

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

\*\*\*\*\*



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCES  
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

\*\*\*\*\*

**CONSTITUANTS CHIMIQUES DES ECORCES DU  
TRONC DE DEUX PLANTES MEDICINALES DU  
CAMEROUN: PAURIDIANTHA CALLICARPOIDES  
HIERN (RUBIACEAE- ET ENTANDROPHRAGMA  
CYLINDRICUM SPRAGUE (MELIACEAE-;  
TRANSFORMATIONS CHIMIQUES ET ACTIVITES  
ANTI-INFLAMMATOIRES DE QUELQUES C**

Doctorat/Ph.D en Chimie Inorganique

Par :

**TATUEDOM KAMGUE OSTEND**  
**D.E.A en Chimie organique**

Sous la direction  
**KOUAM FOGUE Siméon**  
Maître de Conférences

Année Académique  
2014-2015





## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [biblio.centrale.uyi@gmail.com](mailto:biblio.centrale.uyi@gmail.com)

## WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: [biblio.centrale.uyi@gmail.com](mailto:biblio.centrale.uyi@gmail.com)

---

---

## SOMMAIRE

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES .....	i
SOMMAIRE.....	x
DEDICACE .....	xiii
REMERCIEMENTS .....	xivv
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES .....	xviii
LISTE DES TABLEAUX.....	xx
LISTE DES FIGURES .....	xxiii
LISTE DES SCHEMAS .....	xxviii
RESUME .....	xxx
ABSTRACT.....	xxxii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE	
I.1- LE GENRE <i>PAURIDIANTHA</i> .....	6
I.1.1- Aperçu botanique.....	6
I.1.2- Usages des espèces du genre <i>Pauridiantha</i> .....	10
I.1.3- Travaux chimiques et activités biologiques antérieurs sur le genre <i>Pauridiantha</i> .....	12
I.2- LE GENRE <i>ENTANDROPHRAGMA</i> .....	31
I.2.1- Aperçu botanique.....	31
I.2.2- Quelques usages des espèces du genre <i>Entandrophragma</i> .....	36
I.2.3- Travaux chimiques et activités biologiques antérieurs sur le genre <i>Entandrophragma</i> .....	37
I.3- L'INFLAMMATION ET LES ANTI-INFLAMMATOIRES .....	65
I.3.1- L'inflammation.....	65
I.3.2- Les anti-inflammatoires.....	69
I.4- LA CYTOTOXICITE.....	74
I.5- DETERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE PAR L'INTERMEDIAIRE DES ACIDES DE MOSHER (MTPA). .....	75
I.6- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE-SPECTROMETRIE DE MASSE (HPLC-MS).....	77

---

## CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION

<b>II.1- EXTRACTION, ISOLEMENT ET ELUCIDATION DES STRUCTURES DES COMPOSES ISOLES.....</b>	<b>82</b>
II.1.1- Extraction et composés isolés .....	82
II.1.2- Elucidation des structures des composés isolés .....	87
II.1.3- Conclusion partielle .....	215
<b>II.2- TRANSFORMATIONS CHIMIQUES SUR QUELQUES COMPOSES ISOLES... </b>	<b>216</b>
II.2.1- Introduction .....	216
II.2.2- Réactions d'hydrolyse.....	216
II.2.3- Réactions d'acétylation .....	219
II.2.4- Réactions d'estérification.....	223
II.2.5- Conclusion partielle .....	235
<b>II.3- ACTIVITES BIOLOGIQUES DE QUELQUES COMPOSES ISOLES.....</b>	<b>236</b>
II.3.1- Introduction .....	236
II.3.2- Résultats .....	237
II.3.3- Discussion .....	242
II.3.4- Conclusion partielle .....	244

## CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES

<b>III.1- GENERALITES.....</b>	<b>248</b>
III.1.1- Appareillage.....	248
III.1.2- Tests de caractérisation chimique .....	250
<b>III.2- MATERIEL.....</b>	<b>251</b>
III.2.1- Matériel végétal .....	251
III.2.2- Matériel pour l'activité biologique .....	251
<b>III.3- EXTRACTION ET ISOLEMENT DES COMPOSES.....</b>	<b>252</b>
III.3.1- Extraction.....	252
III.3.2- Isolement des composés.....	252
<b>III.4- TRANSFORMATIONS CHIMIQUES SUR QUELQUES COMPOSES ISOLES .</b>	<b>262</b>
III.4.1.- Réactions d'hydrolyse.....	262

---

III.4.2- Réactions d'acétylation.....	263
III.4.3- Réactions d'estérification .....	263
<b>III.5- ACTIVITES BIOLOGIQUES.....</b>	<b>265</b>
III.5.1- Activités anti-inflammatoires .....	265
III.5.2- Test de viabilité des cellules mononucléaires du sang périphérique humain. ....	268
<b>III.6- CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPOSES ISOLES.....</b>	<b>269</b>
III.6.1- Les alcaloïdes.....	269
III.6.2- Les acides phénoliques et dérivés.....	270
III.6.3- Les coumarines .....	270
III.6.4- Les flavonoïdes .....	272
III.6.5- Les iridoïdes.....	272
III.6.6- Les limonoïdes.....	273
III.6.7- Les stéroïdes .....	273
III.6.8- Les carbohydrates .....	274
III.6.9- Les terpénoïdes .....	274
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>279</b>
<b>ANNEXE</b>	
<b>LISTE DES PUBLICATIONS .....</b>	<b>296</b>

---

# DEDICACE

*Je dédie affectueusement ce travail à:*

- *Mes défunts parents: KAMGUE Michel et MOTIO Clémentine*
- *Mon épouse Elvire Flore NOCHE YOUMSSI épouse TATUEDOM*
- *Mes enfants TATUEDOM KAMGUE Emmanuel Lawson  
et TATUEDOM YOUMSSI Uriel Chandler*
- *Ma grande sœur NGUEMKO KAMGUE Jeannette  
et son époux TAGNI MATHIEU*

---

# REMERCIEMENTS

Je rends grâce au Seigneur pour avoir permis que ce qui était un rêve soit aujourd'hui une réalité. Merci Seigneur d'avoir toujours guidé mes pas tout au long de mes différentes formations ainsi que mes différents projets.

Au Professeur **B. T. NGADJUI**, qui m'a accueilli dans son équipe de recherche. Ses encouragements, ses discussions, ses conseils précieux ont été très déterminants pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Au Professeur **S. F. KOUAM**, qui malgré ses multiples occupations a accepté sans réserve de diriger cette thèse, et l'a suivi de bout en bout avec intérêt et dévouement. Il s'y est grandement impliqué par ses directives, ses remarques et suggestions, mais aussi par ses encouragements dans les moments difficiles et cruciaux de son élaboration. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et ma sincère reconnaissance.

Au Professeur **A. E. 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 pour ses incessants encouragements tout au long de cette thèse.

Au Professeur **M. I. CHOUDHARY**, Directeur de "*International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS)*", Université de Karachi-Pakistan, pour avoir dirigé une partie de ce travail durant six mois de recherche effectuée dans ses laboratoires. Qu'il trouve ici l'expression de ma grande reconnaissance.

Au Docteur **S. KUSARI** de INFU-Université Technique de Dortmund en Allemagne pour avoir effectué les tests biologiques.

Au Docteur **M. LAMSHÖFT** de INFU-Université Technique de Dortmund en Allemagne pour les analyses LC-MS.

A la TWAS ("*Third World Academy of Sciences*") pour la bourse de 06 mois qu'elle m'a offerte à travers un séjour à ICCBS à l'Université de Karachi-Pakistan (Novembre 2012-Mai 2013) ainsi que leur soutien matériel et financier accordé à notre laboratoire.

A la FIS (Fondation Internationale pour la Science) pour leur soutien matériel et financier accordé à notre laboratoire.

---

A la fondation HUMBOLDT, pour leur soutien matériel et financier accordé à notre laboratoire

A INFU (“*Institut für Umweltforschung*”) à travers le Professeur **M. SPITELLER** pour le soutien matériel.

A la DAAD (“*German Academic Exchange Service*”) à travers le projet “*Welcome to Africa*” pour leur soutien matériel et financier accordé à notre laboratoire.

A tous les enseignants du Département de Chimie Organique de l'Université de Dschang et de Yaoundé I pour les enseignements et la formation de base qu'ils m'ont fait acquérir.

Aux Professeurs **D. KAPCHE, B. Lenta, P. WAFO**, les Docteurs **R. NGANSOP, E. NGNOKAM** et **T. NDONGO** pour leurs conseils et encouragements. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

A mes aînés de laboratoire, les Docteurs **G. M. KUIGOUA** et **D. B. YAPNA**, pour leur collaboration, leurs conseils et suggestions.

Aux Docteurs **F. TANTAGMO** et **A. ABOUEM** pour les corrections qu'ils ont apportées à la rédaction de cette thèse, mais aussi pour les échanges fructueux que nous avons eus.

A mes frères et sœurs **J. K. NGUEMKO, G. K. DZEPE, H. K. NZUDJO, B. K. DJOUFANG** en témoignage de ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour tous les efforts consentis. Trouvez en ce travail les prémices de vos multiples sacrifices et qu'il soit pour vous un hymne de joie.

Aux Docteurs **G. KAMDJO** et **A. NOUMSSI** ainsi qu'à leurs familles respectives, pour le soutien qu'ils m'ont toujours apporté. Que chacun d'eux trouve ici l'expression de ma gratitude.

A mes beaux parents **A. YOUMSSI** et **J. DJUIKOUO** de m'avoir fait confiance en mettant à mes côtés leur fille, qui ne cesse de me soutenir et de m'apporter le réconfort dans toutes mes épreuves.

Au Docteur **B. Y. SITAMZE**, mon ami et frère naturel, nos échanges et ta disponibilité incessante ont été d'un grand secours pour l'évolution de ce travail. A ton épouse et toi, j'exprime mes sincères reconnaissances.

A mes beaux frères et belles sœurs pour leur soutien moral et leurs encouragements.

A mes cousins et cousines pour leurs conseils et leurs encouragements.



---

A la Génération 70-80 (G 7-8) ainsi qu'à la 3<sup>ème</sup> Mi-Temps pour tous les bons et les mauvais moments que nous avons toujours passés dans la fraternité, la tolérance et le partage.

A mes amis et grand-frères **E. LONLA** Censeur au Lycée Classique de Nkolbisson, **G. ONDOBO** Directeur du CES de MEKON II et ainsi que leurs épouses, pour la confiance qu'ils ont su mettre en moi, leurs conseils et leurs encouragements.

A **P. MBOENE**, Proviseur du Lycée de Ntui et **F. NKINDA**, Proviseur du Lycée de MEFOMO, pour leurs conseils et leurs encouragements.

A l'Honorable **A. KUINCHE**, député du NKOUNG-KHI, pour l'aide financière qu'il apporte aux doctorants de son département à travers le PAD (Programme d'Aide au Doctorants).

A Monsieur **C. KAMGA**, Préfet du Département du NYONG-ET-MFOUMOU, pour ses conseils, ses encouragements et son soutien financier dans la finalisation de ce travail.

Je remercie également Monsieur **V. NANA** botaniste à l'Herbier National du Cameroun pour l'identification et la récolte du matériel végétal.

A tous mes cadets Etudiants-Chercheurs de l'équipe du Professeur **S. F. KOUAM** pour l'esprit d'équipe, de solidarité et pour tous les bons moments passés ensemble.

A **E. R. GUIFFO** technicien au laboratoire du Professeur **S. F. KOUAM**, pour son esprit de gestion et du suivi du matériel, ses conseils et ses encouragements.

A **A. B. KEUGNI** pour sa contribution morale à travers les corrections qu'il a apportées à la rédaction de la partie biologique de cette thèse.

A mes tantes **M. KAMSU** et **J. MAMDJO** pour leurs conseils et leurs encouragements.

Aux familles **M. TAGNI**, **A. KACHE**, **S. TOWO**, **M. FOTSO**, **J. TAGNE** pour le soutien qu'ils m'ont toujours apporté. Que chacun d'eux trouve ici l'expression de ma gratitude.

A tous mes amis **A. FOMI**, **J. R. PELAH**, **Y. D. FAHA**, **S. V. DJIOTSOP**, **R. ATIOGO**, **Y. F. FONGANG**, **P. NYANDJOU** et **J. NGUEPI** avec qui j'ai passé des moments de joie et de peine.

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont apporté leur soutien tant moral que matériel qu'ils trouvent ici un symbole de reconnaissance et ceci pour chacun en ce qui le concerne. Puisse-le présent travail être à la hauteur des attentes de chacun d'entre vous.

---

# LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN: Acide désoxyribonucléique

AE: Acétate d'éthyle

AINS: Anti-inflammatoire non stéroïdique

AIS: Anti-inflammatoire stéroïdique

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation

ATP: Adénoside Triphosphate

CC: Chromatographie sur colonne

CCM: Chromatographie sur couche mince

CD4: Cluster of Differentiation class 4

CI50: Concentration Inhibitrice 50

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

COSY: Correlation Spectroscopy

COX: Cyclo-oxygénase

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

CsA: Cyclosporine A

CTL: Cytotoxic T Lymphocytes

D.O.: Densité Optique

d: doublet

DART-TOF-MS: Direct Analysis in Real Time-Time Of Flight-Mass Spectrometry

dd: doublet dédoublé

ddd: doublet dédoublé dédoublé

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfert

DL50: Dose Létale 50

DMAB: Diméthylaminobenzaldéhyde

DMAP: 4-(Diméthylamino)pyridine

DMSO: Diméthylesulfoxyde

dq: doublet de quatruplet

EC: *Entandrophragma cylindricum*

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

---

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
ESI: ElectroSpray Ionisation  
FCS/SVF: Fetal Calf Serum/Sérum de Veau Fœtal  
Fr: fraction  
GC: Gaz Chromatography  
GC-MS: Gaz Chromatography-Mass Spectrometry  
G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor  
Hex: Hexane  
HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Connectivity  
HMG-CoA: Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A  
HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence  
HPLC: High Performance Liquid Chromatography  
HRESI-MS: High Resolution ElectroSpray Ionisation-Mass Spectrometry  
HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence  
IL: InterLeukine  
IL-1: InterLeukine-1  
IL-17: InterLeukine-17  
IL-6: InterLeukine-6  
IR: Infra Rouge  
LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry  
*ld*: large doublet  
*ls*: large singulet  
*lt*: large triplet  
m: multiplet  
MTPA: 2-methoxy-2-(trifluorométhyl)-2-phénylacetic acid  
MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium  
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
NK: Natural Killers  
NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy  
PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells  
PBS: Phosphate buffer Saline

---

PC: *Pauridiantha callicarpoides*

P<sub>f</sub>: Point de fusion

PGE2: Prostaglandine E2

PHA: Phytohemagglutinine

ppm: Partie par million

q: quadruplet

qd: quatruplet dédoublé

RB: Ressources biologiques

R<sub>f</sub>: Rapport frontal

RMN <sup>13</sup>C: Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13

RMN 1D: Résonance Magnétique à une Dimension

RMN <sup>1</sup>H: Résonance Magnétique Nucléaire du proton

RMN 2D: Résonance Magnétique à deux Dimensions

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

s: singulet

t: triplet

td: triplet dédoublé

Th 17: T helper 17

TMS: Tétraméthylsilane

TNF: Tumor Necrosis Factor

TR: Temps de Rétention

UDA: Université de Douala

UDs: Université de Dschang

UV: Ultra Violet

UY: Université de Yaoundé

---

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Distribution géographique de quelques espèces du genre <i>Pauridiantha</i> en Afrique... 7	7
<b>Tableau II:</b> Distribution géographique de <i>P. callicarpoides</i> au Cameroun. .... 9	9
<b>Tableau III:</b> Alcaloïdes isolés des espèces du genre <i>Pauridiantha</i> ..... 14	14
<b>Tableau IV:</b> Distribution de <i>E. cylindricum</i> en Afrique..... 33	33
<b>Tableau V:</b> Principales appellations de <i>E. cylindricum</i> ..... 35	35
<b>Tableau VI:</b> Quelques sesquiterpénoïdes isolés du genre <i>Entandrophragma</i> ..... 38	38
<b>Tableau VII:</b> Les triterpénoïdes linéaires isolés du genre <i>Entandrophragma</i> ..... 46	46
<b>Tableau VIII:</b> Les protolimonoïdes isolés du genre <i>Entandrophragma</i> ..... 50	50
<b>Tableau IX:</b> Les furannoïdes isolés du genre <i>Entandrophragma</i> ..... 53	53
<b>Tableau X:</b> Quelques stéroïdes isolés du genre <i>Entandrophragma</i> ..... 63	63
<b>Tableau XI:</b> Classes chimiques des principaux AINS..... 71	71
<b>Tableau XII:</b> Quelques adduits caractéristiques formés en LC-MS..... 81	81
<b>Tableau XIII:</b> Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) de PC-A-1 ( <b>155</b> ) dans le CD <sub>3</sub> OD comparées à celles du javaniside..... 97	97
<b>Tableau XIV:</b> Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ) dans le CD <sub>3</sub> OD comparées à celles du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ). .. 107	107
<b>Tableau XV:</b> Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) et <sup>13</sup> C (150 MHz) de PC-14A ( <b>158</b> ) dans le CD <sub>3</sub> OD comparées aux données de la littérature..... 112	112
<b>Tableau XVI:</b> Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (100 MHz) de la scopolétine (PC-1, <b>44</b> ) dans l'acétone..... 117	117
<b>Tableau XVII:</b> Données comparées de RMN <sup>13</sup> C de PC-1 (100 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ), PC-4 (100 MHz, Pyridine) et hymexelsine (25 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). .... 122	122
<b>Tableau XVIII:</b> Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-1, <b>160</b> ) dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> . .. 126	126
<b>Tableau XIX:</b> Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) et <sup>13</sup> C (75 MHz) de PC-29-2 ( <b>161</b> et <b>160</b> ) dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> . .... 130	130
<b>Tableau XX:</b> Données de la littérature RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz), de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine et de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ..... 131	131

---

<b>Tableau XXI:</b> Données comparées de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EC100P331/321 ( <b>162</b> ) avec celles de la littérature. ....	135
<b>Tableau XXII:</b> Données comparées de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) et $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de EC100P332/322 ( <b>163</b> ) avec celles de EC100P331/321 ( <b>162</b> ) dans le $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	139
<b>Tableau XXIII:</b> Données comparées de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EC100P332/322 ( <b>163</b> ) avec celles de la littérature (épicatechine). ....	139
<b>Tableau XXIV:</b> Données de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) et $^{13}\text{C}$ (150 MHz) de PC-A-3 ( <b>156</b> ) dans le $\text{CD}_3\text{OD}$ comparées aux données de RMN $^{13}\text{C}$ (25 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de la littérature (sweroside). ....	144
<b>Tableau XXV:</b> Données spectrales de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) et $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de EC30F-5 ( <b>164</b> ) dans le $\text{CDCl}_3$ comparées à celles de l'andirolide G. ....	149
<b>Tableau XXVI:</b> Données de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) et $^{13}\text{C}$ (150 MHz) du 6- <i>O</i> -hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, <b>166</b> ) dans le $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	158
<b>Tableau XXVII:</b> Données spectrales de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P20/201 ( <b>90</b> ) comparées à celles de la littérature (sapelenine A). ....	162
<b>Tableau XXVIII:</b> Données comparées de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P26 ( <b>167</b> ) avec EC100P20/201 ( <b>90</b> ) (sapelenine A). ....	166
<b>Tableau XXIX:</b> Données comparées de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EC30P183 ( <b>91</b> ) avec celles du sapelenine B. ....	170
<b>Tableau XXX:</b> Données comparées de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EC30P184 ( <b>93</b> ) avec celles de EC30P183 ( <b>91</b> ) et du sapelenine D. ....	174
<b>Tableau XXXI:</b> Données spectrales de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P202 ( <b>92</b> ) comparées à celles de EC100P20/201 ( <b>90</b> ) et de la littérature (sapelenine C). ....	177
<b>Tableau XXXII:</b> Données spectrales de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) et $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de EC30P181 ( <b>168</b> ) dans le $\text{CDCl}_3$ comparées à celles de la littérature (ekeberine $\text{D}_2$ ). ....	182
<b>Tableau XXXIII:</b> Données spectrales de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) et $^{13}\text{C}$ (125 MHz) du sapelenine G (EC100P333, <b>169</b> ) dans le $\text{CDCl}_3$ . ....	188
<b>Tableau XXXIV:</b> Données spectrales de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) et $^{13}\text{C}$ (125 MHz) du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ) dans le $\text{CDCl}_3$ . ....	194

---

---

<b>Tableau XXXV:</b> Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ) comparées à celles de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ) dans le CDCl <sub>3</sub> .....	205
<b>Tableau XXXVI:</b> Données spectrales de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ) comparées à celles de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) et <sup>13</sup> C (125 MHz) de l'ekeberine D2 ( <b>168</b> ) dans le CDCl <sub>3</sub> . ....	210
<b>Tableau XXXVII:</b> Densités optiques des fractions de la chromatographie flash et du résidu Res.1 de <i>E. cylindricum</i> aux doses de 100 et 1 µg/mL. ....	238
<b>Tableau XXXVIII:</b> Concentration Minimale Inhibitrice (µg/mL) des sapelenines G, H, I et J239	
<b>Tableau XXXIX:</b> Chromatogramme de l'extrait brut des écorces du tronc de <i>Pauridiantha callicarpoides</i> .....	253
<b>Tableau XL:</b> Chromatogramme de la série A .....	254
<b>Tableau XLI:</b> Chromatogramme de la série B .....	255
<b>Tableau XLII:</b> Chromatogramme de la série C.....	256
<b>Tableau XLIII:</b> Chromatogramme de la série C <sub>4</sub> .....	257
<b>Tableau XLIV:</b> Chromatogramme de la série D.....	258
<b>Tableau XLV:</b> Chromatogramme de la fraction D <sub>4</sub> .....	258
<b>Tableau XLVI:</b> Chromatogramme de l'extrait à l'AE/MeOH (9:1) des écorces du tronc de <i>E cylindricum</i> .....	259
<b>Tableau XLVII:</b> Chromatogrammes des fractions Fr <sub>1</sub> et Fr <sub>2</sub> .....	260
<b>Tableau XLVIII:</b> Chromatogrammes des fractions Fr <sub>3</sub> et Fr <sub>4-5</sub> .....	261

---

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Position systématique de <i>Pauridiantha callicarpoides</i> .....	8
<b>Figure 2:</b> Photo des fruits de <i>P. callicarpoides</i> .....	10
<b>Figure 3:</b> Rameau, fleur et graine de <i>P. callicarpoides</i> .....	10
<b>Figure 4:</b> Position systématique de <i>Entandrophragma cylindricum</i> .....	32
<b>Figure 5:</b> Répartition de <i>E. cylindricum</i> au Cameroun.....	34
<b>Figure 6:</b> Photo de quelques parties de <i>E. cylindricum</i> .....	34
<b>Figure 7:</b> Photo de l'écorce du tronc fraîchement prélevée de <i>E. cylindricum</i> .....	35
<b>Figure 8:</b> Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	71
<b>Figure 9:</b> Exemples d'anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).....	73
<b>Figure 10:</b> Modèle pour la détermination de la configuration absolue.....	76
<b>Figure 11:</b> Valeurs $\Delta\delta^{S-R}$ obtenues de l'ester de Mosher du 2,3,22,23-tétrahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-6,10,14,18-tétracosatétrène.....	77
<b>Figure 12:</b> (a) Profil chromatographique LC-MS de PC-A: mélange de PC-A-1 (2) et PC-A-2 (1) (b) Spectre de masse HR-ESI du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ) et du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ). .....	87
<b>Figure 13:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	90
<b>Figure 14:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	91
<b>Figure 15:</b> Spectre de masse EI du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	91
<b>Figure 16:</b> Spectre DEPT 135 et 90 du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	92
<b>Figure 17:</b> Spectre COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	94
<b>Figure 18:</b> Spectre HSQC du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	94
<b>Figure 19:</b> Spectre HMBC du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	95
<b>Figure 20:</b> Spectre NOESY du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	96
<b>Figure 21:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ).....	99
<b>Figure 22:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ).....	100
<b>Figure 23:</b> Spectre de masse EI du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ).....	101
<b>Figure 24:</b> Spectre DEPT 135 et 90 du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ).....	102
<b>Figure 25:</b> Spectre COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ).....	103
<b>Figure 26:</b> Spectre HSQC du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ).....	103
<b>Figure 27:</b> Spectre HMBC du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ).....	104
<b>Figure 28:</b> Spectre NOESY du 7-épi-javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ).....	105
<b>Figure 29:</b> Spectre de masse en EI de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14A, <b>158</b> ).....	108
<b>Figure 30:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14A, <b>158</b> ).....	109
<b>Figure 31:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14A, <b>158</b> ).....	110
<b>Figure 32:</b> Spectres DEPT 90 et DEPT 135 de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14A, <b>158</b> ).....	110



<b>Figure 33:</b> Spectre de masse HR-ESI de la scopolétine (PC-1, <b>44</b> ).....	113
<b>Figure 34:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ) de la scopolétine (PC-1, <b>44</b> ).....	115
<b>Figure 35:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ) de la scopolétine (PC-1, <b>44</b> ).....	116
<b>Figure 36:</b> Spectre de masse HR-ESI de l'hymexelsine (PC-4, <b>159</b> ) .....	119
<b>Figure 37:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, Pyridine) de l'hymexelsine (PC-4, <b>159</b> ).....	119
<b>Figure 38:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, Pyridine) de l'hymexelsine (PC-4, <b>159</b> ).....	120
<b>Figure 39:</b> Profil chromatographique LC-MS ( <b>a</b> ) et Spectre de masse HR-ESI ( <b>b</b> ) de la 7,7'- dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-1, <b>160</b> ).....	123
<b>Figure 40:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy- 3,3'-biscoumarine (PC-29-1, <b>160</b> ).....	124
<b>Figure 41:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'- biscoumarine (PC-29-1, <b>160</b> ).....	125
<b>Figure 42:</b> Profil chromatographique LC-MS ( <b>a</b> ) et spectre de masse HR-ESI ( <b>b</b> ) de la 7,7'- dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine et 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'- biscoumarine (PC-29-2, <b>161</b> et <b>160</b> ).....	127
<b>Figure 43:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de PC-29-2 ( <b>161</b> et <b>160</b> ).....	128
<b>Figure 44:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de PC-29-2 ( <b>161</b> et <b>160</b> ).....	130
<b>Figure 45:</b> Spectre de masse HR-ESI de la catéchine (EC100P331/321, <b>162</b> ).....	132
<b>Figure 46:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la catéchine (EC100P331/321, <b>162</b> ).....	133
<b>Figure 47:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la catéchine (EC100P331/321, <b>162</b> ).....	134
<b>Figure 48:</b> Spectre de masse HR-ESI de l'épicatéchine (EC100P332/322, <b>163</b> ).....	136
<b>Figure 49:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'épicatéchine (EC100P332/322, <b>163</b> ). .....	137
<b>Figure 50:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'épicatéchine (EC100P332/322, <b>163</b> ). .....	137
<b>Figure 51:</b> Spectre de masse HR-ESI du sweroside (PC-A-3, <b>156</b> ) .....	140
<b>Figure 52:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du sweroside (PC-A-3, <b>156</b> ).....	141
<b>Figure 53:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du sweroside (PC-A-3, <b>156</b> ) .....	142
<b>Figure 54:</b> Spectre de masse HR-ESI de l'andiolide G (EC30F-5, <b>164</b> ).....	145
<b>Figure 55:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de l'andiolide G (EC30F-5, <b>164</b> ).....	147
<b>Figure 56:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de l'andiolide G (EC30F-5, <b>164</b> ) .....	148
<b>Figure 57:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du mélange β-sitostérol et stigmastérol (PC- 22, <b>153</b> et <b>150</b> ) .....	151
<b>Figure 58:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + CD <sub>3</sub> OD) du mélange 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> - glucopyranoside de β-sitostérol et du 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside de stigmastérol (PC- 31, <b>152</b> et <b>165</b> ). .....	154
<b>Figure 59:</b> Spectre de masse HR-ESI du mélange 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside de β-sitostérol et du 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside de stigmastérol (PC-31, <b>152</b> et <b>165</b> ).....	154
<b>Figure 60:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du 6- <i>O</i> -hexopyranosylhexopyranose (PC- A-7, <b>166</b> ).....	155

<b>Figure 61:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du 6- <i>O</i> -hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, <b>166</b> ).....	156
<b>Figure 62:</b> Spectres DEPT 135 et DEPT 90 du 6- <i>O</i> -hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, <b>166</b> ).....	157
<b>Figure 63:</b> Spectre de masse HR-ESI du sapelenine A (EC100P20/201, <b>90</b> ).....	159
<b>Figure 64:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine A (EC100P20/201, <b>90</b> ).....	160
<b>Figure 65:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine A (EC100P20/201, <b>90</b> ).....	161
<b>Figure 66:</b> Spectre de masse HR-ESI de EC100P26 ( <b>167</b> ).....	163
<b>Figure 67:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P26 ( <b>167</b> ).....	164
<b>Figure 68:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P26 ( <b>167</b> ).....	165
<b>Figure 69:</b> Spectre de masse HR-ESI du sapelenine B (EC30P183, <b>91</b> ).....	167
<b>Figure 70:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine B (EC30P183, <b>91</b> ).....	168
<b>Figure 71:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine B (EC30P183, <b>91</b> ).....	168
<b>Figure 72:</b> Spectre de masse HR-ESI du sapelenine D (EC30P184, <b>93</b> ).....	171
<b>Figure 73:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine D (EC30P184, <b>93</b> ).....	172
<b>Figure 74:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine D (EC30P184, <b>93</b> ).....	172
<b>Figure 75:</b> Spectre de masse HR-ESI du sapelenine C (EC100P202, <b>92</b> ).....	175
<b>Figure 76:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine C (EC100P202, <b>92</b> ).....	176
<b>Figure 77:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine C (EC100P202, <b>92</b> ).....	177
<b>Figure 78:</b> Spectre de masse HR-ESI de l'ekeberine D <sub>2</sub> (EC30P181, <b>168</b> ).....	178
<b>Figure 79:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du de l'ekeberine D <sub>2</sub> (EC30P181, <b>168</b> )..	178
<b>Figure 80:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de l'ekeberine D <sub>2</sub> (EC30P181, <b>168</b> ).....	179
<b>Figure 81:</b> Spectre de masse HR-ESI du sapelenine G (EC100P333, <b>169</b> ).....	183
<b>Figure 82:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine G (EC100P333, <b>169</b> ).....	184
<b>Figure 83:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine G (EC100P333, <b>169</b> ).....	185
<b>Figure 84:</b> Spectre HMBC du sapelenine G (EC100P333, <b>169</b> ).....	185
<b>Figure 85:</b> Spectre COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ du sapelenine G (EC100P333, <b>169</b> ).....	186
<b>Figure 86:</b> Spectre HMQC du sapelenine G (EC100P333, <b>169</b> ).....	187
<b>Figure 87:</b> Spectre de masse HR-ESI du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ).....	189
<b>Figure 88:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ).....	190
<b>Figure 89:</b> Spectre HMQC du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ).....	190
<b>Figure 90:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ).....	192
<b>Figure 91:</b> Spectre HMBC du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ).....	192
<b>Figure 92:</b> Spectre COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ).....	193
<b>Figure 93:</b> Spectres de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du ( <i>S</i> )-EC30P182ACO-MTPA ester ( <b>170b</b> ), de l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO) ( <b>170a</b> ) et du ( <i>R</i> )-EC30P182ACO-MTPA ester ( <b>170c</b> ).....	197
<b>Figure 94:</b> Spectre de masse HR-ESI du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ).....	200
<b>Figure 95:</b> Spectre de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ).....	201
<b>Figure 96:</b> Spectre de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ).....	201

<b>Figure 97:</b> Spectre HMQC du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ) .....	203
<b>Figure 98:</b> Spectre HMBC du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ).....	204
<b>Figure 99:</b> Spectre COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ).....	204
<b>Figure 100:</b> Spectre de masse HR-ESI du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ).....	206
<b>Figure 101:</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ) .....	207
<b>Figure 102:</b> Spectre HMBC du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ) .....	208
<b>Figure 103:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ) .....	208
<b>Figure 104:</b> Spectre HMQC du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ).....	209
<b>Figure 105:</b> Spectre COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ).....	209
<b>Figure 106:</b> Spectres de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du ( <i>S</i> )- EC10P3431-MTPA ester ( <b>172a</b> ), de EC10P3431 ( <b>172</b> ) et du ( <i>R</i> )- EC10P3431-MTPA ester ( <b>172b</b> ).....	212
<b>Figure 107:</b> Spectre de masse EI de PHPC-4 (scopolétine, <b>44</b> , PHPC-4 = PC-1).....	217
<b>Figure 108:</b> Spectre de masse ESI du PH-EC10P3431.....	218
<b>Figure 109:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du PH-EC10P3431. ....	219
<b>Figure 110:</b> Spectre de masse ESI de EC30P182ACO ( <b>170a</b> ) .....	221
<b>Figure 111:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de EC30P182ACO ( <b>170a</b> ).....	221
<b>Figure 112:</b> Spectre de masse ESI de EC30P181ACO ( <b>173</b> ) .....	223
<b>Figure 113:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de EC30P181ACO ( <b>173</b> ).....	223
<b>Figure 114:</b> Spectre de masse ESI de EC30P182Ac ( <b>174</b> ).....	225
<b>Figure 115:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de EC30P182Ac ( <b>174</b> ).....	225
<b>Figure 116:</b> Spectre de masse ESI de EC30P181Ac ( <b>175</b> ).....	226
<b>Figure 117:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de EC30P181Ac ( <b>175</b> ).....	227
<b>Figure 118:</b> Spectre de masse ESI de EC10P3431-MTPA ester ( <b>172a</b> et <b>172b</b> ) .....	229
<b>Figure 119:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du ( <i>R</i> )-EC10P3431-MTPA ester ( <b>172b</b> )	229
<b>Figure 120:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du ( <i>S</i> )-EC10P3431-MTPA ester ( <b>172a</b> )	230
<b>Figure 121:</b> Spectre de masse ESI de EC30P182ACO-MTPA ester ( <b>170b</b> et <b>170c</b> ) .....	232
<b>Figure 122:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du ( <i>R</i> )-EC30P182ACO-MTPA ester ( <b>170c</b> ) .....	232
<b>Figure 123:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du ( <i>S</i> )-EC30P182ACO-MTPA ester ( <b>170b</b> ). .....	232
<b>Figure 124:</b> Spectre de masse ESI de EC30P181ACO-MTPA ester ( <b>173a</b> et <b>173b</b> ) .....	234
<b>Figure 125:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du ( <i>R</i> )-EC30P181ACO-MTPA ester ( <b>173b</b> ) .....	234
<b>Figure 126:</b> Spectre de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du ( <i>S</i> )-EC30P181ACO-MTPA ester ( <b>173a</b> ). .....	235
<b>Figure 127:</b> Effet des composés testés sur la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées par la PHA. (a) Sapelenine G <b>169</b> ; (b) Sapelenine H <b>172</b> ; (c) Sapelenine I <b>170</b> ; (d) Sapelenine J <b>171</b> . ( <b>Concentrations utilisées:</b> 0,41; 1,23; 3,70; 11,11;33,33 et 100 μM). .....	241

---

**Figure 128:** Effet des composés testés sur la viabilité des PBMCs. (a) Sapelenine G **169**; (b) Sapelenine H **172**; (c) Sapelenine I **170**; (d) Sapelenine J **171**. (**Concentrations utilisées**: 0,41; 1,23; 3,70; 11,1; 33,33 et 100  $\mu\text{M}$ ). ..... 242

**Figure 129:** Présentation générale de la plaque pour le test ELISA IL-17 ..... 268

---

## LISTE DES SCHEMAS

<b>Schéma 1:</b> Biosynthèse des alcaloïdes indolo-monoterpéniques.....	20
<b>Schéma 2:</b> Biosynthèse des flavonoïdes .....	40
<b>Schéma 3:</b> Biosynthèse du squalène .....	43
<b>Schéma 4:</b> Biosynthèse des triterpénoïdes et des stéroïdes.....	44
<b>Schéma 5:</b> Biosynthèse des limonoïdes .....	48
<b>Schéma 6:</b> Voie de biosynthèse des prostanoïdes.....	67
<b>Schéma 7:</b> Réactions des chlorures d'acide de Mosher (MTPA-Cl) avec un alcool secondaire .	76
<b>Schéma 8:</b> Protocole simplifié d'analyse LC-MS.....	80
<b>Schéma 9:</b> Modes alternatives d'ionisation en LC-MS et composés convenables.....	80
<b>Schéma 10:</b> Protocole d'extraction et d'isolement des composés de <i>P. callicarpoides</i> .....	83
<b>Schéma 11:</b> Protocole d'extraction et d'isolement des composés de <i>Entandrophragma cylindricum</i> .....	85
<b>Schéma 12:</b> Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC et COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H du javaniside (PC-A-1, <b>155</b> ).....	96
<b>Schéma 13:</b> Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC et COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H du (3 <i>R</i> , 7 <i>R</i> )-7- <i>épi</i> -javaniside (PC-A-2, <b>157</b> ) .....	106
<b>Schéma 14:</b> Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque ou acide vanillique (PC-14A, <b>158</b> ) .....	111
<b>Schéma 15:</b> Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de la scopolétine (PC-1, <b>44</b> ). .....	116
<b>Schéma 16:</b> Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC de l'hymexelsine (PC-4, <b>159</b> ) .....	121
<b>Schéma 17:</b> Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-1, <b>160</b> ) .....	126
<b>Schéma 18:</b> Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC de PC-29-2..	129
<b>Schéma 19:</b> Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC et COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de PC-A-3 ( <b>156</b> ).....	143
<b>Schéma 20:</b> Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC et COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de l'andiolide G (EC30F-5, <b>164</b> ). .....	148
<b>Schéma 21:</b> Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC du 6- <i>O</i> -hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, <b>166</b> ) .....	158
<b>Schéma 22:</b> Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC du sapelenine A (EC100P20/201, <b>90</b> ).....	162
<b>Schéma 23:</b> Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de EC100P26 ( <b>167</b> ) .....	166
<b>Schéma 24:</b> Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC du sapelenine B (EC30P183, <b>91</b> ).....	169
<b>Schéma 25:</b> Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC du sapelenine D (EC30P184, <b>93</b> ).....	173

---

<b>Schéma 26:</b> Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de l'ekeberine D2 (EC30P181, <b>168</b> ).....	181
<b>Schéma 27:</b> Quelques corrélations observées sur les spectres HMBC et COSY du sapelenine G (EC100P333, <b>169</b> ).....	186
<b>Schéma 28:</b> Synthèse de l'acétonide du sapelenine I et des esters de Mosher de l'acétonide du sapelenine I.....	196
<b>Schéma 29:</b> Valeurs $\Delta\delta^{S-R}$ obtenues des esters de Mosher de l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO).....	198
<b>Schéma 30:</b> Quelques corrélations observées sur les spectres HMBC, COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ et NOESY du sapelenine I (EC100P182, <b>170</b> ).....	199
<b>Schéma 31:</b> Quelques corrélations observées sur les spectres HMBC, COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ).....	202
<b>Schéma 32:</b> Corrélations NOE de la portion tétrahydrofurane observées sur le spectre NOESY (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine J (EC20P2031, <b>171</b> ).....	203
<b>Schéma 33:</b> Synthèse des esters de Mosher et hydrolyse acide du sapelenine H.....	211
<b>Schéma 34:</b> Valeurs $\Delta\delta^{S-R}$ obtenues des esters de Mosher du sapelenine H (EC10P3431).....	213
<b>Schéma 35:</b> (a) Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC, COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ).....	
(b) Corrélations NOE de la portion tétrahydrofurane observées sur le spectre NOESY (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ).....	214
<b>Schéma 36:</b> Hydrolyse de l'hymexelsine (PC-4, <b>159</b> ).....	217
<b>Schéma 37:</b> Hydrolyse du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ).....	218
<b>Schéma 38:</b> Acétonidation du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ).....	220
<b>Schéma 39:</b> Acétonidation de l'ekeberine D2 (EC30P181, <b>168</b> ).....	222
<b>Schéma 40:</b> Acétylation du sapelenine I (EC30P182, <b>170</b> ).....	224
<b>Schéma 41:</b> Acétylation de l'ekeberine D2 (EC30P181, <b>168</b> ).....	226
<b>Schéma 42:</b> Estérification avec les chlorures de ( <i>R</i> ) et de ( <i>S</i> )-MTPA du sapelenine H (EC10P3431, <b>172</b> ).....	228
<b>Schéma 43:</b> Estérification de l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO, <b>170a</b> ) avec les chlorures de ( <i>R</i> ) et de ( <i>S</i> )-acide de Mosher.....	231
<b>Schéma 44:</b> Estérification de l'acétonide de l'ekeberine D2 (EC30P181ACO, <b>173</b> ) avec les chlorures de ( <i>R</i> ) et de ( <i>S</i> )-acide de Mosher.....	233

---

## RESUME

Le présent travail porte sur l'étude des constituants chimiques de *Pauridiantha callicarpoides* (Rubiaceae) et de *Entandrophragma cylindricum* (Meliaceae), deux plantes médicinales du Cameroun. Des extraits au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH et au MeOH des écorces du tronc de ces deux plantes, nous avons isolé au total 26 composés par des techniques chromatographiques usuelles (CC, CCM, HPLC) et qui ont été regroupés ainsi qu'il suit:

- 02 alcaloïdes: le javaniside et le 7-*épi*-javaniside qui est un dérivé nouveau d'oxindole.
- 01 acide phénolique: l'acide vanillique ou acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque.
- 04 coumarines: la scopolétine ou 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine, l'hymexelsine ou xeroboside, la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine ou 3,3'-biscopolétine et la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine.
- 02 flavonoïdes: la (+)-Catéchine et l'épicatéchine ou épicatechol.
- 01 iridoïde: le sweroside.
- 01 limonoïde: l'andirolide G.
- 04 stéroïdes: un mélange de  $\beta$ -sitostérol et de stigmastérol; un mélange de 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol et de 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de stigmastérol.
- 01 carbohydate: 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose.
- 10 terpénoïdes: le sapelenine A, le (14*E*,18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracosane-14,18,22-triène-2,3,6,7,10,11-hexaol, le sapelenine B, le sapelenine C, le sapelenine D, l'ekeberine D<sub>2</sub> et quatre dérivés nouveaux que nous avons nommés sapelenines G–J.

Les structures de ces composés ont été entièrement caractérisées sur la base de leurs données physiques (point de fusion, pouvoir rotatoire) et spectroscopiques (RMN 1D et 2D, SM, IR, UV). Certaines structures ont été déterminées par comparaison, soit de leurs données spectrales avec celles de la littérature, soit par des transformations chimiques telles que les réactions d'hydrolyse, d'acétonidation et d'estérification. Ainsi, les réactions d'hydrolyse effectuées sur l'hymexelsine et le sapelenine H ont conduit respectivement à la scopolétine et à l'ekeberine D<sub>2</sub>. Ceux-ci sont deux composés naturels isolés respectivement de *P. callicarpoides* et *E. cylindricum*. Les réactions d'acétonidation sur l'ekeberine D<sub>2</sub> et sur le sapelenine I ont permis d'obtenir l'acétonide de l'ekeberine D<sub>2</sub> et l'acétonide du sapelenine I qui sont deux dérivés nouveaux d'hémisynthèse. Les réactions d'estérification sur l'ekeberine D<sub>2</sub>, l'acétonide de

---

l'ekeberine D2, le sapelenine H, le sapelenine I et sur l'acétonide du sapelenine I ont conduit à l'obtention de huit dérivés nouveaux d'hémisynthèse. Il s'agit du diacétylekeberine D2, du diacétylsapelenine I, des (*S*) et (*R*)-esters de Mosher de l'acétonide de l'ekeberine D2, des (*S*) et (*R*)-esters de Mosher du sapelenine H et des (*S*) et (*R*)-esters de Mosher de l'acétonide du sapelenine I. Les structures des produits d'hémisynthèses ont été confirmées à partir des données spectroscopiques et par comparaison de ces données avec celles des substrats.

L'étude bioguidée menée sur l'extrait des écorces du tronc de *E. cylindricum* a permis d'isoler 4 triterpènes acycliques nouveaux qui ont été évalués *in vitro* pour leurs activités anti-inflammatoires à travers l'inhibition de la sécrétion des PGE2 et l'inhibition de la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs humaines ainsi que pour leurs activités cytotoxiques contre les PBMCs humaines. Il en ressort que:

- Les sapelenines G-J ont inhibé la sécrétion des PGE2 avec des CMI respectives de 0,001; 0,001; 10,0 et 0,01  $\mu\text{g/mL}$ .
- Le sapelenine G possède une forte activité anti-inflammatoire à travers la réduction de la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées par le PHA et ne présente aucun effet cytotoxique sur les PBMCs.
- Le sapelenine H ne possède ni activité anti-inflammatoire à travers la réduction de la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées par le PHA, ni un effet cytotoxique sur les PBMCs.
- Les sapelenines I et J présentent un effet cytotoxique de manière dose-dépendante sur les PBMCs, ce qui rend invalides leurs données sur la suppression de la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs à de fortes concentrations.

**Mots clés:** *Pauridiantha callicarpoides*, Rubiaceae, *Entandrophragma cylindricum*, Meliaceae, épi-javaniside, sapelenines G-J, hydrolyse, acétonidation, estérification, anti-inflammatoire, cytotoxique, HPLC-MS.



---

## ABSTRACT

The present work deals with the study of chemical constituents of two Cameroonian medicinal plants, namely *Pauridiantha callicarpoides* (Rubiaceae) and *Entandrophragma cylindricum* (Meliaceae).

Twenty six compounds have been isolated from the dichloromethane-methanol extracts of these two plants using conventional chromatographic techniques (CC, TLC, HPLC). These isolated compounds have been classified as follows:

- 02 alkaloids: javaniside and 7-*epi*-javaniside which is a new oxindole derivative.
- 01 phenolic acid: vanillic acid or 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid.
- 04 coumarins: scopoletin or 7-hydroxy-6-methoxycoumarin, hymexelsin or xeroboside, 7,7'-dihydroxy-6,6'-dimethoxy-3,3'-biscoumarin or 3,3'-biscopoletin and 7,7'-dihydroxy-6,6'-dimethoxy-8,8'-biscoumarin.
- 02 flavonoids: (+)-Catechin and epicatechin or epicatechol.
- 01 iridoid: sweroside.
- 01 limonoid: andirolide G.
- 04 steroids: a mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol; a mixture of  $\beta$ -sitosterol 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside and stigmasterol 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside.
- 01 carbohydrate: 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose.
- 10 terpenoids: sapelenin A, (14*E*,18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-14,18,22-triene-2,3,6,7,10,11-hexaol, sapelenin B, sapelenin C, sapelenin D, ekeberin D<sub>2</sub>, and four new derivatives for which we have given the name sapelenins G-J.

The structures of these compounds were fully characterized on the basis of their physical (melting point, optical rotation) and spectroscopic data (1D and 2D NMR, MS, IR, UV). Some of the structures were determined by comparison, either of their spectral data with those reported in the literature for analogues or by chemical transformations such as hydrolysis, acetonidation and esterification. Thus, the hydrolysis reactions carried out on hymexelsin and sapelenin H led to scopoletin and ekeberin D<sub>2</sub> respectively, which have been already isolated from *P. callicarpoides* and *E. cylindricum*. The acetonidation reactions on ekeberin D<sub>2</sub> and sapelenin I afforded acetonide of ekeberin D<sub>2</sub> and acetonide of sapelenin I which are two new derivatives. The esterification reactions on ekeberin D<sub>2</sub>, acetonide of ekeberin D<sub>2</sub>, sapelenin H, sapelenin I

---

and acetonide of sapelenin I yielded eight new derivatives: diacetyllekeberin D2, diacetylsapelenin I, and the corresponding Mosher's esters products. The structures of the products were confirmed based on the spectroscopic data and by comparison with those of the starting materials.

The bioguided investigation carried out on the extract of the stem bark of *E. cylindricum* have led to the isolation of four new acyclic triterpenes which have been evaluated *in vitro* for their anti-inflammatory activities through the PGE2 secretion inhibition and the IL-17 secretion inhibition by human PBMCs, and for their cytotoxic activities against human PBMCs. The results obtained show that:

- Sapelenins G-J inhibit the secretion of PGE2 with the MIC of 0,001; 0,001; 10,0 and 0,01  $\mu\text{g/mL}$  respectively.
- Sapelenin G possesses a strong anti-inflammatory activity through the reduction of the IL-17 secretion by PBMCs stimulated with PHA and presents no cytotoxic effect on PBMCs.
- Sapelenin H possesses neither anti-inflammatory activity through the reduction of the IL-17 secretion by PBMCs stimulated with PHA, nor cytotoxic effect against PBMCs.
- Sapelenins I and J show cytotoxic effect in dose-dependent manner on the PBMCs, hence their data on the suppression of IL-17 secretion were invalid at higher concentrations.

**Key Words:** *Pauridiantha callicarpoides*, Rubiaceae, *Entandrophragma cylindricum*, Meliaceae, *epi-javaniside*, sapelenins G-J, hydrolysis, acetonidation, esterification, anti-inflammatory, cytotoxic, HPLC-MS.

---



# **INTRODUCTION GENERALE**

---

---

L'utilisation des ressources biologiques (RB) en général et des plantes en particulier est partie intégrante des traditions de plusieurs cultures. L'homme a depuis son existence puisé dans son environnement c'est-à-dire, il a utilisé les RB pour ses besoins élémentaires comprenant sa nutrition, son abris et sa santé. De nos jours, les plantes constituent une véritable ruche à médicaments chez les africains et les populations des autres continents car elles sont totalement intégrées dans la pharmacopée traditionnelle et le procédé d'utilisation s'opère sous formes d'infusion, de macérât et de décoction. Sous ces formes, elles sont utilisées dans la lutte contre de nombreuses maladies telles que le paludisme, les ulcères gastriques et les maladies rhumatismales qui, autrefois étaient considérées comme maladies des personnes du troisième (60 à 80 ans) et quatrième (plus de 80 ans) âges. De nos jours, les maladies rhumatismales touchent de plus en plus la population la moins âgée de 35 à 55 ans et parfois même les enfants. C'est dans la recherche effrénée des solutions à ces diverses maladies inflammatoires que plusieurs molécules à activités anti-inflammatoires furent mises sur pied (Jacquier, 2009). Elles sont classées en 2 catégories: les Anti-Inflammatoires Stéroïdiens (AIS) et les. Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS). Ainsi:

- La toute première molécule à activité anti-inflammatoire, la colchicine **1a** fut isolée en 1820 par deux Français Pelletier et Caventou des colchiques, plantes du genre *Colchicum* (Colchicaceae) (Fabre, 2005). L'utilisation de cette molécule entraîne entre autres des cas de paralysie neuro-musculaire progressive et de thrombopénie (Putterman et *al.*, 1991).

- La salicine **1b** (ou salicoside) a été isolée en 1829 par Leroux de l'écorce de Saule (*Salix alba L.*). Mais ce composé s'hydrolyse en saligénine **1c** dans la flore intestinale, puis s'oxyde en acide salicylique **1d** au niveau du foie (Levesque et Lafont, 2000).

- L'acide salicylique **1d** fut préparé en 1835 par Lowing par oxydation de l'aldéhyde salicylique **1e** isolé 4 ans plutôt par Pagenstecher des petites fleurs de la reine-des-près (*Spirea ulmaria*). Mais cette molécule est d'une extrême agressivité vis-à-vis des muqueuses gastriques, d'où sa non utilisation (Legueut et *al.*, 1995).

- L'intolérance gastrique de l'acide salicylique va conduire à l'hémisynthèse d'un de ses dérivés, l'acide acétylsalicylique **1f** en 1853 par Gerhardt (Legueut et *al.*, 1995; Levesque et Lafont, 2000).

- En 1897, suite au travail de l'Anglais Hoffmann sur l'acétylation de l'acide salicylique **1d**, il parvient à fabriquer l'acide acétylsalicylique **1f**. Par la suite, il invente avec son supérieur le

---

Professeur Dreser le nom «Aspirin» en 1899 (23 Janvier). Cette marque a été déposée le 1<sup>er</sup> Février de la même année par la firme **BAYER** en Allemagne (Legueut et *al.*, 1995; Levesque et Lafont, 2000). L'utilisation de ce médicament induit des syndromes hémorragiques, des troubles digestifs et l'atteinte hépatique aiguë (Levesque et Lafont, 2000).

De nombreuses classes cliniquement différentes ont été commercialisées après l'aspirine (1899). A quelques exceptions près, toutes ont les mêmes effets thérapeutiques et les mêmes inconvénients ([www.stmi.org.tn/docs/ainspharm.htm](http://www.stmi.org.tn/docs/ainspharm.htm), 2014).

- La recherche des anti-inflammatoires s'est poursuivie jusqu'en 1948, date à laquelle l'action anti-inflammatoire d'un glucocorticoïde la cortisone **2a**, a été démontrée et utilisée pour la première fois par Hench (<http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module8/item112/texte11.htm>, 2014). Mais les effets secondaires tels que: l'hyperglycémie, le retard de croissance chez l'enfant et l'immunodépression, limitent leur utilisation prolongée (Mariam, 2006).

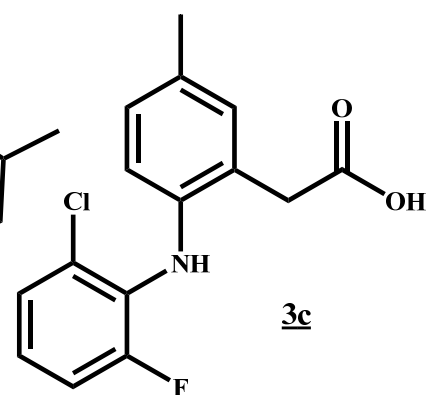
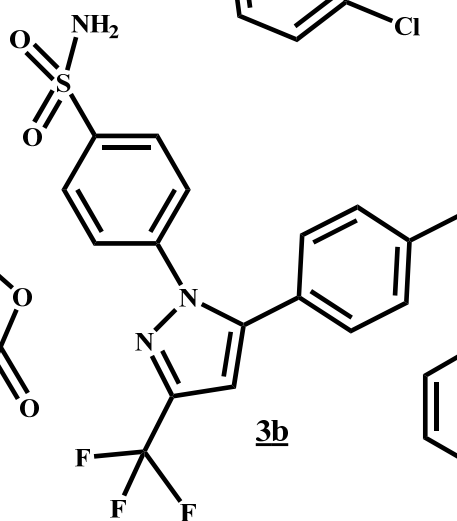
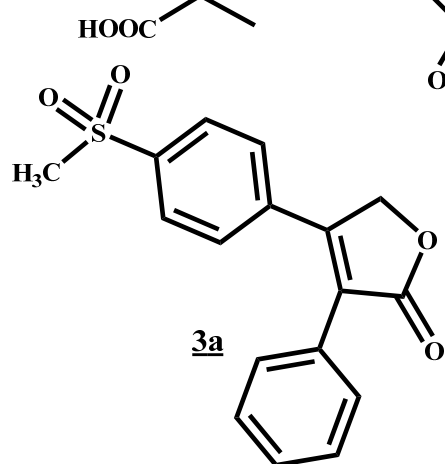
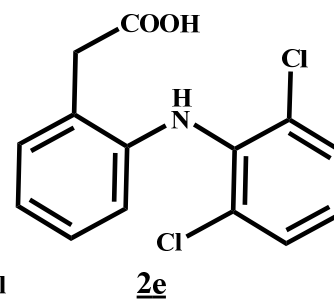
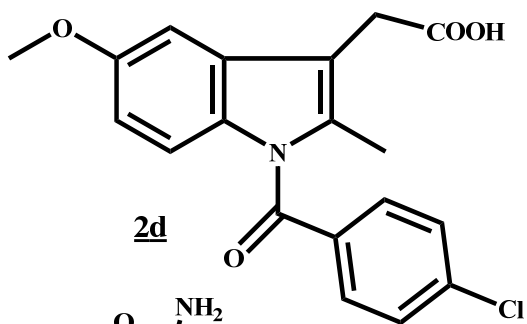
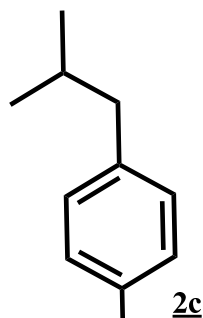
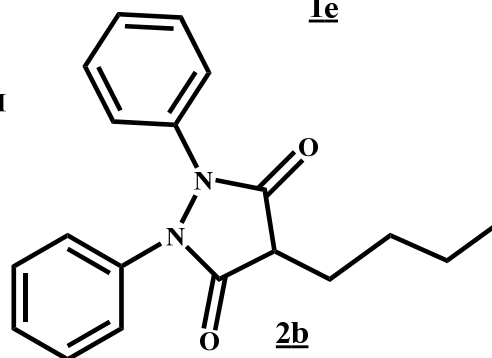
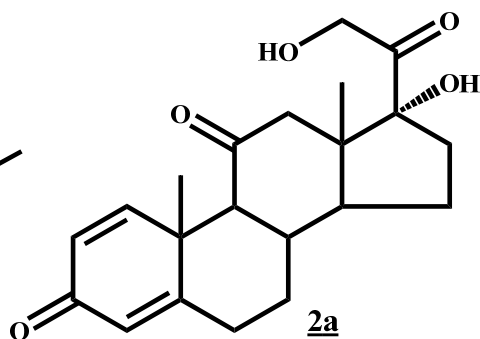
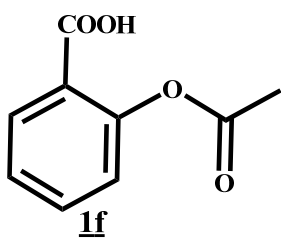
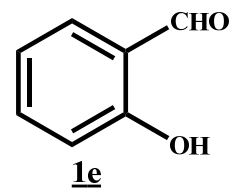
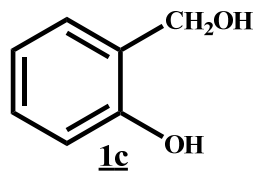
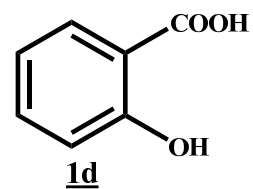
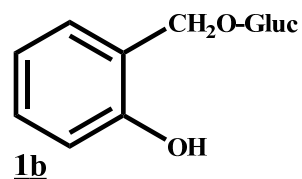
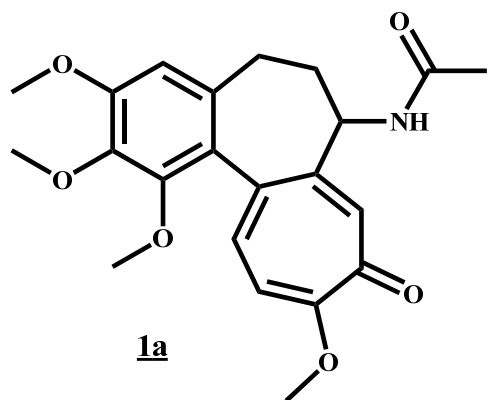
- Par la suite, la phénylbutazone **2b** a été introduite en thérapeutique en 1949 (Schmi, 1987). Ce composé entraîne la réduction de la production des globules blancs et la provocation des cas d'anémie aplasique, d'où l'arrêt de la commercialisation de ce produit en France par le laboratoire **NOVARTIS** depuis le 31 décembre 2011 (Dachicour, 2011).

- L'ibuprofène **2c** a été développé par les chercheurs de la **Compagnie Boots** dans les années 1960, à la suite d'un test systématique des propriétés antipyrétiques et analgésiques de 600 molécules. Son utilisation induit des cas de stomatite, douleurs abdominales (Rainsford, 2003).

- L'indométacine **2d** a été découverte en 1963 et commercialisée par **MERCK** (Hart et Boardman, 1963). Son utilisation induit des cas de tachycardie, et d'insuffisance rénale, (<http://sante-az.aufeminin.com/w/sante/m3052581/medicaments/indocid.html>, 2014).

- En 1974, le diclofénac **2e** était commercialisé pour la première fois au Japon (Brune et Hinz, 2004). Sa toxicité et ses effets indésirables sont essentiellement digestifs et sont communs aux autres AINS. ([www.en-consulte.com/article/1005520](http://www.en-consulte.com/article/1005520), 2014; [www.thérapeutique-info/rep/12137](http://www.thérapeutique-info/rep/12137), 2014; [books-google.fr/books.ISBN\\_28499455](http://books-google.fr/books.ISBN_28499455), 2014).

- La classe la plus récente des AINS est celle des coxibs. Les premiers, le rofécoxib **3a** et le célécoxib **3b** ont été mis sur le marché en 1999 (Gettigan et Henry, 2006). Pour risque accru d'infarctus du myocarde, le rofécoxib a été retiré du marché le 27 septembre 2004 à la demande de la firme qui le commercialisait. Le lumiracoxib **3c** a été aussi retiré du marché du Canada et de la Nouvelle-Zélande pour des raisons de toxicité hépatique (Burton, 2007).



---

Environ trois cent millions de personnes dans le monde consomment des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) d'où, tenant compte de la toxicité et des effets indésirables plus ou moins nombreux de ces produits, l'avènement de toute nouveauté dans cette classe, que ce soit au niveau de la mise au point de nouveaux produits ou de la découverte de leur mécanisme d'action sera d'une importance indéniable ([www.stmi.org.tn/docs/ainspharm.htm](http://www.stmi.org.tn/docs/ainspharm.htm), 2014). C'est ce qui poussera les chercheurs de part le monde plus précisément ceux des groupes **NOVARTIS** (Suisse), **PFIZER** (USA), **BAYER** (Allemagne) et **SANOFI** (France), des Laboratoires Pharmaceutiques **SIPHAT** (Tunisie), **IBERMA** (Maroc), **OLEA** (Côte d'Ivoire) et **CINPHARM** (Cameroun) à la recherche de nouveaux anti-inflammatoires très peu toxiques et n'ayant pas d'effets secondaires. Pour apporter leur contribution, les chercheurs camerounais ont entrepris en collaboration avec d'autres groupes de recherche, les études des substances naturelles pouvant conduire à la découverte des produits ayant des propriétés anti-inflammatoires respectant ces critères.

La littérature indique par exemple que:

- DIMO (UY I) et *al.*, ont travaillé sur les activités anti-oxydative et anti-inflammatoire de quelques constituants isolés des écorces de *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae) (Nguemfo et *al.*, 2009).

- NGUELEFACK (UDs) et *al.*, ont travaillé sur l'effet anti-inflammatoire *In vivo* d'une saponine stéroïdique nouvelle, mannioside A, et ses dérivés isolés de *Dracaena mannii* (Tapondjou et *al.*, 2008).

- NDONGMO (UDA) et *al.*, ont travaillé sur les effets analgésique et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *Allanblackia gabonensis* (Guttiferae) (Ymele et *al.*, 2013).

Notre équipe de recherche dans le même élan d'idée s'est aussi lancée dans la recherche des produits anti-inflammatoires et dans le cadre de nos travaux pour la préparation d'une thèse de Doctorat/PhD, nous avons entrepris ces dernières années l'étude des constituants chimiques des écorces du tronc de deux plantes médicinales du Cameroun: *Pauridiantha callicarpoides* Hiern (Rubiaceae) et *Entandrophragma cylindricum* Sprague (Meliaceae).

Le choix de ces 2 plantes est motivé par:

- 
- les diverses utilisations en médecine naturelle principalement dans le traitement des douleurs intercostales, de l'inflammation du conduit auditif, des affections intestinales et génito-urinaires, des ulcères gastriques, de bronchite, d'affections pulmonaires et des rhumatismes (Hallé, 1966; Bouquet, 1969; Bouquet, 1972; Nkeoua et Boundzanga, 1999; Louppe, 2008).
  - De plus, très peu d'études chimiques ont été effectuées sur les espèces du genre *Pauridiantha* et les derniers travaux sur celles-ci datent de plus de deux décennies, ceci malgré leurs usages médicinaux.
  - Aussi, les composés isolés du genre *Entandrophragma* n'avaient pas encore fait l'objet des tests d'activités anti-inflammatoires.
  - En plus une patente indique dans la littérature que, l'extrait d'Ortie (*Urtica dioica*) qui produit des triterpènes acycliques, a une forte activité anti-inflammatoire (Alberte et al., 2010).

L'objectif principal de ce travail était la recherche des métabolites secondaires peu toxiques ayant des propriétés anti-inflammatoires. Il était donc question:

- ✓ D'obtenir les différents extraits de ces plantes, d'en isoler et de caractériser leurs constituants chimiques.
- ✓ D'évaluer le matériel obtenu (extraits ou fractions et composés) pour leurs activités biologiques notamment, les activités anti-inflammatoires et cytotoxiques.

La première partie de ce travail est focalisée sur la revue de la littérature de *P. callicarpoides* et de *E. cylindricum*. Dans la deuxième partie, nous présenterons l'étude phytochimique de *P. callicarpoides* et de *E. cylindricum*, les transformations chimiques et les activités biologiques effectuées sur les fractions et quelques composés isolés. Enfin la troisième partie sera consacrée aux méthodes et matériels expérimentaux, suivie de la bibliographie consultée.



---



**CHAPITRE I:**  
**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

---

---

## **I.1- LE GENRE *PAURIDIANTHA***

### **I.1.1- Aperçu botanique**

#### **I.1.1.1- Caractères généraux des plantes de la famille des Rubiaceae**

La famille des Rubiaceae est la plus importante des familles qui composent l'ordre des Rubiales (Hallé, 1966). Selon la classification phylogénétique, elle appartient à l'ordre des Gentianales. Cette famille est l'une des plus complexes de la classe des dicotylédones (<http://www.afleurdepau.com/Flore/rubiaceae/f.htm>, 2015). Elle est constituée d'arbres de grande taille; cependant, elle prédomine par le nombre de ses représentants ligneux de petits diamètres: arbustes, arbrisseaux et sous-arbrisseaux (Hallé, 1966; Troupin et *al.*, 1985). Il n'existe pas de latex chez les Rubiaceae, mais les entailles peuvent exsuder certaines gommes (Hallé, 1966).

Les plantes de cette famille sont essentiellement représentées dans les zones de forêts denses, les régions intertropicales et subtropicales. Elles s'adaptent rarement aux climats désertiques ou tempérés (Hallé, 1966; Troupin et *al.*, 1985; <http://erick.dronnet.pagesperso-orange.fr/rubiaceae.htm>, 2015).

La famille des Rubiaceae comprend plus de 5000 espèces réparties en 500 genres environ, avec 140 à 150 genres africains parmi lesquels: *Cinchona*, *Gardenia* et *Pauridiantha* qui a fait l'objet de notre étude (Hallé, 1966; Troupin et *al.*, 1985).

#### **I.1.1.2- Généralités sur le genre *Pauridiantha***

Le genre *Pauridiantha* est constitué d'arbrisseaux, d'arbustes ou petits arbres qui poussent dans les forêts d'Afrique tropicale continentale (Hallé, 1966; Ntore et *al.*, 2003). Les inflorescences sont généralement axillaires. Le calice est cupuliforme denticulé, denté ou lobé (5 à 6 petits lobes) (Hallé, 1966; Troupin, 1982; Ntore et *al.*, 2003).

Les anthères à 2 loges sont plus ou moins arquées, concaves sur la face interne, avec un connectif acuminé introrse. L'ovaire est généralement à 2 loges (Hallé, 1966; Ntore et *al.*, 2003).

Les fruits charnus sont des baies subglobuleuses qui renferment beaucoup de graines le plus souvent ovoïdes ou ellipsoïdes, à tégument séminale caractérisé par des cellules exotestales (Hallé, 1966; Troupin, 1982; Ntore et *al.*, 2003).

*Pauridiantha* est un genre d'Afrique réunissant environ 38 espèces distribuées de la Guinée portugaise à l'Ouganda. Une seule espèce est présente à Madagascar. Le tableau suivant donne la distribution de quelques espèces de ce genre en Afrique (Hallé, 1966; Ntore et al., 2003). De ces espèces, *P. callicarpoides* est celle qui a retenu notre attention.

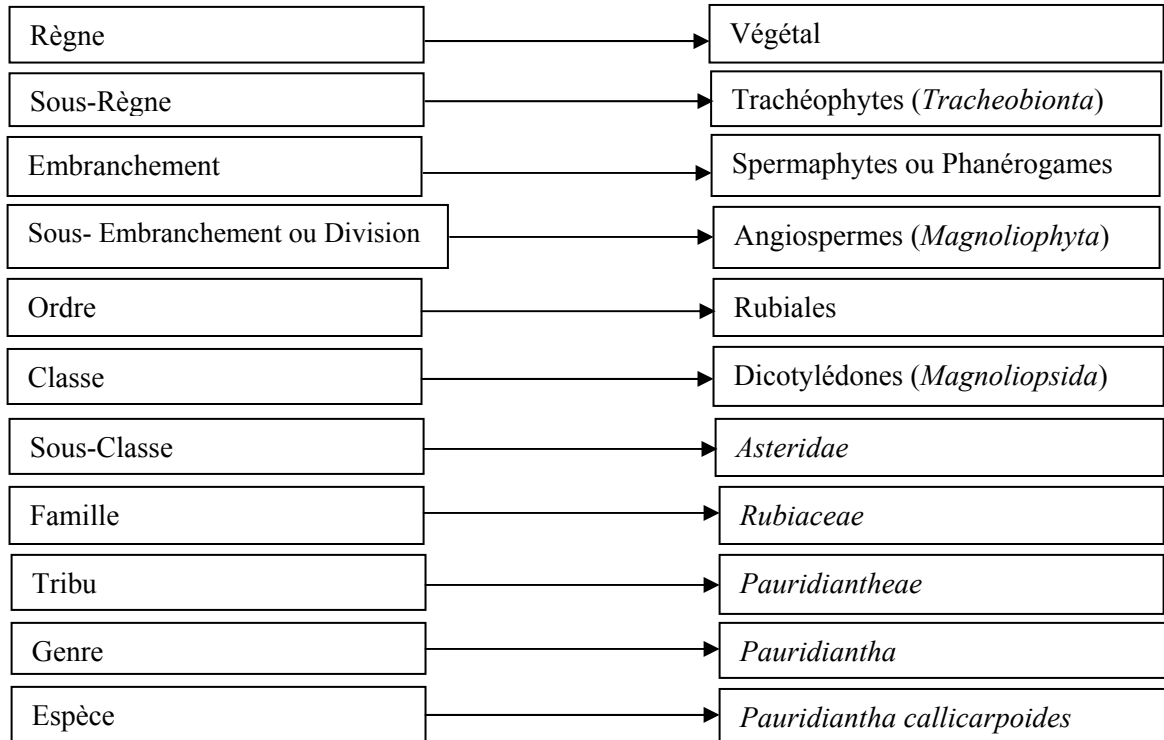
**Tableau I:** Distribution géographique de quelques espèces du genre *Pauridiantha* en Afrique (Hallé, 1966; Ntore et al., 2003).

<b>Espèces</b>	<b>Pays</b>
<i>P. callicarpoides</i>	Cameroun, Congo, Guinée, Ouganda
<i>P. canthiiflora</i>	Sud-Nigéria, Cameroun, Gabon
<i>P. coalescens</i>	Sud-Tanzanie
<i>P. dewevrei</i>	Cameroun, Gabon, Congo, Guinée, Centrafrique, Ouganda
<i>P. efferata</i>	Cameroun
<i>P. floribunda</i>	Sud-Nigéria, Cameroun, Gabon, São-Tomé
<i>P. mayumbensis</i>	Bas-Congo
<i>P. micrantha</i>	Cameroun
<i>P. pyramidata</i>	Sud-Cameroun, Gabon, Congo, Basse-Guinée, Centrafrique
<i>P. rubens</i>	Cameroun, Gabon, Congo, Centrafrique
<i>P. siderophila</i>	Gabon
<i>P. sylvicola</i>	Ghana, Libéria, Haute-Guinée
<i>P. udzungwaensis</i>	Sud-Tanzanie
<i>P. venusta</i>	(Ouest africain)
<i>P. verticillata</i>	Sud-Nigéria, Cameroun, Gabon, Centrafrique
<i>P. viridiflora</i>	Nigéria, Ouganda, Congo, Basse-Guinée, Nord-Ouest Tanzanie

### **I.1.1.3- Généralités sur *Pauridiantha callicarpoides***

#### **I.1.1.3.1- Position systématique**

La figure 1 donne la position systématique de *Pauridiantha callicarpoides*, obtenue à partir de la classification de Arthur Cronquist (1981) spécifique aux angiospermes et du système de nomenclature binomiale des espèces établi par Carl Von Linné au XVIII<sup>e</sup> siècle (Cronquist, 1981).



**Figure 1:** Position systématique de *Pauridiantha callicarpoides*

#### I.1.1.3.2- Description et répartition géographique de *Pauridiantha callicarpoides*

*Pauridiantha callicarpoides* (Hiern) Brem. est un arbuste ou petit arbre de 5 à 12 m de haut, à tronc droit et aux branches harmonieusement étagées et étalées selon le modèle de Roux défini par F. Hallé et R. Oldeman (1970) (Hallé, 1966; Bouquet, 1972). Les rameaux rarement fourchus sont velus.

Les feuilles de grandes dimensions, sont vert foncé au dessus, vert jaunâtre en dessous. Les stipules densément pubescentes, sont très élargies au niveau de l'insertion et atténuées aigues au sommet. Le limbe vert-jaunâtre à sec, pubérulent scabre au dessus, pubescent en dessous, très longuement oblong et lancéolé. La nervure médiane est pubescente. De même, les nervures secondaires au nombre de 20 à 28 paires sont pubescentes et faiblement ascendantes, fermées en arceaux. Les inflorescences sont axillaires, multiflores et corymbiformes (Hallé, 1966; Bouquet, 1972).

Les fleurs sont blanches, vertes, verdâtres ou bleuâtres. Le calice, blanc-jaunâtre, est un peu pubescent sous la cupule glabre et presque indentée. La corolle de 5 à 7 mm de long, verte,

---

glabre, possède 5 lobes triangulaires à pubescence interne violette apparente. Les ovaires ont deux loges (Hallé, 1966; Bouquet, 1972).

Les fruits sont des baies subglobuleuses (de plus ou moins 6 mm), verts avant la maturité, contenant de nombreuses graines subovales et brunes (Hallé, 1966; Bouquet, 1972).

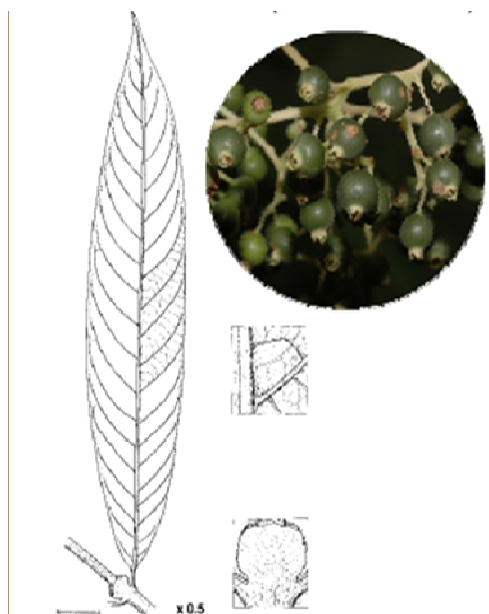
Cette espèce, la plus belle du genre, très commune dans toute la zone forestière de l'Ouest du Congo, existe du Cameroun au Congo central. Le tableau suivant donne la répartition géographique de *P. callicarpoides* au Cameroun (Source de l'Herbier National du Cameroun, 2012).

**Tableau II:** Distribution géographique de *P. callicarpoides* au Cameroun (Source de l'Herbier National du Cameroun, 2012).

Régions	Localités
Centre	-Akonolinga (Dja), -Ngoumou, -Mbalmayo
Est	-Sangha-River (50 km Yokadouma-Mouloundou), -Lomié, -Goyoum, -Doumé, -Bange (route Yokadouma-Mouloundou), -Kinsassa (Nord-Est de Mouloundou), -Bela (3-8 km) Libongo
Littoral	-Mouambon (Koupé-Manengoumba), -Mont-Manengoumba
Nord-Ouest	Boyo
Sud	-Adjap (20 km Sud-Est d'Ebowa), -Forêt du Dja
Sud-Ouest	-Banguem, -Kodmi (Bakossi)

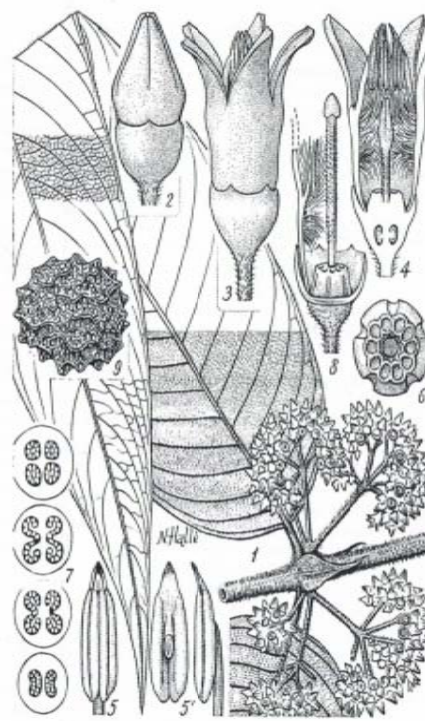
Les figures 2 et 3 représentent les photos de certaines parties de la plante.

***Pauridiantha callicarpoides***  
(Rubiaceae)



(Illustrations © Rosemary Wise, 2015)

**Figure 2:** Photo des fruits de *P. callicarpoides*



(Hallé, 1966)

**Figure 3:** Rameau, fleur et graine de *P. callicarpoides*

### I.1.1.3.3- Synonyme et nom vernaculaire

Certains auteurs donnent à *P. callicarpoides* le nom de *Urophyllum callicarpoides* Hiern (Hallé, 1966; <http://www.theplantlist.org/>, 2012).

Cette plante est connue sous l'appellation «Etsileghe» chez les Fang (Hallé, 1966).

Le genre *Pauridiantha* regroupe de nombreuses espèces à usages culturels, industriels, ainsi que des espèces présentant des propriétés thérapeutiques importantes et variées.

### I.1.2- Usages des espèces du genre *Pauridiantha*

*P. floribunda* est un excellent bois de chauffage connu des populations de Douala-Cameroun (Hallé, 1966). Le bois de *P. callicarpoides* sert à faire des piquets de cases et de grandes pagaies. Au Congo, on y extrait une teinture jaune ou rouge. Ses feuilles fraîches duveteuses servent de papier hygiénique pour les nourrissons (Hallé, 1966).

---

De même, les femmes Baka (Cameroun) utilisent une teinture extraite de *P. rubens* pour colorer les paniers fabriqués à base d'une liane fendue (*Oncocalamus sp.*) (Motte et al., 2012). Une teinture rouge extraite des jeunes feuilles de cette même espèce est également utilisée à Bioko (Guinée Equatoriale), c'est la raison pour laquelle la plante y est cultivée. Mais notons que le mode d'utilisation de cette teinture n'est pas connu. Le potentiel tinctorial de *P. rubens* est renforcé par l'action mordante de l'aluminium présente dans les feuilles. Cette accumulation d'aluminium dans les feuilles semble être une caractéristique chimiotaxonomique du genre *Pauridiantha* (Jansen et Cardon, 2005).

Des sources révèlent que les plantes du genre *Pauridiantha*, surtout les espèces arborescentes sont bien connues des Congolais qui les utilisent couramment en médecine naturelle. Les espèces arbustives ou lianescentes ont aussi parfois été signalées comme plantes médicinales (Bouquet, 1969, 1972; Bouquet et Fournet, 1975):

*P. callicarpoides* est employé en application externe pour le traitement des plaies, en particulier comme pansement après la circoncision, et dans celui de diverses dermatoses (Hallé, 1966; Bouquet, 1972; Nkeoua et Boundzanga, 1999). Le jus des écorces est appliqué, après scarifications épidermiques sur la poitrine du malade souffrant de points pleuraux ou de douleurs intercostales; en instillations nasales ou auriculaires il calmerait les migraines et les inflammations du conduit auditif (Bouquet, 1969). Par voie orale, *P. callicarpoides* est prescrit pour soigner les affections intestinales et génito-urinaires (stérilité, blennorragie, règles douloureuses et irrégulières). La décoction des racines est utilisée pour faciliter l'accouchement; elle agirait aussi sur les céphalées rebelles et persistantes. Ces indications se retrouvent aussi au Gabon (Hallé, 1966; Bouquet, 1972; Nkeoua et Boundzanga, 1999).

Dans la région de Brazzaville, *P. dewevrei* et *P. viridiflora* sont administrés, sous forme de tisane, pour traiter la hernie (Bouquet, 1969, 1972; Nkeoua et Boundzanga, 1999). Le décocté des feuilles de *P. pyramidata* est administré en boisson contre les œdèmes locaux (Bouquet, 1969; Nkeoua et Boundzanga, 1999).

*P. mayumbensis* est utilisé en tisane contre les névralgies (Hallé, 1966). Le décocté des écorces de *P. canthiiflora* est utilisé pour traiter le rachitisme (Nkeoua et Boundzanga, 1999).

D'après ces différentes indications, il semblerait que ces plantes aient des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires, antiseptiques voire antibiotiques et éméto-purgatives importantes (Bouquet, 1969, 1972).

---

Malgré la grande utilité du genre *Pauridiantha* dans la médecine naturelle, très peu d'études chimiques ont été effectuées sur ses espèces.

### **I.1.3- Travaux chimiques et activités biologiques antérieurs sur le genre *Pauridiantha***

#### **I.1.3.1- Travaux chimiques antérieurs**

Le genre *Pauridiantha* est une source importante de métabolites secondaires. En effet, le *screening* chimique préliminaire sur les extraits chloroformiques acides et alcalins des écorces, des racines et des feuilles a montré la présence (Bouquet, 1972):

- de tannins catéchiques dans les écorces du tronc de *P. callicarpoides*, dans les écorces du tronc et dans les feuilles de *P. dewevrei*.
- de faible quantité de saponosides dans les écorces de racines de *P. callicarpoides* (indice mousse = 166), dans les écorces de tronc et de racines de *P. dewevrei* (indice mousse = 150 et 250).
- de quinones libres dans les écorces de racines et, en quantité moindre, dans celles du tronc de *P. callicarpoides*, *P. dewevrei* et de *P. viridiflora*. Par contre, les feuilles de ces trois espèces ne contiennent pas de quinones.
- d'alcaloïdes dans les écorces de racines et de tiges des trois espèces. En ce qui concerne les feuilles, seules celles de *P. dewevrei* en contiennent des traces.

Il a été jusqu'ici isolés et caractérisés des espèces du genre *Pauridiantha* des composés appartenant principalement à trois classes de substances naturelles:

- les alcaloïdes
- les anthraquinones
- les coumarines.

#### **I.1.3.1.1- Les alcaloïdes**

##### **I.1.3.1.1.1- Généralités**

Introduit au début du XIX<sup>e</sup> siècle par W. Meissner pour désigner les substances naturelles réagissant comme des bases, les alcaloïdes sont des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte. Les alcaloïdes ont une structure complexe. Ils peuvent être classés suivant leurs activités biologiques et écologiques, leurs structures chimiques et leurs voies de biosynthèse (Bruneton, 1993).



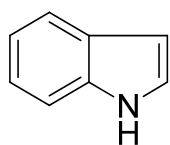
---

Biogénétiquement, les alcaloïdes peuvent être classés en fonction de leur précurseur avant leur synthèse dans une voie biologique. On distingue alors trois grandes classes selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct, et qu'ils comportent ou non un atome d'azote dans un hétérocycle:

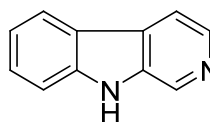
- Les alcaloïdes vrais qui dérivent biosynthétiquement d'acides aminés (ornithine, lysine, tyrosine, arginine, histidine, etc.) et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils apparaissent dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme d'un sel, soit comme *N*-oxide (Bruneton, 1993).
- Les proto-alcaloïdes qui sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils dérivent aussi d'acides aminés (ornithine, lysine, tyrosine, arginine, histidine, etc.) et sont élaborés *in vivo*.
- Les pseudo-alcaloïdes qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs, ou d'un de leurs postcurseurs (dérivés). Ils peuvent aussi résulter d'amination, ou de réaction de transamination dans une voie connectée avec les précurseurs ou les postcurseurs d'acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoïdes et l'on parle alors d'alcaloïdes terpéniques (Bruneton, 1993).

Tenant compte de la nature du système hétérocyclique présent dans le squelette de l'alcaloïde, la classification structurale fait ressortir les alcaloïdes de type pyrrolidine (azolidine), pyrrolizidine, indolizidine, tropane, etc., pour ne citer que quelques exemples.

Les alcaloïdes isolés des espèces du genre *Pauridiantha* appartiennent en majorité au groupe des alcaloïdes indoliques 4 (alcaloïdes indolopyridiniques) et de noyau caractéristique type  $\beta$ -carboline 5.



4



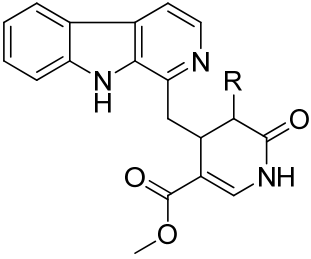
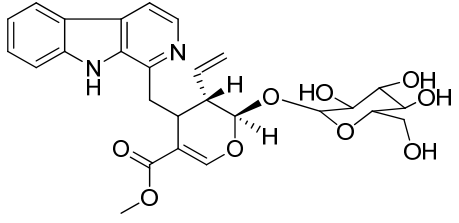
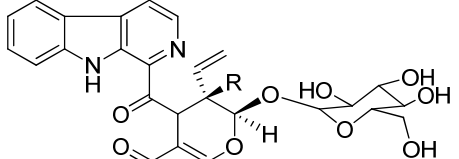
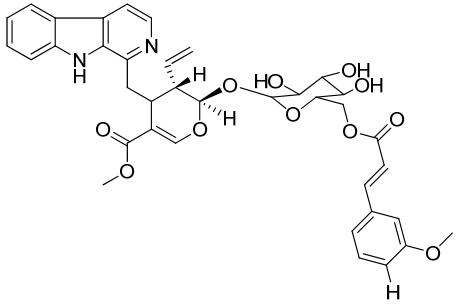
5

Le tableau III regroupe les alcaloïdes isolés des plantes du genre *Pauridiantha*.

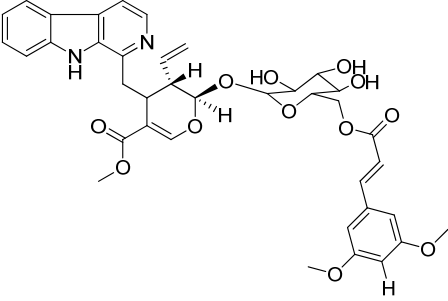
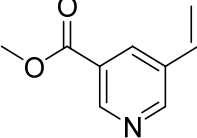
**Tableau III:** Alcaloïdes isolés des espèces du genre *Pauridiantha*

Noms	Structures	Sources	Références
Harmane ou Passiflorine ou 1- méthyl- $\beta$ -carboline <u>6</u>		Ecorces des racines de <i>P.</i> <i>Callicarpoides</i>	(Pousset et <i>al.</i> , 1971)
Pauridianthine <u>7</u>		Ecorces des racines de <i>P.</i> <i>Callicarpoides</i>	(Pousset et <i>al.</i> , 1971)
Pauridianthinol <u>8</u>	<b>R</b> <u>7</u> -COCH <sub>3</sub> <u>8</u> -CHOH-CH <sub>3</sub>	Feuilles de <i>P.</i> <i>lyalii</i>	(Pousset et <i>al.</i> , 1974; Levesque et <i>al.</i> , 1982)
Pauridianthinine <u>9</u>		Ecorces des racines de <i>P.</i> <i>Callicarpoides</i>	(Pousset et <i>al.</i> , 1971)
Lyaline <u>10</u>		Feuilles de <i>P.</i> <i>lyalii</i>	(Levesque et <i>al.</i> , 1974a, 1982)
Lyadine <u>11</u>	<b>R</b> <u>10</u> -CH=CH <sub>2</sub> <u>11</u> -CHOH-CH <sub>3</sub>		

**Tableau III:** Alcaloïdes isolés des espèces du genre *Pauridiantha* (suite)

<p>Lyalidine <b><u>12</u></b></p>		<p>Feuilles de <i>P. lyalii</i> Ecorces des racines de <i>P. Callicarpoides</i></p>	<p>(Levesque et al., 1974b, 1982)</p>
<p>Hydroxylialidine <b><u>13</u></b></p>	<p><b><u>12</u></b> =C-CH<sub>3</sub> <b><u>13</u></b> -CHOH-CH<sub>3</sub></p>	<p>Feuilles de <i>P. lyalii</i></p>	<p>(Levesque et al., 1982)</p>
<p>Lyaloside <b><u>14</u></b></p>		<p>Feuilles de <i>P. lyalii</i></p>	<p>(Levesque et al., 1982)</p>
<p>Pauridianthoside <b><u>15</u></b></p>		<p>Feuilles de <i>P. lyalii</i></p>	<p>(Levesque et al., 1977, 1982)</p>
<p>Isopauridianthoside <b><u>16</u></b></p>	<p><b><u>15</u></b> β-H <b><u>16</u></b> α-H</p>	<p>Feuilles de <i>P. lyalii</i></p>	<p>(Levesque et al., 1983)</p>
<p>6'-(<i>Trans</i>)-féruloyllyaloside <b><u>17</u></b></p>		<p>Feuilles de <i>P. lyalii</i></p>	<p>(Levesque et al., 1982)</p>

**Tableau III:** Alcaloïdes isolés des espèces du genre *Pauridiantha* (suite et fin)

<p>6'-(<i>Trans</i>)- sinapoyllyaloside <b>18</b></p>		<p>Feuilles de <i>P. lyalii</i></p>	<p>(Levesque et al., 1982)</p>
<p>3-vinyl-5-méthoxycarbonylpyridine <b>19</b></p>		<p>Racines de <i>P. Callicarpoides</i></p>	<p>(Pousset et al., 1974)</p>

#### I.1.3.1.1.2- Méthodes de détermination des structures des alcaloïdes oxindoliques

Les réactions générales de précipitation des alcaloïdes sont fondées sur la capacité qu'ont ceux-ci de se combiner avec des métaux et des métalloïdes: bismuth, mercure, tungstène, iode, etc. Dans la pratique, on emploie la solution iodo-iodurée qui est le réactif de Wagner (précipité rouge orangé), le tetraiodomercurate de potassium connu sous le nom de réactif de Mayer (qui donne des précipités blanc-jaunes) et le tetraiodobismuthate de potassium plus connu sous le nom de réactif de Dragendorff (coloration rouge-orangée). Il est également possible d'utiliser le réactif silico-tungstique (mélange d'oxydes de tungstène et de silicium) ou des solutions d'iodo-platinates alcalins. La spécificité de ces réactifs n'est pas absolue: des protéines, des alpha-pyrones, certaines coumarines et des hydroxy-flavones, des lignanes et autres composés peuvent donner des réactions faussement positives avec le réactif de Dragendorff.

D'autres réactifs peuvent être utilisés pour mettre en évidence les alcaloïdes notamment ceux qui donnent des réactions colorées caractéristiques de groupes d'alcaloïdes (Bruneton, 2009):

- Le para diméthylaminobenzaldéhyde (*p*-DMAB) pour les alcaloïdes de l'ergot de seigle;
- Le sulfate de cérium et d'ammonium qui différencie les indoles (jaunes), les dihydroindoles (rouges), les béta-anilinoacrylates (bleus), les oxindoles;
- La ninhydrine pour les arylalkylamines;
- La réaction de Vitali-Morin pour les esters de l'acide tropique;

- 
- Les réactifs au chlorure ferrique en milieu chlorhydrique (tropolones) ou perchlorique (*Rauwolfia*).

En général, les alcaloïdes indoliques réagissent positivement au test de Dragendorff en donnant une coloration orange. Ils réagissent également au test d'Ehrlich (DMAB) en donnant une coloration rose, bleue ou violette et au test de Wasicky (*p*-DMAB dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en donnant une coloration qui varie du bleu violacé au rouge (<http://www.refer.mg/cours/>, 2013). Outre les analyses cristallographiques, le développement rapide des méthodes d'investigation structurale a permis de grands progrès dans la détermination des structures des alcaloïdes spirooxindoliques. Cette détermination fait appel à la combinaison de plusieurs techniques parmi lesquelles: l'UV, l'IR, la spectrométrie de masse (ESI, FAB, etc.), la RMN unidimensionnelle (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) et la RMN à deux dimensions (HMBC, HSQC, COSY, NOESY).

Leurs spectres UV montrent des bandes d'absorptions à  $\lambda_{\max}$  (nm): 286; 252; 207 caractéristiques d'un noyau oxindole (Kitajima et al., 2007; Xin et al., 2008; Salim et al., 2011).

Le spectre IR montre des fréquences d'absorption caractéristiques d'un alcaloïde oxindole à  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3245 (NH); 3120 (C-H aromatique); 1678 (C=O amide); 1621 (C=C oléfinique); 1473 (C=C aromatique) et 1189 (C-O éther cyclique) (Salim et al., 2011).

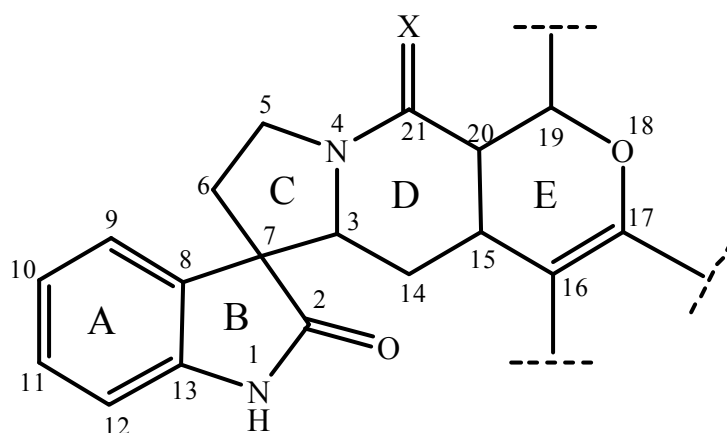
Considérant le squelette ci-dessous, similaire à celui des alcaloïdes que nous avons:

- Pour X=H<sub>2</sub> et avec H-17, leurs spectres de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) présentent généralement:
  - Dans la région des champs faibles, un large singulet intégrant pour un proton autour de  $\delta_H$  compris entre 7,52-10,03 (1H, *ls*, -NH), attribuable au proton de la fonction amine secondaire -NH en position 1. On y observe également un ensemble de signaux indiquant la présence de quatre protons aromatique du cycle A d'un système oxindole ((Kitajima et al., 2007; Xin et al., 2008) autour de  $\delta_H$  7,37 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, H-9); 7,05 (1H, ddd,  $J = 7,6; 7,6; 1,1$  Hz, H-10); 7,21 (1H, ddd,  $J = 7,6; 7,6; 1,1$  Hz, H-11) et 6,85 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, H-12). Un singulet intégrant pour un proton oléfinique à  $\delta_H$  7,65 (1H, s, H-17).
  - Dans la région des champs forts, on observe généralement un ensemble de signaux dont ceux autour de  $\delta_H$  3,28 (1H, ddd,  $J = 8,9; 8,9; 2,6$  Hz, H-5 $\beta$ ); 2,50 (1H, ddd,  $J = 8,9; 8,9; 8,9$  Hz, H-5 $\alpha$ ); 2,38 (1H, ddd,  $J = 12,8; 8,9; 2,6$  Hz, H-6 $\beta$ ) et 2,02 (1H, ddd,  $J = 12,8; 8,9; 8,9$  Hz, H-6 $\alpha$ ) sont caractéristiques des méthylènes de la séquence C<sub>spiro</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N d'un squelette de type

- spirooxindole, des alcaloïdes indoliques isolés des espèces appartenant à la famille des Rubiaceae. On observe également un signal intégrant pour un proton à  $\delta_H$  2,45 (1H, dd,  $J = 11,8; 2,6$  Hz, H-3); 1,14 (1H, ddd,  $J = 11,8; 2,6; 2,6$  Hz, H-14 $\alpha$ ); 0,76 (1H, ddd,  $J = 11,8; 11,8; 11,8$  Hz, H-14 $\beta$ ); 2,48 (1H, m, H-15); 4,20 (1H, qd,  $J = 7,0; 4,0$  Hz, H-19); 1,65 (1H, *lm*, H-20); 3,27 (1H, d,  $J = 12,0$  Hz, H-21 $\beta$ ) et 2.44 (1H, dd,  $J = 12,0; 4,0$  Hz, H-21 $\alpha$ ) (Kitajima *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2008; Salim *et al.*, 2011).

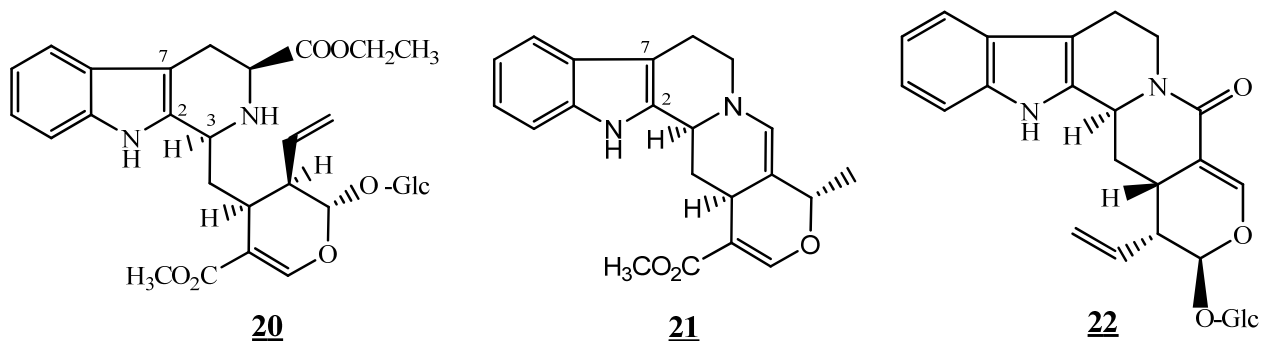
Sur leurs spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), on observe généralement les signaux:

- Des quatre méthylènes susmentionnés à  $\delta_C$  53,5 (C-5); 35,4 (C-6); 30,2 (C-14) et 53,7 (C-21)
- Des méthines apparaissant à  $\delta_C$  125,1 (C-9); 122,7 (C-10); 127,8 (C-11); 109,4 (C-12); 70,9 (C-3); 30,92 (C-15); 157,2 (C-17); 72,0 (C-19) et 37,9 (C-20).
- Des carbones quaternaires résonnant à  $\delta_C$  180,7 (C-2); 56,3 (C-7); 133,3 (C-8); 139,8 (C-13) et 108,7 (C-16).



• Pour  $\text{X}=\text{O}$  avec présence d'une double liaison  $\text{C}_{19}=\text{C}_{20}$  et absence de la double liaison  $\text{C}_{16}=\text{C}_{17}$ , on observe sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$  la disparition des signaux à  $\delta_H$  3,27 (1H, d,  $J = 12,0$  Hz, H-21 $\beta$ ); 2,44 (1H, dd,  $J = 12,0; 4,0$  Hz, H-21 $\alpha$ ) et 1,65 (1H, *lm*, H-20). Des signaux intégrant chacun pour un proton apparaissent à  $\delta_H$  7,38 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz, H-19) si C-19 porte un proton et 1,98 (1H, dd,  $J = 11,0; 8,3$  Hz, H-16) respectivement. Le proton H-17 apparaît à  $\delta_H$  5,05 (1H, d,  $J = 8,3$  Hz) si C-17 porte un atome d'oxygène. Dans ces conditions, sur leurs spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  il y a disparition du signal à  $\delta_C$  53,7 (C-21) et apparition d'un autre signal dans la région des champs faibles à  $\delta_C$  165,8 (C=O, C-21). Les carbones C-16, C-17, C-19 et C-20 apparaissent à  $\delta_C$  56,3; 90,9 (CH-O-); 148,2 et 108,9 respectivement (Van *et al.*, 2005; Kitajima *et al.*, 2007).

Cependant, des différences significatives peuvent être notées pour les signaux des carbones du cycle indole. En effet, les déplacements chimiques typiques à C-2 et C-7 dans les alcaloïdes indolo-monoterpéniques sont de l'ordre de 135 et 108 ppm respectivement. Donc les valeurs des déplacements chimiques mentionnées plus haut à savoir 180,7 (C-2) et 56,3 (C-7) suggèrent fortement l'existence d'un cycle oxoindole au lieu du cycle indole dans les alcaloïdes indolo-monoterpéniques tels que: l'hirsutaside A **20**, la cathénamine **21**, la strictosamide **22** et bien d'autres (Bruneton, 1999; Van et *al.*, 2005; Xin et *al.*, 2008). Les corrélations  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  longues distances généralement observées entre C-2-H-3, C-2-H-5, C-2-H-6, C-7-H-5, C-7-H-14, C-8-H-3 et C-8-H-6 suggèrent C-7 comme un carbone spiro pour lier le cycle oxoindole et le cycle pyrrole (Van et *al.*, 2005).



#### I.1.3.1.1.3- Origine biosynthétique des alcaloïdes indolo-monoterpéniques

Les alcaloïdes indolo-monoterpéniques dérivent du tryptophane. Leur distribution se limite à trois familles: Apocynaceae, Loganiaceae et Rubiaceae (Bruneton, 1999). Ces alcaloïdes proviennent d'un précurseur unique qui est la strictosidine issue de la condensation d'une molécule de tryptamine et d'un aldéhyde monoterpénique, le secologanoside. Cette condensation conduit théoriquement à deux hétérosides épimères: le vincoside ( $3\beta$ ) et la strictosidine ( $3\alpha$ ). En réalité, l'enzyme (la strictosidine-synthase) catalyse la formation exclusive de la strictosidine, précurseur de tous les alcaloïdes indolo-monoterpéniques (schéma 1) (Bruneton, 1999).

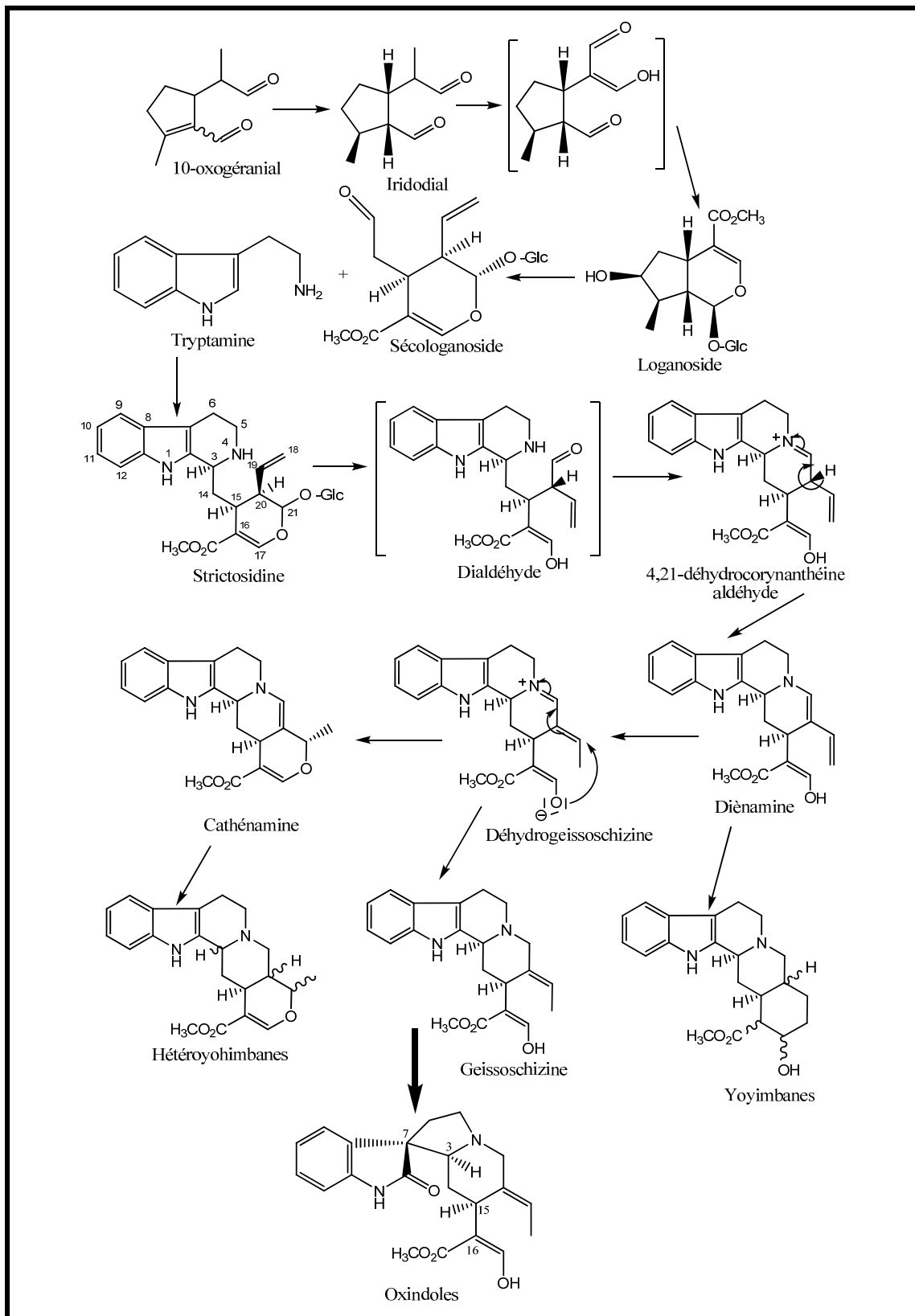


Schéma 1: Biosynthèse des alcaloïdes indolo-monoterpéniques (Bruneton, 1999).

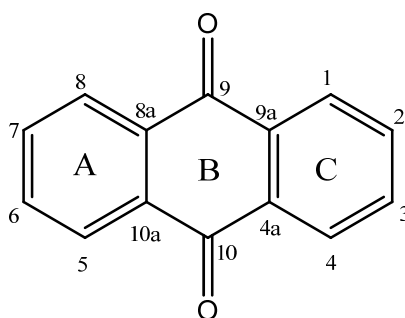


---

### I.1.3.1.2- Les anthraquinones

Les anthraquinones encore appelées émodols, sont les pigments universels des végétaux. Ce sont des métabolites secondaires de coloration jaune ou orange, et parfois rouge, répandus dans le règne végétal, surtout dans les plantes inférieures telles que les champignons et les lichens. Elles sont aussi présentes dans quelques familles de plantes supérieures telles que les Gentianaceae et les Guttiferae (Ritchie et Taylor, 1964; Kouam, 2005).

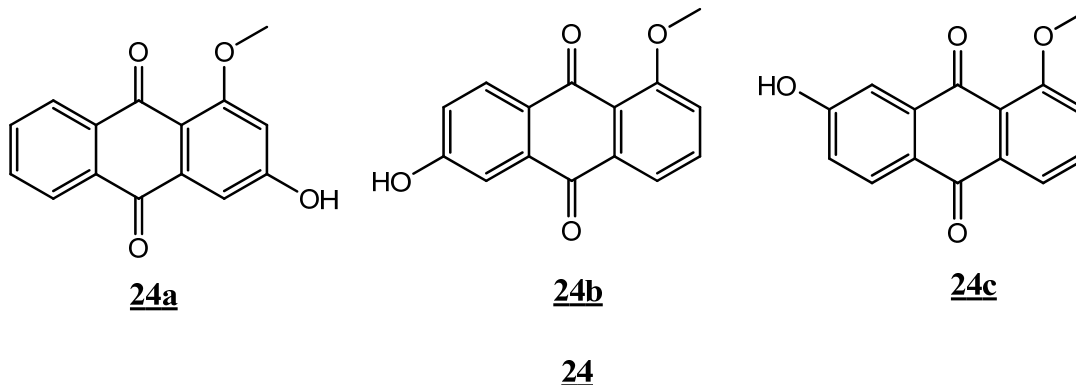
Du point de vue structural, les anthraquinones sont des composés ayant un squelette de base en C<sub>14</sub> **23** avec un enchaînement du type C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>.



### **23**

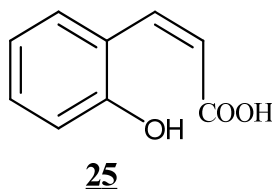
La position 6 est le plus souvent occupée par un groupement méthyle, les substituants pouvant être l'hydroxyle, le méthoxyle, le prényloxyle, le géranyloxyle et/ou l'isoprényle fixés sur les noyaux aromatiques A et C dans les positions 2 et/ou 3.

Jusqu'ici, une seule anthraquinone a été isolée de *P. callicarpoides*. Il s'agit de la 1-méthoxyhydroxyanthraquinone **24** pour qui la structure exacte n'avait pas pu être déterminée. En effet, la quantité du produit obtenu étant très faible n'avait pas permis une étude chimique plus poussée de celui-ci (Bouquet, 1972). Mais, des comparaisons avec des composés isomères (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>) montraient que cette anthraquinone était différente des isomères connus. De plus la littérature ne fournissait aucune donnée se rapportant aux 1-méthoxyanthraquinones hydroxylées en 3, 6 ou 7, ce qui permettait de suggérer que le composé en question est l'isomère hydroxylé en l'une de ces trois positions.



### I.1.3.1.3- Les coumarines

Les coumarines tirent leur nom de «coumarou», nom vernaculaire de la fève tonka (*Dipterix odorata* Wild., Fabaceae) d'où elles furent isolées pour la première fois en 1820. Ce sont des composés naturels ou synthétiques renfermant des squelettes cycliques et comportant une fonction ester (Bruneton, 1993, 1999). Les coumarines sont des 2*H*-1-benzopyran-2-one qui en première approximation sont considérées comme étant des lactones des acides (*Z*)-*O*-hydroxycinnamique **25**.



Le squelette de base des coumarines **26** est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Ford et *al.*, 2001). Toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle phénolique.

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien et jusqu'ici, près d'un millier ont été décrites (Murray, 1989; Bruneton, 1993). Quelques familles d'angiospermes élaborent des structures très variées. Il s'agit des Fabaceae, des Asteraceae, des Rubiaceae, mais surtout des Apiaceae et Rutaceae où on rencontre les molécules les plus complexes des coumarines. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et

---

les huiles essentielles des graines (Deina et *al.*, 2003; Booth et *al.*, 2004; Bouzid, 2009; Patiño et *al.*, 2012).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (Bouzid, 2009).

Les coumarines peuvent être classées en cinq catégories (Deina et *al.*, 2003; Booth et *al.*, 2004; Bhat et *al.*, 2005; Bouzid, 2009; Bruneton, 2009).

- **Les coumarines simples:**

- ✓ Coumarine 26;
- ✓ Ombélliférone (7-hydroxycoumarine) 27;
- ✓ 6, 7-dihydroxycoumarine 28.

- **Les coumarines prénylées:**

- ✓ Subérosine 29;
- ✓ Osthol 30.

- **Les furanocoumarines** qui sont issues de la fusion de la coumarine et de ses dérivés avec un hétérocycle supplémentaire à 5 atomes (hétérocycle furane):

- ✓ Furanocoumarines linéaires pour une association se faisant dans le prolongement de la coumarine (psoralène et ses dérivés: bergaptène, impérorine, xanthotoxine, chalepentine):
  - ❖ Psoralène 31;
  - ❖ Bergaptène 32;
  - ❖ Impérorine 33.
- ✓ Furanocoumarines angulaires pour une association se faisant sur le côté (angélicine et ses dérivés):
  - ❖ Angélicine 34;

---

❖ Pimpinéline 35.

• **Les pyranocoumarines** qui sont issues de la fusion d'un hétérocycle supplémentaire à 6 atomes (hétérocycle pyranne) avec la coumarine:

✓ Pyranocoumarines linéaires pour une fusion se faisant dans le prolongement de la coumarine:

❖ Xanthylétine 36;

❖ Clausarine 37.

✓ Pyranocoumarines angulaires pour une fusion latérale:

❖ Séséline 38;

❖ Visnadine 39.

• **Les dimères et trimères de coumarines:**

✓ Dicoumarines (coumarines dimériques):

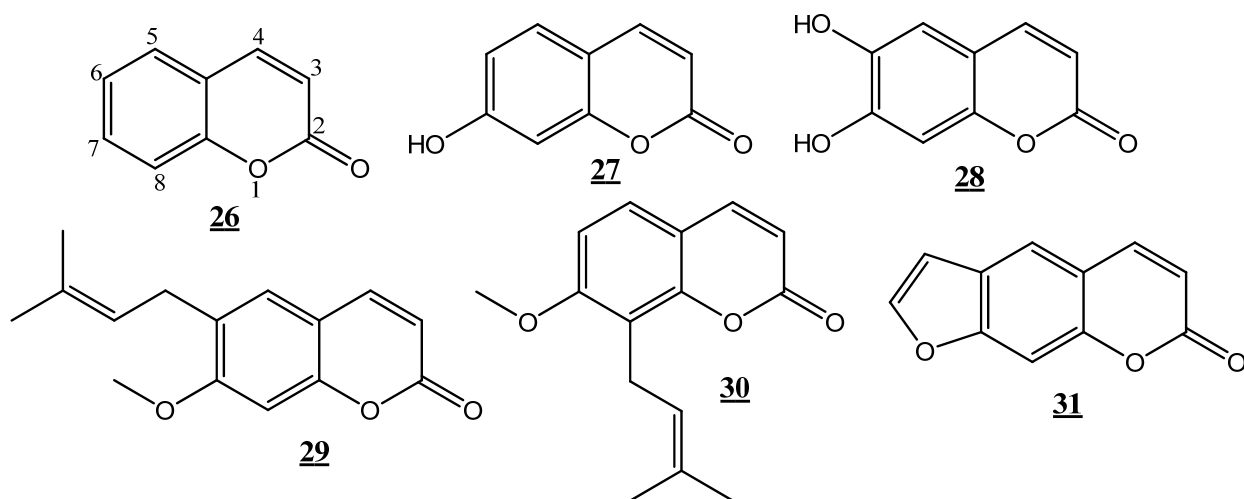
❖ Dicoumarol 40;

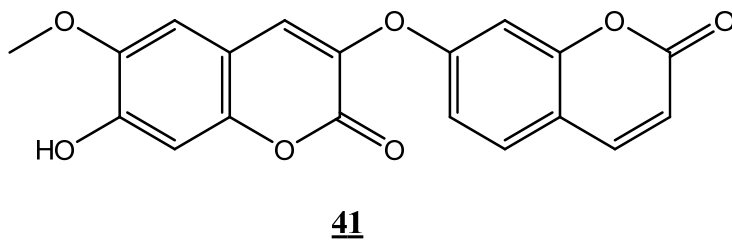
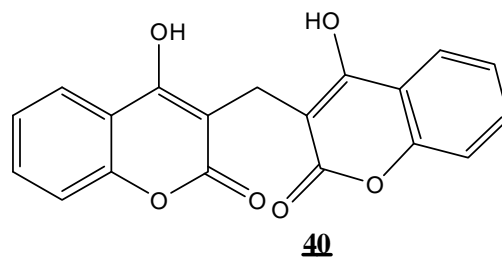
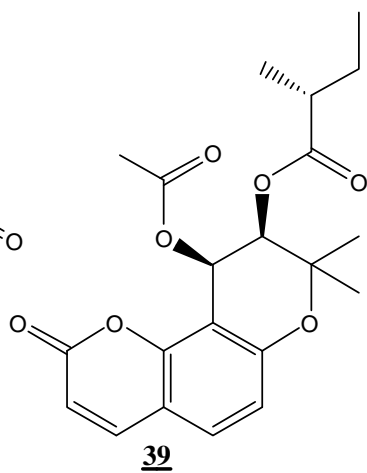
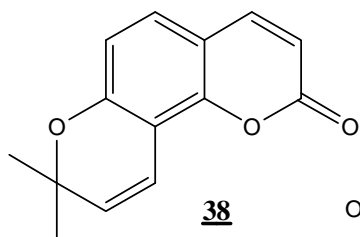
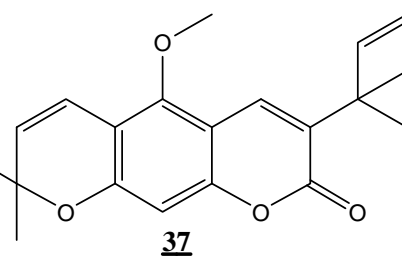
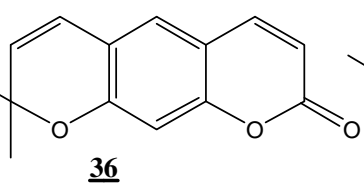
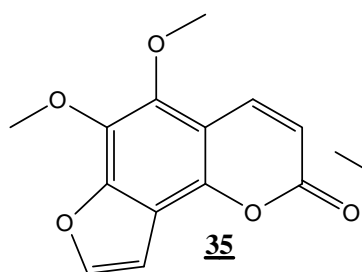
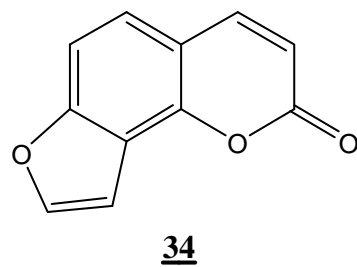
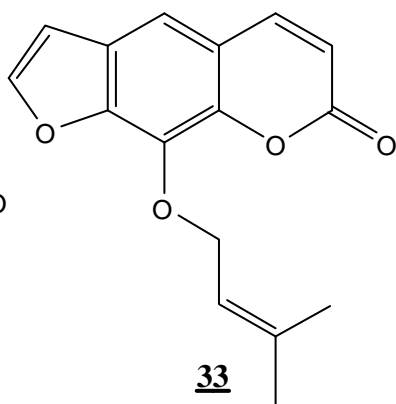
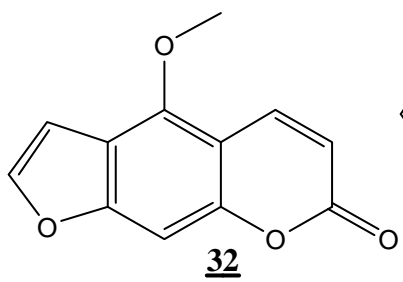
❖ Daphnorétine 41.

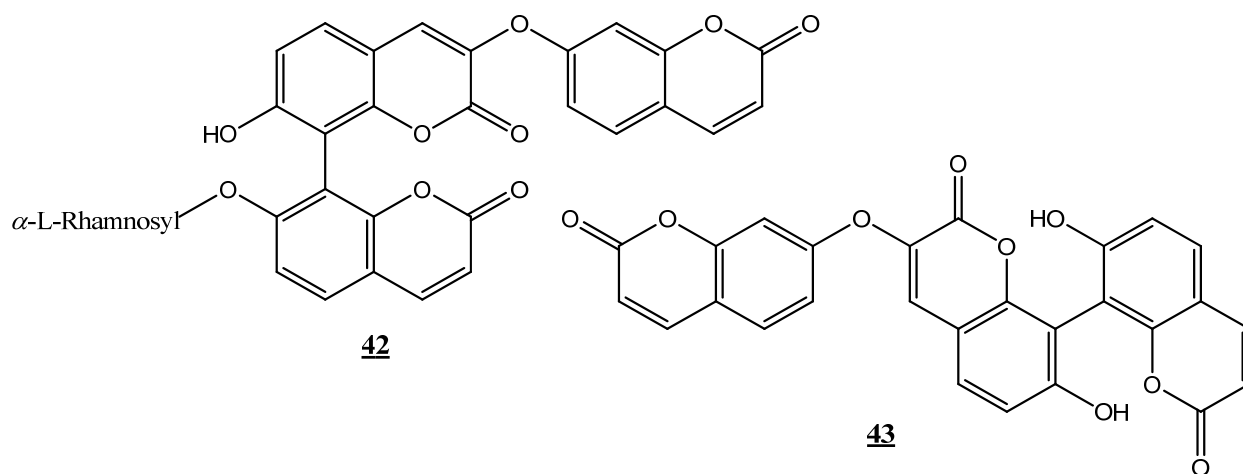
✓ Tricoumarines:

❖ Edgeworoside 42;

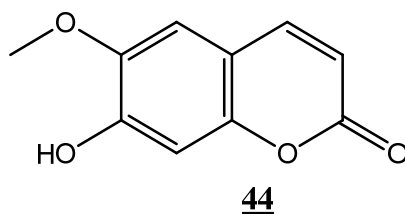
❖ Triumbellattine 43.







A notre connaissance, une seule coumarine a été isolée jusqu'ici du genre *Pauridiantha*. Il s'agit de la scopolétine (scopolétole ou 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine) **44**, isolée de *P. callicarpoides* (Bouquet, 1972; Bouquet et Fournet, 1975).



### I.1.3.2- Activités biologiques antérieures

L'étude des substances naturelles a connu une très grande évolution ces dernières années. Les travaux chimiques menés sur les plantes de la famille des Rubiaceae en général et celles du genre *Pauridiantha* en particulier ont été dans la plupart de temps complétés par l'étude des activités biologiques. Celle-ci a permis de confirmer certaines vertus thérapeutiques signalées en médecine naturelle.

#### I.1.3.2.1- Intérêts biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont des propriétés généralement variées et dépendant de leurs composantes chimiques:

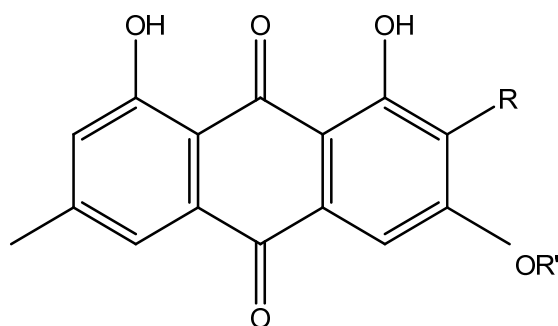
- 
- Action sur le système nerveux central comme anti dépresseur ou comme analgésique (codéine, morphine, etc.) (Bruneton, 1993, 1999).
  - Action sur le système nerveux autonome comme excitant du sympathique (hordéine, éphédrine, etc.) ou en médecine dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie) (Bruneton, 1993, 1999).
  - Action antibiotique, antiparasitaire, anthelminthique à des doses variées (quinine toxique pour l'hématozoaire du paludisme) donc comme antipaludéen, anti tumorale (agent anticancéreux: taxol, vinblastine, vincristine, etc.) (Bruneton, 1993, 1999).
  - Action sur les vaisseaux comme hypertenseur (hydrastine), sur la circulation sanguine (vincamine qui améliore la circulation cérébrale).

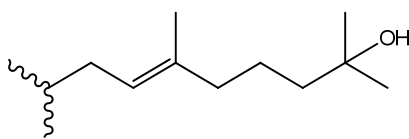
En effet, l'harmane **6** ou passiflorine (1-méthyl- $\beta$ -carboline), agit comme un inhibiteur endogène de la monoamine oxydase de type A (M.A.O-A) (Rommelspacher, 1991; Mebitil, 2006). Il inhibe l'acétylcholinestérase et la *N*-acétyltransférase; interfère avec la toxicité et la génotoxicité des xénobiotiques et est considéré comme «co-mutagène» (Mebitil, 2006). On observe également une inhibition aux fortes doses qui peut être totale, du métabolisme de l'AFB<sub>1</sub> (aflatoxine B<sub>1</sub>) et de sa conversion en AFM<sub>1</sub> (aflatoxine M<sub>1</sub>) par l'harmane (Mebitil, 2006). Les stimulations de l'activité monooxygénasique à faibles doses sont aussi mentionnées. Comme tous les  $\beta$ -carboline, l'harmane a un effet antidopaminergique provoquant des convulsions et des tremblements. Il inhibe fortement l'activité de la topoisomérase I (topo I), mais son effet inhibiteur est faible sur l'activité de la topoisomérase II (topo II) (Mebitil, 2006).

#### **I.1.3.2.2- Intérêts biologiques des anthraquinones**

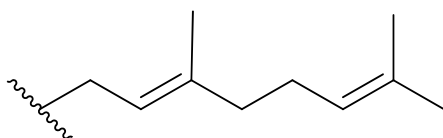
Les anthraquinones sont d'une grande importance physiologique. En effet, les travaux de Bilia et *al.* (2000) révèlent une activité antimittotique des anthraquinones, activité étroitement liée à la propriété cytotoxique. Les propriétés antibiotiques, antiparasitiques, anticancérigènes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires ont été également prouvées (Bilia et *al.*, 2000; Lone et *al.*, 2009; Pellizzoni et *al.*, 2012). Les propriétés antivirales, anti-oxydantes, antitumorales, antidiabétiques, inhibitrices de l'attaque auto-immunitaire et protection contre l'ulcère gastrique sont connues.

Les tests réalisés sur les dérivés d'émодines et toutes les autres anthraquinones émодines montrent que ces composés sont dotés d'activités biologiques importantes. En effet, ce sont des anti-inflammatoires, antimicroorganismes (antimicrobiens, antifongiques, antiparasitaires et antiviraux). Ils agissent sur les systèmes vasomoteurs comme purgatifs, laxatifs, diurétiques et immunitaires (immunostimulant et anticancéreux) (Izhaki, 2002). Notons également que ces composés protègent les plantes contre les herbivores, les frugivores, sans oublier les agents pathogènes (Izhaki, 2002).

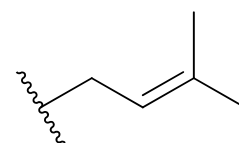


R	R'	
H	H	1,3,8-trihydroxy-6-méthylanthraquinone ou émодine <b>45</b>
H	CH <sub>3</sub>	3-O-méthylémодine ou 1,8-dihydroxy-6-méthyl-3-méthoxyanthraquinone <b>46</b>
H	Ge	3-géranyloxyémодine <b>47</b>
Pr	H	2-isoprénylémодine <b>48</b>
Ge	H	2-géranylémодine <b>49</b>
Pr	CH <sub>3</sub>	2-isoprényl-3-O-méthylémодin <b>50</b>
H		3-(18,19-dihydroxygéranyloxy)-6-méthyl-1,8-dihydroxyanthraquinone <b>51</b>

**NB:** Ge = Géranyl:



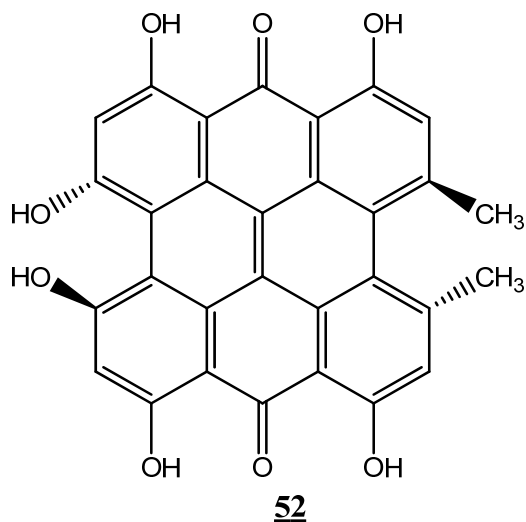
Pr = Prényl:





---

Des travaux de Schinazi et *al.* il ressort que, les anthraquinones substituées par différents groupes tels que: hydroxyle, amino, halogène, acide carboxylique, un groupe aromatique substitué, et sulfonate ont été testées pour déterminer leur activité contre le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) dans des lymphocytes primaires humains. C'est ainsi que l'hypéricine **52**, un dimère d'antraquinone qui présentait antérieurement une activité contre les rétrovirus non humains, a aussi montré une activité anti-VIH-1 dans les lymphocytes. Certaines des anthraquinones actives inhibent l'enzyme VIH-1 transcriptase inverse (Schinazi et *al.*, 1990).



#### I.1.3.2.3- Intérêts biologiques des coumarines

Les coumarines sont des molécules biologiquement actives. Elles manifestent diverses activités: anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique (Ochocka et *al.*, 1995; Taguchi et *al.*, 2000; Ojala et *al.*, 2000; Chen et *al.*, 2004; Khan et *al.*, 2005; Thati et *al.*, 2007; Stefanova et *al.*, 2007).

En 1957, O'Neal et son équipe ont montré l'efficacité des coumarines pour traiter le cancer induit chimiquement par les radiations ultraviolettes (Bouزيد, 2009). Ces molécules sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxydes (Bouزيد, 2009).

---

Les coumarines se révèlent être des composés thérapeutiquement promoteurs dans l'amélioration du système immunitaire (action immunostimulante): l'administration de la coumarine **26** et de l'ombelliférone **27** sur des malades atteints de cancers ou de brucellose a raison de 100 mg par jour a provoqué une augmentation des lymphocytes T Helper dans la circulation sanguine (Stefanova et *al.*, 2007; Bouzid, 2009).

Une étude, réalisée par Grawron et *al.* montre le potentiel carcinogène des coumarines. En effet, leur cytotoxicité a été observée vis à vis des cellules cancéreuses Héla-3, à une dose de 5µg/mL (Harkat, 2008).

Reddy et *al.* ont synthétisé une série de composés coumariniques dérivés de la 3-(*N*-aryl) carboxamide coumarine. Des études de cytotoxicité menées sur des cellules tumorales, ont clairement établi que ces composés empêchent de manière sélective la croissance des cellules cancéreuses (Harkat, 2008).

Une activité antifongique significative a également été reportée pour certaines coumarines. C'est le cas de la scopolétine **44** qui est également active contre les diabètes de types 1 et 2. Dans leurs études *in vitro*, Degre et son équipe ont montré que les coumarines paralysent la croissance de *Saccharomyces servisiae*. Pour l'activité antibactérienne, les coumarines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif (Cottiglia et *al.*, 2001; Khan et *al.*, 2005; Bouzid, 2009).

Après stimulation par des rayonnements ultra-violet de grande longueur d'onde (365 nm), certaines furanocoumarines ont la propriété de stimuler fortement la synthèse de mélanine par les mélanocytes cutanées, à travers une augmentation de leur activité mitotique. Cette propriété a été exploitée par les égyptiens pour le traitement de la dépigmentation (Bruneton, 1993). Il convient d'ajouter que les furanocoumarines sont impliquées dans bien d'autres mécanismes biologiques que nous ne pouvons décrire ici, mais qui constituent des pistes de recherches pour le traitement de maladies comme la sclérose en plaque et la dépression (Veselovskaya et *al.*, 2006).

C'est en raison des diverses utilisations médicales des plantes du genre *Pauridiantha*, d'une part, du fait que tous les documents publiés sur les plantes de ce genre datent de plus de deux décennies pour les plus récents, et de la rareté de l'espèce *Pauridiantha callicarpoides* au Cameroun, d'autre part, que nous avons entrepris les travaux chimiques sur cette espèce.

---

## **I.2- LE GENRE *ENTANDROPHRAGMA***

### **I.2.1- Aperçu botanique**

#### **I.2.1.1- Aperçu botanique sur les *Meliaceae*.**

Le nom de la famille “*Meliaceae*” vient du genre *Melia* (Berhaut, 1958). Cette famille regroupe principalement des arbres et des arbustes ou rarement des plantes herbacées qui appartiennent à l’ordre des Rutales. Les plantes de cette famille se trouvent en général dans les régions tropicale et subtropicale, précisément dans les forêts ouest-africaines (Berhaut, 1958; Watson et Dallwitz, 1992).

La famille des *Meliaceae* compte environ 1400 espèces réparties en 51 genres (Watson et Dallwitz, 1992). Parmi les genres les plus rencontrés, nous citons: *Melia*, *Carapa*, *Ekebergia*, *Toona*, *Khaya* et *Entandrophragma* (Watson et Dallwitz, 1992) qui a fait l’objet de notre étude.

#### **I.2.1.2- Aperçu botanique sur le genre *Entandrophragma*.**

Le genre *Entandrophragma* est limité à l’Afrique tropicale. Il est constitué des espèces de grandes tailles, pouvant atteindre 40 à 50 m de haut et exceptionnellement 60 m. Le tronc a un diamètre d’environ 2 m (Nsiamana, 2008).

Les feuilles caduques sont pennées, avec 5 à 9 paires de folioles. Chaque foliole a 8 à 10 cm de long avec une pointe acuminée. Les fleurs sont produites en inflorescences lâches, chaque petite fleur avec cinq pétales jaunâtres d’environ 2 mm de long, et dix étamines. Les anthères sont presque attachées sur le tube de l’étamine et sont supportées par la pointe de celle-ci (Nsiamana, 2008).

Le fruit est une capsule de cinq valves contenant de nombreuses graines ailées (Nsiamana, 2008).

Le genre *Entandrophragma* renferme 14 espèces environ parmi lesquelles 5 identifiées au Cameroun (Aubreville, 1950; Letouzey, 1985):

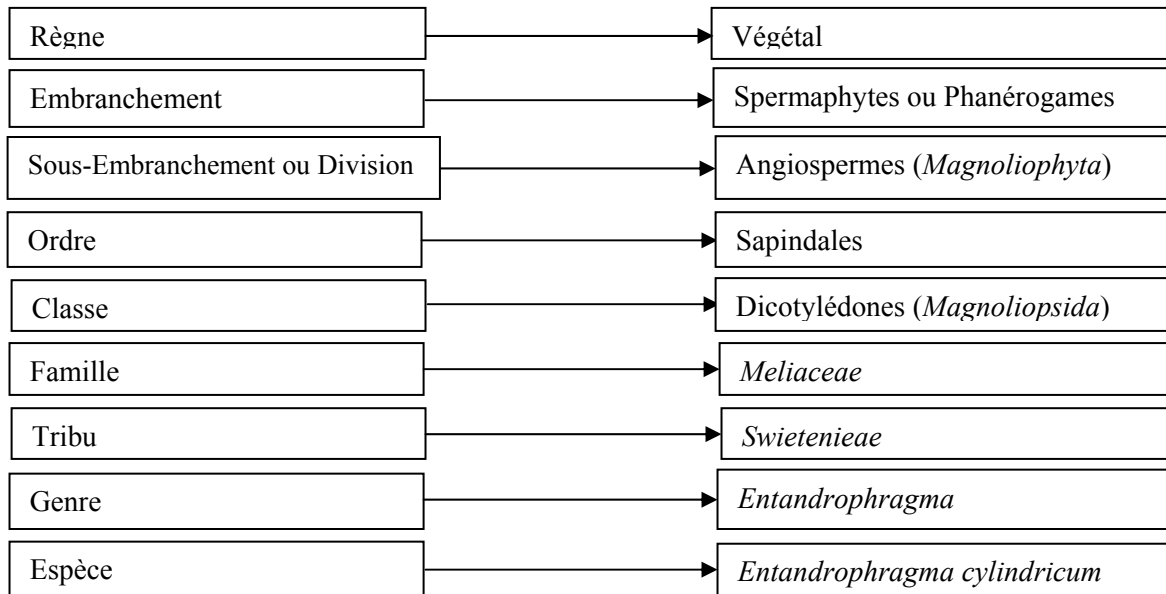
- *Entandrophragma angolense* Welwitsch C.D.C
- *Entandrophragma candollei* Harms
- *Entandrophragma congolense* H. Chev
- *Entandrophragma utile* (Dawe & Sprague) Sprague.
- *Entandrophragma cylindricum* Sprague.

Cette dernière espèce à savoir *Entandrophragma cylindricum* Sprague est celle sur laquelle nous nous sommes particulièrement attardés.

### I.2.1.3- Aperçu botanique de *Entandrophragma cylindricum*

#### I.2.1.3.1- Position systématique

La position systématique de *Entandrophragma cylindricum* selon la classification classique est donnée par la figure 4 suivante (Hawthorne, 1998; Louppe et *al.*, 2008).



**Figure 4:** Position systématique de *Entandrophragma cylindricum*

#### I.2.1.3.2- Description et répartition géographique de *Entandrophragma cylindricum*

*E. cylindricum* est un grand arbre caducifolié, dioïque, atteignant 55 à 65 m de haut. Le fût est dépourvu de branches jusqu'à une hauteur pouvant atteindre 40 m, rectiligne et cylindrique avec jusqu'à 200 à 280 cm de diamètre; à contreforts bas, obtus, pouvant atteindre 2 m de haut et rarement 4 m (Louppe et *al.*, 2008). La surface de l'écorce du gris argenté au brun grisâtre ou brun jaunâtre, devient irrégulièrement écaillée. Le bois de cœur est brun rosé sur une coupe fraîche, fonçant au brun rougeâtre ou au brun pourpre une fois exposé à l'air (Mensbruge, 1966; Louppe et *al.*, 2008).

