

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTÉ DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

ORGANIQUE

CENTRE DE RECHERCHE ET DE

FORMATION DOCTORALE EN

SCIENCES, TECHNOLOGIE ET

GEOSCIENCES

LABORATOIRE DE

PHARMACOCHEMIE DES

SUBSTANCES NATUREL



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ORGANIC

CHEMISTRY

POSTGRADUATE SCHOOL OF

SCIENCE,

TECHNOLOGY AND

GEOSCIENCES

NATURAL PRODUCTS

PHARMACOCHEMISTRY

LABORATORY

Composés azotés et autres constituants chimiques de trois plantes médicinales du Cameroun : *Tabernaemontana contorta* Stapf, *Landolphia lucida* K. Schum et *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon (Apocynaceae) ; Evaluation des activités antibactérienne, antidi

Thèse Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de
Doctorat/Ph. D en Chimie Organique

Par : **EBEDE Guy Roland**
Master en Chimie Organique

Sous la direction de
PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel
Professeur
NDONGO Joseph Thierry
Maître de Conférences

Année Académique : 2021



REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

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

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE CHIMIE ET APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POSTGRADUATE SCHOOL OF SCIENCE,
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES

RESEARCH AND POSTGRADUATE TRAINING UNIT
FOR CHEMISTRY AND APPLICATIONS

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGNIQUE

DEPARTMENT OF ORGANIC CHIMISTRY

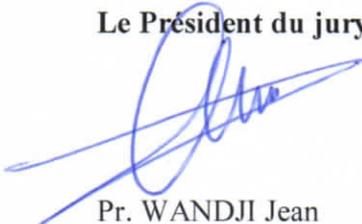
ATTESTATION DE CORRECTION DU MEMOIRE DE DOCTORAT / Ph.D DE M. EBEDE Guy Roland

Nous soussignés, WANDJI Jean, Professeur, Président du jury ; LENTA NDIJAKOU Bruno, Professeur, Membre du jury et TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite, Maître de Conférences, Examineur ; attestons que M. EBEDE Guy Roland, matricule 10Y163 a effectué toutes les corrections, conformément aux recommandations des membres du jury lors de la soutenance en date du 28 Juillet 2021 dans la salle multimédia de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I, sur le sujet intitulé « **Composés azotés et autres constituants chimiques de trois plantes médicinales du Cameroun : *Tabernaemontana contorta* Stapf, *Landolphia lucida* K. Schum et *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon (Apocynaceae); Evaluation des activités antibactérienne, antidiabétique et anticancéreuse** », en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat/PhD en Chimie Organique option Substances Naturelles.

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

Le Président du jury

Les Membres du jury


Pr. WANDJI Jean


Pr. LENTA NDIJAKOU Bruno


Pr. TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2020/2021

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 12 Juin 2020

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maitre de Conférences*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :
MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste

19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUJKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFUET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste

19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste

16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
8	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>

11	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
12	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
33	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFAK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
26	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste

27	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
28	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste

29	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
30	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
31	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
32	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
33	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)
--

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)
--

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
---	---------------------	------------	---------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes</i>
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thierry	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
---	-------------------------	------------	----------------------------

2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
---	-----------------------	-----------------	----------

8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel</i>
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste

28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	39 (18)
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	46 (14)
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (1)	9 (02)	12 (02)	03 (0)	34 (5)
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	35(7)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	25 (2)
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	40 (5)
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	43(7)
Total	69 (4)	99 (28)	130 (33)	45 (10)	343 (75)
Soit un total de		344 (75) dont :			
-	Professeurs	68 (4)			
-	Maîtres de Conférences	99 (28)			
-	Chargés de Cours	130 (33)			
-	Assistants	46 (10)			
	() = Nombre de Femmes	75			

DEDICACE ET REMERCIEMENTS

Dédicace

A mes défunts parents

A ma fille

*« Soyez sans relâche, confiant, optimiste et combatif.
Dieu vous guidera sur le chemin de la réussite. »*

Mouctar Keïta

Remerciements

Mes remerciements vont :

Au Professeur **Dieudonné Emmanuel Pegnyemb**, Chef de Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles (LPSN), qui a bien voulu m'accepter dans son équipe de recherche. Je tiens également à le remercier pour m'avoir encadré et fait confiance dans les diverses tâches qui m'étaient attribuées. J'ai apprécié son enthousiasme communicatif et la liberté qu'il m'a accordée.

Au Maître de Conférences **Joseph Thierry Ndongo**, pour m'avoir encadré, proposé ce sujet, pour m'avoir donné une bonne formation scientifique, pour sa disponibilité, ses conseils, et pour avoir dirigé ce travail avec rigueur jusqu'au bout. Je le remercie aussi pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude. Je tiens enfin à lui exprimer mon respect et ma profonde admiration.

Au Maître de Conférences **Joséphine Ngo Mbing Epouse Pegnyemb**, pour son aide précieuse tout au long de ce travail, ses conseils, ses encouragements, mais aussi sa sympathie.

Au Professeur **Christian Grégoire Bochet**, de l'Université de Fribourg en Suisse pour m'avoir accepté dans son laboratoire dans le cadre de la bourse du rectorat de l'Université de Fribourg attribué aux jeunes chercheurs étrangers talentueux. Sa simplicité, son dynamisme et son ouverture d'esprit en Chimie Organique ont été pour moi des sources de motivation.

Au Professeur **Muhammad Iqbal Choudhary**, du Centre International des Sciences Biologiques et Chimiques (ICCBS) de l'Université de Karachi au Pakistan, pour m'avoir accepté dans son groupe de recherche dans le cadre de la bourse TWAS-UNESCO. Sa simplicité, son dynamisme, sa rigueur dans le travail et son personnage multidisciplinaire ont été pour moi d'énormes sources d'apprentissage.

Au Professeur **Atta-Ur Rahman**, du Centre Internationale des Sciences Biologiques et Chimiques (ICCBS) de l'Université de Karachi au Pakistan, pour m'avoir accepté dans son laboratoire dans le cadre de la bourse TWAS-UNESCO. J'ai apprécié sa bienveillance, sa gentillesse, sa simplicité et sa disponibilité au laboratoire malgré ses multiples occupations.

Au Professeur **Augustin Ephrem Nkengfack**, Chef de Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I pour ses conseils, sa disponibilité et ses encouragements.

A tous les Enseignants du Département de Chimie Organique pour leur détermination à donner à tous les étudiants du Département une formation de qualité.

Aux Maîtres de Conférences **Olivier placide Note** et **Dominique Serge Ngonu Bikobo**, pour leur soutien et leurs conseils pratiques au laboratoire.

Aux Docteurs : **Auguste Abouem A Zintchem**, **Ledoux Kamto**, **Mac Jesus Kinyok**, **Lin Marcellin Ambassa Messi**, **Angélique Nicolas MESSI**, **Line Made Simo**, **Norbert Mbabi Nyemeck II**, **Eric Robert Tiam**, **Aristide Mfifen Munvera**, et **Raduis Melong** pour leurs encouragements et conseils enrichissants.

Aux Docteurs : **Justin Kanga** de l'Université de Yaoundé 1 et **Nuzhat Shehla** de ICCBS pour leur rôle fondamental dans ma formation au laboratoire. Je les remercie pour leur amitié, leur aide, leur confiance et leurs conseils si précieux tout le long de mon travail de thèse.

Aux collègues du Laboratoire de Photochimie et de Synthèse des Produits Naturels de la Faculté de Sciences et de Médecine de l'Université de Fribourg : Docteurs **Freya Harvey**, **Kastrati Agonist**, **Elia Janett** et **Jérémie Loup** ; et à **Diep Kim-Long** pour leur accueil et leur disponibilité.

A Monsieur **Victor Nana**, Botaniste à l'Herbier National du Cameroun, pour l'identification et la récolte des plantes.

A tous mes aînés de laboratoire : **Jean Noel Evina**, **Marius Balemaken Missi**, **Robert Ebeh Messanga**, **Daniel Djou Toukea**, **Jeanne Louise Nkot**, **Fred Zoua**.

A mes promotionnaires : **André Néhémie Bitombo**, **Alexis Bienvenue Nama**, **Emmanuel Mbiang Moffi**, **Eric Mvondo Essimi**, pour leur amitié et pour leur aide précieuse.

Aux cadets: **Aurore Merveilles Bella**, **Christelle Tsaffo**, **Merveille Laura dongmo Momo**, **Bertrand Tadjousap**, **Jean Faustin Atangana**, **Michel Pom**, **Gwladys Djikam**, **Larissa Kom**.

A mon oncle **Janvier Joseph Owono**, ma grand-mère **Madeleine Mfegue**, mon frère **Anselme Aurelien Owono** et mes sœurs : **Marguerite Diane Mbazoa**, **Marie Claudia Amougou** pour m'avoir soutenu jusqu'au bout, qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance.

Aux familles **Amougou Messi**, **Manga**, **Belinga**, **Mekinda**, **Biniga** et **Maguena** pour tout leur soutien moral, financier et affectif.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, que ce travail, soit pour eux, un témoignage de ma profonde affection et tendresse.

TABLE DES MATIERES

Table des matières

Liste protocolaire.....	a
Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
Table des matières.....	iv
Abréviations et Symboles.....	x
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des schémas.....	xviii
Résumé.....	xix
Abstract.....	xxi
Introduction générale.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
I.1. Généralités sur la famille des Apocynaceae.....	3
I.1.1. Introduction.....	3
I.1.2. Classification systématique.....	3
I.1.3. Distribution géographique de la famille des Apocynaceae.....	4
I.2. Le genre <i>Tabernaemontana</i>	5
I.2.1. Introduction.....	5
I.2.2. Classification du genre <i>Tabernaemontana</i> selon Plum. ex L., 1753.....	6
I.2.3. Caractéristiques botaniques des plantes du genre <i>Tabernaemontana</i>	6
I.2.4. Distribution géographique du genre <i>Tabernaemontana</i>	6
I.2.5. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites isolés du genre <i>Tabernaemontana</i>	7
I.2.6. L'espèce <i>Tabernaemontana contorta</i> stapf.....	10
I.2.6.1. Introduction.....	10

I.2.6.2. Classification botanique selon APG III (2009).....	10
I.2.6.3. Description botanique de <i>Tabernaemontana contorta</i> Stapf.....	10
I.2.6.4. Distribution géographique de l'espèce <i>T. contorta</i> Stapf.....	11
I.2.6.5. Usages Ethnopharmacologiques de <i>Tabernaemontana contorta</i>	12
I.2.6.6. Travaux phytochimiques antérieures sur <i>Tabernaemontana contorta</i>	12
I.3. Le genre <i>Landolphia</i>	14
I.3.1. Introduction.....	14
I.3.2. Classification APG III (2009) du genre <i>Landolphia</i>	14
I.3.3. Caractéristiques botaniques des plantes du genre <i>Landolphia</i>	15
I.3.4. Distribution géographique du genre <i>Landolphia</i> dans le monde.....	15
I.3.5. Travaux phytochimiques antérieures sur le genre <i>Landolphia</i>	16
I.3.6. L'espèce <i>Landolphia lucida</i> K. Schum.	20
I.3.6.1. Introduction.....	20
I.3.6.2. Classification botanique selon APG III (2009).....	20
I.3.6.3. Aperçu botanique de <i>Landolphia lucida</i> K. Schum.	20
I.3.6.4. Distribution géographique de l'espèce <i>Landolphia lucida</i> K. Schum.....	21
I.3.6.5. Usages ethnopharmacologiques de <i>Landolphia lucida</i>	21
I.3.6.6. Travaux phytochimiques antérieures sur <i>Landolphia lucida</i>	22
I.3.6.7. Activités biologiques sur <i>Landolphia lucida</i>	22
I.4. Le genre <i>Hedranthera</i>	22
I.4.1. Introduction.....	22
I.4.2. Classification systématique du genre <i>Hedranthera</i>	22
I.4.3. Aperçu botanique du genre <i>Hedranthera</i>	23
I.3.4. Distribution géographique du genre <i>Hedranthera</i> en Afrique.....	24
I.3.5. L'espèce <i>Hedranthera barteri</i> (Hook f.) Pichon.....	24
I.3.5.1. Introduction.....	24

I.3.5.2. Classification botanique de <i>Hedranthera barteri</i> selon the Plant List with literature (2020)	25
I.3.5.3. Usages Ethnopharmacologiques de <i>Hedranthera barteri</i>	25
I.3.5.4. Travaux phytochimiques antérieures sur <i>Hedranthera barteri</i> (Hook f.) Pichon.....	26
I.3.5.5. Activités biologiques sur <i>Hedranthera barteri</i> (Hook f.) Pichon	27
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	29
PARTIE A : ETUDES PHYTOCHIMIQUES.....	29
II.1. Screening biologique des extraits des plantes récoltées.....	29
II.1.1. Introduction.....	29
II.1.2. Discussion.....	30
II.2. Investigation phytochimique des écorces du tronc de <i>Tabernaemontana contorta</i> , des lianes de <i>Landolphia lucida</i> et des tiges de <i>Hedranthera barteri</i>	30
II.2.1. Introduction.....	30
II.2.2. Screening chimique général des extraits des écorces du tronc de <i>Tabernaemontana contorta</i> , des lianes de <i>Landolphia lucida</i> et des tiges de <i>Hedranthera barteri</i>	31
II.2.3. Analyses UPLC et LC-MS/MS des extraits des écorces du tronc de <i>Tabernaemontana contorta</i> et des lianes de <i>Landolphia lucida</i>	32
II.2.4. Etude phytochimique des écorces du tronc de <i>T. contorta</i>	36
II.2.4.1. Extraction et isolement des composés.....	36
II.2.4.2 Caractérisation chimique des composés isolés de <i>T. contorta</i>	38
II.2.4.2.1. Détermination structurale de TC1	38
II.2.4.2.2. Détermination structurale de TC2	47
II.2.4.2.3. Détermination structurale de TC3	57
II.2.4.2.4. Identification de TC4.....	66
II.2.4.2.5. Identification de TC5.....	70
II.2.4.2.6. Identification de TC6.....	73
II.2.4.2.7. Identification de TC7.....	76

II.2.4.2.8. Identification de TC8.....	78
II.2.4.2.9. Identification de TC9.....	82
II.2.2.4.10. Identification de TC10.....	85
II.2.4.2.11. Identification de TC11.....	88
II.2.4.2.12. Identification de TC12.....	91
II.2.5. Etude phytochimique des lianes de <i>L. lucida</i>	94
II.2.5.1. Extraction et isolement des composés des lianes de <i>L. lucida</i>	94
II.2.5.2. Caractérisation chimique des composés isolés de <i>L. lucida</i>	96
II.2.5.2.1. Détermination structurale de LH1	96
II.2.5.2.2. Détermination structurale de LH2.....	104
II.2.5.2.3. Détermination structurale de LH3.....	111
II.2.5.2.4. Identification de LH4.....	118
II.2.5.2.5. Détermination structurale de LH5.....	120
II.2.5.2.6. Identification de LH6.....	127
II.2.5.2.7. Identification de LH7.....	128
II.2.5.2.8. Identification de LH8.....	131
II.2.5.2.9. Identification de LH9.....	134
II.2.5.2.10. Identification de LH10.....	135
II.2.5.2.11. Identification de LH11	138
II.2.5.2.12. Identification de LH12.....	140
II.2.6. Etude phytochimique des tiges de <i>H. barteri</i>	141
II.2.6.1. Extraction et isolement des composés des tiges de <i>H. barteri</i>	141
HB4 (8 mg).....	142
II.2.6.2 Caractérisation chimique des composés isolés de <i>H. barteri</i>	143
II.2.6.2.1. Identification de HB1	143
II.2.6.2.2. Identification de HB2	146

II.2.6.2.3. Identification de HB3	147
II.2.6.2.4. Identification de HB4	150
II.2.6.2.5. Identification de HB5	154
PARTIE B : ETUDES BIOLOGIQUES ET BIOSYNTHESE	156
II.2.7. Activités biologiques des extraits, fractions et composés isolés	156
II.2.7.1 Activité cytotoxique (Brine shrimp)	156
II.2.7.2. Activité antibactérienne.....	156
II.2.7.3. Activité antioxydante	159
II.2.10.4. Activité antidiabétique <i>in vitro</i> de quelques composés isolés de <i>L. lucida</i>	159
II.2.7.5. Activité anticancéreuse <i>in vitro</i> contre les cellules cancéreuses du côlon humain Caco2 (ATCC® HTB37™)	160
DISCUSSION	162
II.2.12. Importance chimiotaxonomique	169
Conclusion et perspectives.....	170
CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES	172
III.1. Matériel végétal et extraction	172
III.1.1. Récolte.....	172
III.1.2. Séchage et broyage	172
III.1.3. Extraction et isolement.....	172
III.2. Méthodes chromatographiques analytiques	176
III.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	176
III.2.2. Chromatographie liquide ultraperformance (UPLC).....	176
III.2.3. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).....	177
III.3. Méthodes chromatographiques préparatives	178
III.3.1. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	178
III.3.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) .	178

III.3.3. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)	178
III.4. Méthodes physico-chimiques	179
III.4.1. Mesure du point de fusion (P. F)	179
III.4.2. Mesure du pouvoir rotatoire	179
III.4.3. Spectroscopie ultraviolet (UV).....	180
III.4.4. Spectroscopie infra-rouge (IR).....	180
III.4.5. Spectroscopie par dichroïsme circulaire (CD)	180
III.4.6. Spectrométrie de masse (MS).....	180
III.4.7. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	181
III.5. Méthodes biologiques	182
III.5.1. Tests antimicrobiens par méthode standard de micro dilution (MABA).....	182
III.5.2. Test de toxicité.....	183
III.5.3. Test de cytotoxicité <i>in vitro</i> contre les cellules cancéreuses du côlon humain Caco2 (ATCC® HTB37™)	184
III.5.4. Test antidiabétique	185
III.6. Constantes physiques et données spectrales des composés isolés.....	186
III.6.1. Composés isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces du tronc de <i>Tabernaemontana contorta</i> Stapf.....	186
III.6.2. Composés isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle des lianes de <i>Landolphia lucida</i>	192
III.6.3. Composés isolés de l'extrait alcaloïdique des tiges de <i>Hedranthera barteri</i>	198
Références bibliographiques	201
Publications	215
Poster	215

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

Abréviations et Symboles

δ :	Déplacement chimique
ε :	Coefficient d'extinction molaire (UV)
TCi, LHi, HBi:	Désignation des composés naturels isolés dans le présent travail (i = 1, 2, 3,...)
Acétone-d ₆ :	Acétone hexadeutérié
AcOEt:	Acétate d'éthyle
AlCl ₃ :	Trichlorure d'aluminium
ATCC:	American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)
CCM:	Chromatographie sur couche mince
COSY:	Correlation Spectroscopy
<i>d</i> :	Doublet
<i>dd</i> :	Doublet dédoublé
CD:	Circular Dichroism
DCM:	Dichlorométhane
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
EI:	Electron Impact ionization
ESI:	ElectroSpray Ionization
FAB:	Fast Atom Bombardment
HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC:	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Glc:	Glucose
Hz:	Hertz
HPLC:	High Pressure Liquid Chromatography
HR:	High Resolution
int. rel.:	Intensité relative
<i>J</i> :	Constante de couplage
MALDI :	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
<i>m</i> :	multiplet
<i>m/z</i> :	masse/charge électrique
CD ₃ OD:	Méthanol tétradeutérié
MS:	Mass Spectrometry
NOE:	Nuclear Overhauser Effect
NOESY:	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
P.F.:	Point de Fusion

Rf:	Facteur de rétention
RT:	Temps de rétention
RMN:	Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹ H:	Résonance Magnétique Nucléaire du proton.
RMN ¹³ C:	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone.
<i>s</i> :	singulet
<i>sh</i> :	<i>Shoulder</i> , désigne un épaulement sur un pic
<i>t</i> :	triplet
TMS:	Tétraméthylsilane (référence pour l'échelle des δ)
UV:	Ultraviolet

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature. C'est pour cela qu'elles sont surtout issues de terminologie anglo-saxonne.

FIGURES - TABLEAUX ET SCHEMAS

Liste des figures

Figure 1- Systématique des Apocynaceae selon Guinard et Dupont	4
Figure 2- Répartition de la famille des Apocynaceae	5
Figure 3- Systématique du genre <i>Tabernaemontana</i> selon Plum. ex L.....	6
Figure 4- Répartition géographique du genre <i>Tabernaemontana</i> en Afrique.....	7
Figure 5- Systématique de <i>Tabernaemontana contorta</i> Stapf selon APG III.....	10
Figure 6- Arbuste de <i>Tabernaemontana contorta</i> Stapf	11
Figure 7- Feuilles, fruit et Ramification de <i>T. contorta</i> Stapf	11
Figure 8- Systématique du genre <i>Landolphia</i>	15
Figure 9- Systématique de <i>Landolphia lucida</i> K. Schum.....	20
Figure 10- Feuilles, fruits et fleurs des lianes de <i>Landolphia lucida</i> K. Schum.	21
Figure 11- Distribution de <i>Landolphia lucida</i> K. Schum.	21
Figure 12- Classification systématique du genre <i>Hedranthera</i>	23
Figure 13- Répartition géographique du genre <i>Hedranthera</i> en Afrique	24
Figure 14- Feuilles, tiges et fleurs de <i>Hedranthera barteri</i> (Hook f.) Pichon	25
Figure 15- Systématique de <i>Hedranthera barteri</i> (Hook f.) Pichon	25
Figure 16- Profils UPLC de l'extrait à l'AcOEt de <i>T. contorta</i>	33
Figure 17- Profils UPLC de l'extrait à l'AcOEt de <i>L. lucida</i>	33
Figure 18- Profils LC-MS/MS de l'extrait à l'AcOEt de <i>T. contorta</i>	34
Figure 19- Profils LC-MS/MS de l'extrait à l'AcOEt de <i>L. lucida</i>	35
Figure 20- Spectres de masse HRESI-MS et ESI-MS du composé TC1	38
Figure 21- Spectre Infrarouge sur disque de AgCl de TC1	39
Figure 22- Spectre de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de TC1	40
Figure 23- Spectre de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de TC1	41
Figure 24- Spectre COSY (400 MHz, CD ₃ OD) de TC1	42
Figure 25- Spectre HMBC (400 MHz, CD ₃ OD) de TC1	42
Figure 26- Spectre NOESY (400 MHz, CD ₃ OD) de TC1.....	43
Figure 27- Spectre de masse ESI-MS de la 2-hydroxypentacosanoate de méthyle	44
Figure 28- Spectres de masse (+)-HRESI-MS et (-)-EI-MS du composé TC2	47
Figure 29- Spectre Infrarouge sur disque de KBr de TC2.....	48
Figure 30- Spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC2	49
Figure 31- Spectre de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC2	49
Figure 32- Spectre COSY (500 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC2.....	50
Figure 33- Spectre HMBC (500 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC2.....	50
Figure 34- Spectre NOESY (500 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC2.....	51
Figure 35- Spectre de masse MALDI du résidu acétylé TC2a	52

Figure 36- Spectre de masse GC-MS de la 2-hydroxytricosanoate de méthyle	52
Figure 37- Spectre de masse (-)-FAB-MS du dérivé DMDS (TC2b)	55
Figure 38- Spectres de masse (+)-HRESI-MS et (-)-FAB-MS du composé TC3.....	57
Figure 39- Spectre Infrarouge sur disque de KBr de TC3.....	58
Figure 40- Spectre de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC3	59
Figure 41- Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC3	60
Figure 42- Spectre de masse (-)-FABMS du résidu acétylé TC3a.....	60
Figure 43- Spectre NOESY (600 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC3.....	61
Figure 44- Spectre HMBC (600 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD) de TC3	61
Figure 45- Spectre GC-MS de la 2-hydroxytétracosanoate de méthyle.....	62
Figure 46- Spectre de masse (-)-FAB-MS du dérivé DMDS (TC3b)	64
Figure 47- Spectres de masse (+)-HRESI-MS du composé TC4.....	66
Figure 48- Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) du composé TC4	66
Figure 49- Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) élargi du composé TC4.....	67
Figure 50- Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) du composé TC4	67
Figure 51- Spectre RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ +CD ₃ OD) du composé TC5.....	71
Figure 52- Spectre RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ +CD ₃ OD) du composé TC5.....	71
Figure 53- Spectre RMN ¹ H (800 MHz, CDCl ₃ +CD ₃ OD) du composé TC6.....	73
Figure 54- Spectre RMN ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃ +CD ₃ OD) du composé TC6.....	74
Figure 55- Spectre RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) du composé TC7	76
Figure 56- Spectre de masse (+)-HRESI-MS de TC8.....	78
Figure 57- Spectre RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) du composé TC8	79
Figure 58- Spectre CD du composé TC8	79
Figure 59- Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) du composé TC8	80
Figure 60- Spectre de masse (-)-FAB-MS de TC9	82
Figure 61- Spectre RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) du composé TC9	83
Figure 62- Spectre RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) du composé TC9	83
Figure 63- Spectre RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du composé TC10.....	86
Figure 64- Spectre RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) du composé TC10.....	86
Figure 65- Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) du composé TC11	89
Figure 66- Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) du composé TC11	89
Figure 67- Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) du composé TC12	92
Figure 68- Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) du composé TC11	92
Figure 69- Spectre de masse (+)-HRESI-MS de LH1.....	96
Figure 70- Spectre IR sur disque de KBr de LH1	97
Figure 71- Spectre UV (MeOH) du composé LH1.....	97
Figure 72- Spectre RMN ¹ H (600 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH1	98

Figure 73- Spectre de RMN ¹³ C (150 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH1	98
Figure 74- Spectre COSY du composé LH1	99
Figure 75- Spectre HMBC du composé LH1	100
Figure 76- Spectre de masse EI-MS du composé LH1	101
Figure 77- Spectre de dichroïsme circulaire du composé LH1.....	101
Figure 78- spectre de masse HREI-MS et EI-MS du composé LH2.....	104
Figure 79- Spectre UV (MeOH) du composé LH2.....	104
Figure 80- Spectre IR sur disque KBr du composé LH2.....	105
Figure 81- Spectre RMN ¹ H (800 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH2	106
Figure 82- Spectre RMN ¹³ C (200 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH2	107
Figure 83- Spectre CD du composé LH2	107
Figure 84- Spectre COSY (800 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH2.....	108
Figure 85- Spectre HMBC (200 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH2.....	108
Figure 86- Spectres de masse (+)-HRESI-MS et (+)-FAB-MS du composé LH3.....	111
Figure 87- Spectre IR sur disque de KBr du composé LH3	112
Figure 88- Spectre UV (MeOH) du composé LH3	112
Figure 89- Spectre RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) du composé LH3	113
Figure 90- Spectre RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) du composé LH3.....	113
Figure 91- Spectre COSY (600 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH3.....	114
Figure 92- Spectre HMBC (125 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH3.....	115
Figure 93- Spectres de masse (+)-HRESI-MS et EI-MS du composé LH5	120
Figure 94- Spectre RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) du composé LH5	121
Figure 95- Spectre IR sur disque de KBr du composé LH5	121
Figure 96- Spectre RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) du composé LH5.....	122
Figure 97- Spectre COSY (600 MHz, CDCl ₃) du composé LH5	123
Figure 98- Spectre HMBC (150 MHz, CDCl ₃) du composé LH5	123
Figure 99- Spectre NOESY (600 MHz, CDCl ₃) du composé LH5	125
Figure 100- Spectre RMN ¹ H (500 MHz, C ₃ D ₆ O) du composé LH6.....	127
Figure 101- Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) du composé LH7	129
Figure 102- Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) du composé LH8	132
Figure 103- Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) du composé LH8.....	132
Figure 104- Spectre RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) du composé LH9	134
Figure 105- Spectre RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) du composé LH10	136
Figure 106- Spectre RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) du composé LH11	138
Figure 107- Spectre RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du composé HB1.....	144
Figure 108- Spectre RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) du composé HB1.....	144
Figure 109- Spectre RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du composé HB3.....	148

Figure 110- Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé HB3.....	149
Figure 111- Spectre de masse (+)-HRESI-MS du composé HB4.....	150
Figure 112- Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) du composé HB3.....	151
Figure 113- Spectre RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) du composé HB4.....	151
Figure 114- Microscopie à force atomique des composés TC2, TC3, TC8, LH2 et LH5 avec <i>E. coli</i>	158
Figure 115- Schéma comparatif des pourcentages d'inhibition des composés purs, de la fraction au MeOH, de l'extrait et de l'actinomycine D	161
Figure 116- Observation des cellules cancéreuses Caco2 au microscope.....	161

Liste des tableaux

Tableau 1- Distribution de la famille des Apocynaceae dans le monde.....	4
Tableau 2- Résultats du screening biologique effectué sur l'extrait brut et la fraction à l'AcOEt de <i>Tabernaemontana contorta</i> et sur la fraction à l'AcOEt de <i>Landolphia lucida</i>	29
Tableau 3- Résultats du screening chimique effectué sur les extraits au méthanol de <i>T. contorta</i> , <i>H. barteri</i> et la fraction à l'AcOEt de <i>L. lucida</i>	31
Tableau 4- Données spectrales RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHz) et ¹³ C (CD ₃ OD, 100 MHz) et corrélations HMBC du composé TC1	46
Tableau 5- Données spectrales RMN du composé TC2 (CDCl ₃ + CD ₃ OD, 500 et 125 MHz)	56
Tableau 6- Données spectrales RMN du composé TC3 (CDCl ₃ + CD ₃ OD, 600 et 150 MHz)	65
Tableau 7- Données spectrales RMN du composé TC4 (CD ₃ OD, 400 et 100 MHz) comparées à celles de la littérature (CD ₃ OD, 400 et 100 MHz)	69
Tableau 8- Données spectrales RMN du composé TC5 (CDCl ₃ +CD ₃ OD, 500 et 125 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl ₃ , 100 et 25 MHz)	72
Tableau 9- Données spectrales RMN du composé TC6 (CDCl ₃ +CD ₃ OD, 800 et 200 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl ₃ , 100 et 25 MHz)	75
Tableau 10- Données spectrales RMN du composé TC7 (CD ₃ OD, 600 et 150 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl ₃ , 300 et 75 MHz).....	77
Tableau 11- Données spectrales RMN du composé TC8 (CD ₃ OD, 600 et 150 MHz) comparées à celles de la littérature (pyridine-d ₅ , 400 et 100 MHz).....	81
Tableau 12- Données spectrales RMN du composé TC9 (CD ₃ OD, 500 et 125 MHz) comparées à celles de la littérature (C ₅ D ₅ N, 400 et 100 MHz)	84
Tableau 13- Données spectrales RMN du composé TC10 (CDCl ₃ , 300 et 75 MHz) comparées à celles de la littérature (Chloroforme-d, 500 et 125 MHz)	87
Tableau 14- Données spectrales RMN du composé TC11 (CD ₃ OD, 400 et 100 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl ₃ , 500 et 125 MHz).....	90
Tableau 15- Données spectrales RMN du composé TC12 (CDCl ₃ , 400 et 100 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl ₃ , 300 et 75 MHz).....	93
Tableau 16- Données spectrales RMN du composé LH1 (C ₃ D ₆ O, 600 et 150 MHz)	103
Tableau 17- Données spectrales RMN du composé LH2 (C ₃ D ₆ O, 800 et 200 MHz)	110
Tableau 18- Données spectrales RMN du composé LH3 (C ₃ D ₆ O, 500 et 125 MHz)	117

Tableau 19- Données spectrales RMN du composé LH4 (C ₃ D ₆ O, 500 et 125 MHz) comparée à celles de la littérature (CDCl ₃ , 400 et 100 MHz).....	119
Tableau 20- Données spectrales RMN du composé LH5 (CDCl ₃ , 600 et 150 MHz).....	126
Tableau 21- Données spectrales RMN du composé LH6 (C ₃ D ₆ O, 500 et 125 MHz) comparée à celle de la littérature (Acétone-d ₆ , 500 et 125 MHz)	128
Tableau 22- Données spectrales RMN du composé LH7 (CD ₃ OD, 400 et 100 MHz) comparée à celle de la littérature (CD ₃ OD, 400 et 100 MHz).....	130
Tableau 23- Données spectrales RMN du composé LH8 (CD ₃ OD, 400 et 100 MHz) comparée à celle de la littérature (CD ₃ OD, 500 et 125 MHz).....	133
Tableau 24- Données spectrales RMN du composé LH9 (CD ₃ OD, 600 et 150 MHz) comparées à celle de la littérature (CD ₃ OD, 400 et 100 MHz).....	135
Tableau 25- Données spectrales RMN du composé LH10 (CD ₃ OD, 600 et 150 MHz).....	137
Tableau 26- Données spectrales RMN du composé LH11 (CD ₃ OD, 600 et 150 MHz).....	139
Tableau 27- Données spectrales RMN du composé LH12 (C ₃ D ₆ O, 400 et 100 MHz) comparées à celle de la littérature (DMSO-d ₆ , 400 et 100 MHz)	140
Tableau 28- Données spectrales RMN du composé HB1 (CDCl ₃ , 300 et 75 MHz) comparées à celle de littérature (CDCl ₃ , 300 et 75 MHz)	145
Tableau 29- Données spectrales RMN du composé HB2 (CDCl ₃ , 300 et 125 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl ₃ , 300 et 75 MHz)	147
Tableau 30- Données spectrales RMN du composé HB3 (CDCl ₃ , 300 et 125 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl ₃ , 400 et 100 MHz).....	149
Tableau 31- Données spectrales RMN du composé HB4 (CDCl ₃ , 300 et 75 MHz) comparées à celles de littérature (CDCl ₃ , 400 et 100 MHz).....	153
Tableau 32- Données spectrales RMN du composé HB5 (CDCl ₃ , 300 et 75 MHz)	155
Tableau 33- Résultats de l'activité cytotoxique de l'extrait au méthanol de <i>T. contorta</i> et de l'extrait à l'AcOEt de <i>L. lucida</i>	156
Tableau 34- Evaluation de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> des extraits et produits purs isolés	157
Tableau 36- Evaluation de l'activité antioxydante.....	159
Tableau 37- Activités <i>in vitro</i> antiglycation et α -glucosidase des composés LH1 et LH4 ...	160
Tableau 35- Pourcentage d'inhibition <i>in vitro</i> de l'extrait au MeOH, de la fraction à l'AcOEt et de quelques produits purs sur la lignée cellulaire Caco2	160
Tableau 38- Caractéristiques de l'appareillage UPLC utilisé.....	177

Liste des schémas

Schéma 1- Protocole d'extraction et isolement des composés des écorces du tronc de <i>T. contorta</i>	37
Schéma 2- Corrélations HMBC et NOESY de TC1.....	43
Schéma 3- Méthanolyse de TC1.....	44
Schéma 4- Fragmentation du composé TC1	45
Schéma 5- Réaction d'acétylation de TC2.....	51
Schéma 6- Réaction d'obtention du dérivé DMDS	53
Schéma 7- Fragmentions issues du spectre de masse EI-MS de TC2	54
Schéma 8- Importantes corrélations HMBC et COSY de TC2.....	54
Schéma 9- Dérivé DMDS (TC2b) et fragmentations FAB-MS	55
Schéma 10- Importantes corrélations HMBC et COSY de TC3.....	63
Schéma 11- Fragmentions issues du spectre de masse FAB-MS de TC3	63
Schéma 12- Dérivé DMDS (TC3b) et fragmentation FAB-MS.....	64
Schéma 13- Protocole d'extraction et isolement des composés des lianes de <i>L. lucida</i>	95
Schéma 14- Corrélations HMBC et COSY du composé LH1	101
Schéma 15- Fragmentations EI-MS possibles du composé LH1	102
Schéma 16- Corrélations HMBC et COSY du composé LH2	109
Schéma 17- Fragmentation EI-MS du composé LH2.....	109
Schéma 18- Corrélations HMBC et COSY du composé LH3	116
Schéma 19- Fragmentation FAB-MS du composé LH3.....	116
Schéma 20- Fragmentation EI-MS du composé LH5.....	124
Schéma 21- Configuration relative du composé LH5 sur la base du NOESY LH5.....	124
Schéma 22- Corrélations HMBC et COSY du composé LH5	125
Schéma 23- Protocole d'extraction et d'isolement des composés des tiges de <i>H. barteri</i>	142
Schéma 24- Biosynthèse de quelques alcaloïdes indoliques isolés	163
Schéma 25- Voie biosynthétique des cérébrosides isolés	164
Schéma 26- Voies de biosynthèse des coumarines (LH5 et LH6)	166
Schéma 27- Voie de biosynthèse de la lignane isolé (composé LH1).....	167
Schéma 28- Biosynthèse de quelques flavonoïdes isolés	168

RESUME

Résumé

Ce travail présente l'étude chimique de trois plantes médicinales camerounaises de la famille des Apocynaceae, *Tabernaemontana contorta*, *Landolphia lucida* et *Hedranthera barteri*. Ainsi, les fractions à l'acétate d'éthyle des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta*, des lianes de *Landolphia lucida* et la fraction alcaloïdique des tiges de *Hedranthera barteri* ont conduit à l'isolement et à la caractérisation de 29 composés. L'analyse structurale des composés isolés a été faite grâce aux techniques de spectrométrie de masse, de résonance magnétique nucléaire 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY, HSCQC, HMBC et NOESY) les plus modernes, de dichroïsme circulaire (CD) et par comparaison avec les données de la littérature.

L'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* a permis d'isoler 12 composés dont trois dérivés nouveaux de la classe des cérébrosides (contortamide (**64**), tabernamide A (**65**) et tabernamide B (**66**)), ainsi que neuf composés déjà décrits dans la littérature, dont quatre alcaloïdes indoliques (la spégatine (**67**), la tombozine (**68**), la N_b-méthyl affinisine (**69**) et l'affinisine (**70**)) et cinq triterpènes (l'acide 2 α , 3 α , 23-trihydroxyursa-12, 20(30)-dien-28-oïque (**71**), l'acide 2 α , 3 β , 23-trihydroxyursa-12, 5(6)-dien-28-oïque (**72**), l'acétate de bauerenyl (**73**), l' α -amyrine (**74**) et l'acide bétulinique (**75**)).

L'extrait à l'acétate d'éthyle des lianes de *Landolphia lucida* a permis d'isoler 12 métabolites secondaires dont quatre dérivés nouveaux incluant un triterpène pentacyclique (la (3-O- β -(E)-(4'-O-acetylferuloyl)lupéol (**77**)), un stéroïde anabolique (le dipropionate de methandryle (**78**)), une lignane (la 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy benzyl) diméthyl succinate (**76**)) et une bicoumarine (la 7,7'-diméthoxy-6,6'-dicoumarinyl ether (**80**)) ; et huit composés connus à savoir un terpène pentacyclique (la 3-O- β -(E)-feruloyllupéol (**79**)), un acide phénolique (l'acide isovanollique (**86**)), une coumarine (la scopoletine (**81**)), et cinq flavonoïdes (la quercitrine (**82**), la rutine (**20**), la quercétine (**83**), l'ériodictyol (**84**) et la 3', 4', 5- trihydroxyflavone (**85**)).

La fraction alcaloïdique des tiges de *Hedranthera barteri* quant à elle a conduit à l'isolement de cinq alcaloïdes connus dont deux indoles (la voacangine (**2**) et la voacristine (**4**)), deux bis indoles (la voacamine (**62**) et la voacorine (**88**)), et la piperine (**87**).

Aux fins de corroborer leur usage en médecine traditionnelle (prevention de la croissance des bactéries et traitement de tumeurs douloureuses), nous avons entrepris des tests antibactérien (sur *Escherichia coli*), antidiabétique et anticancéreux. En effet, le diabète et la souche bactérienne *E. coli* ont été identifiées comme des facteurs de risque potentiel de cancer colorectal favorisant son développement et les métastases.

Ainsi, la contortamide a montré une activité anticancéreuse modérée contre le cancer du côlon humain (Caco2) avec un pourcentage d'inhibition de plus de 60% par rapport à l'actinomycine D utilisée comme référence. Cependant, tabernamide A (**65**) (CMI = 1,4 µg/mL) et tabernamide B (**66**) (CMI = 1,8 µg/mL), la 3-*O*-β-(*E*)-(4-*O*-acetylferuloyl)lupéol (**77**) (CMI = 1,5 µg/mL) et la 7,7'-diméthoxy-6,6'-dicoumarinyl éther (**80**) (CMI = 1,7 µg/mL) ont montré une bonne activité antibactérienne sur la souche *Escherichia coli* (ATCC 25922) comparativement à l'ofloxacin (CMI = 50 µg/mL) utilisée comme médicament standard.

Cependant, la 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxybenzyl) diméthyl succinate (**76**) (CI₅₀ = 525,55 ± 4,17 µM) et la 3β-(*E*)-feruloyllupéol (**79**) (CI₅₀ = 452,39 ± 2,10 µM) ont montré une activité *in vitro* antiglycation comparée à la rutine (CI₅₀ = 54,59 ± 2,20 µM) utilisée comme standard, tandis que la 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy-benzyl) diméthyl succinate (**76**) (CI₅₀ = 268,06 ± 1,47 µM) montrait aussi une bonne activité inhibitrice *in vitro* α-glucosidase par rapport à l'inhibiteur standard l'acarbose (CI₅₀ = 875,75 ± 2,08 µM). Ces tests antiglycation et α-glucosidase ont montré la propriété antidiabétique des deux composés.

Mots clés: Apocynaceae, *Tabernaemontana contorta*, *Landolphia lucida*, *Hedranthera barteri*, cérébrosides, coumarines, triterpènes, anticancéreux, antibactérien, α-glucosidase, antiglycation et antidiabétique.

ABSTRACT

Abstract

This work presents the phytochemical study of three Cameroonian medicinal plants of the Apocynaceae family, *Tabernaemontana contorta*, *Landolphia lucida* and *Hedranthera barteri*. Thus, the ethyl acetate fractions of the bark of the trunk of *Tabernaemontana contorta*, the lianas of *Landolphia lucida* and the alkaloid fraction of the stems of *Hedranthera barteri* led to the isolation and characterization of 29 compounds. The structural analysis of the isolated compounds was performed using 1D (^1H and ^{13}C) and 2D (COSY, HSCQC, HMBC and NOESY) nuclear magnetic resonance techniques, the most modern mass spectrometry, circular dichroism (CD) and by comparison with data from the literature.

The ethyl acetate extract from the trunk bark of *Tabernaemontana contorta* has made it possible to isolate 12 compounds, including: three new derivatives of the cerebroside class (contortamide (**64**), tabernamide A (**65**) and tabernamide B (**66**)), as well as eight compounds already described in the literature, including four indole alkaloids (spegatine (**67**), tombozine (**68**), Nb-methyl affinisine (**69**) and affinisine (**70**)) and five triterpenes (acid- 2α , 3α , 23-trihydroxyursa-12, 20 (30)-dien-28 -oic (**71**), acid- 2α , 3β , 23-trihydroxyursa-12, 5 (6)-dien-28-oic (**72**), bauerenol acetate (**73**), α -amyrin (**74**), and betulinic acid (**75**)).

The ethyl acetate extract from the lianas *Landolphia lucida* K. Schum. led to the isolation of 12 compounds including: four new derivatives including a pentacyclic triterpene (3-*O*- β -(*E*)-(4'-*O*-acetylferuloyl)lupeol (**77**)), an anabolic steroid (methandriol dipropionate (**78**)), a lignan (2,3-bis (4'-hydroxy-3'-methoxy benzyl) dimethyl succinate (**76**)), a bicoumarin (7,7'-dimethoxy-6,6'-dicoumarinyl ether (**80**)); and eight known compounds namely a pentacyclic terpene (3 β -(*E*)-feruloyllupeol (**79**)), a phenolic acid (isovanollic acid (**86**)), a coumarin (scopoletin (**81**)), and flavonoids (rutin (**20**), quercitrin (**82**), quercetin (**83**), eriodictyol (**84**) and 3', 4', 5-trihydroxyflavone (**85**)).

The enriched alkaloid fraction of the stems of *Hedranthera barteri* led to the isolation of five known alkaloids including: two indoles alkaloids (voacangine (**2**) and voacristine (**4**)), two bis indoles alkaloids (voacamine (**62**) and voacarine (**88**)), and a piperine (**87**) alkaloid.

In order to corroborate their use in traditional medicine (prevention of bacteria growth and treatment of painful tumors), we have undertaken antibacterial (on *Escherichia coli*), antidiabetic and anticancer tests. Indeed, diabetes and the bacterial strain *E. coli* have been identified as potential risk factors for colorectal cancer promoting its development and metastasis.

Thus, contortamide showed moderate anticancer activity against human colon cancer (Caco2) with a percentage inhibition of more than 60% compared to actinomycin D used as a

reference. However, tabernamide A (**65**) (MIC = 1.4 $\mu\text{g/mL}$) and tabernamide B (**66**) (MIC = 1.8 $\mu\text{g/mL}$), (3-*O*- β -(*E*)-(4-*O*-acetylferuloyl)lupeol (**77**) (MIC = 1.5 $\mu\text{g/mL}$) and 7,7'-dimethoxy-6,6'-dicoumarinyl ether (**80**) (MIC = 1.7 $\mu\text{g/mL}$) showed good antibacterial activity on the strain *Escherichia coli* (ATCC 25922) compared to ofloxacin (MIC = 50 $\mu\text{g/mL}$) used as a standard drug.

However, 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-methoxy-benzyl) dimethyl succinate (**76**) ($\text{IC}_{50} = 525.55 \pm 4.17 \mu\text{M}$) and 3 β -(*E*)-feruloyllupeol (**79**) ($\text{IC}_{50} = 452, 39 \pm 2.10 \mu\text{M}$) showed *in vitro* antiglycation activity compared to rutin ($\text{IC}_{50} = 54.59 \pm 2.20 \mu\text{M}$) used as a standard, while 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-methoxy-benzyl) dimethyl succinate (**77**) ($\text{IC}_{50} = 268.06 \pm 1.47 \mu\text{M}$) also showed good inhibitory activity *in vitro* α -glucosidase compared to the standard acarbose inhibitor ($\text{IC}_{50} = 875.75 \pm 2.08 \mu\text{M}$). These antiglycation tests and α -glucosidase thus highlighted the antidiabetic power of the two compounds.

Keywords: Apocynaceae, *Tabernaemontana contorta*, *Landolphia lucida*, *Hedranthera barteri*, cerebroside, coumarins, triterpenes, anticancer, antibacterial, α -glucosidase, antiglycation and antidiabetic.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Le diabète sucré ou de type 2 et le cancer colorectal sont des problèmes de santé publique croissants au Cameroun et dans le monde. Ils font partie des causes de décès les plus courantes. Selon les données de l'Organisation mondiale de la morbidité, de 1990 à 2013, la mortalité due au diabète a augmenté de 90% (Siegel, 2020). En effet, au Cameroun, il y a 3,3 cas de cancer colorectal pour 100 000 (<http://globocan.iarc.fr>) et le diabète est la cinquième maladie qui cause le plus de décès. Il tue plus de 2% de la population chaque année. Les facteurs de risque communs du cancer du côlon et du diabète de type 2 comprennent l'obésité, l'inactivité et le vieillissement (González et al., 2017). En outre, les patients atteints de diabète de type 2 ont un taux de 30 à 40% de risque plus élevé de développer un cancer du côlon par rapport aux personnes sans diabète (Hillon et al., 2010; Khandekar et Spiegelman, 2011). A ces nombreux facteurs qui contribuent à la formation de tumeurs, les composants bactériens du microbiome humain y sont associés. En particulier, des souches appartenant à *Escherichia coli* ont été identifiées comme des facteurs de risque potentiels de cancer colorectal favorisant son développement et ses métastases (Castellarin et al., 2012; Arthur et al., 2012).

Le traitement du diabète de type 2 repose sur l'utilisation de plusieurs agents antidiabétiques tels que: les sulfonylurées, les biguanides, les thiazolidinediones, les inhibiteurs de la Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) (Ruiz-Vargas et al., 2019).

Quant au cancer colorectal, son traitement repose sur la chirurgie et la chimiothérapie, qui peut parfois être associée à la radiothérapie. Les indications sont établies en fonction de l'emplacement, du stade, de l'histologie et de l'état général du patient (Ndjitoyap et al., 1990). Cependant, le traitement de ces maladies par ces médicaments et méthodes conventionnels est souvent toxique et entraîne une résistance physiologique, un coût opérationnel élevé, des organismes non ciblés et une inaccessibilité dans les zones reculées. De même, les agents antidiabétiques utilisés provoquent souvent des effets secondaires tels que: le gain de poids, l'hypoglycémie sévère, les dommages au foie et l'hypertension (Ruiz-Vargas et al., 2019; Luna et Feinglos, 2001).

Pour résoudre ces problèmes, la phytothérapie est de plus en plus utilisée, car la médecine traditionnelle étant très souvent considérée comme une méthode de traitement plus appropriée (Marshall, 1998). Environ 80% de la population mondiale dépend toujours de la médecine traditionnelle à base de plantes. Et plus de 60% de médicaments approuvés ou des candidats médicaments sont d'origine naturelle à l'exemple des agents anticancéreux (pentostatine, peplomycine, épirubicine) et de agents antidiabétiques tels que les inhibiteurs de l' α -glucosidase (acarbose). A titre illustratif, la metformine, isolée à partir de *galega officinallis*

(rubiaceae), a des effets indésirables mineurs sur le tractus gastro-intestinal, diminuant ainsi la mortalité par cancer chez les patients diabétiques (Dowling et *al.*, 2007).

C'est dans l'optique de trouver d'autres agents antibactériens et antiadiabétiques de source naturelle pouvant interagir dans la prévention du cancer du côlon, que le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles (LPSN) a mis sur pied ce projet de recherche. A cet égard, trois plantes de la famille des Apocynaceae à savoir, *Tabernaemontana contorta* Stapf, *Landolphia lucida* K. Schum. et *Hedranthera barteri* (Hook f.) ont fait l'objet d'une investigation phytochimique approfondie. La sélection de ces plantes s'est basée sur des considérations chimiotaxonomiques et leurs utilisations en médecine traditionnelle africaine.

Comment est-ce que les plantes choisies pour cette étude peuvent-elles contribuer à la lutte contre les bactéries, le diabète de type 2, le cancer du côlon, et ses complications?

La réponse à cette question part de l'hypothèse selon laquelle les plantes étudiées contiendraient des métabolites secondaires dotés d'un potentiel antimicrobien, antiadiabétique et anticancéreux

L'objectif général de ce travail a donc été d'isoler et caractériser les métabolites secondaires présents dans les plantes étudiées permettant de lutter contre les bactéries et le diabète de type 2, facteurs de risque potentiel du cancer du côlon.

Objectifs Spécifiques

- Evaluer les activités : cytotoxique (contre *Artemia salina*) ; anticancéreuse ; antimicrobienne (contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* et *Escherichia coli*) des différents extraits des plantes récoltées ;
- Réaliser les techniques analytiques couplées (UPLC, LC-MS/MS) afin d'identifier les composés et confirmer leur présence dans les extraits bruts ;
- Evaluer les activités : anticancéreuse du côlon (Caco2), antimicrobienne contre *Escherichia coli* (ATCC 25922) et anti-diabétique (antylglycant et α -glycosidase) des composés purs.

Notre travail s'articulera autour de trois principaux chapitres:

Le chapitre I, relatif à la revue de la littérature, présente la description botanique des genres *Tabernaemontana*, *Landolphia* et *Hedranthera* ; ainsi que des espèces *T. contorta*, *L. lucida* et *H. barteri*, leur répartition géographique ainsi que les travaux chimiques antérieurs qui ont été effectués sur ces plantes.

Le chapitre II, présente les résultats obtenus, leurs interprétations et une discussion.

Le chapitre III, présente le matériel et les méthodes expérimentales utilisées.

Le tout étant soutenu par la liste des documents consultés

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1. Généralités sur la famille des Apocynaceae

I.1.1. Introduction

La famille des Apocynaceae a été décrite pour la première fois en 1789 par le botaniste français Antoine-Laurent de Jussieu (Judd et *al.*, 2002). Cette famille regroupe les plantes dicotylédones comprenant selon la classification traditionnelle, environ 5000 espèces réparties en 375 genres (Endress, 2004 ; Endress et *al.*, 2007). Elle comprend des plantes de l'ordre des arbres, arbustes, des lianes et plus précisément des espèces cactiformes ou des herbes vivaces (Judd et *al.*, 2002).

Cette vaste famille présente certains caractères communs à la grande majorité de ces espèces: les feuilles sont simples, opposées ou en verticilles, rarement stipulées. La sève est généralement un latex laiteux de couleur blanche et l'inflorescence est une cyme.

Les fleurs sont bisexuées, régulières et souvent grandes, remarquables et parfumées. Il y'a habituellement 5 sépales, libres ou soudés en un tube et 5 pétales soudés à la base en tube avec des lobes libres. Les 5 étamines possèdent des anthères soudées les unes des autres. L'ovaire est supère ou semi-infère, formé de 2 carpelles soudés ou libres.

Les fruits sont pairs et charnus, pouvant se fendre ou non. Les graines sont souvent munies d'une aigrette de poils. Elles possèdent ou non de l'albumen et l'embryon est droit (Vernon et Françoise, 1996).

I.1.2. Classification systématique

Les Apocynaceae, appartiennent à l'ordre des Gentianales qui renferment 5 familles : les Apocynaceae, les Gelsemiaceae, les Gentianaceae, les Loganiaceae et les Rubiaceae. En effet, la dernière classification phylogénétique de l'APG (Angiosperms phylogeny Groups), a annexé la famille des Asclepiadaceae aux Apocynaceae (APG III, 2009) afin d'en faire une famille monophylétique. La classification plus récente basée sur le système de classification APG III, organise les Apocynaceae en 5 sous-familles regroupant près de 4555 espèces classées en 415 genres (Endress et Bruyns, 2000):

- Les Rauvolfioideae 980 espèces en 84 genres
- Les Apocynoideae 860 espèces en 77 genres
- Les Périplocoideae 180 espèces en 31 genres
- Les Sécamonoideae 170 espèces en 9 genres
- Les Asclépiadoideae 2365 espèces en 214 genres

La position systématique des Apocynaceae selon Guinard et Dupont est donnée ci-dessous :

Règne : Végétal

Embranchement : Magnolophyta

Sous embranchement : magnolophytina

Classe : Magnolopsida

Ordre : Gentianales

Famille : Apocynaceae

Figure 1- Systématique des Apocynaceae selon Guinard et Dupont (2004)

I.1.3. Distribution géographique de la famille des Apocynaceae

Les Apocynaceae sont connus pour leur importance comme source de substances médicamenteuses de première importance (ex. Vincristine, Vinblastine, Vincamine,) (Hostettman et *al.*, 2000). La famille se développe principalement dans la zone intertropicale (Bruneton, 2001; Shriff et *al.*, 2006) répartis en 4 sous-familles (Gausсен et *al.*, 1982) (Tableau 1).

Tableau 1- Distribution de la famille des Apocynaceae dans le monde

Sous-famille	Genre	Distribution géographique
Apocynoideae	<i>Apocynum</i>	Amérique du Nord, Mexique
	<i>Nerium</i>	De la méditerranée au Japon
	<i>Strophanthus</i>	De l'Afrique à la Malaisie
	<i>Adenium</i>	Xérophytes charnues d'Afrique
	<i>Pachypodium</i>	Madagascar
Plumériodeae	<i>Allamanda</i>	Amérique tropicale
	<i>Landolphia</i>	Madagascar Sud-américaines
	<i>Rauwolfia</i>	Tropique
	<i>Ochrosia</i>	Paléotropicale, absent d'Afrique
	<i>Plumeria</i>	Amérique chaude
	<i>Catharanthus</i>	Tropique, particulièrement Madagascar
	<i>Vinca</i>	Méditerranée et Eurasie
Tabernaemontanoideae	<i>Tabernaemontana</i>	Tropique

	<i>Vacanga</i>	paléotropical
Cerbéroideae	<i>Thevetia</i>	Amérique tropicale
	<i>Cerbera</i>	Madagascar

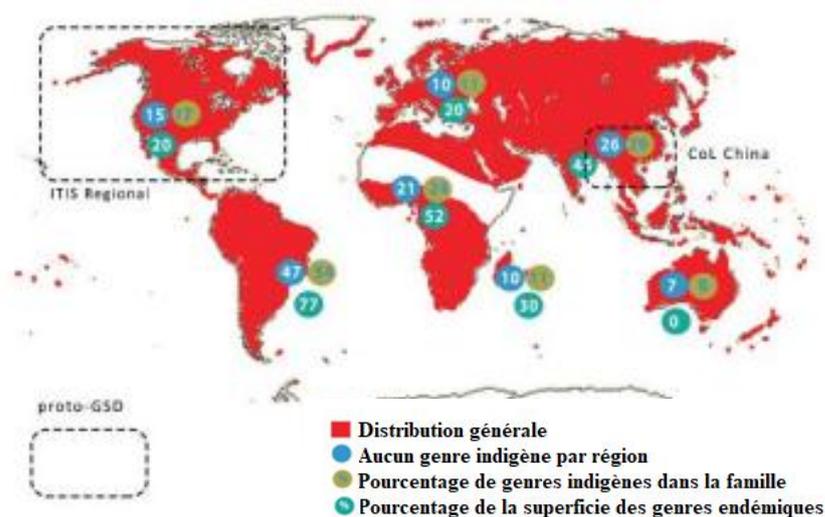


Figure 2- Répartition de la famille des Apocynaceae (Roskov et al., 2013)

En rouge : distribution générale ; en bleu : nombre de genres indigènes par région ; en beige : pourcentage des genres par rapport à la famille ; en vert : pourcentage d'endémicité par rapport à la flore de la région.

De plus, la famille des Apocynaceae est composée de plusieurs genres dont certains sont trouvés au Cameroun, nous pouvons entre autre citer : *Catharanthus*, *Holarrhe*, *Alstonia*, *pleiocarpa*, *Alaphia*, *Wrightia*, *Rauvolfia*, *Tabernaemontana*, *Landolphia* et le genre *Hedranthera*. Nous allons faire une description des trois derniers genres.

I.2. Le genre *Tabernaemontana*

I.2.1. Introduction

Le genre *Tabernaemontana* appartient à la famille des Apocynaceae et à la sous famille des Rauvolfioideae, il comprend environ 117 espèces de plantes à fleurs qui sont des arbustes ou des arbres à répartition pantropicale. Environ 18 espèces existent sur le continent africain, et 15 à Madagascar. Il s'apparente étroitement au genre *Voacanga* (Van Beek et al.1984).

Ce genre a été créé par Carl von Linné en 1753 en référence au botaniste et médecin allemand Jakob Dietrich von Bergzabern (Bad Bergzabern, 1522 - Heidelberg, 1590), connu aussi sous le nom de *Tabernaemontanus*, latinisation de son lieu de naissance Bergzabern. Une

grande confusion règne dans la littérature botanique concernant la délimitation de ce genre (Leeuwenberg, 1994 ; Van Beek, 1984).

I.2.2. Classification du genre *Tabernaemontana* selon Plum. ex L., 1753

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Gentianales

Famille : Apocynaceae

Genre : *Tabernaemontana* Plum. ex L.

Figure 3- Systématique du genre *Tabernaemontana* selon Plum. ex L. (1753)

I.2.3. Caractéristiques botaniques des plantes du genre *Tabernaemontana*

Le genre *Tabernaemontana* regroupe 100 à 110 espèces de plantes à fleurs de la famille des Apocynaceae, que l'on trouve dans les régions tropicales. Ces plantes sont des arbrisseaux ou petits arbres ramifiés à la base et des arbres à latex blanc de 1 à 15 m de haut (Li et *al.*, 1995). Les tiges sont branchées à plusieurs reprises à une ramification dichotomique. Les feuilles sont sempervirentes, opposées, longues de 3 à 25 cm, à sève laiteuse. La surface ventrale du pétiole est munie d'une gaine stipulaire inter et intrapétiolaire (Li et *al.*, 1995).

Les fleurs sont odorantes, blanches, d'un diamètre de 1 à 5 cm. La cime corymbe ou ombelle, à l'aisselle des branches est beaucoup ou rarement une fleur. Le calice à 5 sépales presque libres, imbriqués, munis de colléters à leur base interne. La corolle est à tube cylindrique plus ou moins dilaté au niveau des étamines et parfois plus ou moins tordu en spirale à 5 lobes se recouvrant à gauches. L'ovaire est à 2 carpelles libres et de nombreux ovules par lobe. Le stigmate est plus ou moins cylindrique, ovale ou subulé. Les étamines sont insérées dans le cadre élargi du tube de la corolle. Les filaments sont courts ou presque. Les anthères sont plus longues que ou étroitement triangulaires (Li et *al.*, 1995).

Les fruits sont des follicules coriaces, ovoïdes ou globuleux, géminés. Les graines sont entourées d'un arille coloré, à albumen ruminé. Elles sont obliquement ellipsoïdes, avec rainure profonde sur un côté (Li et *al.*, 1995).

I.2.4. Distribution géographique du genre *Tabernaemontana*

On trouve le plus souvent le genre *Tabernaemontana* en Afrique ou en Amérique du Sud. Cependant il est aussi localisé en Asie, en Australie, dans le pacifique et les régions

subtropicales (González-Rocha et Cerros-Tlatilpa, 2015). En Afrique, les plantes du genre *Tabernaemontana* sont retrouvés à Madagascar, au Kenya, au Nigeria, au Ghana, en Côte d'Ivoire, au Congo, en Tanzanie et au Cameroun (Van Beek et *al.*, 1984). Au Cameroun on les retrouve dans la région de l'Est, du Sud, du Littoral, du Nord-Ouest et du Centre (département de la Mefou et Akono, localité d'Ongot).

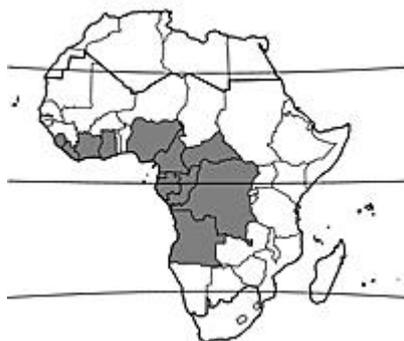


Figure 4- Répartition géographique du genre *Tabernaemontana* en Afrique

Parmi les espèces de plantes du genre *Tabernaemontana* retrouvées au Cameroun nous pouvons citer : *T. pachysiphon*, *T. crassa*, *T. inconspicua*, *T. divaricata* et *T. contorta* qui fait l'objet de notre étude.

I.2.5. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites isolés du genre *Tabernaemontana*

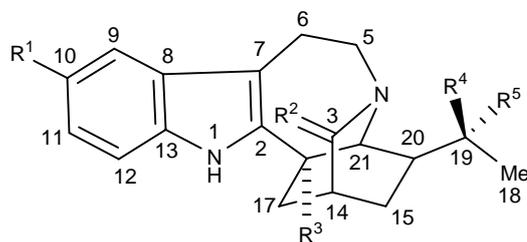
Les travaux phytochimiques réalisées sur le genre *Tabernaemontana* ont permis d'isoler plusieurs métabolites secondaires à savoir les les alcaloïdes indoliques, les flavonoïdes, les triterpènes et les stéroïdes.

I.2.5.1. Les alcaloïdes indoliques

Les plantes du genre *Tabernaemontana* sont potentiellement riches en alcaloïdes indoliques qui sont considérés comme marqueurs chimiques de ce genre. Les principaux alcaloïdes présents sont des monomères, ce qui n'empêche pas également la présence d'alcaloïdes dimères de la classe des corynanthéanes et iboganes (Leeuwenberg, 1991).

Prakash et collaborateurs (2003) ont isolés des écorces du tronc de *Tabernaemontana calcarea* la 3-oxo-19-epi-voacristine (**1**), la voacangine (**2**), la coronaridine (**3**), la voacristine (**4**), la 19-epi-voacristine (**5**), l'ibogamine (**6**), la 10-méthoxyibogamine (**7**), l'heyneanine (**8**), la 19-epi-heyneanine (**9**), la 3R/S-Hydroxytabernanthine (**12**), l'isovoacangine (**13**), la 11-hydroxycoronaridine (**14**), l'isovoacristine (**15**), la 11-méthoxyibogamine (**16**) et la 19-epi-voacristine hydroxyindolenine (**10**). De même, Monnerat et collaborateurs (2005) ont isolés des

racines de *Tabernaemontana hystrix* Steud l'hystrixnine (**11**) tandis que Deng et collaborateurs (2018) ont isolés des feuilles et branches de *Tabernaemontana divaricata* la 3 α -hydroxyméthyl-ibogamine (**17**) et la 3 α -acetateméthoxyl-ibogamine (**18**).



1: R¹ = OCH₃; R² = O; R³ = COOCH₃; R⁴ = H; R⁵ = OH

3-oxo-19-epi-voacristine

2: R¹ = OCH₃; R² = H₂; R³ = COOCH₃; R⁴ = R⁵ = H

Voacangine

3: R¹ = R⁴ = R⁵ = H; R² = H₂; R³ = COOCH₃

Coronaridine

4: R¹ = OCH₃; R² = H₂; R³ = COOCH₃; R⁴ = OH; R⁵ = H

Voacristine

5: R¹ = OCH₃; R² = H₂; R³ = COOCH₃; R⁴ = H; R⁵ = OH

19-epi-voacristine

6: R¹ = R³ = R⁴ = R⁵ = H; R² = H₂

Ibogamine

7: R¹ = OCH₃; R² = H₂; R³ = R⁴ = R⁵ = H

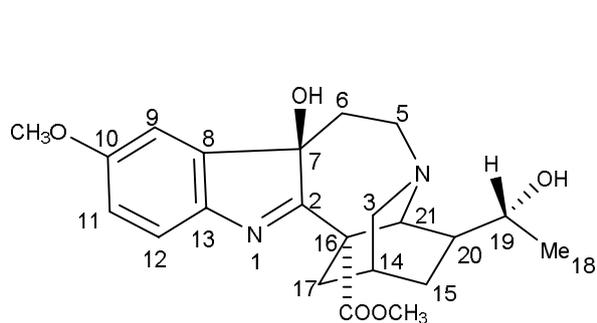
10-méthoxyibogamine

8: R¹ = R³ = R⁵ = H; R² = H₂; R⁴ = OH

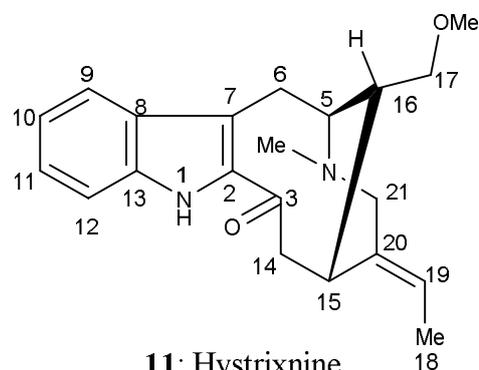
Heyneanine

9: R¹ = R³ = R⁴ = H; R² = H₂; R⁵ = OH

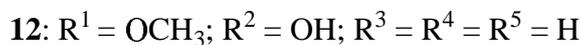
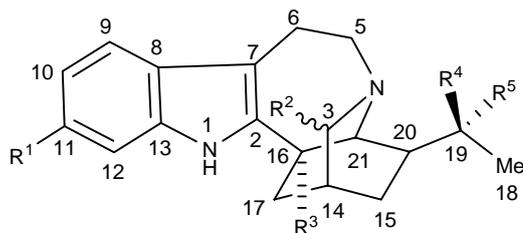
19-epi-heyneanine



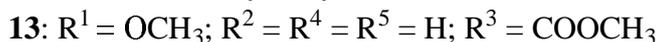
10: 19-epi-voacristine hydroxyindolenine



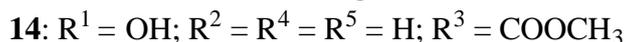
11: Hystrixnine



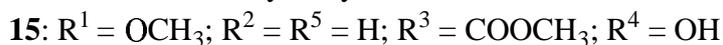
3*R/S*-Hydroxytabernanthine



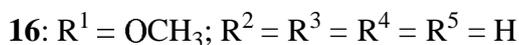
Isovoacangine



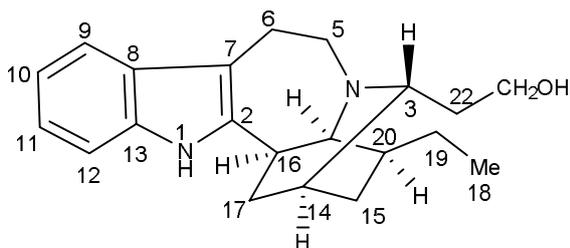
11-hydroxycoronaridine



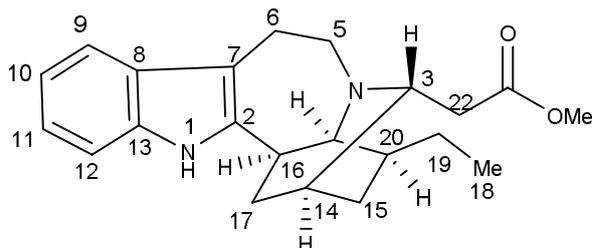
Isovoacristine



11-méthoxyibogamine



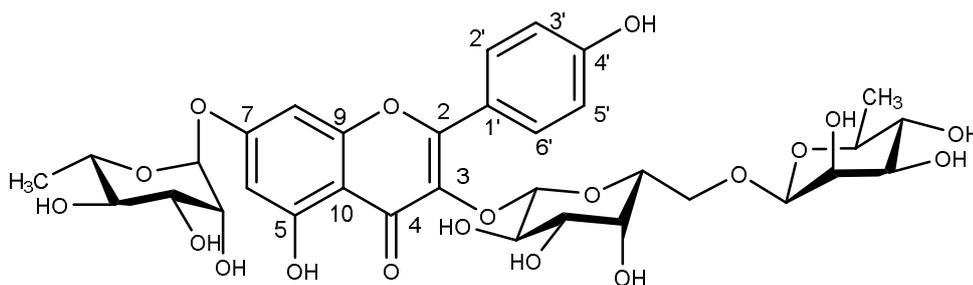
17: 3α-hydroxyméthyl-ibogamine



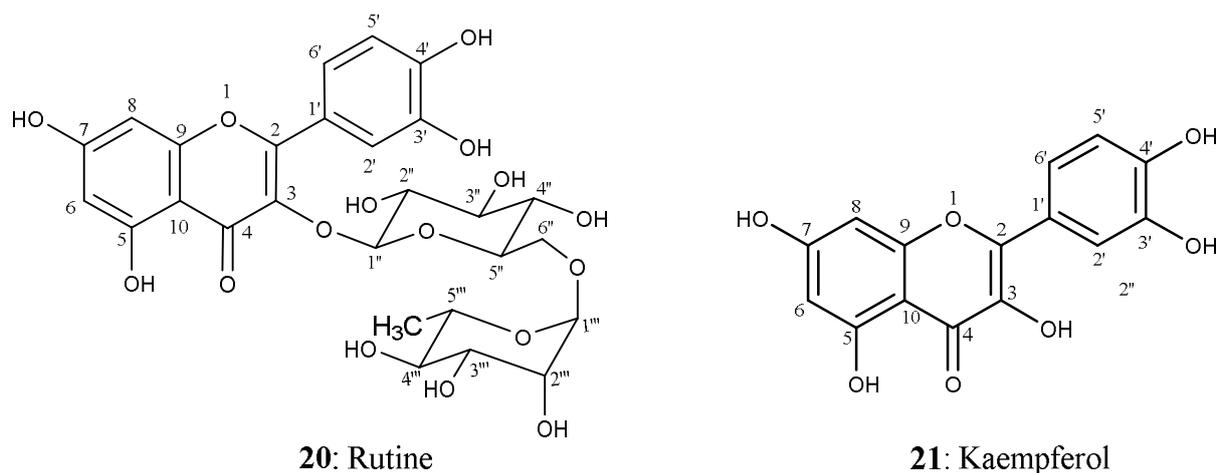
18: 3α-acetateméthoxyl-ibogamine

I.2.5.2. Les flavonoïdes

Plusieurs flavonoïdes ont été isolées des plantes du genre *Tabernaemontana*; ainsi Sathishkumar et *al* (2013) ont isolé des feuilles et du tronc de *Tabernaemontana heyneana* les flavonoïdes tels la robinine (**19**) et la rutine (**20**). Par ailleurs, le kaempferol (**21**) a été identifié par HPLC des feuilles et écorces du tronc de *Tabernaemontana Catharinensis* (Boligon et *al.*, 2015). Ces composés possèdent une bonne activité antimicrobienne (Oliveira et *al.*, 2007; Boligon et *al.*, 2013a).



19: Robinine



I.2.6. L'espèce *Tabernaemontana contorta* stapf

I.2.6.1. Introduction

Tabernaemontana contorta Stapf connue sous le nom de « libon lingu » en langue bassa est une espèce de plantes à fleurs dicotylédones de la famille des Apocynaceae, du genre *Tabernaemontana* (Mbantswe, 2009). *Conopharyngia contorta* (Stapf) et *Sarcopharyngia contorta* (Stapf) Boiteau sont les synonymes de cette espèce.

I.2.6.2. Classification botanique selon APG III (2009)

Règne : Plantae

Clade : Angiospermes, Dicotylédones vraies, Noyau des Dicotylédones vraies, Astéridées, Lamiidées

Ordre : Gentianales

Famille : Apocynaceae

Genre: *Tabernaemontana*

Espèce : *Tabernaemontana contorta* Stapf

Figure 5- Systématique de *Tabernaemontana contorta* Stapf selon APG III (2009)

I.2.6.3. Description botanique de *Tabernaemontana contorta* Stapf

L'espèce *Tabernaemontana contorta* s'apparente à l'espèce *T. pachysiphon*. C'est un arbuste ou petit arbre atteignant 15 m de haut ; avec un tronc atteignant 40 cm de diamètre, sans contreforts ; l'écorce est brun pâle ou gris brun fissurée longitudinalement à grandes lenticelles (Patel et al., 1967).



Figure 6- Arbuste de *Tabernaemontana contorta* Stapf (Ebédé, 12/07/2019)

Les feuilles sont opposées, simples et le fruit est constitué de deux follicules libres presque globuleux de 7-15 cm de diamètre, vert pâle souvent mouchetés contenant de nombreuses graines (Patel et *al.*, 1967).



Figure 7- Feuilles, fruit et Ramification de *T. contorta* Stapf (Ebédé, 12/07/2019)

I.2.6.4. Distribution géographique de l'espèce *T. contorta* Stapf

L'espèce *Tabernaemontana contorta* est retrouvée à Madagascar (Bui et *al.*, 1977), au Nigéria et au Cameroun (Patel et *al.*, 1967). Au Cameroun, *Tabernaemontana contorta* est retrouvée dans les régions de l'Est, du Sud, du Littoral, du Nord-Ouest et du Centre (Herbier National du Cameroun consulté le 09 Décembre 2016). Endémique, elle a été collectée par plusieurs chercheurs notamment dans les lieux suivants : à la baie d'Ambas (latitude : 4° 00' Nord ; longitude : 9° 11' Est), près de Limbé (Mann, 1861) ; à la station Johann-Albrechtshöhe à Kumba près du lac Barombi Mbo (région du Sud-Ouest ; Latitude: 4° 39' 59.99" N et

Longitude: 9° 23' 59.99" E) (Staudt, 1897) ; en bordure du marigot Olezoa, près de Melen (latitude : 3,8667; longitude : 11,5006), dans la subdivision de Yaoundé (Mpom, 1953).

I.2.6.5. Usages Ethnopharmacologiques de *Tabernaemontana contorta*

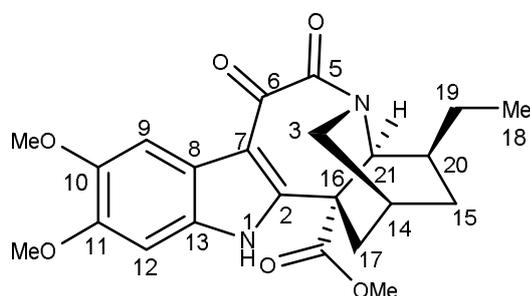
T. contorta est une plante médicinale, aux vertus cicatrisantes (Quattrocchi, 2012). Au Cameroun, ses feuilles sont utilisées pour prévenir contre la formation des chéloïdes (cicatrices épaisses après la guérison d'une blessure) et contre les infections de la peau et des muqueuses (Burkill, 1985).

I.2.6.6. Travaux phytochimiques antérieures sur *Tabernaemontana contorta*

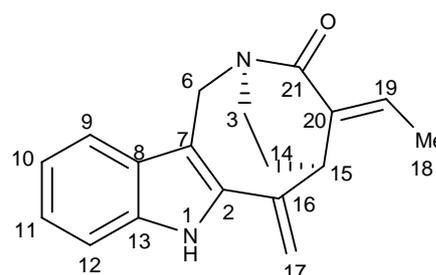
Selon nos investigations, très peu d'études phytochimiques ont été menées sur la plante *Tabernaemontana contorta*. Certains travaux effectués ont permis d'identifier deux classes de métabolites secondaires à savoir les alcaloïdes indoliques et les triterpènes.

➤ Alcaloïdes indoliques

Des fruits de de *T. contorta* ont été isolé deux nouveaux dérivés d'alcaloïdes indoliques : la 5,6-dioxo-11-méthoxy voacangine (**22**) et la (-)-apparicin-21-one (**23**) (Melacheu et *al.*, 2019).

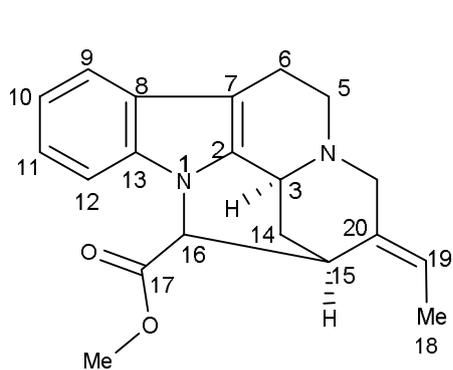


22: 5,6-dioxo-11-méthoxy voacangine

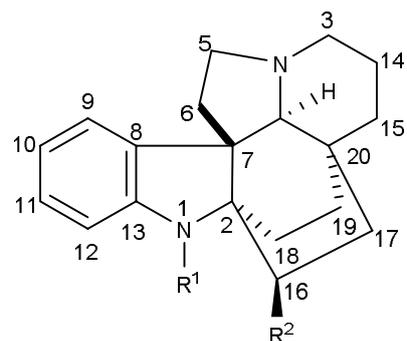


23: (-)-apparicin-21-one

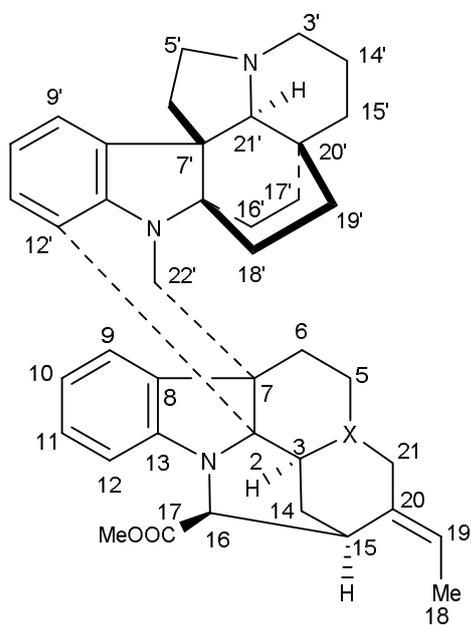
Ndongo et collaborateurs (2017) ont isolé des racines de cette plante les monomères et dimères d'alcaloïdes indoliques parmi lesquels deux dérivés nouveaux: la contortarine A (**26**) et la 16-epi-pleiomutinine (**27a**), ensemble avec la pleiocarpamine (**24**), la pleiocarpine (**25**), la pleiomutinine (**27b**) et la strictosidine lactam (**28**) et la 1-carbométhoxy- β -carboline (**29**).



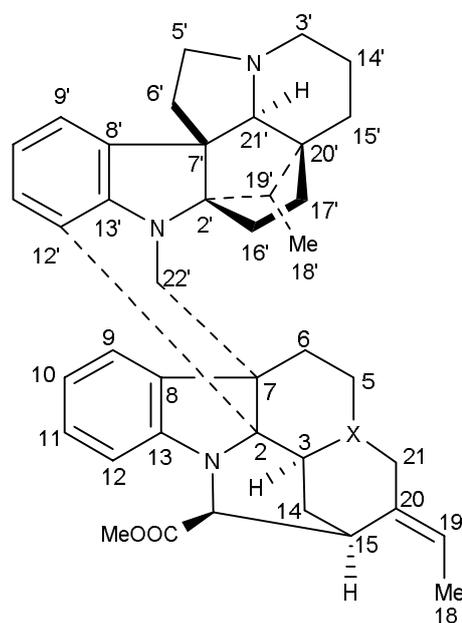
24: Pleiocarpamine



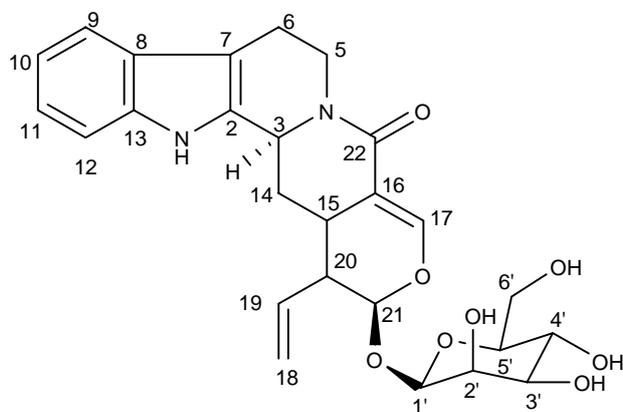
25 : $R^1 = \text{CO}_2\text{Me}$, $R^2 = \text{CO}_2\text{Me}$
Pléiocarpine



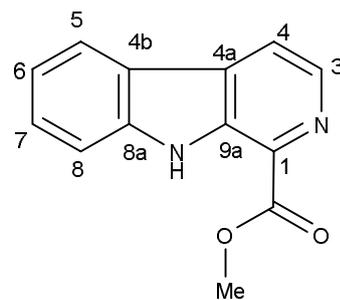
26: Contortarine A



27a: X = N, 16-*épi*
16-*épi*-pleiomutinine
27b: X = N
pleiomutinine



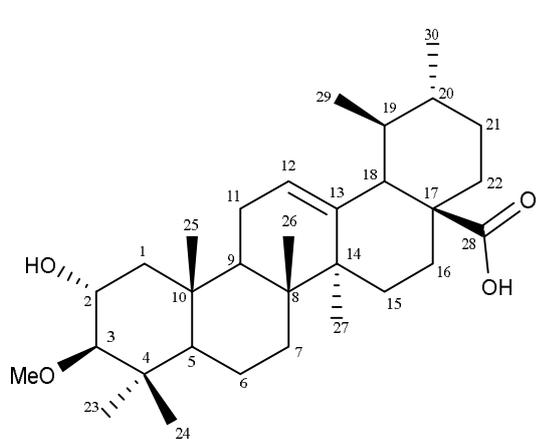
28: Strictosidine lactam



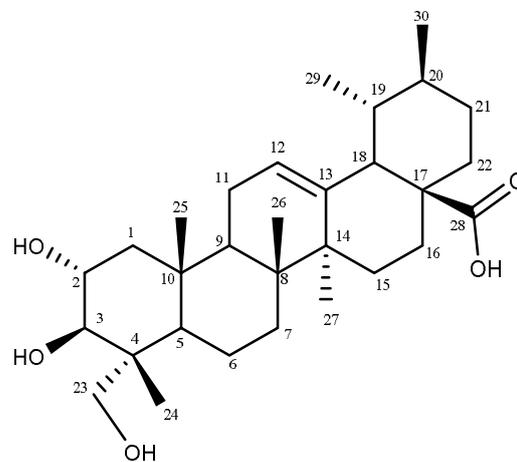
29: 1-carbométhoxy- β -carboline

➤ Les triterpènes

Des triterpènes ont été isolés des fruits de *T. contorta*, l'on peut en citer : l'acide-3-méthoxy ursolique (**30**) et l'acide asiatique (**31**) (Melacheu et *al.*, 2019).



30: Acide-3-méthoxy ursolique



31: Acide asiatique

I.2.6.7. Activités biologiques sur *Tabernaemontana contorta*

Des études biologiques menées sur les composés isolés des racines de *Tabernaemontana contorta* lui confèrent une activité chimiopréventive importante du cancer. En effet, la contortarine A (**26**), la 1-carbométhoxy- β -carboline (**29**) et la strictosidine lactame (**28**) ont présentés propriétés chimiopréventives du cancer par induction de la quinone réductase (QR) avec des valeurs de C_D de $16,0 \pm 2,5$; $30,2 \pm 6,1$ et $23,1 \pm 4,6$ mM, respectivement ; tandis que la pléiomutinine (**27b**) et la 16-épi-pléiomutinine (**27a**) présentaient l'inhibition de l'activité NF- κ B induite par le TNF- α avec des CI_{50} à $11,7 \pm 2,6$ et $3,4 \pm 1,1$ mM, respectivement (Ndongo et *al.*, 2017).

I.3. Le genre *Landolphia*

I.3.1. Introduction

Landolphia est un genre botanique de la famille des Apocynaceae. Ce genre qui comprend 55 espèces tropicales, sud-africaine et malgache, est représentée par des lianes le plus souvent de savane, mais aussi parfois de forêt comme par exemple *L. ovariensis*. C'est un genre constitué de plantes fleuries et des plantes caoutchouc (Salard, 1981).

I.3.2. Classification APG III (2009) du genre *Landolphia*

Règne : Plantae

Clade : Angiospermes, Dicotylédones vraies, Astéridées, Lamiidées

Ordre : Gentianales

Famille : Apocynaceae

Sous-famille : Rauvolfioideae

Tribu : Willughbeeae

Genre: *Landolphia*

Figure 8- Systématique du genre *Landolphia* (P. Beauv., 1806)

I.3.3. Caractéristiques botaniques des plantes du genre *Landolphia*

Du point de vue adaptation et port, les plantes du genre *Landolphia* d'Afrique peuvent se grouper en 2 catégories :

- Des lianes grimpant avec des vrilles et s'élevant jusqu'à la cime des arbres, quand elles vivent dans la forêt dense, ou bien à rameaux retombants et formant de petits buissons épais, hauts seulement de quelques mètres, lorsqu'elles vivent dans la savane.
- D'autres plantes se rapportant encore au genre *Landolphia*, mais qui n'ont plus de vrilles et ne s'enroulent pas, ne sont par conséquent pas des lianes. Ces *Landolphia* ont des racines et des rhizomes puissants. Une partie de ces rhizomes courent près de la surface du sol et émettent çà et là des faisceaux de petites tiges, ou des tiges isolées; dans les deux cas ces tiges sont subherbacées et basses (hautes au plus de quelques décimètres). Elles fleurissent et produisent des fruits dès la première année, puis, à la saison sèche, elles se flétrissent. Ces espèces à tiges herbacées naines et à forts rhizomes, ont été primitivement des lianes qui par suite de l'adaptation au milieu, sous l'influence des incendies allumés par l'homme se sont transformées en espèces qui peuvent continuer à vivre dans la terre malgré les conditions créées par l'homme et défavorables aux lianes (Chevalier, 1906).

I.3.4. Distribution géographique du genre *Landolphia* dans le monde

Le genre *Landolphia*, qui comprend 55 à 65 espèces, a son maximum de distribution dans la forêt dense de la zone équatoriale, mais quelques espèces appartiennent aussi à la zone guinéenne et vivent dans les galeries forestières. Un certain nombre ont pénétré dans la zone soudano-zambésienne et sont devenues des plantes de savanes. D'autres sont des plantes subherbacées. Quelques espèces ont pénétré en Afrique australe. Citons, *L. capensis* Oliv. du Natal et du Transvaal, *L. delagoensis* Pierre de Delagoa-Bay, *L. sivyner-tonii* S. Moore du Gazaland. Une quinzaine d'espèces sont décrites de Madagascar et vivent les unes dans les forêts, les autres dans les savanes. Plusieurs de ces espèces malgaches donnent du bon caoutchouc. Une race, *L. florida* var. *comorensis*, vit dans l'Archipel des Comores. Enfin, trois espèces de *Landolphia* sont connues en Amérique équatoriale, dans les forêts. Ce sont : *L. (Pacouria) guianensis* Aublet de la Guyane française, *L. paraensis* Huber de l'Amazonie et *L.*

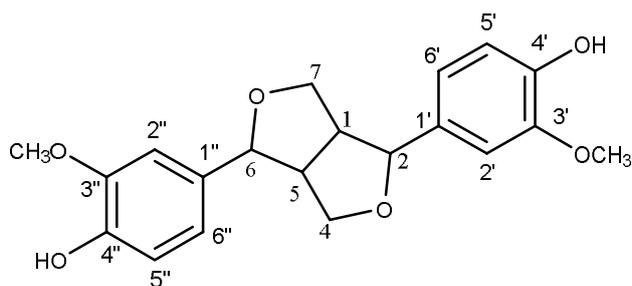
boliviensis Markgraf de Bolivie. Ces espèces semblent appartenir à la section Ancylo-botrys et ne donneraient pas de caoutchouc (Chevalier, 1948).

Parmi les espèces présentes au Cameroun, on a : *L. owariensis*, *L. jumellei*, *L. stenogyre*, *L. hispida* et *L. lucida* à laquelle nous nous intéressons.

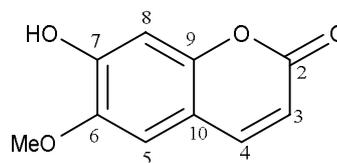
I.3.5. Travaux phytochimiques antérieures sur le genre *Landolphia*

Les lignanes et leurs dérivés sont l'un des constituants les plus largement distribués dans le règne végétal.

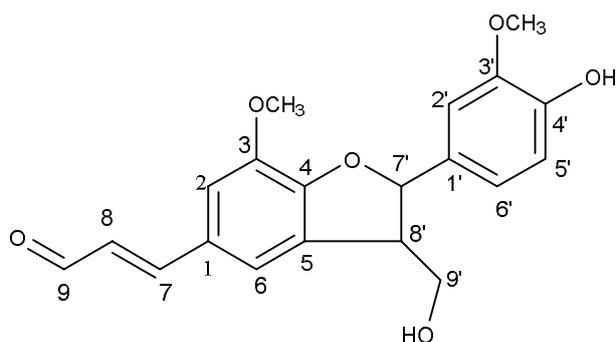
Des composés appartenant à la classe des lignanes, des néolignanes, des sesquilignanes, des coumarines et des sesquiterpènes aromadendrane ont été isolés des racines de *Landolphia heudelotti* (Mireku et al., 2017). Parmi ces composés, on a : le pinorésinol (**32**), la scopolétine (**33**), la balanophonine (**34**), le capstémol (**35**), le 3-(α ,4-hydroxy-3-méthoxybenzyl)-4-(4-hydroxy-3-méthoxybenzyl)tétrahydrofuranne (**36**), la picrasmaliganan A (**37**) et la budlenol E (**38**).



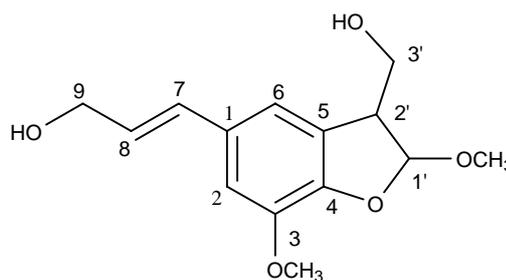
32: Pinorésinol



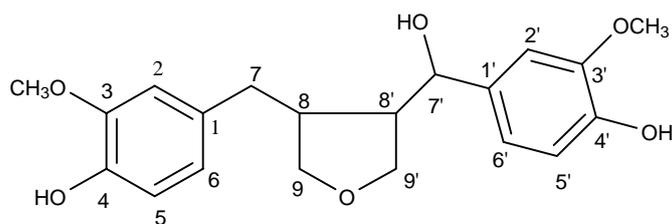
33: Scopolétine



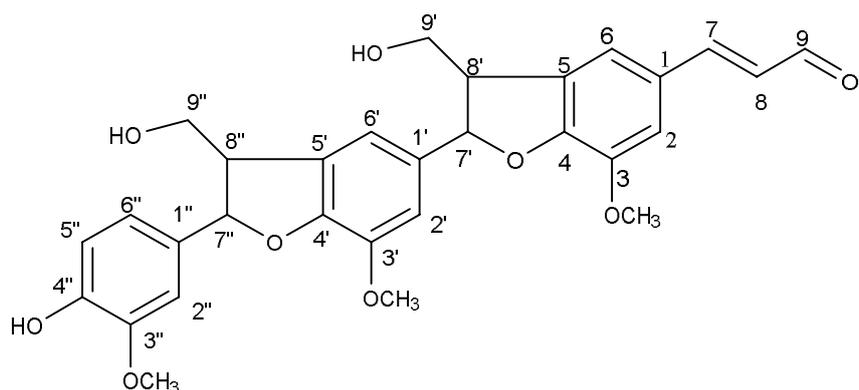
34: Balanophonine



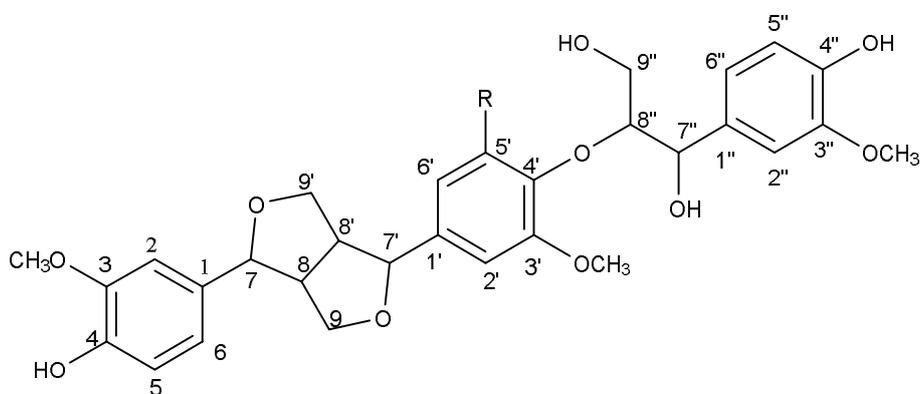
35: Capstémol



36: 3-(α , 4-hydroxy-3-méthoxybenzyl)-4-(4-hydroxy-3-méthoxybenzyl) tétrahydrofuranne



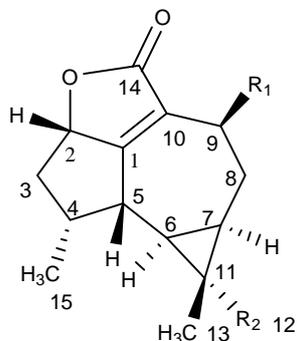
37: Picrasmalignan A



38: R = OCH₃
Budlenol E

Des sesquiterpènes de type aromadendrane comprenant huit nouveaux produits naturels, ont été isolées des racines de *Landolphia dulcis* var. *barteri*. Il s'agit de l'acide-(2*S*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*)-2-hydroxy-2,14-lactone-1(10)-aromadendren-14-oïque (**39**), l'acide (2*S*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 9*S*)-2,9-hydroxy-2,14-lactone-1(10)-aromadendren-14-oïque (**40**), l'acide (2*S*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 11*S*)-2,12-hydroxy-2,14-lactone-1(10)-aromadendren-14-oïque (**41**), la (1*R*, 6*R*, 7*R*, 10*R*, 11*S*)-12-hydroxy-4(5)-aromadendren-3-one (**42**), la (4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 11*S*)-12-hydroxy-1(10)-aromadendren-2-one (**43**), l'acide (4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 11*S*)-2-oxo-1(10)-aromadendren-12-oïque

(**44**), la (1*S*, 6*R*, 7*S*, 10*R*)-10-Hydroxy-4(5)-muurolen-3-one (**45**), la (1*R*, 6*R*, 7*S*, 10*R*)-10-hydroxy-4(5)-cadinen-3-one (**46**) la (4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 11*S*)-12-Hydroxy-1(10)-aromadendren-9-one (**47**), le méthyl (4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 11*S*)-2,9-dioxo-1(10)-aromadendren-12-oate (**48**) et la (4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 11*S*)-12-hydroxy-1(10)-aromadendren-14-al (**49**) (Stærk et al., 2004).



39: R₁ = H; R₂ = CH₃

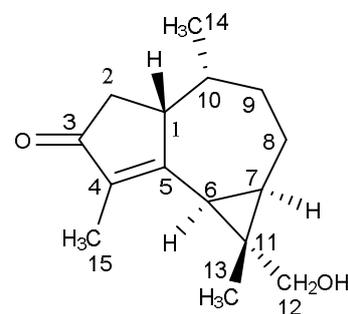
Acide-(2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*)-2-hydroxy-2,14-lactone-1(10)-aromadendren-14-oïque

40: R₁ = OH; R₂ = CH₃

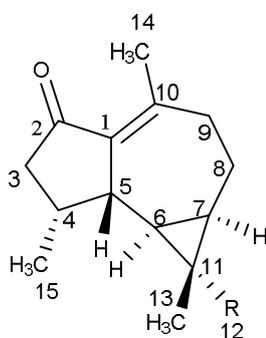
Acide (2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*)-2,9-hydroxy-2,14-lactone-1(10)-aromadendren-14-oïque

41: R₁ = H; R₂ = CH₂OH

Acide (2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,11*S*)-2,12-hydroxy-2,14-lactone-1(10)-aromadendren-14-oïque



42: (1*R*,6*R*,7*R*,10*R*,11*S*)-12-hydroxy-4(5)-aromadendren-3-one

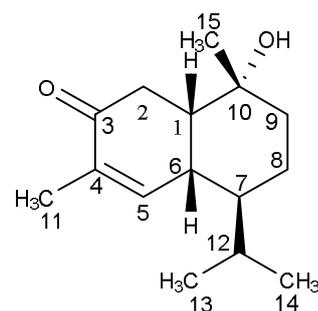


43: R = CH₂OH

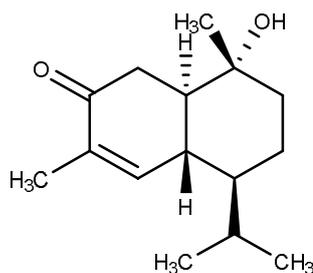
(4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,11*S*)-12-hydroxy-1(10)-aromadendren-2-one

44: R = COOH

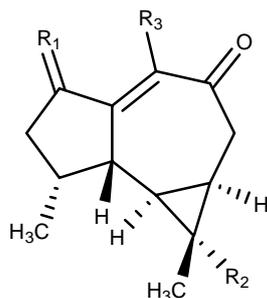
Acide (4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,11*S*)-2-Oxo-1(10)-aromadendren-12-oïque



45: (1*R*,6*R*,7*S*,10*R*)-10-hydroxy-4(5)-cadinen-3-one



46: (1*R*,6*R*,7*R*,10*R*,11*S*)-12-hydroxy-4(5)-aromadendren-3-one

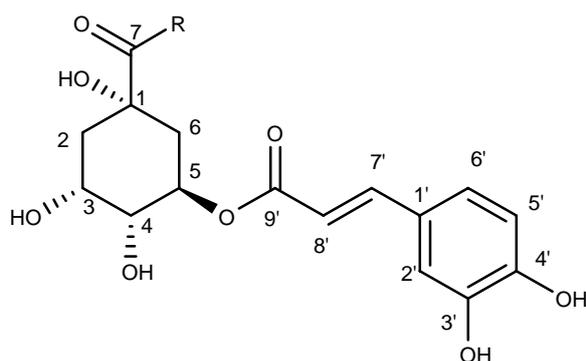


47: R₁ = H; R₂ = CH₂OH; R₃ = CH₃
(4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,11*S*)-12-Hydroxy-1(10)-aromadendren-9-one

48: R₁ = O; R₂ = COOCH₃; R₃ = CH₃
Méthyl (4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,11*S*)-2,9-dioxo-1(10)-aromadendren-12-oate

49: R₁ = O; R₂ = CH₂OH; R₃ = CHO
(4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,11*S*)-12-hydroxy-1(10)-aromadendren-14-al

Les fruits de *Landolphia owariensis* P. Beauv ont montré la présence de phénylpropanoïdes bioactifs, d'acide phénolique et de phytostérol. Des composés bioactifs ont été isolés: l'acide (*E*)-3-(3, 4-dihydroxycinnamoyl) quinique ou (*E*)-acide chlorogénique (**50**), l'ester méthylique de l'acide (*E*)-3-(3, 4-dihydroxycinnamoyl) quinique ou (*E*)-ester méthylique d'acide chlorogénique (**51**) et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque ou l'acide protocolatéchuïque (**52**) (Tochukwu et al., 2016).

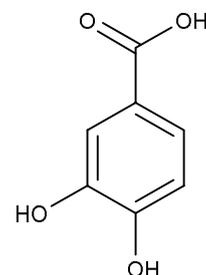


50: R = OH

Acide (*E*)-3-(3,4-dihydroxycinnamoyl) quinique

51: R = OCH₃

Acide (*E*)-3-(3,4-dihydroxycinnamoyl) quinique



52: Acide protocatéchuïque

I.3.6. L'espèce *Landolphia lucida* K. Schum.

I.3.6.1. Introduction

Landolphia lucida K. Schum. est une liane atteignant 1 à 20 m de haut. La plante contient un latex blanc de qualité variable, clairsemé ou abondant, fluide ou collant, ne coagulant qu'avec un caoutchouc de mauvaise qualité. Cette plante a pour synonyme *Dictyophleba lucida* (K. Schum.) Pierre, *Landolphia dubrenquiana* De Wild. et *Pacouria lucida* (K.Schum.) Kuntze (Janot et al., 1966).

I.3.6.2. Classification botanique selon APG III (2009)

Règne : Plantae

Classe : Magnoliopsida

Famille : Apocynaceae

Genre : *Landolphia*

Espèce : *Landolphia lucida* K. Schum.

Figure 9- Systématique de *Landolphia lucida* K. Schum. (Hepper, 1962).

I.3.6.3. Aperçu botanique de *Landolphia lucida* K. Schum.

C'est une liane grimpant jusqu'à 15 m ou plus avec la présence de sève laiteuse. L'écorce est brune verdâtre pâle; les rameaux sont bruns foncés, glabres ou à poils clairsemés lorsqu'ils sont jeunes. Ses feuilles sont opposées, obovales-elliptiques, à texture assez mince, glabres ou avec une ligne de poils sur la nervure centrale enfoncée au-dessus, et les nervures latérales bouclées pour former une veine sous-marginale distincte; l'apex arrondi est souvent avec une courte pointe acuminée. Les fleurs sont en panicules terminales lâches et allongées, légèrement parfumées. Les lobes de la corolle atteignent 15 mm de long, courbes-linéaires, blancs, à long

cilié le long de la marge interne; tube de 11-19 mm de long, étroitement cylindrique, légèrement dilaté dans la moitié supérieure, rose pâle à rose foncé. Le Fruit subsphérique, charnu, atteignant 3 × 4,5 cm, jaune à rouge à maturité est comestible (Janot et *al.*, 1966).



Figure 10- Feuilles, fruits et fleurs des lianes de *Landolphia lucida* K. Schum. (Bart Wursten, 1966)

I.3.6.4. Distribution géographique de l'espèce *Landolphia lucida* K. Schum.

Landolphia lucida K. Schum. est répartie en Afrique centrale et orientale (Angola; Burundi; Cameroun, République centrafricaine, îles Comores, République démocratique du Congo, Malawi, Mozambique, Nigeria, Zambia, Zimbabwe).

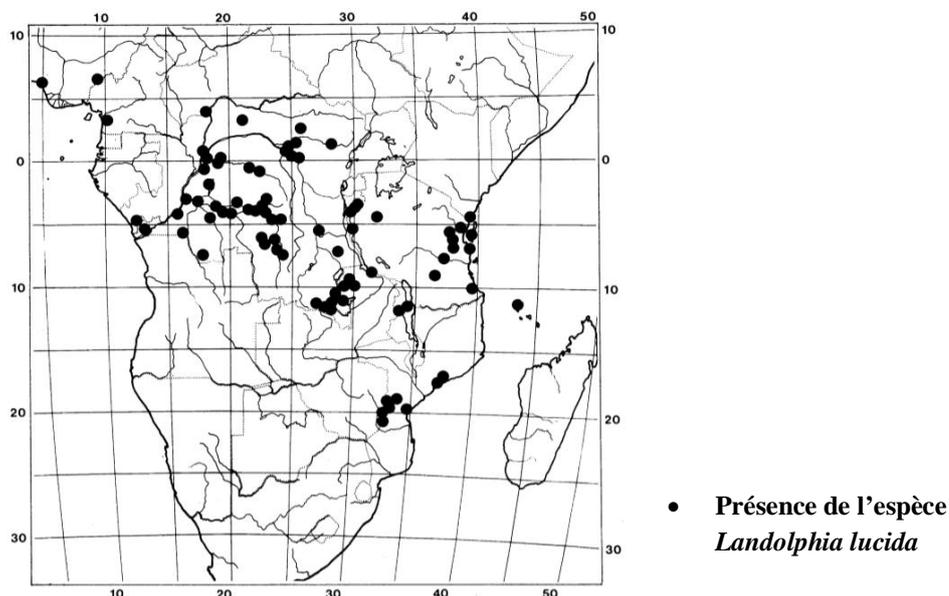


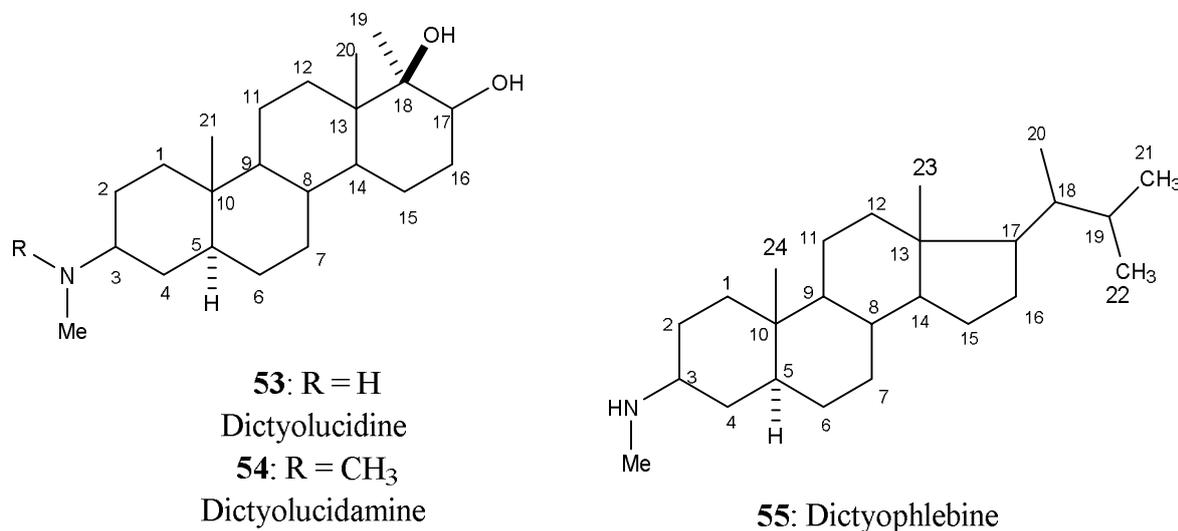
Figure 11- Distribution de *Landolphia lucida* K. Schum. (Botanic Garden Meise, 1989)

I.3.6.5. Usages ethnopharmacologiques de *Landolphia lucida*

La décoction des racines de *L. lucida* est utilisée pour les enfants comme vermifuge (Burkill, 1985). Un latex est obtenu à partir des tiges et les tiges flexibles peuvent être utilisées comme matériau de liage (Ruffo et *al.*, 2002 ; Uphof, 1959).

