



HAL
open science

Étude chimique et biologique de Gentianales gabonaises d'intérêt antipaludique, à alcaloïdes indolomonoterpéniques

Elvis Otogo N'Nang

► **To cite this version:**

Elvis Otogo N'Nang. Étude chimique et biologique de Gentianales gabonaises d'intérêt antipaludique, à alcaloïdes indolomonoterpéniques. Chimie thérapeutique. Université Paris-Saclay; Université des Sciences et Techniques de Masuku (Gabon), 2018. Français. NNT : 2018SACLS039 . tel-02045357

HAL Id: tel-02045357

<https://theses.hal.science/tel-02045357>

Submitted on 22 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Étude chimique et biologique de Gentianales gabonaises d'intérêt antipaludique, à alcaloïdes indolomonoterpéniques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay et
de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku,
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)

université
PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE

Innovation thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué

Spécialité de doctorat:
Chimie Pharmaceutique
- *Chimie des substances naturelles*

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 21/02/2018, par

Elvis OTOGO N'NANG OBIANG

Composition du Jury :

Gérald CULIOLI MCU (HDR), Université de Toulon (EA 4323 MAPIE)	Rapporteur
Catherine LAVAUD PU, Université de Reims (UMR CNRS 6229)	Rapporteur
Olivier GROVEL PU, Université de Nantes (EA 2160 Mer, Molécules, Santé)	Président
Raphaël BIKANGA MCU CAMES, USTM (URCHI-LASNSOM)	Examineur
Séverine DERBRE MCU, Université d'Angers (EA 921 SONAS)	Examineur
Mehdi BENIDDIR MCU, Université Paris-Sud (UMR CNRS 8076)	Encadrant
Pierre CHAMPY PU, Université Paris-Sud (UMR CNRS 8076)	Co-Directeur de thèse
Brice KUMULUNGUI PU CAMES, USTM (Microbiologie)	Co-Directeur de thèse
Grégory GENTA-JOUVE MCU (HDR), Université Paris-Descartes (CNRS UMR8638)	Invité
Erwan POUPON PU, Université Paris-Sud (UMR CNRS 8076)	Invité

Quiconque porte dans le cœur une cathédrale à bâtir, est déjà vainqueur. La victoire est fruit de l'amour. L'amour reconnaît seul le visage à pétrir. L'amour seul gouverne vers lui. L'intelligence ne vaut qu'au service de l'amour.

Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la co-direction du Professeur Pierre CHAMPY et du Docteur, Maître de conférences Mehdi A. Beniddir du laboratoire de pharmacognosie-chimie des substances naturelles BioCIS de la faculté de pharmacie de l'Université Paris-Sud, Paris-Saclay (France) et en cotutelle avec le Professeur Brice Kumulungui du Laboratoire de microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Masuku, Franceville, (Gabon), elle s'est déroulée du 24 novembre 2014 au 11 décembre 2017.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Pierre CHAMPY d'avoir accepté de codiriger ce travail et de m'accueillir dans l'équipe pharmacognosie-chimie des substances naturelles de BioCIS me donnant ainsi, l'opportunité de me former en phytochimie avec des appareils modernes. Je le remercie également de m'avoir donné la possibilité de présenter mes résultats dans différents congrès internationaux.

J'aimerais également exprimer ma très grande gratitude à Monsieur le Docteur, Maître de conférences Mehdi A. Beniddir, qui a été au cœur de ce projet de thèse, et l'a dirigé avec compétence, rigueur, efficacité, une grande disponibilité et une patience extrême. Mais aussi pour ces nombreux conseils et suggestions tant scientifiques que techniques. J'ai tout appris avec lui sur les différentes méthodes et techniques de pointe utilisées dans ce travail, ce qui me donne aujourd'hui un solide bagage pour la suite de ma carrière, je tiens à vous exprimer ma vive reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Brice Kumulungui, Professeur de microbiologie à l'Université des Sciences et Techniques de Masuku, Franceville, co-directeur de cette thèse pour la confiance qu'il m'a témoigné au cours de la réalisation de ce travail, je vous exprime mes vifs remerciements.

Je remercie Madame le Professeur Catherine Lavaud, Professeur de pharmacognosie de l'UFR Pharmacie, Université de Reims, qui malgré ses occupations a accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que rapporteur, mes sincères remerciements.

Je remercie Monsieur le Docteur Gérald Culioli, Maître de conférence (HDR) de l'Université

de Toulon, d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse en tant que rapporteur je vous exprime ma sincère gratitude.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeurs Olivier Grovel PU, Université de Nantes (EA 2160 Mer, Molécules, Santé) d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse en tant que président du jury.

Monsieur le Docteur Raphaël Bikanga MCU CAMES, Vice-Recteur, USTM (Chimie Organique) et le Docteur Séverine Derbré MCU, Université d'Angers (EA 921 SONAS) d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse en tant que examinateur.

Je remercie également le Professeurs Erwan Poupon PU, Université Paris-Sud (UMR CNRS 8076), de m'avoir permis d'assister à ses cours de Master et d'avoir accepté d'être membre du jury de ma thèse en tant qu'invité, mes sincères remerciements

J'aimerais également citer ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour plusieurs aspects de ce travail.

Je remercie en particulier Monsieur Jean-Francois Gallard responsable du service RMN à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles pour son aide concernant la réalisation des analyses RMN de plusieurs composés décrits dans ce travail, l'apprentissage de l'utilisation du logiciel TopSpin et ses nombreux conseils de travail.

Je remercie Monsieur le Docteur Grégory Genta-Jouve, Maître de conférence (HDR) de la faculté de pharmacie de l'Université Paris-Descartes qui a largement contribué au bon déroulement de ce travail en tant que président du comité de mi-thèse, mais aussi dans la réalisation des analyses pour les études conformationnelles des premières molécules isolées.

Je remercie Monsieur le Docteur Guillaume Bernadat de la faculté de pharmacie de l'Université Paris-Sud, Paris-Saclay pour son aide précieuse dans l'apprentissage des études conformationnelles et de programmations avec le logiciel Python.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Henri Bourobou Bourobou et Monsieur Raoul

Niangadouma de l'Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle pour leurs aides dans la récolte et l'identification botaniques des plantes étudiées dans cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Philippe Grellier et Madame Elisabeth Mouray de l'Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes du Muséum national d'Histoire Naturelle, Université de la Sorbonne, pour la réalisation des tests biologiques.

Je tiens également à remercier Madame Karine Leblanc du laboratoire de pharmacognosie-chimie des substances naturelles BioCIS pour son aide lors des purifications par HPLC préparatives. J'ai beaucoup appris avec elle sur les différentes méthodes de chimie analytique. Je remercie également Madame Camille Dejean et Monsieur Jean-Christophe Julien du service RMN du laboratoire BioCIS, pour leur aide en RMN.

J'aimerais également remercier tous les étudiantes et étudiants que j'ai eu l'honneur d'encadrer en stage durant la période de ma thèse, je veux citer ici Eva Lazzaro, Lucas Gallois, Samantha Ahlgren, Coralie Pavesi et Gaëla Cauchie.

Je tiens tout particulièrement à remercier l'État gabonais qui a financé mes études en m'attribuant une bourse, remercier le laboratoire de pharmacognosie-chimie des substances naturelles BioCIS de m'avoir accordé une aide financière.

Toute ma gratitude va enfin à mes parents pour leur soutien tout au long des mes études et durant cette thèse.

Résumé

L'étude chimique de 11 plantes du Gabon, dont certaines utilisées en médecine traditionnelle, a été réalisée pour la recherche de composés antiplasmodiaux de structures nouvelles.

Deux Apocynaceae (*Pleiocarpa mutica* Benth., *Callichilia inaequalis* Stapf) et une Gelsemiaceae (*Mostuea brunonis* Didr.) ont été plus spécifiquement étudiées, via une stratégie de déréplication fondée sur des réseaux moléculaires générés à partir de données CLHP-MS/MS (Molecular networking) et annotés avec une base de données d'alcaloïdes indolomonoterpéniques mise au point au laboratoire (MIADB). Cette investigation a guidé un travail de fractionnement et d'isolement, qui a permis l'obtention d'alcaloïdes indolomonoterpéniques très originaux, en termes de décorations ou de modes d'assemblage.

Des écorces de tiges de *P. mutica*, 7 dimères indolomonoterpéniques non décrits dans la littérature ont été obtenus : 5 sont des bis-aspidofractanes dont 4 sont reliés par un pont méthylène (pléiokomenines A-D) ; deux sont des dimères du type aspidofractane-éburnamine, analogues de la pléiomutine.

Les tiges et les racines de *C. inaequalis* ont livré 2 bis-indoles nouveaux, analogues de la criophylline, dont le premier porteur d'un sulfate dans cette classe d'alcaloïdes, ainsi que l'inaequalisine A, premier indolomonoterpène monomérique lié à un reste phénylpropène via une liaison C-C.

L'étude des tiges et des feuilles de *M. brunonis* a conduit à l'isolement de quatre nouveaux composés : un monomère de type sarpagine (16-*epi*-méthylester-panarine) et 3 dimères bis-vobasines inédits à pont sulfide (theionbrunonines A-C). Des molécules connues, mais pas toujours identifiées dans les genres étudiés, ont également été isolées. Plusieurs de ces composés nouveaux présentent une activité antiplasmodiale de l'ordre du μM *in vitro* sur une souche de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante.

Mots clés : Alcaloïdes indolomonoterpéniques, Apocynaceae, CLHP-MS/MS, Gelsemiaceae, Réseaux moléculaires, Paludisme

Abstract

The chemical study of 11 Gabonese plant species, some being used in traditional medicine, was performed in search for antiplasmodial compounds with new structures.

Two Apocynaceae (*Pleiocarpa mutica* Benth., *Callichilia inaequalis* Stapf) and a Gelsemiaceae (*Mostuea brunonis* Didr.) were more specifically investigated, using LC-MS/MS data in a dereplicative approach based on the “molecular networking” strategy, with an annotation performed using an “in-house” monoterpene indole alkaloids database (MIADB).

This approach was used to guide the isolation of original alkaloids, in terms of substitution patterns or of linkage. From the stem bark of *P. mutica*, 7 previously undescribed dimeric indole monoterpenes were obtained: five are *bis*-aspidofractanes, four of them being linked by a methylene bridge (pleiokomenines A-D); Two are aspidofractane-eburnamine dimers analogous to pleiomutine.

The twigs and roots of *C. inaequalis* yielded 2 new *bis*-indoles analogous to criophylline, among which one is the first natural sulfate-containing monoterpene indole alkaloid. Inaequalisine A, the first monomeric indole monoterpene linked to a phenylpropene moiety by a C-C linkage was also obtained.

The study of the twigs and leaves of *M. brunonis* lead to 4 new compounds: A monomeric sarpagine (16-*epi*-methylester-panarine) and 3 unknown *bis*-vobasines which constituting monomers are linked by a sulfide bridge (theionbrunonines A-C).

Known compounds were also isolated, some of which were previously undescribed in the genera studied here. Several of the new molecules exhibited antiplasmodial *in vitro* activity in the micromolar range against a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*.

Keywords: Apocynaceae, Gelesemiaceae, HPLC-MS/MS, Indole monoterpene alkaloids, Malaria, Molecular networking

Table des matières

Remerciements	ii
Résumé	v
Abstract	vi
Liste des figures	6
Liste des tableaux	10
Liste des sigles et abréviations	11
Introduction générale.....	15
Chapitre I : Données bibliographiques	19
1. Généralité sur le paludisme	19
1.1. Définition et symptomatologie du paludisme.....	19
1.2. Physiopathologie du paludisme, Cycle des <i>Plasmodium</i>	20
2.1. Cycle chez l'homme	21
2.2. Cycle chez l'anophèle	21
1.3. Epidémiologie du paludisme	22
1.3.1. Epidémiologie générale	22
1.3.2. Répartition géographique.....	23
1.3.3. Le paludisme au Gabon	24
1.4. Lutte antipaludique	26
1.4.1. Introduction	26
1.4.2. Lutte antivectorielle.....	27
1.4.3. Chimio-prévention	28
1.4.4. Médicaments employés en prophylaxie et en traitement.....	30
1.4.5. Médicaments antipaludiques en développement	37
1.4.6. Prise en charge du paludisme par la médecine traditionnelle.....	40
2. Alcaloïdes indolomonoterpéniques : généralités	45
2.1. Alcaloïdes indolomonoterpéniques : présentation, distribution, biosynthèse	45
2.2. Activités pharmacologiques et intérêt biologique des alcaloïdes indolomonoterpéniques.....	50
3. Généralités sur les familles des plantes étudiées	53
3.1. Famille des Apocynaceae : généralités.....	53
3.2. Famille des Gelsemiaceae : généralités.....	57
Chapitre II. Méthodologie du travail, travaux préparatoires.....	60
1. Sélection et récolte des plantes	60
1.1. Sélection initiale des plantes	60
1.2. Choix de Gentianales	62
2. Démarche analytique employée.	64
2.1. Introduction	64
2.2. Conditions d'analyse, examen des données	64

2.3.	Analyse par la méthode des réseaux moléculaires	68
2.4.	Construction d'une base de données interne au laboratoire (MIADB)	70
2.5.	Priorisation des purifications.....	71
2.6.	Détermination des niveaux de confiance de Schymanski	72
2.7.	Poursuite des travaux : isolement, évaluation biologique.....	75
Chapitre III. Études chimique et biologique de <i>Pléiocarpa mutica</i> Benth. (Apocynaceae)		78
1.	Introduction.....	78
2.	Présentation du genre <i>Pléiocarpa</i> et de l'espèce <i>Pléiocarpa mutica</i> Benth.....	78
2.1.	Aspects botaniques et distribution du genre <i>Pléiocarpa</i>	78
2.2.	Utilisations traditionnelles.....	81
2.3.	Composition chimique.....	81
3.	Travaux personnels : étude de l'extrait alcaloïdique des écorces de tige de <i>P. mutica</i> Benth.	82
3.1.	Étude préliminaire de l'extrait.....	82
3.2.	Article : <i>Pléiokomenines A–B, deux alcaloïdes dimères aspidofractanes rattachés par un pont méthylène</i>	88
3.3.	Supporting informations Otogo N'Nang Obiang E. et al. <i>Org. Lett.</i> 2017	93
3.3.1.	Experimental section:	94
3.3.1.1.	General experimental procedures.....	94
3.3.1.2.	Plant material	94
3.3.1.3.	Extraction and isolation	94
3.3.1.4.	Unsuccessful conversion of 1 from 3.....	95
3.3.1.5.	Semisynthesis of 1 from 3	95
3.3.1.6.	LC-MS analysis of ($\lambda=254$ nm) for the formation of 1 from 3.....	97
3.3.1.7.	HRESIMS spectrum of semisynthetic pleiokomenine A	98
3.3.1.8.	HRESIMS/MS spectrum of semisynthetic pleiokomenine A	98
3.3.1.9.	^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of semisynthetic pleiokomenine A	99
3.3.1.10.	^{13}C NMR spectrum (100 MHz, CDCl_3) of semisynthetic pleiokomenine A ...	100
3.3.1.11.	Computational methods.....	101
3.3.1.12.	DFT optimized geometry of 3	101
3.3.1.13.	Experimental ECD spectra of 1 and 2	103
3.3.1.14.	EIC of pleiokomenine A (1) m/z 717.4350 from the alkaloid extract.....	104
3.3.1.15.	HRESIMS spectrum of pleiokomenine A (1)	105
3.3.1.16.	HRESIMS/MS spectrum of pleiokomenine A (1) CID @ 70 ev.....	105
3.3.1.17.	^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of pleiokomenine A (1)	106
3.3.1.19.	COSY spectrum (400 MHz, CDCl_3) of pleiokomenine A (1).....	108
3.3.1.20.	HSQC spectrum (400 MHz, CDCl_3) of pleiokomenine A (1)	109
3.3.1.21.	HMBC spectrum (400 MHz, CDCl_3) of pleiokomenine A (1)	110
3.3.1.22.	NOESY spectrum (400 MHz, CDCl_3) of pleiokomenine A (1)	110
3.3.1.23.	EIC of pleiokomenine B (2) m/z 689.4056 from the alkaloid extract.....	112
3.3.1.24.	HRESIMS spectrum of pleiokomenine B (2)	113
3.3.1.25.	HRESIMS/MS spectrum of pleiokomenine B (2) CID @ 70 ev	113

3.3.1.26.	¹ H NMR spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) of pleiokomenine B (2)	114
3.3.1.27.	¹³ C NMR spectrum (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) of pleiokomenine B (2)	115
3.3.1.28.	COSY spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) of pleiokomenine B (2).....	116
3.3.1.29.	HSQC spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) of pleiokomenine B (2)	117
3.3.1.30.	HMBC spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) of pleiokomenine B (2)	118
3.3.1.31.	ROESY spectrum (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) of pleiokomenine B (2).....	119
3.4.	Caractérisation des composés isolés dans les zones C, D et dans les <i>selfloops</i>	120
3.4.1.	Extraction des écorces de tiges de <i>P. mutica</i>	120
3.4.2.	Fractionnement et isolement de l'extrait alcaloïdique	120
3.4.3.	Caractérisation des analogues pléiokomenines (C et D) et du bispléiocarpinium (5).....	123
3.4.4.	Les analogues de la pléiomutine : la 6-oxopléiomutine et la <i>N</i> -oxydepléiomutine	129
4.	Résultats des activités biologiques	135
4.1.	Activité antiplasmodiale	135
4.2.	Activité antileishmanienne	136
4.3.	Activités cytotoxiques.....	137
5.	Conclusion du chapitre III.....	138
6.	Données spectrales des molécules isolées à partir de <i>P. mutica</i>	139
6.1.	Données spectrales de la pléiokomenine C (3)	139
6.2.	Données spectrales de la pléiokomenine D (4)	144
6.3.	Données spectrales du bispléiocarpinium (5)	149
6.4.	Données spectrales de la 6-oxopléiomutine (6).....	154
6.5.	Données spectrales de la <i>N</i> -oxydepléiomutine (7)	159
Chapitre IV. Études chimique et biologique de <i>Callichilia inaequalis</i> Stapf (Apocynaceae)..		165
1.	Introduction <i>Callichilia inaequalis</i>	165
2.	Présentation du genre <i>Callichilia</i> et de l'espèce <i>Callichilia inaequalis</i> Stapf.....	166
2.1.	Aspects botaniques et distribution du genre <i>Callichilia</i>	166
2.2.	Distribution de l'espèce <i>Callichilia inaequalis</i> Stapf.....	167
2.3.	Utilisations traditionnelles.....	167
2.4.	Composition chimique.....	168
2.4.1.	Alcaloïdes indolomonoterpéniques monomères	168
2.4.2.	Alcaloïdes <i>bis</i> -indolomonoterpéniques.....	169
3.	Travaux personnels	170
3.1.	Récolte et identification	170
3.2.	Réseau moléculaire	170
3.2.1.	Analyse du réseau moléculaire de <i>C. inaequalis</i>	171
3.3.	Ciblage des composés à isoler	177
3.4.	Extraction et isolement	180
3.4.1.	Tiges : extraction, fractionnement et isolement	180
3.4.2.	Racines : extraction, fractionnement et isolement.....	181
3.5.	Caractérisation structurale des composés isolés	184
3.5.1.	Caractérisation des composés isolés des tiges	184
3.5.2.	Caractérisation des composés isolés des racines.....	198

3.6.	Voie de biosynthèse de l'inaequalisine A	202
4.	Résultats des activités biologiques	203
4.1	Activité antiplasmodiale	203
5.	Conclusion du chapitre IV.....	204
6.	Données spectrales des molécules isolées	205
6.1.	Données spectrales de la criophylline (1).....	205
6.2.	Données spectrales de l'hydroxy-criophylline (2)	209
6.3.	Données spectrales de l'hydrogénosulfate-criophylline (3).....	213
6.4.	Données spectrales de l'inaequalisine A (5).....	217
Chapitre V. Études chimique et biologique de <i>Mostuea brunonis</i> Didr. (Gelsemiaceae).....		222
1.	Introduction.....	222
2.	Présentation du genre <i>Mostuea</i> et de l'espèce <i>Mostuea brunonis</i> Didr.	222
2.1.	Aspects botaniques et distribution du genre <i>Mostuea</i>	222
2.2.	Utilisations traditionnelles.....	224
2.3.	Composition chimique.....	226
2.3.1.	Alcaloïdes indolomonoterpéniques.....	226
2.3.2.	Alcaloïdes quinoléiques	227
3.	Travaux personnels	228
3.1.	Récolte et identification	228
3.2.	Réseau moléculaire des extraits alcaloïdiques de <i>M. brunonis</i>	228
3.3.	Analyse du réseau moléculaire de <i>M. brunonis</i>	229
3.3.1.	Analyse de la zone A	231
3.3.2.	Analyse de la zone B	232
3.3.3.	Analyse de la zone C	234
3.4.	Détection des composés isolés dans l'extrait de tige	235
3.5.	Extraction des tiges et des feuilles de <i>M. brunonis</i>	237
3.6.	Caractérisation structurale des composés isolés	240
3.6.1.	16- <i>epi</i> -17-méthylester-panarine (1).....	240
3.6.2.	Theionbrunonine A (5).....	243
3.6.3.	Theionbrunonine B (6).....	248
3.6.4.	Theionbrunonine C (7).....	251
3.7.	Hypothèse de biosynthèse des theionbrunonines.....	254
4.	Résultats des activités biologiques	255
4.1.	Activités antiplasmodiales	255
4.2.	Activités cytotoxiques.....	256
5.	Conclusion du chapitre V.....	257
6.	Données spectrales des composés isolés	258
6.1.	. Données spectrales de la 16- <i>epi</i> -17-méthylester-panarine (1).....	258
6.2.	Données spectrales de la theionbrunonine A (5).....	263
6.3.	. Données spectrales de la theionbrunonine B (6)	268
6.4.	Données spectrales de la theionbrunonine C (7)	273
Conclusion et perspectives.....		279
Bibliographie		286
Annexes		297

Annexe 1. Plantes récoltées – synonymies, numéros d’herbier.....	297
Annexe 2. Molécules de référence de la MIADB	300
Annexe 3. Calculs théoriques et génération des courbes de dichroïsme circulaire	309
Annexe 4. Tests biologiques : matériel et méthodes.....	310
1. Évaluation de l’activité antiplasmodiale.....	310
2. Évaluation de l’activité antileishmanienne	312
3. Évaluation de l’activité cytotoxique	314
Annexe 5 Bilan des communications	315
Annexe 6. fiche d’enquête ethnopharmacologique sur les plantes médicinales utilisées au Gabon	317

Liste des figures

Figure 1. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> indiquant les sites d'action des antipaludiques actuels et leur degré de pression de sélection des parasites résistants (Source, Blasca 2017)	20
Figure 2. Répartition du paludisme dans le monde en 2016 (source: OMS, 2017)	24
Figure 3. Antipaludiques employés en clinique, en séries quinoléiques et aryl-amino-alcool	33
Figure 4. Artémisinine et analogues.....	34
Figure 5. Molécules antipaludiques interagissant avec le métabolisme de l'acide folique	36
Figure 6. Antibiotiques utilisés comme antipaludiques	36
Figure 7 Structure de l'atovaquone.....	37
Figure 8. Progression du développement clinique de nouveaux candidats antipaludiques au cours des 5 dernières années. (Source : Wells et al. 2015)	38
Figure 9. Structures de molécules antipaludiques en phase d'expérimentation clinique en 2015.....	39
Figure 10. <i>Alstonia congensis</i> (a), <i>Picralima nitida</i> (b)	41
Figure 11. Principes actifs présumés de MTA antipaludiques africains.....	43
Figure 12. Plantes employées dans des MTA antipaludiques africains : <i>Cryptolepis sanguinolenta</i> (a), <i>Argemone mexicana</i> (b), <i>Cochlospermum planchonii</i> (c)	43
Figure 13. Origine de la strictosidine (parties tryptaminique en noir et monoterpénique en bleu).....	46
Figure 14. Alcaloïdes indolomonoterpéniques de types I, II, III : principe de la biosynthèse .	47
Figure 15 Les 45 squelettes des alcaloïdes indolomonoterpéniques monomériques	49
Figure 16 Alcaloïdes indolomonoterpéniques d'intérêt pharmaceutique cités	51
Figure 17. Exemples d'espèces à alcaloïdes indolomonoterpéniques à fort potentiel pharmacologique : <i>Strychnos nux-vomica</i> (a), <i>Rauwolfia serpentina</i> (b), <i>Tabernanthe iboga</i> (c)	52
Figure 18. Répartition de la famille des Apocynaceae (source : Catalogue of life 2013)	53
Figure 19 Résumé des relations phylogéniques au sein des Apocynaceae admises en 2012 .	54
Figure 20 Triterpénoïdes d'Apocynaceae : exemples	56
Figure 21 Classification phylogénétique de la famille des Gelsemiaceae.....	57
Figure 22 Répartition de la famille de Gelsemiaceae	58
Figure 23 Gelsémine, gelsédine (a) ; <i>Gelsemium sempervirens</i> (L.) J.St.-Hil. (b)	58
Figure 24. Plantes récoltées en 2014	62
Figure 25. Lieux de récolte et d'enquête.	63
Figure 26. Etapes de création d'un réseau moléculaire.....	70
Figure 27. Niveaux de confiance d'identification proposés pour la déréplication par spectrométrie de masse à haute résolution (tiré de : Schymanski et al. ; 2014)	72
Figure 28. Comparaison des spectres MS2 pour la geissoschizoline	73
Figure 29. Déréplication et orientation de la stratégie d'isolement : démarche générale de travail.....	74
Figure 30. Répartition géographique du genre <i>Pleiocarpa</i>	79
Figure 31. Planche botanique de <i>P. mutica</i> Benth.....	80
Figure 32. Alcaloïdes indolomonoterpéniques et indolique isolés de <i>P. mutica</i>	82
Figure 33. Analyse par CLHP-UV-MS de l'extrait alcaloïdique d'écorces de tiges de <i>P. mutica</i>	83

Figure 34. Réseau moléculaire global de l'extrait alcaloïdique d'écorces de tiges de <i>P. mutica</i> annoté avec la MIADB.	84
Figure 35. Nouveaux <i>bis</i> -indoles de types aspidofractane-aspidofractane et aspidofractane-éburnamine isolés des écorces de tiges de <i>P. mutica</i>	87
Figure 36. Experimental ECD spectra of 1-2 (MeOH).....	103
Figure 37. Schéma d'extraction et d'isolement des écorces de tiges de <i>P. mutica</i>	122
Figure 38. Structure de la pléiokomenine C (3).....	123
Figure 39. Comparaison des spectres ¹³ C des pléiokomenine B et C, agrandissement des zones de différences ((CD ₃) ₂ SO, 150 MHz).....	124
Figure 40. Structure de l'acide- <i>N</i> -oxyde formyl-kopsininique et de la <i>N</i> -oxyde isocondylocarpine.....	125
Figure 41. Structure de la pléiokomenine D (4).....	126
Figure 42. Comparaison des spectres ¹ H des pléiokomenines A (400 MHz, CDCl ₃) et D (600 MHz, MeOD).....	126
Figure 43. Structure du bispléiocarpininium (5).....	127
Figure 44. Corrélations HMBC de la bispléiocarpininium (5).....	128
Figure 45. Structure de la 6-oxopléiomutine (6).....	129
Figure 46. Comparaison des spectres ¹³ C du composé 6 et la pléiomutine.....	130
Figure 47. Corrélations COSY et HMBC de la 6-oxopléiomutine.....	130
Figure 48. Corrélations NOESY de la 6-oxopléiomutine (6) : (au-dessus du plan : flèches rouges), (en-dessous du plan : flèches bleues).....	131
Figure 49. Structure de la <i>N</i> -oxydepléiomutine (7).....	132
Figure 50. Comparaison des spectres RMN ¹³ C des 6-oxo et la <i>N</i> -oxydepléiomutine ((CD ₃) ₂ SO, 125 et 100 MHz).....	133
Figure 51. Corrélations COSY et HMBC de la <i>N</i> -oxydepléiomutine.....	133
Figure 52. Répartition géographique du genre <i>Callichilia</i> (selon Map data 2017).....	166
Figure 53. <i>Callichilia inaequalis</i> Stapf (photo prise par Kevin Mebale).....	167
Figure 54. Monomères indolomoterpéniques isolés du genre <i>Callichilia</i>	169
Figure 55. Dimères indolomonoterpéniques isolés dans le genre <i>Callichilia</i>	169
Figure 56. Profils chromatographiques des deux extraits alcaloïdiques de <i>C. inaequalis</i>	171
Figure 57. Nœuds du réseau moléculaire de <i>C. inaequalis</i>	172
Figure 58. Réseau moléculaire global des extraits alcaloïdiques de tiges et de racines de <i>C. inaequalis</i> et de la MIADB ; agrandissement des zones A, B et C.....	173
Figure 59. Annotation et agrandissement de la zone A.....	174
Figure 60 Agrandissement des zones B et C.....	176
Figure 61. Schéma d'extraction et de purification des tiges de <i>C. inaequalis</i>	181
Figure 62. Schéma d'extraction et de fractionnement des racines de <i>C. inaequalis</i>	182
Figure 63. Structures des composés isolés des tiges et des racines de <i>C. inaequalis</i>	183
Figure 64 Structure de la criophylline (1).....	184
Figure 65. Structures connues correspondant à la formule brute de la criophylline (1) (C ₄₆ H ₄₆ N ₄ O ₄).....	186
Figure 66. Spectres RMN ¹ H et ¹³ C de la criophylline (1) (MeOH d ₄ , 400 MHz et 100 MHz). 186	
Figure 67. Structure de l'andrangine.....	187
Figure 68. Corrélations NOESY (double flèche rouge) de la partie Nord de la criophylline (1).....	188
Figure 69. Corrélations NOESY (double flèche rouge) de la partie Sud de la criophylline (1).....	188

Figure 70. Courbes de DCE calculée en (violet) et expérimentale (en vert) de la criophylline (1)	189
Figure 71 Structure de l'hydroxy-criophylline (2)	190
Figure 72. Différence entre les parties Nord des composés 1 et 2.....	191
Figure 73. Corrélations NOESY de la partie Nord de l'hydroxy-criophylline (2)	192
Figure 74. Structure de l'hydrogénosulfate-criophylline (3).....	193
Figure 75. Spectre de masse ESI (+) de l'hydrogénosulfate-criophylline (3)	193
Figure 76. Comparaison des spectres RMN ¹ H des composés 3 et 2 (MeOH-d ₄ , 400 MHz)..	194
Figure 77. Stéroïdes d'origine marine de l'éponge <i>Xestospongia</i> sp.	194
Figure 78. Chromatogrammes de l'extrait éthanolique des tiges de <i>C. inaequalis</i> et le spectre SM de l'hydrogénosulfate-criophylline (3).....	196
Figure 79. Comparaison des courbes expérimentales de dichroïsme circulaire électronique des composés 1, 2 et 3 (MeOH)	197
Figure 80. Structure de l'inaequalisine A (5)	198
Figure 81. Corrélations HMBC et COSY de l'inaequalisine A (5)	199
Figure 82. Motif pyrrolidinodihydroindole et le squelette rhazidine	200
Figure 83. Structure de l'angélicastigmine.....	201
Figure 84. Corrélations ROESY des unités A et B du composé 5	201
Figure 85. Voie de biosynthèse hypothétique de l'inaequalisine A (5)	202
Figure 86. Répartition africaine du genre <i>Mostuea</i> (selon CJBG, 2017).....	223
Figure 87. Planche botanique de <i>Mostuea brunonis</i> (Foren. Kj ©benhavn ,1853)	223
Figure 88. Photographie de <i>Mostuea brunonis</i> Didr. (Source personnelle).....	224
Figure 89. Alcaloïdes indolomonoterpéniques isolés de <i>M. brunonis</i> , hors quinoléines	226
Figure 90. Alcaloïdes quinoléiques isolés de <i>M. brunonis</i>	227
Figure 91. Profils chromatographiques des extraits alcaloïdiques de tiges et de feuilles de <i>M. brunonis</i>	229
Figure 92. Réseau moléculaire global des extraits alcaloïdiques de tiges et de feuilles de <i>M. brunonis</i> annoté par la MIADB	230
Figure 93 Molécules assimilées à la formule brute du composé 1	232
Figure 94. Annotation et agrandissement de la zone A	232
Figure 95. Agrandissement de la zone B	233
Figure 96. Agrandissement de la zone C	234
Figure 97. Schéma d'extraction et de purification des composés isolés de l'extrait alcaloïdique de tiges de <i>M. brunonis</i>	238
Figure 98. Composés isolés de l'extrait alcaloïdique de tiges de <i>M. brunonis</i>	239
Figure 99. 16- <i>epi</i> -17-méthylester-panarine (1).....	240
Figure 100. Spectre proton de la 16- <i>epi</i> -17-méthylester-panarine (1), MeOH d ₄ , 400 MHz	241
Figure 101 Corrélations HMBC et COSY de la 16- <i>epi</i> -17-méthylester-panarine (1)	241
Figure 102. Corrélations NOESY du composé 1 de la 16- <i>epi</i> -17-méthylester-panarine (1) ..	242
Figure 103. Structure de la theionbrunonine A (5)	243
Figure 104. Bisindoles de type vobasine-vobasine	244
Figure 105. Spectres RMN ¹ H (400, MeOH d ₄) et ¹³ C (100, MeOH d ₄) de la theionbrunonine A (5)	245
Figure 106. Spectre MS ² de la theionbrunonine A (5) à 30 eV	246
Figure 107. Corrélations RMN 2D de la theionbrunonine A (5)	246
Figure 108. Corrélations NOESY de la theionbrunonine A.....	247
Figure 109. Corrélations NOESY de la theionbrunonine A (5)	247

Figure 110. Structure de la theionbrunonine B (6)	248
Figure 111. Comparaison des spectres MS ² des composés 6 et 5.....	249
Figure 112. Comparaison des déplacements chimiques des carbones C-5 et C-21 des composés 5 et 6	250
Figure 113. Corrélation COSY et HMBC de la theionbrunonine B (6)	250
Figure 114. Structure de theionbrunonine C (7)	251
Figure 115. Comparaison des spectres MS ² des composés 5, 6 et 7 pour E _c = 30 eV et m/z (100-1200)	252
Figure 116. Comparaison des déplacements chimiques des carbones C-5 et C-21 des composés 5, 6 et 7.....	253
Figure 117. Corrélations COSY, HMBC de la theionbrunonine C (7).....	253
Figure 118. Hypothèse biosynthétique des theionbrunonines.....	254
Figure 119. Structures des alcaloïdes isolées de <i>P. mutica</i>	280
Figure 120. Structures des alcaloïdes isolées de <i>C. inaequalis</i>	281
Figure 121. Structures des alcaloïdes isolées de <i>M. brunonis</i>	282

Liste des tableaux

Tableau 1 Estimation de l'incidence (nouveaux cas) du paludisme et du nombre de décès, de 2010 à 2015 (source, OMS 2017).	23
Tableau 2. Décès dus au paludisme rapportés pour le Gabon (source : OMS, 2017).	25
Tableau 3 Enquête ethnopharmacologique.....	60
Tableau 4. Colonnes C ₁₈ employées pour l'analyse des extraits.....	65
Tableau 5. Paramètres standards utilisés pour les analyses CLHP-MS.....	66
Tableau 6 Tableau de déréplication de l'extrait alcaloïdique d'écorces de tiges de <i>P. mutica</i>	85
Tableau 7. Comparaison des déplacements chimiques des carbones C-3, C-5 et C-21 avoisinant le groupement <i>N</i> -oxyde.....	125
Tableau 8. Activités de l'extrait brut et de 8 composés isolés de <i>P. mutica</i> contre le <i>Plasmodium falciparum</i> (Fcb1).....	135
Tableau 9. Activités antileishmanienne de l'extrait brut et de 6 composés isolés de <i>P. mutica</i>	136
Tableau 10. Activités cytotoxiques de l'extrait brut et de 6 composés isolés de <i>P. mutica</i> ..	137
Tableau 11. Tableau récapitulatif des 12 nœuds concordants entre les spectres MS ² des extraits alcaloïdes et les spectres MS ² issus de la MIADB	175
Tableau 12. Tableau de déréplication des extraits alcaloïdiques de <i>C. inaequalis</i>	178
Tableau 13 Comparaison des déplacements chimiques et des constantes de couplages des protons H-14, H-15, H-14' et H-15' de la criophylline (1) et de l'hydroxy-criophylline (2) (CDCl ₃ , 400 MHz)	191
Tableau 14 Résultats d'activité antiplasmodiale (Fcb1) des composés isolés de <i>C. inaequalis</i>	203
Tableau 15. Nœuds appariés entre les extraits alcaloïdiques et la MIADB	234
Tableau 16. Tableau de déréplication de l'extrait alcaloïdique de tiges de <i>M. brunonis</i>	236
Tableau 17. Résultats d'activité antiplasmodiale (Fcb1) des composés isolés de <i>M. brunonis</i>	255
Tableau 18. Tests cytotoxiques des 7 composés isolés de <i>M. brunonis</i>	256

Liste des sigles et abréviations

$[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire spécifique

A-549 : lignée d'origine humaine de cancer du poumon (épithélium alvéolaire) ;

AB 943 : lignée primaire immortalisée de fibroblastes humains (peau adulte)

ACT : *Artemisinin-based Combination Therapy*

AcOEt : Acétate d'éthyle

APG : *Angiosperm Phylogeny Group*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

AF: Acide Formique

br s: Singulet large (*broad singlet*)

CC : Chromatographie sur Colonne

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

Cl₅₀ : Concentration inhibitrice 50 %

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CLHP-MS : Chromatographie liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse

CID : *Collision Induced Dissociation* (dissociation induite par collision)

CLHP-Q-TOF-MS² : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse tandem (analyseurs Quadripole et Temps de vol)

COSY : *Correlation Spectroscopy*

CPS : chimioprévention du paludisme saisonnier

d : doublet

dd : doublet de doublet

DC : Dichroïsme Circulaire

DCE : Dichroïsme Circulaire Électronique

DCM : Dichlorométhane

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DEPT-135 : *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*.

DO : Densité Optique

DAD : *Diode Array Receptor*, Détecteur UV à barette de diodes

δ_H : déplacement chimique du proton

δ_C : déplacement chimique du carbone

DNP : *Dictionary of Natural Products*

EC : *Exciton Chirality*

EMA : *European Medicines Agency*

éq. : équivalent

ESI : électrospray

FcB1 : souche colombienne du *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante

FDA : *Food and Drug Administration*

FB : formule Brute

GSK : GlaxoSmithKline

GNPS: *Global Natural Product Social Molecular Networking*

HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

HUVEC : lignée endothéliale ombilicale saine humaine

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HEP-G2 : lignée d'origine humaine de cancer hépatique

IR : Infra-Rouge

IPHAMETRA : Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle

J : constante de couplage

LV9: *Leishmania donovani*

m : multiplet

MRC-5 : lignée de fibroblastes de poumons foetaux humains

MTS : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium

MID : moustiquaires à imprégnation durable

MTA : médicament traditionnel amélioré

MIADB: *Monoterpene Indole Alkaloids Data Base*

MS : spectrométrie de masse

MS/MS ou MS^2 : Spectrométrie de masse en 2 étapes

MN : *Molecular Networking*

nm : Nanomètre

NADH : Forme réduite du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide)

NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

NADP⁺: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

N.I. : niveau d'identification

NH₃aq : ammoniacque (solution aqueuse)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

PID : pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides

ppm : partie par million

ROESY : *Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy*

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ONG : Organisation Non Gouvernementale

q : quadruplet

SiOH : silice (gel)

HRSM-ESI : Spectrométrie de masse (Haute résolution) en mode électrospray

S.D.: *standard deviation*

s : singulet

Tr: Temps de rétention

TMS : Triméthyl-silyl

TIC : *Total Ion Count* (courant ionique total)

ToF : *Time-of-flight* (analyseur à temps de vol)

TPI : traitement préventif intermittent

TPIg : traitement préventif intermittent est réservé à la femme enceinte

TPIn : traitement préventif intermittent est réservé nourrisson GlaxoSmithKline GSK

t : triplet

UV : Ultra-Violet

UNICEF : Fonds des Nations Unies pour l'Enfance

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humain

WHO : *World Health Organization* (Organisation Mondiale de la Santé)

Introduction générale

Introduction générale

Les premières traces écrites relatant l'usage des plantes médicinales par l'homme remontent à l'époque sumérienne et akkadienne en Mésopotamie, où des tablettes d'argile, datées du troisième millénaire avant J. C. décrivent l'utilisation de remèdes dérivées de plantes, certains servent encore aujourd'hui pour le traitement des infections parasitaires.¹ Des textes égyptiens très anciens sont connus, comme le papyrus Ebers, datant de 1500 ans avant J. C., décrivant l'usage de 850 plantes.² La *Materia medica* chinoise est une médecine savante largement documentée avec des premiers écrits datant d'environ de 1100 ans avant J. C.³ D'autres civilisations ont marqué l'histoire de la médecine et de la pharmacopée. Les Grecs et les Romains ont contribué au développement de l'utilisation rationnelle des remèdes à base de plantes dans la civilisation occidentale. Les arabes, quant à eux, ont permis la transmission du savoir gréco-romain grâce à la traduction des textes en Arabe au Moyen-Âge.⁴ En Afrique, les traditions médicales sont de transmission orale. Leur genèse est également *a priori* très ancienne.

Aujourd'hui, la médecine traditionnelle reste largement utilisée et constitue le mode principal de prestation de soins de santé dans plusieurs pays du monde. Dans les pays en développement, 60 à 90 % des habitants y ont recours. L'OMS, reconnaît l'importance de l'emploi des médecines traditionnelles et a publié de nombreux documents de référence, dont sa « stratégie pour la médecine traditionnelle 2014-2020 »,⁵ proposant des solutions pour les intégrer dans les systèmes de santé des pays où elles sont présentes de manière prépondérante ou complémentaire.

Dans les recherches scientifiques liées aux plantes, de nombreux succès significatifs ont été enregistrés. C'est le cas dans le cadre de la prise en charge du paludisme, en 1972 de l'artémisinine, extrait d'*Artemisia annua* (Qinghaosu), plante de la pharmacopée chinoise⁶, et bien avant elle, la quinine obtenue de divers quinquinas (*Cinchona* spp.), plantes originaires d'Amérique du Sud.

En Afrique, notamment au Gabon, les plantes médicinales jouent un rôle très

¹ J. K. Borchardt, *Drug News Perspect.* **2002**, 15, 187-192.

² F. Jonckheere, *Le papyrus médical Chester Beatty*, **1947**

³ <http://www.hort.purdue.edu/ChineseMedicinals/newcrop/proceedings1990/v1-499.html> (18/10/2017).

⁴ <http://www.nlm.nih.gov/hmd/index.html> (18/10/2017).

⁵ OMS, *Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023*, **2013**

⁶ D. L. Klayman, *et al.*, *J. Nat. Prod.* **1984**, 47, 715-717.

important dans le traitement d'une grande variété de maladies parasitaires.⁷ Dans ce sens, la pharmacopée des populations du Gabon représente donc un potentiel considérable et près de 55% des habitants utilisent la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire.⁸ La permanence de l'utilisation de ces plantes impose de s'y attarder et de les étudier. D'autre part, le Gabon est couvert de forêts primaires qui recèlent un potentiel végétal et chimique exceptionnel, qui reste encore largement à étudier et à valoriser.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre l'université Paris-Sud / Paris Saclay et l'université des Sciences et Technique de Masuku. Elle rentre dans les thématiques de recherches du laboratoire « Pharmacognosie / chimie des substances naturelles » de l'UMR BioCIS. Au laboratoire, la thématique des alcaloïdes indolomonoterpéniques a été réactivée, et les développements techniques (avec l'exploitation des données de chromatographie liquide haute-performance couplée à la spectrométrie de masse, CLHP-MS) indiquent l'intérêt du réexamen de la composition chimique de plantes anciennement étudiées, à la recherche de métabolites secondaires originaux et bioactifs.

Pour la réalisation de ce travail, trois plantes de l'ordre des Gentianales, deux Apocynaceae et une Gelsemiaceae, ont été sélectionnées pour leur utilisation en médecine traditionnelle contre le paludisme et d'autres parasites, ou pour leur potentiel chimique : il s'agit de *Pleiocarpa mutica* Benth. (écorces de tronc), de *Callichilia inaequalis* Stapf (écorces de racines et tiges) et de *Mostuea brunonis* Didr. (tiges et feuilles).

Ce manuscrit est articulé autour de trois parties. La première, introductive, est constituée de deux chapitres (I, II). Le chapitre I, bibliographique, définit le cadre de l'étude, présente l'état actuel du paludisme dans le monde, notamment au Gabon, et des éléments relatifs à la médecine traditionnelle au Gabon. Le second chapitre présente notre démarche de travail et la méthodologie d'obtention des nouveaux composés, avec quelques rappels bibliographiques relatifs aux techniques. Des éléments préliminaires aux travaux personnels développés ensuite sont présentés.

La seconde partie du manuscrit regroupe trois chapitres (III, IV, V) dédiés aux travaux personnels d'étude chimique et biologique des trois plantes sélectionnées. Ils décrivent l'isolement de petites molécules à partir d'extraits alcaloïdiques et leur caractérisation

⁷ A. M. Towns, et al., *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *155*, 1184-1193.

⁸ E. Makita-Ikouaya, et al., *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé* **2010**, *20*, 179-188.

structurale. Ces chapitres comportent les parties expérimentales correspondantes, ainsi que les données spectrales des nouveaux produits obtenus. Seuls les composés isolés sont numérotés, de manière indépendante pour chaque chapitre.

La troisième partie du manuscrit est dédiée à la conclusion et aux perspectives de ce travail.

Des annexes sont proposées en fin du manuscrit.

Chapitre I : Données bibliographiques

Chapitre I : Données bibliographiques

1. Généralité sur le paludisme

1.1. Définition et symptomatologie du paludisme

Endémie parasitaire majeure, le paludisme (ou malaria) sévit dans les régions équatoriales, tropicales et subtropicales du globe. Elle est causée par des protistes du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre de moustiques femelles appartenant au genre *Anopheles*. Cinq espèces sont responsables de la pathologie chez l'Humain : il s'agit de *Plasmodium falciparum* (la plus fréquemment responsable d'accès mortels), *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, ainsi que de *P. knowlesi*, identifié assez récemment chez l'homme.⁹

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : « le paludisme est une affection fébrile aiguë. Chez un sujet non immunisé, les symptômes apparaissent généralement au bout de 10 à 15 jours après une piqûre de moustique infectante. Les premiers symptômes sont une fièvre, des maux de tête et des frissons. Ces signes peuvent être modérés et difficiles à attribuer au paludisme. » La pathologie se traduit également par des douleurs musculaires, une faiblesse générale, des vomissements, des diarrhées et de la toux. Les accès palustres apparaissent de manière cyclique (correspondant à la libération sanguine du parasite, voir plus loin), selon un rythme variable en fonction de l'espèce incriminée. Une anémie est observée. Chez l'adulte, on peut aussi observer une atteinte multi-organes (hépatomégalie, splénomégalie, insuffisance rénale). L'infection à *Plasmodium falciparum* peut se traduire par une atteinte cérébrale, qualifiée de neuropaludisme, avec nystagmus, convulsions et coma non traité rapidement, cette forme peut s'avérer mortelle.¹⁰ Le parasite se loge au niveau hépatique et des résurgences de la maladie sont possibles.

Les enfants sont particulièrement à risque. Lorsqu'ils sont fortement atteints, ils développent un ou plusieurs des symptômes suivants : anémie sévère, détresse respiratoire consécutive à une acidose métabolique, neuropaludisme. Dans les zones d'endémie, les personnes peuvent parfois être partiellement immunisées et il peut y avoir des infections asymptomatiques.¹⁰

⁹ B. Singh, *et al.*, *Lancet* **2004**, 363, 1017-1024.

¹⁰ OMS. *Aide-mémoire N°94*, Novembre 2017.

1.2. Physiopathologie du paludisme, Cycle des *Plasmodium*

Le cycle du parasite se divise en trois phases. Une se déroule chez le moustique (cycle sporogonique) et deux chez l'hôte humain : le cycle érythrocytaire (dans les cellules sanguines) et le cycle exo-érythrocytaire (hors des cellules sanguines) (Figure 1)¹¹.

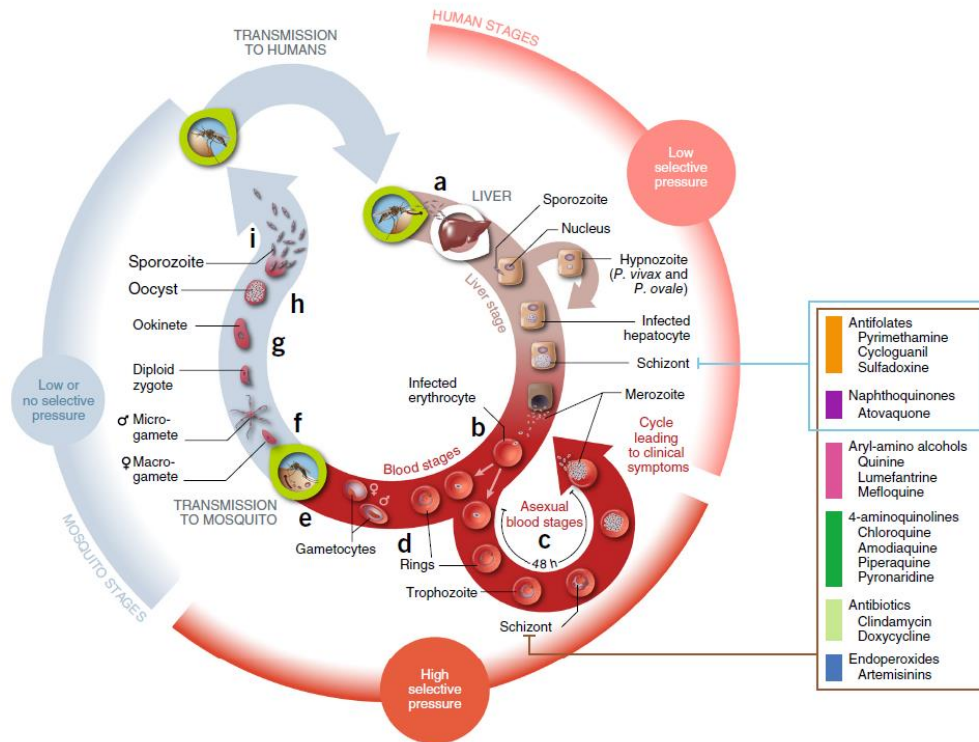


Figure 1. Cycle biologique du *Plasmodium* indiquant les sites d'action des antipaludiques actuels et leur degré de pression de sélection des parasites résistants (Source, Blasca 2017)¹²

Les antipaludiques disponibles actuellement ont plusieurs sites d'action, avec des mécanismes d'action variés (voir Chap. I, parties 1.4.3 et 1.4.4). On peut les distinguer selon la forme parasitaire touchée : asexuée (schizonticides) ou sexuée (gamétocytocides), ou selon le site d'action : dans le globule rouge (érythrocytaire) ou dans les cellules hépatiques (tissulaire). Au cours du travail réalisé ici, les évaluations d'activité des extraits végétaux et des molécules isolées ont été réalisées sur une souche de *Plasmodium falciparum*, en phase asexuée du cycle sur des formes intra-érythrocytaires.

¹¹ T. F. de Koning-Ward, *et al.*, *Nature Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 373-387.

¹² B. Blasco, *et al.*, *Nat. Med.* **2017**, *23*, 917-928.

2.1. Cycle chez l'homme

Chez l'homme, le cycle est lui-même divisé en deux phases (Figure 1) :

- la phase hépatique ou pré-érythrocytaire (exo-érythrocytaire) correspond à la phase d'incubation, cliniquement asymptomatique ; les sporozoïtes inoculés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin restent une demi-heure dans la peau, la lymphe et le sang. Véhiculés par la circulation sanguine, ils atteignent les hépatocytes, et se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus », qui après 7 à 15 jours de maturation, éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang ;
- la phase sanguine ou érythrocytaire quant à elle correspond à la phase clinique de la maladie ; la pénétration du mérozoïte dans l'érythrocyte et sa maturation en trophozoïte puis en schizonte prend 48 ou 72 heures (en fonction de l'espèce) et conduit à la destruction du globule rouge et à la libération de 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Ces mérozoïtes pénètrent dans de nouveaux globules rouges et débutent un nouveau cycle de réplication. Cette partie du cycle correspond à la phase clinique, au cours de laquelle la parasitémie s'élève et le sujet devient fébrile : c'est l'accès palustre avec des accès conformes à la périodicité évoquée plus haut.¹³

2.2. Cycle chez l'anophèle

Les gamétocytes, ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté, se transforment en gamètes mâles et femelles donnant un œuf libre, mobile, appelé ookinète. Celui-ci se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac de l'insecte et se transforme en oocyste. Les cellules parasitaires se multiplient à l'intérieur de cet oocyste, produisant des centaines de sporozoïtes qui migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes constituent les formes infectantes.¹³

¹³ M. Attaran, *et al.*, *Int. J. Fertil. Wom. Med.* **2000**, 45, 314-320.

1.3. Epidémiologie du paludisme

1.3.1. Epidémiologie générale

Selon les dernières estimations de l’OMS, publiées en avril 2017¹⁴, le paludisme a tué près de 429.000 personnes en 2015 : un enfant est mort du paludisme toutes les 2 minutes. Cette même année, le nombre de nouveaux cas de la maladie était estimé à 212 millions, majoritairement en Afrique. 75 % des décès imputables à cette maladie en 2015 ont concerné les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. La co-infection par le VIH est évidemment un problème majeur.

Outre ces conséquences sanitaires, le paludisme a des conséquences socio-économiques majeures, liées à l’invalidité des sujets paludéens.

Le paludisme demeure un problème de santé publique majeur pour une majorité de pays d’Afrique. Cependant, les efforts menés par l’OMS en termes de prévention (voir plus loin) et l’amélioration de l’accès aux traitements (dont la mise en place de campagnes de chimioprophylaxie en zone endémique), avec l’initiative « *Roll Back Malaria* »¹⁵ associant des efforts du secteur pharmaceutique, a permis d’améliorer cette situation. Ainsi, durant ces seize dernières années, plusieurs pays progressent vers l’élimination de la maladie. Entre 2010 et 2015, l’incidence du paludisme a ainsi baissé de 21 % au niveau mondial tandis que le taux de mortalité a reculé de 29 % à 31 % toutes tranches d’âge confondues et de 35 % chez les enfants de moins de 5 ans. En Afrique subsaharienne, l’incidence du paludisme et le taux de mortalité dus à ce fléau ont diminué de 21 % et de 31 %, respectivement, au cours des cinq dernières années. La région européenne, où subsistaient des zones à risque, a été déclarée exempte de paludisme en 2015. Dans les autres régions touchées par la maladie, on note des avancées notables, comme le montre le tableau 1.¹⁴ La pathologie demeure cependant une préoccupation sanitaire majeure.

¹⁴ OMS, *Rapport sur le paludisme dans le monde 2015: résumé*, 2016

¹⁵ <http://www.who.int/malaria/news/2015/governing-board-disbands-rbm-secretariat/en/> ; publié le 25/08/2015.

Tableau 1 Estimation de l'incidence (nouveaux cas) du paludisme et du nombre de décès, de 2010 à 2015 (source, OMS 2017).¹⁴

Réductions estimées dans l'incidence des cas et le nombre de décès (2010-2015)

RÉGION DE L'OMS	RÉDUCTION DE L'INCIDENCE	RÉDUCTION DU TAUX DE MORTALITÉ
Europe	100 %	100 %
Asie du Sud-Est	54 %	46 %
Amériques	31 %	37 %
Pacifique occidental	30 %	58 %
Afrique	21 %	31 %
Méditerranée orientale	11 %	6 %
Total mondial	21 %	29 %

1.3.2. Répartition géographique

Aujourd'hui, le paludisme est considéré endémique dans 91 pays (Figure 2). Le niveau d'endémicité varie d'une région à une autre :¹⁶

- Comme cela a déjà été précisé, l'Afrique reste le continent le plus touché : en 2016, 88 % des cas ont été enregistrés dans cette région, avec 46 pays endémiques dont 38 sous contrôle et 8 en cours d'élimination de la maladie. Le danger est quasi nul en Afrique du Nord, mais majeur en Afrique de l'Est, en Afrique subsaharienne et en Afrique équatoriale, dont le Gabon ;
- Onze pays sont endémiques en Asie du Sud-Est. Le paludisme y est cependant absent des grandes villes ;
- En Amérique du Sud et en Amérique centrale 35 pays sont des zones endémiques. Dans les Antilles, le paludisme sévit à Haïti et en République Dominicaine. En Amérique du Sud, le risque est faible dans les grandes villes, mais réel dans les zones rurales en Bolivie, en Colombie, en Équateur, au Pérou et au Venezuela, et est majeur dans toute la zone amazonienne ; En Amérique centrale, le risque est relativement faible.¹⁰

¹⁶ who.int/iris/bitstream/10665/254892/1/ccs-gab-2016-2021-fr (18/09/2017).

- Enfin, le Moyen-Orient et l’Eurasie comptent 17 pays endémiques tendant à être sous contrôle. Trois pays (le Pakistan, l’Afghanistan et le Yémen) comptabilisent plus de 99 % des décès de la région. ¹⁷

Pays d’endémie paludique en 2000 et 2016

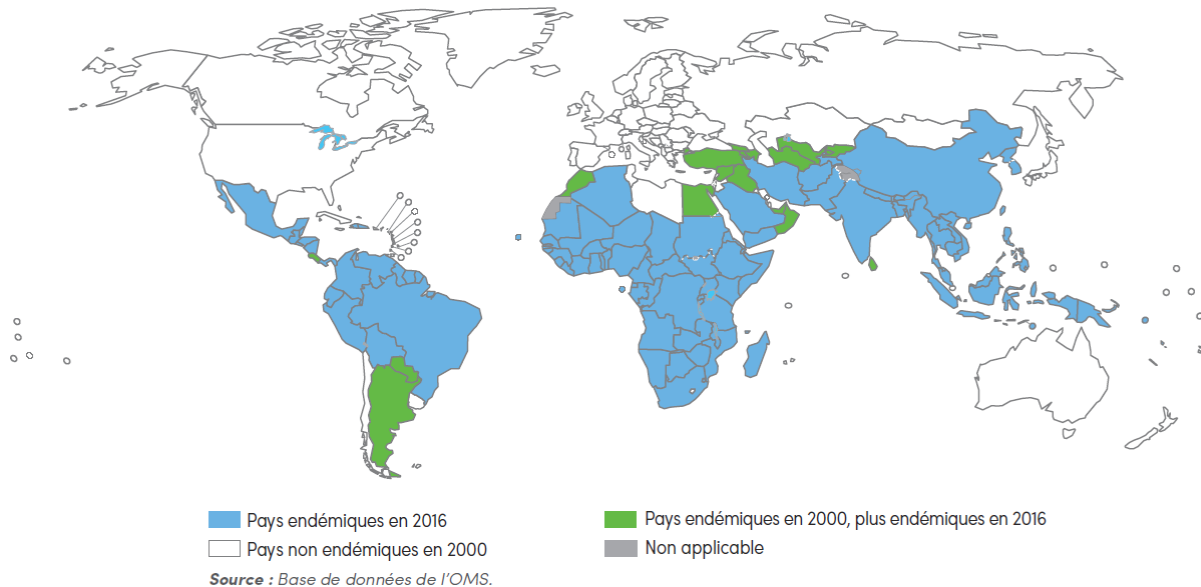


Figure 2. Répartition du paludisme dans le monde en 2016 (source: OMS, 2017)¹⁴

1.3.3. Le paludisme au Gabon

Le Gabon est un pays d’Afrique centrale où la transmission du paludisme est importante et quasi continue tout au long de l’année. Comme dans toute zone équatoriale, le Gabon est ainsi considéré comme une zone d’hyperendémie palustre. Le paludisme y est l’une des premières causes de mortalité.¹⁴ Le maintien de l’endémie palustre résulte de la conjonction de multiples facteurs :

- un écosystème réunissant toutes les conditions nécessaires au développement des anophèles vectrices, donc à la transmission du paludisme ;
- des conditions socio-économiques défavorables ainsi qu’en témoignent la faiblesse des ressources financières des familles, l’inadéquation de la couverture sanitaire (surtout dans les zones rurales), le chômage et l’urbanisation anarchique favorisée par l’afflux des populations rurales vivant dans des quartiers marécageux, créant ainsi des conditions propices au développement des anophèles et à une charge parasitaire importante dans un réservoir humain dense ;

¹⁷ <http://www.who.int/campaigns/malaria-day/2016/fr/> (18/09/2017).

- un recours tardif aux structures sanitaires lié à l’automédication souvent mal maîtrisée et à d’autres pratiques thérapeutiques aggravant l’impact de cette maladie en termes de mortalité et de morbidité.¹⁸

L’incidence du paludisme au Gabon était ainsi de 24.892 pour 100.000 en 2012 et le taux de mortalité est de 67 pour 100.000, d’après l’OMS. Une étude publiée en 2016 dans la revue *Parasite* fait état d’une baisse de la prévalence de 2005 à 2008 (31,2 % à 18,3 %), puis d’une recrudescence (24,1 %) en 2011 à Libreville, et d’une chute à Franceville de 69 % en 2004 à 19,5% en 2009. Elle n’a ensuite plus baissé dans cette ville de 2009 à 2012. Dans ce travail, portant sur plus de 900 enfants fébriles en 2011 et 2012, le paludisme était la seconde cause de fièvre, après les infections respiratoires.¹⁹

L’OMS rapporte pour le Gabon, dans son rapport sur le paludisme de 2016, les chiffres de mortalité présentés dans la table 2, pour un nombre de cas estimé entre 140.000 et 710.000 (médiane : 400.000 cas).

Tableau 2. Décès dus au paludisme rapportés pour le Gabon (source : OMS, 2017)¹⁴.

WHO region Country/area		2000	2005	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Gabon	Presumed and confirmed	127 024	235 479	185 105	178 822	188 089	185 196	185 996	217 287
	Microscopy examined	-	129 513	54 714	-	66 018	90 185	90 275	79 308
	Confirmed with microscopy	50 810	70 644	12 816	-	18 694	26 432	27 687	20 390
	RDT examined	-	-	7 887	-	4 129	10 132	11 812	12 761
	Confirmed with RDT	-	-	1 120	-	1 059	2 550	4 213	3 477
	Imported cases	-	-	-	-	-	-	-	-

Traduction : présumé et confirmé ; examen microscopique ; confirmé par microscopie ; examiné par test diagnostic rapide ; confirmé par test diagnostic rapide ; cas importés

P. falciparum représente l’espèce plasmodiale la plus répandue au Gabon : selon les études, sa fréquence oscille entre 93 et 100 % des infections par le genre, en fonction de la saison²⁰ (97,5 % des cas relevés à Franceville chez l’enfant dans l’étude citée précédemment)²⁰.

Les niveaux de résistance aux antipaludiques conventionnels sont très élevés.²¹ La résistance à la chloroquine est estimée à 100 %;¹⁷ celles à l’amodiaquine et à l’association sulfadoxine-pyriméthamine atteignaient respectivement 34 % et 14 % en 2000.^{22,23}

En 2003, les combinaisons thérapeutiques à base d’artémisinine (CTA / ATC, voir plus loin)

¹⁸ D. P. Mawili-Mboumba, *et al.*, *Cahiers d’études et de recherches francophones/Santé* **2012**, 21, 127-131.

¹⁹ S. Maghendji-Nzondo, *et al.*, *Parasite* **2016**, 23,

²⁰ M. K. Bouyou-Akotet, *et al.*, *Malaria J.* **2009**, 8, 300.

²¹ A. Aubouy, *et al.*, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2003**, 47, 231-237.

²² J. M. M. Ndong, *et al.*, *Tropical Medicine & International Health* **2003**, 8, 25-29.

²³ M. Ramharter, *et al.*, *Acta tropica* **2004**, 90, 55-60.

ont été adoptées par le pays à travers le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP). Il était prévu que le traitement de première ligne soit l'artésunate-amodiaquine et celui de seconde intention, l'artéméther-luméfantrine.²⁴ Ce n'est qu'en 2005 que les ACT ont été largement distribués. Le traitement présomptif chez la femme enceinte (sulfadoxine-pyriméthamine ; voir plus loin) a été également mis en place. Globalement, l'accès aux traitements est non satisfaisant²⁵. Aujourd'hui, les résistances contre les ACT n'ont pas encore été clairement démontrées, mais la probabilité de leur apparition n'est pas nulle. En effet, des échecs thérapeutiques après traitement aux ACT ont été observés en Afrique subsaharienne, dont le Gabon (Pr. M. Kombila, communication personnelle). La résistance aux dérivés de l'artémisinine, essentiellement dans le sud-est asiatique, sera présentée plus loin. Dans le même temps, des campagnes de distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides ont été menées. En conséquence, on a observé une baisse de la prévalence du paludisme chez les enfants fébriles ces dix dernières années.²⁴

Le problème de la contrefaçon des médicaments antipaludiques, important en Afrique subsaharienne,²⁶ ne semble pas majeur dans le circuit pharmaceutique gabonais.¹²

1.4. Lutte antipaludique

1.4.1. Introduction

La lutte initiée contre le paludisme au lendemain de la première guerre mondiale a donné des résultats probants. En effet, grâce à l'utilisation d'insecticides, principalement du dichlorodiphényl-trichloroéthane (DDT) dans les habitations, la morbidité liée à la pathologie avait été considérablement réduite.¹³ Ce succès a poussé l'OMS à lancer en 1955 un ambitieux programme d'éradication du paludisme, le « *Global Malaria Eradication Program* ». Avec l'apparition de résistances, tant au niveau vectoriel que parasitaire, celui-ci a été très vite abandonné. Afin de garantir une riposte mondiale rapide et coordonnée face à la menace de résistance aux insecticides, plusieurs autres programmes se sont succédés avec des résultats positifs : cela a été le cas en 1999, avec le partenariat de l'OMS avec l'UNICEF, le Programme des Nations Unies pour le développement et la Banque Mondiale (« *Roll Back Malaria* »), avec le but de diminuer de moitié la charge du paludisme à l'échéance 2010, en

²⁴ B. Nsimba, *et al.*, *Malar. J.* **2008**, 7, 31.

²⁵ R. Mbouangouere, *et al.*, *AJTCAM* **2008**, 4, 294-298.

²⁶ O. P. Noté, *et al.*, *Phytochem Lett* **2013**, 6, 505-510.

renforçant notamment les systèmes de soins de santé des pays d'endémie ainsi que le suivi et l'évaluation des patients impaludés.²⁷ Ce programme a permis d'énormes progrès dans l'accès aux moustiquaires à imprégnation durable (MID) et aux pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides (PID), conduisant à une réduction effective du paludisme. Les plus fortes baisses absolues des décès ont été observées en Afrique.²⁸ Aujourd'hui, un programme technique mondial de lutte contre le paludisme a été mis en place pour la période 2016-2030, visant à une réduction de 90 % la prévalence de la maladie, avec trois axes stratégiques principaux : la lutte antivectorielle, la chimioprévention et l'accès aux chimiothérapies curatives, déjà largement amélioré avec la poursuite de « *Roll Back Malaria* » au cours des années 2000.

1.4.2. Lutte antivectorielle

L'apparition de souches d'anophèles résistantes aux insecticides courants a entraîné la mise à l'écart de leur usage, le DDT ayant d'autre part été largement banni en raison de sa toxicité, même s'il demeure un recours potentiel. Cela a rendu indispensable le développement de nouveaux outils de lutte antivectorielle. Aujourd'hui, l'OMS recommande l'utilisation des moustiquaires à imprégnation durable (MID) employant uniquement des pyréthriinoïdes ; la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides (PID) ; la distribution des crèmes répulsives dans les zones fortement endémiques.¹⁴

Avec le développement de la biologie moléculaire, des stratégies basées sur la lutte génétique (moustiques génétiquement modifiés) ont été testés, afin de réduire les populations d'anophèles en altérant leur potentiel de reproduction via la dispersion d'anophèles mâles stériles.²⁹ L'ensemencement des eaux avec des prédateurs des anophèles ou de leurs larves (poissons, mollusques) a également été testé. Malheureusement ces mesures ne sont efficaces que dans des zones restreintes et il est très difficile de les appliquer à l'échelle d'un continent comme l'Afrique, pour des raisons de coût et d'obstacles matériels. Cependant, la lutte antivectorielle reste le moyen général le plus efficace pour prévenir la transmission³⁰.

²⁷ M. Le Bras, *et al.*, *Med. Trop.* **2004**, *64*, , 576-578.

²⁸ http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/malaria2010_summary_keypoints_fr (20/09/2017).

²⁹ C. J. Coates, *Nature* **2000**, *405*, 900-902.

³⁰ OMS, *World malaria report 2009*, **2010**

1.4.3. Chimio-prévention

Des approches thérapeutiques préventives sûres, d'un bon rapport coût/efficacité pour la femme enceinte et le jeune enfant, sont recommandées par l'OMS en Afrique subsaharienne dans des zones où il existe une transmission du paludisme modérée à élevée. Ces stratégies préventives sont notamment:

- le traitement préventif intermittent (TPI) et la chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS) ;
- la mise en place d'un premier vaccin contre le paludisme (RTS,S/AS01).

1.4.3.1 Traitement préventif intermittent et chimio-prévention du paludisme saisonnier

Le traitement préventif intermittent est réservé à la femme enceinte (TPIg) et au nourrisson (TPIIn).¹⁴ Il s'effectue avec l'association sulfadoxine-pyriméthamine et peut prévenir la mortalité dans ces populations à risque, l'anémie et les autres effets néfastes du paludisme sur la grossesse. Selon l'OMS, le pourcentage des femmes bénéficiant du TPIg dans 20 pays africains a été multiplié par cinq au cours des cinq dernières années. Toutefois, la couverture par ce traitement est restée faible, s'établissant à peine à 31 % en 2015.¹⁴

La chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS) est un cycle de traitement pour les enfants de moins de cinq ans. Cette stratégie prévoit l'administration d'un traitement par l'amodiaquine pendant un mois et de sulfadoxine-pyriméthamine en saison de forte transmission. Lorsque la CPS est mise en place, le TPIIn ne doit pas être utilisé.

1.4.3.2 Le vaccin RTS,S/AS01 (Mosquirix®)

Le RTS,S/AS01 (RTS,S), également appelé Mosquirix® est le premier vaccin actif contre le paludisme. Créé par le laboratoire pharmaceutique britannique GlaxoSmithKline (GSK) en partenariat avec l'ONG Path (initiative *Path Malaria vaccine*), il s'agit d'un vaccin injectable conférant au jeune enfant une protection partielle contre le paludisme. Il est en cours d'évaluation en Afrique subsaharienne, en tant qu'outil complémentaire de lutte susceptible d'être ajouté à (mais pas de remplacer) l'ensemble de base des mesures de prévention, de diagnostic et de traitement recommandées par l'OMS¹⁷.

En juillet 2015, l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) a donné un avis favorable pour l'évaluation clinique de ce vaccin. En avril 2017, l'OMS a annoncé que le vaccin serait

déployé dans le cadre de projets pilotes dans 3 pays d'Afrique subsaharienne (le Kenya, le Ghana et le Malawi). Le financement de la phase initiale du programme est désormais assuré et les vaccinations doivent commencer en 2018. Ces projets pilotes pourraient ouvrir la voie à un déploiement plus large du vaccin si son innocuité et son efficacité sont jugées acceptables.¹⁴

1.4.4. Médicaments employés en prophylaxie et en traitement

Les médicaments antipaludiques disponibles actuellement appartiennent à plusieurs classes chimiques, avec des mécanismes d'action variés (Figure 1). Ils sont pour la plupart inspirés de molécules naturelles : la quinine (Figure 3) et l'artémisinine (Figure 4).³¹ On peut proposer une classification des antipaludiques selon différents critères : la famille chimique, le site et le mécanisme d'action, ainsi que la forme parasitaire touchée. La Figure 1 récapitule les niveaux d'action de ces molécules. On remarquera que la majorité des molécules citées ici figurent sur la liste des médicaments essentiels de l'OMS. Les traitements sont administrés *per os* ou par voie parentérale.

– Les antipaludiques quinoléines

La quinine est le premier antipaludique naturel connu, isolé en 1820. C'est un alcaloïde extrait des écorces des quinquinas (*Cinchona* spp., Rubiaceae ; initialement de *Cinchona pubescens* Vahl. ; synonyme *C. succirubra* Pav. ex Klotzsch, le quinquina rouge),³² d'origine indolomonoterpénique, possédant un noyau quinoléique et un noyau quinuclidique. Certains de ses analogues naturels (quinidine, cinchonine, cinchonidine ; Figure 3) présentent également une activité antiplasmodiale, plus modérée. La quinine agit principalement sur le stade trophozoïte mature du parasite. Son mécanisme d'action et celui de ses dérivés correspond à l'inhibition de la détoxification de l'hème (Fe²⁺-protoporphyrine IX) en hémozoïne (Fe³⁺-protoporphyrine IX), cette dernière étant toxique pour le parasite.³³ La molécule, bien que cardiotoxique, est toujours employée, en cas d'urgence pour les formes sévères et compliquées du paludisme à *P. falciparum*, en particulier en l'absence d'artésunate par voie intraveineuse (I.V.).

Des molécules synthétiques de type amino-4-quinoléine (chloroquine, amodiaquine, méfloquine) et amino-8-quinoléine (également affiliées à la classe des aryl-amino-alcools : primaquine, tafénoquine) (Figure 3) sont inspirées de la quinine. Comparées à cette dernière, ce sont des molécules d'action rapide, d'élimination lente et de faible toxicité. Elles sont employées en chimioprophylaxie ou en traitement des crises. Elles sont efficaces contre les formes intrahépatiques de toutes les espèces de *Plasmodium*, à la différence des amino-

³¹ D. L. Klayman, *Science* **1985**, 228, 1049-1056.

³² T. N. Wells, *Malar. J.* **2011**, 10, S3.

³³ C. R. Engwerda, *et al.*, *Trends Parasitol.* **2012**, 28, 515-521.

4-quinoléines.³⁴

– **Amino-4-quinoléines.**

Cette série est schizontocide. La chloroquine (Nivaquine®) est utilisée en prophylaxie ou dans un but curatif. Bien tolérée et peu coûteuse, c'est une molécule de choix pour le traitement des accès simples dus à des souches sensibles. Cependant, l'intérêt de cette molécule diminue en raison de l'apparition de souches de *P. falciparum* chloroquinorésistantes. En 1999, cet antipaludique n'avait presque plus d'intérêt thérapeutique en Asie du Sud-Est et son emploi est de plus en plus discuté en Afrique subtropicale et dans le nord de l'Amérique du Sud. En prophylaxie, elle n'est plus utilisée seule qu'en Afrique du nord, au Moyen-Orient, en Amérique centrale et dans les Caraïbes. Ailleurs, elle est soit utilisée en association avec le proguanil, soit remplacée par un autre antipaludique.³⁵

L'amodiaquine (Flavoquine®) a une élimination plus lente que la chloroquine et est utilisée uniquement en traitement curatif. Elle est active contre certaines souches chloroquinorésistantes de *P. falciparum*, bien qu'il y ait une résistance croisée. Il est à noter un regain d'intérêt pour cette molécule en association avec les dérivés de l'artémisinine³⁵. D'autre part, la méfloquine (Lariam®) est également employée en traitement de l'accès palustre.

Enfin, la pyronaridine, employée en monothérapie ou associée à l'artésunate pour traiter la maladie, en Chine, est une amino-acridine apparentée, interférant aussi avec la vacuole digestive sur parasite³⁶

– **Amino-8-quinoléines / aryl-amino-alcools**

La primaquine et la tafénoquine appartiennent à la famille des amino-8-quinoléines.

La primaquine a une activité gamétocytocide sur *P. falciparum* et hypnozoïtocide sur *P. vivax* et *P. ovale*. Elle agit par inhibition de la dihydroorotate réductase impliquée dans la synthèse des bases pyrimidiques et donc de l'ADN plasmodial, ainsi que par interférence avec le métabolisme mitochondrial du parasite.^{12,34}

³⁴ P. Minodier, et al., *Arch. Ped.* **2005**, *12*, 53-58.

³⁵ M. DA, *Méd. Trop.* **2003**, *63*, 267-270.

³⁶ J. C. Assob, et al., *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, 70.

La tafénoquine a également une action hépatique, sur les sporozoïtes. Il s'agit d'une prodrogue qui, métabolisée en quinone active au niveau hépatique, a une action s'exerçant probablement sur la ferredoxine-NADP⁺ réductase et la diflavine réductase. Elle inhibe également l'hème polymérase aux stades sanguins du parasite. La molécule est encore en phase d'investigation clinique (voir partie 1.4.5) mais a reçu une approbation de la *Food and Drug Administration* américaine (FDA).¹²

La luméfántrine ne possède pas de squelette quinoléique mais appartient à la classe des aryl-amino-alcools. Elle inhibe la polymérisation de l'hème. Elle est employée comme traitement curatif en association avec l'artéméther (Riamet®).¹²

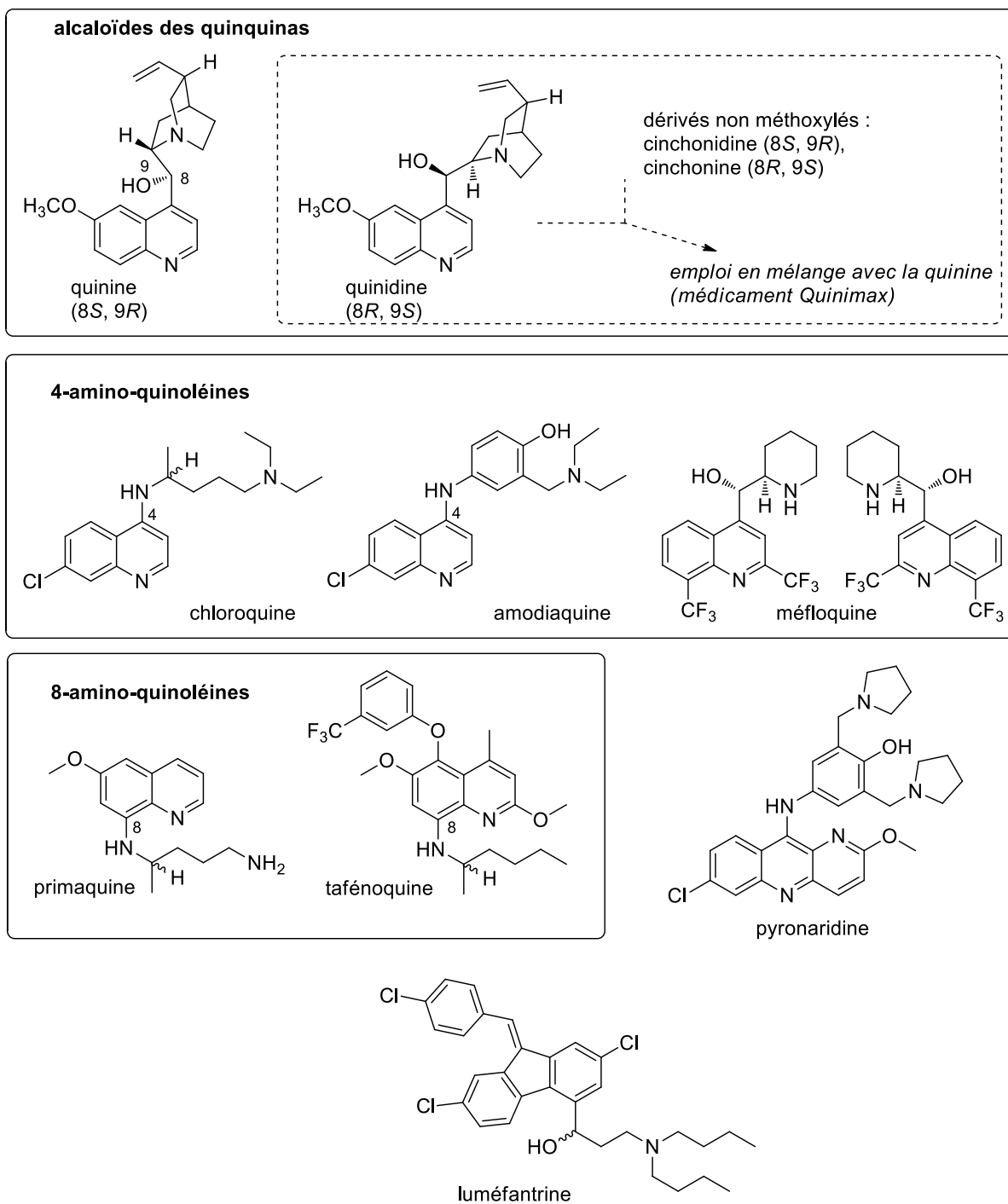


Figure 3. Antipaludiques employés en clinique, en séries quinoléiques et aryl-amino-alcool

– **Les antipaludiques de type sesquiterpénique**

La classe la plus récente d'antipaludiques mise sur le marché correspond à des sesquiterpènes ayant pour chef de file l'artémisinine, molécule découverte en 1972 par des scientifiques chinois³¹ et ayant valu le prix Nobel de médecine en 2015 à son découvreur,

Youyou Tu. Ce composé a été isolé des feuilles de l'armoise annuelle (*Artemisia annua* L., Asteraceae) et possède un groupement endoperoxyde essentiel à son activité biologique. L'artémisinine s'accumulerait dans la vacuole digestive du parasite où sa fonction peroxyde hautement réactive interférerait avec la polymérisation de l'hème et participerait à l'inactivation de protéines de la vacuole digestive. La molécule n'est que peu employée. Ses dérivés hémisynthétiques (artéméther, arteéther et artésunate, mais aussi dihydroartémisinine) constituent des médicaments importants, dont l'OMS préconise l'emploi en association (voir plus loin). Ils agissent après métabolisation en dihydroartémisinine (Figure 4). Ces dernières années, en raison, notamment, de messages, une résistance aux dérivés de l'artémisinine est apparue dans 5 pays du Bassin du Mékong.¹⁰ Comme cela a été évoqué précédemment, des phénomènes de résistance sont également soupçonnés en Afrique subsaharienne, dont le Gabon.