Les jeunes rameaux à pubescence courtes sont brunâtres, marqués de lenticelles (Mensbruge, 1966; Louppe et *al.*, 2008).

Les feuilles sont alternes, groupées à l'extrémité des rameaux. Les pétioles de 5 à 13 cm de long, sont aplatis ou légèrement sillonnés et souvent ailés légèrement à la base. Les pédoncules ont 1 à 6 mm de long, les folioles opposées à alternes (Louppe et *al.*, 2008).

Les fleurs sont unisexuées, petites et régulières, de couleur jaune-vert. Le calice en coupe, est lobé jusqu'à près de la moitié. Les pétales sont libres et ovales. Les étamines sont soudées et ont 10 anthères. Les arbres commencent à fleurir vers l'âge de 35-45 ans et peuvent atteindre 500 ans, voire plus (Louppe et *al.*, 2008).

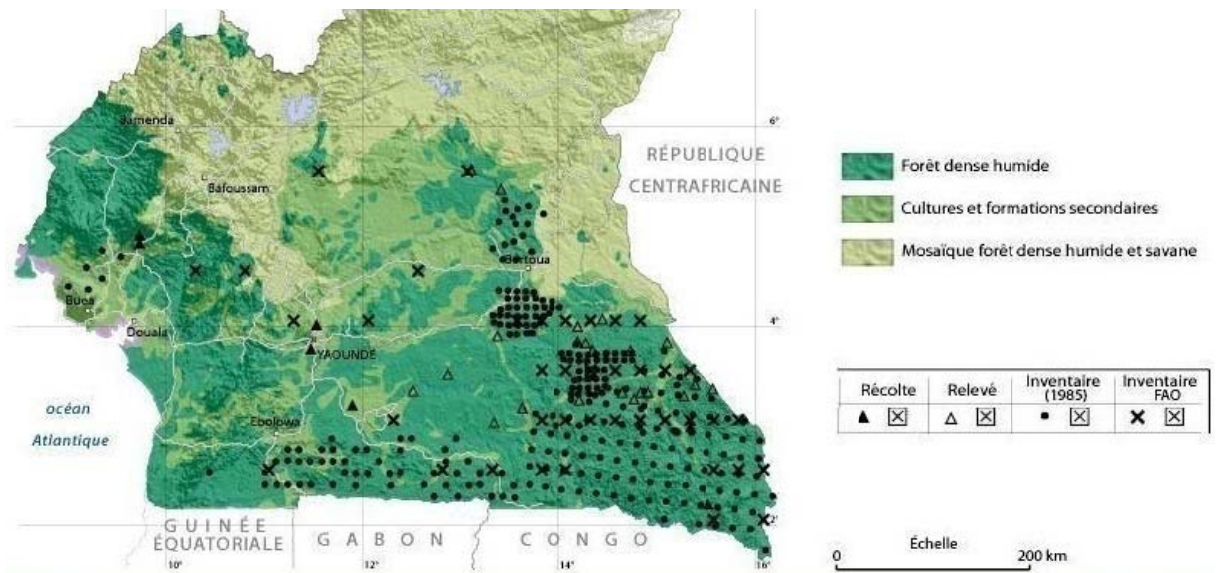
La production de fruits débute lorsque leur diamètre de fût atteint environ 50 cm (Louppe et *al.*, 2008). Les fruits sont sous forme de capsule retombante, cylindrique de 6 à 14 cm (voire 22 cm) de long, brune à noir pourpre et contenant jusqu'à 20 graines. La graine est de couleur brun pâle et de 6 à 11 cm de long (Louppe et *al.*, 2008).

*E. cylindricum* est une espèce des forêts tropicales humides, exploitée de façon sélective dans tout le bassin du Congo pour son bois rouge à très forte valeur commerciale (Hawthorne, 1998;). Cette espèce se développe dans les forêts ouest-africaines, allant de la Côte-d'Ivoire, le long du Golfe de Guinée, jusqu'au Cameroun et de la région de l'estuaire de la République Démocratique du Congo (R.D.C.) à l'Ouganda. On en trouve également dans les forêts à l'Ouest de la Sierra Léone (Chudnoff, 1984; Hawthorne, 1998; Louppe et *al.*, 2008).

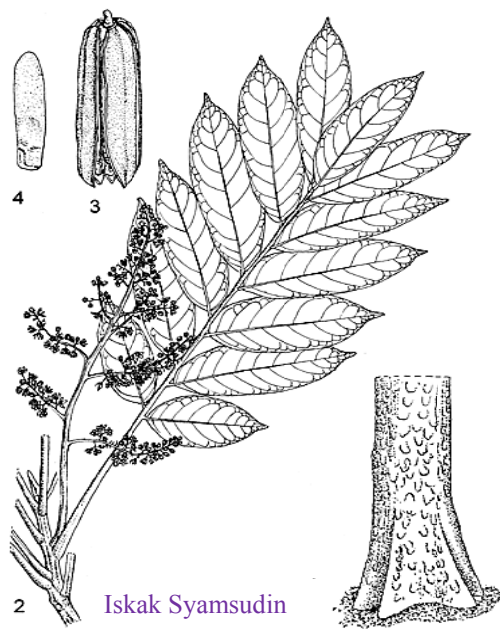
La répartition géographique de *E. cylindricum* est donnée par le tableau IV pour ce qui est de l'Afrique et la figure 5 pour le Cameroun. De même, les figures 6 et 7 présentent les photos des parties de la plante et de la plante entière.

**Tableau IV:** Distribution de *E. cylindricum* en Afrique (USDA-ARS, 2015).

Région africaine	Pays
Afrique Tropicale Est	Ouganda
Afrique Tropicale Centrale-Ouest	Cameroun, République Centrafricaine, Congo, Zaïre
Afrique Tropicale Ouest	Côte d'Ivoire, Ghana, Nigeria, Sierra Leone, Togo
Afrique Tropicale Sud	Angola (Cabinda)



**Figure 5:** Répartition de *E. cylindricum* au Cameroun (Guillaumet et al., 2010).



1= base du fût; 2= rameau en fleurs;  
3= fruit; 4= graine (Louppe et al., 2008)



Guide de la récolte (Sédar MAMALEKE)  
au pied de l'arbre

**Figure 6:** Photo de quelques parties de *E. cylindricum*



**Figure 7:** Photo de l'écorce du tronc fraîchement prélevée de *E. cylindricum*

### I.2.1.3.3- Synonyme et nom vernaculaire

*E. cylindricum* Sprague selon certaines sources, est appelé *Pseudocedrela cylindrica* Sprague (USDA-ARS, 2015). Il est connu sous plusieurs appellations et ceci selon les pays (Tableau V).

**Tableau V:** Principales appellations de *E. cylindricum* (Chudnoff, 1984; [www.forestmaine.com](http://www.forestmaine.com), 2012; USDA-ARS, 2015).

Pays	Appellations
Cameroun	Sapelli, Assie
Allemagne	Sapelli Mahogany
Ghana	Penkwa, Sapelewood
Nigeria	Sapele
Royaume Uni	
Angola	Undianuno
Congo	
Gabon	
Côte d'Ivoire	Aboudikro
Ouganda	Muyovu
R.C.A	M'boyu
R.D.C	Lifaki, Libuyu

---

## **I.2.2- Quelques usages des espèces du genre *Entandrophragma***

Les espèces du genre *Entandrophragma* sont largement utilisées sur le plan industriel et sur le plan thérapeutique.

### **I.2.2.1- Intérêt économique et industriel.**

Les Meliaceae en général et les espèces du genre *Entandrophragma* en particulier, sont d'une grande importance. En effet, leurs bois sont utilisés en ébénisterie (meubles de luxe), en menuiserie (externe et interne). Ils sont généralement commercialisés sous les noms de "sapeli", "sapele", "aboudikro" ou "assié" et sont particulièrement prisés pour la parqueterie, les meubles courants ou éléments, les boiseries intérieures, les lambris, les escaliers (internes). Le bois de *Entandrophragma* est aussi utilisé dans la fabrication des contreplaqués (intérieure, face ou contre-face), les instruments de musique, la sculpture. L'utilisation pour les placages, la construction navale, les charpentes légères, la fabrication des jouets et des pirogues est aussi mentionnée (Louppe et *al.*, 2008; [www.forestmaine.com](http://www.forestmaine.com), 2012).

### **I.2.2.2- Usages en pharmacopée traditionnelle.**

Les espèces du genre *Entandrophragma* sont d'un grand usage dans la médecine naturelle (Feuya, 2005).

En Afrique centrale, les écorces de *E. cylindricum* sont utilisées en pharmacopée traditionnelle sous forme de décoctées ou de macérées. Ces décoctions ou macérations d'écorces se prennent en cas de bronchite, d'affections pulmonaires, de rhumes, d'œdèmes et comme antalgique. La pulpe d'écorces est employée en usage externe sur les furoncles et les plaies (Louppe et *al.*, 2008)

Les écorces de *E. angolense* sont utilisées en Côte-d'Ivoire pour soigner la fièvre, et au Nigéria pour traiter les ulcères gastriques (Tchouankeu, 1999).

Les écorces de *E. candollei* entrent dans une infusion employée au Sud Cameroun pour soigner la toux (Tchouankeu, 1999). Le jus de l'écorce s'emploie comme antalgique et le jus de l'écorce des racines s'applique sur les morsures de serpent (Louppe et *al.*, 2008).

Le jus de l'écorce de *E. utile* est utilisé pour traiter les maux d'estomac (ulcères gastriques) et les douleurs aux reins. On s'en frictionne pour soulager les rhumatismes et on l'emploie tant en



---

instillation oculaire en cas d'inflammation qu'en instillation auriculaire en cas d'otite. Le massage à base d'une macération d'écorces est réputé tonique et stimulant (Louppe et *al.*, 2008). L'écorce de *E. utile* sert à traiter le paludisme. Les feuilles de *E. utile* sont utilisées au Congo comme analgésiques et anti-inflammatoires (Tchouankeu, 1999).

La multiplicité des usages susmentionnés, serait à l'origine de la motivation de certains chercheurs à entreprendre de nombreux travaux chimiques sur les espèces du genre *Entandrophragma*.

### **I.2.3- Travaux chimiques et activités biologiques antérieurs sur le genre *Entandrophragma***

#### **I.2.3.1- Travaux chimiques antérieurs**

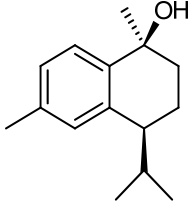
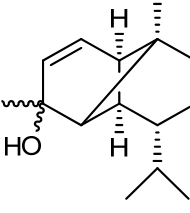
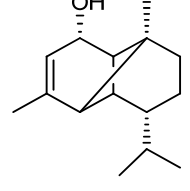
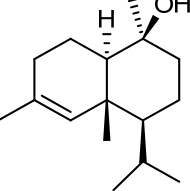
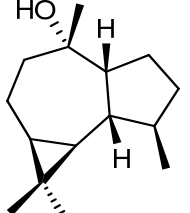
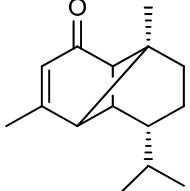
Plusieurs études chimiques ont été déjà effectuées sur le genre *Entandrophragma*. Ces travaux ont conduit à l'isolement et à la caractérisation de plusieurs métabolites secondaires appartenant principalement aux classes des huiles essentielles (sesquiterpénoïdes principalement), des alcaloïdes, des flavonoïdes, des triterpénoïdes et des stérols.

##### **I.2.3.1.1- Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants appartenant quasi exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiquement distinctes. Il s'agit du groupe des terpénoïdes d'une part et du groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part. Dans le cas particulier des huiles essentielles, seuls sont rencontrés les terpènes les plus volatils (ceux de masses moléculaires relativement moyennes) à savoir mono et sesquiterpènes (Bruneton, 1993; Fotso, 2009).

En effet, les sesquiterpènes sont des métabolites secondaires contenant 15 atomes de carbone. Ils dérivent de 3 unités isopréniques (Bruneton, 1999). Quelques sesquiterpènes isolés du genre *Entandrophragma* sont présentés dans le tableau VI suivant.

**Tableau VI:** Quelques sesquiterpénoïdes isolés du genre *Entandrophragma*

Noms	Structures	Sources	Références
10- $\beta$ -hydroxycalamènène <u>53</u>		Ecorces de <i>E. cylindricum</i>	(Daniewski et al., 1996)
4-hydroxycopa-2-ène <u>54</u>			
2- $\alpha$ -hydroxycopa-3-ène <u>55</u>			
T-cadinol <u>56</u>			
Ledol <u>57</u>			
Mustakon <u>58</u>			

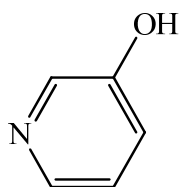
---

Les huiles essentielles ont des propriétés pharmacologiques très importantes:

- Antiseptiques: le pouvoir antiseptique s'exerce contre des bactéries pathogènes variées, incluses les souches habituellement antibiorésistantes. Elles sont également actives sur les champignons et les levures.
- Spasmolytiques et sédatives
- Irritantes qui justifient leur utilisation dans plusieurs pommades (Bruneton, 1993).

#### I.2.3.1.2- Les alcaloïdes

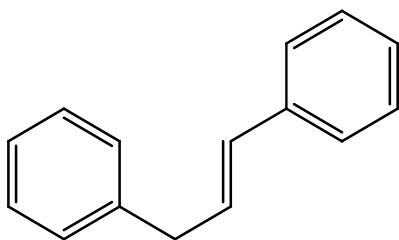
A notre connaissance, un seul alcaloïde a été jusqu'ici isolé du genre *Entandrophragma* et plus précisément de *E. cylindricum*. Il s'agit du 3-hydroxypyridine **59** (Tchouankeu, 1989).



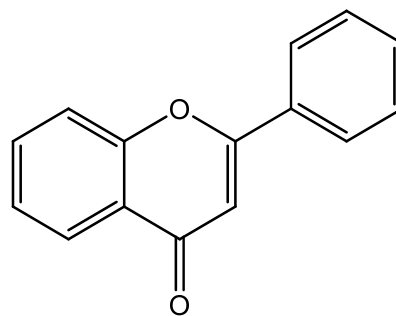
**59**

#### I.2.3.1.3- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une vaste classe de substances naturelles très répandue dans le règne végétal. Ils sont responsables de la coloration des fruits et des fleurs. Du point de vue structural, les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont le squelette carboné en C<sub>15</sub> est caractérisé par un enchaînement C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> correspondant soit à un diphenylpropane **60**, soit au phénylchromane **61** (Bruneton, 1993)



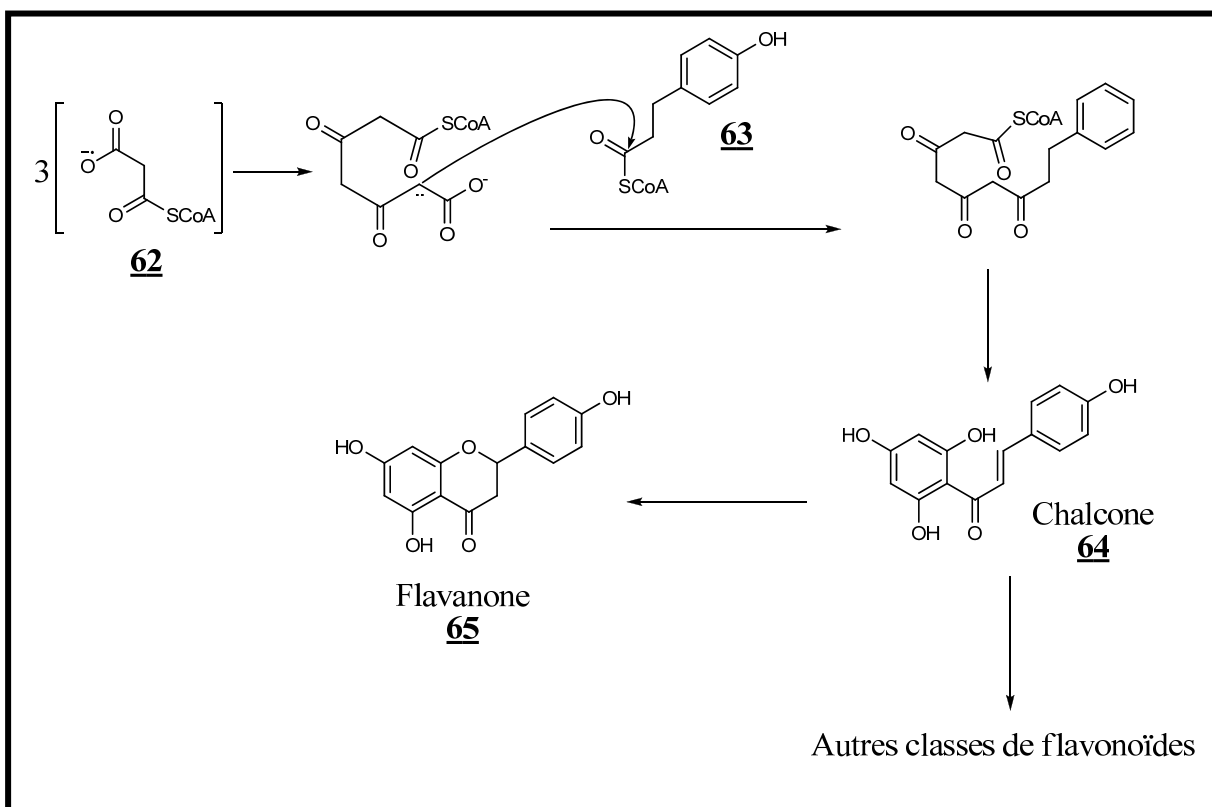
**60**



**61**

Leur biosynthèse est faite à partir d'un précurseur commun: la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone qui sous l'action d'enzymes est métabolisée en plusieurs classes de flavonoïdes. Cependant, des réactions telles que la cyclisation, l'acylation ou la glycosylation conduisent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent dans la plante (Goodwin, 1976; Kapche, 2008).

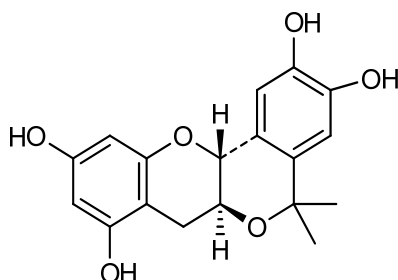
Biogénétiquement, l'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation catalysée par la chalcone synthétase de trois molécules de malonyl-CoA **62** avec un ester du coenzyme A et du *P*-coumaroyl-CoA **63**. Le produit de la réaction est une chalcone **64**. Il s'en suit la cyclisation de la chalcone catalysée par une enzyme, la chalcone isomérase, qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle (addition «*syn*» sur la double liaison *E*), conduisant à la seule (2*S*)-flavanone **65** (Bruneton, 1993). Le schéma suivant présente la biosynthèse des flavonoïdes.



**Schéma 2:** Biosynthèse des flavonoïdes

---

Jusqu'ici, un seul flavonoïde a été isolé de *E. cylindricum*. Il s'agit du (+)-7',7'-diméthyl-5-hydroxy-2*R*,3*S*-transpubéchine **66** (Ngnokam et al., 1994a).

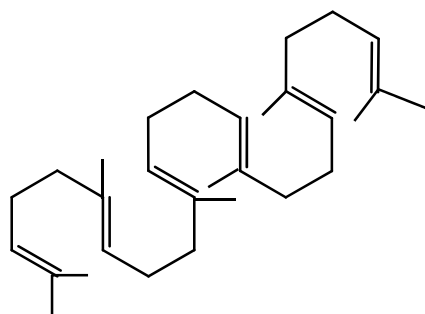


**66**

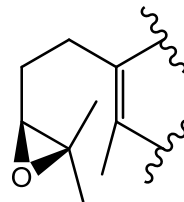
#### I.2.3.1.4- Les triterpénoïdes.

Compte tenu du fait que les triterpènes ont été isolés de *E. cylindricum* et aussi parce que nous y avons isolé d'autres, il est important que nous présentions une revue de la littérature sur cette classe de composé.

Les triterpénoïdes forment un vaste groupe de substances naturelles disséminées dans de nombreuses familles botaniques (Meliaceae, Rutaceae, Euphorbiaceae, Légumineuses, etc.). Leur squelette de base en C<sub>30</sub> résulte de la polycondensation de six unités isopréniques. Ils sont issus de la cyclisation du squalène **67** ou de l'isomère 3*S*-2,3-époxydo-2,3-dihydrosqualène **68**. La cyclisation de ce dernier conduit aux 3β-hydroxytriterpénoïdes qui par oxydation ou réduction peuvent se transformer en 3α-hydroxytriterpénoïdes (Bruneton, 1993; Bruneton, 1999).



**67**



**68**

Il existe des triterpènes polycycliques: il s'agit par exemple des triterpènes tétracycliques et des triterpènes pentacycliques tels que ceux des groupes lanostane **88**, ursane **87**, oléanane **84**,

---

friedelane **85**. Ceux-ci constituent les groupes les plus répandus dans les plantes. A ces deux groupes, nous ajoutons les triterpènes acycliques tels que le squalène **79**, qui n'ont pas subi de cyclisation au cours de leur biosynthèse. Ils constituent cependant la classe de composés majoritaires dans l'espèce *Entandrophragma cylindricum*.

#### **I.2.3.1.4.1- Biosynthèse des triterpénoïdes.**

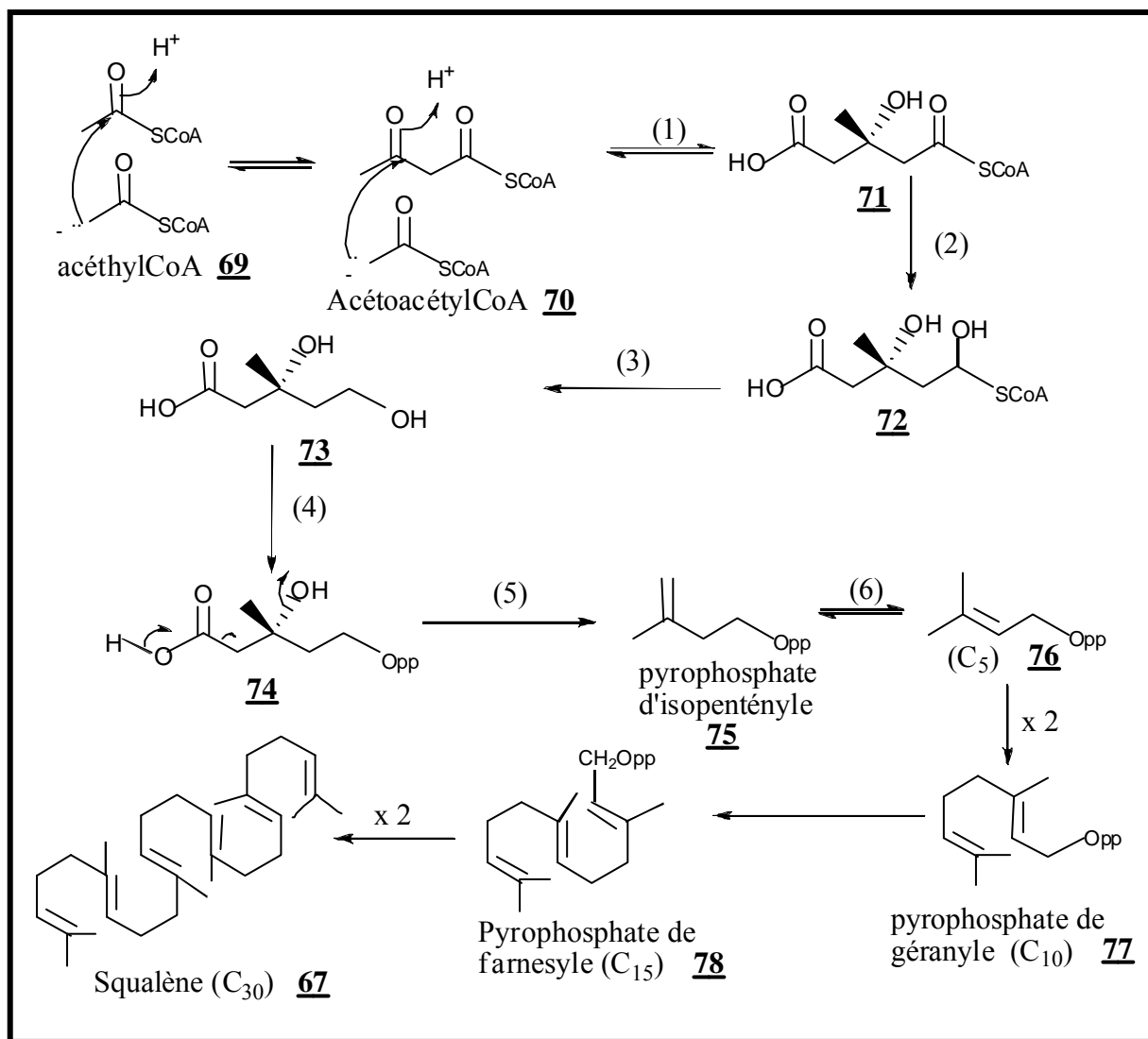
La biosynthèse des triterpènes se fait suivant deux étapes. La première étape constitue la voie mévalonique qui débute avec l'acétyl-CoA (qui est la forme biologiquement active de l'acide acétique) et qui conduit à la formation du 3-hydroxy-3-méthylbutaryl-SCoA **71**. Le composé **71** est successivement réduit par deux NADPH pour donner l'hémiacétal **72** puis l'acide 3-*R*-mévalonique **73**. Ce dernier traité avec deux molécules d'ATP, conduit à l'acide 5-pyrophosphate mévalonique **74**. La décarboxylation du composé **74** conduit au pyrophosphate d'isopentenyle **75**, géranyle **77** et de farnesyle **78**. La dimérisation de ce dernier conduit au squalène **67** (Tchouankeu, 1989; Tchuendem, 1997).

La deuxième étape de la biosynthèse est la cyclisation de l'isomère 3*S* du 2,3-époxy-2,3-squalène **68** ou du squalène pour donner un carbocation. Ce cation peut subir plusieurs modifications (migration 1,2 de protons et de méthyles) et selon la conformation de l'époxy-squalène on peut avoir deux possibilités:

- Si l'époxy-squalène est maintenu dans une conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation de type dammarane **79**. On peut ensuite assister soit à un élargissement du cycle D suivi de la formation d'un cycle supplémentaire, conduisant ainsi aux triterpènes pentacycliques (oléanes, ursanes, lupanes, friedelanes, taraxastanes, etc.), soit aux migrations concertées conduisant à l'euphol et au tirucallol précurseurs de limonoïdes et quassinoïdes. Le réarrangement conduit aussi aux composés tétracycliques dont le cycle D est hexacyclique.

- Si l'époxy-squalène est maintenu dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostane précurseur immédiat, par une suite de migrations 1,2 de protons et de méthyles, des cycloartanes et des cucurbitanes (Bruneton, 1993).

Les schémas 3 et 4 illustrent respectivement la biosynthèse du squalène et les interconversions dans la série des triterpènes pentacycliques.



- (1) = HMG. CoA synthétase  
 (2) = NADPH, HMG. CoA réductase  
 (3) = NADPH

- (4) = 2 ATP  
 (5) = ATP, - CO<sub>2</sub>  
 (6) = Isomérase

**Schéma 3:** Biosynthèse du squalène

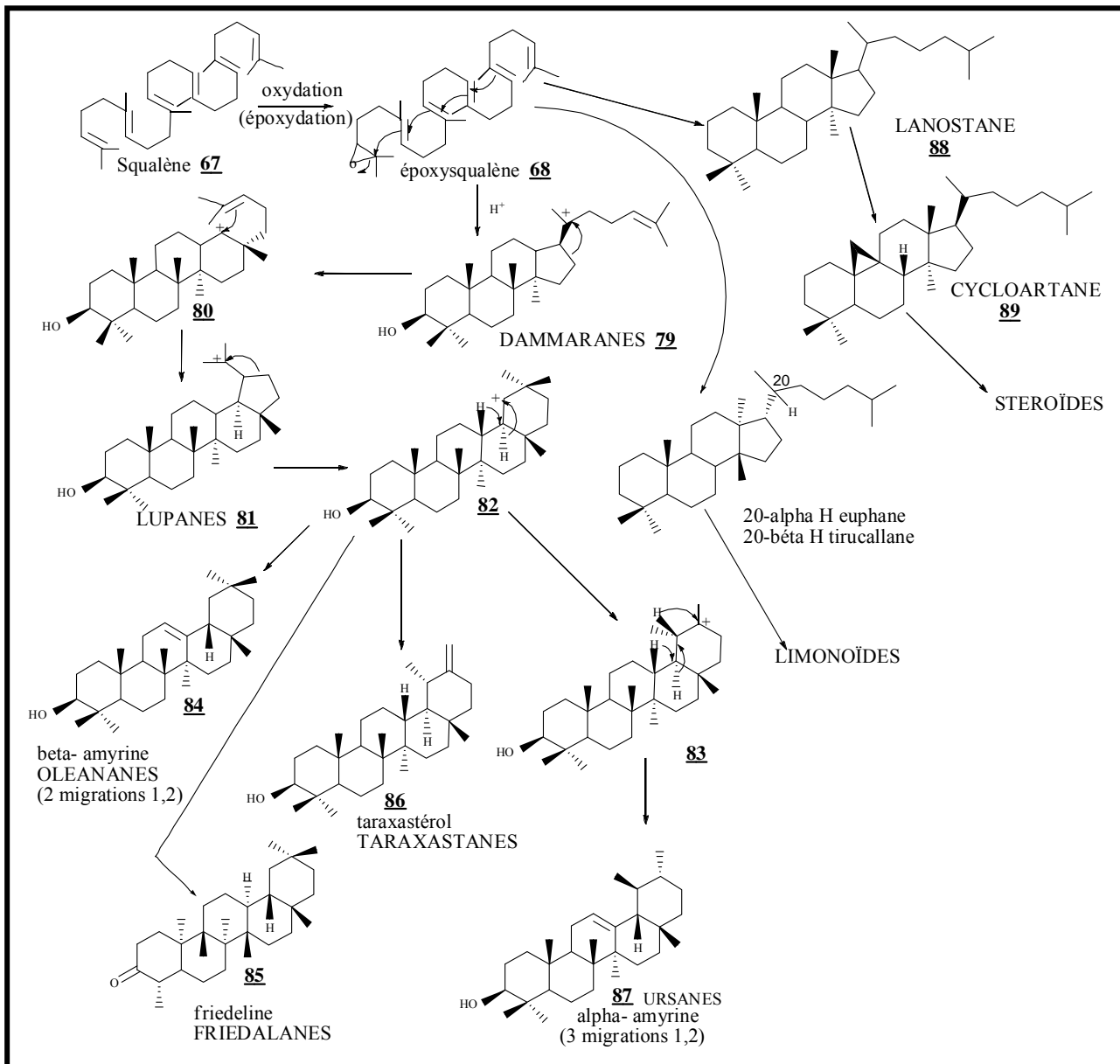


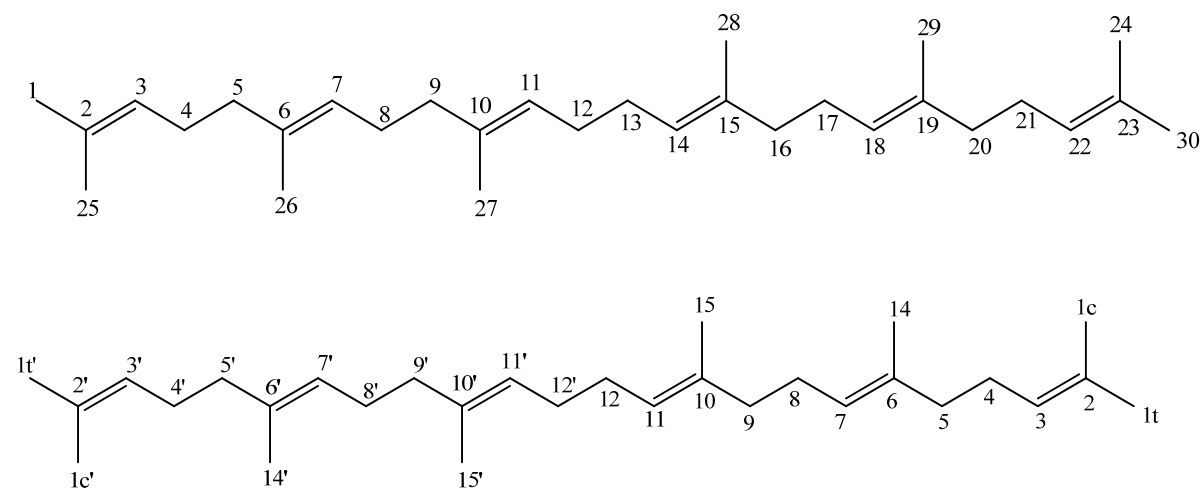
Schéma 4: Biosynthèse des triterpénoïdes et des stéroïdes



---

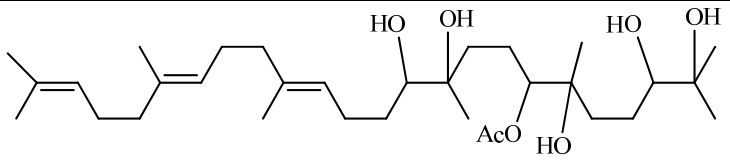
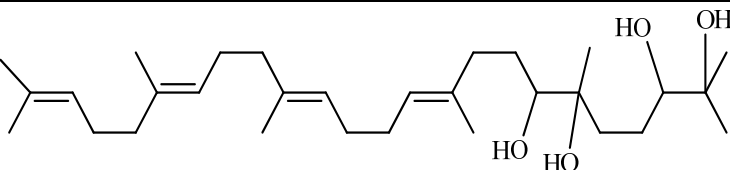
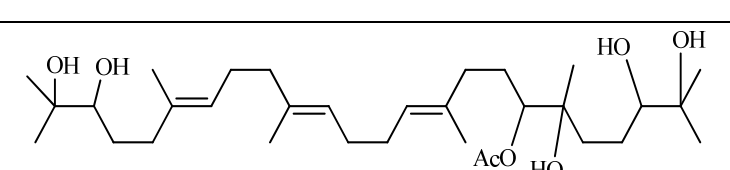
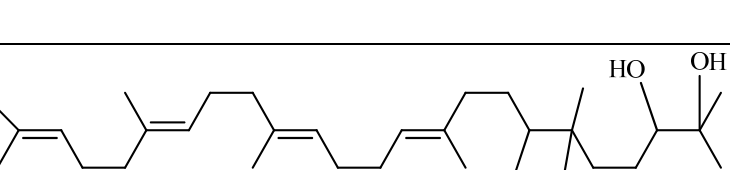
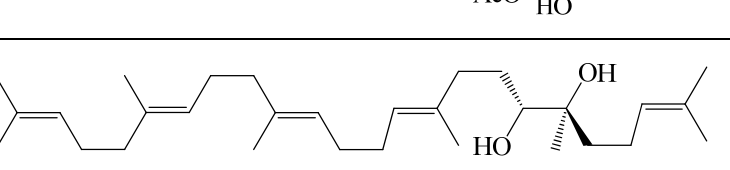
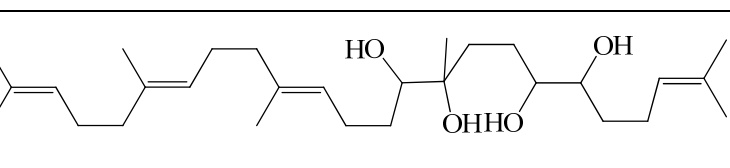
### I.2.3.1.4.2- Les triterpénoïdes acycliques ou linéaires.

Les triterpénoïdes acycliques ou linéaires sont des dérivés linéaires du squalène. La chaîne carbonée a subi quelques modifications. Le squelette carboné des triterpènes acycliques avec les deux numérotations des carbones est le suivant (Bruneton, 1999):



Les études phytochimiques du genre *Entandrophragma* ont permis d'isoler quelques triterpénoïdes acycliques regroupés dans le tableau suivant.

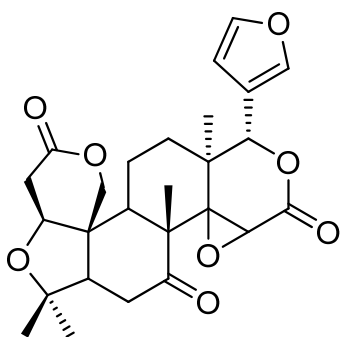
**Tableau VII:** Les triterpénoïdes linéaires isolés du genre *Entandrophragma*

Noms	Structures	Sources	Références
Sapelenine A <b>90</b>		Ecorces de <i>E.</i> <i>cylindricum</i>	(Ngnokam et al., 1993)
Sapelenine B <b>91</b>			
Sapelenine C <b>92</b>			
Sapelenine D <b>93</b>			(Ngnokam et al., 1995)
Sapelenine E <b>94</b>			(Ngnokam et al., 2005)
Sapelenine F <b>95</b>			

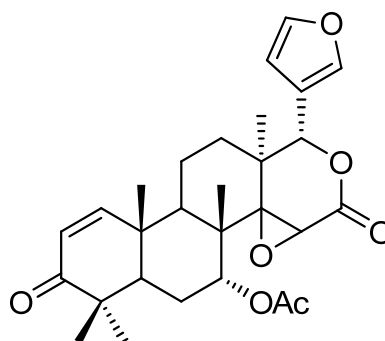
#### I.2.3.1.4.3- Les triterpénoïdes tétracycliques

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Entandrophragma* ont permis d'isoler les triterpénoïdes tétracycliques et particulièrement les limonoïdes. Ces derniers constituent le groupe de métabolites secondaires le plus souvent rencontrés dans la famille des Meliaceae dont ils sont caractéristiques, d'où l'appellation «Méliacines» (Feuya, 2005).

Les limonoïdes constituent une vaste classe de triterpènes tétracycliques dont la chaîne latérale, amputée de quatre atomes de carbone, a été cyclisée en furane. Le nom limonoïde dérive de la limonine **96** qui en est le premier composé, isolé de *Citrus limonin* (Rutaceae) et dont la structure a été déterminée en 1960 (Arigoni et al., 1960). Le premier limonoïde des Meliaceae est la gédunine **97**, isolée de *Entandrophragma angolense* (Adesida et Taylor, 1967).



**96**



**97**

#### I.2.3.1.4.3.1- Biosynthèse et biogénèse des limonoïdes.

Les limonoïdes dérivent biogénétiquement soit de l'euphol **98**, soit du tirrucallol **99**, deux triterpènes tétracycliques, par perte de quatre atomes de carbone sur la chaîne latérale, puis cyclisation de celle-ci pour donner un cycle furanne. Le méthyle en C-14 migre en C-8 et un atome d'oxygène se fixe en C-7 (Feuya, 2005) (schéma 4). Cet intermédiaire **100** subit des modifications pour donner de nouveaux groupes de limonoïdes **101** ou des quassinoïdes **102** (Feuya, 2005).

Bien que cette biogénèse ne soit pas encore bien établie, celle élaborée jusqu'alors est suffisamment étayée par les intermédiaires isolés des Meliaceae, intermédiaires qui sont des triterpènes soit en C<sub>30</sub> appelés protolimonoïdes, soit en, C<sub>26</sub>, C<sub>25</sub> ou C<sub>24</sub>, appelés furannoïdes ou respectivement tétranor, pentanor et hexanortriterpénoïdes. Les noms précédents sont en rapport avec le nombre d'atomes de carbone perdus par le squelette triterpénique de base en C<sub>30</sub> (Feuya, 2005).

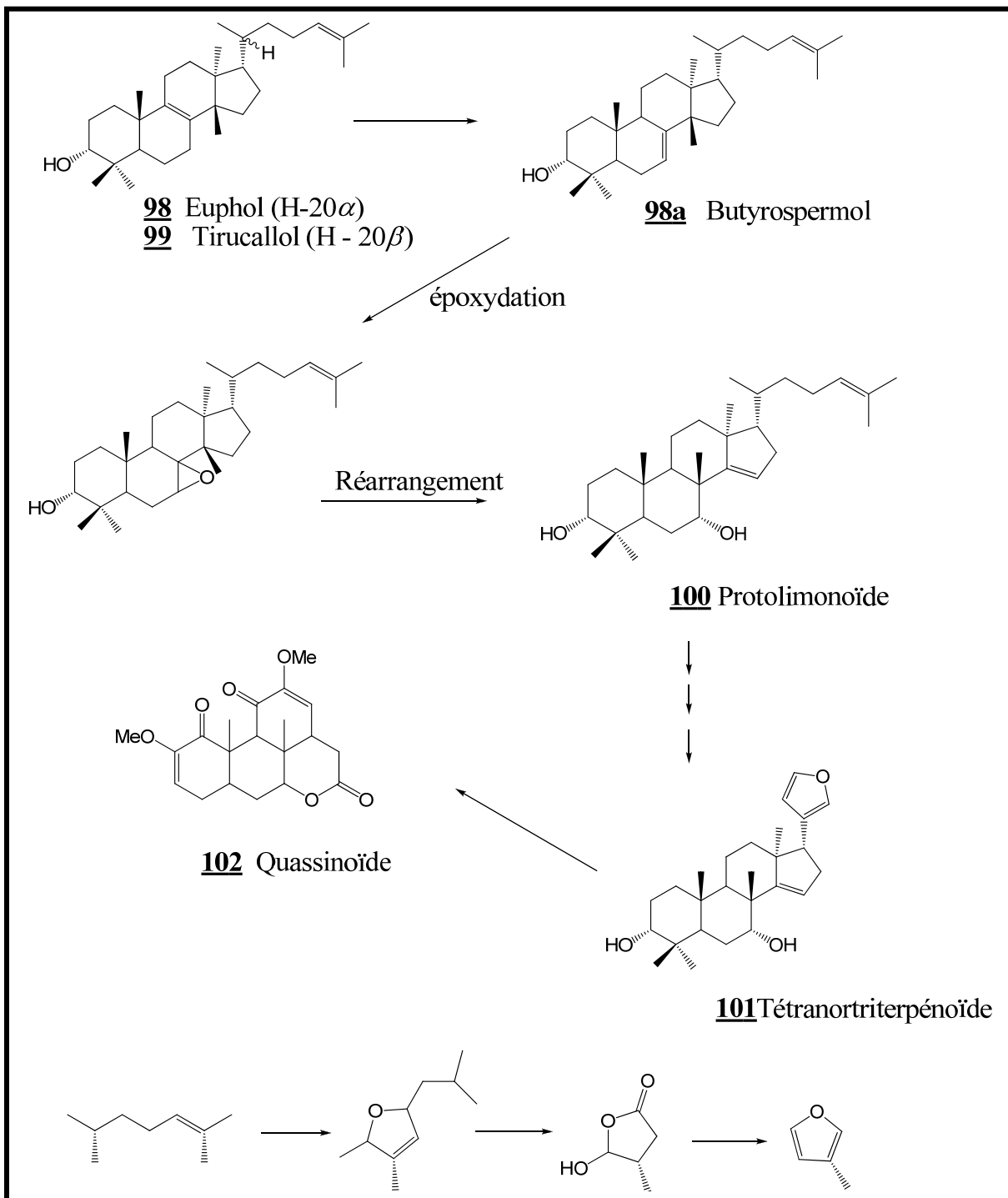


Schéma 5: Biosynthèse des limonoïdes

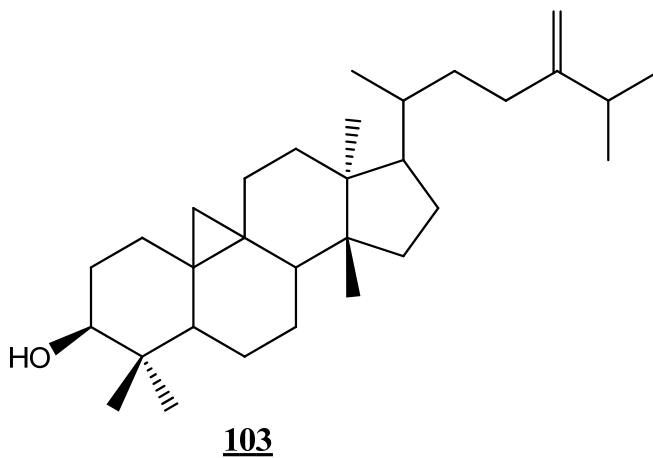
---

Suivant leurs origines biogénétiques et le nombre d'atomes de carbone que comportent leurs squelettes, les limonoïdes sont généralement classés en deux groupes: les furannoïdes et les non furannoïdes.

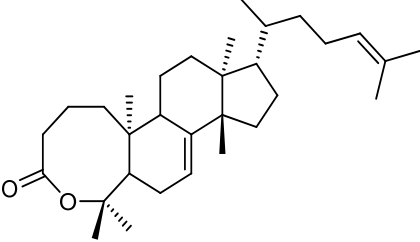
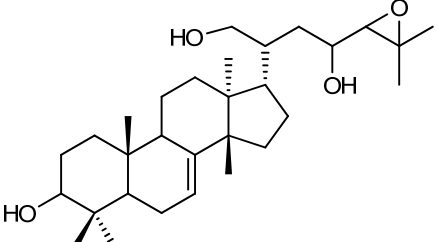
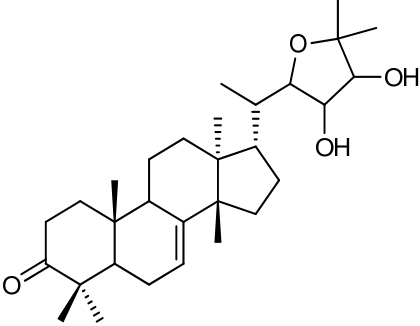
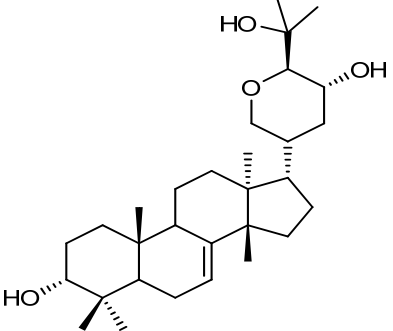
#### **I.2.3.1.4.3.2- Les non furannoïdes ou les protolimonoïdes.**

Les non furannoïdes ou les protolimonoïdes sont des triterpènes tétracycliques polyoxygénés dont le squelette comporte 30 atomes de carbone, à chaînes latérales non cyclisées, ou transformées en tout autre cycle que celui du furane. Ils comportent tous un atome d'oxygène intracyclique. Leur particularité structurale comparée à celles des intermédiaires isolés dans les Meliaceae permet de les considérer comme les précurseurs des limonoïdes (Feuya, 2005).

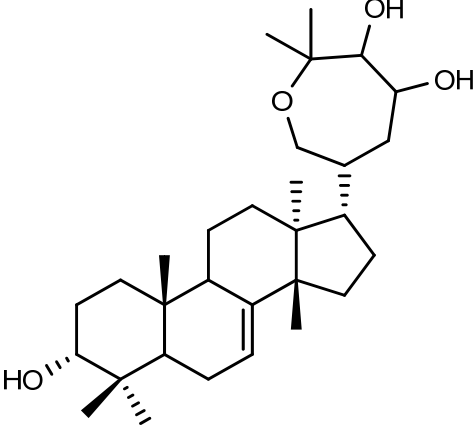
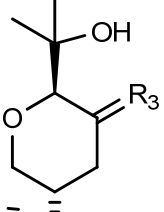
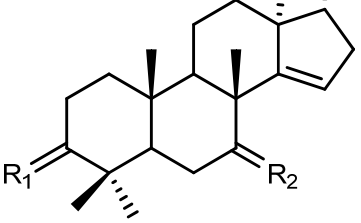
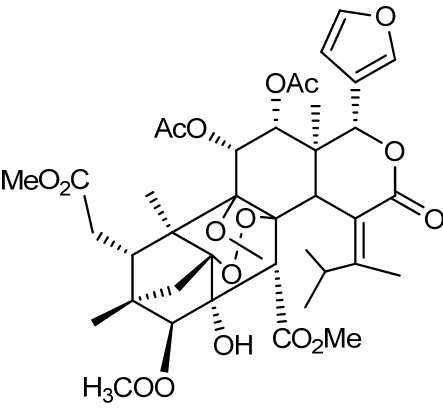
Les travaux chimiques effectués sur le genre *Entandrophragma* ont permis d'isoler en plus du 24-méthylène cycloartenol **103** un triterpène tétracyclique non limonoïdique isolé des écorces du tronc de *E. angolense* (Tchouankeu et *al.*, 1992, Bickii et *al.*, 2007), quelques protolimonoïdes qui sont regroupés dans le tableau VIII suivant.



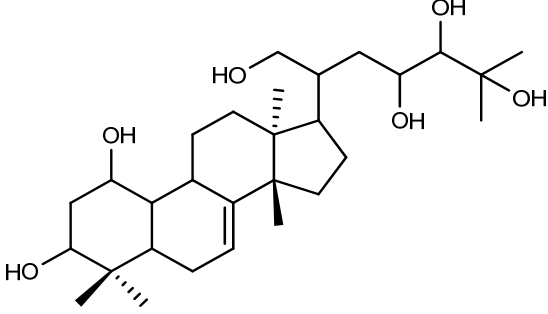
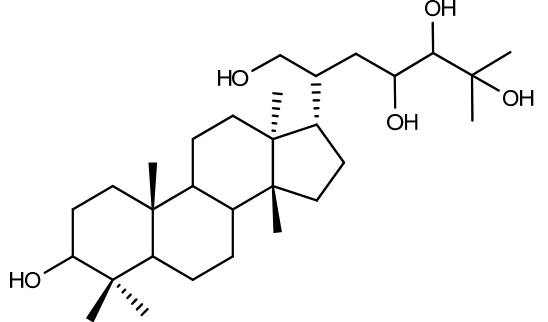
**Tableau VIII:** Les protolimonoïdes isolés du genre *Entandrophragma*

Noms	Structures	Sources	Références
<p>Entandrolide <b><u>104</u></b></p>		<p>Graines de <i>E. angolense</i></p>	<p>(Okorie et Taylor, 1977)</p>
<p>Entandrophragmatriol <b><u>105</u></b></p>		<p>Graines de <i>E. utile</i></p>	<p>(Okorie et Taylor, 1977)</p>
<p>Odoratone <b><u>106</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E. candollei</i></p>	<p>(Tchouankeu et al., 1988)</p>
<p>Sapeline A <b><u>107</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. cylindricum</i></p>	<p>(Chan et al., 1970)</p>

**Tableau VIII:** Les protolimonoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite)

<p>Sapeline B <b><u>108</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. cylindricum</i></p>	<p>(Chan et al., 1970)</p>
<p>Sapeline C <b><u>109</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. cylindricum</i></p>	<p>(Chan et al., 1971)</p>
<p>Spicatine <b><u>110</u></b></p>	 <p><b><u>109</u></b> R<sub>1</sub> = O, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H, alpha-OH <b><u>110</u></b> R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=O, R<sub>3</sub> = H, alpha-OH</p>	<p>Graines de <i>E. spicatum</i></p>	<p>(Connolly et al., 1981)</p>
<p>Sapeline D <b><u>111</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. cylindricum</i></p>	<p>(Chan et al., 1971)</p>

**Tableau VIII:** Les protolimonoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite et fin)

<p>Sapeline E <b><u>112</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. cylindricum</i></p>	<p>(Chan et <i>al.</i>, 1971)</p>
<p>Sapeline F <b><u>113</u></b></p>			

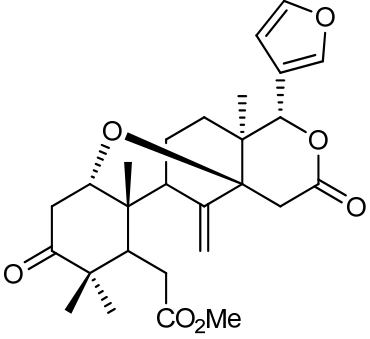
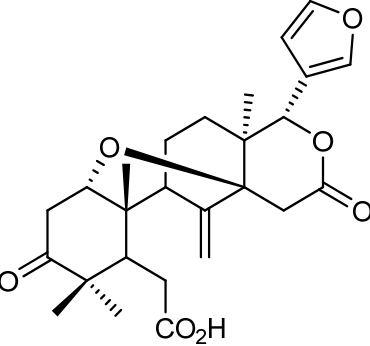
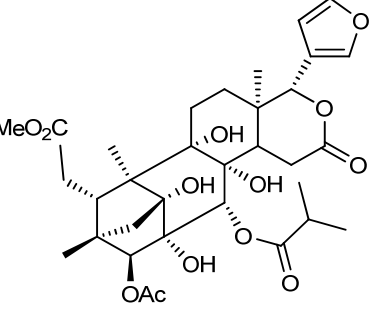
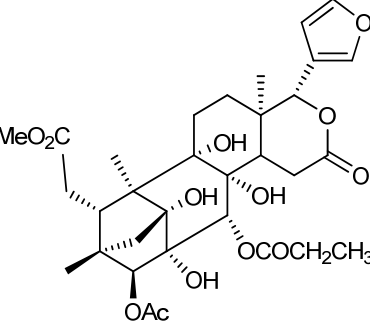
#### I.2.3.1.4.3.3- Les furannoïdes

Ils constituent le groupe le plus important des composés isolés des Meliaceae. Ils sont des triterpènes tétracycliques dégradés suite aux modifications des cycles A, B, C et D du squelette triterpénique et ils contiennent un furane attaché au carbone-17. Ils sont classés suivant les modifications observées sur les cycles A, B, C et D; mais aussi suivant le nombre d'atomes de carbone que comporte le squelette (Feuya, 2005).

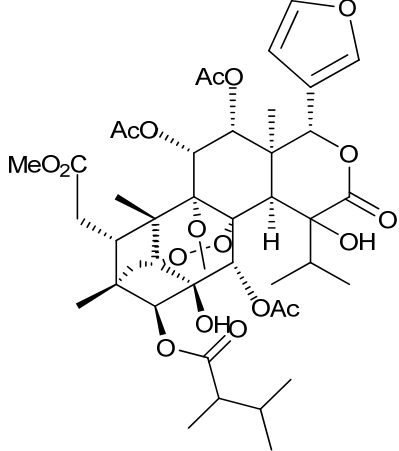
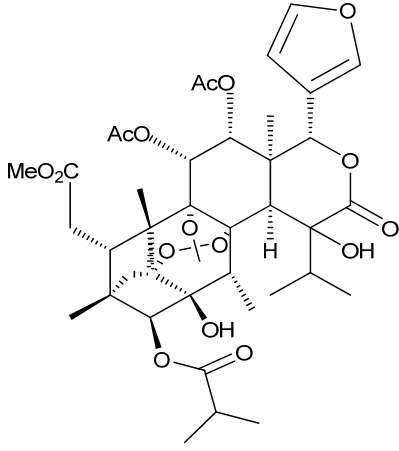
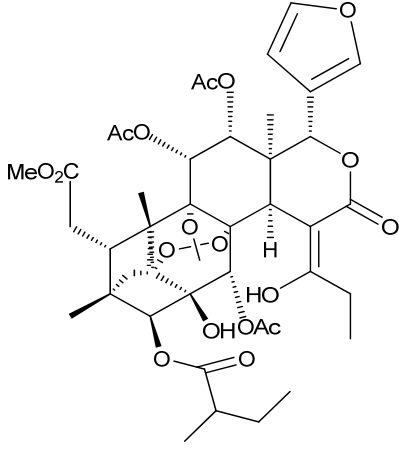
Le tableau IX regroupe quelques furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma*.



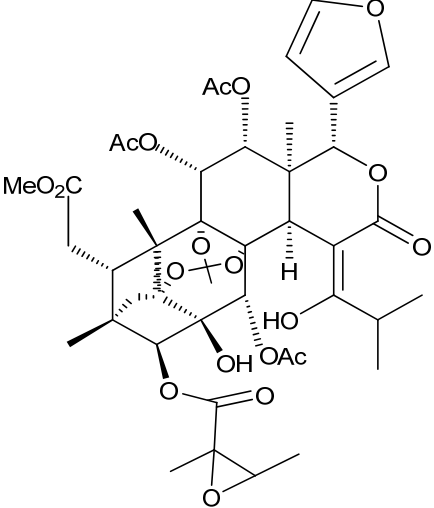
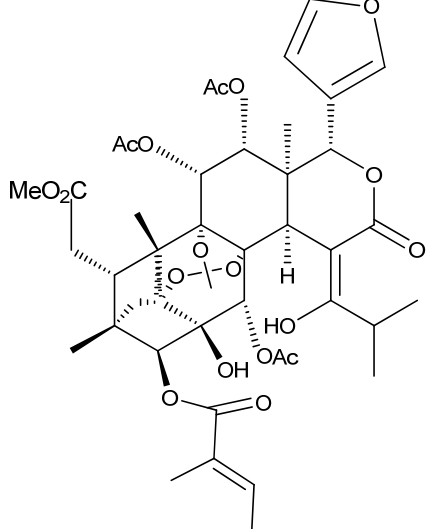
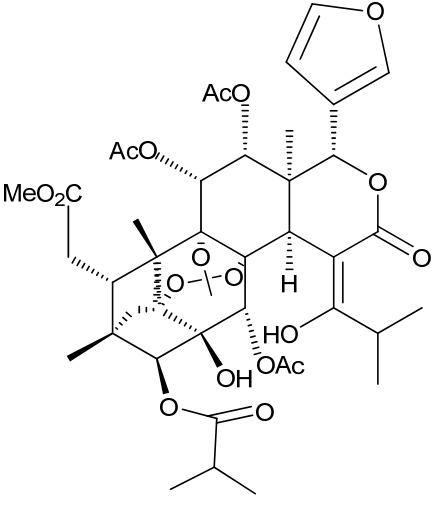
**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma*

Noms	Structures	Sources	Références
<p>Angolensate de méthyle <b><u>114</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. angolense</i>  Bois de <i>E. utile</i></p>	<p>(Chan et al., 1970)</p>
<p>Acide angolensique <b><u>115</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. angolense</i></p>	<p>(Bickii et al., 2007)</p>
<p>Atomasine A <b><u>116</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E. candollei</i></p>	<p>(Tchouankeu et al., 1989)</p>
<p>Atomasine B <b><u>117</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E. candollei</i></p>	<p>(Tchouankeu et al., 1989)</p>

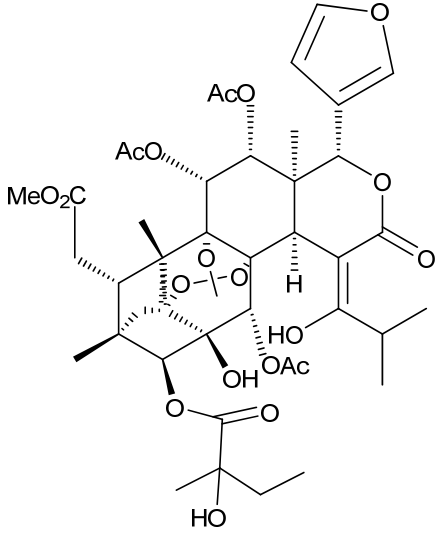
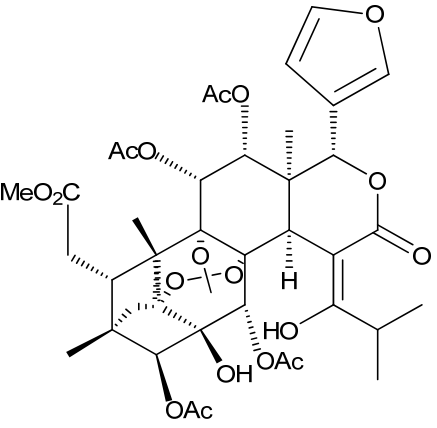
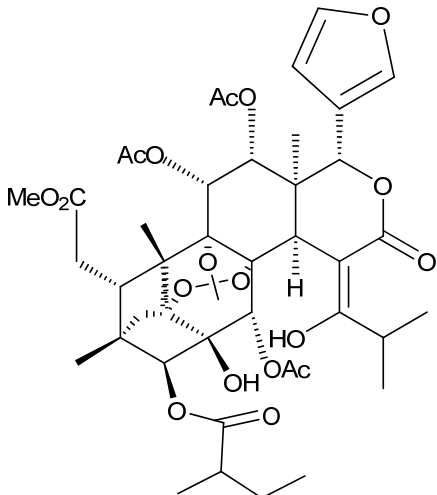
**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite)

<p>Busséine A</p> <p><b><u>118</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. bussei</i></p>	<p>(Hänni et Tamm, 1972; Nsiama, 2008)</p>
<p>Busséine B</p> <p><b><u>119</u></b></p>			<p>(Nsiama, 2008)</p>
<p>Busséine C</p> <p><b><u>120</u></b></p>			

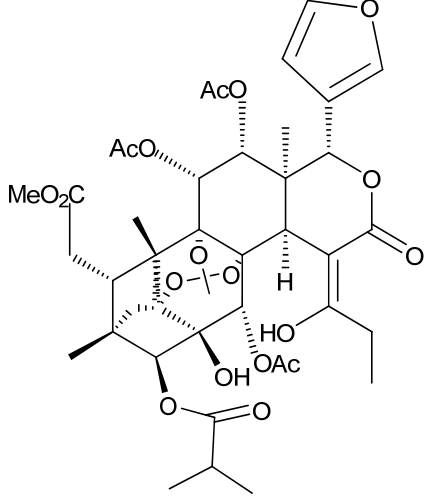
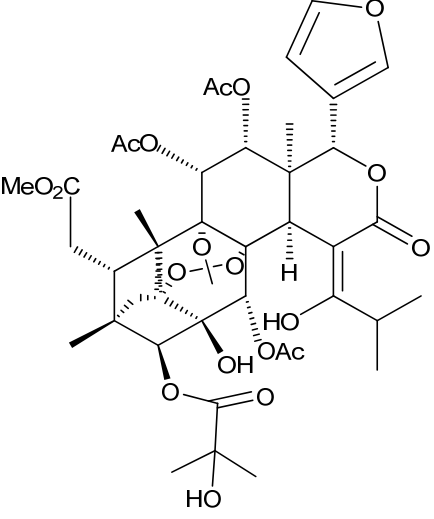
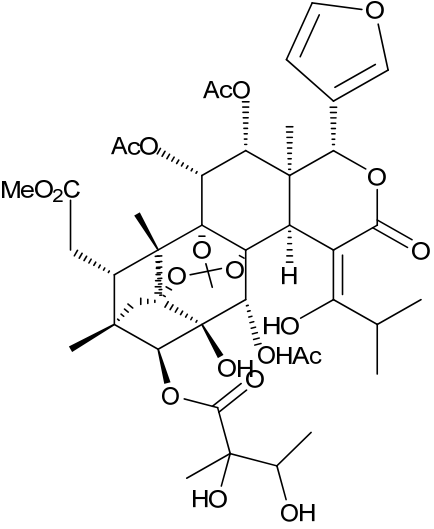
**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite)

<p>Busséine D</p> <p><b><u>121</u></b></p>			
<p>Busséine E</p> <p><b><u>122</u></b></p>		<p>Bois de <i>E.</i> <i>bussei</i></p>	<p>(Nsiama, 2008)</p>
<p>Busséine F</p> <p><b><u>123</u></b></p>			

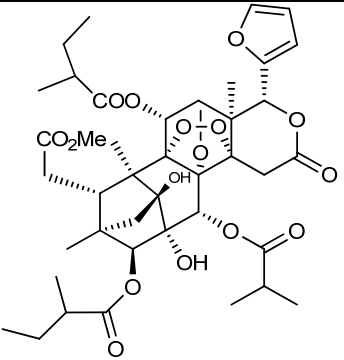
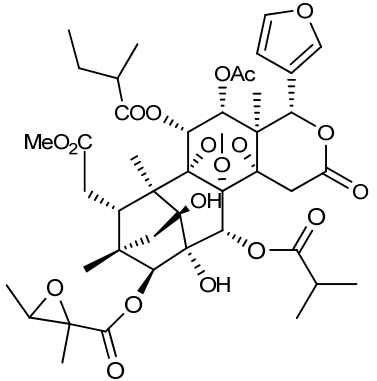
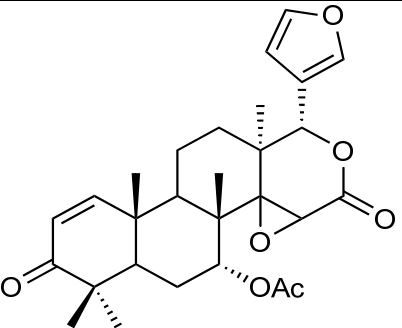
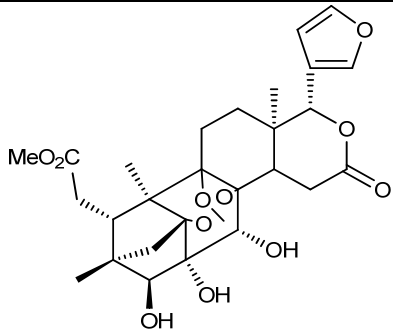
**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite)

<p>Busséine G <b><u>124</u></b></p>			
<p>Busséine H <b><u>125</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. bussei</i></p>	<p>(Nsiam, 2008)</p>
<p>Busséine J <b><u>126</u></b></p>			

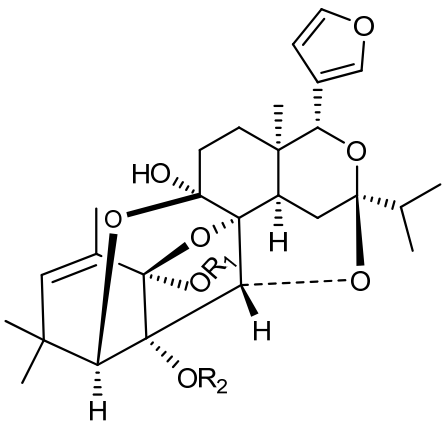
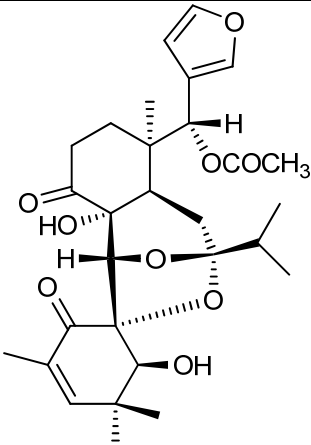
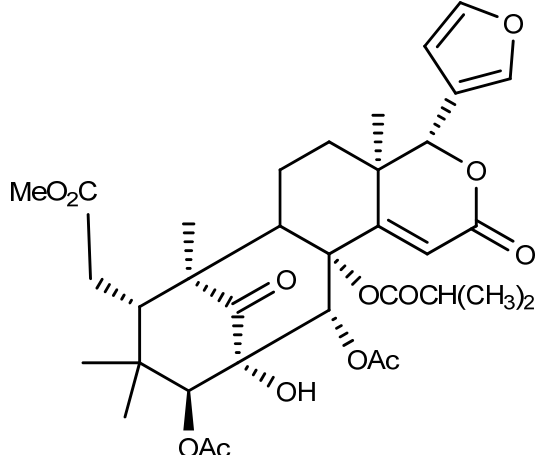
**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite)

<p>Busséine K <b><u>127</u></b></p>			
<p>Busséine L <b><u>128</u></b></p>		<p>Bois de <i>E. bussei</i></p>	<p>(Nsiama, 2008)</p>
<p>Busséine M <b><u>129</u></b></p>			

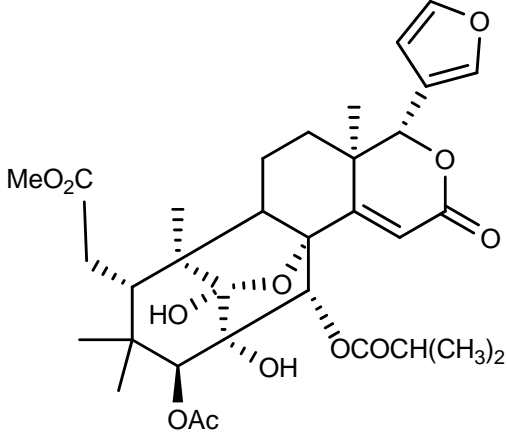
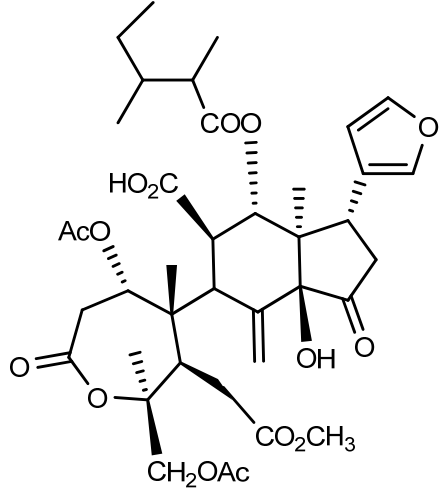
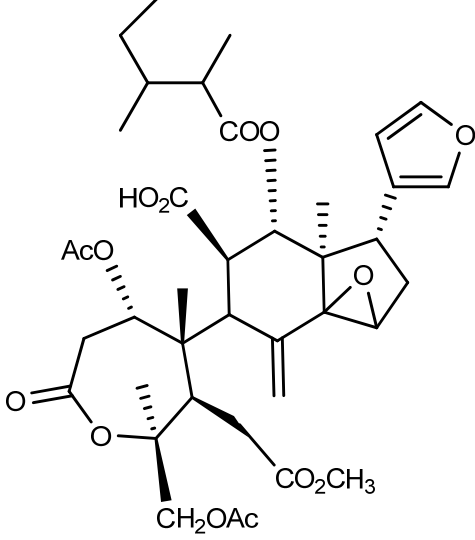
**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite)

<p>Candolleine <b><u>130</u></b></p>		<p>Bois et écorces de <i>E. candollei</i></p>	<p>(Adesida et Taylor, 1967)</p>
<p>Entandrophragmine <b><u>131</u></b></p>		<p>Bois de <i>E.</i> <i>spicatum</i></p>	<p>(Chan et <i>al.</i>, 1970)</p>
		<p>Bois de <i>E.</i> <i>caudatum</i></p>	<p>(Arndt et Baachers, 1972)</p>
<p>Gédunine <b><u>97</u></b></p>		<p>Bois de <i>E.</i> <i>angolense</i></p>	<p>(Adesida et Taylor, 1967)</p>
<p>Phragmaline <b><u>132</u></b></p>		<p>Bois de <i>E.</i> <i>caudatum</i></p>	<p>(Arndt et Baachers, 1972)</p>

**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite)

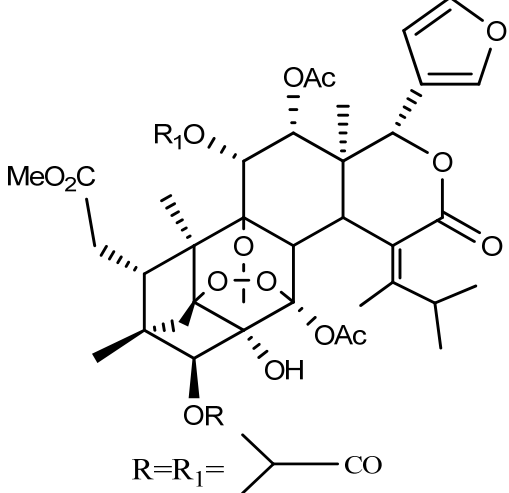
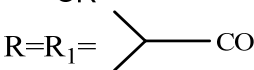
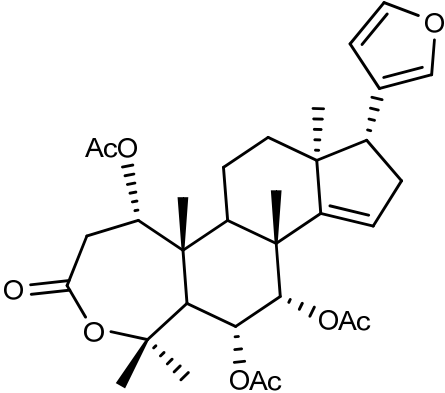
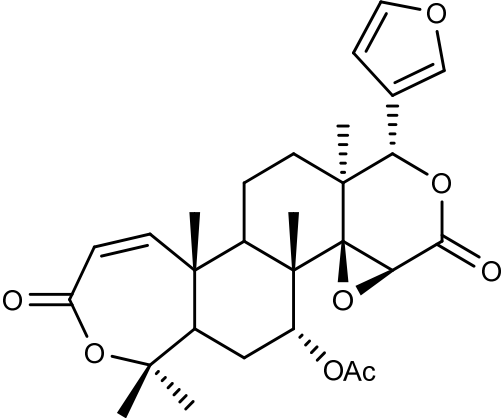
<p>Entiline A <b><u>133</u></b></p>	 <p><b><u>133</u></b> R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H  <b><u>134</u></b> R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=Ac  <b><u>135</u></b> R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H</p>		<p>(Tchouankeu et al., 1990)</p>	
<p>Entiline B <b><u>134</u></b></p>				
<p>Entiline C <b><u>135</u></b></p>				<p>(Nsiana, 2008)</p>
<p>Entiline D <b><u>136</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E.</i> <i>utile</i></p>	<p>(Daniewski et al., 1995)</p>	
<p>Utiline B <b><u>137</u></b></p>				<p>(Daniewski et al., 1993)</p>

**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite)

<p>Untiline C <b><u>138</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E. utile</i></p>	<p>(Daniewski et <i>al.</i>, 1994)</p>
<p>Prieurianine <b><u>139</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E. candollei</i></p>	<p>(Feuya, 2005)</p>
<p>Eoxyprieurianine <b><u>140</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E. candollei</i></p>	<p>(Feuya, 2005)</p>



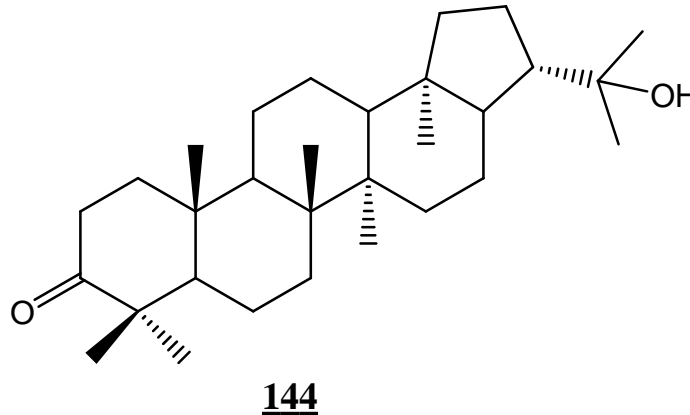
**Tableau IX:** Les furannoïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite et fin)

<p>Spicata-2 <b><u>141</u></b></p>	 <p>R=R<sub>1</sub> = </p>	<p>Graines de <i>E. spicatum</i></p>	<p>(Okorie et Taylor, 1977)</p>
<p>Delevoyine B <b><u>142</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E. delevoyi</i></p>	<p>(Mulholland et al., 1994)</p>
<p>7<math>\alpha</math>-obacunylacétate <b><u>143</u></b></p>		<p>Ecorces de <i>E. angolense</i></p>	<p>(Bickii et al., 2007)</p>

---

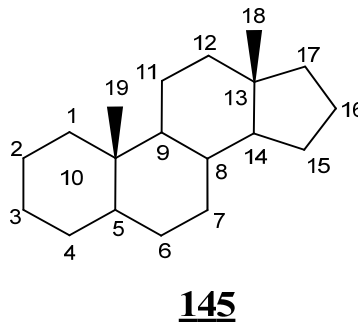
#### I.2.3.1.4.4- Les triterpénoïdes pentacycliques

Des constituants isolés du genre *Entandrophragma*, un triterpène pentacyclique a été isolé précisément des écorces du tronc de *E. cylindricum*. Il s'agit de la 22-hydroxyhopan-3-one **144** (Ngnokam et *al.*, 1994b).



#### I.2.3.1.5- Les stéroïdes

Les stéroïdes sont des produits naturels de structure tétracyclique synthétisés par voie de l'acide acétique. Dans cette classe on retrouve les stérols (sous-classe) qui constituent le groupe de métabolites secondaires les plus répandus dans les végétaux et parmi lesquels se trouvent des composés tels que les acides biliaires, les hormones sexuelles, les glucosides cardiotoniques, et les amines stéroïdiques (Bruneton, 1999; Louppe et *al.*, 2008). Le nom «stéroïde» est donné à tous les composés dont le squelette comporte le noyau perhydrocyclopentanophenanthrène. La position des substituants a été déterminée dans presque tous les composés stéroïdiques disponibles et l'oxygène occupe toujours la position 3; d'où le squelette de base des stéroïdes.



Les stéroïdes dérivent du même précurseur que les triterpènes et sont considérés comme des triterpènes tétracycliques qui ont perdu au moins trois méthyles. Les stéroïdes naturels portent

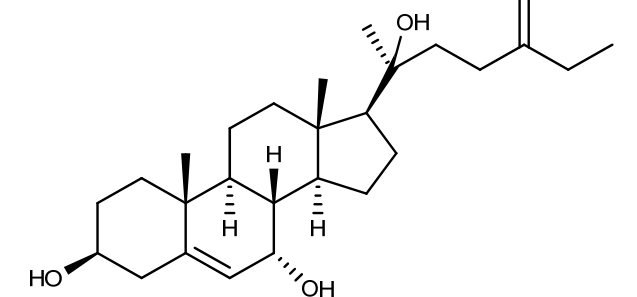
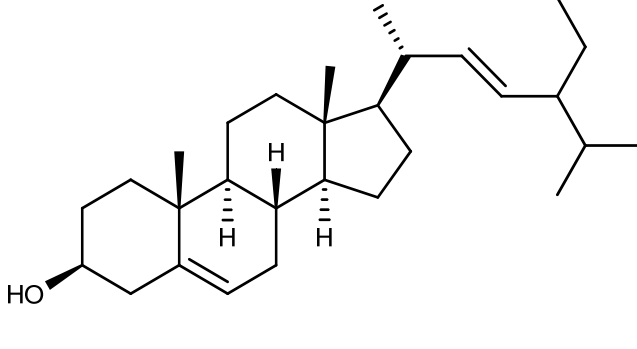
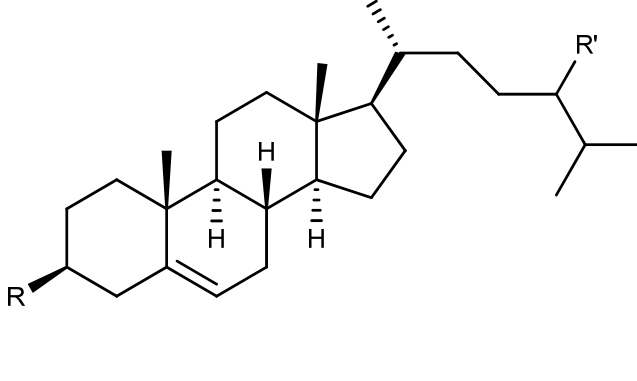
tous un 3- $\beta$ -hydroxyle et au moins une double liaison carbone-carbone (Tchouankeu, 1999). Le schéma 4 présente la biosynthèse des stérols et des triterpènes.

Le tableau X regroupe quelques stérols isolés du genre *Entandrophragma*.

**Tableau X:** Quelques stéroïdes isolés du genre *Entandrophragma*

Noms	Structures	Sources	Références
Ergosta-5,24 (28) dièn-7 $\alpha$ -OMe,3 $\beta$ -ol <b>146</b>		Ecorces de <i>E.</i> <i>utile</i>	(Tchouankeu et al., 1992, 1996; Daniewski et al., 1996)
Peroxyde d'ergostérol <b>147</b>		Ecorces de <i>E.</i> <i>utile</i>	(Tchouankeu et al., 1992, 1996; Daniewski et al., 1996)
7 $\alpha$ ,20(S)-dihydroxy- 4,24(28)- ergostadièn-3-one <b>148</b>			

**Tableau X:** Quelques stéroïdes isolés du genre *Entandrophragma* (suite et fin)

<p><math>3\beta, 7\alpha, 20\beta</math>-trihydroxy-ergosta-5,24(24')-diène <b>149</b></p>		<p>Ecorces de <i>E. utile</i></p>	<p>(Tchouankeu et al., 1992, 1996; Daniewski et al., 1996)</p>																
<p>Stigmastérol <b>150</b></p>																			
<p><math>3\beta</math>-sitostérylhepta decanoate <b>151</b></p>		<p>Ecorces et bois de <i>E. cylindricum</i></p>	<p>(Ngnokam et al., 1994b)</p>																
<p>3-O-β-D-glucopyranosyl-β-sitostérol <b>152</b></p>																			
<p>β-sitostérol <b>153</b></p>				<table border="0"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;"><b>R</b></th> <th style="text-align: center;"><b>R'</b></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;"><b>151</b></td> <td style="text-align: center;"><math>\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}_2</math></td> <td style="text-align: center;"><math>\text{CH}_3\text{CH}_2</math></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><b>152</b></td> <td style="text-align: center;"><math>\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6</math></td> <td style="text-align: center;"><math>\text{CH}_3\text{CH}_2</math></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><b>153</b></td> <td style="text-align: center;"><math>\text{OH}</math></td> <td style="text-align: center;"><math>\text{CH}_3</math></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><b>154</b></td> <td style="text-align: center;"><math>\text{OH}</math></td> <td style="text-align: center;"><math>\text{CH}_3</math></td> </tr> </tbody> </table>		<b>R</b>	<b>R'</b>	<b>151</b>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}_2$	$\text{CH}_3\text{CH}_2$	<b>152</b>	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6$	$\text{CH}_3\text{CH}_2$	<b>153</b>	$\text{OH}$	$\text{CH}_3$	<b>154</b>	$\text{OH}$	$\text{CH}_3$
				<b>R</b>	<b>R'</b>														
<b>151</b>				$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}_2$	$\text{CH}_3\text{CH}_2$														
<b>152</b>	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6$	$\text{CH}_3\text{CH}_2$																	
<b>153</b>	$\text{OH}$	$\text{CH}_3$																	
<b>154</b>	$\text{OH}$	$\text{CH}_3$																	
<p><b>153</b></p>																			
<p>Campestérol <b>154</b></p>																			

---

### I.2.3.2- Activités biologiques antérieures

L'entandrophragmine **131** a été isolée du bois de *E. spicatum* et de *E. caudatum*, elle a démontré une forte toxicité pour les têtards. L'écorce de *E. cylindricum* contient également plusieurs triterpénoïdes acycliques, appelés sapelenines. Des extraits d'écorces ont présenté des propriétés inhibitrices sur la reproduction du charançon du maïs *Sitophilus zeamais* (Louppe et al., 2008).

Certains entilines isolés de *E. utile* et *E. candollei*, notamment entiline A **133** et entiline B **134** ont montré une activité antipaludéenne modérée *in vitro* contre des souches résistantes à la chloroquine de *Plasmodium falciparum* (Tchouya et al., 2005; Louppe et al., 2008). Les extraits des écorces de *E. utile* présentent des propriétés fongicides contre *Pyricularia oryzae* (Tchouankeu, 1999).

De même, les travaux pharmacologiques ont permis de mettre en évidence l'activité antipaludéenne (antiplasmodiale) de certains composés du genre *Entandrophragma*: atomasine A **116**, isolé de *E. candollei* et *E. utile* (Tchouya et al., 2005),  $7\alpha$ -obacunylacétate **143** et 24-méthylène cycloartenol **103** isolés de *E. angolense* (Bickii et al., 2007).

Compte tenu du fait que certains des composés que nous avons isolés de *E. cylindricum* (principalement les triterpènes acycliques) ont présenté des propriétés anti-inflammatoires, nous avons jugé nécessaire de présenter un aperçu sur cette activité biologique.

## I.3- L'INFLAMMATION ET LES ANTI-INFLAMMATOIRES

### I.3.1- L'inflammation

#### I.3.1.1- Généralités sur l'inflammation

Le terme inflammation vient de deux mots latins «*in*» et «*flamma*» et signifie «qui brûle en dedans» (Borel et al., 1984). L'inflammation est un processus réactionnel mis en œuvre par l'organisme chaque fois que l'intégrité de ses constances morphologiques et biologiques est menacée (OMS, 2002). C'est une réaction des êtres vivants à une lésion ou une stimulation cellulaire excessive ou normale due à une agression tissulaire d'origine: mécanique, chimique et immunologique (Aïssata, 2005). L'inflammation est un ensemble de réactions dont la finalité

---

peut être utile (réaction de défense de l'organisme pour faire face à une agression) ou nocive (inflammation secondaire à un processus auto-immune) (Mariam, 2006).

L'inflammation se caractérise le plus souvent par la chaleur, la douleur, la rougeur et la tumeur et comporte des manifestations vasculaires (œdème, vasodilatation), cellulaires (activation leucocytaire) et tissulaires (organisation et réparation) (Kerbaum et *al.*, 1998). Deux types d'inflammations sont connus (Kerbaum et *al.*, 1998; Aïssata, 2005; Amadou, 2005; Mariam, 2006):

- l'inflammation aiguë (localisée ou primaire): C'est la réponse initiale à une lésion tissulaire.
- l'inflammation chronique (généralisée ou secondaire): C'est une série de réactions de longue durée pouvant aller de quelques semaines à quelques années. C'est le cas dans l'inflammation rhumatismale.

Les facteurs étiologiques de l'inflammation sont divers (Amadou, 2005). On a:

- Agents exogènes: qui sont soit de nature physique (radiations, électricité, froid, piqûre, contusion); chimique (acides, substances minérales diverses.); ou biologique (virus, parasites, toxines).
- Agents endogènes: Ce sont essentiellement les antigènes, les auto-antigènes, les complexes immuns circulants, également les cristaux formés dans les liquides biologiques.

L'inflammation est induite par de multiples médiateurs chimiques provenant du plasma ou des cellules et qui interviennent à tous les stades de l'inflammation.

### **I.3.1.2- Quelques médiateurs de l'inflammation**

On en distingue plusieurs dizaines dont l'histamine, la prostaglandine et les cytokines (pro-inflammatoires, immunorégulatrices et effectrices) qui sont des médiateurs de la communication intercellulaire.

#### **I.3.1.2.1- Les prostaglandines (PGs)**

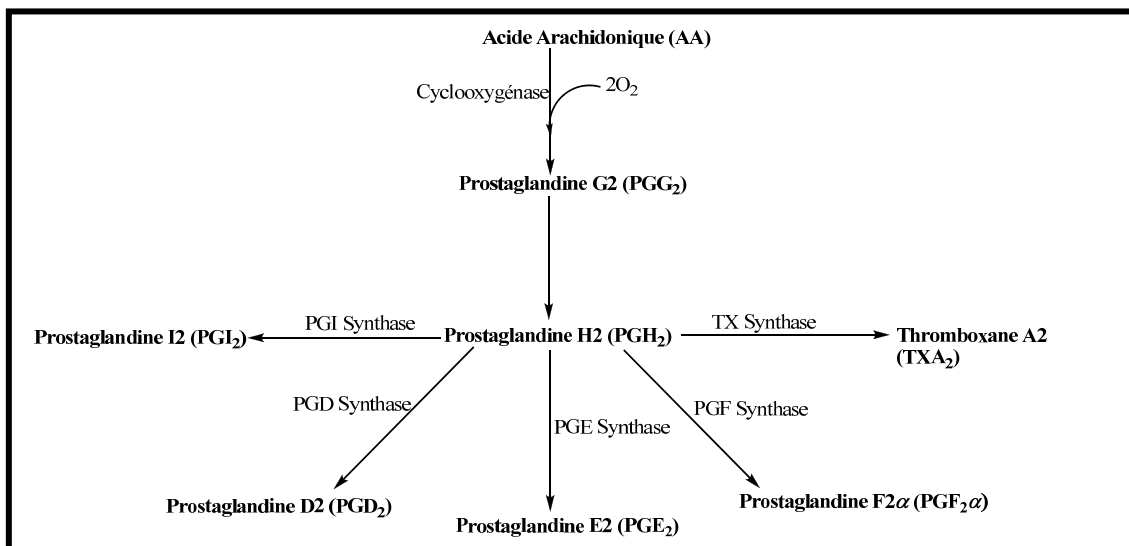
Les prostaglandines sont des métabolites de l'acide arachidonique, obtenues à partir de phospholipides membranaires par action de phospholipases. Ce sont des molécules liposolubles sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles jouent des rôles importants dans les organismes

vivants et se trouvent dans pratiquement tous les tissus et les organes. Les prostaglandines sont des agents de signalisation (médiateurs lipidiques) paracrine et autocrine, possédant chacune 20 atomes de carbone dont un cycle à 5 atomes de carbone. Ce sont des médiateurs chimiques qui possèdent divers effets physiologiques ([www.universalis.fr](http://www.universalis.fr), 2014).

Les prostaglandines sont synthétisées dans la cellule à partir d'acides gras essentiels ([www.universalis.fr](http://www.universalis.fr), 2014):

- l'acide di-homo-gamma-linolénique conduit aux prostaglandines de la série indice 1;
- l'acide arachidonique (AA) donne les prostaglandines de la série indice 2;
- l'acide éicosapentaénoïque (EPA) mène aux prostaglandines de la série indice 3.

Le schéma 6 présente la biosynthèse des prostaglandines de la série indice 2 à partir de l'acide arachidonique (Narumiya, 1999).



**Schéma 6:** Voie de biosynthèse des prostanoïdes

Il existe plusieurs types de prostaglandines parmi lesquels la PGI<sub>2</sub>, la PGH<sub>2</sub> et la PGE<sub>2</sub>.

La prostaglandine de la série E (PGE) et précisément la PGE<sub>2</sub>, est stable contrairement à certaines autres prostaglandines telle que la PGH<sub>2</sub> (Gross, 2006). Cette stabilité lui confère une durée de vie tissulaire relativement longue. Mais dès qu'elle atteint le flux sanguin, elle est rapidement dégradée lors de son premier passage dans le tissu pulmonaire (Gross, 2006).

---

La PGE2 exerce de nombreuses fonctions dans l'organisme, suggérant l'existence de plusieurs récepteurs spécifiques. La PGE2 intervient dans des systèmes fonctionnels aussi variés que la digestion, l'élimination des métabolites, la reproduction, le développement, le système nerveux et est impliquée dans des processus physiopathologiques comme le cancer.

Au niveau du système nerveux, la PGE2 est impliquée dans la douleur, la transmission des signaux nociceptifs et contrôle la survenue de la fièvre (Gross, 2006).

La PGE2 joue un rôle prépondérant dans les réponses inflammatoires. D'une part, elle contrôle la prolifération de la moelle osseuse et donc le nombre de cellules myéloïdes produites. D'autre part, la PGE2 stimule la production de chemokines par les macrophages et régule la production de lymphokines par les cellules T. La PGE2 est un médiateur inflammatoire, produit par les monocytes activés et elle est effectivement mise en évidence dans diverses maladies humaines inflammatoires, liées à l'âge, ou encore cancéreuses. La PGE2 participe également à la régulation de la fonction plaquettaire (Amano *et al.*, 2003; Gross, 2006).

#### **I.3.1.2.2- Les cytokines**

Les cytokines représentent une très grande famille de messagers solubles, essentielles à la communication entre nos cellules. On peut citer entre autres: les interférons gamma, les lymphotoxines (par exemple le TNF-alpha: Tumor Necrosis Factor-alpha), les chimiotoxines et les interleukines qui représentent la famille de cytokine sur laquelle a porté notre attention.

Le terme «interleukine» avait été ainsi nommé car les premières observations semblaient montrer qu'elles étaient exprimées par les globules blancs (d'où *-leukin* pour leucocytes) en guise de moyen de communication (d'où *inter-*). Il a été découvert par la suite que les interleukines étaient produites par une large variété de tissus et cellules, et que bien que regroupées sous cette terminologie par commodité, elles ne présentent aucune parenté biochimique ni de fonction entre elles (Brocker *et al.*, 2010; Khadka, 2014). Les interleukines permettent l'activation de certaines cellules à exercer des fonctions de destruction des microbes ou à produire à leur tour d'autres facteurs.

Il existe plusieurs types d'interleukines. Mais jusqu'en 1979, seules deux interleukines étaient connues et dénommées IL-1 et IL-2. Cependant au début de l'année 2006, ce nombre est passé à 31 interleukines et de nos jours, nous en sommes à 36 qui sont connues et dénommées sous l'intitulé IL-1 à IL-36 (Brocker *et al.*, 2010; Khadka, 2014).



---

Dans la famille d'IL-17, il existe six membres dénommés IL-17-A à IL-17-F. Ces six formes d'interleukines-17 sont toutes impliquées dans l'inflammation mais sont sécrétées par différentes cellules du système inné (granulocytes, des lymphocytes, NK, ...) et par certaines cellules du système adaptatif (lymphocytes Th17) (Rouvier et *al.*, 1993; Yao et *al.*, 1995; Fossiez et *al.*, 1996; Mathieu et *al.*, 2012). Nous avons focalisé notre étude sur IL-17-A, qui a été obtenu par stimulation des cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC) par la phytohemagglutinine (PHA).

Le processus de défense de l'organisme peut parfois évoluer de façon anormale et déclencher des maladies auxquelles on oppose des médicaments anti-inflammatoires pouvant être conventionnels ou traditionnels.

### **I.3.2-Les anti-inflammatoires**

Les anti-inflammatoires sont des médicaments capables d'atténuer ou de supprimer le processus inflammatoire (Mariam, 2006). Ils peuvent agir à divers niveaux. Ils peuvent inhiber la libération des médiateurs ou diminuer la quantité de substrat disponible, ou encore peuvent agir par immunostimulation (Safayhi et Sailer, 1997).

On distingue deux grands groupes: les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).

#### **I.3.2.1- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Ils sont définis pour le mieux comme étant la classe médicamenteuse qui possède les mêmes propriétés pharmacologiques que l'acide acétylsalicylique (aspirine): analgésiques (antalgiques), antipyrétiques, anti-inflammatoires. Ils ont une action symptomatique rapide. Ils n'ont pas d'action sur les processus pathologiques chroniques. L'arrêt de l'AINS est suivi de la reprise de la symptomatologie inflammatoire (Mariam, 2006).

La diminution de la production tissulaire des prostaglandines et thromboxanes du fait de l'inhibition de la cyclo-oxygénase (COX) est le mécanisme d'action commun à tous les AINS (Chauvelot-Moachon et *al.*, 1988). En effet, les AINS ont une similitude dans leurs effets thérapeutiques liés à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines en bloquant la synthèse de la cyclo-oxygénase (COX) qui catalyse la formation des prostaglandines à partir de l'acide

---

arachidonique (Aïssata, 2005). Ils entraînent une diminution de la migration cellulaire et des actions des tissus conjonctifs (glycoprotéine, collagène) (Bourin et *al.*, 1993).

En dehors de l'action sur la cyclo-oxygénase, d'autres mécanismes d'action à l'échelon cellulaire et moléculaire sont proposés pour expliquer notamment les effets anti-inflammatoires des AINS (Chauvelot-Moachon et *al.*, 1988):

- Découplage de la phosphorylation oxydative: entraînant une diminution de l'énergie nécessaire au processus inflammatoire.
- Action sur les polynucléaires neutrophiles: ce qui a pour conséquence une diminution dans la quantité des différents médiateurs de l'inflammation libérés par les cellules.
- Captation de radicaux libres réactifs: conduisant à l'inhibition de l'activation des cyclo-oxygénases et à l'élimination de certaines des manifestations de la réaction inflammatoire.

Les AINS ont en commun un certain nombre d'effets secondaires qui obligent à prendre des précautions lors de leur emploi (Chauvelot-Moachon et *al.*, 1988).

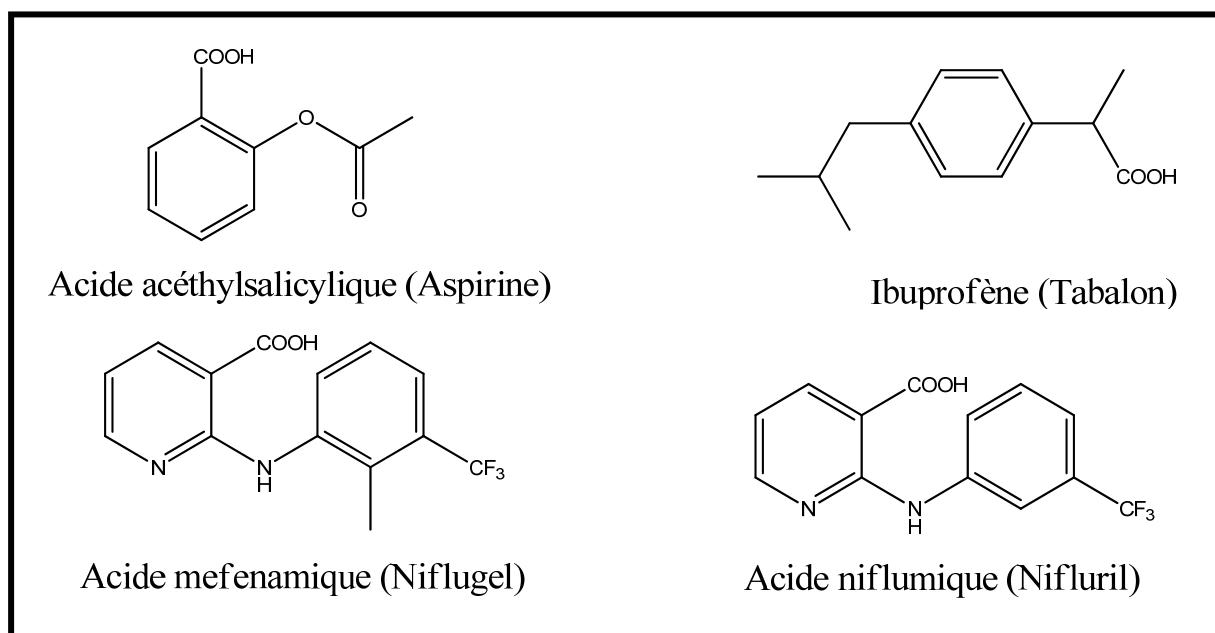
- Troubles digestifs sans gravité immédiate: douleurs épigastriques, nausées, vomissements
- Oedèmes de Quincke, rétention hydro sodée
- Accidents cutanés: syndrome de Lyell
- Accidents gastriques: perforation, hémorragies digestives
- Accidents sanguins
- Toxicité hépatique: risque de survenue d'hépatite toxique
- Toxicité rénale: syndrome néphrétique, réduction de la filtration glomérulaire
- Poussées hypertensives: décompensation cardiaque
- Troubles neuropsychiques et neurosensoriels.

Ils sont répartis en huit principales classes chimiques telles que le présente le tableau suivant (Chauvelot-Moachon et *al.*, 1988).

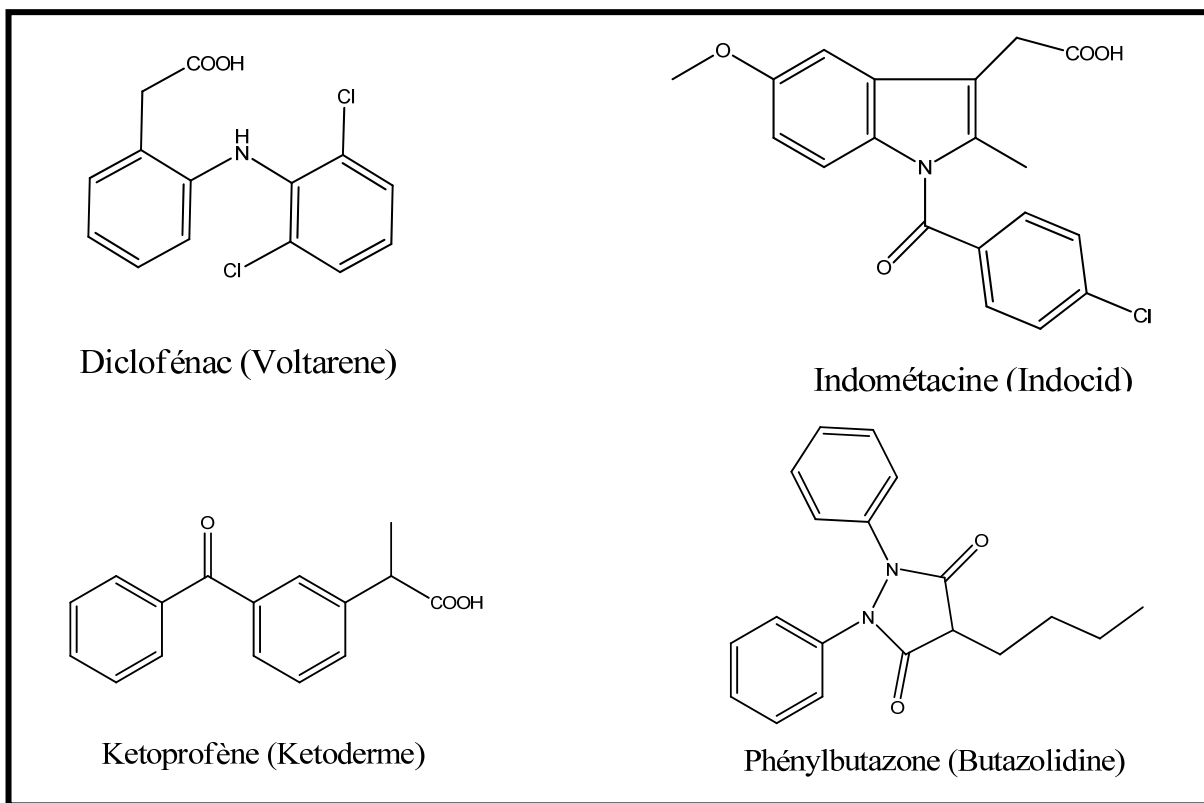
**Tableau XI:** Classes chimiques des principaux AINS.

Classes chimiques	Dénominations communes internationales
Salicylés	Acide acétylsalicylique (Aspirine <sup>®</sup> ), bénomilate
Acides fénamiques ou anthraniliques	Acide flufénamique, acide méfénamique (Niflugel <sup>®</sup> ), acide niflurique (Nifluril <sup>®</sup> )
Indoliques	Indométacine (Indocid <sup>®</sup> ), sulindac
Pyrazolés	Phénylbutazone (Butazolidine <sup>®</sup> ), oxyphenbutazone
Acides pyrrole-acétiques	Tolmétin, zomépirac
Dérivés de l'acide phénylacétique	Diclofénac (Voltarene <sup>®</sup> )
Isoxicams	Piroxicam (Feldene <sup>®</sup> )
Acides propioniques et apparentés (cas du fenbufène)	Acide tiaprofénique, fenbufène, fénoprofène flurbiprofène, indoprofène, ibuprofène (Tabalon <sup>®</sup> ), kétoprofène (Ketoderme <sup>®</sup> ), naproxène, pirprofène

La figure 8 ci-après donne les structures de quelques AINS (Aïssata, 2005; Amadou, 2005; Mariam, 2006).



**Figure 8:** Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).



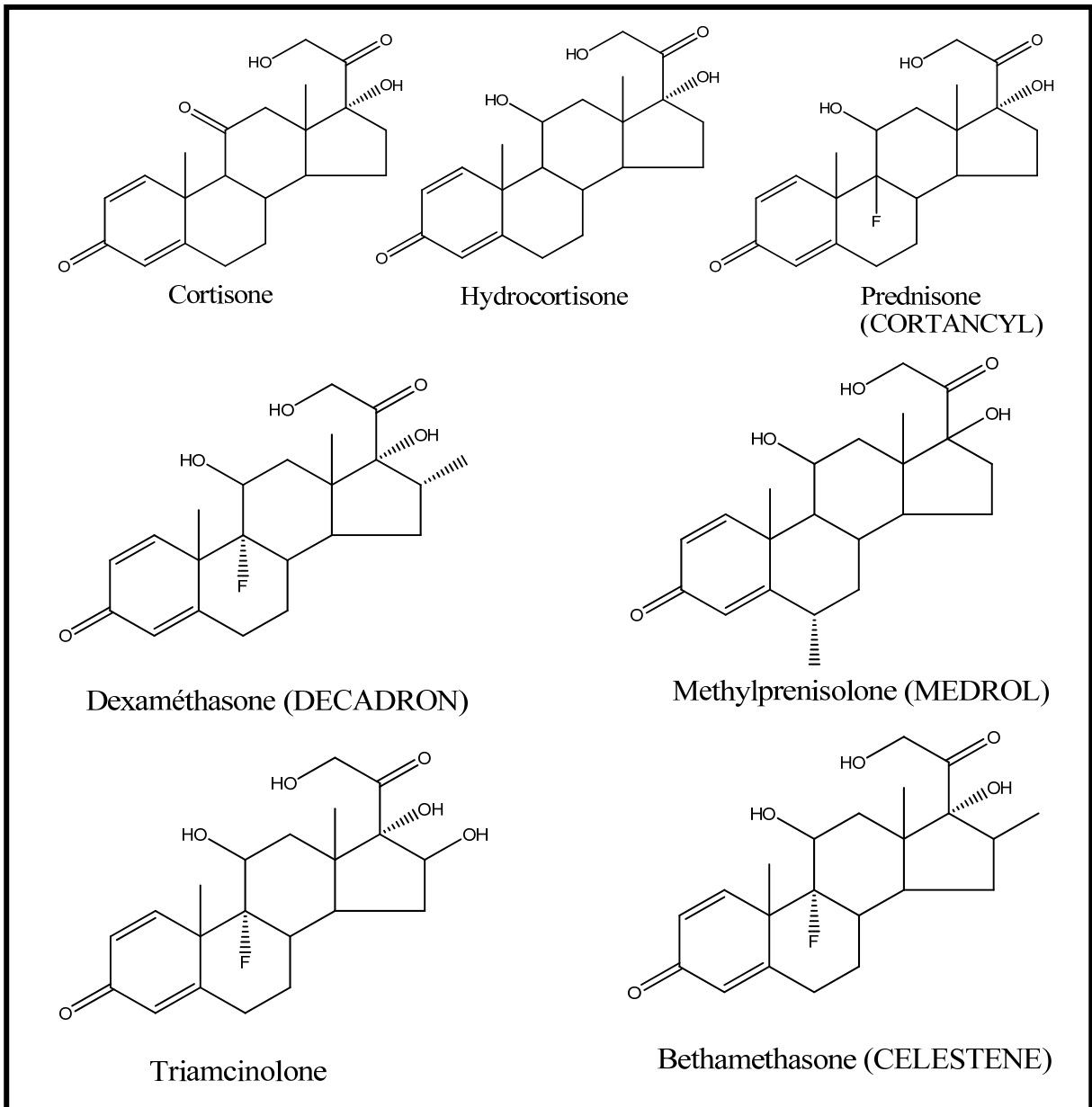
**Figure 8:** Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (suite et fin).

### I.3.2.2- Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes (AIS).

Les anti-inflammatoires stéroïdiens couramment dénommés "corticoïdes" sont des substances ayant en commun une analogie structurale avec une hormone corticosurrénalienne, le cortisol (Mariam, 2006).

Les glucocorticoïdes inhibent la phospholipase A2 et bloquent ainsi la libération de l'acide arachidonique à partir des fractions phospholipidiques des membranes cellulaires. La synthèse des prostaglandines et des leucotriènes est inhibée (Mariam, 2006). En effet, les glucocorticoïdes empêchent la formation de glycéro-phospholipides membranaires en acides arachidoniques par la production d'enzyme lipocortine. Ils diminuent la migration des polynucléaires, monocytes, macrophages vers les sites de l'inflammation et la production de médiateurs comme la sérotonine, l'histamine, les cytokines (Bourin et *al.*, 1993).

Les effets secondaires liés à l'utilisation des corticoïdes sont entre autres: désordres hydroélectriques, troubles de régulation avec hyperglycémie, fragilité cutanée, aménorrhée chez la femme et retard de croissance chez l'enfant, ulcères gastroduédonaux, immunodépression (Mariam, 2006). La figure 9 ci-dessous donne les structures de quelques AIS (Aïssata, 2005; Amadou, 2005; Mariam, 2006).



**Figure 9:** Exemples d'anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).

---

## I.4- LA CYTOTOXICITE

Une substance est dite toxique si elle est nocive pour les cellules et donc, a la propriété de les détruire ou de les altérer (<http://www.futura-sciences.com>, 2015). La cytotoxicité générale est la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire le plus souvent peu différencié.

L'étude toxicologique d'une nouvelle molécule fait aujourd'hui appel:

- à des tests *in vitro* à court terme sur des modèles cellulaires et acellulaires: il s'agit alors des études de toxicité cellulaire ou cytotoxicité.
- à des expérimentations *in vivo*.

Les batteries de tests *in vitro* offrent la potentialité de révéler et de caractériser des toxicités de nature très variables. La toxicité d'un agent chimique est caractérisée par des marqueurs tant moléculaires (il s'agit de modifications de la structure des molécules biologiques par interaction directe ou indirecte) que biologiques (il s'agit de l'altération fonctionnelle des cellules et, secondairement, de son retentissement sur l'homéostasie des organismes ou de l'individu) (Orsière et *al.*, 2001). Suite à une toxicité, une cellule peut mourir par 2 processus distincts:

- la nécrose, qui apparaît généralement après une lésion cellulaire, d'origine chimique ou physique, et résulte d'un processus dégénératif,
- l'apoptose ou mort cellulaire programmée, qui est un processus actif dépendant de l'expression des gènes spécifiques conduisant à l'autodestruction cellulaire.

Trois modèles cellulaires distincts sont utilisés dans le cadre des études de cytotoxicité:

- les cellules en culture (en suspension ou en monocouche) ; il s'agit du modèle le plus utilisé du fait de sa commodité de manipulation. Il peut s'agir de lignées cellulaires ou de cellules en primo-culture,
- les organes isolés perfusés,
- les coupes ou tranches d'organe.

Le but de la cytotoxicité consiste en la détermination de la concentration inhibitrice 50% (CI50) qui pourra ensuite être comparée à la dose létale 50 % (DL50). Il existe plusieurs méthodes d'étude de la cytotoxicité parmi lesquelles: les méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire; les méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire (Orsière et *al.*, 2001).

---

Les méthodes de perturbation de la perméabilité membranaire sont plus nombreuses et plus employées. Ces méthodes sont fondées soit sur l'utilisation de colorants, soit sur le "relargage" de molécules biologiques dans le milieu extérieur.

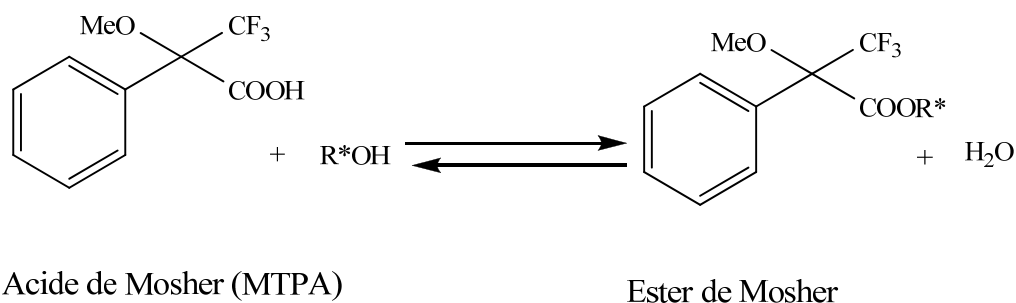
Les méthodes de cytotoxicité utilisant des colorants ont pour principe: l'utilisation d'un colorant qui, en fonction de ses caractéristiques, pénètre dans les cellules vivantes ou mortes. La proportion relative des cellules colorées ou non est un reflet exact du nombre de cellules vivantes ou mortes et donc de la viabilité de l'ensemble de la population cellulaire, en relation directe avec la concentration du toxique étudié. Il existe 3 types de colorants (Orsière et *al.*, 2001):

- les colorants vitaux ou d'exclusion (cellules mortes),
- les colorants supravitaux ou d'inclusion (cellules vivantes),
- les colorants nécessitant une étape de métabolisation (MTT-mesure des capacités métaboliques).

La plupart des composés biologiquement actifs possèdent une structure moléculaire chirale avec plusieurs centres chiraux. La configuration absolue des composés pharmaceutiques est d'une grande importance dans leur activité biologique. On trouve souvent qu'un énantiomère présente une activité médicinale pendant que l'autre n'en présente pas. Dans certains cas, les énantiomères présentent des effets opposés. Pour cette raison, il est important d'obtenir des composés énantiopurs et de déterminer leur configuration absolue.

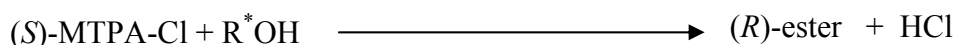
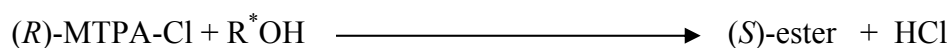
#### **I.5- DETERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE PAR L'INTERMEDIAIRE DES ACIDES DE MOSHER (MTPA).**

L'acide de Mosher ou l'acide 2-méthoxy-2-(trifluorométhyl)-2-phénylacétique réagit avec un alcool secondaire ou une amine de stéréochimie inconnue pour former un ester ou un amide. La stéréochimie de l'ester ou de l'amide est alors déterminée par la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  (Allen, 2008).



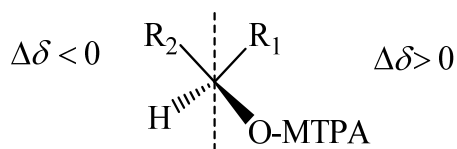
La forme chlorure d'acide du réactif de Mosher est la plus utilisée parce qu'elle a une meilleure réactivité (Ward et Rhee, 1991; Fozing, 2011).

Le chlorure d'acide de Mosher existe sous deux isomères commerciaux: le (*R*)- et le (*S*)-MTPA-Cl.



**Schéma 7:** Réactions des chlorures d'acide de Mosher (MTPA-Cl) avec un alcool secondaire

L'utilisation de la RMN  $^1\text{H}$  permet de calculer la valeur des différences des déplacements chimiques des protons du (*S*)- et (*R*)-ester de Mosher ( $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ ). Cette différence serait due au champ d'anisotropie magnétique que le phényle de l'acide de Mosher exerce dans son entourage (Dale et Mosher, 1973). La configuration absolue de l'alcool s'obtient en plaçant les protons à  $\Delta\delta$  positif sur le côté droit et ceux à  $\Delta\delta$  négatif sur le côté gauche selon le modèle suivant présenté à la figure 10 (Zhi et Yuan, 2005; Fozing, 2011).

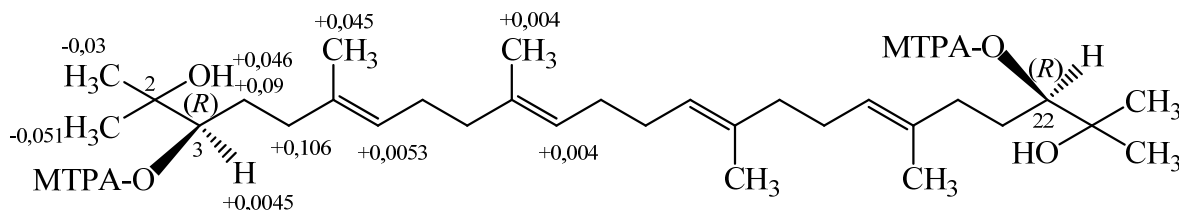


**Figure 10:** Modèle pour la détermination de la configuration absolue.

Les configurations absolues des carbones C-3 et C-22 du 2,3,22,23-tétrahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-6,10,14,18-tétracosatétrène ( $[\alpha]_D^{22} = +23^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 6,97$ )), un



triterpène acyclique isolé des écorces de *Ekebergia capensis*, ont été déterminées par cette méthode (Nishiyama et al., 1996; Nishiyama et al., 1999).



**Figure 11:** Valeurs  $\Delta\delta^{S-R}$  obtenues de l'ester de Mosher du 2,3,22,23-tetrahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-6,10,14,18-tétracosatétraène (Nishiyama et al., 1999).

L'isolement des différentes classes de métabolites secondaires passe par plusieurs méthodes parmi lesquelles CC, CCM, HPLC et LC-MS. Cette dernière méthode est de plus en plus exploitée dans l'étude préliminaire des extraits des plantes dans le but d'en esquisser leur composition. Elle permet également de confirmer ou d'infirmer la pureté d'un échantillon. Il est important pour nous de présenter un bref aperçu de cette technique.

## I.6- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE-SPECTROMETRIE DE MASSE (HPLC-MS)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation des éléments d'un mélange basée sur l'utilisation de deux phases: une phase mobile liquide qui déplace l'échantillon, et une phase stationnaire qui est située à l'intérieur de la colonne. Suivant la nature des deux phases utilisées, les éléments à séparer se répartissent de façon sélective en fonction de leur poids moléculaire, leur taille ou leur charge. Cette technique s'applique à des produits de hautes masses moléculaires, non volatiles ou qui sont susceptibles de se décomposer sous l'effet de la chaleur. Elle nous renseigne sur la présence ou l'absence de certaines substances en fournissant un chromatogramme qui présente le temps de rétention de chacun des constituants (Idsasi, 2013).

---

La spectrométrie de masse (MS) est une technique de détection très puissante et très sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires par analyse du rapport  $m/z$ . Cette technique couplée à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet une élucidation commode des structures des différents éléments des mélanges complexes à l'état de traces (Idsasi, 2013).

En effet, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse encore appelée HPLC-MS ou simplement LC-MS dans le système anglo-saxon est une technique de la chimie analytique qui combine à la fois chromatographie liquide haute performance et la spectrométrie de masse (Ferrer et Thurman, 2009).

Les domaines d'application de la LC-MS sont très variés et cette technique qui est un outil très largement répandu, est utilisée aussi bien pour la séparation et l'identification des molécules organiques ainsi que des macromolécules (protéines,...). Cette technique permet des analyses qualitatives et quantitatives. Elle trouve ses applications aussi bien en recherche fondamentale que dans le contrôle de processus industriels:

- **Chimie organique:** applications en chimie analytique (industrie des parfums, pétrochimie, chimie des polymères, etc.);
- **Applications biomédicales:** analyse de la structure de biomolécules, identification de protéines; pharmacologie, toxicologie, etc.;
- **Contrôle de l'environnement:** mesure qualitative et quantitative des polluants toxiques et dangereux du sol, de l'eau; suivi de la pollution par des pesticides ou des processus industriels, etc.;
- **Agroalimentaire:** contrôle des fraudes alimentaires;
- **Caractérisation des drogues;**
- **Découverte et développement de médicament étudié:** le contrôle de qualité des médicaments pendant la production.

La LC-MS fournit des informations sur le poids moléculaire et les modèles de fragmentation pour l'élucidation des structures. Dans la pratique, on l'utilise pour la détermination de la masse des composés purs ainsi que les masses des différents constituants d'un extrait. Elle est très appliquée dans la vérification de la pureté des composés en chimie organique. C'est une méthode de choix dans l'étude du métabolisme des composés organiques en général et des médicaments

---

en particulier à cause de sa sensibilité et de sa spécificité. Elle est largement utilisée dans l'étude *in vivo* et *in vitro* du métabolisme des médicaments, l'analyse et l'identification des impuretés et la dégradation des produits en pharmacie, l'analyse des impuretés chirales dans les substances médicamenteuses et enfin l'isolement et la caractérisation de potentielles substances médicamenteuses d'origines naturelles ou synthétiques (Chang-Kee et Gwyn, 2002).

L'analyse d'un extrait à l'aide de la LC-MS donne lieu à un spectre comportant les temps de rétention des différents constituants du mélange. Etant donné que la chromatographie liquide associée est en phase inverse (RP-HPLC), plus le temps de rétention est bas plus le composé est polaire et vis-versa (Ferrer et Thurman, 2009).

Les spectromètres de masse liés à cette technique sont à mesure de détecter simultanément un grand nombre de composés même s'ils sont co-élués. La sélectivité est acquise par l'identification et la quantification des masses moléculaires spécifiques de chaque composé du mélange et les voies de fragmentation. La technique d'ionisation utilisée dépend de la structure et de l'acidité ou la basicité du médicament étudié. En général, la méthode ESI (*Electrospray Ionisation*) en mode positif ou négatif est préférée pour les molécules fortement basiques ou acides respectivement. Tandis que la méthode APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*) est plus convenable pour les molécules moins basiques ou acides ou pour les molécules neutres (Chang-Kee et Gwyn, 2002).

Habituellement, le procédé est la chromatographie en phase inverse où le métabolite se lie à la colonne par des interactions hydrophobes, en présence d'un solvant hydrophile (par exemple l'eau) et est élué par un solvant plus hydrophobe (le méthanol ou l'acétonitrile). On utilise des colonnes de très faible dimension (300 à 75  $\mu\text{m}$  de diamètre) contenant un adsorbant en phase inverse. Lors de l'élution, la vitesse d'écoulement avoisine 100  $\text{nL}/\text{min}$  vers l'extrémité inférieure de la colonne. A la sortie de la colonne, une partie du produit est dirigée vers le spectromètre UV et l'autre vers le spectromètre de masse. Ce partage affecte la sensibilité du spectromètre UV.

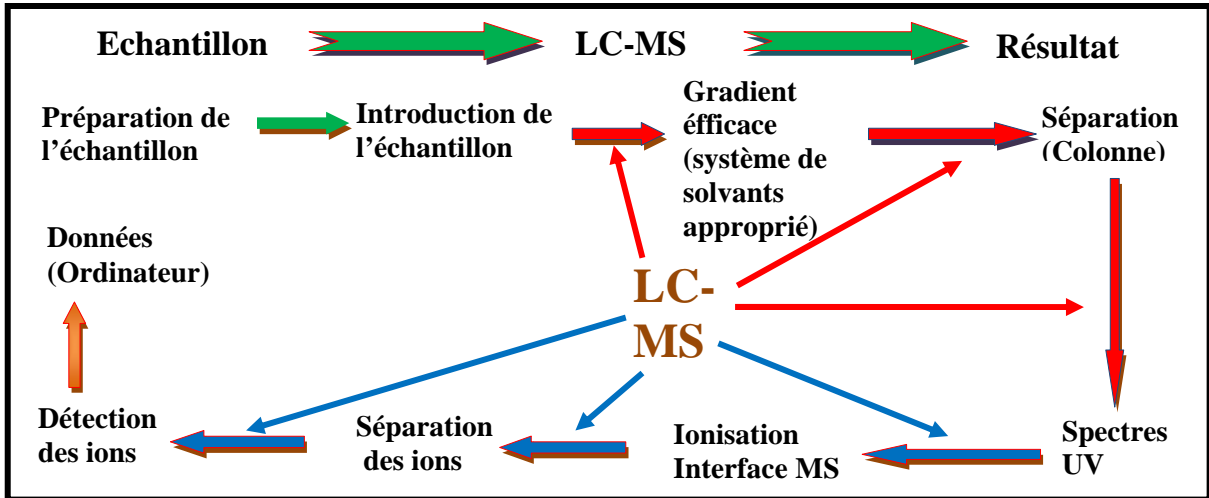


Schéma 8: Protocole simplifié d'analyse LC-MS

Le schéma suivant montre les modes alternatives d'ionisation suivant que le composé est moins polaire (APCI), moyennement polaire ou polaire (ESI).

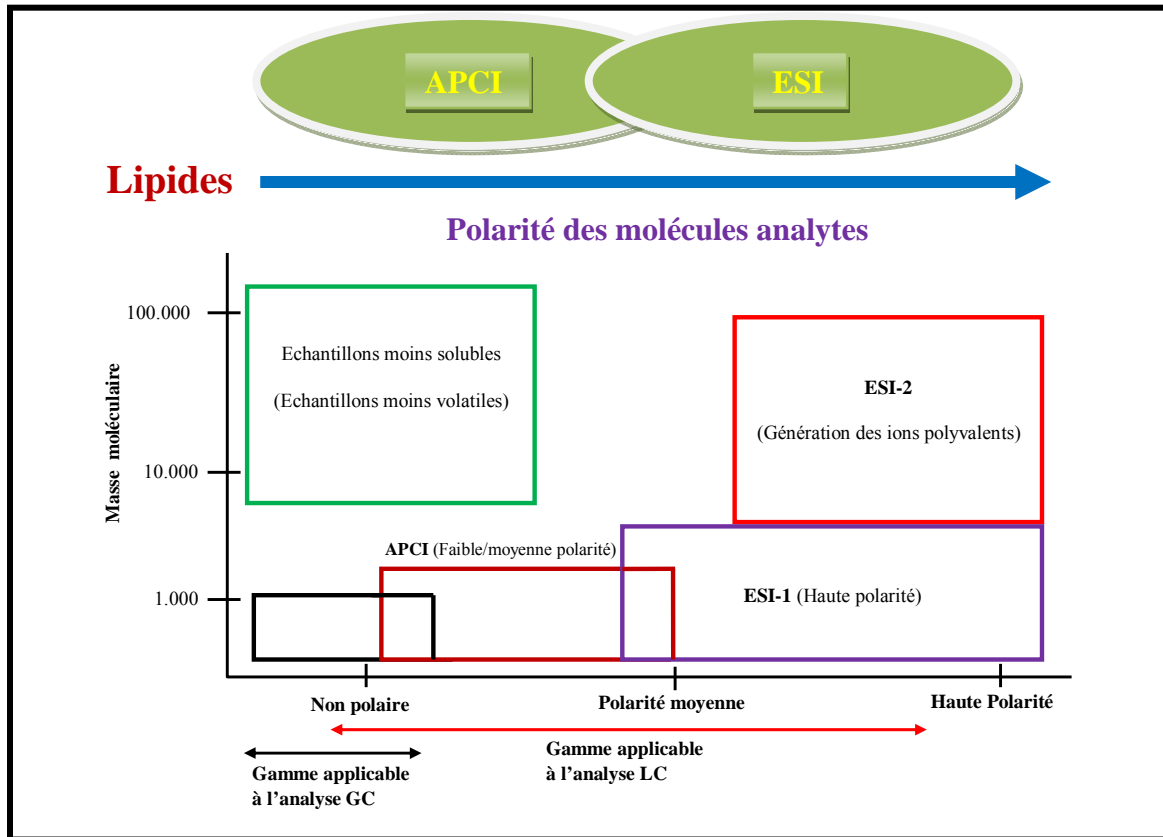


Schéma 9: Modes alternatives d'ionisation en LC-MS et composés convenables (<http://www.shimadzu.com>, 2013).

La méthode LC-MS conduit parfois à la formation des adduits. Le tableau suivant liste quelques adduits caractéristiques formés en LC-MS.

**Tableau XII:** Quelques adduits caractéristiques formés en LC-MS

Ions adduits	Source de l'adduit	Masse de l'ion adduit
$[M+CH_3COO]^-$	Acide acétique	M+59
$[M+Cl]^-$	Solvants chlorés	M+35
$[M+NH_4]^+$	Ammoniac	M+18
$[2M+NH_4]^+$		2M+18
$[M+Na]^+$	Sel de sodium	M+23
$[2M+Na]^+$		2M+23
$[M+2Na]^{2+}$		M+46
$[M+K]^+$	Sel de potassium	M+39
$[M+CH_3CNH]^+$	Acétonitrile	M+42
$[M+NH_4+CH_3CN]^+$		M+59
$[M+Na+CH_3CN]^+$		M+64
$[M+CH_3OHH]^+$	Méthanol	M+33
$[M+H_2OH]^+$	Eau	M+19
$[M+H]^+$		M+1
$[2M+H]^+$		2M+1
$[M+2H]^{2+}$		M+2

Malgré de nombreux avantages liés à l'utilisation de cette technique, grand nombre de problèmes sont cependant observés dans les protocoles LC-MS courants. Certains de ces problèmes sont liés à la séparation LC elle-même, surtout dans le choix du système d'éluant approprié pouvant conduire à une séparation des composés du mélange; d'autres sont reliés aux détecteurs MS utilisés (Tolstikov et Fiehn, 2002; [www.nestgrp.com](http://www.nestgrp.com), 2013).

Au vu de tout ce qui précède, il ressort que l'utilisation de cette technique pourrait constituer un grand avantage dans l'étude préliminaire des extraits des plantes.

---



**CHAPITRE II:  
RESULTATS ET DISCUSSION**

---

---

## II.1- EXTRACTION, ISOLEMENT ET ELUCIDATION DES STRUCTURES DES COMPOSES ISOLES

### II.1.1- Extraction et composés isolés

#### II.1.1.1- Extraction et composés isolés de *Pauridiantha callicarpoides*

Les écorces du tronc de *Pauridiantha callicarpoides* ont été récoltées en Décembre 2010 dans la forêt du Dja (Région de l'Est Cameroun). La plante a été identifiée par M. NANA Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun, où un spécimen a été déposé sous le numéro 39807/SPDK. Ces écorces ont été découpées, séchées puis broyées. Nous avons obtenu 2,5 kg de poudre végétale. Cette poudre a été extraite au mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1/1) à température ambiante pendant 48 heures et 12 heures respectivement. Après évaporation totale du solvant, 345,4 g d'extrait total ont été obtenus. Une partie de cet extrait (335 g) a été fixée sur une masse équivalente de silice puis chromatographiée sur colonne Flash. Au terme de ce processus, nous avons obtenu 5 (cinq) fractions indexées de A à E.

La fraction A a été chromatographiée sur colonne de gel de silice. Nous avons obtenu en plus du composé indexé PC-1, un mélange de stérols indexé PC-22.

De la fraction B, un seul composé indexé PC-14-A a été isolé.

La chromatographie de la fraction C a conduit à l'isolement de 5 (cinq) composés indexés PC-4, PC-29-1, PC-29-2, PC-A-1 et PC-A-2, en plus d'un mélange de deux glucosides de stérols indexé PC-31.

La fraction D a conduit à 2 composés indexés PC-A-3 et PC-A-7.

Le protocole d'extraction et d'isolement des produits de cette plante est donné par le schéma 10 ci-dessous.

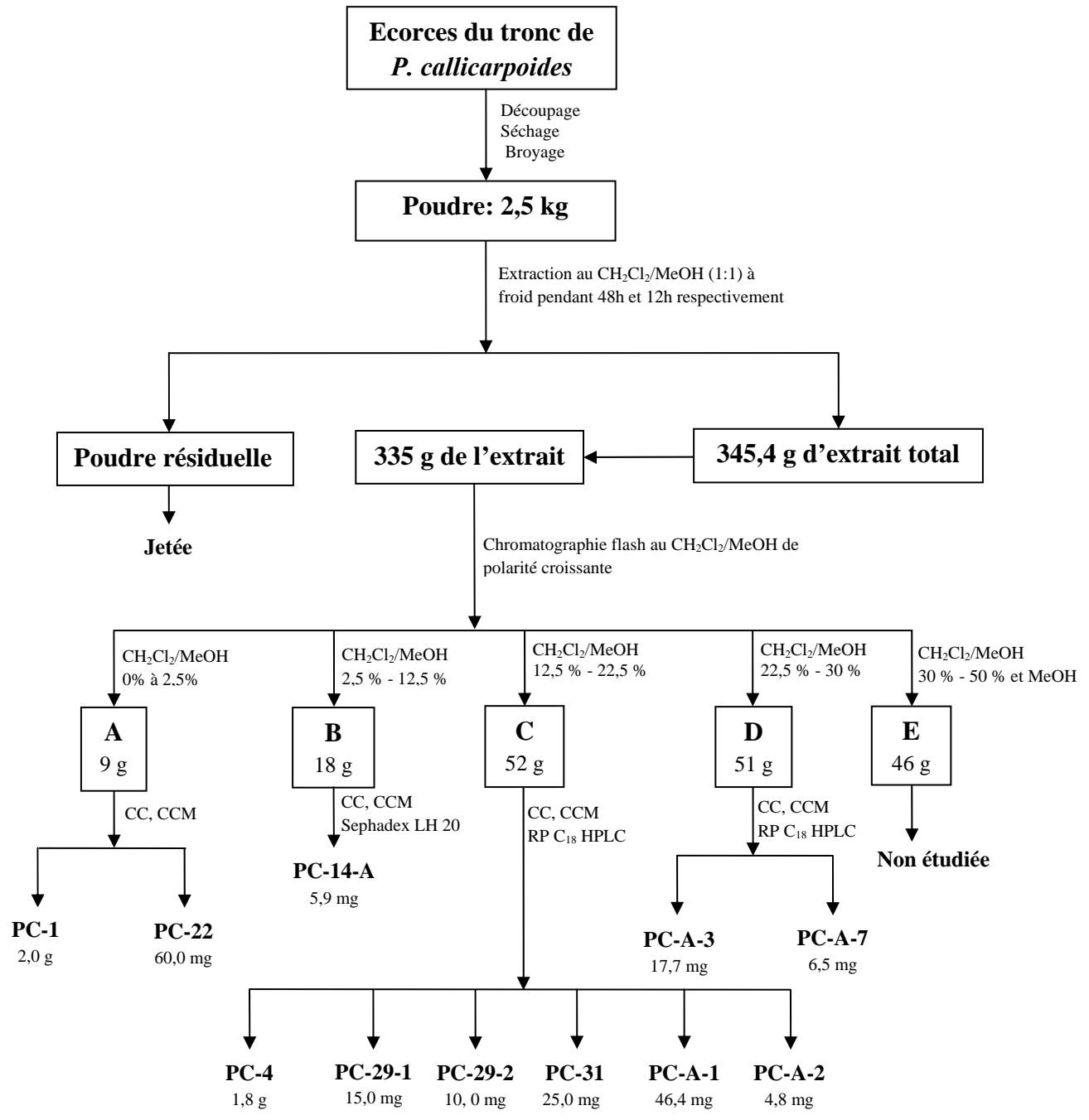


Schéma 10: Protocole d'extraction et d'isolement des composés de *P. callicarpoides*



---

### II.1.1.2- Extraction et produits isolés de *Entandrophragma cylindricum*

Les écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum* ont été récoltées en Juin 2010 dans la forêt du Dja (Région de l'Est Cameroun). La plante a été identifiée par M. NANA Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun, où un spécimen a été déposé sous le numéro 54965/SFR/CAM. Ces écorces ont été découpées, séchées, puis broyées. Nous avons obtenu 7,0 kg de poudre végétale. Cette poudre a été extraite au MeOH à température ambiante pendant 48 heures et 8 heures respectivement. Après évaporation totale du solvant, 890 g d'extrait total ont été obtenus puis ré-extraits au mélange AE/MeOH (9:1) pour donner 390 g d'extrait. Ce dernier (390 g) a été fixé sur une masse équivalente de silice puis chromatographié sur colonne Flash, pour conduire à 7 (sept) fractions indexées Fr<sub>0</sub> à Fr<sub>6</sub>. Les fractions Fr<sub>4</sub> et Fr<sub>5</sub> ont été combinées sous la base d'une CCM analytique et au vue de leurs profils LC-MS.

La fraction Fr<sub>0</sub> contenait principalement un mélange d'acide gras et de phytostérols.

Les fractions Fr<sub>1</sub>, Fr<sub>2</sub>, Fr<sub>3</sub> et Fr<sub>4-5</sub> ont montré de fortes activités anti-inflammatoires. Ces fractions ont été à nouveau soumises séparément aux chromatographies sur colonne Flash pour ainsi conduire à l'obtention de quatre séries de sous-fractions: A<sub>1</sub>-A<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>-B<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> et D<sub>1</sub>-D<sub>7</sub>. Chaque sous-fraction a été soumise à la HPLC semi-préparative en phase inverse.

La sous-fraction A<sub>6</sub> a conduit à l'isolement du composé indexé EC10P3431.

La sous-fraction B<sub>4</sub> a conduit à l'isolement du composé indexé EC20P2031.

De la sous-fraction C<sub>4</sub>, nous avons obtenu le composé indexé EC30P181.