I.3.6.6. Travaux phytochimiques antérieures sur *Landolphia lucida*

Des études phytochimiques sur *Dictyophleba lucida* (K. Schum.) Pierre synonyme de *Landolphia lucida* ont montré la présence de composés bioactifs dans les racines tels que : la dictyolucidine (**53**), la dictyolucidamine (**54**) et la dictyophlebine (**55**) (Janot et *al.*, 1966).



I.3.6.7. Activités biologiques sur *Landolphia lucida*

Des essais biologiques antérieurs sur les feuilles, les tiges et le tronc de *Dictyophleba lucida* (K. Schum.) Pierre (synonyme de *Landolphia lucida* K. Schum) ont montré les activités antimycotiques (Khan, 1999), antibactériennes et antifongiques (Khan et Nkunya, 1990).

I.4. Le genre *Hedranthera*

I.4.1. Introduction

Hedranthera est un genre de la famille des Apocynaceae constitué d'une seule espèce (*Hedranthera barteri*) et est rattaché au genre *Callichilia* qui a été décrit par Stapf en 1902. Ce genre *Callichilia* est constitué de cinq espèces : *Callichilia barteri* (Hook.f.) Stapf, *C. basileis* Beentje, *C. bequaertii* De Wild., *C. inaequalis* Stapf et *C. sessilis* (Benth.) Stapf. Certaines de ces espèces proviennent du genre *Tabernaemontana*. En effet, Markgraf (1923) a réduit sa taille en séparant *Ephippiocarpa* de *Callichilia*, en se basant sur *C. orientalis*.

Pichon (1948), réduit *Callichilia* en plaçant *C. barteri* dans le genre monotypique *Hedranthera*.

I.4.2. Classification systématique du genre *Hedranthera*

La classification systématique du genre *Hedranthera* est assimilée à celle établie sur *Callichilia* par Cronquist en 1981.

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Asteridae

Ordre : Gentianales

Famille : Apocynaceae

Genre : *Hedranthera*

Figure 12- Classification systématique du genre *Hedranthera* (Cronquist, 1981)

I.4.3. Aperçu botanique du genre *Hedranthera*

Les plantes de ce genre ont les mêmes traits botaniques que celles du genre *Callichilia* avec quelques petites différences. Ce sont des arbustes érigés atteignant 3 m de haut, à latex blanc dans toutes les parties ; les branches brun pâle.

Les feuilles sont opposées, simples et entières ; à stipules absentes ; à pétiole de 2-10 (-15) mm de long ; à limbe elliptique à étroitement ovale, de 3,5-21 cm x 1-9 cm, de base cunéiforme ou décurrense sur le pétiole ; à apex acuminé, parfois aigu, papyracé, plus pâle sur le dessous.

L'inflorescence est une cyme à l'aisselle de bractées écailleuses caduques à l'apex d'une branche, juste en dessous de sa ramification bifurquée, pendante, portant 1 à plusieurs fleurs ; le pédoncule mesure de 5-35 (-43) mm de long ; les bractées peu nombreuses près de l'apex, sont de 2-8 mm de long.

Les fleurs bisexuées, régulières, pentamères, sont odorantes la nuit ; aux sépales soudés à la base, largement à étroitement obovales, de 2-17 mm de long (Brink and Belay, 2006).

La différence entre *Hedranthera* et *Callichilia* rapportée par Pichon, n'est pas vraie dans tous les cas. Selon Pichon, les anthères d'*Hedranthera* sont sessiles, adnées à la corolle et pourvues de gros callosités dorsales, tandis que celles de *Callichilia* sont des basifix avec un filament distinct. Les anthères de *Hedranthera* ont un filament court, qui est caché à la vue par la cal. Il a décrit les anthères de *Hedranthera* comme pourvues d'une perspicacité terminale distincte, et celles de *Callichilia* avec un mucro minute. Il s'est avéré que toutes les *Callichilia* spp., y compris *C. barteri* mais à l'exclusion de *C. orientalis*, sont nettement acuminées.

Selon Pichon le disque de *Hedranthera* est libre, tandis que celui de *Callichilia* est adné à l'ovaire au moins au couloir. Beentje (1978) a constaté que le disque peut être partiellement libre et qu'à cet égard, il existe une certaine variation individuelle à la fois chez *C. barteri* et chez d'autres *Callichilia* spp. Les carpelles de *Hedranthera* sont libres et ceux de *Callichilia*

sont syncarpeux à leur base, selon Pichon. Il a été établi que les carpelles de l'ovaire sont toujours, à un faible degré, syncarpe à leur base extrême (Beentje, 1978).

I.3.4. Distribution géographique du genre *Hedranthera* en Afrique

Le genre *Hedranthera* est limité à l'Afrique. On le retrouve au Nigeria, au Cameroun, au Bénin, au Ghana, ainsi qu'au Zaïre (Congo Brazzaville).



Figure 13- Répartition géographique du genre *Hedranthera* en Afrique (selon Map data 2017)

Notre étude s'est orientée uniquement sur l'espèce *Hedranthera barteri* qui est la seule du genre *Hedranthera*.

I.3.5. L'espèce *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon

I.3.5.1. Introduction

Hedranthera barteri (Hook f.) Pichon (HB) est un arbuste de 2 m de haut appartenant à la famille des Apocynaceae, situé dans les zones humides de la forêt fermée du Ghana, du Nord et Sud Nigeria, de l'Ouest Cameroun, ainsi qu'au Zaïre (Congo Brazzaville). Les grandes fleurs tubulaires blanches parfumées rendent la plante décorative et digne d'être cultivée. La plante contient un latex blanc qui ne coagule pas (Dalziel, 1937). *Callichilia barteri* et *Tabernaemontana barteri* sont des synonymes de cette plante.



Figure 14- Feuilles, tiges et fleurs de *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon (Jardin botanique Meise (Belgique), 2018)

I.3.5.2. Classification botanique de *Hedranthera barteri* selon the Plant List with literature (2020)

Règne: Plantae

Classe : Magnoliopsida

Orde : Gentianales

Famille : Apocynaceae

Sous-famille : Rauvolfioideae

Tribu : Tabernaemontaneae

Genre : *Hedranthera* (Stapf) Pichon

Espèce : *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon

Figure 15- Systématique de *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon

I.3.5.3. Usages Ethnopharmacologiques de *Hedranthera barteri*

Hedranthera barteri est une plante endémique nigériane utilisée en médecine populaire pour le traitement des troubles inflammatoires et des tumeurs douloureuses (Ainslie, 1937).

En effet, son fruit est utilisé pour prévenir les fausses couches chez les femmes (Thomas, 1910). La forme des fruits libres bi-carpelés évoque le nom débile d'Ijaw ("testicules de chèvre") et son nom en Yoruba (Nigera) oko aja signifie "pénis de chien". Ce fruit est pris au Nigeria pour le traitement de la gonorrhée, en tant que fémifuge et est facilement mangé par les animaux sauvages (Ainslie, 1937).

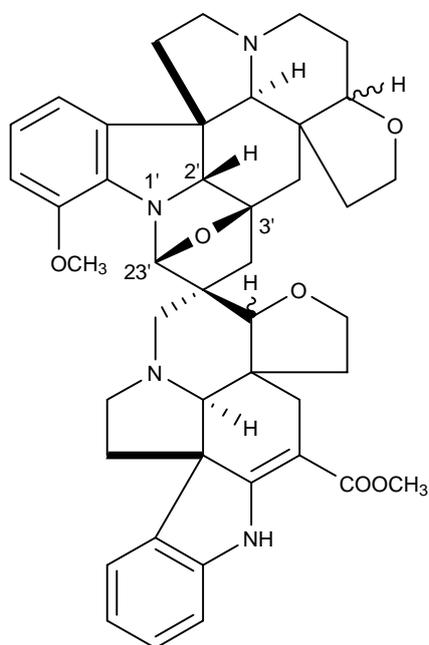
La décoction de feuilles se boit par les Igbo du Sud du Nigéria dans le traitement des étourdissements (Thomas, 1967). Les Yorubas utilisent les exsudats de la feuille pour le traitement des tumeurs douloureuses (Ainslie, 1937), du paludisme et du hoquet (Chukwujekwu et al, 2005). Les Yorubas dans ce contexte font également appel à la plante dans une incantation Odu pour empêcher l'adultère chez les femmes, car un chien en coït a du mal à se retirer

(Thomas, 1967). La plante peut également être un ingrédient, donnée aux enfants (omode) comme laxatif (Dalziel, 1937).

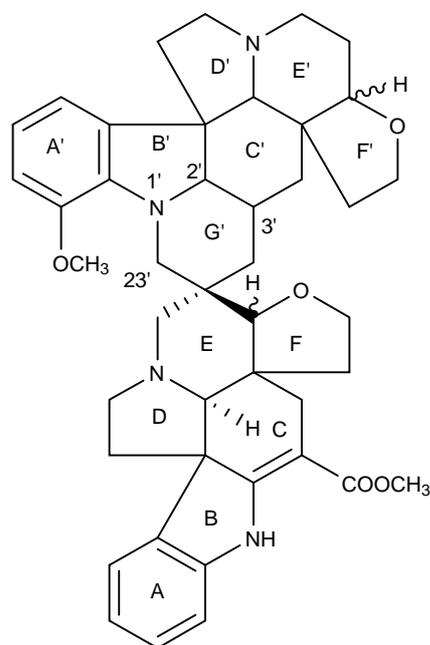
I.3.5.4. Travaux phytochimiques antérieures sur *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon

Il a été démontré que *H. barteri* est une plante riche en alcaloïdes. Ainsi plusieurs alcaloïdes comme l'amataïne (56), la goziline (57), la béninine (58), l'owerreine (60) et la vobtusine (61), ont été isolés (William et Li, 1970 ; Ogunlana et Ramstad, 1975).

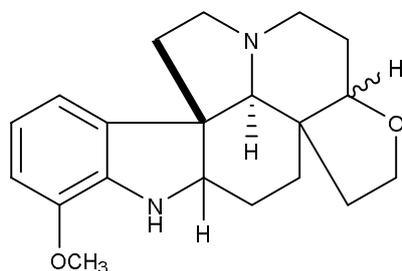
À partir de l'écorce de racine de *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon, ont été isolés les alcaloïdes indoliques nouveaux telles que : l'amataïne (56), la goziline (57), la béninine (58) et l'owerreine (60) ; les alcaloïdes indoliques connus : la vobtusine (61), la voacamine (62), la callichiline (63), voacangine (2) et la conoflorine (59) ainsi que (Agwada et al., 1970).



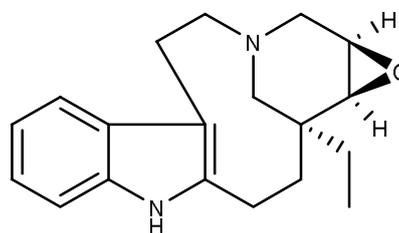
56: Amataïne



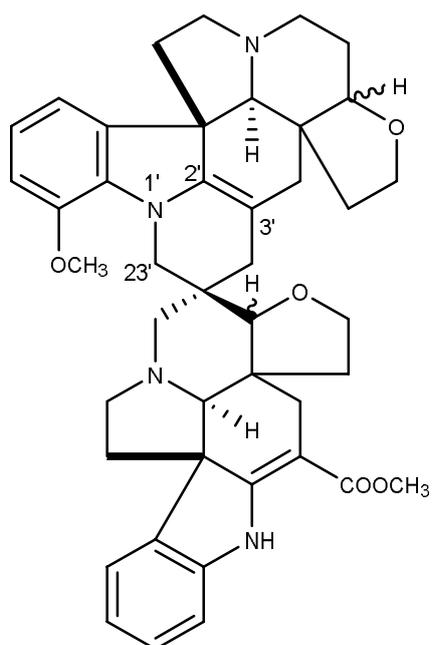
57: Goziline



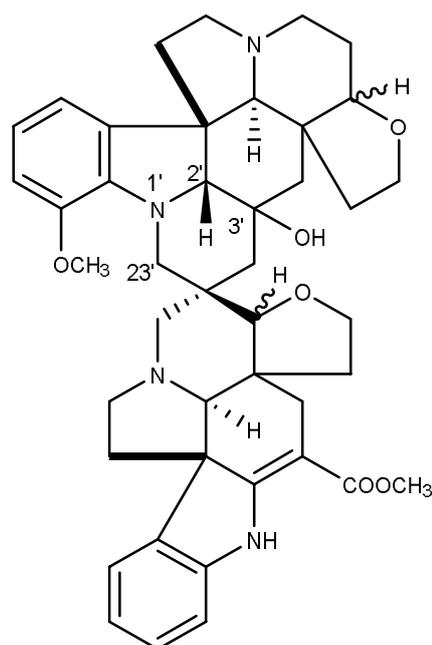
58: Béninine



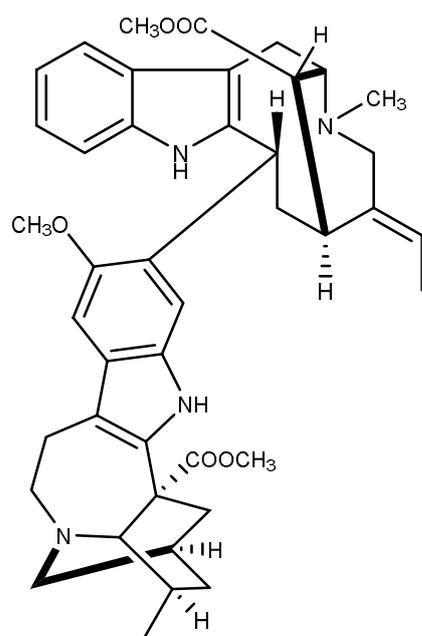
59: Conoflorine



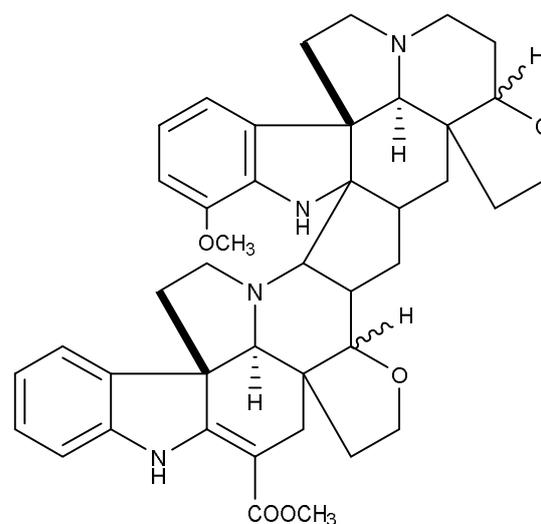
60: Owerreine



61: Vobtusine



62: Voacamine



63: Callichiline

I.3.5.5. Activités biologiques sur *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon

Les études biologiques ont montré que les feuilles d'*Hedranthera barteri* avait une activité antiplasmodiale contre *P. falciparum* à $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Les pourcentages de viabilité des fractions à l'éther de pétrole et au dichlorométhane étaient de 21,86% et de 5,75% respectivement (Chukwujekwu et al., 2005). Il a été démontré que les feuilles possèdent également des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires (Onasanwo et Elegbe, 2006).

Il en ressort, au regard de tout ce qui précède, que les espèces des genres *Tabernaemontana*, *Landolphia* et *Hedranthera* sont des réservoirs présentant une diversité structurale de métabolites secondaires et des activités biologiques intéressantes (traitement du cancer et des maladies microbiennes). Ce qui démontre tout l'intérêt qu'il y'a à poursuivre des recherches sur des plantes de ces trois genres. Ainsi, nous avons entrepris des études chimique et biologique sur les écorces du tronc de *T. contorta*, les lianes de *L. lucida* et les tiges de *H. barteri*. Les résultats obtenus de ces travaux sont présentés dans le chapitre 2.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE A : ETUDES PHYTOCHIMIQUES

II.1. Screening biologique des extraits des plantes récoltées

II.1.1. Introduction

Dans ce travail dont le but est d'isoler des composés actifs, un extrait brut et deux fractions, ont été préparés selon le protocole d'extraction standard décrit au Chapitre III. Il s'agit de l'extrait au méthanol et des fractions à l'AcOEt des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* et des lianes de *Landolphia lucida*. Ces deux plantes ont été choisies sur la base de leurs utilisations en médecine traditionnelle. Les activités biologiques ainsi sélectionnées dans le cadre de notre travail sont :

- Radicalaire (D.P.P.H);
- Anticancereuse contre le cancer du colon (Caco2) ;
- Antibactériennes (MABA) contre *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E.c*), *Bacillus subtilis* ATCC 23857 (*B.s*), *Staphylococcus aureus* NCTC 6571(*S.a*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (*P.a*), *Salmonella typhi* ATCC 14028 (*S.t*);
- Cytotoxique (Brine Shrimp) contre *Artemia salia* (*A.s*) ;

Ces tests donnent un premier aperçu des molécules biologiquement actives contenues dans les différentes fractions et extrait brut. Les résultats sont consignés dans le tableau 2 ci-dessous. Les protocoles et le matériel utilisés lors de ce criblage ainsi que le procédé d'extraction du matériel végétal sont décrits au Chapitre III.

Tableau 2- Résultats du screening biologique effectué sur l'extrait brut et la fraction à l'AcOEt de *Tabernaemontana contorta* et sur la fraction à l'AcOEt de *Landolphia lucida*

Activité(s)	Souche(s)	Contrôle	Concentration		Résultats de <i>T. contorta</i>		Résultats de <i>L. lucida</i>
			Contrôle	Extrait/ Fraction	Extrait au MeOH	Fraction à l'AcOEt	Fraction à l'AcOEt
Antibactérienne	<i>E.c</i>	ofloxacin	1000 µg/mL	3000 µg/mL	-	-	+
	<i>B.s</i>				-	-	-
	<i>S.a</i>				-	-	(+)
	<i>P.a</i>				-	-	-
	<i>S.t</i>				-	-	-
Cytotoxique	<i>A.s</i>	Etoposide		10; 100; 1000 µg/mL	-	-	-
Antioxydant		N-Acetyl- L-Cystéine	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL	-	-	++
		Acide Gallique			-	-	-

- : pas d'activité (+): activité faible +: activité moyenne ++: activité forte

II.1.2. Discussion

Parmi l'extrait brut et les fractions testés, la fraction à l'acétate d'éthyle des lianes de *Landolphia lucida* a montré une faible activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* NCTC 6571(*S.a*) et une activité moyenne sur *E. coli* ATCC 25922 (*E.c*) en utilisant la méthode standard de micro dilution (Rahman, 2001). Ces lianes possèdent également une bonne activité antioxydante comparé au contrôle positif (N-Acetyl-L-Cysteine).

Ces résultats sont critiquables, car bien que l'activité d'un extrait brut soit due à l'activité intrinsèque des composantes actives et de leur quantité relative, un résultat négatif peut être la conséquence de la présence d'une faible quantité de produits actifs dans l'extrait que d'une grande quantité de produits non actifs.

L'extrait au méthanol et la fraction à l'AcOEt des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta*, ainsi que la fraction à l'AcOEt des lianes de *Landolphia lucida* n'ont pas présenté de toxicité ce qui est en accord avec leurs utilisations en pharmacopée traditionnelle.

II.2. Investigation phytochimique des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta*, des lianes de *Landolphia lucida* et des tiges de *Hedranthera barteri*.

II.2.1. Introduction

T. contorta, *L. lucida* et *H. barteri* ont particulièrement retenu notre attention et ont été sélectionnées pour être soumises à une investigation phytochimique approfondie.

En effet, ceci a été motivé par le fait que *T. contorta* est une plante médicinale, aux vertus cicatrisantes (Quattrocchi, 2012). Au Cameroun, ses feuilles sont utilisées pour prévenir contre la formation des chéloïdes (cicatrices épaisses après la guérison d'une blessure) et comme antiseptiques (Burkill, 1985). De plus, quelques alcaloïdes indoliques ayant des propriétés chimiopréventives et non anti-inflammatoires ont été isolées des racines et des fruits de cette plante respectivement (Ndongo et *al.*, 2017 ; Melacheu et *al.*, 2019).

H. barteri est une plante médicinale utilisée pour le traitement des troubles inflammatoires, des tumeurs douloureuses (Ainslie, 1937) et du paludisme (Chukwujekwu et *al.*, 2005). De plus, cette plante est riche en alcaloïdes antibactériens (Ogunlana et Ramstad, 1975).

Quant à *L. lucida*, le fait qu'elle n'ait pas subi d'études biologiques et phytochimiques antérieures pourrait constituer un intérêt.

II.2.2. Screening chimique général des extraits des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta*, des lianes de *Landolphia lucida* et des tiges de *Hedranthera barteri*.

Les extraits bruts au méthanol des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* et des tiges de *Hedranthera barteri*, ainsi que la fraction à l'AcOEt des lianes de *Landolphia lucida* ont été soumis à différents tests chimiques afin d'en déterminer leurs éventuelles compositions. Ce criblage chimique a permis de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes (Dragendorff, coloration orange), de coumarines (NaOH (10%), Fluor. verte à 366 nm), de triterpènes, de stéroïdes (Liebermann Burchard; CHCl₃, Ac₂O, H₂SO₄ conc.), de flavonoïdes (Shinoda; MeOH, Mg, HCl conc), et de phénols dans les extraits étudiés (Bruneton, 1993 ; Sofowora, 1993). Les résultats du screening chimique sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3- Résultats du screening chimique effectué sur les extraits au méthanol de *T. contorta*, *H. barteri* et la fraction à l'AcOEt de *L. lucida*

Métabolites secondaires	Tests	Résultats de <i>T. contorta</i>	Résultats de <i>L. lucida</i>	Résultats de <i>H. barteri</i>
Flavonoïdes	SHINODA (MeOH, Mg, HCl conc)	+	++	-
Alcaloïdes	DRAGGENDORF (HCl, réactif de Dragendorff)	++	-	++
Triterpènes	LIEBERMANN-BURCHARD (CHCl ₃ , Ac ₂ O, H ₂ SO ₄ conc)	++	+	+
Stéroïdes		+	++	+
Coumarines	NaOH (10%), UV	-	+	-
Phénols	(FeCl ₃ , H ₂ O) + (K ₃ [Fe(CN) ₆])	+	+	-

Légende : (+) Présence de la classe de composé; (++) Abondance du composé;

(-) Absence de la classe de composé.

Il ressort du tableau 3 que l'extrait brut des écorces du tronc de *T. contorta* contient les alcaloïdes et les triterpènes en grande majorité. Ce qui est en accord avec les résultats de Ndongu et *al.* (2017) qui ont montré que *T. contorta* est riche en alcaloïdes indoliques.

Les résultats du screening chimique effectué sur l'extrait des lianes de *L. lucida* s'apparentent à ceux de Ezike et *al.* (2016) qui ont montré que la fraction à l'AcOEt des feuilles de *Landolphia owariensis* est très riche en : flavonoïdes et stéroïdes (Ezike et *al.*, 2016).

L'extrait brut au méthanol des tiges de *H. barteri* contient en majorité les alcaloïdes. Ce qui s'accorde avec les résultats obtenus précédemment par Naranjo et son collaborateur (Naranjo et Schmid, 1972) montrant que cette plante est très riche en alcaloïdes.

Nous constatons au terme de nos investigations, que les trois plantes n'ont connu aucun travail relatant les propriétés antitumorales et antidiabétiques. Pourtant, *L. lucida* contient des composés tels que: des flavonoïdes et les phénols. Comme nous l'avons mentionné au screening chimique, il existe également de nombreux travaux sur les activités antibactériennes, antitumorales et antidiabétiques de ces familles des composés (Tochukwu et al., 2016 ; Mireku et al., 2017). Nous avons donc entrepris une investigation phytochimique plus approfondie sur *T. contorta*, *L. lucida* et *H. barteri* en vue de retrouver les composés responsables de ces activités.

II.2.3. Analyses UPLC et LC-MS/MS des extraits des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* et des lianes de *Landolphia lucida*

L'UPLC fait référence à la chromatographie liquide ultra performante, qui s'améliore dans trois domaines: « vitesse, résolution et sensibilité ». Ce système utilise des particules fines (moins de 2,5 μm), ce qui réduit la longueur de la colonne, fait gagner du temps et réduit la consommation de solvant. C'est une technique similaire à la HPLC (Michael, 2005). L'UPLC fournit des capacités de détection des pics pour identifier les composés dans des échantillons très complexes qui résultent de produits naturels et de plantes (Srivastava et al., 2010). Cette technique peut être facilement couplée avec diverses autres techniques telles que la spectrométrie de masse.

Après dilution de nos deux espèces dans le méthanol, l'injection de ces dernières et l'élution à polarité croissante au MeOH/H₂O, a permis d'obtenir différents profils UPLC à des longueurs d'onde différentes (Figs. 16 et 17).

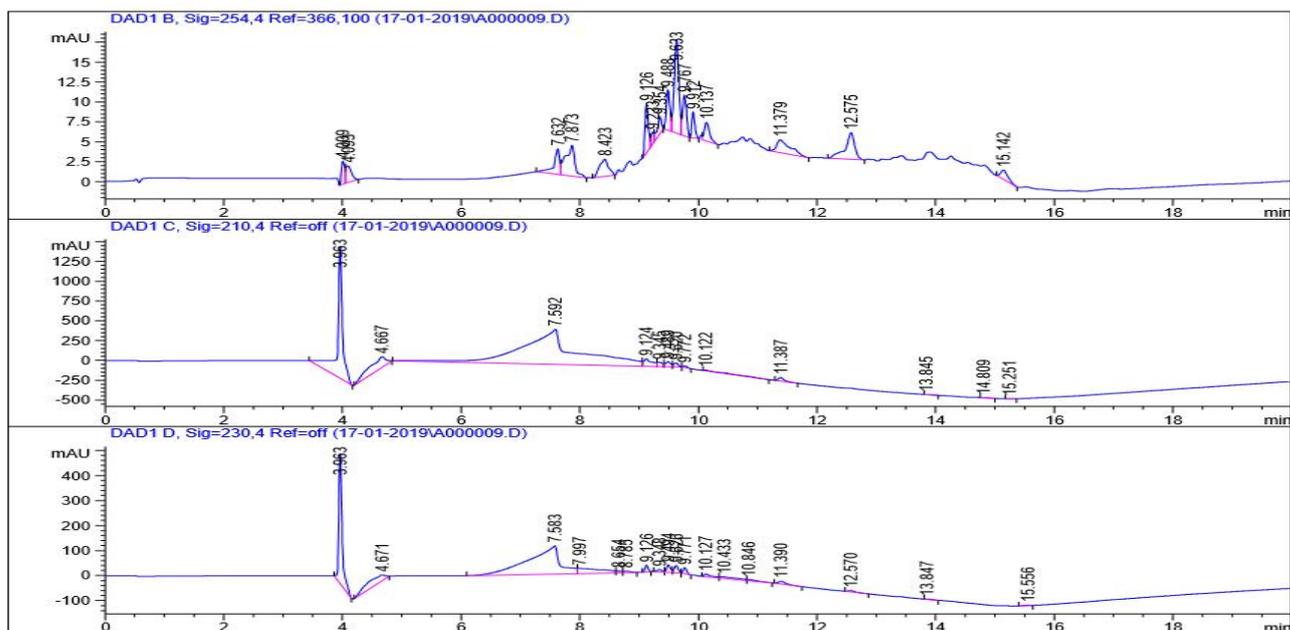


Figure 16- Profils UPLC de l'extrait à l'AcOEt de *T. contorta*

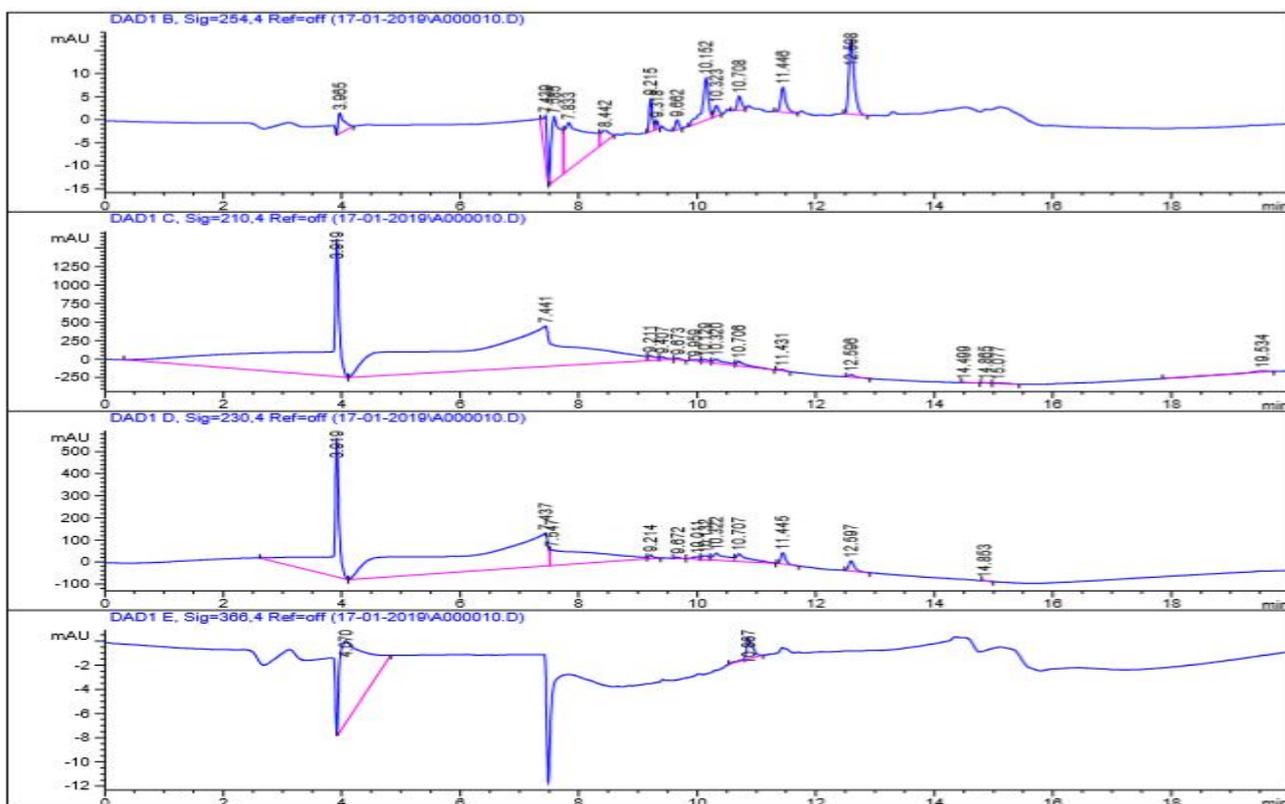


Figure 17- Profils UPLC de l'extrait à l'AcOEt de *L. lucida*

De ces profils, il ressort que la longueur d'onde de 254 nm est celle qui permet de détecter les pics d'intérêt des métabolites secondaires contenus dans les écorces du tronc de *T. contorta* et les lianes de *L. lucida* avec leurs différents temps de rétention. Cette longueur

d'onde pourrait aussi indiquer la présence dans nos deux espèces, des composés polaires tels que les alcaloïdes et les flavonoïdes.

Dans le cadre de ce travail, l'UPLC a permis de faciliter le choix du type de colonne, de la méthode à utiliser et de la préparation des échantillons pour l'analyse LC-MS/MS de nos deux espèces de plantes afin de faciliter l'identification des différents métabolites secondaires. En effet, la principale technique de bioanalyse quantitative est la LC-MS/MS. Elle est grandement utilisée pour la quantification de petites molécules, médicaments et métabolites dû à la très bonne spécificité et sélectivité acquise par l'analyse d'une transition de masse spécifique à la molécule d'intérêt. De manière générale, la LC-MS comprend un spectromètre de masse et seul l'ion précurseur sera analysé tandis que la LC-MS/MS est constitué d'un spectromètre de masse en tandem qui permet l'analyse de l'ion précurseur et des ions fragments.

Pour nos deux espèces, les profils LC-MS/MS obtenus sont données ci-dessus :

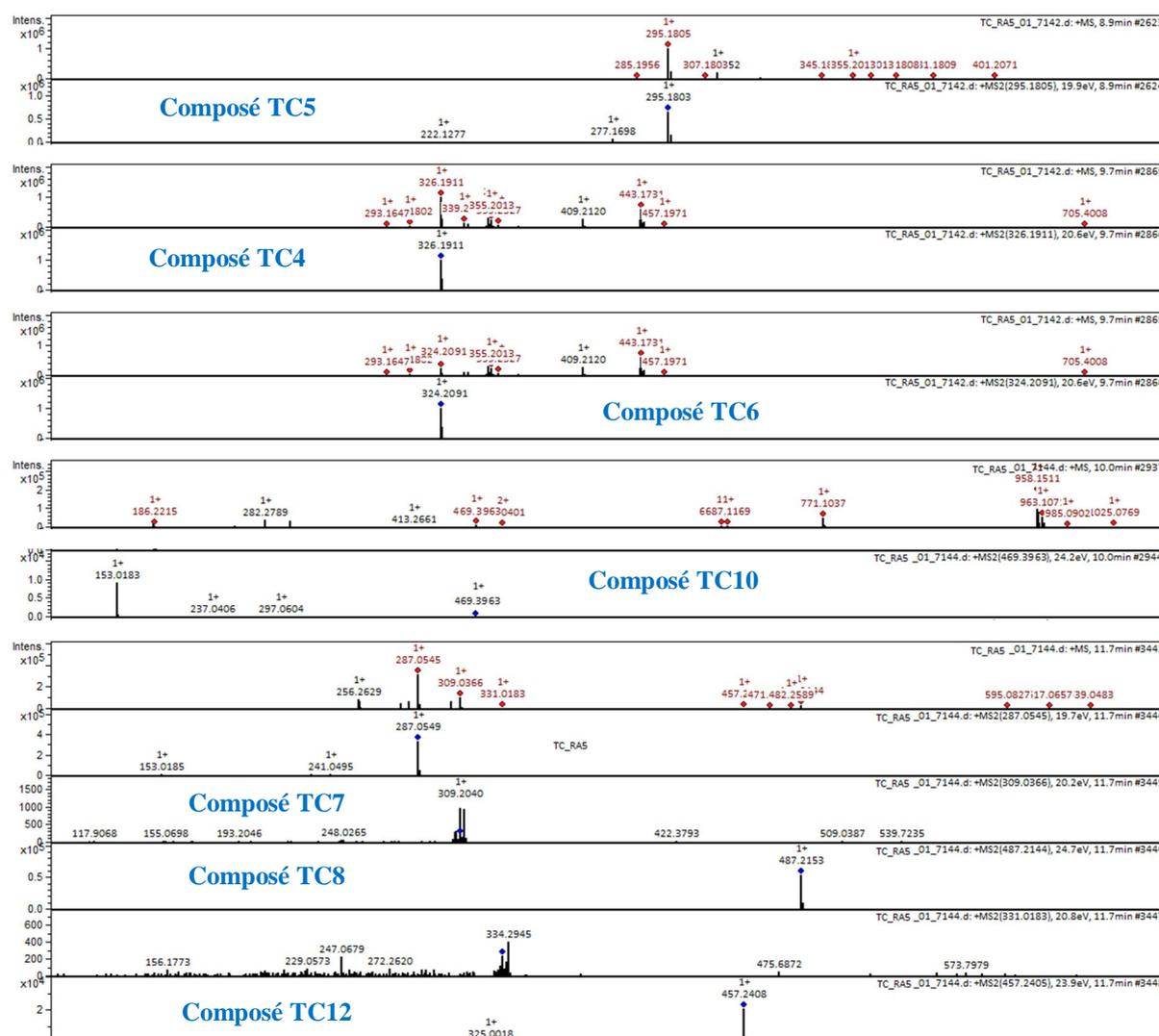


Figure 18- Profils LC-MS/MS de l'extrait à l'AcOEt de *T. contorta*

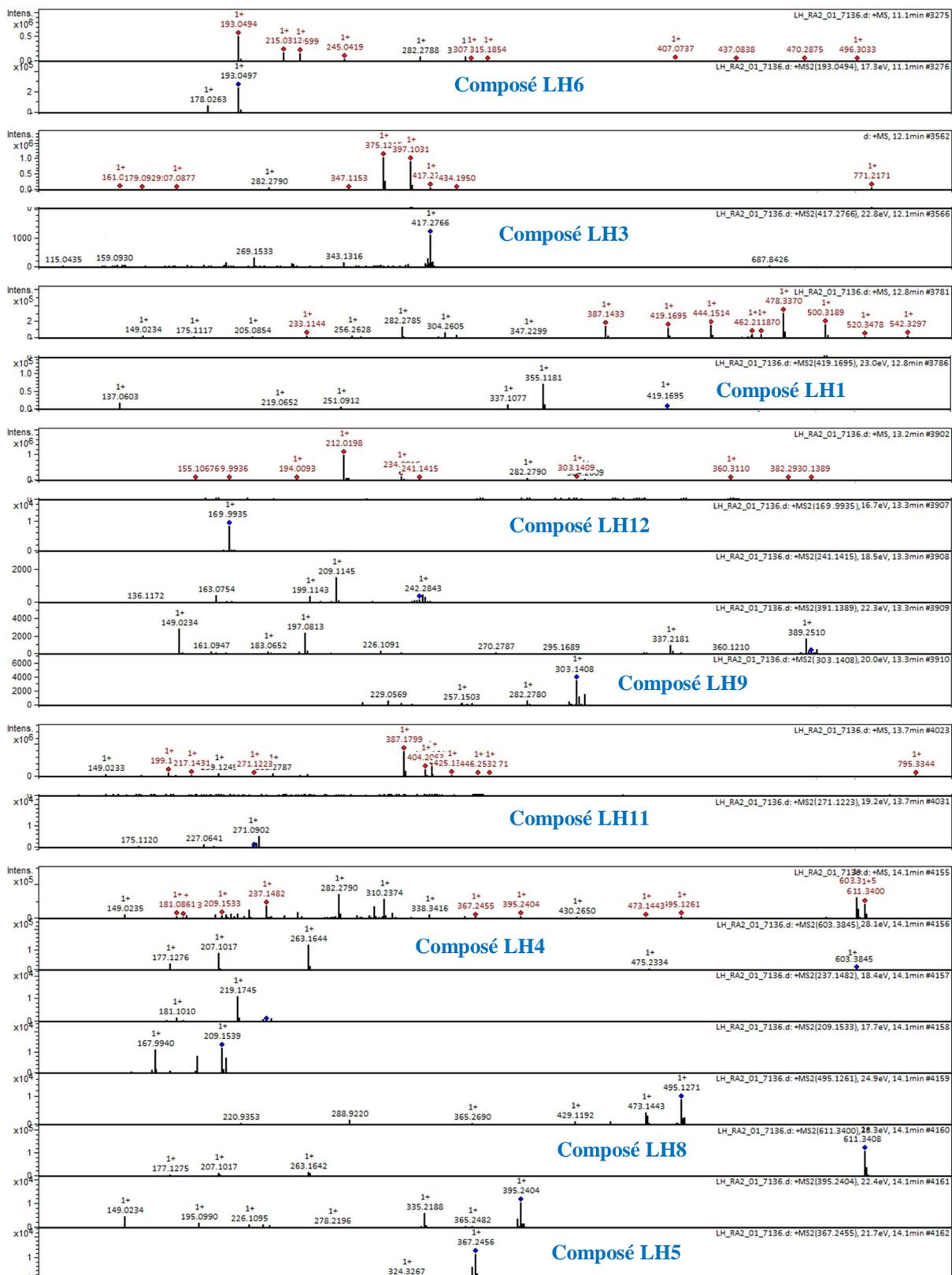


Figure 19- Profils LC-MS/MS de l'extrait à l'AcOEt de *L. lucida*

Il ressort de cette analyse que les composés d'intérêt et biomarqueurs ont été identifiés mais pas tous. En effet, pour certains métabolites à l'égard des protéines ou de peptides, la résolution de la LC-MS/MS pour sélectionner les ions d'intérêts et les séparer des interférents

biologiques n'est pas suffisante ce qui en limite le niveau de détection (Sherman et al., 2009). Pour remédier à ce problème, l'utilisation de la LC-HR/AM («High Resolution/Accurate Mass») ou LC-HR/MS («High Resolution/Mass Spectrometry») est requise.

Vu l'intérêt que les extraits de ces plantes ont suscité tant lors du screening biologique que chimique, leur fractionnement et purification successives ont été entreprises. Ainsi, de l'extrait à l'AcOEt des écorces du tronc de *T. contorta*, 12 composés indexés de **TC1** à **TC12** (64 – 75) ont été isolés ; et de l'extrait à l'AcOEt des lianes de *L. lucida*, 12 composés indexés de **LH1** à **LH12** (76 – 77) ont également été isolés. Bien que l'extrait au méthanol et la fraction alcaloïdique des tiges de *Hedranthera barteri* n'ont pas subi de screening biologique, 05 composés indexés de **HB1** à **HB5** ont été isolés.

II.2.4. Etude phytochimique des écorces du tronc de *T. contorta*

II.2.4.1. Extraction et isolement des composés

Les écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* Stapf ont été découpées, séchées à l'air libre puis broyées finement. La poudre obtenue (1,4 kg) a été extraite au MeOH à froid sous agitation pendant 48 heures. L'extrait brut (163 g) a été dissout partiellement dans 500 mL d'eau distillée et partitionné avec 500 mL d'hexane et 500 mL d'acétate d'éthyle. Après concentration et évaporation des différents solvants, les phases organiques ont donné 12,7 et 72,8 g d'extrait respectivement. La phase aqueuse a été évaporée et séchée pour donner 30,4 g de résidu. L'extrait à l'acétate d'éthyle (72,8 g) a été soumis à des fractionnements par chromatographie sur colonne (CC) sur gel de silice (32–40 µm) (CH₂Cl₂/MeOH de polarité croissante) pour donner huit fractions indexés de A à H sur la base des profils obtenus par chromatographie sur couche mince : A (CH₂Cl₂/MeOH, 50:1; 3,8 g), B (CH₂Cl₂/MeOH, 40:1; 19,2 g), C (CH₂Cl₂/MeOH, 35:1; 6,2 g), D (CH₂Cl₂/MeOH, 30:1; 3,4 g), E (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1; 5,7 g), F (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1; 6,3 g), G (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1; 2,6 g) et H (CH₂Cl₂/MeOH, 1:1; 9,4 g). La fraction B (19,2 g) a été soumise à une CC répétitive sur gel de silice (32–40 µm) avec CH₂Cl₂/MeOH (0 à 20%) comme solvant d'élution pour donner 7 sous-fractions (B₁ – B₇). La sous fraction B₁ (8.1 g) a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice (32–40 µm) avec CH₂Cl₂/MeOH (30:1) comme solvant d'élution pour donner trois composés indexés **TC8** (7 mg), **TC9** (5 mg) et **TC10** (10 mg). Par la suite, la sous-fraction B₂ (6,2 g) a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice (32–40 µm) avec le système Hex/AcOEt (1 à 50%) comme phase mobile pour donner cinq composés indexés **TC7** (7 mg), **TC4** (6 mg), **TC5** (4,5 mg), **TC11** (4,3 mg) et **TC12** (4 mg). Une purification supplémentaire de la sous-fraction B₇ (600 mg) a été effectuée sur une colonne de gel de silice (32–40 µm) avec

$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20 : 1) comme solvant d'éluion pour donner quatre composés **TC1** (5,5 mg), **TC2** (3,4 mg), **TC7** (5,2 mg) et **TC6** (3,3 mg).

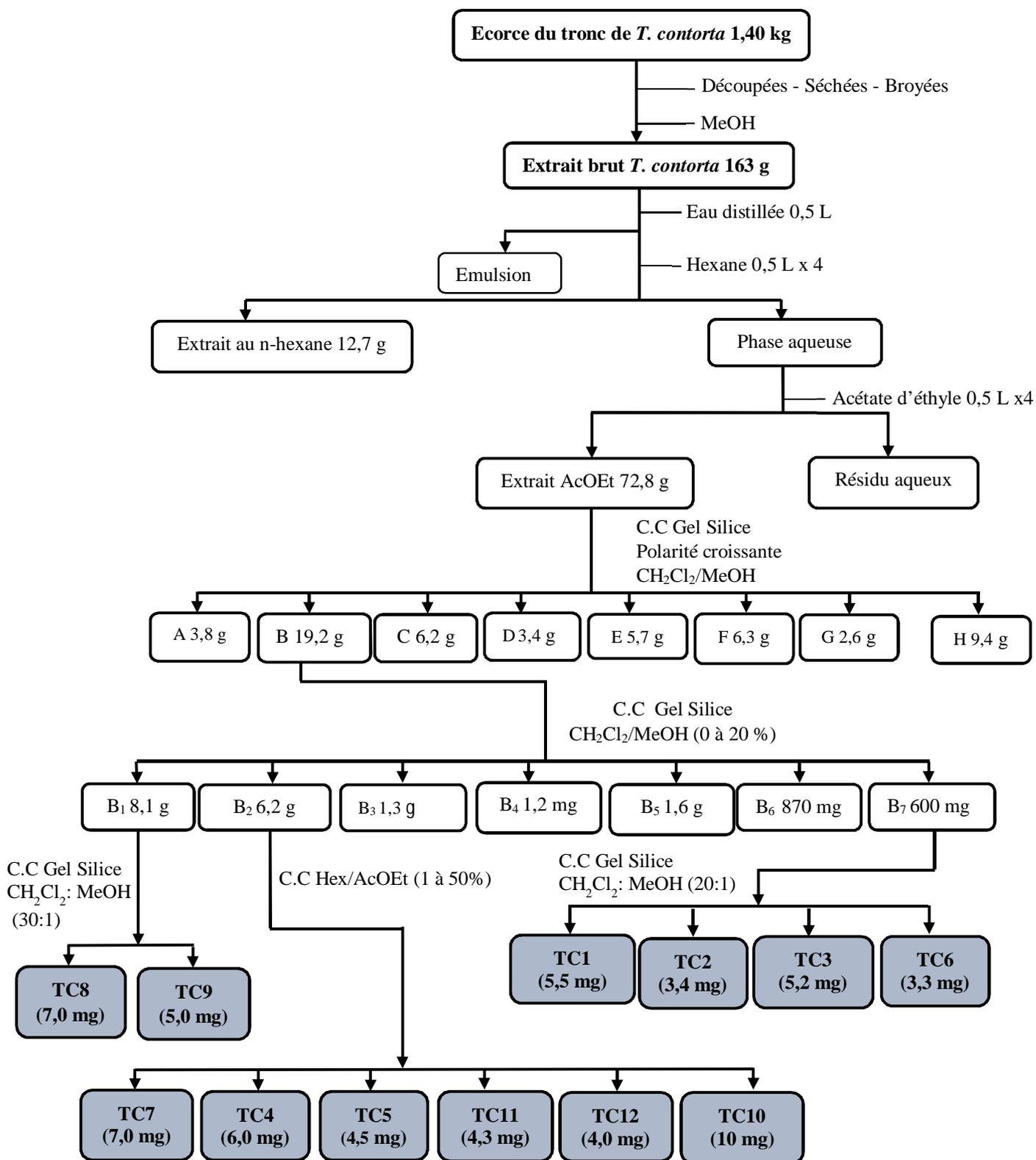


Schéma 1- Protocole d'extraction et isolement des composés des écorces du tronc de *T. contorta*

II.2.4.2 Caractérisation chimique des composés isolés de *T. contorta*

II.2.4.2.1. Détermination structurale de TC1

TC1 se présente sous forme de solide blanc amorphe, $[\alpha]_D^{25} - 27,5$ (c 0,020 ; CHCl₃/MeOH) et soluble dans le MeOH. Son spectre de masse HRESI (Fig. 20) montre le pic de l'adduit sodique $[M+Na]^+$ à m/z 866,67244 (calc. 866,6799) avec l'ion fragment à m/z 381. Cette masse correspond à la formule moléculaire C₄₈H₉₃O₁₀N ayant trois degrés d'insaturations.

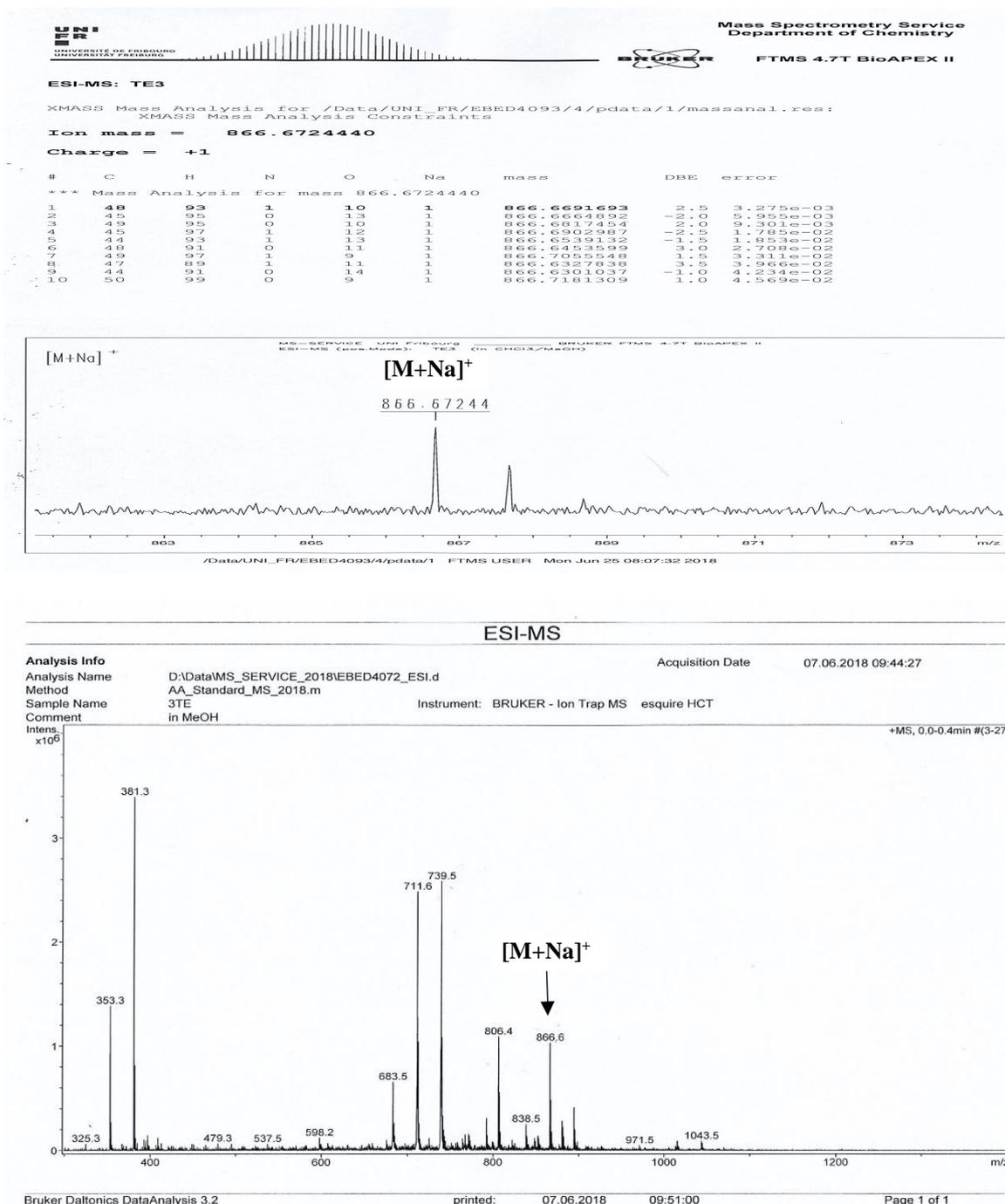


Figure 20- Spectres de masse HRESI-MS et ESI-MS du composé TC1

Son spectre IR (Fig. 21) montre des bandes d'absorption à 3393 et 3313 cm^{-1} (NH et OH libres), 1737 cm^{-1} (carbonyle de l'amide), 2920–2851 cm^{-1} (chaîne aliphatique), 1467–1631 cm^{-1} (double liaison C=C), 1079 et 1034 cm^{-1} pour les absorptions de la liaison C-O-C.

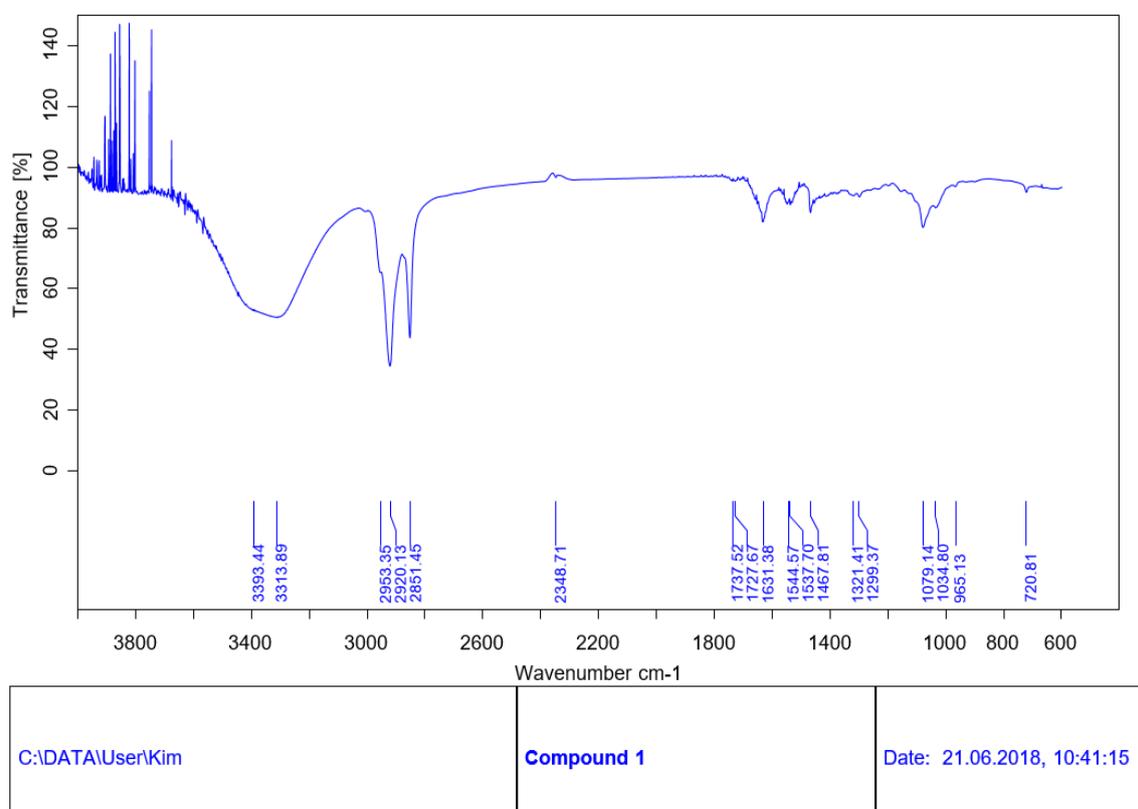


Figure 21- Spectre Infrarouge sur disque de AgCl de TC1

Le spectre RMN ^1H (Fig. 22) de **TC1** montre la présence de plusieurs signaux correspondant à différentes familles de protons. Ainsi on observe un singulet large bande à δ_{H} 1,28-1,40 (brs) attribuable aux protons méthyléniques (H-9–16 ; H-4'–24'), un triplet de six protons à δ_{H} 0,89 (6H, t, H-17 ; H-25', $J = 6,7$ Hz) correspondant à deux méthyles terminaux, ce qui suggère la présence de deux longues chaînes aliphatiques. On observe également deux signaux de protons géminés à un hétéroatome à δ_{H} 4,02 (1H, dd, H-1a ; $J = 7,2 ; 14,8$ Hz) et 3,79 (1H, dd, H-1b, $J = 7,2 ; 14,8$ Hz). Le signal à δ_{H} 4,29 (1H, d, H-1'', $J = 7,8$ Hz), indique la présence d'un proton anomérique d'un résidu de sucre et sa constante de couplage laisse entrevoir la configuration β du glucose ; l'ensemble de ces informations nous permet de suggérer la structure d'un sphingolipide (Huang et *al.*, 1995). De plus, nous observons deux doublets de triplet de deux protons oléfiniques à δ_{H} 5,41 (1H, dt, H-6, $J = 14,4$ Hz) et 5,36 (1H, dt, H-7, $J = 14,4$ Hz) suggérant que cette molécule contient une double liaison de type *trans*.

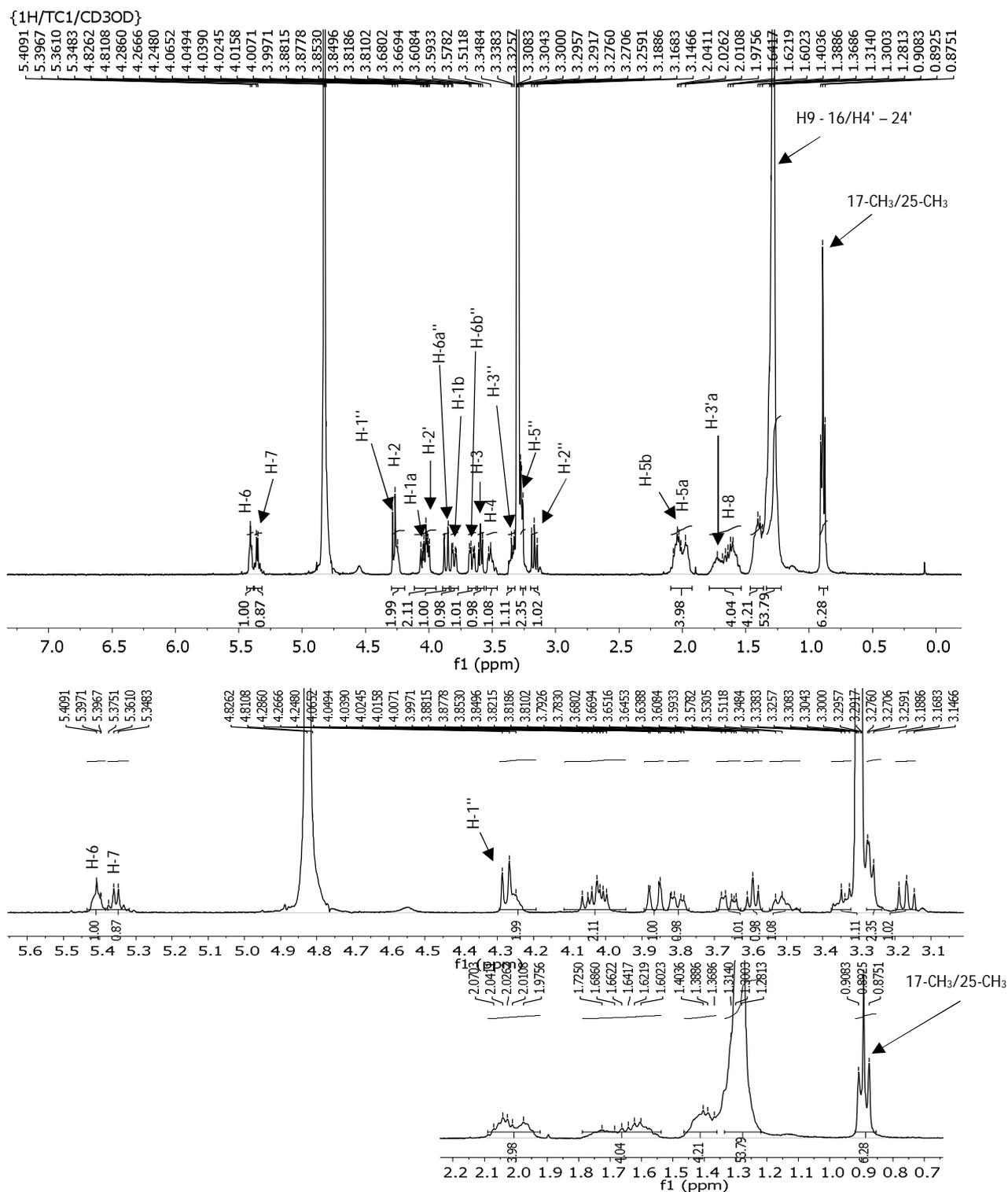
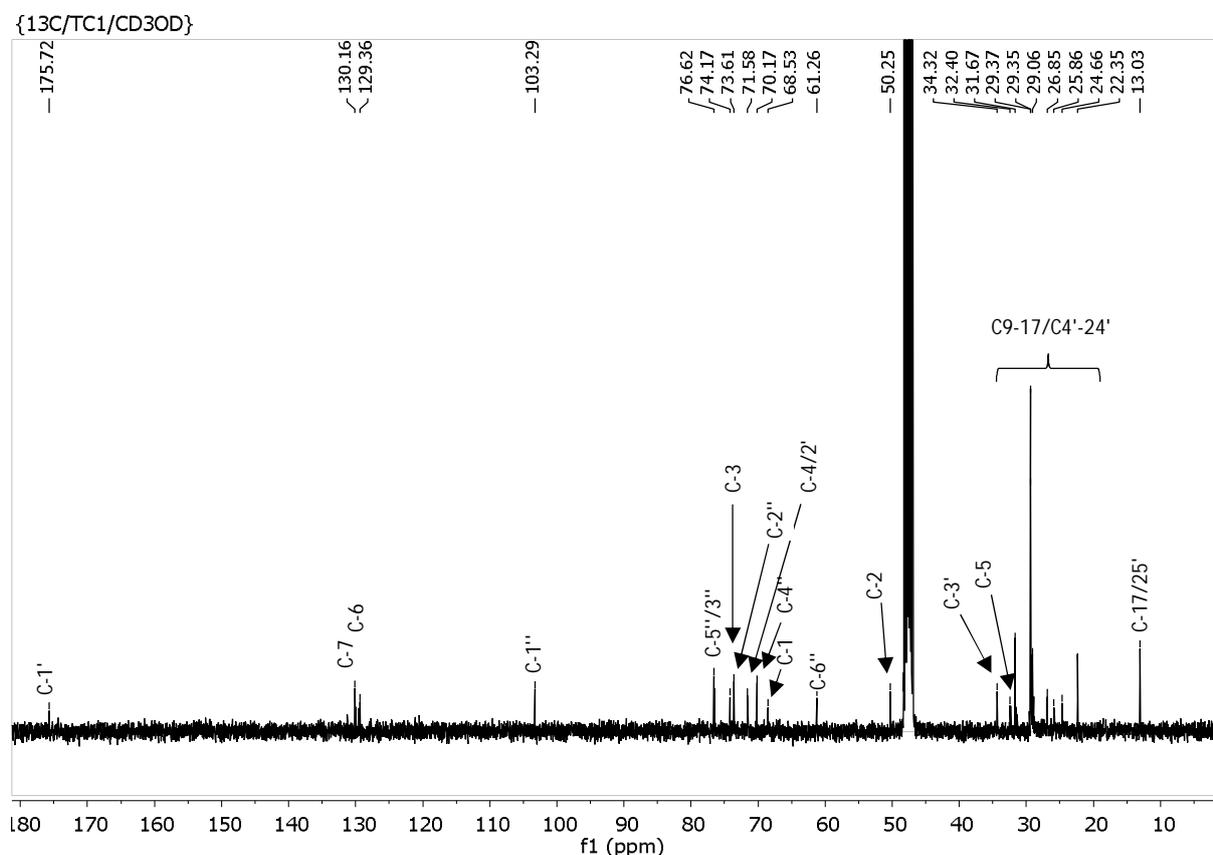


Figure 22- Spectre de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de TC1

Son spectre RMN ^{13}C (Fig. 23) montre 23 signaux de carbone, avec les signaux à δ_{C} 103,3 ; 73,6 ; 76,5 ; 70,2 ; 76,6 et 61,3 confirmant la fraction glucopyranose, un carbone de méthine lié à l'azote à δ_{C} 50,3 (C-2), un carbone oxyméthylène résonnant à δ_{C} 68,5 (C-1), ainsi que trois résonances de carbones oxyméthine à δ_{C} 74,2 (C-3) ; 71,2 (C-4) ; 71,6 (C-2') et un

signal du carbonyle de l'amide à δ_C 175,7 (C-1'). La liaison $\Delta^{6,7}$ oléfinique a été confirmée comme ayant une configuration (*E*) comme en témoignent la constante de couplage ($J = 14,4$ Hz), ainsi que les déplacements chimiques de C-5 à (δ_C 32,4) et C-8 (δ_C 32,0) (Ji et al., 2010). En règle générale, les signaux d'un carbone à côté d'une double liaison *trans* apparaissent entre δ_C 32–33 (Huang et al., 2010), tandis que ceux à côté d'une double liaison *cis* apparaissent entre δ_C 27–28. Cette configuration est également confirmée par la bande à 965 cm^{-1} dans le spectre IR, vibration de déformation de la liaison = C-H, caractéristique d'un système R-CH = CH-R' *trans* (Lui et al., 1999).

Le spectre DEPT 135 a permis d'avoir le nombre de carbones qui portent les protons et l'attribution de chaque proton à son carbone a été faite à l'aide du spectre HSQC (Tableau 4).



L'analyse du spectre de corrélations hétéronucléaires, observées à longue distance et celui du spectre de corrélations homonucléaires a permis d'établir les liaisons entre les sous structures sus citées (Tableau 4). En effet, dans le HMBC (Fig. 25), le proton à δ_H 2,01 (H-5) montre une corrélation 2J avec le carbone à δ_C 129,4 (C-6), tandis que des signaux croisés HMBC et COSY (Fig. 24) sont observés entre C-6 et le proton oléfinique à δ_H 5,41 (H-6), H-5 et H-6, H-5 et H-4 et entre H-4 et H-3, respectivement.

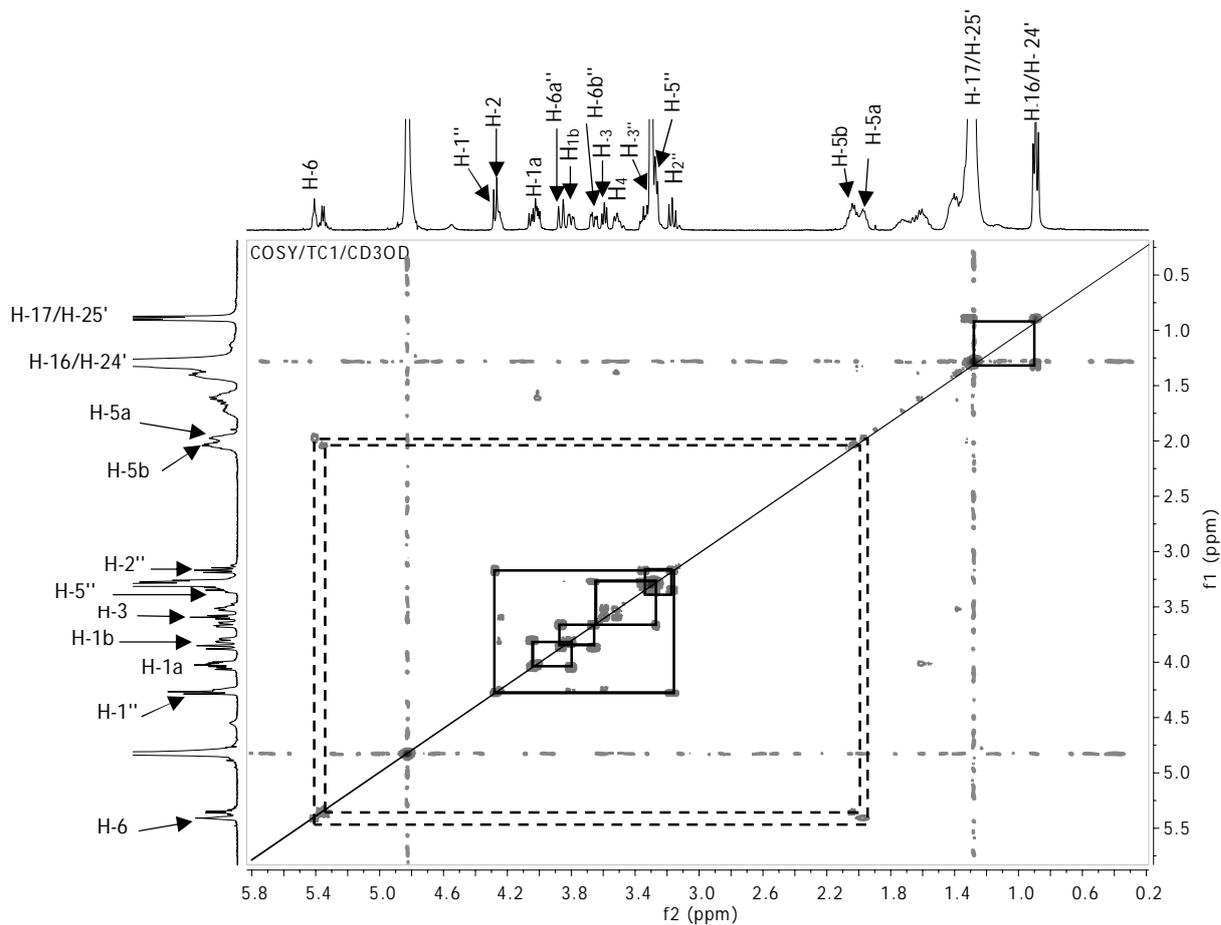


Figure 24- Spectre COSY (400 MHz, CD₃OD) de TC1

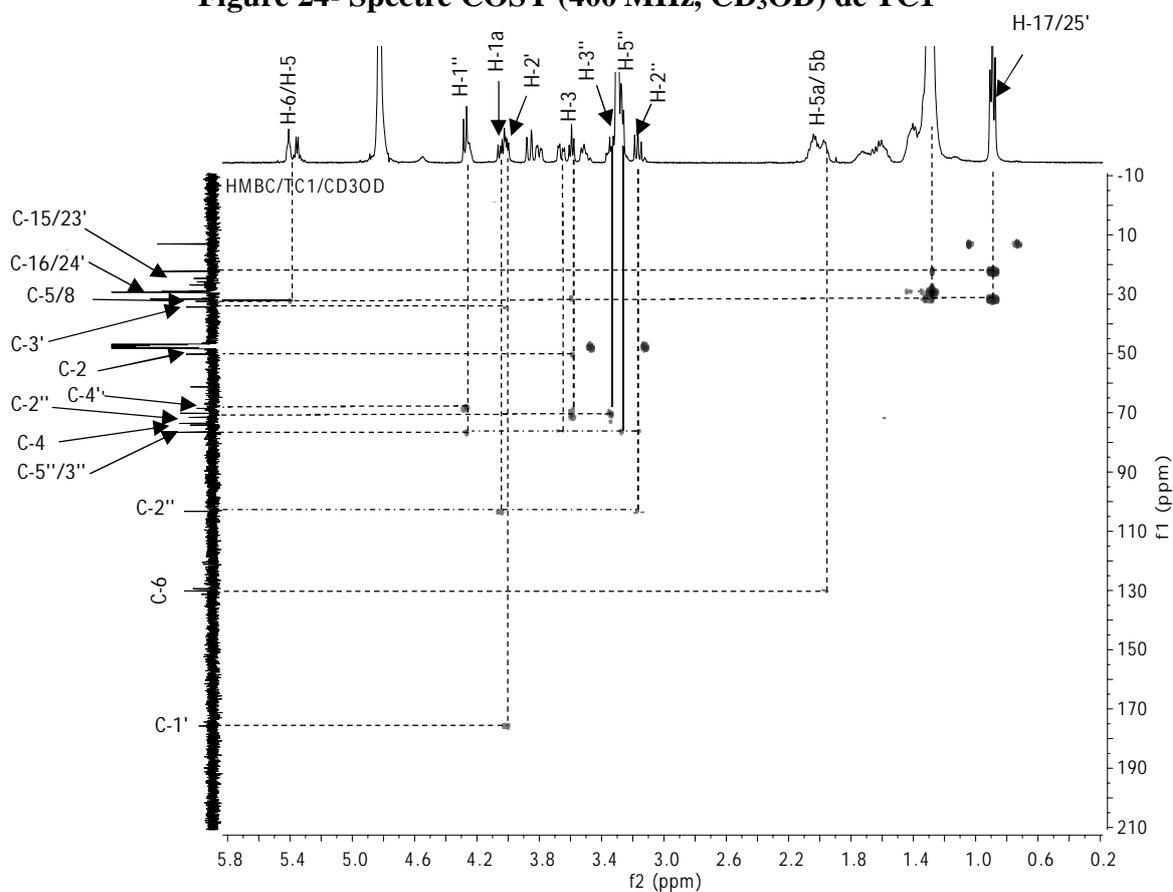
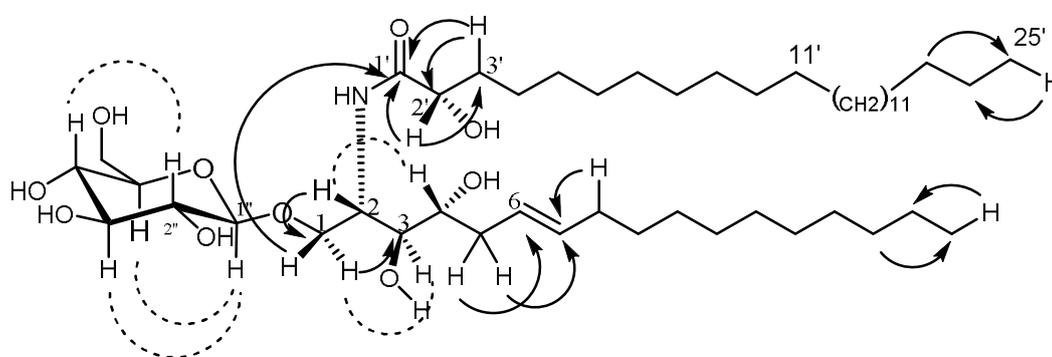
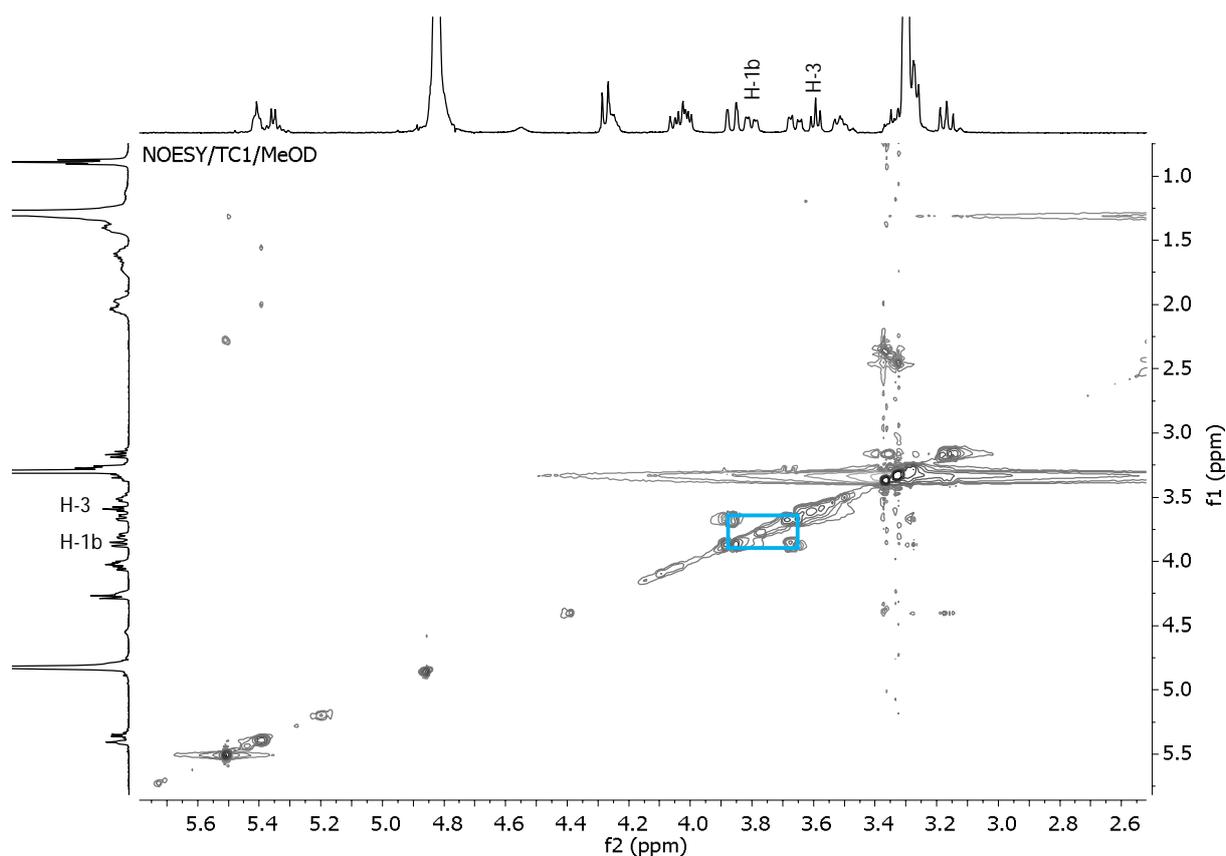


Figure 25- Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD) de TC1

Le spectre NOESY (Fig. 26) a permis la localisation spatiale des groupes hydroxyle dans la sphingosine. Ce spectre montre des interactions entre les protons à δ_H 3,57 (H-3) et 3,79 (H-1b) soutenant que les deux protons sont dans la même orientation spatiale. Les configurations absolues de C-2 et C-3 dans tous les sphingolipides isolés de plantes naturelles sont respectivement de *2S*, *3R* (Karlsson, 1970). Les configurations relatives de C-4 et C-2 sont déterminées comme étant *R* et *S* respectivement par comparaison aux déplacements chimiques précédemment rapportées dans la littérature (Gao *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2003).



La méthanolyse (0,9N HCl-MeOH/70°C/18h) de **TC1** a conduit au mélange de méthyle ester d'acide gras et de la longue chaîne basique (amino-alcool). L'analyse par spectrométrie de masse ESI (mode positif) a permis de détecter le pic de l'ester d'acide gras à m/z 413,5 (Fig. 27) correspondant au 2-hydroxypentacosanoate de méthyle et d'en déduire la longue chaîne basique (LCB) (Schéma 3).

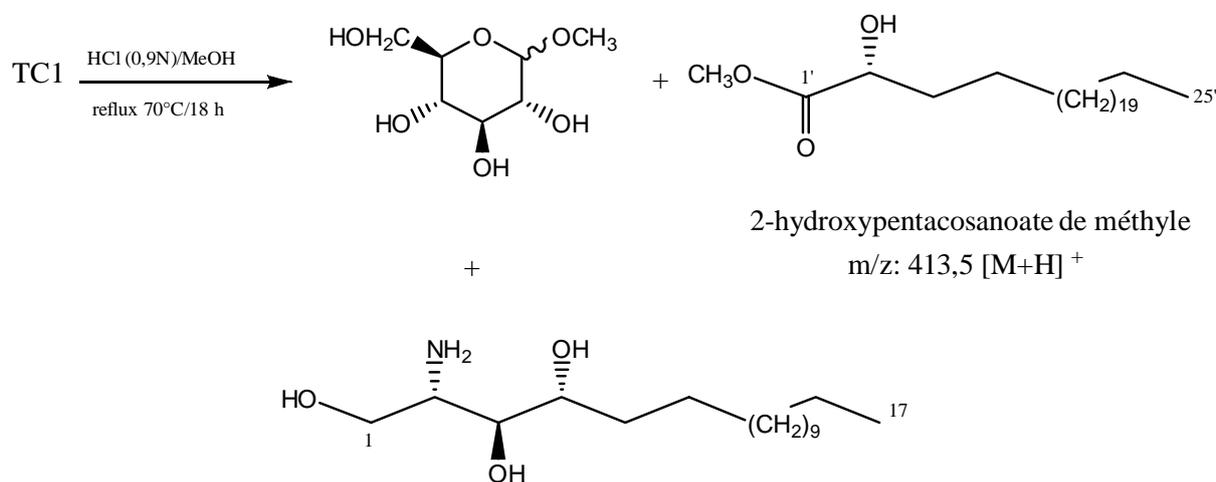


Schéma 3- Méthanolyse de TC1

2-hydroxypentacosanoate de méthyle: ESI-MS m/z : 413,5 $[M+H]^+$, 393,5 $[M-H_2O-H]^+$, 365,5 $[M-C_{25}H_{50}O-H]^+$, 310,5 $[C_{22}H_{45} + H]^+$.

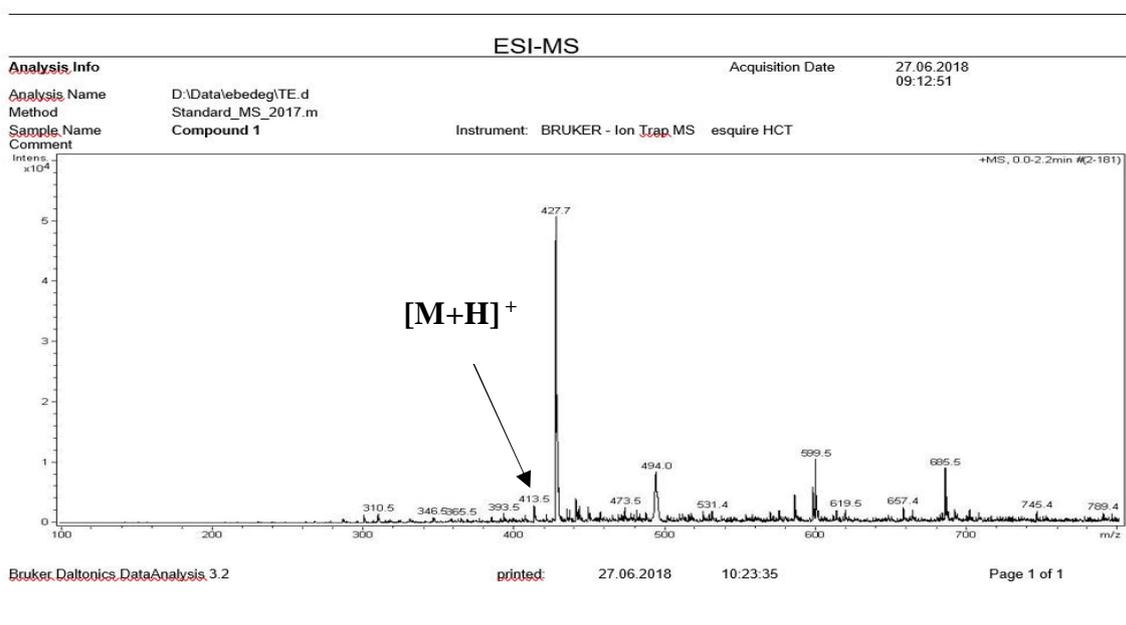


Figure 27- Spectre de masse ESI-MS de la 2-hydroxypentacosanoate de méthyle

Sur la base de ces données de RMN et de spectrométrie de masse, le composé **TC1** a été établie comme étant la 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-(2*S**,3*R**,4*R**,6*)-2-[(2'*S*'*)-2'-hydroxypentacosanoylamino]-1,3,4-heptadecanetriol-6-ene de nom trivial contortamide (**64**) isolé ici pour la première fois (Ebédé et *al.*, 2021).

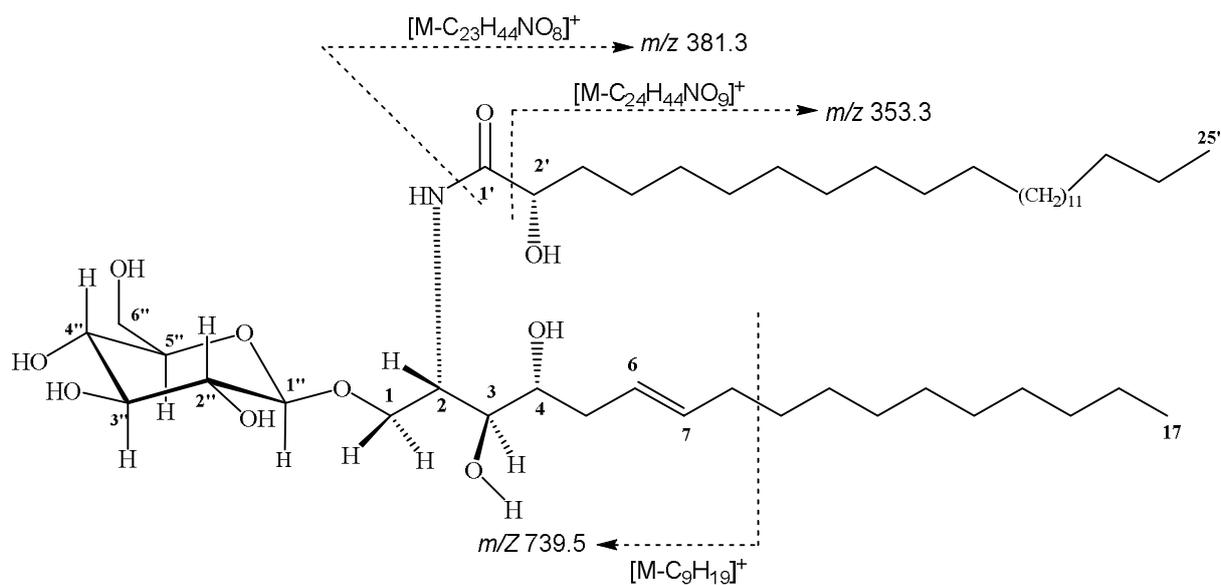
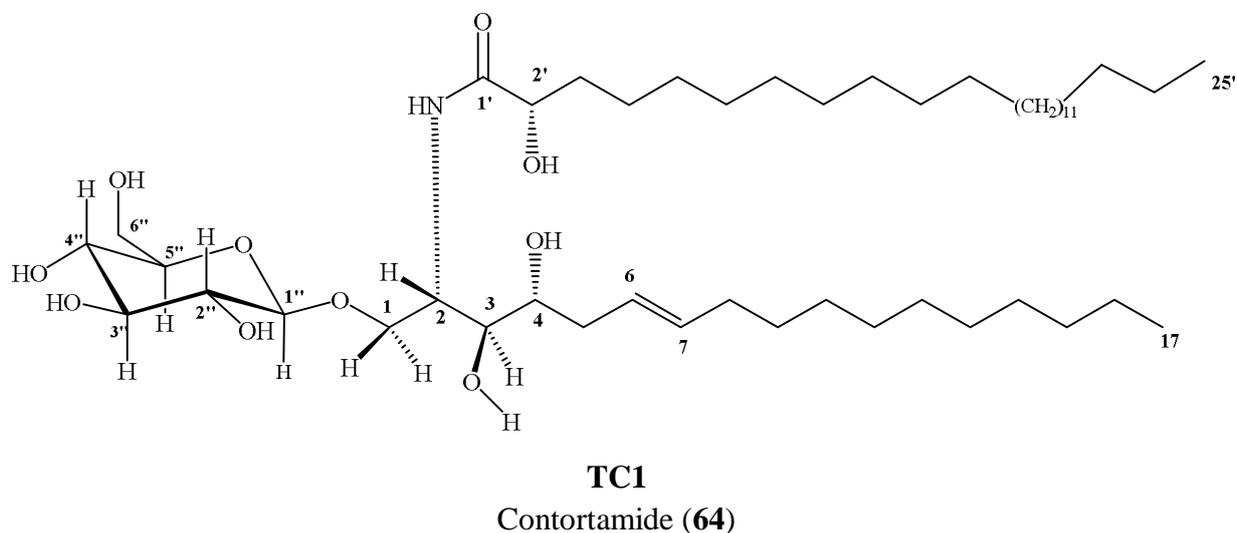


Tableau 4- Données spectrales RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) et ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) et corrélations HMBC du composé TC1

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	HMBC (H→C)	¹ H- ¹ H COSY
1a	4,02 (dd; 7,2 ; 14,8)	68,5	C-1', C-1''	H-2
1b	3,79 (dd; 7,2 ; 14,8)	68,5	C-1', C-1'', C-3	H-2
2	4,24 (m)	50,3	C-1	H-1, H-3
3	3,57 (t; 6,1)	74,2	C-2, C-4, C-5	H-2, H-4
4	3,50 (m)	71,6	-	H-3, H-5
5a	1,98 (m)	32,4	C-6, C-7	H-4
5b	2,01 (m)	32,4	C-6, C-7	H-4
6	5,40 (dt)	129,4	C-5	H-5
7	5,36 (dt)	130,2	C-8	H-8
8	1,64 (m)	32,0	C-7	H-7
9 – 16	1,28-1,40 (brs)	22,2-31,7		H-8
17	0,89 (t; 6,7)	13,1	C-16	H-17
1'		175,7	-	
2'	4,00 (m)	71,6	C-1', C-3'	H-3'
3'a	1,73 (m)	34,4	C-2'	H-2'
3'b	1,63 (m)	34,4	C-2'	H-4'
4' – 24'	1,28-1,40 (brs)	22,2-31,7		H-5'
25'	0,89 (t; 6,7)	13,1	C-25'	H-25'
Glucose				
1''	4,29 (d; 7,8)	103,3	C-1, C-2'', C-3''	H-2''
2''	3,16 (dd; 8,0 ; 16,8)	73,6	C-1, C-3''	H-1'', H-3''
3''	3,33 (m)	76,6	C-4''	H-2'', H-4''
4''	3,26 (dd; 4,0 ; 12,3)	70,2	C-3'', C-5''	H-3'', H-5''
5''	3,27 (m)	76,6	C-3''	H-4'', H-6''
6''a	3,85 (dd; 11,2)	61,3	C-5''	H-5''
6''b	3,64 (dd, J = 4,4 ; 11,2)	61,3	C-5''	H-5''

II.2.4.2.2. Détermination structurale de TC2

Le composé **TC2** a été isolé sous forme d'une poudre amorphe blanche, $[\alpha]_D^{25} + 2,81$ (c 0,013 ; CHCl₃) et soluble dans le CH₂Cl₂/MeOH. Son spectre de masse ESI à haute résolution (Fig. 28) montre le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 840,6637 [M-H]⁻ (masse théorique calculée : 840,6643), correspondant à formule moléculaire C₄₈H₉₀NO₁₀ avec quatre degrés d'insaturation. Cette masse **TC2** est confirmée par son spectre de masse en impact électronique (Fig. 28) avec des ions de fragments à m/z 663 ; 354 ; 325 et 180.

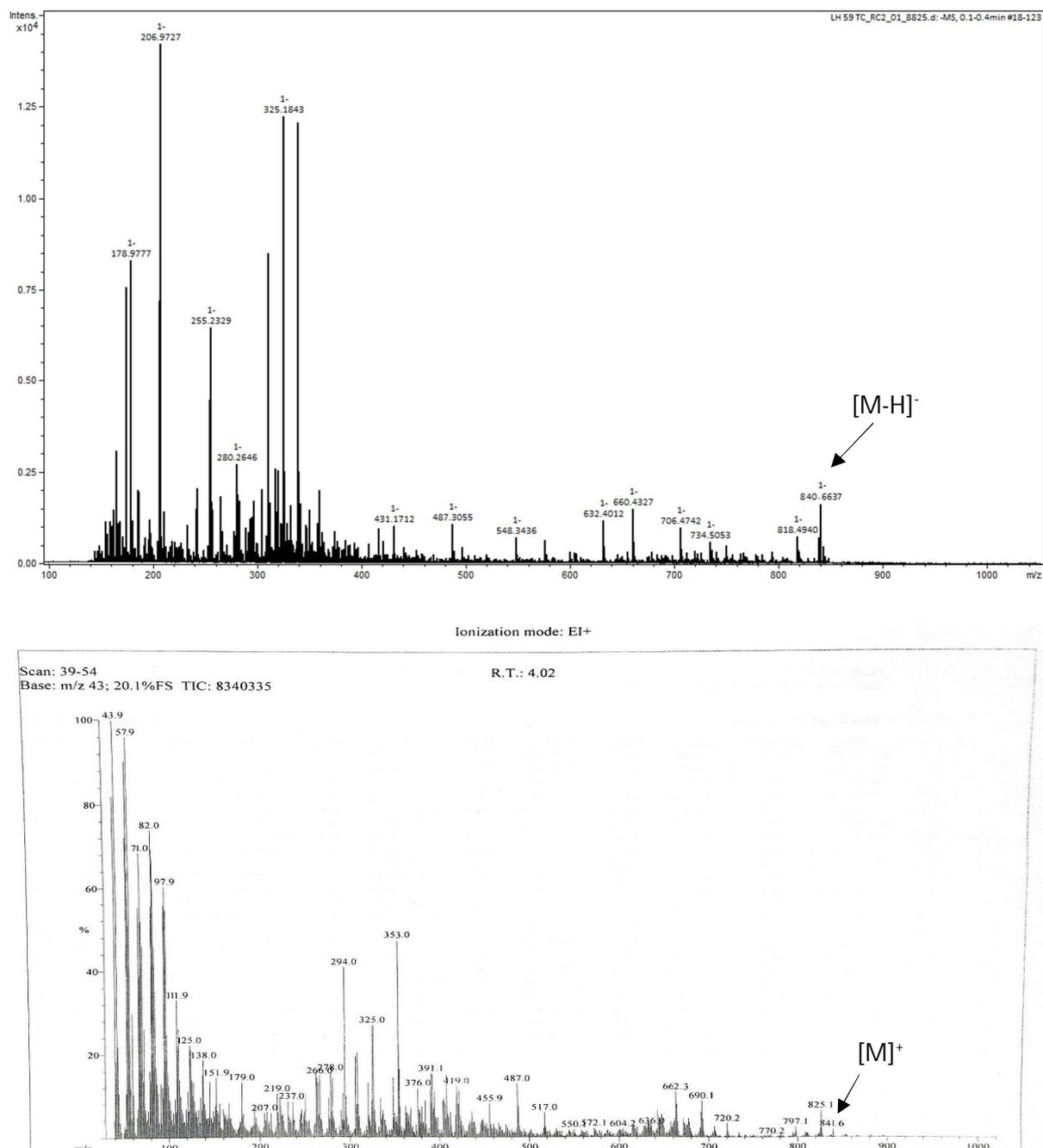


Figure 28- Spectres de masse (+)-HRESI-MS et (-)-EI-MS du composé TC2

Son spectre IR (Fig. 29) montre des bandes d'absorption à 3301 (NH et OH libres), 1727 (carbonyle de l'amide), 2918–2850 (chaîne aliphatique), 1597–1462 (double liaison), 1078–1033 cm^{-1} pour les absorptions de la liaison C-O-C. L'absence des maxima entre 200 et 400 nm sur le spectre UV pourrait suggérer que **TC2** est une cérébroside (Zuo et *al.*, 2013).

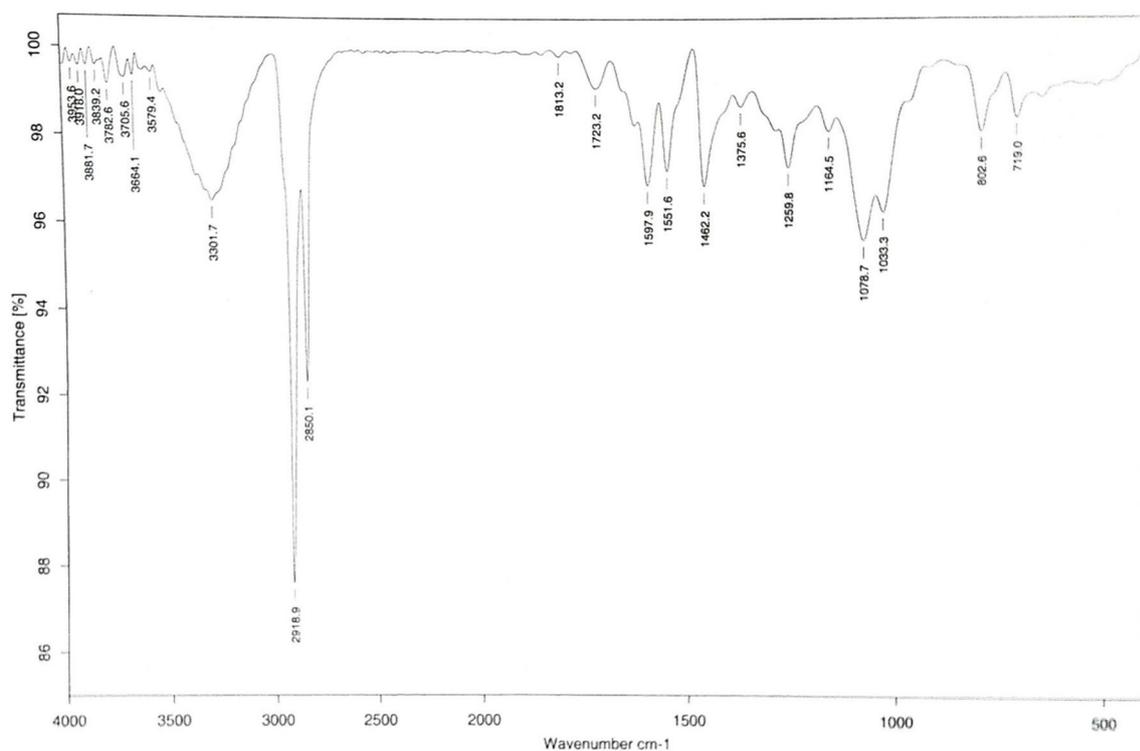


Figure 29- Spectre Infrarouge sur disque de KBr de TC2

Les spectres RMN ^1H (Fig. 30) et ^{13}C (Fig. 31) sont semblables à ceux de **TC1**. On y observe les signaux de protons à : δ_{H} 7,96 (1H, d, $J = 10,0$ Hz) ; 4,14 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'') ; 4,09 (d, $J = 7,8$ Hz ; H-2) ; 3,91(dq, $J = 3,7$; 4,3 ; 11,9 Hz, H-1a) et 3,67 (ddd, $J = 2,2$; 4,1 ; 10,5 Hz, H-1b) ; 3,89 (m, H-2') ; 3,88 (t, $J = 4,5$ Hz ; H-4) ; 3,41 (d, $J = 5,3$ Hz, H-3) ; 1,18–1,14 (m) ; 0,74 (6H, t, $J = 6,9$ Hz ; H-19/H-23') et les signaux des carbones à δ_{C} 175,6 (C-1') ; 102,8 (C-1'') ; 50,0 (C-2) ; 68,4 (C-1) ; 74,1(C-3) ; 71,7 (C-4) ; 71,8 (C-2'') ; 29,1–29,4 ; 13,8 (C-19/C-23') montrent la présence d'une liaison amide, du carbone anomère d'un résidu de sucre, d'une amidométhine, d'un méthylène oxygéné, de trois méthines oxygénées, et de deux fragments aliphatiques à longue chaîne et deux méthyles terminaux respectivement (Tableau 5), suggérant la nature glycolipidique (sphingolipides) de la molécule (Huang et *al.*, 1995). Quatre signaux de carbone tertiaire à δ_{C} 130,5 ; 130,0 ; 129,6 ; 129,1 et quatre doublets

à δ_H 5,26 (1H, dt, $J = 5,0$ Hz) et 5,22 (1H, dt, $J = 5,0$ Hz) ; 5,25 (1H, dt, $J = 15,0$ Hz) et 5,21 (1H, dt, $J = 15,0$ Hz) suggèrent que TC2 possède deux doubles liaisons.

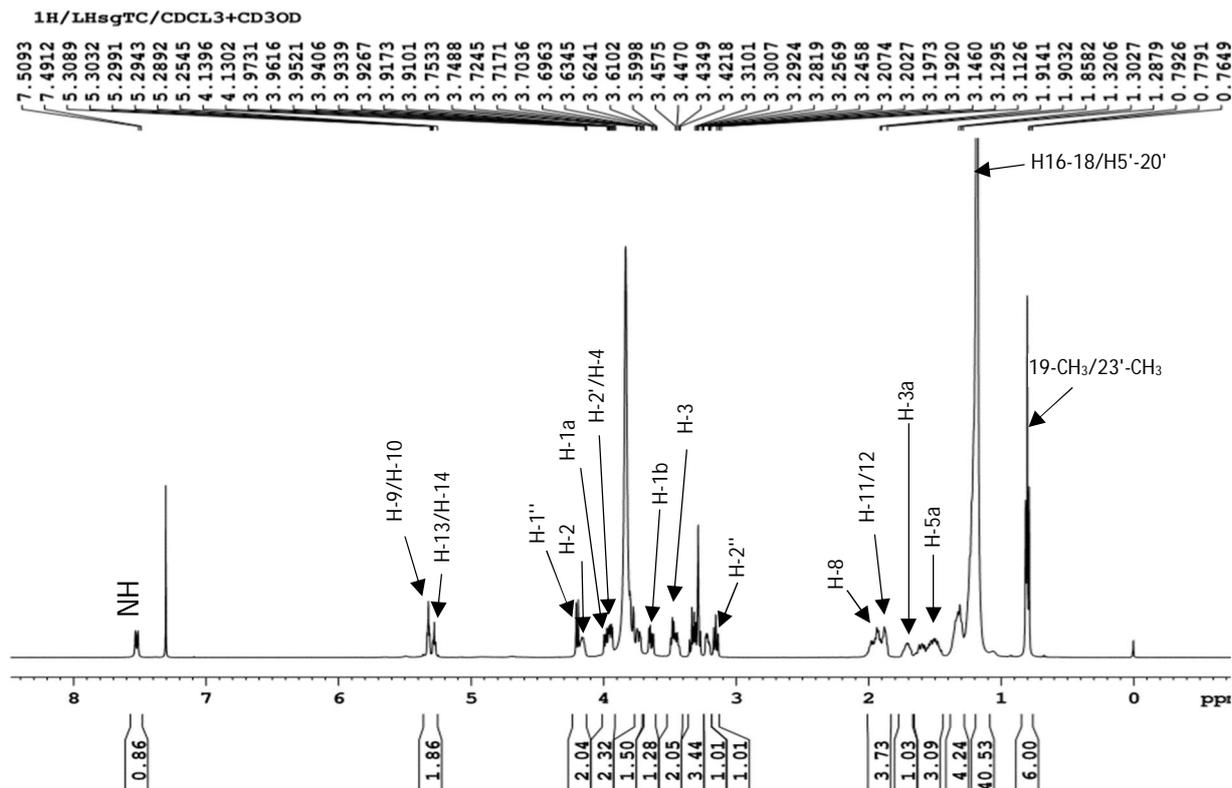


Figure 30- Spectre de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$) de TC2

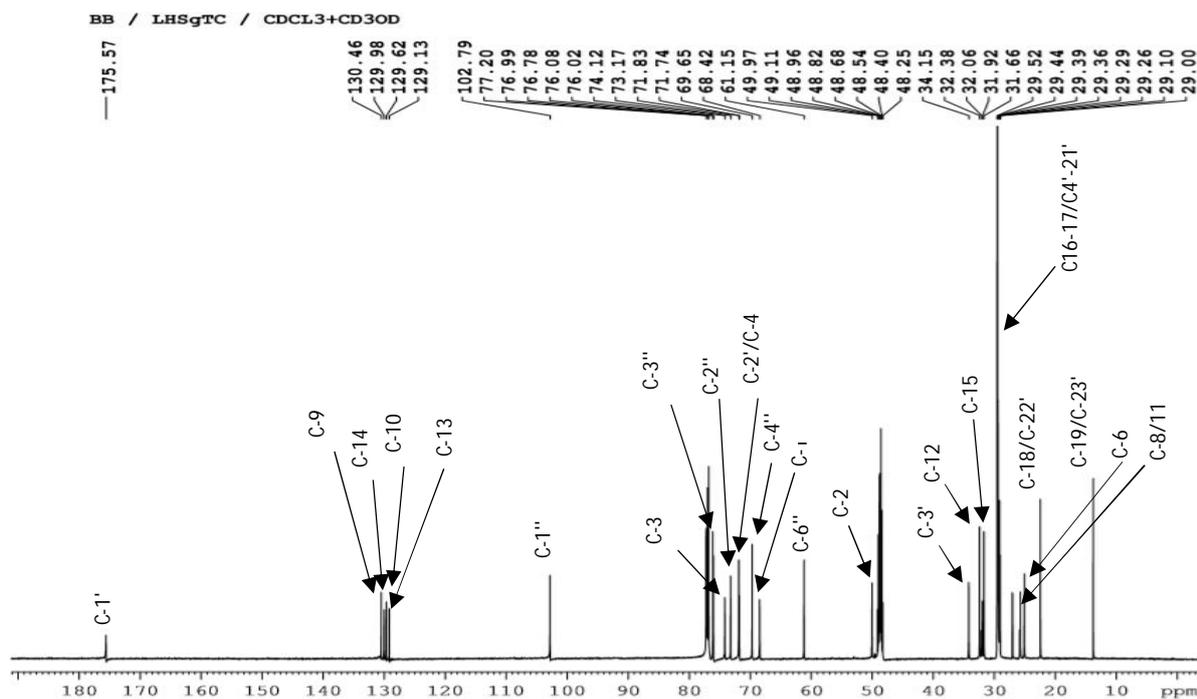


Figure 31- Spectre de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$) de TC2

Toutes les familles de carbones hydrogénés ont été identifiées sur le spectre DEPT 135 et le spectre HSQC a permis d'avoir toutes les corrélations hétéronucléaires (Tableau 5). Le spectre de HMBC (Fig. 33) nous montre des corrélations entre les protons de l'oxyméthine à δ_H 3,88 ; de l'amide à δ_H 7,96 (NH) et le carbonyle à δ_C 175,6. Le proton de l'azométhine à δ_H 4,09 présente une corrélation avec l'oxyméthylène à δ_C 68,4. Ajouté au spectre de HMBC, le spectre de COSY (Fig. 32) donne des corrélations entre les différents protons voisins.

