZOGOUMG**, **Junior ASSOUMOU**, **Junior BOUMTJE**, **Didier DJOSSU**, **Lesly NGEUMO**, **Glwadys JOUMESSI**, **Elvine SOUKOUDJOU**, **Larissa MBOGBA**, **Accange MEKIAGE** et **Rolande NGONO**, pour leur soutien, leur générosité et les bons moments partagés.
- **Mes camarades de promotion** et plus spécifiquement mes amis du LECEPLAM, pour leur esprit de collaboration et leur aide précieuse durant les moments difficiles.
- **Mes amis Rostand TANKOU et Cyriac KAMALEU**, pour leur soutien constant et leurs encouragements sur tous les plans.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour leur amour, leur soutien indéfectible et leurs encouragements tout au long de ce projet. Une pensée spéciale va à mes grands-mères, mes tantes, et mes cousins et cousines, notamment **Charlotte MOGA** et **Didiane SIELINOU**, pour leur présence bienveillante.

À tous, merci infiniment.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

- °C : Degré Celsius
- ^{13}C : Carbone 13
- **AcOEt** : Acétate d'éthyle
- **APG** : *Angiosperms Phylogeny Groups*
- **CC** : Chromatographie sur colonne
- **CCK-8** : *Cell Counting Kit-8*
- **CCM** : Chromatographie sur couche mince
- **CDCl_3** : Chloroforme deutéré
- **CI_{50}** : Concentration inhibitrice médiane (50%)
- **COSY** : *Correlation Spectroscopy*
- **d** : Doublet
- **DCM** : Dichlorométhane
- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- **dd** : Doublet dédoublé
- **ESI** : *ElectroSpray Ionisation*
- **Hex** : Hexane
- **HMBC** : *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*
- **HNC** : Herbier National du Cameroun
- **HSQC** : *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
- **Hz** : Hertz
- **IR** : Infrarouge
- **J** : Constante de couplage
- **LECEPLAM** : Laboratoire d'Etudes Chimique des Endophytes et des Plantes Médicinales
- **m** : Multiplet
- **m/z** : Rapport masse/charge
- **MeOH** : Méthanol
- **MTT** : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
- **PBS** : *Phosphate Buffered Saline*
- **ppm** : Partie par million

- **RMN ^{13}C** : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
- **RMN 1D** : Résonance Magnétique Nucléaire à une dimension
- **RMN ^1H** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton
- **RMN 2D** : Résonance Magnétique Nucléaire à deux dimensions
- **s** : Singulet
- **SA** : *Stipularia africana*
- **UV** : Ultra-violet
- **δ** : Déplacement chimique

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Stipularia africana</i> récolté à Tibati /Ngaoundéré (Source : Photo Moubarak, 2023)	8
Figure 2 : Feuilles de <i>Stipularia africana</i> récoltées à Tibati /Ngaoundéré (Source : Photo Moubarak., 2023)	9
Figure 3 : Fleurs de <i>Stipularia africana</i> récoltées à Tibati /Ngaoundéré (Source : Photo Moubarak., 2023)	9
Figure 4 : Fruits de <i>Stipularia africana</i> récoltées à Tibati /Ngaoundéré (Source : Photo Moubarak, 2023)	10
Figure 5 : Répartition géographique de <i>Stipularia africana</i> au Cameroun	11
Figure 6 : Structures de quelques alcaloïdes isoquinoléiques	17
Figure 7 : Structures de quelques alcaloïdes aporphiniques isolés de différentes espèces végétales.	22
Figure 8 : Structures de quelques alcaloïdes aporphiniques doués de propriétés cytotoxiques.	25
Figure 9 : Spectre de RMN ^1H (CDCl_3, 400 MHz) élargi du composé SA.11	32
Figure 10 : Spectre de masse HRESI-TOF du composé SA.12	34
Figure 11 : Spectre UV du composé SA.12	34
Figure 12 : Spectre de RMN ^{13}C (CDCl_3, 100 MHz) du composé SA.12	35
Figure 13 : Spectre HSQC élargi du composé SA.12	36
Figure 14 : Spectre de RMN ^1H (CDCl_3, 400 MHz) du composé SA.12	37
Figure 15 : Spectre COSY élargi du composé SA.12	38
Figure 16 : Spectre HMBC élargi du composé SA.12	38
Figure 17 : Spectre de masse HRESI-TOF du composé SA.13	41
Figure 18 : Spectre UV du composé SA.13	41
Figure 19 : Spectres comparatifs de RMN ^1H (CDCl_3, 400 MHz) des composés SA.13 et SA.12	43
Figure 20 : Spectre HSQC élargi du composé SA.13	43
Figure 21 : Spectre COSY (CDCl_3, 400 MHz) élargi du composé SA.13	44
Figure 22 : Spectre HMBC élargi du composé SA.13	45

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Biosynthèse des alcaloïdes aporphiniques	18
Schéma 2 : Voie de fragmentation proposée pour la perte d'une molécule d'amine (RNH ₂)	19
Schéma 3 : Voie de fragmentation proposée pour la perte de CH ₃ OH.....	19
Schéma 4 : Voie de fragmentation proposée pour la perte d'un CH ₂ O suivit d'un CO..	20
Schéma 5 : Protocole du traitement alcaloïdique de l'extrait brut.....	29
Schéma 6 : Protocole d'isolement des composés de la fraction alcaloïdique au dichlorométhane de <i>Stipularia africana</i>	31
Schéma 7 : Mécanisme probable de fragmentation du composé SA.12.....	34
Schéma 8 : Corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC du composé SA.12	39
Schéma 9 : Corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC du composé SA.13	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification systématique des Rubiaceae	6
Tableau 2 : Répartition géographique du genre <i>Stipularia</i> en Afrique.....	8
Tableau 3 : Position systématique de l'espèce <i>Stipularia africana</i>	10
Tableau 4 : Structures de base des alcaloïdes vrais et leurs principaux acides aminés précurseurs	13
Tableau 5 : Classification et structures représentatives des principales classes d'alcaloïdes vrais	15
Tableau 6 : Quelques composés non alcaloïdiques isolés de la famille des <i>Rubiaceae</i>	23
Tableau 7 : Quelques alcaloïdes aporphiniques doués d'activités antibactérienne et antiplasmodiale.....	26
Tableau 8 : Critères de l'évaluation de l'activité cytotoxique.....	30
Tableau 9 : Résultats de l'évaluation de l'activité cytotoxique des extraits	30
Tableau 10 : Données spectrales de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) et RMN ^{13}C du composé SA.12 (CDCl_3 , 100 MHz) et de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de la lirioféline	40
Tableau 11 : Données spectrales de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) et RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé SA.13.....	46
Tableau 12 : Récapitulatif de l'isolement des composés de l'extrait alcaloïdique au dichlorométhane de <i>Stipularia africana</i>	52
Tableau 13 : Récapitulatif de l'isolement des composés de la série S22.....	54

RESUME

La présente étude porte sur l'étude de la diversité chimique et de l'évaluation de l'activité cytotoxique de *Stipularia africana*, une plante médicinale camerounaise appartenant à la famille des Rubiaceae. Les feuilles de cette plante sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour traiter des maladies chroniques telles que le diabète, l'hypertension artérielle et les cancers.

L'extrait brut et les fractions obtenues après traitement alcaloïdique ont été évalués pour leurs activités cytotoxiques sur trois lignées cellulaires de glioblastome cérébral : U251-MG, U87-MG et LN229, en utilisant le test de viabilité cellulaire au MTT. Les résultats ont révélé que les fractions alcaloïdique et non alcaloïdique présentaient une activité cytotoxique modérée envers les trois lignées cellulaires testées, avec des valeurs de CI_{50} comprises entre 23,14 et 139,90 $\mu\text{g/mL}$, en comparaison avec l'oxaliplatine utilisée comme molécule de référence.

À partir de la fraction alcaloïdique, qui a montré la meilleure activité cytotoxique, trois composés indexés SA.11, SA.12 et SA.13 ont été isolés grâce à des techniques chromatographiques classiques. L'analyse structurale a permis d'identifier deux alcaloïdes de type aporphinique, la lirioférine (SA.12) et la N-acétylcatalpifoline (SA.13), ainsi qu'un stérol, le β -sitostérol (SA.11).

L'élucidation structurale de ces composés a été réalisée à l'aide de méthodes spectroscopiques courantes, notamment la résonance magnétique nucléaire (RMN) mono-dimensionnelle (^1H et ^{13}C) et bi-dimensionnelle (HSQC, HMBC, COSY), la spectrométrie de masse, ainsi que par comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles rapportées dans la littérature scientifique.

Mots-clés : Rubiaceae, *Stipularia africana*, Extrait alcaloïdique, Activités cytotoxiques, Alcaloïdes aporphiniques.

ABSTRACT

The present study focuses on studying the chemical diversity and evaluating the cytotoxic activity of *Stipularia africana*, a Cameroonian medicinal plant belonging to the Rubiaceae family. The leaves of this plant are widely used in traditional medicine to treat chronic diseases such as diabetes, hypertension and cancers.

The crude extract and fractions obtained after alkaloid treatment were evaluated for their cytotoxic activities against three glioblastoma cell lines, U251-MG, U87-MG, and LN229, using the MTT assay. The results revealed that the alkaloid and non-alkaloid fractions exhibited moderate cytotoxic activity against these cell lines, with IC₅₀ values ranging from 23.14 to 139.90 $\mu\text{g/mL}$, compared to oxaliplatin, used as a reference.

From the dichloromethane alkaloid fraction, which demonstrated the strongest cytotoxic activity, three compounds (SA.11 to SA.13) were isolated using classical chromatographic techniques. These compounds were fully characterised and identified as two aporphine-type alkaloids, lirioferine (SA.12) and N-acetylcatalpifoline (SA.13), and a sterol, β -sitosterol (SA.11).

The structural elucidation of these compounds was achieved using standard spectroscopic methods, including one-dimensional NMR (^1H and ^{13}C), two-dimensional NMR (HSQC, HMBC, and COSY), mass spectrometry, and by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature.

Keywords: *Rubiaceae*, *Stipularia africana*, Alkaloid extract, Cytotoxic activity, Aporphine alkaloids.

INTRODUCTION

Les plantes médicinales jouent un rôle crucial dans le développement de nombreux médicaments modernes, en tant que source de composés bioactifs essentiels à la pharmacopée contemporaine (Dar *et al.*, 2023). En dépit de cette importance, une grande partie de la biodiversité végétale mondiale demeure sous-explorée, particulièrement en Afrique tropicale, une région riche en ressources naturelles mais encore largement méconnue sur le plan scientifique. Sur environ 391 000 espèces de plantes présentes sur la Terre, seulement 40 000 ont été étudiées pour leurs propriétés médicinales (*plant list – Recherche Qwant, s. d.*). Cela laisse entrevoir un immense potentiel inexploité, notamment pour le développement de solutions thérapeutiques adaptées aux besoins pressants des populations.

Dans ce contexte, *Stipularia africana*, une espèce végétale présente dans les écosystèmes tropicaux, constitue un exemple frappant d'espèce inexplorée. À ce jour, aucune étude scientifique documentée n'a été menée sur cette plante, limitant la compréhension de ses propriétés chimiques et biologiques. Pourtant, cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de pathologies telles que le diabète, l'hypertension artérielle et les cancers (Nole *et al.*, 2016), des maladies chroniques en constante progression dans le monde et responsables de lourdes charges socio-économiques et sanitaires (Ambomo *et Myriam*, 2022). L'absence de données scientifiques sur *Stipularia africana* constitue donc une entrave majeure à son exploitation rationnelle et à la valorisation de son potentiel thérapeutique.

La problématique qui se pose est la suivante : quels métabolites secondaires présents dans *Stipularia africana* pourraient être identifiés et exploités pour offrir de nouvelles solutions thérapeutiques face aux pathologies chroniques, notamment les cancers ? Cette question nous conduit à formuler l'hypothèse que *Stipularia africana* contient des composés bioactifs présentant un potentiel cytotoxique intéressant, pouvant servir de base au développement de nouveaux agents thérapeutiques pour lutter efficacement contre les cancers.

C'est dans le but de répondre à ces interrogations que nous avons entrepris cette étude qui vise à explorer la diversité chimique de *Stipularia africana* et à évaluer son potentiel cytotoxique. Ce travail se veut une contribution scientifique qui a pour but de combler les lacunes actuelles dans la connaissance de cette espèce et à valoriser ses composés bioactifs pour des applications potentielles en santé humaine.

L'objectif principal de ce travail est de caractériser les métabolites secondaires de *Stipularia africana* et d'évaluer leur potentiel cytotoxique.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Extraire les métabolites secondaires de *Stipularia africana*

- Évaluer le potentiel cytotoxique des extraits de *Stipularia africana* ;
- Isoler les métabolites secondaires de l'extrait le plus active ;
- Caractériser les composés isolés ;

Ce mémoire s'articulera autour de trois chapitres :

- Le premier chapitre, relatif à la revue de la littérature, présente les connaissances actuelles sur les plantes médicinales et les métabolites secondaires, en mettant l'accent sur leur rôle en pharmacologie.
- Le deuxième chapitre qui est consacré à la présentation des résultats et discussion des travaux personnels obtenus au laboratoire, suivies d'une conclusion et des perspectives pour les travaux futurs.
- Et enfin le dernier chapitre qui est la partie expérimentale, donne les détails sur les protocoles suivis et est complétée par les références bibliographiques.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Généralités sur la famille des *Rubiaceae*

La famille des *Rubiaceae* est l'une des plus vastes familles de plantes à fleurs parmi les dicotylédones, regroupant environ 13 000 espèces réparties dans 630 genres, incluant des plantes économiquement importantes comme le caféier (*Coffea*), la chicorée (*Cichorium*), et la garance (*Rubia*) (Karou et al., 2011). Cette famille se compose d'arbres, d'arbustes, de lianes, ainsi que de plantes herbacées, particulièrement en Europe (Xu et Chang, 2017).

L'identification des *Rubiaceae* repose sur des caractéristiques morphologiques distinctives, principalement la forme et l'arrangement des feuilles, la présence de stipules, et la structure des fleurs.

Les feuilles sont opposées, simples, entières, et accompagnées de stipules interpétiolaires (Razafimandimbison et Rydin, 2024).

Les fleurs des *Rubiaceae* sont généralement hermaphrodites et actinomorphes, avec un calice composé de 4 ou 5 sépales libres ou soudés, parfois très réduits ou caducs. La corolle est formée de 4 à 5 pétales généralement soudés en un tube (Razafimandimbison et Rydin, 2024).

Les fruits des *Rubiaceae*, d'une grande variabilité morphologique, peuvent être sphériques, ellipsoïdaux, ovoïdes ou obovoïdes, et se distinguent par des couleurs variées : rouge, jaune, orange, noir, et plus rarement blanc ou bleu, notamment dans les genres *Tricalysia* et *Psychotrieae* (Delprete et Jardim, 2012).

I.1.1. Classification des *Rubiaceae*

La famille des *Rubiaceae* est intégrée dans l'ordre Gentianales et dans la classe dicotylédone au sein des Angiospermes. La classification basée sur le système APG III (*Angiosperms Phylogeny Groups*), organise la famille des *Rubiaceae* en 71 tribus. Parmi lesquelles 68 sont classifiées dans 2 sous-familles (*Dialypetalanthoideae* avec 38 tribus et *Rubioideae* avec 30 tribus). Les 3 autres tribus, notamment *Acranthereae*, *Coptosapelite* et *Luculiaeae* n'ont pas encore été classifiées dans l'une de ces sous-familles (Razafimandimbison et Rydin, 2024). Le tableau 1 illustre la classification des espèces de la famille des *Rubiaceae*.

Tableau 1 : Classification systématique des *Rubiaceae*

Classification des <i>Rubiaceae</i>	
Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Angiosperme</i>
Classe	<i>Dicotylédone</i>
Sous-classe	<i>Gamopetalae</i>
Ordre	<i>Gentianales</i>
Sous-familles	<i>Dialypetalanthoideae</i>
	<i>Rubioideae</i>
Famille	<i>Rubiaceae</i>

I.1.2. Répartition géographique des *Rubiaceae*

Les plantes de la famille des *Rubiaceae* sont présentes sur tous les continents et s'adaptent à une grande variété de climats, allant des régions froides aux zones tempérées, tropicales et subtropicales. Elles sont particulièrement abondantes dans les environnements tropicaux et subtropicaux, où elles contribuent de manière significative à la biodiversité végétale (Ismail et al., 2012).

I.1.3. Intérêt économique et utilisation traditionnelle

Les plantes de la famille des *Rubiaceae* ont une grande importance, notamment grâce au genre *Coffea*, qui comprend des espèces de valeur commerciale telles que *Coffea arabica* et *Coffea canephora*, largement cultivées en Indonésie pour la production de café (Yanti et al., 2023).

Les usages des *Rubiaceae* en médecine traditionnelle sont nombreux et variés, en grande partie en raison de la richesse en métabolites secondaires dont plusieurs présentent des propriétés thérapeutiques. Par exemple, les racines de *Morinda elliptica* sont utilisées en Malaisie pour traiter la jaunisse et les troubles gastriques, tandis que les feuilles de cette même plante sont utilisées contre la fièvre et les flatulences (Ismail et al., 2012).

De même, les décoctions ou infusions des feuilles d'*Hamelia patens* sont traditionnellement utilisées par voie orale ou cutanée comme analgésiques, anti-inflammatoires, et pour traiter les infections bactériennes et fongiques (Arshad et al., 2012). Par ailleurs, les feuilles de *Mitragyna speciosa* (connues sous le nom de *kratom*) sont utilisées pour prévenir le cancer, améliorer la performance sexuelle et traiter diverses affections telles que le diabète, l'hypertension, l'anxiété, et la dépression (Begum et al., 2024).

I.2. Le Genre *Stipularia*

I.2.1. Caractères morphologiques des espèces du genre

Le genre *Stipularia* comprend deux espèces : *Stipularia africana* et *Stipularia elliptica*. Ces plantes sont généralement des herbes ou des arbustes ligneux et dressés, avec des tiges peu ramifiées. Les feuilles des espèces de ce genre sont grandes, elliptiques, avec des stipules bien visibles, feuillues et caduques.

Les fleurs de *Stipularia* sont portées par des inflorescences axillaires capitées, entourées d'un large involucre campanulé et soutenues par des bractéoles membraneuses. La corolle est étroitement tubulaire, en forme d'entonnoir, avec des lobes courts.

Les fruits sont charnus, de forme subglobuleuse ou obovoïde et contiennent de nombreuses graines. Ces graines sont petites, anguleuses, avec un tégument épais et un endosperme charnu (Bridson et Verdcourt, 2003).

I.2.2. Répartition des espèces du genre en Afrique

Le genre *Stipularia* est principalement représenté en Afrique tropicale par deux espèces : *Stipularia africana* et *Stipularia elliptica*. Ces espèces se distinguent par leur aspect herbacé et leur large distribution géographique à travers divers pays africains, couvrant une gamme de climats et d'écosystèmes. Le tableau 2 présente la répartition géographique de ces deux espèces, soulignant leur présence dans plusieurs pays d'Afrique centrale, de l'ouest et australe. Cette diversité géographique témoigne de l'adaptabilité du genre *Stipularia* aux différentes conditions environnementales du continent africain.