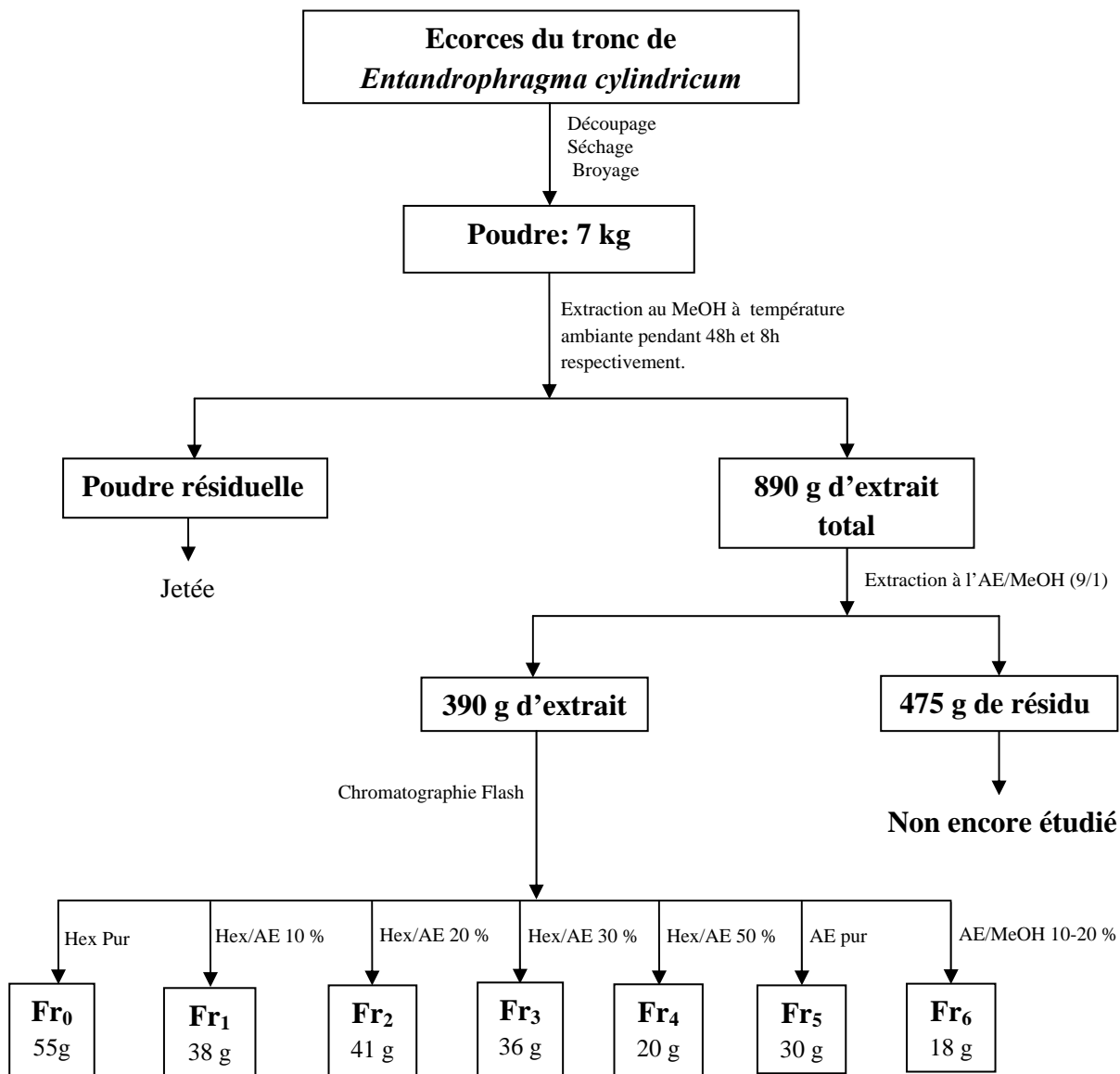
Trois composés indexés EC30P182, EC30P183 et EC30P184 ont été isolés de la sous-fraction C<sub>6</sub>.

La sous-fraction C<sub>7</sub> a conduit à l'obtention du composé indexé EC30F5.

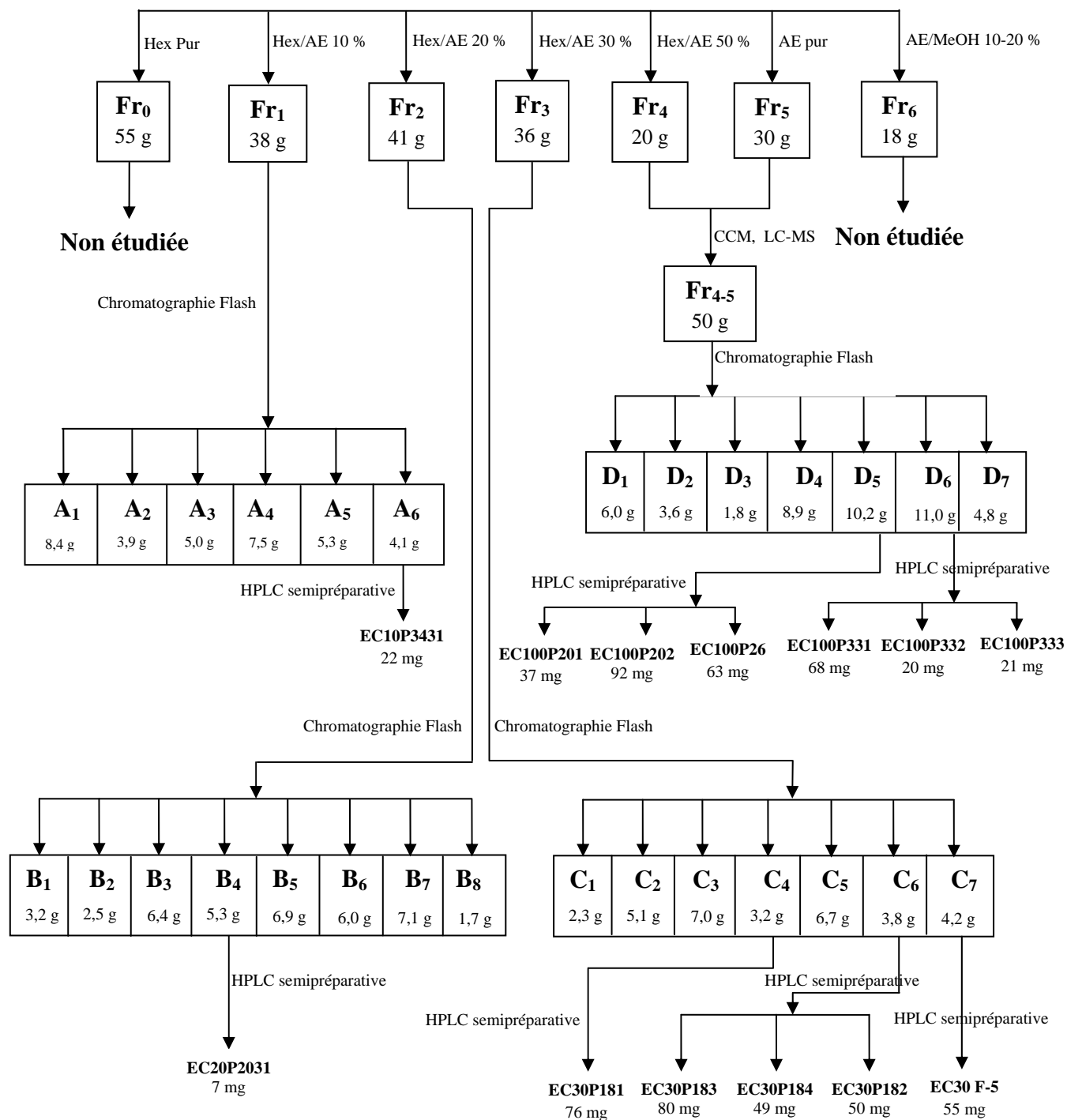
Les composés indexés EC100P201, EC100P202 et EC100P26 ont été isolés de la sous-fraction D<sub>5</sub>.

La sous-fraction D<sub>6</sub> a conduit à l'obtention de trois composés indexés EC100P331, EC100P332 et EC100P333.

Le protocole d'extraction et d'obtention des composés de *Entandrophragma cylindricum* est donné par le schéma 11 ci-dessous.



**Schéma 11:** Protocole d'extraction et d'isolement des composés de *Entandrophragma cylindricum*



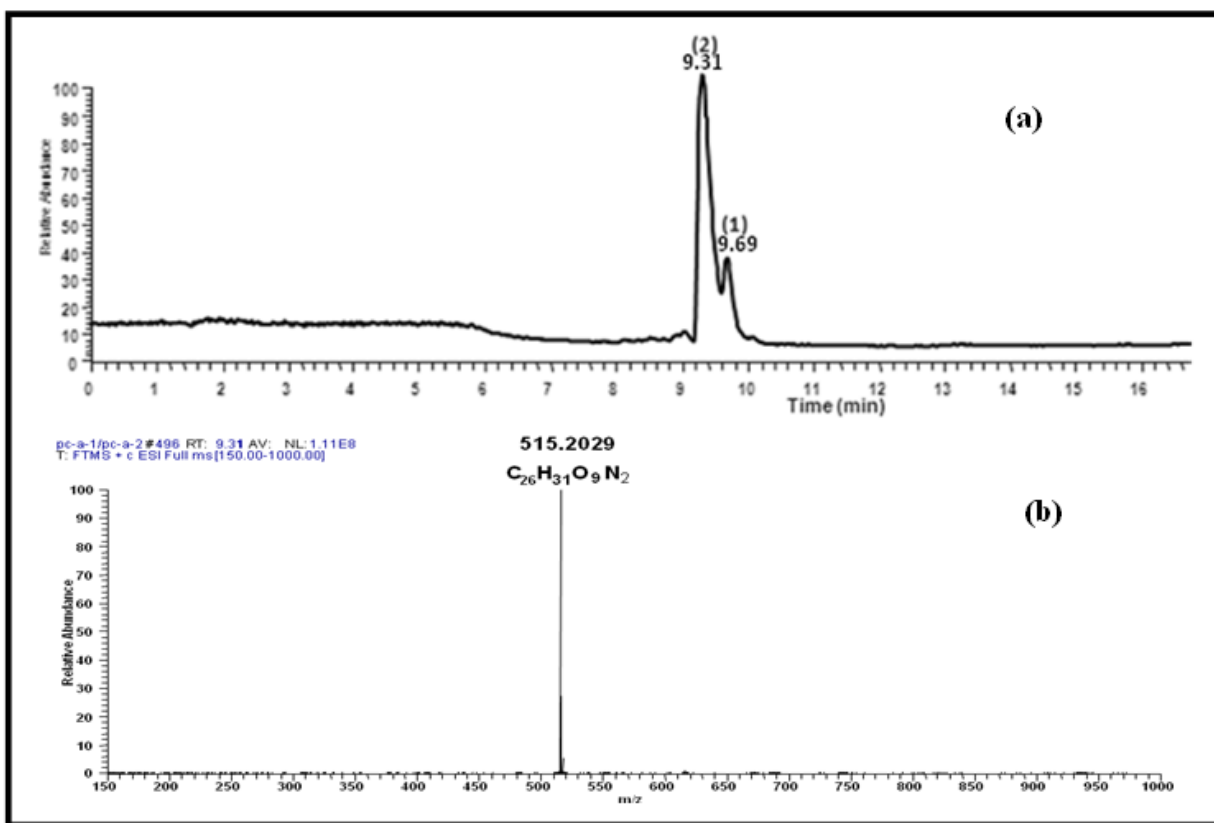
**Schéma 11:** Protocole d'extraction et d'isolement des composés de *Entandrophragma cylindricum* (suite et fin)

## II.1.2- Elucidation des structures des composés isolés

L'étude phytochimique de *Pauridiantha callicarpoides* et de *Entandrophragma cylindricum* nous a permis d'isoler 26 composés qui ont été identifiés et caractérisés sur la base de leurs données spectroscopiques et physiques, puis regroupés en différentes classes de composés organiques à savoir: les alcaloïdes (02), les acides phénoliques et dérivés (01), les coumarines (04), les flavonoïdes (02), les iridoïdes (01), les limonoïdes (01), les stéroïdes (04), les carbohydrates (01) et les terpénoïdes (10).

### II.1.2.1- Les alcaloïdes

Deux alcaloïdes isomères ont été isolés de *P. callicarpoides* puis indexés PC-A-1 et PC-A-2. La figure 12 présente le profil chromatographique du mélange des deux isomères (PC-A) et leur spectre de masse HR-ESI.



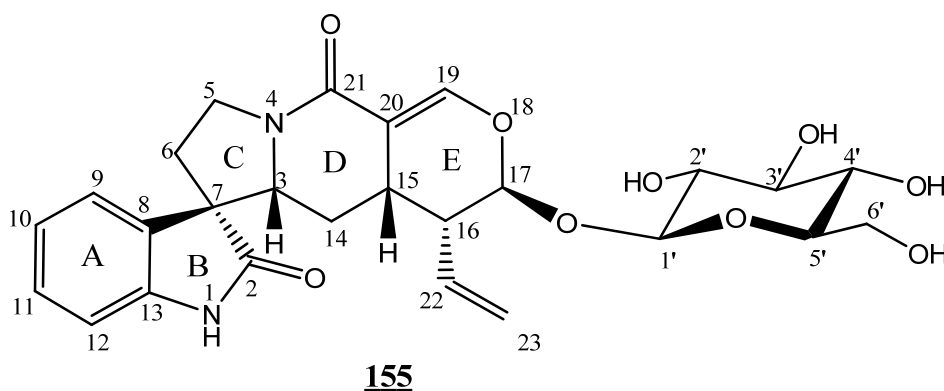
**Figure 12:** (a) Profil chromatographique LC-MS de PC-A: mélange de PC-A-1 (2) et PC-A-2 (1)  
(b) Spectre de masse HR-ESI du javaniside (PC-A-1, 155) et du 7-épi-javaniside (PC-A-2, 157).

### II.1.2.1.1- Javaniside (PC-A-1, **155**)

PC-A-1 se présente sous forme de poudre amorphe incolore. Il est soluble dans le méthanol et répond positivement au test de Dragendorff caractéristique d'un alcaloïde.

Son spectre de masse à haute résolution HR-ESI (Fig. 12b) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  515,2029 (calculée pour  $C_{26}H_{31}O_9N_2$ , 515,2024) compatible avec la formule brute  $C_{26}H_{30}O_9N_2$  renfermant 13 degrés d'insaturation.

L'analyse de son spectre de masse couplée à ceux de l'UV, l'IR, RMN 1D et 2D permet d'attribuer à PC-A-1 la structure suivante:



En effet, son spectre UV présente des bandes d'absorption à  $\lambda_{\max}$ : 196, 238 et 258 nm attribuables au cycle aromatique (cycle A) et révélant un noyau oxindole (Kitajima et *al.*, 2007; Xin et *al.*, 2008; Salim et *al.*, 2011).

Sur son spectre IR, on observe des bandes de vibration à  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3409 (NH), 1705 et 1656 (deux C=O, spiroamide et amide  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturée) (Tanahashi et *al.*, 1999), 1619 (C=C oléfinique), 1578 (C=C aromatique) et 1069 (C-O éther cyclique).

Sur son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 13), on observe quatre signaux d'un proton chacun attribuables au cycle benzénique 1,2-disubstitué (cycle A) d'un noyau oxindole à 6,92 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, H-12); 7,07 (1H, td,  $J = 0,8; 7,6$  Hz, H-10); 7,25 (1H, td,  $J = 0,8; 7,6$  Hz, H-11) et 7,30 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, H-9). De plus, on observe un ensemble de signaux dues à la présence d'une unité de sucre à  $\delta_{\text{H}}$  3,17 (1H, dd,  $J = 7,8; 8,8$  Hz, H-2'); 3,26 (1H, t,  $J = 9,6$  Hz, H-4'); 3,29 (1H, m, H-5'); 3,38 (1H, t,  $J = 8,8$  Hz, H-3'), 3,64 (1H, dd,  $J = 9,6; 12,0$  Hz, H-6'), 3,86 (1H, dd,  $J =$

---

1,6; 12,0 Hz, H-6') et 4,65 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H-1'). Cette portion du sucre a été confirmée d'une part sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 14) où on observe les signaux caractéristiques du glucose avec le signal du carbone anomérique à  $\delta_{\text{C}} 99,5$  (C-1') et d'autre part sur le spectre de masse EI (Fig. 15) où on observe un ion fragment  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6]^+$  à  $m/z 335$  correspondant à la perte d'une unité de glucose. Par ailleurs, la valeur élevée de la constante de couplage du proton anomérique à  $\delta_{\text{H}} 4,65$  (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H-1'), suggère une configuration  $\beta$  ( $\beta$ -O-glycosylé).

De l'analyse du spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  couplé à ceux du DEPT 135 et 90 (Fig. 16), il ressort que PC-A-1 possède 26 carbones répartis en:

- Cinq méthylènes dont ceux à  $\delta_{\text{C}} 120,6$  et  $62,6$  sont attribuables respectivement à un méthylène oléfinique (méthylène terminal C-23) et un oxyméthylène (C-6').
- Quinze méthynes dont deux oléfiniques à  $\delta_{\text{C}} 133,8$  (C-22) et  $148,3$  (C-19) et quatre aromatiques à  $\delta_{\text{C}} 124,0$  (C-9);  $123,8$  (C-10);  $130,1$  (C-11) et  $111,0$  (C-12).
- Six carbones quaternaires dont deux carbonyles des amides à  $\delta_{\text{C}} 165,9$  (C-21) et  $180,9$  (C-2) et deux aromatiques à  $\delta_{\text{C}} 129,5$  (C-8) et  $143,5$  (C-13).

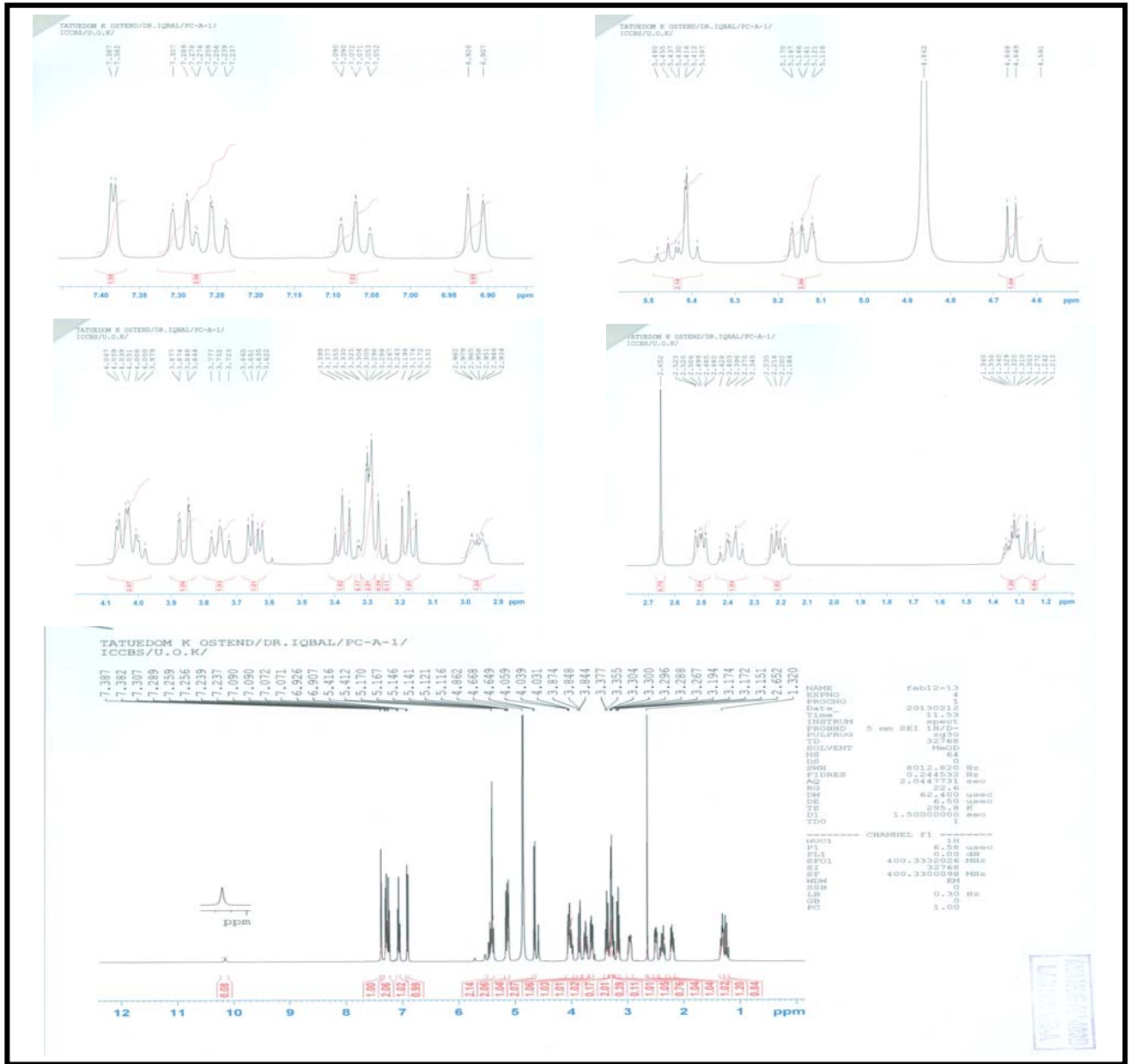


Figure 13: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du javaniside (PC-A-1, 155)

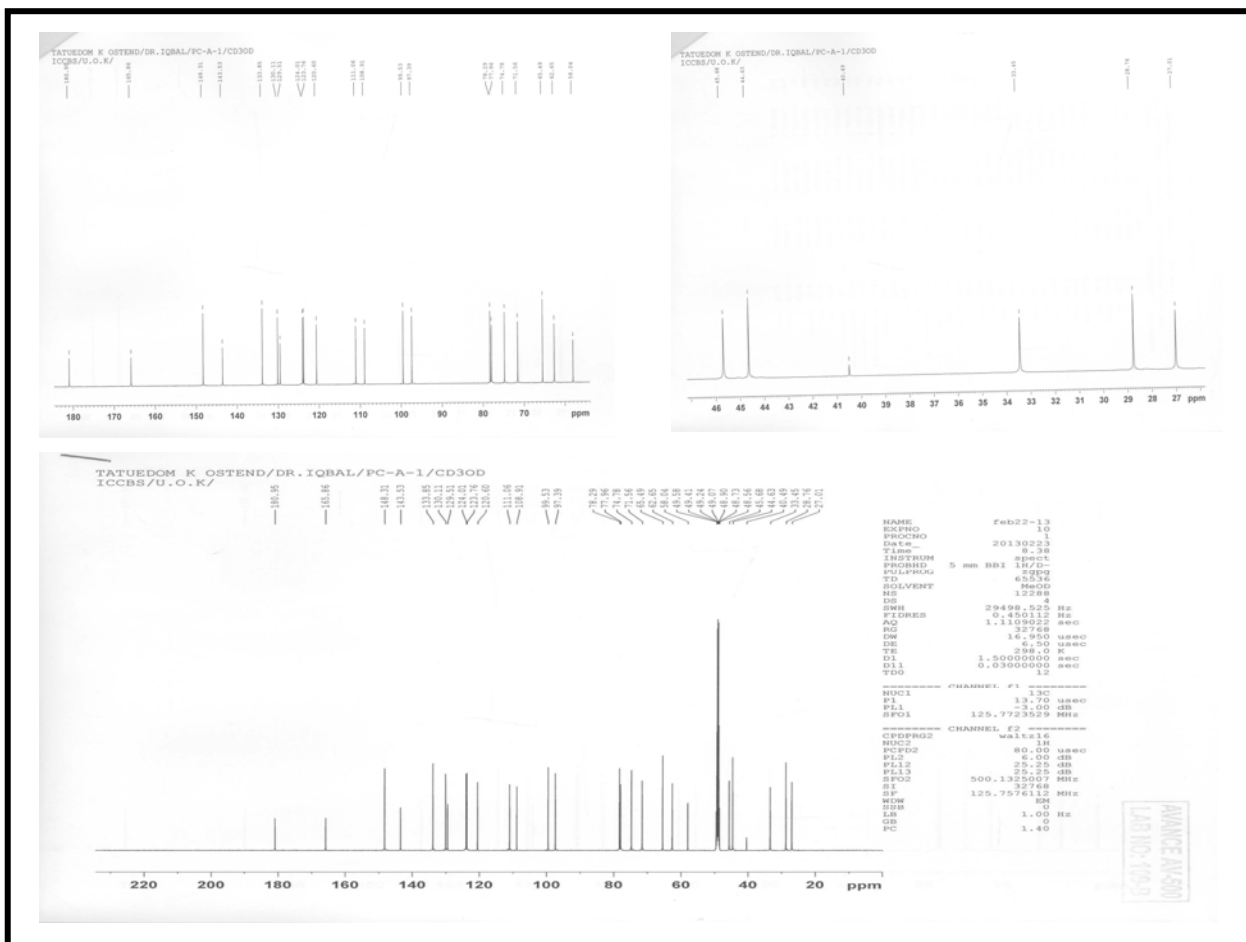


Figure 14: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du javaniside (PC-A-1, 155)

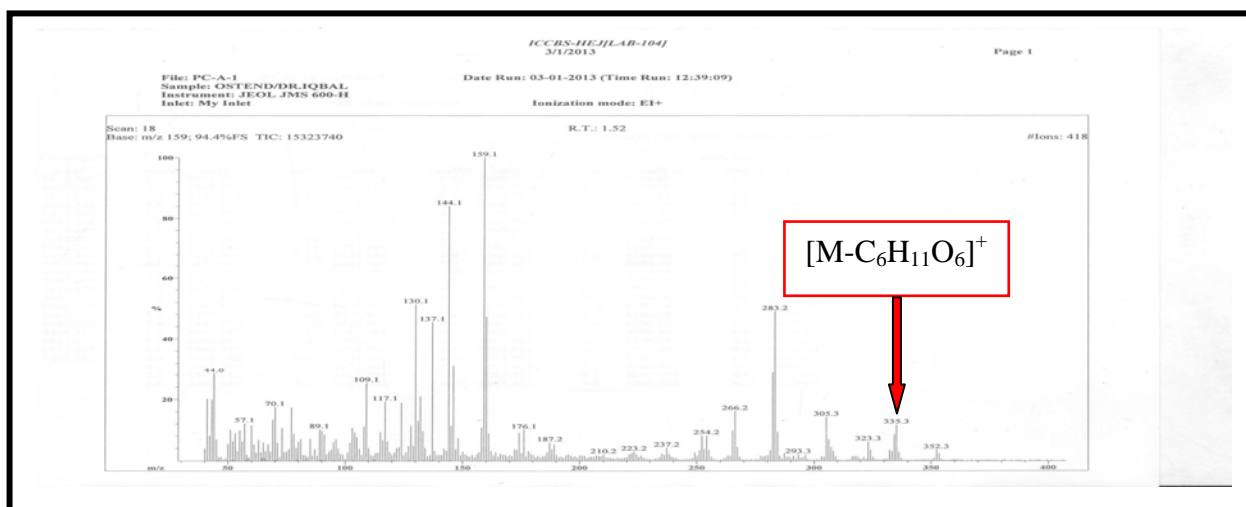
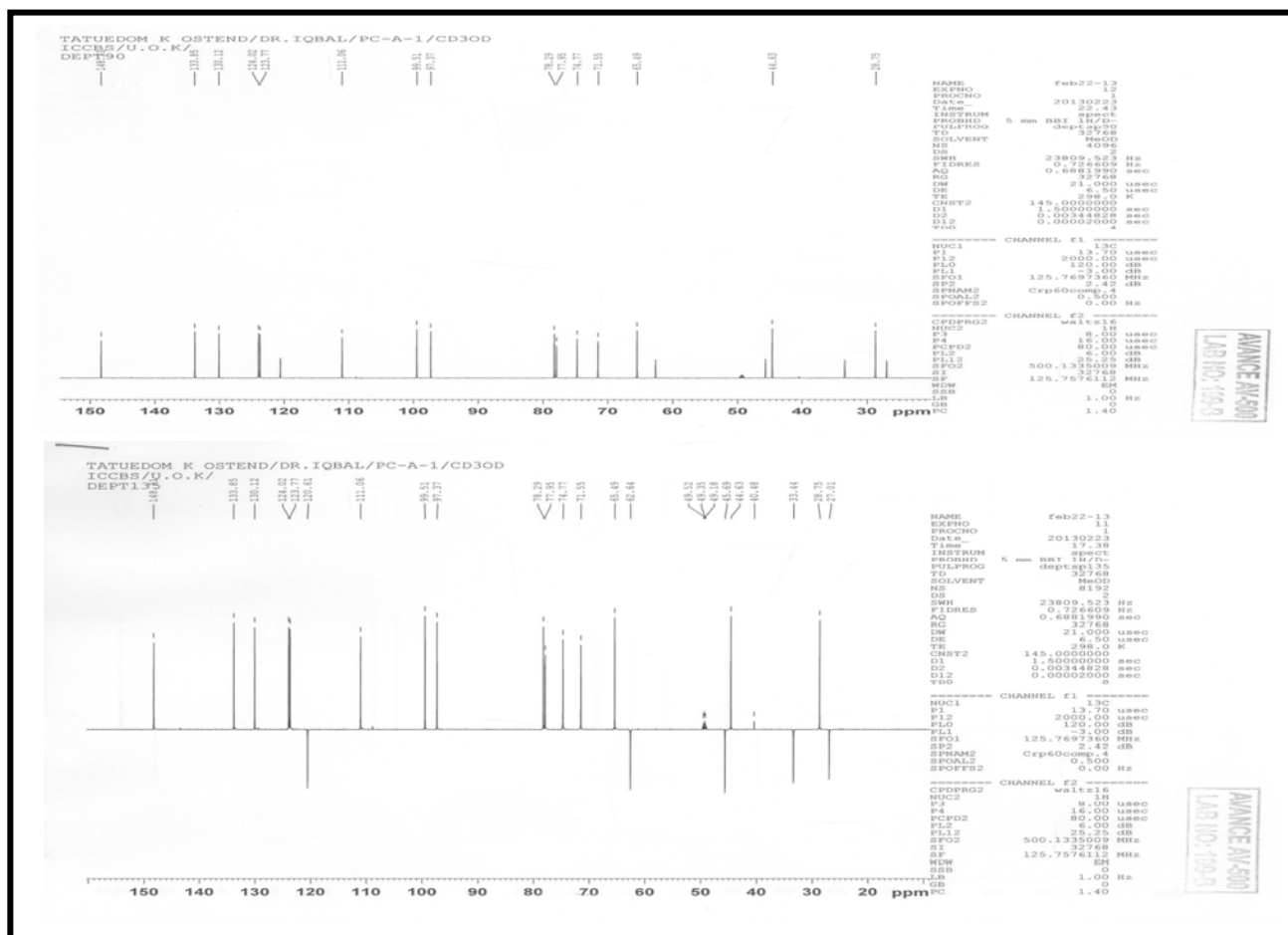


Figure 15: Spectre de masse EI du javaniside (PC-A-1, 155)



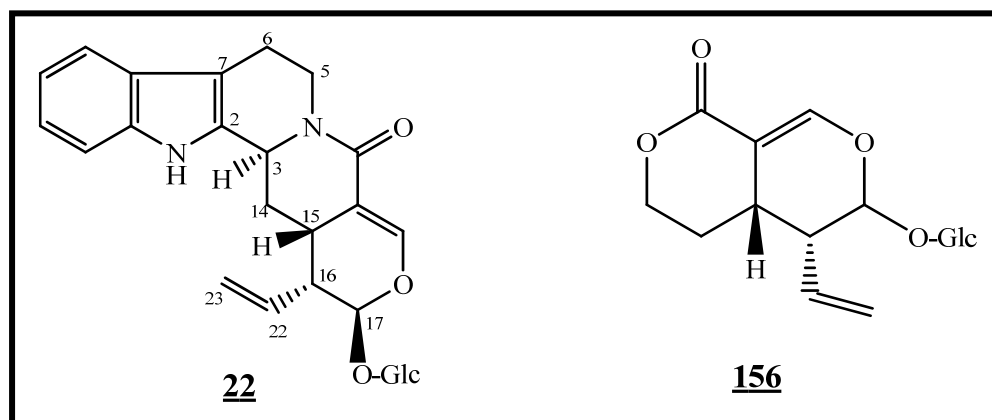


**Figure 16:** Spectre DEPT 135 et 90 du javanaside (PC-A-1, 155)

Sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H, on observe les signaux d'un vinyle terminal à  $\delta_H$  5,43 (1H, dt,  $J = 10,0; 17,2$  Hz, H-22); 5,13 (1H, dd,  $J = 1,8; 10,0$  Hz, H-23); 5,15 (1H, dd,  $J = 1,8; 17,2$  Hz, H-23), de même que ceux d'un proton oléfinique à  $\delta_H$  7,38 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-19) et d'un proton au pied d'un héli-acétal à  $\delta_H$  5,41 (1H, d,  $J = 1,4$  Hz, H-17).

L'analyse des spectres de RMN 2D COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Fig. 17) et HSQC (Fig. 18) indique en plus des systèmes de couplage du noyau aromatique ortho disubstitué et du glucose, deux autres systèmes de couplage indiquant la présence des fragments CH(3)-CH<sub>2</sub>(14)-CH(15)-CH(16)-CH(22)-CH<sub>2</sub>(23) puis CH(16)-CH(17) et CH<sub>2</sub>(5)-CH<sub>2</sub>(6). Il s'agit des systèmes de couplage (I): H-3 ( $\delta$  4,05)-H-14 ( $\delta$  1,24; 1,33)-H-15 ( $\delta$  2,96)-H-16 ( $\delta$  2,50)-H-22 ( $\delta$  5,43)-H-23 ( $\delta$  5,13; 5,15) puis H-16 ( $\delta$  2,50)-H-17 ( $\delta$  5,41) et (II): H-5 ( $\delta$  3,75; 4,00)-H-6 ( $\delta$  2,21; 2,40). Les

caractéristiques spectrales des systèmes de couplage (I), (II) et le groupe carboxyle  $\alpha,\beta$ -insaturés déduites à partir des taches de corrélation HMBC (Fig. 19) (Tableau XIII) indique une similarité structurale entre PC-A-1 et le strictosamide **22**, un alcaloïde indolo-monoterpénique connu (Van et *al.*, 2005). De même, le système de couplage (I) ressemble typiquement à celui que l'on trouve dans le sweroside **156**.



Cependant, nous notons des différences significatives pour les signaux des carbones du cycle indole. En effet, les déplacements chimiques typiques à C-2 et C-7 dans les alcaloïdes indolo-monoterpéniques sont de l'ordre de 135 et 108 ppm respectivement (Van et *al.*, 2005). Donc les valeurs des déplacements chimiques de 180,9 (C-2) et 58,0 (C-7) suggèrent fortement l'existence d'un cycle oxindole au lieu du cycle indole comme dans les alcaloïdes indolo-monoterpéniques courants (Van et *al.*, 2005). Les corrélations  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  longues distances observées ici entre C-2-H-3, C-2-H-6, C-3-H-5, C-7-H-5, C-7-H-14, C-8-H-3 et C-8-H-6 suggèrent C-7 comme un carbone spiro liant le cycle oxindole et le cycle pyrrole (Van et *al.*, 2005). Ce lien est confirmé par comparaison des données de RMN  $^{13}\text{C}$  avec celles des alcaloïdes oxindoles similaires (Van et *al.*, 2005) (Tableau XIII).

La stéréochimie de PC-A-1 a été déterminée grâce à une analyse minutieuse de toutes les constantes de couplage proton. En effet, les constantes de couplage entre H-16-H-17 ( $J = 1,4$  Hz) et H-16-H-15 ( $J = 6,8$  Hz) suggèrent fortement les orientations  $\beta/\beta/\alpha$  de H-15, H-16 et H-17. La configuration  $\beta$  de H-3 a été soutenue par les constantes de couplage entre les protons H-3 et H-14 ( $J_{3,14\alpha} = 11,2$  Hz;  $J_{3,14\beta} = 3,2$  Hz).

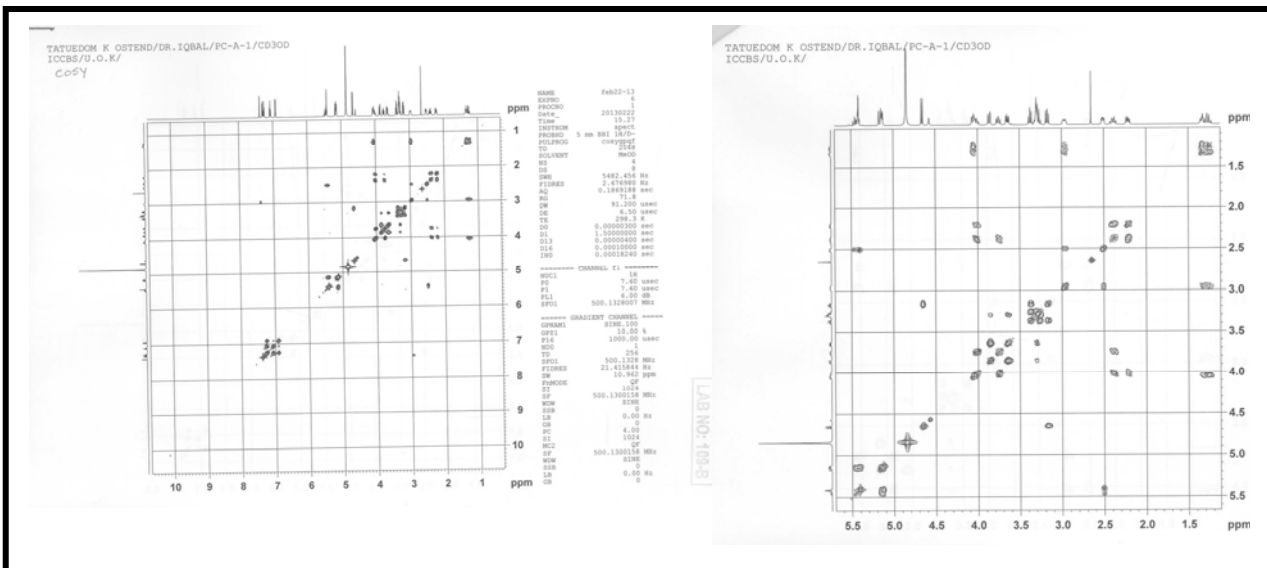


Figure 17: Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du javaniside (PC-A-1, 155)

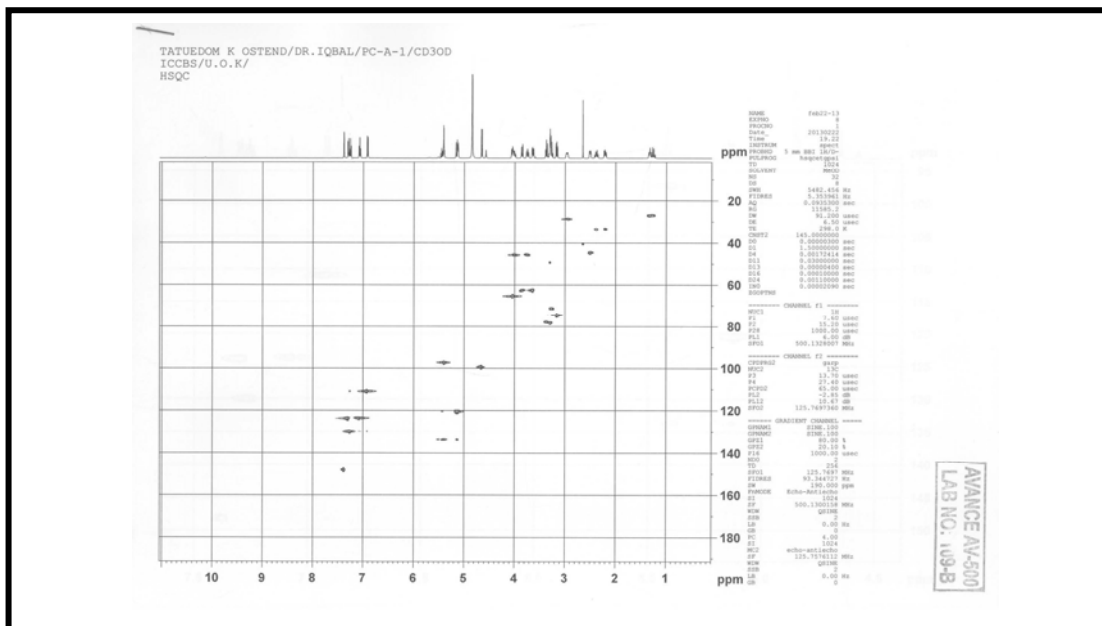
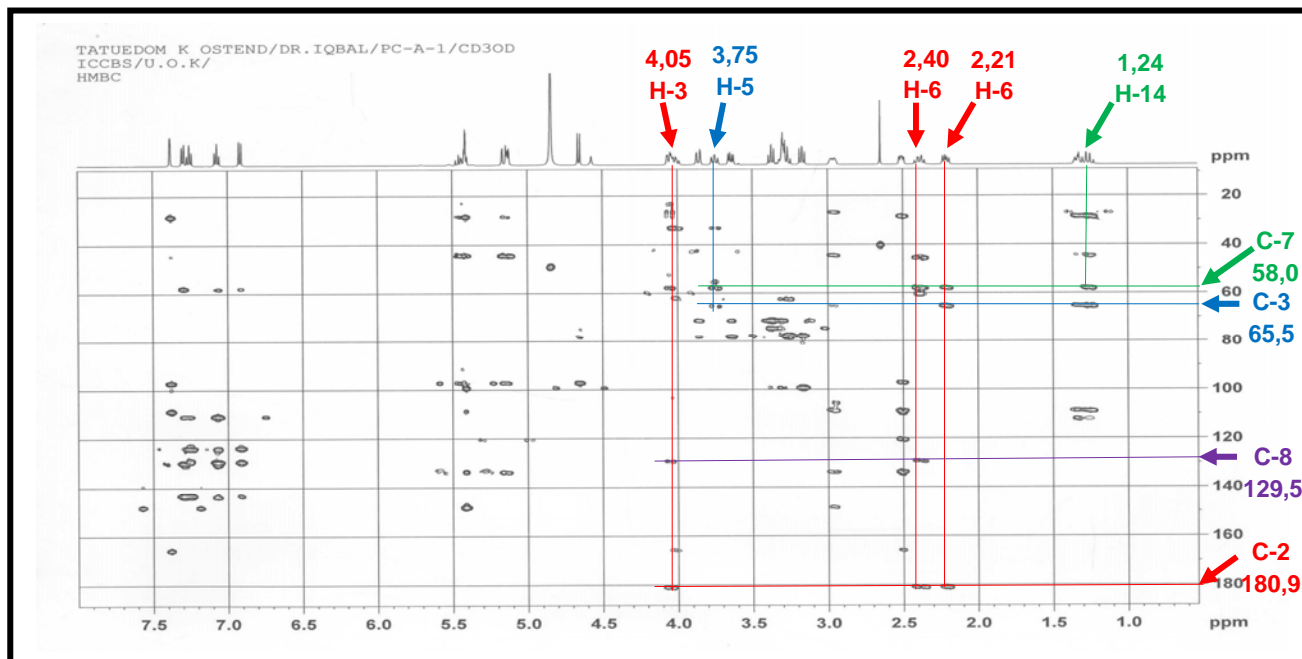


Figure 18: Spectre HSQC du javaniside (PC-A-1, 155)



**Figure 19:** Spectre HMBC du javaniside (PC-A-1, 155)

De plus, sur le spectre NOESY (Fig. 20) on observe des signaux NOE qui fournissent des indices additionnels sur la stéréochimie de PC-A-1. En effet, on a des corrélations NOE entre les protons H<sub>3</sub>-H<sub>9</sub> et H<sub>6β</sub>-H<sub>9</sub>, ce qui suggère fortement que le carbonyle en C-2 est au-dessous du plan C/D/E. La corrélation entre H<sub>3</sub> et H<sub>5β</sub> soutient d'avantage la configuration β/β de ces deux protons (Ma et Hecht, 2004).

Au vue de ce qui précède et tenant compte des données de la littérature, PC-A-1 serait donc le javaniside, un alcaloïde à squelette oxoindole monoterpénique (spirooxoindolomonoterpénique) isolé en 2004 pour la première fois par Ma et Hecht de *Alangium javanicum* (Ma et Hecht, 2004). Ce composé est isolé ici pour la première fois de la famille des Rubiaceae.

Le javaniside induit le clivage du brin d'ADN en présence des ions cuivre II (Cu<sup>2+</sup>) (Ma et Hecht, 2004; Van et *al.*, 2005).

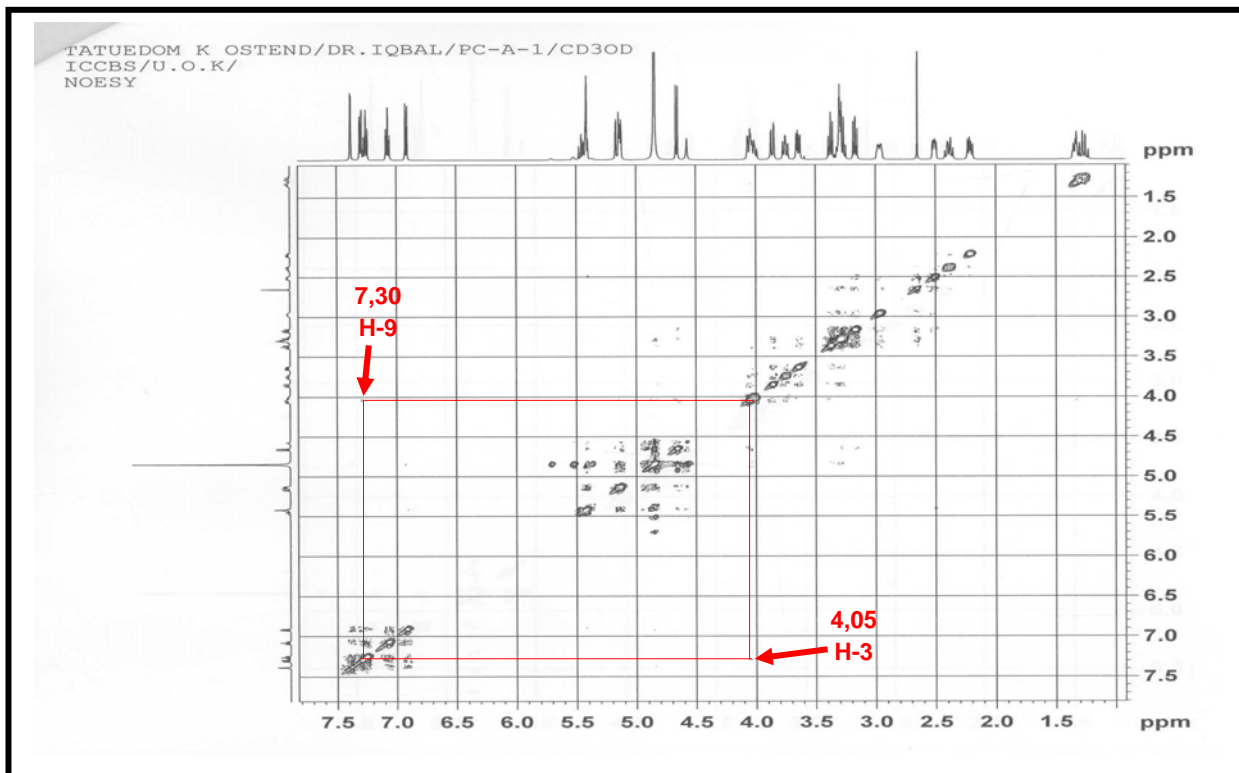


Figure 20: Spectre NOESY du javaniside (PC-A-1, 155)

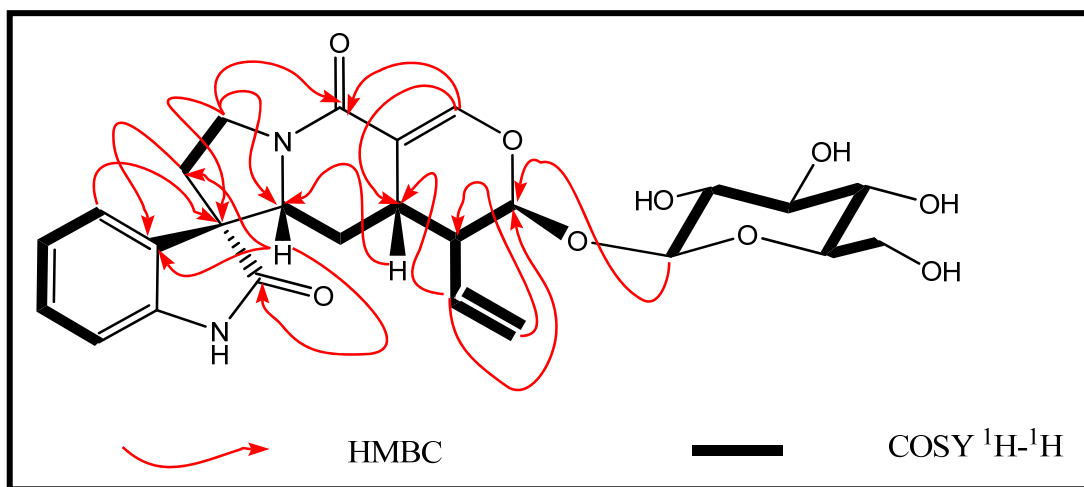


Schéma 12: Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC et COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  du javaniside (PC-A-1, 155).

**Tableau XIII:** Données spectrales de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) de PC-A-1 (**155**) dans le CD<sub>3</sub>OD comparées à celles du javanaside

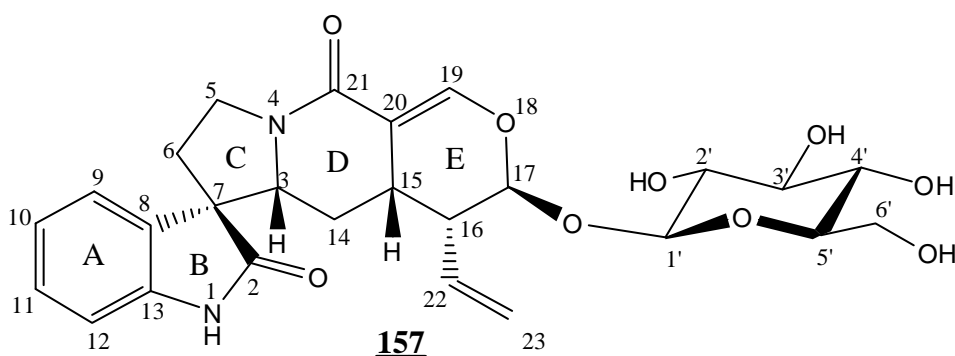
Position	PC-A-1			Javanaside	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (m, <i>J</i> en Hz)	HMBC	$\delta_C$	$\delta_H$ (m, <i>J</i> en Hz)
1-NH	–	10,19 (1H, s)	–	–	–
2	180,9	–	–	180,9	–
3	65,5	4,05 (1H, dd, 3,2; 11,2)	C-2, C-6, C-7, C-8, C-14	65,5	4,09 (dd, 3,0; 11,6)
5	45,7	3,75 (1H, <i>lt</i> , 10,0; 11,6) 4,00 (1H, dd, 8,0; 11,6)	C-3, C-6, C-7 C-6, C-21	45,6	$\beta$ 3,76 ( <i>lt</i> , 11,2; 11,4) $\alpha$ 4,04 (ddd, 7,4; 10,5; 11,4)
6	33,4	2,21 (1H, dd, 8,0; 13,2) 2,40 (1H, ddd, 10,0; 12,8; 13,2)	C-2, C-3, C-7 C-2, C-5, C-7, C-8	33,4	$\alpha$ 2,23 (dd, 7,4; 13,2) $\beta$ 2,40 (ddd, 10,5; 11,2; 13,2)
7	58,0	–	–	58,0	–
8	129,5	–	–	129,5	–
9	124,0	7,30 (1H, d, 7,6)	C-7, C-11, C-12, C-13	123,9	7,30 ( <i>ld</i> , 7,5)
10	123,8	7,07 (1H, td, 0,8; 7,6)	C-7, C-8, C-9, C-12, C-13	123,8	7,07 td, 1,2; 7,5)
11	130,1	7,25 (1H, td, 0,8; 7,6)	C-9, C-10, C-12, C-13	130,0	7,25 (td, 1,2, 7,5)
12	111,0	6,92 (1H, d, 7,6)	C-7, C-8, C-9, C-13	110,9	6,90 ( <i>ld</i> , 7,5)
13	143,5	–	–	143,6	–
14	27,0	1,24 (1H, q, 12,0) 1,33 (1H, dt, 4,0; 12,0)	C-3, C-7, C-15, C-16, C-20 C-3, C-15, C-16, C-20	27,0	$\alpha$ 1,27 (td, 12,2; 12,4) $\beta$ 1,37 (dt, 3,8; 3,8; 12,2)
15	28,8	2,96 (1H, m)	C-3, C-14, C-17, C-19, C-20, C-22	28,7	2,94 (dddd, 2,4; 3,8; 5,5; 12,4)
16	44,6	2,50 (1H, ddd, 1,4; 6,8; 8,4)	C-15, C-17, C-20, C-21, C-22, C-23	44,6	2,56 (ddd, 1,8; 5,5; 9,8)
17	97,4	5,41 (1H, d, 1,4)	C-15, C-16, C-19, C-20, C-22, C-1'	97,3	5,42 (d, 1,8)
19	148,3	7,38 (1H, d, 2,0)	C-15, C-17, C-20, C-21	148,2	7,38 (d, 2,4)
20	108,9	–	–	108,9	–
21	165,9	–	–	165,8	–
22	133,8	5,43 (1H, dt, 10,0; 17,2)	C-15, C-16, C-17	133,8	5,49 (dt, 10,0; 16,8)
23	120,6	5,13 (1H, dd, 1,8; 10,0) 5,15 (1H, dd, 1,8; 17,2)	C-15, C-16, C-17, C-22 C-15, C-16, C-17, C-22	120,4	5,16 (dd, 1,8; 10,0) 5,19 (dd, 1,8; 16,8)
1'	99,5	4,65 (1H, d, 7,8)	C-17, C-5'	99,5	4,64 (d, 8,0)
2'	74,8	3,17 (1H, dd, 7,8; 8,8)	C-1', C-3'	74,8	3,14 (dd, 8,0; 9,0)
3'	78,0	3,38 (1H, t, 8,8)	C-2', C-4'	77,9	3,36 (m)
4'	71,6	3,26 (1H, t, 9,6)	C-3', C-6'	71,5	3,26 (m)
5'	78,3	3,29 (1H, m)	C-1', C-6'	78,3	3,28 (m)
6'	62,6	3,64 (1H, dd, 9,6; 12,0) 3,86 (1H, dd, 1,6; 12,0)	C-4', C-5' C'-4, C-5'	62,6	3,63 (dd, 5,6; 12,0) 3,83 (dd, 2,0; 12,0)

### II.1.2.1.2- 7-Epi-javaniside (PC-A-2, **157**)

PC-A-2 se présente sous forme d'un solide incolore. Il est soluble dans le méthanol et répond positivement au test de Dragendorff caractéristique d'un alcaloïde.

Son spectre de masse à haute résolution HR-ESI (voir Fig. 12b) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  515,2029 (calculée pour  $C_{26}H_{31}O_9N_2$ , 515,2024) compatible avec la formule brute  $C_{26}H_{30}O_9N_2$  renfermant 13 degrés d'insaturation. Donc PC-A-2 est un isomère de PC-A-1

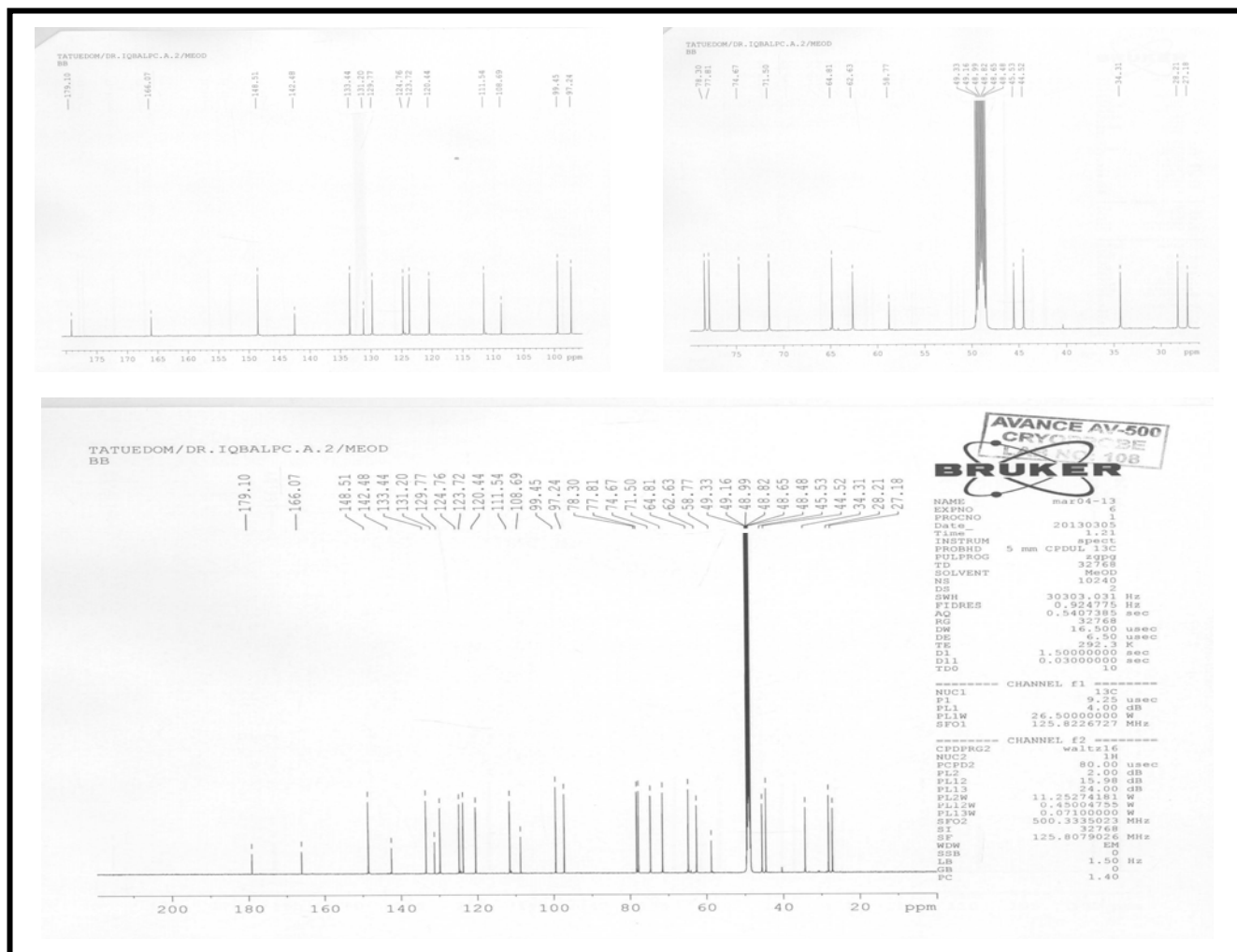
L'analyse minutieuse de son spectre de masse couplée à ceux de l'UV, l'IR, RMN 1D et 2D et comparée aux spectres de PC-A-1 permet d'attribuer à PC-A-2 la structure suivante:



De cette analyse comparée, il ressort que les spectres de ces deux composés sont presque similaires. Cependant on observe sur le profil chromatographique des temps de rétention différents (9,31 et 9,69 minutes pour PC-A-1 et PC-A-2 respectivement), indiquant deux composés différents (Fig. 12a).

En effet, son spectre UV présente des bandes d'absorption à  $\lambda_{\max}$ : 196, 206 et 248 nm attribuables au cycle aromatique (cycle A) et révélant un noyau oxindole (Kitajima et *al.*, 2007; Xin et *al.*, 2008; Salim et *al.*, 2011).

Sur son spectre IR, on observe des bandes de vibration à  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3184 (NH), 3086 (C-H aromatique), 1711 et 1658 (deux C=O, spiroamide et amide  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturée) (Tanahashi et *al.*, 1999), 1587 (C=C oléfinique), 1472 (C=C aromatique) et 1175 (C-O éther cyclique). Ceci est compatible avec l'observation sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 21) des signaux à  $\delta_{\text{C}}$  166,1 (C-21) et 179,1 (C-2), attribuables à deux groupes carbonyles des amides.



**Figure 21:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du 7-*épi*-javaniside (PC-A-2, 157)

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  de PC-A-1 et PC-A-2 sont presque identiques. Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 22) de PC-A-2 présente quatre signaux d'un proton chacun, attribuables au cycle benzénique 1,2-disubstitué (cycle A) d'un noyau oxindole (Kitajima et *al.*, 2007; Xin et *al.*, 2008) à 6,89 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, H-9); 6,96 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, H-12); 7,01 (1H, td,  $J = 1,0$ ; 7,6 Hz, H-10) et 7,25 (1H, td,  $J = 1,2$ ; 7,6 Hz, H-11). Toujours sur ce spectre, on observe un ensemble de signaux dues à la présence d'une unité de sucre à  $\delta_{\text{H}}$  3,15 (1H, dd,  $J = 8,0$ ; 9,2 Hz, H-2'); 3,25 (1H, m, H-4'); 3,27 (1H, m, H-5'); 3,35 (1H, m, H-3'), 3,63 (1H, dd,  $J = 5,6$ ; 12,0 Hz, H-6'), 3,86 (1H, dd,  $J = 1,6$ ; 12,0 Hz, H-6') et 4,63 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1'). Cette portion du sucre a été confirmée d'une part sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  où on observe les signaux caractéristiques du glucose avec le signal du carbone anomérique à  $\delta_{\text{C}}$  99,5 (C-1') et d'autre part



sur le spectre de masse EI (Fig. 23) où on observe un ion fragment  $[M-C_6H_{11}O_6]^+$  à  $m/z$  335 correspondant à la perte d'une unité de glucose. Par ailleurs, la valeur élevée de la constante de couplage du proton anomérique à  $\delta_H$  4,63 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1'), suggère une configuration  $\beta$  ( $\beta$ -O-glycosylé).

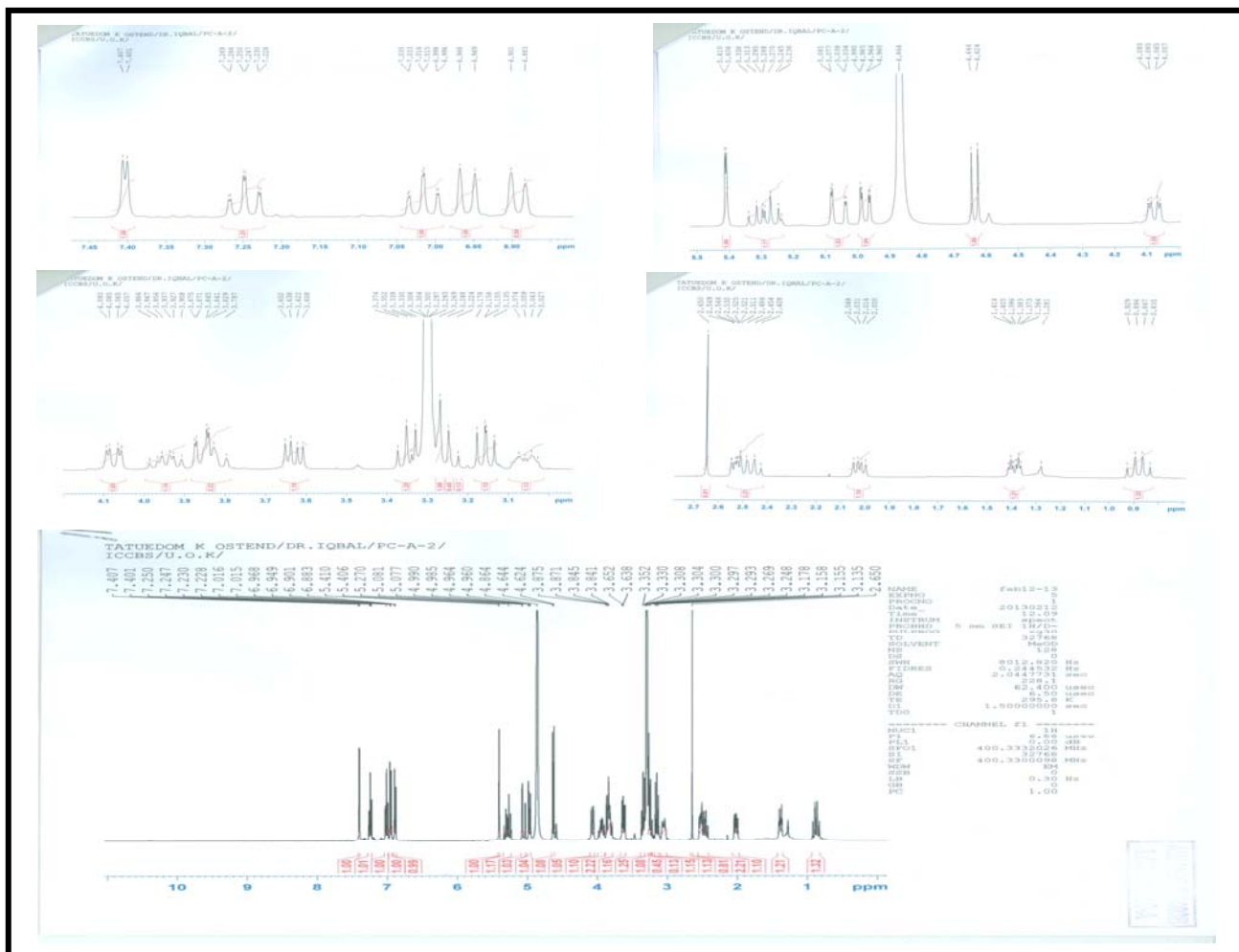
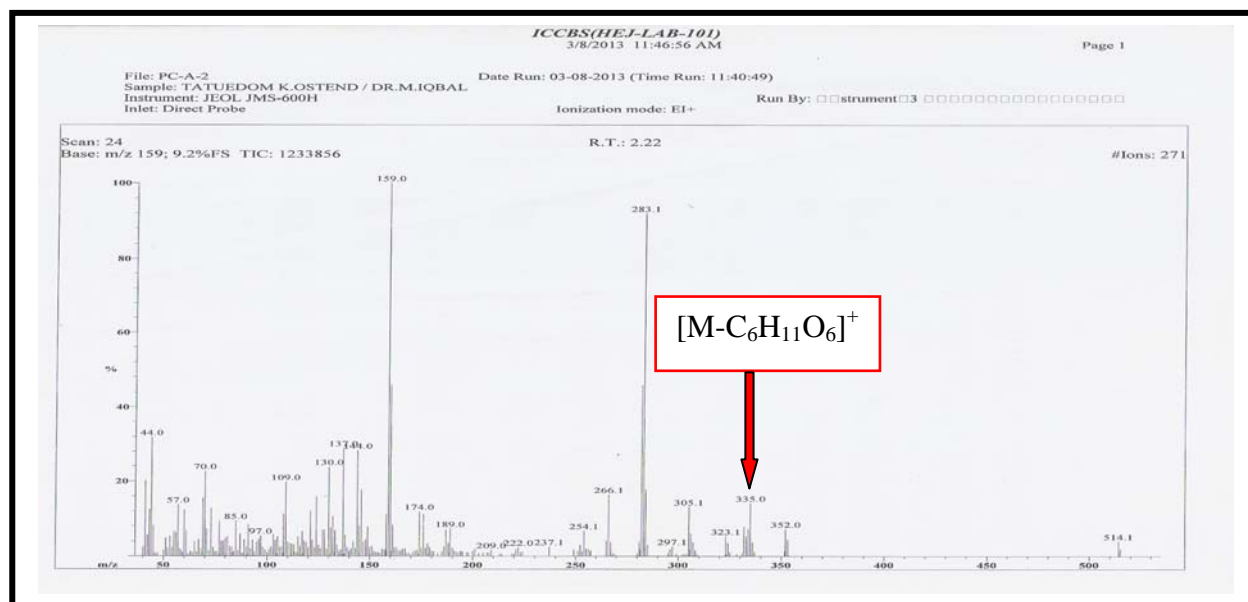


Figure 22: Spectre de RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CD_3OD$ ) du 7-épi-javaniside (PC-A-2, **157**)

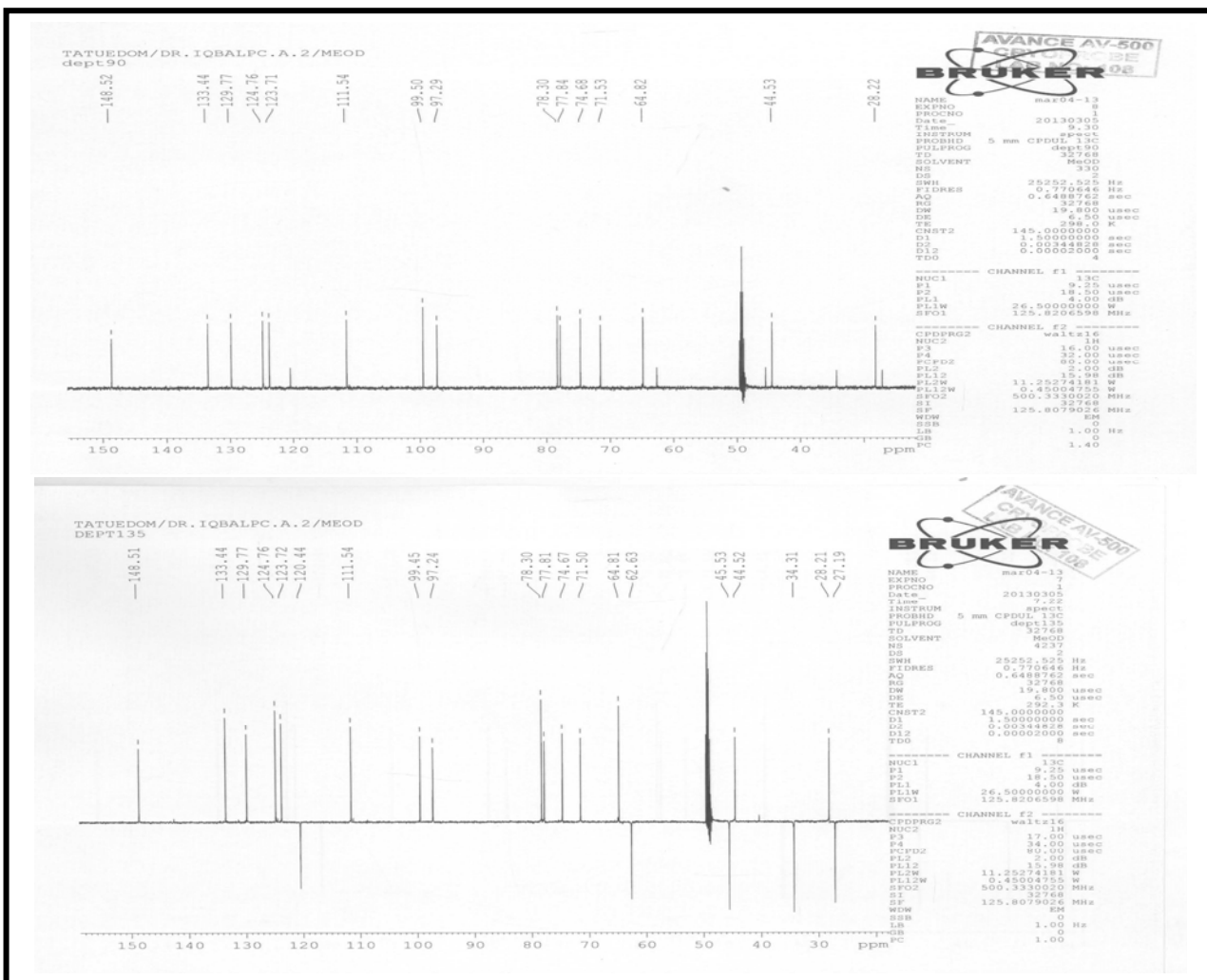


**Figure 23:** Spectre de masse EI du 7-épi-javaniside (PC-A-2, 157)

L'analyse du spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  couplé à ceux du DEPT 135 et 90 (Fig. 24), montre que PC-A-2 possède en plus des 6 carbones du fragment sucre, 20 autres carbones répartis ainsi qu'il suit:

- Quatre méthylènes dont celui à  $\delta_{\text{C}}$  120,4 est attribuable à un méthylène oléfinique (méthylène terminal C-23).
- Dix méthynes dont deux oléfiniques à  $\delta_{\text{C}}$  133,4 (C-22) et 148,5 (C-19) et quatre aromatiques à  $\delta_{\text{C}}$  124,8 (C-9); 123,7 (C-10); 129,8 (C-11) et 111,5 (C-12).
- Six carbones quaternaires dont deux carbonyles des amides à  $\delta_{\text{C}}$  166,1 (C-21) et 179,1 (C-2) et deux aromatiques à  $\delta_{\text{C}}$  131,2 (C-8) et 142,5 (C-13).

De plus sur son spectre de RMN  $^1\text{H}$ , on observe outre les signaux susmentionnés, ceux d'un vinyle terminal à  $\delta_{\text{H}}$  5,28 (1H, dt,  $J = 10,2; 17,2$  Hz, H-22); 4,98 (1H, dd,  $J = 1,8; 10,2$  Hz, H-23); 5,06 (1H, dd,  $J = 1,8; 17,2$  Hz, H-23), de même que ceux d'un proton oléfinique à  $\delta_{\text{H}}$  7,40 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz, H-19) et d'un proton au pied d'un héli-acétal à  $\delta_{\text{H}}$  5,41 (1H, d,  $J = 1,4$  Hz, H-17).



**Figure 24:** Spectre DEPT 135 et 90 du 7-épi-javaniside (PC-A-2, **157**)

L'analyse des spectres COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Fig. 25) et HSQC (Fig. 26) de PC-A-2 fait ressortir les mêmes types de couplage que ceux obtenus sur les spectres de PC-A-1. Elle indique en effet, en plus des systèmes de couplage du noyau aromatique ortho disubstitué et du glucose, deux autres systèmes de couplage indiquant la présence des fragments CH(3)-CH<sub>2</sub>(14)-CH(15)-CH(16)-CH(22)-CH<sub>2</sub>(23) puis CH(16)-CH(17) et CH<sub>2</sub>(5)-CH<sub>2</sub>(6). Il s'agit des systèmes de couplage **(I)**: H-3 ( $\delta$  4,07)-H-14 ( $\delta$  0,87; 1,38)-H-15 ( $\delta$  3,05)-H-16 ( $\delta$  2,53)-H-22 ( $\delta$  5,28)-H-23 ( $\delta$  4,98; 5,06) puis H-16 ( $\delta$  2,53)-H-17 ( $\delta$  5,41) et **(II)**: H-5 ( $\delta$  3,82; 3,93)-H-6 ( $\delta$  2,02; 2,47). Les caractéristiques spectrales des systèmes de couplage **(I)**, **(II)** et le groupe carboxyle  $\alpha,\beta$ -insaturés

déduites à partir des taches de corrélation HMBC (Fig. 27) (voir Tableau XIV) indique une similarité structurale entre PC-A-2 et PC-A-1.

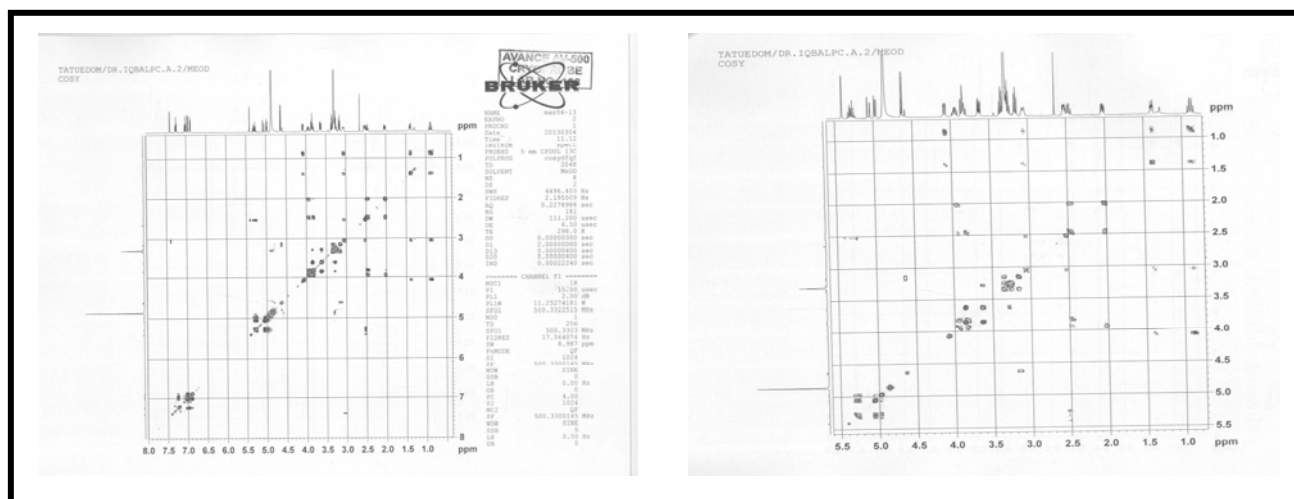


Figure 25: Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du 7-épi-javaniside (PC-A-2, 157)

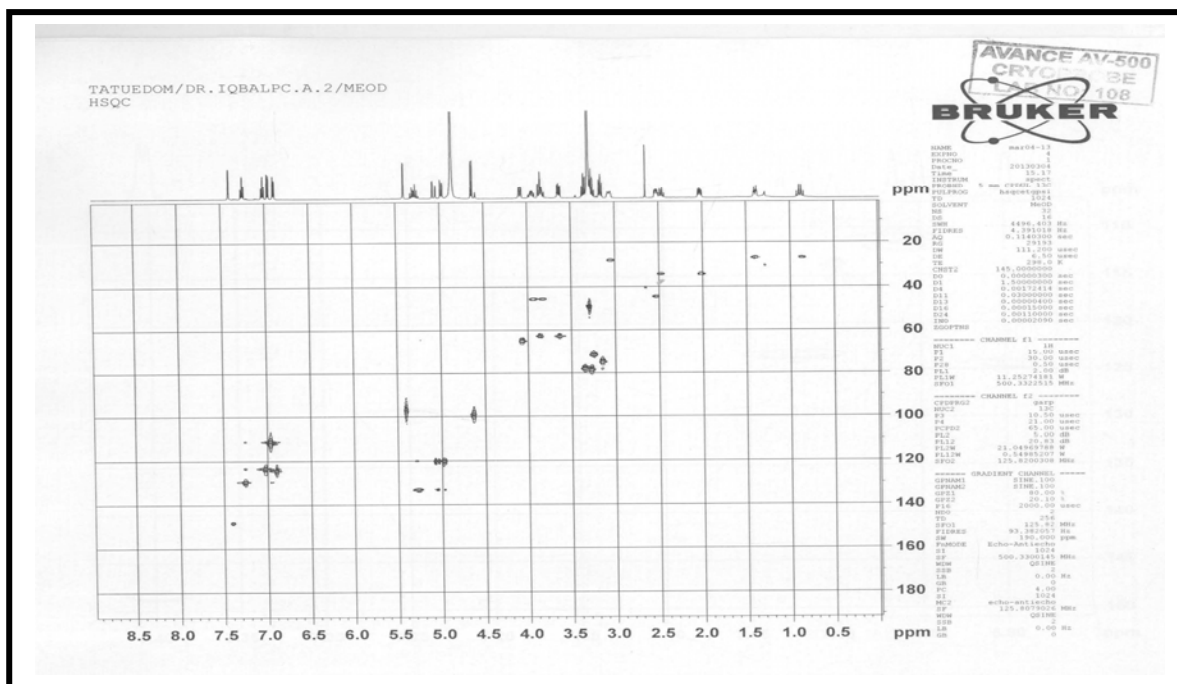
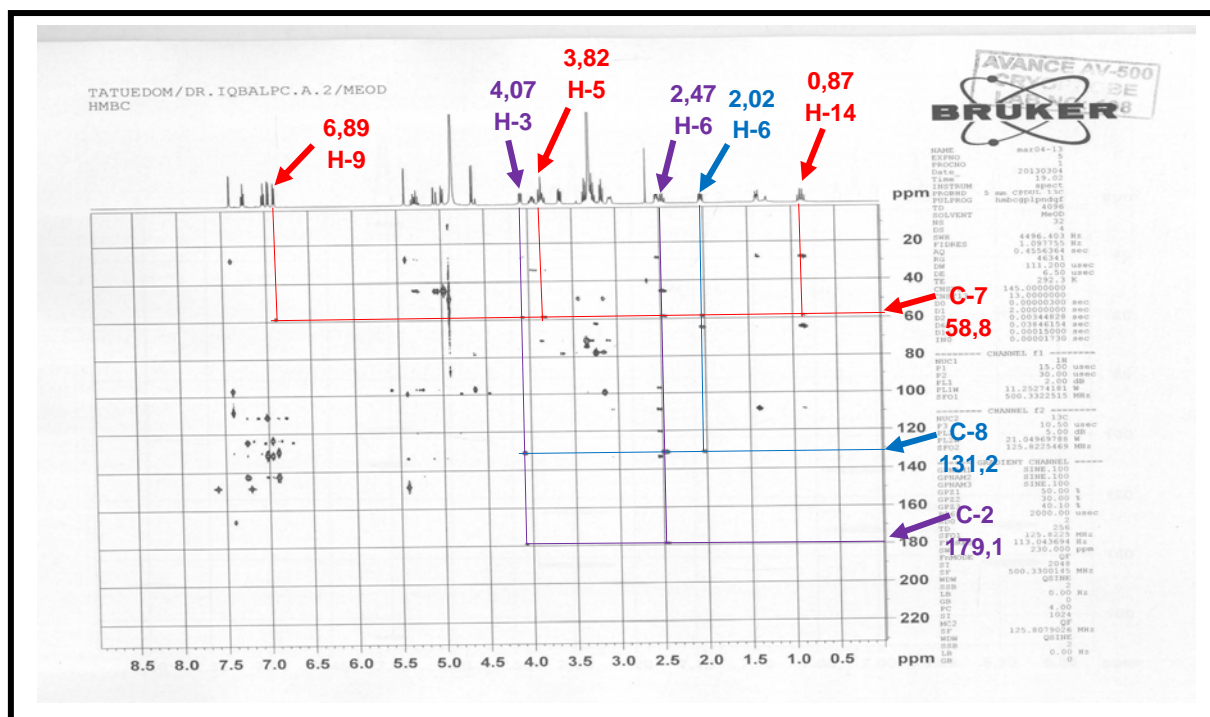


Figure 26: Spectre HSQC du 7-épi-javaniside (PC-A-2, 157)

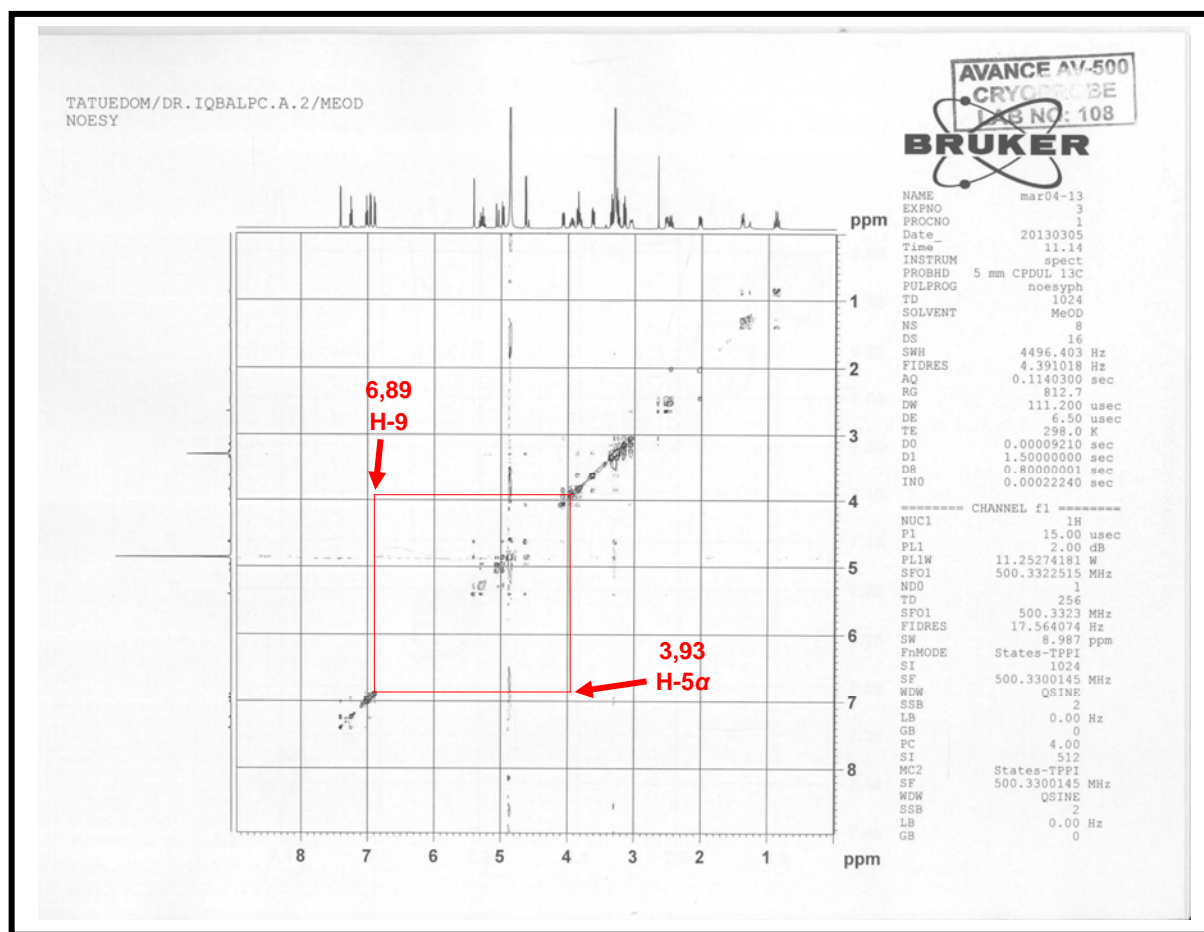


**Figure 27:** Spectre HMBC du 7-épi-javaniside (PC-A-2, 157)

Par ailleurs, les déplacements chimiques caractéristiques à C-2 et C-7 dans les alcaloïdes indolo-monoterpéniques sont de l'ordre de 135 et 108 ppm respectivement (Van et *al.*, 2005). Donc les valeurs des déplacements chimiques de 179,1 (C-2) et 58,8 (C-7) suggèrent fortement l'existence d'un cycle oxoindole au lieu du cycle indole comme dans les alcaloïdes indolo-monoterpéniques courants (Van et *al.*, 2005). Les corrélations  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  longues distances observées ici entre C-2-H-3, C-2-H-6, C-7-H-5, C-7-H-14, C-8-H-3 et C-8-H-6 suggèrent C-7 comme un carbone spiro liant le cycle oxoindole et le cycle pyrrole (Van et *al.*, 2005). Ce lien est confirmé par comparaison des données de RMN  $^{13}\text{C}$  avec celles des alcaloïdes oxoindoles similaires tels que le javaniside 155 (Tableau XIV).

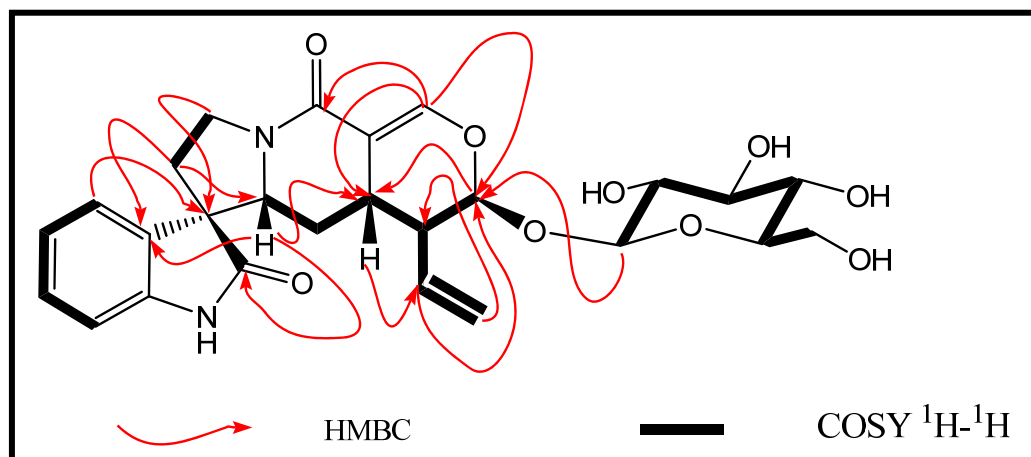
La stéréochimie de PC-A-2 a été déterminée grâce à une analyse minutieuse de toutes les constantes de couplage. En effet, les constantes de couplage entre H-16-H-17 ( $J = 1,4$  Hz) et H-16-H-15 ( $J = 6,8$  Hz) suggèrent fortement les orientations  $\beta/\beta/\alpha$  de H-15, H-16 et H-17 (Van et *al.*, 2005). La configuration  $\beta$  de H-3 a été soutenue par les constantes de couplage entre les protons H-3 et H-14 ( $J_{3,14\alpha} = 11,2$  Hz;  $J_{3,14\beta} = 3,4$  Hz) (Van et *al.*, 2005).

Une petite différence conséquente a été observée par comparaison entre le composé PC-A-2 et le javaniside (PC-A-1). Contrairement au javaniside, l'absence de toute tache de corrélation NOE sur le spectre NOESY (Fig. 28) de PC-A-2 entre les protons H<sub>3</sub>-H<sub>9</sub> et H<sub>6β</sub>-H<sub>9</sub>, fournit des indices additionnels sur la stéréochimie de PC-A-2. En effet, elle suggère fortement que le carbonyle en C-2 est au-dessus du plan C/D/E. Cette information est soutenue par la tache de corrélation NOE observée entre les protons H<sub>9</sub> et H<sub>5α</sub>. La corrélation entre H<sub>3</sub> et H<sub>5β</sub> soutient d'avantage la configuration β/β de ces deux protons (Ma et Hecht, 2004). Il en est de même pour les corrélations entre H<sub>3</sub> et H<sub>15</sub> puis H<sub>3</sub> et H<sub>16</sub>. Ainsi, les signaux des atomes autour du carbone asymétrique C-7 suggèrent que PC-A-2 est l'épimère en C-7 du javaniside.



**Figure 28:** Spectre NOESY du 7-épi-javaniside (PC-A-2, 157)

La combinaison de toutes ces données spectrales comparée à celles du javaniside permet de confirmer pour PC-A-2, la structure **157** qui est celle d'un isomère du javaniside. Cet alcaloïde spirooxindolomonoterpénique est isolé ici pour la première fois d'une source naturelle, mais a été synthétisé en 2005 et le nom de (3*R*, 7*R*)-7-épi-javaniside lui fut proposé (Van et *al.*, 2005).



**Schéma 13:** Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC et COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H du (3*R*, 7*R*)-7-épi-javaniside (PC-A-2, **157**)

**Tableau XIV:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du 7-épi-javaniside (PC-A-2, **157**) dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  comparées à celles du javaniside (PC-A-1, **155**).

Position	PC-A-2			PC-A-1	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1-NH</b>	–	–	–	10,19 (1H, s)	–
<b>2</b>	–	179,1	–	–	180,9
<b>3</b>	4,07 (1H, dd, 3,2; 11,2)	64,8	C-2, C-7, C-8, C-15	4,05 (1H, dd, 3,2; 11,2)	65,5
<b>5</b>	$\beta$ 3,82 (1H, ld, 12,4)	45,5	C-7	3,75 (1H, lt, 10,0; 11,6)	45,7
	$\alpha$ 3,93 (1H, td, 7,3; 12,4)		C-6	4,00 (1H, dd, 8,0; 11,6)	
<b>6</b>	$\alpha$ 2,02 (1H, dd, 7,3; 12,8)	34,3	C-3, C-7, C-8	2,21 (1H, dd, 8,0; 13,2)	33,4
	$\beta$ 2,47 (1H, dd, 10,4; 12,8)		C-2, C-5, C-7, C-8	2,40 (1H, ddd, 10,0; 12,8; 13,2)	
<b>7</b>	–	58,8	–	–	58,0
<b>8</b>	–	131,2	–	–	129,5
<b>9</b>	6,89 (1H, d, 7,6)	124,8	C-7, C-11, C-13	7,30 (1H, d, 7,6)	124,0
<b>10</b>	7,01 (1H, td, 1,0; 7,6)	123,7	C-8, C-12	7,07 (1H, td, 0,8; 7,6)	123,8
<b>11</b>	7,25 (1H, td, 1,0; 7,6)	129,8	C-9, C-13	7,25 (1H, td, 0,8; 7,6)	130,1
<b>12</b>	6,96 (1H, d, 7,6)	111,5	C-8, C-10	6,92 (1H, d, 7,6)	111,0
<b>13</b>	–	142,5	–	–	143,5
<b>14</b>	$\alpha$ 0,87 (1H, q, 12,6)	27,2	C-3, C-7, C-15, C-20	1,24 (1H, q, 12,0)	27,0
	$\beta$ 1,38 (1H, dt, 3,6; 12,6)		C-3, C-15, C-20	1,33 (1H, dt, 4,0; 12,0)	
<b>15</b>	3,05 (1H, m)	28,2	C-20, C-22	2,96 (1H, m)	28,8
<b>16</b>	2,53 (1H, ddd, 1,4; 6,8; 9,6)	44,5	C-14, C-17, C-20, C-22, C-23	2,50 (1H, ddd, 1,4; 6,8; 8,4)	44,6
<b>17</b>	5,41 (1H, d, 1,4)	97,2	C-15, C-19, C-22, C-1'	5,41 (1H, d, 1,4)	97,4
<b>19</b>	7,40 (1H, d, 2,4)	148,5	C-15, C-17, C-20, C-21	7,38 (1H, d, 2,0)	148,3
<b>20</b>	–	108,7	–	–	108,9
<b>21</b>	–	166,1	–	–	165,9
<b>22</b>	5,28 (1H, dt, 10,2; 17,2)	133,4	C-15, C-16, C-17	5,43 (1H, dt, 10,0; 17,2)	133,8
<b>23</b>	4,98 (1H, dd, 1,8; 10,2)	120,4	C-16, C-22	5,13 (1H, dd, 1,8; 10,0)	120,6
	5,06 (1H, dd, 1,8; 17,2)		C-16, C-22	5,15 (1H, dd, 1,8; 17,2)	
<b>1'</b>	4,63 (1H, d, 8,0)	99,5	C-17, C-5'	4,65 (1H, d, 7,8)	99,5
<b>2'</b>	3,15 (1H, dd, 8,0; 9,2)	74,7	C-1', C-3'	3,17 (1H, dd, 7,8; 8,8)	74,8
<b>3'</b>	3,35 (1H, m)	77,8	C-2', C-4'	3,38 (1H, t, 8,8)	78,0
<b>4'</b>	3,25 (1H, m)	71,5	C-3', C-5', C-6'	3,26 (1H, t, 9,6)	71,6
<b>5'</b>	3,27 (1H, m)	78,3	C-4'	3,29 (1H, m)	78,3
<b>6'</b>	3,63 (1H, dd, 5,6; 12,0)	62,6	C-4', C-5'	3,64 (1H, dd, 9,6; 12,0)	62,6
	3,86 (1H, dd, 1,6; 12,0)		C'-4'	3,86 (1H, dd, 1,6; 12,0)	

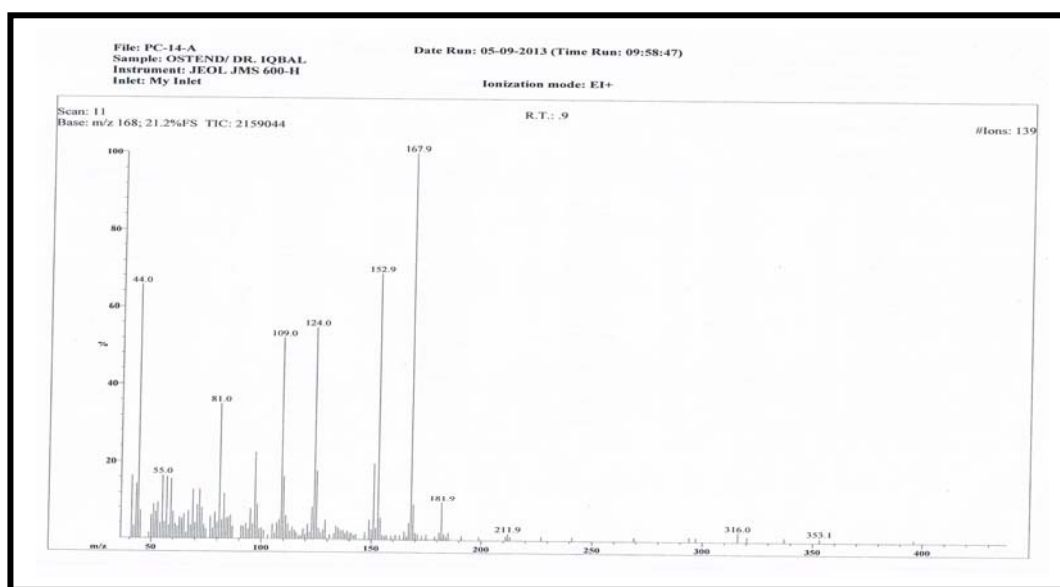


---

### II.1.2.2- Les acides phénoliques et dérivés: l'acide vanillique ou acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14-A, 158)

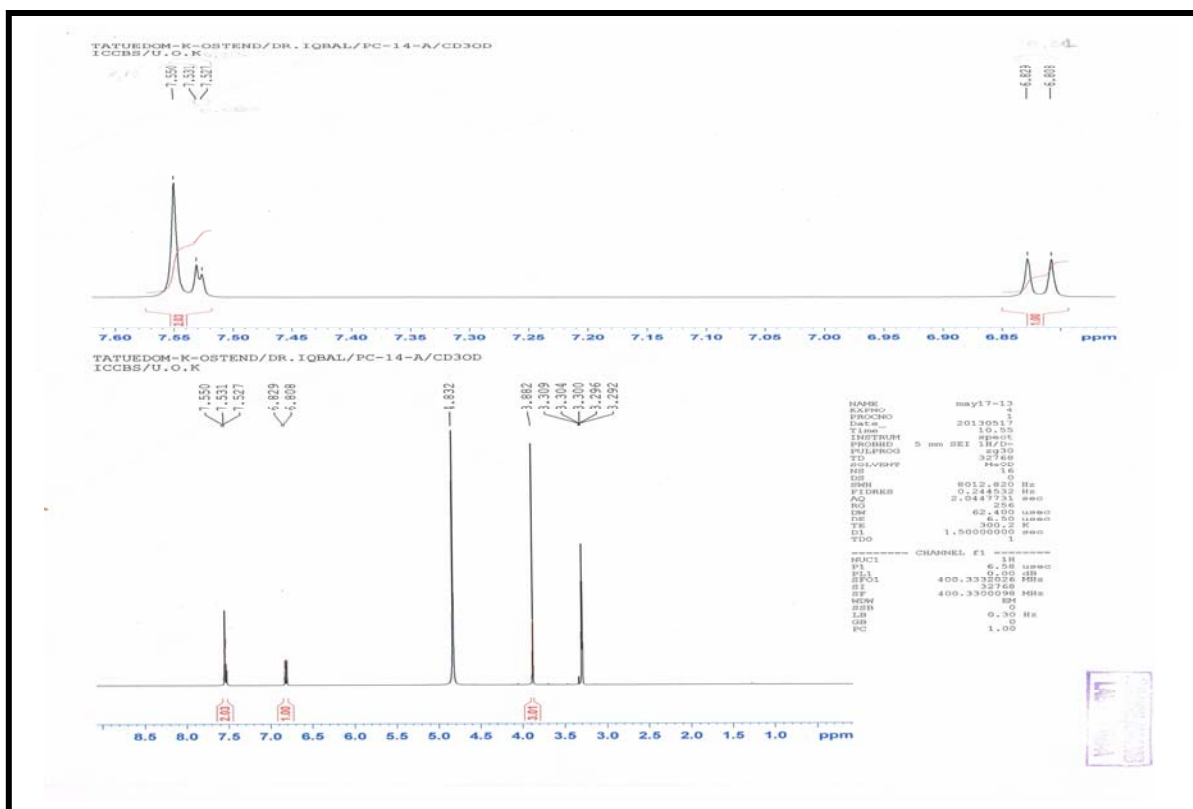
PC-14-A se présente sous forme de fibres jaunes. Il est soluble dans le méthanol et fond entre 210-213°C. Il répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des composés phénoliques.

Son spectre de masse en EI (Fig. 29) présente le pic de l'ion moléculaire  $[M]^+$  à  $m/z$  168 compatible avec la formule brute  $C_8H_8O_4$  renfermant 5 degrés d'insaturation.



**Figure 29:** Spectre de masse en EI de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14A, 158)

Sur son spectre de RMN  $^1H$  (Fig. 30) on observe outre le singulet à  $\delta_H$  3,88 (3H, s) attribuable à un groupement méthoxy, un ensemble de trois signaux à  $\delta_H$  6,82 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz);  $\delta_H$  7,53 (1H, dd,  $J = 8,4; 1,6$  Hz);  $\delta_H$  7,55 (1H, d,  $J = 1,6$  Hz) attribuables à un noyau aromatique substitué (système ABX).



**Figure 30:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14A, **158**)

Son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 31) présente huit signaux de carbone. L'analyse de ce spectre couplée à ceux du DEPT 90 et 135 (Fig. 32) et du HSQC (voir Tableau XV) fait ressortir:

- Un signal de méthyle à  $\delta_{\text{C}}$  56,3, confirmant ainsi la présence du groupement méthoxyle ( $-\text{OCH}_3$ ).
- Trois signaux de méthynes à  $\delta_{\text{C}}$  115,7;  $\delta_{\text{C}}$  125,2 et  $\delta_{\text{C}}$  113,7.
- Quatre signaux de carbones quaternaires à  $\delta_{\text{C}}$  123,7;  $\delta_{\text{C}}$  148,6;  $\delta_{\text{C}}$  152,4;  $\delta_{\text{C}}$  170,6. Ceux à  $\delta_{\text{C}}$  148,6 et  $\delta_{\text{C}}$  152,4 sont attribuables aux carbones aromatiques oxygénés et celui à  $\delta_{\text{C}}$  170,6 attribuable à un carbonyle.

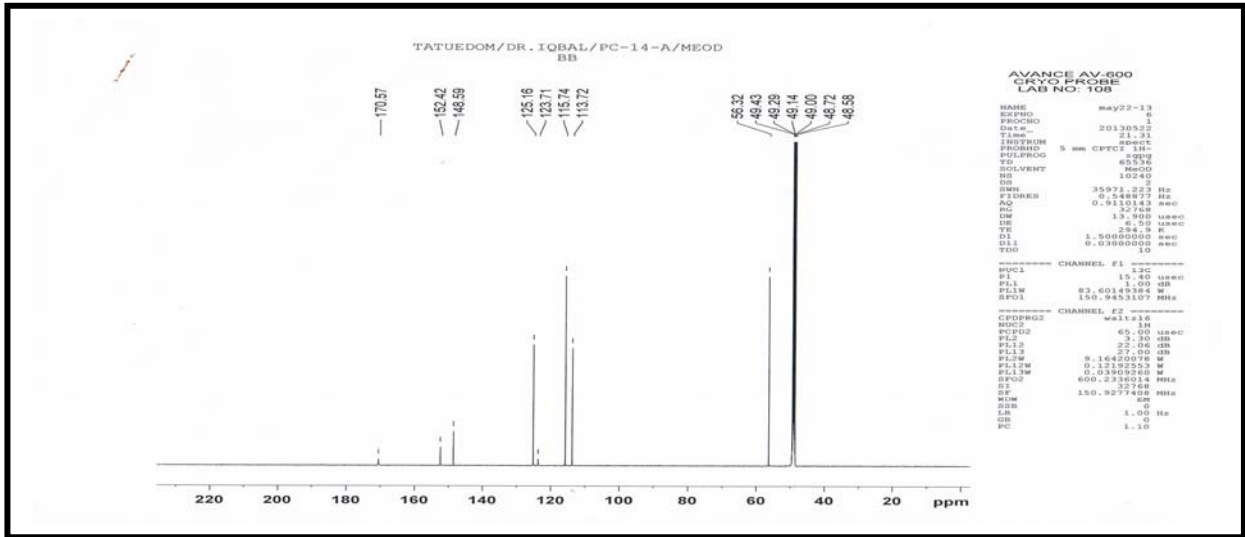


Figure 31: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14A, 158)

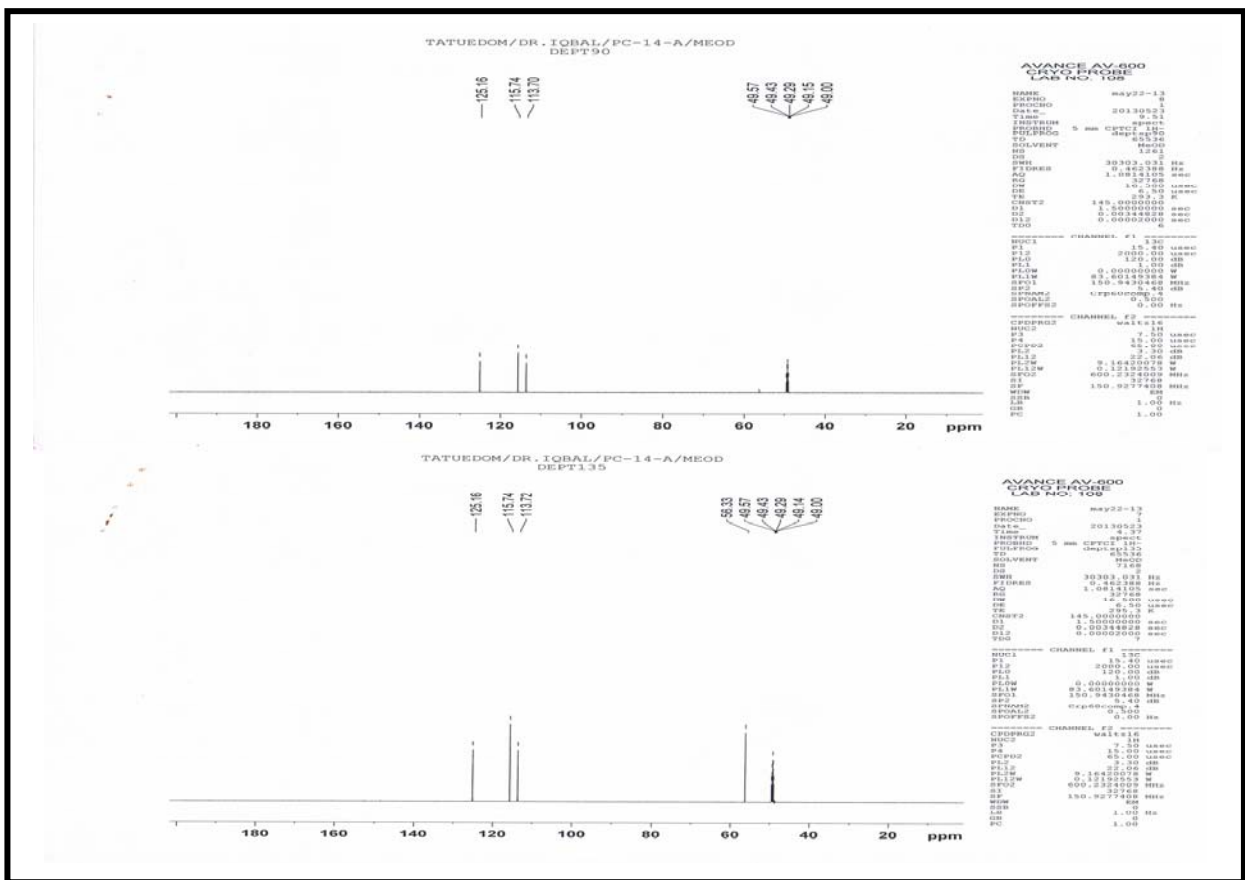
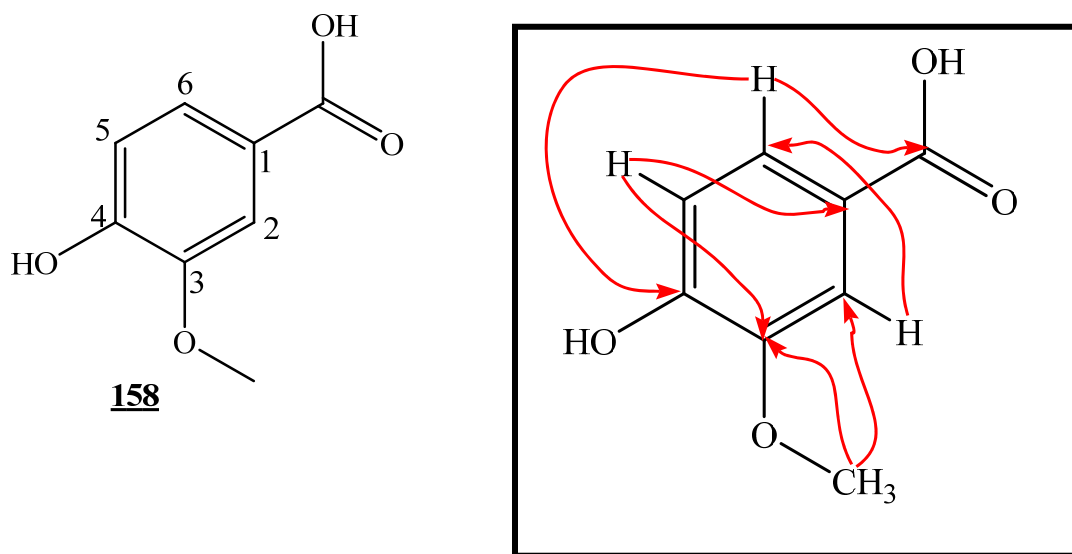


Figure 32: Spectres DEPT 90 et DEPT 135 de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14A, 158).

La position des substituants carboxyle, hydroxyle et méthoxyle sur le noyau aromatique a été confirmée par la présence sur le spectre HMBC (schéma 14) des taches de corrélation entre protons et carbones à  $\delta_H$  3,88/  $\delta_C$  148,6,  $\delta_C$  113,7;  $\delta_H$  6,82/  $\delta_C$  123,7,  $\delta_C$  148,6;  $\delta_H$  7,53/  $\delta_C$  152,4,  $\delta_C$  170,6 et  $\delta_H$  7,55/  $\delta_C$  125,2.

L'ensemble de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites dans la littérature (Tableau XV) permet d'attribuer à PC-14A la structure **158** qui est celle de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque ou acide vanillique, déjà isolé de *Vangueria edulis* par Daoud *et al.* (2012). A notre connaissance, cet acide est isolé ici pour la première fois d'une espèce du genre *Pauridiantha*.

En général, les acides phénoliques possèdent de nombreuses fonctions physiologiques et pharmacologiques. L'acide vanillique en particulier a été évalué pour ses propriétés de suppression du venin de serpent, l'apoptose cellulaire dans les cellules Neuro-2A, l'inflammation hépatique auto-immune chez la souris et la carcinogénèse. En tant qu'un additif alimentaire autorisé avec une odeur très agréable, cet acide phénolique spécifique combine les propriétés idéales pour fonctionner comme une molécule d'inducteur physiologiquement inerte dans l'avenir des thérapies basées sur les gènes et les cellules (Gitzinger *et al.*, 2012).



**Schéma 14:** Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque ou acide vanillique (PC-14A, **158**)

**Tableau XV:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de PC-14A (**158**) dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  comparées aux données de la littérature (Daoud et *al.*, 2012).

Position	PC-14A		Acide vanillique	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	123,7	-	121,7
<b>2</b>	7,55 (1H, d, 1,6)	113,7	7,55 (1H, <i>ls</i> )	114,4
<b>3</b>	-	148,6	-	147,2
<b>4</b>	-	152,4	-	151,2
<b>5</b>	6,82 (1H, d, 8,4)	115,7	6,83 (1H, d, 8,0)	112,4
<b>6</b>	7,53 (1H, dd, 1,6; 8,4)	125,2	7,56 (1H, dd, 2,0; 8,0)	123,8
<b>-COOH</b>	-	170,6	-	168,7
<b>-OCH<sub>3</sub></b>	3,88 (3H, s)	56,3	3,80 (3H, s)	55,0

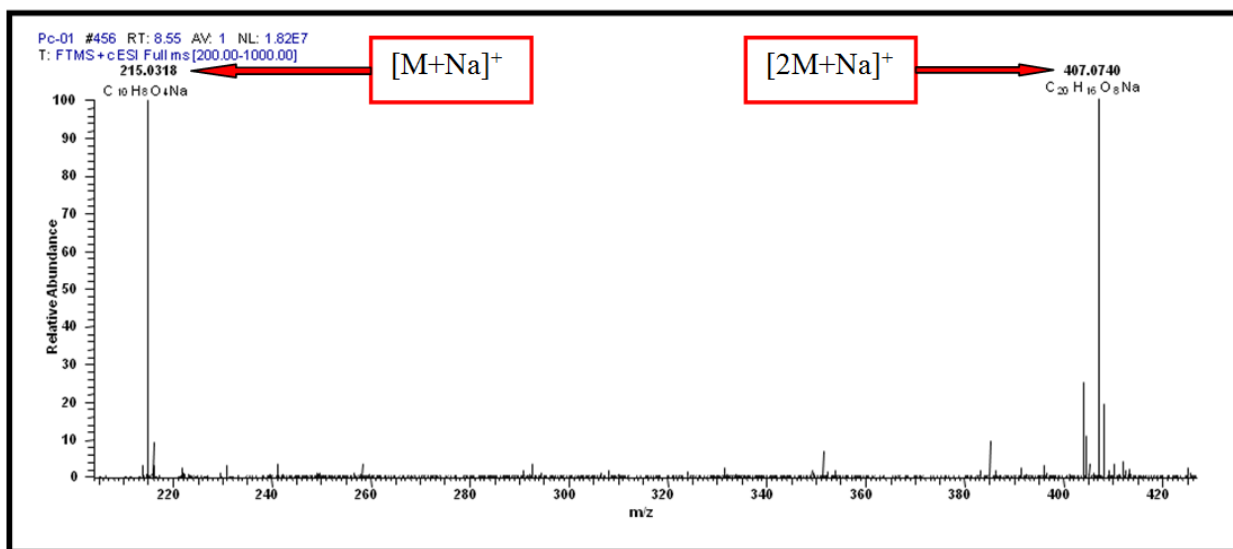
### II.1.2.3- Les coumarines

Nous avons isolé de *P. callicarpoides* trois coumarines indexées PC-1, PC-4, PC-29-1 et un mélange de deux autres que nous avons indexé PC-29-2 constitué de PC-29-1 et son isomère.

#### II.1.2.3.1- La scopolétine ou scopolétol ou 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine (PC-1, **44**)

PC-1 se présente sous forme d'aiguilles jaunes dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (97,5/2,5). Il est soluble dans l'acétone et fond entre 200 et 207°C. Il répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des composés phénoliques.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 33) présente le pic de l'ion moléculaire [M+Na]<sup>+</sup> à *m/z* 215,0318 (calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>Na: 215,0315) compatible avec la formule brute C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> renfermant 7 degrés d'insaturation.

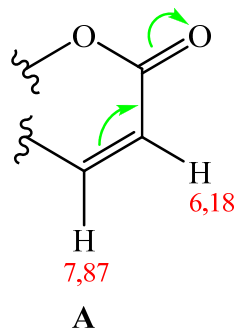


**Figure 33:** Spectre de masse HR-ESI de la scopolétine (PC-1, **44**)

Sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 34), on observe des signaux à δ<sub>H</sub> 6,18 (1H, d, *J* = 9,2 Hz) et à δ<sub>H</sub> 7,87 (1H, d, *J* = 9,2 Hz) attribuables à un système AX des protons oléfiniques en position *cis*. Par ailleurs, le spectre de RMN <sup>13</sup>C (Fig. 35) montre un signal à δ<sub>C</sub> 159,4 attribuable au carbonyle d'un ester. Les valeurs des déplacements chimiques de ces protons sus énumérés montrent qu'ils seraient localisés en α et β du carbonyle. Ceci est confirmé sur son spectre HMBC (schéma 15) où on observe des taches de corrélation entre les signaux du proton résonant

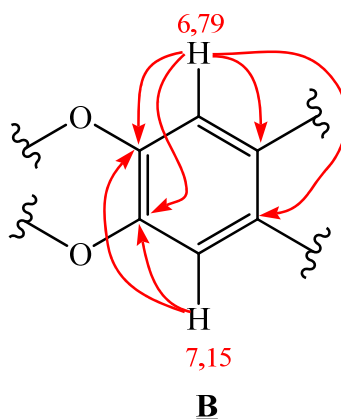
---

à  $\delta_H$  7,87; 6,18 et le signal du carbone à  $\delta_C$  159,4. Ces informations permettent de proposer le fragment **A**.

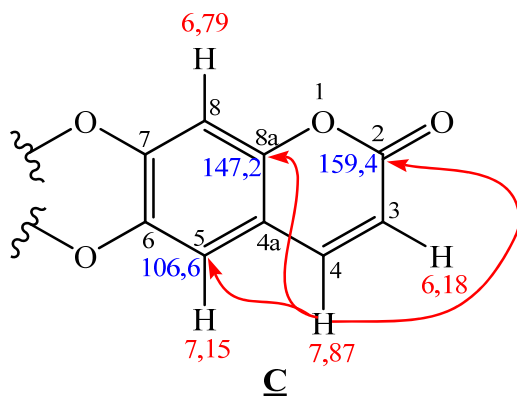


Sur le spectre HMQC (Tableau XVI), on observe des taches de corrélation hétéronucléaire entre les signaux des protons et des carbones à  $\delta_H$  6,18 et  $\delta_C$  109,2;  $\delta_H$  7,87 et  $\delta_C$  142,3;  $\delta_H$  3,86 et  $\delta_C$  53,3;  $\delta_H$  6,79 et  $\delta_C$  100,2;  $\delta_H$  7,15 et  $\delta_C$  106,6.

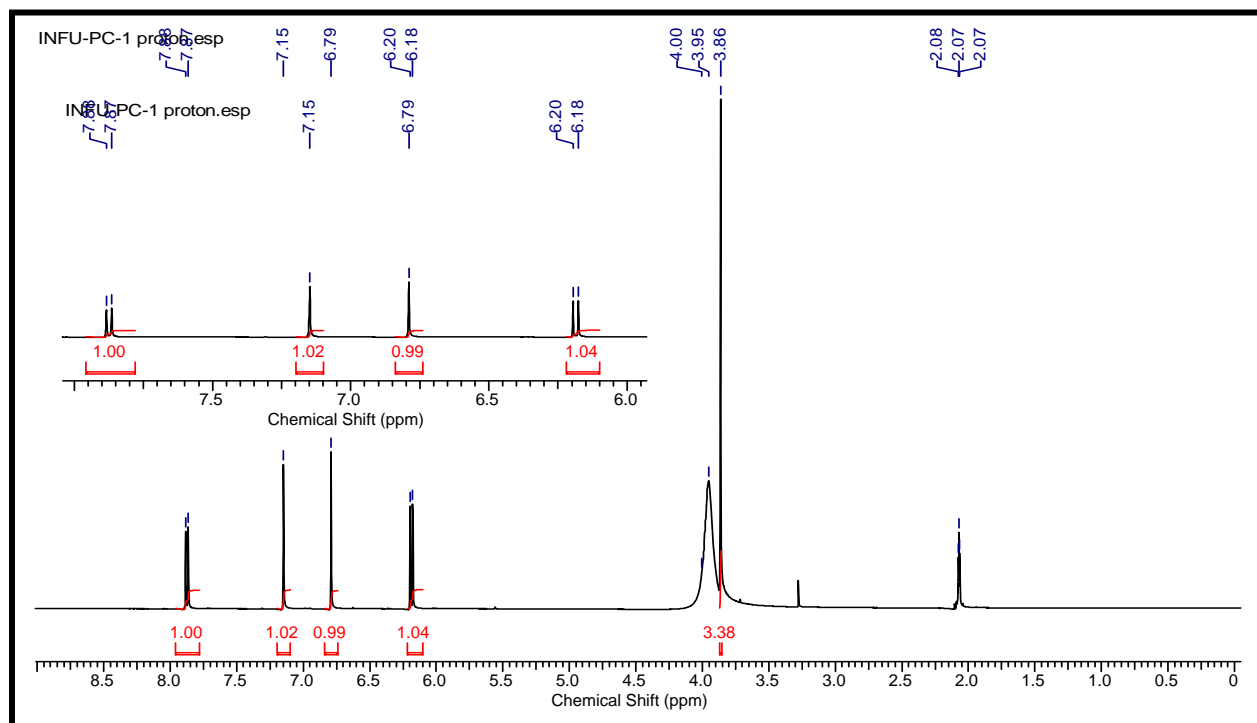
Toujours sur le spectre de RMN  $^1H$ , on observe également deux signaux à  $\delta_H$  6,79 (1H, s) et 7,15 (1H, s) attribuables aux protons d'un noyau aromatique. Sur le spectre HMBC, on observe des taches de corrélation entre les signaux des protons à  $\delta_H$  6,79; 7,15 et les signaux des carbones aromatiques oxygénés à  $\delta_C$  147,2 et 148,7 Ceci nous permet de déduire que les deux protons sont en position *para* et de proposer le fragment **B**.



Sur le spectre HMBC, on observe également des taches de corrélation entre le signal du proton à  $\delta_H$  7,87 et les signaux des carbones à  $\delta_C$  106,6; 147,2 et 159,4. L'ensemble de ces informations permet d'illustrer la sous structure **C** obtenue en reliant les fragments **A** et **B**.

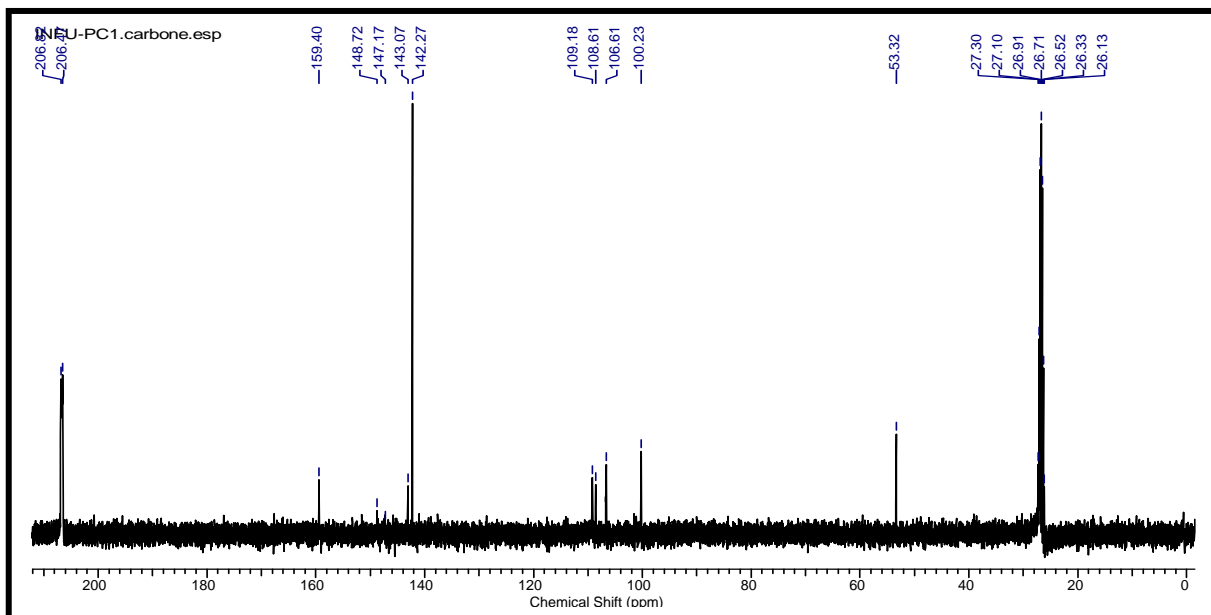


De plus, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  révèle un signal à  $\delta_{\text{H}}$  3,86 (3H, s) attribuable à un groupement méthoxyle qui est confirmé par le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  où on observe un signal à  $\delta_{\text{C}}$  53,3. Par ailleurs, sur le spectre HMBC on observe une tache de corrélation entre les signaux à  $\delta_{\text{H}}$  3,86 et  $\delta_{\text{C}}$  143,1 (C-6). Ce qui permet de positionner le groupement méthoxyle sur C-6. Compte tenu de la formule brute ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ ), nous avons fixé le groupement hydroxyle sur C-7.



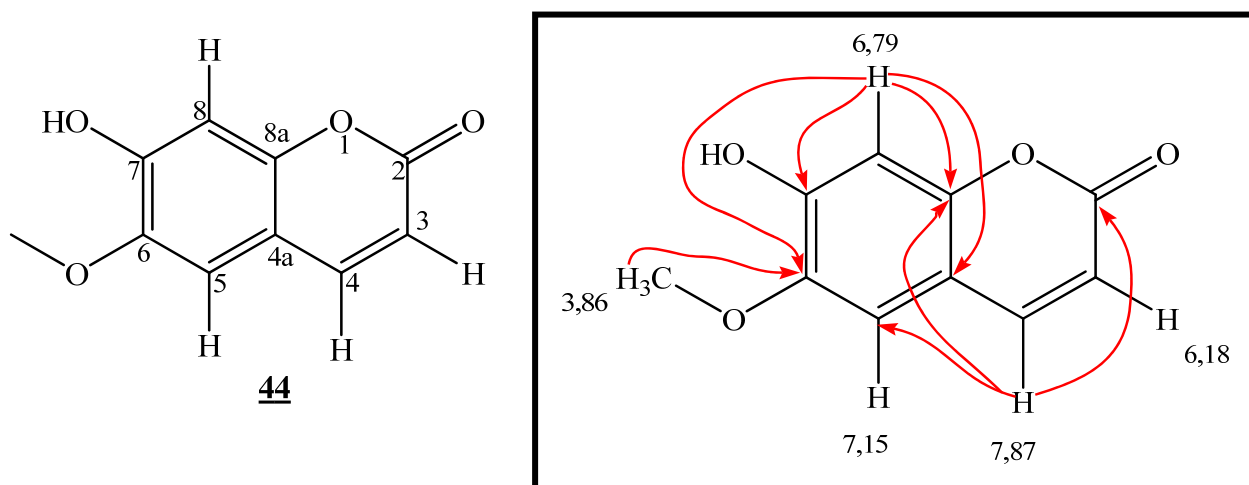
**Figure 34:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) de la scopolétine (PC-1, **44**)





**Figure 35:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) de la scopolétine (PC-1, **44**)

La comparaison de toutes ces données spectrales avec celles décrites dans la littérature (Nikoletta et *al*, 2000) nous a permis d'attribuer à PC-1, la structure **44** qui est celle de la 7-hydroxy-6-méthoxy-2*H*-1-benzopyran-2-one encore appelée scopolétine ou scopolétole précédemment isolée des fruits de *Melia azedarach* L (Nikoletta et *al*, 2000).



**Schéma 15:** Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de la scopolétine (PC-1, **44**).

La scopolétine possède une large gamme d'activités biologiques. Nous pouvons citer entre autre:

- L'activité inhibitrice modérée contre *Micrococcus luteus* (Li et al., 2013).
- L'activité inhibitrice de  $\alpha$ -glucosidase comparée au contrôle positive de l'acarbose (Nurul et al., 2013).
- L'inhibition de la germination de *Panicum miliaceum* (Del Corral et al., 2012).
- Les effets inhibiteurs sur les bactéries et les champignons (Gnonlonfin et al., 2012).
- La scopolétine a montré la plus forte activité acaricide contre *Tetranychus cinnabarinus*, l'activité acaricide optimale étant obtenue à 23,2 et 25,3 °C (Yang et al., 2012).
- La scopolétine a montré des activités hypo-uricémiantes, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques (Yao et al., 2012; Beh et al., 2012).
- La scopolétine est un antioxydant, un antidépresseur et un hypotenseur. Elle exerce des activités anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-diabétiques, antimicrobiennes et anticonvulsives. Elle inhibe la peroxydation lipidique hépatique et augmente l'activité des antioxydants endogènes. La propriété anticancéreuse de la scopolétine est due à l'inhibition de la prolifération de certaines cellules cancéreuses en induisant l'apoptose (Habbu et al., 2012; Cheng et al., 2012).
- Les activités anti-arthritiques *in vivo* en partie en empêchant l'angiogénèse synoviale (Pan et al., 2011) et gastrocinétique (Nima et al., 2012) ont été mentionnées.

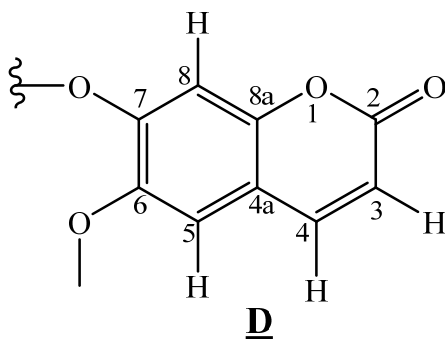
**Tableau XVI:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de la scopolétine (PC-1, **44**) dans l'acétone.

Position	PC-1	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	-	159,4
<b>3</b>	6,18 (1H, d, 9,2)	109,
<b>4</b>	7,87 (1H, d, 9,2)	142,3
<b>5</b>	7,15 (1H, s)	106,6
<b>6</b>	-	143,1
<b>7</b>	-	148,7
<b>8</b>	6,79 (1H, s)	100,2
<b>4a</b>	-	108,6
<b>8a</b>	-	147,2
<b>-OCH<sub>3</sub></b>	3,86 (3H, s)	53,3

### II.1.2.3.2- Hymexelsine ou xeroboside (PC-4, 159)

PC-4 se présente sous forme de fibres blanchâtres dans le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (77,5/22,5). Il est soluble dans la pyridine et fond à 206 °C. Il répond positivement au test de Molish caractéristique des glycosides. Son spectre de masse en haute résolution (HR-ESI) (Fig. 36) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire [M+H]<sup>+</sup> à *m/z* 487,1443 (calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>13</sub>: 487,1446) compatible avec la formule brute C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub> renfermant 9 insaturations.

L'analyse des spectres de RMN <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H (Fig. 37 et Fig. 38) de PC-4 comparée à l'analyse de ceux de PC-1 (Fig. 34 et Fig. 35) permet de relever certaines similitudes dans leurs structures. En effet, sur son spectre de RMN <sup>13</sup>C on observe un ensemble de signaux à δ<sub>C</sub> 104,8; 109,7; 113,2; 114,0; 144,1; 147,1; 148,6; 151,4 et 161,8 attribuables au noyau coumarinique observé dans PC-1. De même, on observe un signal à δ<sub>C</sub> 56,3 ppm attribuable à un groupement méthoxyle. PC-1 serait donc la partie aglycone de PC-4. D'où la sous structure **D** suivante:



Sur ce même spectre de RMN <sup>13</sup>C, on observe deux signaux caractéristiques à δ<sub>C</sub> 102,3 et 111,6 ppm attribuables aux carbones anomériques du glucose et de l'apiose respectivement. En plus, on y observe entre δ<sub>C</sub> 65,0 et 81,0 ppm, 9 signaux attribuables aux carbones des sucres.

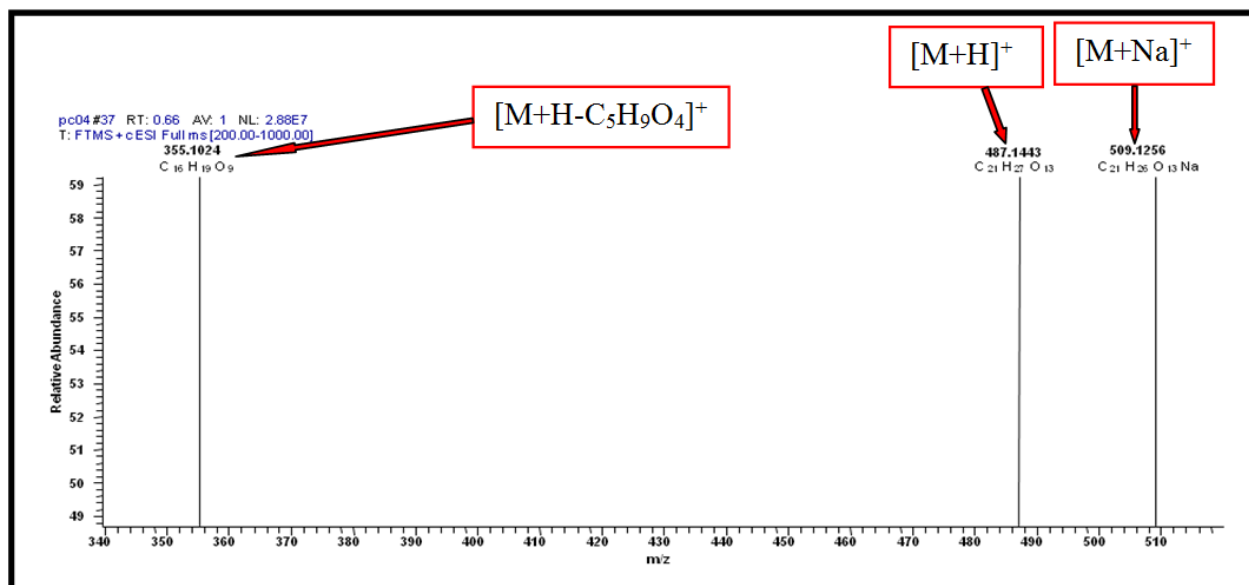


Figure 36: Spectre de masse HR-ESI de l'hymexelsine (PC-4, 159)

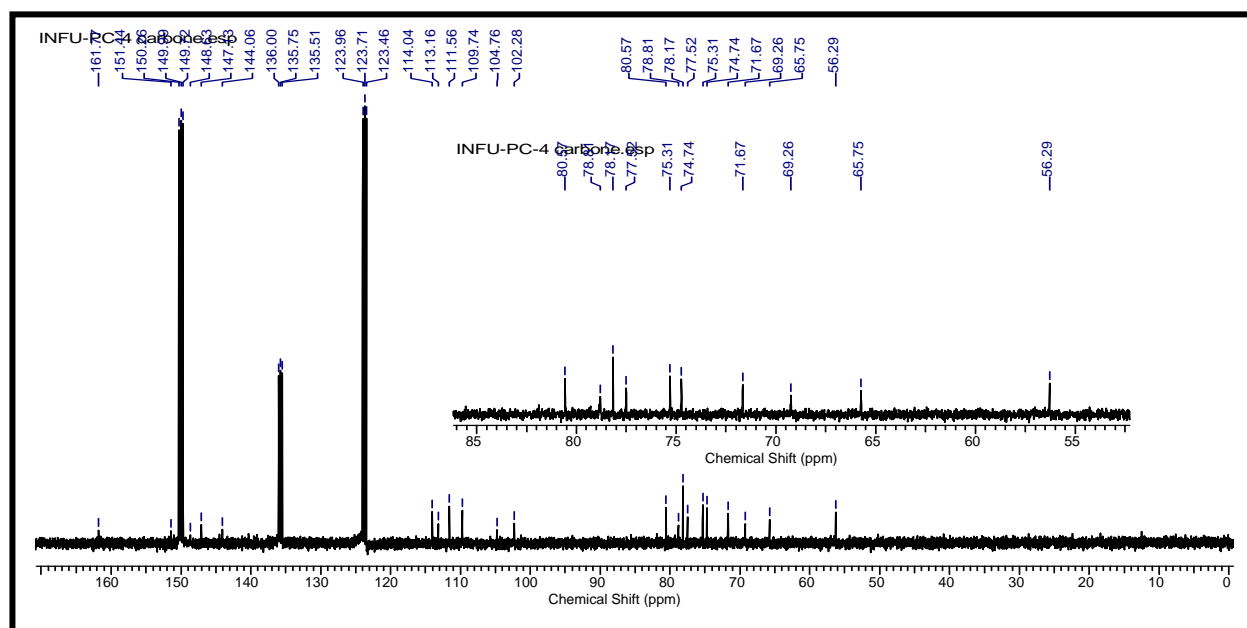
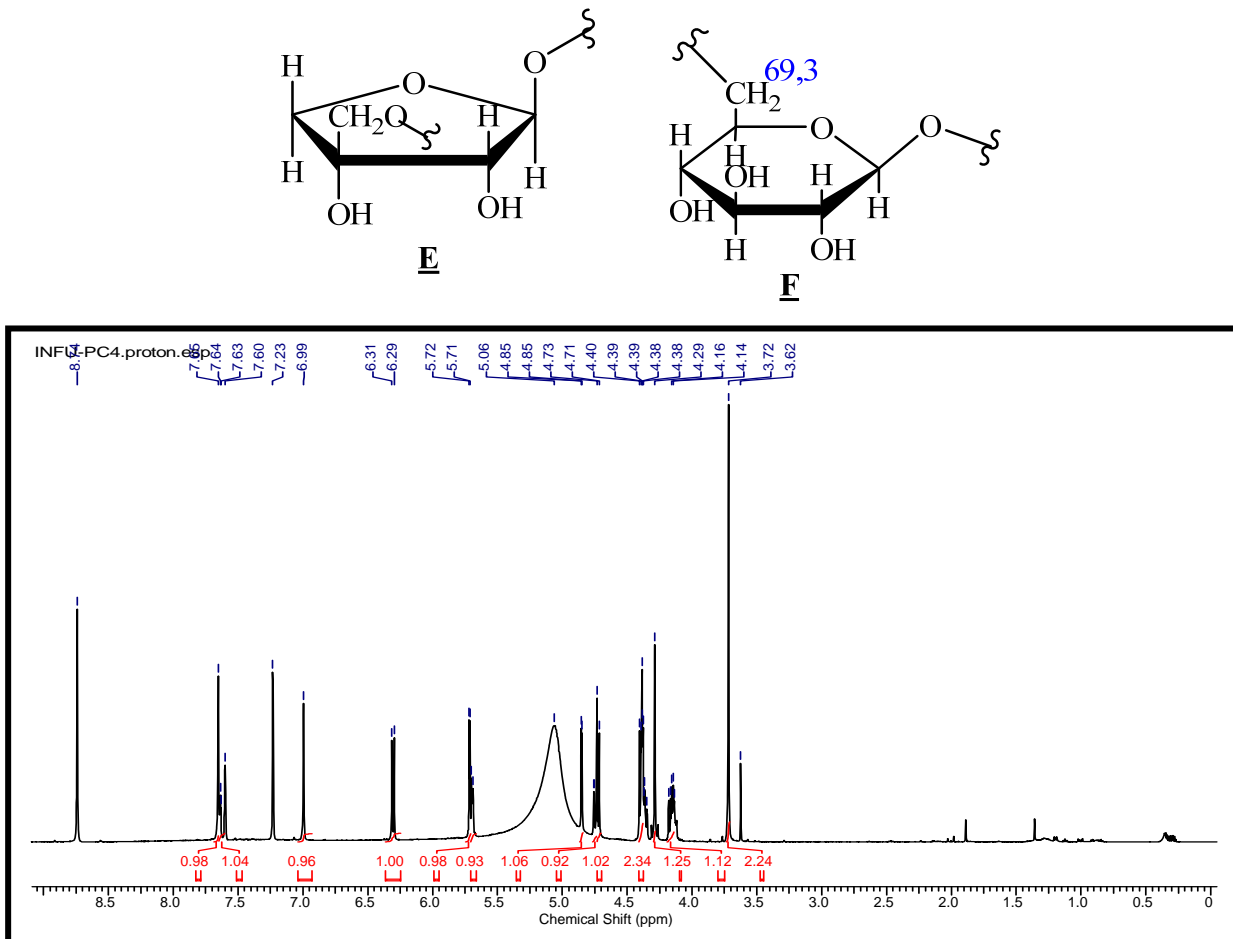


Figure 37: Spectre de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, Pyridine) de l'hymexelsine (PC-4, 159)

Sur le spectre RMN <sup>1</sup>H (Fig. 38), on observe outre les signaux des protons de l'aglycone, des signaux à  $\delta_H$  5,69 (1H, d,  $J = 7,3$  Hz) et 5,71 (1H, d,  $J = 2,6$  Hz) attribuables aux protons anomériques du glucose et de l'apiose.