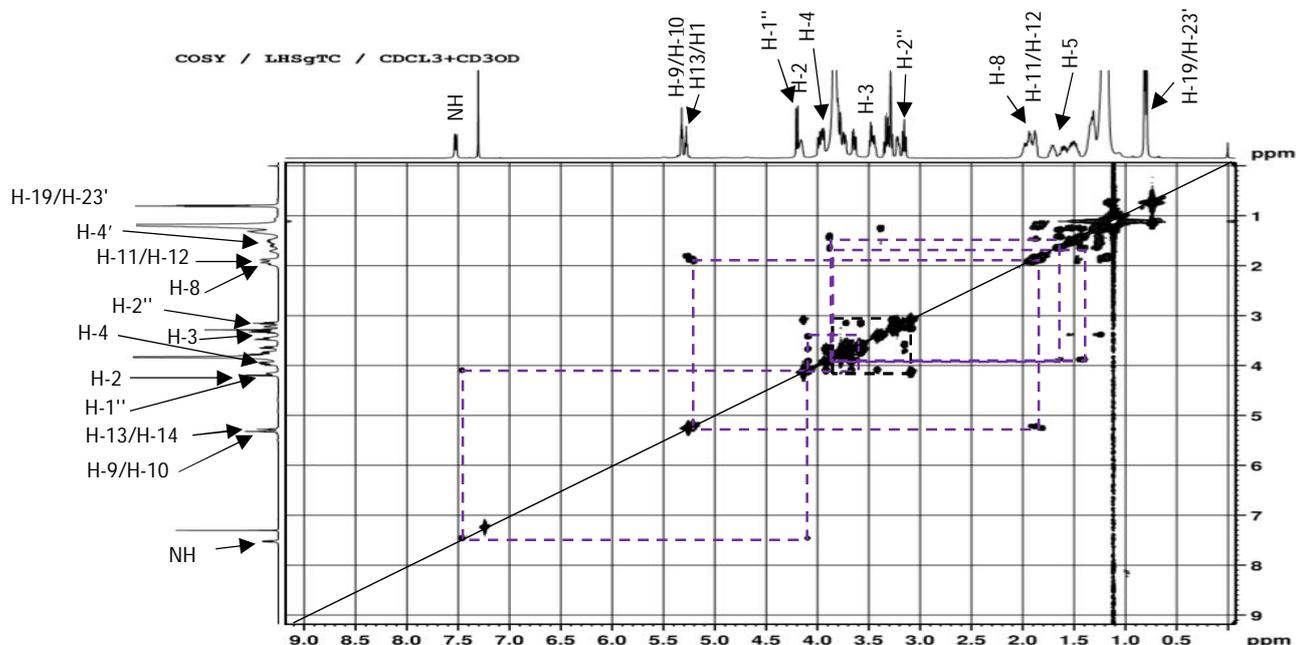


Figure 32- Spectre COSY (500 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$) de TC2

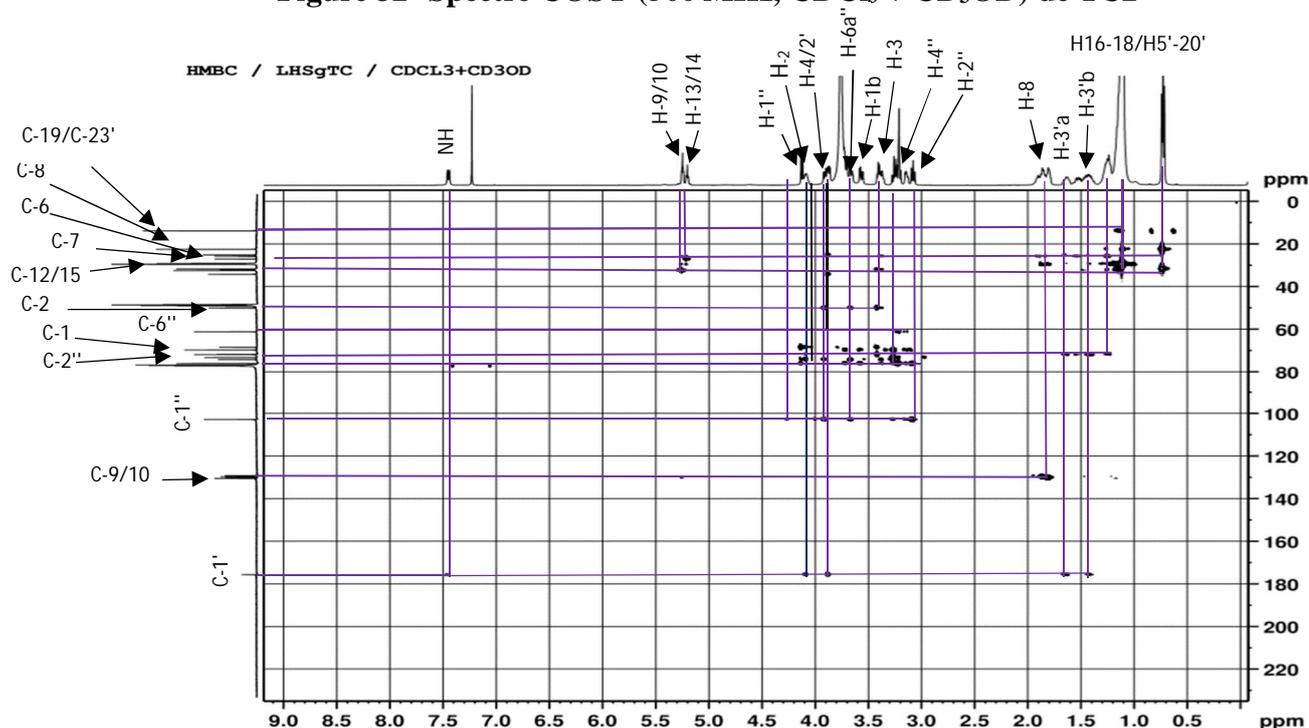


Figure 33- Spectre HMBC (500 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$) de TC2

L'acétylation de **TC2** avec de l'anhydride acétique/pyridine à température ambiante a donné son dérivé de peracétate **TC2a**, qui après une ionisation douce en spectrométrie de masse MALDI-MS a donné le pic de l'ion moléculaire et celui de l'ion pseudo-moléculaire à m/z 1135 $[M]^+$ et de l'adduit sodique à m/z 1158 $[M+Na]^+$ respectivement (Fig. 35) et correspondant à la formule moléculaire $C_{62}H_{105}NO_{17}$ pour **TC2a**. Ceci indique ainsi la présence de sept groupes hydroxyle dans la structure d'origine de **TC2**, sachant qu'après acétylation chaque acétate contribue pour m/z 43. L'exploitation du spectre NOESY (Fig. 34) donne la localisation spatiale des groupes hydroxyle dans la sphingosine.

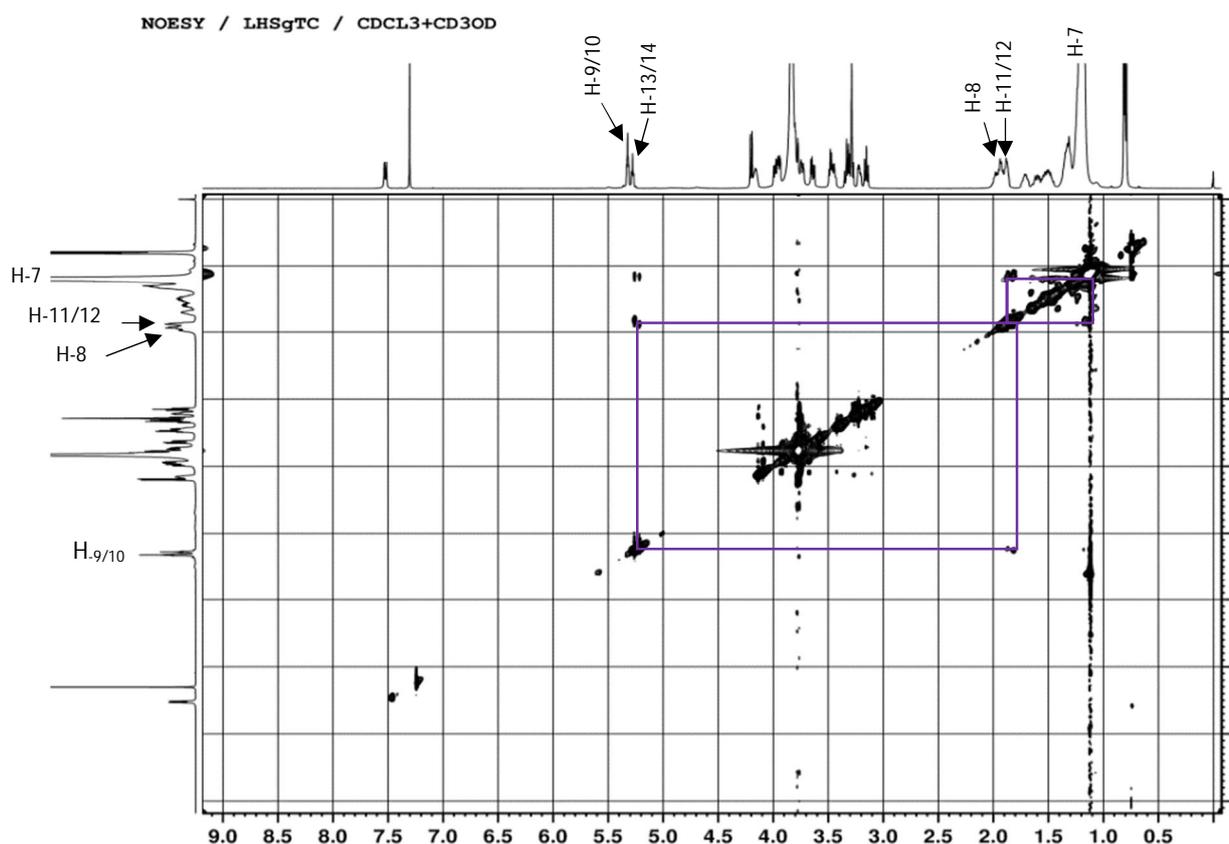


Figure 34- Spectre NOESY (500 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$) de **TC2**

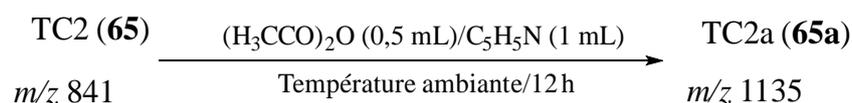


Schéma 5- Réaction d'acétylation de **TC2**

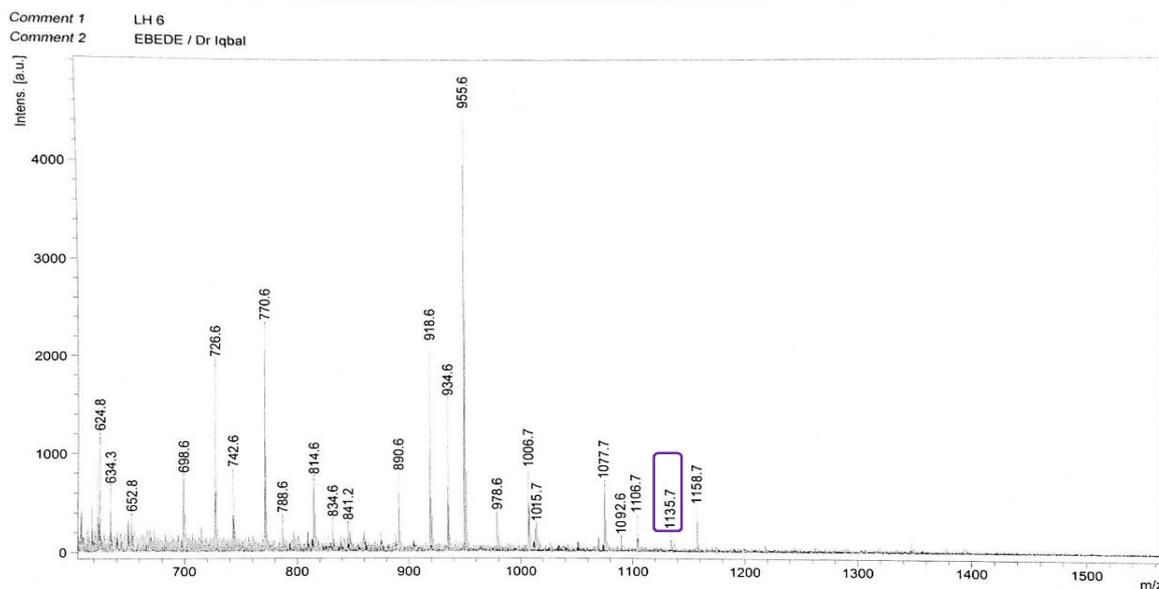


Figure 35- Spectre de masse MALDI du résidu acétylé TC2a

La longueur de l'acide gras (FA) et de la longue chaîne basique (LCB) a été déterminée après méthanolyse (0,9 N ; HCl/MeOH, à 70 °C pendant 18 h). L'ester méthylique d'acide gras (FAME) a été extrait avec du chloroforme et soumis à une analyse GC-MS (Fig. 36), qui a donné le pic de l'ion moléculaire à m/z 384, correspondant à l'ester méthylique de l'acide 2-hydroxytricosanoïque ($C_{24}H_{48}O_3$). Par conséquent, les doubles liaisons sont situées du côté de la LCB.

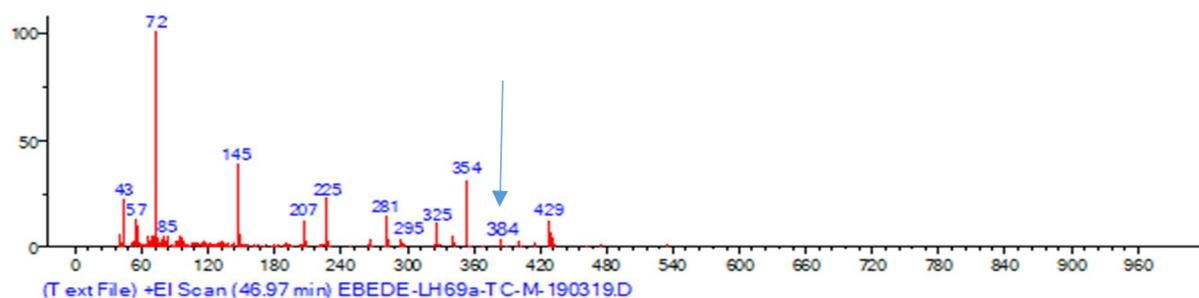


Figure 36- Spectre de masse GC-MS de la 2-hydroxytricosanoate de méthyle

Les positions et le nombre de doubles liaisons ont été confirmées par la réaction entre le composé **TC2** dans le disulfure de carbone et le disulfure de diméthyle ajouté à l'iode. Le résidu (dérivé DMDS, **TC2b**) analysé en spectre de masse FAB (Fig. 37) montre des pics de fragmentation remarquables à m/z 279 et 131, indiquant que les doubles liaisons dans la LCB sont situées en C-9 et C-13 (Schéma 9). Ceci se confirme aussi par des corrélations HMBC entre H-9 (δ_H 5,26) et C-7 (δ_C 27,1), H-10 (δ_H 5,22) et C-11 (δ_C 27,0), H-13 (δ_H 5,25) et C-12 (δ_C 32,4), H-14 (δ_H 5,21) et C-15 (δ_C 32,1) (Schéma 8). La géométrie des liaisons alcènes est

cis (C-9/C-10) et *trans* (C-13/C-14), comme en témoignent les constantes de couplage vicinales basses et grandes ($J_{9-10} = 5,0$ Hz et $J_{13-14} = 15,0$ Hz).

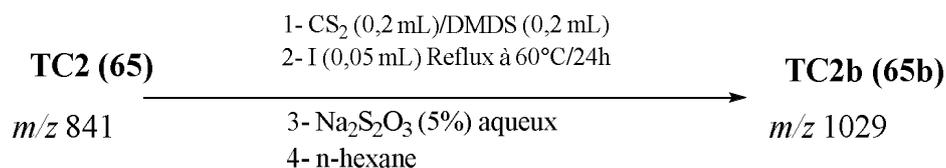
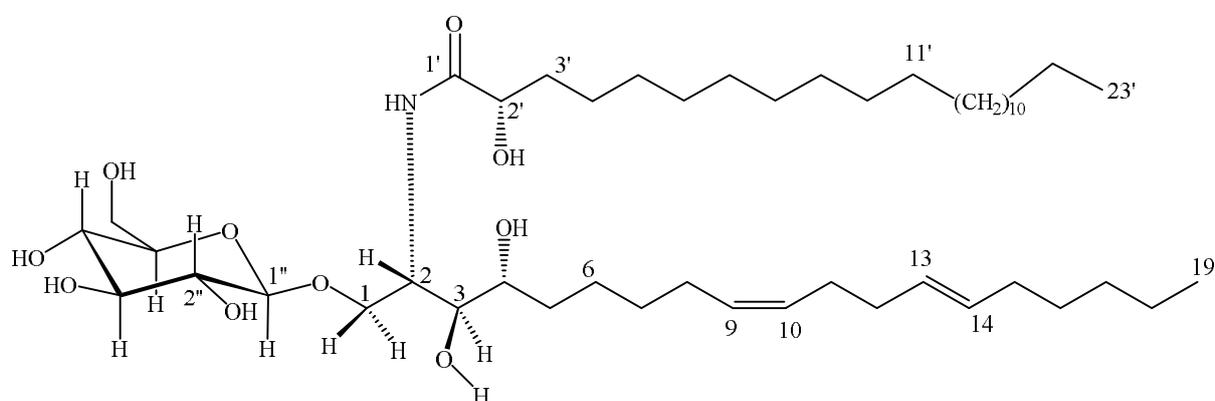


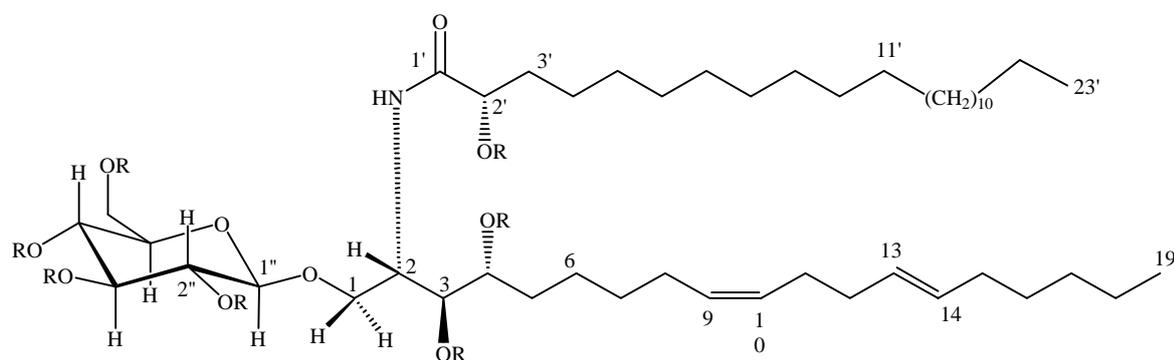
Schéma 6- Réaction d'obtention du dérivé DMDS

Sur la base de ces résultats, la structure du composé **TC2**, présentée ci-dessous, a pu être établie comme la 1-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(2*S**,3*R**,4*R**,9*Z*,12*E*)-2-[(2'*R*'*)-2'-hydroxytricosanoylamino]-1,3,4-nonadecanetriol-9,13-diène et appelé tabernamide A (**65**), nouveau dérivé naturel (Publication en cours de rédaction).



TC2

Tabernamide A (**65**)



TC2a (**65a**) : R = Ac

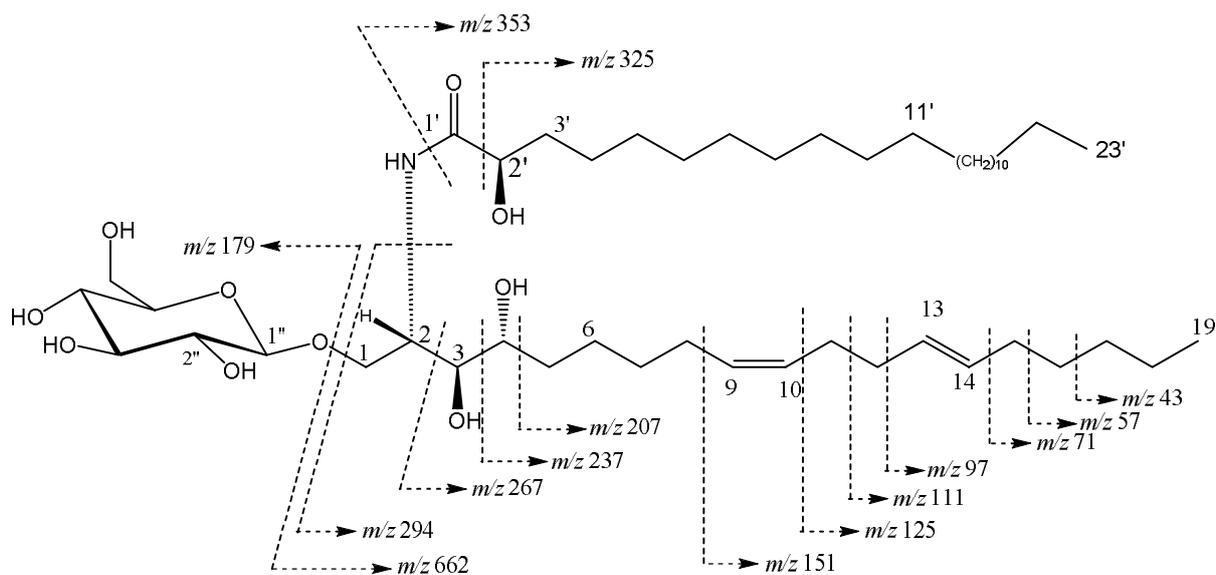


Schéma 7- Fragmentations issues du spectre de masse EI-MS de TC2

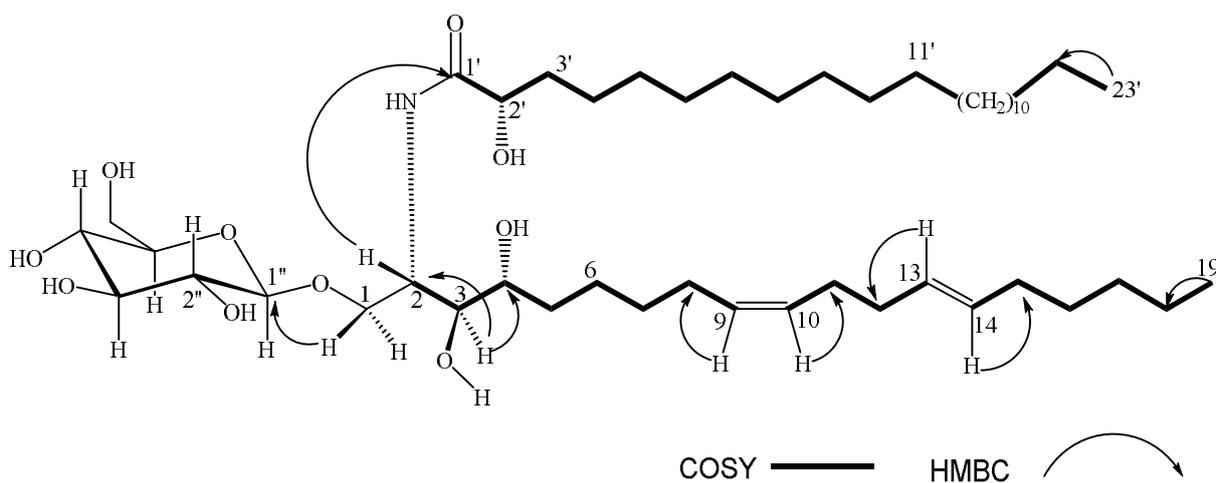


Schéma 8- Importantes corrélations HMBC et COSY de TC2

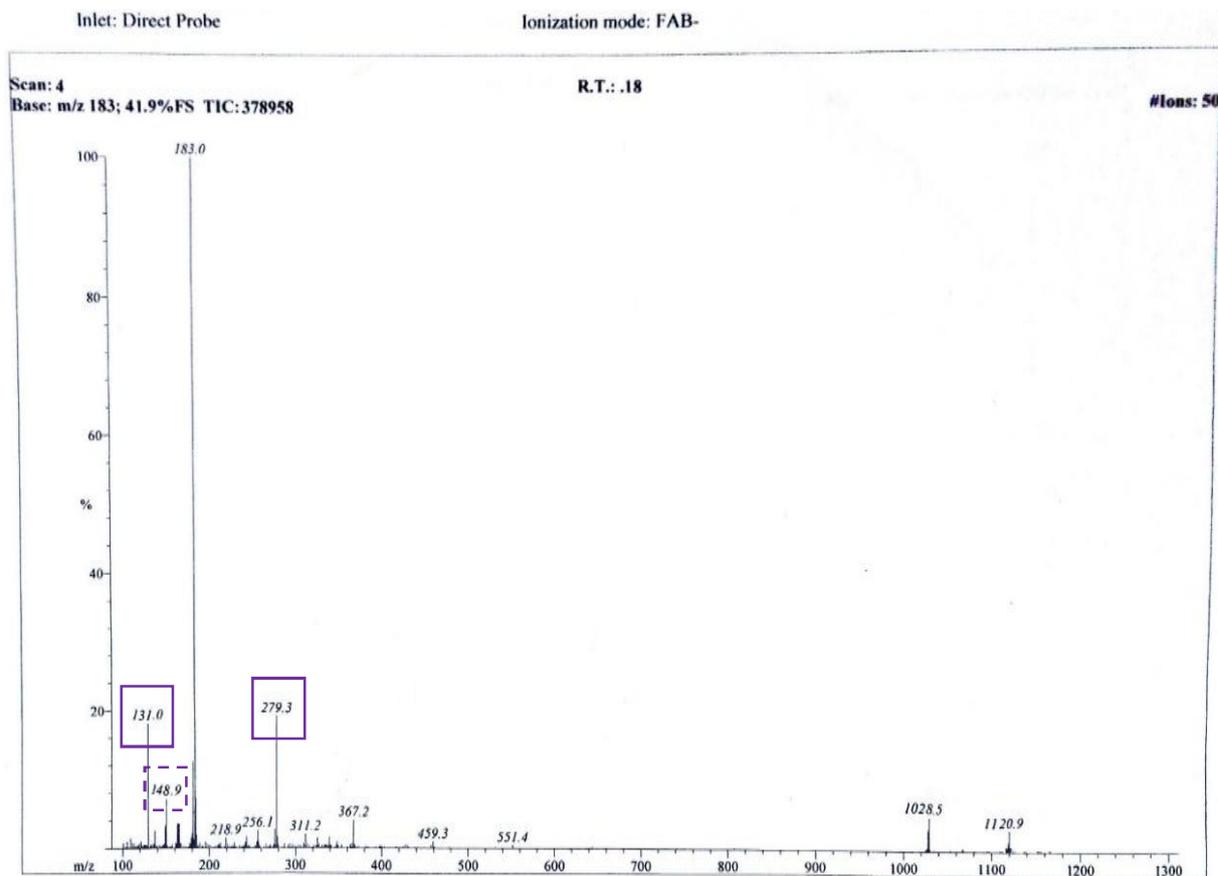


Figure 37- Spectre de masse (-)-FAB-MS du dérivé DMDS (TC2b)

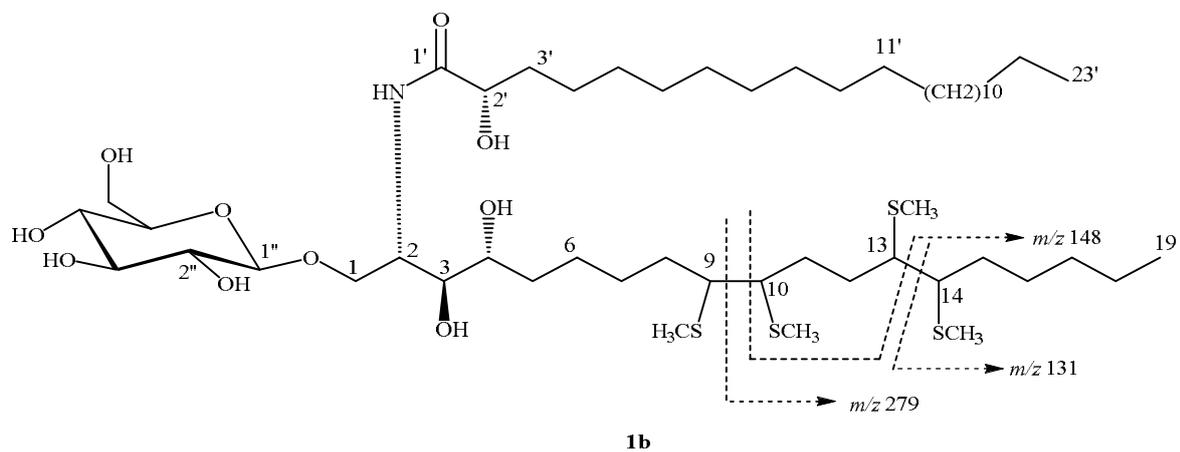


Schéma 9- Dérivé DMDS (TC2b : 65b) et fragmentations FAB-MS

Tableau 5- Données spectrales RMN du composé TC2 (CDCl₃ + CD₃OD, 500 et 125 MHz)

Position	δ_H [m, <i>J</i> (Hz)]	δ_C	HMBC	¹ H- ¹ H COSY
1a	3,91 (dq; 3,7; 4,3 ; 11,9)	68,4	C-1'', C-1', C-2, C-3	H-2, H-1b
1b	3,67 (ddd; 2,2; 4,1 ; 10,5)	68,4	C-1'', C-2, C-3	H-2, H-1a
2	4,09 (d; 7,8)	50,0	C-1', C-1, C-4	H-1b, H-3
3	3,41 (d; 5,3)	74,1	C-1, C-2, C-4, C-5	H-2
4	3,88 (t; 4,5)	71,7	C-2, C-3, C-5, C-6	H-5
5a	1,53 (m)	31,9	C-4, C-6, C-7	H-4
5b	1,26 (m)	3,9	C-6, C-7	H-4
6	1,30 (m)	25,7	C-4	H-5
7	1,26 (brs)	31,7	C-8	H-8
8	1,92 (ddd; 4,7; 7,0; 10,6 ; 22,3)	27,1	C-9	H-9
9	5,26 (dt; 5,0)	130,5	C-8	H-8
10	5,22 (dt; 5,0)	129,6	C-11	
11	1,88	27,0	C-10	
12	1,87	32,4	C-13	H-13
13	5,25 (dt; 15,0)	129,1	C-12	H-12
14	5,21 (dt; 15,0)	130,0	C-12	
15	1,26 (m)	32,1	C-14	
16	1,12 (brs)	29,3	C-18, C-19	H-11
17	1,18	29,5	C-19	
18	1,14	22,4	C-19	
19	0,74 (t; 6,9)	13,8	C-17, C-18	H-18
1'		175,6	-	
2'	3,89 (m)	71,8	C-3'	
3'a	1,64 (ddd; 2,9; 6,6 ; 10,0)	34,2	C-1', C-4', C-5'	H-3'b
3'b	1,43 (m)	34,2	C-4', C-5'	H-3'a
4'	1,17	29,0		
5' – 20'	1,12-1,18 (brs)	29,1-29,4		H-4'
21'	1,18	29,5		
22'	1,14	22,4		H-23'
23'	0,74 (t; 6,9)	13,8	C-21', C-22'	H-22'
Glucose				
1''	4,14 (d; 7,8)	102,8	C-1, C-2'', C-5''	H-2''
2''	3,09 (t; 8,4)	73,2	C-1'', C-3''	H-1'', H-3''
3''	3,26 (d; 4,7)	76,0	C-5'', C-1''	H-2'', H-4''
4''	3,22 (d; 1,7)	69,7	C-2'', C-6''	H-3'', H-5''
5''	3,15 (ddd; 2,6; 5,3 ; 9,0)	76,1	C-3''	H-4'', H-6''
6''a	3,71 (d; 2,5)	61,2	C-4'', C-5''	H-6b''
6''b	3,58 (dd; 5,2 ; 12,2)	61,2	C-4'', C-5''	H-5'', H-6a''

II.2.4.2.3. Détermination structurale de TC3

TC3 se présente sous forme de poudre blanche amorphe, $[\alpha]_D^{25} - 16,9$ (c 0,004 ; CHCl₃) et soluble dans le CH₂Cl₂/MeOH. Son spectre de masse en ESI haute résolution (Fig. 38) montre le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 872,7109 et de l'ion fragment à m/z 368,2313 sur son spectre de masse FAB en mode négatif. Ceci suggère la formule moléculaire C₅₀H₉₈O₁₀N (calculé théoriquement à 872,7112) possédant trois degrés d'insaturation.

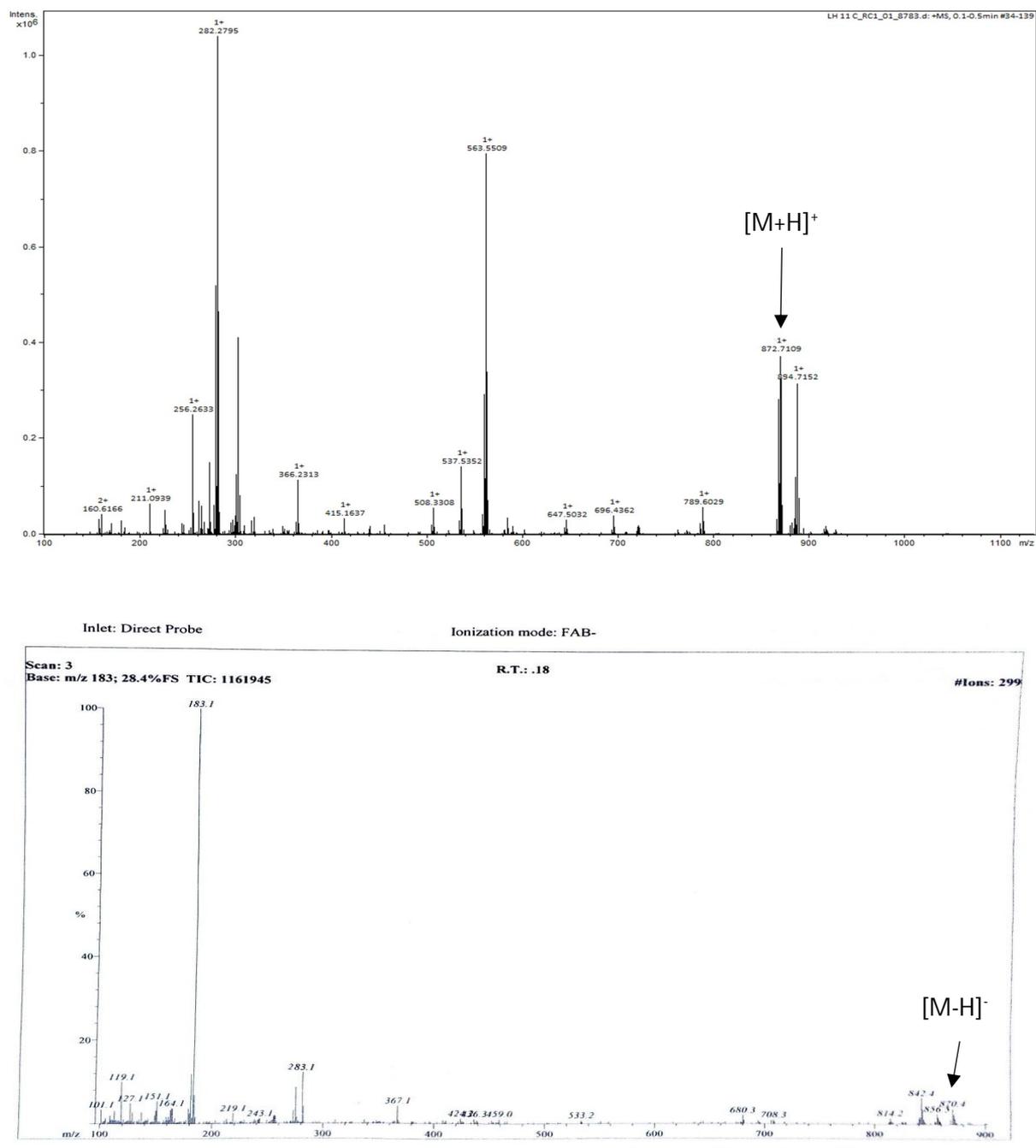


Figure 38- Spectres de masse (+)-HRESI-MS et (-)-FAB-MS du composé TC3

Son spectre IR (Fig. 39) montre des bandes d'absorption à 3300 (br, NH et OH libres), 1630 (CO des amides secondaires), 2921–2853 (chaîne aliphatique), 1537–1462 (double liaison) et 1078 et 1033 cm^{-1} pour les absorptions de C-O-C.

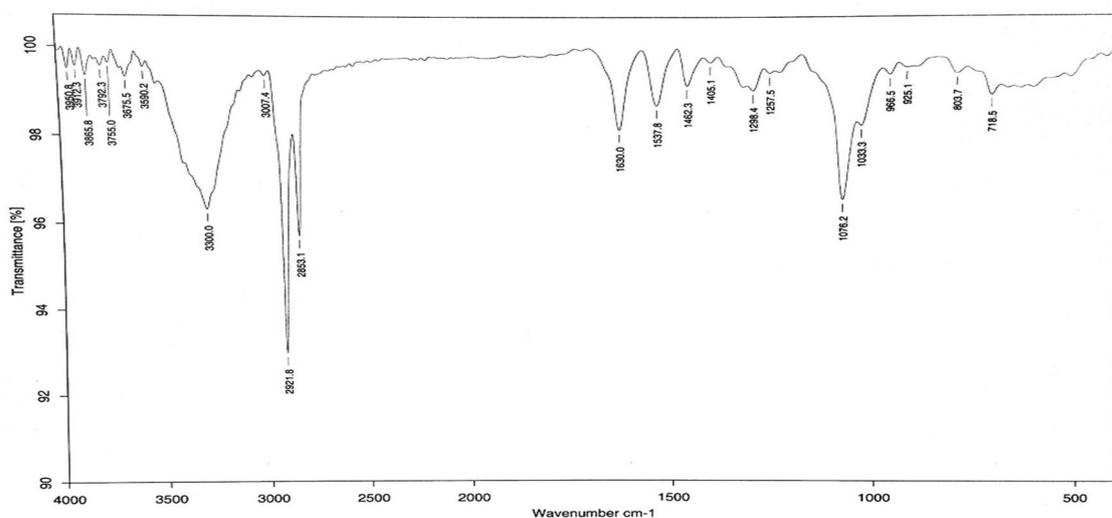


Figure 39- Spectre Infrarouge sur disque de KBr de TC3

Le spectre de RMN ^1H (Fig. 40) de **TC3** indique une large plage de signal de δ_{H} 1,19-1,34 (brs, groupe CH_2) et un triplet à δ_{H} 0,82 (6H, $J = 6,7$ Hz, deux groupes méthyle terminaux) attribués à deux longues chaînes aliphatiques. Le signal du proton à δ_{H} 4,24 (d, $J = 7,8$ Hz), a montré la présence d'un proton anomérique d'un résidu de sucre et sa constante de couplage soutient la configuration β du glucose. Cependant, une paire de protons oléfiniques à δ_{H} 5,34 (1H, m, H-9) et 5,32 (1H, m, H-10) révèle la présence d'une liaison oléfinique.

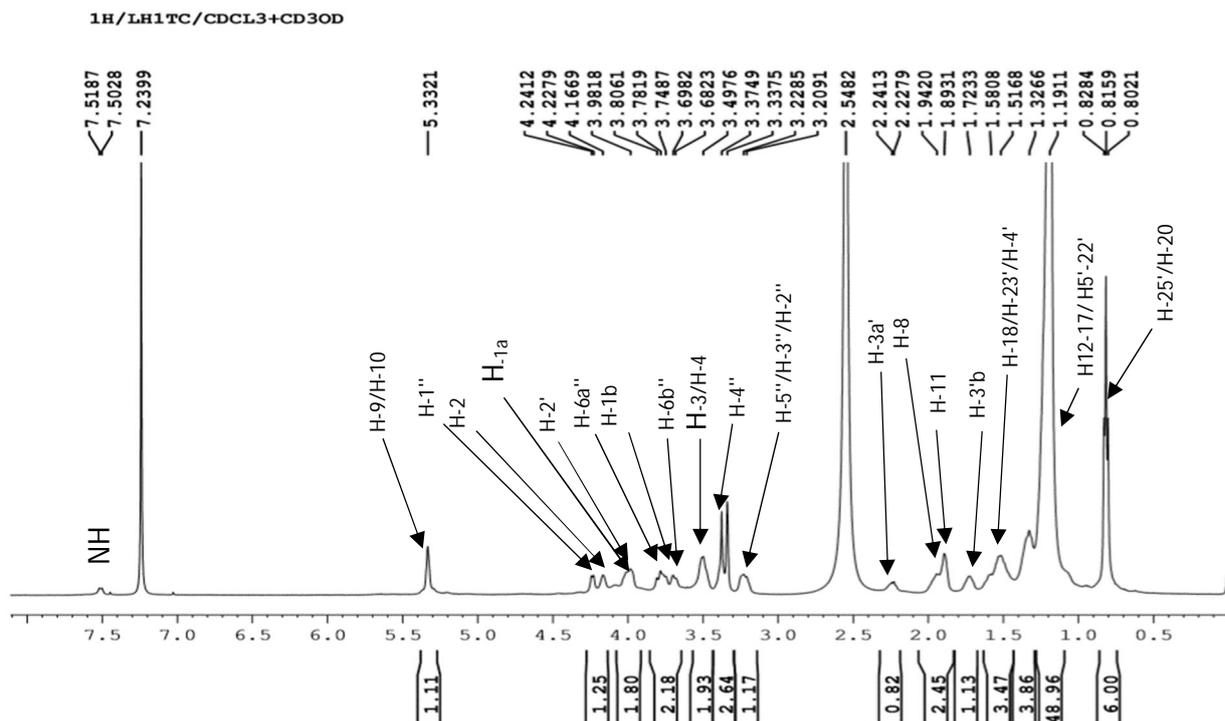


Figure 40- Spectre de RMN ^1H (600 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de TC3

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 41), montre les signaux à δ_{C} 102,8 ; 73,6 ; 76,0 ; 69,5 ; 76,1 et 61,1 confirmant la fraction glucopyranose en **TC3**. Un signal d'un carbone méthine lié à l'atome d'azote à δ_{C} 50,2 (C-2), un carbone oxyméthylène résonnant à δ_{C} 68,3 (C-1), avec trois résonances de carbones d'oxyméthine à δ_{C} 74,2 (C-3) ; 72,1 (C-4) ; 72,0 (C-2') et un signal carbonyle amide à δ_{C} 175,7 (C-1'). La liaison oléfinique $\Delta^{9,10}$ a une configuration (*E*) avec les déplacements chimiques de C-8 en (δ_{C} 32,6) et de C-11 (δ_{C} 32,5). Ces résultats suggèrent que **TC3** appartient aussi à la classe des sphingolipides (Huang et *al.*, 2010).

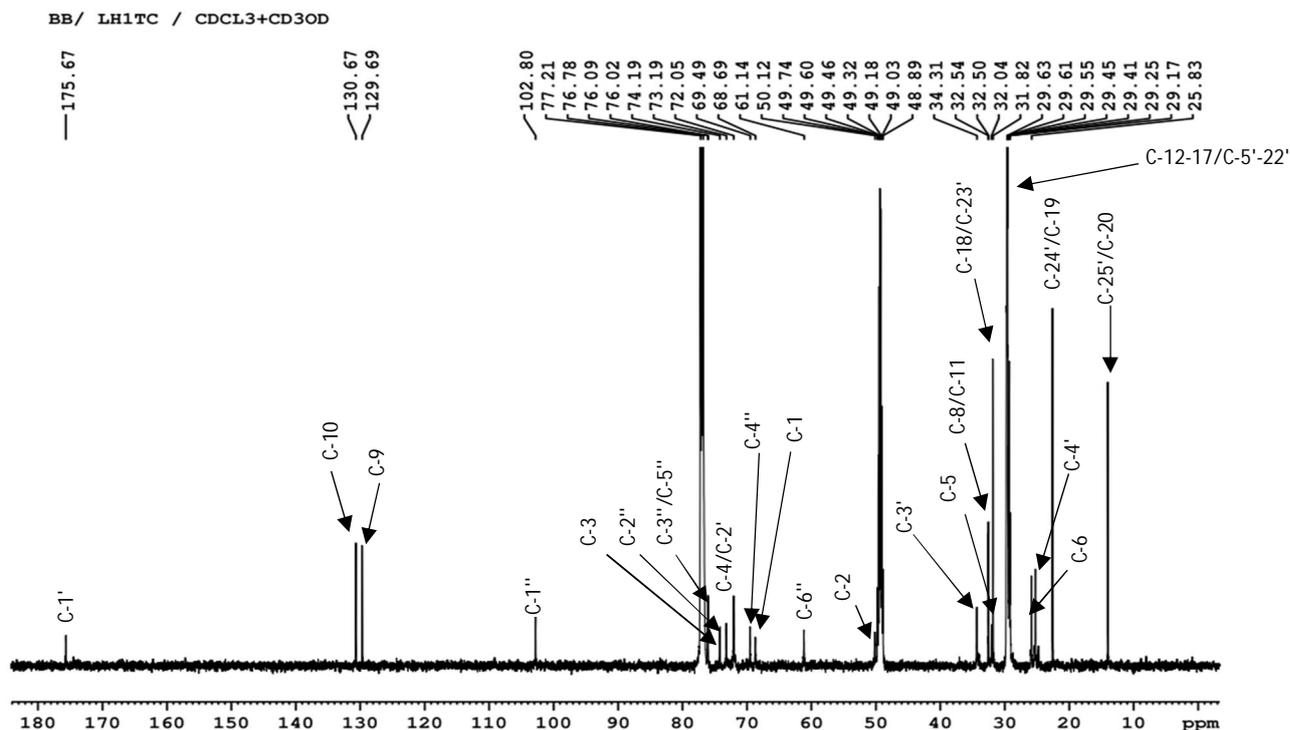


Figure 41- Spectre de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de TC3

Sept groupes hydroxyle dans la structure originale de **TC3** ont été déterminés par acétylation (anhydride acétique / pyridine à température ambiante) pour donner son dérivé de peracétate **TC3a (66a)**, qui a montré le pic de l'ion pseudo-moléculaire du dérivé à m/z 1164,7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ dans son spectre de masse FAB-MS (Fig. 42), correspondant à la formule $\text{C}_{64}\text{H}_{111}\text{NO}_{17}$.

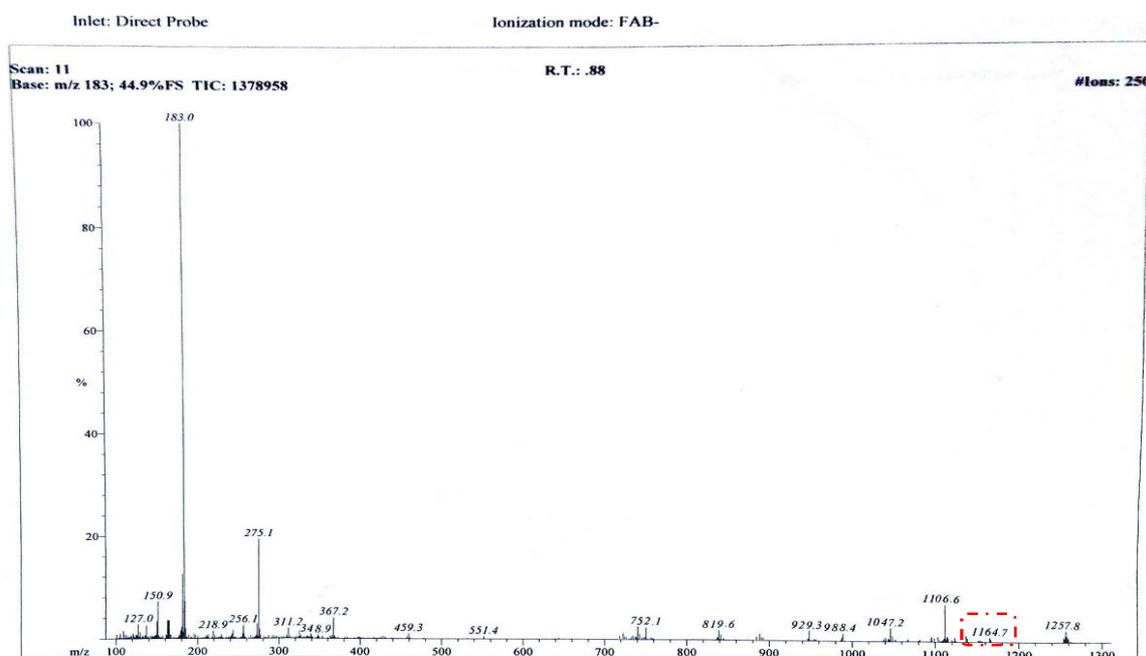


Figure 42- Spectre de masse (-)FABMS du résidu acétylé TC3a

La localisation spatiale des groupes hydroxyle dans la sphingosine a été mise en évidence par l'exploitation du spectre NOESY (Fig. 43).

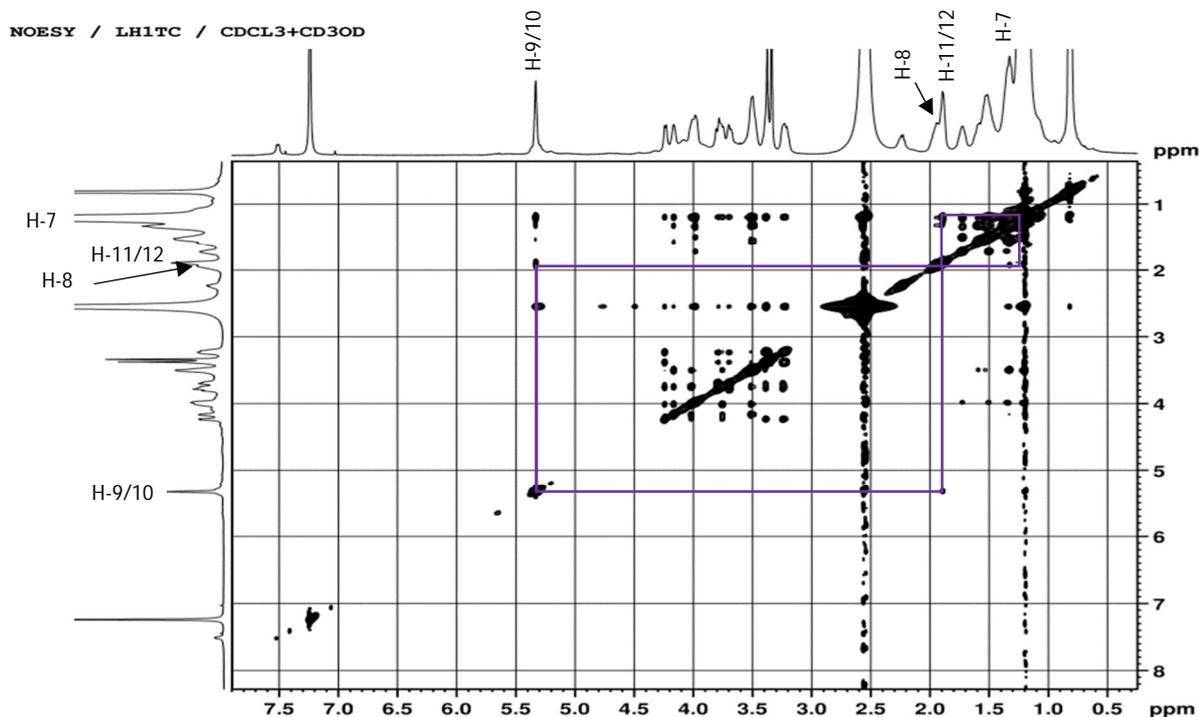


Figure 43- Spectre NOESY (600 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de TC3

Avec la même procédure utilisée pour le composé **TC2**, le dérivé DMDS (**TC3b** : **66b**) du composé **TC3** a montré un pic de fragmentation remarquable à m/z 201 dans le spectre de masse FAB-MS (Fig. 46), indiquant que les doubles liaisons dans LCB sont situées à C-9 (Schéma 12) et confirmé les corrélations en COSY (Tableau 6) et en HMBC (Fig. 44).

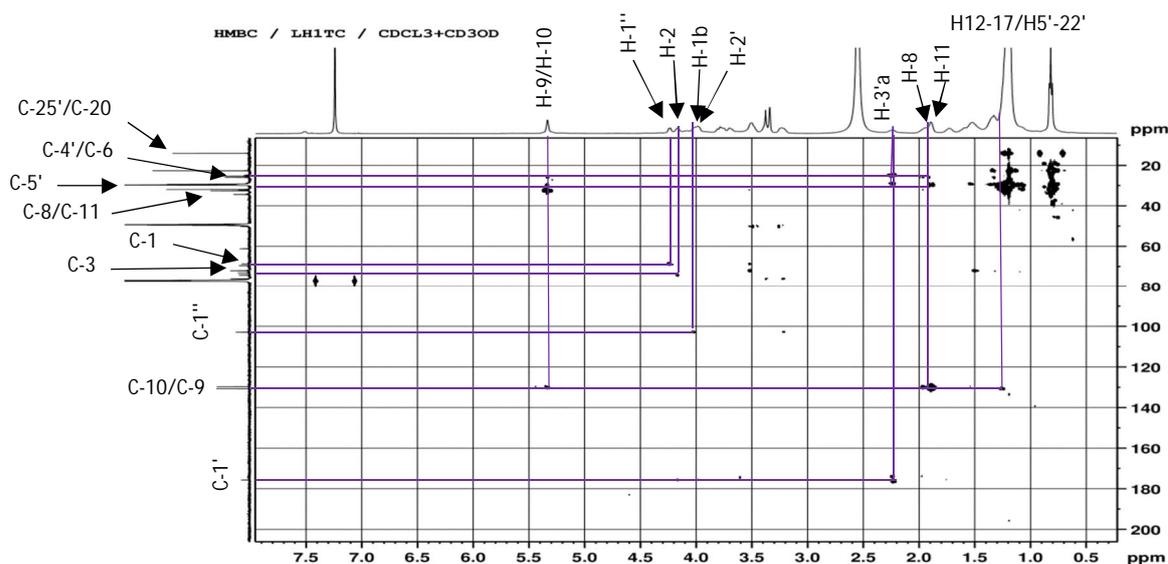


Figure 44- Spectre HMBC (600 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de TC3

La méthanolyse, du composé **TC3** a donné un ester méthylique d'acide gras, un mélange d'anomères α et β de méthyl glucoside et une LCB. L'ester méthylique a été identifié comme étant l'ester méthylique de l'acide 2-hydroxytétracosanoïque par analyse GC-MS (Fig. 45), avec le pic de l'ion moléculaire à m/z 398 $[M]^+$, correspondant à la formule $C_{25}H_{50}O_3$. La stéréochimie relative du carbone C-2' de l'ester méthylique d'acide gras est *R* car sa valeur du pouvoir rotatoire mesuré ($[\alpha]_D^{25} - 1,7$) est identique à celle déjà rapportée dans la littérature pour le même ester méthylique (attar-ur-Rahman, 2008). Les configurations absolues de C-2 et C-3 sont respectivement *2S*, *3R* (Karlsson, 1970).

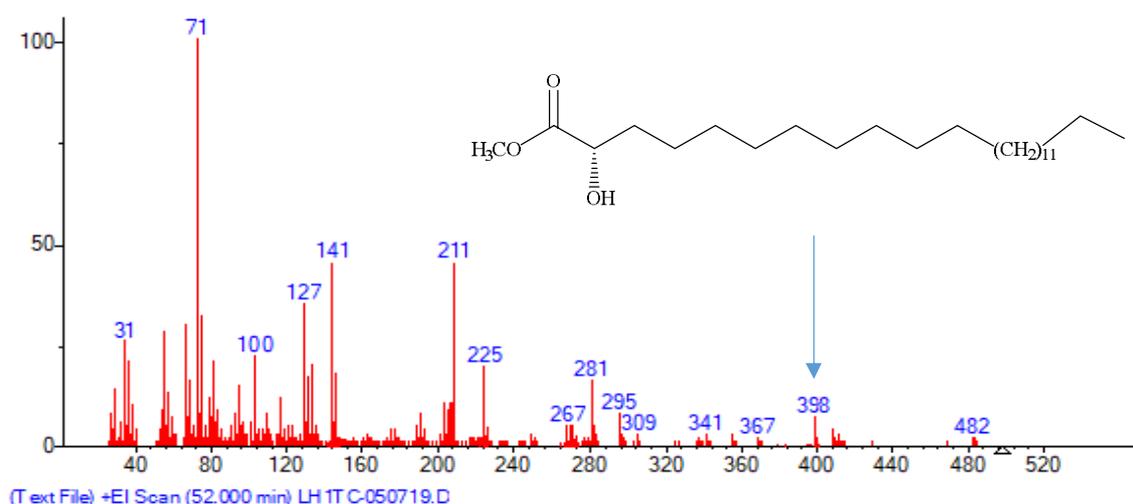
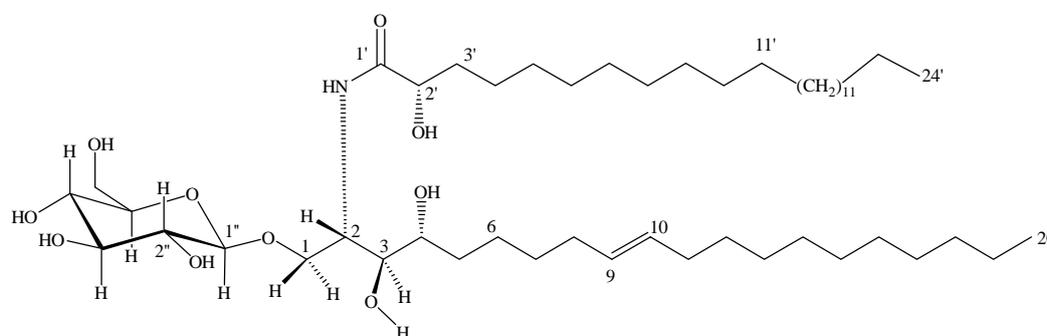


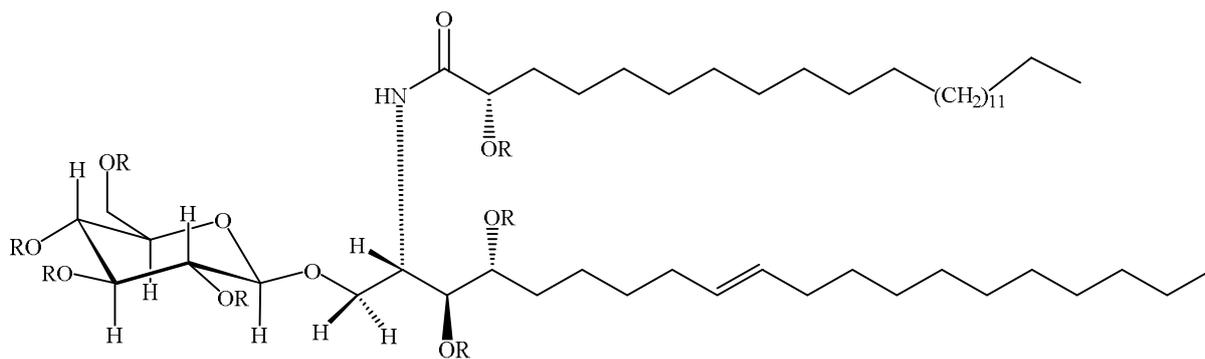
Figure 45- Spectre GC-MS de la 2-hydroxytétracosanoate de methyle

La configuration relative de C-4 a été déterminée comme étant *R* par comparaison aux déplacements chimiques précédemment rapportées (Gao *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2003). Sur la base de ces résultats supra cités, **TC3** a été établie comme la 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-(*2S**, *3R**, *4R**, *6E*)-2-[(*2R*'*)-2'-hydroxytétracosanoylamino]-1,3,4-éicosanetriol-9-ène, dérivé nouveau et nommé tabernamide B (**66**) (publication en cours de rédaction).



TC3

Tabernamide B (**66**)



TC3a (66a) : R = Ac

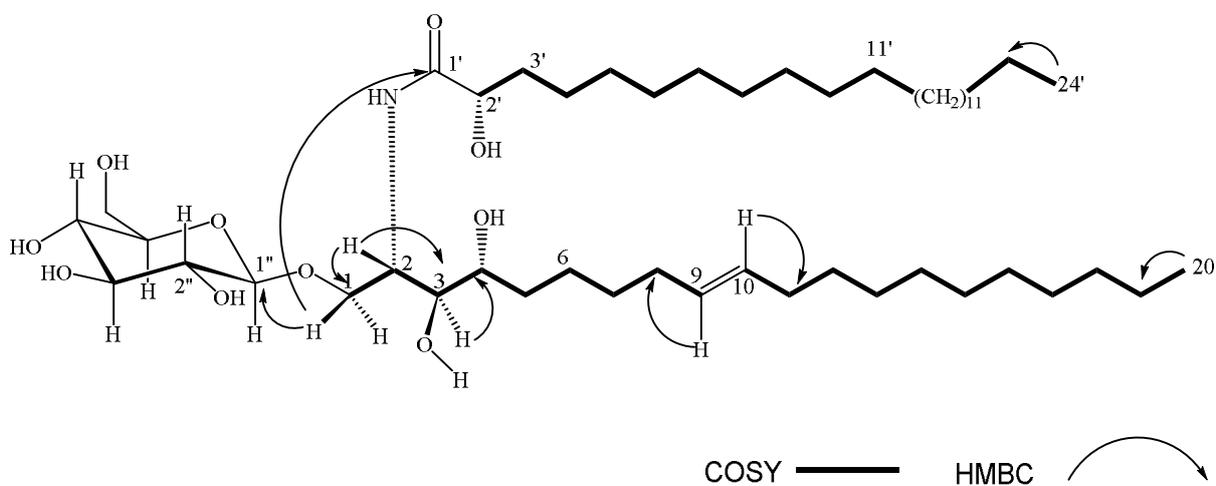


Schéma 10- Quelques correlations HMBC et COSY de TC3

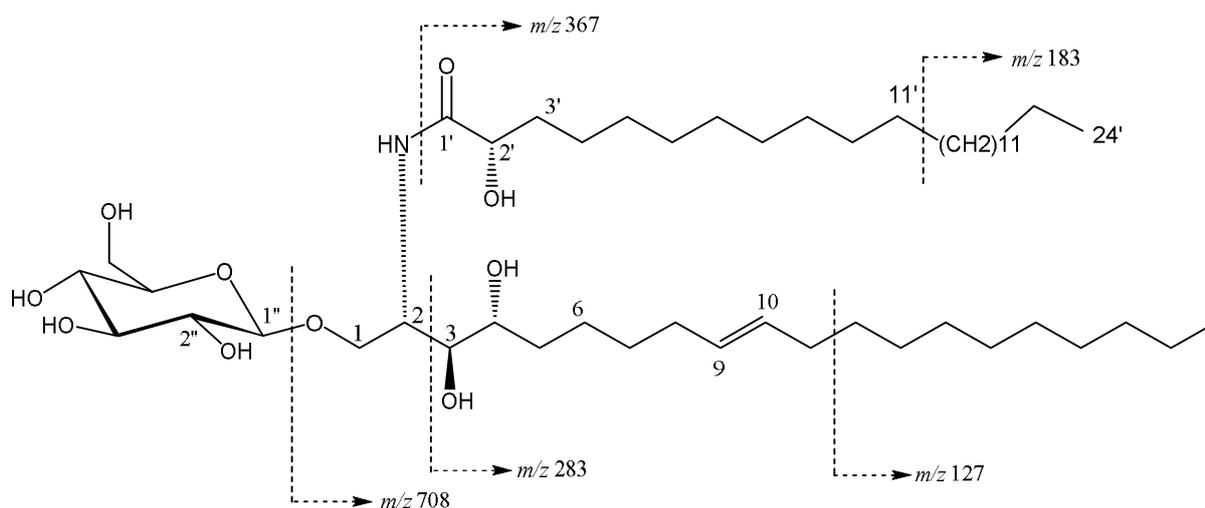


Schéma 11- Fragmentations issues du spectre de masse FAB-MS de TC3

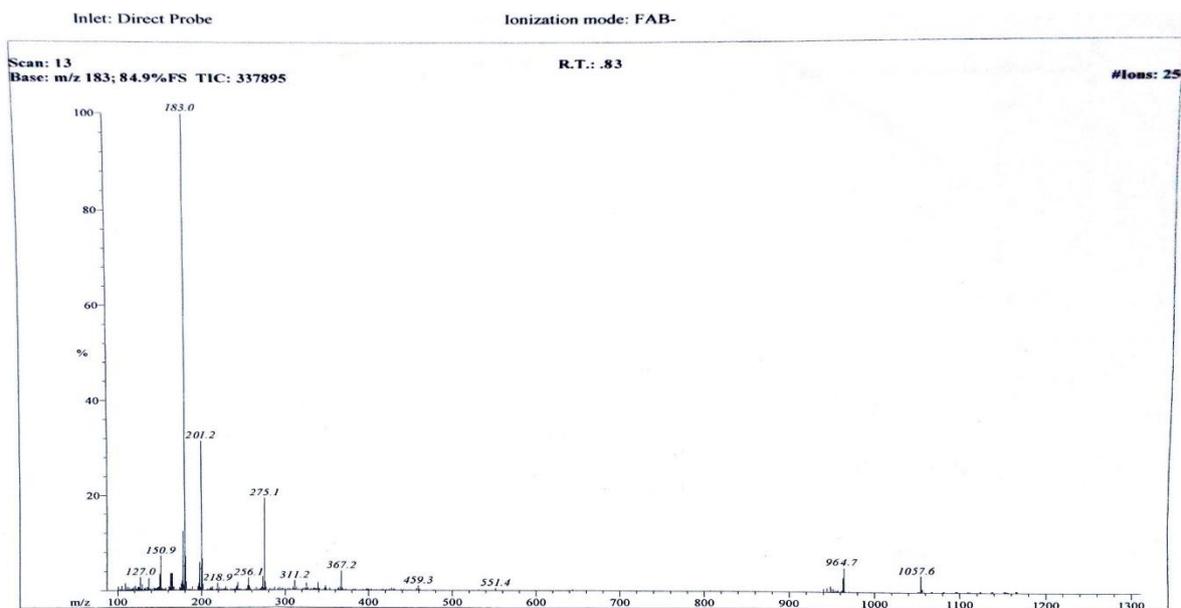


Figure 46- Spectre de masse (-)-FAB-MS du dérivé DMDS (TC3b)

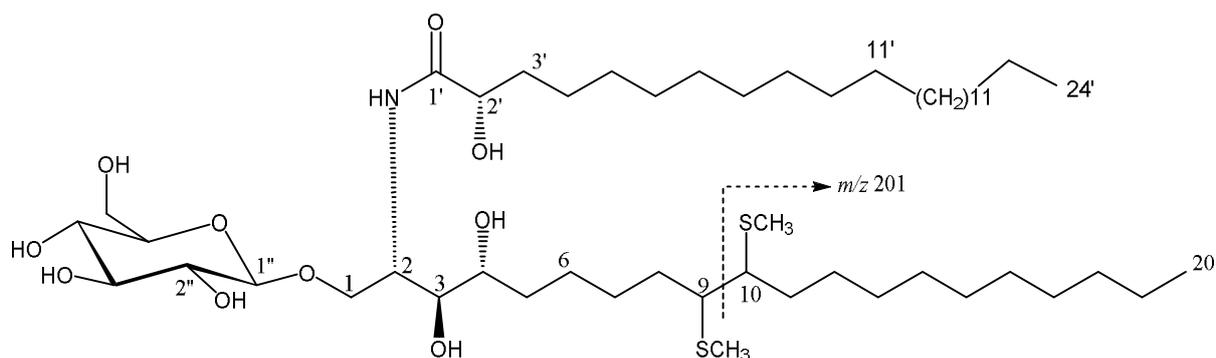


Schéma 12- Dérivé DMDS (TC3b : 66b) et fragmentation FAB-MS

Tableau 6- Données spectrales RMN du composé TC3 (CDCl₃ + CD₃OD, 600 et 150 MHz)

Position	δ_H [m, J (Hz)]	δ_C	HMBC	¹ H- ¹ H COSY
1a	4,02 (m)	68,3	C-1', C-1''	H-2
1b	3,74 (dd; 7,2 ; 10,0)	68,3		H-2
2	4,16 (m)	50,2	C-1', C-3	H-3
3	3,51 (m)	74,2	C-1, C-2, C-4, C-5	H-2
4	3,48 (m)	72,1	C-1, C-2	
5a	1,60 (m)	32,0	C-6, C-7	H-4
5b	1,33 (m)	32,0	C-6, C-7	H-4
6	1,20 (m)	25,8	C-5	H-5
7	1,26 (brs)	29,7	C-8	H-8
8	1,96 (m)	32,6	C-9	H-7
9	5,34	129,7	C-8	H-8
10	5,32	130,7	C-11	
11	1,91	32,5		
12 – 17	1,19-1,34 (brs)	29,1-29,7	C-18, C-19	H-11
18	1,53	31,7		
19	1,21	22,6		
20	0,82 (t; 6,7)	14,0	C-18, C-19	H-18
1'		175,7	-	
2'	3,98 (m)	72,0		H-3'
3'a	2,23 (m)	34,3	C-1', C-3', C-4'	
3'b	1,72 (m)	34,3		
4'	1,52	24,8		
5' – 22'	1,19-1,34 (brs)	29,1-29,7		H-4'
23'	1,53	31,7		
24'	1,21	22,6		H-25'
25'	0,82 (t; 6,7)	14,0	C-23', C-24'	H-24'
Glucose				
1''	4,24 (d; 7,6)	102,8	C-1	H-2''
2''	3,22 (dd; 8,0 ; 14,7)	73,6	C-1'', C-3''	H-1'', H-3''
3''	3,24 (m)	76,0	C-5''	H-2'', H-4''
4''	3,37 (dd; 12,3 ; 4,0)	69,5	C-3''	H-3'', H-5''
5''	3,25 (m)	76,1	C-3''	H-4'', H-6''
6''a	3,77 (dd; 11,2 ; 15,0)	61,1		H-5''
6''b	3,69 (m)	61,1		H-5''

II.2.4.2.4. Identification de TC4

TC4 se présente sous forme de solide brun amorphe soluble dans le MeOH et répond positivement au test de Dragendorff. Son spectre de masse (Fig. 47) en ESI haute résolution révèle le pic de l'ion moléculaire à m/z 326,1909 $[M+H]^+$, suggérant la formule moléculaire $C_{20}H_{25}N_2O_2^+$ avec 10 degrés d'insaturation.

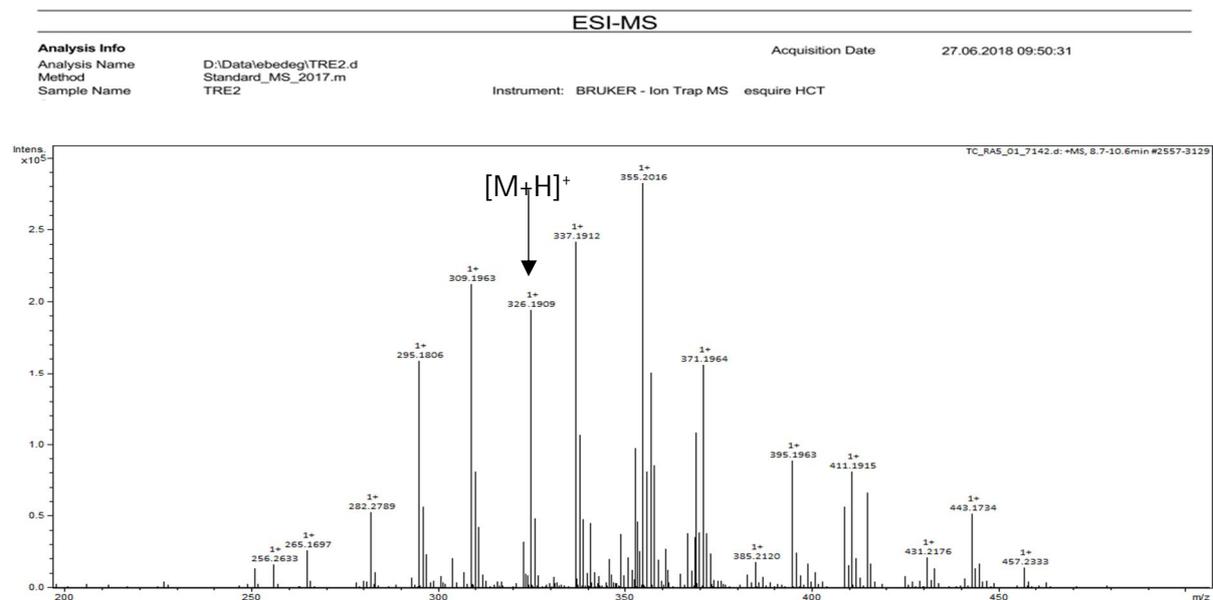


Figure 47- Spectres de masse (+)-HRESI-MS du composé TC4

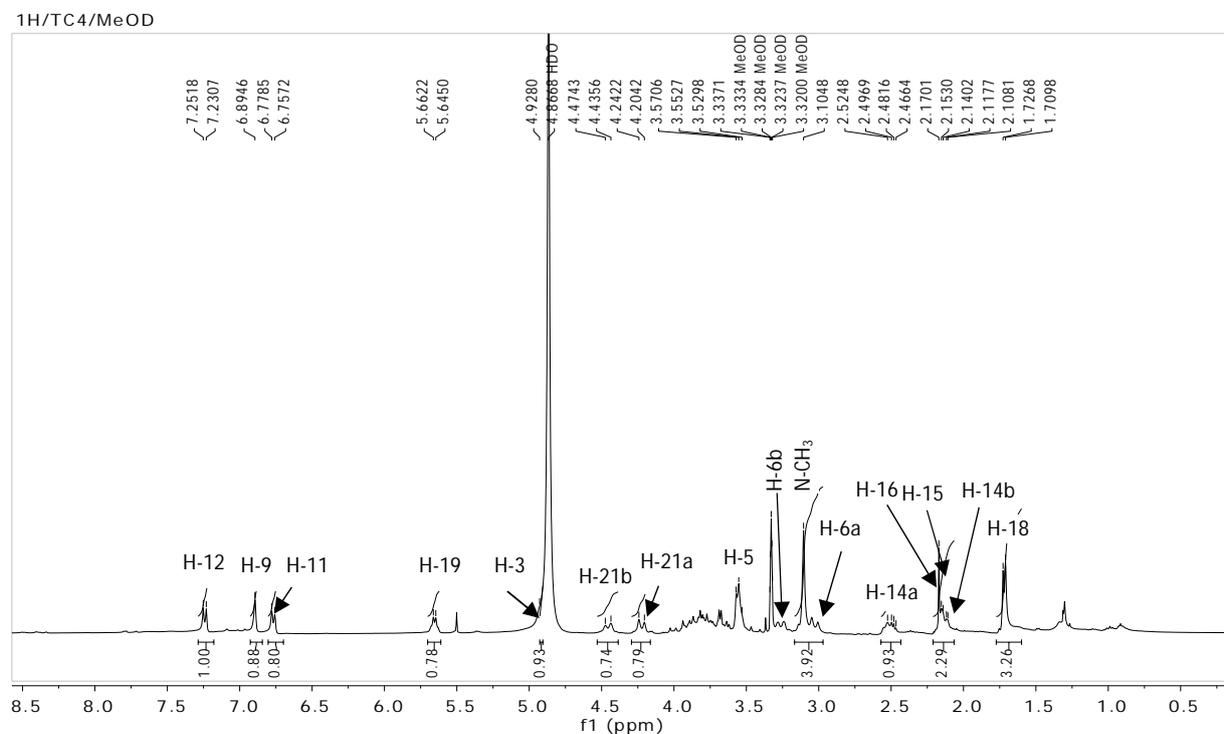


Figure 48- Spectre RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) du composé TC4

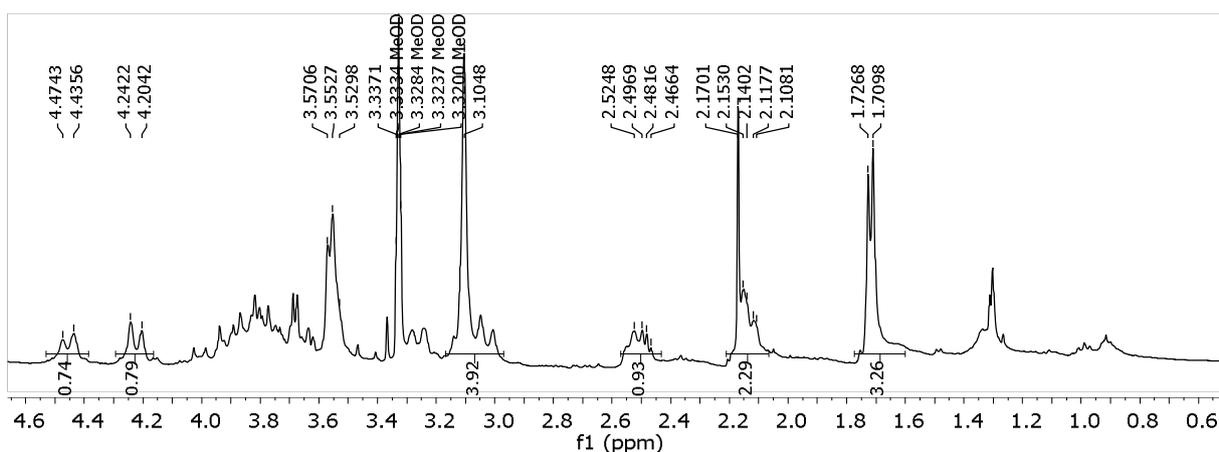
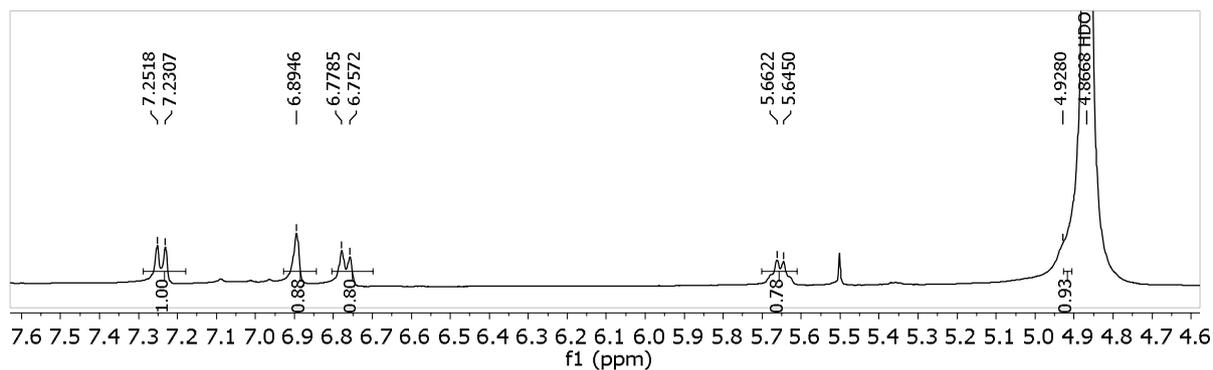


Figure 49- Spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) élargi du composé TC4

$^{13}\text{C}/\text{TC4}/\text{MeOD}$

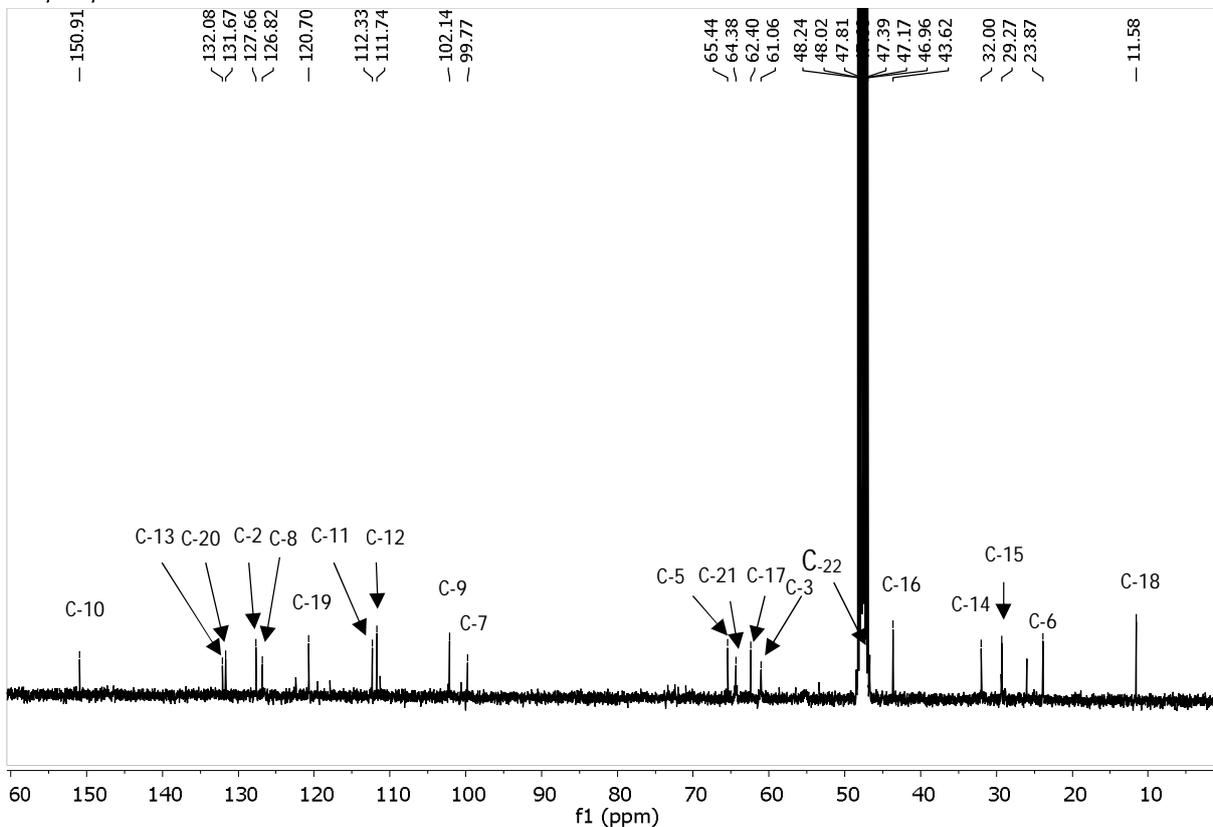
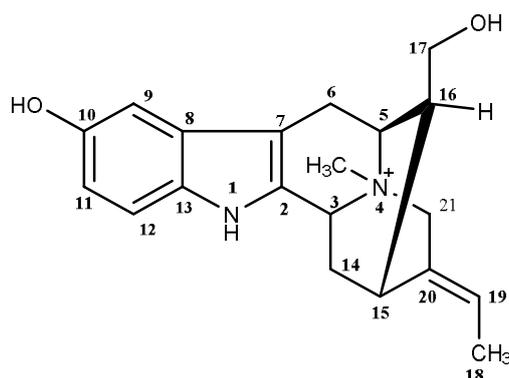


Figure 50- Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) du composé TC4

La RMN ^1H (Fig. 48) présente des signaux de protons aromatiques d'un noyau indole monosubstitué dont : des doublets à δ_{H} 7,22 (1H, d, $J = 8,7$ Hz) et 6,76 (1H, d, $J = 8,7$ Hz) correspondant aux protons H-12 et H-11 respectivement, un singulet à δ_{H} 6,89 correspondant à un proton en position 9 ; un groupe éthylidène à δ_{H} 1,73 (3H, d, $J = 6,8$ Hz) en position 18 et un doublet à δ_{H} 5,66 (1H, q, $J = 6,8$ Hz) affecté à un proton en position 19. Le groupe $\text{N}^+\text{-Me}$ à δ_{H} 3,12 qui est un groupe attracteur d'électrons puissant, laisse les protons H-21 apparaître à δ_{H} 4,45 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H-21b) et 4,22 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H-21a), respectivement. Le signal à δ_{H} 3,56 (2H, d, $J = 7,2$ Hz) indique la présence d'un groupe hydroxyle attaché à un méthylène (δ_{C} 62,4, C-17) et attribuable aux protons de l'oxyméthylène (H-17).

Sur le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 49), on observe 20 signaux de carbone non équivalents, ce qui est cohérent avec le résultat du spectre de masse ESI. L'attribution totale effectuée (Tableau 7) par un examen approfondi de la RMN 1D (RMN ^1H et RMN ^{13}C), 2D (COSY, HSQC et HMBC) et en comparaison avec les données de la littérature a permis d'identifier le composé **TC4** à la spégatine (**67**) isolée précédemment de *Rauvolfia caffra* (Tlhapi et al., 2019).



TC4

Spégatine (**67**)

Tableau 7- Données spectrales RMN du composé TC4 (CD₃OD, 400 et 100 MHz) comparées à celles de la littérature (CD₃OD, 400 et 100 MHz)

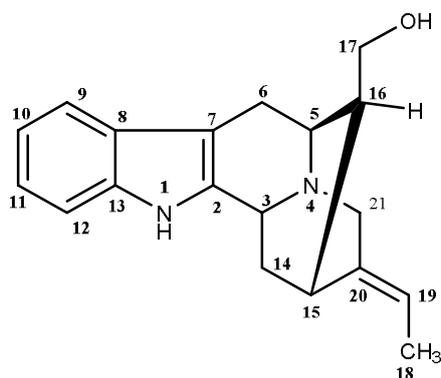
Position	δ_H ppm (m, J en Hz)	δ_C	δ_H ppm (m, J en Hz)	δ_C
			(Tlhapi et al., 2019)	
C				
2	-	131,7	-	132,1
7	-	99,8	-	99,8
8	-	126,8	-	127,7
10	-	150,9	-	150,9
13	-	132,1	-	131,6
20	-	127,7	-	126,8
CH				
3	4,85 (m)	61,1	4,86 (m)	61,1
5	3,55 (m)	65,4	3,56 (m)	65,5
9	6,89 (s)	102,1	6,90 (d; 2,0)	99,8
11	6,76 (d; 8,7)	112,3	6,78 (dd; 2,0 ; 8,7)	111,7
12	7,22 (d; 8,7)	111,8	7,24 (d; 8,8)	112,3
15	2,16 (brs)	29,3	3,12 (dd; 2,0 ; 10,4)	26,0
16	2,18 (m)	43,3	2,23 (m)	43,6
19	5,66 (q; 6,8)	120,7	5,68 (q; 6,8)	120,7
CH ₂				
6a	3,05 (m)	23,9	3,04 (d; 17,2)	23,9
6b	3,25 (m)		3,27 (dd; 4,8 ; 12,4)	
14a	2,52 (brs)	32,0	2,54 (dd; 10,8 ; 11,2)	32,0
14b	2,14 (m)		2,13 (m)	
17	3,56 (d; 7,2)	62,4	3,58 (d; 7,6)	62,4
21a	4,22 (d; 15,0)	64,4	4,23 (d; 15,6)	64,4
21b	4,45 (d; 15,0)		4,45 (d; 15,6)	
CH ₃				
18	1,73 (d; 6,8)	11,6	1,74 (d; 6,8)	11,6
N-CH ₃				
22	3,10 (s)	46,7	3,15 (s)	46,7

II.2.4.2.5. Identification de TC5

Le composé **TC5** a été isolé sous forme d'un solide brun soluble dans le $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ et est alcalino-positif au réactif de Dragendorff. L'analyse du spectre EI-MS a montré le pic de l'ion moléculaire à m/z 294 $[\text{M}]^+$ vérifiant la formule moléculaire $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ et possédant 10 degrés d'insaturation.

Le spectre RMN ^1H (Fig. 51) montre des atomes d'hydrogène liés à un cycle indole à δ_{H} 7,04 (1H, t, $J = 7,0$; H-10) ; 7,11 (1H, ddd, $J = 8,2$; 7,0 ; 1,2 Hz ; H-11) ; 7,37 (1H, dd, $J = 8,2$; 3,6 Hz ; H-12) ; 7,44 (1H, d, $J = 7,0$ Hz ; H-9); trois méthylènes à δ_{H} 1,94 (1H, m, H-14a) et 3,00 (1H, d, $J = 3,1$; H-14b), 4,04 (1H, m, H-21a) et 3,83 (1H, m, H-21b) ; 3,21 (2H, m, H-6); un méthylène hydroxylé à δ_{H} 3,21 (1H, m, H-17b) et 3,45 (1H, m, H-17a); des méthines respectifs à δ_{H} 5,24 (1H, d, $J = 7,1$ Hz ; H-19) indiquant à la présence d'une double liaison ; 4,70 (1H, d, $J = 10,7$; H-3) ; 3,46 (2H, m, H-5) et 2,39 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-16); un méthyl terminal à δ_{H} 1,62 (3H, dd, $J = 7,1$; 1,9 Hz, H-18).

Le spectre RMN ^{13}C (Fig. 52) couplé au DEPT 135 présente 20 signaux de carbone, dont deux atomes de carbone insaturés à δ_{C} 119,5 (C-19) et 129,2 (C-20) ; huit autres atomes de carbone insaturés formant un cycle indole à δ_{C} 124,9 (C-8) ; 118,1 (C-9) ; 119,8 (C-10) ; 122,8 (C-11) ; 112,2 (C-12) ; 137,0 (C-13) ; 130,1 (C-2) ; 103,8 (C-7) et 10 atomes de carbone aliphatiques à δ_{C} 51,4 (C-3) ; 54,6 (C-5) ; 20,9 (C-6) ; 26,0 (C-14) ; 25,5 (C-15) ; 40,3 (C-16) ; 59,9 (C-17) ; 12,8 (C-18) et 55,2 (C-21); sur la base de ces données spectrales ajoutées à celles révélées par les spectres RMN 2D (Tableau 8) et à celles de la littérature, le composé a été identifié à la tombozine (**68**) (ou normacusine B) préalablement isolée de *Peschiera fuchsiaefolia* et *Vinca difformis* (Braga et Reis, 1987 ; Garnier et Mahuteau, 1986).



TC5

Tombozine (**68**)

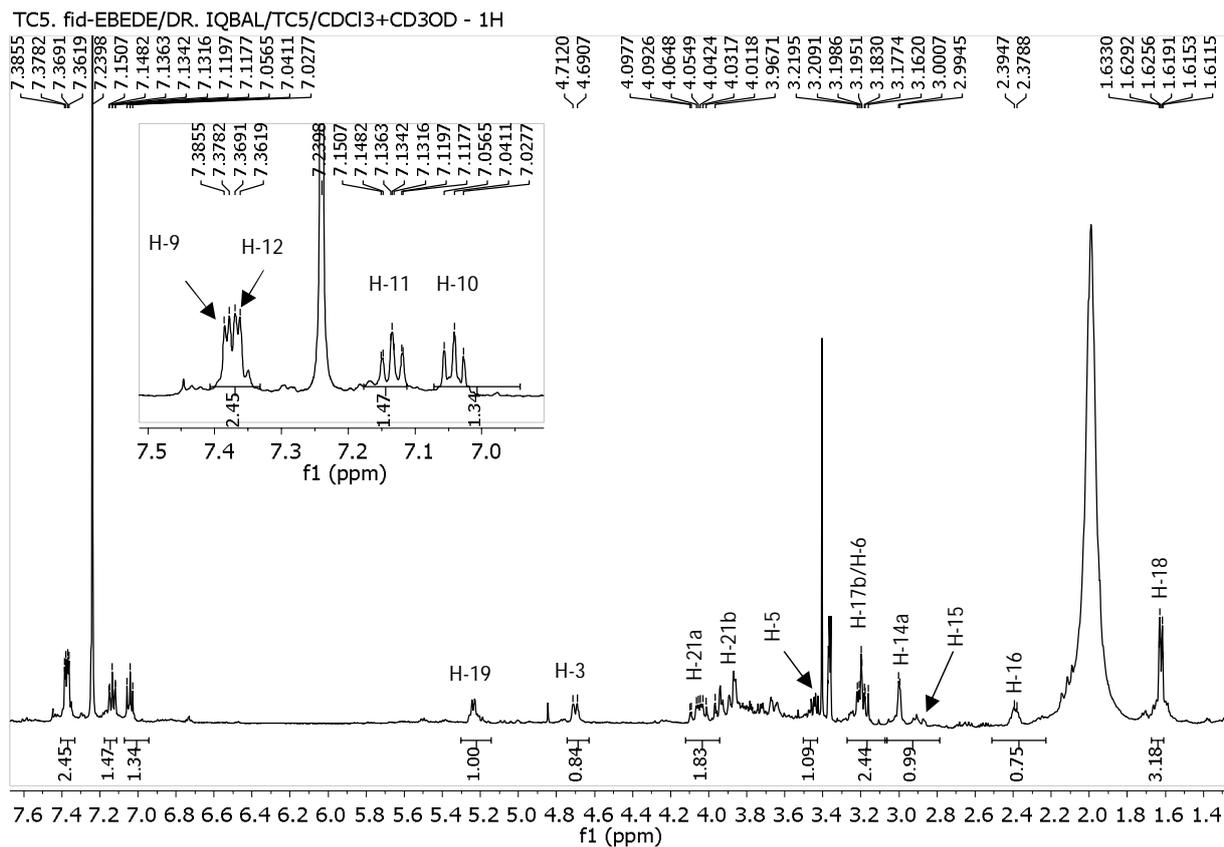


Figure 51- Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) du composé TC5

apr10-19.6.fid - EBEDE/DR.IQBAL/TC5/CDCI3+CD3OD - 13C

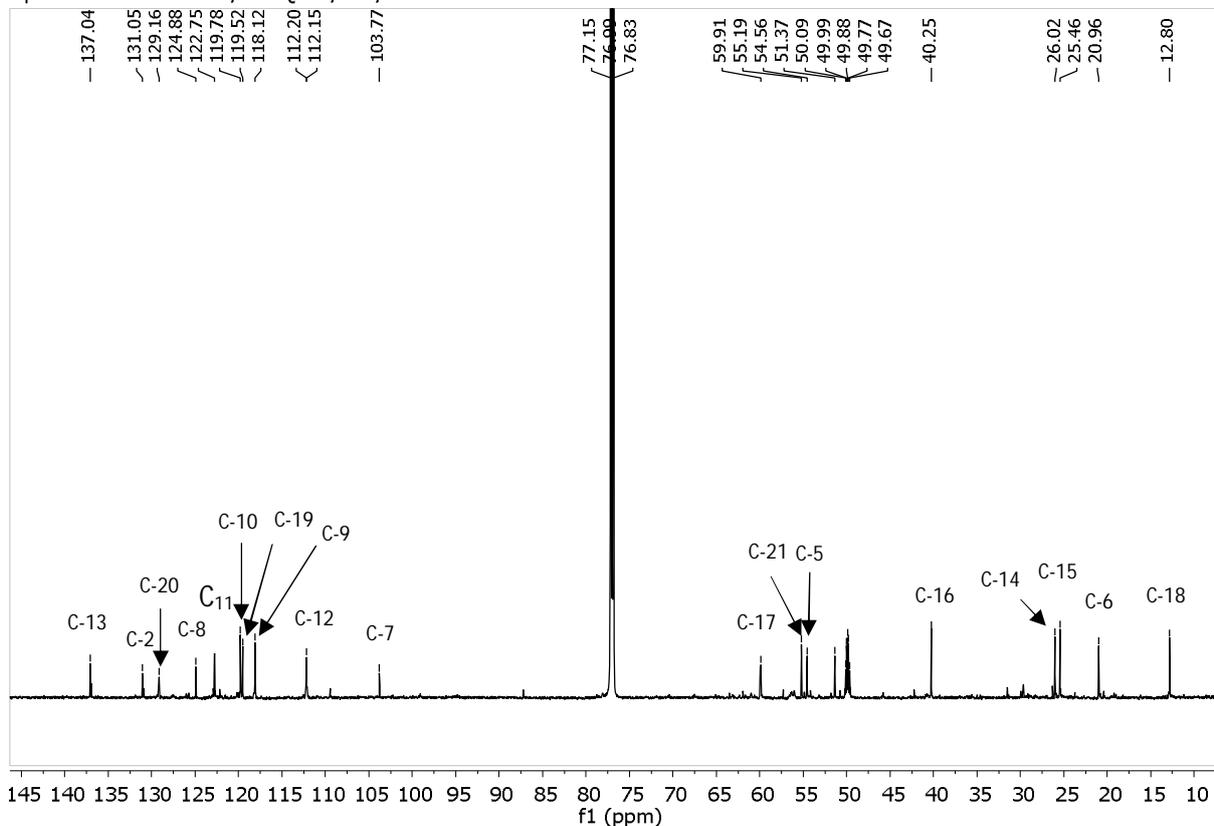


Figure 52- Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) du composé TC5

Tableau 8-Données spectrales RMN du composé TC5 (CDCl₃+CD₃OD, 500 et 125 MHz) comparées à celles de la littérature (DMSO pour RMN ¹H ; CDCl₃ pour RMN ¹³C, 400 et 25 MHz)

position	δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_c	δ_H ppm (m, <i>J</i> en Hz) (Garnier et Mahuteau, 1986)	δ_c (Braga et Reis, 1987)
C				
2	-	131,1	-	132,8
7	-	103,8	-	103,8
8	-	124,9	-	127,1
13	-	137,0	-	136,8
20	-	129,2	-	136,5
CH				
3	4,70 (d; 10,7)	51,4	4,20 (d; 12,0)	50,3
5	3,46 (m)	54,6	2,72 (t; 5,0)	55,5
9	7,44 (d, 7,0)	118,1	7,45	117,9
10	7,04 (t; 7,0)	119,8	7,05	119,2
11	7,13 (ddd; 8,7; 7,0 ; 1,2)	122,8	7,12	121,5
12	7,37 (dd; 8,2 ; 3,6)	112,2	7,38	111,1
15	2,90 (m)	25,5	3,50	27,2
16	2,39 (brd; 8,0)	40,3	1,73 (brq; 5,0))	43,8
19	5,24 (d; 7,1)	119,5	5,45 (q; 7,5)	117,9
CH ₂				
6	3,21 (m)	20,9	2,93 (dd; 5,0 ; 16,0)	26,5
14a	3,00 (d; 8,0)	26,0	2,07 (d; 14,0)	32,8
14b	1,98 (m)		1,62	
17a	3,45 (dd; 7,0 ; 10,7)	60,0	3,43 (m)	64,5
17b	3,21 (m)		3,37 (q; 9,0)	
21a	4,0 (m)	55,2	3,65 (d; 16,0)	55,0
21b	3,83 (m)		3,52 (d; 16,0)	
CH ₃				
18	1,62 (dt; 7,1 ; 1,9)	12,8	1,68 (d; 7,5)	12,7

II.2.4.2.6. Identification de TC6

TC6 a l'aspect d'un solide brun amorphe, soluble dans le $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ et est positif au test de Dragendorff. L'analyse de son spectre EI-MS a montré le pic de l'ion moléculaire à m/z 323 $[\text{M}]^+$ corroborant avec la formule moléculaire $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}^+$ et ayant 10 degrés d'insaturation.

La comparaison des spectres RMN ^1H (Fig. 53) et ^{13}C (Fig. 54) du composé **TC6** avec ceux du composé **TC5** indique que la seule différence entre ces deux composés se trouve au niveau de la présence de deux groupes méthyle dans le composé **TC6** : $\text{N}_1\text{-CH}_3$ (δ_{H} 3,19 et δ_{C} 30,6) et $\text{N}_4\text{-CH}_3$ (δ_{H} 3,62 et δ_{C} 54,9).

L'exploitation des spectres 1D et 2D (Tableau 9) et la comparaison des valeurs des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C du composé **TC6** avec celles de la littérature nous a permis de l'identifier à la N_b -méthyl affinisine (**69**), précédemment isolé de *Peschiera fuchsiaefolia* (Braga et Reis, 1987).

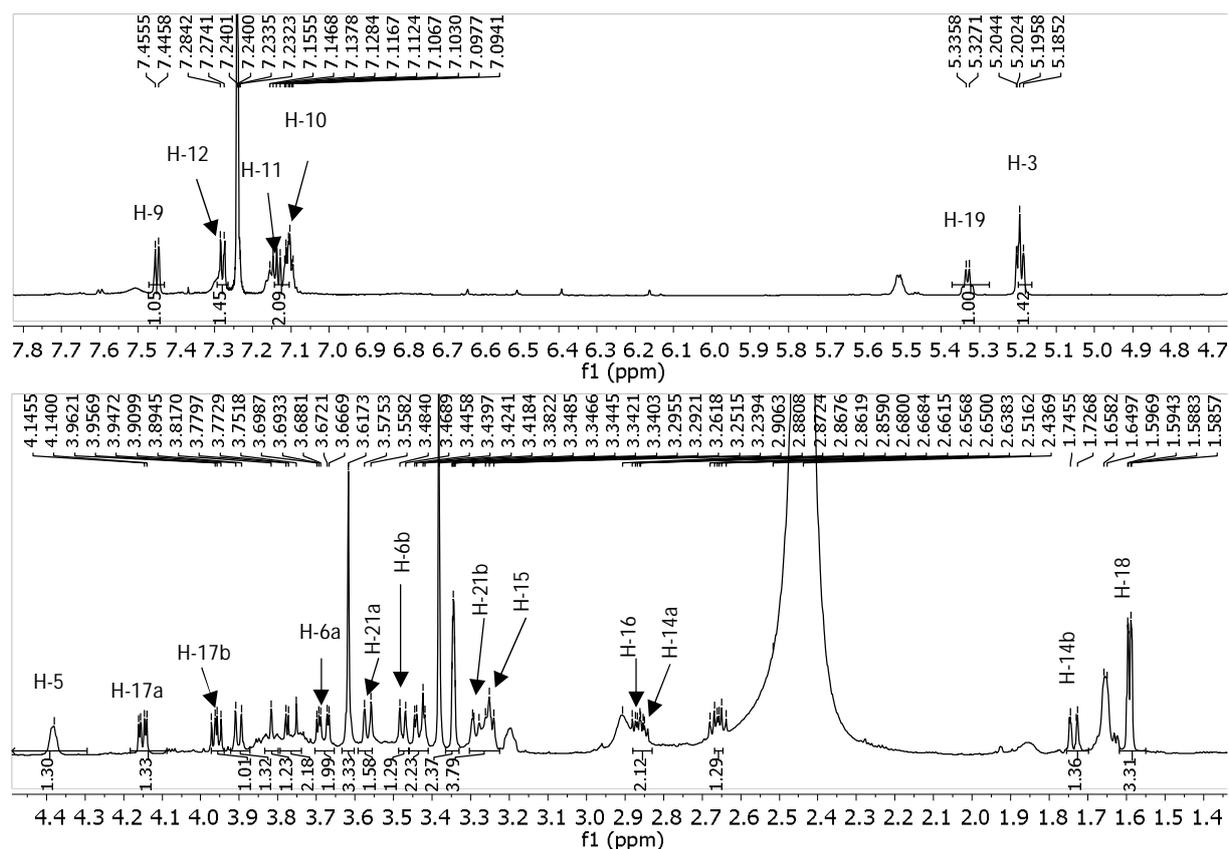


Figure 53- Spectre RMN ^1H (800 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) du composé **TC6**

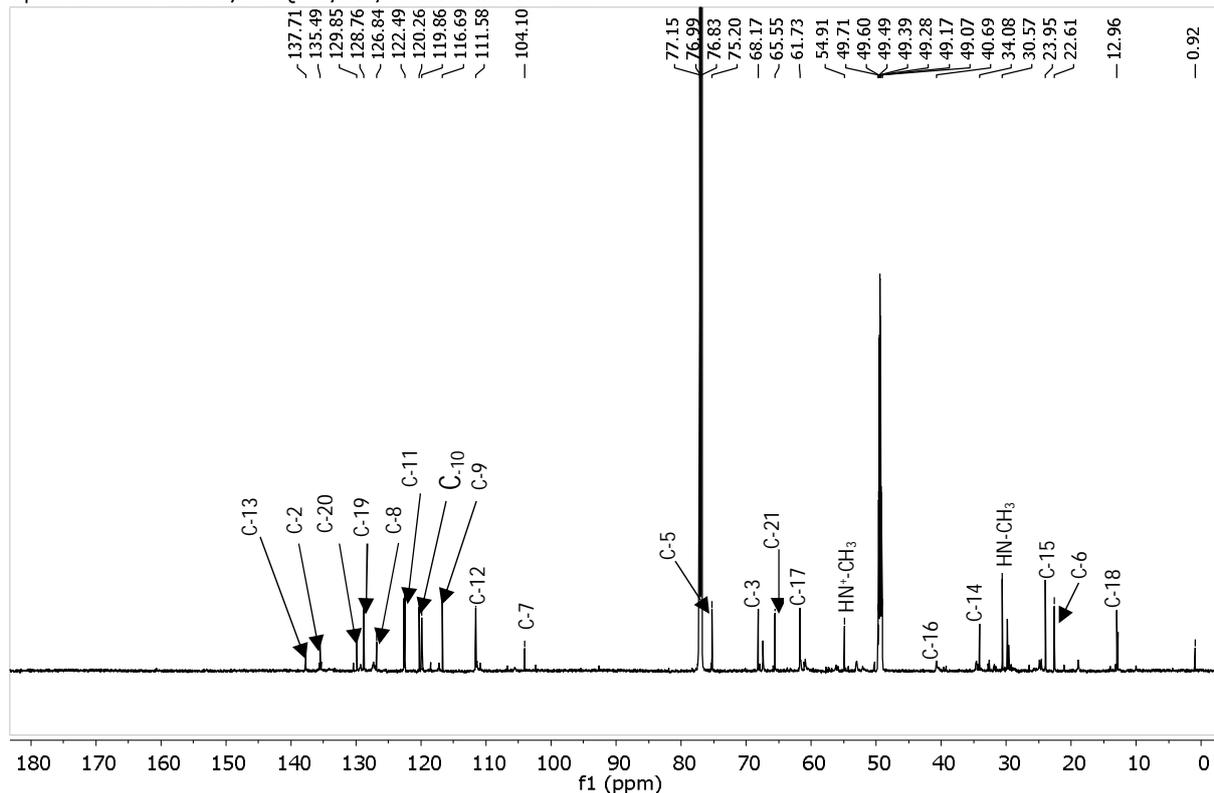
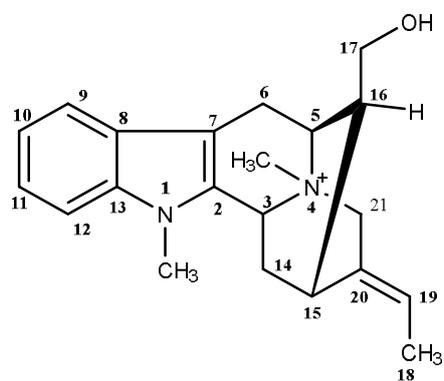


Figure 54- Spectre RMN ^{13}C (200 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) du composé TC6



TC6

N_b -méthyl affinisine (69)

Tableau 9- Données spectrales RMN du composé TC6 (CDCl₃+CD₃OD, 800 et 200 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl₃, 100 et 25 MHz)

position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_C ppm (Braga et Reis, 1987)
C			
2	-	135,5	135,3
7	-	104,1	100,0
8	-	126,9	126,6
13	-	137,7	137,6
20	-	129,9	132,0
CH			
3	5,20 (t; 7,7)	54,9	59,2
5	4,38 (brs)	68,2	65,4
9	7,45 (d; 7,8)	116,7	118,1
10	7,11 (dt; 7,8 ; 3,1)	120,3	119,7
11	7,14 (m)	122,4	120,6
12	7,28 (d; 8,1)	111,6	109,1
15	3,25 (m)	23,9	25,6
16	2,89 (m)	40,7	43,2
19	5,33 (d; 7,0)	119,9	122,4
CH ₂			
6a	3,66 (d; 16,9 ; 4,2)	22,6	24,3
6b	3,42 (d; 4,2)		
14a	2,85 (m)	34,1	31,2
14b	1,74 (m)		
17a	4,15 (dd; 4,4 ; 12,3)	61,7	62,7
17b	3,90 (d; 12,3)		
21a	3,57 (d; 13,7)	65,5	64,5
21b	3,27 (m)		
CH ₃			
18	1,65 (d; 6,8)	12,8	12,3
N- CH ₃	3,19 (s)	30,6	29,4
N ⁺ - CH ₃	3,62 (s)	49,5	47,1

II.2.4.2.7. Identification de TC7

Le composé **TC7** possède des données physico-chimiques et spectrales qui se rapprochent de celles du composé **TC5**. Il se présente sous forme de solide brun amorphe. Sa formule brute $C_{20}H_{24}N_2O$ ayant 10 insaturations est déduite de l'analyse de son spectre de masse EI-MS qui a présenté le pic de l'ion moléculaire $[M]^+$ à m/z 308.

La comparaison des spectres RMN 1D et 2D du composé **TC7** avec ceux du composé **TC5** indique que la seule différence entre ces deux composés se trouve au niveau de l'existence de la liaison N_1-CH_3 (δ_H 3,75 et δ_C 29,7) dans le cas du composé **TC7**, contrairement au composé **TC5** qui n'en possède pas.

