

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE



DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

LABORATOIRE DE CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES

LABORATORY OF NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY

Constituants chimiques à activités antimicrobiennes et
antiplasmodiales de deux plantes médicinales camerounaises:

Polyalthia oliveri Engl.(Annonaceae) et *Canthium*

multiflorum Schum and Thonn (Rubiaceae)

THESE

présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention
du diplôme de Doctorat/PhD en Chimie Organique

Par:

NGOUONPE WEMBE Alain

Matricule: 06T521

MASTER en Chimie Organique

Sous la direction de:

KOUAM FOGUE Siméon

Maître de Conférences

ANNEE 2015



DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE THESE DE DOCTORAT/Ph.D

Je soussigné, **Bonaventure TCHALEU NGADJUI**, *Professeur*, Université de Yaoundé I et Président du Jury de soutenance de thèse de Doctorat / Ph.D de Monsieur. **NGOUONPE WEMBE Alain**, Matricule **06T521**, atteste que le candidat a effectivement corrigé sa thèse soutenue le 15 Mai 2015 dans la Salle S01/02 du Nouveau bloc pédagogique et intitulée «**Constituants chimiques à activités antimicrobienne et antiplasmodiale de deux plantes médicinales camerounaises: *Polyalthia oliveri* Engl. (Annonaceae) et *Canthium multiflorum* Schum & Thonn (Rubiaceae)**», conformément aux observations et recommandations du Jury.

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

Le Président du Jury

Le Rapporteur

Les Membres du Jury

B. T. Ngadjui
Professor
University of Yaounde I

Kouam F. Siméon

Chantal Njomo Njomo
Maître de Conférences



CERTIFICATION

Je soussigné, **KOUAM FOGUE Siméon**, Maître des Conférences, Directeur de thèse de Doctorat/PhD de **M. NGOUONPE WEMBE Alain** (Matricule n° 06T521), certifie qu'il a effectué ce travail au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'École Normale Supérieure, Université de Yaoundé I (Cameroun) avec la collaboration de l'Institut de Recherche Environnementale (INFU) du Département de Chimie et de Chimie Biologique, Chair de la Chimie Environnementale et de la Chimie Analytique, Université Technologique de Dortmund, Allemagne.

Ce travail n'a encore fait l'objet d'aucune présentation pour l'acquisition d'un quelconque diplôme académique que ce soit.

KOUAM FOGUE Siméon

Doctorat d'Etat

Maître de Conférences

(Université de Yaoundé I)

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
 Division de la Programmation et du Suivi
 des Activités Académiques



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE
 Division of Programming and Follow-up
 of Academic Activities

ANNEE ACADEMIQUE 2014/2015

DATE D'ACTUALISATION: 10 Février 2015
ADMINISTRATION

DOYEN : BILONG Paul, *Professeur*
VICE DOYEN / DPSAA : NJOPWOUO Daniel, *Professeur*
VICE DOYEN / DSSE : DONGO Etienne, *Professeur*
VICE DOYEN / DRC : ESSIMBI ZOBO Bernard, *Professeur*

Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche: ABOSSOLO Monique,
Chargé de Cours

Chef Division Administrative et Financière: NDOYE FOE Marie C. F., *Chargé de Cours*

➤ DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (41)			
N°	NOMS ET PRENOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	AMVAM ZOLLO Paul Henri	Professeur	<i>RECTEUR UN</i>
2	MBACHAM Wilfried Fom	Professeur	En poste
3	MOUNDIPA FEWOU PAUL	Professeur	Chef de Département
4	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
5	BENG née NINTCHOM PENLAP Véronique	Maître de Conférences	En poste
6	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
7	FEKAM BOYOM Fabrice	Maître de Conférences	En poste
8	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
9	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
10	MINKA Samuel	Maître de Conférences	En poste
11	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
12	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
13	ATOGHO Barbara Mma	Chargée de Cours	En poste
14	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine	Chargée de Cours	Chef DAF / FS
15	BIGOGA JUDE Daiga	Chargé de Cours	En poste
16	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
17	DJOKAM TAMO Rosine	Chargée de Cours	En poste
18	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargée de Cours	En poste
19	EFFA ONOMO Pierre	Chargé de Cours	En poste
20	EVEHE BEBANDOUE Marie-Solange	Chargée de Cours	En poste
21	EWANE CECILE Anne	Chargée de Cours	En poste
22	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargée de Cours	<i>IA4/ MINESUP</i>
23	NGONDI Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
24	NJAYOU Frédéric Nico	Chargé de Cours	En poste

25	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
26	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargée de Cours	En poste
27	WAKAM née NANA Louise	Chargée de Cours	En Poste
28	AKINDEH MBUH NJI	Assistant	En Poste
29	BEBBE FADIMATOU	Assistante	En poste
30	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Assistante	En poste
31	DAKOLE DABOY Charles	Assistant	En poste
32	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Assistante	En poste
33	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Assistant	En poste
34	KOTUE KAPTUE Charles	Assistant	En poste
35	FONKOUA Martin	Assistant	En poste
36	LUNGA Paul KEILAH	Assistant	En poste
37	MANANGA Marlyse Josephine	Assistante	En poste
38	MBONG ANGIE MOUNGANDE Mary Anne	Assistante	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joelle	Assistante	En poste
40	PACHANGOU NSANGOU Sylvain	Assistant	En poste
41	TIENTCHEU DJOKAM Leopold	Assistant	En poste
➤ DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE (B.P.A) (45)			
1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En Poste
5	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En Poste
6	NGASSAM Pierre	Professeur	En Poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En Poste
9	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
10	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
11	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
12	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>Chef dépt. FMSB</i>
13	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	<i>CT2 MIN. ENERGIE</i>
14	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.E. MINRESI</i>
15	NJAMEN Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
16	TAN Paul	Maître de Conférences	En Poste
17	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
18	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Chargé de Cours	En poste
19	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
20	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
21	BILANDA Danielle Claude	Chargée de Cours	En poste
22	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
23	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
24	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargée de Cours	En poste
25	KEKEUNOU Sévior	Chargé de Cours	En poste
26	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
27	MEGNEKOU Rosette	Chargée de Cours	En poste
28	MONY NTONE Ruth	Chargée de Cours	En poste
29	LEKEUFACK FOLEFACK Guy Benoît	Chargé de Cours	En poste
30	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Chargée de Cours	En poste
31	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
32	TOMBI Jeannette	Chargée de Cours	En poste

33	ATSAMO Albert Donatien	Assistant	En poste
34	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
35	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
36	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
37	MBENOUN MASSE Paul Serge	Assistant	En poste
38	MECHI DONFACK Mireille Flore	Assistante	En poste
39	MOUGANG NGAMENI Luciane	Assistant	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste
41	NGOATEU KENFACK Omer BEBE	Assistant	En poste
42	NJUA Clarisse YAFI	Assistante	En poste
43	OBI OBEN Esther	Assistant	En poste
44	TADU Zéphirin	Assistant	En poste
45	YEDE	Assistant	En poste
➤ DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALE (B. P. V) (27)			
1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
2	AMBANG Zachée	Maître de Conférences	Vice-Doyen/FSE
3	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
4	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
5	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
6	MOSSEBO Dominique Claude	Maître de Conférences	En poste
7	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE/MINRESI</i>
8	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
9	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
10	BIYE Elvire Hortense	Chargée de Cours	En poste
11	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Chargé de Cours	<i>Inspecteur académ. N°1 MINESUP</i>
13	MBOLO Marie	Chargée de Cours	En poste
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy Leonard	Chargé de Cours	En poste
16	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
17	NSOM ZAMO Annie Claude ép. Pial	Chargé de Cours	<i>Expert national./ UNESCO</i>
18	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
19	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
20	DJEUANI Astride Carole	Assistant	En poste
21	GONMADGE Christelle	Assistante	En poste
22	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Assistant	En poste
23	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistante	En poste
24	NGALLE Hermine BILLE	Assistante	En poste
25	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste
26	NOUKEU KOUOKAM Armelle	Assistante	En poste
27	ONANA Jean Michel	Assistant	En poste
➤ DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (37)			
1	KETCHA MBADCAM Joseph	Professeur	Chef de Département
2	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
3	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen / UDS</i>
4	NJOPWOUO Daniel	Professeur	Vice-Doyen / DPSAA
5	AGWARA ONDOH Moïse	Maître de Conférences	<i>Insp Génér. MINPMEA</i>
6	AVOM Jérôme	Maître de Conférences	<i>Directeur au IAI Gabon</i>
7	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée mission P.R.</i>

8	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
9	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
10	GHOGOMU Paul MINGO	Maître de Conférences	<i>Directeur Cabinet PM</i>
11	LAMINSI Samuel	Maître de Conférences	En poste
12	MELO née CHINJE Uphie F.	Maître de Conférences	<i>Directeur Mipromalo</i>
13	NANSEU Charles Péguy	Maître de Conférences	En poste
14	NENWA Justin	Maître de Conférences	En poste
15	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen/UBda</i>
16	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>S.G. MINESUP</i>
17	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
18	BAIZOUMI ZOUA	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINTOUR</i>
19	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
20	GWET Simon-Pierre	Chargé de Cours	En poste
21	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean claude	Chargé de Cours	En poste
22	KONG SAKEO	Chargé de Cours	<i>C. M. Au P. M.</i>
23	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Chargée de Cours	En poste
24	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
25	SIGNING Pierre	Chargé de Cours	En poste
26	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
27	CHEUMANI YONA Arnaud Maxime	Chargé de Cours	En poste
28	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE Awawou	Chargée de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
33	KENNE DEDZO Gustave	Assistant	En poste
34	MBEY Jean Aimé	Assistant	En poste
35	NCHIMI NONO Katia	Assistant	En poste
36	NDI Julius NSAMI	Assistant	En poste
37	NDOSIRI Bridget NDOYE	Assistant	En poste
➤ DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (34)			
1	DONGO Etienne	Professeur	En poste
2	GHOGOMU TIH Raphaël	Professeur	En poste
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU Bonaventure	Professeur	<i>Chef de dépt FMBS</i>
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
6	NKENGFAK Augustin Ephraïm	Professeur	Chef de Département
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Vice-Recteur UBda</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>CS Rectorat/ UYI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>VD/UB</i>
12	KAPNANG Henriette	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	NOUNGOUE TCHAMO Didérot	Maître de Conférences	En poste
17	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C. UYI</i>
18	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

19	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
20	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
21	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
22	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
23	KENMOGNE Marguerite	Chargée de Cours	En poste
24	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
25	NGO MBING Josephine	Chargée de Cours	En poste
26	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
27	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Chargé de Cours	En poste
28	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargée de Cours	En poste
29	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDENGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
32	KAMTO Eutrophe Le Doux	Assistant	En poste
33	NGNINTEDO Dominique	Assistant	En poste
34	NGOMO Orléans	Assistant	En poste
➤ DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (28)			
1	TCHUENTE Maurice	Professeur	<i>PCA UB</i>
2	ATSA ETOUNDI Roger	Maître de Conférences	Chef de Département <i>Chef Division MINFOPRA</i>
3	FOTSO Pauline Laure	Maître de Conférences	<i>Vice-Recteur UDS</i>
4	FOUDA NDJODO Marcel	Maître de Conférences	<i>IAI MINESUP/ Chef Dpt ENS</i>
5	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
6	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO PONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
11	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
12	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
13	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
14	AMINOUE Halilou	Assistant	En poste
15	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
16	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Assistant	En poste
17	DJOUWE MEFFEJA Merline	Assistante	En poste
18	EBELE Serge	Assistant	En poste
19	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
20	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
21	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
22	KENFACK DONGMO Clauvice Viliane	Assistant	En poste
23	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
24	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
25	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
26	MONTHÉ DJIADEU Valéry Martial	Assistant	En poste
27	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
28	TAPAMO KENFACK Hyppolite	Assistant	En poste
➤ DEPARTEMENT DE MATHÉMATIQUE (MA) (37)			
1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>

2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>DIPD UYII</i>
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	NGUETSENG Gabriel	Professeur	<i>Chef de stages IUT-Bois, UYI</i>
5	NOUTCHEGUEME Norbert	Professeur	En poste
6	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>Chef Cellule. MINESUP</i>
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie Blaise	Maître de Conférences	En poste
10	TONGA Marcel	Maître de Conférences	En poste
11	WAMON François	Maître de Conférences	Chef de Département.
12	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gerard	Chargé de Cours	En poste
13	AYISSI Raoult Domingo	Chargé de Cours	En poste
14	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
17	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
18	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
19	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
20	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
21	MBELE BEDIMA Martin	Chargé de Cours	En poste
22	MBIANDA Gilbert	Chargé de Cours	En poste
23	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
24	NGUEFACK Bertrand	Chargé de Cours	En poste
25	NGUIMTSA Charles	Chargé de Cours	En poste
26	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
27	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
28	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
29	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
30	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargée de Cours	En poste
31	BOGSO Antoine M.	Assistant	En poste
32	DJIADEU NGAHA Michel	Assistant	En poste
33	DOUANLA YONTA Hermann	Assistant	En poste
34	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
35	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Assistant	En poste
36	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
37	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin Erick	Assistant	En poste
➤ DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)			
1	ETOA François-Xavier	Professeur	Chef de Département, CT/PM
2	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef de Division Recherche IMPM</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
5	BOYOMO ONANA	Chargé de Cours	En poste
6	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
7	ESSONO ABOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
8	NYEGUE Maximilienne Ascension	Chargée de Cours	En poste
9	RIWOM Sara Honorine	Chargée de Cours	En poste
10	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Assistant	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste

➤ DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (40)			
1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	Chef de Département
3	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
4	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen/UBda</i>
5	WOAFO Paul	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	En poste
7	BEN-BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
8	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt. UN</i>
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
10	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
11	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>Recteur UYII</i>
12	PEMHA Elkana	Maître de Conférences	En poste
13	TCHAWOUA Clément	Maître de Conférences	En poste
14	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
15	BIYA MOTTO Frédéric	Chargé de Cours	<i>Dir. Gén. B. MEKIM</i>
16	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
17	DJUIDJE KENMOE Germaine épouse ALOYEM KAZE	Chargée de Cours	En poste
18	EDONGUE Hervais	Chargé de Cours	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean-Sire	Chargé de Cours	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Chargé de Cours	En poste
21	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	En poste
22	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
23	MBANE BIOUELE	Chargé de Cours	En poste
24	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	<i>Vice-Doyen/UDs</i>
25	NANA NBENDJO Blaise	Chargé de Cours	En poste
26	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
27	OBONOU MARCEL	Chargé de Cours	En poste
28	SAIDOU	Chargé de Cours	En poste
29	SIEWE SIEWE Martin	Chargée de Cours	En poste
30	SIMO Elie	Chargée de Cours	En poste
31	TABI Conrad Bertrand	Chargée de Cours	En poste
32	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
33	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En poste
34	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Chargée de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
35	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
36	ABDOURAHIMI	Assistant	En poste
37	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
38	ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA	Assistante	En poste
39	MBINACK Clément	Assistant	En poste
40	MBOUSSI NKOMIDIO Aissatou	Assistante	En poste
➤ DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (44)			
1	BILONG PAUL	Professeur	Doyen / Chef de Département
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	<i>Doyen / UN</i>
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
6	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	<i>D.I.P.D. UYI</i>
7	MVONDO ONDOA Joseph	Maître de Conférences	En poste

8	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
9	NDJIGUI Paul-Désiré	Maître de Conférences	<i>CSMM</i>
10	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C. / UM</i>
11	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
12	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
13	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
14	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. MINFOF</i>
15	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargée de Cours	Chef DAASR
16	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
17	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Directeur Projet Barrage Memve'ele</i>
18	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>C.S/ MINMIDT</i>
19	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>C.E.A MINMIDT</i>
20	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	En poste
21	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	En poste
22	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
23	LIENOU Gaston	Chargé de Cours	En poste
24	MBIDA AYEM	Chargé de Cours	<i>CS/ LABOGENIE</i>
25	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
26	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
27	MOUNDI Amidou	Chargé de Cours	<i>Inspecteur 1 MINMIDT</i>
28	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
29	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
30	NGUETCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	En poste
31	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
32	NYECK Bruno	Chargé de Cours	<i>S/Directeur/ MINMIDT</i>
33	ONANA Vincent	Chargé de Cours	En poste
34	TCHAKOUNTE Jacqueline épouse. NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>C.E.A MINRESI</i>
35	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
36	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>S. G. MINTP</i>
37	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	En poste
38	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	En poste
39	FUH Calistus Gentry	Assistant	<i>Sec. d'Etat / MINMIDT</i>
40	METANG Victor	Assistant	En poste
41	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
42	TCHAPTCHET TCHATO De Presquidoux	Assistant	En poste
43	TEHNA Natanael	Assistant	<i>CS/ MINMIDT</i>
44	TEMGA Jean Pierre	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département (10 février 2015)

Département	Nombre d'enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	TOTAL
BC	4 (0)	7 (2)	16 (10)	14 (6)	41 (18)
BPA	9 (0)	8 (0)	15 (7)	13 (5)	45 (12)
BPV	1 (0)	7 (0)	11 (3)	8 (6)	27 (9)
C.I.	4 (0)	13 (2)	14 (3)	6 (2)	37 (7)
C.O.	9 (0)	10 (2)	12 (6)	3 (0)	34 (8)
IN	1 (0)	4 (1)	7 (0)	16 (5)	28 (6)
MA	5 (0)	6 (0)	19 (1)	7 (1)	37 (2)
MB	1(0)	2 (0)	7 (3)	3 (0)	13(3)
PH	6 (0)	8 (0)	21 (3)	5 (2)	40 (5)
ST	3 (0)	11 (1)	22 (4)	8 (0)	44 (5)
TOTAL	37 (0)	64 (6)	133 (38)	109 (28)	346 (75)

Soit un total de:

346 (75) dont:

- Professeurs

43 (0)

- Maîtres de Conférences

76 (8)

- Chargés de Cours

144 (40)

- Assistants

82 (27)

- () = Nombre de femmes.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

SOMMAIRE

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES	i
DEDICACE	xiii
REMERCIEMENTS	xiv
LISTE DES ABREVIATIONS	xvii
LISTE DES FIGURES	xix
LISTE DES SCHEMAS	xxii
LISTE DES TABLEAUX	xxiii
RESUME	xxvi
ABSTRACT	xxviii
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE	
I.1. INTRODUCTION GENERALE SUR LES ANNONACEAE	6
I.1.1. Aperçu botanique sur le genre <i>Polyalthia</i>	6
I.1.2. Aperçu botanique sur <i>Polyalthia oliveri</i>	7
I.1.3. Utilisations de quelques espèces du genre <i>Polyalthia</i>	8
I.1.4. Activités biologiques de quelques espèces du genre <i>polyalthia</i>	9
I.1.5. Travaux chimiques antérieurs sur le genre <i>Polyalthia</i>	10
I.1.6. Généralités sur les alcaloïdes	25
I.1.7. Quelques activités biologiques et pharmacologiques de quelques métabolites secondaires isolés du genre <i>Polyalthia</i>	39
I.2. INTRODUCTION GENERALE SUR LES RUBIACEAE	40
I.2.1. Aperçu botanique sur le genre <i>Canthium</i>	40
I.2.2. Aperçu botanique sur <i>Canthium multiflorum</i>	40
I.2.3. Utilisations de quelques espèces du genre <i>Canthium</i>	41
I.2.4. Travaux chimiques antérieurs sur le genre <i>Canthium</i>	43
I.2.5. Généralités sur les iridoïdes	49
I.2.6. Quelques activités biologiques et pharmacologiques de quelques métabolites secondaires isolés du genre <i>Canthium</i>	52
I.3. QUELQUES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ISOLEMENT DES COMPOSES	53
I.3.1. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	53

I.4. DETERMINATION EXPERIMENTALE DES CONFIGURATIONS ABSOLUES PAR LE DICHROÏSME CIRCULAIRE	54
I.4.1. La dispersion optique rotatoire (DOR)	55
I.4.2. Le dichroïsme circulaire (DC)	56
I.5. ACTIVITES BIOLOGIQUES	56
I.5.1. Généralités sur l'activité antimicrobienne	56
I.5.2. Généralités sur l'activité antiplasmodiale	60
CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION	
II.1. EXTRACTION ET ISOLEMENT DES COMPOSES	63
II.1.1. Extraction et isolement des composés de <i>Polyalthia oliveri</i>	63
II.1.2. Extraction et isolement des composés de <i>Canthium multiflorum</i>	65
II.2. CARACTERISATION DES COMPOSES ISOLEES.	67
II.2.1. Les triterpènes	67
II.2.2. Le polyol	80
II.2.3. L'acide phénolique	83
II.2.4. Les alcaloïdes	88
II.2.5. Les iridoïdes	116
II.2.6. Conclusion partielle	143
II.3. TRANSFORMATIONS CHIMIQUES SUR QUELQUES COMPOSES ISOLEES	144
II.3.1. Réaction d'hydrolyse acide de la <i>N</i> -acétyl-8 α -polyveolinone 129	144
II.3.2. Réaction d'acétylation de la <i>N</i> -acétyl polyveoline 130	145
II.3.3. Conclusion partielle	147
II.4. ACTIVITES BIOLOGIQUES DE QUELQUES COMPOSES ISOLEES	148
II.4.1. Activité antiplasmodiale	148
II.4.2. Activité antimicrobienne	149
II.4.3. Cytotoxicité	152
II.4.4. Conclusion partielle	153
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	154
CHAPITRE III: MATERIELS ET METHODES	
III.1. GÉNÉRALITÉS	156
III.2. MATERIEL VEGETAL	157
III.2.1. <i>Polyalthia oliveri</i>	157
III.2.2. <i>Canthium multiflorum</i>	157

III.3. EXTRACTION, ISOLEMENT ET PURIFICATION DES COMPOSES	157
III.3.1. <i>Polyalthia oliveri</i>	157
III.3.2. <i>Canthium multiflorum</i>	161
III.4. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPOSES ISOLES	163
III.4.1. Les triterpènes	163
III.4.2. Le carbohydrate ou polyol	164
III.4.3. L'acide phénolique	165
III.4.4. Les alcaloïdes	165
III.4.5. Les iridoïdes	168
III.5. ACTIVITES BIOLOGIQUES	172
III.5.1. Activité antiplasmodiale	172
III.5.2. Activité antimicrobienne	172
III.5.3. Activité cytotoxique	173
III.6. TRANSFORMATIONS CHIMIQUES	174
III.6.1. Hydrolyse acide de la <i>N</i> -acétyl-8 α -polyveolinone	174
III.6.2. Acétylation de la <i>N</i> -acétyl polyveoline	175
III.7. TESTS CARACTERISTIQUES DES CLASSES DE COMPOSES ISOLES	175
III.7.1. Test de Molish	175
III.7.2. Test de Trim-Hill	176
III.7.3. Test de Libermann-Burchard	176
III.7.4. Test de Dragendorff	176
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	178

DEDICACE

A ma très chère et tendre épouse Nadine TCHINDA

A mon père Jean WEMBE

A ma mère Hélène PELECK

A mes filles Serena NGOUONPE, Eryne NGOUONPE et Ifyana NGOUONPE

REMERCIEMENTS

Je glorifie le seigneur qui a bien voulu m'accorder force et santé tout au long de mes études.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Siméon KOUAM FOGUE pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et permis de réaliser cette thèse. Vos encouragements, vos discussions, vos conseils judicieux et surtout votre rigueur scientifique ont été très déterminants pour ma formation et pour la réalisation de ce travail.

Je remercie le Professeur Augustin Ephraïme NKENGFACK, Chef de Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I, pour son dynamisme, son dévouement et sa disponibilité dans la bonne marche du Département ainsi que pour ses conseils et encouragements pendant toute cette période de préparation de cette thèse.

Je remercie tous les enseignants du Département de Chimie de l'Université de Yaoundé I pour les enseignements reçus.

Je remercie particulièrement tous les enseignants du Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé et plus précisément les Professeurs Bruno LENTA, Décaux KAPCHE et Pascal WAFO, les Docteurs René NGANSOP, Thierry DONGO et Augustin ABOUEM pour le soutien multiforme qu'ils n'ont cessé de m'apporter depuis des années.

Je remercie mes frères et sœurs Victor LAMBO, Luc DJOMGANG, Seraphin KOAGNE, Calixte TCHOMTCHOUA, Camille FOTIE, Vincent KOAGNE, Dieunedort. TAKOUTSING, Guy Alain TATCHUM, Elie TCHOUMTCHOUA, Hortense MAMIAM, Berthe NKOGUEM, Evéline NONO, Arlette MEKUE, Suzanne KOAGNE, Isabelle MEGUIENG, Rosine TCHELO, Nadège KOUAFACK pour leur soutien.

Je remercie mes aînés du laboratoire les Docteurs Guy Merlin KUIGOUA, Patrick ANGO, Christian FOSING et Messieurs Yves NJONKOU, Ostend TATUEDOM pour leur disponibilité et conseil.

Je remercie M. Rodrigue GUIFFO, Technicien du Laboratoire pour sa disponibilité.

Je remercie mes camarades de laboratoire Yvan NGANDJUI, Alexis MBOBDA, Mme Eliette KAMDEM, Gervais HAPPY, Laurice CHENDA, Mireille KEMGNI, Félix WAMBO, Danila JOUKAM, Joseph TCHAMGOUE, Judith DEMGNE, Jerry NGANSOP, Bel Youssouf MOUNTESSOU, Virginie EBESSA, Gladys MOMDJO, Ahmed KUTFON, Armel KOA, Françoise ANABA, Iliassou MOUAFON, Collins WAMBA, Elodie ANOUMEDEM et Anicet TUHENKOUÉ pour leur collaboration.

Je remercie tous les membres d'AMITY F.C. à travers les présidents Guy DEBOK et Laurier KOUAHOU pour la forme physico-morale durant ce travail.

A travers le Proviseur Jacques NWAHA NGUE, je remercie tous mes collègues du Lycée Technique de Mbankomo pour les encouragements.

Je remercie mes amis Luc NOAH, Patrice PENDJE, Fabrice DJEMO, Kelly YAWAT, Georges FEZEU, Willy AGHOKENG, Elie TALON, Patrice KENFACK, Yannick YOMEN, Yacinthe NGUEDIA, Cyrille TOCHE, Guepard TEGANG, Hervé DJEUTCHA, Gisèle KOAGNE, Lilianne SIYAPJE, Wilfried TIAM, Dr. Christophe SIMO, Dr. Rodrigue NGUENKAP, Dieunedort FOKA, Bertrand KOUAMO, Jules NGATCHOU et Dieunedort NGANTENG pour les idées constructives.

Je remercie ma cousine Albertine MEPO pour l'affection dont elle fait preuve.

Je remercie mon feu beau papa Jean YMENE qui après des nombreux encouragements n'a pas pu assister à la clôture de cette belle œuvre parcequ'arraché à la vie trois mois plutôt.

Je remercie sincèrement papa Elias KENNE et maman Odette KENNE qui ont toujours cru en moi en m'encourageant à la persévérance.

Je remercie mes mamans Marie SILATSA, Maguerite JUIFOUO, Jeanne PEYOU, Thérèse SITSAKA, Lydie MAYA, Chantal KAMDEM pour les conseils et soutiens de tous les jours.

Je remercie mes beaux frères Hugues DJOUSSE, Fidèle TIA, Bertrand YMENE, Anselme KUETE et Olivier TANGA pour leurs appuis multiformes.

Je remercie mes belles sœurs Raymonde MELAGUI, Alvine MBOUYA, Stella TIOYO, Falonne TIAYO, Gaelle FOUODJI, Léonie FOUATA qui ne menagent aucun effort pour me venir en aide.

Je remercie tous ceux qui me sont chers et que je n'ai pas pu citer, que ce travail soit un motif de fierté pour vous.

Je remercie sincèrement la German Academic Exchange Service (DAAD) à travers le programme "Welcome to Africa", la Fondation Internationale pour la Science (FIS), l'Academy of Science for the Developing World (TWAS) et la Humboldt pour les soutiens financiers et matériels accordés à notre laboratoire.

LISTE DES ABREVIATIONS

APCI	:	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
CC	:	Chromatographie sur Colonne
CCM	:	Chromatographie sur Couche Mince
CD	:	Circular Dichroism
CI ₅₀	:	Concentration inhibitrice 50
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
COSY	:	Correlation Spectroscopy
d	:	Doublet
dd	:	Doublet dédoublé
DEPT	:	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DOR	:	Dispersion Optique Rotatoire
ESI	:	Electrospray Ionisation
GC-MS	:	Gaz Chromatography Mass Spectrometry
HMBC	:	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	:	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
HPLC	:	High Pressure Liquid Chromatography
HRESI	:	High Resolution Electrospray Ionisation
I.E	:	Impact Electronique
LC-MS	:	Liquid Chromatography Mass Spectroscopy
ls	:	Large singulet
m	:	Multiplet
NOE	:	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	:	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ORTEP	:	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
P.F	:	Point de fusion
ppm	:	Partie par million
Pyr	:	Pyridine
q	:	Quadruplet
RDA	:	Retro-Diels-Alder

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
SM : Spectrométrie de Masse
t : Triplet
UV : Ultra Violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Quelques familles d'antibiotiques, — origine naturelle — origine synthétique ..2	2
Figure 2: <i>Polyalthia oliveri</i> , arbre, branches et feuilles.....7	7
Figure 3: Distribution géographique de <i>Polyalthia oliveri</i> en Afrique (Burkill, 1985).....8	8
Figure 4: Allure d'un spectre COSY ^1H - ^1H37	37
Figure 5: Allure d'un spectre COSY ^1H - ^{13}C37	37
Figure 6: Feuilles de <i>Canthium multiflorum</i>41	41
Figure 7: Courbe de dispersion optique rotatoire55	55
Figure 8: Détermination de la CMI d'un antibiotique par la méthode de diffusion59	59
Figure 9: détermination de la CMI d'un antibiotique par la méthode de dilution60	60
Figure 10: Spectre de masse à HR-ESI de CM0167	67
Figure 11: Spectre de RMN ^1H de CM01 (500 MHz, CDCl_3) du composé CM0168	68
Figure 12: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé CM01.....69	69
Figure 13: Spectre de masse en HRESI de CM0272	72
Figure 14: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, Pyr-d_5) du composé CM0273	73
Figure 15: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, Pyr-d_5) du composé CM0274	74
Figure 16: Spectre de masse en HRESI du composé POE476	76
Figure 17: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE477	77
Figure 18: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de POE4.....78	78
Figure 19: Spectre de masse en HRESI du composé CM06.....80	80
Figure 20: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) du composé CM06.....81	81
Figure 21: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) du composé CM0682	82
Figure 22: Spectre de masse en HRESI du composé CM03.....84	84
Figure 23: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) du composé CM0385	85
Figure 24: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) du composé CM0385	85
Figure 25: Spectre de masse en APCI du composé POE7.....89	89
Figure 26: Spectre UV du composé POE789	89
Figure 27: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE792	92
Figure 28: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE793	93
Figure 29: Spectre de masse à HR-APCI du composé POE19.....96	96
Figure 30: Spectre UV du composé POE1997	97
Figure 31: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de POE19.....97	97
Figure 32: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE1998	98

Figure 33: Spectre de masse à HR-APCI du composé POE30.....	100
Figure 34: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé POE30	101
Figure 35: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé POE30	102
Figure 36: Spectre de masse à HR-APCI du composé POE27.....	103
Figure 37: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé POE27	104
Figure 38: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé POE27	105
Figure 39: Spectre HMBC du composé POE27	105
Figure 40: Spectre NOESY des composés POE30 et POE27	107
Figure 41: Image ORTEP de la molécule de POE27.....	107
Figure 42: Spectre de masse à HR-APCI du composé POE5.....	108
Figure 43: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) du composé POE5	109
Figure 44: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) du composé POE5	109
Figure 45: Spectre HMBC du composé POE5	110
Figure 46: Spectre NOESY du composé POE5.....	112
Figure 47: Image ORTEP de la molécule de POE5.....	112
Figure 48: Spectre DC de: — <i>N</i> -acétyl-8α-polyveolinone (POE27 129) et — <i>N</i> -acétyl- polyveoline (POE5 130); Spectre DC de POE27 (—) et POE5 (—), DFT calculés à partir des conformations dans le cristal de POE27 (—) et de POE5 (—).	113
Figure 49: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM07	117
Figure 50: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) du composé CM07.....	118
Figure 51: Spectre de RMN ¹ H (500MHz, D ₂ O) du composé CM07	119
Figure 52: Spectre HMBC du composé CM07.....	120
Figure 53: Spectre de masse en HRESI du composé CM08.....	122
Figure 54: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) du composé CM08.....	123
Figure 55: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O) du composé CM08	124
Figure 56: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM09	126
Figure 57: Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) du composé CM09.....	127
Figure 58: Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O) du composé CM09.....	127
Figure 59: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM10	130
Figure 60: Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) du composé CM10	131
Figure 61: Spectre de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) du composé CM10.....	131
Figure 62: Spectre HMBC du composé CM10.....	132
Figure 63: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM13	134

Figure 64: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) du composé CM13.....	135
Figure 65: Spectre RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) du composé CM13.....	136
Figure 66: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM12	138
Figure 67: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) du composé CM12.....	139
Figure 68: Spectre COSY du composé CM12.....	140
Figure 69: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) du composé CM12.....	140
Figure 70: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE27h	145
Figure 71: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE5ac.....	146
Figure 72: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE5ac.....	146
Figure 73: Chromatogramme LC-MS des dérivés nouveaux d'indolosesquiterpènes.....	159

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1: Biosynthèse des alcaloïdes par la voie de la tyrosine.....	30
Schéma 2: Biosynthèse des précurseurs des indolosesquiterpènes.....	32
Schéma 3: Mécanisme de la réaction entre un alcaloïde et un hydrate de métaux lourds	34
Schéma 4: Biosynthèse des iridoïdes	51
Schéma 5: Présentation générale du système LC-MS	54
Schéma 6: Protocole d'extraction et d'isolement des composés de <i>Polyalthia oliveri</i>	64
Schéma 7: Protocole d'extraction et d'isolement des composés de <i>Canthium multiflorum</i>	66
Schéma 8: Fragmentation du composé CM01 en spectrométrie de masse	70
Schéma 9: Quelques corrélations HMBC du composé CM03.....	87
Schéma 10: Importantes corrélations HMBC du composé POE7	93
Schéma 11: Quelques corrélations HMBC du composé POE30	103
Schéma 12: Quelques corrélations NOESY des composés POE30 et POE27	107
Schéma 13: Quelques corrélations NOESY du composé POE5.....	112
Schéma 14: Origine biosynthétique des indolosesquiterpènes isolés	116
Schéma 15: Quelques corrélations HMBC du composé CM07.....	121
Schéma 16: Quelques corrélations HMBC du composé CM08.....	125
Schéma 17: Quelques corrélations HMBC du composé CM10.....	133
Schéma 18: Quelques corrélations HMBC du composé CM13.....	136
Schéma 19: Quelques corrélations COSY et HMBC du composé CM12	141
Schéma 20: Hydrolyse acide de la <i>N</i> -acétyl-8 α -polyveolinone	144
Schéma 21: Acétylation de la <i>N</i> -acétyl polyveoline	145
Schéma 22: Principaux ions fragments observés sur le spectre MS/MS	159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Activités biologiques de quelques espèces du genre <i>Polyalthia</i>	10
Tableau II: Quelques lactones isolées de <i>Polyalthia crassa</i>	11
Tableau III: Quelques dérivés benzopyraniques isolés de <i>Polyalthia cerasoide</i>	12
Tableau IV: Quelques dérivés acétyléniques isolés de <i>Polyalthia</i>	13
Tableau V: Quelques diterpènes de type clerodane isolés du genre <i>Polyalthia</i>	17
Tableau VI: Quelques alcaloïdes isoquinoléiques isolés du genre <i>Polyalthia</i>	20
Tableau VII: Quelques alcaloïdes quinoléiques isolés du genre <i>Polyalthia</i>	24
Tableau VIII: Quelques alcaloïdes indoliques isolés du genre <i>Polyalthia</i>	25
Tableau IX: Quelques types d'alcaloïdes et leurs précurseurs.....	26
Tableau X: Déplacements chimiques des méthoxydes des aporphines.....	35
Tableau XI: Quelques alcaloïdes isolés des plantes du genre <i>Canthium</i>	44
Tableau XII: Quelques triterpènes pentacycliques isolés du genre <i>Canthium</i>	45
Tableau XIII: Quelques polyphénols glycosylés de <i>C. berberidifolium</i>	46
Tableau XIV: Quelques iridoïdes isolés du genre <i>Canthium</i>	48
Tableau XV: Données spectrales de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) de CM01 120 comparées à celles de l'acide oleanolique (125 MHz, CDCl ₃) (Mahato et al., 1994).....	71
Tableau XVI: Données spectrales de RMN ¹³ C (125 MHz, Pyr-d ₅) de CM02 121 comparées à celles de l'acide quinovique (125 MHz, CDCl ₃) (Mahato et al., 1994).....	75
Tableau XVII: Données de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de POE4 122 comparées à celles de polycarpol (125 MHz, CDCl ₃) (Hammonnière et al., 1976).....	79
Tableau XVIII: Données de RMN du ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) et ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de CM06 123	83
Tableau XIX: Comparaison des données de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) et RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) de CM03 124 avec celles de l'acide 4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6- <i>O</i> -benzoylglucopyranoside) vanilique: ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) et ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) (Lee et al., 2010)	88
Tableau XX: Comparaison des données de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) et RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de POE7 125 avec celles de la bidebiline A: ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) et ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) (Kanokmedhakul et al., 2003).....	95

Tableau XXI: Comparaison des données de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) et RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de POE19 126 avec celles de la <i>N</i> -méthylurabaine : ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) et ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) (Gabriel et <i>al.</i> , 1987).....	99
Tableau XXII: Données de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) et RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de POE30 (127), POE27 (129), POE5 (130) et polyveoline (128) (360/90 MHz, CDCl ₃) (Riche et <i>al.</i> , 1980).	114
Tableau XXIII: Données de RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O) et ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de CM07 131 comparées aux données de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) et ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de la 6 α -hydroxygeniposide (Massao et <i>al.</i> , 2009).	121
Tableau XXIV: Données de RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O) et ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de CM08 132 comparées aux données de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) et ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) du deacétyl asperuloside ester de méthyle (scandoside ester de méthyle) (Atia et <i>al.</i> , 2009).	125
Tableau XXV: Données de RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O) et ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de CM09 133 comparées aux données de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) et ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de l'acide deacétyl asperulosidique	129
Tableau XXVI: Données de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) et ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) du 6-oxo-genipin 134 comparées à celles du genipin (270 MHz, CDCl ₃) et (67,5 MHz, CDCl ₃).....	133
Tableau XXVII: Données de RMN ¹ H (500 MHz, (CD ₃) ₂ CO) et ¹³ C (125 MHz, (CD ₃) ₂ CO) de CM13 135 comparées aux données de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) et ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) de gardenamide A (Bringmann et <i>al.</i> , 2001).....	137
Tableau XXVIII: Données de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) et ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de CM12 136 comparées aux données de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) et ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) macrophylloside A (Sui-Kiong et <i>al.</i> , 2001).....	142
Tableau XXIX: Concentration Inhibitrice à 50% (CI ₅₀) en μ g/mL de POE5, POE27, CM04, CM05 et CM09 isolés de <i>P. oliveri</i> et <i>C. multiflorum</i> et de l'antibiotique de référence (AR).....	148
Tableau XXX: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en μ g/mL de CM10, CM12, CM04, CM05, CM11, CM13 et CM09 isolés de <i>C. multiflorum</i> et des antibiotiques de référence (Tétracycline, gentamicine et streptomycine).....	150

Tableau XXXI: Concentration Inhibitrice à 50% (CI ₅₀) en µg/mL de POE5, POE27, CM04, CM05 et CM09 isolés de <i>P. oliveri</i> et <i>C. multiflorum</i> et de l'antibiotique de référence (AR).....	152
Tableau XXXII: Chromatogramme de dégrossissement de 118 g d'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de <i>Polyalthia oliveri</i>	158
Tableau XXXIII: Chromatogramme de la série B.....	160
Tableau XXXIV: Chromatogramme de la série D.....	160
Tableau XXXV: Chromatogramme de fractionnement de 125 g d'extrait brut	161

RESUME

Le présent travail porte sur la recherche des constituants chimiques à activités antimicrobiennes et antiplasmodiales de *Polyalthia oliveri* ENGL. (Annonaceae) et *Canthium multiflorum* Schum and Thonn (Rubiaceae).

Nous avons ainsi isolé grâce à diverses techniques chromatographiques en phase liquide telles que la Chromatographie sur Colonne (CC), la Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC) et la Chromatographie sur Couche Mince (CCM):

D'une part de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *Polyalthia oliveri*: **03 dérivés indolosesquiterpènes nouveaux**, la *N*-acétyl 8 α -polyveolinone, la 8 α -polyveolinone et la *N*-acétyl polyveoline; **02 alcaloïdes connus**, la *N*-méthylurabaine et la bidebiline A et **01 triterpène connu**, le polycarpol.

D'autre part de l'extrait au chlorure de méthylène/méthanol (1/1) de la partie aérienne de *Canthium multiflorum*: **01 iridoïde nouveau**; 6-oxo genipin; **08 iridoïdes connus**; la 6- α -hydroxygeniposide, le scandoside méthyl ester, l'acide deacétyl asperulosidique, le gardenamide, la macrophylloside, la garjasmine, la gardenine et la galioside; **02 triterpènes connus**; l'acide oleanolique et l'acide quinovique; **01 polyol connu**; D-mannitol et **01 acide phénolique connu**; l'acide 4-*O*- β -D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) vanilique.

Les structures de tous ces composés ont été établies grâce à des méthodes spectroscopiques usuelles (UV, IR, DC, SM, RMN du ^1H et du ^{13}C) ainsi qu'à la RMN à deux dimensions (COSY, HMQC, HMBC et NOESY). Certaines de ces structures ont été confirmées d'une part par comparaison de leurs données spectrales avec celles décrites dans la littérature et d'autre part par des transformations chimiques telles que l'hydrolyse acide et l'acétylation effectuées respectivement sur la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone et la *N*-acétyl polyveoline.

Les composés nouveaux et certains composés connus isolés en quantité suffisante ont été évalués pour leurs activités antimicrobiennes contre cinq souches de bactéries dont 01 à gram positif: *Staphylococcus aureus* (DSM 799) et 04 à gram négatif: *Actinobacter calcoaceticus* (DSM 30006), *Serratia plymuthica* (DSM 4540), *Pseudomonas stutzeri* (DSM 4166) et *Escherichia coli* (DSM 1116), leurs activités antiplasmodiales contre deux souches de *Plasmodium falciparum* (NF524 et K1) et leurs activités cytotoxiques contre les cellules L-6. Il en ressort que:

-
- La *N*-acétyl 8 α -polyveolinone et la gardenine isolées respectivement des écorces du tronc de *Polyalthia oliveri* et de la partie aérienne de *Canthium multiflorum* possèdent une activité antiplasmodiale significative sur les deux souches de *Plasmodium falciparum* avec des CI₅₀ respectivement de 7,60 μ g/mL et de 7,17 μ g/mL.
 - La galioside et la 6-oxo-genipin isolées de la partie aérienne de *Canthium multiflorum* ont montré des activités antimicrobiennes remarquables contre *Serratia plymuthica* (DSM4540) et *Staphylococcus aureus* (DSM799) avec des CMI respectivement égales à 0,05 μ g/mL et à 0,01 μ g/mL comparées à celle de l'antibiotique de référence, la gentamycine qui est de 0,05 μ g/mL.
 - La *N*-acétyl polyveoline, la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone, la garjasmine, l'acide deacétyl asperulosidique et la gardenine testés pour leurs activités cytotoxiques ont montré des activités sur les cellules L-6 avec des CI₅₀ variant entre 38,5 et 60,4 μ g/mL. Ce qui permet de conclure que ces composés possèdent des activités modérées comparées à celle de la Podophyllotoxine prise comme référence et dont la CI₅₀ est de 0,007 μ g/mL.

Mots clés: *Polyalthia oliveri*, *Canthium multiflorum*, Annonaceae, Rubiaceae, indolosesquiterpène, iridoïde, antimicrobienne, antiplasmodiale, cytotoxique, dichroïsme circulaire.

ABSTRACT

The present work deals with the chemical investigation, chemical transformation as well as antimicrobial, antiplasmodial, and cytotoxic activities of some secondary metabolites isolated from *Polyalthia oliveri* ENGL. (Annonaceae) and *Canthium multiflorum* Schum and Thonn (Rubiaceae).

Thus, by means of various liquid phase chromatographic technics such as Column Chromatography (CC), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Thin Layer Chromatography (TLC) we have isolated:

From the ethyl acetate extract of the stem bark of *Polyalthia oliveri*: **03 new indolosesquiterpens derivatives**; *N*-acetyl 8 α -polyveolinone, 8 α -polyveolinone and *N*-acetyl polyveoline; **02 known alkaloids**; *N*-methylurabaine and bidebiline A and **01 known triterpenoid**; polycarpol.

From the methylene chloride /methanol (1/1) extract of the aerial parts of *Canthium multiflorum*: **01 new iridoïd**; 6-oxo-genipin; **08 known iridoïds**; 6- α -hydroxygeniposide, scandoside methyl ester, deacetyl asperulosidique acid, gardenamide, macrophyllósíde, garjasmíne, gardeníne and galiosíde; **02 known triterpenoids**; oleanolic acid and quinovic acid; **01 known polyol** ; D-mannitol and **01 known phénolic acid** ; 4-*O*- β -D-(6-*O*-benzoylglucopyranosíde) vanilic acid.

The structures of these compounds were determined by the usual spectroscopic analysis (UV, IR, DC, MS, ^1H and ^{13}C NMR) as well as two dimensional NMR spectroscopy (COSY, HMQC, HMBC and NOESY) and circular dichroism. Some of these structures were confirmed either by comparison of their spectral data with those reported in the literature or by chemical reactions such as acid hydrolysis and acetylation on *N*-acetyl 8 α -polyveolinone and *N*-acetyl polyveoline respectively.

The new compounds and some known compounds were evaluated for their antimicrobial activities on five different bacterial strains: 01 Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* (DSM 799) and four Gram-negative *Actinobacter calco-aceticus* (DSM 30006), *Serratia plymuthica* (DSM 4540), *Pseudomonas stutzeri* (DSM 4166) and *Escherichia coli* (DSM 1116), antiplasmodial activities against two *Plasmodium falciparum* strains (NF54 and K1) and cytotoxic activities against L-6 cells.

The results are as follow:

- *N*-acetyl 8 α -polyveolinone and gardenine isolated respectively from stem bark of *Polyalthia oliveri* and the aerial parts of *Canthium multiflorum* were capable to inhibit growth of *Plasmodium falciparum* NF54 and *Plasmodium falciparum* K1 with the IC₅₀ 7.60 μ g/mL and 7.17 μ g/mL respectively
- galioside and 6-oxo-genipin isolated from the aerial parts of *Canthium multiflorum* showed remarkable antimicrobial activities against *Serratia plymuthica* (DSM4540) and *Staphylococcus aureus* (DSM799) with MIC 0.05 μ g/mL and 0.01 μ g/mL compared to those of gentamycin, an antibiotic used as reference (0.05 μ g/mL)
- *N*-acetyl polyveoline, *N*-acetyl-8 α -polyveolinone, garjamine, deacetyl asperulosidic acid and gardenine tested showed cytotoxic activities against L-6 cells with the IC₅₀ comprise between 38.5 and 60.4 μ g/mL. Therefore, we conclude that all these compounds shows moderate activities compared to Podophyllotoxine, an antibiotic used as reference (0.007 μ g/mL).

Key words: *Polyalthia oliveri*, *Canthium multiflorum*, Annonaceae, Rubiaceae, indolosesquiterpen, iridoid, antimicrobial, antiplasmodial, cytotoxic, circular dichroism.

INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation des ressources biologiques dans le traitement des pathologies remonte à plusieurs millénaires. La pharmacopée traditionnelle a ainsi toujours constitué pour les populations, vivant dans des régions dépourvues de centres de santé, la principale voie d'accès aux soins. Dans certains pays africains, plus de 80 % de la population ont recours exclusivement aux plantes comme sources de traitement (OMS, 2002).

De nos jours, la phytothérapie est devenue l'une des principales voies d'accès aux soins. Les laboratoires de chimie, de biologie à travers le monde ont emboîté le pas à la médecine traditionnelle pour la recherche des voies et moyens de venir à bout des pathologies diverses, ceci par la recherche de nouveaux principes actifs. C'est ainsi que dans la lutte antibiotique, plusieurs molécules ont été mises sur pied et classées en familles:

➤ En septembre **1928**, le chercheur écossais Alexander FLEMING découvre la **pénicilline** (pénicilline G), toxine synthétisée par certaines espèces de moisissures du genre *Penicillium*. Les pénicillines n'ont été introduites pour des thérapies qu'en **1940** et entraînent des cas de diarrhée, allergie, toxicités digestive et rénale.

➤ **1932**: Synthèse des **sulfamides** suite à des travaux sur des matières colorantes par Paul EHRLICH qui entraînent des cas d'allergie, de toxicités sanguine et rénale (Singh and Barrett, 2006).

➤ Le premier antituberculeux est la **streptomycine** isolée en **1944** par WAKSMAN et collaborateurs de *Streptomyces griseus* et commercialisée en 1949. Elle entraîne chez certains patients l'ototoxicité (toxicité auditive) et la néphrotoxicité (toxicité rénale) (Singh and Barrett, 2006).

➤ Toujours en **1944**, les **Aminosides** (streptomine) sont produits de façon naturelle en des bactéries de l'ordre des *Actinomycetales* et introduits en thérapeutique à partir de 1950 par le même auteur. Ils entraînent les mêmes cas de toxicités (Singh and Barrett, 2006).

➤ Les **tétracyclines** (Doxycycline) ont été isolées en **1948** par Benjamin DUGGAR des bactéries du genre *Streptomyces* et introduites en thérapeutique à partir de **1949**. Elles entraînent des cas d'allergie, de toxicités digestive et rénale (Singh and Barrett, 2006).

➤ Les **macrolides** (Erythromycine) ont été isolés en **1952** par ABELARDO Aguilar des bactéries du genre *Streptomyces* et introduits en thérapeutique la même année. Ils entraînent des cas d'allergie, toxicités digestive et hépatique (Singh and Barrett, 2006).

➤ Les **céphalosporines** (cefalexine) ont été isolées en **1954** par l'Italien Giuseppe BROTZU des cultures de *Cephalosporium acremonium*. Des cas d'allergie, hémorragies et toxicité rénale ont été enregistrés (Singh and Barrett, 2006).

➤ Les **Quinolones** (acide nalidixique) ont été synthétisées en **1962** par Georges LESCHER à partir des travaux sur la chloroquine. Des cas d'allergie, toxicité auditive et tendinite ont été enregistrés (Singh and Barrett, 2006).

➤ **1986**: Découverte de la **daptomycine** par Eliopoulis et collaborateurs. Puis arrêt de développement pour cause de toxicité et mauvaise efficacité en 1987. Elle est reprise par Cubist en 1997 et remise sur le marché à partir de **2003** aux USA et **2006** en Europe sous le nom **Cubicin®** (Canton et *al.*, 2010).

➤ **1987**: Synthèse des **oxazolidinones** (Linézolide) par Slee et coll. et introduites en thérapeutique en **2000**. Les effets secondaires sont dominés par la myélotoxicité (thrombopénie, anémie, pancytopénie), qui dépend étroitement de la durée du traitement, lequel est rarement indiqué au-delà de 28 jours (Leach et *al.*, 2000).

➤ **1993**: Découverte des **glycylcyclines** à partir des tétracyclines par sémi-synthèse par Tesla et coll. et introduites en thérapeutique en **2005** (Singh and Barrett, 2006).

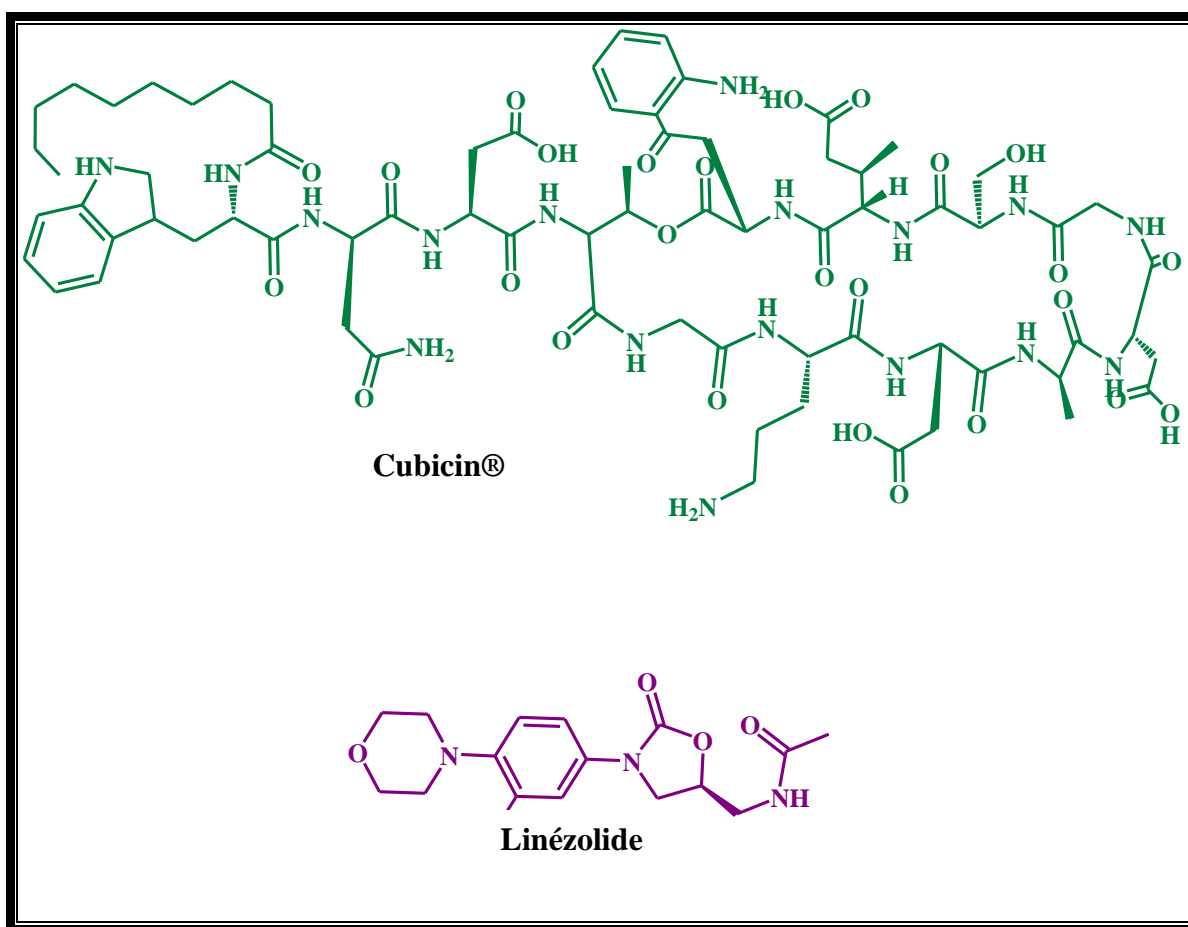


Figure 1: Quelques familles d'antibiotiques, — origine naturelle — origine synthétique

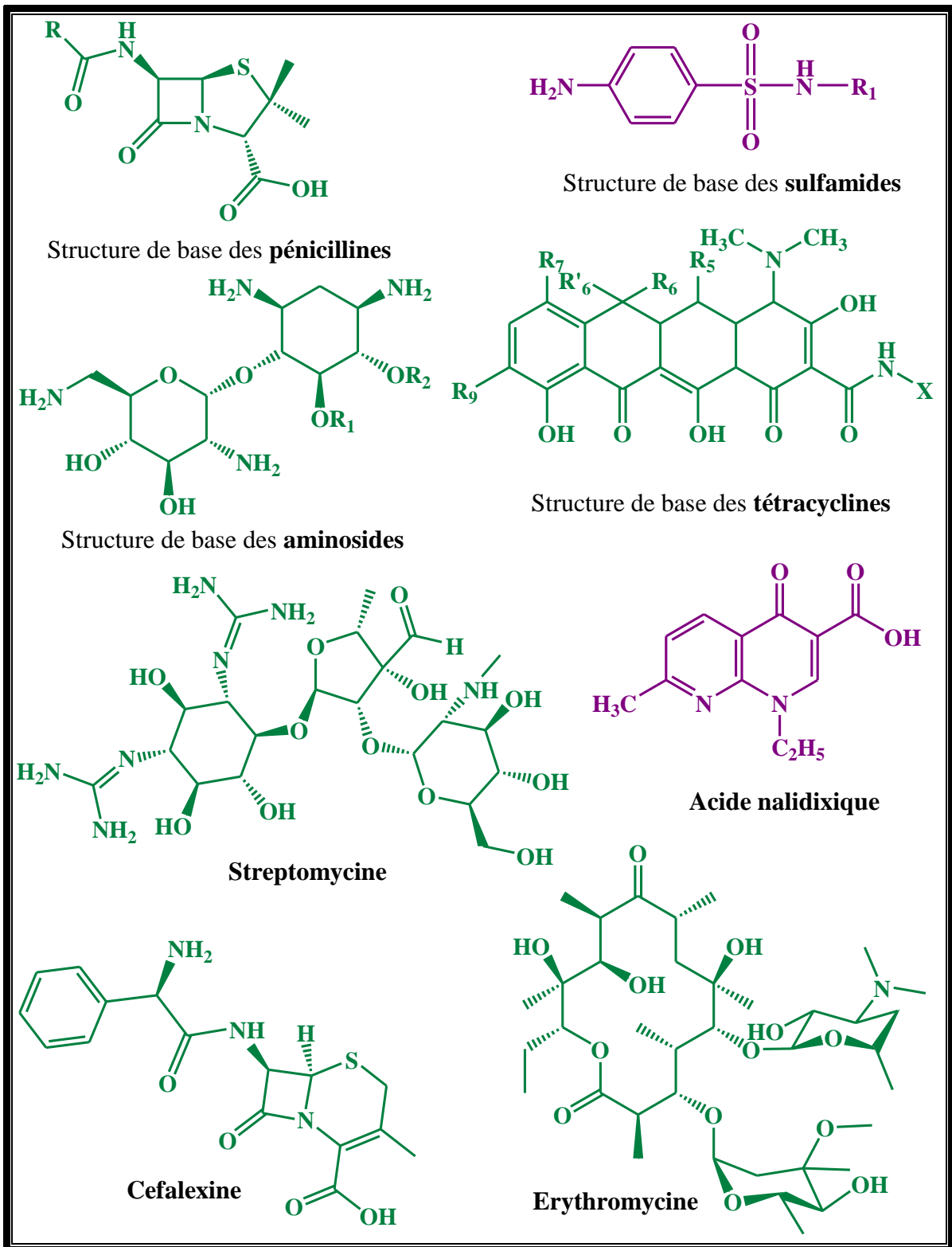


Figure 1(suite et fin): Quelques familles d'antibiotiques, — origine naturelle — origine synthétique

En plus de ces effets toxiques, l'utilisation abusive des antibiotiques engendre un problème de résistance des bactéries. C'est la raison pour laquelle malgré les 10000 antibiotiques d'origine naturelle connus à ce jour, la quête de nouvelles molécules se poursuit et les grandes firmes du monde entier à l'instar de **CUBIST PHARMACEUTICS** (USA), **MERCK** (USA), **CREAPHARMA** (France), **ROCHE** (Suisse), **POLYPHOR** (Suisse), **DISCUVA** (britannique), **SPERO THERAPEUTICS** (USA), **LABOREX** (Cameroun) et **CINPHARM** (Cameroun) ne cessent de s'y investir.

Les chercheurs camerounais ne sont pas restés indifférents et depuis des décennies, des études phytochimiques sont entreprises dans le but de découvrir de nouveaux composés aux propriétés antibiotiques. Ainsi,

- **MBAVENG et collaborateurs** ont évalué en **2012** l'activité antimicrobienne des extraits au méthanol et composés des tiges de *Dorstenia manii*.
- **KUETE et collaborateurs** ont évalué en **2010** l'activité antibactérienne, antimycobactérienne et antifongique de l'extrait au méthanol et composés de *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae).
- **NGAMENI et collaborateurs** ont évalué en **2009** l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut et composés de *Dorstenia turbinata*.
- **BOYOM et collaborateurs** ont évalué en **2011** l'activité antiplasmodiale de l'extrait à l'éthanol des feuilles et écorces de *Polyalthia oliveri*.
- **DONKENG et collaborateurs** ont évalué en **2014** l'activité antimycobactérienne de l'extrait au chlorure de méthylène des feuilles et écorces de *Polyalthia suaveolens*.

Toutes ces recherches n'ont toujours pas permis d'éradiquer le problème et c'est donc à ce titre que l'équipe de recherche du Professeur Kouam Fogue Siméon s'évertue depuis des années dans la recherche entre autres des métabolites secondaires à activités antimicrobiennes, antiplasmodiales, antiinflammatoires et cytotoxiques des plantes camerounaises.

Dans le cadre de ce travail, nous avons entrepris depuis 2010, en vue de préparer cette thèse la recherche des nouveaux constituants chimiques à activités antiplasmodiales et antimicrobiennes de deux plantes médicinales camerounaises: *Polyalthia oliveri* Engl. (Annonaceae) et *Canthium multiflorum* Schum and Thonn (Rubiaceae).

Le choix de ces deux plantes est motivé par leur utilisation par les populations locales dans le traitement de multiples affections telles que les ulcères gastriques, les mycoses, la diarrhée, le paludisme, la conjonctivite, la fièvre jaune et comme vermifuge.

Pour atteindre l'objectif principal qui est la recherche des nouveaux constituants chimiques peu toxiques ayant des propriétés antimicrobiennes et antiplasmodiales, nous devons:

- Extraire, isoler, purifier et caractériser les métabolites secondaires de ces deux plantes;

- Effectuer des transformations chimiques sur quelques uns des composés isolés;

- Effectuer des tests d'activités biologiques sur les composés isolés en quantité suffisante.

Outre l'introduction, notre travail s'articulera autour des quatre parties suivantes:

- Première partie: Revue de la littérature
- Deuxième partie: Résultats et discussion
- Troisième partie: Matériels et méthodes
- Quatrième partie: Références bibliographiques

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1. INTRODUCTION GENERALE SUR LES ANNONACEAE

Les Annonaceae sont des plantes aromatiques, sous forme d'arbres, d'arbustes, d'arbrisseaux, de buissons sarmenteux ou de lianes grêles de la forêt tropicale et subtropicale renfermant environ 120 genres et plus de 2000 espèces. En Asie et en Australie, on dénombre environ 51 genres et 950 espèces, 38 genres et 740 espèces en Amérique alors qu'en Afrique et Madagascar on compte environ 40 genres et 450 espèces (Takhtajan, 1969). L'écorce est généralement gris clair, peu épaisse, fissurée ou plissée longitudinalement. Le tronc est cylindrique et droit chez la plupart de grands arbres. Les feuilles ex-stipulées, sont courtement pétiolées, simples et alternes. Les fleurs trimères, parfumées sont souvent pendantes et fréquemment ouvertes avant le développement complet des autres organes (Le Thomas, 1969). Les Annonaceae ont des fruits syncarpes plus ou moins charnus et des graines avec endosperme ruminé (Le Thomas, 1969).

Outre leur grande importance économique et ethnopharmacologique, plusieurs plantes de cette famille sont utilisées dans l'alimentation (LeBœuf, 1977). Elles produisent aussi des huiles comestibles qui peuvent être utilisées dans la production du savon (Naidu et Saletore, 1954; Ngiefu et *al.*, 1976). Le bois de certaines espèces servait dans la production de l'alcool. Il servait aussi comme combustible ou dans la construction des cases, pirogues pagaies, arcs etc. (Savard, 1951). Parmi les 128 genres, nous avons *Annona*, *Balanga*, *Dennettia*, *Richella*, *Isolona*, *Xylophia*, *Enantia*, *Cananga*, *Monodora*, *Enneastemon*, *Popowia*, *Oxymitra*, *Polyalthia* qui fait l'objet de notre étude.

I.1.1. Aperçu botanique sur le genre *Polyalthia*

Le genre *Polyalthia* appartient à la sous famille des Annonoideae, au tribu des *unonae*, et au sous-tribu des *xylopineae*. Il comporte environ 150 espèces. C'est l'un des genres d'Anonaceae communs aux parties tropicales d'Afrique, de Madagascar, d'Asie et d'Australie. Madagascar et le Sud-Est de l'Asie comportent de nombreuses espèces, tandis qu'en Afrique il n'est représenté que par une espèce orientale (*P. stuhlmannii*) et deux espèces de la côte occidentale et de la forêt équatoriale (*P. suaveolens* et *P. oliveri*). Engler et Diels ont créé pour ces deux espèces Ouest-africaines la section Afropolyalthia que Verdcourt a transformé en 1969 en un genre nouveau (*Greenwayodendron*) caractérisé par la polygamie des fleurs, le connectif des étamines et la position des pétales. Une étude du pollen des annonaceae a mis en évidence la différence de structure de l'exine existant entre le groupe Ouest-africain et les *Polyalthia* asiatiques et malgache. En effet, *Polyalthia capuronii* Cav. et Ker. Malgache présente une couche infratectale à structure columellaire alors que *Polyalthia*

suaveolens Engl. et Diels Ouest-africain présente une couche infratectale à structure grenue. Ceci pourrait constituer un élément nouveau en faveur de la validité du genre *Greenwayodendron*. Ainsi, *Polyalthia oliveri*, espèce sur laquelle nous portons notre attention est alors *Greenwayodendron oliveri* (Hamonnière, 1977; Le Thomas, 1969).

I.1.2. Aperçu botanique sur *Polyalthia oliveri*

Polyalthia oliveri est un arbuste d'environ 4 à 6 m de hauteur et de 50 cm de circonférence (Herbier national du Cameroun). Encore appelée *Greenwayodendron oliveri* Verdc., son écorce est grise noirâtre. Les feuilles de couleur verte et sombre sont ovales, de longueur 10-20 cm et de largeur 4,5-7,5 cm. Les fleurs sont polygames et possèdent une seule rangée d'étamines. Le connectif des étamines est mince et aplati latéralement. Les pétales de fleurs ne sont pas étalés mais linéaires (longueur: 10-12 mm). Le matériel florifère se présente en boutons plus ou moins avancés où les pétales sont connivents. Les fruits sont composés de méricarpes stipités et globuleux (diamètre: 5-8 mm).



Figure 2: *Polyalthia oliveri*, arbre, branches et feuilles

Polyalthia oliveri est une espèce présente dans les grandes forêts denses d'Afrique équatoriale, partant de la Sierra Leone à l'Est du Nigeria en passant par le Gabon et le Cameroun (Burkill, 1985; Le Thomas, 1969). La carte ci-dessous illustre la distribution géographique de la plante en Afrique.

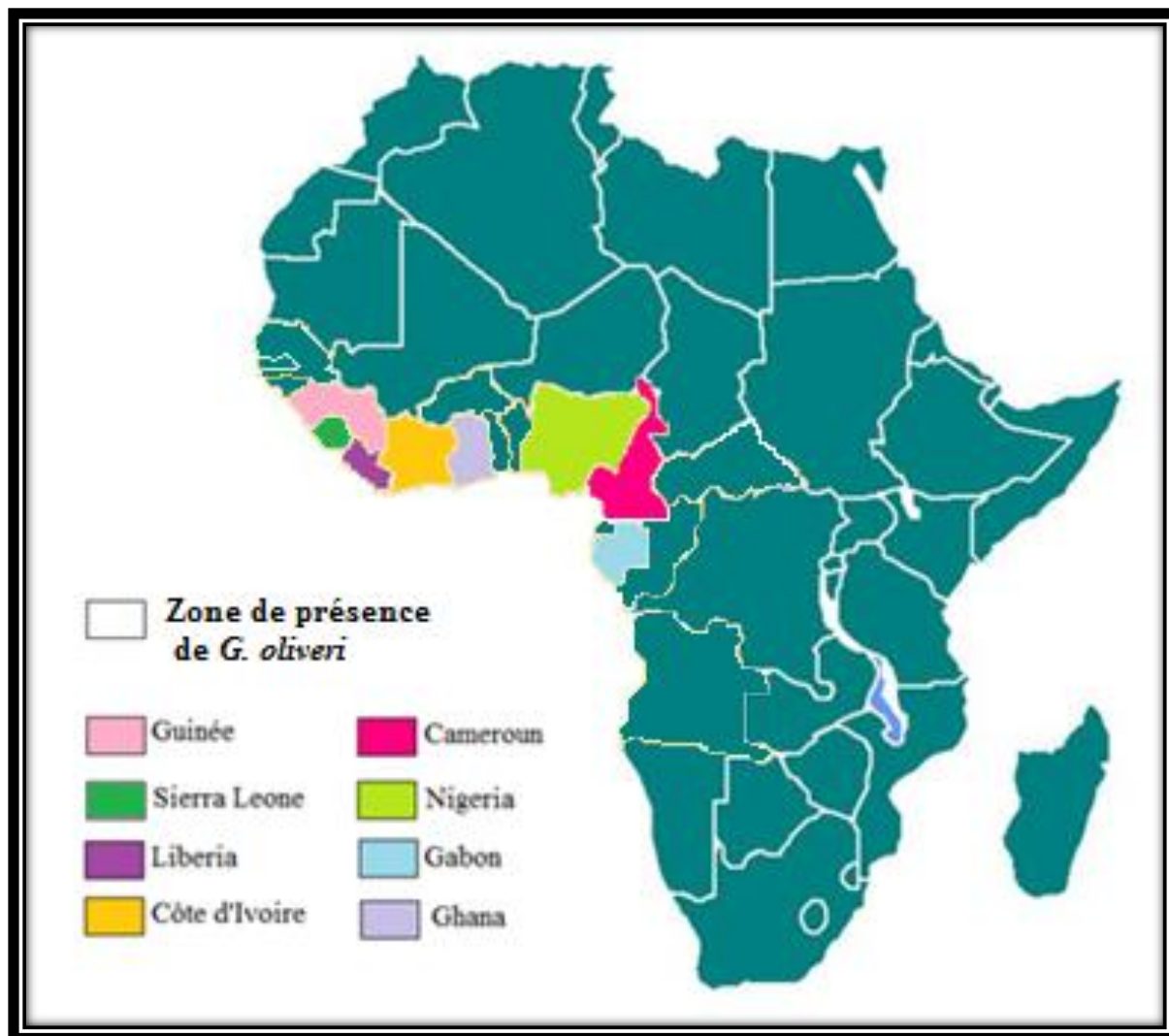


Figure 3: Distribution géographique de *Polyalthia oliveri* en Afrique (Burkill, 1985)

I.1.3. Utilisations de quelques espèces du genre *Polyalthia*

I.1.3.1. Utilisations traditionnelles

Polyalthia oliveri est une espèce Ouest-Africaine qui est communément utilisée comme hypotenseur (Diafouka, 1993). La décoction des écorces du tronc est utilisée par les populations d'Afrique de l'Ouest en général pour soigner la fièvre, comme fébrifuge et sudorifique. De plus en Afrique de l'Ouest, la tribu Mendé (Sierra Leone, Liberia et Guinée) utilise la décoction des écorces pour soigner la fièvre bilieuse. En Sierra Leone particulièrement, cette décoction est utilisée pour soigner la fièvre jaune (Burkill, 1985). Les infusions d'écorces sont utilisées au Liberia comme vermifuge. Au Cameroun, l'infusion des écorces permet de lutter contre les troubles d'estomac (Oliver-Bever, 1982).

La décoction des feuilles de *P. suaveolens* est utilisée en Afrique de l'Ouest par les populations pour combattre la fièvre, les rhumatismes et les douleurs corporelles (Burkill, 1985). Les écorces du tronc de la même plante sont utilisées toujours en Afrique de l'Ouest comme laxatif, purgatif, contre les maux de ventre tandis que les racines sont utilisées pour combattre les vers, les parasites, les œdèmes et la goutte (Le Thomas, 1969).

Au Nigeria et en Inde, les écorces de *P. longifolia* permettent de lutter contre la fièvre, les maladies de la peau et comme fébrifuge (Godofredo, 2013).

I.1.3.2. Utilisations économiques

Les plantes du genre *Polyalthia* ont des multiples utilités en Afrique. Quelle que soit leur origine géographique, le bois des *Polyalthia* est utilisé en menuiserie et en ébénisterie (Hamonnière et al., 1977)

Au Liberia, les tiges droites et minces de *P. oliveri* sont utilisées pour les cadres des maisons locales et au Cameroun elles sont utilisées pour la réalisation d'arcs (Irvine, 1961).

Au Gabon, le bois très dur de *P. suaveolens* est utilisé en ébénisterie, pour la réalisation de poteaux de mine, la construction de cases et la fabrication des chaises, tables, pagaies et lits (Raponda et al., 1961).

En Afrique de l'Ouest, le bois de *P. suaveolens* et la tige de *P. oliveri* sont utilisés comme matériaux de construction. De plus le bois de *P. suaveolens* est utilisé pour la réalisation des outils de chasse et de pêche (Burkill, 1985).

I.1.4. Activités biologiques de quelques espèces du genre *polyalthia*

Les activités biologiques de quelques espèces du genre *Polyalthia* sont regroupées dans le tableau I suivant.

Tableau I: Activités biologiques de quelques espèces du genre *Polyalthia*

Nom de la plante	Partie de la plante	Activités biologiques	Références
<i>P. ou G. suaveolens</i>	Ecorces des tiges séchées extraites au CH ₂ Cl ₂	Antitrypanosomiale, antiplasmodiale, antimycobactérienne	Ngantchou et al., 2010; Boyom et al., 2011; Donkeng et al., 2014; Tsabang et al., 2012
<i>P. longifolia</i>	Racines séchées extraites au méthanol	Antimicrobienne, Hépatoprotecteur, anti-inflammatoire	Godofredo, 2013
	Graines séchées extraites à l'hexane	Antifongique	
	Ecorces des tiges séchées extraites à l'éthanol	Cytotoxique	Zhao et al., 1991
	Extrait à l'éthanol	Anti-ulcère, antibactérienne	Godofredo, 2013
	Racines séchées extraites au méthanol	Antibactérienne, hypotensive	
	Feuilles séchées extraites à l'éthanol	Cytotoxique	Sashjdharma et al., 2010
<i>P. debilis</i>	Racines séchées extraits au CH ₂ Cl ₂	Antimalariale	Kanokmedhakul al., 2003
	Racines séchées extraites au méthanol	Antimicrobactérienne	Panthama et al., 2010
<i>P. crassa</i>	Feuilles et brindilles séchées extraites à l'AE	Cytotoxique	Tuchinda et al., 2006
<i>P. evecta</i>	Racines séchées extraites à l'hexane et au CH ₂ Cl ₂	Antiplasmodiale	Kanokmedhakul et al., 2006
<i>P. barnesii</i>	Ecorces des tiges extraites à l'AE	Cytotoxique	Ma et al., 1994
<i>P. suberosa</i>	Feuilles et tiges extraites à l'éthanol	Anti-VIH	Li et al., 1993
<i>P. oliveri</i>	Feuilles et écorces extraites à l'éthanol	Antiplasmodiale	Madiesse et al., 2012; Boyom et al., 2011

Les espèces du genre *Polyalthia* ont fait l'objet de plusieurs études.

I.1.5. Travaux chimiques antérieurs sur le genre *Polyalthia*

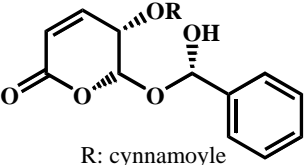
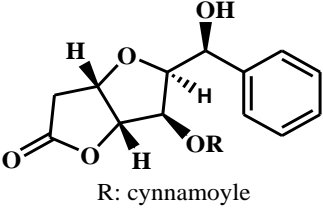
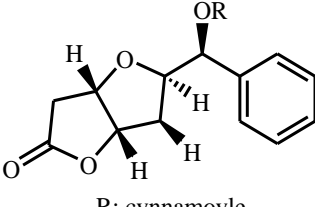
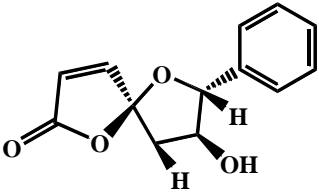
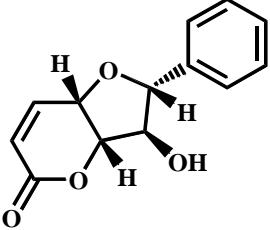
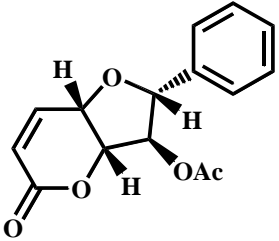
I.1.5.1. Métabolites secondaires isolés du genre *Polyalthia*

Les travaux chimiques antérieurs effectués sur les espèces du genre *Polyalthia* ont conduit principalement à l'isolement des lactones, des benzopyranes, des dérivés acétyléniques, des terpènes et des alcaloïdes.

I.1.5.1.1. Les lactones

Le tableau suivant présente quelques lactones isolés de *Pollyalthia crassa*

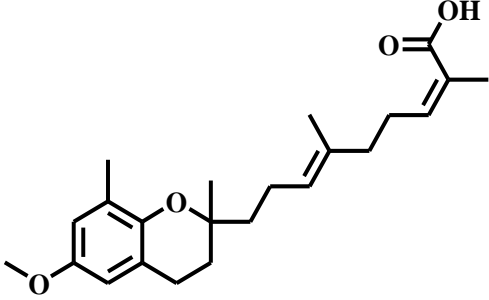
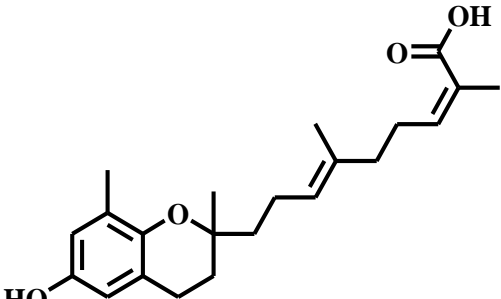
Tableau II: Quelques lactones isolées de *Polyalthia crassa*

Structures des composés	Noms	Sources	Références
 <p>R: cinnamoyle</p>	<u>1</u> Crassalactone A	<i>P. crassa</i> (feuilles et tiges)	Tuchinda, 2006
 <p>R: cinnamoyle</p>	<u>2</u> Crassalactone B		
 <p>R: cinnamoyle</p>	<u>3</u> Crassalactone C		
	<u>4</u> Crassalactone D		
	<u>5</u> (+)-altholactone		
	<u>6</u> (+)-3-acéthylaltholactone		

I.1.5.1.2. Les dérivés benzopyraniques

Le tableau II suivant regroupe quelques métabolites secondaires dérivés du benzopyrane isolés de *Polyalthia cerasoide*

Tableau III: Quelques dérivés benzopyraniques isolés de *Polyalthia cerasoide*

Structures des composés	Noms	Sources	Références
	<u>7</u> Polycerasoidin	<i>P. cerasoides</i> (écorces des tiges)	Gonzalez et al., 1996
	<u>8</u> Polycerasoidol		

I.1.5.1.3. Les dérivés acétyléniques

Apparentés aux lipides, les dérivés acétyléniques ou polyacétyléniques sont souvent linéaires mais peuvent aussi être partiellement cyclisés (Bruneton, 1993). Le tableau suivant donne quelques dérivés acétyléniques isolés des espèces du genre *Polyalthia*.