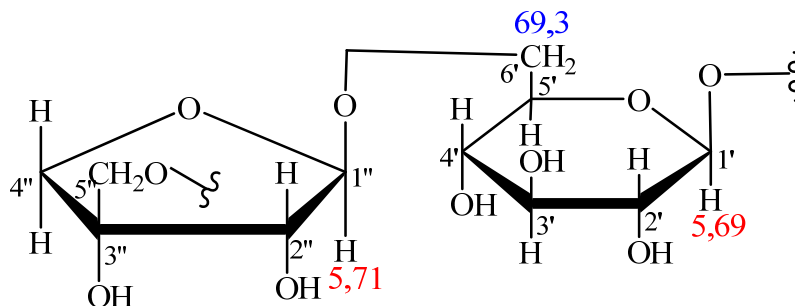
On observe également un ensemble de signaux entre  $\delta_H$  4,10 et 4,90 ppm attribuables aux protons des sucres. Ceci montre que la partie osidique serait formée d'un sucre en C<sub>5</sub> (apiose) et d'un autre en C<sub>6</sub> (glucose), d'où les fragments **E** et **F**.



**Figure 38:** Spectre de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, Pyridine) de l'hymexelsine (PC-4, **159**)

Sur son spectre HMBC (schéma 16) on observe:

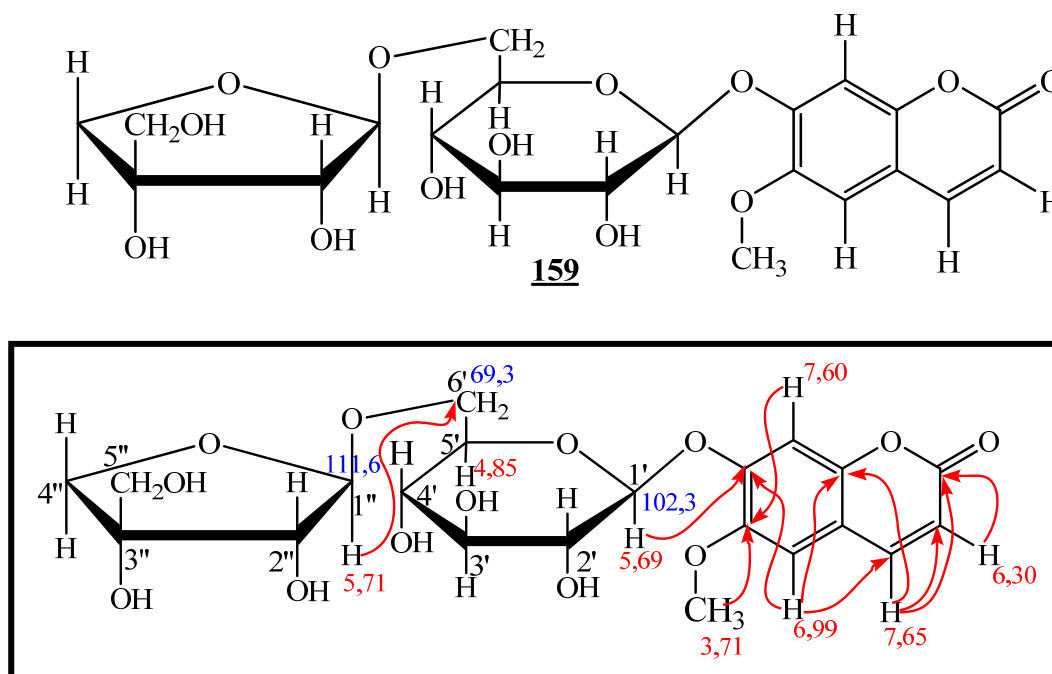
-Une tache de corrélation entre le proton anomérique de l'apiose à  $\delta_H$  5,71 et le carbone à  $\delta_C$  69,3 ppm, d'où la jonction suivante obtenue de **F** et **G**.



-Une tache de corrélation entre le proton anomérique du glucose à  $\delta_H$  5,69 et le carbone de l'aglycone à  $\delta_C$  151,4 ppm (C-7), donc la partie osidique est liée à l'aglycone par le glucose. Ceci est confirmé sur le spectre de masse où on observe un pic à  $m/z$  355,1024 correspondant à la perte d'un fragment  $C_5H_9O_4$  (apiose).

L'interprétation de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites dans la littérature (Tableau XVII) nous a permis d'attribuer à PC-4 la structure **159** qui est celle de l'hymexelsine ou xeroboside déjà isolé par Rao et *al.* des écorces de *Hymenodictyon excelsum* (Rao et *al.*, 1988). A notre connaissance, ce composé est isolé ici d'une espèce du genre *Pauridiantha* pour la première fois.

L'hymexelsine a montré une activité inhibitrice modérée contre *Micrococcus luteus* (Li et *al.*, 2013). L'hymexelsine a montré une activité anti-appétant des insectes à l'égard de *Spodoptera litura* au quatrième stade larvaire (Nagaiah et *al.*, 1992).



**Schéma 16:** Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC de l'hymexelsine (PC-4, **159**)

La comparaison des données de RMN  $^{13}C$  de PC-1 (100 MHz,  $CD_3COCD_3$ ), PC-4 (100 MHz, Pyridine) et hymexelsine (25 MHz,  $DMSO-d_6$ ) est consignée dans le tableau XVII suivant.

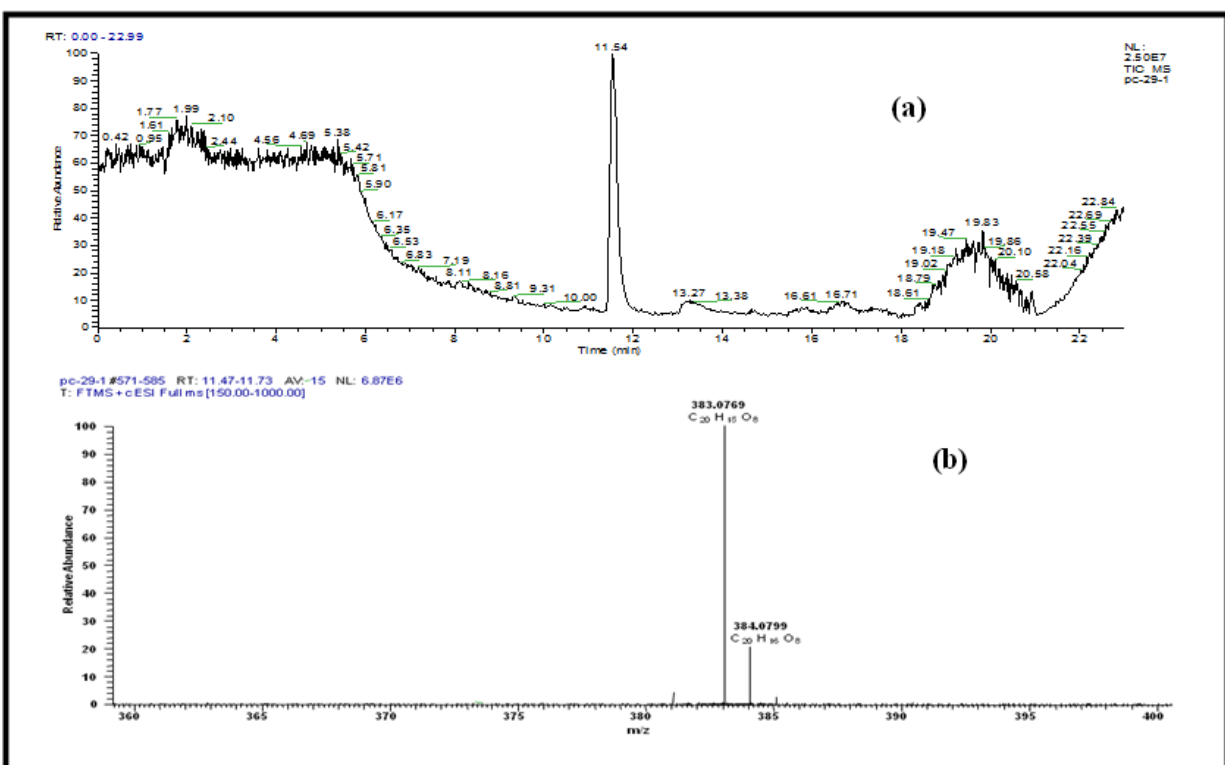
**Tableau XVII:** Données comparées de RMN  $^{13}\text{C}$  de PC-1 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ), PC-4 (100 MHz, Pyridine) et hymexelsine (25 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) (Rao et al, 1988).

Position	PC-1	PC-4	Hymexelsine
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	159,4	161,8	160,9
<b>3</b>	109,2	113,2	113,3
<b>4</b>	142,3	144,1	144,2
<b>5</b>	106,6	104,8	109,8
<b>6</b>	143,1	147,1	145,9
<b>7</b>	148,8	151,4	149,6
<b>8</b>	100,2	109,7	103,1
<b>4a</b>	108,6	114,0	112,5
<b>8a</b>	147,2	148,6	148,8
<b>-OCH3</b>	53,3	56,3	56,1
<b>1'</b>	-	102,3	99,7
<b>2'</b>	-	74,7	72,9
<b>3'</b>	-	78,8	76,4
<b>4'</b>	-	71,7	69,7
<b>5'</b>	-	78,2	76,1
<b>6'</b>	-	69,3	67,5
<b>1''</b>	-	111,6	109,2
<b>2''</b>	-	77,5	75,4
<b>3''</b>	-	80,6	78,7
<b>4''</b>	-	75,3	73,4
<b>5''</b>	-	65,8	63,4

### II.1.2.3.3- 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine ou 3,3'-biscopolétine (PC-29-1, **160**)

PC-29-1 se présente sous forme de poudre cristalline jaune-orangé dans le système  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (96/4). Il est soluble dans le DMSO (ou la pyridine) et fond entre 253-255 °C. Il répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des composés phénoliques.

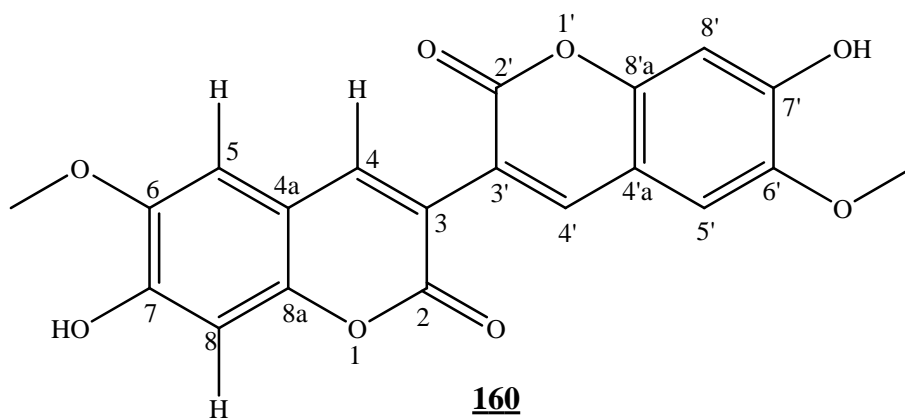
Son spectre de masse à haute résolution HR-ESI (Fig.39b) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[\text{M}+\text{H}]^+$  à  $m/z$  383,0769 (calculée pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_8$ : 383,0761) compatible avec la formule brute  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_8$  renfermant 14 degrés d'insaturation.



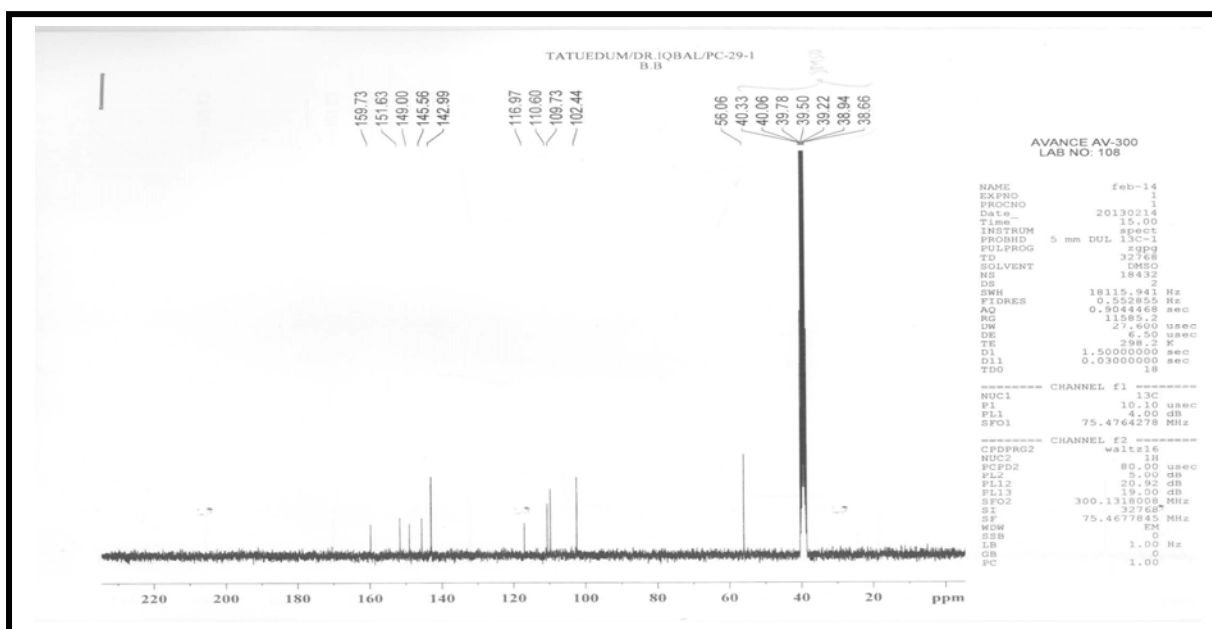
**Figure 39:** Profil chromatographique LC-MS (a) et Spectre de masse HR-ESI (b) de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-1, **160**).



L'analyse de son spectre de masse couplée à ceux de RMN 1D et 2D permet d'attribuer à PC-29-1 la structure suivante:

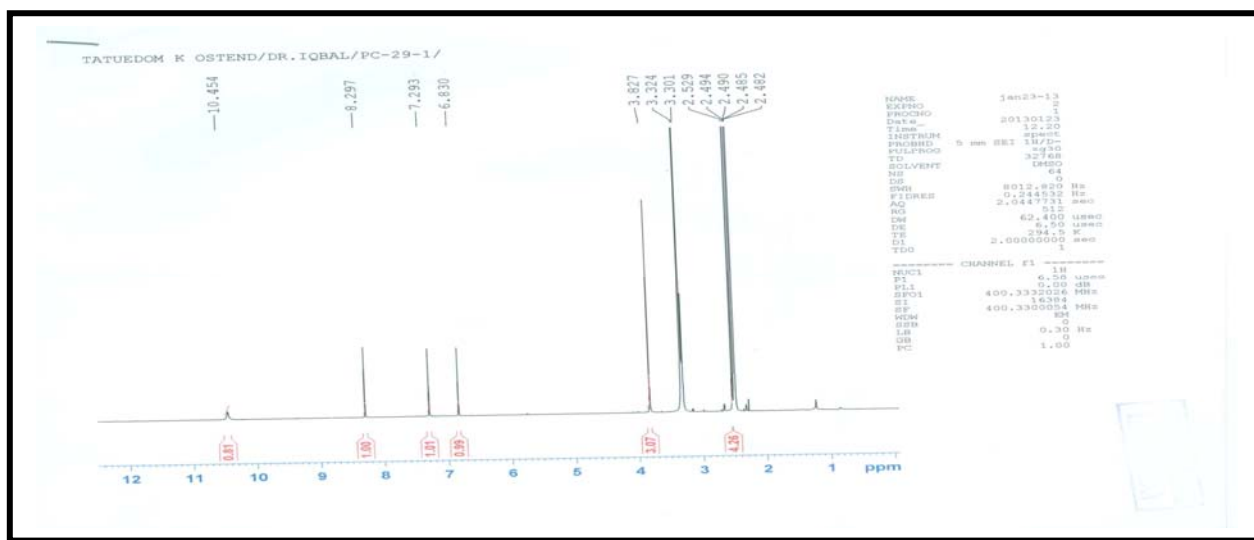


En effet, l'analyse de son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 40) associée à ceux du DEPT 90 et 135 (Tableau XVIII) et du HSQC (Tableau XVIII) fait ressortir dix signaux de carbone dont six quaternaires, trois méthynes et un méthyle.



**Figure 40:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-1, **160**)

La superposition des spectres de RMN <sup>1</sup>H de PC-29-1 (Fig. 41) et de PC-1 (voir Fig. 34) montre pour PC-29-1 des signaux caractéristiques d'un noyau coumarinique. En effet, nous avons deux singulets d'un proton chacun à  $\delta_H$  6,83 et  $\delta_H$  7,30 attribuables aux protons d'un noyau aromatique tétrasubstitué (H-8 et H-5 respectivement), un signal de méthoxy (-OCH<sub>3</sub>) à  $\delta_H$  3,83 (3H, s) et un autre à  $\delta_H$  8,30 (1H, s) attribuable à un proton oléfinique trisubstitué. Le singulet à  $\delta_H$  10,45 (1H, s) est attribuable à un hydroxyle phénolique. La présence de deux signaux de protons oléfiniques à  $\delta_H$  6,18 (d,  $J = 9,2$  Hz) et  $\delta_H$  7,87 (d,  $J = 9,2$  Hz) sur le spectre RMN <sup>1</sup>H de PC-1 montre que pour PC-29-1, nous avons une substitution soit en C-3 soit en C-4.



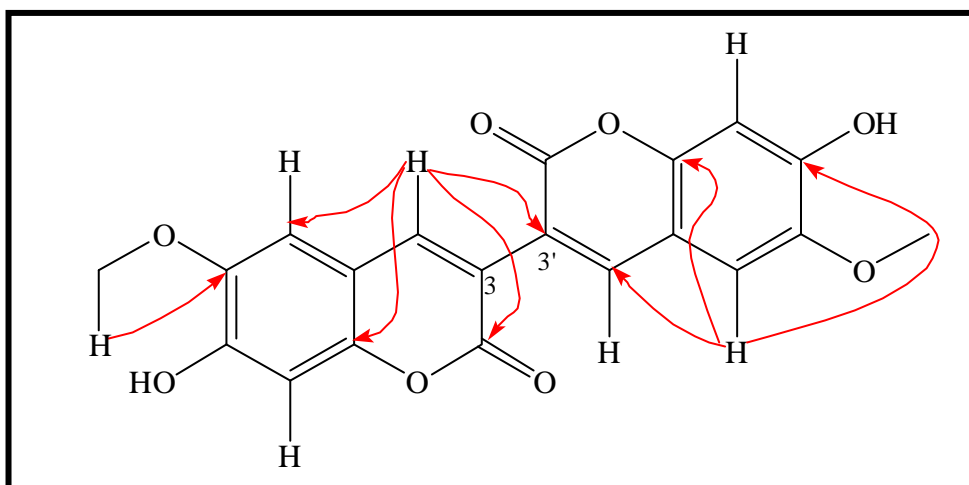
**Figure 41:** Spectre de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-1, **160**)

Compte tenu de la formule brute C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub> et du nombre de signaux (dix) de carbone observé sur le spectre de RMN <sup>13</sup>C, on conclut que PC-29-1 est une molécule symétrique et serait un dimère de PC-1.

Les jonctions possibles pour PC-29-1 sont les jonctions C-3/C-3' et C-4/C-4'. La jonction C-3/C-3' a été retenue par l'observation sur le spectre HMBC (schéma 17) des taches de corrélation intenses entre le proton à  $\delta_H$  8,30 (H-4) et les carbones à  $\delta_C$  117,0 (C-3') et  $\delta_C$  109,7 (C-5).

PC-29-1 serait donc la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine ou 3,3'-biscopolétine ou 3,3'-discopolétine, une biscoumarine à structure symétrique rare, couplée à travers une liaison carbone-carbone. Elle a été isolée pour la première fois de *Erycibe*

*obtusifolia* par Liu et al. (2007) et est à notre connaissance isolée du genre *Pauridiantha* pour la première fois.



**Schéma 17:** Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-1, **160**)

**Tableau XVIII:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-1, **160**) dans le  $\text{DMSO-}d_6$ .

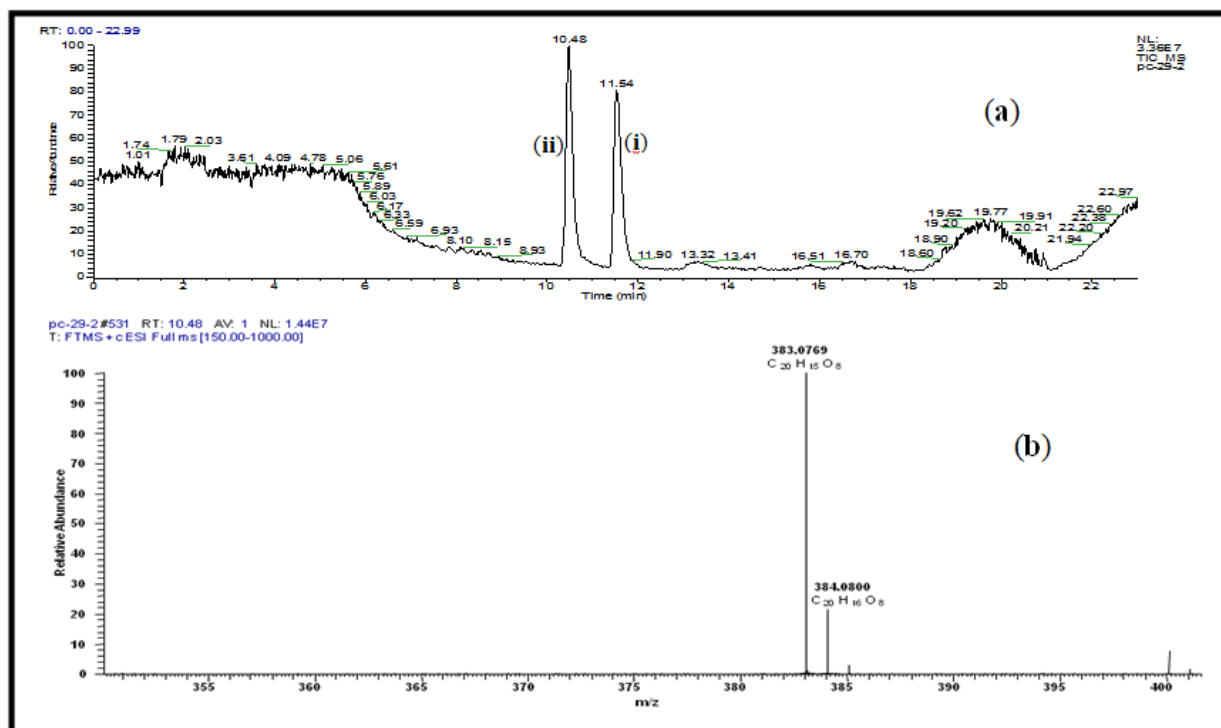
Position	$\delta_{\text{H}}$ (m)	$\delta_{\text{C}}$
2-2'	-	159,7
3-3'	-	117,0
4-4'	8,30 (1H, s)	143,0
4a-4'a	-	110,6
5-5'	7,30 (1H, s)	109,7
6-6'	-	145,6
7-7'	-	151,6
8-8'	6,83 (1H, s)	102,4
8a-8'a	-	149,0
6-6'-OCH <sub>3</sub>	3,83 (3H, s)	56,1
7-7'-OH	10,45 (1H, s)	-

#### II.1.2.3.4- Mélange de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine et 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-2, 161 et 160)

PC-29-2 se présente sous forme de poudre jaune-orangé dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (96/4). Il est soluble dans le DMSO (ou la pyridine) et répond positivement au test au chlorure ferrique caractéristique des composés phénoliques.

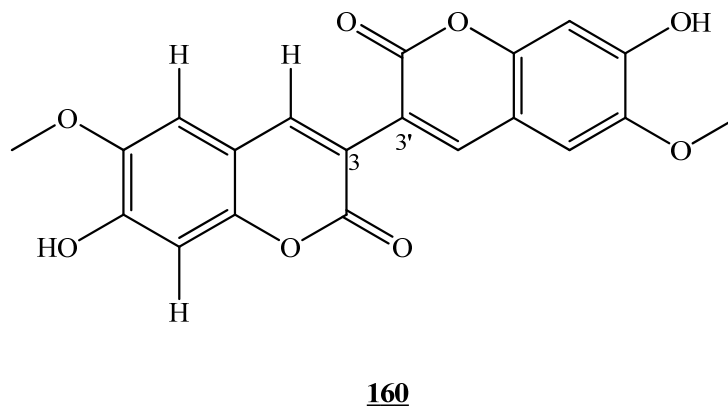
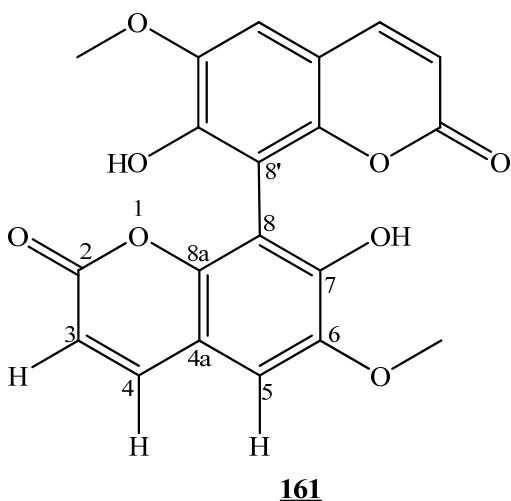
L'analyse au moyen de la technique LC-MS (Fig. 42a) montre que PC-29-2 serait un mélange de deux composés de même poids moléculaire dont PC-29-1 (i) et son isomère (ii).

Son spectre de masse à haute résolution HR-ESI (Fig. 42b) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire [M+H]<sup>+</sup> à *m/z* 383,0769 (calculée C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>O<sub>8</sub>: 383,0761) pour compatible avec la formule brute C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub> renfermant 14 degrés d'insaturation.



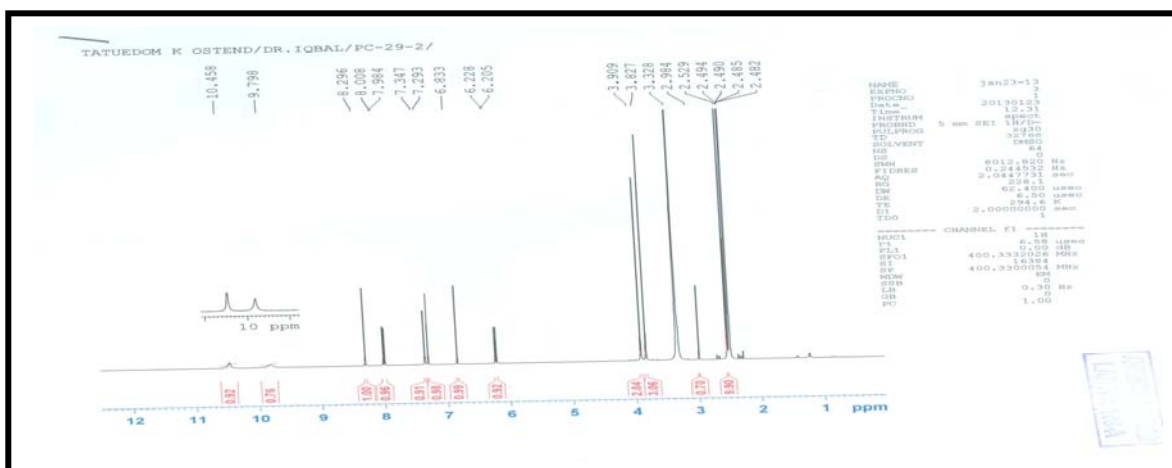
**Figure 42:** Profil chromatographique LC-MS (a) et spectre de masse HR-ESI (b) de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine et 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-2, 161 et 160).

L'analyse de son spectre de masse couplée à ceux de RMN 1D et 2D permet d'attribuer à PC-29-2 les structures suivantes:



En effet, la superposition des spectres de RMN  $^1\text{H}$  de PC-29-1 et PC-29-2 (Fig 43) montre les signaux caractéristiques d'un mélange de deux composés pour PC-29-2. Les signaux à  $\delta_{\text{H}}$  3,83 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  6,83 (1H, s),  $\delta_{\text{H}}$  7,30 (1H, s),  $\delta_{\text{H}}$  8,30 (1H, s) et  $\delta_{\text{H}}$  10,46 (1H, s) correspondent exactement à ceux des protons de PC-29-1.

Nous observons en plus des signaux sus-cités, trois singulets à  $\delta_{\text{H}}$  3,91 (3H, s) attribuables à un groupement méthoxyle,  $\delta_{\text{H}}$  7,35 (1H, s) attribuable au proton d'un noyau aromatique pentasubstitué et  $\delta_{\text{H}}$  9,80 (1H, s) attribuable à un hydroxyle phénolique. Toujours sur ce spectre, on observe deux doublets à  $\delta_{\text{H}}$  6,22 (1H, d,  $J = 9,2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,99 (1H, d,  $J = 9,2$  Hz) attribuables aux protons oléfiniques en «*cis*», probablement ceux en C-3 et C-4 respectivement. Ces signaux correspondent à ceux des protons d'un isomère de PC-29-1 (**161**). La taille des signaux nous permet de déduire que PC-29-1 est le produit majoritaire dans le mélange.

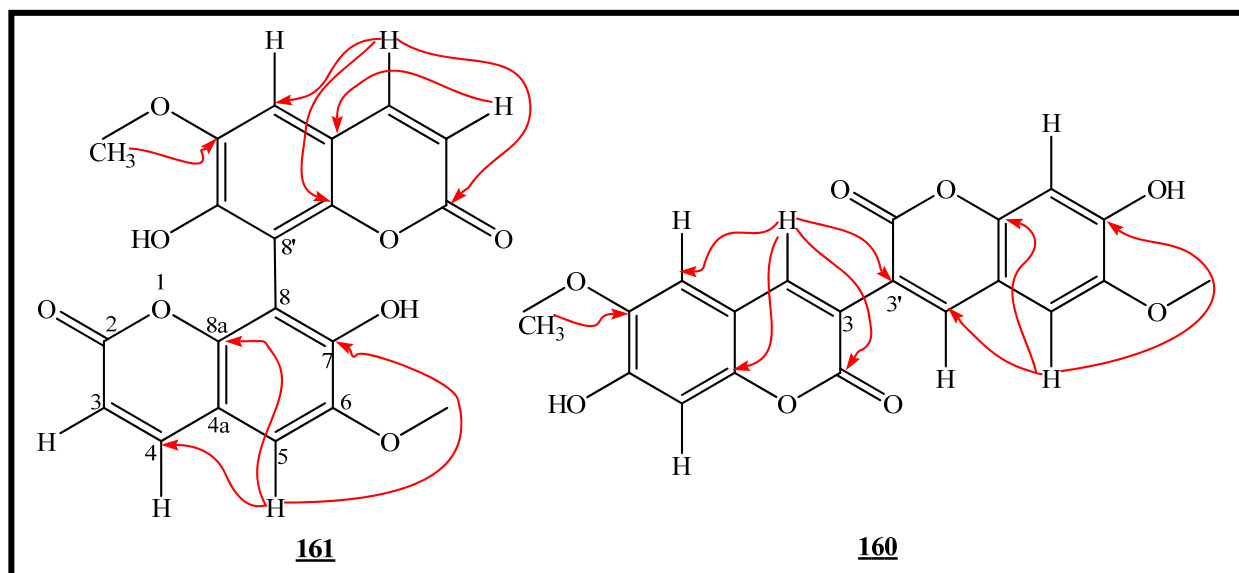


**Figure 43:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de PC-29-2 (**161** et **160**).

L'isomère de PC-29-1 (**161**) possédant un noyau aromatique pentasubstitué et sa molécule étant symétrique, les jonctions possibles sont C-5/C-5' et C-8/C-8'.

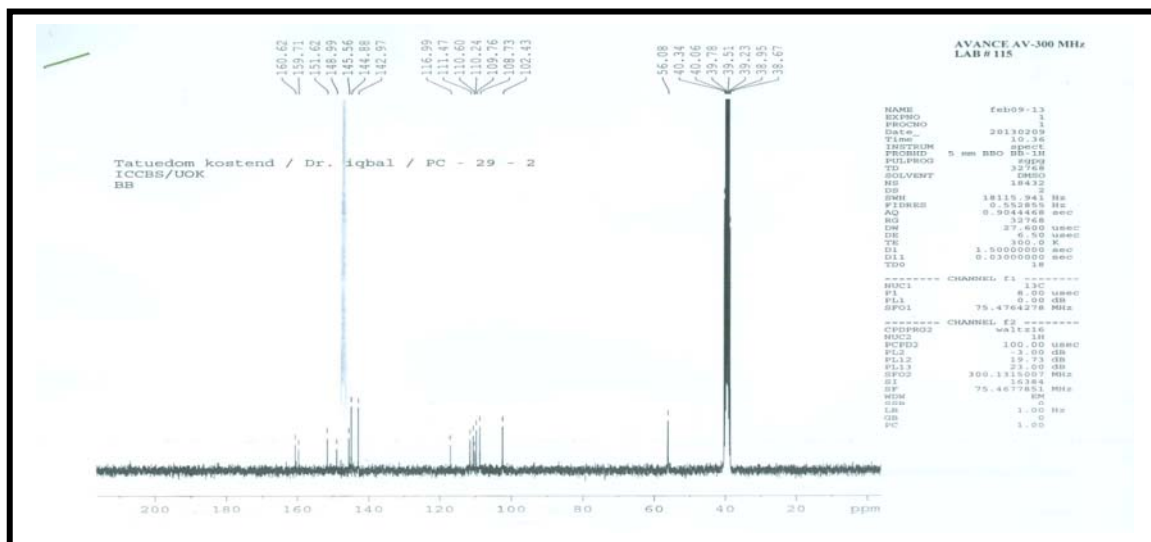
La jonction C-8/C-8' a été retenue par l'observation sur le spectre HMBC (schéma 18) des taches de corrélation entre le proton à  $\delta_H$  7,35 (H-5) et les carbones à  $\delta_C$  144,9 (C-4);  $\delta_C$  147,8 (C-8a) et  $\delta_C$  149,0 (C-6).

PC-29-2 serait donc un mélange de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine (**161**) et de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (**160**), deux biscoumarines à structures symétriques rares couplées à travers une liaison carbone-carbone. Toutes les deux ont été isolées pour la première fois de *Erycibe obtusifolia* par Liu et al. (2007). Elles sont isolées ici pour la première fois d'une espèce du genre *Pauridiantha*.



**Schéma 18:** Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC de PC-29-2

Les attributions complètes des protons et carbones ont été effectuées sur la base de ses spectres de RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (Fig.44), DEPT (Tableau XIX), HSQC (Tableau XIX) et HMBC (voir schéma 18).



**Figure 44:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) de PC-29-2 (**161** et **160**).

Les données spectrales de PC-29-2 ainsi que les données de la littérature de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine et de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine sont consignées dans les tableaux XIX et XX respectivement.

**Tableau XIX:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de PC-29-2 (**161** et **160**) dans le  $\text{DMSO}-d_6$ .

Position	PC-29-2			
	<b>161</b>		<b>160</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>2-2'</b>	-	160,6	-	159,7
<b>3-3'</b>	6,22 (1H, d, 9,2)	111,5	-	117,0
<b>4-4'</b>	7,99 (1H, d, 9,2)	144,9	8,30 (1H, s)	143,0
<b>4a-4'a</b>	-	110,2	-	110,6
<b>5-5'</b>	7,35 (1H, s)	108,7	7,30 (1H, s)	109,8
<b>6-6'</b>	-	144,9	-	145,6
<b>7-7'</b>	-	149,0	-	151,6
<b>8-8'</b>	-	107,5	6,83 (1H, s)	102,4
<b>8a-8'a</b>	-	147,8	-	149,0
<b>6-6'-OCH<sub>3</sub></b>	3,91 (3H, s)	56,1	3,83 (3H, s)	56,1
<b>7-7'-OH</b>	9,80 (1H, s)	-	10,46 (1H, s)	-

**Tableau XX:** Données de la littérature RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine et de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine dans le DMSO- $d_6$  (Liu et *al.*, 2007).

Position	7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine		7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2-2'	-	160,6	-	159,7
3-3'	6,21 (1H, d, 9,5)	111,4	-	117,0
4-4'	7,99 (1H, d, 9,5)	144,9	8,30 (1H, s)	143,0
4a-4'a	-	110,2	-	110,6
5-5'	7,34 (1H, s)	108,7	7,29 (1H, s)	109,7
6-6'	-	144,9	-	145,6
7-7'	-	149,4	-	151,6
8-8'	-	107,7	6,83 (1H, s)	102,4
8a-8'a	-	147,8	-	149,0
6-6' -OCH <sub>3</sub>	3,90 (3H, s)	56,1	3,83 (3H, s)	56,1
7-7' -OH	9,80 (1H, s)	-	10,46 (1H, s)	-



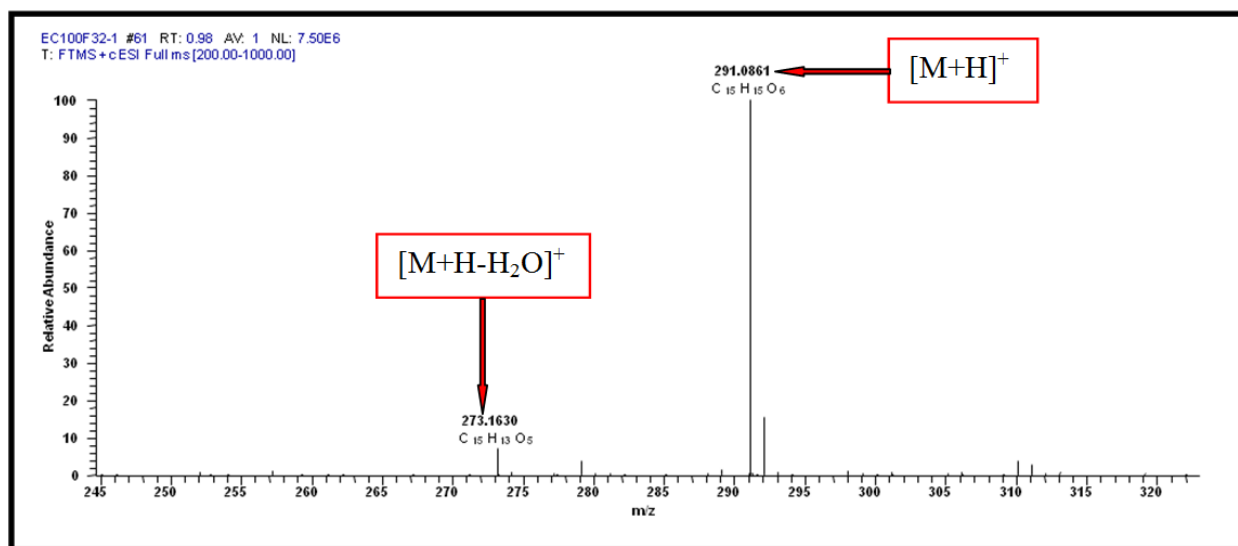
## II.1.2.4- Les flavonoïdes

Deux flavonoïdes indexés EC100P331/321 et EC100P332/322 ont été isolés des écorces du tronc de *E. cylindricum*.

### II.1.2.4.1- (+)-Catéchine (EC100P331/321, 162)

EC100P331/321 se présente sous forme de poudre cristalline orange. Il est soluble dans le méthanol et fond entre 172-174 °C. Il répond positivement au test au chlorure ferrique et à celui de Shinoda, indiquant ainsi sa nature phénolique et flavonoïque.

Sur son spectre de masse HR-ESI (Fig. 45), on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  291,0861 (calculée pour  $C_{15}H_{15}O_6$ : 291,0863) compatible avec la formule brute  $C_{15}H_{14}O_6$  renfermant 09 degrés d'insaturation.

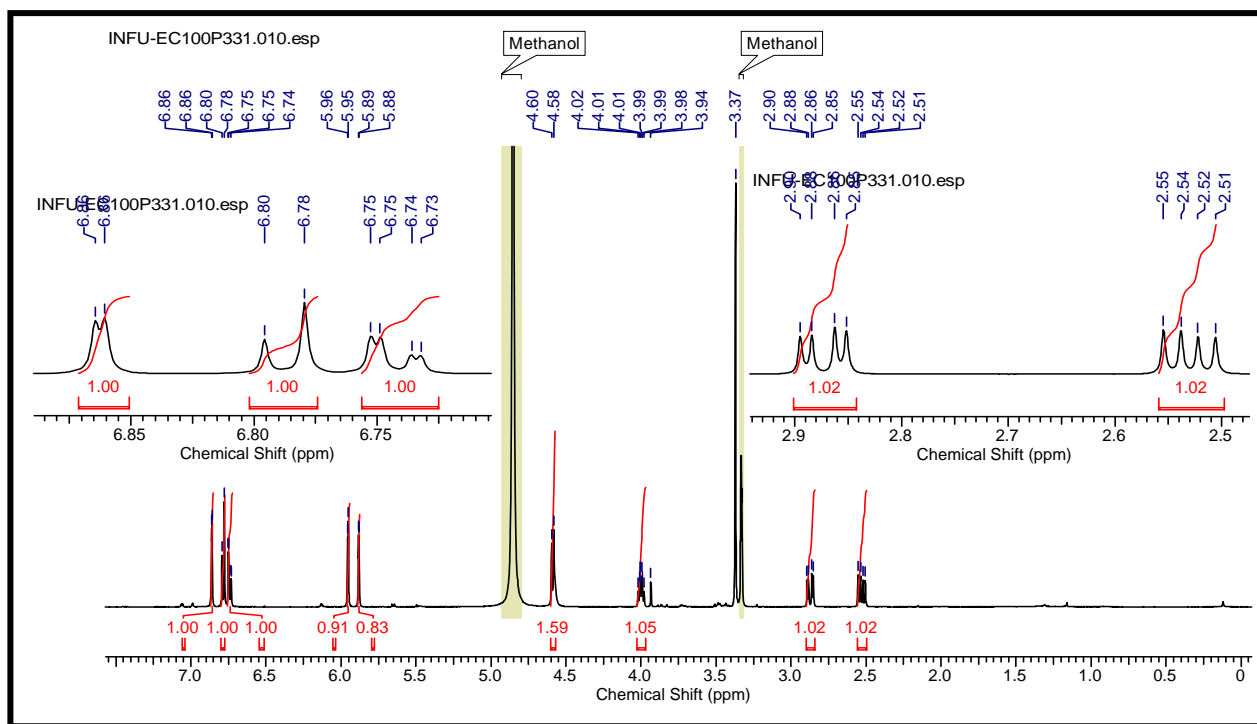


**Figure 45:** Spectre de masse HR-ESI de la catéchine (EC100P331/321, 162)

Son spectre de RMN  $^1H$  (Fig. 46) présente:

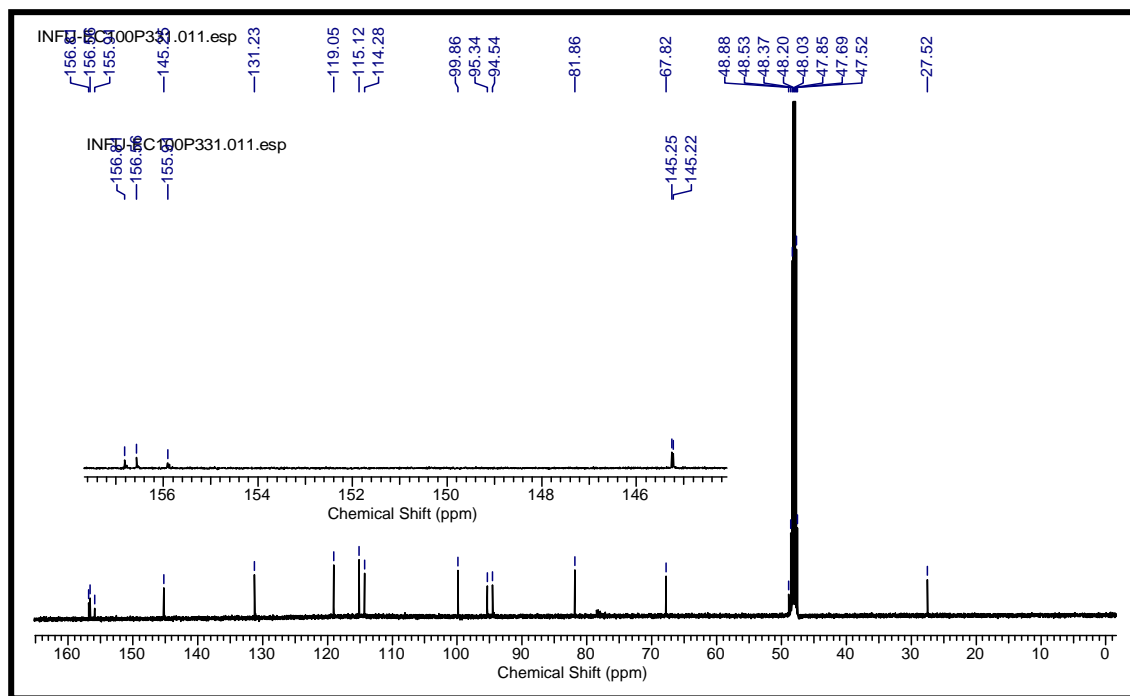
- deux doublets dédoublés d'un proton chacun à  $\delta_H$  2,53 (1H, dd,  $J_{(H-4a, H-3a)} = 8,4$ ;  $J_{(H-4a, H-4e)} = 16,1$  Hz) et 2,87 (1H, dd,  $J_{(H-4e, H-3a)} = 5,8$ ;  $J_{(H-4a, H-4e)} = 16,4$  Hz) (Hye et al., 2009);
- un signal à  $\delta_H$  4,00 (1H, ddd,  $J_{(H-3a, H-4e)} = 5,8$ ;  $J_{(H-3a, H-2a)} = 7,7$ ;  $J_{(H-3a, H-4a)} = 8,0$  Hz) attribuable au proton d'un oxyméthine;
- un signal à  $\delta_H$  4,59 (1H, d,  $J_{(H-2a, H-3a)} = 7,7$  Hz) attribuable au proton d'un autre oxyméthine;

- deux signaux à  $\delta_H$  5,88 (1H, d,  $J= 2,3$  Hz) et 5,95 (1H, d,  $J= 2,3$  Hz) attribuables aux protons d'un noyau aromatique tétrasubstitué;
- trois autres signaux de trois protons aromatiques à  $\delta_H$  6,74 (1H, dd,  $J= 1,9; 8,4$  Hz); 6,78 (1H, d,  $J= 8,0$  Hz) et 6,86 (1H, d,  $J= 1,9$  Hz), suggérant la présence d'un système ABC.



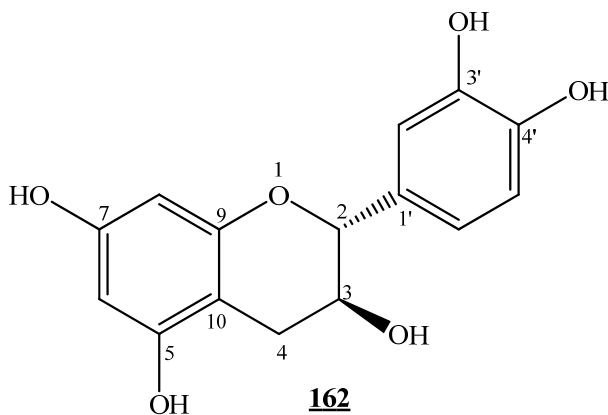
**Figure 46:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la catéchine (EC100P331/321, **162**).

L'analyse de son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 47) fait ressortir la présence des carbones centraux d'une flavane hydroxylée en C-3 à  $\delta_C$  27,8 (C-4), 67,8 (C-3) et 81,9 (C-2) (Markam, 1982). On note également la présence de deux carbones aromatiques oxygénés en *ortho* à  $\delta_C$  145,2 et 145,3 ppm.



**Figure 47:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la catéchine (EC100P331/321, **162**)

La combinaison de toutes ces données en comparaison avec celles décrites dans la littérature, nous a permis d'identifier EC100P331/321 au (2*R*, 3*S*)- 2-(3',4'-dihydroxyphényl)chromane-3,5,7-triol communément appelé catéchine ou catéchol de structure **162**. Ce composé a été déjà isolé de plusieurs espèces végétales parmi lesquelles *Acacia catechu* Willd (Hye *et al.*, 2009).



Notons que la (+)-catéchine possède une activité anti-oxydante, antitumorale et antibactérienne. C'est un potentiel herbicide (Harsh et *al.*, 2002). La catéchine possède également une activité antihormonale, car elle est capable de diminuer ou d'arrêter l'action de certaines hormones (Hye et *al.*, 2009).

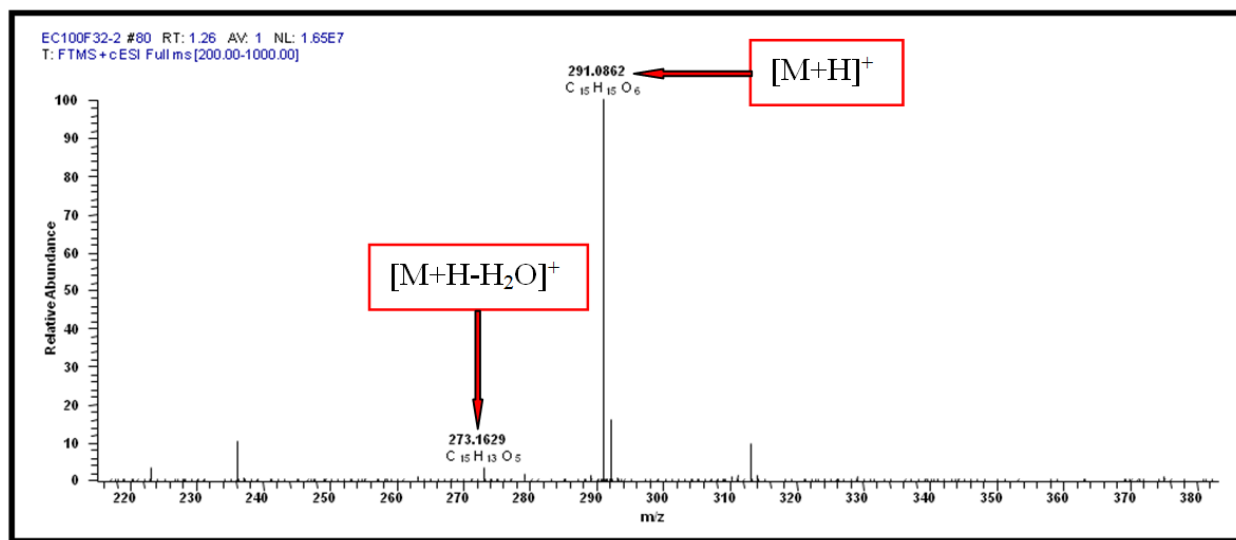
**Tableau XXI:** Données comparées de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EC100P331/321 (**162**) avec celles de la littérature (Hye et *al.*, 2009).

Position	EC100P331/321			Littérature
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	-		-
<b>2</b>	4,59 (1H, d, 7,7)	81,9	C-2', C-3, C-4, C-6', C-9	80,9
<b>3</b>	4,00 (1H, ddd, 5,8; 7,7; 8,0)	67,8	C-1', C-2, C-10	66,3
<b>4</b>	2,53 (1H, dd, 8,4; 16,1)	27,8	C-2, C-3, C-5, C-10	27,7
	2,87 (1H, dd, 5,8; 16,4)		C-2, C-3, C-5, C-10	
<b>5</b>	-	156,6	-	156,1
<b>6</b>	5,88 (1H, d, 2,3)	94,5	C-5, C-8, C-10	93,9
<b>7</b>	-	156,8	-	156,4
<b>8</b>	5,95 (1H, d, 2,3)	95,3	C-6, C-7, C-10	95,1
<b>9</b>	-	155,9	-	155,3
<b>10</b>	-	99,9	-	99,1
<b>1'</b>	-	131,2	-	130,6
<b>2'</b>	6,86 (1H, d, 1,9)	114,3	C-2, C-4', C-6'	114,5
<b>3'</b>	-	145,3	-	144,8
<b>4'</b>	-	145,2	-	144,6
<b>5'</b>	6,78 (1H, d, 8,0)	115,1	C-1', C-3'	115,1
<b>6'</b>	6,74 (1H, dd, 1,9; 8,4)	119,1	C-2, C-2', C-4'	118,4

### II.1.2.4.2- Epicatéchine ou épicatechol (EC100P332/322, **163**)

EC100P332/322 se présente sous forme de poudre cristalline blanche. Il est soluble dans le méthanol et fond entre 239-241 °C. Il répond positivement au test au chlorure ferrique et à celui de Shinoda, indiquant ainsi sa nature phénolique et flavonoïque.

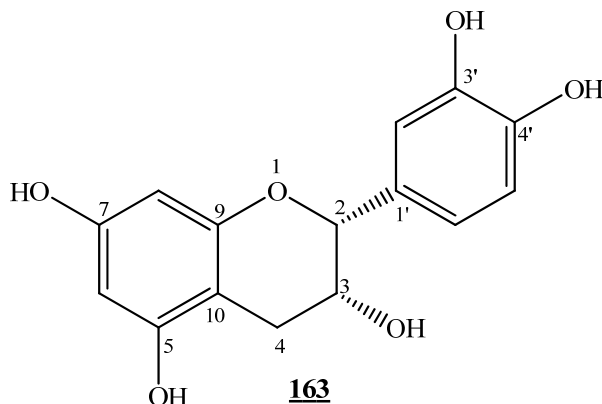
Sur son spectre de masse HR-ESI (Fig. 48), on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  291,0862 (calculée pour  $C_{15}H_{15}O_6$ : 291,0863) compatible avec la formule brute  $C_{15}H_{14}O_6$  renfermant 09 degrés d'insaturation.



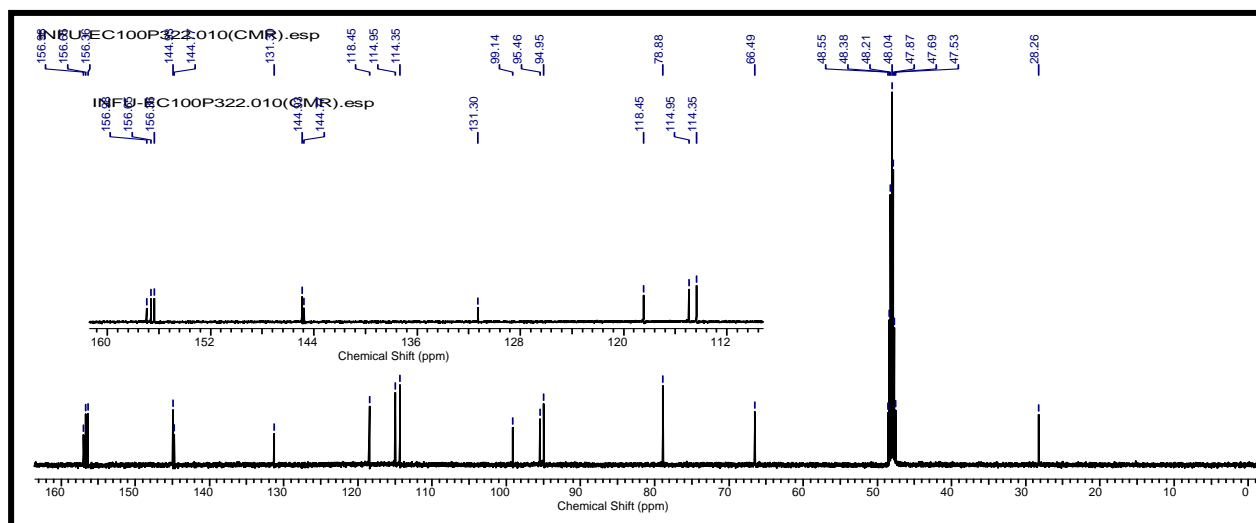
**Figure 48:** Spectre de masse HR-ESI de l'épicatéchine (EC100P332/322, **163**)

Nous pouvons donc déduire que EC100P332/322 est un isomère de EC100P331/321.

L'analyse comparée des spectres de RMN  $^{13}C$  (Fig. 49) et  $^1H$  (Fig. 50) de EC100P332/322 avec ceux de EC100P331/321 (voir Fig. 47 et Fig. 46) nous permet de proposer pour EC100P332/322 la structure **163** suivante:

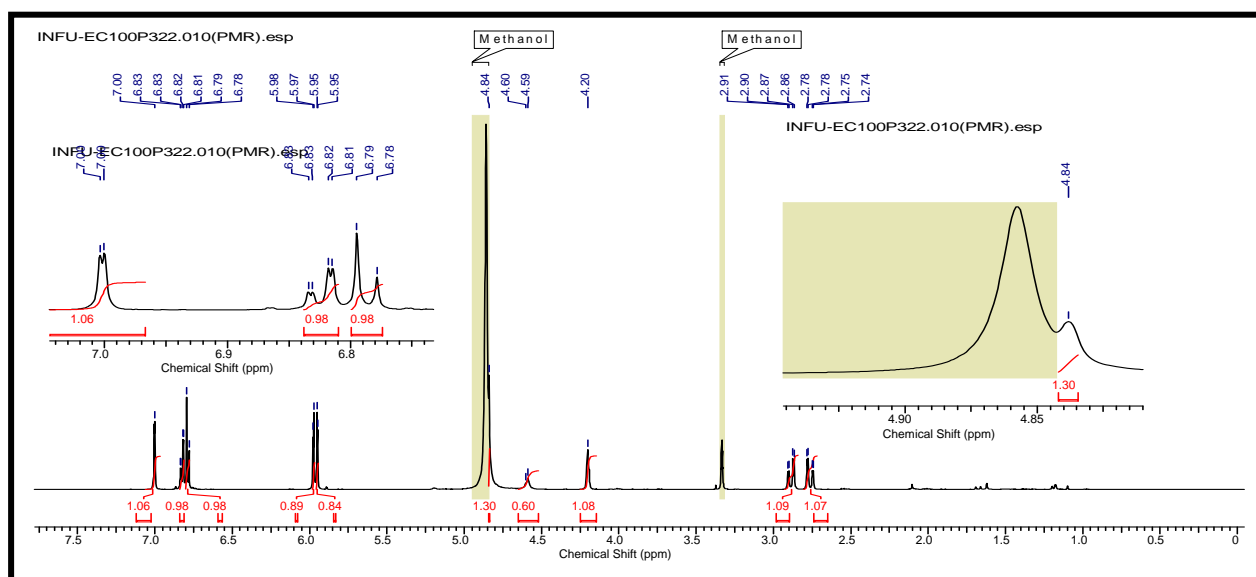


En effet, le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 49) de EC100P332/322 est totalement similaire à celui de EC100P331/321 et présente 15 signaux de carbone dont ceux des carbones centraux d'une flavane hydroxylée en C-3 à  $\delta_{\text{C}}$  28,2 (C-4), 66,5 (C-3) et 78,9 (C-2) (Markam, 1982). On note également la présence de deux carbones aromatiques oxygénés en *ortho* à  $\delta_{\text{C}}$  144,7 et 144,9 ppm.



**Figure 49:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de l'épicatéchine (EC100P332/322, **163**).

De même, les spectres de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 46 et Fig. 50) des 2 composés sont similaires avec pour EC100P332/322, des signaux de protons oxyméthynes à  $\delta_{\text{H}}$  4,20 (1H, m, H-3) et 4,84 (1H, *ls*, H-2). On y observe aussi deux doublets dédoublés d'un proton chacun à  $\delta_{\text{H}}$  2,76 (1H, dd,  $J = 2,7; 16,8$  Hz, H-4) et 2,88 (1H, dd,  $J = 4,6; 16,8$  Hz, H-4).



**Figure 50:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de l'épicatéchine (EC100P332/322, **163**).

---

La différence significative entre les deux composés se trouve au niveau du proton H-2. Pour la catéchine (EC100P331/321), il se présente sous forme de doublet à  $\delta_H$  4,59 ceci est dû à un couplage *trans* entre H-2-H-3 ( $J = 7,7$  Hz). Alors que pour EC100P332/322, H-2 est un large singulet (*ls*) à  $\delta_H$  4,84; ce qui montre l'absence de couplage entre les protons H-2-H-3 et indiquant que H-2 et H-3 sont de configuration *cis*.

L'ensemble de toutes ces données comparé à celles de la catéchine (EC100P331/321) et aux données de la littérature (Kazuo et *al.*, 1999) permet de confirmer pour EC100P332/322 la structure **163** qui est celle du (2*R*, 3*R*)-2-(3',4'-dihydroxyphényl)chromane-3,5,7-triol, communément appelé épicatechine ou épicatechol.

L'épicatechine est un antioxydant puissant. Elle imite l'action de l'insuline et améliore la santé du cœur. En effet, des études montrent que l'épicatechine exerce un rôle protecteur sur la fragilité osmotique des cellules, similaire à celui de l'insuline. Son mécanisme d'action est différent de celle de l'insuline et demeure spéculative. Dans les globules rouges diabétiques l'épicatechine provoque une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase. Cette activité est significativement plus faible chez les patients diabétiques de type 2. L'épicatechine réduit la peroxydation des lipides et inhibe l'agrégation plaquettaire. Elle provoque la dilatation des vaisseaux sanguins par le contrôle de l'oxyde nitrique, une molécule sécrétée par l'endothélium du vaisseau sanguin pour signaler l'environnant musculaire pour se détendre. Les catéchines sont également connues pour leur action à inhiber l'alpha-amylase, empêchant ainsi la digestion et l'absorption des hydrates de carbone qui autrement contribueraient à l'augmentation des niveaux de sucre dans le sang ([www.diabeticbar.com](http://www.diabeticbar.com), 2015).

**Tableau XXII:** Données comparées de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de EC100P332/322 (**163**) avec celles de EC100P331/321 (**162**) dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	EC100P332/322			EC100P331/321	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	-	-	-	-
<b>2</b>	4,84 (1H, <i>ls</i> )	78,9	C-2', C-3, C-4, C-6'	4,59 (1H, d, 7,7)	81,9
<b>3</b>	4,20 (1H, m)	66,5	C-10	4,00 (1H, ddd, 5,8; 7,7; 8,0)	67,8
<b>4</b>	2,76 (1H, dd, 2,7; 16,8)	28,3	C-2, C-3, C-5, C-10	2,53 (1H, dd, 8,4; 16,1)	27,8
	2,88 (1H, dd, 4,6; 16,8)		C-2, C-3, C-5, C-10	2,87 (1H, dd, 5,8; 16,4)	
<b>5</b>	-	156,6	-	-	156,6
<b>6</b>	5,95 (1H, d, 2,3)	94,9	C-8, C-10	5,88 (1H, d, 2,3)	94,5
<b>7</b>	-	157,0	-	-	156,8
<b>8</b>	5,97 (1H, d, 2,3)	95,5	C-6, C-10	5,95 (1H, d, 2,3)	95,3
<b>9</b>	-	156,4	-	-	155,9
<b>10</b>	-	99,1	-	-	99,9
<b>1'</b>	-	131,3	-	-	131,2
<b>2'</b>	7,00 (1H, d, 1,5)	114,4	C-2, C-4', C-6'	6,86 (1H, d, 1,9)	114,3
<b>3'</b>	-	144,9	-	-	145,3
<b>4'</b>	-	144,7	-	-	145,2
<b>5'</b>	6,78 (1H, d, 8,4)	114,9	C-1', C-3'	6,78 (1H, d, 8,0)	115,1
<b>6'</b>	6,82 (1H, dd, 1,5; 8,0)	118,4	C-2, C-2', C-4'	6,74 (1H, dd, 1,9; 8,4)	119,1

**Tableau XXIII:** Données comparées de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EC100P332/322 (**163**) avec celles de la littérature (épicatéchine) (Kazuo et *al.*, 1999).

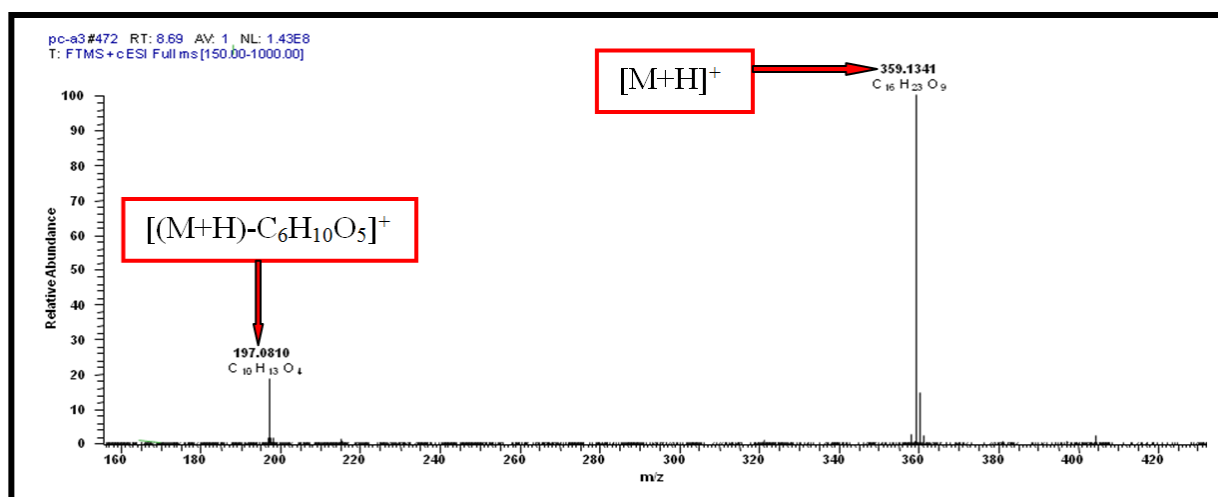
Position	EC100P332/322	Epicatéchine
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	4,84 (1H, <i>ls</i> )	4,86 (1H, s)
<b>3</b>	4,20 (1H, m)	4,20 (1H, m)
<b>4</b>	2,76 (1H, dd, 2,7; 16,8)	2,73 (1H $_{\alpha}$ , dd, 4,1; 17,1)
	2,88 (1H, dd, 4,6; 16,8)	2,85 (1H $_{\beta}$ , dd, 4,0; 17,1)
<b>5</b>	-	-
<b>6</b>	5,95 (1H, d, 2,3)	6,02 (1H, d, 2,3)
<b>7</b>	-	-
<b>8</b>	5,97 (1H, d, 2,3)	5,92 (1H, d, 2,3)
<b>9</b>	-	-
<b>10</b>	-	-
<b>1'</b>	-	-
<b>2'</b>	7,00 (1H, d, 1,5)	7,04 (1H, d, 1,8)
<b>3'</b>	-	-
<b>4'</b>	-	-
<b>5'</b>	6,78 (1H, d, 8,4)	6,79 (1H, d, 8,3)
<b>6'</b>	6,82 (1H, dd, 1,5; 8,0)	6,83 (1H, dd, 1,8; 8,3)



### II.1.2.5- Les iridoïdes: sweroside (PC-A-3, **156**)

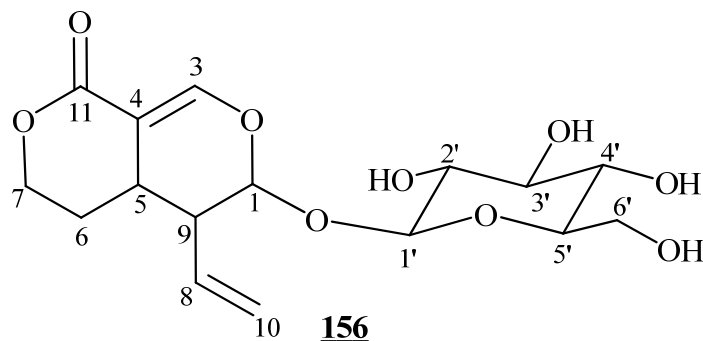
PC-A-3 se présente sous forme de solide incolore après évaporation du système MeOH/H<sub>2</sub>O (4:6). Il est soluble dans le méthanol et fond entre 106-109 °C. Il répond positivement au test de Molish caractéristique des glycosides.

Son spectre de masse en haute résolution (HR-ESI) (Fig. 51) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  359,1341 (calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>9</sub>: 359,1337) compatible avec la formule brute C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub> renfermant 6 insaturations.



**Figure 51:** Spectre de masse HR-ESI du sweroside (PC-A-3, **156**)

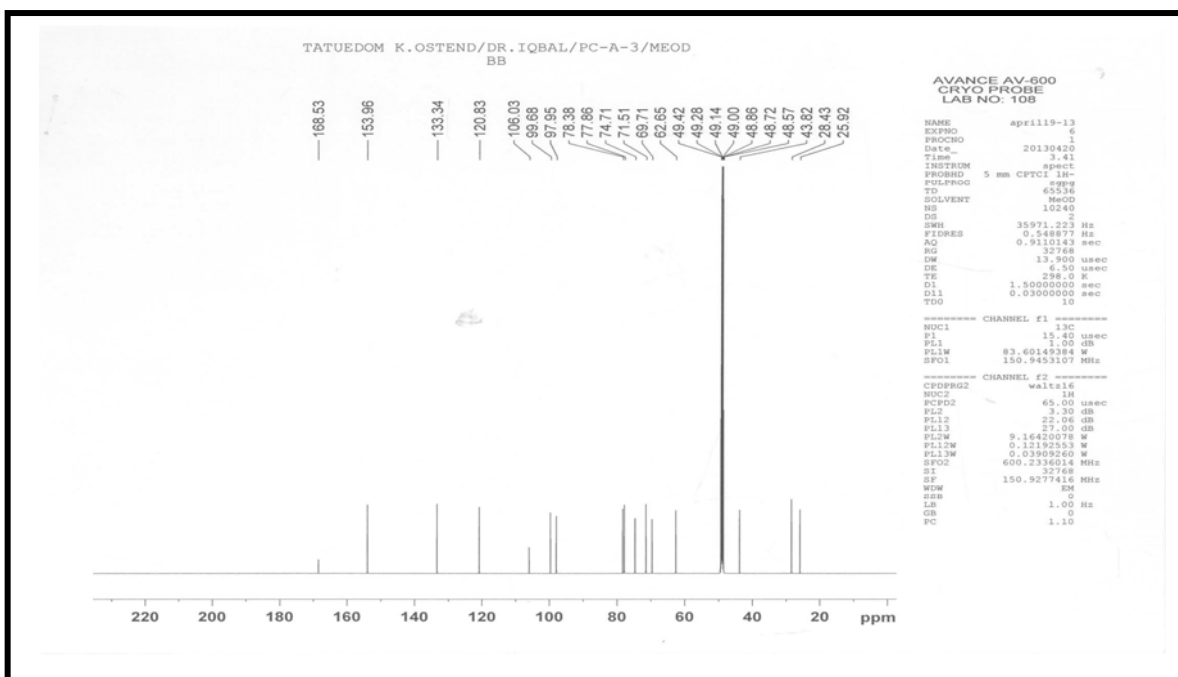
L'analyse de son spectre de masse couplée à ceux de RMN 1D et 2D permet d'attribuer à PC-A-3 la structure suivante:



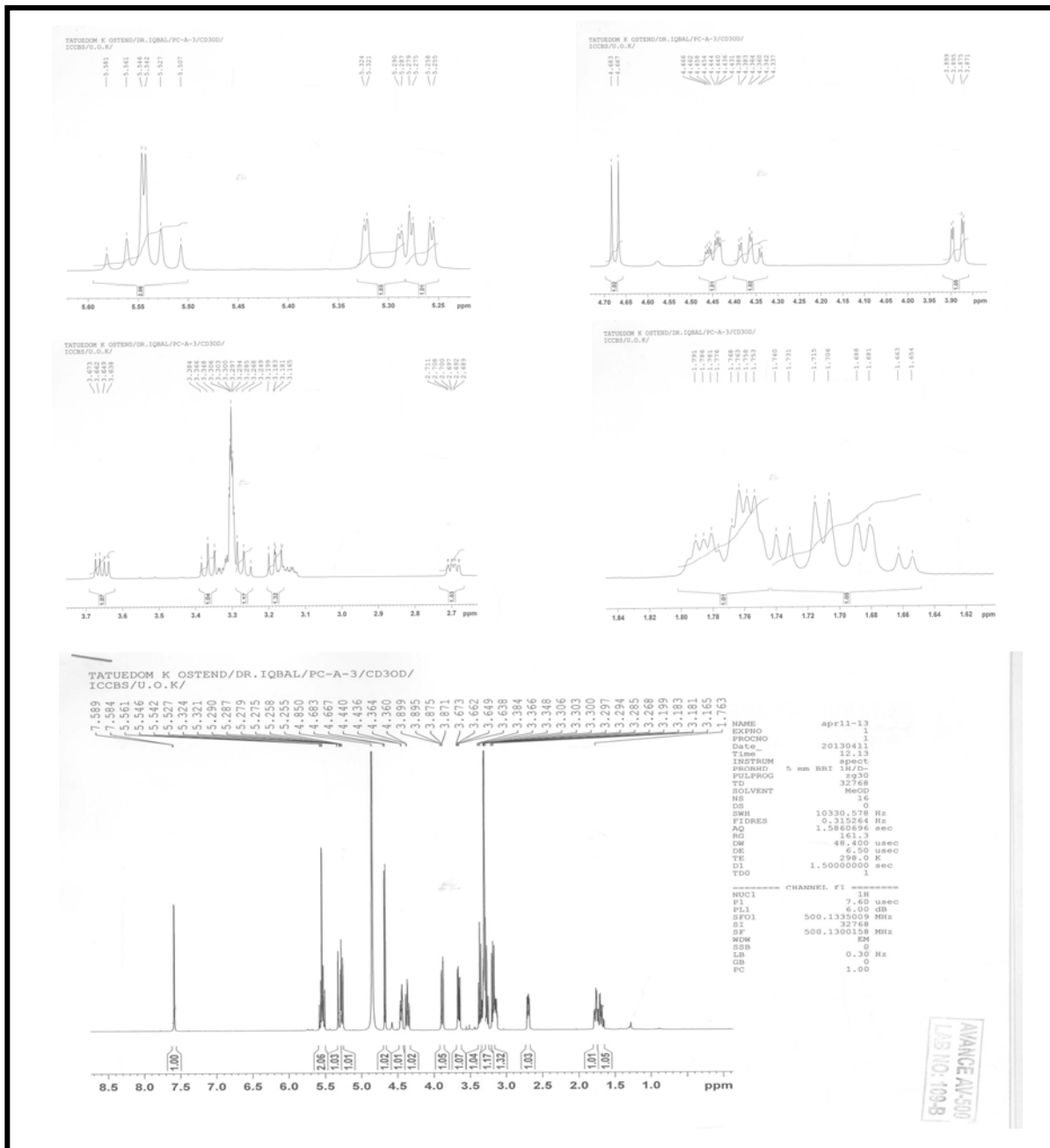
En effet, son spectre de RMN <sup>13</sup>C (Fig. 52) montre 16 signaux de carbones indiquant que PC-A-3 est un composé en C<sub>16</sub>, donc pas de symétrie dans la molécule vu la formule brute C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>. L'analyse de ce spectre couplée à ceux du DEPT 135 et 90 (Tableau XXIV) fait ressortir:

- Quatre méthylènes à  $\delta_C$  25,9 (C-6);  $\delta_C$  62,6 (C-6') et 69,7 (C-7) attribuables aux méthylèneoxy (-CH<sub>2</sub>O-) et  $\delta_C$  120,8 (C-10) attribuable à un méthylène oléfinique. Ceci corrobore avec les taches de corrélation observées sur le spectre HSQC (Tableau XXIV) à  $\delta_C$  25,9/  $\delta_H$  1,70 et 1,77;  $\delta_C$  62,6/  $\delta_H$  3,66 et 3,89;  $\delta_C$  69,7/  $\delta_H$  4,37 et 4,45 ;  $\delta_C$  120,8/  $\delta_H$  5,30 et 5,27.
- Dix méthynes dont ceux à  $\delta_C$  133,3 (C-8) et 154,0 (C-3) attribuables au méthyne oléfinique et méthyne oléfinique déblindé respectivement.
- Deux carbones quaternaires à  $\delta_C$  106,0 (C-4) et  $\delta_C$  168,5 (C-11). Celui à  $\delta_C$  168,5 est attribuable au carbonyle d'un ester cyclique (lactone).

Sur son spectre de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 53) on observe outre les signaux des protons oléfiniques à  $\delta_H$  5,27 (1H, dd,  $J = 2,0, 10,5$  Hz, H-10a); 5,30 (1H, dd,  $J = 1,5, 17,0$  Hz, H-10b); 5,53 (1H, dt,  $J = 10,0, 17,0$  Hz, H-8) et  $\delta_H$  7,59 (1H, d,  $J = 2,5$  Hz, H-3), un ensemble de signaux entre 3,16-4,75 ppm dont certains sont caractéristiques d'un sucre. En effet, le signal à  $\delta_H$  4,68 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1') est attribuable à un proton anomérique. Ce qui est confirmé par l'observation sur le spectre HSQC d'une tache de corrélation entre ce proton et le carbone anomérique à  $\delta_C$  99,7 (C-1'). La valeur de la constante de couplage ( $J = 8,0$  Hz) montre qu'il s'agit d'un anomère béta.



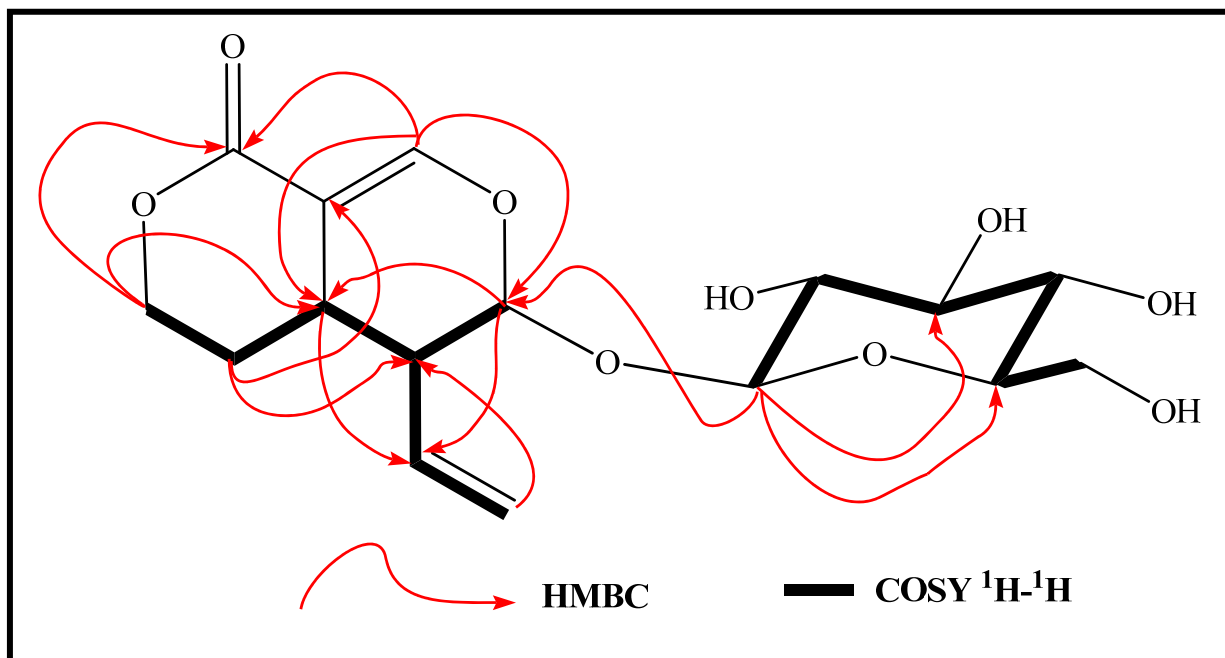
**Figure 52:** Spectre de RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du sweroside (PC-A-3, **156**)



**Figure 53:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du sweroside (PC-A-3, **156**)

Par ailleurs, on observe sur son spectre de masse un pic à  $m/z$  197,0784 correspondant à la partie aglycone et à la perte d'un fragment en  $\text{C}_6$ , donc le sucre serait en  $\text{C}_6$  (glucose). La position du sucre a été déterminée par l'observation sur le spectre HMBC (schéma 19) des taches de corrélation à  $\delta_{\text{H}}$  4,68 (H-1')/  $\delta_{\text{C}}$  97,9 (C-1) et  $\delta_{\text{H}}$  5,54 (H-1)/  $\delta_{\text{C}}$  99,7 (C-1').

Compte tenu de ce qui précède et par comparaison avec les données de la littérature, PC-A-3 serait le sweroside **156**. Ce composé a été déjà isolé de *Tabernaemontana psorocarpa* (Van et al., 1982) et est à notre connaissance isolé d'une espèce du genre *Pauridiantha* pour la première fois.



**Schéma 19:** Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de PC-A-3 (**156**)

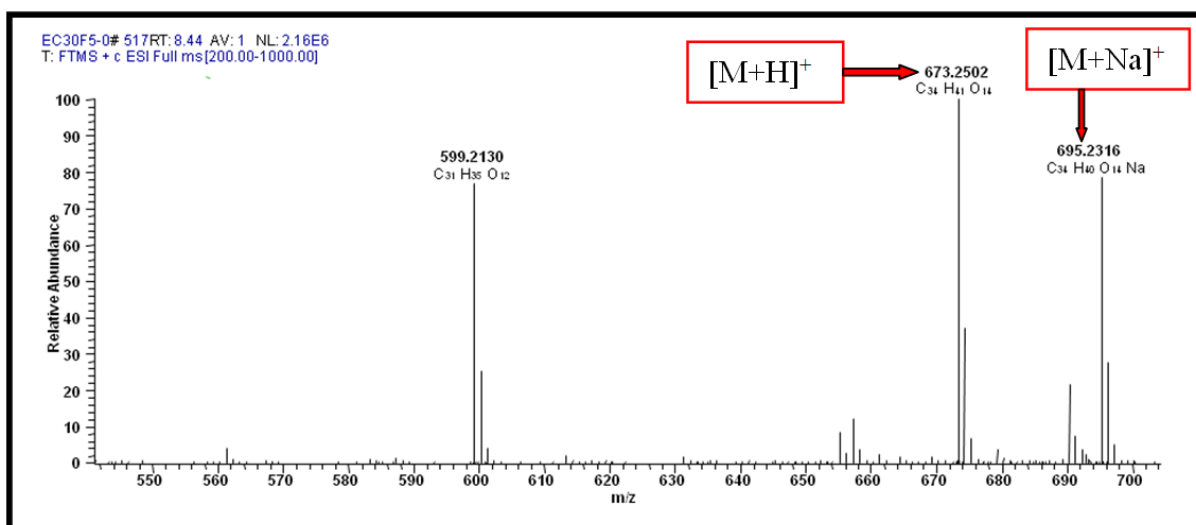
**Tableau XXIV:** Données de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de PC-A-3 (**156**) dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$  comparées aux données de RMN  $^{13}\text{C}$  (25 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de la littérature (sweroside) (Van et *al.*, 1982).

Position	PC-A-3		Sweroside
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	5,54 (1H, d, 2,0)	97,9	97,5
<b>2</b>	-	-	-
<b>3</b>	7,59 (1H, d, 2,5)	154,0	153,2
<b>4</b>	-	106,0	104,6-
<b>5</b>	3,15 (1H, m)	28,4	26,4
<b>6</b>	1,70 (1H, qd, 4,5; 12,5)	25,9	23,8
	1,77 (1H, dq, 2,5; 11,5)		
<b>7</b>	4,37 (1H, td, 2,5; 12,0)	69,7	69,4
	4,45 (1H, dq, 2,0; 11,0)		
<b>8</b>	5,53 (1H, dt, 10,0; 17,0)	133,3	131,3
<b>9</b>	2,70 (1H, ddd, 1,5; 5,5; 9,5)	43,8	41,6
<b>10</b>	5,27 (1H, dd, 1,5; 10,5)	120,8	120,5
	5,30 (1H, dd, 1,5; 17,0)		
<b>11</b>	-	168,5	169,5
<b>1'</b>	4,68 (1H, d, 8,0)	99,7	98,2
<b>2'</b>	3,18 (1H, dd, 8,0; 9,0)	74,7	75,4
<b>3'</b>	3,37 (1H, t, 9,0)	77,9	76,2
<b>4'</b>	3,26 (1H, dd, 9,0; 9,5)	71,5	69,4
<b>5'</b>	3,32 (1H, m)	78,4	72,5
<b>6'</b>	3,66 (1H, dd, 5,5; 12,0)	62,6	60,6
	3,89 (1H, dd, 2,0; 12,0)		

### II.1.2.6- Les limonoïdes: andirolide G (EC30F-5, **164**)

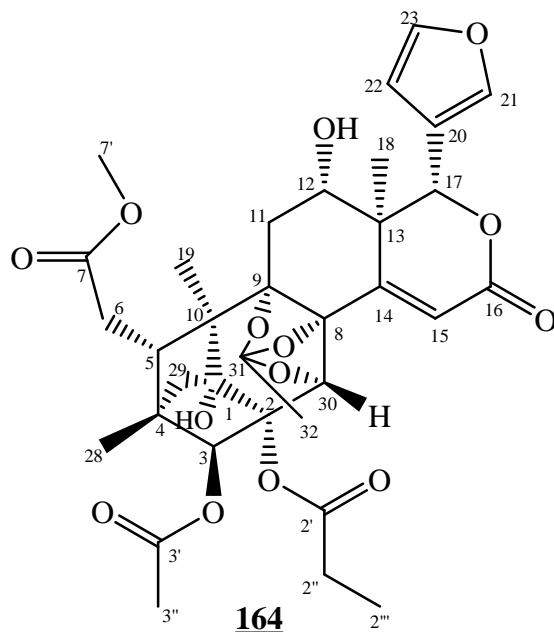
EC30F-5 a été isolé de *Entandrophragma cylindricum* et se présente sous forme d'aiguilles incolores. Il est soluble dans le chloroforme et fond entre 145-147 °C. Il répond positivement au test de Erlich (*para*-N,N-diméthylaminobenzaldéhyde) en donnant une coloration rose après pulvérisation sur une plaque de CCM suivie du chauffage à l'étuve. EC30F-5 serait un limonoïde.

Sur son spectre de masse HR-ESI (Fig. 54), on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  673,2502 (calculée pour  $C_{34}H_{41}O_{14}$ : 673,2491) compatible avec la formule brute  $C_{34}H_{40}O_{14}$  renfermant quinze degrés d'insaturation.



**Figure 54:** Spectre de masse HR-ESI de l'andirolide G (EC30F-5, **164**)

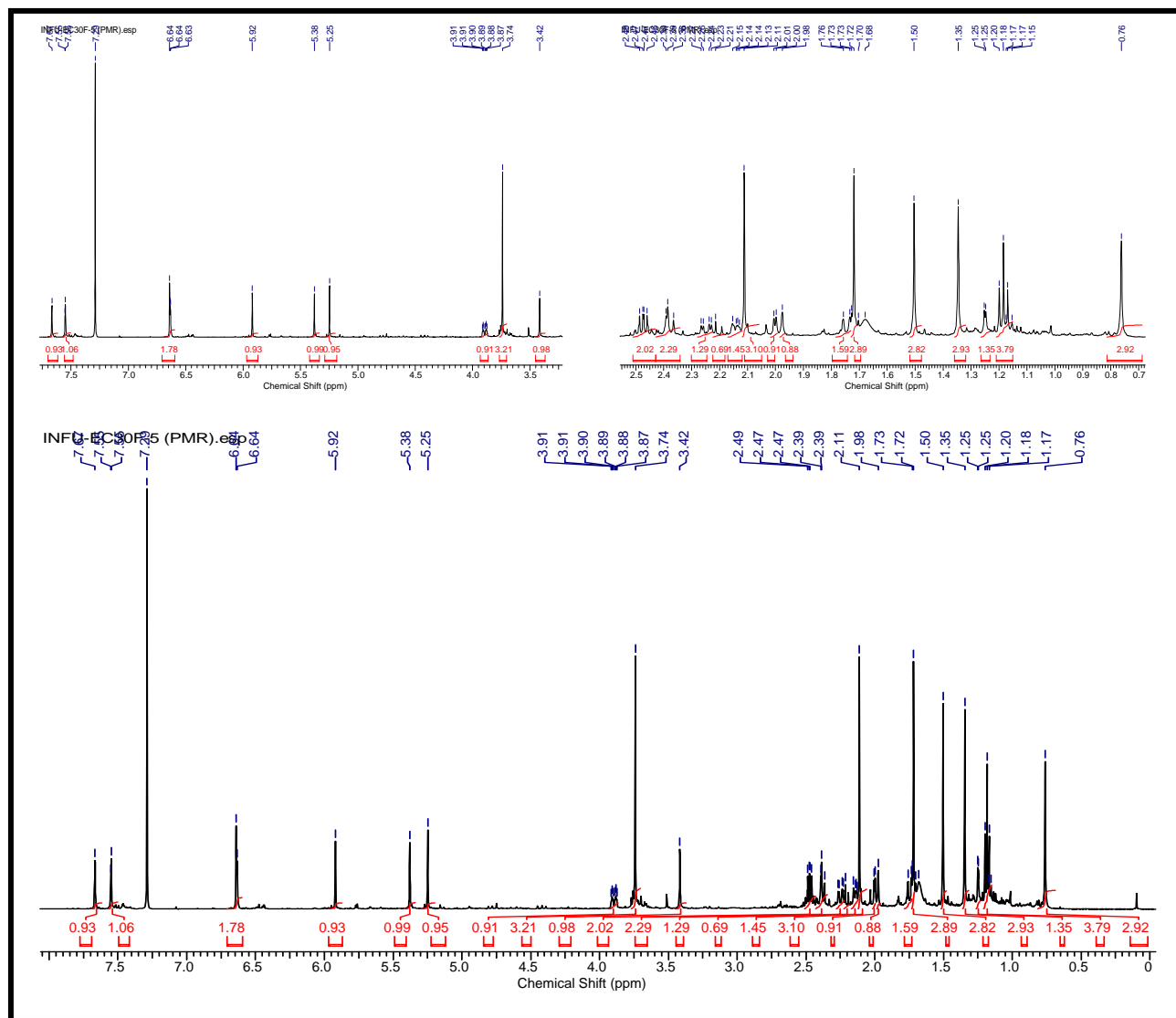
L'analyse de ce spectre couplée à ceux de RMN 1D et 2D permet d'attribuer à EC30F-5 la structure **164** suivante.



En effet, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 55) de EC30F-5 a l'allure générale des phragmalines ortoester (Tan et Luo, 2011). L'analyse de ce spectre couplé à ceux de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 56) et du HMQC (Tableau XXV) fait ressortir les signaux du cycle furanique à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  7,67 (1H, *ls*, H-21)/142,8 (C-21); 7,55 (1H, *ld*,  $J = 1,5$  Hz, H-23)/145,2 (C-23) et 6,64 (1H, *ls*, H-22)/110,0 (C-22) (Tanaka et *al.*, 2011). On observe les signaux de sept méthyles dont deux méthyles angulaires à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1,35 (3H, *s*, H-19)/15,8 (C-19) et 1,50 (3H, *s*, H-18)/13,4 (C-18); un groupe acétyle à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  2,11 (3H, *s*, H-3'')/22,1 (C-3'') et  $\delta_{\text{C}}$  169,5 (C-3'); un groupe propanoyle à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1,18 (3H, *t*,  $J = 7,6$  Hz, H-2''')/9,3 (C-2'''), 2,47 (2H, *m*, H-2'')/28,5 (C-2''),  $\delta_{\text{C}}$  174,2 (C-2'); un groupe méthyle ester à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3,74 (3H, *s*, H-7')/52,7 (C-7'),  $\delta_{\text{C}}$  174,2 (C-2'). Nous avons également les signaux d'un groupe lactone  $\alpha,\beta$ -insaturée à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  6,64 (1H, *ls*, H-15)/124,1 (C-15),  $\delta_{\text{C}}$  154,2 (C-14), 163,9 (C-16); d'un ortho ester à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1,72 (3H, *s*, H-32)/16,9 (C-32),  $\delta_{\text{C}}$  120,1 (C-31). On observe les signaux de quatre oxyméthynes  $\text{sp}^3$  à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3,89 (1H, *dt*,  $J = 2,7$ ; 13,4, H-12)/67,0 (C-12); 5,25 (1H, *s*, H-3)/85,4 (C-3); 5,38 (1H, *s*, H-30)/74,7 (C-30) et 5,92 (1H, *s*, H-17)/79,2 (C-17), ainsi que quatre autres signaux de carbones quaternaires  $\text{sp}^3$  oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  83,9 (C-2); 84,1 (C-8); 84,6 (C-1) et 86,5 (C-9).

Les positions des groupements acétoxy, propanoyle, carbométhoxy, furane et orthoacétyle ont été localisées en C-3, C-2, C-5, C-17 et C-8-C-9-C-30 respectivement sur la base des corrélations observées sur les spectres HMBC et COSY (schéma 20).

La comparaison de ces données spectrales avec celles de la littérature (Tableau XXV) nous permet de confirmer pour EC30F-5 la structure **164** qui est celle de l'andriolide G, un limonoïde de type phragmaline orthoester isolé pour la première fois de *Carapa guianensis* (Meliaceae) (Tanaka et al., 2011).



**Figure 55:** Spectre de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de l'andriolide G (EC30F-5, **164**)



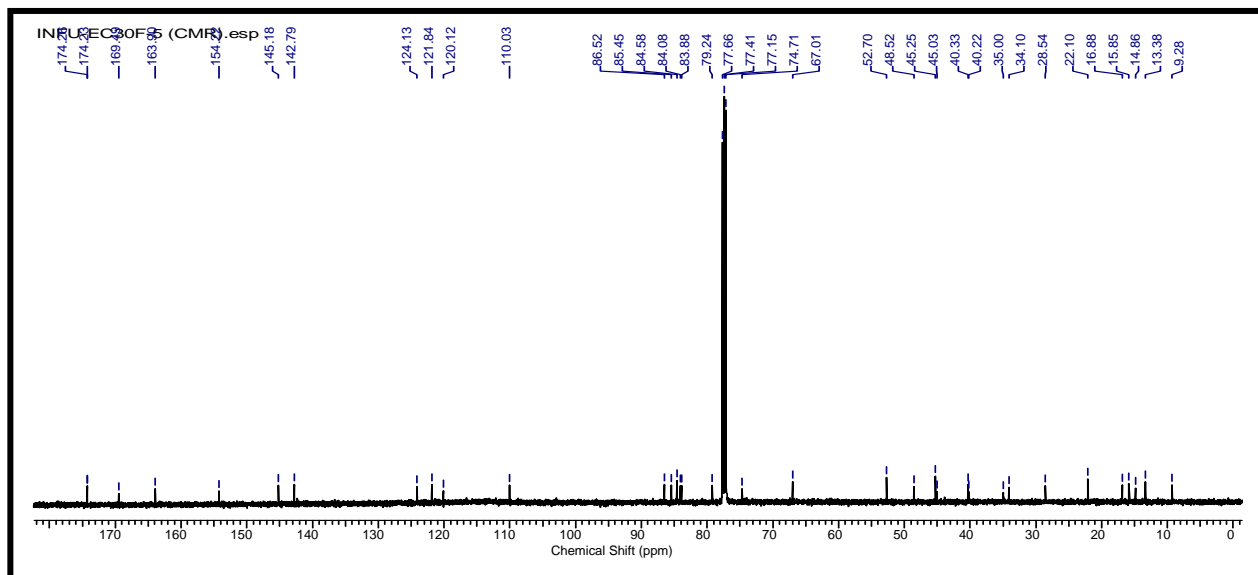


Figure 56: Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de l'andirolide G (EC30F-5, **164**)

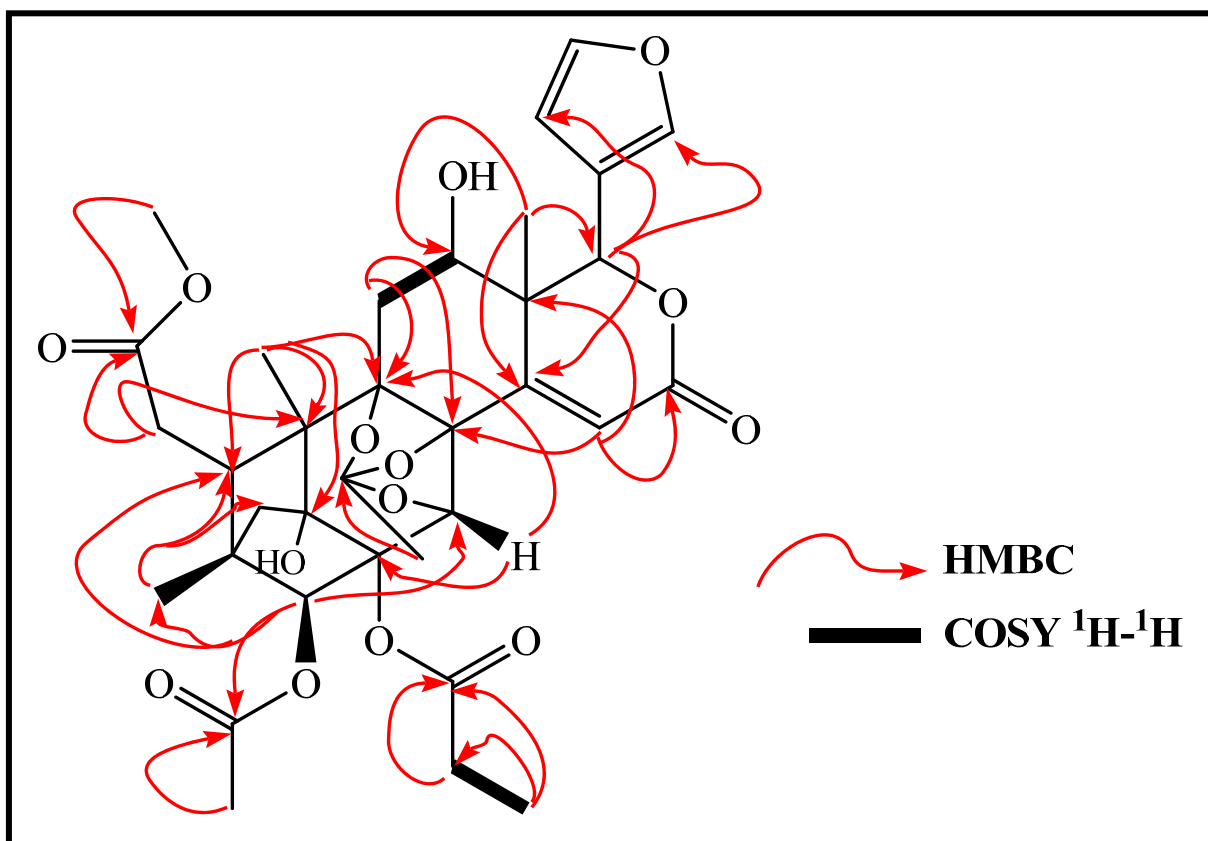


Schéma 20: Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de l'andirolide G (EC30F-5, **164**).

**Tableau XXV:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de EC30F-5 (**164**) dans le  $\text{CDCl}_3$  comparées à celles de l'andiroside G (Takana *et al.*, 2011).

Position	EC30F-5		Andiroside G	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	84,6	-	84,1
2	-	83,9	-	83,5
3	5,25 (1H, s)	85,4	5,22 (1H, s)	85,0
4	-	45,0	-	44,6
5	2,14 (1H, <i>ld</i> , 8,8)	40,3	2,12 (1H, <i>ld</i> , 10,5)	39,9
6	2,39 (2H, d, 10,7)	34,1	2,35 (2H, m)	33,7
7	-	174,2	-	173,8
8	-	84,1	-	83,7
9	-	86,5	-	86,1
10	-	48,5	-	48,1
11	2,00 (1H, d, 4,2) 2,25 (1H, dd, 4,2; 14,5)	35,0	1,98 (1H, dd, 13,0; 17,0) 2,22 (1H, dd, 4,5; 17,0)	34,6
12	3,89 (1H, dt, 2,7; 13,4)	67,0	3,87 (1H, ddd, 2,0; 4,5; 13,0)	66,6
13	-	45,2	-	44,8
14	-	154,2	-	153,8
15	6,64 (1H, <i>ls</i> )	124,1	6,62 (1H, s)	123,7
16	-	163,9	-	163,5
17	5,92 (1H, s)	79,2	5,90 (1H, s)	78,8
18	1,50 (3H, s)	13,4	1,48 (3H, s)	13,0
19	1,35 (3H, s)	15,8	1,32 (3H, s)	15,4
20	-	121,8	-	121,4
21	7,67 (1H, <i>ls</i> )	142,8	7,64 (1H, <i>ls</i> )	142,4
22	6,63 (1H, <i>ld</i> , 1,2)	110,0	6,61 (1H, dd, 0,7; 1,6)	109,6
23	7,55 (1H, <i>ld</i> , 1,5)	145,2	7,53 (1H, t, 1,6)	144,8
28	0,76 (3H, s)	14,8	0,74 (3H, s)	14,4
29	1,74 (1H, <i>ls</i> ) 1,98 (1H, d, 11,5)	40,2	1,72 (1H, d, 10,7) 1,96 (1H, d, 10,7)	39,8
30	5,38 (1H, s)	74,7	5,35 (1H, s)	74,3
31	-	120,1	-	119,7
32	1,72 (3H, s)	16,9	1,70 (3H, s)	16,5
2'	-	174,2	-	173,9
2''	2,47 (2H, m)	28,5	2,44 (1H, dq, 7,6; 13,8) 2,46 (1H, dq, 7,6; 13,8)	28,1
2'''	1,18 (3H, t, 7,6)	9,8	1,16 (3H, t, 7,6)	8,9
3'	-	169,5	-	169,1
3''	2,11 (3H, s)	22,1	2,09 (3H, s)	21,7
7'	3,74 (3H, s)	52,7	3,71 (3H, s)	52,3
12-OH	1,25 (1H, d, 2,7)	-	1,23 (1H, d, 2,0)	-

---

## II.1.2.7- Les stéroïdes

### II.1.2.7.1- Mélange de $\beta$ -sitostérol et stigmastérol (PC-22, **153** et **150**)

Soluble dans le chloroforme, le composé PC-22 se présente sous forme d'aiguilles blanches dans le mélange Hex/AE (92,5/7,5). Le test de Libermann Burchard donne une coloration bleu-verdâtre caractéristique des stérols. Sur une plaque de CCM on observe une tache violette après pulvérisation à l'acide sulfurique dilué et calcination, ce qui laisse à confirmer que PC-22 serait un stérol.

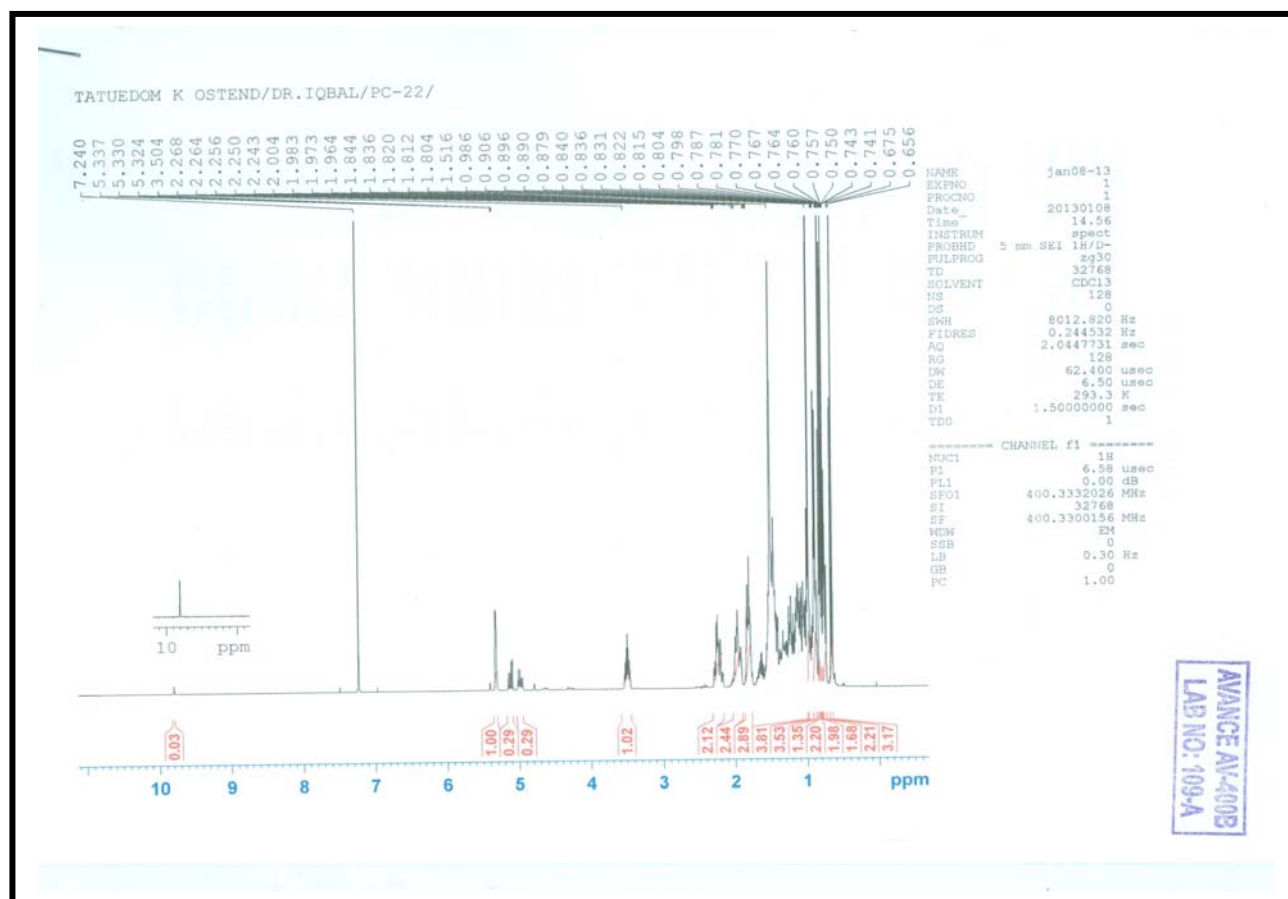
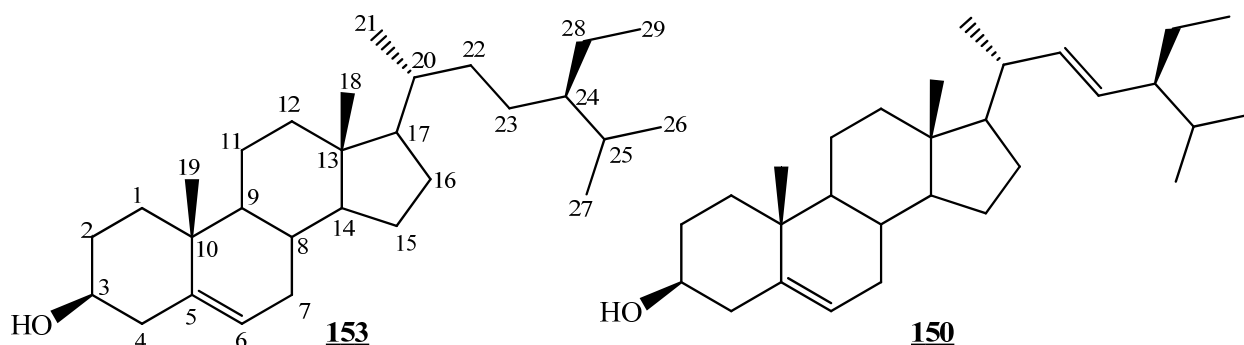
L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 57) montre des signaux caractéristiques d'un phytostérol. En effet, on observe:

- deux singulets de 3 protons chacun à  $\delta_{\text{H}}$  0,78 et 0,99 ppm attribuables aux protons des méthyles angulaires.
- trois doublets de 3 protons chacun  $\delta_{\text{H}}$  0,66 (3H, d,  $J = 7,6$  Hz); 0,80 (3H, d,  $J = 2,4$  Hz) et 0,90 ppm (3H, d,  $J = 6,4$  Hz), ce qui suggère la présence des fragments  $\text{CH}_3\text{-CH-}$ . Un doublet d'un proton à  $\delta_{\text{H}}$  5,33 ppm (1H, d,  $J = 5,2$  Hz) attribuable à un proton oléfinique, probablement celui du proton porté par le carbone C-6.
- Un multiplet d'un proton à  $\delta_{\text{H}}$  3,50 ppm attribuable à un proton géminé à un groupement hydroxyle porté par le carbone C-3 des stérols.

Cependant, la présence sur ce même spectre de RMN  $^1\text{H}$  de deux doublets dédoublés d'intensités moyennement réduites à  $\delta_{\text{H}}$  4,99 (dd,  $J = 8,8$  et 15,2) et 5,13 ppm (dd,  $J = 8,8$  et 15,2) nous fait penser qu'on aurait à faire à un mélange de stérols. Cette hypothèse a été confirmée par comparaison de PC-22 avec un échantillon de référence (constitué de  $\beta$ -sitostérol et stigmastérol observé en CPG) disponible dans notre laboratoire. Ainsi, PC-22 serait un mélange du  $\beta$ -sitostérol (**153**) et du stigmastérol (**150**) avec le  $\beta$ -sitostérol en proportion majoritaire.

Le  $\beta$ -Sitostérol est utilisé comme préventif de l'hypercholestérolémie (Carpenter et *al.*, 1980). En effet, ce composé formerait avec le cholestérol alimentaire dans l'intestin un complexe physique éliminé par les selles. Il est aussi hypotensif, antiulcéreux et anticancéreux (Pegel, 1997). Le  $\beta$ -Sitostérol demeure indispensable pour couvrir les besoins de l'industrie

pharmaceutique en médicaments stéroïdiques (contraceptifs, anabolisants) (Carpenter et al., 1980; Bruneton, 1993).



**Figure 57:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du mélange  $\beta$ -sitostérol et stigmasterol (PC-22, **153** et **150**)

---

### II.1.2.7.2- Mélange de 3-O- $\beta$ -D-gluco-pyranoside de $\beta$ -sitostérol et 3-O- $\beta$ -D-gluco-pyranoside de stigmastérol (PC-31, 152 et 165)

Soluble dans le mélange chloroforme/méthanol, le composé PC-31 se présente sous forme d'une poudre beige dans le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (92,5/7,5). Le test de Libermann Burchard donne une coloration bleu-verdâtre caractéristique des stérols. Le test de Molish est également positif, donc PC-31 serait un glycoside stéroïdique.

L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H (Fig. 58) montre des signaux caractéristiques d'un glycoside de phytostérol. En effet, l'analyse comparée de ce spectre à celui de PC-22 montre outre les signaux caractéristiques des composés PC-22, un ensemble de signaux à  $\delta_H$  3,19 - 4,37 typiques d'un fragment de sucre. Le doublet à  $\delta_H$  4,36 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz) est attribuable au proton anomérique du sucre et la valeur de sa constante de couplage permet de déduire qu'il s'agit d'un  $\beta$ -glucoside.

Nous avons entre autre:

- deux singulets de 3 protons chacun à  $\delta_H$  0,78 et 0,95 ppm attribuables aux protons des méthyles angulaires.
- trois doublets de 3 protons chacun  $\delta_H$  0,63 (3H, d,  $J = 7,2$  Hz); 0,76 (3H, d,  $J = 1,6$  Hz) et 0,86 ppm (3H, d,  $J = 6,4$  Hz), ce qui suggère la présence des fragments CH<sub>3</sub>-CH-. Un doublet d'un proton à  $\delta_H$  5,31 ppm (1H, d,  $J = 5,2$  Hz) attribuable à un proton oléfinique, probablement celui du proton porté par le carbone C-6.
- Un multiplet d'un proton à  $\delta_H$  3,51 ppm attribuable à un proton géminé à un groupement hydroxyle porté par le carbone C-3 des stérols.

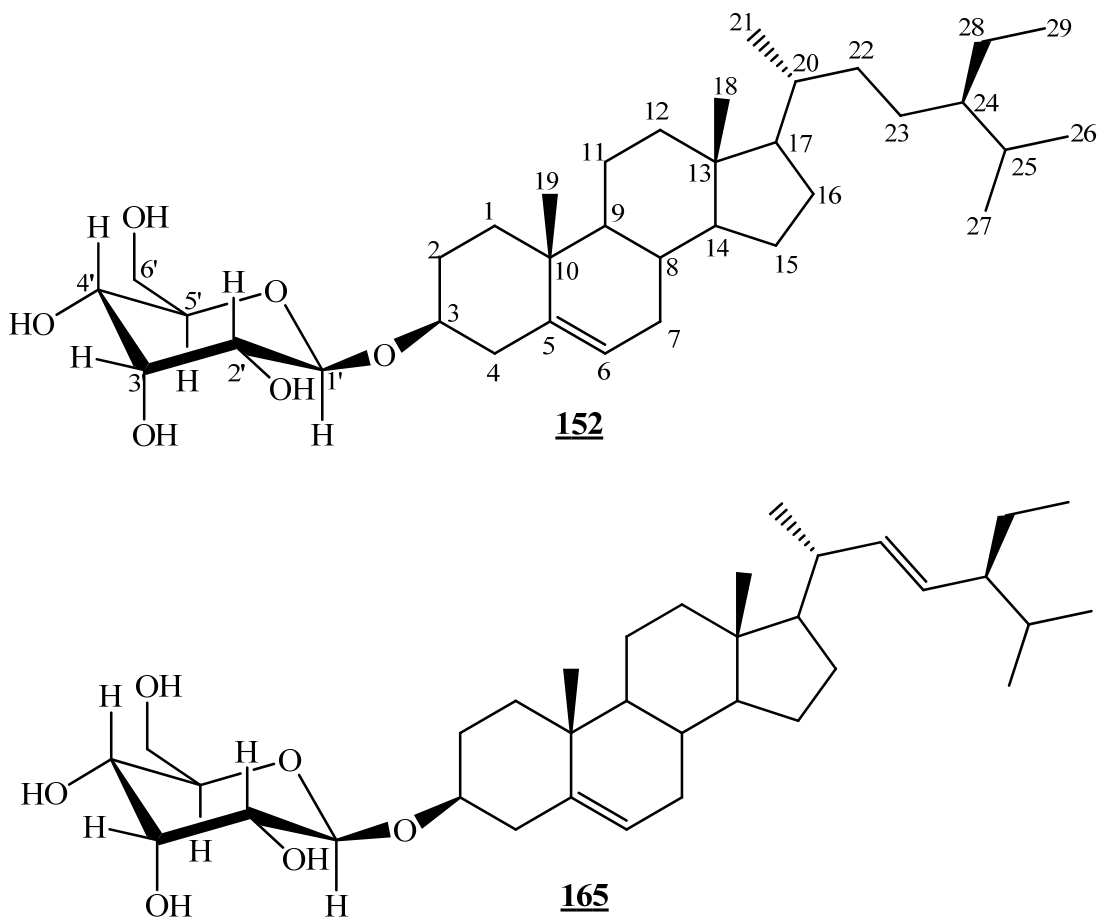
Cependant, la présence sur ce même spectre de RMN <sup>1</sup>H de deux doublets dédoublés d'intensités moyennement réduites à  $\delta_H$  4,95 (H-23, dd,  $J = 8,8$  et 15,2) et 5,09 ppm (H-22, dd,  $J = 8,8$  et 15,2) nous fait penser qu'on aurait à faire à un mélange de glycoside de stérols. Cette information est corroborée par l'observation sur le spectre de masse HR-ESI (Fig. 59) de deux pics d'ions pseudo-moléculaires [M<sub>1</sub>+Na]<sup>+</sup> et [M<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> à  $m/z$  599,4283 (calculée pour C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>Na: 599,4282) et  $m/z$  597,4124 (calculée pour C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>Na: 597,4126) compatibles avec les formules brutes C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub> et C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub> renfermant respectivement six et sept insaturations. Toujours sur ce spectre, nous observons des pics d'ions fragments [(M<sub>1</sub>+H)-

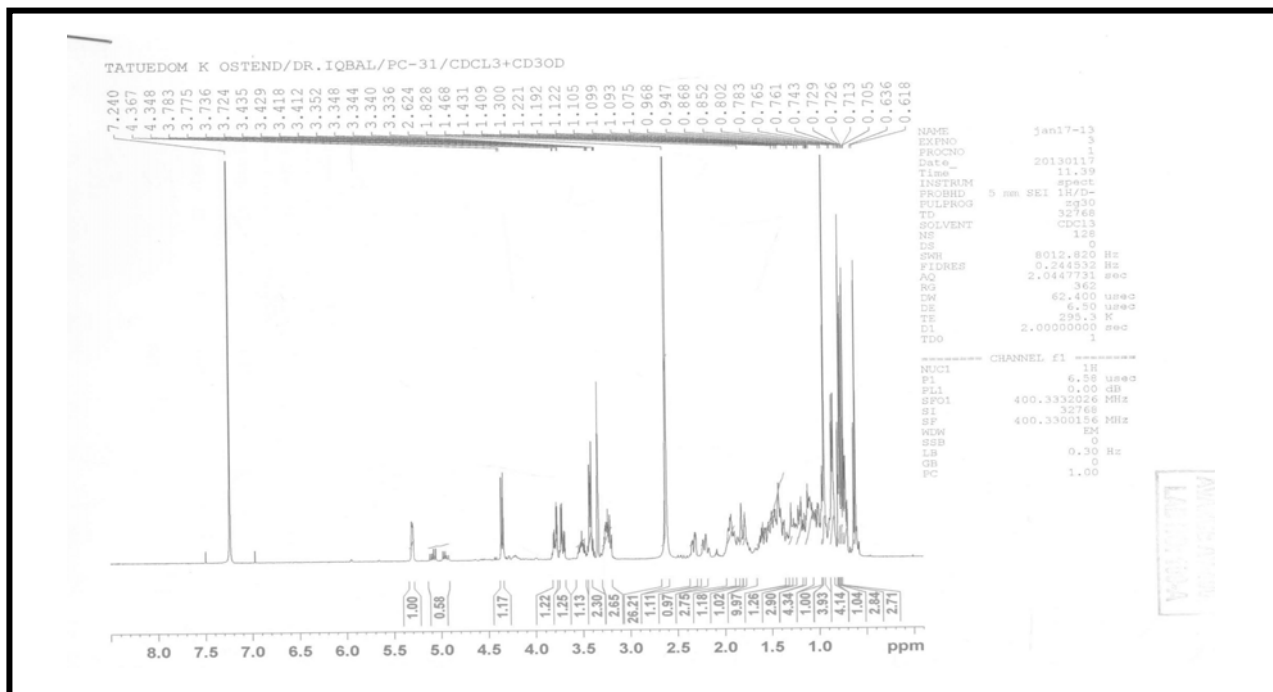
---

$C_6H_{10}O_5]^+$  et  $[(M_2+H)-C_6H_{10}O_5]^+$  à  $m/z$  415 et  $m/z$  413, correspondant respectivement à la perte d'une unité de sucre.

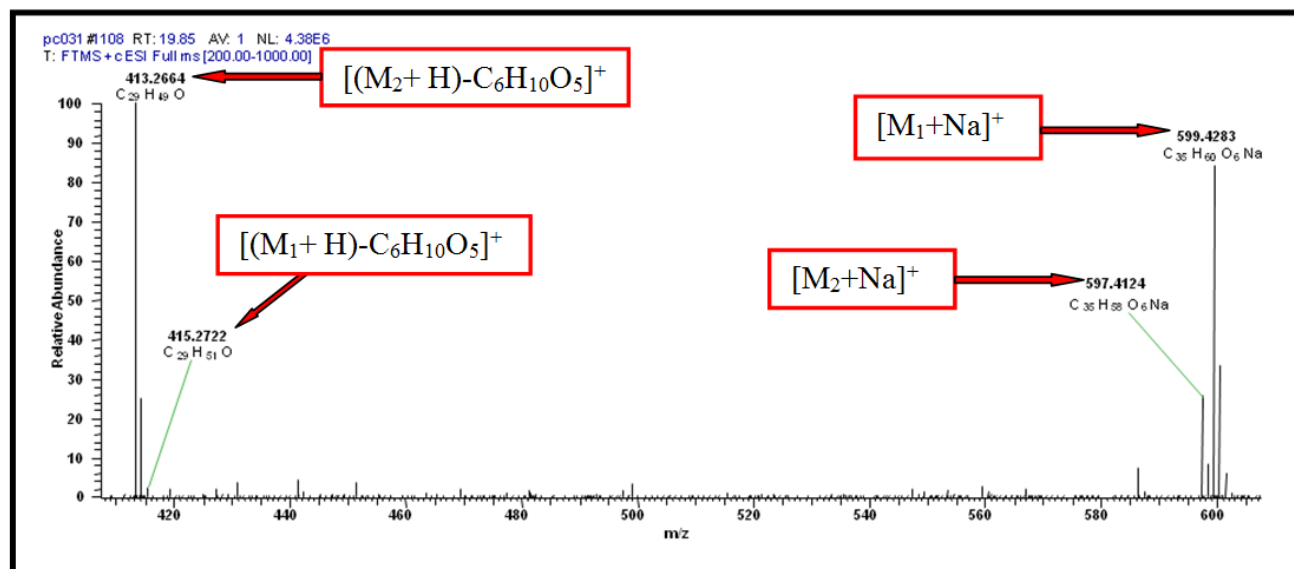
Ainsi, PC-31 serait un mélange du 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol (**152**) et du 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de stigmastérol (**165**) avec le 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol en grande proportion.

Le 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de sitostérol encore appelé sitostéroline présente des activités antigastro-ulcératives, anti-inflammatoires et anti-hyperglycémiques. Par ailleurs, il a été démontré qu'il a un effet protecteur sur le cancer du colon chimiquement induit chez le rat. Il stimule chez l'Homme la prolifération des lymphocytes T et peut ainsi être utilisé dans les combinaisons vitaminiques immunomodulatoires (Bouic *et al.*, 1996).





**Figure 58:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  +  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du mélange 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol et du 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de stigmastérol (PC-31, **152** et **165**).



**Figure 59:** Spectre de masse HR-ESI du mélange 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol et du 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de stigmastérol (PC-31, **152** et **165**).

### II.1.2.8- Les carbohydrates (disaccharides): 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, 166).

PC-A-7 se présente sous forme d'un solide incolore après évaporation du système MeOH/H<sub>2</sub>O (1:9). Il est soluble dans le méthanol et fond à 84°C. Il répond positivement au test de Molisch caractéristique d'un hydrate de carbone (glycoside).

L'analyse de ses spectres de RMN 1D et 2D a permis de lui attribuer la formule brute C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> renfermant deux insaturations.

En effet, sur son spectre de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 60), on observe les signaux caractéristiques de deux sucres à δ<sub>H</sub> 4,46 (1H, d, *J* = 7,6 Hz) et 5,09 (1H, d, *J* = 3,6 Hz) attribuables aux protons anomériques; ce qui nous fait penser à un disaccharide. Les valeurs de leurs constantes de couplage indiquent qu'ils sont bêta et alpha respectivement (De Bruyn et al., 1975).

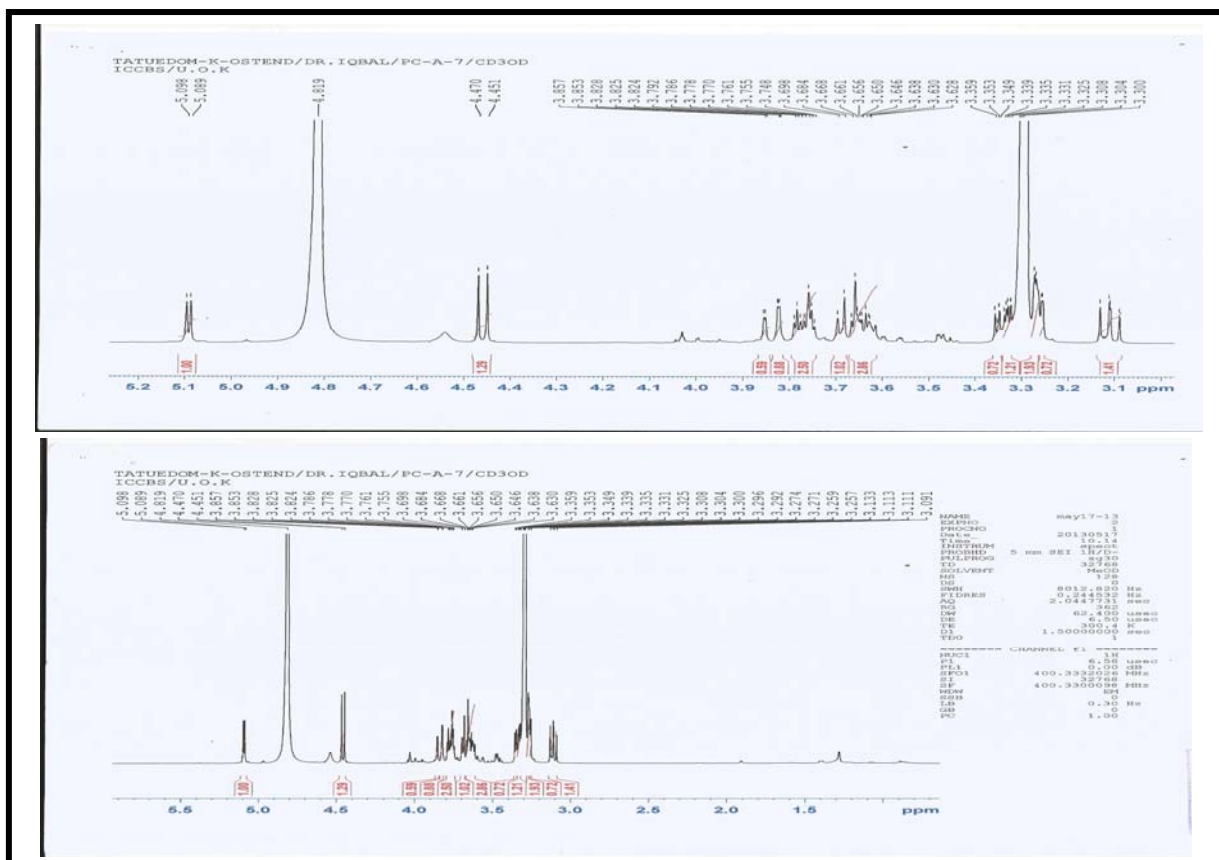
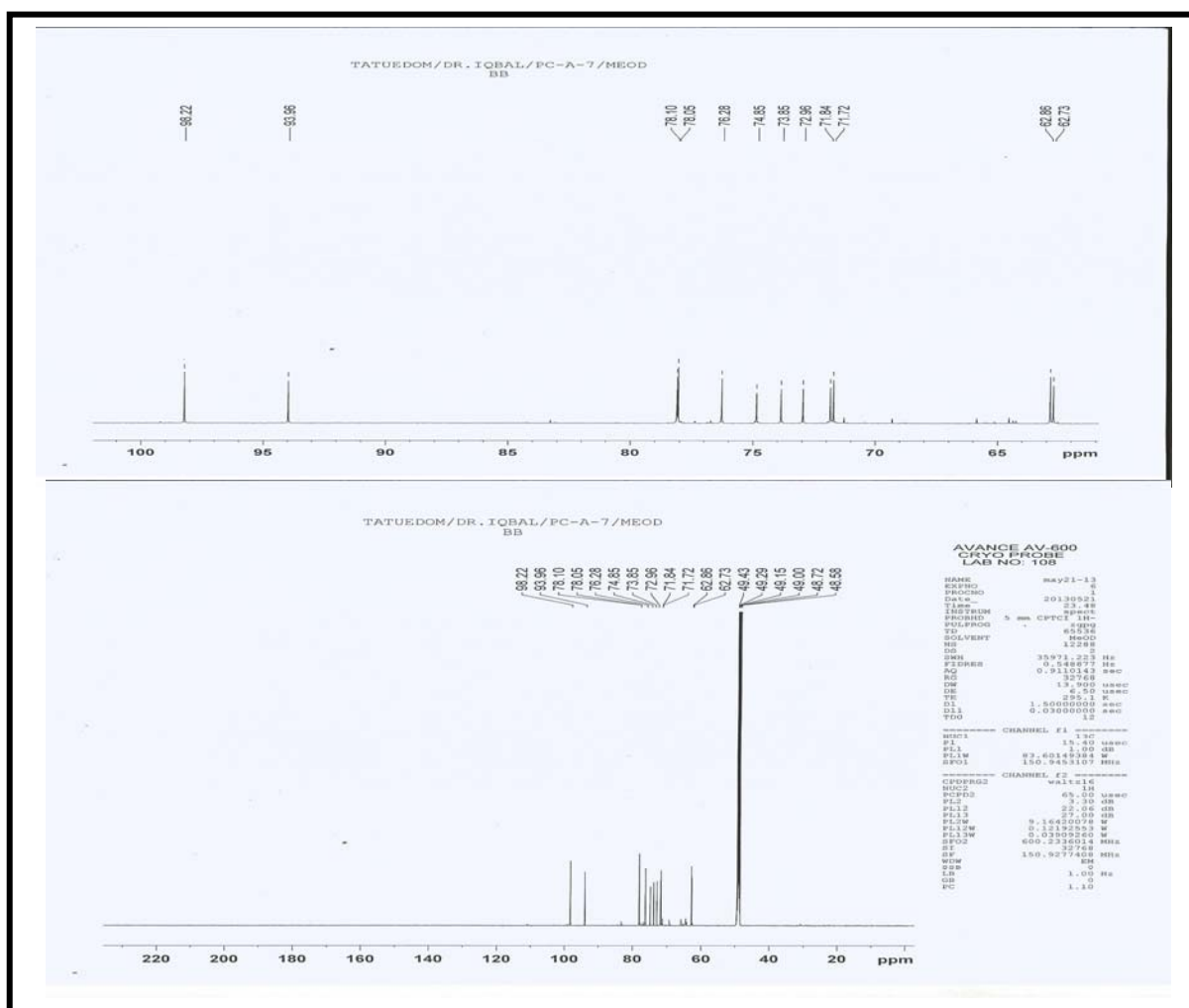


Figure 60: Spectre de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, 166).

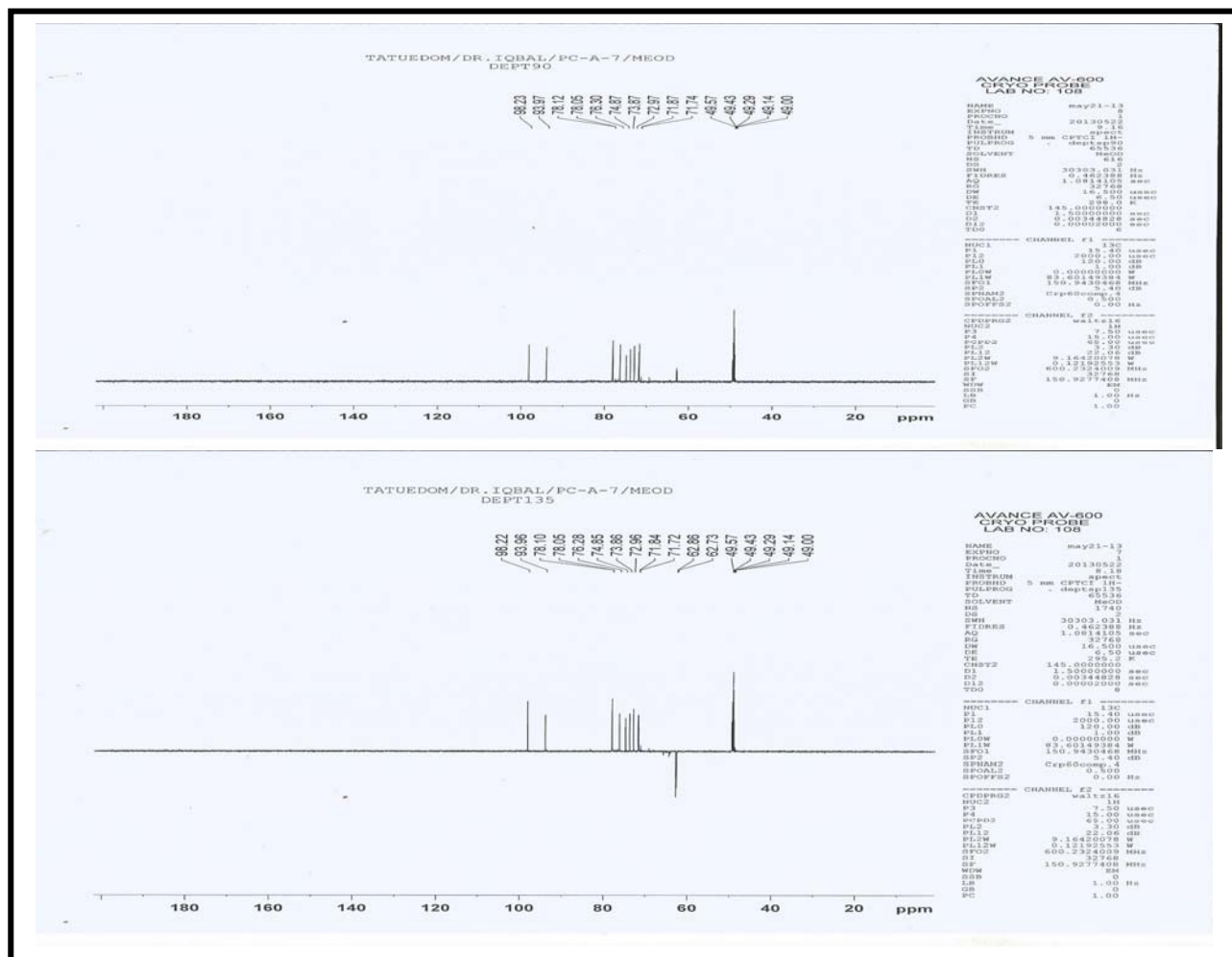


Son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 61) présente douze signaux de carbone, ce qui nous permet de suggérer que PC-A-7 serait un dihexose. L'analyse de ce spectre couplée à ceux du DEPT 135 et DEPT 90 (Fig. 62) fait ressortir:

- Deux méthylènes à  $\delta_{\text{C}}$  62,9 (C-7) et 62,7 ppm (C-7'), attribuables aux oxyméthylènes ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ) des deux monosaccharides.
- Dix méthynes à  $\delta_{\text{C}}$  71,7; 71,8; 72,9; 73,9; 74,9; 76,3; 2x78,1; 93,9 et 98,2, attribuables aux oxyméthynes ( $\text{CH-O}$ ). Ceux à  $\delta_{\text{C}}$  93,9 (C-2) et 98,2 (C-2') sont propres à deux carbones anomériques.