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des spectres RMN 1H (Fig. 55) et ^{13}C du composé **TC7** avec celles de la littérature (Tableau 10) nous a permis de l'identifier à l'affinisine (**70**), déjà isolé de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Zocoler et al., 2005).

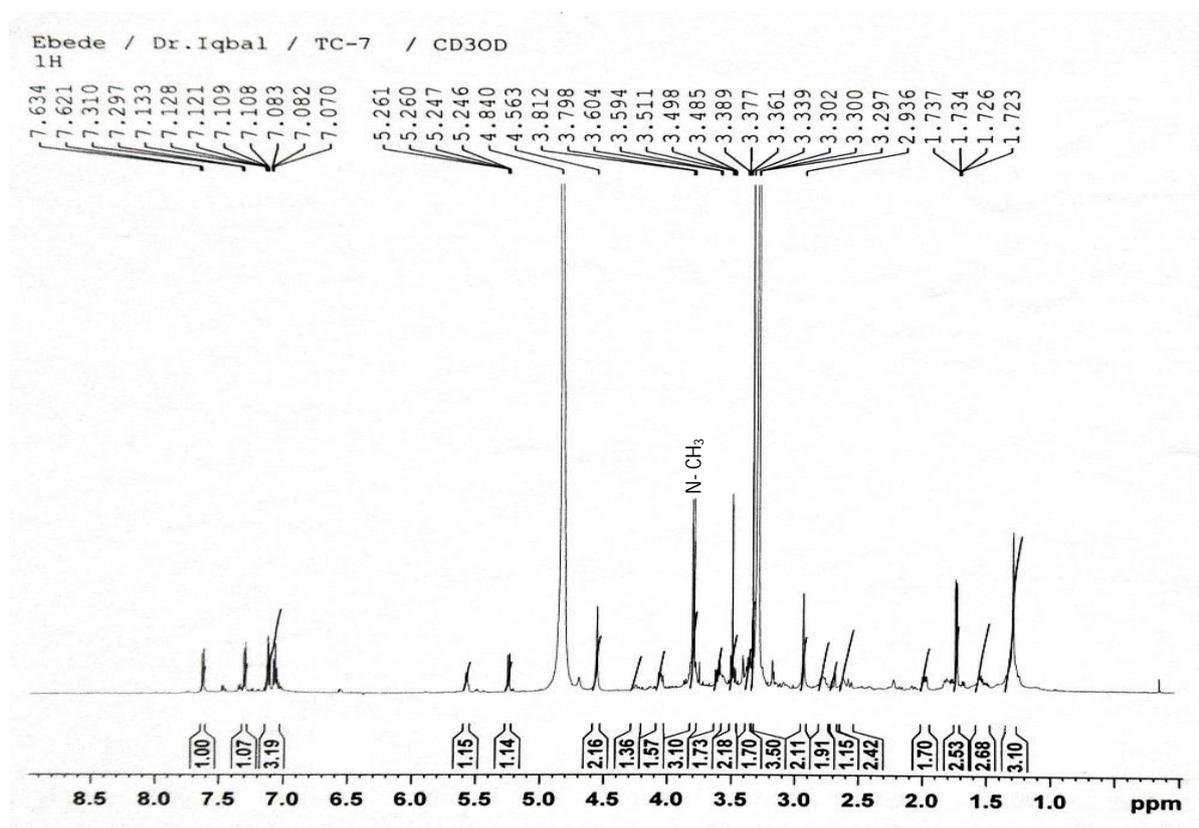
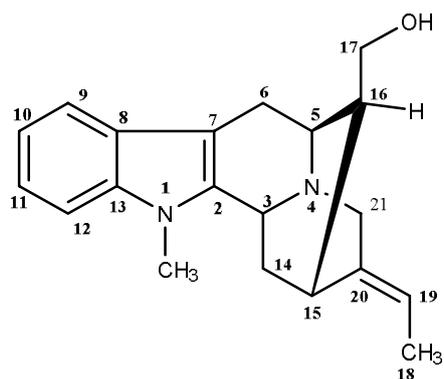


Figure 55- Spectre RMN 1H (600 MHz, CD_3OD) du composé **TC7**



TC7
Affinisine (70)

Tableau 10- Données spectrales RMN du composé TC7 (CD₃OD, 600 et 150 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl₃, 300 et 75 MHz)

position	δ_H ppm (m, J)	δ_C ppm	δ_H ppm (m, J en Hz)	
			(Zocoler et al., 2005)	
C				
2	-	139,1	-	139,8
7	-	103,5	-	103,7
8	-	127,4	-	127,5
13	-	137,3	-	137,4
20	-	135,3	-	136,4
CH				
3	5,25 (t; 7,6)	49,2	4,21 (dd; 2,7 ; 9,9)	49,4
5	4,56 (brs)	53,8	2,79 (dd; 1,2 ; 6,0)	54,5
9	7,62 (d; 7,8)	117,1	7,48 (bd; 7,5)	118,2
10	7,08 (dt; 7,8 ; 3,1)	118,9	7,09 (ddd; 1,2 ; 7,5 ; 8,4)	118,9
11	7,12 (m)	121,2	7,18 (ddd; 1,2 ; 8,1 ; 8,4)	120,9
12	7,30 (d; 8,1)	108,3	7,29 (bd; 8,1)	108,8
15	3,26 (m)	27,4	2,83 (m)	27,5
16	1,90 (m)	43,7	1,87 (m)	44,3
19	5,26 (d; 6,9)	118,3	5,42 (bq; 6,9)	116,6
CH ₂				
6a	2,67 (dd; 4,2 ; 15,6)	26,8	2,63 (dd, 1,2 ; 15,6)	27,0
6b	3,07 (d; 4,2)		3,06 (dd; 4,8 ; 15,6)	
14a	1,73 (m)	32,7	1,67 (m)	32,9
14b	2,93 (m)		2,08 (ddd; 2,4 ; 10,2 ; 11,4)	
17a	3,51 (m)	64,9	3,52 (dd; 8,4 ; 10,5)	65,1
17b	3,59 (d; 12,3)		3,60 (dd; 8,1 ; 10,5)	
21a	3,90 (d; 13,7)	55,8	3,62 (m)	56,4
21b	3,30 (m)			
CH ₃				
18	1,65 (d; 6,8)	12,8	1,65 (dd; 2,1; 6,9)	12,7
N- CH ₃	3,75 (s)	29,7	3,64 (s)	29,2

II.2.4.2.8. Identification de TC8

Le composé **TC8** de formule moléculaire $C_{30}H_{46}O_5$ (8 insaturations) a été isolé sous forme de poudre blanche amorphe soluble dans le méthanol. Son spectre de masse HRESI-MS (Fig. 56) montre le pic de l'ion *pseudo*-moléculaire à m/z 487,3416 $[M+H]^+$ (masse calculée 487,3345). Le spectre d'absorption UV montre deux maxima à 229 et 282 nm, suggérant la présence d'une unité terpenoïdique et des doubles liaisons (Ponomarev et *al.*, 1971). En outre, le spectre IR indique la présence de groupes hydroxyle (3328 cm^{-1}) et carbonyle (1720 cm^{-1}).

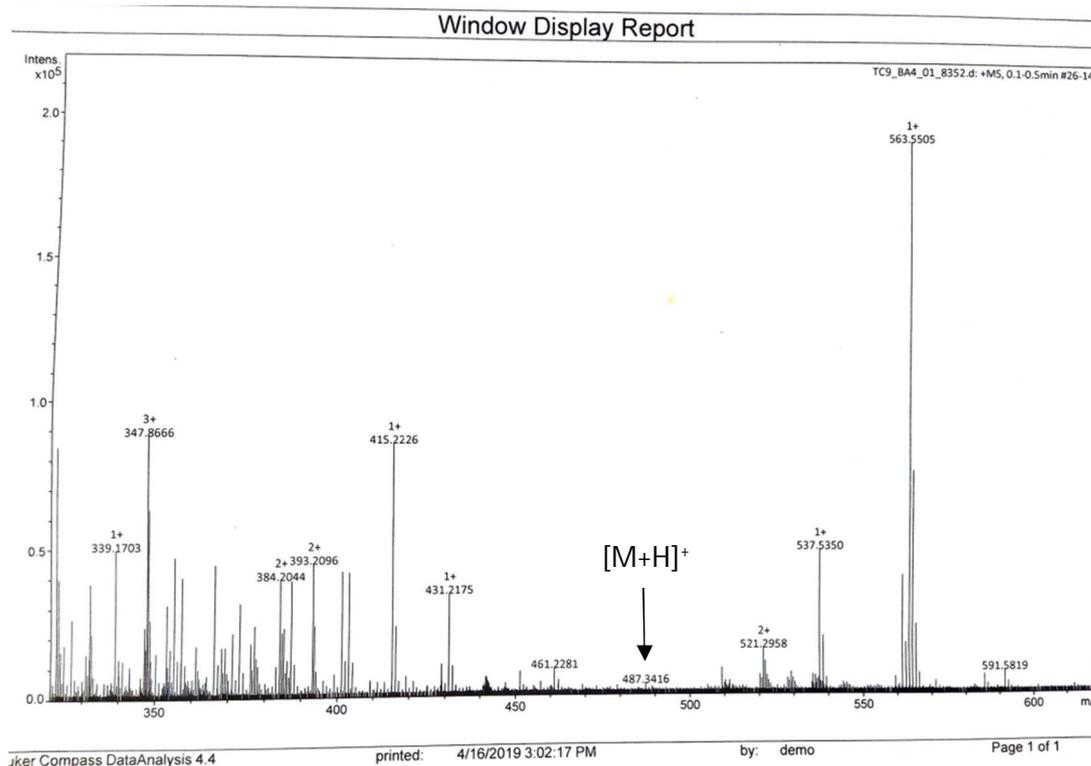


Figure 56- Spectre de masse (+)-HRESI-MS de TC8

Le spectre RMN 1H (Fig. 57) de **TC8** montre cinq groupes méthyle tertiaires à δ_H 0,78 (s, H-25) ; 0,85 (s, H-27) ; 1,01 (d ; $J = 6,8$; H-29) ; 1,03 (s, H-24) et 1,19 (s, H-26). On observe également deux signaux d'oxyméthine et un signal d'oxyméthylène à δ_H 3,62 (d, $J = 9,5$ Hz, H-3) ; 3,89 (1H, ddd, $J = 4,5$; 9,4 ; 11,5 Hz ; H-2) ; 3,54 (d, $J = 11,0$ Hz, Ha-23) et 3,71 (chevauchement, Hb-23), portés par des carbones à δ_C 78,7 (C-3) ; 67,2 (C-2) et 71,3 (C-23) respectivement indiquant la présence de trois groupes hydroxyle. En outre, le spectre RMN 1H montre également un signal oléfinique à δ_H 5,27 (brs, H-12) caractéristique de la double liaison en position 12 et deux signaux pour un exométhylène à δ_H 4,67 (d, $J = 1,7$ Hz, Ha-30) et δ_H 4,67 (d, $J = 1,8$ Hz, Hb-30) suggérant la présence d'une autre double liaison en position 29.

Les données spectrales RMN ^{13}C (Fig. 59) et RMN 2D de **TC8** présentent les caractéristiques structurales d'un ursa-diene (Mahato et Kundu, 1994), avec 30 signaux de

carbone dont : un carbonyle à δ_C 181,0 (C-28), un méthine oléfinique à δ_C 127,0 (C-12), un carbone oléfinique quaternaire à δ_C 139,5 (C-13), un groupe exométhylène à δ_C 105,2 (C-30) et 154,6 (C-20), (Tableau 11).

La comparaison des spectres de RMN (1D et 2D) et de dichroïsme circulaire du composé (Fig. 58) **TC8** avec ceux de la littérature nous permet de l'identifier à l'acide $2\alpha, 3\alpha, 23$ -trihydroxyursa-12,20(30)-dien-28-oïque (**71**), composé connu, précédemment isolé de *Actinidia polygama* par Yutaka et collaborateurs (1992).

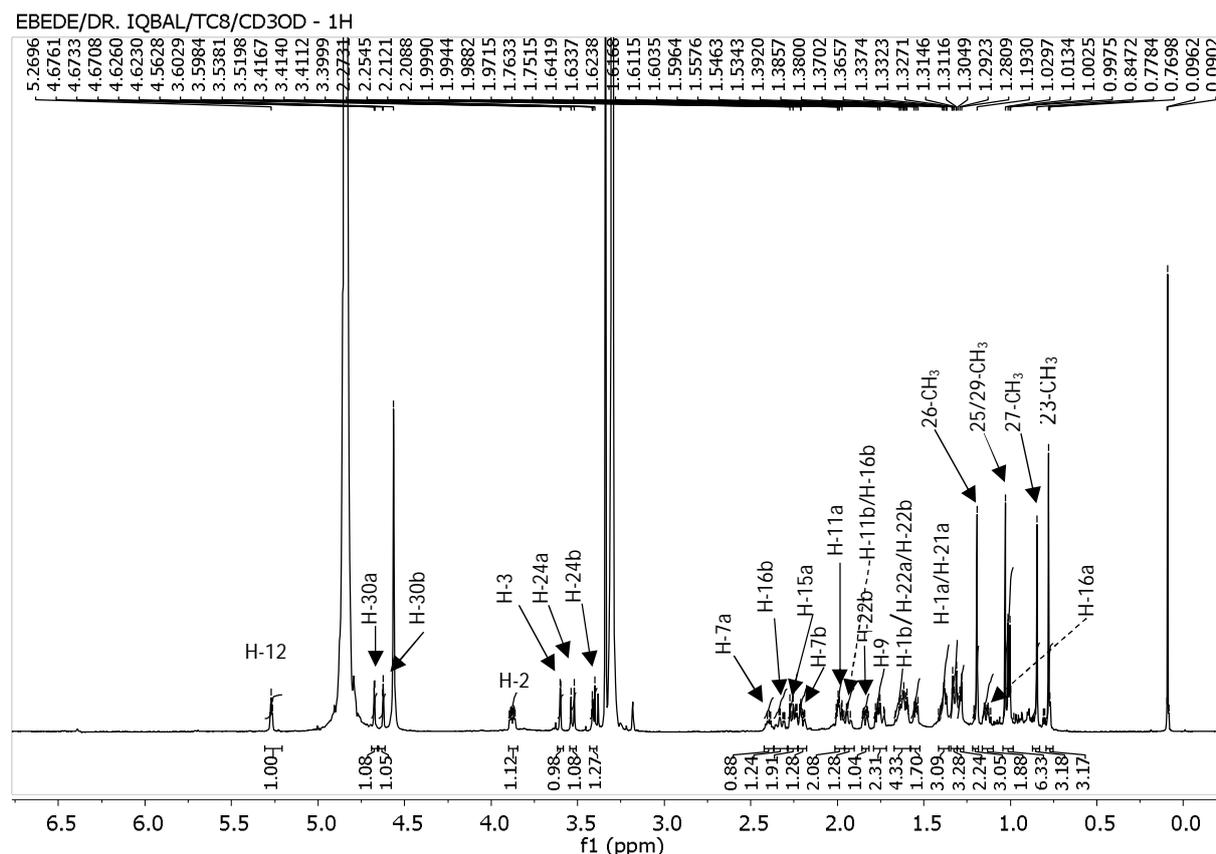


Figure 57- Spectre RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) du composé TC8

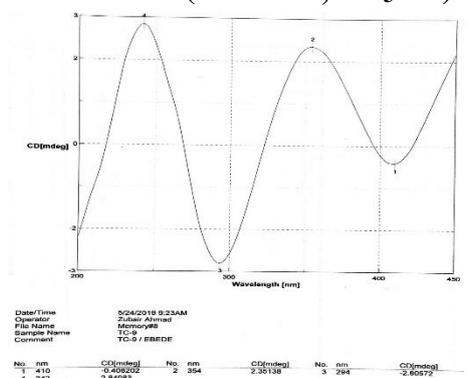


Figure 58- Spectre CD du composé TC8

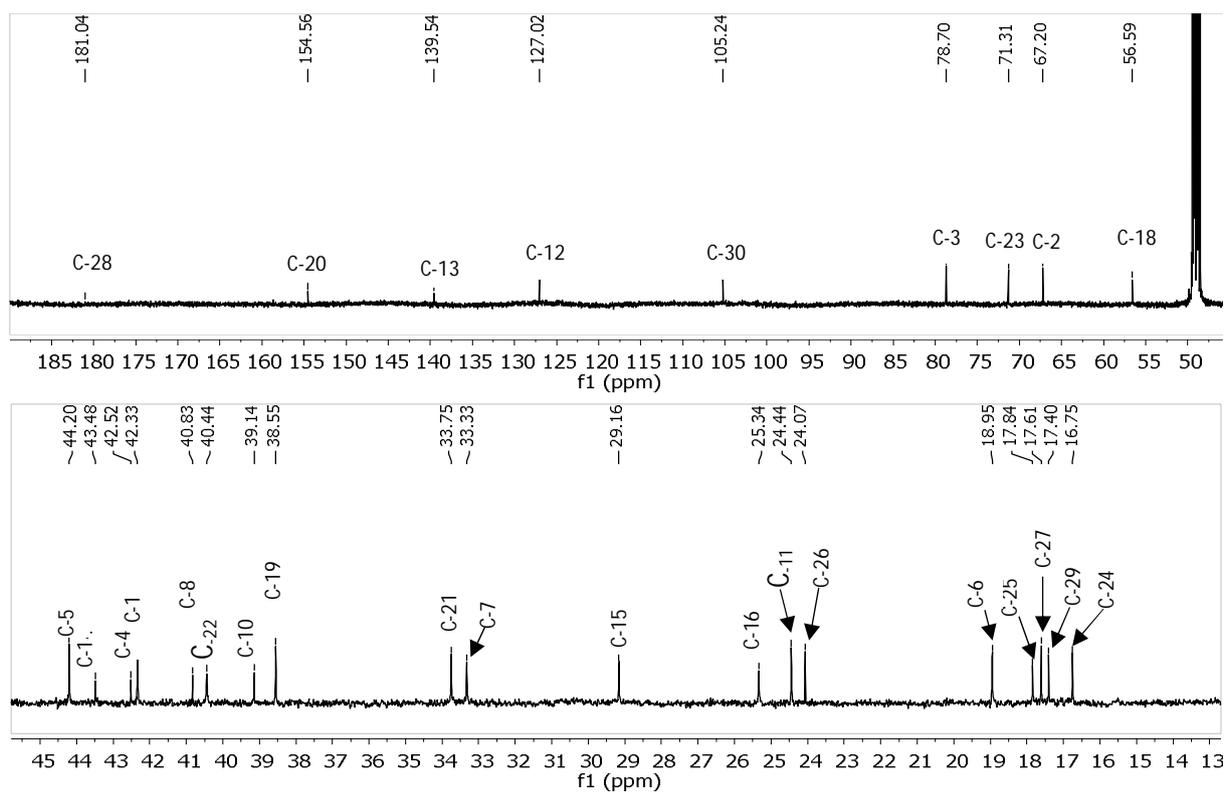
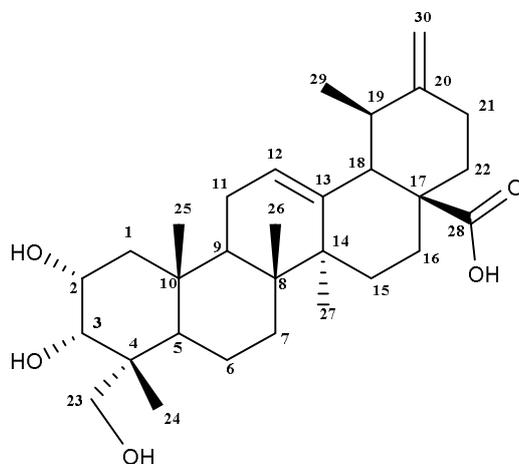


Figure 59- Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) du composé TC8



TC8

Acide 2 α , 3 α , 23-trihydroxyursa-12,20(30)-dien-28-oïque (71)

Tableau 11- Données spectrales RMN du composé TC8 (CD₃OD, 600 et 150 MHz) comparées à celles de la littérature (pyridine-d₅, 400 et 100 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_H (m, J en Hz)		δ_C
			(Yutaka et al., 1992)		
1a	1,31 (d; 6,8)	42,3	n.d	42,6	
1b	1,60 (m)		n.d		
2	3,89 (dd; 2,8; 4,5)	67,2	4,28 (ddd; 2,4; 3,6, 10,0)	66,2	
3	3,62 (d; 2,7)	78,1	4,15 (d; 2,4)	78,8	
4	-	42,5	-	41,9	
5	1,55 (m)	44,2	n.d	43,5	
6a	0,84 (m)	18,9	n.d	18,2	
6b	1,38 (dd; 3,1 ; 8,9)		n.d		
7a	2,33 (m)	33,4	n.d	32,7	
7b	2,21 (m)				
8	-	40,8	n.d	40,0	
9	1,77 (m)	48,7	n.d	47,9	
10	-	39,1	-	38,8	
11a	2,02 (m)	24,4	n.d	23,6	
11b	1,97 (m)		n.d		
12	5,27 (t; 3,7)	127,0	5,46 (br t; 3,0)	125,8	
13	-	139,5	-	139,0	
14	-	43,5	-	42,7	
15a	2,23	29,2	n.d	28,5	
15b	1,74 (m)		n.d		
16a	1,15 (m)	25,3	n.d	24,8	
16b	1,94 (m)		n.d		
17	-	48,9	-	48,2	
18	2,26 (d; 11,2)	56,6	2,74 (d; 11,0)	55,6	
19	2,42 (m)	38,7	n.d	37,7	
20	-	154,6	-	153,8	
21a	1,32 (m)	33,8	n.d	32,7	
21b	1,64 (m)		n.d		
22a	1,60 (m)	40,4	1,60	39,0	
22b	1,84 (m)		n.d		
23a	3,39 (m)	71,3	3,77 (d; 10,8)	71,3	
23b	3,54 (d; 11,0)		3,93 (m)		
24	1,03 (s)	16,7	1,05 (s)	17,1	
25	0,78 (s)	17,8	0,87 (s)	17,5	
26	1,19 (s)	24,1	1,13 (s)	23,6	
27	0,85 (s)	17,6	1,00 (s)	17,6	
28	-	181,0	-	179,3	
29	1,01 (d; 6,8)	17,4	1,08 (d; 6,7)	17,7	
30a	4,67 (d; 1,7)	105,3	4,80 (brs)	104,9	
30b	4,62 (d; 1,8)		4,75 (brs)		

n.d = non déterminé

II.2.4.2.9. Identification de TC9

TC9 a l'aspect d'une poudre blanche amorphe soluble dans le MeOH. Comme **TC8**, **TC9** a pour formule moléculaire $C_{30}H_{46}O_5$ possédant 8 insaturations et a présenté le pic de l'ion *pseudo*-moléculaire à m/z 485,3 sur son spectre de masse FAB en mode négatif (Fig. 60).

L'étude comparative des spectres RMN 1D et 2D du composé **TC9** avec ceux du composé **TC8**, montre que **TC9** ne diffère de **TC8** que par l'absence des deux signaux exométhylène et la présence d'un sixième méthyle à δ_H 0,97 (d, ; 12,9 ; H-30). Cependant le signal de deux protons oléfiniques à δ_H 5,24 (brs, H-6 et H-12) sur le spectre de RMN 1H (Fig. 61), ainsi que les signaux à δ_C 123,5 (C-6) ; 126,7 (C-12) ; 139,8 (C-13) et 145,4 (C-5) sur le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 62) de **TC9** indique toujours la présence de deux doubles liaisons dans le squelette.

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des 1H et ^{13}C (Tableau 12) du composé **TC9** avec celles de la littérature nous a permis de l'identifier à l'acide $2\alpha, 3\beta, 23$ -trihydroyursa-12,5(6)-dien-28-oïque (**72**), précédemment isolé par Zhou et al. (2012).

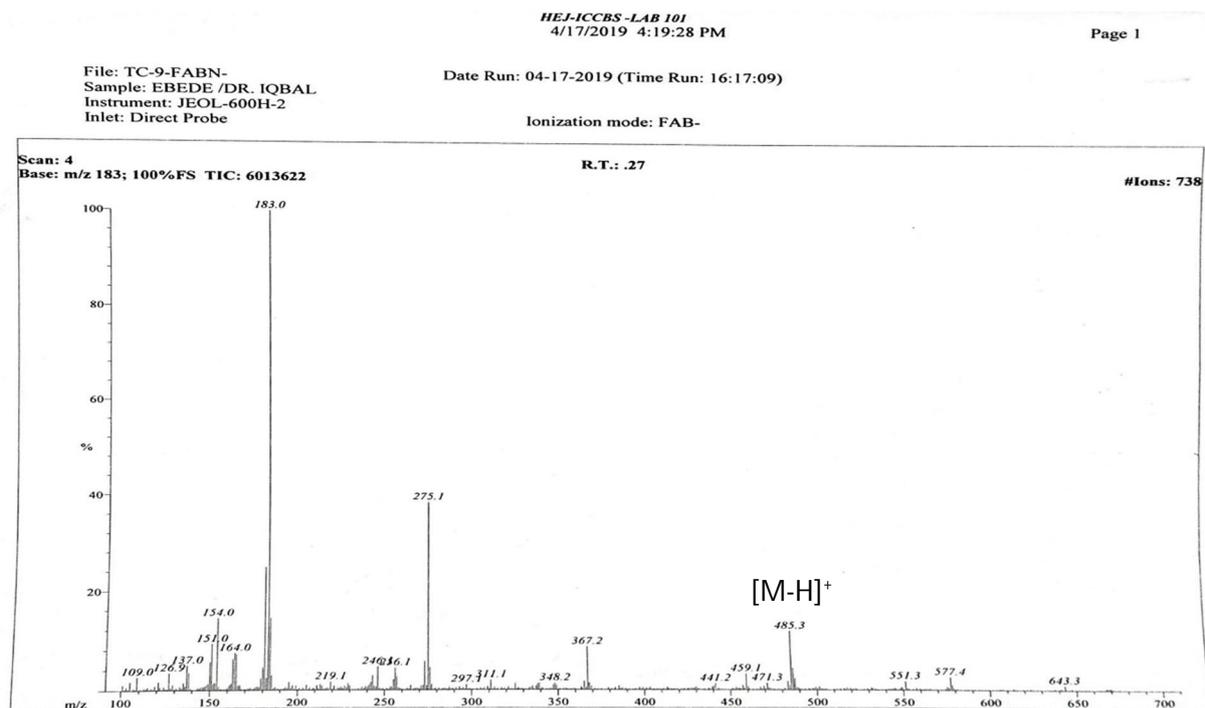


Figure 60- Spectre de masse (-)-FAB-MS de TC9

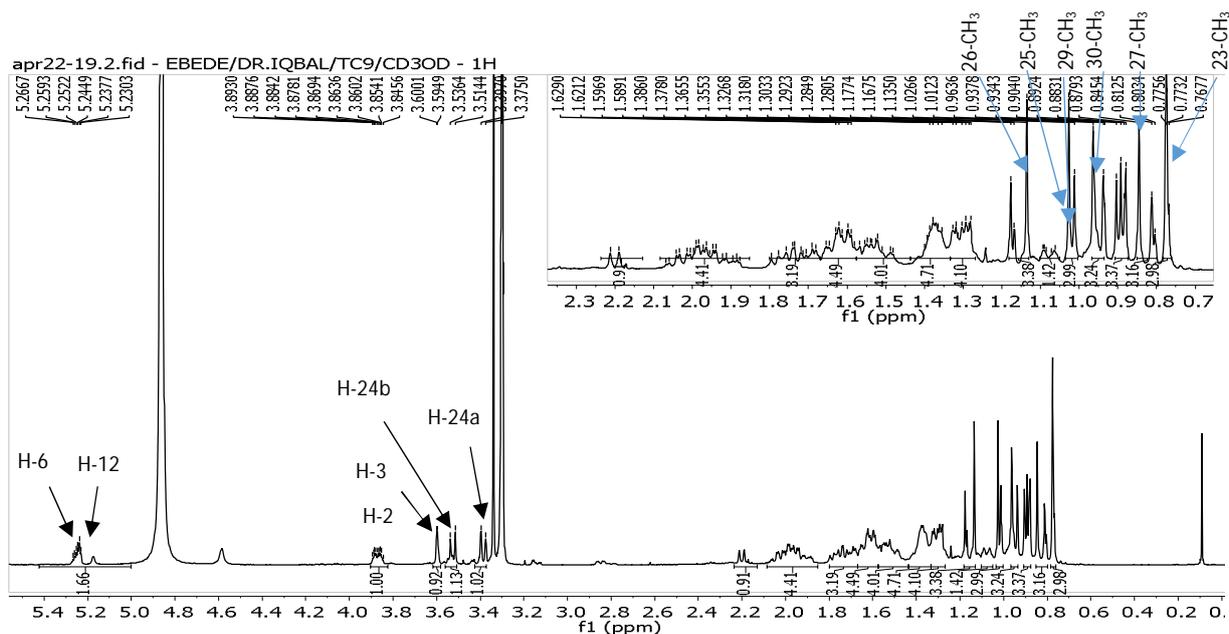


Figure 61- Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du composé TC9

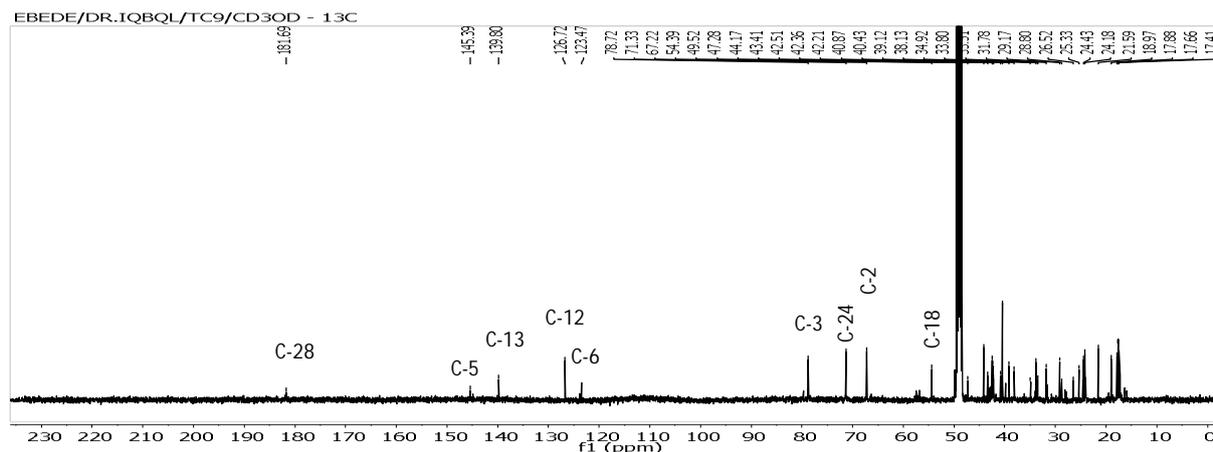
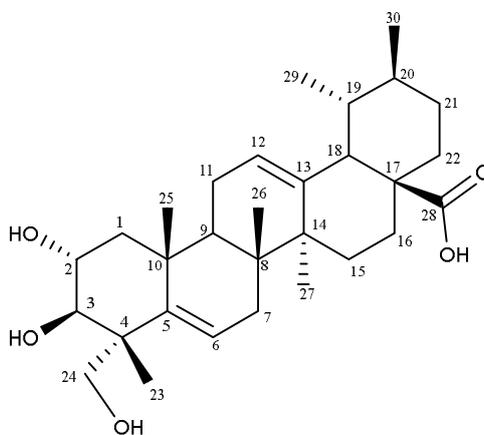


Figure 62- Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé TC9



TC9

L'acide 2α , 3β , 23-trihydroxyursa-12,5(6)-dien-28-oïque (72)

Tableau 12- Données spectrales RMN du composé TC9 (CD₃OD, 500 et 125 MHz) comparées à celles de la littérature (C₅D₅N, 400 et 100 MHz)

Position	δ_H ppm (m, J en Hz)	δ_C ppm	δ_C	
			δ_H (m, J en Hz)	(Ma et al., 2008)
1a	1,31	42,2	n.d	48,0
1b	1,60 (m)		n.d	
2	3,87 (ddd; 2,9; 4,6 ; 12,0)	67,2	4,24 (m)	68,9
3	3,60 (d; 2,9)	78,7	4,28 (m)	78,2
4	-	42,5	-	43,7
5	-	145,4	-	139,4
6	5,24 (m)	123,5	n.d	125,6
7a	2,33	33,8	n.d	33,2
7b	2,21 (m)			
8	-	39,8	n.d	39,5
9	1,77 (m)	47,3	n.d	47,9
10	-	39,9	-	38,3
11a	2,02	24,4	n.d	23,8
11b	1,97 (m)		n.d	
12	5,23 (m)	126,7	5,45 (s)	125,6
13	-	139,8	-	139,3
14	-	43,4	-	42,6
15a	2,23	25,3	n.d	28,7
15b	1,74 (m)		n.d	
16a	1,15	29,2	n.d	24,9
16b	1,94 (m)		n.d	
17	-	49,9	-	48,1
18	2,26 (s)	54,4	2,60 (d; 11,4)	53,5
19	1,38 (m)	40,4	n.d	39,4
20	0,97	40,4	-	39,3
21a	1,29	33,8	n.d	31,0
21b	1,63 (m)		n.d	
22a	1,62	38,1	1,60	37,5
22b	1,68 (m)		n.d	
23a	3,39 (d; 11,0)	71,3	3,71 (d; 10,5)	66,4
23b	3,53 (d; 11,0)		4,33 (d; 10,5)	
24	0,78 (s)	17,9	1,12 (s)	14,5
25	1,03 (s)	17,4	1,11 (s)	17,5
26	1,19 (s)	24,2	1,18 (s)	23,9
27	0,85 (s)	17,7	1,05 (s)	18,9
28	-	181,7	-	180,0
29	1,02 (d; 7,2)	17,6	0,89 (d; 5,9)	17,5
30	0,97 (d; 12,9)	21,6	0,84 (brs)	21,4

n.d = non déterminé

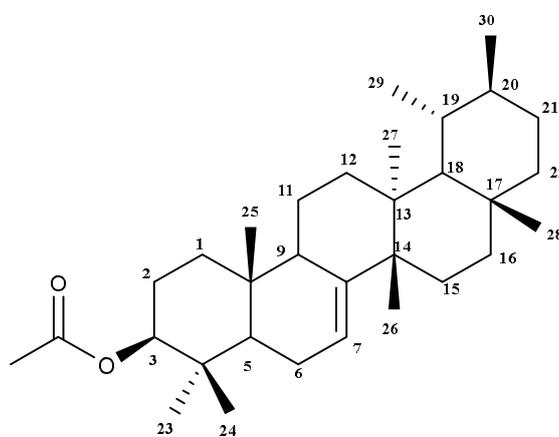
II.2.2.4.10. Identification de TC10

Le composé **TC10** a été isolé sous forme de cristaux blancs soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse ESI basse résolution a montré le pic de l'adduit sodique à m/z 491,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Et par analyse de son spectre de RMN ^{13}C , la formule moléculaire $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ a été déduite avec 7 degrés d'insaturation. Une bande à 1732 cm^{-1} visible sur son spectre IR indique la présence du groupe ester carboxylique.

Sur le spectre de RMN ^1H (Fig. 63) on observe 6 singulets de méthyles tertiaires à δ_{H} 0,70 (H-25) ; 0,78 (H-24) ; 0,86 (H-23) ; 0,87 (H-27) ; 0,92 (H-26) et 0,97 (H-28), et deux doublets de méthyles secondaires à δ_{H} 0,84 (d ; $J = 5,8\text{ Hz}$; H-30) et 0,99 (d, $J = 6,3\text{ Hz}$; H-29). Tous ces huit méthyles suggèrent la présence d'un squelette triterpénique de type ursane (Mahato et Kundu, 1994). On observe également des signaux à δ_{H} 5,34 (1H, t, $J = 3,9\text{ Hz}$, H-7) ; 2,10 (3H, s, (CH_3) -32 liés au groupe $\text{C}=\text{O}$) et δ_{H} 4,45 (1H, m, H-3a) suggérant la présence d'une double liaison dans le squelette et d'un groupement ester qui serait positionné en C-3 au travers d'une liaison oxygénée.

Le spectre de RMN ^{13}C couplé au DEPT 135 montre 32 signaux de carbone (Fig. 64) distincts avec : un ester carbonyle à δ_{C} 171,0 ($\text{C}=\text{O}$), un carbone alcényle à δ_{C} 116,3 (C-7), un groupe méthine oxygéné à δ_{C} 81,2 (C-3), cinq groupes méthine non oxygénés, neuf groupes méthylène, neuf groupes méthyle et cinq carbones quaternaires. La présence des carbones alcényle à δ_{C} 116,3 (C-7) et 145,5 (C-8) est caractéristique d'un triterpénoïde de la classe des friedoursanes (Mahato et Kundu, 1994 ; Ahmad et Rahman, 1994).

L'exploitation de tous les spectres de RMN 1D (Tableau 13) et 2D nous a ainsi permis d'identifier **TC10** à l'acetate de baurenyl (**73**) précédemment isolé de *Tabernaemontana longipes* (Carothers et al., 2018).



TC10

Acétate de baurenyl (**73**)

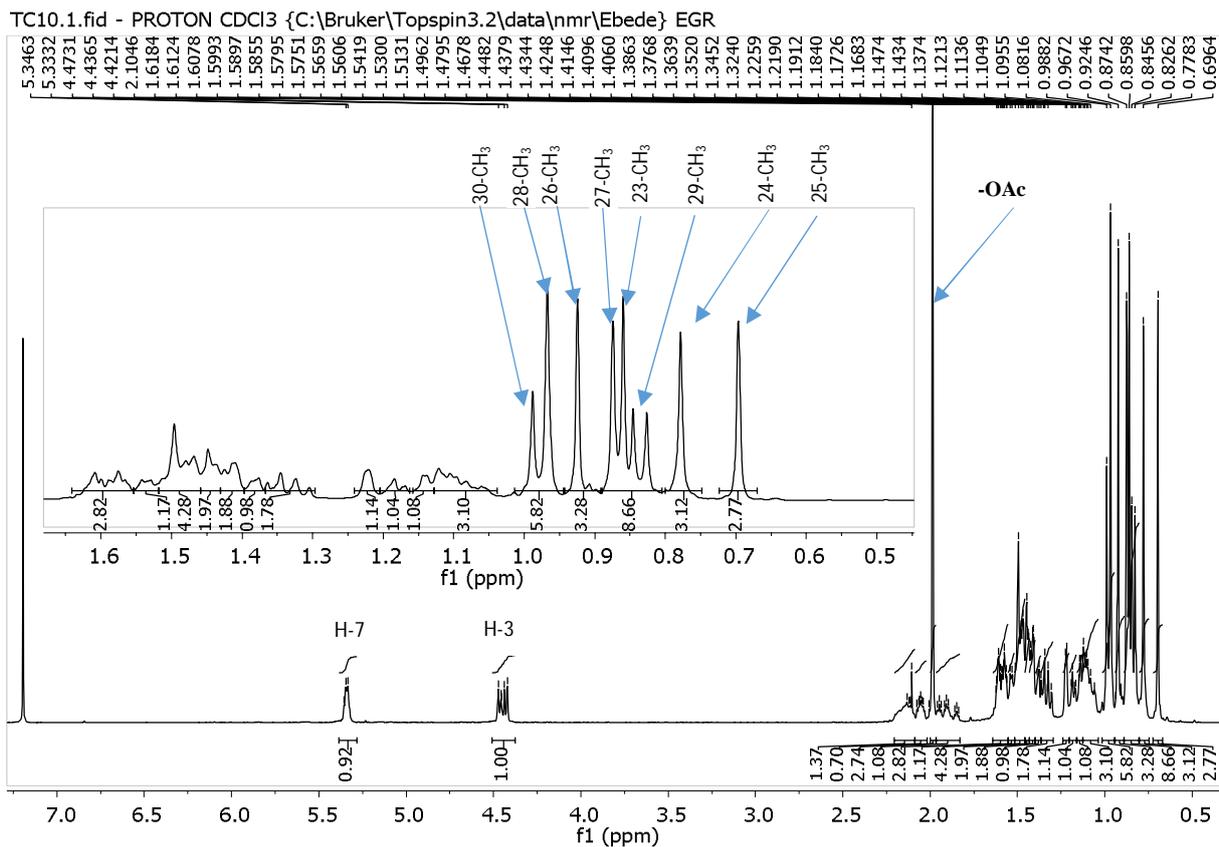


Figure 63- Spectre RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) du composé TC10

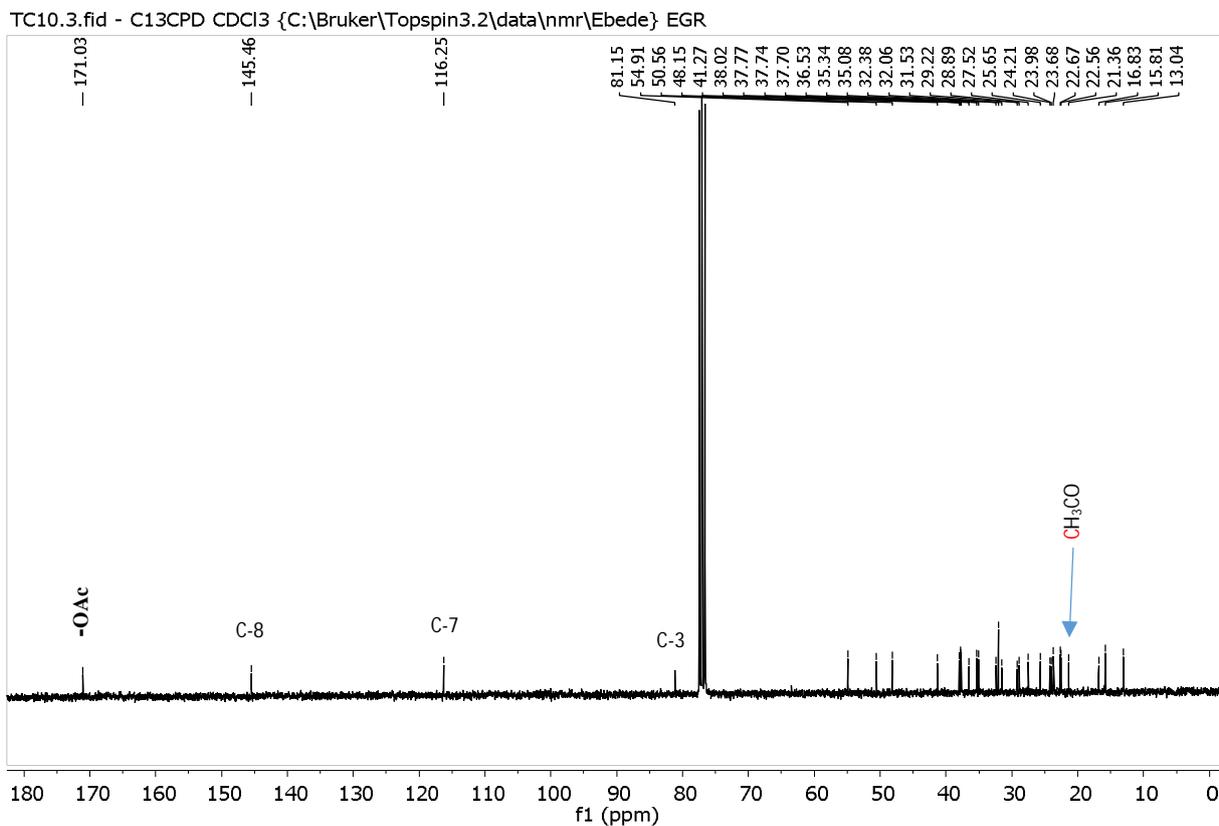


Figure 64- Spectre RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) du composé TC10

Tableau 13- Données spectrales RMN du composé TC10 (CDCl₃, 300 et 75 MHz) comparées à celles de la littérature (Chloroforme-d, 500 et 125 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_C	
			δ_H (J en Hz)	
(Carothers et <i>al.</i> , 2018)				
1a	1,34 (m)	36,5	1,18 (m)	36,6
1b	1,59 (m)		1,66 (m)	
2a	1,59 (m)	24,2	1,66 (m)	24,3
2b	1,91 (m)			
3	4,45 (m)	81,2	4,51 (m)	81,3
4	-	37,8	-	37,9
5	2,12 (m)	48,2	2,21 (m)	48,3
6a	1,91 (m)	23,9	1,97 (m)	24,1
6b	2,06 (td; 2,2 ; 4,1)		2,14 (m)	
7	5,35 (m)	116,3	5,40 (m)	116,4
8	-	145,5	-	145,6
9	1,41 (m)	50,6	1,41 (m)	50,7
10	-	35,1	-	35,0
11a	1,14 (m)	32,4	1,48 (m)	32,5
11b	1,38 (m)		1,56 (m)	
12a	1,10 (m)	31,5	1,14 (m)	31,6
12b	1,22 (m)		1,61 (m)	
13	-	37,7	-	37,8
14	-	37,8	-	37,9
15a	1,41 (m)	28,9	1,40 (m)	28,8
15b	1,50 (m)		1,50 (m)	
16a	1,47 (m)	16,8	1,48 (m)	16,7
16b	1,54 (m)		1,54 (m)	
17	-	41,3	-	41,2
18	1,32 (s)	54,9	1,29 (s)	55,0
19	1,14 (m)	35,3	1,15 (m)	35,3
20	1,54 (m)	32,1	1,54 (m)	31,8
21a	1,19 (m)	29,2	1,19 (m)	29,3
21b	1,51 (m)		1,51 (m)	
22a	1,18 (m)	37,7	1,18 (m)	37,8
22b	1,44 (m)		1,48 (m)	
23	0,86 (s)	15,8	0,93 (s)	15,9
24	0,78 (s)	27,5	0,85 (s)	27,6
25	0,70 (s)	13,1	0,76 (s)	13,1
26	0,92 (s)	23,7	0,99 (s)	23,6
27	0,87 (s)	22,7	0,94 (s)	22,8
28	0,97 (s)	38,0	1,02 (s)	37,9
29	0,99 (d; 6,3)	25,7	1,04 (brs)	25,8
30	0,84 (d; 5,8)	22,6	0,90 (d; 5,8)	22,6
-OAc	2,10 (s)	21,4 ; 171,0	2,05 (s)	21,4 ; 171,1

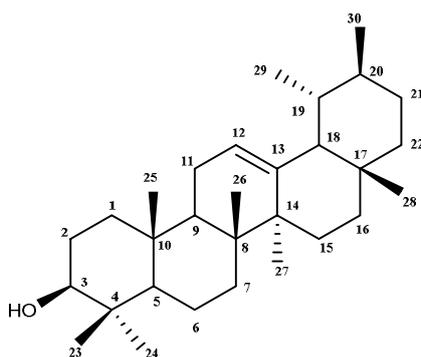
II.2.4.2.11. Identification de TC11

TC11 a été obtenu sous forme de solide amorphe orangé. Son spectre de masse ESI basse résolution montre le pic de l'ion *pseudo*-moléculaire à m/z 427,6 $[M+H]^+$ qui, par exploitation additive du spectre de RMN ^{13}C correspond à la formule moléculaire $C_{30}H_{51}O_2$. Son spectre UV présente une bande d'absorption d'une double liaison conjuguée à 236 nm.

Le spectre de RMN 1H (Fig. 65) montre 6 signaux de méthyles tertiaires à δ_H 0,69 (s) ; 0,75 (s) ; 0,87 (s) ; 0,88 (s) ; 1,02 (s) et 1,19 (s), deux signaux méthyliques secondaires à δ_H 0,78 (d, $J = 2,5$ Hz) et 0,86 (d, $J = 6,6$ Hz) suggérant l'existence d'un squelette triterpénique de type ursane (Mahato et Kundu, 1994) dans ce composé. On observe également des signaux à δ_H 5,13 (t, $J = 3,8$; H-12) et 3,05 (dd, $J = 4,9$; 11,0 Hz, H-3) indiquant la présence d'une double liaison et d'un groupe hydroxyle secondaire respectivement dans le squelette du composé.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C associée au DEPT 135 (Tableau 14) indiquent la présence de huit $-CH_3$, dix $-CH_2$ et quatre $-CH$. De plus, le signal à δ_C 78,3 confirme la présence d'un carbone oxygéné en C-3 et les signaux des carbones insaturés à δ_C 125,5 (C-12) et 138,3 (C-13) suggère que **TC11** appartient à la classe des urs-12-ènes (Galgon et *al.*, 1999 ; Mahato et Kundu, 1994).

Au regard de ce qui précède et en comparaison avec les données de la littérature, le composé **TC11** a été identifié à l' α -amyrine (**74**), isolé précédemment par Nohong et *al.* (2018) des écorces de *Rhizophora mucronata* Lamk.



TC11

α -amyrine (**74**)

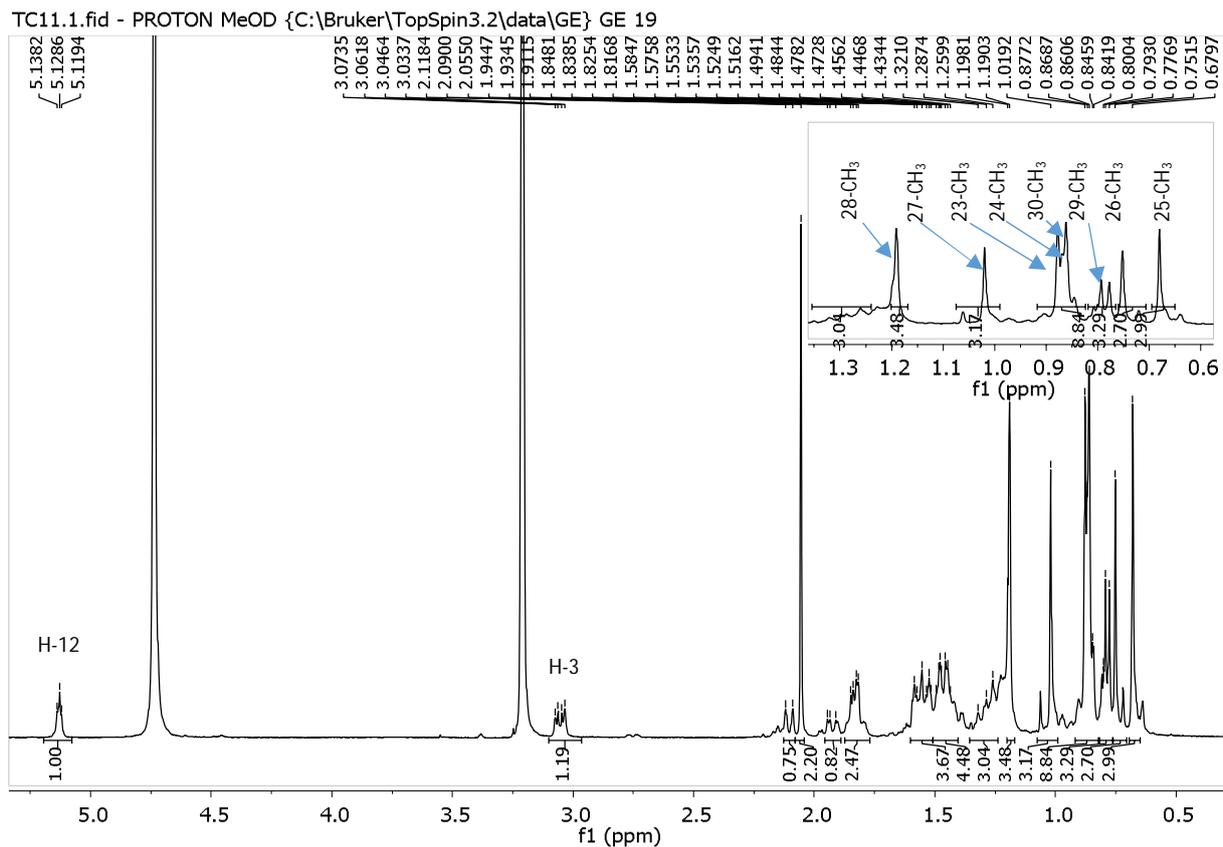


Figure 65- Spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) du composé TC11

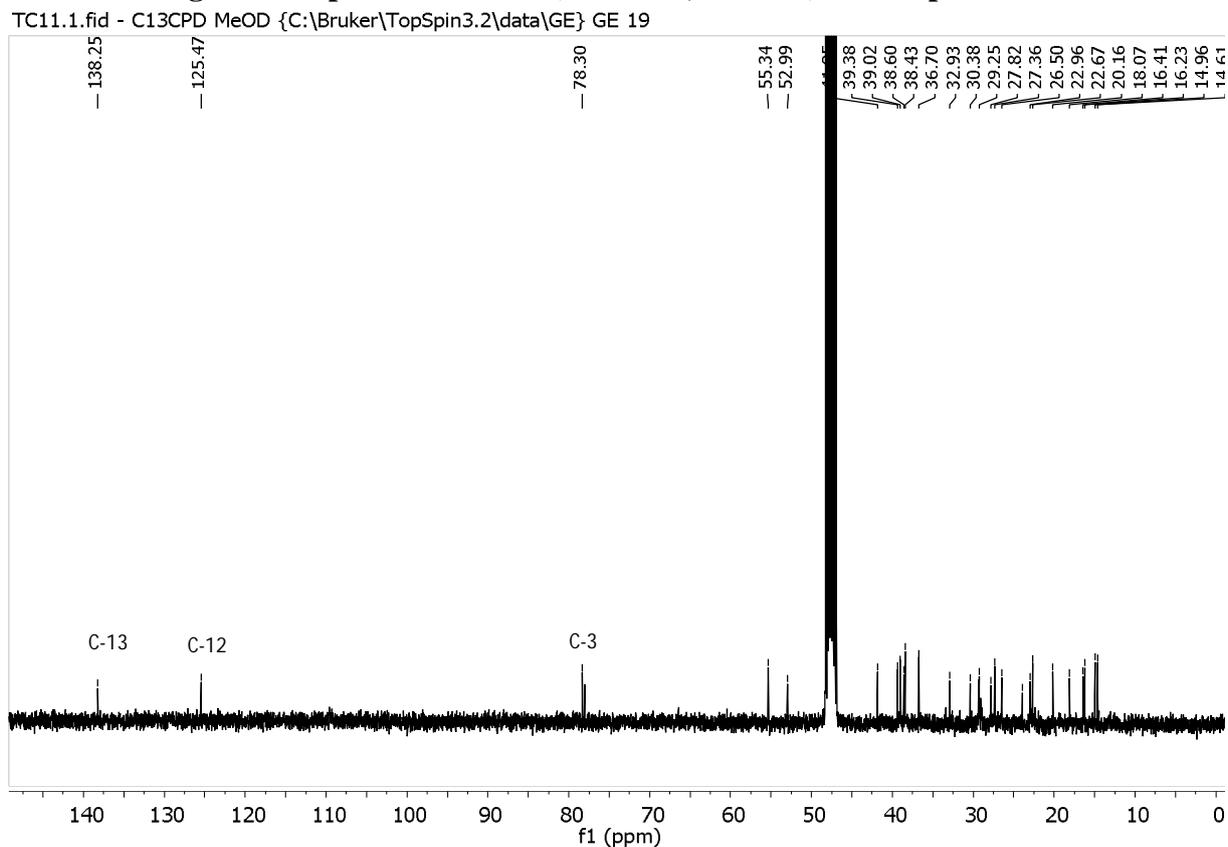


Figure 66- Spectre RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) du composé TC11

Tableau 14- Données spectrales RMN du composé TC11 (CD₃OD, 400 et 100 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl₃, 500 et 125 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_H (m, J en Hz)	δ_C
			(Nohong et al., 2018)	
1a ; 1b	0,89 (m) ; 1,55 (m)	38,6	1,68 (m)	38,9
2a ; 2b	0,98 ; 1,82 (m)	27,8	2,03 (m)	28,2
3	3,05 (dd; 4,9 ; 11,0)	78,3	3,22 (dd; 4,8 ; 11,2)	79,1
4	-	38,4	-	38,7
5	0,66 (m)	55,3	0,74 (d; 11,8)	55,3
6a ; 6b	1,31 (m) ; 1,45 (m)	18,1	1,57 (m)	18,5
7a ; 7b	1,23 (m) ; 1,44 (m)	32,9	1,36 (m)	33,0
8	-	40,7	-	40,1
9	1,45 (m)	47,6	1,54 (m)	47,8
10	-	36,7	-	37,0
11a ; 11b	0,84 ; 1,20 (m)	22,9	1,91 (m)	23,5
12	5,13 (t; 3,8)	125,5	5,12 (t; 3,8)	124,5
13	-	138,3	-	139,7
14	-	41,9	-	42,2
15a ; 15b	1,06 ; 1,31 (m)	27,4	1,61 (t; 4,2)	27,4
16a ; 16b	1,48 (t; 2,3) ; 1,48 (m)	26,5	1,83 (t; 4,9)	26,7
17	-	33,4	-	33,9
18	2,10 (m)	52,9	1,31 (m)	59,1
19	1,26 (m)	39,0	1,36 (m)	39,8
20	0,91	39,0	0,87	39,7
21a ; 21b	1,19 ; 1,41 (m)	30,4	1,39 (m)	31,4
22a ; 22b	1,53 ; 1,58 (m)	36,7	1,41 (t; 10,1)	41,6
23	0,87 (s)	27,2	0,99 (s)	28,2
24	0,85 (s)	14,6	0,95 (s)	15,7
25	0,69 (s)	14,9	0,96 (s)	15,8
26	0,75 (s)	16,2	0,75 (s)	17,0
27	1,02 (s)	22,7	1,01 (s)	23,4
28	1,19 (s)	27,8	1,07 (s)	28,9
29	0,78 (d; 2,5)	16,4	0,80 (d; 3,5)	17,6
30	0,86 (d; 6,6)	20,2	0,91 (d; 5,8)	21,5

II.2.4.2.12. Identification de TC12

Le composé **TC12** a été isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe et ses données spectrales de masse EI-MS (m/z 456,3) et de RMN ^{13}C suggèrent la formule moléculaire $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$.

Le spectre de RMN ^1H (Fig. 67) montre six singulets de méthyles tertiaires à δ_{H} 0,69 ; 0,76 ; 0,87 ; 0,90 ; 0,91 ; 1,62, deux protons oléfiniques à δ_{H} 4,67 (d, $J = 2,2$ Hz, H-29b) et 4,54 (d, $J = 1,9$ Hz, H-29a) représentant la double liaison exocyclique et un proton carbinolique à δ_{H} 3,12 (dd, $J = 5,0 ; 11,3$ Hz, H-3). De plus, les signaux de protons apparaissant à δ_{H} 2,93 (d, $J = 4,9$ Hz, H-19), 2,20 (d, $J = 12,4$ Hz, H-16a), 2,13 (d, $J = 3,2$ Hz, H-13) et 1,90 (d, $J = 6,6$ Hz, H-21a) sont caractéristiques d'un triterpène de type lupane (Viqar et Atta-ur-Rahman, 1994).

L'apparition du signal à δ_{C} 179,3 (C-28) dans le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 68) du composé **TC12**, suggère la présence d'un groupe acide carboxylique dans sa structure. Par ailleurs, les signaux à δ_{C} 150,4 (C-20) et 109,7 indiquent la présence de la double liaison exocyclique (C-29) et le signal à δ_{C} 79,0 (C-3) indique la présence du groupe hydroxyle. Sur la base des données spectrales (Tableau 15) ci-dessus et ceux rapportés dans la littérature, la structure de **TC12** a été attribuée à l'acide bétulinique (**75**), déjà isolé des feuilles de *Carpolepis laurifolia* par Coulerie (2012).

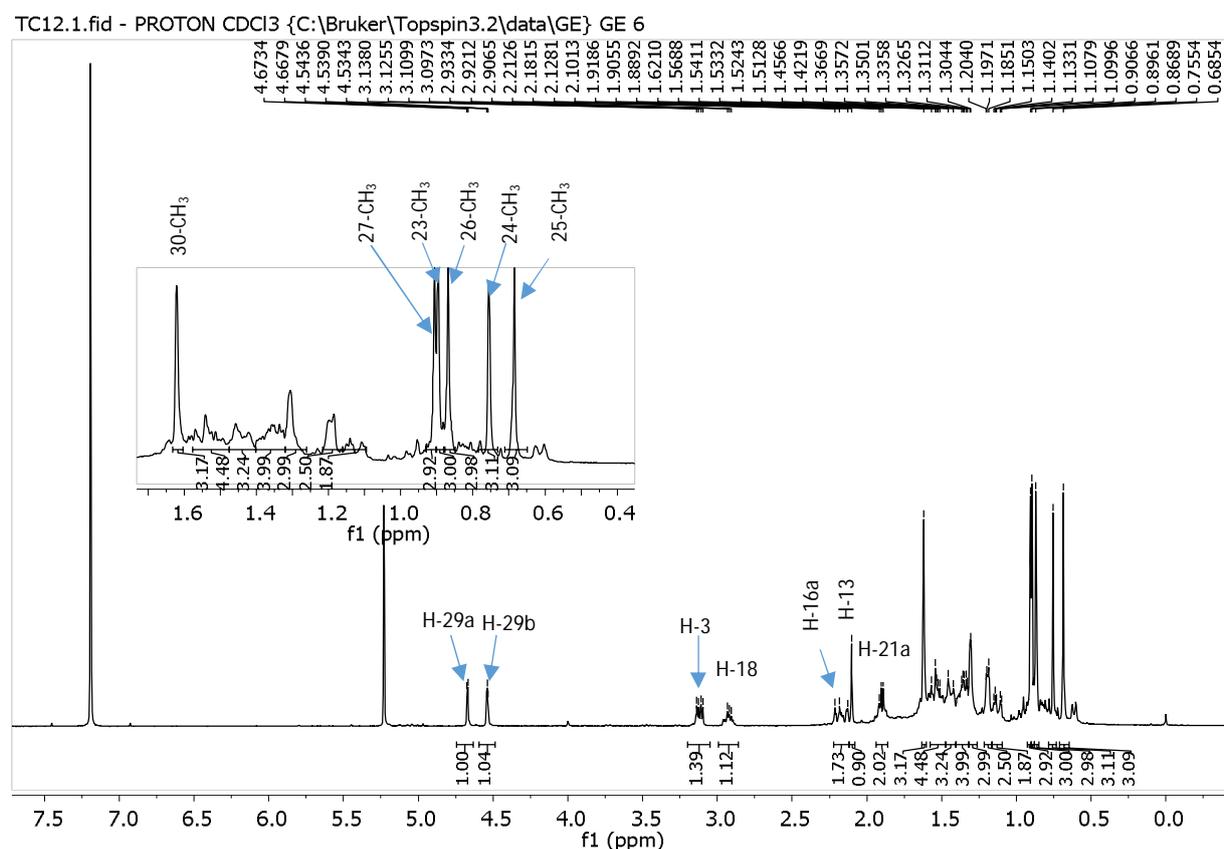


Figure 67- Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) du composé TC12

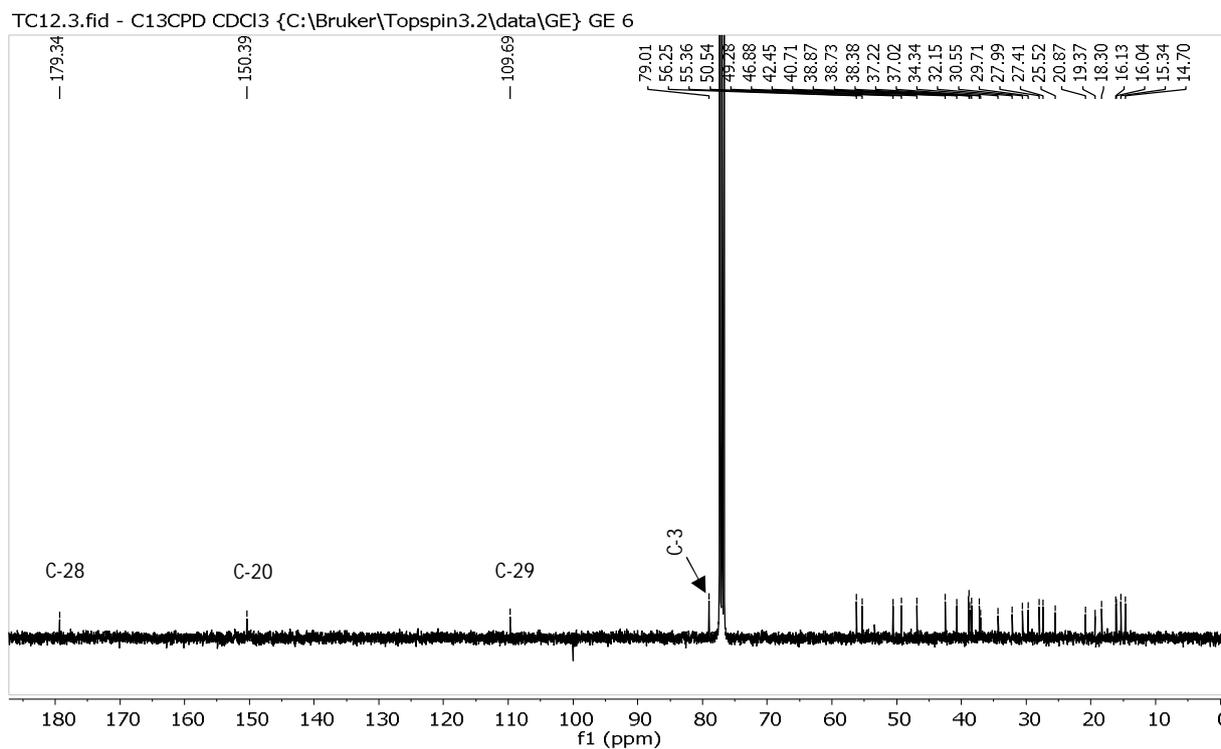
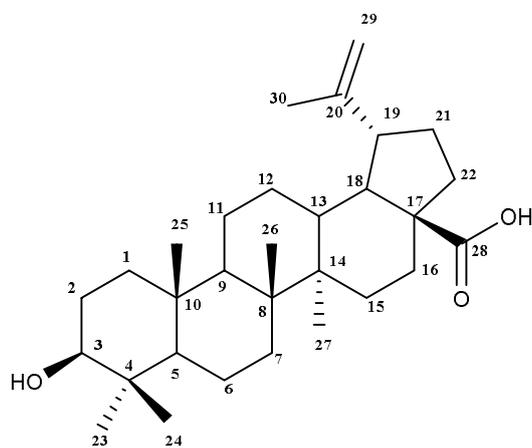


Figure 68- Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) du composé TC11



TC12

Acide bétulinique (75)

Tableau 15- Données spectrales RMN du composé TC12 (CDCl₃, 400 et 100 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl₃, 300 et 75 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_H (m, J en Hz)	δ_C
			(Coulerie et al., 2012)	
1a ; 1b	0,82-1,62 (m)	38,7	1,16 (m)	38,5
2a ; 2b	0,91-1,53 (m)	27,4	1,52-1,61 (m)	27,5
3	3,12 (dd; 5,0 & 11,3)	79,0	3,19 (dd ;12,0 ; 4,5)	79,2
4	-	38,9	-	38,9
5	0,61 (m)	55,4	0,66 (m)	55,5
6a ; 6b	1,31-1,44 (m)	18,3	1,40 (s)	18,4
7a ; 7b	1,31-1,56 (m)	34,3	2,11-2,28 (m)	34,5
8	-	40,7	-	40,5
9	1,20 (m)	50,5	1,25 (s)	50,7
10	-	37,2	-	37,2
11a ; 11b	1,20-1,37 (m)	20,9	1,25 (m)	21,0
12a ; 12b	0,95-1,64 (m)	25,5	1,52-1,61 (m)	25,7
13	2,13 (m)	38,4	2,11-2,28 (m)	38,4
14	-	42,5	-	42,6
15a ; 15b	1,14 -1,45 (m)	29,7	1,23 (m)	30,7
16a ; 16b	1,37-2,17 (m)	32,2	2,11-2,28 (m)	32,3
17	-	56,3	-	56,3
18	1,55 (m)	46,9	1,52-1,61 (m)	49,4
19	2,92 (m)	49,3	2,99 (td; 9,0 ; 5,1)	47,1
20	-	150,4	-	150,0
21a ; 21b	1,35-1,90 (m)	30,6	1,88-2,02 (m)	29,8
22a ; 22b	1,42-1,90 (m)	37,0	1,88-2,02 (m)	37,2
23	0,89 (s)	27,9	0,96 (s)	28,1
24	0,76 (s)	16,0	0,75 (s)	15,5
25	0,69 (s)	15,3	0,82 (s)	16,3
26	0,87 (s)	16,1	0,93 (s)	16,3
27	0,91 (s)	14,7	0,97 (s)	15,5
28	-	179,3	-	179,3
29a	4,54 (d; 1,9)	109,7	4,61 (d; 2,0)	109,8
29b	4,67 (d; 2,2)		4,73 (d; 2,0)	
30	1,62 (s)	19,4	1,69 (s)	19,6

II.2.5. Etude phytochimique des lianes de *L. lucida*

II.2.5.1. Extraction et isolement des composés des lianes de *L. lucida*

Des lianes séchées de *Landolphia lucida* ont été broyées. La poudre obtenue (3,8 kg) a été extraite au MeOH à froid sous agitation pendant 48 heures et concentrée à sec dans un évaporateur rotatif à 40 ° C pour obtenir l'extrait brut (112,8 g). Cet extrait a été dissout dans de l'eau et partitionné avec du n-hexane (2 x 2 L), du CH₂Cl₂ (2 x 2 L) et de l'EtOAc (3 x 2 L), respectivement. L'extrait à l'EtOAc (35,8 g) a été séparé en quatre fractions (LHI – LHIV) par chromatographie sur colonne de gel de silice (70-230 mesh; Merck), éluée avec un système de solvant CH₂Cl₂/MeOH de polarité croissante (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:35, 70:30, 65: 35, 60:40, 50:50, 0:100, v/v). La fraction LH-I (1,5 g) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice et éluée avec le système Hex-EtOAc (10 - 15%) pour donner deux composés purs indexés **LH2** (8 mg) et **LH4** (3 mg). La fraction LH-II (9,3 g) a été séparée en deux sous-fractions (LH-IIa – LH-IIb) par chromatographie sur colonne sur gel de silice (70-230 mesh; Merck), et éluée au CH₂Cl₂/MeOH (10%). La sous-fraction LH-IIa (100 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 et éluée au MeOH/CH₂Cl₂ (30%) ; deux composés indexés **LH3** (7 mg) et **LH12** (4 mg) ont été obtenus. La sous-fraction LH-IIb (40 mg) a été séparée par HPLC préparative en phase normale (en utilisant le système Hex/EtOAc, 40:60, débit = 4 mL/min), ce qui a donné deux composés : **LH6** (6 mg) et **LH5** (5 mg) à des temps de rétention t_R = 36 et 40 min, respectivement. La fraction LH-IV (2,1 g) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice (70-230 mesh; Merck) et éluée avec le CH₂Cl₂/MeOH: (10:1, 5:1) pour donner deux composés : **LH1** (5 mg) et **LH7** (10 mg). La fraction LH-V (10,6 g) a été purifiée par HPLC préparative en phase inverse (en utilisant pour système MeOH/H₂O, 50/50, débit = 5 mL/min ; t_R = 10 min, 18 min, 35 min et 40 min) pour donner quatre composés indexés **LH8** (5,6 mg), **LH9** (5 mg), **LH10** (7 mg) et **LH11** (9 mg), respectivement.

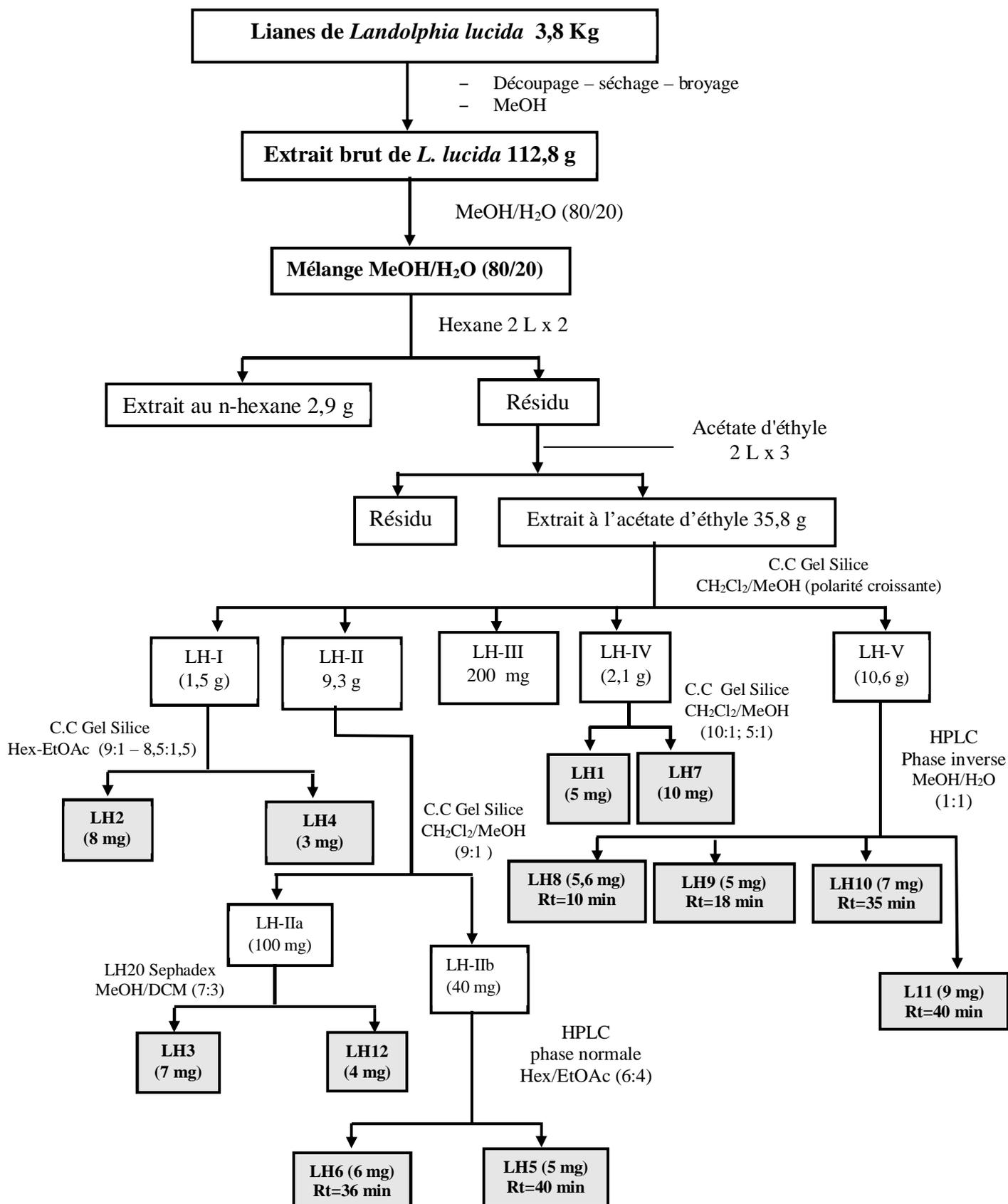


Schéma 13- Protocole d'extraction et isolement des composés des lianes de *L. lucida*

II.2.5.2. Caractérisation chimique des composés isolés de *L. lucida*

II.2.5.2.1. Détermination structurale de LH1

Le composé **LH1** a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche, $[\alpha]_D^{25} + 52,3$ (c 0,0012 ; CHCl_3) et soluble dans l'acétone. Sa formule moléculaire est $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_8$ trouvée sur la base de son spectre de masse HRESI-MS (Fig. 69) en mode positif (m/z 419,1630 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculée à 419,1628), suggérant 10 degrés d'insaturation.

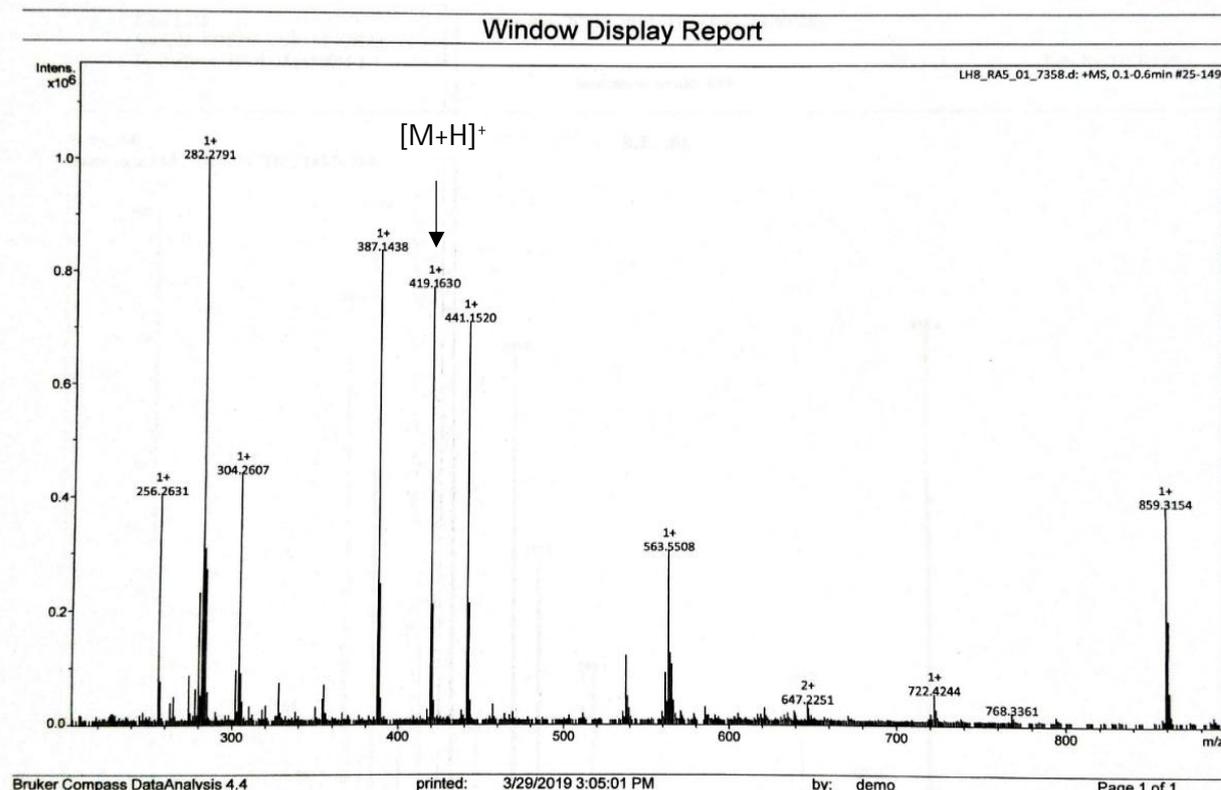


Figure 69- Spectre de masse (+)-HRESI-MS de LH1

Son spectre IR (Fig. 70) révèle la présence de groupes hydroxyles (3421 cm^{-1}), du carbonyle d'un ester (1731 cm^{-1}) et de protons aromatiques ($1602, 1516\text{ cm}^{-1}$). Son spectre UV dans le MeOH (Fig. 71) montre des maxima à 230 et 284 nm caractéristique des composés phénoliques (Markham et chari, 1982).

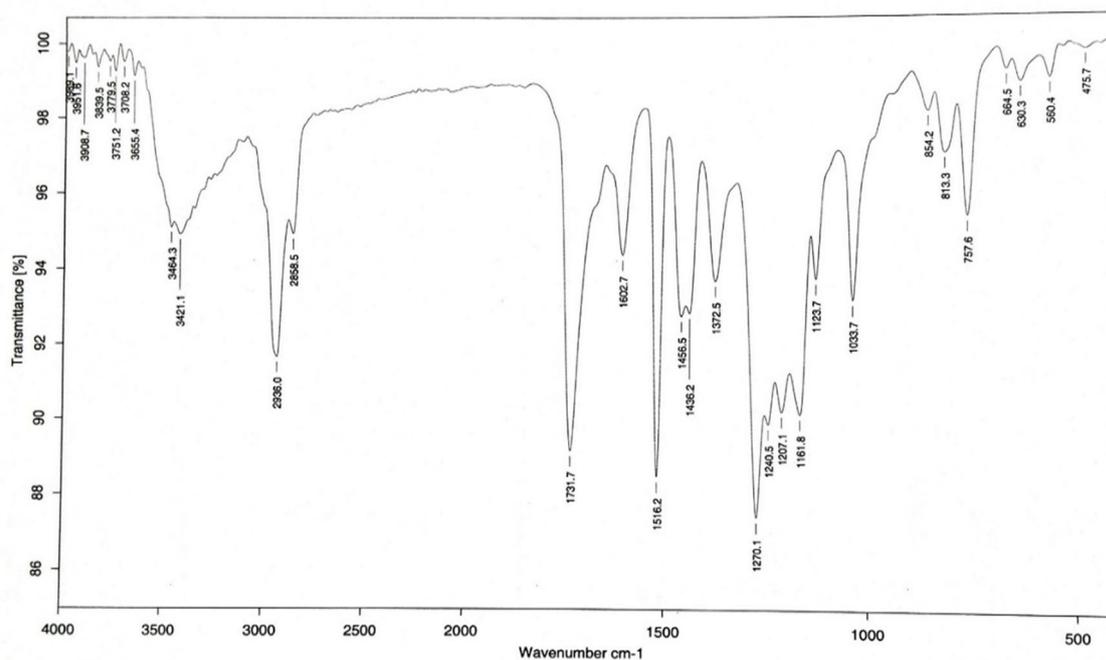


Figure 70- Spectre IR sur disque de KBr de LH1

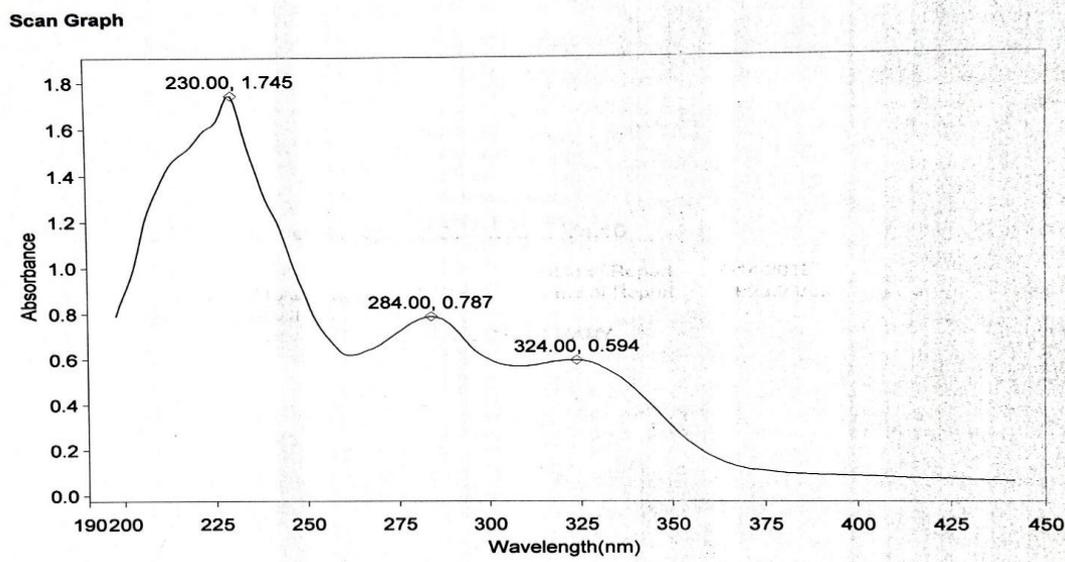


Figure 71- Spetre UV (MeOH) du composé LH1

Le spectre de RMN ^1H (Fig. 72) montre trois protons aromatiques à δ_{H} 6,67 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2), 6,70 (1H, dd, $J = 8,0$ Hz, H-5), et 6,59 (1H, dd, $J = 8,0$, $J = 2,0$ Hz, H-6), qui sont attribués aux hydrogènes de deux cycles aromatiques 1,3,4-trisubstitués, ainsi que deux groupes méthoxy résonnant à δ_{H} 3,76 (3H, s), et 3,56 (3H, s). La fragmentation sur son spectre de masse (Fig. 74) EI-MS à m/z 209 a révélé la présence de deux unités $\text{C}_6\text{-C}_3$ identiques avec la connectivité en C-8 et C-8'. Les diverses fragmentations observées sont matérialisées par le schéma 15.

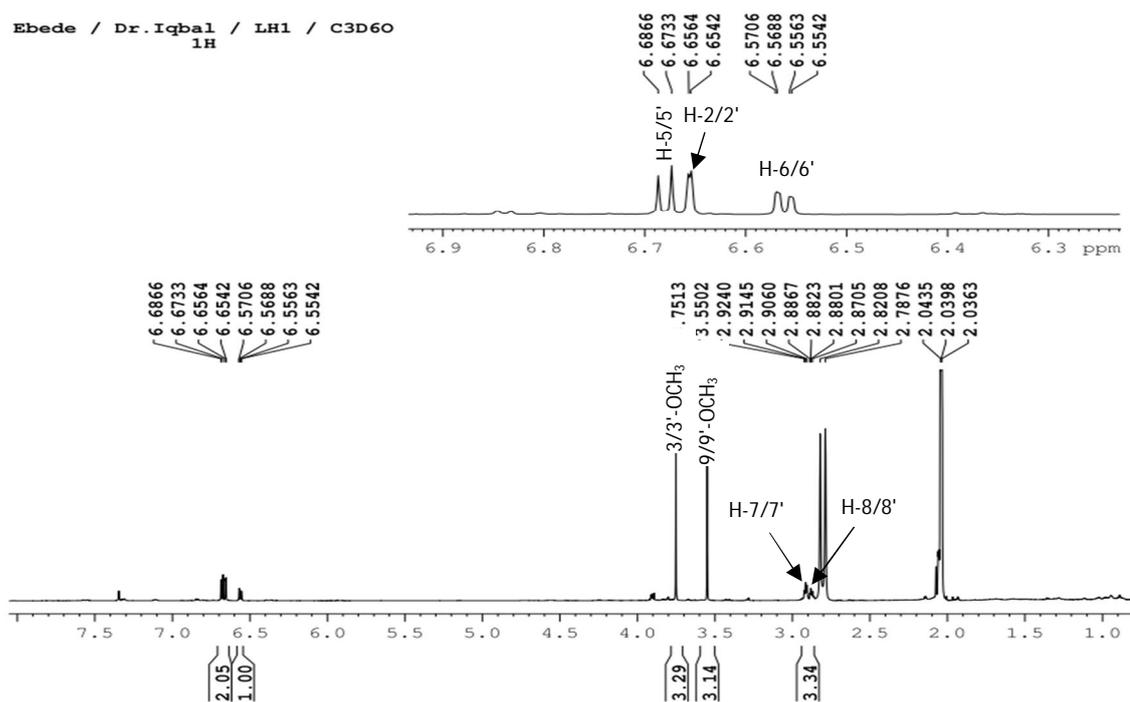


Figure 72- Spectre RMN ¹H (600 MHz, C₃D₆O) du composé LH1

Les spectres de RMN ¹³C (Fig. 73) et DEPT 135 ont montré des signaux pour onze carbones, dont deux méthyles oxygénés à δ_C 56,1 (4-OCH₃) et 51,7 (9-OCH₃), un méthylène à δ_C 36,0 (C-7), quatre méthines à δ_C 49,2 (C-8), 113,2 (C-2), 115,5 (C-5) et 122,4 (C-6), et quatre carbones quaternaires parmi lesquels un carbonyle de l'ester à δ_C 174,3 (C-9).

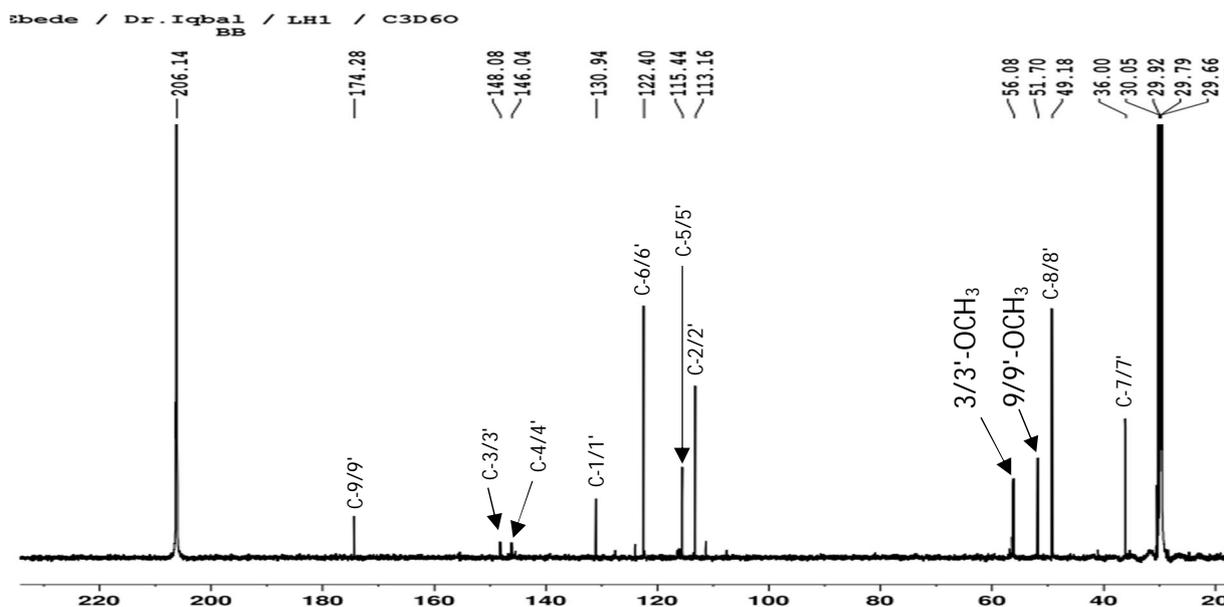


Figure 73- Spectre de RMN ¹³C (150 MHz, C₃D₆O) du composé LH1

Tous les signaux de protons ont été assignés sans ambiguïté à leurs carbones respectifs grâce aux données du spectre HSQC (Tableau 16) et les corrélations entre les protons voisins ont été établies grâce au spectre COSY (Fig. 74). De plus, les corrélations HMBC (Fig. 75) de H-2 avec C-1, C-3, C-4, C-6 et C-7, et de H-5 avec C-1 et C-4, et de H-6 avec les corrélations C-2, C-3 et C-5 et HMBC de H-7 à C-1/C-2/C-6/C-8/C-9, et de H-8 à C-1/C-7/C-9, ont également été observés et nous ont permis de fixer les différents groupements. La configuration absolue des carbones C-8 et C-8' est discernée sur la base du spectre CD caractéristique (Moore et *al.*, 1984). En effet, le spectre CD (Fig. 77) du composé **LH1** montre des effets cotton autour de 232 (-) et 306 (+) nm, en conséquence la configuration absolue *R* a été attribuée pour les positions C-8 et C-8' (Moore et *al.*, 1984).

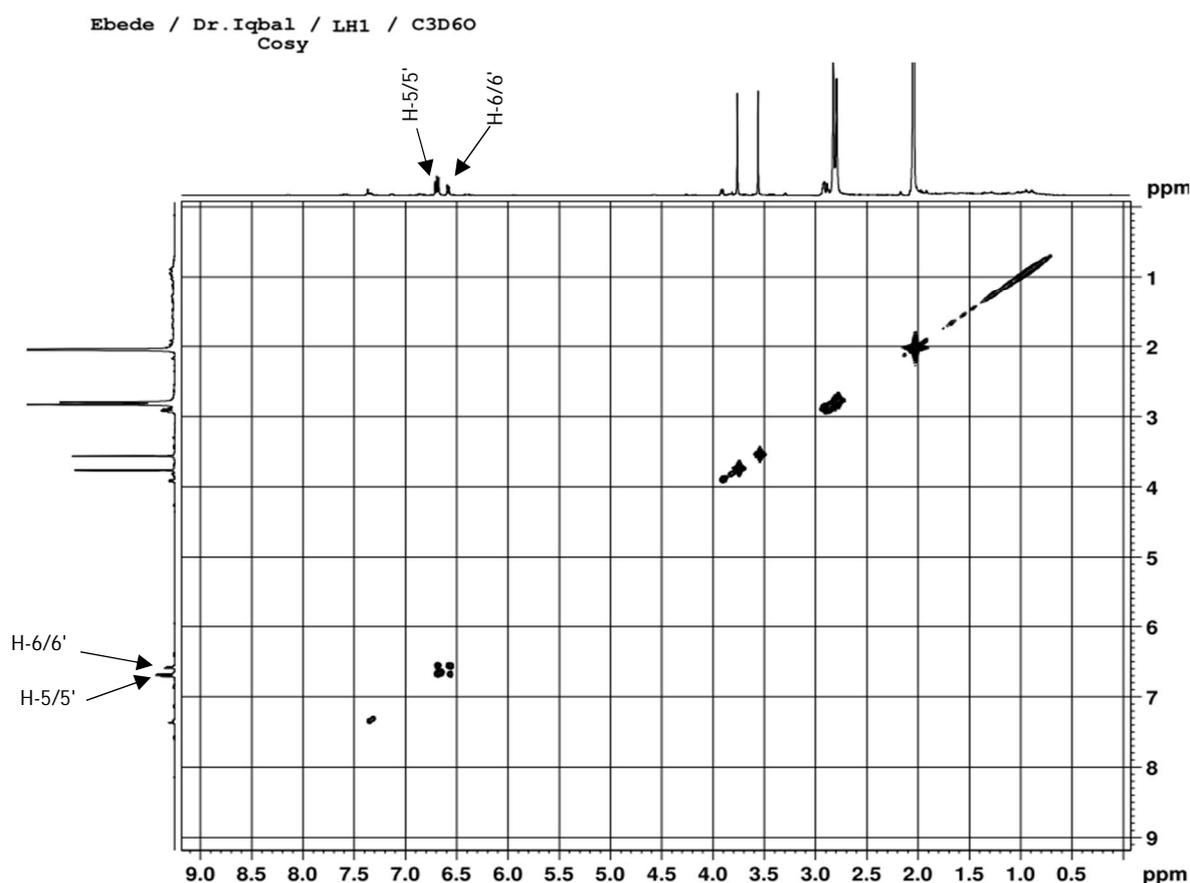


Figure 74- Spectre COSY du composé LH1

Ainsi, la structure de **LH1** a été déterminée comme la 2, 3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxybenzyl) diméthyl succinate (**76**), qui a été précédemment rapporté comme dérivé synthétique (Schöttner et *al.*, 1997). Ce composé est donc isolé et caractérisé pour la première fois ici en tant que nouveau dérivé de source naturelle (Ebede et *al.*, 2021).

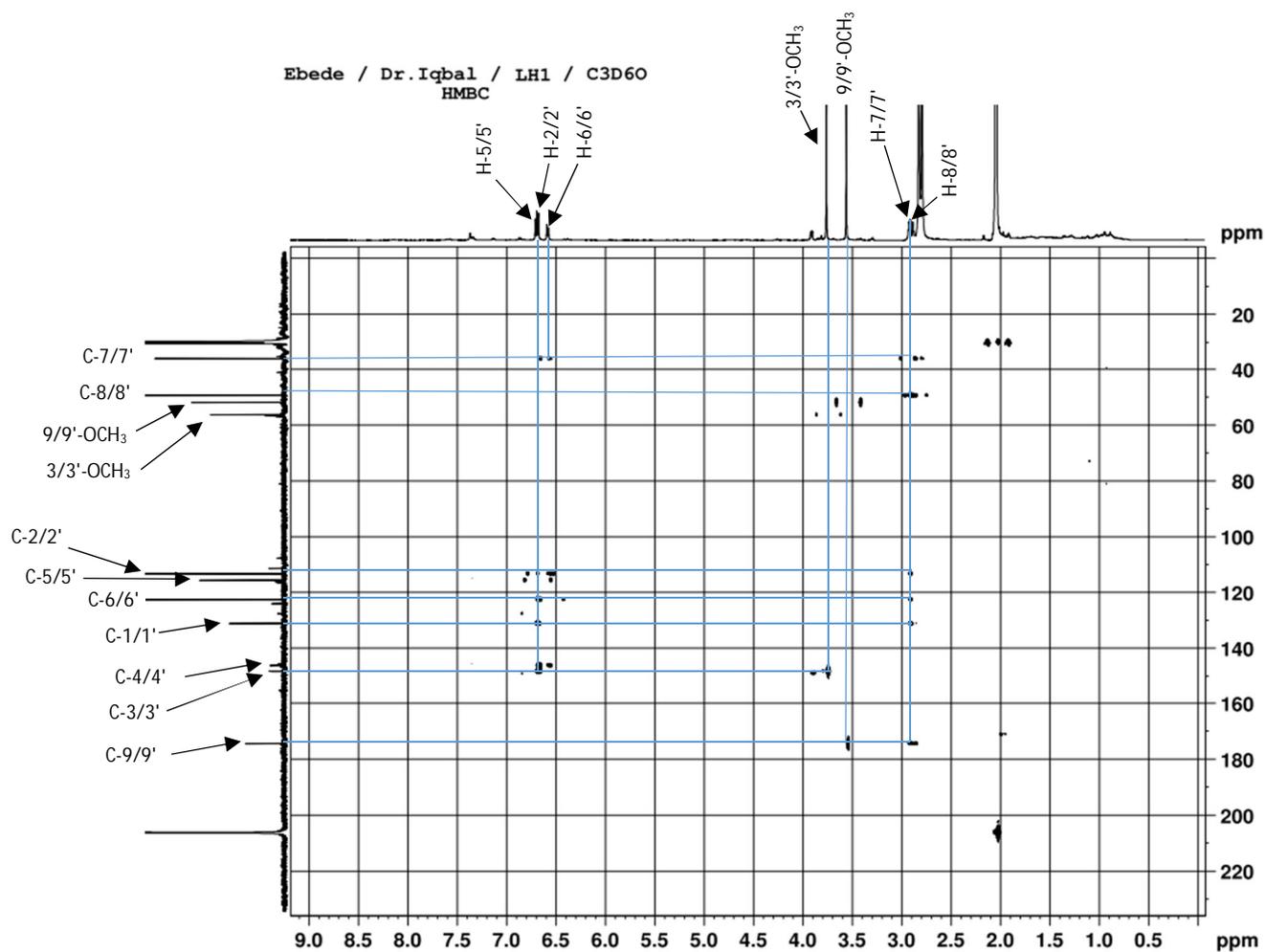
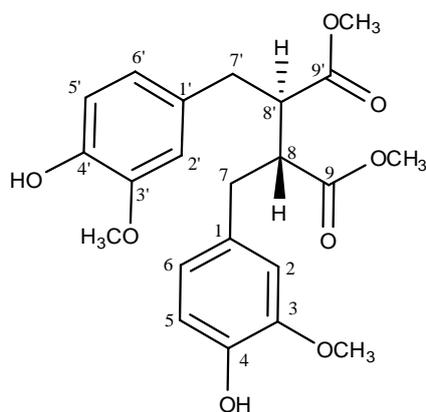


Figure 75- Spectre HMBC du composé LH1



LH1

2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy benzyl) diméthyl succinate (76)

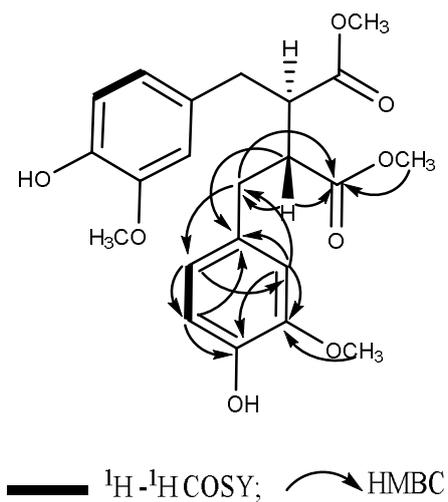


Schéma 14- Quelques corrélations HMBC et COSY du composé LH1

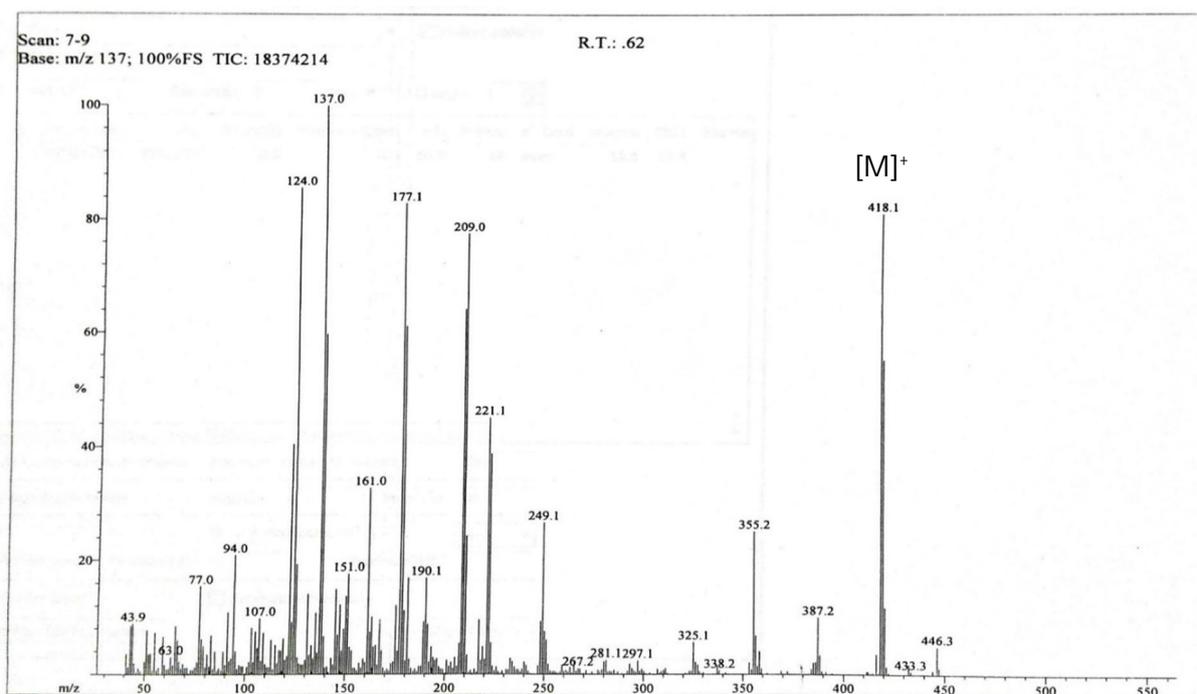


Figure 76- Spectre de masse EI-MS du composé LH1

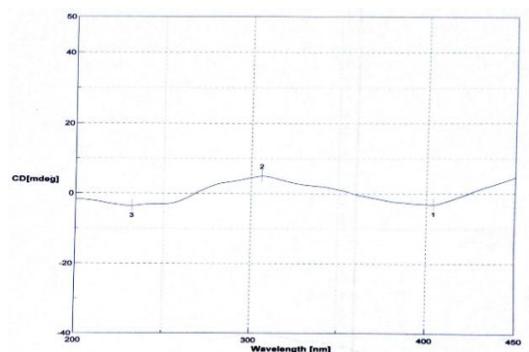


Figure 77- Spectre de dichroïsme circulaire du composé LH1

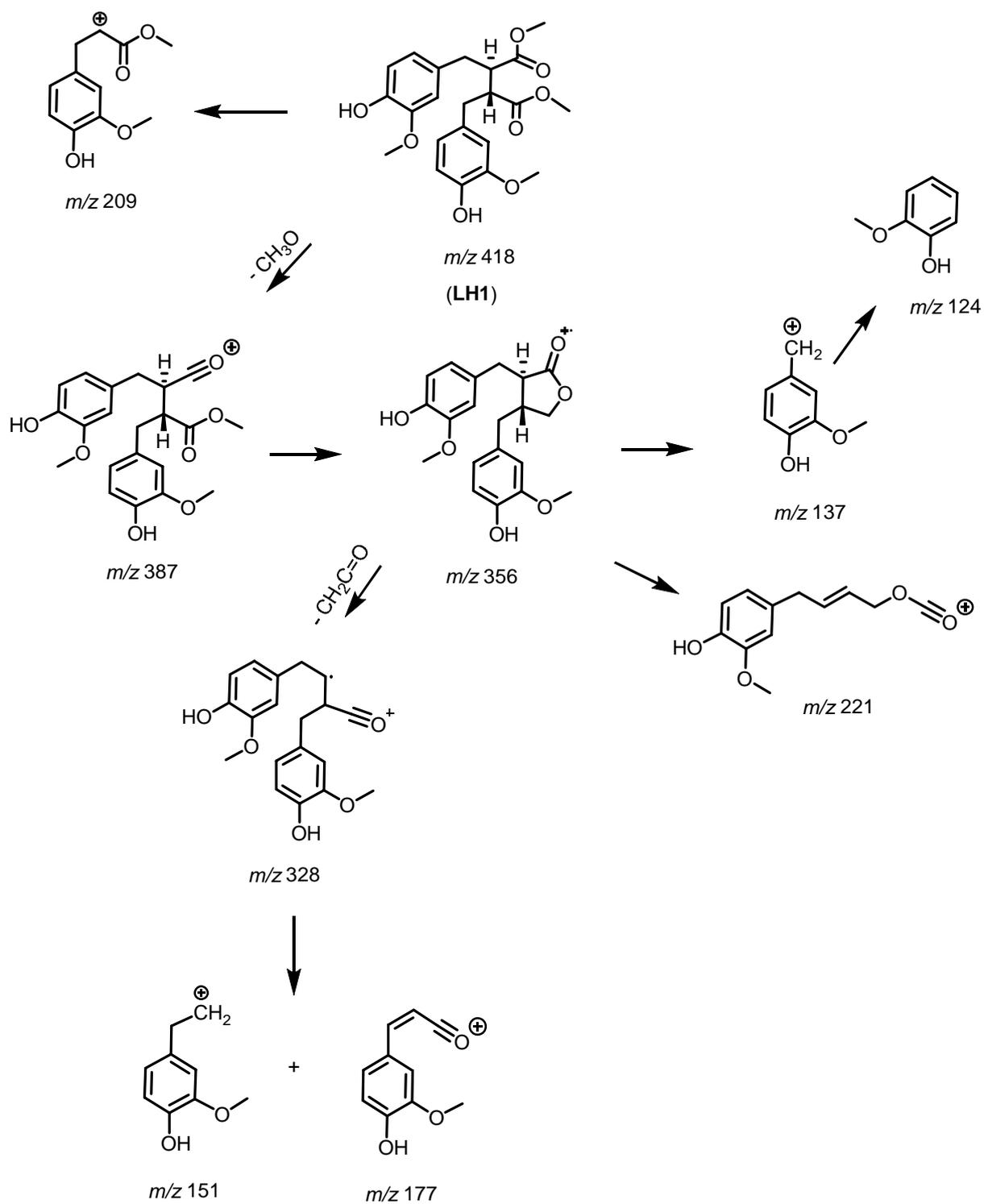


Schéma 15- Fragmentations EI-MS possibles du composé LH1

Tableau 16- Données spectrales RMN du composé LH1 (C₃D₆O, 600 et 150 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	HMBC (H→C)	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹ H NOESY
1	-	130,9			
2	6,67 (d; 2,0)	113,2	C-1; C-4; C-7		H-8
3	-	148,1			
4	-	145,9			
5	6,70 (d; 8,0)	115,5	C-1; C-3; C-4; C-6; C-7	H-6	
6	6,59 (dd; 2,0 & 8,0)	122,4	C-3; C-5; C-2	H-5	H-7
7	2,91 (m)	36,0	C-1; C-2; C-6; C-8; C-9		H-5; H-6
8	2,88 (brs)	49,2	C-1; C-7; C-9		
9	-	174,3			
3-OCH ₃	3,76 (s)	56,1	C-3; C-4		H-5
9-OCH ₃	3,56 (s)	51,7	C-9		
1'	-	130,9			
2'	6,67 (d; 2,0)	113,2	C-1'; C-4'; C-7'		H-8'
3'	-	148,1			
4'	-	145,9			
5'	6,70 (d; 8,0)	115,5	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'	H-6'	
6'	6,59 (dd; 2,0 ; 8,0)	122,4	C-3'; C-5'; C-2'	H-5'	H-7'
7'	2,91 (m)	36,0	C-1'; C-2'; C-6'; C- 8'; C-9'		H-5'; H-6'
8'	2,88 (brs)	49,2	C-1'; C-7'; C-9'		
9'	-	174,3			
3'-OCH ₃	3,76 (s)	56,1	C-3'; C-4'		
9'-OCH ₃	3,56 (s)	51,7	C-9'		

II.2.5.2.2. Détermination structurale de LH2

Le composé **LH2** a été obtenu sous forme d'un solide blanc, $[\alpha]_D^{26} + 6,25$ (c 0,0012 ; CHCl_3) et soluble dans l'acétone. La formule moléculaire $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{O}_5$ a été établie sur la base de son spectre de masse HREI-MS (m/z 644,4454 $[\text{M}]^+$, calculé à 644,4441), indiquant 13 degrés d'insaturation (Fig. 78).