Tableau 2 : Répartition géographique du genre *Stipularia* en Afrique

Espèces	Aspect	Pays	Références
<i>Stipularia africana</i>	Herbe	Sierra Leone, Gabon, République Démocratique du Congo (RDC), Angola, Cameroun, Zambie	(Bridson et Verdcourt, 2003)
<i>Stipularia elliptica</i>	Herbe	Cameroun, Congo, Nigeria, Gabon, Soudan, Zaïre, Tchad, République Centrafricaine	(Hepper, 1958)

L'espèce *Stipularia africana* est au cœur de notre étude en raison de son utilisation répandue en médecine traditionnelle dans la gestion des pathologies chroniques. À ce jour, aucune recherche phytochimique approfondie n'a été menée sur cette plante, ce qui en fait une candidate prometteuse pour des investigations scientifiques visant à explorer ses composés bioactifs et ses potentiels thérapeutiques.

I.3. L'espèce *Stipularia africana*

I.3.1. Aperçu botanique

Stipularia africana est une plante herbacée, érigée et légèrement ramifiée, pouvant atteindre une hauteur de 0,5 à 3 mètres (Figure 1). Sa tige, qui mesure environ 6 cm de diamètre, est modérément ramifiée et présente une base bien ligneuse, conférant à la plante une certaine robustesse malgré son aspect herbacé (Bridson et Verdcourt, 2003).



Figure 1 : *Stipularia africana* récolté à Tibati /Ngaoundéré (Source : Photo Moubarak, 2023)

Les feuilles de *Stipularia africana* sont vert foncé, lisses et peuvent atteindre une longueur de 10 à 34 cm (Figure 2). Elles sont accompagnées de grandes stipules ovales, mesurant de 3 à 4 cm de long et d'un pétiole dont la longueur varie de 1 à 10 cm.



Figure 2 : Feuilles de *Stipularia africana* récoltées à Tibati /Ngaoundéré (Source : Photo Moubarak., 2023)

Les fleurs de *Stipularia africana* sont de couleur rouge vif ou rose verdâtre et sont densément poilues à l'intérieur (Figure 3). Elles peuvent atteindre une longueur de 2 à 4 cm (Bridson et Verdcourt, 2003).



Figure 3 : Fleurs de *Stipularia africana* récoltées à Tibati /Ngaoundéré (Source : Photo Moubarak., 2023)

Les fruits de *Stipularia africana* mesurent généralement entre 15 et 17 mm de longueur et 11 à 14 mm de largeur (Figure 4). À maturité, ils sont de couleur orange à rouge vif et présentent une pulpe blanche ou rosée; Les graines sont brunes de 0,6 mm de diamètre et possèdent des réticules très fines et étirées (Bridson, 2001).



Figure 4 : Fruits de *Stipularia africana* récoltées à Tibati /Ngoundéré (Source : Photo Moubarak, 2023)

I.3.2. Position systématique de l'espèce *Stipularia africana*

La position systématique de *Stipularia africana* dans le système de classification évolutif est donné dans le tableau 3 (Letouzey, 1969).

Tableau 3 : Position systématique de l'espèce *Stipularia africana*

Classification systématique	
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Tracheophyta</i>
Ordre	<i>Gentianales</i>
Classe	<i>Dicotylédone</i>
Sous-classe	<i>Gamopetalae</i>
Famille	<i>Rubiaceae</i>
Sous famille	<i>Dialypetalanthoideae</i>
Genre	<i>Stipularia</i>
Espèce	<i>Stipularia africana</i>

I.3.3. Répartition géographique de l'espèce *Stipularia africana* au Cameroun

Selon les données recueillies à l'Herbier National du Cameroun (HNC), *Stipularia africana* est largement distribuée à travers le Cameroun (HNC., 2023). Cette espèce préfère les zones marécageuses, où elle trouve des conditions optimales pour sa croissance (Figure 5).

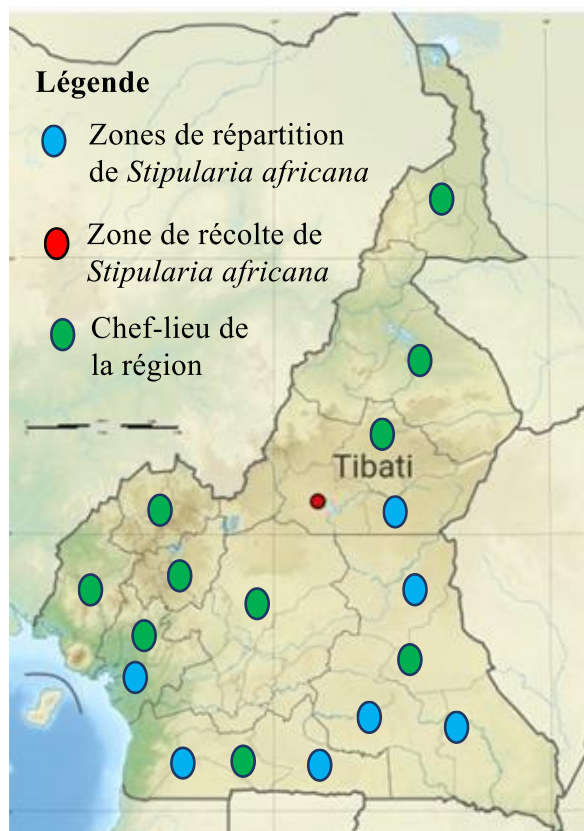


Figure 5 : Répartition géographique de *Stipularia africana* au Cameroun

I.3.4. Usages de *Stipularia africana*

Les espèces du genre *Stipularia* présentent une utilisation limitée, tant sur le plan alimentaire que thérapeutique. Son intérêt alimentaire est assez restreint, bien que ses fruits soient comestibles et souvent consommés en milieu rural pour leur capacité à désaltérer (Nkeoua et Boundzanga, 1999). En médecine traditionnelle, les tradipraticiens utilisent la décoction des feuilles de *Stipularia africana* pour traiter le diabète, l'hypertension artérielle et les cancers (Nole et al., 2016).

Malgré ces utilisations en médecine traditionnelle, aucune étude phytochimique n'a encore été réalisée sur les espèces du genre *Stipularia*. C'est pourquoi nous avons concentré notre recherche bibliographique sur les métabolites secondaires isolés des espèces appartenant à la famille des Rubiaceae.

I.4. Travaux antérieurs sur les *Rubiaceae*

I.4.1. Travaux chimiques antérieurs

Les études chimiques rapportées dans la littérature sur la famille des *Rubiaceae* révèlent la présence de nombreux composés chimiques appartenant à diverses classes de métabolites secondaires. Parmi ces composés, les alcaloïdes sont particulièrement représentatifs (Martins et Nunez, 2015).

I.4.1.1. Généralités sur les alcaloïdes

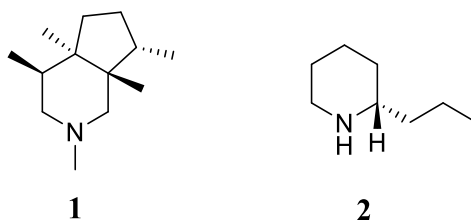
Le monde végétal est une source riche de substances bioactives aux activités biologiques importantes, parmi lesquelles les alcaloïdes occupent une place prépondérante. Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés dont la structure peut varier considérablement, mais qui sont souvent mono- ou polycycliques. La présence d'un atome d'azote dans leur structure leur confère des propriétés basiques et ils peuvent présenter des fonctions amine primaire, secondaire, tertiaire ou même ion ammonium quaternaire.

Les alcaloïdes sont rares chez les bactéries et les champignons mais ils sont largement répandus parmi les angiospermes, en particulier dans les familles suivantes : *Apocynaceae*, *Papaveraceae*, *Magnoliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Rutaceae*, *Fabaceae*, et *Rubiaceae* (Gutiérrez-Grijalva et al., 2020).

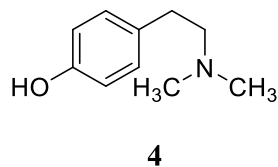
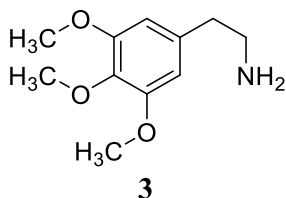
L'extraction des alcaloïdes repose sur leur solubilité différenciée en milieu acide ou alcalin. Les trois principales méthodes d'extraction sont : l'extraction par solvants organiques apolaires en milieu alcalin, l'extraction par solvants organiques polaires et l'extraction par eau acidifiée (Bribi, 2018).

Les alcaloïdes sont classifiés en trois types principaux selon leur précurseur biogénétique et la position de l'atome d'azote (intracyclique ou extracyclique) :

❖ **Les pseudoalcaloïdes** : les pseudoalcaloïdes possèdent un squelette carboné de base qui ne dérive pas d'un acide aminé, mais incluent un atome d'azote intracyclique (Eguchi et al., 2017). Comme exemple nous pouvons citer la β -Skytanthine (**1**) et la (+)-coïne (**2**).



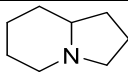
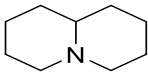
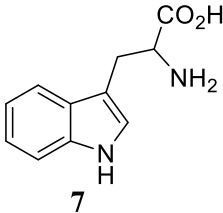
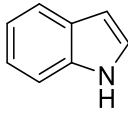
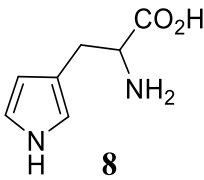
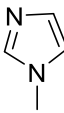
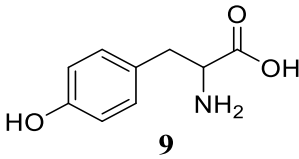
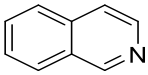
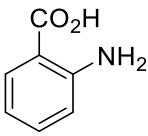
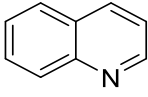
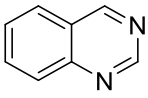
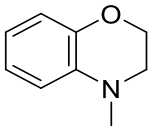
❖ **Les protoalcaloïdes** : les protoalcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas partie intégrante du système hétérocyclique, mais ils dérivent d'acides aminés (Djama et Karour, 2020). La mescaline (**3**) et la hordénine (**4**) sont des exemples de protoalcaloïdes.



❖ **Les alcaloïdes vrais** : les alcaloïdes vrais sont des composés hétérocycliques avec un atome d'azote intracyclique. Ils ont pour précurseur les acides aminés notamment la, L-ornithine (**5**), L-lysine (**6**), L-tryptophane (**7**), L-histidine (**8**), L-tyrosine (**9**) et l'acide antranilique (**10**) leur confère leur noyau de base (Mohamed et Khadidja, 2020). Le tableau 4 présente les noyaux de base des alcaloïdes vrais et leurs acides aminés précurseurs.

Tableau 4 : Structures de base des alcaloïdes vrais et leurs principaux acides aminés précurseurs

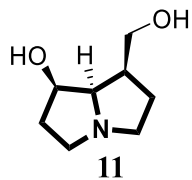
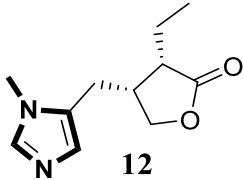
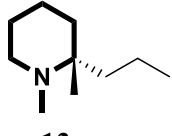
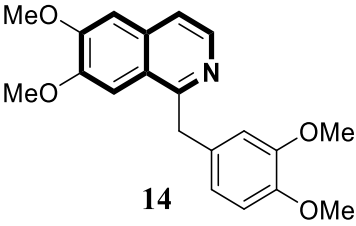
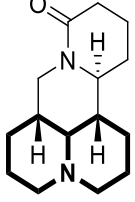
Acides aminés précurseurs des alcaloïdes vrais	Noyaux de base des alcaloïdes vrais
5 Ornithine	Pyrrolidine
	Pyrrolizidine
	Tropane
6 Lysine	Tropane

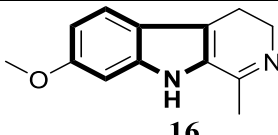
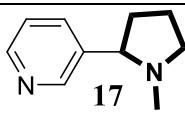
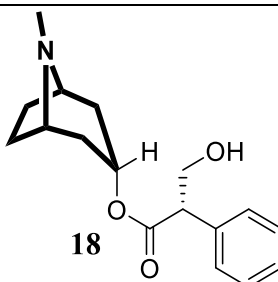
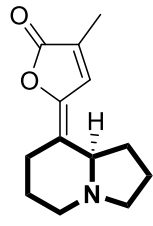
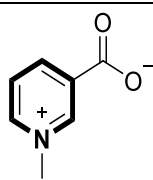
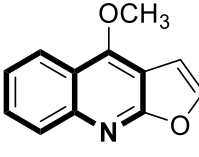
	
	Indolizidine
	
	Quinolizidine
 7	
Tryptophane	Indole
 8	
Histidine	Imidazole
 9	
Tyrosine	Isoquinoléine
 10	
	Quinololine
	
Acide anthranilique	Quinazoline
	
	Benzoxazine

On distingue 11 principales classes d'alcaloïdes vrais : les alcaloïdes pyrroliques, pyrrolidiniques, pyrimidiques, pipéridiniques, quinoléiques, tropaniques, quinolizidinique,

indolique, indolizidiniques, imidazoliques et isoquinoléiques. Le tableau 5 illustre chaque classe avec un exemple tout en mettant en évidence leur noyau de base.

Tableau 5 : Classification et structures représentatives des principales classes d'alcaloïdes vrais

Classes d'alcaloïdes vrais	Structures et noms d'un d'exemple
Pyrrolique	 11 Platynecine
Imidazolique	 12 Pilocarpine
Pipéridinique	 13 N-méthyl coniine
Isoquinoléique	 14 Papavérine
Quinolizidinique	 15 Matrine

Indolique	 16 Amaline
Pyrrolidinique	 17 Nicotine
Tropanique	 18 Hycocyamine
Indolizidinique	 19 Pandalisines A
Pyrimidique	 20 Trigonelle
Quinoléique	 21 Dictamine

Les alcaloïdes isoquinoléiques quant à eux se subdivisent en plusieurs sous-classes notamment les tétrahydroprotoberbérines, les protoberbérines, les

benzyltétrahydroisoquinoléiques, les benzyloisoquinoléiques, les séco-benzyloisoquinoléiques et les aporphines (Dos Santos et Vaz, 2019). La figure 6 illustre cette sous-classification en présentant un exemple représentatif pour chaque sous-classe

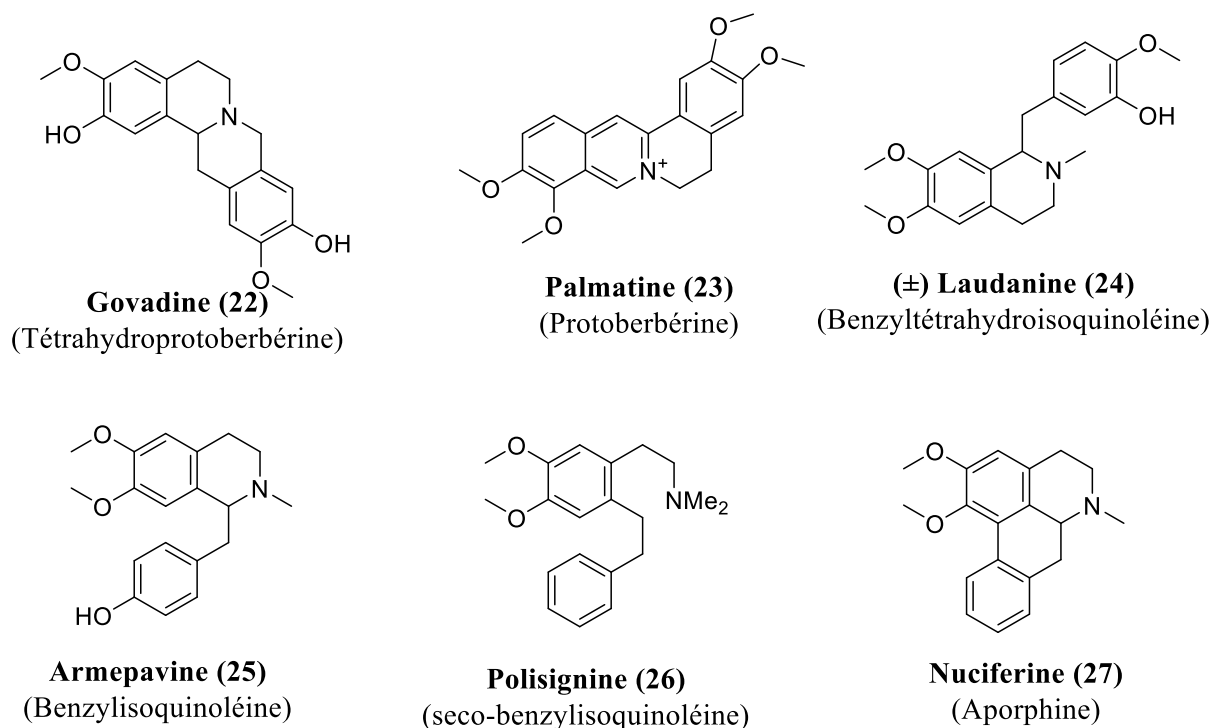


Figure 6 : Structures de quelques alcaloïdes isoquinoléiques

En ce qui concerne les alcaloïdes aporphiniques, de nombreuses études ont démontré leur diversité et complexité structurale, ainsi que leurs nombreuses activités biologiques. Cela souligne l'importance de mener des recherches approfondies sur cette classe de composés, en particulier en ce qui concerne leur biosynthèse, afin de mieux comprendre les voies de formation. (Stevigny et al., 2005).

I.4.1.2. Biosynthèse des alcaloïdes aporphiniques

Les alcaloïdes aporphiniques, en tant qu'alcaloïdes vrais, sont biogénétiquement dérivés d'un acide aminé aromatique, spécifiquement du L-tryptophane (Ikezawa et al., 2008). Leur biosynthèse est facilitée par l'action de plusieurs enzymes, comme le montre le schéma 1.