**Figure 61:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, **166**).

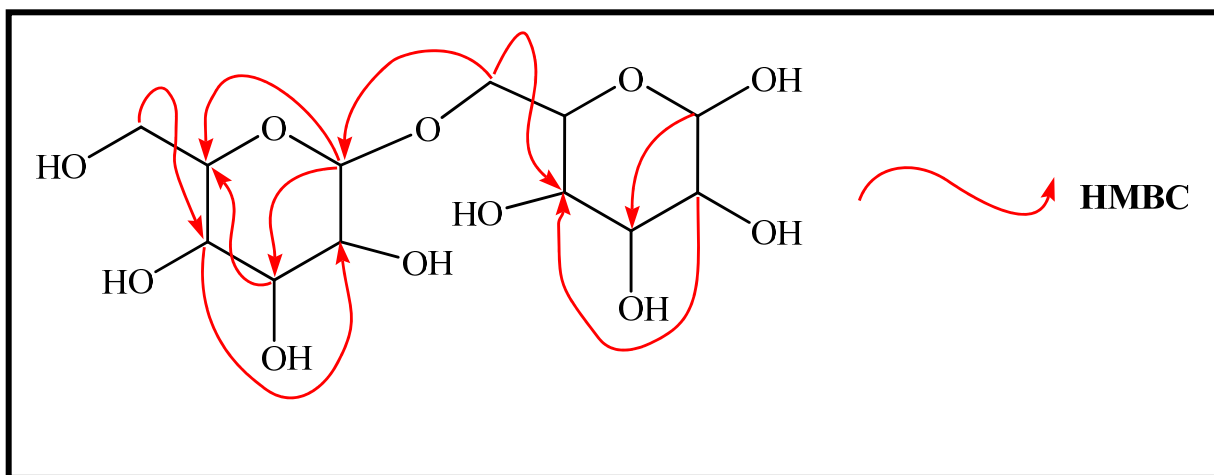
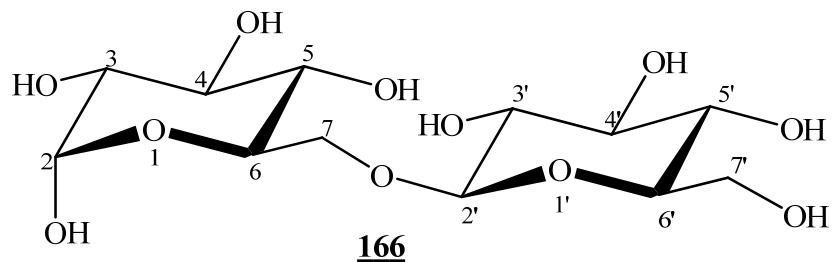


**Figure 62:** Spectres DEPT 135 et DEPT 90 du 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, **166**)

La liaison osidique a été établie entre C-7 et C-2' par le biais du spectre HMBC (schéma 21) sur lequel on observe une tache de corrélation entre le proton à  $\delta_H$  3,65 (H-7) et le carbone à  $\delta_C$  98,2 (C-2').

La combinaison de toutes ces données spectrales nous permet d'attribuer à PC-A-7 la structure **166** qui est celle d'un composé connu: le 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose ou *D*-melibiose (De Bruyn et *al.*, 1975) de nom systématique 6-((3',4',5'-trihydroxy-6'-(hydroxyméthyl)tétrahydro-2*H*-pyran-2'-yloxy)méthyl)tétrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tétraol.

Les attributions complètes des protons et carbones ont été effectuées sur la base de ses spectres de RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ , HSQC (Tableau XXVI) et HMBC.



**Schéma 21:** Quelques corrélations importantes observées sur le spectre HMBC du 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, **166**)

**Tableau XXVI:** Données de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7, **166**) dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

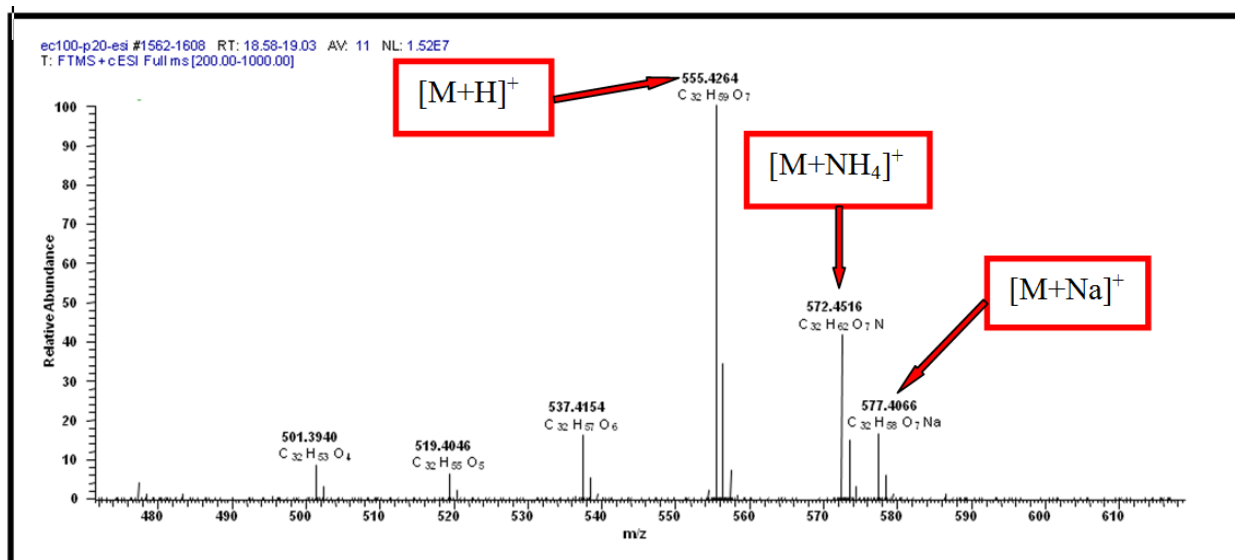
<b>PC-A-7</b>					
<b>Position</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (m, <i>J</i> en Hz)</b>	<b><math>\delta_{\text{C}}</math></b>	<b>Position</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (m, <i>J</i> en Hz)</b>	<b><math>\delta_{\text{C}}</math></b>
<b>1</b>	-	-	<b>1'</b>	-	-
<b>2</b>	5,09 (1H, d, 3,6)	93,9	<b>2'</b>	4,46 (1H, d, 7,6)	98,2
<b>3</b>	3,77 (1H, m)	72,9	<b>3'</b>	3,65 (1H, m)	74,9
<b>4</b>	3,35 (1H, d, 4,0)	73,9	<b>4'</b>	3,11 (1H, dd, 8,0; 8,8)	76,3
<b>5</b>	3,27 (1H, d, 1,2)	71,8	<b>5'</b>	3,27 (1H, d, 1,2)	71,7
<b>6</b>	3,26 (1H, d, 0,8)	78,1	<b>6'</b>	3,33 (1H, m)	78,1
<b>7</b>	3,65 (1H, m) 3,84 (1H, dd, 1,6; 11,6)	62,9	<b>7'</b>	3,69 (1H, d, 5,6) 3,77 (1H, m)	62,7

## II.1.2.9-Terpénoïdes

### II.1.2.9.1- Sapelenine A (EC100P20/201, 90)

EC100P20/201 se présente sous forme d'une poudre cristalline fine blanche. Il est soluble dans le chloroforme et fond entre 111-112 °C. Il répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Sur son spectre de masse HR-ESI (Fig. 63), on observe le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  555,4264 (calculée pour  $C_{32}H_{59}O_7$ : 555,4261) compatible avec la formule brute  $C_{32}H_{58}O_7$  renfermant quatre degrés d'insaturation.



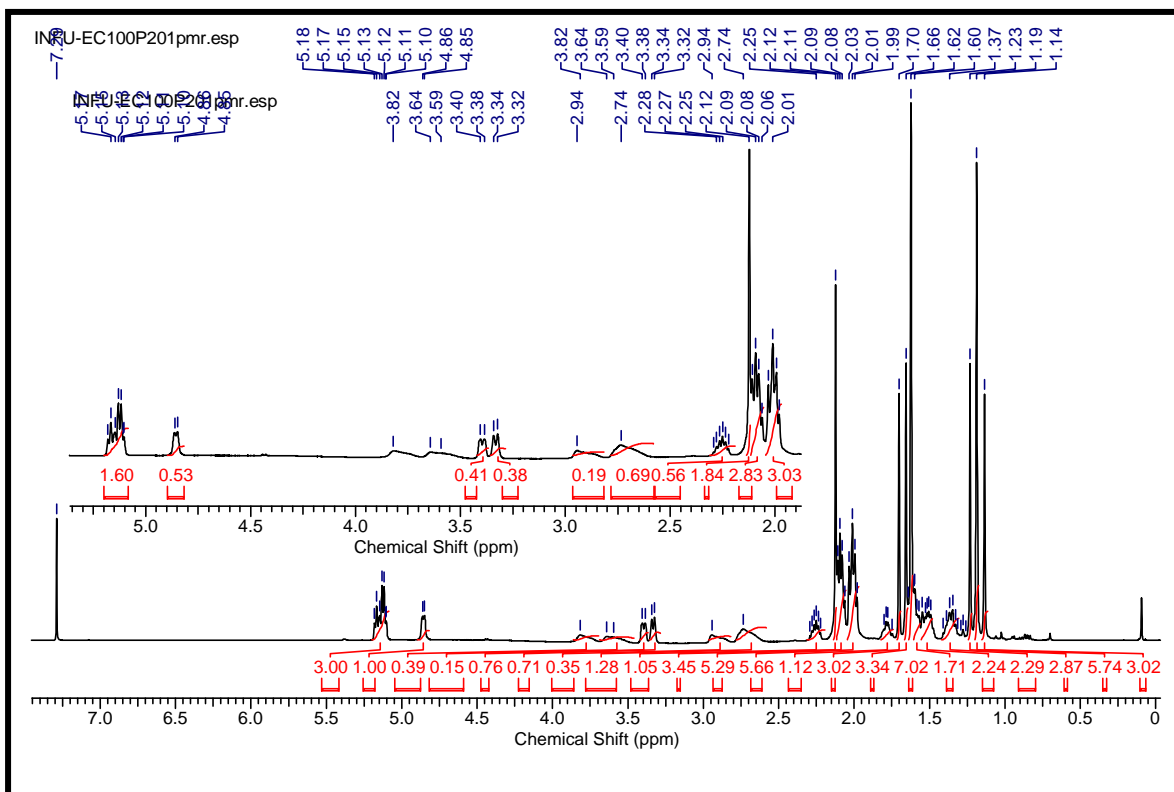
**Figure 63:** Spectre de masse HR-ESI du sapelenine A (EC100P20/201, 90)

Tenant compte de cette formule brute et du fait qu'aucune classe spécifique qui soit connue n'ait un squelette de base en  $C_{32}$ , nous ne pouvons pas à priori proposer une classe de composé à EC100P20/201.

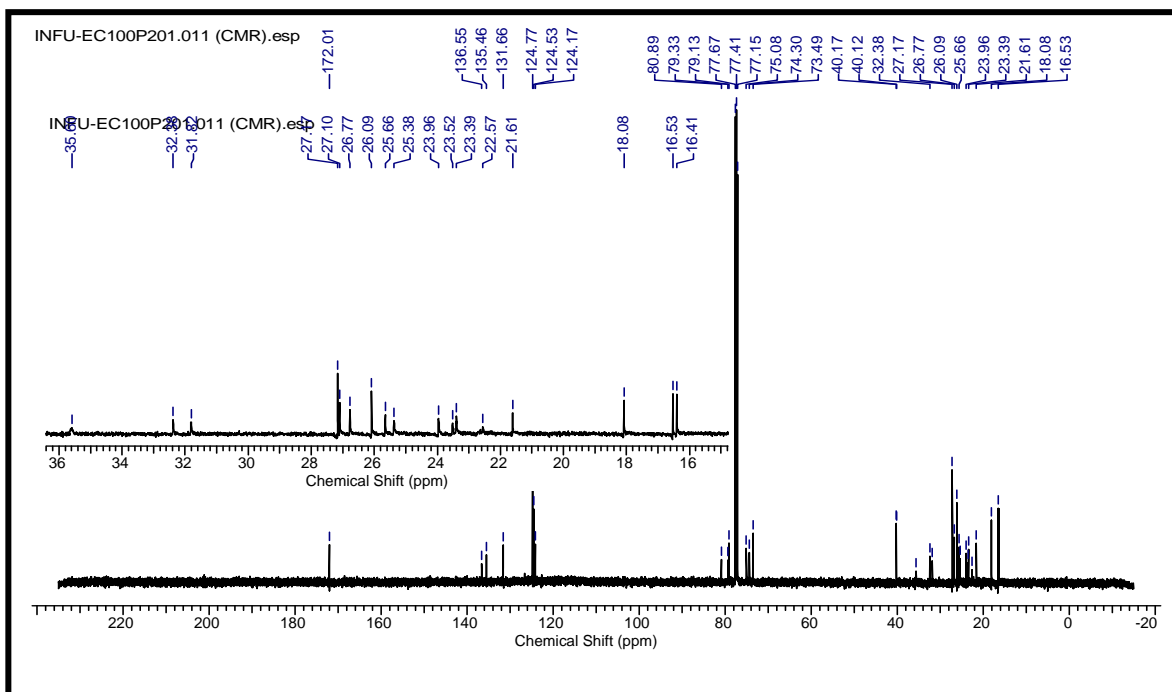
Sur son spectre de RMN  $^1H$  (Fig. 64), on observe un signal à  $\delta_H$  2,12 (3H, s) ce qui permet de suggérer la présence d'un groupe acétyle ( $CH_3-CO-$ ). Cette hypothèse est confirmée plus loin sur son spectre de RMN  $^{13}C$  (Fig. 65) où l'on observe un signal dans la région des champs faibles à  $\delta_C$  172,0 attribuable au carbonyle des esters. Ainsi, EC100P20/201 pourrait être un triterpène.

De plus, sur son spectre de RMN  $^1\text{H}$  proton, on observe outre le signal à  $\delta_{\text{H}}$  2,12 (3H, s), huit autres signaux de méthyles dont ceux à  $\delta_{\text{H}}$  1,62 (3H, s); 1,66 (6H, s) et 1,70 (3H, s) sont attribuables aux méthyles oléfiniques. Ceux à  $\delta_{\text{H}}$  1,14 (3H, s); 1,19 (6H, s) et 1,23 (3H, s) correspondent aux méthyles liés aux carbones hybridés  $\text{sp}^3$  déblindés (portant des oxygènes). On peut alors confirmer sans risque de se tromper que EC100P20/201 est un triterpène.

Par ailleurs, on observe sur le même spectre de RMN  $^1\text{H}$  proton, des signaux caractéristiques de 3 groupements oxyméthynes à  $\delta_{\text{H}}$  3,33 (1H, d,  $J = 10$  Hz); 3,39 (1H, d,  $J = 10$  Hz) et 4,86 (1H, d,  $J = 5$  Hz), ce qui permet de suggérer que 3 doubles liaisons sont oxydées. Cette information est corroborée par la présence sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  des signaux de carbones quaternaires oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  73,5; 74,3 et 75,0. On observe également un signal de protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  5,15 (3H, m); ce qui confirme la présence de 3 autres doubles liaisons dans la molécule, soit 3 insaturations.



**Figure 64:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine A (EC100P20/201, 90)



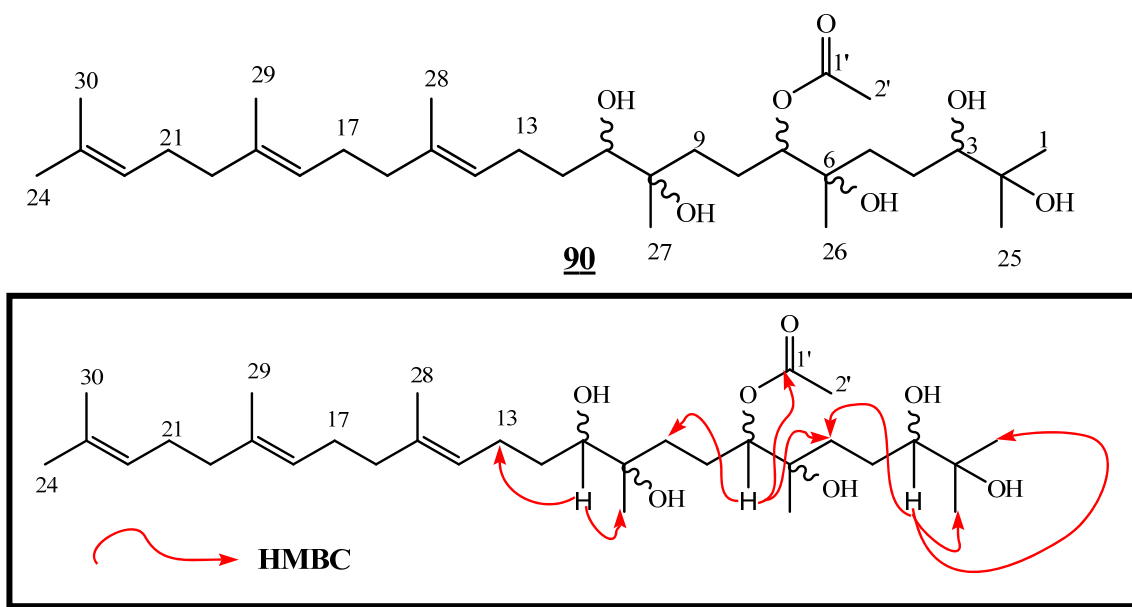
**Figure 65:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine A (EC100P20/201, **90**)

Compte tenu du nombre d'insaturations ( $n_i = 4$ ) et du fait que la dernière insaturation provient du carbonyle de l'ester, on peut conclure aisément que EC100P20/201 est un triterpène acyclique acétylé.

L'analyse du spectre de HMBC (schéma 22) a permis de fixer le groupement acétylé sur la chaîne acyclique. En effet, on y observe des taches de corrélation entre le proton à  $\delta_{\text{H}}$  4,86 (1H, d,  $J = 5$  Hz) et les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  172,0; 74,3; 35,6; 32,4 et 23,5; ce qui permet de fixer ce groupement en C-7.

De même, d'autres taches de corrélation proton/carbone sont observées d'une part à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3,33 / 25,4 ( $\text{CH}_3$ ); 23,9 ( $\text{CH}_3$ ); 26,7( $\text{CH}_3$ ); 35,6 ( $\text{CH}_2$ ); 73,5 (C) et d'autre part à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3,39 / 23,4 ( $\text{CH}_3$ ); 25,7 ( $\text{CH}_2$ ); 31,8 ( $\text{CH}_2$ ) et 75,0 (C).

L'interprétation de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites dans la littérature (Tableau XXVII), nous a permis d'attribuer à EC100P20/201 la structure **90** qui est celle du sapelenine A déjà isolé des écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum* par Ngnokam et *al.* (1993).



**Schéma 22:** Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC du sapelenine A (EC100P20/201, **90**)

**Tableau XXVII:** Données spectrales de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P20/201 (**90**) comparées à celles de la littérature (sapelenine A) (Ngnokam et *al.*, 1993).

Position	EC100P20/201	Sapelenine A	Position	EC100P20/201	Sapelenine A
	$\delta_c$	$\delta_c$		$\delta_c$	$\delta_c$
1	23,9	23,5	17	27,1	26,8
2	73,5	73,0	18	124,5	123,9
3	79,3	78,7	19	135,5	135,1
4	25,4	23,0	20	40,1	39,9
5	35,6	35,3	21	27,2	26,9
6	74,3	73,7	22	124,8	124,5
7	80,9	80,5	23	131,7	131,4
8	23,5	24,8	24	26,1	25,8
9	32,4	39,6	25	26,8	26,2
10	75,1	74,6	26	22,8	21,6
11	79,1	78,6	27	23,4	24,8
12	31,8	32,3	28	16,5	16,3
13	25,7	25,4	29	16,4	16,1
14	124,2	124,3	30	18,1	17,8
15	136,6	136,2	1'	172,0	-
16	40,2	39,8	2'	21,6	-

### II.1.2.9.2- (14*E*, 18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracos-14,18,22-triène-2,3,6,7,10,11-hexaol (EC100P26, **167**)

EC100P26 se présente sous forme d'une huile incolore. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 66), présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  535,3967 (calculée pour  $C_{30}H_{56}O_6Na$ : 535,3969) compatible avec la formule brute  $C_{30}H_{56}O_6$  renfermant trois degrés d'insaturation.

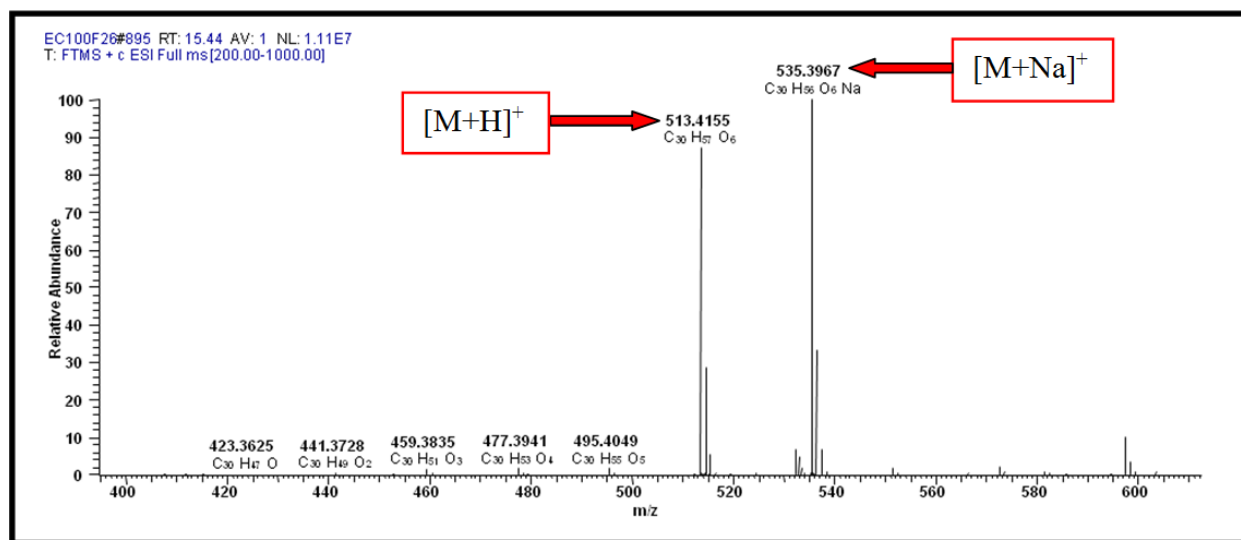
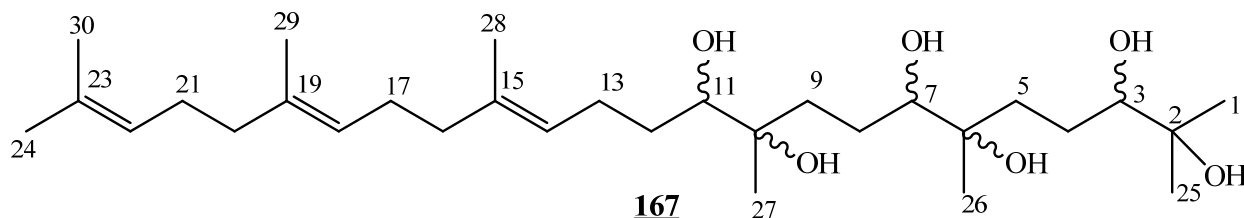


Figure 66: Spectre de masse HR-ESI de EC100P26 (**167**)

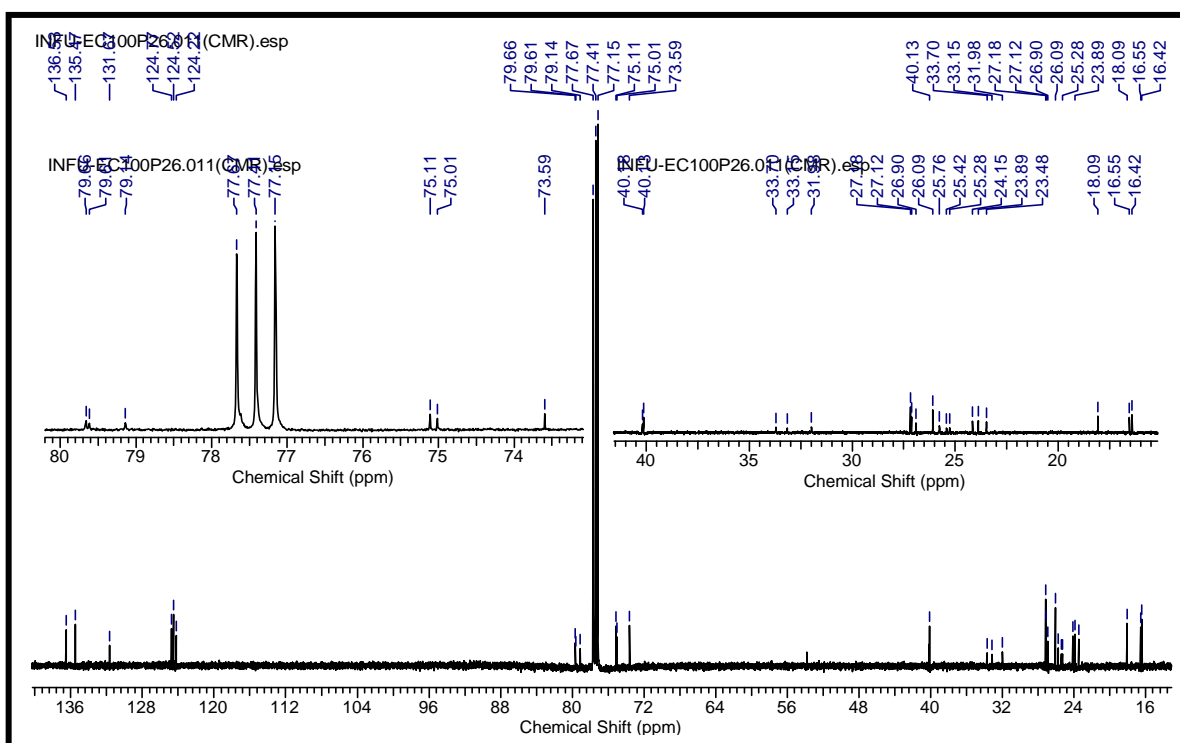
L'analyse comparée des spectres de masse EC100P20/201 et EC100P26, couplée à celle de RMN 1D et 2D permet de déduire que EC100P26 est la forme non acétylée de EC100P20/201 et de proposer pour EC100P26 la structure suivante:





En effet, leur différence de masses moléculaires de 42 unités fait penser à l'absence du fragment acétyle sur EC100P26.

Sur son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 67), on observe les signaux de 30 atomes de carbones au lieu de 32 comme dans le cas de EC100P20/201. EC100P26 pourrait être un triterpène. On note l'absence des 2 signaux caractéristiques du groupement acétyle à  $\delta_{\text{C}}$  172,0 et 21,6.



**Figure 67:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P26 (**167**)

L'analyse minutieuse de ce spectre fait ressortir:

- 8 méthyles à  $\delta_{\text{C}}$  16,4; 16,6; 18,1; 23,5; 23,9; 24,2; 26,1 et 26,9.
- 10 méthylènes à  $\delta_{\text{C}}$  25,3; 25,4; 25,8; 27,1; 27,2; 32,0; 33,2; 33,7; 40,1 et 40,2.
- 6 méthynes dont 3 oxyméthynes à  $\delta_{\text{C}}$  79,1; 79,6 et 79,7. Les 3 autres méthynes sont oléfiniques et apparaissent à  $\delta_{\text{C}}$  124,2; 124,5 et 124,8.
- 6 carbones quaternaires à  $\delta_{\text{C}}$  73,6; 75,0; 75,1 attribuables aux carbones  $\text{sp}^3$  oxygénés et  $\delta_{\text{C}}$  131,7; 135,5 et 136,5 attribuables aux carbones  $\text{sp}^2$  oléfiniques.

Sur son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 68), on observe:

- 8 signaux de méthyles à  $\delta_{\text{H}}$  1,16 (3H, s); 1,18 (3H, s); 1,19 (3H, s); 1,23 (3H, s); ceux à  $\delta_{\text{H}}$  1,62 (6H, s); 1,66 (3H, s) et 1,71 (3H, s) sont attribuables aux méthyles oléfiniques.

- 6 larges singulets d'un proton chacun à  $\delta_H$  2,8; 2,95; 3,34; 3,80; 3,94 et 4,24 attribuables aux protons des groupes hydroxyles.
- 3 signaux de protons oléfiniques à  $\delta_H$  5,12 (1H, t,  $J = 5$  Hz); 5,13 (1H, t,  $J = 5$  Hz) et 5,18 (1H, t,  $J = 5$  Hz).

Sur son spectre de HMBC (schéma 23), on observe des taches de corrélation proton/carbone à :

- $\delta_H / \delta_C$  1,62/ 135,5; 131,7; 124,8; 124,5; 40,1 et 26,1.
- $\delta_H / \delta_C$  1,71/ 131,7; 124,8 et 18,1.
- $\delta_H / \delta_C$  1,66/ 136,5; 124,2 et 40,2.
- $\delta_H / \delta_C$  1,23/ 79,6; 73,6 et 23,9.
- $\delta_H / \delta_C$  1,16/ 79,1; 75,0 et 33,7.
- $\delta_H / \delta_C$  1,18/ 79,7; 75,1 et 33,2.
- $\delta_H / \delta_C$  1,19/ 79,6; 73,6 et 26,9.
- $\delta_H / \delta_C$  3,36/ 75,0; 33,7; 33,2 et 24,2.
- $\delta_H / \delta_C$  3,44/ 75,0; 33,7; 25,8 et 23,5.

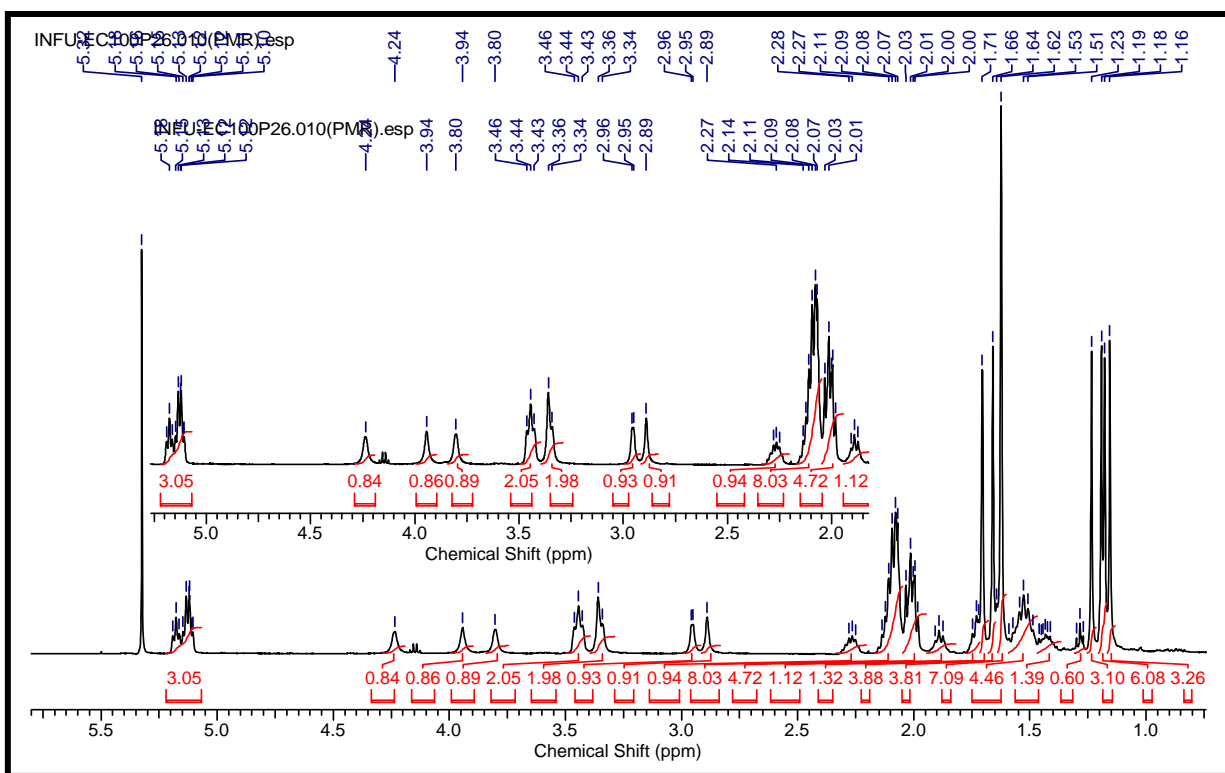


Figure 68: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P26 (**167**)

Au vue de ce qui précède, EC100P26 serait le (14*E*,18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyl tétracos-14,18,22-triène-2,3,6,7,10,11-hexaol de structure **167**. Ce composé a été déjà identifié dans l'extrait de *Urtica dioica* par la méthode DART-TOF-MS (*Direct Analysis in Real Time-Time Of Flight-Mass Spectrometry*) et pourrait être l'un des responsables des activités anti-inflammatoire et anti-allergie connues de cet extrait (Alberte et *al.*, 2010).

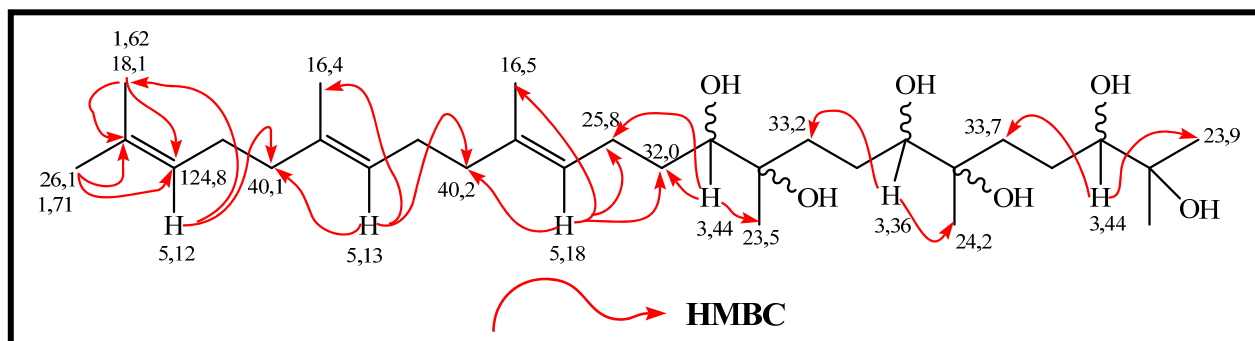


Schéma 23: Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de EC100P26 (**167**)

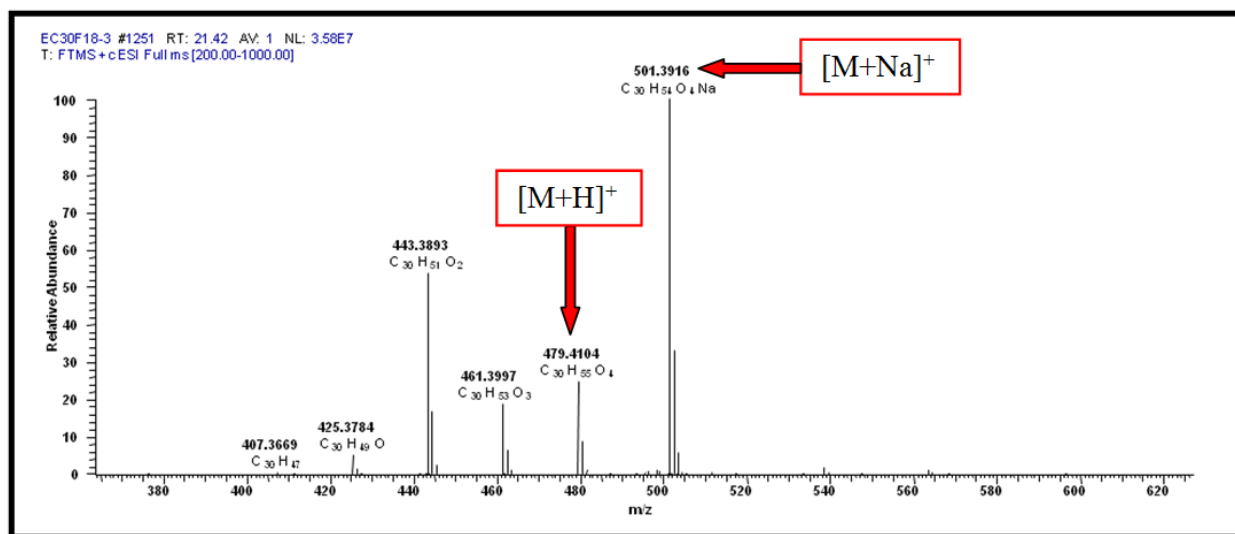
Tableau XXVIII: Données comparées de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P26 (**167**) avec EC100P20/201 (**90**) (sapelenine A).

Position	EC100P26 $\delta_{\text{C}}$	EC100P20/201 $\delta_{\text{C}}$	Position	EC100P26 $\delta_{\text{C}}$	EC100P20/201 $\delta_{\text{C}}$
1	23,9	23,9	17	27,2	27,1
2	73,6	73,5	18	124,5	124,5
3	79,6	79,3	19	135,5	135,5
4	25,4	25,4	20	40,1	40,1
5	33,7	35,6	21	27,1	27,2
6	75,0	74,3	22	124,8	124,8
7	79,7	80,9	23	131,7	131,7
8	25,3	23,5	24	26,1	26,1
9	33,2	32,4	25	26,9	26,8
10	75,1	75,1	26	24,2	22,8
11	79,1	79,1	27	23,5	23,4
12	32,0	31,8	28	16,6	16,5
13	25,8	25,7	29	16,4	16,4
14	124,2	124,2	30	18,1	18,1
15	136,5	136,6	1'	-	172,0
16	40,2	40,2	2'	-	21,6

### II.1.2.9.3- Sapelenine B (EC30P183, 91)

EC30P183 se présente sous forme d'une huile visqueuse. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 69), présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  501,3917 (calculée pour  $C_{30}H_{54}O_4Na$ : 501,3914) compatible avec la formule brute  $C_{30}H_{54}O_4$  renfermant quatre degrés d'insaturation.

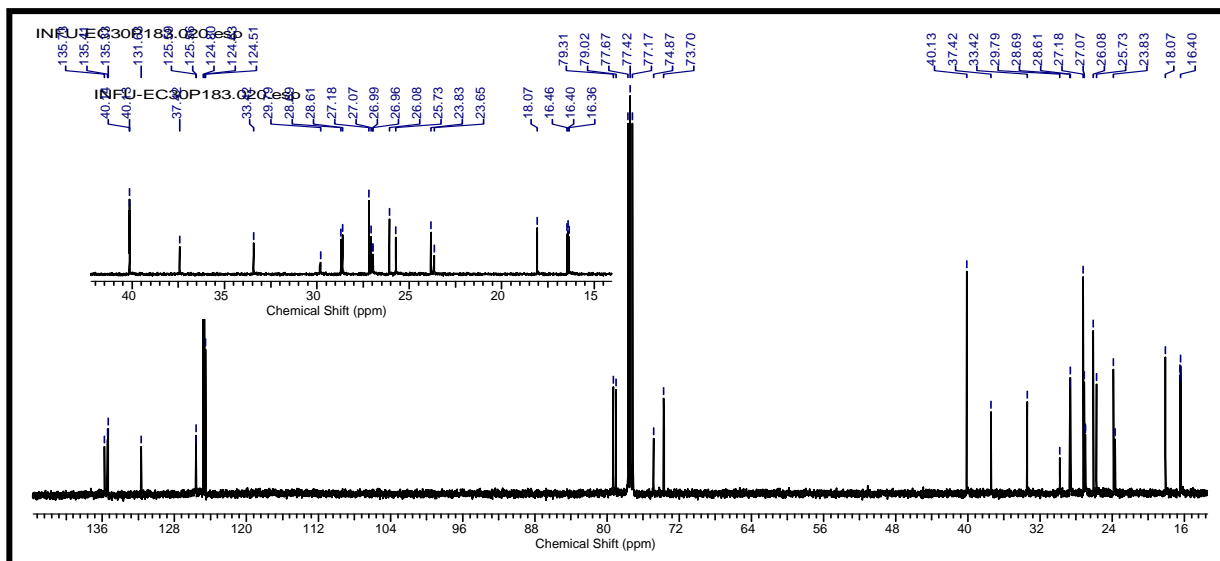


**Figure 69:** Spectre de masse HR-ESI du sapelenine B (EC30P183, 91)

Son spectre de RMN  $^{13}C$  (Fig. 70) présente 30 signaux de carbone, ce qui fait penser à un triterpène. L'analyse minutieuse de ce spectre indique:

- 8 signaux de méthyle à  $\delta_C$  16,4 (2  $CH_3$ ); 16,5; 18,1; 23,7; 23,8; 26,1 et 27,0;
- 10 signaux de métylène à  $\delta_C$  25,7; 27,1; 27,2; 28,6; 28,7; 29,8; 33,4; 37,4 et 40,1 (2  $CH_2$ );
- 6 signaux de méthynes dont ceux  $\delta_C$  124,5; 124,6 et 124,8 sont attribuables aux méthynes oléfiniques. Les deux autres sont des oxyméthynes et apparaissent à  $\delta_C$  79,0 et 79,3 ppm.
- 6 carbones quaternaires à  $\delta_C$  131,6; 135,3; 135,4 et 135,7 attribuables aux carbones  $sp^2$  oléfiniques et  $\delta_C$  73,7 et 74,9 attribuables aux carbones  $sp^3$  oxygénés.

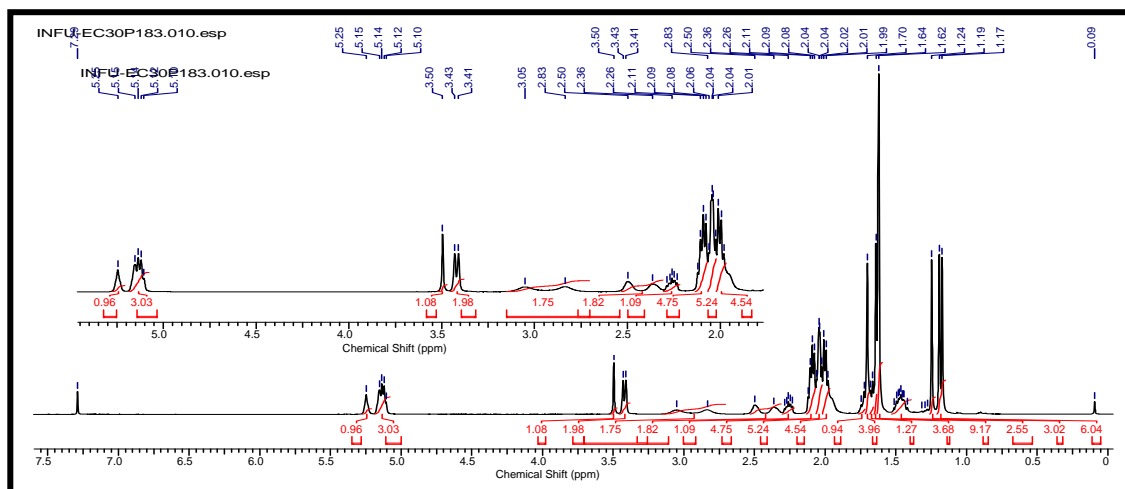
Des informations susmentionnées, on peut déduire que EC30P183 possède quatre doubles liaisons, ce qui correspond aux 4 insaturations de la molécule. EC30P183 serait le squalène avec deux doubles liaisons oxydées, c'est donc un triterpène acyclique.



**Figure 70:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine B (EC30P183, **91**)

Son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 71), montre:

- 8 signaux de méthyles à  $\delta_{\text{H}}$  1,17 (3H, s); 1,19 (3H, s); 1,24 (3H, s); 1,62 (9H, s); 1,64 (3H, s) et 1,70 (3H, s). Ceux à 1,62 (9H, s); 1,64 (3H, s) et 1,70 (3H, s) sont attribuables aux méthyles oléfiniques;
- 4 larges singulets d'un proton chacun à  $\delta_{\text{H}}$  2,36; 2,50; 2,83 et 3,05 attribuables aux protons des groupes hydroxyles;
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  3,42 (2H, d,  $J = 9,9$  Hz) attribuables à 2 protons oxyméthynes;
- 4 signaux de protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  5,12 (1H, m); 5,14 (1H, m); 5,15 (1H, m) et 5,25 (1H, *l*s).

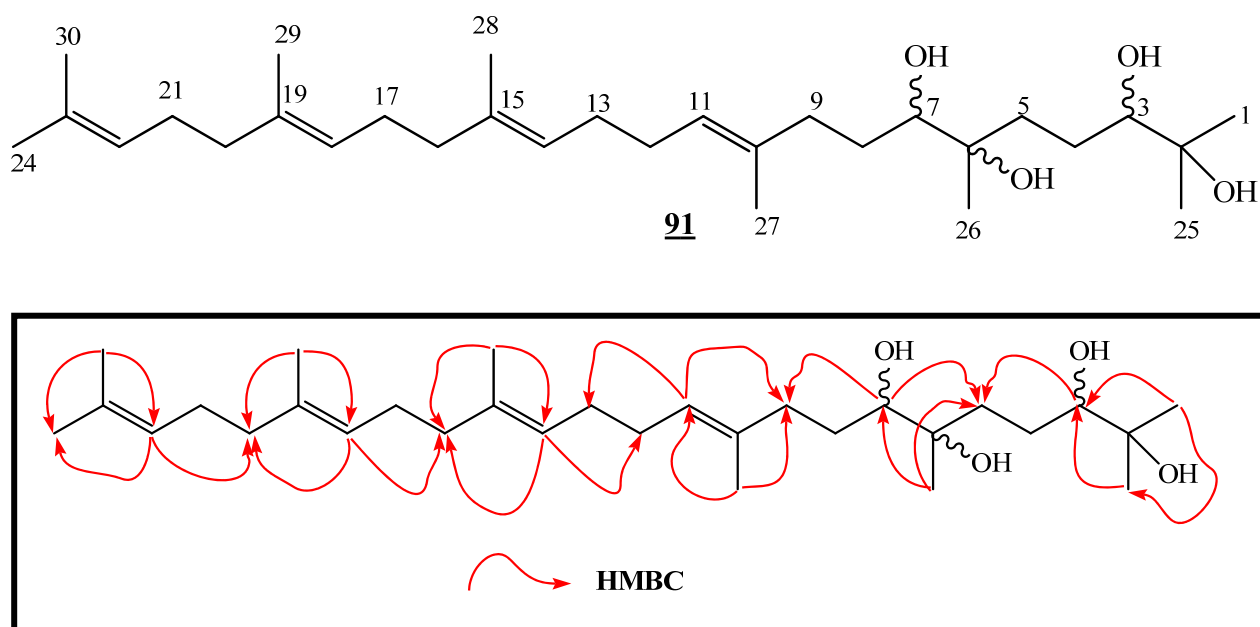


**Figure 71:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine B (EC30P183, **91**)

Sur son spectre de HMBC (schéma 24), on observe des taches de corrélation proton/carbone à:

- $\delta_H / \delta_C$  1,17/ 79,0; 74,9 et 33,4.
- $\delta_H / \delta_C$  1,19/ 79,3; 73,7 et 27,0.
- $\delta_H / \delta_C$  1,24/ 79,3; 73,7 et 23,7.
- $\delta_H / \delta_C$  1,62/ 131,6; 124,8; 124,6; 124,5; 40,1 et 26,1.
- $\delta_H / \delta_C$  1,64/ 135,4; 125,6; 37,4 et 28,6.
- $\delta_H / \delta_C$  1,70/ 131,6; 124,8 et 18,1.
- $\delta_H / \delta_C$  3,42/ 74,9; 73,7; 37,4; 33,4; 29,8; 27,0; 23,7 et 23,8.
- $\delta_H / \delta_C$  5,12/ 18,1; 27,1 et 40,1.
- $\delta_H / \delta_C$  5,14/ 16,4; 27,2 et 40,1.
- $\delta_H / \delta_C$  5,15/ 16,4; 28,6 et 40,1.
- $\delta_H / \delta_C$  5,25/ 16,5; 28,7 et 37,4.

La combinaison de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites dans la littérature (Tableau XXIX), nous permet d'attribuer à EC30P183 la structure **91** qui est celle du sapelenine B déjà isolé des écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum* par Ngnokam et *al.* (1993).



**Schéma 24:** Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC du sapelenine B (EC30P183, **91**)

**Tableau XXIX:** Données comparées de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC30P183 (**91**) avec celles du sapelenine B (Ngnokam et *al.*, 1993).

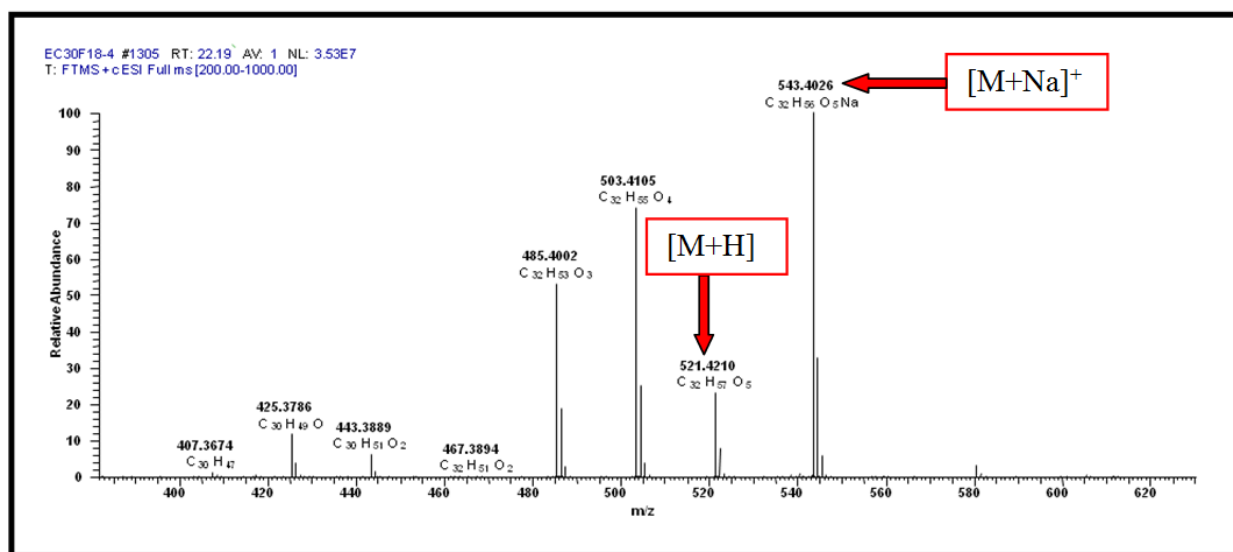
Position	EC30P183	Sapelenine B	Position	EC30P183	Sapelenine B
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	23,7	23,3	<b>16</b>	40,1	38,6
<b>2</b>	73,7	74,5	<b>17</b>	27,2	26,5
<b>3</b>	79,3	78,7	<b>18</b>	124,6	124,0
<b>4</b>	25,7	25,2	<b>19</b>	135,7 <sup>a</sup>	135,1
<b>5</b>	33,4	32,8	<b>20</b>	40,1	38,6
<b>6</b>	74,9	73,2	<b>21</b>	27,1	26,6
<b>7</b>	79,0	78,6	<b>22</b>	124,8	124,3
<b>8</b>	29,8	28,4	<b>23</b>	131,6	131,1
<b>9</b>	37,4	36,8	<b>24</b>	26,1	26,6
<b>10</b>	135,4	134,8	<b>25</b>	27,0	26,4
<b>11</b>	125,6	124,8	<b>26</b>	23,8	23,2
<b>12</b>	28,6	28,2	<b>27</b>	16,5	15,8
<b>13</b>	28,7	28,1	<b>28</b>	16,4	15,8
<b>14</b>	124,5	124,1	<b>29</b>	16,4	15,8
<b>15</b>	135,3 <sup>a</sup>	135,1	<b>30</b>	18,1	17,8

**NB:** <sup>a</sup> Les résonances avec les mêmes indices dans la même colonne peuvent être permutées

#### II.1.2.9.4- Sapelenine D (EC30P184, **93**)

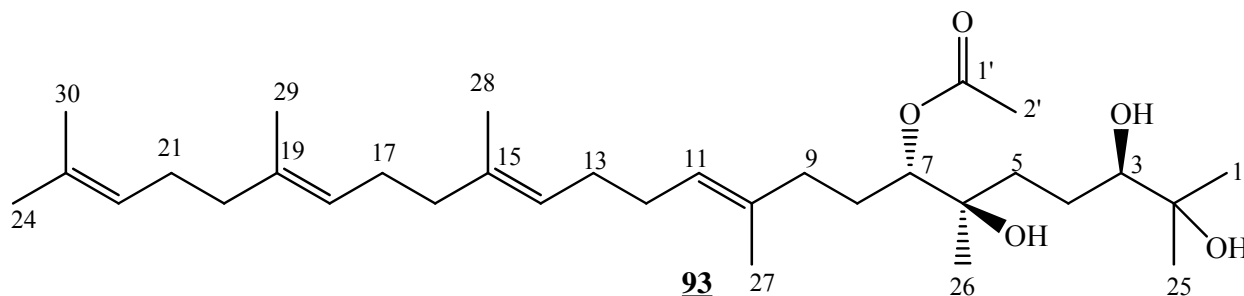
EC30P184 est une huile. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 72), présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  543,4026 (calculée pour  $C_{32}H_{56}O_5Na$ : 543,4020) compatible avec la formule brute  $C_{32}H_{56}O_5$  renfermant cinq degrés d'insaturation.



**Figure 72:** Spectre de masse HR-ESI du sapelenine D (EC30P184, **93**)

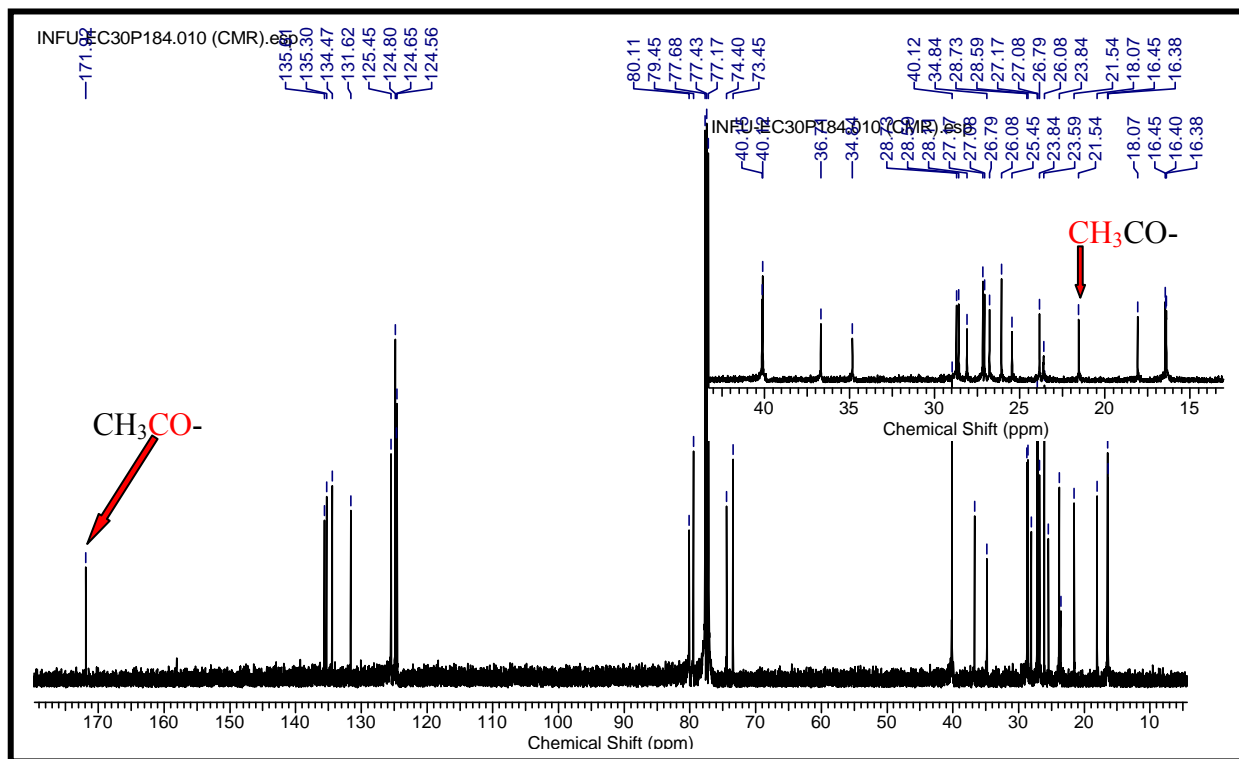
L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D de EC30P184 comparée à celle du sapelenine B (voir Fig. 70 et Fig. 71) nous permet de dire que EC30P184 est la forme monoacétylée du sapelenine B et de lui proposer la structure suivante:



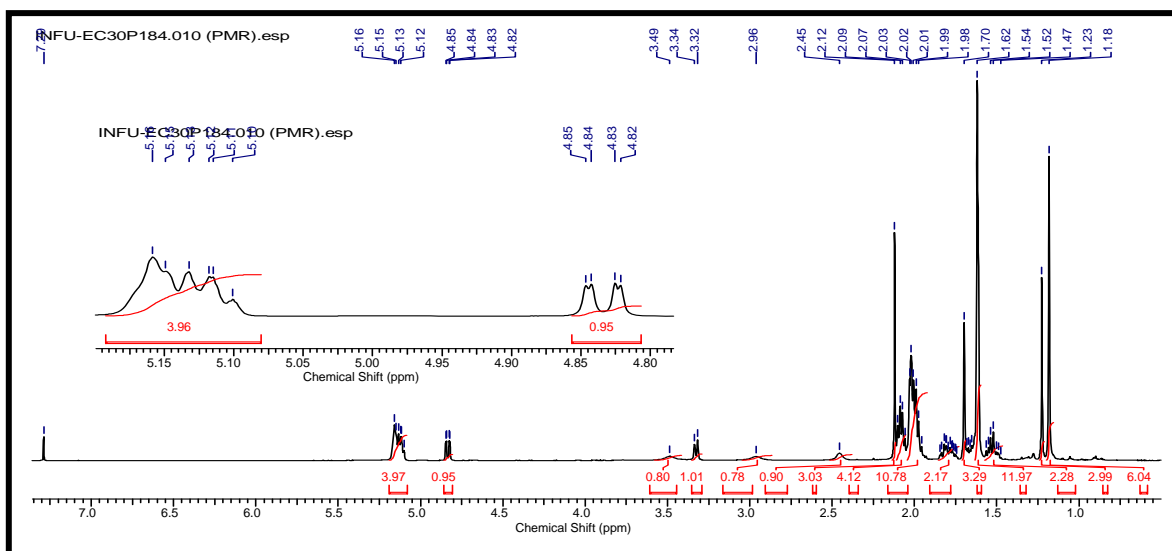
En effet, leur différence de masse de l'ordre de 42 unités indique la présence d'un fragment acétyle ( $CH_3-CO-$ ). Ceci est confirmé d'une part, sur spectre de RMN  $^{13}C$  (Fig. 73) où l'on



observe deux signaux supplémentaires à  $\delta_C$  171,9 (C-1', carbonyle des esters) et 21,5 (C-2', méthyle); et d'autre part sur le spectre de RMN  $^1H$  (Fig. 74) où l'on observe un signal d'un méthyle supplémentaire à  $\delta_H$  2,12 (3H, s, H-2').



**Figure 73:** Spectre de RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ) du sapelenine D (EC30P184, 93)

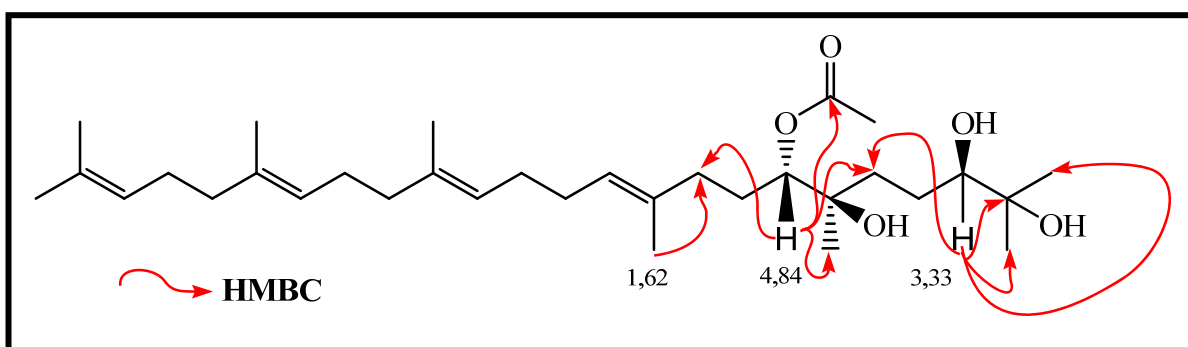


**Figure 74:** Spectre de RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ) du sapelenine D (EC30P184, 93)

De plus, son spectre de RMN  $^1\text{H}$  présente outre le signal à  $\delta_{\text{H}}$  2,12 (3H, s), huit autres signaux de méthyles dont ceux à  $\delta_{\text{H}}$  1,18 (6H, s, H-1, H-26) et 1,23 (3H, s, H-25) sont attribuables aux méthyles liés aux carbones hybridés  $\text{sp}^3$  oxygénés. Ceux à  $\delta_{\text{H}}$  1,62 (12H, s, H-27, H-28, H-29, H-30) et 1,70 (3H, s, H-24) correspondent aux méthyles oléfiniques.

Nous observons sur le même spectre des signaux caractéristiques de 2 groupements oxyméthynes à  $\delta_{\text{H}}$  3,33 (1H, d,  $J = 10$  Hz, H-3) et 4,84 (1H, dd,  $J = 5; 10$  Hz, H-7), ce qui permet de confirmer que 2 doubles liaisons sont oxydées. Cette information est corroborée par la présence sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  de 2 signaux de carbones quaternaires oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  73,5 (C-2) et 74,4 (C-6) en plus de 2 signaux d'oxyméthynes à  $\delta_{\text{C}}$  79,5 (C-3) et 80,1 (C-7). Par ailleurs, on observe un signal de protons oléfiniques entre 5,10-5,15 (4H, m, H-11, H-14, H-18, H-22), ce qui confirme la présence de 4 doubles liaisons dans la molécule. Ceci est justifié par les signaux de carbones oléfiniques observés sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  à  $\delta_{\text{C}}$  124,6 (C-14); 124,7 (C-18); 124,8 (C-22); 125,5 (C-11); 131,6 (C-23); 134,5 (C-10); 135,3 (C-19) et 135,6 (C-15).

L'ensemble de toutes ces données spectrales comparé à celles décrites dans la littérature (Tableau XXX) permet de confirmer pour EC30P184 la structure **93** qui est celle du (3*R*, 6*R*, 7*S*)-2,3,6-trihydroxy-7-acétoxy-2,3,6,7-tétrahydrosqualène communément appelé sapelenine D. Ce composé a été isolé pour la première fois des écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum* par Ngnokam et al. (1995).



**Schéma 25:** Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC du sapelenine D (EC30P184, **93**)

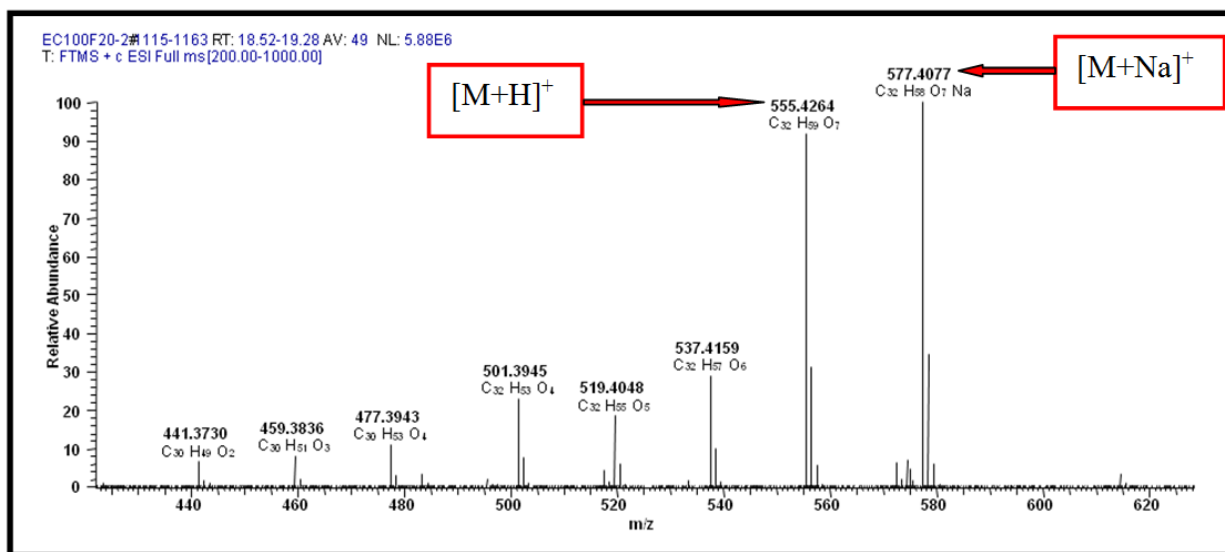
**Tableau XXX:** Données comparées de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC30P184 (**93**) avec celles de EC30P183 (**91**) et du sapelenine D (Ngnokam et *al.*, 1995).

Position	EC30P184	EC30P183	Sapelenine D
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	23,8	23,7	23,4
<b>2</b>	73,5	73,7	73,0
<b>3</b>	79,5	79,3	79,6
<b>4</b>	25,5	25,7	25,0
<b>5</b>	34,8	33,4	34,4
<b>6</b>	74,4	74,9	73,9
<b>7</b>	80,1	79,0	80,0
<b>8</b>	28,1	29,8	27,6
<b>9</b>	36,7	37,4	36,2
<b>10</b>	134,5	135,4	134,0
<b>11</b>	125,5	125,6	124,9
<b>12</b>	28,6	28,6	28,2
<b>13</b>	28,7	28,7	28,2
<b>14</b>	124,6	124,5	124,2
<b>15</b>	135,6	135,3 <sup>a</sup>	135,1
<b>16</b>	40,1	40,1	39,7
<b>17</b>	27,2	27,2	26,6
<b>18</b>	124,7	124,6	124,2
<b>19</b>	135,3	135,7 <sup>a</sup>	134,8
<b>20</b>	40,1	40,1	39,7
<b>21</b>	27,1	27,1	26,7
<b>22</b>	124,8	124,8	124,9
<b>23</b>	131,6	131,6	131,2
<b>24</b>	26,1	26,1	25,6
<b>25</b>	26,8	27,0	25,6
<b>26</b>	23,6	23,8	21,1
<b>27</b>	16,5	16,5	15,9
<b>28</b>	16,4	16,4	16,0
<b>29</b>	16,4	16,4	16,0
<b>30</b>	18,1	18,1	17,8
<b>1'</b>	171,9	-	171,1
<b>2'</b>	21,5	-	21,1

### II.1.2.9.5- Sapelenine C (EC100P202, 92)

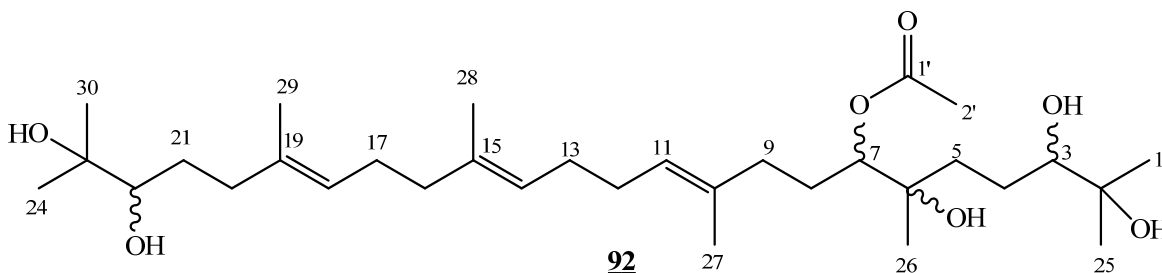
EC100P202 est une huile. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 75), présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  577,4077 (calculée pour  $C_{32}H_{58}O_7Na$ : 577,4075) compatible avec la formule brute  $C_{32}H_{58}O_7$  renfermant quatre degrés d'insaturation.



**Figure 75:** Spectre de masse HR-ESI du sapelenine C (EC100P202, 92)

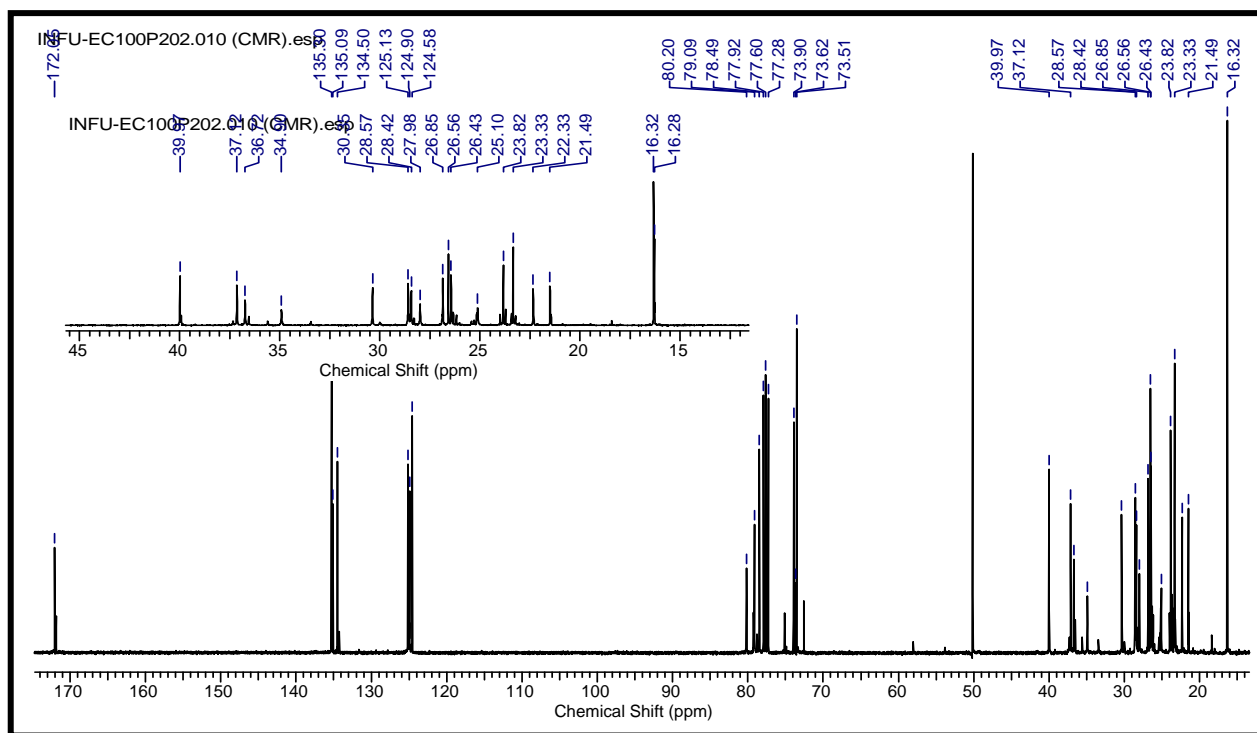
La superposition de son spectre de masse à celui du sapelenine A (EC100P20/201, 90) permet de déduire que les deux sont des isomères et de proposer pour EC100P202 la structure suivante:



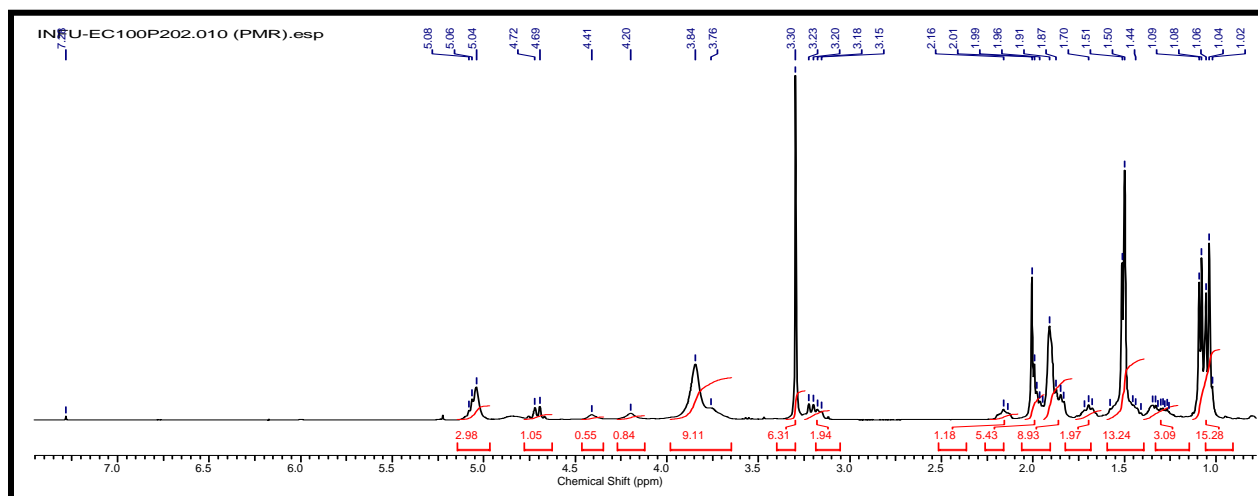
En effet, le spectre de RMN  $^{13}C$  (Fig. 76) de EC100P202 tout comme celui du sapelenine A (voir Fig. 65) présente en plus de trois signaux de carbones quaternaires  $sp^2$  à  $\delta_C$  135,3; 135,1 et 134,5; trois autres signaux de méthynes oléfiniques à  $\delta_C$  125,1; 124,9 et 124,6. Ces informations

permettent de confirmer la présence de trois doubles liaisons dans la molécule. Ceci est en accord avec son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 77) où l'on observe des signaux de protons oléfiniques entre 5,04 - 5,08 (3H, m). Cependant, l'absence sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  d'un signal de carbone quaternaire  $\text{sp}^2$  à  $\delta_{\text{C}}$  131,7 indique l'absence d'une double liaison terminale. Les signaux de carbones quaternaires oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  73,5 (C-23); 73,6 (C-2) et d'oxyméthynes à  $\delta_{\text{C}}$  78,5 (C-22); 79,1 (C-3) confirment que la double liaison  $\text{C}_{22}\text{-C}_{23}$  a été oxydée.

La combinaison de toutes ces données spectrales comparée à celles décrites dans la littérature (Tableau XXXI) nous permet de confirmer pour EC100P202, la structure **92** qui est celle du sapelenine C. Ce composé a été isolé pour la première fois des écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum* par Ngokam et al. (1993).



**Figure 76:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine C (EC100P202, **92**)



**Figure 77:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine C (EC100P202, **92**)

**Tableau XXXI:** Données spectrales de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC100P202 (**92**) comparées à celles de EC100P20/201 (**90**) et de la littérature (sapelenine C) (Ngokam *et al.*, 1993).

Position	EC100P 202 $\delta_{\text{C}}$	EC100P 20/201 $\delta_{\text{C}}$	Sapelenine C $\delta_{\text{C}}$	Position	EC100P 202 $\delta_{\text{C}}$	EC100P 20/201 $\delta_{\text{C}}$	Sapelenine C $\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	23,8	23,9	23,0	<b>17</b>	26,4	27,1	26,3
<b>2</b>	73,6	73,5	73,0	<b>18</b>	124,9	124,5	124,7
<b>3</b>	79,1	79,3	78,7	<b>19</b>	134,5	135,5	134,0
<b>4</b>	25,1	25,4	24,7	<b>20</b>	37,1	40,1	36,6
<b>5</b>	34,9	35,6	34,4	<b>21</b>	30,4	27,2	29,0
<b>6</b>	73,9	74,3	73,5	<b>22</b>	78,5	124,8	78,0
<b>7</b>	80,2	80,9	79,6	<b>23</b>	73,5	131,7	73,0
<b>8</b>	28,0	23,5	27,5	<b>24</b>	26,6 <sup>a</sup>	26,1	26,2
<b>9</b>	36,7	32,4	36,2	<b>25</b>	26,9	26,8	26,2
<b>10</b>	135,3	75,1	134,8	<b>26</b>	22,3	22,8	22,3
<b>11</b>	125,1	79,1	124,2	<b>27</b>	16,3	23,4	15,8
<b>12</b>	28,4	31,8	28,0	<b>28</b>	16,3	16,5	15,8
<b>13</b>	28,6	25,7	27,9	<b>29</b>	16,3	16,4	15,8
<b>14</b>	124,6	124,2	124,6	<b>30</b>	23,3 <sup>a</sup>	18,1	23,3
<b>15</b>	135,1	136,6	134,6	<b>1'</b>	172,1	172,0	-
<b>16</b>	40,0	40,2	39,0	<b>2'</b>	21,5	21,6	-

**N.B.:** <sup>a</sup> Les résonances avec les mêmes indices dans la même colonne peuvent être permutées.

### II.1.2.9.6- Ekeberine D2 (EC30P181, 168)

EC30P181 se présente sous forme d'une huile visqueuse incolore. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 78) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  495,4055 (calculée pour  $C_{30}H_{55}O_5$ : 495,4044) dont l'analyse nous permet de lui attribuer la formule brute  $C_{30}H_{54}O_5$  renfermant quatre degrés d'insaturation. Ceci est confirmé sur le spectre de RMN  $^{13}C$  (Fig. 79) où l'on observe 30 signaux de carbones. Nous pouvons donc suggérer pour EC30P181 une structure triterpénique.

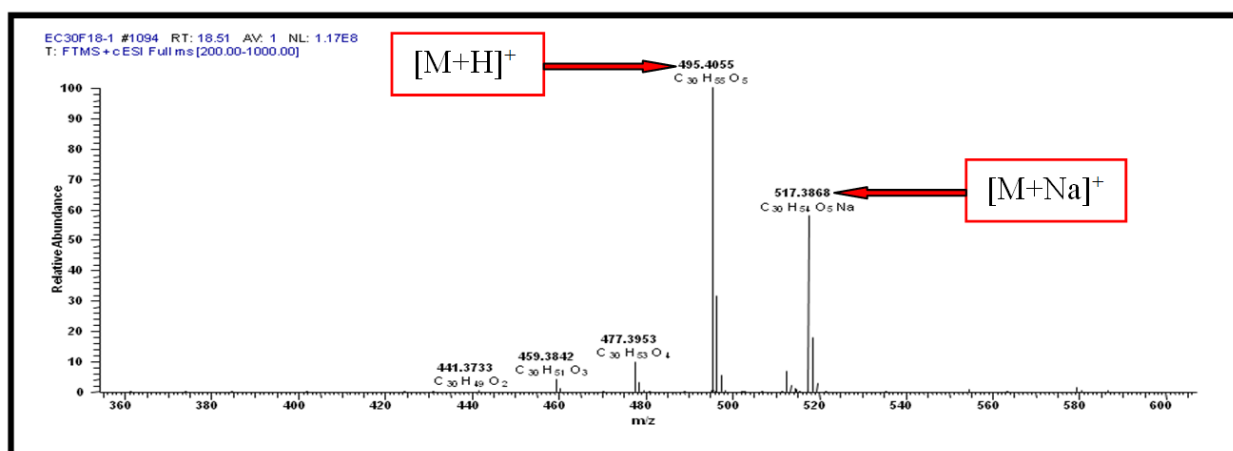


Figure 78: Spectre de masse HR-ESI de l'ekeberine D<sub>2</sub> (EC30P181, 168)

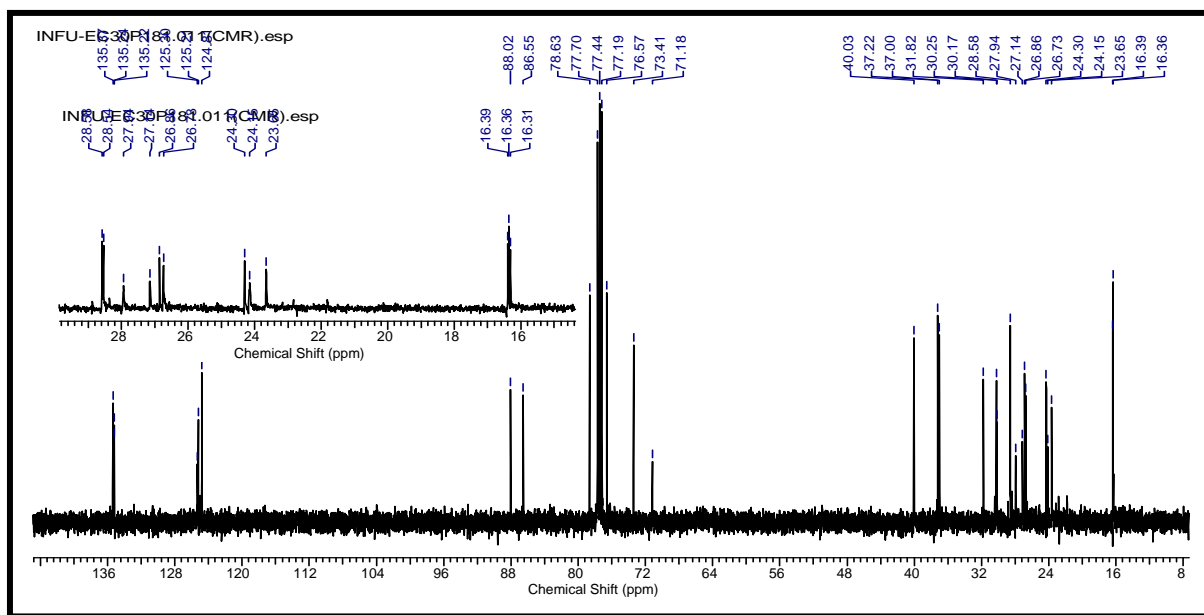
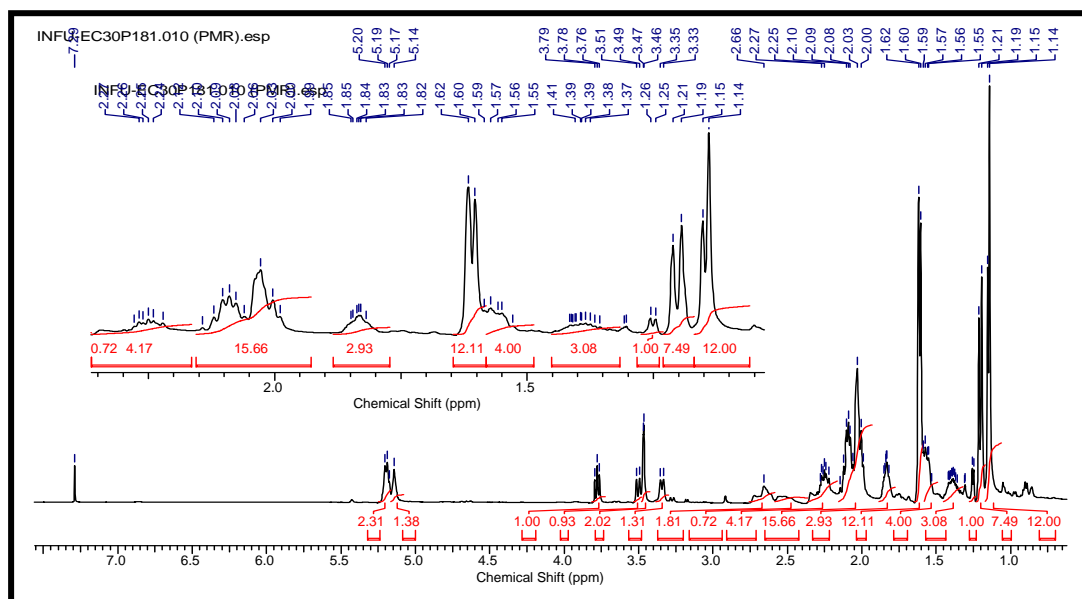


Figure 79: Spectre de RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ) du de l'ekeberine D<sub>2</sub> (EC30P181, 168)

L'analyse de son spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 80) couplée à ceux de RMN  $^{13}\text{C}$  et HMQC (Tableau XXXII) montre les signaux de huit méthyles à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1,14/24,2 et 24,3 (6H); 1,15/23,7 (3H); 1,19/26,9 (3H); 1,21/27,9 (3H); 1,60/16,4 (3H); 1,62/16,3 et 16,3 (6H). Ces informations permettent de confirmer que EC30P181 est un triterpène. Les signaux à  $\delta_{\text{C}}$  16,3 et 16,4 correspondent aux méthyles oléfiniques.



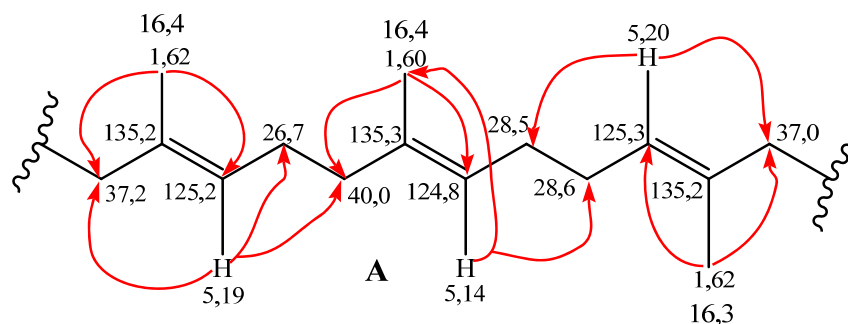
**Figure 80:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de l'ekeberine  $\text{D}_2$  (EC30P181, **168**)

De plus sur son spectre de RMN  $^1\text{H}$ , on observe des signaux de trois protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  5,14 (1H, m); 5,19 (1H, m) et 5,20 (1H, m). Ces protons ont été fixés sur les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  124,8; 125,2 et 125,3 respectivement, ceci sur la base des taches de corrélation observées sur le spectre HMQC (Tableau XXXII).

Sur son spectre HMBC (schéma 26), on observe d'une part des taches de corrélation proton/carbone à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1,60/40,0; 124,8; 135,3 et 1,62/37,0; 37,2; 125,2; 125,3; 135,2;135,2 d'autre part. De même, on observe des taches de corrélation à  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  5,14/16,4; 28,5; 28,6; 40,0; 5,19/26,7; 37,2; 40,0 et 5,20/28,5; 28,6; 37,0.

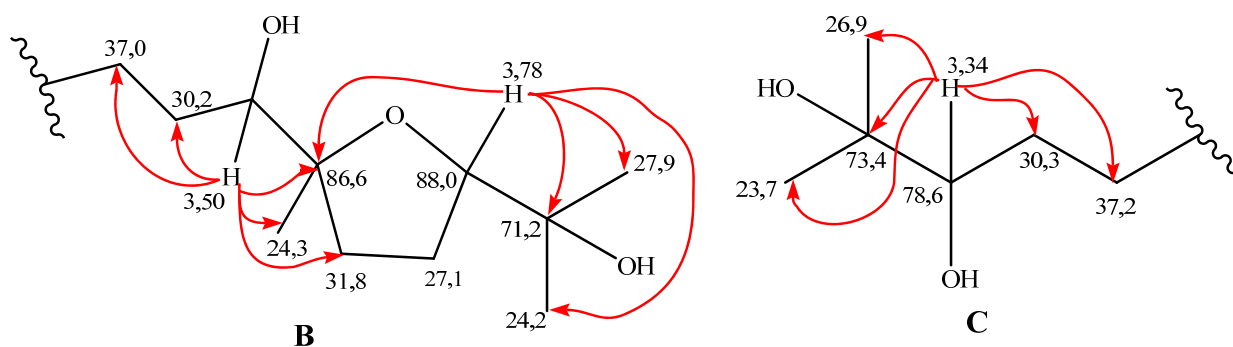
De ce qui précède, nous pouvons proposer le fragment **A** suivant:



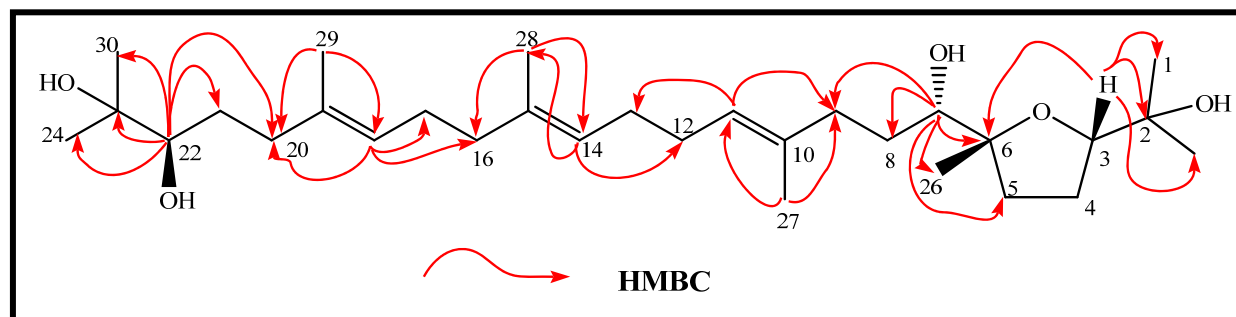
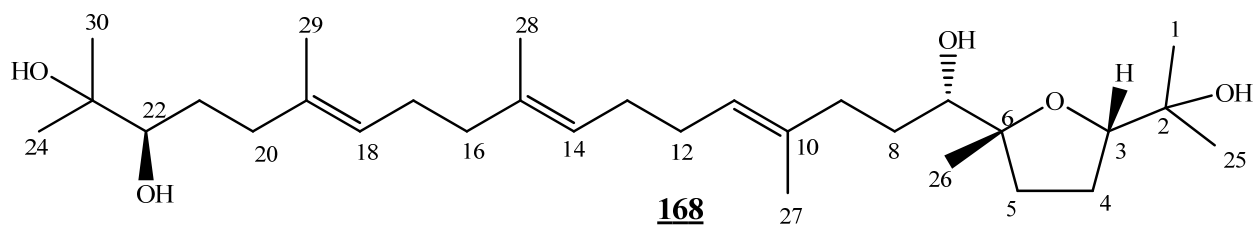


Un ensemble de signaux correspondant à un cycle furanique (tétrahydrofurane) est également observé sur son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  à  $\delta_C$  88,0; 86,6; 31,8 et 27,1. Ceci est confirmé sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$  où l'on observe outre le signal du proton oxyméthine du cycle furanique à  $\delta_H$  3,78 (1H, dd,  $J = 5; 10$  Hz); ceux à  $\delta_H$  1,83 (2H, m); 1,57 (1H, m); 2,09 (1H, m). On y observe également deux autres signaux de deux autres protons oxyméthines à  $\delta_H$  3,34 (1H, d,  $J = 10$  Hz) et 3,50 (1H, d,  $J = 10$  Hz).

Ces informations associées aux taches de corrélation observées sur le spectre HMBC à  $\delta_H/\delta_C$  3,78/24,2; 27,9; 71,2; 86,6;  $\delta_H/\delta_C$  3,50/24,3; 30,1; 31,8; 37,0 et 86,6 et  $\delta_H/\delta_C$  3,34/23,7; 26,9; 30,3; 37,2 et 73,4 permettent de proposer les fragments **B** et **C** suivants, puis de relier les fragments **A**, **B** et **C**.



L'interprétation de toutes ces données spectrales comparées à celles décrites dans la littérature (Tableau XXXII), nous a permis d'attribuer à EC30P181 la structure **168** qui est celle de l'ekeberine  $\text{D}_2$  déjà isolé des écorces du tronc de *Ekebergia capensis* Sparm par Murata et al. (2008).



**Schéma 26:** Quelques corrélations observées sur le spectre HMBC de l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**)

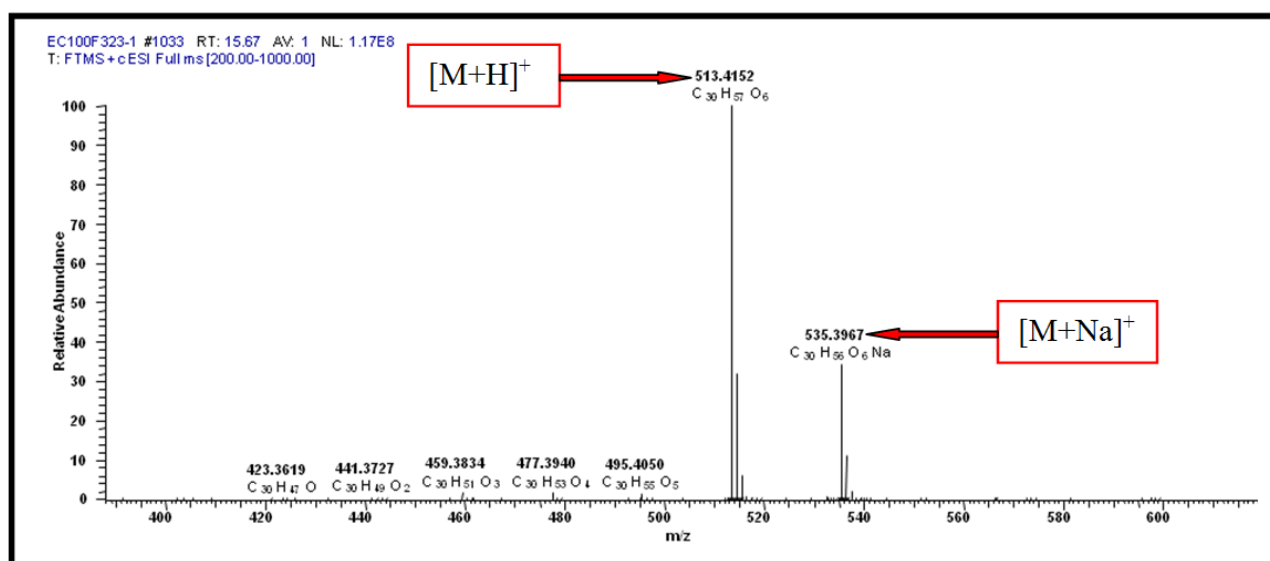
**Tableau XXXII:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de EC30P181 (**168**) dans le  $\text{CDCl}_3$  comparées à celles de la littérature (ekeberine  $\text{D}_2$ ) (Murata et *al.*, 2008).

Position	EC30P181		Ekeberine $\text{D}_2$	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	1,14 (3H, s)	24,2	1,13 (3H, s)	24,0
<b>2</b>	-	71,2	-	70,5
<b>3</b>	3,78 (1H, dd, 5; 10)	88,0	3,76 (1H, dd, 10; 6)	87,7
<b>4</b>	1,83 (2H, m)	27,1	1,85 (2H, m)	26,6
<b>5</b>	1,57 (1H, m)	31,8	1,56 (1H, m)	31,5
	2,09 (1H, m)		2,09 (1H, m)	
<b>6</b>	-	86,5	-	86,1
<b>7</b>	3,50 (1H, d, 10)	76,6	3,50 (1H, dd, 10; 1,5)	76,2
<b>8</b>	1,40 (1H, m)	30,2	1,40 (1H, m)	29,9
	1,57 (1H, m)		1,60 (1H, m)	
<b>9</b>	2,03 (1H, m)	37,0	2,03 (1H, m)	36,6
	2,26 (1H, m)		2,26 (1H, m)	
<b>10</b>	-	135,2	-	135,0
<b>11</b>	5,20 (1H, m)	125,3	5,20 (1H, m)	124,9
<b>12</b>	2,03 (2H, m)	28,6	2,03 (2H, m)	28,2
<b>13</b>	2,03 (2H, m)	28,5	2,03 (2H, m)	28,2
<b>14</b>	5,14 (1H, m)	124,8	5,14 (1H, m)	124,5
<b>15</b>	-	135,4	-	134,9
<b>16</b>	2,03 (1H, m)	40,0	2,03 (1H, m)	40,0
	2,09 (1H, m)		2,09 (1H, m)	
<b>17</b>	2,09 (2H, m)	26,7	2,09 (2H, m)	26,4
<b>18</b>	5,19 (1H, m)	125,2	5,20 (1H, m)	125,1
<b>19</b>	-	135,2	-	134,9
<b>20</b>	2,06 (1H, m)	37,2	2,05 (1H, m)	36,8
	2,25 (1H, m)		2,25 (1H, m)	
<b>21</b>	1,40 (1H, m)	30,3	1,40 (1H, m)	29,7
	1,57 (1H, m)		1,56 (1H, m)	
<b>22</b>	3,34(1H, d, 10)	78,6	3,34 (1H, dd, 10,5; 2)	78,3
<b>23</b>	-	73,4	-	73,0
<b>24</b>	1,15 (3H, s)	23,7	1,15 (3H, s)	23,4
<b>25</b>	1,21 (3H, s)	27,9	1,22 (3H, s)	27,7
<b>26</b>	1,14 (3H, s)	24,3	1,14 (3H, s)	23,8
<b>27</b>	1,62 (3H, s)	16,3	1,60 (3H, ls)	16,0
<b>28</b>	1,60 (3H, s)	16,4	1,60 (3H, ls)	16,0
<b>29</b>	1,62 (3H, s)	16,4	1,62 (3H, ls)	15,9
<b>30</b>	1,19 (3H, s)	26,9	1,20 (3H, s)	26,5

### II.1.2.9.7- Sapelenine G (EC100P333/3231, 169)

Isolé des écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum*, EC100P333 se présente sous forme d'une huile incolore. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

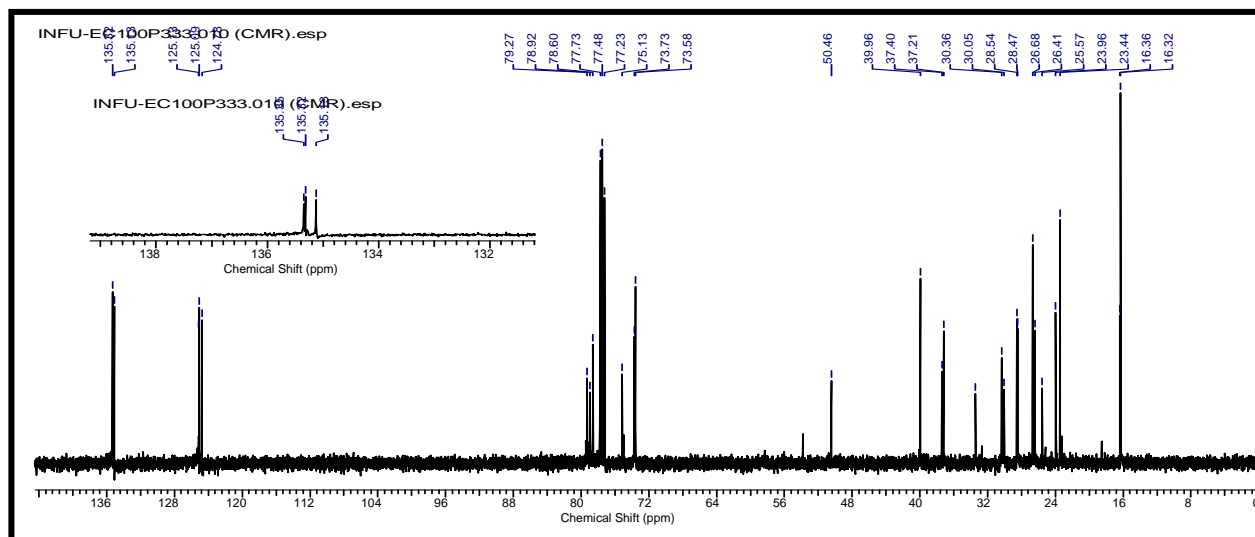
Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 81) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  513,4152 (calculée pour  $C_{30}H_{57}O_6$ : 513,4150) compatible avec la formule brute  $C_{30}H_{56}O_6$  renfermant trois insaturations.



**Figure 81:** Spectre de masse HR-ESI du sapelenine G (EC100P333, 169)

Son spectre de RMN  $^{13}C$  (Fig. 82) présente 30 signaux de carbone répartis ainsi qu'il suit:

- 8 méthyles à  $\delta_C$  16,3 (3 $CH_3$ ) attribuables aux méthyles oléfiniques; 23,4 (2 $CH_3$ ); 23,9 et 26,7 (2 $CH_3$ ) attribuables aux méthyles portés par des carbones  $sp^3$  oxygénés.
- 10 méthylènes à  $\delta_C$  25,5; 26,4; 28,4; 28,5; 30,1; 30,4; 33,4; 37,2; 37,4 et 40,0.
- 6 méthynes dont trois oxyméthynes à  $\delta_C$  78,6; 78,9; 79,3 et trois méthynes  $sp^2$  à  $\delta_C$  124,8 et 125,1 (2CH).
- 6 carbones quaternaires dont trois carbones  $sp^2$  à  $\delta_C$  135,1; 135,3 (2C) et trois carbones oxygénés à  $\delta_C$  73,6; 73,7 et 75,1.

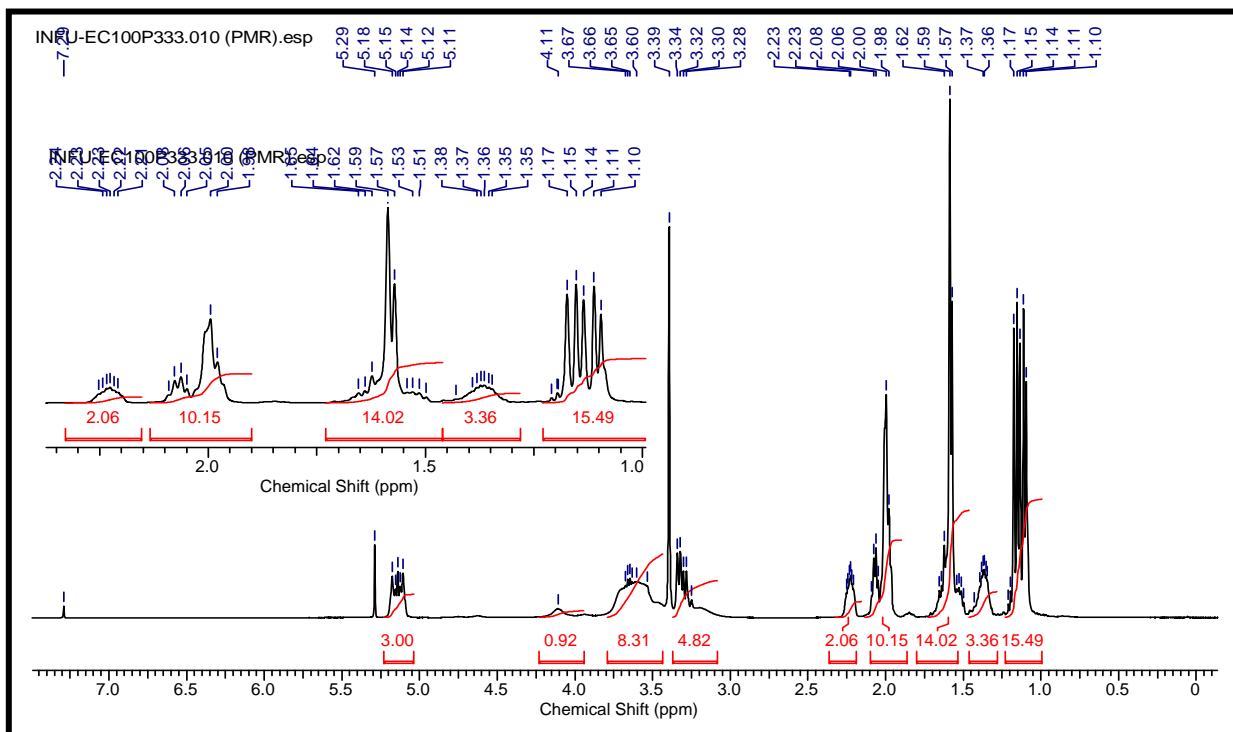


**Figure 82:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine G (EC100P333, **169**)

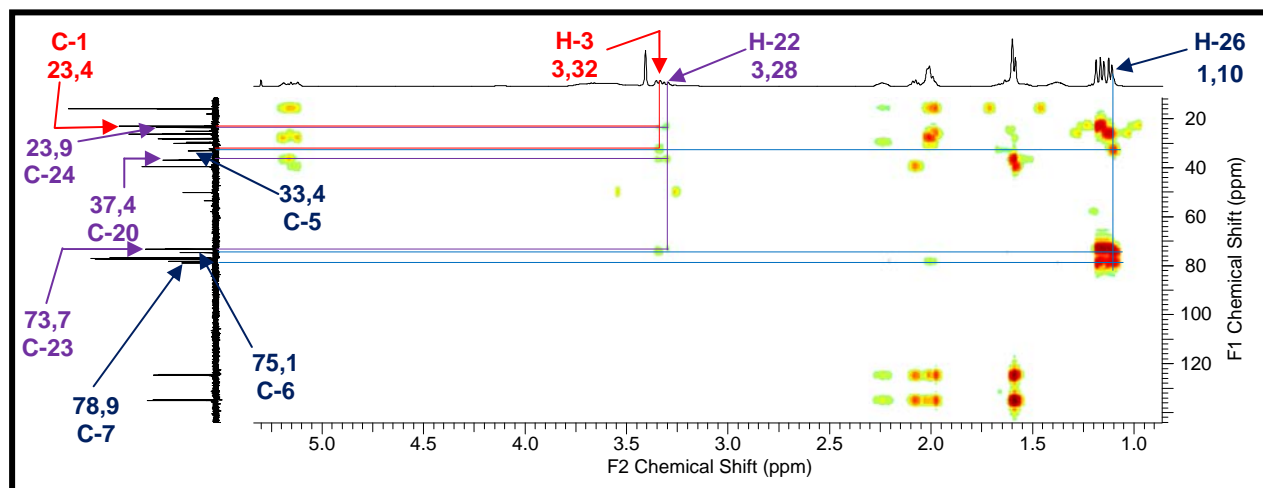
Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 83) présente les singulets de 8 groupes méthyles dont cinq à  $\delta_{\text{H}}$  1,10; 1,11; 1,14; 1,15 et 1,17 attribuables aux méthyles liés aux carbones  $\text{sp}^3$  et trois autres à  $\delta_{\text{H}}$  1,57 et 1,59 ( $2\text{CH}_3$ ) attribuables aux méthyles vinyliques.

De ce qui précède et par comparaison de ces données avec celles décrites dans la littérature (Ngnokam et *al.*, 1993, 1995; Miller et Tinto, 1995; Murata et *al.*, 2008), EC100P333 serait un dérivé du squalène avec une structure très proche de celle du sapelenine C **92** (Ngnokam et *al.*, 1993). La présence dans les champs faibles de trois groupes méthyles autour de  $\delta_{\text{H}}$  1,50 - 1,80 ppm et l'absence dans le spectre HMBC (Fig. 84) de toute tache de corrélation entre deux de ces méthyles oléfiniques indiquent clairement l'absence de deux méthyles vinyliques terminaux. Ces informations permettent de suggérer l'oxydation des doubles liaisons terminales sur le squelette du squalène assigné au composé EC100P333.

Sur son spectre HMBC (Fig. 84), on observe des taches de corrélation proton/carbone d'une part à  $\delta_{\text{H}}$  3,28 (1H, m)/ $\delta_{\text{C}}$  23,9; 37,4; 73,7 et  $\delta_{\text{H}}$  3,32 (1H, m)/ $\delta_{\text{C}}$  23,4; 33,4 d'autre part. Plus loin, on observe d'autres taches de corrélation entre les protons du méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  1,10 et les deux carbones à  $\delta_{\text{C}}$  33,4; 75,1 et 78,9.



**Figure 83:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine G (EC100P333, **169**)



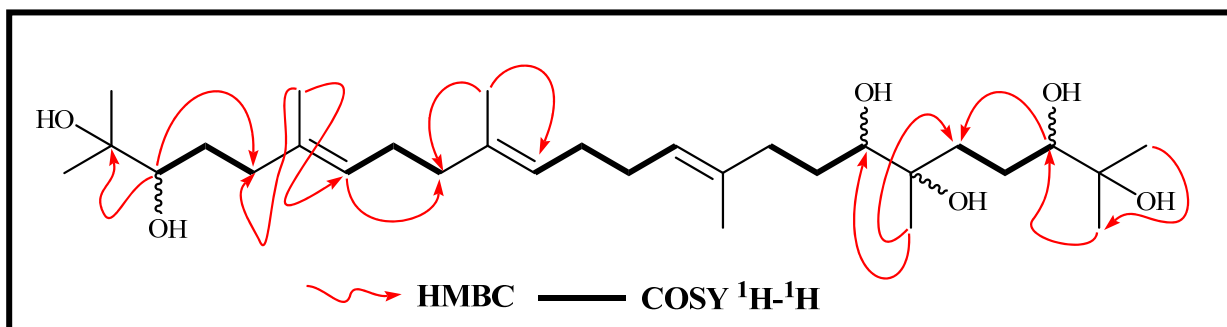
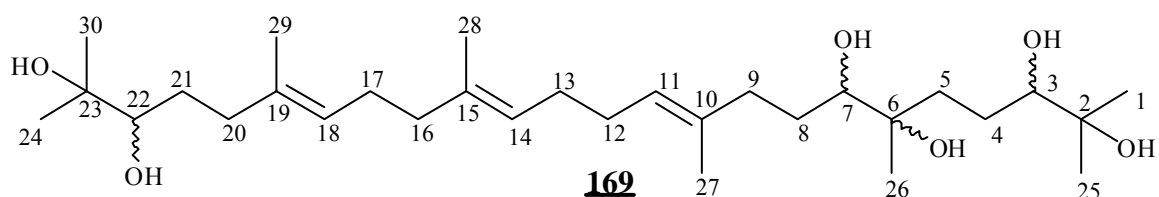
**Figure 84:** Spectre HMBC du sapelenine G (EC100P333, **169**)

Sur le spectre COSY (Fig. 85), on observe des corrélations homonucléaires caractérisant la connectivité entre les protons à  $\delta_{\text{H}}$  3,32 (H-3); 1,64 (H-4a); 1,36 (H-4b) et 1,62 (H-5) respectivement, indiquant l'oxydation de deux doubles liaisons successives dans le composé EC100P333.

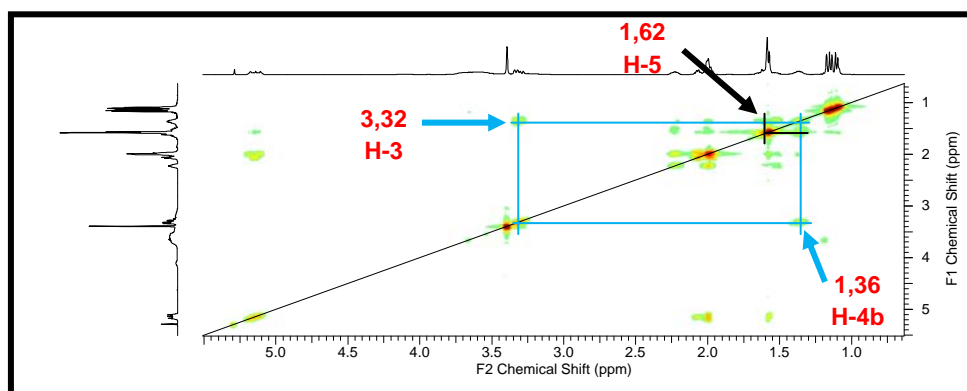
Les configurations absolues des carbones C-3, C-6, C-7 et C-22 n'ont pas pu être assignées compte tenu de la flexibilité de la molécule.

Sur la base de toutes ces données, nous avons attribué à EC100P333, la structure **169**. EC100P333 est un dérivé nouveau de triterpène acyclique de nom systématique (10*E*, 14*E*, 18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracososa-10,14,18-triène-2,3,6,7,22,23-hexaol, auquel nous avons proposé le nom de sapelenine G.

Son isomère EC100P26 **167** a été décrit comme un des constituants à activité anti-inflammatoire et anti-allergie de l'extrait d'Ortie (*Urtica dioica*) (Alberte et al., 2010).



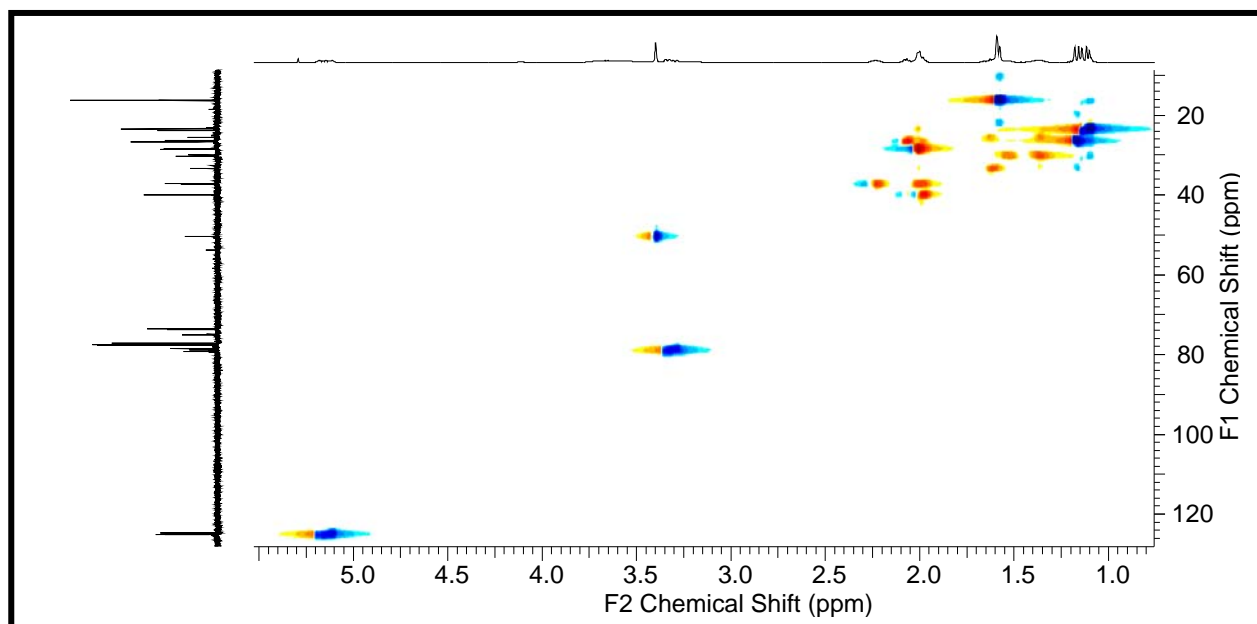
**Schéma 27:** Quelques corrélations observées sur les spectres HMBC et COSY du sapelenine G (EC100P333, **169**)



**Figure 85:** Spectre COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H du sapelenine G (EC100P333, **169**)

---

L'attribution complète des déplacements chimiques aux protons et aux carbones a été faite sur la base des spectres de RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , HMBC, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et HMQC (Fig. 86).



**Figure 86:** Spectre HMQC du sapelenine G (EC100P333, **169**)



**Tableau XXXIII:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du sapelenine G (EC100P333, **169**) dans le  $\text{CDCl}_3$ .

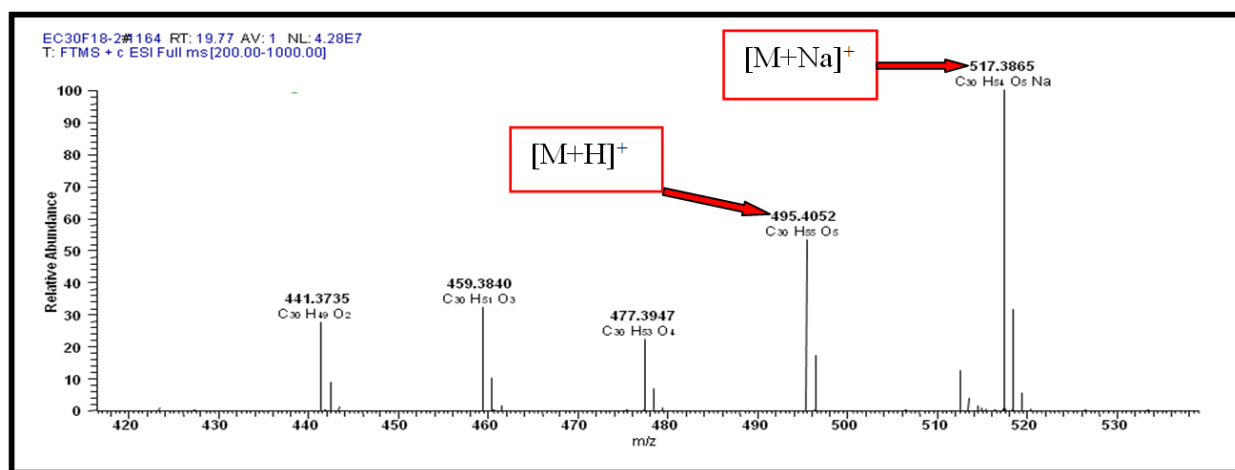
EC100P333					
Position	$\delta_{\text{H}}$ (m)	$\delta_{\text{C}}$	Position	$\delta_{\text{H}}$ (m)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	1,11 (3H, s) <sup>b</sup>	23,4	<b>16</b>	1,98 (2H, m)	39,9
<b>2</b>	-	73,6	<b>17</b>	2,08 (2H, m)	26,4
<b>3</b>	3,32 (1H, m)	79,3 <sup>a</sup>	<b>18</b>	5,11 (1H, m)	125,1
<b>4</b>	1,36 (1H, m) 1,64 (1H, m)	25,6	<b>19</b>	-	135,3
<b>5</b>	1,62 (2H, m)	33,4	<b>20</b>	2,08 (1H, m) 2,23 (1H, m)	37,4 <sup>c</sup>
<b>6</b>	-	75,1	<b>21</b>	1,36 (1H, m) 1,53 (1H, m)	30,4 <sup>b</sup>
<b>7</b>	3,34 (1H, m)	78,9 <sup>a</sup>	<b>22</b>	3,28 (1H, m)	78,6
<b>8</b>	1,36 (1H, m) 1,53 (1H, m)	30,1 <sup>b</sup>	<b>23</b>	-	73,7
<b>9</b>	2,08 (1H, m) 2,23 (1H, m)	37,2 <sup>c</sup>	<b>24</b>	1,14 (3H, s) <sup>b</sup>	23,9 <sup>d</sup>
<b>10</b>	-	135,3	<b>25</b>	1,17 (3H, s) <sup>a</sup>	26,7
<b>11</b>	5,18 (1H, m)	125,1	<b>26</b>	1,10 (3H, s)	23,4
<b>12</b>	2,00 (2H, m)	28,5	<b>27</b>	1,59 (3H, s)	16,3
<b>13</b>	2,00 (2H, m)	28,5	<b>28</b>	1,57 (3H, s)	16,3
<b>14</b>	5,14 (1H, m)	124,8	<b>29</b>	1,59 (3H, s)	16,3
<b>15</b>	-	135,1	<b>30</b>	1,15 (3H, s) <sup>a</sup>	26,7 <sup>d</sup>

**N.B:** <sup>a, b, c, d</sup> Les résonances avec les mêmes indices dans la même colonne peuvent être permutées.

### II.1.2.9.8- Sapelenine I (EC30P182, 170)

EC30P182 a été isolé des écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum* et se présente sous forme d'une huile incolore optiquement active,  $[\alpha]_D^{20} = +194^\circ$  [*c* 0,01; CH<sub>3</sub>OH]. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 87) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+Na]^+$  à *m/z* 517,3865 (calculée pour C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>O<sub>5</sub>Na: 517,3863) compatible avec la formule brute C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>O<sub>5</sub> renfermant quatre insaturations.

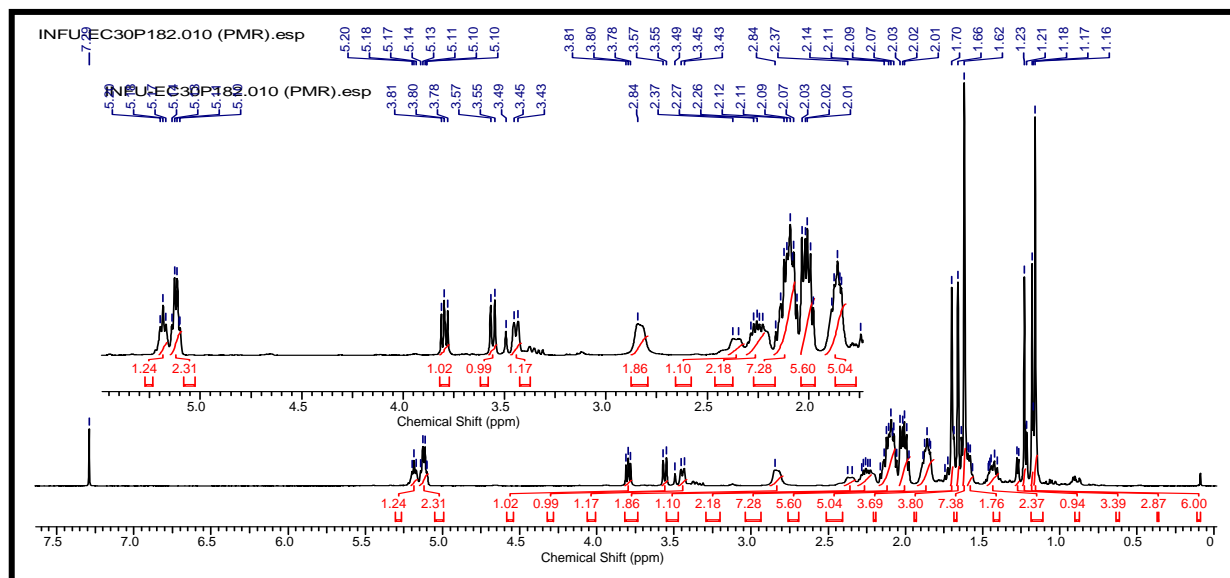


**Figure 87:** Spectre de masse HR-ESI du sapelenine I (EC30P182, 170)

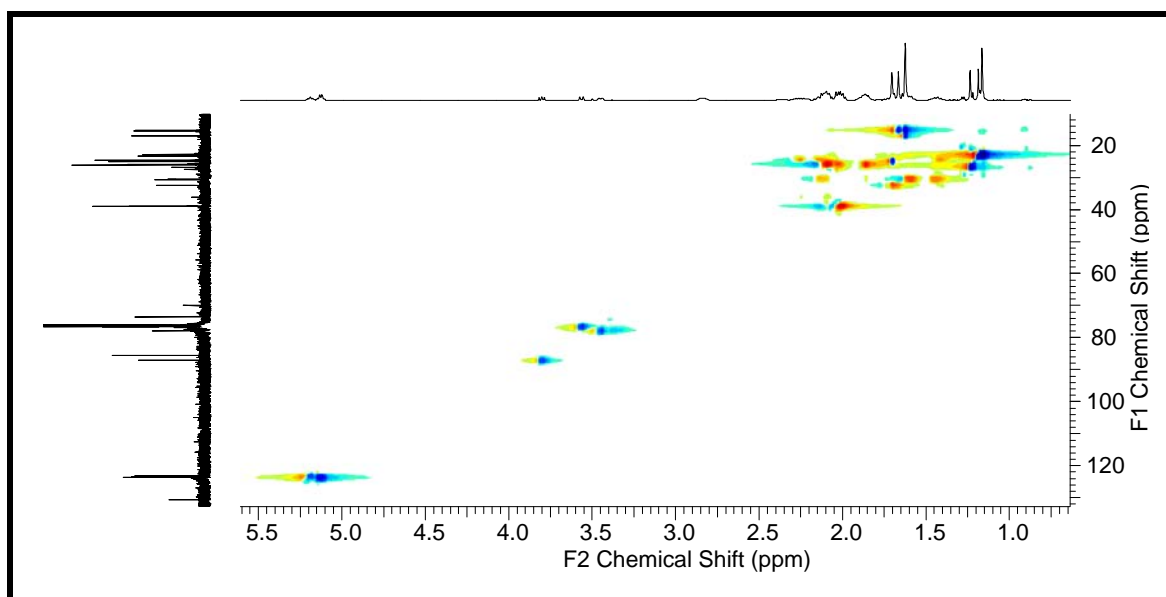
Des fragments importants ont été obtenus dans son spectre de masse à *m/z* 477  $[(M+H)-H_2O]^+$ , 459  $[(M+H)-2xH_2O]^+$  et 441  $[(M+H)-3xH_2O]^+$ , indiquant trois groupes hydroxyles dans la structure de EC30P182.

De plus, son spectre de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 88) indique les signaux de huit groupes méthyles à  $\delta_H$  1,16 (6H, s); 1,18 (3H, s); 1,23 (3H, s) pour les méthyles fixés sur les carbones sp<sup>3</sup> et 1,62 (6H, s); 1,65 (3H, s); 1,70 (3H, s) pour les méthyles oléfiniques. Ce même spectre indique les résonances de trois protons oléfiniques à  $\delta_H$  5,18 (1H, t, *J* = 6,9 Hz); 5,13 (1H, t, *J* = 6,5 Hz) et 5,11 (1H, t, *J* = 6,9 Hz).

Sur son spectre HMQC (Fig. 89), on observe des taches de corrélation <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C à  $\delta_{H/C}$  3,80/88,2; 3,56/77,7 et 3,44/78,9 correspondant à trois groupes oxyméthynes.



**Figure 88:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine I (EC30P182, **170**)

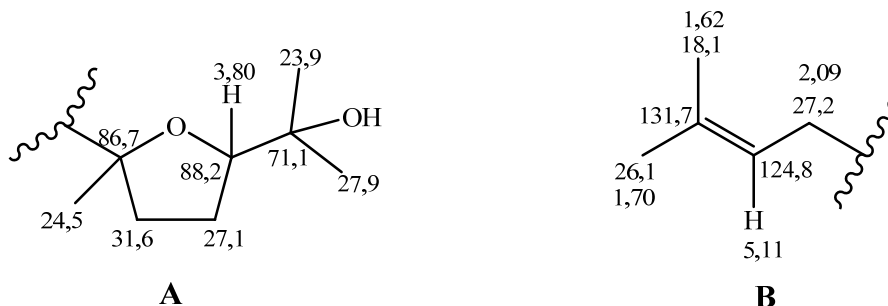


**Figure 89:** Spectre HMQC du sapelenine I (EC30P182, **170**)

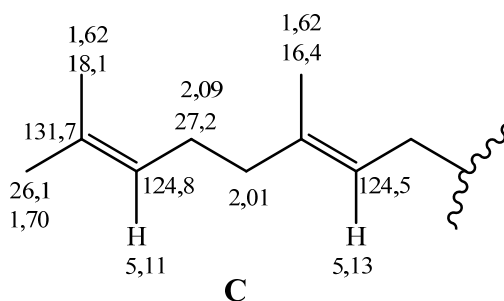
Sur son spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 90), 30 signaux de carbones ont été observés. EC30P182 est donc un triterpène acyclique renfermant au moins trois groupes hydroxyles.

Toujours sur ce spectre, on peut distinguer les signaux caractéristiques d'une sous-structure de type 2-hydroxypropanyl-2-méthyltétrahydrofuran-2-yl (**A**) à  $\delta_{\text{C}}$  86,7; 31,6; 27,1; 88,2; 71,1; 23,9; 24,5 et 27,9.

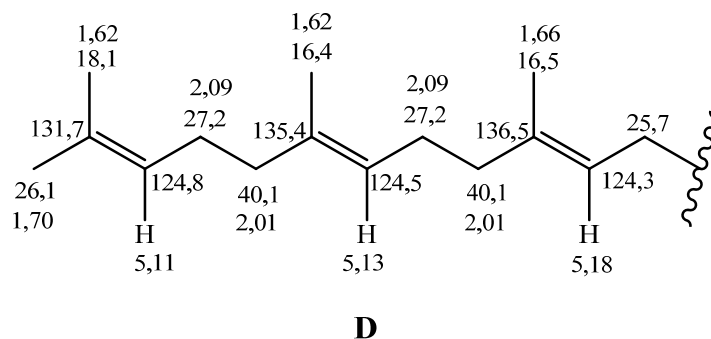
Sur son spectre HMQC, les résonances à  $\delta_{H/C}$  5,11/124,8 (carbone oléfinique); 2,09/27,2 (protons méthyléniques); 1,62/18,1 et 1,70/26,1 (deux méthyles oléfiniques) sont typiques à celles d'un groupe prényle (**B**) (Kouam *et al.*, 2007).



Cependant, nous observons sur son spectre HMBC (Fig. 91) des taches de corrélation d'une part entre les protons résonant à  $\delta_H$  1,62 (CH<sub>3</sub>-30) et 1,70 (CH<sub>3</sub>-24) avec le signal du carbone à  $\delta_C$  124,8 (C-22) et d'autre part entre ce même carbone et le proton à  $\delta_H$  2,01 (H-20). De plus, la tache de corrélation observée entre le signal à  $\delta_H$  2,01 et le carbone à  $\delta_{H/C}$  1,62/16,4 (CH<sub>3</sub>-29) permet de suggérer la présence d'un fragment géranyle (**C**) dans la structure de EC30P182.



Toujours sur ce spectre, on observe des taches de corrélation  $^1H/^{13}C$  à  $\delta_{H/C}$  1,66/40,1; 124,3 et 136,5;  $\delta_{H/C}$  5,13/16,4; 27,2; 40,1 et  $\delta_{H/C}$  5,18/16,5; 25,7; 31,8 et 40,1 suggérant la présence d'un fragment farnésyle (**D**).



Les deux groupes hydroxyles restants ont été fixés sur les carbones C-10 et C-11 après analyse minutieuse des données du spectre HMBC. En fait, les protons du méthylène à  $\delta_H$  1,42 et 1,58 (CH<sub>2</sub>-8) indiquent des corrélations avec deux carbones quaternaires oxygénés à  $\delta_C$  74,6 (C-10) et 86,7 (C-6) et l'un des méthyles à  $\delta_H$  1,16 (CH<sub>3</sub>-27) corrèle avec les carbones à  $\delta_C$  78,9 (C-11); 74,6 (C-10) et 33,6 (C-9). Ainsi, EC30P182 est un isomère de l'ekeberine D2 (Murata *et al.*, 2008), ayant une double liaison terminale. Cette information est corroborée d'une part par la présence sur le spectre de RMN <sup>13</sup>C, d'un signal de carbone sp<sup>2</sup> terminale à  $\delta_C$  131,7 (C-23) et d'autre part par les taches de corrélation observées sur le spectre HMBC entre deux méthyles oléfiniques à  $\delta_{H/C}$  1,62 (H-30)/26,1(C-24) et 1,70(H-24) /18,1(C-30).

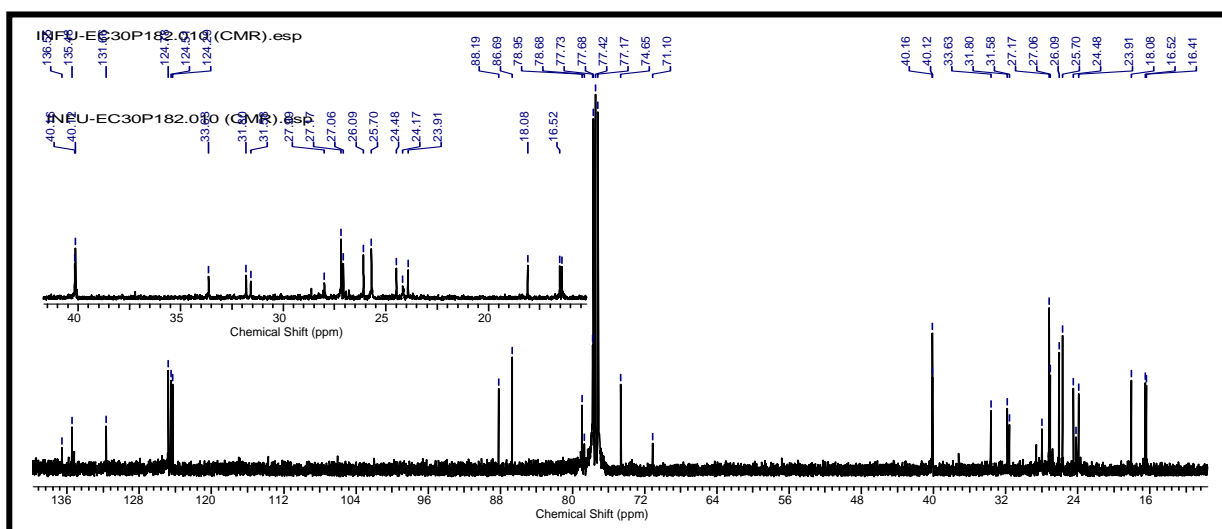


Figure 90: Spectre de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du sapelenine I (EC30P182, 170)

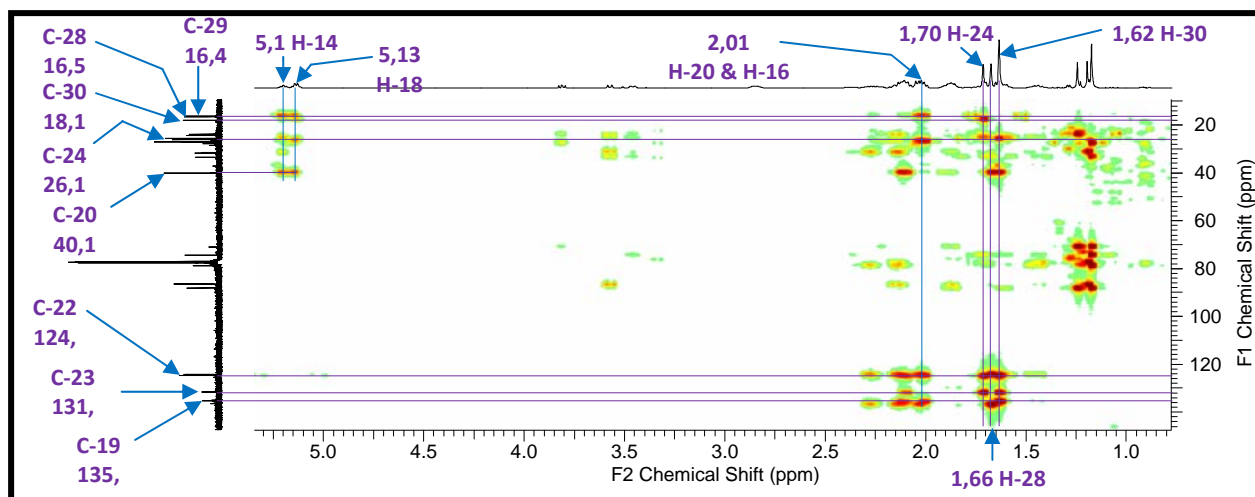
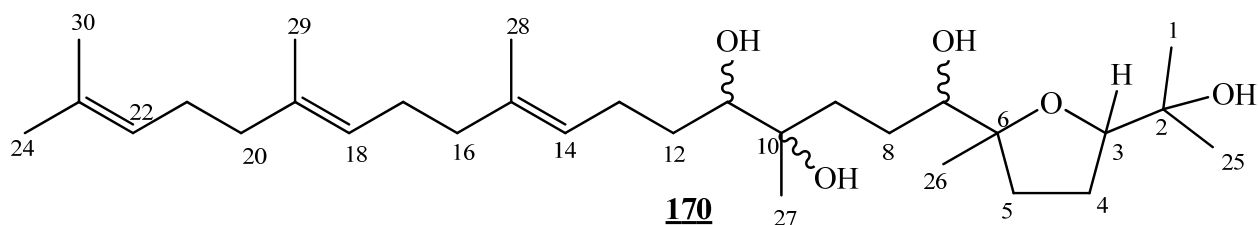
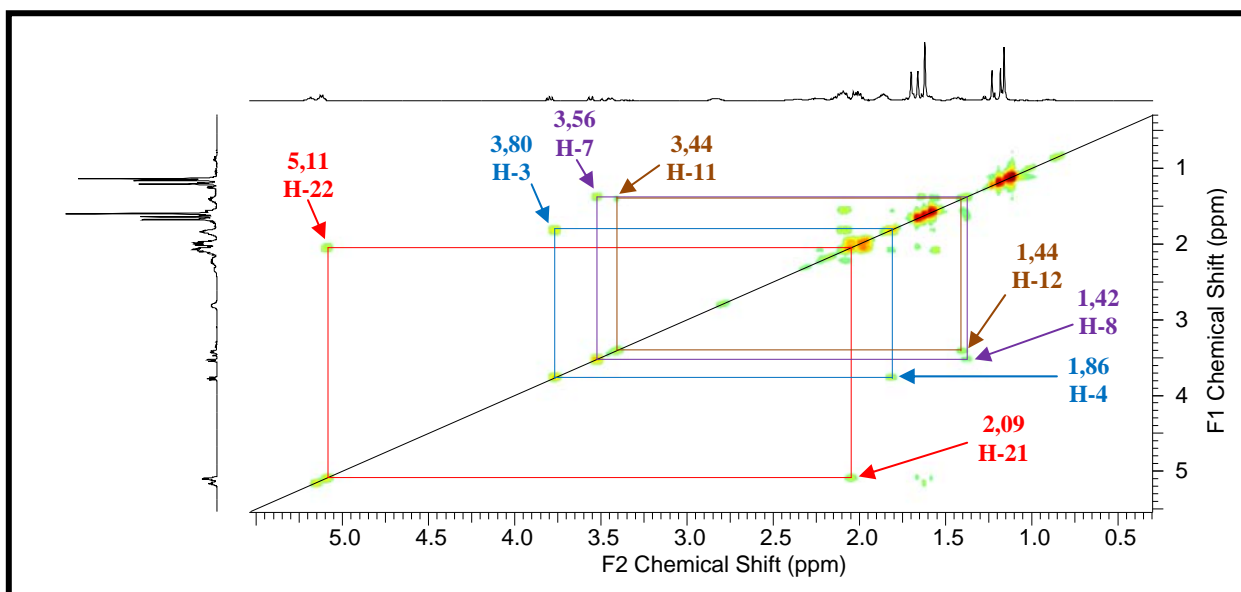


Figure 91: Spectre HMBC du sapelenine I (EC30P182, 170)

L'ensemble de ces données nous a permis d'attribuer à EC30P182 la structure **170** qui est celle du (8*E*,12*E*)-1-(5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-méthyltetrahydrofuran-2-yl)-4,9,13,17-tétraméthyl-octa-deca-8,12,16-triène-1,4,5-triol. Ce composé est décrit ici pour la première fois et nous lui avons proposé le nom de sapelenine I.