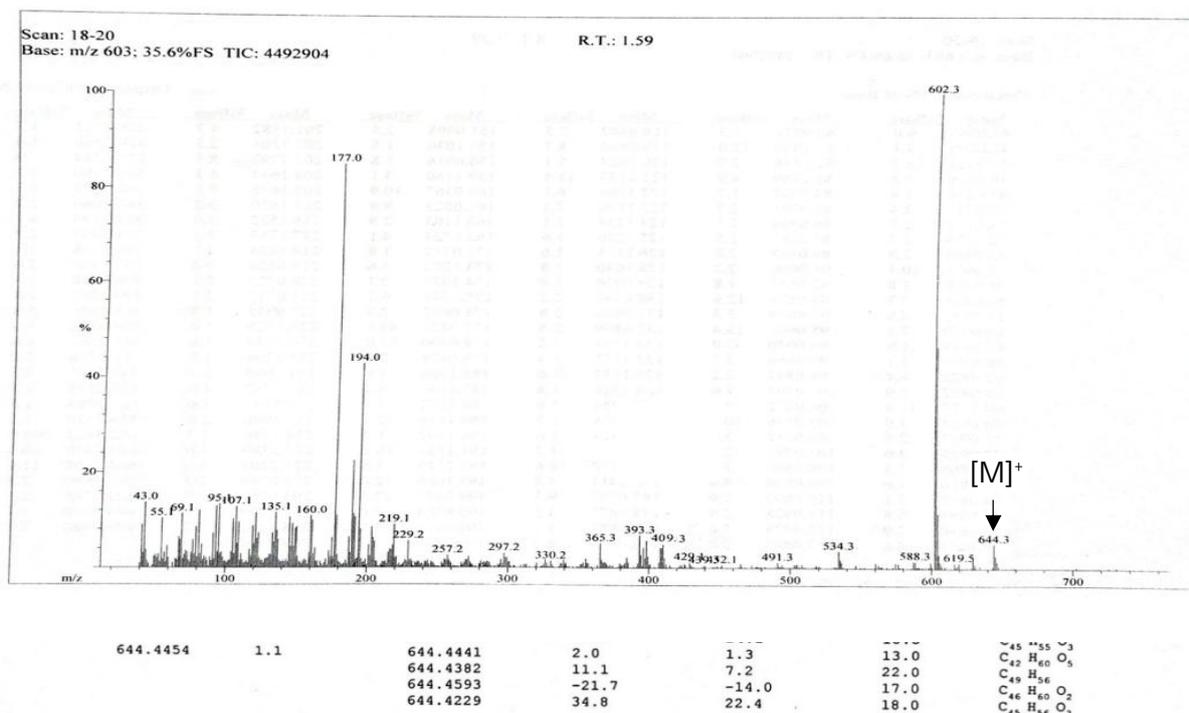


Figure 78- spectre de masse HREI-MS et EI-MS du composé LH2

Dans le spectre IR (Fig. 80), des bandes d'absorption ont été observées à 2936 ($-\text{CH}_3$), 1738 ($\text{O}=\text{C}-$ de l'ester), 1599 – 1151 ($\text{C}=\text{C}$ aromatique), 1457 ($-\text{CH}_2$ cyclique), et 1093 cm^{-1} (cyclo-alcane). Le spectre UV (MeOH) permet d'observer trois maxima à 213, 229 et 278 nm suggérant la présence de plusieurs types d'insaturation dans la molécule (Fig. 79).

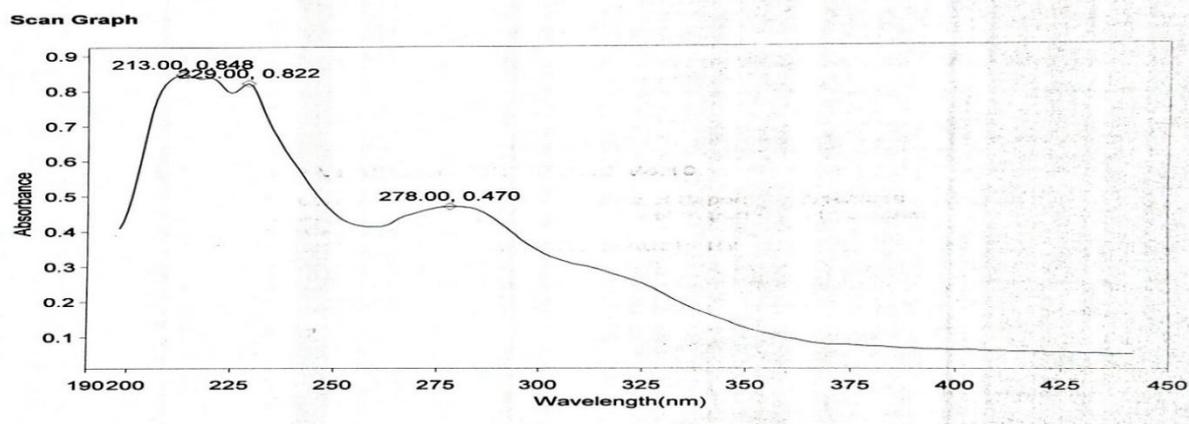


Figure 79- Spectre UV (MeOH) du composé LH2

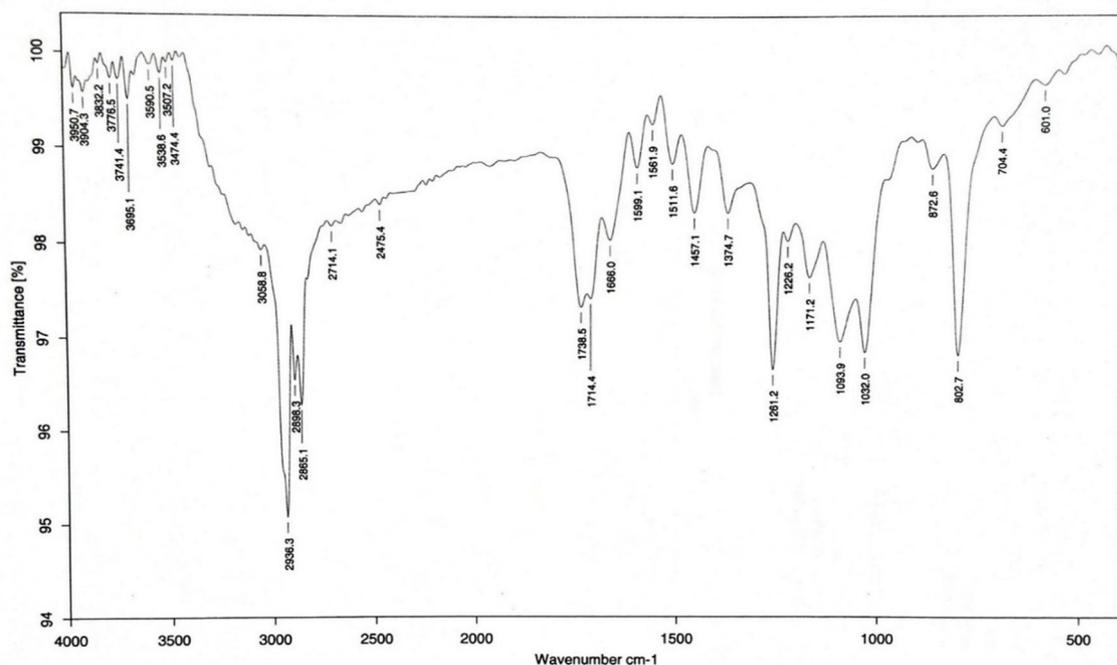


Figure 80- Spectre IR sur disque KBr du composé LH2

Les données des déplacements chimiques de RMN ^1H (Fig. 81) ont montré sept signaux de méthyles tertiaires résonnant à δ_{H} 1,70 (s, H-29) ; 1,08 (s, H-27) ; 1,01 (s, H-26) ; 0,93 (s, H-24) ; 0,88 (s, H-23) ; 0,86 (s, H-25) et 0,82 (s, H-28) qui corrént en HSQC avec les carbones à δ_{C} 19,5 ; 14,9 ; 17,0 ; 16,6 ; 28,3 ; 16,4 et 18,3 respectivement. Ce même spectre montre le signal d'un proton méthine oxygéné à δ_{H} 4,56 (t; $J = 2,7$; H-3) et également des résonances à δ_{H} 4,56 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H-30a) et 4,70 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H-30b), représentant la double liaison exocyclique d'une chaîne latérale isopropényle. En outre, on observe un signal de proton lupéniol caractéristique à δ_{H} 2,43 (H-19). L'ensemble de ces données indiquent le squelette triterpénoïdal de type lupane (Connolly et Hill, 1991).

De plus, la présence de cinq autres signaux entre δ_{H} 6,56 – 7,64, parmi lesquels deux protons mutuellement couplés à δ_{H} 7,64 (1H, $J = 16,0$ Hz, H-7') et 6,56 (1H, $J = 16,0$ Hz, H-8'); deux doublets à δ_{H} 7,10 (1H, $J = 8,1$ Hz, H-5') ; 7,46 (1H, $J = 2,0$ Hz, H-2') et un doublet dédoublé à δ_{H} 7,25 (1H, $J = 2,0$; 8,1 Hz, H-6') suggérant la présence d'un fragment cinnamoyle 3',4'-disubstitué de configuration *trans* et l'existence d'un système ABX. Par ailleurs, un singulet de protons de groupe méthyle à δ_{H} 2,23 (3H, H-11') dû à la présence d'un groupe acétyle, et un signal de méthoxy à δ_{H} 3,91 (3H, 3'-OCH₃) ont également été observés.

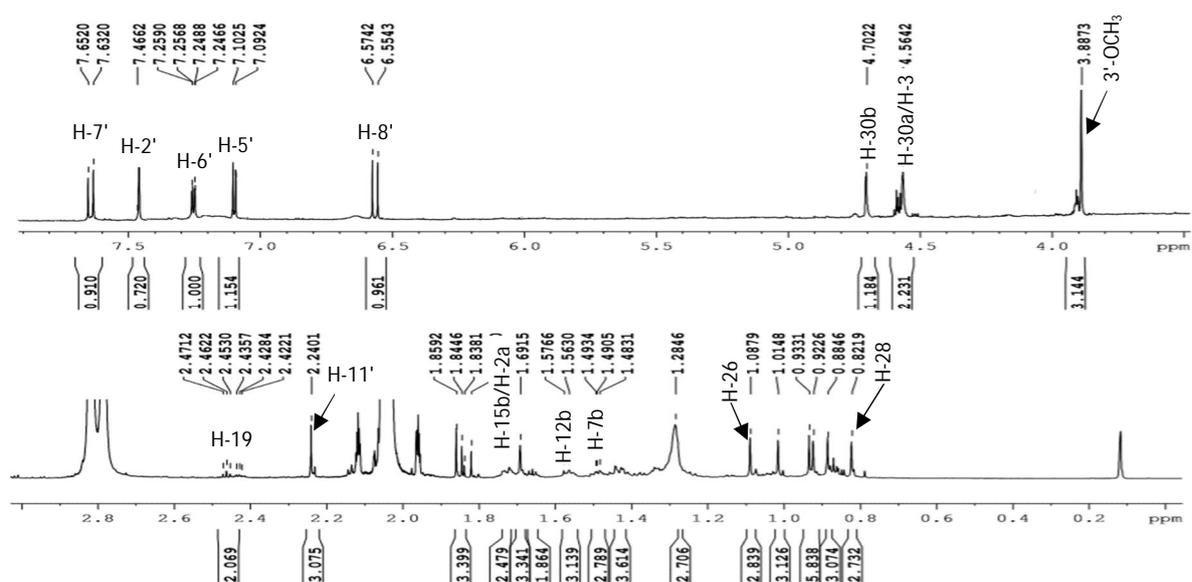


Figure 81- Spectre RMN ^1H (800 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) du composé LH2

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 82) montrent 42 signaux différents dont : six signaux de carbone protonés à δ_{C} 144,3 (C-7') ; 119,8 (C-8') ; 124,1 (C-5') ; 112,4 (C-2') ; 122,1 (C-6') et 20,4 (C-11'), ainsi que cinq résonances de carbone quaternaire à δ_{C} 168,8 (C-10') ; 166,8 (C-9') ; 151,5 (C-3') ; 141,5 (C-4') et 134,3 (C-1'). Ces données indiquent qu'en dehors d'un squelette triterpénique dans **LH2**, une chaîne latérale de 12 carbones supplémentaires est également présente. Cela est accord avec les fragmentations observées sur son spectre de masse EI-MS (Schéma 17). L'attribution de tous les protons aux différents carbones a été faite par l'analyse du spectre HSQC (Tableau 17).

Le groupe di-ester a été placé en C-3 (δ_{C} 81,3) sur la base de considérations biogénétiques (Siddiqui et Kardar, 2001), ainsi qu'à travers des corrélations observées sur le spectre HMBC (Fig. 85) entre le proton H-3 (δ_{H} 4,56) et les carbones C-4 (δ_{C} 38,7), C-9' (δ_{C} 166,8), et C-23 (δ_{C} 28,3). Les positions du deuxième groupe ester méthylique et du méthoxy sur le groupement benzène sont identifiables par les corrélations HMBC entre H-11' (δ_{H} 2,23) et C-4' (δ_{C} 141,5), H-3'-OCH₃ (δ_{H} 3,91) et C-3' (δ_{C} 151,5).

La configuration absolue a été attribuée 3*S* en raison de son effet Cotton positif à 288 nm dans le spectre CD (Fig. 83) (Giorgio *et al.*, 2004). Sur la base de ces résultats, la structure du composé **LH2**, présentée ci-dessous, a pu être établie comme la 3-*O*- β -(*E*)-(4'-*O*-acetylferuloyl)lupéol (**77**), décrit ici pour la première fois (Ebede *et al.*, 2021).

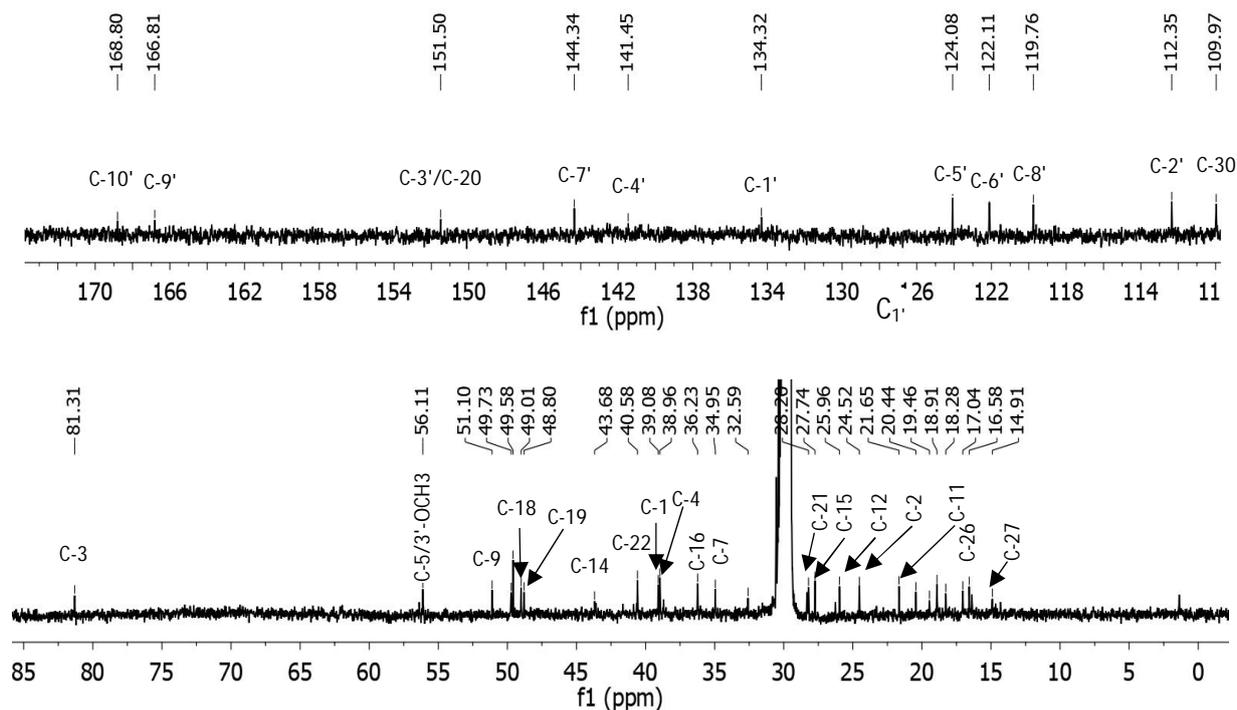


Figure 82- Spectre RMN ^{13}C (200 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) du composé LH2



Figure 83- Spectre CD du composé LH2

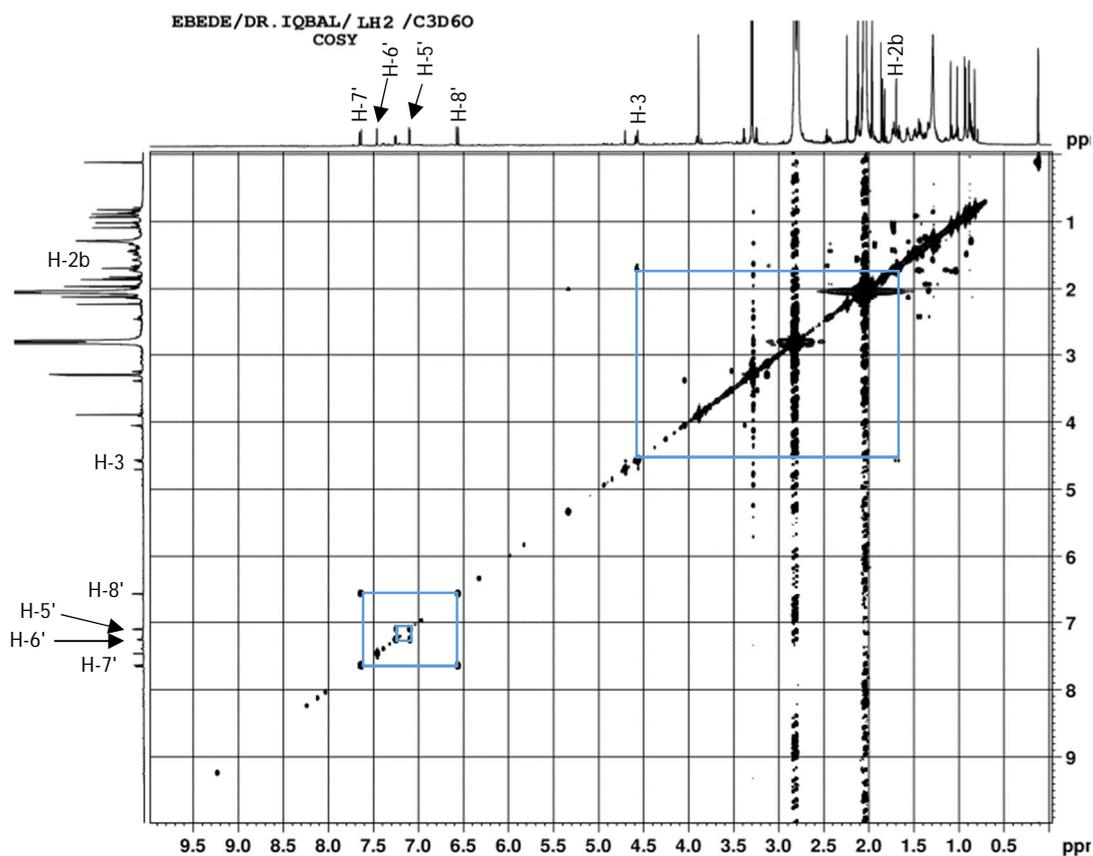


Figure 84- Spectre COSY (800 MHz, C₃D₆O) du composé LH2

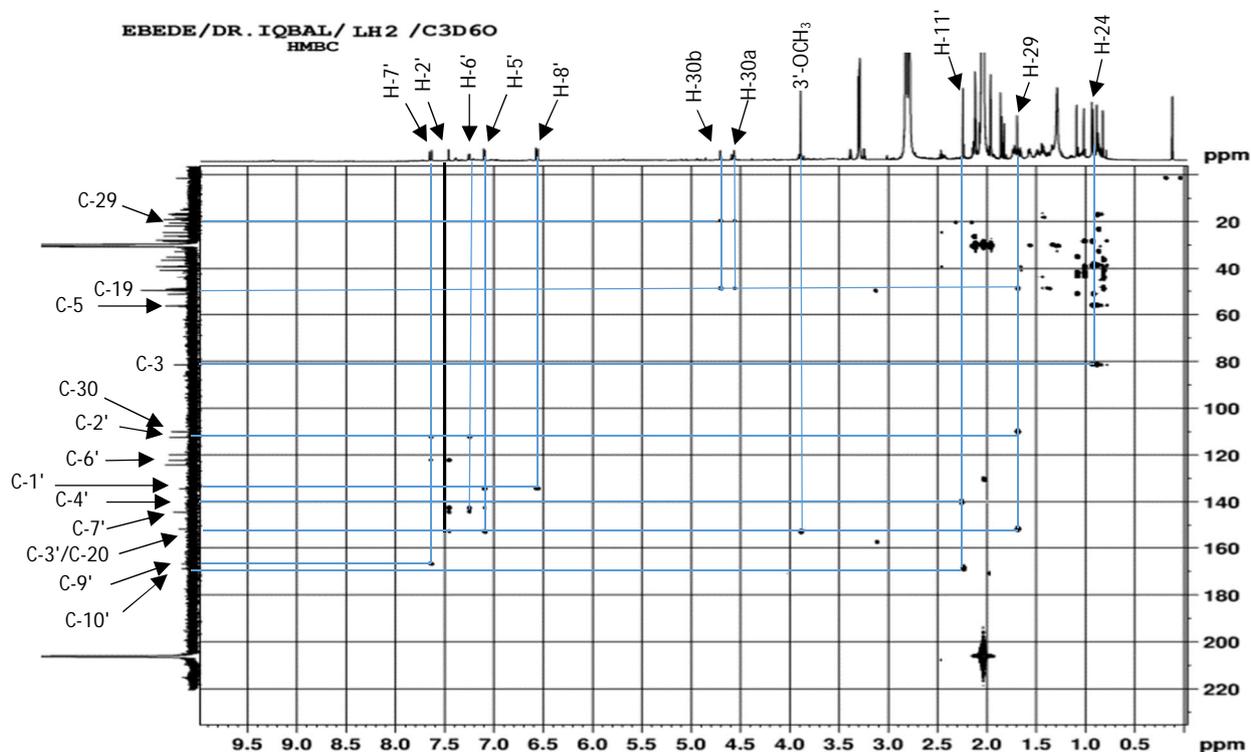
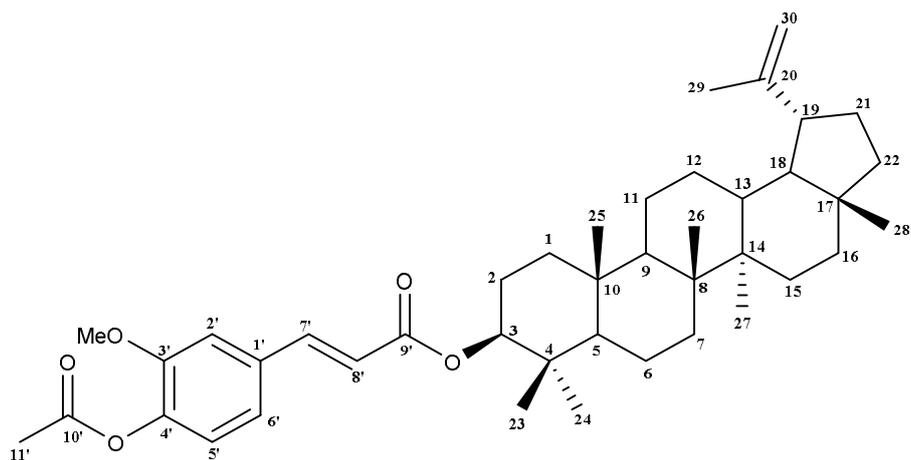


Figure 85- Spectre HMBC (200 MHz, C₃D₆O) du composé LH2



LH2

3-O- β -(*E*)-(4'-O-acetylferuloyl)lupéol (**77**)

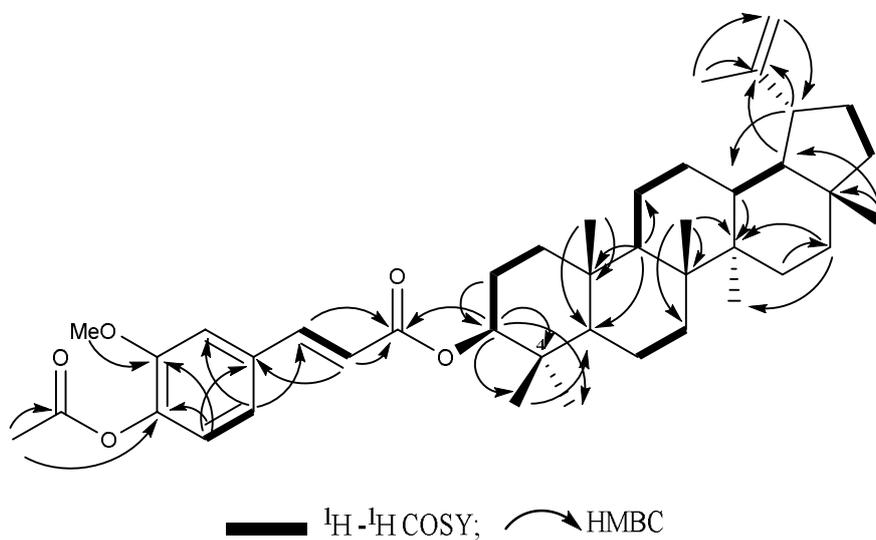


Schéma 16- Corrélations HMBC et COSY du composé LH2

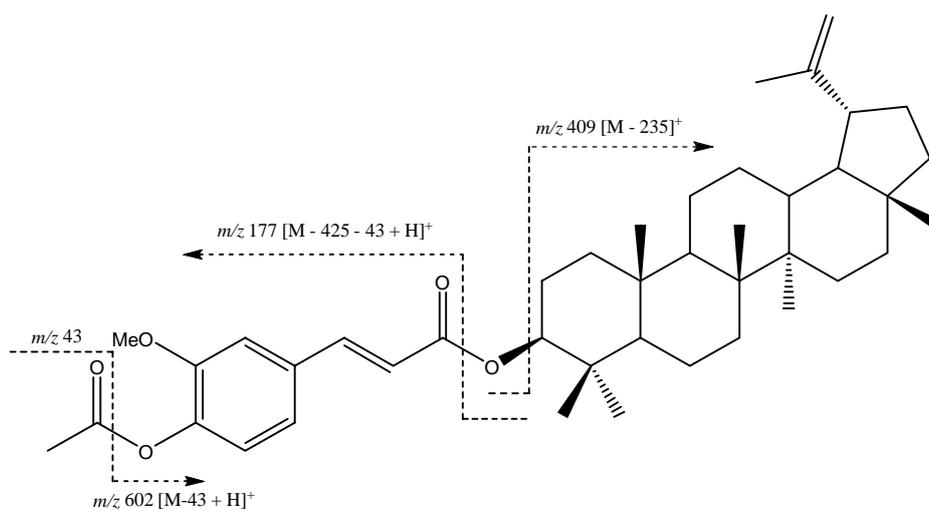


Schéma 17- Fragmentation EI-MS du composé LH2

Tableau 17- Données spectrales RMN du composé LH2 (C₃D₆O, 800 et 200 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	HMBC	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹ H NOESY
1a ; 1b	1,07 ; 1,73 (m)	39,1		H-2	
2a ; 2b	1,65 ; 1,72 (m)	24,5	C-3	H-1; H-3	
3	4,56 (t; 2,7)	81,3	C-2; C-4; C-23; C-24; C-9'	H-2	H-23
4		38,7			
5	0,93 (m)	56,1			
6a ; 6b	1,55 ; 1,70 (m)	18,9		H-7	
7a ; 7b	1,41 ; 1,48 (m)	34,9		H-6	
8		41,6			
9	1,43 (m)	51,1	C-5; C-10; C-14	H-11	
10		37,9			
11a ; 11b	1,26 ; 1,44 (m)	21,6	C-26	H-9; H-12	
12a ; 12b	1,15 ; 1,58 (m)	25,9		H-11	
13	1,07 (m)	38,9	C-14	H-18	
14		43,7			
15a ; 15b	1,04 ; 1,69 (m)	27,7	C-16	H-16	
16a ; 16b	1,12 ; 1,75 (m)	36,2	C-14; C-27	H-15	
17		43,7			
18	1,43 (m)	49,0	C-20	H-13	
19	2,43 (m)	48,8	C-13; C-20; C-30		
20		151,5			
21	0,89 ; 1,03 (m)	28,2		H-22	
22	1,23 ; 1,37 (m)	40,6	C-17; C-19; C-20; C-28	H-21	
23	0,88 (s)	28,3	C-3; C-4; C-5; C-24		H-2
24	0,93 (s)	16,6	C-3; C-4; C-5; C-9; C-23		
25	0,86 (s)	16,4	C-5; C-10		
26	1,01 (s)	17,0	C-7; C-8; C-9; C-14; C-27		
27	1,08 (s)	14,9			
28	0,82 (s)	18,3	C-13; C-17; C-18		
29	1,70 (s)	19,5	C-19; C-20; C-30		
30a ; 30b	4,56 (d; 1,3) ; 4,70 (d; 2,6)	109,9	C-19; C-29		
1'		134,3			
2'	7,46 (d; 2,0)	112,4	C-3'; C-6'; C-7'		3'-OCH ₃
3'		151,5			
4'		141,5			
5'	7,10 (d; 8,1)	124,1	C-1'; C-3'; C-4'	H-6'	
6'	7,25 (dd; 2,0 ; 8,1)	122,1	C-2'; C-7'	H-5'	
7'	7,64 (d; 16,0)	144,3	C-2'; C-6'; C-9'	H-8'	
8'	6,56 (d; 16,0)	119,8	C-1'; C-9'	H-7'	
9'		166,8			
10'		168,8			
11'	2,23 (s)	20,4	C-4'; C-10'		
3'-OCH ₃	3,91 (s)	56,4	C-3'		H-2'

II.2.5.2.3. Détermination structurale de LH3

Le composé **LH3** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche, $[\alpha]_D^{26} + 11,1$ (c 0,0016 ; CHCl_3) et soluble dans le MeOH. La formule moléculaire $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Na}$ (7 degrés d'insaturation) a été déduite de son spectre de masse HRESI-MS à m/z 439,2818 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (théoriquement calculé à 439,2824) et de son spectre de masse FAB-MS en mode positif à m/z 417 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Fig. 86).

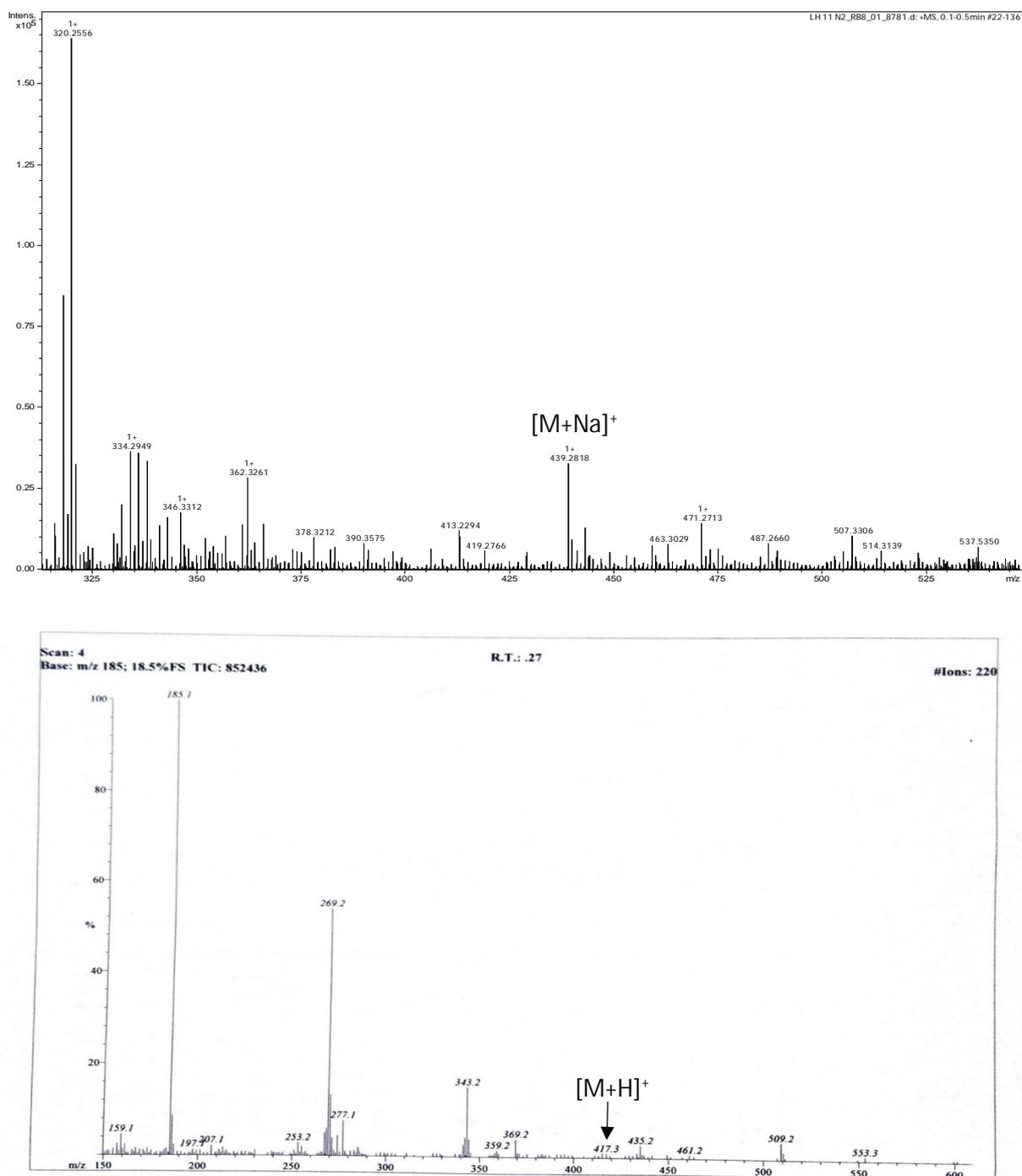


Figure 86- Spectres de masse (+)-HRESI-MS et (+)-FAB-MS du composé LH3

Dans le spectre IR (Fig. 87), des bandes ont été observées à 2939 ($-CH_3$), 1734 ($O=C-$ de l'ester), 1460 ($-CH_2$ cyclique), 1370 ($-CH_2$ (CH_3) 2γ), et 1086 cm^{-1} (cycloalcane). **LH3** répond positivement au test de Liebermann-Burchard et son spectre UV (Fig. 88) montre un maximum à 229 nm suggérant un squelette stéroïdique (Kandati et al., 2012).

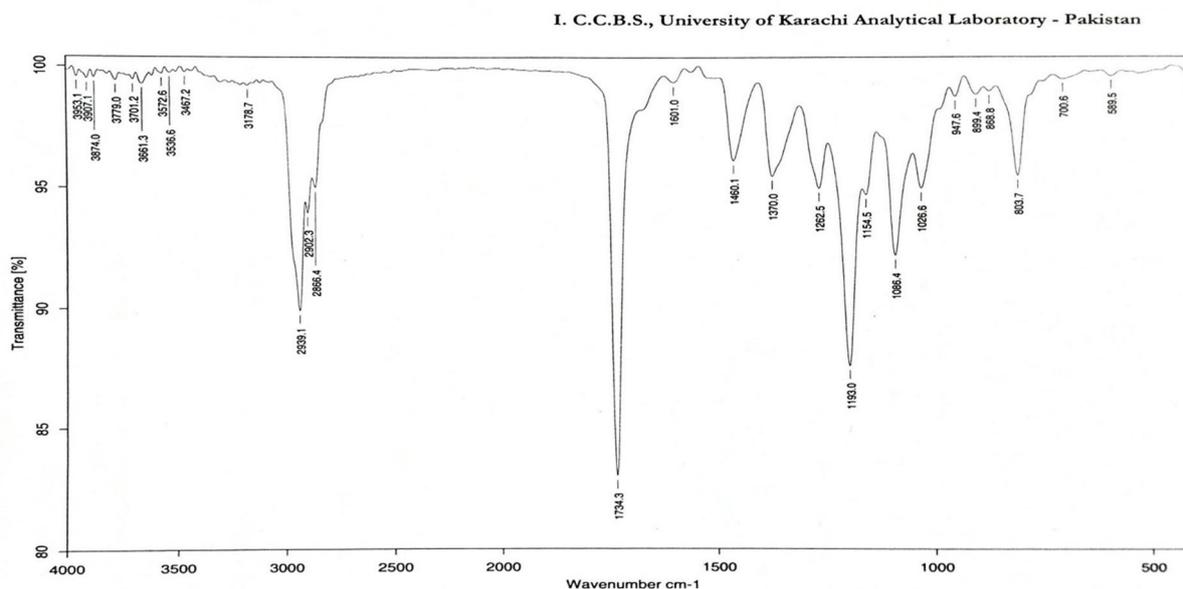


Figure 87- Spectre IR sur disque de KBr du composé LH3

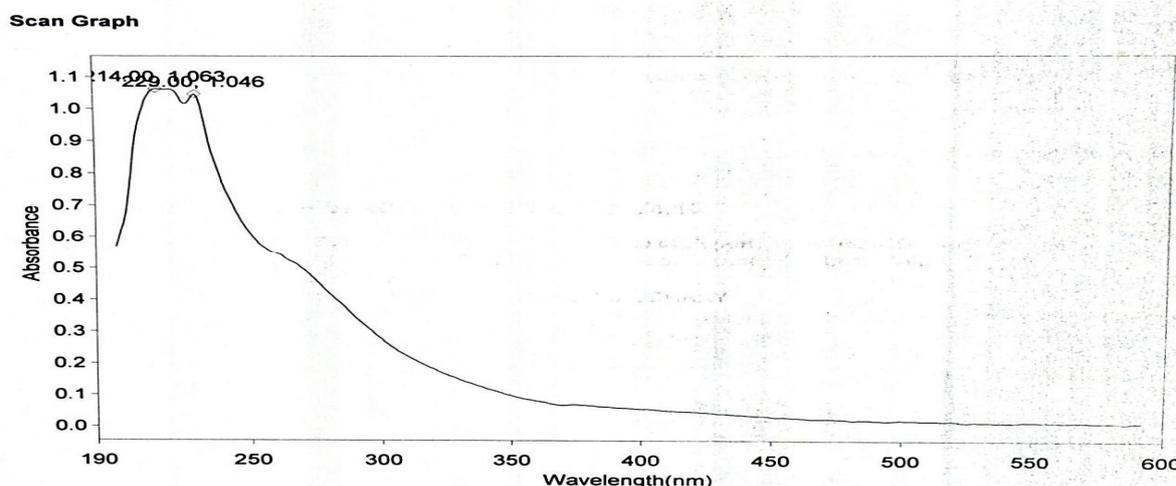


Figure 88- Spectre UV (MeOH) du composé LH3

Le spectre de RMN 1H de **LH3** (Fig. 89) présente trois méthyles singulets intenses à δ_H 0,89 ; 1,06 et 1,43 ; deux méthyls doublets 1,08 (d, $J = 1,5$) ; 1,09 (d ; $J = 1,5$) qui corrént en HSQC avec les carbones à δ_C 14,8 (C-19) ; 19,5 (C-20) ; 21,8 (C-18) ; 9,4 (C-26) et 9,6 (C-23) respectivement. On observe également un proton de méthine qui apparait à δ_H 4,52 (m, H-

3), suggérant la présence d'un groupe ester en C-3 et un proton déblindé à δ_H 5,39 (d ; $J = 22,6$; 7,6 Hz) en raison de la présence d'une liaison oléfinique trisubstituée.

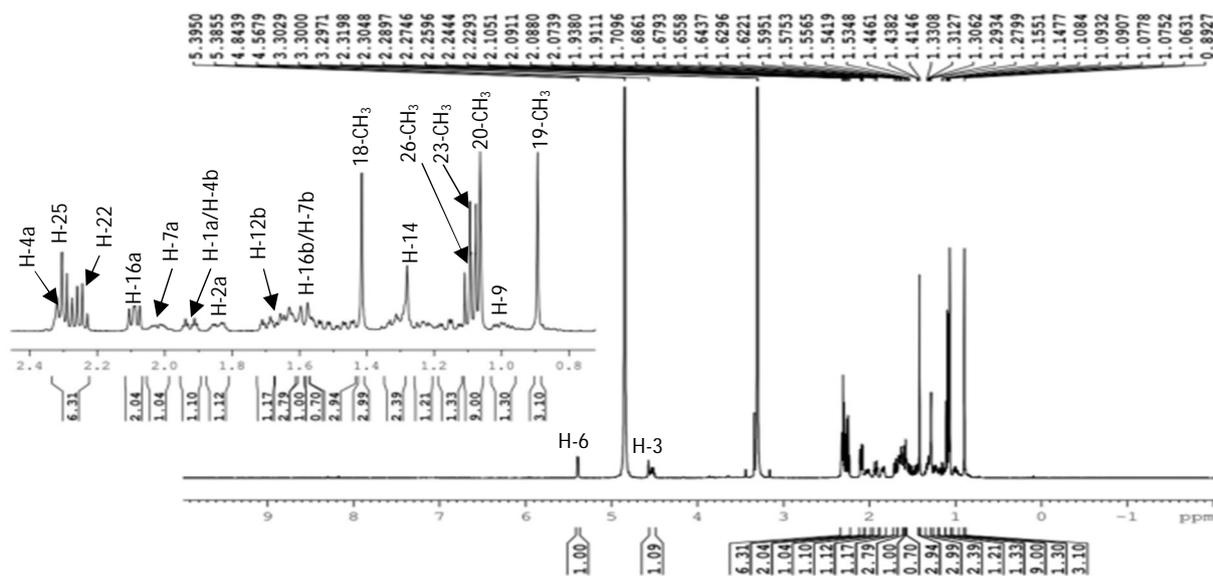


Figure 89- Spectre RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) du composé LH3

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 90) montre 26 signaux de carbone dont 5 méthyles, 10 méthylènes, 5 méthines et 6 carbones quaternaires. Les deux carbones de la double liaison C-5 et C-6 résonnent à δ_C 141,0 et 123,6 respectivement. Toutefois, les signaux à δ_C 75,4 (C-3), et 92,0 (C-17) correspondent à deux carbones oxygénés liés chacun à un groupe propylester et dont les deux carbonyles résonnent à δ_C 175,8.

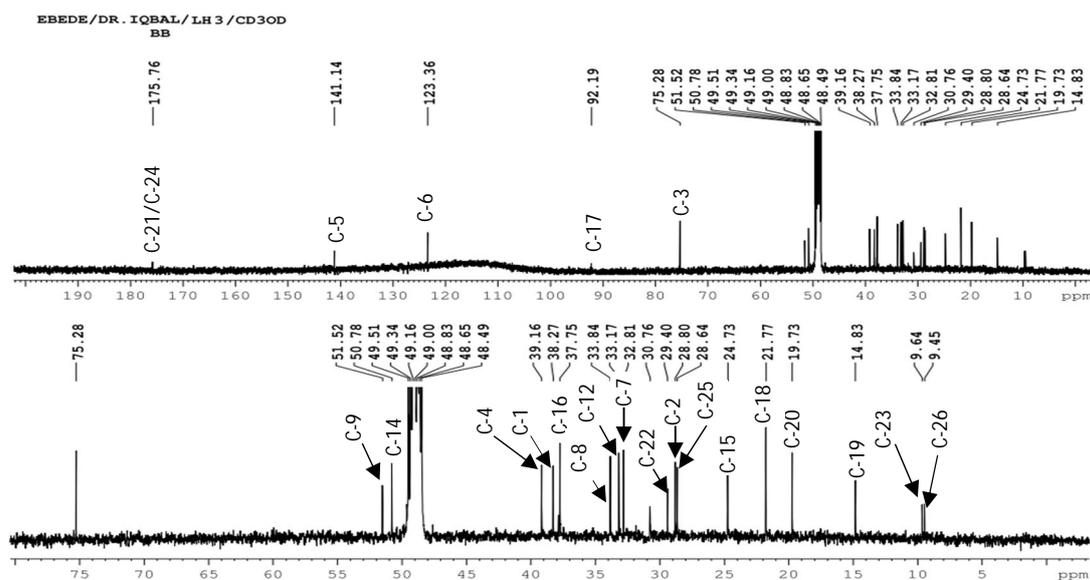


Figure 90- Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) du composé LH3

Le spectre HMBC a permis de connecter les deux groupes propylesters à travers des corrélations entre H-4 et C-2/C-3/C-5/C-6/C-10/C-24, entre H-22 et C-23, et entre H-25 et C-23/C-24 (Fig. 90).

Les données du spectre COSY (Fig. 91), soutenues par les différents ions fragments (Schéma 19) obtenus à partir du spectre de masse FAB-MS ont permis de confirmer les différentes positions des protons dans la structure de **LH3**.

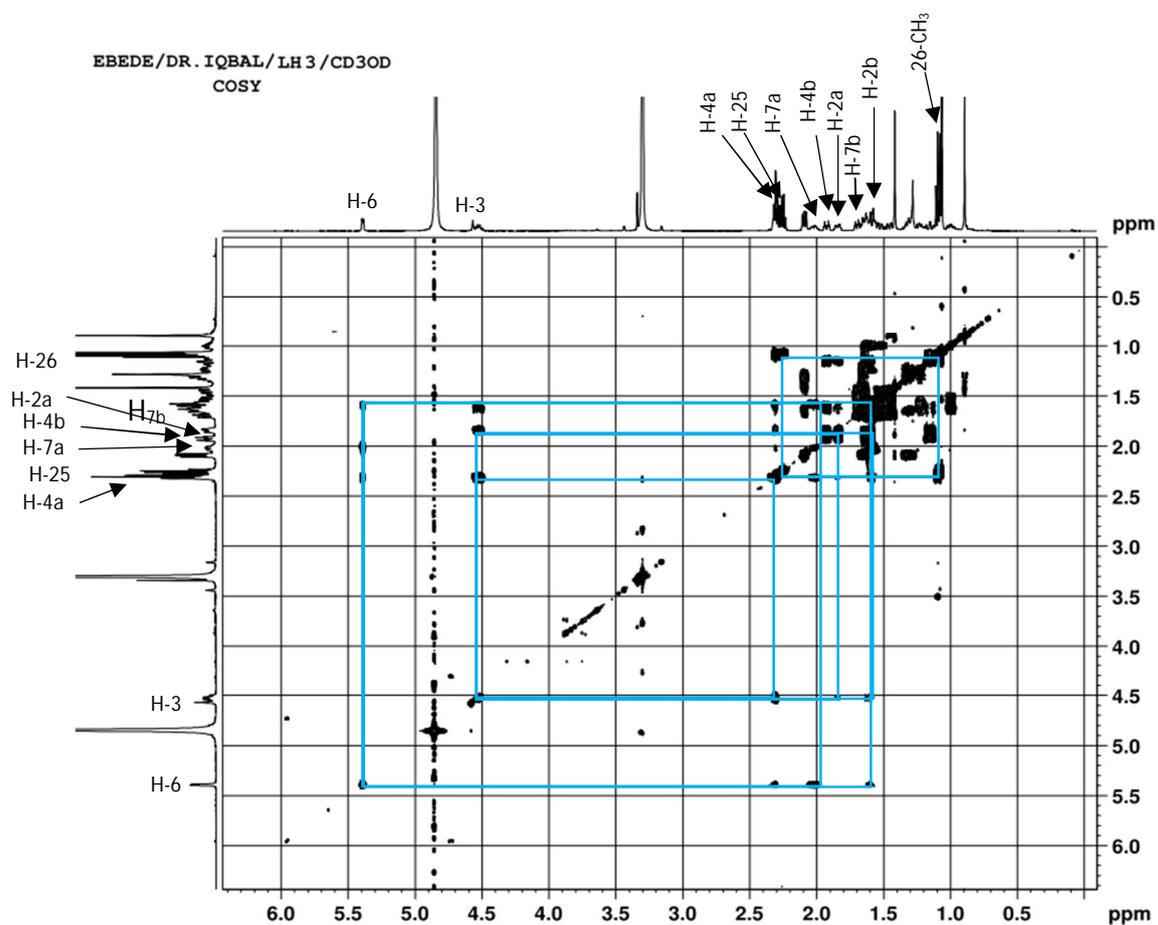


Figure 91- Spectre COSY (600 MHz, C_3D_6O) du composé LH3

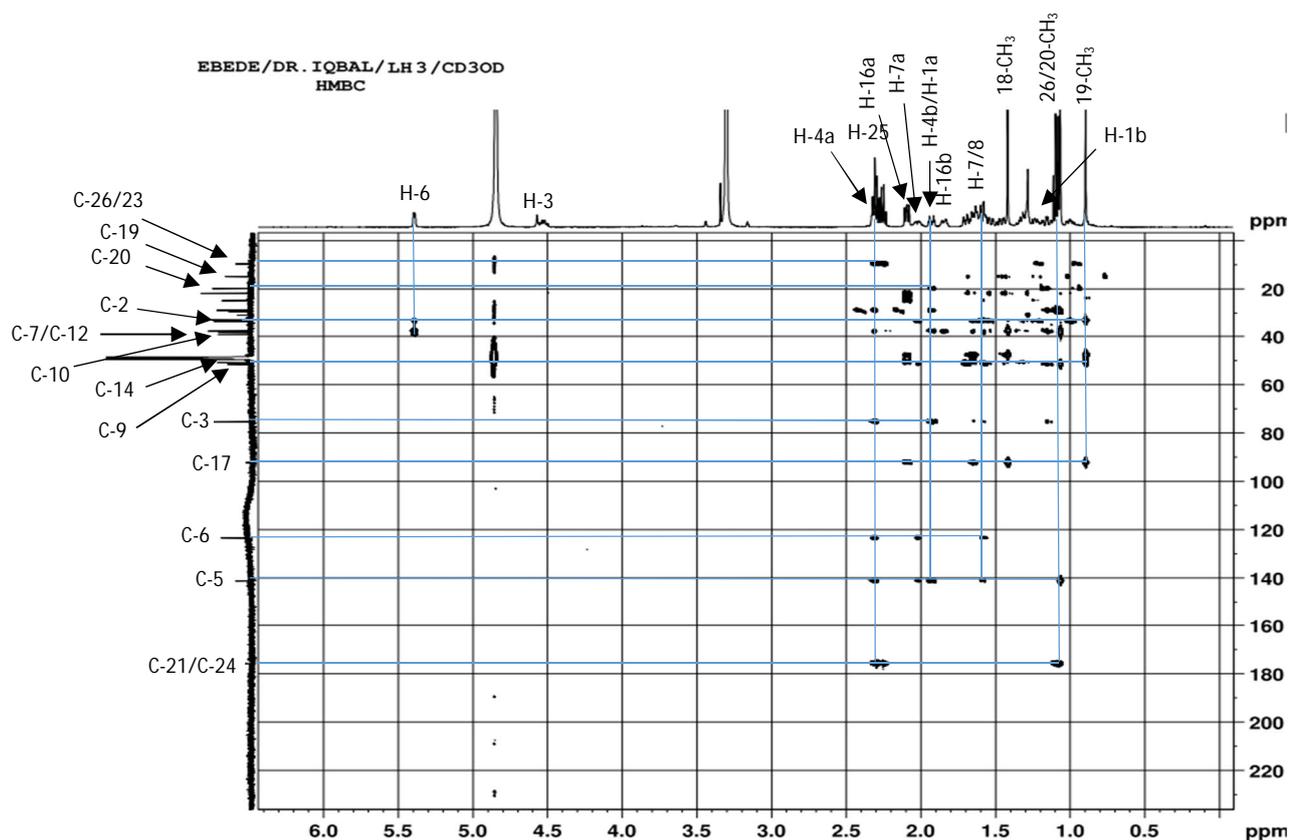
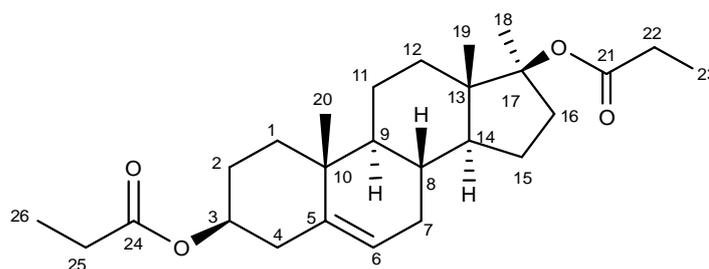


Figure 92- Spectre HMBC (125 MHz, C₃D₆O) du composé LH3

Sur la base des données spectroscopiques ci-dessus et ceux issues des analyses des spectres HSQC, et NOESY (Tableau 18), le composé **LH3** a été identifié au méthandriol dipropionate (**78**), un stéroïde anabolique-androgénique précédemment synthétisé (McKinney et *al.*, 2012). Il est ici isolé et entièrement caractérisé pour la première fois comme produit de source naturelle (Ebede et *al.*, 2021).



LH3

Méthandriol dipropionate (**78**)

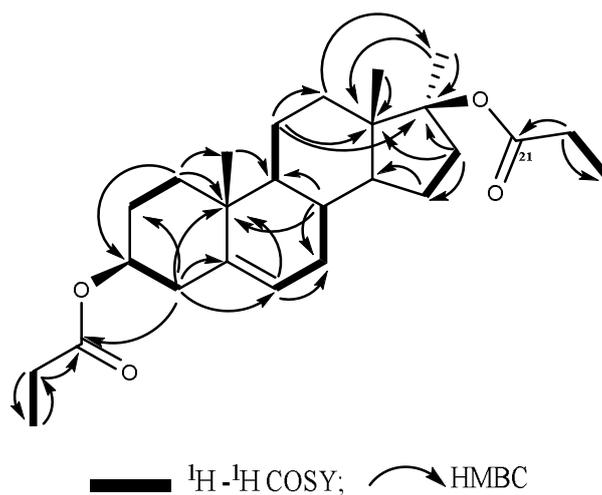


Schéma 18- Corrélations HMBC et COSY du composé LH3

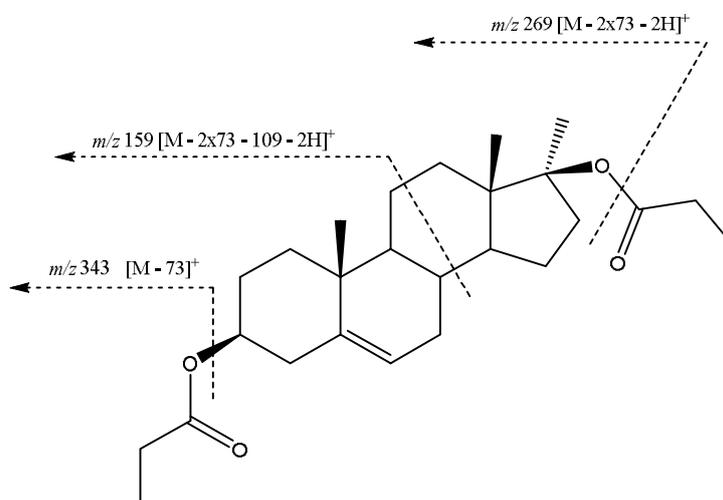


Schéma 19- Fragmentation FAB-MS du composé LH3

Tableau 18- Données spectrales RMN du composé LH3 (C₃D₆O, 500 et 125 MHz)

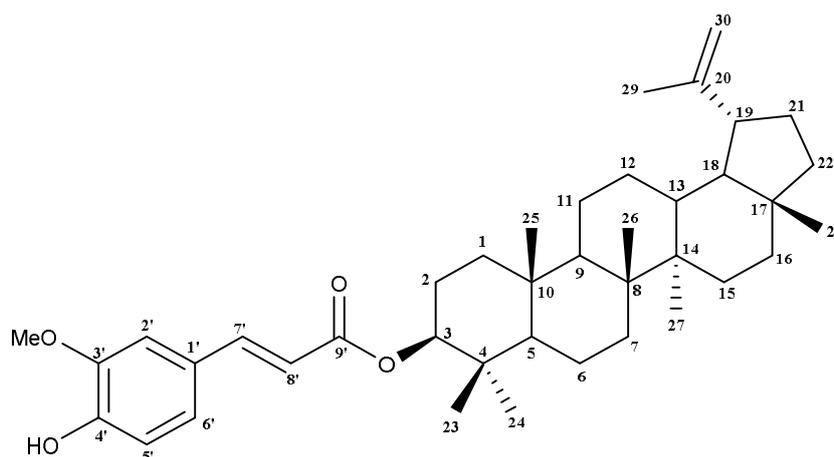
Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	HMBC (H→C)	¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹ H NOESY
1a ; 1b	1,92 ; 1,16 (m)	38,3	C-3, C-10, C-20	H-2	H-1, H-9
2a ; 2b	1,85 ; 1,63 (m)	28,8	C-1		H-2
3	4,52 (m)	75,4			H-4
4a ; 4b	2,31 ; 1,94 (dq, 22,6 ; 7,6)	39,2	C-2, C-3, C-5, C-6, C-10, C-24	H-3	H-3, H-6
5	-	141,1			
6	5,39 (d; 22,6 ; 7,6)	123,6	C-7, C10	H-7, H-8	H-4, H-7
7a ; 7b	2,02 & 1,57 (m)	32,8	C-5, C-6, C-9	H-6	H-6, H-7, H-8
8	1,57 (m)	33,8	C-7, C-9, C-10	H-6	H-7
9	1,01 (m)	51,5	C-8		H-1
10	-	37,8			
11a ; 11b	1,63 ; 1,44 (m)	21,8	C-12, C-13, C-14, C-17	H-9	
12a ; 12b	1,71 ; 1,47 (m)	33,2	C-11, C-18		
13	-	47,6			
14	1,23 (m)	50,7	C-12		
15a ; 15b	1,66 ; 1,33 (m)	24,4	C-14	H-16	
16a ; 16b	2,09 ; 1,58 (dd; 8,9 ; 6,7)	37,7	C-13, C-15, C-17	H-15	
17	-	92,0			
18	1,43 (s)	21,8	C-13, C-16, C-17		H-15
19	0,89 (s)	14,8	C-12, C-13, C-14		
20	1,06 (s)	19,5	C-1, C-2, C-9		
21	-	175,8			
22	2,25 (d; 7,6)	29,3	C-23	H-23	
23	1,09 (d; 1,5)	9,6	C-21	H-22	H-22
24	-	175,8			
25	2,30 (d, 7,6)	28,6	C-24, C-26	H-26	
26	1,08 (d; 1,5)	9,4	C-24	H-25	H-24

II.2.5.2.4. Identification de LH4

Le composé **LH4** possède des données physico-chimiques et spectrales qui se rapprochent de celles du composé **LH2**. Il se présente sous forme de solide blanc amorphe, soluble dans l'acétone. Sa formule brute $C_{40}H_{58}O_4$ ayant 12 insaturations est déduite des analyses de son spectre de RMN ^{13}C et de son spectre de masse EI-MS qui présente l'ion moléculaire $[M]^+$ à m/z 602.

La comparaison des spectres RMN 1H , ^{13}C et 2D du composé **LH4** avec ceux du composé **LH2** indique que la seule différence entre ces deux composés se trouve au niveau du groupe ester méthylique précédemment positionné en C-4'. Dans le cas du composé **LH4** ce groupe est remplacé par un groupement hydroxyle.

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des 1H et ^{13}C (Tableau 19) du composé **LH4** avec celles de la littérature nous a permis de l'identifier à la 3β -(*E*)-feruloyllupeol (**79**), précédemment isolé de *Ceriops tagal* par He et al. (2007).



LH4

3β -(*E*)-feruloyllupeol (**79**)

Tableau 19- Données spectrales RMN du composé LH4 (C₃D₆O, 500 et 125 MHz) comparée à celles de la littérature (CDCl₃, 400 et 100 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_C (He et <i>al.</i> , 2007)
1a ; 1b	1,04 ; 1,70	39,1	38,5
2a ; 2b	1,65 ; 1,98	24,5	23,9
3	4,56 (t; 2,9)	80,9	80,9
4	-	38,7	39,0
5	0,93 (m)	56,2	55,5
6a ; 6b	1,47 ; 1,67 (m)	18,9	18,3
7a ; 7b	1,41 ; 1,48 (m)	34,9	34,3
8	-	41,7	40,9
9	1,41 (m)	51,1	50,4
10	-	37,9	37,2
11a ; 11b	1,26 ; 1,44 (m)	21,6	21,0
12a ; 12b	1,11 ; 1,69 (m)	25,8	25,2
13	1,04 (m)	38,9	38,1
14	-	43,7	42,9
15a ; 15b	1,11 ; 1,69 (m)	28,3	27,5
16a ; 16b	1,12 ; 1,70 (m)	36,2	35,6
17	-	43,6	43,0
18	1,40 (m)	49,1	48,0
19	2,42 (m)	48,9	48,4
20	-	151,3	150,9
21	0,86 ; 1,01 (m)	28,2	29,9
22	1,20 ; 1,40 (m)	40,3	34,3
23	0,88 (s)	28,3	28,1
24	0,93 (s)	16,6	16,7
25	0,86 (s)	16,4	16,2
26	1,08 (s)	17,1	16,0
27	1,01 (s)	14,9	14,6
28	0,82 (s)	18,3	18,0
29	1,70 (s)	19,4	19,3
30a ; 30b	4,56 (d; 1,3) ; 4,70 (d; 2,6)	109,9	109,3
1'	-	127,5	127,2
2'	7,33 (d; 2,0)	111,2	109,4
3'	-	149,9	146,8
4'	-	148,7	147,9
5'	6,86 (d; 8,2)	115,9	116,4
6'	7,13 (dd; 2,0 ; 8,2)	123,4	123,0
7'	7,58 (d; 15,9)	145,1	144,3
8'	6,39 (d; 16,0)	116,4	116,4
9'	-	167,2	167,1
3'-OCH ₃	3,91 (s)	56,3	56,0
OH	8,13 (s)		

II.2.5.2.5. Détermination structurale de LH5

Le composé **LH5** se présente sous forme de Poudre blanche, $[\alpha]_D^{25} + 32,3$ (c 0,0012 ; CHCl_3) et soluble dans le chloroforme. Sa formule moléculaire $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_7$ a été établie au moyen de son spectre de masse à m/z 367,0738 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (valeur calculée = 367,0740) et possédant 14 insaturations. Cette masse est confirmée par la présence du pic de l'ion moléculaire à m/z 366 $[\text{M}]^+$ sur son spectre EI-MS (Fig. 93). Le spectre IR (Fig. 93) révèle la présence des carbonyles (1731 cm^{-1}) et des cycles aromatiques (1602 and 1516 cm^{-1}).

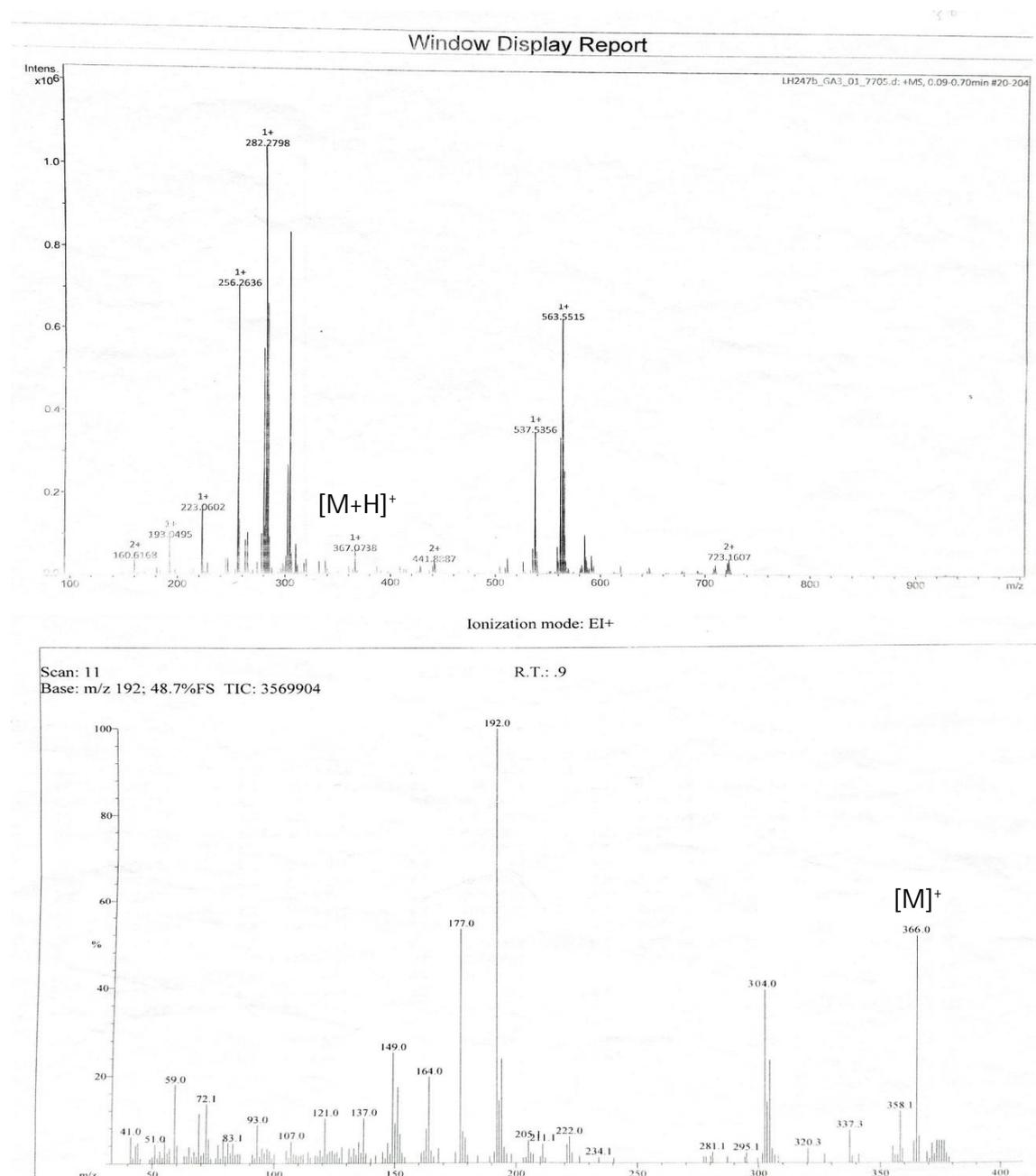


Figure 93- Spectres de masse (+)-HRESI-MS et EI-MS du composé LH5

Le spectre RMN ^1H de **LH5** (Fig. 94) présente uniquement cinq signaux à δ_{H} 6,26 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-3/H-3') ; 6,98 (2H, s, H-5/H-5') ; 6,90 (2H, s, H-8/H-8') ; 7,57 (2H, d, $J = 9,6$ Hz, H-4/H-4') et 3,94 (6H, s, 7-OMe et 7'-OMe). Ceci suggère la présence de deux fragments scopolétine (Shapizadeh et Melnikoff, 1969) identiques 6,6-disubstitués.

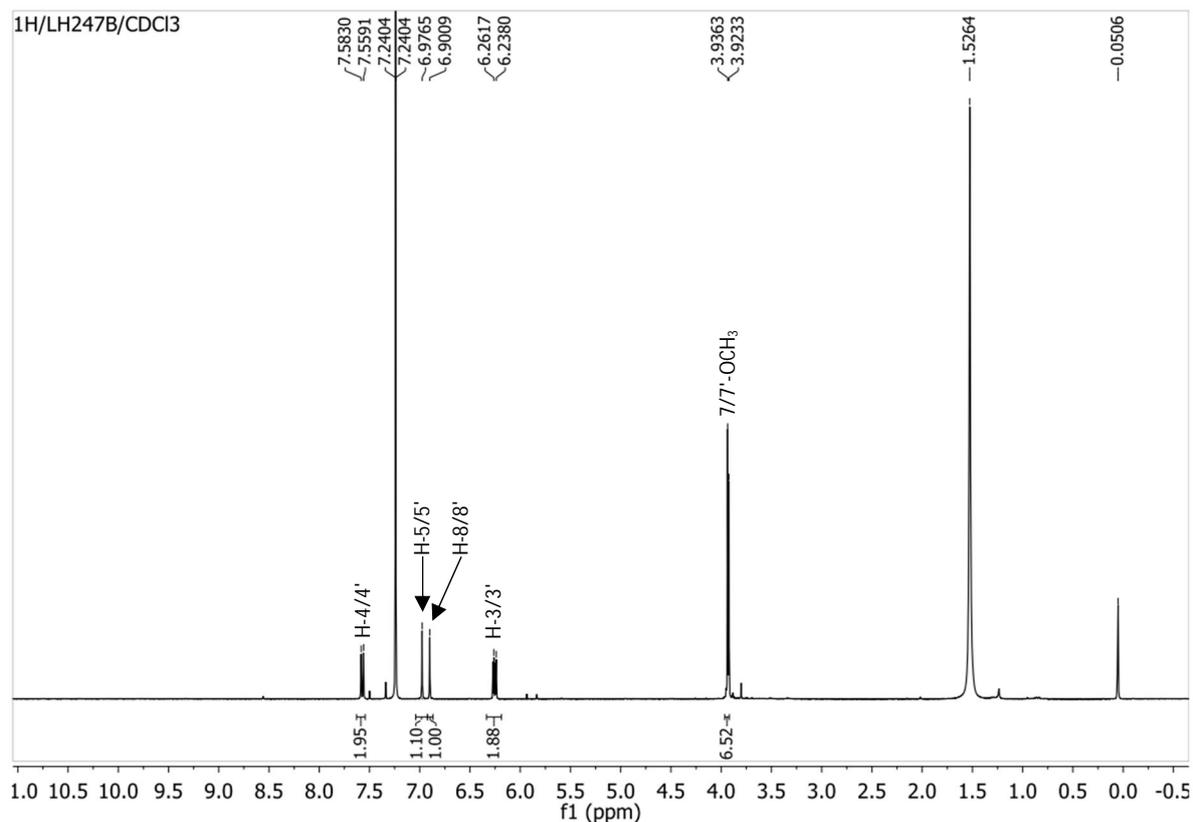


Figure 94- Spectre RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) du composé LH5

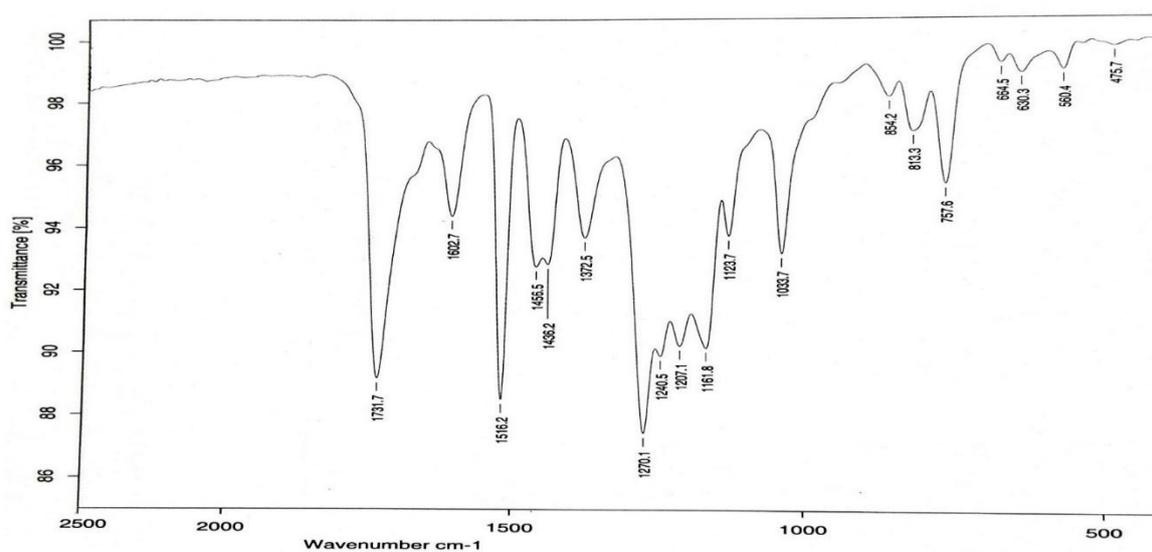


Figure 95- Spectre IR sur disque de KBr du composé LH5

Le spectre de RMN ^{13}C (Fig. 96) quant à lui révèle dix signaux de carbones, qui est la moitié du nombre d'atomes de carbones présents dans la formule moléculaire $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_7$, suggérant que **LH5** est un dimère symétrique. L'attribution des signaux des différents protons aux carbones a été faite grâce à l'analyse du spectre HSQC (Tableau 20) soutenue par le spectre COSY (Fig. 97).

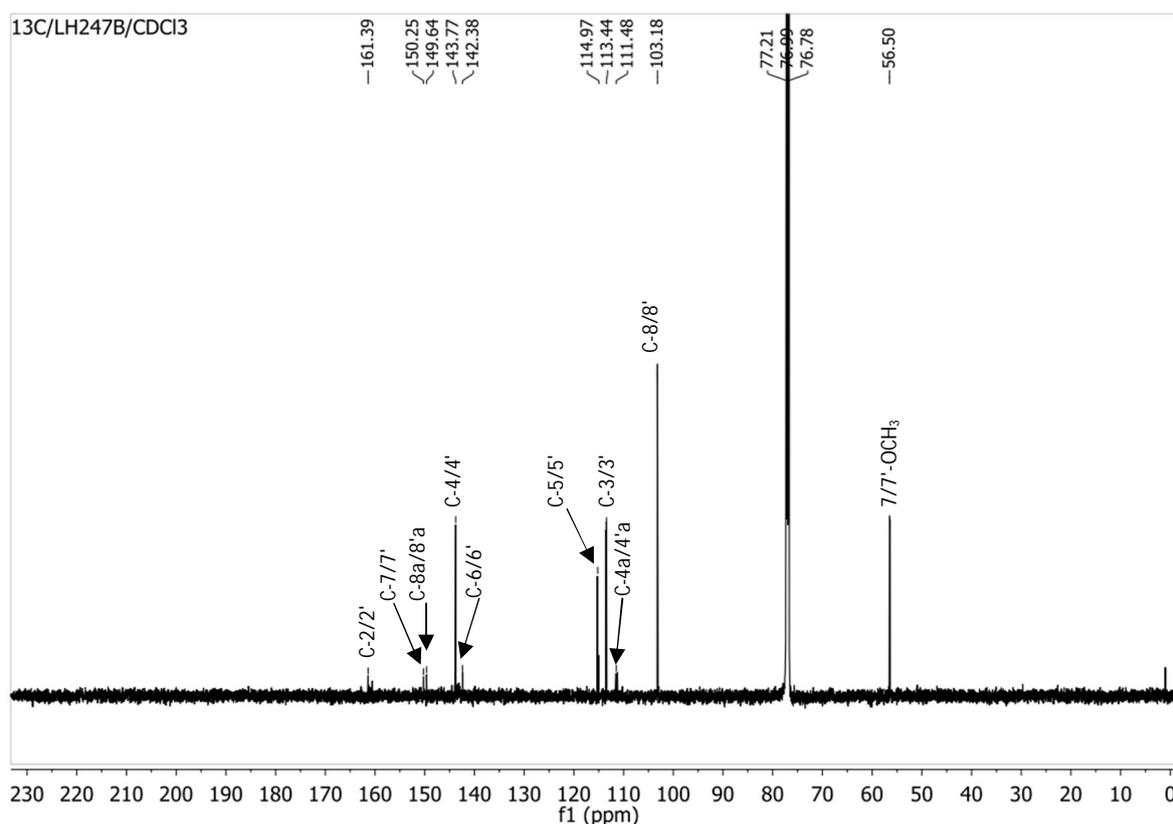


Figure 96- Spectre RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) du composé **LH5**

Le spectre HMBC (Fig. 98) permet d'observer les corrélations entre le proton à δ_{H} 6,98 (H-5) et le carbone aromatique oxygéné à δ_{C} 142,4 (C-6). D'autres corrélations pertinentes sont observées entre H-4 et C-8a et C-2, entre H-3 et C-2 et C-4a, entre H-5 et C-6, C-5, C-6', et entre H-8 et C-2, C-8a et C-6. Les déplacements chimiques de C-6 (δ_{C} 142,4) et C-6' (δ_{C} 142,4) ensemble avec les données du spectre HRESI-MS indique que les deux fragments coumarines sont reliés au travers d'un oxygène en C-6 et C-6'. Ces données sont soutenues par les fragmentations EI-MS (Schéma 20) à m/z 304, 192 et 177, révélant ainsi les pertes de deux groupements méthoxy et d'une unité de scopolétine.

D'importantes corrélations NOESY (Fig. 99) observées entre H-4 et H-5 et aussi bien entre H-3 et H-4 ont permis d'établir la substitution et la disposition spatiale des protons dans la structure de **LH5**.

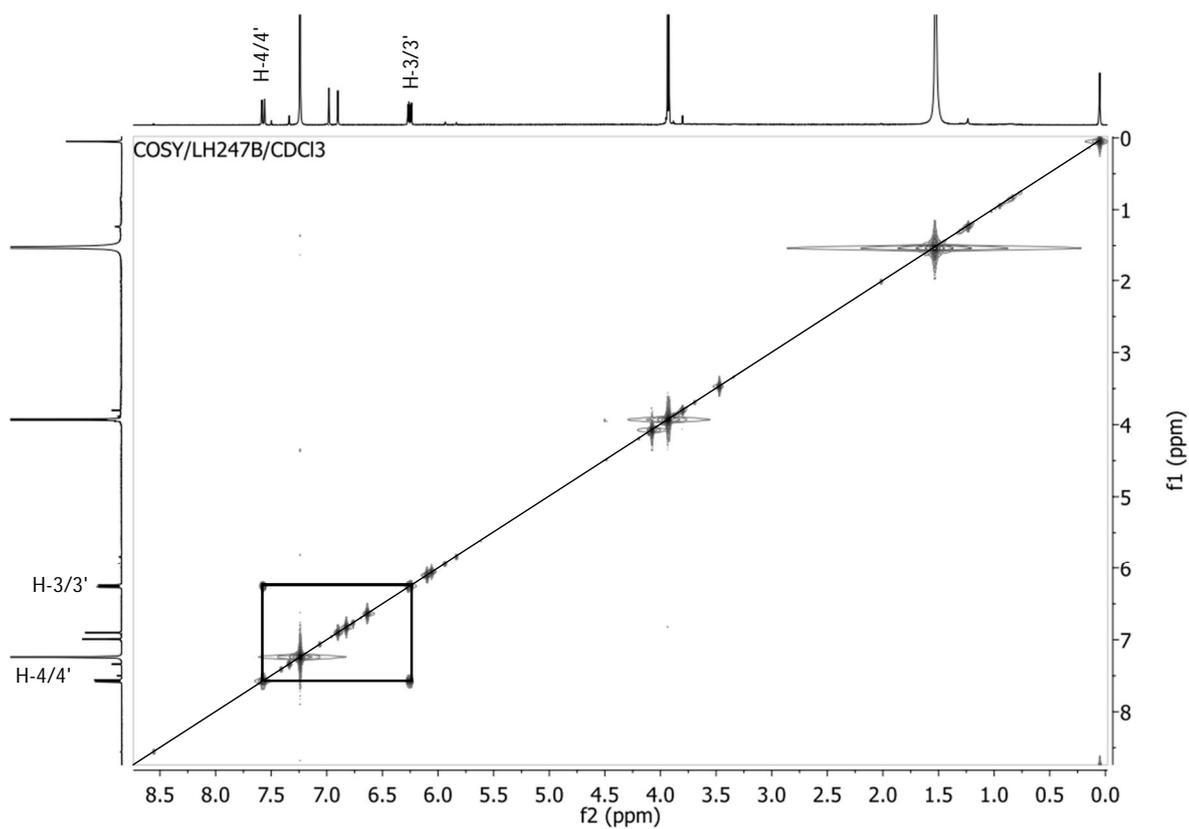


Figure 97- Spectre COSY (600 MHz, CDCl₃) du composé LH5

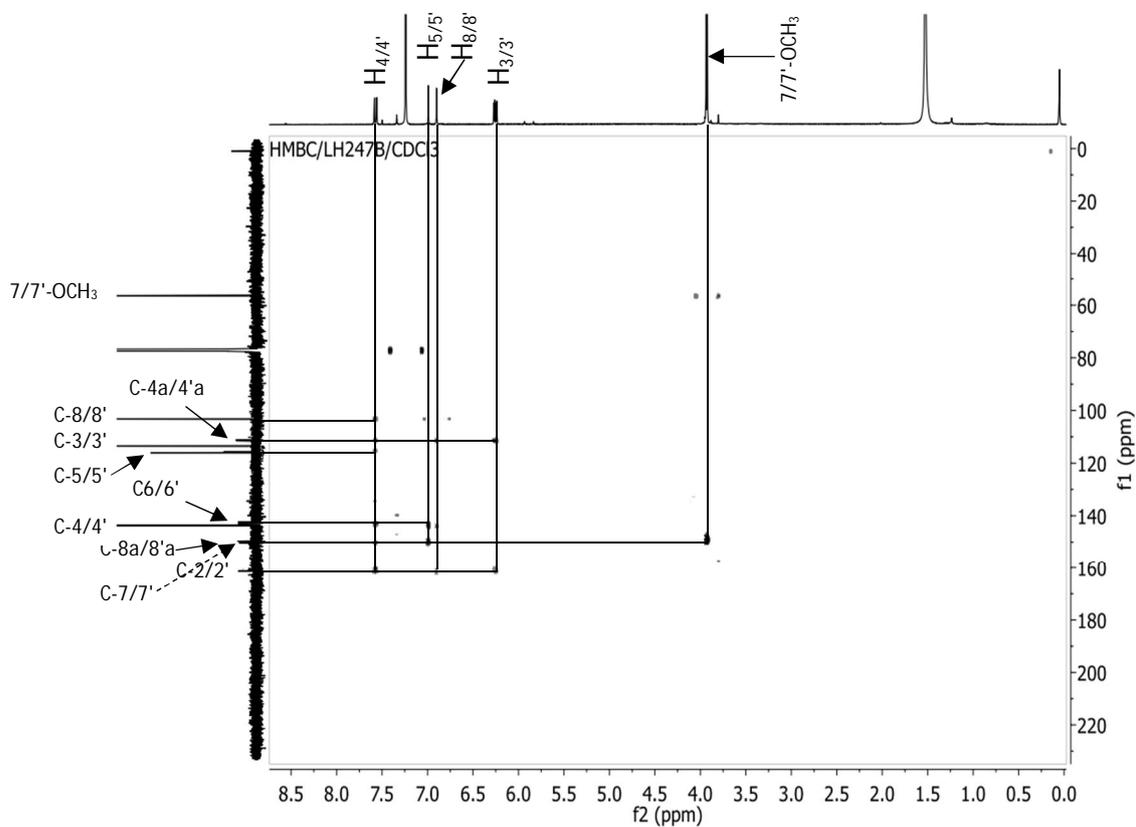
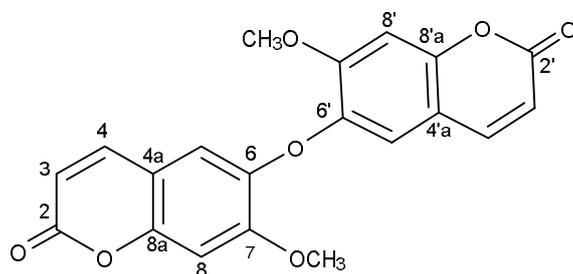


Figure 98. Spectre HMBC (150 MHz, CDCl₃) du composé LH5

Sur la base des données spectrales ci-dessus, **LH5** a été établie comme la 7,7'-diméthoxy-6,6'-dicoumarinyl éther (**80**), un nouveau dérivé naturel (Ebede et *al.*, 2021).



LH5

7,7'-diméthoxy-6,6'-dicoumarinyl éther (**80**)

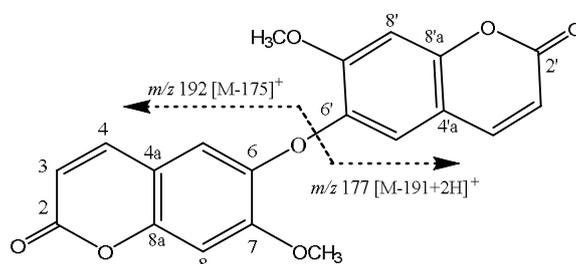


Schéma 20- Fragmentation EI-MS du composé LH5

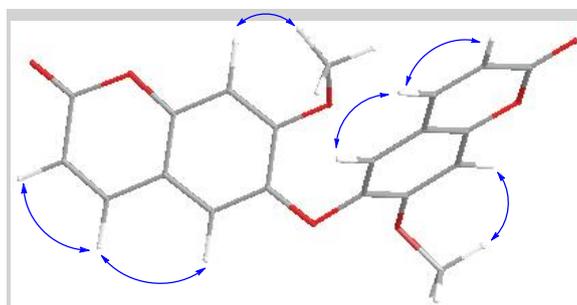


Schéma 21- Corrélations NOESY du composé LH5

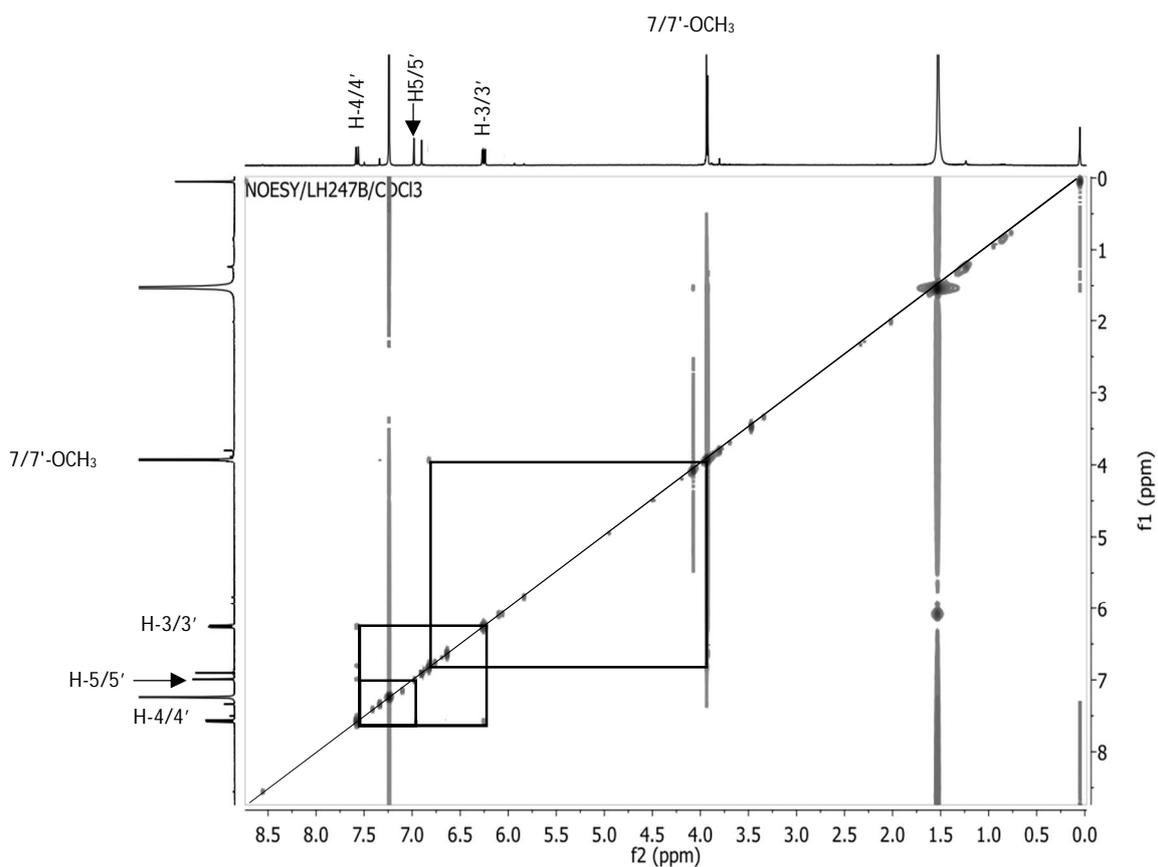


Figure 99- Spectre NOESY (600 MHz, CDCl₃) du composé LH5

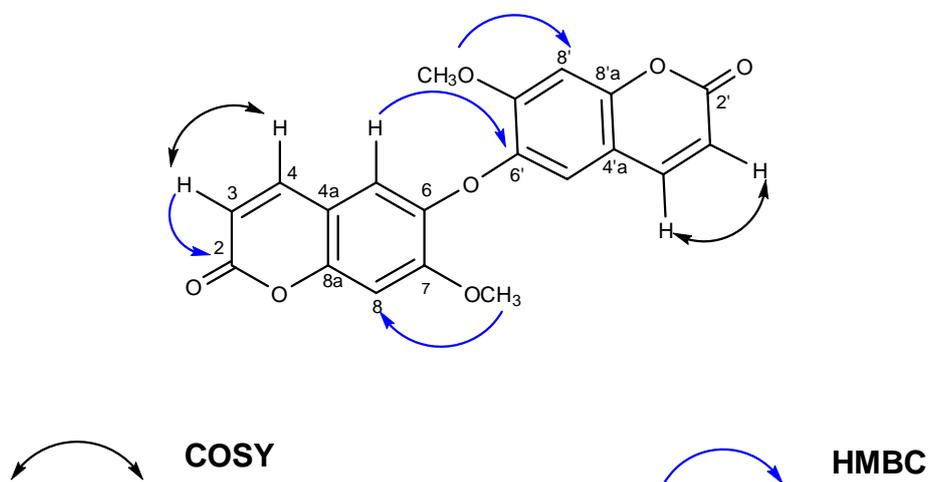


Schéma 22- Corrélations HMBC et COSY du composé LH5

Tableau 20- Données spectrales RMN du composé LH5 (CDCl₃, 600 et 150 MHz)

N°	¹ H (m, J en Hz)	COSY	HSQC/DEPT	HMBC
2			161,4	
3	6,26 (d; 9,6)	H-4	113,6	C-4; C-4a; C-2
4	7,57 (d; 9,6)	H-3	143,8	C-3; C-4a; C-2; C-8a
4a			111,5	
5	6,98 (s)		114,9	C-6; C-7
6			142,4	
7			149,8	
8	6,90 (s)		103,2	C-2; C-6; C-8a
8a			149,6	
7-OMe	3,94 (s)		56,5	C-7
2'			161,4	
3'	6,26 (d; 9,6)	H-4	113,6	C-4'; C-4'a; C-2'
4'	7,57 (d; 9,6)	H-3	143,8	C-3'; C-4'a; C-2'; C-8'
4'a			111,5	
5'	6,98 (s)		114,9	C-6'; C-7'
6'			142,4	
7'			149,8	
8'	6,90 (s)		103,2	C-2'; C-6'; C-8'a
8'a			149,6	
7'-OMe	3,94 (s)		56,5	C-7'

II.2.5.2.6. Identification de LH6

Le composé **LH6** possède des données physico-chimiques et spectrales qui se rapprochent de celles du composé **LH5**. Il se présente sous forme de solide blanc, soluble dans l'acétone. Sa formule brute $C_{10}H_8O_4$ ayant 7 insaturations est déduite de l'analyse de son spectre de masse HRESI-MS qui présente l'ion pseudo-moléculaire à m/z 193,0504 $[M+H]^+$ (masse calculée 193,0423).

La comparaison des spectres 1D (Fig. 100), 2D et de masse du composé **LH6** avec ceux du composé **LH5** indique que **LH6** possède une seule unité coumarine contrairement à **LH5**.

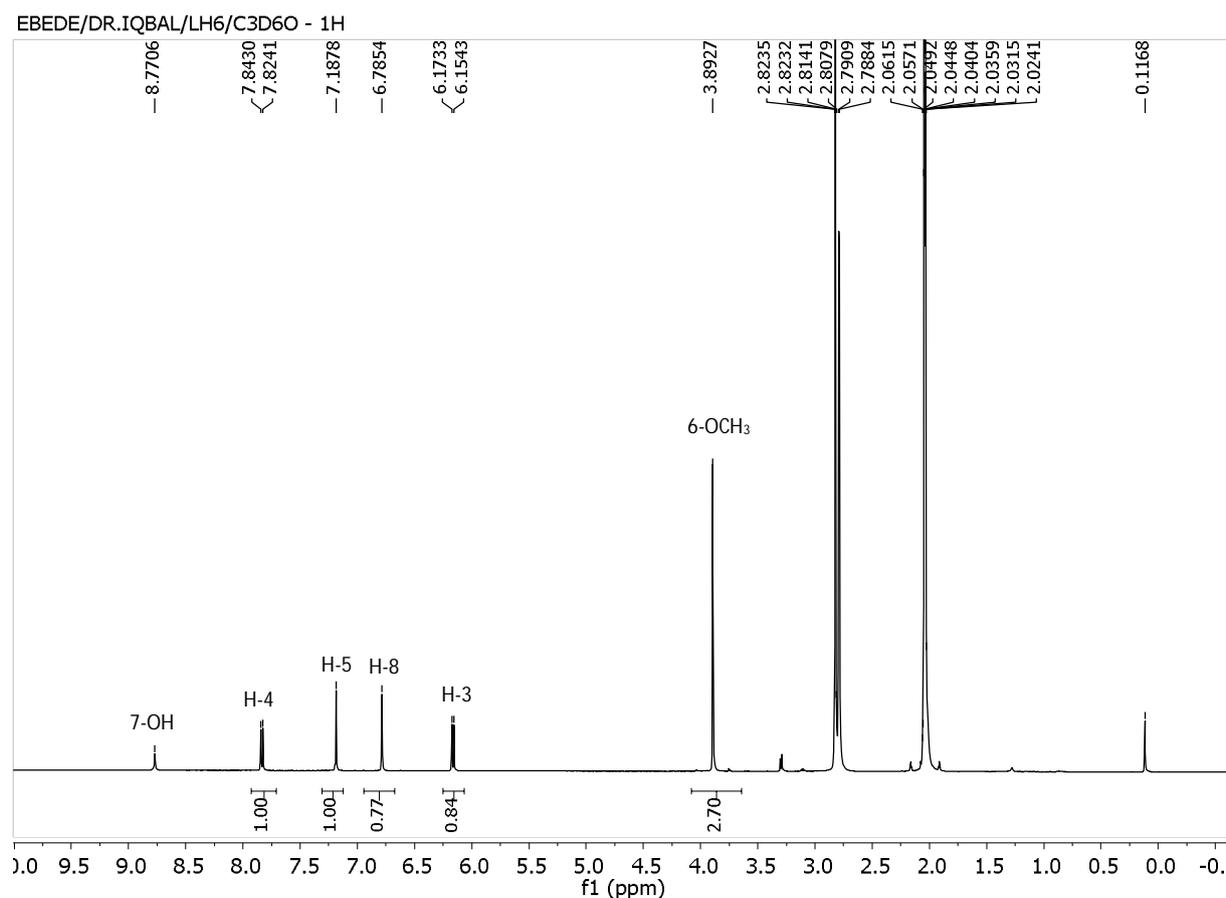
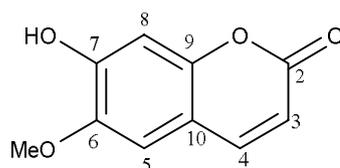


Figure 100- Spectre RMN 1H (500 MHz, C_3D_6O) du composé LH6

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des 1H et ^{13}C (Tableau 21) du composé **LH6** avec celles de la littérature nous a permis de l'identifier à la scopolétine (**81**), précédemment isolé de *Macaranga gigantifolia* Merr par Darmawan et al. (2012).



LH6

Scopoléline (81)

Tableau 21- Données spectrales RMN du composé LH6 (C₃D₆O, 500 et 125 MHz) comparée à celle de la littérature (Acétone-d₆, 500 et 125 MHz)

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C}	(Darmawan et al., 2012)	
			δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C}
2	-	161,4	-	160,8
3	6,16 (d; 9,5)	113,5	6,25 (d; 9,7)	113,3
4	7,83 (d; 9,5)	143,3	7,84 (d; 9,7)	144,7
5	7,19 (s)	107,5	7,19 (s)	109,9
6	-	143,9	-	146,0
7	-	149,7	-	151,9
8	6,79 (s)	103,2	6,79 (s)	103,7
9	-	150,3	-	151,2
10	-	111,5	-	112,1
6-OCH ₃	3,89 (s)	56,4	3,90 (s)	56,7
OH	8,77 (s)	-	-	-

II.2.5.2.7. Identification de LH7

Le composé **LH7** se présente sous forme de cristaux jaune soluble dans le MeOH. Il réagit positivement au test de Shinoda, caractéristique des flavonoïdes. Son spectre de masse ESI-MS montre le pic de l'adduit sodique $[M+Na]^+$ à m/z 471,3 suggérant la formule moléculaire C₂₁H₂₀O₁₁. Le spectre ¹³C a confirmé la présence de 21 signaux de carbones.

Le spectre RMN ¹H (Fig. 101) indique un flavonoïde avec un système ABX à δ_{H} 6,90 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-5') ; 7,33 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-2') et 7,30 (1H, dd, $J = 8,3 ; 2,2$ Hz, H-6') dans la structure de **LH7**. L'existence de H-6 et H-8 a été confirmée par deux signaux singulets larges à δ_{H} 6,20 (1H, brd, $J = 2,0$ Hz, H-6) et 6,36 (1H, brd, $J = 2,0$ Hz, H-8). Ce spectre indique aussi la présence d'un squelette du rhamnoside sur la base des pics distinctifs à δ_{H} 5,34 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H-1") et 0,93 (d, $J = 6,1$ Hz, H-6").

Par conséquent, la structure du composé **LH7** a été identifiée comme étant la quercitrine (**82**) isolée des feuilles d'*Ixora coccinea* (Ma et al., 2005).

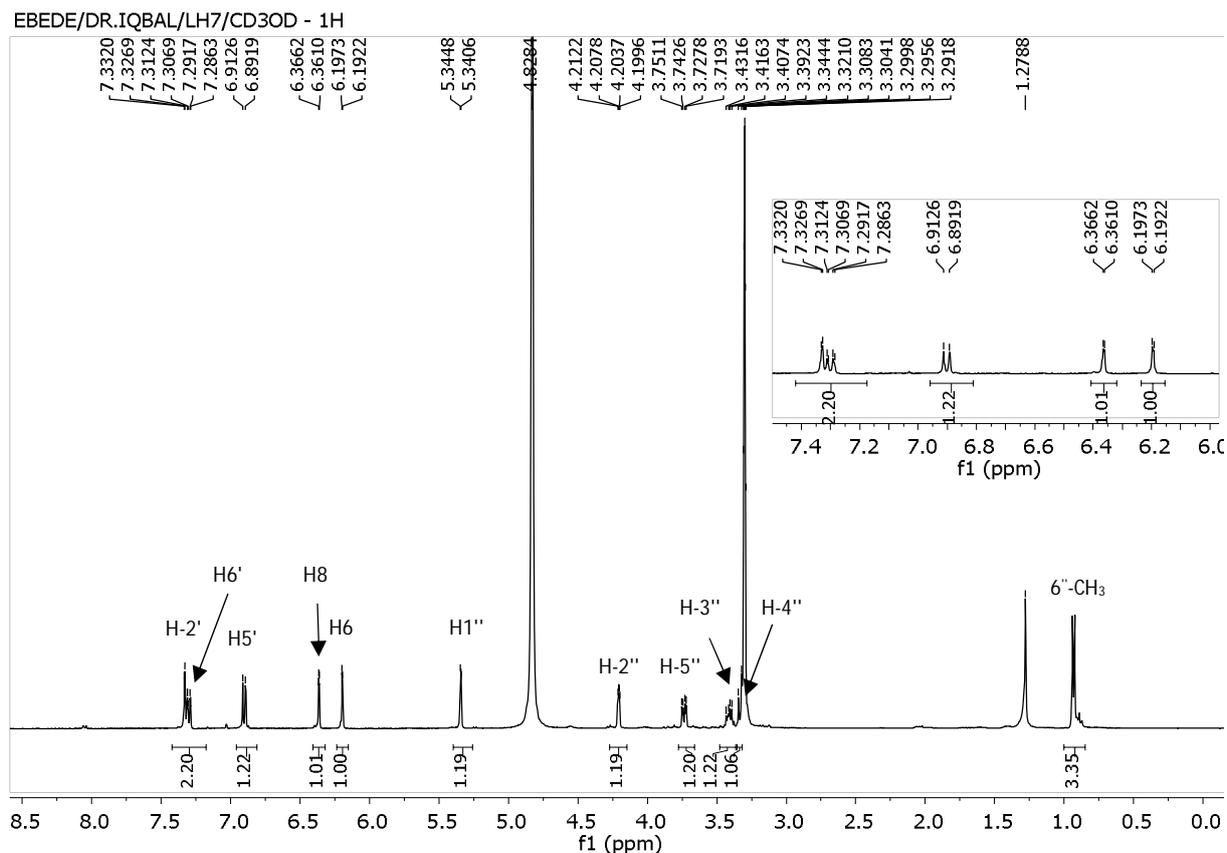
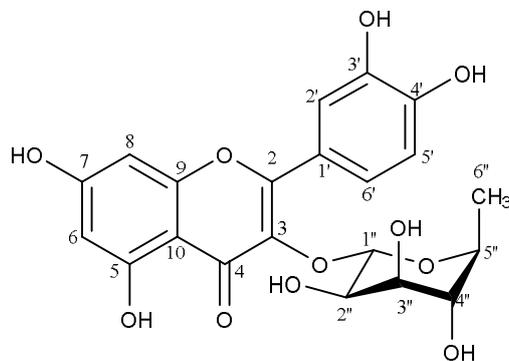


Figure 101- Spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) du composé LH7



LH7

Quercitrine (**82**)

Tableau 22- Données spectrales RMN du composé LH7 (CD₃OD, 400 et 100 MHz) comparée à celle de la littérature (DMSO-d₆, 400 et 100 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_H (m, J en Hz)	δ_C
			(Ma et al., 2005)	
2	-	157,2	-	156,9
3	-	134,8	-	134,6
4	-	178,3	-	178,2
5	-	161,8	-	161,8
6	6,20 (d; 2,0)	98,5	6,19 (br.s)	99,3
7	-	164,6	-	165,1
8	6,36 (d; 2,0)	93,3	6,36 (br.s)	94,1
9	-	157,9	-	157,7
10	-	104,5	-	104,4
1'	-	121,4	-	121,6
2'	7,33 (d; 2,2)	115,6	7,29 (d; 1,5)	115,9
3'	-	145,0	-	145,7
4'	-	148,4	-	149,0
5'	6,90 (d; 8,3)	114,9	6,85 (d; 8,4)	116,1
6'	7,30 (dd; 8,3 ; 2,2)	121,5	7,24 (d; 8,4)	121,2
Rhamnose				
1''	5,34 (d; 1,7)	102,2	5,25 (s)	102,3
2''	4,21 (dd; 1,7 ; 3,3)	71,9	4,22 (dd; 1,7 ; 3,3)	70,8
3''	3,41 (dd; 9,7 ; 6,1)	70,7	3,40 (dd; 9,7 ; 6,1)	71,0
4''	3,32 (m)	70,5	3,14 (m)	71,7
5''	3,74 (dd; 9,3 ; 3,4)	70,6	3,73 (dd; 9,3 ; 3,4)	70,5
6''	0,93 (d; 6,1)	16,3	0,81 (d; 6,0)	18,0

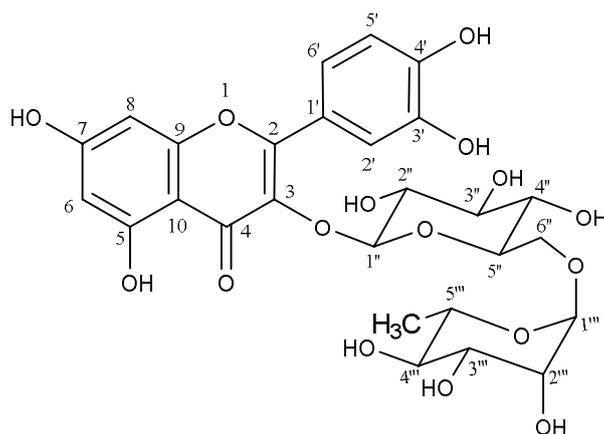
II.2.5.2.8. Identification de LH8

Le composé **LH8** se présente sous forme de poudre jaune soluble dans le MeOH. Il réagit positivement au test de Shinoda, laissant envisager une structure de type flavonoïde confirmée par les deux maxima à 258 et 352 nm du spectre d'absorption UV, caractéristiques des bandes I et II d'un flavonol. Son spectre de masse ESI-MS montre le pic de l'ion *quasi*-moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 609, concordant avec la formule moléculaire $C_{27}H_{30}O_{16}$.

Les signaux présents sur le spectre de RMN 1H du composé **LH8** (Fig. 102) dans la région de protons aromatiques renforcent l'hypothèse de la présence d'une génine de type quercétine. En outre, nous observons les signaux de deux protons anomériques à δ_H 5,06 (d, $J = 7,5$ Hz) et 4,51 (d, $J = 1,3$ Hz) confirmant la présence de deux sucres (Ternai et Markham, 1976).

L'analyse du spectre RMN ^{13}C montre les signaux caractéristiques de la génine quercétine (Fig. 103). Les déplacements RMN ^{13}C dans la région des sucres sont caractéristiques, d'une part, d'un glucopyranose dont on note la configuration β grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique (H-1'', $J = 7,5$ Hz) et, d'autre part, d'un rhamnopyranose en configuration α (constante de couplage du proton anomérique H-1''', $J = 1,3$ Hz) (Markham et Ternai, 1976 ; Senatore et al., 2000).