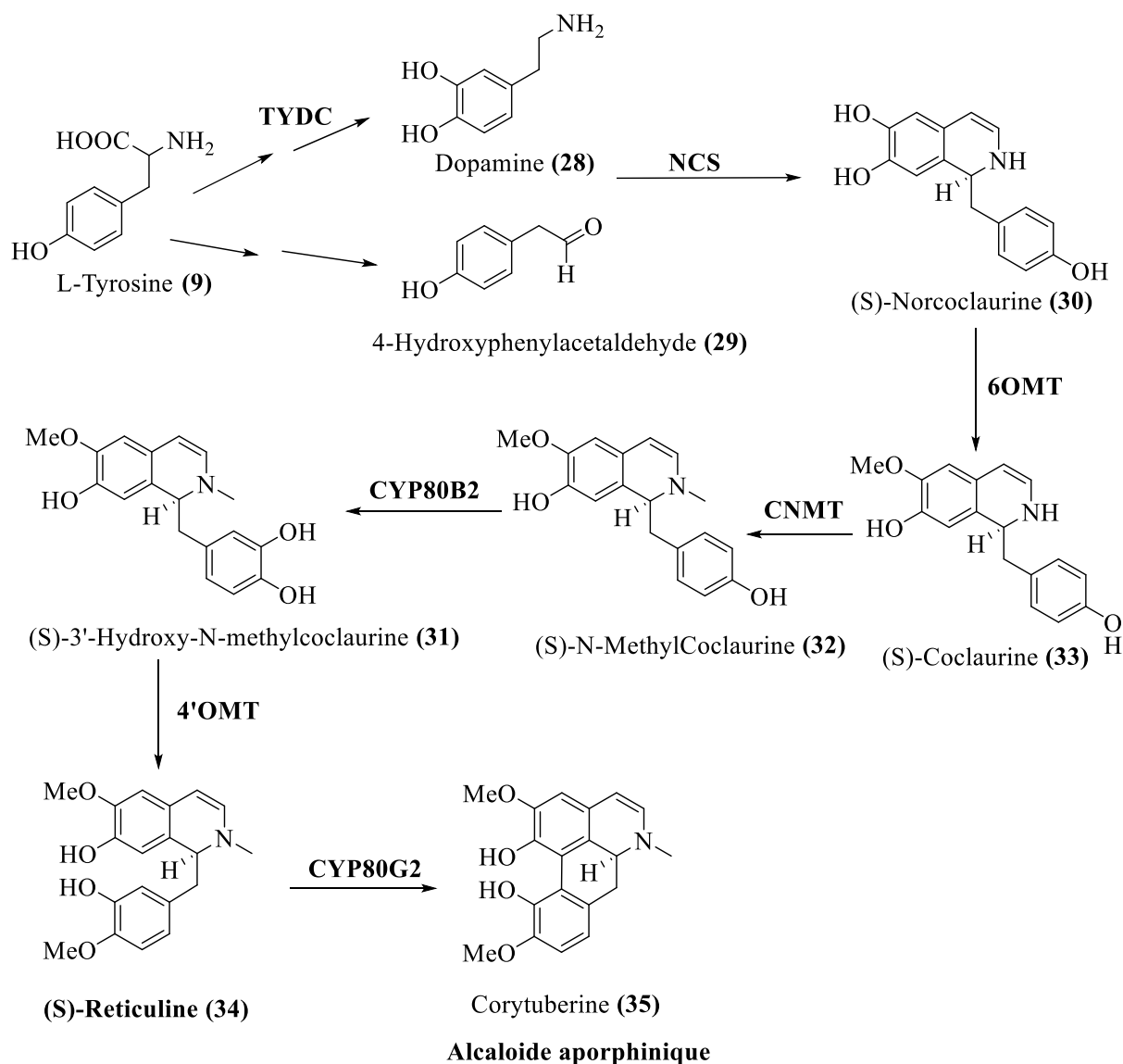


Schéma 1 : Biosynthèse des alcaloïdes aporphiniques

Significations des acronymes des enzymes impliquées dans la biosynthèse des alcaloïdes aporphiniques : **TYDC**, tyrosine décarboxylase ; **NCS**, (S)-norcoclaurine synthase ; **6OMT**, (S)-norcoclaurine 6-Ométhyltransferase ; **CNMT**, (S)-coclaurine-N-méthyltransférase ; **CYP80B2**, (S)-N-méthylcoclaurine 3'-O-hydroxylase ; **4'OMT**, 3'-O-hydroxy-N-méthylcoclaurine-4'-O-méthyltransférase ; **CYP80G2**, (S)-corytuberine synthase.

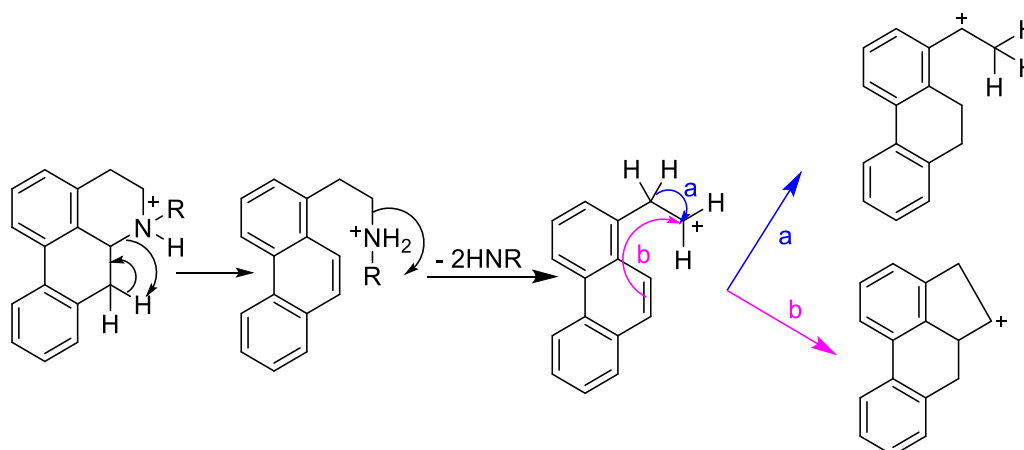
I.4.1.3. Détermination structurale des alcaloïdes aporphiniques

Comme pour d'autres classes de métabolites secondaires, l'élucidation structurale des alcaloïdes aporphiniques est réalisée à l'aide de techniques spectroscopiques courantes. Celles-ci incluent la spectroscopie ultra violette, la spectroscopie infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) à la fois unidimensionnelle et bidimensionnelle, ainsi que la spectrométrie de masse.



Spectrométrie de masse

Lors de la fragmentation en spectrométrie de masse ESI (*Electrospray Ionization*), le spectre de masse peut montrer un pic correspondant à l'ion $[M+H-RNH_2]^+$, qui peut être identifié comme $[M+H-17]^+$ ou $[M+H-31]^+$ en fonction de la nature du groupement radical (R = H ou CH₃). Ces fragments résultent de la perte de la molécule d'ammoniac ou de la méthylamine respectivement. Le Schéma 2 illustre le mécanisme de cette fragmentation.



a : Voie par transfert de proton

b : Voie de cyclisation

Schéma 2 : Voie de fragmentation proposée pour la perte d'une molécule d'amine (RNH₂)

A partir du pic de l'ion $[M+H-RNH_2]^+$, on peut observer :

- Des pics secondaires, tels que le pic correspondant à la perte d'une molécule de méthanol, si le composé contient un groupe méthoxyle et hydroxyl vicinaux comme le montre le Schéma 3.

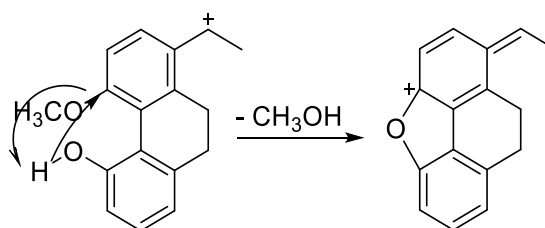


Schéma 3 : Voie de fragmentation proposée pour la perte de CH₃OH

- Un pic correspondant à la perte d'une molécule de formaldéhyde suivie d'une molécule de monoxyde de carbone, si le composé contient un groupe méthylènedioxy comme le montre le schéma 4 (Stévinny et al., 2004).

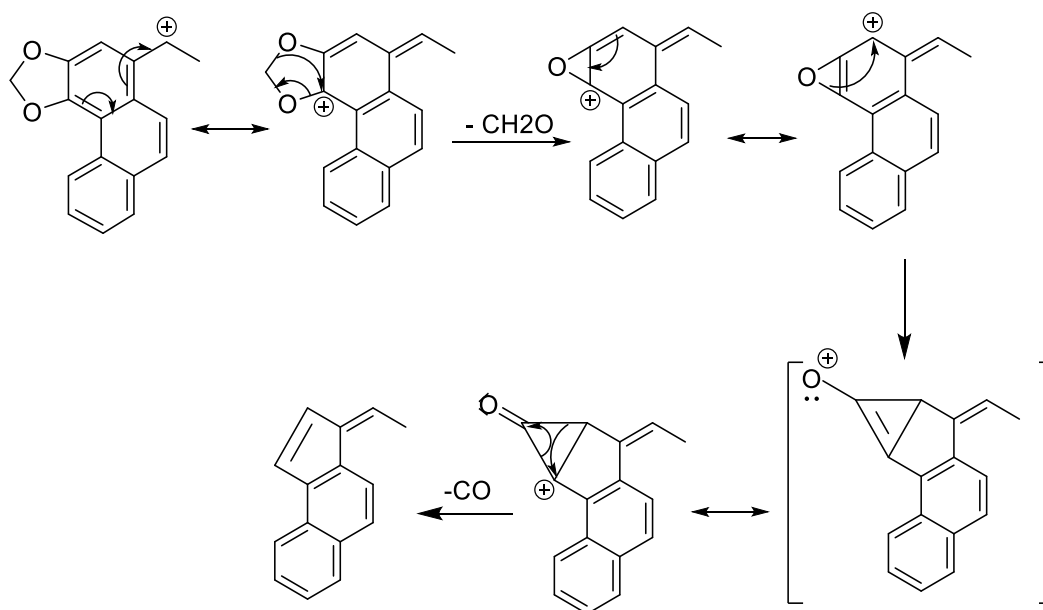


Schéma 4 : Voie de fragmentation proposée pour la perte d'un CH₂O suivit d'un CO



Spectroscopie ultra-violette (UV)

La spectroscopie ultra-violette est une méthode qui permet de mettre en évidence les différents chromophores dans les composés organiques à travers les transitions électroniques. Elle est largement utilisée pour la caractérisation de nombreux métabolites secondaires à l'instar des alcaloïdes aporphiniques. L'analyse des spectres UV de ces derniers montre une bande d'absorption maximale caractéristique entre 283 et 305 nm correspondant au squelette des alcaloïdes de types aporphinique 1, 2, 9 et 10 tétrasubstitué (Omar *et al.*, 2020).



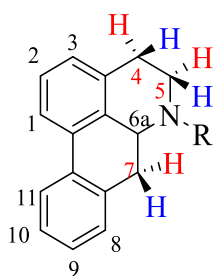
Spectroscopie infrarouge (IR)

Cette technique fournit les informations sur les groupements fonctionnelles présents dans un composé organique. Concernant les alcaloïdes aporphiniques, leur structure inclut un noyau aromatique ainsi que des fonctions hydroxyles et méthoxyles.

Les spectres IR de cette classe de métabolites secondaires présente une bande de vibration entre 1465 - 1510 cm⁻¹ et entre 2928 - 2825 cm⁻¹ du noyau aromatique attribuable respectivement à la double liaison C-C et à la liaison C-H du noyau aromatique. De plus, on observe une bande de vibration à 1258 cm⁻¹ correspondant à la liaison C-O du méthoxy (Omar *et al.*, 2020).

❖ Résonance magnétique nucléaire du proton RMN ^1H unidimensionnelle.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton permet de déterminer les différentes familles de protons présents dans la structure d'une molécule organique. Pour les alcaloïdes aporphiniques, les spectres RMN ^1H révèlent généralement des signaux caractéristiques du noyau aromatique, résonnant dans les champs faibles avec des déplacements chimiques allant de 6 à 8 ppm. De plus, on observe également des signaux des protons aliphatiques (H-4, H-5, H-6a et H-7) qui sont souvent diastéréotopiques (H-4, H-5 et H-7) et résonnent dans les champs forts avec des déplacements chimiques variant entre 2,23 et 3,54 ppm. Ces valeurs peuvent varier en fonction de l'environnement chimique des protons (Amna et al., 2015). Ces protons sont mis en évidence sur le squelette du noyau aporphinique (36) (Rufino et al., 2005)



36

R= H, Alkyl, Acétyl, etc.

❖ Résonance magnétique nucléaire du carbone RMN ^{13}C unidimensionnelle

Les spectres de RMN ^{13}C fournissent des informations sur les différents types de carbone (méthine, méthylène, méthyle et quaternaire) ainsi que sur leurs états d'hybridations (sp , sp^2 et sp^3). L'interprétation des spectres, RMN ^{13}C des alcaloïdes aporphiniques révèlent :

- Les signaux des carbones aromatiques apparaissant dans les champs faibles avec les valeurs de déplacements chimiques allant de 100 à 132 ppm. Ces valeurs de déplacements chimiques peuvent atteindre 150 ppm quand ils sont liés à l'oxygène (Ali, 2021)

- Les signaux des carbones méthyléniques hybridés sp^3 en position 4, 5 et 7 apparaissant dans les champs forts avec des valeurs de déplacements chimiques comprises entre 29 à 50 ppm (Bogdanov et al., 2012).

- Le signal du carbone hybridé sp^3 caractéristique des alcaloïdes aporphiniques correspondant à un méthine en position 6a qui apparaissant autour de 60 ppm (Heng et al., 2018).

I.4.1.4. Quelques alcaloïdes aporphiniques isolés de quelques espèces végétales

Les alcaloïdes de type aporphine constituent la plus grande sous-classe des alcaloïdes isoquinoléiques, caractérisée par un squelette à quatre anneaux fusionnés, notés A, B, C et D, avec l'atome d'azote situé dans le cycle B. Cette classe de composés peut être di-, tri-, tétra-, penta- ou hexa-substituée, avec des substituants tels que les groupes hydroxyle, méthoxyle et méthylènedioxy. Les bases les plus courantes sont les tétra-substituées en positions 1,2,9,10 et 1,2,10,11, tandis que les bases penta-substituées en positions 1,2,3,9,10 sont plus rares (Liu et al., 2023). Les alcaloïdes de type aporphine sont présents dans environ 20 familles de plantes, notamment *Annonaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Lauraceae*, *Monimiaceae*, *Magnoliaceae*, et *Berberidaceae*. Les alcaloïdes aporphiniques les plus courants incluent la caaverine (37), l'anonaine (38), la magnoflorine (39), la boldine (40), la glaucine (41) et la néolitsine (42) (Teles et al., 2019). La figure 7 illustre les structures de certains alcaloïdes aporphiniques isolés de diverses espèces végétales.

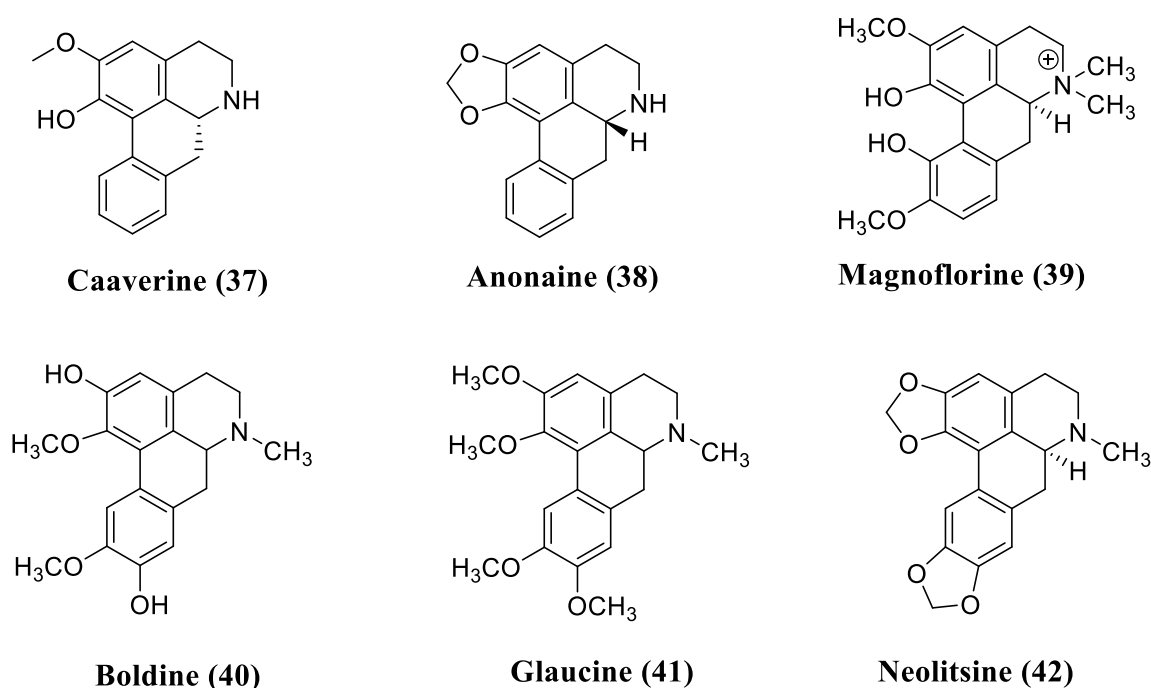
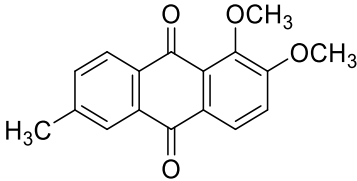
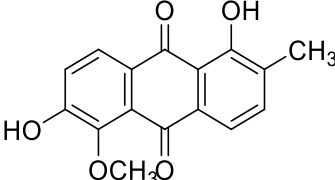
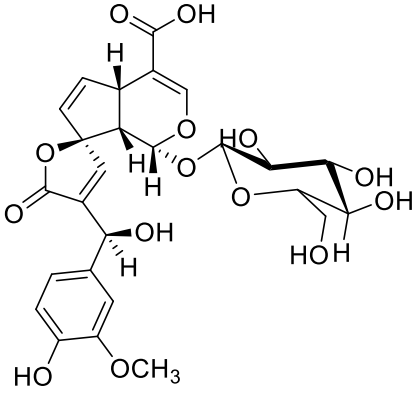


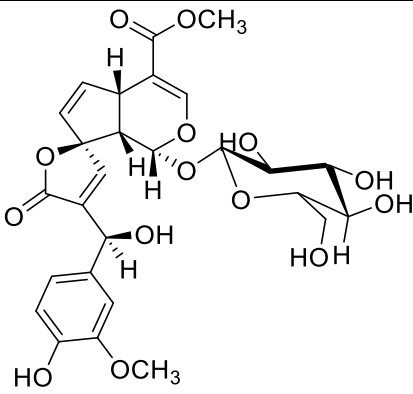
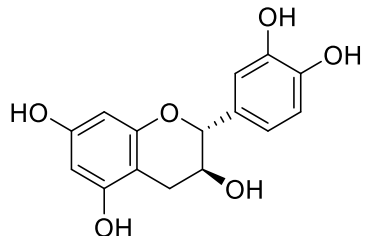
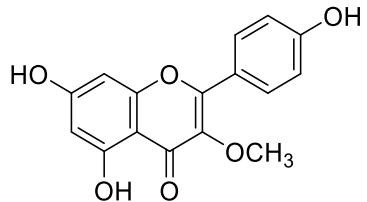
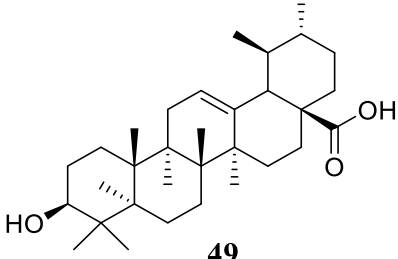
Figure 7 : Structures de quelques alcaloïdes aporphiniques isolés de différentes espèces végétales

I.4.1.5. Composés non alcaloïdiques isolés des espèces de la famille des *Rubiaceae*

Les études chimiques réalisées sur plusieurs espèces de la famille des *Rubiaceae* ont conduit à l'isolement et à la caractérisation de nombreux métabolites secondaires tels que les anthraquinones, les iridoïdes et les triterpènes (Martins et Nunez, 2015). Le tableau 6 présente quelques exemples de molécules appartenant à ces classes de métabolites secondaires.