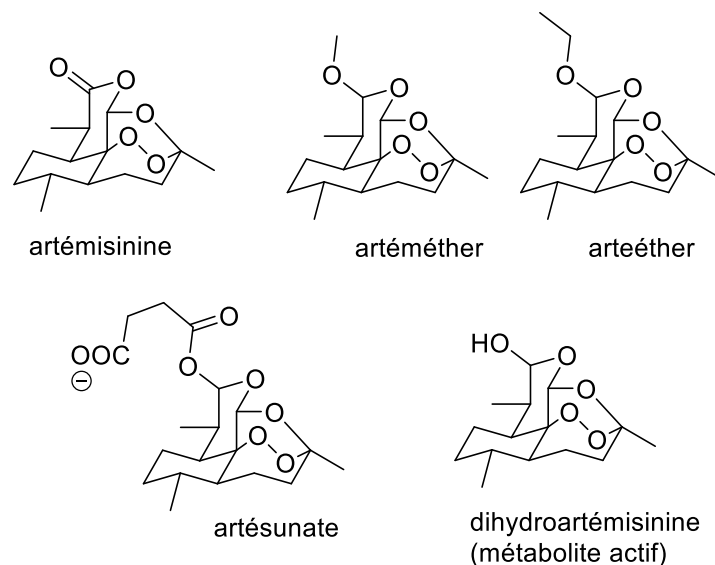


Figure 4. Artémisinine et analogues

– **Les ACT : « Artemisinin-based Combination Therapy »**

Depuis les années 90, des médicaments combinant des dérivés de l'artémisinine avec d'autres antipaludiques, tels que l'amodiaquine (association à l'artésunate ; Coarsucam®), la luméfantrine (association à l'artéméther ; Coartem®, Riamet®...), la pipéraquine (en association avec la dihydroartémisinine ; Eurartesim®), la méfloquine (avec l'artésunate ; ASMQ®, MefliamPlus®, Artequin®) sont utilisés, en particulier dans les zones de

multirésistances. Ces combinaisons thérapeutiques, appelées couramment ACT (CTA) pour « *Artemisinin-based Combination Therapy* », sont préconisées par l’OMS. Le principal frein à l’utilisation à grande échelle des ACT est le coût du traitement, dix fois plus élevé que celui à la chloroquine.³⁷ Malgré cela, plus de 50 pays où le paludisme est endémique ont placé les ACT comme traitement de première ligne, et de nombreux programmes d’aide internationale sont mobilisés pour en réduire le coût.³⁸

– Antifolates

Actuellement deux familles de composés dits « antifolates » sont employées comme antipaludiques : il s’agit de molécules antifoliques ou antifoliniques, qui inhibent la métabolisation de l’acide folique chez le parasite, nécessaire à la formation des bases puriques et pyrimidiques et donc de l’ADN.³⁹

Le seul antifolique employé dans le traitement du paludisme est la sulfadoxine (Figure 5). Elle s’emploie en association avec la pyriméthamine (Fansidar®) dans le traitement des accès palustres non compliqués à *P. falciparum* en cas de résistance aux amino-4-quinoléines ou de contre-indication des autres antipaludiques. C’est un schizontocide, inhibiteur de déhydrofolate réductase.⁴⁰

Les antifoliniques sont la pyriméthamine (utilisée uniquement en association avec la sulfadoxine) et le proguanil (Figure 5). Elles inhibent la dihydrofolate réductase, empêchant ainsi la réduction de l’acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique.

Le proguanil (Paludrine®...) est une prodrogue dont le métabolite actif (cycloguanil) est un schizontocide d’action lente sur les formes érythrocytaires du parasite, présentant également une activité schizontocide hépatique. Son analogue, le chlorproguanil, n’est pas sur le marché en France.

Ces molécules sont uniquement utilisées en association pour le traitement de la crise, afin de potentialiser leur effet curatif et de diminuer leur toxicité.⁴⁰

³⁷ P. Millet, *Rev. Prat* **2005**, 55, 875-879.

³⁸ OMS, *The world health report 2006: working together for health*, **2006**

³⁹ A. Nzila, *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, 57, 1043-1054.

⁴⁰ O. Ekanem, *et al.*, *Bull. World Health Organ.* **1990**, 68, 45-52.

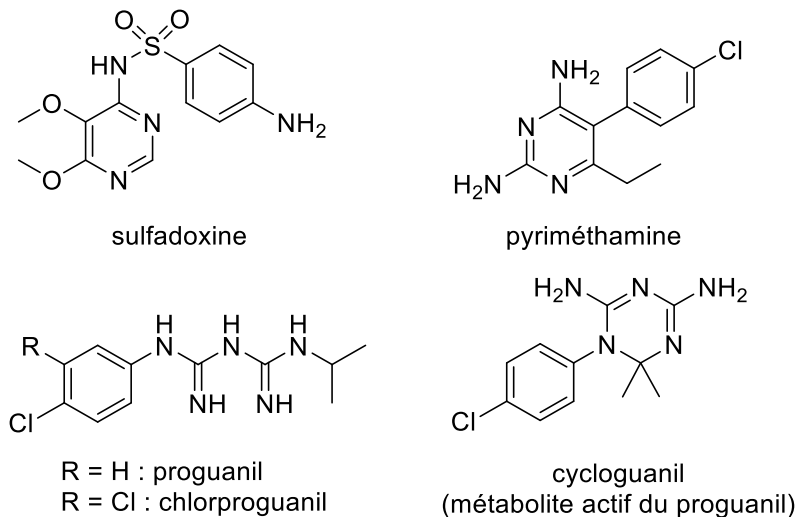


Figure 5. Molécules antipaludiques interagissant avec le métabolisme de l'acide folique

– **Les antibiotiques utilisés comme antipaludiques**

Certains antibiotiques comme la doxycycline (une tétracycline) ou la clindamycine (un lincosamide) peuvent inhiber la synthèse protéique de l'apicoplaste du *Plasmodium*.^{41,42}

La doxycycline (Figure 6) est employée en monothérapie pour la chimioprophylaxie, ainsi qu'en traitement curatif en association à la quinine.

La clindamycine (Figure 6) est employée hors AMM, par voie parentérale en association à la quinine, en traitement curatif.

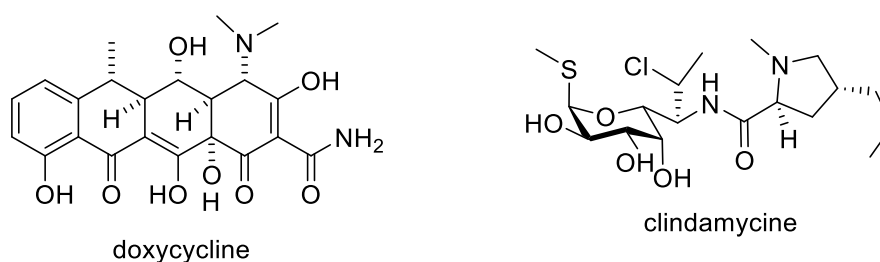


Figure 6. Antibiotiques utilisés comme antipaludiques

⁴¹ P. Ambroise-Thomas, *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **2004**, 97, 155-160.

⁴² T. Gaillard, thèse de doctorat, **2015**.

– Inhibiteurs mitochondriaux

L'atovaquone (Figure 7) est un inhibiteur du complexe III mitochondrial de certains protistes. Elle a peu d'impact thérapeutique lorsqu'elle est utilisée seule. En combinaison avec un antimétabolite (proguanil ; Malarone® et génériques), on observe une intéressante synergie, avec une action sur les stades hépatocytaires de *P. falciparum*.⁴³

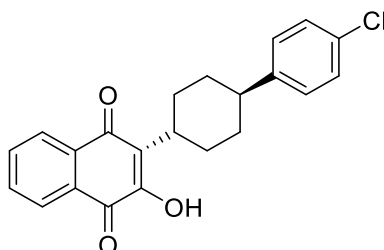


Figure 7 Structure de l'atovaquone

Les molécules antipaludiques sont souvent utilisées en association car l'action synergique permet d'augmenter l'efficacité des médicaments et d'obtenir une protection mutuelle des produits contre l'acquisition de résistance du parasite (cas des ACT). En effet, la sélection des parasites mutants est le plus souvent favorisée par certaines caractéristiques des molécules actives, comme une mauvaise biodisponibilité ou un index thérapeutique faible ne permettant pas une escalade de doses pour contrer la résistance.³⁷ Certaines associations sont anciennes et les nouvelles sont toutes au moins en bithérapie, soit en associations commerciales fixes, soit en associations libres (2 sortes de comprimés).⁴³ Enfin, l'état des résistances aux antipaludiques ne sera pas développé plus avant dans ce manuscrit. Une excellente revue a été récemment publiée dans *Nature Medicine*.¹²

1.4.5. Médicaments antipaludiques en développement

La dernière décennie a vu la mise au point d'une douzaine de nouvelles entités chimiques entrées en développement clinique (Figure 9).⁴⁴ Plus de la moitié des projets de découverte de nouveaux antipaludiques ont pour cible la phase érythrocytaire du cycle du parasite et des cibles identiques à celles des antipaludiques actuels. La Figure 8 montre la progression

⁴³ F. Marra, et al., *Ann. Pharmacother.* **2003**, 37, 1266-1275.

⁴⁴ T. N. Wells, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14, 424-442.

du développement clinique des molécules antipaludiques de 2010 à 2015.⁴⁴

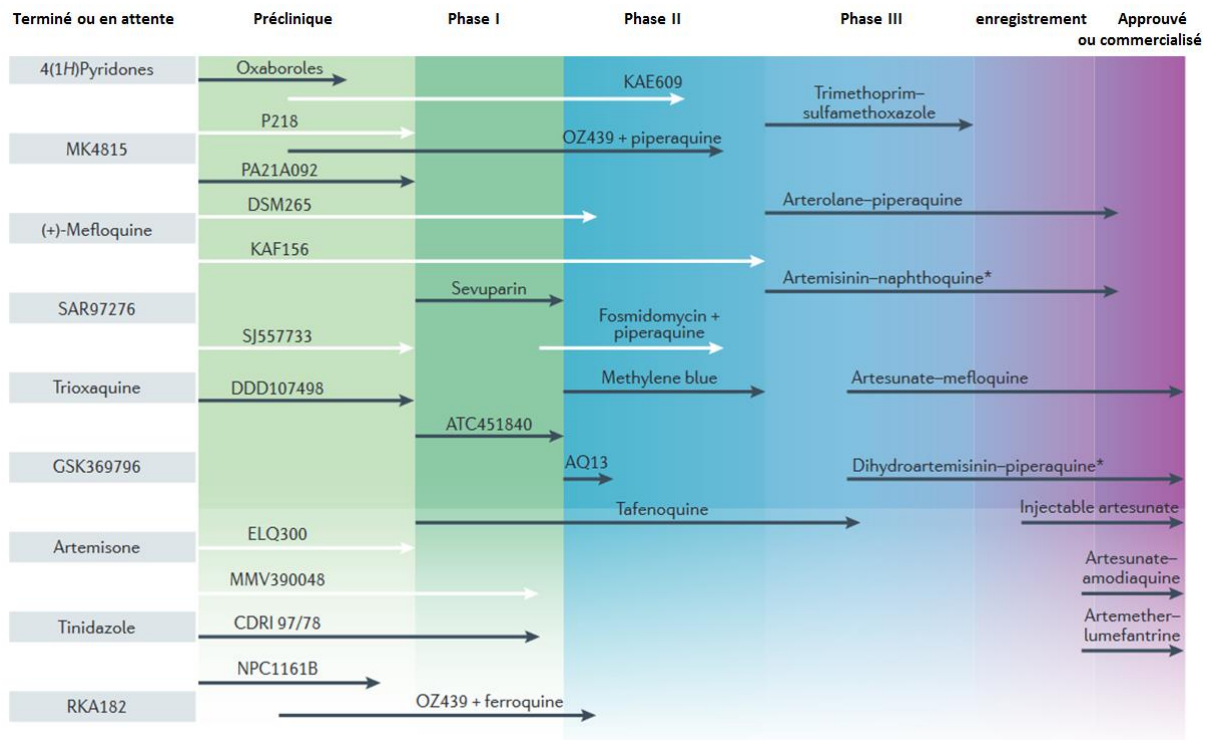
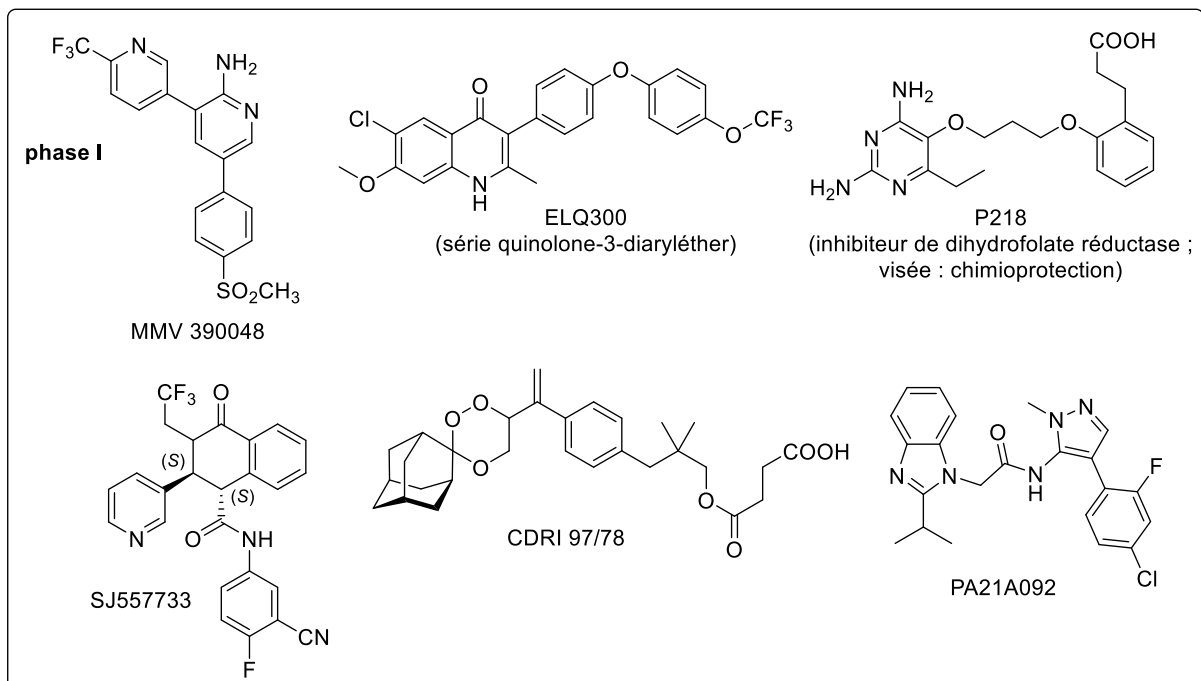


Figure 8. Progression du développement clinique de nouveaux candidats antipaludiques au cours des 5 dernières années. (Source : Wells et al. 2015)⁴⁴



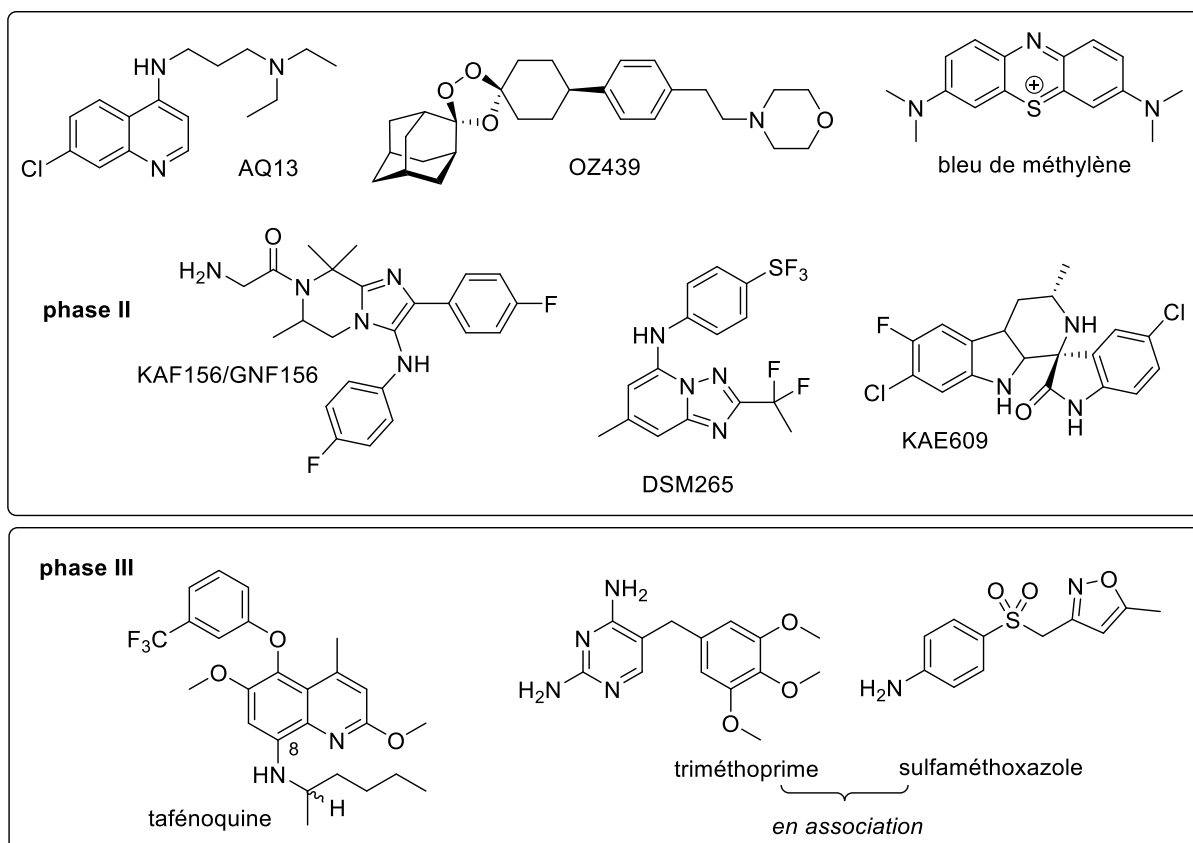


Figure 9. Structures de molécules antipaludiques en phase d'expérimentation clinique en 2015

Les molécules antiplasmodiales présentées ici (Figure 9) étaient donc en essais cliniques de phase I à III en 2015, Certains de ces composés agissent comme des schizontocides⁴⁴ C'est le cas des trioxolanes synthétiques, le CDRI97/78 et l'OZ439 (artefenomel), qui contiennent le groupe actif endoperoxide que l'on trouve dans l'artémisinine et ses dérivés, mais qui sont par ailleurs structurellement différents.

D'autres sont des antimétabolites et agissent sur des nouvelles cibles du parasite. C'est cas des composés comme NITD609 (KAE609), SJ557733 et PA21A092, inhibiteurs de la Na⁺ATPase⁴. Dans ce portefeuille figurent aussi le MMV390048, un inhibiteur de la phosphatidylinositol 4-kinase ; le P218, inhibiteur sélectif de la dihydrofolate réductase plasmodiale ; le DSM265, inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase (curatif : phase II ; testé en prophylaxie en phase I)⁴⁵; le KAF156, au mécanisme d'action inconnu⁴⁴.

⁴⁵ M. Sulyok, *et al.*, *Lancet Infect Dis* **2017**, *17*, 636-644.

1.4.6. Prise en charge du paludisme par la médecine traditionnelle

La médecine traditionnelle revêt une importance fondamentale pour la santé mondiale, comme le souligne l'OMS. D'après cette agence, environ 80 % de la population africaine n'a accès qu'à la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de santé.^{20,46,47} L'OMS souligne les besoins en termes d'encadrement réglementaire et d'évaluation (rapport bénéfique / risque ; efficacité clinique, potentiellement *via* d'autres modèles que celui de l'étude randomisée en double aveugle contre placebo ou médicament de référence, pour des raisons infrastructurelles et financières). Dans le monde entier, plus de 1100 espèces végétales seraient utilisées pour le traitement du paludisme⁴⁸ et de la fièvre, et on estime que 80 % des patients atteints du paludisme en Afrique sont traités dans la communauté et ne vont jamais dans un établissement de santé formel.⁴⁹

– Plantes employées au Gabon

La flore du Gabon, pays à la couverture forestière importante (> 85 %, forêts primaires ou secondaires) compte plus de 7000 espèces, dont 11 % sont endémiques ou quasi-endémiques.⁵⁰ Une étude quantitative des plantes commercialisées sur les principaux marchés aux plantes médicinales du pays, réalisée en 2012, relève la commercialisation de 217 espèces, avec un volume annuel estimé à 27 tonnes et un chiffre d'affaire annuel de l'ordre de 1,5 millions de \$, pour une population de 1,6 million d'habitants. Parmi les espèces inventoriées, 4 % sont proposées pour le traitement des fièvres ou du paludisme, *Annickia affinis* (Exell) Versteegh & Sosef (Annonaceae) en tête.⁵¹

L'ouvrage « *Plantes utiles du Gabon* » de A. Raponda-Walker et R. Sillans (1961) désigne 33 plantes réputées fébrifuges, dont une Apocynaceae (*Picralima nitida* (Stapf) T.Durand & H.Durand) et trois Rubiaceae (*Pseudocinchona mayumbensis* (R.D.Good) Raym.-Hamet [accepté : *Corynanthe mayumbensis* (R.D.Good) N.Hallé.] ; *Sarcocephalus esculentus* Afzel.

⁴⁶ Z. Qi, *et al.*, *Science* **2014**, 346, S5-S6.

⁴⁷ OMS, *WHO traditional medicine strategy 2002-2005*, World Health Organization, **2002**

⁴⁸ J. G. Breman, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, 64, 1-11.

⁴⁹ M. Willcox, *et al.*, *Traditional medicinal plants and malaria*, **2004**

⁵⁰ <http://herbarium.naturalis.nl/gabon/> (03/11/2017).

⁵¹ A. M. Towns, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2014**, 155, 1184-1193.

[accepté : *S. latifolius* (Sm.) E.A.Bruce ; *S. pobeguinii* Hua ex Pobég.).⁵²

La « Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques du Gabon » de E. J. Adjanohoun *et al.* (1984) n'a pas pu être consultée.⁵³

Des enquêtes ethnobotaniques postérieures ont relevé l'utilisation de plusieurs dizaines espèces dans ces indications.^{54,55,56,57,58} Des convergences d'usage sont notables, par exemple pour des Apocynaceae d'usage répandu en Afrique tropicale et équatoriale : *Picralima nitida*⁵⁹; *Alstonia boonei* De Wild., chez les Fang⁵⁷ les Kota, les Kwélé, les pygmées Baka⁶⁰; *Alstonia congensis* Engl. dans les régions de l'Estuaire (Libreville), du Moyen Ogooué (Lambaréné) et de l'Ogooué Ivindo (Makokou)⁶¹ (Figure 10). Ces deux dernières espèces sont souvent confondues ou employées indifféremment.⁶²

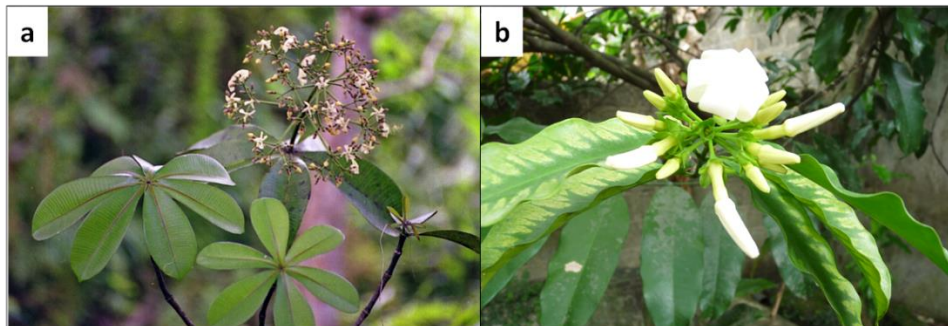


Figure 10. *Alstonia congensis* (a), *Picralima nitida* (b)

(sources : a. Scamperdale, Useful tropical plants, Creative Commons ; b. Tela-botanica)

– Médicaments traditionnels améliorés antipaludiques en Afrique

Dans plusieurs pays d'Afrique sub-saharienne, des médicaments traditionnels améliorés (MTA ; définis par l'OMS) constitués de poudres ou éventuellement d'extraits végétaux, standardisés sans que leur teneur en molécules actives soient forcément connue (ou sans que ces dernières soient formellement identifiées), sont enregistrés dans un cadre réglementaire variable, et portent pour indication le traitement des crises de paludisme non

⁵² A. Raponda-Walker, *et al.*, *Les plantes utiles du Gabon*, 1961

⁵³ E. J. Adjanohoun, *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Gabon.*, 1984

⁵⁴ J. B. Lekana-Douki, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 133, 1103-1108.

⁵⁵ D. Olivier, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2015**, 176, 438-462.

⁵⁶ B. Akendengué, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **1994**, 41, 193-200.

⁵⁷ B. Akendengué, *J. Ethnopharmacol.* **1992**, 37, 165-173.

⁵⁸ <http://imsear.hellis.org/handle/123456789/164014> (18/10/2017).

⁵⁹ O. Erharuyi, *et al.*, *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, 7, 1-8.

⁶⁰ J. L. Betti, *et al.*, *J. Med. Plant. Res.* **2013**, 7, 2300-2318.

⁶¹ M. Lamidi, *et al.*, *Actes du 4^e Congrès Européen d'Ethnopharmacologie 2002*: IRD Ed,

⁶² J. B. Lekana-Douki, *et al.*, *Pharm. Méd. Trad. Afr.* **2016**, 17, 19-22.

compliquées. L'activité antiplasmodiale des plantes entrant dans la composition de ces produits, sur la base d'usages traditionnels importants et convergents, a généralement fait l'objet d'évaluations *in vitro*, voire *in vivo*, mais les données précliniques relatives à leur sécurité et les données cliniques sont généralement parcellaires ou manquantes.⁶³ M. Willcox, un auteur actif dans le domaine, relève la commercialisation, en Afrique, de MTA pour lesquels quelques données cliniques encourageantes existent.⁶⁴ Ces produits sont constitués :

- de poudre de parties aériennes d'*Artemisia annua* L. (Asteraceae)⁶⁵ ;
- d'extrait d'écorce de *Cinchona calisaya* Wedd. (synonyme *Cinchona ledgeriana* (Howard) Bern. Moens ex Trimen, Rubiaceae) ;
- de poudre de parties aériennes de *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr. (Apocynaceae) pour infusion ;
- de racines de *Cochlospermum planchonii* Hook. F. ex Planch. (Bixaceae) pour décoction⁶⁶ ;
- d'un mélange pour décoction de *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae), de *Lippia chevalieri* Mold. (Verbenaceae) et d'*Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (synonyme : *Spilanthes oleracea* L., Asteraceae) (parties aériennes).
- *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) fait également l'objet d'une commercialisation sous forme standardisée, en Afrique de l'Ouest (Figure 11; Figure 12).

Des MTA sont commercialisés au Gabon, par exemple à l'Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle (IPHAMETRA).⁶⁷ Le développement et l'évaluation de tels produits représentent des enjeux importants en termes de santé publique.⁶⁸ La production de ces produits soulève des questions en termes écologiques, une majeure partie des plantes employées en médecine traditionnelle et valorisées économiquement, à plus ou moins grande échelle, étant issue de gîtes sauvages, notamment en Afrique.^{69,70}

⁶³ M. Willcox, *et al.*, *Malar. J.* **2011**, *10*, S7.

⁶⁴ M. Willcox, *Planta Med* **2011**, *77*, 662-671.

⁶⁵ M. L. Willcox, *et al.*, *Malar. J.* **2011**, *10*, 84.

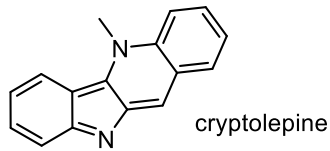
⁶⁶ A. Lamien-Meda, *et al.*, *Phytochemistry* **2015**, *119*, 51-61.

⁶⁷ B. B. Henri, *Pharm. Méd. Trad. Afr.* **2004**, *13*, 35-48.

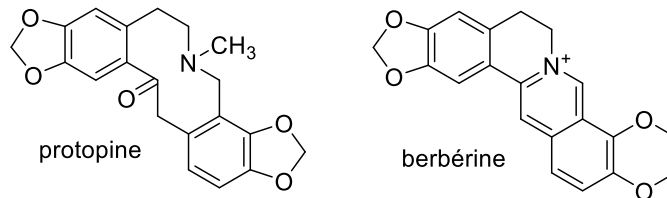
⁶⁸ D. Shaw, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *140*, 513-518.

⁶⁹ A. Booker, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *140*, 624-633.

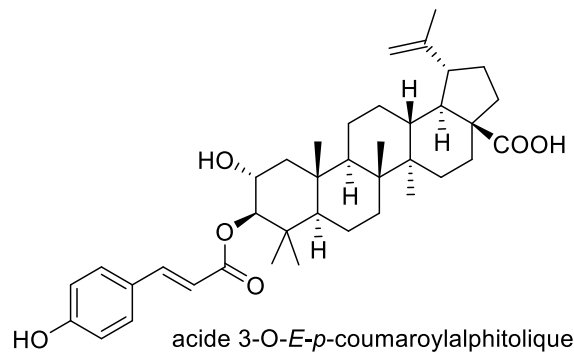
⁷⁰ B.-E. Van Wyk, *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *176*, 118-134.



Cryptolepis sanguinolenta – Apocynaceae



Argemone mexicana – Papaveraceae



Cochlospermum planchonii – Bixaceae

Figure 11. Principes actifs présumés de MTA antipaludiques africains



Figure 12. Plantes employées dans des MTA antipaludiques africains : *Cryptolepis sanguinolenta* (a), *Argemone mexicana* (b), *Cochlospermum planchonii* (c)

(Sources photographiques : Wikipedia / Wikimedia commons)

Dans le cadre de ce travail, certaines espèces investiguées ont été choisies en fonction de leur clade et de leur potentiel pour la découverte de structures originales, sans se fonder sur un emploi traditionnel notable comme antipaludique. Cependant, outre les quinquinas, certaines plantes à alcaloïdes indolomonoterpéniques ont été sélectionnées dans la tradition pour la prise en charge du paludisme,⁷¹ et leurs métabolites peuvent présenter des activités antiplasmodiales notables *in vitro*.^{72,73}

⁷¹ G. Komlaga, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *172*, 333-346.

⁷² P. A. Onguéné, *et al.*, *Malar. J.* **2013**, *12*, 449.

⁷³ I. Hedberg, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **1983**, *9*, 105-127.

2. Alcaloïdes indolomonoterpéniques : généralités

2.1. Alcaloïdes indolomonoterpéniques : présentation, distribution, biosynthèse

Les alcaloïdes indolomonoterpéniques constituent le groupe le plus vaste des alcaloïdes dérivés du tryptophane et des alcaloïdes en général. Cette classe de métabolites secondaires a une distribution restreinte à des espèces végétales provenant de 4 des 5 familles constituant l'ordre des Gentianales (Lamiids) :

- Loganiaceae ;
- Gelsemiaceae (anciennement Loganiaceae, jusqu'en 1995 ; dont l'ancienne famille des Pteleocarpaceae) ;
- Rubiaceae ;
- Apocynaceae.

Les Gentianaceae en sont ainsi exemptes.

D'autre part, on rencontre exceptionnellement ces molécules chez des Asterids basales :

- Icacinaceae⁷⁴ (ordre des Icacinales, encore reconnues par l'APG IV)⁷⁵ ;
- Nyssaceae (avec le genre *Camptotheca* ; ordre des Cornales) ;
- Cornaceae (incluant les Alangiaceae⁷⁶ depuis l'APG II⁷⁷ ; ordre des Cornales).

A ce jour, plus de 3 000 alcaloïdes indolomonoterpéniques différents ont été isolés. Ils se caractérisent par leur origine biosynthétique commune : ils proviennent tous d'un même précurseur, la strictosidine, issue de la condensation d'une molécule de tryptamine et d'une unité monoterpénique de type sécoiridoïde, hétérosidique, le sécologanoside^{78,79} (Figure 13). Certains alcaloïdes indolomonoterpéniques ne possèdent pas de noyau indolique, oxindolique ou dihydroindolique mais un noyau quinoléique (quinine et analogues, camptothécine et analogues), les stades précoces de leur biogenèse les rattachant cependant à cette classe d'alcaloïdes.⁸⁰

⁷⁴ B. Ramesha, et al., *Phytomedicine* **2013**, *20*, 521-527.

⁷⁵ M. Chase, et al., *Bot. J. Linnean Soc.* **2016**, *181*, 1-20.

⁷⁶ A. Itoh, et al., *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 723-725.

⁷⁷ *Bot. J. Linnean Soc.* **2003**, *141*, 399-436.

⁷⁸ S. E. O'Connor, et al., *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 532-547.

⁷⁹ V. De Luca, et al., *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2014**, *19*, 35-42.

⁸⁰ J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (5^e Ed.)*, **2016**

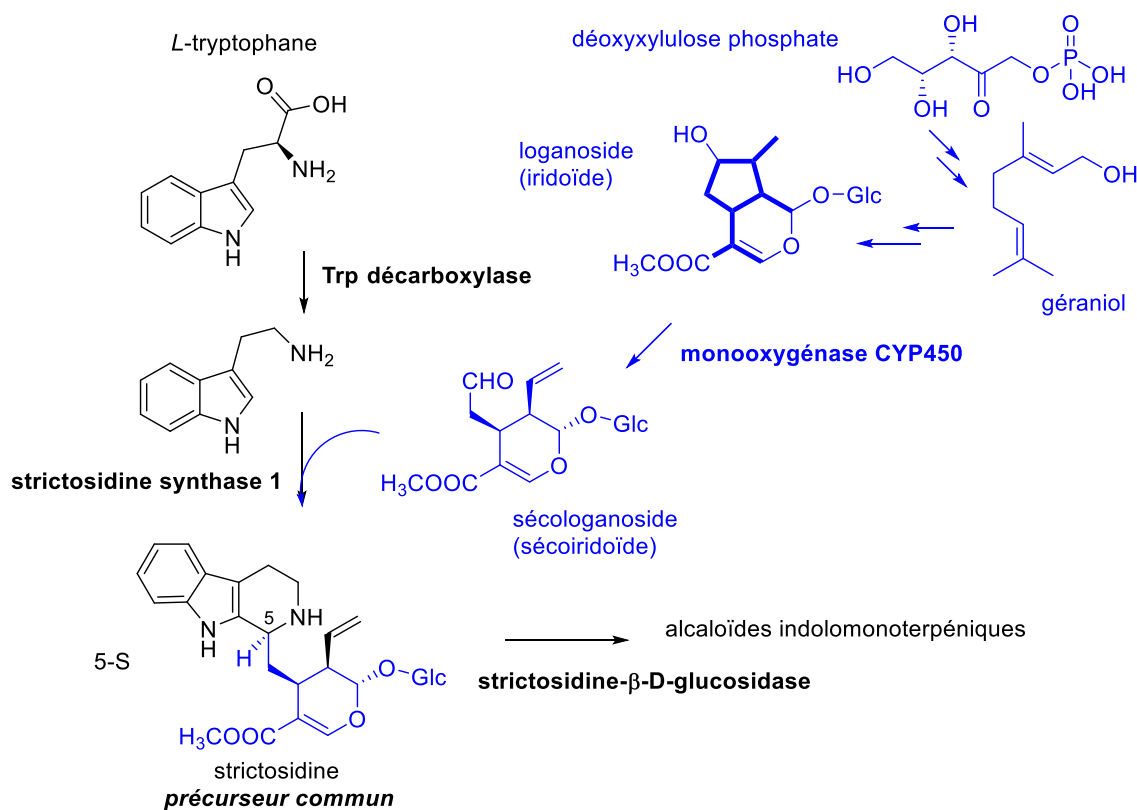


Figure 13. Origine de la strictosidine (parties tryptaminique en noir et monoterpénique en bleu)

Les alcaloïdes indolomonoterpéniques présentent une très forte diversité structurale : 45 squelettes étaient décrits en 2017 (42 au commencement de ce travail). On répartit traditionnellement ces squelettes en 3 types structuraux, en fonction de l'absence de réarrangement de la partie d'origine monoterpénique (type I : sans clivage de la liaison C-2/C-3 – type Ia, ou avec clivage de celle-ci – type Ib), ou d'une rupture de la liaison C-15/C-16 de cette entité, avec attaque du carbone C-17 sur le C-14 (type II) ou sur le C-20 (type III) (Figure 14).⁸¹

⁸¹ P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Ed., 2009

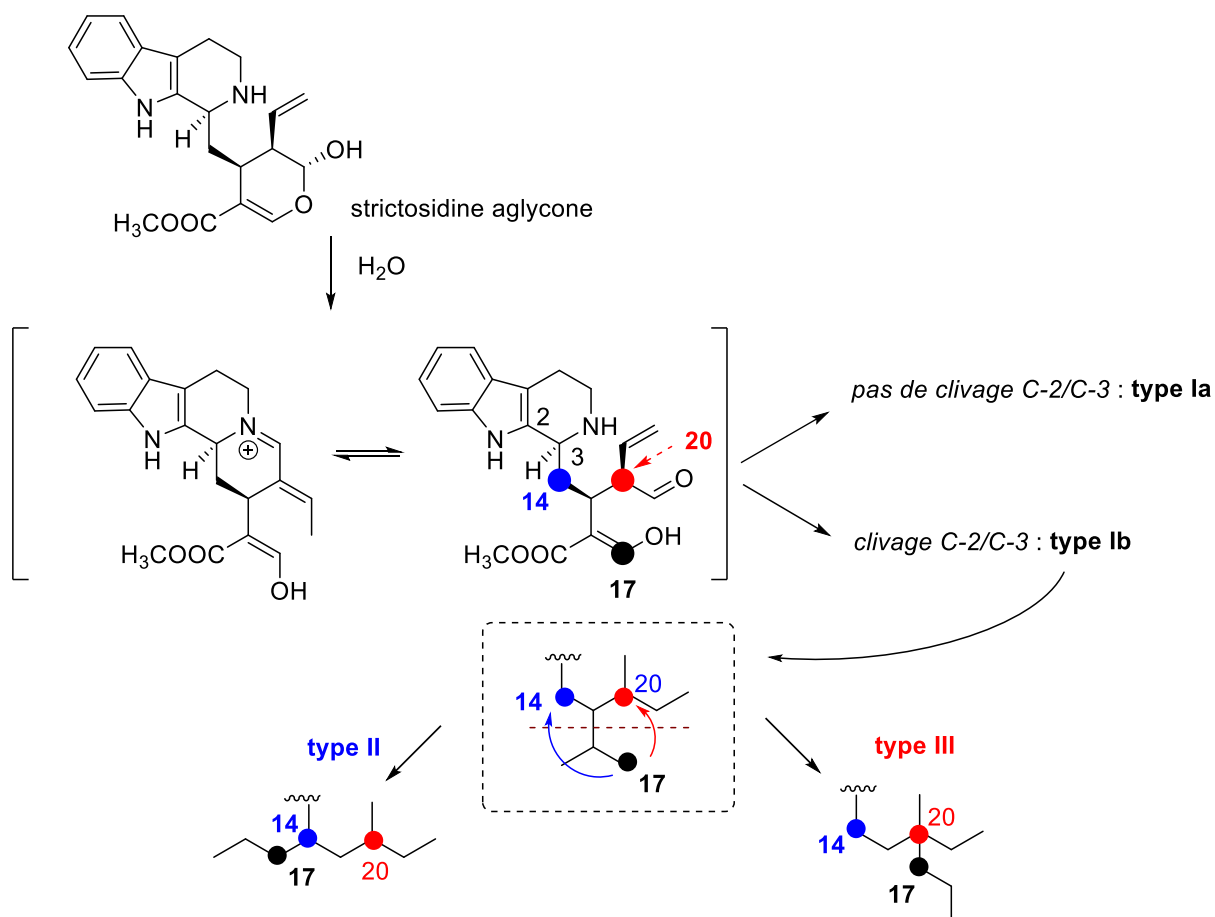


Figure 14. Alcaloïdes indolomonoterpéniques de types I, II, III : principe de la biosynthèse⁸²

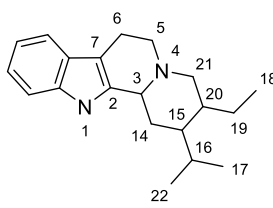
La dimérisation (en séries homo ou hétérodimériques), voire la trimérisation, peuvent être observées dans les différentes familles de Gentianales productrices. Les modes de couplage sont variés et ne feront pas l'objet d'une présentation ici. Des exemples sont présentés plus loin, et des dimères originaux ont été isolés au cours de ce travail, amenant à une discussion sur la diversité au sein de ce large groupe.

Globalement, les voies de biosynthèse dans cette vaste série sont mal connues, à l'exception de celles des « vinca-alcaloïdes » (alcaloïdes « binaires » de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don, Apocynaceae ; employés en thérapeutiques ; voir plus loin) et de celles de leurs précurseurs.⁸³

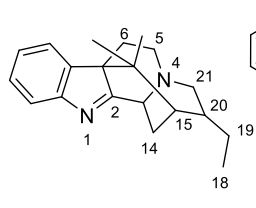
⁸² Rq : la numérotation retenue ici est celle de la strictosidine.

⁸³ E. C. Tatsis, *et al.*, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 316.

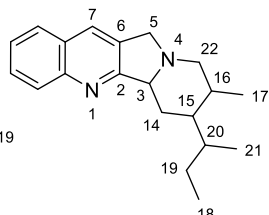
Alcaloïdes indolomonoterpéniques de type I Corynantheane Strychnane



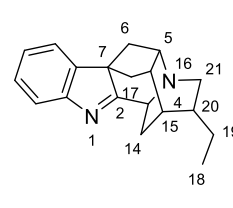
Ajmalicine



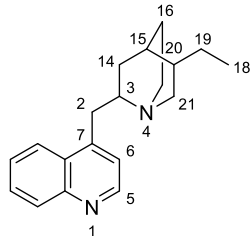
Akuammiline



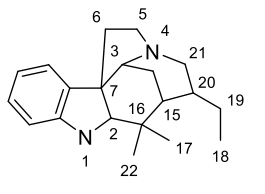
Camptothecin



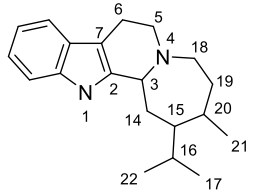
Ajmaline



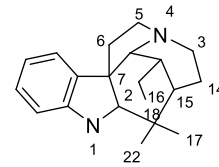
Cinchona



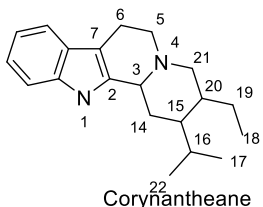
Akuammicine



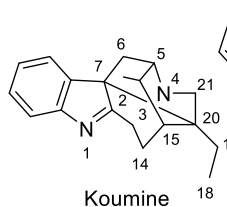
Cadambane



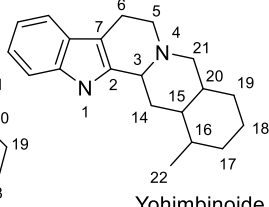
Condylocarpane



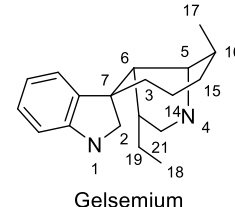
Corynantheane



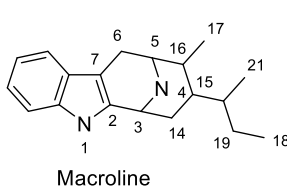
Koumine



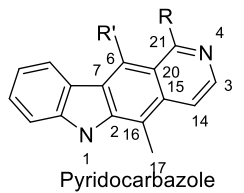
Yohimbinoïde



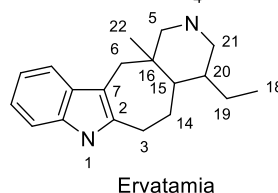
Gelsemium



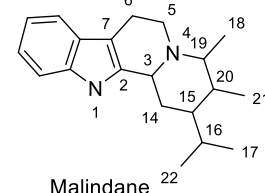
Macroline



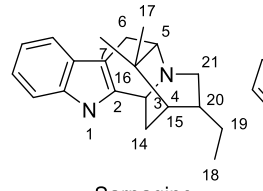
Pyridocarbazole



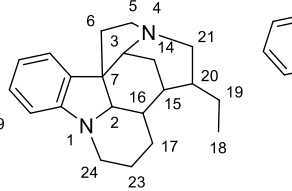
Ervatamia



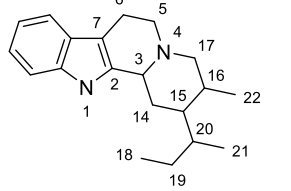
Malindane



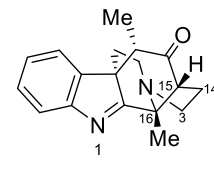
Sarpagine



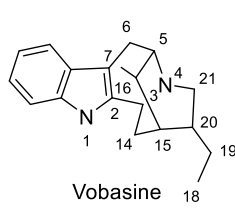
Strychnidine



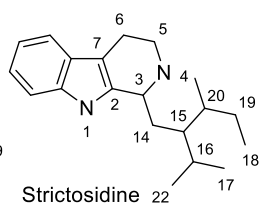
Vallesiachotamane



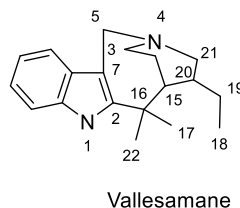
Arborisidine



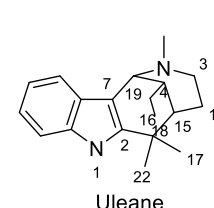
Vobasine



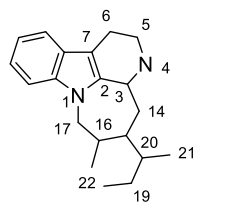
Strictosidine



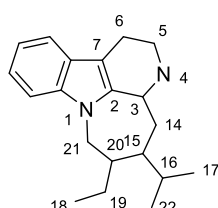
Vallesamane



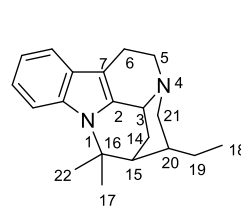
Uleane



Akageran

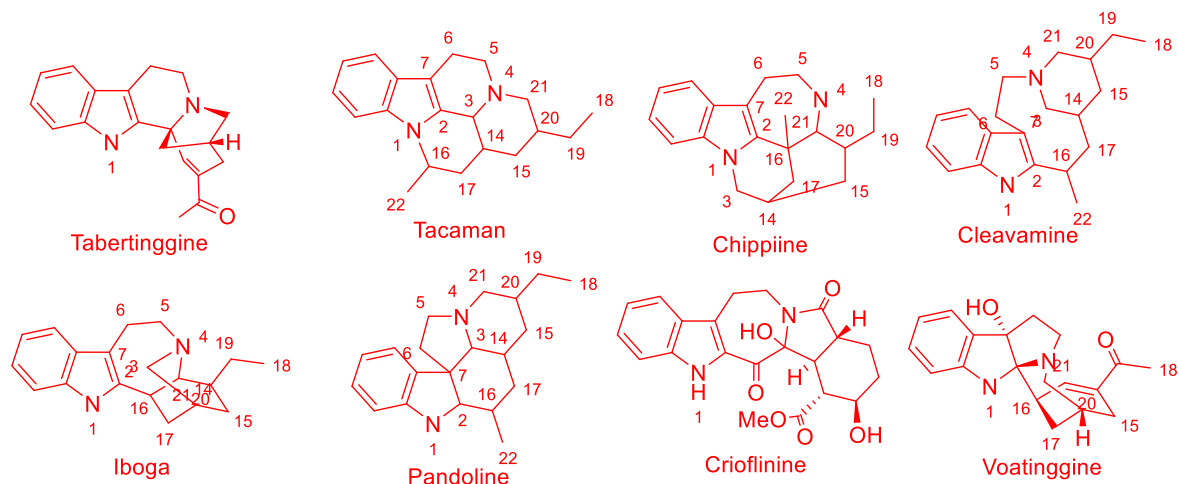


Correantane

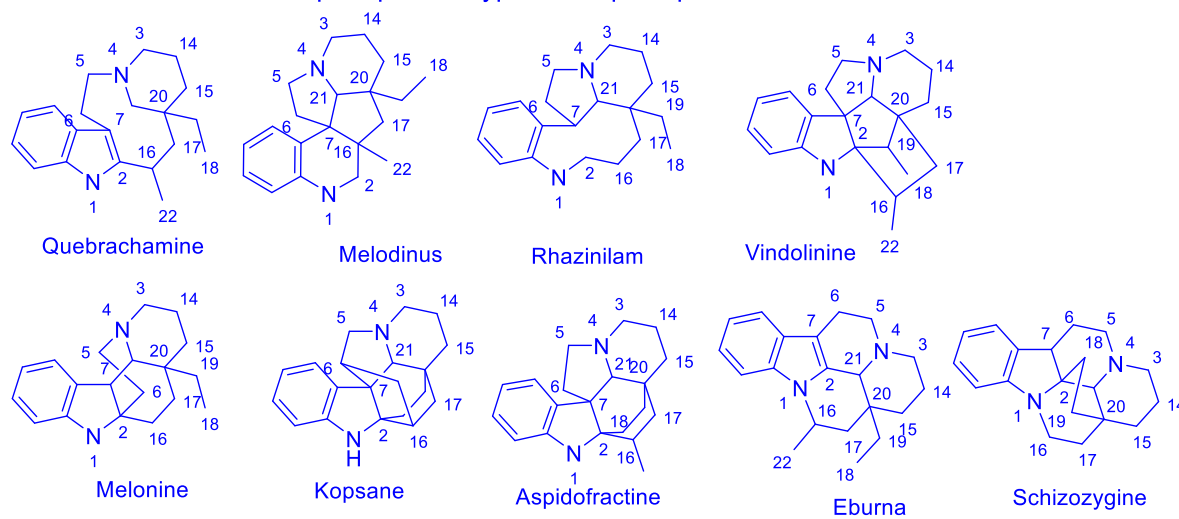


Pleiocarpamane

Alcaloïdes indolomonoterpéniques de types II IBOGANE



Alcaloïdes indolomonoterpéniques de types III Aspidospermane



Alcaloïdes indolomonoterpéniques non classés

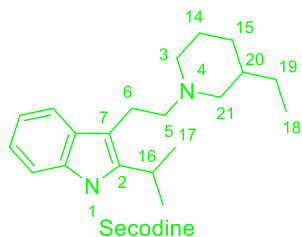


Figure 15 Les 45 squelettes des alcaloïdes indolomonoterpéniques monomériques

2.2. Activités pharmacologiques et intérêt biologique des alcaloïdes indolomonoterpéniques

Les plantes à alcaloïdes indolomonoterpéniques sont fréquemment employées par l'Homme comme plantes-poisons (poisons de flèche, poisons ordaliques, psychotropes ...) et / ou comme plantes médicinales, avec de forts phénomènes de convergence.^{84,85,86} En effet, ces alcaloïdes possèdent des activités pharmacologiques très marquées, notamment sur la sphère cardiovasculaire et les systèmes nerveux périphérique et central.⁵ Les alcaloïdes de cette classe mis sur le marché des médicaments tendent à être abandonnés au profit de principes actifs au rapport bénéfice/risque plus favorable et à la marge thérapeutique moins étroite (c'est le cas, par exemple, pour la strychnine, l'ajmalicine (raubasine), la réserpine, la yohimbine...)⁸⁰. De même, les plantes contenant ces alcaloïdes employées en phytothérapie occidentale sont globalement abandonnées car trop toxiques et n'ont guère plus que des emplois en homéopathie. Cependant, certains représentants suscitent actuellement des efforts de recherche préclinique et clinique, dans l'optique d'un emploi thérapeutique (ibogaïne et noribogaïne de *Tabernanthe iboga* Baill., Apocynaceae, comme anti-addictifs^{87,88}; mitragynine de *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil., Rubiaceae, comme antalgique⁸⁹) (Figure 16).

Certains indolomonoterpènes exercent une activité antimalarique (la quinine extraite des *Cinchona* en particulier).⁵ Ce potentiel antiplasmodial, retrouvé pour des représentants de types et de squelettes variés⁹⁰, justifie probablement l'utilisation de nombreuses espèces végétales en médecine traditionnelle (voir partie 1.4.6, réf. cit.).

D'autres sont cytotoxiques et présentent un potentiel antitumoral. Ainsi, cette classe de molécules a un intérêt fondamental en thérapeutique anticancéreuse avec la vinblastine et la vincristine, deux alcaloïdes « binaires » de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) (Figure 16) et leurs analogues hémisynthétiques, à activité anti-tubuline^{6,7}. La camptothécine (*Camptotheca acuminata* Decne., Cornaceae) constitue un chef-de-file dont

⁸⁴ C. H. Saslis-Lagoudakis, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. PNAS* **2012**, *109*, 15835-15840.

⁸⁵ P. Delaveau, *Plantes agressives et poisons végétaux*, **1974**

⁸⁶ G. T. Prance, *Econ. Bot.* **2001**, *55*, 347-362.

⁸⁷ M. Belgers, et al., *Transl. Psychiatry* **2016**, *6*, e826.

⁸⁸ U. Schmidt, et al., *J. Card. Fail.* **1995**, *1*, 311-321.

⁸⁹ A. C. Kruegel, et al., *Neuropharmacol.* **2017**. sous presse,

⁹⁰ C. W. Wright, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 961-968.

des dérivés hémisynthétiques sont employés en chimiothérapie anti-cancéreuse, en tant qu'inhibiteurs de topo-isomérase de type I.⁵

Au cours de cette thèse, les composés isolés ont ainsi été évalués *in vitro* pour leurs activités antiplasmodiale et cytotoxique.

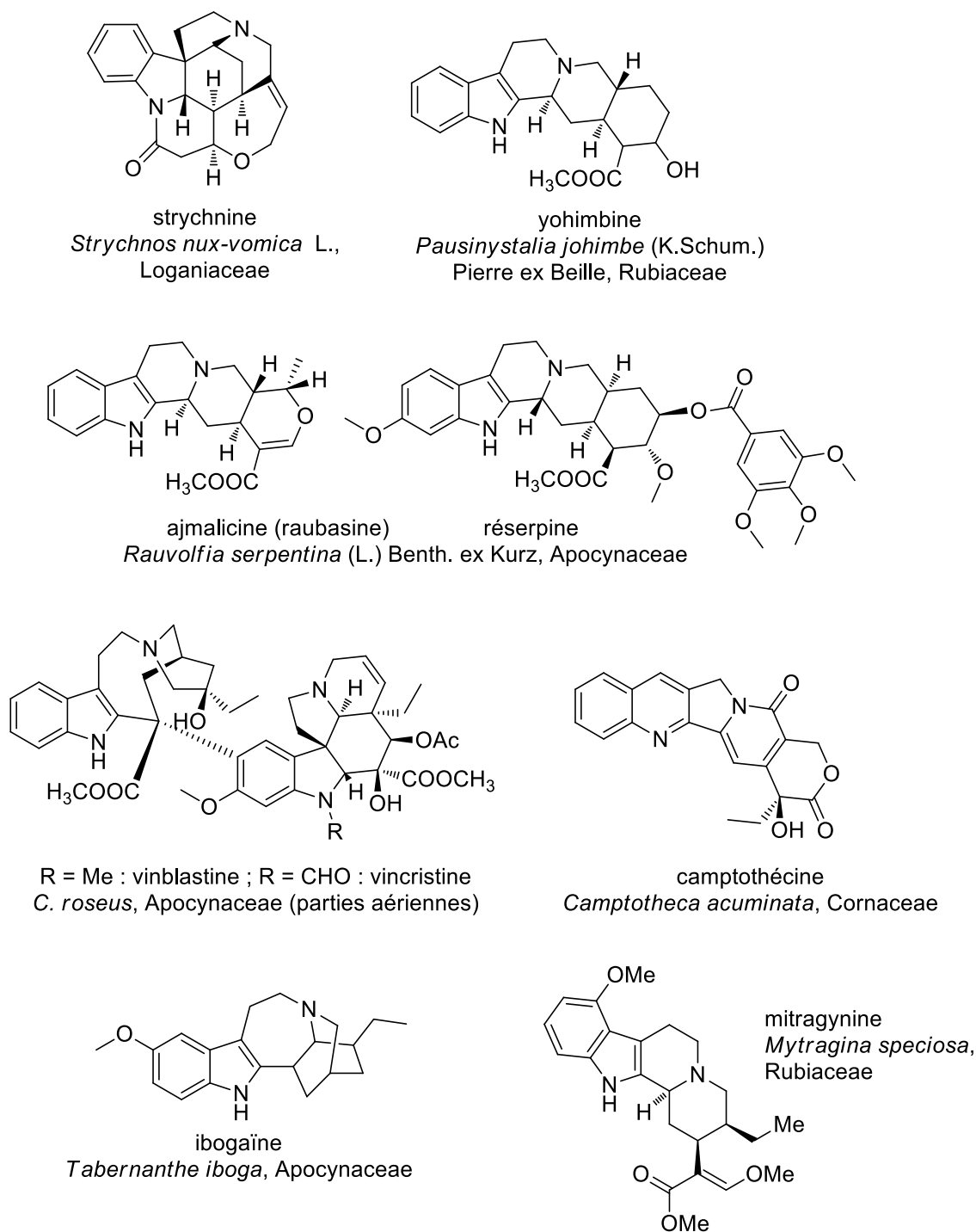


Figure 16 Alcaloïdes indolomonoterpéniques d'intérêt pharmaceutique cités

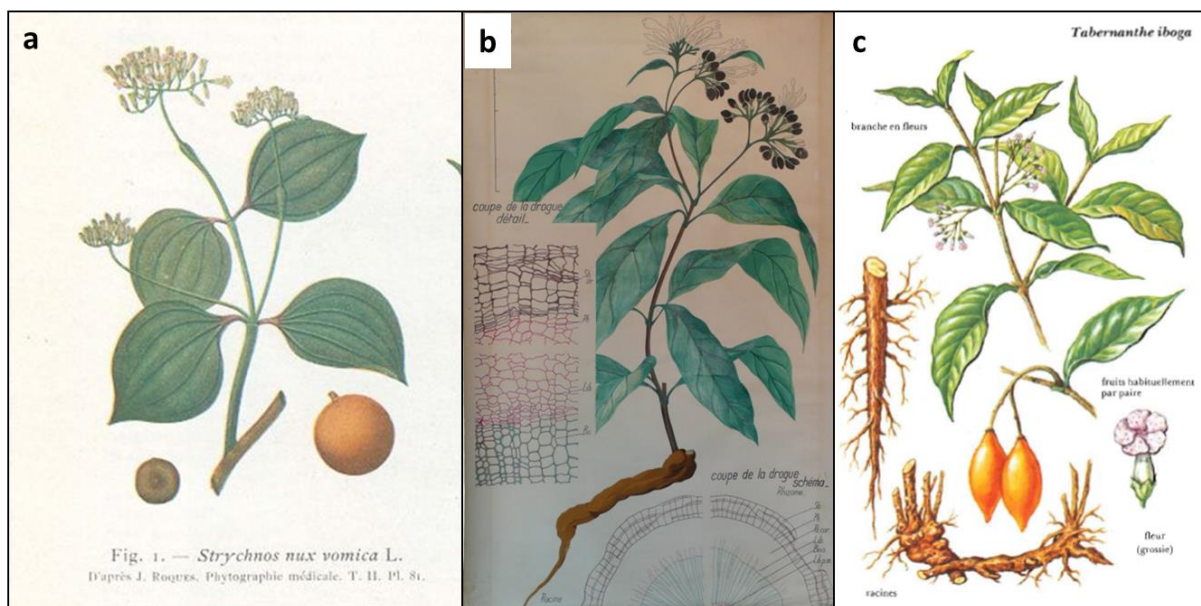


Figure 17. Exemples d'espèces à alcaloïdes indolomonoterpéniques à fort potentiel pharmacologique : *Strychnos nux-vomica* (a), *Rauwolfia serpentina* (b), *Tabernanthe iboga* (c)

(Source : BIUSanté, Univ. Paris-Descartes / Musée François Tillequin)

3. Généralités sur les familles des plantes étudiées

Notre travail expérimental a porté sur 3 espèces : 2 appartenaient à la famille des Apocynaceae et une était une Gelsemiaceae. Les caractères généraux de ces familles sont présentés ici. Les espèces sont décrites en introduction des travaux correspondant.

3.1. Famille des Apocynaceae : généralités

Les Apocynaceae constituent une vaste famille d'Angiospermes qui fut décrite pour la première fois en 1789 par le botaniste français Antoine-Laurent de Jussieu.⁹¹ Rattachée à l'ordre des Gentianales, cette famille regroupe 410 genres et 5556 espèces acceptés par le site The PlantList (qui référence 18208 noms d'espèces au total).⁹²

Ce sont essentiellement des arbres, des arbustes, des lianes, répandus dans les régions tropicales et subtropicales. Quelques représentants herbacés sont rencontrés dans les zones tempérées (Figure 18).⁹³ Ce sont parfois des plantes cultivées, d'intérêt économique (plantes ornementales, sources de principes actifs médicamenteux, plantes médicinales).⁸⁰

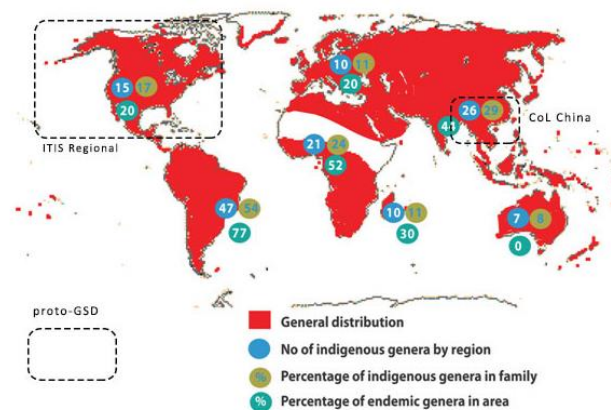


Figure 18. Répartition de la famille des Apocynaceae (source : Catalogue of life 2013)⁹⁴

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

⁹¹ M. Endress, *Telopea* **2004**, *10*, 525-541.

⁹² <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Apocynaceae/> (27/09/2017).

⁹³ <http://www.biologydiscussion.com/angiosperm/dicotyledons/apocynaceae-characters-distribution-and-types/48288> (27/09/2017).

⁹⁴ <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2013/> (03/10/2017).

La classification interne de cette famille a été l'objet de modifications assez récentes. Dans une revue publiée en 2013, Nazar *et al.*⁹⁵ retiennent une organisation en 5 sous-familles (*Rauvolfioideae*, *Apocynoideae*, *Periplocoideae*, *Secamonoideae* et *Asclepiadoideae*), divisées en 22 tribus et une quarantaine de sous-tribus, avec de nombreux déplacements récents de genres et sous-tribus (Figure 19). Endress *et al.* (2014) inventorient 25 tribus et 49 sous-tribus pour 366 genres, incluant de nouvelles tribus dans les *Rauvolfioideae* et les *Apocynoideae*⁹⁶ des espèces étudiées au cours de cette thèse sont des *Rauvolfioideae*. Elles appartiennent à la tribu des *Hunteriae* (genre *Pleiocarpa*) et à la tribu des *Willughbeieae*, sous-tribu des *Tabernaemontanineae* (genre *Callichilia*).⁹⁶

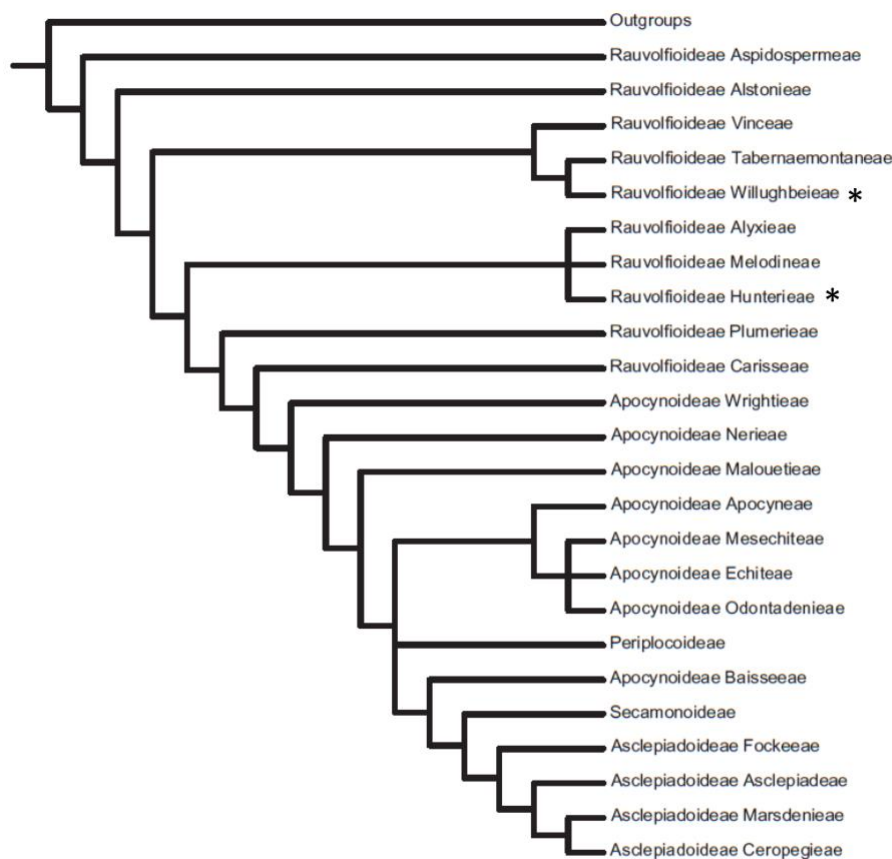


Figure 1. A summary of the relationships between the five subfamilies and twenty-two tribes of Apocynaceae. All clades shown are present in the strict consensus trees of previous phylogenetic studies (Rapini *et al.*, 2007; Simoes *et al.*, 2007; Livshultz, 2010). Outgroups include the other four families in the Gentianales order (Gelsemiaceae, Gentianaceae, Loganiaceae and Rubiaceae) according to APG III (2009).

Figure 19 Résumé des relations phylogéniques au sein des Apocynaceae admises en 2012

(source : Nazar *et al.*)⁹⁵

⁹⁵ N. Nazar, *et al.*, *Bot. J. Linn. Soc.* **2013**, 171, 482-490.

⁹⁶ M. E. Endress, *et al.*, *Phytotaxa* **2014**, 159, 175-194.

Pour les 5 sous-familles et 22 tribus. Tous les clades présentés constituent un consensus des références citées. Les groupes externes appartiennent aux 4 autres familles de Gentianales (APG III). Astérisques : tribus auxquelles sont rattachées les plantes étudiées au cours de cette thèse.

Les plantes de cette famille ont des caractéristiques morphologiques communes⁹⁷:

- leurs feuilles sont généralement opposées ou verticillées, à nervation pennée ;
- les inflorescences sont groupées en cymes ou en racèmes ; les fleurs peuvent parfois être solitaires, terminales ou axillaires ;
- les fleurs, pentamères, sont souvent remarquables et de grande taille, à corolle tubulaire avec 5 lobes, 5 étamines insérées sur la corolle, 2 (à 8) carpelles fusionnés ou 2 carpelles libres ;
- les fruits, souvent géminés, sont des baies, des drupes ou parfois des follicules déhiscents.⁹⁸

Enfin, elles sont pourvues de latex.

Les Apocynaceae produisent plusieurs classes de métabolites secondaires qui les caractérisent :

- iridoïdes et séco-iridoïdes ;
- triterpénoïdes de type stérol, à noyau pregnane et *nor*-pregane, souvent hétérosidiques (Figure 20a) ;
- dérivés pregnanes azotés (dits « alcaloïdes stéroïdiques d'Apocynaceae ») (Figure 20b) ;
- hétérosides cardiotoniques de type cardénolide (Figure 20c) ;
- alcaloïdes indolomonoterpéniques, chez les *Rauvolfioideae*, avec des dérivés de type I, II, III et des alcaloïdes binaires.⁹⁹

Des lignanes, des alcaloïdes indoliques et des alcaloïdes pyrrolizidiniques sont parfois décrits.

Les flavonoïdes de la famille ont fait l'objet de travaux.^{81,80}

⁹⁷ F. Dupont, *et al.*, *Abrégés de pharmacie. Botanique, les familles de plantes.* (15^e Ed.), **2012**

⁹⁸ R. Clark, *The Kew Tropical plant families identification handbook*, **2014**

⁹⁹ E. W. C. Chan, *et al.*, *J. Integr. Med.* **2016**, *14*, 269-284.

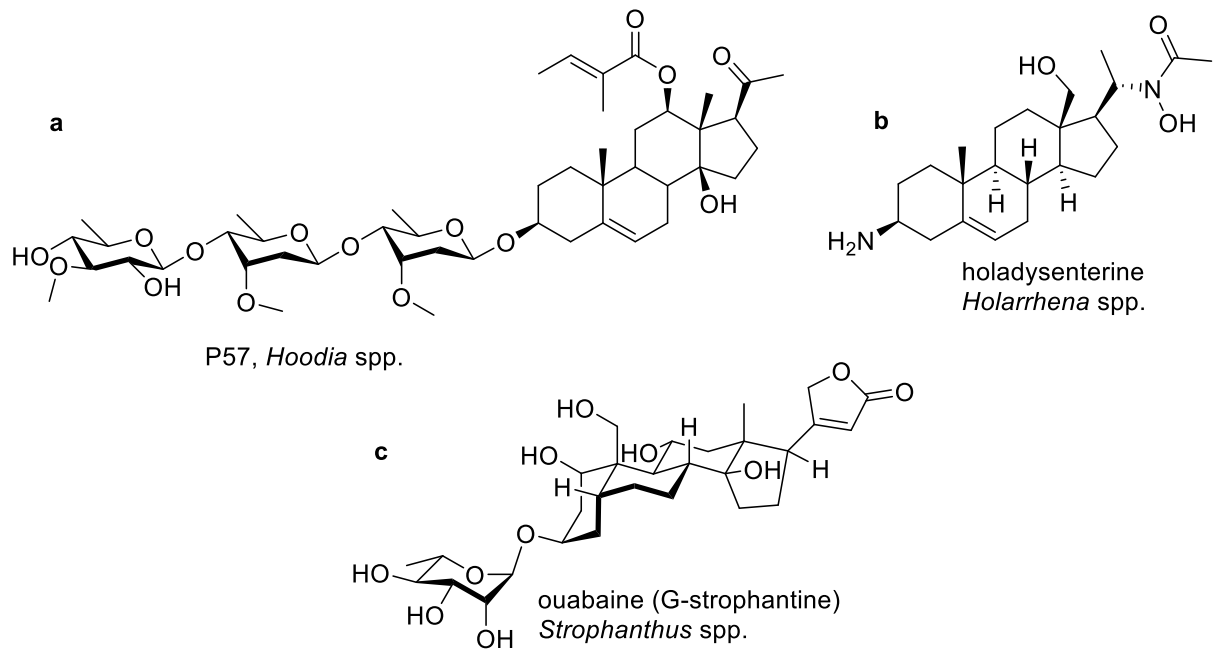


Figure 20 Triterpénoïdes d'Apocynaceae : exemples

3.2. Famille des Gelsemiaceae : généralités

Les Gelsemiaceae sont également des Gentianales¹⁰⁰. Cette petite famille a été séparée de celle des Loganiaceae en 1994.^{101,102} Elle ne comprend qu'une dizaine d'espèces réparties 3 genres, considérés plus proches des Apocynaceae que des Loganiaceae, d'après les données morphologiques et moléculaires.¹⁰⁰ Ce sont :

- le genre *Mostuea*, avec 7 espèces d'Afrique tropicale et d'Amérique du Sud ;
- le genre *Gelsemium*, avec 2 espèces d'Amérique du Nord et d'Asie ;^{103,104}
- le nouveau genre *Pteleocarpa* (anciennement Pteleocarpaceae), inclus dans cette famille en 2014, qui est originaire du Sud-Est de l'Asie et ne comprend qu'une seule espèce.¹⁰⁵

Une classification phylogénétique récente est présentée dans la Figure 21, présentant la position de la famille par rapport aux autres Gentianales.

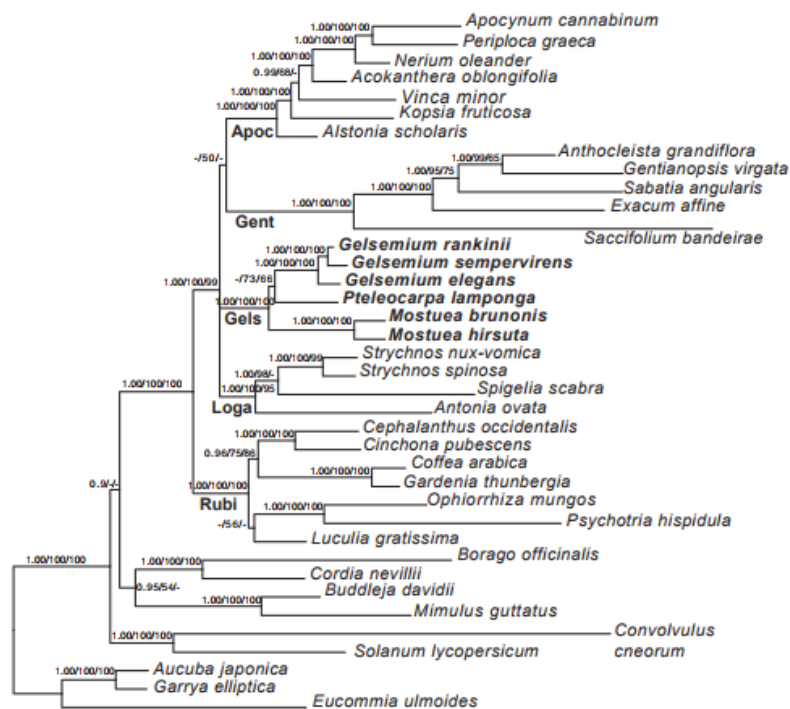


Figure 21 Classification phylogénétique de la famille des Gelsemiaceae

(Source : L. Struwe *et al.*, 2014) ; Gelsemiaceae : en gras ; Rubi : Rubiaceae ; Loga : Loganiaceae ; Gels : Gelsemiaceae ; Apoc : Apocynaceae

¹⁰⁰ L. Struwe, *et al.*, *Cladistics* **1994**, 10, 175-206.

¹⁰¹ U. Brunken, *et al.*, *Forschungsinstitut Senckenberg* **2008**,

¹⁰² N. F. Refulio-Rodriguez, *et al.*, *Am. J. Bot.* **2014**, 101, 287-299.

¹⁰³ Z. Jiao, *et al.*, *Syst. Botany* **2007**, 32, 617-627.

¹⁰⁴ <http://www.tela-botanica.org/apd-nn-71845-repartition> (28/09/2017).

¹⁰⁵ L. Struwe, *et al.*, *Bot. J. Linn. Soc.* **2014**, 175, 482-496.

Ces plantes sont distribuées dans les zones tropicales et subtropicales d'Amérique du Nord et du Sud, d'Afrique, de Madagascar et de l'est de l'Asie (Figure 22). Ce sont des arbustes ou des lianes, qui se distinguent des Loganiaceae par leurs fleurs.¹⁰⁶

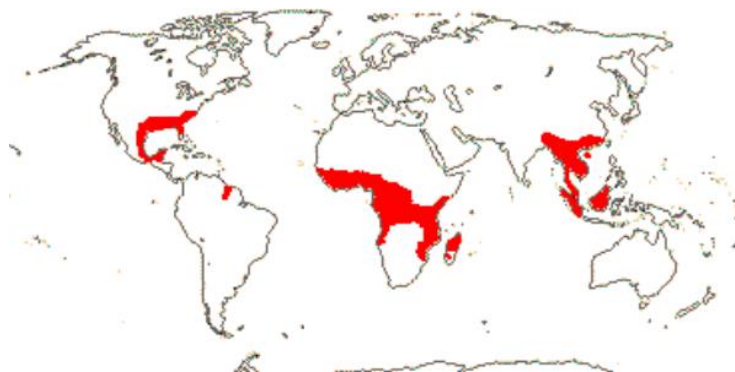


Figure 22 Répartition de la famille de Gelsemiaceae

(Source : www.mobot.org, 2003)

Les plantes appartenant aux trois genres de la famille des Gelsemiaceae s'identifient par leurs traits morphologiques et anatomiques : feuilles simples et entières, fleurs pentamériques, hétérostyles, à ovaire supère.⁹³ Elles n'élaborent pas de latex.

Les *Mostuea* et les *Gelsemium* sont connus pour leurs alcaloïdes indolomonoterpéniques complexes qui peuvent être très toxiques, comme la gelsémine (un agoniste des récepteurs à la glycine, anciennement employé comme antinévralgique ; type gelsémine) et la gelsédine (type gelsédine) (Figure 23), aux squelettes caractéristiques (

Figure 15)¹⁰⁷. De nombreux chimistes et pharmaciens sont fascinés par ces composés.¹⁰⁸ Des iridoïdes et des dérivés de type pregnane sont également rencontrés dans cette famille.¹⁰⁹

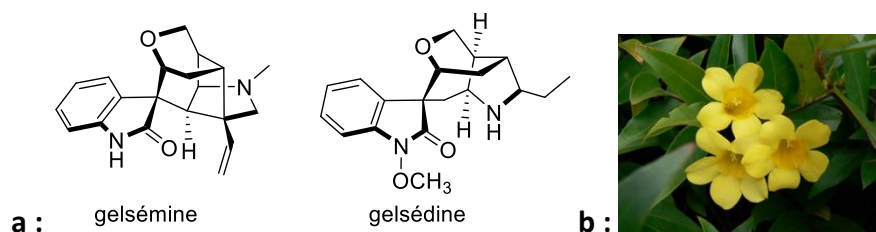


Figure 23 Gelsémine, gelsédine (a) ; *Gelsemium sempervirens* (L.) J.St.-Hil. (b)¹¹⁰

¹⁰⁶ <https://books.google.fr/books?isbn=3642540104> (28/03/2017).

¹⁰⁷ L. Wang, *et al.*, *Fitoterapia* **2017**, *120*, 131-135.

¹⁰⁸ G.-L. Jin, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *152*, 33-52.

¹⁰⁹ Y. Schun, *et al.*, *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 195-198.

¹¹⁰ (Source photographique : Wikipedia / Wikimedia commons (b))

Chapitre II

Méthodologie de travail, travaux préparatoires

Chapitre II. Méthodologie du travail, travaux préparatoires

1. Sélection et récolte des plantes

La première partie de ce travail de thèse a consisté en la sélection et la récolte d'espèces d'intérêt, pour la réalisation d'études chimiques et biologiques. Nous nous sommes intéressés à la prise en charge traditionnelle des fièvres et du paludisme, pour laquelle un corpus de connaissances relatif au Gabon a déjà été publié (voir partie introductive). Nous voulions focaliser nos efforts sur des espèces n'ayant fait l'objet que d'un nombre restreint d'études chimiques, ou pour lesquelles les données de la littérature ne se fondaient pas sur des techniques spectroscopiques et séparatives modernes.

1.1. Sélection initiale des plantes

Dans un premier temps, une enquête ethnopharmacologique a été réalisée. Le travail d'interrogatoire a été mené suivant un mode directif (remplissage d'un questionnaire « *fiche d'enquête ethnopharmacologique sur les plantes médicinales utilisées au Gabon* » voir en annexe 6, employé en routine par les membres du laboratoire de chimie des substances naturelles de l'USTM) aux mois de juillet et août 2014, dans les zones suivantes : province de l'Estuaire, village de Dame-Oyem, et au marché du Jardin de la Prairie ; province du Haut-Ogooue, village de Mbaya. Environ vingt personnes ont été interrogées sur les plantes employées dans la prise en charge des fièvres et du paludisme. Ces informateurs étaient des tradipraticiens et des vendeurs de plantes sur le marché du Jardin de la Prairie (Tableau 3).

Tableau 3 Enquête ethnopharmacologique

Zone	Nombre de vendeurs	Nombre de tradipraticiens	Ethnies
Province de l'Estuaire	15	1 (femme)	Fang
Province du Haut-Ogooue	0	3 (2 hommes, 1 femme)	Obamba

Des dons (vivres, cigarettes) ont été faits dans le village de Dame-Oyem. Un consentement éclairé a été obtenu suite à une conversation au cours de laquelle la démarche du travail a été expliquée, sans signature de contrat spécifique.

Les résultats qualitatifs (espèces et emplois cités) et quantitatifs (nombre d'espèces citées, convergence...) ne sont pas détaillés ici. Suite à l'analyse des résultats, 8 premières plantes (Figure 24) ont été récoltées dans leur milieu naturel (Figure 25). Des échantillons d'herbier ont été déposés à l'Herbier National du Gabon, après confirmation de leur identité par M. Raoul NIANGADOUMA et par le Pr. Henri BOUROBOU BOUROBOU. Les noms acceptés (site The Plant List, 10/2017) et les noms sous lesquels ces plantes ont été enregistrées dans l'herbier figurent ci-dessous. Les synonymies et numéros d'herbier sont indiqués dans l'annexe 1. Les drogues végétales récoltées étaient :

- écorces de *Annickia chlorantha* (Oliv) Setten et Maas (Annonaceae) (accepté) ;
- feuilles et tiges de *Dichaetanthera africana* Jacq.-Fél. (Melastomataceae) (accepté) ;
- feuilles et tiges de *Diodia sarmentosa* Sw. (Rubiaceae ; nom d'enregistrement de l'échantillon à l'herbier national du Gabon) ; nom accepté : *Diodella sarmentosa* (Sw.) Bacigalupo & Cabral ex Borhidi ;
- feuilles et tiges d'*Emilia lisowskiana* C.Jeffrey (Asteraceae) (accepté) ;
- écorces de *Harungana madagascariensis* Lam Ex Poir (Hypericaceae) (accepté) ;
- écorces de *Piptadeniastrum africana* Hook.F.Brenav (Fabaceae ; nom d'enregistrement de l'échantillon à l'herbier national du Gabon) ; nom accepté : *Piptadeniastrum africanum* (Hook.f.) Brenan ;
- écorces et les racines de *Pseudospondias* sp. (Anacardiaceae) – espèce non déterminée formellement ;
- écorces de *Zanthoxylum macrophyllum* Nutt. (Rutaceae ; nom d'enregistrement de l'échantillon à l'herbier national du Gabon) ; nom accepté : *Zanthoxylum clavaherculis* L.

Les mêmes collaborateurs ont confirmé l'identité des plantes étudiées dans les chapitres III à V. Pour l'obtention des échantillons, il n'y a pas eu d'accord avec le point-focal de la convention sur la biodiversité. Cependant, l'herbier national du Gabon est un centre de référence qui a dûment enregistré ces acheminements et fourni un accord d'exportation à des fins de recherche fondamentale.