Sur la base des spectres de RMN 1D et 2D et en comparaison avec les données de la littérature, le composé **LH8** a donc été identifié comme étant la rutine (**20**) isolée des feuilles de *Agrimonia pilosa* (Anh et Van Linh, 2017).



LH8

Rutine (**20**)

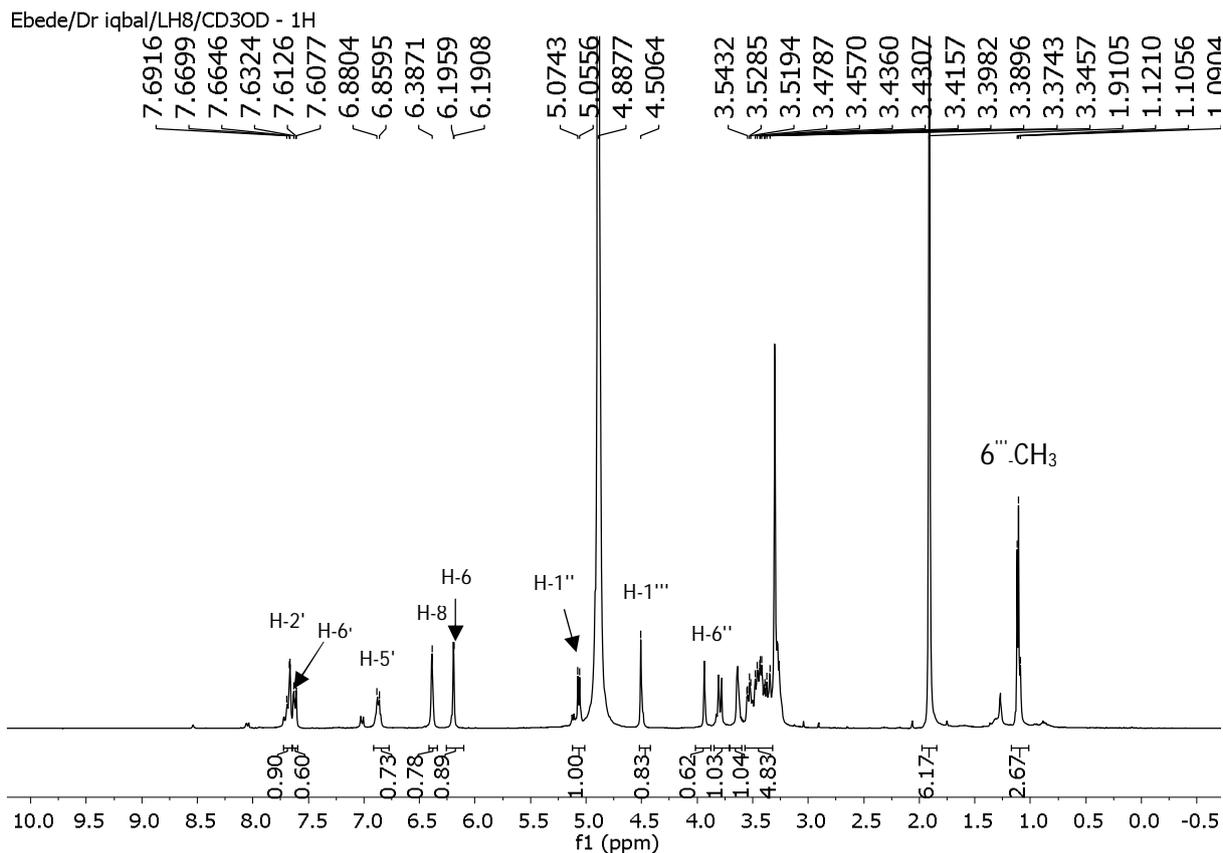


Figure 102- Spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) du composé LH8

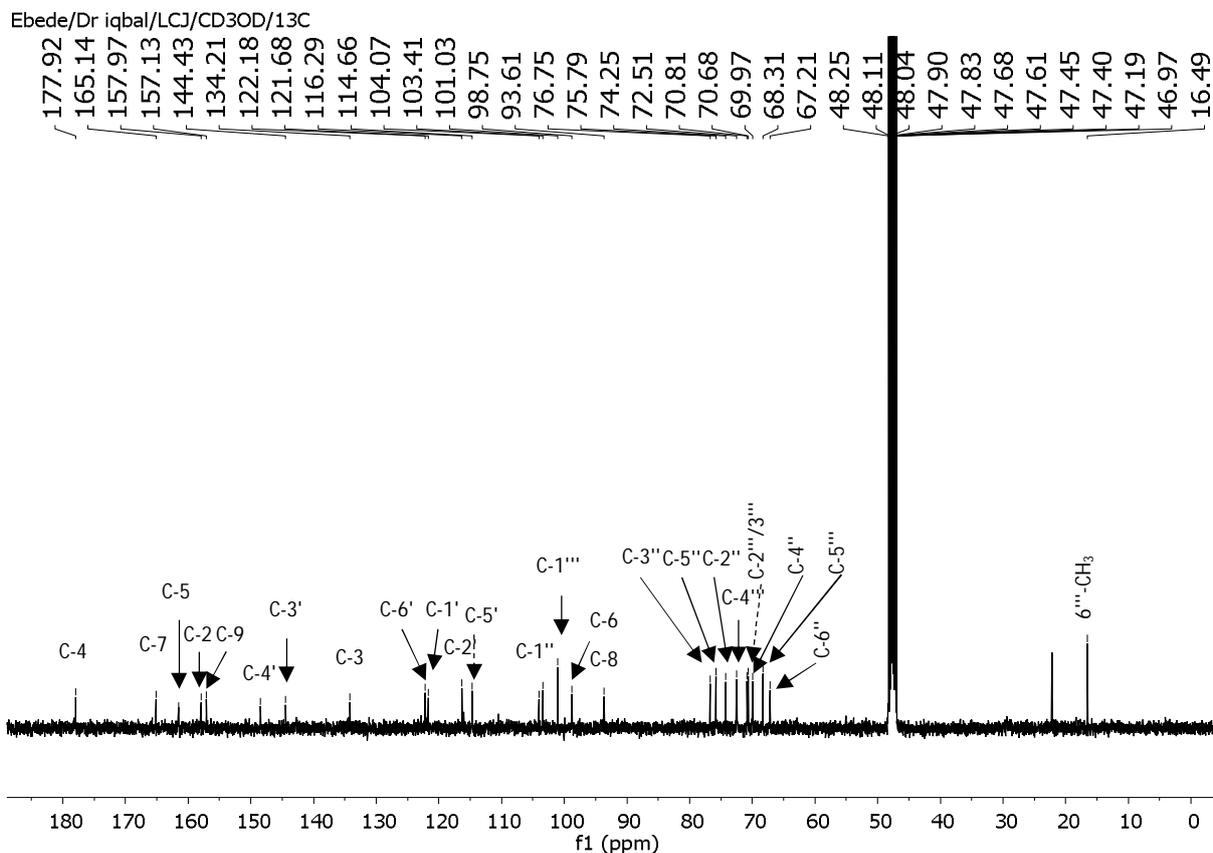


Figure 103- Spectre RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) du composé LH8

Tableau 23- Données spectrales RMN du composé LH8 (CD₃OD, 400 et 100 MHz) comparée à celle de la littérature (CD₃OD, 500 et 125 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	(Anh et Van Linh, 2017)	
			δ_H (m, J en Hz)	δ_C
2	-	157,9	-	158,5
3	-	134,2	-	135,6
4	-	177,9	-	179,4
5	-	161,5	-	163,0
6	6,19 (d; 2,0)	98,7	6,23 (brs)	99,0
7	-	165,1	-	166,0
8	6,39 (brs)	93,6	6,42 (brs)	94,9
9	-	157,1	-	159,4
10	-	104,1	-	105,6
1'	-	121,7	-	123,1
2'	7,67 (d; 2,1)	116,3	7,69 (brs)	117,7
3'	-	144,4	-	145,8
4'	-	148,5	-	149,8
5'	6,87 (d; 8,4)	114,7	6,89 (d; 8,5)	116,1
6'	7,63 (d; 8,3 ; 2,1)	122,2	7,65 (brd; 8,5)	123,6
Glucose				
1''	5,06 (d; 7,5)	103,4	5,12 (d; 7,5)	104,7
2''	3,47 (m)	74,3	3,50 (dd; 7,5 ; 9,0)	75,7
3''	3,42 (m)	76,8	3,43 (dd; 9,0 ; 9,0)	78,2
4''	3,26 (m)	69,9	3,28 (m)	71,4
5''	3,32 (m)	75,8	3,33 (m)	77,2
6''	3,79 (d; 10,4)	67,2	3,82 (brd; 11,0)	68,6
Rhamnose				
1'''	4,50 (d; 5,5)	101,0	4,54 (brs)	102,4
2'''	3,63 (m)	70,7	3,65 (brs)	72,3
3'''	3,53 (m)	70,8	3,56 (dd; 3,0 ; 9,0)	72,1
4'''	3,28 (m)	72,5	3,30 (dd; 9,0 ; 9,0)	73,9
5'''	3,43 (m)	68,3	3,47 (m)	69,7
6'''	1,11 (d; 6,1)	16,5	1,14 (d; 6,0)	17,9

II.2.5.2.9. Identification de LH9

Le composé **LH9** possède des données physico-chimiques et spectrales qui se rapprochent de celles du composé **LH7**. Il se présente sous forme de cristaux jaunâtre et est soluble dans le MeOH. Sa formule brute $C_{15}H_{10}O_7$ ayant 11 insaturations est déduite de l'analyse de son spectre de masse HREI-MS qui présente l'ion *pseudo*-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 303,0430.

La comparaison des spectres RMN 1H (Fig. 104) et ^{13}C du composé **LH9** avec ceux du composé **LH7** montre que les deux composés ont une génine identique de type quercétine. La seule différence entre ces deux composés se trouve au niveau des signaux du sucre de type rhamnoside inexistants dans le cas du composé **LH9** et qui sont remplacés par un groupe hydroxyle en position C-3.

Sur la base des données spectrales de RMN 1D (Tableau 24) et 2D et en comparaison avec celle de la littérature, le composé **LH9** s'identifie comme étant la quercétine (**83**) déjà isolé des feuilles de *Rauwolfia serpentina* (Gupta et al., 2015).

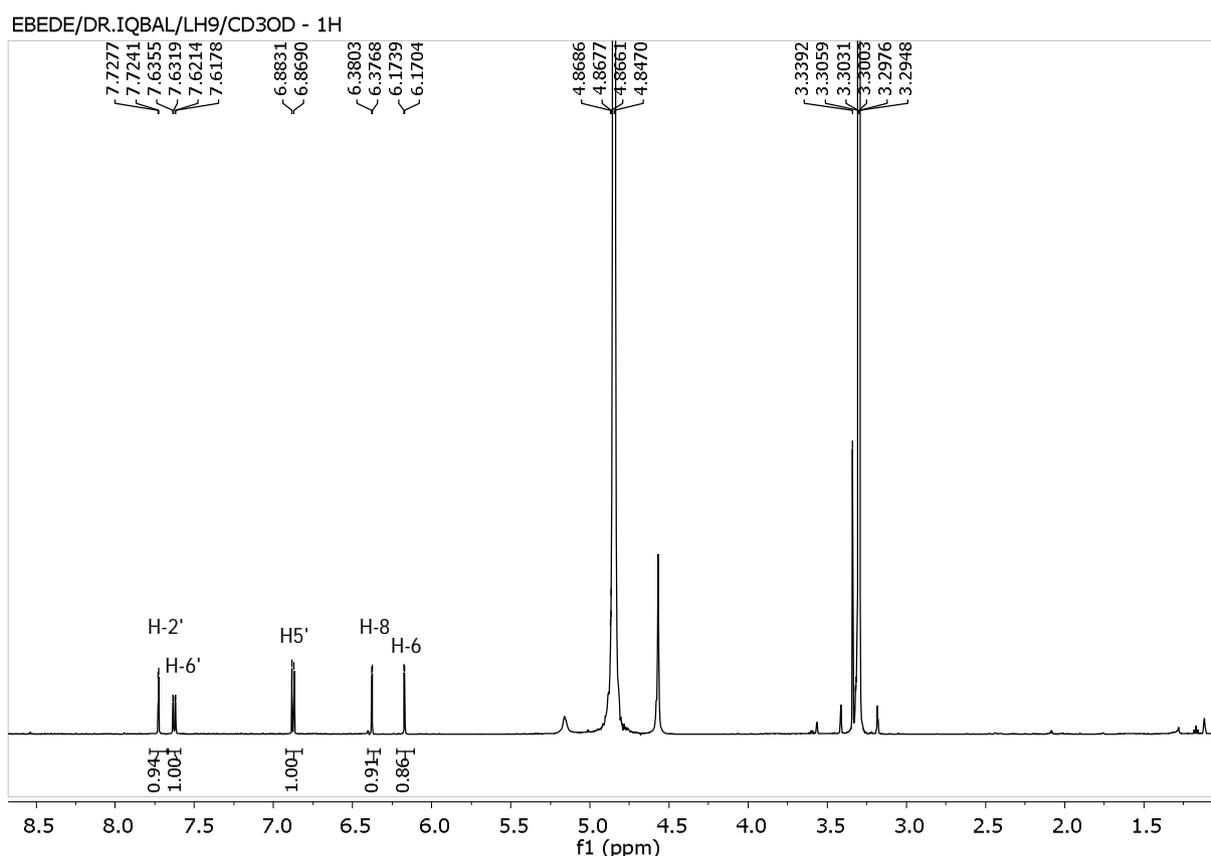
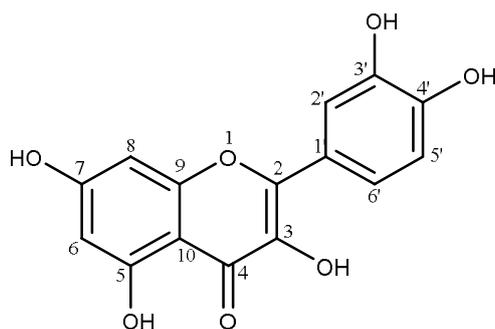


Figure 104- Spectre RMN 1H (600 MHz, CD_3OD) du composé LH9



LH9

Quercétine (83)

Tableau 24- Données spectrales RMN du composé LH9 (CD₃OD, 600 et 150 MHz) comparées à celle de la littérature (CD₃OD, 400 et 100 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_H (m, J en Hz)		δ_C
			(Gupta et al., 2015)		
2	-	147,9	-	148,1	
3	-	137,2	-	137,2	
4	-	177,3	-	177,5	
5	-	162,5	-	162,5	
6	6,17 (d; 2,1)	99,3	6,19 (d; 2,0)	99,4	
7	-	165,9	-	165,8	
8	6,38 (d; 2,1)	93,6	6,40 (d; 2,0)	94,6	
9	-	158,3	-	158,1	
10	-	104,4	-	104,6	
1'	-	124,2	-	124,2	
2'	7,73 (d; 2,2)	115,9	7,75 (d; 2,1)	116,1	
3'	-	146,2	-	146,2	
4'	-	148,8	-	150,4	
5'	6,88 (d; 8,5)	116,2	6,88 (d; 8,2)	116,1	
6'	7,63 (d; 8,5 ; 2,2)	121,7	7,62 (d; 8,3 ; 2,1)	121,9	

II.2.5.2.10. Identification de LH10

Le composé **LH10** se présente sous forme de poudre jaune amorphe, soluble dans le MeOH. Il réagit positivement au test de Shinoda, caractéristique des flavonoïdes. Son spectre de masse en mode positif HRESI-MS a montré le pic de l'ion *quasi*-moléculaire à m/z : 289,0708 $[M+H]^+$ concordant avec la formule brute C₁₅H₁₂O₆. Son spectre de RMN ¹³C a présenté 15 signaux de carbones en accord avec la formule moléculaire.

Le spectre de RMN ^1H du composé **LH10** (Fig. 105) montre trois signaux à δ_{H} 2,69 (1H, dd, $J = 17,1 ; 3,1$ Hz), 3,06 (1H, dd, $J = 17,1 ; 12,7$ Hz) et 5,27 (1H, dd, $J = 12,8 ; 3,1$ Hz), généralement attribuable à H-3 et H-2 d'un squelette de flavanone. De plus, des signaux pour trois protons à 6,78 (2H, d, $J = 2,0$ Hz) et 6,91 (1H, d, $J = 1,5$ Hz) sont attribuables aux protons aromatiques H-2', H-5' et H-6' du cycle B 3,4-disubstitué de **LH10**. Deux protons aromatiques supplémentaires à δ_{H} 5,87 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) et 5,89 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) ont été observés et pourraient être attribués aux protons aromatiques H-6 et H-8 respectivement du cycle A.

L'analyse de ces ensembles de données avec les spectres COSY, HSQC, HMBC et NOESY, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature (Agrawal, 1989), ont permis d'identifier **LH10** à la 3', 4', 5, 7-tétrahydroxyflavanone (ériodictyol) (**84**), précédemment isolé de *Cordia globosa* (Silva et al., 2010).

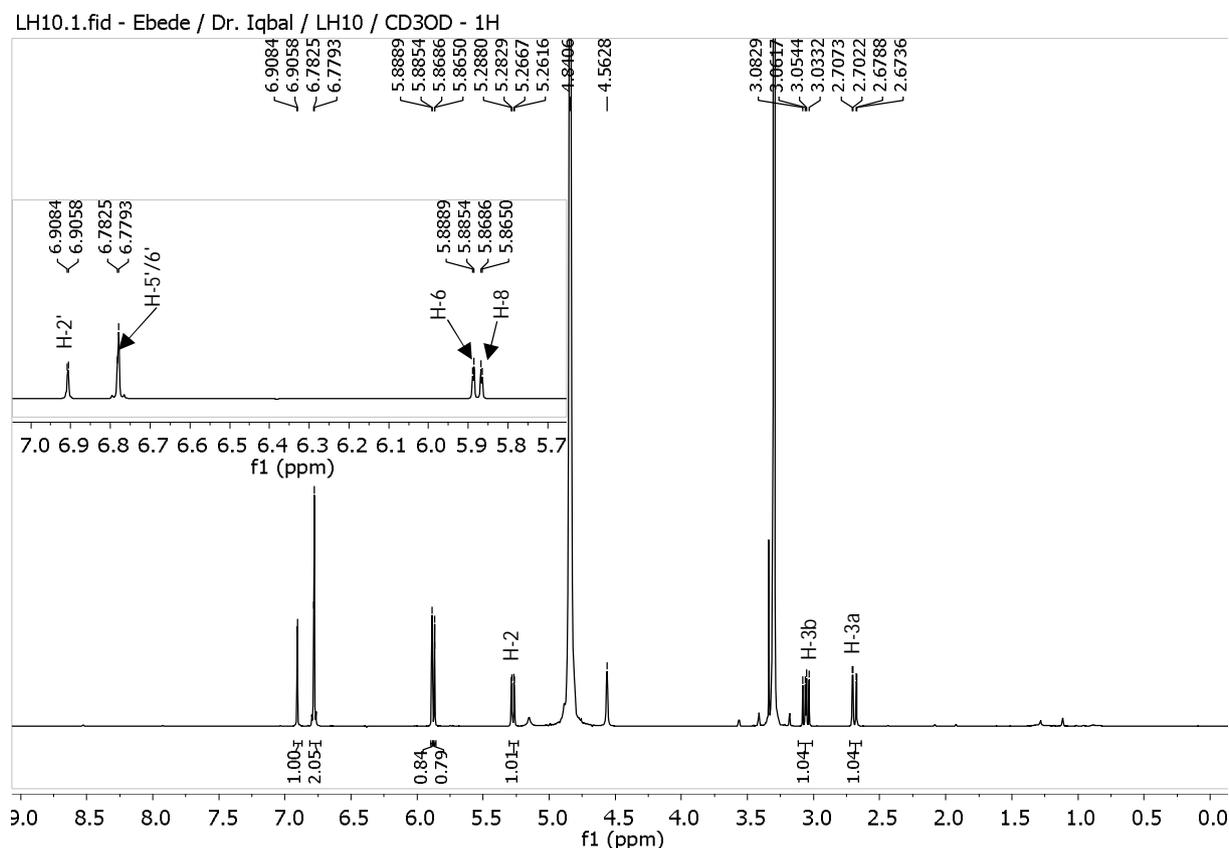
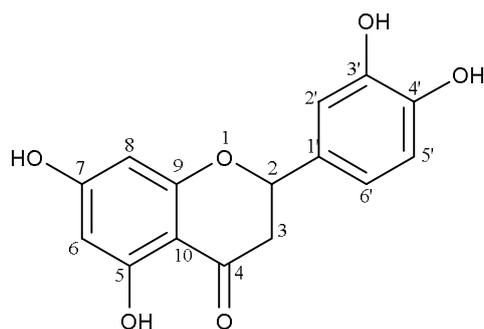


Figure 105- Spectre RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) du composé LH10



LH10

Eriodictyol (**84**)

Tableau 25- Données spectrales RMN du composé LH10 (CD₃OD, 600 et 150 MHz) comparées à celles de la littérature (CD₃OD, 200 et 50 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_H (m, J en Hz)		δ_C
			(Silva et al., 2010)		
2	5,27 (dd; 12,8 ; 3,1)	80,5	5,26 (dd; 12,5 ; 3,0)	80,5	
3a	2,69 (dd; 17,1 ; 3,1)	44,1	2,68 (dd; 17,0 ; 3,0)	44,1	
3b	3,06 (dd; 17,1 ; 12,7)	44,1	3,06 (dd; 17,0 ; 12,5)	44,1	
4	-	197,7	-	197,8	
5	-	165,5	-	165,4	
6	5,89 (d; 2,2)	97,1	5,89 (d; 2,2)	97,0	
7	-	168,6	-	168,4	
8	5,87 (d; 2,2)	96,2	5,87 (d; 2,2)	96,2	
9	-	164,8	-	164,9	
10	-	103,3	-	103,3	
1'	-	131,8	-	131,8	
2'	6,91 (d ; 1,5)	114,7	6,91 (brs)	114,7	
3'	-	146,5	-	146,5	
4'	-	146,9	-	146,9	
5'	6,78 (d, 2,0)	116,2	6,78 (brs)	116,2	
6'	6,78 (d ; 2,0)	119,2	6,78 (brs)	119,3	

II.2.5.2.11. Identification de LH11

Le composé **LH11** soluble dans le MeOH, est une poudre jaune amorphe et positif au test de Shinoda, caractéristique des flavonoïdes. Son spectre de masse HRESI-MS a montré le pic de l'ion *quasi*-moléculaire à m/z 269,0455 $[M-H]^-$ correspondant à la formule moléculaire $C_{15}H_{10}O_5$. Les données de RMN 1H (Fig. 106) ont montré sept signaux de protons sur le cycle aromatique dont : un proton d'une flavone non substitué en C-3 à δ_H 6,59 (1H, s, H-3) ; trois signaux de protons à δ_H 6,83 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-5'), 7,21 (1H, dd, $J = 8,3 ; 2,1$ Hz, H-6') et 6,60 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2') indiquant des couplages *ortho* (H-5' et H-6') et *mé*ta (H-2' et H-6') respectivement dans le cycle B de la flavone disubstitué en C-3' et C-4' par deux groupes hydroxyle; et trois autres signaux de protons à δ_H 6,64 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-6), 7,55 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-7) et 7,52 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-8) indiquant la monosubstitution du cycle A de la flavone en C-5 par un hydroxyle.

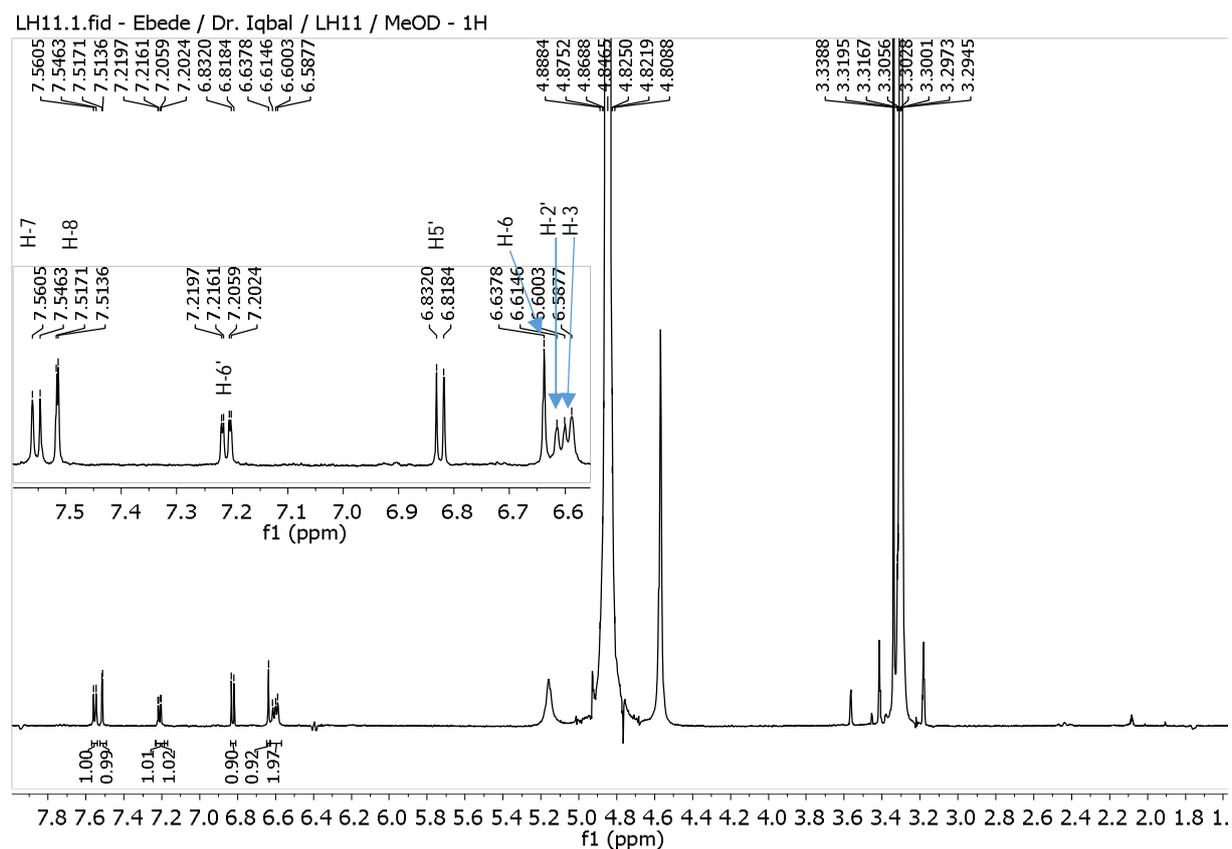
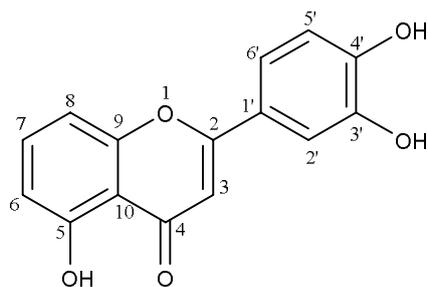


Figure 106- Spectre RMN 1H (600 MHz, CD_3OD) du composé LH11

Ainsi, sur la base des données spectrales de RMN 1D (Tableau 26) et 2D et en comparaison avec celle de la littérature, le composé **LH11** s'identifie à la 3', 4', 5-trihydroxyflavone (**85**) déjà obtenu par Chen et *al* (2020).



LH11

3', 4', 5- trihydroxyflavone (**85**)

Tableau 26- Données spectrales RMN du composé LH11 (CD₃OD, 600 et 150 MHz)

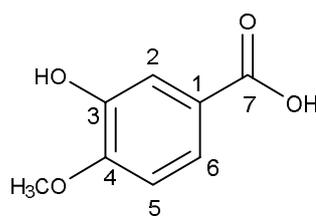
Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C
2	-	160,1
3	6,59 (s)	99,8
4	-	183,3
5	-	158,8
6	6,64 (d; 7,6)	113,7
7	7,55 (d; 8,5)	134,7
8	7,52 (d; 8,5)	106,1
9	-	157,6
1'	-	126,7
2'	6,60 (d; 2,1)	116,7
3'		116,3
4'	-	149,8
5'	6,83 (d; 8,3)	118,7
6'	7.21 (dd; 2,1 & 8,3)	126,1

II.2.5.2.12. Identification de LH12

Le composé **LH12** se présente sous forme de poudre jaune pâle amorphe soluble dans l'acétone. La mesure du spectre de masse ESI haute résolution en mode positif du composé **LH12 a** indiqué la présence d'un ion *pseudo*-moléculaire à m/z 169,0495 $[M+H]^+$ résultant de la formule moléculaire $C_8H_8O_4$.

L'étude du spectre RMN 1H du composé **LH12** montre un profil relativement simple et permet de mettre en évidence la présence d'un singulet à δ_H 3,90 (3H, *s*) correspondant à un groupement méthoxyle, deux doublets à δ_H 6,90 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-5) et 7,55 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2), et un doublet dédoublé à δ_H 7,52 (1H, *dd*, $J = 8,2 ; 2,0$ Hz, H-6).

La comparaison des valeurs des déplacements chimiques des 1H et ^{13}C (Tableau 27) du composé **LH12** avec celles de la littérature nous a permis de l'identifier à l'acide isovanollique (**86**), précédemment isolé de *Lonicera japonica* par Ge et al. (2018).



LH12

Acide isovanollique (**86**)

Tableau 27- Données spectrales RMN du composé LH12 (C_3D_6O , 400 et 100 MHz) comparées à celle de la littérature (DMSO- d_6 , 400 et 100 MHz)

Position	δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_C ppm	(Ge et al., 2018)	
			δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_C ppm
1	-	122,9	-	121,7
2	7,55 (<i>d</i> ; 2,0)	115,5	7,43 (<i>m</i>)	115,1
3	-	151,9	-	151,1
4	-	148,0	-	147,3
5	6,90 (<i>d</i> ; 8,2)	113,4	6,82 (<i>d</i> ; 8,5)	112,8
6	7,52 (<i>dd</i> ; 8,2 ; 2,0).	124,8	7,43(<i>m</i>).	123,5
7	-	167,4	-	167,2
6-OCH ₃	3,90 (<i>s</i>)	56,3	3,79 (<i>s</i>)	55,6

II.2.6. Etude phytochimique des tiges de *H. barteri*

II.2.6.1. Extraction et isolement des composés des tiges de *H. barteri*

Les tiges de *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon ont été découpées, séchées à l'air libre puis broyées. La poudre obtenue (2,6 kg) a été extraite au MeOH à froid sous agitation pendant 48 heures. L'extrait brut (70 g) a été dissout dans l'acétate d'éthyle et une solution aqueuse de HCl (5%) dans la proportion 1/9 (1mL de HCl dans 9 mL d'eau distillée) a été ajoutée progressivement. La solution précédente obtenue a été introduite dans une ampoule à décanter et l'AcOEt a été ajoutée pour séparer la phase organique (mélange de composés organiques) de la phase aqueuse (solution ionique d'alcaloïdes) à travers cinq extractions répétitives. La phase aqueuse a été ensuite introduite dans un grand erlen meyer, puis la solution d'hydrogencarbonate de sodium (33 g de NaHCO₃ dans 100 mL d'eau distillée) a été progressivement et délicatement ajoutée. Le nouveau mélange (phase organique + NaHCO₃) alcalin (PH = 7-8) obtenu a été transféré dans l'ampoule à décanter et deux phases ont été obtenues : la phase alcaloïdique au-dessus et la phase aqueuse en dessous. La phase alcaloïdique a été extraite plusieurs fois à l'AcOEt et concentrée à sec dans un évaporateur rotatif à 40 ° C pour obtenir l'extrait brut alcaloïdique (20 g). Cet extrait a été fractionné en trois (HB-I – HB-III) par chromatographie sur colonne de gel de silice (70-230 mesh; Merck), et élué avec un système de solvant CH₂Cl₂/MeOH à polarité croissante ((30/1; 20/1; 10/1). La fraction HB-I (4,5 g) a été séparée en deux sous-fractions (HB-Ia – HB-Ib) par chromatographie sur colonne sur gel de silice (70-230 mesh; Merck), et éluée au CH₂Cl₂/MeOH (10/1 ; 5/1). Les deux sous-fractions HB-Ia (60 mg) et HB-Ib (80 mg) ont été soumises à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 et éluée au MeOH (100%) pour donner donner 3 composés purs indexés **HB2** (8 mg), **HB1** (7 mg) et **HB5** (4 mg). La fraction HB-II (2,3 g) a subit une purification sur une colonne de gel de silice avec le système CH₂Cl₂/MeOH (10:1) comme solvant d'éluion pour donner un seul composé **HB4** (8 mg). Enfin, la fraction HB-III (300 mg) a été purifiée par chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 et éluée au MeOH (100%) pour donner également un composé **HB3** (7 mg).

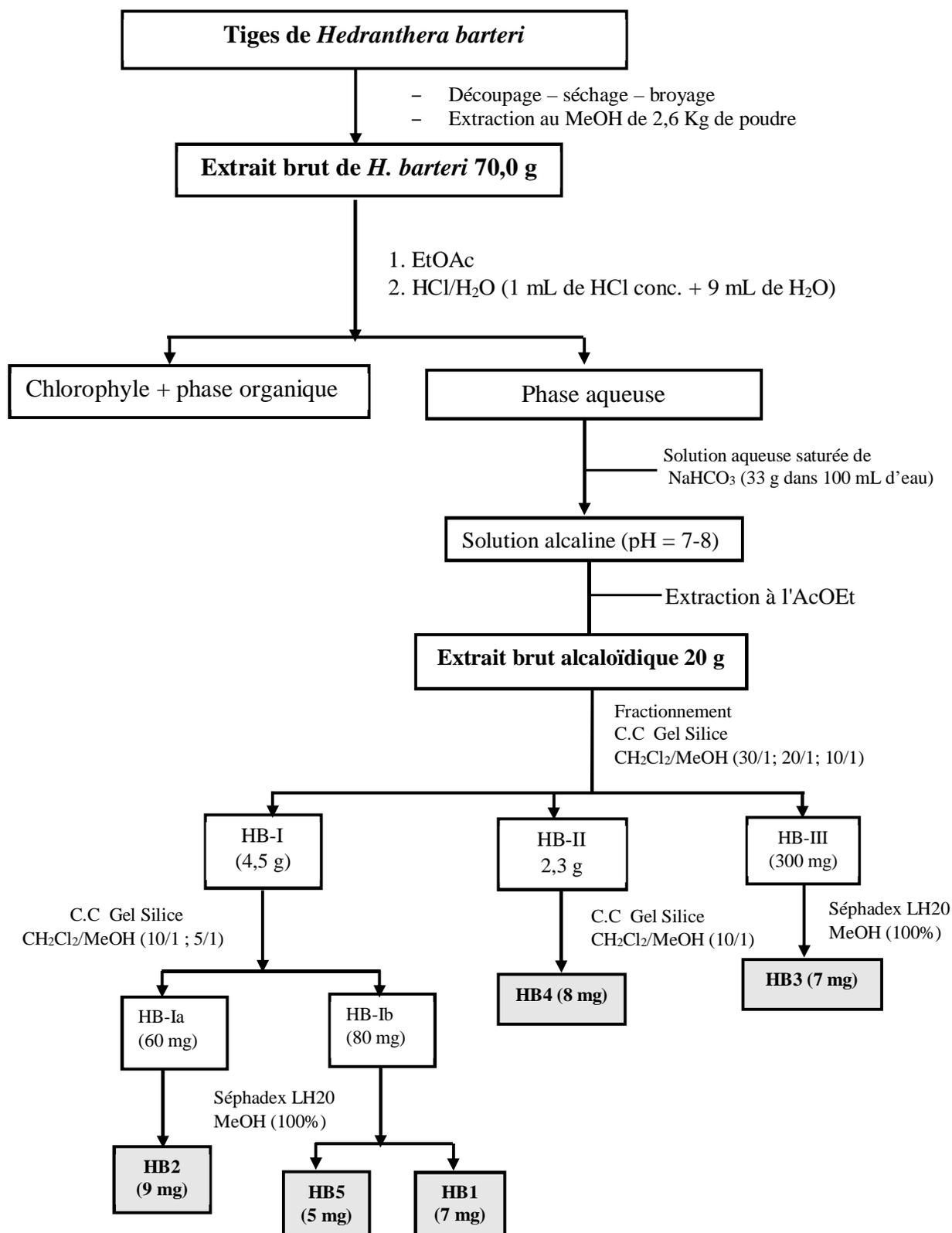


Schéma 23- Protocole d'extraction et d'isolement des composés des tiges de *H. barteri*

II.2.6.2 Caractérisation chimique des composés isolés de *H. barteri*

II.2.6.2.1. Identification de HB1

Le composé **HB1** se présente sous forme poudre jaune, il est soluble dans le chloroforme et répond positif au test de Dragendorff caractéristique des alcaloïdes et particulièrement au test de Ehrlich caractéristique des alcaloïdes indoliques.

Son spectre de masse en EI montre l'ion moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 384$ correspondant à la formule brute $C_{22}H_{28}N_2O_4$ renfermant 10 degrés d'insaturations.

Sur le spectre RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) de **HB1** (Fig. 107), on observe la présence d'un doublet de doublet à δ_H 6,80 (1H, dd, $J = 2,2 ; 8,6$ Hz) correspondant au proton H-11. On observe également 3 doublets à δ_H 7,12 (1H, $J = 8,6$ Hz) ; 6,89 (1H, $J = 2,2$ Hz) et à 1,08 (3H, $J = 6,4$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-12, H-9 et H-18. Les protons H-9, H-11 et H-12 sont caractéristiques du benzène 1,2-disubstitué de l'indole (Keawpradub et *al.*, 1997). On observe le proton de l'oxyméthine à δ_H 4,78 (1H, qd, $J = 1,8 ; 6,6$ Hz). On observe deux singulets à δ_H 3,84 (s, 3H) et 3,72 (s, 3H) attribuables aux deux groupes méthoxyl. Dans la zone des aliphatiques on observe cinq signaux des méthylènes entre 1,80 et 3,58 attribuables aux protons H-3, H-5, H-6, H-15 et H-17. On observe également dans cette zone, trois méthynes à δ_H 1,38; 2,63 et 3,45 attribuables respectivement à H-20, H-14, H-21.

Le spectre RMN ^{13}C (Fig. 108) du composé **HB1** présente 22 signaux sous forme de singulet correspondant à 22 signaux de carbones. Le un signal à δ_C 175,9 correspond au carbonyl des esters ; des signaux à δ_C 136,5 ; 109,6 ; 128,8 ; 100,6 ; 154,1 ; 112,3 ; 111,2 et 130,5 sont attribuables respectivement aux carbones C-2, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12 et C-13 caractéristiques des carbones d'un noyau indole substitué en C-10 (Prakash et *al.*, 2003).

Sur la base des interprétations de ces données et en combinaison avec les spectres COSY, HSQC, HMBC et NOESY, nous avons identifié le composé **HB1** à la voacristine (**4**) précédemment isolé *Tabernaemontana catharinensis* par Peirara et *al.* (2008) et des racines de *Hedranthera barteri* (Naranjo et Schmid, 1972).

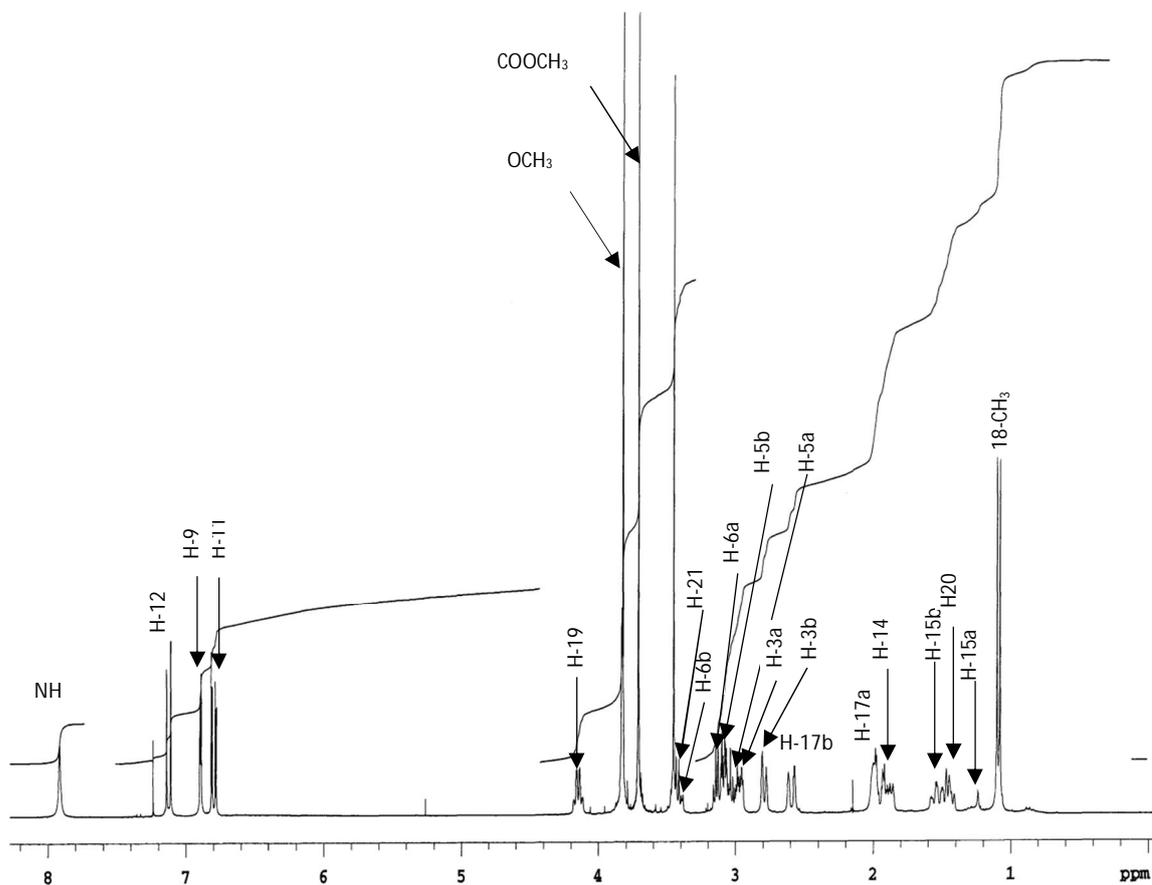


Figure 107- Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) du composé HB1.

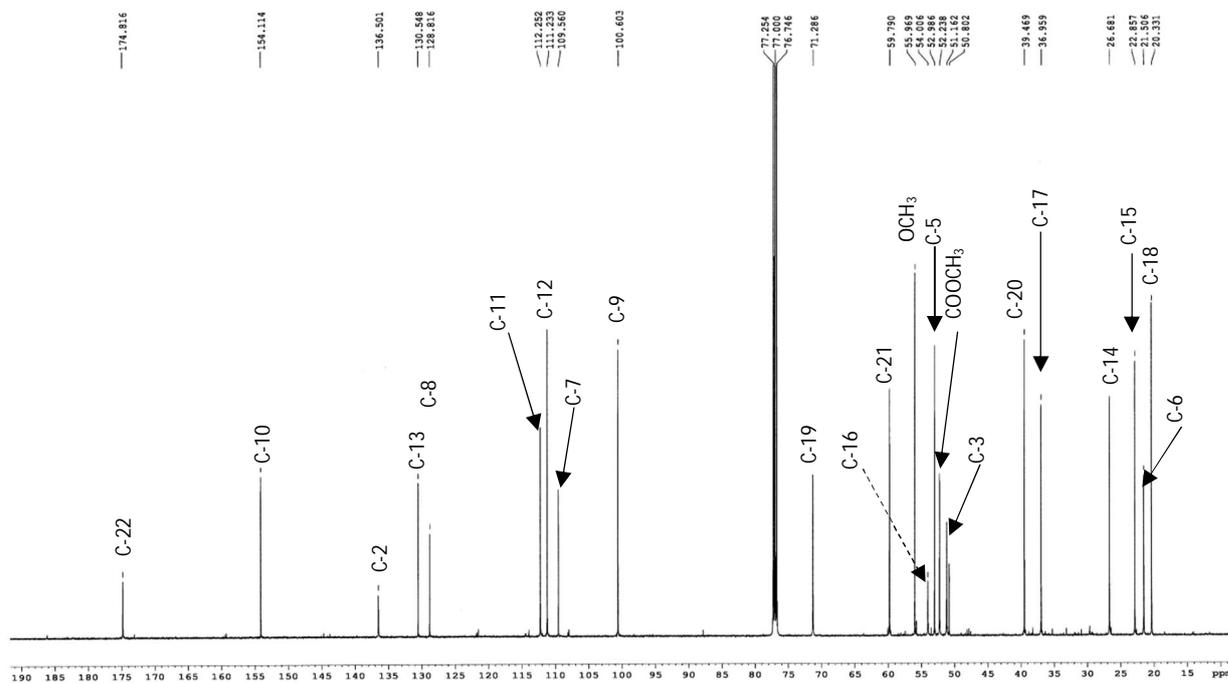
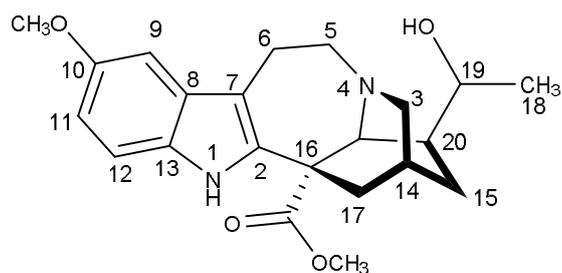


Figure 108- Spectre RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) du composé HB1.



HB1

Voacristine (4)

Tableau 28- Données spectrales RMN du composé HB1 (CDCl₃, 300 et 75 MHz) comparées à celle de littérature (CDCl₃, 300 et 75 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_H (m, J en Hz)		δ_C
			(Peirara et al., 2008)		
2	-	136,5	-	-	136,6
3a	2,75 (dt; 2,1 ; 9,1)	51,2	2,74 (dd; 2,1 ; 9,1)	-	52,3
3b	2,93 (m)	-	2,93 (m)	-	-
5a	3,16 (m)	53,0	3,15 (m)	-	51,4
5b	3,58 (m)	-	3,55 (m)	-	-
6a	3,21 (m)	21,5	3,22 (m)	-	21,4
6b	3,37 (m)	-	3,35 (m)	-	-
7	-	109,6	-	-	109,4
8	-	128,8	-	-	128,7
9	6,89 (d; 2,2)	100,6	6,90 (d; 2,6)	-	100,6
10	-	154,1	-	-	154,0
11	6,80 (dd; 2,2 ; 8,6)	112,3	6,79 (dd; 2,6 ; 8,6)	-	112,1
12	7,12 (d; 8,6)	111,2	7,14 (d; 8,6)	-	111,3
13	-	130,5	-	-	130,7
14	2,63 (d; 8,2)	26,7	2,64 (d; 8,6)	-	26,6
15a	1,21 (m)	22,9	1,21 (m)	-	22,9
15b	1,55 (m)	-	1,55 (m)	-	-
16	-	54,0	-	-	55,9
17a	1,86 (m)	37,0	1,86 (m)	-	36,8
17b	2,52 (m)	-	2,52 (m)	-	-
18	1,08 (d; 6,4)	20,1	1,10 (d; 6,4)	-	20,3
19	4,78 (qd; 1,8 ; 6,6)	71,3	4,78 (qd; 1,8 ; 6,6)	-	71,2
20	1,38 (m)	39,5	1,38 (m)	-	39,4
21	3,45 (brs)	59,8	3,45 (brs)	-	59,6
OCH ₃	3,84 (s)	56,0	3,83 (s)	-	54,0
COOCH ₃	3,75 (s)	175,8	3,71 (s)	-	174,6
COOCH ₃	-	52,2	-	-	52,9
NH	7,84 (s)	-	8,17 (s)	-	-

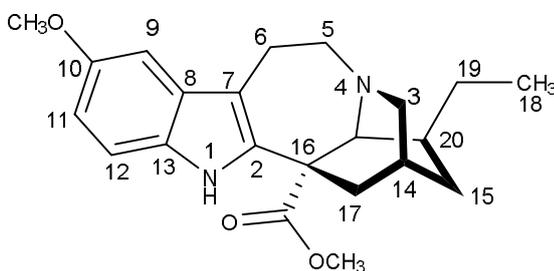
II.2.6.2.2. Identification de HB2

Le composé **HB2** possède des données physico-chimiques et spectrales semblables de celles du composé **HB1**. Il se présente sous forme de cristaux blancs, soluble dans le chloroforme. Il répond positivement au test de Dragendorff caractéristique des alcaloïdes et particulièrement au test de Ehrlich caractéristique des alcaloïdes indoliques.

Sa formule brute $C_{22}H_{28}N_2O_3$ ayant 10 insaturations a été déduite de l'analyse de son spectre de masse HREI-MS qui a présenté l'ion *pseudo*-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 369,2177.

La comparaison des spectres RMN 1H et ^{13}C du composé **HB2** avec ceux du composé **HB1** montre que les deux composés ont un squelette de base identique. Cependant le groupement hydroxyle (-OH) précédemment présent en position C-19 dans le composé **HB1** est inexistant dans le composé **HB2**. De même, le méthyl en position C-18 qui apparaissait sous forme de doublet à δ_H 1,08 (d, $J = 6,4$ Hz) dans le composé **HB1** résonne sous forme de triplet à δ_H 0,90 (t; 7,4) dans **HB2**.

Sur la base des données spectrales de RMN 1D (Tableau 29) et 2D et en comparaison avec celle de la littérature, le composé **HB2** s'identifie comme étant la voacangine (**2**) déjà isolé de l'écorce des racines de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Zocoler et al., 2005).



HB2

Voacangine (**2**)

Tableau 29- Données spectrales RMN du composé HB2 (CDCl₃, 300 et 125 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl₃, 300 et 75 MHz)

Position	δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_C	(Zocoler et al., 2005)	
			δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_C
2	-	137,5	-	137,6
3a	2,80 (d; 8,3)	51,6	2,80 (d; 8,4)	51,5
3b	2,90 (m)		2,90 (m)	
5a	2,98 (m)	53,2	2,98 (m)	53,1
5b	3,14 (m)		3,13 (m)	
6a	3,21 (m)	22,2	3,22 (m)	22,1
6b	3,37 (m)		3,37 (m)	
7	-	110,0	-	110,2
8	-	129,1	-	129,3
9	6,92 (d; 2,4)	100,7	6,92 (d; 2,4)	100,9
10	-	153,8	-	154,2
11	6,80 (dd; 2,4 ; 8,6)	111,7	6,80 (dd; 2,4 ; 8,7)	111,9
12	7,16 (d; 8,6)	110,9	7,13 (d; 8,7)	111,1
13	-	130,5	-	130,6
14	1,87 (m)	27,4	1,87 (m)	27,2
15a	1,12 (m)	32,1	1,12 (m)	31,9
15b	1,75 (m)		1,75 (m)	
16	-	55,2	-	55,1
17a	1,90 (m)	36,5	1,90 (m)	36,5
17b	2,60 (ddd; 2,5; 5,6 ; 14,0)		2,57 (ddd; 2,4; 5,7 ; 14,1)	
18	0,90 (t; 7,4)	11,7	0,90 (t; 7,5)	11,5
19a	1,44 (m)	26,8	1,44 (m)	26,6
19b	1,55 (m)		1,55 (m)	
20	1,32 (m)	39,1	1,32 (m)	38,0
21	3,58 (brs)	57,5	3,54 (brs)	57,5
OCH ₃	3,84 (s)	56,0	3,81 (s)	55,7
COOCH ₃	3,75 (s)	175,5	3,71 (s)	175,9
COOCH ₃	-	52,5	-	52,5
NH	7,83 (s)		7,67 (s)	

II.2.6.2.3. Identification de HB3

Le composé **HB3** à l'aspect des cristaux jaunâtres en forme d'aiguille. Son spectre de masse HRESI-MS a montré le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 286,1443 ; correspondant à la formule brute C₁₇H₁₉NO₃ avec 9 degrés d'insaturations. Il est soluble dans le chloroforme et répond positif au test de Dragendorff mais est négatif au test de Ehrlich suggérant ainsi qu'il s'agit d'un alcaloïde ne possédant pas le noyau indole.

Le spectre RMN ¹H (Fig. 109) de **HB3** montre un signal singulet d'un dioxy méthylène à δ_H 5,98 du cycle dioxolane et d'autres signaux de trois protons aromatiques à δ_H 6,97 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H-7) ; 6,89 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-10) et 6,89 (1H, dd, $J = 8,0$ et $1,7$ Hz, H-11) révélant qu'il contient un noyau benzène trisubstitué. La présence de signaux à δ_H 3,53 et 3,65 (chacun 2H, m, H-2'' et H-6'') ; 1,59 (4 H, m, H- H-3'' et H-5'') et 1,65 (2H, m, H-4'') ont révélé la présence d'un cycle piperidine dans le composé (De Cleyn et Verzele, 1975). Les signaux de champ faible à δ_H 6,45 (1H, d, $J = 14,6$ Hz, H-2) ; 7,40 (1H, dd, $J = 14,5$ et $10,2$ Hz, H-3)

indiquent la présence de protons trans-oléfiniques conjugué à un groupe carbonyle. De plus, le spectre RMN ^1H a montré des signaux pour deux protons oléfiniques à δ_{H} 6,78 (1H, dd, $J = 15,5$ et $10,2$ Hz, H-4) et 6,75 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-5).

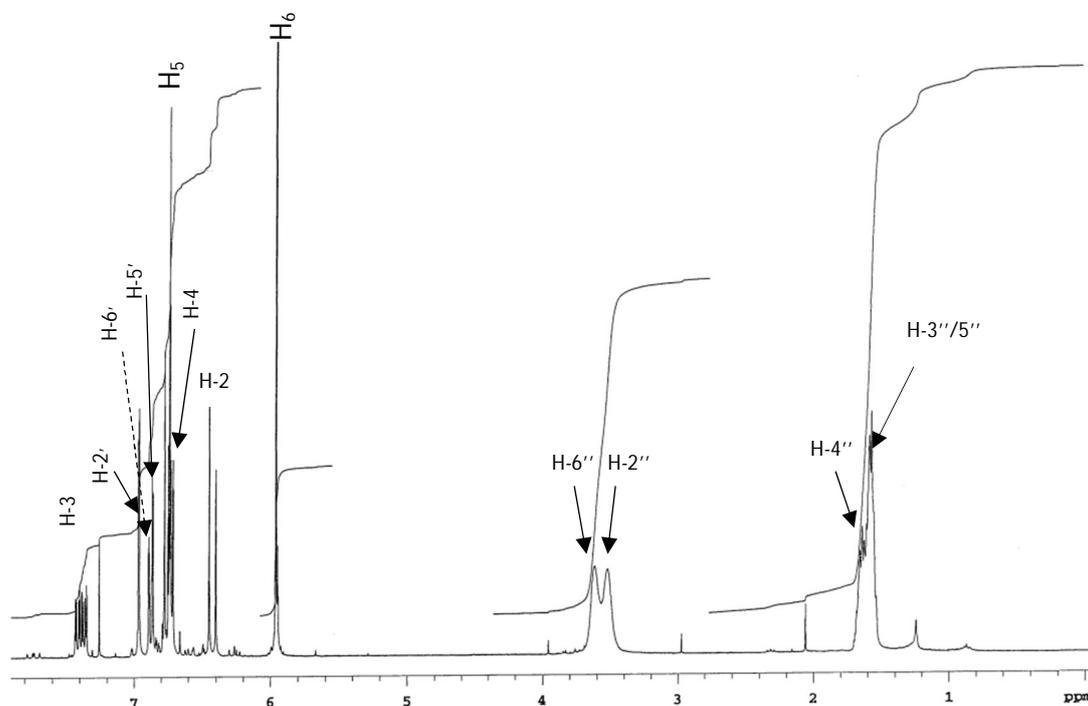


Figure 109- Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) du composé HB3.

Le spectre RMN ^{13}C (Fig. 110) montre la présence de 17 signaux de carbones. Le signal apparaissant à δ_{C} 165,3 révèle la présence d'un groupe carbonyle. En outre, la présence du cycle de la piperidine est confirmée par les signaux à δ_{C} 43,3 et 46,9 (C-2'' et C-6''), δ_{C} 25,7 et 26,8 (C-3'' et C-5'') et 24,7 (C-4''). La présence de deux doubles liaisons conjuguées est confirmée par les pics à 120,0 ; 142,3 ; 125,3 et 138,1 pour C-2, C-3, C-4 et C-5 respectivement. Ce qui montre que l'amide est un fragment diénamide. La présence du groupe méthylènedioxy est confirmée par les signaux présents en δ_{C} 100,1.

En plus des spectres RMN 2D, les déplacements chimiques des protons et des carbones (Tableau 30) montrent une ressemblance étroite avec les données rapportées dans la littérature et ont permis de confirmer la structure de **HB3** au piperine (**87**) isolé de *Piper nigrum* (Khan et al., 2017).

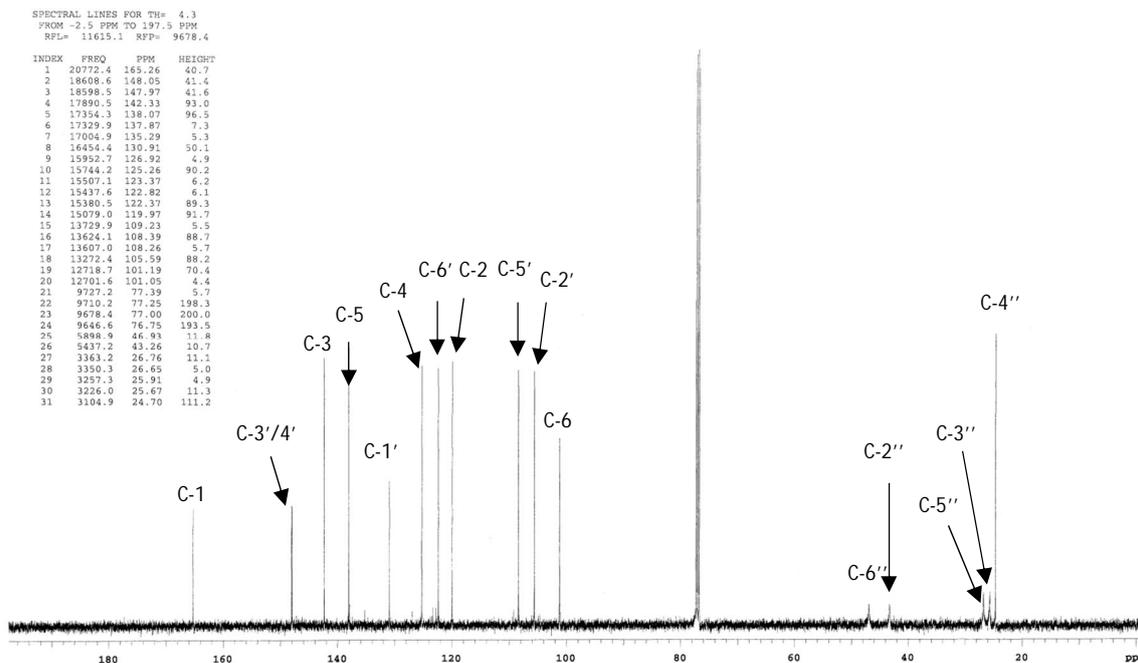
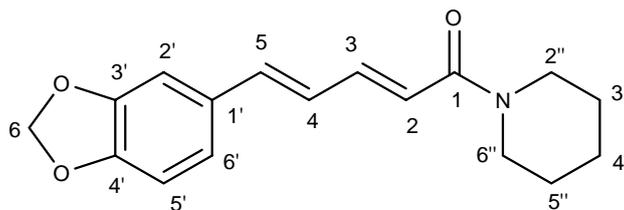


Figure 110- Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé HB3



HB3

Piperine (87)

Tableau 30- Données spectrales RMN du composé HB3 (CDCl_3 , 300 et 125 MHz) comparées à celles de la littérature (CDCl_3 , 400 et 100 MHz)

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J en Hz)		δ_{C}
			(Khan et al., 2017)		
1	-	165,3	-	-	165,5
2	6,45 (d; 14,5)	120,0	6,42 (d; 14,8)	-	120,1
3	7,40 (dd; 10,2 ; 14,5)	142,3	7,38 (ddd; 1,8 ; 8,4; 14,3)	-	142,5
4	6,78 (dd; 10,2 ; 15,6)	125,3	6,74 (m)	-	125,4
5	6,75 (d; 15,6)	138,1	6,74 (m)	-	138,2
6	5,98 (s)	100,1	5,96 (s)	-	101,3
1'	-	130,9	-	-	131,1
2'	6,97 (d; 1,7)	105,6	6,96 (s)	-	105,7
3'	-	148,0	-	-	148,2
4'	-	148,1	-	-	148,1
5'	6,85 (d; 8,1)	108,4	6,76 (d; 8,0)	-	108,5
6'	6,89 (dd; 1,7 ; 8,1)	122,4	6,88 (d; 8,0)	-	122,5
2''	3,53 (m)	43,3	3,62 (m)	-	43,3
3''	1,59 (m)	25,7	1,58 (m)	-	26,8
4''	1,65 (m)	24,7	1,65 (m)	-	24,7
5''	1,59 (m)	26,8	1,58 (m)	-	25,7
6''	3,65 (m)	46,9	3,51 (m)	-	46,9

II.2.6.2.4. Identification de HB4

HB4 a été obtenue sous forme de cristaux blancs. Son spectre de masse HRESI-MS a présenté le pic de l'ion moléculaire protoné à m/z 705,3994 concordant avec la formule brute $C_{43}H_{52}N_4O_5$ renfermant 20 degrés d'insaturation. Son spectre UV a montré des maxima d'absorption 290, 278 et 227 nm spécifiques du noyau indole.

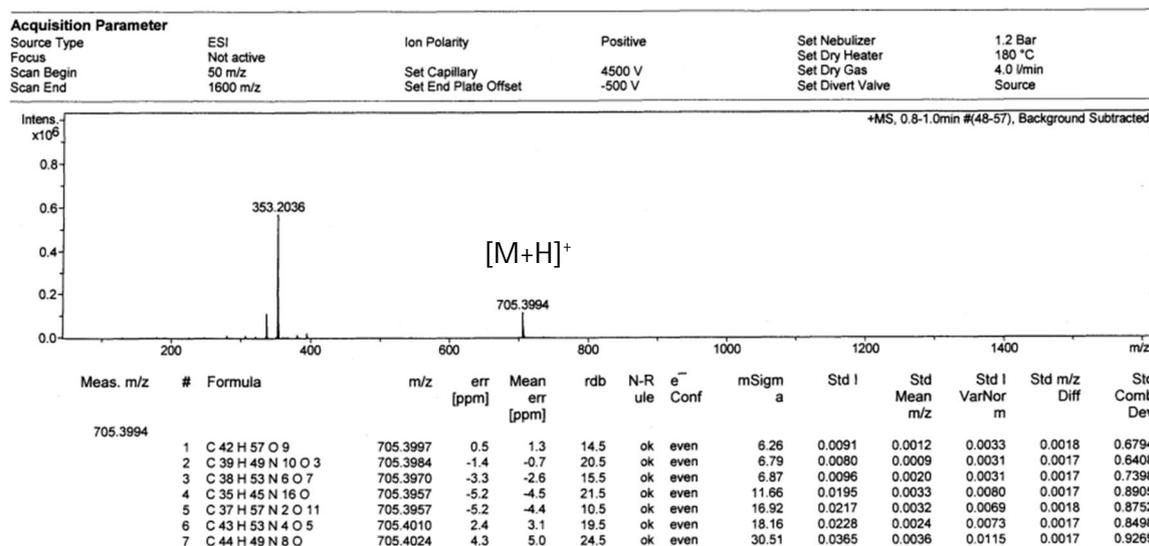


Figure 111- Spectre de masse (+)-HRESI-MS du composé HB4

Le spectre RMN 1H (Fig. 112) présente les signaux de deux protons échangeables à δ_H 7,69 et 7,45 pour deux groupes NH. Six protons aromatiques apparaissent à δ_H 7,53 ; 7,08 ; 7,05 ; 7,06 ; 6,92 et 6,73. Un méthyle triplet δ_H 0,87 (3H, $J = 7,2$ Hz, H-18), un doublet méthyle δ_H 1,64 (3H, $J = 6,6$ Hz, H-18'), un singulet méthyle δ_H 2,58 (3H, Me-4') et un singulet méthoxy δ_H 3,98 (3H, MeO-10). Deux singulets carbométhoxy ont été observés à δ_H 3,64 et 2,45 (MeO-22 & 22' respectivement). D'autres signaux à δ_H 1,66 (d, $J = 7,0$ Hz) et 5,30 (q, $J = 7,0$ Hz), ont été attribués à des groupements méthyle et éthylidène. Ces observations ont suggéré la présence de deux squelettes indoles de type voacangine et vobasine (Buchi et *al.*, 1964).

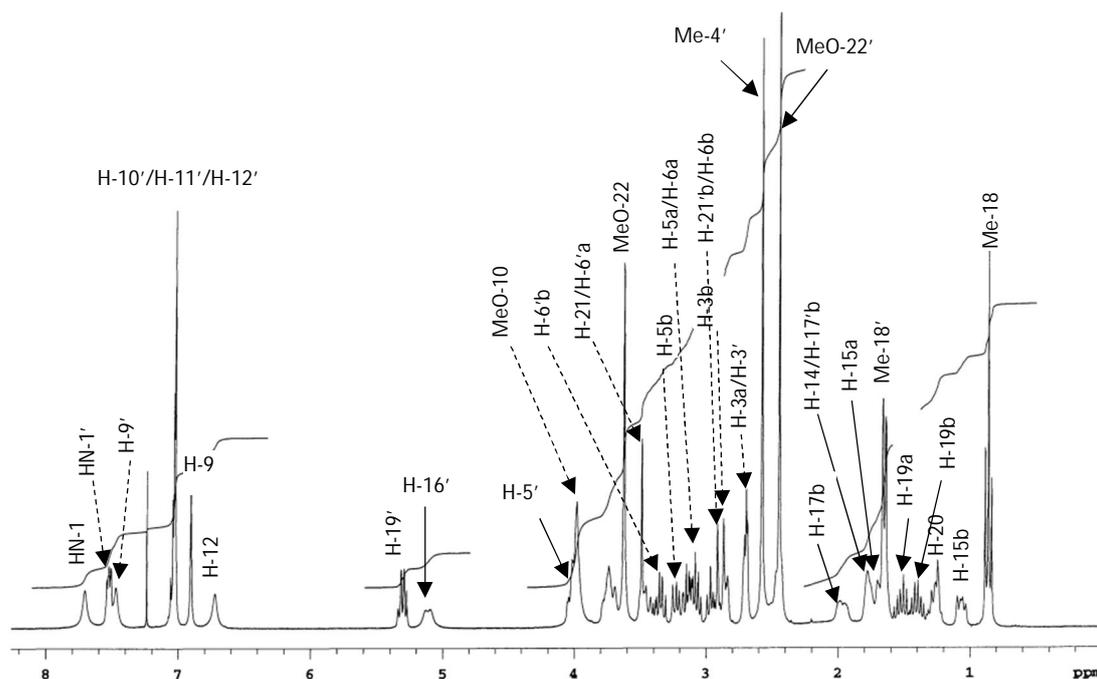


Figure 112- Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) du composé HB3.

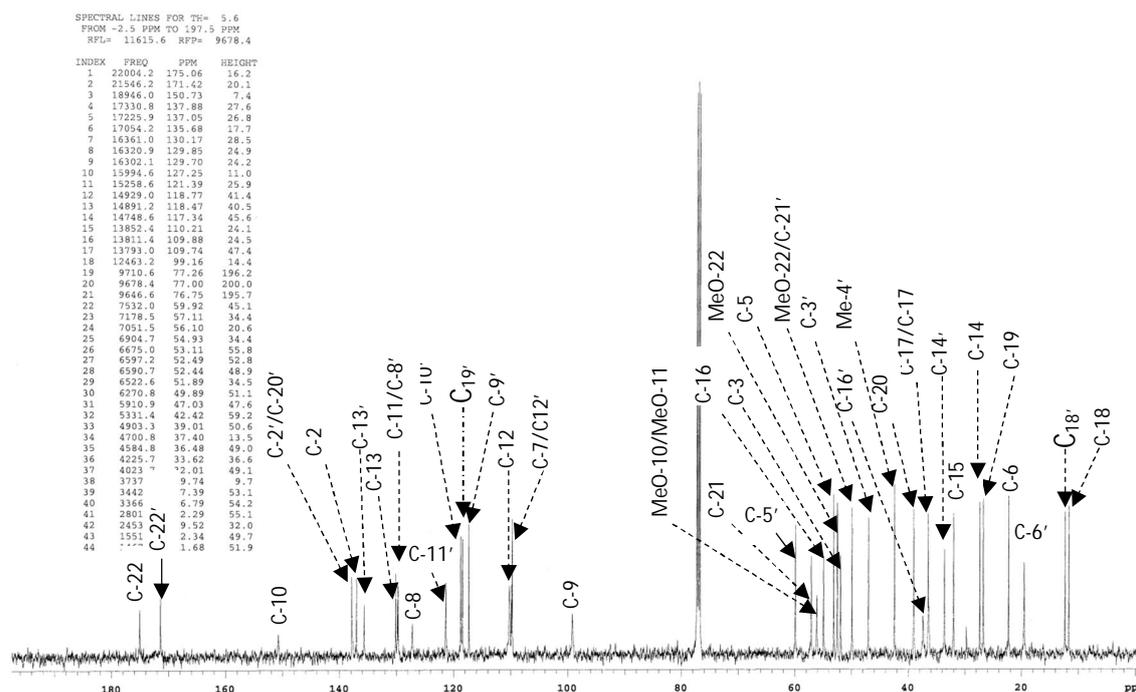


Figure 113- Spectre RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) du composé HB4

L'analyse des spectres RMN ^{13}C (Fig, 113) et du DEPT 135 a permis d'identifier un alcaloïde bis-indole avec les signaux correspondant à 14 quaternaires (C), 14 méthines (CH), 9 méthylènes (CH_2) et 6 méthyles (CH_3) dont trois méthoxyles et un groupe NMe.

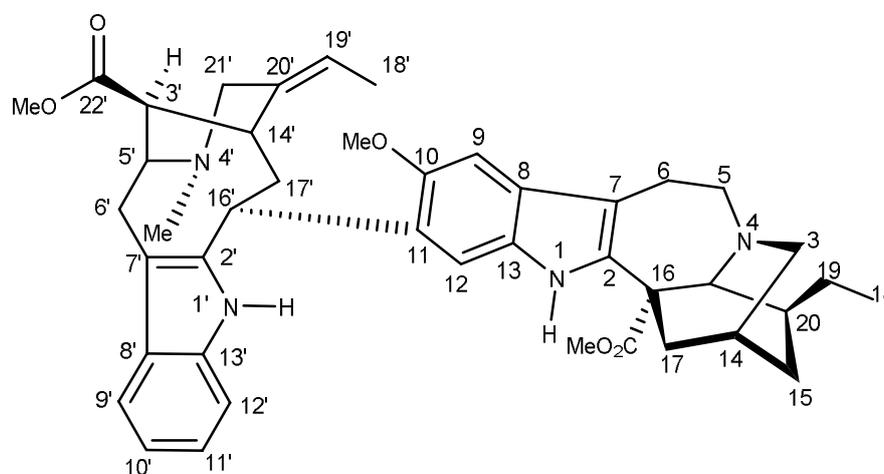
L'analyse des déplacements chimiques du proton et du carbone du méthine CH-16' (δ_{H} 5,15 et δ_{C} 37,4) et la présence de deux signaux singulets attribués aux hydrogènes H-9 (δ_{H} 6,92)

et H-12 (δ_H 6,73) ont été utilisés pour établir la jonction entre les deux fragments voacangine et vobasine au niveau de C-10 et CH-16'.

En effet, sur le spectre HMBC on a observé les couplages hétéronucléaires entre H-17b (δ_H 5,30 ; 3J (C, H)) et C-11 (δ_C 150,7), C-12 (δ_C 110,2) et C-13 (δ_C 130,2), entre H-16' (δ_H 1,78 ; 3J (C, H)) et C-12.

Le spectre NOESY de **HB4** a fourni des informations sur la proximité spatiale (couplage dipolaire) entre les atomes d'hydrogène (Tableau 31), nous permettant d'établir la configuration. L'emplacement spatial du méthoxy en position C-10 a été déduit par le spectre NOESY révélant des pics croisés correspondant au couplage dipolaire entre H-9 (δ_H 6,92) et MeO-10 (δ_H 3,98). Une autre corrélation spatiale intéressante existe entre H-12' (δ_H 7,05) et NH-1' (δ_H 7,69).

Ainsi, au regard de ces informations et en comparaison avec les données de la littérature, **HB4** a été identifié à la voacamine (**62**), un alcaloïde bisindole déjà obtenu à partir de l'écorce des racines de *Hedranthera barteri* (Naranjo et Schmid, 1972) et de *Tabernaemontana laeta* (Medeiros et al, 1999).



HB4

Voacamine (**62**)

**Tableau 31- Données spectrales RMN du composé HB4 (CDCl₃, 300 et 75 MHz)
comparées à celles de littérature (CDCl₃, 400 et 100 MHz)**

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C	δ_C (Medeiros et al., 1999)
2	-	137,1	137,1
3	2,85 (m, Hb) 2,72 (m, Ha)	51,9	51,8
5	3,36 (m, Hb) 3,20 (m, Ha)	53,1	53,0
6	3,09 (m, Hb) 2,97 (m, Ha)	22,3	22,2
7	-	109,9	109,9
8	-	127,3	127,3
9	6,92 (s)	99,2	99,2
10	-	150,7	150,8
11	-	129,7	129,8
12	6,73 (brs)	110,2	110,3
13	-	130,2	130,2
14	1,78 (m)	27,4	27,3
15	1,70 (m, Ha); 1,07 (m, Hb)	32,0	31,9
16	-	54,9	54,9
17	2,58 (m, Ha) 1,98 (m, Hb)	36,5	36,4
18	0,87 (t; 7,3)	11,7	11,6
19	1,53 (m, Ha) ; 1,41 (m, Hb)	26,8	26,7
20	1,27 (m)	39,1	38,9
21	3,50 (s)	57,1	57,1
22	-	175,1	175,2
MeO-10	3,98 (brs)	56,1	56,0
MeO-22	3,64	52,4	52,5
HN-1	7,45 (brs)	-	-
2'	-	137,9	138,0
3'	2,72 ((m)	47,0	47,0
5'	4,05 (m)	59,9	59,8
6'	3,48 (m, Ha) 3,23 (m, Hb)	19,5	19,4
7'	-	109,9	109,9
8'	-	129,9	129,9
9'	7,53 (d; 8,1)	117,4	117,4
10'	7,08 (m)	118,8	118,8
11'	7,06 (m)	121,4	121,5
12'	7,05 (m)	107,7	109,8
13'	-	135,7	135,8
14'	3,78 (m)	33,6	33,5
16'	5,17 (brd)	37,4	37,2
17'	2,48 (m, Ha) 1,78 (m, Hb)	36,5	36,4
18'	1,64 (t; 7,0)	12,3	12,3
19'	5,30 (d; 7,0)	118,5	118,8
20'	-	137,9	138,0
21'	3,69 (m, Ha) 2,97 (m, Hb)	52,5	52,4
22'	-	171,4	171,6
MeO-22'	2,45 (s)	49,9	49,9
Me-4'	2,58 (s)	42,4	42,4
HN-1'	7,69 (brs)	-	-

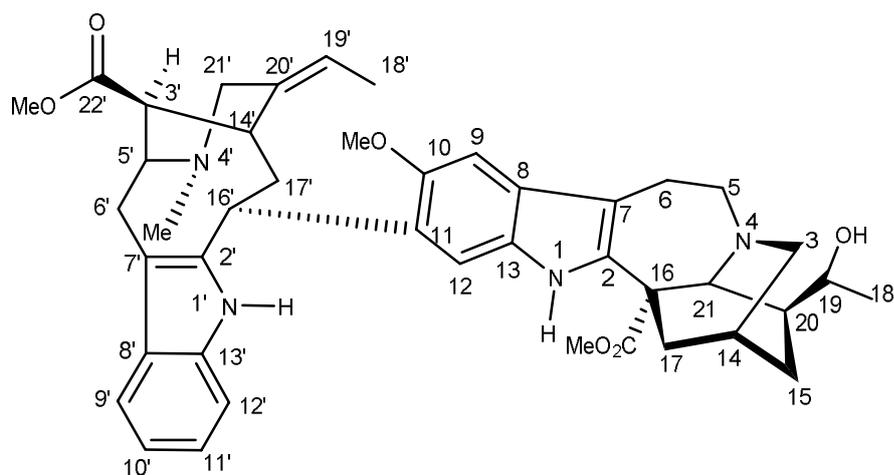
II.2.6.2.5. Identification de HB5

Le composé **HB5** possède des données physico-chimiques et spectrales semblables de celles du composé **HB4**. Il se présente sous forme de cristaux blancs, soluble dans le chloroforme. Il répond positivement au test de Dragendorff caractéristique des alcaloïdes et particulièrement au test de Ehrlich caractéristique des alcaloïdes indoliques.

Son spectre de masse HRESI-MS indique le pic de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 721,3947 dont la formule moléculaire est $C_{43}H_{52}N_4O_6$ avec 20 degrés d'insaturation.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C de **HB5** sont extrêmement similaires à ceux de **HB4**. En particulier, le signal du groupe méthoxy aromatique est à la position normale C-10. La principale différence résulte de la présence d'un groupe hydroxy en C-19 (δ_C 71,3) qui donne naissance à un méthyle doublet à δ_H 1,05 (CH₃-18).

Sur la base des interprétations de ces données et en combinaison avec les spectres COSY, HSQC, HMBC et NOESY, le composé **HB5** a été identifié à la voacorine (**88**) précédemment isolé de *Voacanga africana* (Buchi et al., 1964).



HB5

Voacorine (**88**)

Tableau 32- Données spectrales RMN du composé HB5 (CDCl₃, 300 et 75 MHz)

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C
2	-	136,9
3	2,85 (m, Hb); 2,72 (Ha)	51,4
5	3,36 (Hb); 3,20 (Ha)	52,8
6	3,09 (Hb); 2,97 (Ha)	21,7
7	-	109,8
8	-	127,0
9	6,92 (s)	99,1
10	-	150,9
11	-	129,6
12	6,73 (brs)	110,4
13	-	130,1
14	1,78 (m)	26,9
15	1,70 (Ha); 1,07 (Hb)	33,5
16	-	53,9
17	2,58 (Ha); 1,98 (Hb)	36,3
18	0,87 (t; 7,3)	12,4
19	4,05 (m)	71,3
20	1,27 (m)	39,4
21	3,50 (s)	56,1
22	-	174,2
MeO-10	3,98 (brs)	56,1
MeO-22	3,64	52,3
HN-1	7,47 (brs)	-
2'	-	137,7
3'	2,72 ((m)	46,7
5'	4,05 (m)	59,5
6'	3,48 (Ha); 3,23 (Hb)	19,8
7'	-	109,8
8'	-	129,6
9'	7,53 (d; 8,1)	117,3
10'	7,08 (m)	118,9
11'	7,06 (m)	121,5
12'	7,05 (m)	109,4
13'	-	135,7
14'	3,78 (m)	33,5
16'	5,15 (brd)	37,4
17'	2,48 (Ha); 1,78 (Hb)	36,9
18'	1,64 (t; 7,0)	12,4
19'	5,37 (d, 7,0)	118,9
20'	-	136,2
21'	3,69 (Ha); 2,97 (Hb)	52,8
22'	-	171,0
MeO-22'	2,45 (s)	49,9
Me-4'	2,58 (s)	42,2
HN-1'	7,73 (brs)	-

PARTIE B : ETUDES BIOLOGIQUES ET BIOSYNTHESE

II.2.7. Activités biologiques des extraits, fractions et composés isolés

II.2.7.1 Activité cytotoxique (Brine shrimp)

L'activité cytotoxique contre *Artemia salina* a été réalisée sur l'extrait au méthanol de *T. contorta* et l'extrait à l'AcOEt de *L. lucida*. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 33.

Tableau 33- Résultats de l'activité cytotoxique de l'extrait au méthanol de *T. contorta* et de l'extrait à l'AcOEt de *L. lucida*

Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Nombre de crevettes	Nombre de survivants	% de mortalité LD50 ($\mu\text{g/mL}$)	Référence	% de mortalité LD50 ($\mu\text{g/mL}$)
10	30	28	6,66%	Etoposide	46,6%
100	30	25	16,66%		
1000	30	19	36,66%		

Au regard de ces résultats, les échantillons n'ont montré aucune cytotoxicité à une concentration élevée.

II.2.7.2. Activité antibactérienne

L'extrait au méthanol de *T. contorta*, l'extrait à l'AcOEt de *L. lucida* et les composés isolés ont été évalués pour l'effet d'inhibition de la croissance sur différentes souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* et *Pseudomonas aeruginosa*) en comparant au standard ofloxacin. 60 mg de chaque extrait a été testé à une concentration de 3000 $\mu\text{g/mL}$ comparativement à 10 mg du control positif (1000 $\mu\text{g/mL}$). Les composés ont été testés à une concentration de 4 $\mu\text{g/mL}$. Les résultats sont présentés dans le tableau 34.

Tableau 34- Evaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits et produits purs isolés

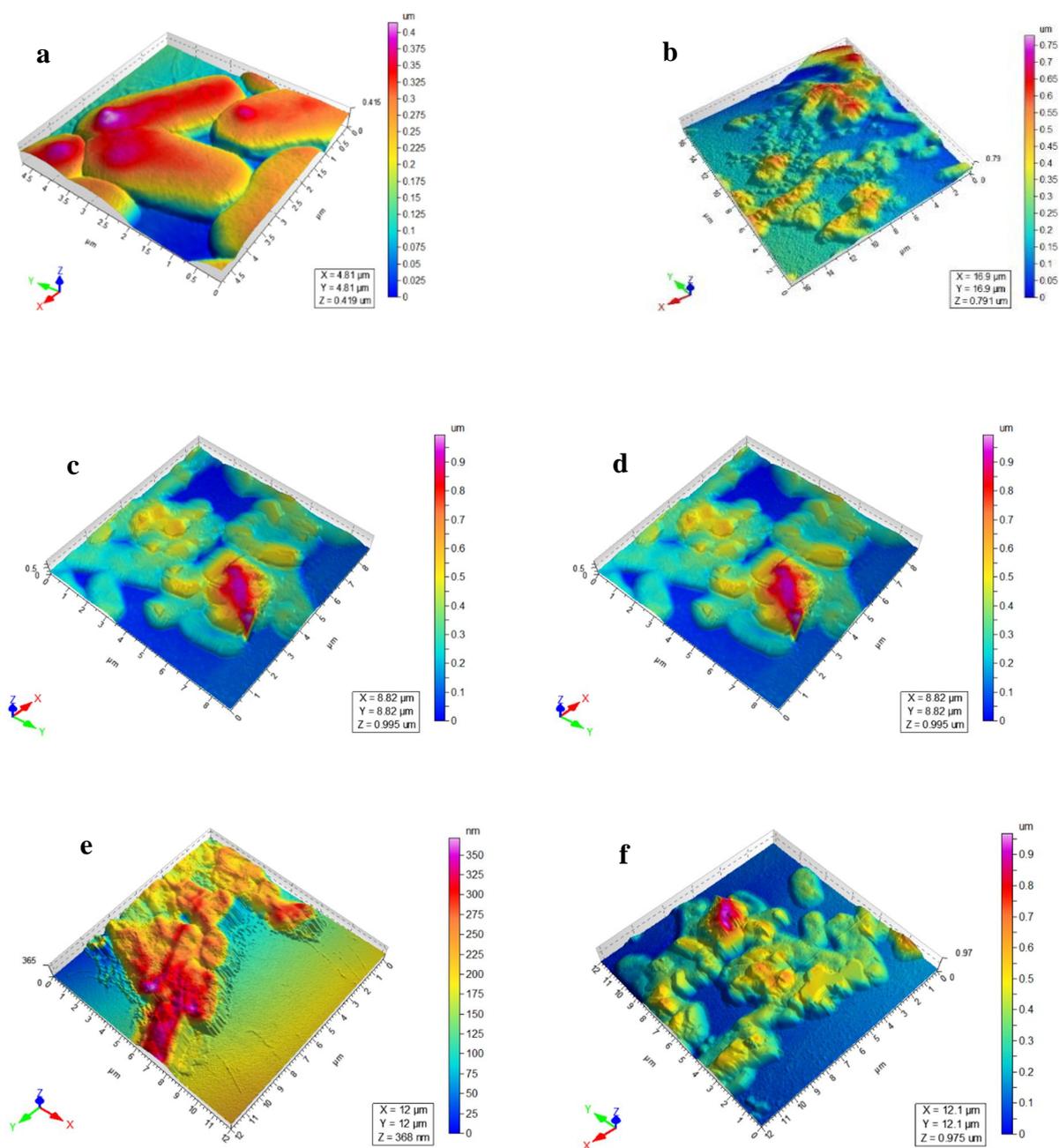
Extraits / Produits purs	Tests antibactériens ((%) pourcentage d'inhibition)					CMI ($\mu\text{g/mL}$) Sur <i>E. coli</i>
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	
<i>T. contorta</i> (MeOH)	5	10	0	0	0	N.D
<i>L. lucida</i> (MeOH)	0	0	0	0	0	N.D
TC1	—	—	—	—	—	N.D
TC2	0	0	83	0	0	1,4
TC3	0	0	70	0	0	1,8
TC4	—	—	—	—	—	N.D
TC5	—	—	—	—	—	N.D
TC6	—	—	—	—	—	N.D
TC7	—	—	—	—	—	N.D
TC8	0	0	80	0	0	1,3
TC9	—	—	—	—	—	N.D
TC10	—	—	—	—	—	N.D
TC11	—	—	—	—	—	N.D
TC12	—	—	—	—	—	N.D
LH1	—	—	—	—	—	N.D
LH2	0	0	84	0	0	2,3
LH3	—	—	—	—	—	N.D
LH4	—	—	—	—	—	N.D
LH5	0	0	78	0	0	4,6
LH6	—	—	—	—	—	N.D
LH7	—	—	—	—	—	N.D
LH8	—	—	—	—	—	N.D
LH9	—	—	—	—	—	N.D
LH10	—	—	—	—	—	N.D
LH11	—	—	—	—	—	N.D
LH12	—	—	—	—	—	N.D
Ofloxacin	96	91	90	95	95	0,14

N.D : Non déterminé

— : Non testé

Les composés **TC2** (CMI = 1,4 $\mu\text{g/mL}$), **TC3** (CMI = 1,8 $\mu\text{g/mL}$), **TC8** (CMI = 1,3 $\mu\text{g/mL}$), **LH2** (CMI = 1,5 $\mu\text{g/mL}$) et **LH5** (CMI = 1,7 $\mu\text{g/mL}$) ont présenté une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli* (ATCC 25922) par rapport au médicament standard, l'ofloxacine (Tableau 34). Les résultats de la microscopie à force atomique (Fig. 112)

ont montré la capacité de ces composés à inhiber la souche MDR (Multidrug-résistant) *E. coli* à plus de la moitié, ce qui a donné des résultats prometteurs pour de nouvelles recherches.



- a: *E. coli* (ATCC 259229) non traité;
- b : *E. coli* (ATCC 25922) traité par TC2 à 4 $\mu\text{g/mL}$.
- c : *E. coli* (ATCC 25922) traité par TC3 à 4 $\mu\text{g/mL}$.
- d : *E. coli* (ATCC 25922) traité par TC8 à 4 $\mu\text{g/mL}$.
- e : *E. coli* (ATCC 25922) traité par LH2 à 4 $\mu\text{g/mL}$.
- f : *E. coli* (ATCC 25922) traité par LH5 à 4 $\mu\text{g/mL}$.

Figure 114- Microscopie à force atomique des composés TC2, TC3, TC8, LH2 et LH5 avec *E. coli*

II.2.7.3. Activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes de l'extrait au méthanol de *T. contorta* et de la fraction à l'AcOEt de *L. lucida* ont été évaluées en utilisant la N-Acetyl-L-Cystéine et l'acide gallique comme références. Les résultats ont été consignés dans le tableau 36.

Tableau 35- Evaluation de l'activité antioxydante

Extrait/Référence	Concentration (mg/mL)	% Inhibition	IC ₅₀ ±SEM (mg/mL)
<i>T. contorta</i> (MeOH)	0,5	59,6	0,40 ± 0,019
<i>L. lucida</i> (AcOEt)	0,5	93,2	0,0534 ± 0,0015
Std N-Acetyl-L-Cysteine	0,5	97,5	0,0141 ± 0,0001
Std Gallic Acid	0,5	96,9	0,0032 ± 0,0001

Il en ressort que les lianes de *L. lucida* possèdent une bonne activité radicalaire à 0,5 mg/mL comparé au control positif (N-Acetyl-L-Cystéine) avec des valeurs de CI₅₀ de 0,0534 ± 0,0015 et 0,0141 ± 0,0001 mg/mL respectivement. On note cependant que cette activité antioxydante est inférieure à celle de la molécule de référence. La fraction au MeOH de *T. contorta* s'est avérée inactive.

II.2.10.4. Activité antidiabétique *in vitro* de quelques composés isolés de *L. lucida*

Étant donné que l'activité antioxydante de la fraction des lianes de *L. lucida* a été bonne, nous avons évalué l'activité antidiabétique notamment à travers les tests antiglycation et α -glucosidase de certains composés purs.

En effet, le diabète est un trouble endocrinien courant caractérisé par une hyperglycémie et des complications à long terme affectant les yeux, les nerfs, les vaisseaux sanguins, la peau et les reins. Autrement dit c'est un trouble métabolique qui provoque une glycémie à jeun et postprandiale élevée. Une glycation accrue des protéines et une accumulation de produits finaux de glycation avancée (AGEP) ont été impliquées dans la pathogenèse des complications diabétiques. La glycation et la formation d'AGEP s'accompagnent également de la formation de radicaux libres via l'auto-oxydation du glucose et des protéines glyquées. Les composés possédant des propriétés combinées d'antiglycation et d'antioxydant peuvent offrir un potentiel thérapeutique.

L' α -glucosidase quant à elle catalyse la dernière étape du processus digestif des glucides (Sou et *al.*, 2000). Parmi les médicaments thérapeutiques pour prévenir les niveaux élevés de glucose dans le sang, les inhibiteurs de l' α -glucosidase sont efficaces en retardant l'absorption du glucose (Matsui et *al.*, 1996). Les inhibiteurs de cette enzyme retardent la digestion des

glucides et entraînent une réduction du taux d'absorption du glucose dans le sang. Par conséquent, l'inhibition de l' α -glucosidase est une intervention importante dans la gestion du diabète non insulino-dépendant (Ali et al., 2002).

Seuls les composés **LH1** et **LH4** ont été soumis à l'évaluation des activités inhibitrices antiglycation et α -glucosidase. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 37.

Tableau 36- Activités *in vitro* antiglycation et α -glucosidase des composés LH1 et LH4

Composés purs	antiglycation ^a	α -glucosidase ^a
	CI ₅₀ \pm SEM (mM)	CI ₅₀ \pm SEM (μ M)
LH1(76)	452,39 \pm 2,10	268,06 \pm 1,47
LH4 (79)	525,55 \pm 4,17	—
Rutin ^b	54,59 \pm 2,20	—
Acarbose ^b	—	875,75 \pm 2,08

IC₅₀ est la concentration (mM) qui permet une inhibition de 50% de la croissance.

L'activité antiglycation et α -glucosidase sont exprimées en tant que valeurs moyennes de trois données expérimentales.

^a Testé à la concentration de 1 mM.

^b Contrôle positif.

—: Non testé

Les composés **LH1** (CI₅₀ = 525,55 \pm 4,17 mM) et **LH4** (CI₅₀ = 452,39 \pm 2,10 mM), ont montré une activité modéré antiglycation *in vitro*. Ces composés à une concentration de 1 mM ont présenté une inhibition de 78,87% (**LH1**) et 84,41% (**LH4**) respectivement, tandis que l'inhibiteur standard rutine a montré une inhibition de 90,97%. Pour l'activité inhibitrice *in vitro* α -glucosidase, seul le composé **LH1** (CI₅₀ = 268,06 \pm 1,47 μ M) a été actif et a présenté une activité supérieure par rapport à l'inhibiteur standard acarbose (CI₅₀ = 875,75 \pm 2,08 μ M).

II.2.7.5. Activité anticancéreuse *in vitro* contre les cellules cancéreuses du côlon humain Caco2 (ATCC® HTB37™)

L'activité cytotoxique de l'extrait au méthanol (TE), de la fraction à l'AcOEt (TC) de *T. contorta* ainsi que des composés **TC1**, **TC10** et **TC11** a été évaluée contre le cancer du côlon humain. La méthode utilisée est le MTT et la lignée cellulaire le Caco2. Les autres composés n'ont pas été testés et les résultats sont consignés dans le tableau 35 ci-dessous et la figure 113.

Tableau 37- Pourcentage d'inhibition *in vitro* de l'extrait au MeOH, de la fraction à l'AcOEt et de quelques produits purs sur la lignée cellulaire Caco2

	Produits purs/ Fraction / Extrait					
	TC11(74)	TC10 (73)	TC1 (64)	TC	TE	actinomycin D
% inhibition	23.28 \pm 9.14	43.32 \pm 10.67	62.13 \pm 3.28	22.99 \pm 6.70	9.54 \pm 3.64	65.40 \pm 4.30

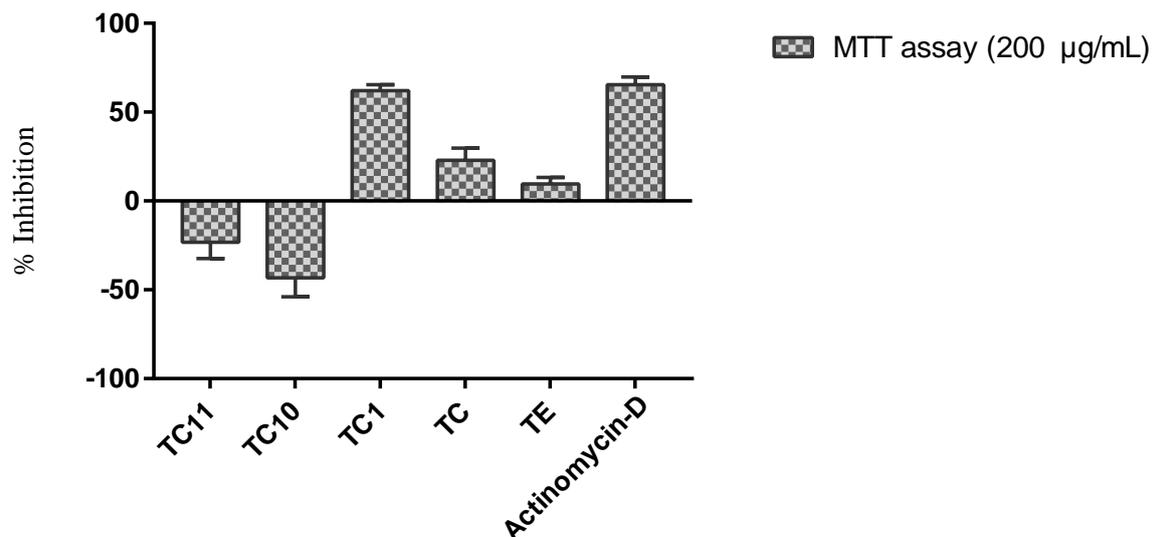
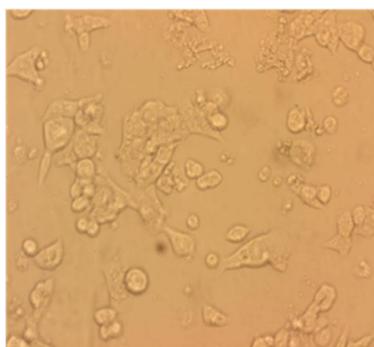


Figure 115- Schéma comparatif des pourcentages d'inhibition des composés purs, de la fraction au MeOH, de l'extrait et de l'actinomycine D (standard)

Tous les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SD (n = 3).

Ces résultats montrent que la cérébroside **TC1** a une activité cytotoxique significative avec un pourcentage d'inhibition de plus de 60% par rapport à l'actinomycine D qui est le contrôle positif.

Il en ressort que la majorité des cellules observées au microscope après traitement par **TC1** ont perdu leur viabilité (Fig. 114).



(a) Contrôle de la lignée cellulaire Caco2



(b) Inhibition de la lignée cellulaire Caco2 par **TC1**

Figure 116- Observation des cellules cancéreuses Caco2 au microscope

DISCUSSION

Il ressort de ces différentes analyses que de *T. contorta*, deux cérébrosides **TC2** (tabernamide A) et **TC3** (tabernamide B) ont présenté une bonne activité antibactérienne sur la souche *Escherichia coli* (ATCC 25922). Cependant, le mécanisme d'action des cérébrosides proprement dit sur les bactéries reste inconnu, bien que les recherches aient déterminé la capacité de ces lipides à interférer avec la destruction phagocytaire des micro-organismes (Bibel et Shinefield, 1992). Le composé **TC1** (contortamide) actif sur les cellules cancéreuses du colon humain (Caco2), pourrait être considéré comme agent préventif contre le cancer du côlon. Ceci est en accord avec les travaux de Sugawara et *al.* (2006) qui ont montré que les cérébrosides induisent une apoptose significative dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du côlon.

En outre, la 3-*O*- β -(*E*)-(4-*O*-Acetylferuloyl)lupéol (**LH2**) et la 7,7'-diméthoxy-6,6'-dicoumarinyl éther (**LH5**) ont présenté une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli* (ATCC 25922) par rapport à l'ofloxacine utilisé comme référence. Ceux-ci seraient responsables de l'activité moyenne de la fraction à l'acétate d'éthyle des lianes de *Landolphia lucida* contre *Escherichia coli* ATCC 25922.

Par ailleurs la 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy benzyl) diméthyl succinate (**LH1**) et la 3 β -(*E*)-feruloyllupéol (**LH4**) ont présenté l'activité antidiabétique par une glycation et une inhibition de l' α -glucosidase. Cependant **LH1** présente la meilleure activité antidiabétique par rapport à l'acarbose utilisé comme référence. Ceci serait dû :

- à la forte présence des groupements hydroxyle et méthoxy qui substituent des noyaux aromatiques;
- à l'effet donneur d'électrons du groupe méta-méthoxy en présence du groupe para-hydroxyle (Khan et *al.*, 2009 ; Khan et *al.*, 2021).

Toutefois, la 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy benzyl) diméthyl succinate (**LH1**) pourrait aussi être responsable de l'activité antioxydante de la fraction à l'AcOEt de *L. lucida*. En effet les lignanes ayant un groupe hydroxy libre sur le fragment phénolique, ont révélé une inhibition à la fois contre l' α -glucosidase et les radicaux libres respectivement. Ces observations suggèrent avant tout que la présence d'un groupe hydroxy libre joue un rôle essentiel dans l'exercice de l'inhibition. Pour l'antioxydation, l'hydroxyle phénolique pourrait donner un radical hydrogène (H \cdot) pour mettre fin à la propagation des radicaux (Yehye et *al.*, 2015), ainsi prévenir l'apparition de troubles cellulaires.

Au vue de ces activités que possède *Landolphia lucida*, cette plante pourrait donc aussi agir contre le cancer du côlon car les maladies microbiennes et le diabète constituent des facteurs à risque de ce cancer.

II.2.11. Hypothèse sur la biosynthèse de quelques composés isolés

Les composés isolés dans cette étude présentent une très grande variété structurale. Ils peuvent être regroupés en six classes chimiques (alcaloïdes, cérébrosides, triterpènes, coumarines, lignanes et flavonoïdes) qui présentent chacune un lien biogénétique.

Ainsi, la biosynthèse des alcaloïdes indoliques commencerait systématiquement avec la sécologanine et la tryptamine (O'Connor et Maresh, 2006), provenant respectivement du 1-désoxy-D-gluco-5-phosphate et de l'acide aminé tryptophane, d'où provient l'indole (schéma 24).

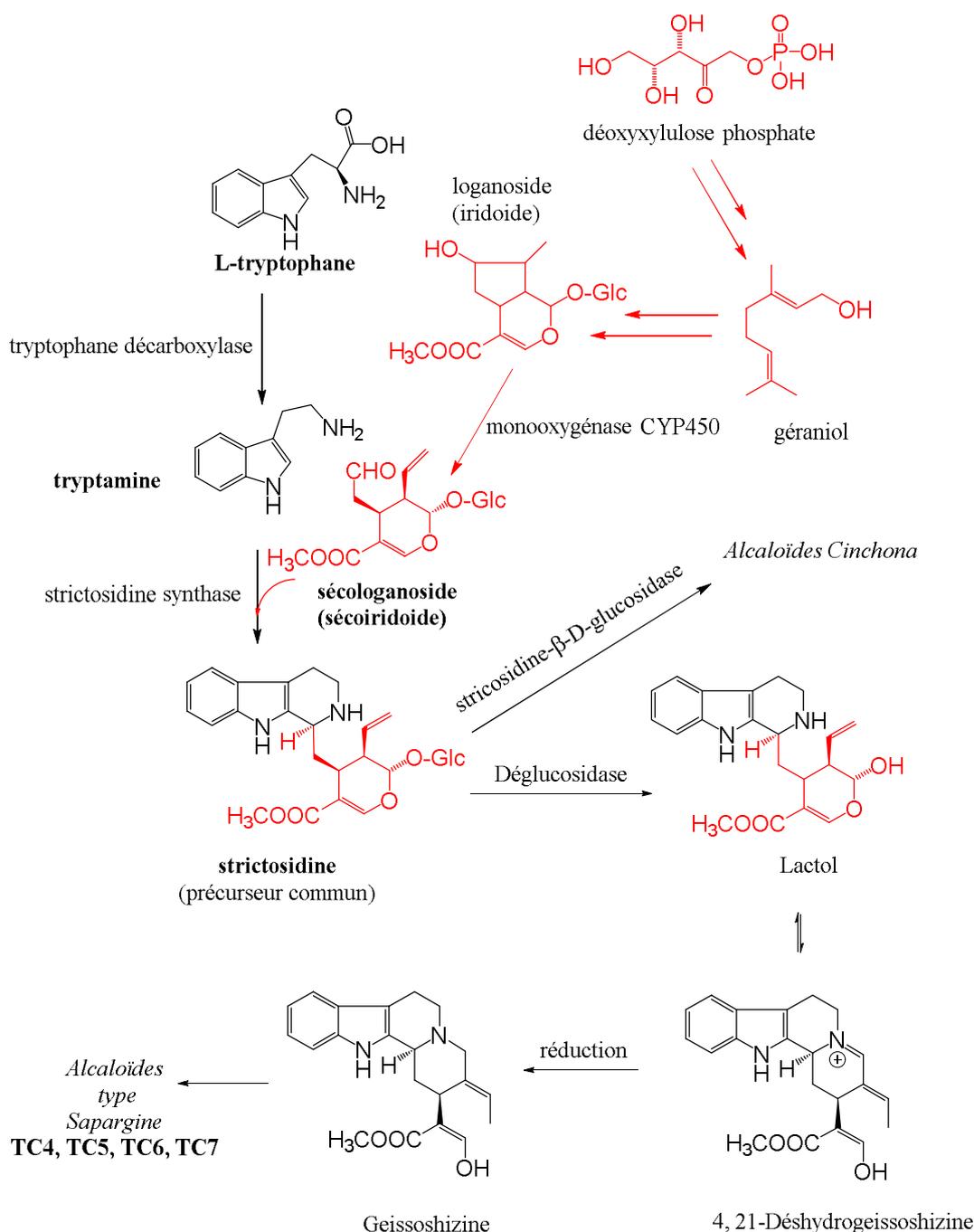


Schéma 24- Biosynthèse de quelques alcaloïdes indoliques isolés

Les cérébrosides quant à elles sont biosynthétisées à partir de sucres activés par des glycosyltransférases. Leur catabolisme dépend d'une β -galactosidase ou d'une β -glucosidase d'acides lysosomiques dont les déficits respectifs produisent les maladies de Krabbe et de Gaucher. En général, la première étape de la biosynthèse est la condensation de la L-sérine et de l'acylCoA gras, donnant la 3-cétodihydrosphingosine, qui est réduite en dihydrosphingosine. Ce composant est ensuite N-acylé, suivi d'une déshydrogénation pour former une céramide. (Sandjo et Kuete, 2013) (Schéma 25).