Tableau IV: Quelques dérivés acétyléniques isolés de *Polyalthia*

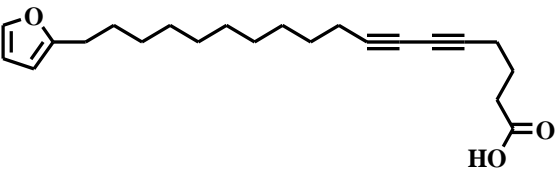
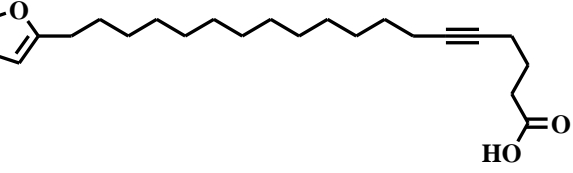
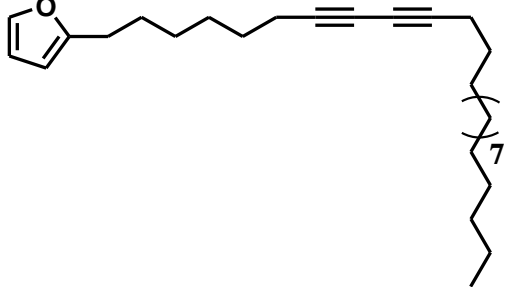
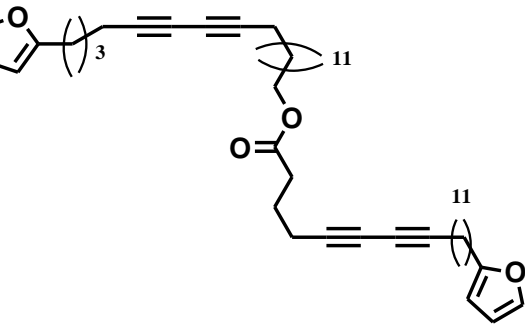
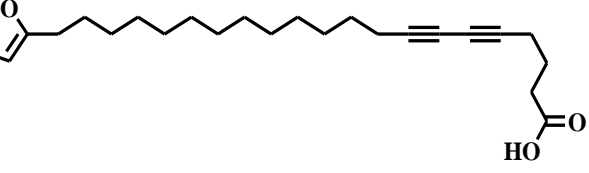
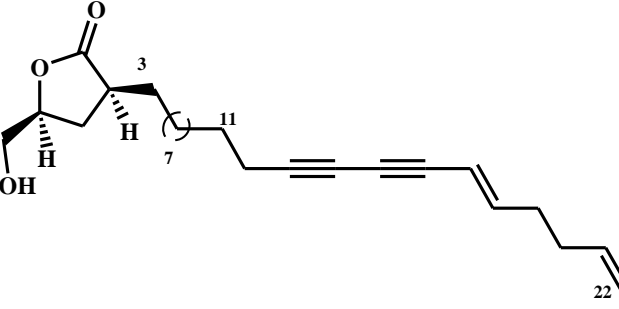
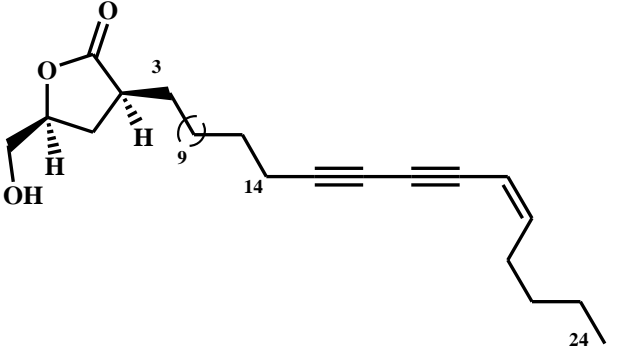
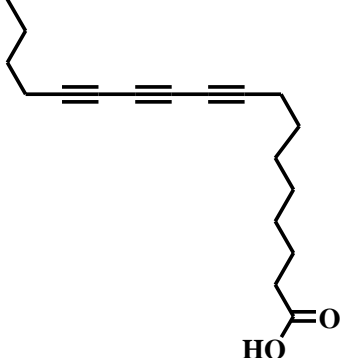
Structures des composés	Noms	Sources	Références
	9 acide 19-(2-furyl)nonadeca-5,7-diynoïque	<i>P. evecta</i> (racines)	Kanokmedha kul et <i>al.</i> , 2006
	10 acide 19-(2-furyl)nonadeca-5-ynoïque		
	11 1-(2-furyl)pentacos-7,9-diyne		
	12 21-(2-furyl)heneicosa-14,16-diyne-19-(2-furyl)nonadeca-5,7-diynoate		
	13 acide évectique ou acide 21-furanheneicos-5,7-diynoïque		

Tableau IV: Quelques dérivés acétyléniques isolés de *Polyalthia* (suite)

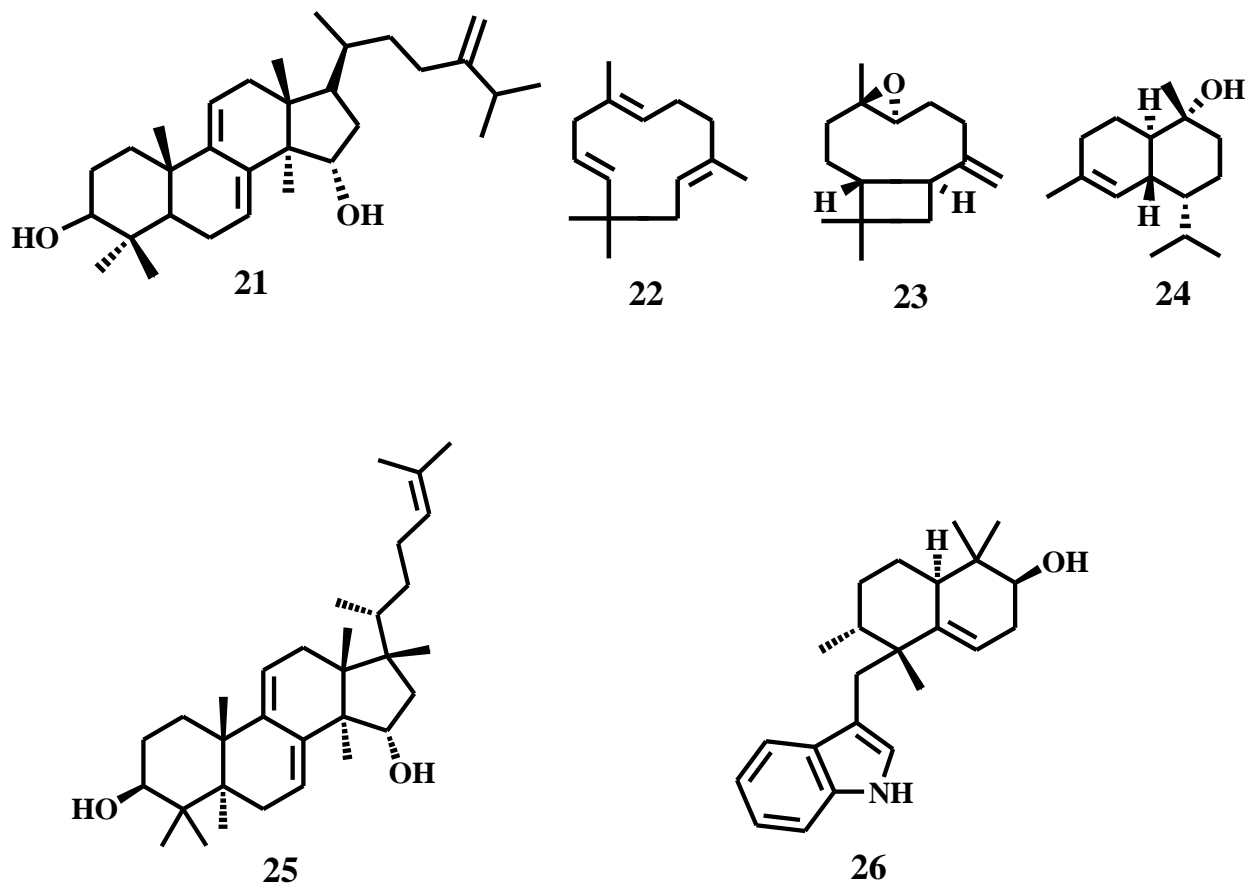
<p>The structure shows a 5-membered lactone ring with a hydroxyl group at C-2 and a side chain at C-3. The side chain consists of a propyl group followed by two triple bonds (at carbons 14 and 16) and a terminal propyl group (carbons 18, 20, 22).</p>	<p>14 debilisone A</p>	<p><i>P. debilis</i> (racines)</p>	<p>Panthama et al., 2010</p>
<p>The structure shows a 5-membered lactone ring with hydroxyl groups at C-2 and C-3. The side chain at C-3 consists of a propyl group followed by two triple bonds and a terminal propyl group with a hydroxyl group at the end (carbon 22).</p>	<p>15 debilisone B</p>		
<p>The structure shows a 5-membered lactone ring with hydroxyl groups at C-2 and C-3. The side chain at C-3 consists of a propyl group followed by two triple bonds and a terminal propyl group with a terminal double bond (carbon 22).</p>	<p>16 debilisone C</p>	<p><i>P. cerasoides</i> (racines)</p>	<p>Kanokme dhakul et al., 2007</p>
<p>The structure shows a 5-membered lactone ring with hydroxyl groups at C-2 and C-3. The side chain at C-3 consists of a propyl group followed by two triple bonds and a terminal propyl group with a terminal double bond (carbon 22).</p>	<p>17 debilisone D</p>		

Tableau IV: Quelques dérivés acétyléniques isolés de *Polyalthia* (suite et fin)

	<p>18 debilisone E</p>		
	<p>19 debilisone F</p>	<p><i>P. cerasoides</i> (racines)</p>	<p>Kanokmedhakul et al., 2007</p>
	<p>20 acide octadeca-9,11,13-triynoïque</p>		

I.1.5.1.3. Les terpènes

Les terpènes isolés antérieurement du genre *Polyalthia* sont essentiellement des diterpènes de type clerodane. Cependant on peut noter la présence de quelques triterpènes à l'instar du suberosol **21** isolé de *P. suberosa* (Li et al., 1993), **25** polycarpol et **26** polyalthénol isolés de *P. oliveri* (Hamonnière et al., 1977) et sesquiterpènes à l'exemple de l' α -humulène **22**, l'oxyde de caryophyllène **23** et du (-)- α -cadinol **24**, tous isolés de *P. cerasoide* (Kanokmedhakul et al., 2007).



Le tableau V suivant donne quelques diterpènes de type clerodane isolés du genre *Polyalthia*.

Tableau V: Quelques diterpènes de type clerodane isolés du genre *Polyalthia*.

Structures des composés	Noms	Sources	Références
	27 16(<i>R</i>)-3,13 <i>Z</i> -kolavadien-16,15-olide	<i>P. viridis</i> (écorces du tronc)	Kijjoa et al., 1990
	28 16-(<i>R</i> et <i>S</i>)-3,13 <i>Z</i> -kolavadien-16,15-olide-2-one		
	29 16-(<i>R</i> et <i>S</i>)-2,13 <i>Z</i> -kolavadien-16,15-olide-3-al		
	30 acide méthyl 2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -farnesoate,3,13 <i>E</i> -kolavadien-15-oïque		
	31 14,15-bisnor-3,11 <i>E</i> -kolavadien-13-one	<i>P. longifolia</i> (feuilles)	Phadnis et al., 1998

Tableau V: Quelques diterpènes de type clerodane isolés du genre *Polyalthia* (suite)

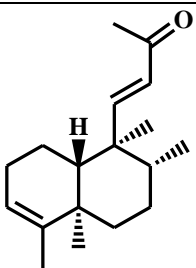
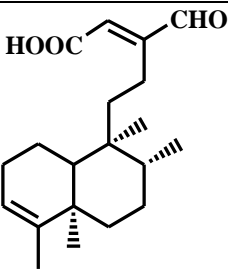
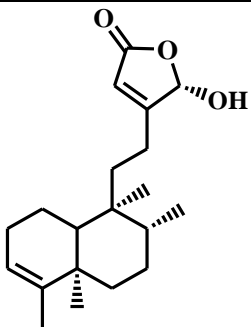
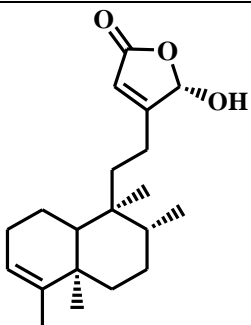
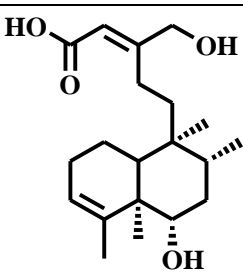
	<p>32 14,15-bisnor-3,11<i>E</i>-kolavadien-13-one</p>		
	<p>33 acide 16-oxo cleroda-3,13(14)<i>E</i>-dien-15-oïque</p>	<p><i>P. longifolia</i> (feuilles)</p>	<p>Phadnis et al., 1998</p>
	<p>34 16<i>x</i>-hydroxy-cleroda-3,13(14)<i>Z</i>-dien-15,16-olide</p>		
	<p>35 16<i>x</i>-hydroxy-cleroda-3,13(14)<i>Z</i>-dien-15,16-olide</p>		
	<p>36 acide 6<i>α</i>,16-dihydroxycleroda-3,13-dien-15-oïque</p>	<p><i>P. longifolia</i> (tiges)</p>	<p>Lee et al., 2009</p>

Tableau V: Quelques diterpènes de type clerodane isolés du genre *Polyalthia* (suite et fin)

	<p>37 acide 4α,18β-époxy-16-hydroxycylérod-13-en-15-oïque</p>	<p><i>P. longifolia</i> (tiges)</p>	<p>Lee et al., 2009</p>
	<p>38 3β,5β,16α-trihydroxyhalima-13(14)-en-15,16-olide</p>	<p><i>P. longifolia</i> (plante)</p>	<p>Chen et al., 2000</p>
	<p>39 3β,16α-dihydroxycyléroda-4(18),13(14)Z-dien-15,16-olide</p>	<p><i>P. barnesii</i> (écorces des tiges)</p>	<p>Ma et al., 1994</p>
	<p>40 16α-hydroxycyléroda-4(18),13(14)Z-dien-15,16-olide</p>	<p><i>P. cheliensis</i> (écorces des tiges)</p>	<p>Hao et al., 1995</p>

I.1.5.1.4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes isolés du genre *Polyalthia* sont généralement de nature isoquinoléique (aporphiniques et protoberbériques), quinoléiques (anthracénique) ou indolique (indolosesquiterpénique). Les tableaux VI, VII et VIII ci-dessous donnent l'essentiel des alcaloïdes isolés des espèces du genre *Polyalthia*.

Tableau VI: Quelques alcaloïdes isoquinoléiques isolés du genre *Polyalthia*

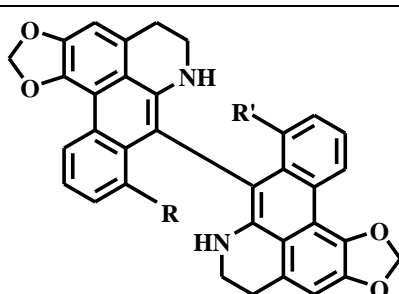
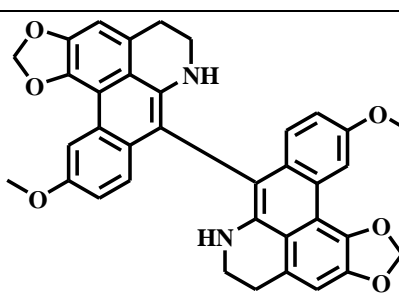
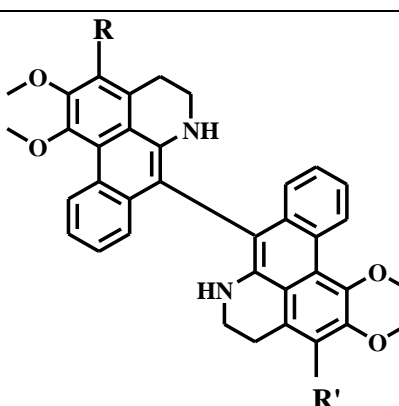
Structures des composés	Noms	Sources	Références
	41 R=R'=H: bis-7,7'-dehydroanonaine	<i>P.debilis</i> (racines)	Kanokmedhakul et <i>al.</i> , 2003
	42 R=H; R'=OCH ₃ : 7-dehydroanonaine-7'-dehydro-8'-methoxyanonaine		
	43 R=R'= OCH ₃ : bis-7,7'-dehydro-8,8'-dimethoxyanonaine		
	44 bis-7,7'-dehydro-10,10'-dimethoxyanonaine		
	45 R=R'= OCH ₃ : 7,7'-bisdehydro- <i>O</i> -methylisopiline	<i>P. bullata</i> (écorces des tiges)	Joseph et <i>al.</i> , 1996
	46 R=H ; R'=OCH ₃ : 7-dehydronornuciferinyl-7'-dehydro- <i>O</i> -methylisopiline		
	47 R=R'=H : urabaine		

Tableau VI: Quelques alcaloïdes isoquinoléiques isolés du genre *Polyalthia* (suite)

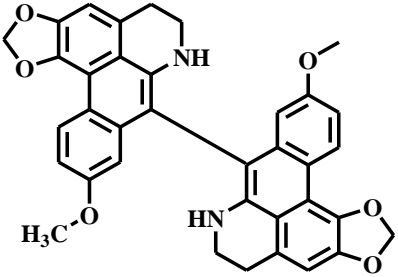
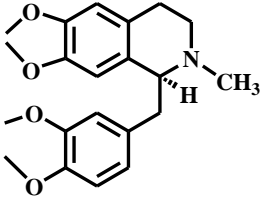
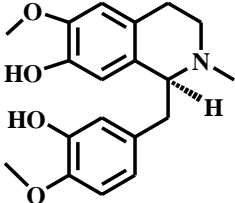
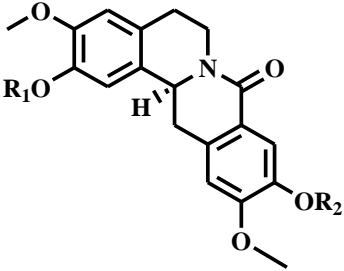
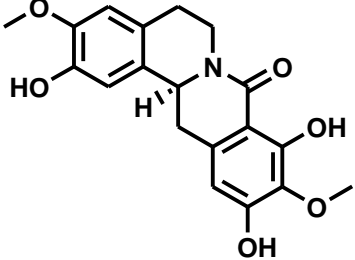
	<p>48 bidebiline E</p>		
	<p>49 laudanosine</p>	<p><i>p.</i> <i>cerasoides</i> (racines)</p>	<p>Kanokmedhakul et al., 2007</p>
	<p>50 reticuline</p>		
	<p>51 R₁=R₂=H : cerasodine</p>	<p><i>p.</i> <i>cerasoides</i> (écorces des tiges)</p>	<p>Gonzalez et al., 1997</p>
	<p>52 R₁=H; R₂=CH₃ : cerasonine</p>		
	<p>53 (-)-8- oxopolyalthiaine</p>	<p><i>P.</i> <i>longifolia</i> (écorces des tiges)</p>	<p>Chen et al., 2000</p>

Tableau VI: Quelques alcaloïdes isoquinoléiques isolés du genre *Polyalthia* (suite)

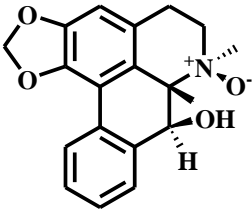
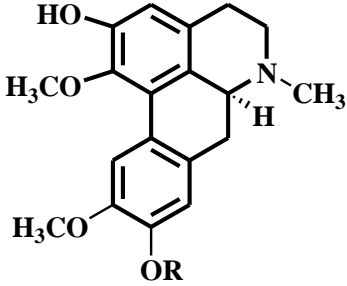
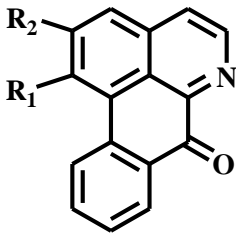
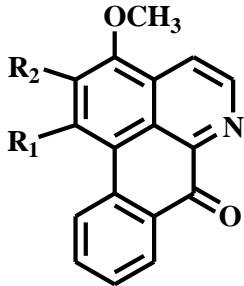
	<p>54 β-N-oxy olivéroline</p>		<p>Wu et <i>al.</i>, 1990</p>
	<p>55 R = H : (+)-boldine</p>		
	<p>53 R = CH₃ : (+)-moschatoline</p>		
	<p>56 R₁ = R₂ = OCH₃ : lyscamine</p>	<p><i>p.</i> <i>cauliflora</i>(écorces de tronc)</p>	<p>Jossang et <i>al.</i>, 1984</p>
	<p>57 R₁R₂ = OCH₂O : liriodénine</p>		
	<p>58 R₁ = R₂ = OCH₃ : 3-méthoxy moschatoline</p>		
	<p>59 R₁R₂ = OCH₂O : athérospermidine</p>		

Tableau VI: Quelques alcaloïdes isoquinoléiques isolés du genre *Polyalthia* (suite et fin)

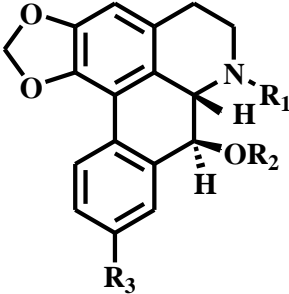
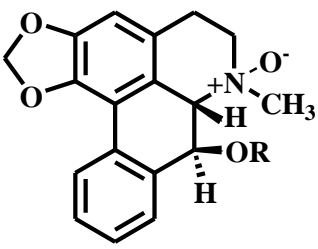
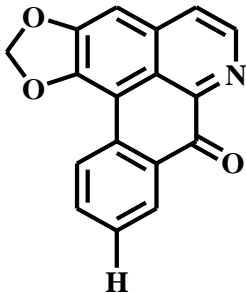
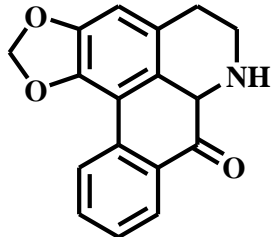
Structures	Noms	Sources	Références
	60 R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H, R ₃ = OCH ₃ : olivéridine		
	61 R ₁ = R ₂ = H, R ₃ = OCH ₃ : norolivéridine		
	62 R ₁ = CH ₃ , R ₂ = R ₃ = H : olivéroline		
	63 R ₁ = R ₂ = CH ₃ , R ₃ = OCH ₃ : olivérine		
	64 R = H : <i>N</i> -oxy olivéroline	<i>P. oliveri</i> (écorces)	Hamonnière et <i>al.</i> , 1976
	65 R = CH ₃ : <i>N</i> -oxy <i>N</i> -méthyl pachypodanthine		
	66 liriodénine		
	67 anonaïne		

Tableau VII: Quelques alcaloïdes quinoléiques isolés du genre *Polyalthia*

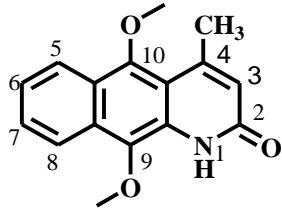
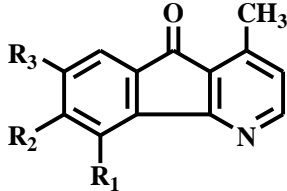
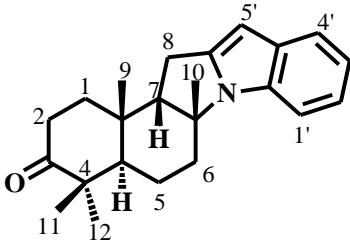
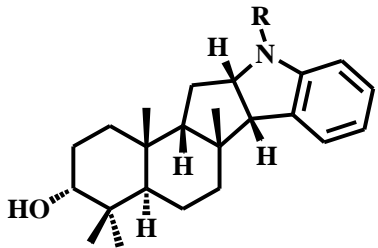
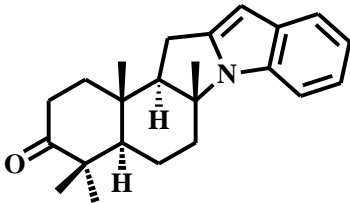
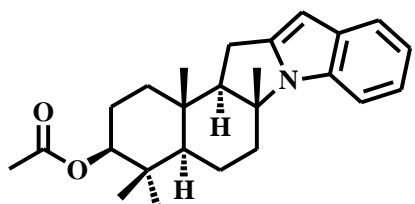
Structures	Noms	Sources	Références
	<p>68 1-aza-9,10-dimethoxy-4-méthyl-2-oxo-1,2-dihydroanthracène ou kalasinamide</p>	<p><i>P. suberosa</i>(tiges)</p>	<p>Tuchinda et <i>al.</i>, 2000</p>
	<p>69 R₁ = R₂ = OCH₃, R₃ = OH : darienine ou 1-aza-6-hydroxy-7,8-dimethoxy-4-méthylfluorèn-9-one</p>	<p><i>P. longifolia</i> (écorces des tiges)</p>	<p>Wu et <i>al.</i>, 1990</p>
	<p>70 R₁ = H, R₂ = R₃ = OCH₃ : polyfothine ou 1-aza-6,7-dimethoxy-4-méthylfluorèn-9-one</p>		
	<p>71 R₁ = H, R₂ = OCH₃, R₃ = OH : isoconcodine ou 1-aza-6-hydroxy-7-méthoxy-4-méthylfluorèn-9-one</p>		

Tableau VIII: Quelques alcaloïdes indoliques isolés du genre *Polyalthia*

Structures	Noms	Sources	Références
	<u>72</u> polysin	<i>P. suaveolens</i> (écorces des tiges)	Ngantchou et al., 2010
	<u>73</u> R = H : polyveoline		
	<u>74</u> R = COCH ₃ : N- acétylpolyveoline		
	<u>75</u> greenwayodendrin-3- one		
	<u>76</u> 3-O-acétyl greenwayodendrin		

En raison du fait que les espèces du genre *Polyalthia* produisent majoritairement des alcaloïdes, nous allons présenter les généralités sur cette classe de composés.

I.1.6. Généralités sur les alcaloïdes

Composés organiques d'origine synthétique ou naturelle (le plus souvent végétal), azotés, plus ou moins basiques, de distribution restreinte et doués à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées (Bruneton, 1993), les alcaloïdes représentent un ensemble très complexe et varié.

Du point de vue structural, les alcaloïdes peuvent être classés en groupe selon leur précurseur biosynthétique. Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ce dernier cas, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par des réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones. Dans le tableau ci-dessous sont décrits quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé (Mauro, 2006).

Tableau IX: Quelques types d'alcaloïdes et leurs précurseurs


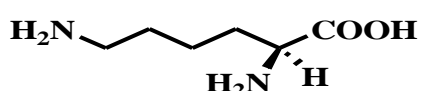
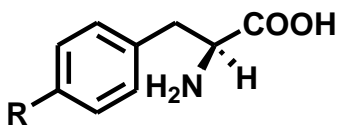
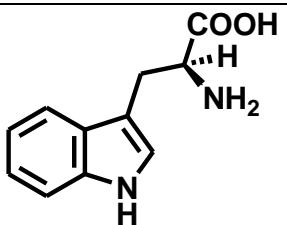
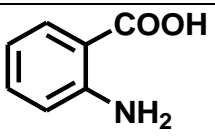
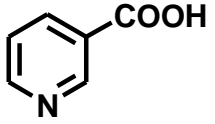
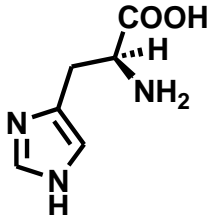
Acide aminé	Nom	Type d'alcaloïde
	<u>77</u> Ornithine	Pyrrolidines, pyrrolizidines, tropanes
	<u>78</u> Lysine	Pipéridines, quinolizidines, indolizidines
	<u>79</u> R=H: Phenylalanine <u>80</u> R=OH: Tyrosine	Alcaloïdes du type éphédrine, isoquinoléine
	<u>81</u> Tryptophane	Indoles
	<u>82</u> Acide anthranilique	Quinoléines, quinazolines, acridines
	<u>83</u> Acide nicotinique	Pyridines

Tableau IX: Quelques types d'alcaloïdes et leurs précurseurs (suite et fin)

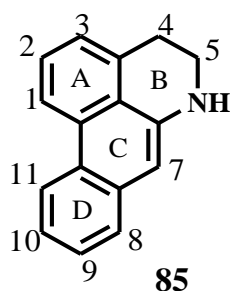
	<p>84 Histidine</p>	<p>Imidazoles</p>
<p>Via amination</p>		<p>Alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens</p>

Comme nous venons de le constater pour *Polyalthia oliveri*, les alcaloïdes aporphiniques représentent la principale classe de composés isolés. Nous nous consacrerons donc à la présentation des alcaloïdes isoquinoléiques (aporphiniques) et indoliques (indolosesquiterpènes)

I.1.6.1. Les alcaloïdes aporphiniques et indolosesquiterpènes

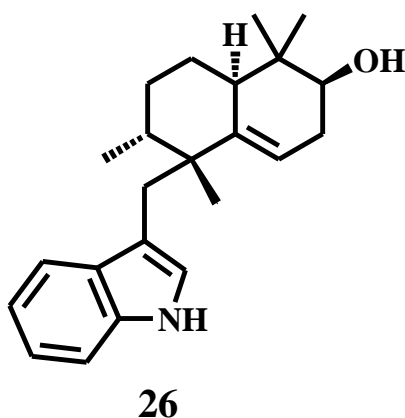
I.1.6.1.1. Alcaloïdes aporphiniques

Très vaste groupe de plus de 500 alcaloïdes (aporphines, pro-aporphines et dérivés), les aporphinoïdes sont fréquents chez certaines familles: Annonaceae, Lauraceae, Mognoliaceae, Monimiaceae, Menispermaceae. Les aporphines (*N*-méthylées) et les nor-aporphines sont toujours substituées en 1 et 2 par des hydroxyles, des méthoxyles ou des méthylènedioxyles, elles sont souvent substituées en 9, 10 et/ou 11, plus rarement en 8 et 3. Les aporphines peuvent être oxydées en 7 (7-hydroxy et 7-oxo-aporphines), plus rarement en 4 (Bruneton, 1993). Le squelette de base des aporphines est celui de la structure suivante **85**:

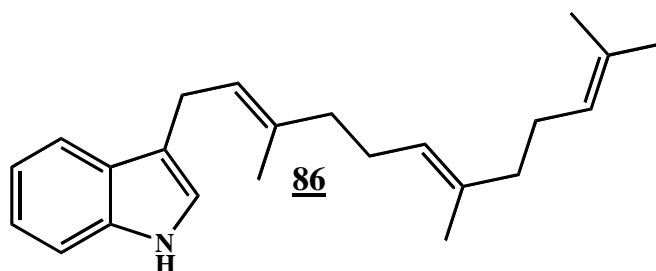
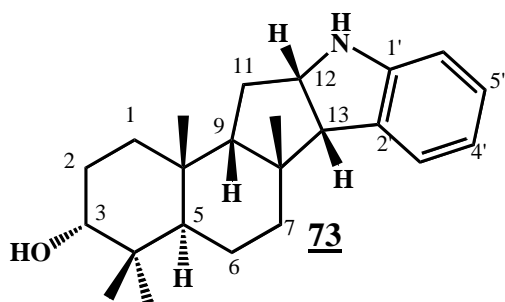


I.1.6.1.2. Alcaloïdes indolosesquiterpènes

Les indoles sesquiterpéniques constituent un petit groupe de substances naturelles appartenant à la classe des indoles terpéniques. Ils sont très intéressants à cause de la complexité de leur structure et sont pourvus de propriétés biologiques variées à l'instar des activités antibactérienne, anticancer et antiVIH (Ding et *al.*, 2010). Le tout premier composé indolosesquiterpène est le polyalthénol **26** isolé de *Polyalthia oliveri* en 1977 par Hamonnière et *al.*



Jusqu'ici, on compte environ 43 indolosequiterpènes naturels isolés et caractérisés (Marcos et *al.*, 2013). Ces composés naturels sont classés en 03 grands groupes: Farnesyl indoles (3-farnesyldole **86**), drimanyl indoles (polyveoline **73**) et aureanyl indoles (polyalthénol **26**)



I.1.6.2. Biosynthèse des alcaloïdes de nature isoquinoléique et indoliques

I.1.6.2.1. Dérivés isoquinoléines

La tyrosine est le précurseur de la biogénèse des dérivés de l'isoquinoléine. La conversion de deux molécules de tyrosine en dopamine et en acide dihydroxy-3-4-phénylpyruvique, et la condensation de ces deux produits amènent à la formation du noyau benzyltétrahydroisoquinoléine, intermédiaire nécessaire à la biogénèse de tous les alcaloïdes de type isoquinoléique. La cyclisation du noyau benzyltétrahydroisoquinoléine peut se faire de deux façons différentes; soit en cyclisant directement les cycles A et D qui donnent alors le noyau aporphine, soit par l'intermédiaire d'un noyau proaporphinique par couplage oxydatif qui amène la formation d'aporphines substituées.

D'autres substitutions peuvent se produire selon les capacités enzymatiques des plantes qui peuvent conduire à la formation de divers composés tels que: des aporphiniums quaternaires, des *N*-oxyaporphines, des oxoaporphines et d'autres composés comme l'indique le schéma suivant (Fournet, 1979) :

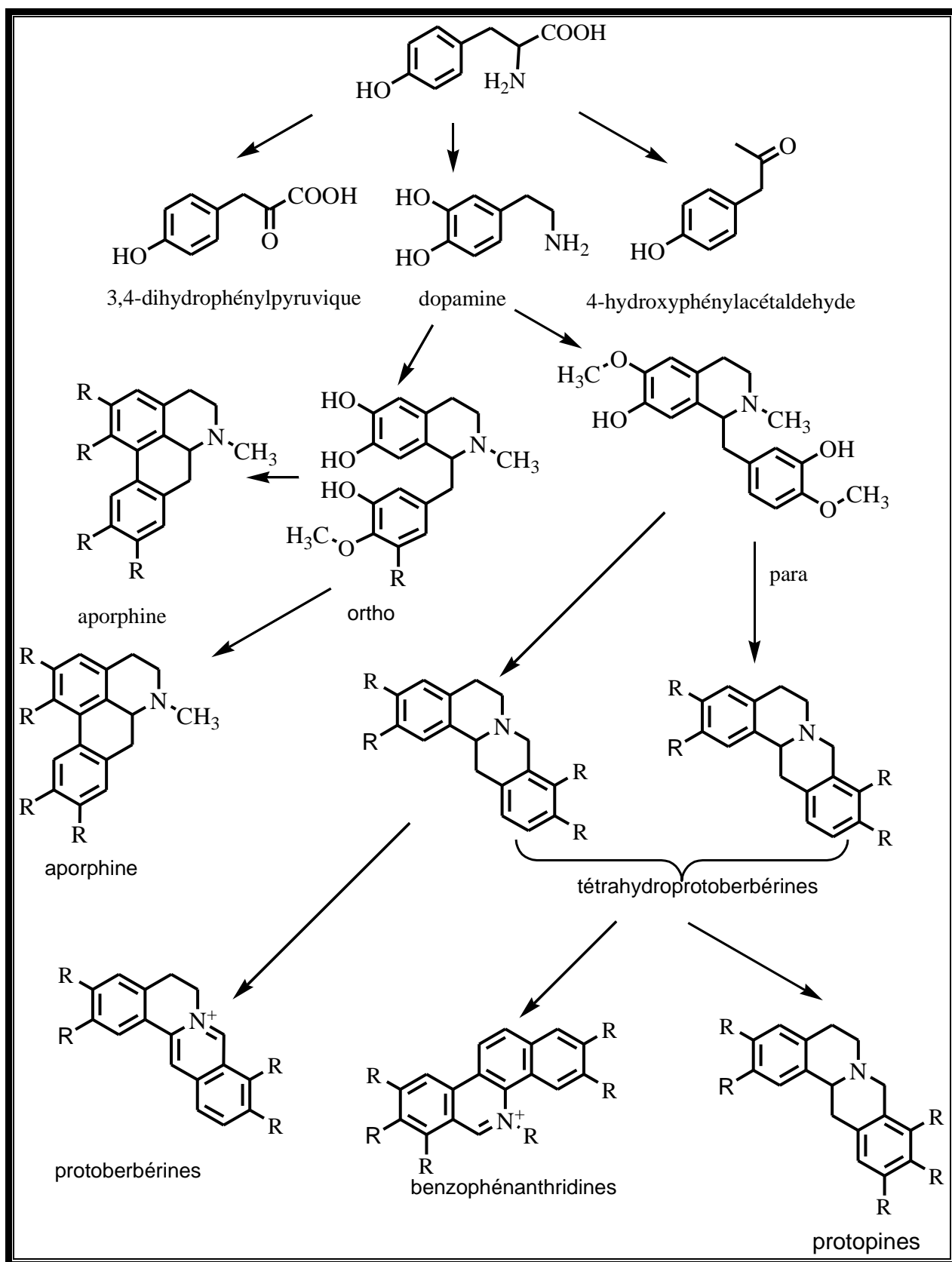


Schéma 1: Biosynthèse des alcaloïdes par la voie de la tyrosine

I.1.6.2.2. Dérivés indolosesquiterpènes (Marcos et *al.*, 2013)

A la base, tous les 03 groupes d'indolosesquiterpènes suivent la même voie biogénétique qui consiste en la condensation d'une partie indolique et une partie terpénique pour former l'indole terpénique, squelette précurseur de l'indolosesquiterpène. C'est ainsi que suivant la voie A, un prenyl transferase insère un farnesyl diphosphate en C-3 de l'indole 3-glycérol phosphate pour donner un intermédiaire. A la suite de l'élimination de la 3-phosphate glycéraldéhyde, on obtient le précurseur 3-farnesyl indole **I**. Suivant la voie B, un prenyl transferase différent insère un farnesyl diphosphate en C-2. Après un déplacement hybride de C-2 à C-3 suivi de l'élimination de la 3-phosphate glycéraldéhyde, on obtient le précurseur 2-farnesyl indole **II**. La voie C nécessite l'apport d'un acide aminé. C'est ainsi que l'indole 3-glycérol phosphate est d'abord converti en tryptophane et additionné à un autre acide aminé (leucine, valine ou proline) pour donner la diketopiperazinique. La prenylation en C-3 conduit au précurseur drimanyl indole dicetopiperazinique **III**. Chacun de ces précurseurs, à la suite des séquences d'oxydation et de cyclisation conduit à la formation des indolosequiterpènes. Le schéma suivant résume cette biosynthèse des précurseurs.

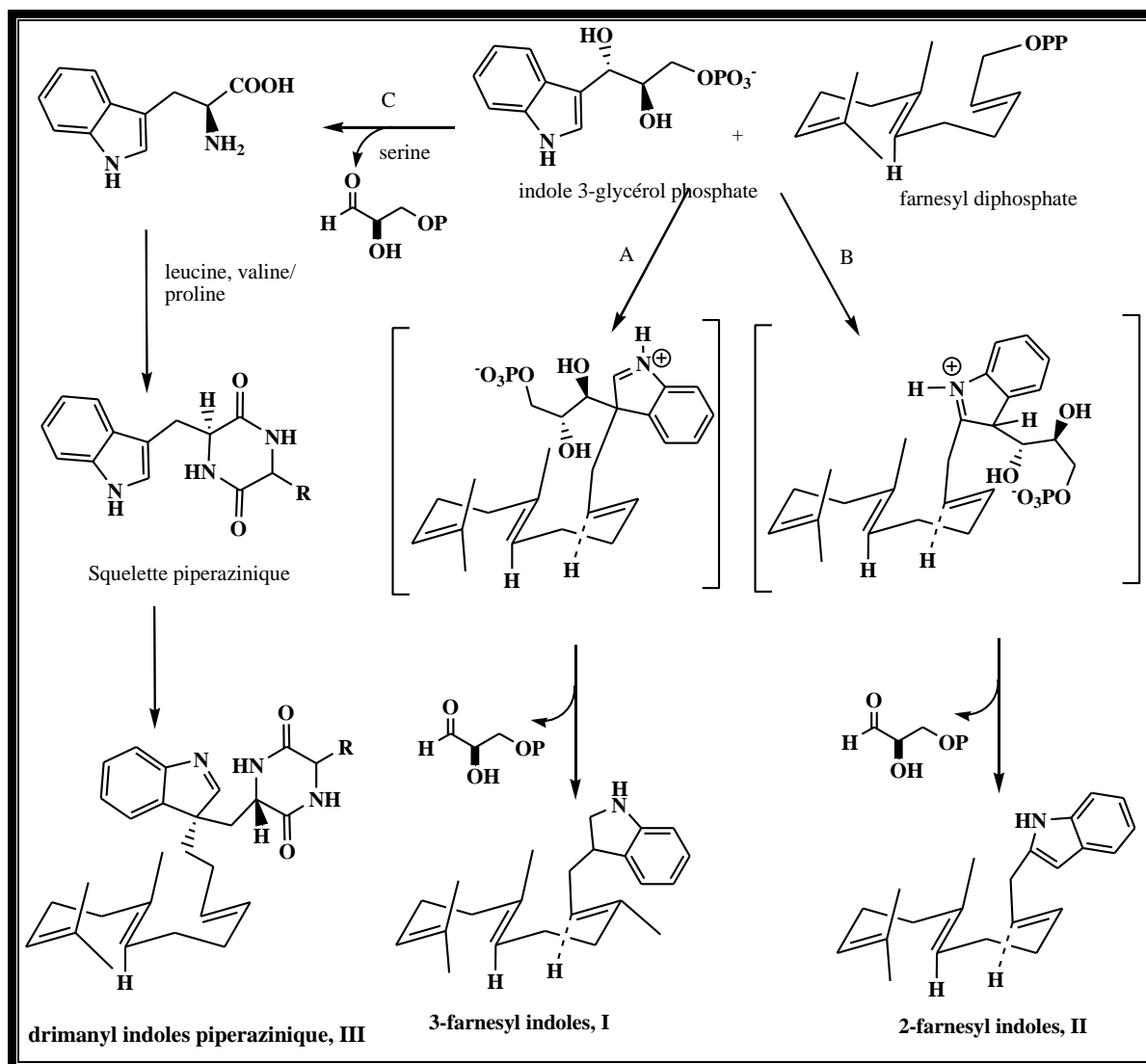


Schéma 2: Biosynthèse des précurseurs des indolosesquiterpènes

I.1.6.3. Extraction et caractérisation

L'extraction des alcaloïdes est basée en règle générale sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état de sels et sur leur basicité. C'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, dans les solvants organiques d'autre part (Bruneton, 1993).

A partir de ces principes généraux, nous avons retenu deux grandes méthodes d'extraction à savoir les méthodes générales et les méthodes spéciales.

- **Les méthodes générales**

La première méthode générale d'extraction consiste à traiter directement la poudre végétale par une base qui libère les alcaloïdes présents. Ensuite, par épuisement du milieu au

moyen d'un solvant organique approprié, l'extrait obtenu après évaporation du solvant donne l'extrait alcaloïdique brut. Ce dernier sera soumis enfin à différentes techniques de purification ou de fractionnement quand il s'agit d'un bloc alcaloïdique.

La deuxième méthode générale d'extraction traite la poudre végétale directement par de l'eau ou de l'alcool acidulé. Les alcaloïdes vont passer alors dans le solvant sous forme de solution de sels d'alcaloïdes. Par concentration de la solution, l'on obtient un extrait qui pourra être soumis à plusieurs types de traitements:

- Un premier type de traitement est la libération de l'alcaloïde par un alcali, suivit de l'épuisement par un solvant organique;
- Un deuxième type de traitement est la précipitation directe de l'alcaloïde à partir de sels par l'action d'une base suivit de la séparation par filtration et de la décantation du précipité d'alcaloïde;
- Un troisième type de traitement est la séparation de l'alcaloïde par chromatographie sur colonne: cette séparation réalise dans un premier temps le passage de la solution sur une résine échangeuse d'ions (résine anionique) qui fixe la base. Dans un deuxième temps, l'alcalisation de la résine libère l'alcaloïde qui sera déplacé par un solvant organique approprié.

▪ Méthodes spéciales

Pour les alcaloïdes volatiles, l'extraction est réalisée par traitement de la poudre végétale par la soude en présence d'éther. L'élimination de l'éther par évaporation à basse température donne un extrait qui est soumis à la distillation à la vapeur : l'alcaloïde volatil comme dans le cas de la nicotine est alors entraîné par la vapeur.

Pour les alcaloïdes donnant des combinaisons avec des bases fixes en raison de la présence d'une fonction phénol, il ne se produit pas de précipitations avec des bases : les phénols restent solubles dans l'eau.

Tous les alcaloïdes présentent des propriétés alcalines plus ou moins marquées et forment des sels avec les acides (sulfates, chlorhydrates,...). Ils peuvent aussi précipiter les hydrates de métaux lourds tels que le bismuth, l'iode, le mercure, le tungstène leur permettant ainsi d'adopter une structure d'ammonium quaternaire selon le schéma de réaction suivant (Ranarivelo, 2004) :

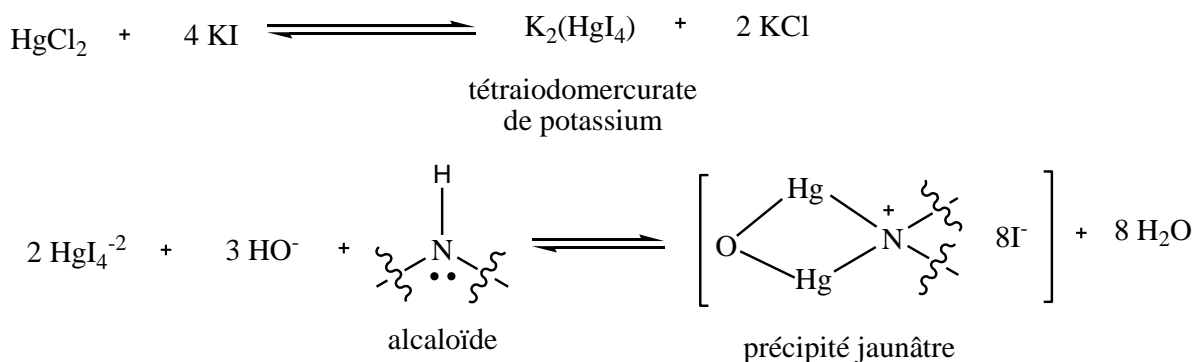


Schéma 3: Mécanisme de la réaction entre un alcaloïde et un hydrate de métaux lourds

Les alcaloïdes répondent donc positivement aux tests de Dragendorff, Valsler Mayer, Wagner, ...Le test de Dragendorff utilisé pour caractériser les alcaloïdes de *P. oliveri* est décrit dans la partie expérimentale.

I.1.6.4. Méthodes générales de détermination des structures des alcaloïdes aporphiniques et indolosequiterpènes

Comme tout métabolite secondaire, l'élucidation des alcaloïdes aporphiniques et indolosequiterpènes de *Polyalthia* se fait grâce aux techniques spectroscopiques telles que: Infrarouge, Ultraviolet, Résonance Magnétique Nucléaire à une dimension (RMN ¹H, RMN ¹³C) et à deux dimensions (COSY, HMBC, HSQC, NOESY.....) et la Spectrométrie de masse.

I.1.6.4.1. Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres IR fournissent des informations sur les groupements fonctionnels présents dans une molécule lorsqu'on examine leurs fréquences de vibration caractéristiques des liaisons qui les constituent. L'information capitale qui ressort de cette technique pour l'étude des alcaloïdes est la détection des groupements hydroxyles, carbonyles, amides, esters et principalement celui de *N*-CH₃. La plupart des alcaloïdes aporphiniques présente une large bande d'absorption entre 2800-2789 cm⁻¹ due à la présence du groupement *N*-CH₃. Selon le type d'alcaloïde aporphinique, nous pouvons avoir les absorptions autour de 3500 cm⁻¹, 1765 cm⁻¹, 1630 cm⁻¹ et 1652 cm⁻¹ dues respectivement aux groupements hydroxyles, esters, amides et carbonyles et une bande d'absorption est observée autour de 1600 cm⁻¹ caractéristique des liaisons aromatiques (Vargas et al., 1996). Ce qui est remarquable chez les indolosequiterpènes c'est la présence des bandes à 3310 cm⁻¹ (OH) et 1665 cm⁻¹ (C=O amide).

I.1.6.4.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN permettent de distinguer les différents types de protons (RMN ^1H) et de carbone (RMN ^{13}C) en se basant sur la multiplicité de leurs signaux et sur les valeurs de leurs déplacements chimiques (Atta-ur-Rahman, 1986).

- **Résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H)**

La RMN du ^1H est l'une des méthodes spectroscopiques très utile dans l'élucidation des structures des composés organiques en général et des alcaloïdes en particulier. Elle permet, grâce aux déplacements chimiques des protons, de déterminer le type de squelette des alcaloïdes, par identification des protons des cycles A, B, C, D et de leurs constantes de couplage. Dans la structure de base des aporphines **85**, le méthyle fixé sur l'atome d'azote résonne sous forme d'un singulet entre 2,5 et 2,6 ppm. Les protons méthyléniques en position 4, 5 et 7 résonnent entre 2,4 et 3,5 ppm. Les protons aromatiques résonnent entre 6,5 et 7,2 ppm à l'exception du proton en C11 qui lui résonne entre 7,9 et 8,15 ppm. Le déplacement chimique des méthoxyles varient en fonction de leur position sur le cycle A et D. Ces déplacements chimiques sont consignés dans le tableau suivant (Guinaudeau et *al.*, 1983):

Tableau X: Déplacements chimiques des méthoxyles des aporphines

Position des méthoxyles	Déplacements chimiques en ppm
1	3,6 – 3,7
2	3,85 – 3,95
9	3,95
10	3,9 – 3,95
11	3,7 – 3,8

En ce qui concerne les indolosequiterpènes issus de la 3-farnesyl indole, on remarque entre 0,80 et 1,08 ppm les signaux des 4 groupements méthyles. Lorsque l'indolosequiterpène est acétylé, le méthyle du groupement acétyle est observé autour de 2,26 ppm. La sortie de deux méthynes déblindés entre 3,50 et 4,70 ppm est due à l'influence du noyau aromatique (Riche et *al.*, 1980).

- **Résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN ^{13}C)**

La RMN du ^{13}C permet de confirmer le squelette de base assigné aux alcaloïdes, d'identifier les positions de substituant sur le cycle A, B, C et D. Dans la structure de base

des aporphines, le méthyle fixé sur l'azote résonne entre 40 et 44 ppm et les méthylènes des cycles B et C résonnent entre 28 et 60 ppm (Urzua et *al.*, 1984). Les carbones aromatiques non substitués résonnent entre 106 et 127 ppm, les carbones aromatiques portant les groupements -OH, -OCH₃ et -COCH₃ sont plus déblindés et résonnent entre 140 et 155 ppm. Les carbones aromatiques de jonction de cycle C3a, C6a, C7a et C11a résonnent entre 119 et 135 ppm. Le méthyle dioxo et les méthoxyles montrent leurs signaux respectivement entre 100-102 ppm. Dans le cas des 7-déhydroaporphines, le carbone 6a résonne entre 142-143,5 ppm et celui en position 7 entre 100-102 ppm (Guinaudeau et *al.*, 1983).

Le carbone C-3 est caractéristique chez les indolosesquiterpènes et résonne vers 76,5 ppm (oxyméthine) ou vers 219,5 ppm (carbonyle) (Okorie, 1981). De plus, les 4 méthyles entre 19,8 et 29,6 ppm sont aussi remarquables. Si l'indolosesquiterpène est acétylé, on observe un groupement carbonyle des amides autour de 169,7 ppm. Une zone aromatique est visible entre 116,8 et 143,9 ppm. (Hocquemiller et *al.*, 1981).

I.1.6.4.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions

Apparues au cours de la deuxième moitié des années 70, les techniques de RMN à deux dimensions fournissent beaucoup de renseignements dans l'étude structurale des alcaloïdes. Elles permettent non seulement par exemple d'attribuer sans ambiguïté les signaux d'un spectre aux différents atomes (¹H, ¹³C) présents dans la molécule mais aussi de donner la position exacte de ces atomes.

Deux types de pics sont observables sur les spectres de RMN 2D : les pics diagonaux situés le long de la diagonale et correspondant aux signaux du spectre à une dimension classique et les pics "hors diagonales" correspondant aux corrélations entre différents noyaux (COSY ¹H-¹H). En RMN 2D, on distingue également deux types de corrélations : les corrélations homonucléaires (¹H-¹H, ¹³C-¹³C) et les corrélations hétéronucléaires (¹H-¹³C).

Les corrélations homonucléaires s'effectuent entre noyaux couplés par un couplage scalaire : c'est la spectroscopie de corrélation ou COSY (Bax et *al.*, 1981). Pour la corrélation ¹H-¹H, ce type de spectre est appelé spectre COSY ¹H-¹H. Lorsque deux protons A et X sont couplés, il apparaît comme le montre la figure 4 deux taches diagonales correspondant aux deux doublets obtenus pour ces protons en RMN 1D classique aux fréquences W_A et W_X et deux taches "hors diagonales" situées à égales distances de la diagonale et qui peuvent être reliées entre elle en constituant un carré parfait.

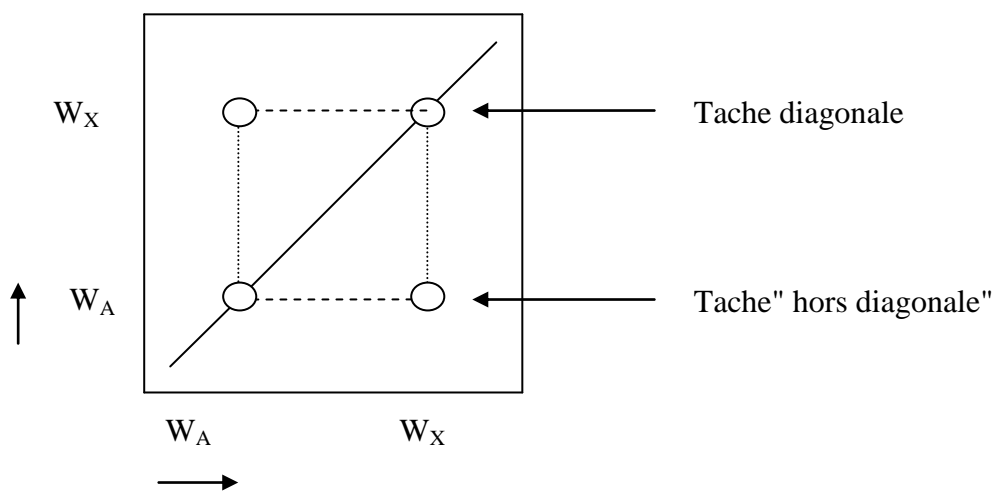


Figure 4: Allure d'un spectre COSY ^1H - ^1H

Quant à la corrélation ^{13}C - ^{13}C , la technique la plus utilisée est le COSY ^{13}C - ^{13}C encore appelée technique "INADEQUATE". Cette technique donne des spectres intéressants mais demande pour sa réalisation de grandes quantités de produit, ce qui suppose une grande solubilité de l'échantillon dans le solvant utilisé. Pour des petites molécules comme les flavonoïdes, il faut environ 200 mg de produit. Les alcaloïdes aporphiniques en nécessitent davantage.

Pour les corrélations hétéronucléaires (^1H - ^{13}C), on obtient des diagrammes sur lesquels le spectre de RMN ^1H est représenté selon l'un des axes et le spectre RMN ^{13}C selon l'autre. On a par exemple la technique HETCOR (Heteronuclear correlation) (Maudslay and Morris, 1977) qui permet de rattacher les protons aux atomes de carbones auxquels ils sont directement liés dans la molécule et d'en déduire l'attribution des signaux de l'un des spectres quand l'autre est connu. La diagonale dans ce cas n'est pas vraiment définie comme en COSY ^1H - ^1H .

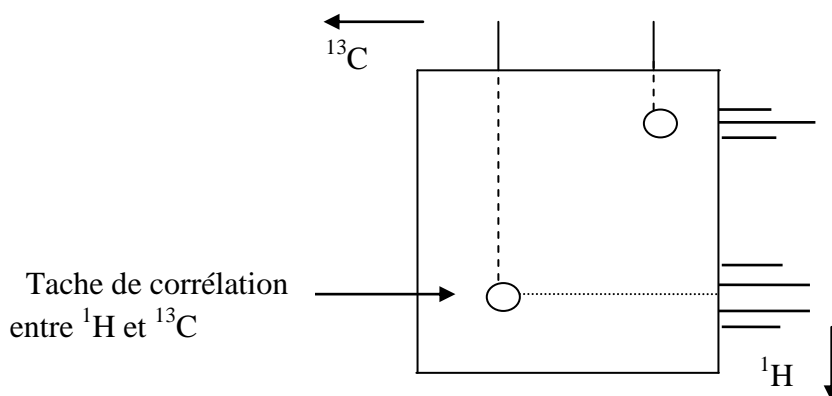


Figure 5: Allure d'un spectre COSY ^1H - ^{13}C

Il existe également d'autres techniques de couplage ^1H - ^{13}C tels que

-
- Le HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) ou corrélation ^1H - ^{13}C longue distance.
 - Le HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) ou corrélation ^1H - ^{13}C direct.

Le HMBC donne le même résultat que le COLOG classique mais au lieu d'observer le carbone pour en déduire sa corrélation avec des protons, on observe le proton qui est le plus sensible. Quant au HMQC, il donne des corrélations directes comme le COSY ^1H - ^{13}C mais observe le proton (le plus sensible) à partir duquel on déduit le carbone auquel il est lié.

I.1.6.4.4. Le NOESY

L'expérience NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) met en évidence la proximité des protons. Les signaux de corrélation sont observés dans un spectre NOESY entre les paires de protons qui sont proches dans l'espace. En général, on observe des corrélations 1,3-diaxiales et équatoriale-axiales entre les paires de protons distants de moins 4.5 Å. Si le NOESY intramoléculaire est un des outils importants dans l'attribution des signaux d'un résidu saccharidique, le NOESY intermoléculaire est essentiellement utilisé pour déterminer la séquence des sucres et leurs points de jonction. Lorsqu'on observe une corrélation NOESY entre le proton anomère d'un sucre et un proton appartenant à un autre sucre, ces deux protons définissent la liaison entre les deux sucres. Les corrélations NOE sont les plus souvent observées entre le proton anomère et le proton relié à l'atome de carbone de la liaison avec l'aglycone (Kougan, 2010)

I.1.6.4.5. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode de détermination des structures des alcaloïdes parfois indispensable. Elle a pour avantage sur les autres techniques qu'elle nécessite de très faibles quantités de produits. Elle permet de déterminer, chez les alcaloïdes, la masse molaire du composé et nous renseigne aussi sur la distribution des substituants sur les différents cycles.

Le spectre de masse des aporphines est caractérisé par les pics $[\text{M}]^+$ (pic de base) et de $[\text{M}-1]^+$ intense dû à la perte de l'hydrogène en 6a. La perte des groupements méthyles, hydroxyles et méthoxyles est mise en évidence par la présence des pics $[\text{M}-15]^+$, $[\text{M}-17]^+$, et $[\text{M}-31]^+$. La présence des pics $[\text{M}-29]^+$ ou $[\text{M}-43]^+$ est due à la perte du groupement méthylène imine ($\text{HN}=\text{CH}_2$) ou du N-méthylène imine ($\text{CH}_3\text{-N}=\text{CH}_2$) par un mécanisme de type retro Diels-Alder au niveau du cycle B (Tolstikov et *al.*, 2002).

I.1.7. Quelques activités biologiques et pharmacologiques de quelques métabolites secondaires isolés du genre *Polyalthia*

I.1.7.1. Les lactones

Des lactones isolées de *P. crassa*, **1** crassalactone A, **2** crassalactone B, **3** crassalactone C et **4** crassalactone D ont présenté une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses des mammifères (Tuchinda, 2006).

I.1.7.2. Les dérivés acétyléniques

Des dérivés acétyléniques isolés du genre *Polyalthia*, les acides 19-(2-furyl) nonadeca-5,7-diynoïque **9** et 19-(2-furyl) nonadeca-5-ynoïque **10** ont présenté une activité antivirale contre *Herpès simplex* de type 1 (Kanokmedhakul et al., 2006). Debilisone B **15**, debilisone C **16** et debilisone E **18** quant à eux ont présenté une activité antimicrobactérienne contre *Mycobacterium tuberculosis* (Panthama et al., 2010) alors que l'acide octadeca-9,11,13-triynoïque **20** a présenté une activité antiplasmodiale contre *Plasmodium falciparum* (Kanokmedhakul et al., 2007).

I.1.7.3. Les terpènes

Des sesquiterpènes isolés du genre *Polyalthia*, le α -humulene **22** a présenté une activité antimicrobienne contre *Mycobacterium tuberculosis* et l'oxyde de caryophyllene **23** une activité antiplasmodiale contre *Plasmodium falciparum* (Kanokmedhakul et al., 2007).

Des diterpènes de type clerodane isolés du genre *Polyalthia*, $3\beta,5\beta,16\alpha$ -trihydroxyhalima-13(14)-en-15,16-olide **40** et $3\beta,16\alpha$ -dihydroxycleroda-4(18),13(14)Z-dien-15,16-olide **41** ont présenté une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses humaines (Ma et al., 1994; Chen et al., 2000)

I.1.7.4. Les alcaloïdes

Plusieurs travaux ont été menés sur les activités biologiques des alcaloïdes isolées du genre *Polyalthia*. Il en ressort de ceux-ci que : la liriodénine **57** a présenté une activité cytotoxique (Wu et al., 1990), la bidebiline E **48**, une activité antiplasmodiale contre *Plasmodium falciparum* (Kanokmedhakul et al., 2007), le polysin **72** une activité antitrypanosomiale contre *Trypanosoma brucei* (Ngantchou et al., 2010) et le (-)-8-oxopolyalthiaïne **53** une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses humaines (Chen et al., 2000).

I.2. INTRODUCTION GENERALE SUR LES RUBIACEAE

Les Rubiaceae constituent une large famille de plantes d'environ 450 genres et 6500 espèces. Rencontrées le plus souvent sous forme d'arbres de grande taille, d'arbustes ou de lianes. Plusieurs espèces de cette famille se trouvent en zones tropicales et subtropicale, très peu en zones tempérée et arctique (Mill et *al.*, 2008; Atia et *al.*, 2009). Les feuilles simples et entières, sont munies de stipules interpetiolaires. Les fleurs, hermaphrodites, possèdent toutes le même nombre de sépales et d'étamines (Mill et *al.*, 2008). Les Rubiaceae ont des fruits variables. Ce sont des capsules ou des baies parfois ligneuses.

Au Cameroun, on a recensé environ 100 genres parmi lesquels *Gardenia*, *Uncarya*, *Morindea*, *Nauclea* et *Canthium* (Sonke, 2000), genre qui nous intéresse.

I.2.1. Aperçu botanique sur le genre *Canthium*

Le genre *Canthium* autre fois appelé *Plectronia* appartient à la famille des Rubiaceae. Ce genre fait partie des genres les plus importants de la flore tropicale tant sur le plan floristique que médicinale (Hepper, 1963). Les plantes du genre *Canthium* sont des arbrisseaux épineux ou non, dressés ou grimpants (Heywood, 1988). Les feuilles opposées sont en général brièvement pétiolées et oblongues, charnues ou membraneuses et à stipules intra-pétiolaires. Le fruit est une drupe bilobée. Les graines sont plus ou moins oblongues. Les fleurs le plus souvent petites, sont blanches ou verdâtres (Heywood, 1988).

On compte un grand nombre d'espèces dont plus de dix pour la flore Camerounaise (Herbier National). Parmi celles-ci *Canthium multiflorum* a fait l'objet de notre étude.

I.2.2. Aperçu botanique sur *Canthium multiflorum*

L'espèce *Canthium multiflorum* est un arbuste d'environ 3 m de hauteur répandu en Afrique et est généralement utilisée en médecine naturelle. C'est une plante sarmenteuse, aux fleurs blancs-verdâtres, aux feuilles lisses et portant les fruits dont la couleur varie de l'orange au rouge (Herbier National).



Figure 6: Feuilles de *Canthium multiflorum*

Comme les autres espèces du genre *Canthium*, *Canthium multiflorum* pousse de préférence sur les sols argileux, les sols de la latérite ou des rivières. Au Cameroun, on la rencontre dans la région du Nord à 28 kilomètres au sud de Garoua. Dans la région du centre, on la trouve sur la rive du «Nyong» à Mbalmayo, près de Nkolbong III, soit à 55 km au sud de Yaoundé, on la rencontre également à 20 kilomètres au Nord d'Obala sur la bordure de la Sanaga (Herbier National).

Les espèces du genre *Canthium* sont très utilisées en médecine traditionnelle pour soigner plusieurs affections.

I.2.3. Utilisations de quelques espèces du genre *Canthium*

I.2.3.1. Utilisations traditionnelles

Les espèces du genre *Canthium* sont largement utilisées comme antipaludiques traditionnels à l'instar des feuilles de *Canthium cornelia* en Guinée et la racine de *Canthium zanzibaricum* en Tanzanie (Subramani et al., 2004).

L'extrait aqueux de la tige de *Canthium parviflorum* est utilisé dans la cicatrisation des plaies (Jose et al., 2008).

L'extrait alcoolique de l'écorce de la tige de *Canthium subcordatum* a des propriétés potentielles antidiabétiques (Subramani et al., 2004). Le décocté aqueux de cette espèce est

souvent utilisé pour calmer la lombalgie et est prescrite aux femmes enceintes (Vergiat, 1970).

Au Burkina Faso, les racines de *Canthium multiflorum* sont utilisées pour le traitement du paludisme et de l'hypertension artérielle. Les feuilles de cette même plante sont utilisées contre la diarrhée, la conjonctivite, les mycoses et les autres maladies infectieuses (Akomo et al., 2009). Les extraits au méthanol de *Canthium multiflorum* ont été testés pour les activités antipaludiques et antibactériennes (Akomo et al., 2009).

L'extrait alcoolique des écorces des tiges de *Canthium subcordatum* possède des activités antidiabétiques. En Afrique de l'ouest cette espèce est utilisée dans le traitement de l'hypertension (Achenbach et al., 1981).

Le macéré dans du vin de palme de la sciure de *Canthium anorldianum* est administré aux personnes atteintes de la blennorragie ou de la lèpre (Dongo et al., 1989). L'écorce fraîche de la même plante est utilisée pour soigner le diabète, l'hypertension et la toux (Dongo et al., 1989).

Les feuilles et les cendres de *Canthium vénosum*, mélangées à l'huile rouge sont utilisées pour soigner la rate. Au Libéria, on utilise ce mélange pour amorcer les abcès (Irvine, 1961). En côte d'Ivoire, les feuilles mélangées au beurre de Galam s'emploient pour soigner les rhumatismes (Irvine, 1961).

I.2.3.2. Usages économiques et industriels

Le tronc de *Canthium cyclophyllum* et *Canthium zanzibarium* fournit des poteaux utilisés pour la construction des cases ainsi que la confection des meubles (Larher et al., 1979)

Les plantes du genre *Canthium* sont utilisées pour la production de bois d'œuvre, des poteaux, des piquets, pâte à papier.

A Tahiti, les fleurs très parfumées de *Canthium odorata* sont utilisées dans la fabrication des parfums et la confection des couronnes ainsi que des colliers (Achenbach et al., 1981).

Toutes ces vertus thérapeutiques ont poussé plusieurs chercheurs à s'intéresser aux espèces du genre *Canthium*

I.2.4. Travaux chimiques antérieurs sur le genre *Canthium*

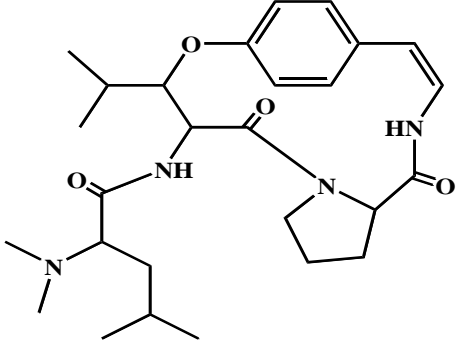
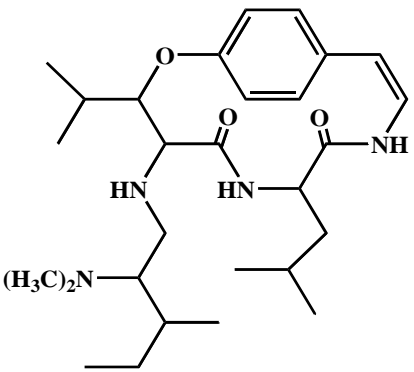
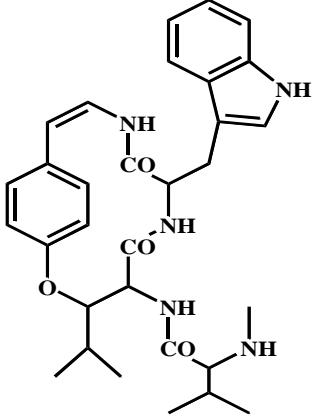
Les travaux chimiques antérieurs effectués sur le genre *Canthium* ont révélé l'existence d'une grande variété de métabolites secondaires dont les alcaloïdes (Dongo et *al.*, 1989 ;), les triterpènes (Jose et *al.*, 2008; Traoré et *al.*, 2008; Wang et *al.*, 2008; Herath et *al.*, 1979), les polyphénols glycosilés (Kanchanapoom et *al.*, 2002), les hétérosides cyanogénétiques (Schwarz et *al.*, 1996) et les iridoïdes (Achenbach et *al.*, 1981; Kanchanapoom et *al.*, 2002)

I.2.4.1. Les alcaloïdes

Des travaux chimiques antérieurs sur les espèces du genre *Canthium*, plusieurs alcaloïdes ont été isolés.

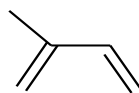
Le tableau XI ci-dessous regroupe quelques alcaloïdes isolés des plantes du genre *Canthium*.

Tableau XI: Quelques alcaloïdes isolés des plantes du genre *Canthium*

Structures	Noms	Sources	Références
	87: Anordianine		
	88: Frangulanine	<i>C. anordianum</i> (plante)	Dongo et al., 1989
	89 Discarine		

I.2.4.2. Les triterpènes

Les triterpènes constituent un groupe de composés naturels renfermant dans leur structure une trentaine d'atomes de carbone. La plupart des triterpènes dérivent de la cyclisation du squalène, lui-même provenant de la condensation de six unités isopreniques **90p** (Bruneton, 1993).



90p

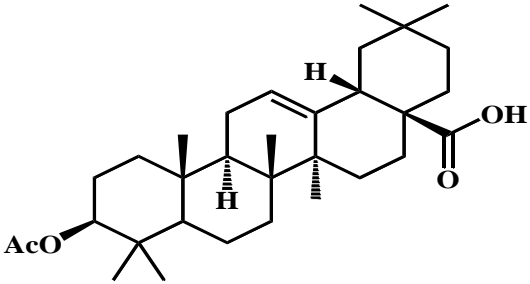
La majorité de triterpènes isolés des espèces du genre *Canthium* sont des triterpènes pentacycliques.

Le tableau XII regroupe quelques triterpènes pentacycliques isolés des plantes du genre *Canthium*.

Tableau XII: Quelques triterpènes pentacycliques isolés du genre *Canthium*

Structures	Noms	Sources	Références
	90 : Taraxerol	<i>C. parviflorum</i> <i>Lam</i> (feuilles)	Jose et <i>al.</i> , 2008
	91 : Acide 19 α -hydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oïque	<i>C. multiflorum</i> (racines)	Traoré et <i>al.</i> , 2008
	92 : Acide quinovique	<i>C. dicoccum</i> (écorces)	Herath et <i>al.</i> , 1979

Tableau XII: Quelques triterpènes pentacycliques isolés du genre *Canthium* (suite et fin)

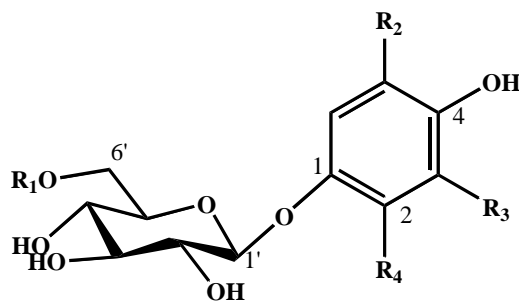
	<p>93: Acide 3-β-acétyloléanolique</p>	<p><i>C. simile</i> (feuilles)</p>	<p>Wang et <i>al.</i>, 2008</p>
---	--	--	---------------------------------

I.2.4.3. Les polyphénols glycosylés

Le terme polyphénol ou composé phénolique est employé pour caractériser les composés qui ont tous en commun dans leurs structures un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Lorsque ces squelettes carbonés de base sont rattachés à un ou plusieurs sucres, on parle de polyphénols glycosylés.

Kanchanapoom et *al.*, ont isolé en 2002 de la partie aérienne de *C. berberidifolium* quatre polyphénols glycosylés tous nouveaux : canthoside A **94**, canthoside B **95**, canthoside C **96** et canthoside D **97**.

Tableau XIII: Quelques polyphénols glycosylés de *C. berberidifolium*



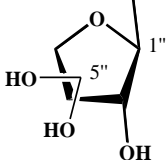
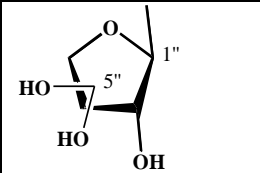
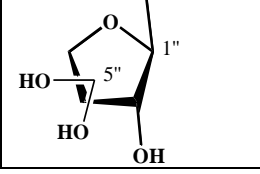
R₁	R₂	R₃	R₄	Numéro
H	OMe	OMe	H	94
	OMe	OMe	H	95

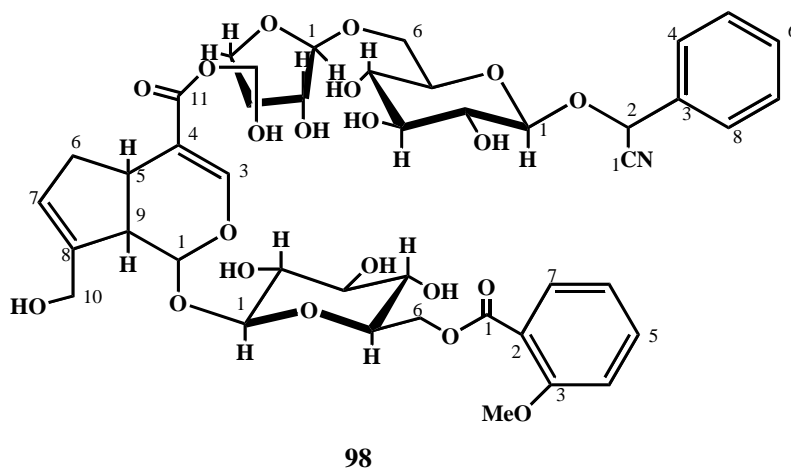
Tableau XIII: Quelques polyphénols glycosylés de *C. berberidifolium* (suite et fin)

	H	OMe	H	<u>96</u>
	H	H	OMe	<u>97</u>

I.2.4.4. Les hétérosides cyanogénétiques

Les hétérosides cyanogénétiques sont des substances d'origine végétale qui par hydrolyse, libèrent de l'acide cyanhydrique. (http://fr.wikipedia.org/wiki/Scille_maritime) consulté le 26 décembre 2014 à 17h.

A notre connaissance, un seul hétéroside cyanogénétique (2R-[(2-methoxybenzoylgenoposidyl)-5-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-glucopyranosyloxy]-2-phenyl acétonitrile **98**) a été isolé des graines de *C. schimperianum* en 1996 par Schwarz et *al.*

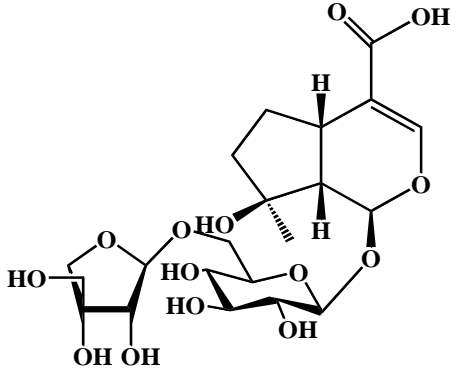
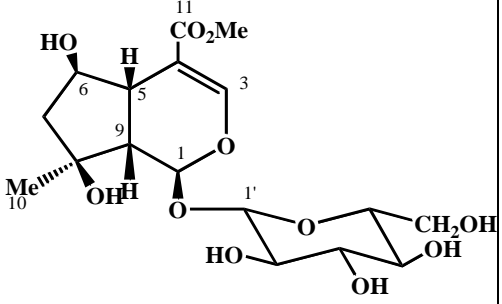
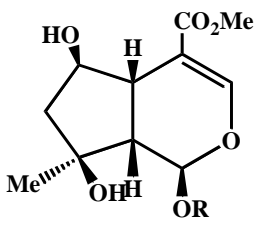
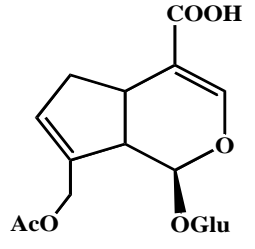


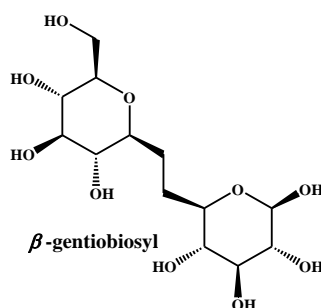
I.2.4.5. Les iridoïdes

Les iridoïdes forment le groupe de métabolites secondaires le plus répandu chez les végétaux et les animaux. Ce sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopentapyranique à jonction cis, partiellement hydrogéné (Arrif, 2009).

Le tableau suivant regroupe quelques iridoïdes isolés du genre *Canthium*.

Tableau XIV: Quelques iridoïdes isolés du genre *Canthium*.

Structures	Noms	Sources	Références
	<p>99 Acide 6-O-β-D-apiofuranosyl-mussaenosidique</p>	<p><i>C. Berberidifolium</i> (partie aérienne)</p>	<p>Kanchanapoom et <i>al.</i>, 2002</p>
	<p>100 Shanzhiside ester de méthyle</p>	<p><i>C. subcordatum</i> (écorces des racines)</p>	<p>Achenbach et <i>al.</i>, 1981</p>
	<p>101 R = β-gentiobiosyl : Shanzhiside ester de méthyl gentiobioside</p>		
	<p>102 Acide 10-O acétyl geniposidique</p>	<p><i>C. multiflorum</i> (racines)</p>	<p>Traoré et <i>al.</i>, 2008</p>



Etant donné que la principale classe de composés isolés du genre *Canthium* est celle des iridoïdes, nous avons jugé utile de présenter ces derniers, notamment leur classification, leur biosynthèse et la méthode de détermination de leur structure.

I.2.5. Généralités sur les iridoïdes

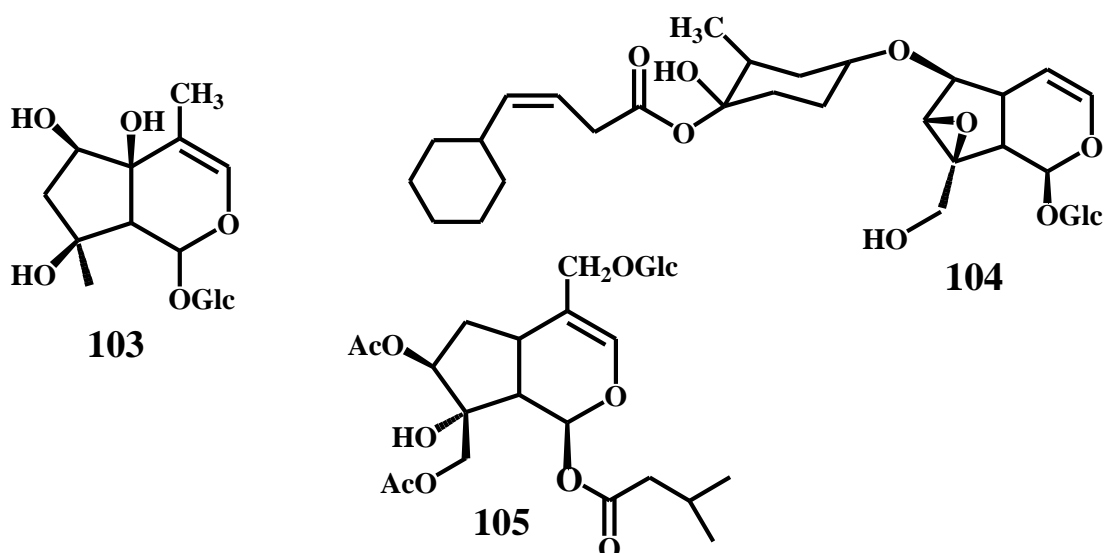
Les iridoïdes forment le groupe de métabolites secondaires le plus répandu chez les végétaux et les animaux. Ce sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopentapyranique. Les iridoïdes sont très sensibles aux acides et s'hydrolysent dans les conditions normales de température et de pression. Ils ont une fonction énol-éther très caractéristique qui s'ouvre facilement s'il n'y a pas de sucre lié. Leur intérêt vient surtout du fait que ce sont des intermédiaires clés pour la biosynthèse de produits naturels extrêmement importants (Arrif, 2009; Kuigoua, 2009).

I.2.5.1. Classification des iridoïdes

Les iridoïdes présentent une grande variété de structures. C'est ainsi qu'on distingue :

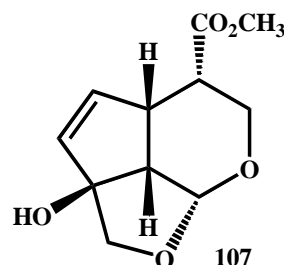
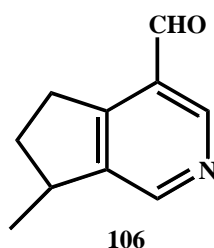
➤ **Les iridoïdes glycosilés**

Dans ce cas, le squelette de base porte un ou plusieurs sucres en C-1 (gardenoside **103**), en C-6 (scrospioside B **104**) ou en C-11 (suspensolide A **105**) de la génine (Arrif, 2009).