Tableau 6 : Quelques composés non alcaloïdiques isolés de la famille des *Rubiaceae*

Classes de composés	Structures et Noms	Sources	Références
Anthraquinone	 43 1,2-diméthoxy-6-méthyl-9,10-anthranquinone	<i>Rennelia elliptica</i>	(Ismail et al., 2012)
	 44 Morindone-5-méthylether	<i>Morinda elliptica</i>	(Ismail et al., 2012)
Iridoïde	 45 Acide methoxymorindique	<i>Morinda morindoides</i>	(Seri et al., 2017)

	 46 Méthyl methoxymorindoate		
Flavonoïde	 47 (+) -catéchine	<i>Uncaria sinensis</i>	(Heitzman et al., 2005)
	 48 3-méthoxykaempferol	<i>Gardenia oudiepe</i>	(Santi et al., 2018)
Terpénoïde	 49 Acide ursolique	<i>Sabicea grisea</i>	(Martins et Nunez, 2015)

I.4.2. Travaux pharmacologiques antérieurs sur les *Rubiaceae*.

Les études pharmacologiques antérieures sur les plantes appartenant à la famille des *Rubiaceae* ont révélé qu'elles possèdent d'excellentes activités biologiques, notamment antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et cytotoxiques (Ugorji et al., 2019) ; (Ekalu, 2021) Ces activités sont attribuables aux métabolites secondaires présents dans ces plantes. Bien que les alcaloïdes puissent être toxiques à fortes doses, ils présentent des propriétés pharmacologiques notables à faibles doses telles que des activités antifongiques, antibactériennes, antivirales, et cytotoxiques (Bribi, 2018).

I.4.2.1. Potentiel cytotoxique des alcaloïdes aporphiniques isolés des espèces végétales

De nombreuses études menées sur diverses espèces de plantes ont permis d'isoler plusieurs classes de métabolites secondaires dont les alcaloïdes aporphiniques. Ces recherches ont mis en évidence le potentiel cytotoxique de ce type d'alcaloïdes. En effet, les tests de cytotoxicité CCK-8 réalisés sur des alcaloïdes aporphiniques tels que la corydine (50), l'isocorydine (51), le 10-O-méthyl-hernovine (52), la corytuberine (53), la lagesianine A (54) et la nanténine (55) (Figure 8) ont montré une cytotoxicité modérée et non sélective vis-à-vis des souches H1299, MCF-7, et des lignées de cellules tumorales SMMC-7721, avec des valeurs de CI_{50} variant de 53,58 à 73,22 μ M (Sun et al., 2014). En outre, la N-méthylactinodaphine (56) a révélé une forte activité cytotoxique sur les souches HT29 et SKMEL28 (Ndi et al., 2015)

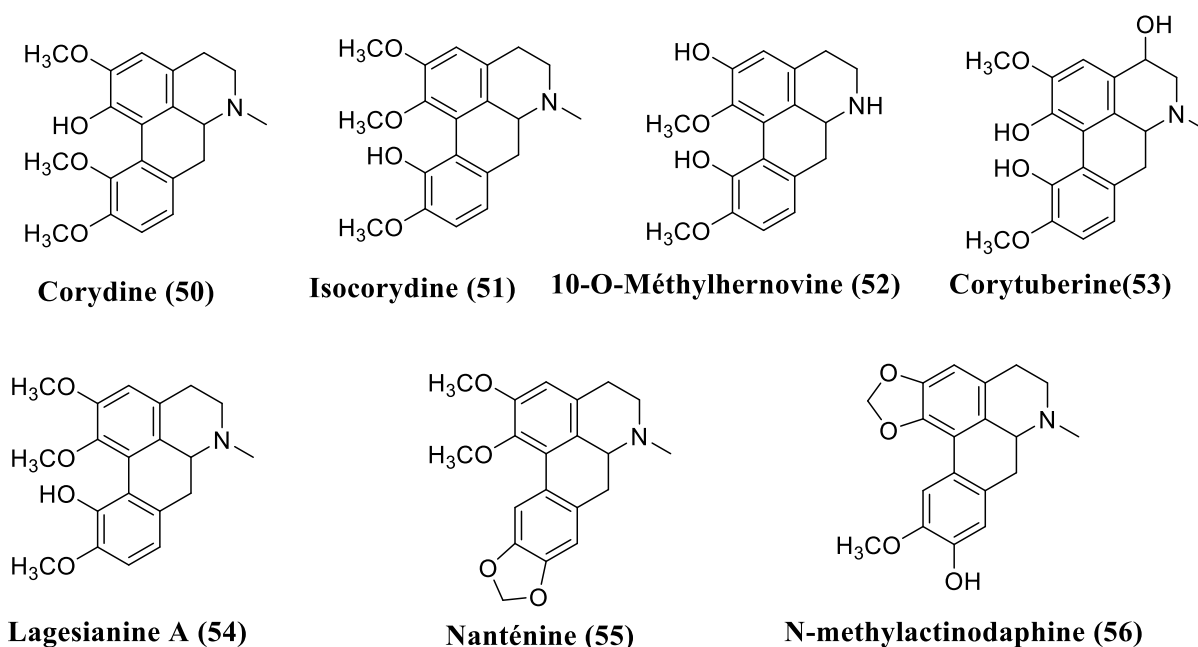
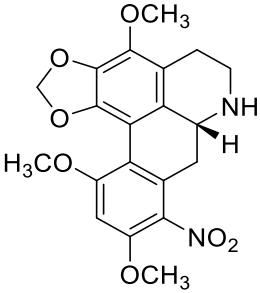
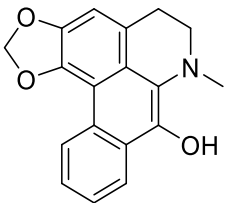
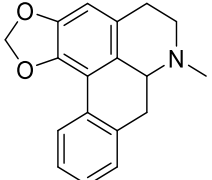


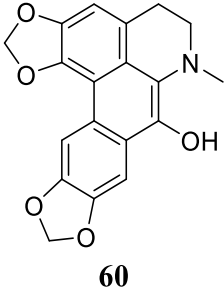
Figure 8 : Structures de quelques alcaloïdes aporphiniques doués de propriétés cytotoxiques

I.4.2.2. Autres activités pharmacologiques des alcaloïdes aporphiniques des *Rubiaceae*

En plus de leur activité cytotoxique, les alcaloïdes aporphiniques présentent d'autres potentiels, notamment antibactérien et antiplasmodial. Le tableau 7 présente les structures de quelques alcaloïdes aporphiniques dotés d'activités antibactérienne et antiplasmodiale.

Tableau 7 : Quelques alcaloïdes aporphiniques doués d'activités antibactérienne et antiplasmodiale

Activités biologiques	Alcaloïdes aporphiniques	CI ₅₀ /MIC	Souches	Références
Antibactérienne	 57 Dasymaroine A	1,2 μ M	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Yu et al., 2019)
		2,5 μ M	<i>Escherichia coli</i>	
	 58 Amocurine D	3,1 μ g/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	(Chumkaew et al., 2021)
Antiplasmodiale	 59 Roemerine	0,89 μ g/mL	<i>Plasmodium falciparum</i>	(Omar et al., 2020)

	 60 Amocurine F	1,84 $\mu\text{g/mL}$	<i>Plasmodium falciparum</i>	(Chumkaew et Srisawat, 2022)
--	--	-----------------------	------------------------------	------------------------------

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Le travail effectué dans le cadre de notre étude comporte deux volets : Un volet phytochimique dans lequel nous avons procédé à l'extraction, l'isolement et à la caractérisation des métabolites secondaires de la plante *Stipularia africana* d'une part et d'un autre volet biologique, où l'évaluation de l'activité cytotoxique de l'extrait brut et des fractions a été faite.

II.1. Extraction et fractionnement

II.1.2. Extraction du matériel végétal

Le matériel végétal constitué de la plante entière, *Stipularia africana* a été récolté au mois d'octobre 2023 à Tibati, région de l'Adamaoua/Cameroun. Par la suite, il a été découpé, séché à température ambiante (25°C) et broyé afin d'obtenir une poudre de 1732 g qui a subi une extraction par macération au dichlorométhane /méthanol (1/1). La solution résultante a été filtrée et concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 50°C pour conduire à un extrait brut (46,11g).

II.1.3. Fractionnement de l'extrait brut

L'extrait obtenu a subi un fractionnement par traitement alcaloïdique (schéma 5) pour donner deux fractions : l'une alcaloïdique et l'autre non alcaloïdique (SAnal). La fraction alcaloïdique a par la suite subi une partition liquide-liquide dans différents solvants organiques conduisant ainsi à la formation de deux nouvelles fractions : l'une soluble dans le dichlorométhane (SAorg1) et l'autre soluble dans l'acétate d'éthyle (SAorg2) et un résidu aqueux.

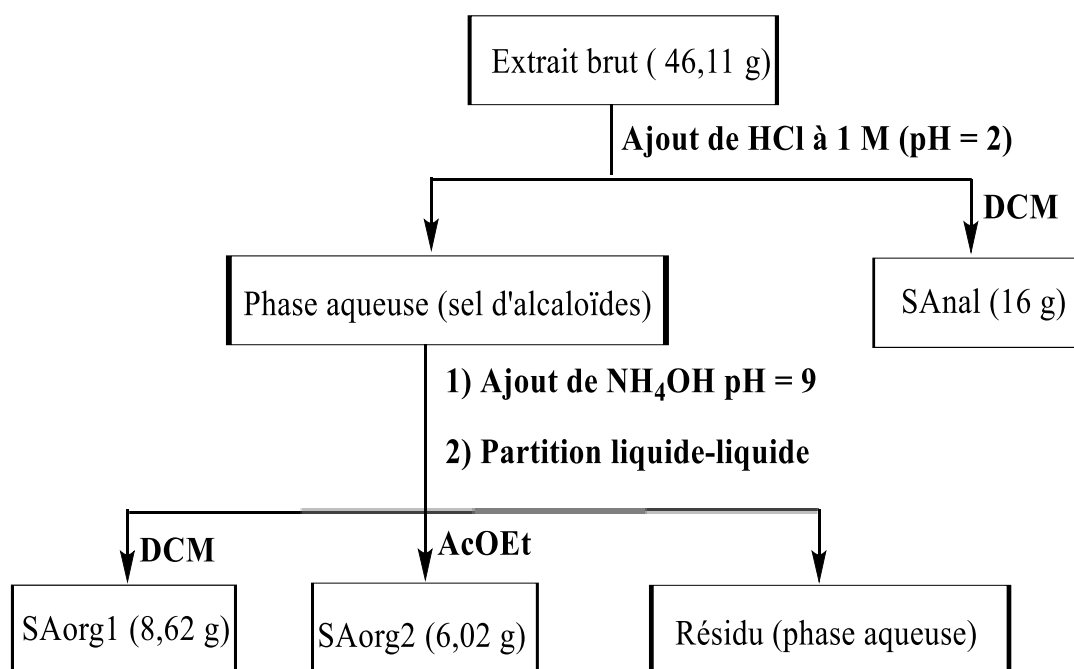


Schéma 5 : Protocole du traitement alcaloïdique de l'extrait brut

L'extrait brut au chlorure de méthylène/ méthanol (1 /1) de *Stipularia africana* et les différentes fractions obtenues après le traitement alcaloïdique de l'extrait brut ont été évalués pour leur activité cytotoxique.

II.2. Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits

II.2.1. Méthodes utilisées et lignées cellulaires

L'activité cytotoxique a été réalisée sur trois lignées cellulaires de glioblastome cérébral humaine (U87-MG, U251 et LN229) à l'aide la méthode du test au MTT dans le but d'avoir une idée sur le potentiel cytotoxique de l'extrait et des fractions de *Stipularia africana*.

II.2.2. Critères de l'évaluation de l'activité cytotoxique

Selon l'Institut National de Cancer des Etats unies, les critères d'évaluation de l'activité cytotoxique sont consignés dans le tableau 8 comme suit ([Widiandani et al., 2023](#)):

Tableau 8 : Critères de l'évaluation de l'activité cytotoxique

$CI_{50}(\mu g/mL)$	Activité cytotoxique
• $CI_{50} \leq 20$	Excellente
• $21 \leq CI_{50} \leq 200$	Modérée
• $201 \leq CI_{50} \leq 500$	Faible
• $CI_{50} > 500$	Pas de cytotoxicité

II.2.3. Résultats des tests cytotoxiques

Les résultats montrent une réponse diversifiée sur ces trois lignées cellulaires, avec un résumé fourni dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats de l'évaluation de l'activité cytotoxique des extraits

Echantillons	$CI_{50} (\mu g/mL)$		
	U87-MG	U251	LN229
SAce	238,90±23,43	804,90±37,98	267,50±17,07
SAaq	>1000	>1000	>1000
SAanal	92,38±5,98	133,30±9,43	139,90±12,45
SAorg1	69,20±6,76	57,90±4,87	23,14±2,54
SAorg2	>1000	>1000	>1000
Oxaliplatine	0,299	13,44	4,784

SAce : extrait brute de SA ; **SAaq** : fraction aqueuse de SA ; **SAanal** : fraction non alcaloïdique de SA ; **SAorg1** : fraction au dichlorométhane de SA ; **SAorg2** : fraction à l'acétate d'éthyle de SA.

Les valeurs de CI_{50} varient entre 23,14 et 804,90 $\mu\text{g/mL}$. À la lumière de ces résultats, il apparaît que les fractions SAorg1 et SAnal présentent une activité cytotoxique modérée vis-à-vis des trois lignées cellulaires U251-MG, U87-MG et LN299. Cette activité modérée suggère que ces fractions pourraient contenir des composés ayant un potentiel cytotoxique direct, ou bien qu'un effet synergique entre les différents composés présents dans les fractions pourrait être responsable de cette activité.

II.3. Isolement et identification structurale des composés isolés

II.3.1. Isolement des composés

La fraction alcaloïdique SAorg1, ayant montré une activité cytotoxique prometteuse par rapport aux autres fractions, a ensuite subi une chromatographie sur une colonne ouverte de gel de silice. L'élution a été réalisée à l'aide de solvants purs ou de mélanges de solvants hexane, acétate d'éthyle et méthanol de polarité croissante. Au terme de ce processus chromatographique, trois composés indexés SA.11, SA.12 et SA.13 ont été isolés, analysés et caractérisés. Le schéma 6 résume le protocole expérimental ayant conduit à l'isolement de ces composés. Dans les pages qui suivent, l'élucidation des structures de ces trois composés sera présentée.

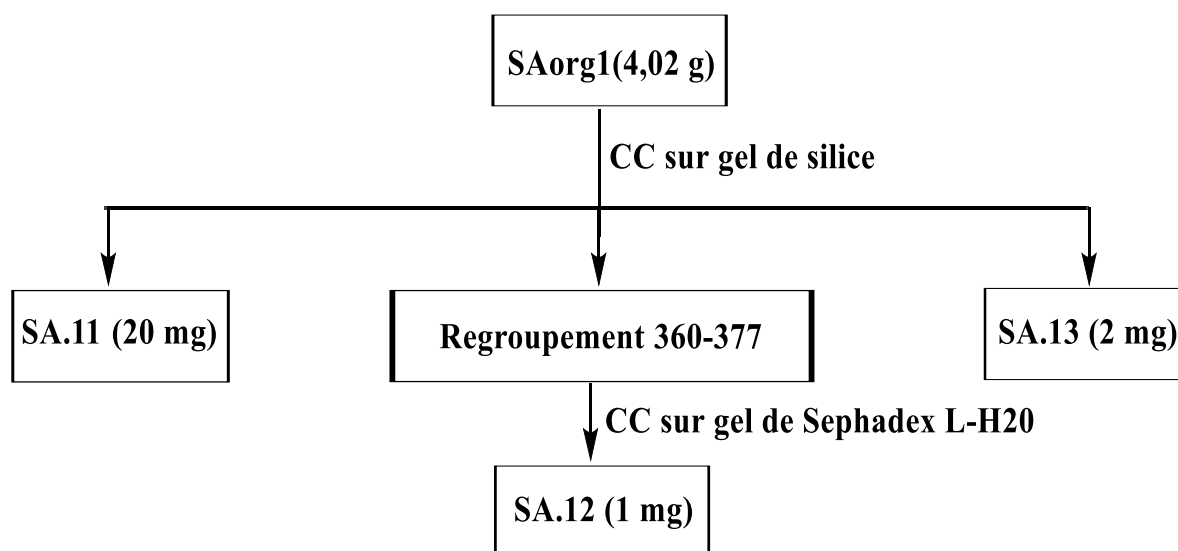


Schéma 6 : Protocole d'isolement des composés de la fraction alcaloïdique au dichlorométhane de *Stipularia africana*

II.3.2. Identification des composés

II.3.2.1. Identification du composé SA.11

Le composé SA.11 précipite sous forme de poudre blanche dans le système *n*-hexane/acétate d'éthyle (19 /1) de la fraction alcaloïdique au DCM de *Stipularia africana*. Il

est soluble dans le dichlorométhane. Dissous dans le chloroforme, il réagit avec l'anhydride acétique en présence de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réactif de Libermann Buchard) en donnant une coloration vert bleuâtre caractéristique des stéroïdes. L'analyse de son spectre RMN ^1H par comparaison aux données décrites dans la littérature a permis d'identifier le composé SA.11 au β -sitostérol (**61**) de formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ renfermant 5 degrés d'insaturations (Nyigo *et al.*, 2016).

En effet, son spectre RMN ^1H (Figure 9) montre un signal de proton oléfinique à δ_{H} 5,36 (1H, m) correspondant au proton H-6, ainsi qu'un ensemble de signaux dont les déplacements chimiques varient entre 0,69 et 2,29 ppm. De plus, un signal correspondant à un proton apparaît à δ_{H} 3,51 (1H, m) correspondant à l'oximéthine en position C-3.