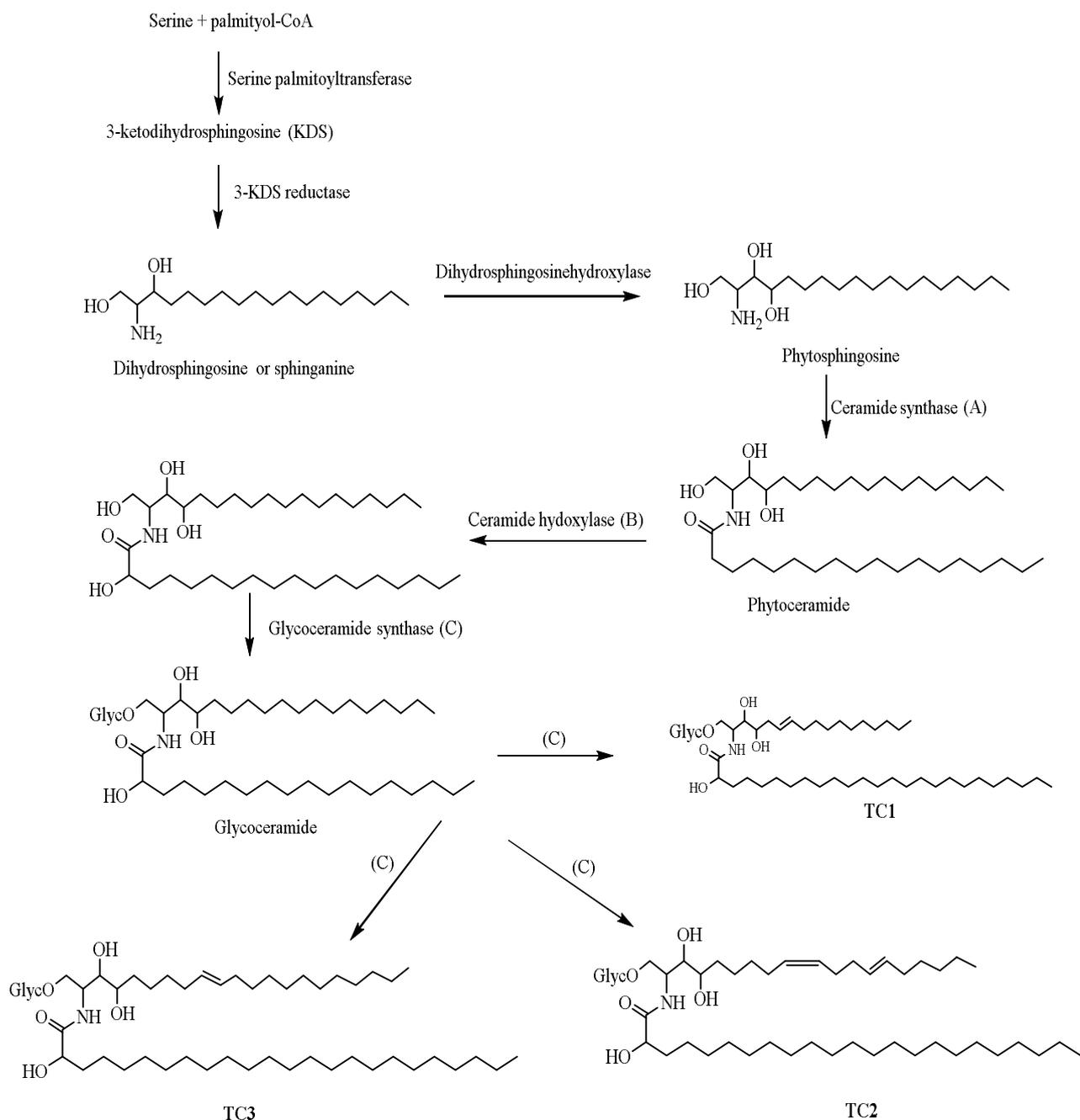
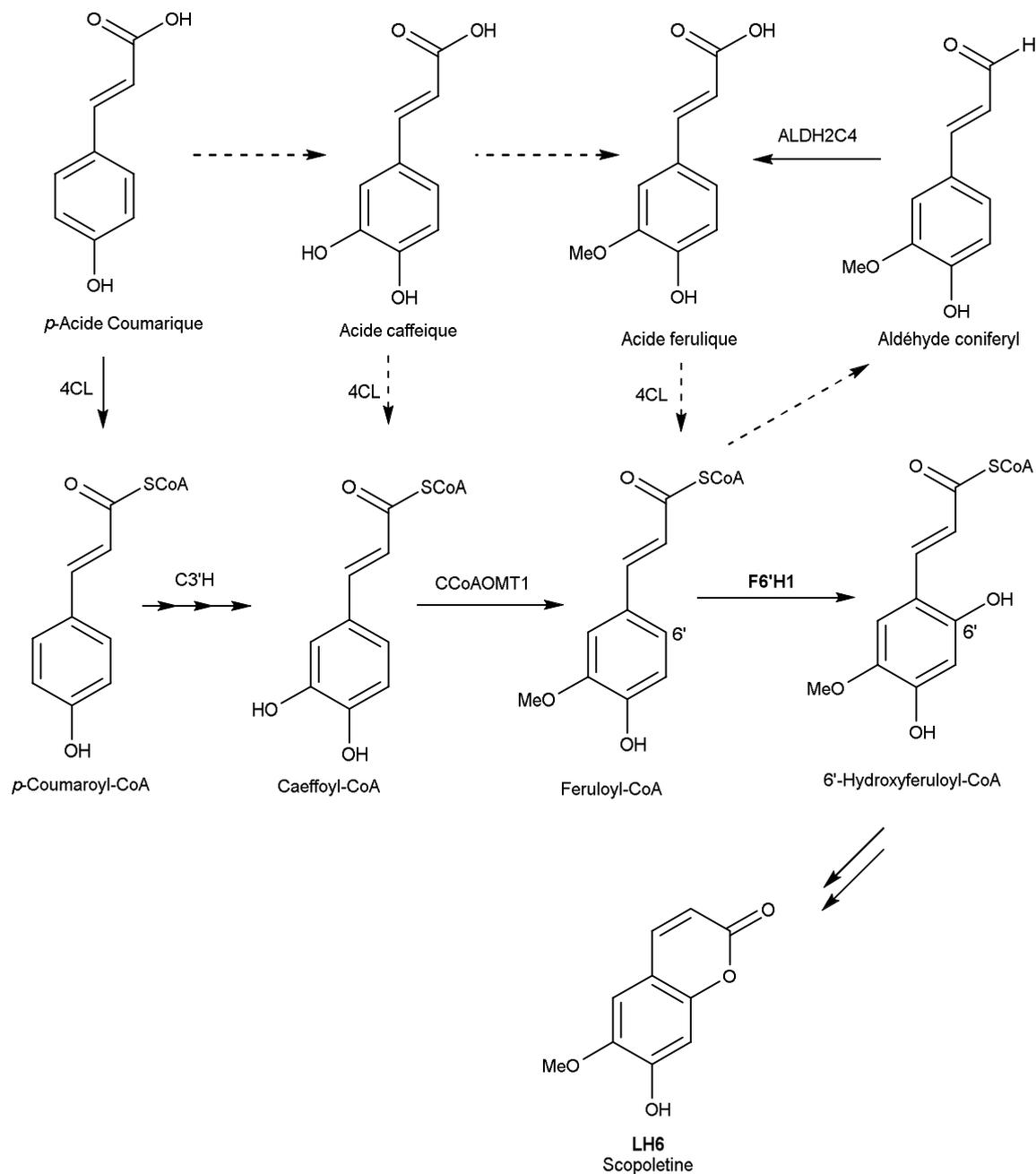


Schéma 25- Voie biosynthétique des cérébrosides isolés

Les voies de biosynthèse des coumarines et lignanes présentent un précurseur commun. Ces classes de composés dérivent du métabolisme des phénylpropanoïdes (Brown 1962 ; Kai et *al.*, 2006). La première des enzymes intervenant dans cette voie est la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) permettant de transformer la phénylalanine en *p*-coumarate (Schéma 26).



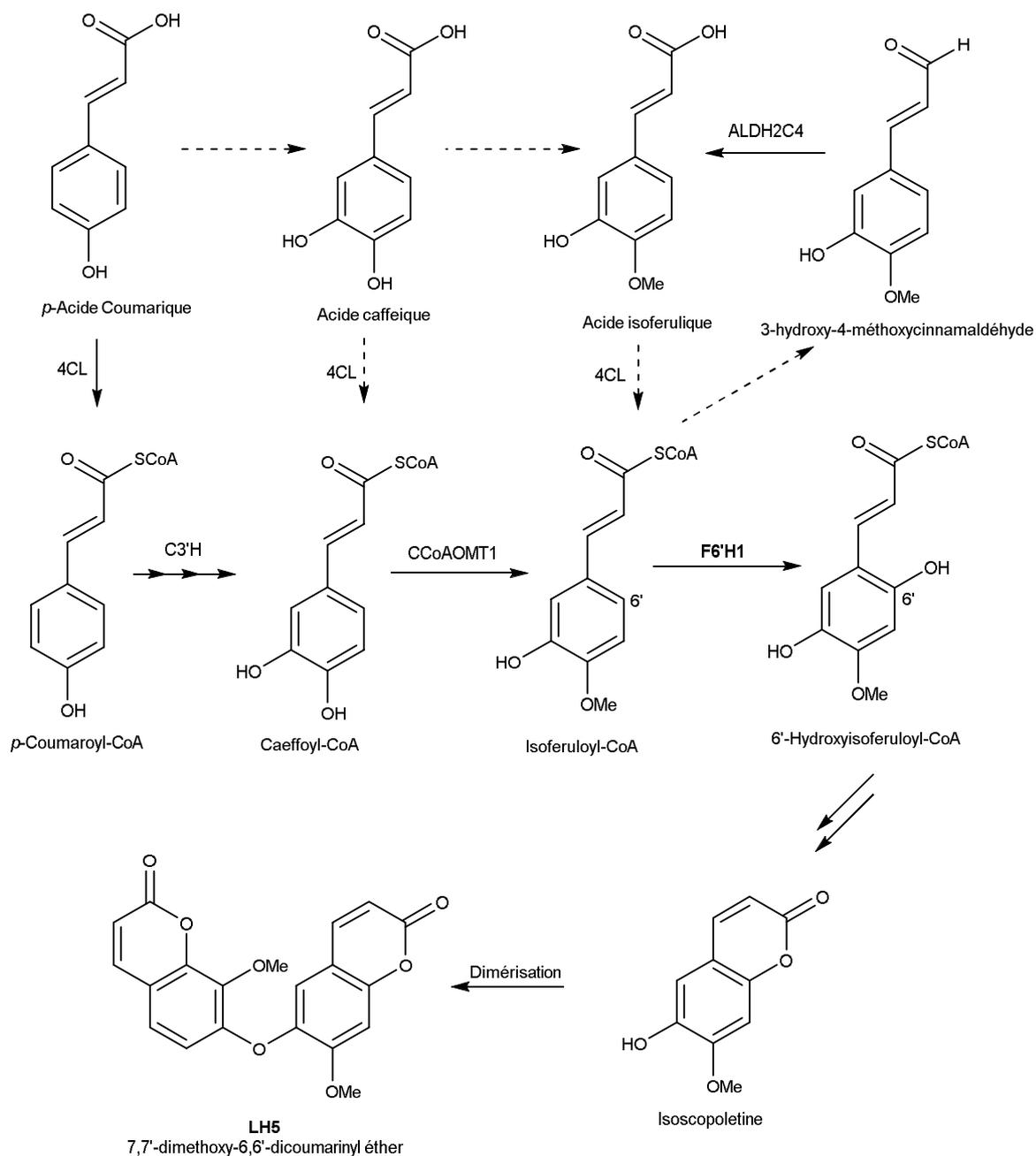


Schéma 26- Voies de biosynthèse des coumarines (LH5 et LH6)

La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes aboutit notamment aussi à la formation d'alcool coniférylique qui constitue l'unique précurseur de la voie de biosynthèse des lignanes (Schéma 27) et de celle des flavonoïdes (Ferrer et *al.*, 2008).

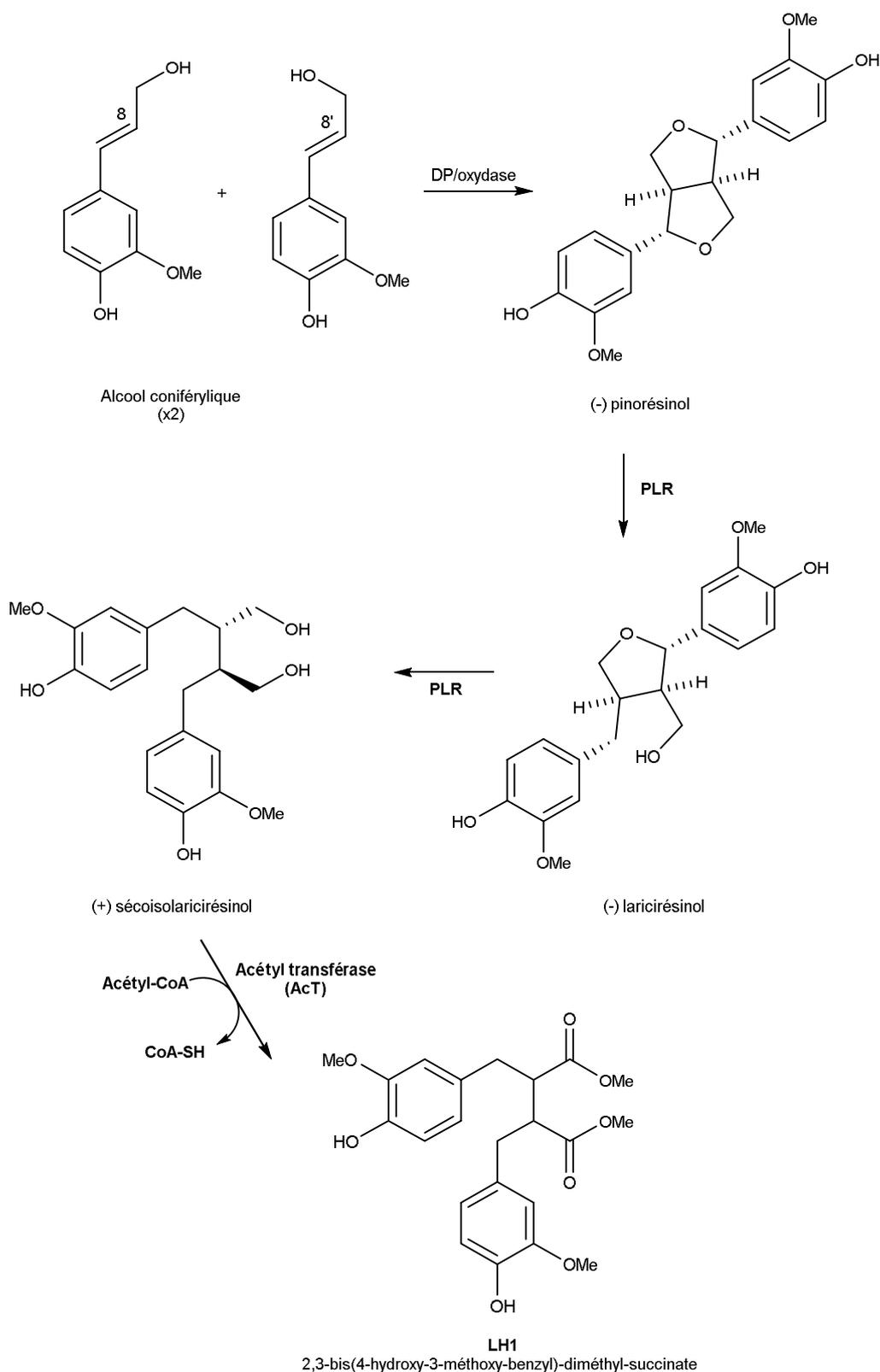


Schéma 27- Voie de biosynthèse de la lignane isolé (composé LH1)

Enfin, la biosynthèse des flavonoïdes au sens large va se réaliser à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-coA). La première étape de ce métabolisme est catalysée par la Chalcone Synthase (CHS), une enzyme qui utilise le pcoumaroyl-CoA comme

substrat sur lequel elle catalyse la condensation de 3 manonyl-CoA. La chalcone issue de cette réaction enzymatique est la structure de base des flavonoïdes, laquelle va donner naissance à de très nombreuses classes qui se différencient selon les substitutions présentes sur leur cycle (Schéma 28) (Petersen *et al.*, 1999 ; Winkel-Shirley 2001a et b).

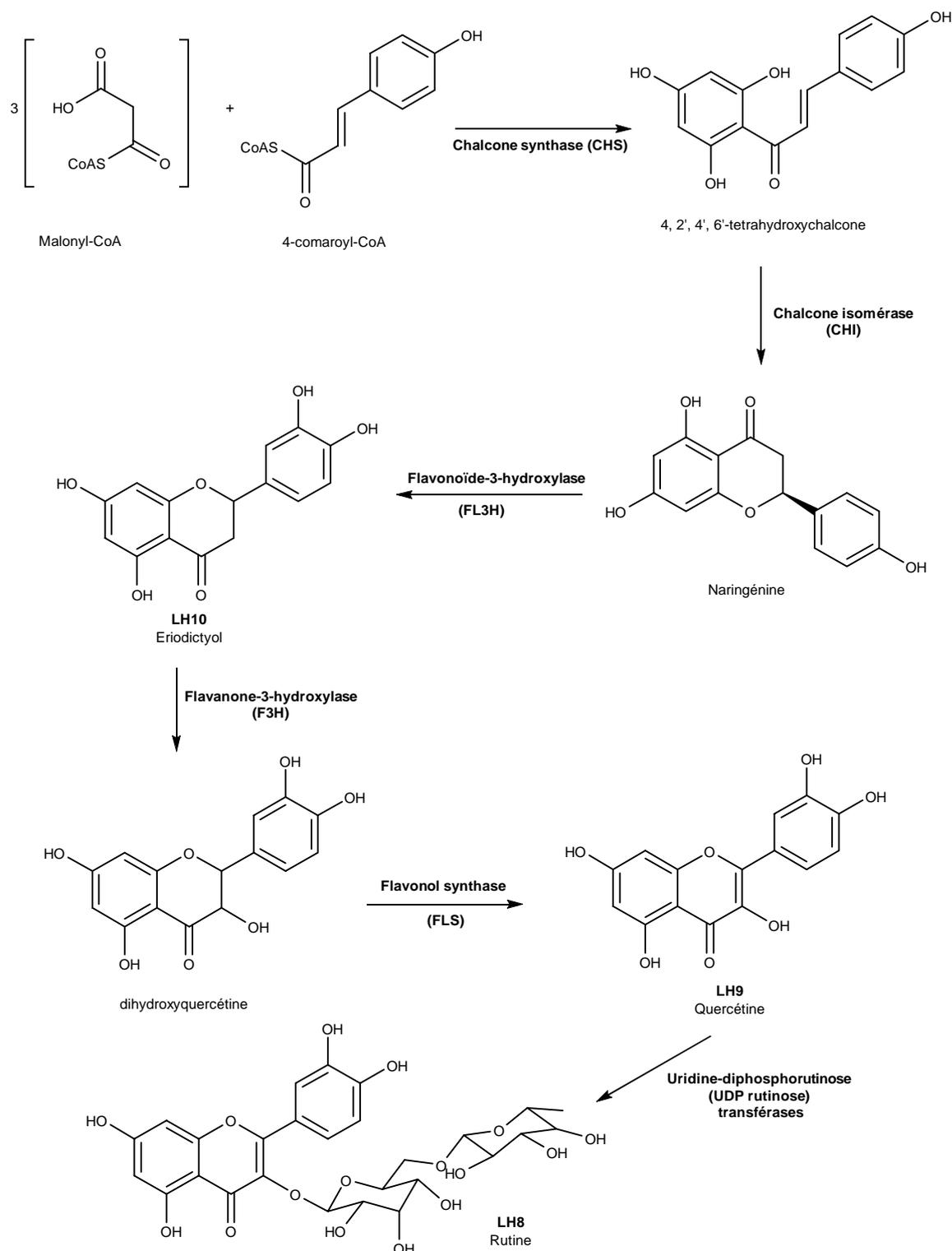


Schéma 28- Biosynthèse de quelques flavonoïdes isolés (Bruneton, 2009 ; Erlund, 2004)

II.2.12. Importance chimiotaxonomique

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que *T. contorta* est une source d'autres classes de métabolites secondaires en dehors des alcaloïdes indoliques (type sapargine) qui constituent les marqueurs de cette plante (Ndongo et *al.*, 2017; Melacheu et *al.*, 2019). Ainsi, la classe des cérébrosides isolés au cours de cette étude est identifiée dans l'espèce *T. contorta* et du genre *Tabernaemontana* pour la première fois. De même plusieurs triterpènes de type ursane et différentes de ceux isolés par Melacheu et *al.* (2019) ont été obtenus. Ceci implique le fait que l'espèce *Tabernaemontana contorta* pourrait aussi être considéré comme une source de triterpènes de la classe des ursanes et des glycoscéramides.

Par ailleurs, les néolignanes, sesquilignanes, coumarines et acides phénoliques ont été isolés en tant que principaux constituants du genre *Landolphia* (Mireku et *al.*, 2017; Tochukwu et *al.*, 2016). Ces classes de composés sont isolées pour la première fois de *L. lucida*. Il s'agit ici du premier rapport sur les structures des flavonoïdes et triterpènes du genre *Landolphia*.

Enfin, les travaux phytochimiques antérieures ont permis d'isoler plusieurs alcaloïdes indoliques dans les fruits et les écorces des racines de *H. barteri* (Ogunlana et Ramstad, 1975; Naranjo et Schmid, 1972). Cependant l'isolement de cette classe de composés pour la première fois dans les tiges de cette plante vient sans doute confirmer cette plante comme étant principalement constituée des alcaloïdes indoliques (notamment les bis indoles) de type ibogane. Ainsi, la voacangine (**2**) et la voacamine (**62**) peuvent être considérées comme principaux marqueurs de cette plante car elles se retrouvent isoler dans toutes ses parties.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Cette étude avait pour objectif la recherche de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique. Sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle et à l'aide de méthodes de criblage chimique et biologique, des extraits de plantes camerounaises provenant de trois espèces différentes dont *Tabernaemontana contorta*, *Landolphia lucida* et *Hedranthera barteri* (Apocynaceae) ont été évaluées. Ainsi, une investigation phytochimique des extraits à l'acétate d'éthyle des lianes de *Landolphia lucida* et des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* ainsi que de la fraction alcaloïdique de *Hedranthera barteri* a conduit à l'isolement et à la caractérisation de 29 composés dont 7 sont nouveaux. L'analyse structurale des composés isolés a été faite grâce aux techniques de spectrométrie de masse, de résonance magnétique nucléaire 1D et 2D les plus récentes et des données de la littérature.

L'étude de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* a permis d'isoler 12 composés indexés de **TC1** à **TC12** (**64 - 75**) parmi lesquels : trois cérébrosides nouvelles (contortamide (**64**), tabernamide A (**65**) et tabernamide B (**66**)), quatre alcaloïdes indoliques de type sarpagine et cinq triterpènes.

L'extrait à l'acétate d'éthyle des lianes de *Landolphia lucida* a permis d'isoler 12 métabolites secondaires indexés de **LH1** à **LH12** (**76 - 87**): deux triterpènes pentacycliques de type lupane dont un dérivé nouveau (la (3-O-β-(E)-(4'-O-acetylferuloyl)lupéol (**77**)), un nouveau stéroïde anabolique (le dipropionate de méthandryle (**78**)), une nouvelle lignane (la 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy benzyl) dimethyl succinate (**76**)), un acide phénolique (**89**), une coumarine simple (la scopolétine (**81**)), une nouvelle bicoumarine (la 7,7'-diméthoxy-6,6'-dicoumarinyl ether (**80**)) et cinq flavonoïdes (la quercitrine (**82**), la rutine (**20**), la quercétine (**83**), l'ériodictyol (**84**) et la 3', 4', 5- trihydroxyflavone (**85**)). Tous ces composés sont ici identifiés pour la première fois de l'espèce *L. lucida* K. Schum.

La fraction alcaloïdique issue des tiges de *Hedranthera barteri* a conduit à l'isolement de cinq alcaloïdes connus indexés de **HB1** à **HB2** parmi lesquels deux indoles (la voacangine (**2**) et la voacristine (**4**)), deux bis indoles (la voacamine (**62**) et la voacorine (**88**)), et la piperine (**87**). Les quatre premiers alcaloïdes sont tous de type ibogane.

L'évaluation des activités biologiques sur les composés et extraits a permis de voir que **TC2** (tabernamide A (**65**)) et **TC3** (tabernamide B (**66**)) ont présenté une bonne activité antibactérienne sur la souche *Escherichia coli* (ATCC 25922) tandis **TC1** (contortamide (**64**)) a été actif sur les cellules cancéreuses du colon humain (Caco2). Cependant l'extrait en lui-même n'a présenté aucune activité, ceci pouvant s'expliquer par la présence en quantité minimale des composés responsables des différentes activités. De même, les composés **LH2**

(la (3-*O*- β -(*E*)-(4'-*O*-acetylferuloyl)lupéol (**77**)) et **LH5** (la 7,7'-diméthoxy-6,6'-dicoumarinyl éther (**80**)) ont montré une bonne activité antibactérienne sur *Escherichia coli* (ATCC 25922). Ce qui amène à penser que ces derniers sont responsables de l'activité antibactérienne de la fraction à l'acétate d'éthyle observée lors du screening biologique. Cependant, les composés **LH1** (2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy benzyl) diméthyl succinate (**76**)) et **LH4** (3-*O*- β -(*E*)-feruloyllupéol (**79**)) ont montré une activité antidiabétique modérée à travers les tests antiglycation et α -glucosidase. Ces composés possédant des propriétés combinées d'antiglycation et inhibiteurs de α -glucosidase seraient donc en partie responsables de l'activité antioxydante de l'extrait observée à 0,5 mg/mL, comparée au contrôle positif (N-Acetyl-L-Cystéine) avec des valeurs de CI_{50} de $0,0534 \pm 0,0015$ et $0,0141 \pm 0,0001$ mg/mL respectivement.

Les techniques couplées UPLC, LC-MS/MS utilisées dans cette étude ont permis à chaque fois de confirmer la présence des composés purs obtenus dans les extraits de départ. Ceci qui est un apport dans le domaine de la recherche phytochimique et les applications futures dans le domaine de dérégulation d'extraits bruts, une procédure utilisée en phytochimie pour éviter de ré-isoler des produits connus. En effet, ces techniques permettent de sauvegarder les espèces menacées de disparition en travaillant avec de très faibles quantités de matériel végétal.

Une évaluation de la toxicité des extraits à l'acétate d'éthyle: des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* ainsi que des lianes de *Landolphia lucida* a été faite grâce au test de cytotoxicité du brineshrimp. Au vu du résultat obtenu, nous pouvons dire que les différents extraits de *T. contorta* et de *L. lucida* ne sont pas toxiques pour l'organisme.

Afin de promouvoir la pharmacopée traditionnelle, nous envisageons :

- Continuer l'évaluation des activités antibactérienne (sur *E. coli*) et anticancéreuse sur les composés qui n'ont pas subi de tests afin d'identifier ceux qui pourraient mieux agir dans la prévention du cancer du côlon humain.
- Effectuer des tests *in vivo* sur les composés qui ont présenté l'activité antidiabétique ; et préparer l'extrait aqueux de *L. lucida* qui sera aussi soumis au test antidiabétique *in vivo* afin de voir si cette plante peut être utilisée en pharmacopée camerounaise en tant qu'agent antidiabétique. Ceci pourrait réduire le taux de risque de développement de cancer colorectal chez les patients diabétiques.
- Finir l'étude phytochimique des autres fractions de *L. lucida* ainsi que des autres parties de cette plante afin de voir si d'autres classes de métabolites secondaires y sont présentes.
- Evaluer l'activité anticancéreuse (*in vitro* et *in vivo*) du côlon sur tous les composés antimicrobiens et antidiabétiques afin de voir s'ils peuvent aussi agir directement sur le cancer du côlon et être utilisés comme agents anticancéreux.

CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES

III.1. Matériel végétal et extraction

III.1.1. Récolte

Les écorces du tronc de *T. contorta* et les lianes de *Landolphia lucida* K. Schum. (Apocynaceae) ont été récoltées au Mont Kalla (Nkolbison, à 8 km de la ville de Yaoundé) dans la région du centre en janvier 2017 et identifiées taxonomiquement par M. Victor Nana (botaniste à l'herbier national, Yaoundé, Cameroun). Des échantillons de référence se trouvent à l'Herbier National de Yaoundé-Cameroun (N° 43440/HNC et 64532/HNC, respectivement).

Les tiges de *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon (Apocynaceae) ont été récoltées à 8 km de la ville de Kribi dans la Région du Sud Cameroun en Mai 2016, et identifiées par M. Victor Nana (Botaniste à l'Herbier National, Yaoundé, Cameroun). Un spécimen de référence (N ° 32918/HNC) se trouve déposé à l'herbier national de Yaoundé- Cameroun.

III.1.2. Séchage et broyage

Le matériel végétal a été découpé, séché à l'air libre pendant 2 à 3 semaines. Les plantes ont été ensuite broyées finement pour être soumises à des extractions.

III.1.3. Extraction et isolement

L'extraction a été faite à température ambiante en agitant le mélange pendant 48 heures environ, dans un volume de solvant approprié (MeOH). Cette opération a été répétée trois fois pour chaque solvant. Les quantités des extractions des deux plantes investiguées sont indiquées pour chaque plante au chapitre des résultats (chapitre 2). Après filtration, évaporation du solvant les extraits bruts obtenus sont ensuite dissouts partiellement dans l'eau distillée, puis partitionnés avec l'hexane et l'acétate d'éthyle.

III.1.3.1. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique permet d'identifier les différentes familles de composés présentes dans les extraits. Il a été réalisé par la méthode décrite par Harborne (1998) et Sofowora (1993).

***Test des phénols**

3 mL d'une solution de chlorure ferrique 5% fraîchement préparée pendant 5 min est ajoutée à 0,5 g d'extrait dissout dans 2 mL d'eau. Après homogénéisation, quelques gouttes d'une solution de ferricyanure de potassium sont ajoutées. L'observation d'un précipité vert indique un test positif et révèle la présence de ces composés.

***Test des flavonoïdes**

A une solution alcoolique contenant 1 mg de produit à analyser, on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes se manifeste par une effervescence suivie d'un changement de couleur de la solution passant au rose ou au pourpre (Shinoda, 1928).

***Test des alcaloïdes**

500 mg d'extrait sont chauffés dans 10 mL d'acide sulfurique 1% pendant 2 à 3 min, puis filtré. À 1 mL du filtrat, on ajoute quelques gouttes du réactif de Mayer. L'obtention d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

***Test des triterpènes et des stéroïdes**

50 mg d'extrait sont dissouts dans 20 mL de chlorure de méthylène. A cette solution, on ajoute successivement 4 gouttes d'anhydride acétique et de l'acide sulfurique. La présence des triterpènes se manifeste par un changement de la couleur rouge violacée, alors que la couleur bleue verdâtre est caractéristique des stéroïdes.

***Test des coumarines**

1 g de poudre végétale est placé dans un tube, en présence de quelques gouttes d'eau. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV (Rizk, 1982).

III.1.3.2. Extraction et isolement des composés des écorces du tonc de *Tabernaemontana contorta*

Les écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* Stapf ont été découpées, séchées à l'air libre puis broyées finement. La poudre obtenue (1,4 kg) a été extraite au MeOH à froid sous agitation pendant 48 heures. L'extrait brut (163 g) a été dissout partiellement dans 500 mL d'eau distillée et partitionné avec 500 mL d'hexane et 500 mL d'acétate d'éthyle. Après concentration et évaporation des différents solvants, les phases organiques ont donné 12,7 et 72,8 g d'extraits respectivement. La phase aqueuse a été évaporée et séchée pour donner 30,4 g de résidu. L'extrait à l'acétate d'éthyle (72,8 g) a été soumis à des fractionnements par chromatographie sur colonne (CC) sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH de polarité croissante) pour donner huit fractions A-H sur la base des profils obtenus par chromatographie sur couche mince : A (CH₂Cl₂:MeOH, 50:1; 3,8 g), B (CH₂Cl₂:MeOH, 40:1; 19,2 g), C (CH₂Cl₂/MeOH,

35:1; 6,2 g), D (CH₂Cl₂:MeOH, 30:1; 3,4 g), E (CH₂Cl₂:MeOH, 25:1; 5,7 g), F (CH₂Cl₂:MeOH, 20:1; 6,3 g), G (CH₂Cl₂:MeOH, 10:1; 2,6 g) et H (CH₂Cl₂:MeOH, 1:1; 9,4 g). La fraction B (19,2 g) a été soumise à une CC répétitive sur gel de silice avec CH₂Cl₂/MeOH (0 à 20%) comme solvant d'élution pour donner 7 sous-fractions (B₁ – B₇). La sous fraction B₁ (8,1 g) a été chromatographiée sur une colonne de gel avec CH₂Cl₂/MeOH (30:1) comme solvant d'élution pour donner 7 mg d'acide-2 α , 3 α , 23-trihydroxyursa-12, 20(30)-dien-28-oïque (TC8), 5 mg d'acide-2 α , 3 β , 23-trihydroxyursa-12, 5(6)-dien-28-oïque (TC9) et 10 mg d'acétate de bauerenyl (TC10). Par la suite, la sous-fraction B₂ (6,2 g) a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice (32–40 μ m) avec Hex/AcOEt (1 à 50%) comme phase mobile pour donner 7 mg d'affinisine (TC7), 6 mg de spégatine (TC4), 4,5 mg de tombozine (TC5), 4,3 mg d' α -amyrine (TC11) et 4 mg d'acide bétulinique (TC12). Une purification supplémentaire de la sous-fraction B₇ (600 mg) a été effectuée sur une colonne de gel avec CH₂Cl₂/MeOH (20 : 1) comme solvant d'élution pour donner 5,5 mg de contortamide (TC1), 3,4 mg de tabernamide A (TC2), 5,2 mg de tabernamide B (TC7) et 3,3 mg de N_b-méthyl affinisine (TC6).

III.1.3.3. Extraction et isolement des composés des lianes de *Landolphia lucida*

Des lianes de *Landolphia lucida* ont été séchées et broyées. La poudre obtenue (3,8 kg) a été extraite au MeOH à froid sous agitation pendant 48 heures et concentrée à sec dans un évaporateur rotatif à 40 ° C pour obtenir l'extrait brut (112,8 g). Cet extrait a été dissout dans de l'eau et partitionné avec du n-hexane (2 x 2 L), du CH₂Cl₂ (2 x 2 L) et de l'EtOAc (3 x 2 L), respectivement. L'extrait à l'EtOAc (35,8 g) a été séparé en quatre fractions (LHI – LHIV) par chromatographie sur colonne de gel de silice (70-230 mesh; Merck), élué avec un système de solvant CH₂Cl₂/MeOH à polarité croissante (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:35, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 0:100, v/v). La fraction LH-I (1,5 g) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice et éluee avec le système Hex-EtOAc (10 - 15%) pour donner 8 mg de 3-O- β -(E)-(4'-O-acetylferuloyl)lupéol (LH2) et 3 mg de 3 β -(E)-feruloyllupeol (LH4). La fraction LH-II (9,3 g) a été séparée en deux sous-fractions (LH-IIa – LH-IIb) par chromatographie sur colonne sur gel de silice (70-230 mesh; Merck), et éluee au CH₂Cl₂/MeOH (10%). La sous-fraction LH-IIa (100 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 et éluee au MeOH/CH₂Cl₂ (30%) pour donner 7 mg de méthandriol dipropionate (LH3) et 4 mg d'acide isovanollique (LH12). La sous-fraction LH-IIb (40 mg) a été séparée par HPLC préparative en phase normale (en utilisant le système Hex/EtOAc, 40:60, débit = 4 mL/min), ce qui a donné 6 mg de scopolétine (LH6) et 5 mg de 7,7'-diméthoxy-6,6'-dicoumarinyl éther (LH5) à des temps de rétention t_R = 36 et 40 min, respectivement. La

fraction LH-IV (2,1 g) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice (70-230 mesh; Merck) et éluée avec le CH₂Cl₂/MeOH: (10:1, 5:1) pour donner 5 mg de 2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy-benzyl) diméthyl succinate (**LH1**) et 10 mg de quercitrine (**LH7**). La fraction LH-V (10,6 g) a été purifiée par HPLC préparative en phase inverse (en utilisant pour système MeOH/H₂O, 50/50, débit = 5 mL/min ; t_R = 10 min, 18 min, 35 min et 40 min) pour donner 5,6 mg de rutine (**LH8**), 5 mg de quercétine (**LH9**), 7 mg d'ériodictyol (**LH10**) et 9 mg de 3', 4', 5- trihydroxyflavone (**LH11**), respectivement.

III.1.3.4. Extraction et isolement des composés des tiges de *Hedranthera barteri*

Les tiges de *Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon ont été découpées, séchées à l'air libre puis broyées. La poudre obtenue (2,6 kg) a été extraite au MeOH à froid sous agitation pendant 48 heures. L'extrait brut (70 g) a été dissout dans l'acétate d'éthyle et une solution aqueuse de HCl (5%) dans la proportion 1:9 (1mL de HCl dans 9 mL d'eau distillée) a été ajoutée progressivement. La solution précédente obtenue a été introduite dans une ampoule à décanter et l'AcOEt a été ajoutée pour séparer la phase organique (mélange de composés organiques) de la phase aqueuse (solution ionique d'alcaloïdes) à travers cinq extractions répétitives. La phase aqueuse a été ensuite introduite dans un grand erlen meyer, puis la solution d'hydrogencarbonate de sodium (33 g de NaHCO₃ dans 100 mL d'eau distillée) a été progressivement et délicatement ajoutée. Le nouveau mélange (phase organique + NaHCO₃) alcalin (PH = 7-8) obtenu a été transféré dans l'ampoule à décanter et deux phases ont été obtenues : la phase alcaloïdique au-dessus et la phase aqueuse en dessous. La phase alcaloïdique a été extraite plusieurs fois à l'AcOEt et concentrée à sec dans un évaporateur rotatif à 40 ° C pour obtenir l'extrait brut alcaloïdique (20 g). Cet extrait a été fractionné en trois (HB-I – HB-III) par chromatographie sur colonne de gel de silice (70-230 mesh; Merck), et élué avec un système de solvant CH₂Cl₂/MeOH à polarité croissante ((30/1; 20/1; 10/1). La fraction HB-I (4,5 g) a été séparée en deux sous-fractions (HB-Ia – HB-Ib) par chromatographie sur colonne sur gel de silice (70-230 mesh; Merck), et éluée au CH₂Cl₂/MeOH (10/1 ; 5/1). Les deux sous-fractions HB-Ia (60 mg) et HB-Ib (80 mg) ont été soumises à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 et éluée au MeOH (100%) pour donner 8 mg de voacangine (**HB2**), 7 mg de voacristine (**HB1**) et 4 mg de voacorine (**HB5**). La fraction HB-II (2,3 g) a subi une purification sur une colonne de gel de silice avec CH₂Cl₂/MeOH (10:1) comme solvant d'éluion pour donner 8 mg de voacamine (**HB4**). Enfin, la fraction HB-III (300 mg) a été purifiée par chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 et éluée au MeOH (100%) pour donner 7 mg de piperine (**HB3**).

III.2. Méthodes chromatographiques analytiques

III.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses sur couche mince (CCM) ont été réalisées, pour la majorité, à l'aide de plaques de silicagel 60 F₂₅₄ sur feuille d'aluminium (*Merck*), ce qui constitue la phase stationnaire. Ces plaques sont ensuite plongées dans des cuves chromatographiques, remplies à environ 0,5 cm avec une phase mobile, qui peut être généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée.

Après son développement, la plaque CCM est observée à la fluorescence UV (254 et 366 nm) et après dérivatisation chimique avec l'un des réactifs chimiques en solution afin de mettre en évidence des constituants ou classes de constituants présents dans l'extrait brut. Ainsi, les réactifs utilisés pour le présent travail sont les suivants:

- **Anisaldéhyde:** Détection des sapogénines, des huiles essentielles, des stéroïdes des carbohydrates, des glycosides, des phénols antioxydants et des antibiotiques

Préparer 3,7 mL de p-anisaldéhyde, 1,5 mL d'acide acétique glacial, 5mL d'acide sulfurique concentré est ajouté à 135 mL d'éthanol absolu. Vaporiser ensuite le mélange sur la plaque puis chauffer.

- **Réactif de Dragendorff:** détection des alcaloïdes

Préparer une solution composée de 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'acide tartrique dans 40 mL d'eau (= A) et une solution contenant 16 g de KI dans 40 mL d'eau (= B). Mélanger extemporanément 5 mL de A, 5 mL de B, 100 mL d'eau et 20 g d'acide tartrique. Vaporiser le mélange sur la plaque. Les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orange (Wagner et Bladt, 1996).

III.2.2. Chromatographie liquide ultraperformance (UPLC)

Le système UPLC utilisé se compose d'un système de solvants binaires, d'un gestionnaire d'échantillons, d'un gestionnaire de colonnes et d'un détecteur.

Après dissolution de nos deux extraits de plantes (fractions à l'AcOEt) dans le méthanol, les profils UPLC ont été obtenus en utilisant les caractéristiques suivantes:

Tableau 38- Caractéristiques de l'appareillage UPLC utilisé

Caractéristiques	Extrait à l'AcOEt de <i>T. contorta</i>	Extrait à l'AcOEt de <i>L. lucida</i>
Colonne	ODS C-18 H-80 (6,0x250mm)	ODS C-18 H-80 (6,0x250mm)
	4 µm 80A	4 µm 80A
Taille des particules	moins de 2 µm	moins de 2 µm
Débit	0,6 mL/min	0,6 mL/min
Solvant de lavage de la colonne	Méthanol	Méthanol
Volume injecté	5 µL	5 µL
Température de la colonne	65 °C	65 °C
Pression maximale	103,5 Mpa	103,5 Mpa
Systèmes d'élution (MeOH/H ₂ O)	(95:5), (90:10), (80:20), (70:30), (60:40), (50:50), (40:60), (30:70), (20:80)	(95:5), (90:10), (80:20), (70:30), (60:40), (50:50), (40:60), (30:70), (20:80)
Durée totale d'exécution	20 min	20 min
Consommation totale de solvant (y compris 0,5 min de délai entre les injections)	MeOH : 7,0 mL Eau : 8,8 mL	MeOH : 7,0 mL Eau : 8,8 mL
Longueurs d'onde utilisées	210, 230 et 254 nm	210, 230, 254 et 366 nm
Concentration de l'extrait	0,1 mg/mL	0,1 mg/mL

III.2.3. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Les analyses LC-MS/MS ont été effectuées sur l'appareil 7890A LC-MS/MS Triple Quad system (Agilent technologies) constitué des éléments suivants :

- Un Système HPLC Agilent 1100 muni d'une pompe quaternaire, d'un autosampler et d'un détecteur UV à barrettes de diodes.
- Un Spectromètre de masse à triple quadripôle Thermo TSQ Quantum Ultra Triple Quad LC/MS/MS équipé d'une interface d'ionisation electrospray (HESI II Source) et contrôlé par le logiciel Qualitative Analysis B.06.00.

Les extraits à l'AcOEt de *Tabernaemontana contorta* et de *Landolphia lucida* ont été injectés sur une colonne HPLC C₁₈ Symetry (Waters) (3,5 µm, 75 x 4,6 mm). Les séparations ont été menées à température ambiante avec une phase mobile constituée de deux solvants eau-acide formique 0,1% (A) et acétonitrile (B) dans les conditions suivantes : de 0 à 35 min, 13% B pendant 35 min, puis en 2 min un gradient linéaire de 13 à 20% B, 20% de B pendant 8 min, puis en 2 min un gradient linéaire de 20 à 100% B, enfin, retour aux conditions initiales (13% B) en une minute pour rééquilibrer la colonne avant une nouvelle injection.

Pour toutes les analyses, les solvants utilisés sont de qualité HPLC (SDS, Peypin), le débit était réglé à 0,7 mL/min, et la longueur d'onde de mesure fixée à 260 nm. Le volume d'injection variait entre 20 et 100 µL en fonction de composé ou de l'extrait injecté.

III.3. Méthodes chromatographiques préparatives

III.3.1. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mis en œuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

Pour les chromatographies d'adsorption, la phase stationnaire utilisée était la silice en phase normale (70–230 mesh; Merck). L'élution a été réalisée par simple gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide.

Les chromatographies d'exclusion ont été réalisées sur gel de Sephadex® LH20 et la phase mobile était le MeOH ou le MeOH/CH₂Cl₂ (30%). Les fractions recueillies ont été regroupées selon les résultats de l'analyse par CC

III.3.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

L'analyse GC-MS a été faite sur l'appareil GC-MS 7000 A TRIPLE QUAD (Agilent technologies) fonctionnant sous une fréquence de 50 Hz. La colonne utilisée est de type OPTIMA 5MS (30 m x 0,25 µm) avec une température maximale de 340 °C.

Avant injection, la température dans la colonne était de 50 °C, sous une pression de 9,05 psi, un débit de 1,129 mL/min, une vitesse moyenne de 38,724 cm/sec, un temps de rétention de 1,2912 min et un délai de pré-injection de 500 ms.

3 µL des produits de méthanolyse des composés **TC2** et **TC3** dissoutes dans le chloroforme, ont été injectés en utilisant une seringue de 10 µL et avec une vitesse d'injection de 50 µL/s. La température finale de la colonne était de 260 °C, sous une pression de 9,05 psi, le débit total d'écoulement de 26,709 mL/min, le débit de purge de 3 mL/min, le débit de l'économiseur de gaz de 20 mL/min après 2 min. La durée totale de chaque analyse a été de 68 min.

III.3.3. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

La HPLC préparative a été effectuée par des instruments analytiques japonais (Japan Analytical Industry Co. Ltd, Tokyo, Japan) équipés d'un détecteur UV et d'un détecteur IR (RI-5).

➤ En phase normale on a :

Instrument: LC-908W Recycling Preparative HPLC (Japan Analytical Industry Co., Ltd.).

Colonne : sil-d-60-80A (250 × 20 mm, 4 μm)

Solvant : élution isocratique par Hex/EtOAc (40:60)

Débit d'élution : 4 mL/min

Concentration de l'échantillon : 8,33 mg/mL

Longueur d'onde sélectionnée : 254 nm

Les composés **LH6** et **LH5** ont été obtenus à des temps de rétention $t_R = 36$ et 40 min, respectivement.

➤ En phase inverse on a :

Instrument: LC-908W-C-60 Recycling Preparative HPLC (Japan Analytical Industry Co., Ltd.)

Colonne : ODS H-80 (250 × 20 mm, 4 μm)

Solvant : élution isocratique par MeOH/H₂O (50:50)

Débit d'élution : 5 mL/min

Concentration de l'échantillon : 8,33 mg/mL

Longueur d'onde sélectionnée : 254 nm

Les composés **LH8**, **LH9**, **LH10** et **LH11** ont été obtenus à des temps de rétention $t_R = 10$ min, 18 min, 35 min et 40 min respectivement.

III.4. Méthodes physico-chimiques

III.4.1. Mesure du point de fusion (P. F)

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil à plaque chauffante de type Buchi-M560. Les valeurs ont été relevées après observation du changement d'état au microscope et n'ont pas été corrigées.

III.4.2. Mesure du pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des molécules isolées a été mesuré sur un polarimètre digital automatique de type P2000 (N° de série = A060061232), à la longueur d'onde de la raie WI du sodium ($\lambda = 589$ nm) comme source lumineuse et dans une cuve de 10 cm à température ambiante. La valeur de $[\alpha]_D^{25}$, exprimée en degrés, a été calculée au moyen de la formule suivante:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha \times 1000}{C \times l}$$

α : angle de rotation en degrés lu sur le polarimètre

C: concentration de la solution mesurée en g/l.

l: longueur de la cuve de mesure en dm

Dans la partie **III.6**, les concentrations se rapportant aux mesures polarimétriques sont exprimées par convention en 100 g/mL.

III.4.3. Spectroscopie ultraviolet (UV)

Les spectres U.V. des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type Hitachi U-3200, double faisceau permettant des lectures directes contre témoin. Les mesures se font dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm. Les résultats obtenus sont présentés dans la partie III.6 sous la forme: λ_{\max} nm ($\log \varepsilon$), où λ_{\max} nm représente les longueurs d'onde des maxima en nm ; ε est l'absorbance molaire à ces longueurs d'onde. En effet, une radiation monochromatique de longueur d'onde fixe traverse un échantillon d'épaisseur l , l'absorbance vérifie la loi de beer-lambert, soit : $A = \varepsilon lc$

Avec :

A : absorbance

ε : le coefficient d'absorption molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$

l : la largeur de cuve en cm

c : la concentration de la solution en mol/L

III.4.4. Spectroscopie infra-rouge (IR)

Les spectres infra-rouge des molécules ont été réalisés au moyen des spectrophotomètres FT-IR Tensor 27 (Bruker) et Shimadzu 8900 FT-IR sur une lame de AgCl et dans des pastilles de KBr respectivement.

Pour cela, une quantité de 1 mg d'échantillon a été mélangée à 100 mg de KBr (qualité IR). La pastille a été obtenue à l'aide d'une presse Shimadzu 8900FT-IR. Le balayage des nombres d'onde a été fait entre 4000 et 600 cm^{-1} sur une durée de 20 minutes.

D'autre part 1 mg d'échantillon a été dissoute dans le CH_2Cl_2 et déposé sur une lame de AgCl et introduite dans le spectrophotomètre FT-IR Tensor 27. Le balayage des nombres d'onde a été fait entre 4000 et 600 cm^{-1} sur une durée de 5 minutes.

III.4.5. Spectroscopie par dichroïsme circulaire (CD)

Les spectres CD ont été mesurés sur un spectropolarimètre de type JASCO J-810.

III.4.6. Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse des produits purs isolés ont été obtenus par plusieurs modes d'ionisation.

➤ Ionisation par Electrospray (Electro Spray Ionisation) ESI

D'une part, les spectres ESI ont été enregistrés sur un spectromètre de masse MicroTOF-Q (Bruker) utilisant l'ion sodium comme contre ion et contrôlé par le logiciel Analyst (Agilent,

version 1.3.1). D'autre part Les données ESI-MS ont été obtenues sur un spectromètre à piège à ions (Amazon Speed, Bruker, Germany) en modes positifs et négatifs.

➤ Impact Electronique (Electronic Impact) EI

Les spectres de masse en EI ont été réalisés sur un spectromètre JEOL JMS-600H avec un champ de 70 eV.

➤ Spectrométrie de masse haute résolution

Les spectres de masse de haute résolution ont été enregistrés en electrospray sur un appareil JEOL JMS-600H.

➤ Spectrométrie de masse par bombardement atomique rapide (FAB-MS)

Les spectres de masse en EI ont été réalisés sur un spectromètre JEOL JMS-600H.

Ces analyses ont été menées d'une part par Albert Ruggi du Département de chimie (Faculté des sciences et de médecine, Université de Fribourg, Suisse), et d'autre part par Afshan Iqbal et Junaid ul Haq du Centre Internationales des Sciences Chimiques et Biologiques (ICCBS) de l'université de Karachi (Pakistan).

III.4.7. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Université de Fribourg et de ICCBS sur des appareils de type Brüker AM400 FTNMR (fréquences de 400 (^1H) et 100 MHz (^{13}C)), Brüker Avance 500 (fréquences de 500 (^1H) et 125 MHz (^{13}C)), Brüker Avance-600 avec cryosonde (fréquences de 600 (^1H) et 150 MHz (^{13}C)) ou Brüker AV-III-HD 800 avec cryosonde (fréquences de 800 (^1H) et 200 MHz (^{13}C)) selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés méthanol- d_4 , acétone- d_6 et chloroforme- d dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Les programmes de séquences impulsionnelles standard fournies par Brüker ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, NOESY, HSQC et HMBC.

Corrélations homonucléaires

- COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

- NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$): cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

Corrélations hétéronucléaires

- HSQC ($^1J_{H-C}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.

- HMBC ($^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$) : cette technique permet la détection des couplages longue distance $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$.

III.5. Méthodes biologiques

III.5.1. Tests antimicrobiens par méthode standard de micro dilution (MABA)

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée en triple essai, selon la méthode de micro dilution standard (Rahman, 2001), et exprimée en concentration minimale inhibitrice (CMI), par rapport à l'antibiotique ofloxacin (contrôle positif). Une solution mère de 3000 $\mu\text{g/mL}$ des extraits et de 4 mg/mL des composés purs a été préparée dans du DMSO à 100% et diluée en série dans du bouillon Mueller Hinton (MHB) à des concentrations sur plaque à 96 puits entre 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 ; 3,125 ; 1,56 $\mu\text{g/mL}$, de sorte que le volume final devienne 100 μL (composé et milieu). Des souches *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 23857), *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) et *Salmonella typhi* (ATCC 14028) à pleine croissance ont été diluées tour à tour 1000 fois dans le milieu MHB et 100 μL de ce milieu bactérien dilué ont été ajoutés à tous les puits précédents, de sorte que le volume final (200 μL) contiendrait une charge bactérienne d'environ 0,5 à 1,0 $\times 10^6$ UFC/mL. Le contrôle positif ne contenait que des milieux MHB et des bactéries. Chaque concentration a été exécutée en trois essais. Les plaques ont été scellées et incubées à 37 °C pendant 18 à 22 h. Le lendemain, tous les puits ont été visuellement vérifiés pour confirmer la croissance des bactéries. Peu de temps après avoir remarqué les puits clairs et troubles, 20 μL de colorant bleu Alamar 0,02% (Alfa Aesar) ont été ajoutés dans chaque puits et incubés dans un incubateur à agitation à 80 tr/min et à 37 °C pendant 2 h. Le changement de couleur du colorant Alamar du bleu au rose indique la croissance de souches bactériennes. Pour une analyse quantitative, l'absorbance a été enregistrée à 570 et 600 nm dans le spectrophotomètre Multiskan TM GO (ThermoScientific, USA). La différence en pourcentage dans la réduction du bleu Alamar entre les cellules traitées et les cellules témoins a été calculée en utilisant la formule indiquée par Lancaster (Lancaster et Fields, 1996).

➤ Analyse par microscopie à force atomique

Des bactéries complètement développées (*Escherichia coli* ATCC 25922) ont été diluées et ajustées à 2,5 $\times 10^7$ UFC/ml dans du MHB. Ces cellules ont été traitées avec **LH2**, **LH5**, **TC2** et **TC3** à la concentration de 4 $\mu\text{g/mL}$ d'échantillon et incubées à 37 °C pendant 2

h. Après incubation, les cellules ont été centrifugées (3500 tr/min pendant 5 min) et les culots formés ont été lavés deux fois avec de l'eau de qualité analytique. Un contrôle positif non traité et des cellules bactériennes traitées dans un volume de 5 μ L ont été appliqués sur une surface de plaquette de silicium revêtue de poly-L-lysine et séchés à température ambiante. Une analyse par microscopie à force atomique (AFM) a été réalisée (Agilent Technologies 5500) en mode taraudage avec un cantilever en nitrure de silicium. La topographie 3D et ses images pseudo-couleurs respectives ont été obtenues après chaque balayage, le logiciel PicoView 1.2 a été utilisé pour analyser ces images, et une autre structure morphologique du contrôle et des bactéries traitées a été évaluée.

III.5.2. Test de toxicité

L'activité cytotoxique contre *Artemia salina* a été réalisée selon la méthode mise au point par Rahman (2001) avec certaines modifications.

Pour réaliser ce test,

1- Eclosion des œufs

- Dissoudre 25g de NaCl dans 500 mL d'eau distillée
- Ajouter approximativement 400 mL de solution dans un récipient séparé en 2 compartiments dans le fond du récipient, laisser une petite ouverture entre les deux compartiments.
- Ajouter des œufs dans l'un des compartiments du récipient
- Eclairer ce compartiment avec une lampe
- Garder les laves en présence de la lumière à une T° ambiante de 37 °C pendant 24 heures.
- Après 24 heures il y a éclosion des œufs.

2- Préparation des extraits à différentes concentrations.

- Peser 2,5 mg ; 5 mg et 10 mg de chaque extrait puis dissoudre dans 1mL de MeOH.
- Evaporer complètement le MeOH dans chaque extrait puis ajouter 2 mL d'eau salée dans chaque flacon d'extraits.
- Introduire 30 laves de crevettes de saumure dans chaque flacon
- Incuber l'ensemble pendant 24 h à 36 °C

3- Préparation du contrôle positif et un contrôle négatif.

- Pour le contrôle positif, introduire 5 mL de méthanol dans un flacon puis évaporer complètement. Par la suite introduire 5 mL d'eau salée dans ce flacon.
- Pour le contrôle négatif, introduire 5 mL d'eau distillée dans un flacon.
- Introduire également 30 laves de crevettes de saumure dans chaque flacon.

- Incuber l'ensemble dans les mêmes conditions que précédemment c'est-à-dire pendant 24 heures.

4- Décompte des survivants.

- ❖ Verser le contenu de chaque tube sur une plaque en verre transparente
- ❖ Compter le nombre de survivants et de Décès a l'aide d'un microscope de dissection
- ❖ Calculer le pourcentage de survivants

III.5.3. Test de cytotoxicité *in vitro* contre les cellules cancéreuses du côlon humain Caco2 (ATCC® HTB37™)

➤ Evaluation de la cytotoxicité

Le test de cytotoxicité a été réalisé en utilisant le test MTT comme décrit précédemment par Rahman et *al.* (2001). En bref, lorsque les cellules ont atteint une confluence de 90% dans une plaque de microtitration, le milieu DMEM a été remplacé par un nouveau. Ensuite, 1 μ L de solution mère de chaque composé et extrait préparé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) a été dilué avec du milieu complet jusqu'à la concentration d'essai finale (200 μ g/mL) dans la plaque de microtitrage à 96 puits et incubé pendant 72 h. De plus, le milieu a été retiré et 200 μ L de solution de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (5 mg/mL, PBS, pH 7,2) (MTT, Sigma-Aldrich) incubé à 37 °C pendant 4 h. Ensuite, la solution ci-dessus a été doucement retirée et 100 μ L de DMSO ont été ajoutés dans chaque puits pour dissoudre les cristaux de formazan bleus pendant 5 min à 37 °C. Enfin, l'absorbance a été immédiatement lue à 570 nm en utilisant un lecteur de plaque d'essai biologique (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Les différents types d'échantillons suivants ont été inclus: blancs moyens (milieu de croissance sans cellules ni médicaments), blanc de médicament (milieu de croissance avec médicament mais pas de cellules), contrôle positif (cellules traitées avec un médicament standard, actinomycine-D), contrôle négatif (cellules non traitées plus milieu) et le milieu d'essai plus cellules plus composé d'essai ou extrait. Cette expérience a été réalisée en triple. Le pourcentage d'inhibition des composés a été déterminé par comparaison avec le témoin de croissance positif non traité. Toutes les données ont été compilées à partir d'un minimum de trois expériences. Les données pour l'analyse statistique ont été exprimées comme moyenne \pm SD (n), n (nombre d'expériences). L'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Dunnett, comme spécifié, a été effectuée à l'aide de GraphPad Prism version 7.00 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, Californie, États-Unis. La formule suivante a été utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition de la croissance:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left(\frac{(\text{Test well} - 0.1)}{(\text{Control well} - 0.1)} \right) \times 100$$

➤ Culture des cellules

L'American Type Culture Collection (ATCC) et une croissance dans un faucon Costar T75 stérile contenant du DMEM (Sigma-Aldrich), qui a été complétée avec du sérum bovin foetal (10%, v/v), 100 mg / ml de streptomycine, 100 U/mL de pénicilline G. L'incubation a été effectuée à 37 ° C dans une atmosphère à 5% de CO₂ avec 95% d'humidité. Après 75% à 80% de confluence, les cellules ont été retirées du ballon par traitement avec une solution de trypsine-EDTA (0,05%, Gibco). Une suspension de cellules viables de 5 x 10⁴ cellules /mL a été réalisée et ensemencée dans une plaque de microtitrage à 96 puits (SPL Life sciences Co., Ltd Corée) et incubée. La visualisation des cellules à chaque étape a été effectuée au microscope et enregistrée avec une caméra numérique (Austria-Micros, LIB-302).

III.5.4. Test antidiabétique

➤ Test antiglycation

Les études d'antiglycation ont été réalisées en utilisant un test spectrophotométrique basé sur ELISA, précédemment rapporté avec une légère modification. 20 µL des composés et 50 µL de HSA (10 mg/mL) ont été ajoutés pour préparer le mélange réactionnel. Ensuite, 50 µL de fructose (500 mM) et 80 µL de tampon phosphate (100 mM; pH 7,4) ont été ajoutés, et la plaque a été incubée à 37 °C pendant 7 jours. Du NaN₃ (3 mM) a été ajouté dans du tampon phosphate comme agent antimicrobien. Après 7 jours d'incubation, la fluorescence spécifique (excitation, 330 nm; émission, 440 nm) a été mesurée pour analyser l'activité antiglycation de l'échantillon test à l'aide d'un spectrofluoromètre à plaque de microtitrage (Spectra Max, Molecular Devices, CA, USA) (Wu et Yen, 2005). Le pourcentage d'inhibition de la formation d'AGE par l'échantillon d'essai par rapport au témoin a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{1 - \text{Fluorescence de l'échantillon testé}}{\text{Fluorescence du groupe de contrôle}} \times 100$$

La valeur IC₅₀ a été déterminée en surveillant l'effet de diverses concentrations (comprises entre 15 et 1 000 µM) des composés à tester. Les valeurs IC₅₀ ont été calculées en utilisant le programme EZ-FIT Enzyme Kinetics (Perrella Scientific Inc., Amherst, USA). L'activité antiglycation des composés a été comparée à la rutine, qui a été utilisée comme inhibiteur standard.

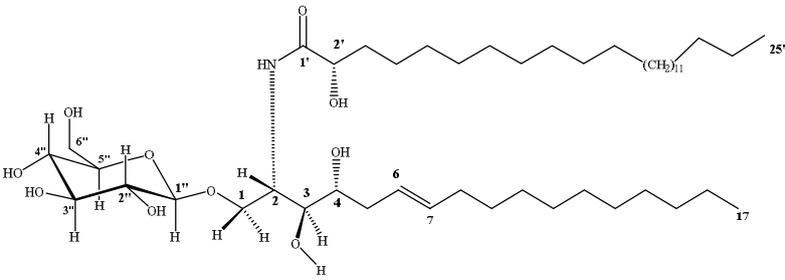
➤ Evaluation de l'activité inhibitrice de l'enzyme α -glucosidase

L'activité inhibitrice *in vitro* α -glucosidase a été réalisée en utilisant du tampon phosphate salin de pH (6,8). L'enzyme a été dissoute, dans du tampon PBS (1 U)/2 mL, 20 μ L/puits d'enzyme, 135 μ L/puits de tampon PBS, 20 μ L/puits de composés d'essai (0,5 mM) ont été ajoutés, dans 96 -Puits plaque et a été incubé à 37 ° C pendant 15 minutes. Après incubation du substrat, du p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside de concentration 0,7 mM a été ajouté et un changement d'absorbance a été enregistré à 400 nm pendant 30 minutes. 7% de DMSO a été utilisé comme témoin positif. L'acarbose a été utilisé comme référence standard.

Ces tests ont été réalisés au Centre Panjwani de médecine moléculaire et de recherche sur les médicaments (PCMD), Centre Internationale des Sciences Chimiques et Biologiques (ICCBS) de l'Université de Karachi, Pakistan.

III.6. Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

III.6.1. Composés isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces du tronc de *Tabernaemontana contorta* Stapf

Composé TC1	
Contortamide Poudre blanche amorphe Solubilité : Méthanol $C_{48}H_{93}O_{10}N$ Masse : 843 $[\alpha]_D^{25} : -27,5$ (c 0,020 ; $CHCl_3/MeOH$) CCM : $R_f = 0,70$ ($CH_2Cl_2/MeOH, 15 : 1$)	
HRESI-MS: m/z 866,67244 $[M+Na]^+$ IR (AgCl): 3393, 2953, 2851, 1727, 1631, 1321, 1299, 1079, 1034 cm^{-1} 1H -NMR ($CD_3OD, 400 MHz$) et ^{13}C -NMR ($CD_3OD, 100 MHz$) voir Tableau 4	

Composé TC2

Tabernamide A

Poudre blanche amorphe

Solubilité : Mélange

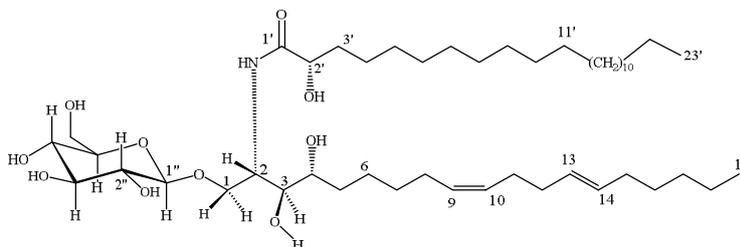
dichlorométhane-Méthanol

$C_{48}H_{91}NO_{10}$

Masse : 841

$[\alpha]_D^{25} : + 2,81$

(c 0,013; $CHCl_3$)



HRESI-MS: m/z 840,6637 $[M - H]^-$

IR (KBr) ν_{max} 3301, 2918, 2850, 1723, 1597, 1462, 1078, 1033 cm^{-1}

1H -NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$, 500 MHz) et ^{13}C -NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$, 125 MHz) voir

Tableau 5

Composé TC3

Tabernamide B

Poudre blanche amorphe

Solubilité : Mélange

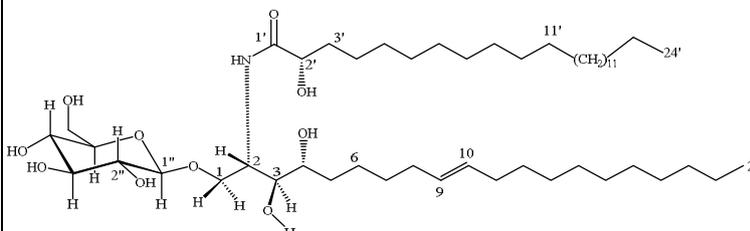
dichlorométhane-Méthanol

$C_{48}H_{91}NO_{10}$

Masse : 871

$[\alpha]_D^{25} : - 16,9$

(c 0,004; $CHCl_3$)



HRESI-MS: m/z 872,7109 $[M + H]^+$

IR (KBr) ν_{max} 3300, 2921, 2853, 1630, 1537, 1462, 1078, 1033 cm^{-1}

1H -NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$, 600 MHz) et ^{13}C -NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$, 150 MHz) voir

Tableau 6

Composé TC4

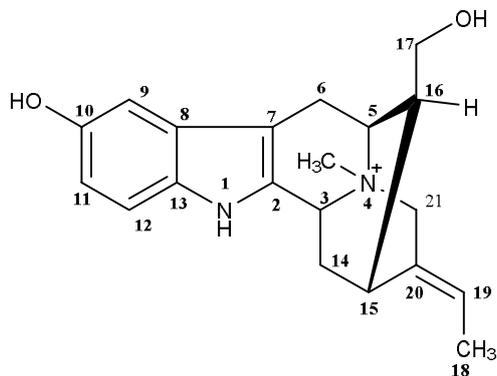
Spégatine

Solide brun amorphe

Solubilité : Méthanol

$C_{20}H_{25}N_2O_2^+$

Masse : 325



HRESI-MS : m/z 326,1909 $[M+H]^+$

IR (KBr) ν_{max} : 3352 (O-H) et 1638 cm^{-1}

1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) voir **Tableau 7**

Composé TC5

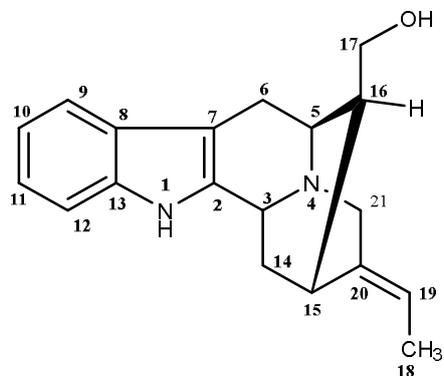
Tombozine

Solide brun amorphe

Solubilité : Mélange
dichlorométhane-Méthanol

$C_{19}H_{22}N_2O$

Masse : 294



EI-MS : m/z 294 $[M]^+$

IR (KBr) ν_{max} : 3352 (O-H) et 1639 (N-H) cm^{-1}

1H -NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD , 500 MHz) et ^{13}C -NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD , 125 MHz) voir **Tableau 8**

Composé TC6

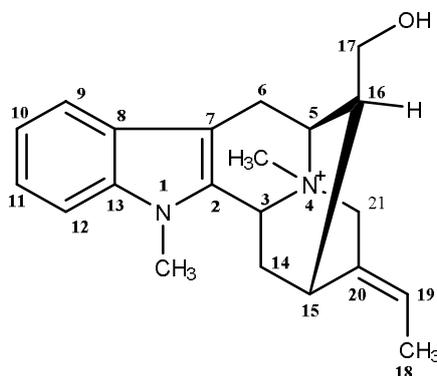
N_b-méthyl affinisine

Solide brun amorphe

Solubilité : Mélange
dichlorométhane-Méthanol

C₂₁H₂₇N₂O⁺

Masse : 323



EI-MS : m/z 323 [M]⁺

IR (KBr) ν_{\max} : 3351 (O-H) et 1638 (N-H) cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD, 800 MHz) et ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD, 200 MHz) voir **Tableau 9**

Composé TC7

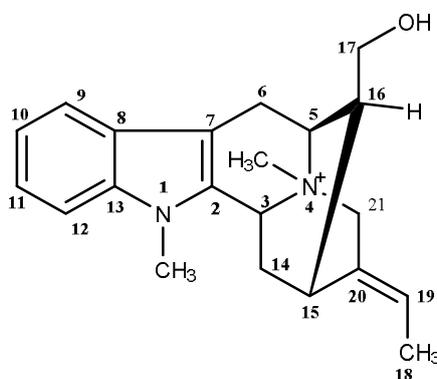
Affinisine

Solide brun amorphe

Solubilité : Méthanol

C₂₀H₂₄N₂O

Masse : 308



EI-MS : m/z 308 [M]⁺

IR (KBr) ν_{\max} : 3353 (O-H) et 1637 (N-H) cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) et ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) voir **Tableau 10**

Composé TC8

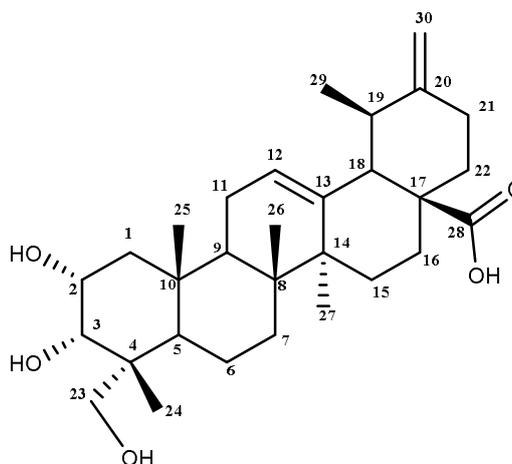
Acide-2 α ,3 α ,23-
trihydroxyursa-12,20(30)-
dien-28-oïque

Poudre blanche amorphe

Solubilité : Méthanol

$C_{30}H_{46}O_5$

Masse : 486



HRESI-MS : m/z 487,3416 $[M+H]^+$

IR (KBr) ν_{max} : 3328 (O-H) et 1720 (CO) cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} : 229 et 282 nm

1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) voir **Tableau 11**

Composé TC9

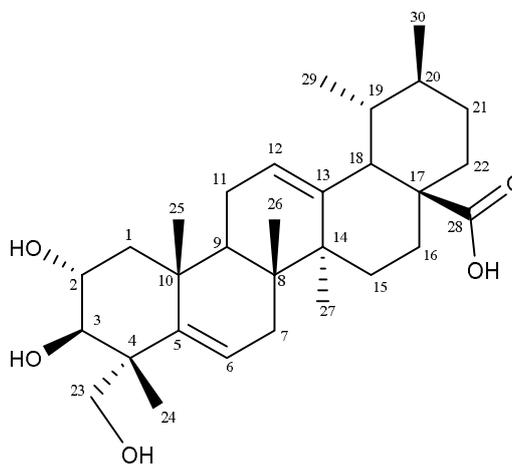
Acide-2 α , 3 β , 23-
trihydroxyursa-12,5(6)-
dien-28-oïque

Poudre blanche amorphe

Solubilité : Méthanol

$C_{30}H_{46}O_5$

Masse : 486



FAB-MS : m/z 485 $[M-H]^+$

IR (KBr) ν_{max} : 3328 (O-H) et 1720 8 (CO) cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} : 228 et 283 nm

1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) voir **Tableau 12**

Composé TC10

Acétate de bauerenyl

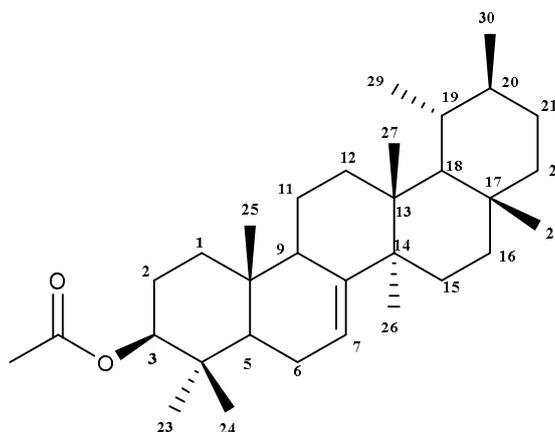
Cristaux blanc

Solubilité : Chloroforme

P.F : 289–291 °C

C₃₂H₅₂O₂

Masse : 468



ESI-MS: m/z 491 [M+Na]⁺; m/z 959 [2M+Na]⁺

IR (CHCl₃) ν_{\max} 2935, 1732, 1463, 1374, 1249, 1026 cm⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) et ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) voir **Tableau 13**

Composé TC11

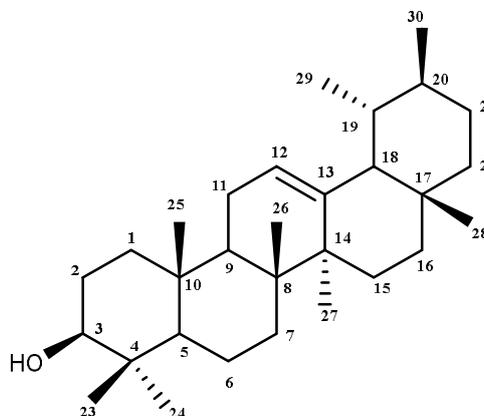
α -amyrine

Cristaux blanc

Solubilité : Chloroforme

C₃₀H₅₀O₂

Masse : 426



ESI-MS: m/z 427 [M+H]⁺

IR (CHCl₃) ν_{\max} 3445, 3034, 2716, 1666, 1450, 1367 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) et ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) voir **Tableau 14**

Composé TC12

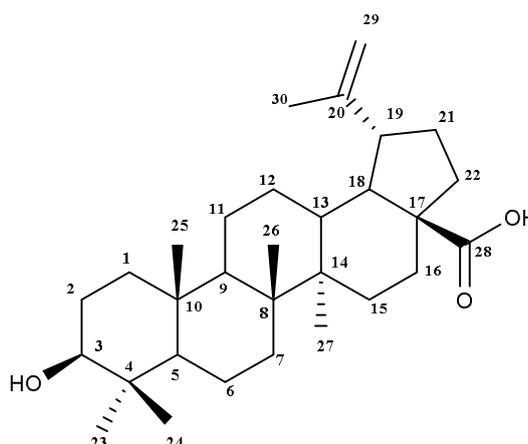
Acide bétulinique

Poudre blanche amorphe

Solubilité : Méthanol



Masse : 456



HREI-MS: m/z 456,3606 $[M]^+$

1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) voir **Tableau 15**

III.6.2. Composés isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle des lianes de *Landolphia lucida*

Composé LH1

2,3-bis (4'-hydroxy-3'-méthoxy-benzyl) dimethyl succinate

Poudre blanche

Solubilité : Acétone

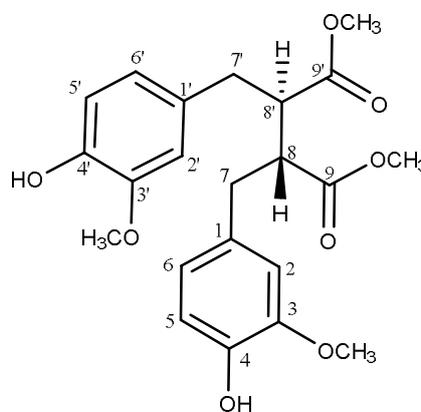


Masse : 418

$[\alpha]_D^{25} = +52,3$

(c 0,0012 ; $CHCl_3$)

P.F: 158-160 °C



HREI-MS: m/z 419,1630 $[M+H]^+$; 441,1520 $[M+Na]^+$; 859,3154 $[2M+Na]^+$

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 230 (1,745), 284 (0,787), 324 (0,594) nm

CD (c 0,3 mol/L, MeOH) λ_{max} ($\Delta \epsilon$): 232 (- 3,55826), 306 (+5,01297)

IR (KBr) ν_{max} : 3421, 2936, 2858, 1731, 1602, 1516, 1270, 1161, 1033, 757 cm^{-1}

EI-MS (probe) 70 eV, m/z (rel. int. %) : 418 $[M]^+$ (80), 387 (9), 356 (6), 221 (44), 209 (77), 177 (82), 151 (17), 137 (100), 124 (85)

1H -NMR (C_3D_6O , 600 MHz) et ^{13}C -NMR (C_3D_6O , 150 MHz) voir **Tableau 16**

Composé LH2

3-O-β-(E)-(4'-O-Acetylferuloyl)lupéol

Poudre blanche

Solubilité : Acétone

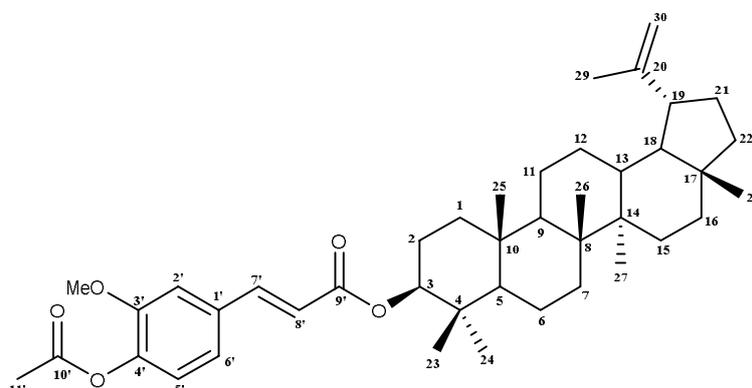
$C_{42}H_{60}O_5$

Masse : 644

$[\alpha]_D^{26} = + 6,25$

(*c* 0,0012 ; $CHCl_3$)

P.F: 241-243 °C



HREI-MS: m/z 644,4454 $[M]^+$

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 213 (0,848), 229 (0,822), 278 (0,470) nm

CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 288 (+1,74329)

IR (KBr) ν_{max} 2936, 2865, 1738, 1660, 1599, 1261, 1093, 802 cm^{-1}

EI-MS (probe) 70 eV, m/z (rel. int. %): 644 $[M]^+$ (5), 602 (100), 409 (4), 194 (42), 177 (85), 43 (13)

1H -NMR (C_3D_6O , 800 MHz) et ^{13}C -NMR (C_3D_6O , 200 MHz) voir **Tableau 17**

Composé LH3

Méthandriol dipropionate

Poudre blanche

Solubilité : Méthanol

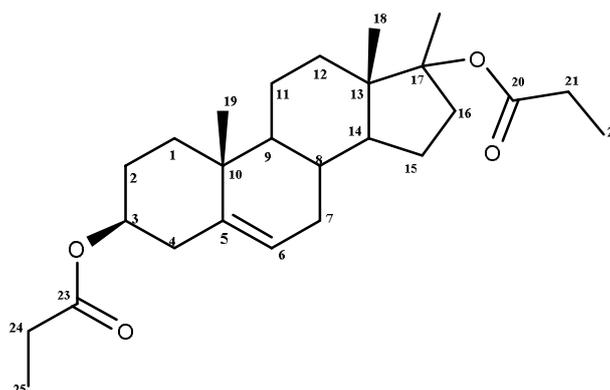
$C_{26}H_{40}O_4$

Masse : 416

$[\alpha]_D^{26} = + 11,1$

(*c* 0,0016 ; $CHCl_3$)

P.F: 96-98 °C



HRESI-MS: m/z 439,2818 $[M+Na]^+$

FAB-MS: m/z 417 $[M+H]^+$

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 214 (1,063), 229 (1,046) nm

IR (KBr) ν_{max} 2939, 1734, 1460, 1370, 1262, 1193, 1086, 803 cm^{-1}

1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) voir **Tableau 18**

Composé LH4

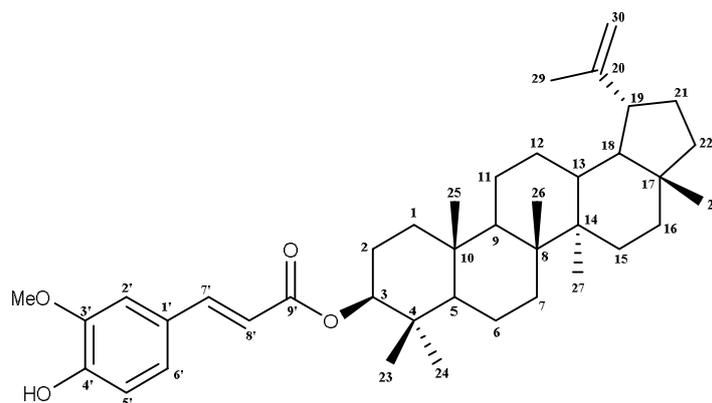
3 β -(*E*)-feruloyllupéol

Poudre blanche amorphe

Solubilité : Acétone

C₄₀H₅₈O₄

Masse : 602



EI-MS: m/z 602 [M]⁺ (35), 409 (41), 194(13), 177 (16), 77 (100)

¹H-NMR (C₃D₆O, 500 MHz) et ¹³C-NMR (C₃D₆O, 125 MHz) voir **Tableau 19**

Composé LH5

7,7'-diméthoxy-6,6'- dicoumarinyl éther

Poudre blanche

Solubilité : Chloroforme

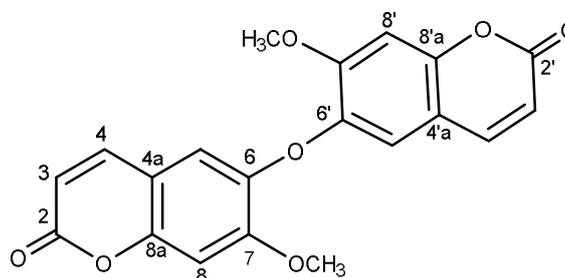
C₂₀H₁₄O₇

Masse : 366

[α]_D²⁵ = + 32,3

(*c* 0,0012; CHCl₃)

P.F: 112–114 °C



HRESI-MS: m/z 367,0738 [M+H]⁺

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 230 (1,745), 284 (0,787), 324 (0,594) nm

IR (KBr) ν_{\max} 2939, 1734, 1460, 1370, 1262, 1193, 1086, 803 cm⁻¹

¹H-NMR (CD₃Cl, 600 MHz) et ¹³C-NMR (CD₃Cl, 150 MHz) voir **Tableau 20**

Composé LH6

Scopolétine

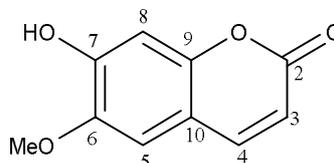
Poudre blanche

Solubilité : Acétone

$C_{10}H_8O_4$

Masse : 192

P.F: 203~204°C



HRESI-MS: m/z 193,0504 $[M+H]^+$

EI-MS m/z (%):192 $[M]^+$ (100), 177, 164, 149, 121, 69

1H -NMR (C_3D_6O , 500 MHz) et ^{13}C -NMR (C_3D_6O , 125 MHz) voir **Tableau 21**

Composé LH7

Quercitrine

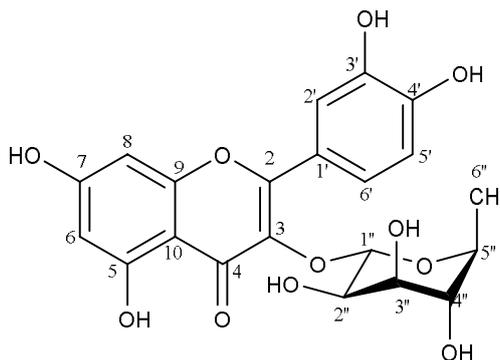
Cristaux jaune

Solubilité : Méthanol

$C_{21}H_{20}O_{11}$

Masse : 448

P.F: 181-182 °C



ESI-MS: m/z 471 $[M+Na]^+$, m/z 919 $[2M+Na]^+$

UV : λ_{max} (MeOH) 254 et 356 nm

IR : ν_{max} (KBr) 3450 (OH), 1660 (C=O), 1605 (cycle aromatique), 1112 (C-O) cm^{-1}

1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) voir **Tableau 22**

Composé LH8

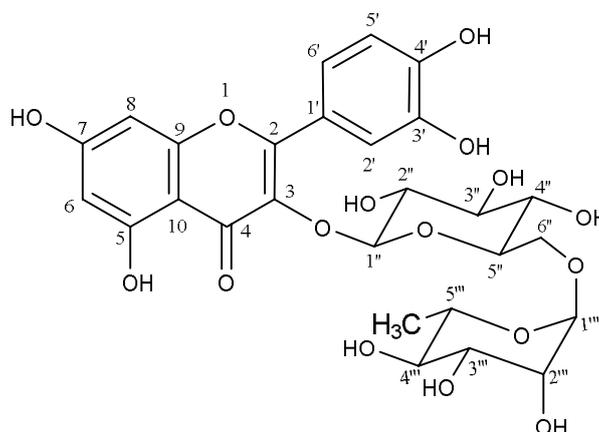
Rutine

Poudre jaune

Solubilité : Méthanol

$C_{27}H_{30}O_{16}$

Masse : 610



ESI-MS (néгатif) m/z (int. rel): 609 $[M-H]^-$ (100), 300 (57), 301 (42), 271 (40), 255 (20), 179 (11), 151 (5).

UV (MeOH) λ_{max} : 258 et 352 nm

IR : ν_{max} (KBr) 3347 (OH), 3372, 3256, 1652 (C=O), 1603 (cycle aromatique), 1200 (C-O) cm^{-1}

1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) voir **Tableau 23**

Composé LH9

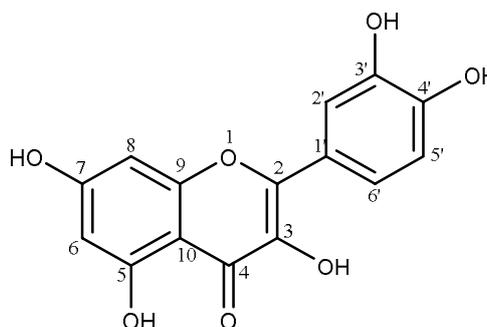
Quercétine

Poudre jaune

Solubilité : Méthanol

$C_{15}H_{10}O_7$

Masse : 302



ESI-MS: m/z 303,0430 $[M+H]^+$

ESI-MS (néгатif) m/z : 301 (71), 271 (100), 255 (42), 243 (15), 227 (10)

UV (MeOH) λ_{max} : 245 et 360 nm

1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) voir **Tableau 24**

Composé LH10

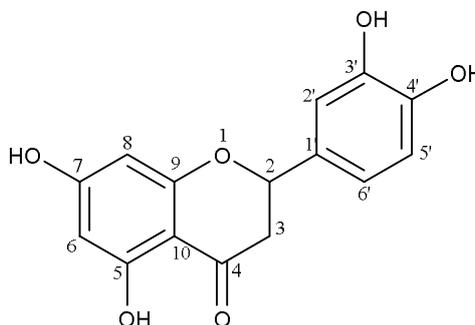
Eriodictyol

Poudre jaune amorphe

Solubilité : Méthanol

$C_{15}H_{12}O_6$

Masse : 288



ESI-MS: m/z 289,0708 $[M+H]^+$

UV (MeOH) λ_{max} : 225, 283, 326 nm

1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) voir **Tableau 25**

Composé LH11

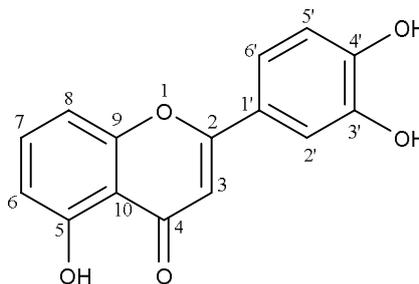
3', 4', 5- trihydroxyflavone

Poudre jaune amorphe

Solubilité : Méthanol

$C_{15}H_{10}O_5$

Masse : 270



ESI-MS: m/z 269,0455 $[M-H]^+$

UV (MeOH) λ_{max} : 286 nm

1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) et ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) voir **Tableau 26**

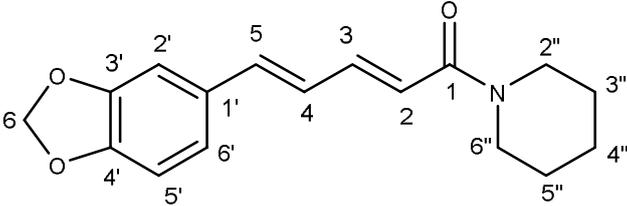
Composé LH12	
<p>Acide isovanollique</p> <p>Poudre jaune pâle amorphe</p> <p>Solubilité : Acétone</p> <p>$C_8H_8O_4$</p> <p>Masse : 168</p>	
<p>ESI-MS: m/z 169,0495 $[M+H]^+$</p> <p>1H-NMR (C_3D_6O, 400 MHz) et ^{13}C-NMR (C_3D_6O, 100 MHz) voir Tableau 27</p>	

III.6.3. Composés isolés de l'extrait alcaloïdique des tiges de *Hedranthera barteri*

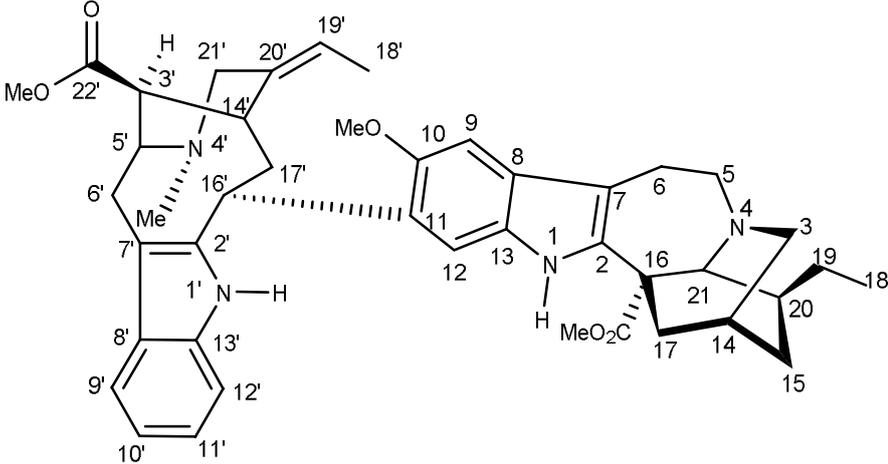
Composé HB1	
<p>Voacristine</p> <p>Poudre jaune</p> <p>Solubilité : Chloroforme</p> <p>$C_{22}H_{28}N_2O_4$</p> <p>Masse : 384</p>	
<p>1H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) et ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) voir Tableau 28</p>	

Composé HB2	
<p>Voacangine</p> <p>Cristaux blancs</p> <p>Solubilité : Chloroforme</p> <p>$C_{22}H_{28}N_2O_3$</p> <p>Masse : 368</p>	
<p>ESI-MS: m/z 369,2177 $[M+H]^+$</p> <p>1H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) et ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) voir Tableau 29</p>	

Composé HB3

<p>Piperine Cristaux jaune Solubilité : Chloroforme $C_{17}H_{19}NO_3$ Masse : 285</p>	 <p>The structure shows a piperidine ring (labeled 1'' to 6'') connected via a carbonyl group (C1) to a chain of two trans-alkenes (C2=C3 and C4=C5). The C5 is attached to a benzene ring (labeled 1' to 6'). The benzene ring has a 1,3-dioxole ring fused to it, with oxygen atoms at positions 3' and 4'.</p>
<p>ESI-MS: m/z 286,1443 $[M+H]^+$ 1H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) et ^{13}C-NMR $CDCl_3$, 75 MHz) voir Tableau 30</p>	

Composé HB4

<p>Voacamine Cristaux blancs Solubilité : Chloroforme $C_{43}H_{52}N_4O_5$ Masse : 704</p>	 <p>The structure is a complex pentacyclic alkaloid. It features a central benzene ring (labeled 8' to 13') with a methoxy group (MeO) at position 10'. This ring is fused to a piperidine ring (labeled 1 to 6) which has a methyl group (Me) at position 7 and a methoxycarbonyl group (MeO2C) at position 2. The piperidine ring is further fused to a bicyclic system (labeled 14 to 21) containing another nitrogen atom. Various methyl groups (18, 19, 20, 21) and a methoxy group (22) are attached to the bicyclic system. The structure is highly stereospecific, with wedged and dashed bonds indicating the 3D arrangement of atoms.</p>
<p>ESI-MS: m/z 705,3994 $[M-H]^+$ UV (MeOH) λ_{max}: 290, 278 et 227 nm 1H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) et ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) voir Tableau 31</p>	

Composé HB5

Voacorine

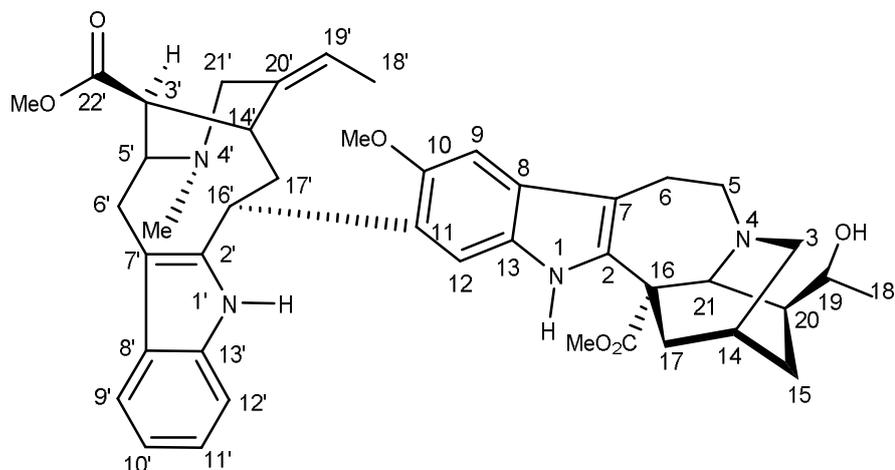
Cristaux blancs

Solubilité :

Chloroforme

$C_{43}H_{52}N_4O_6$

Masse : 720



ESI-MS: m/z 721,3947 $[M-H]^+$

1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) et ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) voir **Tableau 32**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Agwada, V., Patel, M. B., Hesse, M. and Schmid, H. 1970. Die Alkaloide aus *Hedranthera barteri* (Hook. f.) Pichon. 139. Mitteilung über Alkaloide. *Helvetica Chimica Acta* **53** (7), 1567-1577.
- Ahmed, V. U., and Rahman, A. U. 1994. Handbook of Natural Products Data. Pentacyclic Triterpenoids, BV Elsevier Science, London **21**, pp 1102-1103.
- Ainslie J. R. 1937. A List of plant used in Native Medicine in Nigeria. Imperial forestry Institute, Oxford, paper 7 (Mimeographed), p 30.
- Ali, M. S., Jahangir, M., Ul Hussan, S. S., and Choudhary, M. I. 2002. Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. *Phytochemistry* **60** (3), 295-299.
- Anh, H. L. T., and Van Linh, N. 2017. Flavonoids and flavan-3-ol from aerial part of *Agrimonia pilosa* LEDEB. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology* **4** (10), 2458-9403.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**, 399-436.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: *Botanical Journal Linn. Society* **161** (2), 105-121.
- Arthur, J. C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J. M., Fan, T. J., Campbell, B. J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A. B., and Rhodes, J. M. 2012. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **338** (6103), 120-123.
- Atta U. R., Zareen, S., Choudhary, M. I., Akhtar, M. N., and Ngounou, F. N. 2008. A triterpenoidal saponin and sphingolipids from *Pteleopsis hylodendron*. *Phytochemistry* **69** (12), 2400–2405.
- Barreto-Bergter, E., Pinto, M. R., and Rodrigues, M. L. 2004. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **76** (1), 67-84.
- Beentje, H.J. (1978): A revision of *Callichilia* Stapf (Apocynaceae), laboratory of plant taxonomy and plant geography. Agricultural University Wageningen. The Netherlands **2** (6), 1–32.
- Belgers, M., Leenaars, M., Homberg, J. R., Ritskes-Hoitinga, M., Schellekens, A. F., and Hooijmans, C. R. 2016. Ibogaine and addiction in the animal model, a systematic review and meta-analysis. *Translational psychiatry* **6** (5), 826-826.
- Bibel, D. J., Aly, R., and Shinefield, H. R. 1992. Antimicrobial activity of sphingosines. *Journal of Investigative Dermatology* **98** (3), 269-273.
- Boligon, A. A., Kubiça, T. F., Mario, D. N., de Brum, T. F., Piana, M., Weiblen, R., Lovato, L., Alves, S.H., Santos, R.G.V., Alves, G.F.S., and Athayde, M. L. 2013. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiologiae Plantarum* **35** (7), 2229-2239.
- Boligon, A. A., Piana, M., Kubica, T. F., Mario, D. N., Dalmolin, T. V., Bonez, P. C., Weiblen, R., Lovato, L., Alves, S. H., Campos, M. M. A., and Athayde, M. L. 2015. HPLC

- analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Journal of Applied Biomedicine* **13** (1), 7-18.
- Braga, R. M., and Reis, F. D. A. 1987. Quaternary alkaloids from *Peschiera fuchsiaefolia*. *Phytochemistry* **26** (3), 833-836.
- Brink, M., Belay, G., and De Wet, J. M. J. 2006. Plant resources of tropical Africa 1: cereals and pulses. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands / Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands / CTA, Wageningen, Netherlands **1**, pp 54-57.
- Brown, S. A. 1962. Biosynthesis of coumarin and herniarin in lavender. *Science* **137** (3534), 977-978.
- Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème édition. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, p 915.
- Bruneton, J. 2001. Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 2ème édition. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, pp 129-136.
- Bruneton, J. 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4ème édition. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, pp 841-842.
- Bruneton, J. 2016. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 5ème édition. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, p 1488.
- Buchi, G., Manning, R. E. and Monti, S. A. 1964. Voacamine and voacordine. *Journal of the American Chemical Society*, **86** (21), 4631-4641.
- Bui, A. M., Debray, M. M., Boiteau, P., and Potier, P. 1977. Étude chimiotaxonomique de quelques espèces de *Hazunta*. *Phytochemistry* **16** (6), 703-706.
- Burkill HM. 1985. The useful plants of West tropical Africa families S-Z, 2nd edition. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, pp 1954-1972
- Carothers, S., Nyamwihura, R., Collins, J., Zhang, H., Park, H., Setzer, W. N., and Ogungbe, I. V. 2018. Bauerenol acetate, the pentacyclic triterpenoid from *Tabernaemontana longipes*, is an antitrypanosomal agent. *Molecules* **23** (2), 355.
- Caruso, M. L., and Fucci, L. 1990. Histological identification of *Helicobacter pylori* in early and advanced gastric cancer: To the editor. *Journal of Clinical Gastroenterology* **12** (5), 601-602.
- Chase, M., Christenhusz, M., Fay, M., Byng J., Judd, W., Soltis, D., Mabberley, D., Sennikov, A., Soltis, P., and Stevens, P. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181** (1), 1-20.
- Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore R. A., and Holt, R. A. 2012. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research* **22** (2), 299-306.
- Cateni, F., Zilic, J., Falsone, G., Scialino, G., and Banfi, E. 2003. New cerebroside from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **13** (24), 4345-4350.

- Chaturvedula, V. P., Sprague, S., Schilling, J. K., and Kingston, D. G. I. 2005. New Cytotoxic Indole Alkaloids from *Tabernaemontana calcarea* from the Madagascar Rainforest. *Journal of Natural Products* **68** (9), 1444-1444.
- Chen, S., Li, X., Liu, X., Wang, N., An, Q., Ye, X. M., and Wang, W. J. 2020. Investigation of Chemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effects of Alfalfa Flavonoids on Growth Performance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-11.
- Cheng, S. Y., Wen, Z. H., Chiou, S. F., Tsai, C. W., Wang, S. K., Hsu, C. H., Dai, C. F., Chiang, M. Y., Wang, W. H., and Duh, C. Y. 2009. Ceramide and cerebrosides from the octocoral *Sarcophyton ehrenbergi*. *Journal of Natural Products*. **72** (3), 465-468.
- Chevalier, A. 1948. Les Lianes à caoutchouc de l'Afrique tropicale. *Journal d'Agriculture Traditionnelle et de Botanique Appliquée* **28** (311), 390-421.
- Chevalier, M. A. 1906. Histoire d'une liane à caoutchouc de l'Afrique tropicale (*Landolphia Dawei* Stapf). *Bulletin de la Société Botanique de France* **53** (1), 17-36.
- Chukwujekwu, J. C., Van Staden, J., Smith, P., & Meyer, J. J. M. 2005. Antibacterial, anti-inflammatory and antimalarial activities of some Nigerian medicinal plants. *South African Journal of Botany* **71** (3-4), 316-325.
- Connolly, J. D., and Hill, R. A., 1991. *Dictionary of terpenoids*, Chapman and Hall, London **1**, pp 463–545.
- Coulerie, P. 2012. Étude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue. Thèse de Doctorat, Nouvelle Calédonie, pp 203-205, 236.
- Cronquist, A. and Takhtadziān, A. L. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York **582** (13 C7), 499-501.
- Dalziel, J. M. 1937: *The useful plants of West Tropical Africa*. Crown Agents for the Colonies, London, p 48.
- Darmawan, A., Kosela, S., Kardono, L. B., and Syah, Y. M. 2012. Scopoletin, a coumarin derivative compound isolated from *Macaranga gigantifolia* Merr. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2** (12), 175.
- De Cleyn, R., and Verzele, M. 1975. Constituents of Peppers Part VII. Spectroscopic structure elucidation of piperine and its isomers. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges* **84** (5), 435-438.
- De Hoogh, B. 1989. *Dictyophleba* Pierre. Series of revisions of Apocynaceae XXVIII. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique/Bulletin van de Nationale Plantentuin van België* **59** (1), 207-226.
- Deng, Y., Bao, M. F., Shi, B. B., Wu, J., and Cai, X. H. 2018. Three New Indole Alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *Natural Products and Bioprospecting* **8** (3), 183-188.
- Devkota, K. P., Wilson, J. A., Henrich, C. J., McMahon, J. B., Reilly, K. M., and Beutler, J. A. 2014. Compounds from *Simarouba berteriana*, which inhibit proliferation of NF1-defective cancer cells. *Phytochemistry Letters* **7**, 42-45.
- Dewick, P. M. 2009. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3rd Edition, John Wiley and Sons, New York. pp 187-310.

- Dibong, S. D., Mpondo Mpondo, E., Ngoye, A., and Priso, R. J. 2011b. Modalities of exploitation of medicinal plants in Douala's region. *American Journal of Food and Nutrition* **1** (2), 67-73.
- Dibong, S., Mpondo M., Ngoye A, Kwin, N., and Betti, J. L., 2011a. Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales vendues sur les marchés de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* **37**, 2496-2407.
- Dowling, R. J., Zakikhani, M., Fantus, I. G., Pollak, M., and Sonenberg, N. 2007. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Research* **67** (22), 10804-10812.
- Ebede, G. R., Ndongo, J. T., Mbing, J. N., Shehla, N., Rahman, A. U., Pegnyemb, D. E., and Choudhary, M. I. 2021. Isolation of new secondary metabolites from the liana *Landolphia lucida* K. Schum. (Apocynaceae). *Phytochemistry Letters* **41**, 27-33.
- Ebede, G. R., Ndongo, J. T., Mbing, J. N., Kenfack, H. C., Pegnyemb, D. E., and Bochet, C. G. 2021. Contortamide, a new anti-colon cancer cerebroside and other constituents from *Tabernaemontana contorta* Stapf (Apocynaceae). *Natural product research* **35** (11), 1757-1765.
- Endress, M. E. 2004. Apocynaceae: Brown and now. *Telopea* **10**, 525-541.
- Endress, M. E., and Bruyns, P. V. 2000. A revised classification of the Apocynaceae sl. *The Botanical Review* **66** (1), 1-56.
- Endress, M. E., Liede-Schumann, S., and Meve, U. 2007. Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94** (2), 259-267.
- Erlund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research* **24** (10), 851-874.
- Ezike, A. C., Okonkwo, C. H., Akah, P. A., Okoye, T. C., Nworu, C. S., Mbaoji, F. N., Nwabunike I. A., and Onyeto, C. A. 2016. *Landolphia owariensis* leaf extracts reduce parasitemia in Plasmodium berghei-infected mice. *Pharmaceutical biology* **54** (10), 2017-2025.
- Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart Jr, C., and Noel, J. P. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* **46** (3), 356-370.
- Fondoun, J. M., and Manga, T. T. 2000. Farmers indigenous practices for conserving *Garcinia kola* and *Gnetum africanum* in southern Cameroon. *Agroforestry systems* **48** (3), 289-302.
- Galgon, T., Höke, D., and Dräger, B. 1999. Identification and quantification of betulinic acid. *Phytochemical Analysis* **10** (4), 187-190.
- Gao, C., and Yao, S. K. 2009. Diabetes mellitus: a " true" independent risk factor for hepatocellular carcinoma?. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International* **8** (5), 465-473.
- Gao, J. M., Dong, Z. J., and Liu, J. K. 2001. A new ceramide from the *basidiomycete Russula cyanoxantha*. *Lipids* **36** (2), 175-181.

- Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q., and Qin, H. 2015. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in microbiology* **6**, 20.
- Gaussen, H., Leroy, J. F., and Ozenda. P. 1982. Précis de botanique. Végétaux supérieurs, 2^{ème} édition. Masson, Paris, pp 393-395.
- Garnier, J., and Mahuteau, J. 1986. A new alkaloid difforine and normacusine B from *Vinca difformis*. *Planta medica* **52** (1), 66-67.
- Ge, L., Wan, H., Tang, S., Chen, H., Li, J., Zhang, K., Zhou, B., Jia, F., Wu, S., and Zeng, X. 2018. Novel caffeoylquinic acid derivatives from *Lonicera japonica* Thunb. flower buds exert pronounced anti-HBV activities. *Royal Society of Chemistry* **8**, 35374.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national GBD, Mortality. 2013. Causes of death collaborators. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **385**, 117-171.
- Giorgio, E., Parrinello, N., Caccamese, S., and Rosini, C. 2004. Non-empirical assignment of the absolute configuration of (–)-naringenin, by coupling the exciton analysis of the circular dichroism spectrum and the ab initio calculation of the optical rotatory power. *Organic and biomolecular chemistry* **2** (24), 3602-3607.
- González, N., Prieto, I., del Puerto-Nevado, L., Portal-Nuñez, S., Ardura, J. A., Corton, M., Beatriz Fernández-Fernández, B., Aguilera, O., Gomez-Guerrero, C., Mas, S., Moreno, J. A., Ruiz-Ortega, M., Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Rojo, F., Vivanco, F., Esbrit P., Ayuso, C., AlvarezLlamas, G., Egido, J., García-Foncillas, J., Ortiz, A., and Diabetes Cancer Connect Consortium. 2017. 2017 update on the relationship between diabetes and colorectal cancer: epidemiology, potential molecular mechanisms and therapeutic implications. *Oncotarget* **8** (11), 18456.
- González-Rocha, E., and Cerros-Tlatilpa, R. 2015. La familia Apocynaceae (Apocynoideae y Rauvolfioideae) en el estado de Morelos, México. *Acta Botánica Mexicana* **110**, 21-70.
- Guedje, N., and Fankap, R. 2001. Utilisations traditionnelles de *Garcinia lucida* et *Garcinia kola* (Clusiaceae) au Cameroun. *Systematics and Geography of plants* **71**, 747-758.
- Guignard, Dupont. 2004. Botanique : systématique, 13^{ème} édition. Masson, Paris, pp164 -179.
- Guissou, J. P., Millogo-Kone, H., and Kaboré, I. Z. 1992. Etude comparative de l'activité pharmacologique de *Euphorbia hirta* L.(Euphorbiaceae) et *Holarrhena floribunda* G. Don (Apocynaceae) vis-à-vis d'amibes non pathogènes du gène *Amoeba proteus*. *Médecine d'Afrique Noire* **39** (5), 358-363.
- Gupta, J., Gupta, A., and Gupta, A. K. 2015. Extraction and identification of flavonoid natural antioxidant in the leaves of *Rauwolfia serpentina*. *International Journal of Chemical Studies* **3** (1), 35-37.
- Harborne, J. B. 1998. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 3rd Edition. Chapman and Hall International, London; New York, pp 40-231.
- He, L., Wang, Y. S., and Wang, Q. J. 2007. *In vitro* antitumor activity of triterpenes from *Cerlops tagal*. *Natural product research* **21** (14), 1228-1233.
- Hepper, F. N. 1962. Notes on Tropical African Rubiaceae: III. *Kew Bulletin* **16** (2), 329-339.