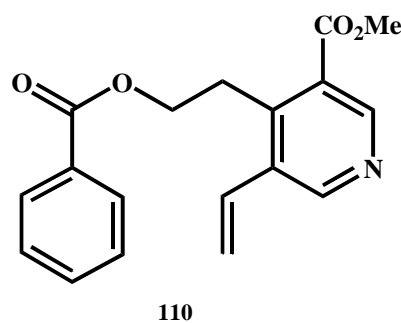
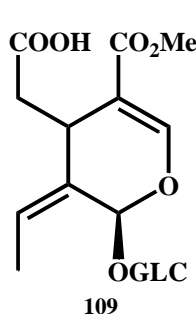
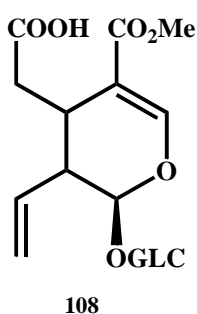
➤ **Les iridoïdes simples ou non glycosilés**

Ils sont polycycliques (indicaine **106**) ou des alcaloïdes (dunnisinine **107**) (Arrif, 2009).



➤ **Les séco-iridoïdes**

Les séco-iridoïdes dérivent des iridoïdes par ouverture de la liaison C₇-C₈ du cycle cyclopentanique. On distingue celles ayant un groupement vinyle en C-9 (sécoxyloganine **108**), celles ayant un groupement éthylidène en C-9 (oléoside **109**) et celles qui sont amidifiées par une amine aromatique (fontaphilline **110**).



I.2.5.2. Biosynthèse des iridoïdes

Les iridoïdes sont des monoterpènes qui dérivent du pyrophosphate de géranyle. De nombreuses expériences basées sur le marquage isotopique ont montré que le pyrophosphate de géranyle préalablement oxydé en dialdéhyde, subit une cyclisation conduisant à l'iridodial ou le 8-épi-iridodial. L'oxydation de l'iridodial donne le loganine, précurseur immédiat de la plupart des iridoïdes. Le même processus s'appliquant au 8-épi-iridodial, conduit aussi bien à l'antirrhinoside qu'à l'aucuboside ou au gardénoside. Il s'avère que c'est au niveau du loganine, que s'opère l'ouverture du cycle (schéma3), aboutissant aux séco-iridoïdes. Cette ouverture conduit à la sécologanine, précurseur de tous les séco-iridoïdes et de beaucoup d'alcaloïdes (Arrif, 2009).

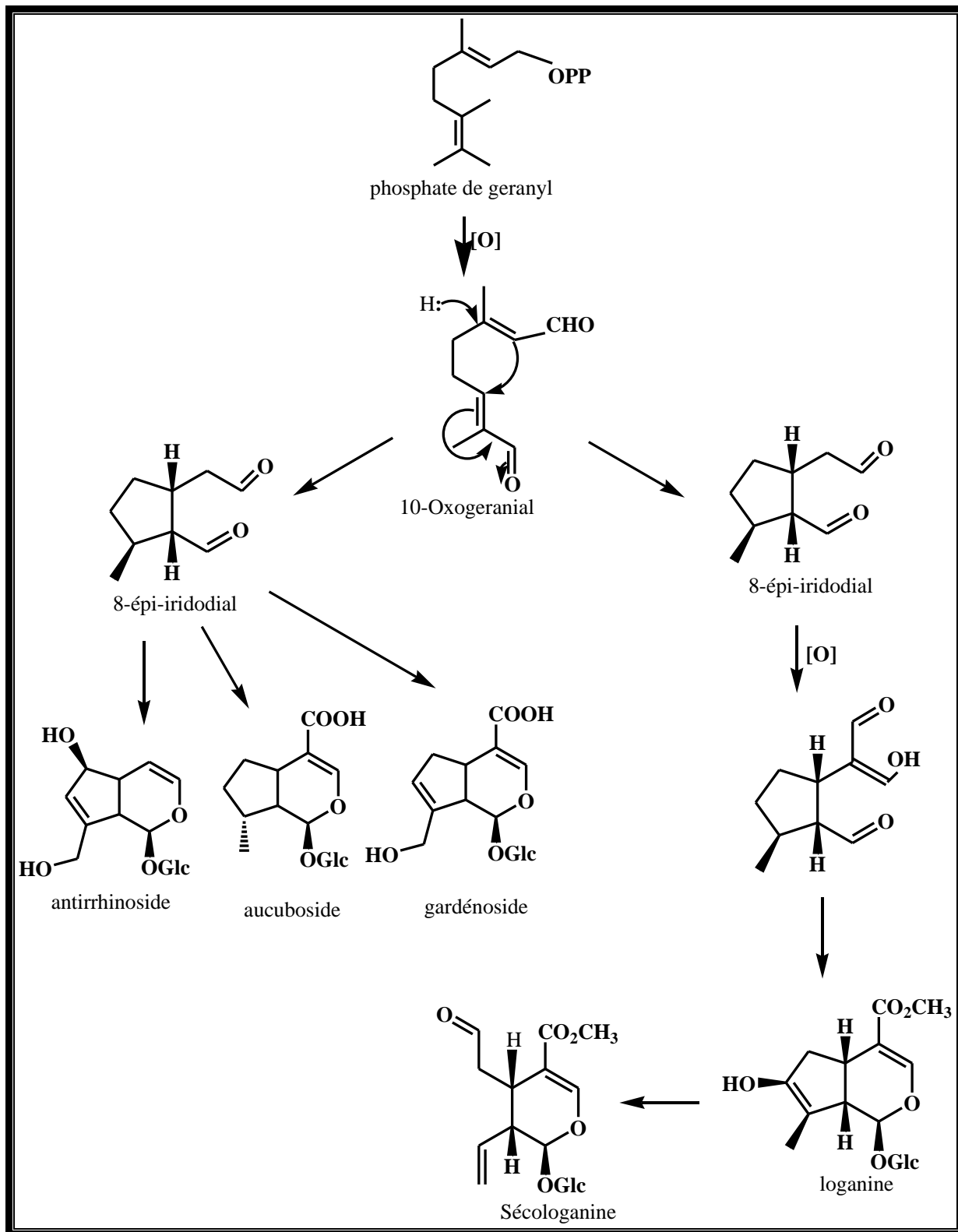


Schéma 4: Biosynthèse des iridoïdes

I.2.5.3. Méthode de détermination de la structure des iridoïdes

Les différentes méthodes spectroscopiques telles que l'ultraviolet (UV), l'infrarouge (IR), la Résonance Magnétique Nucléaire à une dimension (RMN du ^1H , RMN du ^{13}C) et à deux dimensions (COSY, HMBC, HMQC, etc.) permettent de déterminer la structure d'un iridoïde (Vercauteren, 2007).

Le spectre ultraviolet (UV) d'un iridoïde présente des bandes d'absorption à λ_{max} compris entre 233 et 235 nm traduisant l'existence d'une transition $n-\pi^*$ dans la molécule. En l'absence du groupement CO_2CH_3 , cette bande se trouve entre 207 et 210 nm (Atia et al., 2009).

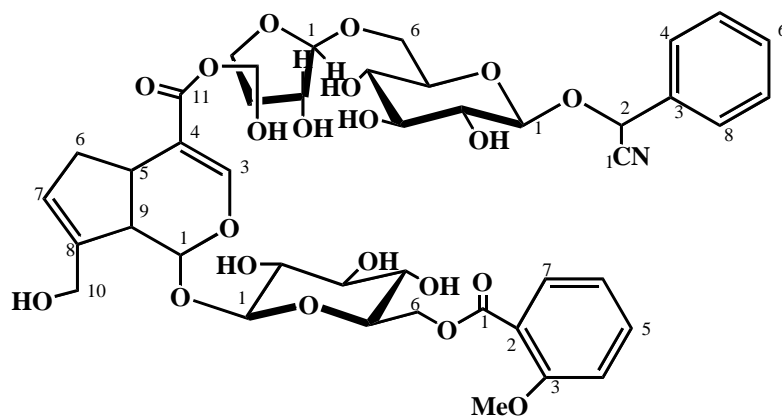
Le spectre infrarouge (IR) présente quant à lui une bande de vibration significative entre 1706 et 1730 cm^{-1} lorsque nous avons un carbonyle d'ester et 1635 cm^{-1} lorsque nous avons une double liaison carbone-carbone (Atia et al., 2009).

Le spectre de RMN ^{13}C présente le pic d'un carbonyle des esters autour de 170 ppm et le pic du carbone anomérique autour de 99,8 ppm.

Le spectre de RMN ^1H présente le pic du proton anomérique autour de 4,9 ppm: S'il s'agit d'un anomère β la constante de couplage est comprise entre 5 et 12 Hz et s'il s'agit d'un anomère α , cette constante est inférieure à 5 Hz.

I.2.6. Quelques activités biologiques et pharmacologiques de quelques métabolites secondaires isolés du genre *Canthium*

Des composés isolés des espèces du genre *Canthium*, 2R-[(2-methoxybenzoylgenoposidyl)-5-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranosyloxy]-2-phenyl acétonitrile **98** isolé de *C. schimperianum* a montré une activité retardatrice contre les larves de *Spodoptera littoralis*.



I.3. QUELQUES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ISOLEMENT DES COMPOSES

L'isolement des métabolites secondaires nécessite non seulement les méthodes chromatographiques telles que la chromatographie sur colonne de gel de silice (CC) et la chromatographie sur couche mince (CCM), mais aussi la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS ou HPLC-MS). Compte tenu du rôle important qu'à jouer cette dernière technique dans la séparation des composés de *P. oliveri* et de *C. multiflorum*, nous avons jugé opportun de présenter son fonctionnement.

I.3.1. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse encore appelée LC-MS dans le système anglo-saxon est une technique de la chimie analytique qui combine à la fois Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) et la spectrométrie de masse (MS) (Ferrer et *al.*, 2009). Dans la pratique, on l'utilise pour la détermination de la masse des composés purs et les masses des différents constituants d'un extrait.

I.3.1.1. Appareillage et fonctionnement

Le système LC-MS comprend essentiellement des colonnes HPLC qui contiennent le matériel chromatographique (phase stationnaire), une pompe qui permet de déplacer la phase mobile (eau généralement) à travers la colonne à la vitesse de 1 à 50 mL/min, un injecteur automatique capable d'injecter entre 10 et 40 µL d'échantillon à analyser, un détecteur UV et un spectromètre de masse. Ce dernier est lui-même constitué d'un ionisateur qui produit des ions positifs ou négatifs (HRESI, IC, IE...), d'un analyseur qui sépare les ions collectés, d'un détecteur qui sert à mesurer le nombre d'électrons et amplifier le signal pour une bonne sensibilité, et d'une base de données pour l'identification de molécules. Le schéma suivant donne la présentation générale du système LC-MS (Chang-Kee et *al.*, 2002).

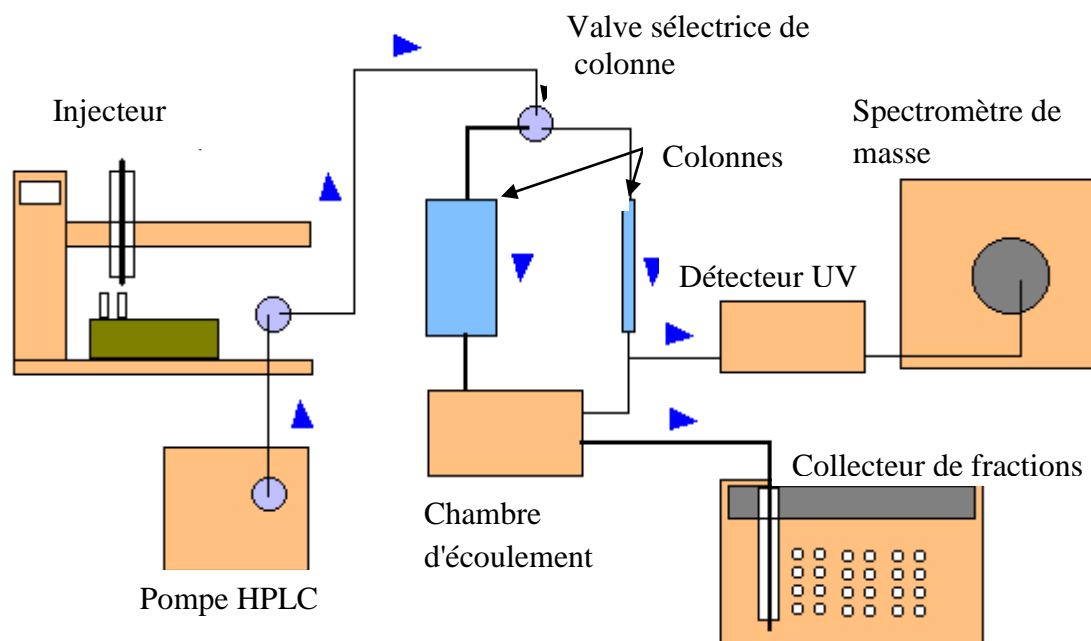


Schéma 5: Présentation générale du système LC-MS

I.3.1.2. Application

Les domaines d'application de la chromatographie de masse couplée à la spectrométrie de masse sont multiples. C'est ainsi que grâce à sa haute sensibilité, cette technique est utilisée pour l'étude du métabolisme du médicament, l'analyse et l'identification des impuretés, la dégradation des produits pharmaceutiques, l'isolement et la caractérisation des métabolites secondaires naturels ou synthétiques (Chang-Kee et *al.*, 2002).

La plupart des composés biologiquement actifs de *Canthium* et *Polyalthia* possèdent des centres chiraux. Ces centres chiraux seraient donc d'une grande importance dans l'activité biologique des composés pharmaceutiques. Il est important de déterminer les configurations absolues des carbones asymétriques pour les composés qui en ont car il peut arriver qu'un énantiomère présente une activité biologique tandis que l'autre n'en présente pas (Madec, 2004).

I.4. DETERMINATION EXPERIMENTALE DES CONFIGURATIONS ABSOLUES PAR LE DICHROÏSME CIRCULAIRE

Deux phénomènes associés aux transitions d-d observées dans les composés sont très utiles pour attribuer les configurations absolues. Ces phénomènes sont la dispersion optique rotatoire (DOR) et le dichroïsme circulaire (DC), qui constituent à eux deux la base de l'effet Cotton. La règle générale est que si pour des composés analogues les transitions électroniques

correspondantes présentent des effets Cotton de même signe, ces composés ont la même configuration optique (Cotton *et al*, 2000).

I.4.1. La dispersion optique rotatoire (DOR)

La DOR est la mesure de la variation de la rotation optique en fonction de la longueur d'onde. Il se produit une inversion brusque du sens de rotation au voisinage d'une bande d'absorption.

Lorsque l'on trace le spectre de dispersion optique rotatoire dans une région où il n'y a pas d'absorption (c'est-à-dire loin d'une transition électronique), on observe une décroissance régulière en valeur absolue de la rotation, celle-ci tendant vers zéro sans toutefois atteindre cette valeur. Par contre, si la molécule possède une bande d'absorption à une longueur d'onde λ_a , la courbe prend une forme particulière (figure 7), la rotation changeant de signe et s'annulant pour la longueur d'onde λ_a (Geoff *et al*, 1996).

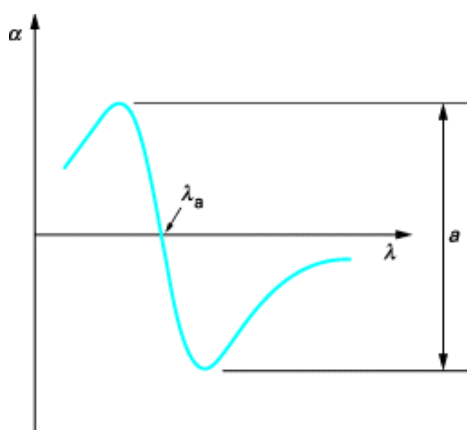


Figure 7: Courbe de dispersion optique rotatoire

Ce type de courbe est appelé «effet Cotton». Cet effet est qualifié de positif quand la rotation est positive pour les longueurs d'onde supérieures à λ_a , et négatif dans le cas contraire.

Ces courbes sont très utiles pour attribuer les configurations absolues par simple comparaison avec le spectre de DOR d'un composé de configuration connue (Cotton *et al*, 2000).

I.4.2. Le dichroïsme circulaire (DC)

Le dichroïsme circulaire repose sur la capacité d'un échantillon possédant un chromophore chiral ou placé dans un environnement asymétrique, d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement droite et la lumière polarisée circulairement gauche.

Deux énantiomères présentent des spectres de dispersion optique rotatoire (DOR) de signe opposé. Lorsqu'ils possèdent des chromophores, on obtient des courbes de dichroïsme circulaire (DC) opposées pouvant présenter des effets Cotton différents. En comparant les effets Cotton des courbes obtenues avec ceux des chromophores connus, on peut aisément déduire la configuration absolue.

Etant donné que l'un de nos objectifs spécifiques est l'isolement des constituants à activités antimicrobienne et antiplasmodiale, Nous avons opté de faire une revue de la littérature sur ces différentes activités.

I.5. ACTIVITES BIOLOGIQUES

I.5.1. Généralités sur l'activité antimicrobienne

I.5.1.1 Introduction

Pendant longtemps, les plantes médicinales et les substances naturelles ont été presque les seules sources de médicaments pour l'industrie pharmaceutique. Aujourd'hui encore les recherches dans le domaine des substances naturelles sont orientées dans les pays développés vers la découverte de nouveaux médicaments. L'étude bio-guidée des extraits de plantes est utilisée pour traquer, isoler et identifier les composés doués d'activités biologiques et pharmacologiques.

En Afrique, la plupart des populations dépendent des substances naturelles et de leurs dérivés pour leurs soins de santé primaire. Ainsi l'étude des plantes médicinales est nécessaire pour l'optimisation et la modernisation de leur utilisation (Aissatou, 2005).

I.5.1.2. Tests antimicrobiens

I.5.1.2.1 Définitions (Seto et al., 1997)

Les substances antimicrobiennes sont des molécules capables d'inhiber le développement des organismes tels que les bactéries, les champignons, les parasites et même les virus. Ces molécules sont d'origines diverses: naturelle (végétaux, microorganismes), synthétique ou hémisynthétique.

Les antibiotiques sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes qui ont le pouvoir de s'opposer à la multiplication des germes bactériens (médicament bactériostatique) ou en les détruisant (médicament bactéricide).

Les bactéries sont des microorganismes de 1 à 10 µm de diamètre. Elles sont des parasites si elles vivent aux dépens d'autres organismes et des saprophytes dans le cas contraire.

Les antifongiques sont des substances détruisant les champignons responsables des mycoses (fongicides) ou empêchant leur croissance et leur multiplication.

Les champignons sont très répandus dans la nature (levures, moisissures) et peuvent vivre en saprophytes ou en parasites chez les hommes et les animaux. Les mycoses sont des infections causées par des champignons lorsque les conditions de vie deviennent favorables (utilisations d'antibiotiques à spectre large, des corticoïdes, l'humidité et certaines maladies telles que le diabète).

I.5.1.2.2. Exemples de classification des bactéries (Aissatou, 2005).

Les bactéries sont classées selon:

- **Leur morphologie:**

- En sphère, coque ou cocci (forme arrondie): le staphylocoque, le gonocoque, le méningocoque.

- En bacille ou bâtonnet: le *Corynebacterium diptheriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*

En spirale: Tréponème, Borrelia, Campylobacter.

- **Leur affinité à la coloration de Gram.**

Le Danois Gram a mis au point en 1884 une technique qui permet de classer les bactéries en Gram + et en Gram -. Elle consiste à faire agir sur les bactéries du violet gentiane puis une solution iodo-iodurée. Si la paroi des cellules bactériennes conserve la coloration violette même après lavage à l'éthanol, elles sont dites Gram+, mais s'il y a décoloration elles sont dites Gram-.

I.5.1.2.3. La concentration minimale inhibitrice (CMI) (Berche et al., 1988).

La concentration minimale inhibitrice est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant de 18 à 24 heures la multiplication des bactéries (bactériostase). Cette

valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories sensibles, résistantes ou intermédiaires à l'action d'un agent antimicrobien.

Une souche est dite sensible à un antibiotique lorsque la CMI de celui-ci est nettement inférieure à la concentration sanguine obtenue après l'administration d'une dose utilisable en thérapeutique. A l'opposé elle est dite résistante lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte sans utiliser des doses toxiques. Si la CMI se situe entre ces deux extrêmes, la sensibilité de la souche bactérienne est dite intermédiaire. Les organismes ne pourront pas être atteints avec une antibiothérapie standard mais ils pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée soit par la méthode par dilution, soit par diffusion de l'antibiotique.

- **Méthode de diffusion**

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé de Müller Hinton préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (10^6 bactéries/ml) en phase exponentielle de croissance. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration). Après incubation du milieu de culture (18h à 37°C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne. La multiplication des microorganismes s'arrête là où il existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique, on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur approchée de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée. En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur des diamètres d'inhibition de croissance et celle de la CMI. Cette relation étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des espèces différentes (Berche et *al*, 1988).

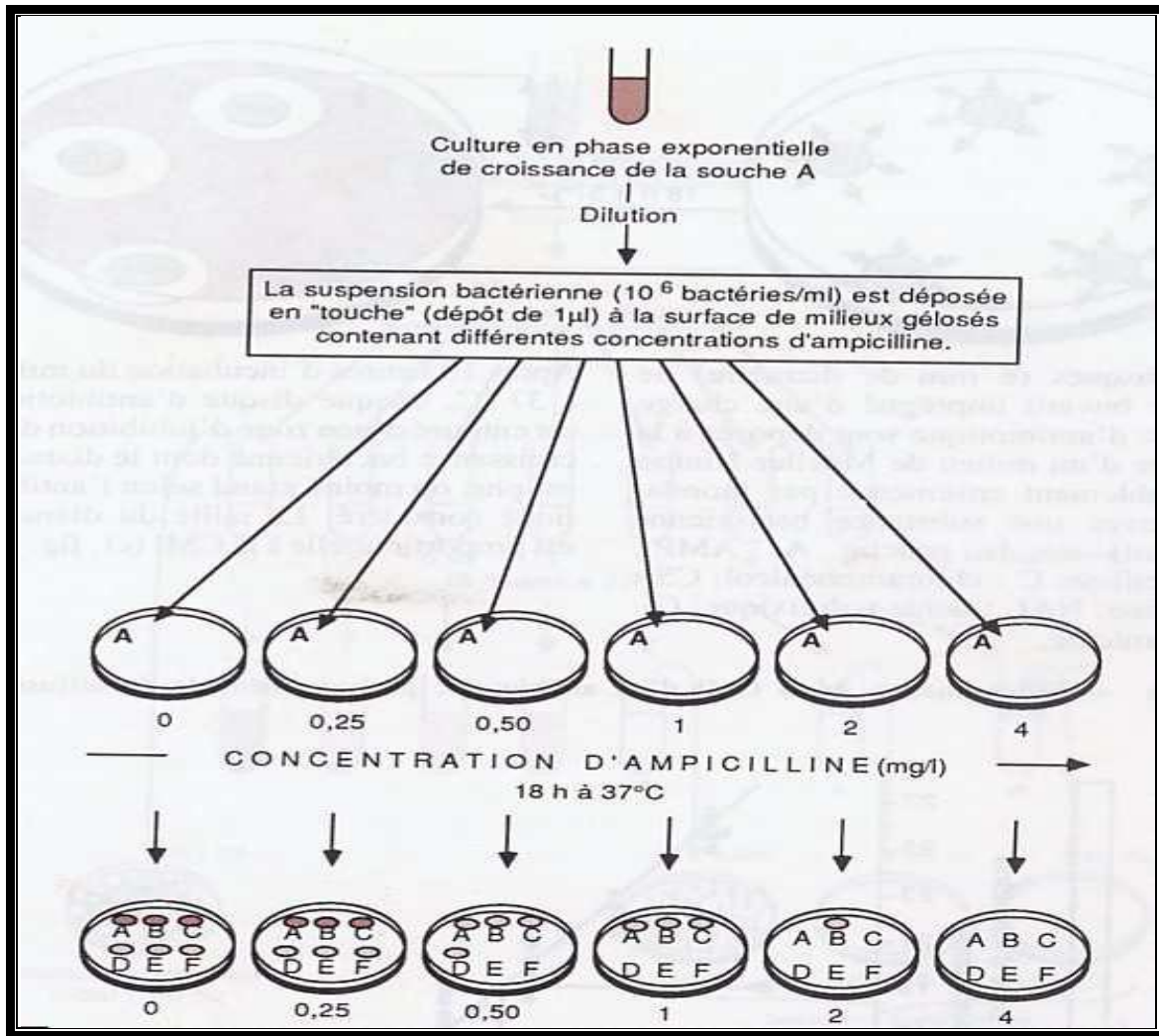


Figure 8: Détermination de la CMI d'un antibiotique par la méthode de diffusion

- **Méthode de dilution**

C'est la méthode de référence qui peut être pratiquée en milieu solide ou liquide. Lorsque la mesure de la CMI est effectuée selon une technique en milieu liquide, on distribue dans un premier temps dans une série de tubes à hémolyse stériles, sous un même volume des concentrations décroissantes d'antibiotique (habituellement en progression géométrique de raison 2). Puis on ajoute dans chacun des tubes, sous un même volume une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 bactéries/ml (inoculum bactérien optiquement invisible). La CMI de l'antibiotique sur la souche étudiée est définie comme la plus faible concentration inhibant après 18 à 24 h de contact à 37°C , toute croissance bactérienne visible à l'œil.

Le principe de la technique en milieu solide est identique, l'antibiotique étant ici incorporé dans un milieu de culture rendu solide par la présence de gélose. L'intérêt de cette

technique en milieu solide réside dans la possibilité d'étudier un grand nombre de souches bactériennes (Berche et *al.*, 1988).

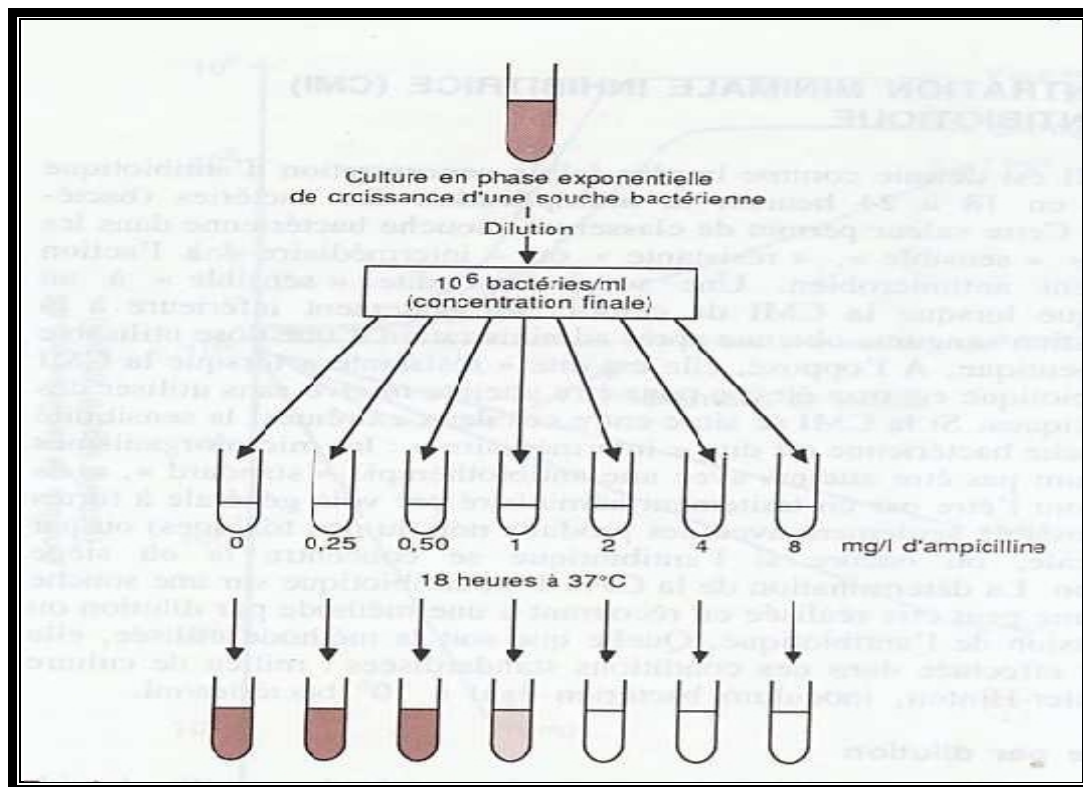


Figure 9: détermination de la CMI d'un antibiotique par la méthode de dilution

- **Méthode bio-autographique.**

Elle consiste à la dilution rapide ainsi qu'à l'isolement des constituants actifs à travers une cible. Les chromatogrammes sont recouverts d'un milieu de culture incorporé de microorganismes. Après une incubation pendant 24h à 37°C un révélateur approprié permet d'observer l'activité (Mogode, 2005).

I.5.2. Généralités sur l'activité antiplasmodiale

I.5.2.1. Le paludisme (Foley et *al.*, 1997).

Le paludisme ou malaria est une maladie due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* transmis par des moustiques du genre *Anopheles*. Cinq espèces peuvent parasiter l'homme avec la possibilité de développer la maladie: *Plasmodium virax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* et *P. falciparum* qui a lui tout seul est responsable de plus de 90% des

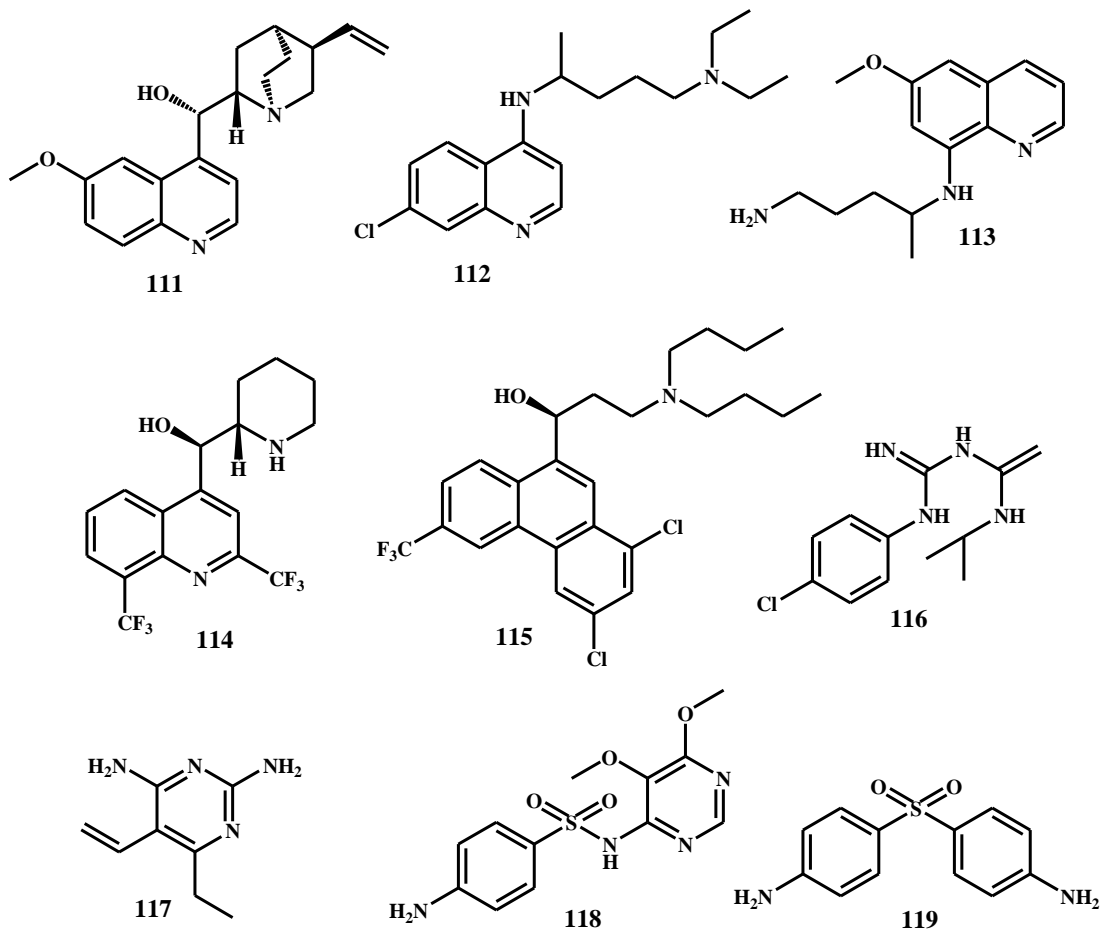
cas de paludisme. Les parasites sont transmis par l'anophèle femelle infestée ou par inoculation avec du sang infesté

Dans le cas de l'infection par *P. falciparum*, les parasitémies élevées peuvent entraîner une sévère hémolyse qui peut être fatale chez des individus non immunisés. C'est l'affection la plus redoutée à cause du risque d'accès mortel. L'incubation dure en général 7 à 15 jours. le cycle schizogonique érythrocytaire dure 48 heures et se déroule principalement dans les capillaires viscéraux, en particulier au niveau de l'encéphale où stagnent les érythrocytes infestés. Ceci serait la cause de l'encéphalite palustre.

I.5.2.2. Quelques principes actifs utilisés dans le traitement du paludisme (Saifi et *al.*, 2013).

L'essentiel des principes actifs utilisables dans le traitement du paludisme proviennent des classes des composés suivantes:

- Les quinolines (quinine **111**, chloroquine **112**, primaquine **113**, méfloquine **114** etc.)
- Les dérivés du phénantrènylméthanol: halofanthrine **115**
- Les antifolates: proguanil **116**, pyriméthamine **117**, sulfadoxine **118** etc.)
- La dapsone **119**



I.5.2.3. Quelques modes d'action des antipaludiques (Saifi et al., 2013).

La chloroquine et la quinine agissent presque de manière similaire à la seule différence que la chloroquine cause l'agglutination des pigments alors que la quinine s'oppose à ce processus. De plus, la quinine est une base plus faible que la chloroquine et a une affinité faible avec l'hème traduisant ainsi que d'autres mécanismes autres que le transport d'ion et l'interaction hème-médicament sont nécessaires. La quinine peut aussi inhiber l'hème polymérase et l'hème catalase.

La mefloquine inhibe aussi l'hème polymérase avec plus ou moins la même efficacité que la chloroquine.

Les antifolates inhibent soit la dihydrofolate reductase (DHFR) (pyriméthamine, proguanil) soit la dihydroptéroate synthase (DHPS) (sulfadoxine).

Au regard de tout ce qui précède, nous avons entrepris l'étude de *P. oviveri* et *C. multiflorum*.

RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. EXTRACTION ET ISOLEMENT DES COMPOSES

II.1.1. Extraction et isolement des composés de *Polyalthia oliveri*

Les écorces du tronc de *Polyalthia oliveri* ont été récoltées au sommet du mont Kala à Yaoundé, dans la région du Centre-Cameroun, le 09 juin 2012. L'identification a été faite par M. NANA Victor, botaniste de l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé où un spécimen a été enregistré et conservé sous le numéro 27357 SRF Cam.

Ces écorces ont été découpées, puis séchées et broyées. La poudre obtenue (4,0 kg) a subi une macération au mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) pendant 48 heures. L'évaporation du solvant sous pression réduite a permis d'obtenir 434 g d'une gomme noire que nous avons dissoute dans le mélange $\text{AcOEt}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1). La fraction soluble dans l'AcOEt (118 g) a été fixée sur une masse équivalente de silice, puis chromatographiée sur une colonne Flash. Sur la base de la CCM analytique, les fractions obtenues ont été regroupées puis purifiées par des méthodes chromatographiques variées pour conduire à l'isolement de 06 produits purs indexés POE4, POE5, POE7, POE19, POE27 et POE30 et identifiés respectivement au polycarpol, au *N*-acétyl polyveoline, à la bidebiline A, au *N*-méthyl urabaine, à la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone et à la 8 α -polyveolinone.

Les structures de ces composés ont été établies par l'analyse de leurs données spectroscopiques et physiques. Certaines de ces structures ont été confirmées d'une part par comparaison de leurs données spectrales avec celles décrites dans la littérature et d'autre part par des transformations chimiques telles que l'hydrolyse acide et l'acétylation effectuées respectivement sur la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone et la *N*-acétyl polyveoline.

Le protocole d'extraction et d'isolement des produits de cette plante est donné par le schéma 6 ci-dessous.

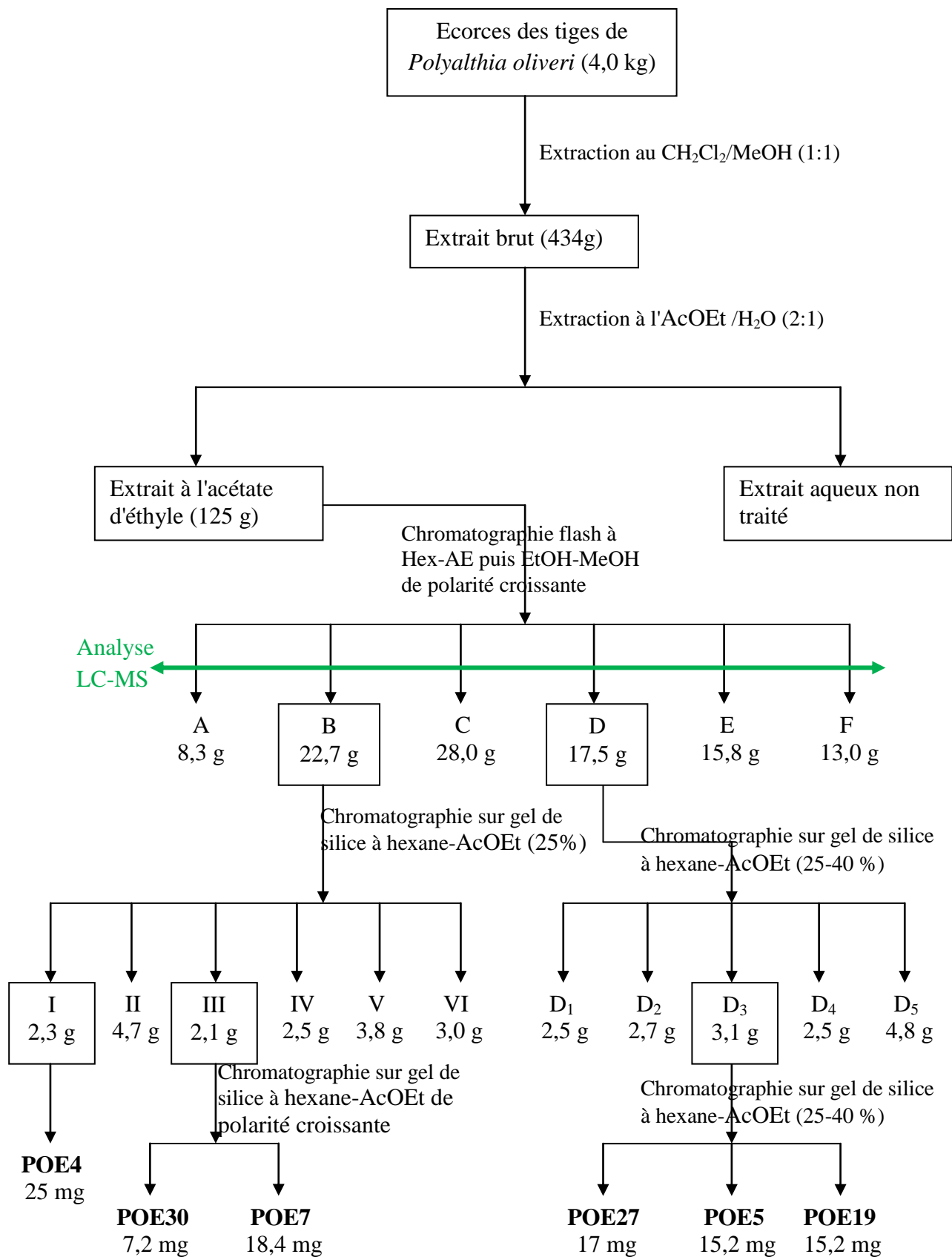


Schéma 6: Protocole d'extraction et d'isolement des composés de *Polyalthia oliveri*

II.1.2. Extraction et isolement des composés de *Canthium multiflorum*

La partie aérienne de *Canthium multiflorum* a été récoltée à Obala, bordure du fleuve Sanaga, Région du Centre, Cameroun en juillet 2010. L'identification botanique a été faite par M. Victor Nana, botaniste à l'Herbier National du Cameroun où un spécimen (27357 SRF Cam) y a été déposé.

Le matériel végétal a été séché puis broyé. La poudre obtenue (1035 g) a été extraite deux fois au mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) à température ambiante pendant 48h et 24h respectivement. Après évaporation sous pression réduite du solvant, 132g d'extrait brut ont été obtenus. Une partie de cet extrait brut (125 g) a été chromatographiée sur colonne de gel de silice pour conduire après purification des fractions obtenues à 13 produits purs indexés CM01, CM02, CM03, CM04, CM05, CM06, CM07, CM08, CM09, CM10, CM11, CM12 et CM13.

Les structures de ces composés ont été établies par l'analyse de leurs données spectroscopiques et physiques et par comparaison de ces données avec celles décrites dans la littérature.

Le protocole d'extraction et d'isolement des produits de cette plante est donné par le schéma 7 ci-dessous.

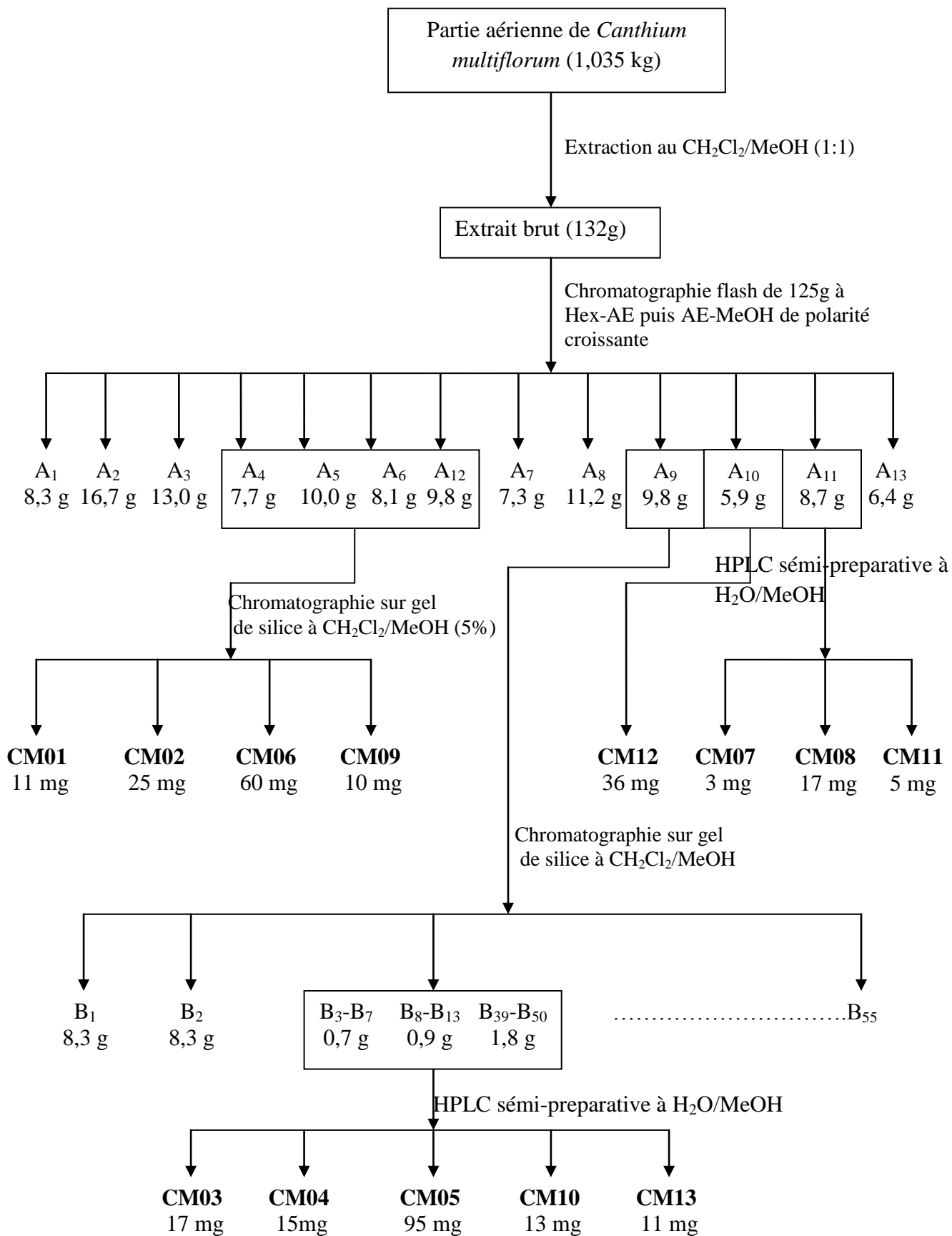


Schéma 7: Protocole d'extraction et d'isolement des composés de *Canthium multiflorum*

II.2. CARACTERISATION DES COMPOSES ISOLES.

L'étude phytochimique de *Polyalthia oliveri* et de *Canthium multiflorum* nous a permis d'isoler 19 produits qui ont été identifiés et caractérisés sur la base de leurs données spectroscopiques et physiques et regroupés en différentes classes de composés organiques: 03 triterpènes, 01 polyol, 01 acide phénolique, 09 iridoïdes et 05 alcaloïdes

II.2.1. Les triterpènes

II.2.1.1. Identification de CM01 ou acide oléanolique 120

CM01 est obtenu sous forme de poudre blanche. Il est soluble dans le méthanol. Le test de Liebermann-Burchard donne une coloration violette, ce qui suggère que CM01 serait un triterpène.

Son spectre de masse à HR-ESI (figure 10) montre le pic de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 457,3676 compatible avec la formule brute $C_{30}H_{48}O_3$ renfermant sept insaturations.

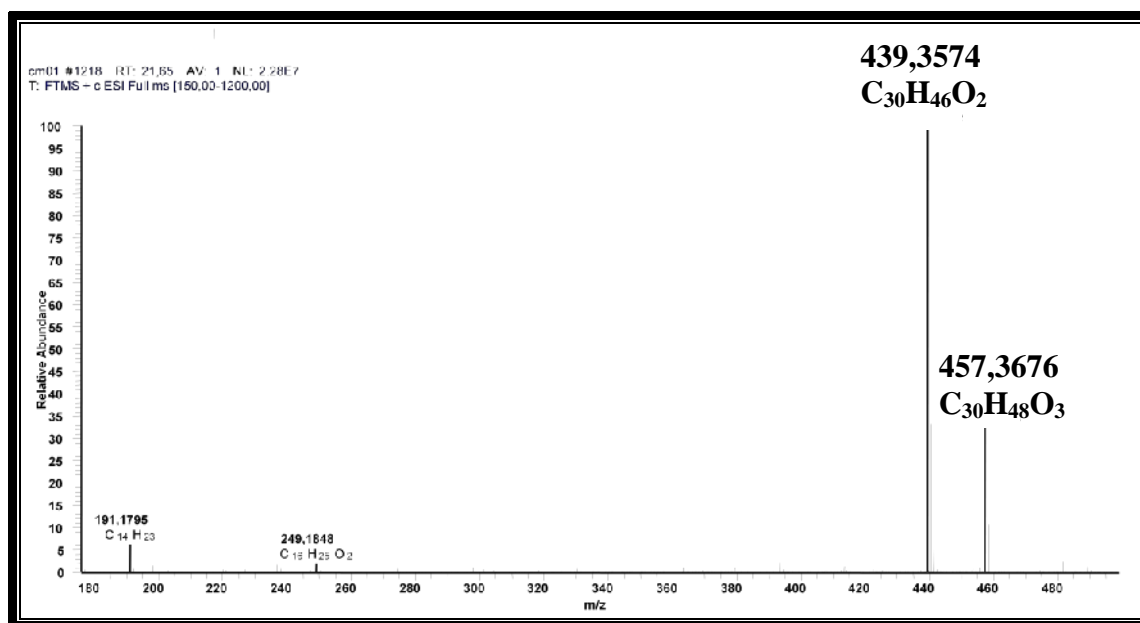


Figure 10: Spectre de masse à HR-ESI de CM01

L'analyse du spectre de RMN du 1H (Figure 11) de CM01 signale la présence de

- 7 singulets intenses de 3 protons chacun entre δ_H 0,60 et 1,18 attribuables à 7 groupements méthyles
- Un doublet dédoublé à δ_H 2,84 (1H, 3,8; 13,7 Hz) caractéristique du signal du proton H-18 d'un oléan-12-ène. D'autre part, le déplacement chimique élevé de ce proton H-

18 nous suggère la présence d'un groupement attracteur d'électrons en α de ce dernier. On observe en plus :

- Un doublet dédoublé à δ_H 3,22 (1H, 4,9; 11,8 Hz) attribuable à un proton situé au pied d'un hydroxyle en position 3;
- Un proton oléfinique à δ_H 5,26 caractéristique du proton H-12 des oléan-12-ènes.

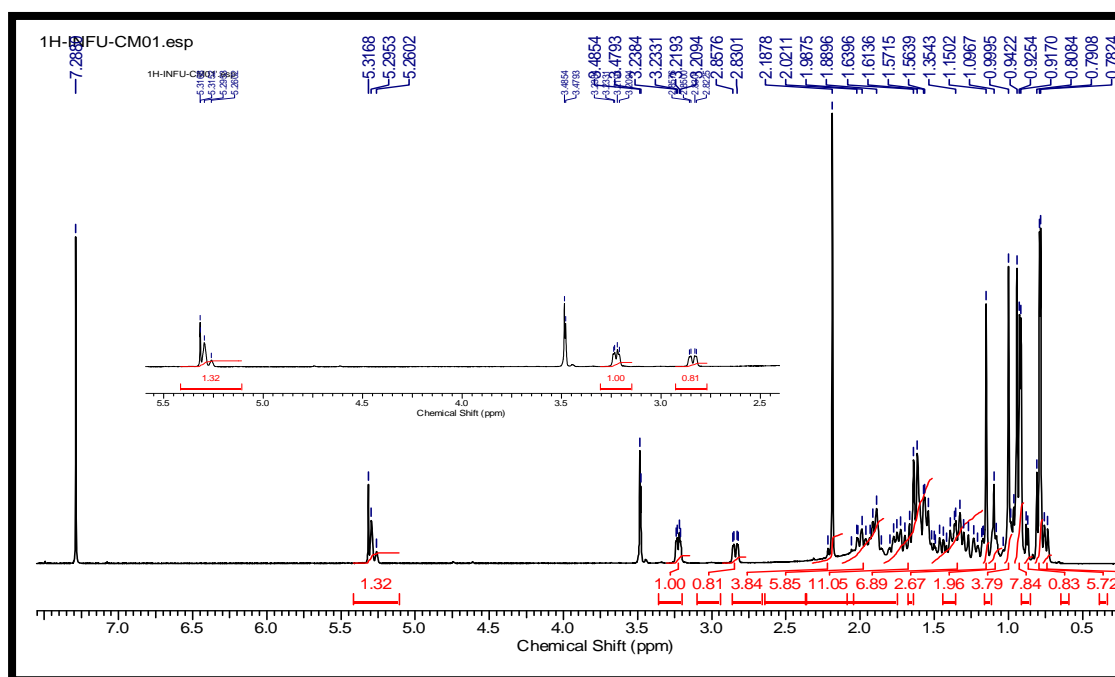


Figure 11: Spectre de RMN ^1H de CM01 (500 MHz, CDCl_3) du composé CM01

Ces informations sont confirmées par le spectre de RMN ^{13}C (figure 12) où l'on observe respectivement à δ_C 122,6 et 144,2 ppm les signaux des carbones C-12 et C-13 des oléan-12-ènes.

Sur ce spectre, nous remarquons à δ_C 183,2 ppm le signal du carbonyle d'un acide suggérant la présence d'un groupement carboxyle dans le squelette de CM01. La position de ce groupement a été déduite de l'étude du spectre de masse de ce produit où l'on observe à m/z 249 un ion fragment confirmant sa présence en position 17 du squelette de base du dérivé CM01. Cet ion fragment est issu de la fragmentation de type rétro diels-Alder du cycle C. L'existence d'un ion fragment à m/z 439 traduit la perte d'une molécule d'eau, preuve que CM01 contient un groupement hydroxyle (OH) (Schéma 8).

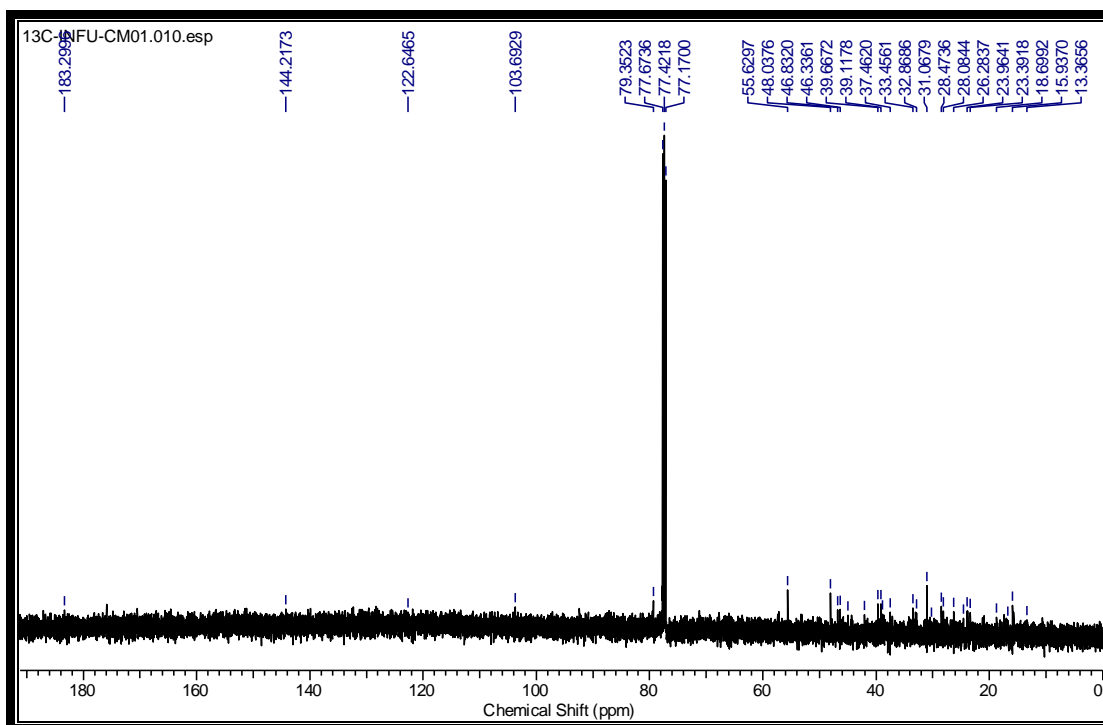


Figure 12: Spectre de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) du composé CM01

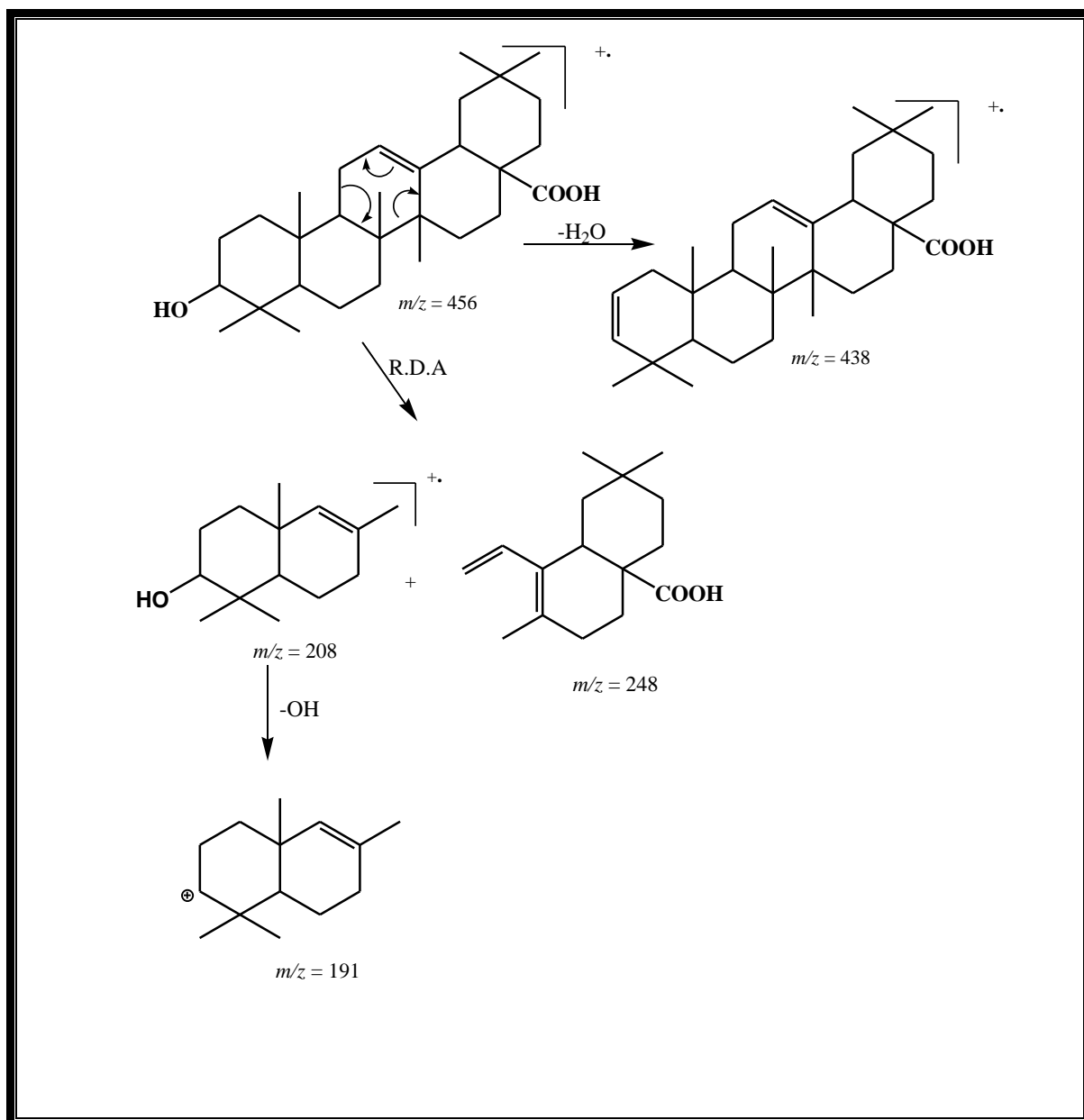
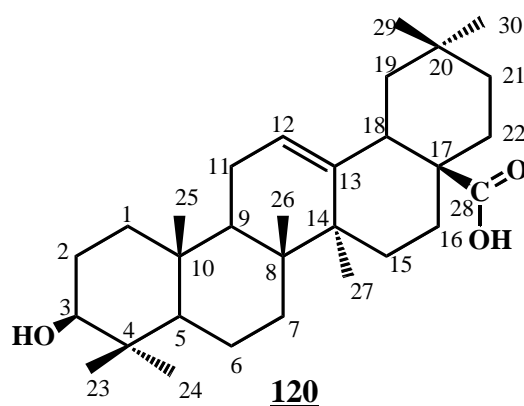


Schéma 8: Fragmentation du composé CM01 en spectrométrie de masse

Toutes ces données physiques et spectroscopiques comparées à celles décrites dans la littérature (Mahato *et al.*, 1994), nous permettent d'identifier CM01 à l'acide oléanolique **120**.



Kapil et *al* ont démontré en 1994 que l'acide oléanolique (**120**) avait une activité anticomplémentaire par inhibition de la C3-convertase.

Récemment, Jiménez et *al.*, 2013 ont montré que ce même composé avait une activité antimicrobienne et immunomodulant dans le traitement de la tuberculose.

Tableau XV: Données spectrales de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD) de CM01 **120 comparées à celles de l'acide oléanolique (125 MHz, CDCl₃) (Mahato et *al.*, 1994).**

Position	CM01 120	Acide oléanolique
	δ_C	δ_C
1	38,8 (t)	38,5
2	28,0 (t)	27,4
3	79,3 (d)	78,7
4	39,1 (s)	38,7
5	55,6 (d)	55,2
6	18,6 (t)	18,3
7	32,8 (t)	32,6
8	39,6 (s)	39,3
9	48,0 (d)	47,6
10	37,4 (s)	37,0
11	23,3 (t)	23,1
12	122,6 (d)	122,1
13	144,2 (s)	143,4
14	42,0 (s)	41,6

15	28,4 (t)	27,7
16	23,9 (t)	23,4
17	46,8 (s)	46,6
18	41,5 (d)	41,3
19	44,9 (t)	45,8
20	30,2 (q)	30,6
21	38,4 (t)	33,8
22	32,8 (t)	32,3
23	28,4 (q)	28,1
24	13,3 (q)	13,6
25	15,9 (q)	15,3
26	16,7 (q)	16,8
27	26,2 (q)	26,0
28	183,2 (s)	181,0
29	33,4 (q)	33,1
30	24,5 (q)	23,6

II.2.1.2. Identification de CM02 ou acide quinovique 121

Le composé CM02 est une poudre blanche. Il est soluble dans le méthanol. Le test de Liebermann-Burchard est positif (Liebermann-Burchard, 1964), ce qui suggère que CM02 est un triterpène.

Son spectre de masse en HRESI (figure 13) montre le pic de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 487,1216 compatible avec la formule brute $C_{30}H_{46}O_5$ renfermant huit insaturations.

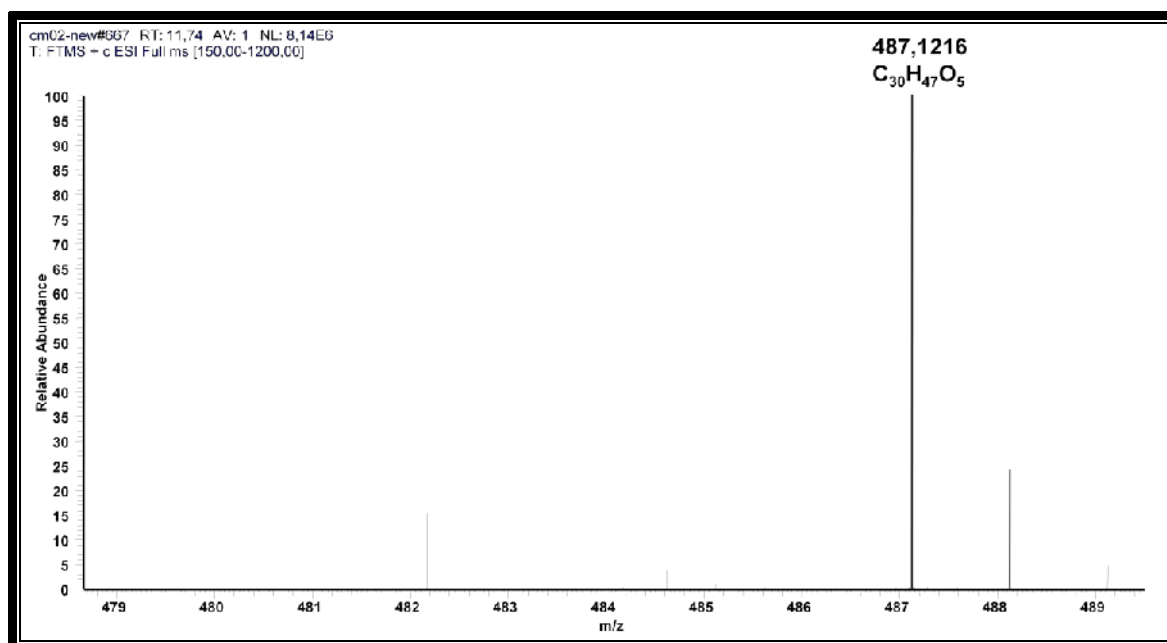


Figure 13: Spectre de masse en HRESI de CM02

L'analyse de son spectre RMN ^{13}C (figure 14) montre deux carbones oléfiniques à δ_C 151,4 et 135,4 attribuables respectivement aux carbones C-13 et C-12 de la série urs-12-ène. On observe à δ_C 79,2 un signal correspondant à un oxyméthine qui serait probablement celui du carbone C-3. Les signaux à δ_C 181,3 et 179,3 sont attribuables aux deux carbonyles des acides.

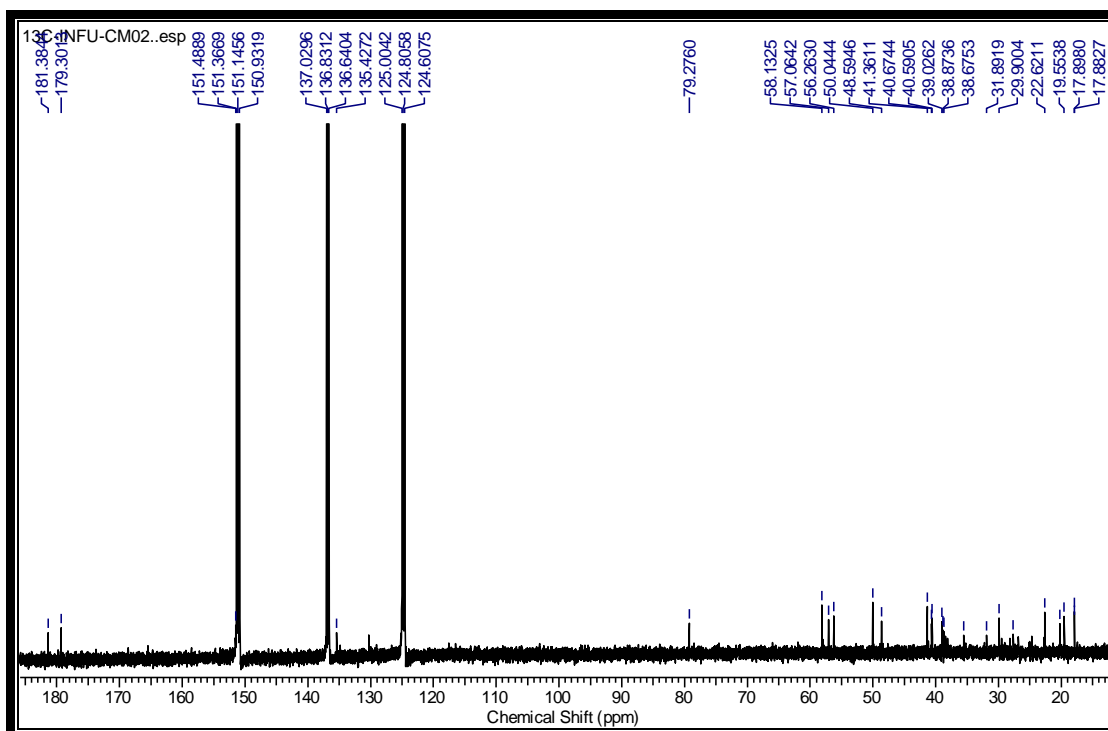


Figure 14: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, Pyr- d_5) du composé CM02

L'analyse du spectre de RMN ^1H (figure 15) de CM02 révèle la présence de six singulets entre δ_{H} 0,70 et 1,20 attribuables aux six méthyles dont quatre quaternaires (carbones angulaires). Le signal à δ_{H} 6,04 (1H, d, 3,1 Hz) et celui à δ_{H} 3,32 (1H, dd, 4,6; 11,1 Hz) sont caractéristiques respectivement d'un proton oléfinique et d'un proton géminé au groupement hydroxyle.

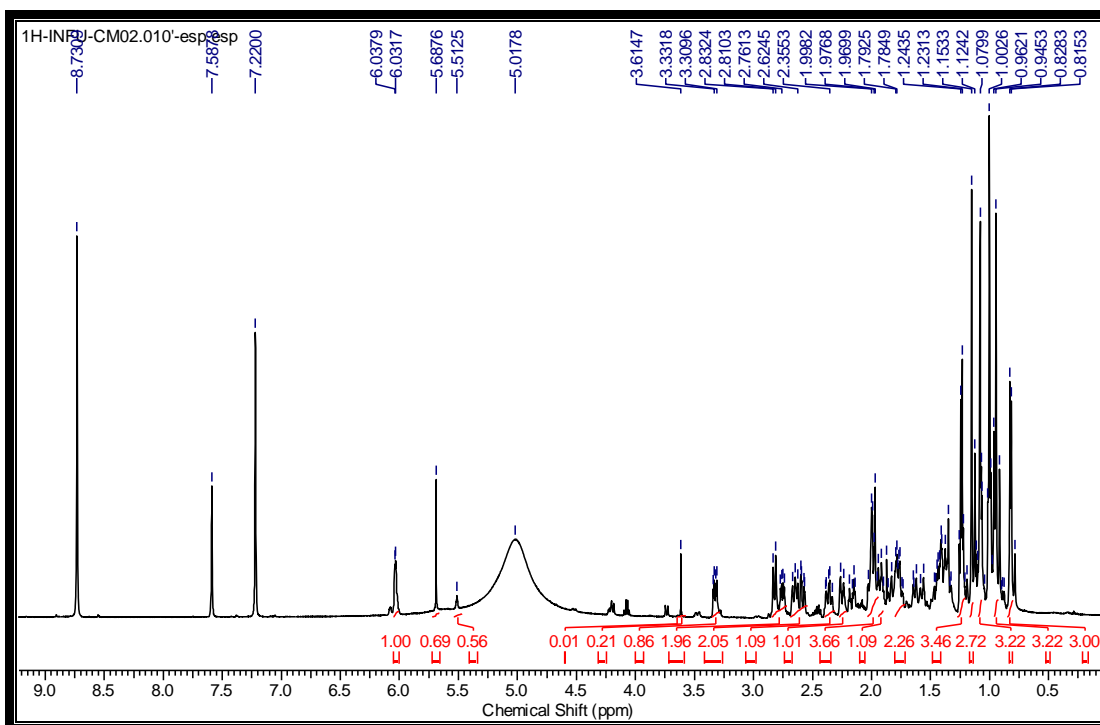


Figure 15: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, Pyr- d_5) du composé CM02

La comparaison des données spectroscopiques de CM02 avec celles de la littérature (Mahato *et al.*, 1994) permet de l'identifier à l'acide quinovique **121**.

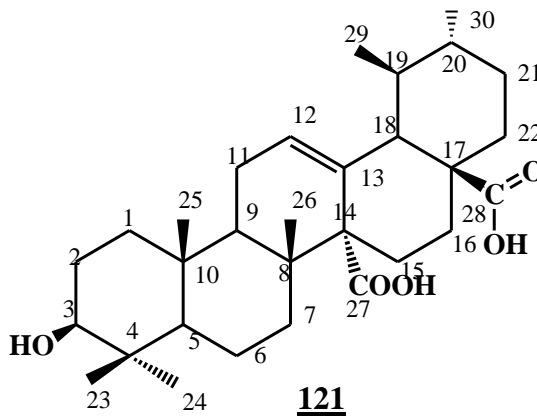


Tableau XVI: Données spectrales de RMN ¹³C (125 MHz, Pyr-d₅) de CM02 121 comparées à celles de l'acide quinovique (125 MHz, CDCl₃) (Mahato et al., 1994).

Position	CM02 <u>121</u>	Acide quinovique
	δ_C	δ_C
1	38,8 (t)	39,4
2	26,8 (t)	26,5
3	79,2 (d)	78,1
4	39,0 (s)	39,4
5	56,2 (d)	55,9
6	19,5 (t)	19,0
7	38,6 (t)	37,7
8	40,6 (s)	40,2
9	48,5 (d)	47,4
10	38,4 (s)	37,5
11	22,6 (t)	23,5
12	130,3 (d)	129,1
13	135,4 (s)	134,2
14	57,0 (s)	56,9

15	27,6 (t)	28,3
16	24,6 (t)	25,6
17	48,5 (s)	48,9
18	56,2 (d)	55,1
19	38,8 (t)	39,5
20	38,0 (q)	37,8
21	29,9 (t)	30,7
22	35,5 (t)	37,2
23	28,1 (q)	28,7
24	17,8 (q)	16,8
25	17,8 (q)	16,8
26	19,5 (q)	18,4
27	179,3 (s)	178,2
28	181,3 (s)	180,2
29	20,1 (q)	19,1
30	22,7 (q)	21,7

II.2.1.3. Identification de POE4 ou polycarpol 122

POE4 cristallise dans le méthanol sous forme de fines aiguilles incolores et fond entre 173 et 174°C. Il réagit positivement au test de Liberman-Burchard caractéristique des triterpènes.

L'analyse de son spectre de masse en HRESI (figure 15) montre le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 441,3731 compatible avec la formule brute C₃₀H₄₈O₂ renfermant 7 d'insaturations.

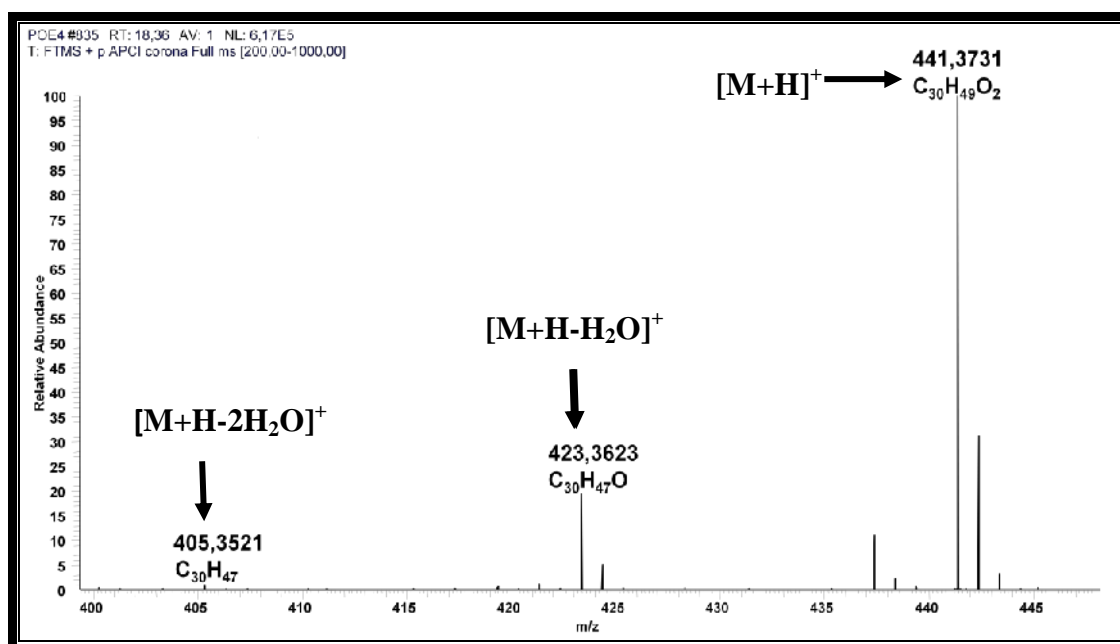


Figure 16: Spectre de masse en HRESI du composé POE4

L'analyse du spectre de RMN ¹H (figure 17) de POE4 montre dans les champs forts entre δ_H 0,88 et 1,70, huit signaux dont un à δ_H 0,90 (3H, d, 5,5 Hz) et sept singulets tous attribuables aux protons des méthyles d'un triterpène de la série des lanostanes (Hammonnière et *al.*, 1976). On observe aussi deux signaux à δ_H 3,26 (1H, dd, 4,3; 11,4 Hz) et à 4,28 (1H, dd, 5,8; 9,7 Hz) attribuables aux protons géminés aux groupes OH. La présence des deux groupements hydroxyles est confirmée sur le spectre de masse où on observe des pics des ions fragments à m/z 423 et 405 dus à la perte successive de deux molécules d'eau.

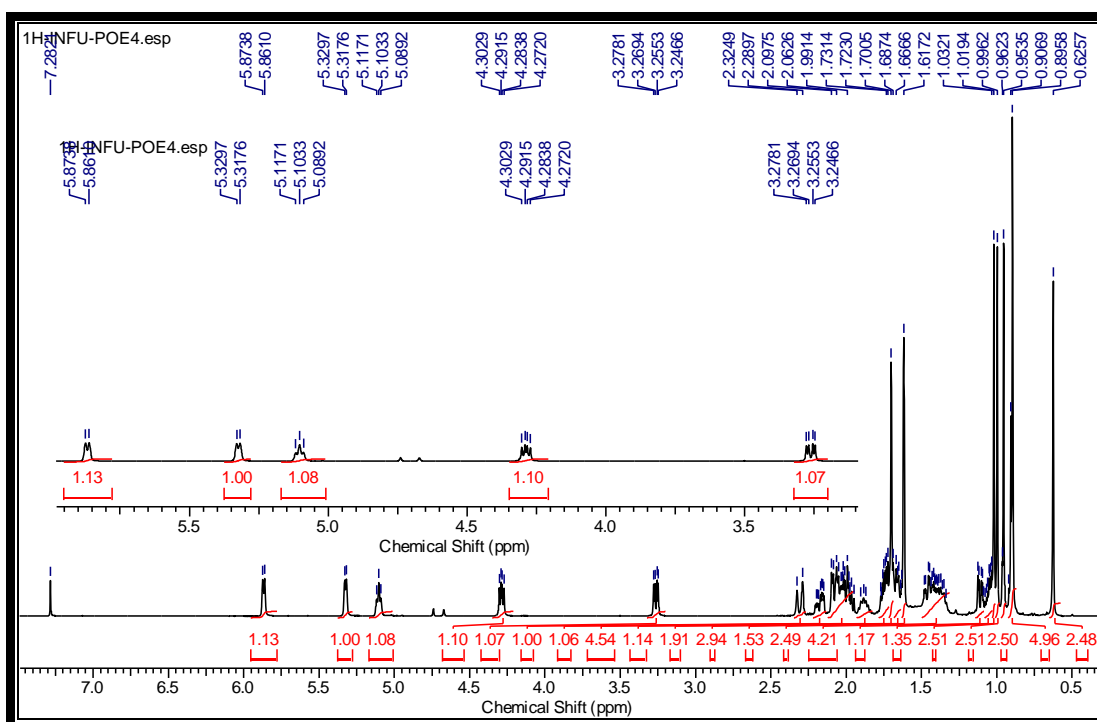


Figure 17: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE4

Ces informations sont confirmées sur le spectre de RMN ^{13}C (figure 18) où on observe dans la région des champs faibles à δ_{C} 124,9, 131,1, 140,8 et 146,0, quatre signaux tous attribuables aux carbones oléfiniques (C-7, C-8, C-9 et C-11) des lanost-7,9(11)-ènes (Hammonnière et *al.*, 1976). On observe également à δ_{C} 116,0 et 121,2 les signaux de deux carbones oléfiniques, traduisant ainsi la présence de 02 doubles liaisons exocycliques dans la structure de POE4. Ce spectre présente de plus un ensemble de huit groupements méthyles dont les signaux apparaissent entre δ_{C} 15,8 et 24,8 confirmant la nature triterpenique de POE4.

Toutes ces informations associées à celles de la littérature (Hammonnière et *al.*, 1976) nous ont permis d'attribuer à POE4 la structure **122** qui est celle de polycarpol.

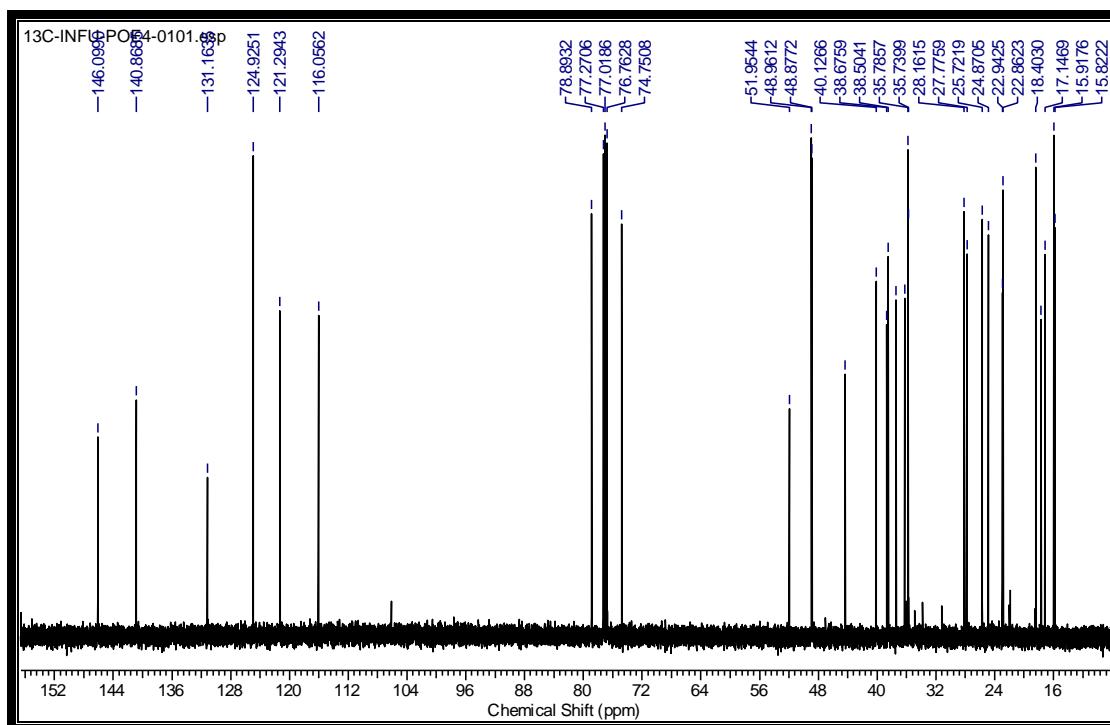


Figure 18: Spectre de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de POE4

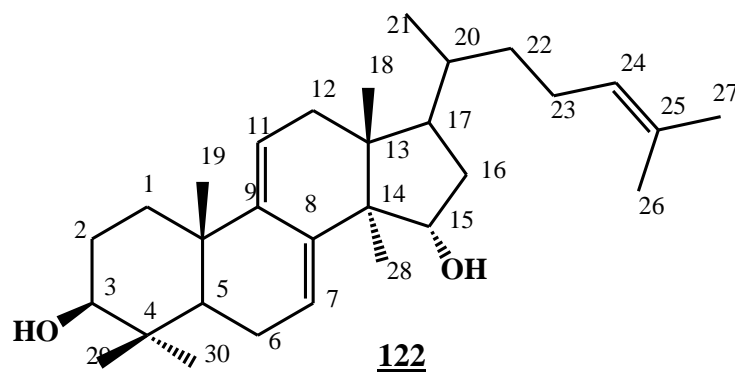


Tableau XVII: Données de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de POE4 122 comparées à celles de polycarpol (125 MHz, CDCl_3) (Hammonnière et *al.*, 1976).