L'attribution complète des déplacements chimiques aux protons et aux carbones a été faite sur la base des spectres de RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , HMBC, HMQC et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Fig. 92).



**Figure 92:** Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du sapelenine I (EC30P182, **170**)

**Tableau XXXIV:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du sapelenine I (EC30P182, **170**) dans le  $\text{CDCl}_3$ .

EC30P182					
Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Position	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	1,16 (3H, s)	23,9	<b>16</b>	2,01 (2H, m)	40,2
<b>2</b>	-	71,1	<b>17</b>	2,09 (2H, m)	27,2
<b>3</b>	3,80 (1H, t, 8,8)	88,2	<b>18</b>	5,13 (1H, t, 6,5)	124,5
<b>4</b>	1,86 (2H, m)	27,1	<b>19</b>	-	135,5
<b>5</b>	1,58 (1H, m) 2,12 (1H, m)	31,6	<b>20</b>	2,01 (2H, m)	40,1
<b>6</b>	-	86,7	<b>21</b>	2,09 (2H, m)	27,2
<b>7</b>	3,56 (1H, d, 10,3)	77,7	<b>22</b>	5,11 (1H, t, 6,9)	124,8
<b>8</b>	1,42 (1H, m) 1,58 (1H, m)	31,8	<b>23</b>	-	131,7
<b>9</b>	1,68 (2H, m)	33,6	<b>24 (proE)</b>	1,70 (3H, s)	26,1
<b>10</b>	-	74,6	<b>25</b>	1,23 (3H, s)	27,9
<b>11</b>	3,44 (1H, d, 10,3)	78,9	<b>26</b>	1,18 (3H, s)	24,5 <sup>a</sup>
<b>12</b>	1,44 (2H, m)	31,8	<b>27</b>	1,16 (3H, s)	24,2 <sup>a</sup>
<b>13</b>	1,42 (1H, m) 2,26 (1H, m)	25,7	<b>28</b>	1,66 (3H, s)	16,5
<b>14</b>	5,18 (1H, t, 6,9)	124,3	<b>29</b>	1,62 (3H, s)	16,4
<b>15</b>	-	136,5	<b>30 (proZ)</b>	1,62 (3H, s)	18,1

**N.B.:** <sup>a</sup> Les résonances avec les mêmes indices dans la même colonne peuvent être permutées.

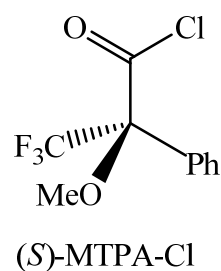
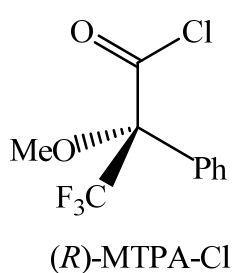
Deux groupes d'hydroxyles secondaires sont présents dans la structure du sapelenine I, ce qui rend les déterminations de leurs configurations absolues difficiles. Toutefois, étant donné que les deux groupes hydroxyles (C-10 et C-11) sont proches l'un de l'autre, nous avons préparé l'acétonide du sapelenine I. Pour cela, ce composé a été traité avec du 2,2-diméthoxypropane, l'acide *p*-toluène sulfonique dans l'acétone pour donner l'acétonide EC30P182ACO (**170a**)

---

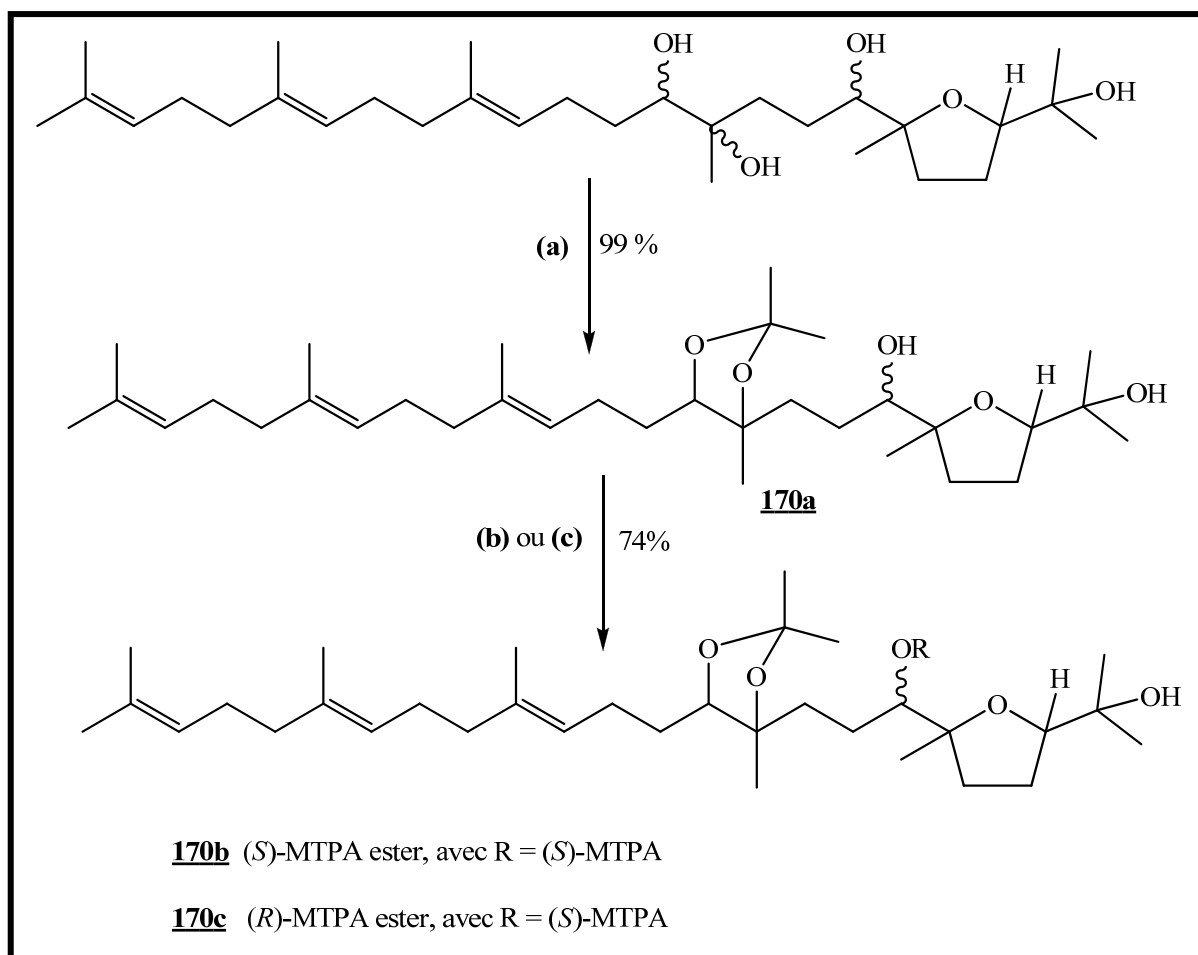
correspondant (Ngnokam et *al.*, 1995; Huang et *al.*, 2009). Les configurations absolues du fragment tétrahydrofurane ont été élucidées par les deux expériences NOESY et Mosher.

En effet, les corrélations NOESY ont été observées entre 1-CH<sub>3</sub> et H-3; H-3 et 26-CH<sub>3</sub>; H-7 et 26-CH<sub>3</sub>.

Par ailleurs, la méthode modifiée de Mosher a été utilisée pour déterminer la configuration absolue du carbone C-7 (Ohtani et *al.*, 1991; Lamshöft et *al.*, 2003). Ainsi, EC30P182 réagit avec le (*R*) et le (*S*) chlorure d'acide de Mosher (MTPA-Cl) dans le diméthylaminopyridine (DMAP) auquel on ajoute quelques gouttes de pyridine pour donner respectivement le (*S*) (**170b**) et le (*R*) (**170c**) ester de Mosher. Les deux réactions sont effectuées en parallèles.



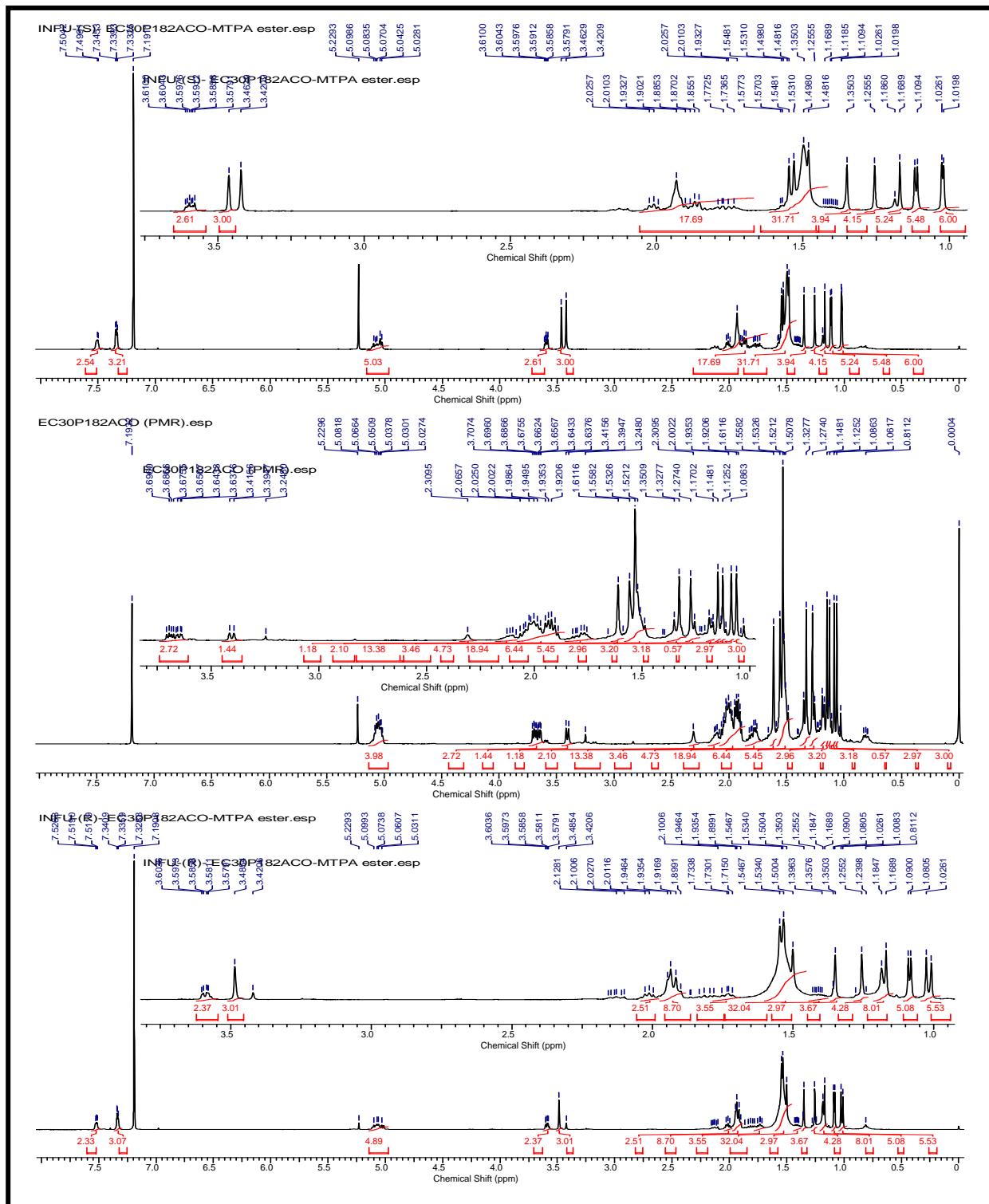




**Schéma 28:** Synthèse de l'acétonide du sapelenine I et des esters de Mosher de l'acétonide du sapelenine I

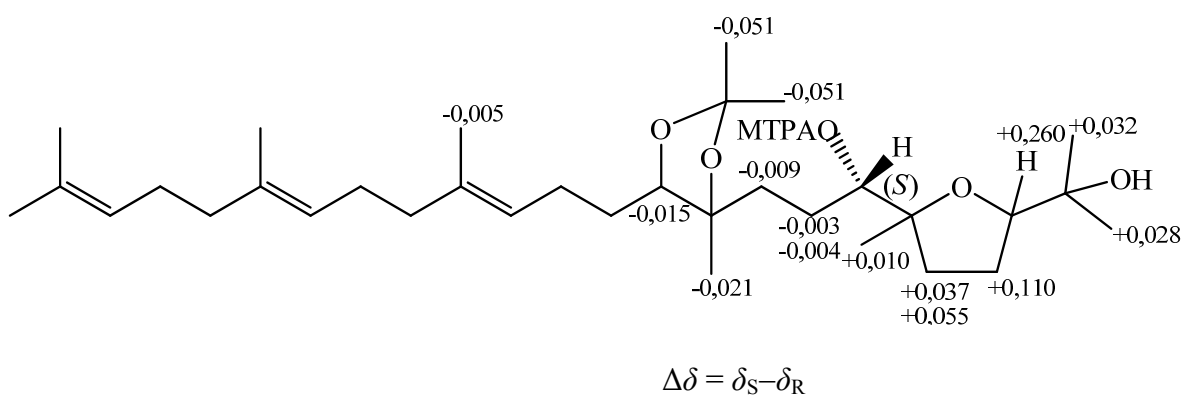
- (a): 2,2-diméthoxypropane, acide *p*-toluène sulfonique, acétone, à température ambiante, 30 mn  
 (b): (*R*)-MTPA-Cl, DMAP, à température ambiante, durant une nuit  
 (c): (*S*)-MTPA-Cl, DMAP, à température ambiante, durant une nuit

Les milieux réactionnels ont été soumis à la HPLC préparative pour conduire respectivement à l'acétonide du sapelenine I (**170a**), aux (*S*)-MTPA ester (**170b**) et (*R*)-MTPA ester (**170c**). Les produits obtenus ont été transférés dans les tubes de RMN et les spectres de RMN  $^1\text{H}$  de l'acétonide et des esters de Mosher ont été enregistrés.



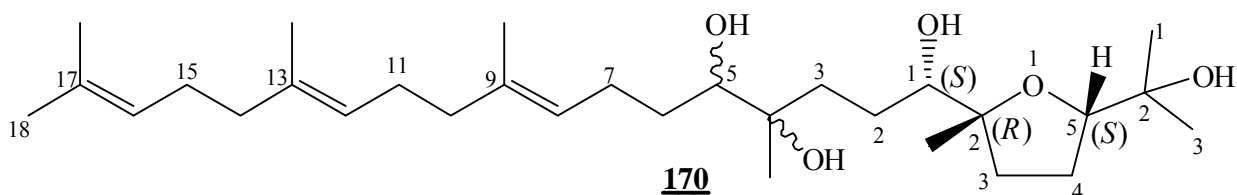
**Figure 93:** Spectres de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du  $(S)$ -EC30P182ACO-MTPA ester (**170b**), de l'acétone du sapelenine I (EC30P182ACO) (**170a**) et du  $(R)$ -EC30P182ACO-MTPA ester (**170c**).

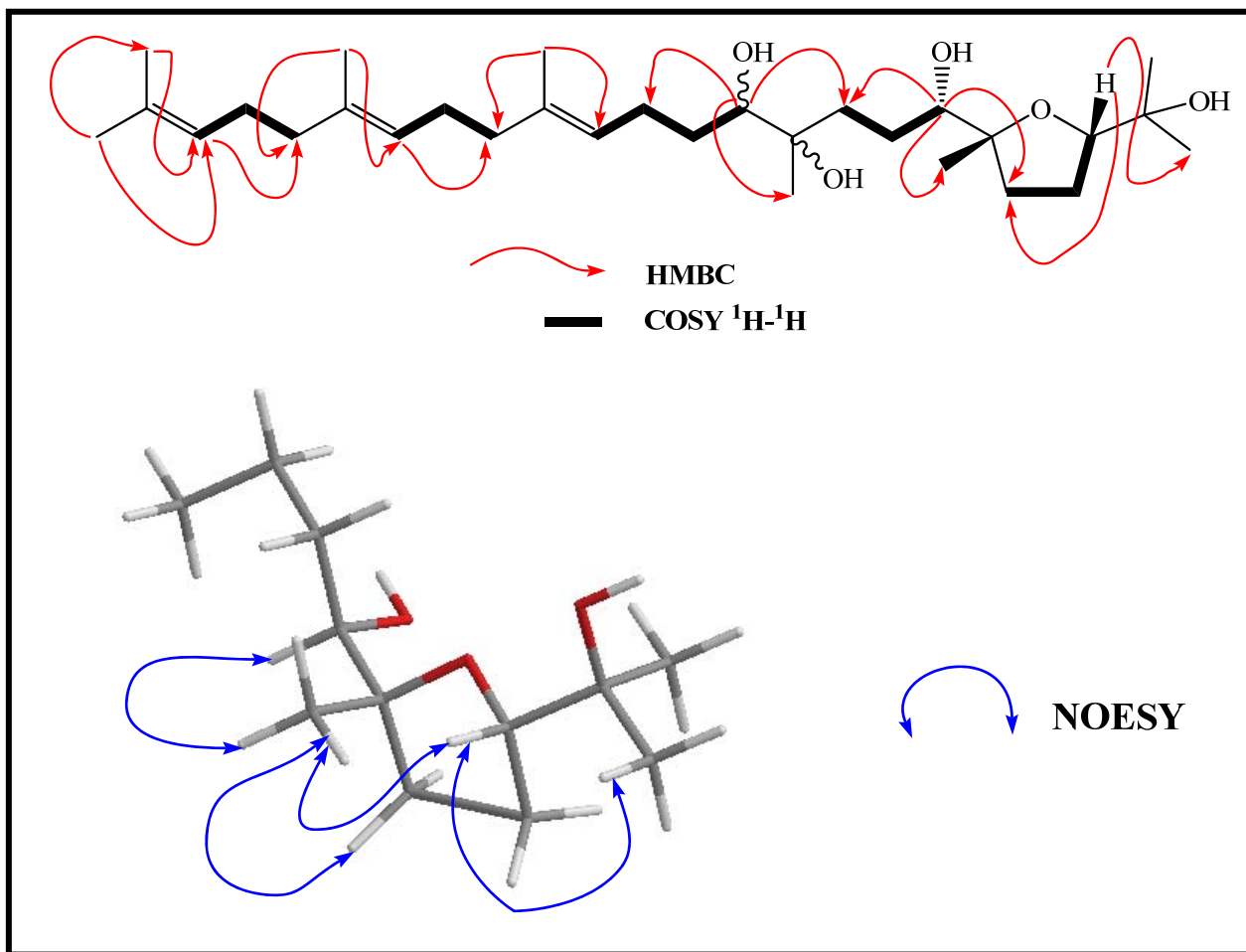
Les données enregistrées sur ces spectres nous ont permis de calculer les valeurs des différences des déplacements chimiques entre le (*S*)- et le (*R*)- ester de Mosher [ $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ ], de positionner les groupements autour du carbone asymétrique (C-7) et de lire les configurations absolues autour de celui-ci (schéma 29). Ainsi, la configuration absolue autour du carbone C-7 a été déterminée comme (*S*). Compte tenu des corrélations NOESY susmentionnées, les configurations absolues des carbones C-3 et C-6 ont conséquemment été déterminées comme 3*S* et 6*R* respectivement. Cependant, il n'a pas été possible de déterminer les configurations absolues des carbones C-10 et C-11.



**Schéma 29:** Valeurs  $\Delta\delta^{S-R}$  obtenues des esters de Mosher de l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO)

De cette étude, il ressort que le sapelenine I serait le (1*S*,8*E*,12*E*)-1-((2*R*,5*S*)-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-méthyltétrahydrofuran-2-yl)-4,9,13,17-tétraméthyl-octadeca-8,12,16-triène-1,4,5-triol.



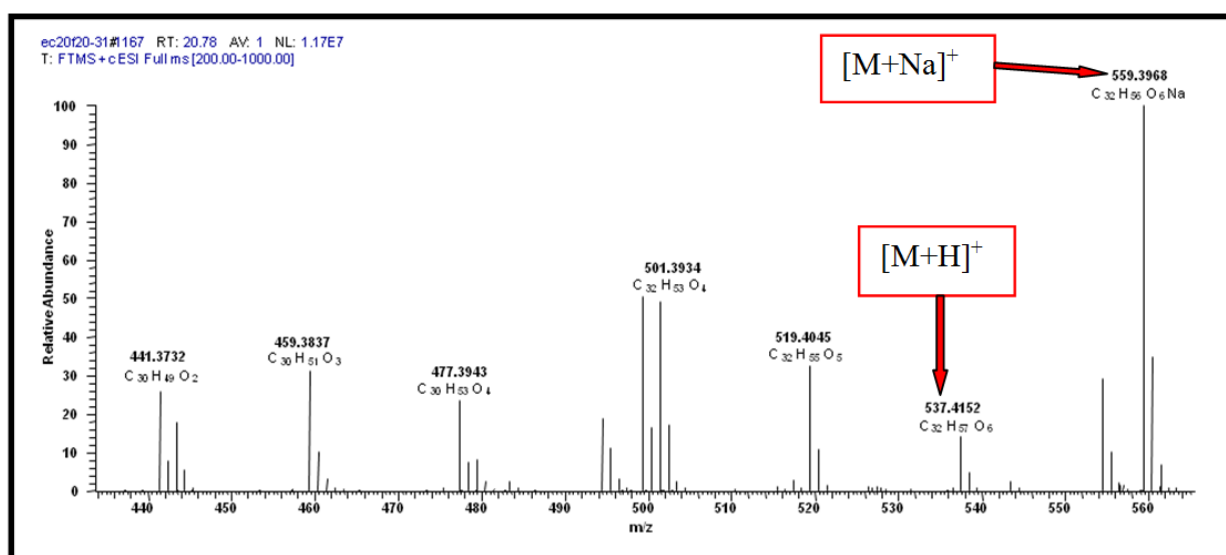


**Schéma 30:** Quelques corrélations observées sur les spectres HMBC, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et NOESY du sapelenine I (EC100P182, 170)

### II.1.2.9.9- Sapelenine J (EC20P2031, 171)

Isolé des écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum*, EC20P2031 se présente sous forme d'une huile incolore optiquement active,  $[\alpha]_D^{20} = +36^\circ$  [*c* 0,01; CH<sub>3</sub>OH]. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 94) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+Na]^+$  à *m/z* 559,3968 (calculée pour C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>Na: 559,3969) compatible avec la formule brute C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub> renfermant cinq insaturations.

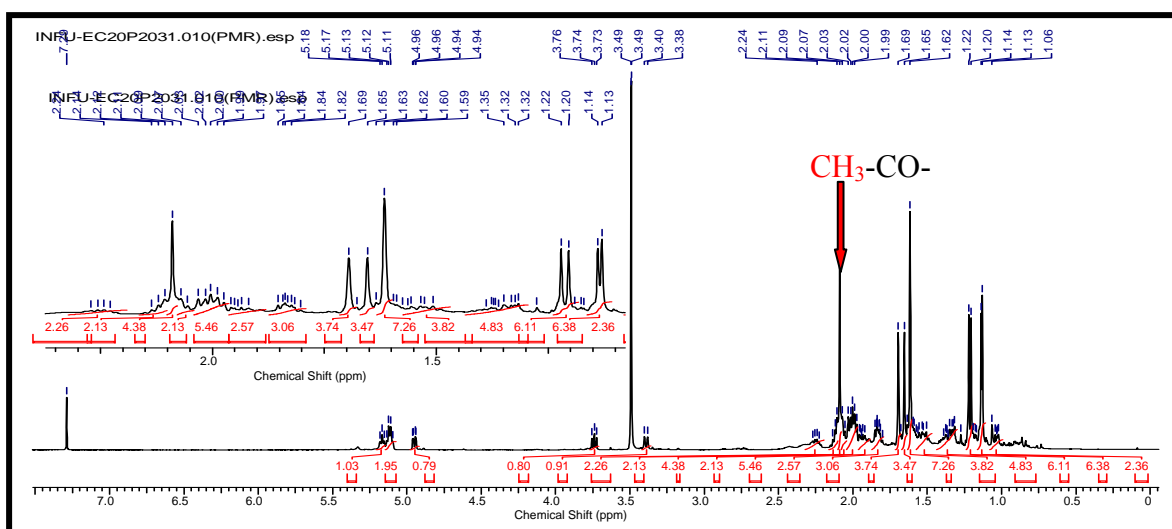


**Figure 94:** Spectre de masse HR-ESI du sapelenine J (EC20P2031, 171)

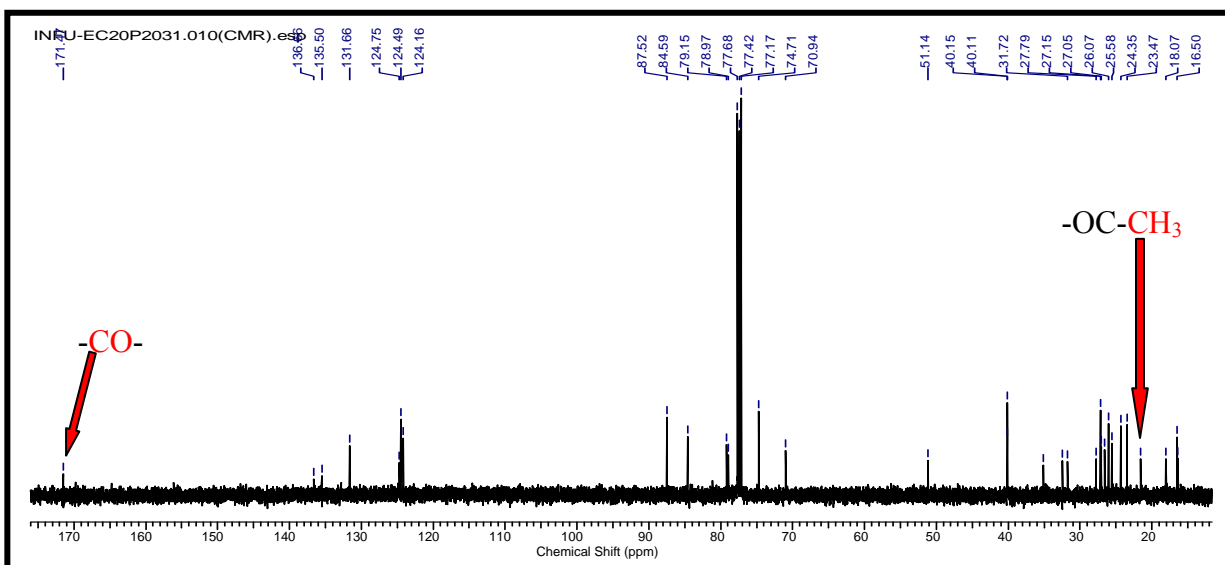
La comparaison de son spectre de masse à celui de EC30P182 (Fig. 87) montre une différence de 42 unités entre les pics d'ions pseudo-moléculaires  $[M+Na]^+$  de ces deux composés, ce qui nous permet de suggérer que EC20P2031 peut être un dérivé acétylé de EC30P182. Cette hypothèse est soutenue par la présence sur son spectre de masse des ions fragments à *m/z* 519  $[(M+H)-H_2O]^+$ , *m/z* 501  $[(M+H)-2H_2O]^+$ , *m/z* 495  $[(M+H)-C_2H_2O]^+$ , 477  $[(M+H)-C_2H_2O-H_2O]^+$ , 459  $[(M+H)-C_2H_2O-2xH_2O]^+$  et 441  $[(M+H)-C_2H_2O-3xH_2O]^+$ , indiquant un groupe acétyle et trois groupes hydroxyle dans la structure de EC20P2031.

Son spectre IR indique des fréquences caractéristiques à 3430 et 3360 cm<sup>-1</sup> pour les groupes hydroxyles; 1730 cm<sup>-1</sup> pour le carbonyle des esters.

Les valeurs des déplacements chimiques de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de EC20P2031 sont quasi identiques à celles du sapelenine I (EC30P182, **170**). Cependant, sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 95) du composé EC20P2031, la résonance est observée pour un groupe acétyle à  $\delta_{\text{H}}$  2,09 et le signal à  $\delta_{\text{H}}$  3,56 (H-7, oxyméthine) dans le sapelenine I (**170**) est déplacé vers les champs faibles à  $\delta_{\text{H}}$  4,95 confirmant la présence d'un groupe acétyle. Cette information est corroborée par les résonances à  $\delta_{\text{C}}$  171,5 et 21,6 observées sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 96) et propres à un groupe acétyle. De ce qui précède, il est clair que le groupement hydroxyle a été remplacé dans EC30P182 par un groupe acétoxy.



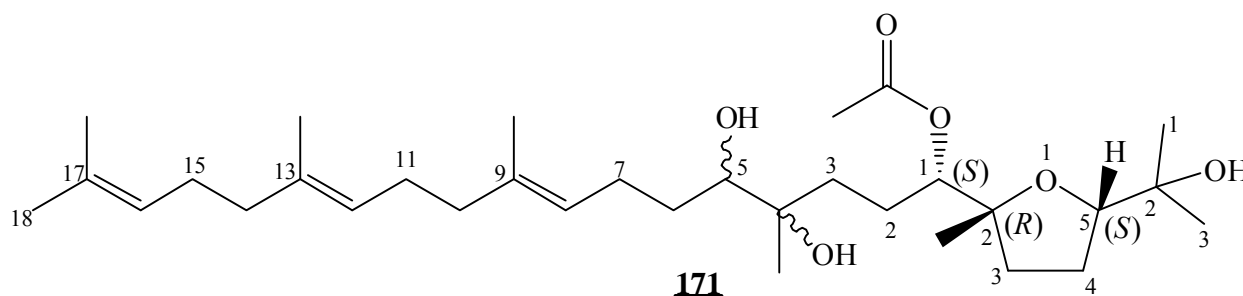
**Figure 95:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine J (EC20P2031, **171**)



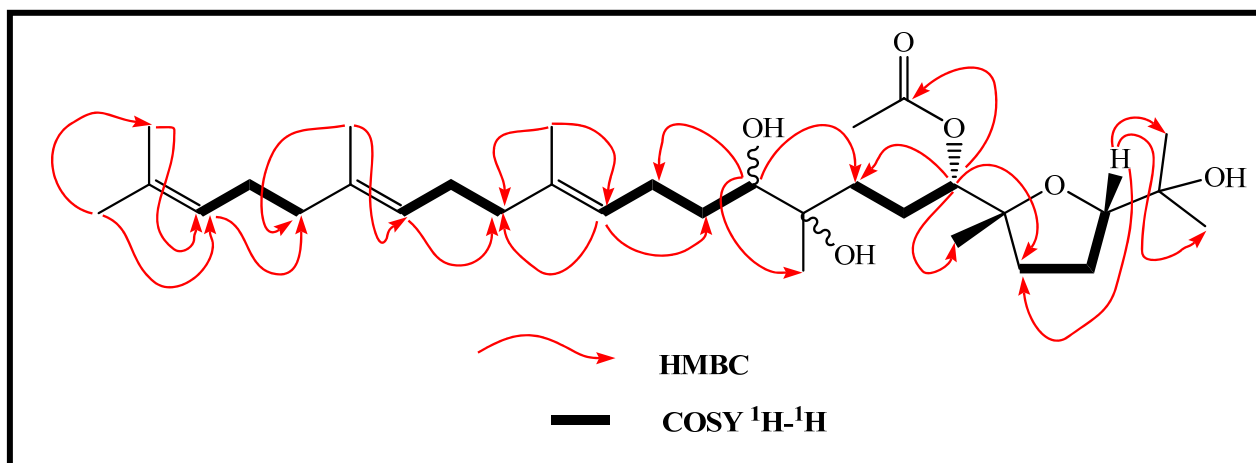
**Figure 96:** Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine J (EC20P2031, **171**)

Sur la base de la formation des sapelenines G-I dans le même extrait de plante, nous nous sommes dits qu'ils possèdent la même origine biogénétique. En plus des corrélations chimiques importantes observées (schéma 31), nous avons supposé les configurations absolues des trois centres stéréogéniques C-3, C-6 et C-7 de EC20P2031 identiques à ceux du sapelenine I (EC30P182, **170**). Les configurations absolues de C-10 et C-11 n'ont pas pu être déterminées.

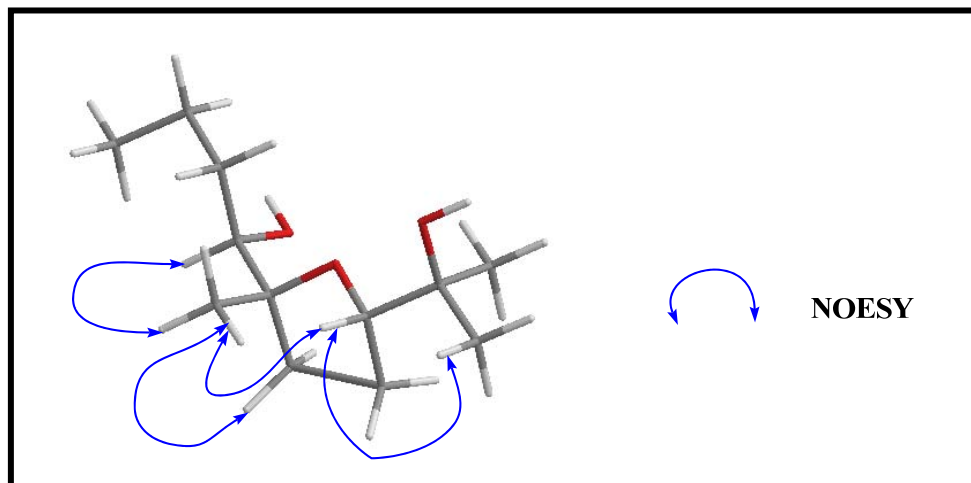
L'ensemble de toutes ces données nous permet d'attribuer à EC20P2031, la structure **171** qui est celle du sapelenine J ou acétate de (1*S*,8*E*,12*E*)-4,5-dihydroxy-1-((2*R*,5*S*)-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-méthyltetrahydrofuran-2-yl)-4,9,13,17-tétraméthyl-octadeca-8,12,16-triène, un triterpène acyclique nouveau, décrit ici pour la première fois.



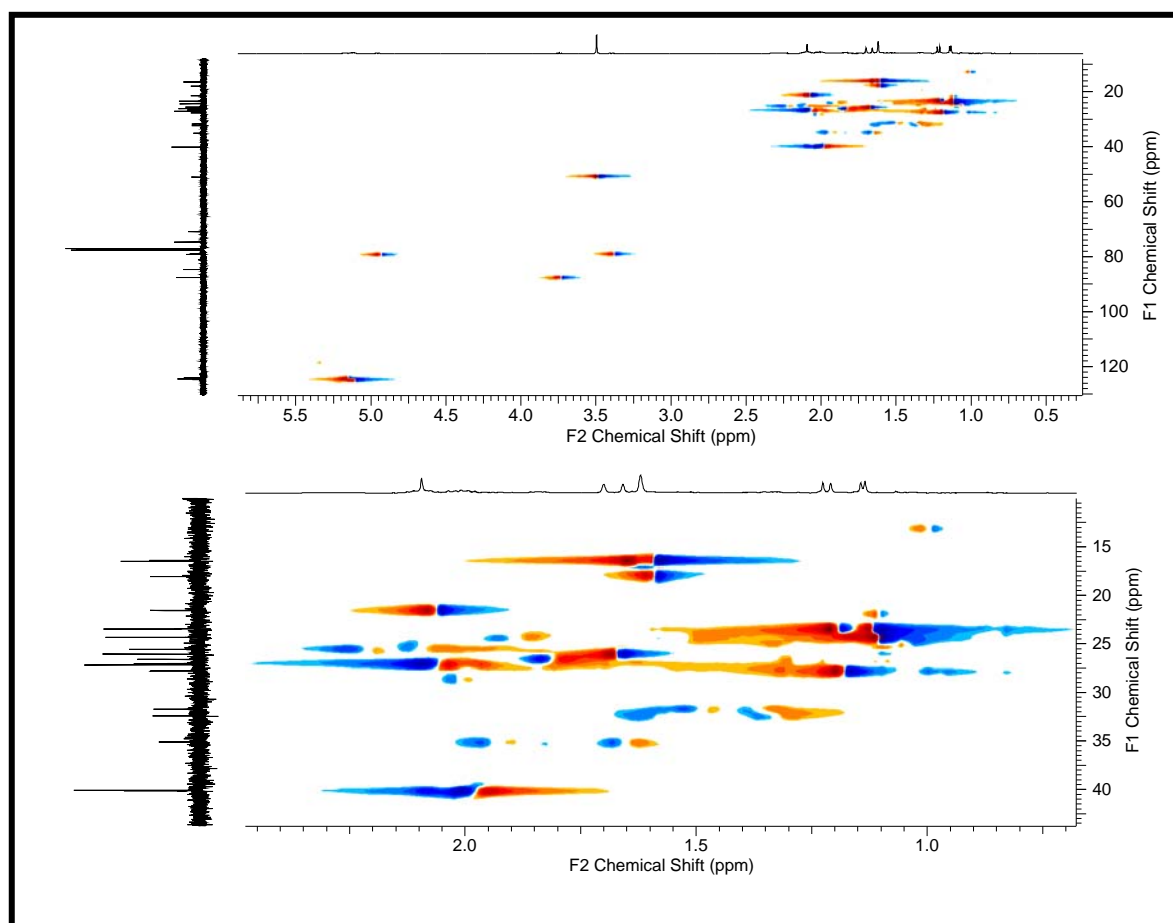
L'attribution complète des déplacements chimiques aux protons et aux carbones a été faite sur la base des spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , HMQC (Fig. 97), HMBC (Fig. 98) et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Fig. 99).



**Schéma 31:** Quelques corrélations observées sur les spectres HMBC, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du sapelenine J (EC20P2031, **171**).



**Schéma 32:** Corrélations NOE de la portion tétrahydrofurane observées sur le spectre NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du sapelenine J (EC20P2031, 171)



**Figure 97:** Spectre HMQC du sapelenine J (EC20P2031, 171)



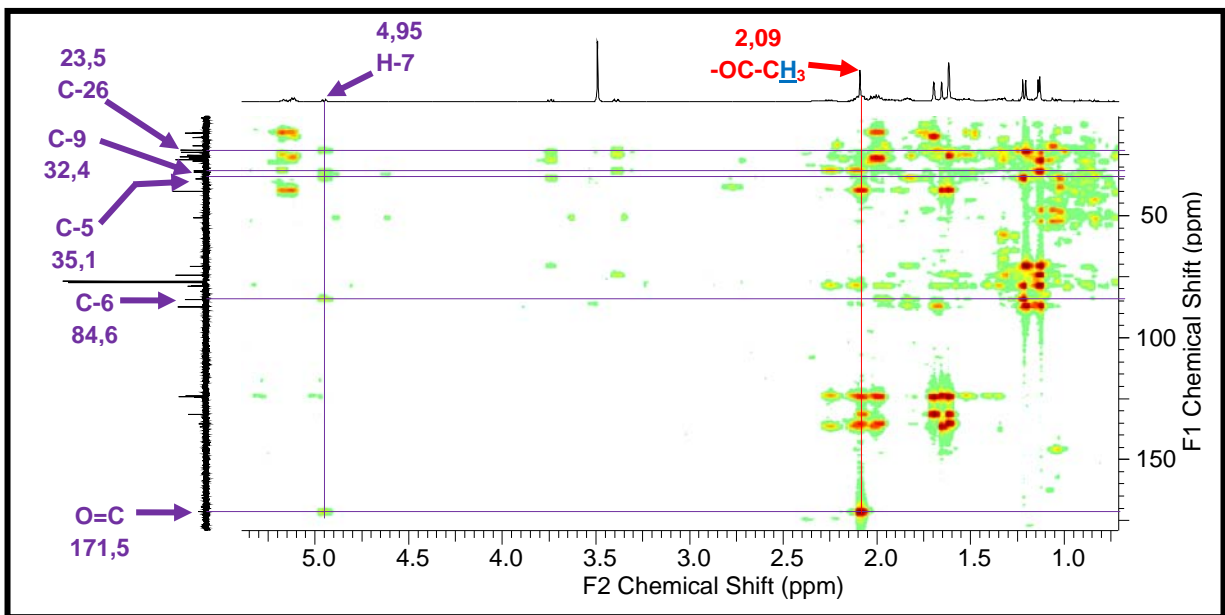


Figure 98: Spectre HMBC du sapelenine J (EC20P2031, 171)

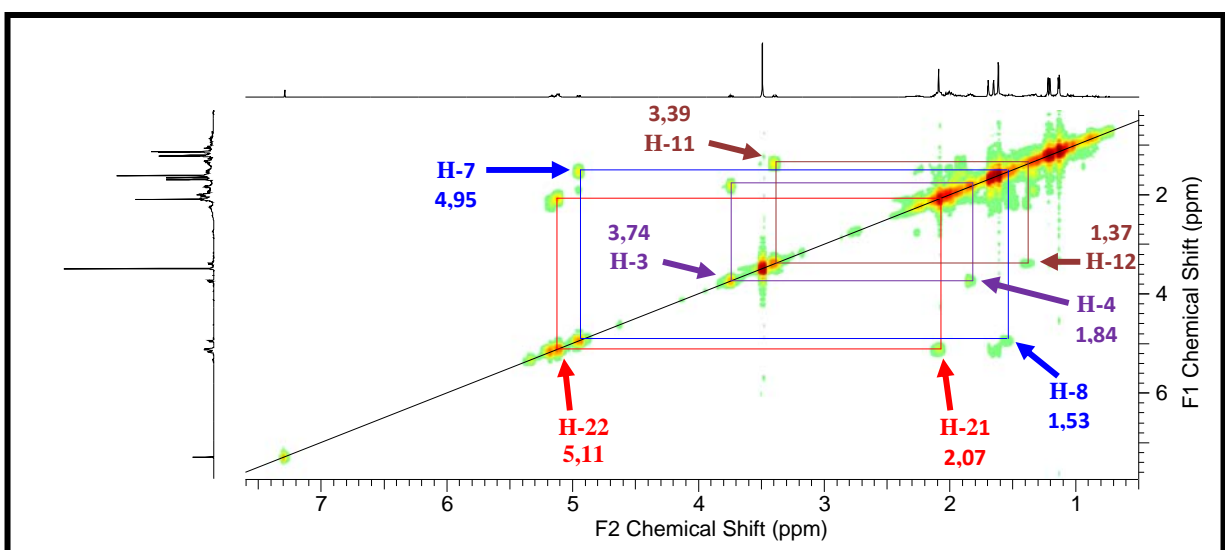


Figure 99: Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du sapelenine J (EC20P2031, 171)

**Tableau XXXV:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du sapelenine J (EC20P2031, **171**) comparées à celles de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du sapelenine I (EC30P182, **170**) dans le  $\text{CDCl}_3$ .

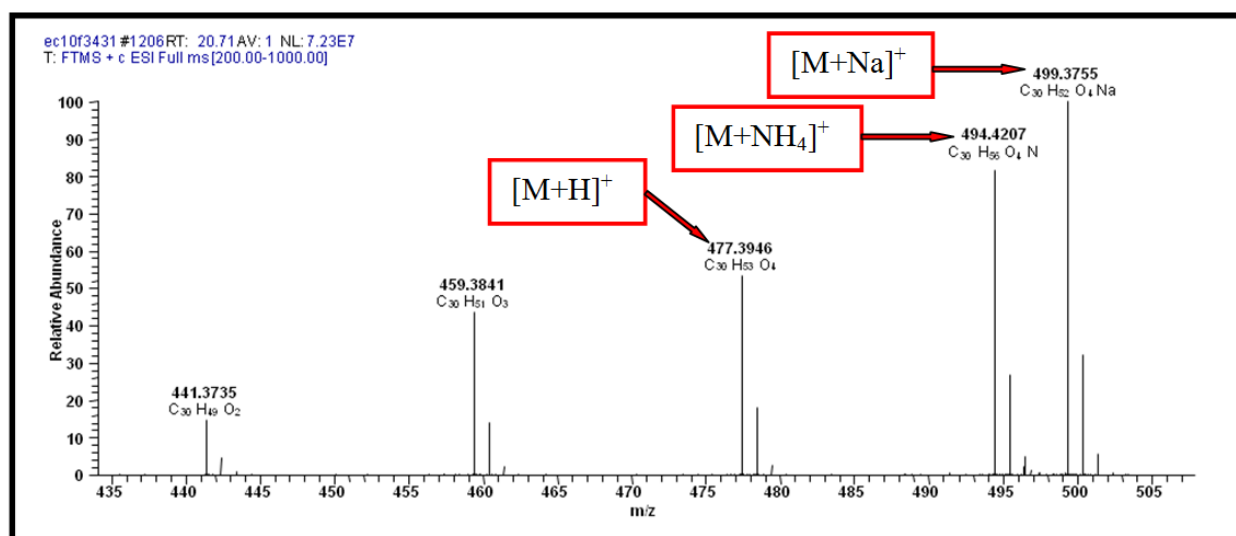
Position	EC20P2031		Sapelenine I	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1,13 (3H, s)	24,3	1,16 (3H, s)	23,9
2	-	70,9	-	71,1
3	3,74 (1H, t, 6,7)	87,5	3,80 (1H, t, 8,8)	88,2
4	1,84 (2H, m)	26,6	1,86 (2H, m)	27,1
5	1,68 (1H, m)	35,1	1,58 (1H, m)	31,6
	1,97 (1H, m)		2,12 (1H, m)	
6	-	84,6	-	86,7
7	4,95 (1H, dd, 2,7; 9,6)	79,1	3,56 (1H, d, 10,3)	77,7
8	1,53 (2H, m)	31,7	1,42 (1H, m)	31,8
			1,58 (1H, m)	
9	1,64 (2H, m)	32,4	1,68 (2H, m)	33,6
10	-	74,7	-	74,6
11	3,39 (1H, d, 10,3)	78,9	3,44 (1H, d, 10,3)	78,9
12	1,37 (2H, m)	31,7	1,44 (2H, m)	31,8
13	2,26 (2H, m)	25,6	1,42 (1H, m)	25,7
			2,26 (1H, m)	
14	5,17 (1H, t, 7,2)	124,1	5,18 (1H, t, 6,9)	124,3
15	-	136,7	-	136,5
16	2,02 (2H, m)	40,1	2,01 (2H, m)	40,2
17	2,08 (2H, m)	27,1 <sup>b</sup>	2,09 (2H, m)	27,2
18	5,12 (1H, t, 6,1)	124,4	5,13 (1H, t, 6,5)	124,5
19	-	135,5	-	135,5
20	2,02 (2H, m)	40,1	2,01 (2H, m)	40,1
21	2,07 (2H, m)	27,0 <sup>b</sup>	2,09 (2H, m)	27,2
22	5,11 (1H, t, 6,9)	124,7	5,11 (1H, t, 6,9)	124,8
23	-	131,7	-	131,7
24 ( <i>proE</i> )	1,69 (3H, s)	26,1	1,70 (3H, s)	26,1
25	1,20 (3H, s)	27,8	1,23 (3H, s)	27,9
26	1,22 (3H, s)	23,5	1,18 (3H, s)	24,5 <sup>a</sup>
27	1,14 (3H, s)	23,5	1,16 (3H, s)	24,2 <sup>a</sup>
28	1,65 (3H, s)	16,5	1,66 (3H, s)	16,5
29	1,62 (3H, s)	16,4	1,62 (3H, s)	16,4
30 ( <i>proZ</i> )	1,62 (3H, s)	18,1	1,62 (3H, s)	18,1
<u>CH<sub>3</sub>-CO-</u>	2,09 (3H, s)	21,6	-	-
<u>CH<sub>3</sub>-CO-</u>	-	171,5	-	-

**N.B.:** <sup>a, b</sup> Les résonances avec les mêmes indices dans la même colonne peuvent être permutées.

### II.1.2.9.10- Sapelenine H (EC10P3431, **172**)

EC10P3431 a été isolé des écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum* et se présente sous forme d'une huile incolore. Il est soluble dans le chloroforme et répond positivement au test de Liebermann-Burchard caractéristique des triterpènes.

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 100) présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  499,3755 (calculée pour  $C_{30}H_{52}O_4Na$ : 499,3758) compatible avec la formule brute  $C_{30}H_{52}O_4$  renfermant cinq insaturations.



**Figure 100:** Spectre de masse HR-ESI du sapelenine H (EC10P3431, **172**)

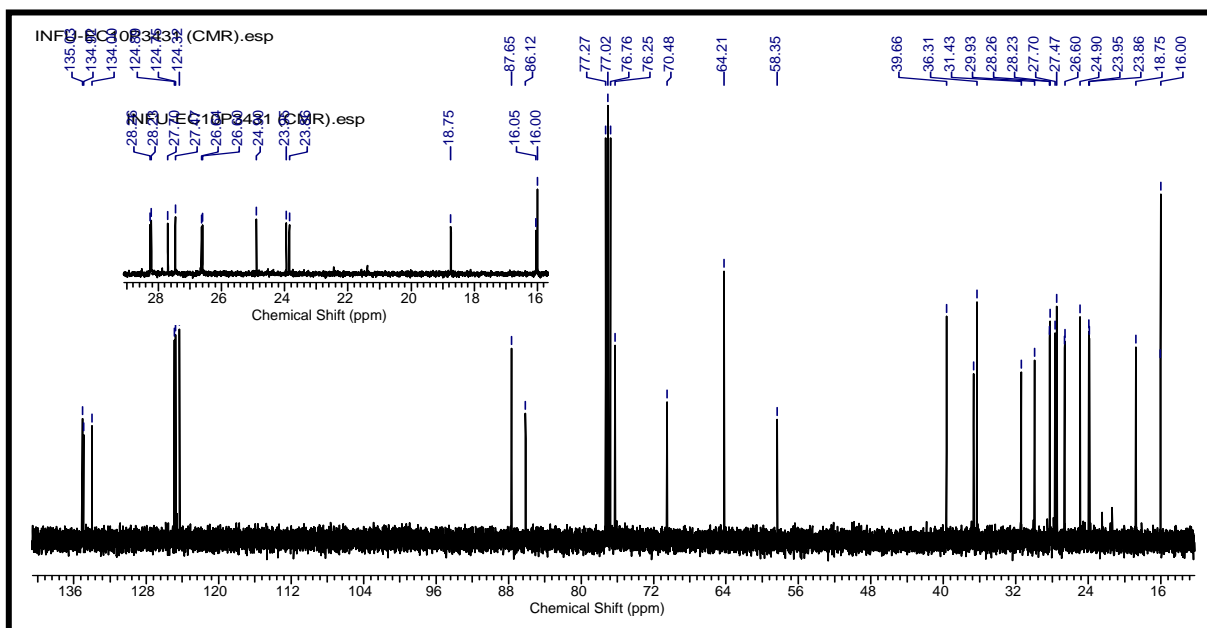
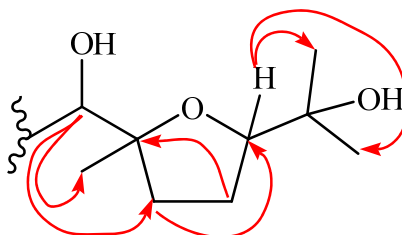
Deux fragments importants ont été obtenus dans son spectre de masse à  $m/z$  459  $[(M+H)-H_2O]^+$  et 441  $[(M+H)-2xH_2O]^+$ , indiquant deux groupes hydroxyles dans la structure de EC10P3431.

Sur son spectre IR, des bandes d'absorption ont été observées à  $3430\text{ cm}^{-1}$  (OH) et  $1660\text{ cm}^{-1}$  (C=C).

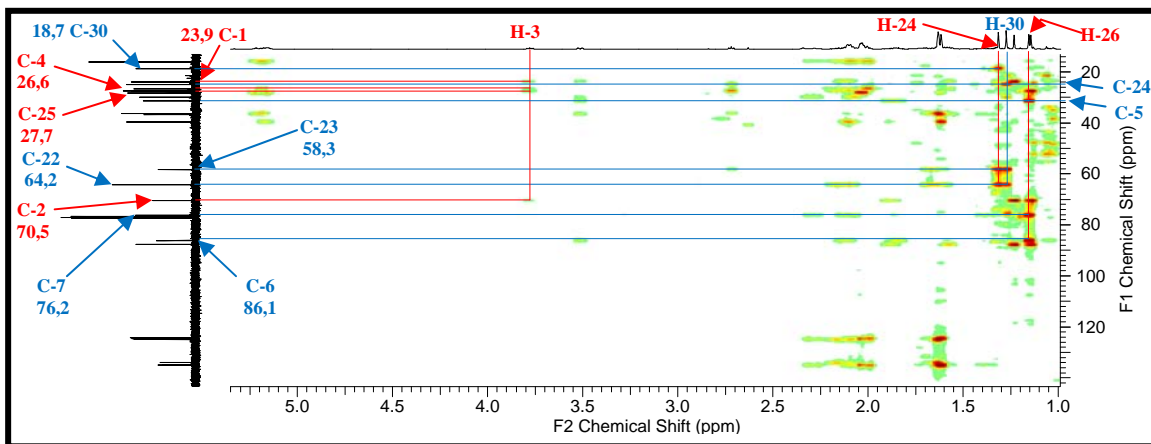
Son spectre de RMN  $^{13}C$  (Fig. 101) présente 30 signaux typiques d'un squelette de triterpène acyclique avec 8 groupes méthyles et 10 méthylènes (Ngnokam et al., 1993, 1995; Murata et al., 2008). Un fragment 2-hydroxypropanyl-2-méthyl-tetrahydrofuranyle a été établi sur la base des données spectrales. En effet, sur ce spectre on observe un oxyméthine à  $\delta_C$  87,6; un carbone

quaternaire oxygéné à  $\delta_C$  86,1; deux carbones méthyléniques à  $\delta_C$  26,6 et 31,4 et trois groupes méthyles à  $\delta_C$  23,9; 23,8 et 27,7 (Tableau XXXVI).

On observe sur son spectre HMBC (Fig. 102) des taches de corrélation proton/carbone entre le signal du proton à  $\delta_H$  3,77 (oxyméthine) et les signaux de carbone à  $\delta_C$  70,5; 27,7; 26,6 et 23,9. Les corrélations entre les signaux des protons du méthyle à  $\delta_H$  1,16 ( $\delta_C$  23,8) et les signaux de carbone à  $\delta_C$  76,2 (oxyméthine),  $\delta_C$  86,1 et  $\delta_C$  31,4 montrent que le fragment tétrahydrofurane est lié à un groupe oxyméthine ( $\delta_H$  3,51), d'où la sous-structure suivante:

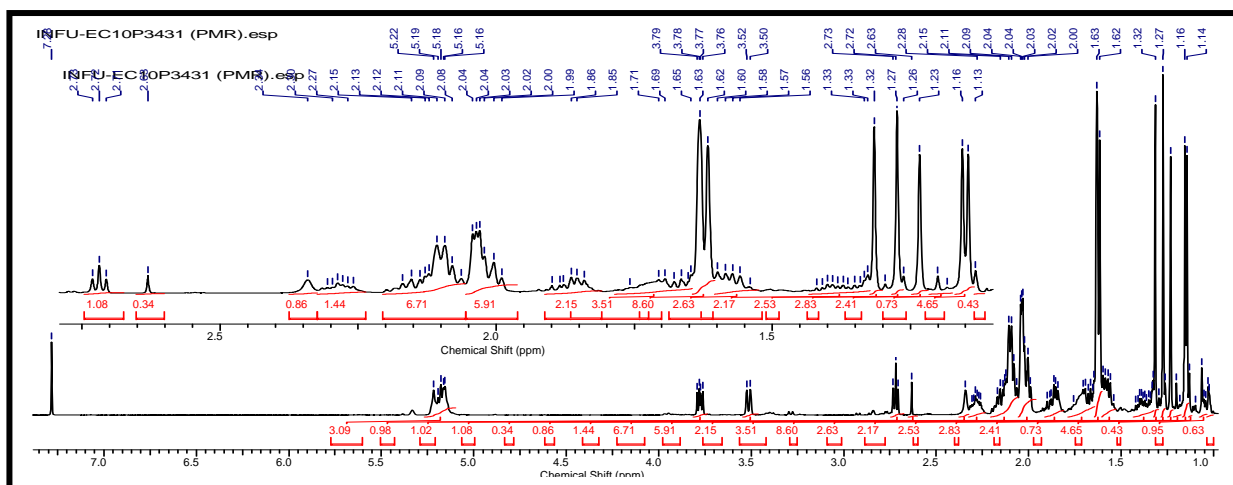


**Figure 101:** Spectre de RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ) du sapelenine H (EC10P3431, 172)

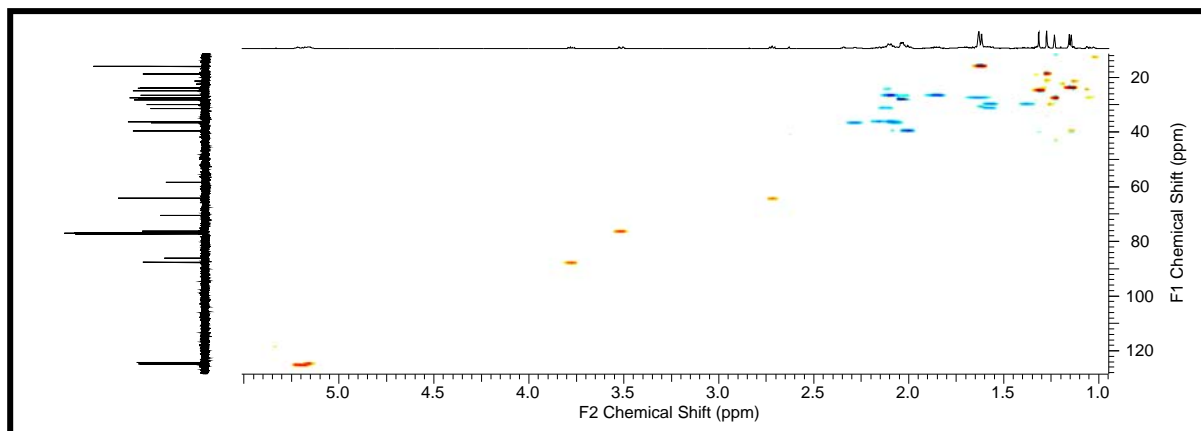


**Figure 102:** Spectre HMBC du sapelenine H (EC10P3431, 172)

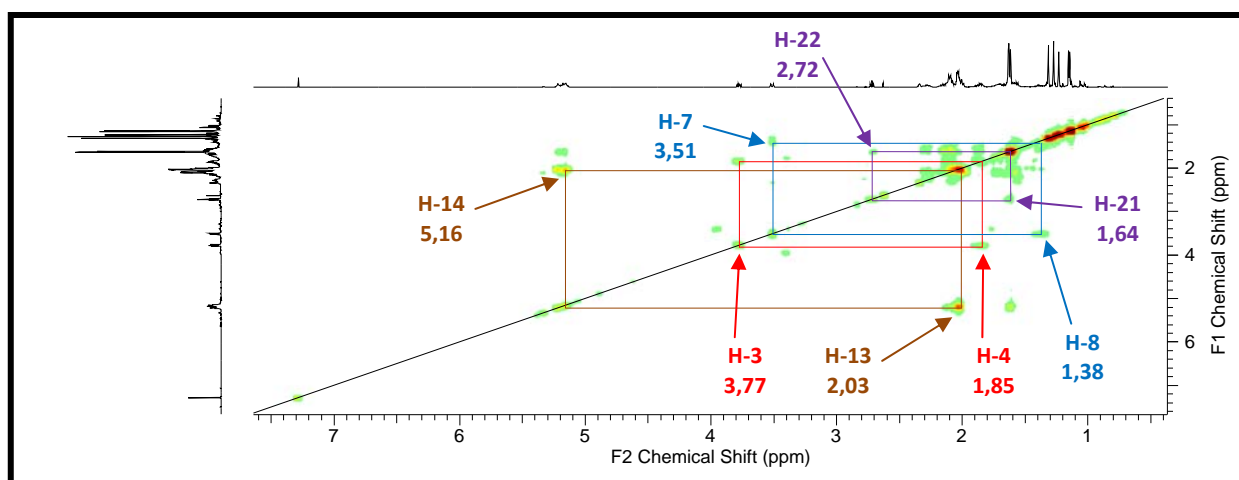
De plus, le couplage des spectres de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 103) ou  $^{13}\text{C}$  et HMQC (Fig. 104) nous permet de distinguer des résonances distinctes d'une fonction époxy à  $\delta_{\text{H/C}}$  2,72/64,2 (oxyméthine, CH-O) et  $\delta_{\text{C}}$  58,3 (carbone quaternaire oxygéné). Des taches de corrélation importantes ont été observées sur le spectre HMBC à  $\delta_{\text{H}}$  1,27/ $\delta_{\text{C}}$  24,9; 64,2 et  $\delta_{\text{H}}$  1,32/ $\delta_{\text{C}}$  18,7; 64,2, indiquant que le groupe époxy est fixé à C-22, C-23. Ceci suggère que la structure de EC10P3431 peut être un précurseur de l'ekeberine D2 (168), un triterpène acyclique isolé pour la première fois de *Ekebergia capensis* (Murata *et al.*, 2008). L'hydrolyse acide ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 10%) de EC10P3431 donne l'ekeberine D2, ce qui est confirmée par comparaison des données spectrales avec celles décrites dans la littérature (Murata *et al.*, 2008) (Tableau XXXVI). Ces informations ont été fortement soutenues par les résultats des spectres COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Fig. 105) et HMBC (schéma 35).



**Figure 103:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine H (EC10P3431, 172)

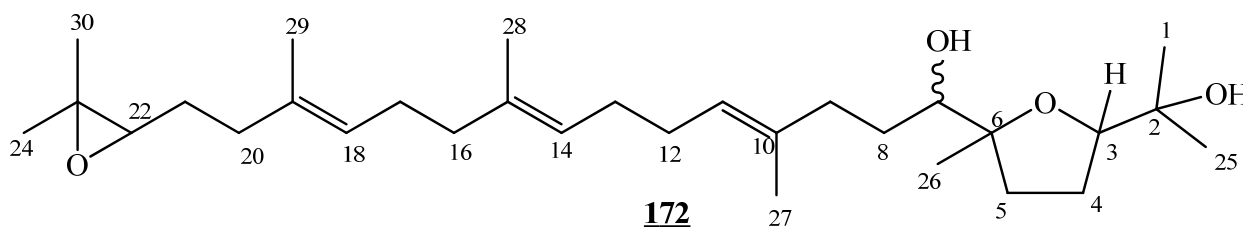


**Figure 104:** Spectre HMQC du sapelenine H (EC10P3431, **172**)



**Figure 105:** Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du sapelenine H (EC10P3431, **172**)

La combinaison de ces données nous a permis d'attribuer à EC10P3431 la structure **172** qui est celle du (4*E*,8*E*,12*E*)-15-(3,3-diméthylloxiran-2-yl)-1-(5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-méthyltetrahydrofuran-2-yl)-4,9,13-triméthylpentadeca-4,8,12-trièn-1-ol. Ce composé est un dérivé nouveau de triterpène acyclique décrit ici pour la première fois et nous lui avons proposé le nom de sapelenine H.



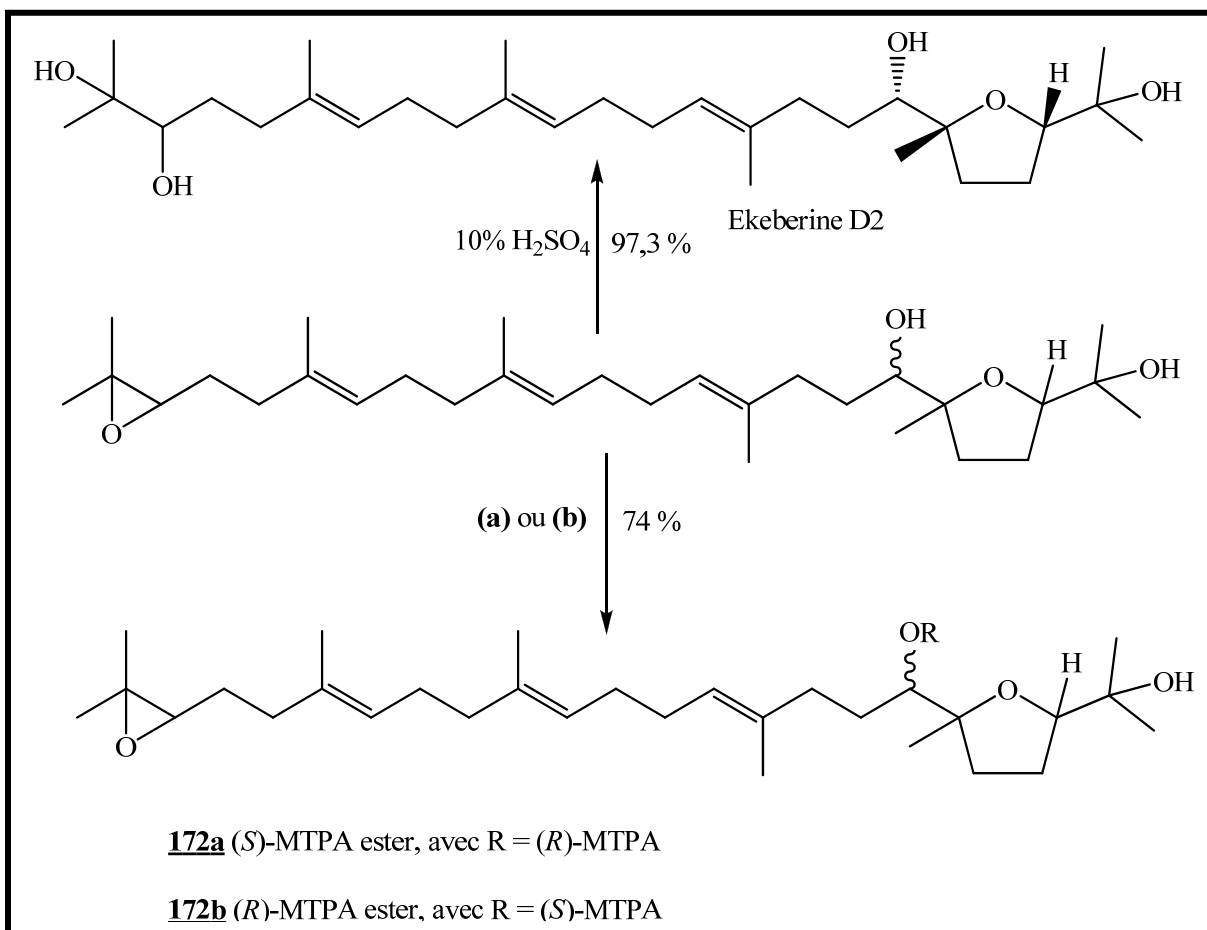
Les déplacements chimiques des protons et des carbones ont été complètement attribués sur la base des spectres de RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , HMBC, HMQC et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

**Tableau XXXVI:** Données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du sapelenine H (EC10P3431, **172**) comparées à celles de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de l'ekeberine D2 (**168**) dans le  $\text{CDCl}_3$  (Murata et *al.*, 2008).

Position	EC10P3431		Ekeberine D2	
	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1,14 (3H, s)	23,9	1,13 (3H, s)	24,0
2	-	70,5	-	70,5
3	3,77 (1H, dd, 5,9; 10,1)	87,6	3,76 (1H, dd, 10,0; 6,0)	87,7
4	1,85 (2H, m)	26,6	1,85 (2H, m)	26,6
5	1,58 (1H, m)	31,4	1,56 (1H, m)	31,5
	2,12 (1H, m)		2,09 (1H, m)	
6	-	86,1	-	86,1
7	3,51 (1H, d, 10,2)	76,2	3,50 (1H, dd, 10,0; 1,5)	76,2
8	1,38 (1H, m)	29,9	1,40 (1H, m)	29,9
	1,58 (1H, m)		1,60 (1H, m)	
9	2,28 (2H, m)	36,6	2,03 (1H, m)	36,6
			2,26 (1H, m)	
10	-	135,0	-	135,0
11	5,22 (1H, <i>ls</i> )	124,7	5,20 (1H, m)	124,9
12	2,10 (2H, m)	28,2	2,03 (2H, m)	28,2
13	2,03 (2H, m)	28,2	2,03 (2H, m)	28,2
14	5,16 (1H, <i>ls</i> )	124,3	5,14 (1H, m)	124,5
15	-	134,9	-	134,9
16	2,00 (2H, m)	39,6	2,03 (1H, m)	40,0
			2,09 (1H, m)	
17	2,10 (2H, m)	26,6	2,09 (2H, m)	26,4
18	5,18 (1H, <i>ls</i> )	124,9	5,20 (1H, m)	125,1
19	-	134,0	-	134,9
20	2,16 (2H, m)	36,3	2,05 (1H, m)	36,8
			2,25 (1H, m)	
21	1,64 (2H, m)	27,5	1,40 (1H, m)	29,7
			1,56 (1H, m)	
22	2,72 (1H, t, 6,2)	64,2	3,34 (1H, dd, 10,5; 2,0)	78,3
23	-	58,3	-	73,0
24	1,32 (3H, s)	24,9	1,15 (3H, s)	23,4
25	1,23 (3H, s)	27,7	1,22 (3H, s)	27,7
26	1,16 (3H, s)	23,8	1,14 (3H, s)	23,8
27	1,63 (3H, s)	16,0	1,60 (3H, <i>ls</i> )	16,0
28	1,62 (3H, s)	16,0	1,60 (3H, <i>ls</i> )	16,0
29	1,63 (3H, s)	16,0	1,62 (3H, <i>ls</i> )	15,9
30	1,27 (3H, s)	18,7	1,20 (3H, s)	26,5

La présence d'un hydroxyle secondaire (alcool secondaire) en C-7 du sapelenine H nous a permis de déterminer sa configuration absolue via la méthode modifiée de Mosher (Ohtani et *al.*, 1991; Lamshöft et *al.*, 2003). Ainsi, les esters de (*R*)- et (*S*)-MTPA du sapelenine H ont été préparés par traitement avec le chlorure de (*R*)- et (*S*)- $\alpha$ -méthoxy- $\alpha$ -trifluorométhylphénylacétyle (MTPA-Cl) dans le diméthylaminopyridine (DMAP) suivi de quelques gouttes de pyridine pour donner respectivement le (*S*) (**172a**) et le (*R*) (**172b**) ester de Mosher.

Les milieux réactionnels ont été soumis à la HPLC préparative pour conduire aux ester de (*S*)-MTPA (**172a**) et (*R*)-MTPA (**172b**) respectivement. Les produits obtenus ont été transférés dans les tubes de RMN et les spectres de RMN  $^1\text{H}$  des esters de Mosher ont été enregistrés.

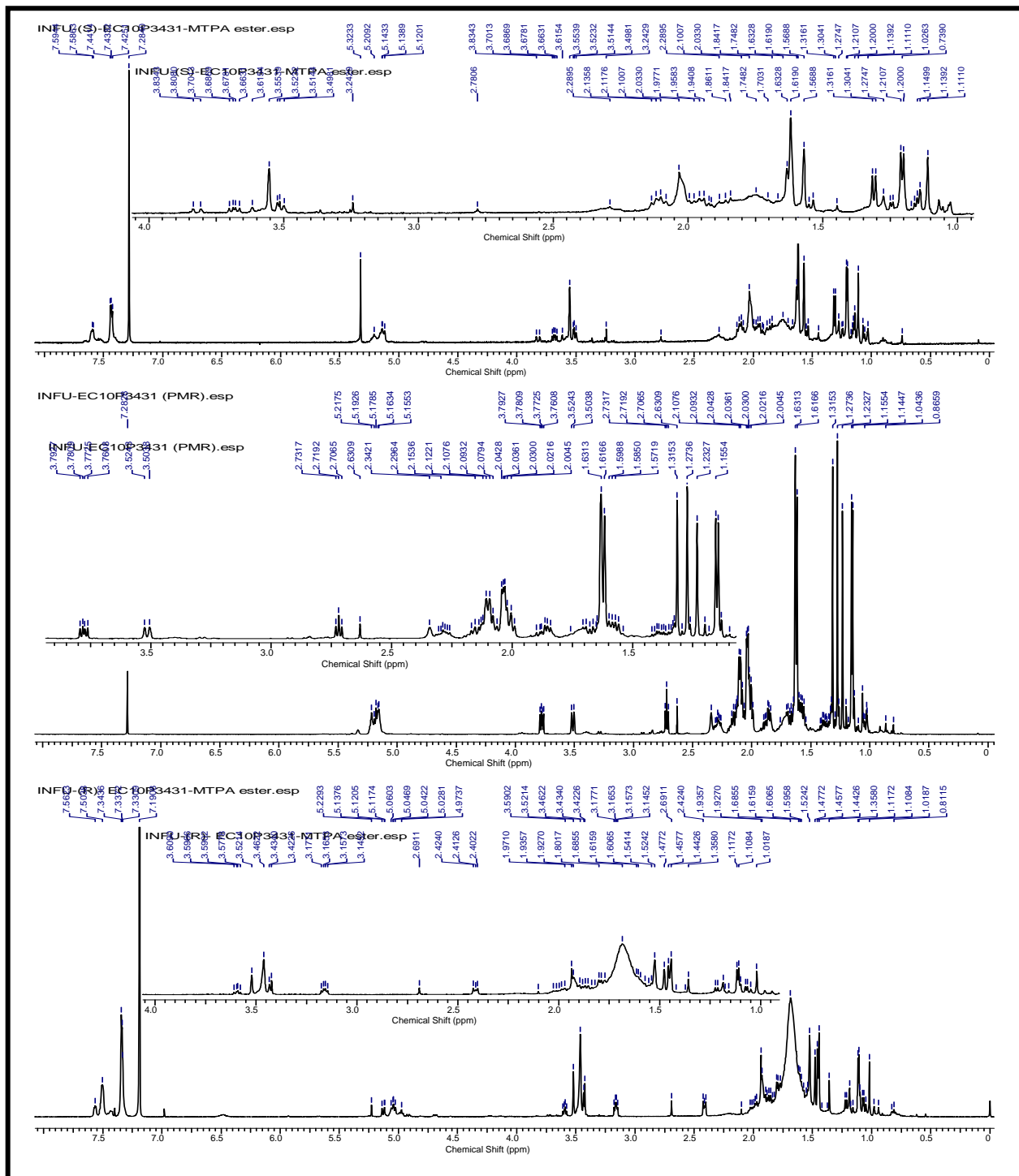


**Schéma 33:** Synthèse des esters de Mosher et hydrolyse acide du sapelenine H

(a): (*R*)-MTPA-Cl, DMAP, à température ambiante, durant une nuit

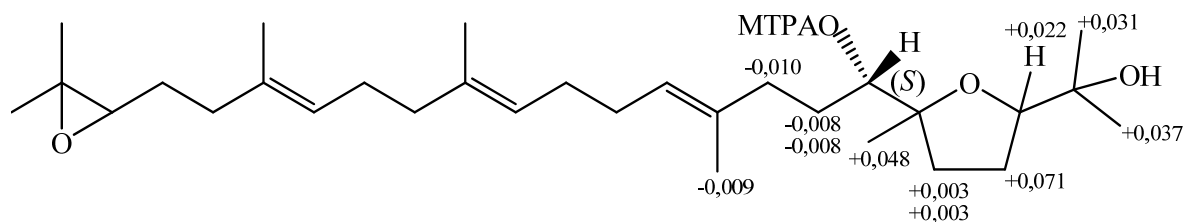
(b): (*S*)-MTPA-Cl, DMAP, à température ambiante, durant une nuit





**Figure 106:** Spectres de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du (*S*)- EC10P3431-MTPA ester (**172a**), de EC10P3431 (**172**) et du (*R*)- EC10P3431-MTPA ester (**172b**).

Les différences significatives des déplacements chimiques entre le (*S*)- et le (*R*)- ester de Mosher [ $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ ] ont été observées pour les protons proches du centre chiral C-7, ce qui nous a permis de positionner les groupements autour dudit carbone et de lire les configurations absolues autour de celui-ci (schéma 34). Ainsi, la configuration absolue autour du carbone C-7 a été déterminée sur la base de la règle de Mosher comme (*S*).

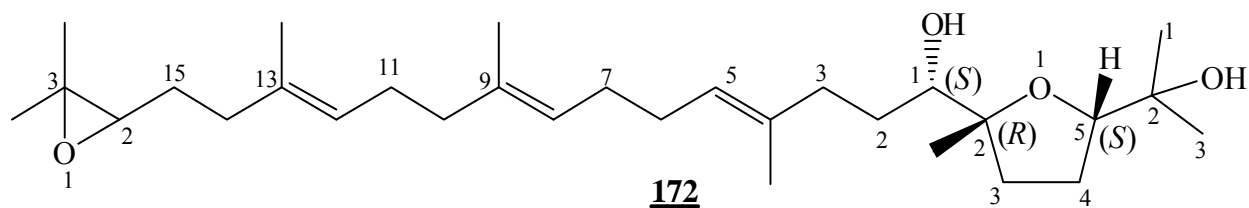


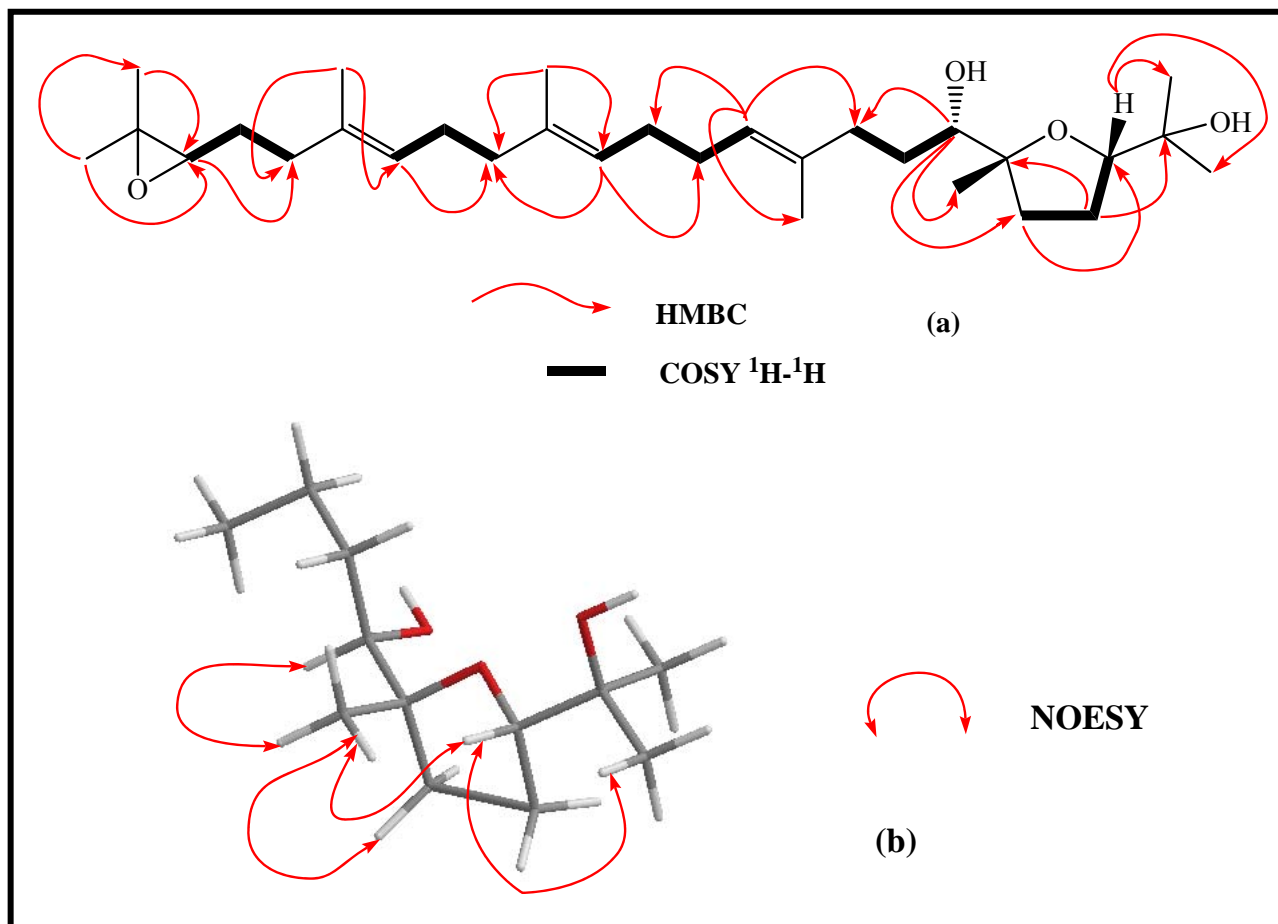
$$\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$$

**Schéma 34:** Valeurs  $\Delta\delta^{S-R}$  obtenues des esters de Mosher du sapelenine H (EC10P3431)

Les configurations absolues des deux autres centres stéréogéniques du fragment tétrahydrofurane du sapelenine H à savoir C-3 et C-6, ont été déduites et déterminées comme 3*S* et 6*R* respectivement, ceci sur la base de son spectre NOESY. En effet, des corrélations NOE importantes ont été observées entre H-3, CH<sub>3</sub>-6 et H-7. La configuration absolue du carbone C-22 n'a pas été déterminée.

Il ressort alors de ce qui précède que le sapelenine H est le (1*S*,4*E*,8*E*,12*E*)-15-(3,3-diméthylloxiran-2-yl)-1-((2*R*,5*S*)-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-méthyltétrahydrofuran-2-yl)-4,9,13-triméthylpentadeca-4,8,12-trièn-1-ol.





**Schéma 35:** (a) Quelques corrélations importantes observées sur les spectres HMBC, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du sapelenine H (EC10P3431, **172**)

(b) Corrélations NOE de la portion tétrahydrofurane observées sur le spectre NOESY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du sapelenine H (EC10P3431, **172**).

---

### II.1.3- Conclusion partielle

L'étude des constituants chimiques que nous avons entreprise sur les écorces des troncs de *P. callicarpoides* et de *E. cylindricum* a conduit à l'isolement de 26 composés. Les structures de ces composés ont été élucidées grâce aux différentes techniques spectroscopiques (UV, IR, SM, RMN 1D et 2D) et parfois par comparaison avec des échantillons authentiques disponibles au laboratoire. Il s'agit de quatre triterpènes nouveaux décrits ici pour la première fois et d'un alcaloïde isolé pour la première fois d'une source naturelle: Sapelenine G, H, I et J et 7-Epi-javaniside. Les 21 autres sont des composés connus et en dehors de la scopolétine, des sapelenines A, B, C, et D, du mélange de  $\beta$ -sitostérol et de stigmastérol ainsi le mélange 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol et 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmastérol, tous les autres composés à savoir: Javaniside, Acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque, Hymexelsine, 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine, 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine, (+)-Catéchine, Epicatéchine, Sweroside, Andiolide G, Hexopyranosylhexopyranose, (14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracos-14,18,22-triène-2,3,6,7,10,11-hexaol et Ekeberine D<sub>2</sub> ont cependant été isolés de ces plantes pour la première fois.

---

## II.2- TRANSFORMATIONS CHIMIQUES SUR QUELQUES COMPOSES ISOLES

### II.2.1- Introduction

L'élucidation des structures des composés isolés de *Pauridiantha callicarpoides* et de *Entandrophragma cylindricum* a été faite et certaines structures se sont révélées intéressantes de par leurs structures et les groupements fonctionnels qui y sont attachés. Nous avons ainsi jugé nécessaire d'effectuer les transformations chimiques sur ceux isolés en quantité suffisante. Il s'agit de la coumarine PC-4 et des trois triterpènes acycliques EC10P3431, EC30P181 et EC30P182. Les réactions effectuées sont diverses. Alors que les réactions d'hydrolyse et d'acétylation permettent de confirmer les structures de certains composés isolés, la réaction d'estérification quant à elle a servi de déterminer des configurations absolues de certains centres asymétriques. A part l'hymexelsine, une coumarine glycosylée, ces réactions ont été faites essentiellement sur les triterpènes acycliques isolés tous de *E. cylindricum*.

### II.2.2- Réactions d'hydrolyse

Les réactions d'hydrolyse acide ont été effectuées sur deux composés à savoir l'hymexelsine (**159**) isolée de *P. callicarpoides* et le sapelenine H (**172**) isolé de *E. cylindricum*.

#### II.2.2.1- Hydrolyse acide de l'hymexelsine (PC-4, **159**)

Nous avons effectué l'hydrolyse de PC-4 en présence de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %. La réaction s'est effectuée à reflux pendant environ 3h30 min. Après refroidissement, le milieu réactionnel a été ensuite extrait à l'acétate d'éthyle pour conduire après évaporation du solvant aux cristaux jaunes indexés PHPC-4. Les spectres de masse (Fig. 107) et de RMN du <sup>1</sup>H de PHPC-4 sont identiques à ceux de PC-1.

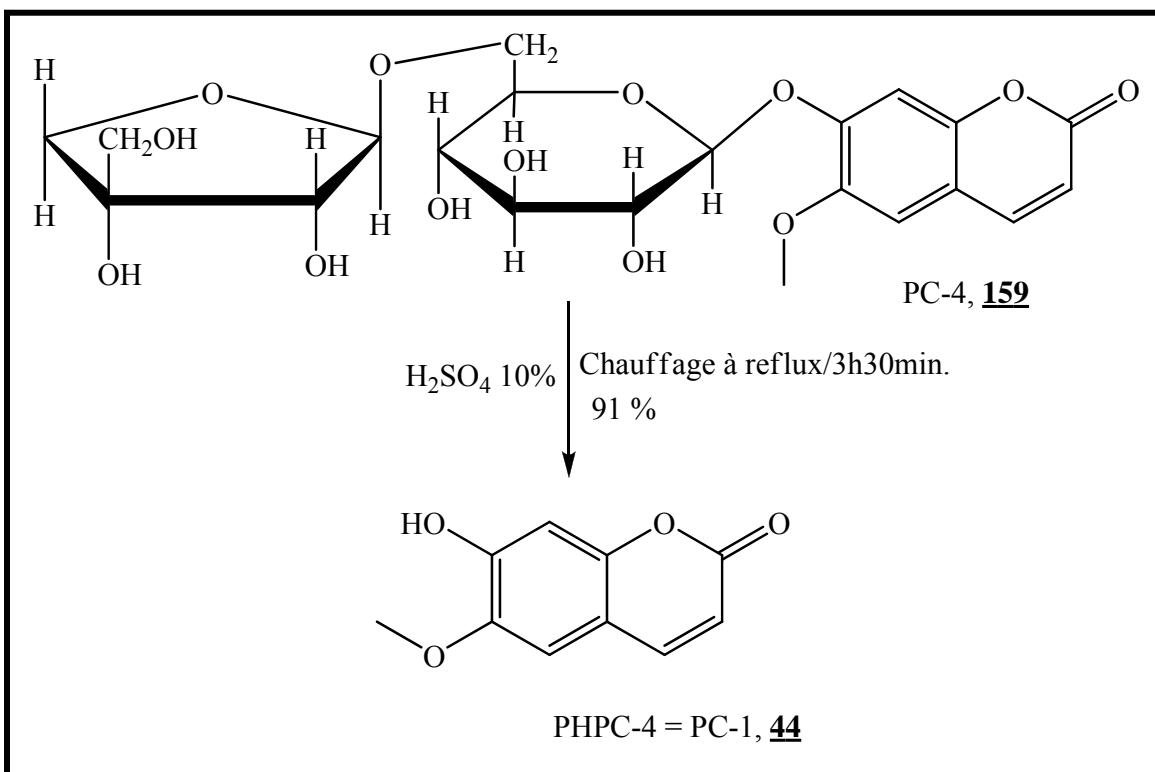


Schéma 36: Hydrolyse de l'hymexelsine (PC-4, **159**)

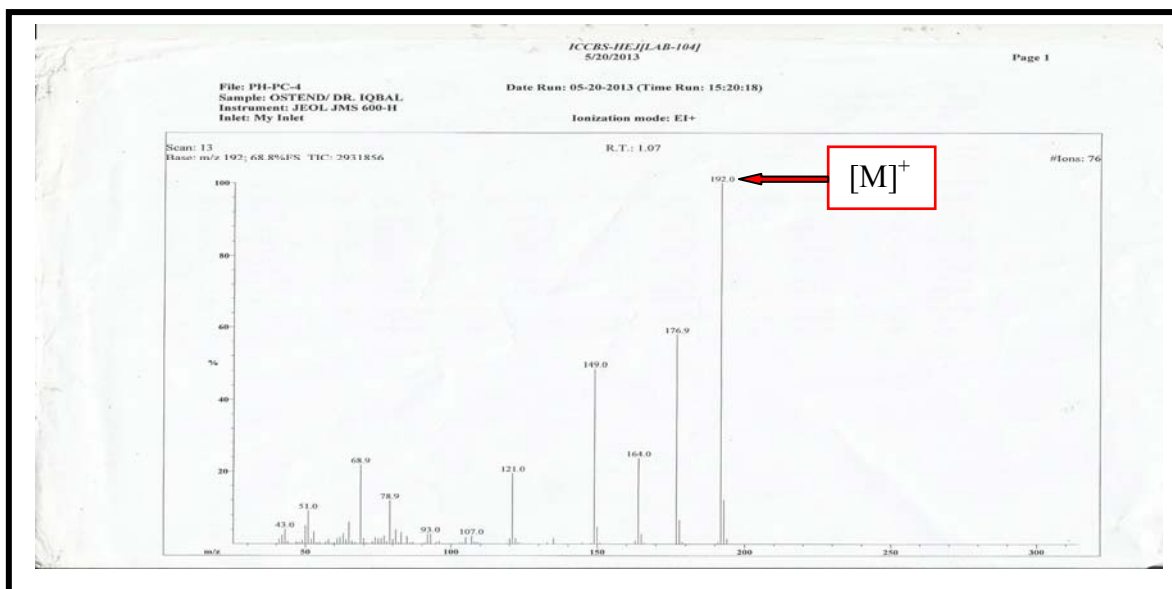


Figure 107: Spectre de masse EI de PHPC-4 (scopolétine, **44**, PHPC-4 = PC-1)

## II.2.2.2- Hydrolyse du sapelenine H (EC10P3431, 172)

La réaction d'hydrolyse a été effectuée sur le sapelenine H en présence de l'acide sulfurique 10%. La réaction a été effectuée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 10 h. Le milieu réactionnel a été ensuite extrait avec du dichlorométhane et après évaporation du solvant, l'extrait obtenu a été soumis à une HPLC préparative pour conduire à l'ekeberine D2.

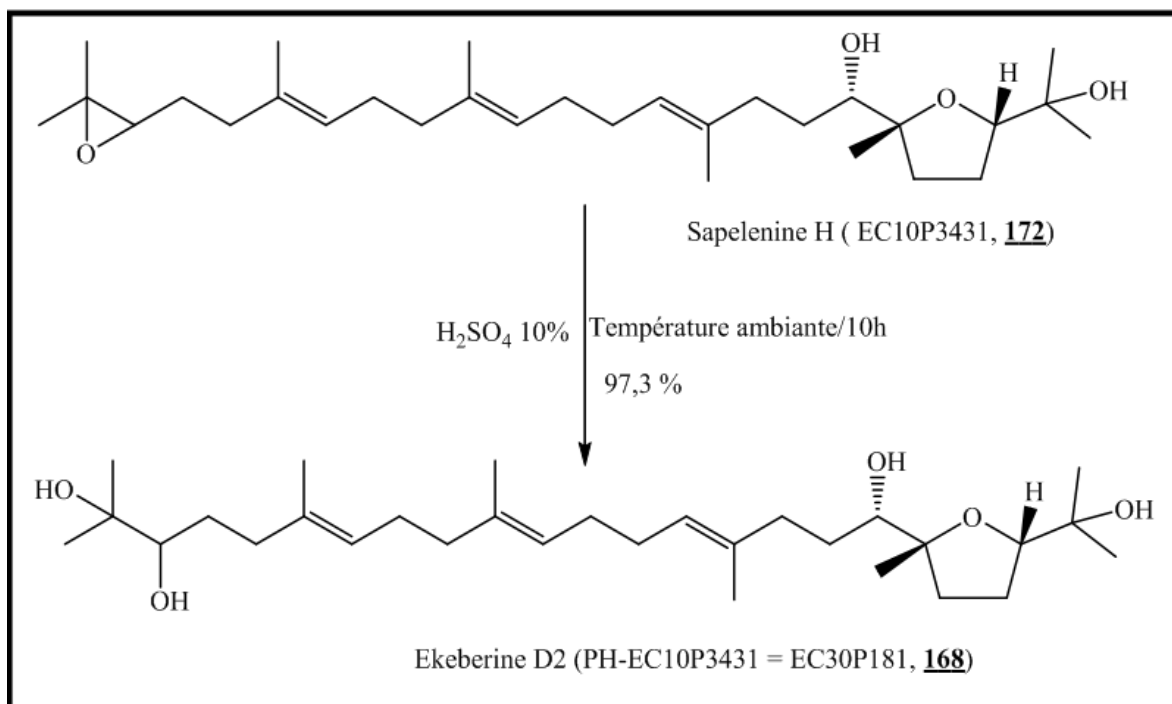


Schéma 37: Hydrolyse du sapelenine H (EC10P3431, 172)

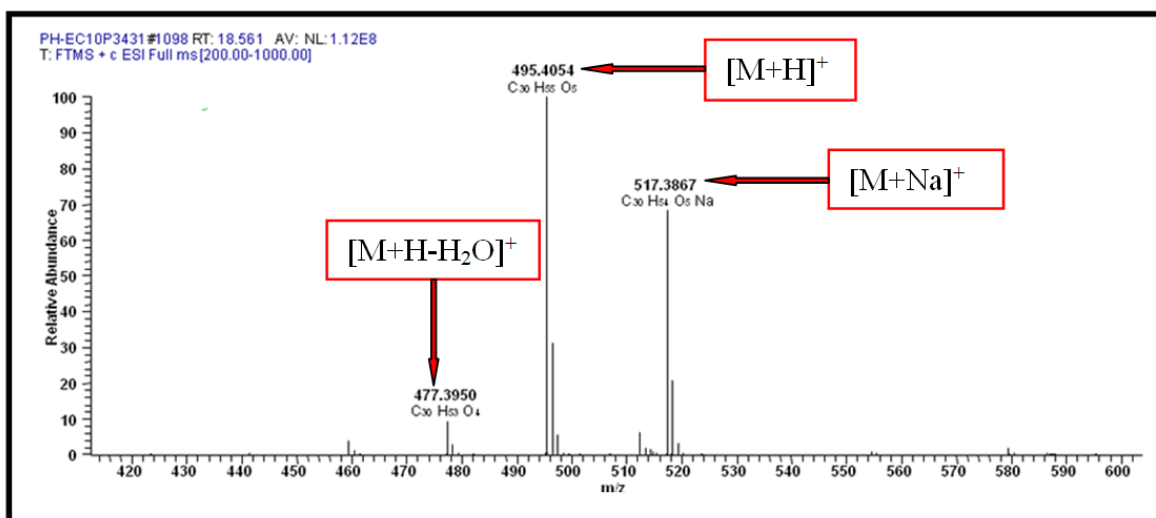
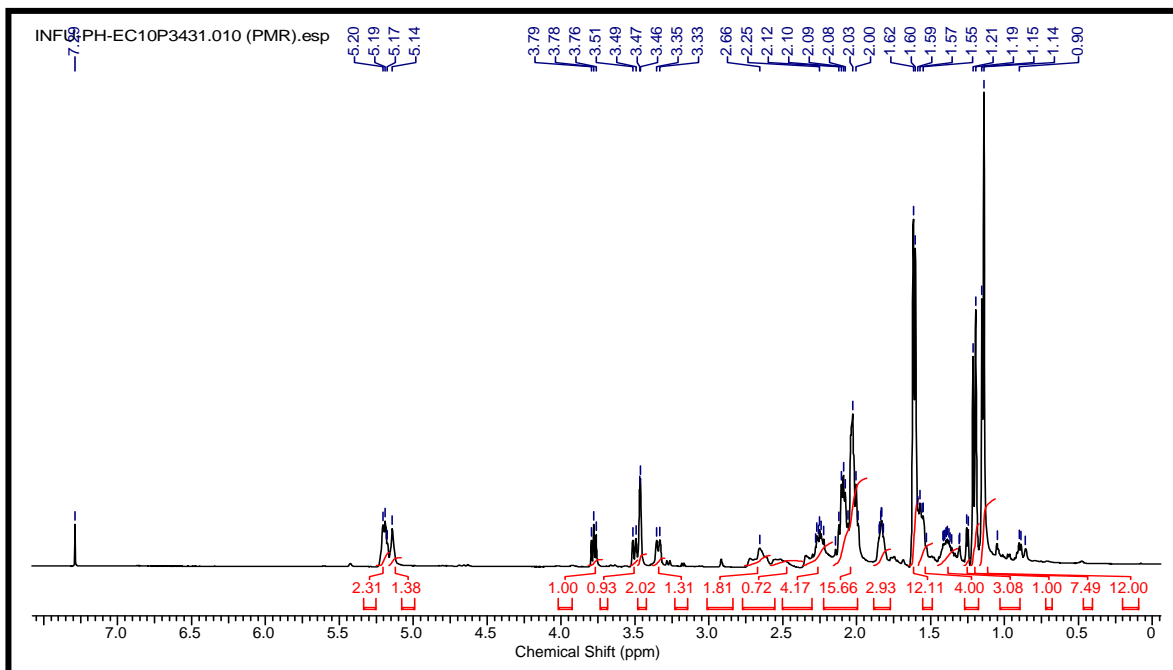


Figure 108: Spectre de masse ESI du PH-EC10P3431.



**Figure 109:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du PH-EC10P3431.

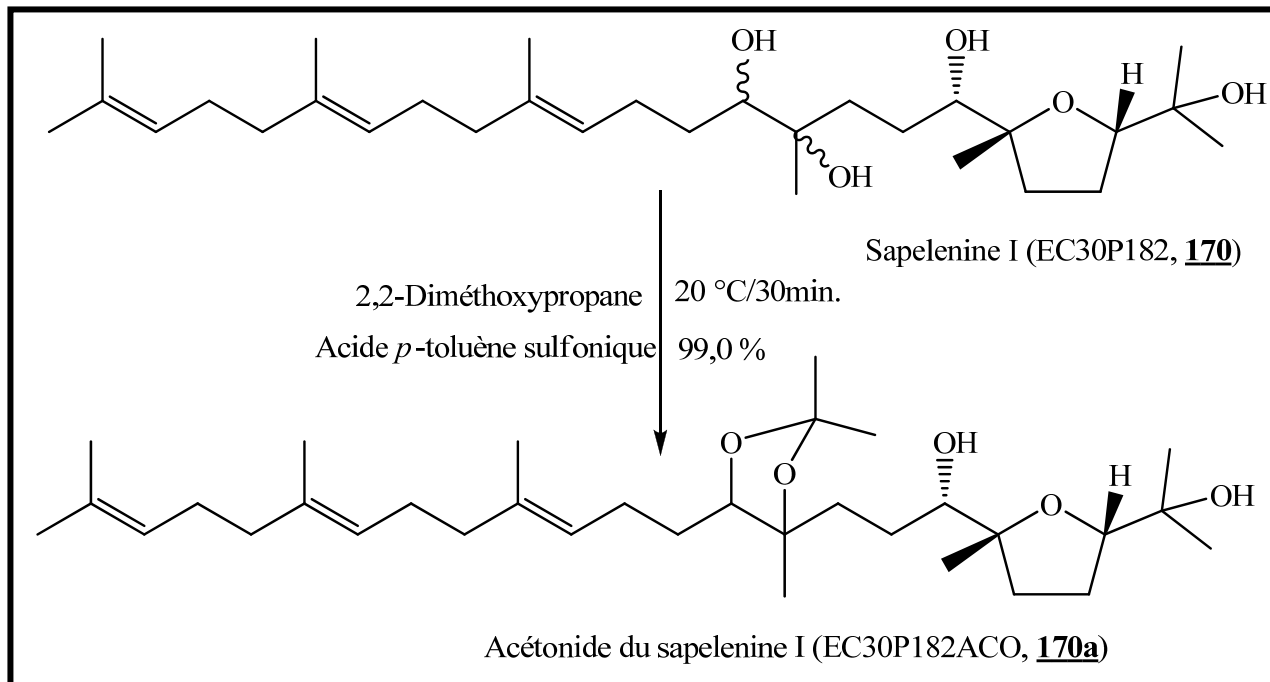
### II.2.3- Réactions d'acétonidation

Les réactions d'acétonidation ont été effectuées dans le but de protéger les deux fonctions hydroxyles fixées sur deux carbones consécutifs afin de déterminer la configuration absolue du carbone de l'hydroxyméthine par la méthode modifiée de Mosher.

#### II.2.3.1- Acétonidation du sapelenine I (EC30P182, **170**)

Nous avons fait réagir sur EC30P182, le 2,2-diméthoxypropane et l'acide *p*-toluène sulfonique. La réaction a été arrêtée avec de l'eau et le milieu réactionnel a été extrait avec de l'hexane puis lavé avec du  $\text{NaHCO}_3$  et séché avec du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Après évaporation du solvant, l'extrait est soumis à une HPLC préparative pour conduire à une huile incolore qui est l'acétonide de EC30P182 (**170a**).





**Schéma 38:** Acétonidation du sapelenine I (EC30P182, **170**)

Le spectre de masse HR-ESI de EC30P182ACO (Fig. 110), présente le pic de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  557,4164 (calculée pour  $C_{33}H_{58}O_5Na$ : 557,4176), compatible avec la formule brute  $C_{33}H_{58}O_5$  renfermant cinq insaturations. Il y a donc une insaturation supplémentaire par rapport au substrat qui est le sapelenine I (EC30P182, **170**). Celle-ci proviendrait du greffage de l'acétal (2,2-diméthoxypropane) en positions C-10-C11 avec formation d'un cycle à 5 atomes.

Son spectre de RMN  $^1H$  (Fig. 111) montre les signaux de deux méthyles supplémentaires à  $\delta_H$  1,27 (3H, s) et 1,33 (3H, s) attribuables aux méthyles du groupement acétal. Ceci est confirmé sur le spectre de RMN  $^{13}C$  où on observe 3 signaux de carbone en plus avec celui du carbone doublement oxygéné à  $\delta_C$  105,5 ppm.

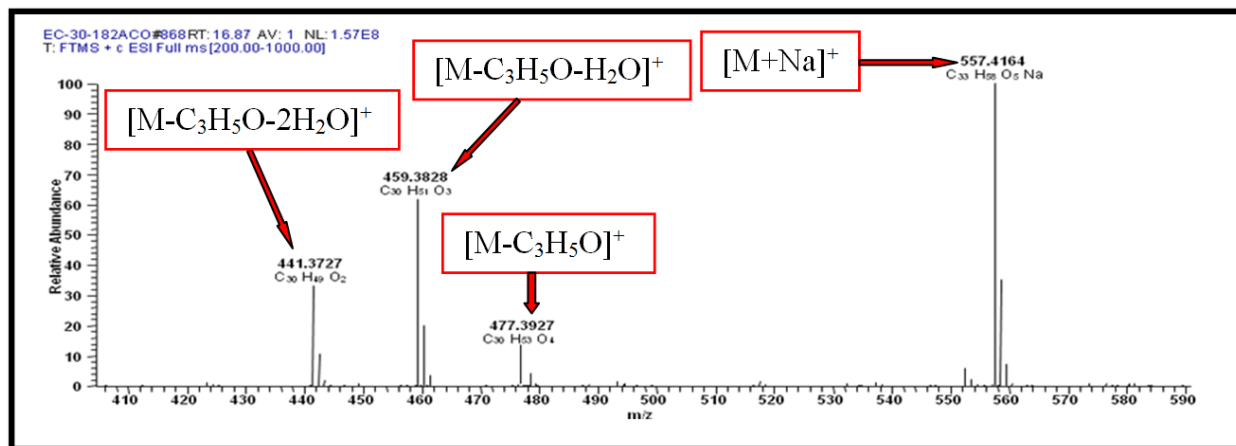


Figure 110: Spectre de masse ESI de EC30P182ACO (**170a**)

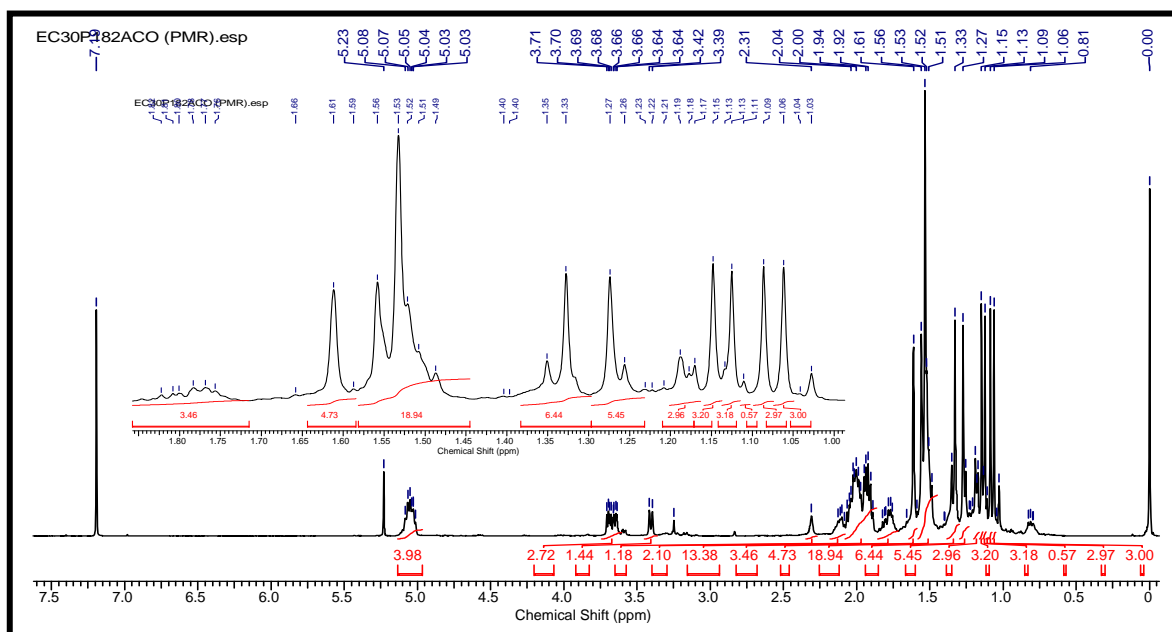
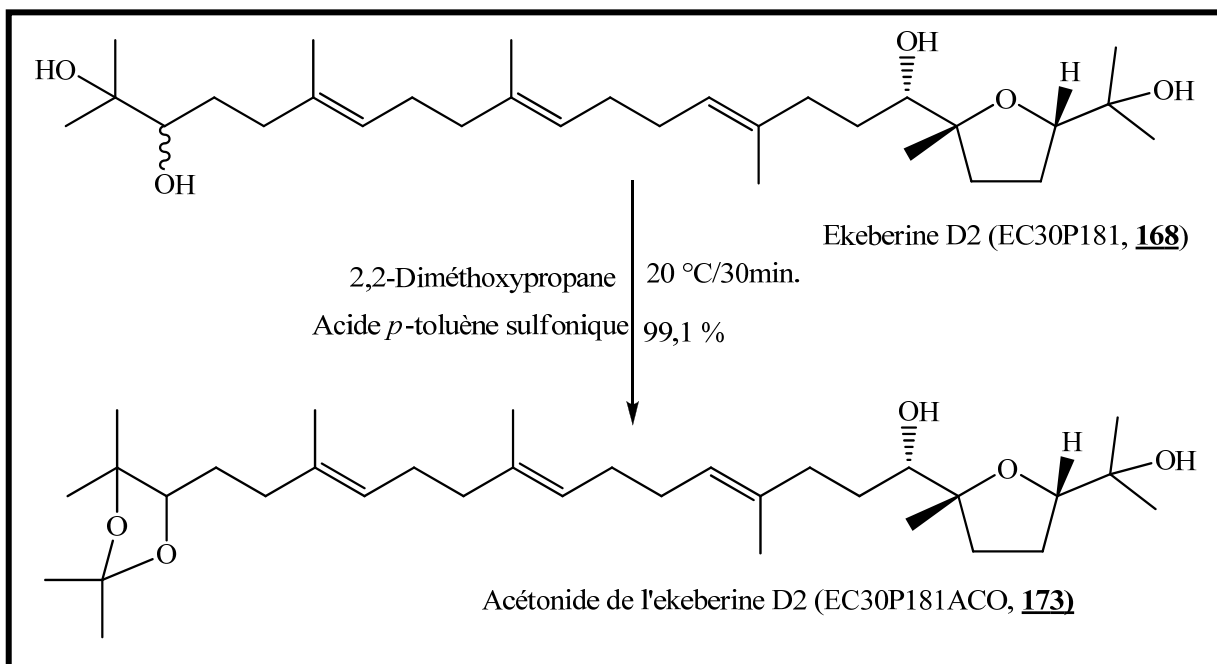


Figure 111: Spectre de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de EC30P182ACO (**170a**)

### II.2.3.2- Acétonidation de l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**)

Tout comme le sapelenine I, l'ekeberine D2 possédant deux groupes hydroxyles portés par des carbones consécutivement liés (C-22-C-23), une réaction d'acétonidation similaire à la précédente a été également effectuée sur l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**) pour conduire à la formation du groupement acétal correspondant.



**Schéma 39:** Acétonidation de l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**)

Le spectre de masse HR-ESI de EC30P181ACO (Fig. 112), présente le pic de l'ion pseudomoléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  557,4177 (calculée pour  $C_{33}H_{58}O_5Na$ : 557,4176), compatible avec la formule brute  $C_{33}H_{58}O_5$  renfermant cinq insaturations. Il y a donc une insaturation supplémentaire par rapport au substrat qui est l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**). Celle-ci proviendrait du greffage du groupement acétal (2,2-diméthoxypropane) en positions C-22-C23 avec formation d'un cycle à 5 atomes.

Son spectre de RMN  $^1H$  (Fig. 113) montre les signaux de deux méthyles supplémentaires à  $\delta_H$  1,34 (3H, s) et 1,44 (3H, s) attribuables aux méthyles du groupement acétal. Ceci est confirmé sur le spectre de RMN  $^{13}C$  où on observe 3 signaux de carbone en plus à  $\delta_C$  26,7 et 26,9 ppm avec celui du carbone doublement oxygéné à  $\delta_C$  106,4 ppm.

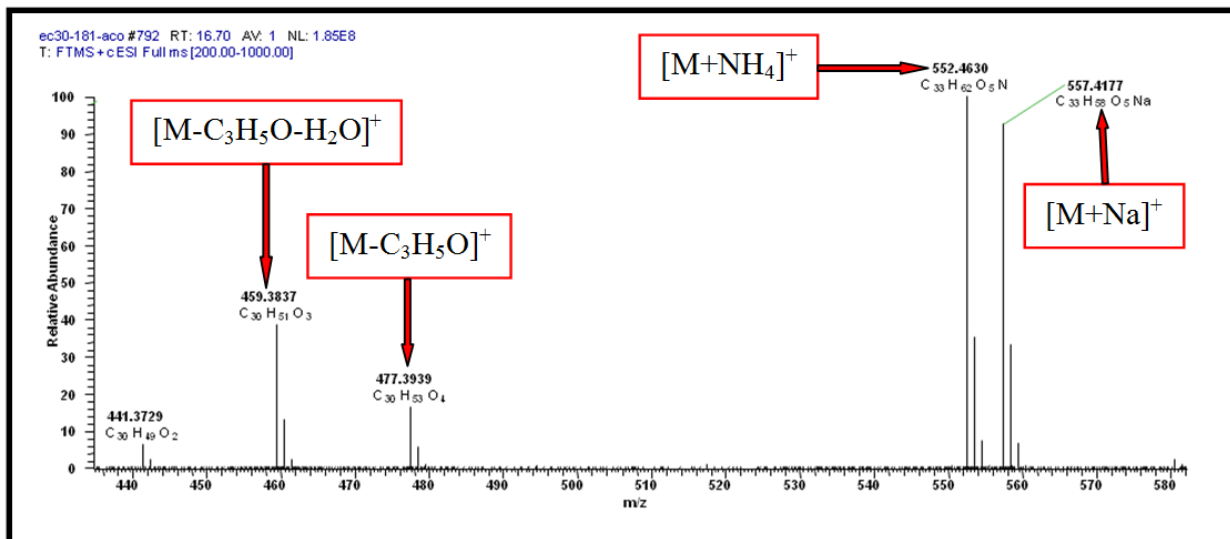


Figure 112: Spectre de masse ESI de EC30P181ACO (**173**)

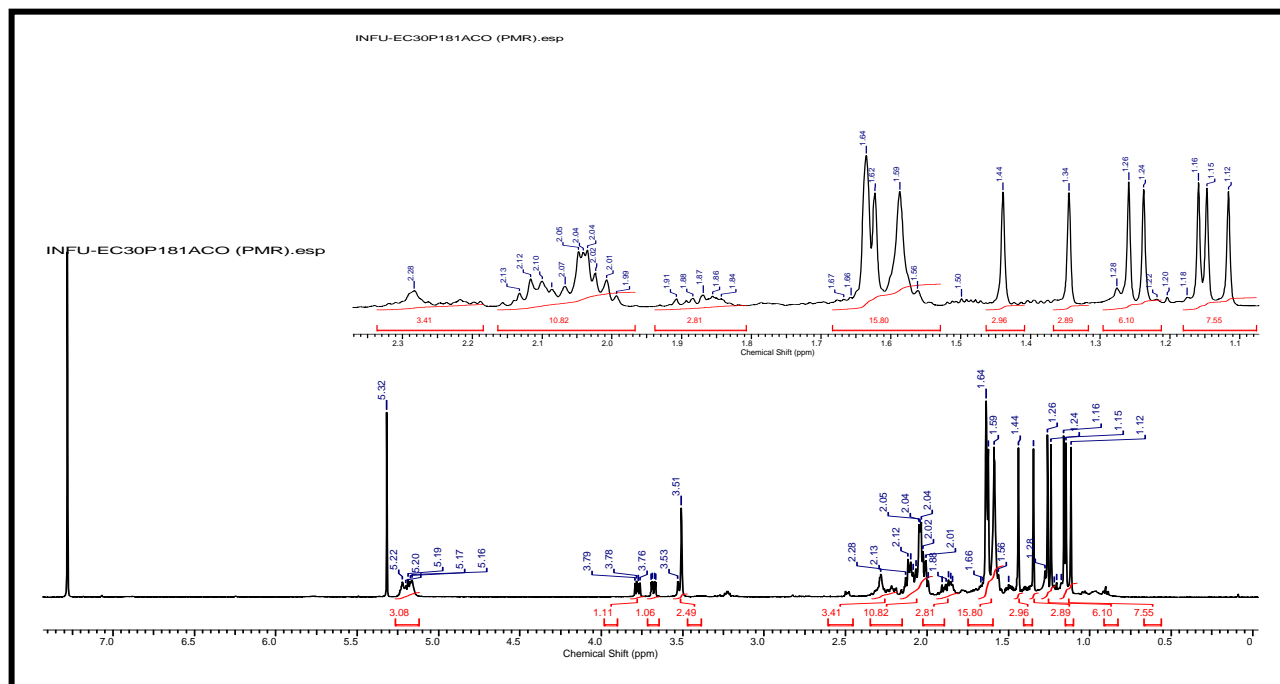


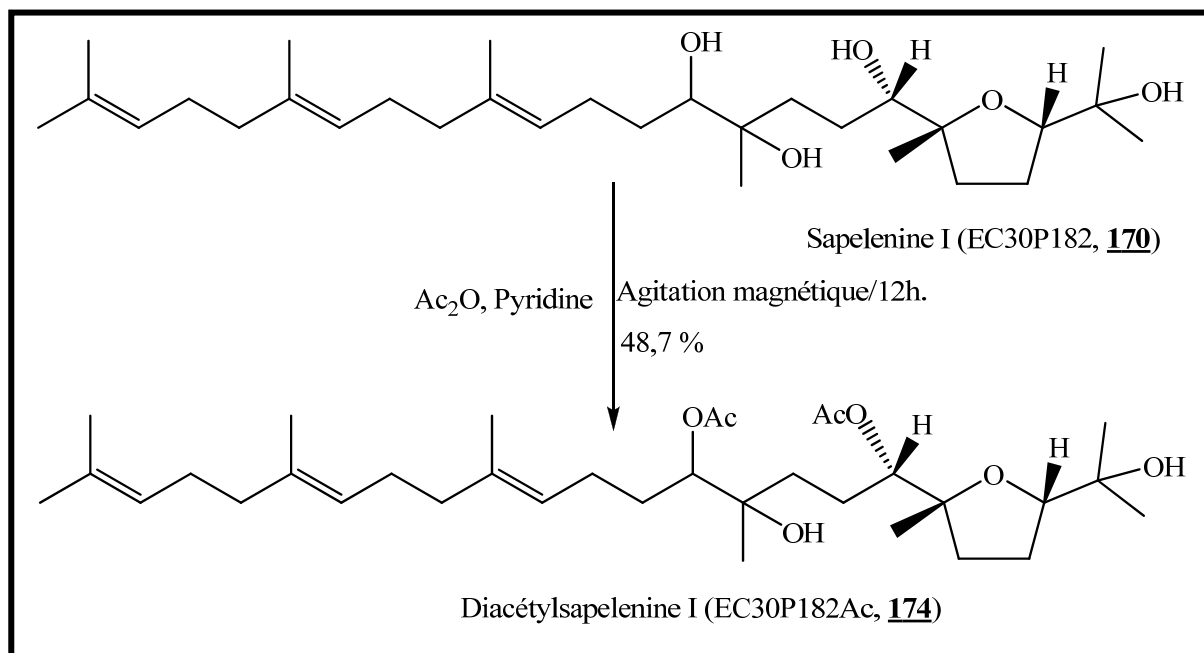
Figure 113: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC30P181ACO (**173**)

## II.2.4- Réactions d'estérification

Les réactions d'estérification effectuées ici nous ont conduit à la détermination des configurations de quelques centres stéréochimiques.

#### II.2.4.1- Acétylation du sapelenine I (EC30P182, **170**)

Au sapelenine I (EC30P182, **170**), nous avons ajouté de la pyridine anhydre et de l'anhydride acétique, puis le mélange réactionnel a été soumis à une agitation magnétique pendant 12h. Après traitement du milieu réactionnel, l'extrait obtenu a été soumis à une HPLC préparative pour conduire au diacétylsapelenine I (EC30P182Ac, **174**) de couleur incolore.



**Schéma 40:** Acétylation du sapelenine I (EC30P182, **170**)

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 114) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire à  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z$  601,4073 (calculée pour  $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_7\text{Na}$ : 601,4075), compatible avec la formule brute  $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_7$  renfermant six insaturations. Les deux insaturations en plus proviendraient probablement de deux groupements acétyles, ce qui se confirme par une différence de masse de 84 unités entre les deux composés correspondant à deux fragments acétyles. Cette information est corroborée sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 115) où on observe outre les signaux du sapelenine I, deux signaux de méthyles acétyliques à  $\delta_{\text{H}}$  2,09 (3H, s) et 2,12 (3H, s).

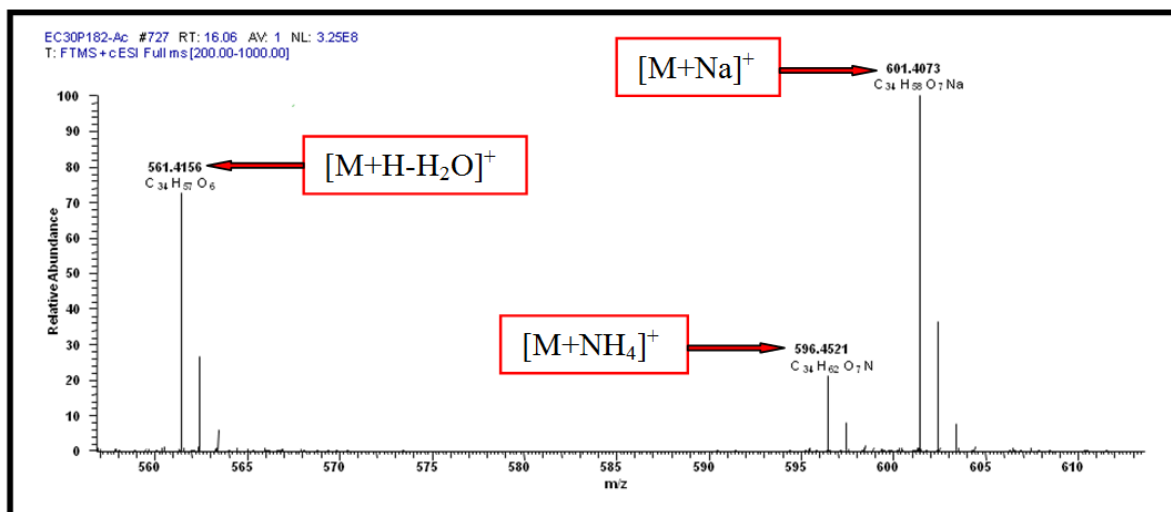


Figure 114: Spectre de masse ESI de EC30P182Ac (**174**)

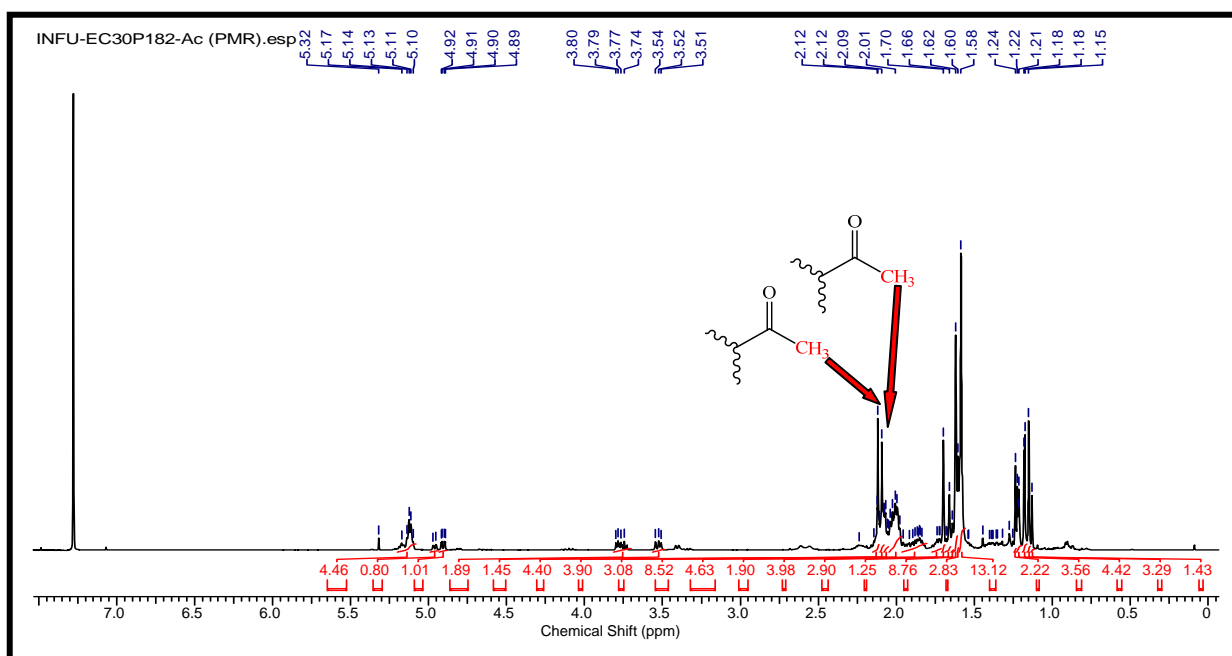
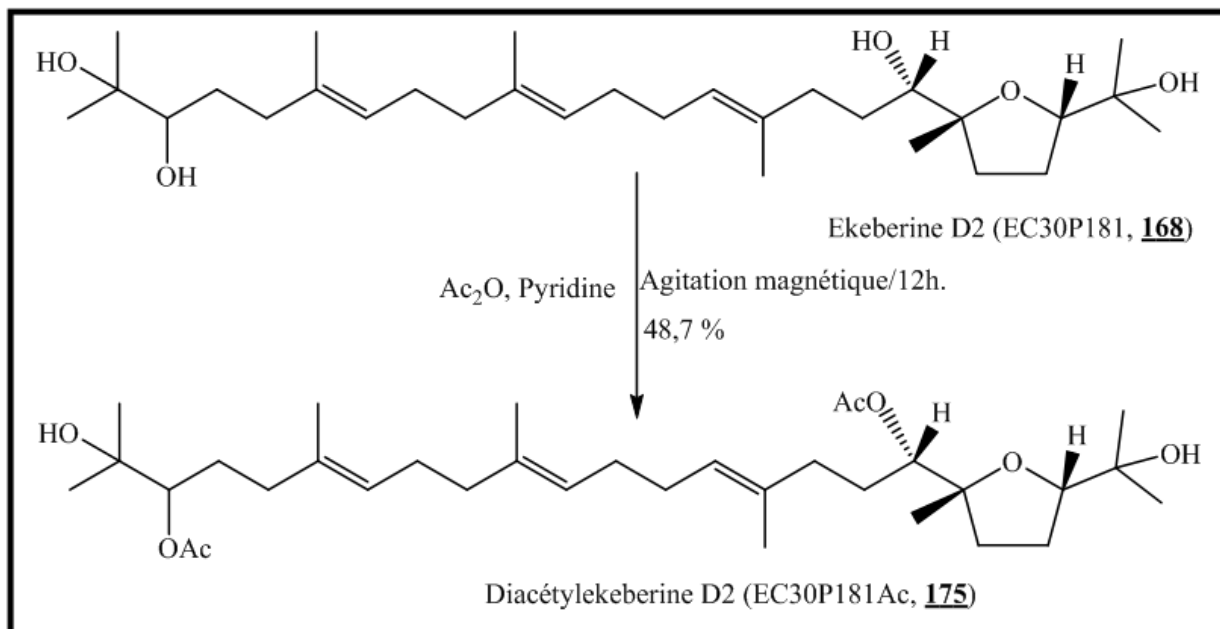


Figure 115: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC30P182Ac (**174**)

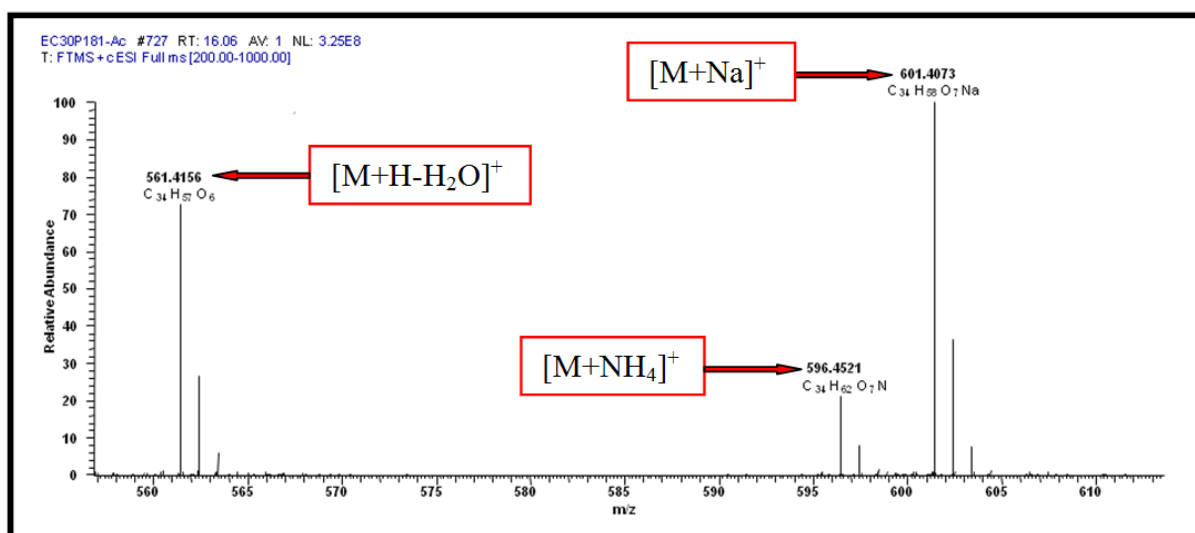
#### II.2.4.2- Acétylation de l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**)

Une même réaction que la précédente a été effectuée sur l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**) pour conduire au diacétylekeberine D2 (EC30P181Ac, **175**) comme huile incolore majoritaire.

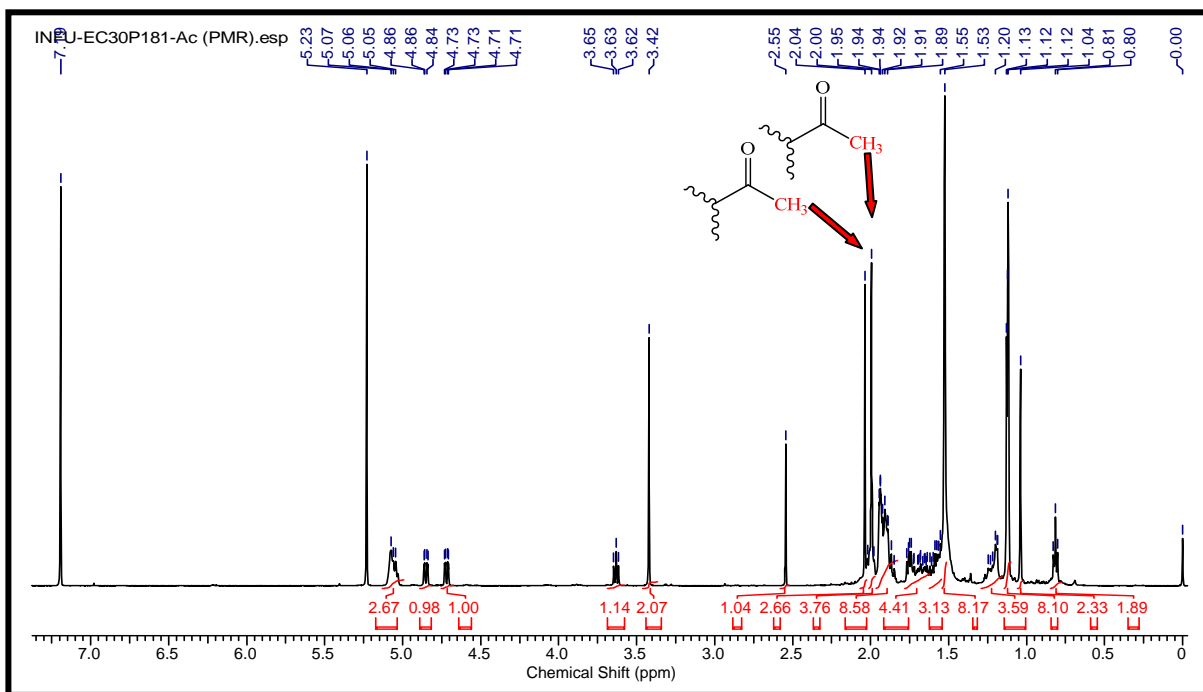


**Schéma 41:** Acétylation de l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**)

Le spectre de masse HR-ESI (Fig. 116) de EC30P181Ac est identique à celui de EC30P182Ac (Fig. 114), ce qui nous permet de conclure que EC30P181Ac est bien le produit diacétylé de l'ekeberine D2. Cette information est soutenue par le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 117) où on observe en plus des signaux de l'ekeberine D2, deux signaux de méthyles acétyliques à  $\delta_{\text{H}}$  2,00 (3H, s) et 2,04 (3H, s).