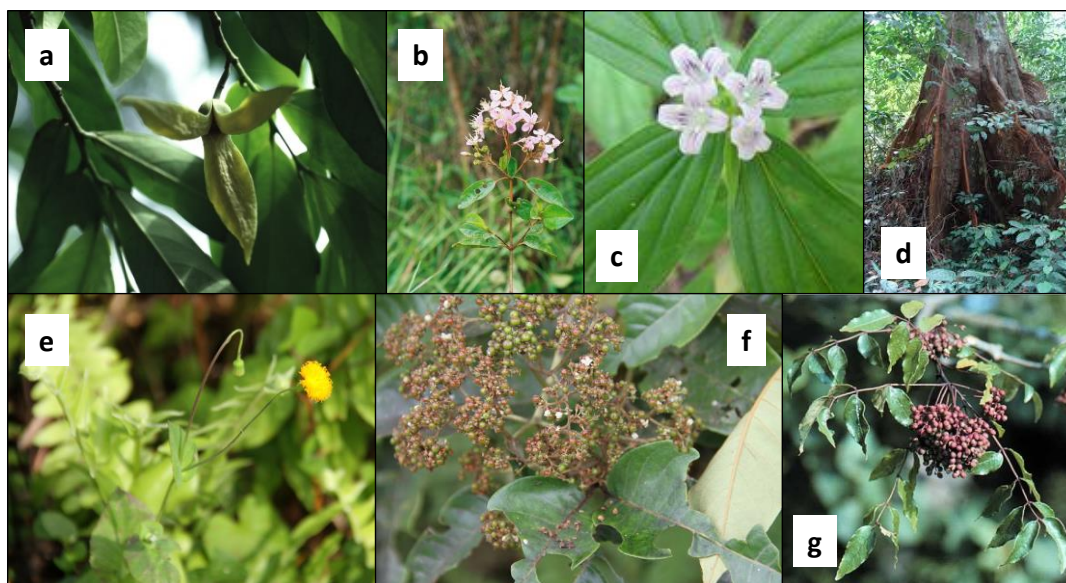


Figure 24. Plantes récoltées en 2014

(a) *Annickia chlorantha*, (b) *Dichaetanthera africana*, (c) *Diodella sarmentosa*, (d) *Piptadeniastrum africanum*, (e) *Emilia lisowskiana*, (f) *Harungana madagascariensis*, (g) *Zanthoxylum clava-herculis*

(Sources : Ethnopharmacologia.org ; Wikimedia Commons)

Les matières premières végétales séchées et pulvérisées ont fait l'objet d'une extraction méthanolique à froid, avant d'être analysées par CLHP-UV-ESI(+)-Q/TOF. Ces analyses ont été menées dans des conditions de travail standard, présentées plus loin. Une déréplication grossière a été réalisée (détermination de la formule brute des composés apparaissant comme majoritaires en détection MS ou UV), en comparaison de la littérature portant sur les espèces ou leurs genres. Ces résultats préliminaires ne nous ont pas incités à poursuivre les études chimiques de ces espèces. Ces plantes feront peut être l'objet de travaux ultérieurs au laboratoire. Les extraits obtenus doivent encore faire l'objet d'une évaluation de leur activité antiplasmodiale *in vitro*. A notre connaissance, seule celle d'*A. chlorantha* est décrite¹¹¹

1.2. Choix de Gentianales

D'autre part, les écorces de tronc de *Pleiocarpa mutica* Benth., traditionnellement employées dans l'indication, par exemple au Ghana¹¹², ont également été obtenues. Leur

¹¹¹ N. Tsabang, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2012**, 139, 171-180.

¹¹² J. Addae-Kyereme, *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* **2001**, 76, 99-103.

sélection a été faite sur un travail identique de déréplication préliminaire et a été motivée par les activités du laboratoire relatives aux alcaloïdes des Apocynaceae,¹¹³ dont ceux de cette plante en particulier.¹¹⁴

Une seconde campagne sur le terrain, réalisée en janvier-février 2016 durant la petite saison sèche, a permis une nouvelle récolte de l'espèce *Pleiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae), ainsi que l'obtention de *Callichilia inaequalis* Stapf (Apocynaceae ; tiges et racines) et de *Mostuea brunonis* Didr. (Gelsemiaceae ; écorces et feuilles), retenues sur des critères chimiotaxonomiques et non plus ethnobotaniques.

Les récoltes ont été réalisées dans les zones indiquées sur la carte suivante (Figure 25), et ont fait partie intégrante de ce travail de thèse.



Figure 25. Lieux de récolte et d'enquête.

Ronds rouges : lieux d'enquête et de récoltes initiales [Dame-Oyem ; Mbaya] ; ronds verts : lieux de récolte des Gentianales étudiées 1. Seconde récolte de *Pleiocarpa mutica*, forêt de Bambidi (Ogooué Lolo) ; 2. Récolte de *Callichilia inaequalis* et de *Mostuea brunonis*, forêt de Mondah (Estuaire)] (carte

adaptée de : <http://www.voyagegabon.fr/geographie/>)

¹¹³ M. A. Beniddir, et al., *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 2115-2119.

¹¹⁴ D. Lachkar, et al., *Nature Chemistry* **2017**, 9, 793-798.

2. Démarche analytique employée.

2.1. Introduction

Notre travail expérimental principal a d'abord consisté en l'étude déréplicative poussée des trois Gentianales, dans le but d'identifier de manière efficace des molécules de nature alcaloïdique de structures originales, pour un travail ultérieur de fractionnement, d'isolement et de détermination structurale, puis d'évaluation biologique, détaillés dans les chapitres suivants.

Cette démarche de travail est fondée sur l'emploi du couplage chromatographie liquide haute performance (CLHP) / spectrométrie de masse tandem (MS/MS ou MS²) Q/TOF et sur l'organisation des données obtenues par la technique des réseaux moléculaires (*Molecular Networking*).¹¹⁵ On verra que cette approche est très efficace dans le cas des plantes à alcaloïdes indolomonoterpéniques.

Le développement, la mise au point puis la mise à l'épreuve d'un protocole à implanter au laboratoire ont constitué une part importante de cette thèse. Un travail conjoint a été réalisé avec Alexander FOX-RAMOS (étude de Gentianales péruviennes) et Charlotte ALCOVER (étude de *Picralima nitida*), dans le cadre de leur thèse et de leur stage de M2, respectivement. Outre des conditions usuelles de travail et des règles de bonnes pratiques, nous avons généré une base de données spectrales et chromatographiques à partir d'échantillons authentiques d'alcaloïdes indolomonoterpéniques, la MIADB (*Monoterpene Indole Alkaloids DataBase*), décrite plus loin.

2.2. Conditions d'analyse, examen des données

2.2.1. Analyse par CLHP-MS, déréplication

L'analyse préliminaire des plantes est réalisée par CLHP-UV-MS/MS, sur des extraits alcaloïdiques purifiés obtenus avec de petites quantités de matériel végétal (5 g alcalinisés par l'ammoniaque, pour 200 mL d'AcOEt ; 1 extraction de 24 h à température ambiante (t.a.) ; purification par extraction liquide/liquide, suivant un protocole identique à celui employé à une échelle préparative : voir chapitres suivants). Des extraits méthanoliques ou éthanoliques ont également été réalisés (5 g, 200 mL, t.a., 24 h) mais n'ont pas fait l'objet

¹¹⁵ J. Y. Yang, *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 1686-1699.

d'une étude préliminaire systématique.

Les injections des extraits alcaloïdiques à 1,5 mg/mL dans le MeOH (qualité CLHP) étaient d'un volume de 5 µL. La séparation est réalisée par chromatographie à polarité de phases inversée, avec des colonnes analytiques octadécylsilylées (C₁₈), dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 4. Elles sont protégées avec les précolonnes correspondantes (10 mm). La colonne donnant la meilleure séparation chromatographique a été employée pour la suite des analyses.

Tableau 4. Colonnes C₁₈ employées pour l'analyse des extraits

Nom, Fabricant	Dimensions	Diamètre de particules	Spécificités
Sunfire® C ₁₈ Waters	150 × 2,1 mm	3,5 µm	« <i>End-capping</i> » (inactivation des silanols résiduels)
XBridge® C ₁₈ Waters	150 × 2,1 mm	3,5 µm	greffage « trifonctionnel » C ₁₈ -Si(O) ₃

Un gradient d'élution standard est employé : MeOH/H₂O+0,1 % HCOOH (5/95→100/0 en 40 min), au débit de 0,25 mL/min. La colonne n'est pas thermostatée¹¹⁶. La détection est assurée avec un détecteur UV à barrettes de diode branché en série avec un spectromètre de masse Agilent 6530 AccurateMass, équipé d'une source électrospray (ESI) et d'un analyseur de type quadropole / temps de vol (Q/TOF). Les mesures sont effectuées de *m/z* 100 à 1200. La source ESI est compatible avec des analytes présentant des gammes de polarité variées. Elle est bien adaptée aux alcaloïdes. Elle est utilisée en mode positif exclusivement, en raison de la nature des extraits et de notre intérêt pour ces composés, principalement observés sous forme [M]⁺ ou [M+H]⁺. L'analyseur offre une précision satisfaisante sur les mesures (< 5 ppm) avec une résolution également satisfaisante (> 10000). Des mesures de haute résolution (HR-MS) assurent une certitude importante sur les formules brutes calculées pour les ions parents et pour les fragments observés. Ce niveau de qualité des données est nécessaire à l'approche par *Molecular Networking* employée ensuite. La sensibilité dans les séries nous intéressant n'a pas été évaluée avec des molécules étalons. Après de nombreux essais, les paramètres standards choisis en source sont ceux présentés dans le Tableau 5. L'optimisation de ces conditions, fruit d'un travail

¹¹⁶ absence de four à colonne ; la pièce est par contre climatisée. Des dérives de temps de rétention sont parfois observés (voir plus loin).

collectif, n'est pas détaillée ici.

Tableau 5. Paramètres standards utilisés pour les analyses CLHP-MS.

Tension du capillaire	3,5 kV
Température de la source	320 °C
Potentiel du fragmenteur	180 V
Débit de N ² (<i>sheath gas flow</i>)	10 L/min
Pression du nébuliseur	35 psi

La fragmentation est réalisée en mode automatique (AutoMS) « Top 3 » : les 3 ions les plus intenses sont fragmentés, avec une exclusion de 40 secondes après trois répétitions. La comparaison des spectres MS/MS de molécules témoins a montré une forte hétérogénéité de la capacité des alcaloïdes indolomonoterpéniques à se fragmenter. Trois énergies de collision distinctes sont donc successivement employées au cours d'une même analyse : 30, 50 et 70 eV, avec un temps d'activation de 30 ms. Les spectres obtenus sont moyennés et les données sont traitées à l'aide du logiciel MassHunter® (Agilent).

La liste des pics obtenus en MS ($I > 10^5$ coups ; obtenue avec le mode « Find Auto MSMS ») fait l'objet de l'analyse suivante :

- Détermination de la formule brute avec MassHunter® avec les paramètres suivants : 3 à 60 atomes de carbone, 0 à 120 atomes d'hydrogène, 0 à 30 atomes d'oxygène, 0 à 10 atomes d'azote (le soufre et le chlore¹¹⁷ sont maintenant inclus) ; Le score obtenu est pondéré par l'espacement des pics du massif isotopique. Le choix de la ou des propositions les plus plausibles est réalisé par l'expérimentateur (ex : nombre d'atomes d'azote attendu en regard des atomes de carbone, etc.) ;
- Recherche complémentaire incluant d'autres hétéroatomes ou des métaux en cas d'obtention de formules incompatibles avec celles attendues pour des composés naturels usuels ;
- Confrontation des formules brutes obtenues avec les bases de données^{118,119} suivantes : *Dictionnaire of Natural Products*¹²⁰ ; *Dictionnaire of Alkaloids*¹²¹ ; *Reaxys*.¹²²

¹¹⁷ Des artefacts d'extraction / de purification au CHCl₃ ou au CH₂Cl₂ ont été détectés par ailleurs. L'AcOEt a été choisi comme solvant extractif pour cette raison.

¹¹⁸ M. S. Butler, *et al.*, *Planta Med.* **2014**, *80*, 1161-1170.

¹¹⁹ A. Bouslimani, *et al.*, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 718-729.

¹²⁰ DNP <http://dnp.chemnetbase.com> (18/10/2017).

L'analyse des résultats est réalisée manuellement, certaines propositions étant écartées pour des raisons chimiotaxonomiques.

Les données sont traitées de manière manuelle. Cette approche, assez fastidieuse, gagnerait à être automatisée.¹²³ Elle permet d'orienter le travail d'isolement ultérieur, à la recherche de composés inconnus compatibles avec des alcaloïdes indolomonoterpéniques, ou de composés connus de cette classe, d'intérêt pour le laboratoire (témoins analytiques, outils pharmacologiques, squelettes ou molécules destinés à une transformation hémisynthétique¹²⁴ Une analyse par la méthode des réseaux moléculaires est réalisée en complément, comme élément prépondérant pour l'orientation des purifications. Enfin, les spectres UV sont également informatifs, avec des maxima d'absorption caractéristiques (environ 270, 280 et 295 nm pour des dérivés à noyau indole conservé).

Rq : Les fractions obtenues par chromatographie en phase normale dans un but préparatif montrent en CLHP-UV-MS des pics minoritaires, non repérés initialement. Ces données n'ont pas toujours été analysées par la méthode des réseaux moléculaires, de manière combinée aux extraits alcaloïdiques totaux¹²⁵. Cela n'a été nécessaire que dans le cas de *Callichilia inaequalis*, afin d'avoir un nombre de nœuds suffisant, représentatif de la composition des tiges et de racines (voir le réseau présenté dans le chapitre correspondant).

2.2.2. Examen des spectres MS

Les alcaloïdes indolomonoterpéniques sont observés sous forme d'ions à m/z impairs¹²⁶ (adduits protonnés $[M+H]^+$; ions $[M]^+$ pour les ammoniums quaternaires). De manière intéressante, on observe également sur les spectres MS des agrégats de type $[2M+H]^+$ (dimères de source), ainsi que des ions $[M+2H]^{2+}$ dans le cas de composés dimériques vrais (« alcaloïdes binaires »). L'examen de ces autres adduits, distinguables par le biais de leurs massifs isotopiques, est également riche en informations.

¹²¹ J. Buckingham, *et al.*, *Dictionary of Alkaloids, with CD-ROM*, 2010

¹²² Reaxys <http://www-reaxys-com> (18/10/2017).

¹²³ S. Bertrand, *et al.*, *Phytochemistry Lett.* **2017**, 21, 297-305.

¹²⁴ S. Benayad, *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2015, 1894-1898.

¹²⁵ Pas de différences significatives avec les extraits réalisés sur des petites quantités de plantes.

¹²⁶ Rq : des alcaloïdes indolomonoterpéniques à 3 atomes d'azote, a priori non artefactuels, ont été exceptionnellement décrits ¹²⁶G.-Y. Zhu, *et al.*, *Org. Lett.* **2014**, 16, 1080-1083.

2.3. Analyse par la méthode des réseaux moléculaires

Les données obtenues en CLHP-MS/MS sont converties en format de fichier « .mgf », puis exportées vers le serveur GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*)¹²⁷ pour la construction de réseaux moléculaires.

L'approche par construction de réseaux moléculaires (*Molecular networking*) à partir de données MS/MS est une technique récente de déréplication conçue par l'équipe de DORRESTEIN (Université de Californie, San Diego). Cet outil innovant, accessible librement par internet (GNPS), repose sur un postulat simple : les molécules structurellement proches partagent des voies de fragmentation similaires en spectrométrie de masse tandem, conduisant à des fragments ou des pertes de neutre en commun. Ainsi, cette approche utilise des algorithmes d'alignements spectraux, permettant la mise en évidence des familles de molécules analogues par l'intermédiaire de réseaux moléculaires, à l'aide de l'outil informatique de visualisation Cytoscape, également accessible librement sur internet.¹²⁸ Elle permet d'organiser et de visualiser des données MS² sous la forme d'une carte organisée en fonction de similitudes spectrales. L'algorithme convertit les données MS² sous forme de vecteurs, leur ressemblance correspondant au cosinus de l'angle entre la somme ces vecteurs.¹²⁹

Les spectres MS/MS, correspondant aux pics chromatographiques, apparaissent sous forme de nœuds (« *nodes* »), qui sont organisés dans une représentation bidimensionnelle sous forme d'une carte ou d'un réseau. Ces nœuds sont reliés entre eux par des liens indiquant un degré de similitude. Ils s'organisent ainsi en groupes (« *clusters* »), plus ou moins grands. Les nœuds non appariés apparaissent de manière isolée (sous forme de connexions à eux même, « *selfloops* »). La forme du réseau et les liens s'établissant entre les nœuds sont variables : ils sont fonction des paramètres choisis par l'utilisateur (nombre de fragments communs et degré de similitude – « *cosine score* » ou score de similitude, de 0 à 1). L'image ainsi obtenue n'a pas un caractère absolu. Des règles de travail standard ont dues être établies (voir plus loin).

Il est possible de construire un réseau utilisant plusieurs jeux de données (par exemple : analyse de plusieurs extraits distincts, d'un extrait et des fractions qui en sont issues, d'un

¹²⁷ Pas de différences significatives avec les extraits réalisés sur des petites quantités de plantes

¹²⁸ P. Shannon, *et al.*, *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498-2504.

¹²⁹ S. E. Stein, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 859-866.

extrait et de données de référence issues d'une base de données spectrales). Pour distinguer des nœuds issus de jeux de données distincts, une annotation peut être introduite par le biais de couleurs et/ou de formes différentes en fonction de l'origine des données (extrait ou base de données, par exemple), en faisant émerger des correspondances (nœuds communs entre plusieurs extraits ou fractions, ou entre extrait et substance de référence, par exemple ; on parle de « *group mapping* »). Les correspondances entre un spectre MS² expérimental et celui d'une base de données sont désignées sous le nom de « *matches* », qui permettent théoriquement d'identifier une substance, en s'affranchissant cependant du temps de rétention. Un « *match* » peut ainsi être artéfactuel (par exemple : correspondance pour des diastéréoisomères ou des composés distincts ayant des spectres MS² identiques ou proches). D'autre part, le lien établi entre des nœuds issus de données expérimentales et un nœud correspondant à une substance de référence indique la probable présence d'analogues. Le site GNPS¹³⁰ comprend une base de données spectrale communautaire à laquelle peuvent contribuer les utilisateurs. La littérature montre l'emploi d'autres spectres de référence (par exemple l'utilisation de spectres MS² simulés pour l'ensemble des molécules du *Dictionary of Natural Products*, proposée par Allard,¹³¹ notamment pour la recherche d'alkaloïdes indolomonoterpéniques¹³²). Dans des approches comparatives entre données expérimentales propres et données disponibles dans des bases de données spectrales, la qualité de ces dernières apparaît comme cruciale. D'autre part, la qualité des données expérimentales et de leur éventuel retraitement est également un point-clé.¹³³ La Figure 26 montre les étapes de l'établissement d'un réseau moléculaire.

¹³⁰ M. Wang, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828-837.

¹³¹ P.-M. Allard, *et al.*, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3317-3323.

¹³² L. C. Klein-Júnior, *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2017**, sous presse.

¹³³ F. Olivon, *et al.*, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 7836-7840.

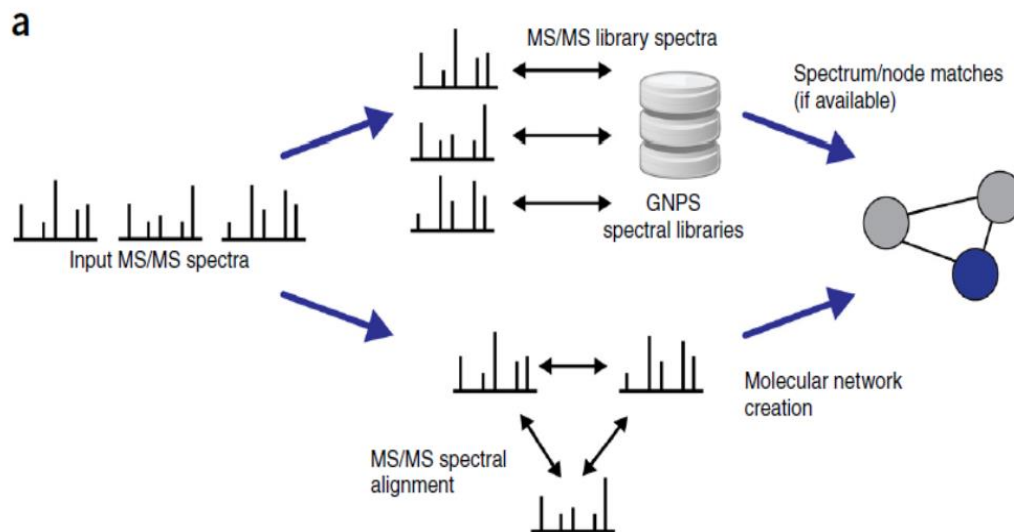


Figure 26. Etapes de création d'un réseau moléculaire

(source : Wang *et al.*, 2016)

Pour nos analyses, les paramètres sélectionnés sur GNPS sont les suivants :

- *Parent ion mass tolerance* : 0,02 ;
- *Fragment mass tolerance* : 0,02 (i.e. différences sur les mesures, en Thompson) ;
- Nombre de fragments communs : 6 ;
- *Min pairs cos* : 0,5 ou 0,6 ou 0,7 (score de similitude) ;
- *Mode MS Cluster* : activé

2.4. Construction d'une base de données interne au laboratoire (MIADB)

Le succès d'une étude de déréplication basée sur les réseaux permettant la caractérisation rapide des composés connus dépend grandement de la disponibilité et de la qualité des bases de données MS/MS. Les bibliothèques existantes, comme MassBank¹³⁴, Metlin¹³⁵, NIST¹³⁶ et GNPS¹³⁰, hébergent des données MS/MS de plus de 22644 composés. Ceci est loin d'être comparable aux plus de 282000 produits naturels décrits à ce jour¹³⁷. D'autre part, la qualité des données MS/MS proposées par de telles bases de données est parfois insuffisante (erreurs d'identification, par exemple).

¹³⁴ MassBank <http://www.massbank.jp/> (11/10/2017).

¹³⁵ Metlin <https://metlin.scripps.edu/> (11/10/2017).

¹³⁶ M. W. Chase, *J. Chem. Phys. Ref. Data* **1996**, 25, 551-603.

¹³⁷ J. F. Morton, *Atlas of medicinal plants of Middle America: Bahamas to Yucatan*, **1981**

Par conséquent, nous avons décidé de constituer une base de données spectrale interne au laboratoire, dénommée *Monoterpene Indole Alkaloids Data Base* (« MIADB »), à partir de molécules physiquement disponibles, en série indolomonoterpénique. Les données MS/MS ont été obtenues dans des conditions standardisées, correspondant à nos conditions d'étude des extraits. D'autre part, ces données ont été générées en conditions chromatographiques, suivant nos conditions éluives standard sur les deux colonnes citées précédemment, de manière à disposer de temps de rétention permettant de confirmer ou d'infirmer les identifications (*matches* dans les réseaux). Les spectres UV obtenus sont également d'intérêt dans ce cadre.

Cette base de données a été mise au point grâce à une collecte d'alcaloïdes indolomonoterpéniques initialement issus de deux laboratoires : le laboratoire de pharmacognosie de Châtenay-Malabry et le département de chimie des substances naturelles de l'ICSN à Gif-sur-Yvette. Au moment de nos travaux expérimentaux, le nombre de composés de référence employés était de 55 (étude de *P. mutica*), puis de 69 (étude de *C. inaequalis*) et enfin de 74 (étude de *M. brunonis*).

Depuis, la MIADB s'est encore enrichie, par le biais d'autres dons ainsi que de travaux d'isolement et d'hémisynthèse réalisés au laboratoire. Les molécules isolées au cours de ce travail de thèse y ont évidemment été incorporées. Ont été inclus récemment des échantillons rares du laboratoire de pharmacognosie de Paris-Descartes. Actuellement, la MIADB contient les données MS/MS de 119 alcaloïdes de référence, correspondant à 27 squelettes d'alcaloïdes indolomonoterpéniques, couvrant plus de 50 % des 45 squelettes connus dans cette classe (Annexe 2).

2.5. Priorisation des purifications

L'incorporation de la MIADB dans les réseaux moléculaires des extraits alcaloïdiques des trois plantes étudiées a constitué un moyen efficace et rationnel pour cibler de nouveaux analogues de produits connus, ainsi que des composés de structures totalement inconnues. Les règles employées pour prioriser l'isolement sont variables (il peut sembler intéressant, par exemple, de s'intéresser exclusivement à des « *selfloops* », *a priori* très originaux ou correspondant à des squelettes non présents dans la MIADB). Nous avons déterminé la stratégie d'isolement en fonction de l'abondance des produits dans les extraits et les fractions, en privilégiant des « *clusters* » ne comportant pas de molécules de référence ou

reliés à des molécules de référence peu communes ou appartenant à des classes alcaloïdiques non décrites dans les espèces végétales sélectionnées.

2.6. Détermination des niveaux de confiance de Schymanski

Dans le souci de clarifier la concordance des spectres MS² des composés de références de la MIADB et ceux de nos extraits alcaloïdiques, dans une optique de déréplication, nous avons eu recours aux règles de certitude dans l'identification proposées par Schymanski *et al.*¹³⁸ Ces règles indiquent un degré de confiance pour l'identification des composés, réparti en 5 niveaux (1 à 5) (Figure 27). Elles sont basées sur la concordance de plusieurs paramètres :

- le temps de rétention (une co-injection étant préconisée par les auteurs) ;
- la mesure de masse précise (HR-MS ; formules brutes identiques, massifs isotopiques concordants) ;
- l'appareusement des spectres MS/MS et UV.

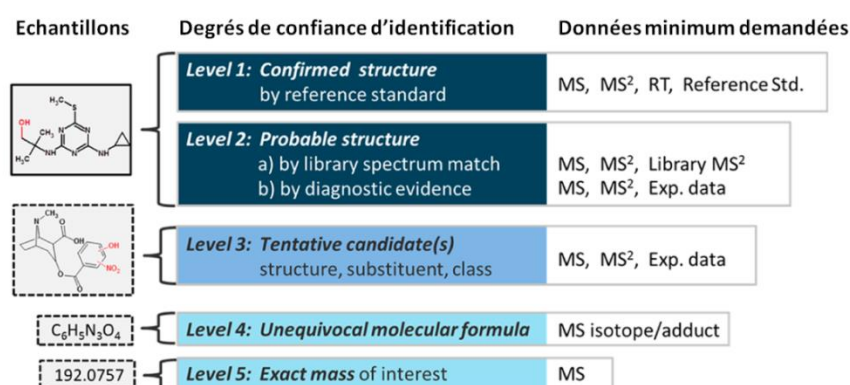


Figure 27. Niveaux de confiance d'identification proposés pour la déréplication par spectrométrie de masse à haute résolution (tiré de : Schymanski *et al.* ; 2014)

Le niveau 1 correspond à une identification sûre d'un composé. Pour ce niveau, les spectres MS et MS² et le temps de rétention sont comparés à une substance de référence physiquement disponible. Dans notre cas, la coinjection n'étant pas toujours possible, une différence tolérée d'une minute¹³⁹ sur les temps de rétention observés est admise.

Le niveau 2 est proposé pour une comparaison satisfaisante avec des données présentes dans une base de données (niveau 2a), ou pour une interprétation satisfaisante des données

¹³⁸ E. L. Schymanski, *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 2097-2098.

¹³⁹ Eventuellement 1,5 min.

de MS et de MS/MS (niveau 2b). Pour ce niveau, les temps de rétention entre un analyte et une référence ne sont pas forcément concordants, indiquant une ressemblance (parfois relative en termes structuraux) mais ne permettant pas d'affirmer avec certitude l'identité d'un *match* expérimental.

Les autres niveaux (3, 4 et 5) ne font pas l'objet de précisions dans ce manuscrit.

L'emploi de cette classification est ici indicatif. Nous appellerons « *match* », la concordance de spectres MS² issus de deux échantillons différents. Par exemple, la Figure 28 montre un *match* entre les spectres de la geissoschizoline provenant de l'extrait alcaloïdique des racines de *C. inaequalis* et ceux issus de la MIADB. On peut constater la proximité des valeurs de *m/z* en MS et l'identité des formules brutes générées et des massifs isotopiques (voir chapitre correspondant), la similitude des spectres MS², la proximité des temps de rétention (encadrés en rouge dans la figure).¹⁴⁰ Pour ce *match*, un niveau de confiance de 1 a été attribué, puis a été confirmé par l'isolement. Dans nos analyses, des *matches* de niveau 1 peuvent éventuellement être artéfactuels (épimères, isomères proches, etc.). Ce cas de figure s'est présenté pour d'autres travaux du laboratoire.

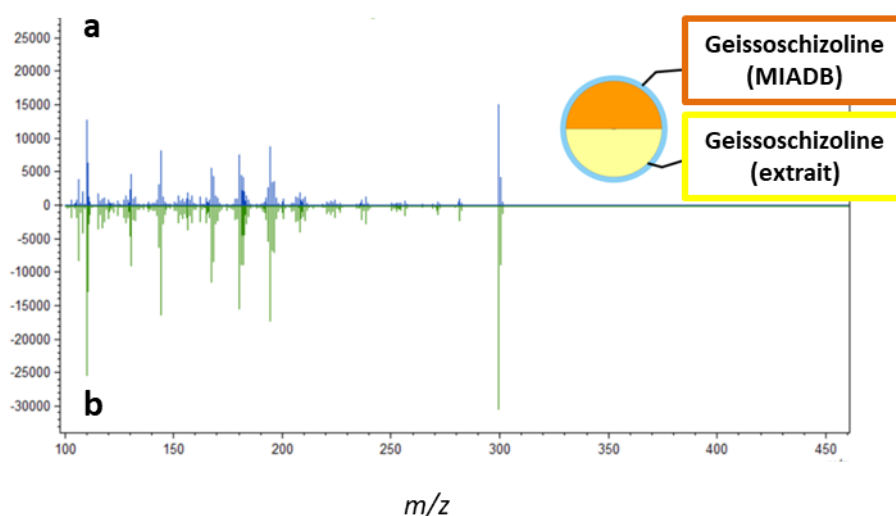


Figure 28. Comparaison des spectres MS² pour la geissoschizoline

a. extrait brut des racines de *C. inaequalis*, Tr 9,4 min, *m/z* = 299,2799 ;

b. MIADB ; Tr 10,3 min, *m/z* = 299,2801 ; différence de masse : 0,0002 Th., équivalent à une erreur de 0,6 ppm.

Les points-clés de notre démarche sont présentés ci-dessous (Figure 29). Si cette approche

¹⁴⁰ Différence de 1,2 minutes, qui constitue une limite dans notre approche.

mérite encore des mises au point au laboratoire, certains problèmes ayant été mis en évidence au cours de ce travail, sa mise en application est satisfaisante.

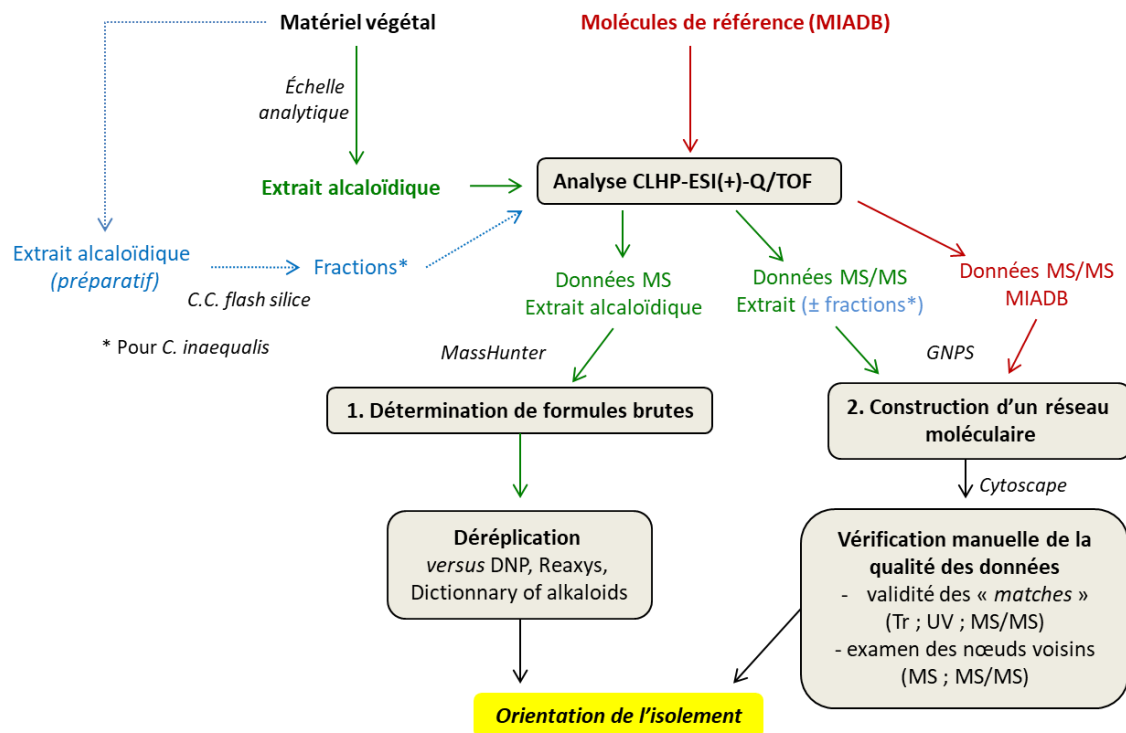


Figure 29. Déréplication et orientation de la stratégie d'isolement : démarche générale de travail.

2.7. Poursuite des travaux : isolement, évaluation biologique.

Les travaux de purification et d'isolement ont été effectués au Laboratoire de pharmacognosie, CNRS UMR 8076 BioCIS (faculté de pharmacie, Châtenay-Malabry, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay). Les analyses RMN ont été majoritairement réalisées par Jean-François Gallard à Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, CNRS) à Gif-sur-Yvette. Les spectres de dichroïsme circulaire électronique ont été acquis à l'ICSN, à la faculté de pharmacie de Châtenay. Une aide à la modélisation a été apportée par Guillaume Bernadat, de l'équipe « Molécules fluorées » de BioCIS.

Les extraits alcaloïdiques des 3 espèces étudiées et l'ensemble des composés isolés au cours de ce travail ont été testés *in vitro* sur une souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* (FcB1), au stade érythrocytaire (culture asynchrone, mesure à 24 h, par incorporation d'hypoxanthine tritiée, comparativement à la chloroquine). Aucun phénomène d'hémolyse n'a été observé. Ces tests d'activité antipaludique ont été réalisés par Elisabeth Mouray à l'Unité « Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes » (MCAM, CNRS UMT 7245) au Muséum National d'Histoire Naturelle (Sorbonne Universités, Paris), sous la direction de Philippe Grellier, dans la cadre d'une collaboration scientifique.

D'autre part, des tests « de routine » ont été ou seront réalisés au sein de notre UMR, par M. Sébastien POMEL, de l'équipe « chimiothérapie antiparasitaire », dans un modèle *in vitro* de *Leishmania donovani* sous forme amastigote axénique puis intramacrophagique.

Enfin, les mêmes échantillons ont fait l'objet d'une évaluation de leur cytotoxicité. Plusieurs lignées ont été employées :

- HUVec, lignée endothéliale ombilicale saine humaine (employée comme indicateur préalable de toxicité potentielle) ;
- A549, lignée d'origine humaine de cancer du poumon (épithélium alvéolaire) ;
- HEP-G2, lignée d'origine humaine de cancer hépatique (criblage d'un intérêt antitumoral potentiel).

Les échantillons ont été comparés à la doxorubicine. Ces tests ont été réalisés par Stéphanie Denis, de l'institut GALIEN (CNRS UMR 8612, faculté de pharmacie, Châtenay-Malabry, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay).

- AB-943. Ces tests ont été réalisés par Elisabeth Mouray

Les chapitres suivants présenteront les résultats obtenus (déréplication, isolement, détermination structurale, données biologiques), plante par plante :

- pour *Pleiocarpa mutica*, sous la forme d'un article publié, en anglais, précédé des données de déréplication et suivi de données complémentaires ;
- pour *Callichilia inaequalis* puis pour *Mostuea brunonis*, sous un format de présentation classique, avec des annexes pour chaque partie.

Les communications générées par ces travaux sont présentées en fin de manuscrit en annexe 4.

Chapitre III
Études chimique et biologique de
***Pléiocarpa mutica* Benth.**
(Apocynaceae)

Chapitre III. Études chimique et biologique de *Pléiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae)

1. Introduction

Ce chapitre porte sur l'étude chimique et biologique d'extraits alcaloïdiques d'écorces de tiges de *Pléiocarpa mutica* Benth.¹⁴¹

Pléiocarpa mutica est une plante endémique des forêts tropicales d'Afrique centrale. Elle a fait l'objet de plusieurs études entre 1950 et 1970. En 1957, Douglas *et al.*, ont signalé la présence d'alcaloïdes dans les écorces et les racines de la plante.¹⁴¹ En 1961, Kump *et al.*, ont montré une forte activité hypotensive des extraits organiques et aqueux, par un effet adrénolytique, ainsi que des propriétés nématocides.¹⁴²

Nous avons réalisé une étude phytochimique de l'extrait alcaloïdique des écorces de tiges, par la technique des réseaux moléculaires,¹⁴³ à l'aide de la MIADB¹⁴⁴ présentée dans le chapitre II, qui venait d'être mise en place. L'apport essentiel de ces deux outils a permis la déréplication rapide d'alcaloïdes connus d'une part, et de cibler des composés inconnus.

2. Présentation du genre *Pléiocarpa* et de l'espèce *Pléiocarpa mutica* Benth.

2.1. Aspects botaniques et distribution du genre *Pléiocarpa*

Le genre *Pléiocarpa* appartient à la famille des Apocynaceae et à la sous-famille des Rauvolfioideae.^{145,146} Il est endémique des régions tropicales du continent africain,¹⁴⁷ on le retrouve précisément dans 5 pays : la Sierra Leone, le Ghana, dans l'est du Nigeria, le Congo

¹⁴¹ A. Kiang, *et al.*, *Malayan Pharm. J.* **1957**, *6*, 138.

¹⁴² D. P. N. Tsao, *et al.*, *Econ. Bot.* **1961**, *15*, 99-103.

¹⁴³ L.-F. Nothias-Scaglia, *et al.*, *Spectra Analyse* **2015**, *307*, 73-78.

¹⁴⁴ A. E. Fox Ramos, *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1007-1014.

¹⁴⁵ E. Omino, thèse de doctorat, **1996**.

¹⁴⁶ <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Apocynaceae/> (27/09/2017).

¹⁴⁷ W. Evans, *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 16th Ed., **1996**.

et le Gabon.^{148,149} Ce genre comprend 6 espèces :

- *Pleiocarpa pycnantha* (K. Schum.) Stapf ;
- *P. bicarpellata* Stapf ;
- *P. brevistyla* Omino ;
- *P. mutica* Benth. ;
- *P. picralimoides* (Pichon) Omino ;
- *P. rostrata* Benth.^{149,145}

Ce genre s'apparente aux genres *Hunteria* et *Picralima*.¹⁴¹



Figure 30. Répartition géographique du genre *Pleiocarpa*
(source : database.prota.org, 2006)¹⁴⁸

L'espèce *Pleiocarpa mutica* est rencontrée dans des forêts primaires et secondaires denses d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale : on la retrouve précisément de la Sierra Leone au Ghana, et du Nigeria au Gabon.¹⁴⁵ Elle possède 5 synonymes (*Hunteria pleiocarpa* Hallier f. ; *Pleiocarpa bakueana* A. Chev. [nom invalide] ; *Pleiocarpa salicifolia* Stapf ; *Pleiocarpa ternata* A.Chev. ; *Pleiocarpa tricarpellata* Stapf).

¹⁴⁸ N. Nyunaï, et al., *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand and H. Durand. [Internet] Record from PROTA4U. Schmelzer, GH and Gurib-Fakim, A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, 2006

¹⁴⁹ O. A. Omoyeni, et al., *Phytochem. Rev.* 2017, 16, 97-115.



Figure 31. Planche botanique de *P.mutica* Benth.

1. tige (x 2/3) ; 2. fleur (x 3,4) ; 3. corolle ouverte (x 4) ; 4. calice ouvert avec pistil (6) ; 5. infructescence (x 2/3) ; 7. coupe longitudinale de la graine dans le fruit (x1) ; 8. pulpe (x 1) ; 9. graine (x 1) ; 10. embryon (source : Kiang, *et al.*, 1957)141

Pleiocarpa mutica Benth. est décrit comme un arbuste ou petit arbre atteignant 7,5 m de haut ; son tronc varie de 1,5-5 cm de diamètre. Son écorce est lisse allant du brun foncé à gris pâle. Ses autres caractéristiques (Figure 31) sont :

- des feuilles opposées, parfois en verticilles de 3, simples et entières, à stipules absentes, à pétiole long de 5-15 mm, à limbe elliptique, oblong ou ovale de 5-20(-30) cm sur 2-8(-11, 5) cm ;
- une inflorescence en grappe axillaire de 1,5-2,5 cm par 2-3 cm, à environ 10(-35) fleurs aux bractées très petites ;
- des fleurs bisexuées, régulières, pentamères, très odorantes, sessiles ; à sépales ovales ou elliptiques, de 1,5-2 mm de long, libres ou connés à la base ;
- un fruit constitué de 5 follicules contenant chacun une graine, obovoïdes à globuleux ou ellipsoïdes, de 13,5-20 mm de long, à apex pointu, jaune à orange vif, légèrement ridé à finement verruqueux ;
- des graines globuleuses à oblongues, de 7,5-12 mm de long, brunes.^{145,148}

2.2. Utilisations traditionnelles

Pleiocarpa mutica est une plante médicinale appréciée par les populations là où elle est présente. En Sierra Leone, l'écorce moulue est frottée sur le corps pour lutter contre la fièvre.¹⁴⁵ Chez les Agnis, de Côte d'Ivoire, on boit une décoction d'écorce râpée pour traiter les maux d'estomac. Une décoction d'écorce de racine y est utilisée contre les maladies rénales et le paludisme.^{145,148} Au Ghana, les racines se prennent en décoction comme fébrifuge et antipaludique, et pour traiter la jaunisse et les convulsions. L'écorce broyée dans du vin de palme se prend comme laxatif.¹⁴⁹

2.3. Composition chimique

Pleiocarpa mutica a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques. En 1961, Kump et al. ont isolé les premiers alcaloïdes indolomonotérpéniques de cette Apocynaceae.¹⁵⁰ Dès lors, des travaux ont été effectués à partir des racines et des écorces de tiges, conduisant à l'isolement d'une vingtaine d'alcaloïdes indolomonoterpéniques (monomères et dimères) appartenant à divers squelettes : aspidofractane, éburname, pléiocarpamine, strychnane, akuammilane et sarpagane.^{151,152,153}

Dans les racines, on trouve la pléiocarpine, la kopsinine, la kopsinoline, la pléiocarpoline, la méthylsarpagine, la pléiocarpamine, la (-)-éburnamine et la pléiomutinine, qui est l'un des deux dimères décrits de la plante.^{154,155}

Dans l'écorce de tiges, trois dioxokopsanes, la 10,22-dioxokopsane, la N-méthyl-10,22-dioxokopsane, et la N-carbométhoxy-10,22-dioxokopsane ont été décrites.¹⁵¹ D'autres molécules ont également été ultérieurement isolées de l'écorce de tiges : de la 10-hydroxy-N-4-méthyl-hunterburine,¹²¹ l'isotuboflavine¹⁵⁴, la norisotuboflavine, la flavocarpine¹⁵⁶ et la pléiomutine, représentant le second et seul autre dimère indolomonoterpénique décrit dans cette plante¹⁵⁷. Une β -carboline a également été isolée (Figure 32)

¹⁵⁰ W. Kump, et al., *Helv. Chim. Acta* **1961**, *44*, 1503-1516.

¹⁵¹ H. Achenbach, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4944-4950.

¹⁵² H. Achenbach, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4177-4181.

¹⁵³ H. Achenbach, et al., *Tetrahedron Lett.* **1965**, *6*, 3239-3243.

¹⁵⁴ J. Addae-Kyereme, et al., *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 99-103.

¹⁵⁵ N. Hart, et al., *Austr. J. Chem.* **1972**, *25*, 2739-2741.

¹⁵⁶ G. Buchi, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3393-3397.

¹⁵⁷ D. W. Thomas, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1537-1544.

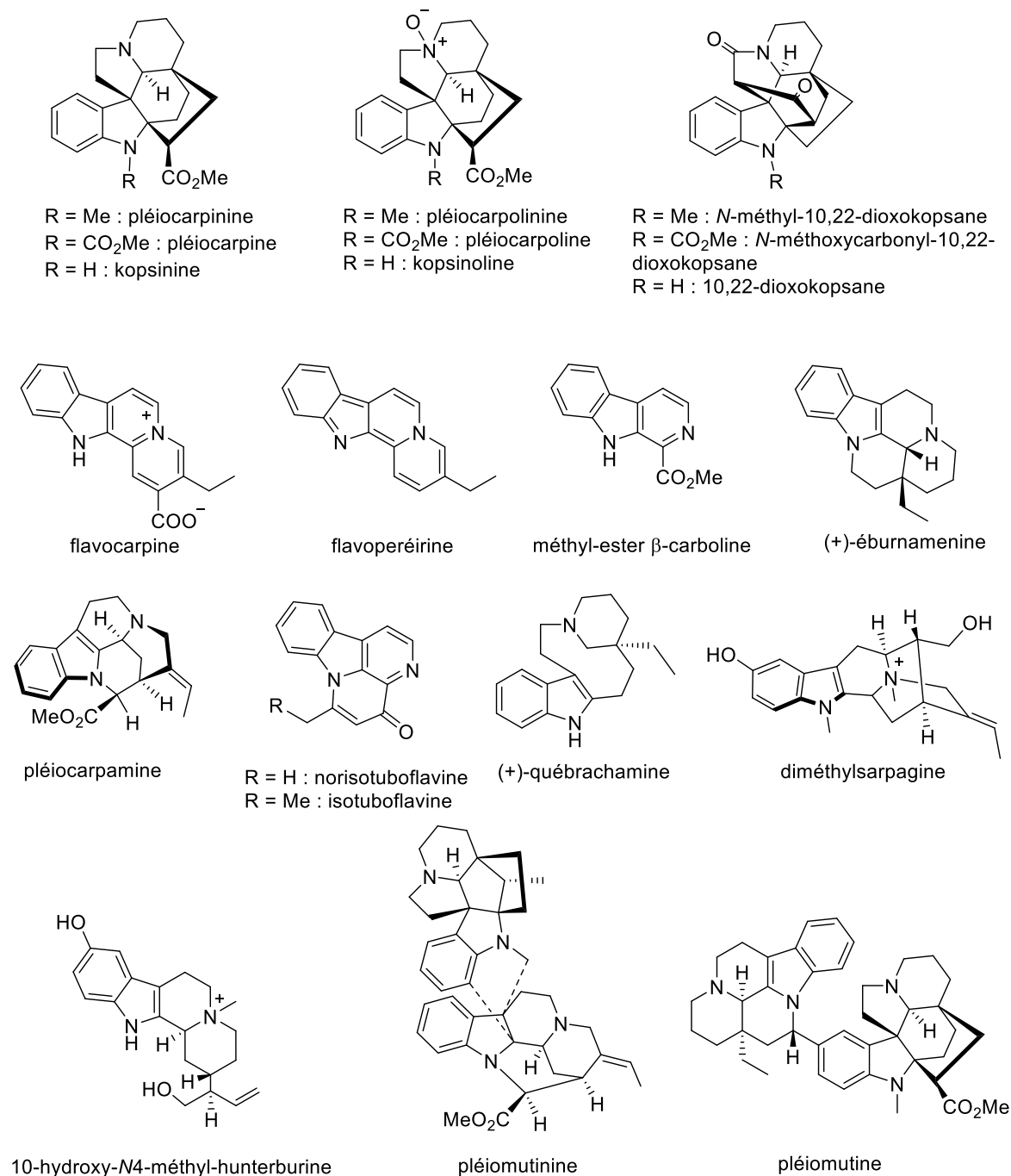


Figure 32. Alcaloïdes indolomonoterpéniques et indolique isolés de *P. mutica*

3. Travaux personnels : étude de l'extrait alcaloïdique des écorces de tige de *P. mutica* Benth.

3.1. Étude préliminaire de l'extrait

Nous avons obtenu un extrait alcaloïdique à partir des écorces de tiges de *P. mutica*. Celui-ci a été analysé par CLHP-MS/MS (Figure 33).

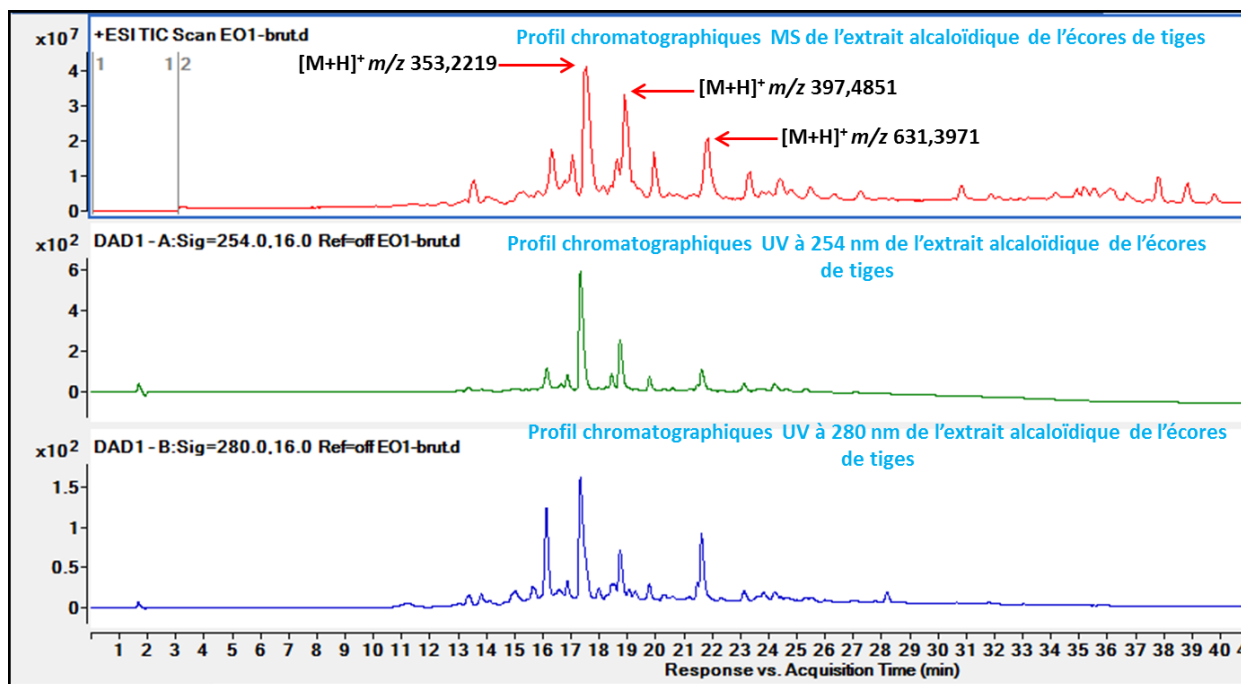


Figure 33. Analyse par CLHP-UV-MS de l'extrait alcaloïdique d'écorces de tiges de *P. mutica*

ESI(+), m/z 100-1200, UV : λ 254 nm et λ B 280 nm,
 élution sur colonne X-Bridge®

Les chromatogrammes montrent trois pics majoritaires correspondant à des composés connus de *P. mutica*, il s'agit ici de la pléiocarpinine¹⁵⁴, la pléiocarpine¹⁵⁴ et de la pleiomutine¹⁵⁷

Le réseau moléculaire obtenu à partir de l'extrait alcaloïdique de *P. mutica* a été généré à partir de 1968 spectres MS / MS individuels, organisés en 251 nœuds formant 9 zones dont une zone de *selfloop* contenant 127 nœuds libres (Figure 34). Parmi ces zones, cinq présentent des nœuds concordant avec les composés de la MIADB ayant tous des niveaux d'identification (N.I) égale à 1.

Ce réseau montre que les zones **A** et **B** contiennent plusieurs molécules concordantes avec les composés connus issus de la MIADB. Elles nous ont semblé moins intéressantes que les zones **C** et **D**, ne montrant quant à elles pas ou presque pas de *matches* avec les composés de la MIADB. Ceci et la confrontation des données avec les bases de données usuelles suggèrent la présence de composés non encore décrits dans la plante. De plus, ces deux zones montrent des nœuds ayant des valeurs de m/z comprises entre 600 et 750 Da, laissant penser à d'éventuels composés dimériques, rarement décrits dans l'espèce.

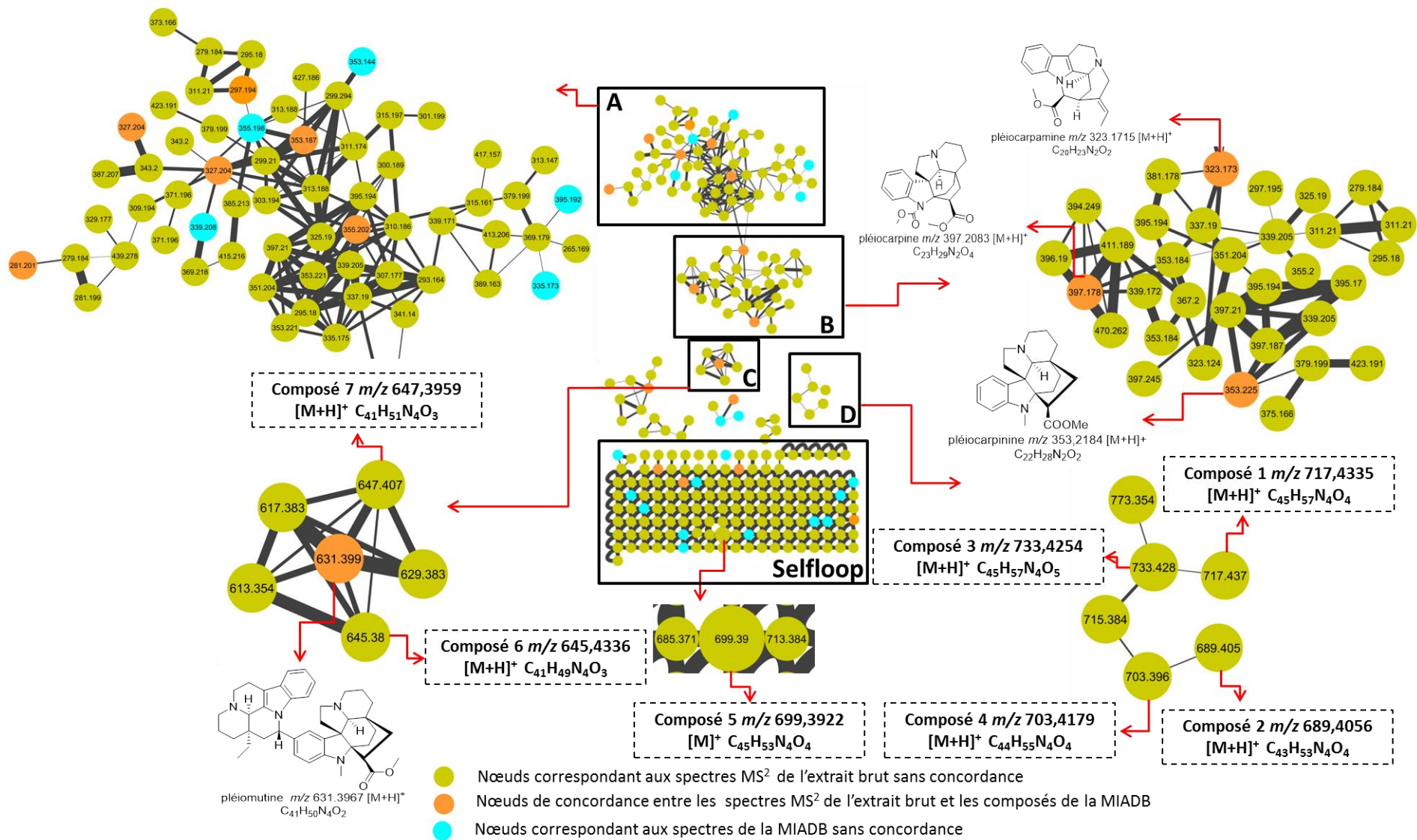


Figure 34. Réseau moléculaire global de l'extrait alcaloïdique d'écorces de tiges de *P. mutica* annoté avec la MIADB.

**Tableau 6 Tableau de déréplication de l'extrait alcaloïdique d'écorces de tiges de
*P.mutica***

Tr (min)	m/z	FB	Score %	Diff. ppm	Intensité	Identif. DNP	Identif. Reaxys	Noms des composés
10,5	343,2024	C20 H26 N2 O3	92,93	-0,82	48065	12 hits	7 hits	
10,5	323,1761	C20 H22 N2 O2	88,8	-2,78	210267	56 hits	43 hits	pléiocarpamine
10,5	299,1757	C18 H22 N2 O2	98,7	-0,59	42295	13 hits	59 hits	
12,2	337,1921	C21 H24 N2 O2	99,23	-3,2	503952	30 hits	12 hits	
12,3	397,4850	C23H29N2O4	95,36	-1,2	55446	52 hits	11 hits	pléiocarpine
12,3	385,1756	C21 H24 N2 O5	94,46	0,3	222436	26 hits	9 hits	
12,7	355,1768	C21 H26 N2 O3	72,9	-1,55	36060	7 hits	26 hits	
13,3	313,1899	C19 H24 N2 O2	74,28	4,24	55538	40 hits	15 hits	
13,4	339,2064	C21 H26 N2 O2	99,44	1,22	3271735	51 hits	12 hits	
13,8	661,3752	C41 H48 N4 O4	99,11	-0,44	57025	4 hits	2 hits	
13,9	293,1648	C19 H20 N2 O	98,33	-0,19	671187	23 hits	5 hits	
14,2	309,1613	C19 H20 N2 O2	78,27	-6,2	101003	20 hits	3 hits	
14,6	619,364	C39 H46 N4 O3	94,2	0,61	43006	1 hit	1 hit	
14,7	384,1921	C21 H25 N3 O4	93,19	-0,27	49485	4 hits	1 hit	
14,8	413,2081	C23 H28 N2 O5	98,58	-2,2	107251	38 hits	34 hits	pléiocarpoline
14,9	297,1952	C19 H24 N2 O	97,99	2,61	1216852	62 hits	52 hits	
15,1	499,1986	C26 H30 N2 O8	96,45	1,40	125463	23 hits	15 hits	vincosamide
15,1	279,1868	C19 H22 N2	93,47	-4,17	62670	11 hits	4 hits	
15,1	357,1819	C20 H24 N2 O4	93,76	-3,05	202513	24 hits	9 hits	
15,3	709,3974	C42 H52 N4 O6	98,03	-1,55	276390	0 hit	0 hit	
15,5	379,2013	C23 H26 N2 O3	97,77	1,43	71196	2 hits	2 hits	
15,5	621,3802	C39 H48 N4 O3	97,7	-0,12	97365	1 hit	0 hit	
15,8	366,1802	C21 H23 N3 O3	61,3	-1,84	119107	7 hits	5 hits	
15,9	383,1962	C22 H26 N2 O4	52,35	1,7	69041	98 hits	102 hits	
16,0	311,1755	C19 H22 N2 O2	77,43	-1,31	300480	40 hits	24 hits	
16,4	365,1854	C22 H24 N2 O3	82,2	1,53	418090	12 hits	15 hits	
16,8	395,197	C23 H26 N2 O4	94,02	-0,95	6862750	22 hits	9 hits	
17,1	295,1806	C19 H22 N2 O	98,39	-0,47	178993	50 hits	43 hits	
17,6	369,1804	C21 H24 N2 O4	97,21	1,17	350006	113 hits	169 hits	
17,6	383,1615	C21 H22 N2 O5	63,01	-4,66	39068	11 hits	4 hits	
17,6	397,2115	C23 H28 N2 O4	99,4	1,59	2896775	37 hits	25 hits	
18,0	280,192	C16 H25 N O3	96,48	-4,56	61038	34 hits	68 hits	
18,6	353,2219	C22 H28 N2 O2	93,94	2,06	6981215	8 hits	13 hits	pléocarpinine
19,5	421,2109	C25 H28 N2 O4	92,59	2,42	36863	0 hit	0 hit	
20,3	617,3853	C40 H48 N4 O2	98,06	0,29	90258	7 hits	4 hits	
20,5	689,4056	C43 H53 N4 O4	87,8	-0,4	10254	0 hit	0 hit	
21,1	321,1619	C20 H20 N2 O2	82,88	-7,18	81434	13 hits	6 hits	
21,5	647,3952	C41 H50 N4 O3	98,6	-3,24	272543	0 hit	0 hit	
21,6	631,3996	C41 H50 N4 O2	99,13	1,34	1108368	1hit	1 hit	pléiomutine
24,9	645,3785	C41 H48 N4 O3	93,14	-0,83	36578	0 hit	0 hit	
21,6	717,4350	C45 H56 N4 O4	90,48	-1,8	245905	0 hit	0 hit	
22,0	623,3454	C35 H42 N4 O3	92,8	-0,2	57618	0 hit	0 hit	
22,4	733,4281	C45 H56 N4 O4	93,25	-1,2	254957	0 hit	0 hit	
22,4	615,3690	C40 H47 N4 O5	98,56	-2,42	36985	5 hits	3 hits	pléonutinine
23,2	703,4216	C44H 54 N4 O4	97,48	-3,18	315222	0 hit	0 hit	
23,6	699,3922	C45 H50 N4 O4	94,13	-2,08	1175219	0 hit	0 hit	

Le tableau 6 présente l'ensemble de composés dérèpliqués dans l'extrait alcaloïdique de *P. mutica*. Les composés surlignés en orange correspondent à ceux qui ont été ciblés et isolés dans ce travail. Il indique également les temps de rétentions (Tr), les valeurs m/z , les formules brutes et leurs scores. Ces paramètres ont été définis dans la partie « Démarche de travail » (Chapitre II).

Cette étape de dérèplication a conduit à la détection et à l'isolement par CLHP-préparative de 15 molécules dont 7 nouvelles et 8 connues. Parmi les nouveaux composés, on note 5 dimères de la série des aspidofractanes dont 4 sont liés par un pont méthylène. A noter qu'il s'agit ici des premiers *bis*-indoles aspidofractane avec ce type de liaison, que nous avons nommés « pléiokomenines A–D » (**1-4**). Les pléiokomenines A et B (**1, 2**) ont fait l'objet d'une publication dans le journal « *Organic Letters* » qui constitue la première partie de ce chapitre. Le cinquième *bis*-indole aspidofractane, que nous avons nommé bispléiocarpinium (**5**), présente une liaison carbone-carbone entre les carbones C-3 et C-5'. Deux autres dimères analogues de la pléiomutine ont également été isolés. Il s'agit de la *N*-4'-oxydepléiomutine (**7**) et la 6-oxopléiomutine (**6**) (Figure 35).

Parmi les composés connus isolés dans ce travail, deux sont décrits pour la première fois dans *P. mutica*, il s'agit de la sarpagine ($m/z = 323,2118 [M]^+$; $C_{21}H_{27}N_2O^+$) et du vincosamide ($m/z = 499,1986 [M+H]^+$; $C_{26}H_{30}N_2O_8$). Par contre, les six autres ont déjà été décrits dans le genre *Pleiocarpa*. Ceux sont la pléiocarpine, la pléiocarpine, la pléiocarpamine, la pléiocarpoline, la pléiomutine et la pléiomutinine, d'intérêt pour l'enrichissement de la MIADB.

La présentation des résultats obtenus lors de ces travaux d'isolement et de détermination structurale est divisée en deux parties distinctes.

La première partie (**3.2**) correspond à un article qui s'articule autour des premières molécules isolées dans la zone **D** du réseau moléculaire. Il s'agit des pléiokomenines A et B (**1, 2**). Elle présente aussi l'hémisynthèse de la pléiokomenine A, réalisée à partir de la pléiocarpine et d'un équivalent de formaldéhyde médiée par du triflate de scandium.

La seconde partie (**3.3**), quant à elle porte sur l'isolement et la caractérisation d'autres composés de la zone **D**, les pléiokomenines C et D, ainsi que du bispléiocarpinium localisé dans la zone des *selfloops* et enfin des analogues de la pléiomutine appartenant à la zone **C**.

Les activités antiplasmodiales, antileishmaniennes et cytotoxiques de l'ensemble des nouveaux composés et de l'extrait alcaloïdique de *P. mutica* ont été évaluées.

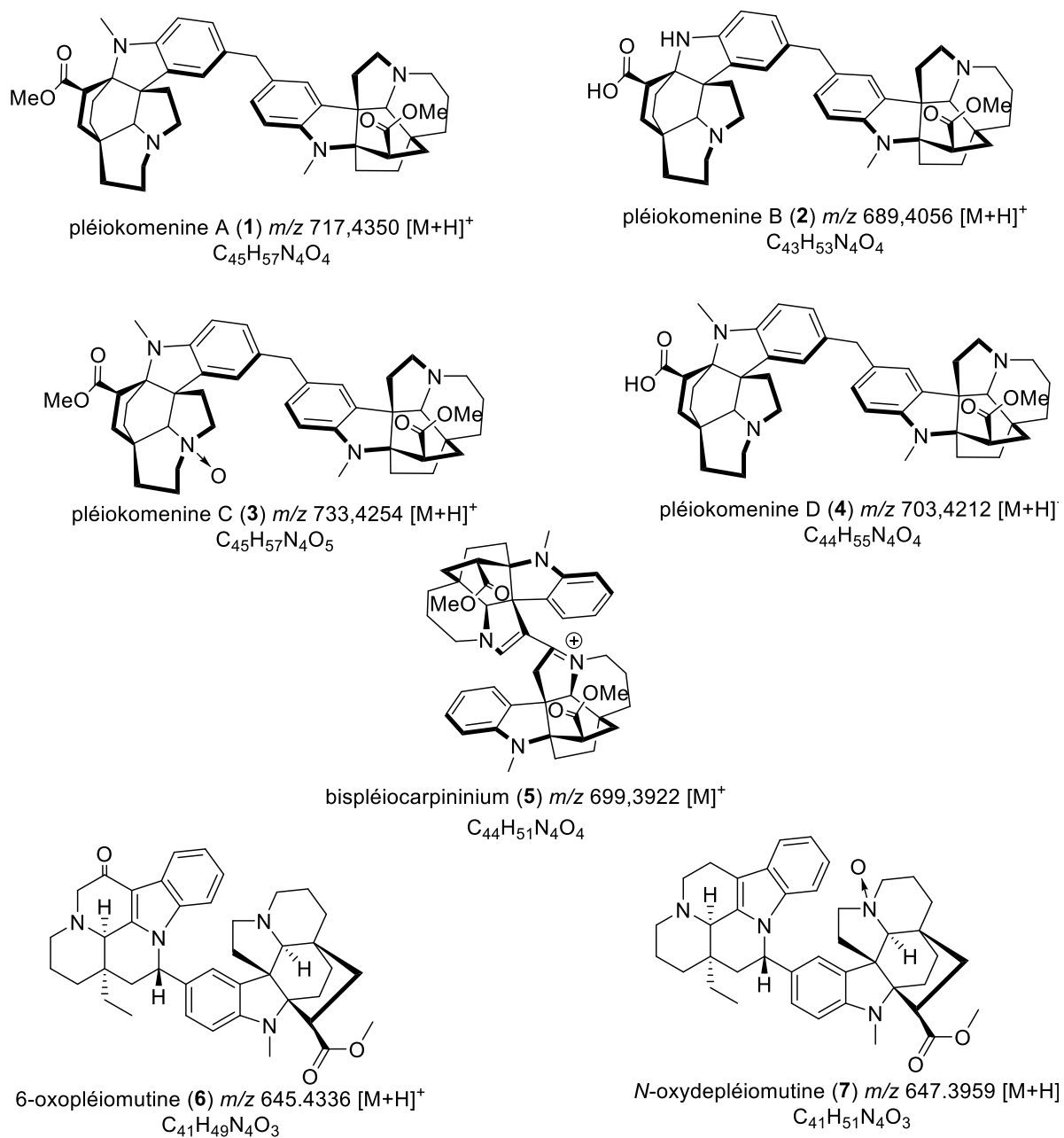


Figure 35. Nouveaux bis-indoles de types aspidofractane-aspidofractane et aspidofractane-éburnamine isolés des écorces de tiges de *P. mutica*

3-7 : configurations absolues restant à confirmer

3.2. Article : *Pléiokomenines A–B, deux alcaloïdes dimères aspidofractanes rattachés par un pont méthylène*

Pléiokomenines A–B: Dimeric Aspidofractinine Alkaloids Tethered with a Methylene Group

Otogo N'ngang E., Genta-Jouve G., Gallard J.-F., Kumulungui B., Mouray E., Grellier P., Evanno L., Poupon E., Champy P., Beniddir M.A.

Article publié dans le journal *Organic Letters* (07/11/2017)¹⁵⁸

DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03098.

RÉSUMÉ

Les pléiokomenines A–B (**1–2**), représentent les premiers exemples d'alcaloïdes indolomonoterpéniques dimères d'aspidofractanes reliés par un pont méthylène. Ils ont été isolés de l'écorce de tige de *Pleiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae). Leurs structures ont été élucidées par une combinaison d'analyses spectroscopiques et de l'hémisynthèse de la pléiokomenine A à partir de la pléiocarpinine et d'un équivalent de formaldéhyde médiée par le triflate de scandium. Les pléiokomenines A (**1**) et B (**2**) ont montré une activité antiplasmodiale modeste, de l'ordre du micromolaire contre la souche FcB1 de *P. falciparum*.

¹⁵⁸ E. Otogo N'Nang Obiang, *et al.*, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6180-6183.

Pleiokomenines A and B: Dimeric Aspidofractinine Alkaloids Tethered with a Methylene Group

Elvis Otogo N'Nang Obiang,^{†,§} Grégory Genta-Jouve,[‡] Jean-François Gallard,[⊥] Brice Kumulungui,[§] Elisabeth Mouray,^{||} Philippe Grellier,^{||} Laurent Evanno,[†] Erwan Poupon,[†] Pierre Champy,^{*,†} and Mehdi A. Beniddir^{*,†,ⓧ}

[†]Équipe "Pharmacognosie-Chimie des substances naturelles" BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

[‡]C-TAC, UMR 8638 CNRS, Faculté de Pharmacie de Paris, Paris-Descartes University, Sorbonne, Paris Cité, 4, Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

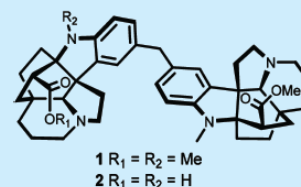
[⊥]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, ICSN UPR 2301, Université Paris-Saclay, 21, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[§]Laboratoire de microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Masuku, BP769 Franceville, Gabon

^{||}Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245), Muséum national d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Universités, CP52, 57, rue Cuvier, 75005 Paris, France

Supporting Information

ABSTRACT: Pleiokomenines A and B (1 and 2), first examples of dimeric aspidofractinine alkaloids linked by a methylene bridge, were isolated from the stem bark of *Pleiocarpa mutica*. Their structures were elucidated by a combination of spectroscopic analyses and semisynthetic derivatization of pleiocarpinine (3) and a formaldehyde equivalent mediated by scandium trifluoromethanesulfonate. Pleiokomenines A (1) and B (2) showed moderate antiplasmodial activities in the micromolar range against the FcB1 strain.



Aspidofractinine alkaloids, often called *Kopsia* alkaloids, are a small family of monoterpene indole alkaloids that feature a cage-like bicyclo[2.2.2]octane central to a polycyclic system. These alkaloids have attracted the interest of synthetic chemists because of their chemical structures^{1–3} and a broad range of biological activities.^{4–6} Aspidofractinine alkaloids are at present limited to five genera of the family Apocynaceae, namely, *Aspidosperma*, *Hunteria*, *Kopsia*, *Melodinus*, and *Pleiocarpa*. Recently, our group has been engaged in a research program directed toward the streamlined reinvestigation of previously studied Apocynaceae plants.^{7–9} Our experience in this area has taught us that much unique specialized metabolites structures remain to be discovered in these understudied species. These results fueled our endeavors toward the investigation of the stem bark of *Pleiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae), which appears to be a poorly documented member of the Apocynaceae family.¹⁰ Phytochemical endeavors spanning the past 50 years have resulted in the isolation of 19 indole alkaloids from this plant.¹⁰ Remarkably, the majority of these compounds were isolated in the 1960s.^{11–17} Herein, we report the isolation, structural elucidation, and biological evaluation of pleiokomenines A and B (1 and 2), representing the first examples of monoterpene bisindole alkaloids with a methylene bridge linking two aspidofractinine-type units.¹⁸ So far, among over 300 described bisindole alkaloids, the methylene bridge is encountered in 10 representatives, namely by chronological appearance: vindoline,¹⁹ voacolinol,²⁰ N(4), N(4′)-bis[(+)-N(1)-meloninium],²¹

methylene, 10,10′-bis[(+)-N(1)-norvallesamidine],²¹ methylenebismehranine,²² raureflexine,²³ biscarpamontamine A,²⁴ voacandimine C,²⁵ and meloyines II–III.²⁶

Pleiokomenine A (1) was obtained as a brown amorphous solid. Its molecular formula was determined as C₄₅H₅₆N₄O₄ according to its HRESIMS peak at *m/z* 717.4350 [M + H]⁺. Its IR spectrum showed an absorption band at 1756 cm⁻¹, corresponding to an ester function. The UV spectrum showed absorption maxima at 207, 265, and 305 nm typical of an indoline chromophore. The HRESIMS analysis indicated that compound 1 should possess 45 carbons, but the ¹³C NMR spectrum accounted only for 23 carbon signals (Table 1), which were assigned by the aid of HSQC as two methyl carbons, nine methylene carbons, five methine carbons, and seven quaternary carbons including one carbonyl carbon. In addition, the ¹H NMR spectrum accounted for roughly half of the expected proton signals. A thorough analysis of these data led us to suspect that 1 might be an homodimeric compound. Careful examination of the ¹H and ¹³C NMR spectra indicated that the NMR data of 1 were coincidental with those of the well-known aspidofractinine alkaloid pleiocarpinine²⁷ (3) (Figure 1), previously described in this plant,¹² which was also isolated in the course of this work. The main differences between 1 and pleiocarpinine (3) were the loss of the aromatic signals H-10 in 3 and the gain of an aromatic

Received: October 3, 2017

Published: November 7, 2017

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Data for Pleiokomenines A and B (1 and 2)^a

position	1		2	
	δ_{H} , mult (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult (J, Hz)	δ_{C}
2		70.6		71.1
3	3.32, m	46.6	2.82, m; 2.98, br t	47.1
5	3.49, m	50.3	3.17, m; 2.80, m	49.9*
6	1.76, dt (15.2, 9.6); 2.78, m	33.6	1.23, m; 2.50, m	35.2
7		57.3		56.4
8		137.2		140.2
9	7.43, br s	122.3	6.83, br s	120.7
10		133.8		131.6
11	6.91, dd (7.8, 1.6)	127.9	6.80, dd (7.6, 1.6)	126.8**
12	6.35, d (8.0)	108.3	6.32, d (8.2)	107.5
13		149.0		149.5
14	1.97, m; 1.65, m	15.7	1.21, m; 1.75, m	16.9
15	1.61, m; 1.43, m	34.1	1.51, m; 1.21, m	35.7
16	2.99, dd (11, 8.5)	41.5	3.04, t (9.4)	41.0
17	2.81, m; 1.48, m	32.3	2.60, m; 1.39, m	31.5
18	1.51, m; 1.41, m	23.8	1.51, m; 1.18, m	23.8
19	1.40, m	33.6	1.14, m; 1.43, m	32.7
20		30.0		30.6
21	3.50, s	66.7	2.78, br s	68.3
22	3.75, overlap	41.4	3.71, br s	40.5
2'		70.6		66.0
3'	3.32, m	46.6	2.82, m; 2.98, br t	47.2
5'	3.49, m	50.3	3.10, m; 2.84, m	49.8*
6'	1.76, dt (15.2, 9.6); 2.78, m	33.6	2.44, m; 1.35, m	35.8
7'		57.3		57.3
8'		137.2		140.7
9'	7.43, br s	122.3	6.90, br s	121.8
10'		133.8		134.5
11'	6.91, dd (7.8, 1.6)	127.9	6.80, dd (7.6, 1.6)	126.9**
12'	6.35, d (8.0)	108.3	6.65, d (8.2)	112.2
13'		149.0		146.0
14'	1.97, m; 1.65, m	15.7	1.23, m; 1.78, m	17.1
15'	1.61, m; 1.43, m	34.1	1.51, m; 1.21, m	35.6
16'	2.99, d (11, 8.5)	41.5	2.83, m	41.8
17'	2.81, m; 1.48, m	32.3	1.60, m	31.3
18'	1.51, m; 1.41, m	23.8	1.39, m; 1.10, m	33.2
19'	1.40, m	33.6	1.32, m	31.7
20'		30.0		32.1
21'	3.50, s	66.7	2.82, s	68.4
16-CO ₂ Me	3.76, s	52.5	3.65, s	51.8
16-CO ₂ Me		174.6		174.3
1-N-Me	2.69, s	31.1	2.63, s	30.9
16'-CO ₂ Me	3.76, s	52.5		
16'-CO ₂ Me		174.6		
1'-N-Me	2.69, s	31.1		
16'-COOH				176.0

^a1 in CDCl₃; 2 in DMSO-*d*₆. ^1H and ^{13}C : 400 and 100 MHz for 1; 600 and 150 MHz for 2. */** attributions can be exchanged.

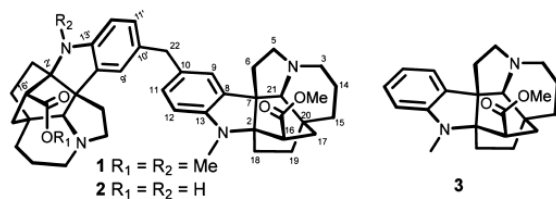


Figure 1. Structures of pleiokomenines A and B (1 and 2) and (–)-pleiocarpinine (3).

quaternary carbon signal (δ_{C} 133.8) and new methylene signals ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 41.4/3.75) in 1. The HMBC correlations from H₂-22 to C-9/C-9', C-10/C-10', and C-11/C-11' suggested that the methylene group served as a bridge linking the two indoline moieties at C-10 and C-10' (Figure 2). The NOESY correlations observed between N-Me and H-16, H-12 and between H-21 and H-9 confirmed that 1 has the same relative configuration as pleiocarpinine (3) (Figure 2).

In an attempt to assign the absolute configuration of 1, its assembly from isolated (–)-pleiocarpinine (3) was envisioned. Since the absolute configuration of 3 was established on the basis

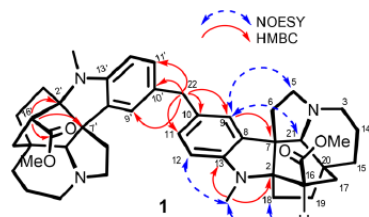


Figure 2. Selected 2D NMR correlations for 1.

of chemical correlation between aspidospermane and aspidofractinine alkaloids by Schmid et al.²⁸ in 1964 through the comparison of ORD (optical rotation dispersion) curves,²⁹ quantum chemical ECD calculations were performed to ascertain the absolute configuration of 3.³⁰ Finally, the theoretically calculated ECD spectrum of 3 was in good agreement with the experimental ECD spectrum (Figure 3), thus confirming the initial proposed absolute configuration.

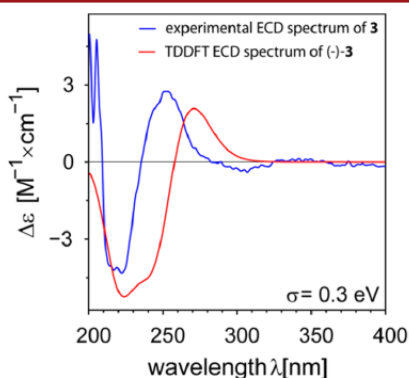
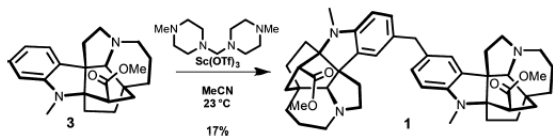


Figure 3. Calculated and experimental ECD spectra of 3.

Having established the stereochemistry of 3, we next focused upon its dimerization to afford pleiokomenine A (1). According to the structure of 1, we first set out to perform the dimerization using formaldehyde. However, this attempt turned out to be fruitless, as no desired product was detected. Further investigation revealed that the use of a combination of scandium trifluoromethanesulfonate and bis(4-methylpiperazin-1-yl)methane³¹ afforded (–)-pleiokomenine A in 17% isolated yield (Scheme 1). Semisynthetic pleiokomenine A was found to be identical in all spectroscopic respects to the natural product.³² Thus, its absolute configuration was assigned as shown.

Pleiokomenine B (2) was isolated as a brown amorphous solid. Its molecular formula was determined to be C₄₃H₅₂N₄O₄ from its protonated molecular ion at *m/z* of 689.4056 [M + H]⁺ in the HRESIMS, indicating a molecular weight of 28 mass units lower

Scheme 1. Dimerization of (–)-Pleiocarpinine (3) to (–)-Pleiokomenine A (1)



than 1. In its ¹H NMR spectrum (Table 1), the signals observed closely matched those of 1. The main differences between 2 and 1 were the loss of one of the two *N*-methyl groups and one of the two methoxy groups. These observations, in combination with an analysis of COSY, HSQC, and HMBC spectra, indicated that compound 2 corresponds to 1'-*N*-demethyl 16'-demethoxypleiokomenine A. Collectively, HMBC correlations arising from (i) H-16 to C-2 and CO₂Me (δ_C 174.6), (ii) OMe (δ_H 3.65) to CO₂Me (δ_C 174.6), and (iii) *N*-Me (δ_H 2.63) to C-2 (Figure 4),

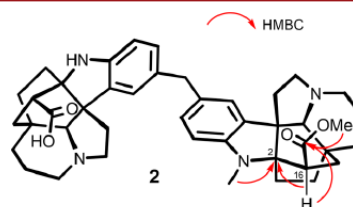
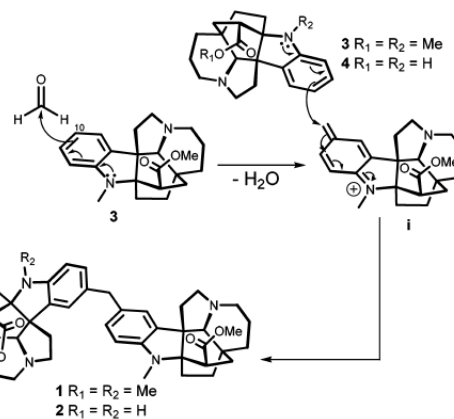


Figure 4. Selected HMBC correlations for 2.

confirmed the location of the *N*-Me group and the ester group on the same indoline moiety. Taking biosynthetic considerations into account, the relative configuration of 2 was determined to be identical with that of 1, which was also supported by the similarity of the NOESY correlations. The absolute configuration of compound 2 was determined by comparing its experimental ECD spectrum with the spectrum of 1 (Supporting Information).