- Hillon, P., Guiu, B., Vincent, J., and Petit, J. M. 2010. Obesity, type 2 diabetes and risk of digestive cancer. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **34** (10), 529-533.
- Hostettmann, K., Marston, A., Ndjoko, K., and Wolfender, J. L. 2000. The potential of African plants as a source of drugs. *Current Organic Chemistry* **4** (10), 973-1010.
- Huang, Q., Tezuka, Y., Hatanaka, Y., Kikuchi, T., Nishi, T., and Tubaki, Y. 1995. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. iv. Minor peptaibols of *trichoderma kiningii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **43** (10), 1663-1667.
- Huang, X. Z., Yin, Y., Dai, J. H., Liang, H., Dai, Y., and Bai, L. 2010. Two new ceramides from the stems of *Piper betle* L. *Chinese Chemical Letters* **21** (4), 433-436.
- Janot, M. M., Monneret, C., Monseur, X., Khuong-Huu, Q., and Goutarel, R. 1966. Steroid alkaloids. LV. Alkaloids of *Dictyophleba lucida* (K. Schum.) Pierre; structures of dictyolucidine and dictyolucidamine. *Bulletin de la Societe chimique de France* **11**, 3472.
- Itoh, A., Ikuta, Y., Tanahashi, T., and Nagakura, N. 2000. Two Alangium alkaloids from *Alangium I amarckii*. *Journal of Natural Products* **63** (5), 723-725.
- Jia, A. Q., Yang, X., Wang, W. X., and Jia, Y. H. 2010. Glycocerebroside bearing a novel long-chain base from *Sagina japonica* (Caryophyllaceae). *Fitoterapia* **81** (6), 540-545.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A and Stevens, P. 2002. Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. De Boeck Université, Louvain-la-Neuve, p 366.
- Kai, K., Shimizu, B. I., Mizutani, M., Watanabe, K., and Sakata, K. 2006. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **67** (4), 379-386.
- Kandati, V., Govardhan, P., Reddy, C. S., Nath, A. R., and Reddy, R. R. 2012. *In vitro and in vivo* anti-inflammatory activity of *Andrographis serpyllifolia* (Rottl. Ex Vahl.) Wt. *International Current Pharmaceutical Journal* **1** (8), 199-204.
- Karlsson, K. A. 1970. Sphingolipid long chain bases. *Lipids* **5** (11), 878-891.
- Keawpradub, N., Houghton, P. J., Eno-Amooquaye, E. and Burke, P. J. 1997. Activity of extracts and alkaloids of *Thai Alstonia* species against human lung cancer cell lines. *Planta Medica*, **63** (2), 97-101.
- Khan, A., Khan, A., Ahmad, M., Ali, M., Farooq, U., Khan, F. A., and Bukhari, S. M. 2021. Antiglycation potential of Indigoferin a, Indigoferin B and Indigoferin C natural products from *Indigofera heterantha* Brandis. *Clinical Phytoscience* **7** (1), 1-6.
- Khan, K. M., Khan, M., Ali, M., Taha, M., Rasheed, S., Perveen, S., and Choudhary, M. I. 2009. Synthesis of bis-Schiff bases of isatins and their antiglycation activity. *Bioorganic and medicinal chemistry* **17** (22), 7795-7801.
- Khan, M.R., and Nkunya, M. H. H. 1990. Antimicrobial activity of Tanzanian traditional medicinal plants. In: Ministry of Health. Proceedings of an International Conference on Traditional Medicinal Plants. Arusha, Tanzania, 18-13.
- Khan, M. R. 1999. Antimycotic activity of some medicinal plants. *Pharmaceutical biology* **37** (5), 346-350.

- Khan, Z. R., Moni, F., Sharmin, S., Al-Mansur, M. A., Gafur, A., Rahman, O., and Afroz, F. 2017. Isolation of bulk amount of piperine as Active Pharmaceutical Ingredient (API) from black pepper and white pepper (*Piper nigrum* L.). *Pharmacology and Pharmacy*, **8** (7), 253-262.
- Khandekar, M. J., Cohen, P., and Spiegelman, B. M. 2011. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews Cancer* **11** (12), 886-895.
- Kim, S. Y., Choi, Y. H., Huh, H., Kim, J., Kim, Y. C., and Lee, H. S. 1997. New antihepatotoxic cerebroside from *Lycium chinense* fruits. *Journal of Natural Products* **60** (3), 274-276.
- Kruegel, A. C., and Grundmann, O. 2018. The medicinal chemistry and neuropharmacology of kratom: A preliminary discussion of a promising medicinal plant and analysis of its potential for abuse. *Neuropharmacology* **134**, 108-120.
- Lancaster, M. V., Fields, R. D., 1996. Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. U.S. Patent No. 5,501,959: U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC.
- Lee, M. H., Lee, G. H., and Yoo, J. S. 2003. Analysis of ceramides in cosmetics by reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with collision-induced dissociation. *Rapid communications in mass spectrometry* **17** (1), 64-75.
- Lendvai, B., Zelles, T., Rozsa, B., and Vizi, E. S. 2003. A vinca alkaloid enhances morphological dynamics of dendritic spines of neocortical layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin* **59** (4), 257-260.
- Leeuwenberg, A. J. M. 1994. A revision of *Tabernaemontana* two. The new world species and *Stemmadenia*. *Royal Botanic Gardens, Kew, Wageningen* **2**, pp 150-156.
- Leeuwenberg, A. J. M. 1991. A Revision of *Tabernaemontana*: The old World Species. *Royal Botanic Gardens, Kew*, pp 53-63.
- Li, P.; Leeuwenberg, A. J. M and Middleton, D. J. 1995. Apocyanaceae, in: Wu, Z.; Raven, P.H. and Hong, D. *Flora of China*. Science Press, Beijing; Missouri Botanical Garden Press, St. Louis **16**, pp 143-188.
- Linné Carl von. 1753. *Species plantarum: Exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. Stockholm (Suède), Lars Salvius **1** (1753), 210-211.
- Liu, H., Orjala, J., Sticher, O., and Rali, T. 1999. Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*. *Journal of Natural Products* **62** (1), 70-75.
- Luna, B., and Feinglos, M. N. 2001. Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus. *American Family Physician* **63** (9), 1747.
- Ma, H. L., Qin, J. Y., Wang, L., Yang, S. X., Chiu, M. H., Zhang, X. M., and Gao, J. M. 2008. A new triterpene from the leaves of *Craibiodendron yunnanense*. *Chemistry of Natural Compounds* **44** (1), 44-47.
- Ma, X., Tian, W., Wu, L., Cao, X., and Ito, Y. 2005. Isolation of quercetin-3-O-L-rhamnoside from *Acer truncatum* Bunge by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1070** (1-2), 211-214.

- Mahato, S. B., and Kundu, A. P. 1994. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* **37** (6), 1517-1575.
- Mann G. 1861. Type of *Tabernaemontana contorta* Stapf (family Apocynaceae). Royal Botanic Gardens, Kew, p 703.
- Markgraf, F. 1923. Ehippiocarpa, eine neue Gattung der Apocynaceen aus Südostafrika, mit Bestimmungsschlüssel der übrigen afrikanischen Tabernaemontaninae. Notizblatt des Königl. botanischen Gartens und Museums zu Berlin **74** (8), 303-311.
- Markham, K. R., and Chari, V. M. 1982. In JB Harborne and TJ Mabry (Eds.). The flavonoids: Advances in research. Chapman and Hall, London, pp 19–134.
- Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., and Mabry, T. J. 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids—III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* **34** (9), 1389-1397.
- Marshall, N. T. 1998. Searching for a cure: Conservation of medicinal wild life resources in East and Southern Africa. Traffic International, Cambridge, p 132.
- Marshall, S.J. Russell, P.F. Philipson, J.D. Kirby, G.C. Warhurst, D.C., and Weight, C.W. 2000. Antiplasmodial and antiamebic activities of medicinal plants from Sierra Leone. *Prostate* **14**, 356-358.
- Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T., and Osajima, Y. 1996. In *vitro* survey of α -glucosidase inhibitory food components. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60** (12), 2019-2022.
- Mauro, N. M. 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (\pm)-camptothécine. Thèse Doctorat, Université Joseph Fourier-GRENOBLE 1, p186.
- Mbantswe, N. E. O. 2009. « J'ai isolé des substances anti-infectieuses à partir d'une plante », propos recueillis par Parfait Tabapsi pour Mutations, sur africapresse.com. 05-03-2009.
- McKinney, A., Young, E. B., Cunnington, K., Stewart, R., and McLeod, M. 2012. The metabolism of synthetic anabolic-androgenic steroids in the greyhound: nandrolone laurate and methandriol dipropionate. In: Proceedings of the 18th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Beresford GD, Howitt RG (Eds), Dunmore, Auckland, New Zealand, pp. 423-430.
- Medeiros, W. L. B., Vieira, I. J. C., Mathias, L., Braz-Filho, R., Leal, K. Z., Rodrigues-Filho, E. and Schripsema, J. 1999. Two known bis-indole alkaloids isolated from *Tabernaemontana laeta*: complete ^1H and ^{13}C chemical shift assignments. *Magnetic Resonance in Chemistry* **37** (9), 676-681.
- Melacheu, G. L. F, Njoya E. M., Jouda J. B., Kweka B. N. W., Mbazona C. D., Wang F., and Wandji J. 2019. Two new indole alkaloids from *Tabernaemontana contorta* Stapf. *Phytochemistry Letters* **30**, 116-119.
- Mehta, S., Blackinton, D., Omar, I., Kouttab, N., Myrick, D., Klostergaard, J., and Wanebo, H. 2000. Combined cytotoxic action of paclitaxel and ceramide against the human Tu138 head and neck squamous carcinoma cell line. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **46** (2), 85-92.
- Michael, E. S. 2005. UPLC: an introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **28**, 1253-1263.

- Mireku, E. A., Mensah, A. Y., Mensah, M. L. K., Amponsah, I. K., and Mintah, D. 2017. Phytochemical constituents and anti-oxidative properties of *Landolphia heudelotti* roots. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **8** (7), 2862-2866.
- Moore, R. E., Blackman, A. J., Cheuk, C. E., Mynderse, J. S., Matsumoto, G. K., Clardy, J., and Craig, J. C. 1984. Absolute stereochemistries of the aplysiatoxins and oscillatoxin A. *The Journal of Organic Chemistry* **49** (13), 2484-2489.
- Morita, N., Shimokoriyama, M., Shimizu, M., and Arisawa, M. 1972. Studies on medicinal resources. XXXII. The components of rhizome of *Iris tectorum* Maximowicz (Iridaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **20** (4), 730-733.
- Mpom, B. 1953. Cameroon National Herbarium (YA), YA0004752 « West African Plants - A Photo Guide - *Tabernaemontana contorta* Stapf ».
- Naranjo, J., Hesse, M. and Schmid, H. 1972. Indolalkaloide aus den Blättern von *Hedranthera barteri* (Hook. f.) Pichon. 146. Mitteilung über Alkaloide. *Helvetica Chimica Acta* **55** (6), 1849-1866.
- Ndjitoyap Ndam, E. C., Mbakop, A., Tzeuton, C., Atangana, I., and Essomba, A. 1990. Les cancers rectocoliques au Cameroun: aspects épidémiologiques et cliniques de 122 cas. *Médecine et chirurgie digestives* **19** (7), 427-430.
- Ndongo, J. T., Mbing, J. N., Tala, M. F., Monteillier, A., Pegnyemb, D. E., Cuendet, M., and Laatsch, H. 2017. Indoline alkaloids from *Tabernaemontana contorta* with cancer chemopreventive activity. *Phytochemistry* **144**, 189-196.
- Ngo Bum, E., Taiwe, G. S., Moto, F. C. O., Ngoupaye, G. T., Nkantchoua, G. C. N., Pelanken, M. M., Rakotonirina, S.V., and Rakotonirina, A. 2009. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative properties of the roots of *Nauclea latifolia* Smith in mice. *Epilepsy and Behavior*, **15** (4), 434-440.
- Nohong, Soekamto N. H., Ahyar Ahmad, A., and Sahidin. 2018. α -Amyrin and β -sitosterol from bark extract of *Rhizophora mucronata* Lamk. and their cytotoxic activity against HeLa Cell Line. *International Research Journal of Pharmacy* **9**, 75-79.
- Nwaogu, L. A., Alisi, C. S., Igwe, C. U., and Ujowundu, C. O. 2008. A comparative study of the antimicrobial properties of the ethanolic extracts of *Landolphia owariensis* leaf and root. *African Journal of Biotechnology* **7** (4), 368-372.
- O'Connor, S. E., and Maresh, J. J. 2006. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports* **23** (4), 532-547.
- Odugbemi, T., and Akinsulere, O. 2006. Medicinal Plants by Species names. Outlines and Pictures of Medicinal Plants from Nigeria. University of Lagos Press, Lagos, pp 95-156.
- Ogunlana, E. O. and Ramstad, E. 1975. Investigations into the antibacterial activities of local plants. *Planta Medica* **27** (4), 354-360.
- Okonkwo, J. N. 2013. Isolation and characterization of potential bioactive compounds of *Landolphia owariensis*. *International Journal of Applied Research in Natural Products* **6** (3), 23.
- Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., and Pereira, J. A. 2007. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as

- source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food chemistry* **105** (3), 1018-1025.
- Omino, E. A., and Kokwaro, J. O. 1993. Ethnobotany of Apocynaceae species in Kenya. *Journal of ethnopharmacology* **40** (3), 167-180.
- Onasanwo S.A. and Elegbe R.A. 2006. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the leaf extracts of *Hedranthera barteri* in rats and mice. *African Journal of Biomedical Research* **9**, 109-117.
- OMS. Principaux repères sur la résistance aux antimicrobiens. 2018. <http://www.who.int/fr/newsroom/fact-sheets/detail/r%C3%A9sistance-aux-antimicrobiens>.
- Ogunlana, E. O., and Ramstad, E. 1975. Investigations into the antibacterial activities of local plants. *Planta Medica* **27** (4), 354-360.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). 2002. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005, Genève, WHO/EDM/TRM/2002, p 78.
- Parsonnet, J. 1995. Bacterial infection as a cause of cancer. *Environmental Health Perspectives* **103** (8), 263-268.
- Patel, M. B., Miet, C., and Poisson, J. 1967. Alkaloids of some African *Tabernaemontana*. In *Annales pharmaceutiques francaises* **25** (5), 379-384.
- Pelletier, P. 1819. Mémoire sur un nouvel alcali végétal (la strychnine) trouvé dans la fève de Saint-Ignace, la noix vomique, etc. *Annales de Chimie et de Physique* **10**, 142-177.
- Pereira, P. S., França, S. D. C., Oliveira, P. V. A. D., Breves, C. M. D. S., Pereira, S. I. V., Sampaio, S. V., Nomizo, A., and Dias, D. A. (2008). Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and *in vitro* cytotoxicity. *Química Nova* **31** (1), 20-24.
- Petersen, M., Strack, D., and Matern, U. 1999. Biosynthesis of phenylpropanoid and related compounds. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews*. In: M. Wink (ed.). Sheffield Academic Press Ltd. London, pp 151-221.
- Pichon, M. 1948. Classification des Apocynacées: IX. Rauvolfiées, Alstoniées, Allamandées et Tabernaemontanoidées. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Série B, Botanique* **27**, 152-251.
- Platz, E. A., Willett, W. C., Colditz, G. A., Rimm, E. B., Spiegelman, D., and Giovannucci, E. 2000. Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle-aged US men. *Cancer Causes and Control* **11** (7), 579-588.
- Ponomarev, V. D., Oganessian, É. T., and Semenchenko, V. F. 1971. Absorption spectra of pentacyclic triterpenoids in sulfuric acid. *Chemistry of Natural Compounds* **7** (2), 139-141.
- Pousset, J., Touré, P., Lo, I., Cados, M. and Diop, M. 1983. Plantes médicinales Africaine XII. Mise au point d'un sirop antitussif et étude clinique préliminaire. *Médecine d'Afrique noire électronique* **30** (4), 191-192.
- Prakash Chaturvedula, V. S., Sprague, S., Schilling, J. K., and Kingston, D. G. I. 2003. New Cytotoxic Indole Alkaloids from *Tabernaemontana calcarea* from the Madagascar Rainforest 1. *Journal of Natural Products* **66** (4), 528-531.

- Quattrocchi, U. 2012. CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology, 1st edition. CRC press, New Delhi **5**, p 3650.
- Ramesha, B. T., Suma, H. K., Senthilkumar, U., Priti, V., Ravikanth, G., Vasudeva, R., Kumar, S. T.R., Ganeshaiyah. K.N., and Shaanker, R. U. (2013). New plant sources of the anti-cancer alkaloid, camptothecin from the *Icacinaeae taxa*, India. *Phytomedicine* **20** (6), 521-527.
- Rahman, A. U. 1986. Nuclear magnetic resonance: basic principles. Springer, New York, pp 34-86.
- Rahman, A. U., Choudhary, M. I., and Thonsen, W. J., 2001. Bioassay techniques for drug development, The Netherlands: Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp 28-29.
- Rastrelli, L., Saturnino, P., Schettino, O., and Dini, A. 1995. Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43** (8), 2020-2024.
- Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F., and Zwahlen, M. 2008. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet* **371** (9612), 569-578.
- Rizk, A. M., Am, R., Al Nagdy, S. A., and El Missiry, M. M. 1982. Constituents of plant growing in Qatar. *Bases bibliographiques Pascal et Francis* **52** (2), 35-42.
- Roskov, Y., Kunze, T., Paglinawan, L., Orrell, T., Nicolson, D., Culham, A., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., Baillargeon, G., Hernandez, F. and De Wever, A. 2013. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2013 Annual Checklist. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2013/. Species 2000: Reading, United Kingdom.
- Ruffo, C. K., Birnie, A., and Tengnas, B. 2002. Edible wild plants of Tanzania, Relma Technical Handbook Series 27, Nairobi, Kenya, Regional Land Management Unit (Relma), Swedish International Development Cooperation Agency (SIDA), p 766.
- Ruiz-Vargas, J. A., Morales-Ferra, D. L., Ramírez-Ávila, G., Zamilpa, A., Negrete-León, E., Acevedo-Fernández, J. J., and Peña-Rodríguez, L. M. 2019. α -glucosidase inhibitory activity and in vivo antihyperglycemic effect of secondary metabolites from the leaf infusion of *Ocimum campechianum* mill. *Journal of Ethnopharmacology* **243**, 112081.
- Salard-Cheboldaeff, M. 1981. Palynologie maestrichtienne et tertiaire du Cameroun. Resultats botaniques. *Review of Palaeobotany and Palynology* **32** (4), 401-439.
- Sandjo, L. P., and Kuete, V. 2013. Ceramides, cerebrosides, and related long chains containing derivatives from the medicinal plants of Africa. In *Medicinal Plant Research in Africa*, 607-620.
- Sathishkumar, T., Baskar, R., Aravind, M., Tilak, S., Deepthi, S. and Bharathikumar, V. M. 2013. Simultaneous extraction optimization and analysis of flavonoids from the flowers of *Tabernaemontana heyneana* by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electron spray ionization/mass spectrometry. *International Scholarly Research Notices Biotechnology* **13**, 1-10.
- Saulnier, P. 1998. Plantes médicinales et soins en Afrique. SEPIA, Saint-Maur, pp 40-84.

- Schmidt, U., Hajjar, R. J., and Gwathmey, J. K. 1995. The force interval relationship in human myocardium. *Journal of Cardiac Failure* **1** (4), 311-321.
- Schöttner, M., Ganßer, D., and Spittle, G. 1997. Interaction of lignans with human sex hormone binding globulin (SHBG). *Zeitschrift für Naturforschung C* **52** (11-12), 834-843.
- Senatore, F., D'Agostin, M., and Dini, I. 2000. Flavonoid glycosides of *Barbarea vulgaris* L.(Brassicaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** (7), 2659-2662.
- Shafizadeh, F., and Melnikoff, A. B. 1970. Coumarins of *Artemisia tridentat* ssp. vaseyana. *Phytochemistry* **9** (6), 1311-1316.
- Sherman, J., McKay, M. J., Ashman, K., and Molloy, M. P. 2009. How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy. *Proteomics* **9** (5), 1120-1123.
- Shinoda J., 1928. Color reactions of flavone and flavanol derivatives and the like. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan: Yakugaku Zasshi* **48**, 214–220.
- Shriff, N., Saudarshana, M. S., Umesha, S., and Hariprasad, P. 2006. Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. *Africa journal of biotechnology* **5** (10), 946-950.
- Siddiqui, B. S., and Kardar, M. N. 2001. Triterpenoids from *Lawsonia alba*. *Phytochemistry* **58** (8), 1195-1198.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. 2020. Cancer statistics. 2020. CA: a Cancer Journal for Clinicians **70** (1), 7-30.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Fedewa, S. A., Butterly, L. F., Anderson, J. C., Cercek, A., Smith, R. A., and Jemal, A. 2020. Colorectal cancer statistics, 2020. CA: a Cancer Journal for Clinicians **70** (3), 145-164
- Silva, S. A. S. D., Agra, M. D. F., Tavares, J. F., da-Cunha, E. V., Barbosa-Filho, J. M., and Silva, M. S. D. 2010. Flavanones from aerial parts of *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth, Boraginaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20** (5), 682-685.
- Sofowora, A. 1993. Phytochemical screening of medicinal plants and traditional medicine in Africa. Spectrum Books Ltd, Ibadan, pp 270 – 289.
- Sou, S., Mayumi, S., Takahashi, H., Yamasaki, R., Kadoya, S., Sodeoka, M., and Hashimoto, Y. 2000. Novel α -glucosidase inhibitors with a tetrachlorophthalimide skeleton. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **10** (10), 1081-1084.
- Srivastava, B., Sharma, B. K., Baghel, U. S., and Sethi, N. 2010. Ultra performance liquid chromatography (UPLC): a chromatography technique. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance* **2** (1), 19-25.
- Stapf, O. 1902. Apocynaceae. In: W.T. Thiselton-Dyer (ed.), *Flora of Tropical Africa*. Lovell Reeve and Co., London **4** (1), pp 24–231.
- Stærk, D., Skole, B., Jørgensen, F. S., Budnik, B. A., Ekpe, P., and Jaroszewski, J. W. 2004. Isolation of a Library of Aromadendranes from *Landolphia dulcis* and Its Characterization Using the VolSurf Approach. *Journal of Natural Products* **67** (5), 799-805

- Staudt, A. 1897. Filed as *Conopharyngia contorta* Stapf (family Apocynaceae). Academy of Natural Sciences (Philadelphia Herbarium), Philadelphia, p 796.
- Sugawara, T., Zaima, N., Yamamoto, A., Sakai, S., Noguchi, R., and Hirata, T. 2006. Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerebrosides and their cytotoxicity against human colon cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70** (12), 2906–2912
- The Plant List with literature. Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/btkum2> accessed via GBIF.org on 2021-05-21.
- Okonkwo, T. J., Osadebe, P. O., and Proksch, P. 2016. Bioactive phenylpropanoids, phenolic acid and phytosterol from *Landolphia owariensis* P. Beauv stringy seed pulp. *Phytotherapy Research* **30** (1), 78-83.
- Tlhapi, D. B., Ramaite, I. D., Van Ree, T., Anokwuru, C. P., Orazio, T. S., and Hoppe, H. C. 2019. Isolation, Chemical Profile and Antimalarial Activities of Bioactive Compounds from *Rauwolfia caffra* Sond. *Molecules* **24** (1), 39.
- Uphof, J. C. T. 1959. Dictionary of economic plants. H. R. Engelmann (J. Cramer), Weinheim, pp 39-400.
- Van Beek, T. A., Verpoorte, R., Svendsen, A. B., Leeuwenberg, A. J. M., and Bisset, N. G. 1984. *Tabernaemontana* L.(Apocynaceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **10** (1), 1-156.
- Verger, P. 1967. Awon ewé Osanyin: Yoruba medicinal leaves. University of Ife, Institute of African Studies **8**, p 72.
- Vernon, H. H., et Françoise B. 1996. Les plantes à fleurs : 306 familles de la flore mondiale. Nathan, Paris, pp 222-227.
- Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G., and Vigneri, R. 2009. Diabetes and cancer. *Endocrine-Related Cancer* **16** (4), 1103-1123.
- Vigneri, R. 2009. Diabetes: diabetes therapy and cancer risk. *Nature Reviews Endocrinology*, **5** (12), 651-652.
- Wagner H., and Blatt S. 2001. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp 199-245.
- Warnecke, D., and Heinz, E. 2003. Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60** (5), 919-941.
- Watson, A. J., and Collins, P. D. 2011. Colon cancer: a civilization disorder. *Digestive Diseases* **29** (2), 222-228.
- Weber, K. T., Hammache, D., Fantini, J., and Ganem, B. 2000. Synthesis of glycolipid analogues that disrupt binding of HIV-1 gp120 to galactosylceramide. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **10** (10), 1011-1014.
- Winkel-Shirley, B. 2001a. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126** (2), 485-493.
- Winkel-Shirley, B. 2001b. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology* **127** (4), 1399-1404.

- Wu, C. H., and Yen, G. C. 2005. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* **53** (8), 3167-3173.
- Yehye W. A., Rahman N. A., Ariffin A., Hamid S. B. A., Alhadi A. A., Kadir F. A., Yaeghoobi, M. 2015 Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *European Journal of Medicinal Chemistry* **101**, 295-312.
- Yutaka S, Kazunori O, Noriaki, M., and Tsuyoshi Y. 1992. Triterpenoids from the fruit galls of *Actinidia polygama*. *Phytochemistry* **31** (8), 2801-2804.
- Zetler, G., Lenschow, E., and Prenger-Berninghoff, W. 1968. Action of 11 indole alkaloids on the guinea pig heart *in vivo* and *in vitro* compared with those of 2 synthetic azepinoindoles, quinidine and quindonium. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **260** (1), 26-49.
- Zhou, C., Li, X., Li, H., and Li, R. 2012. Chemical constituents from the leaves of *Craibiodendron yunnanense*. *Biochemical Systematics and Ecology* **45**, 179-182.
- Zocoler, M. A., de Oliveira, A. J., Sarragiotto, M. H., Grzesiuk, V. L., and Vidotti, G. J. 2005. Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16** (6B), 1372-1377.
- Zuo, H. J., Wang, T., Qi, Y. X., Zhao, Q. C., and Li, Z. B. 2013. Extraction, purification and cytotoxic activity of cerebroside from *Asterina pectinifera*. In *Advanced Materials Research* **781**, 682-686.

Publications

Ebede, G. R., Ndongo, J. T., Mbing, J. N., Shehla, N., Rahman, A. U., Pegnyemb, D. E., and Choudhary, M. I. 2021. Isolation of new secondary metabolites from the liana *Landolphia lucida* K. Schum. (Apocynaceae). *Phytochemistry Letters* **41**, 27-33.

Ebede, G. R., Ndongo, J. T., Mbing, J. N., Kenfack, H. C., Pegnyemb, D. E., and Bochet, C. G. 2021. Contortamide, a new anti-colon cancer cerebroside and other constituents from *Tabernaemontana contorta* Stapf (Apocynaceae). *Natural product research* **35** (11), 1757-1765.

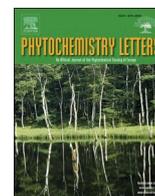
Poster

Guy R. Ebede, Joseph T. Ndongo, Joséphine N. Mbing, Hector C. M. Kenfack, Dieudonné E. Pegnyemb a and Christian G. Bochet. Evaluation of anti-colon cancer activity of chemical constituents from *Tabernaemontana contorta* Stapf (Apocynaceae). The 27th annual conference, Cameroon biosciences society. December, 02nd to 04th 2020.

Guy Roland Ebede, Joseph Thierry Ndongo, Joséphine Ngo Mbing, Nuzhat Shehla, Atta-ur Rahman, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb, Muhammad Iqbal Choudhary. Antibacterial and antidiabetic constituents from the liana *Landolphia lucida* K. Schum. (Apocynaceae). The 2nd International Conference, Cameroon Academy of Young Scientists (CONFCAYS-2021). August, 18th to 20th 2021

« *Ce n'est pas d'où vous venez
qui compte, mais où vous allez.* »

Ella Fitzgerald



Isolation of new secondary metabolites from the liana *Landolphia lucida* K. Schum. (Apocynaceae)

Guy Roland Ebede^{a,c}, Joseph Thierry Ndongo^{a,b,*}, Joséphine Ngo Mbing^a, Nuzhat Shehla^c, Atta-ur Rahman^c, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb^a, Muhammad Iqbal Choudhary^{c,d,**}

^a Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

^b Department of Chemistry, Higher Teacher Training College, University of Yaoundé I, P.O. Box 47, Yaoundé, Cameroon

^c H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, Karachi 75270, Pakistan

^d Department of Biochemistry, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Jeddah-21589, Saudi Arabia

ARTICLE INFO

Keywords:

Pentacyclic triterpene
Bicoumarin
Antibacterial activity
Landolphia lucida

ABSTRACT

A new pentacyclic triterpene 3-*O*- β -(*E*)-(4-*O*-acetylferuloyl)-lupeol (**1**) possessing an unusual (*E*)-acetylferuloyl moiety at C-3 and a new bicoumarin 7,7'-dimethoxy-6,6'-dicoumarinyl ether (**2**) were isolated from the liana *Landolphia lucida* K. Schum, along with fourteen previously known compounds **3–16**, where methandriol dipropionate (**3**) and 2,3-bis-(4-hydroxy-3-methoxy-benzyl)-dimethyl-succinate (**5**) were obtained for the first time from natural sources. The structures of the new compounds were established on the basis of extensive 1D and 2D NMR spectroscopy, and HRMS data analyses. The absolute configuration of **1** was determined by circular dichroism (CD) spectroscopy. Furthermore, compounds **1** and **2** had exhibited a significant antibacterial activity against *Escherichia coli* (ATCC 25922) with MIC values of 2.3 μ M and 4.6 μ M, respectively; while compounds **4** and **5** showed antiglycation and α -glucosidase inhibitory activities.

1. Introduction

Landolphia (Apocynaceae) is a genus of flowering plants native to tropical Africa. There are about 50 species of *Landolphia* in continental Africa and about 14 more species in Madagascar (Omino, 2002). *Landolphia lucida* K. Schum is a liana up to 1–20 m high, which is distributed in the Central and East Africa, from Nigeria to Comoro Islands. Regarding the Plants of the World Online and Flora of Tropical East Africa, the currently accepted name of *Landolphia lucida* K. Schum. is *Dictyophleba lucida* (K. Schum.) Pierre (De Hoogh, 1989). However, in the present paper the synonym *Landolphia lucida* is used. A phytochemical study of the leaves of *Dictyophleba lucida* (K. Schum.) Pierre revealed the presence of dictyolucidine, dictyolucidamine and dictyophlebine (Janot et al., 1966). A root-decoction is used for children as a vermifuge (Burkill, 1985). A latex is obtained from the stems, and the flexible stems can be used as tying material (Uphof, 1959; Ruffo et al., 2002). Previously biological assays on the leaves, stems and trunk of *Dictyophleba lucida* (K. Schum.) Pierre showed the antimycotic (Khan,

1999), antibacterial and antifungal (Khan and Nkunya, 1990) activities.

In continuation of our search for new bioactive compounds from Cameroonian medicinal plants, the methanolic extract of the liana *Landolphia lucida* K. Schum has been investigated. A new pentacyclic triterpene, possessing an unusual (*E*)-acetylferuloyl moiety at C-3, 3-*O*- β -(*E*)-(4-*O*-acetylferuloyl)-lupeol (**1**) and a new bicoumarin 7,7'-dimethoxy-6,6'-dicoumarinyl ether (**2**), were isolated along with fourteen known compounds (**3–16**) (Figs. 1 and S1). In this report, we describe the structure elucidation of the new compounds **1–2**, and determination of absolute configuration of **1**, as well as NMR chemical shifts assignments of methandriol dipropionate (**3**), obtained together with 2,3-bis-(4-hydroxy-3-methoxy-benzyl)-dimethyl-succinate (**5**) for the first time as natural products. Furthermore, *in vitro* anti-bacterial (**1–2**), antiglycation and α -glucosidase activities (**1**, **2**, **4** and **5**), were also evaluated.

* Corresponding author at: Department of Chemistry, Higher Teacher Training College, University of Yaoundé I, P.O. Box 47, Yaoundé, Cameroon.

** Corresponding author at: H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, Karachi 75270, Pakistan.

E-mail addresses: thierry.ndongo@ens.cm (J.T. Ndongo), iqbal.choudhary@iccs.edu (M.I. Choudhary).

<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.10.012>

Received 8 April 2020; Received in revised form 18 October 2020; Accepted 21 October 2020

1874-3900/© 2020 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

2. Results and discussion

The liana *Landolphia lucida* K. Schum was powdered, and extracted with MeOH to obtain crude extract. The crude extract partitioned with *n*-hexane, CH₂Cl₂, and EtOAc. The EtOAc extract was subjected to silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC, which revealed 16 compounds. The structures of the new compounds, named 3-*O*-β-(*E*)-(4-*O*-acetylferuloyl)-lupeol (**1**) and 7,7'-dimethoxy-6,6'-dicoumarinyl ether (**2**), were elucidated by modern spectroscopic methods and CD experiment. The known compounds were identified as methandriol dipropionate (**3**) (McKinney et al., 2012), 3β-(*E*)-feruloyllupeol (**4**) (Lei et al., 2007), 2,3-bis-(4-hydroxy-3-methoxy-benzyl)-dimethyl-succinate (**5**) (Schöttner et al., 1997), 6,8-dimethoxy-7-(6'-methoxy-7'-coumarinyloxy) coumarin (**6**) (Qian et al., 2014), benzoic acid (**7**) (Makboul et al., 2013), isosopoletin (**8**) (Shafizadeh and Melnikoff, 1970), scopoletin (**9**) (Mireku et al., 2017), isovanillic acid (**10**) (Ge et al., 2018), quercitrin (**11**) (Lin et al., 2007), 6-hydroxyluteolin (**12**) (Lin et al., 2007), quercetin (**13**) (Lin et al., 2007), 3',4',5-trihydroxyflavone (**14**) (Chen et al., 2020), eriodictyol (**15**) (Lin et al., 2007), and rutin (**16**) (Gupta et al., 2015).

Compound **1** was obtained as a white amorphous solid. The molecular formula C₄₂H₆₀O₅ was established based on its HREI-MS spectrum (*m/z* 644.4454 [M]⁺, calcd for C₄₂H₆₀O₅, 644.4441), indicating thirteen degrees of unsaturation. In the IR spectrum, absorption bands were observed at 2936 (–CH₃), 1738 (O=C– of ester), 1599–1151 (aromatic group), 1457 (cyclic –CH₂), and 1093 cm^{–1} (cycloalkane). The ¹H NMR chemical shifts data of **1** (Table 1) showed signals for seven tertiary methyl singlets (δ_H 1.70, 1.48, 1.08, 0.93, 0.88, 0.86 and 0.82) indicative of a triterpenoid skeleton. The ¹H NMR spectrum also displayed resonances at δ_H 1.70 (3H, s, H-30), 4.56 (1H, d, *J*_{29a, 29b} = 2.6 Hz, H-29a), and 4.70 (1H, d, *J*_{29b, 29a} = 2.6 Hz, H-29b), corresponding to an isopropenyl side chain, and a characteristic lupenol proton signal at H_β

19 (δ_H 2.43) indicating the lupine-type triterpenoidal skeleton (Connolly and Hill, 1991). These assignments were in accordance with HMBC correlations of H-30 methyl protons with C-20 (δ_C 151.5) and C-29 (δ_C 109.9), H-19 with C-20 (δ_C 151.5), and of H-29 with C-19 (δ_C 48.8) (Fig. 2). The molecular formula, and ¹³C NMR data indicated that apart from a triterpene skeleton of **1**, a side chain of additional 12 carbons was also present, attributed to 4'-acetoxy-3'-methoxy-*trans*-cinnamoyloxy (*E*-acetylferuloyloxy) group on the basis of detailed spectroscopic analysis. In the ¹H NMR spectrum the presence of five downfield signals between δ_H 6.56–7.64 and their coupling pattern suggested the presence of 3',4'-disubstituted cinnamoyl moiety. Coupling constants of the two mutually coupled protons at δ_H 7.64 (1H, *J*_{7,8} = 16.0 Hz, H-7') and 6.56 (1H, *J*_{8,7} = 16.0 Hz, H-8') suggested the presence of a *trans*-cinnamoyl group. The ¹H NMR spectrum also revealed two-proton doublets at δ_H 7.10 (1H, *J*_{5',6'} = 8.1 Hz, H-5'), and 7.46 (1H, *J*_{2',6'} = 2.0 Hz, H-2'), and one proton doublet at δ_H 7.25 (1H, *J*_{6',5'} = 8.1 Hz, *J*_{6',2'} = 2.0 Hz, H-6') due to *ortho* (H-5'), *meta* (H-2'), and *ortho-meta* (H-6') coupled protons, respectively. The ¹³C NMR data showed six downfield protonated carbon signals at δ_C 144.3 (C-7'), 119.8 (C-8'), 124.1 (C-5'), 112.4 (C-2'), 122.1 (C-6'), and 20.4 (C-11'), along with five downfield quaternary carbon resonances at δ_C 168.8 (C-10'), 166.8 (C-9'), 151.5 (C-3'), 141.4 (C-4'), and 134.3 (C-1'). The ¹H and ¹³C NMR chemical shifts data of **1** (Table 1) showed resemblance with that of known compound 3-β-(*E*)-feruloyllupeol (**4**) (Lei et al., 2007), except for the obvious difference observed at C-4'. The detailed analysis of the NMR data established the structure of compound **1** bearing unprecedented additional methyl ester group at C-4' (δ_C 141.5). Methyl protons singlet at δ_H 2.23 (3H, H-11') was due to an ester methyl group, and a methoxy signal at δ_H 3.91 (3H, 3'-OCH₃) were also observed in the ¹H NMR spectrum, and their attachments on the substituted benzene moiety were supported by their respective HMBC correlations with C-4' (δ_C 141.5), and with C-3' (δ_C 151.5), respectively. The important HMBC correlations of H-6' with C-4',

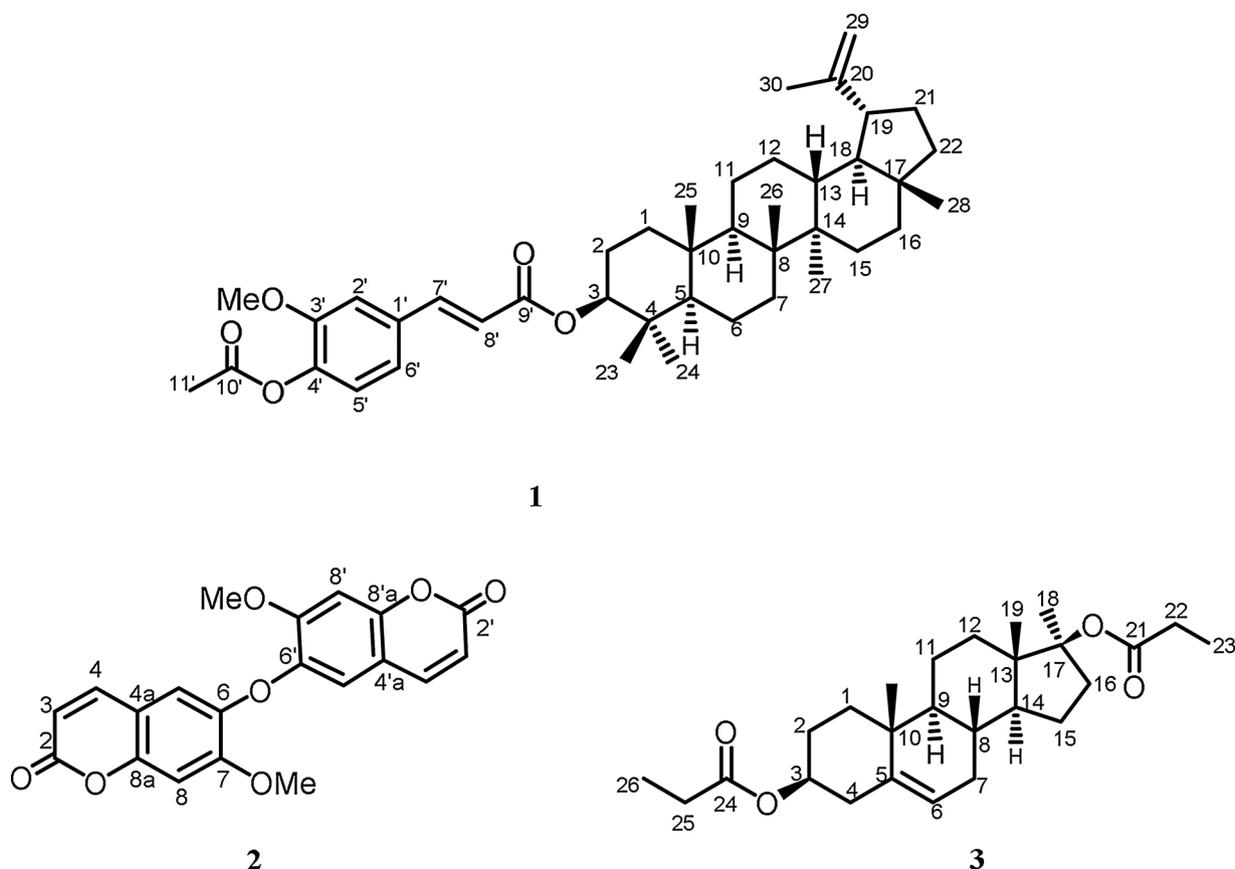


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–3.

Table 1
¹H and ¹³C NMR chemical shifts data of **1** and **3**.

No.	1 ^a		3 ^b	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1a		1.07	38.3	1.92
1b		1.73		1.16
2a		1.65		1.63
2b	24.5	1.72	28.8	1.85
3	81.3	4.56	75.4	4.52
4a	38.7	–	39.2	1.94 dd (2.6, 7.6)
4b				2.31
5	56.1	0.93	141.1	–
6a	18.9	1.55	123.6	5.39 d (4.9)
6b		1.70		
7a	34.9	1.41		1.57
7b		1.48	32.8	2.02
8	41.6	–	33.8	1.57
9	51.1	1.43	51.5	1.01
10	37.9	–	37.8	–
11a	21.6	1.26		1.44
11b		1.44	21.8	1.63
12a	25.9	1.15		1.47
12b		1.58	33.2	1.71
13	38.9	1.07	47.6	–
14	43.7	–	50.7	1.23
15a	27.7	1.04		1.33
15b		1.69	24.4	1.66
16a	36.2	1.12		1.58
16b		1.75	37.7	2.09 dd (6.7, 8.9)
17	43.7	–	92.0	–
18	49.0	1.43	21.8	1.43
19	48.8	2.43	14.8	0.89
20	151.5	–	19.5	1.06
21	28.2	0.89	175.8	–
		1.03		
22a	40.6	1.23	29.3	2.25
22b		1.37		
23	28.3	0.88	9.6	1.09
24	16.6	0.93	175.8	–
25	16.4	0.86	28.6	2.30 d (7.6)
26	17.0	1.08	9.4	1.08
27	14.9	1.48		
28	18.3	0.82		
29a	109.9	4.56 d (2.6)		
29b		4.70 d (2.6)		
30	19.5	1.70		
1'	134.3	–		
2'	112.4	7.46 d (2.0)		
3'	151.5	–		
4'	141.4	–		
5'	124.1	7.10 d (8.1)		
6'	122.1	7.25 dd (2.0, 8.1)		
7'	144.3	7.64 d (16.0)		
8'	119.8	6.56 d (16.0)		
9'	166.8	–		
10'	168.8	–		
11'	20.4	2.23		
3'-OCH ₃	56.4	3.91		

Assignments are based on the HMBC, HSQC, COSY and DEPT experiments.

^a Sample was in C₃D₆O, ¹H NMR was measured at 800 MHz, and ¹³C NMR at 200 MHz.

^b Sample was in CD₃OD, ¹H NMR was measured at 500 MHz, and ¹³C NMR at 125 MHz.

H-2' with C-4' and C-3', and H-2' with C-4' and C-3' showed that the acetylated and methoxylated groups were attached in carbon C-4' and C-3', respectively. Additional comparison of measured and calculated carbon shifts using the CSEARCH Robot Referee, were in good accordance to confirm assignment at C-4' and C-3' (Fig. S39). The difference to predicted values for these two carbons were 0.1 and 1.3 ppm, respectively (Haider and Robien, 2020). The di-ester group was placed at C-3 based on biogenetic consideration (Siddiqui and Kardar, 2001), as well as based on HMBC correlations of H-3 proton (δ_H , 4.56) with C-4 (δ_C 38.7), C-9' (δ_C 166.8), and C-23 (δ_C 28.3). The absolute configuration of

C-3 was deduced by analysis of CD spectra (Fig. S15). Consequently, the absolute configuration was assigned as 3S because of its positive Cotton effect at 288 nm in the CD spectrum (Giorgio et al., 2004). Thus, the structure of new compound **1** was elucidated as 3-O- β -(E)-(4-O-acetylferuloyl)-lupeol. Various mass fragments in the EI-MS spectrum further substantiated these inferences (Fig. 3). The skeleton was finally confirmed through the hydrolysis of **1** with 2% methanolic KOH which yielded betulinic acid.

Compound **2** was obtained as white powder, m.p. 112–114 °C. Its molecular formula was established as C₂₀H₁₅O₇ by means of HRESI-MS (m/z 367.0738 [M+H]⁺, calcd for C₂₀H₁₅O₇, 367.0740), suggesting 14 degrees of unsaturation. The IR spectrum reveals the presence of carbonyls (1731 cm⁻¹) and aromatic moieties (1602 and 1516 cm⁻¹). Only five signals at δ_H 6.26 (1H, d, $J_{3,4}$ = 9.6 Hz, H-3/H-3'), 6.98 (2H, s, H-5/H-5'), 6.90 (2H, s, H-8/H-8'), 7.57 (2H, d, $J_{4,3}$ = 9.6 Hz, H-4/H-4'), and 3.94 (6H, s, 7-OMe and 7'-OMe) appear in the ¹H NMR spectrum (Table 2). This suggests the presence of a 6,6-disubstituted coumarin moiety. The molecular formula C₂₀H₁₄O₇, the IR spectrum, and the number of proton signals in the ¹H NMR spectrum suggest compound **2** to be an oxygenated biscoumarin derivative. The ¹³C NMR spectrum (Table 2) reveals ten carbon signals, which are only half of the number of carbon atoms in the molecular formula of C₂₀H₁₄O₇, suggesting a symmetrical dimeric structure for compound **2**. The important NOESY correlations observed between H-4 and H-5 as well as between H-3 and H-4 enabled us to unambiguously establish the substitution pattern of compound **2** (Fig. 4). The assignment of all carbon atom signals was done using HSQC and HMBC experiments. The HMBC correlation observed between the proton at δ_H 6.98 (H-5) and the oxygenated aromatic carbon at δ_C 142.4 (C-6) suggests a linkage at C-6 position. Further pertinent HMBC correlations were observed from H-4 to C-8a and C-2, from H-3 to C-2 and C-4a, from H-5 to C-6, C-5, and C-6 as well as from H-8 to C-2, C-8a and C-6 (Fig. S25). The chemical shifts of C-6 (δ_C 142.4) and C-6' (δ_C 142.4) together with the HRESI-MS data suggest that the two coumarin moieties are linked through an oxygen bridge at C-6 and C-6'. This was supported by the EI-MS fragmentations at m/z 304, 192 and 177, and revealed two methoxy groups and one coumarin unit losses (Fig. S17). On the basis of the above spectral data, compound **2** was then characterized as 7,7'-dimethoxy-6,6'-dicoumarinyl ether. To the best of our knowledge, this compound is described here for the first time.

Compound **3** was obtained as a white powder. The molecular formula of C₂₆H₄₀O₄Na was deduced by HRESI-MS (m/z 439.2818 [M + Na]⁺, calcd for C₂₆H₄₀O₄Na, 439.2824) and NMR data, indicating 7 degrees of unsaturation. In the IR spectrum, bands were observed at 2939 (–CH₃), 1734 (O = C– of ester), 1460 (cyclic –CH₂), 1370 (–CH₂ (CH₃)₂), and 1086 cm⁻¹ (cycloalkane). Liebermann-Burchard reaction indicated that compound **3** possesses a steroidal skeleton (Kandati et al., 2012). The ¹H NMR spectra of compound **3** showed the presence of five intense singlets indicating the presence of five methyl groups at δ_H 0.89, 1.06, 1.08, 1.09, and 1.43. The oxygenated methine proton of this sterol skeleton appeared as a multiplet at δ_H 4.52, suggesting the presence of an ester group at C-3. The ¹H NMR chemical shifts data also showed proton at δ_H 5.39 (d, $J_{6,4}$ = 22.6, 7.6 Hz) suggesting the presence of a trisubstituted olefinic bond. The ¹³C NMR chemical shifts data (Table 1), together with DEPT 135 data, showed twenty-six carbon signals including five methyl, ten methylene, five methine, and six quaternary carbons. The ¹³C NMR data showed signals at δ_C 141.1, and 123.6 for C5, and C6 olefinic bond, respectively. Furthermore, oxygenated carbons were resonated at δ_C 75.4 (C-3), and 92.0 (C-17), corresponding to two propylester groups. The two carbonyls appeared at δ_C 175.8 and their respective positions were confirmed by cross peaks between H-4 and C-2/C-3/C-5/C-6/C-10/C-24, and between H-22 and C-23, and cross peaks between H-25 and C-23/C-24 in the HMBC spectrum (Fig. S36). Thus on the basis of COSY, HSQC, HMBC, and NOESY spectroscopic data, compound **3** was identified as methandriol dipropionate, an anabolic-androgenic steroid previously synthesized (McKinney et al., 2012). This is the first report of its NMR data and its isolation as a

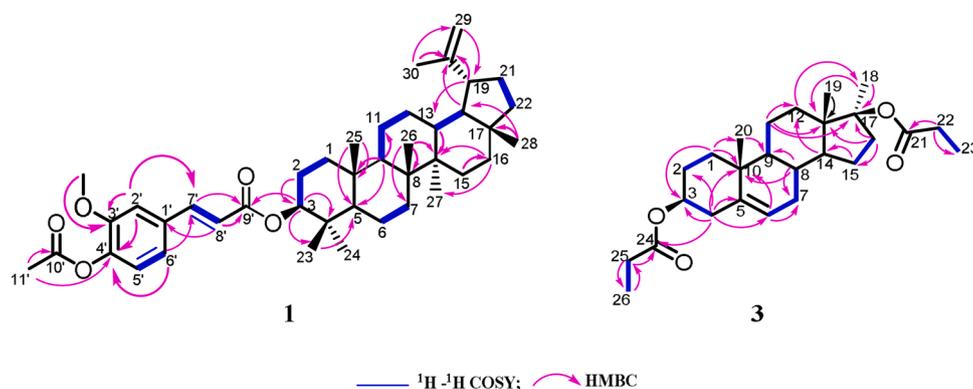


Fig. 2. Key $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations of compounds **1** and **3**.

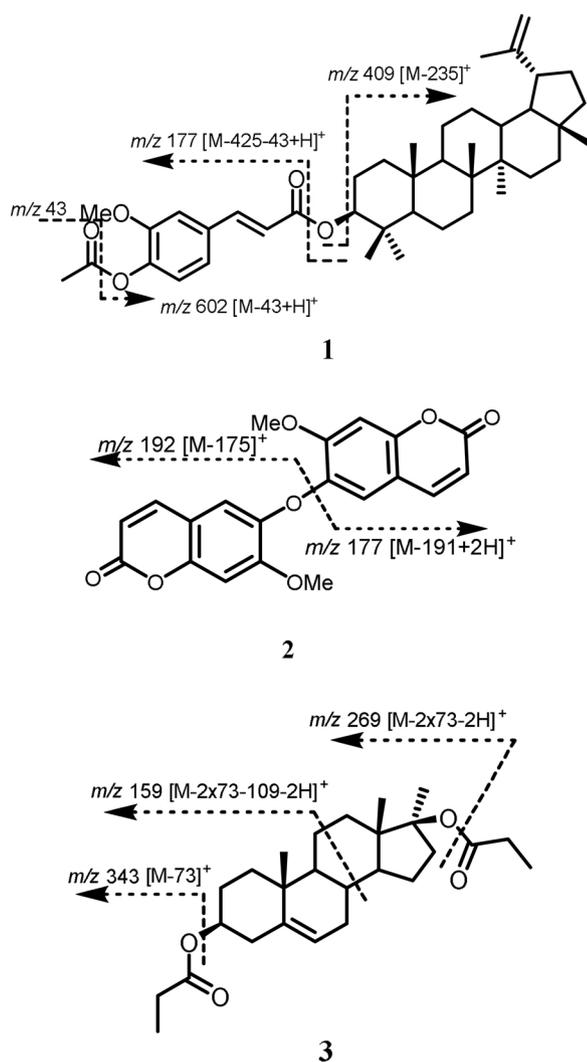


Fig. 3. EI-MS fragmentation patterns of **1-2** and FAB-MS fragmentation patterns of **3**.

natural product. The structure of **3** was further substantiated by various mass fragmentation patterns (Figs. 3 and S29) and identified in the fresh raw extract by LC–MS and LCM–S/MS experiments (Fig. S40–41).

Compounds **1** (MIC = 2.3 μM) and **2** (MIC = 4.6 μM) exhibited significant antibacterial activity against *Escherichia coli* (ATCC 25922) in comparison to the standard drug, ofloxacin (Table 3). AFM results (Fig. 5) showed the ability of **1** and **2** to inhibit MDR *Escherichia coli* at

Table 2
 ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts data of **2**.

No.	2	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
2	161.4	–
3	113.6	6.26 d (9.6)
4	143.8	7.57 d (9.6)
4a	111.5	–
5	114.9	6.98 s
6	142.4	–
7	149.8	–
8	103.2	6.90 s
8a	150.3	–
7-OMe	56.5	3.94 s
2'	161.4	–
3'	113.6	6.26 d (9.6)
4'	143.8	7.57 d (9.6)
4'a	111.5	–
5'	114.9	6.98 s
6'	142.4	–
7'	149.8	–
8'	103.2	6.90 s
8'a	150.3	–
7'-OMe	56.5	3.94 s

Assignments are based on the HMBC, HSQC, COSY and DEPT experiments. Sample was in CDCl_3 , ^1H NMR was measured at 600 MHz, and ^{13}C NMR at 150 MHz.

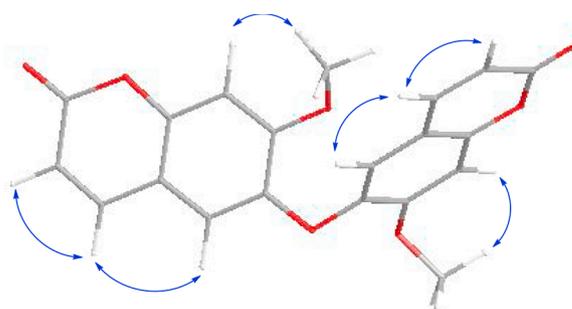


Fig. 4. NOESY correlations of compound **2**.

more than half thus gave promising result for further research.

Compounds **4** ($\text{IC}_{50} = 525.55 \pm 4.17 \mu\text{M}$) and **5** ($\text{IC}_{50} = 452.39 \pm 2.10 \mu\text{M}$), showed a good antiglycation activity *in vitro*. These compounds at 1 mM concentration exhibited 78.87 % (**4**) and 84.41 % (**5**) inhibition respectively, while the standard inhibitor rutin showed 90.97 % inhibition (Table 4). For the *in vitro* inhibitory activity for α -glucosidase, only compound **5** ($\text{IC}_{50} = 268.06 \pm 1.47 \mu\text{M}$) was active compared to the standard inhibitor acarbose (Table 4). However, compounds **1** and

Table 3*In vitro* antibacterial activity of compounds 1 and 2.

Compounds	antibacterial ^a <i>E. coli</i> ATCC 25922 (MIC)	% INHIBITION (MEAN ± S.D)
1	2.3	84 ± 2
2	4.6	78 ± 2
Ofloxacin ^b	138.4	90 ± 2

MIC is minimum inhibitory concentration (μM).

Antibacterial activity is expressed as mean values of three experimental data.

^a Highest test concentration at 4 mg/mL.^b Positive control.

2 were inactive for these assays. These activities of 4 and 5 probably might be due to electron donating effect of *meta*-methoxy group in the presence of *para*-hydroxyl group (Khan et al., 2009). Our study, therefore, indirectly confirms the mechanism of antidiabetic activity of 4 and 5 through a glycation and α -glucosidase inhibition.

3. Materials and methods

3.1. General experimental procedures

Optical rotations were measured on a P2000 automatic digital polarimeter. Melting points were performed on a Buchi-M560 melting point apparatus. CD Spectra were measured on a JASCO J-810 spectropolarimeter. UV spectra were measured on a Hitachi U-3200 spectrophotometer. IR spectra were recorded on a Shimadzu 8900FT-IR spectrophotometer in KBr disks. The NMR spectra in methanol- d_4 , acetone- d_6 and chloroform- d were obtained using Bruker Avance-500, Avance-600 cryo-probe and AV-III-HD 800 with cryo-probe instruments, operating at 500, 600, and 800 MHz for ^1H NMR, and 125, 150 and 200 MHz for ^{13}C NMR, respectively. Chemical shifts are given in

δ (ppm) using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. EI-MS, HREI-MS, and fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS) were obtained with a JEOL JMS-600H mass spectrometer. ESI-MS data were obtained on an ion-trap (Amazon Speed) spectrometer by Bruker (Germany). HRESI-MS, LC-MS and LC-MS/MS were measured on a Bruker (MaXisII) Q-TOF. Preparative HPLC was carried out on a Japan Analytical Instrument with a LC-908W detector using a sil-d- 60-80A column (250 × 20 mm, 4 μm) for normal phase, and ODS H-80 column for reverse phase. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated silica gel plates (Merck 60F₂₅₄; 20 × 20, 0.25 mm). Column chromatography was performed on silica gel (70–230 mesh; Merck). Chromatograms were visualized by spraying with a solution of 10 % H₂SO₄ or under ultraviolet light of wavelengths 254, and 366 nm.

Table 4*In vitro* antiglycation and α -glucosidase activities of compounds 4 and 5.

Compounds	antiglycation ^a IC ₅₀ ± SEM (μM)	α -glucosidase ^b IC ₅₀ ± SEM (μM)
4	452.39 ± 2.10	268.06 ± 1.47
5	525.55 ± 4.17	—
2	—	—
1	—	—
Rutin ^c	54.59 ± 2.20	—
Acarbose ^c	—	875.75 ± 2.08

IC₅₀ is the concentration (μM) that affords 50 % inhibition of growth.

Antiglycation activity is expressed as mean values of three experimental data.

“—” mean “not active”.

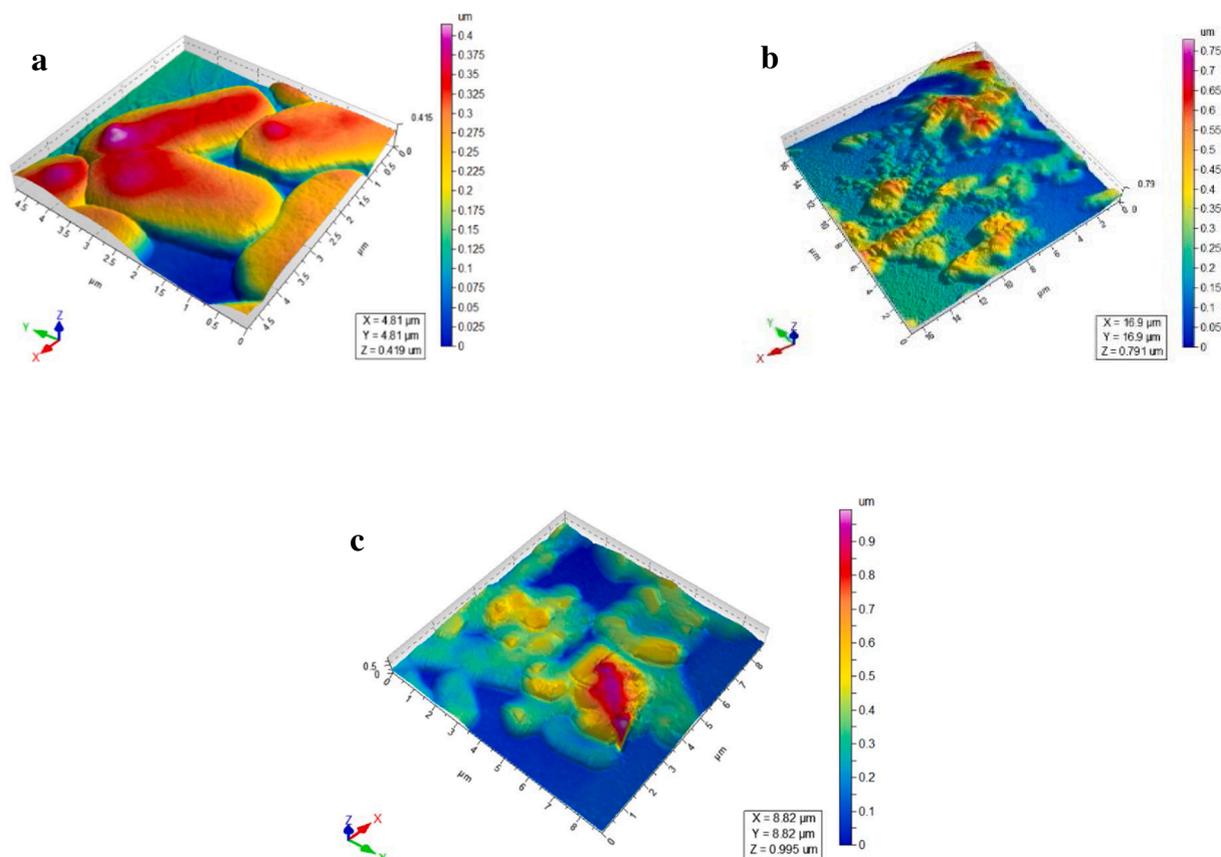
^a Test concentration at 1 mM.^b Test concentration at 0.5 mM.^c Positive control.

Fig. 5. Atomic force microscopy images of *E. coli* (ATCC 259229) untreated (a) and treated with compound 1 (b) and compound 2 (c) at 4 μg/mL respectively.

3.2. Plant material

The liana *Landolphia lucida* K. Schum. was collected at Mont Kalla (Nkolbison, at 8 km west of Yaounde) at the Centre Region of Cameroon in December 2017, and identified by Mr. Victor Nana (Botanist at National Herbarium, Yaounde, Cameroon). A voucher specimen (N° 64532/HNC) was deposited at the National Herbarium in Yaounde, Cameroon.

3.3. Extraction and isolation

Dried liana *Landolphia lucida* K. Schum. (3.8 kg) were powdered, and extracted at room temperature with MeOH (3 × 4 L) for a week. The crude extract was concentrated to dryness in a rotary evaporator at 40 °C to obtain a gummy residue (112.8 g). This gummy material was dissolved in water, and partitioned with *n*-hexane (2 × 2 L), CH₂Cl₂ (2 × 2 L), and EtOAc (3 × 2 L), respectively. The EtOAc extract (35.8 g) was separated by column chromatography over silica gel (70–230 mesh; Merck), eluted with gradient solvent system of CH₂Cl₂/MeOH (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:35, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 0:100, v/v). A total of 100 fractions of 250 mL each were obtained and combined based on TLC profiles into four main fractions (A–D). Fraction A (1.5 g, CH₂Cl₂/MeOH, 100:0 and 95:5) was subjected to silica gel column chromatography, and eluted with Hex-EtOAc (10% - 15%) to yield compounds **1** (8 mg), and **4** (3 mg). Fraction B (9.3 g, CH₂Cl₂/MeOH, 90:10, 85:15, 80:20 and 75:35) was separated by column chromatography over silica gel (70–230 mesh; Merck), eluted with CH₂Cl₂/MeOH (10%) and two fractions (B₁–B₂) were obtained on the basis of TLC. Fraction B₁ (100 mg) was subjected to Sephadex LH-20 column chromatography, and eluted with MeOH/CH₂Cl₂ (30%) to yield compounds **3** (7 mg), **7** (4 mg) and **10** (6 mg). Fraction B₂ (40 mg) was separated by preparative HPLC (using Hex/EtOAc, 40:60, v/v, flow rate = 4 mL/min), which yielded compounds **8** (4 mg), **9** (6 mg), **2** (5 mg) and **6** (7 mg) at retention times of *t_R* = 30, 36, 40 and 45 min, respectively. Fraction C (2.1 g, CH₂Cl₂/MeOH, 70:30, 65:35 and 60:40) was subjected to column chromatography over silica gel (70–230 mesh; Merck), and eluted with CH₂Cl₂/MeOH: (10:1, 5:1, v/v) to yield compounds **5** (5 mg), and **11** (10 mg). Fraction D (10.6 g, CH₂Cl₂/MeOH, 50:50 and 0:100) was purified by preparative HPLC (using MeOH/H₂O, 50/50, flow rate = 5 mL/min, *t_R* = 10 min, 15 min, 18 min, 35 min, and 40 min) to yield compounds **16** (5.6 mg), **12** (12.5 mg), **13** (3 mg), **15** (9 mg), and **14** (7 mg), respectively.

3.4. Physical and spectroscopic data of isolated compounds from the lianas of *Landolphia lucida* var. *hispidia*

3-O-β-(E)-(4-O-Acetylferuloyl)-lupeol (1): White powder; m.p. 241–243 °C; $[\alpha]_D^{26} = + 6.25$ (c 0.0012, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 213 (0.848), 229 (0.822), 278 (0.470) nm; CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \epsilon$) 288 (+1.74329); IR (KBr) ν_{max} 2936, 2865, 1738, 1660, 1599, 1261, 1093, 802 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; EI-MS (probe) 70 eV, *m/z* (rel. int. %): 644 [M]⁺(5), 602 (100), 409 (4), 194 (42), 177 (85), 43 (13); HRESI-MS *m/z* 644.4454 [M]⁺ (calcd for C₄₂H₆₀O₅, 644.4441).

7,7'-dimethoxy-6,6'-dicoumarinyl ether (2): White powder; m.p. 112–114 °C; $[\alpha]_D^{25} = + 32.3$ (c 0.0012, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 230 (1.745), 284 (0.787), 324 (0.594) nm; IR (KBr) ν_{max} 1731, 1602, 1516, 1270, 1161, 1033, 757 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2; EI-MS (probe) 70 eV, *m/z* (rel. int. %): 366 [M]⁺(21.6), 192 (48.7), 177 (53.1); HRESI-MS (positive mode) *m/z* 367.0738 [M+H]⁺, calcd for C₂₀H₁₅O₇, 367.0740).

Methandriol dipropionate (3): White powder; m.p. 96–98 °C; $[\alpha]_D^{26} = + 11.1$ (c 0.0016, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 214 (1.063), 229 (1.046); IR (KBr) ν_{max} 2939, 1734, 1460, 1370, 1262, 1193, 1086, 803 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; ESIHR-MS (positive mode) *m/z* 439.2818 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₆H₄₀O₄Na, 439.2824).

3.5. Antibacterial assays of compounds 1 and 2

The antibacterial activity evaluation was carried out in triplicate, according to the standard micro dilution method (Rahman, 2001), and expressed as minimum inhibitory concentration (MIC), comparing to antibiotic ofloxacin (positive control). Stock solutions 4 mg/mL of compounds **1** and **2** were prepared in 100% DMSO, and serially two-fold diluted in Mueller Hinton Broth (MHB) in 96-well plate concentrations between 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 µg/mL, such that the final volume becomes 100 µL (compound and media). Fully-grown *Escherichia coli* (ATCC 25922) were 1,000 times diluted in MHB media, and 100 µL of this diluted bacterial media were added to all previous wells, such that final volume (200 µL) would contain bacterial load of approximately 0.5–1.0 × 10⁶ CFU/mL. Positive control contains only media and bacteria. Each concentration was run in triplicates. Plates were sealed, and incubated at 37 °C for 18–22 h. Next day all wells were visually checked to confirm the growth of bacteria. Soon after noticing the clear and turbid wells, 20 µL of 0.02% Alamar Blue dye (Alfa Aesar) was added in each well, and incubated in a shaking incubator at 80 rpm, and 37 °C for 2 h. Change in colour of Alamar dye from blue to pink indicated the growth of bacterial strains. For quantitative analysis, absorbance was recorded at 570, and 600 nm in Multiskan™ GO spectrophotometer (ThermoScientific, USA). Percentage difference in reduction of Alamar Blue between treated and control cells were calculated using the formula reported by Lancaster (Lancaster and Fields, 1996).

3.6. Atomic force microscopy analysis

Fully grown bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922) was diluted, and adjusted to 2.5 × 10⁷ CFU/mL in MHB. These cells were treated with compounds **1** and **2** at the concentration of 4 µg/mL of sample, and incubated at 37 °C for 2 h. After incubation, cells were centrifuged (3500 rpm for 5 min), and pellets formed were washed with analytical grade water twice. Untreated positive control, and treated bacterial cells in a volume of 5 µL were applied on poly-L-lysine coated silicon wafer surface, and dried at room temperature. Atomic force microscopic (AFM) analysis was carried out (Agilent Technologies 5500) in tapping mode with silicon nitride cantilever. 3D Topography, and its respective pseudo colour images were obtained after each scan, and PicoView 1.2 software was used to analyse these images, and further morphological structure of control and treated bacteria were evaluated.

3.7. Antiglycation activity

The antiglycation studies were carried out by using ELISA based spectrophotometric assay, previously reported with slight modification. 20 µL of compounds **1**, **2**, **4** and **5** (1 mM) and 50 µL HSA (10 mg/mL) were added to prepare the reaction mixture. Then 50 µL fructose (500 mM) and 80 µL phosphate buffer (100 mM; pH 7.4) were added, and the plate was incubated at 37 °C for 7 days. Na₃N (3 mM) was added in phosphate buffer as an anti-microbial agent. After 7 days of incubation, the specific fluorescence (excitation, 330 nm; emission, 440 nm) was measured to analyse the antiglycation activity of the test sample using a microtitre plate spectrofluorometer (Spectra Max, Molecular Devices, CA, USA) (Wu and Yen, 2005). Percent inhibition of AGEs formation by the test sample versus control was calculated by using the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = (1 - \text{Fluorescence of test sample} / \text{Fluorescence of the control group}) \times 100$$

The IC₅₀ value was determined by monitoring the effect of various concentrations (ranges between 15–1000 µM) of test compounds. The IC₅₀ values were calculated by using EZ-FIT Enzyme Kinetics Program (Perrella Scientific Inc., Amherst, USA). The antiglycation activity of

compounds 4 and 5 was compared with rutin, which was used as the standard inhibitor.

3.8. Inhibitory activity assay for α -glucosidase enzyme

The *in vitro* inhibitory activity for α -glucosidase was performed by using phosphate buffer saline of pH (6.8). Enzyme was dissolved, in PBS buffer (1 U)/2 mL, 20 μ L/well of enzyme, 135 μ L/well of PBS buffer, 20 μ L/well test compounds (1, 2, 4 and 5) (0.5 mM) were added, into 96-wells plate and was incubated at 37 °C for 15 min. After incubation substrate, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside of concentration (0.7 mM) was added and change in absorbance was recorded at 400 nm for 30 min. 7% of DMSO was used as a positive control. Acarbose was used as a standard.

4. Conclusion

In this study, a new pentacyclic triterpene (1) and a new bicoumarin (2) were isolated from the liana *Landolphia lucida* K. Schum, along fourteen previously known compounds 3–16 where methandriol dipropionate (3) and 2,3-bis-(4-hydroxy-3-methoxy-benzyl)-dimethyl-succinate (5) were isolated for the first time as natural products. Compounds 1 and 2 showed antibacterial potential against *Escherichia coli* (ATCC 25922) with MIC values at 2.3 μ M and 4.6 μ M, respectively; while compounds 4 and 5 displayed antiglycation activity with IC₅₀ values of 452.39 \pm 2.10 μ M and 525.55 \pm 4.17 μ M respectively. However, compound 4 also presented α -glucosidase inhibitory activity with IC₅₀ value of 268.06 \pm 1.47 μ M. These results indicated that compounds 1 and 2 might represent the candidate precursors for the development of antimicrobial agents.

Declaration of Competing Interest

The authors declared no potential conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by TWAS-UNESCO (FR number 3240299149) to G.R.E and by the Alexander von Humboldt Foundation (Ref. 3.4-8151/19052) to J.T.N. The support of the H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS) is also duly acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.10.012>.

References

Burkill, H.M., 1985. *The Useful Plants of West Tropical Africa, Families S-Z*. Richmond: Royal Botanic Gardens, UK, pp. 1954–1972.

Chen, S., Li, X., Liu, X., Wang, N., An, Q., Ye, X.M., Zhao, Z.T., Wang, W.J., 2020. Investigation of chemical composition, antioxidant activity, and the effects of alfalfa flavonoids on growth performance. *Oxid. Med. nCell. Longev.* 2020, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/8569237>.

Connolly, J.D., Hill, R.A., 1991. *Dictionary of Terpenoids Vol 1*. Chapman and Hall, London, pp. 463–545.

De Hoogh, B., 1989. *Dictyophleba Pierre*. Series of revisions of Apocynaceae xxviii. *Bull. Jard. Bot. Nat. de Belg./Bull. Nat. Plantentuin Belg.* 59, 207–226. <https://doi.org/10.2307/3668166>.

Ge, L., Wan, H., Tang, S., Chen, H., Li, J., Zhang, K., Zeng, X., 2018. Novel caffeoylquinic acid derivatives from *Lonicera japonica* Thunb. flower buds exert pronounced anti-HBV activities. *RSC Adv.* 8, 35374–35385. <https://doi.org/10.1039/C8RA07549B>.

Giorgio, E., Parrinello, N., Caccamese, S., Rosini, C., 2004. Non-empirical assignment of the absolute configuration of (–)-naringenin, by coupling the exciton on analysis of the circular dichroism rotatory power. *Org. Biomol. Chem.* 2, 3602–3607. <https://doi.org/10.1039/B411110A>.

Gupta, J., Gupta, A., 2015. Isolation and identification of flavonoid rutin from *Rauwolfia serpentina*. *Int. J. Chem. Stud.* 3, 113–115.

Haider N., Robien W., 2020. <https://nmrpredict.orch.univie.ac.at/c13robot/robot.php>.

Janot, M.M., Monneret, C., Monseur, X., Khuong-Huu, Q., Goutarel, R., 1966. Steroid alkaloids. LV. Alkaloids of *Dictyophleba lucida* (K. Schum.) Pierre; structures of dictyolucidine and dictyolucidamine. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 11, 3472–3478.

Kandati, V., Govardhan, P., Reddy, C.S., Nath, A.R., Reddy, R.R., 2012. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of *Andrographis serpyllifolia* (Rottl. Ex Vahl.) Wt. Int. *Curr. Pharm. J.* 1, 199–204. <https://doi.org/10.3329/icpj.v1i8.11250>.

Khan, M.R., 1999. Antimycotic activity of some medicinal plants. *Pharm. Biol.* 37, 346–350. <https://doi.org/10.1076/phbi.37.5.346.6059>.

Khan, M.R., Nkunya, M.H.H., 1990. Antimicrobial activity of Tanzanian traditional medicinal plants. In: Ministry of Health. *Proceedings of an International Conference on Traditional Medicinal Plants*. Arusha, Tanzania, 18–13.

Khan, K.M., Khan, M., Ali, M., Taha, M., Rasheed, S., Perveen, S., Choudhary, M.I., 2009. Synthesis of bis-Schiff bases of isatins and their antiglycation activity. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7795–7801. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.09.028>.

Lancaster, M.V., Fields, R.D., 1996. Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. U.S. Patent No. 5,501,959: U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC.

Lei, H., You-Shao, W., Qing-Ji, W., 2007. *In vitro* antitumor activity of triterpenes from *Ceriopis tagal*. *Nat. Prod. Res.* 21, 1228–1233. <https://doi.org/10.1080/14786410701369516>.

Lin, L.Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R.J., Harnly, J.M., 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Anal.* 20, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.fca.2006.09.005>.

Makboul, M.A., Attia, A.A., Farag, S.F., Mohamed, N.M., Ross, S.A., Takaya, Y., Niwa, M., 2013. A new pentacyclic triterpenoid from the leaves of *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. *Nat. Prod. Res.* 27, 2046–2052. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.824443>.

McKinney, A.R., Young, E.B., Cunnington, K., Stewart, R.T., McLeod, M.D., 2012. The metabolism of synthetic anabolic-androgenic steroids in the greyhound: nandrolone laurate and methandriol dipropionate. In: Beresford, G.D., Howitt, R.G. (Eds.), *Proceedings of the 18th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Dunmore, Auckland, New Zealand, pp. 423–430.

Omino, E., 2002. *Flora of Tropical East Africa-Apocynaceae*. CRC Press, 2002.

Qian, L., Wenqin, G., Jiaqing, C., Xiuli, B., Gang, C., Xiaoshu, Z., Xichun, X., Yuqing, Z., 2014. New cytotoxic compounds from flowers of *Lawsonia inermis* L. *Fitoterapia* 94, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.02.007>.

Rahman, A.U., Choudhary, M.I., Thonsen, W.J., 2001. *Bioassay Techniques for Drug Development*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 28–29.

Ruffo, C.K., Birnie, A., Tengnas, B., 2002. *Edible Wild Plants of Tanzania, relma Technical Handbook Series 27*, Nairobi, Kenya, Regional Land Management Unit (Relma). Swedish International Development Cooperation Agency (SIDA), p. 766.

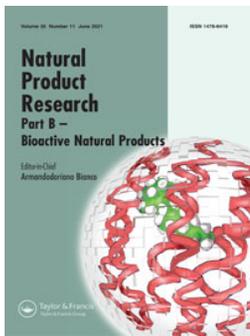
Schöttner, M., Ganßer, D., Spittler, G., 1997. Interaction of lignans with human sex hormone binding globulin (SHBG). *Z. Naturforsch.* 52, 834–843. <https://doi.org/10.1515/znc-1997-11-1218>.

Shafizadeh, F., Melnikoff, A.B., 1970. Coumarins of *Artemisia tridentata* ssp. *Vaseyana*. *Phytochemistry* 9, 1311–1316. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85324-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85324-8).

Siddiqui, B.S., Kardar, M.N., 2001. Triterpenoids from *Lawsonia alba*. *Phytochemistry* 58, 1195–1198. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00329-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00329-6).

Uphof, J.C.T., 1959. *Dictionary of economic plants*, Weinheim H. R. Engelmann (J. Cramer), New York: Hafner, Codicote, Herts: Wheldon and Wesley, Ltd., pp. 391–400.

Wu, C.H., Yen, G.C., 2005. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3167–3173. <https://doi.org/10.1021/jf048550u>.



Contortamide, a new anti-colon cancer cerebroside and other constituents from *Tabernaemontana contorta* Stapf (Apocynaceae)

Guy R. Ebede, Joseph T. Ndong, Joséphine N. Mbing, Hector C. M. Kenfack, Dieudonné E. Pegnyemb & Christian G. Bochet

To cite this article: Guy R. Ebede, Joseph T. Ndong, Joséphine N. Mbing, Hector C. M. Kenfack, Dieudonné E. Pegnyemb & Christian G. Bochet (2021) Contortamide, a new anti-colon cancer cerebroside and other constituents from *Tabernaemontana contorta* Stapf (Apocynaceae), Natural Product Research, 35:11, 1757-1765, DOI: [10.1080/14786419.2019.1636243](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1636243)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1636243>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 05 Jul 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 158



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)



Contortamide, a new anti-colon cancer cerebroside and other constituents from *Tabernaemontana contorta* Stapf (Apocynaceae)

Guy R. Ebede^{a,d}, Joseph T. Ndongo^b, Joséphine N. Mbing^a, Hector C. M. Kenfack^c, Dieudonné E. Pegnyemb^a and Christian G. Bochet^d

^aDepartment of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon;

^bDepartment of Chemistry, Higher Teacher Training College, University of Yaoundé I, Yaoundé,

Cameroon; ^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, Dschang,

Cameroon; ^dDepartment of Chemistry, Faculty of Science and Medicine, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

ABSTRACT

A new cerebroside, Contortamide (**1**) together with nine known compounds spagtrine (**2**), affinisine (**3**), Nb-methylaffinisine (**4**), ursolic acid (**5**), α -amyrin (**6**), bauerenol acetate (**7**), lupeol (**8**), betulinic acid (**9**) and β -sitosterolglycoside (**10**) were isolated from the trunk bark of *Tabernaemontana contorta* Stapf. The new compound **1** showed significant activity against Caco-2 colon cancer cells with the MTT method. Compounds **1–4** and **6–9** were isolated for the first time from this species.

ARTICLE HISTORY

Received 3 April 2019

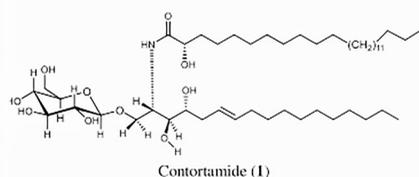
Accepted 22 June 2019

KEYWORDS

Contortamide;
Tabernaemontana contorta
Stapf; Apocynaceae;
colon cancer



Trunk of *Tabernaemontana contorta* Stapf



Contortamide (**1**)

1. Introduction

The genus *Tabernaemontana* that consists of about 110 species is pantropical. About 18 species exist in the African continent and 15 in Madagascar. The species *Tabernaemontana contorta* Stapf is similar to the pachysiphon species. It is found in Madagascar (Bui et al. 1977), Nigeria and Cameroon (Patel et al. 1967). Plants of the genus *Tabernaemontana* are used in several fields. *Tabernaemontana catharinensis* is used to reduce toothache, remove tumors from the epidermis and as an antidote

CONTACT J. T. Ndongo  thierry.ndongo@ens.cm

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1636243>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

for snakebite (Leeuwenberg 1994; Pereira et al. 2008). *Tabernaemontana contorta* Stapf, a flowering plant, belongs to the family Apocynaceae. In Cameroon, its leaves are used to prevent keloids formation and as antiseptic (Burkill 1985). Indole alkaloids are useful chemical markers of the genus *Tabernaemontana*. Coronaridine, an iboga-type indole alkaloid, has been isolated from over 50 *Tabernaemontana* species and can thus be inferred as a chemotaxonomic marker of the genus (Garcellano et al. 2019). However, this genus contains a considerable presence of phenolic compounds identified in the ethyl acetate fraction of *Tabernaemontana catharinensis* (Pauleti et al. 2018). Two bisindoline alkaloids, contortarine A, 16-epi-pleiomutinine, pleiomutinine, and five others alkaloids, 1-carbomethoxy- β -carboline, strictosidine lactam, pleiocarpamine and pleiocarpine were isolated from the roots of *Tabernaemontana contorta* Stapf (Ndongo et al. 2017). From the fruits of this plant, two new indole alkaloid derivatives, 5,6-dioxo-11-methoxy voacangine and (-)-apparcin-21-one, together with four known compounds, voacangine, ursolic acid, 3-methoxyursolic acid and asiatic acid were isolated (Foudjo Melacheu et al. 2019). In our ongoing search for bioactive secondary metabolites from Cameroonian *Tabernaemontana* species, isolation of the constituents of the trunk bark of *Tabernaemontana contorta* was carried out. As results, a new cerebroside (**1**) together with nine known compounds (**2–10**) were isolated. In this article, we wish to describe the isolation and structural elucidation of this new compound as well as the evaluation of the anti-colon cancer activity of some of them.

2. Results and discussion

The methanol extract of trunk bark of *Tabernaemontana contorta* Stapf was fractionated by column chromatography on silica gel using a dichloromethane/methanol solvent system with increasing polarity to give eight fractions. The two first fractions were chromatographed on silica gel columns to give ten compounds **1–10** (Figure 1). Compound **1** was isolated as a white amorphous solid, $[\alpha]_D^{25} - 27.5$ (c 0.020, CHCl₃/MeOH). The HRESI-MS showed a quasi-molecular ion peak $[M+Na]^+$ at m/z 866.67244 suggesting a molecular formula of C₄₈H₉₃O₁₀N and fragment ion at m/z 381. Its IR spectrum showed absorption bands at 3393 and 3313 cm⁻¹ (br, NH and OH), 1737 and 1631 cm⁻¹ (amide group CO), 2920–2851 cm⁻¹ (aliphatic chain), 1467 cm⁻¹ (double bond) and 1079 and 1034 cm⁻¹ for C–O–C absorptions. The ¹H NMR spectra (Table S1) of **1** indicated a broad signal range of δ_H 1.28–1.40 (brs, CH₂ group) and a triplet at δ_H 0.89 (6H, $J=6.7$ Hz, two terminal methyl groups) assigned to two long aliphatic chains. The proton signal at δ_H 4.29 (d, $J=7.8$ Hz), displayed the presence of an anomeric proton of a sugar residue and its coupling constant supports the β -configuration of the glucose. However, a pair of olefinic protons at δ_H 5.41 (1H, dt, H-6) and 5.36 (1H, dt, H-7) revealed the presence of one olefinic bond. In the ¹³C-NMR spectrum, the signals at δ_C 103.3, 73.6, 76.5, 70.2, 76.7 and 61.3 confirmed the glucopyranose moiety in **1**. A signal of a methine carbon bearing nitrogen at δ_C 50.3 (C-2), an oxymethylene carbon resonated at δ_C 68.5 (C-1), along with three resonances of oxymethine carbons at δ_C 74.4 (C-3), 71.4 (C-4), 71.5 (C-2') and an amide carbonyl signal at δ_C 176.2 (C-1'). The Δ [6,7] olefinic bond was confirmed to have a (*E*)-configuration as evidenced by the coupling constants ($J=14.4$ Hz), together with the

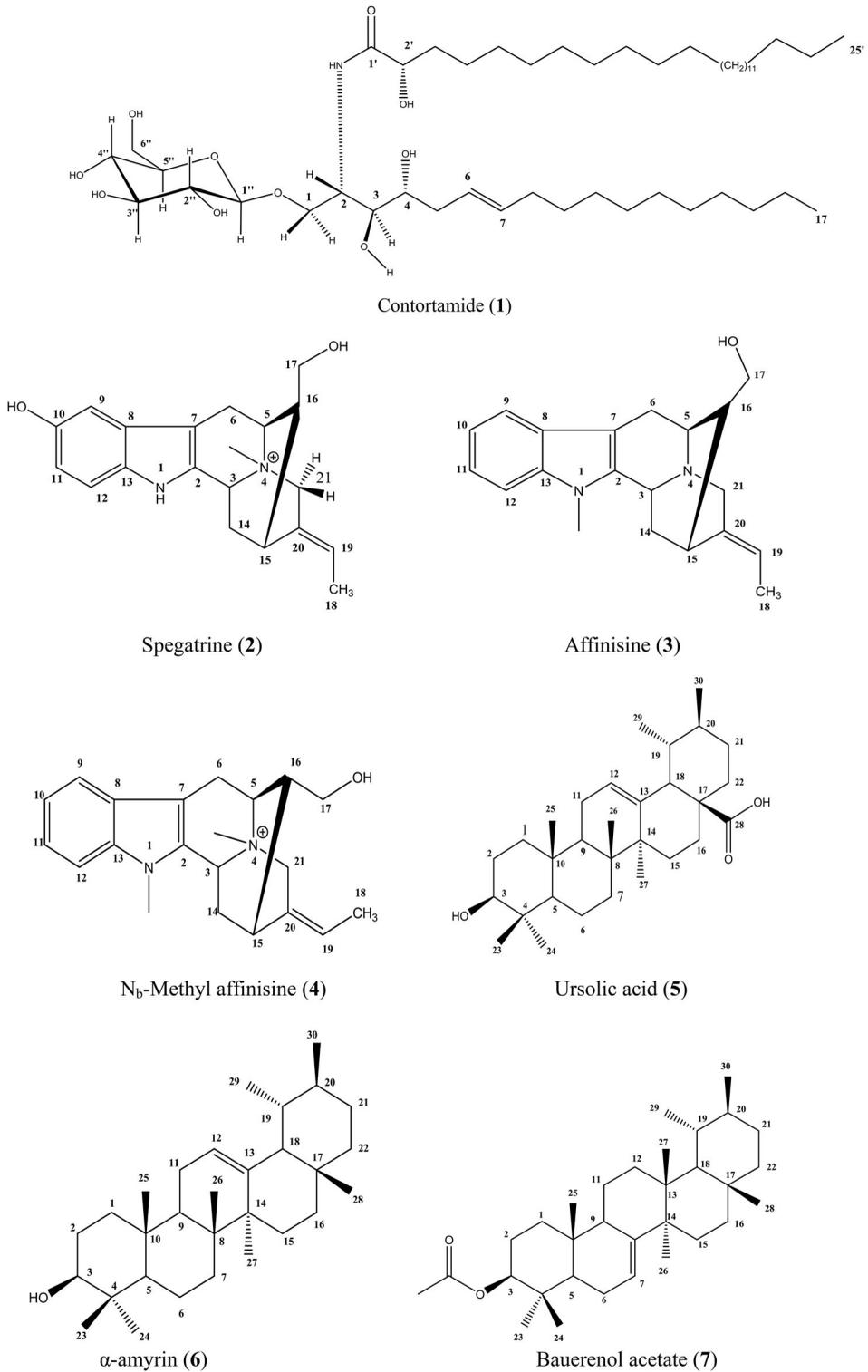


Figure 1. Chemical structures of the isolated compounds (1–10).

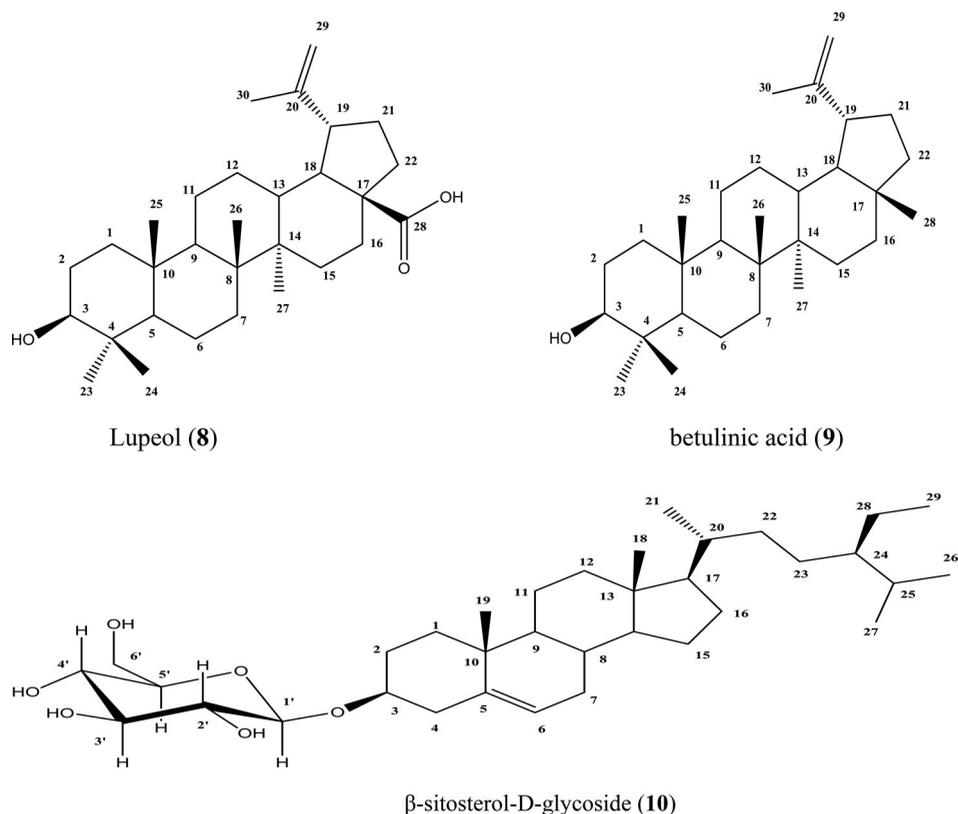


Figure 1. Continued

chemical shifts of C-5 at (δ_C 32.4) and C-8 (δ_C 32.0). Typically, the signals of a carbon next to a *trans* double bond appear between δ_C 32 and 33 (Ai-Qun et al. 2010; Huang et al. 2010), while those of a *cis* double bond appear between δ_C 27 and 28 (Liu et al. 1999). This configuration was also confirmed by the band at 965 cm^{-1} in the IR spectrum, vibration of deformation of the bond =C-H, characteristic of a system R-CH=CH-R' *trans*. The position of the double bond could be deduced from the following evidence: The proton at δ_H 2.01 (H-5) showed 2J -HMBC correlation with carbon at δ_C 129.4 (C-6), whereas HMBC and COSY cross signals were observed between C-6 and the olefinic proton at δ_H 5.41 (H-5), H-5 and H-6, H-5 and H-4 and between H-4 and H-3, respectively. These results suggested that **1** might belong to the sphingolipid class of compounds (Huang et al. 1995). The spatial location of hydroxyl groups in sphingosine was evident by exploitation of NOESY spectrum (Figure S9) which showed interactions between the protons at δ_H 3.57 and 3.79 supporting that the two protons were in the same spatial orientation. The absolute configurations of C-2 and C-3 in all sphingolipids isolated from natural plants were 2*S*, 3*R*, respectively (Karlsson 1970). The relative configuration of C-4 was both determined to be *R* and *S* for C-2' by comparing the chemical shift with previously reported data (Gao et al. 2001; Zhan and Yue 2003). Based on these evidences, (**1**) could be assigned the structure 1-O- β -D-glucopyranosyl-(2*S*,3*R*,4*R*,6*E*)-2-[(2'*S*)-2'-hydroxypentacosanoylamino]-1,3,4-heptadecanetriol-6-ene (Figure 1) and named contortamide (**1**). The known compounds were

identified as spegatrine (**2**) (Ndongo et al. 2018), affinisine (**3**) and N_b-methyllaffinisine (**4**) (Monnerat et al. 2005), ursolic acid (**5**) (Foudjo Melacheu et al. 2019), α -amyrin (**6**) and bauerenol acetate (**7**) (Carothers et al. 2018), lupeol (**8**) and betulinic acid (**9**) (Pereira et al. 2008), β -sitosterolglycoside (**10**) (Rahmana et al. 2009) by comparison of physical and reported NMR data in the literature.

Methanolysis (0.9N, HCl/MeOH, at 70 °C during 18 h) of compound **1** gave the fatty acid methyl ester (Figure S13) and the long chain base which were characterized by ESI-MS analysis. The peak at m/z 413 corresponded to a fatty acid methyl ester. The results of the cytotoxicity assay toward human colonic cancer cell line Caco-2 are shown on Figure S16. Both fraction and extract did not show any cytotoxic activity Caco-2 cell line at the tested concentration. Meanwhile, among the pure compounds, the new isolated Contortamide presented a good cytotoxic activity ($62.13 \pm 3.28\%$ inhibition). Only this new compound (**1**) affects the growth of human colonic cancer cell line Caco-2 (Figure S15).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

FT-IR spectra were obtained on a FT-IR Tensor 27 spectrometer (Bruker). NMR spectra were recorded on a Bruker AM400 FTNMR spectrometer using TMS as an internal standard. ESI-MS and HRESI-MS were performed on a MicrOTOF-Q mass spectrometer (Bruker). All measurements were made at the Department of Chemistry (Faculty of science and medicine, University of Fribourg, Switzerland). TLC was performed on silica gel 60F₂₅₄ (1.05554.0001, Merck, Darmstadt, Germany) and RP-18 F_{254S} plates (1.15685.0001, Merck, Darmstadt, Germany). Column chromatography was performed on silica gel (240–430 mesh, Merck, Darmstadt, Germany).

3.2. Plant material

Tabernaemontana contorta Stapf. (Apocynaceae) was collected from Mont Kalla (Nkolbison, at 8 km. W. of Yaoundé) at the Centre Region of Cameroon in January 2017 and taxonomically identified by Mr. Victor Nana (Botanist at National Herbarium, Yaoundé, Cameroon). A voucher specimen (N° 43440/HNC) was deposited National Herbarium in Yaoundé, Cameroon.

3.3. Extraction and isolation

Dried trunk bark of *Tabernaemontana contorta* Stapf (1.4 kg) was powdered and extracted at room temperature with MeOH (3 \times 4 L) for 1 week. The crude extract was concentrated to dryness in a rotary evaporator at 40 °C to obtain a gummy residue (72.8 g). The residue was chromatographed on silica gel column to give eight fractions using a CH₂Cl₂/MeOH solvent system with increasing polarity: A (CH₂Cl₂:MeOH, 50:1; 9.81 g), B (CH₂Cl₂:MeOH, 40:1; 9.17 g), C (CH₂Cl₂/MeOH, 35:1; 6.18 g), D (CH₂Cl₂:MeOH, 30:1; 3.37 g), E (CH₂Cl₂:MeOH, 25:1; 5.66 g), F (CH₂Cl₂:MeOH, 20:1; 6.34 g), G (CH₂Cl₂:MeOH, 10:1; 2.64 g), H (CH₂Cl₂:MeOH, 1:1; 6.37 g). Fraction (B) was further

separated on silica gel (40–60 μm) column eluted with CH_2Cl_2 :MeOH (1% to 100%) to afford 7 sub-fractions (B1–B7). Later, sub-fraction B2 was chromatographed over silica gel (32–40 μm) column by using hexane:ethyl acetate as mobile phase with gradient elution (1% to 50%) to afford nine compounds: **2** (3.4 mg), **3** (5.2 mg), **4** (3.3 mg), **5** (7 mg), **6** (6 mg), **7** (4.5 mg), **8** (2.3 mg), **9** (2 mg), and **10** (10 mg). Fraction E was further chromatographed on a silica gel column (32–40 μm) using CH_2Cl_2 : MeOH (1% to 100%) as solvent system to yield new compound **1** (5.7 mg).

3.3.1. Contortamide (1)

White amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -27.5 (c 0.020, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$); TLC Rf: 0.70 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15/1); IR (AgCl) cm^{-1} : 3393, 2953, 2851, 1727, 1631, 1321, 1299, 1079, 1034; HRESI-MS $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 866.67244 (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{93}\text{O}_{10}\text{N}$: 843.6799).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) data, see Table S1.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} : 5.40 (1H, dt, H-6, $J=14.4$ Hz), 5.46 (1H, dt, $J=14.4$ Hz, H-7), 4.26 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1''), 4.24 (1H, m, H-2), 4.02 (1H, m, H-1a), 4.00 (1H, m, H-2'), 3.85 (1H, dd, 11.2 Hz, H-6''a), 3.79 (1H, dd, $J=7.2$; 14.8 Hz, H-1b), 3.64 (1H, dd, $J=4.4$; 11.2 Hz, H-6''b), 3.57 (1H, t, $J=6.1$ Hz, H-3), 3.50 (1H, m, H-4), 3.33 (1H, m, H-3''), 3.27 (1H, m, H-5''), 3.26 (1H, dd, $J=12.3$; 4 Hz, H-4''), 2.01 (1H, m, H-5b), 1.98 (1H, m, H-5a), 1.73 (1H, m, H-3'a), 1.64 (1H, m, H-8), 1.63 (1H, m, H-3'b), 1.28–1.40 (58H, brs, H-9–16/H-4'–24'), 0.89 (6H, t, $J=6.7$ Hz, H-17/25').

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz): 176.2 (C-1'), 130.4 (C-7), 129.4 (C-6), 103.3 (C-1''), 76.6 (C-5''), 76.6 (C-3''), 74.4 (C-3), 73.6 (C-2''), 71.5 (C-2'), 71.4 (C-4), 70.2 (C-4''), 68.5 (C-1), 61.3 (C-5'), 50.3 (C-2), 34.4 (C-3'), 32.4 (C-5), 32.0 (C-8), 22.2–31.7 (C-9–16/C-4'–24'), 13.1 (C-17/C-25').

3.3.2. Methanolysis

Compound **1** (1 mg) was refluxed (70 $^\circ\text{C}$) for 18 h in 2.5 mL of MeOH containing 1.5 mL of 0.9 N HCl under magnetic stirring. The mixture was neutralized with aqueous solution of Na_2CO_3 and extracted with CHCl_3 . Methanolysis of **1** afforded methyl-2-hydroxypentacosanoate. This fatty acid methyl ester was characterized by ESI-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ at m/z 413 (Figure S13). Methyl-2-hydroxypentacosanoate: ESI-MS m/z: 413 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 393 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^+$, 365 $[\text{M}-\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}-\text{H}]^+$, 310 $[\text{C}_{22}\text{H}_{45} + \text{H}]^+$.

3.5. Biological assay

3.5.1. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay was performed using the MTT assay as earlier described by Rahman-Atta-Ur and Thonsen (2001). Briefly, when the cells attained 90% confluence in microtiter plate, DMEM medium was replaced by a fresh one. Then, 1 μl of stock solution of each compound and extract made in dimethylsulfoxide (DMSO) was diluted with complete medium to the final test concentration (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) into the 96-well 96-well microtiter plate and incubated for 72 h. Moreover, the medium was removed and 200 μl of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide solution (5 mg/ml, PBS, pH 7.2) (MTT, Sigma-Aldrich) and incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 4 h. Subsequently, the above solution was gently removed and 100 μl of DMSO added in

each well to dissolve the blue formazan crystals during 5 min at 37 °C. Finally, the absorbance was immediately read at 570 nm using bioassay plate reader (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). These following different types of samples were included: medium blanks (growth medium with no cells or drugs), drug blank (growth medium with drug but no cells), positive control (cells treated with standard drug, actinomycin-D), negative control (cells untreated plus medium) and the test medium plus cells plus test compound or extract. This experiment was performed in triplicate. The inhibition percentage of compounds were determined by comparing with the untreated positive growth control. All data were compiled from a minimum of three experiments. Data for statistical analysis were expressed as the mean \pm standard deviation, n (number of experiments). One-way ANOVA with Dunnett's test, as specified, was performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA. The following formula was used to calculate the percentage growth inhibition:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left(\frac{\text{Test well} - 0.1}{\text{Control well} - 0.1} \right) \times 100$$

3.5.2. Cell culture

Cancer cell line Caco-2 was obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and growth in sterile Costar T75 falcon containing DMEM (Sigma-Aldrich), which was supplemented with fetal bovine serum (10%, v/v), 100 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin G. Incubation was done at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere with 95% humidity. After 75–80% confluence, the cells were removed from the flask by treating with trypsin-EDTA solution (0.05%, Gibco). A viable cells suspension of 5×10^4 cells/ml was done and seeded into a 96-well microtiter plate (SPL Life sciences Co., Ltd Korea) and incubated. Visualization of the cells at each step was done microscopically and recorded with digital camera (Austria-Micros, LIB-302).

4. Conclusion

The species *Tabernaemontana contorta* Stapf, is known to be an abundant source of alkaloids, especially indole alkaloids. The bioactivity study of the isolated compounds indicated that compound **1** exhibited anti-colon cancer activity. Complementary investigations on compound **1** will be done to show the mechanisms of its anti-cancer effect, safety margin, lethal dose, effective dose, as well as *in vivo* studies.

Acknowledgements

We are grateful to the Department of Chemistry, Faculty of Science and Medicine from the University of Fribourg, Switzerland.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

University of Fribourg - Scholarships for foreign researchers 229779. This research was funded by University of Fribourg - Scholarships for foreign researchers - grant No. 229779.

References

- Ai-Qun J, Xu Y, Wei-Xin W, Yong-Hong J. 2010. Glycocerebroside bearing a novel long-chain base from *Sagina japonica* (caryophyllaceae). *Fitoterapia*. 81(6):540–545.
- Bui A-M, Debray M-M, Boiteau P, Potier P. 1977. Etude chimiotaxonomique de quelques especes de Hazunta. *Phytochemistry*. 16(6):703–706.
- Burkill HM. 1985. The useful plants of west tropical Africa, families S-Z. Richmond (UK): Royal Botanic Gardens; p. 1954–1972.
- Carothers S, Nyamwihura R, Collins J, Zhang H, Park H, Setzer W, Ogungbe I. 2018. Bauerenol acetate, the pentacyclic triterpenoid from *Tabernaemontana longipes*, is an antitrypanosomal agent. *Molecules*. 23(2):355.
- Garcellano RC, Cort JR, Moinuddin SG, Franzblau SG, Ma R, Aguinaldo AM. 2019. An iboga alkaloid chemotaxonomic marker from endemic *Tabernaemontana ternifolia* with antitubercular activity. *Nat Prod Res*. 1–5. doi:10.1080/14786419.2018.1550759.
- Foudjo Melacheu GL, Njoya EM, Jouda J-B, Kweka BNW, Mbazono CD, Wang F, Wandji J. 2019. Two new indole alkaloids from *Tabernaemontana contorta* Stapf. *Phytochem Lett*. 30:116–119.
- Gao JM, Dong ZJ, Liu JK. 2001. A new ceramides from the basidiomycete *Russula cyanoxantha*. *Lipids*. 36(2):175–180.
- Huang Q, Tezuka Y, Hatanaka Y, Kikuchi T, Nishi A, Tubaki K. 1995. Studies on Metabolites of Mycoparasitic Fungi. IV. Minor Peptaibols of *Trichoderma kiningii*. *Chem Pharm Bull*. 43(10): 1663–1667.
- Huang XZ, Yin Y, Dai JH, Liang H, Dai Y, Bai L. 2010. Two new ceramides from the stems of *Piper betle* L. *Chin Chem Lett*. 21(4):433–436.
- Karlsson KA. 1970. Sphingolipids long chain bases. *Lipids*. 5(11):878–891.
- Leeuwenberg AJM. 1994. A revision of *Tabernaemontana*. The new world species and stemmadenia, Vol 2. Kew (UK): Royal Botanic Gardens; p. 213–450.
- Liu H, Orjala J, Sticher O, Rali T. 1999. Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*. *J Nat Prod*. 62(1):70–75.
- Monnerat CS, Souza J. J D, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira IJC. 2005. A new indole alkaloid isolated from *Tabernaemontana hystrix* steud (Apocynaceae). *J Braz Chem Soc*. 16(6b): 1331–1335.
- Ndongo JT, Ngo Mbing J, Feussi T, Monteillier A, Pegnyemb DE, Cuendet M, Laatsch H. 2017. Indoline alkaloids from *Tabernaemontana contorta* with cancer chemopreventive activity. *Phytochemistry*. 144:189–196.
- Ndongo JT, Ngo Mbing J, Aymeric M, Feussi T, Rütten M, Mombere D, Cuendet M, Pegnyemb DE, Birger D, and Laatsch H. 2018. Carbazole, aspidofractinine and aspidocarpamine. Type alkaloids from *Pleiocarpa pycnantha*. *J Nat Prod*. 81:193–1202.
- Patel MB, Miet C, Poisson J. 1967. A Revision of *Tabernaemontana*: alkaloids from some African *Tabernaemontana*. *Ann Pharm Fr*. 25(5):379–384.
- Pauleti NN, Mello J, Siebert DA, Micke GA, de Albuquerque CAC, Alberton MD, Barauna SC. 2018. Characterisation of phenolic compounds of the ethyl acetate fraction from *Tabernaemontana catharinensis* and its potential antidepressant-like effect. *Nat Prod Res*. 32(16):1987–1990.
- Pereira PS, França S. D C, Oliveira P. V A D, Breves C. M D S, Pereira SIV, Sampaio SV, Nomizo A, Dias DA. 2008. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. *Quím Nova*. 31(1):20–24.

- Rahman-Atta-Ur CM, Thonsen WJ. 2001. Bioassay techniques for drug development. Amsterdam, the Netherlands: Harwood Academic Publishers; p. 28–29.
- Rahmana SMM, Mukta AZ, Hossain MA. 2009. Isolation and characterization of β -sitosterol-D-glycoside from petroleum extract of the leaves of *Ocimum sanctum* L. As J Food Ag-Ind. 2: 39–43.
- Zhan ZJ, Yue JM. 2003. New glyceroglycolipid and ceramide from *Premna microphylla*. Lipids. 38(12):1299–1303.