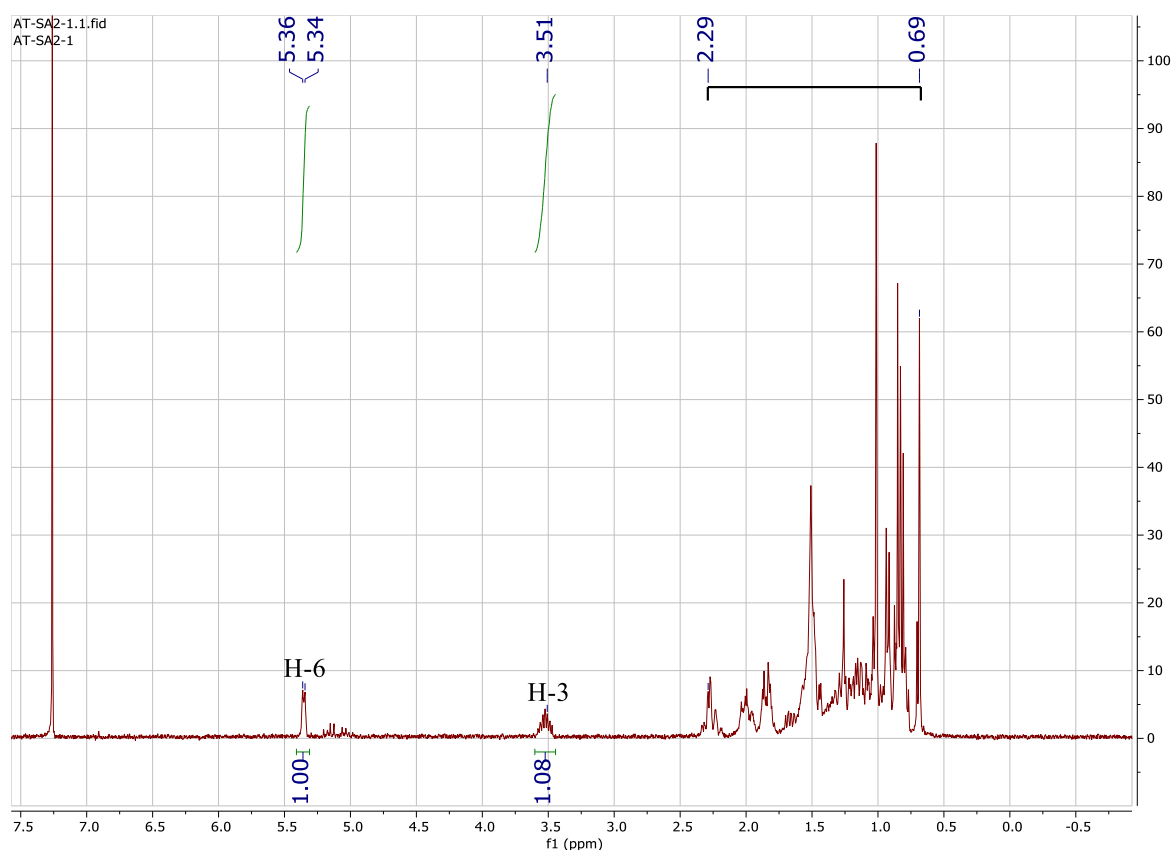
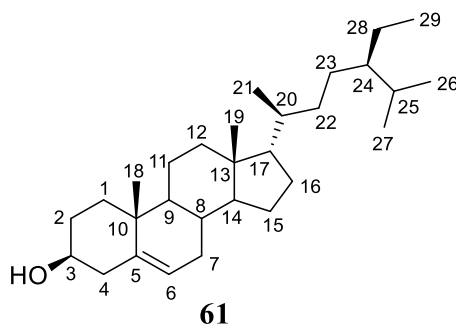


Figure 9 : Spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) élargi du composé SA.11

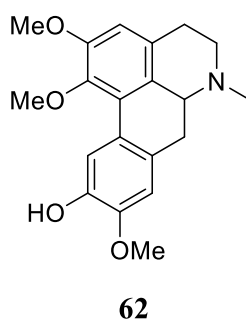


II.3.2.2. Identification du composé SA.12

Le composé SA.12 a été isolé à partir de la sous-fraction extraite au dichlorométhane de l'extrait alcaloïdique de *Stipularia africana*. Il se présente sous forme de poudre jaune dans le système de solvant Hex/AcOEt (3/1). Soluble dans le dichlorométhane. Le composé SA.12 acidifié et préalablement dissous dans le méthanol en présence du réactif de Dragendorff (60 g d'iodure de potassium, 0,85 g de nitrate de bismuth, 13,55 g chlorure de mercure, 200 ml d'ammoniaque et 100 ml de dichlorométhane) donne une coloration rouge orangé lui conférant ainsi sa nature alcaloïdique.

Son spectre de masse à haute résolution et sous ionisation électro-spray en mode positif (figure 10) présente le pic de l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à m/z 342,1706 calculé pour 342,1661 compatible avec la formule brute $C_{20}H_{23}NO_4$ et renfermant 10 degrés d'insaturations.

Une recherche minutieuse dans les bases de données DNP (*Dictionary of Natural Products*) et *Scifinder* en conjonction avec l'analyse des données de RMN à une dimension et à deux dimensions a permis de l'identifier le composé SA.12 à la lirioférine (**62**).



La présence de l'ion fragment $[M+H-31]^+$ correspondant à la perte du CH_3NH_2 confirme que cet alcaloïde aporphinique est N-substitué (N- CH_3). Le schéma 7 présente le mécanisme de fragmentation du composé SA.12 mettant en évidence la perte du groupe méthyl et la formation de l'ion fragment $[M+H-31]^+$ à m/z 311.

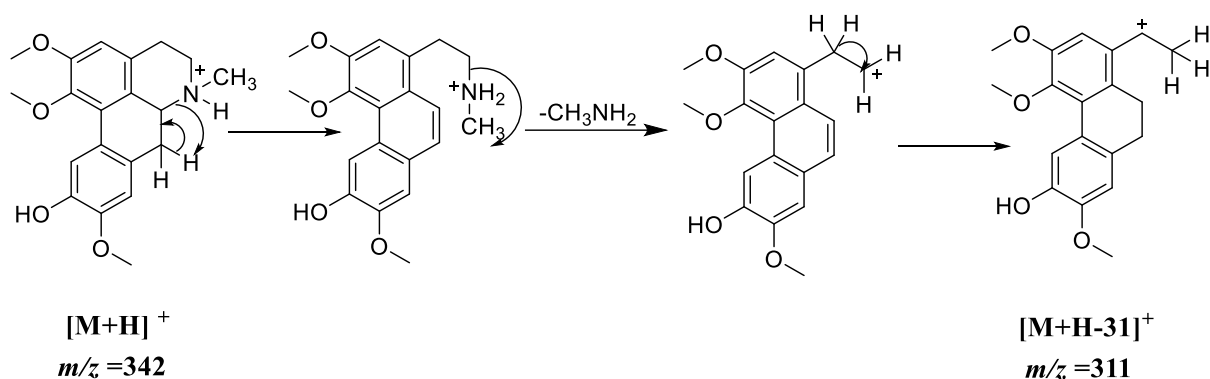


Schéma 7 : Mécanisme probable de fragmentation du composé SA.12

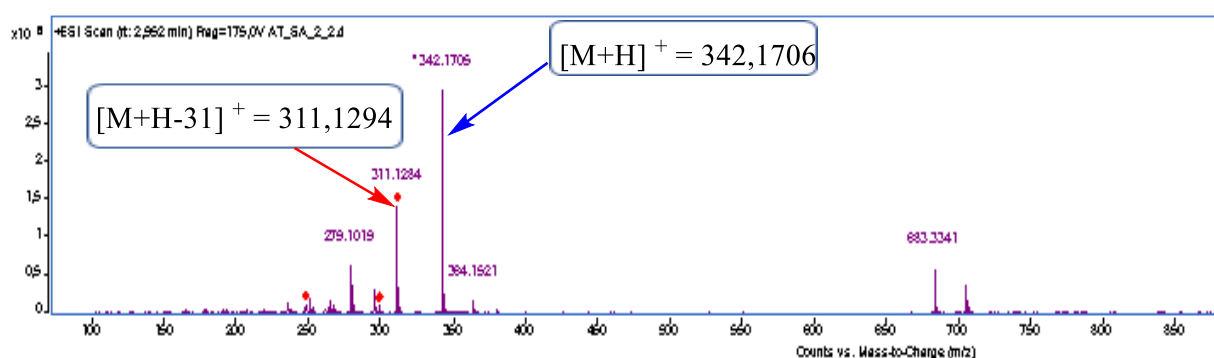


Figure 10 : Spectre de masse HRESI-TOF du composé SA.12

Son spectre UV (Figure 11) présente des bandes d'absorptions à $\lambda_{\max}$ 235, 270 et 303 nm caractéristiques du squelette aporphinique 1,2,9,10 tétrasubstitué (Omar et al., 2020).

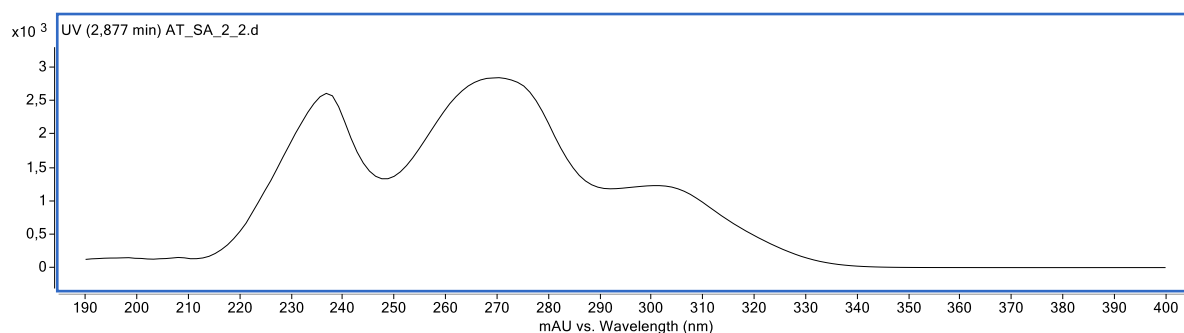


Figure 11 : Spectre UV du composé SA.12

Son spectre de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, Figure 12) découplé proton large bande fait ressortir 20 signaux correspondant aux 20 atomes de carbones que renferment la molécule. L'analyse complète de ces signaux par la technique HSQC (Figure 13) montre les signaux de

carbones hydrogénés des carbones quaternaires, dont 9 atomes de carbones quaternaires hybridés sp^2 à δ_C 119,3 (C-7a) ; 122,1 (C-1b) ; 125,9 (C-1a) ; 126,6 (C-11a) ; 127,1 (C-3a) ; 142,8 (C-2) ; 143,9 (C-10) ; 149,9 (C-9) et 152,7 (C-1). Parmi les atomes de carbones hydrogénés, on distingue :

- Un méthine hybridé sp^3 à δ_C 62,4 (C-6a) et trois autre hybridés sp^2 à δ_C 111,0 (C-3) ; 111,6 (C-8) et 119,7 (C-11).
- Trois méthylènes hybridés sp^3 à δ_C 26 (C-4) ; 32,9 (C-7) ; 52 (C-5).
- Quatre méthyls à δ_C 42,0 ; 55,9 ; 56,0 et 62,1.

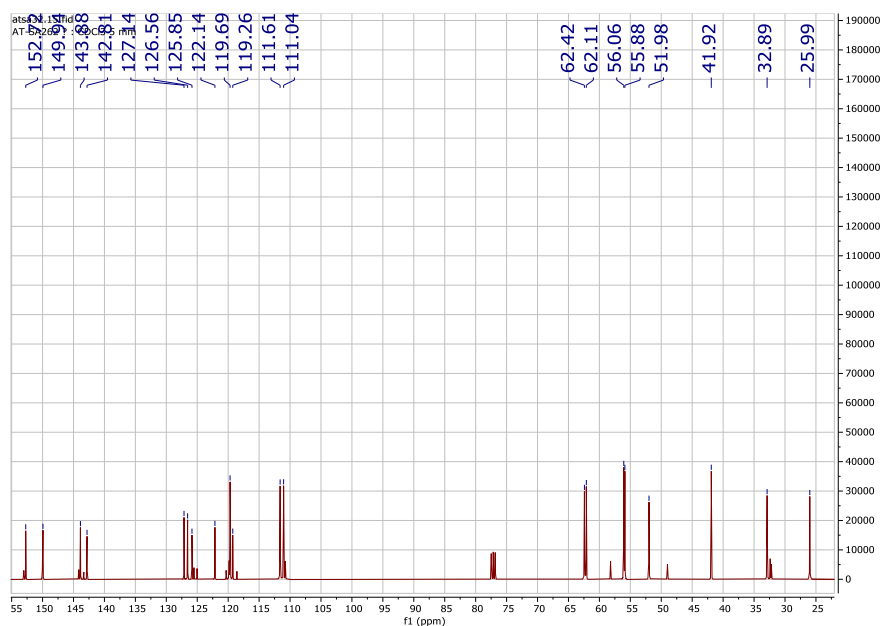


Figure 12 : Spectre de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) du composé SA.12

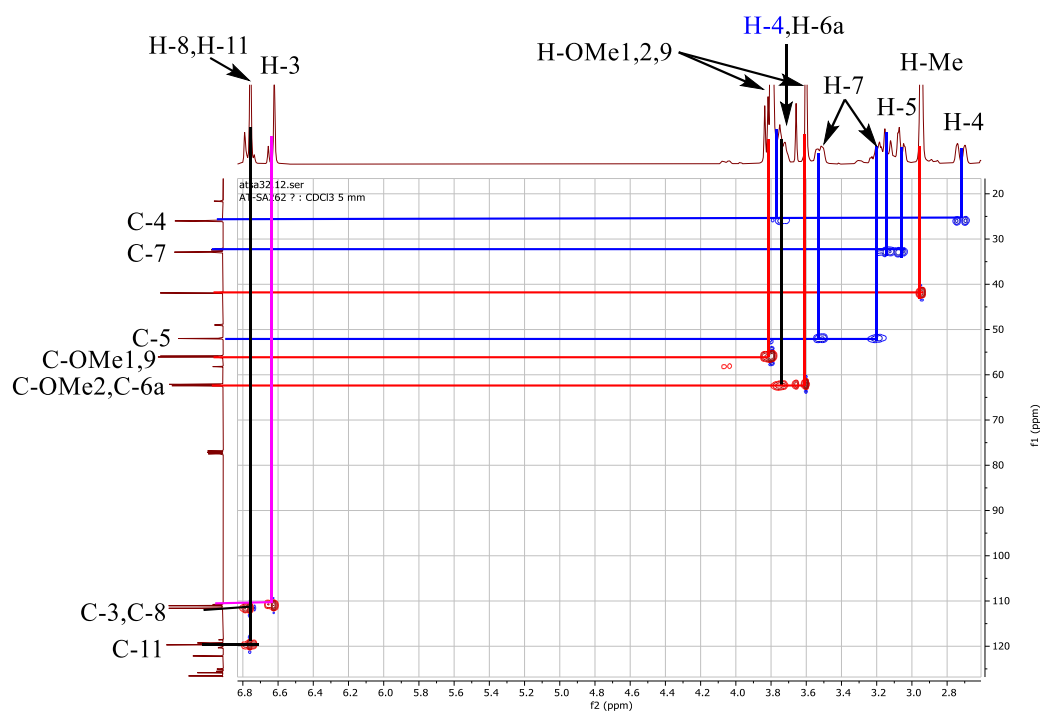


Figure 13 : Spectre HSQC élargi du composé SA.12

Sur le spectre RMN ^1H du composé SA.12 (Figure 14), on observe les signaux caractéristiques des alcaloïdes aporphiniques, résonnant entre δ_{H} 2,70 et δ_{H} 3,74 attribuables aux protons aliphatiques en position H-4, H-5, H-6a et H-7. Dans la zone aromatique de ce même spectre, trois signaux de protons aromatiques sont observés respectivement à δ_{H} 6.61 (1H, s, H-3), 6,74 (1H, s, H-11) et 6,75 (1H, s, H-8). On note également les signaux intégrant pour trois protons, correspondant aux protons des groupe méthoxyle apparaissant à 3,59 (3H, s) ; 3,78 (3H, s) et 3,79 (3H, s) et de ceux d'un du méthyl lié à l'atome d'azote résonant à δ_{H} 2,92 (3H, d).

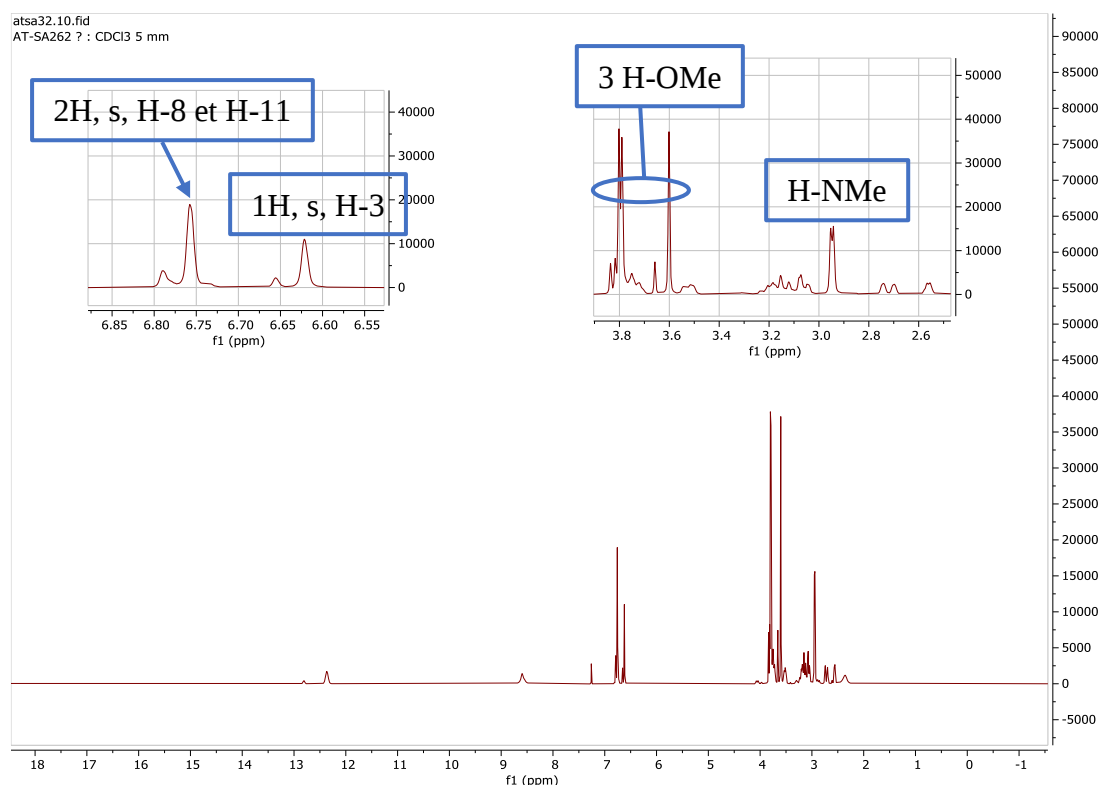


Figure 14 : Spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé SA.12

Les données de RMN 2D, notamment les spectres COSY et HMBC, permettent d'attribuer les carbones quaternaires et de déterminer le mode de substitution sur le squelette aporphinique du composé SA.12. En effet, sur son spectre COSY (Figure 15) on observe les taches de corrélations 3J entre les protons H-4 à δ_{H} 2,70 et H-5 à δ_{H} 3,20, ainsi qu'entre les protons H-6a à δ_{H} 3,74 et H-7 à δ_{H} 3,05.

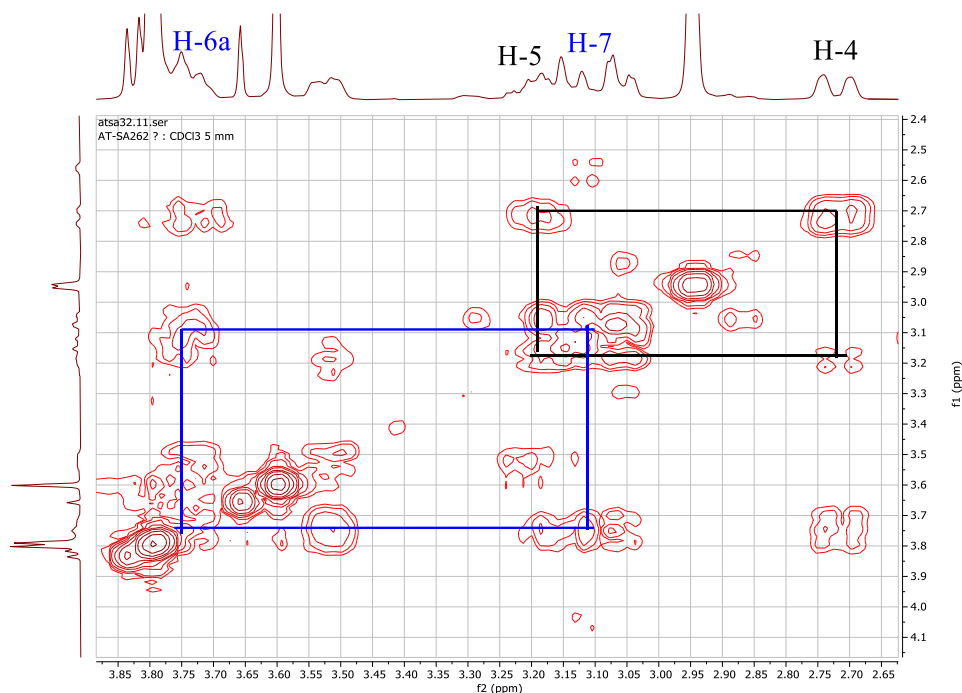


Figure 15 : Spectre COSY élargi du composé SA.12

Les corrélations hétéronucléaires observées sur le spectre HMBC (Figure 16) du composé SA.12 entre les protons des groupes méthoxyles, respectivement à 3,78 (3H, s) ; 3,6 (3H, s,) et 3,79 (3H, s) et les carbones en position C-1, C-2 et C-9 confirment la localisation des groupes méthoxyles.