A possible biogenetic pathway for pleiokomenines A and B is presented in Scheme 2. The sequence is initiated by an

Scheme 2. Plausible Biosynthetic Pathway of Pleiokomenines A and B (1 and 2)



hydroxymethylation of (–)-pleiocarpinine (3), in which the electron-rich C-10 of 3 acts as the nucleophile to react with formaldehyde,³³ whose presence may result from microbial degradation reactions.³⁴ Then, a conjugate addition of another molecule of (–)-pleiocarpinine (3) or kopsinic acid (4)³⁵ onto the intermediate i should lead to dimers 1 and 2, respectively. Although the bioinspired assembly of 1 using formaldehyde and 3 could not occur under mild conditions, at this stage, it is difficult to completely rule out the possibility that 1 is nonenzymatically produced.

Pleioikomenines A and B showed moderate antiplasmodial activity toward the chloroquine-resistant strain FcB1 of *P. falciparum* with IC₅₀ of 3.7 ± 0.2, 44.5 ± 5.2 μM, respectively.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03098.

Experimental procedures; 1D and 2D NMR spectra for 1 and 2 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: pierre.champy@u-psud.fr.

*E-mail: mehdi.beniddir@u-psud.fr.

ORCID

Mehdi A. Beniddir: 0000-0003-2153-4290

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to ANBG (Agence Nationale des Bourses du Gabon) for the fellowship 828988C (E.O.N). In addition, this work was supported by French ANR grant ANR-15-CE29-0001. We thank Karine Leblanc (BioCIS) for her assistance in the preparative HPLC purifications and Camille Dejean (BioCIS) for her assistance in NMR analyses.

■ REFERENCES

- (1) Jones, S. B.; Simmons, B.; Mastracchio, A.; MacMillan, D. W. C. *Nature* 2011, 475, 183–188.
- (2) Gagnon, D.; Spino, C. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 6035–6041.
- (3) Wu, X.; Huang, J.; Guo, B.; Zhao, L.; Liu, Y.; Chen, J.; Cao, W. *Adv. Synth. Catal.* 2014, 356, 3377–3382.
- (4) Zeng, T.; Wu, X.-Y.; Yang, S.-X.; Lai, W.-C.; Shi, S.-D.; Zou, Q.; Liu, Y.; Li, L.-M. *J. Nat. Prod.* 2017, 80, 864–871.
- (5) Yap, W.-S.; Gan, C.-Y.; Sim, K.-S.; Lim, S.-H.; Low, Y.-Y.; Kam, T.-S. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 230–239.
- (6) Subramaniam, G.; Hiraku, O.; Hayashi, M.; Koyano, T.; Komiyama, K.; Kam, T.-S. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 53–57.
- (7) Beniddir, M. A.; Martin, M.-T.; Tran Huu Dau, M.-E.; Rasoanaivo, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. *Tetrahedron Lett.* 2013, 54, 2115–2119.
- (8) Beniddir, M. A.; Martin, M. T.; Dau, M. E. T. H.; Grellier, P.; Rasoanaivo, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. *Org. Lett.* 2012, 14, 4162–4165.
- (9) Fox Ramos, A. E.; Alcover, C.; Evanno, L.; Maciuk, A.; Litaudon, M.; Duplais, C.; Bernadat, G.; Gallard, J.-F.; Jullian, J.-C.; Mouray, E.; Grellier, P.; Loiseau, P. M.; Pomel, S.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A. *J. Nat. Prod.* 2017, 80, 1007–1014.
- (10) Omoyeni, O.; Hussein, A.; Iwuoha, E.; Green, I. *Phytochem. Rev.* 2017, 16, 97–115.
- (11) Kump, W. G.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* 1961, 44, 1503–1516.
- (12) Kump, W. G.; Le Count, D. J.; Battersby, A. R.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* 1962, 45, 854–858.
- (13) Achenbach, H.; Biemann, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, 4177–4181.
- (14) Achenbach, H.; Biemann, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, 4944–4950.
- (15) Achenbach, H.; Biemann, K. *Tetrahedron Lett.* 1965, 6, 3239–3243.
- (16) Thomas, D. W.; Achenbach, H.; Biemann, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 1537–1544.
- (17) Thomas, D. W.; Achenbach, H.; Biemann, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 3423–3426.
- (18) For another example of aspidofractinine–aspidofractinine type bisindole alkaloid linked by a C–C bond, see (nitaphylline): Kam, T.-S.; Lim, T.-M.; Subramaniam, G.; Tee, Y.-M.; Yoganathan, K. *Phytochemistry* 1999, 50, 171–175.
- (19) Rabaron, A.; Plat, M.; Potier, P. *Pl. Med. Phytother.* 1973, 7, 53–58.
- (20) Govindachari, T. R.; Sandhya, G.; Chandrasekharan, S.; Rajagopalan, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1987, 1137–1138.
- (21) Mehri, H.; Baassou, S.; Plat, M. *J. Nat. Prod.* 1991, 54, 372–379.
- (22) Lien, T. P.; Kamperdick, C.; Van Sung, T.; Adam, G.; Ripperger, H. *Phytochemistry* 1998, 49, 1797–1799.
- (23) Chatterjee, A.; Ghosh, A. K.; Das, P. C.; Bhowmik, T.; Banerji, J. *J. Indian Chem. Soc.* 1998, 75, 695.
- (24) Zaima, K.; Hirata, T.; Hosoya, T.; Hirasawa, Y.; Koyama, K.; Rahman, A.; Kusumawati, L.; Zaini, N. C.; Shiro, M.; Morita, H. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1686–1690.
- (25) Kitajima, M.; Iwai, M.; Kogure, N.; Kikura-Hanajiri, R.; Goda, Y.; Takayama, H. *Tetrahedron* 2013, 69, 796–801.
- (26) Zhang, B.-J.; Liu, C.; Bao, M.-F.; Zhong, X.-H.; Ni, L.; Wu, J.; Cai, X.-H. *Tetrahedron* 2017, 73, 5821–5826.
- (27) Kuehne, M. E.; Seaton, P. J. *J. Org. Chem.* 1985, 50, 4790–4796.
- (28) Guggisberg, A.; Gorman, A. A.; Bycroft, B. W.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* 1969, 52, 76–89.
- (29) Morita, H.; Nugroho, A. E. *Heterocycles* 2012, 84, 101–113.
- (30) Even though the optical rotation data of the literature matched very well those of the isolated 3, ECD calculation was performed because it is well known that both the sign and magnitude of the optical rotation change with the salt form. For example, see: Baran, P. S.; Li, K.; O'Malley, D. P.; Mitsos, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2006, 45, 249–252.
- (31) Mewald, M.; Medley, J. W.; Movassaghi, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2014, 53, 11634–11639.
- (32) It must be pointed out that ¹H NMR chemical shifts of H-9, H-9', and H-21 were found to be particularly concentration dependent, and up to 0.3 ppm differences were observed at different concentrations. Interestingly, this shielding was also observed on the ¹H NMR spectrum of pleioikomenine B (2).
- (33) For examples involving formaldehyde in the formation of dimeric natural products, see: (a) Reference 20. (b) Gorman, A. A.; Dastoor, N. J.; Hesse, M.; Philipsborn, W. V.; Renner, U.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* 1969, 52, 33–55. (c) Okada, M.; Sugita, T.; Wong, C. P.; Wakimoto, T.; Abe, I. *J. Nat. Prod.* 2017, 80, 1205–1209. (d) Fu, P.; Legako, A.; La, S.; MacMillan, J. B. *Chem. - Eur. J.* 2016, 22, 3491–3495.
- (34) Dewick, P. M. In *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd ed.; Wiley: Chichester, 2009; pp 163–165.
- (35) Kitajima, M.; Anbe, M.; Kogure, N.; Wongseripatana, S.; Takayama, H. *Tetrahedron* 2014, 70, 9099–9106.

3.3. Supporting informations Otogo N’Nang Obiang E. et al. *Org. Lett.* 2017

Supporting Information

Pleiokomenines A–B: Dimeric Aspidofractinine Alkaloids Tethered with a Methylene Group
Elvis Otogo N’Nang Obiang,^{†,§} Grégory Genta-Jouve,[‡] Jean-François Gallard,[⊥] Brice
Kumulungui,[§] Elisabeth Mouray,[⊥] Philippe Grellier,[⊥] Laurent Evanno,[†] Erwan Poupon,[†] Pierre
Champy,^{*,†} and Mehdi A. Beniddir ^{*,†}

[†] Équipe “Pharmacognosie-Chimie des substances naturelles” BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.

[‡] C-TAC, UMR 8638 CNRS, Faculté de Pharmacie de Paris, Paris-Descartes University, Sorbonne, Paris Cité, 4, Avenue de l’Observatoire, 75006 Paris, France.

[⊥] Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, ICSN UPR 2301, Université Paris-Saclay, 21 avenue de la Terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

[§] Laboratoire de microbiologie, Université des Sciences et Technique de Masuku, BP769, Franceville, Gabon.

[⊥] Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245), Muséum national d’Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Universités, CP52, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France.

Pierre.champy@u-psud.fr ; mehdi.beniddir@u-psud.fr

3.3.1. Experimental section:

3.3.1.1. General experimental procedures

The optical rotations were measured in the methanolic solution at 25 °C on a Polar 32 polarimeter. Ultraviolet (UV) spectra were measured on a Lightwave II+ WPA 7126 V. 1.6.1 spectrophotometer. CD spectra were measured at 25 °C on a JASCO J-810 spectropolarimeter. Infrared (IR) spectra were recorded with a Perkin-Elmer® type 257 spectrometer. Exact mass HRESIMS data were recorded using an Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in positive ion mode. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker AM-400 (400 MHz) and AM-600 (600 MHz) apparatus using CDCl₃ and DMSO-*d*₆ as solvents. The solvent signals were used as references. Multiplicities are described by the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, bs = broad singlet. Xbridge® preparative C18 columns (150 × 19 mm, i.d. 5 μm, Waters) were used for preparative HPLC separations with a Waters Delta Prep equipped with a binary pump (Waters 2525) and a UV-visible diode array detector (190-600 nm, Waters 2996). Silica 120 g and 24 g Grace® cartridges were used for flash chromatography with an Armen Instrument – Spot Liquid Chromatography Flash apparatus. Chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich.

3.3.1.2. Plant material

The stem bark from *Pleiocarpa mutica* Benth. was collected in Bambidi forest, Gabon in February 2015. Botanical identification was confirmed by Prof. Henri Paul Bourobou Bourou and Mr. Raoul Niangadouma of the Institute of Pharmacopoeia and Traditional Medicine (IPHAMETRA) of Libreville. A herbarium voucher specimen (6558) was deposited at the National Herbarium of Gabon (Libreville).

3.3.1.3. Extraction and isolation

The dried and powdered stem bark of *P. mutica* (2.5 kg) was alkalinized with NH₄OH (25%) and extracted with CH₂Cl₂ (10 L, room temperature, for 24 h). The CH₂Cl₂ crude extract was filtered under vacuum and concentrated by rotatory evaporation. This extract was submitted to liquid/liquid extraction with a solution of hydrochloric acid 1% (2.5 L), followed by

alkalinization of the aqueous fraction with concentrated NH_4OH solution until pH 10, and extraction of liberated alkaloids with EtOAc. The EtOAc fraction was reduced to dryness by rotatory evaporation at 35 °C yielding 32 g of an alkaloid extract. A part of this residue (15 g) was fractionated by flash chromatography on Silica 120 g Grace[®] cartridge using a gradient of CHCl_3 with increasing proportions of MeOH (100:0 to 0:100). The flow rate was set at 80 mL/min. The flash chromatography separation yielded 18 fractions according to their TLC profiles, which were analyzed by HPLC-TOF-HRESIMS in order to localize the potential new compounds. The fractions F.12 and F.14 were selected for purification by preparative HPLC-UV using an Xbridge[®] preparative C_{18} columns (150 × 19 mm, i.d. 5 μm , Waters) with a linear gradient elution of MeOH-H₂O (0.1% formic acid). The flow rate was 17 mL/min and UV absorbance was detected at 254 nm and 280 nm. Fraction 12 (673 mg) was purified with a preparative HPLC-UV using a gradient of MeOH-H₂O (0.1% formic acid) (30% to 65% MeOH in 36 min) and afforded pleiokomenine A (**1**) (8.5 mg) and pleiocarpinine (**3**) (12 mg). Fraction 14 (373 mg) was purified with a preparative HPLC-UV using a gradient of MeOH-H₂O (0.1% formic acid) (35% to 70% MeOH in 41 min) and afforded pleiokomenine B (**2**) (5.5 mg).

Pleiokomenine A (1): brown amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{19} -80$ (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 206.7 (4.03), 265.4 (3.47), 305 (3.01); IR ν_{max} 1756, 1360, 1248, 1039, 757 cm^{-1} ; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 717.4350 (calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_4$, 717.4374).

Pleiokomenine B (2): brown amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{19} +20$ (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 226.8 (3.81), 259.7 (3.53), 293.4 (3.25); IR ν_{max} 1756, 1460, 1249, 1038, 755 cm^{-1} ; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 689.4056 (calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_4$, 689.4061).

3.3.1.4. Unsuccessful conversion of **1** from **3**

To a solution of (–)-pleiocarpinine (**3**, 2 mg, 5.6 μmol , 1 equiv) in THF (1 mL), 2.8 mL of 37% formaldehyde solution was added, and then stirred at room temperature for 48 hours. LC-MS analysis did not detect the desired product (pleiokomenine A). (–)-pleiocarpinine (**3**, 1.5 mg) was recovered.

3.3.1.5. Semisynthesis of **1** from **3**

Scandium trifluoromethanesulfonate (61.9 mg, 125.1 μmol , 3.00 equiv) was added as a solid

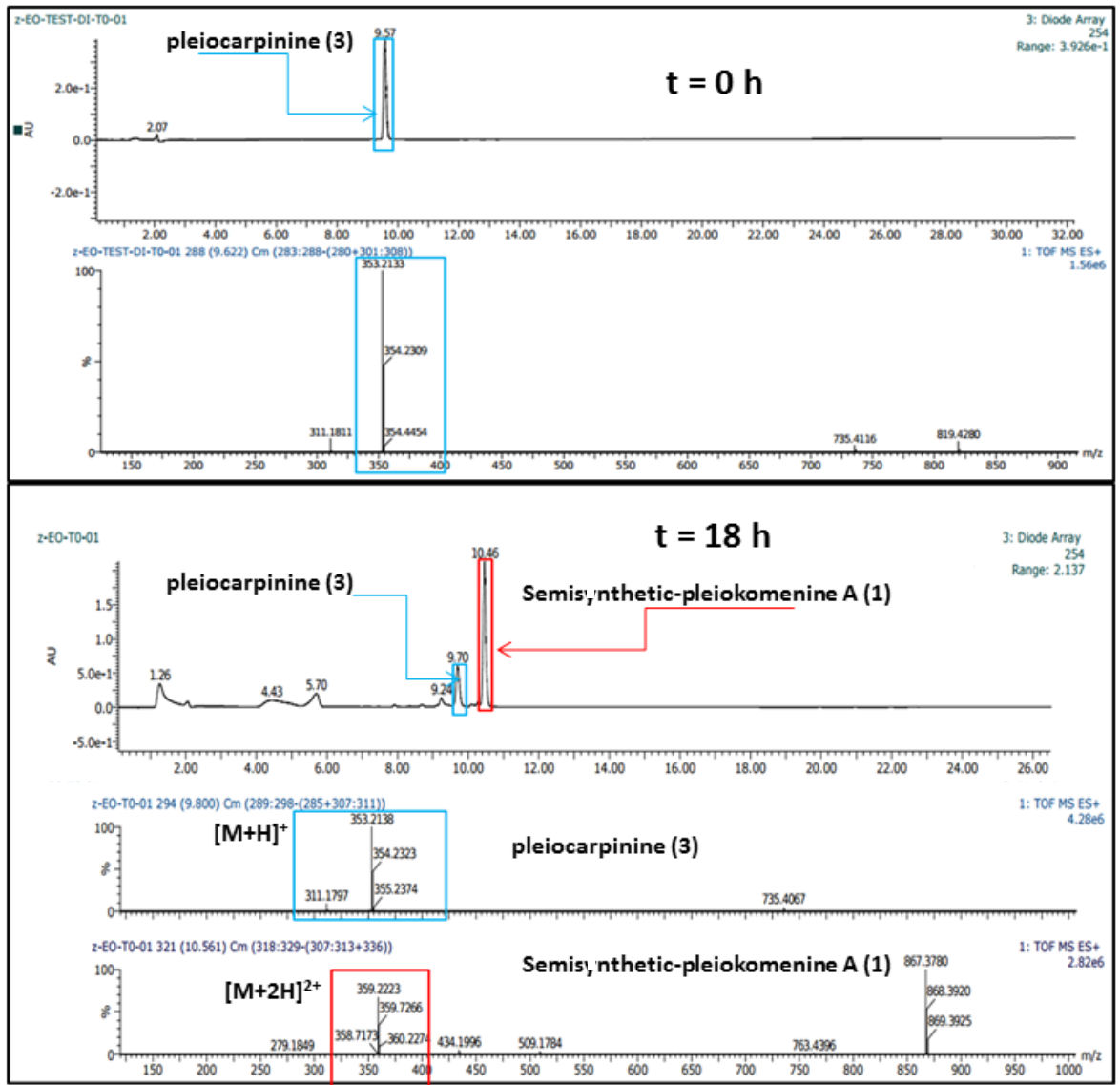
to a solution of (-)-pleiocarpinine (**3** 14.73 mg, 41.7 μmol , 1 equiv) and bis(4-methylpiperazin-1-yl)methane (4.3 mg, 20.8 μmol , 0.50 equiv) in acetonitrile (0.3 mL) at 23 °C. After 18 h, saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (10 mL) was added dropwise. Dichloromethane (10 mL) was added to the mixture and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 \times 10 mL). The combined organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate, were filtered, and were concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by preparative HPLC using a gradient of MeOH–H₂O (0.1% formic acid) (30% to 65% MeOH in 36 min) to give (-)-pleiokomenine A (**1**, 5 mg, 17%) as a brown amorphous solid.

FTIR (thin film) cm^{-1} : 1759, 1360, 1248, 1039, 757.

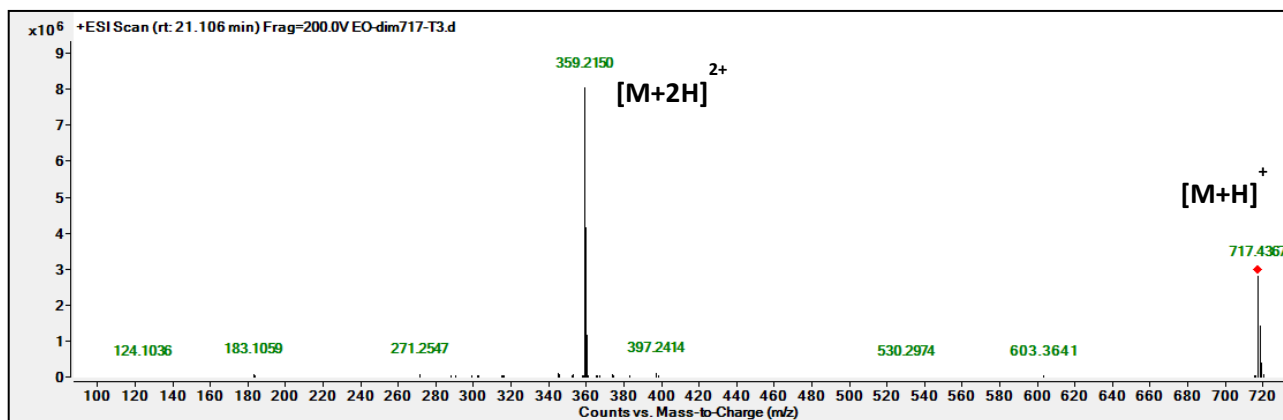
$[\alpha]_{\text{D}}^{19} = -70$ (c 0.05, MeOH) {natural: $[\alpha]_{\text{D}}^{19} -80$ (c 0.05, MeOH)}.

HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 717.4367 (calcd for C₄₅H₅₆N₄O₄, 717.4374).

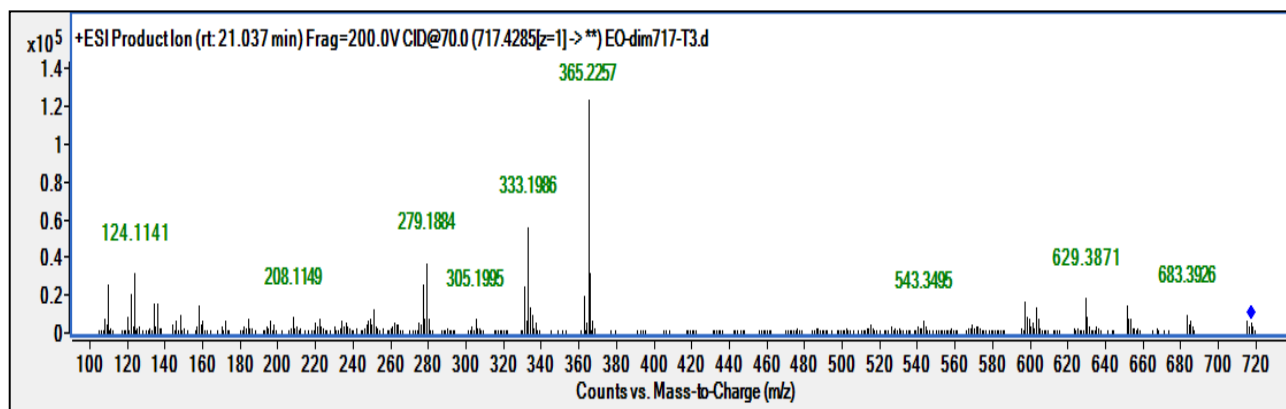
3.3.1.6. LC-MS analysis of ($\lambda=254$ nm) for the formation of 1 from 3



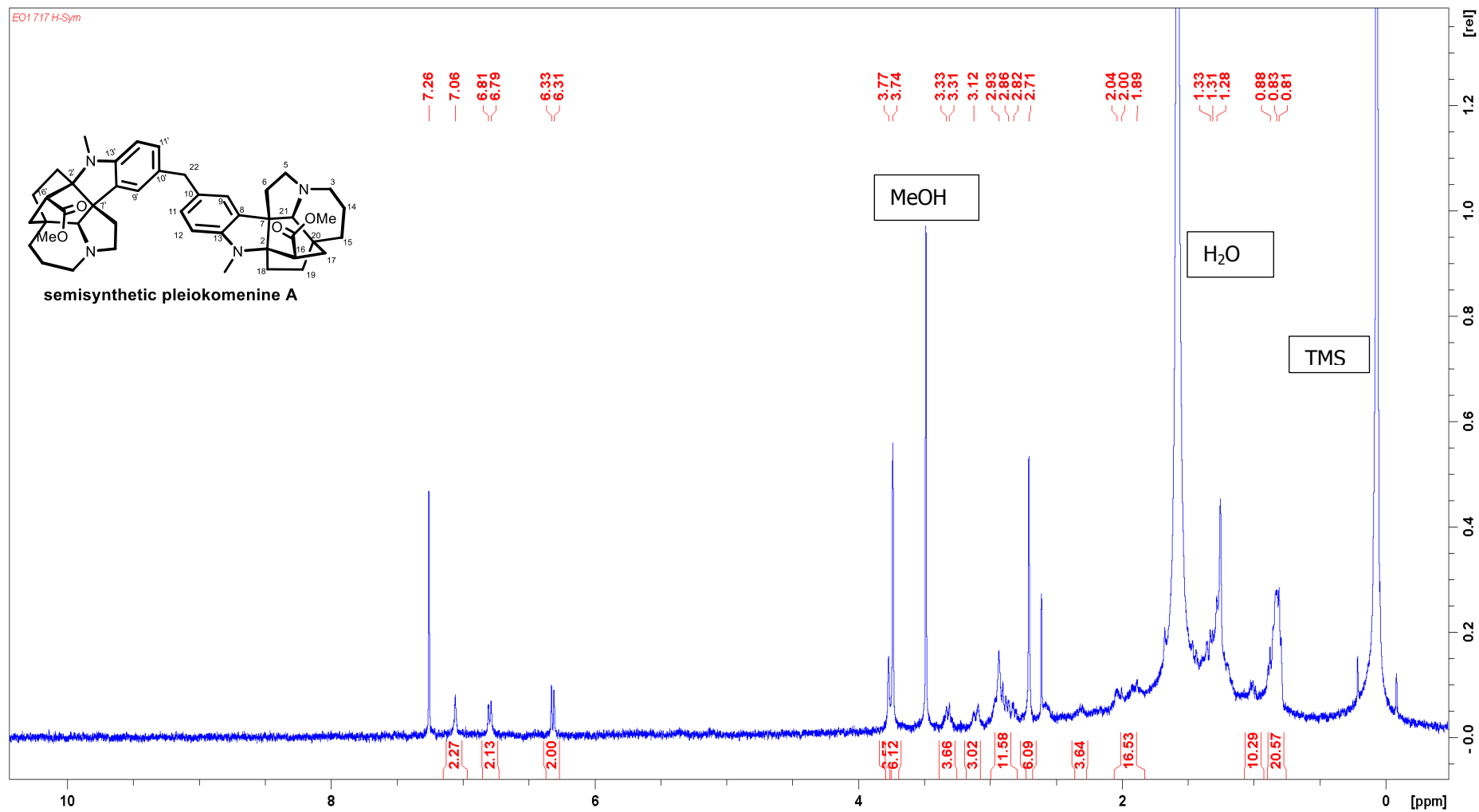
3.3.1.7. HRESIMS spectrum of semisynthetic pleiokomenine A



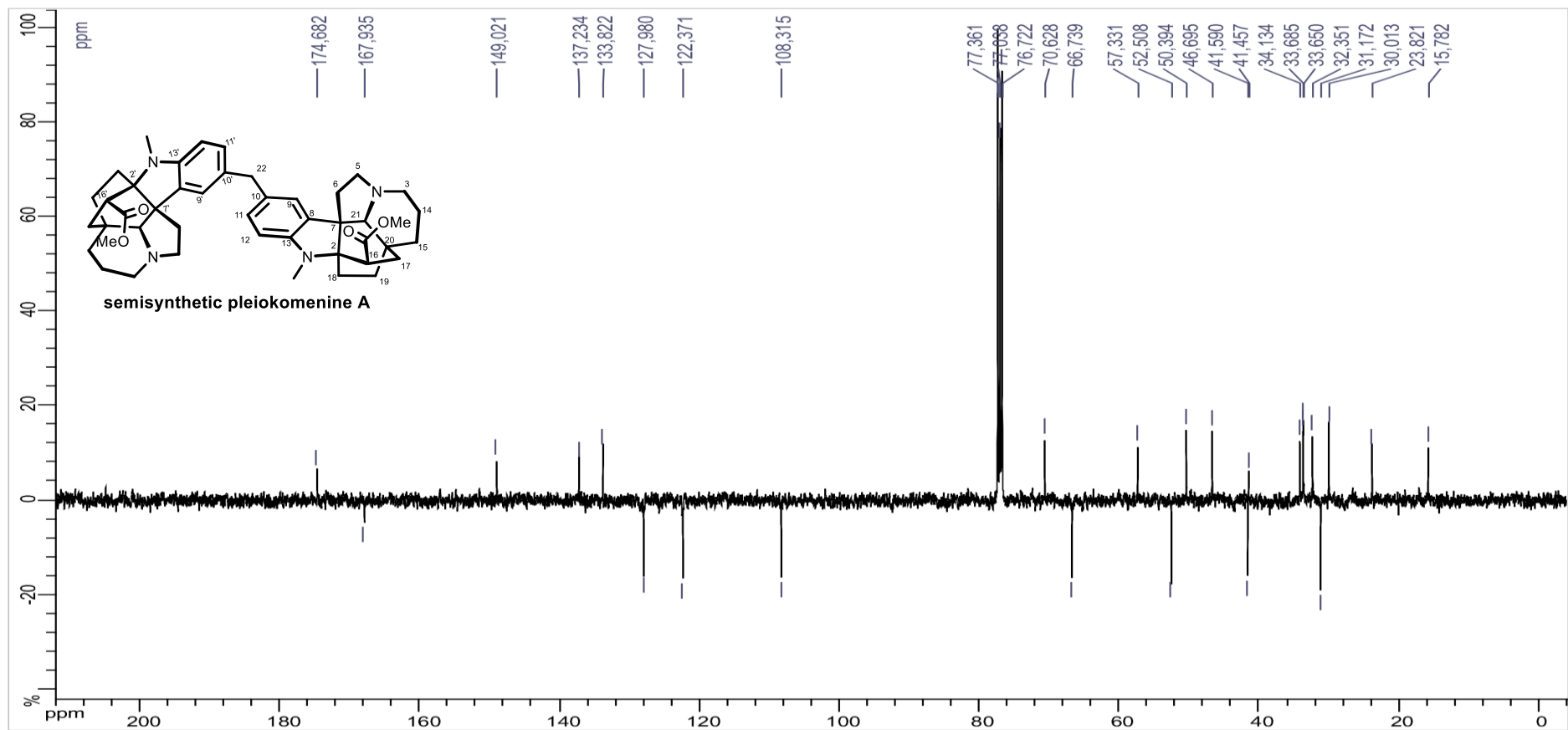
3.3.1.8. HRESIMS/MS spectrum of semisynthetic pleiokomenine A



3.3.1.9. ¹H NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) of semisynthetic pleiokomenine A



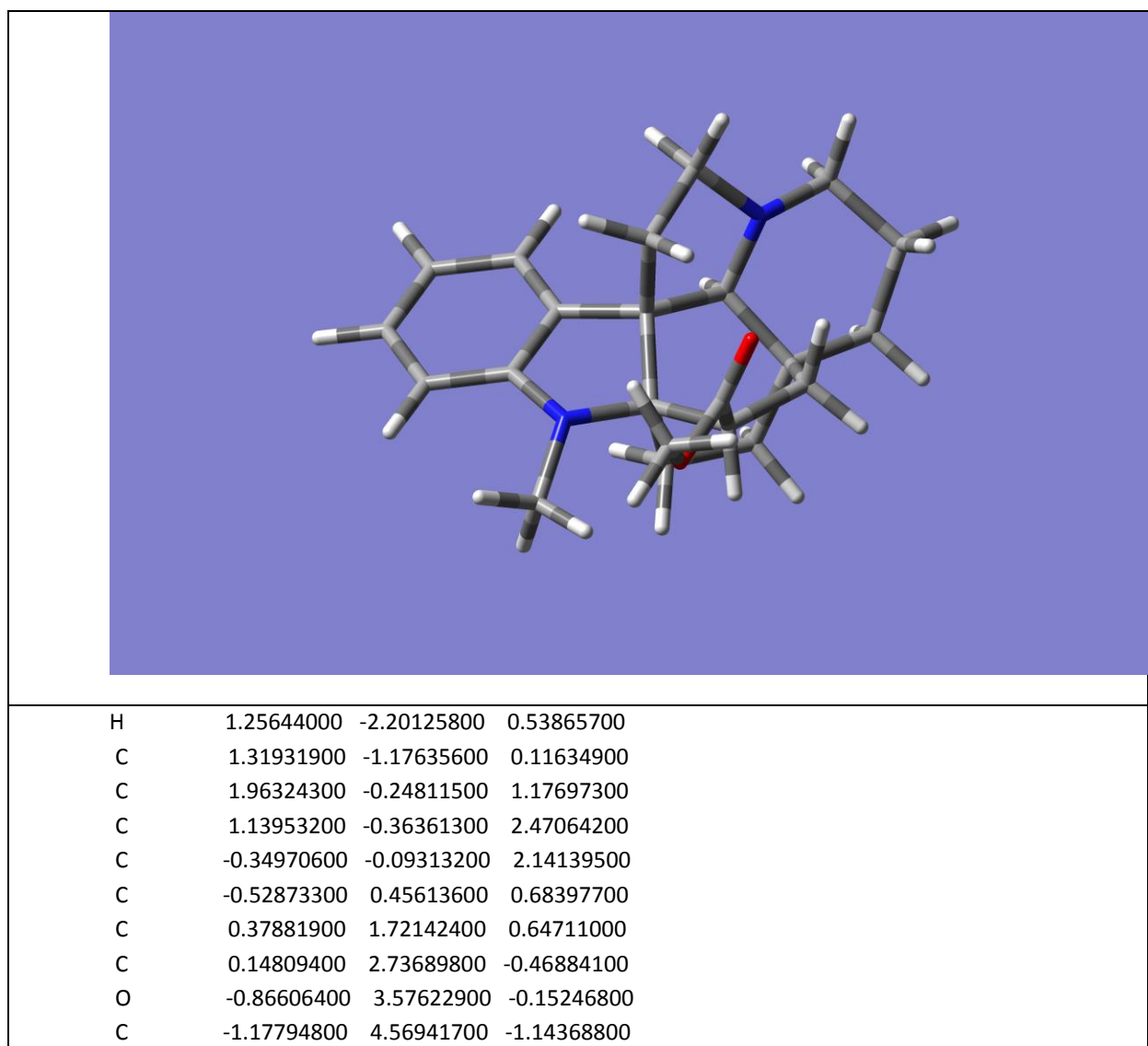
3.3.1.10. ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, CDCl_3) of semisynthetic pleiokomenine A



3.3.1.11. Computational methods

All calculations have been performed using Gaussian 09W.¹⁵⁹ After geometry optimization of the most stable conformer using the wB97XD method at the 6-31g(d), a frequency calculation at the same level of theory was initiated to confirm the presence of a real minimum (no imaginary frequency). TDDFT was then employed to predict the rotational strengths of the transition states (n=6) using the B3LYP method at the b3lyp/6-311+g(d,p) level. ECD spectrum was then generated using SpecDis (using value of 0.3 eV).¹⁶⁰

3.3.1.12. DFT optimized geometry of 3



¹⁵⁹ M. J. Frisch, *Gaussian 09, Revision A.02*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT 2009,

¹⁶⁰ T. Bruhn, *et al.*, *SpecDis Version 2010*, 1, 51.

O	0.79053400	2.85551300	-1.49112400
C	1.85902500	1.21737200	0.67899000
N	-1.96977000	0.58687400	0.36205900
C	-2.83462800	1.43324600	1.17107900
C	-2.40331500	-0.72446900	0.08409300
C	-3.70072800	-1.23388400	0.11853400
C	-3.89149700	-2.59002000	-0.18541900
C	-2.81649200	-3.41987900	-0.49818600
C	-1.51191800	-2.89778700	-0.52819200
C	-1.30983400	-1.55927600	-0.23506100
C	-0.08306600	-0.66599600	-0.31200900
C	0.11782700	-0.31454700	-1.83364100
C	1.25423700	-1.26517300	-2.24484200
N	2.12166100	-1.14033300	-1.09275800
C	3.42938700	-1.73689200	-0.96604900
C	4.21744600	-0.91356300	0.07060100
C	3.42177600	-0.71902400	1.37868300
H	1.51966700	0.34817800	3.21480700
H	1.25779500	-1.36337200	2.90742800
H	-0.77902200	0.63439200	2.83943100
H	-0.93653100	-1.01023100	2.24071900
H	0.16248000	2.27812600	1.56621200
H	-2.01411400	5.13753000	-0.73495800
H	-1.45955200	4.09362900	-2.08652400
H	-0.31747900	5.22086000	-1.31697400
H	2.45045400	1.87137800	1.33166100
H	2.27693100	1.29373600	-0.32636800
H	-2.35091700	2.39675200	1.33343100
H	-3.09776600	0.98637200	2.14366800
H	-3.76487700	1.62146800	0.62432300
H	-4.54764800	-0.60803400	0.38252100
H	-4.89849100	-2.99900100	-0.16019800
H	-2.98451500	-4.47071700	-0.71634600
H	-0.67091500	-3.54325600	-0.77005000
H	0.45994200	0.70868600	-1.97891800
H	-0.80111600	-0.46291900	-2.40565800
H	1.76887700	-0.93720500	-3.15583300
H	0.88012900	-2.29380600	-2.42217900
H	3.38302100	-2.80201900	-0.65335300
H	3.93653500	-1.70783000	-1.93752900
H	4.44987200	0.06130400	-0.37442100
H	5.17445700	-1.40246600	0.29467500
H	3.95613200	-0.02412900	2.04109100
H	3.38616600	-1.68249500	1.90932000

3.3.1.13. Experimental ECD spectra of 1 and 2

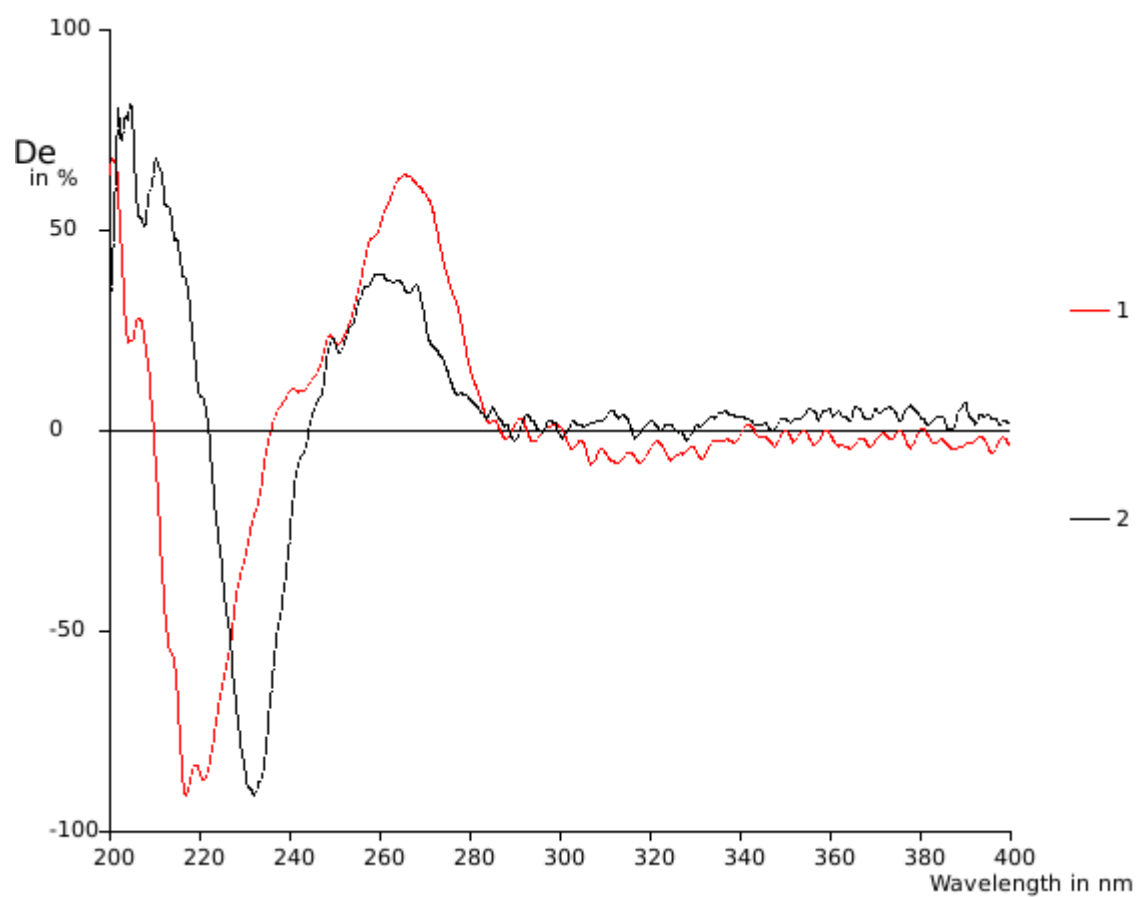
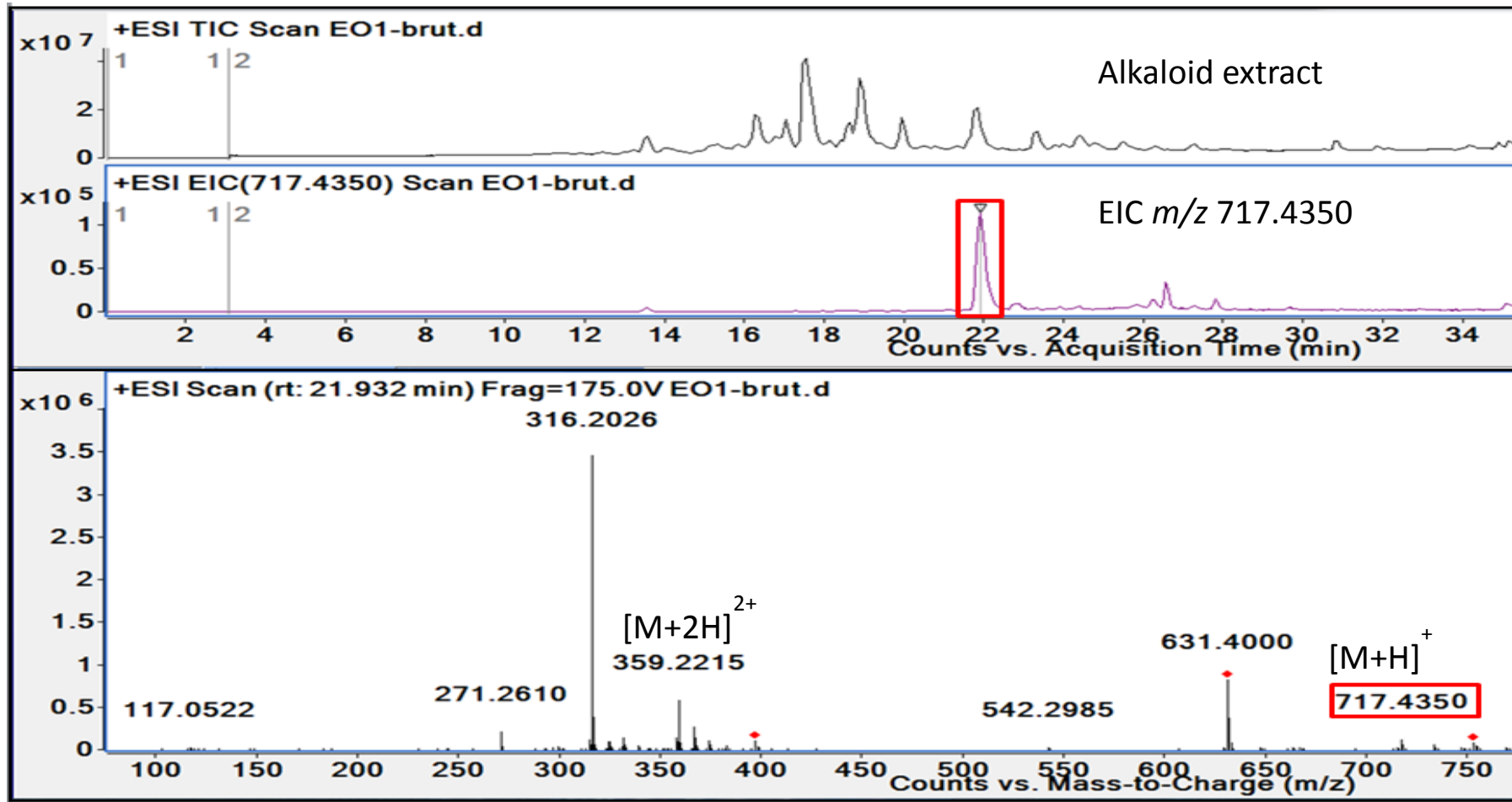


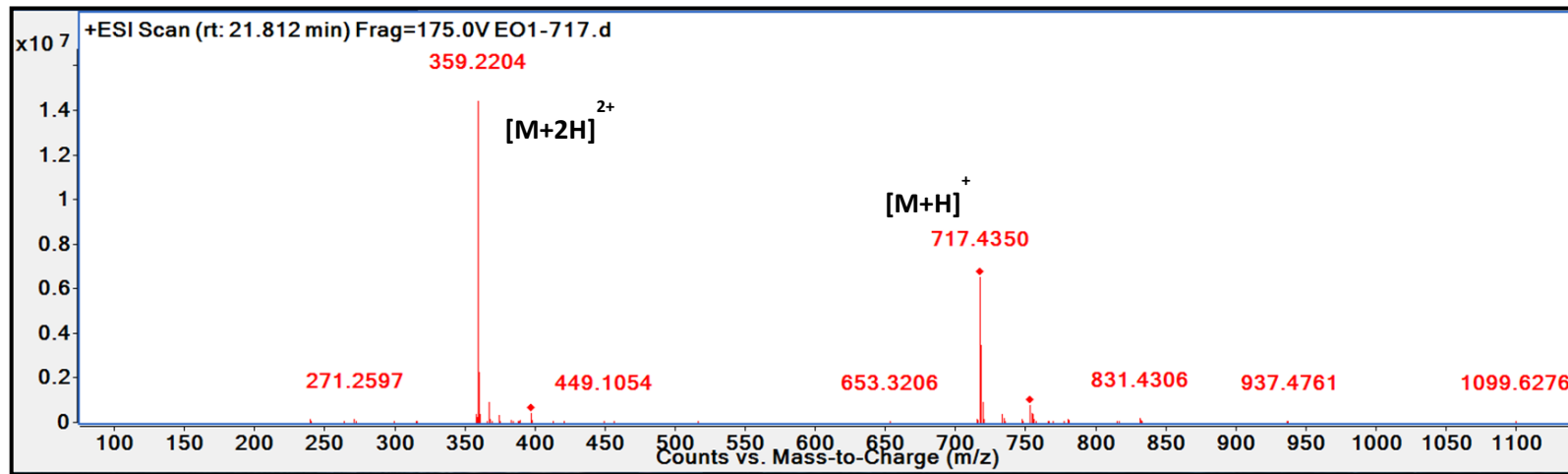
Figure 36. Experimental ECD spectra of 1-2 (MeOH)

3.3.1.14. EIC of pleiokomenine A (1) m/z 717.4350 from the alkaloid extract

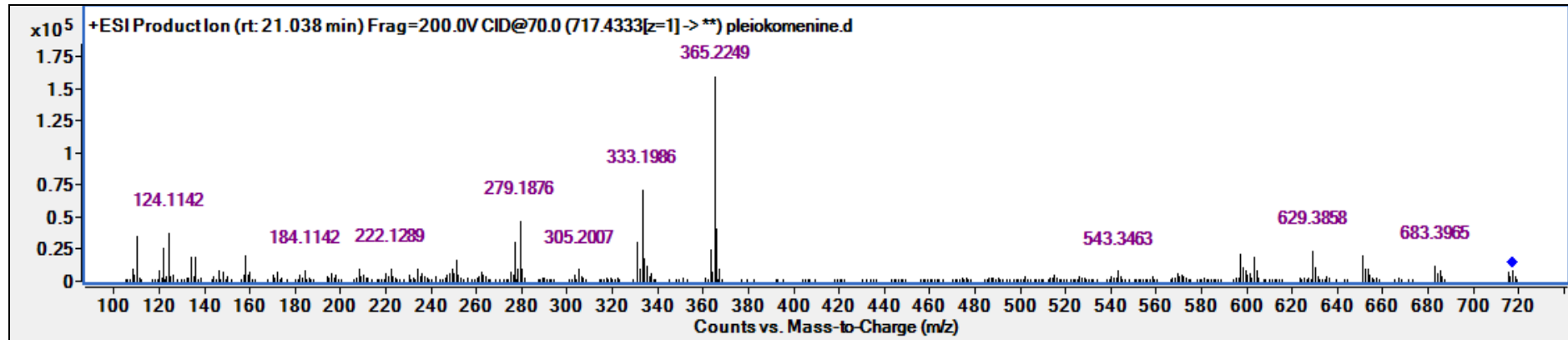


Xbridge[®] C₁₈ (150 × 2.1 mm); i.d. 3.5 μm, Waters (5/95:100/0) MeOH/H₂O+0.1%formic acid. Flow rate: 0.25 mL/min. Injection volume: 5 μL. Concentration: 1 mg/mL.

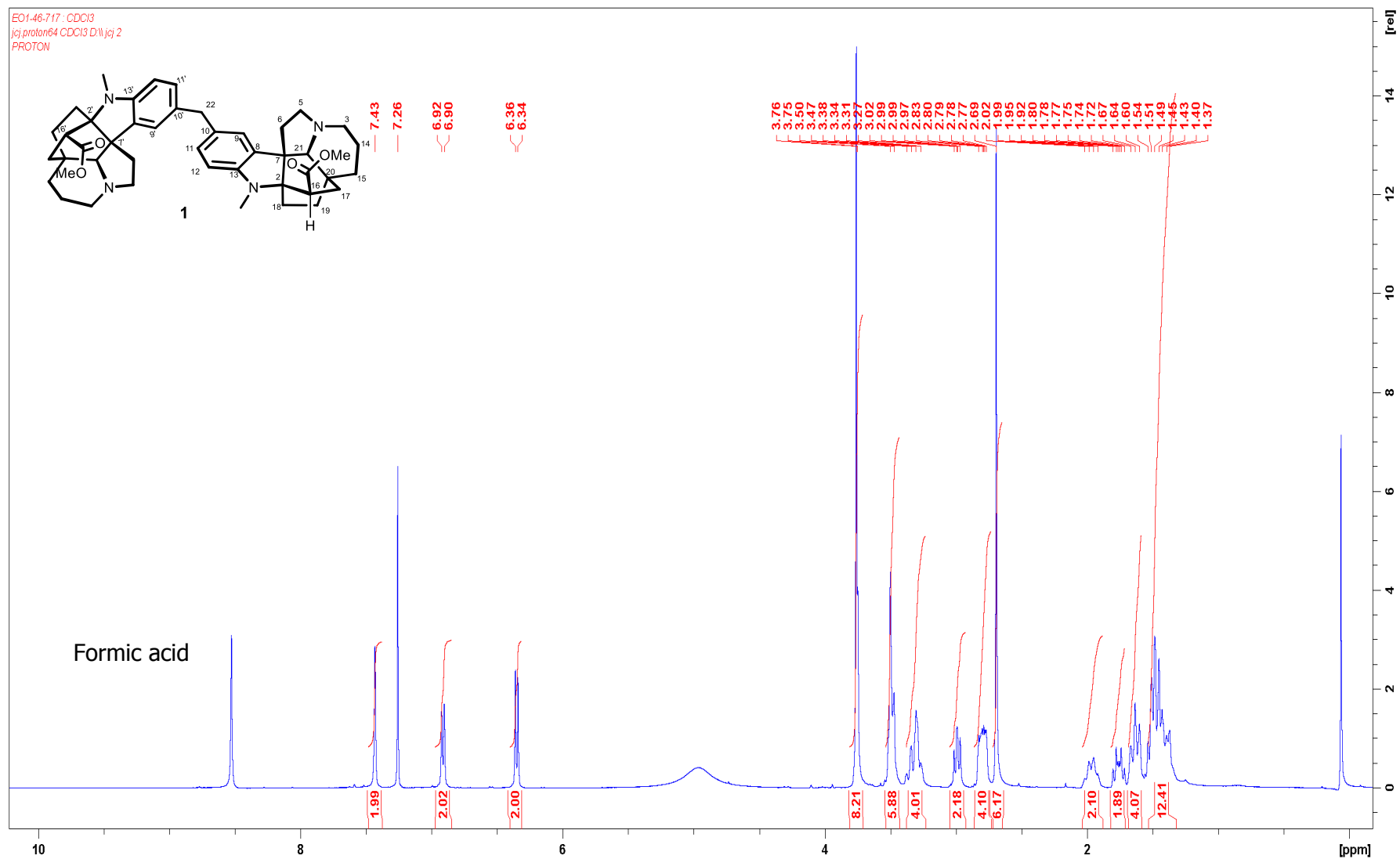
3.3.1.15. HRESIMS spectrum of pleiokomenine A (1)



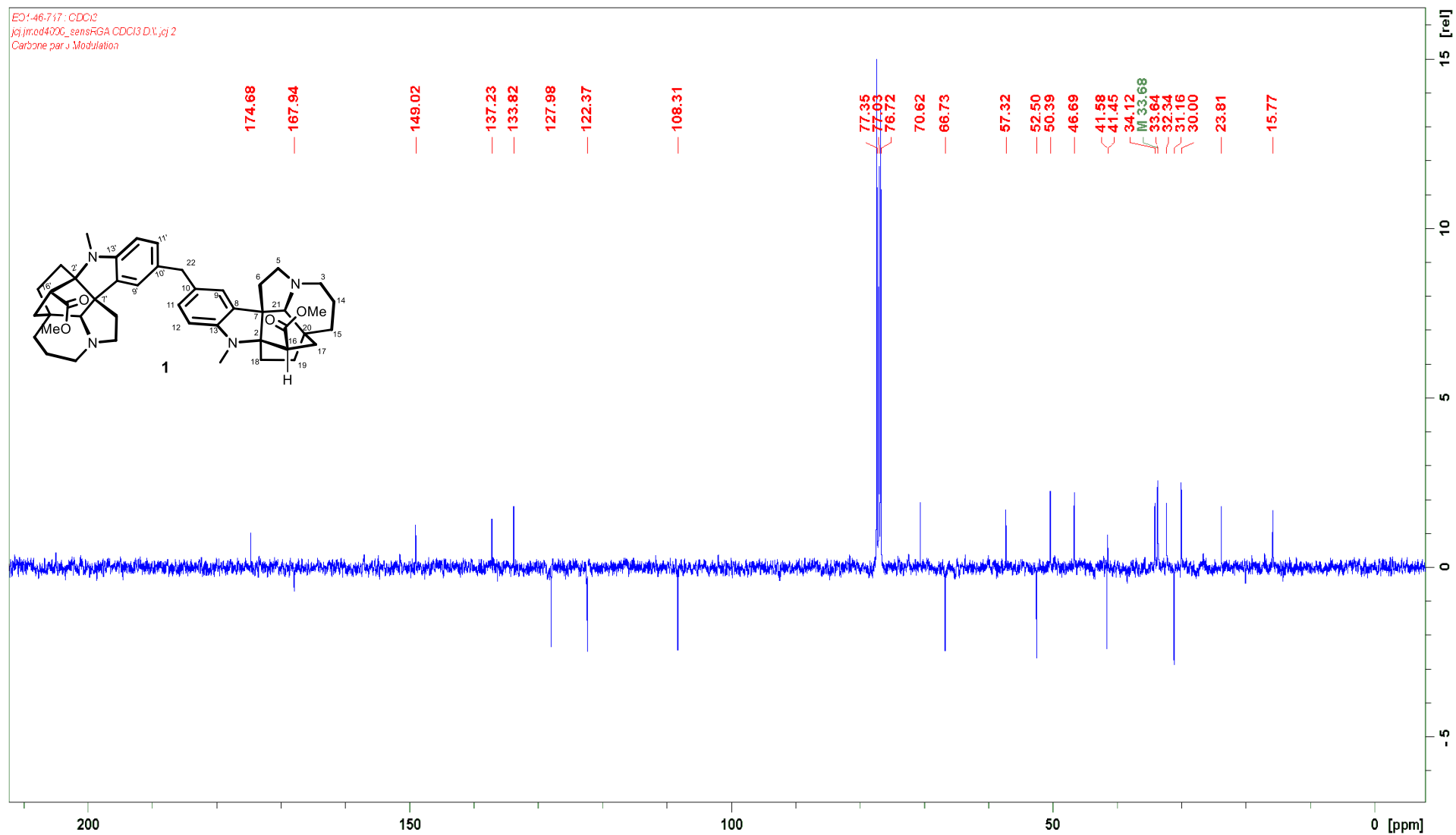
3.3.1.16. HRESIMS/MS spectrum of pleiokomenine A (1) CID @ 70 ev



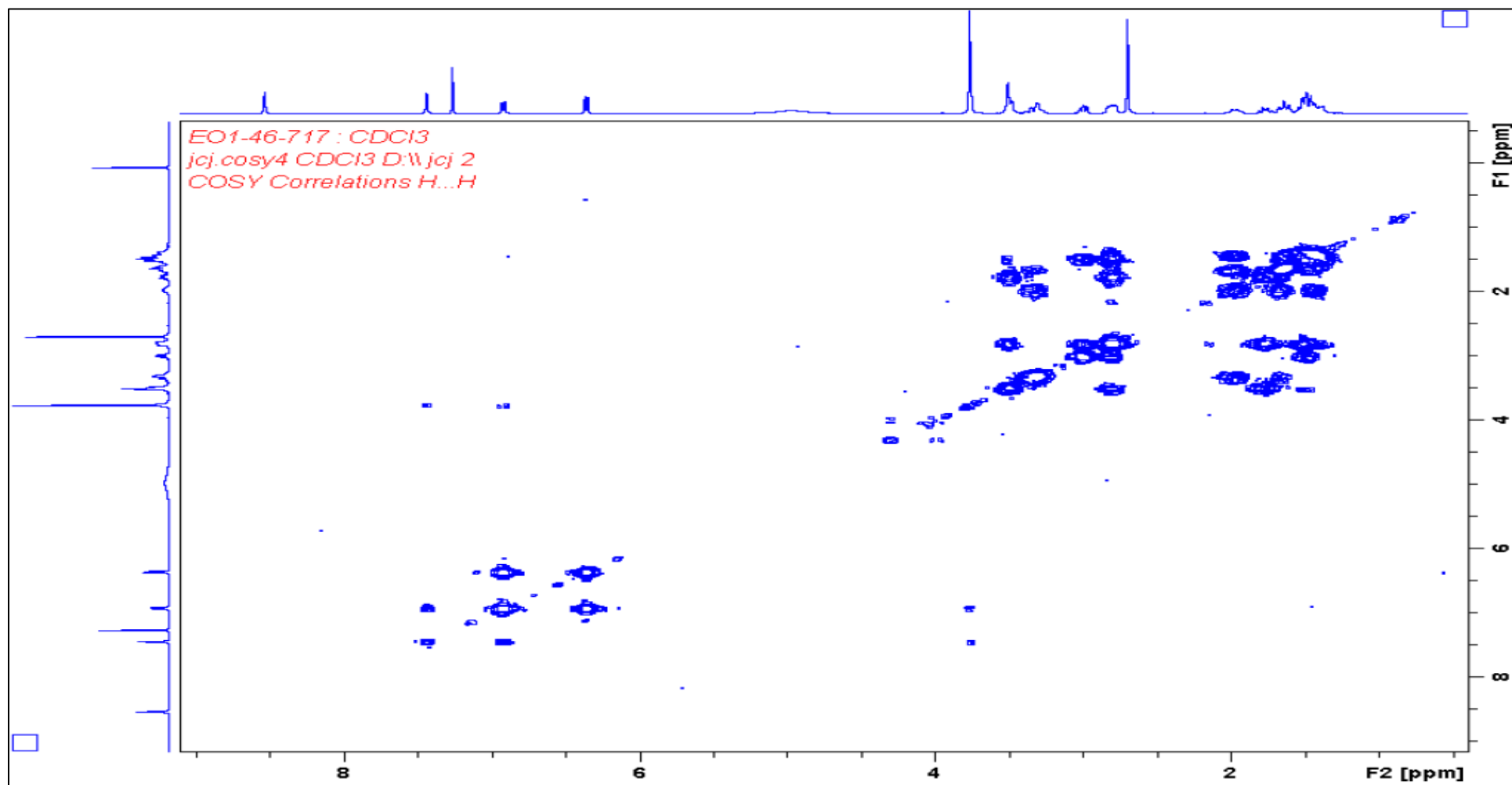
3.3.1.17. ¹H NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) of pleiokomenine A (1)



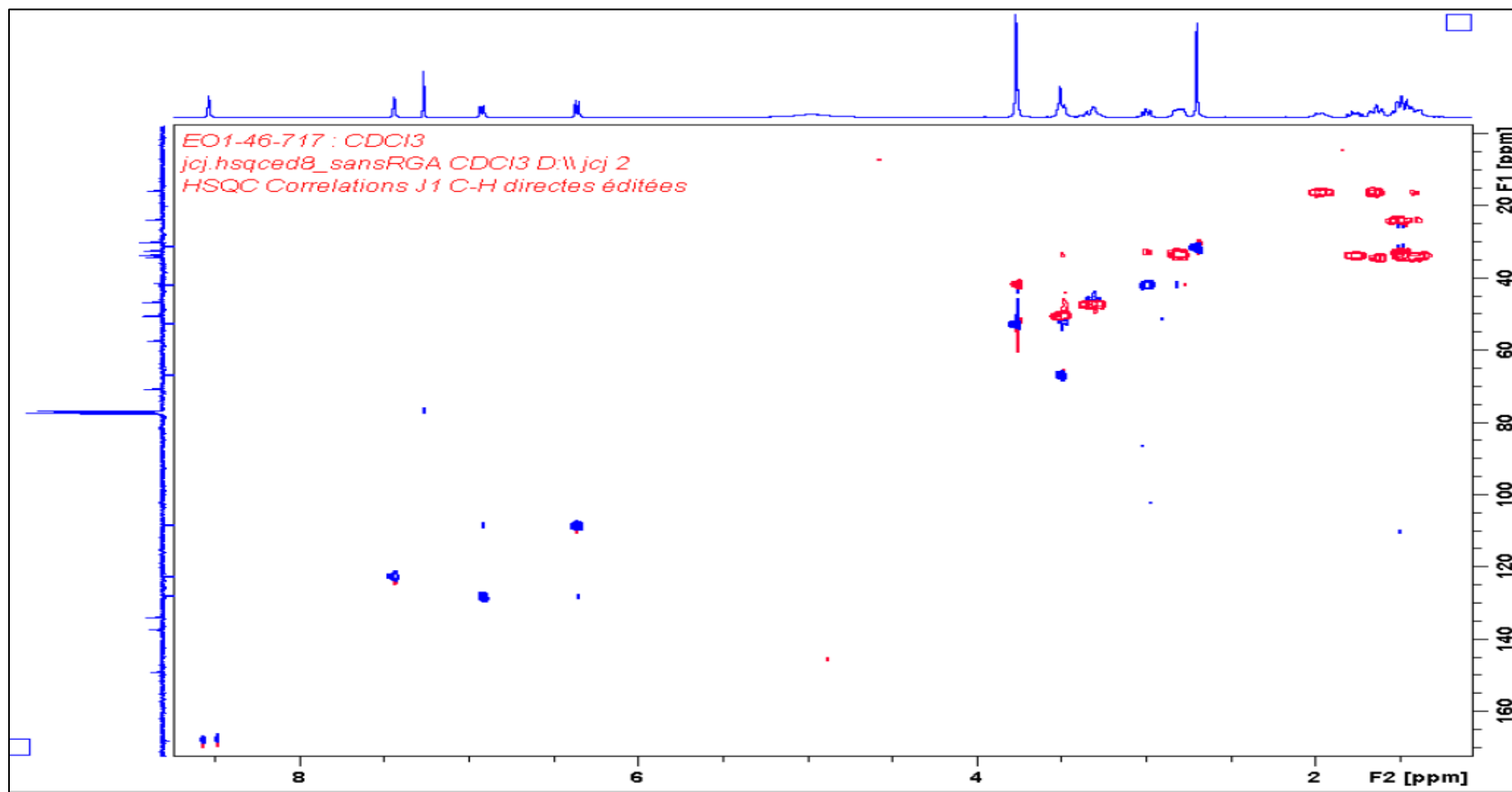
3.3.1.18. ¹³C NMR spectrum (100 MHz, CDCl₃) of pleiokomenine A (1)



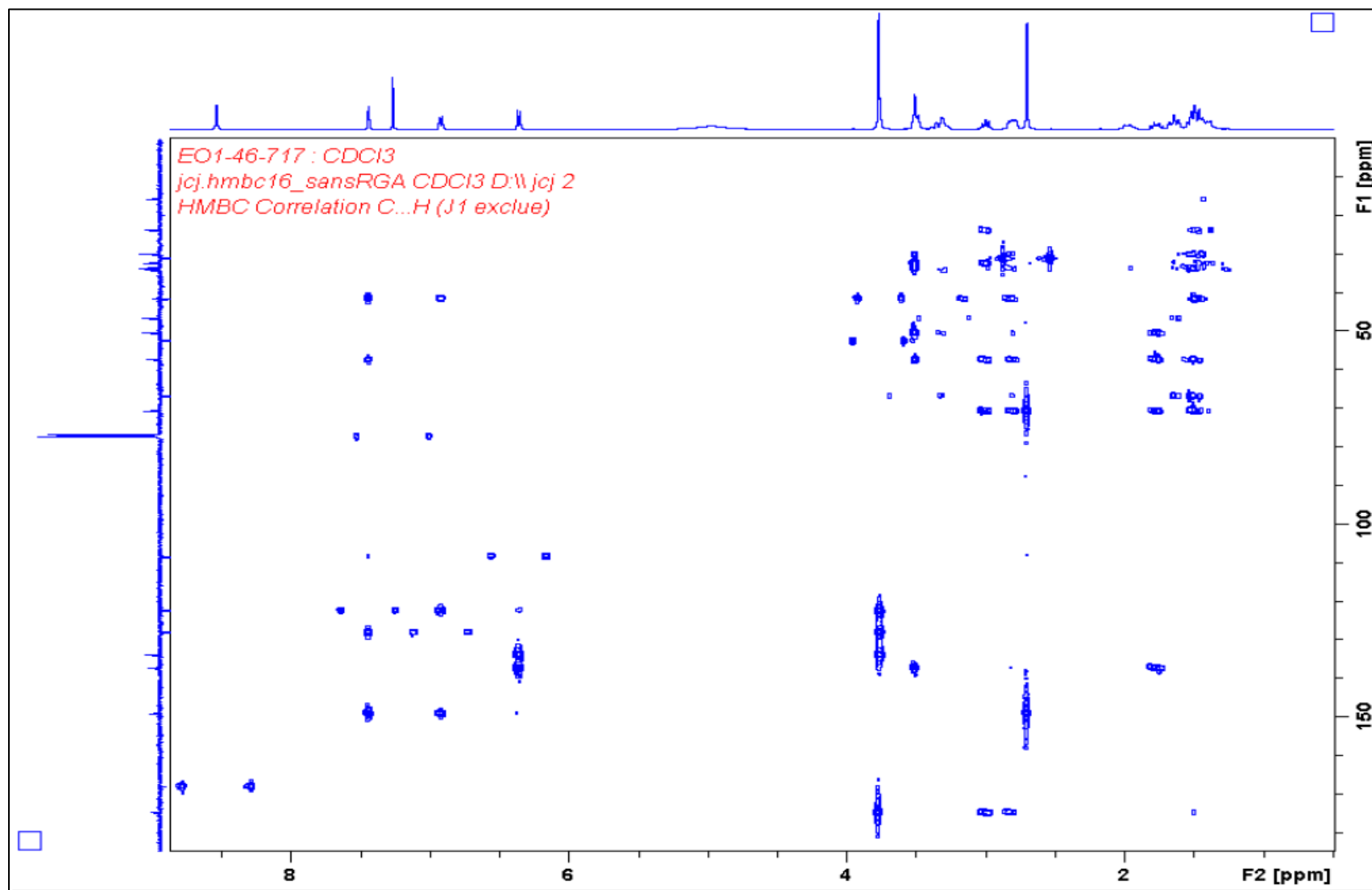
3.3.1.19. COSY spectrum (400 MHz, CDCl₃) of pleiokomenine A (1)



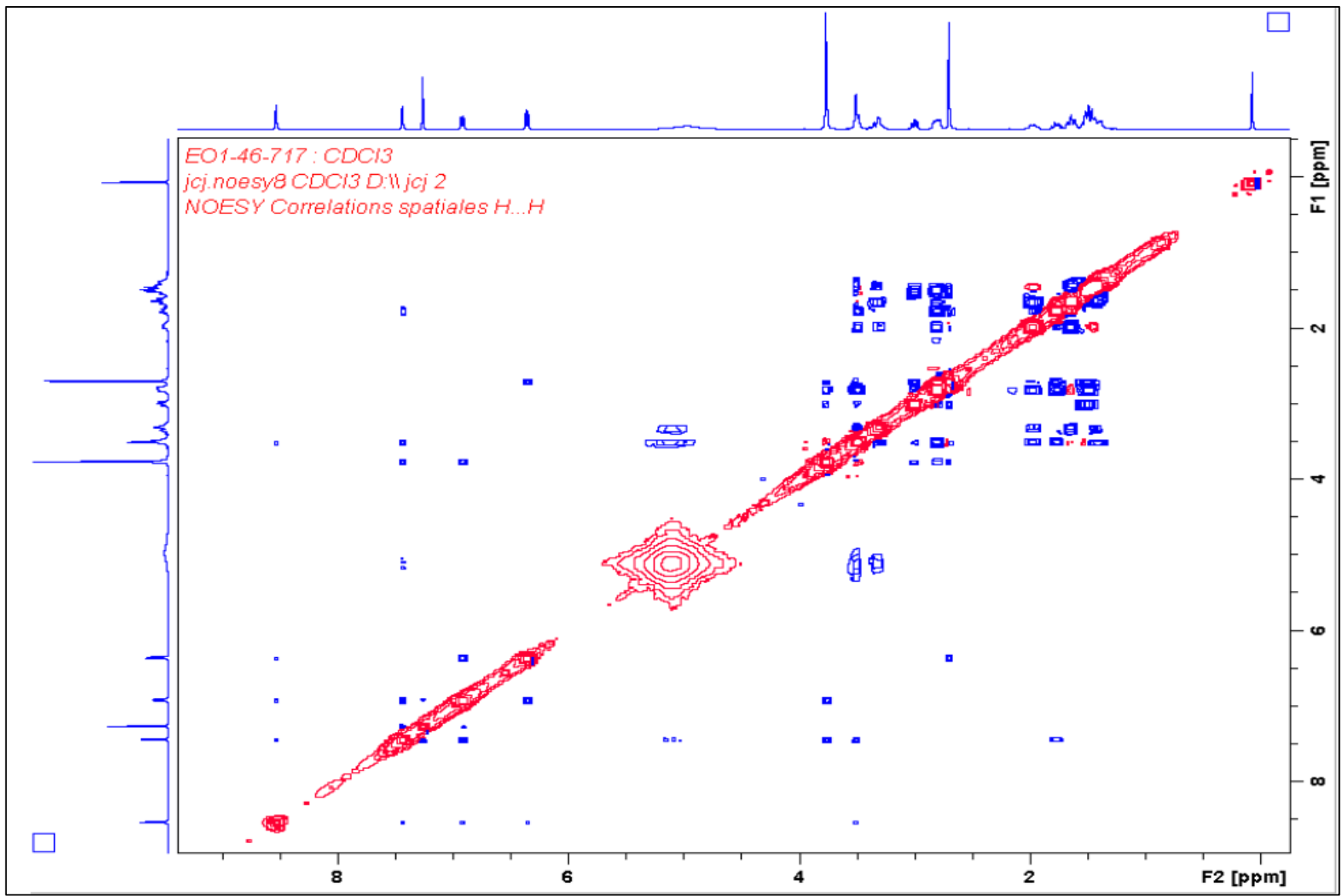
3.3.1.20. HSQC spectrum (400 MHz, CDCl₃) of pleiokomenine A (1)



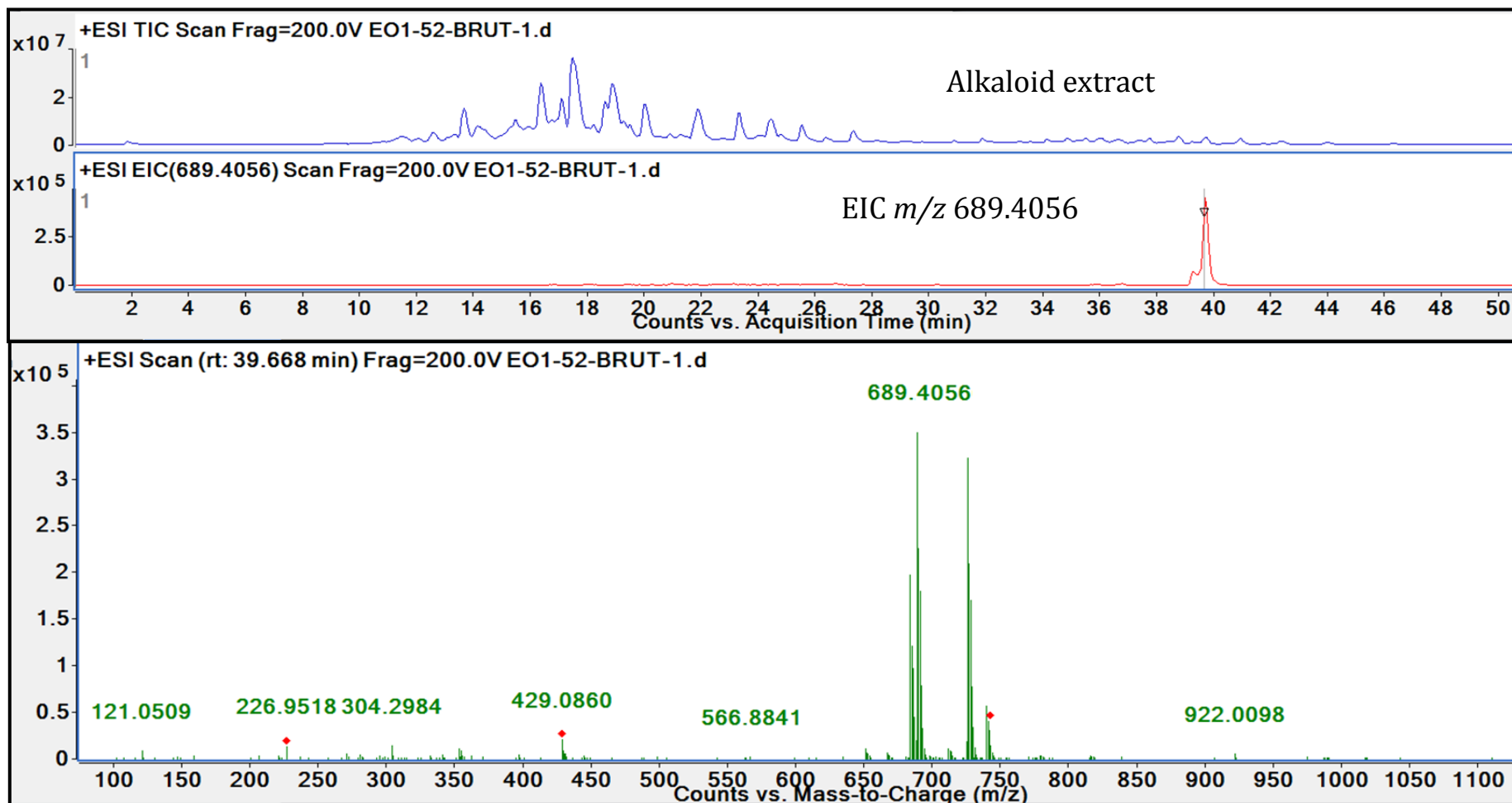
3.3.1.21. HMBC spectrum (400 MHz, CDCl₃) of pleiokomenine A (1)



3.3.1.22. NOESY spectrum (400 MHz, CDCl₃) of pleiokomenine A (1)

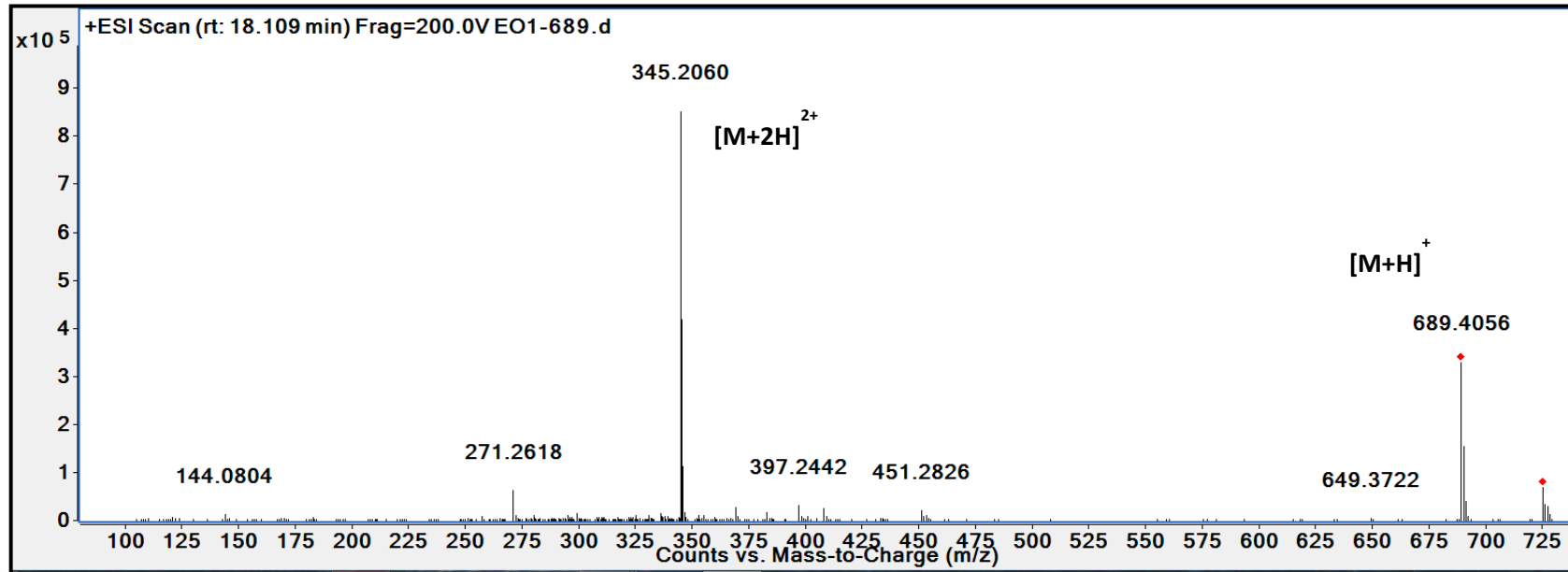


3.3.1.23. EIC of pleiokomenine B (2) m/z 689.4056 from the alkaloid extract

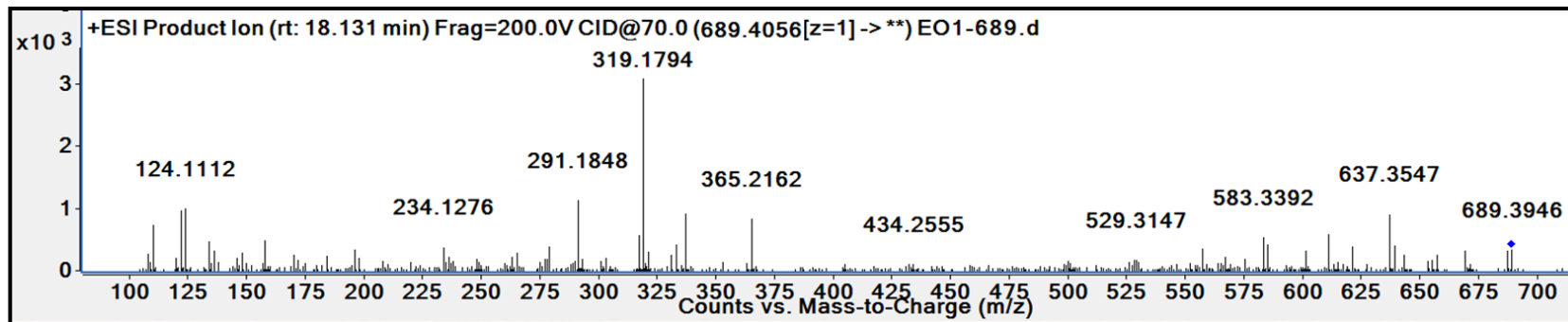


Xbridge[®] C₁₈ (150 × 2.1 mm); i.d. 3.5 μm, Waters (5/95:100/0) MeOH/H₂O+0.1%formic acid. Flow rate: 0.25 mL/min. Injection volume: 5 μL. Concentration: 1 mg/mL.