**Figure 116:** Spectre de masse ESI de EC30P181Ac (**175**)

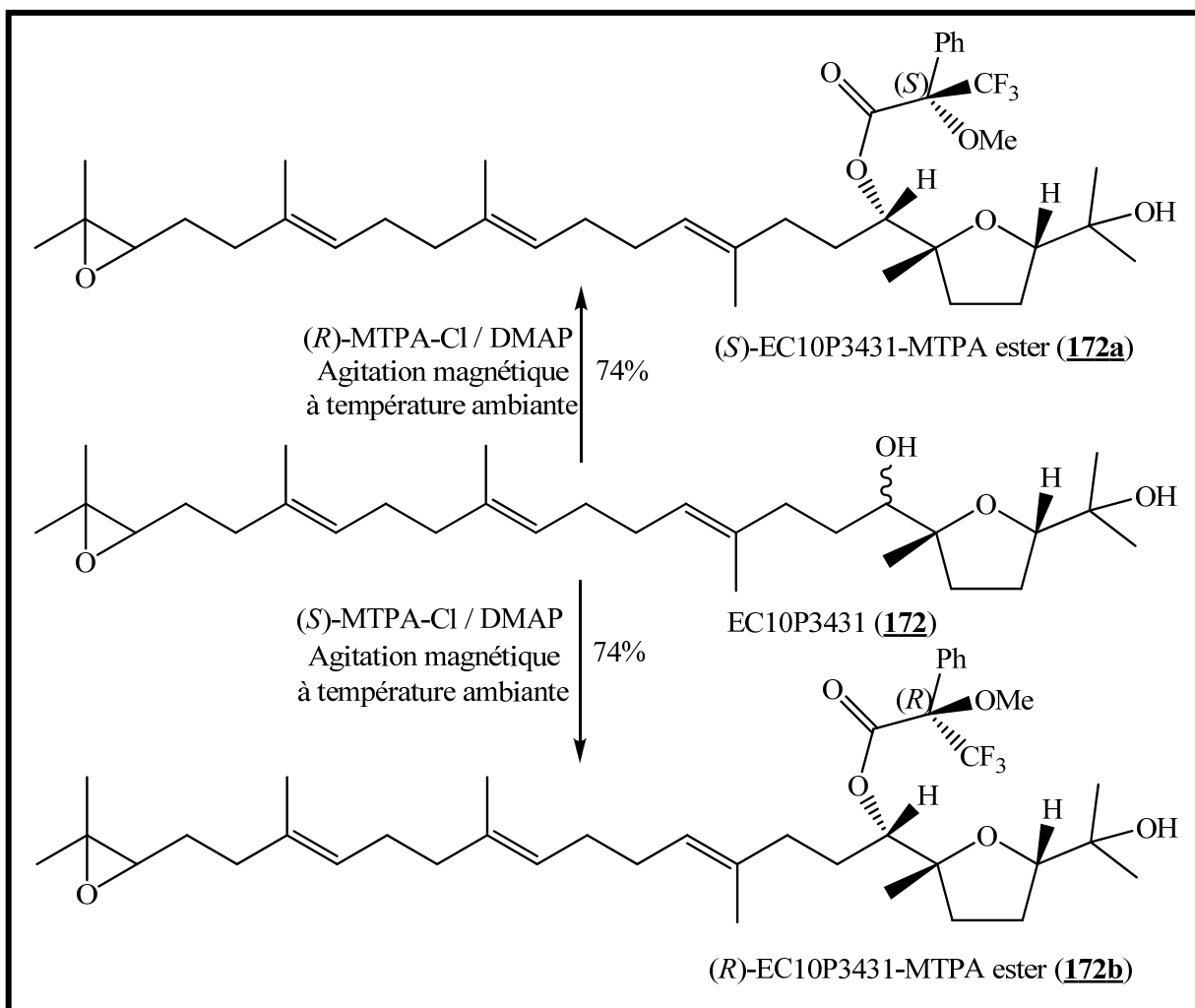


**Figure 117:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EC30P181Ac (**175**)

### II.2.4.3- Estérification du sapelenine H (EC10P3431, **172**) avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-acide de Mosher.

L'estérification du sapelenine H avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-acide de Mosher a été faite dans le but de déterminer la configuration absolue du carbone C-7. Pour cela, deux portions du sapelenine H ont été traitées avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-MTPA dans le DMAP et avec agitation magnétique à température ambiante durant une nuit. Les deux réactions ont été effectuées en parallèle et leurs progressions étaient suivies par la HPLC analytique. Après consommation totale du sapelenine H, le solvant a été évaporé et le mélange réactionnel soumis à une HPLC préparative. Nous avons ainsi obtenu le (*S*) et le (*R*)-MTPA ester respectivement.





**Schéma 42:** Estérification avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-MTPA du sapelenine H (EC10P3431, **172**).

Son spectre de masse HR-ESI (Fig. 118) présente le pic de l'ion pseudomoléculaire à  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  715,4171 (calculée pour  $C_{40}H_{59}O_6F_3Na$ : 715,4156), compatible avec la formule brute  $C_{40}H_{59}O_6F_3$  renfermant dix insaturations. Les cinq insaturations supplémentaires proviendraient du fragment de l'acide de Mosher qui possède un noyau aromatique et un carbonyle. La différence de masse de 216 unités entre EC10P3431-MTPA-ester et EC10P3431 confirme la présence de ce fragment.

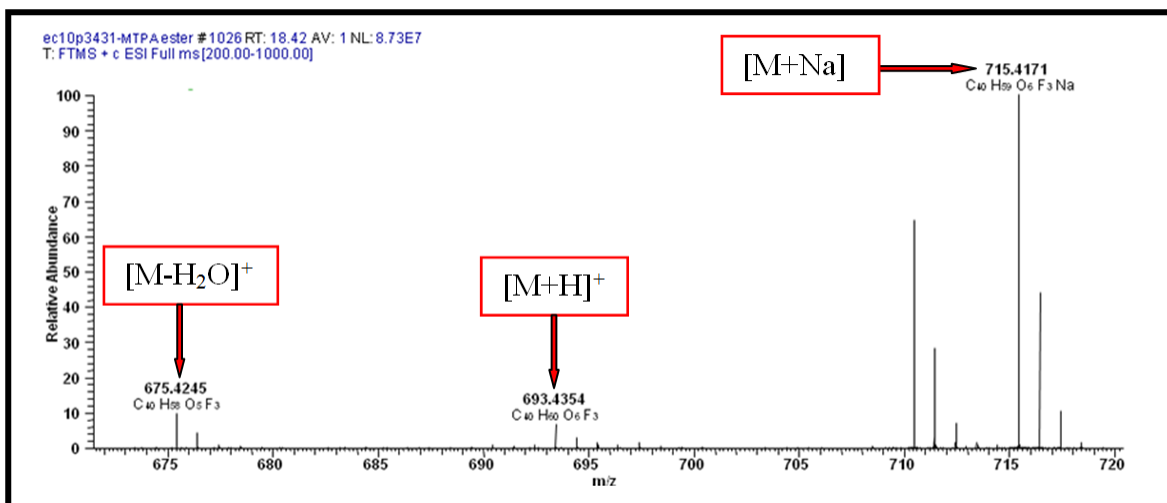


Figure 118: Spectre de masse ESI de EC10P3431-MTPA ester (**172a** et **172b**)

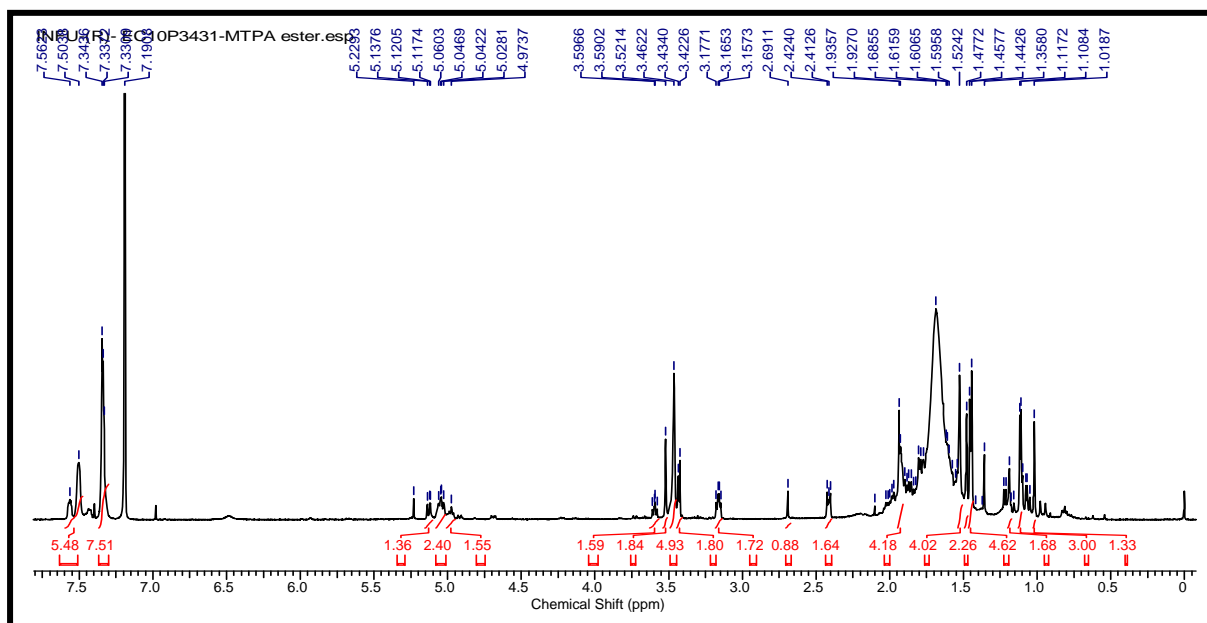
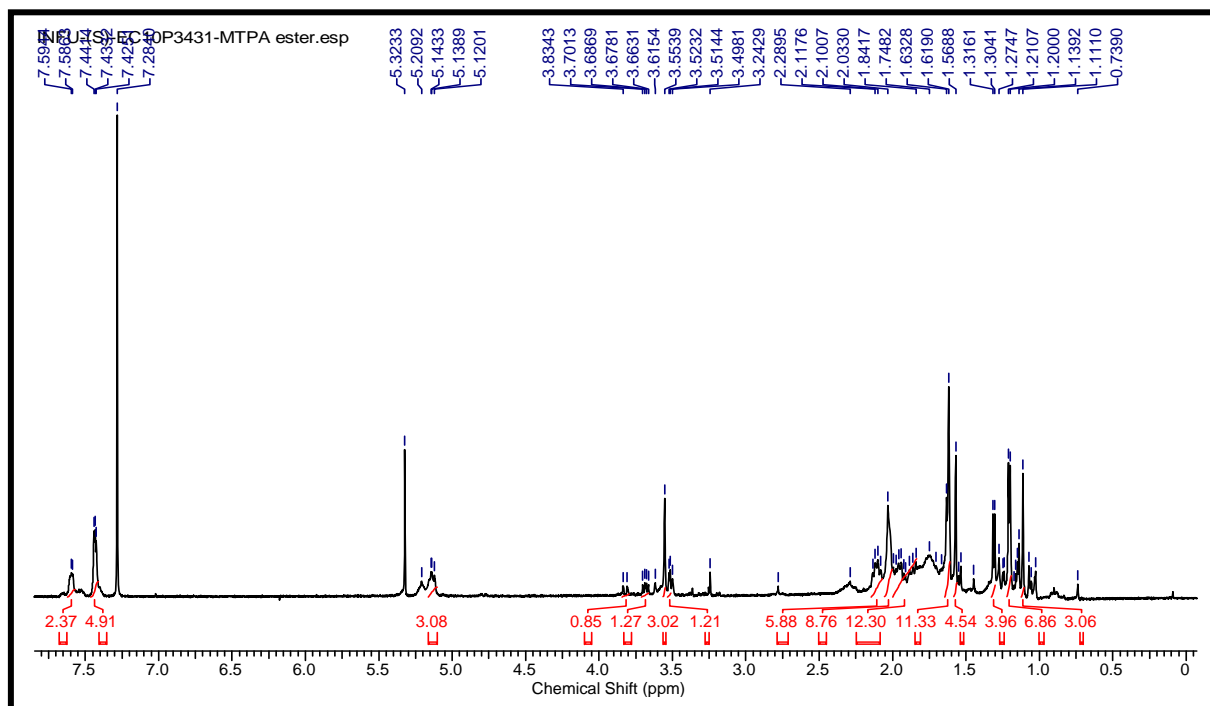


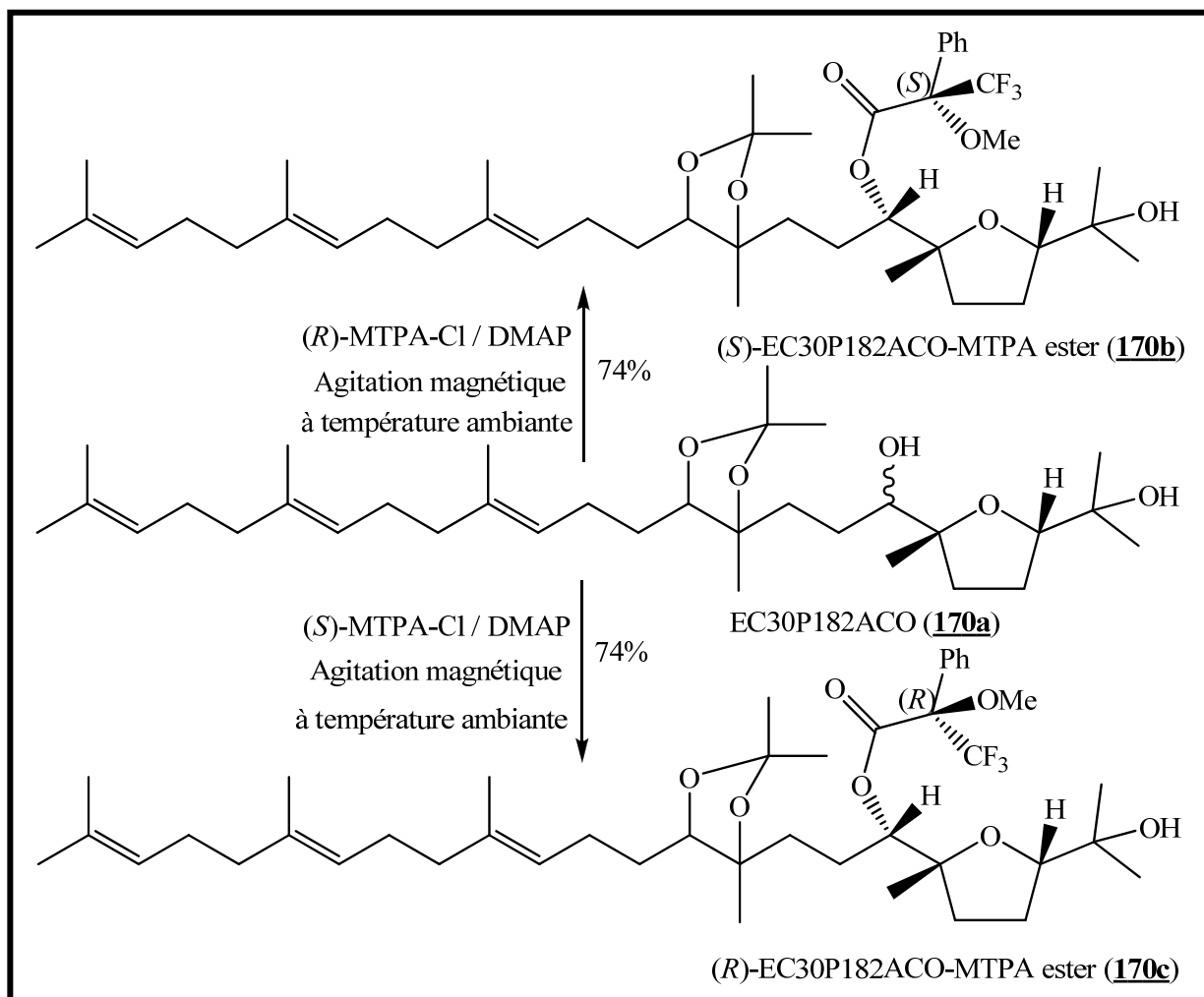
Figure 119: Spectre de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du (*R*)-EC10P3431-MTPA ester (**172b**)



**Figure 120:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du (*S*)-EC10P3431-MTPA ester (**172a**)

#### II.2.4.4- Estérification de l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO, **170a**) avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-acide de Mosher

L'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO, **170a**) a subi les mêmes réactions susmentionnées avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-acide de Mosher. Ces réactions ont été faites dans le but de déterminer la configuration absolue du carbone C-7. Par la même procédure, nous avons obtenu le (*S*) et le (*R*)-MTPA ester respectivement.



**Schéma 43:** Estérification de l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO, **170a**) avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-acide de Mosher.

Le spectre de masse HR-ESI (Fig. 121) de EC30P182ACO-MTPA ester présente le pic de l'ion pseudomoléculaire à  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  773,4582 (calculée pour  $C_{43}H_{65}O_7F_3Na$ : 773,4575), compatible avec la formule brute  $C_{43}H_{65}O_7F_3$  renfermant dix insaturations. Les cinq insaturations supplémentaires proviendraient probablement du fragment de l'acide de Mosher qui possède un noyau aromatique et un carbonyle. La différence de masse de 216 unités entre EC30P182ACO-MTPA ester et EC30P182ACO confirme la présence de ce fragment.

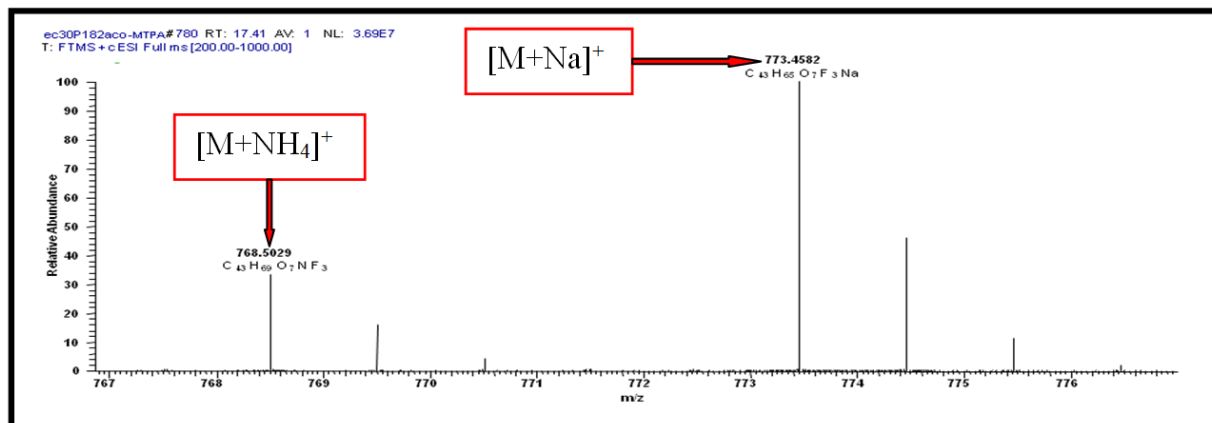


Figure 121: Spectre de masse ESI de EC30P182ACO-MTPA ester (**170b** et **170c**)

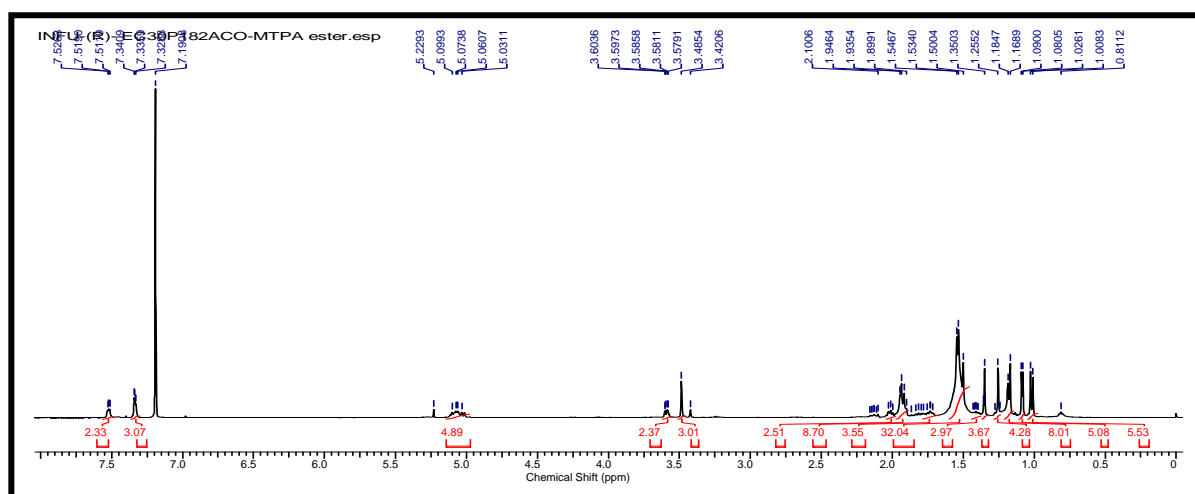


Figure 122: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du (*R*)-EC30P182ACO-MTPA ester (**170c**)

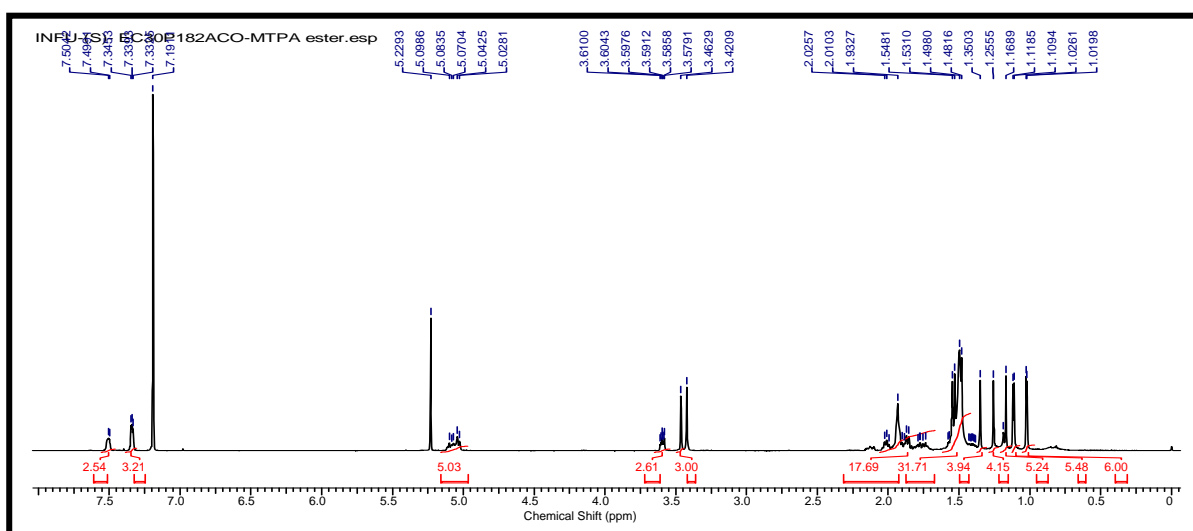
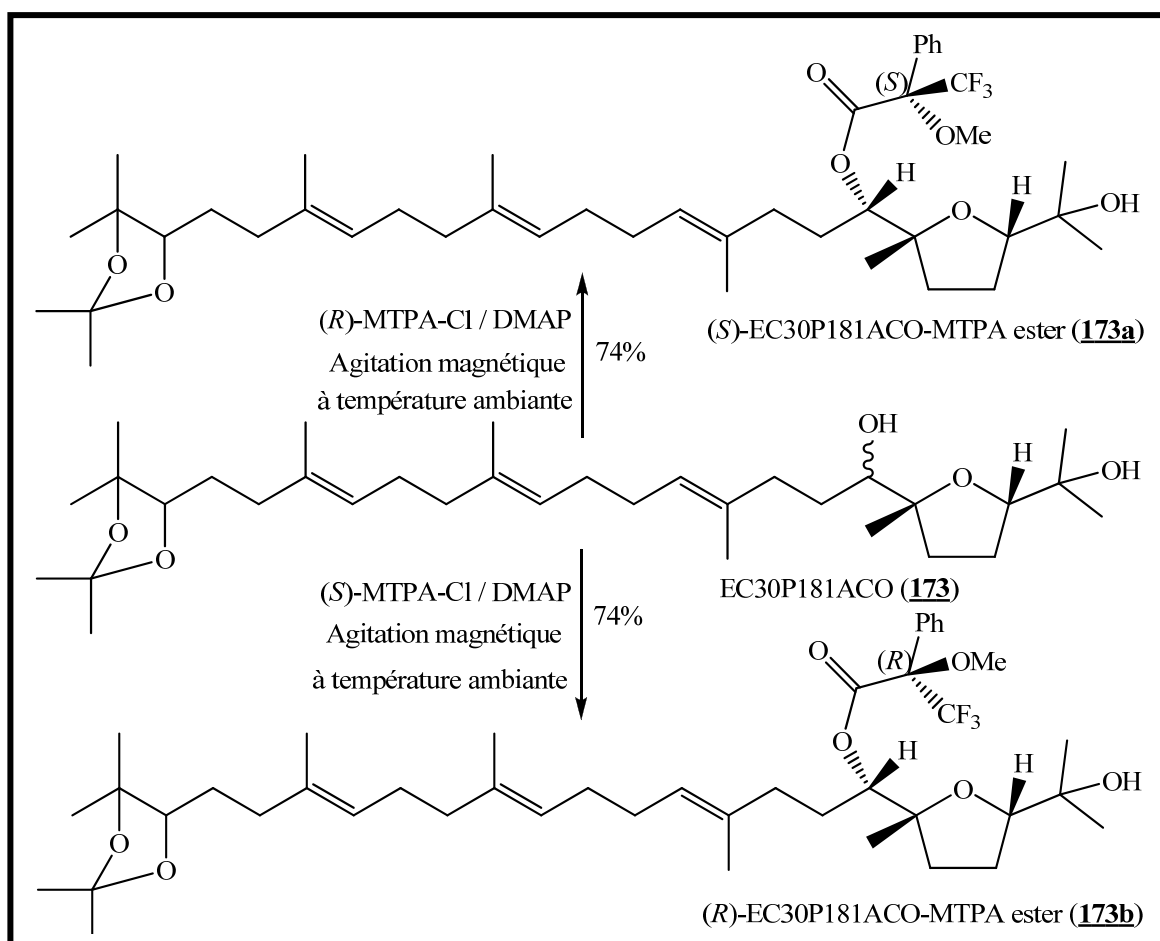


Figure 123: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du (*S*)-EC30P182ACO-MTPA ester (**170b**).

## II.2.4.5- Estérification de l'acétonide de l'ekeberine D2 (EC30P181ACO, **173**) avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-acide de Mosher

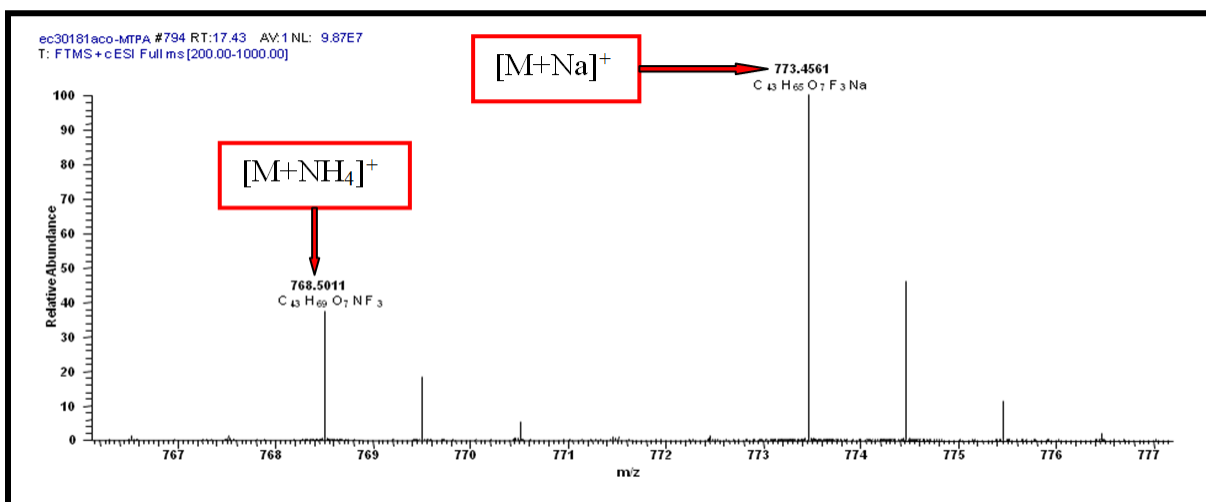
Tout comme le sapelenine H (EC10P3431, **172**) et l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO, **170a**), l'acétonide de l'ekeberine D2 (EC30P181ACO, **173**) a subi des réactions d'estérification avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-acide de Mosher. Ces réactions ont été faites toujours dans le but de déterminer la configuration absolue du carbone C-7. La même procédure nous a permis d'obtenir le (*S*) et le (*R*)-MTPA ester respectivement.



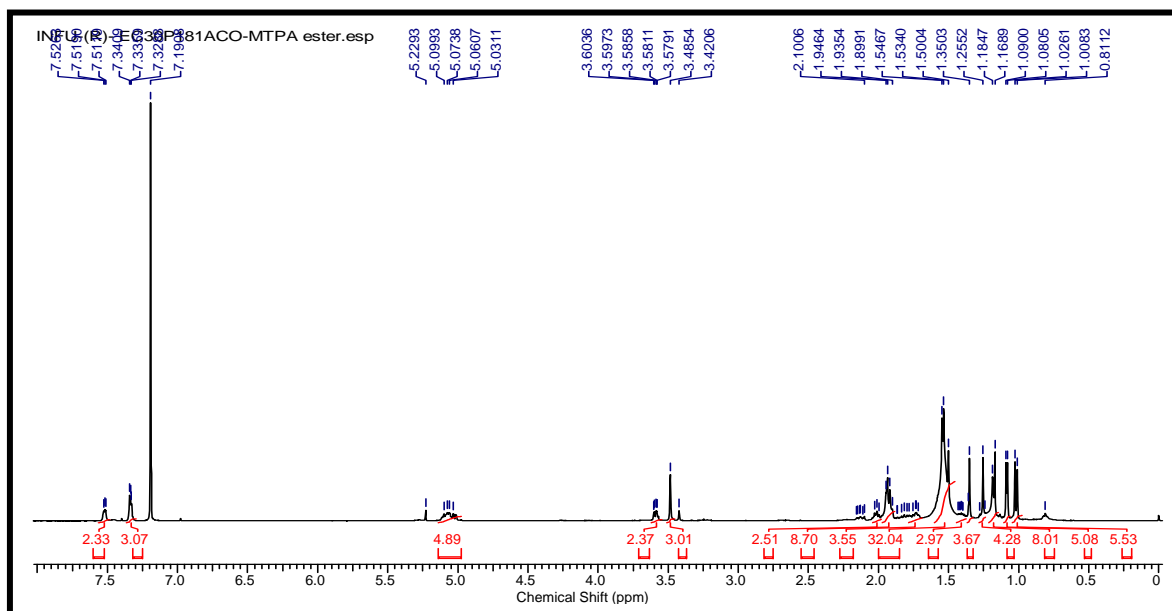
**Schéma 44:** Estérification de l'acétonide de l'ekeberine D2 (EC30P181ACO, **173**) avec les chlorures de (*R*) et de (*S*)-acide de Mosher.

Le spectre de masse HR-ESI (Fig. 124) de EC30P181ACO-MTPA ester est identique à celui de EC30P182ACO-MTPA et présente le pic de l'ion pseudomoléculaire à  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  773,4561 (calculée pour  $C_{43}H_{65}O_7F_3Na$ : 773,4575), compatible avec la formule brute

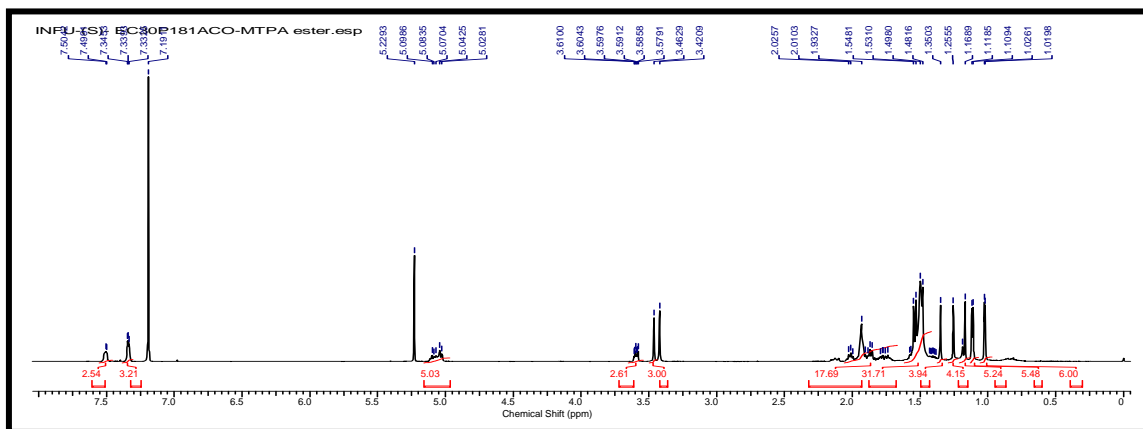
$C_{43}H_{65}O_7F_3$  renfermant dix insaturations. De même, les cinq insaturations supplémentaires proviennent du fragment de l'acide de Mosher qui possède un noyau aromatique et un carbonyle. La différence de masse entre EC30P181ACO-MTPA ester et EC30P181ACO est également de 216 unités, confirmant ainsi la présence de ce fragment.



**Figure 124:** Spectre de masse ESI de EC30P181ACO-MTPA ester (**173a** et **173b**)



**Figure 125:** Spectre de RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ) du (*R*)-EC30P181ACO-MTPA ester (**173b**)



**Figure 126:** Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du (*S*)-EC30P181ACO-MTPA ester (**173a**).

## II.2.5- Conclusion partielle

Dans cette partie de notre travail, nous avons présenté trois types de réaction effectués. Il s'agit des réactions d'hydrolyse et d'acétonidation qui ont permis de confirmer les structures de certains composés isolés; les réactions d'estérification qui ont servi de déterminer les configurations absolues de certains centres chiraux. Ainsi, les réactions d'hydrolyse faites sur l'hymexelsine (PC-4, **159**) et le sapelenine H (EC10P3431, **172**) ont conduit respectivement à la scopolétine (PC-1, **44**) avec un rendement de 91 % et à l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**) avec un rendement de 97,3 %. Nous avons ensuite procédé aux acétonidations du sapelenine I (EC30P182, **170**) et de l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**) qui ont donné respectivement l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO, **170a**, 99 %) et l'acétonide de l'ekeberine D2 (EC30P181ACO, **173**, 99,1 %).

Les réactions d'estérification ont bouclé cette partie par les acétylations du sapelenine I (EC30P182, **170**) et de l'ekeberine D2 (EC30P181, **168**) qui ont conduit à l'obtention du diacétylsapelenine I (EC30P182Ac, **174**) et du diacétylekeberine D2 (EC30P181Ac, **175**) avec des rendements de 48,7 %. Puis les estérifications du sapelenine H (EC10P3431, **172**), de l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO, **170a**) et de l'acétonide de l'ekeberine D2 (EC30P181ACO, **173**) avec les chlorures de (*R*) et (*S*)-acide de Mosher qui ont permis d'obtenir les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher du sapelenine H ((*S*)-EC10P3431-MTPA ester, **172a**; (*R*)-EC10P3431-MTPA ester, **172b**), les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher de l'acétonide du sapelenine I ((*S*)-EC30P182ACO-MTPA ester, **170b**; (*R*)-EC30P182ACO-MTPA ester, **170c**) et enfin les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher de l'acétonide de l'ekeberine D2 ((*S*)-EC30P181ACO-MTPA ester, **173a**; (*R*)-EC30P181ACO-MTPA ester, **173b**) avec des rendements de 74 %.



---

## II.3- ACTIVITES BIOLOGIQUES DE QUELQUES COMPOSES ISOLES

### II.3.1- Introduction

Les composés connus que nous avons isolés de *P. callicarpoides* et de *E. cylindricum* ont déjà pour la plupart fait l'objet des tests d'activités biologiques. C'est ainsi que, le javanaside **155** induit le clivage du brin d'ADN en présence des ions  $\text{Cu}^{2+}$  (Ma et Hecht, 2004; Van et al., 2005). La scopolétine **44** possède un large spectre d'activités dont l'activité inhibitrice contre *Micrococcus luteus*, de  $\alpha$ -glucosidase, sur la germination de *Panicum miliaceum*, sur les bactéries, les champignons (Del Corral et al., 2012; Gnonlonfin et al., 2012; Li et al., 2013; Nurul et al., 2013) et sur les acariens (Yang et al., 2012). C'est aussi un antioxydant, un antidépresseur et un hypotenseur. Elle possède des activités anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-diabétiques, antimicrobiennes, anticancéreuses et anticonvulsives (Pan et al., 2011; Habbu et al., 2012; Cheng et al., 2012); la liste est loin d'être exhaustive. L'hymexelsine **159** possède une activité inhibitrice ainsi qu'une activité anti-appétant (anorexigène) (Nagaiah et al., 1992; Li et al., 2013). L'acide vanillique **158** présente une activité antivenimeuse (contre le venin du serpent), inhibe l'apoptose cellulaire, l'inflammation hépatique auto-immune et la carcinogénèse. (Gitzinger et al., 2012). La (+)-catéchine **162** possède une activité anti-oxydante, antitumorale, antihormonale et antibactérienne. (Harsh et al., 2002; Hye et al., 2009). L'épicatéchine **163** est un antioxydant puissant, elle a une action similaire à celle de l'insuline et améliore la santé du cœur ([www.diabeticbar.com](http://www.diabeticbar.com), 2013). Le  $\beta$ -Sitostérol **153** est utilisé comme préventif de l'hypercholestérolémie, c'est un hypotensif, un antiulcéreux et un anticancéreux (Carpenter et al., 1980; Pegel, 1997). Le 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de sitostérol encore appelé sitostéroline **152** présente des activités antigastro-ulcérate, anti-inflammatoire anticancéreuse et anti-hyperglycémique (Bouic et al., 1996).

Nous présentons dans cette partie de notre travail, les activités biologiques des fractions et des composés nouveaux isolés de *E. cylindricum*. En effet, sur la base des informations recueillies sur le terrain au moment de la récolte de ces deux plantes, il ressort qu'elles sont utilisées pour soigner le rhumatisme ou tout au mieux, pour soulager les douleurs rhumatismales. En plus une patente (brevet) indique dans la littérature que, l'extrait d'Ortie (*Urtica dioica*) qui produit des triterpènes acycliques, a une forte activité anti-inflammatoire (Alberte et al., 2010). C'est dans cette optique que nous avons orienté nos tests essentiellement vers les activités anti-

---

inflammatoires et la cytotoxicité. Une autre motivation vient du fait que, dans un fractionnement bio-guidé, les fractions Fr<sub>1</sub>, Fr<sub>2</sub>, Fr<sub>3</sub>, Fr<sub>4-5</sub> avaient montré de fortes activités anti-inflammatoires sur la sécrétion des PGE<sub>2</sub>. Ainsi, nous avons soumis les sapelenines G **169**, H **172**, I **170** et J **171** qui sont quatre triterpènes acycliques nouveaux isolés des écorces du tronc de *E. cylindricum* à ces deux tests. Notons par ailleurs qu'aucun des composés isolés de *P. callicarpoides* n'a été soumis à ces tests et ceci pour trois raisons fondamentales:

- Les composés isolés de cette plante sont de faibles quantités en dehors de la scopolétine et de l'hymexelsine qui étaient les composés majoritaires et que nous avons obtenu à plus de 2,0 g et 1,8 g respectivement.
- La littérature sur les activités biologiques des composés connus indiquait que la scopolétine possède entre autres activités, une activité anti-inflammatoire. A cet effet, ce composé étant majoritaire dans la plante, nous avons supposé qu'il serait en majorité responsable de l'activité signalée par les villageois.
- En plus, en raison du coût élevé des tests anti-inflammatoires, seuls les composés nouveaux étaient soumis à ce test.

## **II.3.2- Résultats**

### **II.3.2.1- Activité des fractions de *E. cylindricum* sur la sécrétion des prostaglandines E<sub>2</sub>**

Le tableau XXXVII montre qu'aucune des fractions Fr<sub>0</sub>-Fr<sub>6</sub> et le résidu Res 1 n'a présenté une densité optique (D.O) inférieure à 1,5924 à la fois aux doses de 100 et 1 µg/mL.

Les fractions Fr<sub>1</sub> (1,5799), Fr<sub>2</sub> (1,5692), Fr<sub>4-5</sub> (1,5908) et le résidu Res 1 (1,5777) ont présenté une D.O inférieure à 1,5924 à 100 µg/mL avec Fr<sub>2</sub> la plus active à cette concentration; alors que Fr<sub>3</sub> est la seule fraction à avoir présenté une D.O de 1,5687 (D.O < 1,5924) à 1 µg/mL. Les fractions Fr<sub>0</sub> à 100 µg/mL et Fr<sub>4-5</sub> à 1 µg/mL ont présenté une D.O inférieure à zéro.

Quant aux standards indométhacine et diclofénac, ils ont tous deux présenté une D.O inférieure à 1,5924 aux concentrations de 500; 100 et 10 µg/mL. L'indométhacine aux concentrations de 1; 0,1 et 0,01 µg/mL a présenté une D.O inférieure à zéro.

**Tableau XXXVII:** Densités optiques des fractions de la chromatographie flash et du résidu Res.1 de *E. cylindricum* aux doses de 100 et 1 µg/mL.

Code Fractions/standards	Concentrations (µg/mL)		Valeurs finales calculées de D.O. / corrigées
Fr <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	100	LNS
	C <sub>2</sub>	1	1,6160
Fr <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	100	1,5799
	C <sub>2</sub>	1	1,6027
Fr <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	100	1,5692
	C <sub>2</sub>	1	1,6078
Fr <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	100	1,6556
	C <sub>2</sub>	1	1,5687
Fr <sub>4-5</sub>	C <sub>1</sub>	100	1,5908
	C <sub>2</sub>	1	LNS
Fr <sub>6</sub>	C <sub>1</sub>	100	1,5997
	C <sub>2</sub>	1	1,6174
Res.1	C <sub>1</sub>	100	1,5777
	C <sub>2</sub>	1	1,6337
<b>Standard Diclofénac</b>			
DF <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	500	0,6177
DF <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	100	0,6682
DF <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	10	0,6658
DF <sub>4</sub>	C <sub>4</sub>	1	0,6685
DF <sub>5</sub>	C <sub>5</sub>	0,1	1,7618
DF <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	0,01	LNS
<b>Standard Indométhacine</b>			
IM <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	500	0,6391
IM <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	100	0,6281
IM <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	10	0,6292
IM <sub>4</sub>	C <sub>4</sub>	1	LNS
IM <sub>5</sub>	C <sub>5</sub>	0,1	LNS
IM <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	0,01	LNS

- D.O < 1,5924 signifie activité anti-inflammatoire
- D.O > 1,5924 signifie absence d'activité anti-inflammatoire
- LNS signifie Liaison Non Spécifique (D.O < 0)

### II.3.2.2- Activité des sapelenines G-J sur la sécrétion des prostaglandines E2

Le tableau XXXVIII présente l'effet des sapelenines G-J sur la sécrétion des PGE2. Il ressort de ce tableau que tous les quatre sapelenines nouvellement isolés ont inhibé la sécrétion des PGE2 à certaines concentrations testées. Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

permettent de dire que le sapelenine H utilisé à la dose de 0,001  $\mu\text{g/mL}$  était le plus actif. Ainsi, les CMI et les concentrations en PGE2 ( $\text{pg/mL}$ ) dans le milieu pour chaque sapelenine testé étaient comme suit: sapelenine G (0,001; 26,05), sapelenine H (0,001; 18,59), sapelenine I (10,0; 32,63) et sapelenine J (0,01; 23,88); où le premier nombre est la CMI et le second la concentration en PGE2.

**Tableau XXXVIII:** Concentration Minimale Inhibitrice ( $\mu\text{g/mL}$ ) des sapelenines G, H, I et J

Composés	Concentrations des échantillons ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentrations des PGE2 ( $\text{pg/mL}$ )
Sapelenine G	10,0	11,43
	1,0	12,68
	0,1	13,16
	0,01	14,23
	<b>0,001</b>	<b>26,05 (CMI)</b>
	0,0001	x
	0,00001	x
Sapelenine H	10,0	7,99
	1,0	6,26
	0,1	7,08
	0,01	8,45
	<b>0,001</b>	<b>18,59 (CMI)</b>
	0,0001	x
	0,00001	x
Sapelenine I	<b>10,0</b>	<b>32,63 (CMI)</b>
	1,0	x
	0,1	x
	0,01	x
	0,001	x
	0,0001	x
	0,00001	x
Sapelenine J	10,0	8,36
	1,0	18,19
	0,1	20,65
	<b>0,01</b>	<b>23,88 (CMI)</b>
	0,001	x
	0,0001	x
	0,00001	x

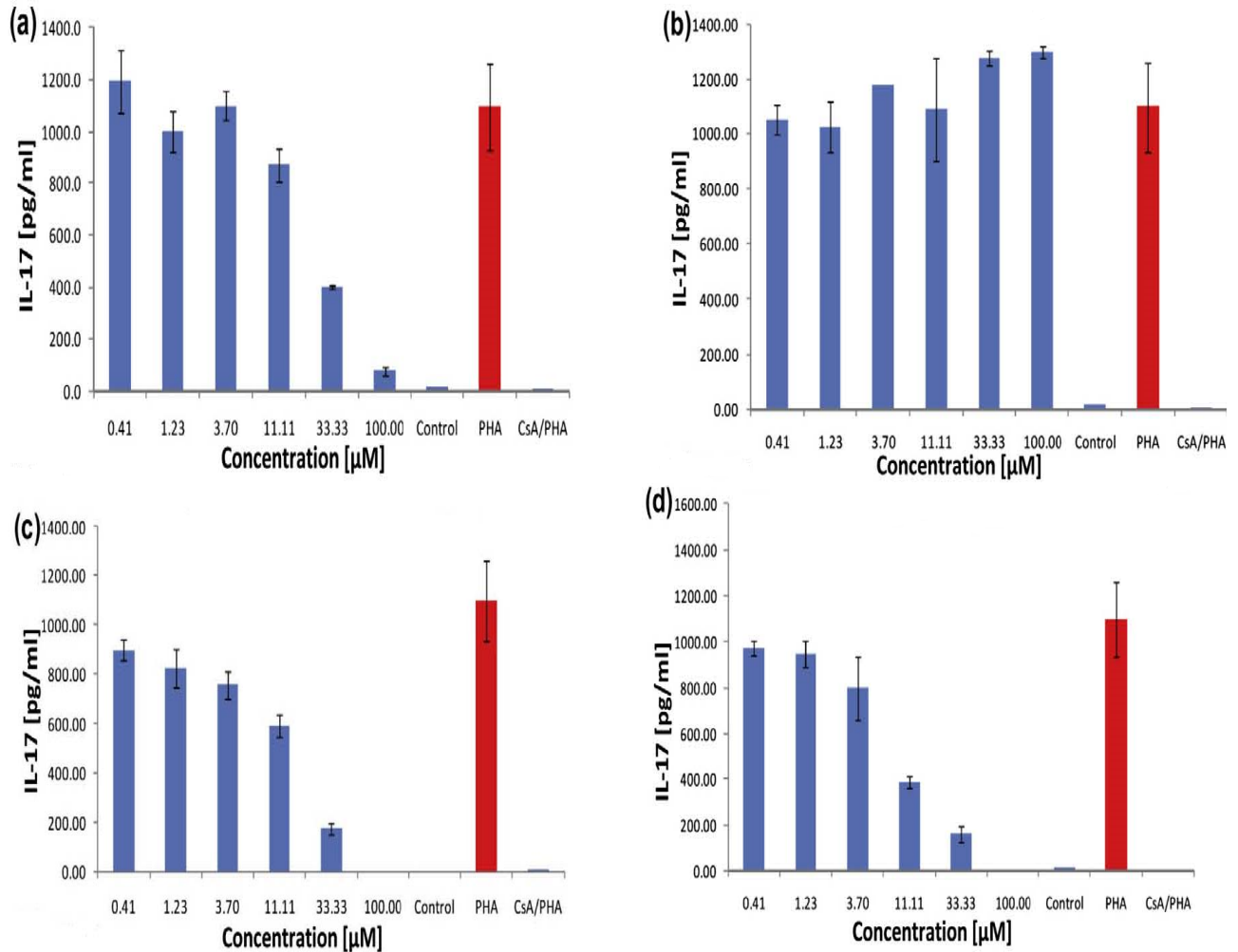
---

### II.3.2.3- Activité des sapelenines G-J sur la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs

Les figures 127 ci-dessous représentent l'effet des composés (sapelenines G-J) testés sur la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées par la PHA.

Les sapelenines G **169** (Fig. 127a), I **170** (Fig. 127c), et J **171** (Fig. 127d), ont significativement inhibé la sécrétion de l'IL-17 à la concentration de 11,11  $\mu\text{M}$  par rapport au contrôle positif (PBMCs+PHA). Cette inhibition a été faite de manière dose-dépendante. L'activité de ces composés à de fortes concentrations (33,33 et 100,00  $\mu\text{M}$ ), a été comparable à celle de la référence (CsA) qui a complètement inhibé la sécrétion de l'IL-17 (Fig. 127c et Fig. 127d).

Par contre, la figure 127b montre que le sapelenine H **172** n'a pas empêché la sécrétion de l'IL-17. D'ailleurs, à de fortes concentrations telle que 100,00  $\mu\text{M}$ , la sécrétion de l'IL-17 a atteint 1300,00  $\text{pg/mL}$ , valeur supérieure à 1100,00  $\text{pg/mL}$  chez le contrôle positif.

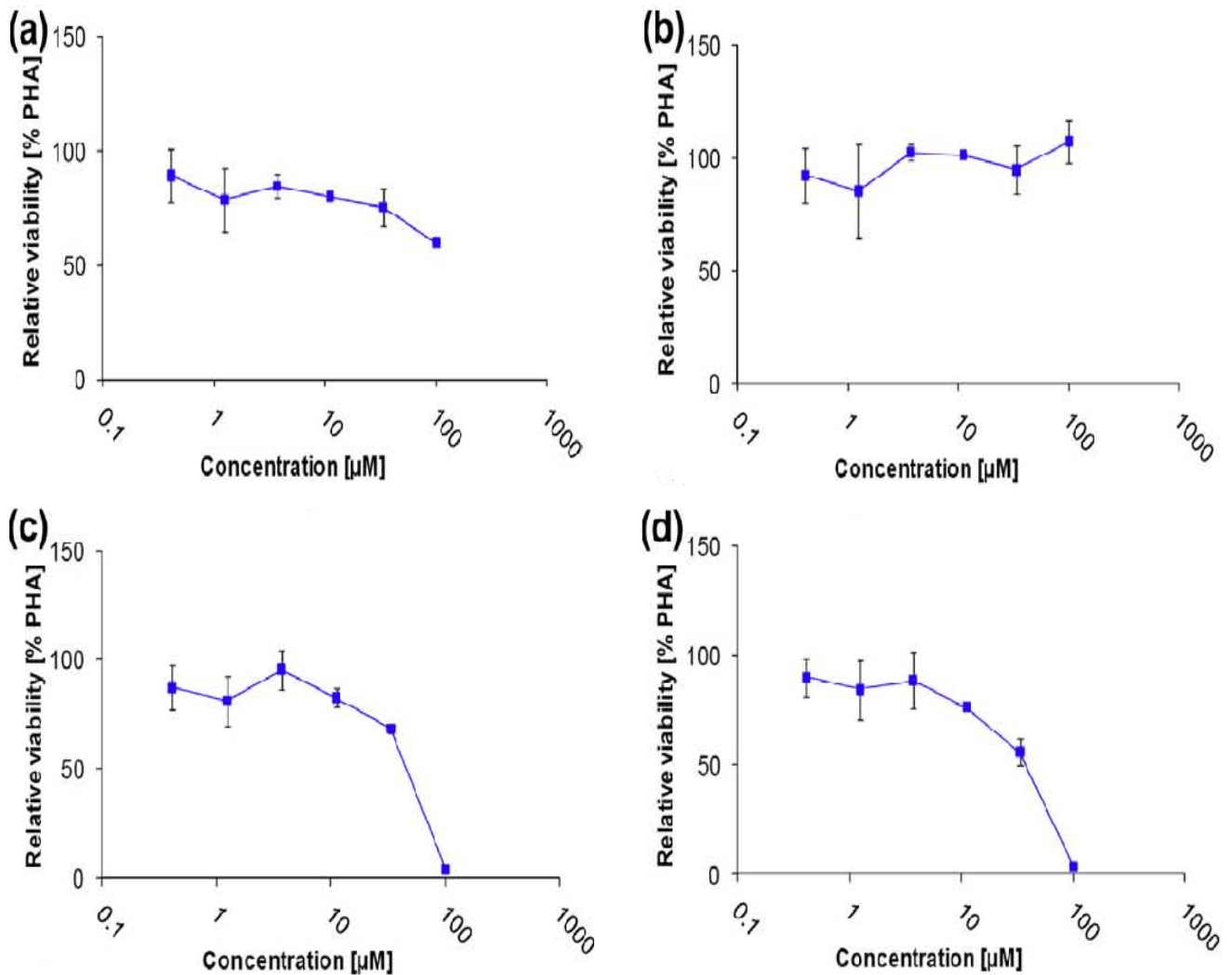


**Figure 127:** Effet des composés testés sur la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées par la PHA. (a) Sapelenine G 169; (b) Sapelenine H 172; (c) Sapelenine I 170; (d) Sapelenine J 171. (**Concentrations utilisées:** 0,41; 1,23; 3,70; 11,11;33,33 et 100 μM).

#### II.3.2.4- Effet cytotoxique des sapelenines G-J

Les figures 128 ci-dessous permettent de déterminer la viabilité des PBMCs exposées aux différents composés (sapelenines G-J) à des concentrations croissantes. Les figures 128a et 128b, 128c et 128d montrent que la viabilité cellulaire à des concentrations inférieures ou égales à 10 μM était relativement élevée. Cette viabilité cellulaire reste élevée même à la concentration de 100 μM pour les sapelenines G et H (Fig. 128a et 128b). Mais pour les sapelenines I et J, dès que

la concentration devenait supérieure à 10  $\mu\text{M}$ , la viabilité cellulaire commençait à baisser. Ainsi pour les sapelenines I et J à 100  $\mu\text{M}$ , la viabilité cellulaire était de 0 % PHA.



**Figure 128:** Effet des composés testés sur la viabilité des PBMCs. (a) Sapelenine G 169; (b) Sapelenine H 172; (c) Sapelenine I 170; (d) Sapelenine J 171. (**Concentrations utilisées:** 0,41; 1,23; 3,70; 11,1; 33,33 et 100  $\mu\text{M}$ ).

### II.3.3- Discussion

Les prostaglandines (PG) sont des dérivés de l'acide arachidonique provenant du métabolisme des phospholipides membranaires sous l'action des phospholipases (Narumiya, 1999; [www.universalis.fr](http://www.universalis.fr), 2014). Ces médiateurs (PG) sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques entre autres, la filtration glomérulaire, le travail

---

obstétrical, l'inflammation et la douleur (Amadou, 2005; Gross, 2006.). L'utilisation des fractions et des composés isolés de *E. cylindricum* a montré une activité antiprostaglandinique pour nombreuses fractions et les sapelenines G-J. En effet, ces fractions et composés agiraient comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) à l'instar de l'indométhacine et du diclofénac. Ces deux médicaments ont une activité anti-inflammatoire connue par leur capacité à inhiber la cyclo-oxygénase (COX) qui catalyse la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Chauvelot-Moachon et al., 1988; Aïssata, 2005). Ils entraînent une diminution de la migration cellulaire et des actions des tissus conjonctifs (glycoprotéine, collagène) (Bourin et al, 1993). Des résultats similaires ont été obtenus par Handa et Sharma en 1992, Thioune et Pousset (1997-1998) qui respectivement ont démontré que l'activité anti-inflammatoire de *Azadirachta indica* et *Khaya senegalensis* deux plantes de la famille des Meliaceae serait due aux dérivés triterpéniques. De même, la capacité de *Trichilia Drageana* (Meliaceae) à inhiber la synthèse des prostaglandines serait due à la présence des triterpènes modifiés dans cette plante (Mariam, 2006).

L'inflammation se caractérise aussi par la libération d'autres médiateurs tels que les bradykinines, les thromboxanes et les interleukines.

Parmi les interleukines, l'interleukine-17 (IL-17) est une cytokine impliquée dans de nombreuses régulations immunitaires parmi lesquelles les processus inflammatoires (Iwakura et al., 2011; Angkasekwinai et Dong, 2011). Ce médiateur induit l'expression des gènes codants pour la synthèse des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et G-CSF (Kolls et Linden, 2004; Iwakura et al., 2008).

Les sapelenines G-J exclu le sapelenine H, ont significativement supprimé la sécrétion de l'IL-17 (Fig. 127), tout de même comme la CsA. En effet la CsA est un immunosuppresseur restreint aux cellules lymphoïdes et notamment les lymphocytes T et B. Son activité passe par l'inhibition de la transcription de nombreux gènes d'interleukines parmi lesquelles l'IL-2 et l'IL-17 (Miroux, 2011). Le sapelenine G agirait par le même mécanisme que la cyclosporine A. Quant aux sapelenines I et J, l'étude de la viabilité cellulaire indique que ces composés n'auraient pas véritablement une activité anti-inflammatoire, mais plutôt leur cytotoxicité à fortes doses serait responsable de l'inhibition de la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs. Ces résultats corroborent ceux de Tullayakorn et al. (2012), qui ont montré que l'extrait ethanologique de



---

*Zingiber officinale* inhibait de façon dose-dépendante la viabilité des cholangiocarcinomes humains.

La cytotoxicité des sapelenines I et J serait due à la présence du cycle furanique dans leurs structures. L'inocuité du sapelenine H portant le même cycle furanique serait due à la présence d'un groupement époxyyl situé à l'autre extrémité de sa chaîne et qui inhiberait l'activité cytotoxique du cycle furanique.

Les sapelenines G, I et J en supprimant la sécrétion de l'IL-17 possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Cependant, l'activité anti-inflammatoire des sapelenines I et J n'est exprimée qu'à faibles doses.

### **II.3.4- Conclusion partielle**

Dans cette partie de nos travaux, il était question de soumettre certains des composés isolés aux tests d'activités anti-inflammatoire et cytotoxique. C'est ainsi que, les sapelenines G-J ont fait l'objet des tests d'inhibition respectivement de la sécrétion des PGE2 et de la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées par la PHA. Ces tests ont été couplés aux tests de viabilité des PBMCs. De cette analyse, il ressort que, les sapelenines G-J ont inhibé la sécrétion des PGE2 avec des CMI respectives de 0,001; 0,001; 10,0 et 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; le sapelenine H **172** n'a aucun effet inhibiteur sur la sécrétion de l'IL-17 contrairement aux sapelenines G **169**, I **170** et J **171** qui suppriment fortement la sécrétion de l'IL-17 à la concentration de 11,11 $\mu\text{M}$ , cette suppression s'intensifiant de manière dose-dépendante. Cependant, la suppression de la sécrétion de l'IL-17 par les sapelenines I et J étant couplée à une mort cellulaire, ne saurait permettre de leur attribuer un effet anti-inflammatoire mais plutôt cytotoxique.

L'activité anti-inflammatoire et l'inocuité du sapelenine G pourraient contribuer à enrichir la pharmacie des anti-inflammatoires à forte tolérance cellulaire. Quant aux sapelenines I et J, parce qu'ayant inhibé la viabilité cellulaire, ils pourraient être utilisés contre la prolifération des cellules cancéreuses.

---



**CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

---

---

L'étude des constituants chimiques que nous avons entreprise sur les écorces du tronc de *Pauridiantha callicarpoides* et de *Entandrophragma cylindricum* a conduit à l'isolement de 26 composés dont les structures ont été élucidées sur la base de leurs données spectroscopiques et physiques, puis par comparaison avec des données de la littérature. Ces composés regroupés en grandes familles comprennent:

- 02 alcaloïdes: le javaniside **155** et le 7-*épi*-javaniside **157**.
- 01 acide phénolique: l'acide vanillique ou acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque **158**.
- 04 coumarines: la scopolétine ou scopolétole ou 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine **44**, l'hymexelsine ou xeroboside **159**, la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine ou 3,3'-biscopolétine **160** et la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine **161**.
- 02 flavonoïdes: la (+)-Catéchine **162** et l'épicatéchine ou épicatéchole **163**.
- 01 iridoïde: le sweroside **156**.
- 01 limonoïde: l'andiloride G **164**.
- 04 stéroïdes: un mélange de  $\beta$ -sitostérol **153** et stigmastérol **150**, un mélange de 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de  $\beta$ -sitostérol **152** et 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside de stigmastérol **165**.
- 01 carbohydrate: 6-*O*-hexopyranosylhexopyranose **166**.
- 10 terpénoïdes: le sapelenine A **90**, le (14*E*,18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracos-14,18,22-triène-2,3,6,7,10,11-hexaol **167**, le sapelenine B **91**, le sapelenine D **93**, le sapelenine C **92**, l'ekeberine D<sub>2</sub> **168**, le sapelenine G **169**, le sapelenine I **170**, le sapelenine J **171** et le sapelenine H **172**.

L'*épi*-javaniside **157** est un dérivé nouveau d'oxindole. En dehors de la scopolétine **44**, tous les autres composés sont isolés pour la première fois de *P. callicarpoides*.

Les sapelenines G **169**, H **172**, I **170** et J **171** sont des triterpènes acycliques décrits ici pour la première fois. La (+)-catéchine **162**, l'épicatéchine **163**, l'andiloride G **164**, le (14*E*,18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracos-14,18,22-triène-2,3,6,7,10,11-hexaol **167** et l'ekeberine D<sub>2</sub> **168** sont isolés du genre *Entandrophragma* pour la première fois.

Quelques transformations chimiques ont été effectuées dans l'optique de confirmer les structures proposées pour certains composés et de former les intermédiaires réactionnels devant conduire à la détermination des configurations absolues de certains centres asymétriques. Ainsi, l'hydrolyse acide de l'hymexelsine et du sapelenine H a conduit à l'obtention de la scopolétine et

---

de l'ekeberine D2, ce qui a permis de confirmer leurs structures. Le sapelenine I et l'ekeberine D2 deux triterpènes acycliques, ont subi des réactions d'acétonidation pour conduire aux acétonides du sapelenine I **170a** et de l'ekeberine D2 **173** respectivement. Ces réactions nous ont permis de protéger les hydroxyles vicinaux afin de procéder à la détermination des configurations absolues de certains centres asymétriques. Le sapelenine I et l'ekeberine D2 ont également été acétylés par l'anhydride acétique en milieu basique pour donner le diacétylsapelenine I **174** et le diacétylekeberine D2 **175** respectivement. Le sapelenine H, le sapelenine I acétonidé et l'ekeberine D2 acétonidé ont subi des réactions d'estérification avec les réactifs de Mosher que sont les chlorures de (*R*) et (*S*)-acide de Mosher. Nous avons obtenu les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher du sapelenine H (**172a** et **172b**), les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher de l'acétonide du sapelenine I (**170b** et **170c**) et enfin les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher de l'acétonide de l'ekeberine D2 (**173a** et **173b**) respectivement.

Il est à noter que: l'acétonide du sapelenine I **170a**, l'acétonide de l'ekeberine D2 **173**, le diacétylsapelenine I **174**, le diacétylekeberine D2 **175**, les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher du sapelenine H (**172a** et **172b**), les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher de l'acétonide du sapelenine I (**170b** et **170c**), les (*S*) et (*R*)-esters de Mosher de l'acétonide de l'ekeberine D2 (**173a** et **173b**) obtenus après certaines des réactions ci-dessus, sont des dérivés nouveaux d'hémisynthèse.

L'étude des activités biologiques des fractions et certains composés isolés en quantité suffisante de *E. cylindricum* nous a permis de mettre en évidence leurs activités anti-inflammatoires et cytotoxiques. En effet, il ressort que:

- Les fractions Fr<sub>1</sub>, Fr<sub>2</sub>, Fr<sub>3</sub>, Fr<sub>4-5</sub>, et le résidu Res.1 en inhibant la sécrétion des PGE<sub>2</sub> (D.O < 1,5924), possèdent des activités anti-inflammatoires.
- Les sapelenines G-J ont inhibé la sécrétion des PGE<sub>2</sub> avec des CMI respectives de 0,001; 0,001; 10,0 et 0,01 µg/mL.
- Le sapelenine G **169** en inhibant fortement la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées par le PHA, possède un fort potentiel anti-inflammatoire. Ce composé ne présente aucun effet cytotoxique sur les PBMCs.
- Le sapelenine H **172** qui n'a aucun effet inhibiteur sur la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées par le PHA, ne possède aucune activité anti-inflammatoire ni un effet cytotoxique sur les PBMCs.

- 
- Les sapelenines I **170** et J **171** ont montré un effet cytotoxique de manière dose-dépendante sur les PBMCs. Ainsi, leurs données de la suppression de l'IL-17 ont été considérées invalides à de fortes concentrations.

En somme, les résultats des tests anti-inflammatoires et la bibliographie sur les activités biologiques des composés isolés peuvent justifier l'utilisation de *P.callicarpoides* et de *E. cylindricum* en médecine naturelle dans le traitement de diverses maladies inflammatoires dont les maladies rhumatismales.

Tenant compte de ces résultats fort intéressants obtenus, nous pouvons estimer que les objectifs ont été globalement atteints.

Pour la suite de nos travaux, nous envisageons:

- De réétudier *P. callicarpoides* afin d'augmenter les quantités des composés isolés, puis d'évaluer leurs activités anti-inflammatoires et cytotoxiques
- De rechercher de nouvelles activités pour les composés majoritaires
- D'effectuer des tests anti-inflammatoires sur les autres cytokines impliquées dans les réactions inflammatoires.
- D'étudier les interactions synergiques existantes entre les composés isolés et les médicaments de références.
- D'étudier le profil toxicologique des composés isolés: toxicité aigue, subaigue, chronique, (hépatotoxicité à long terme, dommages, ...).
- D'étendre nos investigations sur les autres parties des deux plantes et sur d'autres espèces des genres *Pauridiantha* et *Entandrophragma*.

---



**CHAPITRE III:  
MATÉRIEL ET MÉTHODES**

---

---

## III.1- GENERALITES

### III.1.1- Appareillage

Les balances utilisées sont de marque COBOS précision, modèle D-6000-SX et SARTORIUS précision 1/10000.

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil de type Gallenkamp modèle MFB.595.010 m et sur un appareil de type MPM-H<sub>2</sub>.

L'activité optique (pouvoir rotatoire) des composés a été mesurée sur un polarimètre JASCO Digital (modèle P-2000) utilisant un prisme Glan-Taylor comme polariseur, en solubilisant les produits dans le méthanol.

Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre de type VECTOR22, après pastillage dans KBr.

Les spectres UV ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre de type Thermo Electron-Vision pro software V4.10. Le méthanol a été utilisé comme solvant.

Les spectres de masse en impact électronique (énergie d'ionisation: 70 eV) ont été obtenus sur un spectromètre de type JOEL JMS 600-H.

Les spectres de masse en «ElectroSpray Ionisation» ont été enregistrés avec un spectromètre de masse Esquire 3000, utilisant comme source d'ions, le Nano ESI, Off-line.

La haute résolution (HRESIMS) a été réalisée sur un spectromètre de type LTQ Orbitrap (Thermo Fisher, USA) équipé d'une source HESI-II.

Le spectromètre de masse était couplé à un système HPLC de type Agilent 1200 (Santa Clara, USA) utilisant une colonne de gravité Nucléodur C18 de Macherey-Nagel (50\*2 mm, dimension des particules de 1,9µm) constitué d'une pompe de chromatographie liquide (LC), d'un détecteur PDA ( $\lambda = 205$  nm), d'un auto-injecteur (volume d'injection 10 µL) et d'un four à colonne (30 °C). Le système de solvant utilisé était méthanol/H<sub>2</sub>O ou acétonitrile/H<sub>2</sub>O de différentes polarités.

Les spectres de RMN 1D et 2D ont été enregistrés à la température ambiante sur les spectromètres Bruker Avance Av-300, Bruker Avance Av-400, Bruker Avance Av-500 et Bruker Avance Av-600 opérant aux fréquences de 300, 400, 500 et 600 MHz pour le proton, et 75, 100, 125 et 150 MHz pour le carbone 13. Les solutions utilisées étaient dans l'acétone deutériée (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>), le chloroforme deutérié (CDCl<sub>3</sub>), le méthanol deutérié (CD<sub>3</sub>OD), le diméthylsulfoxyde deutérié (DMSO-*d*<sub>6</sub>) et la pyridine deutériée (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N). Pour toutes les mesures

---

effectuées, les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm en prenant comme référence interne dans tous les cas le tétraméthylsilane (TMS,  $\delta = 0$ ). Les constantes de couplage ( $J$ ) sont exprimées en Hertz (Hz).

Le fractionnement des extraits et la purification des composés ont été essentiellement faits par chromatographie. Ainsi, nous avons effectué des chromatographies flash sous vide, des chromatographies sur colonne, des chromatographies d'exclusion, des chromatographies sur couche mince (analytique et préparative) et des chromatographies liquides hautes performances (analytique et préparative).

Le gel de silice de fabrication Merck (70-230 mesh) de granulométries 0,025-0,040 mm, 0,040-0,063 mm et 0,063-0,200 mm a été utilisé comme phase stationnaire. Pour la chromatographie d'exclusion, nous avons utilisé le Séphadex LH-20. Les dimensions des colonnes ont été choisies en fonction de la quantité de soluté à séparer.

Les CCM analytiques ont été effectuées en utilisant des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 F<sub>254</sub> (Merck, 20 × 20 cm) d'épaisseur 0,2 mm. Les CCM analytiques en phase inverse ont également été effectuées en utilisant des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice en phase inverse C<sub>18</sub> de dimensions 5 x 20 cm et d'épaisseur 0,25 mm. Les révélateurs utilisés pour visualiser les taches en CCM étaient soit la lampe UV (254 et 366 nm), soit la vapeur d'iode, soit la pulvérisation à l'acide sulfurique dilué à 50% ou pulvérisation à la solution de ninydrine suivi du chauffage à l'étuve à 100 °C.

Les CCM préparatives ont été effectuées en utilisant des plaques obtenues en déposant une couche de gel de silice 60 HF<sub>254+366</sub> d'épaisseurs 0,5-1 mm sur des lames de verre de dimensions 5 × 20 cm, 10 × 20 cm et 20 × 20 cm.

Les différents éluants utilisés ont été adaptés aux phases stationnaires en fonction de la polarité des composés à séparer ou à analyser. La masse absorbante était fonction de celle de l'échantillon à séparer.

Dans le cas de la chromatographie liquide haute performance (analytique et préparative), nous avons essentiellement travaillé en phase inverse, utilisant soit le système méthanol/H<sub>2</sub>O soit acétonitrile /H<sub>2</sub>O. Nous nous sommes servis d'un système Gilson constitué d'une pompe 322 avec un détecteur UV 152 ( $\lambda = 205\text{nm}$ ) et utilisant une colonne de gravité Nucléodur de Macherey-Nagel (Düren, Germany) (250 x 16 mm ou 250 x 4,6 mm, dimension des particules de 5  $\mu\text{m}$ ). Les conditions chromatographiques sont présentées ci-dessous:



---

### HPLC analytique

Pompe: VARIAN 9010  
Injecteur: VARIAN 9100  
DéTECTEUR monochrome: VARIAN 9065  
Colonne: Symmetry C18, 5  $\mu\text{m}$ ,  
4,6 x 250 mm  
Débit: 1 mL/ min  
Volume d'injection: 30  $\mu\text{L}$   
Longueur d'onde: 205 nm  
Concentration de l'échantillon: 1 mg/mL

### HPLC préparative

Pompe programmable: Gilson 322  
Module Manométrique: Gilson 806  
Mélangeur Dynamique: Gilson 811B  
DéTECTEUR: Gilson L200E  
Pré Colonne: VP 50/21, Nucléodur 100-10  
C18 ec (Macherey-Nagel)  
Colonne: VP 250/21, Nucléodur 100-10  
C18 ec (Macherey-Nagel)  
Débit: 4 mL/ min  
Volume d'injection: 250 – 500  $\mu\text{L}$   
Longueur d'onde: 205 nm  
Sensibilité: 0.2; 0.5; 1  
Concentration échantillon: 35-40 mg/ mL

### III.1.2- Tests de caractérisation chimique

#### III.1.2.1- Test de Liebermann-Burchard

Dissoudre quelques milligrammes de produit dans le chloroforme (1 mL). Ajouter à la solution obtenue quelques gouttes d'anhydride acétique, puis d'acide sulfurique concentré. Les terpénoïdes donnent avec ce réactif une coloration rouge brique, puis violette, puis bleue et finalement vert foncé. Les stérols donnent une coloration bleue qui vire rapidement au vert foncée.

#### III.1.2.2- Test de Molish

Dans un tube à essai, dissoudre quelques milligrammes de produit à l'aide d'une solution d'éthanol- $\alpha$ -naphtol 1 %. Laisser ensuite couler sur les parois du tube quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. La présence des sucres se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge violacé à l'interphase.

---

### **III.1.2.3- Test au chlorure ferrique**

A une solution méthanolique de produit, ajouter quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique. La présence des phénols se manifeste par un changement de coloration suite à la formation d'un ion complexe  $[\text{Fe}(\text{ArO})_6]^{3-}$  de couleur violette ou bleue.

### **III.1.2.4- Test de Shinoda**

A une solution alcoolique du composé, ajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré, puis quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes se manifeste par une effervescence, suivie d'un changement de coloration qui peut être violette ou rouge brique.

### **III.1.2.5- Test de Dragendorff**

Le test de Dragendorff consiste à pulvériser le mélange de nitrate de bismuth dissous dans une solution d'acide acétique et d'iodure de potassium sur une plaque de CCM sur laquelle est préalablement fixé le produit à révéler. Le test est positif lorsque le produit devient orange.

### **III.1.2.6- Test de Erlich**

Le test de Erlich pour les limonoïdes consiste à déposer les taches du produit sur la plaque de CCM, de pulvériser celle-ci à l'aide du *p*-N,N-diméthylaminobenzaldéhyde et la porter à l'étuve. La coloration rose indique la présence des limonoïdes.

## **III.2- MATERIEL**

### **III.2.1- Matériel végétal**

Les écorces du tronc de *Entandrophragma cylindricum* et de *Pauridiantha callicarpoides* ont été récoltées dans la forêt du Dja (vers Lomié) Région de l'Est Cameroun respectivement en Juin et en Décembre 2010. L'identification de ces espèces a été faite par Monsieur NANA Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun où des spécimens ont été conservés sous les références N° 39807/SPDK (*P. callicarpoides*) et N° 54965/SFR/CAM (*E. cylindricum*).

### **III.2.2- Matériel pour l'activité biologique**

Le matériel utilisé était constitué:

- Des PGE2 contenues dans un kit de test des PGE2 (R & D Systems ®). Ce kit contient en plus des PGE2, le diluant RD5-56 et le NBS (*Normal Binding Substrate*), les anticorps primaires, les anticorps conjugués PGE2 (anticorps secondaires) et le tampon.

- 
- Des cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMCs) qui ont été isolées du sang des donateurs volontaires sains à Dortmund, en Allemagne et d'un kit ELISA IL-17 humain (Ray Biotech, Inc.).
  - Du milieu de culture RPMI-1640 (Pan Biotech) supplémenté avec 1% de L-glutamine (200 mM) et 10% de sérum fœtal de veau (FCS) inactivé ou décomplémenté, pénicilline, 0,1 mg/mL de streptomycine et 2mM de L-glutamine dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.
  - Des réactifs: résazurine (Sigma), CellTiter Blue (Promega), tampon phosphate salin (PBS: 10 mM de phosphate de potassium pH 7,4 et 150 mM de chlorure sodium) contenant 1mM d'EDTA.

### **III.3- EXTRACTION ET ISOLEMENT DES COMPOSES**

#### **III.3.1- Extraction**

##### **III.3.1.1- Extraction des écorces du tronc de *P. callicarpoides***

Les écorces du tronc de *P. callicarpoides* ont été découpées, séchées puis broyées. La poudre obtenue (2,5 kg) a été extraite au mélange chlorure de méthylène-méthanol (1:1) à température ambiante pendant 48 heures, puis 12 heures respectivement. L'évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif sous pression réduite a conduit à l'obtention de 345,4 g d'extrait brut.

##### **III.3.1.2- Extraction des écorces du tronc de *E. cylindricum***

Les écorces du tronc de *E. cylindricum* ont été découpées, séchées puis broyées. La poudre obtenue (7,0 Kg) a été extraite au méthanol à température ambiante pendant 48 heures, puis 8 heures respectivement. Après évaporation totale du solvant à l'évaporateur rotatif sous pression réduite, 890 g d'extrait total a été obtenu puis ré-extrait au mélange acétate d'éthyle/méthanol (9:1) pour donner 390 g d'extrait.

#### **III.3.2- Isolement des composés**

##### **III.3.2.1- Isolement des composés des écorces du tronc de *P. callicarpoides***

Une partie de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol (335 g) des écorces du tronc de *P. callicarpoides* a été fixée sur une masse équivalente de silice, puis fractionnée par chromatographie flash de gel de silice. L'élution a été faite au chlorure de méthylène, puis au

mélange chlorure de méthylène -méthanol de polarité croissante et enfin au méthanol. Des fractions de 500 mL ont été collectées, évaporées sous pression réduite et regroupées sur la base de la CCM analytique. Nous avons ainsi obtenu cinq séries principales A, B, C, D et E (Tableau XXXIX).

**Tableau XXXIX:** Chromatogramme de l'extrait brut des écorces du tronc de *Pauridiantha callicarpoides*

<b>Eluant</b>	<b>Fractions</b>	<b>Séries (masses en g)</b>	<b>Remarques</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 0% à 2,5%	1-11	<b>A</b> (9)	Mélange de produits dont un cristallise sous forme d'aiguilles jaunes <b>PC-1</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (2,5% à 12,5%)	12-33	<b>B</b> (18)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (12,5% à 22,5%)	34-49	<b>C</b> (52)	Mélange de produits dont un cristallise sous forme de fibres blanchâtres <b>PC-4</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (22,5 à 30%)	50-58	<b>D</b> (51)	Mélange de produits contenant <b>PC-4</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (30% à 50%)- MeOH pur	59-71	<b>E</b> (46)	Mélange de produits + trainées

Les fractions 2-11 ont été filtrées individuellement avant le regroupement des filtrats avec la fraction 1 sur la base de la CCM pour constituer la serie A (9 g). Les produits solides (aiguilles jaunes) obtenus ont été essorés et se sont révélés identiques après une CCM comparative. Nous avons indexé ce produit PC-1 (1,3 g).

Les fractions 40-51 ont été filtrées individuellement avant le regroupement des filtrats 40-49 et 50-51 respectivement aux fractions 34-39 et 52-58 pour constituer les séries C et D. Les produits solides obtenus (fibres blanchâtres) se sont révélés identiques après une CCM et ont été indexés PC-4 (1,5 g).

### **III.3.2.1.1- Chromatographie de la série A**

La série A (9,0 g) a été fixée sur une masse équivalente de silice et chromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution s'est faite au mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante. Les fractions de 50 mL ont été recueillies et regroupées sur la base de la CCM analytique (Tableau XL).

**Tableau XL:** Chromatogramme de la série A

<b>Eluant</b>	<b>Fractions</b>	<b>Séries</b>	<b>Observations</b>
Hex/AE (5%)	1-19	1-17	Mélange huileux
Hex/AE (7,5%)	20-50	18-68	Mélange de produits dont <b>PC-22</b>
Hex/AE (10%)	51-81		
Hex/AE (12,5%)	82-90	69-91	Mélange de produits
Hex/AE (15%)	91-103	92-126	Mélange de produits dont <b>PC-1</b>
Hex/AE (17,5%)	104-113		
Hex/AE (20%)	114-126		
Hex/AE (22,5%)	127-138	127-154	Mélange d'au moins 6 produits dont <b>PC-1</b>
Hex/AE (25%)	139-151		
Hex/AE (27,5%)	152-160		
Hex/AE (32,5%)	161-166	155-168	Mélange de plus de 5 produits + trainées
Hex/AE (50%)	167-168		

Les fractions de 22 à 29 ont été filtrées individuellement avant leur regroupement avec les fractions 18-21 et 30-68 sur la base de la CCM. Les produits solides obtenus (fibres blanches) ont été essorés et mélangés après une CCM analytique pour donner le produit PC-22 (60,0 mg).

Les fractions de 104 à 154 ont été filtrées individuellement avant les différents regroupements (Tableau XL). Les produits solides obtenus (aiguilles jaunes) se sont révélés identiques à PC-1 (700 mg) après une CCM analytique.

### **III.3.2.1.2- Chromatographie de la série B**

La série B (18,0 g) a été fixée sur une masse équivalente de silice et chromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution s'est faite au mélange chlorure de méthylène-méthanol de polarité croissante. Les fractions de 100 mL ont été recueillies et regroupées sur la base de la CCM analytique (Tableau XLI).

**Tableau XLI:** Chromatogramme de la série B

Eluant	Fractions	Séries	Remarques
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> pur	1-6	B <sub>0</sub>	1-11 regroupées: mélange de produits en trace
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (1%)	7-17	B <sub>1</sub> (1,5)	12-17 regroupées: mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (2%)	18-24	B <sub>2</sub> (1,8)	18-26 regroupées: mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (3,5%)	25-32	B <sub>3</sub> (5,9)	27-45 regroupées: mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (5%)	33-40		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (7%)	41-46		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (9%)	47-55	B <sub>4</sub> (6,1)	46-61 regroupées: mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (11%)	56-62		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (13%)	63-66	B <sub>5</sub>	Trainées
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (20%)	67-70		

La série B<sub>1</sub> (1,5 g) a été fixée sur la silice, puis rechromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution s'est faite au chlorure de méthylène, puis au chlorure de méthylène-méthanol (1 à 3%). Nous avons collecté 35 fractions de 25 mL. Les fractions de 14 à 23 présentaient des précipités et ont été filtrées. Les produits solides obtenus ont été comparés et regroupés sur la base de la CCM analytique, puis indexés PC-14 (9,2 mg). Ce produit impur a été dissout dans le méthanol, rechromatographié sur colonne de séphadex LH-20 et élué au méthanol pur. 12 fractions de 10 mL chacune ont été recueillies. Sur la base de la CCM, les fractions 4 à 10 ont été regroupées et ont laissé apparaître après évaporation du solvant, des paillettes jaunâtres que nous avons filtrées et indexées PC-14A (5,9 mg).

### III.3.2.1.3- Chromatographie de la série C

La série C (52,0 g) a été fixée sur une masse équivalente de silice et chromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution s'est faite au mélange chlorure de méthylène-méthanol de polarité croissante. Les fractions de 200 mL ont été recueillies et regroupées sur la base de la CCM analytique (Tableau XLII).

**Tableau XLII:** Chromatogramme de la série C

Eluant	Fractions	Séries (masse en g)	Remarques
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (2%)	1-13	C <sub>0</sub> (0,5 g)	2-7 regroupées: mélange de produits.
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (4%)	14-24	C <sub>1</sub> (1,5 g)	8-23 regroupées: mélange de produits dont <b>PC-29-1</b> et <b>PC-29-2</b> .
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (7,5%)	味 d37	<sub>2</sub> (2,0 g)	24-31 regroupées: mélange de produits dont <b>PC-31</b> .
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (10%)	38-60	C <sub>3</sub> (9,5 g)	32-41 regroupées: mélange d'environ 6 produits.
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (12,5%)	61-70	C <sub>4</sub> (29,7 g)	□A <sub>7</sub> -83 regroupées: mélange d'au moins 5 produits dont <b>PC-4</b> .
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (15%)	71-78		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (20%)	79-86		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (25%)	87-94	C <sub>5</sub> (3,2 g)	84-96 regroupées: mélange de produits + trainées.
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50%)	95-96		

#### Purification des composés PC-29-1, PC-29-2, PC-31 et PC-4

Les fractions de 8 à 23 ont été filtrées avant le regroupement des eaux mères. La CCM des précipités obtenus montre qu'ils présentent les mêmes caractéristiques à savoir: mêmes  $R_f$ , mêmes couleurs à l'UV 366 nm. Ces précipités ont été regroupés en deux sous la base de leurs couleurs et indexés PC-29-1 (15,0 mg) poudre jaune et PC-29-2 (10,0 mg) poudre rougeâtre.

Les fractions de 27 à 28 ont été filtrées avant le regroupement des filtrats aux fractions 24-26 et 29-31 sur la base de la CCM. Les produits solides obtenus (poudre blanche) ont été essorés et mis ensembles après une CCM. Nous avons indexé ce produit PC-31 (25,0 mg).

Les fractions de 42 à 55 ont été filtrées avant le regroupement des eaux mères aux fractions 56-83 sur la base de la CCM. Les produits solides obtenus (fibres blanchâtres) ont été essorés et regroupés sur la base d'une CCM puis indexés PC-4 (300 mg) après une CCM analytique.

#### Purification des composés PC-A-1 et PC-A-2

La série C<sub>4</sub> (29,7 g) a été fixée sur une masse équivalente de silice et rechromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution s'est faite au mélange chlorure de méthylène-méthanol de polarité croissante. Les fractions de 150 mL ont été recueillies et regroupées sur la base de la CCM analytique (Tableau XLIII).

**Tableau XLIII:** Chromatogramme de la série C<sub>4</sub>

<b>Eluant</b>	<b>Fractions</b>	<b>Séries (masse en g)</b>	<b>Remarques</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (7,5%)	1-53	1-10 (0,1)	mélange de produits
		11-30 (1,2)	mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (10%)	54-64	31-65 (8,5)	mélange de produits dont <b>PC-4</b> et <b>PC-A</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (12,5%)	65-71	66-71 (14,0)	mélange de produits dont <b>PC-A</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50%)	72-73	72-73 (2,1)	mélange de produits

Les fractions de 42 à 43 ont été filtrées, la CCM montre que le produit solide obtenu (fibres blanchâtres) est identique à PC-4.

Les fractions de 45 à 65 ont été également filtrées et les produits obtenus sont identiques et indiquent une seule tache après une CCM en phase normale. Nous les avons regroupés et indexés PC-A (3,5 g). Cependant, l'analyse HPLC-MS permet de voir qu'il s'agit d'un mélange de deux isomères. Ce qui est confirmé après une CCM en phase inverse qui montre deux taches après révélation à l'UV (254 et 366 nm) et à l'acide sulfurique dilué (50%). Il s'agit donc d'un mélange de deux produits.

Une partie de PC-A (60 mg) a été purifiée sur une HPLC préparative en phase inverse. L'élution a été faite avec un système isocratique MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), lampe UV 254 nm et vitesse d'écoulement 5 mL/min. Après des temps de rétention de 20 et 22 minutes, nous avons obtenu deux produits, qui après évaporation du solvant ont donné respectivement PC-A-1 (46,4 mg) et PC-A-2 (4,8 mg).

#### **III.3.2.1.4- Chromatographie de la série D**

La série D (51,0 g) a été fixée sur une masse équivalente de silice et chromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution s'est faite à l'acétate d'éthyle, puis au mélange acétate d'éthyle-méthanol de polarité croissante. Les fractions de 200 mL ont été recueillies et regroupées sur la base de la CCM analytique (Tableau XLIV).



**Tableau XLIV:** Chromatogramme de la série D

Eluant	Fractions	Séries (masse en g)	Remarques
AE pur	1-11	D <sub>1</sub> (0,2)	1-3 regroupées: mélange de produits.
AE/MeOH (5%)	12-36	D <sub>2</sub> (0,8)	4-22 regroupées: mélange d'au moins 5 produits.
AE/MeOH (10%)	37-52	D <sub>3</sub> (0,6)	23-37 regroupées: mélange de produits.
AE/MeOH (15%)	53-78	D <sub>4</sub> (31,9)	38-93 regroupées: mélange d'environ 6 produits.
AE/MeOH (20%)	79-98	D <sub>5</sub> (7,3)	94-125 regroupées: mélange d'au moins 5 produits.
AE/MeOH (25%)	99-120		
AE/MeOH (30%)	121-140	D <sub>6</sub> (2,1)	126-155 regroupées: mélange de produits.
AE/MeOH (35%)	141-152		
AE/MeOH (50%)	153-155		Trainées

**Purification des composés PC-A-3 et PC-A-7**

La série D<sub>4</sub> (31,9 g) a été fixée sur une masse équivalente de silice et rechromatographiée sur colonne de gel de silice. L'élution s'est faite avec un système isocratique CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AE/MeOH/H<sub>2</sub>O (8:8:6:1). Les fractions de 150 mL ont été recueillies et regroupées sur la base de la CCM analytique (Tableau XLV).

**Tableau XLV:** Chromatogramme de la fraction D<sub>4</sub>

Eluant	Fractions	Séries (masse en g)	Remarques
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AE/MeOH/ H <sub>2</sub> O (8:8:6:1)	1-50	3-5 (0,2922)	mélange d'environ 4 produits.
		6-8 (0,6452)	mélange d'environ 5 produits.
		9-15 (2,0)	mélange d'environ 5 produits.
		16-20 (1,4)	mélange d'environ 5 produits.
		21-37 (12,0)	mélange d'environ 5 produits.
		38-50 (9,1)	mélange d'environ 5 produits.
MeOH.	51-53		Trainées

Une partie de la série 3-5 (50 mg) a été traitée par la HPLC préparative en phase inverse. L'élution s'est faite au système isocratique MeOH/H<sub>2</sub>O (4:6), lampe UV 254 nm et vitesse d'élution 4 mL/min. Nous avons obtenu en plus de PC-A-2, un solide incolore après un temps de

rétenion de 25 minutes. De même, une partie de la série 6-8 (66 mg) a été soumise au même traitement et a conduit en plus de PC-A-1 et PC-A-2 au même solide incolore après un TR de 25 minutes. Ce produit a été indexé PC-A-3 (17,7 mg).

Une partie de la série 21-37 (50 mg) a été également traitée par la HPLC préparative en phase inverse. L'élution s'est faite au système isocratique MeOH/H<sub>2</sub>O (1:9), lampe UV 254 nm et vitesse d'élution 4 mL/min. Nous avons obtenu après un TR de 14 minutes, un produit solide incolore et l'avons indexé PC-A-7 (6,5 mg).

### III.3.2.2- Isolement des composés des écorces du tronc de *E. cylindricum*

L'extrait au méthanol des écorces du tronc de *E. cylindricum* a été réextrait à l'acétate d'éthyle-méthanol (9:1). L'extrait obtenu (390 g) a été fixé sur une masse équivalente de silice, puis fractionné par chromatographie flash de gel de silice. L'élution a été faite à l'hexane, puis au mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante, et enfin au mélange acétate d'éthyle-méthanol (10-20%). Les fractions de même polarité ont été recueillies, évaporées sous pression réduite et regroupées en sept grandes fractions principales Fr<sub>0</sub>, Fr<sub>1</sub>, Fr<sub>2</sub>, Fr<sub>3</sub>, Fr<sub>4</sub>, Fr<sub>5</sub> et Fr<sub>6</sub> (Tableau XLVI).

La fraction Fr<sub>0</sub> sur la base de la GC-MS s'est révélée être constituée principalement des acides gras et de phytostérols. Cette fraction ainsi que la fraction Fr<sub>6</sub> n'ont pas été étudiées. Les fractions Fr<sub>4</sub> et Fr<sub>5</sub> ont été combinées sur la base de leurs profils LC-MS pour donner la fraction Fr<sub>4-5</sub>.

**Tableau XLVI:** Chromatogramme de l'extrait à l'AE/MeOH (9:1) des écorces du tronc de *E. cylindricum*

Eluant	Fractions	Masses (g)	Remarques
Hex. Pur	Fr <sub>0</sub>	55	Mélange de produits huileux
Hex/AE (9:1)	Fr <sub>1</sub>	38	Mélange de produits
Hex/AE (8:2)	Fr <sub>2</sub>	41	Mélange de produits
Hex/AE (7:3)	Fr <sub>3</sub>	36	Mélange de produits
Hex/AE (1:1)	Fr <sub>4</sub>	20	Mélange de produits
AE pur	Fr <sub>5</sub>	30	Mélange de produits
AE/MeOH (9:1)	Fr <sub>6</sub>	18	Mélange de produits
AE/MeOH (8:2)			

Les 4 fractions Fr<sub>1</sub>, Fr<sub>2</sub>, Fr<sub>3</sub> et Fr<sub>4-5</sub> ont été à nouveau fractionnées par chromatographie flash de gel de silice. L'éluion a été faite au mélange hexane-acétate d'éthyle soit 5-25 % pour Fr<sub>1</sub> ou 20-37,5 % pour Fr<sub>2</sub> et au mélange chlorure de méthylène-méthanol 0-10 % pour les fractions Fr<sub>3</sub> et Fr<sub>4-5</sub>. Nous avons obtenu quatre séries de six (A<sub>1</sub>-A<sub>6</sub>), huit (B<sub>1</sub>-B<sub>8</sub>), sept (C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>) et sept (D<sub>1</sub>-D<sub>7</sub>) sous-fractions (Tableaux XLVII et XLVIII).

**Tableau XLVII:** Chromatogrammes des fractions Fr<sub>1</sub> et Fr<sub>2</sub>

Eluant	Fractions	Sous-fractions (masses)	Remarques
<b>Fr<sub>1</sub></b>			
Hex/AE (95:5)	1-10	A <sub>1</sub> (8,4 g)	Mélange de produits
Hex/AE (92,5:7,5)	11-14	A <sub>2</sub> (3,9 g)	Mélange de produits
Hex/AE (90:10)	15-18	A <sub>3</sub> (5,0 g)	Mélange de produits
Hex/AE (85:15)	19-29	A <sub>4</sub> (7,5 g)	Mélange de produits
Hex/AE (80:20)	30-36	A <sub>5</sub> (5,3 g)	Mélange de produits
Hex/AE (75:25)	37-39	A <sub>6</sub> (4,1 g)	Mélange de produits
<b>Fr<sub>2</sub></b>			
Hex/AE (80:20)	1-6	B <sub>1</sub> (3,2 g)	Mélange de produits
Hex/AE (78,5:22,5)	7-9	B <sub>2</sub> (2,5 g)	Mélange de produits
Hex/AE (75:25)	10-14	B <sub>3</sub> (6,4 g)	Mélange de produits
Hex/AE (72,5:27,5)	15-20	B <sub>4</sub> (5,3 g)	Mélange de produits
Hex/AE (70:30)	21-25	B <sub>5</sub> (6,9 g)	Mélange de produits
Hex/AE (67,5:32,5)	26-29	B <sub>6</sub> (6,0 g)	Mélange de produits
Hex/AE (65:35)	30-35	B <sub>7</sub> (7,1 g)	Mélange de produits
Hex/AE (62,5:37,5)	36-38	B <sub>8</sub> (1,7 g)	Mélange de produits

**Tableau XLVIII:** Chromatogrammes des fractions Fr<sub>3</sub> et Fr<sub>4-5</sub>

Eluant	Fractions	Sous-fractions (masses)	Remarques
<b>Fr<sub>3</sub></b>			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:1)	1-7	C <sub>1</sub> (2,3 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (98:2)	8-12	C <sub>2</sub> (5,1 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (96,5:3,5)	13-22	C <sub>3</sub> (7,0 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95:5)	23-27	C <sub>4</sub> (3,2 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (93,5:6,5)	28-35	C <sub>5</sub> (6,7 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (92:8)	36-38	C <sub>6</sub> (3,8 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	39-41	C <sub>7</sub> (4,2 g)	Mélange de produits
<b>Fr<sub>4-5</sub></b>			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (99:1)	1-7	D <sub>1</sub> (6,0 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (98:2)	8-12	D <sub>2</sub> (3,6 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (96,5:3,5)	13-14	D <sub>3</sub> (1,8 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95:5)	15-19	D <sub>4</sub> (8,9 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (93,5:6,5)	21-27	D <sub>5</sub> (10,2 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (92:8)	28-37	D <sub>6</sub> (11,0 g)	Mélange de produits
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	38-40	D <sub>7</sub> (4,8 g)	Mélange de produits

Les sous-fractions A<sub>6</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, D<sub>5</sub> et D<sub>6</sub> ont été soumises à la HPLC préparative en phase inverse à une longueur d'onde de 205 nm et une vitesse d'écoulement de 4 mL/min., avec le système de solvant H<sub>2</sub>O (A)-MeOH (B) de gradient programmé.

#### Méthode d'élution

Temps (min)	% A (H <sub>2</sub> O)	% B (MeOH)
00-15	70	30
15-28	20	80
28-30	00	100
30-37	00	100

Ensuite, le système est retourné aux conditions initiales (70 % de A) en 1 min., puis s'est stabilisé en 5 min.

---

Ainsi:

- Le composé EC10P3431 (22 mg) a été obtenu de la sous-fraction A<sub>6</sub> avec un temps de rétention de 20 min 42 s.
- Le composé EC20P2031 (7 mg) a été obtenu de la sous-fraction B<sub>4</sub> avec un temps de rétention de 20 min 47 s.
- Le composé EC30P181 (76 mg) a été obtenu de la sous-fraction C<sub>4</sub> avec un temps de rétention de 18 min 30 s.
- Les composés EC30P182 (50 mg), EC30P183 (80 mg) et EC30P184 (49 mg) ont été obtenus de la sous-fraction C<sub>6</sub> avec des temps de rétention respectifs de 19 min 48 s, 21 min 28 s et 22 min 12 s.
- Le composé EC30F5 (55 mg) a été obtenu de la sous-fraction C<sub>7</sub> avec un temps de rétention de 08 min 26 s.
- De la sous-fraction D<sub>5</sub>, nous avons obtenu les composés EC100P20/201 (37 mg), EC100P202 (92 mg) et EC100P26 (63 mg) avec des temps de rétention respectifs de 18 min 56 s, 18 min 54 s et 19 min 12 s.
- Enfin, la sous-fraction D<sub>6</sub>, a conduit à l'obtention des composés EC100P331/321 (68 mg), EC100P332/322 (20 mg) et EC100P333/3231 (21 mg) avec des temps de rétention respectifs de 01 min 00 s, 01 min 25 s et 15 min 36 s.

### **III.4- TRANSFORMATIONS CHIMIQUES SUR QUELQUES COMPOSES ISOLÉS**

#### **III.4.1.- Réactions d'hydrolyse**

##### **III.4.1.1- Réaction d'hydrolyse de l'hymexelsine (PC-4)**

PC-4 (50 mg, 0,103 mmol) a été chauffé à reflux pendant 03 h 30 min dans le mélange méthanol-acide sulfurique 10 % (1/1) à la température de 60 °C. Le mélange réactionnel a été ensuite extrait à l'acétate d'éthyle pour conduire après évaporation du solvant sous pression réduite aux cristaux jaunes, composé que nous avons indexé PHPC-4 (18 mg, 91 %). Ce composé a été identifié sur la base de ses données spectrales et par CCM comparative à la scopolétine **44** (Page 217).

---

#### **III.4.1.2- Réaction d'hydrolyse du sapelenine H (EC10P3431)**

A une solution de EC10P3431 (10 mg, 0,021 mmol) ont été ajoutés 5 mL d'une solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10%). Le mélange réactionnel a été soumis à une agitation magnétique à température ambiante pendant 10 h. Le milieu réactionnel a été ensuite extrait avec du dichlorométhane et après évaporation du solvant sous pression réduite, l'extrait obtenu a été soumis à une HPLC préparative pour conduire au composé indexé PH-EC10P3431 (10,1 mg; 97,3 %). Ce composé a été identifié sur la base de ses données spectrales et par CCM comparative à l'ekeberine D2 **168** (Page 218).

#### **III.4.2- Réactions d'acétonidation**

##### **III.4.2.1- Réaction d'acétonidation du sapelenine I (EC30P182)**

A une solution de EC30P182 (20 mg, 0,040 mmol) dans l'acétone (5 mL), ont été ajoutés 1 mL de 2,2-diméthoxypropane et 4 mg d'acide *p*-toluène sulfonique. Après 30 minutes à 20 °C, la réaction a été arrêtée avec de l'eau et le milieu réactionnel a été extrait avec de l'hexane puis lavé avec du NaHCO<sub>3</sub> et séché avec du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Après évaporation du solvant, l'extrait est soumis à une HPLC pour conduire à une huile incolore que nous avons indexé EC30P182ACO (21,4 mg; 99 %). Ce composé a été identifié sur la base de ses données spectrales à l'acétonide du sapelenine I **170a** (Page 220).

##### **III.4.2.2- Réaction d'acétonidation de l'ekeberine D2 (EC30P181)**

Une réaction similaire à la précédente a été effectuée sur EC30P181 (7 mg, 0,014 mmol) pour conduire à une huile incolore que nous avons indexé EC30P181ACO (7,5 mg; 99,1 %). Le composé a été identifié sur la base de ses données spectrales à l'acétonide de l'ekeberine D2 **173** (Page 222).

#### **III.4.3- Réactions d'estérification**

##### **III.4.3.1- Réaction d'acétylation du sapelenine I (EC30P182)**

0,5 ml de la pyridine anhydre et 1 ml de l'anhydride acétique ont été ajoutés à 10 mg de EC30P182 (0,020 mmol) et le mélange réactionnel a été soumis à une agitation magnétique pendant 12 h. Après traitement du milieu réactionnel, l'extrait obtenu a été soumis à une HPLC pour conduire à une huile incolore majoritaire indexée EC30P182Ac (5,7 mg; 48,7 %) et qui a été identifiée sur la base de ses données spectrales au diacétylsapelenine I **174** (Page 224).

---

#### **III.4.3.2- Réaction d'acétylation de l'ekeberine D2 (EC30P181)**

Une réaction similaire à la précédente a été effectuée sur EC30P181 (10 mg, 0,020 mmol) pour conduire à une huile incolore majoritaire indexée EC30P181Ac (5,7 mg; 48,7 %), qui a été identifiée sur la base de ses données spectrales au diacétylekeberine D2 175 (Page 226).

#### **III.4.3.3- Réaction d'estérification du sapelenine H (EC10P3431) avec les chlorures de (R) et de (S)-acide de Mosher.**

Deux portions de EC10P3431 (7 mg, 0,014 mmol chacune) ont été traitées avec les chlorures de (R) et de (S)-MTPA dans le DMAP et avec agitation magnétique à température ambiante durant une nuit. Les deux réactions ont été effectuées en parallèle et leurs progressions étaient suivies par la HPLC analytique. Après consommation totale de EC10P3431, le solvant a été évaporé et le mélange réactionnel soumis à une HPLC préparative pour conduire aux composés indexés (S)-EC10P3431-MTPA et (R)-EC10P3431-MTPA ester respectivement (7,5 mg chacun; 74 %). Ces composés ont été identifiés aux (S) et (R)-MTPA ester de sapelenine H (172a et 172b, Page 228) sur la base de leurs données spectrales.

#### **III.4.3.4- Réaction d'estérification de l'acétonide du sapelenine I (EC30P182ACO) avec les chlorures de (R) et de (S)-acide de Mosher**

EC30P182ACO (5 mg, 0,009 mmol) a subi les mêmes réactions susmentionnées avec les chlorures de (R) et de (S)-acide de Mosher. Par la même procédure, nous avons obtenu les composés indexés (S)-EC30P182ACO-MTPA et (R)-EC30P182ACO-MTPA ester respectivement (5,2 mg chacun; 74 %). Ces composés ont été identifiés aux (S) et (R)-MTPA ester de l'acétonide du sapelenine I (170b et 170c, Page 231) sur la base de leurs données spectrales.

#### **III.4.3.5- Réaction d'estérification de l'acétonide de l'ekeberine D2 (EC30P181ACO) avec les chlorures de (R) et de (S)-acide de Mosher**

EC30P181ACO (10 mg, 0,019 mmol) a subi les mêmes réactions que EC10P3431 et EC30P182ACO avec les chlorures de (R) et de (S)-acide de Mosher, ce qui a permis via la même procédure d'obtenir les composés indexés (S)-EC30P181ACO-MTPA et (R)-EC30P181ACO-MTPA ester respectivement (10,2 mg chacun; 74 %). Ceux-ci ont été identifiés aux (S) et (R)-MTPA ester de l'acétonide de l'ekeberine D2 (173a et 173b, Page 233) sur la base de leurs données spectrales.

---

## III.5- ACTIVITES BIOLOGIQUES

### III.5.1- Activités anti-inflammatoires

#### III.5.1.1- Tests des fractions et composés nouveaux isolés de *Entandrophragma cylindricum* sur la sécrétion des PGE2.

Un kit de test des PGE2 contenant tout le matériel nécessaire (R&D Systems®) a été utilisé pour mesurer respectivement les densités optiques et les concentrations minimales inhibitrices des fractions et des composés nouveaux isolés. Les fractions ou composés à tester ont été dissous dans le DMSO (0,2 % v/v) et dilués trois fois dans le diluant RD5-56. Les fractions Fr<sub>0</sub>; Fr<sub>1</sub>; Fr<sub>2</sub>; Fr<sub>3</sub> Fr<sub>4-5</sub>; Fr<sub>6</sub> et le résidu (Res 1) ont été testées chacun aux concentrations de 100 et 1 µg/mL. Quant aux composés nouveaux (sapelenines G-J), ils ont été testés chacun aux concentrations de 10,0; 1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 et 0,00001 µg/mL. Toutes les substances étaient maintenues à température ambiante avant utilisation. Les standards indométhacine (500; 100; 10; 1; 0,1; 0,01) et diclofénac (500; 100; 10; 1; 0,1 µg/mL) ont été utilisés simultanément et en parallèle. On a des puits dans lesquels les substances ont été introduites comme suit:

- Dans certains puits NBS (*Normal Binding Substrate*), 200 µL de diluant RD5-56 ont été introduits
- Dans les puits standards, 150 µL de diluant RD5-56 ont été introduits
- Dans les puits restants, 150 µL de standard, de contrôles (indométhacine ou diclofénac) ou d'échantillons (fractions ou composés purs), ont été introduits.

Par la suite, 50 µL d'anticorps primaires ont été ajoutés dans chacun des puits à l'exception des puits NBS (la couleur bleue apparaissait dans tous les puits sauf les puits NBS). Les puits ont été ensuite recouverts et incubés à température ambiante pendant une heure sur un *shaker* (0,12'' orbit) à une vitesse de 500 rpm. Sans laver les puits, 50 µL de d'anticorps conjugués PGE2 (anticorps secondaires) ont été ajoutés dans chaque puits (la couleur virait au violet dans tous les puits sauf les puits NBS). Les puits ont été couverts avec une plaque adhésive et incubés pendant 2 heures à température ambiante sur le *shaker* à 500 rpm.

Le contenu de chaque puits a été aspiré et lavé quatre fois. Pour cela, chaque puits était rempli avec 400 µL de tampon de lavage en utilisant une pissette et en s'assurant de bien aspirer le reste de liquide à chaque lavage. Après le dernier lavage, on s'assurait que tout le tampon a été enlevé et la plaque était bien essorée sur une serviette propre.



---

Ensuite 200  $\mu\text{L}$  de solution de substrat ont été ajoutés dans chaque puits et l'incubation s'était faite pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. L'arrêt de la réaction s'était fait en ajoutant 100  $\mu\text{L}$  de la solution d'arrêt dans chaque puits et les couleurs dans les puits viraient du bleu au jaune.

Par lecture spectrophotométrique à 540 nm, les densités optiques (D.O) pour les différentes fractions ont été déterminées, tout comme les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour chacun des sapelenines G-J. En effet, les CMI des sapelenines G-J ont été déterminées à partir d'une courbe standard  $D.O_{\text{standard}} = f(\log C_{\text{standard}})$ . Pour compenser l'effet de la dilution, chaque concentration lue à partir de la courbe standard était multipliée par le facteur de dilution (FD = 3).

### **III.5.1.2- Tests des composés nouveaux isolés de *Entandrophragma cylindricum* sur la sécrétion de l'IL-17 par les PBMCs stimulées avec la PHA.**

#### **III.5.1.2.1- Isolement des cellules mononucléaires du sang périphérique humain**

La technique utilisée est celle décrite en 2001 par Zvetkova et *al.* (Zvetkova et *al.*, 2001). Les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMCs) sont composées des globules blancs ou leucocytes principalement les monocytes et les lymphocytes. Elles ont été isolées du sang des donneurs volontaires sains à Dortmund, en Allemagne. La séparation des cellules du sang a été réalisée par centrifugation sur gradient de densité. En effet, après centrifugation du sang à la vitesse de 500 rpm, les érythrocytes et granulocytes sédimentent au fond du tube. Les lymphocytes et monocytes sont isolés sous la forme d'un anneau blanc au dessus du gradient de densité et seuls les lymphocytes T ont été utilisés pour la production de l'IL-17. Après isolement, les PBMCs ont été lavées 3 fois dans le tampon phosphate salin (PBS: 10 mM de phosphate de potassium pH 7,4 et 150 mM de chlorure sodium) contenant 1mM d'EDTA. Les cellules ont été maintenues dans le milieu RPMI-1640 (Pan Biotech) supplémenté avec 10 % du sérum fœtal de veau (FCS) inactivé ou décomplémenté par chauffage pendant 30 min à 56 °C. Dans le même milieu ont été ajoutés 100 unités/mL de pénicilline; 0,1 mg/mL de streptomycine et 2mM de L-glutamine dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de  $\text{CO}_2$ .

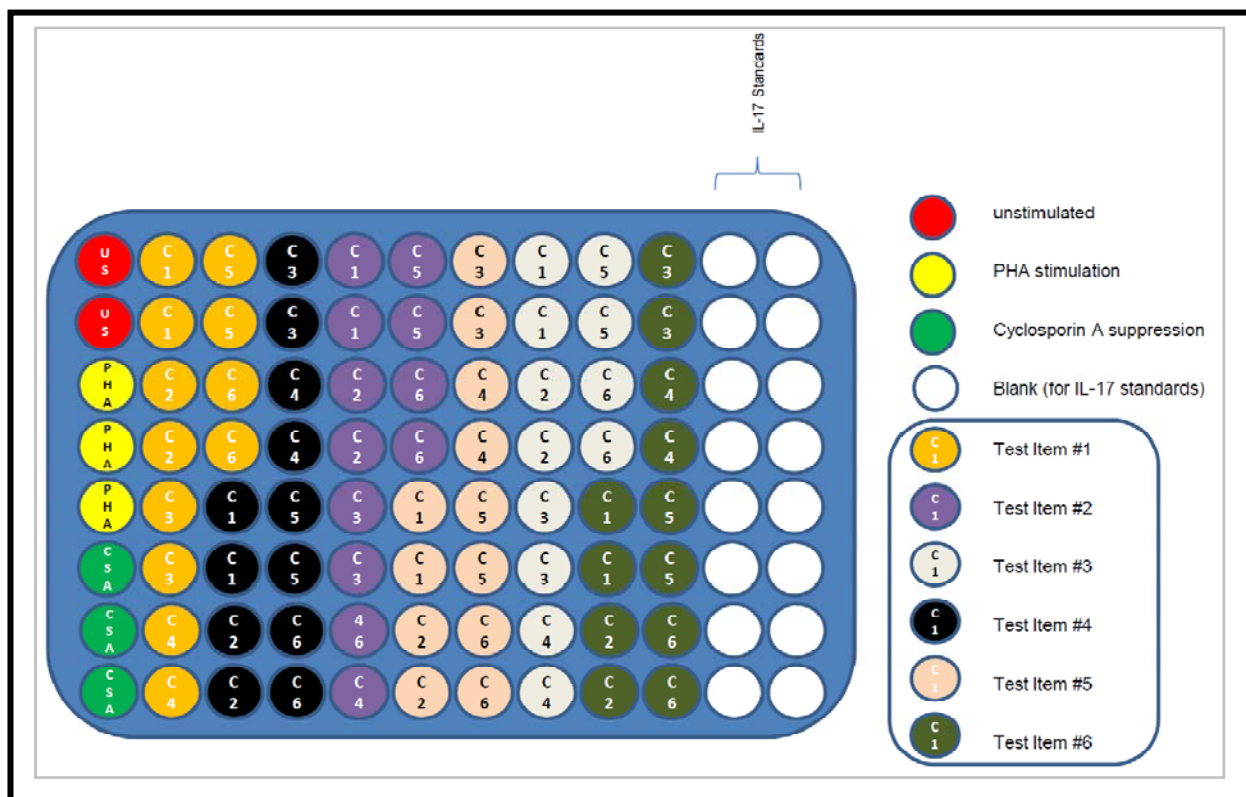
---

### **III.5.1.2.2- Stimulation des cellules mononucléaires du sang périphérique humain et mesure de la concentration de l'IL-17.**

Les PBMCs humain ont été stimulées avec la phytohemagglutinine (PHA). Une plaque de 96 puits (Costar) associée à un kit ELISA IL-17 humain (Ray Biotech, Inc.) a été utilisée pour mesurer la concentration de l'IL-17. Pour chacune des expérimentations effectuées, les PBMCs ont été fraîchement préparées. Les composés à tester ont été dissouts dans le DMSO à 0,2 % v/v. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 48 heures.

Les PBMCs isolées ont été introduites dans les puits à une densité de  $3,72 \text{ E} \pm 06$  cellules/mL, dans le milieu de culture RPMI-1640 en présence ou en absence (contrôle négatif) de la phytohémagglutinine (PHA, Sigma). Dans un certain nombre de puits contenant le stimulant PHA, ont été ajoutés la Cyclosporine A (CsA) à la concentration de  $0,41 \mu\text{M}$  (contrôle de référence) et les composés à tester à des concentrations non cummulatives de 0,41; 1,21; 3,70; 11,11; 33,33 et  $100 \mu\text{M}$  ( $C_{\text{max}}$ :  $100\mu\text{M}$  avec un facteur de dilution de 3). Les puits restants contenant les PBMCs et la PHA ont été utilisés comme contrôles positifs. Pour chacune des six concentrations, l'expérimentation a été faite en duplicata dans deux puits.

La lecture des réactions colorées a nécessité l'arrêt des réactions. Pour cela, un volume de  $50 \mu\text{L}$  d'acide phosphorique 3M a été ajouté dans chaque puits. L'intensité de la couleur orangée dans les puits était proportionnelle à la concentration de l'IL-17 dans les puits. Ainsi les densités optiques ont été lues à 450 nm avec un lecteur de plaque de marque Spectramax (Molecular Devices), en commençant par le blanc, puis le standard, ensuite les étalons et enfin les échantillons. La courbe d'étalonnage nous a permis de déterminer les concentrations de l'IL-17 dans les échantillons, le contrôle de référence, le contrôle positif et le contrôle négatif.



**IL:** InterLeukine;      **PHA:** Phytohémmagglutinine

**Figure 129:** Présentation générale de la plaque pour le test ELISA IL-17

Pour confirmer que les données obtenues pour la sécrétion de l'IL-17 n'ont pas été affectées par la cytotoxicité des sapelenines G-J vis-à-vis des PBMCs, nous avons évalué la viabilité des PBMCs traitées avec ces composés respectivement à travers un test de viabilité cellulaire (CellTiter-Blue®, Promega) en parallèle.

### III.5.2- Test de viabilité des cellules mononucléaires du sang périphérique humain.

La cytotoxicité des composés isolés a été évaluée selon la méthode de Pagé et *al.* (1993), modifiée par Ahmed et *al.* (1994). Les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMCs) ont été cultivées dans des plaques de culture cellulaire Costar de 96 puits, chaque puits contenant 100  $\mu$ L du milieu RPMI-1640 (Pan Biotech) supplémenté avec 1% de L-glutamine (200 mM) et 10% de sérum fœtal de veau (FCS) inactivé et les PBMCs. Les composés à tester ont été dissous dans du DMSO et une série de six dilutions avec pour facteur de dilution 3 couvrant une gamme de 0,41 à 100  $\mu$ M a été préparée en double, puis redissout dans le milieu de

culture. Après 7h30 min d'incubation, les plaques ont été examinées sous un microscope inversé afin de s'assurer de la croissance des contrôles et des conditions stériles. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  de la résazurine (Sigma) qui est l'indicateur de viabilité, a été ensuite ajouté dans chaque puits et les plaques ont été incubées durant 2 heures supplémentaires. La viabilité des cellules a été mesurée avec le réactif CellTiter Blue (Promega). Ce réactif mesure l'activité métabolique des cellules vivantes qui réduisent la résazurine en résorufine (un produit fluorescent) et dont la quantité est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Il suffit de mesurer le signal fluorescent par un fluorimètre et de calibrer la mesure par une gamme. C'est ainsi que la densité optique des puits a été évaluée par un scanner à fluorescence en utilisant une longueur d'onde excitatrice de 536 nm et une longueur d'onde d'émission de 588 nm (Victor plate reader, PerkinElmer, Inc.). La fluorescence est mesurée et exprimée en pourcentage de PHA (% PHA).

### III.6- CARACTERISTIQUES PHYSICO-CIMIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPOSES ISOLES

#### III.6.1- Les alcaloïdes

##### III.6.1.1- Javaniside (PC-A-1) 155

Etat physique: Poudre amorphe incolore

Formule brute:  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{N}_2$

Test de Dragendorff: Positif

Test de Molish: Positif

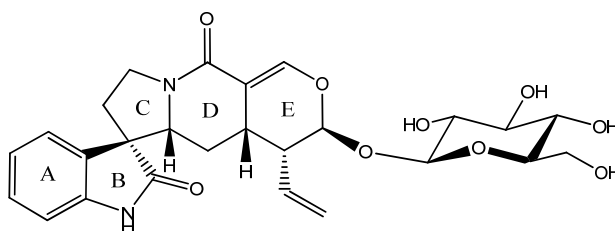
$[\alpha]_D^{23} -141,1^\circ$  (c 0,0014, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  nm: 196, 238 et 258

IR ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3409, 1705, 1656, 1619, 1578, 1467, 1069.

HR-ESIMS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  515,2029; Fig. 12

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ : Tableau.XIII; Fig. 13 et 14



### III.6.1.2- 7-Epi-javaniside (PC-A-2) 157

Etat physique: solide incolore

Formule brute: C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>N<sub>2</sub>

Test de Dragendorff: Positif

Test de Molish: Positif

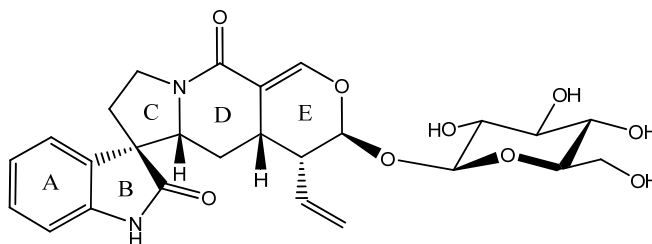
$[\alpha]_D^{23} -115,9^\circ$  (c 0,001, MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm: 196, 206 et 248

IR (CH<sub>3</sub>OH)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3184, 3086, 1711, 1658, 1587, 1472, 1336, 1175, 1073.

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> m/z 515,2029; Fig. 12

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le CD<sub>3</sub>OD: Tableau.XIV; Fig. 22 et 21



### III.6.2- Les acides phénoliques et dérivés

#### Acide vanillique ou acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (PC-14-A) 158

Etat physique: fibres jaunes

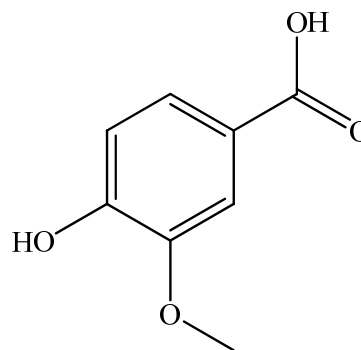
Formule brute: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

Test au FeCl<sub>3</sub>: Positif

EI-MS: [M]<sup>+</sup> m/z 168; Fig. 29

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) et <sup>13</sup>C (150 MHz) dans le CD<sub>3</sub>OD:

Tableau.XV; Fig. 30 et 31



### III.6.3- Les coumarines

#### III.6.3.1- Scopolétine ou scopolétol ou 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine (PC-1) 44

Etat physique: aiguilles jaunes

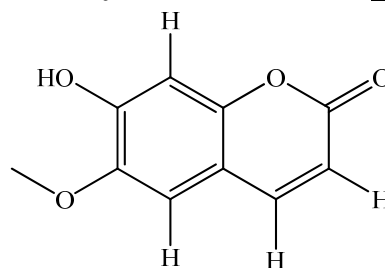
Pf: 200 et 207 °C

Formule brute: C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

Test au FeCl<sub>3</sub>: Positif

HRESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> m/z 215,0318; Fig. 33

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, Acétone-d<sub>6</sub>) et <sup>13</sup>C (100 MHz, Acétone-d<sub>6</sub>): Tableau XVI; Fig. 34 et 35.



### III.6.3.2- Hymexelsine ou xeroboside (PC-4) 159

Etat physique: fibres blanchâtres

P<sub>f</sub>: 206 °C

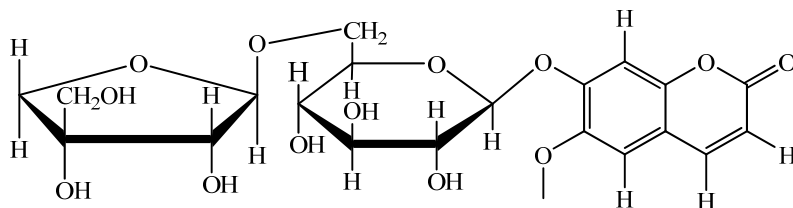
Formule brute: C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>

Test au FeCl<sub>3</sub>: Négatif

Test de Molish: Positif

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 487,1443; Fig. 36

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (100 MHz) dans la Pyridine: Tableau XVII; Fig. 38 et 37.



### III.6.3.3- 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine ou 3,3'-biscopolétine (PC-29-1) 160

Etat physique: poudre cristalline jaune-orangé

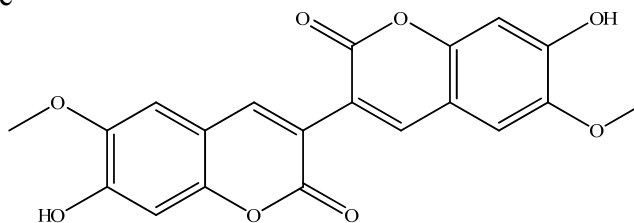
P<sub>f</sub>: 253-255 °C

Formule brute: C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub>

Test au FeCl<sub>3</sub>: Positif

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 383,0787; Fig. 39b

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>: Tableau XVIII; Fig. 41 et 40.



### III.6.3.4- Mélange de la 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-8,8'-biscoumarine et 7,7'-dihydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'-biscoumarine (PC-29-2) 161 et 160

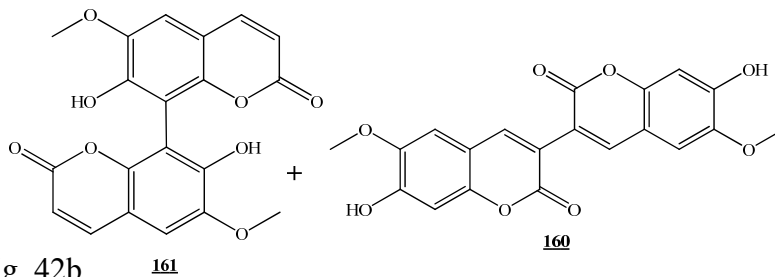
Etat physique: poudre jaune-orangé

Formule brute: C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub>

Test au FeCl<sub>3</sub>: Positif

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 383,0769; Fig. 42b

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) et <sup>13</sup>C (75 MHz) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>: Tableau XIX; Fig. 43 et 44.



### III.6.4- Les flavonoïdes

#### III.6.4.1- (+)-Catéchine (EC100P331/321) 162

Etat physique: poudre cristalline orange

Pf: 172-174 °C

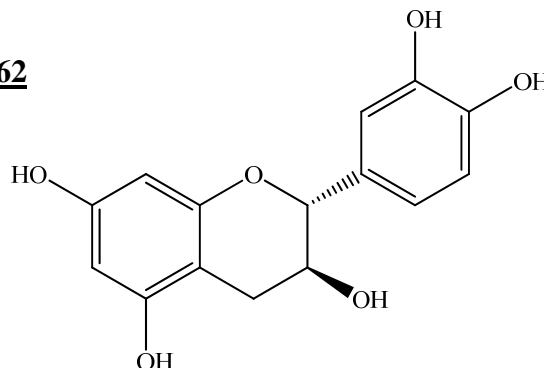
Formule brute: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>

Test au FeCl<sub>3</sub>: Positif

Test de Shinoda: Positif

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 291,0861; Fig. 45

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le CD<sub>3</sub>OD: Tableau XXI; Fig. 46 et 47



#### III.6.4.2- Epicatéchine ou épicatechol (EC100P332/322) 163

Etat physique: poudre cristalline blanche

Pf: 239-241 °C

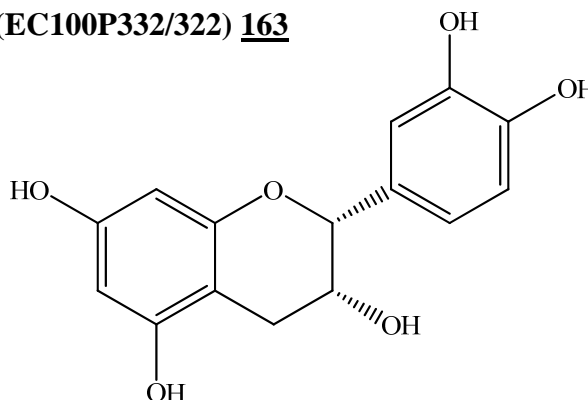
Formule brute: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>

Test au FeCl<sub>3</sub>: Positif

Test de Shinoda: Positif

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 291,0862; Fig. 48

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le CD<sub>3</sub>OD: Tableau XXII; Fig. 50 et 49



### III.6.5- Les iridoïdes

#### Sweroside (PC-A-3) 156

Etat physique: solide incolore

Pf: 106-109 °C

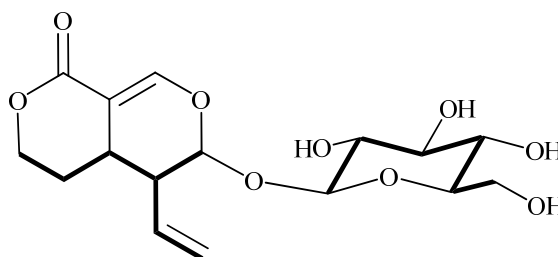
Formule brute: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

Test de Molish: Positif

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> -156,1° (c 0,0024, MeOH)

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 359,1341; Fig. 51

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (150 MHz) dans le CD<sub>3</sub>OD: Tableau XXIV; Fig. 53 et 52.



### III.6.6- Les limonoïdes

#### Andirolide G (EC30F-5) 164

Etat physique: aiguilles incolores

Pf: 145-147 °C

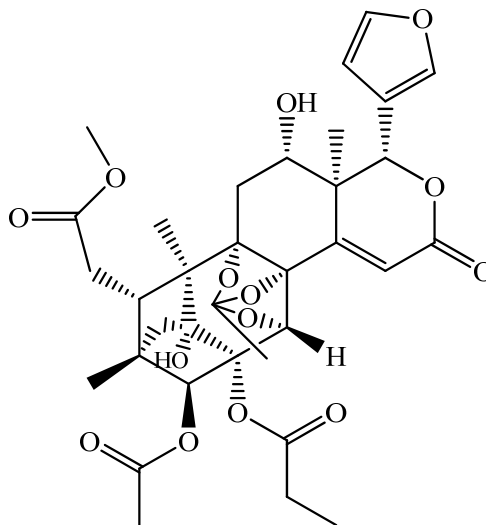
Formule brute: C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

Test de Erlich: Positif

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> m/z 673,2502; Fig. 54

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le CDCl<sub>3</sub>:

Tableau XXV; Fig. 55 et 56



### III.6.7- Les stéroïdes

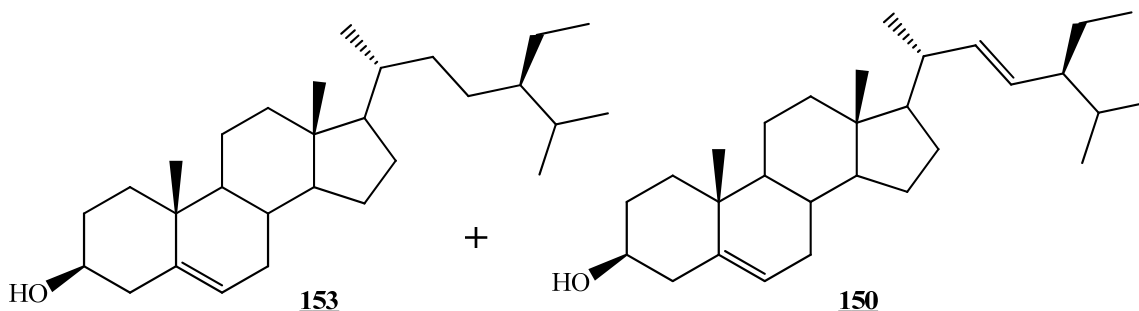
#### III.6.7.1- Mélange de $\beta$ -sitostérol et de stigmastérol (PC-22) 153 et 150

Etat physique: aiguilles blanches

Formules brutes: C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O et C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O

Test de Libermann Burchard: Positif

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Fig. 57



#### III.6.7.2- Mélange de 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de $\beta$ -sitostérol et 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de stigmastérol (PC-31) 152 et 165

Etat physique: Poudre beige

Formules brutes: C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub> et C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>

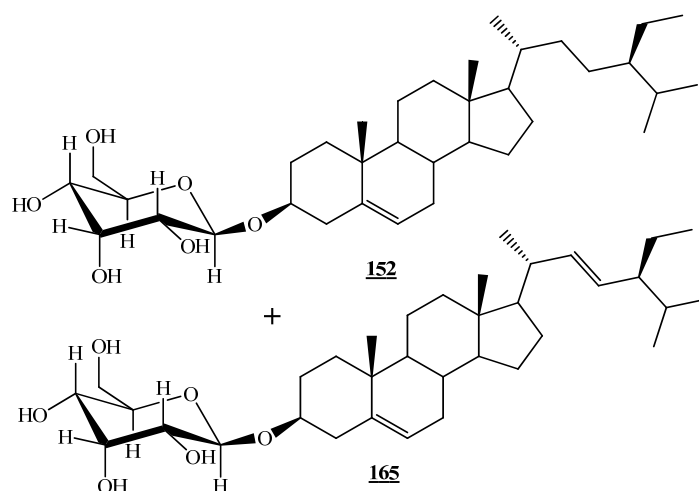
Test de Libermann Burchard: Positif

Test de Molish: Positif

HRESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> m/z 599,4283 et 597,4124 ; Fig. 59



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) dans le mélange CDCl<sub>3</sub>+ CD<sub>3</sub>OD): Fig. 58



### III.6.8- Les carbohydrates

#### 6-O-hexopyranosylhexopyranose (PC-A-7) 166.

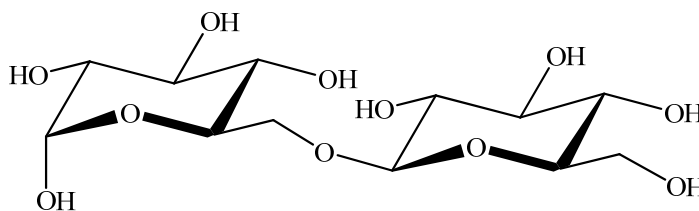
Etat physique: solide incolore

P<sub>f</sub>: 84°C

Formule brute: C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>

Test de Molish: Positif

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) et <sup>13</sup>C (150 MHz) dans le CD<sub>3</sub>OD): Tableau XXVI; Fig. 60 et 61



### III.6.9- Les terpénoïdes

#### III.6.9.1- Sapelenine A (EC100P20/201) 90

Etat physique: poudre cristalline fine blanche

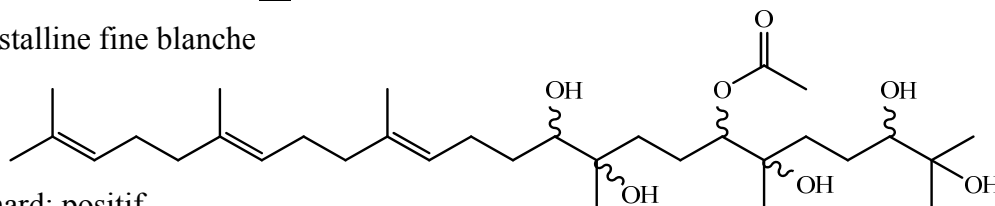
P<sub>f</sub>: 111-112 °C

Formule brute: C<sub>32</sub>H<sub>58</sub>O<sub>7</sub>

Test de Libermann Burchard: positif

HRESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> m/z 555,4264; Fig. 63

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le CDCl<sub>3</sub>: Tableau XXVII; Fig. 64 et 65



#### III.6.9.2- (14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracos-14,18,22-triène-2,3,6,7,10,11-hexaol (EC100P26) 167

Etat physique: huile incolore

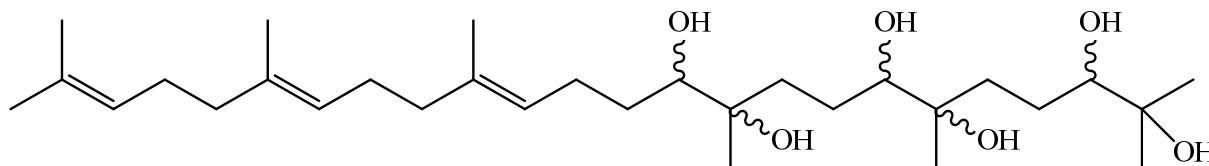
Formule brute: C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>

Test de Libermann Burchard: positif

---

HRESI-MS:  $[M+Na]^+$   $m/z$  535,3967; Fig. 66

RMN  $^1H$  (500 MHz) et  $^{13}C$  (125 MHz) dans le  $CDCl_3$ : Tableau XXVIII; Fig. 68 et 67.



### III.6.9.3- Sapelenine B (EC30P183) 91

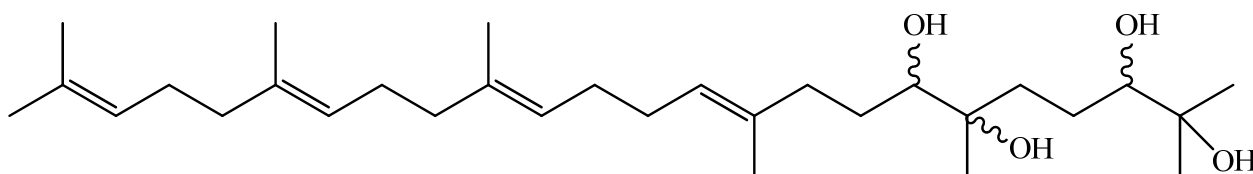
Etat physique: huile visqueuse

Formule brute:  $C_{30}H_{54}O_4$

Test de Libermann Burchard: positif

HRESI-MS:  $[M+Na]^+$   $m/z$  501,3917; Fig. 69

RMN  $^1H$  (500 MHz) et  $^{13}C$  (125 MHz) dans le  $CDCl_3$ : Tableau XXIX; Fig. 71 et 70



### III.6.9.4- Sapelenine D (EC30P184) 93

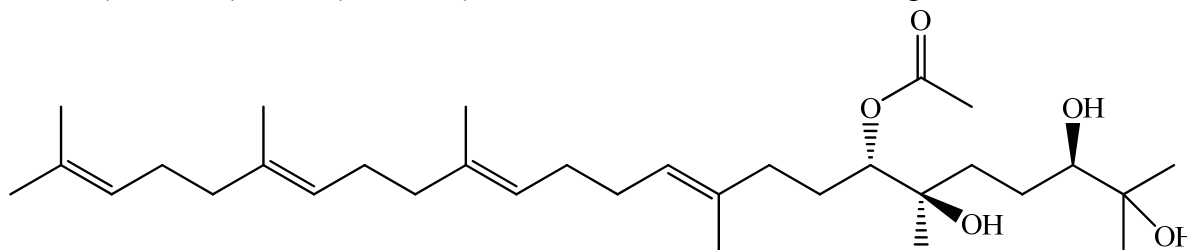
Etat physique: huileux

Formule brute:  $C_{32}H_{56}O_5$

Test de Libermann Burchard: positif

HRESI-MS:  $[M+Na]^+$   $m/z$  543,4024; Fig. 72

RMN  $^1H$  (500 MHz) et  $^{13}C$  (125 MHz) dans le  $CDCl_3$ : Tableau XXX; Fig. 74 et 73



### III.6.9.5- Sapelenine C (EC100P202) 92

Etat physique: huileux

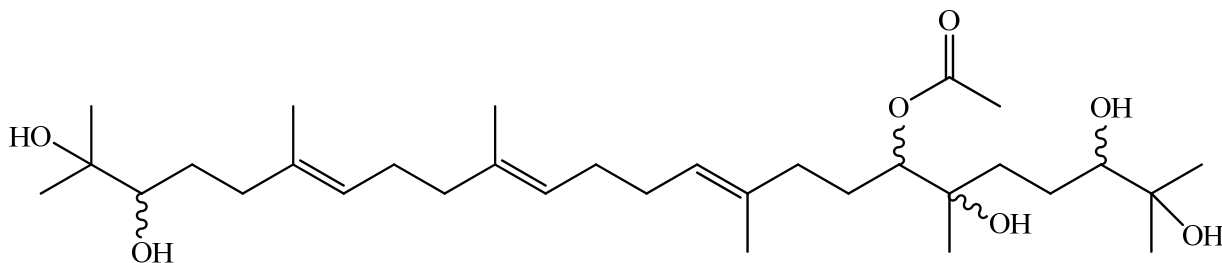
Formule brute:  $C_{32}H_{58}O_7$

Test de Libermann Burchard: positif

---

HRESI-MS:  $[M+Na]^+$   $m/z$  577,4077; Fig. 75

RMN  $^1H$  (500 MHz) et  $^{13}C$  (125 MHz) dans le  $CDCl_3$ : Tableau XXXI; Fig. 77 et 76.