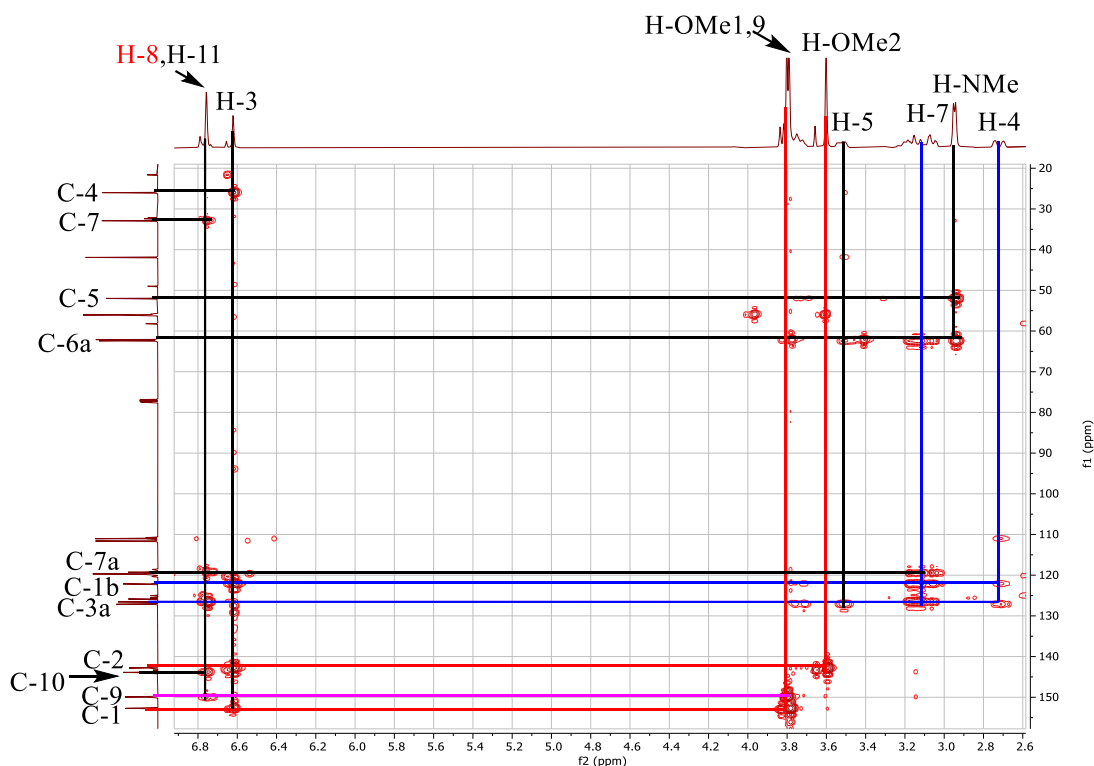


Figure 16 : Spectre HMBC élargi du composé SA.12

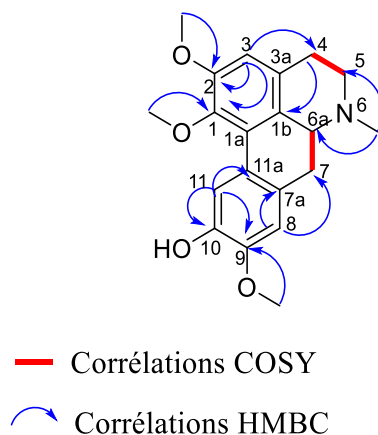
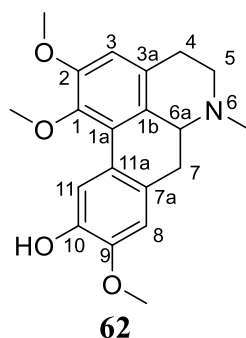


Schéma 8 : Corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC du composé SA.12

L'ensemble de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites dans la littérature a permis d'identifier le composé SA.12 à la lirioférine (**62**) isolée pour la première fois de l'aubier décoloré de *Liriodendron tulipifera* (Magnoliaceae) par Chen-Loung et collaborateur en 1976 (Chen-Loung et al., 1976). Elle possède une activité antimicrobienne significative en inhibant la croissance des cellules de *Enterococcus faecalis* (Rahmasari et al., 2023).



Le tableau 10 présente un récapitulatif des données spectrales du composé SA.12 en comparaison avec celles de la lirioférine.

Tableau 10 : Données spectrales de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) et RMN ¹³C du composé SA.12 (CDCl₃, 100 MHz) et de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de la liriopérine

SA.12					liriopérine (Saidi et al., 2009)
N°	δ _C	δ _H (nH, m, J en Hz)	COSY	HMBC	δ _C
1	152,7	-	-	-	144,2
1a	125,9	-	-	-	127,8
1b	122,1	-	-	-	127,0
2	142,8	-	-	-	152,0
3	111,0	6,61 (1H, s)	-	C1, C2, C3a, C4	110,2
3a	127,1	-	-	-	128,6
4	26	2,70-3,73 (2H, m)	H-5	C3, C3a, C1b	28,8
5	52	3,20-3,50 (2H, m)	H-4	C6a, C3a	53,1
6a	62,4	3,74 (1H, d, 3,37)	H-7	-	62,4
7	33	3,05-3,14 (2H, dd 3,37 ; 13,66)	H-6a	C7a, C1b, C11a, C6a	33,9
7a	119,3	-	-	-	129,8
8	111,6	6,75 (1H, s)	-	C7 ; C7a, C9	113,9
9	149,9	-	-	-	145,3
10	143,9	-	-	-	144,9
11	119,7	6,74 (1H, s)	-	C10, C11a, C7a,	111,2
11a	126,6	-	-	-	123,8
-OMe 1	55,9	3,78 (3H, s)	-	-	60,2
-OMe 2	62,1	3,59 (3H, s)	-	-	56,0
-OMe 9	56,0	3,79 (3H, s)	-	-	55,8
N-Me	42	2,92(3H, s)	-	-	43,6

II.3.2.3. Identification du composé SA.13

Obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange *n*-hexane/acétate d'éthyle (7/3) ; le composé SA.13 est soluble dans le dichlorométhane. Acidifié et préalablement dissous dans le méthanol en présence du réactif de Dragendorff (60 g d'iodure de potassium, 0,85 g de nitrate de bismuth, 13,55 g chlorure de mercure, 200 ml d'ammoniaque et 100 ml de dichlorométhane) il donne une coloration rouge orangé caractéristique des alcaloïdes.

Son spectre de masse à haute résolution sous ionisation electrospray (HRESI-MS) (Figure 17) en mode positif présente le pic de l'ion moléculaire protonée $[M+H]^+$ à m/z 384,1905 calculé pour 384,1766 dont l'analyse à haute résolution a permis de lui attribuer la formule brute $C_{22}H_{25}NO_5$ renfermant 11 degrés d'insaturations.

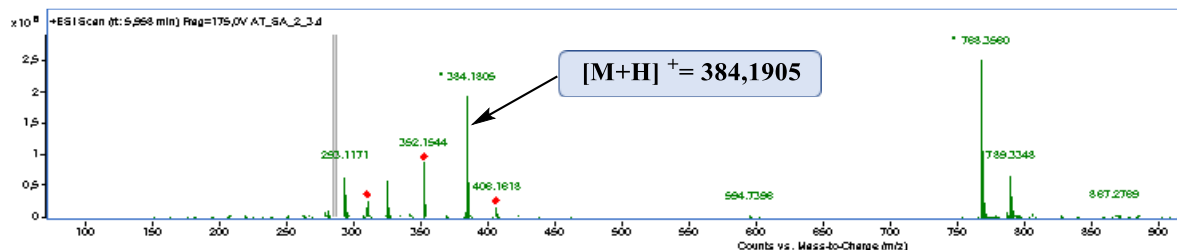
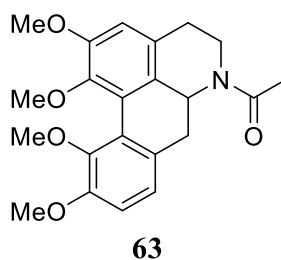


Figure 17 : Spectre de masse HRESI-TOF du composé SA.13

Une recherche minutieuse dans les bases de données DNP (*Dictionary of Natural Products*) et Scifinder en conjonction avec l'analyse des données de RMN à une dimension et à deux dimensions a permis d'identifier le composé SA.13 à la N-acétylcatalpifoline (**63**).



Son spectre UV (Figure 18) présente des bandes d'absorptions à λ_{max} 240, 283 et 305 nm caractéristiques du squelette aporphinique 1,2,10,11 tétrasubstitué (Omar et al., 2020).

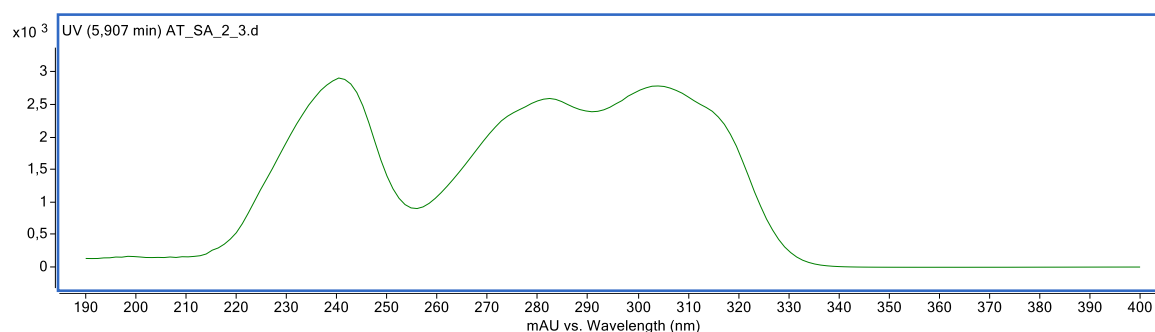


Figure 18 : Spectre UV du composé SA.13

L'analyse comparative des spectres de RMN ^1H des composés SA.13 et SA.12 en conjonction avec celle du spectre HSQC du composé SA.13 (Figures 19 et 20) révèle de nombreuses similitudes. Les similitudes observées sur les spectres de RMN ^1H de ces deux composés ont trait à la présence :

- d'un ensemble de signaux entre δ_{H} 2,70 et δ_{H} 5,06, attribués aux protons aliphatiques en positions H-4, H-5, H-7 et H-6a ;
- de deux signaux de protons aromatiques apparaissant dans la région des champs forts à δ_{H} 6,77 (1H, s) / δ_{C} 111.3 et 6,62 (1H, d, 8) / δ_{C} 110.8; et correspondant respectivement aux protons en positions H-3 et H-8 ;
- des signaux caractéristiques des protons de groupes méthoxyles, apparaissant respectivement à δ_{H} 3,65 (3H, s), 3,88 (3H, s) et 3,89 (3H, s) ;

En revanche, comme éléments de différence, on note :

- l'apparition d'un signal à δ_{H} 2,20 (3H, s) / δ_{C} 22,5 correspondant au groupe méthyle lié à un groupement acétyle ;
- la présence d'un signal de méthoxyle supplémentaire apparaissant à δ_{H} 3,89 (3H, s) / δ_{C} 55,7 ;
- le déplacement dans la région des champs faibles des signaux des protons aliphatique et aromatique apparaissant désormais à δ_{H} 5,06/ δ_{C} 50,6 et à δ_{H} 8,14/ δ_{C} 111.7, et attribuable aux protons en positions H-6a et H-9 respectivement ;
- et la disparition du signal correspondant au proton du groupe méthyle lié à un atome d'azote.

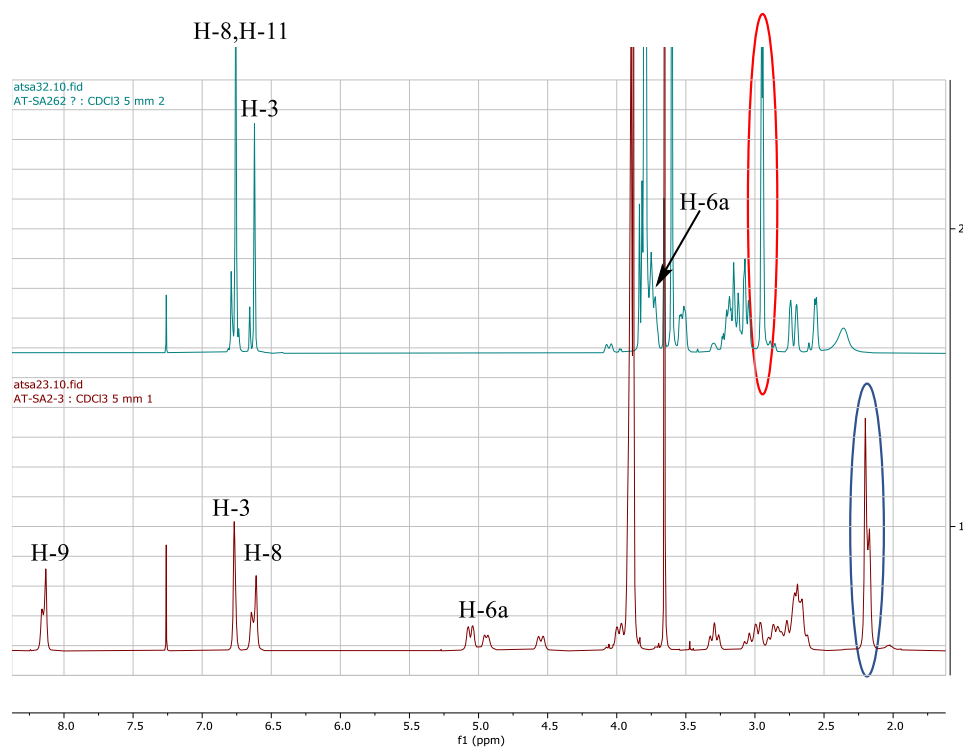


Figure 19 : Spectres comparatifs de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) des composés SA.13 et SA.12

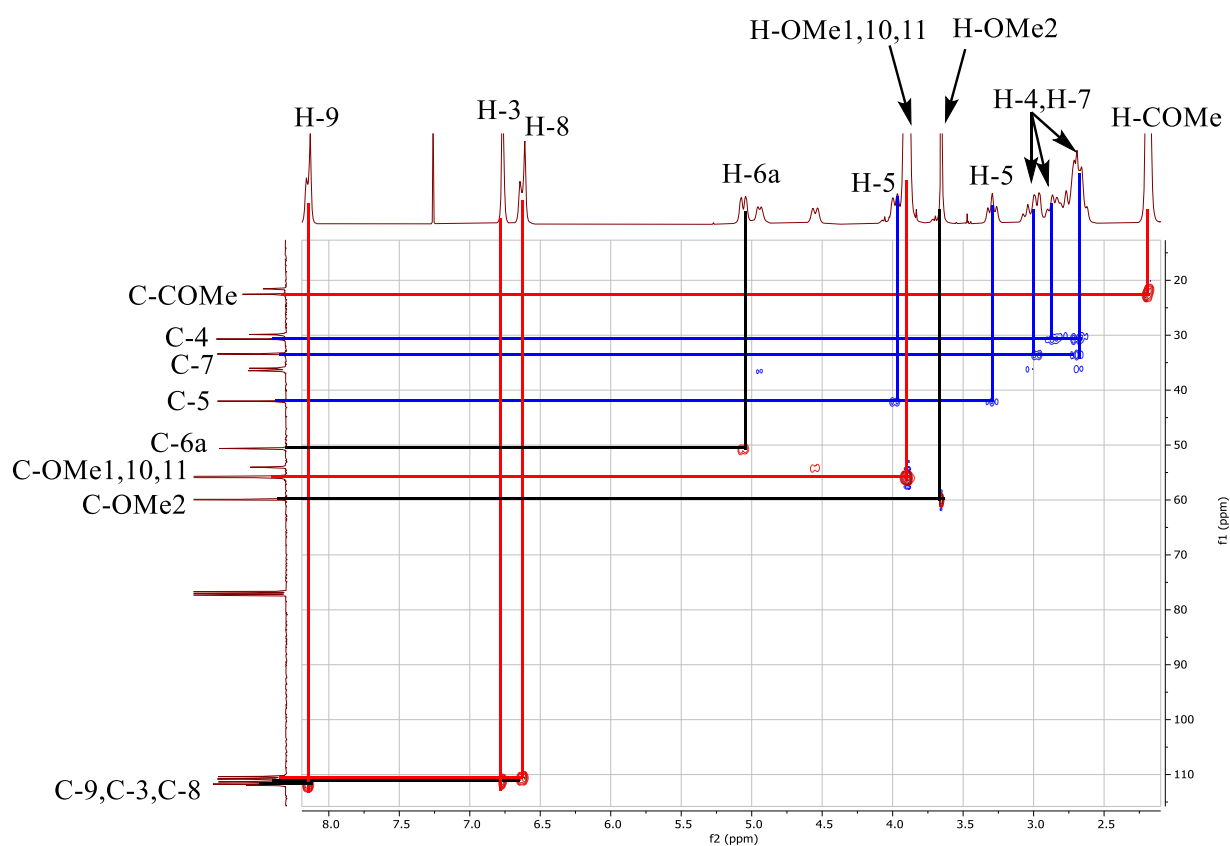


Figure 20 : Spectre HSQC élargi du composé SA.13

L'ensemble de ces données spectrales confirme que le composé SA.13 est un alcaloïde de type aporphine, renfermant dans sa structure un groupement acétyle et quatre groupes méthoxyles.

Les positions de ses différents substituants ont été confortées par les taches de corrélations observées sur les spectres COSY (Figure 21) et HMBC (Figure 22) du composé SA.13.

En effet, les taches de corrélations homonucléaires entre les protons H-4 et H-5 apparaissant respectivement à δ_H 1,69 (1H, m) et à δ_H 3,29 (1H, m) d'une part, et entre les protons H-7 et H-6a apparaissant respectivement à δ_H 1,7 (1H, m) et à δ_H 5,06 (1H, m), confirme leurs différentes positions.