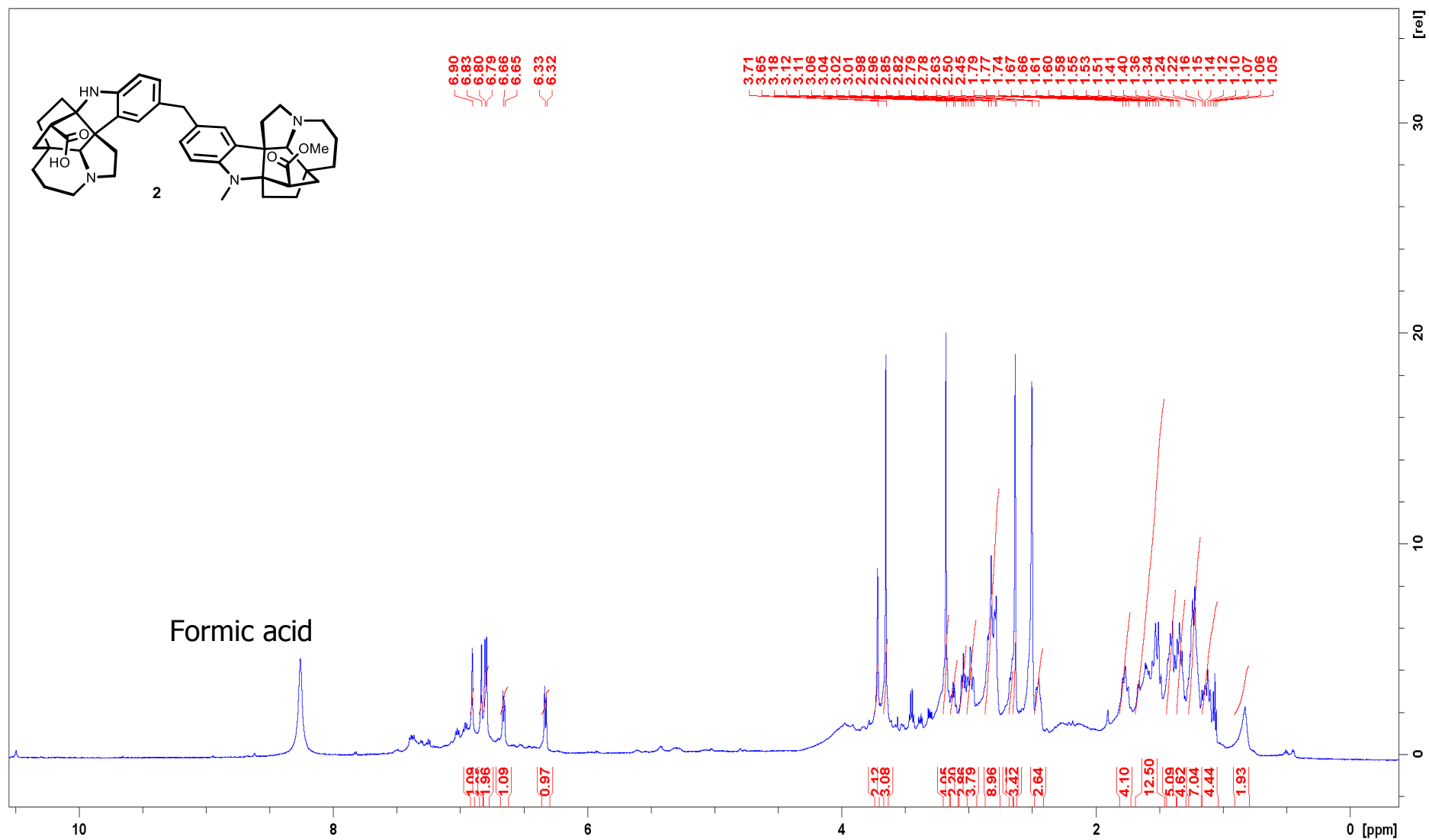
3.3.1.24. HRESIMS spectrum of pleiokomenine B (2)



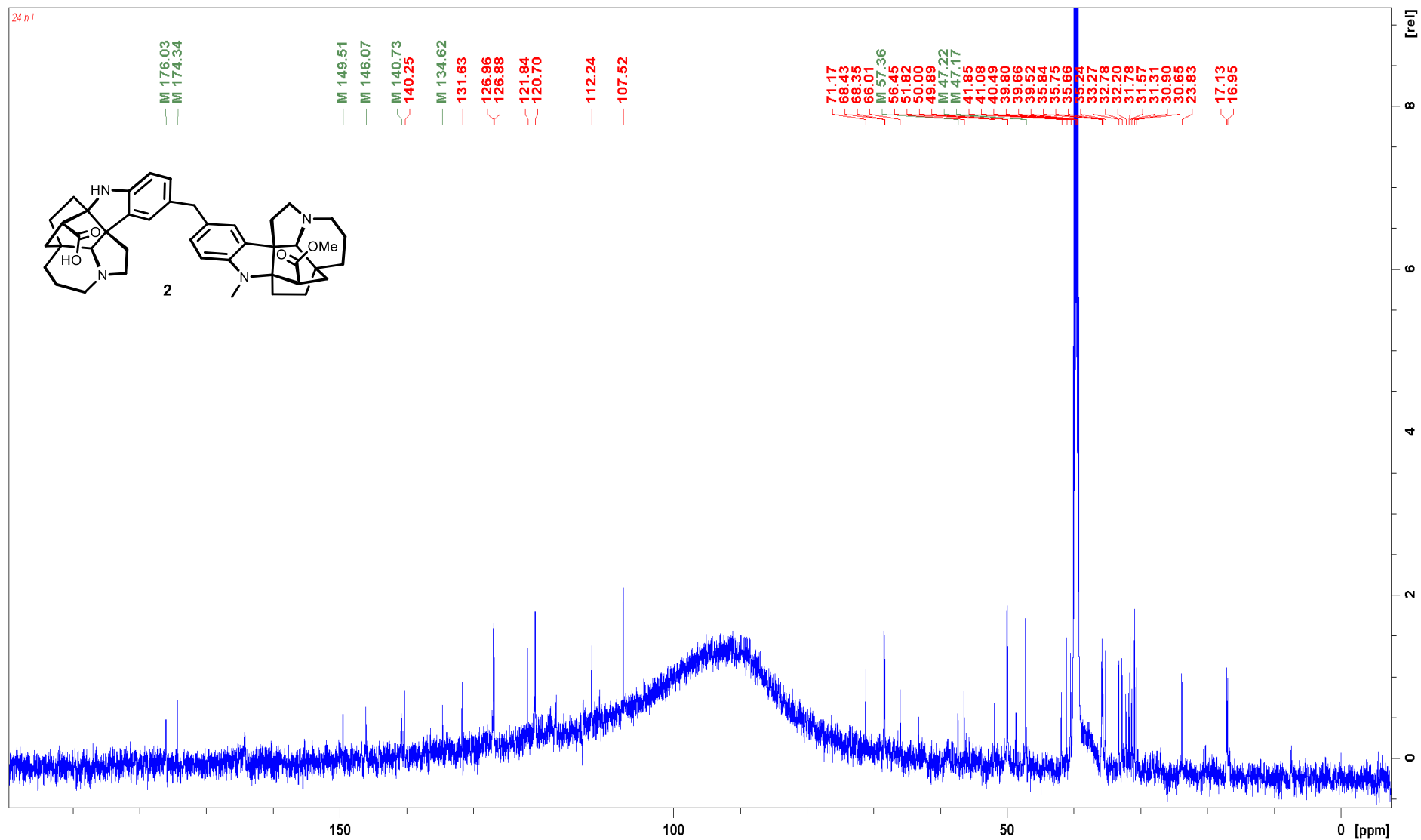
3.3.1.25. HRESIMS/MS spectrum of pleiokomenine B (2) CID @ 70 ev



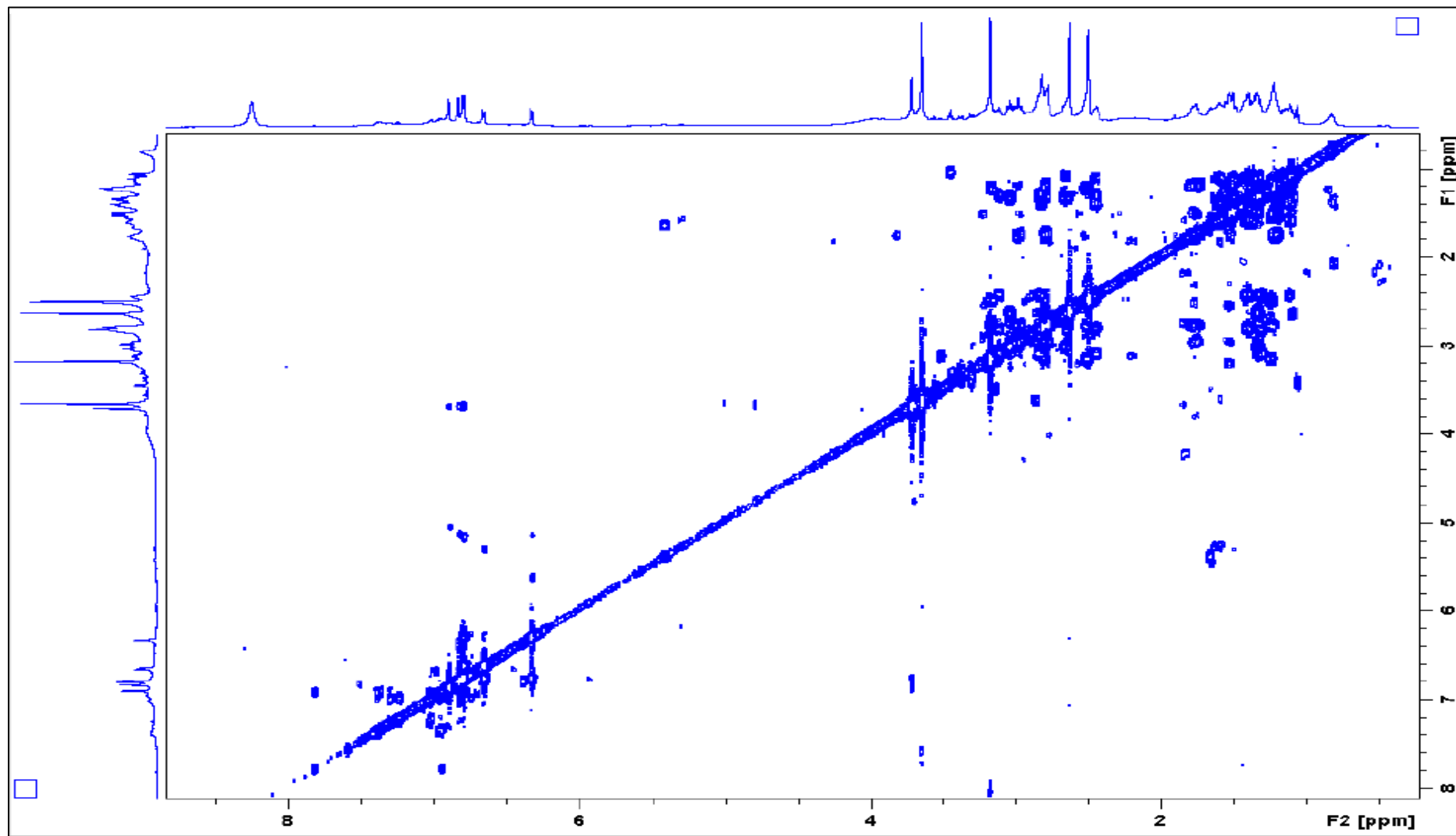
3.3.1.26. ¹H NMR spectrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) of pleiokomenine B (2)



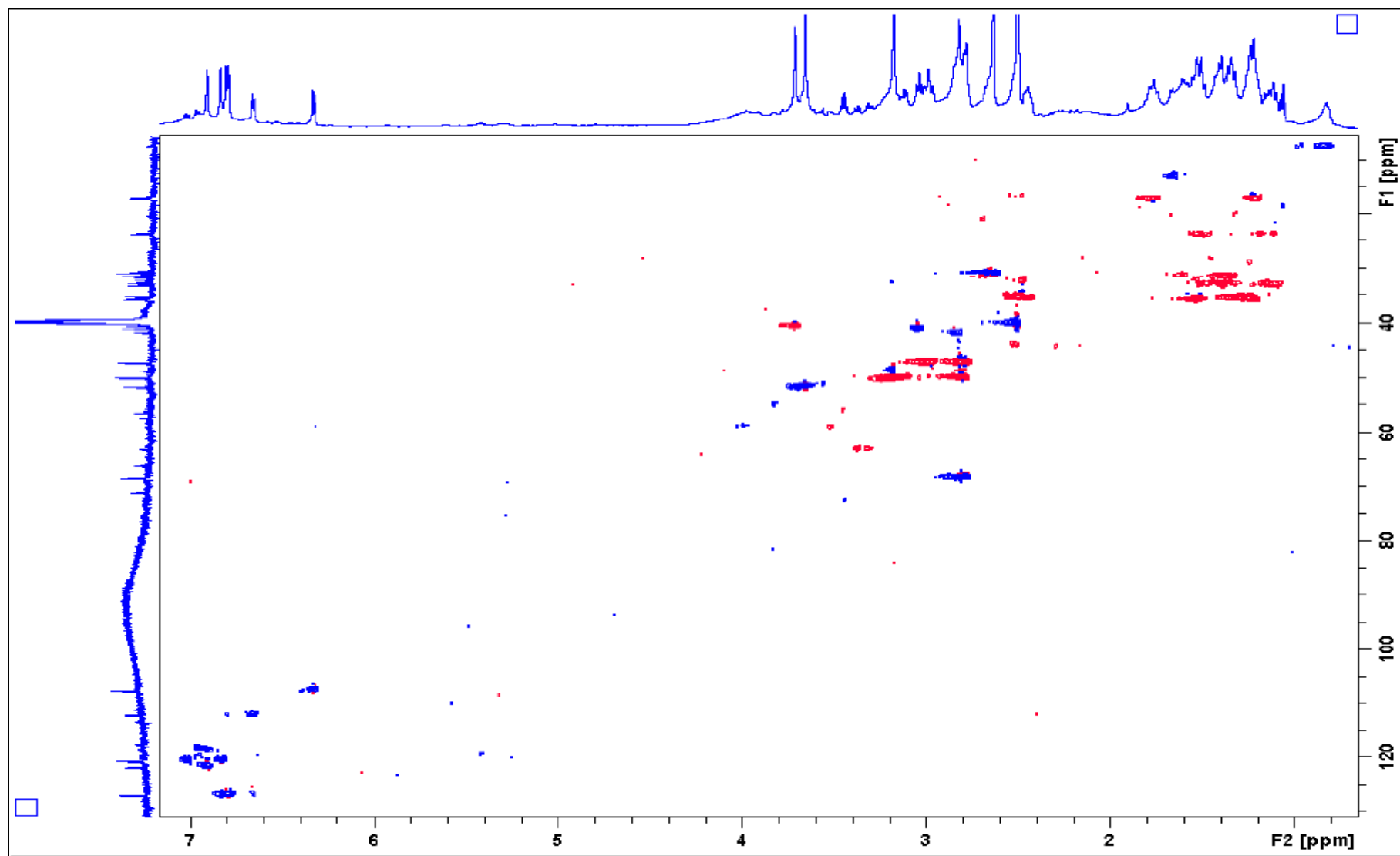
3.3.1.27. ¹³C NMR spectrum (150 MHz, DMSO-d₆) of pleiokomenine B (2)



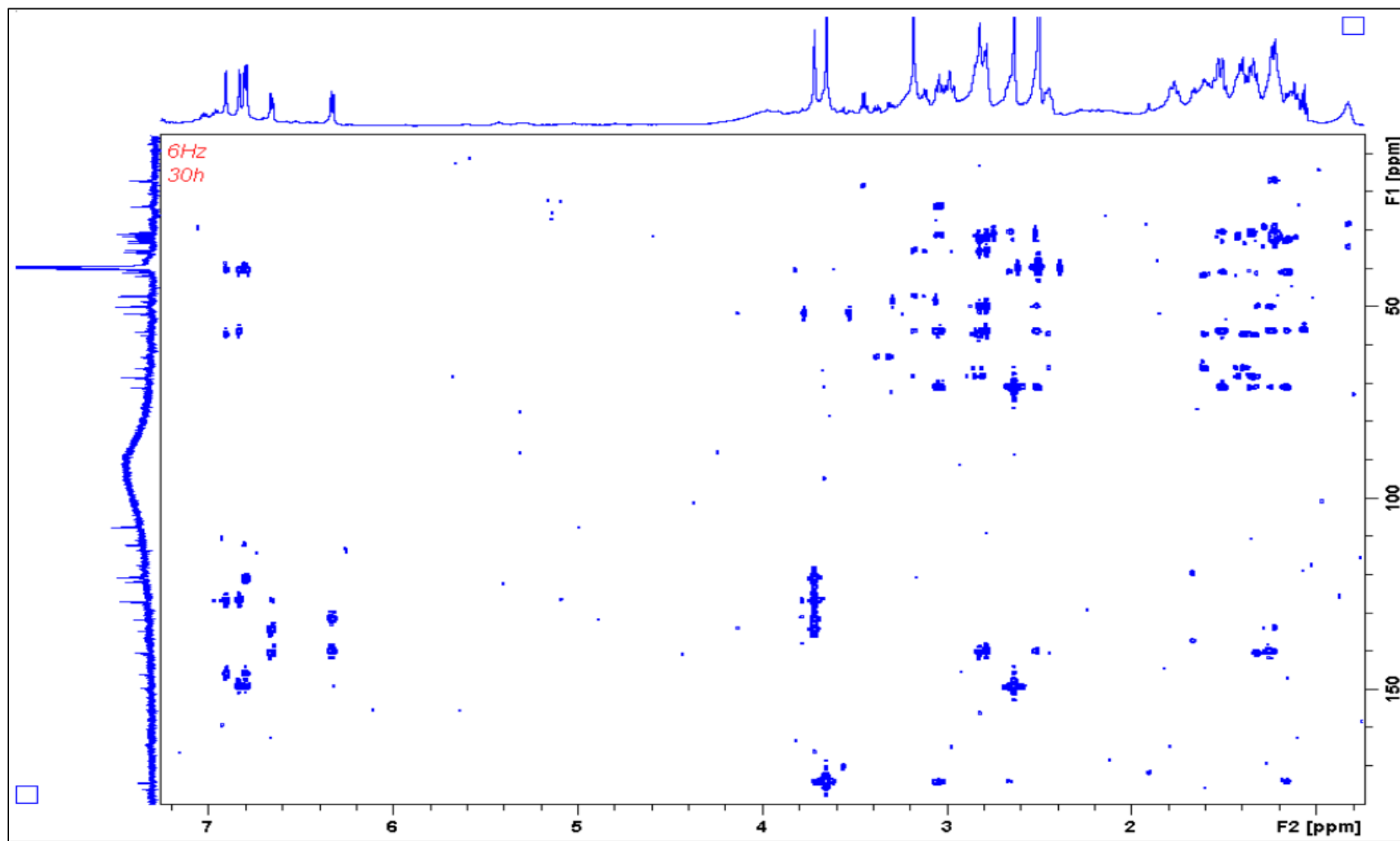
3.3.1.28. COSY spectrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) of pleiokomenine B (2)



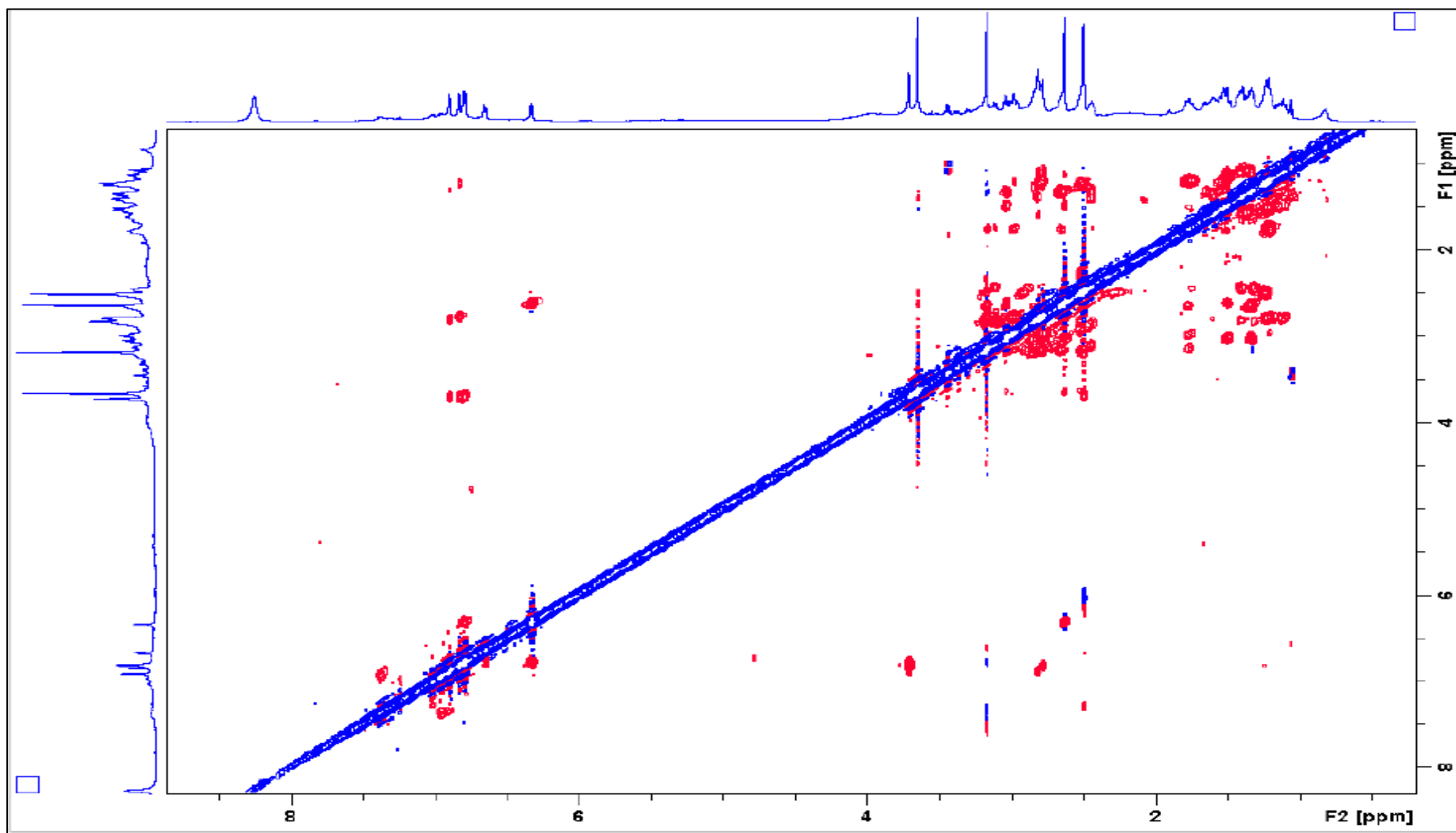
3.3.1.29. HSQC spectrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) of pleiokomenine B (2)



3.3.1.30. HMBC spectrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) of pleiokomenine B (2)



3.3.1.31. ROESY spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of pleiokomenine B (2)



3.4. Caractérisation des composés isolés dans les zones C, D et dans les *selfloops*.

3.4.1. Extraction des écorces de tiges de *P. mutica*

Les écorces de tiges de *P. mutica* (3,5 Kg) séchées et broyées ont été extraites suivant la méthode classique d'obtention des alcaloïdes. Après une alcalinisation avec une solution d'ammoniaque (NH₃aq) (1,2 L), la poudre a été macérée dans de l'acétate d'éthyle (AcOEt) (10 L) durant 30 h. L'extrait AcOEt obtenu a été concentré sous vide à 38°C à l'aide d'un évaporateur rotatif pour ne garder que 200 mL. Le résidu concentré a été soumis à des partitions liquide/liquide. Une avec une solution de H₂SO₄ à 2 % (800 mL), puis réalcalinisée avec du NH₃aq (400 mL) jusqu'à pH = 10. Une contre extraction dans de l'AcOEt (800 mL) a permis d'obtenir 20,4 g ($\rho = 0,58\%$) d'un extrait alcaloïdique.

3.4.2. Fractionnement et isolement de l'extrait alcaloïdique

16 g de l'extrait alcaloïdique obtenu ont été soumis à une Chromatographie flash en utilisant une cartouche de silice 120 g Grace avec un gradient de CHCl₃-MeOH (100: 0 à 0: 100) à 80 ml / min conduisant à seize fractions (**F.1-F.16**) regroupées selon leurs profils en chromatographie sur couche mince (CCM). La fraction **F.4** (139,1 mg) a été soumise à une CLHP-préparative en utilisant une phase inverse C18 Sunfire® avec un gradient CHCl₃-MeOH / H₂O + 0,1 % acide formique (AF) (25:75) pendant 20 minutes et a conduit à l'isolement du composé **5** que nous avons nommé le bispléiocarpinium (13,4 mg, $\rho = 0,0003\%$) et du vincosamide (12,7 mg, $\rho = 0,0003\%$), un composé connu mais jamais décrit dans le genre *Pleiocarpa*. La purification de la fraction **F.6** (102,2 mg) a été réalisée par HPLC-préparative éluee avec un gradient CHCl₃-MeOH 0,1% (A.F) (30:70) durant 25 minutes. 4 composés connus de la plante ont été isolés. Il s'agit de la pléiocarpamine (15 mg, $\rho = 0,0004\%$), la pléiocarpinine (12 mg, $\rho = 0,0003\%$), la pléiocarpine (6 mg, $\rho = 0,0004\%$) et la pléiocarpoline (14 mg, $\rho = 0,0004\%$).^{154,155} La fraction **F.9** (677,5 mg) a été soumise à une chromatographie flash en utilisant une cartouche de silice 80 g Grace avec un gradient de CHCl₃-MeOH (100: 0 à 0: 100) à 60 ml / min, conduisant à six sous-fractions, **F.9.1** à **F.9.6** regroupées selon leurs profils CCM. La sous-fraction **F.9.2** (96,5 mg) a été purifiée par HPLC-préparative en utilisant

un gradient CHCl₃-MeOH-H₂O 0,1% AF (35: 65) et a permis l'obtention de la pléiomutine¹⁵⁴ (2 mg, $\rho = 0,00005\%$) et de la sarpagine¹⁵³ (13 mg, $\rho = 0,0003\%$). La fraction **F.12** (973,4 mg) a été également fractionnée en utilisant la même colonne et les mêmes conditions que la fraction F.9. Dix sous-fractions (**F.12.1** à **F.12.10**) ont été obtenues et regroupées selon leurs profils CCM. La sous-fraction **F.12.3** (254,7 mg) a subi une seconde chromatographie flash en utilisant une cartouche Grace de 24 g de silice avec un gradient de CHCl₃-MeOH (100: 0 à 0: 100) à 15 ml / min. Six sous-fractions (**F.12.3.1-F.12.3.6**) ont été obtenues. La sous-fraction **F.12.2.2** (45,7 mg) a montré un pic majoritaire correspondant au composé **3**, purifié par CLHP préparative en utilisant un gradient de CHCl₃-MeOH-H₂O 0,1% (AF) (35:65) nous l'avons nommé la pléiokomenine C (3,6 mg, $\rho = 0,00005\%$). La sous-fraction **F.12.2.4** (105,2 mg) a également été purifiée, dans les mêmes conditions que la sous-fraction **F.12.2.2**. Elle a conduit à l'isolement du composés **6** (5 mg, $\rho = 0,0001\%$), du composé **7** (4 mg, $\rho = 0,0001\%$) et de la pléiomutine¹⁵⁷ (34 mg, $\rho = 0,0009\%$). Les composés **6** et **7** ont été respectivement nommés oxopléiomutine et *N*-oxydepléiomutine. Enfin, la fraction **F.14** (41,2 mg) a été purifiée par CLHP-préparative en utilisant un gradient CHCl₃-MeOH-H₂O 0,1% AF (35: 75) durant 25 minutes, et a conduit à l'isolement du composé **4** (3 mg, $\rho = 0,00008\%$), nommé pléiokomenine D. Un schéma d'extraction est présenté dans la Figure 37.

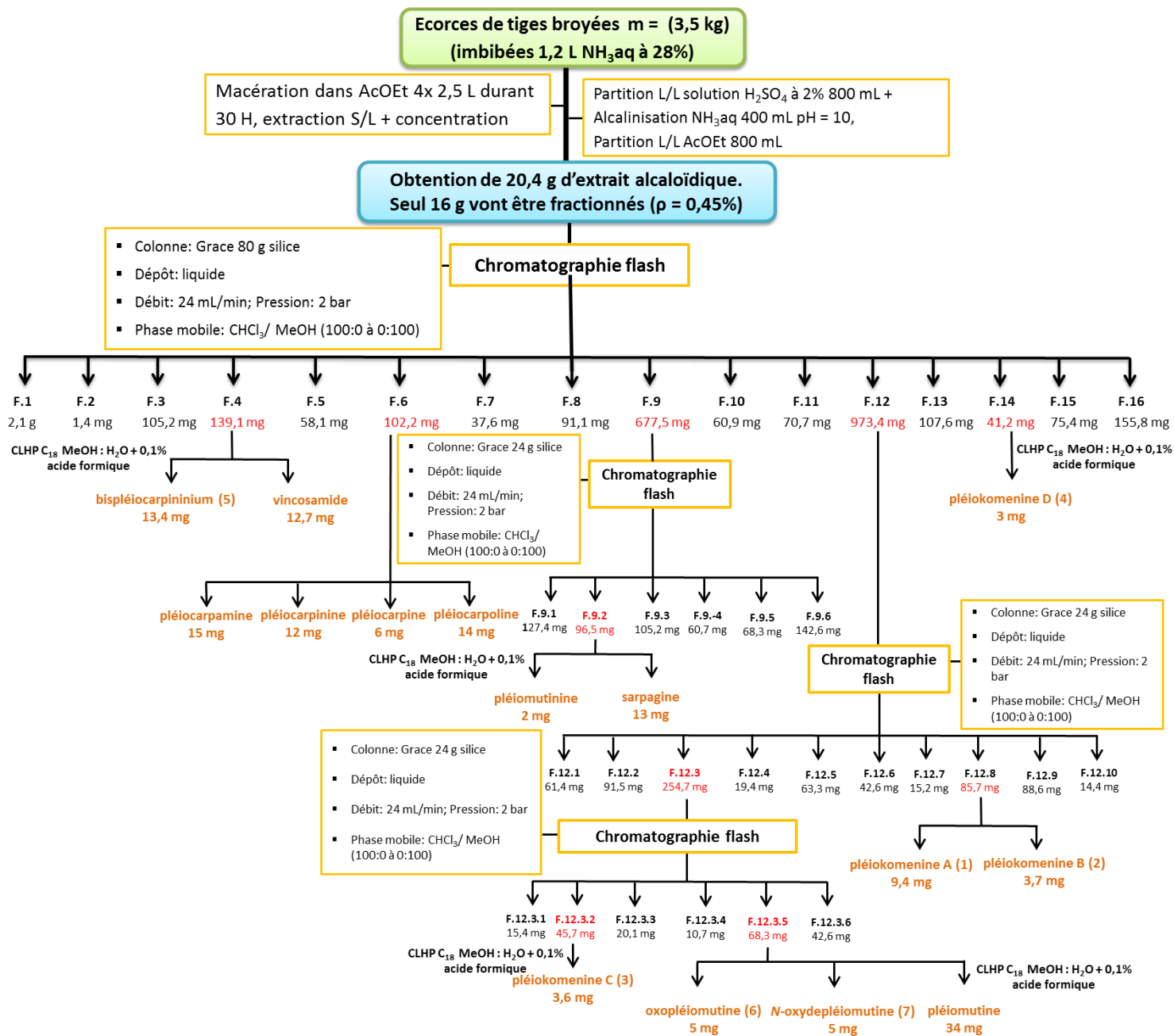


Figure 37. Schéma d'extraction et d'isolement des écorces de tiges de *P. mutica*

3.4.3. Caractérisation des analogues pléiokomenines (C et D) et du bispléiocarpinium (5)

Deux analogues des pléiokomenines A et B ont été également ciblés dans la zone **D** du réseau et isolées. Il s'agit des pléiokomenines C et D. Deux analogues de la pléiomutine, la *N*-oxydepléiomutine et la 6-oxopléiomutine, ciblés dans la zone **C** ainsi que le bispléiocarpinium (5) détectée dans la zone des *selfloops* du réseau ont également été caractérisés (Figure 34).

3.4.3.1. La pléiokomenine C (3)

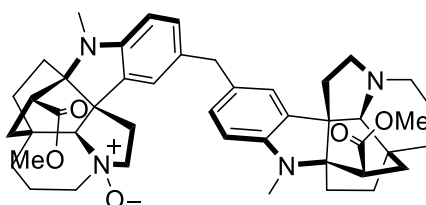


Figure 38. Structure de la pléiokomenine C (3)

Tout comme les pléiokomenines A et B, la pléiokomenine C (3) a été obtenue sous la forme d'une poudre amorphe brune foncée. Son spectre de masse HRESI-QTOF-SM+ a montré un ion moléculaire à m/z 733,4335 $[M+H]^+$, correspondant à la formule brute $C_{45}H_{57}N_4O_5$, [calculée pour $C_{45}H_{57}N_4O_5$: 733,4323, erreur = -1,2 ppm] ce qui correspond à 20 degrés d'insaturations et 16 unités de masse en plus que la pléiokomenine A (1). Les spectres UV et IR, sont similaires à ceux de la pléiokomenine A. C'est un composé optiquement actif avec un pouvoir rotatoire spécifique d'une valeur de $[\alpha]_D^{19} - 40$ (c 0,05, MeOH).

L'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C dans du $(CD_3)_2SO$ de la pléiokomenine C (3) montre qu'elle est très similaire aux pléiokomenines A et B excepté le déblindage de certains protons et carbones caractéristiques de la présence d'un groupement *N*-oxyde (Figure 38). Ces déblindages ont été observés sur les positions C-3' (δ_H 3,67 et 3,33, δ_C 63,1), C-5' (δ_H 4,02 et 3,14, δ_C 63,5) et C-21' (δ_H 3,91 δ_C 82,6) de la pléiokomenine C (3) en comparaison avec la pléiokomenine B (2) comme le montre la Figure 39.

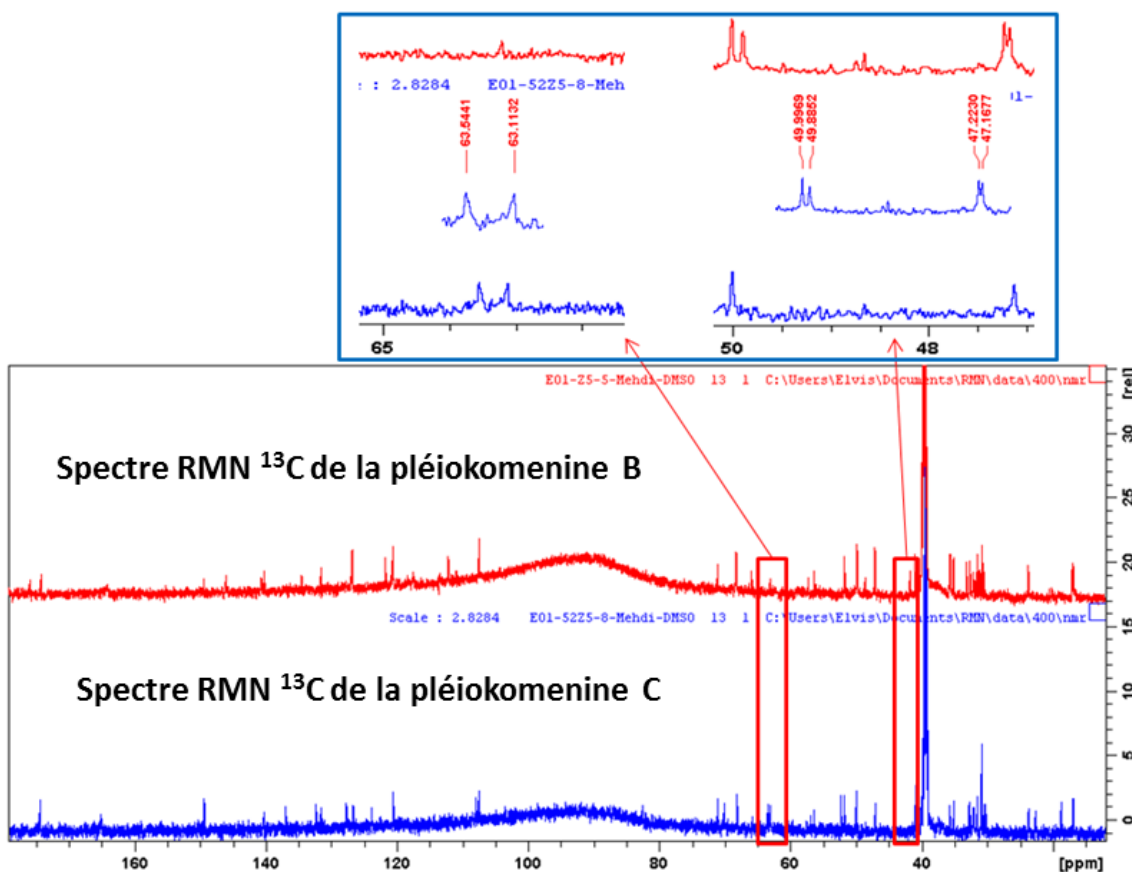


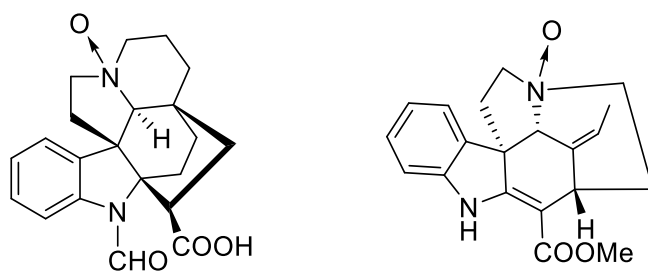
Figure 39. Comparaison des spectres ^{13}C des pléiokomenine B et C, agrandissement des zones de différences ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 150 MHz)

Pour confirmer la présence du groupement *N*-oxyde dans l'une des unités pléiocarpinines du composé **3**, nous avons comparé les déplacements chimiques des carbones C-3', C-5' et C-21' avec ceux des deux molécules ayant le même *N*-(4)-oxyde (Figure 40). Il s'agit de la *N*-oxyde-isocondylocarpine¹⁶¹ et l'acide-*N*-oxyde formylkopsininique¹⁶² (Figure 40). Nous avons remarqué que les C-3 et C-5 et le C-21 reliés à l'azote *N*-4 oxydé de ces molécules indiquent les mêmes déplacements chimiques observés chez la pléiokomenine C (Tableau 7). Ceci suggère que le composé **3** possède une unité pléiocarpinine *N*-oxydée¹⁶³, et correspond donc à la *N*-4-oxyde-pléiokomenine A.

¹⁶¹ Y. Wu, *et al.*, *J Nat Med* **2009**, *63*, 283-289.

¹⁶² K. Ahmad, *et al.*, *Open Conf. Proceedings J.* **2013**, *4*, 75-82.

¹⁶³ Notons que ce genre de monomère est connu chez *P. mutica* et a déjà été isolés auparavant, il s'agit de la pléiocarpoline.¹⁵⁷



acide-*N*-oxyde formylkopsininique *N*-oxyde isocondylocarpine

Figure 40. Structure de l'acide-*N*-oxyde formyl-kopsininique et de la *N*-oxyde isocondylocarpine

Tableau 7. Comparaison des déplacements chimiques des carbones C-3, C-5 et C-21 avoisinant le groupement *N*-oxyde

Composés	δ_c		
	C-3'	C-5'	C-21'
Pléiokomenine B	47,1	49,9	68,3
Pléiokomenine C	63,1	63,4	82,6
<i>N</i> -oxyde-isocondylocarpine	61,7	67,5	
acide- <i>N</i> -oxyde formyl-kopsininique	63,2	63,8	83,1

L'analyse combinée des données RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) de la pléiokomenine C va confirmer sa similarité avec les deux pléiokomenines décrites précédemment dans l'article. Les similarités des corrélations ROESY entre **3** et les pléiokomenines A et B suggèrent qu'elles présentent la même configuration relative.

3.4.3.2. La pléiokomenine D (4)

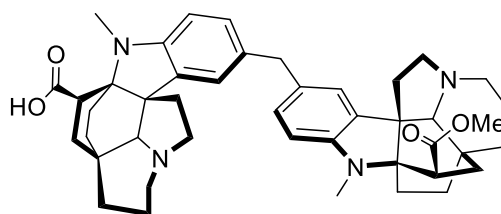


Figure 41. Structure de la pléiokomenine D (4)

Comme ses analogues, la pléiokomenine D (4) a été obtenue sous la forme d'une poudre amorphe brune foncée. Son spectre de masse HRESI-QTOF-SM+ a montré un ion moléculaire à m/z 703,4179 $[M+H]^+$, correspondant à la formule brute $C_{44}H_{54}N_4O_4$, [calculée pour $C_{44}H_{55}N_4O_4$: 703,4218, erreur = -2,5 ppm] indiquant 20 degrés d'insaturations et 14 unités de masse en moins que la pléiokomenine A. Les spectres UV et IR, sont similaires à ceux des pléiokomenines (A–C). Cette molécule est optiquement active avec un pouvoir rotatoire d'une valeur de $[\alpha]_D^{19} - 60$ (c 0.05, MeOH).

L'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C de la pléiokomenine D (4) indique qu'elle est très proche de la pléiokomenine A (Figure 42). Toutefois, on note l'absence d'un des groupements méthoxy, appartenant aux fonctions ester de la molécule. Cette fonction a été remplacée par un acide carboxylique (Figure 41).

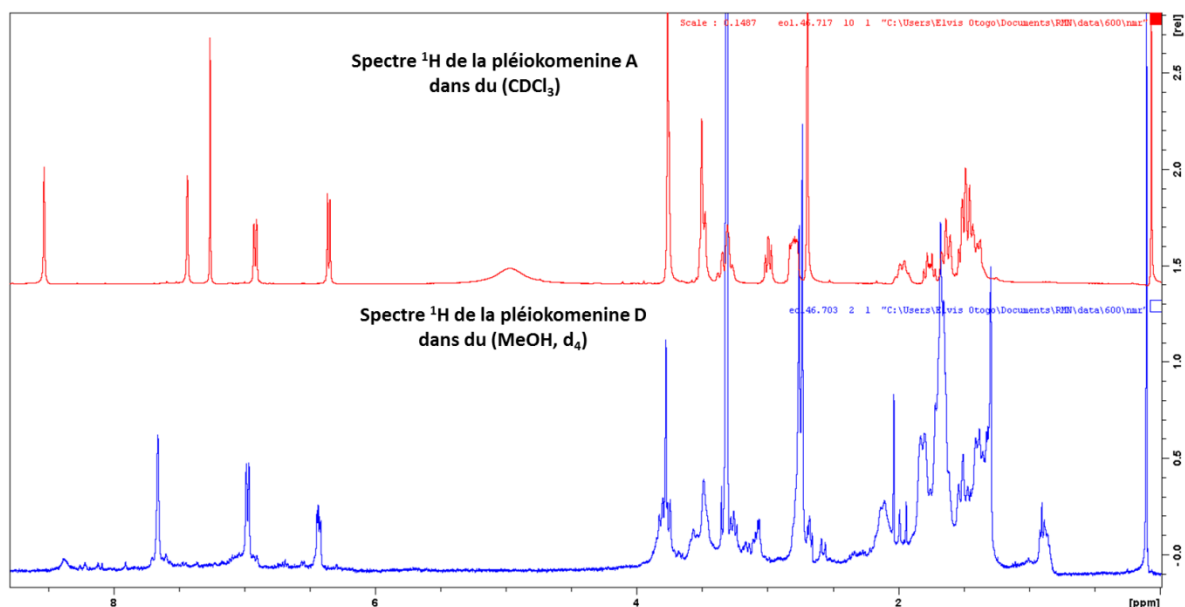


Figure 42. Comparaison des spectres 1H des pléiokomenines A (400 MHz, $CDCl_3$) et D (600 MHz, MeOD)

L'ensemble de ces observations, combinées à l'analyse des données COSY, HSQC et HMBC, ont permis de confirmer la structure de la pléiokomenine D (**4**)

La configuration relative de la pléiokomenine D a été déduite de celle de la pléiokomenine A sur la base de la similarité des corrélations NOESY. Sa configuration absolue reste à établir par l'emploi de l'ECD.

3.4.3.3. Le bispléiocarpinium (**5**)

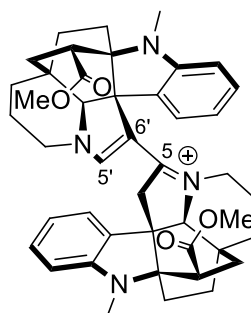


Figure 43. Structure du bispléiocarpinium (5**)**

La bispléiocarpinium **5** a été obtenue sous la forme d'une poudre amorphe brune foncée. Les spectres UV et IR, sont similaires à ceux des pléiokomenines décrites précédemment. Son spectre HRESI-QTOF-SM+ a montré un ion moléculaire à m/z 699,3922 $[M]^+$, correspondant à la formule brute $C_{44}H_{51}N_4O_4^+$, [calculée pour $C_{44}H_{51}N_4O_4$: 669,3905, erreur = -1,8 ppm]. Il possède 22 degré d'insaturations, deux de plus que les pléiokomenines. C'est un composé optiquement actif avec un pouvoir rotatoire d'une valeur de $[\alpha]_D^{19,2} - 65$ (c 0,05, MeOH).

L'analyse des données RMN 1H , ^{13}C dans le $CDCl_3$ a révélé que **5** possède 44 carbones, dont 4 méthyles, 13 méthylènes, 13 méthines et 14 quaternaires, ayant des déplacements chimiques qui sont similaires à ceux des pléiokomenines (A–D). Ceci laisse penser que **5** est un homodimère de type aspidofractane. Toutefois on peut noter d'une part, le remplacement de trois méthylènes d'hybridation sp^3 dans le spectre ^{13}C , par les carbones sp^2 (C-6', C-5' et C-5) et d'autre part la présence d'une fonction iminium au niveau de l'azote N-4 de l'unité B, justifiée par le déblindage du carbone C-5 (δ_c 170,3) lié à cet azote (Figure 43).

La structure du composé **5** a été élucidée par l'analyse détaillée et combinée des spectres COSY, HMBC (Figure 44). Le pontage des deux unités a été notamment établi grâce aux

corrélations HMBC observées entre le proton H-5' et le carbone C-5 ainsi que les protons H₂-6 et le carbone C-6' (Figure 44). Ce pontage entre les carbones C-5 et C-6' est similaire à celui de l'alasmontamine A, un alcaloïde indolomonoterpénique tetrakis unique en son genre, isolé de *Tabernaemontana elegans* Stapf.¹⁶⁴

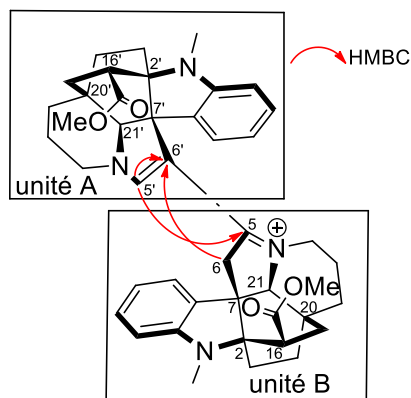


Figure 44. Corrélations HMBC de la bispléiocarpinium (5)

L'analyse approfondie du spectre ROESY de 5 a indiqué des corrélations similaires à celles observées pour les pléiokomenines, avec les mêmes centres chiraux (C-2, C-2', C-7, C-7', C-16, C-16', C-20, C-20', C-21, C-21'). Cela suggère que le composé 5 présente la même configuration relative que les pléiokomenines. La détermination de la configuration absolue du bispléiocarpinium (5) à l'aide du dichroïsme circulaire électronique est en cours.

¹⁶⁴ Y. Hirasawa, *et al.*, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5718-5721.

3.4.4. Les analogues de la pléiomutine : la 6-oxopléiomutine et la N-oxydépléiomutine

3.4.4.1. La 6-oxopléiomutine (6)

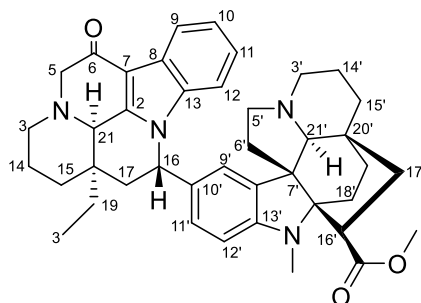


Figure 45. Structure de la 6-oxopléiomutine (6)

La 6-oxopléiomutine (6) a été obtenue sous la forme d'une poudre amorphe pourpre. Son spectre UV a montré des absorptions à 245, 268 et 295 nm, caractéristique des chromophores indolique.¹⁶⁵ Le spectre IR indique la présence d'une fonction ester à 1756 cm^{-1} et d'une fonction cétone-conjuguée à 1684 cm^{-1} . Le spectre HRESI-QTOF-SM+ a montré un ion pseudomoléculaire à m/z 645,3916 $[\text{M}+\text{H}]^+$, correspondant à la formule brute $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_3$, [calculée pour $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_3$: 645,3799, erreur = $-1,9$ ppm]. Elle possède 20 degrés d'insaturation. C'est un composé optiquement actif avec un pouvoir rotatoire d'une valeur de $[\alpha]_{\text{D}}^{19,2} -40$ (c 0,05, MeOH).

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C indique que la 6-oxopléiomutine (6) possède 41 atomes de carbones comprenant ; 3 méthyles, 14 méthylènes, 11 méthines et 13 carbones quaternaires. La majorité des déplacements chimiques protons et carbones de 6 ont montré une similarité avec ceux observés chez la pléiomutine. Cependant, la comparaison des deux spectres RMN ^{13}C a indiqué une variation significative du signal du carbone C-6. Ce carbone est à δ_{C} 17,8 dans la pléiomutine, correspondant à un CH_2 , tandis que dans le composé 6 il est à δ_{C} 192,2, signal caractéristique d'une cétone (Figure 46). Ce qui laisse donc suggérer que le composé 6 est un analogue de la pléiomutine.¹⁵⁷

¹⁶⁵ A. L. Gunatilaka, *et al.*, *Heterocycles* **1989**, 28, 999-1005.

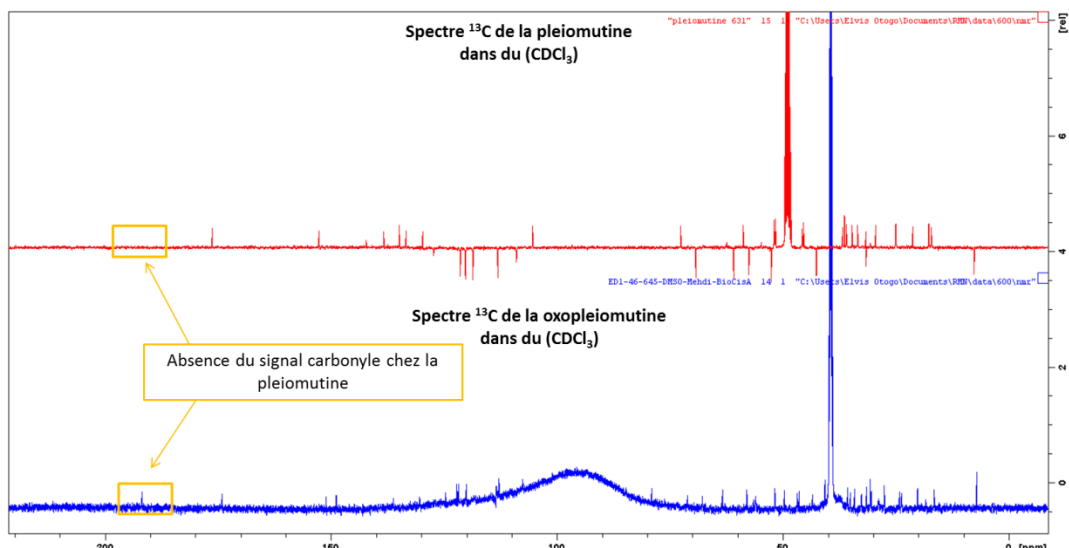


Figure 46. Comparaison des spectres ^{13}C du composé 6 et la pléiomutine

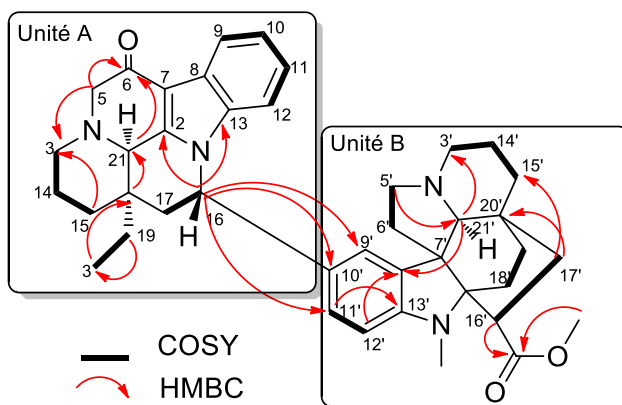


Figure 47. Corrélations COSY et HMBC de la 6-oxopléiomutine

L'analyse des données RMN 2D (COSY, HSQC et HMB) a confirmé que le composé 6 correspond à un alcaloïde *bis*-indole de type éburnamine-aspidofractane très proche de la pléiomutine.

La structure de la 6-oxopléiomutine et la position du carbonyle en C-6 ont été élucidées par une analyse combinée des spectres COSY et HMBC (Figure 47). Les corrélations HMBC des protons H-5 et H-21 avec le carbone C-6 (δ_{C} 192,2) indiquent clairement la position du carbonyle. Les corrélations HMBC du porton H-16 avec les carbones C-10', C-11' et C-9' ont permis de relier les deux unités A et B.

a. Configuration relative de la 6-oxopléiomutine (6)

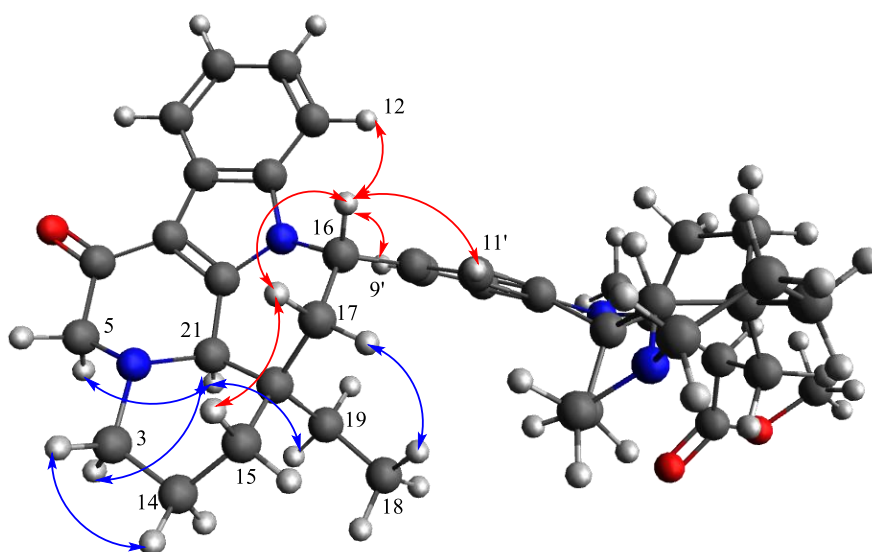


Figure 48. Corrélation NOESY de la 6-oxopléiomutine (6) : (au-dessus du plan : flèches rouges), (en-dessous du plan : flèches bleues)

La configuration relative du composé **6** a été déduite à l'aide des corrélations observées sur le spectre NOESY. Les corrélations observées entre H-16/H-12, H-9', H-11', H-17a ainsi qu'entre H-17a et H-15_a indiquent que ces protons sont cofaciaux (Figure 48). Tandis que les corrélations observées entre H-21/H-19, H-5 et H_b-3 suggèrent que ces protons sont orientés vers la face opposée. La configuration relative de l'unité A éburnane du composé **6** a été définie comme étant (16S*, 20R*, 21R*). Soulignons que les corrélations NOESY de l'unité B aspidofractane du composé **6** sont similaires à celles de la pléiocarpinine (2'R*, 7'R*, 16'R*, 20'R*, 21'S*).

La configuration relative de la 6-oxopléiomutine a été définie comme étant 16S*, 20R*, 21R*, 2'R*, 7'R*, 16'R*, 20'R*, 21'S*.

3.4.4.2. La *N*-oxydépléiomutine

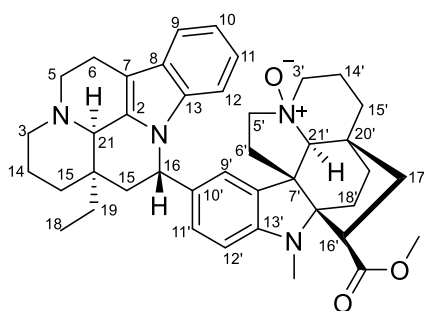


Figure 49. Structure de la *N*-oxydépléiomutine (7)

Le composé **7** a été obtenu sous la forme d'une poudre amorphe pourpre. Les spectres UV et IR, se sont montrés similaires à ceux de la 6-oxopléiomutine (**6**) décrite précédemment. Le spectre HRESI-QTOF-SM+ a indiqué un ion pseudomoléculaire à m/z 647,3916 $[M+H]^+$, correspondant à la formule brute $C_{41}H_{51}N_4O_3$, [calculée pour $C_{41}H_{51}N_4O_3$: 647,3956, erreur = $-0,2$ ppm]. Elle possède deux unités de masse en plus que la 6-oxopléiomutine. C'est un composé optiquement actif avec un pouvoir rotatoire d'une valeur de $[\alpha]_D^{19,2} - 40$ (c 0,05, MeOH).

L'analyse des données RMN 1H et ^{13}C dans l'acétone deutérée du composé **7** indique qu'ils sont étroitement similaires à ceux de la 6-oxopléiomutine, mais à une seule différence : l'absence du carbonyle dans le spectre carbone (Figure 50) et la présence de certains carbones déblindés appartenant à l'unité aspidofractane (unité B, Figure 49) du composé **7**. Cette observation combinée à l'analyse du spectre HSQC suggère que le carbonyle a été remplacé par un méthylène sur le carbone C-6.

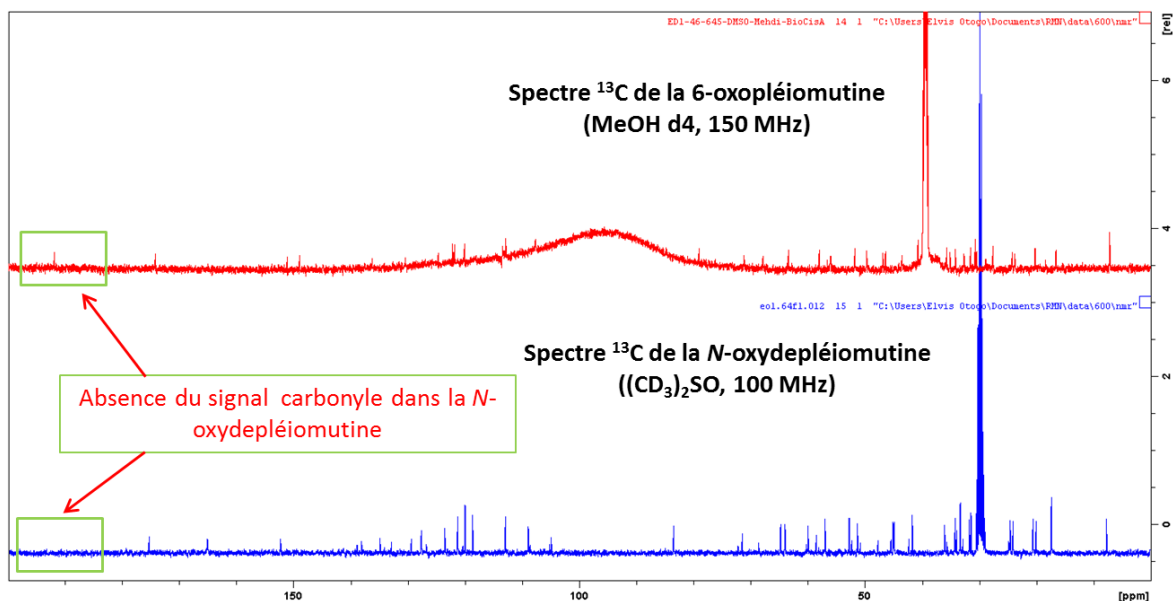


Figure 50. Comparaison des spectres RMN ^{13}C des 6-oxo et la *N*-oxypéléiomutine ((CD_3) $_2\text{SO}$, 125 et 100 MHz)

L'analyse détaillée des données RMN 2D (COSY et HMBC) a révélé que le composé **7** est un analogue de la pléiomutine, possédant un atome d'oxygène en plus. Ceci a été particulièrement soutenu par les valeurs des déplacements chimiques observées chez les carbones (C-3', C-5' et C-21'), mais surtout par les corrélations HMBC des protons H-21' vers les carbones C-3', C-5' et de H-5' vers le C-21', permettant ainsi de positionner le *N*-oxyde dans l'unité B de la molécule. Le reste des corrélations COSY, HMBC et NOESY sont similaires à celles observées chez la 6-oxopléiomutine (**6**) ou chez la pléiomutine (Figure 51).

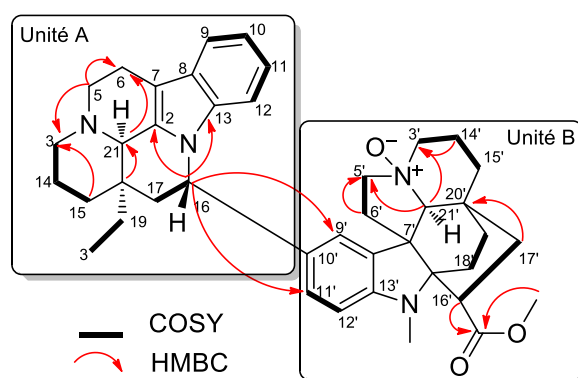


Figure 51. Corrélations COSY et HMBC de la *N*-oxypéléiomutine

a. Configuration relative de la *N*-oxydepléiomutine (7)

Les corrélations NOESY du composé **7** montrent de très fortes similarités avec celles de la pléiomutine. La configuration relative de la *N*-oxydepléiomutine (**7**) a donc été déduite de celle de la pléiomutine.

Des calculs de dichroïsme circulaire électronique sont actuellement en cours pour déterminer la configuration absolue des composés **6** et **7**.

4. Résultats des activités biologiques

Durant ce travail, les activités antiplasmodiale, antileishmanienne et cytotoxique des composés isolés ont été évaluées. Seuls les nouveaux composés ont été testés. Parmi ces composés, certains n'ont pas pu être testés dans les trois cibles sus-citées en raison des faibles quantités isolées. Bien que la pléiomutine est une molécule connue, cette dernière a quand même été testée en raison de l'absence de données biologiques dans la littérature.

4.1. Activité antiplasmodiale

Les sept nouveaux composés isolés y compris la pléiomutine ont été évalués sur une souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* (FcB1). Les résultats sont présentés dans le Tableau 8 ci-dessous. L'interprétation de ce tableau indique que les pléiokomenines ont montré une activité significative avec des CI_{50} comprises entre 3,2 et 3,7 μ M. Les analogues de la pléiomutine se sont montrés moins actifs. Pour information, l'extrait alcaloïdique a montré une activité appréciable avec une $CI_{50} = 2,4 \mu$ g/mL

Tableau 8. Activités de l'extrait brut et de 8 composés isolés de *P. mutica* contre le *Plasmodium falciparum* (FcB1)

Composés	FcB1 CI_{50} (μ M)
Pléiokomenine A (1)	3,7 \pm 0,1
Pléiokomenine B (2)	3,3 \pm 0,3
Pléiokomenine C (3)	3,2 \pm 0,2
Pléiokomenine D (4)	20,5 \pm 0,4
Bispléiocarpinium (5)	14,5 \pm 0,7
6-Oxopléiomutine (6)	75,5 \pm 0,5
N-oxypoléiomutine (7)	44, 5 \pm 0,2
Pléiomutine	3,1 \pm 0,9
Chloroquine	0,05 \pm 0,06

4.2. Activité antileishmanienne

L'activité antileishmanienne de six composés ainsi que l'extrait alcaloïdique a été évaluée *in vitro*. Les résultats obtenus, montrent une relative activité de l'ensemble des composés y compris l'extrait brut (Tableau 9). On notera tout de même la forte activité de la pléiokomenine A sur la souche axénique amastigote de *L. donovani*.

Tableau 9. Activités antileishmanienne de l'extrait brut et de 6 composés isolés de *P. mutica*

Composés	<i>L. donovani</i> LV9 axénique amastigote CI ₅₀ µM	<i>L. donovani</i> LV9 intramacrophagique amastigote CI ₅₀ µM
Pléiokomenine A (1)	2,65 ± 0,44	25,37 ± 4,65
Pléiokomenine B (2)	18,76 ± 3,08	81,09 ± 30,11
Pléiokomenine C (3)	68,19 ± 9,46	93,71 ± 13,00
Pléiokomenine D (4)	45,05 ± 5,04	35,89 ± 11,86
6-oxopléiomutine (6)	> 155,27	110,07 ± 26,90
N-oxydepléiomutine (7)	> 154,79	> 154,79
Extrait alcaloïdique*	8,51 ± 0,92	2,4 ± 0,1
Miltéfosine	1,42 ± 0,20	5,2 ± 0,4

*Exprimé en µg/mL

4.3. Activités cytotoxiques

Le test de cytotoxicité a été effectué sur une lignée saine (HUVEC) et deux lignées cancéreuses (A549 et HEP-G2). Les six composés et l'extrait alcaloïdique ont été testés (Tableau 10). Les résultats obtenus montrent qu'ils sont faiblement cytotoxiques à 10 µM. Cependant leur potentiel antitumorale n'a pas été démontré dans cette étude et aucune toxicité cellulaire n'a été enregistrée.

Tableau 10. Activités cytotoxiques de l'extrait brut et de 6 composés isolés de *P. mutica*

Composés	Souches traitées avec une dose de 10 µM		
	A549 % survie	HUVEC % survie	HEP-G2 % survie
Pléiokomenine A (1)	50,8 ± 5,9	62,3 ± 7,5	61,4 ± 8,3
Pléiokomenine B (2)	88,0 ± 4,9	92,5 ± 4,3	72,1 ± 6,2
Pléiokomenine C (3)	90,3 ± 1,5	94,1 ± 7,2	82,2 ± 19,1
Pléiokomenine D (4)	91,8 ± 3,9	97,7 ± 0,7	85,7 ± 27,0
6-oxopléiomutine (6)	92,5 ± 3,8	92,7 ± 11,5	93,8 ± 17,4
<i>N</i>-oxydépléiomutine (7)	75,2 ± 5,6	92,8 ± 13,8	71,3 ± 28,5
Extrait alcaloïdique*	53,9 ± 2,5	93,7 ± 8,6	22,0 ± 4,8
<i>Non traité</i>	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Doxorubicine HCl	28,3 ± 3,0	35,5 ± 5,7	27,1 ± 9,8

*Extrait testé à 10 µg/mL

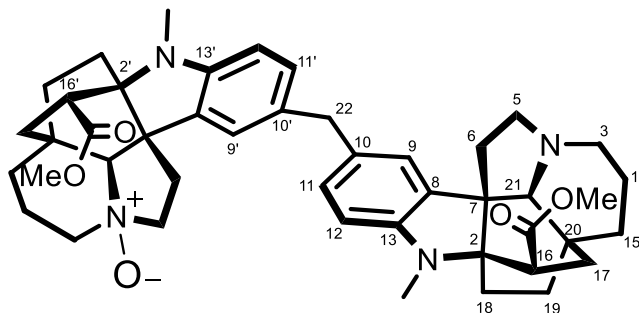
5. Conclusion du chapitre III

L'étude phytochimique de *Pleiocarpa mutica* par l'approche des réseaux moléculaires et de la MIADB a conduit à l'isolement de sept nouveaux alcaloïdes *bis*-indoliques encore jamais décrits dans la littérature. Les quatre premiers dimères de cette étude appartiennent à la série des aspidofractane-aspidofractane et nous les avons nommés pléiokomenines-A à D. Elles représentent les premiers exemples d'alcaloïdes indolomonoterpéniques dimères d'aspidofractanes reliés par un pont méthylène. Le composé **5** est également un dimère aspidofractane relié par une liaison C6'-C5 similaire à celle de l'Alasmontamine A. Quant aux deux derniers composés (**7-6**), ils sont du type aspidofractane-éburnamine, analogues de la pléiomutine. Huit autres composés connus ont également été isolés durant ce travail dans le seul but d'enrichir la MIADB. Il s'agit de la pléiocarpamine, la pléiocarpoline, la pléiocarpolinine, la pléiocarpine, la sarpagine, la pléiocarpinine (qui a servi pour l'hémisynthèse de la pléiokomenine-A) et les deux dimères connus de cette plante la pléiomutinine et la pléiomutine.

Les nouveaux composés (**1-7**) et l'extrait alcaloïdique ont été soumis à des tests biologiques *in vitro* portant sur la recherche d'activités antiplasmodiale (FcB1), antileishmanienne et de cytotoxiques. Les valeurs obtenues sont de l'ordre du micromolaire pour le test antiplasmodial et antileishmaniose, ce qui traduit une activité *in vitro* très moyenne pour ces molécules. Ces composés ne sont pas cytotoxiques au regard des résultats obtenus.

6. Données spectrales des molécules isolées à partir de *P. mutica*

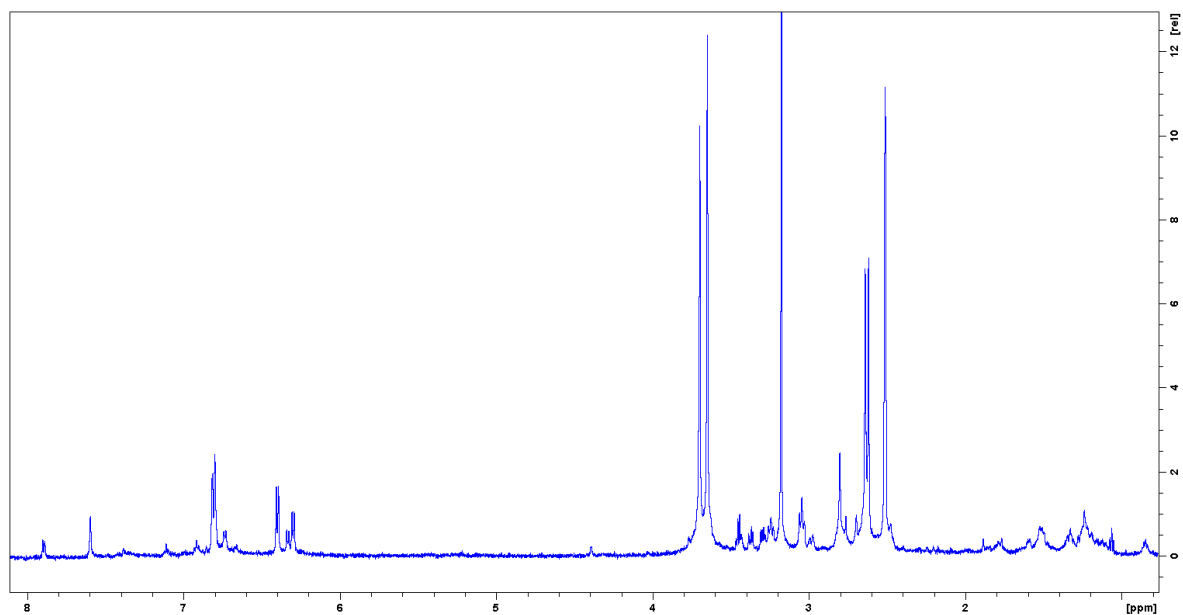
6.1. Données spectrales de la pléiokomenine C (3)



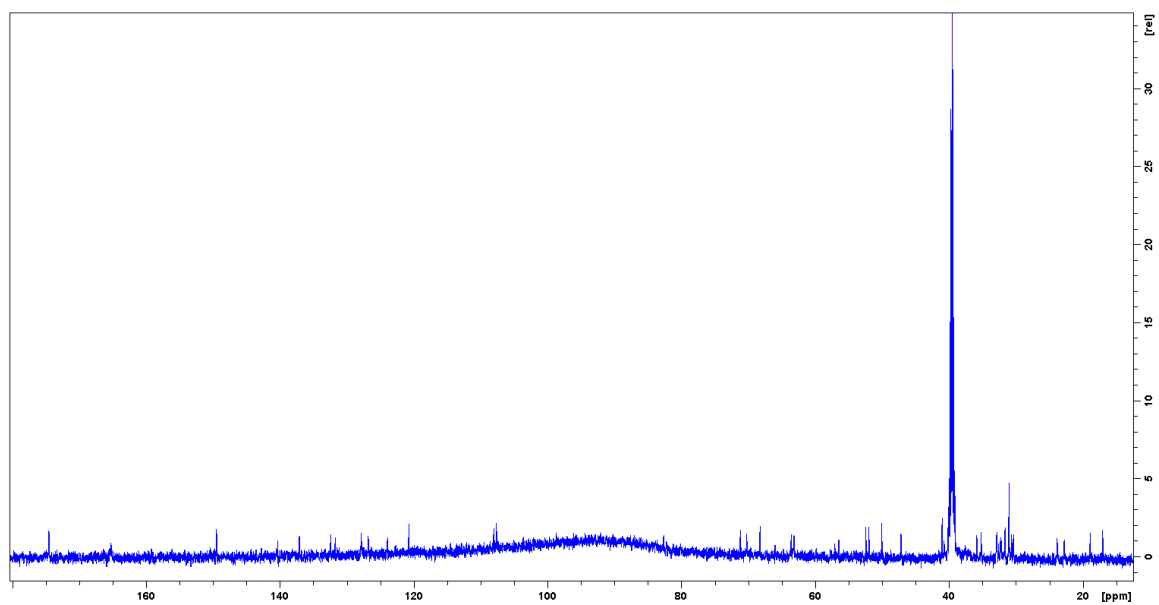
- **Aspect** : poudre amorphe brun foncé
- **UV, (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$)** : 207; 265; 305,8 nm
- **$[\alpha]_{589}^{19,0}$** : -40 (*c* 0,05, MeOH)
- **Masse (ESI-HRMS):** $[M+H]^+$ $m/z = 733,4335$, calculée pour $C_{45}H_{57}N_4O_5$, $m/z = 733,4323$ (Diff = -1,2 ppm)

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		71.1
3	2.97, m ; 2.78, m	47.1
5	3.16, m ; 2.79, m	49.9
6	1.49 m ; 1.20 m	35.78
7		56.4
8		137.1
9	7.58, sl	123.9
10		132.4
11	6.79, (dd, 7.6, 1.6)	128.1
12	6.38, (d, 8.2)	108.8
13		149.6
14	1.19 m ; 1.77m	16.9
15	1.39 m; 1.58 m	32.7
16	3.03, s d	41.0
17	1.48, m; 1.14, m	30.3
18	1.51 m ; 1.18 m	23.7
19	1.51 m ; 1.18 m	31.5
20		30.5
21	2.79 s	68.1
22	3.61, overlap	40.9
2'		70.2
3'	4.01, m ; 3.34 m s	63.4
5'	3.66, m; 3.13, m	63.1
6'	2.52, m ; 2.46 m	35.16
7'		57.0
8'		140.2
9'	6.80, sl	120.6
10'		131.7
11'	6.97, d (7.6)	126.8
12'	6.41, d (8.2)	107.6
13'		149.6
14'	1.97, m 1.78 m	18.8
15'	1.39, m 2.50 m	32.5
16'	3.23, (t, 10)	40.1
17'	2.64, m 1.48 m	31.6
18'	1.51, m 1.37 m	22.7
19'	1.39, m 1.73 m	30.6
20'		30.9
21'	3.90 s	82.3
16-CO ₂ Me	3.63, s	52.4
16-CO ₂ Me		174.5
1-N-Me	2.60, s	30.9
16'-CO ₂ Me	3.68 s	52.1
16'-CO ₂ Me	2.62 s	174.4
1'-N-Me	2.75	31.03

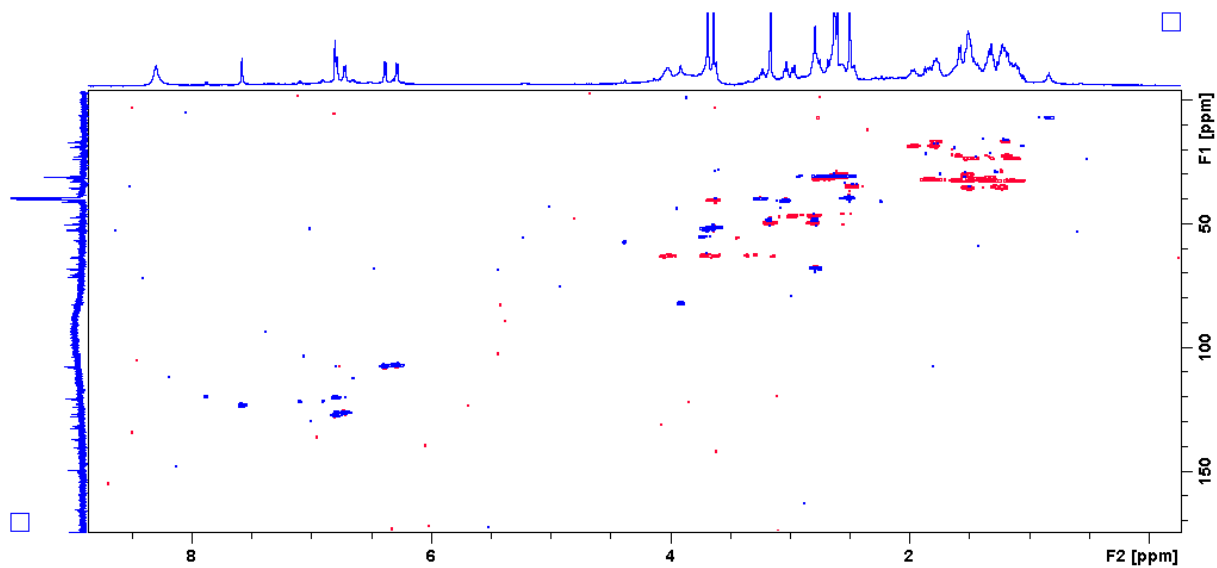
- Spectres RMN de la pléiokomenine C (3)



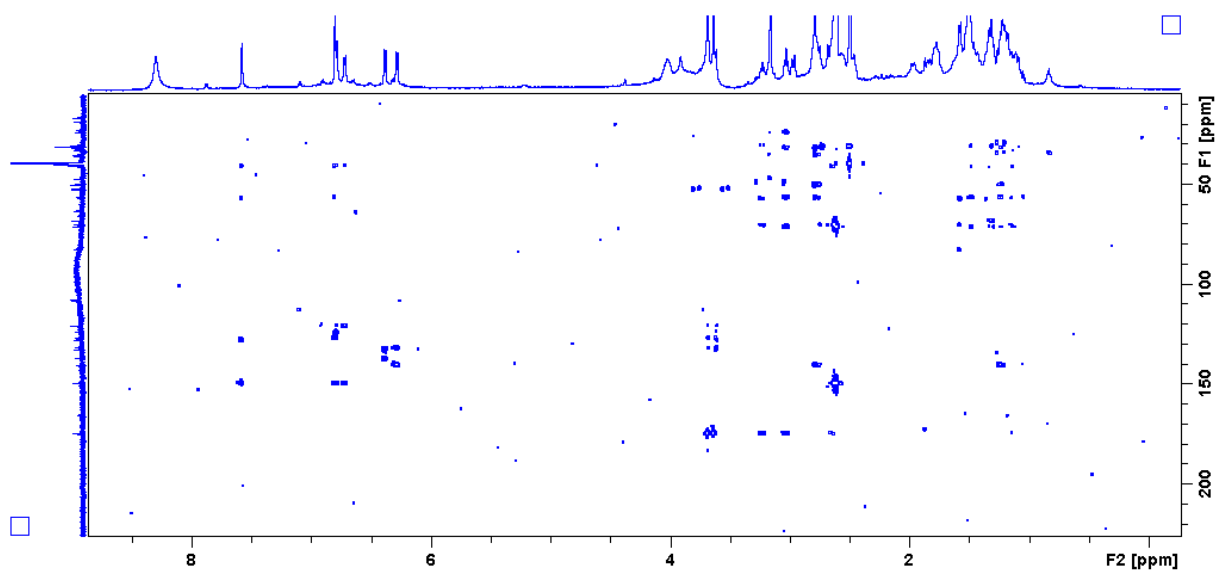
Spectre RMN ^1H de la pléiokomenine C (3) ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 600 MHz)



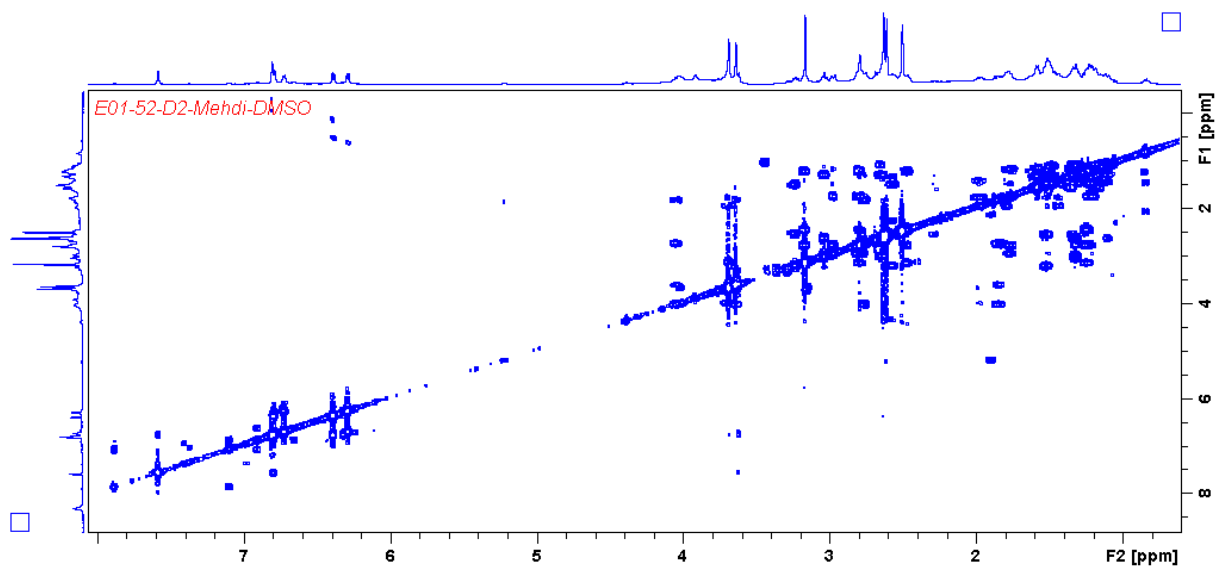
Spectre RMN ^{13}C de la pléiokomenine C (3) ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 150 MHz)



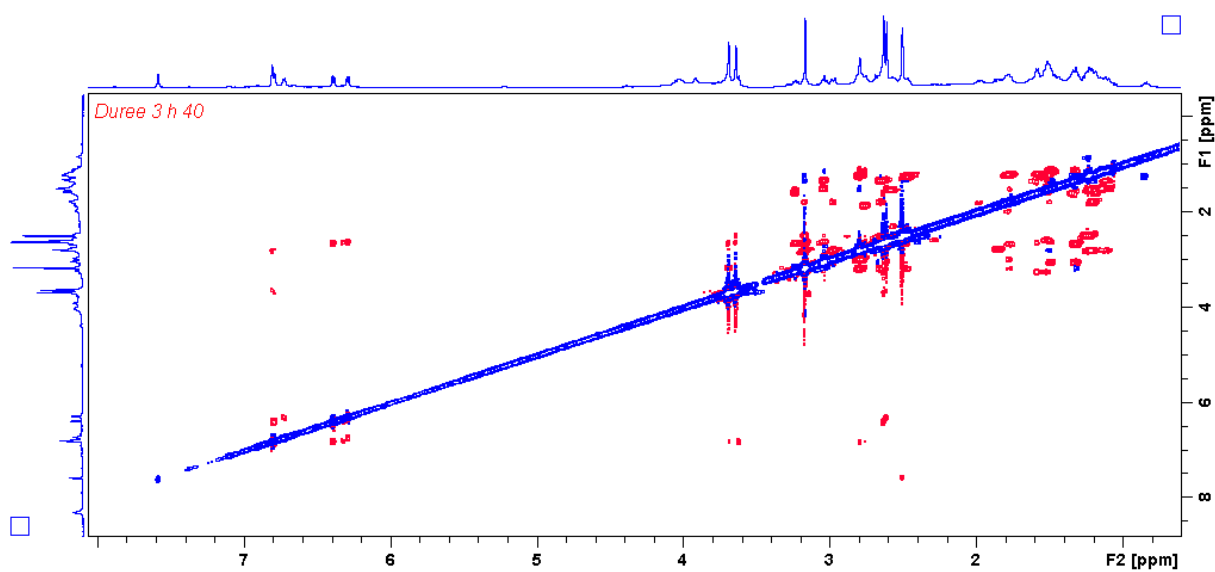
Spectre RMN HSQC de la pléiokomenine C (**3**) ((CD₃)₂SO, 600 MHz)