Position	POE4 <u>122</u>	polycarpol
	δ_{C}	δ_{C}
1	35,7 (t)	35,7
2	27,7 (t)	27,7
3	78,9 (d)	78,9
4	37,7 (s)	38,7
5	48,8 (d)	48,8
6	22,9 (t)	22,9
7	121,3 (d)	121,3
8	140,8 (s)	140,8
9	146,1 (s)	146,1
10	37,4 (s)	37,4
11	116,1 (d)	116,0
12	38,5 (t)	38,5
13	44,3 (s)	44,3
14	51,9 (s)	51,9
15	74,7 (d)	74,7
16	40,1 (t)	40,1
17	48,9 (d)	48,9
18	15,9 (q)	15,9
19	22,8 (q)	22,8
20	35,8 (d)	35,8
21	18,4 (q)	18,4
22	36,2 (t)	36,2
23	24,8 (t)	24,8
24	124,9 (d)	124,9
25	131,2 (s)	131,2
26	17,6 (q)	17,6
27	25,7 (q)	25,7
28	28,1(q)	28,1
29	15,8 (q)	15,8
30	17,1(q)	17,1

II.2.2. Le polyol

Identification de CM06 ou D-mannitol 123

Le composé CM06 est obtenu sous forme de poudre blanche cristalline dans le mélange hexane-acétate d'éthyle. Il fond entre 166 et 168 °C et réagit positivement au test de Molish, caractéristique des sucres.

Sa formule brute $C_6H_{14}O_6$ est déterminée à partir de l'analyse de son spectre de masse en HRESI (figure 19) où on observe le pic de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 183,0864. Le fait que CM06 ne compte aucune insaturation suggère qu'il s'agit d'une molécule linéaire. Le pic de l'ion fragment à m/z 165, résultant de la perte d'une molécule d'eau dans la structure traduit la présence d'au moins un groupement hydroxyle.

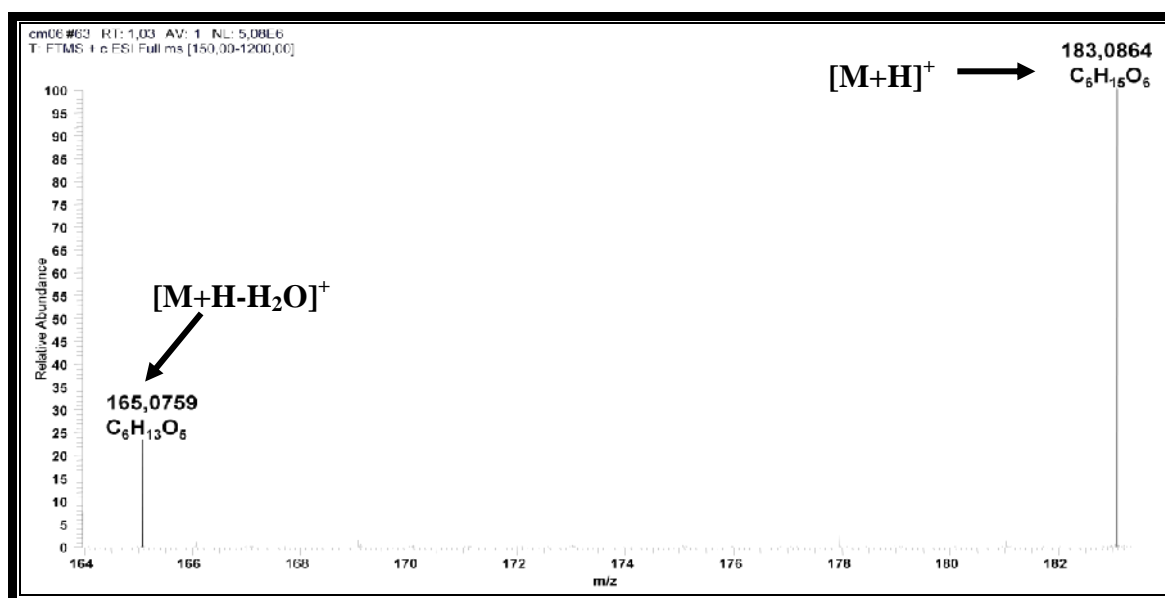


Figure 19: Spectre de masse en HRESI du composé CM06

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C (figure 20) fait ressortir uniquement trois signaux dont deux respectivement à δ_C 70,6 et 72,1 attribuables à deux oxyméthynes et un à δ_C 64,6 qui correspond à un oxyméthylène. Ce qui suggère la présence dans la structure de CM06 d'un élément de symétrie.

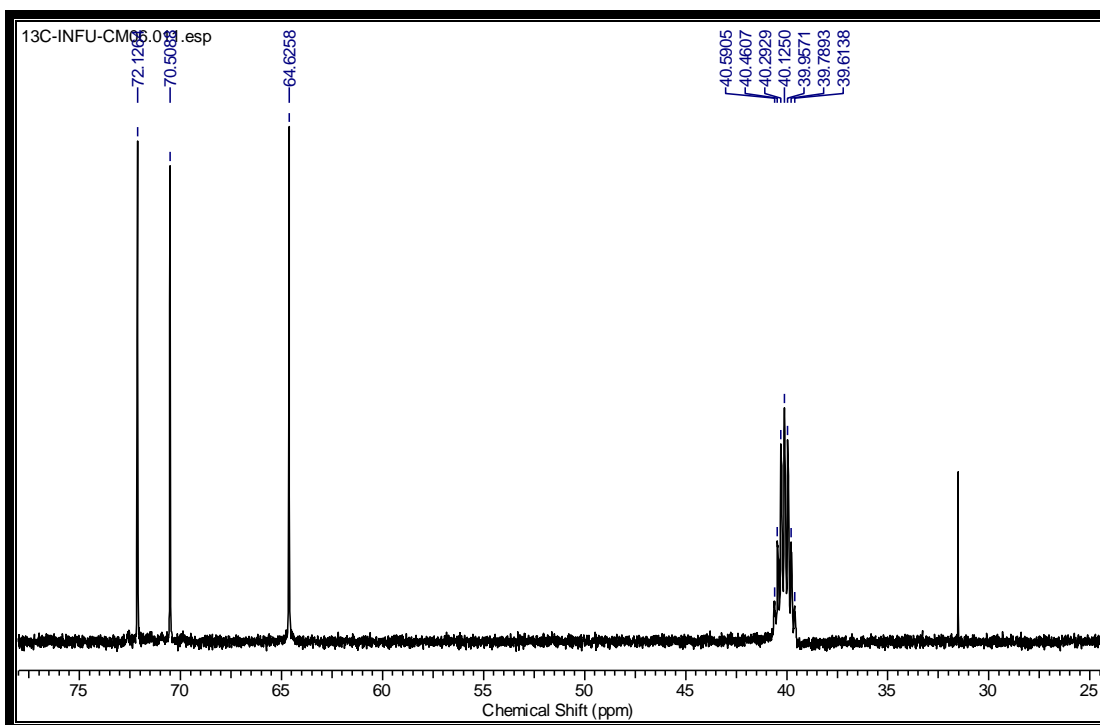


Figure 20: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) du composé CM06

Ces informations sont confirmées sur le spectre de RMN ^1H (figure 21) qui révèle:

- Deux signaux à δ_{H} 3,39 (2H, dd, 6,1, 10,7 H-1a) et à 3,66 (2H, dd, 3,4, 10,7 H-1b) tous attribuables aux protons diastéréotopiques et géminés au groupement hydroxyle.
- Un signal à δ_{H} 3,42 (2H, d, 8,0 H-3 ou H-4) attribuable aux protons de deux groupements oxyméthynes.
- Un signal à δ_{H} 3,46 (2H, m, H-2 ou H-5) attribuable également aux protons de deux autres groupements oxyméthynes.

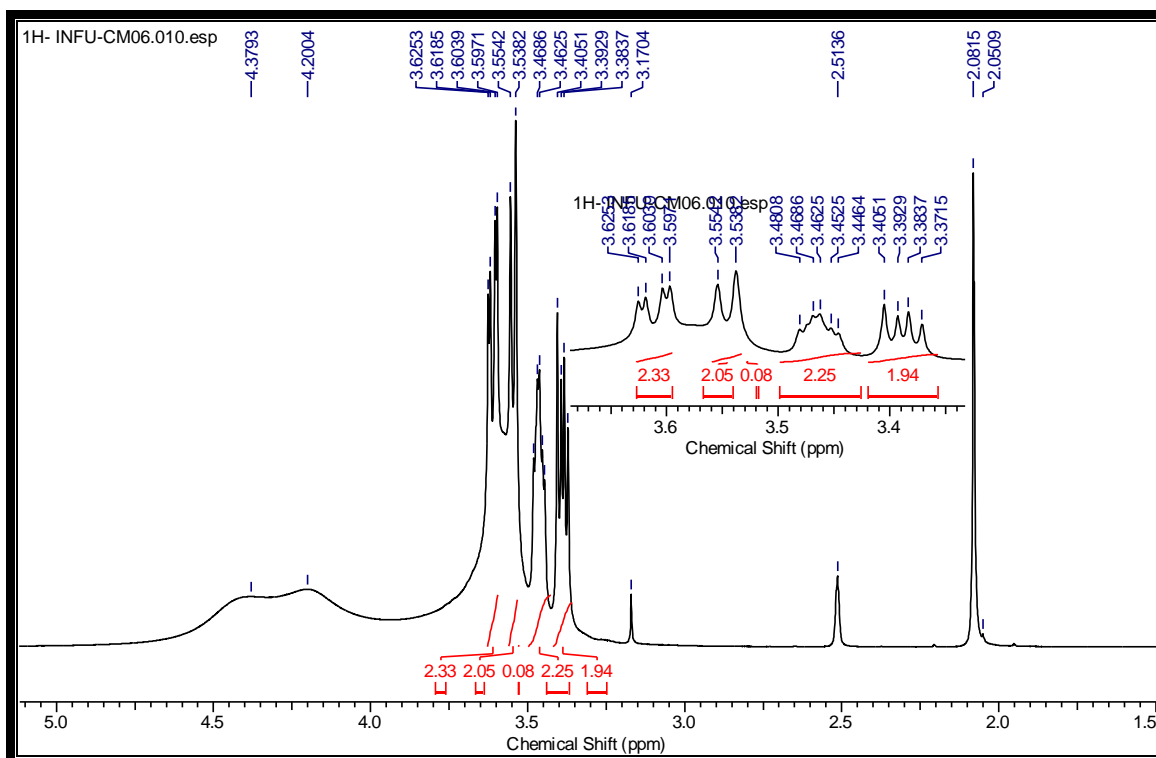


Figure 21: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé CM06

L'ensemble de toutes ces informations comparées avec celles de la littérature (Fronczek *et al.*, 2003) nous ont permis d'attribuer à CM06 la structure **123** qui est celle du D- mannitol.

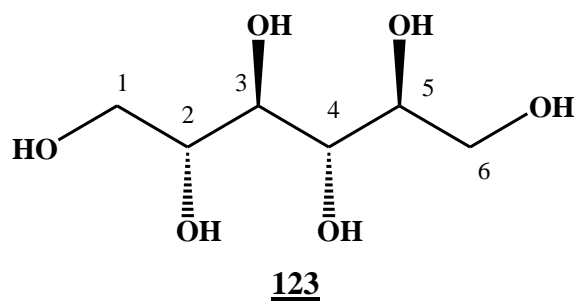


Tableau XVIII: Données de RMN du ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) et ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de CM06 123

Position	CM06 <u>123</u>	
	δ_{H}	δ_{C}
1	3,39 (2H, dd, 6,1; 10,7 Hz)	64,6 (t)
	3,66 (2H, dd, 3,4; 10,7 Hz)	
2	3,46 (2H, m)	72,1 (d)
3	3,42 (2H, d, 8,0 Hz)	70,5 (d)
4	3,42 (2H, d, 8,0 Hz)	70,5 (d)
5	3,46 (2H, m)	72,1 (d)
6	3,39 (2H, dd, 6,1; 10,7 Hz)	64,6 (t)
	3,66 (2H, dd, 3,4; 10,7 Hz)	

II.2.3. L'acide phénolique

Identification de CM03 ou acide 4-*O*- β -D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) vanilique 124

Le composé CM03 est obtenu sous forme de poudre blanche. Il est soluble dans le chloroforme et optiquement actif ($[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -58^{\circ}$).

Son spectre UV montre une absorption maximale à λ_{max} 282 nm caractéristique des composés phénoliques (Lee et *al.*, 2010).

Le spectre IR de CM03 montre des bandes d'absorption à 1706 cm^{-1} (carbonyle des esters), 3333 cm^{-1} (groupement hydroxyle) et à 1624 cm^{-1} (C=C aromatique) et 1070 cm^{-1} (C-O des sucres).

Son spectre de masse en HR-ESI (figure 22) montre le pic de l'ion pseudo moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 457,1097 en accord avec la formule moléculaire $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}\text{Na}$ renfermant 11 insaturations.

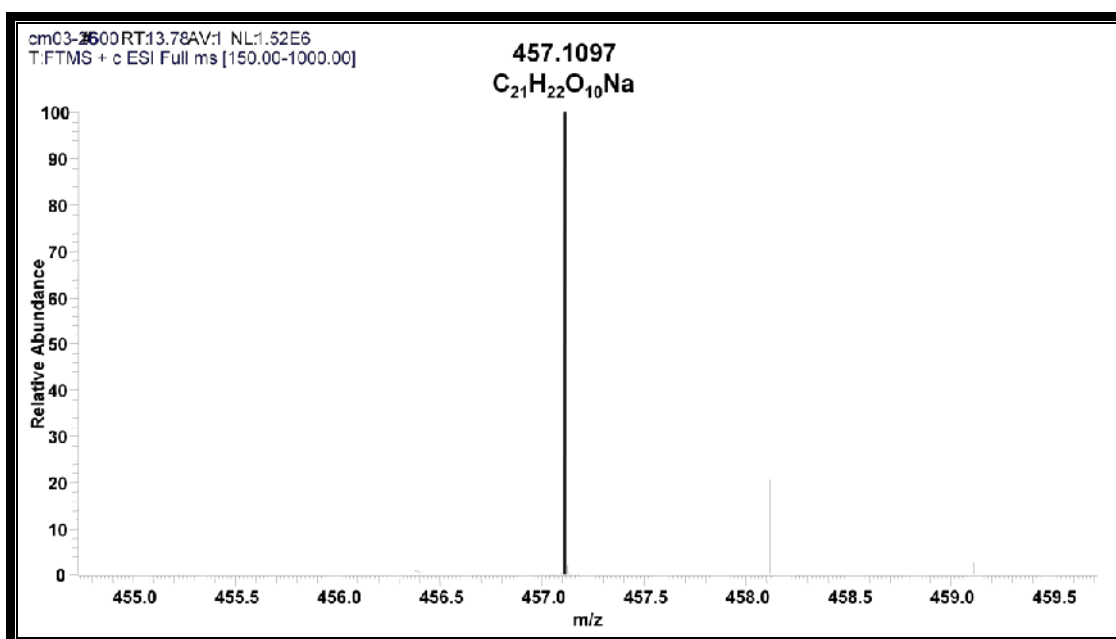


Figure 22: Spectre de masse en HRESI du composé CM03

L'analyse du spectre de RMN 1H (figure 23) de CM03 montre un système ABM à δ_H 7,44 (1H, d, 1,9, H-2), 7,35 (1H, dd, 1,9; 8,4, H-6) et à 7,15 (1H, d, 8,4, H-5) tous attribuables aux protons d'un noyau aromatique trisubstitué. On observe également un système ABC à δ_H 7,93 (2H, dd, 8,4; 1,1, H-2''), 7,66 (1H, pt, 8,4; 7,6, H-4'') et 7,52 (2H, t, 7,6, H-3'') tous caractéristiques des protons d'un noyau aromatique monosubstitué. Toujours sur ce spectre, les signaux à δ_H 5,11 (1H, d, 7,6, H-1') et à 3,78 (3H, s, H-8) sont caractéristiques du proton anomérique d'un sucre et des protons d'un oxyméthyle respectivement.

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C (figure 24) nous a permis de faire ressortir:

- Deux signaux à δ_C 167,9 et 165,5 attribuables respectivement au carbonyle des acides carboxylique et au carbonyle des esters.
- Un ensemble de signaux entre δ_C 110,0 et 150,0 attribuables aux carbones aromatiques
- Six signaux à δ_C 99,9, 77,3, 74,6, 73,8, 70,9 et 64,9 correspondant tous aux carbones du sucre.
- Un signal à δ_C 56,4 attribuable à un oxyméthyle.

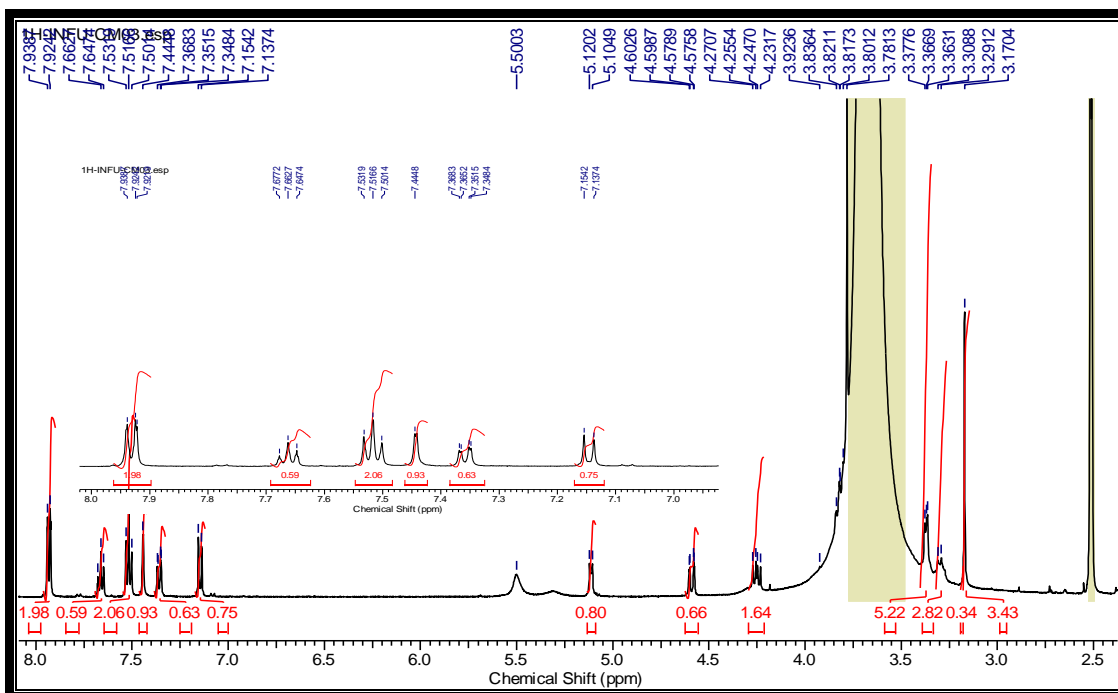


Figure 23: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé CM03

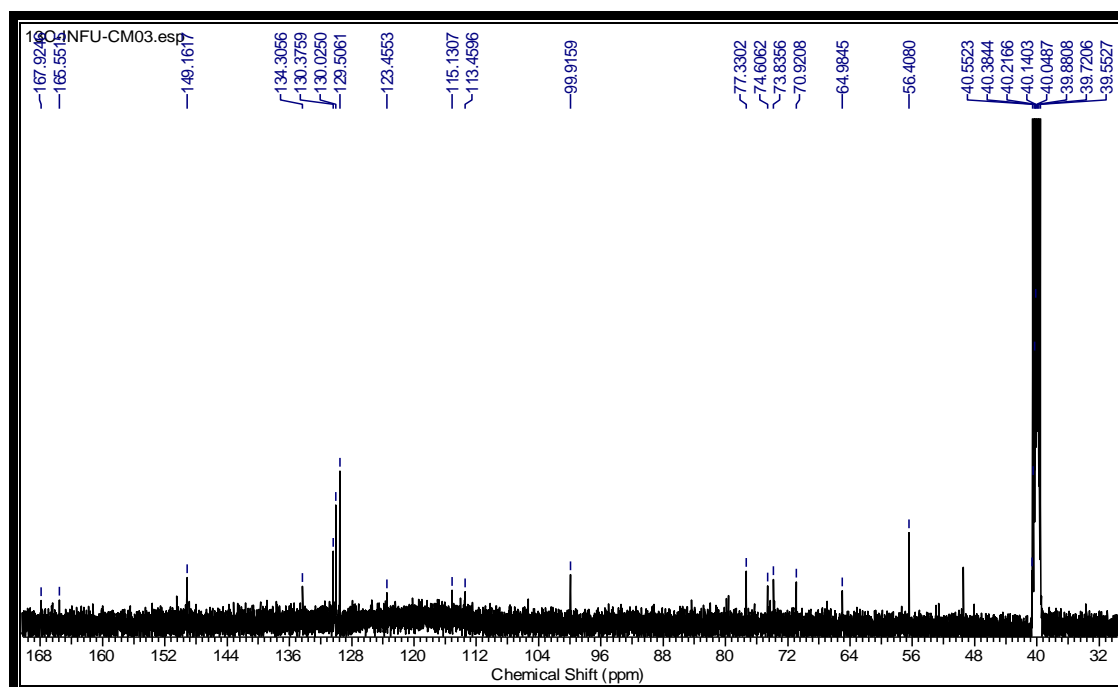
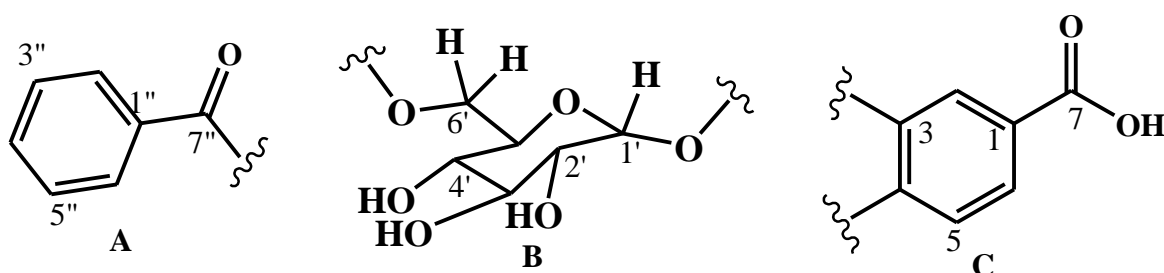


Figure 24: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) du composé CM03

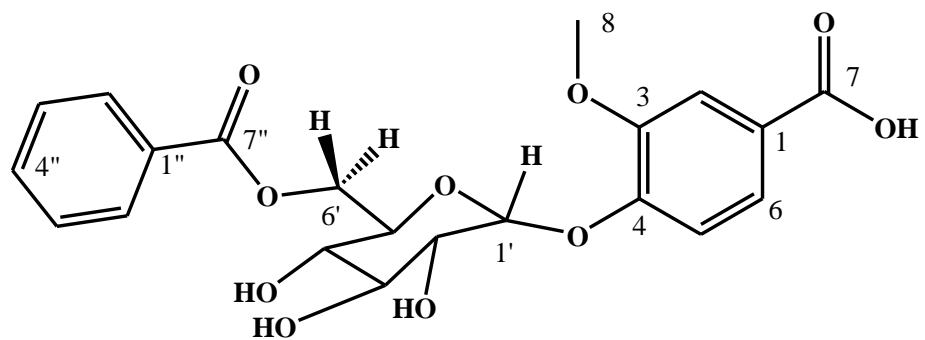
Toutes ces informations combinées aux corrélations observées sur le spectre HMBC entre le proton à δ_H 7,93 et le carbonyle à δ_C 165,5 d'une part et d'autre part entre les protons à δ_H 7,44 et 7,35 et le carbonyle à δ_C 167,9 nous ont permis de suggérer les sous structures suivantes:



Toujours sur le spectre HMBC du composé CM03, on observe d'une part une tache de corrélation entre le proton H-1' du sucre à δ_H 5,11 et le carbone C-4 à δ_C 149,1 et d'autre part une tache de corrélation entre les protons H-6' du sucre à δ_H 4,59 et 4,25 et le carbone C-7'' à δ_C 165,5. Ce qui permet de déduire que le sucre est fixé en C-4 de la sous structure A et en C-7'' de la sous structure C.

La position de l'oxyméthyle est déduite de la corrélation observée entre les protons à δ_H 3,78 et le carbone C-3 à δ_C 149,1

De tout ce qui précède, nous avons attribué à CM03 la structure **124**, qui est celle de l'acide 4-O- β -D-(6-O-benzoylglucopyranoside) vanilique déjà isolée de *Lonicera japonica* par Lee et *al.*, 2010. Il est décrit ici pour la première fois de *C.multiflorum*.



115

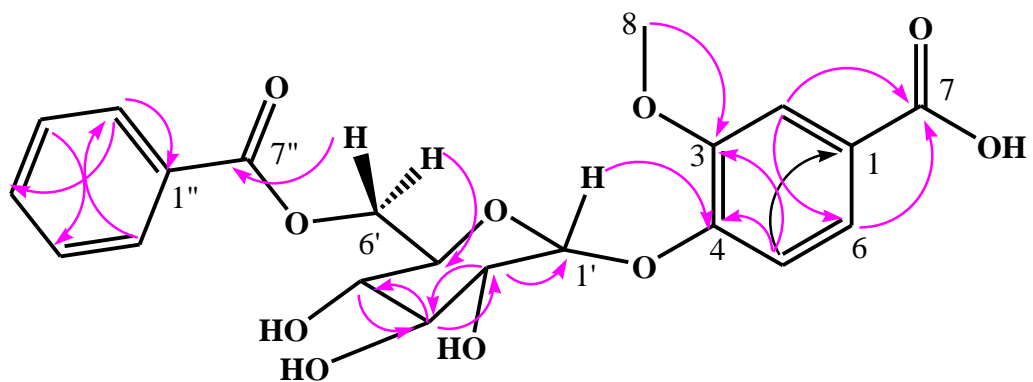


Schéma 9: Quelques corrélations HMBC du composé CM03

Tableau XIX: Comparaison des données de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) et RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) de CM03 124 avec celles de l'acide 4-*O*- β -D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) vanilique: ^1H (300 MHz, CD_3OD) et ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) (Lee et al., 2010)

Positions	CM03 <u>124</u>		acide 4- <i>O</i> - β -D-(6- <i>O</i> -benzoylglucopyranoside) vanilique	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1		125,4 (s)		126,2
2	7,44 (d, 1,9)	113,4 (d)	7,57 (d, 1,8)	114,3
3		149,1 (s)		150,4
4		150,4 (s)		151,6
5	7,15 (d, 8,4)	115,1 (d)	7,13 (d, 8,4)	116,5
6	7,35 (dd, 1,9, 8,4)	123,4 (d)	7,42 (dd, 1,8, 8,4)	124,6
7		167,9 (s)		169,5
8	3,78 (s)	56,4 (q)	3,87 (s)	56,6
1'	5,11 (d, 7,6)	99,9 (d)	5,06 (d, 7,8)	101,6
2'	3,80 (m)	73,8 (d)	3,58 (t, 8,4)	74,7
3'	3,36 (t, 7,3)	77,3 (d)	3,52 (t, 8,4)	77,8
4'	3,30 (m)	70,9 (d)	3,44 (t, 8,7)	72,0
5'	3,84 (m)	74,6 (d)	3,83 (ddd, 2,1, 7,8, 9,9)	75,6
6'	4,58 (dd, 11,8, 1,9) 4,24 (dd, 11,8, 7,6)	64,9 (t)	4,71 (dd, 11,7, 2,1) 4,39 (dd, 11,7, 7,5)	65,3
1''		130,3 (s)		131,2
2''	7,93 (dd, 8,4, 1,2)	130,0 (d)	7,99 (dt, 1,5, 7,2)	130,6
3''	7,52 (t, 7,6)	129,5 (d)	7,47 (tt, 1,5, 7,5)	129,6
4''	7,66 (t, 7,3)	134,3 (d)	7,61 (tt, 1,8, 7,2)	134,4
5''	7,66 (t, 7,6)	129,5 (d)	7,47 (tt, 1,5, 7,5)	129,6
6''	7,93 (dd, 8,4, 1,2)	130,0 (d)	7,99 (dt, 1,5, 7,2)	130,6
7''		165,5 (s)		167,7

II.2.4. Les alcaloïdes

II.2.4.1. Identification de POE7 ou bidebiline A 125

Soluble dans le chlorure de méthylène, le composé POE7 précipite sous forme de poudre cristalline verdâtre dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (30%) et présente un point de fusion entre 240 et 241 °C. Il répond positivement au test de Dragendorff caractéristique des alcaloïdes.

Sa composition élémentaire $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2$ renfermant 24 insaturations a été déduite de son spectre de masse en APCI-TF (figure 25) à haute résolution en mode positif qui montre le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 525,1813. Nous notons également sur ce

spectre, la présence d'un ion fragment $[M/2+H]^+$ à m/z 264,1017; fragment qui correspond à la formule brute $C_{17}H_{13}O_2N$.

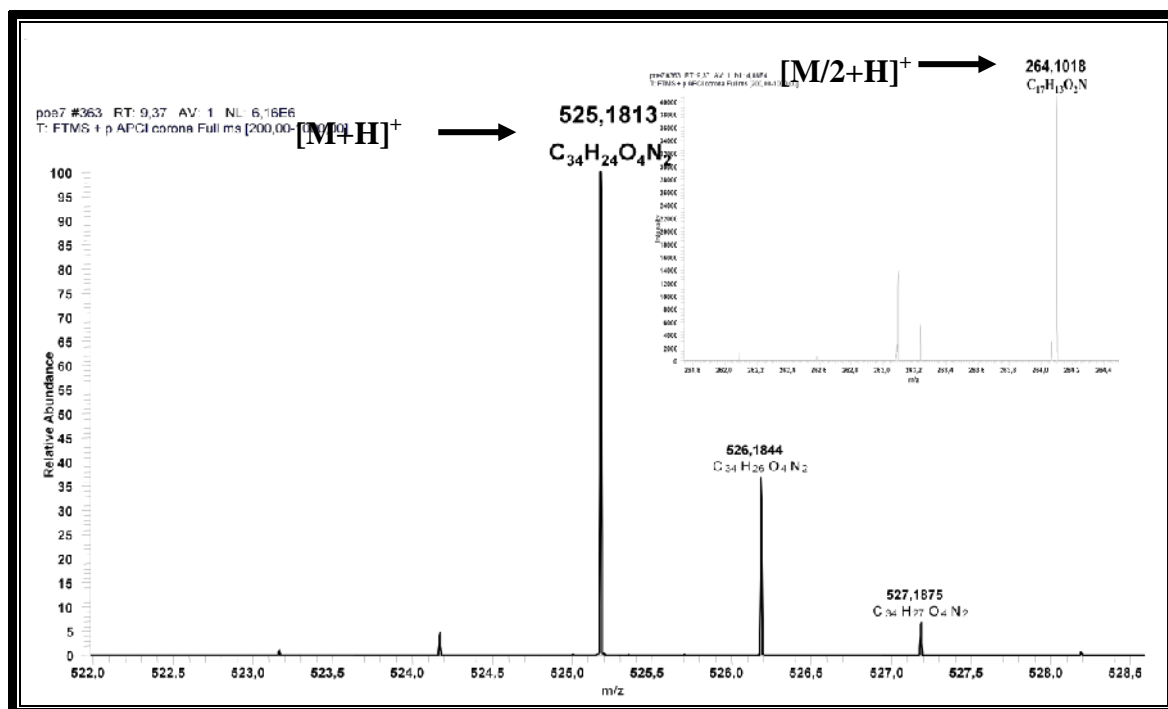


Figure 25: Spectre de masse en APCI du composé POE7

Son spectre UV (figure 26) montre quatre bandes d'absorption maximales à λ_{max} 226, 262, 336 et 400 nm qui sont caractéristiques d'un système dehydroaporphinique. (Kanokmedhakul et al., 2003).

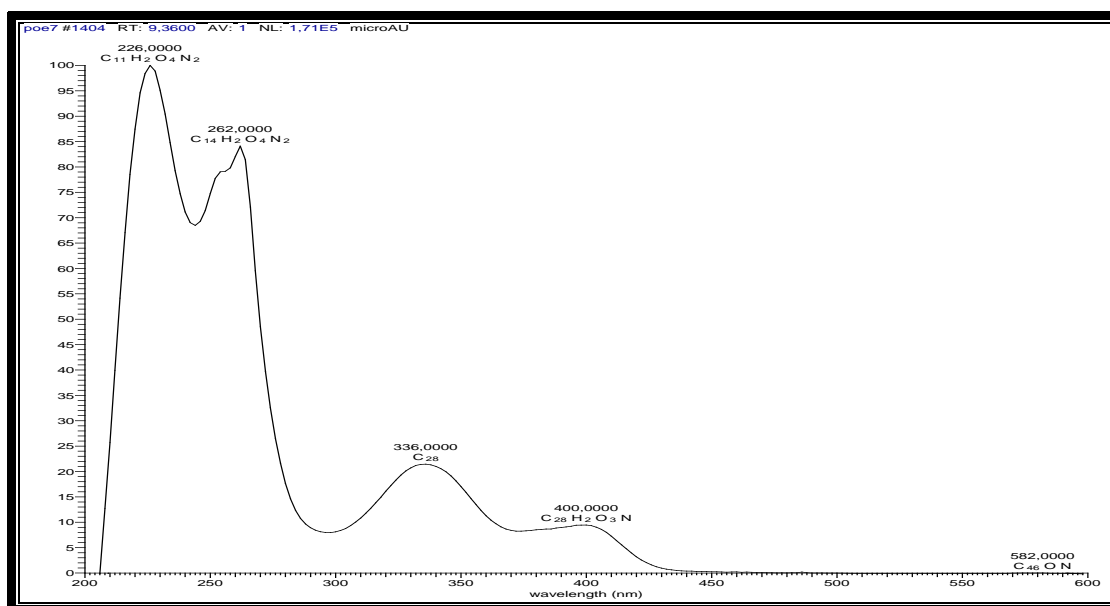
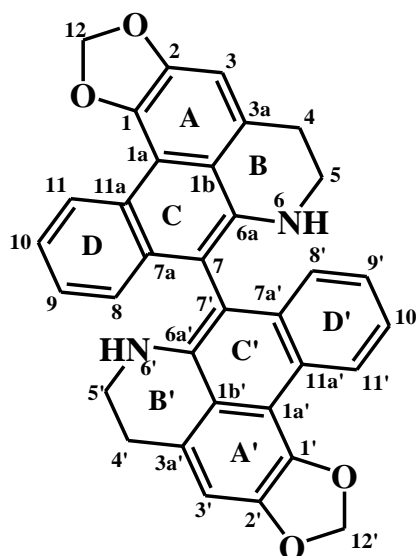
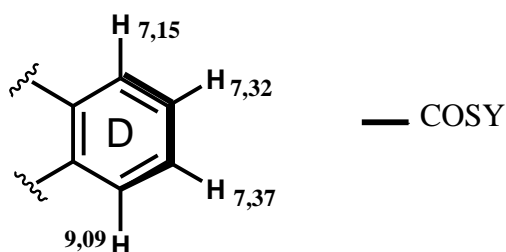


Figure 26: Spectre UV du composé POE7

L'analyse des spectres de RMN ^1H et ^{13}C nous a permis de constater que le nombre de signaux attendus est réduit de moitié. Ce qui suggère que POE7 serait un dimère dont le monomère est de formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$ renfermant 12 insaturations. Par comparaison de ces données avec celles de la littérature (Kanokmedhakul *et al.*, 2003), nous avons attribué à POE7 la structure suivante

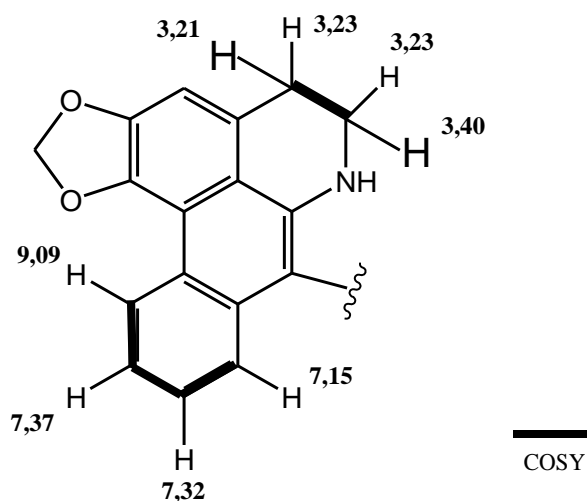


En effet, son spectre de RMN ^1H (figure 27) montre dans les champs faibles des signaux à δ_{H} 9,09 (1H, d, 8,4, H-11), 7,37 (1H, t, 8,05, H-10), 7,32 (1H, d, 8,05, H-9) et 7,15 (1H, d, 8,05, H-8) attribuables à des protons aromatiques. Ce qui suggère la présence d'un cycle aromatique disubstitué, probablement le cycle D du squelette aporphinique. Ces informations sont corroborées sur le spectre de COSY où on observe des taches de corrélation entre les protons H-8 et H-9, H-9 et H-10 et H-10 et H-11.



Le fort déblindage du proton à δ_H 9,09 (1H, d, 8,4, H-11) suggère l'effet anisotropique du cycle A. De plus nous observons le signal du proton à δ_H 7,08 (1H, s, H-3) attribuable au proton aromatique du cycle A. On observe d'autres signaux dans des champs faibles dont

- Des multiplets à δ_H 3,21 (1H), 3,40 (1H) et 3,23 (2H) attribuables aux protons diastéréotopiques de deux groupements méthylènes (C-4 et C-5) du cycle B qui couplent ensemble d'après le spectre COSY.
- Un singulet de deux protons à δ_H 6,30 (2H, H-12) attribuables aux protons du dioxyméthylène. D'après les données de la littérature, la dehydroanonaine présente un signal autour de 6,56 ppm attribuable au proton 7 (Kanokmedhakul et *al.*, 2003). Ce signal est absent sur le spectre de RMN 1H de POE7, ce qui confirme que les deux unités sont liées par ce carbone.



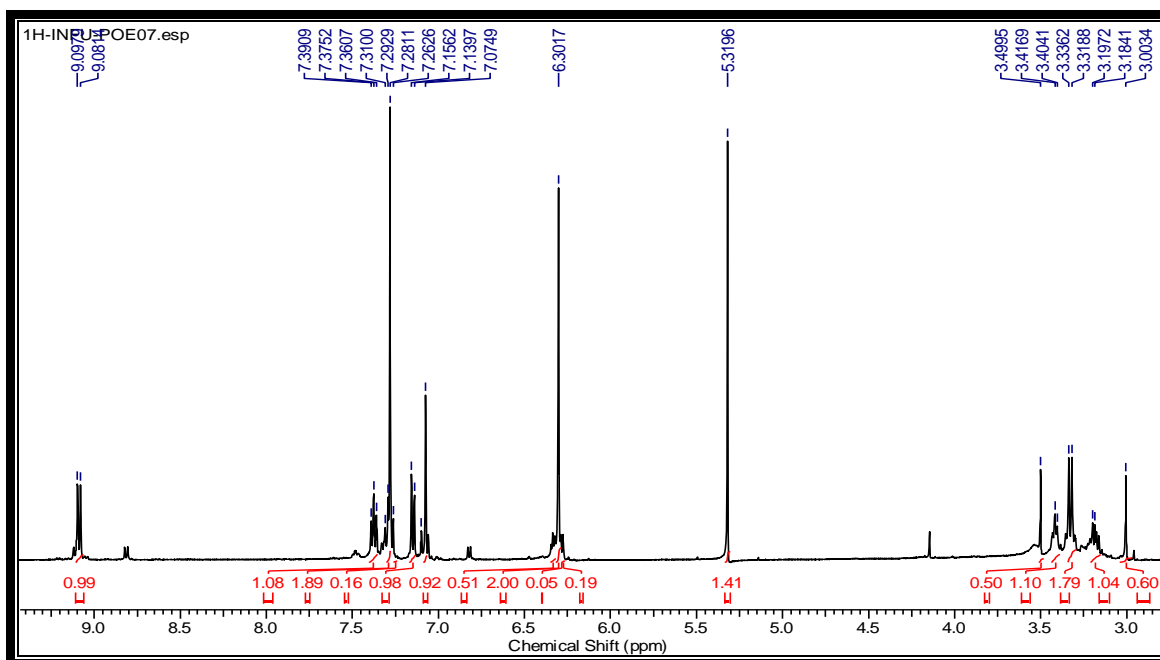


Figure 27: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE7

Sur le spectre de RMN ^{13}C (figure 28) découplé large bande combiné au spectre de HSQC nous observons dix-sept (17) signaux pouvant être repartis ainsi qu'il suit:

- Neuf (9) signaux de carbones quaternaires à δ_{C} 145,7 (C-2), 142,1 (C-1), 140,0 (C-6a), 133,0 (C-7a), 128,1 (C-3a), 124,3 (C-11a), 118,1 (C-1b), 117,6 (C-1a) et 106,7 (C-7).
- Cinq (5) signaux de méthynes aromatiques à $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 127,7 (C-9)/6,32, 127,3 (C-11)/9,09, 123,5 (C-8)/7,15, 122,8 (C-10)/7,37 et 108,1 (C-3)/7,08.
- Trois (3) signaux de méthylènes à $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 101,1 (C-12)/6,30, 41,4 (C-5)/3,23, 3,40 et 30,4 (C-4)/3,21, 3,23.

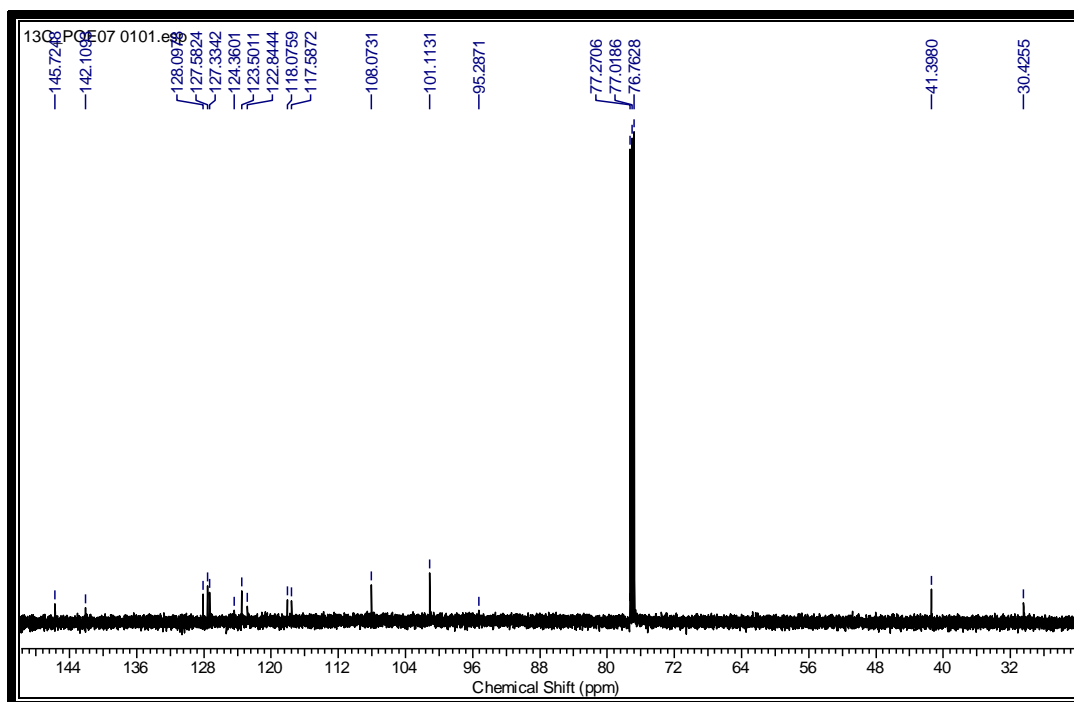


Figure 28: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE7

L'analyse du spectre HMBC nous a révélé de nombreuses corrélations dont les plus importantes sont indiquées sur le schéma suivant

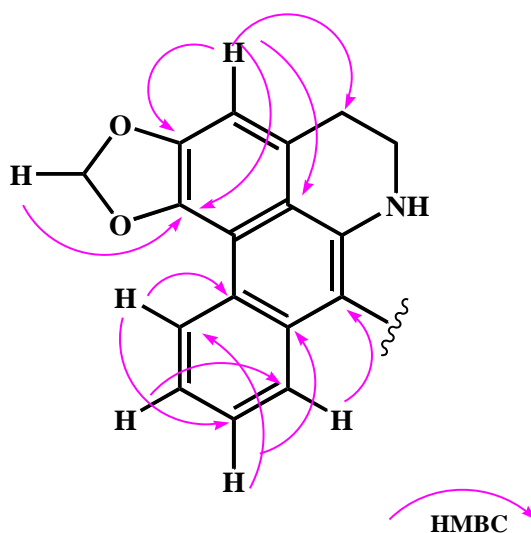


Schéma 10: Importantes corrélations HMBC du composé POE7

Toutes ces informations associées à celles obtenues dans la littérature nous ont permis d'attribuer à POE7 la structure **116** qui est celle de la bidebiline A. Ce composé a déjà été isolé des racines de *Polyalthia debilis* par Kanokmedhakul et *al.*, 2003 et son nom systématique est la bis-7,7'-dehydroanonaine.

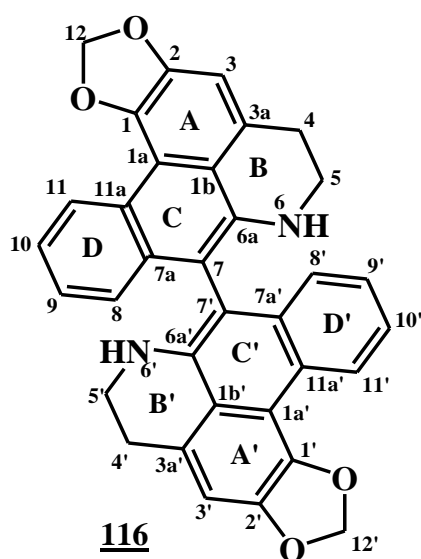


Tableau XX: Comparaison des données de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) et RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de POE7 125 avec celles de la bidebiline A: ¹H (300 MHz, CDCl₃) et ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (Kanokmedhakul et al., 2003)

Positions	POE7 <u>125</u>		Bidebiline A	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1		142,1 (s)		142,1 (s)
1'		142,1 (s)		142,1 (s)
1a		117,6 (s)		117,2 (s)
1a'		117,6 (s)		117,2 (s)
1b		118,1 (s)		120,7 (s)
1b'		118,1 (s)		120,7 (s)
2		145,7 (s)		145,6 (s)
2'		145,7 (s)		145,6 (s)
3	7,08 (s)	108,1 (d)	7,03 (s)	107,9 (d)
3'	7,08 (s)	108,1 (d)	7,03 (s)	107,9 (d)
3a		128,1 (s)		128,3 (s)
3a'		128,1 (s)		128,3 (s)
4	3,21-3,23 (m)	30,4 (t)	3,40-3,15 (m)	30,8 (t)
4'	3,21-3,23 (m)	30,4 (t)	3,40-3,15 (m)	30,8 (t)
5	3,23-3,40 (m)	41,4 (t)	3,40-3,15 (m)	41,2 (t)
5'	3,23-3,40 (m)	41,4 (t)	3,40-3,15 (m)	41,2 (t)
6a		140,0 (s)		140,8 (s)
6a'		140,0 (s)		140,8 (s)
7		106,7 (s)		105,7 (s)
7'		106,7 (s)		105,7 (s)
7a		133,0 (s)		133,9 (s)
7a'		133,0 (s)		133,9 (s)
8	7,15 (d, 8,05)	123,5 (d)	7,10 (d, 7,9)	127,5 (d)
8'	7,15 (d, 8,05)	123,5 (d)	7,10 (d, 7,9)	127,5 (d)
9	7,32 (d, 8,05)	127,5 (d)	7,24 (t, 7,2)	127,3 (d)
9'	7,32 (d, 8,05)	127,5 (d)	7,24 (t, 7,2)	127,3 (d)
10	7,37 (t, 8,05)	122,8 (d)	7,33 (t, 7,1)	122,4 (d)
10'	7,37 (t, 8,05)	122,8 (d)	7,33 (t, 7,1)	122,4 (d)
11	9,09 (d, 8,4)	127,3 (d)	9,04 (d, 8,1)	123,4 (d)
11'	9,09 (d, 8,4)	127,3 (d)	9,04 (d, 8,1)	123,4 (d)
11a		124,3 (s)		123,5 (s)
11a'		124,3 (s)		123,5 (s)
12	6,30 (s)	101,1 (t)	6,27 (s)	101,0 (t)
12'	6,30 (s)	101,1 (t)	6,27 (s)	101,0 (t)

II.2.4.2. Identification de POE19 ou N-méthylurabaine 126

Le composé POE19 précipite sous forme de poudre grise dans le mélange hexane/acétate d'éthyle (42,5%). Il est soluble dans le chlorure de méthylène et présente un

point de fusion entre 261 et 262 °C. Il répond positivement au test de Dragendorff caractéristique des alcaloïdes.

Sa formule moléculaire $C_{37}H_{34}O_4N_2$ renfermant 22 insaturations a été déduite de son spectre de masse en APCI-TF (figure 28) à haute résolution en mode positif qui montre le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 571,2629. On observe également des pics des ions fragments à m/z 293,1412 et 278,1175 correspondant respectivement aux formules brutes $C_{19}H_{19}O_2N$ et $C_{18}H_{16}O_2N$. Ce qui suggère que POE19 serait un dimère dissymétrique.

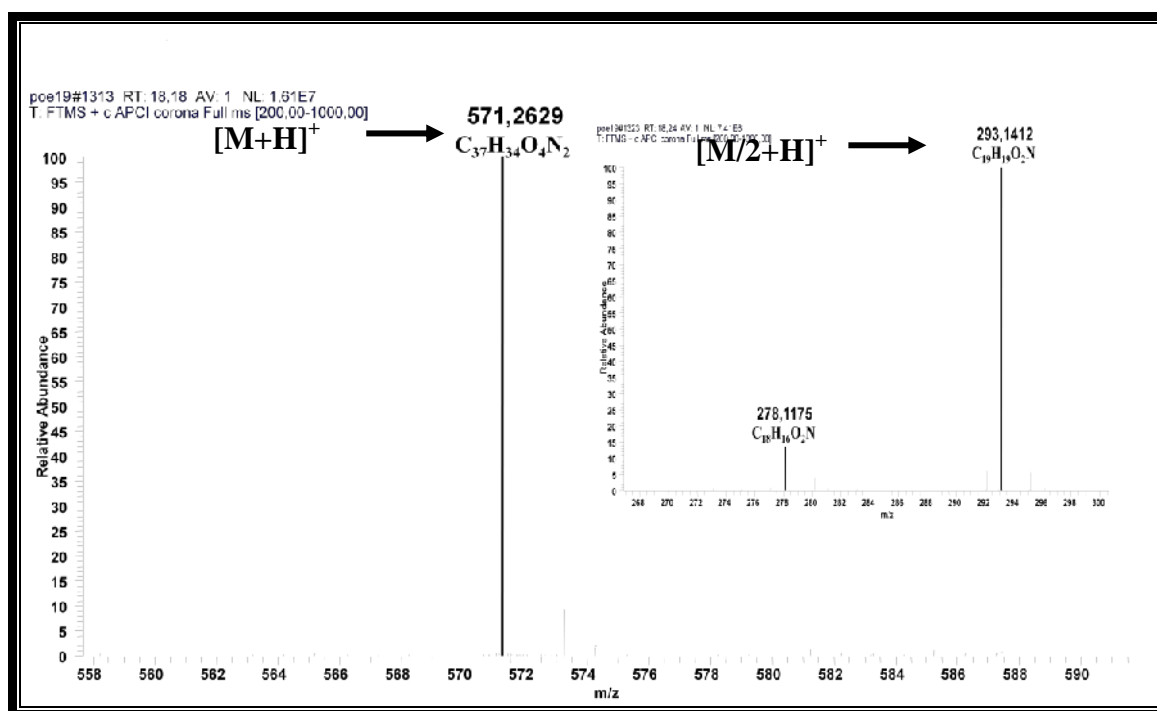


Figure 29: Spectre de masse à HR-APCI du composé POE19

L'analyse de son spectre UV (figure 30) révèle trois bandes d'absorption maximales à λ_{max} 228 nm, 260 nm et 330 nm qui sont caractéristiques d'un système dehydroaporphinique (Gabriel et al., 1987).

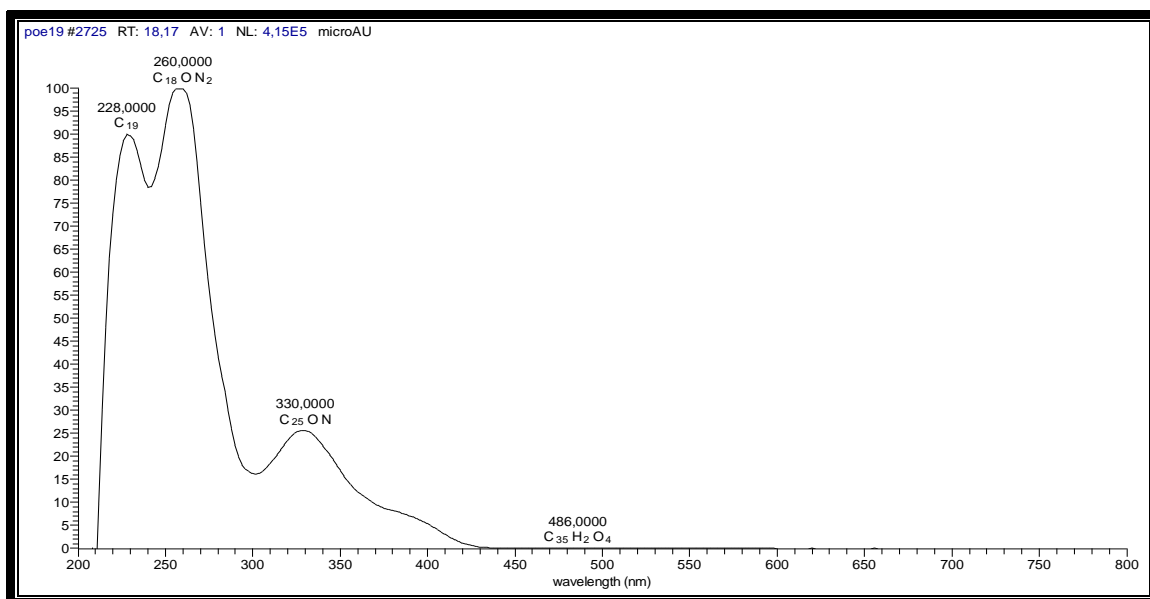


Figure 30: Spectre UV du composé POE19

Lorsqu'on compare les spectres de RMN ¹H de POE19 (figure 31) et de POE7 (figure 23), on constate la disparition du signal à δ_H 6,30 (O-CH₂-O) sur le spectre de POE19 et l'apparition d'un ensemble de quatre singulets intégrant 3 protons chacun respectivement à δ_H 4,07, 4,06, 4,05 et 4,00, attribuables tous aux protons des groupements oxyméthyles. On observe également l'apparition d'un singulet à δ_H 2,60 attribuable à un *N*-méthyle. Ce qui nous permet de confirmer l'hypothèse du dimère dissymétrique.

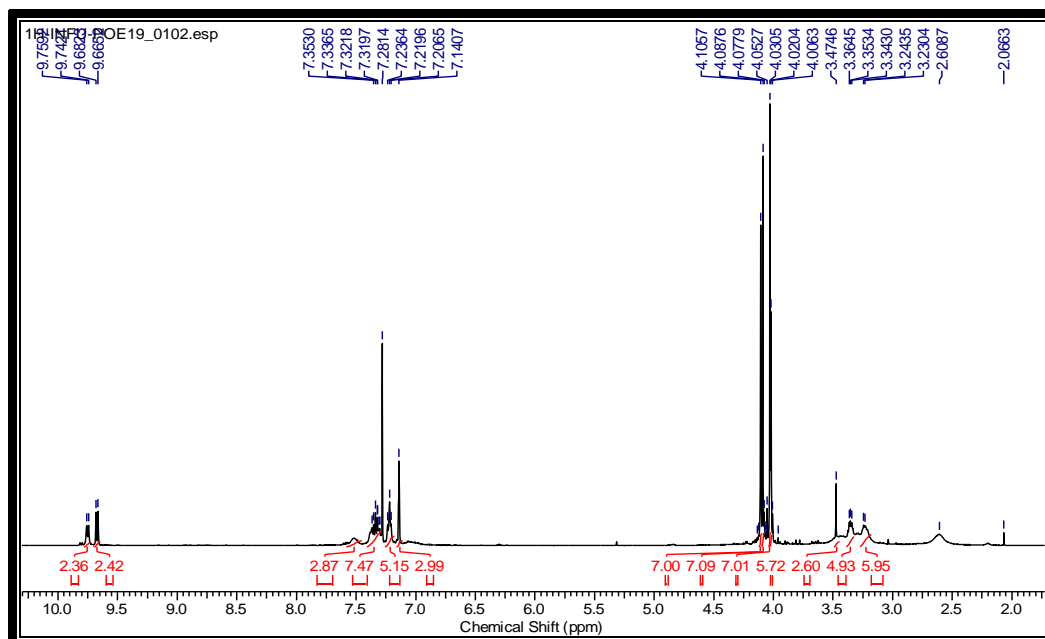


Figure 31: Spectre de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de POE19

Ces informations sont corroborées sur le spectre RMN ^{13}C (figure 32) par les signaux d'un *N*-méthyle à δ_{C} 41,0 et des oxyméthyles respectivement à δ_{C} 56,4, 56,5, 59,9 et 60,0.

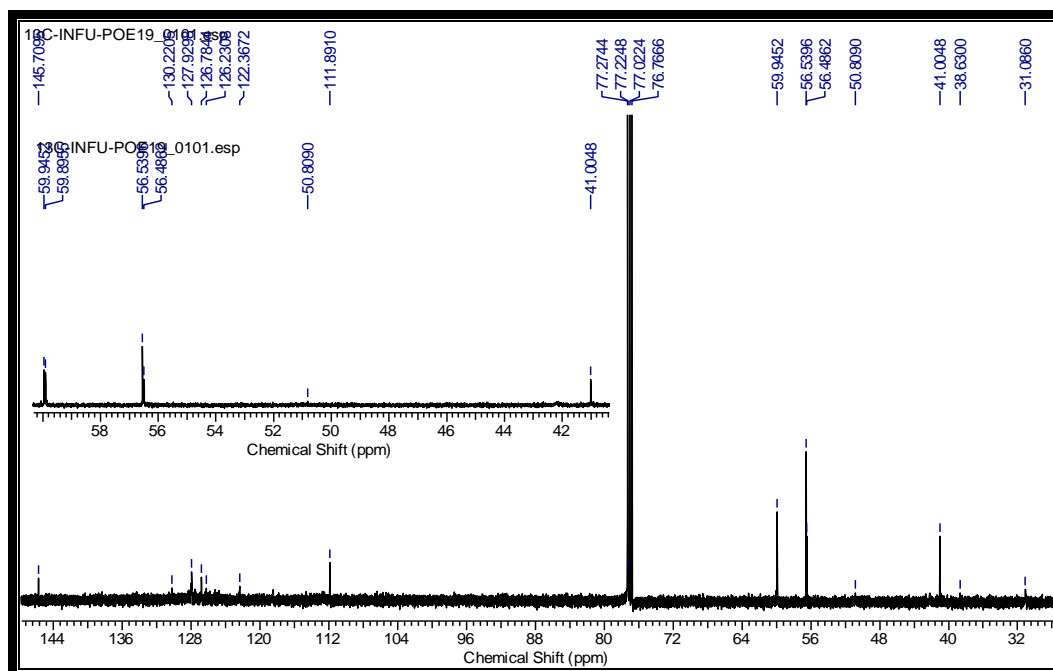


Figure 32: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE19

De tout ce qui précède, nous avons déduit la structure **126** pour POE19, correspondant à celle de la *N*-méthylurabaine déjà isolée par Gabriel et *al.*, 1987.

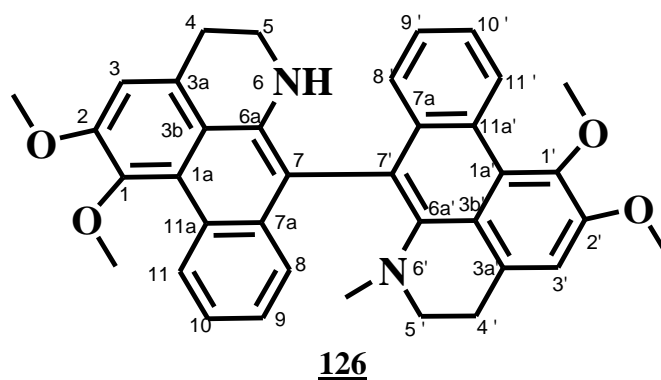


Tableau XXI: Comparaison des données de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) et RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de POE19 126 avec celles de la *N*-méthylurabaine : ^1H (400 MHz, CDCl_3) et ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Gabriel et al., 1987)

Positions C	POE19 <u>126</u>		N-méthylurabaine	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1		145,7 (s)		146,1
1'		145,7(s)		146,1
1a		125,2 (s)		125,8
1a'		126,2 (s)		126,3
1b		118,4 (s)		118,8
1b'		122,3(s)		121,4
2		145,7(s)		151,3
2'		145,7 (s)		151,2
3	7,08 (s)	111,9(d)	7,03 (s)	112,2
3'	7,08 (s)	112,0(d)	7,03 (s)	112,7
3a		130,2 (s)		130,1
3a'		130,3 (s)		130,9
4	3,21-3,23 (m)	31,1 (t)	3,40-3,15 (m)	31,4
4'	3,21-3,23 (m)	29,1 (t)	3,40-3,15 (m)	29,8
5	3,23-3,40 (m)	41,0 (t)	3,40-3,15 (m)	41,2
5'	3,23-3,40 (m)	50,8 (t)	3,40-3,15 (m)	50,6
6a		140,0 (s)		139,2
6a'		142,0 (s)		144,8
7		118,4 (s)		118,1
7'		122,4 (s)		122,7
7a		133,0 (s)		133,8
7a'		134,0 (s)		134,7
8	7,30(d, 8,05)	127,9 (d)	7,21 (d, 7,9)	127,9
8'	7,16(d, 8,05)	127,5 (d)	7,12 (d, 7,9)	127,4
9	7,30(d, 8,05)	126,2 (d)	7,20 (t, 7,2)	127,2
9'	7,17(d, 8,05)	126,7 (d)	7,17 (t, 7,2)	126,8
10	7,36(t, 8,05)	125,1 (d)	7,29 (t, 7,1)	125,0
10'	7,36(t, 8,05)	125,2 (d)	7,42 (t, 7,1)	125,2
11	9,75 (d, 8,4)	127,3 (d)	9,66 (dd, 8,0; 2,5)	122,3
11'	9,67 (d, 8,4)	127,3 (d)	9,61 (dd, 8,0; 2,5)	124,4
11a		123,9 (s)		124,0
11a'		126,0 (s)		125,8
12	4,05 (s)	56,4 (q)	4,00 (s)	56,8
12'	4,00 (s)	59,8 (q)	3,97 (s)	60,0
13	4,07 (s)	59,9 (q)	4,07 (s)	60,0
13'	4,06 (s)	56,5 (q)	4,06 (s)	56,8
N-Me	2,60 (s)	41,0		42,0

II.2.4.3. Détermination de la structure de POE30 ou 8 α - polyveolinone 127

Le composé POE30 est obtenu sous forme d'huile claire. Il réagit positivement au test de Dragendorff, caractéristique des alcaloïdes. Son pouvoir rotatoire est ($[\alpha]_D^{26} +118,6^\circ$ (c 6,6, CH₂Cl₂)).

Son spectre IR présente des bandes de vibration caractéristiques d'un noyau aromatique (1618 et 1595 cm⁻¹), d'un groupement amine (3300 cm⁻¹) et d'un groupement carbonyle (1695 cm⁻¹).

Sur son spectre de masse en APCI-TF (figure 33) à haute résolution en mode positif, on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 338,2487, suggérant la formule moléculaire C₂₃H₃₂NO, renfermant 9 insaturations.

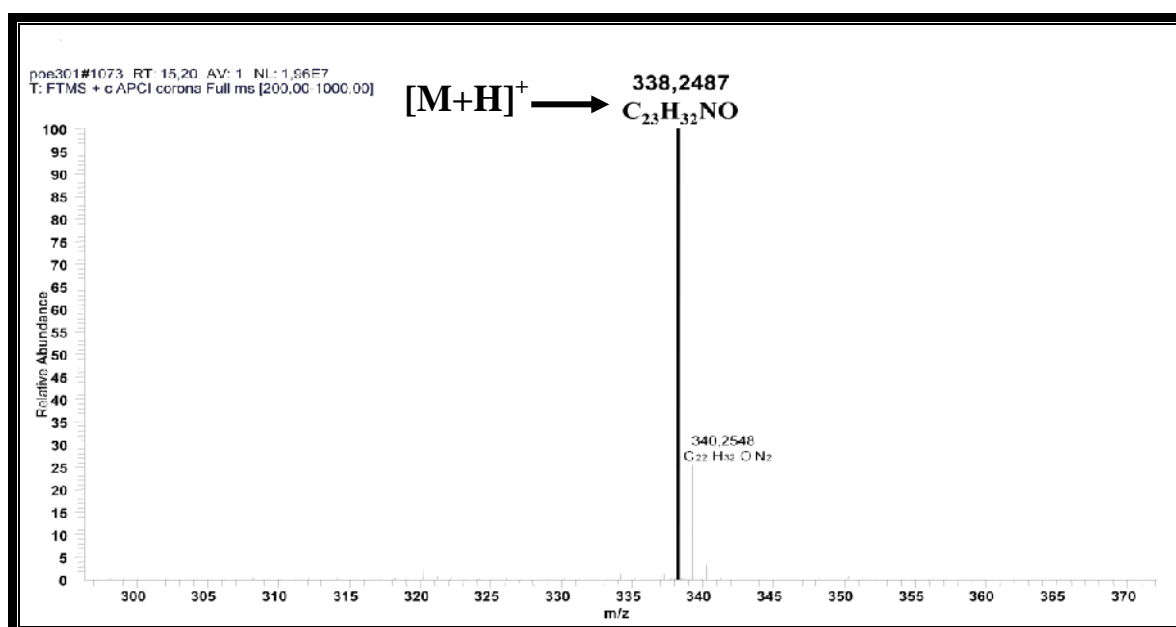
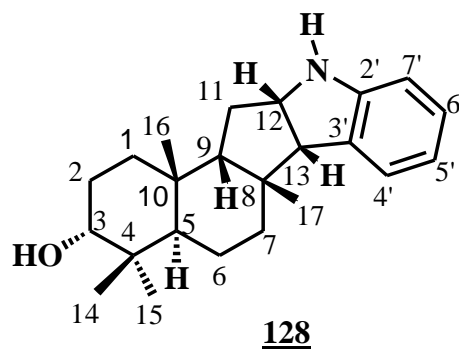


Figure 33: Spectre de masse à HR-APCI du composé POE30

L'analyse de son spectre de RMN ¹³C (figure 34) fait ressortir vingt trois signaux d'atomes de carbones dont quatre correspondant aux groupements méthyles (δ_C 19,8, 23,8, 29,2 et 22,6), six quaternaires, cinq secondaires et huit tertiaires. Ces informations sont confirmées sur le spectre de RMN ¹H dont l'analyse révèle la présence de quatre groupements méthyles à δ_H 1,08 (3H, s, H-15), 0,89 (3H, s, H-16) et 0,80 (6H, s H-14 et H-17) et deux groupements méthynes à δ_H 4,73 (1H, ddd, 2,0 7,7, 9,5, H-12) et 3,50 (1H, d, 9,5, H-13). De plus sur ce spectre de RMN ¹H, on observe des signaux à δ_H 7,26 (1H, d, 7,2, H-4'), 7,40 (1H, dd, 7,2, 7,2, H-5'), 7,40 (1H, dd, 7,2 et 6,4 H-6') et 7,55 (1H, d, 6,4, H-7') caractéristiques d'un noyau aromatique 1,2-disubstitué. Toutes ces données sont similaires à celles décrites

dans la littérature pour un indolosesquiterpène (Hocquemiller et *al.*, 1981; Okorie, 1981). L'analyse des spectres de RMN 2D (COSY, HMQC (tableau XXII) et HMBC (schéma 10)) nous a permis de suggérer que POE30 a une structure très proche de celle de la polyveoline **128** (Riche et *al.*, 1980).



Le composé POE30 est donc de la classe des indolosesquiterpènes fréquemment isolés des espèces du genre *Polyalthia* (Hamonniere et *al.*, 1977; Ngantchou et *al.*, 2010). Les signaux à δ_H 4,73 et 3,50 sont attribuables aux protons H-12 et H-13. Par ailleurs, l'absence du signal d'un oxyméthine à environ δ_H 3,40 sur le spectre de RMN 1H nous a permis de suggérer en le localisant un groupe carbonyle en C-3. Ceci est confirmé sur le spectre de RMN ^{13}C (figure 35) où on observe un signal à δ_C 219,7 attribuable au carbonyle d'une cétone cyclique.

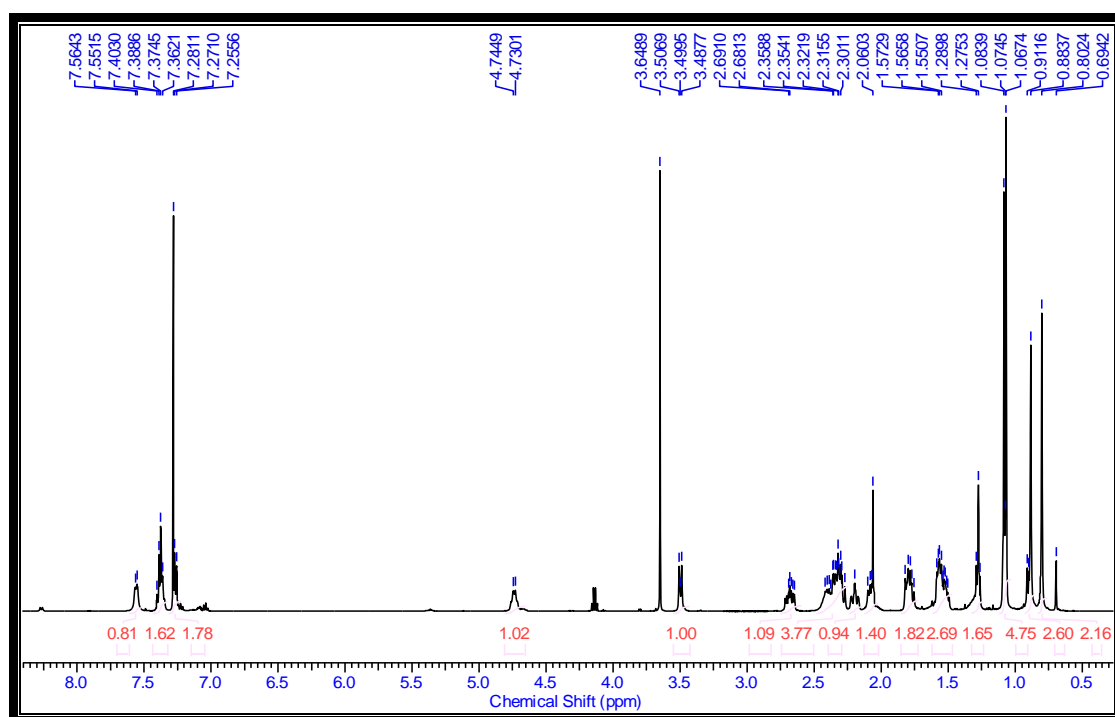


Figure 34: Spectre de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) du composé POE30

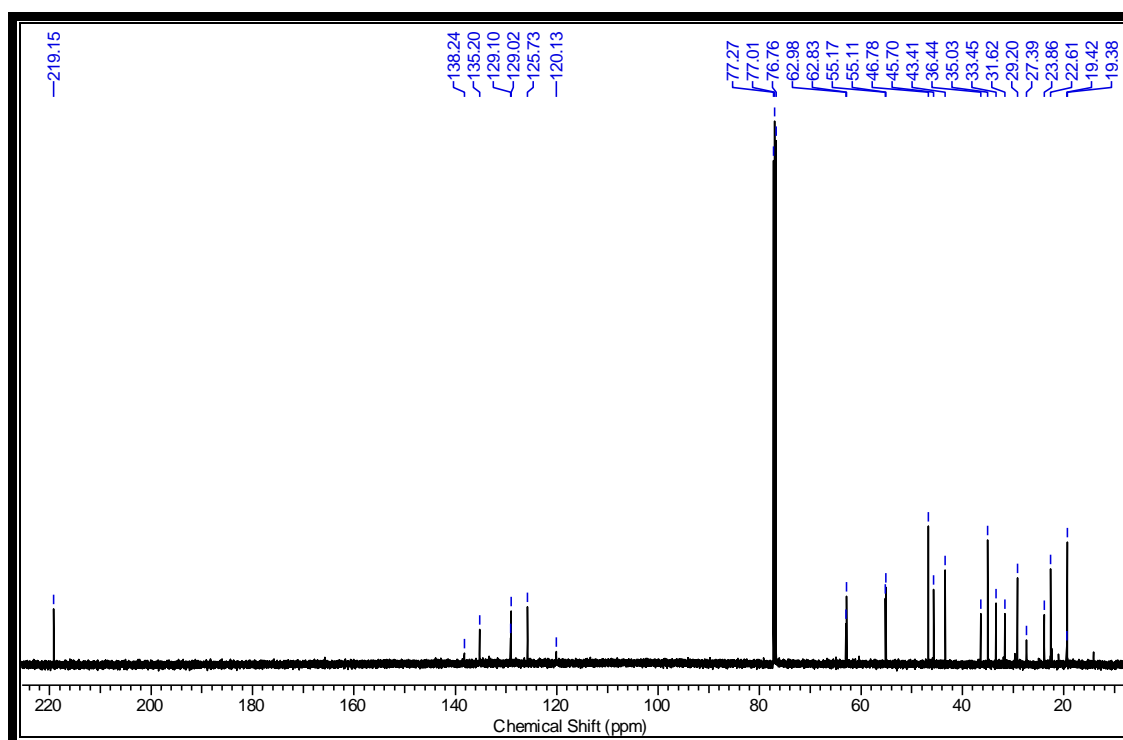
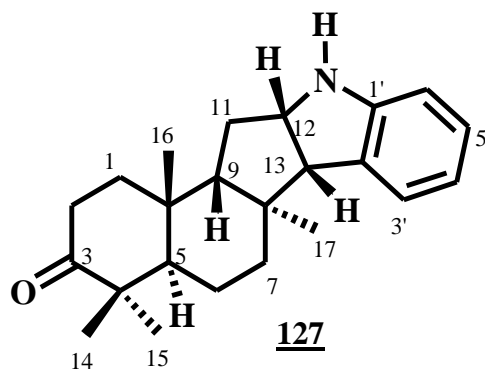


Figure 35: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE30

La configuration relative de cet indolosesquiterpène nouveau a été élucidée grâce aux expériences NOESY (schéma 12). En effet, l'effet NOE a été observé aussi bien entre CH_3 -16, CH_3 -14, H-9, H-12 et H-13 et qu'entre CH_3 -15, CH_3 -17 et H-5 confirmant ainsi l'orientation des substituants dans le composé POE30. Les spectres COSY, HMQC et HMBC ont permis l'attribution complète des données de RMN ^1H et ^{13}C .

De tout ce qui précède, nous avons établi pour POE30 la structure (**127**) ci-dessous. C'est un composé nouveau auquel nous avons proposé le nom 8α -polyveolinone pour signifier la différence avec la configuration 8β de la polyveoline(**128**).



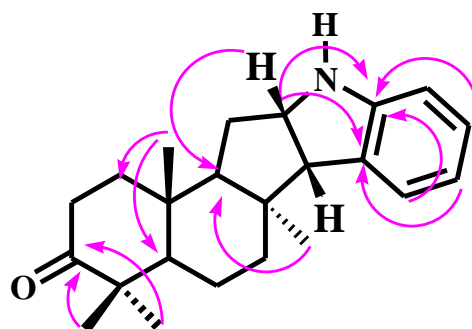


Schéma 11: Quelques corrélations HMBC du composé POE30

II.2.4.4. Détermination de la structure de POE27 ou *N*-acétyl-8 α -polyveolinone 129

Le composé POE27 est obtenu sous forme de cristaux de couleur brune dans le mélange hexane-acétate d'éthyle. Il est soluble dans le chloroforme et fond entre 199 et 203°C.

L'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 380, 2592 observé sur le spectre de masse (figure 36) en APCI (haute résolution) est en accord avec la masse moléculaire calculée pour la formule $C_{25}H_{34}NO_2$ (calcd. 380,2589) renfermant 10 insaturations.

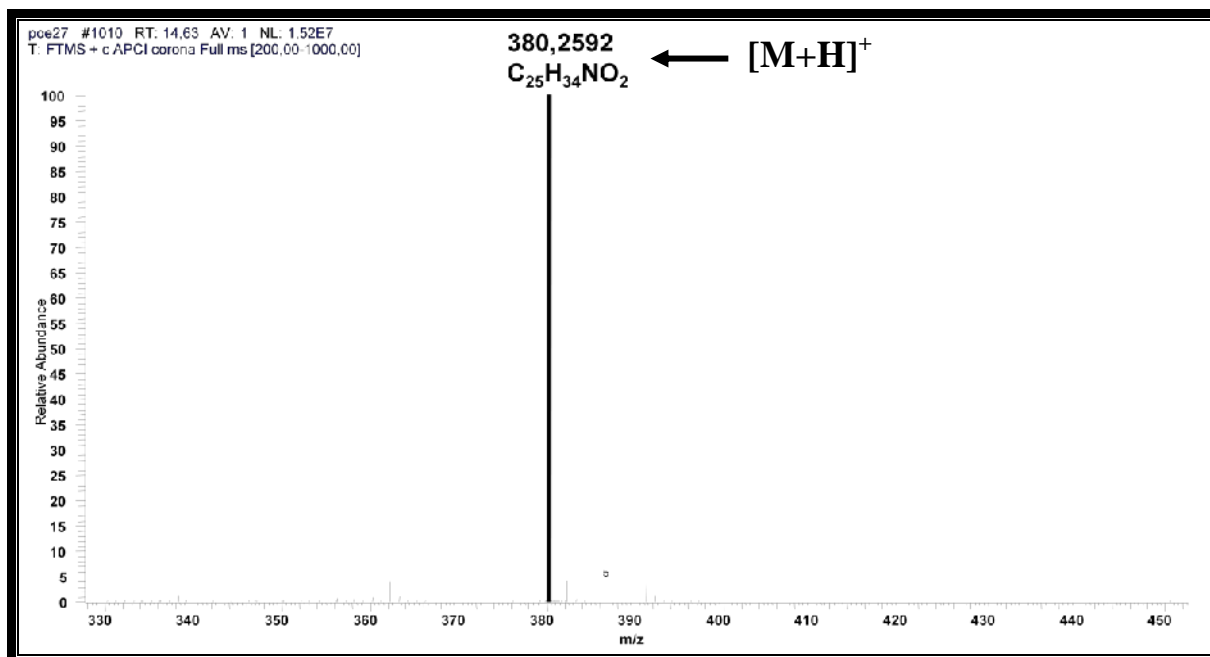


Figure 36: Spectre de masse à HR-APCI du composé POE27

L'analyse comparée des spectres UV, IR, de RMN ^1H et ^{13}C de POE27 et POE30 nous a permis de ressortir le même squelette indolosesquiterpène pour POE27.