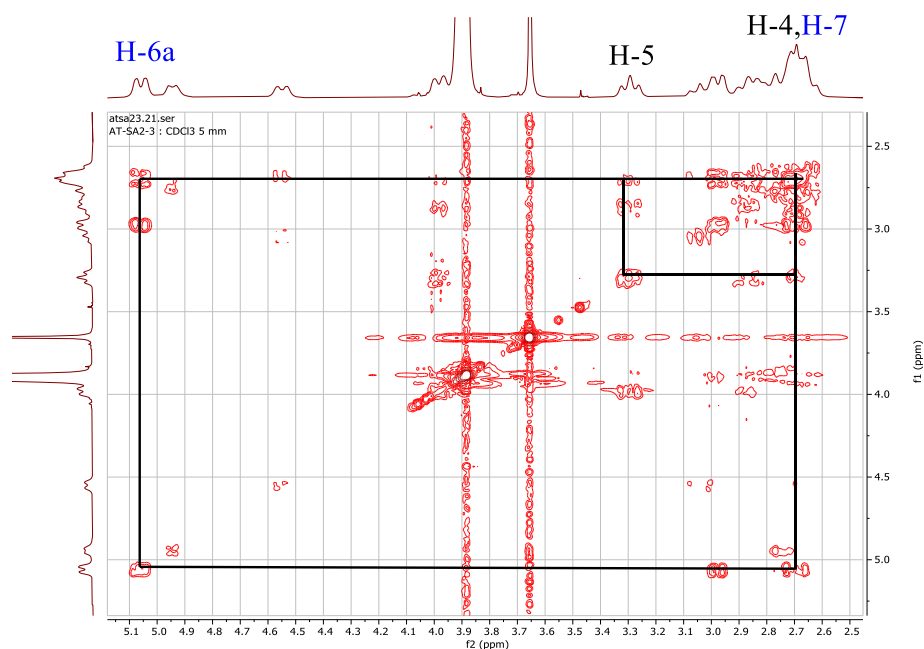


Figure 21 : Spectre COSY (CDCl₃, 400 MHz) élargi du composé SA.13

Par ailleurs, les corrélations hétéronucléaires 1H - ^{13}C observées sur le spectre de HMBC entre les protons de chacun des quatre groupes méthoxyle et les carbones en position C-1, C-2, C-10 et C-11, respectivement confirment la position des différents groupes méthoxyles. De plus, la corrélation entre les protons du méthyle apparaissant à δ_H 2,20 et le carbone du carbonyle à δ_C 160,0 confirme bien que ce groupe méthyle est lié au carbonyle.

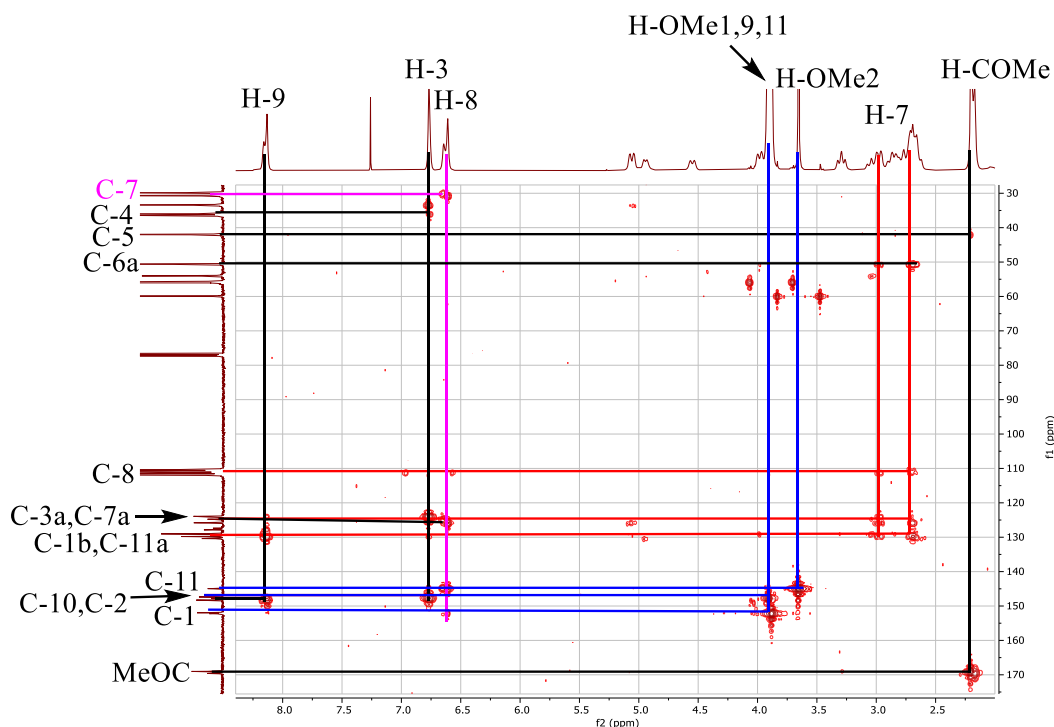


Figure 22 : Spectre HMBC élargi du composé SA.13

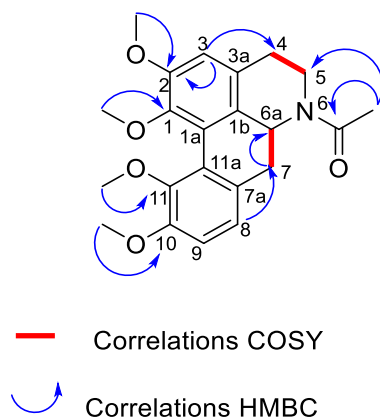
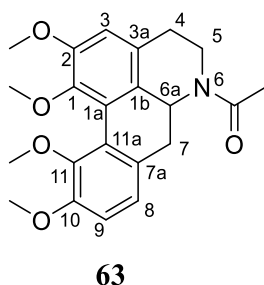


Schéma 9 : Corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC du composé SA.13



L'ensemble de ces données spectrales, comparées à celles décrites dans la littérature, confirme que la structure du composé SA.13 correspond à celle de la N-acétylcatalpifoline (**63**).

Le tableau 11 présente un récapitulatif des données spectrales du composé SA.13.

Tableau 11 : Données spectrales de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) et RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé SA.13

SA.13				
N°	δ_{H} (nH, m, J en Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC
1	-	151,9	-	-
1a	-	129,0	-	-
1b	-	110,3	-	-
2	-	144,9	-	-
3	6,77 (1H, s)	111,3	-	C2, C4
3a		123,8	-	-
4	2,69-2,98 (2H, m)	33,4	H-5	3a
5	3,29-3,98 (2H, m)	42,0	H-4	C6a,
6a	5,06 (1H, dd, 14,28 ; 9,75)	50,6	H-7	-
7	2,70-2,85 (2H, dd, 14,28 ; 4,37)	30,7	H-6a	C1b, C6a et C11a
7a	-	125,8	-	-
8	6,62 (1H, d, 12,39)	110,8		C7, C7a
9	8,14 (1H, d, 12,39)	111,7	-	C11a, C10
10	-	148,9	-	-
11	-	147,4	-	-
11a	-	129,9	-	-
-OMe 1	3,88 (3H, s)	55,9	-	C1
-OMe 2	3,65(3H, s)	60,0	-	C2
-OMe 10	3,89 (3H, s)	55,9	-	C10
-OMe 11	3,89(3H, s)	55,7	-	C11
MeC <u>O</u>		160,0	-	-
CO <u>Me</u>	2,20	22,5	-	C5, MeOC <u></u>

Ce travail a conduit à l'isolement et à l'identification de trois composés, le β -sitostérol, la lirioféline et la N-acétylcatalpifoline.

Il est rapporté dans la littérature que la lirioféline présente des activités anti-inflammatoires ([Rahmasari et al., 2023](#)), tandis que le β -sitostérol possède des propriétés antimicrobiennes ([Loizou et al., 2010](#)). Toutefois, aucune activité cytotoxique n'a été décrite en ce jour pour ces trois composés.

En raison des très faibles quantités des produits isolés, il n'a pas été possible d'évaluer directement leur potentiel cytotoxique. Cependant, deux fractions distinctes dont l'une alcaloïdique et l'autre non alcaloïdique obtenue tous les deux avec le dichlorométhane (DCM), ont montré une activité cytotoxique modérée. Cette activité pourrait être attribuée à la présence de composés agissant en synergie dans ces fractions.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail a porté sur l'exploration de la diversité chimique et l'évaluation de l'activité cytotoxique de *Stipularia africana*. Dans la recherche de composés à potentiel cytotoxique, nous avons évalué l'activité de l'extrait brut ainsi que des fractions obtenues. Les résultats indiquent que les fractions alcaloïdique et non alcaloïdique présentent une activité cytotoxique modérée sur trois lignées cellulaires de glioblastome cérébral (U251-MG, U87-MG et LN229), avec des valeurs de CI_{50} variant de 23,14 à 139,90 $\mu\text{g/mL}$.

L'investigation phytochimique de la fraction alcaloïdique au dichlorométhane, identifiée comme l'une des plus actives, a conduit à l'isolement et à la caractérisation de trois composés : le β -sitostérol, la lirioférine et la N-acétylcatalpifoline. Bien que ces composés n'aient pas pu être testés pour leur cytotoxicité en raison de leurs faibles quantités, leur provenance d'une fraction modérément cytotoxique suggère qu'ils pourraient présenter une activité biologique intéressante.

Ces résultats apportent une réponse partielle à notre question de recherche en démontrant que l'extrait de *Stipularia africana* contient des métabolites secondaires susceptibles de présenter une activité cytotoxique agissant potentiellement de manière individuelle ou synergique. Bien que ces composés n'aient pas encore été évalués spécifiquement pour leur activité cytotoxique, les fractions alcaloïdiques et non alcaloïdiques identifiées constituent une base prometteuse pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre le cancer.

Pour approfondir ces conclusions, les travaux futurs se concentreront sur la purification des fractions restantes, l'étude des autres parties de la plante (fleurs et fruits), ainsi que l'évaluation de l'activité cytotoxique des composés isolés dans des quantités suffisantes. Ces étapes permettront de mieux comprendre le potentiel thérapeutique de cette espèce et de valoriser davantage sa richesse chimique.

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Récolte et identification du matériel végétal

Le matériel végétal de *Stipularia africana* a été récolté en octobre 2023 à Tibati, une localité de la région de l'Adamaoua au Cameroun en compagnie du botaniste Dr Essono du Département de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I. L'identification s'est faite par comparaison à un échantillon disponible à l'Herbier National du Cameroun sous le numéro de référence 7244. Après la récolte, le matériel végétal a été découpé, séché à température ambiante (25°C) et broyé pour obtenir une poudre (1732 g).

Pour isoler les métabolites secondaires de cette espèce et élucider leurs structures, divers équipements et techniques ont été nécessaires.

III.2. Appareillages et matériels

Du broyage du matériel végétal jusqu'à l'isolement des composés a été réalisé avec les appareillages et matériels disponibles au Laboratoire des Substances Naturelles et de Synthèse Organique appliquée.

❖ Appareillages

Une broyeuse Retsch de type SM 100 qui à 230 V, 10.0 A, 1.5 KW, 1390 tr/min et 50 Hz, a été utilisé pour le broyage du matériel végétal.

Deux balances, l'une de marque COBOS, modèle D-600-SX et l'autre de marque SARTORIUS de précision 1/1000, ont été utilisées pour effectuer les différentes pesées.

Un évaporateur rotatif de type Heidolph connecté à un circulateur d'eau de marque LAUDA et de type WKL 230 a été utilisé pour effectuer les différentes évaporations

Une lampe UV de type Herolab (UV-8S/L) aux longueurs d'onde 254 et 360 nm ; a été utiliser pour la révélation des plaques CCM. Par la suite, cette révélation a été également faite successivement à l'aide des vapeurs d'iode et de l'acide sulfurique dilué (H₂SO₄, 20%).

Les analyses spectrales des composés isolés ont été faites en collaboration avec la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris-Saclay en France :

Les spectres de masse haute résolution ESI-TOF (*ElectroSpray Ionisation-Time Of Flight*) ont été réalisés sur un spectromètre à trappe d'ion thermoquest TLM LCQ en *by pass*, soit en LC-MS, chaîne UPLC (Agilent) (colonne BEH Acquity C18 1.0 x 50 mm, 1.7 µm) couplée d'un spectromètre de masse ESI-TOF (LCT Premier XE) et d'un détecteur UV PDA (Agilent).

Les expériences de résonnance magnétique nucléaire ont été réalisées sur un appareil Bruker Avance 400 MHz pour le ^1H et 100 MHz pour le ^{13}C en utilisant le chloroforme deutéré (CDCl_3) comme solvant. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) relatif au tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques du CDCl_3 sont : (δ_{H} : 7,24 ; δ_{C} : 77,23). Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). Les multiplicités des signaux des protons sont données par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), m (multiplet) et dd (doublet dédoublé). L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D (^1H et ^{13}C) associée aux expériences 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC et ^1H - ^{13}C HMBC) en utilisant le logiciel *MestReNova*.

❖ Matériels

Des larges récipients en verre ; tels que l'erlenmeyer et l'ampoule à décanter ont été utilisés respectivement pour la macération du matériel végétal et pour le fractionnement de l'extrait brut par traitement alcaloïdique.

Une colonne ouverte en verre de 65 cm de hauteur et de 4 cm de diamètre interne, avec pour phase stationnaire la silice (SiO_2) de granulométrie 40-60 μm de type MERCK ou le Séphadex LH-20 (40-75 μm), a été utilisée pour réaliser une Chromatographie sur Colonne (CC).

Des plaques carrées fabriquées en feuilles d'aluminium recouverte d'une mince couche gel de silice de type Merck 60 F254, d'épaisseur 0,2 mm et de dimension 20 cm $\times$ 20 cm, ont été utilisées pour réaliser les Chromatographies sur couche mince (CCM).

Les cuves chromatographiques de forme cylindrique ont été utilisées pour développer les plaques chromatographiques dans un solvant ou un système de solvants constitué d'hexane, d'acétate d'éthyle, et de méthanol de polarité croissante.

Extraction de la poudre de *Stipularia africana*

La poudre obtenue a subi une extraction par macération avec un mélange de solvants constitué de dichlorométhane et de méthanol dans les proportions équivalentes à température ambiante (25-27°C) pendant 48 heures. La solution résultante a été filtrée et concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 50°C, ce qui a permis d'obtenir 46,11 g d'extrait brut de couleur verte. Cet extrait brut a ensuite été soumis à un fractionnement par traitement alcaloïdique.

III.4. Fractionnement de l'extrait brut par traitement alcaloïdique

L'extrait brut (46,11 g) a subi un traitement alcaloïdique (Schéma 5). Au cours de ce processus, l'ajout de l'eau acidifiée a permis dans un premier temps de le diviser en deux fractions : l'une soluble dans le dichlorométhane (16,00 g), et l'autre, un sel d'alcaloïde soluble dans l'eau. Cette solution aqueuse a été soumise à un traitement basique, suivi d'une partition liquide-liquide entraînant la formation de nouvelles phases dont deux organiques : l'une dans le dichlorométhane (6,02 g) et l'autre dans l'acétate d'éthyle (8,62 g) et à un résidu aqueux

III.5. Isolement et purification des composés

L'extrait alcaloïdique au dichlorométhane (4,02 g) a été fixé sur la célite dans les proportions (1 : 2) et chromatographié sur une colonne ouverte de 4 cm de diamètre et 65 cm de hauteur. L'élution s'est faite avec des solvants ou mélange de solvants constitué d'hexane, d'acétate d'éthyle et de méthanol de polarité croissante. De cette colonne, 414 fractions de 100 mL chacune ont été recueillies et rassemblées sur la base de leur profil chromatographique sur couche mince. Le tableau 12 résume l'ensemble de ces données.

Tableau 12 : Récapitulatif de l'isolement des composés de l'extrait alcaloïdique au dichlorométhane de *Stipularia africana*

Système d'élution	Fractions	Séries	Observations
<i>n</i> -Hexane	1-3	S1	Ne présente aucune tache ni trainée.
<i>n</i> -Hexane	4-6	S2	Cette sous fraction présente deux taches à l'UV dont l'une est fluorescente et l'autre non qui se révèle également à l'iode et à l'acide.
<i>n</i> -Hexane	7-10	S3	Ne présente aucune tache ni trainée.
<i>n</i> -Hexane	11-16	S4	Cette sous fraction montre une tache fluorescente qui se révèle juste à l'UV.
<i>n</i> -Hexane	17-46	S5	Cette sous fraction ne présente aucune tache ni trainée.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (37/1)	47-61	S6	Cette sous fraction présente une trainée à l'iode et à l'acide sulfurique dilué après calcination.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (37/1)	62-68	S7	Cette sous fraction présente plusieurs taches à l'UV, à l'iode et à l'acide sulfurique dilué après calcination
<i>n</i> -Hex/AcOEt (37/1)	69	S8	Cette sous fraction présente une tache fluorescente après révélation à l'UV, trois tâches après révélation à l'iode et à l'acide.

<i>n</i> -Hex/AcOEt (37/1)	70-73	S9	Cette sous fraction ne présente une tache qui se révèle juste à l'iode.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (37/1)	74-112	S10	Cette sous fraction présente deux taches fluorescentes à l'UV et 3 tâches à l'iode et à l'acide sulfurique dilué après calcination.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (37/1)	113-133	S11	Cette sous fraction présente une tache fluorescente à l'UV et deux taches à l'iode et à l'acide sulfurique après calcination.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (19/1)	134-171	S12	Cette sous fraction présente deux taches qui se révèlent à l'UV (petite longueur d'onde) et l'iode.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (19/1)	172-209	S13	Cette sous fraction présente deux taches qui se révèlent à l'UV, l'iode et à l'acide sulfurique après calcination.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (19/1)	210-221	S14	Cette sous fraction présente une trainée rouge à l'UV et trois taches à l'iode et à l'acide.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (37/3)	222-227	S15	Cette sous fraction présente une tache à l'iode et deux taches à l'acide.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (9/1)	228-236	S16	Cette sous fraction révèle plusieurs taches aussi bien à l'UV, à l'iode qu'à l'acide.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (9/1)	237-255	S17	Cette sous fraction révèle plusieurs taches et une trainée aussi bien à l'UV, à l'iode qu'à l'acide.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (9/1)	256-282	S18	Cette sous fraction présente trois taches à l'UV plus une trainée rouge. Après révélation à l'iode et l'acide, on observe cinq taches.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (9/1)	283-287	S19	Cette sous fraction montre une tache après révélation à l'iode et à l'acide sulfurique après calcination.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (17/3)	288-325	S20	Cette sous fraction présente plusieurs taches plus une trainée rouge à l'UV et on observe ces mêmes taches à l'iode et à l'acide sulfurique après révélation.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (3/1)	326-359	S21	Cette sous fraction présente une tache et deux taches avec une trainée rouge à l'UV respectivement à la petite et grande longueur d'onde. A l'iode, on observe une tache et trois taches à l'acide.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (3/1)	360-377	S22	Cette sous fraction présente une tache fluorescente avec une trainée rouge à l'UV (grande longueur d'onde), une tache à l'iode et trois taches à l'acide après calcination.
<i>n</i> -Hex/AcOEt (7/ 3)	378-404	S23	Cette sous fraction présente deux taches à l'iode et à l'UV dont l'une fluorescente à la grande longueur

			d'onde (360 nm) et l'autre à la petite longueur d'onde (254 nm).
<i>n</i> -Hex/AcOEt (3/2)	405-414	S24	Cette sous fraction sous fraction présente une trainée après révélation à l'iode et à l'UV et deux taches à l'acide.
MeOH	-	S25	Lavage

❖ Protocole d'obtention des composés

• Traitement de la série S11 : obtention de SA.11

La sous-fraction 113-133, obtenue par élution au système Hex/AcOEt à (19/1), a été obtenue sur la base des résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM) analytique pour former la série S11. Après avoir été laissé au repos à température ambiante pendant 24 heures, un précipité s'est formé. Ce précipité a été filtré, lavé au méthanol, puis séché pour obtenir une poudre blanche. Une analyse par CCM du produit indique qu'il est pur. Cette poudre a été indexée SA.11 et pèse 20 mg.