Spectre RMN HMBC de la pléiokomenine C (**3**) ((CD₃)₂SO, 600 MHz)

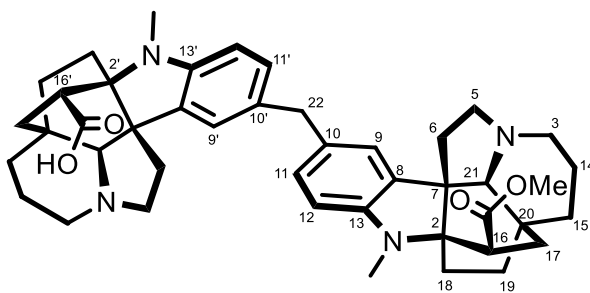


Spectre RMN COSY de la pléiokomenine C (**3**) ((CD₃)₂SO, 600 MHz)



Spectre RMN NOESY de la pléiokomenine C (**3**) ((CD₃)₂SO, 600 MHz)

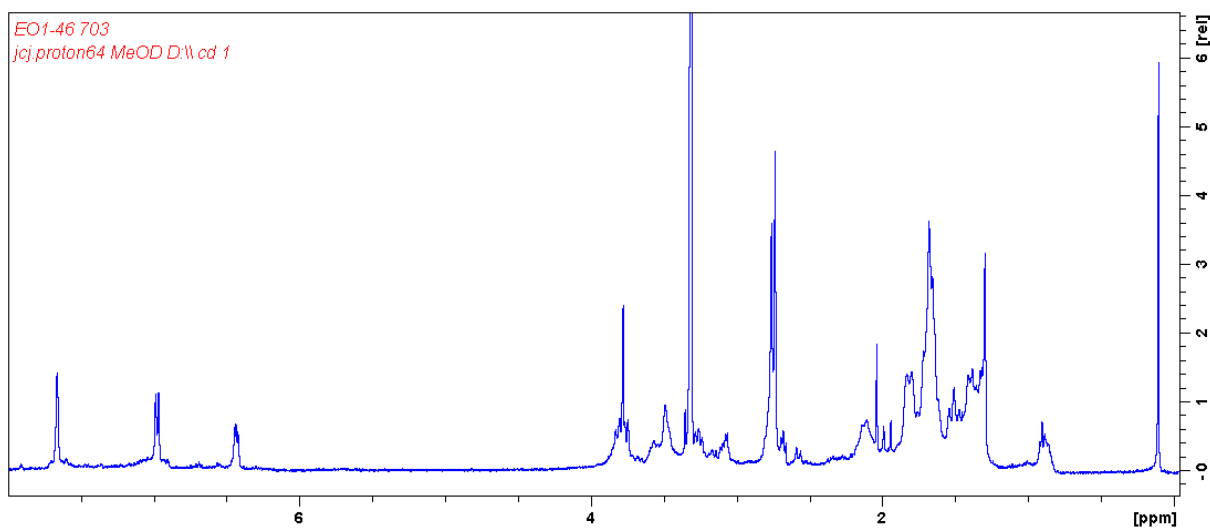
6.2. Données spectrales de la pléiokomenine D (4)



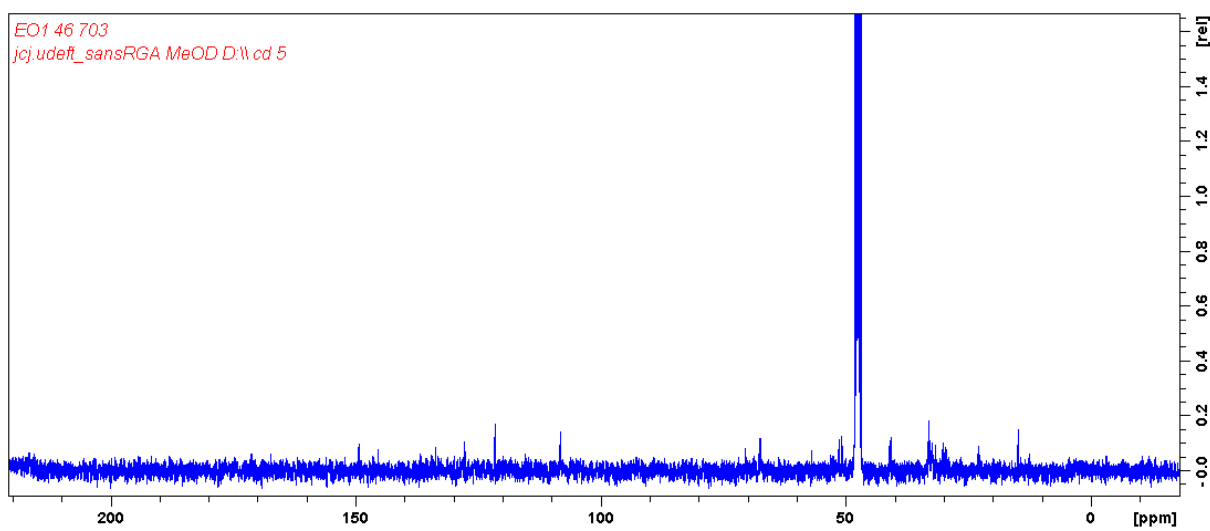
- **Aspect** : poudre amorphe brun foncé
- **UV, (MeOH) λ_{max} (log ϵ)** : 207; 265; 305,8 nm
- **$[\alpha]_{589}^{19,0}$** : -60 (c 0,05, MeOH)
- **Masse (ESI-HRMS)** : $[M+H]^+$ m/z = 703,4179, calculée pour $C_{44}H_{55}N_4O_5$, m/z = 703,4218 (Diff = -2,5 ppm)

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		70.5
3	3.48 m , 3.18 m	46.9
5	3.82 m ; 2.54, m	50.8
6	1.63 m; 1.50 m	32.4
7		56.3
8		136.7
9	7.66, sl	121.6
10		133.7
11	6.97, (dd, 7.6, 1.6)	127.8
12	6.43, (d, 8.2)	107.7
13		149.3
14	2.11 m ; 1.7 m	14.9
15	1.77 m ; 1.39 m	32.7
16	2.99, (t, 10)	40.8
17	2.81 m ; 1.21 m	29.2
18	1.65 m ; 1.37 m	22.8
19	1.39 m ; 1.73 m	31.2
20		30.2
21	3.79 s	67.4
22	3.70, overlap	41.1
2'		70.6
3'	3.48 m ; 3.18 m	46.9
5'	3.82 m; 2.54 m	50.8
6'	1.63 m; 1.50 m	35.4
7'		56.3
8'		136.7
9'	7,66, sl	121.6
10'		133.7
11'	6.97, (dd, 7.6, 1.6)	127.4
12'	6.41, (d, 8.2)	107.6
13'		149.3
14'	2.11 m 1.70 m	14.9
15'	1.77 m ; 1.39 m	33.1
16'	2.99, (t, 10)	40.8
17'	2.81 m ; 1.21 m	29.2
18'	1.65 m ; 1.37 m	23.1
19'	1.39 m ; 1.73 m	30.7
20'		30.2
21'	3.79 s	67.7
16-CO ₂ Me	3.69 s	51.4
16-CO ₂ Me		174.2
1-N-Me	2.73 s	30.1
16'-CO ₂ H		175.2
1'-N-Me	2.75	31.0

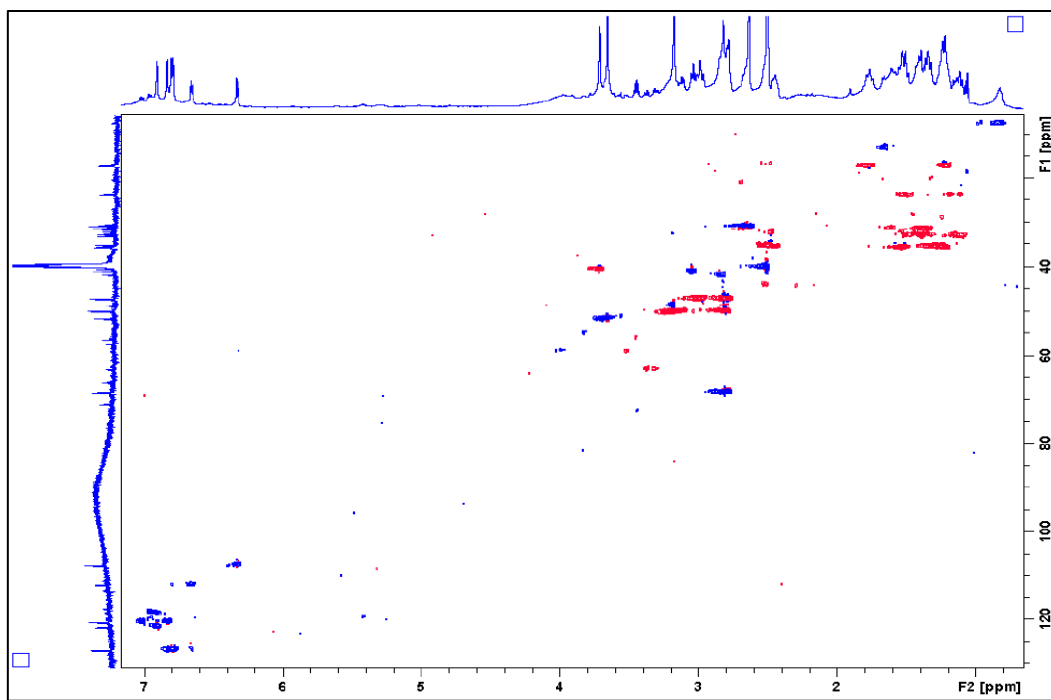
- Spectres RMN de la pléiokomenine D (4)



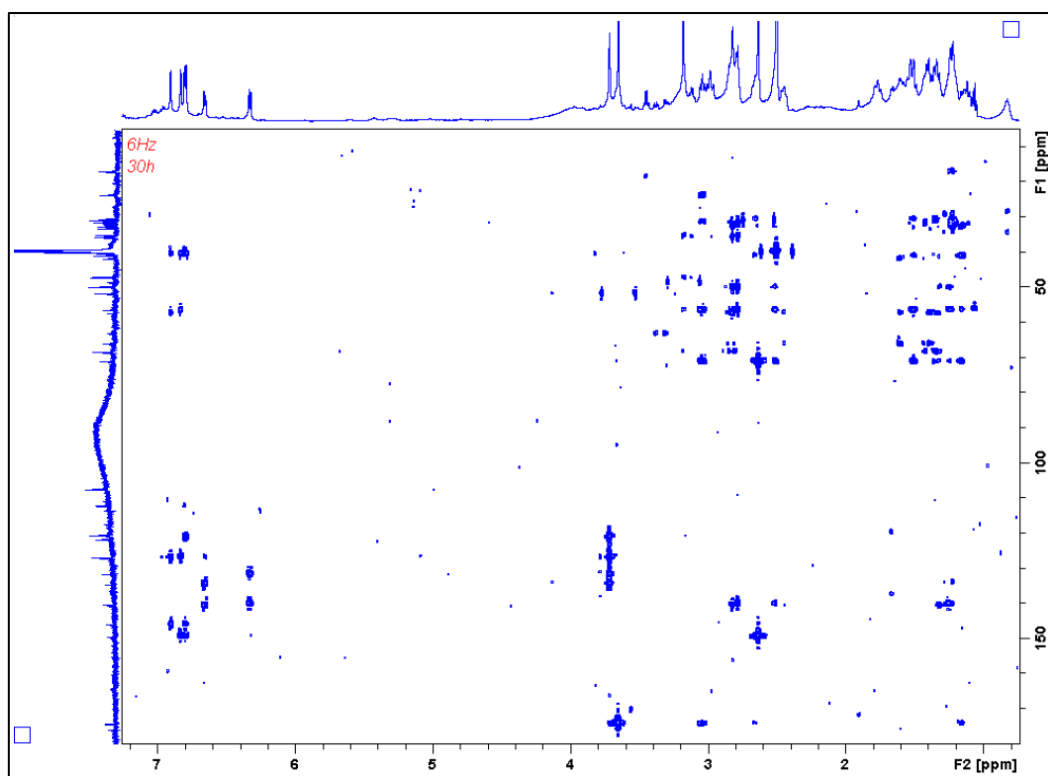
Spectre RMN ^1H de la pléiokomenine D (4) (MeOH d_4 , 400 MHz)



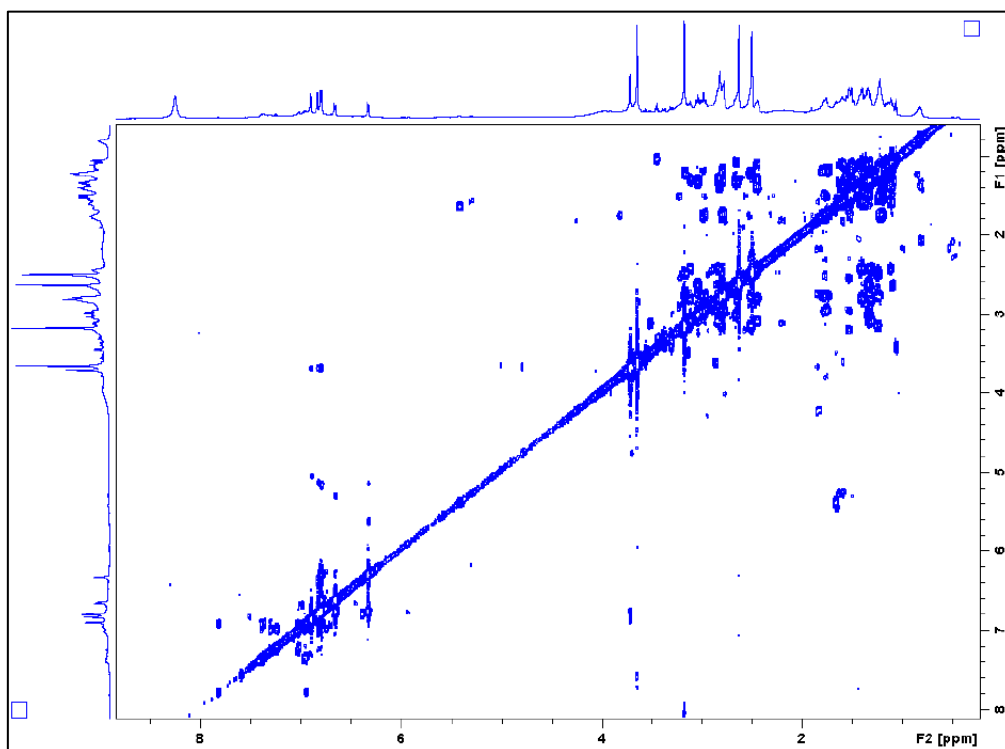
Spectre RMN ^{13}C de la pléiokomenine D (4) (MeOH d_4 , 100 MHz)



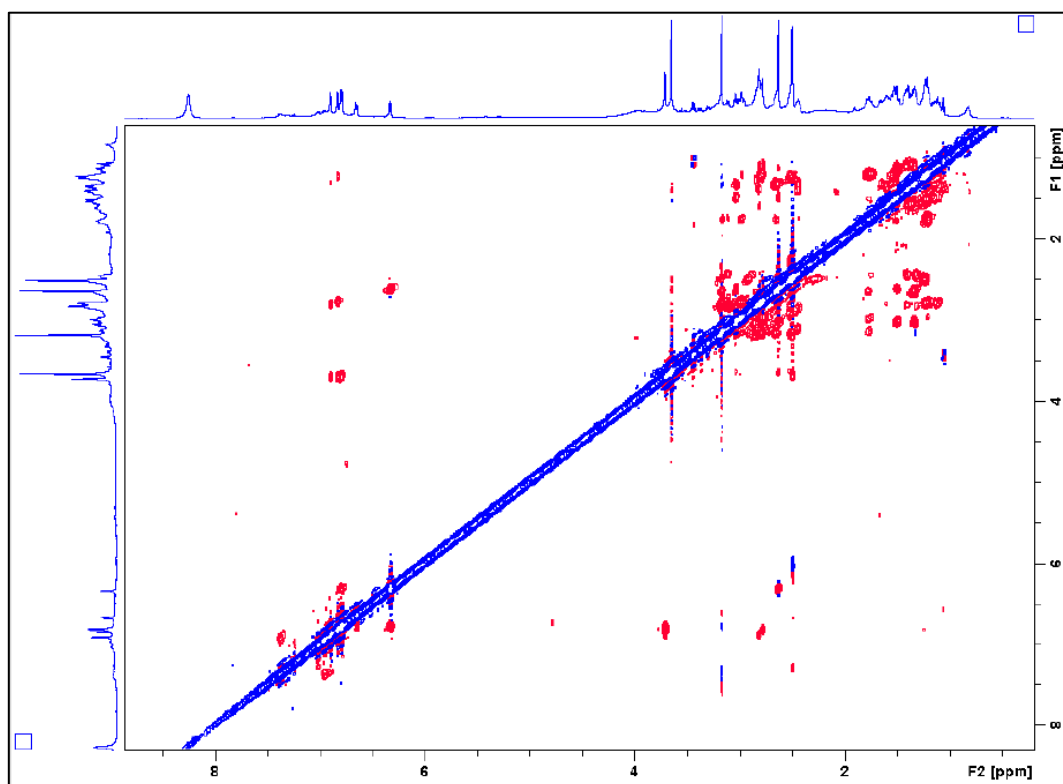
Spectre RMN HSQC de la pléiokomenine D (**4**) (MeOH d₄, 400 MHz)



Spectre RMN HMBC de la pléiokomenine D (**4**) (MeOH d₄, 400 MHz)

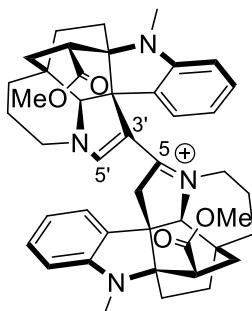


Spectre RMN COSY de la pléiokomenine D (**4**) (MeOH d_4 , 400 MHz)



Spectre RMN NOESY de la pléiokomenine D (**4**) (MeOH d_4 , 400 MHz)

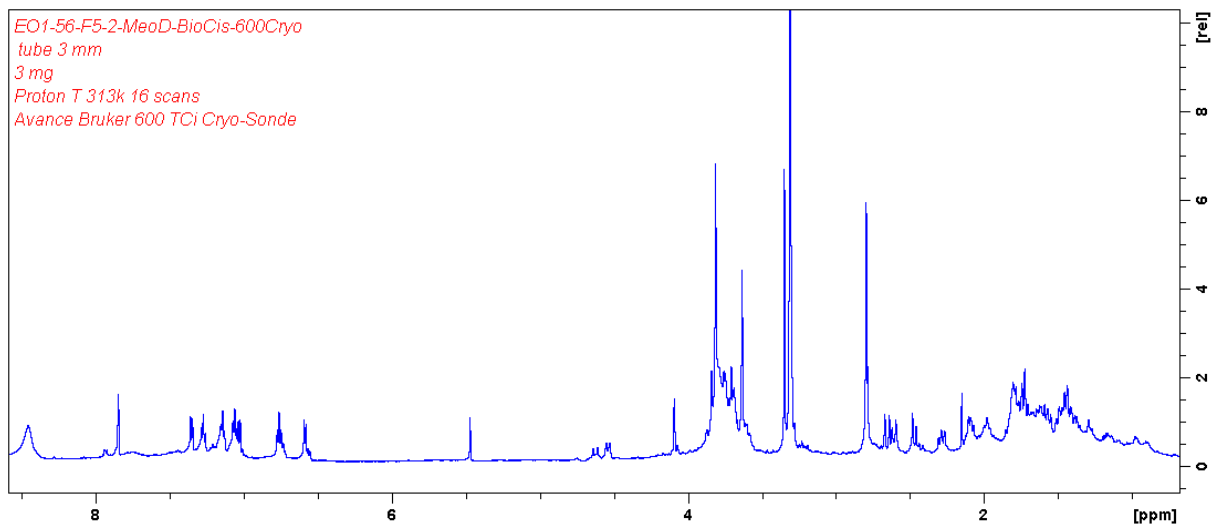
6.3. Données spectrales du bispléiocarpinium (5)



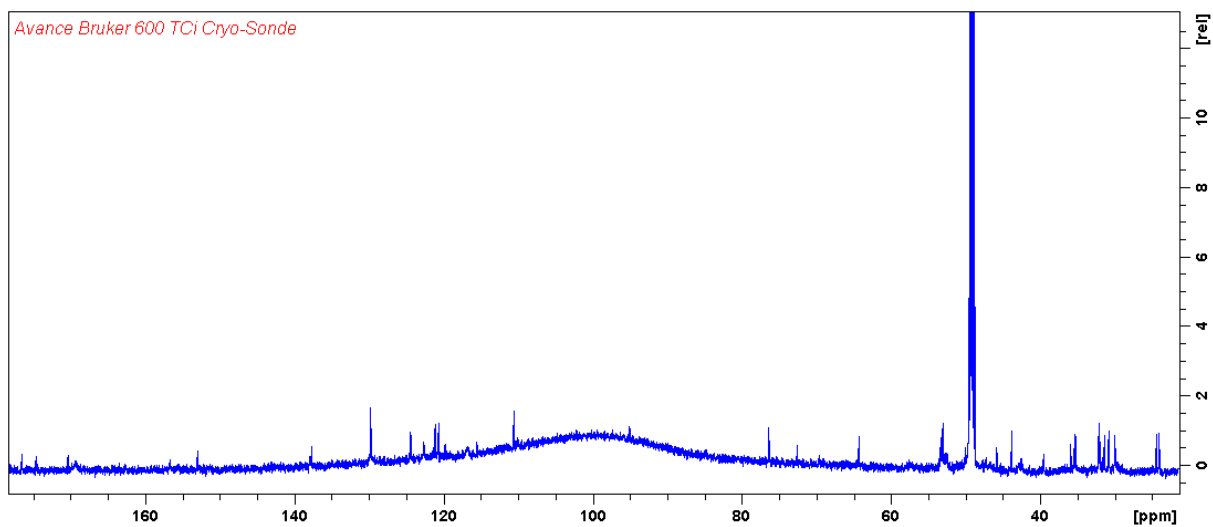
- **Aspect** : poudre amorphe brun foncé
- **UV, (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$)** : 207; 265; 305,8 nm
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{19,0}$** : -65 (c 0,05, MeOH)
- **Masse (ESI-HRMS)**: $[M]^+$ $m/z = 699,3922$, calculée pour $\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_5$, $m/z = 669,3905$
(Diff = -1,8 ppm)

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		71.9
3	3.57, m ; 4.45, m	47.5
5		170.3
6	4.36, m ; 2.67, m	44.7
7		53.2
8		136.1
9	7.06, d (7.7)	121.1
10		118.0
11	7.12, (d, 7.6)	127.9
12	6.60, (d, 8.2)	108.7
13		151.4
14	2.11, m; 1.7, m	14.9
15	1.77, m; 1.39, m	33.1
16	2.99, (t, 10)	40.8
17	2.81, m ; 1.21, m	29.2
18	1.65, m ; 1.37, m	22.8
19	1.39, m ; 1.73, m	31.2
20		34.2
21	4.08 s	75.1
2'		72.5
3'		94.8
5'	7.87 s	156.6
6'	1.63, m; 1.50, m	32.4
7'		56.3
8'		136.7
9'	7.66, d (7.7)	121.6
10'		133.7
11'	6.97, d (7.6)	127.4
12'	6.41, d (8.2)	10.7
13'		149.3
14'	2.11, m;1.7, m	14.9
15'	1.77, m;1.39, m	33.1
16'	2.99, (t, 10)	40.8
17'	2.81, m ; 1.21, m	29.2
18'	1.65, m ; 1.37, m	23.1
19'	1.39, m ; 1.73, m	31.7
20'		30.2
21'	3.83 s	64.2
16-CO ₂ Me	3.69 s	51.4
16-CO ₂ Me		176.9
1-N-Me	2.73, s	30.1
16'-CO ₂ Me	2.75 s	
16'-COOH	8.16 s	175.1
1'-N-Me	2.75	30.1

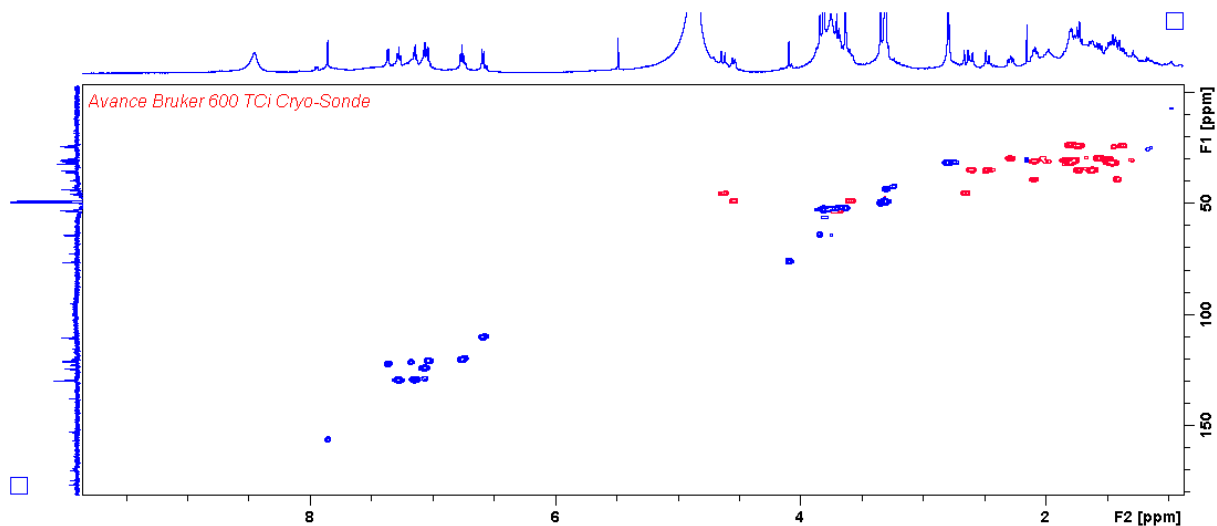
- Spectres RMN du bispléiocarpinium (5)



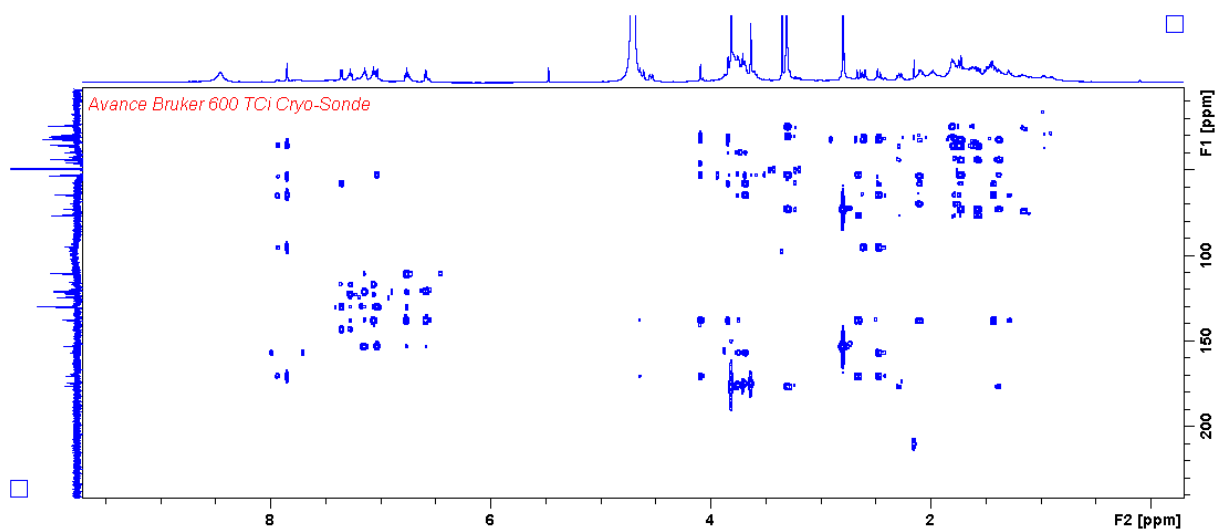
Spectre RMN ^1H du bispléiocarpinium (5) (MeOH d_4 , 600 MHz)



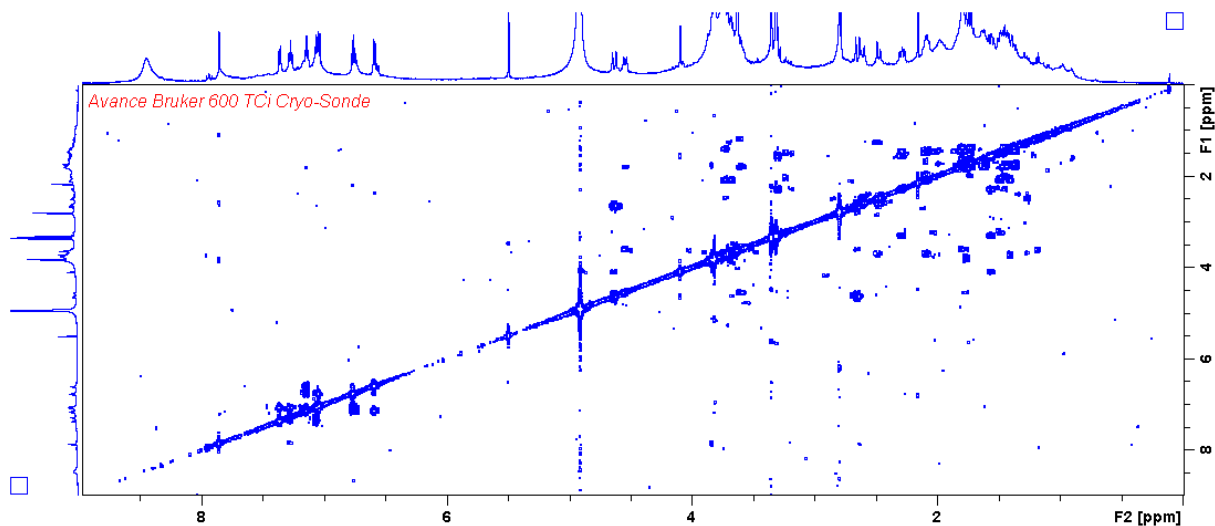
Spectre RMN ^{13}C du bispléiocarpinium (5) (MeOH d_4 , 150 MHz)



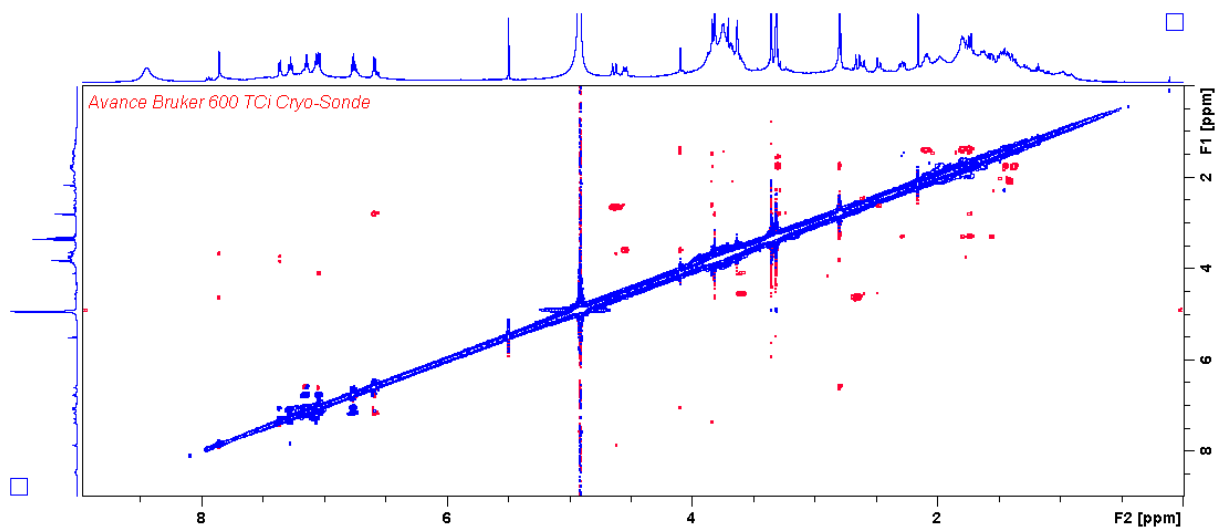
Spectre RMN HSQC du bispléiocarpinium (5) (MeOH d_4 , 600 MHz)



Spectre RMN HMBC du bispléiocarpinium (5) (MeOH d_4 , 600 MHz)

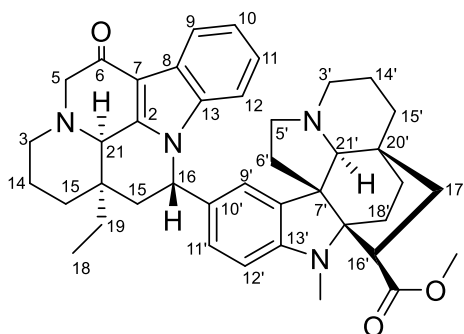


Spectre RMN COSY du bispléiocarpinium (5) (MeOH d₄, 600 MHz)



Spectre RMN ROESY du bispléiocarpinium (5) (MeOH d₄, 600 MHz)

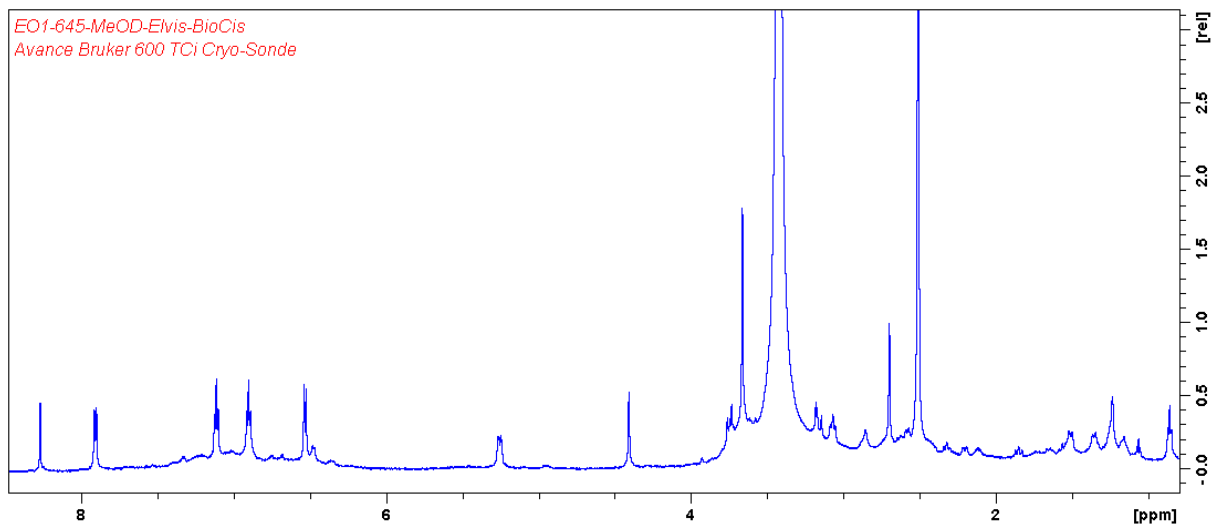
6.4. Données spectrales de la 6-oxopléiomutine (6)



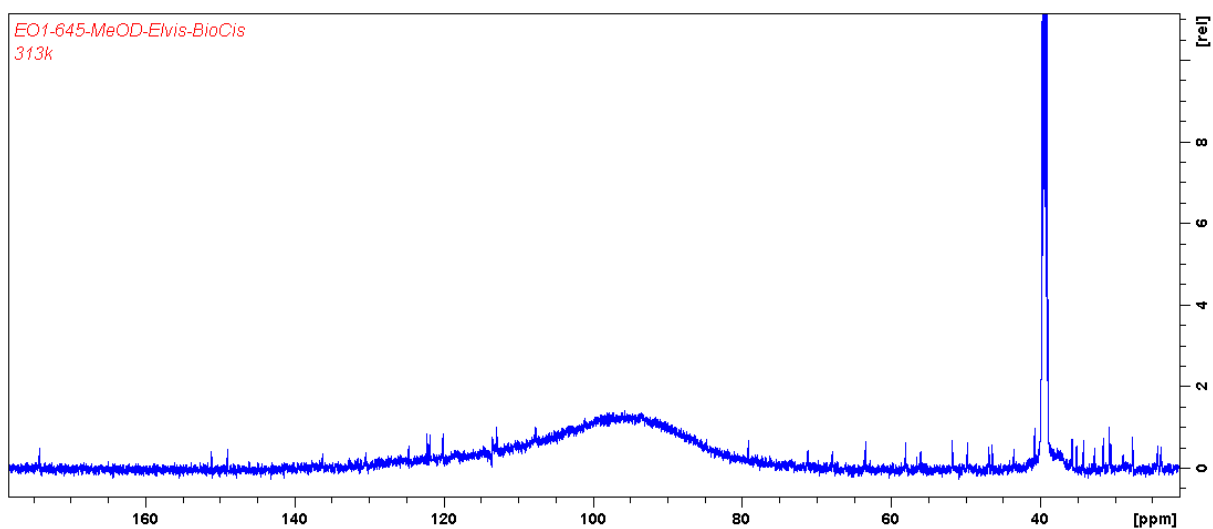
- **Aspect** : poudre amorphe brun foncé
- **UV, (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$)** : 239,8; 268,2; 327,8 nm
- **$[\alpha]_D^{19,0}$** : -40 (c 0,05, MeOH)
- **Masse (ESI-HRMS)**: $[M+H]^+$ $m/z = 645,3916$, calculée pour $C_{41}H_{49}N_4O_3$, $m/z = 645,3799$ (Diff = $-1,9$ ppm).

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		148.9
3	2.58, (d, 15.8) 2.38, (d, 15.8)	46.7
5	3.15, m ; 3.16, m	63.4
6		191
7		107.7
8		124.2
9	7.90, (d, 8.4)	120
10	7.1, (t,, 7.5)	122.8
11	6.9, (t, 7.6)	121.4
12	6.50, (d, 7.6)	112.3
13		136.1
14	2.11, m; 1.7, m	20.3
15	1.77, m; 1.39, m	24.3
16	5.05, (d, 10.3)	56.06
17	2.81, m ; 1.21, m	43.5
18	1.37 (3H, m)	7.2
19	1.39, m ; 1.73, m	27.6
20		34.4
21	3.79 s	58.1
2'		71.1
3'	2.52, m ; 2.32, m	46.4
5'	3.14, m ; 2.75, m	49.7
6'	2.44, m ; 1.10, m	35.7
7'		56.4
8'		124.7
9'	7.11, sl	118.9
10'		130.8
11'	6.89, d	126.4
12'	6.47, (d, 8.1)	107.6
13'		151.1
14'	1.73, m ; 1.15, m	16.9
15'	1.51, m ; 1.24, m	35.1
16'	3.07, t	40.7
17'	2.64, m ; 1.34, m	31.5
18'	1.50, m ; 1.26, m	23.8
19'	1.35, m ; 1.16, m	32.7
20'		30.4
21'	2.86, s	68.7
16-CO ₂ Me	3.71, s	51.8
16-CO ₂ Me		174.1
1-N-Me	2.70, s	30.7

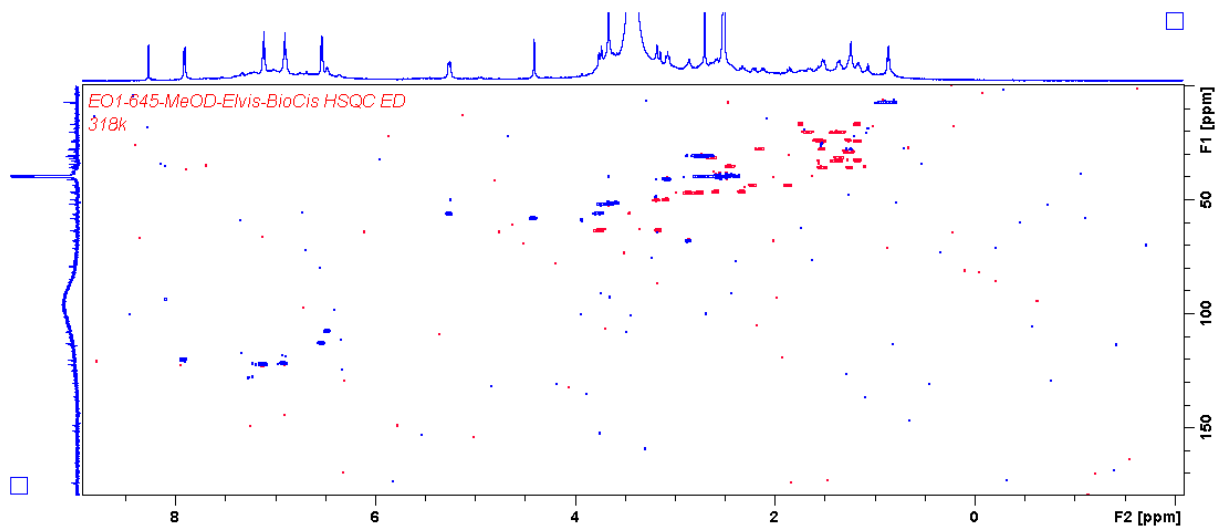
- Spectres RMN de la 6-oxopléiomutine (6)



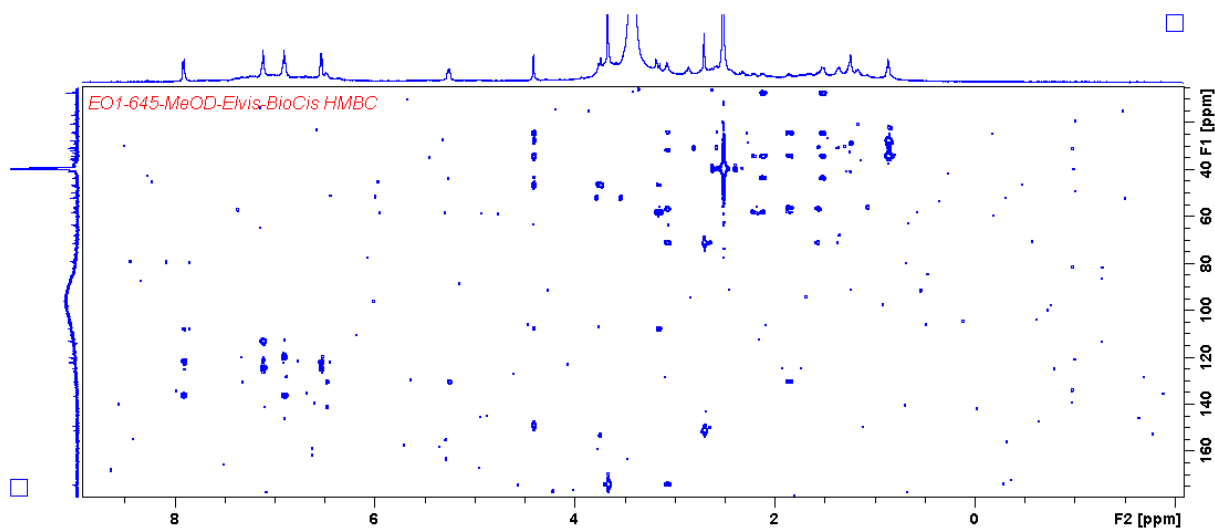
Spectre RMN ^1H de la 6-oxopléiomutine (6) (MeOH d_4 , 600 MHz)



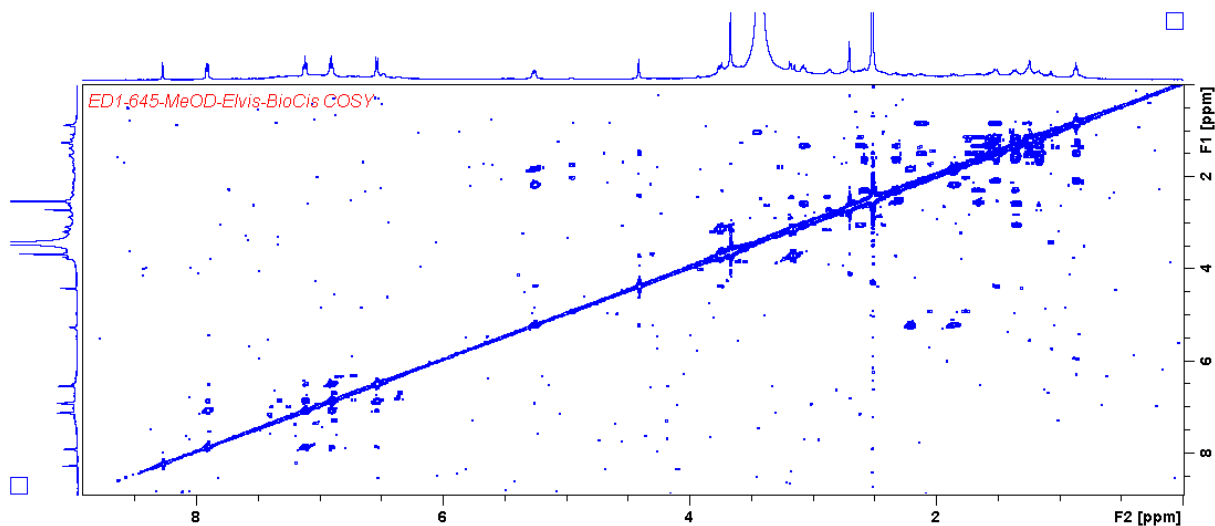
Spectre RMN ^{13}C de la 6-oxopléiomutine (6) (MeOH d_4 , 150 MHz)



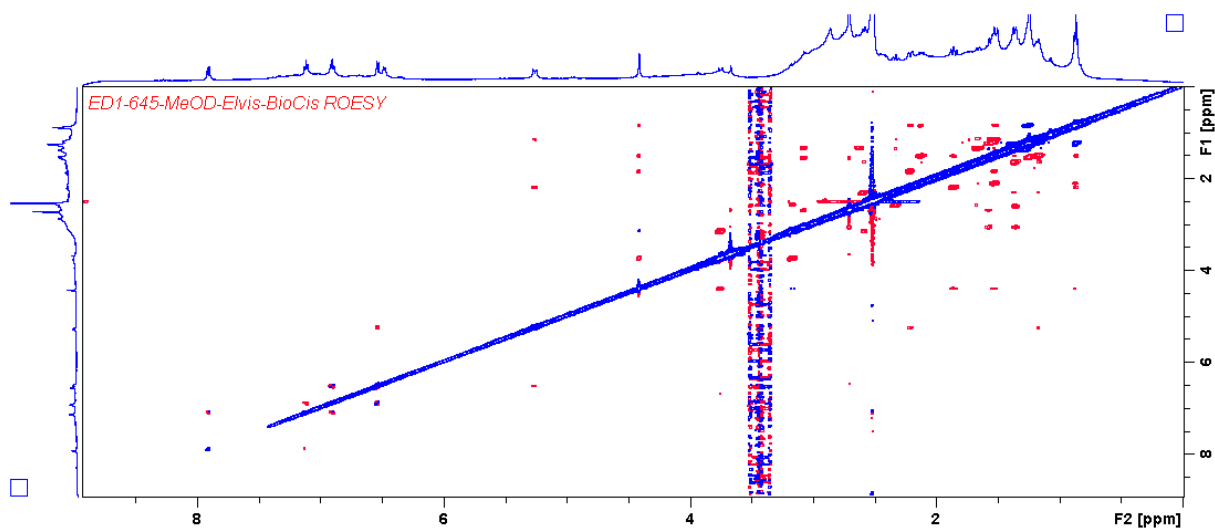
Spectre RMN HSQC de la 6-oxopléiomutine (**6**) (MeOH d_4 , 600 MHz)



Spectre RMN HMBC de la 6-oxopléiomutine (**6**) (MeOH d_4 , 600 MHz)

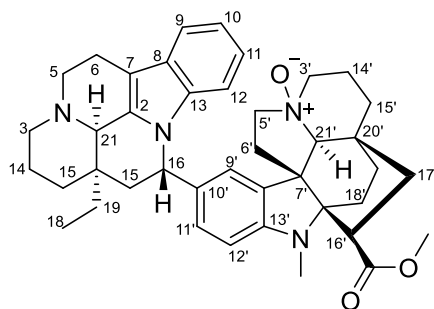


Spectre RMN COSY de la 6-oxopléiomutine (**6**) (MeOH d_4 , 600 MHz)



Spectre RMN NOESY de la 6-oxopléiomutine (**6**) (MeOH d_4 , 600 MHz)

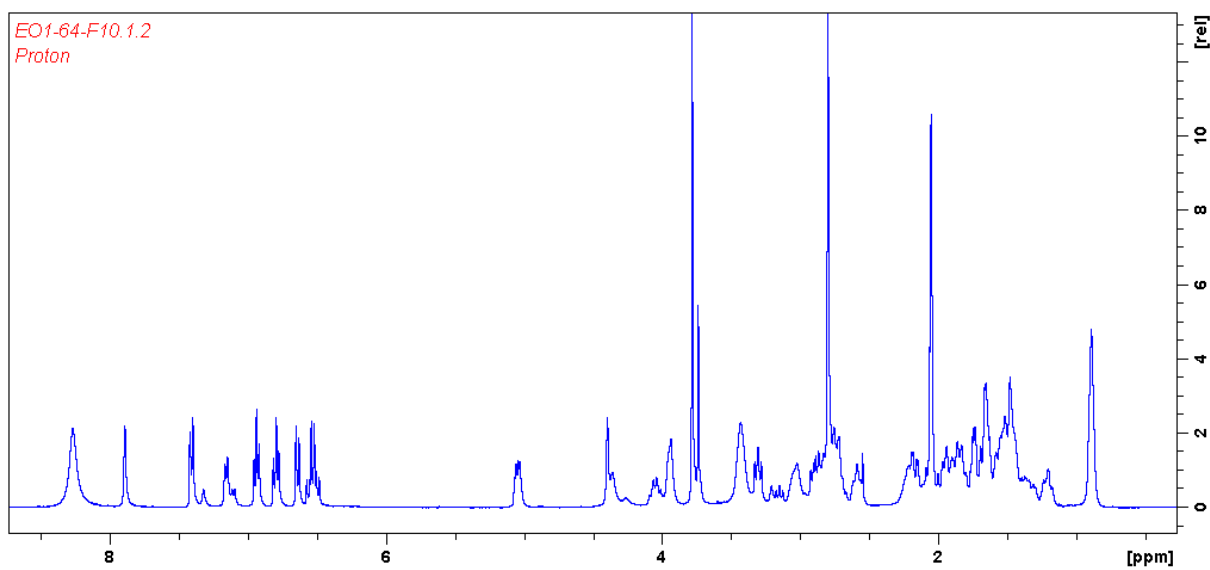
6.5. Données spectrales de la *N*-oxydepléiomutine (7)



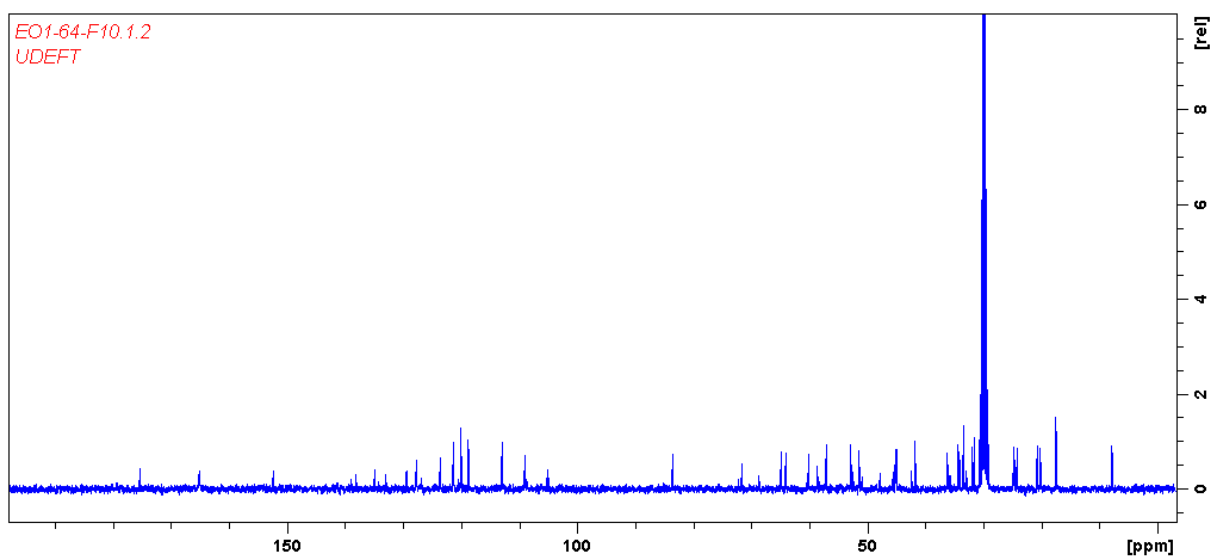
- **Aspect** : poudre amorphe brun foncé
- **UV, (MeOH) λ_{max} (log ϵ)** : 239,8; 268,2; 327,8 nm
- **$[\alpha]_{589}^{19,0}$** : -40 (*c* 0,05, MeOH)
- **Masse (ESI-HRMS)**: $[M+H]^+$ m/z = 647,3916, calculée pour $C_{41}H_{51}N_4O_3$, m/z = 647,3956 (Diff = -0,2 ppm).

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		148.9
3	2.58, (d, 15.8) 2.38, (d, 15.8)	46.7
5	4.0, m 3.83, m	63.4
6	3.79 m	18.5
7		107.7
8		124.2
9	7.90, (d, 8.4)	120
10	7.1, (t,, 7.5)	122.8
11	6.9, (t, 7.6)	121.4
12	6.50, (d, 7.6)	112.3
13		136.1
14	2.11, m; 1.7, m	20.3
15	1.77, m; 1.39, m	24.3
16	5.05, (d, 10.3)	56.06
17	2.81, m ; 1.21, m	43.5
18	1.37 (3H, m)	7.2
19	1.39, m ; 1.73, m	27.6
20		34.4
21	4,23, s	81.9
2'		71.1
3'	2.52, m ; 2.32, m	60.4
5'	3.14, m ; 2.75, m	63.4
6'	2.44, m ; 1.10, m	35.7
7'		56.4
8'		124.7
9'	7.11, s	118.9
10'		130.8
11'	6.89, d	126.4
12'	6.47, (d, 8.1)	107.6
13'		151.1
14'	1.73, m ; 1.15, m	16.9
15'	1.51, m ; 1.24, m	35.1
16'	3.07, t	40.7
17'	2.64, m ; 1.34, m	31.5
18'	1.50, m ; 1.26, m	23.8
19'	1.35, m ; 1.16, m	32.7
20'		30.4
21'	2.86, s	68.7
16-CO ₂ Me	3.71, s	51.8
16-CO ₂ Me		174.1
1-N-Me	2.70, s	30.7

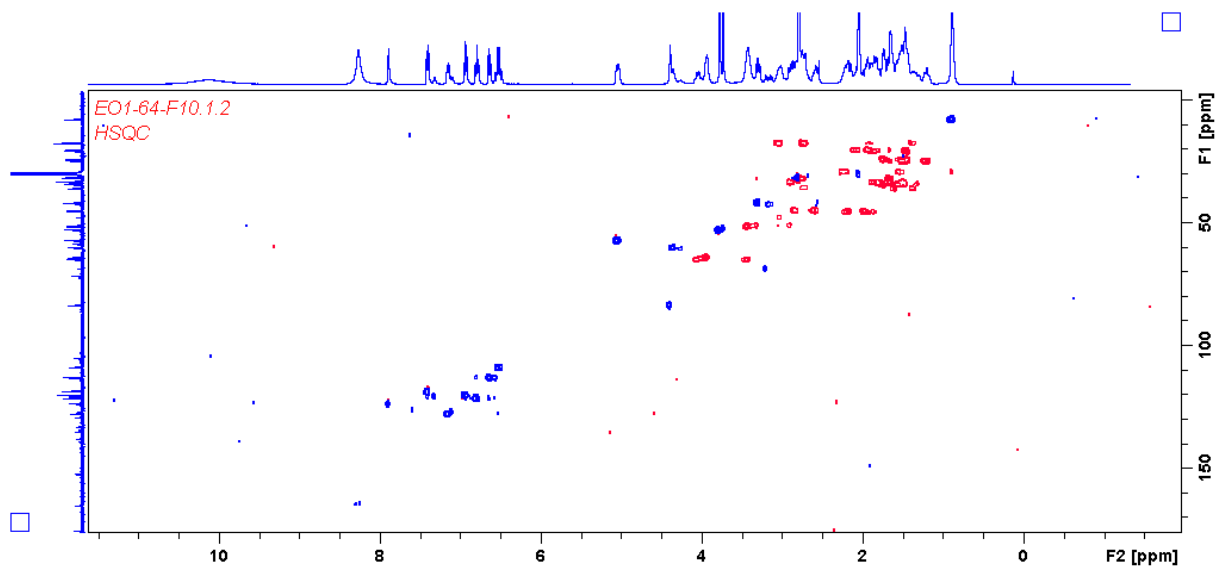
- Spectres RMN de la *N*-oxydepléiomutine (7)



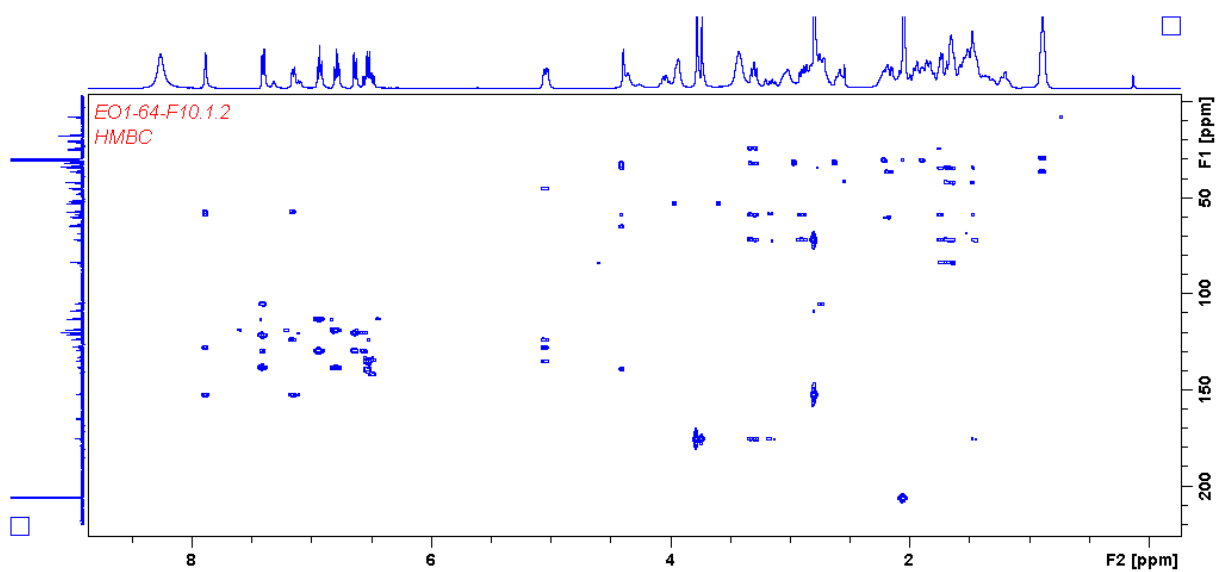
Spectre RMN ^1H de la *N*-oxydepléiomutine (7) $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz



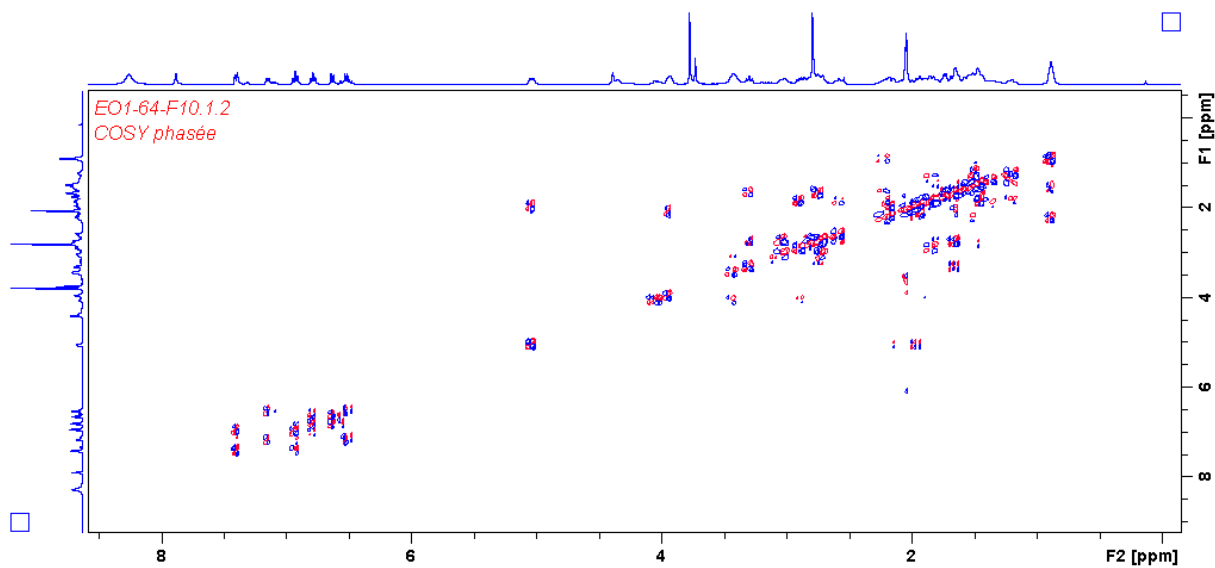
Spectre RMN ^{13}C de la *N*-oxydepléiomutine (7) $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 100 MHz



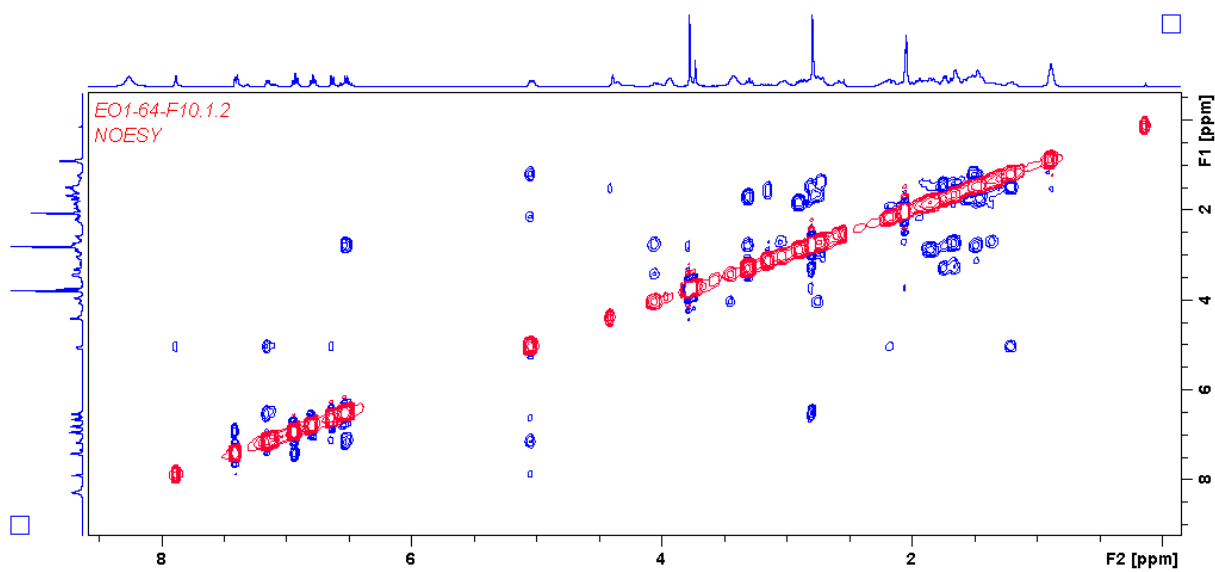
Spectre RMN HSQC de la *N*-oxydepléiomutine (**7**) (CD₃)₂CO, 400 MHz)



Spectre RMN HMBC de la *N*-oxydepléiomutine (**7**) (CD₃)₂CO, 400 MHz)



Spectre RMN COSY de la *N*-oxydepléiomutine (**7**) (CD₃)₂CO, 400 MHz)



Spectre RMN NOESY de la *N*-oxydepléiomutine (**7**) (CD₃)₂CO, 400 MHz)

Chapitre IV

Études chimique et biologique de

***Callichilia inaequalis* Stapf**

(Apocynaceae)

Chapitre IV. Études chimique et biologique de *Callichilia inaequalis* Stapf (Apocynaceae)

1. Introduction *Callichilia inaequalis*

Dans ce chapitre est présentée l'étude phytochimique de *Callichilia inaequalis* Stapf, Apocynaceae endémique de la flore tropicale d'Afrique centrale.¹⁶⁶ Les plantes du genre *Callichilia* ont déjà été étudiées pour des raisons différentes. C'est le cas de *C. subsessilis* et *C. barteri*, dont l'étude des racines a permis d'isoler des alcaloïdes indoliques, à l'exemple de la lonicérine, et des alcaloïdes bis-indoliques tel que la vobtusine, un dimère rare.^{166,167} Pour *C. stenosepala* Stapf. (synonyme de *C. subsessilis*, voir plus loin), l'évaluation de l'activité antiplasmodiale de l'extrait brut et des fractions a été réalisée.^{168,169} Une autre étude a montré un bon niveau d'activité antinociceptive d'un extrait éthanolique de ses écorces de racines.¹⁶⁹

La première partie de ce chapitre décrit l'extraction alcaloïdique des tiges et des racines, ainsi que l'étude dérégulative et le ciblage des composés inconnus par l'approche du « *Molecular Networking* » (MN) La seconde porte sur l'isolement et la caractérisation des nouveaux composés. Tous ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Gaëla CAUCHIE, étudiante en Master 2.

¹⁶⁶ M. Brink, et al., *Plant resources of tropical Africa No. 1: Cereals and pulses*. **2006**,

¹⁶⁷ J. Poisson, et al., *Tetrahedron* **1966**, *22*, 1075-1094.

¹⁶⁸ N. Kunesch, et al., *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 2854-2859.

¹⁶⁹ C. Orabueze, et al., *Planta Med.* **2014**, *80*, PP18.

2. Présentation du genre *Callichilia* et de l'espèce *Callichilia inaequalis* Stapf

2.1. Aspects botaniques et distribution du genre *Callichilia*

Le genre *Callichilia* appartient à la famille des Apocynaceae et à la sous famille des *Tabernaemontaneae*.¹⁷⁰ Ce genre comporte six espèces qui sont confinées en Afrique tropicale, généralement dans les forêts humides (Figure 52)¹⁷¹ : *Callichilia barberi* Stapf, *C. basileis* Beentje, *C. bequaertii* De Wild, *C. inaequalis* Stapf, *C. monopodialis* Stapf et *C. subsessilis* Stapf.¹⁴⁶



Figure 52. Répartition géographique du genre *Callichilia* (selon Map data 2017)

Les plantes de ce genre 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 décurrente 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.

¹⁷⁰ A. O. Simões, et al., *Taxon* **2010**, 59, 772-790.

¹⁷¹ <http://apps.kew.org/herbcat/getImage.do?imageBarcode=K000028172> (03/09/2017).

- 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.¹⁶⁶

2.2. Distribution de l'espèce *Callichilia inaequalis* Stapf

L'espèce *C. inaequalis* (Figure 53) est principalement retrouvée dans les forêts humides du Nigeria, du Cameroun et celles du Gabon.¹⁷² Selon « *The Plant List* », cette espèce compte deux synonymes : *C. manii* Stapf et *Tabernaemontana inaequalis* Pierre ex Stapf.¹⁷¹ L'espèce n'a pas fait l'objet d'évaluation de son caractère potentiellement menacé par l'UICN (union internationale pour la conservation de la nature).



Figure 53. *Callichilia inaequalis* Stapf (photo prise par Kevin Mebale)

2.3. Utilisations traditionnelles

Les plantes de ce genre sont des productrices d'alcaloïdes indolomonoterpéniques, en particulier des monomères et dimères présentant des activités biologiques utiles pour l'Homme.^{121,122,123} L'espèce *Callichilia stenosepala* Stapf est couramment utilisée par les praticiens traditionnels du Sud-Est du Nigéria comme remède pour le traitement du paludisme, de la fièvre et d'autres affections.¹⁷³ L'espèce *C. barteri* est utilisée par le peuple Yoruba du Nigeria en infusion comme traitement contre les vertiges ou comme laxatif pour les enfants, où Les feuilles de cette même espèce sont aussi appliquées sur les « tumeurs ». Les extraits de fruits sont ingérés comme vermifuge et pour traiter la gonorrhée. Les Ijos,

¹⁷² <http://www.gbif.org/species/6701>. Répartition géographique du genre *Callichilia*. (08/09/2017).

¹⁷³ C. I. Orabueze, et al., *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *11*, 1-9.

une tribu du Nigéria, donnent ce fruit à mordre à leurs enfants au cours des éruptions dentaires.¹⁶⁹

Notons que nos recherches sur l'espèce dans la littérature ethnobotanique, notamment dans le livre référence de la flore du Gabon « Plantes utile du Gabon » de Raponda-Walker,¹⁷⁴ n'ont donné aucun résultat. Cette espèce reste peu connue et peu documentée.

2.4. Composition chimique

À notre connaissance, l'espèce *Callichilia inaequalis* n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique. Cependant, dans les autres espèces de *Callichilia*, six alcaloïdes indolomonoterpéniques soit 3 monomères et 3 dimères ont été isolés dans les années 1960-1970. Les représentants de cette classe de molécules isolés dans le genre *Callichilia* sont décrits dans les sections suivantes.

2.4.1. Alcaloïdes indolomonoterpéniques monomères

Très peu de monomères ont été décrits dans ce genre, d'après une recherche réalisée sur *SciFinder*, dans le *Dictionary of Alkaloids, Reaxys* et le DNP (*Dictionary of Natural Products*). Trois monomères, l'aspidodasycarpine, la modestanine et la beninine ont été isolés des racines de l'espèce *Callichilia barteri*.¹²¹ Ils appartiennent à la classe des aspidospermanes (type III), à l'exception de l'aspidodasycarpine qui provient du squelette akuammiline (type I) (Figure 54).

¹⁷⁴ A. Raponda-Walker, *et al.*, *Les plantes utiles du Gabon*, 1961

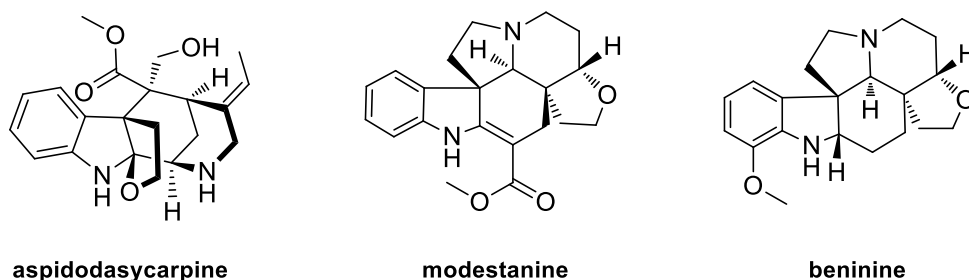


Figure 54. Monomères indolomoterpéniques isolés du genre *Callichilia*

2.4.2. Alcaloïdes *bis*-indolomonoterpéniques

Trois molécules *bis*-indoliques spiraniques ont été isolées du genre *Callichilia*, précisément de *C. subsessilis* et *C. barteri*. Il s'agit de la vobtusine et de la subsessiline, de type Aspidosperma-Aspidosperma (type III)¹⁶⁷ et la callichiline de type Aspidosperma-Eburnea (monomères de type III et de type I) (Figure 55).¹⁶⁷

Il faut noter que la subsessiline a également été décrite sous le nom d'amataïne, extraite de l'écorce de racine d'*Hedranthera barteri* (Hook f.) Pichon,¹⁷⁵ et de grandifoline, extraite des feuilles de *Voacanga grandifolia* Miq. (Rolf.), identifiée aussi dans les feuilles de *Voacanga thouarsii* Roem et Schult.¹⁷⁶

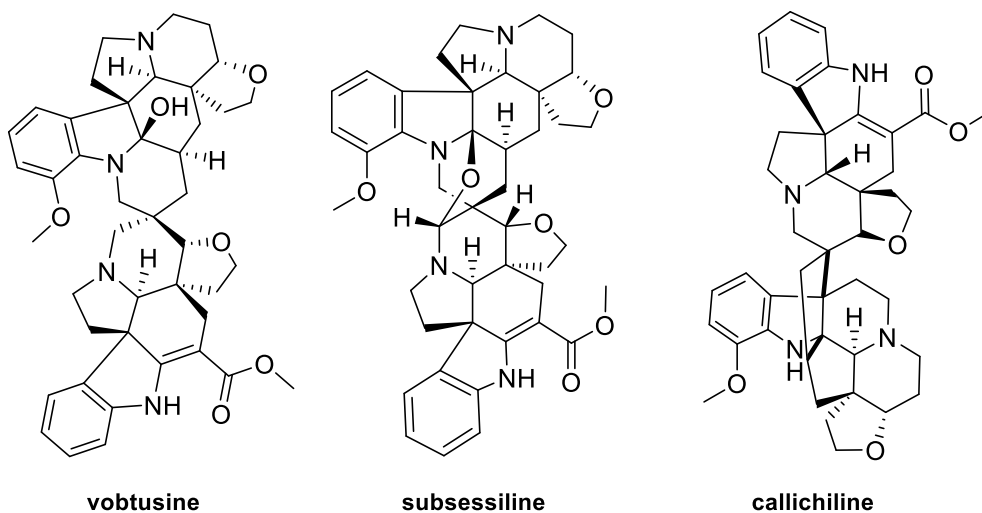


Figure 55. Dimères indolomonoterpéniques isolés dans le genre *Callichilia*

À titre indicatif, le motif spiranique est, entre autres, retrouvé dans des *bis*-indoles isolés de

¹⁷⁵ [https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?fr=1&g=pe&p=Callichilia+barteri+\(Hook.f.\)+Stapf](https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?fr=1&g=pe&p=Callichilia+barteri+(Hook.f.)+Stapf) (25/10/2017).

¹⁷⁶ M. Mosihuzzaman, et al., *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 2195-2230.

Leuconotis griffithii Hook. F. (Apocynaceae). Il s'agit notamment de la leucoridine A¹²⁴ et de la leucofoline.¹⁷⁷ Ce sont, respectivement, des alcaloïdes de type Strychnos-Strychnos et de type Aspidospermatane-Aspidospermatane.

3. Travaux personnels

3.1. Récolte et identification

Ces travaux ont été effectués sur les tiges et les racines sèches de *Callichillia inaequalis* récoltées en janvier 2016. L'échantillon qui a été déposé à l'herbier national du Gabon à Libreville porte le code (E.O.N n° 0014).

3.2. Réseau moléculaire

Cette partie du travail a pour but la détection rapide des composés connus à partir des extraits alcaloïdiques de tige et de racine de l'espèce *C. inaequalis*, mais aussi de cibler de nouvelles entités chimiques potentielles. Une extraction par la méthode classique d'obtention des alcaloïdes a été réalisée sur les tiges (1860 g) et les racines (356 g) donnant respectivement : 8,6 g ($\rho = 0,46 \%$) et 1,65 g ($\rho = 0,46 \%$). Ces extraits ont été analysés par CLHP-Q-TOF-MS²-ESI en mode ionisation positive dans les conditions décrites dans la partie « ma démarche de travail » (Figure 56).

Un réseau moléculaire commun des extraits de *C. inaequalis* a été généré et analysé, avec injection des données CLHP-MS/MS de fraction de colonne (Figure 58). Il a été annoté à l'aide de la MIADB¹⁴⁴ et les données ont été comparées aux bases de données usuelles : *Reaxys*®, le *Dictionary of Natural Products*® et le *Dictionary of alkaloids*. Cette comparaison donne un deuxième niveau d'analyse permettant d'apprécier le degré d'originalité des nœuds observés.

¹⁷⁷ C.-Y. Gan, et al., *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1365-1370.

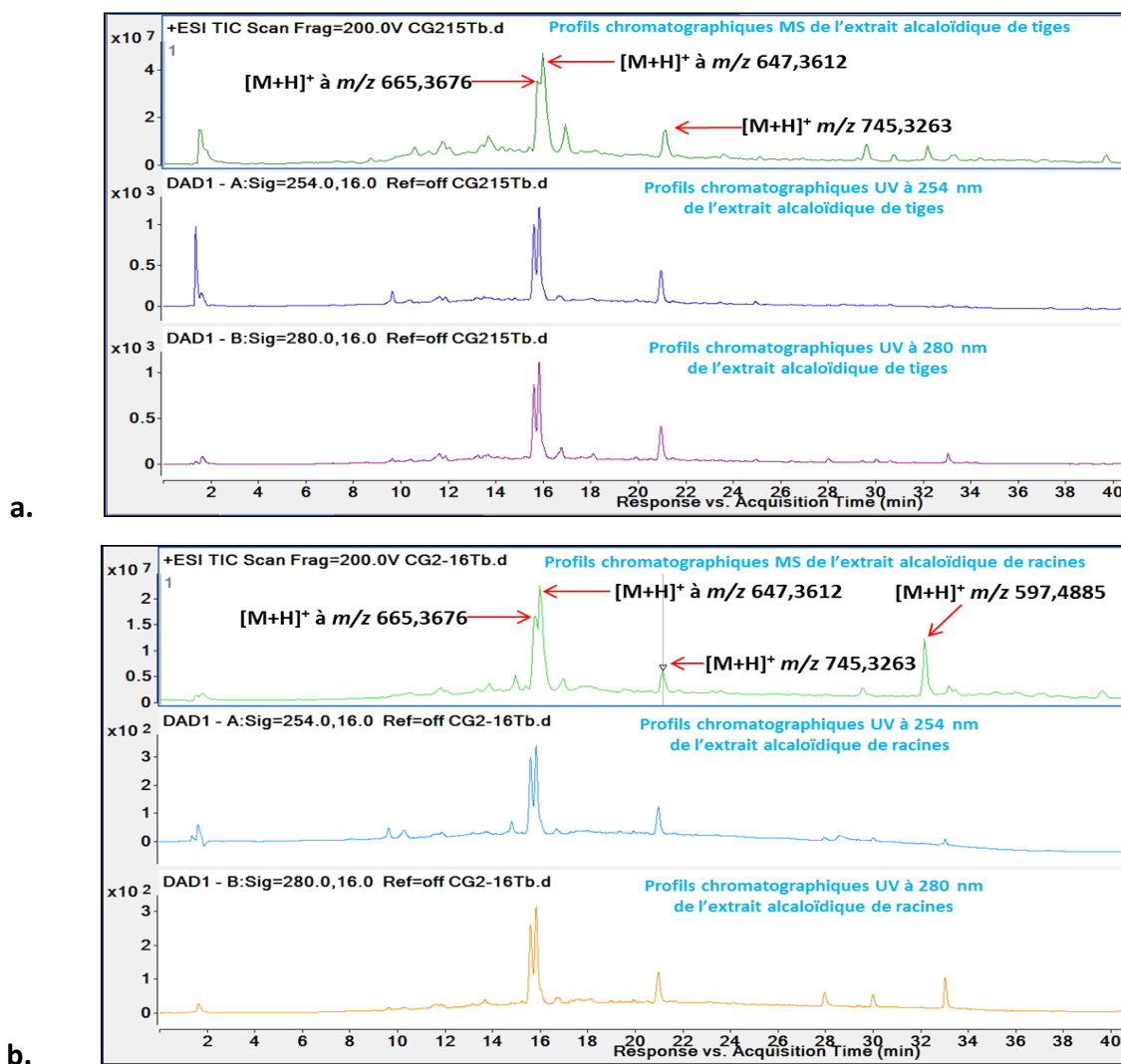


Figure 56. Profils chromatographiques des deux extraits alcaloïdiques de *C. inaequalis*

a : tiges ; **b** : racines ; ESI(+), m/z 100-1200, UV : λ 254 nm et λ B 280 nm,
 élution sur colonne Sunfire®

La comparaison des chromatogrammes des deux extraits met en évidence des compositions proches, avec 3 composés majoritaires communs. Ceux-ci correspondent à des nœuds d'intérêt dans l'analyse du réseau moléculaire (voir 3.2.1.2, plus loin).