En effet le spectre IR de POE27 montre une large bande d'absorption à 1656 cm^{-1} , attribuable au groupement carbonyle des amides. Ceci est confirmé sur le spectre RMN ^{13}C , où on observe un signal à $\delta_{\text{C}} 170,1$.

Sur le spectre de RMN ^1H (figure 37), on observe un signal à $\delta_{\text{H}} 2,26$ (3H, s) attribuable aux protons du méthyle d'un groupement acétyle. Cette information est corroborée sur le spectre de RMN ^{13}C (figure 38) de POE27 par le signal à $\delta_{\text{C}} 24,9$ attribuable au groupement méthyle.

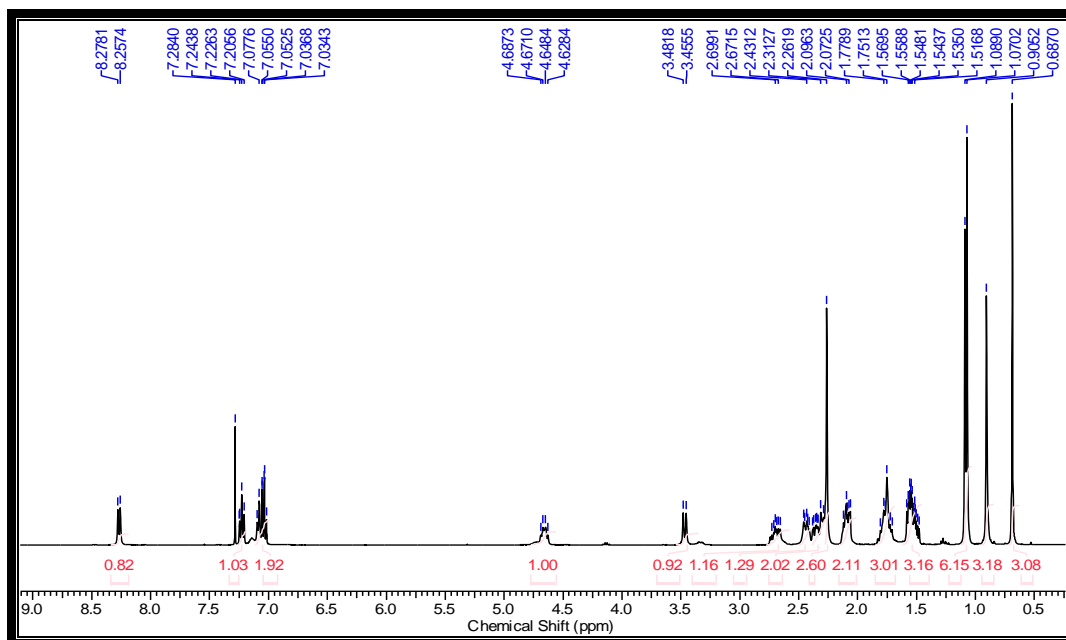


Figure 37: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE27

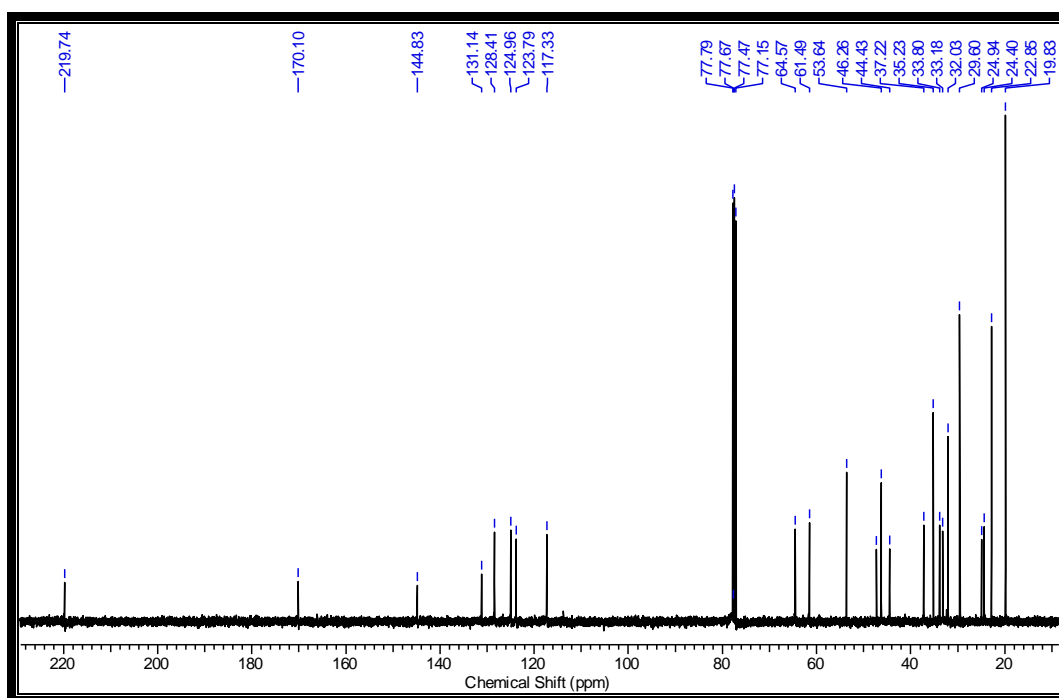


Figure 38: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE27

La position du groupement acétyle a été révélée sur le spectre HMBC (figure 39) par la corrélation longue distance entre le signal du proton à δ_{H} 4,65 (1H, m) (aminométhine) et le carbonyle de l'amide à δ_{C} 170,1. De plus, l'hydrolyse acide de POE27 a conduit à la formation de POE27h de même point de fusion que POE30.

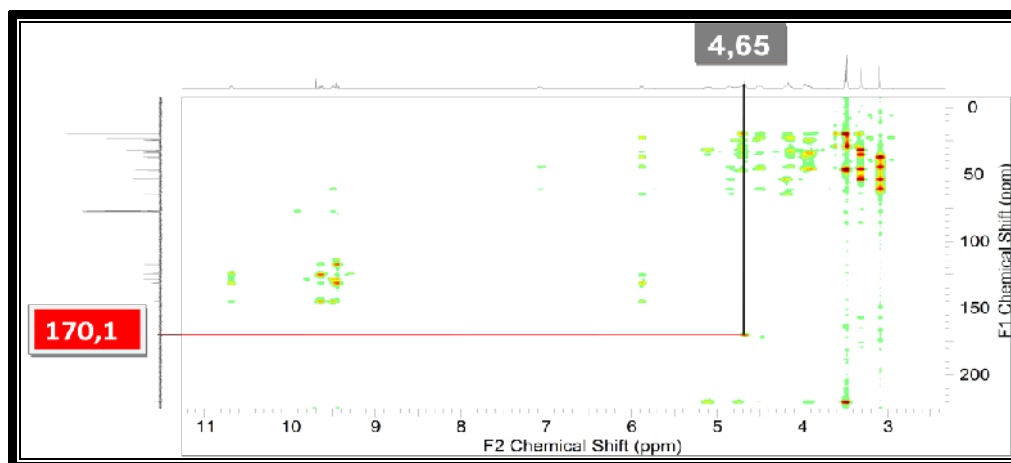
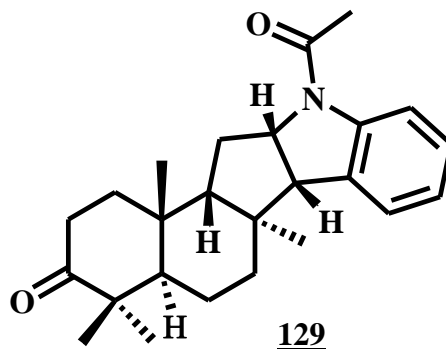


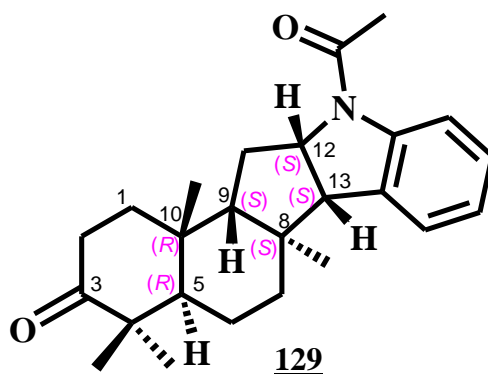
Figure 39: Spectre HMBC du composé POE27

De tout ce qui précède, nous avons attribué à ce composé nouveau la structure **129** et lui avons donné le nom *N*-acétyl-8 α -polyveolinone. Cette structure a été confirmée sans ambiguïté par l'analyse des données cristallographiques obtenues par diffraction des rayons-X sur monocristal. Cette analyse montre que le monocristal appartient au système

orthorhombique, de groupe spatial $P2_12_12_1$ et de coordonnées: $a = 12,1238(7) \text{ \AA}$, $b = 12,5887(7) \text{ \AA}$, $c = 13,4898(9) \text{ \AA}$, $V = 2058,9(2) \text{ \AA}^3$, $z = 4$. La structure cristalline de POE27 est représentée par la figure 41. POE27 est donc une cétone épimère en C-8 de la polyveoline 128. Sur la base de la même origine biogénétique et de leurs données RMN, nous avons proposé la même configuration absolue pour POE27 et POE30.



Les courbes expérimentales et théoriques obtenues sur le spectre de dichroïsme circulaire (figure 48) montrent clairement la configuration (5*R*, 8*S*, 9*S*, 10*R*, 12*S*, 13*S*) pour POE27.



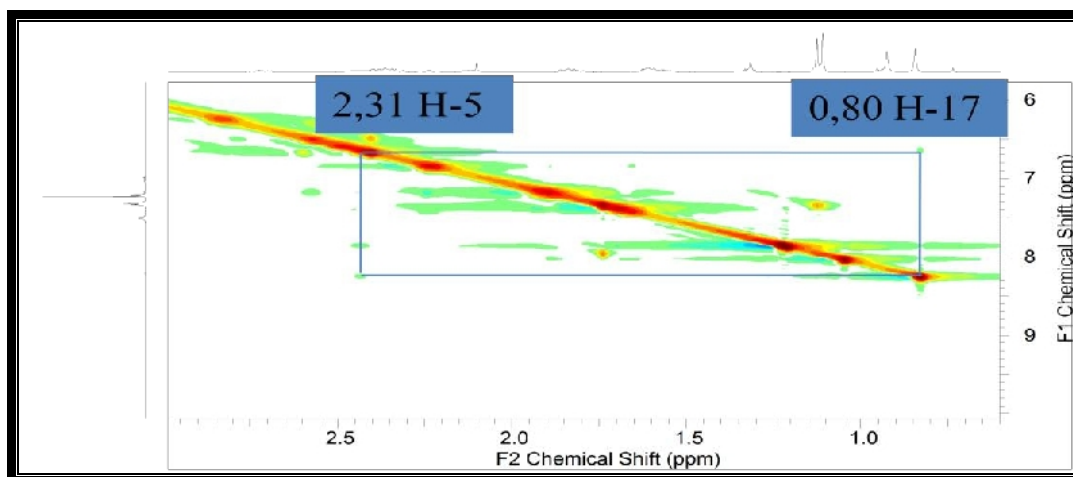


Figure 40: Spectre NOESY des composés POE30 et POE27

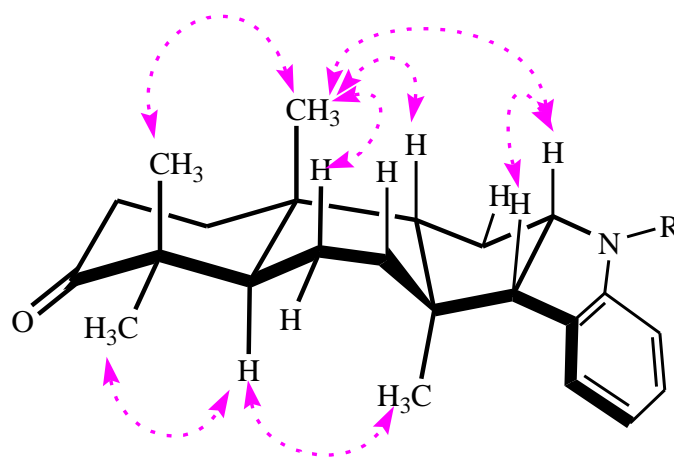


Schéma 12: Quelques corrélations NOESY des composés POE30 et POE27

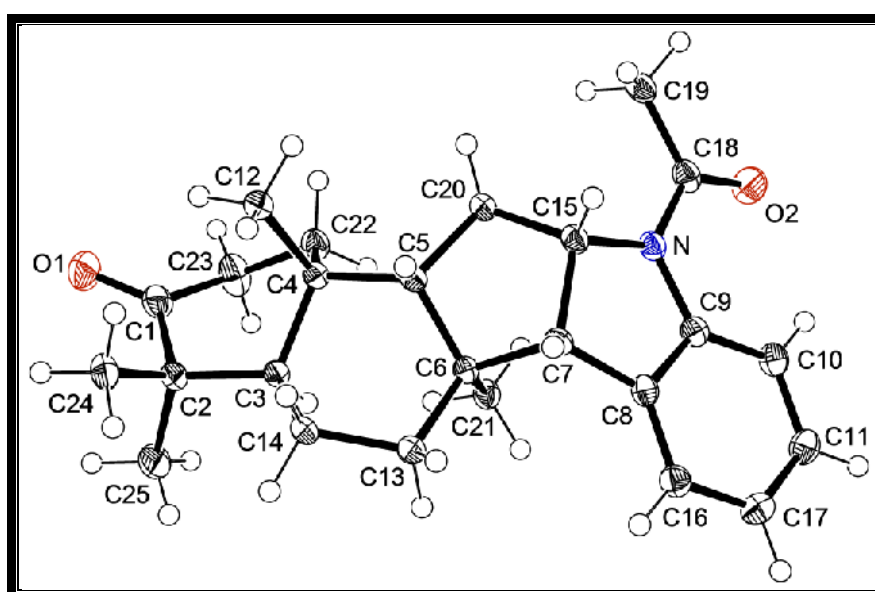


Figure 41: Image ORTEP de la molécule de POE27

II.2.4.5. Détermination de la structure de POE5 ou *N*-acétyl polyveoline 130

Obtenu sous forme de cristaux marron, le composé POE5 est soluble dans le chloroforme et fond entre 225 et 229 °C.

Son spectre de masse à HR-APCI (figure 42) montre le pic de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 382,2738 en accord avec la formule moléculaire $C_{25}H_{36}NO_2$ renfermant neuf insaturations.

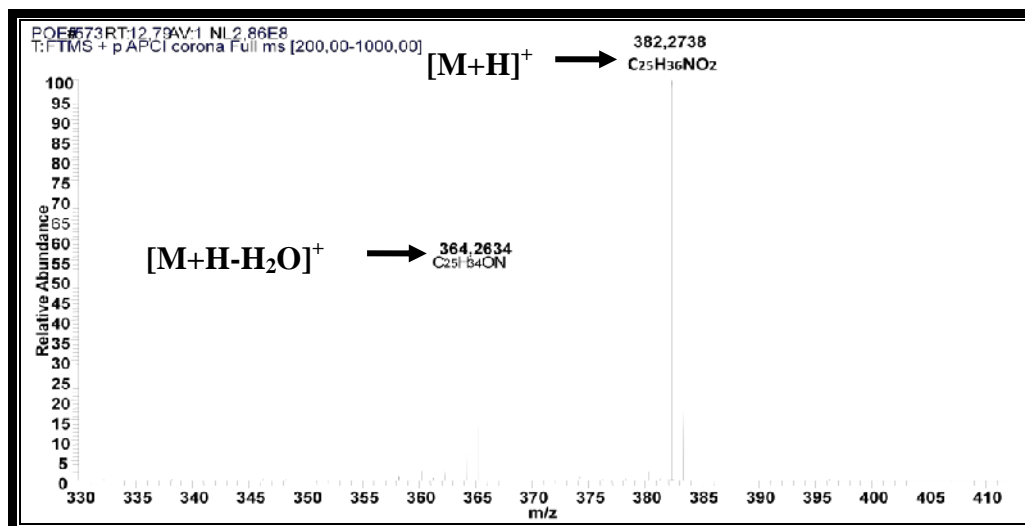


Figure 42: Spectre de masse à HR-APCI du composé POE5

Les bandes d'absorption à 3310 et 1665 cm^{-1} sur le spectre IR sont caractéristiques respectivement d'un groupement hydroxyle et d'un groupement carbonyle des amides.

Les données de RMN 1H et ^{13}C de POE5, POE27 et POE30 sont presque identiques (Tableau XXII). La différence réside au niveau des deux singulets à δ_H 3,40 (oxyméthine) et 2,25 (groupement acétyle) observés sur le spectre de RMN 1H de POE5 mais absents sur celui de POE27 et POE30 respectivement.

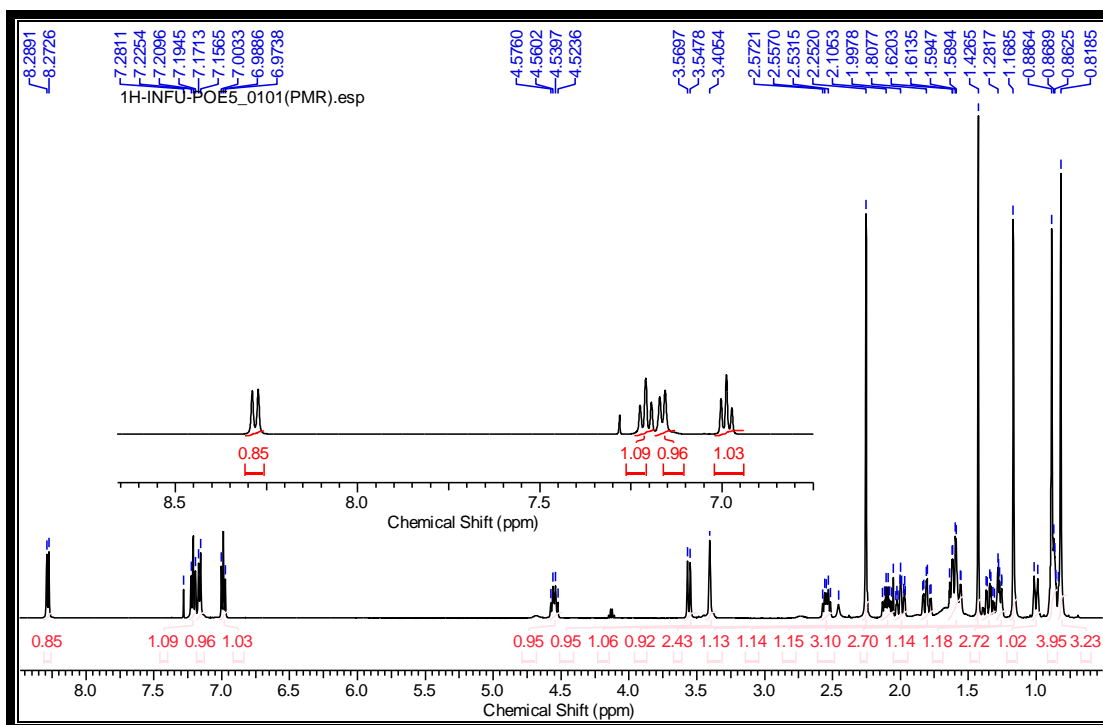


Figure 43: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE5

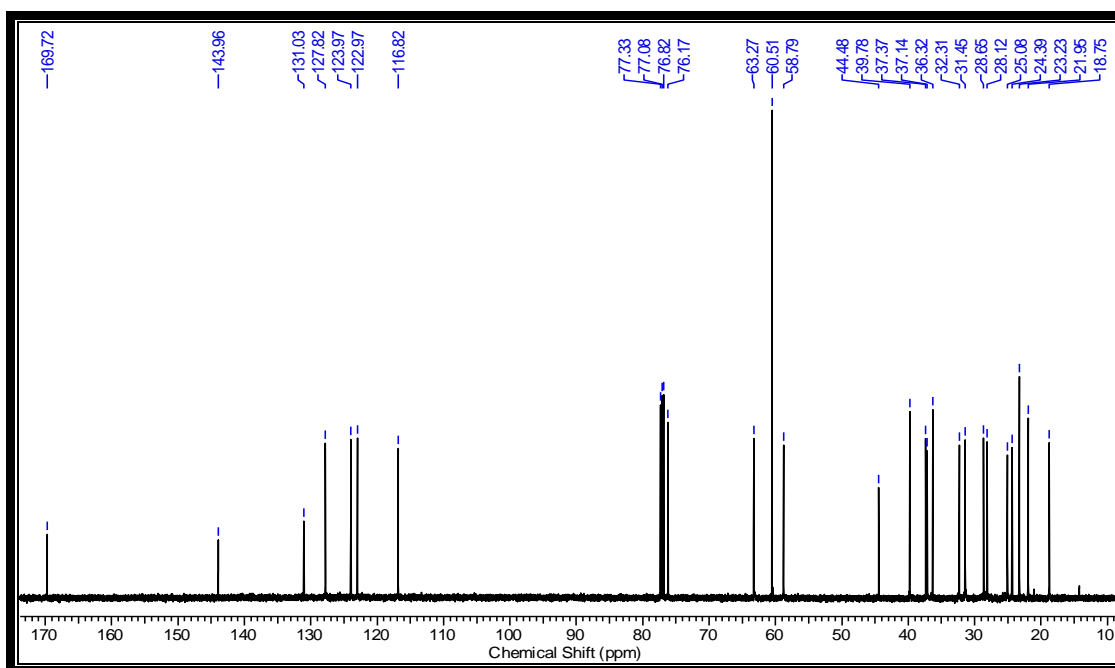


Figure 44: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE5

L'analyse des données spectrales COSY et HMBC (figure 45) de POE5 nous a permis d'établir que ce composé possède la même base structurale que POE27 et POE30. Ainsi, POE5 serait aussi un indolesquiterpène. On observe toujours sur le spectre HMBC une

tache de corrélation entre le proton à δ_H 3,40 et les deux méthyles à δ_C 21,9 (CH₃-14) et 28,1 (CH₃-15). Ce qui montre que le groupement carbonyle observé dans POE27 et POE30 a été réduit en alcool secondaire. Cette information est confirmée par la réaction d'acétylation de POE5 (schéma 21) dans le mélange anhydride acétique et pyridine qui a conduit à un indolosesquiterpène diacétylé.

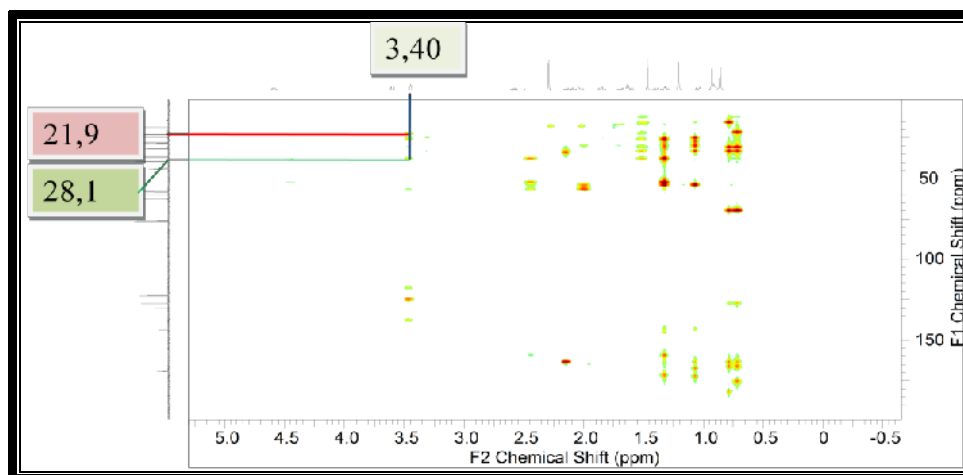
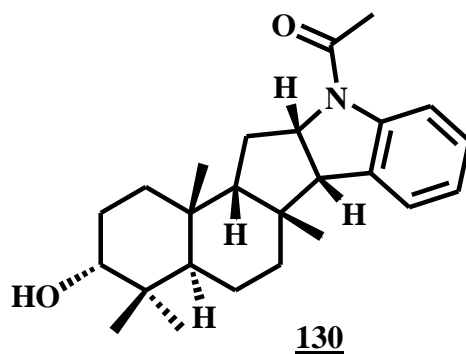


Figure 45: Spectre HMBC du composé POE5

La comparaison des données de RMN ¹H et ¹³C de POE27 et POE5 montre des différences (tableau 22) pour CH₃-17 (δ_H 0,69/ δ_C 22,8 pour POE27 et 1,42/28,6 pour POE5) et H-5 (δ_H 2,31/ δ_C 46,2 pour POE27 et 1,60/39,7 pour POE5), suggérant une configuration différente en C-8. Donc POE5 serait un épimère en C-8 de POE27 et POE30. Ceci est confirmé par les taches de corrélations observées sur le spectre NOESY (figure 45 et schéma 14) entre les méthyles CH₃-14, CH₃-16, CH₃-17 et les protons H-3 et H-9 d'une part et d'autre part entre le méthyle CH₃-15 et le proton H-5. Par ailleurs, la valeur de la constante de couplage pour H-3 ($J \sim 0$ Hz) nous a permis d'orienter le groupement hydroxyle en position α sur le carbone C-3.

De toutes ces analyses, nous avons attribué à POE5 la structure **130** qui est celle de la *N*-acétylpolyveoline.

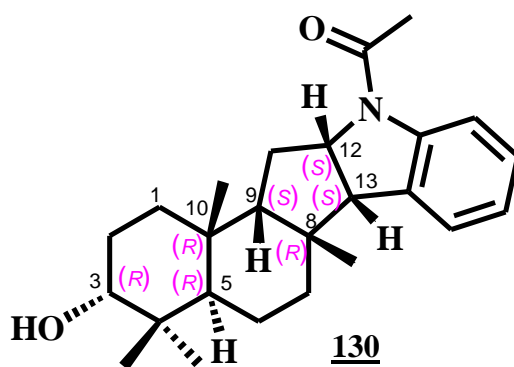


Cette structure est confirmée par l'analyse des données cristallographiques obtenues par diffraction des rayons X sur monocristal de POE5. Cette analyse montre que le monocristal appartient au système monoclinique, de groupe spatial $P2_1$ et de coordonnées: $a = 9,9085(3)$, $b = 7,3530(2)$, $c = 14,9480(5)$ en angström, $V = 1048,58(5) \text{ \AA}^3$, $z = 2$. La structure cristalline de POE5 est représentée par la figure 47.

Selon toujours cette analyse, la configuration relative de POE5 est la même que celle de la polyveoline (Hocquemiller et *al.*, 1981).

Notons que ce composé a été décrit à tort comme composé connu isolé des tiges de *Polyalthia suaveolens* par Okorie (1981). Mais aucune donnée expérimentale n'a été publiée jusqu'ici (Ngantchou et *al.*, 2010).

Les courbes expérimentales et théoriques obtenues sur le spectre de dichroïsme circulaire (figure 47) montrent clairement la configuration (3*R*, 5*R*, 8*R*, 9*S*, 10*R*, 12*S*, 13*S*) pour POE5.



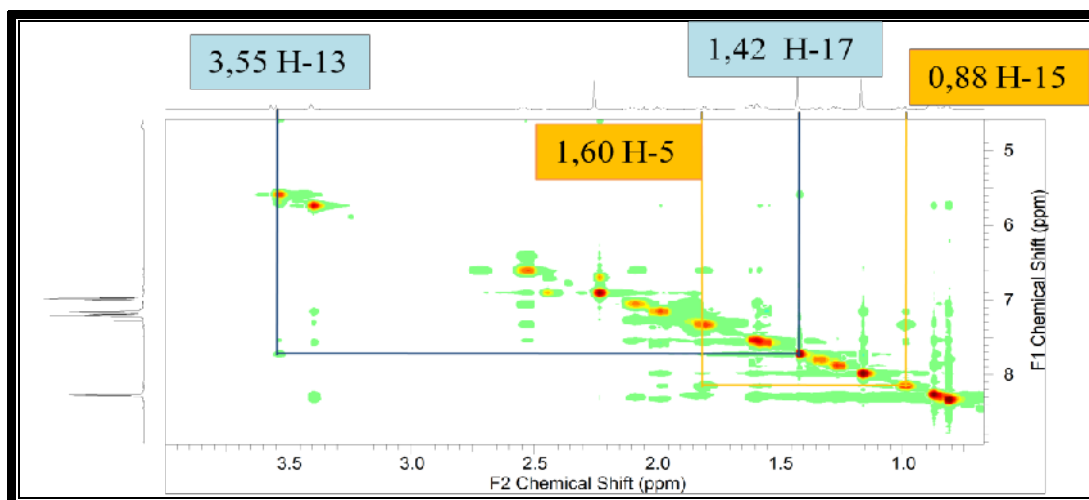


Figure 46: Spectre NOESY du composé POE5

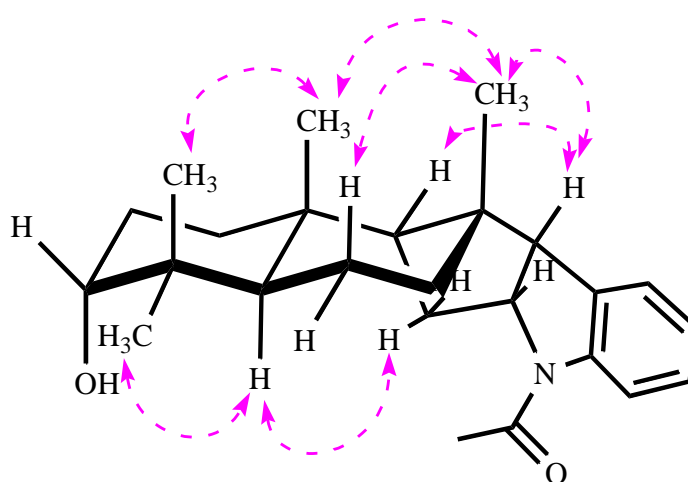


Schéma 13: Quelques corrélations NOESY du composé POE5

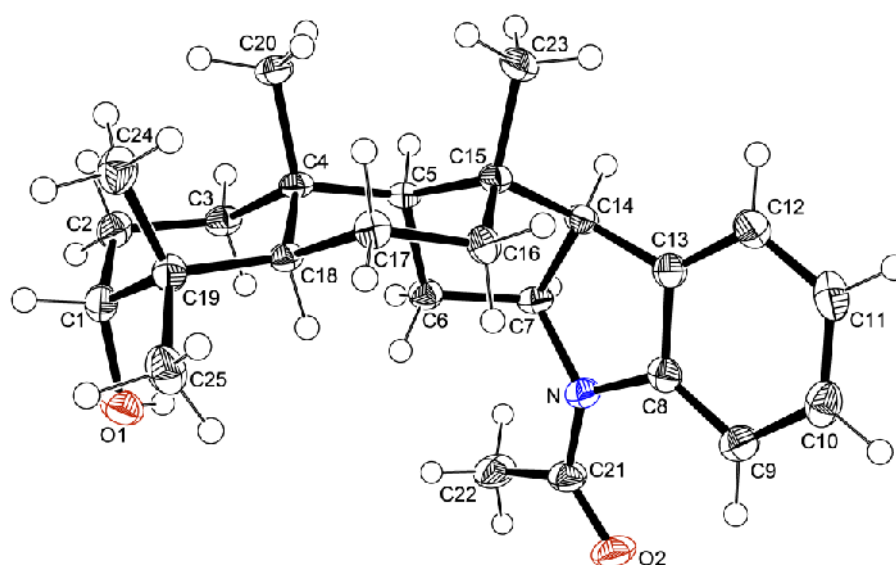


Figure 47: Image ORTEP de la molécule de POE5

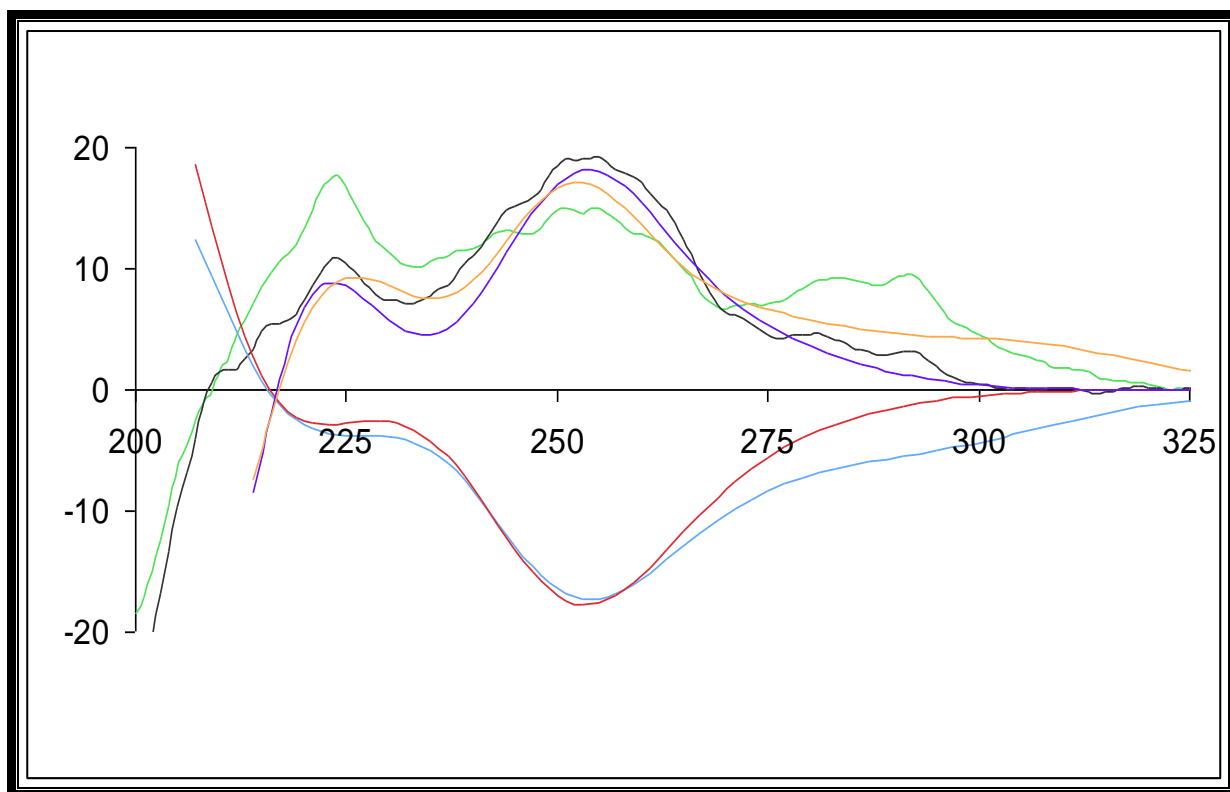


Figure 48: Spectre DC de: — *N*-acétyl-8 α -polyveolinone (POE27 129) et — *N*-acétyl-polyveoline (POE5 130); Spectre DC de POE27 (—) et POE5 (—), DFT calculés à partir des conformations dans le crystal de POE27 (—) et de POE5 (—).

Tableau XXII: Données de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) et RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de POE30 (127), POE27 (129), POE5 (130) et polyveoline (128) (360/90 MHz, CDCl₃) (Riche et al., 1980).

No	8α-Polyveolinone<u>127</u>		N-acetyl- 8α-polyveolinone<u>129</u>		N-acetyl Polyveoline<u>130</u>		Polyveoline <u>128</u>
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_C
1	1,51 (m); 2,20 (m)	31,6	1,52 (m); 2,08 (m)	32,0	1,00 (dt, 2,7,13,0) 1,80 (td, 3,2,13,6)	31,4	31,7
2	2,34 (m); 2,67 (m)	35,0	2,35 (m) 2,70 (m)	33,8	1,55 (m) 2,00 (tt, 3,0, 13,6)	25,0	25,0
3		219,1		219,7	3,40(ls)	76,1	76,4
4		46,7		47,2		37,3	36,3
5	2,31 (m)	45,7	2,31 (m)	46,2	1,60(m)	39,7	39,6
6	1,56 (m)	19,3	1,55 (m)	19,8	1,27 (m); 1,34 (m)	18,7	18,6
7	1,79 (m) 2,08 (m)	36,4	1,79 (m) 2,09 (m)	37,2	0,86 (m)	32,3	31,2
8		43,4		44,4		44,4	44,6
9	1,79 (m)	55,1	1,75 (m)	53,6	1,59 (ls)	60,5	61,1
10		35,0		35,2		36,3	44,3
11	2,39	27,3	2,44	33,1	2,09 (m); 2,54 (m)	37,1	37,1
12	4,73(ddd, 2,0, 7,7, 9,5)	62,9	4,65 (ddd, 1,7, 7,7, 10,5)	64,5	4,54 (ddd, 2,6, 7,7, 10,9)	63,2	61,1
13	3,50(d, 9,5)	62,8	3,46 (d, 10,5)	61,5	3,55 (d, 10,9)	58,7	37,2
14	0,80 (s)	19,3	1,07 (s)	19,8	0,82 (s)	21,9	23,2
15	1,08 (s)	29,2	1,08 (s)	29,6	0,88 (s)	28,1	28,2
16	0,89 (s)	23,8	0,91 (s)	24,4	1,16 (s)	23,2	21,9
17	0,80 (s)	22,6	0,69 (s)	22,8	1,42 (s)	28,6	28,1
2'		138,2		144,8		143,9	152,2

Tableau XXII: Données de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) et RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de POE30 (127), POE27 (129), POE5 (130) et polyveoline (128) (Riche et *al.*, 1980) (suite et fin).

3'		135,1		131,1		131,0	127,5
4'	7,26 (d, 7,2)	125,7	7,08(dd, 7,2, 1,0)	125,0	7,15 (d, 7,3)	123,9	124,3
5'	7,40(dd, 7,2, 7,2)	129,0	7,04 (ddd, 7,2, 7,2, 1,2)	123,7	6,98 (dd, 7,3,7,3)	122,9	117,6
6'	7,40 (dd, 7,2, 6,4)	129,0	7,24 (ddd, 7,2, 8,2, 1,0)	128,4	7,21 (dd, 7,3, 8,0)	127,8	127,5
7'	7,55 (d, 6,4)	12,1	8,26 (dd, 8,2, 1,2)	117,3	8,27 (d, 8,0)	116,8	108,8
<u>CH₃-CO</u>			2,26 (s)	24,9 170,1	2,25 (s)	24,3 169,7	

II.2.4.6. Origine biosynthétique des indolosesquiterpènes isolés (POE30 (127), POE27 (129), POE5 (130))

Le précurseur étant la 3-farnesyl indole **I** (schéma 14), la biosynthèse est initiée par l'époxydation pour donner l'intermédiaire (époxyde **II**) qui peut subir la cyclisation de Markovnikov pour donner le carbocation **III** (Marcos et *al.*, 2013). D'autres cyclisations, oxydations et acétylations du carbocation permettent d'obtenir la 8 α -polyveolinone 127, la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone 129 *N*-acétyl polyveoline 130 et la polyveoline. Le schéma 14 ci-dessous résume cette biosynthèse.

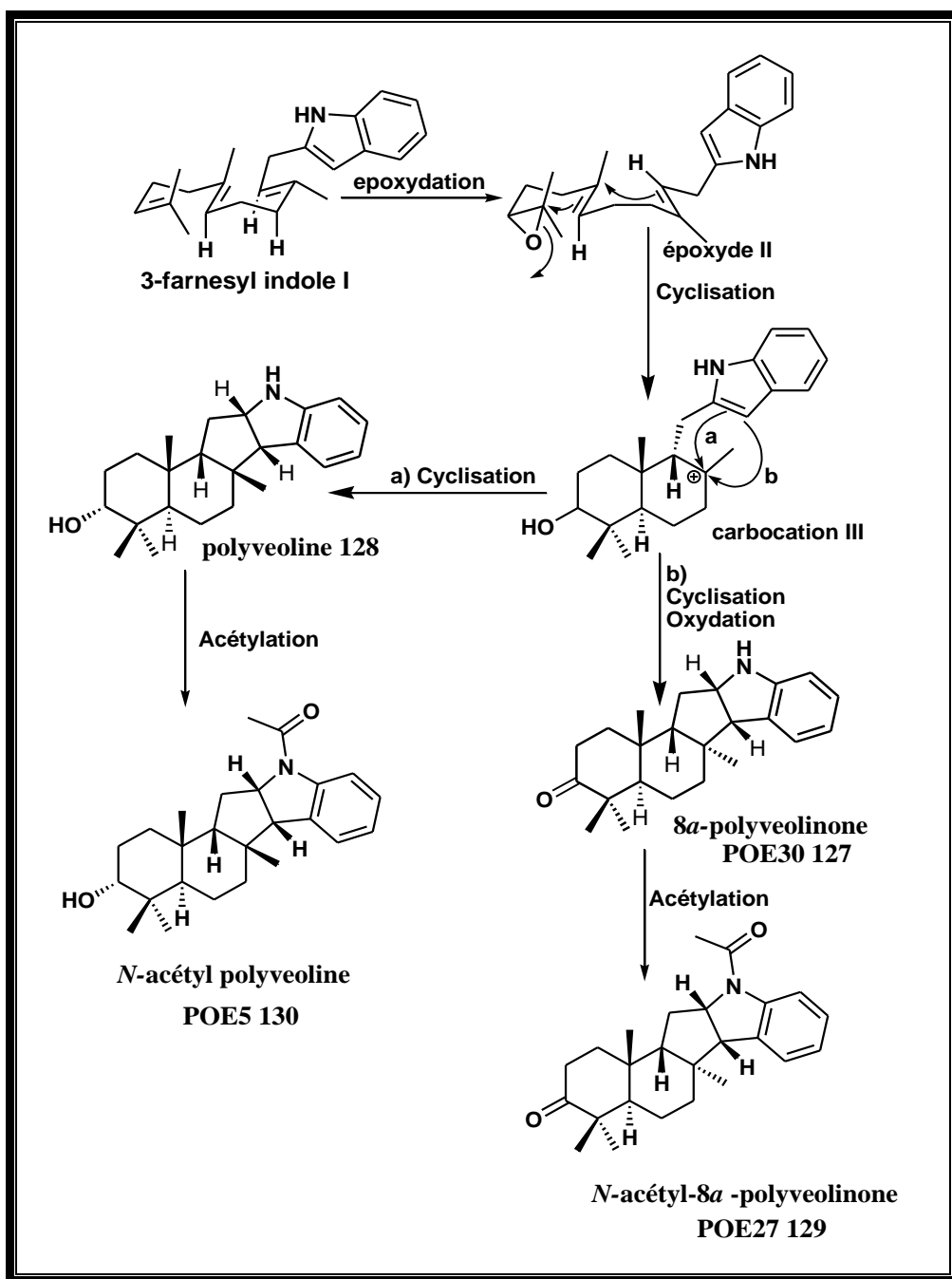


Schéma 14: Origine biosynthétique des indolosesquiterpènes isolés
(POE27 127, POE30 129 et POE5 130)

II.2.5. Les iridoïdes

II.2.5.1. Identification de CM07 ou 6α-hydroxygeniposide 131

Le composé CM07 est obtenu de *C. multiflorum* sous forme de poudre blanche dans le mélange Hexane-acétate. Il est soluble dans le chlorure de méthylène. Le test de Trim-Hill caractéristique des iridoïdes est positif pour ce composé. Le test de Molish l'est également. CM07 serait donc un iridoïde glycosilé.

Son spectre de masse ESI à haute résolution (figure 49) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 427,1208$ compatible avec la formule brute $C_{17}H_{24}O_{11}$ renfermant 6 insaturations.

Son spectre UV montre des bandes d'absorption maximales entre 233 et 235 nm, caractéristiques des iridoïdes (Atia et *al.*, 2009).

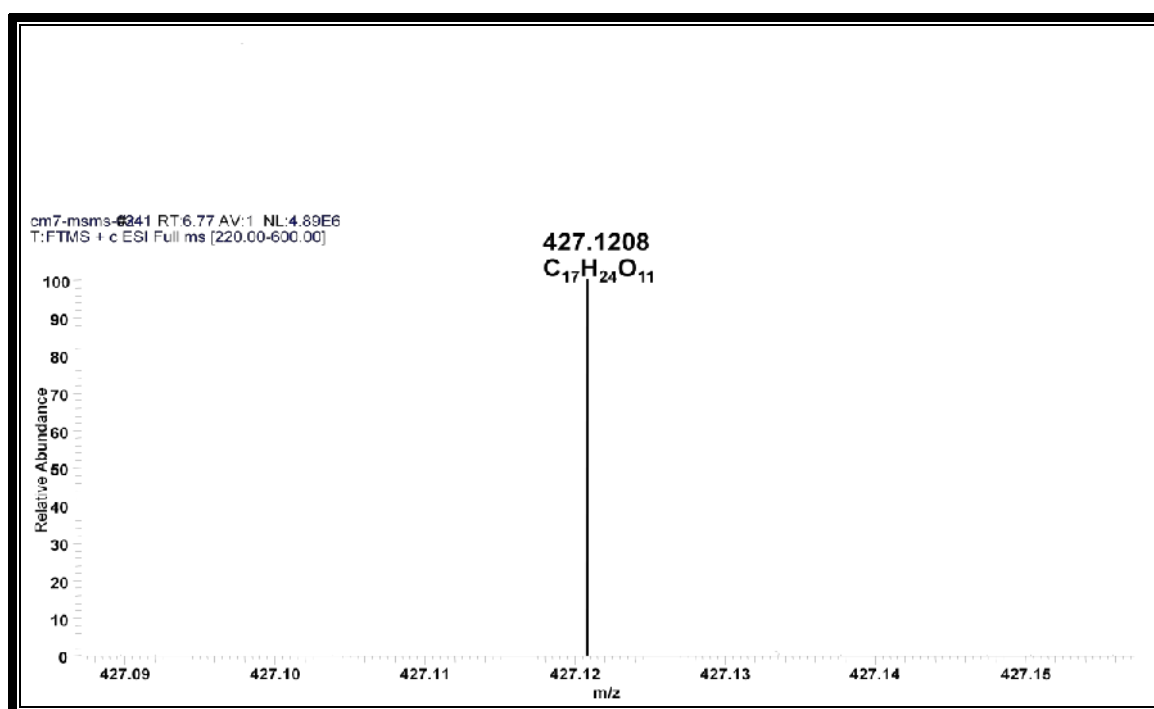


Figure 49: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM07

Son spectre IR présente des bandes d'absorption des groupements hydroxyles entre 3100 et 3440 cm^{-1} , d'un carbonyle des esters à 1710 cm^{-1} et des doubles liaisons à 1630 cm^{-1} . Ceci est confirmé sur le spectre de RMN ^{13}C (figure 50) où on observe un signal à $\delta_{\text{C}} 170,3$ attribuable au carbonyle d'un groupe ester. Toujours sur ce spectre, on observe:

- Des signaux à $\delta_{\text{C}} 153,1, 146,4, 129,2$ et $109,8$ tous attribuables aux carbones oléfiniques;
- Un ensemble de signaux entre $\delta_{\text{C}} 61,0$ et $80,6$ attribuables aux oxyméthynes et suggérant la présence d'un sucre dans la structure de CM07;
- Un signal à $\delta_{\text{C}} 99,0$ caractéristique du carbone anomère du glucoside;
- Un signal à $\delta_{\text{C}} 52,3$ attribuable à un groupement méthoxyle.

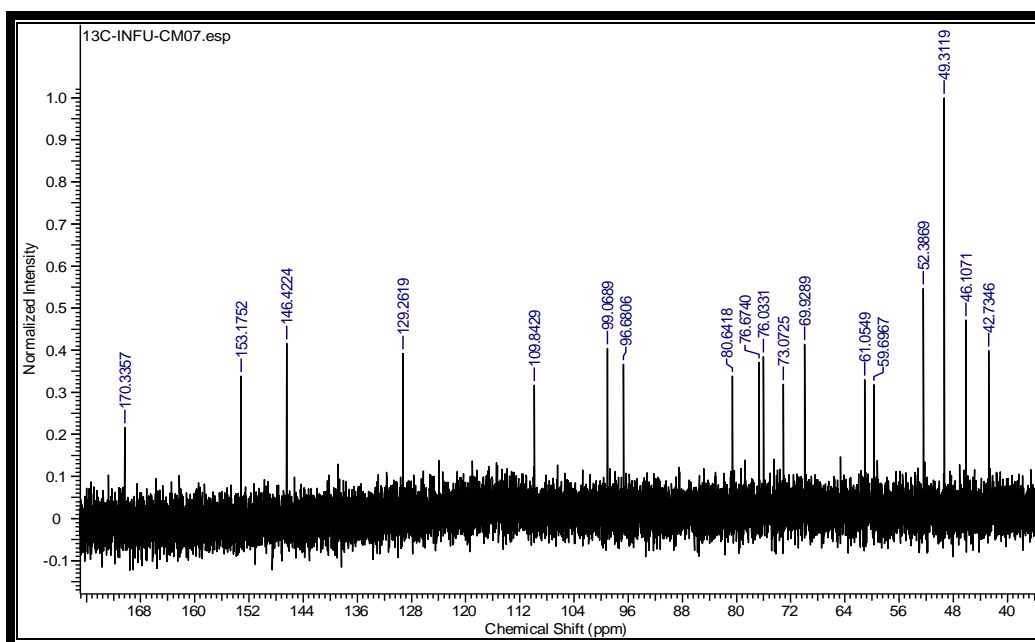


Figure 50: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé CM07

Sur le spectre de RMN ^1H (figure 51) du composé CM07, on observe deux singulets d'un proton chacun respectivement à δ_{H} 7,69 et 6,02 attribuables aux protons oléfiniques. On observe également sur ce spectre un signal à δ_{H} 3,70 (3H, s) attribuable aux protons du groupement méthoxyle. Les deux signaux à δ_{H} 4,40 (1H, d, 15,6) et à 4,23 (1H, d, 15,6) sont attribuables aux protons géminés et diastérotopiques. Cette information est confirmée sur le spectre HMBC par les taches de corrélation entre chacun de ces deux protons et les carbones à δ_{C} 146,4, 129,2 et 46,1.

Toujours sur ce spectre on observe un signal à δ_{H} 4,92 (1H, d, 9,1) attribuable au proton du groupement dioxyméthyne ou acétal (H-1). De plus on observe un signal à δ_{H} 4,77 (1H, d, 8,0) caractéristique du proton anomère et confirmant ainsi la présence du sucre.

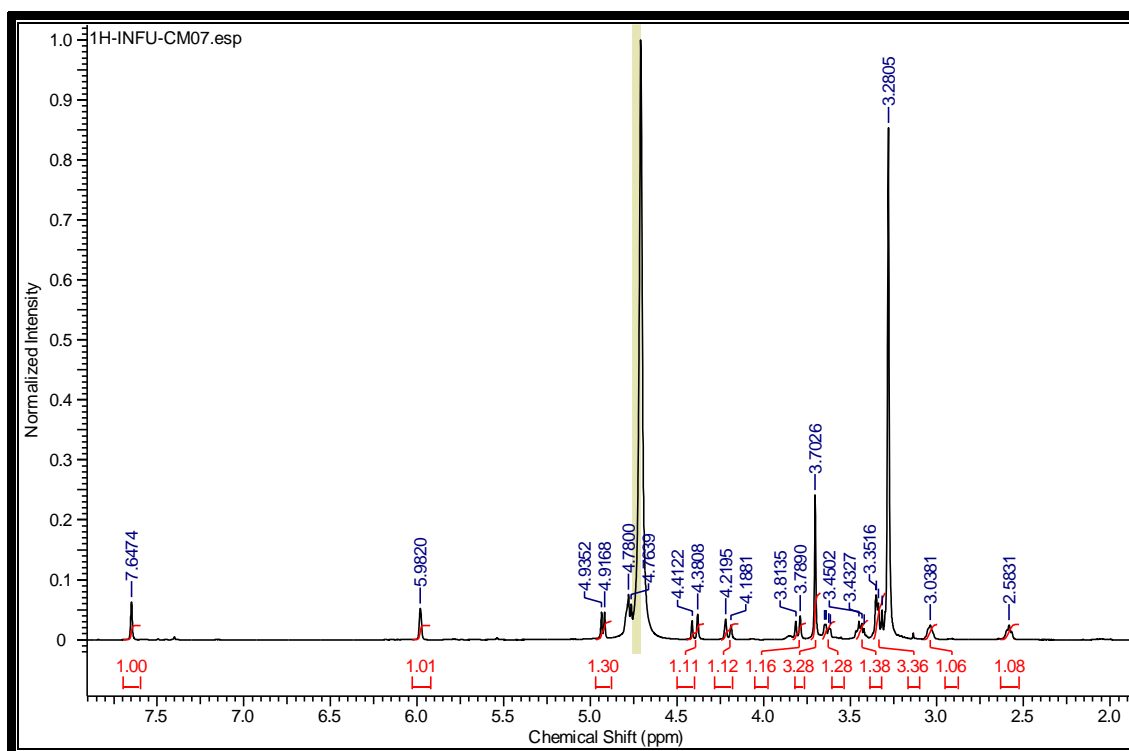
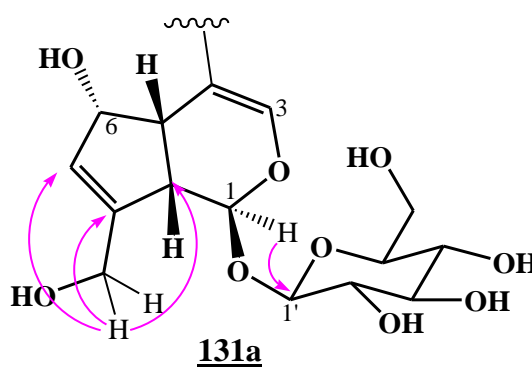


Figure 51: Spectre de RMN ^1H (500MHz, D_2O) du composé CM07

Sur le spectre HMBC (figure 52), la tache de corrélation entre le proton à δ_{H} 4.92 et le carbone anomère à δ_{C} 99,0 nous a permis de fixer le sucre en position C-1 d'où la sous structure (**131a**) suivante



Toujours sur le spectre HMBC, la tache de corrélation entre le proton oléfinique à δ_{H} 7,64 et le carbonyle des esters à δ_{C} 170,3 nous a permis de fixer le groupement méthyle ester sur le carbone C-4.

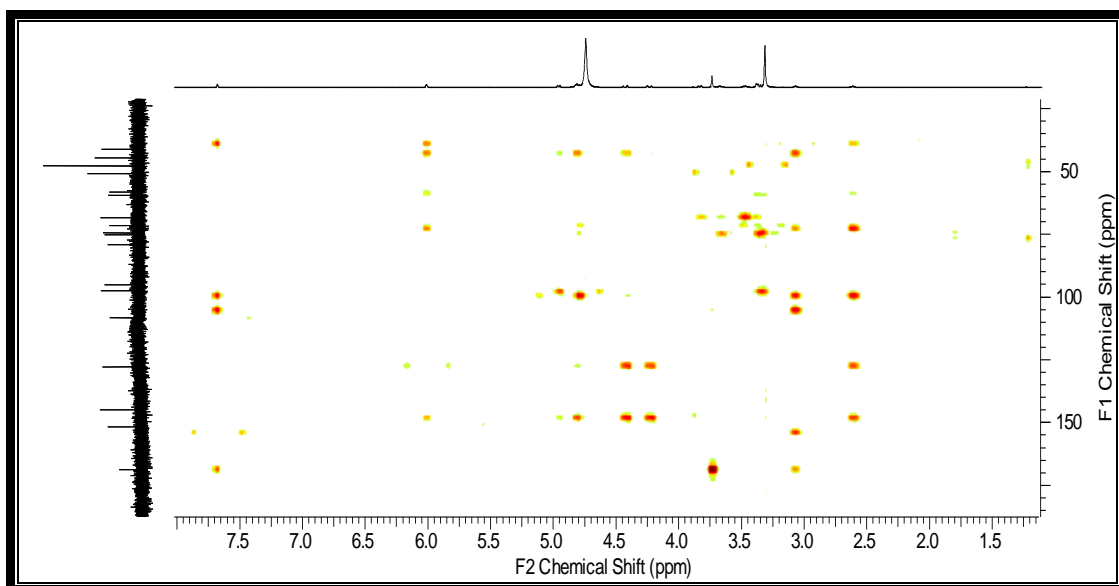
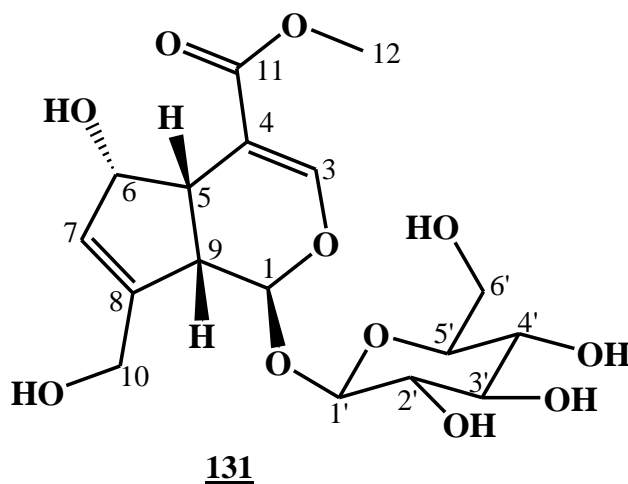


Figure 52: Spectre HMBC du composé CM07

L'ensemble des données spectrales comparées à celles de la littérature nous a permis d'attribuer à CM07 la structure **131** qui est celle de la 6 α -hydroxygeniposide déjà isolée de *Lamium amplexicaule* par Massao et *al.* en 2009.



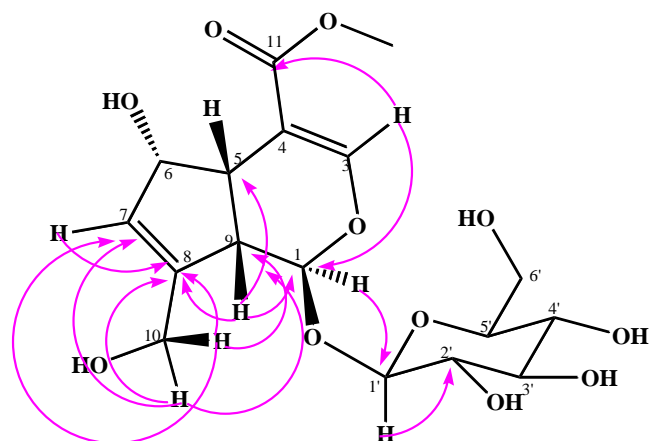


Schéma 15: Quelques corrélations HMBC du composé CM07

Tableau XXIII: Données de RMN ^1H (500 MHz, D_2O) et ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de CM07 131 comparées aux données de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) et ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de la 6 α -hydroxygeniposide (Massao et al., 2009).

Position	CM07 <u>131</u>		6 α -hydroxygeniposide	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1	4,92 (d, 9,1)	96,6 (d)	5,05 (d, 6,9)	101,5
3	7,64 (s)	153,1 (d)	7, 64 (s)	155,3
4		109,8 (s)		108,2
5	3,03 (m)	42,7 (d)	3,02 (m)	42,7
6	4,74 (d, 8,0)	73,0 (d)	4,79 (d, 5,6)	75,4
7	5,98 (s)	129,2 (d)	6,01 (s)	129,8
8		146,4 (s)		151,5
9	2,58 (m)	46,1 (d)	2,57 (m)	45,8
10	4,20 (d, 15,6) 4,40 (d, 15,6)	59,6 (t)	4,21 (d, 15,6) 4,45 (d, 15,6)	61,6
11		170,3 (s)		169,4
12	3,70 (s)	52,3 (q)	3,73 (s)	52,8
1'	4,77 (d, 8,0)	99,0 (d)	4,71 (d, 7,8)	100,5
2'	3,35 (m)	69,9 (d)	3,23 (m)	74,9
3'	3,45 (m)	76,6 (d)	3,37 (m)	78,5
4'	3,31 (m)	61,0 (d)	3,28 (m)	71,6
5'	3,32 (m)	80,6 (d)	3,33 (m)	77,8
6'	3,63 (dd, 2,0, 12,2) 3,80 (d, 12,2)	61,9 (t)	3,60 (dd, 11,9, 5,5) 3,85 (dd, 11,9, 2,0)	62,8

II.2.5.2. Identification de CM08 ou scandoside ester de méthyle 132

Le composé CM08 est obtenu sous forme de poudre blanche dans le mélange Hexane-acétate. Il est soluble dans le chloroforme. Il donne un test positif avec le réactif de Trim-Hill ainsi qu'avec le réactif de Molish caractéristique des iridoïdes glycosylés.

Son spectre de masse à HR-ESI (figure 53) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 427,1212$ compatible avec la formule brute $C_{17}H_{24}O_{11}$ renfermant 6 insaturations et identique à celle de CM07. Ce qui suggère que CM08 et CM07 seraient des isomères. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse du spectre de RMN ^{13}C (figure 54) de CM08 qui fait ressortir 17 signaux de carbones parmi lesquels un carbonyle des esters à δ_C 170,3, quatre carbones oléfiniques à δ_C 153,1, 146,4, 129,2 et 109,8 et deux carbones acétals à δ_C 99,0 et 96,7.

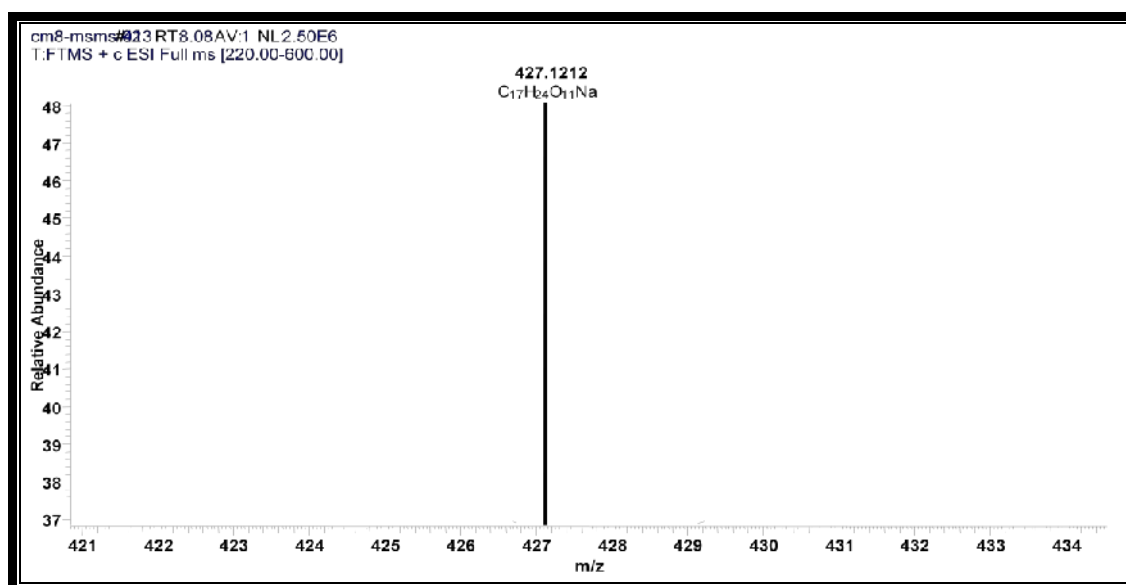


Figure 53: Spectre de masse en HRESI du composé CM08

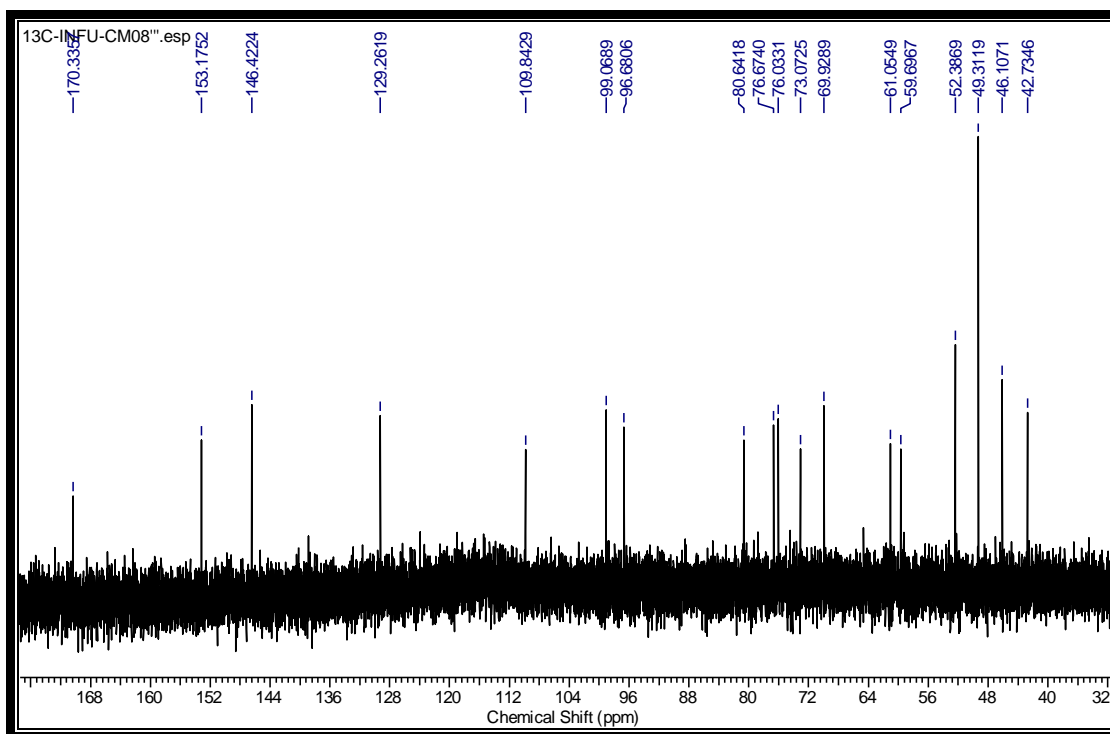


Figure 54: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé CM08

L'analyse comparée des spectres de RMN ^1H de CM08 (figure 55) et CM07 (figure 51) montre une grande similitude. La seule grande différence est le déplacement chimique du proton H-1 (δ_{H} 5,37) qui apparaît vers les champs faibles sur le spectre de CM08. La valeur de la constante de couplage de ce proton ($\sim 4,9$ Hz) comparée à celle obtenue sur le spectre de CM07 qui est de 9,1 Hz nous a permis de conclure que CM07 et CM08 sont des épimères en C-1.

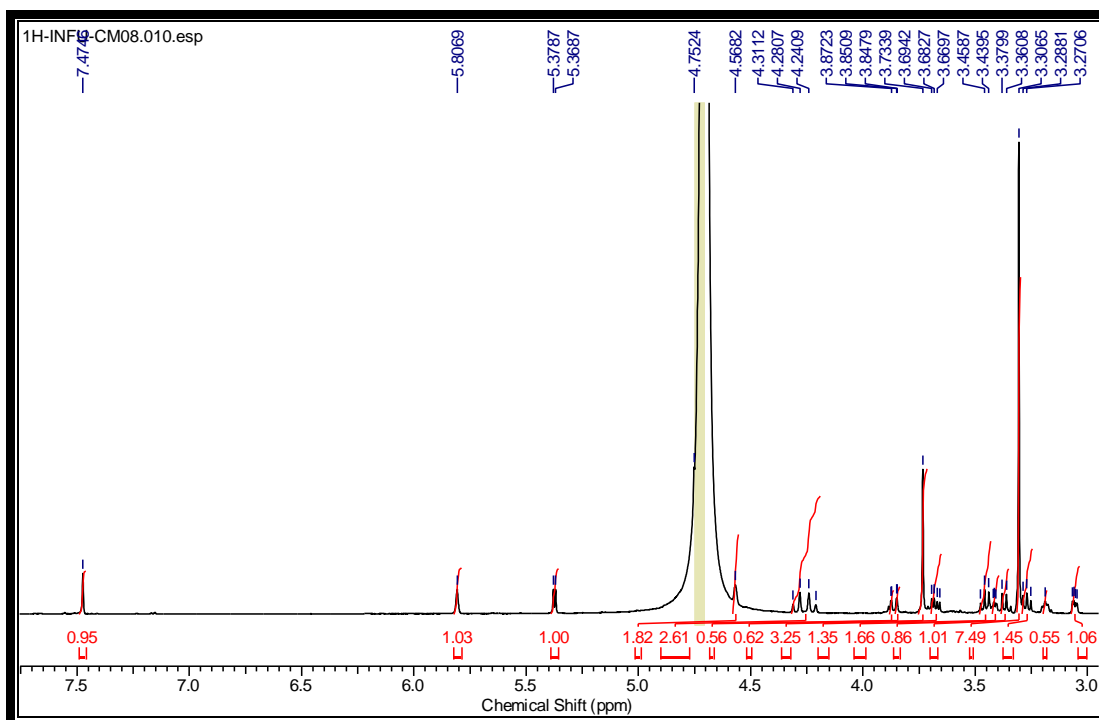
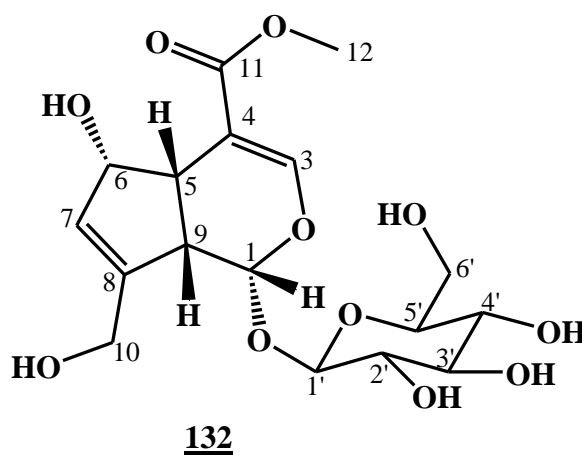


Figure 55: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, D_2O) du composé CM08

De tout ce qui précède, nous avons déduit la structure **132** pour CM08, correspondant à celle du deacetyl asperuloside méthyle ester (scandoside méthyle ester) déjà isolé de *Aitchisonia rosea* (Atia et al., 2009).



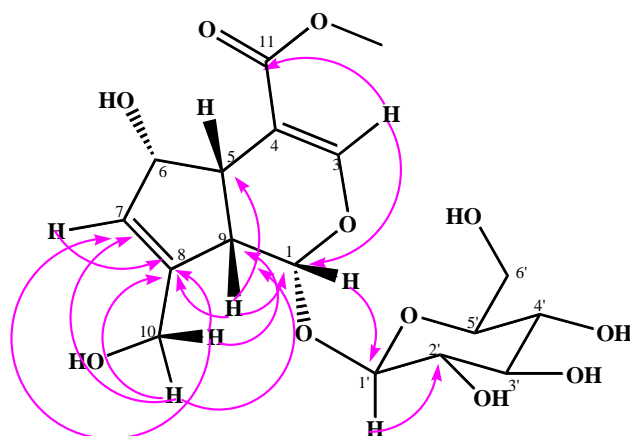


Schéma 16: Quelques corrélations HMBC du composé CM08

Tableau XXIV: Données de RMN ^1H (500 MHz, D_2O) et ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de CM08 132 comparées aux données de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) et ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) du deacétyl asperuloside ester de méthyle (scandoside ester de méthyle) (Atia et al., 2009).

Position	CM08 <u>132</u>		Scandoside ester de méthyle	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1	5,37 (d, 4,9)	96,7 (d)	5,05 (d, 6,9)	101,5
3	7,47 (s)	153,0 (d)	7, 64 (s)	155,3
4		109,8 (s)		108,2
5	3,05 (m)	42,7 (d)	3,02 (m)	42,7
6	4,56 (d, 8,0)	80,6 (d)	4,79 (d, 5,6)	75,4
7	5,80 (s)	129,1 (d)	6,01 (s)	129,8
8		146,4 (s)		151,5
9	3,18 (m)	46,1 (d)	2,57 (m)	45,8
10	4,23 (d, 15,0) 4,30 (d, 15,0)	59,6 (t)	4,21 (d, 15,6) 4,45 (d, 15,6)	61,6
11		170,3 (s)		169,4
12	3,73 (s)	52,3 (q)	3,73 (s)	52,8
1'	4,74 (d, 8,0)	99,0 (d)	4,71 (d, 7,8)	100,5
2'	3,33 (m)	69,9 (d)	3,23 (m)	74,9
3'	3,49 (m)	76,6 (d)	3,37 (m)	78,5
4'	3,40 (m)	61,0 (d)	3,28 (m)	71,6
5'	3,43 (m)	80,6 (d)	3,33 (m)	77,8
6'	3,71 (dd, 5,7, 12,6) 3,92 (d, 12,6)	61,0 (t)	3,60 (dd, 11,9, 5,5) 3,85 (dd, 11,9, 2,0)	62,8

II.2.5.3. Identification de CM09 ou acide deacétyl asperulosidique 133

Obtenu sous forme de cristaux jaune dans le mélange chlorure de méthylène-méthanol, le composé CM09 est soluble dans le méthanol et fond entre 130 et 134°C. Ses tests positifs avec les réactifs de Trim-Hill et de Molish montrent que CM09 est un iridoïde glycosilé.

Sur son spectre de masse en ESI à haute résolution (figure 56), on observe le pic de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 391,2916, compatible avec la formule brute $C_{16}H_{22}O_{11}$ renfermant 6 insaturations.

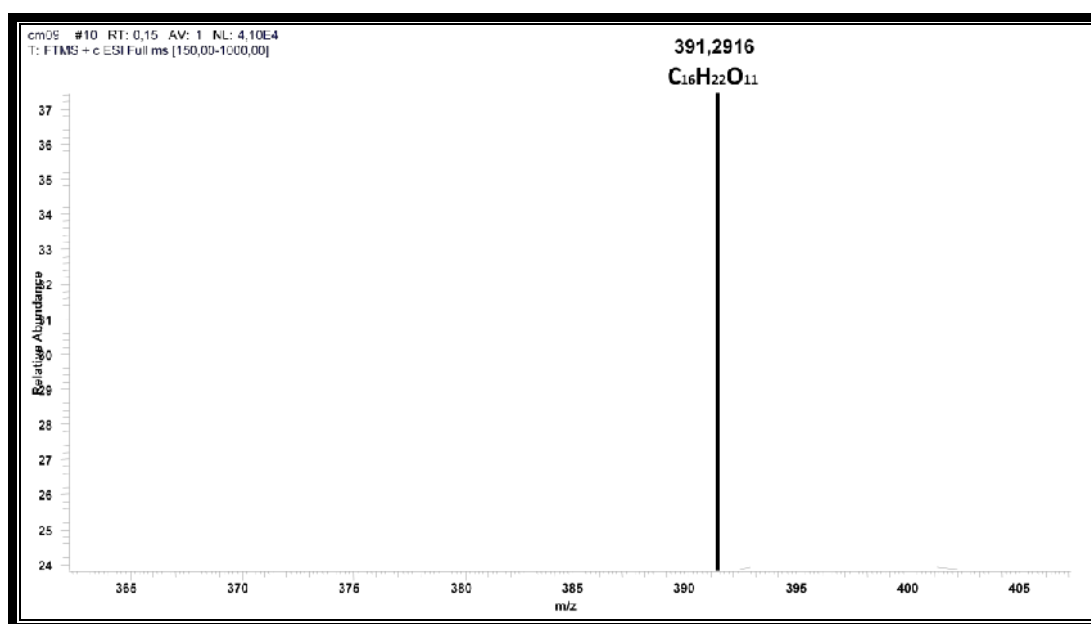


Figure 56: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM09

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C (figure 54) de CM09 fait ressortir les signaux de 16 carbones dont 03 quaternaires à δ_C 171,4, 107,1 et 149,6, 11 méthynes et 02 méthylènes. La comparaison de ce spectre à celui du composé CM08 nous a permis de constater l'absence du signal à δ_C 52,23 (-OCH₃) sur le spectre de CM09. Cette absence est confirmée par le léger déblindage du carbonyle dont le signal passe de δ_C 170,3 (ester) (CM08) à δ_C 171,4 (acide) (CM09).

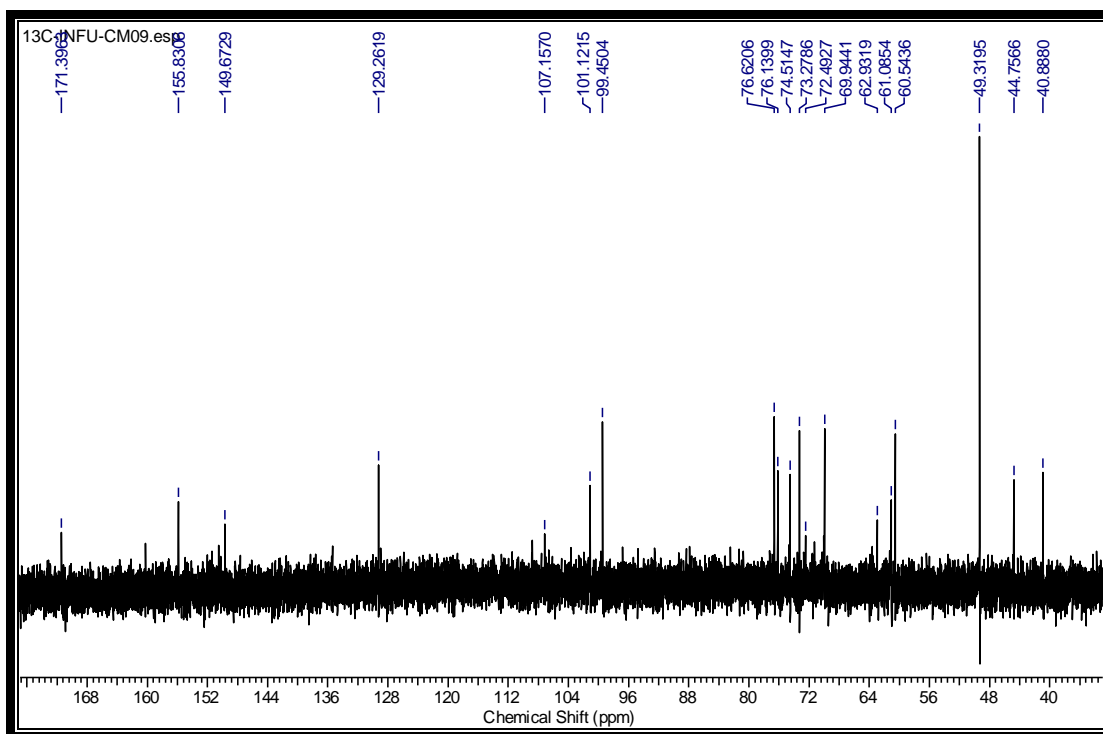


Figure 57: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé CM09

La superposition du spectre de RMN ^1H (figure 58) de CM09 à celui de CM08 révèle une grande similitude. Cependant sur le spectre de CM09, on constate l'absence du signal à δ_{H} 3,78 (3H, s) correspondant au groupement méthoxyle sur le spectre de CM08.

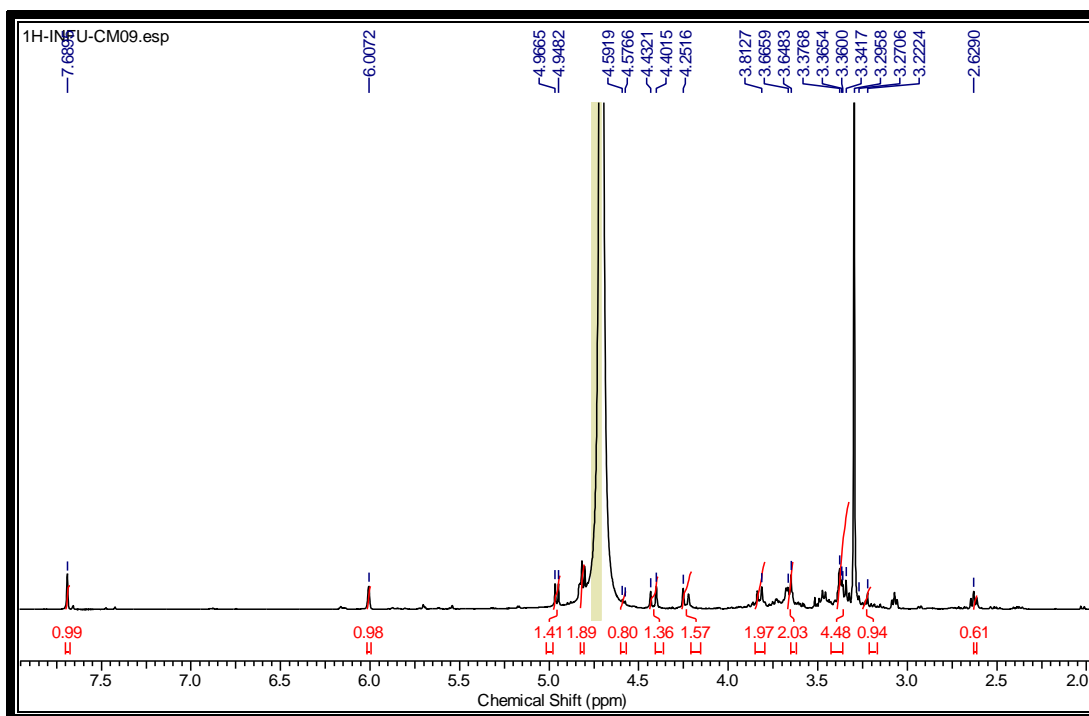


Figure 58: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, D_2O) du composé CM09

Compte tenu de tout ce qui précède, nous avons attribué à CM09 la structure **133** qui est celle de l'acide deacétyl asperulosidique déjà décrite dans la littérature (Atia et *al.*, 2009).