• Traitement de la série S22 : obtention de SA.12

La sous-fraction 360-377 obtenue par élution au système Hex/AcOEt (3/1) a été obtenue sur la base de leurs profils chromatographiques pour donner la série S22 (27 mg) qui a été soumise à une chromatographie sur une colonne de gel de Séphadex LH20. Ainsi, cette série a été fixée sur la silice dans les proportions 1 :2, puis chromatographiée sur une colonne de 4 cm de diamètre pour 65 cm de longueur. L'élution s'est effectuée de manière isocratique avec un mélange de solvants chlorure de méthylène/méthanol dans les proportions (1/4). Comme le montre le tableau 14, 85 fractions de 10 mL ont été recueillies et regroupées en fonction de leurs profils chromatographiques.

Tableau 13 : Récapitulatif de l'isolement des composés de la série S22

Système d'élution	Sous fractions	Série	Observation
DCM/MeOH (1/4)	1-43	S°1	Ne présente aucune tache
DCM/MeOH (1/4)	44-55	S°2	Présente une tache fluorescente à l'UV
DCM/MeOH (1/4)	56-85	S°3	Ne présente aucune tache
MeOH	-	S°4	Lavage

La sous fraction 44-55 obtenue par élution au système DCM/MeOH (1/4) a été regroupée sur la base de la CCM analytique pour donner la série S°2. Laissée au repos à température ambiante pendant 3 jours, il s'est formé un précipité jaune. Le profil chromatographique de ce produit nous laisse croire qu'il est pur et est alors indexé **SA.12 (1mg)**.

- **Traitement de la série S23 : obtention de SA.13**

La sous fraction 378-404 obtenue par élution au système Hex/AcOEt (7/3) a été regroupée sur la base de la CCM analytique pour donner la série S23. Laissée au repos à température ambiante, il s'est formé un précipité qui a été filtré, lavé avec le Méthanol puis séché pour donner une poudre de couleur blanc cassé. Le profil chromatographique nous laisse croire qu'il est pur et est alors indexé **SA.13 (2mg)**.

III.6. Evaluation de l'activité cytotoxique

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en collaboration avec le Professeur Dzoyem Jean Paul du Département de Biochimie de l'Université de Dschang. L'effet inhibiteur des échantillons sur la croissance des cellules cancéreuses a été évalué sur trois lignées de glioblastome : les cellules d'astrocytome U251-MG, les cellules de glioblastome épithéliales U87-MG et les cellules de glioblastome de type épithéliale LN229. La cytotoxicité *in vitro* contre ces lignées cellulaires a été déterminée à l'aide du test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium).

- **Culture des cellules**

Les cellules ont été cultivées dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) riche en glucose, supplémenté de 10 % de sérum bovin fœtal (FTS) et d'une solution contenant 1 % de pénicilline/streptomycine/fungizone (PSF). Les lignées cellulaires ont été maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5 % de CO₂. L'oxaliplatine, médicament de chimiothérapie à base de platine principalement utilisé pour traiter le cancer colorectal, a été utilisé comme référence pour les tests de cytotoxicité.

- **Principe**

Le test au MTT est un dosage colorimétrique qui repose sur la réduction d'un sel de tétrazolium jaune en cristaux de formazan violets par des cellules métaboliquement actives. Le réactif utilisé est le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Ce composé contient un anneau de tétrazolium qui est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes.

La réduction du MTT produit un précipité de couleur violette dans les mitochondries des cellules actives. La quantité de précipité formée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et à leur activité métabolique. Après avoir incubé les cellules avec le MTT pendant environ 4 heures à 37°C, il est crucial de dissoudre le précipité de formazan violet dans du DMSO à 100%. Cette étape permet de quantifier la quantité relative de cellules vivantes et métaboliquement actives en mesurant la densité optique à 570 nm par spectroscopie.

- **Mode opératoire**

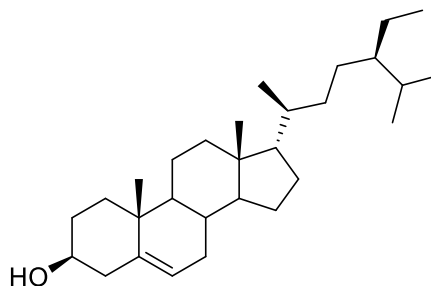
Les cellules ont été récoltées en phase logarithmique en utilisant de la trypsine (0,05% de trypsine, 0,02% d'EDTA, dans du PBS). Par la suite, les suspensions cellulaires ont été diluées avec un milieu de croissance approprié pour obtenir une densité cellulaire de 10^4 cellules/puits. Des aliquotes de 100 μ L de chaque suspension ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 96 puits. Les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère humide de 5% de CO₂ relative dans un incubateur à CO₂. Après l'incubation, des matériaux de test (100 μ L/puits) à différentes concentrations ont été ajoutés aux puits contenant les cellules. Les plaques ont ensuite été incubé pendant 48 heures, puis le milieu de chaque puits a été aspiré et la solution de MTT (2mg/mL dans du PBS) a été diluée au 1 :10 avec du milieu frais et ajouté à chaque puits et les plaques ont été incubées à 37°C pendant 4 heures. Le milieu a été aspiré des puits et du DMSO a été ajouté pour solubiliser les cristaux de formazan formés. L'absorbance de la solution solubilisée obtenu a été mesurée sur un lecteur de microplaques BioTek à 570 nm. La concentration provoquant une inhibition de 50% de la croissance cellulaire (CI₅₀) a été calculée à partir de la courbe concentration-réponse d'inhibition par analyse de régression.

La doxorubicine a été utilisée comme contrôles positif. Des contrôles appropriés avec une concentration équivalente de DMSO ont également été inclus.

III.7. Caractéristiques physico-chimiques des composés isolés

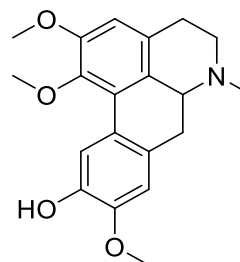
❖ Composé SA.11

- **Aspect physique** : Poudre blanche
- **Solvant de solubilité** : Chloroforme
- **Test Libermann Buchard** : Positif
- **Formule brute** : $C_{29}H_{50}O$
- **Masse moléculaire** : 412 g/mol
- **Spectre RMN 1D** : Figure : 9



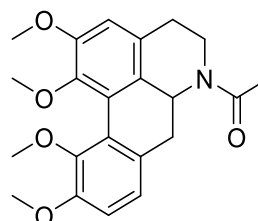
❖ Composé SA.12

- **Aspect physique** : Poudre jaune
- **Solvant de solubilité** : Chloroforme
- **Test de Dragendorff** : Positif
- **Formule brute** : $C_{20}H_{23}NO_4$
- **Masse moléculaire** : 341 g/mol
- **Spectre de masse** : Figure : 10
- **Spectre UV** : Figure 11
- **Spectre RMN 1D** : Figures : 12 et 14
- **Spectre RMN 2D** : Figures : 13, 15 et 16



❖ **Composé SA.13**

- **Aspect physique** : Poudre blanche
- **Solvant de solubilité** : Chloroforme
- **Test de Dragendorff** : Positif
- **Formule brute** : $C_{22}H_{25}NO_5$
- **Masse moléculaire** : 383 g/mol
- **Spectre de masse** : Figure 17
- **Spectre UV** : Figure 18
- **Spectre RMN 1D** : Figure : 19
- **Spectre RMN 2D** : Figures 20, 21 et 22



x

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ali, G. (2021). *Synthetic Studies on Aporphine Alkaloids and Polycyclic Spiro Lignans*.
- Ambomo & Myriam.S. (2022). L'éducation thérapeutique des personnes vivant avec le diabète de type 2 au Cameroun: Une analyse socioanthropologique, 1-358.
- Amna, U., Hasnan, M. H. H., Ahmad, K., Ali, A., Awang, K., & Nafiah, M. (2015). *In vitro* cytotoxic of aporphine and proaporphine alkaloids from *Phoebe grandis* (Ness) Merr. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 32, 15-20.
- Arshad Ahmad, A. A., Pandurangan, A., Namrata Singh, N. S., & Preeti Ananad, P. A. (2012). *A mini review on chemistry and biology of Hamelia patens* (Rubiaceae).
- Begum, T., Arzmi, M. H., Khatib, A., Uddin, A. B. M. H., Aisyah Abdullah, M., Rullah, K., Mat So'ad, S. Z., Zulaikha Haspi, N. F., Nazira Sarian, M., Parveen, H., Mukhtar, S., & Ahmed, Q. U. (2024). A review on *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae) as a prominent medicinal plant based on ethnobotany, phytochemistry and pharmacological activities. *Natural Product Research*, 1-17.
- Bogdanov, M. G., Svinyarov, I., Keremedchieva, R., & Sidjimov, A. (2012). Ionic liquid-supported solid-liquid extraction of bioactive alkaloids. I. New HPLC method for quantitative determination of glaucine in *Glaucium flavum* Cr.(Papaveraceae). *Separation and purification technology*, 97, 221-227.
- Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids : A review. *Asian journal of botany*, 1(1), 1-6.
- Bridson, D. M. (2001). Additional notes on *Pavetta* (Rubiaceae: Pavetteae) from tropical eastern and southern Africa. *Kew Bulletin*, 567-600.
- Bridson, D. M., & Verdcourt, B. (2003). *Flora Zambesiaca 5 (3) : Rubiaceae, Part 3. royal Botanic Gardens. Kew*.
- Chapman, J. (Ed.). (2024). *Dictionary of Natural Products* (Version 2024). CRC Press)

- Chen-Loung, C., Hou-Min, C., Cowling, E. B., Chi-Yin, H. H., & Gates, R. P. (1976). Aporphine alkaloids and lignans formed in response to injury of sapwood in *Liriodendron tulipifera*. *Phytochemistry*, 15(7), 1161-1167.
- Chumkaew, P., & Srisawat, T. (2022). A New Antimalarial Aporphine Alkaloid from the Leaves of *Amoora cucullata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 58(6), 1085-1088.
- Chumkaew, P., Teerapongpisan, P., & Pechwang, J. (2021). Two New Aporphine Alkaloids from *Amoora cucullata* and their Antibacterial Activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 57(5), 907-910.
- Da Silva, F. M. A., Da Silva Filho, F. A., De Lima, B. R., De Almeida, R. A., Mendonça, D. M., Pereira Junior, R. C., Dutra, L. M., Barison, A., Koolen, H. H. F., De Souza, A. D. L., & Pinheiro, M. L. B. (2016). (+)- N -Formylnorglaucine Rotamers from *Unonopsis stipitata* DIELS. *Helvetica Chimica Acta*, 99(7), 494-498.
- Dar, R. A., Shahnawaz, M., Ahanger, M. A., & Majid, I. (2023). Exploring the diverse bioactive compounds from medicinal plants : A review. *J. Phytopharm*, 12, 189-195.
- Delprete, P. G., & Jardim, J. G. (2012). Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae : An overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia*, 63, 101-128.
- Djama, S., & Karour, T. (2020). *Les alcaloïdes : Classification, extraction, criblage et activités biologiques* [PhD Thesis, Université Mouloud Mammeri].
- Dos Santos, A. R., & Vaz, N. P. (2019). Isoquinoline Alkaloids and Chemotaxonomy. In K. G. Ramawat (Éd.), *Biodiversity and Chemotaxonomy*, 24, 167-193.
- Eguchi, R., Ono, N., Horai, H., Amin, M. A.-U., Hirai, A. M., Kawahara, J., Kasahara, S., Endo, T., & Kanaya, S. (2017). Classification of alkaloid compounds based on subring skeleton (srs) profiling : On finding relationship of compounds with metabolic pathways. *J Comput Aided Chem*, 18, 58-75.

- Ekalu, A. (2021). Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Mitracarpus* species (Rubiaceae) : A review. *Scientific African*, 11, 692.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., López-Martínez, L. X., Contreras-Angulo, L. A., Elizalde-Romero, C. A., & Heredia, J. B. (2020). Plant Alkaloids : Structures and Bioactive Properties. In M. K. Swamy (Éd.), *Plant-derived Bioactives*, 85-117.
- Heitzman, M. E., Neto, C. C., Winiarz, E., Vaisberg, A. J., & Hammond, G. B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66(1), 5-29.
- Heng, H. L., Chee, C. F., Chin, S. P., Ouyang, Y., Wang, H., Buckle, M. J., Herr, D. R., Paterson, I. C., Doughty, S. W., & Rahman, N. A. (2018). Synthesis and evaluation of nuciferine and roemerine enantiomers as 5-HT₂ and α ₁ receptor antagonists. *Medicinal Chemistry Communications*, 9(3), 576-582.
- Hepper, F. N. (1958). *Sabicea* Aubl. And *Stipularia* Beauv. (Rubiaceae-Mussaendeae) in Tropical Africa. *Kew Bulletin*, 13(2), 289-294.
- Ikezawa, N., Iwasa, K., & Sato, F. (2008). Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C–C phenol coupling of (S)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 8810-8821.
- Ismail, N. H., Alias, A., & Osman, C. P. (2012). Alkaloids and anthraquinones from Malaysian flora. *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 296.
- Karou, S. D., Tchacondo, T., Ilboudo, D. P., & Simporé, J. (2011). Sub-Saharan Rubiaceae : A review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. *Pakistan journal of biological sciences*, 14(3), 149-169.
- Letouzey, R. (1969). *Manuel de botanique forestière. Afrique tropicale*. GERDAT-CTFT.

- Liu, Y., Li, Y., Muema, F. W., Zhang, H., Seukep, A. J., & Guo, M. (2023). Aporphine alkaloids identified from *Xylopia aethiopica* and their potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *Journal of Functional Foods*, 106, 105601.
- Loizou, Stella, Lekakis, Ioannis, Chirousos, George, P. & Satsou, P. (2010). β -sitostérol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Molecular nutrition & food research*, 2010, 54(4), 551-558.
- Martins, D., & Nunez, C. V. (2015). Secondary metabolites from *Rubiaceae* species. *Molecules*, 20(7), 13422-13495.
- Mohamed, A., & Khadidja, S. (2020). *Identification et caractéristique de la sauge officinale au niveau de la wilaya de Tlemcen* [PhD Thesis].
- Ndi, C. P., Sykes, M. J., Claudie, D. J., McKinnon, R. A., Semple, S. J., & Simpson, B. S. (2015). Antiproliferative aporphine alkaloids from *Litsea glutinosa* and ethnopharmacological relevance to kuuku i'yu traditional medicine. *Australian Journal of Chemistry*, 69(2), 145-151.
- Nkeoua, G., & Boundzanga, G. C. (1999). *Donnees sur les produits forestieres non ligneux en Republique du Congo*.
- Nole, T., Lionel, T. W., Cedrix, T. S., & Gabriel, A. A. (2016). Ethnomedical and Ethnopharmacological Study of Plants Used For Potential Treatments of Diabetes and Arterial Hypertension by Indigenous People in Three Phytogeographic Regions of Cameroon. *Diabetes case Rep*, 1(110), 2.
- Nyigo, V. A., Peter, X., Mabiki, F., Malebo, H. M., Mdegela, R. H., & Fouche, G. (2016). Isolation and identification of euphol and β -sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens*. *The Journal of Phytopharmacology*, 5(3), 100-104.
- Omar, H., Fadaeinasab, M., Taha, H., Widyawaruyanti, A., Nafiah, M. A., & Rachmatiah, T. (2020). Aporphine alkaloids with *in vitro* antiplasmodial activity from the leaves of *Phoebe tavoyana*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 22(1), 52-60.

Plant list – Recherche Qwant. (s. d.). Qwant. Consulté 3 décembre 2024, à l'adresse <https://www.qwant.com>

Rahmasari, R., Reynaldi, G., Forestrania, R., Puspitasari, N., & Elya, B. (2023). *Zanthoxylum acanthopodium* : Microscopic, Chemical Characteristic, and anti-Enterococcus faecalis Effectivity of Fruit and Leaves Ethanol Extract. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 16(2), 809-816.

Razafimandimbison, S. G., & Rydin, C. (2024). Phylogeny and classification of the coffee family (Rubiaceae, Gentianales) : Overview and outlook. *TAXON*, 73(3), 673-717.

Rufino, A. R., Brant, A. J. C., Santos, J. B. O., Ferreira, M. J. P., & Emerenciano, V. P. (2005). Simple Method for Identification of Skeletons of Aporphine Alkaloids from ¹³ C NMR Data Using Artificial Neural Networks. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(3), 645-651.

Saidi, N., Hadi, A. H. A., Awang, K., & Mukhtar, M. R. (2009). Aporphine Alkaloids From Bark of *Cryptocarya ferrea*. *Indonesian Journal of Chemistry*, 9(3), 461-465.

Santi, M. D., Zunini, M. P., Vera, B., Bouzidi, C., Dumontet, V., Abin-Carriquiry, A., Grougnet, R., & Ortega, M. G. (2018). Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) *in vitro* and molecular docking studies. *European journal of medicinal chemistry*, 143, 577-582.

Seri, C. S., Ramiarantsoa, H., Nana, F., & Dicko, A. (2017). Two new iridoid glycosides from *Morinda morindoides* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(1), 01-04.

Stevigny, C., Bailly, C., & Quetin-Leclercq, J. (2005). Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(2), 173-182.

- Stévigny, C., Jiwan, J. H., Rozenberg, R., De Hoffmann, E., & Quetin-Leclercq, J. (2004). Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(5), 523-528.
- Sun, R., Jiang, H., Zhang, W., Yang, K., Wang, C., Fan, L., He, Q., Feng, J., Du, S., Deng, Z., & Geng, Z. (2014). Cytotoxicity of Aporphine, Protoberberine, and Protopine Alkaloids from *Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) Fedde. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014(1), 580483.
- Teles, M. M. R. S., Pinheiro, A. A. V., Dias, C. D. S., Tavares, J. F., Barbosa Filho, J. M., & Da Cunha, E. V. L. (2019). Alkaloids of the *Lauraceae*. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 82, 147-304.
- Ugorji, C. O., Ihedioha, J. N., Agbo, M. O., Ekere, N. R., Nwafor, F. I., & Odoemelam, E. I. (2019). Antimicrobial and Antioxidant Studies of the Leaf Extract and Fractions of *Sabicea brevipes* Wernham (Rubiaceae). *Int J Biochem Res Rev*, 27(2), 9-10.
- Widiandani, T., Tandian, T., Zufar, B. D., Suryadi, A., Purwanto, B. T., & Hardjono, S. (2023). *In vitro* study of pinostrobin propionate and pinostrobin butyrate : Cytotoxic activity against breast cancer cell T47D and its selectivity index. *Journal of Public Health in Africa*, 14(1).
- Xu, Z., & Chang, L. (2017). *Rubiaceae*. In Z. Xu & L. Chang, *Identification and Control of Common Weeds*, 3, 375-403.
- Yanti, M. E., Nasution, N., As'ad, O. A., & Surbakti, S. (2023). Income Analysis of People's Coffee Farmers (*Coffea*). in Sipiongot Village, Dolok District, North Padang Lawas District. *Agripreneur: Jurnal Pertanian Agribisnis*, 12(2), 57-61.
- Yu, Z., Han, C., Song, X., Chen, G., & Chen, J. (2019). Bioactive aporphine alkaloids from the stems of *Dasymaschalon rostratum*. *Bioorganic chemistry*, 90, 103069.