### III.6.9.6- Ekeberine D2 (EC30P181) 168

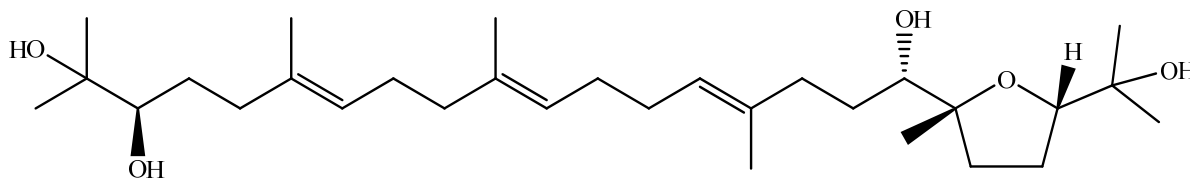
Etat physique: huile visqueuse incolore

Formule brute:  $C_{30}H_{54}O_5$

Test de Libermann Burchard: positif

HRESI-MS:  $[M+H]^+$   $m/z$  495,4055; Fig. 78

RMN  $^1H$  (500 MHz) et  $^{13}C$  (125 MHz) dans le  $CDCl_3$ : Tableau XXXII; Fig. 80 et 79



### III.6.9.7- Sapelenine G (EC100P333/3231) 169

Etat physique: huile incolore

Formule brute:  $C_{30}H_{56}O_6$

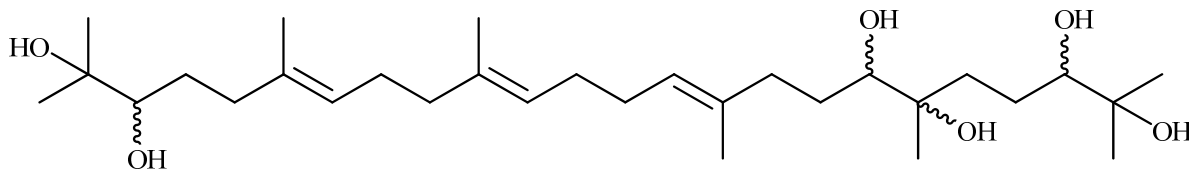
Test de Libermann Burchard: positif

$[\alpha]_D^{20} = +260^\circ$  ( $c$  0,01;  $CH_3OH$ )

IR (KBr)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3386, 1660, 1447, 1373, 1160, 1069, 1008

HRESI-MS:  $[M+H]^+$   $m/z$  513,4152; Fig. 81

RMN  $^1H$  (500 MHz) et  $^{13}C$  (125 MHz) dans le  $CDCl_3$ : Tableau XXXIII; Fig. 83 et 82



### III.6.9.8- Sapelenine I (EC30P182) 170

Etat physique: huile incolore

Formule brute: C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>O<sub>5</sub>

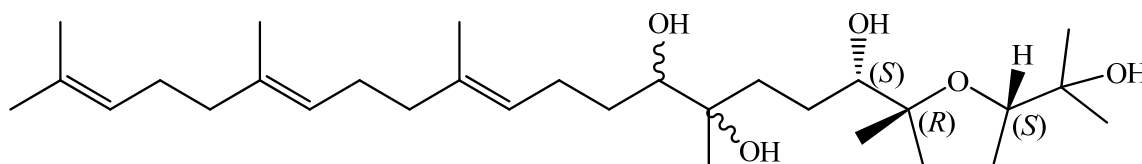
Test de Libermann Burchard: positif

$[\alpha]_D^{20} = +194^\circ$  (*c* 0,01; CH<sub>3</sub>OH)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3430, 1660, 1447, 1378, 1173, 1078, 1026

HRESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 517,3865; Fig. 87

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le CDCl<sub>3</sub>: Tableau XXXIV; Fig. 88 et 90



### III.6.9.9- Sapelenine J (EC20P2031) 171

Etat physique: huile incolore

Formule brute: C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>

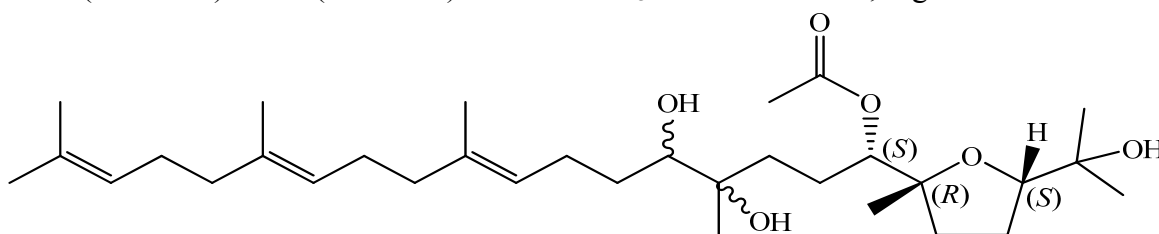
Test de Libermann Burchard: positif

$[\alpha]_D^{20} = +36^\circ$  (*c* 0,01; CH<sub>3</sub>OH)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3430, 3360, 1730, 1660, 1443, 1373, 1243, 1082, 1021

HRESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 559,3968; Fig. 94

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le CDCl<sub>3</sub>: Tableau XXXV; Fig. 95 et 96



### III.6.9.10- Sapelenine H (EC10P3431) 172

Etat physique: huile incolore

Formule brute: C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>

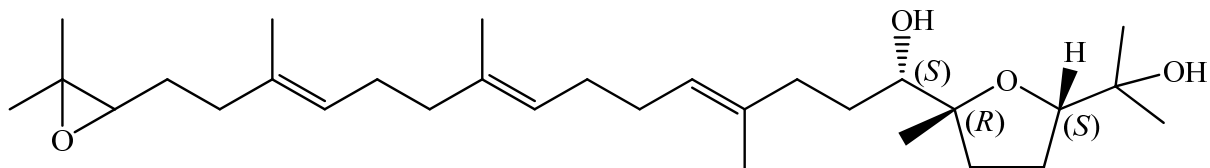
Test de Libermann Burchard: positif

$[\alpha]_D^{20} = +58^\circ$  (*c* 0,01; CH<sub>3</sub>OH)

IR (KBr);  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3430, 1660, 1447, 1378, 1173, 1078, 1026.

HRESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 499,3755; Fig. 100

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans le CDCl<sub>3</sub>: Tableau XXXVI; Fig. 103 et 101



### III.6.9.11- Diacétylsapelenine I (EC30P182Ac) 174.

Etat physique: huile incolore

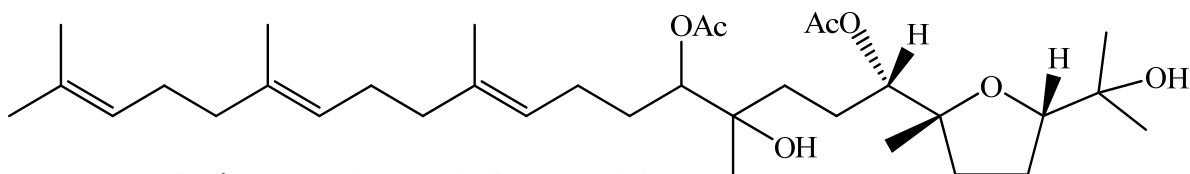
Formule brute: C<sub>34</sub>H<sub>58</sub>O<sub>7</sub>

Test de Libermann Burchard: positif

$[\alpha]_D^{20} = +192^\circ$  (*c* 0,005; CH<sub>3</sub>OH)

HRESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 601.4073; Fig. 114

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,11 (1H, t, *J* = 5,5; H-22), 5,12 (2H, t, *J* = 6,5; H-14, H-18), 4,85 (1H, dd, *J* = 2,8; 9,7), 4,72 (1H, dd, *J* = 2,1; 10,2), 3,78 (1H, t, *J* = 5,7); 2,23 (1H, m, H-13), 2,12 (1H, m, H-5), 2,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2,09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2,07 (4H, m, H-17,H-19), 2,00 (m, H-20), 1,85 (2H, m, H-4), 1,69 (3H, s, CH<sub>3</sub>-24), 1,65 (2H, m, H-9), 1,61 (3H, s, CH<sub>3</sub>-30), 1,58 (6H, s, CH<sub>3</sub>-28, CH<sub>3</sub>-29), 1,54 (1H, m, ), 1,53 (3H, m), 1,38 (1H, m), 1,23 (3H, s, CH<sub>3</sub>-25), 1,17 (3H, s, CH<sub>3</sub>-26), 1,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>-1); Fig. 115.



### III.6.9.12- Diacétyllekeberine D2 (EC30P181Ac) 175

Etat physique: huile incolore

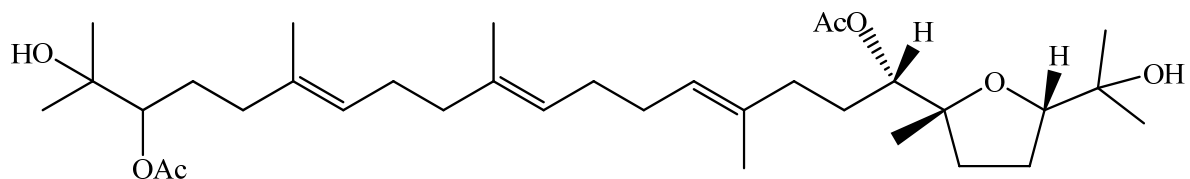
Formule brute: C<sub>34</sub>H<sub>58</sub>O<sub>7</sub>

Test de Libermann Burchard: positif

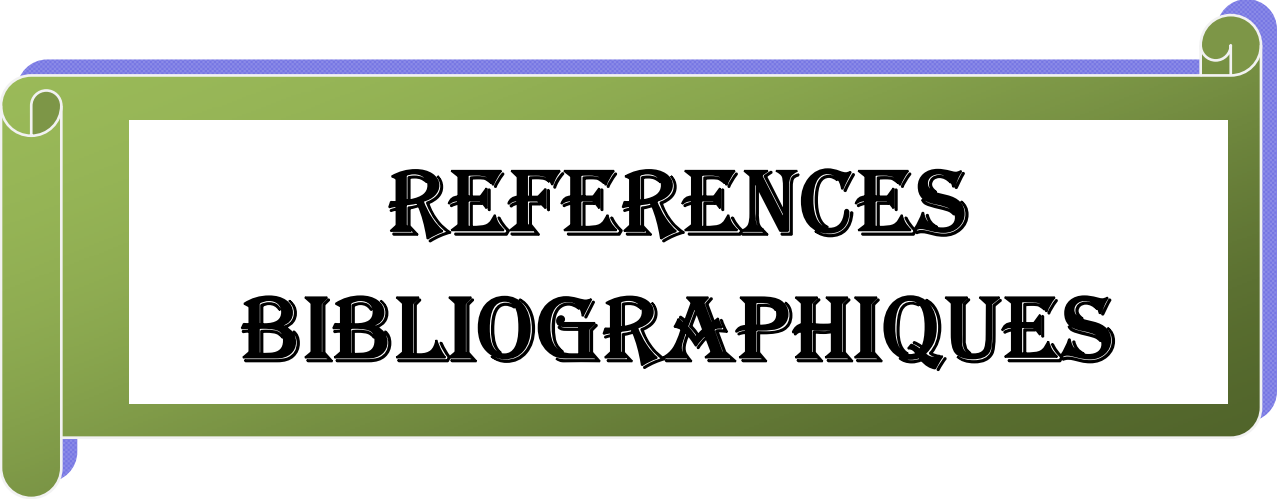
$[\alpha]_D^{20} = +10^\circ$  (*c* 0,005; CH<sub>3</sub>OH)

HRESI-MS: [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 601,4073; Fig. 116

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,06 (m, 3H), 4,85 (dd, *J* = 2,2; 10,2), 4,72 (dd, *J* = 2,6; 10,2), 3,63 (t, *J* = 8,0), 2,03 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,52 (m, 9H), 1,13 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 1,11 (s, 6H), 1,03 (s, 3H); Fig. 117.



---



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- 
- Adesida, G. A., Taylor, D. A. H. 1967. "The chemistry of the genus *Entandrophragma*". *Phytochemistry* **6**, 1429–1433.
- Aïssata, M. D. 2005. «Etude des plantes médicinales de NIAFUNKE (Région Tombouctou), phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée)». Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université de Bamako, Mali, p. 33–37.
- Alberte, R. S., Roschek, W. P., Li, D. 2010. "Anti-inflammatory and anti-allergy extracts from nettle". United States Patent Application, Publication N°. US2010/0009927 A1.
- Allen, D. A., Tomaso, A. E., Priest, O. P., Hindson, D. F., Hurlburt, J. L. 2008. "See for example Mosher Amides: Determining the absolute stereo chemistry of optically-Active Amines". *J. Chem. Educ.* **85**, 698.
- Amadou, D. 2005. «Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae)». Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université de Bamako, Mali, pp. 18–27.
- Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., Murata, T., Yoshimura, H., Narumiya, S., Majima, M. 2003. "Host prostaglandin E2-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth". *J. Exp. Med.* **197**, 221–232.
- Angkasekwinai, P., Dong, C. 2011. «Th17 cytokines: characteristics, regulation, and biological function». In: Jiang, S. (Ed.), *Th17 Cells in Health and Disease*. Springer, New York, USA, pp. 27–40.
- Arigoni, D., Barton, D. H. R., Caglioti, C., Corey, E. J., Ferrini, P. G., Glatier, E. R., Jeger, D., Melera, A., Pradam, S. K., Shafner, F., Sternhell, S., Templeton, J. F., Obinaga, S. 1960. "The constitution of limonin". *Experientia* **16**, 41–46.
- Arndt, R. R., Baachers, W. H. 1972. "The structure of phragmalin a meliacin with a norbornane part skeleton". *Tetrahedron* **28**, 2333–2334.
- Aubreville, A. 1950. «Flore forestière Soudano-guinéenne». Société d'édition géographique, p. 377.
- Beh, H. K., Seow, L. J., Asmawi, M. Z., Abdul Majid, A. M. S., Murugaiyah, V., Ismail, N., Ismail, Z. 2012. "Anti-angiogenic activity of *Morinda citrifolia* extracts and its chemical constituents". *Nat. Prod. Res.* **26**, 1492–1497.

- 
- Belkahia, C., Zakraoui, L. “Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), Actualités Pharmacologiques”. Société Tunisienne de Médecine Interne. <http://www.stmi.org.tn/docs/ainspharm.htm>, Consulté le 08 Juillet 2014 à 15h 10mn.
- Berhaut, J. 1958. «Flore illustrée du Sénégal». Tome 6, dicotylédones, Paris, p. 317.
- Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A., Sivakumar, M. 2005. «Chemistry of Natural Products». Narosa Publishing House, New Delhi Mumbai Kolkata, pp. 613–615.
- Bickii, J., Feuya, G. R., Tchouankeu, J. C., Tsamo, E. 2007. “The antiplasmodial agents of stem bark of *Entandrophragma angolense* (Meliaceae)”. *Afr. J. Trad. CAM.* **4**, 135–139.
- Bilia, A. R., Yusuf, A. W., Braca, A., Keita, A., Morelli, I. 2000. “New prenylated anthraquinones and xanthenes from *Vismia guineensis*”. *J. Nat. Prod.* **63**, 16–21.
- Booth, N. L., Dejan, N., Richard, B., Stoci, E. 2004. “New lanthanide complexes of 4-methyl-7-hydroxy coumarin and their pharmacological activity”. *Clin. Pharmacol. Ther.* **50**, 120–123.
- Borel, J., Garon J., Chanard, D., Gougeon, J., Leutenegger, M., Marquart, F., Potron, G., Randoux, M., Zeitoum, P. 1984. «Comment prescrire et interpréter un examen de biochimie?». Ed. Maloine S.A., 27 Rue de l'école de médecine, Paris, France, pp. 408–417.
- Bouic, P. J. D., Etsebeth, S., Liebenberg, R. W., Albrecht, C. F., Pegel, K., Van Jaarveld, P. P. 1996. “ $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination”. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**, 693–700.
- Bouquet, A. 1969. «Féticheurs et Médecines Traditionnelles du Congo (Brazzaville)». Mémoires O.R.S.T.O.M., n° **36**, pp. 214–215.
- Bouquet, A. 1972. «Plantes Médicinales Du Congo-Brazzaville *Uvariopsis*, *Pauridiantha*, *Diospyros*». Travaux et Documents de l'O.R.S.T.O.M., n° **13**, pp. 61–87.
- Bouquet, A., Fournet, A. 1975. «Recherches récentes sur les plantes médicinales Congolaises». *Fitoterapia*, **46**, Collection de Références n° B-7991 O.R.S.T.O.M., pp. 243–246.
- Bourin, M., Lèvre, M., Hervé, A. 1993. «Cours de pharmacologie». 3<sup>e</sup> Ed., Ellipses, Paris, p. 351.
- Bouزيد, W. 2009. «Etude de l'Activité Biologique des Extraits du Fruit de *Crataegus monogyna* Jacq». Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biochimie Appliquée, Université El Hadj Lakhder–Batna, Algérie, pp. 28–30.



- 
- Brocker, C., Thompson, D., Matsumoto, A., Nebert, D. W., Vasiliou, V. 2010. "Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family". *Hum. Genomics*. **5**, 30–55.
- Brune, K., Hinz B. 2004. "The Discovery and Development of Anti-inflammatory Drugs". *Rev. Arthritis Rheum.*, **50**, 2391–2399.
- Bruneton, J. 1993. «Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales». 2<sup>e</sup> Ed., Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, pp. 229–241, 315–324, 340–350, 391, 527–536, 626–642.
- Bruneton, J. 1999. «Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales». 3<sup>e</sup> Ed., Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, Editions Médicinales Internationales, pp. 266–293, 487–491.
- Bruneton, J. 2009. «Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales», 4<sup>e</sup> Ed., revue et augmentée, Technique et Documentation, Paris, Editions Médicales Internationales, 1288 p.
- Burton, B. 2007. "COX 2 inhibitor rejected in North America but retained in Europe". *Br. Med. J.*, **335**, 791.
- Carpenter, R. C., Sotheeswaran, S., Sultanbawa, M.U.S., Balasubramaniam, S. 1980. "Triterpenes of Five Euphorbiaceae Species of Sri Lanka". *Phytochemistry* **19**, 1171–1174.
- Chan, W. R., Taylor, D. R., Yee, T. H. 1970. "Triterpenoids from *Entandrophragma cylindricum* Sprague. Part I. Structures of Sapelins A and B". *J. Chem. Soc. C*, 311–314.
- Chan, W. R., Taylor, D. R., Yee, T. H. 1971. "Triterpenoids from *Entandrophragma cylindricum* Sprague. Part II. Structures of Sapelins C, D, E and F". *J. Chem. Soc. C*, 2662–2667.
- Chang-Kee L., Gwyn L., 2002. "Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis". *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 547–557.
- Chauvelot-Moachon, L., Brouilhet, H., Giroud, J. P. 1988. «Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens, in Pharmacologie clinique, bases de la thérapeutique». 2<sup>e</sup> Ed., Expansion Scientifique Française, pp. 709–742.
- Chen, C. N., Weng, M. S., Wu, C., Lin, J. k. 2004. "Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells". *Food Chem.* **1**, 175–185.
- Cheng, A.S., Cheng, Y.H., Chang, T.L. 2012. "Scopoletin attenuates allergy by inhibiting Th2 cytokines production in EL-4 T cells". *Food Funct.* **3**, 886–890.

- 
- Chudnoff, M. 1984. "Tropical Timbers of the World". USDA Forest Service. Ag., handbook n° 607.
- Connolly, J. D., Phillips, W. R., Mulholland, D. A., Taylor, D. A. H. 1981. "Spicatin, a protolimonoid from *Entandrophragma spicatum*". *Phytochemistry* **20**, 2596–2597.
- Cottiglia, F., Loy, G., Garan, D., Floris, C., Casu, M., Pompei, R., Bonsignore, L. 2001. "Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L.". *Phytomedicine* **8**, 302–305.
- Cronquist, A. 1981. «An Integrated System of Classification of Flowering Plants». Columbia University Press, New York, pp 1262. ISBN 0-231-03880-1.
- Dachicour, J. N. 2011. "Arrêt de la commercialisation de la phénylbutazone (Butazolidine®) depuis le 31/12/2011". <http://www.spondylarthrite-blog.com/traitements-2/arret-de-la-commercialisation-de-la-phenylbutazone-butazolidine100-mg-comprime-enrobe>, Consulté le 11 Juillet 2014 à 09h 30mn.
- Dale, J. A., Mosher, H. S. 1973. "Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagent. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift of Diastereomeric Mandelate, *O*-Methylmandelate and  $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters". *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 512–519.
- Daniewski, W. M., Anczewski, W., Gumulka, M., Danikiewicz, W., Jacobsson, U., Norin, T. 1996. "Sesquiterpenoids constituents of *Entandrophragma cylindricum*". *Phytochemistry* **43**, 811–814.
- Daniewski, W. M., Gumulka, M., Danielwskicz, W., Sitkowski, J., Jacobsson, U., Norin, T. 1995. "Entilin D, a heptanortriterpenoid from the bark of *Entandrophragma utile*". *Phytochemistry* **40**, 903–906.
- Daniewski, W. M., Gumulka, M., Danikiewicz, W., Gluzinski, P., Krajewski, J., Pankowska, E., Bloskyz, E., Jacobsson, U., Norin, T. 1993. "Utiline B, a tetranortriterpenoid of the mexicanolide group from the bark of *Entandrophragma utile*". *Phytochemistry* **33**, 1534–1536.
- Daniewski, W. M., Gumulka, M., Danikiewicz, W., Gluzinski, P., Krajewski, J., Sitkowski, J., Bloszyk, E., Drozd, B., Jacobsson, U., Szafranski, F. 1994. "A tetranortriterpenoid from the bark of *Entandrophragma utile*". *Phytochemistry* **36**, 1001–1003.
- Daoud, W. B., Enaam, Y. B., Yaser, G. G., Shaymaa, M. M. 2012. "Phytochemical and biological study of *Vangueria edulis* cultivated in Egypt". *Bull. Pharm. Sci., Assiut University*, Vol. **35**, Part 1, 67–81.
-

- 
- De Bruyn, A., Anteunis, M., Van Beeumen, J., Verhegge, G. 1975. "A 300 MHz study of melibiose, lactose and 3-keto-lactose in D<sub>2</sub>O". *Bull. Soc. Chim. Belg.* **84**, 407–416.
- Deina, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L. 2003. "Natural product: their chemistry and biological significance". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**, 65–70.
- Del Corral, S., Cuffini, S. L., Cardoso, S. G., Bortoluzzid, A. J., Palacios, S. M. 2012. "Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers". *Phytochemistry Lett.* **5**, 280–283.
- Fabre, A. J. 2005. «Le colchique deux millénaires d'actualité». *Histoire des Sciences Médicales*, Tome **39**, n°2, pp. 143–154.
- Ferrer, I., Thurman, E. M., 2009. "Liquid chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry: Principles, Tools and Applications for Accurate Mass Analysis". New York, NJ: Wiley. [ISBN 978-0-470-13797-0](#).
- Feuya, G. R. T. 2005. «Contribution à l'étude chimique de *Entandrophragma angolense* (Meliaceae) et *Meiocarpidium lepidotum* (Annonaceae). Quelques transformations chimiques et tests biologiques sur certains composés isolés». Thèse de Doctorat/*Ph.D* en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun.
- Ford, R. A., Hawkins, D. R., Mayo, B. C., Api, A. M. 2001. "The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances". *Food Chem. Toxicol.* **39**, 153–162.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarar, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S. 1996. "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce pro-inflammatory and hematopoietic cytokines". *J. Exp. Med.* **183**, 2593–2603.
- Fotso, W. G. 2009. «Etude phytochimique de deux plantes médicinales du Cameroun: *Irvingia gabonensis* (Irvingiaceae) et *Crassocephalum bialfrae* (Asteraceae). Evaluation des activités antimicrobiennes, antioxydantes, anti-HIV et transformations chimiques sur quelques composés isolés». Thèse de Doctorat/*Ph.D* en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun, p. 19.
- Fozing, D. A. C. 2011. «Etude des feuilles et des écorces du tronc de *Morus mesozygia* STAPF. (Moraceae), évaluation des activités biologiques et hémisynthèses de quelques composés». Thèse de Doctorat/ *Ph.D* en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun, pp. 36–37.

- 
- Gettigan, P. Mc., Henry, D. 2006. "Cardiovascular Risk and Inhibition of Cyclooxygenase: a Systematic Review of the Observational Studies of Selective and Nonselective Inhibitors of Cyclooxygenase 2". *JAMA*, **296**, 1633–1644.
- Gitzinger, M., Kemmer, C., Fluri, D. A., El-Baba, M. D., Weber, W., Fussenegger, M. 2012. "The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice". *Nucleic Acids Res.* **40**, 1-15.
- Gnonlonfin, G. J. B., Sanni, A., Brimer, L. 2012. "Review Scopoletin - A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties". *Crit. Rev. Plant Sci.* **31**, 47–56.
- Goodwin, T. W. 1976. «Chemistry and biochemistry of plants pigments». 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, London, Tome **1**, pp. 446–447.
- Gross, S. 2006. «Rôle de la prostaglandine E2 dans l'hémostase artérielle et l'athérombose». Thèse en sciences du vivant, Université Louis Pasteur, Strasbourg I, pp.11–12.
- Guillaumet, J. L., Chevillotte, H., Doumenge, C., Valton, C., Fauvet, N., Achoundong, G. 2010 «Atlas des essences commercialisées d'Afrique tropicale humide: l'exemple du Cameroun». pp. 19–20, [www.sud-expert-plantes.ird.fr/.../2179\\_321\\_PublRev\\_Guillaumet\\_J.-L.\\_Atlas\\_des\\_essences\\_COMPLET](http://www.sud-expert-plantes.ird.fr/.../2179_321_PublRev_Guillaumet_J.-L._Atlas_des_essences_COMPLET), Consulté le 18 Février 2015 à 17h 20min.
- Habbu, P. V., Smita, D. M., Mahadevan, K. M., Shastry, R. A., Biradar, S. M. 2012. "Protective effect of *Habenaria intermedia* tubers against acute and chronic physical and psychological stress paradigms in rats". *Rev. Bras. Farmacogn.* **22**, 568–579.
- Hallé, N. 1966. «Flore du Gabon: Famille des Rubiacées (1<sup>ère</sup> partie)». Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris 5<sup>e</sup>, pp. 7–20, 234–235, 257–259.
- Hänni, R., Tamm, C. 1972. "Structure of the tetranortriterpene bussein". *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 1253–1254.
- Harkat, H. 2008. «Hétérocycles oxygénés et composés aromatiques de *Frankenia thymifolia* Desf.: formation d'hétérocycles oxygénés et isolement de substances naturelles». Thèse de Doctorat en Sciences (Chimie), Université Elhadj Lakhdar Batna, Algérie, pp. 22–23.
- Harsh, P. B., Walker, T. S., Stermitz, F. R., Hufbauer, R. A., Vivanco, J. M. 2002. "Enantiomeric-Dependent Phytotoxic and Antimicrobial Activity of (+ -)-Catechin. A Rhizosecreted Racemic Mixture from Spotted Knapweed". *Plant Physiol.* **128**, 1173–1179.
- Hart, F. D, Boardman, P. L. 1963. "Indomethacin: A new non-steroid anti-inflammatory agent". *Br. Med. J.* **5363**, 965–70.

---

Hawthorne, W. 1998. “*Entandrophragma cylindricum*. The IUCN Red List of Threatened Species”. Version 2014.3, <http://www.iucnredlist.org/details/33051/0>, Consulté le 18 Février 2015 à 17h 25mn.

<http://books-google.fr/books.ISBN28499455>, Consulté le 11 Juillet 2014 à 09h 30mn.

<http://erick.dronnet.pagesperso-orange.fr/rubiaceae.htm>, Consulté le 18 Février 2015 à 16h 05mn.

<http://sante-az.aufeminin.com/w/sante/m3052581/medicaments/indocid.html>, Consulté le 11 Juillet 2014 à 09h 50mn.

<http://www.afleurdepau.com/Flore/rubiaceae/f.htm>, Consulté le 19 Février 2015 à 12h 28mn.

<http://www.diabeticbar.com/epicatechin.htm>, Consulté le 19 Février 2015 à 12h 36mn.

<http://www.en-consulte.com/article/1005520>, Consulté le 11 Juillet 2014 à 09h 55mn.

<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/biologie-cytotoxique-2658/>, Consulté le 19 Février 2015 à 12h 46mn.

<http://www.lesmaisonsderetraite.fr/sante/La-phytotherapie-pour-soulager-les-rhumatismes.htm>, Consulté le 19 Février 2015 à 15h 08mn.

<http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module8/item112/texteI1.htm>, Consulté le 20 Avril 2014 à 16h 30mn.

<http://www.refer.mg/cours/yr/pages/m2.html>, Consulté le 24 Octobre 2013 à 16h 12mn.

<http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/intro/lib/lectalk/46/46intro.html>, Consulté le 19 Février 2015 à 15h 20mn.

<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-211049>, Consulté le 19 Février 2015 à 15h 22mn.

<http://www.thérapeutique-info/rep/12137>, Consulté le 11 Juillet 2014 à 08h 22mn.

<http://www.universalis.fr/encyclopedie/prostaglandines/3-proprietes-physiologiques-et-pharmacologiques/>, Consulté le 19 Février 2015 à 15h 24mn.

Huang, Z., Hashida, K., Makino, R., Kawamura, F., Shimizu, K., Kondo, R., Ohara, S. 2009. “Evaluation of biological activities of extracts from 22 African tropical wood species”. *J. Wood Sci.* **55**, 225–229.

Hye, M. A., Taher, M. A., Ali, M.Y., Ali, M.U., Zaman, S. 2009. “Isolation of (+)-Catechin from *Acacia Catechu* (Cutch Tree) by a Convenient Method”. *J. Sci. Res.* **1**, 300–305.

- 
- Idsasi, H. 2013. «Laboratoire HPLC / MS». UATRS-CNRST, [http://uatrs.cnrst.ma/index.php?option=com\\_content&view=article&id=45&Itemid=47](http://uatrs.cnrst.ma/index.php?option=com_content&view=article&id=45&Itemid=47), Consulté le 19 Février 2015 à 12h 21mn
- Illustrations © Rosemary Wise. «Les Arbes du Bord de Route du Parc National de Nouabalé-Ndoki». Photos © Royal Botanic Garden Edinburgh, <http://www.darwininitiative.org.uk/documents/15011/18332/15-011%20FR%20Ann16%20posters.pdf>, Consulté le 26 Février 2015 à 12h 50mn.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., Nakae, S. 2011. “Functional specialization of interleukin-17 family members”. *Immunity* **34**, 149–162.
- Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H. 2008. “The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens”. *Immunol. Rev.* **226**, 57–79.
- Izhaki, I. 2002. “Emodin, a secondary metabolite with multiple ecologic functions in higher plants”. *New phytol.* **155**, 205–217.
- Jacquier, M. C. 2009. “La polyarthrite rhumatoïde, rhumatisme chronique”. Futura-Sciences, <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dossiers/d/medecine-polyarthriterhumatoide-rhumatisme-chronique-898/>, Consulté le 19 Février 2015 à 15h 31mn.
- Jansen, P. C. M., Cardon, D. 2005. «Ressources végétales de l’Afrique tropicale 3 Colorants et tannins». Fondation PROTA, CTA Wageningen, Pays-Bas, p. 131.
- Kapche, W. F. G. D. 2008. «Métabolites secondaires de quelques plantes médicinales du Cameroun; transformations chimiques et activités biologiques de certains extraits et composés isolés». Thèse de Doctorat d’Etat en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun, p. 10.
- Kazuo, O., Masayuki, S., Natsuki, M., Fumio, N., Yukihiko, H. 1999. “Identification of (2)-epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat”. *Drug Metab. Dispo.* **27**, 309–316.
- Kerbaum, S., Coasta, J. M., Delatour, F. 1998. «Dictionnaire de la médecine». Ed. *Flammarion*, Paris, France, pp. 286–475.
- Khadka, A. 2014. “Interleukins in Therapeutics”. *PharmaTutor.* **2**, 67–72.
- Khan, I., Kulkari, M. V., Gopal, M., Shahabuddin. 2005. “Synthesis and biological evaluation of novel angular fused polycyclic coumarins”. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 3584–3587.

- 
- Kitajima, M., Nakayama, T., Kogure, N., Wongseripipatana, S., Takayama, H. 2007. "New heteroyohimbine-type oxindole alkaloid from the leaves of Thai *Mitragyna hirsuta*". *J. Nat. Med.* **61**, 192–195.
- Kolls, J. K., Linden, A., 2004. "Interleukin-17 family members and inflammation". *Immunity* **21**, 467–476.
- Kouam, F. S. 2005. «Etude phytochimique de deux plantes médicinales du Cameroun, *Harungana madagascariensis* et *Bridelia micrantha*, hémisynthèse et activités biologiques de quelques composés». Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun, p. 13.
- Kouam, S. F., Yapna, D. B., Krohn, K., Ngadjui, B. T., Ngoupayo, J., Choudhary, M. I., Schulz, B. 2007. "Antimicrobial Prenylated Anthracene Derivatives from the Leaves of *Harungana madagascariensis*". *J. Nat. Prod.* **70**, 600–603.
- Lamshöft, M., Schmickler, H., Marnier, F. J. 2003. "Determination of the Absolute Configuration of Hydroxyiridals by Chiroptical and NMR Spectroscopic Methods". *Eur. J. Org. Chem.* **4**, 727–733.
- Legueut C. B., Josse M., Villedary F., Wolff F. 1995. «Chimie Terminale S». Collection D. Secrétan, Ed. Didier, Paris-France, pp. 231–248.
- Letouzey, R. 1985. «Carte phytogéographique du Cameroun au 1/500000<sup>e</sup>». Institut de la Carte Internationale de la Végétation, Toulouse, France, p. 5.
- Levesque H., Lafont O. 2000. L'aspirine à travers les siècles: rappel historique. *Rev. Méd. Interne*, **21**, Suppl. 1, 8-17. [http://www.chups.jussieu.fr/polys/certifopt/saule\\_coxib/theme/Levesque.pdf](http://www.chups.jussieu.fr/polys/certifopt/saule_coxib/theme/Levesque.pdf), Consulté le 20 Avril 2015 à 15h 08mn.
- Levesque, J., Jacquesy, R., Foucher, J. P. 1982. "Alcoyl-gluco-alcaloïdes: nouveaux composés isolés de *Pauridiantha lyalii* Brem (Rubiacees)". *Tetrahedron* **38**, 1417–1424.
- Levesque, J., Jacquesy, R., Merienne, C. 1983. "A glucoalkaloid of unusual configuration isolates from *Pauridiantha lyalii*: Isopauridianthoside". *J. Nat. Prod.* **46**, 619–625.
- Levesque, J., Pousset, J. L., Cavé, A. 1974b. "Minor alkaloids of *Pauridiantha lyalii* (Rubiaceae): Lyalidine and hydroxylyalidine". *C. R. Acad. Sc. Paris, Série C, Sciences Chimiques* **279**, 1053–1055.
- Levesque, J., Pousset, J. L., Cavé, A. 1977. "Pauridianthoside, a new glucoalkaloid isolated from *Pauridiantha lyalii*". *Fitoterapia* **48**, 5–7.

- 
- Levesque, J., Pousset, J. L., Cavé, A., Cavé, A. 1974a. "Lyaline and lyadine, new alkaloids from *Pauridiantha lyalli* (Rubiaceae)". *C. R. Acad. Sc. Paris, Série C, Sciences Chimiques* **278**, 959–961.
- Li, Q. J., Wang, M. L., Yang, X. S., Ma, L., Hao, X. J. 2013. "Two new coumarin glycosides from *Chimonanthus nitens*". *J. Asian Nat. Prod. Res.*, DOI:10.1080/10286020.2012.762766.
- Liu, J., Feng, Z., Xu, J., Wang, Y., Zhang, P. 2007. "Rare biscoumarins and a chlorogenic acid derivative from *Erycibe obtusifolia*". *Phytochemistry* **68**, 1775–1780.
- Lone, M. A., Dinisha, M., Pooja, M., Aarti, D., Safena, R. C. 2009. "Anti-inflammatory and antimicrobial activity of anthraquinone isolated from *Aloe vera* (Liliaceae)". *Chem. Asian. J.* **21**, 1807–1811.
- Louppe, D., Oteng-Amoako, A. A., Brink, M. 2008. «Ressources végétales de l’Afrique tropical 7(1): Bois d’œuvre 1». Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas, pp. 268–274.
- Ma, J., Hecht, S. M. 2004. "Javaniside, a novel DNA cleavage agent from *Alangium javanicum* having an unusual oxindole skeleton". *Chem. Commun.*, 1190–1191.
- Mariam, C. T. 2006. «Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali». Thèse de Doctorat d’Etat en Pharmacie, Université de Bamako, Mali, pp. 79–85.
- Markam, K. R. 1982. «Techniques of flavonoid identification». Academic Press, London.
- Mathieu, M., Guimezanes, A., Donnet-Kamel, D., Litadier-Dossou, M-A. 2012. «Inflammation et maladies: clés de compréhension». Inserm, Fondation ARTHRITIS, Recherche et Rhumatismes, pp. 14–60.
- Mebtil, K. 2006. «Etude in vitro de la modulation de la conversion de l’aflatoxine B1 en aflatoxine M1 par deux  $\beta$ -carbolines (harman et norharman) et certains de leurs apparentés structuraux». Mémoire en vue de l’obtention du Diplôme de Magister en Biologie, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, pp. 12–22.
- Mensbruge, D. L. G. 1966. «La germination et les plantules des essences arborées de la forêt dense humide de la Côte d’Ivoire». Centre Technique Forestier Tropical, Nogent-sur-Marne, Seine, France, p. 226.
- Miller, S. L., Tinto, W. F., 1995. "Quassiols B-D, new squalene triterpenes from *Quassia multiflora*". *Tetrahedron* **51**, 11959–11966.



- 
- Miroux, C. 2011. «Lymphocytes T régulateurs et transplantation hépatique: Modulation de l'activité des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ par les drogues immunosuppressives». Thèse de Doctorat de l'Université de Lille 2, Ecole Doctorale Biologie – Santé.
- Motte, F. E., Aumeeruddy, T. Y., Dounias, E. 2012. «Hommes et natures». Ed., IRD, 13<sup>e</sup> Congrès de la Société Internationale d'Ethnobiologie, Montpellier, p. 9.
- Mulholland, D. A., Osborne, R., Roberts, S. L., Taylor, D. A. H. 1994. "Limonoids and triterpenoids acids from the bark of *Entandrophragma delevoyi*". *Phytochemistry* **37**, 1417–1420.
- Murata, T., Miyase, T., Muregi, F. W., Naoshima-Ishibashi, Y., Umehara, K., Warashina, T., Kanou, S., Mkoji, G. M., Terada, M., Ishih, A. 2008. "Antiplasmodial Triterpenoids from *Ekebergia capensis*". *J. Nat. Prod.* **71**, 167–174.
- Murray, R. D. H. 1989. "Coumarins". *Nat. Prod. Rep.* **6**, 591–624.
- Nagaiah, K., Krupadanam, G. L. D., Srimannarayana, G. 1992. "Coumarins from the bark of *Xeromphis uliginosa*". *Fitoterapia* **63**, 378–379.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. 1999. "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions". *Physiol. Rev.* **79**, 1193–1226.
- Ngnokam, D., Massiot, G., Bliard, C., Tsamo, E. 1995. "Sapelenin D, a New Acyclic Triterpenoid from the stem bark of *Entandrophragma cylindricum*". *Nat. Prod. Lett.* **5**, 289–293.
- Ngnokam, D., Massiot, G., Nuzillard, J. M., Connolly, J. D., Tsamo, E., Morin, C. 1993. "Sapelenins A, B and C, acyclic triterpenoids from the stem bark of *Entandrophragma cylindricum*". *Phytochemistry* **34**, 1603–1607.
- Ngnokam, D., Massiot, G., Nuzillard, J. M., Tsamo, E. 1994a. "(+)-7',7'-dimethyl-5-hydroxy-2R, 3S-trans-pubeschin from *Entandrophragma cylindricum*". *Phytochemistry* **37**, 529–531.
- Ngnokam, D., Massiot, G., Nuzillard, J. M., Tsamo, E. 1994b. "Steroids and Terpenoids from the bark and the wood of *Entandrophragma cylindricum*". *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **8**, 15–20.
- Ngnokam, D., Nuzillard, J. M., Bliard, C. 2005. "Sapelenins E and F: new acyclic triterpenoids from the stem bark of *Entandrophragma cylindricum*". *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **19**, 227–231.
- Nguemfo E. L., Dimo T., Dongmo A. B., Azebaze A. G. B., Alaoui K., Asongalem A. E., Cherrah Y., Kamtchouing P. 2009. "Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some

- 
- isolated constituents from the stem bark of *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae)". *Inflammopharmacology*, **17**, 37–41.
- Nima, S., Kasiwong, S., Ridditid, W., Thaenmanee, N., Mahattanadul, S. 2012. "Gastrokinetic activity of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its possible mechanism of action in human and rat models". *J. Ethnopharmacol.* **142**, 354–361.
- Nishiyama, Y., Moriyasu, M., Ichimaru, M., Tachibana, Y., Kato, A., Mathenge, S. G., Nganga, J. N., Juma, F. D. 1996. "Acyclic triterpenoids from *Ekebergia capensis*". *Phytochemistry* **42**, 803–807.
- Nishiyama, Y., Moriyasu, M., Ichimaru, M., Tachibana, Y., Kato, A., Mathenge, S. G., Nganga, J. N., Juma, F. D. 1999. "Absolute configurations of two acyclic triterpenoids from *Ekebergia capensis*". *Phytochemistry* **52**, 1593–1596.
- Nkeoua, G., Boundzanga, G. C. 1999. «Données sur les produits forestiers non ligneux en République du Congo». Projet GCP/INT/679/EC, Programme de partenariat – EC – FAO (1998-2000), Brazzaville, Congo, p. 97.
- Nsiama, T. K. 2008. «Structural Studies of Tetranortriterpenoids from the Congolese species of *Entandrophragma angolense* And Efficient Short Step Synthesis of Corey's Tamiflu Intermediate». *Doctor of Philosophy* in Nature System Sciences, Kagoshima University, Japon, pp. 24–37.
- Ntore, S., Robbrecht, E., Smets, E., Dessein, S. 2003. "Deux nouvelles espèces paléoen-démiques de *Pauridiantha* (Rubiaceae) des Monts Udzungwa (sud de la Tanzanie)". *ADANSONIA*, série. **3**, **25**, 65–76.
- Nurul Islam, M., Jung, H. A., Sohn, H. S., Kim, H. M., Choi, J. S. 2013. "Potent  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaries*". *Arch. Pharmacol Res.* DOI:10.1007/s12272-013-0069-7.
- Ochocka, R. J., Rajzer, D., Kowalsk, Lamparczyk, H. 1995. "Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. By capillary electrophoresis". *J. Chromatogr., A* **709**, 197–202.
- Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H. 1991. "High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids". *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4092–4096.
- Ojala, T., Rames, S., Haansu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., Vuorela, P. 2000. "Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland". *J. Ethnopharmacol.* **73**, 299–305.
-

- 
- Okorie, D. A., Taylor, D. A. H. 1977. "Triterpenes from the seed of *Entandrophragma* species". *Phytochemistry* **16**, 2029–2035.
- OMS. 2002. "Médecine traditionnelle". *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé* **2**, 1–6.
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Botta, A. 2001. «Eléments de cytotoxicologie ou toxicologie cellulaire». Faculté de Médecine de Marseille, [http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/Learnnet/webcours/med\\_travail/cytotoxicologie/index.htm](http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/Learnnet/webcours/med_travail/cytotoxicologie/index.htm), Consulté le 19 Février 2015 à 15h 37mn.
- Pan, R., Gao, X.H., Lu, D., Xu, X. X., Xia, Y.F., Dai, Y. 2011. "Prevention of FGF-2-induced angiogenesis by scopoletin, a coumarin compound isolated from *Erycibe obtusifolia* Benth, and its mechanism of action". *Int. Immunopharmacol.* **11**, 2007–2016.
- Patiño, L. O. J., Prieto, R. J. A., Cuca, S. L. E. 2012. «*Zanthoxylum* genus as potential source of bioactive compounds. In: Bioactive Compounds in Phytomedicine». Editor, Rasooli I., InTech, Rijeka-Croatia, pp. 185–218.
- Pegel, K. H. 1997. "The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition". *S. Afr. J. Sci.*, **93**, 293–299.
- Pellizzoni, M., Ruzickova, G., Kalhotka, L., Lucini, L. 2012. "Antimicrobial activity of different *Aloe barbadensis* Mill. and *Aloe arborescens* Mill. leaf fractions". *J. Med. Plants Res.* **6**, 1975–1981.
- Pousset, J. L., Bouquet, A., Cave, A., Cave, A., Paris, R. R. 1971. "Structure de deux nouveaux alcaloïdes isolés de *Pauridiantha callicarpoides* Brem: (Rubiaceées)". *C. R. Acad. Sc. Paris, Série C*, t. **272**, 665–667.
- Pousset, J. L., Levesque, J., Cavé, A., Picot, F., Potier, P., Paris, R. R. 1974. "Chemical study of *Pauridiantha lyallii* (Rubiaceae)". *Plant. Med. Phytother.*, **8**, 51–56.
- Putterman C., Ben-Chetrit E., Caraco Y., Levy M. 1991. "Colchicine intoxication: clinical pharmacology, risk factors, features, and management". *Semin. Arthritis Rheum.*, **21**, 143–155.
- Rainsford K. D. 2003. "Discovery, mechanisms of action and safety of ibuprofen". *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*, **135**, 3–8.
- Rao., P. S., Asheervadam, Y., Khaleelullah, M<sub>D</sub>., Rao, N. S., Murray, R. D. H. 1988. "Hymexelsin, an apiose-containing Scopoletin glycoside from the stem bark of *Hymenodictyon excelsum*". *J. Nat. Prod.* **51**, 959–961.

- 
- Ritchie, E., Taylor, W.C. 1964. "The constituents *Harungana madagascariensis* Poir". *Tetrahedron Lett.* **23**, 1431–1436.
- Rommelspacher, H., May, T., Susilo, R. 1991. " $\beta$ -carbolines and tetrahydroisoquinolines: detection and function in mammals". *Planta Med.* **57**, S85–S92.
- Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattei, M.G., Denizot, F., Golstein, P. 1993. "CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpes virus saimiri gene". *J. Immunol.* **150**, 5445–5456.
- Safayhi, H., Sailer, E. R. 1997. "Anti-inflammatory effects of pentacyclic triterpenes". *Planta Med.* **63**, 487–493.
- Salim, F., Ismail, N. H., Awang, K., Ahmad, R. 2011. "Rauniticine-allo-Oxindole B and Rauniticinic-allo Acid B, New Heteroyohimbine-Type oxindole alkaloids from the stems of Malaysian *Uncaria longiflora* var. *pteropoda*". *Molecules* **16**, 6541–6548.
- Schmi H. 1987. «Eléments de pharmacologie». Flammarion, Paris, pp. 196–201.
- Shinazi, R. F., Chu, C. K., Babu, J. R., Oswald, B. J., Saalman, V., Cannon, D. L., Eriksson, B. F. H., Nasr, M. 1990. "Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus". *Antiviral Res.* **13**, 265–272.
- Source de l'Herbier National du Cameroun, Yaoundé, Cameroun.
- Stefanova, T., Nikolova, N., Michailova, A., Mitov, I., Iancovii., Zlabinger, G. I., Neychev, H. 2007. "Enhanced resistance to *Salmonella* enteric sero var typhimurium infection in mice after coumarin treatment". *Microbes Infect.* **9**, 7–14.
- Taguchi, G., Fujikawa, S., Yazawa, T., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M., Okazaki, M. 2000. "Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells". *Plant Sci.* **151**, 153–161.
- Tan, Q-G., Luo, X-D. 2011. "Meliaceous Limonoids: Chemistry and Biological Activities". *Chem. Rev.* **111**, 7437–7522.
- Tanahashi, T., Sakai, T., Takenaka, Y., Nagakura, N., Chen, C-C. 1999. "Structure Elucidation of two Secoiridoid Glucosides from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* (L.) Kobuski". *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 1582–1586.
- Tanaka, Y., Yamada, T., In, Y., Muraoka, O., Kajimoto, T., Tanaka, R. 2011. "Absolute stereostructure of andirolides A–G from the flower of *Carapa guianensis* (Meliaceae)". *Tetrahedron* **67**, 782–792.

- 
- Tapondjou A. L., Ponou K. B., Teponno R. B., Mbiantcha M., Djoukeng J. D., Nguenefack T. B., Watcho P., Cadenas A. G., Park, H-J. 2008. "In vivo anti-inflammatory effect of a new steroidal saponin, mannoside A, and its derivatives isolated from *Dracaena mannii*". *Arch. Pharm. Res.*, **31**, 653–658.
- Tchouankeu, J. C. 1989. «Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cameroun: *Entandrophragma candollei* Harms (Meliaceae)». Thèse de Doctorat 3<sup>e</sup> cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun.
- Tchouankeu, J. C. 1999. «Métabolites secondaires de *Entandrophragma utile* Sprague (Méliacées)». Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun.
- Tchouankeu, J. C., Nyasse, B., Tsamo, E., Connolly, J. D. 1996. "7 $\alpha$ , 20(S)-dihydroxy-4, 24(28)-ergostadien-3-one from *Entandrophragma utile*". *J. Nat. Prod.* **59**, 958–959.
- Tchouankeu, J. C., Nyasse, B., Tsamo, E., Sondengam, B. L., Morin, C. 1992. "An ergostane derivative from the bark of *Entandrophragma utile*". *Phytochemistry* **31**, 704–705.
- Tchouankeu, J. C., Tsamo, E., Sondengam, B. L. 1988. "Extractives from the stem bark of *Entandrophragma candollei*". *Ann. Fac. Sc.*, 127–130.
- Tchouankeu, J. C., Tsamo, E., Sondengam, B. L., Connolly, J. D. 1989. "Atomasins A and B tetranortriterpenoids from the bark of *Entandrophragma candollei*". *Phytochemistry* **28**, 2855–2857.
- Tchouankeu, J. C., Tsamo, E., Sondengam, B. L., Connolly, J. D., Rycroft, D. S. 1990. "Entilins A and B, two novel heptanortriterpenoid derivatives from *Entandrophragma utile* (Meliaceae): Structural elucidation using 2D NMR long-range  $\delta_C/\delta_H$  correlation experiments". *Tetrahedron Lett.* **31**, 4505–4508.
- Tchouya, G. R. F., Bickii, J., Tchouankeu, J. C., Tsamo, E. 2005. "In vitro anti-malarial activity of limonoids from two meliaceous plants". *West Afr. J. Pharmacol. Drug Res.* **21**, 39–42.
- Tchuendem, K. M. H. 1997. «Terpénoïdes et lignanes de quelques plantes médicinales du Cameroun». Thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle en Chimie Organique, Université de Yaoundé I, Cameroun.
- Thati, B., Noble, A., Rowan, R., Creaven, S. B., Walsh, M., Egan, D., Kavanagh, K. 2007. "Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*". *Toxicol. in vitro* **21**, 801–808.
- Tolstikov V. V., Fiehn, O., 2002. "Analysis of highly polar compounds of plant origin:
-

---

combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry”. *Anal. Biochem.* **301**, 298–307.

Tolstikov, V. V., Tanaka, N., Fiehn, O. “Metabolomics: LC-MS Analysis Development”. [www.nestgrp.com/pdf/Pp1/Tolstikov.pdf](http://www.nestgrp.com/pdf/Pp1/Tolstikov.pdf), Consulté le 19 Février 2015 à 15h 47mn.

TROPIX 6.0 – CIRAD. 2008, [www.forestmaine.com/fichiers/afrique/sapelli.pdf](http://www.forestmaine.com/fichiers/afrique/sapelli.pdf), Consulté le 22 Avril 2012 à 15h 20mn.

Troupin, G. 1982. «Flore des plantes ligneuses du Rwanda». Institut National de Recherche Scientifique, Musée Royal de l’Afrique Centrale, Butaré, n° **21**, p. 572.

Troupin, G., Ayobangira, F. X., Bridson, D., Champluvier, D., Lawalree, A., Malaise, P., Maquet, P., Reekmans, M., Schotsmans, H., Verdcourt, B. 1985. «Flore du Rwanda: Spermatophytes». Agence de Coopération Culturelle et Technique, Musée Royal de l’Afrique Centrale, Tervuren, Belgique, Annales Série In-8° Sciences Economiques. n°15, Vol. **III**, pp. 122–123.

Tullayakorn, P., Vithoon, V., Veerachai, E., Smarn, T., Wanna, C., Arunporn, I., Kesara, N. B. 2012. “Cytotoxicity, toxicity and anticancer activity of *Zingiber officinale* Roscoe against Cholangiocarcinoma”. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **13**, 4597–4606.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/~sbmljw/cgi-bin/taxon.pl?401310>, Consulté le 19 Février 2015 à 16h 12mn.

Van, B. T. A., Lankhorst, P. P., Verpoorte, R., Svendsen, A. B. 1982. “Isolation of the Secoiridoid-Glucoside Sweroside from *Tabernaemontana psorocarpa*”. *Planta Med.* **44**, 30–31.

Van, C. P., Ji, M., Shannon, J. T., Zhidong, X., Sidney, M. H. 2005. “Alkaloids from *Alangium javanicum* and *Alangium grisolleoides* that Mediate Cu<sup>2+</sup>-Dependent DNA Strand Scission”. *J. Nat. Prod.* **68**, 1147–1152.

Veselovskaya, M. V., Garzed, M. M., Vinogradova, V. I., Khilia, P. V. 2006. “Modified coumarins furocoumarin derivatives of cytisin”. *Chem. Nat. Compd.* **42**, 277–280.

Ward, D. E., Rhee, C. K. 1991. “A simple method for the microscale preparation of Mosher’s acid chloride”. *Tetrahedron Lett.* **32**, 7165–7166.

- 
- Watson, L., Dallwitz, M. J. 1992. «The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval». Version: 19<sup>th</sup> August 2014, <http://delta-intkey.com>, Consulté le 25 Février 2015 à 17h 35mn.
- Xin, W. B., Chou, G. X., Wang, Z. T. 2008. “Two new alkaloids from the leaves of *Uncaria hirsuta* Haviland”. *Chin. Chem. Lett.* **19**, 931–933.
- Yang, Z., Zhang, Y. Q., Ding, W., Luo, J. X., Qin, P. Y. 2012. “Effect of temperature on toxicities of scopoletin and bisdemethoxycurcumin against *Tetranychus cinnabarinus* (Acari:Tetranychidae)”. *Kun Chong Xue Bao.* **55**, 420–425.
- Yao, X., Ding, Z., Xia, Y., Wei, Z., Luo, Y., Feleder, C., Dai, Y. 2012. “Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by scopoletin and underlying mechanisms”. *Int. Immunopharmacol.* **14**, 454–462.
- Yao, Z., Fanslow, W. C., Seldin, M. F., Rousseau, A-M., Painter, S. L., Comeau, M. R., Cohen, J. I., Spriggs, M. K. 1995. “Herpes virus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor”. *Immunity* **3**, 811–821.
- Ymele E. V., Dongmo A. B., Dimo T. 2013. “Analgesic and anti-inflammatory effect of aqueous extract of the stem bark of *Allanblackia gabonensis* (Guttiferae)”. *Inflammopharmacology* **21**, 21–30.
- Zhi, J. X., Yuan, C. L. 2005. “Synthesis and Determination of Absolute Configuration of a divergent polyhydroxy Enyne compound”. *Chin. Chem. Lett.* **16**, 1569–1572.
- Zvetkova, E., Wirleitner, B., Tram, N. T., Schennach, H., Fuchs, D. 2001. “Aqueous extracts of *Crinum latifolium*(L) and *Camellia sinensis* show immunomodulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells”. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 2143–2150.



**ANNEXE**





---

## LISTE DES PUBLICATIONS

- 1- Simeon Fogue Kouam, Souvik Kusari, Marc Lamshöft, **Ostend Kamgue Tatuedom**, Michael Spitteller. **2012**. “Sapelenins G-J, acyclic triterpenoids with strong anti-inflammatory activities from the bark of the Cameroonian medicinal plant *Entandrophragma cylindricum*”. *Phytochemistry*, **83**, 79–86.
- 2- **Ostend K. Tatuedom**, Simeon F. Kouam, Diane Beatrice Yapna, Bonaventure T. Ngadjui, Ivan R. Green, M. Iqbal Choudhary, Jeanne E. R. Lantovololona and Michael Spitteller. **2014**. “Spiroalkaloids and coumarins from the stem bark of *Pauridiantha callicarpoides*”. *Z. Naturforsch*, **69b**, 747–752.



## Sapelenins G–J, acyclic triterpenoids with strong anti-inflammatory activities from the bark of the Cameroonian medicinal plant *Entandrophragma cylindricum*

Simeon Fogue Kouam<sup>a,b</sup>, Souvik Kusari<sup>a,1</sup>, Marc Lamshöft<sup>a,1</sup>, Ostend Kamgue Tatuedom<sup>b</sup>, Michael Spiteller<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Environmental Research (INFU) of the Faculty of Chemistry, Chair of Environmental Chemistry and Analytical Chemistry, TU Dortmund, Otto-Hahn-Str. 6, D-44221 Dortmund, Germany

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Higher Teachers' Training College, University of Yaounde I, P. O. Box 47, Yaounde, Cameroon

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 January 2012

Received in revised form 6 June 2012

Available online 14 July 2012

#### Keywords:

*Entandrophragma cylindricum*

Cameroonian medicinal plant

Sapelenin

Anti-inflammatory

Cytotoxic

### ABSTRACT

Four acyclic triterpene derivatives named sapelenins G–J (**1–4**), along with eight known compounds, sapelenins A–D, ekeberin D2 (**5**), (+)-catechin and epicatechin, and anderolide G, were isolated from the stem bark of the Cameroonian medicinal plant, *Entandrophragma cylindricum* Sprague, on the basis of bioassay-guided fractionation. Their structures were determined by means of high-resolution mass spectrometry and NMR spectroscopic data, as well as by comparison with the literature values of their analogs. The absolute configurations of the compounds (**1–4**) were assigned by the modified Mosher's method in conjunction with NOESY experiments and chemical modifications. The anti-inflammatory activities of the sapelenins were evaluated by assessing their ability to suppress or inhibit the secretion of cytokine interleukin-17 (IL-17) by human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with phytohemagglutinin (PHA). The cytotoxicity of these compounds on PMBCs was further assessed for correctly interpreting their anti-inflammatory responses. The tested compounds demonstrated moderate to significant anti-inflammatory activities by suppressing the secretion of IL-17 by PHA-stimulated human PBMCs. One of them, sapelenin G (**1**), showed high potency in suppressing the secretion of IL-17 by PBMCs comparable to reference cyclosporine A, without causing any cytotoxic effects (negligible), and deserves further considerations towards developing an effective anti-inflammatory drug.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In our search for bioactive metabolites from Cameroonian medicinal plants, we recently encountered a plant in the Dja rain-forest, locally known in Cameroon as 'Sapele'. This plant is botanically known as *Entandrophragma cylindricum* Sprague (Meliaceae). The genus *Entandrophragma* contains ten species which are generally recognized as distinct, together with some four varieties that probably do not rank in any species (Adesida and Taylor, 1967). *E. cylindricum* is one of the only five species that have been discovered so far in Cameroon (Letouzey, 1985). It is a very bulky and tall forest tree, up to 45 m in height and native to tropical Africa. The bark of this timber has been extensively exploited by the 'Bantu' and 'Baka' tribes in the eastern region of Cameroon, for the treatment of rheumatism in the traditional medicine sub-sector. Although phytochemical studies on this plant genus have been reported earlier with the most prominent classes of com-

pounds isolated being complex limonoids (Taylor and Wragg, 1967; Chan et al., 1970; Baxter et al., 1998; Nsima et al., 2011) and highly oxygenated acyclic triterpenes (Ngnokam et al., 1993, 1995, 2005), little pharmacological investigation has so far been performed (Huang et al., 2009).

Here, we report the isolation and the characterization of four new acyclic triterpene derivatives named sapelenins G–J (**1–4**), together with eight known compounds, sapelenins A–D (Ngnokam et al., 1993, 1995), ekeberin D2 (**5**) (Murata et al., 2008), (+)-catechin and epicatechin (Kashiwada et al., 1990a,b), and anderolide G (Tanaka et al., 2011). We also report the anti-inflammatory activities of the novel sapelenins by evaluating their ability to suppress/inhibit secretion of cytokine IL-17 (interleukin-17) by human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with phytohemagglutinin (PHA). We further evaluated the cytotoxicity of the tested compounds (**1–4**) on PMBCs in order to correctly interpret their anti-inflammatory responses.

### 2. Results and discussion

Compound **1**, named sapelenin G (Fig. 1), was isolated as a colorless oil. Its molecular formula (C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>) was determined from

\* Corresponding author. Tel.: +49 231 755 4080; fax: +49 231 755 4085.

E-mail addresses: [m.spiteller@infu.tu-dortmund.de](mailto:m.spiteller@infu.tu-dortmund.de), [m.spiteller@infu.uni-dortmund.de](mailto:m.spiteller@infu.uni-dortmund.de) (M. Spiteller).

<sup>1</sup> These authors contributed equally.

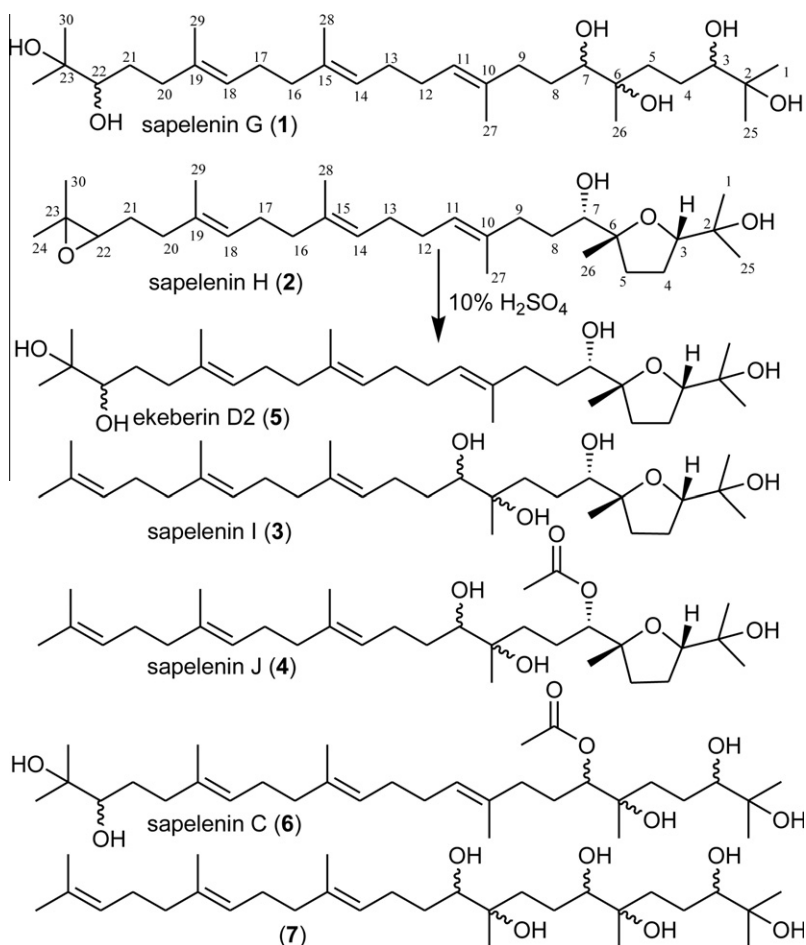


Fig. 1. Structures of sapelenins G–J (1–4) and compounds 5–7.

the pseudomolecular ion peak at  $m/z = 513.4152$  (calcd. for  $C_{30}H_{57}O_6$ , 513.4155), obtained by high-resolution mass spectrometry (HR-MS) and is consistent with three degrees of unsaturation. The IR spectrum exhibited bands for a hydroxyl functional group at  $\nu_{\max} = 3386 \text{ cm}^{-1}$ . The  $^{13}\text{C}$  NMR (see Supplementary data, Table S1) displays 30 carbon signals which can be sorted into eight methyls, ten methylenes, three oxymethines, three  $\text{sp}^2$  methines and six quaternary carbons including three  $\text{sp}^2$  carbons, and three bearing oxygen. The  $^1\text{H}$  NMR (see Supplementary data, Table S1) spectrum showed resonances for eight methyl groups including three vinylic ones ( $\delta_{\text{H}}$  1.57,  $2 \times \delta_{\text{H}}$  1.59), and five attached to  $\text{sp}^3$  carbon.

From the above evidence and by comparing these data with those described in the literature (Ngnokam et al., 1993, 1995; Miller and Tinto, 1995; Murata et al., 2008), sapelenin G (1) was confirmed as a derivative of squalene with a structure similar to that of sapelenin C (6) (Ngnokam et al., 1993). The presence of three low field methyl groups around  $\sim\delta_{\text{H}}$  1.5–1.8 and the lack of any correlation peaks from two of these olefinic methyl groups in the HMBC spectrum indicated clearly the absence of the two terminal vinylic methyl groups and consequently, suggested the oxidation of the terminal double bonds of the squalene skeleton assigned to compound 1. In the HMBC experiment (Fig. 3a<sub>1</sub>), the proton signal at  $\delta_{\text{H}}$  3.28 (H-22) showed correlation peaks with carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  23.4 ( $\text{CH}_3$ -24), 26.7 ( $\text{CH}_3$ -30) and 37.4 ( $\text{CH}_2$ -20), and cross peaks were also observed between the proton signal at  $\delta_{\text{H}}$  3.32 (H-3) and the carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  23.4 ( $\text{CH}_3$ -1), 26.7 ( $\text{CH}_3$ -25) and 33.4 ( $\text{CH}_2$ -5), respectively. Furthermore, the methyl signal at  $\delta_{\text{H}}$  1.10 (H-26) showed cross peaks with two carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  33.4 (C-5) and 78.9 (C-7). In the COSY spectrum, connectivity

was observed between the protons at  $\delta_{\text{H}}$  3.32 (H-3), 1.64 (H-4a), 1.36 (H-4b), and 1.62 (H-5), respectively, indicating the oxidation of two contiguous double bonds in 1. The relative configurations of C-3, C-6, C-7 and C-22 could not be assigned. The compound was assigned the structure (10*E*,14*E*,18*E*)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-10,14,18-triene-2,3,6,7,22,23-hexaol and named sapelenin G (1). Its isomer (7) has been described as one of the constituents of the anti-inflammatory and anti-allergy extract of nettle (Alberte et al., 2010).

Compound 2 (Fig. 1) was obtained as a colorless oil. Its molecular formula was determined as  $C_{30}H_{52}O_4$  by HR-MS ( $m/z$  477.3945  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). IR absorption bands were observed at 3430 nm (OH) and 1660 nm (C=C). The  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data of 2 (see Supplementary data, Table S1) exhibited 30 typical resonances for an acyclic triterpene skeleton including eight methyl and ten methylene groups (Ngnokam et al., 1993, 1995; Murata et al., 2008). A 2-hydroxypropenyl-2-methyltetrahydrofuran sub-structure was established from spectral data evidence. An oxymethine ( $\delta_{\text{C}}$  87.6), an oxygenated tertiary carbon ( $\delta_{\text{C}}$  86.1), two methylene carbons ( $\delta_{\text{C}}$  26.6 and 31.4) and two methyl groups ( $\delta_{\text{C}}$  23.8 and 27.7) were observed in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (see Supplementary data, Table S1). The HMBC experiment (Fig. 3a<sub>2</sub>) showed cross peaks with proton signal at  $\delta_{\text{H}}$  3.77 (oxymethine) and carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  86.1, 23.8 and 27.7. The long-range correlation between the methyl protons at  $\delta_{\text{H}}$  1.15 ( $\delta_{\text{C}}$  23.8) and the carbon signals at  $\delta_{\text{C}}$  76.2 (oxymethine),  $\delta_{\text{C}}$  87.1 and  $\delta_{\text{C}}$  31.4 established that the dihydrofuran moiety resided next to an oxymethine group ( $\delta_{\text{H}}$  3.51). Furthermore, in the  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR spectrum, we could distinguish distinctive resonances for an epoxy function ( $\delta_{\text{H/C}}$  2.71/

64.2, CH and  $\delta_C$  58.3, qC). In the HMBC experiment, important cross peaks from H-30 ( $\delta_H$  1.27) to C-24 ( $\delta_C$  24.9); from H-30 ( $\delta_H$  1.27) to C-22 ( $\delta_C$  64.2); H-24 ( $\delta_H$  1.31) to C-30 ( $\delta_C$  27.4) and H-24 ( $\delta_H$  1.31) to C-22 ( $\delta_C$  64.2) were observed, indicating that the epoxy group was located at C-22, C-23. This suggests that the structure of **2** may be a precursor of ekeberin D2 (**5**), isolated for the first time from this plant (Murata et al., 2008). Compound **2**, on hydrolysis using aqueous acid (10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) yielded ekeberin D2 (**5**), which was confirmed by comparison of the spectral data with that reported (Murata et al., 2008). This finding was strongly supported by the <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY and HMBC results. The presence of a secondary alcohol at C-7 of **2** allowed us to determine its absolute stereochemistry by utilizing the modified Mosher's method (Ohtani et al., 1991; Lamshöft et al., 2003). (*R*)- and (*S*)-MTPA esters of sapelenin H (**2**) were prepared by treatment with (*R*)- and (*S*)- $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylphenylacetyl (MTPA) chloride in DMAP followed by drops of pyridine. Compound **2** was converted to the corresponding MTPA esters *S* and *R*, respectively. Significant  $\Delta\delta$  values ( $\Delta\delta = \delta_{S\text{-MTPA-ester}} - \delta_{R\text{-MTPA-ester}}$ ) were observed for the protons near the chiral center C-7 as shown in Fig. 2. According to Mosher's rule, the absolute configuration at C-7 was determined as *S*. As a consequence, the absolute configurations of the other two stereogenic centers in the dihydrofuran portion of **2** were deduced to be 3*S*, 6*R*, on the basis of the established relative stereochemistry from the significant NOE effect between H-3, CH<sub>3</sub>-6 and H-7 (Fig. 3b). The absolute configuration at C-22 could not be determined. Thus, compound **2** is accordingly (1*S*,4*E*,8*E*,12*E*)-15-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)-1-((2*R*,5*S*)-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran-2-yl)-4,9,13-trimethylpentadeca-4,8,12-trien-1-ol.

Compound **3** (Fig. 1) was isolated as an optically active colorless oil,  $[\alpha]_D^{20} = +194^\circ$  [*c* 0.01, CH<sub>3</sub>OH]. Its HR-MS mass spectrum showed a quasi-molecular ion peak  $[M+H]^+$  at  $m/z = 495.4054$  corresponding to the molecular formula C<sub>30</sub>H<sub>55</sub>O<sub>5</sub>. The IR spectrum contained hydroxyl group absorption at 3430 cm<sup>-1</sup>. Important fragments were obtained at  $m/z$  477  $[[M+H]^+ - H_2O]^+$ , 459  $[[M+H]^+ - 2 \times H_2O]^+$  and 441  $[[M+H]^+ - 3 \times H_2O]^+$  in its mass spectrum, indicating three hydroxyl groups in the structure of **3**. Its <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMR spectra showed resonances at  $\delta_{H/C}$  3.79/88.1, 3.56/77.7 and 3.44/78.9, corresponding to three oxymethine groups (see Supplementary data, Table S1). Furthermore, the <sup>1</sup>H NMR spectrum indicated resonances for eight methyl groups [ $\delta_H$  1.17, 1.22, 1.65, 1.69 (each 3H), 1.15 (6H), 1.61 (6H)] and resonances of three olefinic protons at  $\delta_H$  5.18 ( $J = 6.9$ ), 5.11 ( $J = 6.5$ ), 5.12 ( $J = 6.8$ ). In the <sup>13</sup>C NMR spectrum, a total of 30 resonances were observed. Compound **3** is, thus, an acyclic triterpene containing at least three hydroxyl groups. In the <sup>13</sup>C NMR spectrum, one can distinguish resonances for a 2-hydroxypropanyl-2-methyl-tetrahydrofuran-2-yl moiety at  $\delta_C$  86.6, 31.5, 27.0, 88.1, 71.1, 23.9, and

27.1. Resonances at  $\delta_{H/C}$  5.11/124.7 (olefinic carbon), 2.09/27.0 (methylene protons), 1.61/18.0 and 1.69/25.7 (two methyl groups) in the <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMR spectra were typical for those of a prenyl group (Kouam et al., 2007). However, in the HMBC experiment (Fig. 3a<sub>3</sub>), we observed correlations of proton resonances at  $\delta_H$  1.61 (CH<sub>3</sub>-30) and 1.69 (CH<sub>3</sub>-24) with the carbon signal at  $\delta_C$  124.7 (C-22) which in turn showed a cross peak with a proton signal at  $\delta_H$  2.01 (H-20). In addition, a cross peak was observed between signal at  $\delta_H$  2.01 and a carbon resonating at  $\delta_H$  1.61 (CH<sub>3</sub>-29) suggesting a geranyl moiety in the structure of **3**. The remaining two hydroxyl groups were located at C-10 and C-11, based on the careful examination of the HMBC data. In fact, the methylene protons ( $\delta_H$  1.42 and 1.58 (CH<sub>2</sub>-8)) indicated correlations with two quaternary oxygenated carbons ( $\delta_C$  74.6 (C-10), and 86.6 (C-6)) and the methyl group at  $\delta_H$  1.15 (CH<sub>3</sub>-27) showed cross peaks with carbon signals at  $\delta_C$  78.9 (C-11), 74.6 (C-10) and 33.6 (C-9). Sapelenin I (**3**) is, thus, an isomer of ekeberin D2 (**5**) (Murata et al., 2008). Because two secondary hydroxyl groups are present in the structure of sapelenin I (**3**), the determinations of their absolute configurations is difficult. However, treatment of **3** with 2,2-dimethoxypropane and *p*-toluene sulfonic acid in acetone afforded the corresponding acetonide (**3a**). The absolute configurations of the dihydrofuran moiety were elucidated by both NOESY and Mosher's experiments (Figs. 2 and 3b). NOESY correlations were observed between 1-CH<sub>3</sub>, H-3 and 26-CH<sub>3</sub>, and H-7 and 26-CH<sub>3</sub>. The modified Mosher's method (Fig. 2) was applied to determine the absolute configuration of C-7 to be the same as in **2** (7*S*) and consequently, those of C-3 and C-6 were found to be respectively, 3*S* and 6*R*. However, it was not possible to determine the absolute configurations at C-10 and C-11. On the basis of the above evidence, the structure of compound **3** was assigned to be (1*S*, 8*E*,12*E*)-1-((2*S*,5*R*)-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran-2-yl)-4,9,13,17-tetra-methyl octadeca-8,12,16-triene-1,4,5-triol.

Compound **4** (Fig. 1) was obtained as an optically active colorless oil  $\{[\alpha]_D^{20} + 36$  (*c* 0.01, CH<sub>3</sub>OH)} with the molecular formula C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>, established by HR-MS in conjunction with the NMR spectra. The IR spectrum of **4** indicated the presence of hydroxyl (3430 and 3360 cm<sup>-1</sup>) and ester carbonyl (1730 cm<sup>-1</sup>) groups. The chemical shift values of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of **4** in CDCl<sub>3</sub> (see Supplementary data, Table S1) were almost identical with those of compound **3**. However, in the <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound **4**, a resonance was observed for an acetyl group at  $\delta_H$  2.09 and the signal at  $\delta_H$  3.56 (H-7) in **3** shifted downfield to  $\delta_H$  4.95, confirming the presence of an acetyl group. This was corroborated by the resonances at  $\delta_C$  171.1 in the <sup>13</sup>C NMR spectrum. From this evidence, it was clear that the hydroxy moiety was replaced in **3** by an acetoxy group. Based on the formation of the sapelenins G–I (**1–3**) in the same plant extract, we speculate that they possess the same biogenetic origin. In addition to the consis-

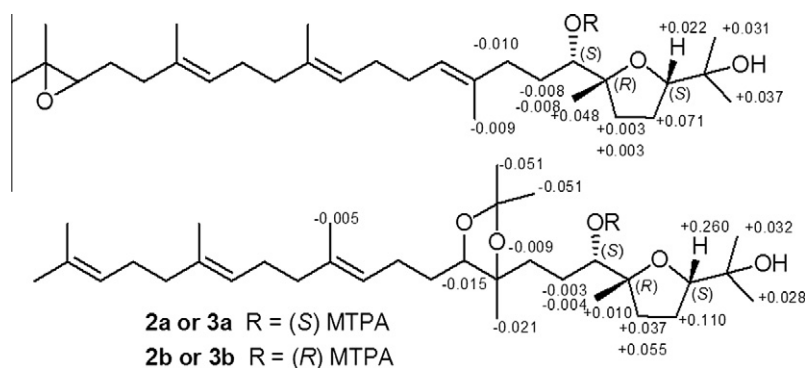
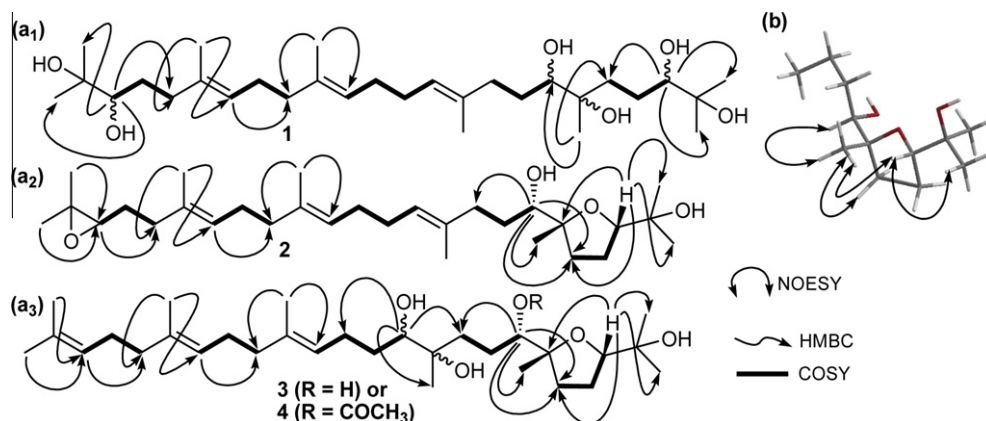
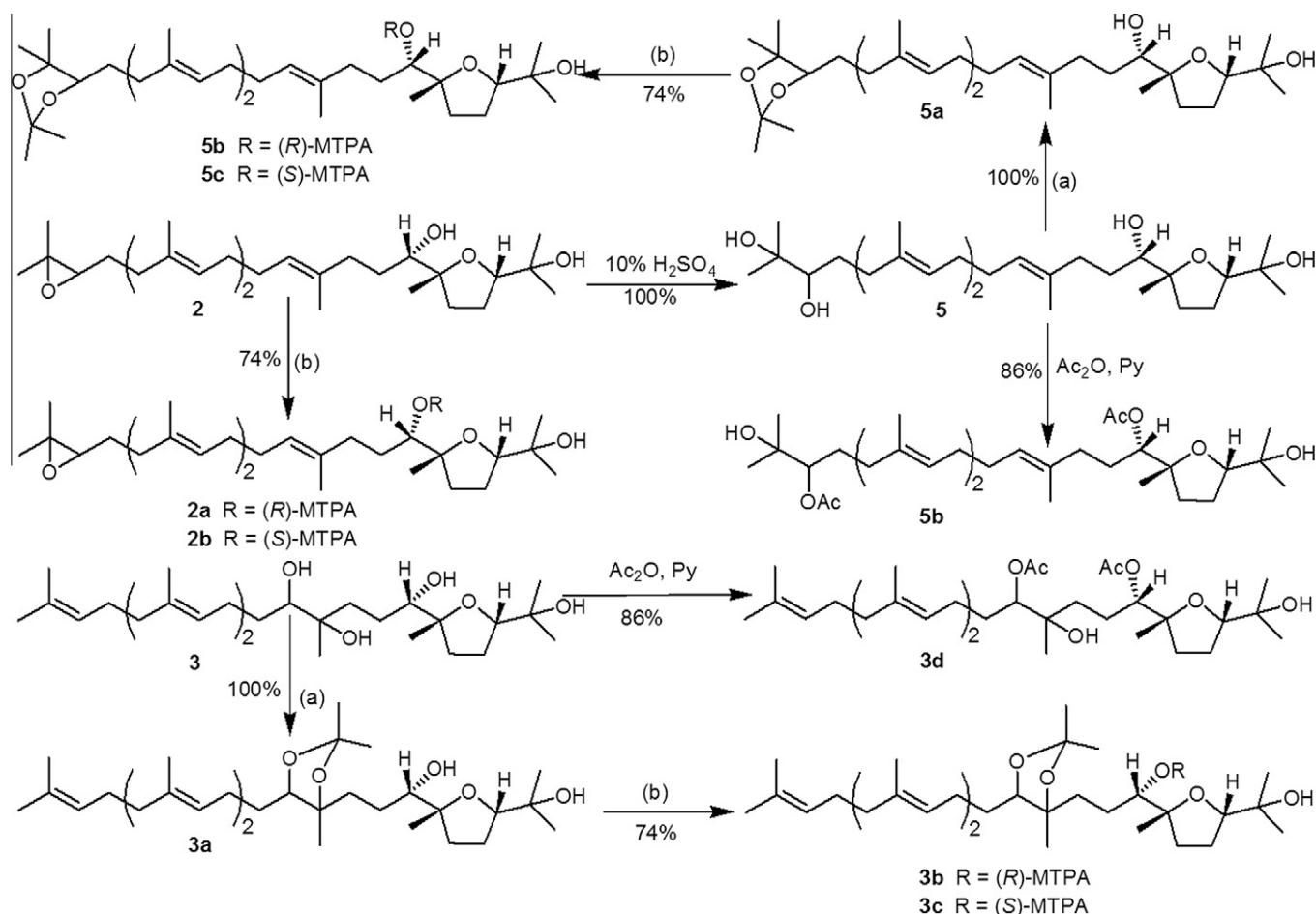


Fig. 2.  $\Delta\delta(\delta_S - \delta_R)$  values (in ppm) for the MTPA esters of **2** and **3**.



**Fig. 3.** (a)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (bold bonds) and selected HMBC (curved arrows) correlations for 1–4. (b) Key NOE correlation (curved arrows) observed for the dihydrofuran portion for 2–5 NOESY spectrum (in  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



**Fig. 4.** Schematic representation of the chemical conversion of sapelenin derivatives. (a) 2,2-dimethoxypropane, *p*-toluenesulfonic acid, acetone at rt, 30 mn, 98%; (b) (+) or (–)- MTPA chloride, DMAP, at RT, overnight, 74%.

tent chemical correlations (Fig. 4), we assume identical absolute configurations of the three stereogenic centers C-3, C-6 and C-7 of the derivatives presented in Fig. 4. The absolute configurations at C-10 and C-11 could not be determined. The structure of **4** was, thus, determined as a (1*S*,8*E*,12*E*)-4,5-dihydroxy-1-((2*S*,5*R*)-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyltetrahydrofuran-2-yl)-4,9,13,17-tetramethyloctadeca-8,12,16-trienyl acetate.

The IL-17 (or IL-17A), originally called cytotoxic T-lymphocyte antigen-8, is the signature cytokine of the recently identified T

helper 17 (Th17) cell subset of  $\text{CD}_4^+$  T cells, and is associated with several immune regulatory functions, including the inflammatory process during infection and in autoimmune diseases (Iwakura et al., 2011; Angkasekwinai and Dong, 2011). In fact, the IL-17 family of cytokines is involved in the development of inflammation and host defense against infection by inducing the expression of genes encoding proinflammatory cytokines (such as TNF, IL-1, IL-6, G-CSF, and GM-CSF), chemokines (such as CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2, and CCL7), antimicrobial peptides (such as defensins and

S100 proteins), and matrix metalloproteinases (such as MMP1, MMP3, and MMP13) from fibroblasts, endothelial cells, and epithelial cells (Kolls and Linden, 2004; Iwakura et al., 2008, 2011; Reynolds et al., 2010). Furthermore, IL-17 also promotes SCF- and G-CSF-mediated granulopoiesis and recruits neutrophils to the inflammatory sites (Iwakura et al., 2011). Therefore, we employed the 96 well-plate format of measurement of IL-17 secretion by human PBMCs stimulated with PHA using the human IL-17 ELISA kit (Ray Biotech, Inc.). Sapelenins G–J (1–4) demonstrated moderate to significant anti-inflammatory activities by suppressing the secretion of IL-17 by human PBMCs stimulated with PHA (Fig. 5). We used cyclosporine A (CsA) as an additional control (reference). Sapelenins G (1), I (3), and J (4) significantly suppressed IL-17 secretion at the concentration of 11.1  $\mu\text{M}$ , which became pronounced in a concentration-dependent manner. Their activity was comparable to that of the reference (CsA) at higher concentrations. Sapelenin H (2) was not potent in suppressing the secretion of IL-17 even at the highest concentration tested (100.0  $\mu\text{M}$ ). However, to confirm that the data obtained for IL-17 secretion was not affected by the cytotoxicity of the sapelenins towards PBMCs, we evaluated the viability of the PBMCs treated with the respective compounds by a cell viability assay (CellTiter-Blue<sup>®</sup>, Promega) in parallel (Fig. 6).

The cytotoxicity assay (Fig. 6) revealed that sapelenin G (1) had only negligible cytotoxic effects against the PBMCs even at higher concentrations. Sapelenin H (2) did not show any cytotoxic effect at any tested concentration. Sapelenins I (3) and J (4) started demonstrating cytotoxicity against the PBMCs at 33.3  $\mu\text{M}$  and 11.1  $\mu\text{M}$ , respectively, that increased in a concentration-dependent exponential manner at higher concentrations; that is, at 100  $\mu\text{M}$  for both the sapelenins. This assay, thus, allowed us to discriminate the real anti-inflammatory responses of the tested compounds from the false positives.

Taken together, the anti-inflammatory and cytotoxicity assays revealed that sapelenin G (1) is highly potent in suppressing the secretion of IL-17 by PBMCs without causing any cytotoxic effects, and deserves further consideration for development as an anti-inflammatory drug. Sapelenin H (2) neither possessed the potency to suppress IL-17 secretion by the PBMCs nor had any cytotoxic activity towards them. However, since sapelenins I (3) and J (4) showed a concentration-dependent cytotoxic effect on the PBMCs, their IL-17 suppression data were considered invalid at the higher concentrations.

### 3. Experimental

#### 3.1. General experimental procedures

##### 3.1.1. NMR

The NMR spectra were recorded on a Bruker DRX-500 NMR. Chemical shifts ( $\delta$ ) were quoted in parts per million (ppm) from internal standard tetramethylsilane (TMS). The  $^3J_{\text{C,H}}$  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.

##### 3.1.2. Column chromatography and preparative HPLC

Flash column chromatography was performed using silica-gel 60 (Merck, 0.040–0.063 mm). Preparative reversed-phase HPLC was carried out with a Gilson system consisting of pump 322 with a UV detector 152 ( $\lambda = 205$  nm) using a Nucleodur Gravity column from Macherey–Nagel (Düren, Germany) (250  $\times$  16 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size). Separation was achieved by using a H<sub>2</sub>O (A)–MeOH (B) gradient program as follows (flow rate 4 mL min<sup>-1</sup>): 70% A linear to 75% B for 15 min, linear gradient to 20% A over 13 min, linear

gradient to 0% A over 2 min, after 100% B isocratic for 7 min. Afterwards, the system returned to its initial condition (70% A) within 1 min, and was equilibrated for 5 min.

#### 3.2. Plant material

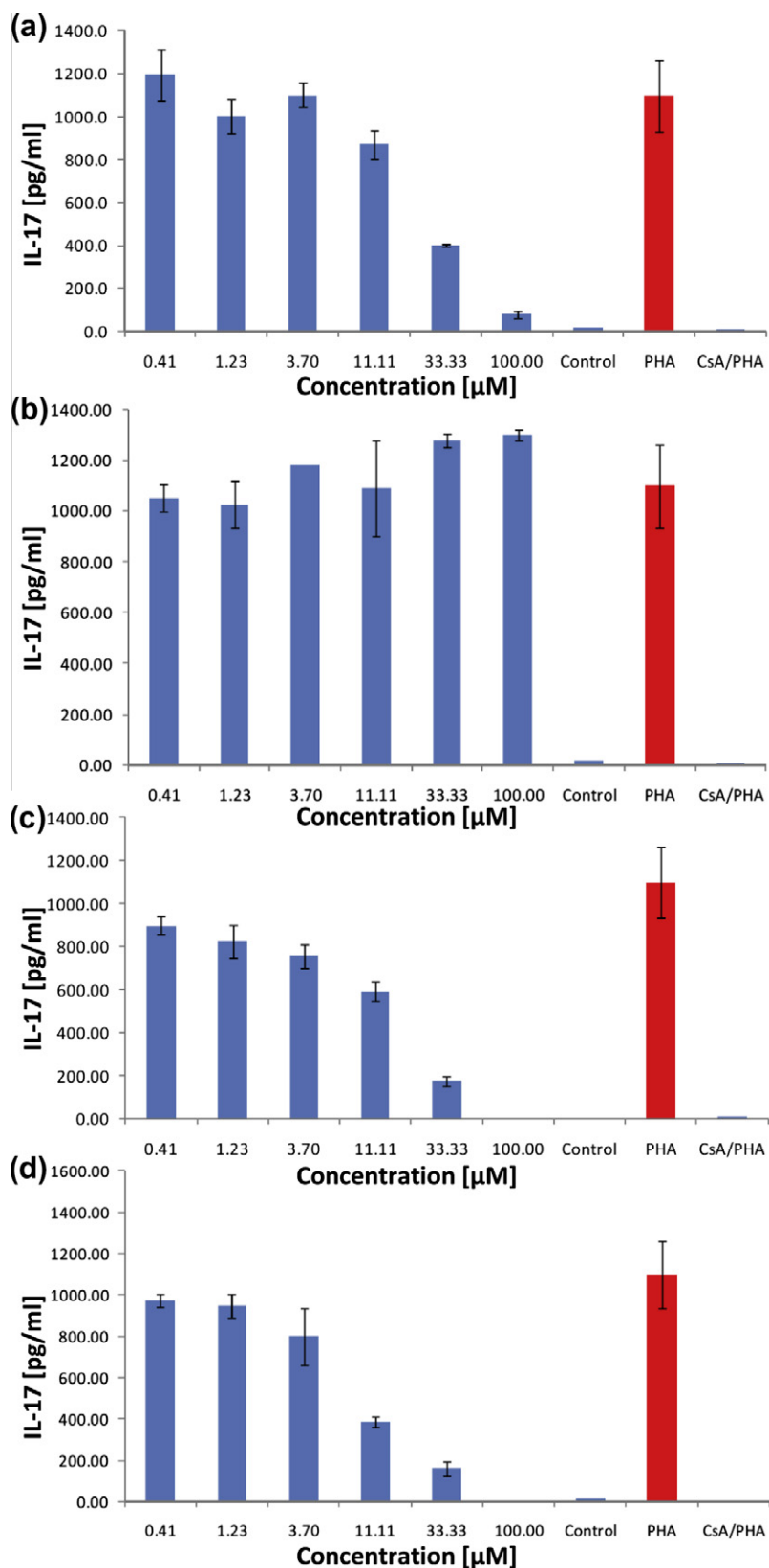
The stem bark of *E. cylindricum* was collected from the Dja rainforest, east region, Cameroon, in June 2010. The botanical identification was made at the National Herbarium of Cameroon in Yaoundé by Mr. Victor Nana (botanist) and a voucher specimen (No. 54965/SFR/CAM) was deposited.

#### 3.3. Extraction and isolation

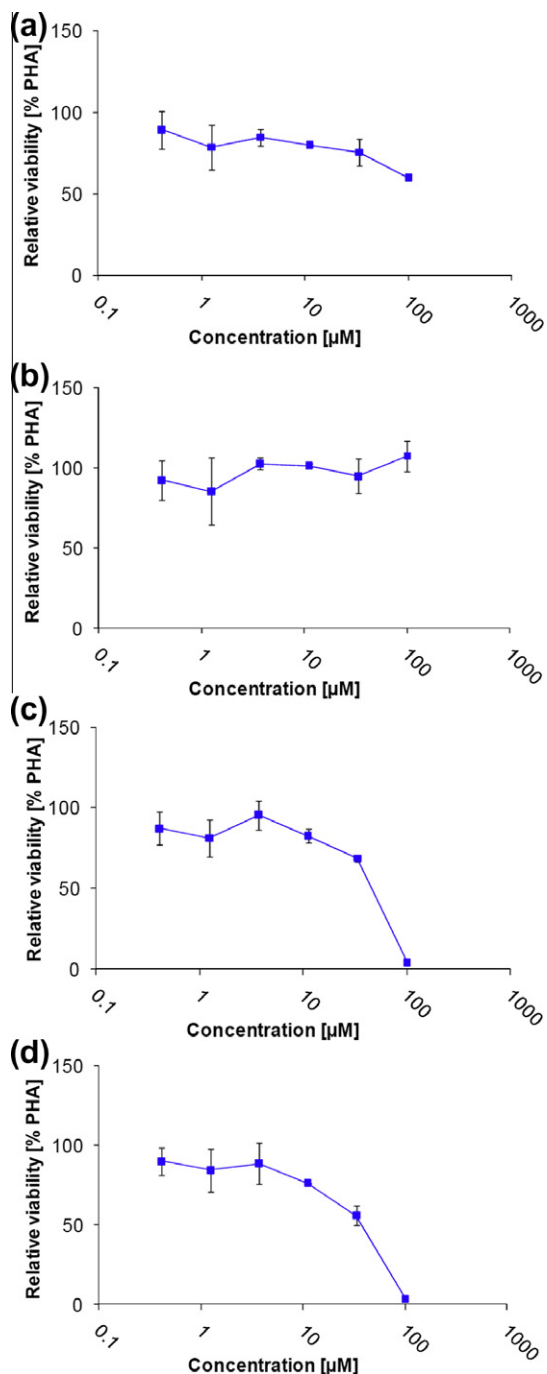
The air-dried stem bark of *E. cylindricum* (7 kg) was powdered and extracted twice with MeOH at room temperature for 48 and 8 h, respectively. The organic solvent was concentrated to afford a crude extract (890 g) which was re-extracted with ethyl acetate/methanol (90/10) to obtain a 390 g extract, which was further subjected to flash silica gel column chromatography, using a gradient of ethyl acetate in hexane, to give seven fractions named fr<sub>0</sub> (pure hexane); fr<sub>1</sub> (hexane/ethyl acetate, 9/1); fr<sub>2</sub> (hexane/ethyl acetate, 4/1); fr<sub>3</sub> (hexane/ethyl acetate, 7/3); fr<sub>4</sub> (hexane/ethyl acetate, 1/1); fr<sub>5</sub> (pure ethyl acetate) and fr<sub>6</sub> (ethyl acetate/methanol, 4/1). Fr<sub>4</sub> and fr<sub>5</sub> were combined based on their LC-MS profiles. Fraction fr<sub>0</sub> was found to contain mainly mixtures of hydrocarbons and phytosterols. Fractions fr<sub>1</sub> (38 g), fr<sub>2</sub> (41 g), fr<sub>3</sub> (36 g), fr<sub>4</sub> (20 g) and fr<sub>5</sub> (30 g) which showed strong anti-inflammatory activities, were again subjected separately to flash silica gel column chromatography, using the same gradient of solvent, to afford four series of six (A<sub>1</sub>–A<sub>6</sub>); eight (B<sub>1</sub>–B<sub>8</sub>), seven (C<sub>1</sub>–C<sub>7</sub>) and seven (D<sub>1</sub>–D<sub>7</sub>) sub-fractions. Each subfraction was submitted to the semipreparative HPLC at wavelength 205 nm with the solvent system H<sub>2</sub>O (B)–MeOH (A) with gradient program as described above. Fractions A<sub>6</sub> and B<sub>4</sub> gave, respectively, sapelenins H (2, 22 mg) and J (4, 7 mg); fractions C<sub>4</sub> and C<sub>6</sub> yielded ekeberin D<sub>2</sub> (5, 76 mg) and sapelenins B (80 mg), D (49 mg) and I (3, 50 mg); Fractions D<sub>5</sub> gave sapelenins A (37 mg) and C (92 mg); and Fraction D<sub>6</sub> afforded (+)-catechin (68 mg), epicatechin (20 mg) and sapelenin G (1, 21 mg).

#### 3.4. Accurate mass measurement

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<sup>-1</sup>; mass range: 200–1000) with nominal mass resolving power of 60000 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 1200 HPLC system (Santa Clara, USA) consisting of LC-pump, PDA detector ( $\lambda = 205$  nm), auto sampler (injection volume 10  $\mu\text{l}$ ) 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 (five arbitrary units). Helium served as the collision gas. The separations were performed by using a Nucleodur Gravity column (50  $\times$  2 mm, 1.8  $\mu\text{m}$  particle size) from Macherey–Nagel (Düren, Germany) with a H<sub>2</sub>O (+0.1% HCOOH, +10 mM NH<sub>4</sub>Ac) (A)/acetonitrile (+0.1% HCOOH) (B) gradient (flow rate 300  $\mu\text{l}$  min<sup>-1</sup>). Samples were analyzed by using a gradient program as follows: 90% A isocratic for 2 min, linear gradient to 100% B over 13 min, after 100% B



**Fig. 5.** Effect of the tested compounds on the secretion of IL-17 by PHA-stimulated PBMCs. (a) Sapelenin G (1); (b) Sapelenin H (2); (c) Sapelenin I (3); (d) Sapelenin J (4). As negative control, IL-17 secretion in unstimulated PBMCs was determined. As positive control, IL-17 secretion in PHA-stimulated PBMCs without adding any tested compound was determined. An additional control (reference) of CsA was used to determine the comparative efficacy of the tested drugs. (Concentrations used: 0.41, 1.23, 3.70, 11.11, 33.33, and 100  $\mu\text{M}$ ).



**Fig. 6.** Effect of the tested compounds on the viability of PBMCs. (a) Sapelenin G (**1**); (b) Sapelenin H (**2**); (c) Sapelenin I (**3**); (d) Sapelenin J (**4**). (Concentrations used: 0.41, 1.23, 3.70, 11.11, 33.33, and 100  $\mu\text{M}$ ).

isocratic for 5 min, the system returned to its initial condition (90% A) within 0.5 min, and was equilibrated for 4.5 min.

### 3.5. Physico-chemical constants of **1–4**

Sapelenin G (**1**): oil,  $[\alpha]_D^{20} + 260$  (c 0.01, MeOH); IR (KBr);  $\nu_{\text{max}}$  3386 (OH), 1660 (C=C), 1447, 1373, 1160, 1069, 1008  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) are shown in Table S1 (Supplementary data); HR-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$  513.4152 (calcd. for  $\text{C}_{30}\text{H}_{57}\text{O}_6$ , 513.4155).

Sapelenin H (**2**): oil,  $[\alpha]_D^{20} + 58$  (c 0.01, MeOH); IR (KBr);  $\nu_{\text{max}}$  3430 (OH), 1660 (C=C), 1447, 1378, 1173, 1078, 1026  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) are shown in Table S1 (Supplementary data); HR-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$  477.3945 (calcd. for  $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{O}_4$ , 477.3944).

Sapelenin I (**3**): oil,  $[\alpha]_D^{20} + 194$  (c 0.01, MeOH); IR (KBr);  $\nu_{\text{max}}$  3430 (OH), 1660 (C=C), 1447, 1378, 1173, 1078, 1026  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) are shown in Table S1 (Supplementary data); HR-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$  495.4054 (calcd. for  $\text{C}_{30}\text{H}_{55}\text{O}_5$ , 495.4049).

Sapelenin J (**4**): oil,  $[\alpha]_D^{20} + 36$  (c 0.01, MeOH); IR (KBr);  $\nu_{\text{max}}$  3430 (OH), 3360 (OH), 1730 (C=O), 1660 (C=C), 1443, 1373, 1243, 1082, 1021  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) are shown in Table S1 (Supplementary data); HR-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$  537.4150 (calcd. for  $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{O}_6$ , 537.4155).

### 3.6. Chemical conversion of sapelenin derivatives

#### 3.6.1. Acetonidation of sapelenin I (**3**)

To a solution of sapelenin I (**3**) (20.0 mg, 0.040 mmol) in acetone (5 ml) was added 1 ml of 2,2-dimethoxypropane and 4 mg of *p*-toluene sulfonic acid. After 30 min at 20  $^\circ\text{C}$ , the solution was quenched with water and the reaction mixture was extracted with hexane and washed with  $\text{NaHCO}_3$ , and then dried over  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . The solvent was evaporated at reduced pressure and the extract was subjected to the HPLC to afford the acetonide (**3a**) (21.4 mg, 99%) as a colorless oil. HR-MS  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z$  557.4166 (calcd. for  $\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{O}_5\text{Na}$ , 557.4182).

#### 3.6.2. Acetonidation of ekeberin D2 (**5**)

The same reaction was performed with **5** (7.0 mg, 0.014 mmol) to afford the expected acetonide (**5a**) (7.5 mg, 99.1%) as a colorless oil. HR-MS  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z$  557.4171 (calcd. for  $\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{O}_5\text{Na}$ , 557.4182).

#### 3.6.3. Acetylation of sapelenin I (**3**)

Dry pyridine (0.5 ml) and  $\text{Ac}_2\text{O}$  (1.0 ml) were added to sapelenin I (**3**, 10 mg, 0.020 mmol) and stirred for 12 h. After the usual work-up, the extract was subjected to the HPLC to afford sapelenin I diacetate (**3d**) (5.7 mg, 48.7%) as a major colorless oil; diacetylsapelenin I,  $[\alpha]_D^{20} + 192^\circ$  (c 0.005, MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.11 (1H, t,  $J = 5.5$ , H-22), 5.12 (2H, t,  $J = 6.5$ , H-14,18), 4.85 (1H, dd,  $J = 2.8$ , 9.7), 4.72 (1H, dd,  $J = 2.1$ , 10.2), 3.78 (1H, t,  $J = 5.7$ ), 2.23 (1H, m, H-13), 2.12 (1H, m, H-5), 2.11 (3H, s,  $\text{H}_3\text{CCO}$ ), 2.09 (3H, s,  $\text{H}_3\text{CCO}$ ), 2.07 (4H, m, H-17,H-19), 2.00 (m, H-20), 1.85 (2H, m, H-4), 1.69 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -24), 1.65 (2H, m, H-9), 1.61 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -30), 1.58 (6H, s,  $\text{CH}_3$ -28,29), 1.54 (1H, m), 1.53 (3H, m), 1.38 (1H, m), 1.23 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -25), 1.17 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -26), 1.15 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -1); HR-MS  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z$  601.4073 (calcd. for  $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_7\text{Na}$ , 601.4080).

#### 3.6.4. Acetylation of ekeberin D2 (**5**)

The same reaction was performed with **5** (10 mg, 0.020 mmol) to afford the expected ekeberin D2 diacetate (**5b**) (5.7 mg, 48.7%) of ekeberin D2 (**5**) as a major colorless oil; ekeberin D2 diacetate (**5b**),  $[\alpha]_D^{20} + 10^\circ$  (c 0.005, MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.06 (m, 3H), 4.85 (dd,  $J = 2.2$ , 10.2), 4.72 (dd,  $J = 2.6$ , 10.2), 3.63 (t,  $J = 8.0$ ), 2.03 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.52 (m, 9H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.11 (s, 6H), 1.03 (s, 3H); HR-MS  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z$  601.4073 (calcd. for  $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_7\text{Na}$ , 601.4080).

#### 3.6.5. Hydrolysis of sapelenin H (**2**)

To a solution of sapelenin H (**2**, 10 mg, 0.021 mmol), 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (5 ml) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until the HPLC analysis revealed the disappearance of the starting epoxide (10 h). The reaction medium was then ex-



tracted with dichloromethane (5 × 3 ml), and the organic solution was decanted. The solvent was evaporated at reduced pressure and the extract subjected to the preparative HPLC to afford the natural product ekeberin D<sub>2</sub> (**5**, 10.1 mg, 97.3%).

### 3.6.6. Esterification of sapelenin H (**2**) with (R) and (S)-MTPA chloride

Two portions of sapelenin H (**2**, 7 mg, 0.014 mmol each) were treated with (R) and (S)-MTPA chloride in 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), stirring at room temperature. The two reactions were conducted in parallel and the progress was monitored by the analytical HPLC. After complete consumption of the sapelenin H (**2**), the solvent was evaporated and the reaction mixture submitted to the preparative HPLC to afford the (S) and (R)-MTPA ester of **2** (7.5 mg each, 74%).

### 3.6.7. Esterification of compounds **3a** and **5a** with MTPA chloride

The same reaction of **3a** (5 mg, 0.009 mmol) and **5a** (10 mg, 0.019 mmol) with (R) and (S)-MTPA chloride afforded the (S) and (R)-MTPA ester of **3a** (5.2 mg, 74%) and **5a** (10.2 mg, 74%) respectively.

## 3.7. Biological activities

### 3.7.1. Anti-inflammatory assay

The suppression of anti-inflammatory response assay (IL-17 ELISA) was performed according to Zvetkova et al. (2001). The detailed assay parameters are elaborated in the Supplementary data (Table S2 for assay conditions, instrumentations and parameters; Fig. S1 represents the general plate layout for the assay; Fig. S2 shows the viability of PBMC controls).

### 3.7.2. Viability of PBMCs assay (cytotoxicity assay)

The cytotoxicity of the tested compounds on PBMCs was performed using the Resazurin-based CellTiter-Blue<sup>®</sup> cell viability assay kit (Promega) strictly following the manufacturer's guidelines (Anonymous, 2009). The detailed assay parameters are elaborated in the Supplementary data (Table S3 for assay conditions, instrumentations and parameters).

## Acknowledgements

Part of this work was supported by the Dortmund Gambrinus Fellowship (to S.F.K.) and the International Foundation of Science (Grant No. F/4893-1). This work was also supported by the German Academic Exchange Service (DAAD) initiative "Welcome to Africa". The authors (S.K., M.L., and M.S.) are grateful to 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. We thank Sebastian Malchow and Tobias Goldmann for excellent technical assistance.

## 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.2012.06.004>.

## References

- Adesida, G.A., Taylor, D.A.H., 1967. The chemistry of the genus *Entandrophragma*. *Phytochemistry* 6, 1429–1433.
- Alberte, R.S., Roschek, W.P., Li, D., 2010. United States Patents Application. No. US2010/0009927 A1.
- Angkasekwina, P., Dong, C., 2011. T<sub>H</sub>17 cytokines: characteristics, regulation, and biological function. In: Jiang, S. (Ed.), *T<sub>H</sub>17 Cells in Health and Disease*. Springer, New York, USA, pp. 27–40.
- Anonymous, 2009. CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay Technical Bulletin, Rev. 6/09. #TB317, Promega Corporation, USA.
- Baxter, R.L., Dijkstra, F.J.J., Gould, R.O., Parsons, S., 1998. β-Dihydroentandrophragmin-ethyl acetate (1/0.355). *Acta Cryst. C54*, 1182–1184.
- Chan, W.R., Taylor, D.R., Yee, T.H., 1970. Triterpenoids from *Entandrophragma cylindricum* Sprague. Part I. Structures of sapelins A and B. *J. Chem. Soc. C2*, 311–314.
- Huang, Z., Hashida, K., Makino, R., Kawamura, F., Shimizu, K., Kondo, R., Ohara, S., 2009. Evaluation of biological activities of extracts from 22 African tropical wood species. *J. Wood Sci.* 55, 225–229.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., Nakae, S., 2011. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34, 149–162.
- Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H., 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.* 226, 57–79.
- Kashiwada, Y., Iizuka, H., Yoshioka, K., Chen, R.F., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., 1990a. Tannins and related compounds. XCIII: occurrence of enantiomeric proanthocyanidins in the leguminosae plants, *Cassia fistula* L. and *C. javanica* L. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 888–893.
- Kashiwada, Y., Morita, M., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., 1990b. Tannins and related compounds. XCI: isolation and characterization of proanthocyanidins with an intramolecularly doubly-linked unit from the fern, *Dicranopterispedata* HOUTT. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 856–860.
- Kolls, J.K., Linden, A., 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467–476.
- Kouam, S.F., Yapna, D.B., Krohn, K., Ngadjui, B.T., Ngoupayo, J., Choudhary, M.J., Schulz, B., 2007. Antimicrobial prenylated anthracene derivatives from the leaves of *Harungana madagascariensis*. *J. Nat. Prod.* 70, 600603.
- Lamshöft, M., Schmickler, H., Marner, F.-J., 2003. Determination of the absolute configuration of hydroxyiridals by chiroptical and NMR spectroscopic methods. *Eur. J. Org. Chem.* 4, 727733.
- Letouzey, R., 1985. Notice de la carte géographique du Cameroun. *Int. de la carte géographique*. Toulouse, France, 4, pp. 98.
- Miller, S.L., Tinto, W.F., 1995. Quassiols B-D, new squalenetrirpenes from *Quassiamultiflora*. *Tetrahedron* 51, 11959–11966.
- Murata, T., Miyase, T., Muregi, F.W., Naoshima-Ishibashi, Y., Umehara, K., Warashina, T., Kanou, S., Mkoji, G.M., Terada, M., Ishih, A., 2008. Antiplasmodialtriterpenoids from *Ekebergiacapensis*. *J. Nat. Prod.* 71, 167–174.
- Ngnokam, D., Massiot, G., Bliard, C., Tsamo, E., 1995. Sapelenin D, a new acyclic triterpenoid from the stem bark of *Entandrophragma cylindricum*. *Nat. Prod. Lett.* 5, 289–293.
- Ngnokam, D., Massiot, G., Nuzillard, J.-M., Connolly, J.D., Tsamo, E., Morin, C., 1993. Sapelenins A, B and C, acyclic triterpenoids from the stem bark of *Entandrophragma cylindricum*. *Phytochemistry* 34, 1603–1607.
- Ngnokam, D., Nuzillard, J.M., Bliard, C., 2005. Sapelenin E and F: new acyclic triterpenoids from the stem bark of *Entandrophragma cylindricum*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 19, 227–231.
- Nsiama, T.K., Okamura, H., Hamada, T., Morimoto, Y., Doe, M., Iwagawa, T., Nakatani, M., 2011. Rings D-seco and B, D-secotetranortriterpenoids from root bark of *Entandrophragma angolense*. *Phytochemistry* 72, 1854–1858.
- Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H., 1991. High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4092–4096.
- Reynolds, J.M., Angkasekwina, P., Dong, C., 2010. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 413–423.
- Tanaka, Y., Yamada, T., In, Y., Muraoka, O., Kajimoto, T., Tanaka, R., 2011. Absolute stereostructure of andriolides A–G from the flower of *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Tetrahedron* 67, 782–792.
- Taylor, D.A.H., Wragg, K., 1967. The structure of entandrophragmin. *Chem. Commun. (London)* 2, 81–83.
- Zvetkova, E., Wirleitner, B., Tram, N.T., Schennanach, H., Fuchs, D., 2001. Aqueous extracts of *Crinum latifolium* (L.) and *Camellia sinensis* show immunomodulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunopharmacol.* 1, 2143–2150.

# Spiroalkaloids and Coumarins from the Stem Bark of *Pauridiantha callicarpoides*

Ostend K. Tatuedom<sup>a,b</sup>, Simeon F. Kouam<sup>a</sup>, Diane Beatrice Yapna<sup>c</sup>,  
Bonaventure T. Ngadjui<sup>d</sup>, Ivan R. Green<sup>e</sup>, M. Iqbal Choudhary<sup>b</sup>,  
Jeanne E. R. Lantovololona<sup>f</sup>, and Michael Spitteller<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Higher Teachers' Training College, University of Yaounde 1,  
P. O. Box 47, Yaounde, Cameroon

<sup>b</sup> H. E. J. Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical Sciences, University  
of Karachi, Karachi 75270, Pakistan

<sup>c</sup> Département des Sciences Pharmaceutiques, Faculté de Médecine et Sciences Pharmaceutiques,  
Université de Douala, B. P. 2701, Douala, Cameroon

<sup>d</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde 1, B. P. 812,  
Yaounde, Cameroon

<sup>e</sup> Department of Chemistry, University of Stellenbosch, P/Bag X 1, Matieland, 7602,  
South Africa

<sup>f</sup> Department of Chemistry, Laboratory of Structural Chemistry, University of Antananarivo,  
P. O. Box 906, 101-Antananarivo, Madagascar

<sup>g</sup> Institute of Environmental Research (INFU) of the Faculty of Chemistry, Chair of  
Environmental Chemistry and Analytical Chemistry, Technical University Dortmund,  
Otto-Hahn-Str. 6, D-44221 Dortmund, Germany

Reprint requests to Professor Simeon Fogue Kouam. Tel: +237 94 46 45 35.

E-mail: [kfogue@yahoo.com](mailto:kfogue@yahoo.com)

*Z. Naturforsch.* **2014**, *69b*, 747–752 / DOI: 10.5560/ZNB.2014-4055

Received February 28, 2014

A new spiroalkaloid, 7-*epi*-javaniside (**1**), was isolated from the Cameroonian plant *Pauridiantha callicarpoides*, along with seven known compounds *viz.*, javaniside (**2**), sweroside (**3**), hymexelsin (**4**), scopoletin (**5**), 7,7'-dihydroxy-6,6'-dimethoxy-8,8'-biscoumarin (**6**), 7,7'-dihydroxy-6,6'-dimethoxy-3,3'-biscoumarin (**7**), and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**8**). The structures of the new alkaloid, as well as those of the known compounds, were elucidated by detailed spectroscopic analysis including 1D and 2D NMR and by comparison with the literature data for related compounds.

**Key words:** *Pauridiantha callicarpoides*, Rubiaceae, Coumarins, Javaniside, *epi*-Javaniside, Spiroalkaloids

## Introduction

Natural products are known to be more efficient and inherently better tolerated in the body as compared to synthetic compounds [1]. In the literature, several reviews have described the importance of genetic resources in drug discovery, and some of them described efficacy of natural and synthetic products [1–4]. Although natural and synthetic compounds usually have similarities in their chemical structures, the natural

compounds significantly outperform their synthetic counterparts for several reasons. For example, synthetic vitamin E has a lower biological activity than natural vitamin E since it is a racemic mixture [5]. Javaniside isolated from *Alangium javanicum*, can better mediate DNA strand scission than the synthetic one [6]. It is thus far more effective and important to use chirally pure natural compounds for the treatment of human ailments. Consequently, a comprehensive knowledge of the available genetic re-

sources, capable of producing bioactive compounds is both important and vital. *Pauridiantha callicarpoides* of the Rubiaceae family is a small tree native to Africa [7, 8]. Previous phytochemical studies on this plant led to the isolation of two new alkaloids [9]. As part of our continuing search for compounds from Cameroonian medicinal plants [10, 11], a dichloromethane/methanol extract of the stem bark of *P. callicarpoides* was investigated, and herewith we describe the isolation, structure elucidation of the new spiroalkaloid.

## Results and Discussion

The HPLC profile of a fraction obtained after silica gel flash column chromatography (see Experimental Section) showed what turned out to be two isomers in the ratios shown in Fig. 1. These were successfully separated by using a semi-preparative HPLC to afford *epi*-javaniside (**1**) and javaniside (**2**) (Fig. 2).

Compound **1**, named *epi*-javaniside was obtained as an optically active colorless powder ( $[\alpha]_D^{23} = -115.9^\circ$ ). Its molecular formula  $C_{26}H_{30}N_2O_9$  was determined from its HRESI-MS which showed a quasi-molecular ion peak  $[M+H]^+$  at  $m/z = 515.2029$  (calcd. 515.2024), requiring 13 degrees of unsaturation. UV absorption bands were observed at 206 and 248 nm characteristic of an aromatic ring. IR absorptions at 3184, 3086, 1711, and  $1658\text{ cm}^{-1}$  revealed the presence of hydroxyl, spiroamide and  $\alpha,\beta$ -unsaturated amide groups, respectively, which was consistent with NMR observations at  $\delta_C = 166.1$  (C-21) and 179.1 (C-2) ppm for two amide carbonyl groups [12]. In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, signals for a 1,2-disubstituted benzene ring were observed at  $\delta_H = 6.89$  (d,  $J = 7.6$  Hz, H-9), 6.96 (d,  $J = 7.6$  Hz, H-12), 7.01 (td,  $J = 7.6, 1.0$  Hz, H-10), and 7.25 (td,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, H-11) ppm. In addition, a set of signals due to a sugar moiety were observed at  $\delta_H = 3.15$  (dd,  $J = 9.2, 8.0$  Hz, H-2'), 3.25 (m, H-4'), 3.27 (m, H-5'), 3.35 (m, H-3'), 4.63

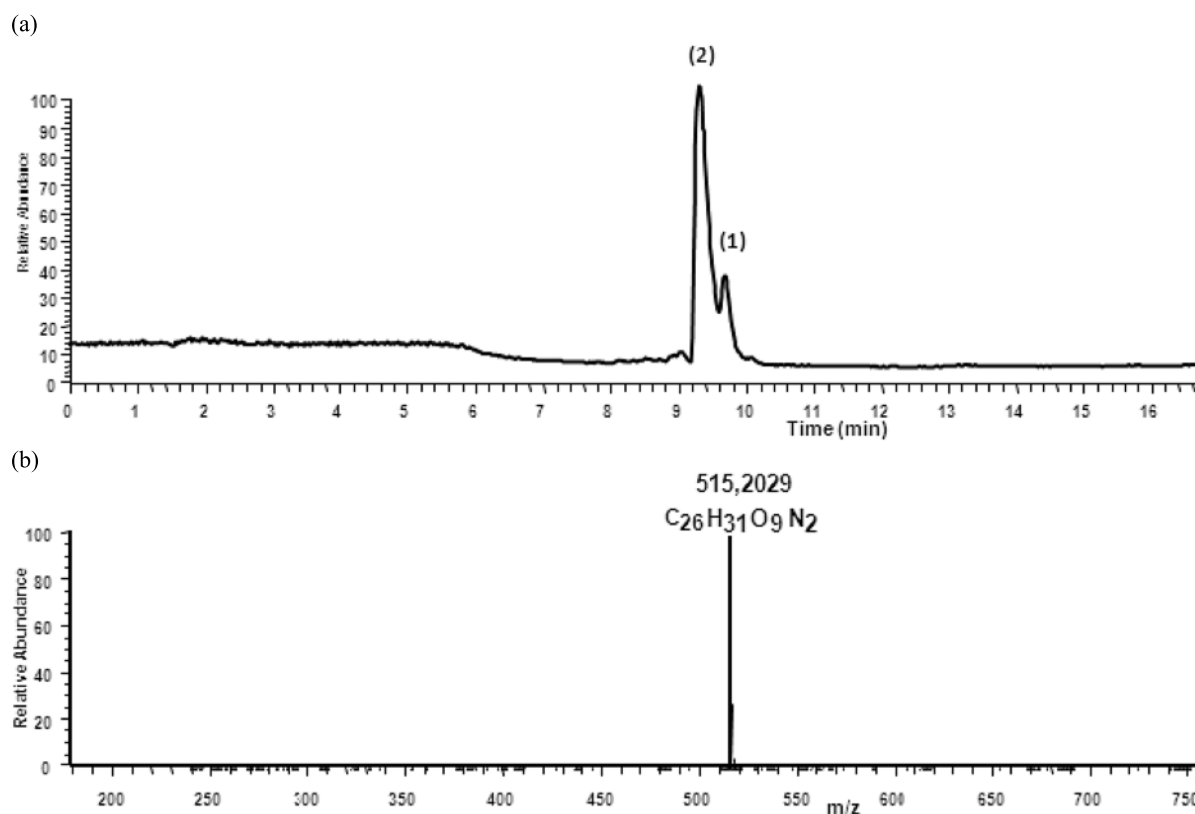


Fig. 1. HPLC chromatogram (a) and high-resolution mass spectrum (b) of the two isomers **1** and **2**.

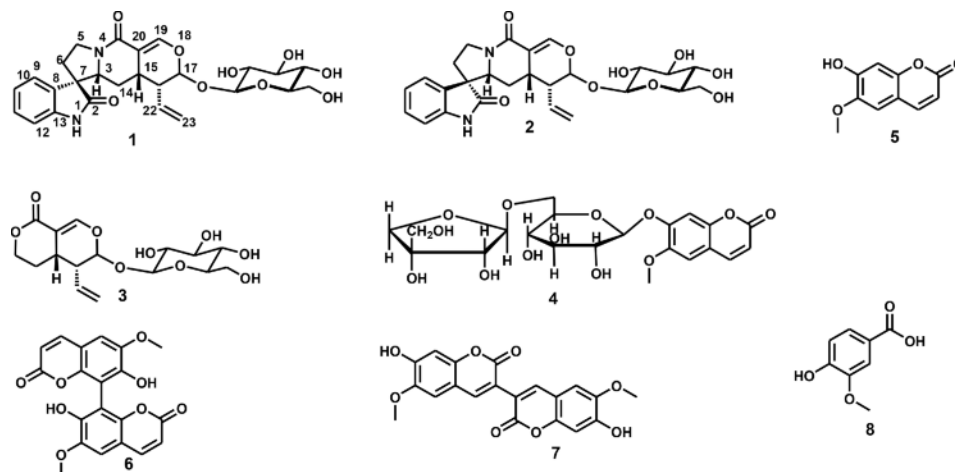


Fig. 2. Chemical structures of compounds 1–8.

(d,  $J = 8.0$  Hz, H-1'), 3.63 (dd,  $J = 12.0, 5.6$  Hz, H-6'), and 3.86 (dd,  $J = 12.0, 1.6$  Hz, H-6') ppm. The presence of the sugar unit was further supported by the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum with characteristic signals for a glucose moiety. The anomeric carbon was observed at  $\delta_{\text{C}} = 99.5$  (C-1') ppm. The large coupling constant of the anomeric proton at  $\delta_{\text{H}} = 4.63$  (d,  $J = 8.0$  Hz) ppm indicated its  $\beta$  configuration. Additionally, the  $^{13}\text{C}$  NMR and DEPT spectra showed signals for 20 carbons including four methylenes, ten methines (two olefinic and four aromatic ones) and six quaternary carbons, of which two are amide carbonyl groups and two are aromatic carbons at  $\delta_{\text{C}} = 131.2$  (C-8) and 142.5 (C-13) ppm. Analysis of the 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMQC spectra of compound **1** further indicated the presence of the fragments CH(3)–CH<sub>2</sub>(14)–CH(15)–CH(16)–CH(22)–CH<sub>2</sub>(23) and CH(16)–CH(17) which typically resembled the systems found in sweroside and secologanin [13, 14]. Comparison of the NMR data of compound **1** and sweroside (**3**) indicated the presence of a partial sub-structure of **1** [13]. In the HMBC spectrum, a signal characteristic of a hemi-

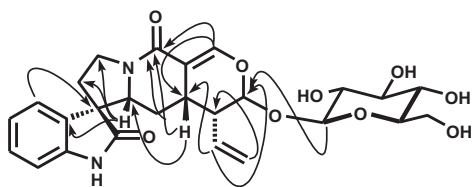
acetal group at  $\delta_{\text{H}} = 5.41$  (d,  $J = 1.4$  Hz, H-17) ppm showed a strong correlation with the anomeric carbon at  $\delta_{\text{C}} = 99.5$  ppm (Fig. 3). Compound **1** showed UV, IR, MS, and NMR spectral features closely resembling those of **2** (see Table 1). A small difference between the two compounds was observed, and the signals of the atoms around the asymmetric C-7 suggest that **1** is the C-7 epimer of javaniside (**2**), which was synthesized in 2005 [6]. Thus, compound **1**, based also on the HPLC and the above spectral evidences, was identified to be isomeric with javaniside (**2**) isolated from *Alangium javanicum* in 2004 [15], and the trivial name 7-*epi*-javaniside was assigned.

Seven known compounds (Fig. 2) were also isolated from the plant extract and were identified as javaniside (**2**) [6], sweroside (**3**) [13], hymexelsin (**4**) [16], scopoletin (**5**) [17], 7,7'-dihydroxy-6,6'-dimethoxy-8,8'-biscoumarin (**6**) [17], 7,7'-dihydroxy-6,6'-dimethoxy-3,3'-biscoumarin (**7**) [17], and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**8**) [18], by comparison of their spectroscopic data with those reported.

## Experimental Section

### General experimental procedures

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on Avance AV-500 and AV-600 spectrometers at  $\nu = 500.130$  and 600.233 MHz ( $^1\text{H}$ ); 125.757 and 150.927 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), respectively. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) with tetramethylsilane (TMS) as internal standard. UV spectra were recorded in methanol on a Thermo

Fig. 3. Key HMBC correlations for compound **1**.

Position	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1-NH	—	—	10.19	—
2	—	179.1	—	180.9
3	4.07 (dd, 3.2, 11.2)	64.8	4.05 (dd, 3.2, 11.2)	65.4
5	3.82 (brd, 12.4)	45.5	3.75 (brt, 10.0, 11.6)	45.6
	3.93 (td, 7.3, 12.4)		4.00 (dd, 8.0, 11.6)	
6	2.02 (dd, 7.3, 12.8)	34.3	2.21 (dd, 8.0, 13.2)	33.4
	2.47 (dd, 10.4, 12.8)		2.40 (ddd, 10.0, 12.8, 13.2)	
7	—	58.8	—	58.0
8	—	131.2	—	129.5
9	6.89 (d, 7.6)	124.8	7.30 (d, 7.6)	124.0
10	7.01 (td, 1.0, 7.6)	123.7	7.07 td, 0.8, 7.6)	123.7
11	7.25 (td, 1.0, 7.6)	129.8	7.25 (td, 0.8, 7.6)	130.1
12	6.96 (d, 7.6)	111.5	6.92 (d, 7.6)	111.0
13	—	142.5	—	143.5
14	0.87 (q, 12.6)	27.2	1.24 (q, 12.0)	27.0
	1.38 (dt, 3.6, 12.6)		1.33 (dt, 4.0, 12.0)	
15	3.05 (m)	28.2	2.96 (m)	28.7
16	2.53 (ddd, 1.4, 6.8, 9.6)	44.5	2.50 (ddd, 1.4, 6.8, 8.4)	44.6
17	5.41 (d, 1.4)	97.2	5.41 (d, 1.4)	97.3
19	7.40 (d, 2.4)	148.5	7.38 (d, 2.0)	148.3
20	—	108.7	—	108.9
21	—	166.1	—	165.8
22	5.28 (dt, 10.2, 17.2)	133.4	5.43 (dt, 10.0, 17.2)	133.8
23	4.98 (dd, 1.8, 10.2)	120.4	5.13 (dd, 1.8, 10.0)	120.6
	5.06 (dd, 1.8, 17.2)		5.15 (dd, 1.8, 17.2)	
1'	4.63 (d, 8.0)	99.5	4.65 (d, 7.8)	99.5
2'	3.15 (dd, 8.0, 9.2)	74.7	3.17 (dd, 7.8, 8.8)	74.8
3'	3.35 (m)	77.8	3.38 (t, 8.8)	77.9
4'	3.25 (m)	71.5	3.26 (t, 9.6)	71.6
5'	3.27 (m)	78.3	3.29 (m)	78.3
6'	3.63 (dd, 5.6, 12.0)	62.6	3.64 (dd, 9.6, 12.0)	62.6
	3.86 (dd, 1.6, 12.0)		3.86 (dd, 1.6, 12.0)	

Table 1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data for compounds **1** and **2** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500/125.75 MHz)<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> The coupling constants ( $J$ ) are in parentheses and reported in Hz; chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm.

Electron, VISION PRO software V4.10, and IR spectra on a VECTOR22 instrument. For optical rotation measurements, a Polarimeter P-2000 was used. EI-MS was performed at 70 eV, and the data were recorded on a Jeol JMS 600-H Instrument. The high-resolution mass spectra were reordered with an LTQ Orbitrap spectrometer (Thermo Fisher, USA) equipped with an HESI-II source. The mass spectrometer was coupled to an Agilent 1200 HPLC system using a Macherey-Nagel Nucleodur Gravity C18 column ( $50 \times 2$  mm,  $1.9 \mu\text{m}$  particle size) and an acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  gradient. Normal-phase TLC and reverse-phase TLC were carried out using pre-coated aluminum-backed supported silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, 0.2 mm thickness) and RP C<sub>18</sub> silica gel (0.25 mm thickness), respectively. Spots for compounds on TLC were detected using UV light (254 and 366 nm) and/or by spraying with a 50% aqueous solution of  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , (or ninhydrin), followed by heating. Silica gel (Merck, 0.040–0.063 mm) was used for flash chromatography, and column chromatography was carried out over sil-

ica gel 60 (Merck, 70–230 mesh). Reverse-phase C<sub>18</sub> HPLC and Sephadex LH-20 were also used for purification.

#### Plant material

The stem bark of *P. callicarpoides* was collected from the Dja rain forest in the eastern region of Cameroon in December of 2010. The plant was identified by Mr. Victor Nana, botanist at the National Herbarium of Cameroon in Yaoundé, where a voucher specimen (no. 39807/SPDK) was deposited.

#### Extraction and isolation

The air-dried stem bark of *P. callicarpoides* (2.8 kg) was powdered and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1 : 1, 10L) twice at room temperature for 48 h and 12 h, respectively. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford a crude extract (345.4 g) which was subjected to flash silica gel column chromatography with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH using a gradual increase of solvent polarity to

give 5 fractions: A (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9.3 g); B [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (2.5–12.5%), 17.97 g]; C [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (12.5–22.5%), 52.2 g]; D [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (22.5–30%), 50.92 g], and E [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (30–50%), 45.5 g]. Repeated silica gel column chromatography of fraction A eluted with a gradient of hexane-EtOAc yielded scopoletin (**5**) (2.0 g) and a mixture of sterols (60 mg). Column chromatography of fraction B over silica gel followed by Sephadex LH-20 and eluting with a gradient of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH and then pure MeOH afforded again compound **5** and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**8**) (5.92 mg). Compounds **7** (15.0 mg), **6** (10.0 mg), glycoside of  $\beta$ -sitosterol (25.0 mg), hymexelsin (**4**) (1.8 g) and a mixture of two other compounds named PC-A were obtained after further purification of fraction C over a silica gel column eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1.5–30%). The mixture of PC-A was subjected to RP C<sub>18</sub> HPLC eluting with MeOH-H<sub>2</sub>O (1 : 1), UV lamp 254 nm, flow rate 5 mL min<sup>-1</sup> to yield compound **2** (46.4 mg) with RT of 20 min and compound **1** (4.8 mg) with RT of 22 min. Column chromatography of fraction D over silica gel, eluting with an EtOAc-MeOH gradient, afforded six sub-fractions D1–D6. D4 was again subjected separately to column chromatography over silica gel and then to the semi-preparative HPLC at wavelength 254 nm with the gradient solvent system H<sub>2</sub>O (B)-MeOH (A). Sub-fractions 6–8 were resubmitted to semi-preparative HPLC with the isocratic solvent system MeOH-H<sub>2</sub>O (4 : 6) to yield sweroside (**3**) (17.74 mg) with RT of 25 min.

*7-Epi-javaniside (1)*, colorless solid. –  $[\alpha]_D^{23} = -115.9^\circ$  ( $c = 0.001$ , MeOH). – HRMS ((+)-ESI):  $m/z = 515.2029$  (calcd. 515.2024 for C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, [M+H]<sup>+</sup>). – UV (MeOH):  $\lambda_{\max} = 196, 206$  and  $248$  nm. – IR (CH<sub>3</sub>OH):  $\nu = 3184, 3086, 1711, 1658, 1587, 1472, 1336, 1175, 1073$  cm<sup>-1</sup>. – <sup>1</sup>H NMR (500.13 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS): see Table 1. – <sup>13</sup>C NMR (125.75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS): see Table 1.

*Javaniside (2)*, colorless amorphous powder. –  $[\alpha]_D^{23} = -141.1^\circ$  ( $c = 0.0014$ , MeOH). – HRMS ((+)-ESI):  $m/z = 515.2029$  (calcd. 515.2024 for C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, [M+H]<sup>+</sup>). – IR (CH<sub>3</sub>OH):  $\nu = 3409, 1705, 1656, 1619, 1578, 1467, 1069$  cm<sup>-1</sup>. – UV (MeOH):  $\lambda_{\max} = 196, 238, 258$  nm. – <sup>1</sup>H NMR (500.13 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS): see Table 1. – <sup>13</sup>C NMR (125.75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS): see Table 1.

#### Acknowledgement

O. T. K. and S. K. F. thank TWAS and DFG for a research stay at the H. E. J. Research Institute of Chemistry and the Institute of Environmental Research of the TU Dortmund, respectively. The authors appreciate the financial support of the International Foundation of Science (grant no. F/4893-1), the Third World Academy for the Sciences (grant no. 10-004 RG/CHE/AF/AC-I) and the German Academic Exchange Service (DAAD) initiative “Welcome to Africa”. S. K. F. also thanks the Humboldt Foundation for the donation of equipment. Our thanks also go to Dr. Marc Lamshöft for LC-MS measurements.

- [1] H. Zaid, J. Raiyn, A. Nasser, B. Saad, A. Rayan, *Open Nutraceut. J.* **2010**, *3*, 194–202.
- [2] K. H. Lee, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 500–516.
- [3] D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 496–511.
- [4] P. C. M. Jansen, D. Cardon (Eds.), *Dyes and Tannins. Plant Resources of Tropical Africa*, 3<sup>rd</sup> ed., CTA, Wageningen, **2005**.
- [5] K. M. Connolly, Natural versus synthetic vitamins & minerals – What’s the difference?: <http://www.totalhealthmagazine.com/articles/vitamins-and-supplements/natural-versus-synthetic-vitamins-minerals-whats-the-difference.html> (accessed April 27, 2014).
- [6] C. P. Van, M. Ji, J. T. Shannon, X. Zhidong, M. H. Sidney, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1147–1152.
- [7] A. Bouquet, *Plantes Médicinales Du Congo-Brazzaville, Uvariopsis, Pauridiantha, Diospyros*, Vol. 13, Travaux et Documents de l’ORSTOM, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Paris, **1972**, pp. 61–87.
- [8] N. Hallé, *Flore du Gabon: Famille des Rubiacées* (1<sup>ère</sup> partie), Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris 5<sup>e</sup>, **1966**, pp. 7–20, 234.
- [9] J. L. Pousset, A. Bouquet, A. Cave, A. Cave, R. R. Paris, *C. R. Séances Acad. Sci., Ser. C* **1971**, *272*, 665–667.
- [10] M. F. Tala, K. Krohn, H. Hussain, S. F. Kouam, H. K. Wabo, P. Tane, B. Schulz, Q. Hu, *Z. Naturforsch.* **2007**, *62b*, 565–568.
- [11] D. Tazoo, K. Krohn, H. Hussain, S. F. Kouam, E. Don-go, *Z. Naturforsch.* **2007**, *62b*, 1208–1212.
- [12] T. Tanahashi, T. Sakai, Y. Takenaka, N. Nagakura, C.-C. Chen, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1582–1586.
- [13] H. Achenbach, C. Renner, I. Addae Mensah, *Planta Med.* **1982**, *46*, 88–90.
- [14] E. J. Lee, J. Y. Lee, J. S. Kim, S. S. Kang, *Nat. Prod. Sci.* **2010**, *16*, 32–38.
- [15] J. Ma, S. M. Hecht, *Chem. Commun.* **2004**, 1190–1191.

- [16] P. S. Rao, Y. Asheervadam, M. D. Khaleelullah, N. S. Rao, R. D. H. Murray, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 959–961.
- [17] L. Jian, F. Ziming, X. Jianfu, W. Yinghong, Z. Peicheng, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1775–1780.
- [18] K. Bao, A. Fan, Y. Dai, L. Zhang, W. Zhang, M. Cheng, X. Yao, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 5084–5090.