3.2.1. Analyse du réseau moléculaire de *C. inaequalis*

Les extraits alcaloïdiques des tiges et des racines de *C. inaequalis* ainsi que les 69 composés de références issus de la MIADB ont été analysés par LC-MS² en mode positif dans les conditions naturelle du laboratoire décrit dans la partie démarche du travail. Le réseau

moléculaire complet obtenu est présenté dans la

Figure 58. Les nœuds bleu clair correspondent aux spectres MS² des substances de références (MIADB) sans concordance avec des molécules des extraits. Les nœuds de couleurs vertes et jaune correspondent respectivement aux spectres des composés issus des extraits de tige et de racine. Les nœuds ayant en même temps les couleurs vertes, jaune et bleu, représentent les spectres provenant des tiges et des racines qui sont apparentés « matché » aux spectres des composés de références (Figure 57). La proportion de chaque couleur sur un nœud est fonction du nombre de spectres MS² de l'ion parent générés par le spectromètre de masse durant l'analyse chromatographique de l'analyse de l'échantillon et non l'abondance réelle que pourrait exprimer l'intensité d'un pic. Bien que cette représentation n'ait pas de signification d'un point de vue quantitatif, elle permet néanmoins d'afficher de façon simple l'appartenance multiple de certains ions en fonction de leurs origines. La Figure 57 présente les quatre types de nœuds obtenus de ce réseau

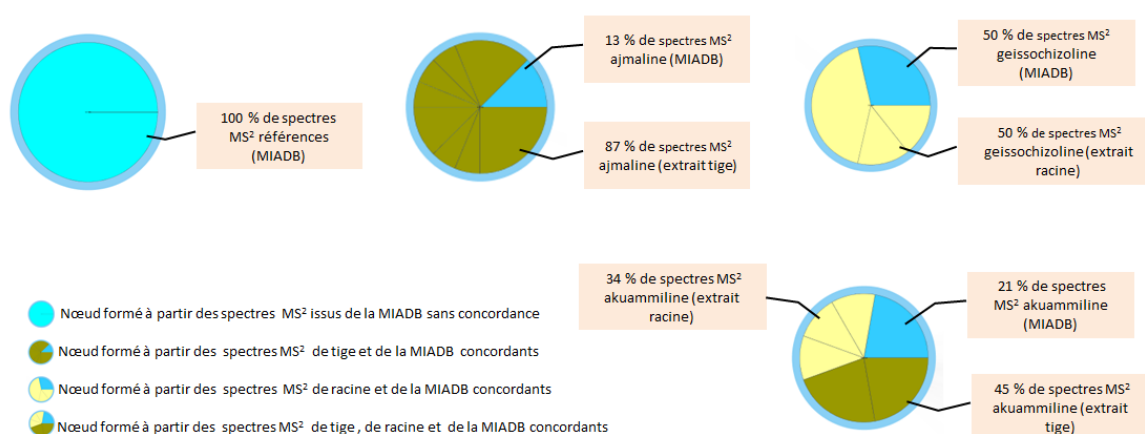


Figure 57. Nœuds du réseau moléculaire de *C. inaequalis*

Dans le réseau moléculaire global généré, on a obtenu : 1948 spectres MS² individuels provenant des deux extraits alcaloïdiques, de la MIADB (et des fractions de colonnes). Ils se sont organisés en 283 nœuds formant 11 clusters (zone de nœuds connectés entre eux), parmi lesquelles trois zones (**A**, **B** et **C**) nous ont semblées particulièrement intéressantes (Figure 58). Grâce à l'ajout des composés de références, 12 « matches » ont été observés (superposition entre un composé de la MIADB et un composé issu des extraits). La comparaison suivant les règles proposées par Schymanski¹³⁸ (voir partie « démarche de

travail » du chapitre 2) nous a permis d'exprimer un degré de confiance de 1 sur l'identification de 9 de ces composés. Plusieurs autres nœuds ont été détectés dans ces zones comme étant des analogues probables de ces molécules dérépliquées, sur la base de leurs fortes similarités spectrales. Le degré de confiance est exprimé dans les figures correspondantes.

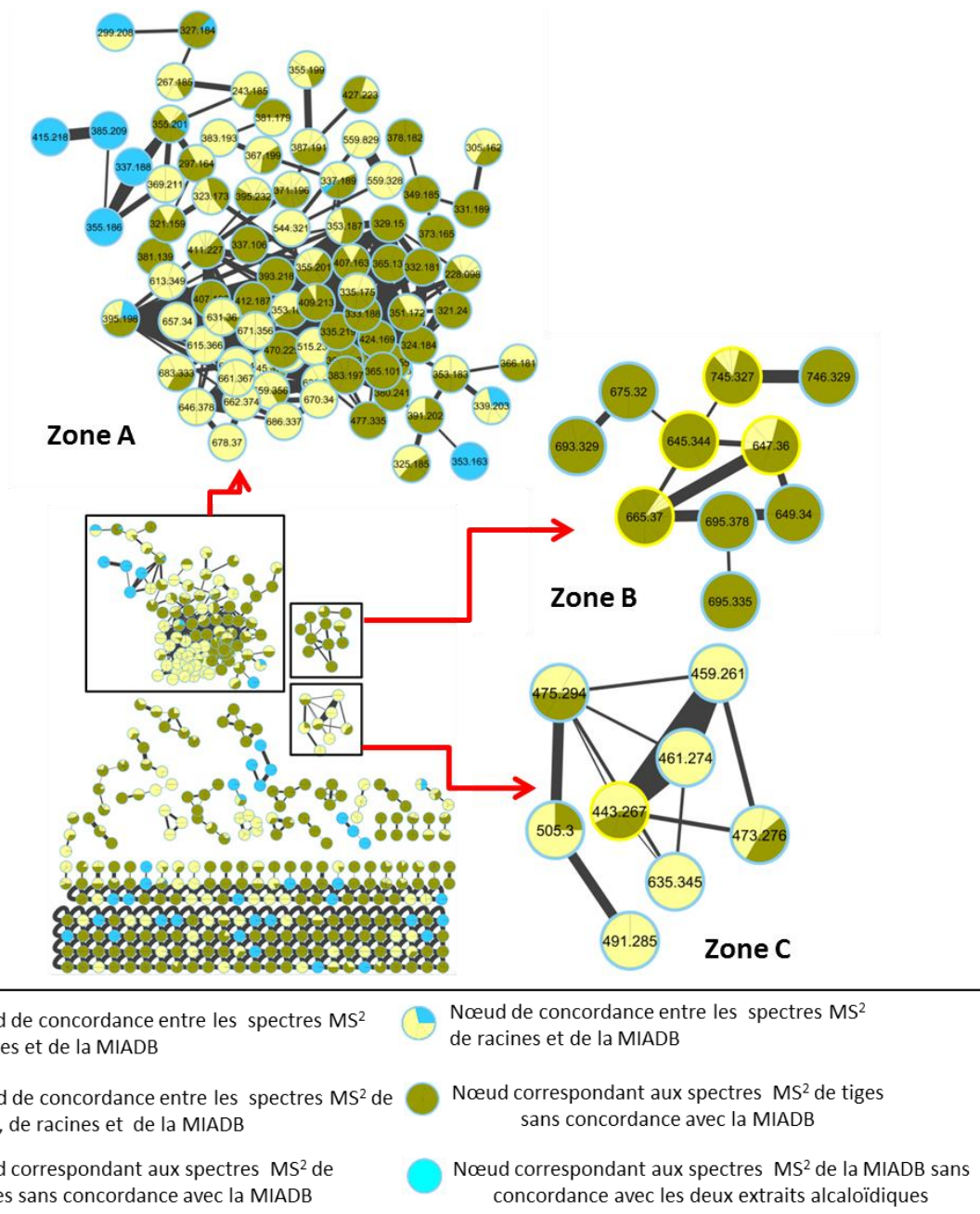


Figure 58. Réseau moléculaire global des extraits alcaloïdiques de tiges et de racines de *C. inaequalis* et de la MIADB ; agrandissement des zones A, B et C

Certains « *matches* » apparaissent dans des « *selfloops* » qui ne sont pas indiqués sur cette figure. Au niveau d'identification 1, on retrouve la raubasine dans les racines et la

québrachidine dans les tiges et les racines (Tableau 11).

3.2.1.1. Analyse de la zone A

L'analyse de la zone **A** a montré six couples d'ions (nœuds) qui sont appariés avec les composés de la MIADB. Ces six spectres MS² associés n'ont jamais été décrits dans le genre *Callichilia*, cinq ont été classés à un niveau de confiance d'identification 1, indiquant une identification quasi-sûre (à l'épimérie près). Ce sont l'akuammiline et la tabersonine dans les tiges et les racines ; l'ajmaline dans les tiges seules ; la geissoschizoline et la coronaridine dans les racines seules (Figure 59). Un seul spectre MS² apparié au spectre de référence de la corynanthine a été classé au degré de confiance d'identification 2. En effet, les deux ions ont montrés une même valeur de $m/z = 354,1943$, un spectre MS² similaire mais un temps de rétention non concordant (tableau 1). Ceci suggère la présence d'isomères.

Ces différents niveaux d'identification ont été établis par l'observation des temps de rétentions similaires et l'inspection des données MS/MS. Le réseau correspondant à la zone **A** est présenté dans la Figure 59 ci-dessous.

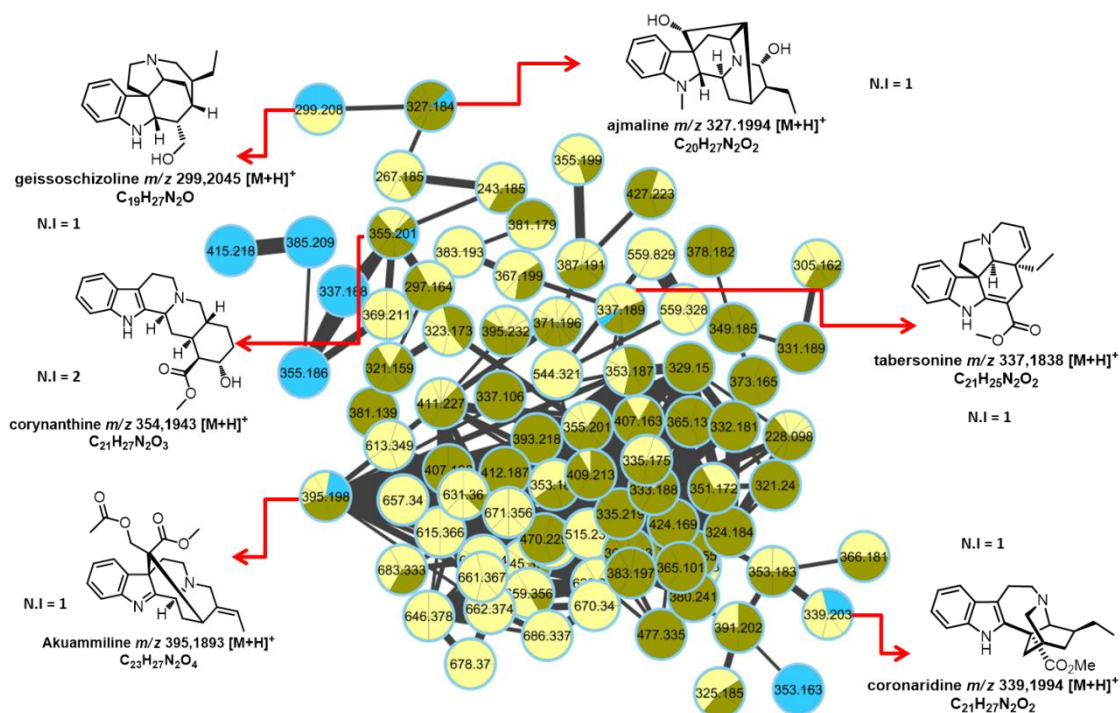


Figure 59. Annotation et agrandissement de la zone A

N.I. : niveau d'identification selon Schymanski

Tableau 11. Tableau récapitulatif des 12 nœuds concordants entre les spectres MS² des extraits alcaloïdes et les spectres MS² issus de la MIADB

Pour les *matches* racine et tige, un seul Tr est exprimé pour les 2 extraits, en raison d'une quasi-identité.

Matches	Origines des spectres (Nœuds)	m/z [M+H]⁺	Temps de rétention en min (Tr)	Niveaux attribués
Ajmaline	Extrait tiges	327,1949	11,8	Niveau 1
Ajmaline	Référence (MIAB)	327,1865	12,0	
Akuammiline	Extrait tiges et racines	395,1959	14,2	Niveau 1
Akuammiline	Référence (MIAB)	395,1975	13,8	
Tabersonine	Extrait tiges et racines	337,2011	17,4	Niveau 1
Tabersonine	Référence (MIAB)	337,18808	17,9	
Coronaridine	Extrait des racines	339,1994	17,5	Niveau 1
Coronaridine	Référence (MIAB)	339,2020	16,9	
Geissoschizoline	Extrait des racines	229,2149	9,3	Niveau 1
Geissoschizoline	Référence (MIAB)	229,2091	10,3	
Corynanthine	Extrait tiges et racines	355,1943	17,2	Niveau 2a
Corynanthine	Référence (MIAB)	355,1942	14,2	
Québrachamine	Extrait des racines	283,4247	13,0	Niveau 1
Québrachamine	Référence (MIAB)	283,4241	14,0	
Raubasine	Extrait des racines	353,4391	16,9	Niveau 1
Raubasine	Référence (MIAB)	353,4395	16,2	
Québrachidine	Extrait tiges et racines	353,4315	13,6	Niveau 1
Québrachidine	Référence (MIAB)	353,4312	13,5	
Yohimbine	Extrait des tiges	355,4437	15,9	Niveau 1
Yohimbine	Référence (MIAB)	355,4431	15,1	
Epiméloscine	Extrait des racines	293,1654	16,1	Niveau 2a
Epiméloscine	Référence (MIAB)	293,1650	13,9	
Vincamine	Extrait tiges et racines	355,4483	13,4	Niveau 2a
Vincamine	Référence (MIAB)	355,4486	20,0	

L'ordre est proposé sur la base de la position dans le réseau.

Le Tableau 11 présente l'ensemble des douze matches observés dans le réseau des extraits alcaloïdiques de *C. inaequalis*. Il comporte ainsi les valeurs de m/z de chaque composé, le temps de rétention obtenu sur une colonne C₁₈ Xbridge® dans les conditions chromatographiques décrites dans la partie « Démarche de travail », et le niveau de confiance selon Schymanski.

3.2.1.2. Analyse des zones B et C

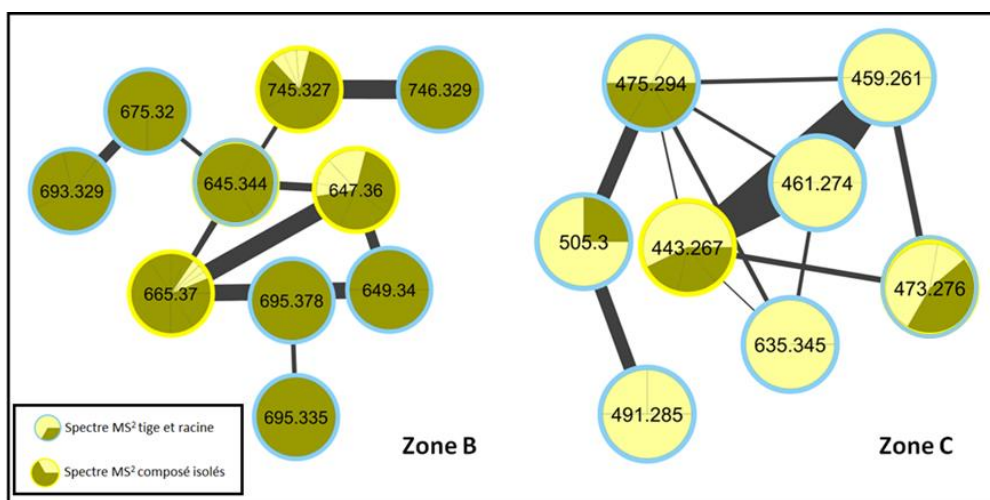


Figure 60 Agrandissement des zones B et C

L'analyse des zones **B** et **C** montre qu'aucun nœud provenant des extraits alcaloïdiques n'est apparié aux substances de références de la MIADB (Figure 60). La comparaison des formules brutes des composés correspondant à ces nœuds aux bases de données n'a donné aucun « hit » (Tableau 12). Ce sont donc potentiellement de nouveaux composés et de bons candidats pour l'isolement.

L'observation de ces deux zones a montré que les nœuds de la zone **B** correspondent aux composés qui proviennent majoritairement de l'extrait des tiges, tandis que ceux de la zone **C** sont issus de l'extrait des racines essentiellement. Enfin, la zone **B** contient plusieurs des pics majoritaires observés dans les deux extraits et indique leur proximité structurale (m/z 647, m/z 665, m/z 745 ; Figure 54). Ces molécules ont été ciblées préférentiellement (voir 3.3.) et purifiées.

3.3. Ciblage des composés à isoler

Lors de l'analyse de la topologie du réseau moléculaire de *C. inaequalis* et des substances de référence de la MIADB, les groupes **B** et **C** ont attiré notre attention (Figure 60). La zone **C** n'a montré aucun nœud apparié aux substances de référence. De plus, cette zone présente des nœuds de poids moléculaires compris entre 600 à 750 Da. Ceux-ci pouvant correspondre à d'éventuelles molécules *bis*-indoliques.

Selon nos recherches bibliographiques, trois molécules *bis*-indoliques avaient été isolées et décrites dans ce genre : la callichiline ($m/z_{th} = 689,8512$; $C_{42}H_{49}N_4O_5$ $[M+H]^+$), la vobtusine ($m/z_{th} = 719,8913$; $C_{43}H_{51}N_4O_6$ $[M+H]^+$) et la subsessiline ($m/z_{th} = 717,8756$; $C_{43}H_{49}N_4O_6$ $[M+H]^+$) (Figure 55) et d'après les valeurs de m/z observées sur les nœuds de cette zone, aucune d'elles ne correspond. Les formules brutes de chacun des nœuds de ces deux groupes ont été générées et comparées aux différentes bases de données à notre disposition (DNP[®], Reaxys[®] et *Dictionary of Alkaloids*).

Dans le groupe **B**, la formule brute du nœud correspondant à la valeur de $m/z = 647,3612$ $[M+H]^+$ a montré cinq hits sur DNP[®], trois hits sur Reaxys[®] et un dans le dictionnaire des alcaloïdes. C'est donc potentiellement un composé connu. Cependant, les formules brutes des autres nœuds des groupes **B** et **C** se sont révélées inconnues avec 0 « hit » trouvé dans les trois bases de données. Le Tableau 12 présente l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude de déréplication. Ainsi, les lignes colorées en jaune correspondent aux composés qui nous ont semblé potentiellement nouveaux et isolables. Certaines donnaient des « hits », non satisfaisants. Le composé à m/z 443 n'a pas été spécifiquement ciblé mais a pu être facilement obtenu. Les composés majoritaires des extraits ont été ciblés en raison de leur potentielle originalité structurale.

Tableau 12. Tableau de déréplication des extraits alcaloïdiques de *C. inaequalis*

Les composés isolés sont indiqués avec un surlignage jaune.

Origines	TR (min)	<i>m/z</i>	Formule brute	Score %	Diff. ppm	Intensité	Identification DNP	Identification Reaxys
Tige	8.844	313.191	C19 H24 N2 O2	89.28	0.48	3982	12 hits	8 hits
Tige	9.361	327.175	C19 H22 N2 O3	80.33	0.62	3774	56 hits	43 hits
Racine	10.208	329.186	C19 H24 N2 O3	89.89	-0.47	2452	18 hits	12 hits
Tige	10.276	315.206	C19 H26 N2 O2	86.49	1.54	3625	30 hits	13 hits
Tige	10.632	345.181	C19 H24 N2 O4	87.63	-2.03	3390	26 hits	16 hits
Racine	10.699	297.196	C19 H24 N2 O	89.22	-0.43	7930	115 hits	86 hits
Tige	11.852	353.186	C21 H24 N2 O3	93.66	-0.6	10667	151 hits	93 hits
Tige	12.156	323.139	C19 H18 N2 O3	83.08	-0.7	5423	14 hits	4 hits
Tige	12.19	353.185	C19 H22 N5 O2	85.18	-2.09	8895	53 hits	22 hits
Tige	12.919	375.191	C20 H26 N2 O5	90.11	0.98	1699	20 hits	22 hits
Tige	13.173	329.186	C19 H24 N2 O3	78.5	-1.26	1942	21 hits	1 hit
Tige	13.427	420.168	C22 H28 O8	90.3	-0.88	5686	74 hits	42 hits
Racine	13.58	369.182	C21 H24 N2 O4	89.17	-1.83	3106	68 hits	31 hits
Racine	14.732	411.229	C24 H30 N2 O4	95.07	-1.62	4188	72 hits	47 hits
Racine	15.012	401.207	C22 H28 N2 O5	98.31	-0.57	21500	11 hits	11 hits
Racine	15.24	385.213	C22 H28 N2 O4	98.7	-0.7	21367	24 hits	19 hits
Tige	16.435	420.265	C26 H33 N3 O2	96.87	-0.34	15022	52 hits	36 hits
Tige zone B	16.613	647.361	C40 H46 N4 O4	97.83	-1.49	23955	5 hits	3 hits
Tige zone B	16.884	665.368	C40 H48 N4 O5	98.13	-0.76	7986	0 hit	0 hit
Tige	17.07	341.186	C20 H24 N2 O3	97.82	0.83	10011	17 hits	4 hits
Tige	17.129	337.191	C21 H24 N2 O2	96.98	1.35	39183	98 hits	90 hits
Racine	17.282	695.366	C40 H48 N4 O6	97.02	-1.1	3179	0 hits	hits
Tige	17.307	353.186	C21 H24 N2 O3	81.4	0.45	4114	12 hits	16 hits
Tige zone B	19.959	745.331	C40 H48 N4 O8 S	99.76	0.14	2009	0 hit	0 hit
Tige	27.439	329.316	C19 H40 N2 O2	80.38	0.71	1982	10 hits	5 hits
Tige	29.616	367.334	C22 H42 N2 O2	73.71	-4.43	3148	43 hits	18 hits
Racine zone C	33.301	443.267	C29 H34 N2O2	89.2	-24.3	4931	0 hit	0 hit
racine	33.92	309.229	C16 H28 N4 O2	65.54	-5.09	1026	14 hits	5hits
Racine zone B	34.182	719.381	C43 H51 N4 O6	66.21	-0.02	1117	1 hit	1 hit
racine	34.437	517.376	C24 H50 N3 O3	84.86	0.09	1851	10 hits	3 hits
Racine zone C	34.471	473.351	C30 H37 N2 O3	80.81	-2.31	1795	0 hit	0 hit
Racine	34.471	429.325	C22 H44 N4 O2	83.05	1.85	9973	87 hits	27 hits
Racine	34.657	429.319	C28 H44 N2O3	75.34	-0.33	1018	53 hits	14 hits
Tige	34.911	619.442	C31 H60 N3 O9	79.08	0.97	2176	41 hits	10 hits
Racine	36.012	457.351	C24 H46 N3 O5	82.13	-0.18	1545	31hit	11 hits
Tige	37.419	413.268	C24 H34 N3 O3	74.48	-1.6	2604	80 hits	21 hits

Le tableau de déréplication obtenu des deux extraits alcaloïdiques présente chaque nœud avec son temps de rétention (Tr), sa valeur *m/z*, sa formule brute (FB), et le score. Ce score, exprimé en pourcentage, correspond à la moyenne des scores des paramètres de génération de formules brutes (abondance isotopique, précision masse et allure du massif isotopique) utilisés par le logiciel MassHunter®. On note aussi les résultats des recherches faites sur deux

bases de données usuelles.

3.4. Extraction et isolement

3.4.1. Tiges : extraction, fractionnement et isolement

Nous avons réalisé une extraction des tiges séchées et broyées (1860 g) de *C. inaequalis*. Après avoir été alcalinisée avec une solution d'ammoniaque 6 M (NH₃aq), la poudre est extraite par macération avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt) pendant 30 h. L'extrait AcOEt obtenu a été concentré sous vide à 38°C par un évaporateur rotatif pour ne garder que 200 mL. La solution obtenue a été soumise à des partitions liquide/liquide. La première avec une solution de H₂SO₄ à 2 % (600 mL), puis alcalinisée avec une solution de NH₃aq 300 mL jusqu'à pH = 10 et une contre extraction avec de l'AcOEt. Cette partition nous a permis d'obtenir 8,6 g (ρ = 0,46 %) d'un extrait alcaloïdique total.

L'extrait alcaloïdique (8,6 g) obtenu a été entièrement fractionné par chromatographie flash, en utilisant une cartouche Grace® de gel de silice 40 g, avec un gradient de CH₂Cl₂-MeOH (100:0 à 0:100) de polarité croissante à 40 mL/min. Neuf fractions (**F.1** à **F.9**) ont été obtenues suite à rassemblement selon les profils en CCM.

La fraction **F.1** (31,5 mg) a été soumise à une CLHP préparative en utilisant une phase inverse C₁₈ Sunfire® dans un système MeOH / H₂O + 0,1 % acide formique (25:65) à 17 mL/min pendant 20 minutes et nous a permis d'isoler le composé **1** (13,4 mg, ρ = 0,0006 %) identifié comme étant la criophylline, molécule connue¹⁷⁸ mais jamais isolée dans le genre *Callichilia*. Les fractions F.3, F.4, et F.5 (69 mg) ont été mélangées dans le but d'accroître la quantité du composé que nous souhaitons isoler. L'ensemble a été soumis à une CLHP-préparative en utilisant les mêmes conditions de séparation que pour la fraction **F.1**. Nous avons obtenu le composé **2** (9 mg, ρ = 0,0004 %), la dihydro-criophylline, un nouveau composé analogue de la criophylline.

La fraction **F.7** (367 mg) a été soumise à une seconde chromatographie flash sur une colonne Grace® de 24 g de silice avec un gradient de CH₂Cl₂-MeOH (100:0 à 0:100) de polarité croissante à 24 mL/min conduisant à 6 fractions (**F.7.1** à **F.7.6**) qui ont été regroupées sur la base de leurs profils CCM. La fraction **F.7.1** (45 mg, ρ = 0,002 %) a été soumise à une CLHP-préparative en utilisant une phase inverse C₁₈ Sunfire® dans un système MeOH/ H₂O + 0,1 % acide formique (30:55) à 17 mL/min pendant 20 minutes conduisant à l'obtention du

¹⁷⁸ A. Cavé, et al., *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 5081-5084.

composé **3**, inconnu que nous avons dénommé hydrogénosulfate-criophylline (23 mg, $\rho = 0,001$ %). Ensuite, la fraction **F.7.4** (102 mg, $\rho = 0,005$ %) a été aussi soumise à une CLHP-préparative en utilisant la phase inverse C₁₈ Sunfire® dans un système MeOH/ H₂O + 0,1 % acide formique 35 : 65 à 17 mL/min pendant 25 minutes conduisant à l'obtention du composé **4** (6 mg, $\rho = 0,0003$ %), correspondant au (7*R*, 8*R*, 7'*R*)-(+)-lyonirésinol, un lignane¹⁷⁹ (Figure 61).

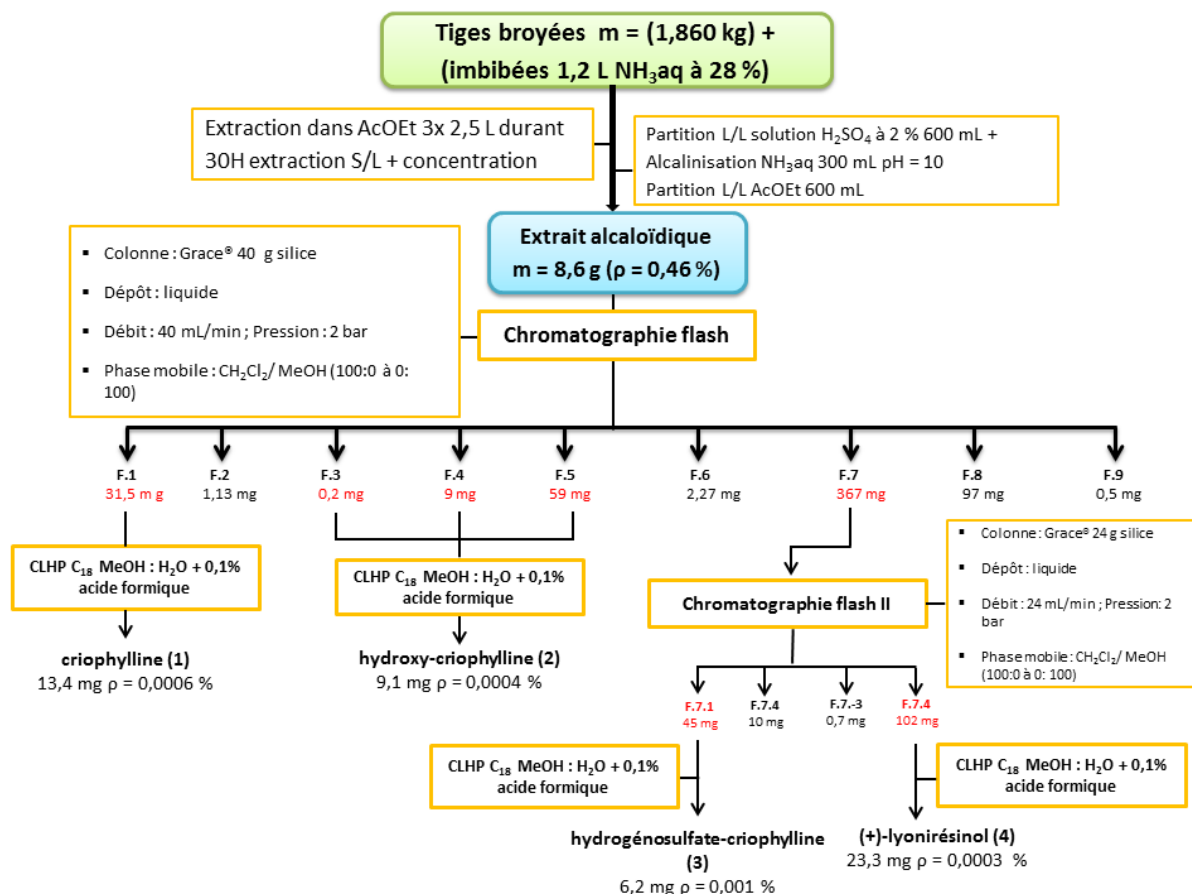


Figure 61. Schéma d'extraction et de purification des tiges de *C. inaequalis*

3.4.2. Racines : extraction, fractionnement et isolement

Les racines séchées et broyées (356 g) de *C. inaequalis* ont été extraites suivant le protocole décrit précédemment. L'extrait brut alcaloïdique (1,65 mg, $\rho = 0,46$ %) obtenu a été fractionné par chromatographie flash, en utilisant une cartouche Grace® de gel de silice de

¹⁷⁹ E. J. Jeong, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2283-2286.

24 g, et le gradient de CH₂Cl₂-MeOH (100:0 à 0:100) de polarité croissante à 24 mL/min. Sept (7) fractions **F.1-F.7** ont été obtenues et rassemblées selon leurs profils en CCM.

La détection d'un pic majoritaire sur le chromatogramme de la fraction **F.3** (19 mg, $\rho = 0,005$ %) et les résultats obtenus lors de l'étude de déréplication de l'extrait brut des racines nous ont amené à le purifier par CLHP préparative en phase inverse C₁₈ Sunfire® par le système de solvant MeOH/ H₂O + 0,1 % acide formique (35 : 65) à 17 mL/min. Nous avons obtenu le composé **6** (6,6 mg, $\rho = 0,001$ %) correspondant à la vobtusine. Ce composé est connu et avait déjà été isolé dans le genre *Callichilia*.¹⁶⁷

La fraction **F.7** 25 mg ($\rho = 0,007$ %) des racines a été soumise à une CLHP-préparative en utilisant une phase inverse C₁₈ Sunfire® et le système de solvant MeOH/(H₂O + 0,1 % acide formique) 30:55 à 17 mL/min pendant 20 minutes conduisant à isoler l'inaequalisine A (**5**, 1 mg, $\rho = 0,0002$). Le schéma d'extraction des racines est présenté dans la Figure 62.

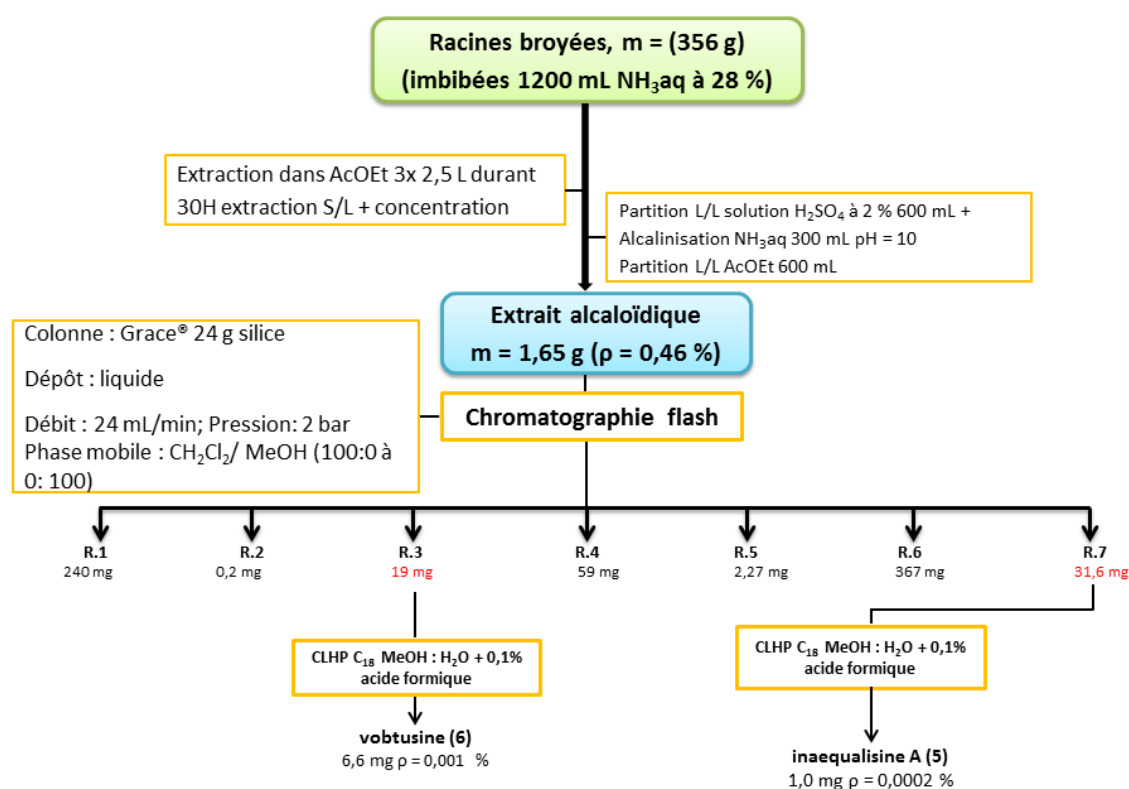


Figure 62. Schéma d'extraction et de fractionnement des racines de *C. inaequalis*

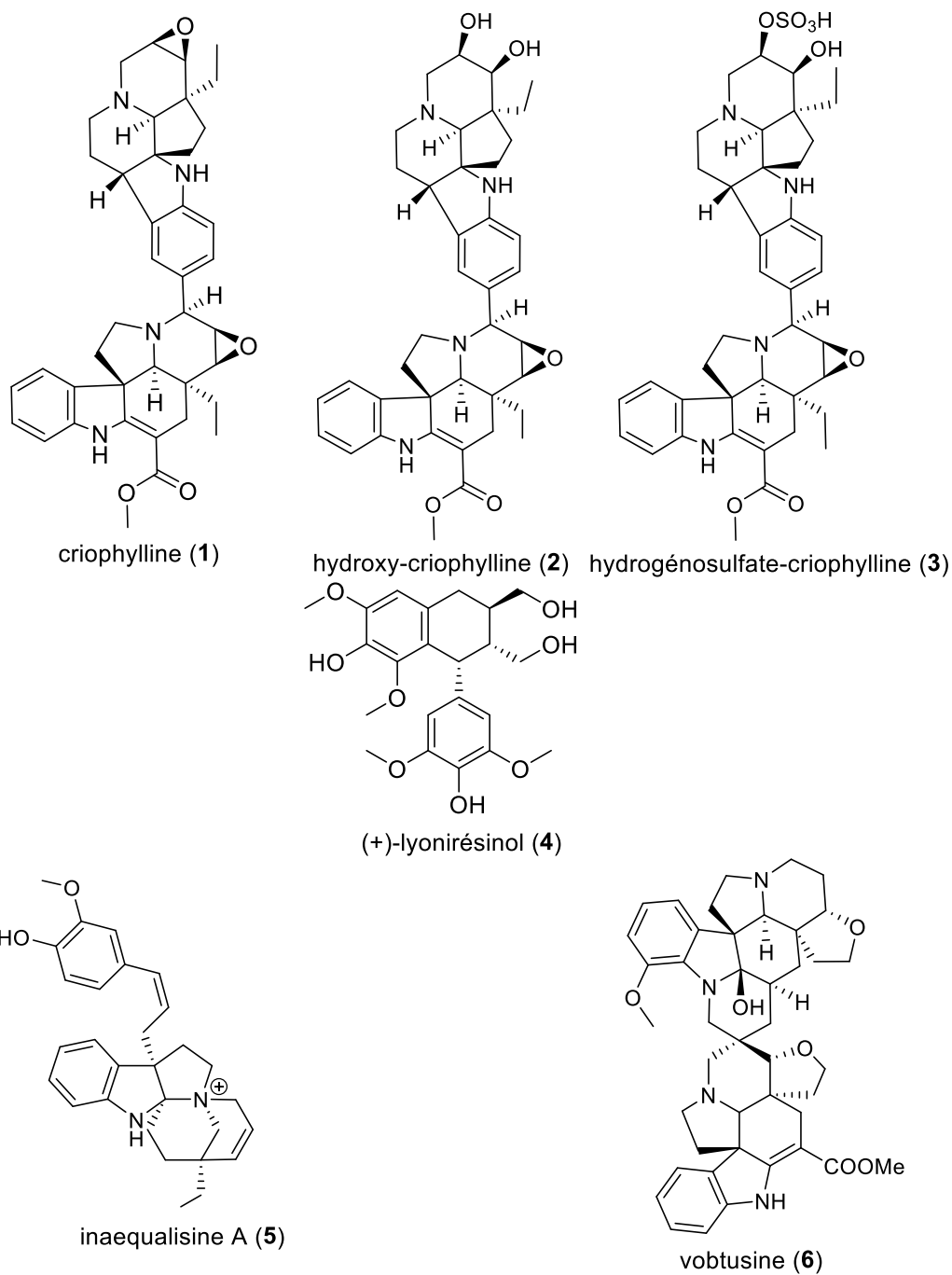


Figure 63. Structures des composés isolés des tiges et des racines de *C. inaequalis*

3.5. Caractérisation structurale des composés isolés

3.5.1. Caractérisation des composés isolés des tiges

Les structures des composés **1-3** isolés des tiges de *C. inaequalis* et détectés dans la zone **C** du réseau moléculaire (Figure 60) ont été caractérisés par l'analyse des données spectroscopiques UV/Vis, RMN, HRSM se sont révélés être des alcaloïdes bis-indolomonoterpéniques. Leur numérotation se base donc sur celle convenue pour cette classe de molécules naturelles.¹⁸⁰ Dans cette section, nous allons détailler l'élucidation structurale de ces 3 composés à partir des données spectrales (UV, $[\alpha]_D$, DCE (dichroïsme circulaire électronique) et HRESI-QTOF-SM+) et par l'intégralité des spectres RMN 1D et 2D. Seuls les composés nouveaux seront décrits, ceux connus isolés dans ce travail sont caractérisés dans la partie expérimentale.

3.5.1.1. La criophylline (1)

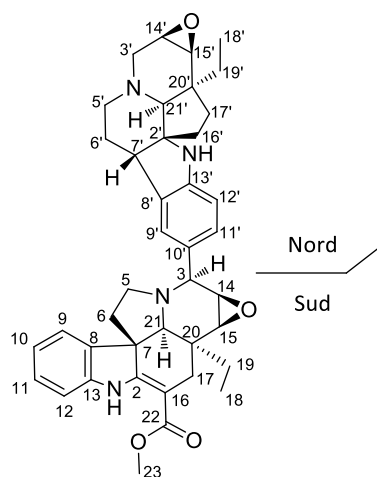


Figure 64 Structure de la criophylline (1)

Le composé **1** a été obtenu sous la forme d'un solide amorphe brun foncé. Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (HRESI-QTOF-SM+) a montré un pic correspondant à un adduit proton $[M+H]^+$ à m/z 647,3612 [calculée pour $C_{40}H_{47}N_4O_4$: 647,3592 ; Diff. = -3,12 ppm]. Ce composé présente donc 20 degrés

¹⁸⁰ J. Bruneton, *et al.*, *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1963-1967.

d'insaturation. Le spectre UV du composé **1** est caractéristique d'un système carboxyméthylène-indolénine et du système dihydro-indolique,¹⁷⁸ avec les quatre bandes à 205,2 ; 254,6 ; 295,7 et à 326,5 nm. La mesure du pouvoir rotatoire du composé **1** a montré une valeur de $[\alpha]_D^{24,0} = + 140,0$ (c 0,05, CH₂Cl₂). Cette valeur $[\alpha]_D$ s'est avérée être différent de celle trouvée par Cavé *et al.* en 1973 qui est de -176 (c 1,04, CHCl₃).¹⁸¹

L'interrogation des bases de données à partir de la formule brute générée nous a proposée cinq hits : la leuconoline,¹⁷⁷ l'ervafolidène,¹⁸² la villalstonine,¹⁸³ la criophylline¹⁷⁸ et un alcaloïde *bis*-indolique de *Pandaca caducifolia* dont la structure reste toujours inconnue à ce jour. Les structures des quatre autres composés sont représentées dans la Figure 65 ci-contre.

L'analyse des spectres RMN 1D (¹H, ¹³C et DEPT 135) a confirmé la présence de 40 atomes de carbone comme sur la formule brute générée. L'interprétation sur le spectre ¹H a montré sept signaux aromatiques, ce qui ne correspond qu'à la criophylline parmi les correspondances avec les bases de données. En effet, l'étude du spectre ¹H de l'ervafolidène a montré huit protons aromatiques alors que le composé **1** n'en compte que sept. Les spectres ¹H de la leuconoline et de la villastonine¹⁸⁴ enregistrés dans le CDCl₃ et rapportés dans la littérature, ont montré un déplacement chimique à 5,60 ppm, absent du spectre ¹H du composé **1** (Figure 66). L'attribution des signaux ¹H et ¹³C a donc révélé que le composé **1** correspond à la criophylline. Les détails sont en annexe.

¹⁸¹ Il faut noter que la mesure faite par Cavé *et al.* en 1973 a été réalisée à 578 nm, une longueur d'onde qui est différente de la nôtre (589 nm). Les conditions expérimentales n'étant pas les mêmes, cette comparaison de valeur et de signe de pouvoir rotatoire ne permet pas de conclure sur la stéréochimie absolue du composé **1**

¹⁸² M. Zeches, *et al.*, *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 707-713.

¹⁸³ R. C. Elderfield, *et al.*, *Phytochemistry* **1972**, *11*, 339-343.

¹⁸⁴ I. M. Said, *et al.*, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1323-1324.

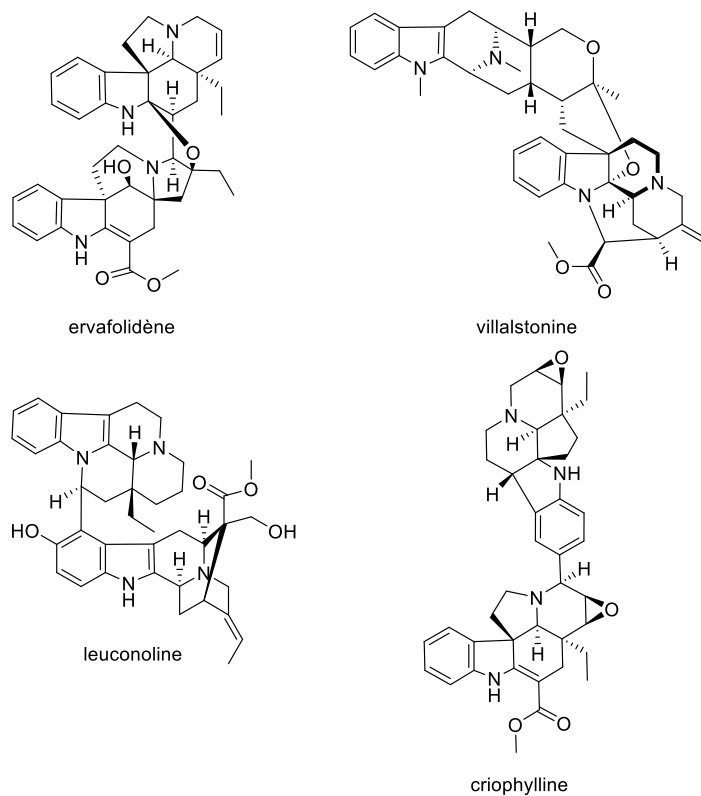


Figure 65. Structures connues correspondant à la formule brute de la criophylline (1) ($C_{46}H_{46}N_4O_4$)

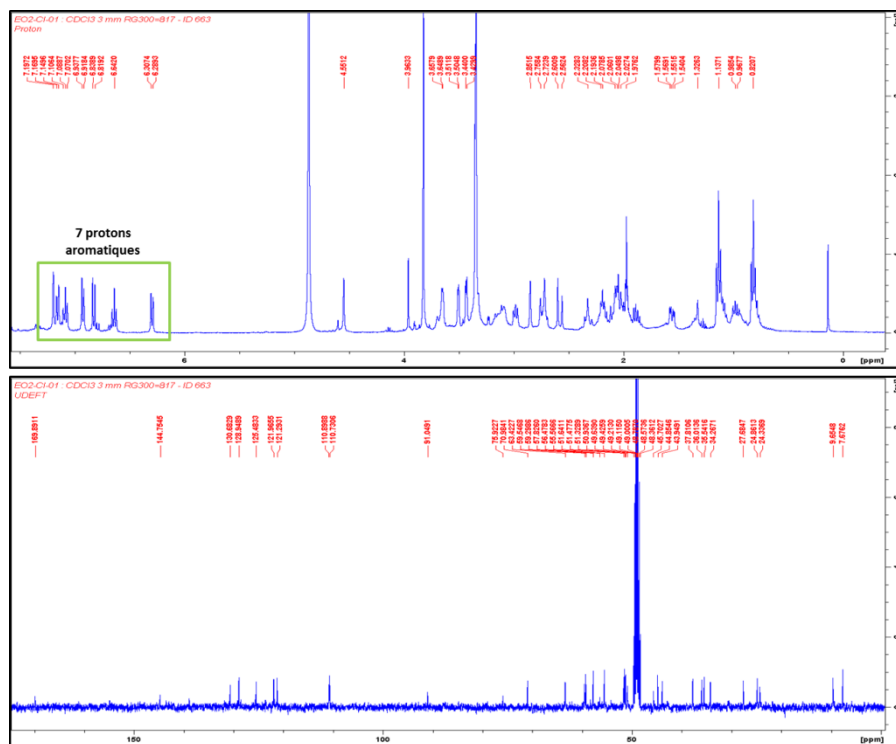


Figure 66. Spectres RMN 1H et ^{13}C de la criophylline (1) ($MeOH-d_4$, 400 MHz et 100 MHz)

Comme nous l'avons présenté dans la Figure 64, le composé **1** (criophylline) est constitué de deux parties. La partie Nord de cette molécule est un monomère ayant un squelette de type andrangine, et la partie Sud est un squelette de type tabersonine. Les alcaloïdes bis-indoliques possédant un monomère de type andrangine sont très rares : en effet, d'après la littérature, la criophylline est l'unique exemple. Le monomère andrangine est présenté dans la Figure 67 ci-dessous.

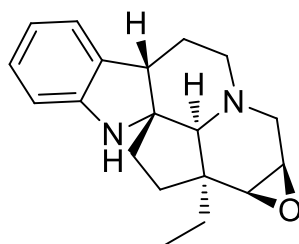


Figure 67. Structure de l'andrangine

a) Configuration relative de la criophylline (1)

Lors de la description de la criophylline par Bruneton *et al.* en 1974, une configuration relative a été proposée à partir des déplacements chimiques ^{13}C des monomères constitutifs (andrangine-tabersonine).¹⁸⁰ Ici nous proposons de réétudier la configuration relative de cette molécule par l'interprétation des corrélations observées sur le spectre NOESY. Afin de simplifier l'analyse du spectre NOESY, nous avons décidé d'étudier la stéréochimie de chaque unité indolomonoterpénique avant de nous intéresser à la molécule entière.

– Configuration relative de la partie Nord (andrangine) de la criophylline (1)

Dans la partie andrangine du composé **1** (Figure 67), les corrélations NOESY que nous avons observées entre les protons H-21', H-19', H-18', H-15' et H-14' montrent que ceux-ci ont la même orientation, arbitrairement indiquée en α (Figure 68). Par ailleurs, la corrélation NOESY observée entre le proton H-7' et H₂-16' permet de déduire leur orientation en β . Ces orientations permettent de déterminer une configuration relative pour la partie Nord du composé **1** comme étant : 2'R*, 7'S*, 14'R*, 15'S*, 20'S*, 21'S*.

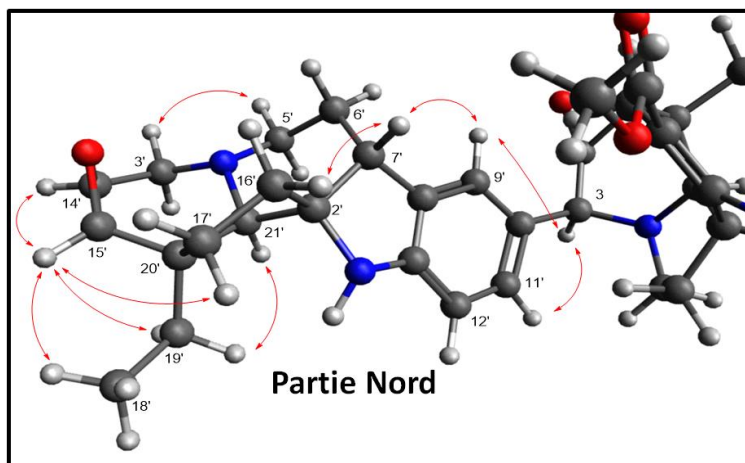


Figure 68. Corrélations NOESY (double flèche rouge) de la partie Nord de la criphylline (1)

– Configuration relative de la partie Sud (tabersonine) de la criphylline (1)

Dans l'unité tabersonine (Figure 69), les corrélations NOESY observées entre les protons H-3, H-14 et H-15 et celles entre les protons H-18, H-19 et H-21 indiquent clairement que ces protons ont la même orientation, arbitrairement indiquée α (Figure 69). De ce fait, les corrélations NOESY observées entre les protons H₂-6 et H₂-5 indique qu'ils sont orientés en β . Ces orientations permettent de déterminer une configuration relative pour la partie Sud de ce composé comme étant : 3*S**, 7*R**, 14*R**, 15*S**, 20*S**, 21*R**.

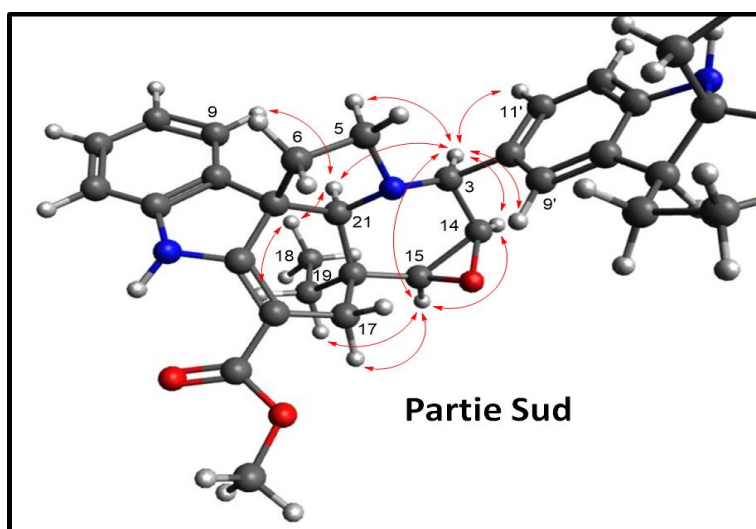


Figure 69. Corrélations NOESY (double flèche rouge) de la partie Sud de la criphylline (1)

– Assemblage des unités constitutives

Finalement, la configuration relative de la criophylline a été déterminée comme étant 3S*, 7R*, 14R*, 15S*, 20S*, 21R*, 2'R*, 7'S*, 14'R*, 15'S*, 20'S*, 21'S* et correspond bien à la configuration relative des monomères constitutifs précédemment proposée par Jean Bruneton *et al.* en 1974. Cependant seule la configuration relative ayant été décrite pour la criophylline,¹⁸⁰ nous nous sommes attelés à déterminer la configuration absolue par dichroïsme circulaire électronique (DCE).

b) Configuration absolue de la criophylline (1) par DCE

La configuration absolue de la criophylline (1) a été déterminée par comparaison des courbes expérimentales et théoriques (en exploitant la configuration relative proposée précédemment) de DCE (Figure 70). Les effets Cotton étant similaires entre les deux courbes, la configuration absolue de **1** est : 3S, 7R, 14R, 15S, 20S, 21R, 2'R, 7'S, 14'R, 15'S, 20'S, 21'S. Ces configurations sont celle rapportées dans la Figure 64.

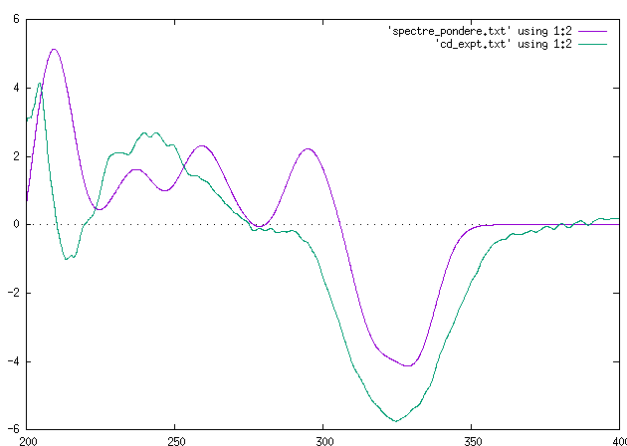


Figure 70. Courbes de DCE calculée en (violette) et expérimentale (en vert) de la criophylline (1)

3.5.1.2. L'hydroxy-criophylline (2)

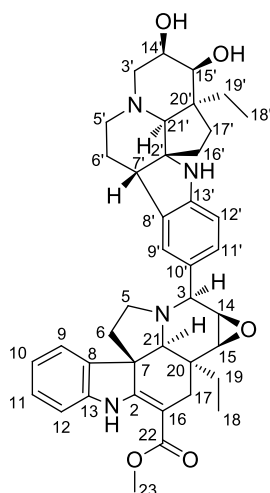


Figure 71 Structure de l'hydroxy-criophylline (2)

Le composé **2** a été obtenu sous la forme d'un solide amorphe brun foncé. L'analyse HRESI-QTOF-SM+ a montré un adduit proton $[M+H]^+$ à m/z 665,3676, correspondant à la formule brute $C_{40}H_{48}N_4O_5$ [calculée pour $C_{40}H_{49}N_4O_4$: 665,3697 ; Diff. = 3,23 ppm]. Il présente 19 degrés d'insaturation. Comme dans le composé **1**, 4 bandes d'absorption UV ont été observées à 204,2 ; 254,1 ; 296,7 et 327,6 nm caractéristiques d'un système-dihydro indolique. La mesure du pouvoir rotatoire du composé **2** a montré une valeur de $[\alpha]_D^{24,0} = -207,3$ (c 0,018, CH_2Cl_2).

Contrairement au composé **1**, l'interrogation des bases de données (*DNP*[®], *Reaxys*[®] et *Scifinder*[®]) à partir de la formule brute générée du composé **2** n'a donné aucun hit (voir le Tableau 12 de déréplication des extraits bruts de *C. inaequalis*). On peut laisser penser que c'est un nouveau composé. Selon la différence de masse déterminée entre le composé **2** et la criophylline (**1**). On pouvait émettre l'hypothèse d'une ouverture de l'époxyde en système diol. Cela a été confirmé par l'étude des spectres RMN 1D et 2D.

En effet, les spectres RMN 1D (1H , ^{13}C et DEPT 135) de la criophylline et du composé **2** présentent beaucoup de similitudes. Toutefois, nous pouvons noter la présence d'une différence de déplacements chimiques provenant de la partie Nord de la molécule. Le Tableau 13 ci-dessous, présente les différents déplacements chimiques observés.

Tableau 13 Comparaison des déplacements chimiques et des constantes de couplages des protons H-14, H-15, H-14' et H-15' de la criophylline (1) et de l'hydroxy-criophylline (2) (CDCl₃, 400 MHz)

Composé	Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	J (Hz)
criophylline (1)	14	3,47	55,6	3,6
	15	3,31	57,8	
	14'	3,60	51,3	3,4
	15'	3,39	59,3	
Hydroxy-criophylline (2)	14	3,48	55,5	3,5
	15	3,31	57,7	
	14'	3,83	69,2	8,5
	15'	3,52	75,1	

En comparant les constantes de couplages des protons H-14' et H-15' de la criophylline (1) et du composé 2, nous avons constaté une variation de 3,4 Hz pour le composé 1 à 8,5 Hz pour le composé 2. Ceci correspond donc à un changement d'angle dièdre entre ces protons, expliqué par l'ouverture de l'époxyde de la partie Nord de la criophylline donnant ainsi deux groupements hydroxyles comme nous le voyons dans la structure de l'hydroxy-criophylline (2) (Figure 72).

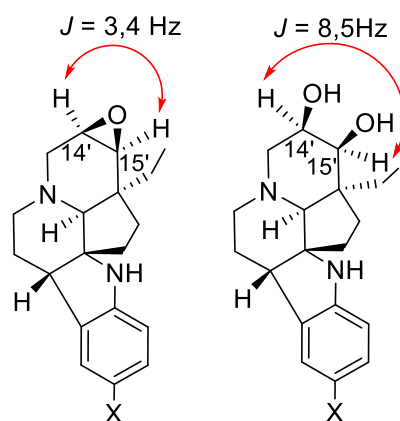


Figure 72. Différence entre les parties Nord des composés 1 et 2

a) Configuration relative de l'hydroxy-criophylline (2)

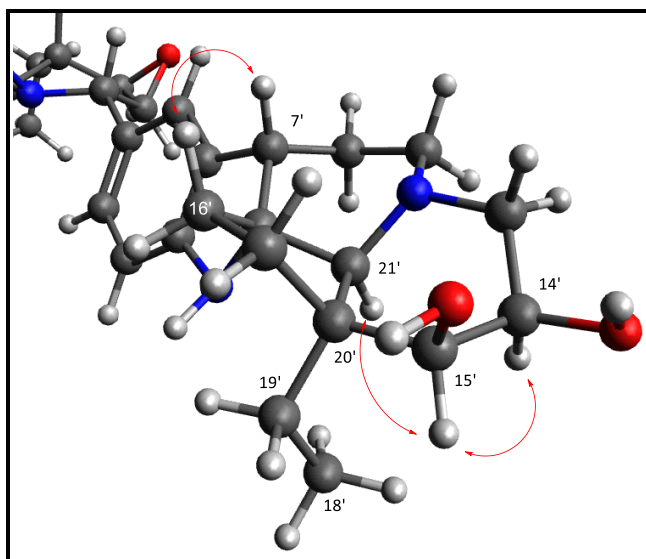


Figure 73. Corrélations NOESY de la partie Nord de l'hydroxy-criophylline (2)

Les analyses des spectres RMN de l'hydroxy-criophylline (2) ont montré que la structure de ce composé est très proche de celle de la criophylline (1), à l'exception de la partie Nord qui montre des signaux différents dus à la présence des groupements hydroxyles formés après l'ouverture de l'époxyde. Ainsi, afin de déterminer la stéréochimie de ce composé qui présente un nombre de centres asymétriques égal à celui de la criophylline (12 centres), nous avons analysé les spectres 2D NOESY de ce composé. Nous présentons ici, la configuration relative de la partie Nord (andrangine), l'unité Sud (tabersonine) étant similaire à celle de la criophylline (1).

Les corrélations NOESY observées entre les protons H-14', H-15' et H-21' de l'hydroxy-criophylline (2) ont permis de conclure sur l'orientation de ces protons, qui se situent du même côté du plan (Figure 73). La configuration relative de l'hydroxy-criophylline (2) proposée est donc : $3S^*$, $7R^*$, $14R^*$, $15S^*$, $20S^*$, $21R^*$, $2'R^*$, $7'S^*$, $14'R^*$, $15'S^*$, $20'S^*$, $21'S^*$.

3.5.1.3. L'hydrogénosulfate-criophylline (3)

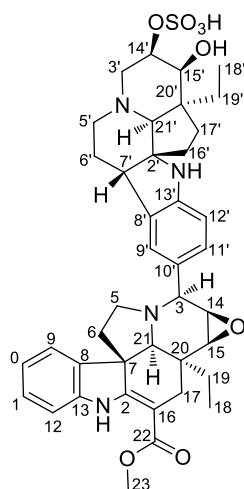


Figure 74. Structure de l'hydrogénosulfate-criophylline (3)

Selon sa position dans le réseau, de l'hydrogénosulfate-criophylline (3) serait très proche structuralement des deux premiers décrits précédemment. Son spectre HRESI-QTOF-SM+ a montré un pic pour l'adduit proton $[M+H]^+$ à m/z 745,3263, conforme à la formule brute $C_{40}H_{48}N_4O_8S$. [calculée pour $C_{40}H_{49}N_4O_8S$: 745,3266, Diff. = 0,35 ppm]. Comme dans les composés 1 et 2, le spectre UV de l'hydrogénosulfate-criophylline (3) montre quatre bandes à 203,1 ; 256,2 ; 297,9 et 326,3 nm, caractéristiques des dihydro-indoles. La mesure du pouvoir rotatoire a montré une valeur de $[\alpha]_D^{24,0} = +15,4$ (c 0,065, CH_2Cl_2).

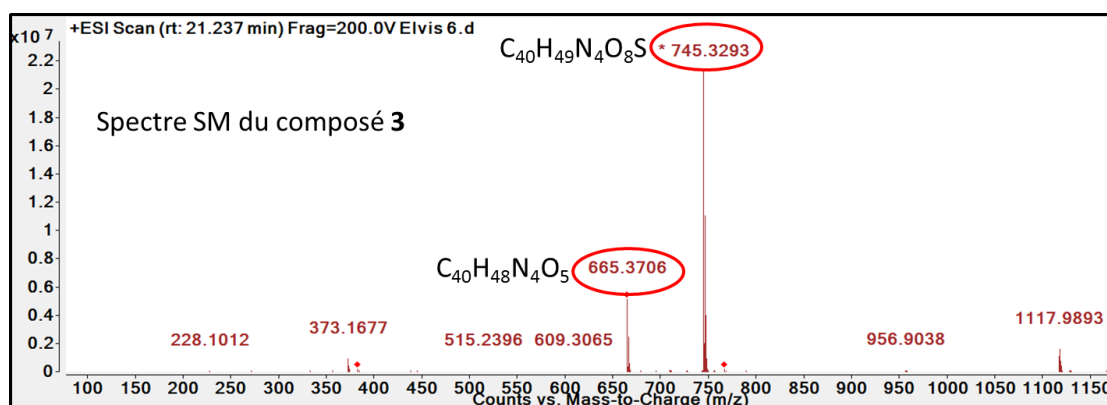


Figure 75. Spectre de masse ESI (+) de l'hydrogénosulfate-criophylline (3)

La présence d'un atome de soufre dans la formule brute proposée par l'analyse en HRESISM nous a poussé à analyser le spectre de masse HRESI (+) de l'hydrogénosulfate-criophylline (3)

(Figure 75). Ce dernier indique la présence d'un pic intense à m/z 745,3263, $[M+H]^+$ et d'un second pic à m/z 665,3676 $[M+H]^+$. La différence de masse entre ces deux pics est de 80 unités de masses, ce qui pourrait correspondre à un groupement sulfate.

Cette hypothèse de la présence d'un groupement sulfate sur le composé **3** a été confirmée par la comparaison des spectres RMN 1H des deux composés. Même si on peut remarquer une grande similarité entre les deux spectres (

Figure 76), il faut noter le déplacement chimique du proton H-14' qui se trouve déblindé d'environ 1 ppm dans le spectre du de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**) par rapport au spectre du composé **2**.

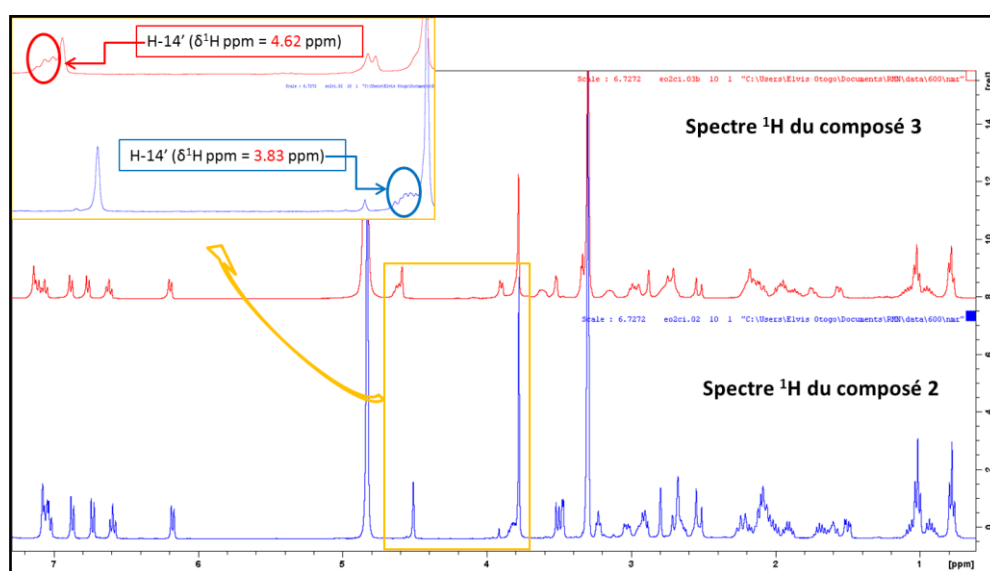


Figure 76. Comparaison des spectres RMN 1H des composés **3** et **2** (MeOH- d_4 , 400 MHz)

Ce déblindage caractéristique a pu être observé chez deux stérols d'origine marine (Figure 77) isolés de l'éponge *Xestospongia* sp. par Qureshi. A. et Faulkner. D.J. en 1999.¹⁸⁵

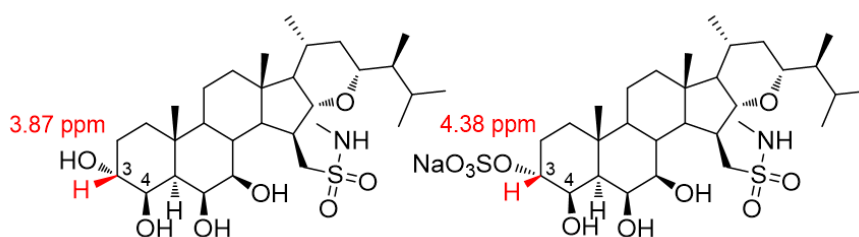


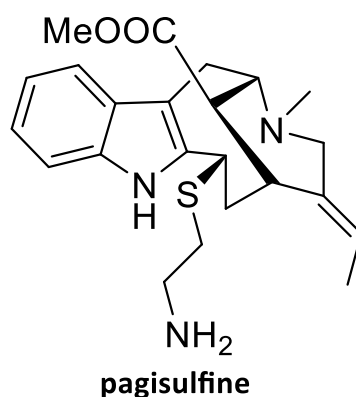
Figure 77. Stérols d'origine marine de l'éponge *Xestospongia* sp.

¹⁸⁵ A. Qureshi, et al., *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8323-8330.

L'ensemble de toutes ces observations nous ont permis de valider notre hypothèse, celle de la présence d'un groupement sulfate dans le composé **3**. Il est important de noter que l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**) est le premier dimère indolomonoterpénique possédant un groupement sulfate.

a) Hydrogénosulfate-criophylline (**3**) : substance naturelle ou artefact ?

A notre connaissance, il n'existerait qu'un seul exemple d'alcaloïde indolomonoterpénique soufré, la pagisulfine, isolé en 1986 de *Pagiantha cerifera* (Apocynaceae).¹⁸⁶



La rareté de ce type substitution chez les alcaloïdes indolomonoterpéniques et l'utilisation de l'acide sulfurique lors de l'extraction de la plante ont suscité un doute sur la nature du composé **3**. Nous avons donc supposé que ce composé pouvait être un artefact formé durant l'extraction. Nous avons donc cherché à vérifier cette supposition.

Ainsi, pour vérifier la nature exacte de notre composé, nous avons décidé d'extraire de nouveau les tiges de *C. inaequalis* (5 g) avec de l'éthanol sans l'utilisation de l'acide sulfurique. L'extrait éthanolique a été analysé par CLHP-ESI-Q/TOF. La Figure 78 présente le chromatogramme CLHP et le spectre MS associé, en comparaison avec les données de l'extrait alcaloïdique. On observe la présence d'un pic à $m/z = 745,3270$ correspondant à la formule brute $C_{40}H_{49}N_4O_8S$, au temps de rétention 20,8 min correspondant aux caractéristiques de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**). Ces observations nous ont permis de confirmer le caractère non artefactuel de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**).

¹⁸⁶ M. Bert, *et al.*, *Heterocycles* **1986**, *24*, 1567-1570.

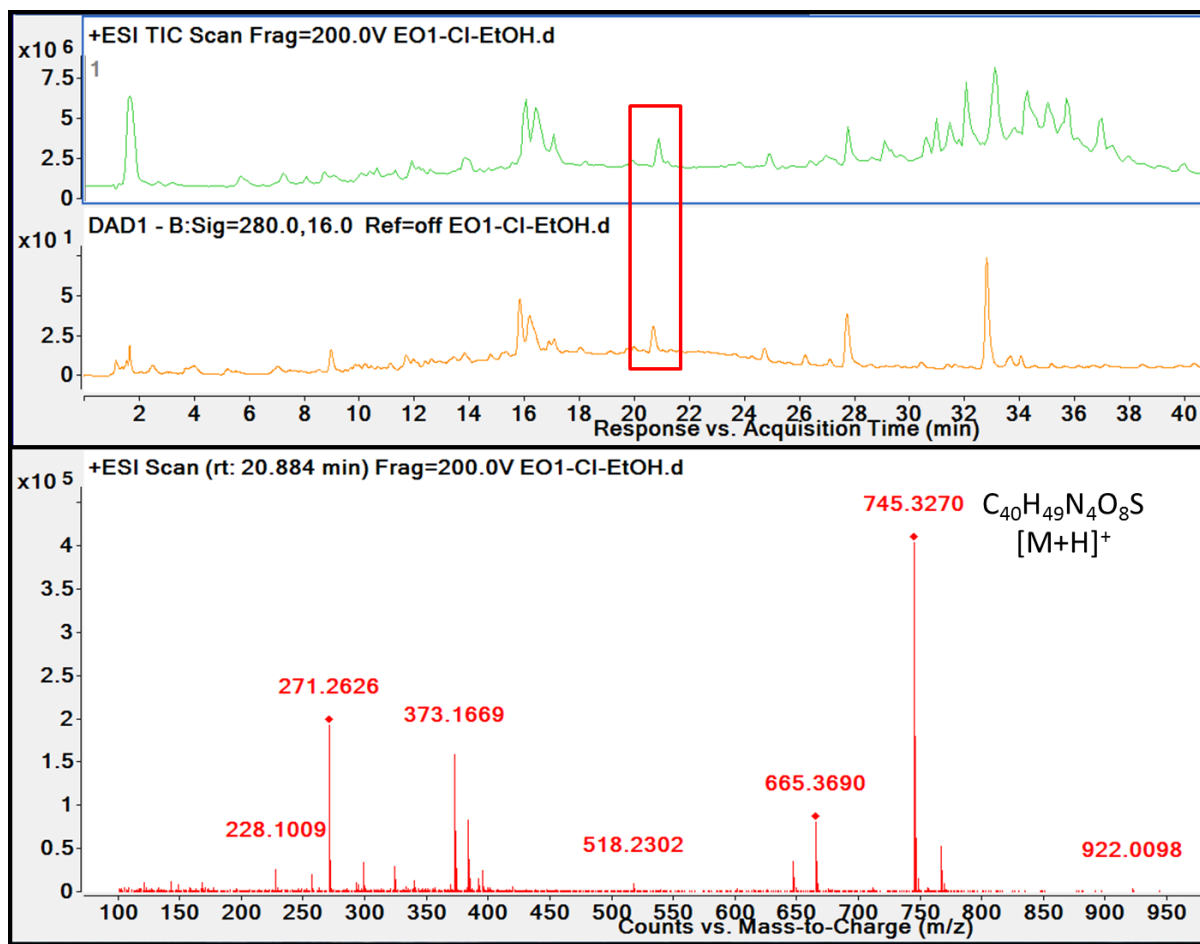


Figure 78. Chromatogrammes de l'extrait éthanolique des tiges de *C. inaequalis* et le spectre SM de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**)

a) Configuration relative de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**)

Les spectres RMN NOESY des composés **2** et **3** ont montré les mêmes corrélations. Nous avons donc déduit la configuration relative de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**) à partir de celle du composé **2** (Figure 73). La configuration relative proposée est : 3S*, 7R*, 14R*, 15S*, 20S*, 21R*, 2'R*, 7'S*, 14'R*, 15'S*, 20'S*, 21'S*.

b) Configurations absolues des composés 2 et 3

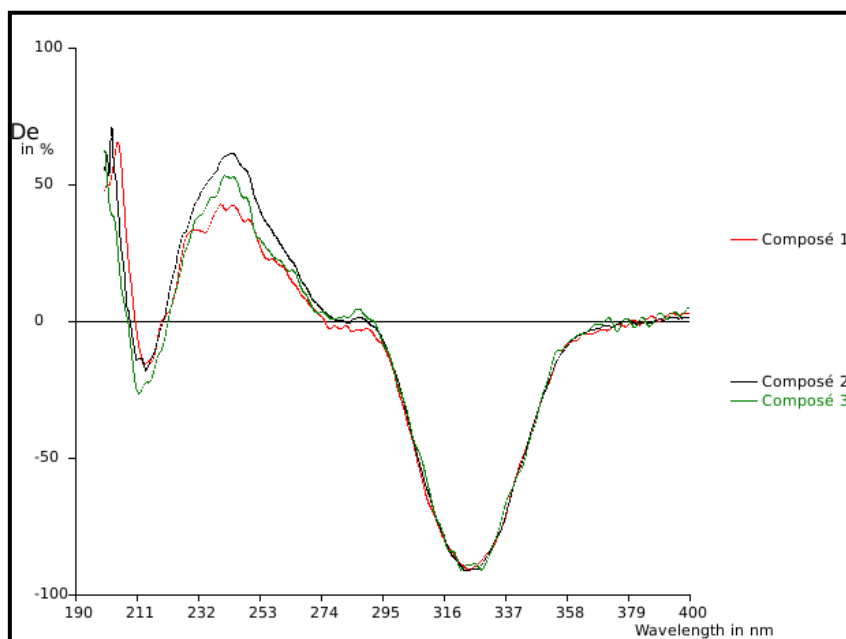


Figure 79. Comparaison des courbes expérimentales de dichroïsme circulaire électronique des composés 1, 2 et 3 (MeOH)

Rouge : composé 1 ; violet : composé 2 ; vert : composé 3.

En observant les courbes de DCE des trois composés (**1**, **2** et **3**) (Figure 79), nous remarquons qu'ils sont superposables. De plus, appartenant à la même série chimique, on peut aisément extrapoler le résultat obtenu pour le composé **1** (criophylline) aux composés **2** et **3** en leur attribuant la configuration absolue suivante : $3S, 7R, 14R, 15S, 20S, 21R, 2'R, 7'S, 14'R, 15'S, 20'S, 21'S$.

3.5.2. Caractérisation des composés isolés des racines

L'étude des racines de *C. inaequalis* nous a permis d'isoler deux composés : le composé **5**, ciblé dans le groupe **C** du réseau moléculaire et le composé **6**, détecté parmi ceux n'appartenant à aucun groupe (*selfloop*). Comme pour les composés extraits des tiges, ces deux composés ont été caractérisés par les mêmes méthodes d'analyses.

Le composé **6** correspondant à la vobtusine ne sera pas décrit car c'est un composé connu du genre *Callichilia*. Ses caractéristiques spectrales sont identiques à celles de la littérature.¹⁶⁷

3.5.2.1. inaequalisine A (5)

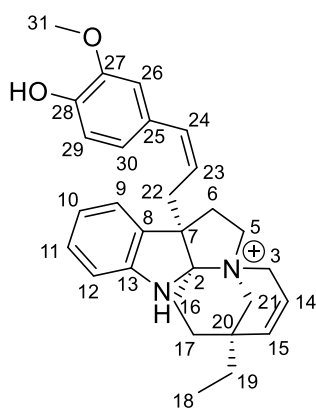


Figure 80. Structure de l'inaequalisine A (5)

Le composé **5** a été obtenu sous forme d'un solide amorphe jaune. L'analyse HRESI-QTOF-SM+ a montré un pic pseudomoléculaire $[M]^+$ à m/z 443,2669, correspondant à la formule brute $C_{29}H_{35}N_2O_2^+$ [calculée pour $C_{29}H_{35}N_2O_2^+$: 443,2693, Diff. = 5,43 ppm], le composé présente 14 degrés d'insaturation. Le spectre UV est caractéristique du système dihydro-indole, avec les trois bandes à 202,2 ; 268,8 et 293,6 nm. C'est un composé optiquement actif avec une valeur de $[\alpha]_D^{24,0} = +110,0$ (c 0,05, CH_2Cl_2).

Une étude approfondie des spectres RMN 2D (COSY, NOESY et HMBC) nous a permis de déterminer la structure plane du composé **5**. Pour des raisons de clarté, nous l'avons divisé en deux unités A et B (Figure 81).

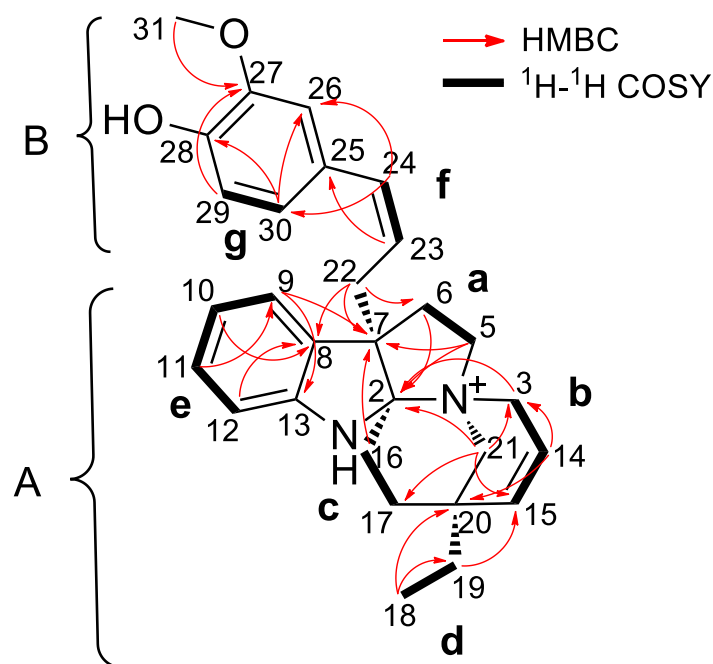


Figure 81. Corrélations HMBC et COSY de l'inaequalisine A (5)

a) Analyse de l'unité A

Les corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC ont permis de distinguer sept structures partielles (a-g) comme il est indiqué sur la Figure 81. La structure partielle **a** a été reliée au noyau dihydroindolique (C-2, C-7) grâce aux corrélations HMBC observées entre H₂-5 et C-7 et C-2, ainsi qu'entre H₂-6 et C-2. De même, la structure partielle **e** a pu être reliée aux carbones C-13 et C-8 grâce aux corrélations HMBC entre H-12 et C-8 ; entre H-10 et C-8 et entre H-9 et C-13. Par ailleurs, les structures partielles **a**, **b**, **c** et **d** ont pu être reliées grâce aux corrélations HMBC observées entre H₂-21 et C-2, C-5, C-15, C-17 et C-20. Toutes ces corrélations, dont celle observée entre le proton H-3 et C-2, ont permis la construction du motif pyrrolidinodihydroindole (Figure 82). Ces observations au niveau de l'unité A, sont en faveur du squelette de la rhazidine (Figure 82), un alcaloïde indolomonoterpénique retrouvé dans divers espèces appartenant aux Apocynaceae. Dans la nature, seule la (-)-rhazidine y est retrouvée. La (+)-rhazidine a été obtenue par hémisynthèse.^{187,188}

¹⁸⁷ Y. L. Yang, *et al.*, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 1392-1399.

¹⁸⁸ J. Éles, *et al.*, *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39*, 767-771.

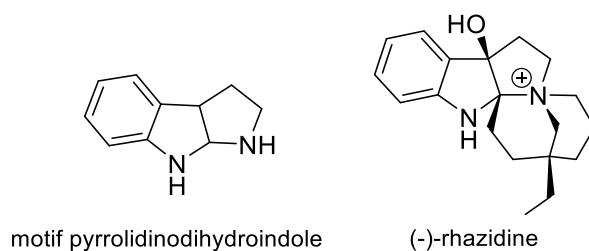


Figure 82. Motif pyrrolidinodihydroindole et le squelette rhazidine

b) Analyse de l'unité B

La structure partielle **f** a pu être reliée au noyau aromatique de l'unité B grâce aux corrélations HMBC entre H-23 et C-25 ainsi qu'entre H-24 et C-26 et C-30. La structure partielle **g** a été jointe aux carbones C-26, C-27 et C-28 grâce aux corrélations HMBC entre H-30 et C-26 et C-28 ainsi qu'entre H-29 et C-27. Le groupement méthoxy a été relié au noyau aromatique en C-27 grâce à la corrélation HMBC observée entre H₃-31 et C-27 (Figure 81). L'unité B correspond à un reste phénylpropanique de type férulique que nous désignerons comme unité cinnamique en raison de son origine biosynthétique probable dans la suite du manuscrit. La stéréochimie *Z* de la double liaison entre C-23 et C-24 a pu être déterminée grâce à la valeur de la constante de couplage entre H-23 et H-24, qui est de 10 Hz. Cette stéréochimie est étonnante pour un tel composé, car habituellement la stéréochimie *trans* est communément rencontrée pour les cinnamates. Dans notre cas, cette double liaison *Z* serait stabilisée par l'effet « *π-stacking* » entre les deux cycles aromatiques (noyau dihydroindole et l'unité cinnamique).

Enfin, la liaison entre les unités A et B a pu être déterminée grâce à la corrélation HMBC observée entre H-22 et C-7. Cette substitution est atypique.

Il est important ici de noter que ce composé est le premier exemple d'alcaloïde indolomonoterpénique lié à une entité phénylpropène *via* une liaison C-C par le carbone C-7. En revanche, il existe un exemple de produit naturel à motif pyrrolodihydroindole possédant le même type de liaison et de substitution. Il s'agit de l'angélicastigmine (Figure 83), un alcaloïde de type ésérine de stéréochimie non déterminée, isolé de l'espèce *Angelica polymorpha* issue de la famille des Apiaceae.¹⁸⁹

¹⁸⁹ P. Pachaly, *et al.*, *Pharmazie* **2000**, *55*, 777-778.