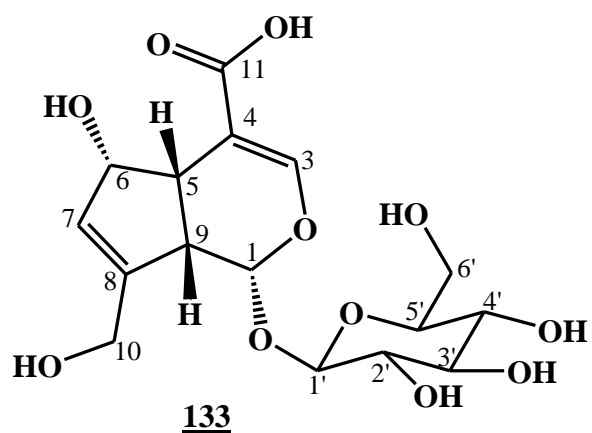


Tableau XXV: Données de RMN ^1H (500 MHz, D_2O) et ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de CM09 133 comparées aux données de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) et ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de l'acide deacétyl asperulosidique

Position	CM09 <u>133</u>		Acide deacétyl asperulosidique	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1	4,98 (d, 9,0)	101,1 (d)	4,95 (d, 6,9)	100,6
3	7,73 (s)	155,8 (d)	7,71 (s, 1,2)	155,3
4	/	108,8 (s)	/	108,2
5	3,10 (m)	40,9 (d)	3,12 (m)	40,7
6	4,87 (d, 5,5)	73,3 (d)	4,88 (d, 6,6)	73,4
7	6,05 (s)	129,3 (d)	6,03 (s)	129,5
8	/	149,7 (s)	/	149,5
9	2,66 (t, 10,0)	44,8 (d)	2,67 (m)	44,8
10	4,26 (d,15,5) 4,45(d, 15,5)	60,5 (t)	4,45 (d 15,6), 4,23 (d, 15,6)	60,0
11	/	171,4 (s)	/	171,0
1'	4,83 (d, 9,0)	99,5 (d)	4,81 (d, 7,8)	99,6
2'	3,70 (m)	76,1 (d)	3,70 (m)	76,1
3'	3,53 (m)	69,9 (d)	3,53 (m)	69,9
4'	3,52 (m)	76,6 (d)	3,51 (m)	76,6
5'	3,69 (dd, 12,2) 3,84 (d, 12,0)	61,1 (d)	3,68 (dd, 11,9, 5,5) 3,85 (dd, 11,9, 2,0)	61,1
6'	4,98 (d, 9,0)	101,1 (t)	4,95 (d, 6,9)	100,6

II.2.5.4. Détermination de la structure de CM10 ou 6-oxo-genipin 134

Le composé CM10 est obtenu sous forme de poudre amorphe verdâtre dans le mélange eau-méthanol par HPLC sémi-préparative.

L'analyse de son spectre de masse en ESI à haute résolution (figure 59) montre le pic de l'ion pseudo moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 241,0708 en accord avec la formule moléculaire $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_6$ renfermant six insaturations.

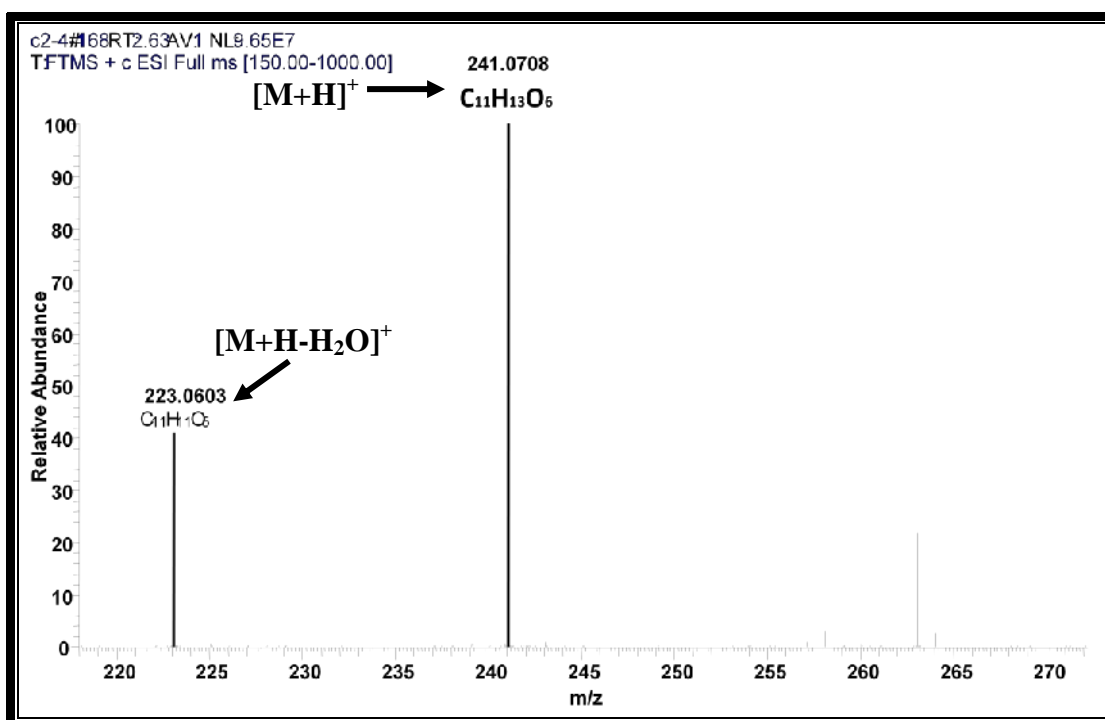


Figure 59: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM10

Sur son spectre IR on observe les bandes d'absorption du groupement hydroxyle à 3421 cm^{-1} et d'un groupement carbonyle à 1625 cm^{-1} .

L'analyse couplée des spectres RMN ^{13}C (figure 61) et HSQC (tableau 24) fait ressortir les signaux de 11 atomes de carbones dont un groupement hémiacétal à δ_{C} 93,6, un méthoxyle à δ_{C} 50,3, un oxyméthylène à δ_{C} 58,6 et deux carbonyles respectivement à δ_{C} 172,8 (cétone cyclique) et δ_{C} 164,8 (ester). On observe également 4 signaux à δ_{C} 155,9, 109,9, 123,0 et 151,6 tous attribuables à des carbones oléfiniques. Toutes ces données combinées à celles observées sur le spectre de RMN ^1H (figure 60) sont caractéristiques du cyclopentanopyrane du squelette d'un iridoïde (Dinda et *al.*, 2007; Dinda et *al.*, 2009; Dinda et *al.*, 2011). En fait, le signal à δ_{C} 164,8 est attribuable au carbonyle d'un ester de méthyle couramment rencontré dans cette série de composés. Les signaux à δ_{C} (δ_{H}) 93,6 (5,76) et 155,9 (7,30) sont respectivement ceux de l'hémiacétal (C-1(H-1)) et du carbone (proton) vinylique C-3 (H-3) en accord avec les déplacements chimiques des iridoïdes déjà décrits dans la littérature (Kuigoua et *al.*, 2010; Dinda et *al.*, 2009).

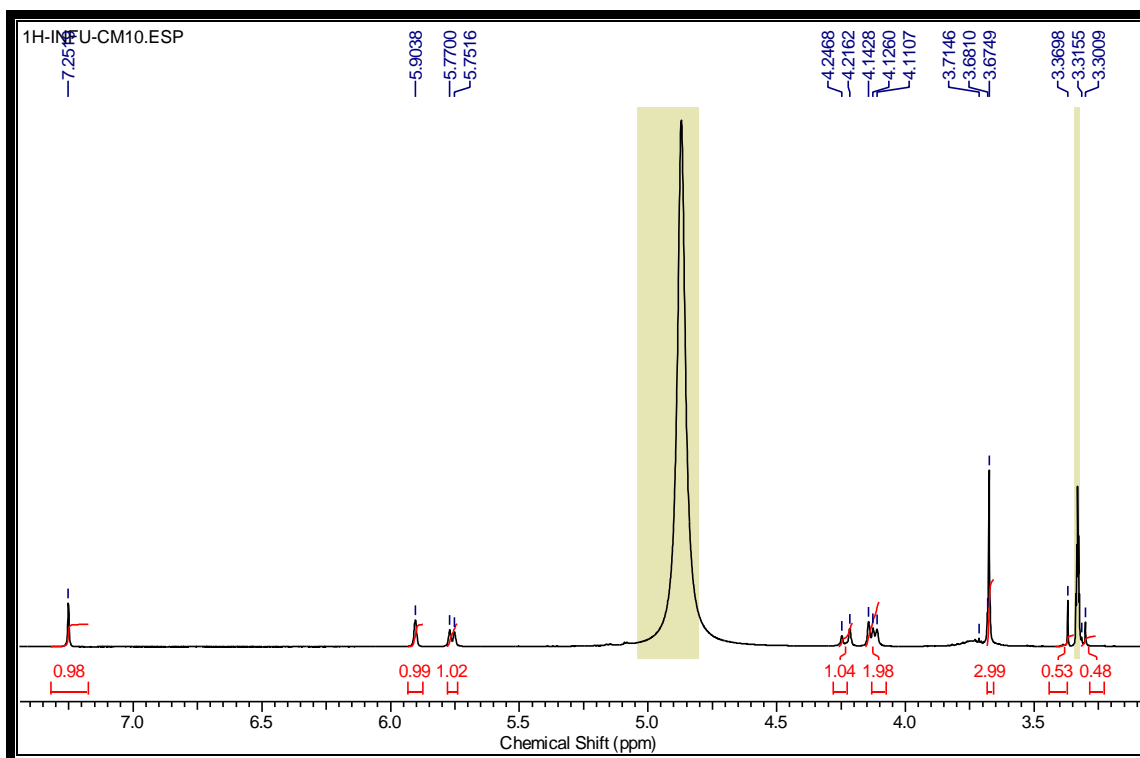


Figure 60: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) du composé CM10

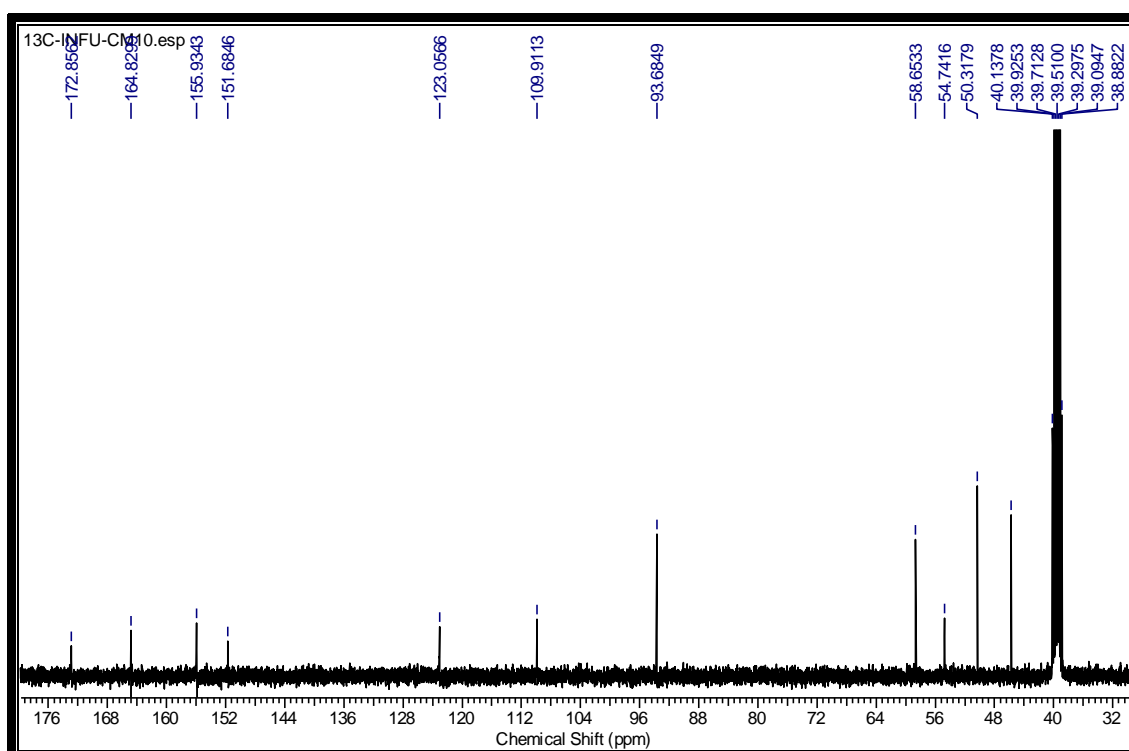


Figure 61: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé CM10

L'analyse du spectre HMBC (figure 62) du composé CM10 nous a permis d'obtenir des informations supplémentaires. Notamment les taches de corrélation entre le signal du proton H-3 à δ_H 7,30 et ceux des carbones à δ_C 93,6, 164,8 et 45,7 d'une part et d'autre part entre le signal du proton H-7 à δ_H 5,90 et les carbones à δ_C 45,7, 54,7 et 58,6. Ce qui nous a permis de positionner le groupement ester de méthyle en C-4 et le groupement oxyméthylène en C-8.

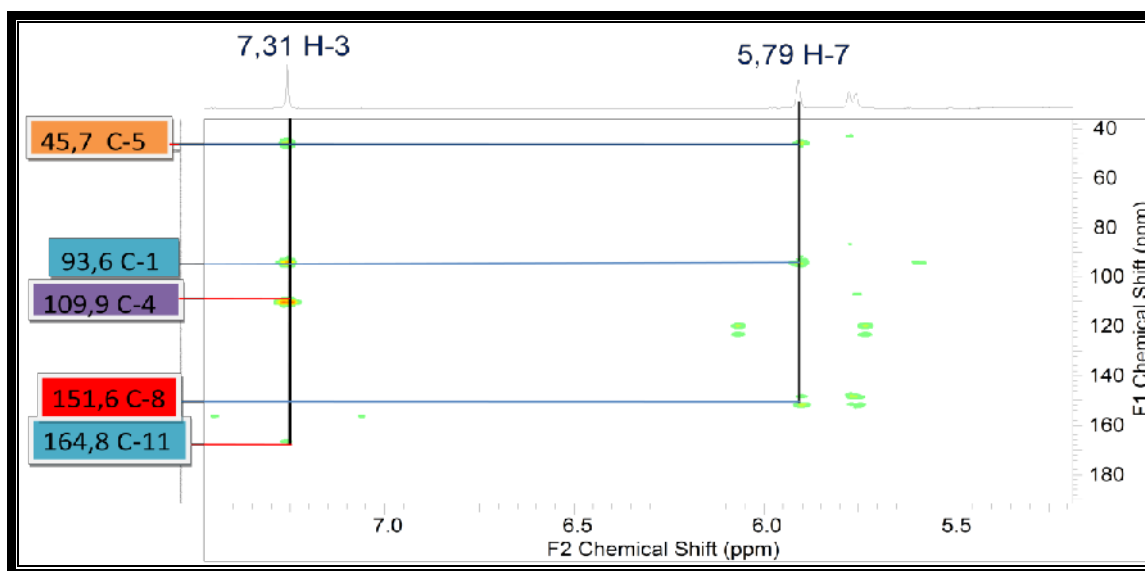
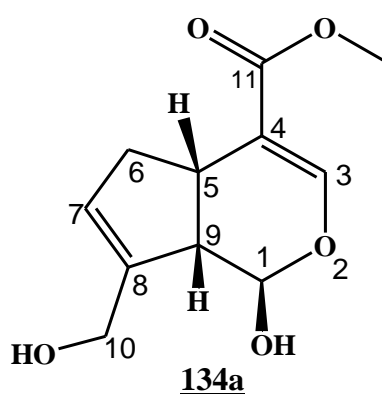


Figure 62: Spectre HMBC du composé CM10

L'ensemble des déplacements chimiques du composé CM10 sont similaires à ceux du genipin **134a** et dérivés (Endo et *al.*, 1973; Dinda et *al.*, 2009).



De tout ce qui précède, nous avons proposé à CM10 la structure **134**. A ce composé nouveau, nous avons donné le nom de 6-oxo-genipin.

Notons que le genipin **134a** est un composé naturel isolé des fruits de *Gardenia jasminoides* Ellis qui est un bioadhésif et antimicrobien (Vaandering, 2006).

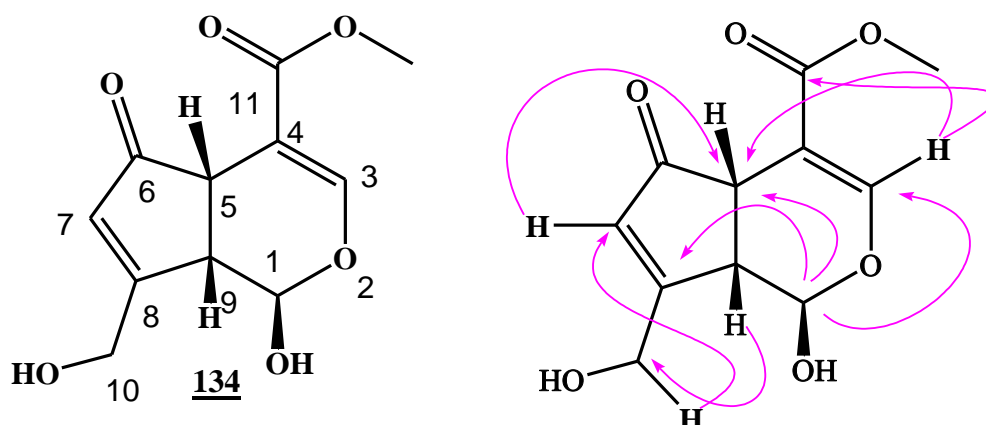


Schéma 17: Quelques corrélations HMBC du composé CM10

Tableau XXVI: Données de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) et ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du 6-oxo-genipin 134 comparées à celles du genipin (270 MHz, CDCl_3) et (67,5 MHz, CDCl_3)

Position	CM10 <u>134</u>		genipin	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1	5,76 (d, 9,2)	93,6	5,54 (s)	96,0
3	7,30 (s)	155,9	7,48 (s)	153,0
4	/	109,9	/	107,7
5	4,11 (m)	45,7	3,27 (dd, 14,4; 6,8)	32,1
6		172,8	2,69 (d, 16,0) 3,22 (d, 16,0)	46,2
7	5,90 (s)	123,0	5,30 (d, 4,4)	121,6
8	/	151,6	/	143,3
9	3,70 (d, 9,2)	54,7	3,62 (s)	51,0
10	4,21 (d, 15,3) 4,24 (d, 15,3)	58,6	4,36 (d, 12,8) 4,45 (d, 12,8)	64,7
11	/	164,8	/	167,7
12	3,67 (s)	50,3	3,71 (s)	54,5

II.2.5.5. Identification de CM13 ou gardenamide 135

Obtenu dans le système eau/méthanol sous la forme d'un solide amorphe, le composé CM13 répond positivement au test de Trim-Hill caractéristique des iridoïdes ainsi qu'à celui de Dragendorff, caractéristique des alcaloïdes

Sa formule moléculaire $C_{11}H_{13}O_4N$ a été déduite de l'analyse de son spectre de masse en ESI à haute résolution (figure 63) qui montre le pic de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 224,0920.

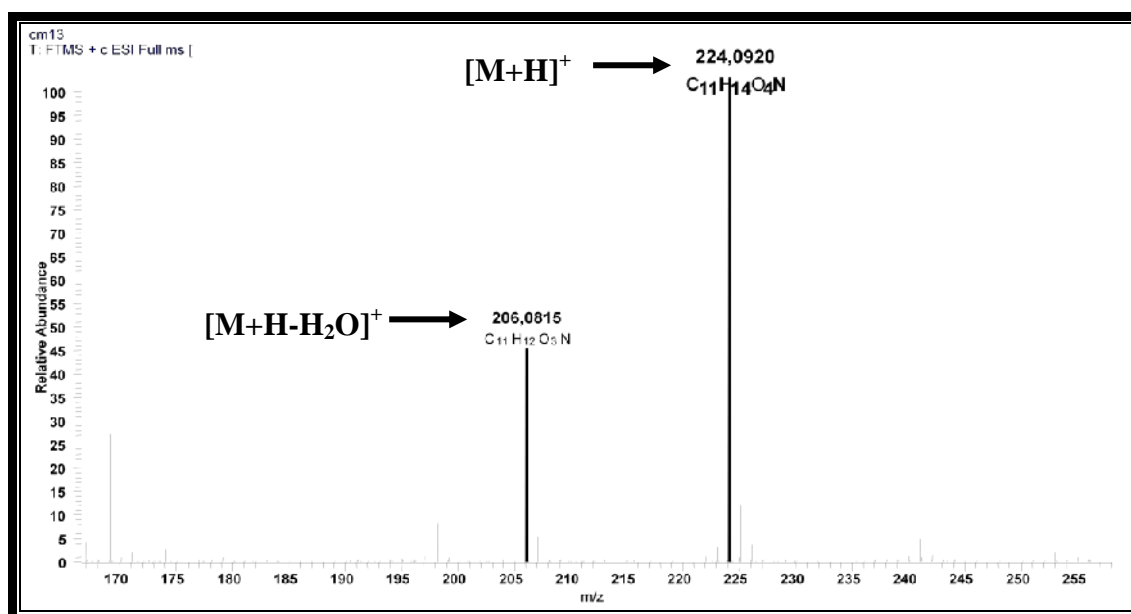


Figure 63: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM13

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C (figure 64) du composé CM13 fait ressortir les signaux de 11 carbones dont:

- Deux carbonyles respectivement à δ_C 171,7 (amide) et 168,0 (ester);
- Quatre oléfiniques à δ_C 143,5, 133,7, 126,5 et 110,0;
- Un oxyméthylène et un oxyméthyle respectivement à δ_C 60,8 et 54,4;
- Deux méthynes à δ_C 50,9 et 37,9;
- Un méthylène à δ_C 40,1.

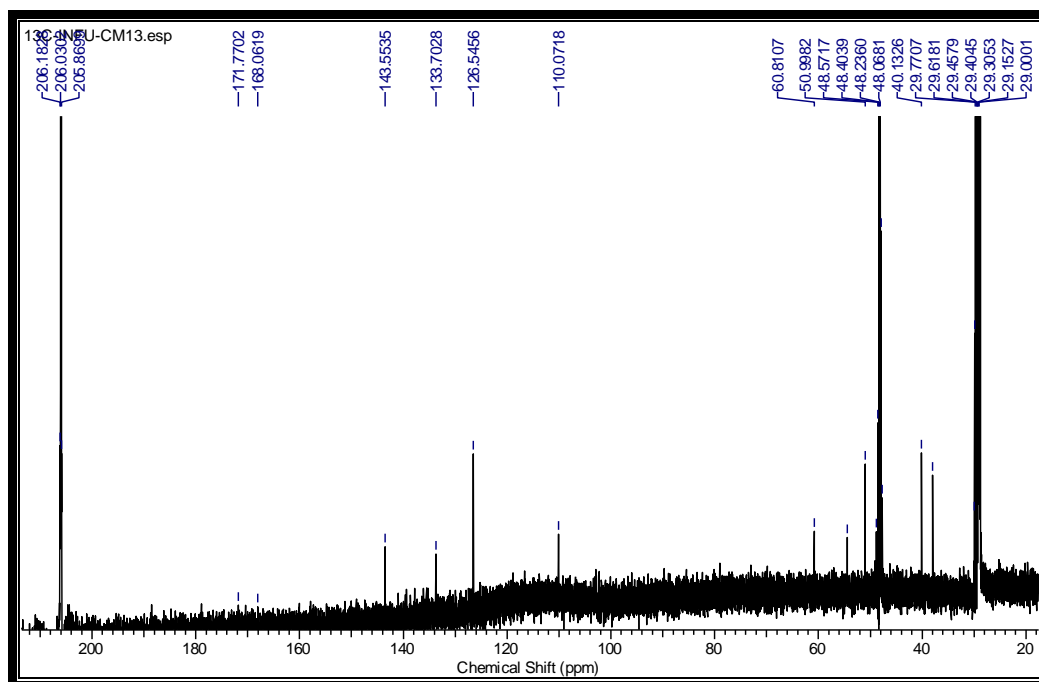


Figure 64: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) du composé CM13

L'analyse du spectre de RMN ^1H (figure 65) nous a permis de confirmer la présence des carbones oléfiniques avec deux signaux à δ_{H} 5,79 (1H, dd, 1,2, 2,7) et 7,23 (1H, s) attribuables aux protons oléfiniques H-3 et H-7. Toujours sur ce spectre, les signaux à δ_{H} 3,69 (3H, s), 4,33 (1H, dd, 1,5, 14,0) et 4,25 (1H, dd, 1,5, 14,0) sont attribuables respectivement aux 3 protons de l'oxyméthyle et aux 2 protons de l'oxyméthylène.

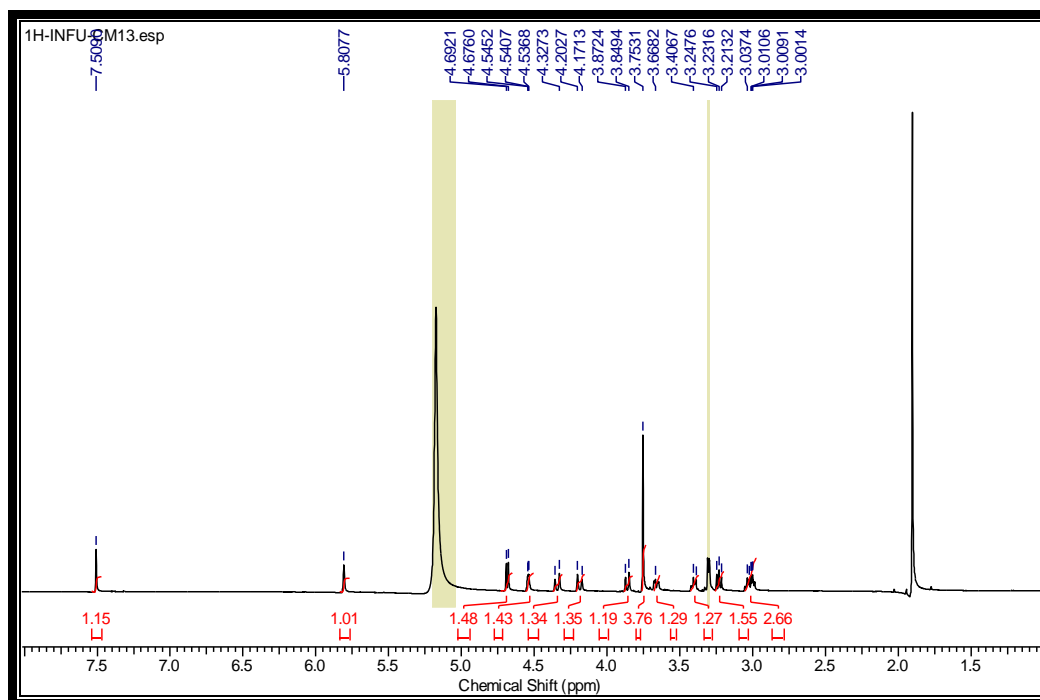


Figure 65: Spectre RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) du composé CM13

Les positions des groupements ester et oxyméthylène ont été déterminées par l'analyse du spectre HMBC qui montre des corrélations entre le signal du proton H-3 à δ_{H} 7,23 et celui du carbonyle à δ_{C} 168,0 d'une part et d'autre part entre le signal du proton H-7 à δ_{H} 5,79 et celui du carbone C-10 à δ_{C} 60,8.

L'ensemble de toutes ces informations comparées à celles obtenues dans la littérature (Bringmann et *al.*, 2001) nous ont permis d'attribuer à CM13 la structure **135** qui est celle de la gardenamide déjà isolée de *Rothmannia urcelliformis* par Bringmann et *al.*, 2001.

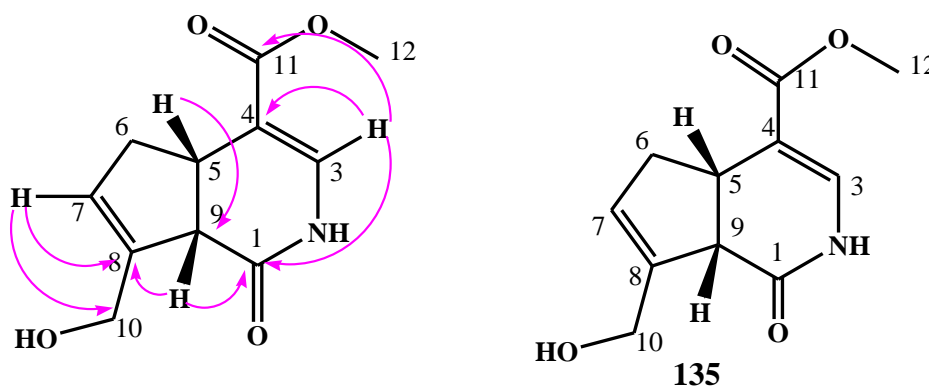


Schéma 18: Quelques corrélations HMBC du composé CM13

Tableau XXVII: Données de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) et ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de CM13 135 comparées aux données de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) et ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) de gardenamide A (Bringmann et *al.*, 2001)

Positions	CM13 <u>135</u>		Gardenamide A	
	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}
1		171,7		172,8
3	7,23 (s)	133,7	7,19 (s)	134,9
4	/	110,0	/	111,2
5	3,47 (dd, 10,5, 8,7)	37,9	3,52 (dt, 10,7, 8,7)	38,8
6	2,80 (m) 2,20 (m)	40,1	2,86 (dddt, 16,4, 8,4, 2,8, 1,4) 2,16 (dddt, 16,4, 8,8, 2,2, 2,2)	41,0
7	5,79 (dd, 1,2, 2,7)	126,7	5,84 (m)	128,1
8	/	143,5	/	143,7
9	3,60 (d, 10,5)	50,9	3,59 (m)	49,4
10	4,33 (dd, 14,0, 1,5) 4,25 (dd, 14,0, 1,5)	60,8	4,38 (dd, 14,1, 1,7), 4,36 (dd, 14,1, 1,1)	61,8
11	/	168,0	/	168,9
12	3,69 (s)	54,4	3,73 (s)	52,0

II.2.5.6. Identification de CM12 ou macrophylloside 136

Obtenu sous forme de poudre blanche dans le dichlorométhane, le composé CM12 est soluble dans le chloroforme. Ses tests positifs avec les réactifs de Trim-Hill et de Molish montrent que CM09 est un iridoïde glycosilé.

Le spectre IR de CM12 montre des bandes d'absorption à 3424, 1730 et 1649 cm^{-1} caractéristiques respectivement des groupements hydroxyle, carbonyle et oléfinique.

Son spectre de masse en ESI à haute résolution présente (figure 66) le pic de l'ion pseudo moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 427,1212. Cette masse est en accord avec la formule moléculaire $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ qui comprend 6 insaturations.

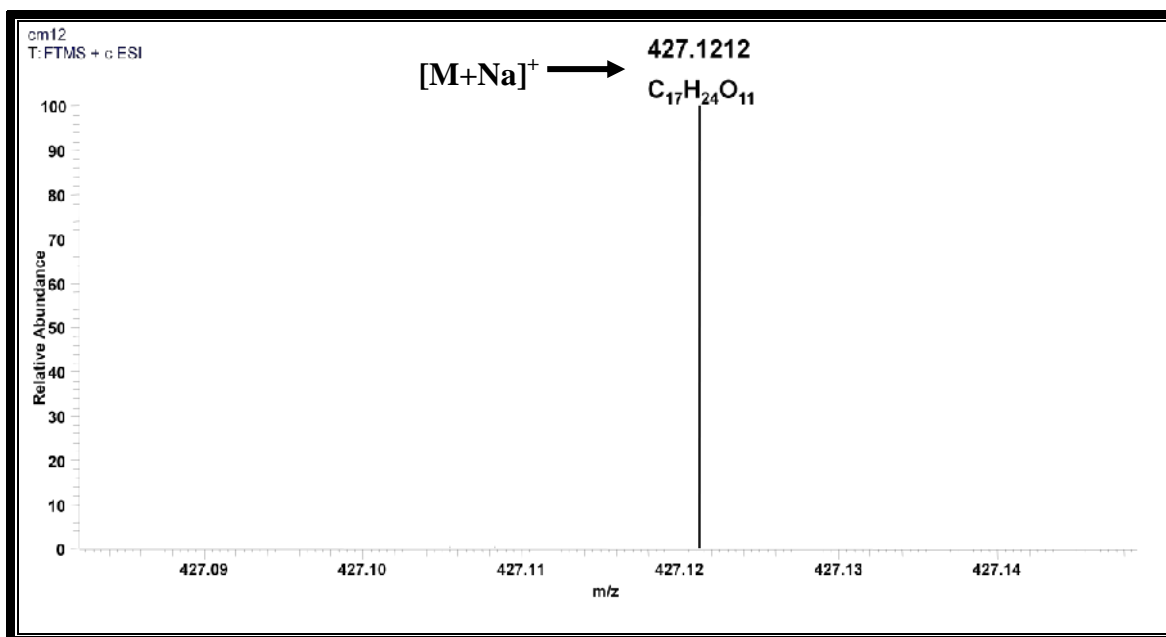


Figure 66: Spectre de masse à HR-ESI du composé CM12

L'analyse du spectre de RMN ¹³C (figure 67) du composé CM12 nous a permis de suggérer un carbonyle des esters à δ_C 172,5, deux groupements acétals respectivement à δ_C 95,8 et à 94,1 et deux carbones oléfiniques à δ_C 137,5 et à 135,3. De plus sur ce spectre, on observe des signaux à δ_C 84,6, 67,2 et à 50,0 attribuables respectivement à un alcool tertiaire, un méthyne et un groupement oxyméthyle. L'ensemble des signaux entre δ_C 68,2 et 99,1 suggèrent la présence d'un sucre dans la structure de CM12. Ceci est confirmé sur le spectre de RMN ¹H (figure 66) de CM12 par le signal à δ_H 4,68 (d, 8,0) attribuable au proton anomérique.

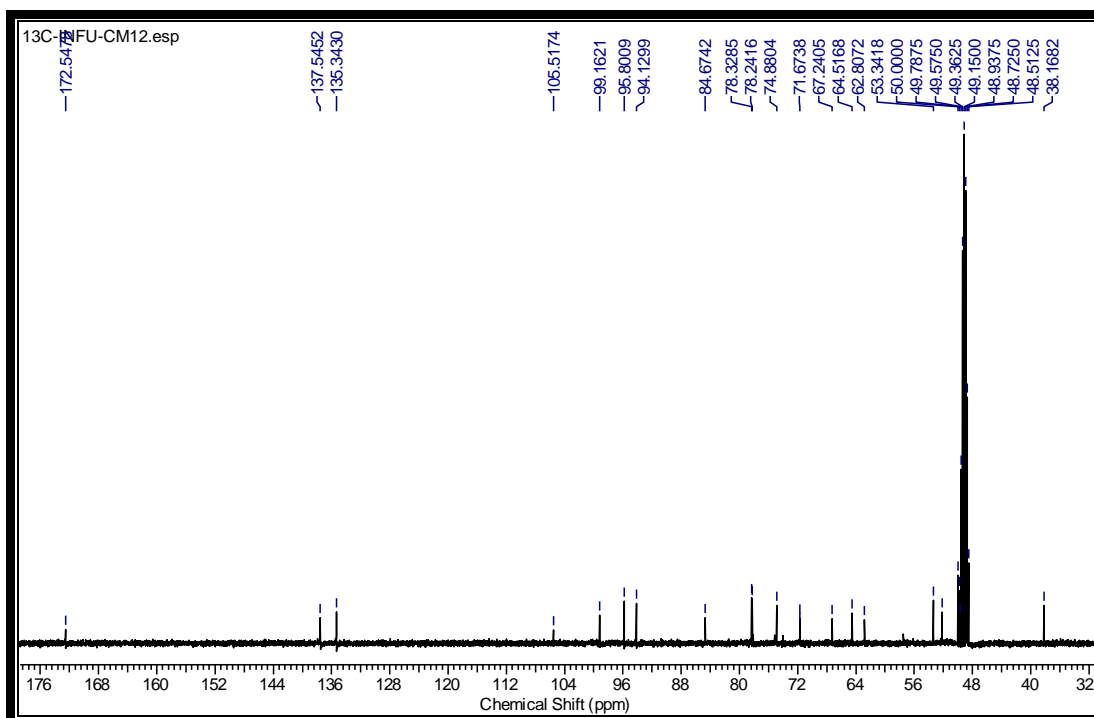


Figure 67: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) du composé CM12

Toujours sur le spectre de RMN ^1H on observe:

- Les protons des groupements acétals à δ_{H} 5,64 (1H, d, 2,3) et 5,49 (1H, s);
- Les protons oléfiniques à δ_{H} 6,05 (1H, dd, 3,0, 5,8) et 5,59 (1H, d, 5,8);
- Les protons du groupement oxyméthyle à δ_{H} 3,33 (3H, s);
- Deux méthynes respectivement à δ_{H} 2,46 (1H, d, 7,8) et 3,26 (1H, t, 1,5).

L'analyse du spectre COSY (figure 68) met en évidence les taches de corrélation entre le proton H-1 du groupement acétal à δ_{H} 5,64 et les protons H-9 et H-5 des méthynes à δ_{H} 2,46 et 3,26. On observe aussi une corrélation entre le proton H-5 et le proton oléfinique à δ_{H} 6,05. Ce dernier couple à son tour avec l'autre proton oléfinique à δ_{H} 5,59. Ces informations nous ont permis de suggérer le cyclopentanopyrane comme squelette de base du composé CM12.

La valeur de la constante de couplage du proton H-1 à δ_{H} 5,64 (1H, d, 2,3) nous a permis de trouver la position du sucre par rapport à l'aglycone.

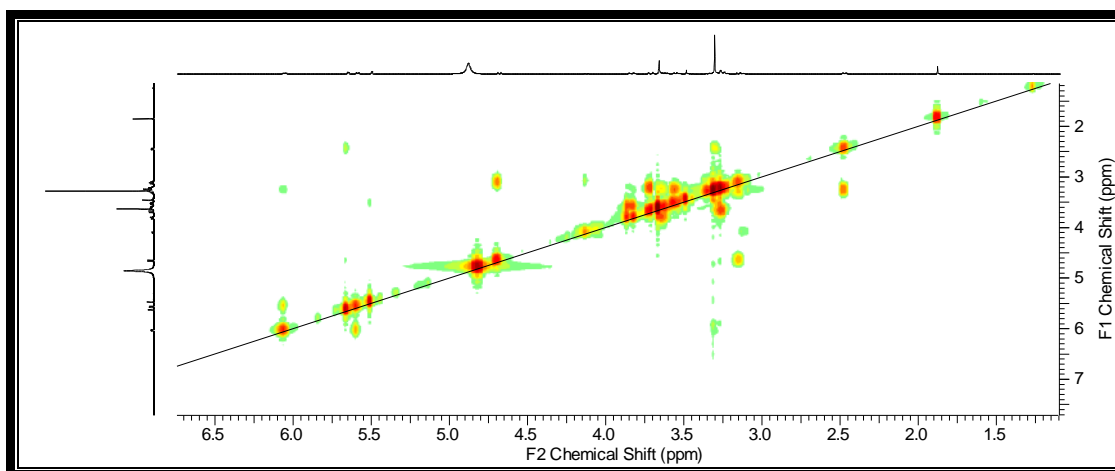


Figure 68: Spectre COSY du composé CM12

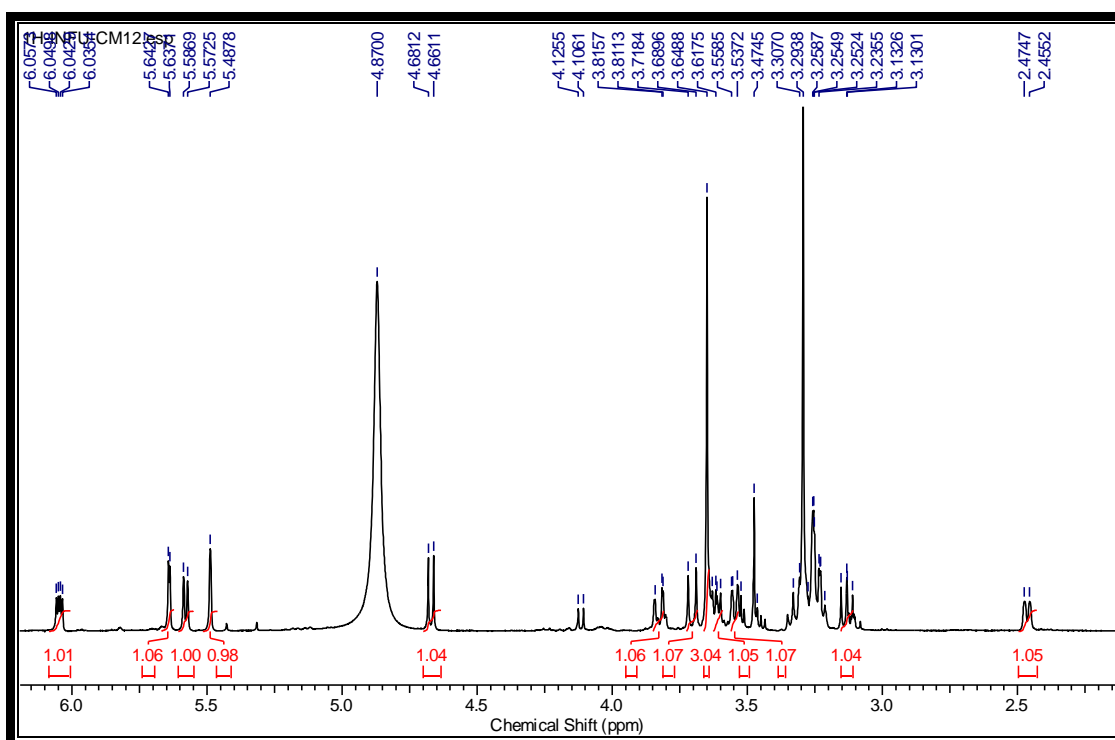


Figure 69: Spectre de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) du composé CM12

Le spectre HMBC, en montrant des corrélations entre le proton H-1' et C-1 d'une part et entre H-1 et C-1' d'autre part nous a permis de positionner le groupement β -glucopyranosyle en C-1. De même, la corrélation entre le proton H-3 et le carbonyle nous a permis de fixer le groupement méthyle ester en C-4. La liaison éther formée entre C-10 et C-3 émane de la corrélation observée entre les protons H-10 et le proton H-3 et vis-versa.

L'ensemble de toutes ces informations comparées à celles décrites dans la littérature nous a permis d'attribuer à CM12 la structure **136** qui est celle de la macrophyllósíde déjà isolée des feuilles de *Rothmannia macrophylla* par Sui-Kiong et *al.* en 2001.

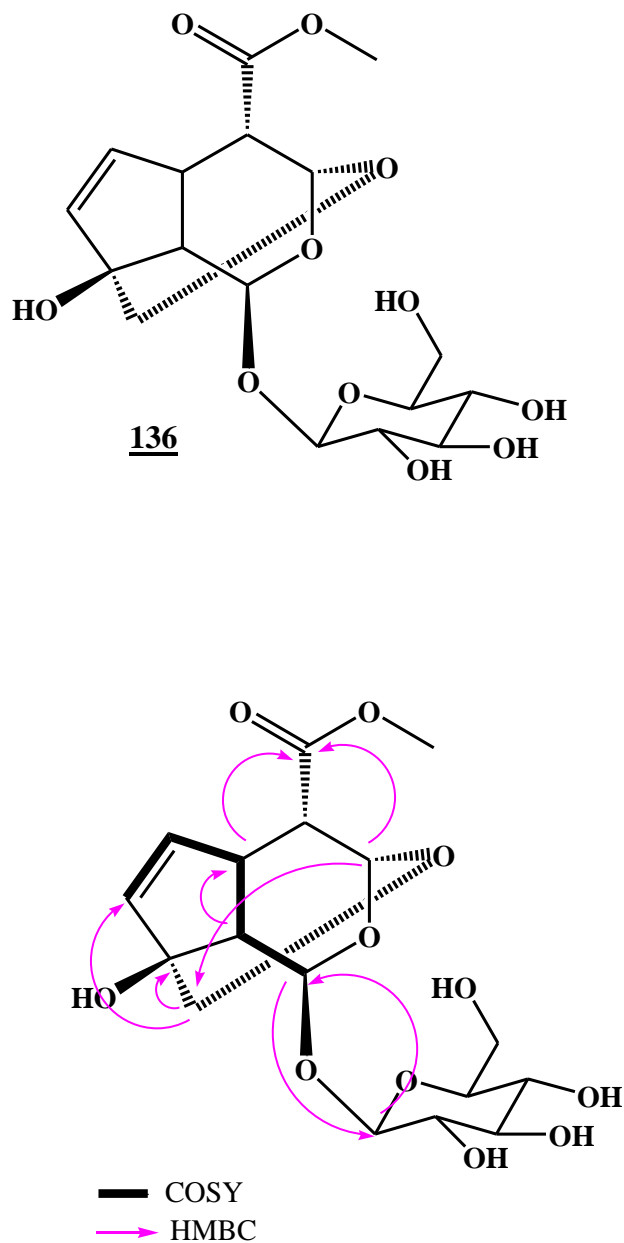


Schéma 19: Quelques corrélations COSY et HMBC du composé CM12

Tableau XXVIII: Données de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) et ¹³C (100 MHz, CD₃OD) de CM12 136 comparées aux données de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) et ¹³C (125 MHz, CD₃OD) macrophyllósíde A (Sui-Kíong et al., 2001)

Position	CM12 <u>136</u>		Macrophyllósíde	
	δ_H (J en Hz)	δ_C	δ_H (J en Hz)	δ_C
1	5,64 (d, 2,3)	94,1	5,69 (d, 2,0)	94,0
3	5,49 (s)	95,8	5,54 (d, 1,0))	95,7
4	3,71 (d, 11,5)	48,5	3,59 (dd, 1,0, 8,0)	49,6
5	3,26 (t, 1,5)	38,1	3,35 (ddd, 3,0, 8,0, 8,0)	38,0
6	6,05 (dd, 3,0, 5,8)	135,3	6,10 (dd, 3,0, 5,5)	135,2
7	5,59 (d, 5,8)	137,5	5,63 (d, 5,5)	137,4
8	/	84,6	/	84,5
9	2,46 (d, 7,8)	53,3	2,52 (dd, 2,0, 8,0)	53,2
10	3,70 (d, 11,5) 3,80 (d, 11,5)	67,2	3,75 (d, 11,5), 3,78 (d, 11,5)	67,1
11	/	172,2	/	172,4
12	3,33 (s)	50,0	3,70 (s)	52,0
1'	4,68 (d, 8,0)	99,1	4,72 (d, 8,0)	99,1
2'	3,13 (d, 1,0)	75,1	3,18 (dd, 8,0, 9,0)	74,7
3'	3,28 (m)	78,1	3,20-3,40 (m)	78,1
4'	3,24 (m)	71,2	3,20-3,40 (m)	71,6
5'	3,32 (m)	78,3	3,20-3,40 (m)	78,2
6'	3,62 (d, 1,7) 3,82 (d, 1,7)	62,6	3,67 (dd, 5,0, 12,0) 3,88 (dd, 1,5, 12,0)	62,7

II.2.6. Conclusion partielle

L'étude phytochimique que nous avons entreprise sur les écorces des tiges de *P. oliveri* ainsi que sur les écorces du tronc et des tiges de *C. multiflorum* a conduit à l'isolement de 19 composés. Les structures de ces composés ont été élucidées grâce à l'analyse de leurs spectres de masse et aux différentes techniques spectroscopiques 1D et 2D. Il s'agit de 03 indolosesquiterpènes (8α -polyveolinone **127**, *N*-acétyl- 8α -polyveolinone **129** et *N*-acétyl polyveoline **130**) et 01 iridoïde (6-oxo-genipin **134**) nouveaux, décrits ici pour la première fois. Les 15 autres sont des composés connus identifiés à l'acide oleanolique **120**, l'acide quinovique **121**, polycarpol **122**, D-mannitol **123**, l'acide 4-*O*- β -D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) vanilique **124**, *N*-méthylurabaine **126**, bidebine A **125**, 6- α -hydroxygeniposide **131**, scandoside ester de méthyle **132**, acide deacétyl asperulosidique **133**, gardenamide **135**, macrophylloside **136**, garjasmine **137**, gardenine **138** et galioside **139**.

II.3. TRANSFORMATIONS CHIMIQUES SUR QUELQUES COMPOSES ISOLÉS

Nous avons effectué quelques transformations chimiques sur deux composés nouveaux isolés de *Polyalthia oliveri* dans le but de confirmer leurs structures. C'est ainsi que la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone (POE27) a été hydrolysée en milieu acide pour donner la 8 α -polyveolinone (POE27_h) (Schéma 20). La *N*-acétyl polyveoline (POE5) quant à elle a été acétylée dans le but de confirmer la structure et notamment la présence et la position du groupement hydroxyle. Nous avons ainsi obtenu la *O*, *N*-diacétyl polyveoline (POE5ac) (Schéma 21).

II.3.1. Réaction d'hydrolyse acide de la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone 129

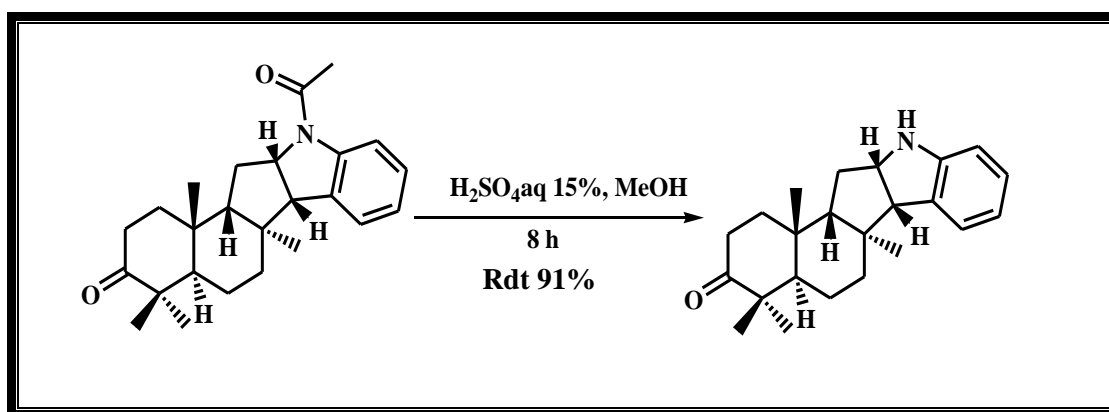


Schéma 20: Hydrolyse acide de la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone

POE27_h est obtenu dans le mélange hexane-acétate d'éthyle 35% sous forme d'huile claire. Il répond positivement au test de Dragendorff, caractéristique des alcaloïdes. Sur son spectre de masse en APCI-TF à haute résolution en mode positif, on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 338,2473, suggérant la formule moléculaire $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}$, renfermant 9 insaturations. Lorsqu'on compare son spectre de RMN ^1H à celui de POE27, on remarque l'absence du singulet à δ_{H} 2,26 ppm présent sur le spectre de POE27, caractéristique du groupement acétyle. Ceci indique que ce dernier a été déacétylé. Par ailleurs, on note par comparaison que ce spectre de RMN ^1H (figure 70) est identique à celui de POE30.

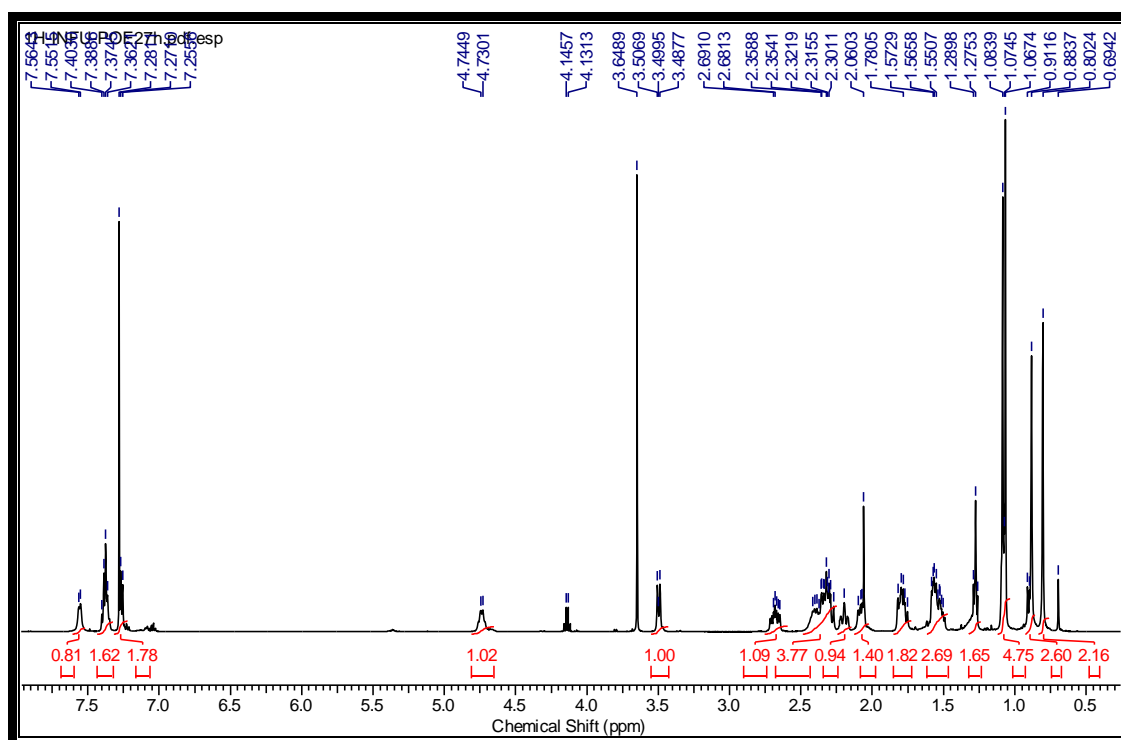


Figure 70: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE27h

II.3.2. Réaction d'acétylation de la *N*-acétyl polyveoline **130**

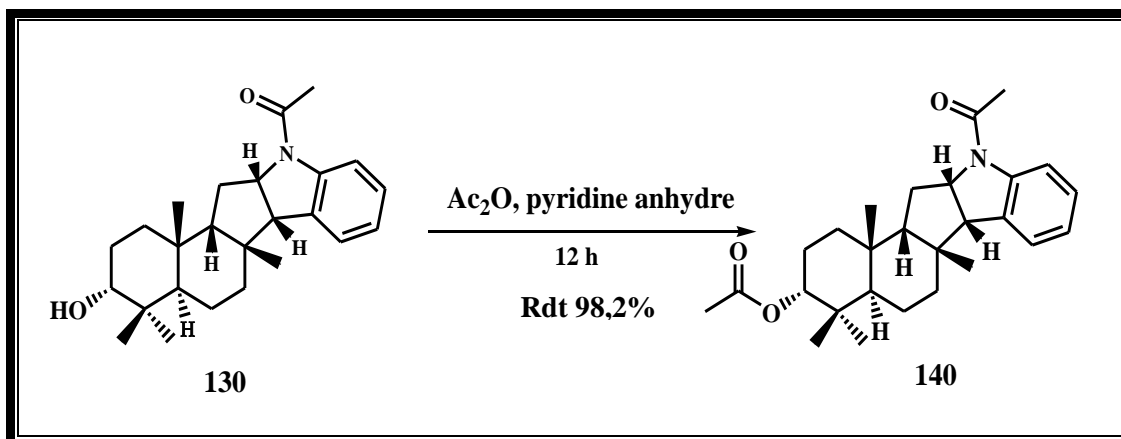


Schéma 21: Acétylation de la *N*-acétyl polyveoline

Obtenu sous forme d'huile peu colorée, le composé POE5ac **140** répond positivement au test de Dragendorff, caractéristique des alcaloïdes. Sur son spectre de masse en APCI-TF à haute résolution en mode positif, on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 424,2851, suggérant la formule moléculaire $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{NO}_3$, renfermant 10 insaturations. Les données de RMN ^1H des composés POE5 et POE5ac **140** sont presque similaires. Cependant on observe sur le spectre de POE5ac un singulet de 3 protons à δ_{H} 2,06, absent sur le spectre

de POE5. Cette information est confirmée sur le spectre de RMN ^{13}C de POE5ac par le signal à δ_{C} 21,7 attribuable au carbone d'un groupement méthyle et absent sur celui de POE5. Tout ceci indique que POE5 a été bien acétylé.

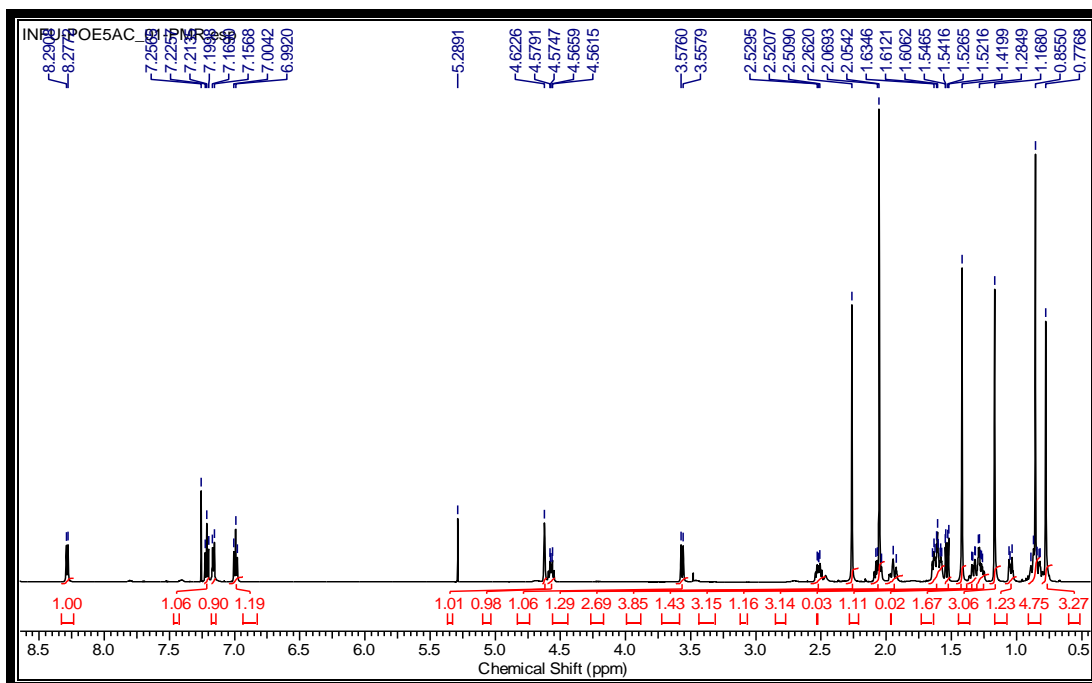


Figure 71: Spectre de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé POE5ac

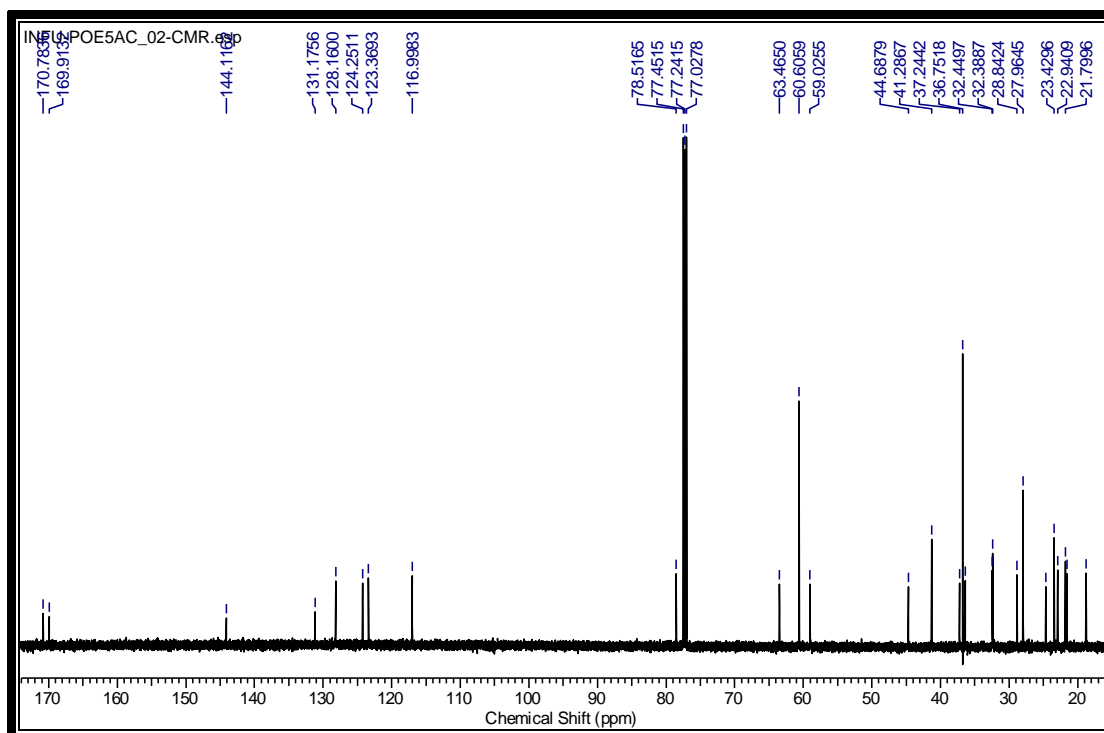


Figure 72: Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé POE5ac

II.3.3. Conclusion partielle

Dans cette partie de notre travail, nous avons procédé à l'hydrolyse acide de la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone (POE27, **129**) dans le but de confirmer sa structure. Nous avons obtenu la 8 α -polyveolinone (POE30, **127**) qui est l'un des indolosesquitrepènes isolés avec un rendement de 91%. De plus, l'acétylation de la *N*-acétyl polyveoline (POE5, **130**). a conduit à la *O*-*N*-diacétyl polyveoline (POE5ac, **140**) avec un rendement de 98,2%.

II.4. ACTIVITES BIOLOGIQUES DE QUELQUES COMPOSES ISOLES

Dans le cadre de ce travail, nous avons jugé utile de soumettre certains composés isolés en quantité suffisante aux tests d'activités antiplasmodiale, antimicrobienne et cytotoxique.

II.4.1. Activité antiplasmodiale

II.4.1.1. Introduction

Des composés isolés de *Polyalthia oliveri* et *Canthium multiflorum*, POE5 (**130**), POE27 (**129**), CM04 (**137**), CM05 (**138**) et CM09 (**133**) ont été testés sur deux souches de *Plasmodium falciparum*, K1(chloroquino résistance) et NF54 (chloroquino sensible). L'activité antiplasmodiale a été évaluée sur la base de la concentration inhibitrice à 50% et selon la méthode décrite par Talontsi et *al.*, 2013. La chloroquine (Sigma-Aldrich) a été utilisée comme référence.

II.4.1.2. Résultats et discussion

Les résultats sont présentés dans le tableau XXIX.

Tableau XXIX: Concentration Inhibitrice à 50% (CI₅₀) en µg/mL de POE5, POE27, CM04, CM05 et CM09 isolés de *P. oliveri* et *C. multiflorum* et de l'antibiotique de référence (AR)

Composé	Activité antiplasmodiale		Indice de selectivité
	CI ₅₀ (µg/mL)		
	<i>Plasmodium falciparum</i>		
	K1	NF54	
<i>N</i> -acétyl polyveoline (POE5, 130)	/	29,10	1,46
<i>N</i> -acétyl-8α-polyveolinone (POE27, 129)	/	7,60	5,06
Garjasmine (CM04, 137)	38,50	/	1,50
Gardenine (CM05, 138)	7,17	/	7,01
Acide deacétyl asperulosidique (CM09, 133)	> 50	/	/
Chloroquine (AR)	0,064	0,006	

Sensibilité: CI₅₀ ≤ 50 µg/mL Non sensibilité: CI₅₀ > 50 µg

Les tests d'activité antiplasmodiale effectués sur les composés isolés de *Polyalthia oliveri* (POE5 **130**, et POE27 **129**) sur *Plasmodium falciparum* NF54 et de *Canthium multiflorum* (CM04 **137**, CM05 **138**, CM09 **133**) sur *Plasmodium falciparum* K1 montrent que les CI₅₀ des composés CM04, CM05, CM09, POE5, et POE27 sont respectivement

38,50, 7,17, 50, 29,10 et 7,60 µg/mL. Ces valeurs sont plus élevées que la CI₅₀ de la chloroquine (0,064 µg/mL). D'après ces résultats, le *Plasmodium falciparum* K1 est sensible aux composés CM04 (38,50 µg/mL) et CM05 (7,17 µg/mL), mais la plus grande activité est marquée par CM05. De même, le *Plasmodium falciparum* NF54 est sensible aux composés POE5 et POE27 avec la plus grande sensibilité présentée sur POE27 (7,60 µg/mL). Plus la CI₅₀ d'un composé est faible plus le composé est actif (Clarkson et al., 2004).

Cette différence d'activité des composés testés pourraient s'expliquer par leur différence de structure. En effet, d'après les résultats obtenus à l'analyse structurale, les composés testés peuvent être classés en deux groupes: le groupe des iridoïdes (CM04, CM05 et CM09) et le groupe des alcaloïdes indolosesquiterpènes (POE27 et POE5). Dans le groupe des alcaloïdes indolosesquiterpènes, le groupement carbonyle en C-3 présent dans la structure de *N*-acétyl-8 α -polyveolinone **129** (POE 27) serait responsable de la plus grande activité de cette dernière. Ce qui n'est pas le cas dans la structure de *N*-acétyl polyveoline **130** (POE5) où en C-3, on rencontre un groupement hydroxyle. Quant au groupe des iridoïdes, nous remarquons que la gardenine **138** possède en position 2 dans sa structure un atome d'azote alors que dans la même position pour les deux autres composés (Garjasmine **137** et Acide deacétyl asperulosidique **133**), nous avons un atome d'oxygène. En somme, nous pouvons dire que tous les composés testés ont une activité inhibitrice vis-à-vis de *P. falciparum*.

II.4.2. Activité antimicrobienne

II.4.2. 1. Introduction

Les activités antimicrobiennes des composés isolés en quantité suffisante de *C. multiflorum* ont été évaluées sur cinq souches différentes de bactéries : *Staphylococcus aureus* (DSM 799) comme Gram positif, *Actinobacter calco-aceticus* (DSM 30006), *Serratia plymuthica* (DSM 4540), *Pseudomonas stutzeri* (DSM 4166) et *Escherichia coli* (DSM 1116) comme gram négatif. Les antibiotiques de référence utilisés sont : Tétracycline, Gentamicin et Streptomycin

II.4.2. 2. Résultats et discussion

Des composés isolés de *C. multiflorum*, 6-oxo-genipin (CM10, **134**), macrophyllósíde (CM12, **136**), garjasmine (CM04, **137**), gardenine (CM05, **138**), gardenamide A (CM13, **135**), galioside (CM11, **139**) et l'acide deacétyl asperulosidique (CM09, **133**) ont été testés. Le

tableau XXX présente les concentrations minimales inhibitrices des composés testés vis-à-vis des microorganismes tests (quatre bactéries Gram négatifs et une bactérie Gram positif).

Tableau XXX: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en µg/mL de CM10, CM12, CM04, CM05, CM11, CM13 et CM09 isolés de *C. multiflorum* et des antibiotiques de référence (Tétracycline, gentamicine et streptomycine)

Echantillons	Activité antimicrobienne (CMI) en µg/mL					Indice de selectivité
	<i>Actinobacter calco-aceticus</i> (DSM 30006)	<i>Serratia plymuthica</i> (DSM45 40)	<i>Pseudo monas stutzeri</i> (DSM 4166)	<i>Escherichia coli</i> (DSM 1116)	<i>Staphylococcus aureus</i> (DSM 799)	
Tétracycline	0,5	2	0,5	2	2	/
Gentamicine	0,05	0,5	0,5	0,1	0,1	/
streptomycine	0,01	1	0,05	0,5	1	/
Genipin	/	/	/	/	0,1	/
Loganine	/	/	/	/	>10	/
CM10 134	0,01	0,5	2	0,5	0,01	/
CM12 136	0,05	0,5	>10	5	>10	/
CM04 137	2	10	10	1	2	57,80
CM05 138	0,5	0,05	5	>10	0,05	1006,00
CM13 135	5	>10	1	>10	>10	/
CM11 139	0,5	0,05	1	1	0,5	/
CM09 133	5	1	0,5	0,5	10	/

Bonne activité : $0 < \text{CMI} < 1$; Faible activité : $1 \leq \text{CMI} \leq 10$; Pas d'activité : $\text{CMI} > 10$.

Ces résultats montrent que la CMI des composés varie de 0,01 à plus de 10 µg/mL par rapport aux antibiotiques de références dont la CMI varie de 0,01 à 2 µg/mL et aux analogues structuraux le génipin de CMI 0,1 µg/mL et la loganine de CMI >10 µg/mL. Plus la CMI d'un composé isolé est inférieure ou égale à celle de l'antibiotique de référence utilisé plus le composé est actif. Par ailleurs, l'activité antimicrobienne d'un composé varie en fonction de sa structure. C'est pour cela que:

Les composés CM05 **138** (0,5 µg/mL) et CM11 **139** (0,5 µg/mL) sont actifs comme la tétracycline (0,5 µg/mL) sur *Actinobacter calco-aceticus* (DSM 30006). CM10 (0,01µg/mL) est actif comme la streptomycine et le composé CM12 **136** (0.05 µg/mL) comme la

gentamycine (0,05 µg/mL). Par ailleurs, les CMI des composés CM04 **137** (2 µg/mL), CM13 **135** (5 µg/mL) et CM09 **133** (5 µg/mL) supérieures à celles des antibiotiques de référence indiquent leur faible activité sur *Actinobacter calco-aceticus*.

Les composés CM05 **138** (0,05 µg/mL) et CM11 **139** (0,05 µg/mL) sont plus actifs sur *Serratia plymuthica* (DSM4540) par rapport aux antibiotiques de référence utilisés. CM10 **134** (0,5 µg/mL) et CM12 **136** (0,5 µg/mL) sont actifs comme la gentamycine (0,5 µg/mL), il en est de même pour CM09 **133** (1µg/mL) qui est actif comme la streptomycine (1 µg/mL). Les composés CM04 **137** et CM13 **135** ont cependant présenté une faible activité sur *Serratia plymuthica* par rapport aux antibiotiques de référence.

Les composés testés ont présenté une faible activité sur *Pseudomonas stutzeri* (DSM 4166) et *Escherichia coli* (DSM 1116) par rapport aux antibiotiques de référence utilisés. Cependant, CM09 **133** (0,5 µg/mL) est actif comme la tétracycline (0,5 µg/mL) sur *Pseudomonas stutzeri*. Par ailleurs, CM10 **134** (0,5 µg/mL) et CM09 **133** (0,5 µg/mL) sont actifs comme la streptomycine sur *E.coli*.

Les composés CM10 **134** (0,01 µg/mL) et CM05 **138** (0,05 µg/mL) sont très actifs sur *Staphylococcus aureus* (DSM 799) par rapport aux antibiotiques de référence et aux analogues structuraux utilisés, la génipine et la loganine. Cette dernière n'a présenté aucune activité comme les composés CM12 **136** (>10 µg/mL), CM13 **135** (>10 µg/mL) et CM09 **133** (10 µg/mL). De plus les composés CM04 **137** (2 µg/mL) et CM11 **139** (2 µg/mL) sont également actifs sur cette bactérie Gram positif.

Il ressort de cette analyse que les composés isolés de *C. multiflorum* sont plus ou moins actifs sur les bactéries Gram négatifs telles que: *Actinobacter calco-aceticus* (DSM 30006), *Serratia plymuthica* (DSM4540), *Pseudomonas stutzeri* (DSM 4166), *Escherichia coli* (DSM 1116) et les bactéries Gram positif à l'exemple de *Staphylococcus aureus* (DSM 799).

L'activité antimicrobienne des composés dépend de leur groupement fonctionnel. En effet, c'est le groupement carbonyle en position 6 de la 6-oxo-genipin (CM10, **134**) qui serait responsable de sa très grande activité sur *Staphylococcus aureus* (DSM 799) par rapport à la génipin, son analogue structural. De même, l'atome d'azote en position 2 sur la structure de la gardenine (CM05, **138**) serait responsable de la grande activité du composé.

Des études antérieures menées par Akcos *et al.*, 1998 et Ganapaty *et al.*, 2008 ont révélé l'activité antimicrobienne d'autres iridoïdes comme l'ajugol sur les bactéries Gram négatifs et Gram positifs à l'instar de *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 31,25 µg/mL.

Ces résultats montrent que les composés isolés de *C. multiflorum* ont une grande importance du point de vu médical grâce à leur activité antimicrobienne sur les bactéries pathogènes à l'homme. Des études supplémentaires seront nécessaires en vue de déterminer leurs mécanismes d'action et leur profil de toxicité.

II.4.3. Cytotoxicité

II.4.3.1. Introduction

Des composés isolés de *Polyalthia oliveri* et *Canthium multiflorum*, POE5 **130**, POE27 **129**, CM04 **137**, CM05 **138** et CM09 **133** ont été testés sur une souche de myoblaste de rat squelettique L6. L'activité cytotoxique a été évaluée sur la base de la concentration inhibitrice à 50%. La Podophyllotoxine a été utilisée comme référence.

II.4.3.2. Résultats et discussion

Les résultats des tests d'activité cytotoxique des composés concernés sont consignés dans le tableau XXXI ci-dessous.

Tableau XXXI: Concentration Inhibitrice à 50% (CI₅₀) en µg/mL de POE5, POE27, CM04, CM05 et CM09 isolés de *P. oliveri* et *C. multiflorum* et de l'antibiotique de référence (AR)

Composé	Activité cytotoxique CI ₅₀ (µg/mL)
	Myoblaste de rat squelettique L-6
<i>N</i> -acétyl polyveoline (POE5, 130)	42,7
<i>N</i> -acétyl-8α-polyveolinone (POE27, 129)	38,5
Garjasmine (CM04, 137)	57,8
Gardenine (CM05, 138)	50,3
Acide deacétyl asperulosidique (CM09, 133)	60,4
Podophyllotoxine (AR)	0,007

Il ressort de ce tableau que tous les composés testés ont une activité cytotoxique contre la cellule L-6 avec des CI₅₀ comprises entre 38,5 et 60,4 µg/mL. Ces valeurs sont largement supérieures à celle du contrôle positif (0,007 µg/mL), traduisant ainsi la faible activité cytotoxique de ces composés.

II.4.4. Conclusion partielle

L'étude pharmacologique de certains composés isolés en quantité suffisante des deux plantes nous a permis d'évaluer leurs activités antiplasmodiales, antimicrobiennes et cytotoxiques. Il en ressort que :

- La *N*-acétyl 8 α -polyveolinone (POE27 **129**) et la gardenine (CM05 **138**) isolées respectivement des écorces du tronc de *Polyalthia oliveri* et de *Canthium multiflorum* possèdent une activité antiplasmodiale significative sur les deux souches de *Plasmodium falciparum* (NF54 et K1) avec des IC₅₀ respectivement de 7,60 $\mu\text{g/mL}$ et de 7,17 $\mu\text{g/mL}$.

- La galioside (CM11 **139**) et la 6-oxo-genipin (CM10 **134**) isolées des écorces de *Canthium multiflorum* ont montré des activités antimicrobiennes remarquables contre *Serratia plymuthica* (DSM4540) et *Staphylococcus aureus* (DSM799) avec des CMI respectivement égales à 0,05 $\mu\text{g/mL}$ et à 0,01 $\mu\text{g/mL}$ comparées à celle de l'antibiotique de référence, la gentamycine qui est de 0,05 $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats pourraient justifier l'utilisation de la plante dans le traitement des maladies infectieuses.

- La *N*-acétyl polyveoline (POE5), la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone (POE27 **129**), la garjasmine (CM04 **137**), l'acide deacétyl asperulosidique (CM11 **139**) et la gardenine (CM05) testés pour leurs activités cytotoxiques ont montré des activités sur les cellules L-6 avec des CI₅₀ variant entre 38,5 et 60,4 $\mu\text{g/mL}$. Ce qui permet de conclure que ces composés possèdent des activités modérées comparées à celle de la podophyllotoxine pris comme référence et dont la CI₅₀ est de 0,007 $\mu\text{g/mL}$.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude phytochimique que nous avons effectuée sur les écorces des tiges de *P. oliveri* ainsi que sur la partie aérienne de *C. multiflorum* a conduit à l'isolement de 19 composés. Les structures de ces composés ont été élucidées grâce à l'analyse de leurs spectres de masse et aux différentes techniques spectroscopiques 1D et 2D. Il s'agit de:

- 03 triterpènes: le polycarpol (POE4, **122**), l'acide oléanolique (CM01, **120**) et l'acide quinovique (CM02, **121**);

- 01 polyol ou carbohydrate: le D-mannitol ou 1,2,3,4,5,6-hexahydroxyhexane (CM06, **123**);

- 01 acide phénolique: l'acide 4-*O*- β -D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) vanilique (CM03, **124**);

- 09 iridoïdes: la 6 α -hydroxygeniposide (CM07, **131**), le scandoside méthyl ester (CM08, **132**), l'acide deacétyl asperulosidique (CM09, **133**), le 6-oxo-genipin (CM10, **134**), la gardenamide A (CM13, **135**), la macrophyllósíde (CM12, **136**), la garjasmíne (CM04, **137**), la Gardenine (CM05, **138**) et l'acide deacétyl asperulosidique (CM11, **139**);

- 03 indolosesquiterpènes: la 8 α -polyveolinone (POE30, **127**), la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone (POE27, **129**) et la *N*-acétyl polyveoline (POE5, **130**);

- 02 alcaloïdes aporphiniques: la bidebiline A (POE7, **125**) et la *N*-méthyl urabaine (POE19, **126**).

Les 3 indolosesquiterpènes sont des dérivés nouveaux ainsi que la 6-oxo-genipine. Tous les 15 autres composés sont connus.

L'étude pharmacologique de certains composés isolés en quantité suffisante des deux plantes nous a permis de mettre en évidence leurs activités antiplasmodiale, antimicrobiennes et cytotoxique. Il en ressort que:

- La *N*-acétyl 8 α -polyveolinone (POE27, **129**) et la gardenine (CM05, **138**) isolées respectivement des écorces du tronc de *Polyalthia oliveri* et de la partie aérienne de *Canthium multiflorum* possèdent une activité antiplasmodiale significative sur les deux souches de *Plasmodium falciparum* (NF54 et K1) avec des IC₅₀ respectivement de 7,60 μ g/mL et de 7,17 μ g/mL. En revanche, l'acide deacétyl asperulosidique (CM09, **133**) et la *N*-acétyl polyveoline (POE5 **130**) ont montré des activités faibles ou modérées.

- La galioside (CM11, **139**) et la 6-oxo-genipin (CM10, **134**) isolées de la partie aérienne de *Canthium multiflorum* ont montré des activités antimicrobiennes remarquables

contre *Serratia plymuthica* (DSM4540) et *Staphylococcus aureus* (DSM799) avec des CMI respectivement égales à 0,05 µg/mL) et à 0,01 µg/mL comparées à celle de l'antibiotique de référence, la gentamycine qui est de 0,05 µg/mL. Trois autres composés, la gardenamide A (CM13, **135**), la macrophyllósíde (CM12, **134**) et l'acide deacétyl asperulosídique (CM09, **133**) ont montré des activités appréciables respectivement contre *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia plymuthica* et *Escherichia coli*. Ces résultats pourraient justifier l'utilisation de la plante dans le traitement des maladies infectieuses.

- La *N*-acétyl polyveoline (POE5, **130**), la *N*-acétyl-8α-polyveolinone (POE27, **129**), la garjasmíne (CM04, **137**), l'acide deacétyl asperulosídique (CM11, **139**) et la gardeníne (CM05, **138**) testés pour leurs activités cytotoxiques ont montré des activités sur les cellules L-6 avec des CI₅₀ variant entre 38,5 et 60,4 µg/mL. Ce qui permet de conclure que ces composés possèdent des activités modérées comparées à celle de la podophyllotoxíne pris comme référence et dont la CI₅₀ est de 0,007 µg/mL.

Il a été également question dans le cadre de ce travail d'effectuer quelques transformations chimiques sur les dérivés nouveaux dans le but de confirmer leurs structures. C'est ainsi que la *N*-acétyl-8α-polyveolinone (POE27, **129**) a été hydrolysée en milieu acide et nous avons obtenu la 8α-polyveolinone (POE30, **128**). Nous avons aussi acétylé la *N*-acétyl polyveoline qui a conduit à la *O,N*-diacétyl polyveoline **140**.

Pour la suite de nos travaux, nous envisageons évaluer la toxicité des composés bio-actifs et étendre notre investigation sur les autres parties de ces plantes et sur d'autres espèces des genres *Polyalthia* et *Canthium*.

CHAPITRE III: MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.1. GÉNÉRALITÉS

Les points de fusion ont été pris sur un appareil de type Gallenkamp modèle MFB.595.010 m pour points de fusion et sont non corrigés.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à température ambiante dans le chloroforme deutéré sur un polarimètre digital JASCO DIP-360.

Les balances utilisées sont de marque COBOS, modèle D-600-SIX, précision 1/1000 et SARTORIUS, modèle, BL1500S, précision 1/100.

Les spectres IR ont été enregistrés sur des spectrophotomètres de type JASCO 320-A ou NICOLET 510 P FT-IR, soit sur les pastilles de KBr, soit dans le CHCl_3 .

Les spectres UV ont été enregistrés à l'aide des spectrophotomètres HITACHI UV 3200 ou UV-210 PC et les λ_{max} sont données en nm.

Les spectres de masse ont été réalisés à haute résolution sur un spectromètre de type LTQ-Orbitrap Spectrometer (Thermo Fisher ou Santa clara, USA) muni d'une source HESI-II sous une énergie de 35 eV.

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à l'aide des appareils Bruker DRX-500 et opérant à des fréquences de 500 MHz pour la RMN ^1H et 125 MHz pour la RMN ^{13}C . Les déplacements chimiques sont donnés en ppm avec comme référence interne le tétraméthylsilane ($\delta = 0$). Les solvants utilisés sont deutérés à l'instar du chloroforme, du méthanol, du diméthylsulfoxyde et de l'eau.

Les spectres CD ont été enregistrés en utilisant un spectropolarimètre de type JASCO J-815.

Les spectres HMBC, HMQC, NOESY et COSY ont été enregistrés avec les séquences d'impulsions usuelles.

Les constantes de couplage J sont exprimées en Hertz.

Les silices utilisées pour les colonnes sont de plusieurs granulométries (0,063-0,200; 0,200-0,500 mm de diamètre) et de type MERCK. Les chromatographies sur couche mince analytique et préparative ont été réalisées à partir des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice de type 60 F₂₅₄, d'épaisseur 0,2 mm et de dimension 20×20 cm.

Les révélateurs utilisés pour visualiser les taches en CCM sont l'acide sulfurique dilué (50%) et la lampe UV (254 et 366 nm). Les plaques CCM sont pulvérisées sous la hotte et calcinées à l'étuve à une température avoisinant 100 °C.

Les données cristallographiques ont été collectées sur des diffractomètres de type Oxford Diffraction Xcalibur S à 173°K en utilisant une radiation monochromatique de longueur d'onde $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$.

III.2. MATERIEL VEGETAL

III.2.1. *Polyalthia oliveri*

Les écorces du tronc de *Polyalthia oliveri* ont été récoltées au sommet du Mont Kala, Région du Centre, Cameroun le 09 juin 2012. L'identification a été faite par M. NANA Victor, botaniste de l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé où un spécimen a été enregistré et conservé sous le numéro 1952/SRFK.

III.2.2. *Canthium multiflorum*

La partie aérienne de *Canthium multiflorum* a été récoltée à Obala, au bord du fleuve Sanaga, Région du Centre, Cameroun en juillet 2010. L'identification a été faite par M. NANA Victor, botaniste de l'Herbier National du Cameroun à Yaoundé où un spécimen a été enregistré et conservé sous le numéro 27357 SRF Cam.

III.3. EXTRACTION, ISOLEMENT ET PURIFICATION DES COMPOSES

III.3.1. *Polyalthia oliveri*

Les écorces du tronc ont été découpées, séchées puis broyées. La poudre obtenue (4 Kg) a été extraite au mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) pendant 48 heures. L'évaporation du solvant sous pression réduite a permis d'obtenir 434 g d'extrait pâteux, collant et de couleur noire qui a été reextrait dans un mélange $\text{AcOEt}/\text{H}_2\text{O}$ pour donner 125 g d'extrait à l'acétate d'éthyle. Une partie de cet extrait (118 g) a été chromatographiée sur colonne flash et éluee avec les mélanges *n*-hexane/ AcOEt et AcOEt/MeOH de polarité croissante. 101 fractions de 200 mL chacune ont été collectées et regroupées sur la base de la chromatographie sur couche mince (Tableau XXXII) en 6 séries (A–F).

Tableau XXXII: Chromatogramme de dégrossissement de 118 g d'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *Polyalthia oliveri*

Fractions	Eluant	Série	Masse	Observation
1–9	Hex pur	A	8,3 g	Melange d'huiles
10–31	Hex/AE (10% et 20%)	B	22,7 g	Mélange de produits
32–53	Hex/AE (30% et 40%)	C	28,0 g	Mélange complexe de produits
54–76	Hex/AE (50%)	D	17,5 g	Mélange d'environ 4 produits
77–98	AE pur et AE/MeOH 5%	E	15,8 g	Mélange de produits
99–101	AE/MeOH 10%	F	13,0 g	Trainée

L'analyse couplée Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse (LC-MS) (figure 73) des ces 6 séries a révélé la présence de plusieurs alcaloïdes. Nous avons ensuite étudié les fractions dont les chromatogrammes ont montré des pics correspondant aux masses non encore identifiées dans cette espèce. Il s'agit des ions quasi-moléculaires ($C_{23}H_{32}NO$ de m/z 338,24784; $C_{25}H_{34}NO_2$ de m/z 380,25841 et $C_{25}H_{36}NO_2$ de m/z 382,27406) représentant des possibles dérivés d'indolosesquiterpènes nouveaux (figure 69). Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse de leurs spectres MS/MS (figure 70).

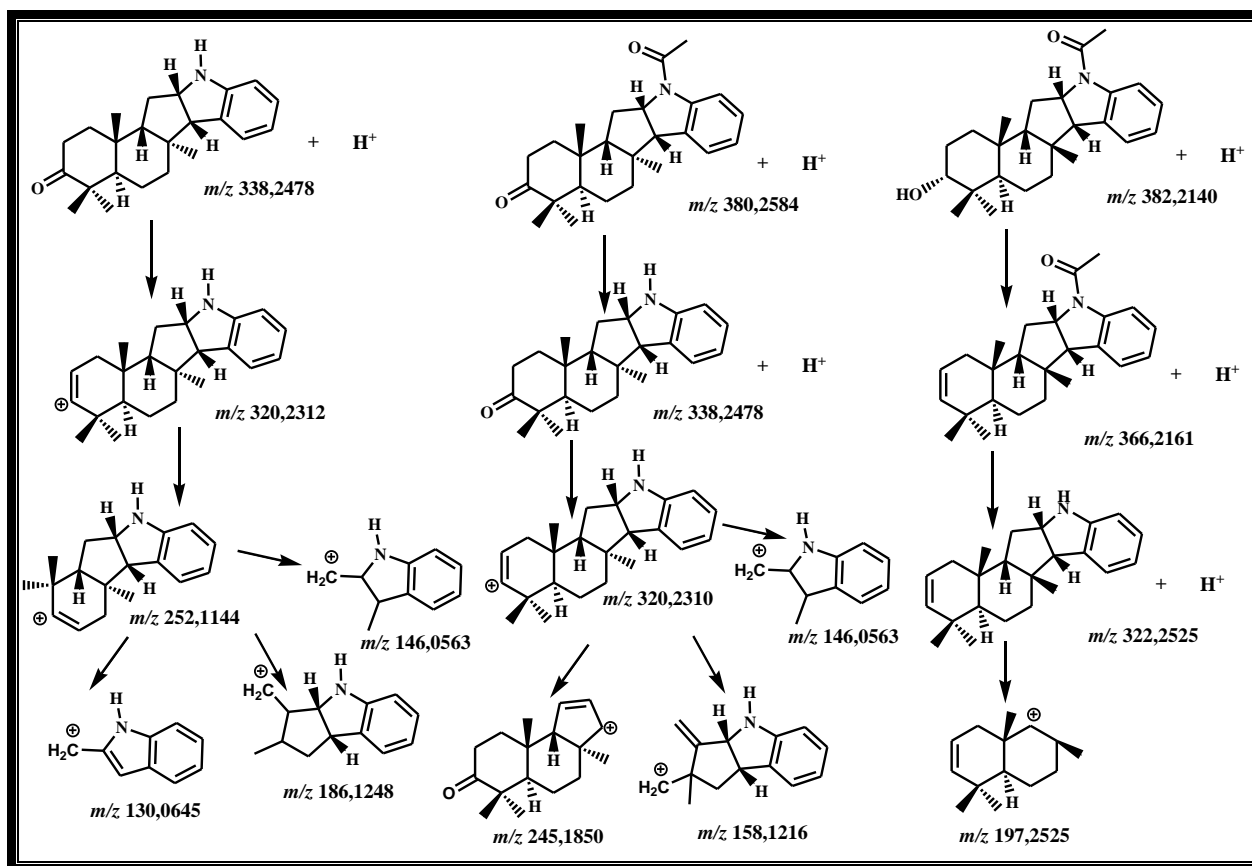


Schéma 22: Principaux ions fragments observés sur le spectre MS/MS

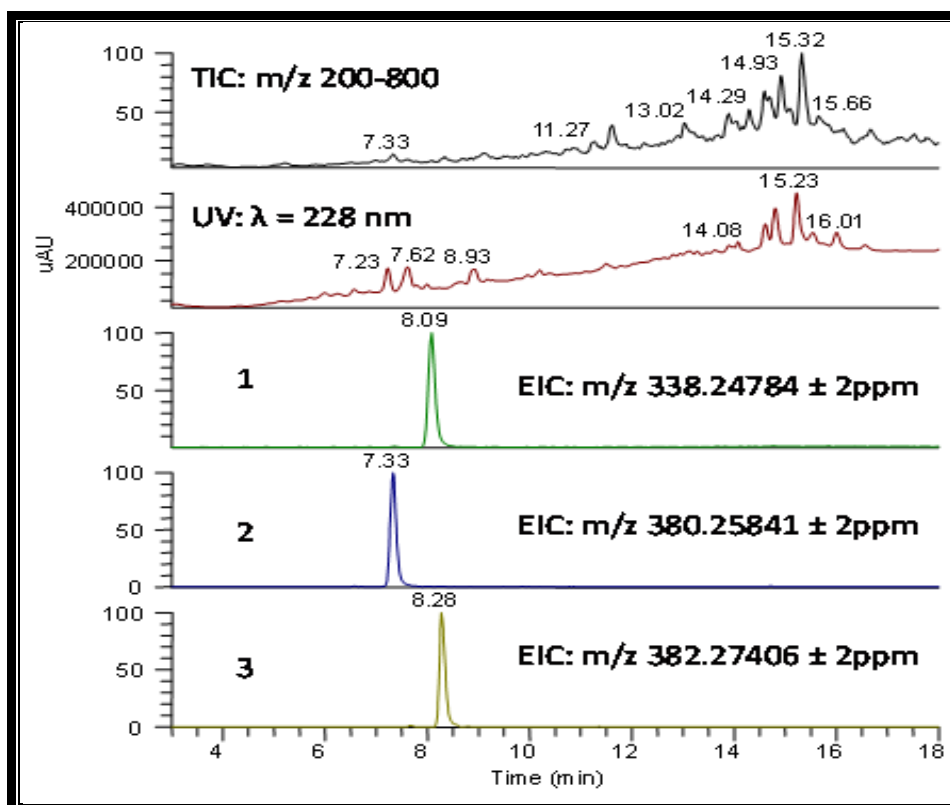


Figure 73: Chromatogramme LC-MS des dérivés nouveaux d'indolosesquiterpènes

C'est ainsi que la série B (22,7 g) a été rechromatographiée sur colonne de gel de silice avec le mélange hexane-AcOEt comme éluant. 76 fractions de 100 mL ont été collectées et regroupées sur la base de la CCM analytique en 6 sous-fractions (I–VI).

Tableau XXXIII: Chromatogramme de la série B

Fractions	Eluant	Sous-fractions	Masse	Observation
1–11	Hex/AE (25%)	I	2,3 g	Mélange de produits dont POE4
12–38	-/-	II	4,7 g	Mélange de produits
39–47	-/-	III	2,1 g	Mélange de produits
48–59	-/-	IV	2,5 g	Mélange de produits
60–70	-/-	V	3,8 g	Mélange de produits
71–76	-/-	VI	3,0 g	Mélange de produits

Après filtration du contenu du flacon I, nous avons obtenu le composé POE4 (25 mg).

La sous fraction III a été rechromatographiée sur colonne de gel de silice avec comme éluant le mélange hexane-AcOEt de polarité croissante en commençant par hexane-AcOEt 10% pour donner les composés POE30 (7,2 mg) et POE7 (18,4 mg).

La série D (17,5 g) a été chromatographiée sur colonne de gel de silice avec le mélange hexane-AcOEt (25–40%) comme éluant. 5 sous fractions (D₁–D₅) ont été obtenues (Tableau XXXIV) sur la base de la chromatographie sur couche mince.

Tableau XXXIV: Chromatogramme de la série D

Fractions	Eluant	Sous-fractions	Masse	Observation
1–7	Hex/AE (25%)	D1	2,1 g	Mélange de produits
8–18	Hex/AE (30%)	D2	2,7 g	Mélange de produits
19–27	Hex/AE (35%)	D3	3,1 g	Mélange de produits
28–49	Hex/AE (40%)	D4	2,5 g	Mélange de produits
50–67	Hex/AE (50%)	D5	4,8 g	Mélange de produits

La sous-fraction D3 a été rechromatographiée sur colonne de gel de silice avec comme éluant le mélange hexane-AcOEt de polarité croissante (25-40%) pour donner les composés POE27 (17,0 mg), POE5 (15,2 mg) et POE19 (22,1 mg).

III.3.2. *Canthium multiflorum*

La partie aérienne de *C. multiflorum* découpée et séchée au soleil, a été broyée. La poudre obtenue (1035 g) a été extraite deux fois au mélange chlorure de méthylène-méthanol (1:1) à température ambiante pendant 48 h et 24 h respectivement. Après évaporation du solvant, nous avons obtenu 132 g d'extrait brut.

Une partie de cet extrait (125 g) a été soumise à une chromatographie flash sur colonne de gel de silice avec comme éluant les mélanges hexane-acétate d'éthyle et chlorure de méthylène-méthanol de polarité croissante. Des portions de 200 mL ont été recueillies et regroupées sur la base de la C.C.M. analytique pour donner 13 fractions (A₁-A₁₃).

Tableau XXXV: Chromatogramme de fractionnement de 125 g d'extrait brut

Fractions	Eluant	Fractions	Masse	Observation
1-11	Hex pur	A ₁	8,3 g	Mélange d'huiles
12-25	Hex/AE 10%	A ₂	16,7 g	Mélange de produits
26-33	Hex/AE 25%	A ₃	13,0 g	Mélange de produits
34-46	Hex/AE 30%	A ₄	7,7 g	Mélange de produits
47-58	Hex/AE 40%	A ₅	10,0 g	Mélange de produits
59-70	CH ₂ Cl ₂ pur	A ₆	8,1 g	Mélange de produits
71-85	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 5%	A ₇	7,3 g	Mélange de produits
86-97	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 10%	A ₈	11,2 g	Mélange de produits
98-111	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 15%	A ₉	9,8 g	Mélange de produits
112-128	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 25%	A ₁₀	5,9 g	Mélange de produits
129-140	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 30%	A ₁₁	8,7 g	Mélange de produits
141-156	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 40%	A ₁₂	9,8 g	Mélange de produits
157-170	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 50%	A ₁₃	6,4 g	Mélange de produits

D'après l'analyse GC-MS, la fraction A₁ est un mélange complexe d'hydrocarbure et d'acide gras et n'a pas été étudiée.

Sur la base de la C.C.M., les fractions A₄, A₅, A₆ et A₁₂ ont été soumises chacune à une chromatographie sur colonne de gel de silice avec le même système de solvant pour donner respectivement CM01 (11 mg), CM09 (10 mg), CM02 (25 mg) et CM06 (60 mg).

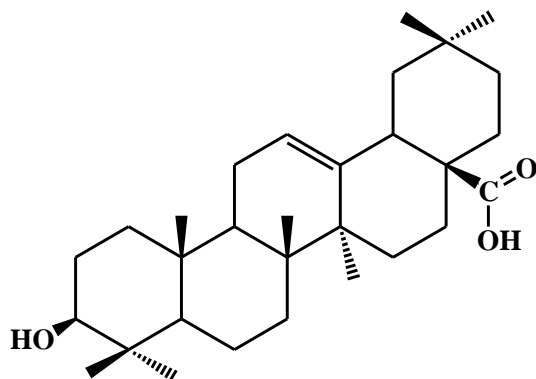
La chromatographie sur colonne de gel de silice avec le mélange CH₂Cl₂/MeOH comme éluant de la fraction A₉ a conduit à 55 sous-fractions (B₁-B₅₅). Selon leurs profils LC-MS, les sous-fractions B₃-B₇, B₈-B₁₃ et B₃₉-B₅₀ ont été regroupées et purifiées chacune à l'aide de la HPLC semi-préparative avec le système H₂O + 0,1% HCOOH(A)-MeOH(B) comme éluant pour donner les produits CM05 (95 mg), CM04 (15 mg), CM13 (11 mg), CM10 (13 mg) et CM03 (17 mg).

Les fractions A₁₀ et A₁₁ sont des mélanges de produits d'après leurs profils HPLC. Ainsi, la HPLC sémi-préparative de la fraction A₁₀ a conduit à l'isolement du composé CM12 (36 mg) alors que celle de la fraction A₁₁ a conduit à l'isolement des composés CM11 (5 mg), CM07 (3 mg) et CM08 (17 mg).

III.4. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPOSES ISOLES

III.4.1. Les triterpènes

III.4.1.1. Acide oleanolique (CM01, 120)



Aspect physique: poudre blanche

Test de Liebermann-Burchard : positif

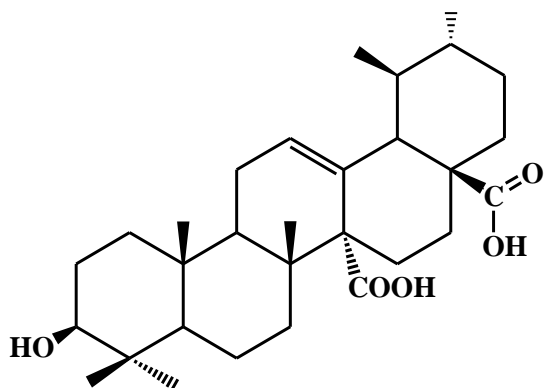
Solvant de solubilité: méthanol

Formule brute: $C_{30}H_{48}O_3$

Spectre de masse: $[M+H]^+$ m/z 457,3676

Spectre RMN 1H et ^{13}C : Tableau XV. Page 69

III.4.1.2. Acide quinovique (CM02, 121)



Aspect physique : poudre blanche

Test de Liebermann-Burchard : positif

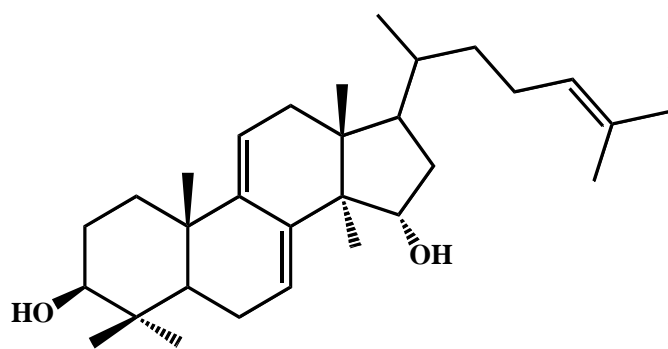
Solvant de solubilité: méthanol

Formule brute: $C_{30}H_{46}O_5$

Spectre de masse: $[M+H]^+$ m/z 487,1216

Spectre RMN 1H et ^{13}C : Tableau XVI. Page 73

III.4.1.3. Polycarpol (POE4, 122)



Aspect physique: aiguilles incolores

Test de Liebermann-Burchard: positif

Point de fusion: 173–174°C

Solvant de solubilité: méthanol

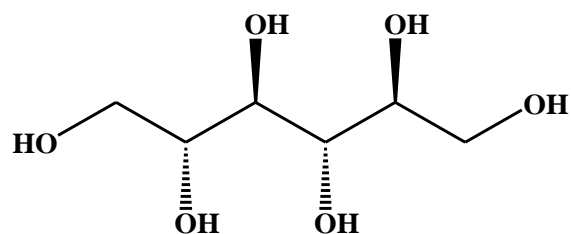
Formule brute: C₃₀H₄₈O₂

Spectre de masse: [M+H]⁺ m/z = 441,3731

Spectre RMN ¹H et ¹³C: Tableau XVII Page 77

III.4.2. Le carbohydrate ou polyol

D-mannitol (CM06, 123)



Aspect physique: poudre blanche

Test de Molish: positif

Solvant de solubilité: méthanol

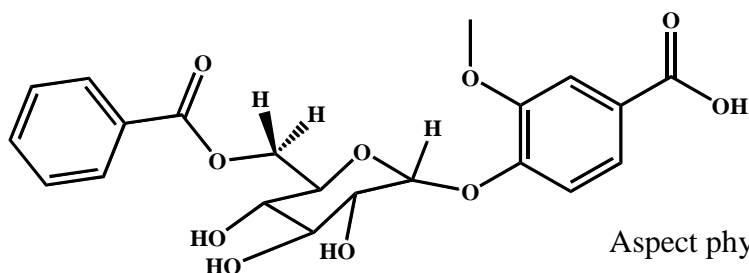
Formule brute: C₆H₁₄O₆

Spectre de masse: [M+H]⁺ m/z. 183, 0864

Spectre RMN ¹H et ¹³C: Tableau XVIII Page 81

III.4.3. L'acide phénolique

Acide 4-O-β-D-(6-O-benzoylglucopyranoside) vanilique (CM03, 124)



Aspect physique: poudre blanche

Solvant de solubilité: chloroforme

UV: 282 nm

IR: 3333, 1706, 1624, 1070 cm^{-1}

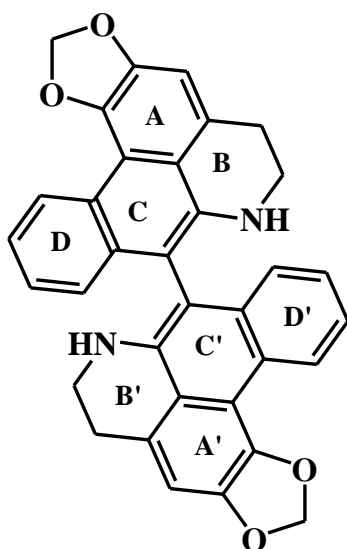
Formule brute: $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$

Spectre de masse: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 457,1097

Spectre RMN ^1H et ^{13}C : Tableau XIX Page 86

III.4.4. Les alcaloïdes

III.4.4.1. Bidebiline A (POE7, 125)



Aspect physique: poudre verdâtre

Test de Dragendorff: positif

Solvant de solubilité: chloroforme

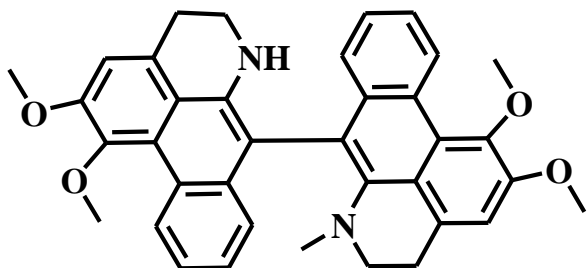
UV: 400, 336, 262, 226 nm

Formule brute: $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2$

Spectre de masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 525,1813

Spectre RMN ^1H et ^{13}C : Tableau XX Page 93

III.4.4.2. *N*-methylurabaine (POE19, 126)



Aspect physique: poudre grise

Test de Dragendorff: positif

Solvant de solubilité: chloroforme

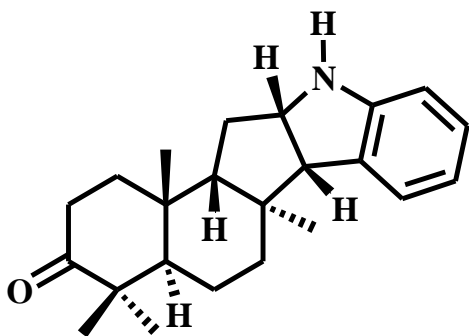
UV: 330, 260, 228 nm

Formule brute: $C_{37}H_{34}O_4N_2$

Spectre de masse: $[M+H]^+$ m/z 571,2629

Spectre RMN 1H et ^{13}C : Tableau XXI Page 97

III.4.4.3. 8α -Polyveolinone (POE30, 127)



Aspect physique: huile claire

Test de Dragendorff: positif

Solvant de solubilité: chloroforme

Pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D^{26} +118,6^\circ$ (c 6,6, CH_2Cl_2)

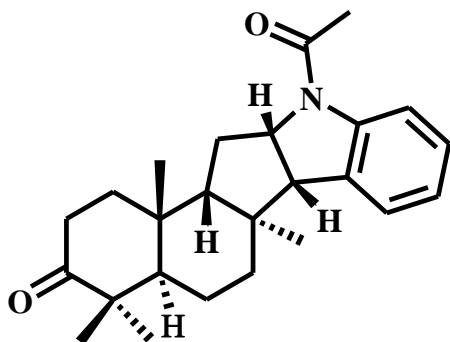
IR (KBr): 3300, 1695, 1618, 1595 cm^{-1}

Formule brute: $C_{23}H_{32}ON$

Spectre de masse: $[M+H]^+$ m/z 338,2473 (calcd. pour $C_{23}H_{33}ON$ 338,2483)

Spectre RMN 1H et ^{13}C : Tableau XXII Page 112 et 113

III.4.4.4. *N*-acétyl-8 α -polyveolinone (POE27, 129)



Aspect physique: cristaux bruns.

Test de Dragendorff : positif

Solvant de solubilité: chloroforme

Pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D^{26} +215^\circ$ (c 9,2, MeOH)

Point de fusion: 199–203°C

IR (KBr) : 3300, 1656 cm^{-1}

UV (MeOH): 290, 228 nm

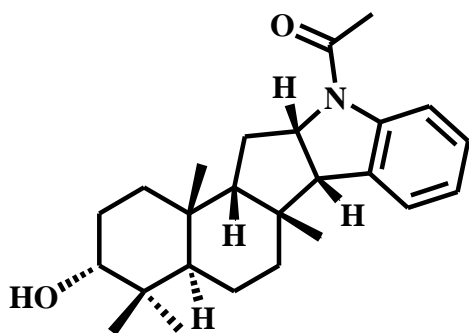
Formule brute: $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}$

Spectre de masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 380, 2592 (calcd. pour $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{O}_2\text{N}$ 380,2589)

Spectre RMN ^1H et ^{13}C : Tableau XXIII Page 112 et 113

Spectre DC (c 0,1 MeOH) λ_{max} 255 (+10) nm

III.4.4.5. *N*-acétyl polyveoline (POE5, 130)



Aspect physique: cristaux marron.

Test de Dragendorff: positif

Solvant de solubilité: chloroforme

Point de fusion: 225–229°C

IR (KBr): 3440, 1665 cm^{-1}

UV (MeOH): λ_{max} 216, 259, 282, 291 nm

Formule brute: $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_2\text{N}$

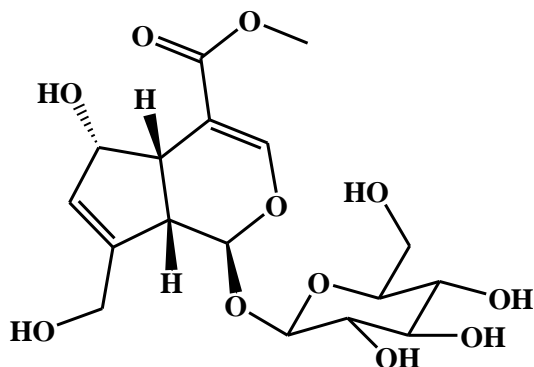
Spectre de masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 382,2738 (calcd. pour $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{O}_2\text{N}$ 382.2746)

Spectre RMN ^1H et ^{13}C : Tableau XXIV Page 112 et 113

Spectre DC (c 0,1 MeOH) λ_{max} 255 (+10) nm

III.4.5. Les iridoïdes

III.4.5.1. 6 α -hydroxygeniposide (CM07, 131)



Aspect physique: poudre blanche.

Test de Trim-Hill: positif

Test de Molish: positif

Solvant de solubilité: méthanol

IR: 3440, 3100, 1710, 1630 cm^{-1}

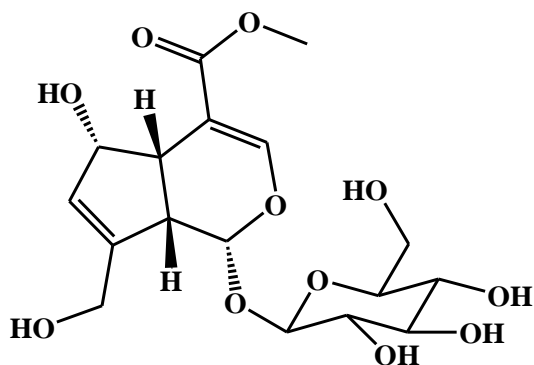
UV: 235 et 233 nm

Formule brute: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}\text{N}$

Spectre de masse: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 427,1208$

Spectre RMN ^1H et ^{13}C : Tableau XXV Page 119

III.4.5.2. Scandoside ester de méthyle (CM08, 132)



Aspect physique: poudre blanche.

Test de Trim-Hill: positif

Test de Molish: positif

Solvant de solubilité: méthanol

IR: 3440, 3100, 1710, 1630 cm^{-1}

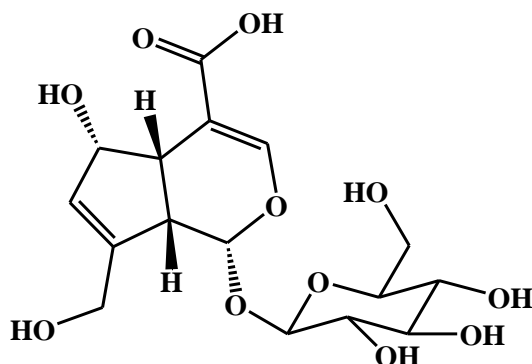
UV: 235 et 233 nm

Formule brute: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$

Spectre de masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 427,1212$

Spectre RMN ^1H et ^{13}C : Tableau XXVI Page 123

III.4.5.3. Acide deacétyl asperulosidique (CM09, 133)



Aspect physique: cristaux jaune.

Test de Trim-Hill: positif

Test de Molish: positif

Solvant de solubilité: méthanol

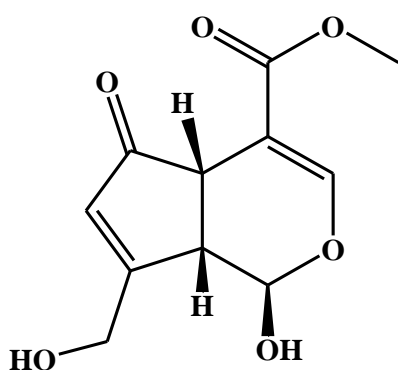
Point de fusion: 130-134°C

Formule brute: C₁₆H₂₂O₁₁

Spectre de masse: [M+H]⁺ m/z 391,2916

Spectre RMN ¹H et ¹³C: Tableau XXVII Page 127

III.4.5.4. 6-oxo-genipin (CM10, 134)



Aspect physique: poudre amorphe verdâtre.

Test de Trim-Hill: positif

Solvant de solubilité: DMSO

Pouvoir rotatoire: [α]_D²⁶ +16° (c 2,2, CH₃OH).

IR (KBr): 3421, 1625 cm⁻¹

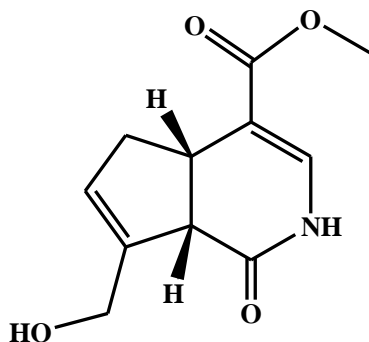
UV(MeOH): λ_{max} = 256 nm

Formule brute: C₁₁H₁₃O₆

Spectre de masse: [M+H]⁺ m/z 241,0708 (calcd. 241,0712)

Spectre RMN ¹H et ¹³C: Tableau XXVIII Page 131

III.4.5.5. Gardenamide A (CM13, 135)



Aspect physique: poudre amorphe.

Test de Trim-Hill: positif

Test de Dragendorff: positif

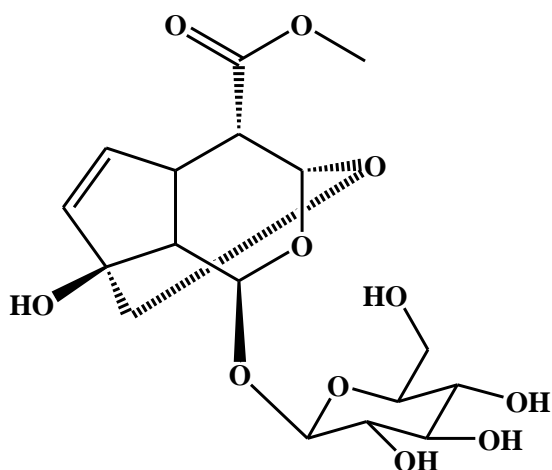
Solvant de solubilité: acétone

Formule brute: C₁₁H₁₃O₄N

Spectre de masse: [M+H]⁺ m/z 224,0920.

Spectre RMN ¹H et ¹³C: Tableau XXIX Page 135

III.4.5.6. Macrophyllósíde (CM12, 136)



Aspect physique: poudre blanche.

Test de Trim-Hill: positif

Test de Molish: positif

Solvant de solubilité: méthanol

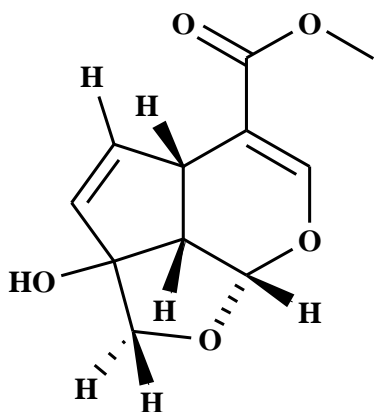
IR: 3424, 1730, 1649 cm⁻¹

Formule brute: C₁₇H₂₄O₁₁

Spectre de masse: [M+Na]⁺ m/z 427,1212

Spectre RMN ¹H et ¹³C: Tableau XXX Page 140

III.4.5.7. Garjasmine (CM04, 137)



Aspect physique: cristaux blancs.

Point de fusion: 135-135,5°C

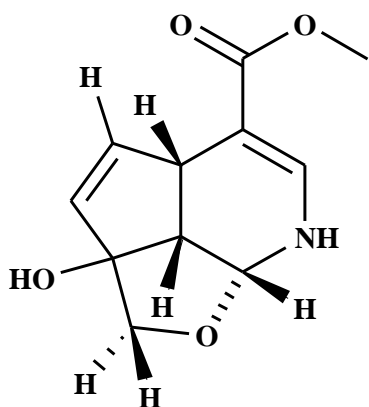
Test de Trim-Hill: positif

Pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D^{26} +254^\circ$ (c 0,40, CHCl₃).

Formule brute: C₁₁H₁₂O₅

Spectre de masse: $[M+H]^+$ m/z, 225,0757

III.4.5.8. Gardenine (CM05, 138)



Aspect physique: huile claire.

Test de Trim-Hill: positif

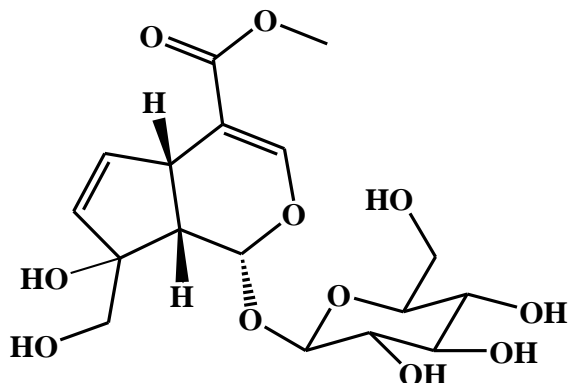
Dragendorff: positif

Pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D^{26} +78.0^\circ$ (c 0.118, MeOH)..

Formule brute: C₁₁H₁₃O₄N

Spectre de masse: $[M+H]^+$ m/z, 224,0922

III.4.5.9. Galioside (CM11, 139)



Aspect physique: huile claire.

Test de Trim-Hill: positif

Pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D^{26} +78.0^\circ$ (c 0.118, MeOH)..

Formule brute: C₁₇H₂₂O₁₁

Spectre de masse: $[M+H]^+$ m/z, 342,1810

III.5. ACTIVITES BIOLOGIQUES

III.5.1. Activité antiplasmodiale

Pour cette étude, deux souches présentées comme multi-résistante et sensible aux antipaludiques ont été utilisées. Il s'agit respectivement de *Plasmodium falciparum* K1 et *Plasmodium falciparum* NF54. La chloroquine utilisée comme antipaludique de référence provient de la Thaïlande (Thaithong et al., 1983). Les composés testés (POE5, POE27, CM04, CM05 et CM09) ont été dissous dans le DMSO à la concentration de 10 µg/mL. La solution obtenue a été mélangée au milieu de culture RPMI 1640 [HEPES (5,94 g/L), NaHCO₃ (2,1 g/L), neomycine (100 U/mL), AlbumaxR et les globules rouges humaines A+ (2,5%).] sans hypoxanthine. C'est ainsi que 11 séries de solutions diluées avec des concentrations comprises entre 100 et 0,002 µg/mL ont été préparées et introduites dans des plaques de 96 puits. Ces plaques ont été incubées à 37°C dans une atmosphère enrichie de 4% de CO₂, 3% d'O₂ et 93% de N₂. Après 48h, on a ajouté dans chaque puits 50 µL d'hypoxanthine. Les plaques ont été à nouveau incubées dans les mêmes conditions mais pendant 24h seulement avant d'être recouvertes de cellules de type Betaplate (Wallac, Zurich, Suisse). On a transféré les globules rouges sur un filtre à fibres en verre et lavées avec de l'eau distillée. Le filtre séché a été inséré dans un papier plastique avec 10 mL de fluide et placé dans le Betaplate.

Les valeurs des CI₅₀ ont été calculées à partir des courbes d'inhibition sigmoïdale par régression linéaire.

III.5.2. Activité antimicrobienne

Les bactéries sont classées en deux grands groupes en fonction de la nature de leur paroi. En effet, les bactéries à paroi fine peuvent réagir positivement à la coloration de Gram : elles sont dites bactéries Gram positif. Par contre, celles à paroi épaisse réagissent négativement et sont dites bactéries Gram négatif.

Dans la coloration de Gram, les bactéries sont d'abord colorées par du violet de gentiane, puis elles sont traitées par la liqueur de Gram. Après lavage à l'éthanol, les bactéries qui retiennent la coloration bleu-foncée du violet de gentiane sont des bactéries Gram positif et celles qui ne retiennent aucune coloration sont appelées Bactéries Gram négatif (Hermane, 1985).

Pour cette évaluation de l'activité antimicrobienne de quelques composés isolés, les souches utilisées sont *Staphylococcus aureus* (DSM 799) comme Gram positif, *Actinobacter calco-aceticus* (DSM 30006), *Serratia plymuthica* (DSM 4540), *Pseudomonas stutzeri* (DSM 4166) et *Escherichia coli* (DSM 1116) comme gram négatif. Les antibiotiques de référence utilisés sont : Tétracycline, Gentamicine et Streptomycine.

Le milieu utilisé pour l'activation des microorganismes est le bouillon nutritif MDG (Merck, Darmstadt, Germany) et cette activation a été optimisée selon le guide DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Ces souches microbiennes activées ont été inoculées et cultivées sur géloses nutritives à 37°C pendant 24h.

Les activités antimicrobienne des composés testés ont été déterminées par la méthode de diffusion sur disques telle que décrite par Wilker, 2006. Le milieu solide a été préparé dans des boîtes de pétri stérilisées de 90 mm contenant 22 mL d'agar nutritif sur une profondeur finale de 4 mm. 100 µL de chaque inoculum a été aspergé sur la gélose et répandu uniformément à l'aide des techniques standards. Sur des papiers disque stérilisés de 6mm de diamètre on a imprégné 20 µL de chaque échantillon dissout dans le méthanol suivant des concentrations comprises entre 0,01 et 10,0 µg/mL. Après séchage sous hotte biologique, les disques ont été introduits dans les boîtes de pétri contenant les souches microbiennes. L'ensemble est ensuite maintenu à 4°C pendant 3 h avant d'être incubé à 37°C pendant 24 h. Les contrôles positifs et négatifs ont été effectués en testant uniquement l'effet du solvant et des antibiotiques de référence sur les bactéries. Ce qui nous a permis de déterminer les diamètres d'inhibition et par là même les CMI des composés testés.

III.5.3. Activité cytotoxique

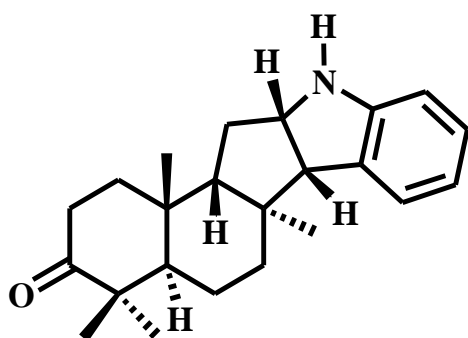
L'activité cytotoxique a été effectuée dans les boîtes de pétri de 96 puits contenant chacune 100 µL de milieu RPMI 1640 supplémenté de 1% de L-glutamine (200mM), 10% de serum bovin foetal et 4000 cellules myoblastes de rat squelettique (L-6). Une série de dilutions avec des concentrations comprises entre 100 et 0,002 µg/mL ont été préparées. Après 70 h d'incubation, les plaques ont été examinées à l'aide d'un microscope dans le but de s'assurer la croissance effective des contrôles. 10 µL d'Alamar Blue ont été ajouté dans chaque puit avant d'incuber pendant 2 h une fois de plus. La lecture des plaques a été faite grâce à un fluoromètre microplaque de type Spectramax Gemini XS (Moléculaire Devices Coopération, Sunnyvale, CA, USA) utilisant une longueur d'onde d'absorption de 536 nm et une longueur d'onde d'émission de 588 nm. Les valeurs de CI₅₀ ont été calculées par

régression linéaire des courbes d'inhibition sigmoïdale utilisant un logiciel de marque SoftmaxPro (Molécular Devices Coopération, Sunnyvale, CA, USA).

III.6. TRANSFORMATIONS CHIMIQUES

III.6.1. Hydrolyse acide de la *N*-acétyl-8 α -polyveolinone

5,0 mg de *N*-acétyl-8 α -polyveolinone (POE27, **129**) (0,026 mmol) ont été dissous dans 10 mL de méthanol. Nous avons ajouté à la solution obtenue 20 mL d'une solution aqueuse d'acide sulfurique (H₂SO₄) 15 %. Le mélange a été porté à reflux pendant 8 h. Après refroidissement, nous avons dilué le milieu réactionnel avant d'extraire à l'acétate d'éthyle. Après séchage du résidu grâce à Na₂CO₄ nous avons obtenu un solide sous forme de gomme. Ce solide a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec le mélange hexane-acétate d'éthyle 35% comme éluant. Nous avons ainsi obtenu un composé déacétylé pur indexé POE27h (4,04 mg ; rendement = 91 %).



POE27h: 8 α -Polyveolinone **127**

Aspect physique: huile claire

Test de Dragendorff: positif

Solvant de solubilité: chloroforme

IR: 3300, 1695, 1618, 1595 cm⁻¹

Formule brute: C₂₃H₃₂NO

III.6.2. Acétylation de la *N*-acétyl polyveoline

10 mg de *N*-acétyl polyveoline (POE5 **130**) (0,026 mmol) ont été dissous dans 0,5 mL de pyridine anhydre puis acétylé avec 1,0 mL d'anhydride acétique à température ambiante pendant 12 h. L'extrait obtenu a été chromatographié sur colonne de gel de silice et nous avons obtenu une huile peu colorée et indexée POE5ac (10,8 mg ; rendement = 98,2 %).

POE5ac: *O*, *N*-diacétyl polyveoline

Aspect physique: huile colorée

Test de Dragendorff: positif

Solvant de solubilité: chloroforme

Pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D^{26} = +96^\circ$ (*c* 10,8 ; MeOH)

Formule brute: C₂₇H₃₈NO₃

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): 8,28 (d, 8,2), 7,21 (t, 7,3); 7,16 (d, 7,3), 6,99 (t, 7,3), 4,62 (brs), 4,56 (q, 7,9), 3,56 (d, 10,8), 2,52 (m), 2,26 (s), 2,06 (m), 2,05 (m), 1,93 (d, 14,0), 1,60 (m), 1,53 (dd, 2,9, 12,0), 1,42 (s), 1,34 (dd, 3,5, 12,9), 1,28 (m), 1,16 (s), 1,04 (dt, 3,8, 13,4), 0,85 (s), 0,84 (m), 0,77 (s);

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): 170,7 (CH₃C=O), 169,9 (CH₃C=O), 144,1 (C-2'), 131,1 (C-3'), 128,1 (C-6'), 124,2 (C-4'), 123,3 (C-5'), 116,9 (C-7'), 78,5 (C-3), 63,4 (C-12), 60,6 (C-9), 59,0 (C-13), 44,6 (C-8), 41,2 (C-5), 37,2 (C-4), 36,7 (C-11), 36,4 (C-10), 32,4 (C-7), 32,3 (C-1), 28,8 (C-17), 27,9 (C-15), 24,6 (CH₃C=O), 23,4 (C-16), 22,9 (C-2), 21,7 (C-14), 21,5 (CH₃C=O), 18,7 (C-6).

III.7. TESTS CARACTERISTIQUES DES CLASSES DE COMPOSES ISOLEES

III.7.1. Test de Molish

But: identifier les sucres

Réactifs: éthanol, α-naphtol, H₂SO₄ concentré.

Mode opératoire: dans un tube à hémolyse, dissoudre une petite quantité de produit à l'aide d'une solution d'éthanol-α-naphtol (1%) (1g de α-naphtol dans 99g d'éthanol). Laisser couler ensuite sur la paroi quelques gouttes de H₂SO₄ concentré.

Interprétation: la présence des sucres se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge violacé à l'interface.

III.7.2. Test de Trim-Hill

But: identifier les iridoïdes.

Réactifs: HCl concentré, acide acétique, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, réactif de Trim-Hill.

Mode opératoire: dans un tube à essai, dissoudre 1 g de plante découpée en petits morceaux dans 5 mL de HCl aqueux à 1 %. . Après 3 – 6 h, 0,1 mL du macérat est décanté dans un autre tube contenant 1 mL de réactif de Trim-Hill (composé de 10 mL d'acide acétique 1 mL de 0,2 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 0,5 mL de HCl concentré).

Interprétation: après chauffage du tube pendant un temps donné, une couleur bleue est produite s'il y a présence d'iridoïdes.

III.7.3. Test de Libermann-Burchard

But: identifier les triterpènes.

Réactifs: Chloroforme, anhydride acétique, H_2SO_4 concentré.

Mode opératoire: dans un tube à essai, dissoudre environ 1 mg de produit dans du chloroforme. Ajouter à la solution obtenue quelques gouttes d'anhydride acétique, puis d'acide sulfurique concentré.

Interprétation: L'observation d'une couleur rouge violacé indique la présence de triterpènes.

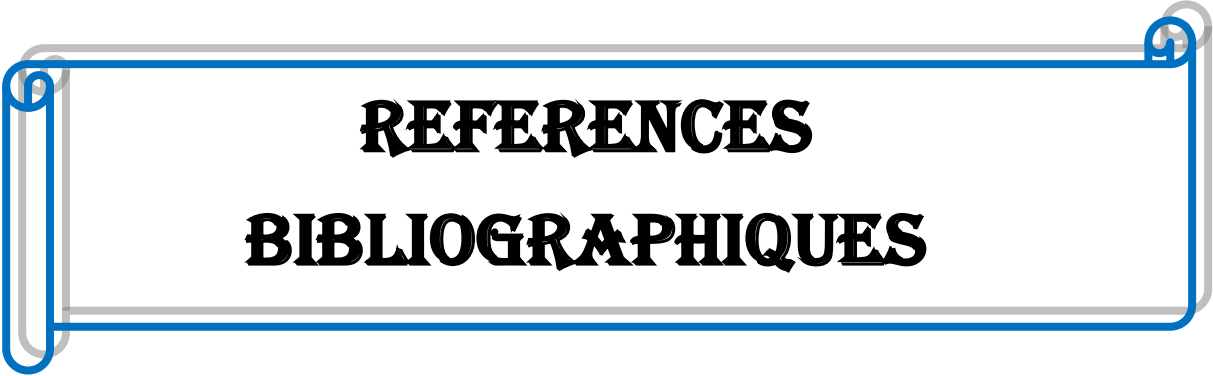
III.7.4. Test de Dragendorff

But: identifier les alcaloïdes.

Réactifs: Ethanol, solution de HCl, réactif de Dragendorff.

Mode opératoire: dans un tube à essai, dissoudre environ 1 mg de produit dans de l'éthanol. Ajouter à la solution obtenue quelques gouttes du réactif de Dragendorff (tetraiodobismuthate de potassium), puis quelques gouttes d'acide chlorhydrique et agiter.

Interprétation: La formation d'un précipité orange indique la présence d'alcaloïdes.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-
- Achenbach H., Waibel R., Raffelsberger B., Addae-Mensah I. 1981. Iridoid and other constituents of *Canthium subcordatum*. *Phytochemistry* **20**, 1591–1595.
- Aissatou M. D. 2005. Etude des plantes médicinales de Niafunke (Région Tombouctou), Phytochimie et Pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidaceae). Thèse de Doctorat d'état, Faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie, Université de Bamako-Mali. p. 68
- Akcos Y, Ezer N, Özcelik B, Abbasoglu U. 1998. Iridoid Glucosides from *Sideritis lycia* Boiss. and Heldr. and its Antimicrobial Activities. *J. Pharm. Sci.* **23**, 99–103.
- Akomo E.F.O., Zongo C., Karou S.D., Obame L.C., Savadogo A., Atteke C., Traoré A.S. 2009. In vitro antiploasmodial and antibacterial activities of *canthim multiflorum* Schum and Thonn (Rubiaceae) extracts. *Pakistan J. biol. sci.* **12**, 919–923.
- Arrif, S. 2009. Etude des métabolites secondaires de deux Scrophulariacées du genre *Verbascum* : *V. balli* et *V. dentifolium*. Thèse en Chimie, Faculté des Sciences, Université El Hadj Lahhdar-Batna Algérie, p 172
- Atia T.N., Shagufta P., Afshan B., Itrat F., Abdul M., Rascool B.T. 2009. Aitchisonides A and B, new irodoid glucosides from *Aitchisonia rosea*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **11**, 985–989.
- Atta-ur-Rahman 1986. Nuclear Magnetic Resonance. New-York, *Springerverlag*, 326–329.
- Bax A., Freeman R., Morris G., 1981. Correlation of proton chemical shifts by two-dimensional Fourier transform NMR. *J. Magn. Reson.* **42**, 164–168.
- Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. 1988. Bactériologie. Les bactéries des infections humaines. Edition Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, P. 660
- Boyom F.F., Tsouh F.P.V., Yamthe T.L.R., Mfopa N.A., Madiesse K.E., Mbacham W.F., Tsamo E., Amvam Z.H., Gut J., Rosenthal J.P. 2011. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annoceae. *J. Ethnopharmacol.* **134**, 717–724.
- Bringmann G., Hamm A., Kraus J., Ochse M., Noureldeen A., Jumbam D.N. 2001. Gardenamide A from *Rothmannia urcelliformis* (Rubiaceae) - Isolation, absolute
-

-
- stereostructure, and biomimetic synthesis from genipine. *Eur. J. Org. Chem.* **10**, 1983–1987.
- Bruneton J. 1993. *Phytochimie et plantes médicinales*. Paris, Pharmacognosie 2e édition, Techniques et documentation, Lavoisier, pp. 146-158, 200-274, 526-536, 627-876.
- Burkill H.M. 1985. *The useful plants of west tropical Africa*. Kew-Angleterre, Royal Botanic gardens, Edition 2, vol. 1, pp. 112–115, 700–707, 760–775.
- Chang-Kee L., Gwyn L. 2002. Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 547–557.
- Chen C.Y., Chang F.R., Shih Y.C., Hsieh T.J., Chia Y.C., Tseng H.Y., Chen H.C., Chen S.J., Hsu M.C., Wu Y.C. 2000. Cytotoxic constituents of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1475–1478.
- Clarkson C., Maharaj V.J., Crouch N.R., Olwen M.G., Pamisha P., Motlalepula G.M., Niresh B., Smith P.J., Folb P.I. 2004. In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *J. Ethnopharmacol.* **92**, 177–191
- Cotton F. A., Wilkinson G., Murillo C. A., Bochmann M. 2000. *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th Edition. *J. Chem. Edu.* **77**, 311.
- Diafouka A., Lejoly J. 1993. Plantes hypotensives utilisées en medecine traditionnelle à Brazzaville (Congo). *Médicaments et Aliments: L'Approche Ethnopharmacologique*, 275–279.
- Dinda B, Debnath S, Harigaya Y. 2007. Naturally Occurring Iridoids. A review part 1. *Chem Pharm Bull.* **55**, 159–222.
- Dinda B., Chowdhury D.R., Mohanta B.C. 2009. Naturally Occurring Iridoids, Secoiridoids and Their Bioactivity. *Chem Pharm Bull.* **57**, 765–796
- Dinda B., Debenath S., Banik R. 2011. Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. *Chem. Pharm. Bull.* **59**, 803–833
- Ding L., Münch J., Goerls H., Maier A., Fiebig H.H., Liu W.H., Hertweck C. 2010. Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 6685–6687.
-

-
- Dongo, E., Ayafor, F.J., Sondengam, L.B., Connolly, D.J. 1989. A New Peptide Alkaloid from *Canthium anoroldianum*. *J. Nat. Prod.* **52**, 840–843.
- Donkeng D.V.F., Roque S., Trigo G., Tsouh F.P.V., Yamthe T.L.R., Tsabang N., Amvam Z.P.V., Correlá-Neves M., Boyom F.F. 2014. Antimycobacterial activity of selected medicinal plants extracts from Cameroon. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 273–288.
- Endo T, Taguchi H. 1973. The constituents of *Gardenia jasminoides* Geneposide and Genipin-gentiobioside. *Chem Pharm Bull.* **21**, 2684–2988
- Ferrer I., Thurman E.M. 2009. Liquid chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry: Principles, Tools and Applications for Accurate Mass Analysis. New York, N.J.: Wiley, [ISBN 978-0-470-13797-0](https://doi.org/10.1002/9780470137970).
- Foley M., Tilley L. 1997. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Int. J. Parasitol.* **27**, 231–240
- Fournet A. 1979. Plantes médicinales congolaises *medicarpidium Limaciopsis*. Université de Paris-Sud-Centre d'Orsay, Thèse de Doctorat, pp. 64–65.
- Fronczek R.F., Kamel N.H., Slattery M. 2003. Three polymorphs (α , β , and δ) of D-mannitol at 100 K. *Acta Crystallogr.* **59**, 567–570.
- Gabriel A., Diego C., André C. 1987. Three bis-dehydroaporphines from *Oxandra cf. major*. *Phytochemistry* **26**, 1227–1229.
- Ganapaty S, Nyamathulla S, Srilakshmi GVK, Raj Kumar PV. 2008. Iridoid compounds and antimicrobial activity of the roots of *Tecoma stans* (L) Juss. *Asian. J. Chem.* **20**, 4493–4497.
- Geoff R.C., Freeman W. H. 1996. Descriptive Inorganic Chemistry. *J. Chem. Edu.* **75** (6), 697.
- Godofredo S. Indian tree, tree of india, *Polyalthia longifolia*: Philippine herbal medicine. En ligne: <http://stuartxchange.com/indiantree.html> Consulté le 29 mars 2013
- Gonzalez M.C., Sentandreu M.A., Rao K.S., Zafra-Polo M.C., Cortes D. 1996. Prenylated Benzopyran derivatives from two *Polyalthia* species. *Phytochemistry* **43**, 1361–1364.
-

-
- Canton R., Ruiz-Garbajosa P., Chaves R.L., Johnson A.P. 2010. A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence? *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1126–1136.
- Gonzalez M.C., Zafra-Polo M.C., Llázquez M.A., Serrano A., Cortes D. 1997. Cerasodine and Cerasonine: New Oxoprotoberberine Alkaloids from *Polyalthia cerasoides*. *J. Nat. Prod.* **60**, 108–110.
- Guinaudeau H., Leboeuf M., Cave A. 1983. Aporphinoid alkalid III. *J. Nat. Prod.* 761–839.
- Hammonnière M., Fournet A., Leboeuf M., Bouquet A., 1976. Le polycarpol, nouveau triterpène isolé de *Polyalthia oliveri*. *Phytochemistry* **282**, 1045–1047.
- Hammonnière M., Leboeuf M., Cave A. 1977. Alcaloïdes aporphiniques et composés terpéniques du *polyalthia oliveri* Engl.. *Phytochemistry* **16**, 1029–1034.
- Hao X.J., Yang X.S., Zhang Z., Shang L.J. 1995. Clerodane diterpenes from *Polyalthia cheliensis*. *Phytochemistry* **2**, 447–448.
- Hepper, F.N 1963. Plants of the 1957-58 West Africa Expedition II: The bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*) and Kersting's groundnut (*Kerstingiella geocarpa*) wild in West Africa. *Kew Bull.* **16**, 395–407.
- Herath, W.H.M., Sultanbawa, M.U.S., Wannigama, G.P., Cave, A. 1979. Alkaloidal and other constituents of *Uncaria elliptica* and *Canthium dicoccum*. *Phytochemistry* **18**, 1385–1387.
- Hermane 1985. *Eléments de microbiologie*, Editeurs des sciences et des arts. Paris, pp 4–15.
- Heywood, 1988. Tropical woody Rubiaceae, *Opera Bot.* **1**, pp 1–271
- Hocquemiller R., Dubois G., Leboeuf M., Cave A., Kunesch N., Riche C., Chiaroni A. 1981. La Polyveoline, nouvel indolosesquiterpène isolé du *Polyalthia suaveolens* (Anonaceae). *Tetrahedron Lett.* **50**, 5057–5060.
- Irvine F. 1961. Woody plants of Ghana. *Oxford University Press*, p.658.
- Jiménez-Arellanes A., Luna-Herrera J., Cornejo-Garrido J., López-García S., Castro-Mussot M.E., Meckes-Fischer M., Mata-Espinoza D., Marquina B., Torres J., Pando R.H. 2013

-
- Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Compl. Altern. Med.* **13**, 258.
- Jose B., Jirovetz L., Shafi P. M. 2008. Phytochemical studies on the thorns and leaves of *Canthium parviflorum* Lam. *Asian J. Chem.* **20**, 5372–5376.
- Joseph D., Connolly M.D., Enamul H., Kadir A.A. 1996. Two 7, 7'-bisdehydroaporphine alkaloids from *polyalthia bullata*. *Phytochemistry* **43**, 295–297.
- Jossang A., Leboeuf M., Cavé A. 1984. Alcaloïdes des Annonaceae : alcaloïdes de *P. cauliflora* *J. Nat. Prod.* **47**, 504–513.
- Kanchanapoom T., Kasai R., Yamasaki K. 2002. Iridoid and phenolic diglycosides from *Canthium berberidifolium*. *Phytochemistry* **61**, 461–464..
- Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Kantikeaw I., Phonkerd. N. 2006. 2-substituted furans from the roots of *Polyalthia evecta*. *J. Nat. Prod.* **69**, 68–72.
- Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Lekphrom R. 2007. Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1536–1538.
- Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Ohtant I.I., Isobe M. 1998. A diyonic acid from *Polyalthia evecta*. *Phytochemistry* **1**, 131–133.
- Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Yodbuddee D., Phonkerd N. 2003. New Antimalarial Bis-dehydroaporphine Alkaloids from *Polyalthia debilis*. *J. Nat. Prod.* **66**, 616–619.
- Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Yodbuddee D., Phonkerd. N. 2003. New Antimalarial Bis-dehydroaporphine Alkaloids from *Polyalthia debilis*. *J. Nat. Prod.* **66**, 616–619.
- Kapil A., Sharma S. 1994. Anti-complement activity of oleanolic acid: an inhibitor of C3-convertase of the classical complement pathway. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 922–933.
- Kijjoa A., Pinto M.M.M., Pinho P.M M., Tantisewet B., Herz W. 1990. Clerodane derivatives from *Polyalthia viridis*. *Phytochemistry* **2**, 653–655.
-

kougan N.G.B., 2010. Isolement et caractérisation des saponosides de trois plantes de la famille des araliaceae et dracaenaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales. Université de Bourgogne, p. 50

Kuete V., Poumale Poumale H.M., Guedem A.N., Shino Y., Randrianasolo R., Ngadjui B.T. (2010b). Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae), *S. Afr. J. Bot.* **76**, 536–542.

Kuigoua G.M., Kouam S.F., Ngadjui B.T., Schulz B., Green I.R., Choudhary M.I., Krohn K. 2010. Minor Secondary Metabolic Products from the Stem Bark of *Plumeria rubra* Linn. Displaying Antimicrobial Activities. *Planta Med.* **76**, 620–625.

Kuigoua, G.M. 2009. Biological Evaluation and Phytochemical Study of a medicinal plant: *Plumeria rubra* (Apocynaceae) and an *Endophythetic fungus: Microsphaeropsis sp.* Structural Modification of plumieride. Thèse en Chimie Organique, Faculté des sciences, Université de Yaoundé I, pp 120–130

Larher F., Stewart G.R., 1979. Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytol.* **82**, 671–678.

Le Thomas A. 1969. Annonacées dans Flore du Gabon par Aubréville A. Muséum National d'histoire naturelle, Paris V, n° 16, pp. 9–21, 175–265.

Leach K.L. Brickner S.J., Noe M.C., Miller P.F. 2011. Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1222**, 49–54.

Lebœuf M., Fournet A., Bouquet A., Cave A. 1977. Plante médicinales et phytothérapie. tome XI, n° 4, pp. 284–288.

Lee E.J., Kim J.S., Kim H.P., Lee J.H., Kang S.S. 2010. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chem.* **120**, 134–139.

Lee T.H., Wang M.J., Chen P.Y., Wu T.Y., Wen W.C., Tsai F.Y., Lee C.K. 2009. Constituents of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *J. Nat. Prod.* **72**, 1960–1963.

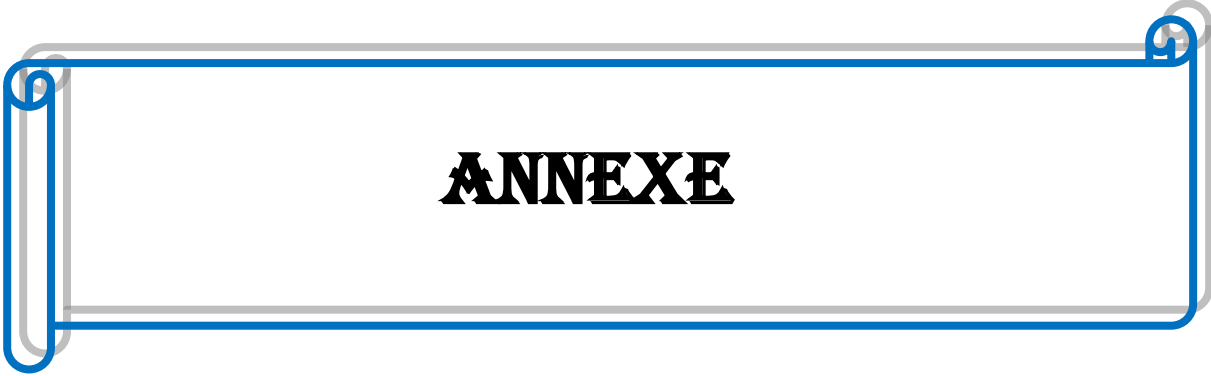
-
- Li H.Y., Sun N.J., Kashiwada Y., Sun L., Snider J.V., Cosentino L.M., Lee K.H. 1993. Anti-AIDS agents, 9 suberosol, a new lanostane-type triterpene and anti-HIV principle from *Polyalthia suberosa*. *J. Nat. Prod.* **7**, 1130–1133.
- Ma X., Lee I.S., Chai H.B., Zaw K., Farnsworth N.R., Soejarto D.D., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. 1994. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Polyalthia barnesii*. *Phytochemistry* **6**, 1659–1662.
- Madec, J., 2004. Synthèse de nouvelles diphosphines et nouveaux phosphoramidites dissymétriques chiraux par atropoisomérisation. Étude de leurs propriétés en catalyse asymétrique. Thèse de Doctorat de L'Université Paris Vi Spécialité: Chimie Organique. Paris-France pp.8–9.
- Madieese K.E.A., Mbacham F.W., Boyom F.F., Amvam Z.P.H., Tsamo E., Rosenthal J.P. 2012. In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* field isolates to extracts from Cameroonian Annonaceae plants. *Parasitol. Res.* **110**, 109–117.
- Mahato S.B., Kundu A.P. 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry* **36**, 1517–1575.
- Marcos S.I., Moro F.R., Costales I., Basabe P., Diez D. 2013. Sesquiterpenyl indoles. *Nat. Prod. Rep.*, **30**, 1509–1526.
- Massao K., Ric O., Yasunori Y. 2009. Three New Monoterpene Glucosides from *Lamium amplexicaule*. *Helv. Chim. Acta* **92**, 2063–2070.
- Maudslay A.A., Ernst R.R., 1977. Principles of magnetic resonance. *Chem. Phys. Lett.* **50**, 368.
- Mauro N.M. 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+) – anatoxine-a et la (+/-)-camptothécine. Université de Grenoble I, France, Thèse de Doctorat / PhD en Chimie, pp. 11–31.
- Mbaveng A.T., Kuete V., Ngameni B., Beng V.P., Ngadjui B.T., Meyer J.J., Lall N. 2012. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from the twigs of *Dorstenia mannii* (Moraceae) *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 1283
-

-
- Mill P., Don D., Forst G. 2008. Présentation des Rubiaceae. <http://domicus.molleotus.free.fr/v/Rubiaceae.html>, consulté le 09 Mai 2012.
- Mogode D.J. 2005. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl. (Caesalpniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie, Université de Bamako-Mali. p. 60.
- Naidu N.B., Saletore S.A. 1954. Studies on *Annona squamosa* (Linn) seed (custard apple seed). The soap making properties. *Indian Soap J.* **20**, 141.
- Ngameni B., Kuete V., Simo I. K., Mbaveng A. T., Awoussong P. K., Patnam R., Roy R., Ngadjui B. T. 2009. Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *S. Afr. J. Bot.* **75**, 256–261.
- Ngantchou I., Nyasse B., Denier C., Blonski C., Hannaert V., Schneider B. 2010. Antitrypanosomal alkaloids from *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae): Their effects on three selected glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. *Bioorg. med. chem. lett.* **20**, 3495–3498.
- Ngiefu C.K., Paquot C., Vieux A. 1976. Oil-bearing plants of Zaire. II. Botanical families providing oils of medium unsaturation. *Oléagineux* **31**, 545–547.
- Okorie D.A., 1981. Polyavolinamide, an indolosesquiterpene alkaloid from *Polyalthia suaveolens*. *Phytochemistry* **20**, 2575–2578.
- Oliver-Bever B. 1982. Medicinal plants in tropical West Africa II. Plants acting on the nervous system. *J. Ethnopharmacol.* **7**, 1–93.
- OMS 2002. Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005. Genève, p.78.
- Panthama N., Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K. 2010. Polyacetylenes from the roots of *Polyalthia debilis*. *J. Nat. Prod.* **73**, 1366–1369.
- Phadnis A.P., Patwardhan S.A., Dhaneshwar N.N., Tavle S.S., Guru Row T.N. 1998. Clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia*. *Phytochemistry* **9**, 2899–2901.

-
- Ranarivelo Y. 2004. Les grandes familles chimiques de produits naturels. Faculté des sciences, Université d'Antananarivo-Madagascar, Cours de discipline universitaire à distance. En ligne : <http://www.refer.mg./cours/yr/index.html> Consulté le 10 juin 2013.
- Raponda W.A., Sillans R. 1961. Les plantes utiles du Gabon, Paris VI, Edition Paul Lechevalier, p. 70.
- Riche C., Chiaroni A., Dubpois G., Hocquemiller R., Leboeuf M., Cave A. 1980. La polyveoline, nouvel indolosesquiterpene isolée de *Polyalthia suaveolens*, Anonaceae.. *Tetrahedron Lett.* **22**, 206–208.
- Saifi M.A., Beg T., Harrath A.H., Altayala F.S.H., Quraishy S.A. 2013. Antimalarial drugs: Mode of action and status of resistance. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **7**, 148–156.
- Sashjdhara K.V., Singh S.P., Kant R., Maulik P.R., Sarkar J., Kanojiya S., Kumar K.R. 2010. Cytotoxic cycloartane triterpene and rare isomeric bisclerodane diterpenes from the leaves of *Polyalthia longifolia*. *Bioorg. med. chem. lett.* **20**, 5767–5771.
- Savard J., Espil L. 1951. Hydrolyse par percolation sulfurique de quelques bois tropicaux. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent sur Marne. **3**, p.7.
- Schwarz, B., Wray, V., Proksch, P. 1996. A cyanogenic glycoside from *Canthium schimperianum*. *Phytochemistry*, **42**, 633–636.
- Seto R., Nakamura H., Nanjo F., Hara Y. 1997. Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1434–1439.
- Singh S.B., Barrett J.F. 2006. Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1006–1015.
- Sonke A. 2000. Les Rubiaceae au Cameroun. Hatier, pp. 5–10.
- Source de l'Herbier National du Cameroun.
- Subramani K., Gunasegaran R., Shiyamala C., Ganesan T. 2004. Antifungal activity of certain flavonol glycosides and phenolic acid from *Canthium* species. *Adv. Plant Sci.* **17**, 745–748.
- Sui-Kiong L., Takashi T., Isao K. 2001. Iridoids from *Rothmannia macrophylla*. *J. Nat. Prod.* **64**, 796–798.
-

-
- Takhtajan A. 1969. Flowering plants, origin and dispersal. Edinburgh, Olivier and Boyd. p. 99.
- Talontsi M.F., Lamshöft M., Bauer J.O., Razakarivony A.A., Andriamihaja B., Strohmann C., Spiteller M. 2013. Antibacterial and Antiplasmodial Constituents of *Beilschmiedia cryptocaryoides*. *J. Nat. Prod.* **76**, 97–102.
- Thaithong, S., Beale, G.H. Chutmongkonkul M. 1983. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: an in vitro study of isolates mainly from Thailand. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg.* **77**, 228–231.
- Tolstikov V.V., Fiehn O. 2002. Max planck institute of Molecular Plant Physiology. Potsdam Germany Dept., *Lotharwillmitzer* 14424.
- Traoré M., Jaroszewski J., Olsen C.E., Ouédraogo J.B., Pierre G.I., Nacoulma O.G., Guiguemdé T.R. 2008. A new oxygenated ursane derivative from *Canthium multiflorum*. *Planta Med.* **74**, 560–562.
- Tsabang N., Tsouh F.P.V., Yamthe T.L.R., Noguem B., Bakarnga-Via I., Dongmo N.M.S., Nkongmeneck B.A., Boyom F.F. 2012. Ethnopharmacological Survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* **139**, 171–180.
- Tuchinda P., Munyoo B., Pohmakotr M., Thinapong P., Sophasan S., Santisuk T., Reutrakul V. 2006. Cytotoxic Styryl-Lactones from the Leaves and Twigs of *Polyalthia crassa*. *J. Nat. Prod.* **69**, 1728–1733.
- Tuchinda P., Pohmakotr M., Munyoo B., Reutrakul V., Santisuk T. 2000. An azaanthracene alkaloid from *Polyalthia suberosa*. *Phytochemistry* **53**, 1079–1082.
- Urzua A., Torres R. 1984. 6a, 7-déhydroboldine from the bark of *Pemus boldus*. *J. Nat. Prod.* 525–526.
- Vaandering B. (http://www.wou.edu/las/physci/ch350/Projects_2006/Vaandering/Genipin.htm) (consulté le 03/03/2013).
- Vargas L., Barrios M., Cazebas J. M., Castro O. 1996. Aporphine alkaloids from *Ocotea haldrid* geiana bark. *Fitoterapia*, LXVII, p. 144.
-

-
- Vergiat A.M. 1970. Plantes magiques et médicinales des Féticheurs. *J. Agr. Trop. Botan. Appl.* Tome XVI, n^o 215 paris p 238.
- Wang W.U., Chen G.Y., Yin W.Q., Han C. R., Zhang Y.Q. 2008. Chemical constituents from the stems of *Canthium simile* Merr and Chur. *Linchan Huaxue Gongye Yu* **28**, 124–126.
- Wu Y.C., Duh C.Y. 1990. Two new natural azafluorene alkaloids and a cytotoxic aporphine alkaloid from *polyalthia longifolia*. *J. Nat. Prod.* **53**, 1327–1331.
- Zhao G., Jung J., Smith D.L., Wood K.V., McLaughlin J.L. 1991. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia*. *Planta Med.* **57**, 380–384.



ANNEXE

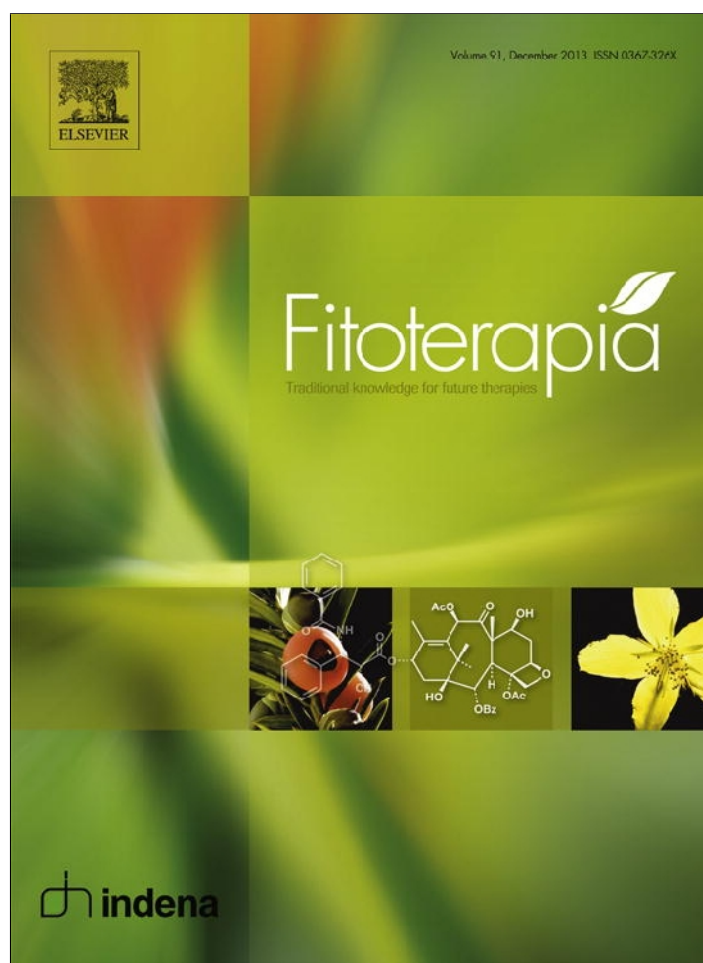


LISTE DES PUBLICATIONS

Kouam F. S., **Ngouonpe W. A.**, Bullach A., Lamshöft M., Kuigoua G. M., Spiteller M. 2013. Monoterpenes with antibacterial activities from a Cameroonian medicinal plant *Canthium multiflorum* (Rubiaceae). *Fitoterapia* **91**, 199–204.

Kouam F. S., **Ngouonpe W. A.**, Bullach A., Lamshöft M., Talonsi M. F., Bauer J. O., Strohmann C., Ngadjui T. B., Spiteller M. 2014. Indolosesquiterpene alkaloids from the Cameroonian medicinal plant *Polyalthia oliveri* (Annonaceae). *Phytochemistry* **105**, 52–59.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

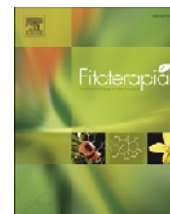
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Fitoterapia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fitote

Monoterpenes with antibacterial activities from a Cameroonian medicinal plant *Canthium Multiflorum* (Rubiaceae)



Simeon Fogue Kouam^a, Alain Wembe Ngouonpe^a, Anke Bullach^b, Marc Lamshöft^b,
Guy Merlin Kuigoua^{a,b}, Michael Spiteller^{b,*}

^a Department of Chemistry, Higher Teachers' Training College, University of Yaounde I, P. O. Box 47, Yaounde, Cameroon

^b Institute of Environmental Research (INFU), Department of Chemistry and Chemical Biology, Chair of Environmental Chemistry and Analytical Chemistry, TU Dortmund, Otto-Hahn-Str. 6, D-44221 Dortmund, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2013

Accepted in revised form 27 August 2013

Available online 9 September 2013

Keywords:

Canthium multiflorum

Rubiaceae

Iridoids

Antibacterial

Antiplasmodial

ABSTRACT

Investigation of the crude extract obtained from the aerial parts of *Canthium multiflorum* led to the isolation of a new iridoid (**1**) together with twelve known compounds. The structures of these compounds were elucidated by interpretation of 1D and 2D NMR spectroscopic data, accurate mass measurements and comparison with analytical data of previously known analogues. Most of the isolated compounds have been reported for the first time from *C. multiflorum*. The antimicrobial activities of the isolated compounds were evaluated on five different bacterial strains using agar diffusion technique. The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 799), and the Gram-negative bacteria *Actinobacter calco-aceticus* (DSM 30006), *Serratia plymuthica* (DSM 4540), *Pseudomonas stutzeri* (DSM 4166) and *Escherichia coli* (DSM 1116) were employed for this purpose. The new iridoid, named 6-oxo-genipin (**1**), demonstrated significant inhibitory activity against all microbial strains tested, especially the pathogen *Staphylococcus aureus*. In addition, the compounds **3**, **4** and **9** exhibited antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* strain K1 and weak cytotoxicity against L6 cell lines.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Iridoids which comprise a large number of distinctive bicyclic monoterpenes are widely distributed in genetic resources such as plants and fungi [1–3]. The biological properties of plant derived iridoids have been demonstrated and a large number of plant species has bioactive iridoids as their major constituents. Iridoids cover a wide range of pharmacological properties, including anticancer, anti-inflammatory, antifungal and anti-bacterial activities [4,5]. The family Rubiaceae is recognized as a rich source of bioactive compounds including iridoids, alkaloid, triterpenes [6–8]. Most iridoids isolated from this family have been described to have a cyclopentanopyran skeleton with carboxylic acid group or methyl ester functionality

[1,2,9]. Previous chemical investigations showed that *Canthium* species characteristically contain compounds such as iridoids [10,11], terpenoids [12–14], cyanogenic glycoside [6], phenolic glycosides [10], and alkaloids [15,16]. The literature survey indicated the *in vitro* antiplasmodial and antibacterial activities of *Canthium multiflorum* Schum and Thonn (Rubiaceae) extracts [12,14]. In our continuous search for bioactive secondary metabolites from Cameroonian medicinal plants, we selected extracts of *C. multiflorum* which is regularly used in traditional medicine by the local population [12–14]. Herein, we describe the isolation and structural elucidation of compound (**1**), as well as the antimicrobial activities of selected isolates.

2. Results and discussion

In order to study the bioactive constituents of *C. multiflorum*, the ethylacetate fraction was primarily purified by silica gel

* Corresponding author.

column chromatography. Further fractionation by means of preparative high performance liquid chromatography (HPLC) resulted in the isolation of one new compound, named 6-oxo-genipin (**1**) together with twelve known compounds (**2–13**, Scheme 1).

Compound **1** was obtained as a greenish amorphous powder, and its molecular formula was assigned to be $C_{11}H_{12}O_6$ from its HR-ESI-MS (m/z 241.0709 $[M + H]^+$, calcd. for $C_{11}H_{13}O_6$, 241.0712) and NMR data (experimental part), indicating six degrees of unsaturation. The IR spectrum displayed the presence of hydroxyl (3421 cm^{-1}), and carbonyl (1625 cm^{-1}) absorptions. Analysis of ^{13}C NMR and HSQC spectra (experimental part) showed 11 carbon resonances including a hemiacetal (δ_c 93.6), one methoxyl (δ_c 50.3), one oxymethylene (δ_c 58.6) and two carbonyl (δ_c 164.8 and 172.8) groups. The ^1H NMR spectral data in conjunction with those of ^{13}C NMR were characteristics to a cyclopentanopyran ring, corresponding to an iridoid skeleton [1,2,9]. While the signal at δ 164.8 was assigned to the methyl ester group commonly observed in this series of compound, resonances at $\delta_c(\delta_H)$ 93.6 (5.70) and 155.9 (7.31) respectively to the hemiacetal and vinylic carbons/protons were assigned to the C-1 (H-1) and C-3 (H-3) as compared with chemical shifts of iridoids already published in the literature [1,2,17]. Further structural information was provided by correlation of the cross peaks in the HMBC spectrum (Fig. 1). Correlations were observed between proton signal at δ_H 7.31 (H-3) and carbon signals at δ_c 93.6, 164.8 and 45.7. The latter also correlated with proton signal at δ_c 5.79 (H-7), which in turn showed cross peaks with δ_c 54.7 and δ_c 58.6. The chemical shifts of compound **1** were very similar with those of genipin and derivatives [1,2,18]. From this evidence, compound **1** was identified as 6-oxo-genipin. Genipin is a naturally occurring compound isolated in the fruit

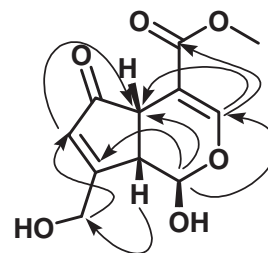
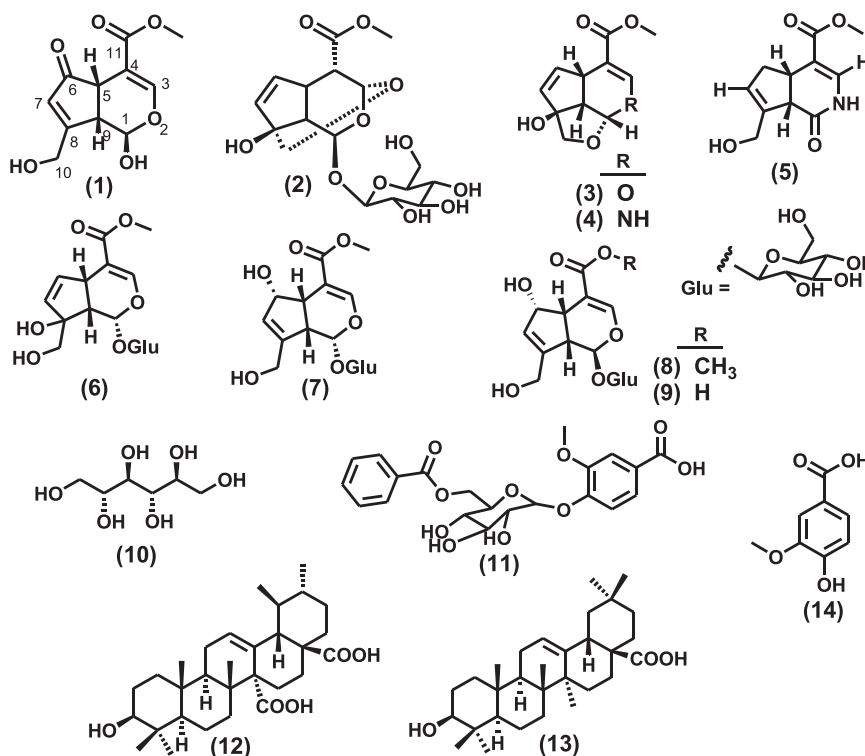


Fig. 1. Key HMBC correlations of compound **1**.

of *Gardenia jasminoides* Ellis which shows great potential as a bioadhesive and wound healing dressing material [5].

The known compounds were identified as macrophyllolide (**2**) [19], garjasmine (**3**) [20], gardenine (**4**) [21], gardenamide (**5**) [8], galioside (**6**) [22], aitchisonide B (**7**) [23], 6 α -hydroxygeniposide (**8**) [24,25], deacetyl asperulosidic acid (**9**) [26], allitol (**10**) [27,28], vanilic acid 4- O - β -D-(6- O -benzoylglucopyranoside (**11**) [29], quinovic acid (**12**) [30] oleanolic acid (**13**) [30] by comparison of their measured spectroscopic data with literature values.

The study of the stem bark of *C. multiflorum* yielded several secondary metabolites including iridoids, triterpenes and phenolic compounds. The results for the iridoid composition of *C. multiflorum* were in good agreement with those reported for other genera of *Canthium*. The isolated iridoids have chemotaxonomic evidence for the genus *Canthium* which belong to the tribe Vanguerieae [10,11,14]. The presence of the other compounds such as phenolic compounds (**11**, **14**) and triterpenes (**12**, **13**) in this plant is not surprising. These classes of secondary metabolites have already been isolated from other *Canthium* [6,10,12].



Scheme 1. Structures of isolated compounds (**1–13**).

The antimicrobial activity of the isolated compound **1–6**, **9**, loganin, genipin and reference antibiotics obtained from agar disc diffusion assays is summarized in Table 1. The known compounds showed moderate or good activity when compared with the antibiotics. In comparison to genipin the new derivate **1** exhibit a remarkable higher activity against the pathogen *Staphylococcus aureus*. In contrast to this finding the testing of loganin revealed no activity against this strain. In former reports other iridoids with antibacterial activity were described [31–33]. Akcos et al. report the structure elucidation of a new iridoid called ajugol from *Sideritis lycia* Boiss. & Heldr. and its antimicrobial activity against selected Gram positive and negative bacteria, including *Staphylococcus aureus* with a distinct higher MIC of 31.25 µg/mL. Sterility and bacterial growth have been confirmed by control samples. The influence of the sample solvent MeOH has been excluded. The antiplasmodial activity testing of compounds **3**, **4** and **9** caused a concentration-dependent growth inhibition of the chloroquine-sensitive substrain of strain of *P. falciparum*. Their IC₅₀ values ranged from 7.17 to >50 µg/mL as compared to 0.064 µg/mL for chloroquine as a positive control. These values are in the same range as already reported data of other iridoids [35]. Cytotoxicity tests of compounds **3**, **4** and **9** against the L-6 cells showed cytotoxicity with an IC₅₀ in a concentration range from 50.3 to 60.4 µg/mL, whereas the control test with podophyllotoxin revealed an IC₅₀ of 0.007 µg/mL.

3. Experimental

3.1. General procedures

¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) spectra were measured with a Bruker DRX 500 instrument using deuterated solvent such as chloroform-d, methanol-d₄, dimethylsulfoxide-d₆ and water-d₂. Chemical shifts (δ) were

quoted in parts per million (ppm) from internal standard tetramethylsilane (TMS). The ³J_{C-H} couplings were measured by means of pulsed field gradient HMBC spectra recorded by varying the J-refocusing time between *t* = 0.04 and 0.14 s.

Flash column chromatography was performed using silica-gel 60 (Merck, 0.015–0.04 mm). Preparative reversed-phase HPLC was carried out with a Gilson system consisting of pump 322 with a UV detector 152 (λ = 205 nm) using a Gemini C18 column (250 × 10 mm, 10 µm particle size) from Phenomenex (Torrance, CA, USA). Separation was performed by using a H₂O + 0.1% HCOOH (A) - MeOH (B) gradient program as follows (flow rate 4 mL min⁻¹): 80% A isocratic for 3 min, linear gradient to 40%A for 15 min, linear gradient to 0% A over 2 min, after 100% B isocratic for 5 min. Afterwards, the system returned to its initial condition (80% A) within 1 min, and was equilibrated for 4 min.

The high resolution mass spectra were obtained with an LTQ-Orbitrap Spectrometer (Thermo Fisher, USA) equipped with a HESI-II source. The spectrometer was operated in positive mode (1 spectrum s⁻¹; mass range: 200–800) with nominal mass resolving power of 60 000 at *m/z* 400 with a scan rate of 1 Hz) with automatic gain control to provide high-accuracy mass measurements within 2 ppm deviation using an internal standard; Bis(2-ethylhexyl)phthalate: *m/z* = 391.284286. The spectrometer was attached with an Agilent (Santa Clara, USA) 1200 HPLC system consisting of LC-pump, PDA detector (λ = 205 nm), auto sampler (injection volume 10 µL) and column oven (30 °C). Following parameters were used for experiments: spray voltage 5 kV, capillary temperature 260 °C, tube lens 70 V. Nitrogen was used as sheath gas (50 arbitrary units) and auxiliary gas (5 arbitrary units). Helium served as the collision gas. The separations were performed by using a Phenomenex Gemini C18 column (150 × 2 mm, 3 µm particle size) with a H₂O (+ 0.1% HCOOH) (A)/acetonitrile (+ 0.1% HCOOH) (B) gradient (flow rate 300 µL min⁻¹). Samples were analyzed by using a gradient program as follows: 90% A

Table 1
Biological activity of genipin, loganin, selected antibiotics and the pure compounds **1–6** and **9**.

	Antimicrobial activity					Antiplasmodial activity	Cytotoxic activity
	MIC [µg/mL]					IC ₅₀ [µg/mL]	
	<i>Actinobacter calcoaceticus</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	Rat skeletal myoblasts
	DSM 30006	DSM 4540	DSM 4166	DSM 1116	DSM 799	K1	L6
Tetracycline	0.5	2	0.5	2	2		
Gentamicin	0.05	0.5	0.5	0.1	0.1		
Streptomycin	0.01	1	0.05	0.5	1		
Chloroquine						0.064	
Podophyllotoxin							0.007
Genipin					0.1		
Loganin					>10		
1	0.01	0.5	2	0.5	0.01		
2	0.05	0.5	>10	5	>10		
3	2	10	10	1	2	38.5	57.8
4	0.5	0.05	5	>10	0.05	7.17	50.3
5	5	>10	1	>10	>10		
6	0.5	0.05	1	1	0.5		
9	5	1	0.5	0.5	10	>50	60.4

isocratic for 2 min, linear gradient to 100% B over 13 min, after 100% B isocratic for 5 min, the system returned to its initial condition (90% A) within 0.5 min, and was equilibrated for 4.5 min.

3.2. Plant material

The aerial part of *Canthium multiflorum* was collected at Obala, along Sanaga river, in the centre region, Cameroon, in July 2010. The botanical identification was made by Mr. Victor Nana a botanist at the National Herbarium of Cameroon where a collected plant sample was deposited under the number 27357 SRF Cam.

3.3. Extraction and isolation

The air-dried aerial part of *C. multiflorum* (1035 g) was powdered and extracted twice with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) at 22 °C for 48 and 24 h, respectively. The organic solvent was removed to afford a crude extract (132 g), which was further subjected to flash silica gel column chromatography, using a gradient of ethyl acetate in hexane, then pure dichloromethane followed by a gradient of methanol in dichloromethane, to give thirteen fractions named A1 (pure hexane); A2 (hexane/ethyl acetate, 9/1); A3 (hexane/ethyl acetate, 4/1); A4 (hexane/ethyl acetate, 7/3); A5 (hexane/ethyl acetate, 3/2); A6 (pure dichloromethane), A7 (dichloromethane/methanol 19/1), A8 (dichloromethane/methanol 9/1), A9 (dichloromethane/methanol 19/1), A10 (dichloromethane/methanol 4/1), A11 (dichloromethane/methanol 7/3), A12 (dichloromethane/methanol 3/2) and A13(dichloromethane/methanol 95/5). Based on their TLC profiles, fractions A4 (771.2 mg), A5 (100.2 mg) A6 (809.2 mg), and A12 (9.82 g) were subjected separately to silica gel column chromatography at atmospheric pressure, using the same gradient of solvent to afford respectively **13** (11 mg), **9** (10 mg), **12** (25 mg), **10** (60.0 mg). A9 (984.0 g) subjected to flash silica gel column chromatography, using the same gradient of dichloromethane/methanol to afford fifty-five subfractions (B1–B55). GC-MS analysis revealed fraction A1 to be a complex mixture of hydrocarbons and fatty acids. According to their LC-MS profiles, subfractions B3–B7, B8–B13, B39–B50 were purified each by repeated semi-preparative HPLC at wavelength 205 nm with the solvent system $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%\text{HCOOH}$ (A)–MeOH (B) with gradient program as described above to give **4** (95 mg), **3** (15 mg), **5** (11 mg), **1** (13 mg) and **11** (17 mg). HPLC analysis of fractions A10 and A11 gave profiles which showed a mixture of compounds. These fractions were then submitted to semi-preparative HPLC. Fraction A10 afforded **2** (36 mg) while fraction A11 gave **9** (5 mg), **8** (3 mg) and **7** (17 mg).

3.3.1. 6-Oxo-genipin (1)

oil, $[\alpha]_{\text{D}}^{29} + 16^\circ$ (c 2.2, CH_3OH); IR (KBr): 3421, 2986, 2930, 1652, 1247, 1026 cm^{-1} ; UV (MeOH): λ_{max} : 256 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7.31 (s, H-3), 5.79 (s, H-7), 5.70 (d, 8.7, H-1), 4.01 (d, 15.3, H-10b), 3.99 (d, 15.3, H-10a), 3.94 (brs, H-5), 3.57 (d, 8.7, H-9), 3.56 (s, H-12); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 182.8 (C-6), 164.8 (C-11), 155.9 (C-3), 151.6 (C-8), 123.0 (C-7), 109.9 (C-4), 93.6 (C-1), 58.6 (C-10), 54.7 (C-9), 50.3 (C-12), 45.7 (C-5); HR-ESI-MS

$[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 241.0709 (calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_6$, 241.0712), 223.0604 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$).

3.4. Selected microorganisms for antimicrobial activity testing

The in vitro antimicrobial activities of the samples were tested against a panel of control strains belonging to the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ), Braunschweig, Germany. The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 799), and the Gram-negative bacteria *Actinobacter calco-aceticus* (DSM 30006), *Serratia plymuthica* (DSM 4540), *Pseudomonas stutzeri* (DSM 4166) and *Escherichia coli* (DSM 1116) were employed.

3.5. Culture media, activation and maintenance of microorganisms

The medium used for the activation of the microorganisms was Nutrient broth (Merck, Darmstadt, Germany) and activation was performed strictly according to DSMZ guidelines. The activated test microbial strains were inoculated and cultured on Nutrient agar (NA) medium (DIFCO, cat. no. 213000) at 37 °C for 24 h (stationary culture), and maintained at 4 °C until used. Fresh logarithmic phase cultures were prepared from the above by inoculating five colonies into 5 mL of the Nutrient broth and incubating for 24 h at 37 °C. The turbidity was corrected against a McFarland turbidity standard, by adding isotonic sodium chloride solution until 100 colony forming units (CFU mL^{-1}) were obtained. All procedures were carried out under strict aseptic conditions.

3.6. Antimicrobial assay and minimum inhibitory concentration (MIC)

The antimicrobial activities of the samples were determined by disc diffusion method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [34]. The plates were prepared in 90 mm sterile Petri dishes (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany) with 22 mL of Nutrient agar, yielding a final depth of 4 mm. 100 mL of inoculum suspension of the tested microorganisms was spread on the solid media plates using the standard spread-plate technique. After incubation for 2 h at 4 °C sterile assay paper discs 6.0 mm in diameter (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Germany) were impregnated with 20 μL of the methanolic samples, air dried under the laminar airflow hood, and placed on the inoculated plates. The concentration range for all samples was 0.01–10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. 6 sets of controls were run simultaneously. One control was the organism control and consisted of a seeded Petri dish with no sample. The second control consisted of samples on unseeded Petri dishes to check for sterility. Three positive controls using the following antibiotics; tetracycline (Tetracycline hydrochloride, Vetrinal, Sigma-Aldrich, Munich, Germany), streptomycin (Streptomycin sulfate salt, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and gentamicin (Gentamicin sulfate salt, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) were performed (concentration range of 0.01–10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in MeOH). Finally, to ensure the elimination of any solvent effect, disks imbued with 20 μL of sterile MeOH were run as a sixth control. The MICs were determined for all the samples, standard solutions

and all the microorganisms. Each test was carried out in triplicate.

Reference compounds genipin and loganin were purchased from Sigma–Aldrich.

3.7. Antiplasmodial activity

In vitro activity against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* was assayed using a 3H-hypoxanthine incorporation assay [37–39], the chloroquine and pyrimethamine resistant K1 strain that originated from Thailand [38] and the standard drug chloroquine (Sigma–Aldrich). Compounds were dissolved in DMSO at 10 µg/mL and added to parasite cultures incubated in RPMI 1640 medium without hypoxanthine, supplemented with HEPES (5.94 g/L), NaHCO₃ (2.1 g/L), neomycin (100 U/mL), AlbumaxR and washed human red cells A + at 2.5% haematocrit (0.3% parasitaemia). Serial drug dilutions of eleven 3-fold dilution steps covering a range from 100 to 0.002 µg/mL were prepared. The 96-well plates were incubated in a humidified atmosphere at 37 °C; 4% CO₂, 3% O₂, 93% N₂. After 48 h 50 µL of 3H-hypoxanthine (= 0.5 µCi) was added to each well of the plate. The plates were incubated for a further 24 h under the same conditions. The plates were then harvested with a Betaplate™ cell harvester (Wallac, Zurich, Switzerland), and the red blood cells transferred onto a glass fibre filter then washed with distilled water. The dried filters were inserted into a plastic foil with 10 mL of scintillation fluid, and counted in a Betaplate™ liquid scintillation counter (Wallac, Zurich, Switzerland). IC50 values were calculated from sigmoidal inhibition curves by linear regression.

3.8. In vitro cytotoxicity with L6 cells

Assays were performed in 96-well microtiter plates, each well containing 100 µL of RPMI 1640 medium supplemented with 1% L-glutamine (200 mM) and 10% fetal bovine serum, and 4000 L-6 cells (a primary cell line derived from rat skeletal myoblasts) [40]. Serial drug dilutions of eleven 3-fold dilution steps covering a range from 100 to 0.002 µg/mL were prepared. After 70 h of incubation the plates were inspected under an inverted microscope to assure growth of the controls and sterile conditions. 10 µL of Alamar Blue was then added to each well and the plates incubated for another 2 h. Then the plates were read with a Spectramax Gemini XS microplate fluorometer (Molecular Devices Cooperation, Sunnyvale, CA, USA) using an excitation wave length of 536 nm and an emission wave length of 588 nm. The IC50 values were calculated by linear regression from the sigmoidal dose inhibition curves using SoftmaxPro software (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). The IC50 values in µmol/mL are the means of two independent assays; the individual values varied less ± 50%.

Acknowledgments

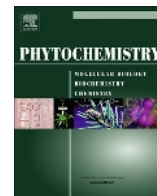
Part of this work was supported by the International Foundation of Science (No. F/4893-1) and the Third World Academy Science (No. 10-004 RG/CHE/AF/AC-I). This project has been completed with the financial support of DAAD through the program “Welcome to Africa”. GMK acknowledges the support he got from the German Academic Exchange Service

(DAAD) for six months fellowship that enabled work at Institute of Environmental Research (INFU). We are grateful to Mr. Victor Nana for assisting in plant collection and Dr. Souvik Kusari for guidance in antimicrobial testing.

References

- [1] Dinda B, Debnath S, Harigaya Y. Naturally Occurring Iridoids. A review part 1. *Chem Pharm Bull* 2007;55(2):159–222.
- [2] Dinda B, Chowdhury DR, Mohanta BC. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. *Chem Pharm Bull* 2009;57(8):765–96.
- [3] Wen-Li M, Bo Z, You-Xing Z, Hui-Ming Z, Xun-Li WC, Yan-Bo Z, et al. Meroterpenes from endophytic fungus A1 of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea*. *Mar Drugs* 2012;10(9):1993–2001.
- [4] Geu-Flores F, Sherden NH, Courdavault V, Burla V, Glenn WS, Wu C, et al. “An alternative route to cyclic terpenes by reductivecyclization in iridoid biosynthesis” Letter: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11692>.
- [5] Vaandering B. http://www.wou.edu/las/physci/ch350/Projects_2006/Vaandering/Genipin.htm. [accessed 03/03/2013].
- [6] Schwarz B, Wray V, Prokscht P. A cyanogenic glycoside from *Canthium schimperianu*. *Phytochemistry* 1996;42(3):633–6.
- [7] Machida K, Takehara E, Kobayashi H, Kikuchi M. New iridoid glycosides from the leaves of *Gardenia jasminoides* cv. fortuneana HARA. *Chem Pharm Bull* 2003;51(12):1417–9.
- [8] Bringmann G, Hamm A, Kraus J, Ochse M, Noureldeen A, Jumbam DN. Gardenamide A from *Rothmannia urcelliformis* (Rubiaceae) - Isolation, absolute stereostructure, and biomimetic synthesis from genipine. *Eur J Org Chem* 2001;2001(10):1983–7.
- [9] Dinda B, Debenath S, Banik R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Chem Pharm Bull* 2011;59(7):803–33.
- [10] Kanchanapoom T, Kasai R, Yamasaki K. Iridoid and phenolic diglycosides from *Canthium berberidifolium*. *Phytochemistry* 2002;61:461–4.
- [11] Achenbach H, Waibel E, Raffelsberger B, Addae-Mensah I. Iridoid and other constituents of *Canthium subcordatum*. *Phytochemistry* 1981;20(7):1591–5.
- [12] Traore M, Jaroszewski JW, Olsen CE, Ouedraogo JB, Pierre GI, Nacoulma OG, et al. A new oxygenated ursane derivative from *Canthium multiflorum*. *Planta Med* 2008;74(5):560–2.
- [13] Traore-Coulibaly M, Ziegler HL, Olsen CE, Hassanata M-K, Pierre GI, Nacoulma OG, et al. 19 α -hydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic acid, an antiplasmodial triterpenoid isolated from *Canthium multiflorum*. *Nat Prod Res* 2009;23(12):1108–11.
- [14] Akomo EFO, Zongo C, Karou SD, Obame LC, Savadogo A, Atteke C, et al. In vitro antiplasmodial and antibacterial activities of *Canthium multiflorum* Schum and Thonn (Rubiaceae) extracts. *Pak J Biol Sci* 2009;12(12):1919–23.
- [15] Dongo E, Ayafor JF, Sondengam BL, Connolly JD. A new peptide alkaloid from *Canthium anordianum*. *J Nat Prod* 1989;52(4):840–3.
- [16] Herath WHMW, Sultanbawa MUS, Wannigama GP, Cavé A. Alkaloidal and other constituents of *Uncaria elliptica* and *Canthium dicoccum*. *Phytochemistry* 1979;18:1385–7.
- [17] Kuigoua GM, Kouam SF, Ngadjui BT, Schulz B, Green IR, Choudhary MI, et al. Minor Secondary Metabolic Products from the Stem Bark of *Plumeria rubra* Linn. displaying antimicrobial activities. *Planta Med* 2010;76:620–5.
- [18] Endo T, Taguchi H. The constituents of *Gardenia jasminoides* Geneposide and Genipin-gentiobioside. *Chem Pharm Bull* 1973;21(12):2684–988.
- [19] Sui-Kiong L, Takashi T, Isao K. Iridoids from *Rothmannia macrophylla*. *J Nat Prod* 2001;64:796–8.
- [20] Nakatani K, Shimano K, Hiraishi A, Han Q, Isoe S. Synthesis of asperuloside aglucon silyl ether and garjasmine from (+)-genipin via gardenoside aglucon bis(silyl ether) as a common intermediate. *Bull Chem Soc Jpn* 1993;66(9):2646–52.
- [21] Yukio K, Masao H, Teruakin A, Kyoichi K, Tsuneo N. Formation of nitrogen-containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria. *Planta Med* 1991;57(6):536–42.
- [22] Shigurom K, Amaki A, Takagi S. The structure and antimicrobial activity of aglucones of galioside and gardenoside. *J Nat Prod* 1983;46(4):532–6.
- [23] Noor AT, Perveen S, Begum A, Fatima I, Malik A, Tareen RB. Aitchisonides A and B, new iridoid glucosides from *Aitchisonia rosea*. *J Asian Nat Prod Res* 2009;11(11):985–9.
- [24] Kikuchi M, Onoguchi R, Yaoita Y. Three new monoterpenes glucosides from *Lamium amplexicaule*. *Helv Chim Acta* 2009;92:2063–70.
- [25] Ono M, Ishimatsu N, Masuoka C, Yoshimitsu H, Tsuchihashi R, Okawa M, et al. Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*. *Chem Pharm Bull* 2007;55(4):632–4.
- [26] Shixiu F, Jijiang B, Shengxiang Q, Yong L, Tao C. Iridoid and phenolic glycosides from the roots of *Prismatomeris connate*. *Nat Prod Commun* 2012;7(5):561–2.

- [27] Jones AJ, Grant DM, Winkley MW, Robins RK. Carbon-13 magnetic resonance. XVII. Pyrimidine and purine nucleosides. *J Am Chem Soc* 1970;92:4079–87.
- [28] Wu DR. The biochemistry of sugars. Shanghai: High Educational Press; 1987, p. 157.
- [29] Lee EJ, Kim JS, Kim HP, Lee J-H, Kang SS. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chem* 2010;120(1):134–9.
- [30] Mahato SB, Kundu AP. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 1994;37(6):1517–75.
- [31] Akcos Y, Ezer N, Özcelik B, Abbasoglu U. Iridoid Glucosides from *Sideritis lycia* Boiss. & Heldr. and its Antimicrobial Activities. *FABAD J Pharm Sci* 1998;23:99–103.
- [32] Castro-Gamboa I, Castro O. Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). *Phytochemistry* 2004;65:2369–72.
- [33] Ganapaty S, Nyamathulla S, Srilakshmi GVK, Raj Kumar PV. Iridoid compounds and antimicrobial activity of the roots of *Tecoma stans* (L) Juss. *Asian J Chem* 2008;20(6):4493–7.
- [34] Wikler MA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2–A9. 9th ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2006.
- [35] Nogueira CR, Lopes LMX. Antiplasmodial natural products. *Molecules* 2011;16:2146–90.
- [36] Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. In vitro activities of and mechanisms of resistance to antifol antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;16:710–8.
- [37] Matile H, Pink JRL. In: Lefkovits I, Pernis B, editors. Immunological methods. San Diego, CA, USA: Academic Press; 1990. p. 221–34.
- [38] Thaitong S, Beale GH, Chutmongkonkul M. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: an in vitro study of isolates mainly from Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77:228–31.
- [39] Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to H³-thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 1994;170:211–24.
- [40] Page B, Page M, Noel C. Fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int J Oncol* 1993;3:473–6.



Indolosesquiterpene alkaloids from the Cameroonian medicinal plant *Polyalthia oliveri* (Annonaceae)[☆]

Simeon Fogue Kouam^{a,b,*}, Alain Wembe Ngouonpe^a, Marc Lamshöft^b, Ferdinand Mouafo Talontsi^b, Jonathan O. Bauer^d, Carsten Strohm^d, Bonaventure Tchaleu Ngadjui^c, Hartmut Laatsch^e, Michael Spiteller^{b,*}

^a Department of Chemistry, Higher Teachers' Training College, University of Yaoundé I, P.O. Box 47, Yaoundé, Cameroon

^b Institute of Environmental Research (INFU), Department of Chemistry and Chemical Biology, TU Dortmund, Otto-Hahn-Str. 6, D-44221 Dortmund, Germany

^c Department of Organic Chemistry, University of Yaoundé, B.P. 812, Yaoundé, Cameroon

^d Inorganic Chemistry, Department of Chemistry and Chemical Biology, TU Dortmund, Otto-Hahn-Str. 6, D-44221 Dortmund, Germany

^e Institute for Organic and Biomolecular Chemistry, Georg-August University, Tammannstrasse 2, D-37077 Göttingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2013

Received in revised form 19 June 2014

Available online 16 July 2014

Keywords:

Polyalthia oliveri

Annonaceae

Indolosesquiterpenes

Absolute configuration

High resolution mass spectrometry

Antiplasmodial

Cytotoxicity

ABSTRACT

The stem bark of *Polyalthia oliveri* was screened for its chemical constituents using liquid chromatography high resolution mass spectrometry resulting in the isolation of three indolosesquiterpene alkaloids named 8 α -polyveolinone (**1**), *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (**2**) and *N*-acetyl-polyveoline (**3**), together with three known compounds, dehydro-*O*-methylisopiline (**4**), *N*-methylurabaine (**5**) and polycarpol (**6**). The structures of the compounds were elucidated by means of high resolution mass spectrometry and different NMR techniques and chemical transformations. Their absolute configurations were assigned by *ab-initio* calculation of CD and ORD data (for **2** and **3**) and X-ray diffraction analysis (for **2**). Compounds **2** and **3** exhibited moderate antiplasmodial activity against erythrocytic stages of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* NF54 strain and low cytotoxicity on rat skeletal myoblast (L6) cell line.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Although more than 125 secondary metabolites have been isolated from *Polyalthia* species, Paarakh and Khosa in their recent review point out that exploration of this genus for secondary metabolites is not yet exhaustive (Paarakh and Khosa, 2009). A number of *Polyalthia* species have been investigated as a source of potential bioactive compounds such as alkaloids, sesquiterpenes, clerodane diterpenoids, phenyltetrahydrofurano-5-pyrones, flavonoids, acetogenins, and prenylated benzopyrans demonstrating antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, hepatoprotective, leishmanicidal, analgesic, and hypotensive activities (Faizi et al., 2003; Hamonniere et al., 1977; Kemgne et al., 2012; Kee-Huat et al., 1997; Marcos et al., 2013; Ngantchou et al., 2010; Okorie et al., 1981; Paarakh and Khosa, 2009). While the

most prominent constituents, alkaloids and clerodane diterpenoids, have been isolated and described as chemotaxonomic markers for this genus, the aporphine alkaloids previously observed in *Polyalthia oliveri* seem to be that more likely (Hamonniere et al., 1974, 1977; Kijjoa et al., 1990, 1993; Leboeuf et al., 1982; Phadnis et al., 1988; Quevauviller and Hamonniere, 1977; Richomme et al., 1991). *P. oliveri* Engl., which belongs to the Annonaceae family, is a small tree up to 13–15 m tall found in the rain forest area from Sierra Leone to Ghana (Burkill, 1985; Tafokou, 2011) and in the center region of Cameroon. This plant is used in traditional medicine for the treatment of fever, skin diseases and hypertension, stomach problems, vermifuge and malaria (Burkill, 1985; Boyom et al., 2009; Irvine, 1961). Since only few studies have been reported so far on *P. oliveri*, we collected the stem bark of this plant in order to investigate their secondary metabolites and their antiplasmodial properties in context of our research on Cameroonian medicinal plants (Kouam et al., 2012, 2013). Herein we report the isolation and structure elucidation of 8 α -polyveolinone (**1**), *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (**2**) and *N*-acetyl-polyveoline (**3**), three new indolosesquiterpenes, as well as their antiplasmodial activity and cytotoxicity.

[☆] Dedicated to Prof. Dr. Armin de Meijere on the occasion of his 75th anniversary

* Corresponding authors. Address: Department of Chemistry, Higher Teachers' Training College, University of Yaoundé I, P.O. Box 47, Yaoundé, Cameroon. Tel.: +237 9446 4535 (S.F. Kouam). Tel.: +49 231 755 4080; fax: +49 231 755 4085 (M. Spiteller).

E-mail addresses: kfogue@yahoo.com (S.F. Kouam), m.spiteller@infu.tu-dortmund.de (M. Spiteller).

2. Results and discussion

2.1. LC–MS analysis of the crude extract

The dichloromethane/methanol (CH₂Cl₂/MeOH 1:1) extract of *P. oliveri* Engl. stem bark was suspended in water (H₂O) and extracted with ethyl acetate (EtOAc). Analysis of the EtOAc-soluble portion using LC–MS high resolution mass spectrometry (HRMS) and MS/MS exhibited three compounds, tentatively identified as indolosesquiterpenes. Besides the numerous signals in the total ion chromatogram (TIC) (*m/z* 200–800), the high resolution masses extracted from the ion chromatograms (± 2 ppm) of selected quasi-molecular ions (C₂₃H₃₂NO \rightarrow *m/z* 338.24784; C₂₅H₃₄NO₂ \rightarrow *m/z* 380.25841; C₂₅H₃₆NO₂ \rightarrow *m/z* 382.27406), represented possible indole derivatives, and indicated previously unknown alkaloids (Fig. 1). Based on these MS data, three new indolosesquiterpenes, namely 8 α -polyveolinone (1), *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (2), and the 8 β -configured *N*-acetyl-polyveoline (3) were isolated using a combination of analytical and chromatographic techniques (LC–MS, silica gel, and Sephadex LH-20).

2.2. Structural elucidation of isolated indolosesquiterpenes

The structure elucidation of the new indolosesquiterpenes 1–3 was carried out by means of selected NMR experiments and by comparison with existing NMR data. The structures of known compounds were identified as dehydro-*O*-methylisopiline (4), *N*-methylurabaine (5) and polycarpol (6), respectively, previously isolated from *Polyalthia suaveolens* and *P. oliveri* (Hamonniere et al., 1977; Ngantchou et al., 2010).

8 α -Polyveolinone (1) was isolated as clear oil showing an orange colored precipitate with Dragendorff's reagent indicating the alkaloid nature of the compound. A positive optical rotation ($[\alpha]_D^{26} + 118.6$ (c 6.6, CH₂Cl₂)) was observed. The IR spectrum of 1 displayed absorption bands for aromatic rings (1618 and 1595 cm⁻¹), amine group (3300 cm⁻¹) and a carbonyl group (1695 cm⁻¹). The HRMS spectrum of 1 revealed a quasi-molecular ion peak [M+H]⁺ at *m/z* 338.2473, suggesting the molecular formula C₂₃H₃₂NO (calc. 338.2483 for [M+H]⁺ ion) with 9 double bond

equivalents. The ¹³C NMR spectrum indicated 25 carbon atoms including four methyls (δ_C 19.3, 23.8, 29.2, 22.6), seven quaternary and tertiary carbon atoms. The ¹H NMR spectrum of 1 exhibited resonances confirming the presence of four methyl groups at δ_H 1.08 and 0.89 (3H each, s), 0.80 (6H, s) and two methines at δ_H 4.73 (ddd, 2.0, 7.7, 9.5) and 3.50 (d, 9.5). Furthermore, the ¹H NMR spectrum revealed signals at δ_H 7.26 (2H, d, 7.2), 7.40 (1H, dd, 7.2, 7.2), 7.40 (1H, dd, 7.2, 6.4) and 7.55 (1H, d, 6.4), which are typical for a 1,2-disubstituted benzene ring. These findings were similar to those described in the literature for other indolosesquiterpenes (Hocquemiller et al., 1981; Okorie, 1981). Analysis of its 2D NMR (COSY, HMQC and HMBC) showed resonances similar to those of polyveoline (7) (Riche et al., 1980), except for the chemical shift of C-3, which appeared as ketone carbonyl (δ_C 219.1) instead of a secondary alcohol and the relatively high chemical shift of the methyl group CH₃-17 (δ_H 0.80/ δ_C 22.6) (Table 1). Signals at δ_H 4.73 and 3.50 were assigned to H-12 and H-13. Thus, compound 1 belongs to the group of indolosesquiterpenes frequently reported from *Polyalthia* spp. (Hamonniere et al., 1977; Ngantchou et al., 2010). The relative configuration of the new indolosesquiterpene was elucidated by NOESY experiments (Figs. 4a and 4b). Cross peaks were observed between CH₃-16, CH₃-14, H-9, H-12 and H-13, as well as between CH₃-15, CH₃-17 and H-5 confirmed the orientation of the substituents in 1 as shown in Fig. 1. A full assignment of all ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of 1 was obtained from COSY, HMQC, and HMBC experiments. Fig. 3 shows the important HMBC correlations of 1, supporting the proposed structure. Thus, structure 1 was elucidated and assigned with the trivial name 8 α -polyveolinone, to indicate the difference to the 8 β -configured known polyveoline (7).

N-acetyl-8 α -polyveolinone (2) was isolated as light brown crystals with a melting point of 199–203 °C. An [M+H]⁺ ion at *m/z* 380.2579 in the HRMS spectrum of the purified compound was in accordance with a calculated molecular weight for the formula C₂₅H₃₄NO₂ (calcd. 380.2589 for the [M+H]⁺ ion). The UV, IR, and ¹H and ¹³C NMR spectra of compound 2 revealed data similar to those of compound 1, which indicated that 2 also belongs to the class of indolosesquiterpenes. The IR spectrum of 2 showed a strong absorption band at 1656 cm⁻¹ corresponding to an amide carbonyl group. Its UV spectrum exhibited absorption bands at 228 and 290 nm. The 1D and 2D NMR (HMQC and HMBC) spectra (Table 1 and Fig. 3) confirmed that 2 is a derivative of 1. A 3H singlet at δ_H 2.26 corresponded to the methyl of an acetyl group (δ_C 24.9), which was confirmed in the ¹³C NMR spectrum of compound 2 by a resonance at δ_C 170.1. The HMBC experiment showed a long-range correlation between the proton signal at δ_H 4.65 (1H, ddd, 1.7, 7.7, 10.5) (aminomethine) and the ester amide group at δ_C 170.1, revealing the site of attachment of the acetyl unit to be on nitrogen. Acid hydrolysis of compound 2 gave 8 α -polyveolinone (1) with a melting point identical to that of the natural product. Thus, the structure of the new alkaloid was elucidated as *N*-acetyl-8 α -polyveolinone. X-ray diffraction of crystals grown in dichloromethane/methanol confirmed the molecular connectivity. The structure was solved by direct methods in the space group *P*₂₁₂₁ (Fig. 1 and Fig. 4a). The final refinement of the Flack parameter (Flack, 1983) gave a value of 0.06(4) of the crystal with the SHELXL program (Sheldrich, 2008) and allowed an unambiguous assignment of the absolute configuration of 2 as shown in Fig. 4a. Thus, compound 2 is the C-8 epimeric ketone of polyveoline (7). On the basis of the same biogenetic origin of compounds 1 and 2, their NMR data, we propose the same absolute configuration for 1 as for 2.

The third compound was obtained as dark brown crystals with the molecular formula C₂₅H₃₅NO₂, as deduced from the quasi-molecular ion at *m/z* = 382.2737 [M+H]⁺, indicating 9 double bond equivalents. Its IR spectrum showed bands for hydroxyl

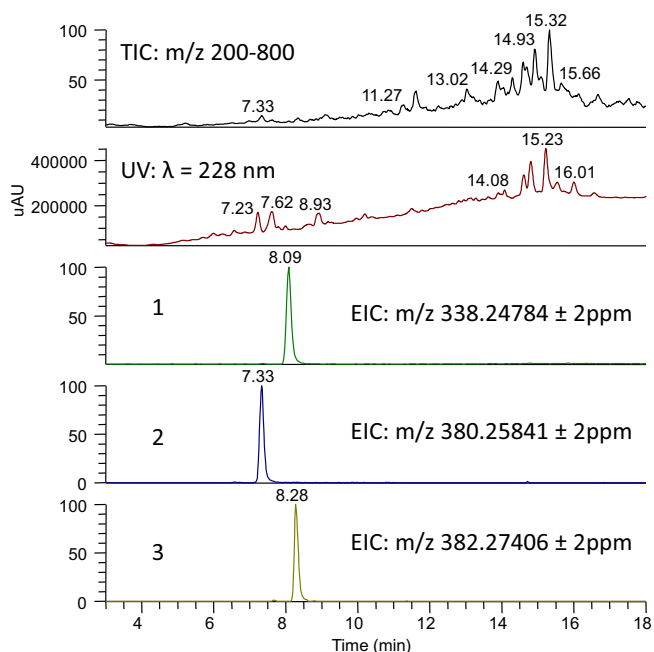


Fig. 1. Total ion current (TIC), UV-chromatogram ($\lambda = 228$ nm) and extracted ion chromatograms of new indolosesquiterpenes 1, 2 and 3.

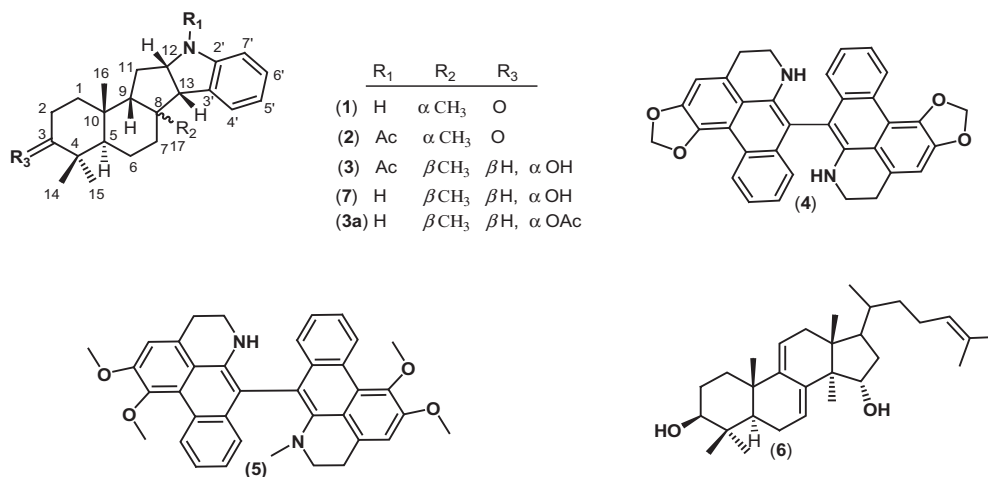


Fig. 2. Structures of the isolated compounds (1–6).

Table 1

¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR data of compounds 1–3 and 7 (in CDCl₃)^{a,b}.

No.	8α-polyveolinone (1)		N-acetyl-8α-polyveolinone (2)		N-acetyl-polyveoline (3)		Polyveoline (7)
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	
1	1.51 (m), 2.20 (m)	31.6	1.52 (m), 2.08 (m)	32.0	1.00 (dt, 2.7, 13.0) 1.80 (td, 3.2, 13.6)	31.4	31.7
2	2.34 (m), 2.67 (m)	35.0	2.35 (m), 2.70 (m)	33.8	1.55 (m), 2.00 (tt, 3.0, 13.6)	25.0	25.0
3		219.1		219.7	3.40 (brs)	76.1	76.4
4		46.7		47.2		37.3	36.3
5	2.31 (m)	45.7	2.31 (m)	46.2	1.60 (m)	39.7	39.6
6	1.56 (m)	19.3	1.55 (m)	19.8	1.27 (m), 1.34 (m)	18.7	18.6
7	1.79 (m), 2.08 (m)	36.4	1.79 (m) 2.09 (m)	37.2	0.86 (m)	32.3	31.2
8		43.4	–	44.4		44.4	61.6
9	1.79 (m)	55.1	1.75 (m)	53.6	1.59 (brs)	60.5	61.1
10		35.0		35.2		36.3	44.3
11	2.39	27.3	2.44	33.1	2.09 (m), 2.54 (m)	37.1	37.1
12	4.73 (ddd, 2.0, 7.7, 9.5)	62.9	4.65 (ddd, 1.7, 7.7, 10.5)	64.5	4.54 (ddd, 2.6, 7.7, 10.9)	63.2	61.1
13	3.50d (9.5)	62.8	3.46 (d, 10.5)	61.5	3.55 (d, 10.9)	58.7	37.2
14	0.80 (s)	19.3	1.07 (s)	19.8	0.82 (s)	21.9	23.2
15	1.08 (s)	29.2	1.08 (s)	29.6	0.88 (s)	28.1	28.2
16	0.89 (s)	23.8	0.91 (s)	24.4	1.16 (s)	23.2	21.9
17	0.80 (s)	22.6	0.69 (s)	22.8	1.42 (s)	28.6	28.1
2'		138.2		144.8		143.9	152.2
3'		135.1		131.1		131.0	127.5
4'	7.26 (d, 7.2)	125.7	7.08 (dd, 7.2, 1.0)	125.0	7.15 (d, 7.3)	123.9	124.3
5'	7.40 (dd, 7.2, 7.2)	129.0	7.04 (ddd, 7.2, 7.2, 1.2)	123.7	6.98 (dd, 7.3, 7.3)	122.9	117.6
6'	7.40 (dd, 7.2, 6.4)	129.0	7.24 (ddd, 7.2, 8.2, 1.0)	128.4	7.21 (dd, 7.3, 8.0)	127.8	127.5
7'	7.55 (d, 6.4)	120.1	8.26 (dd, 8.2, 1.2)	117.3	8.27 (d, 8.0)	116.8	108.8
CH ₂ CO			2.26 (s)	24.9	2.25 (s)	24.3	
OCH ₃				170.1		169.7	

^a Assigned by DEPT, COSY, HSQC and HMBC experiments.

^b NMR chemical shifts are given in ppm relative to TMS as an internal reference at δ 0.00. Coupling constants (*J*) are given in Hz.

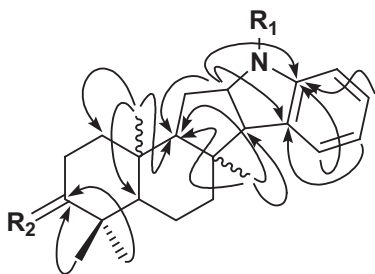


Fig. 3. Important HMBC correlations observed for compounds 1, 2 and 3.

(3310 cm⁻¹) and amide carbonyl groups (1665 cm⁻¹). The ¹H and ¹³C NMR spectra of 1–3 (see Table 1) were nearly identical, except the two singlets at δ_H 3.40 (oxymethine group) and 2.25 (acetyl

group) in the ¹H NMR spectrum of 3, which were absent in that of 1 and 2. Analysis of the ¹H–¹H COSY and HMBC data of 3 established the same basic skeleton as for compounds 1 and 2, indicating that 3 was also an indolosequiterpene. The HMBC experiment exhibited a signal at δ_H 3.40, which showed correlations with two methyl signals at δ_C 21.9 (CH₃-14) and 28.1 (CH₃-15). The acetylation of 3 using acetic anhydride and pyridine (see Section 4) gave the expected diacetylated indolosequiterpene. Further comparison of the ¹H and ¹³C NMR data obtained for 2 with those of 3 and polyveoline (7) showed noticeable chemical shifts differences (Table 1) for CH₃-17 (δ_H 0.69/δ_C 22.8 in 2 and 1.42/28.6 in 3), H-5 (δ_H 2.31/δ_C 46.2 in 2 and 1.60/39.7 in 3) and C-9 (δ_C 53.6 in 2 and 60.5 in 3), suggesting a different configuration at C-8. Thus, compound 3 was elucidated as C-8 epimer of 1 and 2. This was confirmed by NOE correlations of the methyl groups CH₃-14, CH₃-16,

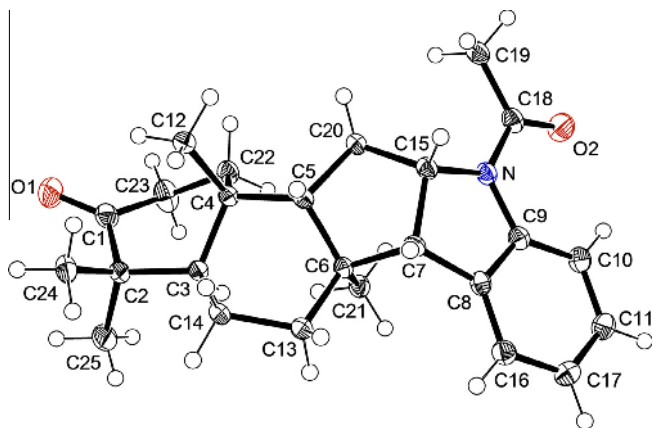


Fig. 4a. Molecular structure and absolute configuration of *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (**2**). Displacement ellipsoids are drawn at 50% probability.

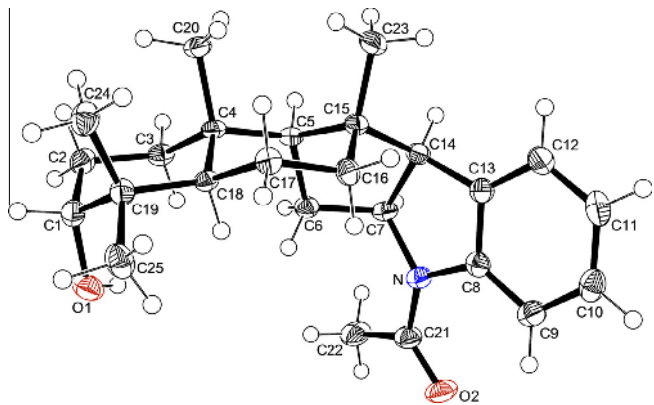


Fig. 4b. Molecular structure and relative configuration of *N*-acetyl-polyveoline (**3**). Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level.

CH₃-17, and the protons H-3 and H-9 on the same β -face as in **1/2**, while cross peaks between CH₃-15 and H-5 indicated their position on the α -face. The coupling constant of $J = \sim 0$ Hz observed for H-3 in the ¹H NMR was indicative for confirmed the α orientation of the hydroxyl group at C-3 additionally. Thus, compound **3** is α -configured at C-8, in contrast to **1** and **2**.

To confirm the proposed configuration and substitution patterns in **3**, the sample was crystallized from dichloromethane/methanol (3:1) and subjected to single crystal X-ray diffraction

analysis (Fig. 4b). The obtained crystal data confirmed the structure of **3** as well as the relative configuration (Fig. 1), which is the same as that of polyveoline (**7**) (Hocquemiller et al., 1981). From this analysis, the structure of **3** was elucidated and assigned as *N*-acetyl-polyveoline with *cis*-connected rings B and C. This compound was wrongly described before as known compound isolated from the stem of *P. suaveolens* by Okorie (1981), but no experimental data have been published so far (Ngantchou et al., 2010).

2.3. Absolute configuration of isolated indolosesquiterpenes

The determination of the absolute configuration of compounds **2** and **3** was based on their crystal structure (Fig. 4a and Fig. 4b), of which the relative configuration of all their stereo centers were assigned as (5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,12*S*,13*S*) in **2**, or (3*R*^{*},5*R*^{*},8*R*^{*},9*S*^{*},10*R*^{*},12-*S*^{*},13*S*^{*}) in **3**, respectively. The differentiation of the **2/ent-2** and **3/ent-3** enantiomers was (additionally for **2**) performed by *ab-initio* calculations: for both molecules, first a conformer search was performed using the built-in mechanism and additionally the Monte Carlo technique of SPARTAN'14 (Wavefunction, Irvine, CA, USA) software: calculations with PM3 delivered 10 conformers for **2** and 13 conformers for **3**. Their individual geometries were further optimized with Gaussian (Frisch et al., 2009) using DFT calculations with the B3LYP functional and the 6-311G(2d,p) basis set. The ECD spectra (Fig. 6) of all conformers were calculated on the same level of theory, ORD data were obtained with WB97XD/6-311G(d,p). In all conformers, the *N*-acetyl group was situated in the benzene ring plane, but two groups of conformers could be distinguished: three with the more stable *s-cis* orientation of the acetyl CO group (**2a**, with respect to the *N*-acetyl bond and the benzene ring), and seven conformers with an *s-trans* conformation (**2b**) (Fig. 5). The individual conformers in both groups had nearly identical energy values and Boltzmann factors (Fig. 5). Consequently, the CD spectrum calculated from the two different Boltzmann-averaged conformers was nearly identical with that from all ten Boltzmann-weighted conformers (Fig. 6), so that **2** can be approximated as a 2:1 mixture of **2a** and **2b** (see Fig. 6). The curve shape of experimental versus calculated CD spectra showed clearly a (5*R*,8*S*,9*S*,10*R*,12*S*,13*S*) configuration for **2**, as shown in Fig. 6. This was additionally confirmed by the positive prefix for the calculated optical rotations of all conformers, as found in the experiment for the natural mixture.

In the same way, the absolute configuration of **3** was assigned from CD and ORD calculations as (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*R*,12*S*,13*S*). It should be stated that the *cis*-connection of rings B and C derived from X-ray diffraction is not influencing the calculated CD data (Fig. 6), however, explains the strong upfield shift of the protons at C-5,6,7 by interaction with the benzene ring. A plausible bioge-

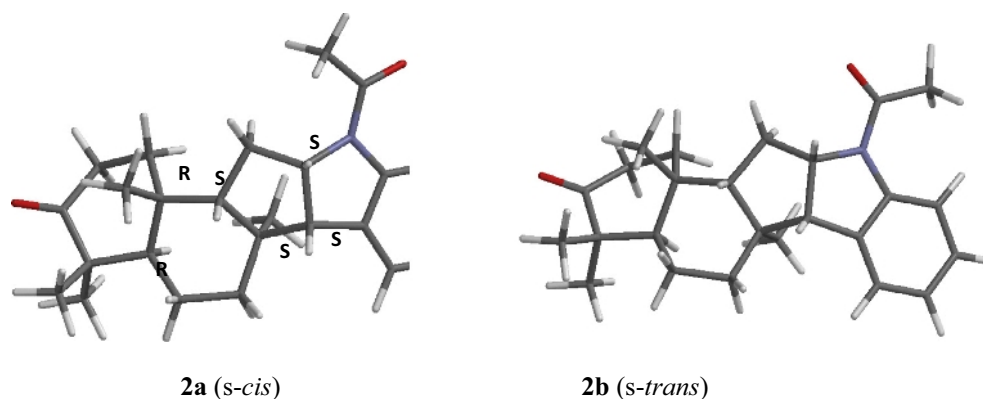


Fig. 5. Main conformer **2a** (64%) and minor conformer **2b** (36%) of *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (**2**).

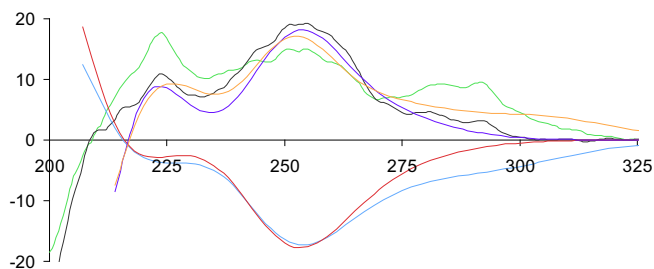


Fig. 6. Experimental CD spectrum of: — *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (**2**) and — *N*-acetyl-polyveoline (**3**); CD spectra of **2** (—) and **3** (—), DFT calculated from the conformations in the crystal; DFT-calculated CD spectra of *ent*-**2** (—) and of *ent*-**3** (—).

netic pathway for compounds **1–3** is proposed in Fig. 7. The biosynthesis would be initiated by epoxidation of 3-farnesyl indole (**8**) to afford the intermediate **9**, which can then undergo Markovnikov cyclisation to form the carbocation **10** (Marcos et al., 2013). Further cyclisation, oxidation and acetylation of **10** would generate compounds **1**, **2** and **3**, depending on the side (a,b) of the cyclisation in **10**.

The known compounds were identified as dehydro-*O*-methylsopiline (**4**), *N*-methylurabaine (**5**), and polycarpol (**6**) (Fig. 2) by analysis of their NMR spectra and by comparison with the data reported in the literature (Hamonniere et al., 1976, 1977; Connolly et al., 1996; Li et al., 1993; Ngantchou et al., 2010).

Compounds **2** and **3** were tested against the chloroquine-resistant strain NF54 of malaria parasite (*Plasmodium falciparum*) as well as their cytotoxicity on L6 cell lines as described previously (Talontsi et al., 2013) and the results are presented in Table 2. *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (**2**) and compound **3** showed moderate

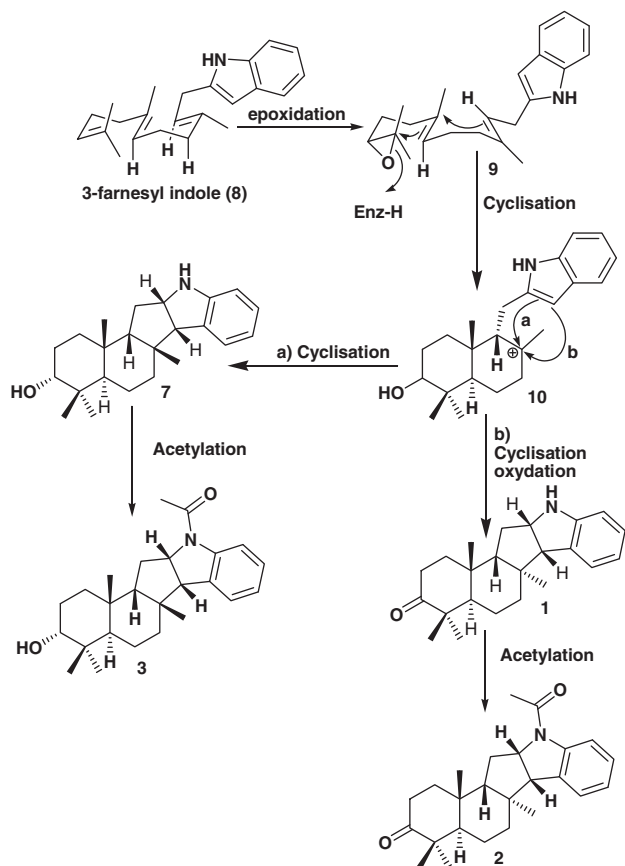


Fig. 7. Plausible biogenetic origin of compounds **1**, **2** and **3**.

Table 2
Cytotoxicity and antiplasmodial activity of compounds **2** and **3**^a.

Compound	Antiplasmodial activity IC ₅₀ [μ M] <i>Plasmodium falciparum</i> (NF54)	Cytotoxic activity IC ₅₀ [μ M] rat skeletal myoblasts (L6)
2	7.6	38.5
3	29.1	42.7
Chloroquine	0.006	
Podophyllotoxin		0.012

^a IC₅₀ values are the means of two independent assays.

antiplasmodial activity against *P. falciparum* and low cytotoxicity on rat skeletal myoblasts L6 cell lines, respectively. Compound **2** exhibited a four times higher potential than compound **3** and we propose that this may be due to the presence of carbonyl group at C-3 and the configuration change at C-8. The obtained values are in the same range as already reported data of other indolosesquiterpene alkaloids (Nogueira and Lopes, 2011).

3. Conclusion

In this study, investigation of the stem bark of *P. oliveri* yielded three new indolosesquiterpenes, two known aporphine alkaloids and the lanostane triterpenoid polycarpol. Their structures were elucidated by extensive NMR techniques and then confirmed by single-crystal X-ray diffraction analysis and chemical transformations. The absolute configurations were assigned by *ab-initio* calculation of CD and ORD data. Compounds **2** and **3** exhibited moderate antiplasmodial activity against erythrocytic stages of chloroquine-sensitive *P. falciparum* NF54 strain and low cytotoxicity on rat skeletal myoblast (L6) cell line.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

4.1.1. NMR and CD

The NMR spectra were recorded on a Bruker DRX-500 NMR. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) from internal standard tetramethylsilane (TMS). The ³J_{CH} couplings were measured by means of pulsed field gradient HMBC spectra recorded by varying the *J*-refocusing time between *t* = 0.04 and 0.14 s. The CD spectrum was collected using a JASCO J-815 spectropolarimeter.

4.1.2. X-ray

Single crystal X-ray diffraction analysis to determine the relative configurations of **2** and **3** was performed on an Oxford Diffraction Xcalibur S diffractometer at 173(2) K using graphite-monochromated Mo-K α radiation (λ = 0.71073 Å). The crystal structures were solved with direct methods (SHELXS97; Sheldrick, 2008) and refined against *F*² with the full-matrix least-squares method (SHELXL97; Sheldrick, 2008). A multi-scan absorption correction using the CrysAlis RED program (Oxford Diffraction, 2006) was employed. The non-hydrogen atoms were refined anisotropically. All of the hydrogen atoms were placed in geometrically calculated positions and each was assigned a fixed isotropic displacement parameter based on a riding-model. The determination of the absolute configuration of compound **2** was performed on a Bruker D8 Venture diffractometer at 100(2) K using Cu-K α radiation (λ = 1.54178 Å). The crystal structures were solved with direct methods (SHELXS97; Sheldrick, 1997) and refined against *F*² with the full-matrix least-squares method (SHELXL14; Sheldrick, 2014). A multi-scan absorption correction using the SADABS V2014/2 program (Bruker AXS Inc.) was employed. The non-hydrogen

atoms were refined anisotropically. All of the hydrogen atoms were placed in geometrically calculated positions and each was assigned a fixed isotropic displacement parameter based on a riding-model.

4.2. Plant material

The stem bark of *P. oliveri* Engl. was collected from Mount Kala at the Centre Region of Cameroon. Identification of the plant material was done by Mr. Nana Victor of the National Herbarium of Yaounde, Cameroon, where a voucher specimen (1952 SRFK) was deposited.

4.3. Extraction and isolation

The air-dried and powdered stem bark (4.0 kg) was extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) mixture at room temperature for 48 h. The solution was filtered and removal of the solvent under vacuum afforded 434 g of black gum, which was suspended in water (H_2O) and extracted with ethyl acetate (EtOAc, 123 g). A part of the EtOAc-soluble fraction (118 g) was subjected to flash silica gel column chromatography and eluted with a mixture of *n*-hexane–EtOAc and EtOAc–MeOH in order of increasing polarity (0–100%) to yield a total of 101 fractions of ca. 200 ml each of which were combined on the basis of TLC analysis into six fractions: A (8.3 g, *n*-hexane), B (22.7 g, *n*-hexane–EtOAc, 9:1 and 4: 1), C (28.0 g, *n*-hexane–EtOAc, 7:3 and 3:2), D (17.5 g, *n*-hexane–EtOAc, 1:1), E (15.8 g, EtOAc–MeOH, 100:0 and 49:1), F (13.0 g, EtOAc–MeOH, 9:1). Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis (LC–MS) metabolic profiling of these fractions revealed many alkaloids. Fractions with the resulting chromatograms which revealed peaks corresponding to compounds with sum formulas that have not been previously identified were further studied. Fraction B (22.7 g) was subjected to column chromatography over a silica gel column (60–120 mesh, 20.0 g) using hexane–EtOAc (25%) as eluant. The column eluates were monitored by thin-layer chromatography, and similar fractions were combined to give six sub-fractions (I–VI). From sub fraction I, compound **6** (25 mg) was obtained. The sub fraction III, when subjected to further silica gel column chromatography eluting with a mixture of *n*-hexane–EtOAc yielded compounds **1** (7.2 mg) and **4** (18.4 mg). Fraction D (17.5 g) was subjected to further silica gel CC using a gradient solvent of *n*-hexane–EtOAc (25–40%). Five sub fractions (D₁–D₅) were obtained after having monitored the eluates by TLC. Fractions D₃ were then subjected to repeated silica gel column chromatography, eluting with a mixture of *n*-hexane–EtOAc in order of increasing polarity (25–40%) to give compounds **2** (17 mg), **3** (15.2 mg) and **5** (22.1 mg).

4.4. Accurate mass measurement

The high resolution mass spectra were measured with an LTQ-Orbitrap Spectrometer (Thermo Fisher, USA) equipped with a HESI-II source. The spectrometer was operated in positive mode (1 spectrum s^{-1} ; mass range: 200–1000) with nominal mass resolving power of 60,000 at m/z 400 with a scan rate of 1 Hz) with automatic gain control to provide high-accuracy mass measurements within 2 ppm deviation using an internal standard; Bis(2-ethylhexyl)phthalate: $m/z = 391.284286$. The spectrometer was attached with an Agilent (Santa Clara, USA) 1200 HPLC system consisting of LC-pump, PDA detector ($\lambda = 205$ nm), auto sampler (injection volume 10 μl) and column oven (30 °C). MS/MS experiments were performed by CID (collision induced decay, 35 eV) mode. Following parameters were used for experiments: spray voltage 5 kV, capillary temperature 260 °C, tube lens 70 V. Nitrogen was used as sheath gas (50 arbitrary units) and auxiliary gas (5 arbitrary units). Helium served as the collision gas.

4.5. Physico-chemical constants of new compounds

4.5.1. 8 α -Polyveolinone (**1**)

Clear oil; ($[\alpha]_D^{26} + 118.6$ (c 6.6, CH_2Cl_2); UV (MeOH): λ_{max} (log ϵ): 214, 228, 302 nm; IR (KBr); ν_{max} 3300, 2952, 2921, 2869, 1618, 1695, 1595, 1460, 1382, 747 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) are shown in Table 1; HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 338.2473 (calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}$, 338.2483).

4.5.2. *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (**2**)

Light brown block crystals; mp. 199–203 °C; ($[\alpha]_D^{26} + 215$ (c 9.2, MeOH); UV (MeOH): λ_{max} (log ϵ): 228, 252, 282, 290 nm; IR (KBr); ν_{max} 2956, 2934, 2865, 1695, 1656, 1591, 1473, 1378, 747 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) are shown in Table 1; HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 380.2579 (calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{NO}_2$, 380.2589).

4.5.3. *N*-acetylpolyveoline (**3**)

Dark brown block crystals; mp. 225–229 °C; ($[\alpha]_D^{26} + 98$ (c 11.2, MeOH); UV (MeOH): λ_{max} (log ϵ): 216, 259, 282, 291 nm; CD (c 0.1, MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 255 (+10) nm; IR (KBr); ν_{max} 3310, 2937, 2860, 1665, 1595, 1385, 756 cm^{-1} , ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) are shown in Table 1; HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 382.2737 (calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{NO}_2$, 382.2746).

4.6. Acid hydrolysis of *N*-acetyl-polyveolinone

N-acetyl-polyveoline (**3**, 5.0 mg, 0.026 mmol) was suspended in MeOH (10 ml) and 20 ml of a solution of 15% aq. H_2SO_4 were added. The mixture was refluxed for 8 h. After cooling, the mixture was diluted with H_2O and extracted with ethyl acetate. The residue obtained was dried (Na_2CO_4) and evaporated to give a gummy solid. After purification on a Si gel column, using *n*-hexane/EtOAc 35% a pure deacetyl compound was obtained, which was identical with the natural compound **1** (4.04 mg, 91%).

4.7. Acetylation of *N*-acetyl-polyveoline (**3**)

Dry pyridine (0.5 ml) and Ac_2O (1.0 ml) were added to *N*-acetyl-polyveoline (**3**, 10 mg, 0.026 mmol) and stirred for 12 h. After the usual workup, the extract was subjected to silica gel column chromatography to afford *O,N*-diacetylpolyveoline (**3a**) (10.8 mg, 98.2%) as a colorless oil; *O,N*-diacetylpolyveoline; ($[\alpha]_D^{26} + 96^\circ$ (c 10.8, MeOH); HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 424.2855 (calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{NO}_3$, 424.2851); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 8.28 (d, 8.2), 7.21 (t, 7.3); 7.16 (d, 7.3), 6.99 (t, 7.3), 4.62 (brs), 4.56 (q, 7.9), 3.56 (d, 10.8), 2.52 (m), 2.26 (s), 2.06 (m), 2.05 (m), 1.93 (d, 14.0), 1.60 (m), 1.53 (dd, 2.9, 12.0), 1.42 (s), 1.34 (dd, 3.5, 12.9), 1.28 (m), 1.16 (s), 1.04 (dt, 3.8, 13.4), 0.85 (s), 0.84 (m), 0.77 (s); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 170.7 ($\text{CH}_3\text{C=O}$), 169.9 (CH_3CON), 144.1 (C-2'), 131.1 (C-3'), 128.1 (C-6'), 124.2 (C-4'), 123.3 (C-5'), 116.9 (C-7'), 78.5 (C-3), 63.4 (C-12), 60.6(C-9), 59.0 (C-13), 44.6 (C-8), 41.2 (C-5), 37.2 (C-4), 36.7 (C-11), 36.4 (C-10), 32.4 (C-7), 32.3 (C-1), 28.8 (C-17), 27.9 (C-15), 24.6 (CH_3CON), 23.4 (C-16), 22.9 (C-2), 21.7 (C-14), 21.5(CH_3CO), 18.7(C-6).

4.8. X-ray crystallography

4.8.1. Crystallographic data of *N*-acetyl-8 α -polyveolinone (**2**)

X-ray data for measurement of the relative configurations of **2**: Light brown blocks crystals, crystal size 0.40 × 0.30 × 0.30 mm, $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NO}_2$, $M_r = 379.52$, orthorhombic, space group $P2_12_1$, $a = 12.1238(7)$ Å, $b = 12.5887(7)$ Å, $c = 13.4898(9)$ Å, $V = 2058.9(2)$ Å³, $Z = 4$, $\rho = 1.224$ Mg m^{-3} . 7579 reflections measured with 2θ in the range 4.66–51.98°. 4046 unique reflections ($R_{\text{int}} = 0.0252$). $R_1 = 0.0370$, $wR_2 = 0.0691$ (all data). CCDC number: 959818.

X-ray data for measurement of the absolute configurations of **2**: Light brown blocks crystals, crystal size $0.16 \times 0.12 \times 0.06$ mm, $C_{25}H_{33}NO_2$, $M_r = 379.52$, orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $a = 12.1434(6)$ Å, $b = 12.5941(6)$ Å, $c = 13.4732(6)$ Å, $V = 2060.53(17)$ Å³, $Z = 4$, $\rho = 1.223$ Mg m⁻³. 58,448 reflections measured with 2θ in the range 9.62 – 149.04° . 4201 unique reflections ($R_{int} = 0.0295$). $R_1 = 0.0272$, $wR_2 = 0.0715$ (all data), Absolute structure parameter $0.06(4)$. CCDC number: 1001203.

4.8.2. Crystallographic data of *N*-acetyl-polyveoline (**3**)

Dark brown blocks crystals, crystal size $0.30 \times 0.10 \times 0.10$ mm, $C_{25}H_{35}NO_2$, $M_r = 381.54$, monoclinic, space group $P2_1$, $a = 9.9085(3)$ Å, $b = 7.3530(2)$ Å, $c = 14.9480(5)$ Å, $\beta = 106.802(4)^\circ$, $V = 1048.58(5)$ Å³, $Z = 2$, $\rho = 1.215$ Mg m⁻³. 18,988 reflections measured with 2θ in the range 5.70 – 52.00° . 4073 unique reflections ($R_{int} = 0.0283$). $R_1 = 0.0317$, $wR_2 = 0.0753$ (all data). CCDC number: 959819.

Crystallographic data (excluding structure factors) of compounds **2** and **3** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication no. CCDC 959818 (**2**) (relative configuration), CCDC 1001203 (**2**) (absolute configurations) and CCDC 959819 (**3**) (relative configurations). Copies of the data can be obtained free of charge on application to The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK [fax: (+44) 1223-336-033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk].

4.9. Computational methods

Conformational searches were performed using the conformer distribution search implemented in Spartan'14 (Wavefunction, Irvine, CA, USA), using AM1. DFT calculations were performed with Gaussian'09W, Vers. 7.0 (Frisch et al., 2009). All AM1 conformers within 5 kcal above the global minimum were further optimized (geometry + frequency) with DFT at the B3LYP/6-311G(2d,p) level. From the frequency calculations, the free energies were obtained and the Boltzmann factors calculated for 300 K. DFT calculations employing the WB97XD functional and the 6-311G(d,p) basis set were used to calculate the molar values for the optical rotations. The data obtained were weighted according to their Boltzmann factors.

4.10. Antiplasmodial activity

In vitro activity against erythrocytic stages of *P. falciparum* was assayed using a 3H-hypoxanthine incorporation assay (Ahmed et al., 1994; Matile and Pink, 1990; Thaithong et al., 1983), the chloroquine and pyrimethamine resistant K1 strain that originated from Thailand (Thaithong et al., 1983) and the standard drug chloroquine (Sigma–Aldrich). Compounds were dissolved in DMSO at 10 µg/ml and added to parasite cultures incubated in RPMI 1640 medium without hypoxanthine, supplemented with HEPES (5.94 g/L), NaHCO₃ (2.1 g/L), neomycin (100 U/mL), AlbumaxR and washed human red cells A+ at 2.5% haematocrit (0.3% parasitaemia). Serial drug dilutions of eleven 3-fold dilution steps covering a range from 100 to 0.002 µg/ml were prepared. The 96-well plates were incubated in a humidified atmosphere at 37 °C; 4% CO₂, 3% O₂, 93% N₂. After 48 h, 50 µl of [³H]hypoxanthine (=0.5 µCi) was added to each well of the plate. The plates were incubated for a further 24 h under the same conditions. The plates were then harvested with a Betaplate™ cell harvester (Wallac, Zurich, Switzerland), and the red blood cells transferred onto a glass fiber filter then washed with distilled water. The dried filters were inserted into a plastic foil with 10 ml of scintillation fluid, and counted in a Betaplate™ liquid scintillation counter (Wallac,

Zurich, Switzerland). IC₅₀ values were calculated from sigmoidal inhibition curves by linear regression.

4.11. *In vitro* cytotoxicity with L6 cells

Assays were performed in 96-well microtiter plates, each well containing 100 µl of RPMI 1640 medium supplemented with 1% L-glutamine (200 mM) and 10% fetal bovine serum, and 4000 L6 cells (a primary cell line derived from rat skeletal myoblasts) (Page et al., 1993). Serial drug dilutions of eleven 3-fold dilution steps covering a range from 100 to 0.002 µg/ml were prepared. After 70 h of incubation the plates were inspected under an inverted microscope to assure growth of the controls and sterile conditions. 10 µl of Alamar Blue was then added to each well and the plates incubated for another 2 h. Then the plates were read with a Spectramax Gemini XS microplate fluorometer (Molecular Devices Cooperation, Sunnyvale, CA, USA) using an excitation wave length of 536 nm and an emission wave length of 588 nm. The IC₅₀ values were calculated by linear regression from the sigmoidal dose inhibition curves using SoftmaxPro software (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). The IC₅₀ values in µmol/ml are the means of two independent assays; the individual values varied less ±50%.

Acknowledgments

This work was supported by the German Academic Exchange Service (DAAD) initiative “Welcome to Africa” and the Ministry of Innovation, Science, Research and Technology of the State of North Rhine-Westphalia, Germany and the German Research Foundation (DFG) for funding a high-resolution mass spectrometer, the Third World Academy of Science (Grant N° 10-004 RG/CHE/AF/AC-I) and the International Foundation of Science (Grant No. F/4893-1). AvH is also acknowledged for equipment donation to SKF.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.015>.

References

- Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Walsh, J.E., 1994. A new rapid and simple non radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* 170, 211–224.
- Boyom, F.F., Kemgne, E.M., Tepongning, R., Ngouana, V., Mbacham, W.F., Tsamo, E., Zollo, P.H.A., Gut, J., Rosenthal, P.J., 2009. Antiplasmodial activity of extracts from seven medicinal plants used in malaria treatment in Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* 123, 483–488.
- Burkill, H.M., 1985. The useful plants of West Tropical Africa, second ed., vol. 2, Royal Botanic Gardens Kew.
- Connolly, J.D., Haque, M.D.E., Kadir, A.A., 1996. Two 7,7'-bisdehydroaporphine alkaloids from *Polyalthia bullata*. *Phytochemistry* 43, 295–297.
- Faizi, S., Khan, A.A., Azher, S., Khan, S.A., Tauseef, S., Ahmad, A., 2003. New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. *pandula*. *Planta Med.* 69, 350–355.
- Flack, H.D., 1983. On enantiomorph-polarity estimation. *Acta Crystallogr.* A39, 876–881.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J.A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, O., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J., 2009. Gaussian 09W, Version 7.0; Gaussian, Wallingford, CT.

- Hamonniere, M., Leboeuf, M., Cave, A., 1977. Alcaloides aporphiniques et composés terpeniques du *Polyalthia oliveri*. *Phytochemistry* 16, 1029–1034.
- Hamonniere, M., Fournet, A., Leboeuf, M., Bouquet, A., Cave, A., 1976. Polycarpol, a new triterpene from *Polyalthia oliveri* Engl. and *Meiocarpidium lepidotum* Engl. and Diels, Annonaceae. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. C: Sci. Chim.* 282, 1045–1047.
- Hamonniere, M., Leboeuf, M., Cave, A., 1974. Oliveridine and oliverine new aporphinic alkaloids of *Polyalthia oliveri*. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. C: Sci. Chim.* 278, 921–924.
- Hocquemiller, R., Dubois, G., Leboeuf, M., Cave, A., Kunesch, N., Riche, C., Chiaroni, A., 1981. La Polyveoline, nouvel indolosesquiterpene isolé du *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae). *Tetrahedron Lett.* 22, 5057–5060.
- Irvine, F.R., 1961. *Woody Plants of Ghana*. Oxford University Press, London.
- Kee-Huat, L., Cheng-Hock, C.C., Swee-Hock, G., 1997. Seco-Benzyltetrahydroisoquinolines from *Polyalthia insignis* (Annonaceae). *Tetrahedron Lett.* 38, 1253–1256.
- Kemgne, E.A.M., Mbacham, W.F., Boyom, F.F., Amvam, Z.P.H., Tsamo, E., Rosenthal, P.J., 2012. In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* field isolates to extracts from Cameroonian Annonaceae plants. *Parasitol. Res.* 110, 109–117.
- Kijjoo, A., Pinto, M.M.M., Pinho, P.M.M., Tantisewie, B., Herz, W., 1990. Clerodane derivatives from *Polyalthia viridis*. *Phytochemistry* 29, 653–655.
- Kijjoo, A., Pinto, M.M.M., Pinho, P.M.M., Herz, W., 1993. Clerodanes from *Polyalthia viridis*. *Phytochemistry* 34, 457–460.
- Kouam, S.F., Kuigoua, G.M., Bullach, A., Lamshöft, M., Ngouonpe, A.W., Spiteller, M., 2013. Monoterpenes with antibacterial activities from a Cameroonian medicinal plant *Canthium multiflorum* (Rubiaceae). *Fitoterapia* 91, 199–204.
- Kouam, S.F., Kusari, S., Lamshöft, M., Tatuedom, O.K., Spiteller, M., 2012. Sapelenins G-J, acyclic triterpenoids with strong anti-inflammatory activities from the bark of the Cameroonian medicinal plant *Entandrophragma cylindricum*. *Phytochemistry* 83 (2012), 79–86.
- Leboeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R., 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21, 2783–2813.
- Li, H.-Y., Sum, N.-J., Kashiwada, Y., Sun, L., 1993. Suberosol, a new C₃₁ lanostane-type triterpene and anti-HIV principle from *Polyalthia suberosa*. *J. Nat. Prod.* 56, 1130–1133.
- Marcos, I.S., Moro, R.F., Costales, I., Basabe, P., Diez, D., 2013. Sesquiterpenyl indoles. *Nat. Prod. Rep.* 30, 1509–1526.
- Matile, H., Pink, J.R.L., 1990. In: Lefkovits, I., Pernis, B. (Eds.), *Immunological Methods*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 221–234.
- Ngantchou, I., Nyasse, B., Denier, C., Blonski, C., Hannaert, V., Schneider, B., 2010. Antitrypanosomal alkaloids from *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae): their effects on three selected glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 3495–3498.
- Nogueira, C.R., Lopes, L.M.X., 2011. Antiplasmodial natural products. *Molecules* 16, 2146–2190.
- Okorie, D.A., 1981. Polyavolinamide, an indolosesquiterpene alkaloid from *Polyalthia suaveolens*. *Phytochemistry* 20, 2575–2578.
- Paarakh, P.M., Khosa, R.L., 2009. Phytoconstituents from the genus *Polyalthia*. *J. Pharm. Res.* 2, 594–605.
- Page, B., Page, M., Noel, C., 1993. Fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int. J. Oncol.* 3, 473–476.
- Phadnis, A.P., Patwardhan, S.A., Dhanešwar, N.N., Tavale, S.S., Row, T.N.G., 1988. Clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia*. *Phytochemistry* 27, 2899–2901.
- Quevauviller, A., Hamonniere, M., 1977. *Polyalthia oliveri* Engler (Annonaceae) main alkaloids activities on the central nervous system and cardiovascular system. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D: Sci. Nat.* 284, 93–96.
- Riche, C., Chiaroni, A., Dubois, G., Hocquemiller, R., Leboeuf, M., Cave, A., 1980. La Polyveoline, nouvel indolosesquiterpene du *Polyalthia suaveolens*. *Planta Med.* 39, 206–207.
- Richomme, P., Godet, M.-C., Foussard, F., Toupet, L., Sévenet, T., Bruneton, J., 1991. A novel leishmanicidal labdane from *Polyalthia macropoda*. *Planta Med.* 57, 552–554.
- Sheldrich, G.M., 2008. The *SHELX* programs for crystal structure determination are reviewed by their author. *Acta Crystallogr. A* 64, 112–122.
- Tafokou, J.R.B., 2011. *Greenwayodendron suaveolens* (Engl. & Diels) Verdc. In: Lemmens, R.H.M.J., Louppe, Oteng-Amoako, A.A. (Eds.), *Prota 7: Timbers/Bois d'œuvre 2*. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands.
- Talontsi, M.F., Lamshöft, M., Bauer, J.O., Razakarivony, A.A., Andriamihaja, B., Strohmman, C., Spiteller, M., 2013. Antibacterial and antiplasmodial constituents of *Beilschmiedia cryptocaryoides*. *J. Nat. Prod.* 76, 97–102.
- Thaithong, S., Beale, G.H., Chutmongkonkul, M., 1983. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: an in vitro study of isolates mainly from Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 228–231.