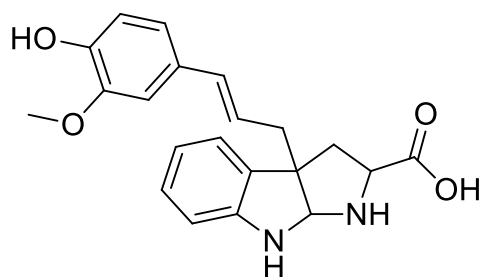


Figure 83. Structure de l'angélicastigmine

c) Configuration relative du composé 5

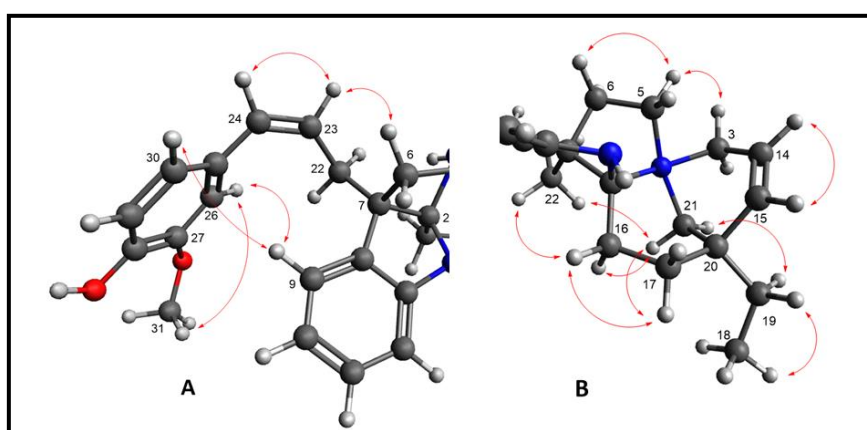


Figure 84. Corrélations ROESY des unités A et B du composé 5

L'interprétation du spectre RMN ROESY du composé **5** nous a permis de déterminer sa configuration relative. Les corrélations ROESY observées entre les protons H-22, H-16, H-17, H-21, H-19 et H-18 indiquent clairement que ces protons ont la même orientation, arbitrairement indiquée α (Figure 84). Par ailleurs, les protons H-15, H-14 ainsi que les protons H-3, H-5 et H-6 ont une orientation en β . Les corrélations entre les protons H-9, H-26 et H-30 ainsi qu'entre H-23 et H-24 sont en accord avec la stéréochimie de la double liaison de l'unité cinnamique (Figure 84). Finalement, d'après les corrélations ROESY (Figure 84), la configuration relative du composé **5** a été déterminée comme étant : $2R^*$, $4S^*$, $7R^*$, $20R^*$.

La détermination de la configuration absolue du composé **5** à l'aide du dichroïsme circulaire électronique était en cours au moment de la rédaction du manuscrit et ne peut donc pas être précisée ici.

Le composé **5** constitue un nouveau composé que nous avons dénommé inaequalisine A.

3.6. Voie de biosynthèse de l'inaequalisine A

Afin de mieux comprendre l'origine structurale des inaequalisine, nous nous sommes attelés à proposer une voie de biosynthèse hypothétique.

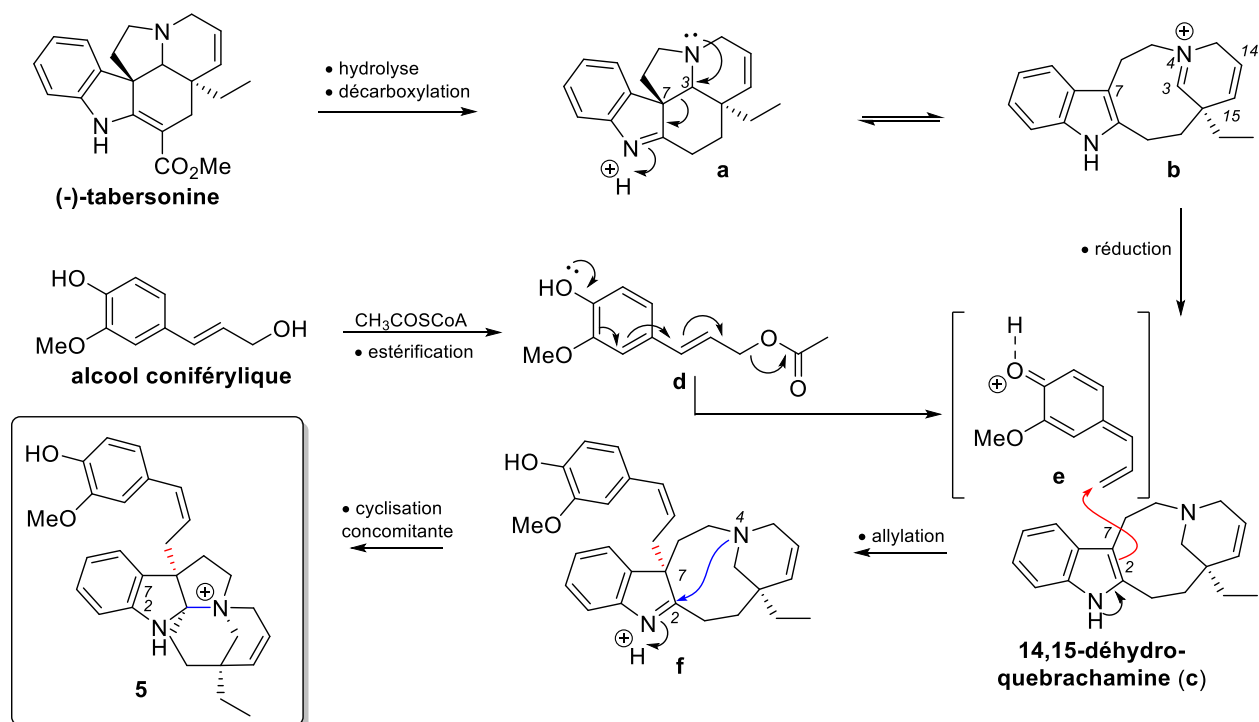


Figure 85. Voie de biosynthèse hypothétique de l'inaequalisine A (5)

La séquence aurait pour point de départ la (-)-tabersonine qui, après hydrolyse et décarboxylation, conduirait au composé **a** qui est en équilibre avec sa forme iminium **b**. Une réduction de **b** permettrait d'obtenir la 14,15-déhydro-québrachamine (**c**). L'unité **d** serait un dérivé de l'alcool coniférylique estérifié par le coenzyme A. Le départ du groupement acétate permettrait l'obtention de l'intermédiaire quinone méthide **e** qui assurerait l'allylation de **c** donnant **f**. La cyclisation concomitante expliquerait l'origine de l'inaequalisine A (**5**) (Figure 85).

On notera que la tabersonine et la québrachamine ont été identifiés lors de l'analyse par molecular networking des extraits alcaloïdiques de tige et de racine (voir Tableau 11).

4. Résultats des activités biologiques

Au cours de notre travail, nous avons évalué l'activité antiplasmodiale des composés isolés. Seuls les composés **1-4**, extraits des tiges, ont été testés. Les composés issus des racines n'ont été obtenus qu'en très faible quantité et n'ont pas pu être testés.

4.1 Activité antiplasmodiale

Les composés ont été évalués sur une souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* (FcB1). Les résultats sont présentés dans le Tableau 14 ci-dessous.

L'analyse de ce tableau montre que tous les composés testés ont une activité de l'ordre du micromolaire. Leurs activités sont très inférieures à celle du produit de référence. L'hydroxy-criophylline (**2**) est la plus active ($CI_{50} = 2,95 \mu\text{M}$), suivie de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**). Les deux autres composés (**1** et **4**) ont montré une activité faible.

Tableau 14 Résultats d'activité antiplasmodiale (FcB1) des composés isolés de *C. inaequalis*

Composés	FcB1 CI_{50} (μM)
criophylline (1)	$54,5 \pm 0,1$
hydroxy-criophylline (2)	$2,9 \pm 0,1$
hydrogénosulfate-criophylline (3)	$14,3 \pm 0,2$
(+)-lyonirésinol (4)	$48,1 \pm 0,4$
chloroquine	$0,05 \pm 0,06$

5. Conclusion du chapitre IV

La mise en place et le développement de la *Monoterpene Indole Alkaloids Data Base* (MIADB) au sein du laboratoire a permis une dérégulation et une annotation rapides et efficaces du réseau moléculaire global de *C. inaequalis*. Cette approche a permis de déréguler 12 molécules qui n'ont jamais été décrites dans le genre *Callichilia*. L'étude phytochimique de *Callichilia inaequalis* par cette technique innovante conduit à l'isolement de trois nouveaux composés indolomonoterpéniques (**2-3, 5**) encore jamais décrits dans la littérature : deux *bis*-indoles (**2-3**) de la série andrangine-tabersonine et un monomère, l'inaequalisine A (**5**). Ce dernier est remarquable, il s'agit ici du premier exemple d'alcaloïde indolomonoterpénique lié à une entité phénylpropène *via* une liaison C-C. Des analogues ont été mis en évidence dans le réseau moléculaire, et un second composé a été obtenu dans cette classe. L'établissement de sa structure est en cours. Ces données ne sont pas montrées ici.

De plus, nous avons également pu isoler le premier alcaloïde *bis*-indolomonoterpénique (**3**) possédant un groupement sulfate tout en ayant écarté sa nature artificielle. Deux composés connus ont également été isolés durant ce travail, il s'agit de la vobtusine (**6**), dimère connu dans le genre *Callichilia* et un cyclolignane connu sous le nom de la (+)-lyonirésinol (**4**).

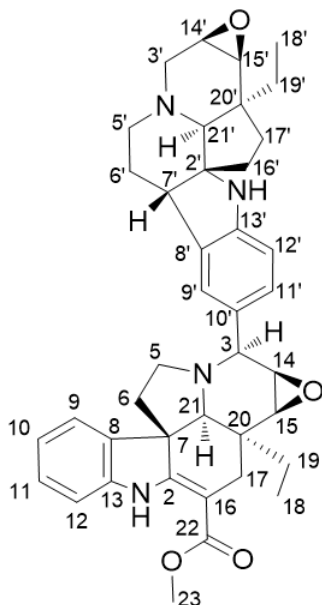
Par ailleurs, la configuration absolue de la criophylline (**1**) et de ses deux analogues (**2** et **3**) a été déterminée par Dichroïsme Circulaire Électronique (DCE).

Les composés (**1-4**) ont été soumis à des évaluations biologiques portant sur la recherche d'activités antiplasmodiale (FcB1). Les valeurs obtenues sont de l'ordre du micromolaire pour le test antiplasmodial, ce qui traduit une activité *in vitro* très moyenne pour ces molécules.

La faible quantité d'extrait de tiges et de racines ne permet pas l'isolement d'autres molécules appartenant à d'autres clusters d'intérêts. Une étude de la plante à une plus grande échelle est envisagée.

6. Données spectrales des molécules isolées

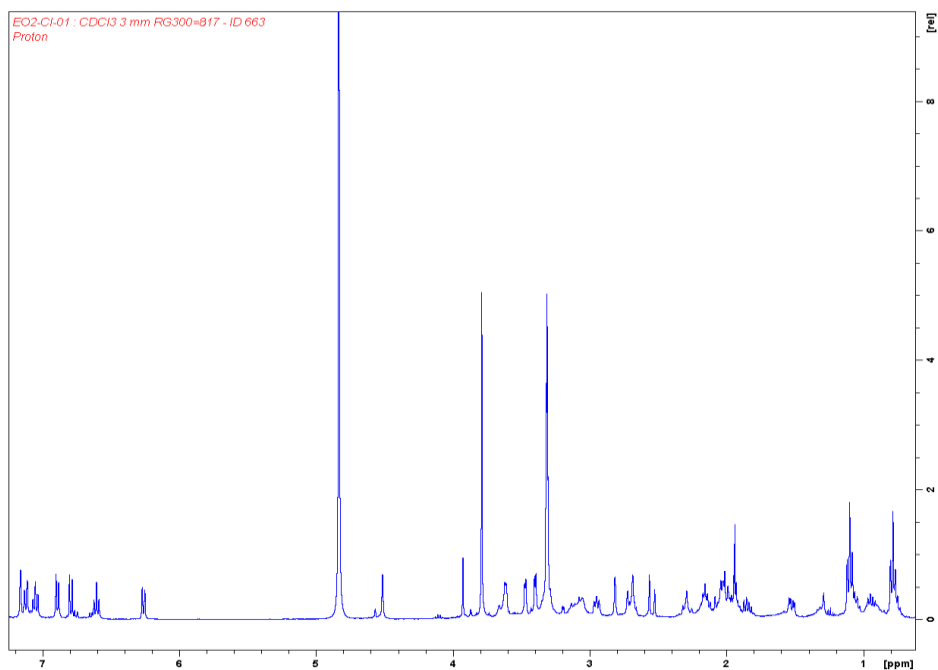
6.1. Données spectrales de la criophylline (1)



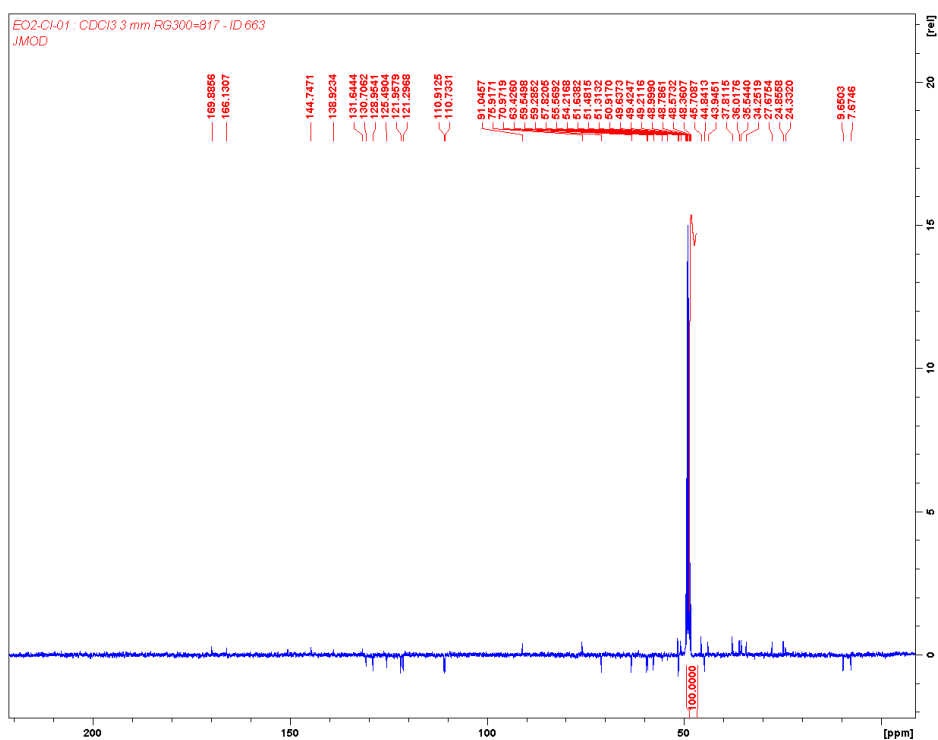
- **Aspect** : Solide amorphe brun foncé
- **UV, (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$)** : 326,5 nm (3,86), 295,7 nm (3,87), 254,6 nm (3,9576), 205,2 nm (4,51)
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{24,0}$** : + 140,0 (*c*, 0,01, CH₂Cl₂)
- **Masse (ESI-HRMS)**: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 647,3612, calculée pour C₄₀H₄₇N₄O₄, m/z = 647,3592 (Diff = -3,12 ppm)

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		166.1
3	4.57 ; sl	59.5
4		
5	2.94 t (7.4) ; 2.68 ; m	49.11
6	1.51 ; dd (11 4.3) ; 1.93 t (3.1)	43.9
7		55.67
8		138.83
9	6.26 ; d (7.2)	121.9
10	6.60 ; t (7.5)	121.3
11	7.05 ; td (7.6 ; 0.8)	128.9
12	6.89 ; d (7.7)	110.7
13		142.7
14	3.47 ; dd (3.6 ; 0.8)	55.59
15	3.31, m	57.83
16		91.1
17	2.54 ; dd (15.2 ; 1.7) ; 2.70 d (15.4)	24.8
18	0.78 ; t (7.3)	7.71
19	0.93 ; q (7.2) ; 1.06 m	27.69
20		37.8
21	2.81 s	63.4
2'		75.9
3'	3.61 m	50,9
4'		
5'	3.09 ; m ; 3.31 m	51,6
6'	2.16 m	24,3
7'	3.31, m	44,8
8'		131,7
9'	7.16 ; sl	125,5
10'		126,5
11'	7.12 ; dd (7.8 ; 1.5)	130,7
12'	6.79 ; d (7.9)	110,9
13'		150,6
14'	3.60 m	51,3
15'	3.39 ; d (3.4)	59,3
16'	2.02 m	36
17'	2.03 ; m ; 2.29 m	35.5
18'	1.08 ; t (7.3)	9.6
19'	1.85 ; m 1.95 m	34.2
20'		45.7
21'	3.06 ; m	70.9

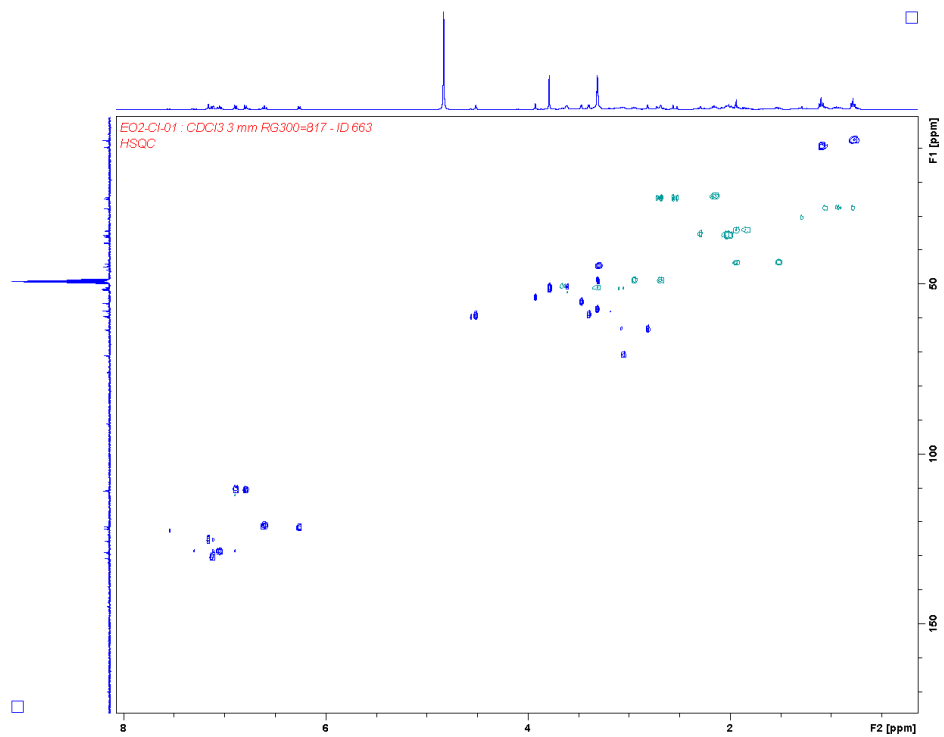
- Spectres RMN de la criophylline (1)



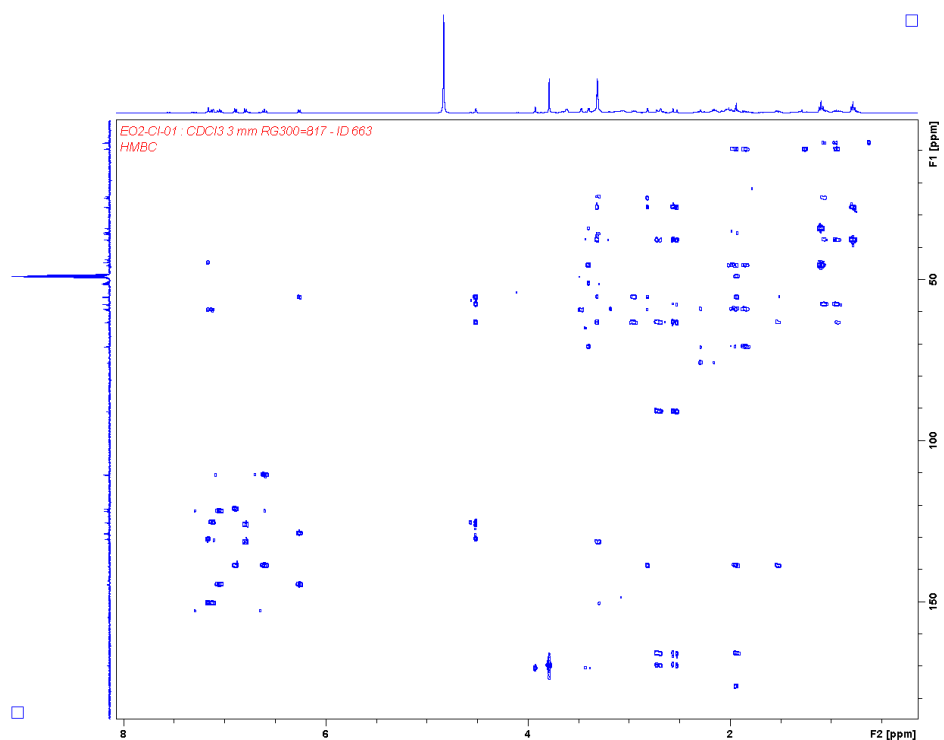
Spectre RMN ^1H de la criophylline (1) (CD_3OD , 400 MHz)



Spectre RMN ^{13}C de la criophylline (1) (CD_3OD , 100 MHz)

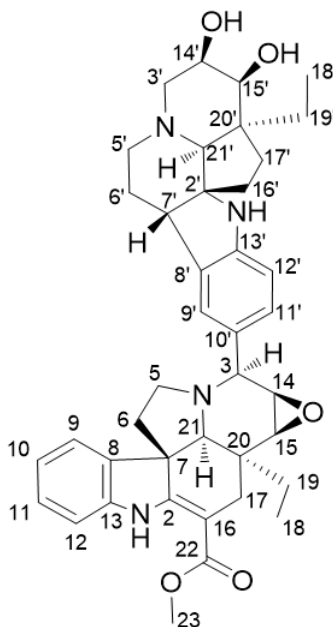


Spectre RMN HSQC de la criophylline (1) (CD₃OD, 400 MHz)



Spectre RMN HMBC de la criophylline (1) (CD₃OD, 400 MHz)

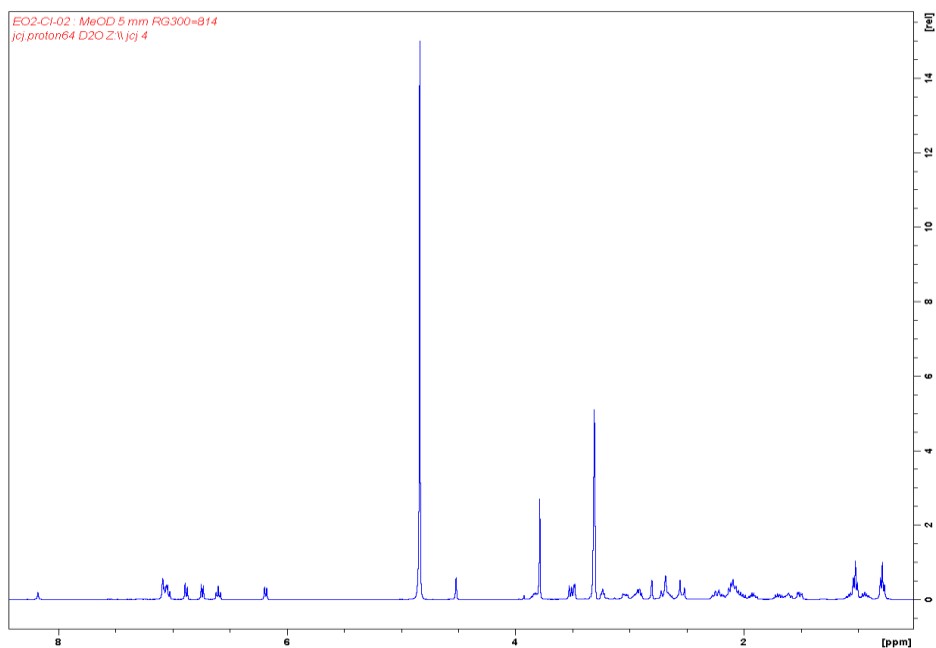
6.2. Données spectrales de l'hydroxy-criophylline (2)



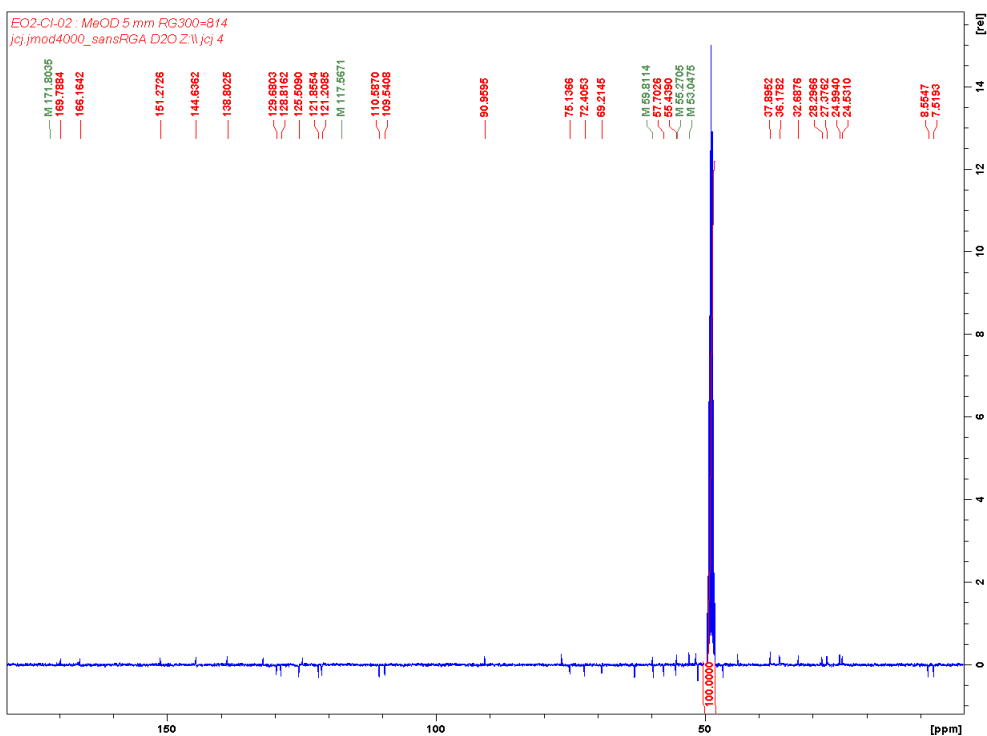
- **Aspect** : Solide amorphe brun foncé
- **UV, (MeOH) λ_{\max} (log ϵ)** : 327,6 nm (4,40), 296,7 nm (4,33), 254,1 nm (4,29), 230,0 nm (4,42).
- **$[\alpha]_D^{24,0}$** : -207,3 (*c* 0,018, CH₂Cl₂).
- **Masse (ESI-HRMS)**: [M+H]⁺ *m/z* = 665,3676, calculée pour C₄₀H₄₉N₄O₅ *m/z* = 665.3697 (Diff. = -3,23 ppm).

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
1		
2		166.2
3	4.51, sl	59.6
4		
5	2.66, m ; 2.91 q	48.9
6	1.51, dd (11.4 4.1) ; 1.92 m	44.0
7	-	55.3
8	-	138.8
9	6.18, d (7.2)	121.9
10	6.60, t (7.3)	121.2
11	7.04, t (8.2)	128.8
12	6.88, d (7.8)	110.6
13		144.6
14	3.48 dd, (3.5 0.9)	55.5
15	3.31, m	57.7
16	-	91.0
17	2.54, m ; 2.71, dd (15.2 1.7)	24.5
18	0.79, t (7.4)	7.5
19	0.94, q (7.3) ; 1.07 m	27.4
20		37.9
21	2.80, s	63.1
22		169.8
23	3.79, s	51.4
2'		76.7
3'	2.24, m ; 3.04, dd (11.6 4.2)	59.8
4'	-	
5'	2.54, d (15) ; 2.92, m	51.7
6'	2.10, m	25.0
7'	3.24, t (5.7)	46.6
8'		132.2
9'	7.08, s	125.5
10'		124.8
11'	7.05, d (7.3)	129.7
12'	6.88 d (7.8)	109.5
13'		151.2
14'	3.83, m	69.2
15'	3.52, d (8.5)	75.1
16'	2.12, m ; 2.22, q (11)	36.2
17'	1.61 m ; 2.11 m	32.7
18'	1.02, t (7.5)	8.6
19'	1.69, m ; 2.04 q (7.4)	28.3
20'	-	50.0
21'	2.66, m	72.4

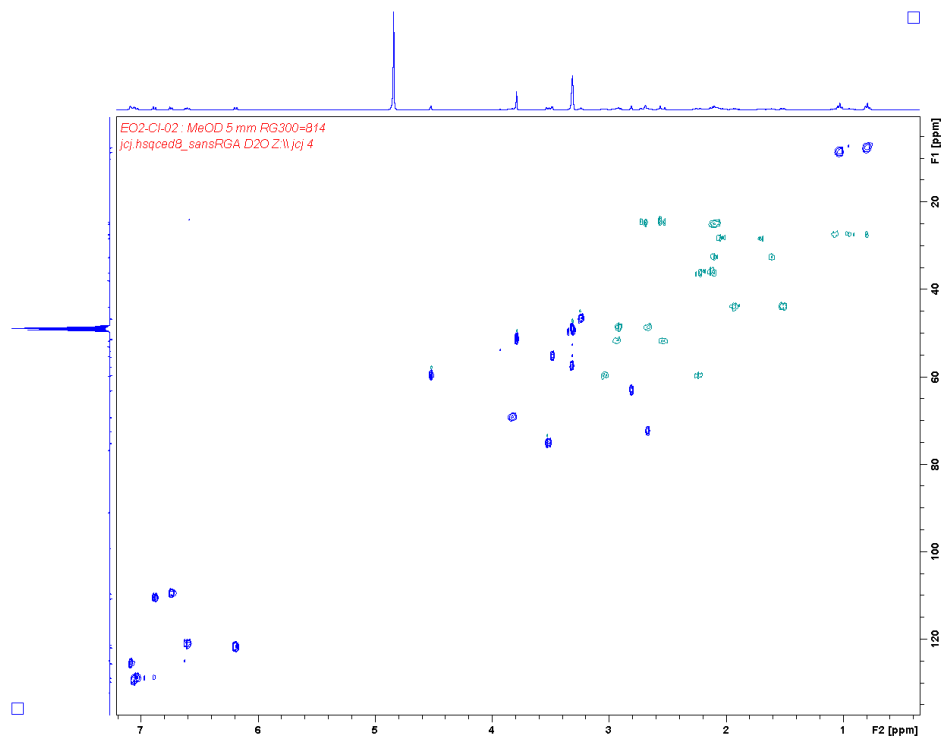
- Spectres RMN de l'hydroxy-criophylline (2)



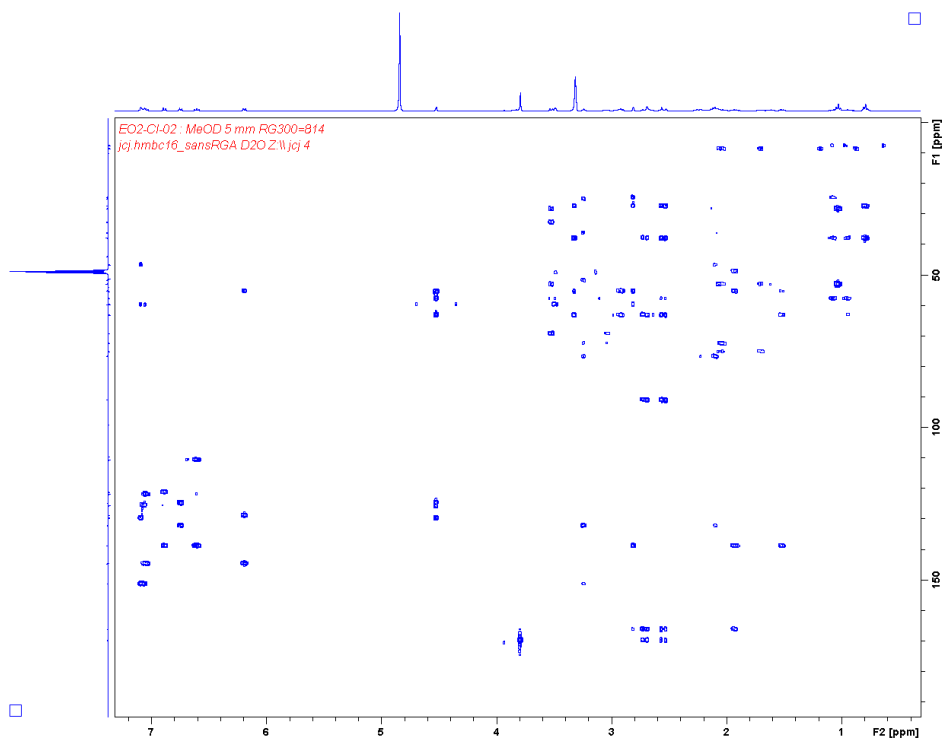
Spectre RMN ^1H de l'hydroxy-criophylline (2) (MeOH d_4 , 400 MHz)



Spectre RMN ^{13}C de l'hydroxy-criophylline (2) (MeOH d_4 , 100 MHz)

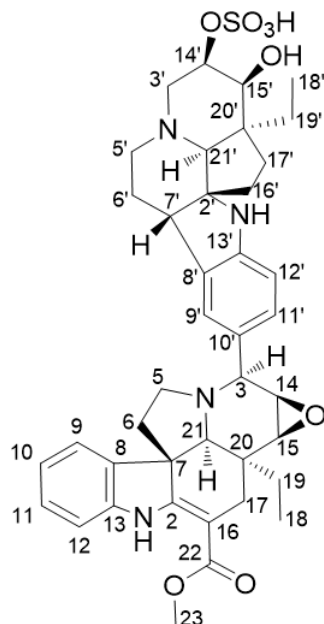


Spectre RMN HSQC de l'hydroxy-criophylline (**2**) (MeOH d₄, 400 MHz)



Spectre RMN HMBC de l'hydroxy-criophylline (**2**) (MeOH d₄, 400 MHz)

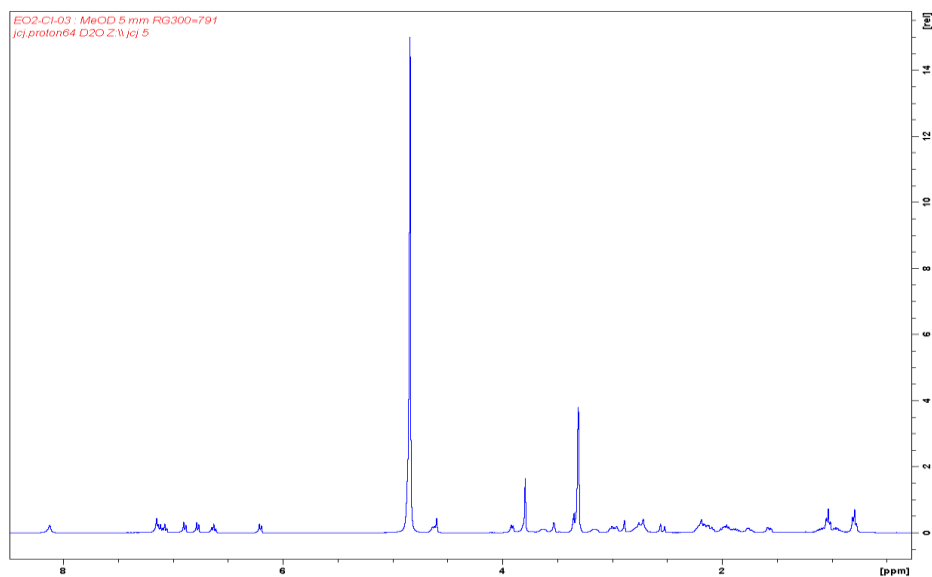
6.3. Données spectrales de l'hydrogénosulfate-criophylline (3)



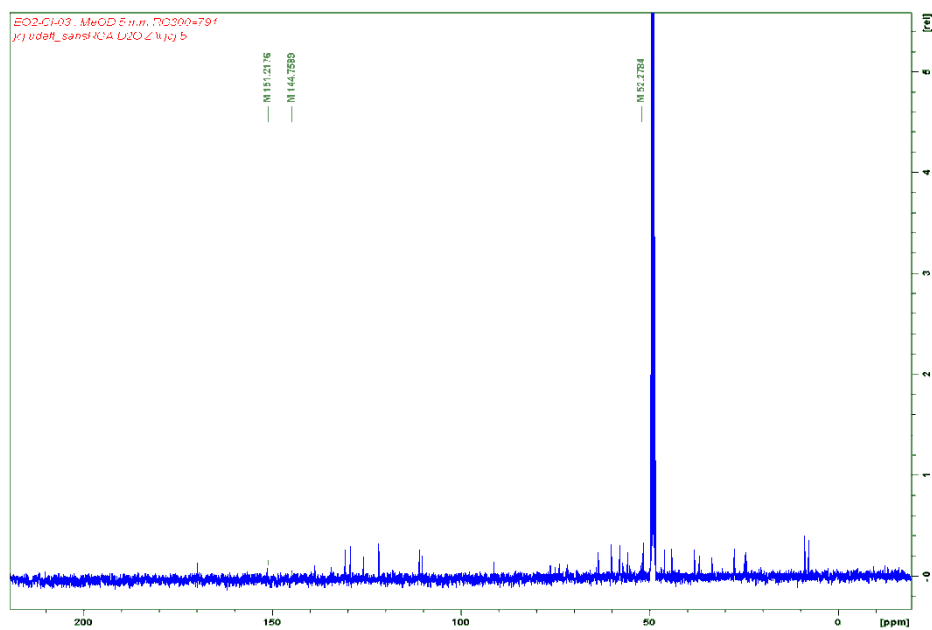
- **Aspect** : Solide amorphe brun foncé
- **UV, (MeOH) λ_{\max} (log ϵ)** : 326,3 nm (3,22), 297,9 nm (3,17), 256,2 nm (3,12), 203,1 nm (3,56).
- **$[\alpha]_D^{24,0}$** : + 15,0 (*c* 0,065, CH₂Cl₂).
- **Masse (ESI-HRMS)** : $[M+H]^+$ m/z = 745,3263, calculée pour C₄₀H₄₉N₄O₈S m/z = 745,3266 (Diff. = 0,35 ppm).

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
1		
2		166.1
3	4.60, sl	59.9
4		
5	2.72, m ; 3.00, t (3.0)	49.0
6	1.57, dd (11.6 4.1) ; 1.96, m	44.0
7		55.3
8		138.5
9	6.26, d (7.3)	121.8
10	6.63, t (7.5)	121.5
11	7.08, t (7.6)	129.2
12	6.89, d (7.9)	110.8
13		144.7
14	3.52, d (3.0)	55.8
15	3.35, d (3.4)	57.9
16		91.1
17	2.54, d (16) ; 2.74, m	24.7
18	0.79, t (7.4)	7.6
19	0.95, q (7.9) ; 1.09, m	27.6
20		37.0
21	2.88, s	63.4
22		169.8
23	3.79, s	51.4
2'		76.1
3'	2.74, m ; 3.04, q (3.1)	57.0
4'		
5'	2.74, m ; 3.16, m	51.8
6'	2.19, m	24.6
7'	3.30, m	46.2
8'		131.7
9'	7.15, s	125.6
10'		124.5
11'	7.12, d (8.1)	130.6
12'	6.77, d (7.9)	110.1
13'		151.3
14'	4.62, m	74.9
15'	3.91, d (6.8)	71.7
16'	2.12, m ; 2.20, m	36.6
17'	1.76, m ; 2.15, m	33.4
18'	1.03, t (7.3)	8.8
19'	1.88, m ; 1.97, m	29.7
20'		52.3
21'	2.96, s	73.9

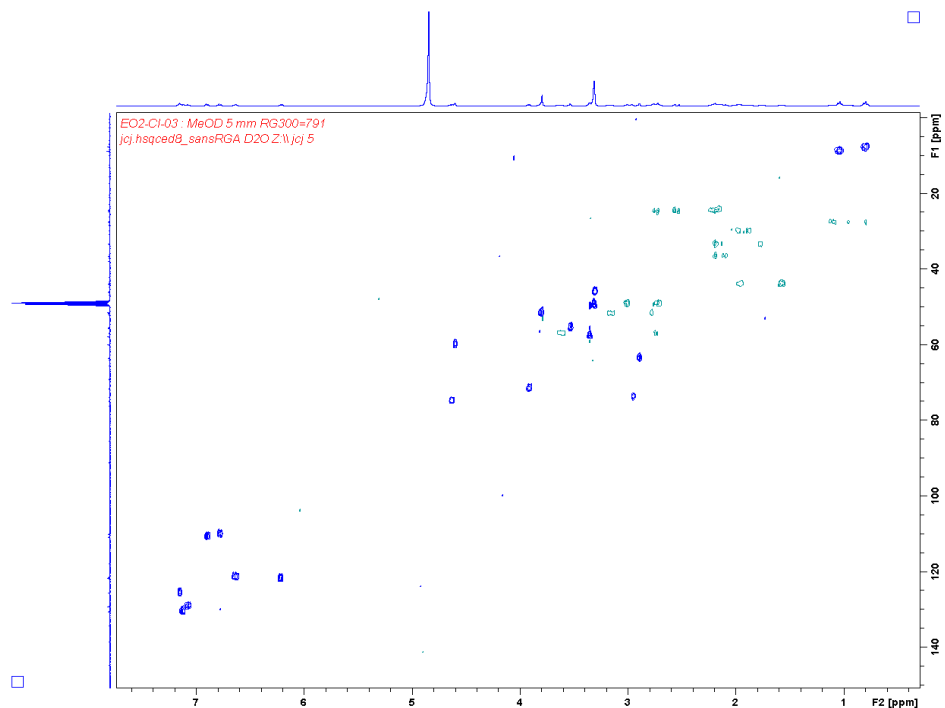
- Spectres RMN de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**)



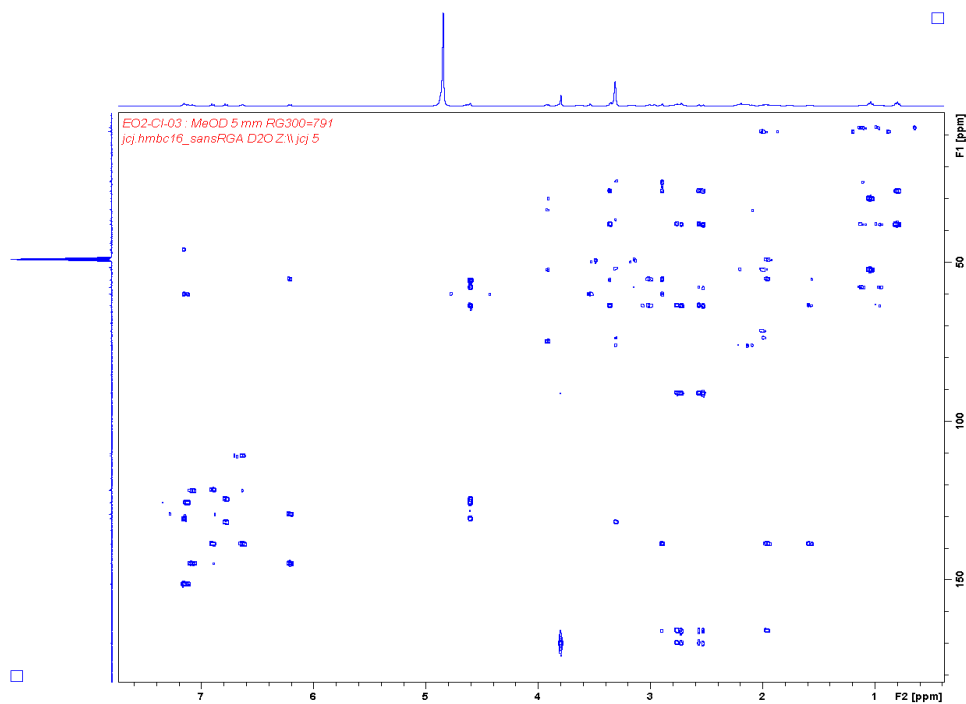
Spectre RMN ^1H de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**) (MeOH d_4 , 400 MHz)



Spectre RMN ^{13}C de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**) (MeOH d_4 , 100 MHz)

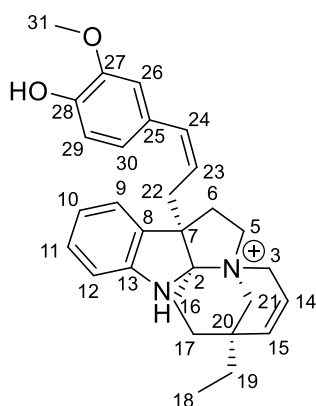


Spectre RMN HMBC de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**) (MeOH d₄, 400 MHz)



Spectre RMN HMBC de l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**) (MeOH d₄, 400 MHz)

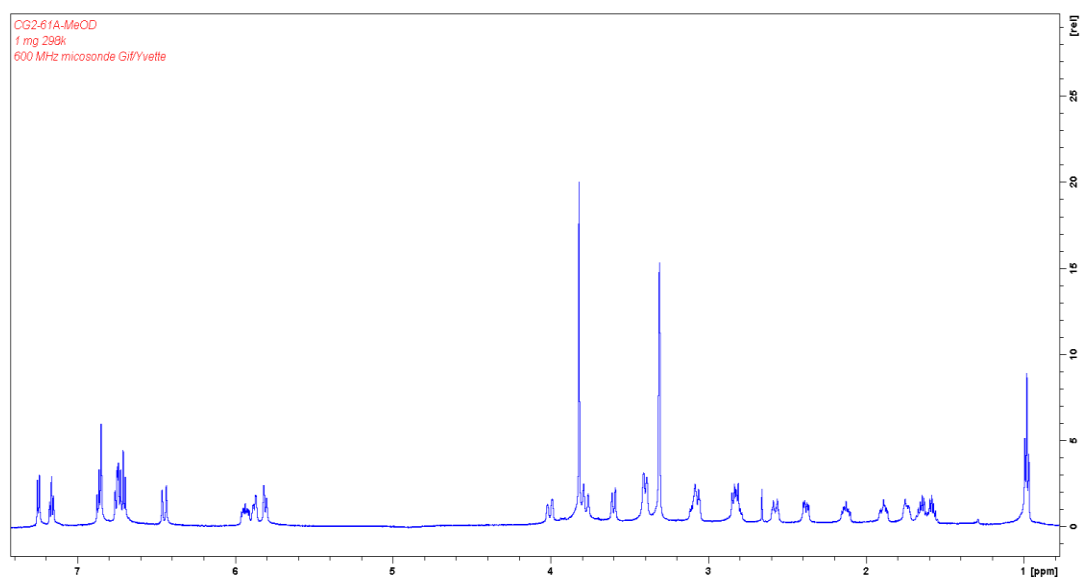
6.4. Données spectrales de l'inaequalisine A (5)



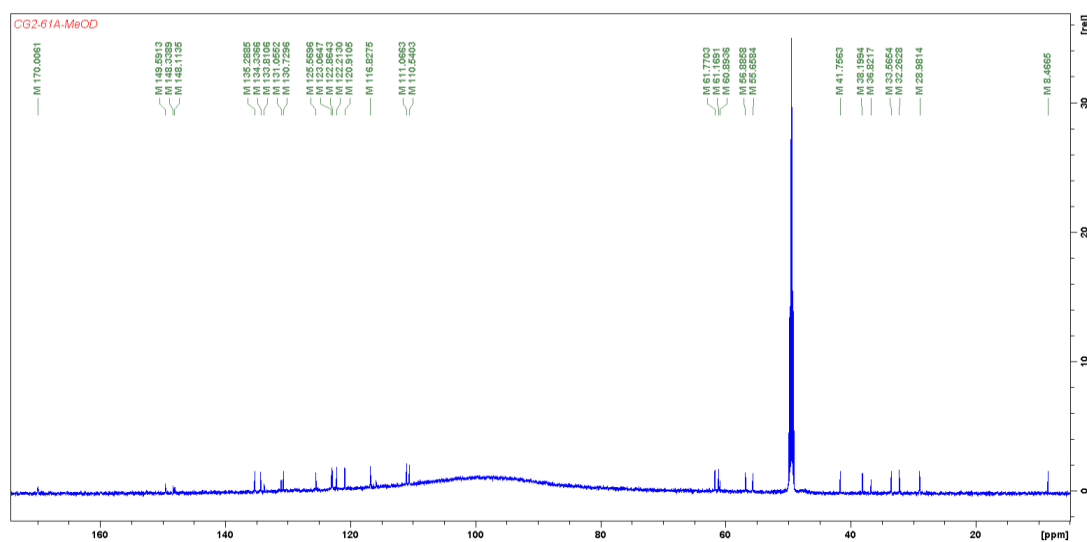
- **Aspect** : Solide amorphe jaune
- **UV**, (MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 293,6 nm (3,30), 268,8 nm (3,47), 202,2 nm (4,06).
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{24,0}$** : + 110,0 (*c* 0,05 , CH₂Cl₂)
- **Masse (ESI-HRMS)**: [M]⁺ m/z = 443,2669, calculée pour C₂₉H₃₅N₂O₂⁺ m/z = 443,2693, Diff. = -1,02 ppm

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		108.7
3	3.78, d (18) ; 4.00, dl (18)	55.7
5	3.09, m ; 3.40, m	61.8
6	2.85, m ; 3.08, m	41.8
7		60.9
8		133.8
9	7.25, d (7.4)	125.5
10	6.86, t (7.1)	122.2
11	7.16, t (7.5)	130.7
12	6.73, d (8)	110.5
13		148.3
14	5.88, dd (10.4 3.0)	122.9
15	5.81, d (10.2)	134.3
16	2.13, m ; 2.58, dt (15.8 5.0)	28.9
17	1.73, m ; 1.89, m	33.6
18	0.98, t (7.4)	8.5
19	1.58, m ; 1.64, m	32.2
20		36.8
21	3.40, d (12.4) 3.60, d (12.5)	61.2
22	2.38, dd (14.0 5.7) ; 2.82, m	38.2
23	5.93, m	123.1
24	6.45, d (15.6)	135.9
25		131.1
26	6.85, sl	111.0
27		149.6
28		148.1
29	6.70, d (7.5)	116.8
30	6.75, dl (8.0)	121.1
31	3.82, s	56.9

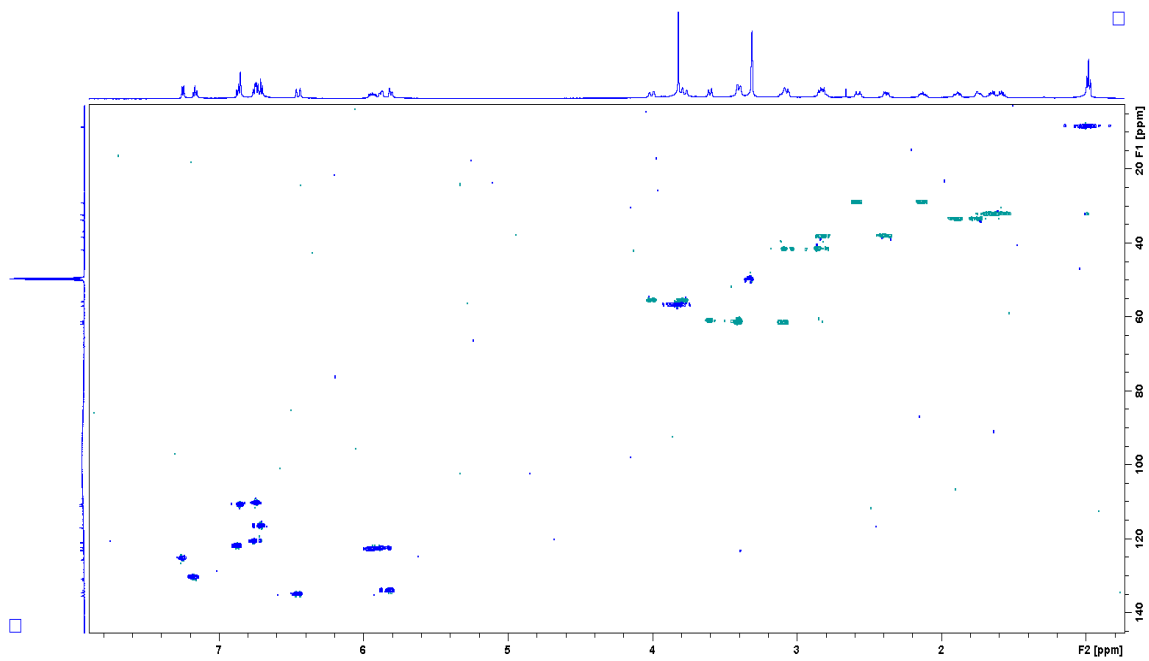
- Spectres RMN de l'inaequalisine A (5)



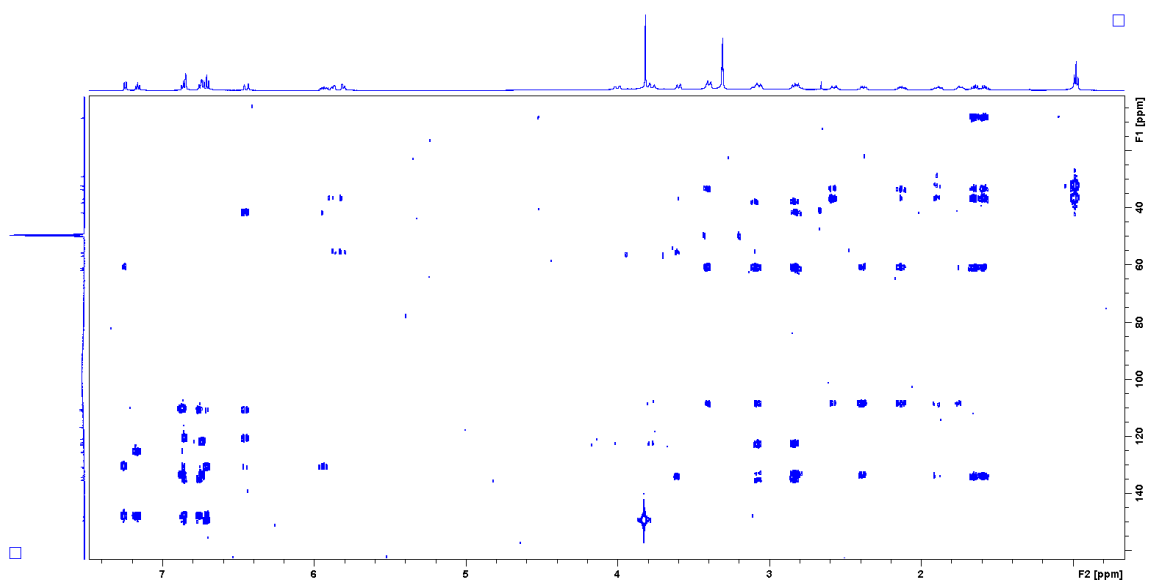
Spectre RMN ^1H de l'inaequalisine A (5) (MeOH d_4 , 600 MHz)



Spectre RMN ^{13}C de l'inaequalisine A (5) (MeOH d_4 , 150 MHz)



Spectre HSQC de l'inaequalisine A (5) (MeOH d₄, 600 MHz)



Spectre HMBC de l'inaequalisine A (5) (MeOH d₄, 600 MHz)

Chapitre V

Études chimique et biologique de

***Mostuea brunonis* Didr.**

(Gelsemiaceae)

Chapitre V. Études chimique et biologique de *Mostuea brunonis* Didr. (Gelsemiaceae)

1. Introduction

Le chapitre V présente l'étude chimique et biologique des extraits alcaloïdiques de tiges et de feuilles de *Mostuea brunonis* Didr., une plante appartenant à la famille des Gelsemiaceae.⁷⁵

Pour étudier ces extraits, nous avons suivi le même procédé que celui des chapitres précédents. Il a été question ici d'extraire spécifiquement les alcaloïdes à partir de feuilles et de tiges de *M. brunonis*, d'effectuer une étude de dérégulation par LC-MS/MS avec le ciblage des composés non connus grâce à l'approche du « *Molecular Networking* ». ¹⁸⁷ Puis de réaliser l'isolement et la caractérisation des nouveaux composés.

2. Présentation du genre *Mostuea* et de l'espèce *Mostuea brunonis* Didr.

2.1. Aspects botaniques et distribution du genre *Mostuea*

Le genre *Mostuea* est principalement distribué en Afrique tropicale.¹⁹⁰ Il ne comprend que neuf espèces dont huit sont retrouvées en Afrique et Madagascar : *M. batesii* Baker, *M. adamii* Sillans, *M. brunonis* Didr., *M. hirsuta* (T. Anderson ex Benth.) Baill., *M. microphylla* Gily, *M. muricata* Babral et Lc. Rossi, *M. neurocarpa* Gily et *M. walleri* Baker. Seule l'espèce *M. surinamenris* Benth. est présente en Amérique du Sud.^{190,191}

¹⁹⁰ G. H. Schmelzer, *et al.*, *Plant resources of tropical Africa*, 2008

¹⁹¹ <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Apocynaceae> (22/10/2018).

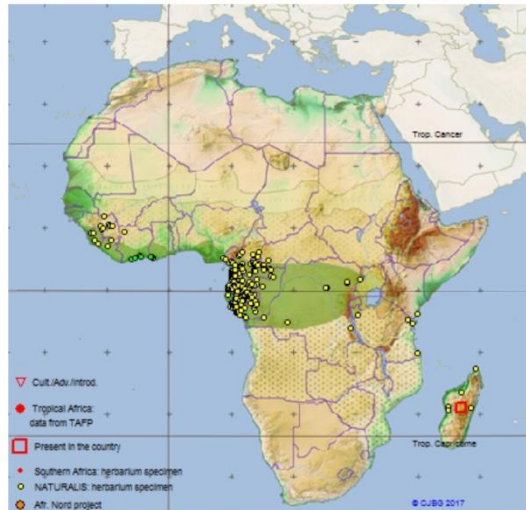


Figure 86. Répartition africaine du genre *Mostuea* (selon CJBG, 2017)

L'espèce *Mostuea brunonis* Didr. est endémique dans les forêts pluviales et secondaires d'Afrique Centrale et de l'Est. Elle est présente au Cameroun, en Centre-Afrique, au Gabon, en République Démocratique du Congo, au Kenya et vers le Sud jusqu'en Angola et au Mozambique.¹⁹⁰ Cette espèce possède environ 30 synonymes (Annexe 1).¹⁹² Elle a fait l'objet de plusieurs investigations dont la plus récente est celle faite par Jin-Rui Dai *et al.* en 1999.¹⁹³ Les caractères morphologiques *M. brunonis* sont communs aux plantes de la famille des Gelsemiaceae¹⁹⁰ (Figure 87).

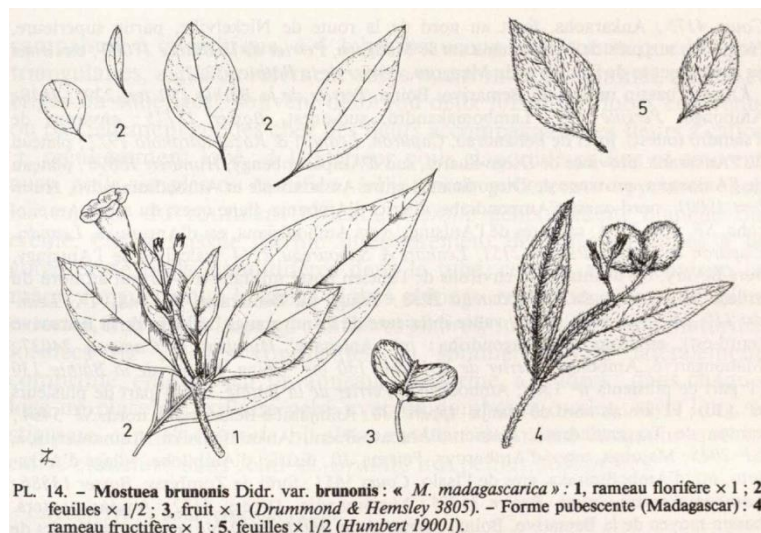


Figure 87. Planche botanique de *Mostuea brunonis* (Foren. Kj ©benhavn ,1853)

¹⁹² M. Onanga, thèse de doctorat, 1983.

¹⁹³ J.-R. Dai, *et al.*, *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 1427-1429.

- C'est un arbuste, un sous-arbrisseau ou parfois une liane, très ramifié, atteignant 7 m de haut avec des tiges érigées ou pendantes, à rameaux étalés ; à petits rameaux à proximité de l'apex soit diversement poilus soit glabres ;
- à feuilles opposées, simples et entières, à stipules membraneuses, triangulaires ; à pétiole de 0,5-8 mm de long ; à limbe oblong-ovale, ovale-elliptique ou elliptique de 0,5-15(-28) cm sur 0,5-8(-13) cm ;
- à inflorescence en cyme axillaire ou terminale, lâche à capitée, le plus souvent située sur un court rameau latéral, pouvant n'avoir qu'une fleur, à pilosité variable ;
- à fleurs bisexuées, légèrement zygomorphes, pentamères, hétérodistylées ; à sépales fusionnés jusqu'à la moitié de leur longueur, ovales, ovales-lancéolées à ovales linéaires, de 1-5 mm x 0,5-1 mm, à apex aigu ; poilues ou glabres à l'extérieur ; à corolle blanche, lilas ou rose, dans la plupart des cas à base et gorge jaunes ou oranges ;
- aux fruits sous forme de capsule bilobée de 4-7(-13) mm x 8-14 mm, glabre ou poilue, terne, brun moyen à foncé une fois sèche, à 4 valves, à 2-4 graines ;
- à graines planes convexes, obliquement ovales-orbiculaires, d'environ 10 mm x 6 mm x 2,5 mm, de couleur brun pâle.¹⁹⁰



Figure 88. Photographie de *Mostuea brunonis* Didr. (Source personnelle)

2.2. Utilisations traditionnelles

M. brunonis est traditionnellement utilisée par les populations des pays où on la retrouve. C'est le cas en Centrafrique, où la décoction ou l'infusion de racine est employée pour traiter les rhumes, l'hyperménorrhée, les affections rénales, ainsi que pour leurs vertus

aphrodisiaques. On prend des bains à la décoction de racine pour traiter la fièvre jaune.¹⁹⁰ Les jeunes feuilles se consomment dans les aliments pour traiter les maux d'estomac, et la décoction de rameaux se prend pour traiter les ballonnements de ventre chez les enfants.¹⁹⁰ Au Gabon, la racine râpée s'utilise pour lutter contre le sommeil ou pour ses vertus aphrodisiaques ; son action est décrite par l'Abbé Walker comme « similaire à celle de *Tabernanthe iboga* Baill.^{194,190} Elle se consomme d'ailleurs seule ou en mélange avec *Tabernanthe iboga* ; un usage prolongé peut mener à des troubles cérébraux ». ¹⁹⁰ Son usage comme stimulant est confirmé par De Smet, qui remet en cause sa réputation d'hallucinogène.¹⁹⁵ En Tanzanie, les racines se mastiquent pour traiter les maux d'estomac. La racine en décoction ou râpée fraîche se prend comme vermifuge. La racine râpée s'utilise aussi pour traiter les morsures de serpent ; elle s'applique en pansements sur les plaies. En République Démocratique du Congo, l'écorce de racine est un ingrédient d'un poison de flèche.^{190,193}

¹⁹⁴ A. Chevalier, *JATBA* **1946**, 26, 1-2.

¹⁹⁵ P. A. De Smet, *J. Ethnopharmacol.* **1996**, 50, 141-146.

2.3. Composition chimique

Très peu de travaux ont été publiés concernant *M. brunonis*, mais les études réalisées à partir des feuilles, tiges et les racines de cette plante ont permis d'isoler plusieurs alcaloïdes indoliques et quinoléiques, tous d'origine indolomonoterpénique qui se sont montrés modérément cytotoxiques.¹⁹³

2.3.1. Alcaloïdes indolomonoterpéniques

Mostuea brunonis contient plusieurs alcaloïdes indolomonoterpéniques de différents types de squelettes (Figure 89). Les études phytochimiques précédentes ont montré que les tiges et les feuilles contiennent de la mostuéine et de la gelsémicine (=11-méthoxy-gelsédine) et ses deux analogues : la 4,20-didéhydro-gelsémicine et la 14-hydroxy-gelsémicine.¹⁹⁶ La sempervirine a été isolée des racines. Dans une autre étude, guidée par l'activité cytotoxique de l'extrait organique de l'ensemble de plante, le strictosamide et la 2'-O-acétylstrictosamide ont également été isolés.¹⁹³

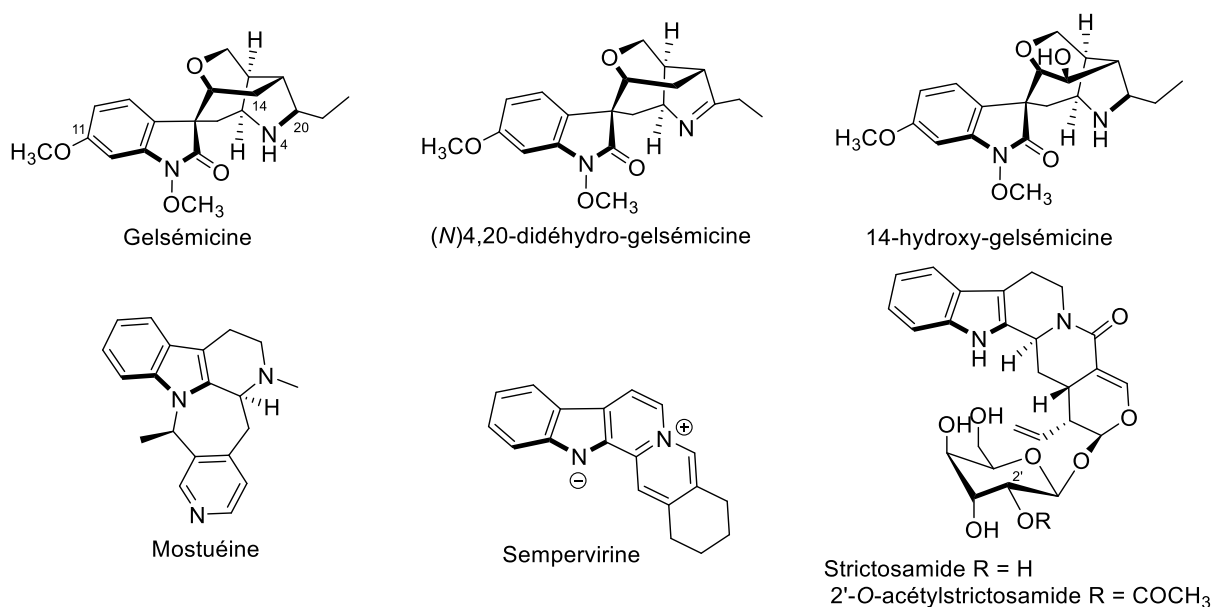


Figure 89. Alcaloïdes indolomonoterpéniques isolés de *M. brunonis*, hors quinoléines

¹⁹⁶ J. C. Liu, *China Journal* 1931, 5, 345-352.

2.3.2. Alcaloïdes quinoléiques

Dans les racines de l'espèce, un alcaloïde quinoléique, la camptothécine a été isolé. Ce composé est un chef de file d'une série d'origine indolomonoterpénique, connu pour sa présence dans *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae).¹⁹⁷ La camptothécine est fortement cytotoxique et, ses dérivés hemisynthétiques sont des principes actifs employés dans les chimiothérapies contre les cancers du côlon et du sein, le cancer du poumon à petites cellules et la leucémie.¹⁹⁰ Son utilisation dans des fongicides agricoles a été brevetée en Chine. Dans l'extrait de plante entière de *Mostuea brunonis* la 20-O- β -D-glucopyranosylcamptothécine et le déoxypumiloside ont également été isolés¹⁹³ (Figure 90).

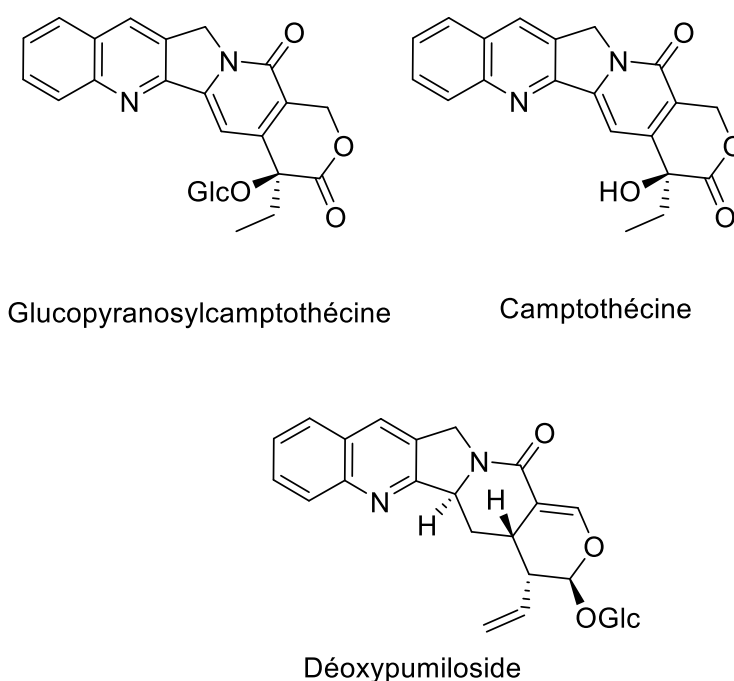


Figure 90. Alcaloïdes quinoléiques isolés de *M. brunonis*

¹⁹⁷ J. G. Buta, et al., *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1978**, *17*, 160-161.

3. Travaux personnels

3.1. Récolte et identification

Les tiges et les feuilles de *M. brunonis* ont été récoltées en janvier 2016 durant la petite saison sèche dans la forêt tropicale de la Mondah province de l'Estuaire au Nord-Ouest du Gabon. Un échantillon (E.O.N n° 0015) a été déposé à l'herbier national du Gabon de l'Institut de Pharmacopée et de Médecine traditionnelle, à Libreville.

3.2. Réseau moléculaire des extraits alcaloïdiques de *M. brunonis*

Une étude de déréplication des extraits alcaloïdiques des tiges (3,639 g, $\rho = 0,247\%$) et des feuilles (0,589 g, $\rho = 0,073\%$) de *M. brunonis* a été effectuée en utilisant la même approche de « *Molecular networking* ». ^{198,143} Ces extraits ont été tout d'abord analysés par CLHP-ESI-Q-TOF-MS² en mode ionisation positive selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre II (« démarche de travail »). Les chromatogrammes obtenus de cette analyse sont présentés dans la Figure 91.

Un réseau moléculaire global de ces deux extraits a été généré et interprété (Figure 92). Comme pour *P. mutica* et *C. inaequalis*, ce réseau a été annoté à l'aide de la MIADB. ¹⁴⁴ Cette étude de déréplication nous permettra de trier les molécules connues de *M. brunonis* et d'identifier les molécules potentiellement inconnues.

Les profils chromatographiques obtenus montrent une nette différence entre les deux drogues végétales, avec seulement une partie d'alcaloïdes majoritaires en commun, ceux apparaissant comme les plus abondants en détections UV et MS étant distincts.

¹⁹⁸ R. S. A. Cabral, et al., *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2270-2278.

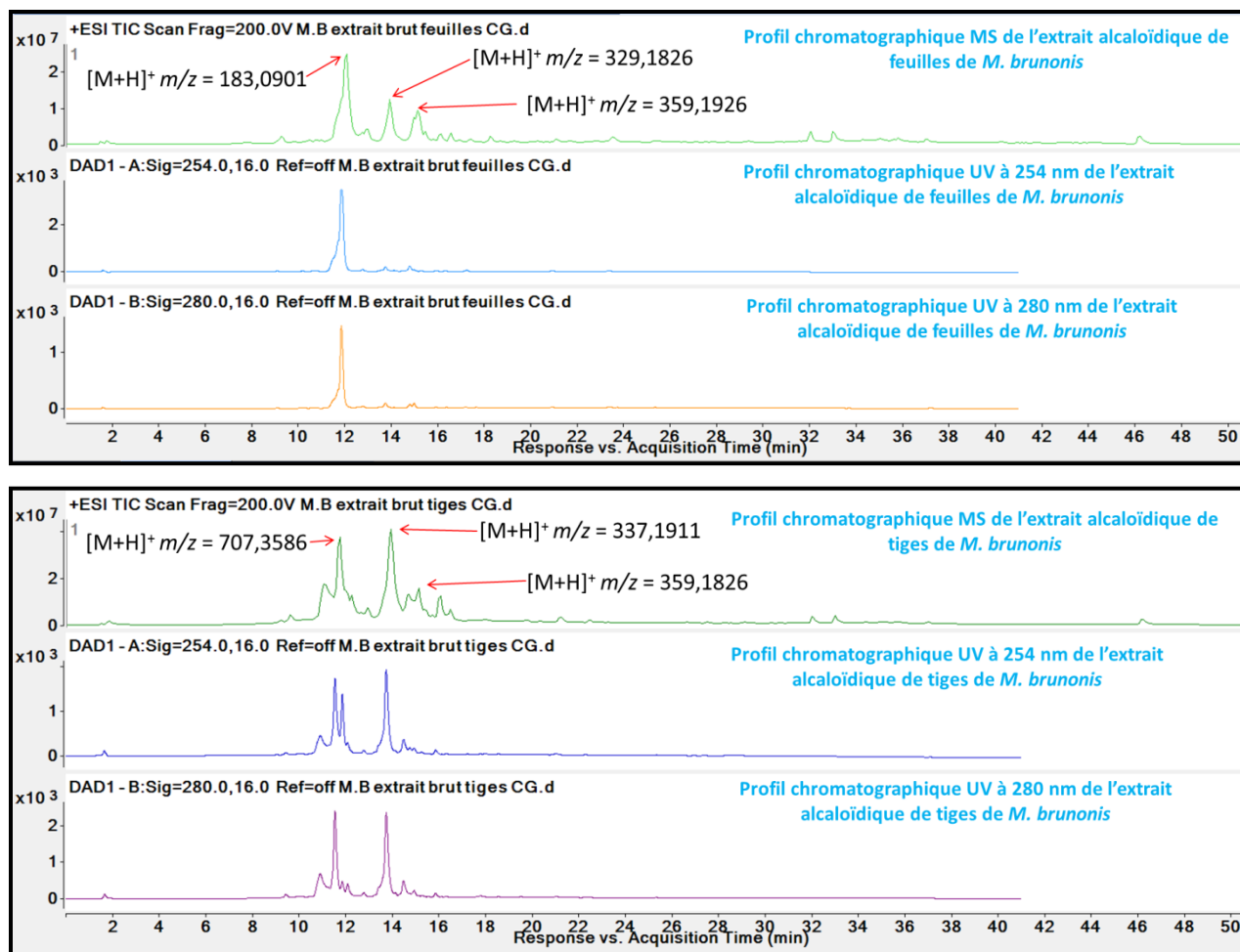


Figure 91. Profils chromatographiques des extraits alcaloïdiques de tiges et de feuilles de *M. brunonis*

3.3. Analyse du réseau moléculaire de *M. brunonis*

Les données obtenues de l'analyse par CLHP-SM² en mode positif des extraits alcaloïdiques de *M. brunonis* ainsi que celles des 76 alcaloïdes de la MIADB ont été traitées par la technique du réseau moléculaire. La carte moléculaire obtenue (Figure 92) était composée de deux zones principales (zones **A** et **B**) regroupant un nombre important de nœuds, et trois petites zones dont l'une nous a semblée intéressante (zone **C**). Les nœuds en vert clair du réseau correspondent aux composés issus de l'extrait alcaloïdique de feuille, ceux de couleur vert foncé correspondent à l'extrait alcaloïdique de tige, les nœuds rouges correspondent au spectre de références tandis que les nœuds vert-clair bleu et vert-foncé bleu correspondent aux spectres MS² des tiges et des feuilles qui se sont apparentés aux spectres des composés

de références de la MIADB. Grâce à l'ajout des références, deux spectres MS² ont « matché » tandis que d'autres spectres apparentés ont été observés comme étant des analogues probables sur la base de leur similarité spectrale. Par ailleurs, la comparaison suivant les règles proposées par Schymanski¹³⁸ nous a permis de conforter nos hypothèses de similarité entre les nœuds.

A l'issue de cette détection grâce aux jeux d'appariement des spectres, une comparaison de formules brutes des composés ciblés et ceux des bases de données usuelles a été effectuée.

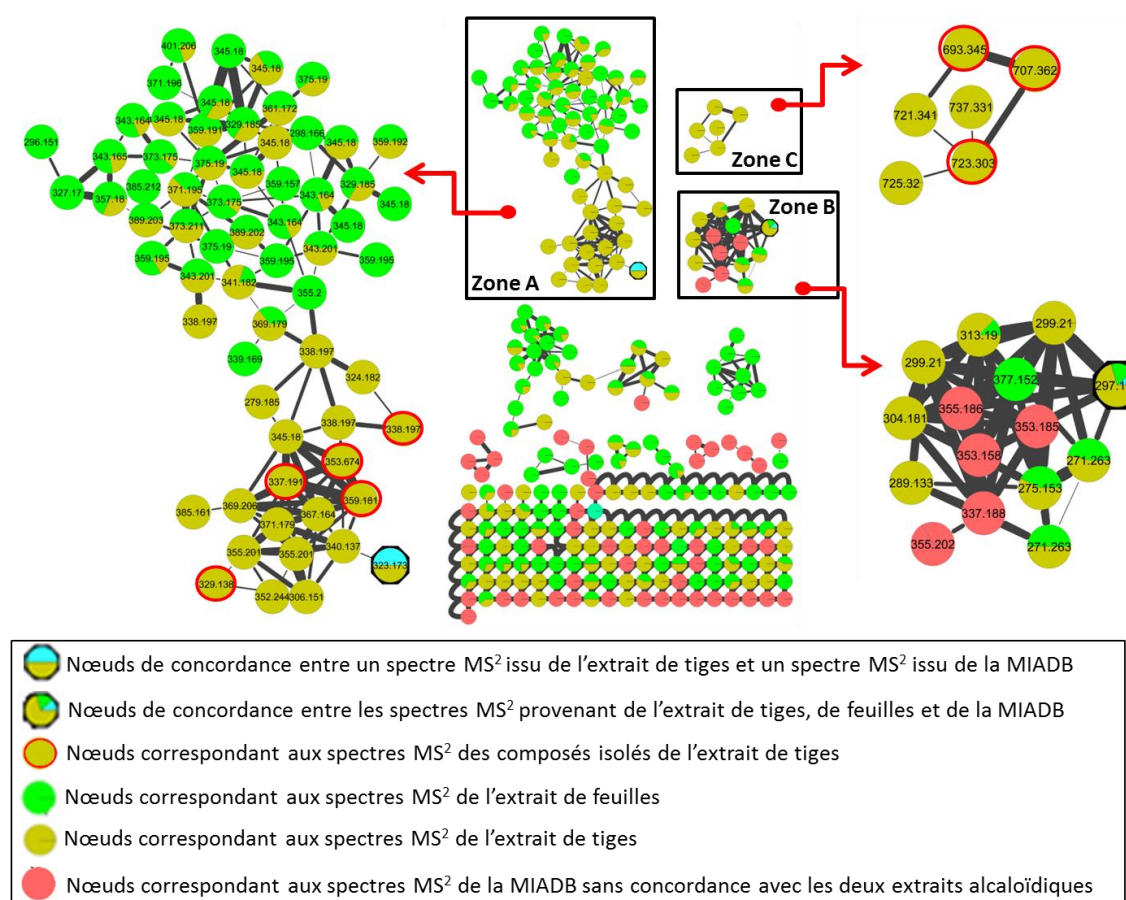


Figure 92. Réseau moléculaire global des extraits alcaloïdiques de tiges et de feuilles de *M. brunonis* annoté par la MIADB

3.3.1. Analyse de la zone A

Le réseau moléculaire de la zone **A** a montré deux parties distinctes : une partie haute regroupant majoritairement des nœuds appartenant à l'extrait alcaloïdique de feuilles, tandis que la partie basse regroupe principalement des nœuds issus de l'extrait alcaloïdique de tiges (Figure 94). De plus, dans cette partie, on note la présence d'un *match* correspondant à la gelsémine¹⁹⁹ ($[M+H]^+$ $m/z = 323,173$; $C_{20}H_{23}N_2O_2$), qui est un alcaloïde indolomonoterpénique de type oxindolique, présent généralement dans le genre *Gelsemium*,^{200,170} plantes appartenant à la famille des Gelsemiaceae¹⁴⁶ largement étudiées en Chine,¹⁹⁶²⁰¹ qui n'avait jamais été décrit dans *M. brunonis*. En se basant sur les règles proposées par Schymanski, une identification de niveau 1 a pu être assignée (Tableau 15). De plus, ce *match*, nous a permis de cibler et d'isoler deux autres molécules oxindoliques connues : la gelsédine (**2**)²⁰² que nous décrivons ici pour la première fois dans le genre *Mostuea* et la gelsémicine (**4**)²⁰² ($[M+H]^+$ $m/z = 359,1926$; $C_{20}H_{27}N_2O_4$), déjà décrite dans l'espèce.

Dans cette même zone, deux autres composés ont pu être ciblés et isolés, il s'agit du composé (**1**) et de la vobasine (**3**).²⁰³ Le composé **1** a été ciblé et isolé parce que sa formule brute $[C_{21}H_{25}N_2O_2]^+$ correspondait à trois indolomonoterpènes de squelettes akuammiline, pléiocarpamine et strychnane, respectivement de la *N*(4)-méthylstrictamine isolée des feuilles de *Rhazya stricta*,²⁰⁴ la *N*(4)-méthylakuammicine isolée d'*Alstonia macrophylla*²⁰⁵ et la *N*(4)-méthyl-pléiocarpamine isolée de *Kopsia singaporensis*¹⁶² (Figure 93). Notons que ces derniers sont différents des squelettes vobasine et oxindoles, observés dans l'ilot ci-dessous (Figure 94).

¹⁹⁹ F. Lovell, et al., *Tetrahedron Lett.* **1959**, *1*, 1-5.

²⁰⁰ Y. Schun, et al., *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 483-487.

²⁰¹ M. Kitajima, et al., *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 142-142.

²⁰² M. Kitajima, et al., *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 715-718.

²⁰³ U. Renner, *Cell. Mol. Life Sci.* **1959**, *15*, 185-186.

²⁰⁴ A.-u. Rahman, et al., *Z. Naturforsch. B Chem. Sci.* **1987**, *42*, 91-93.

²⁰⁵ T.-S. Kam, et al., *Phytochemistry* **1999**, *51*, 839-844.

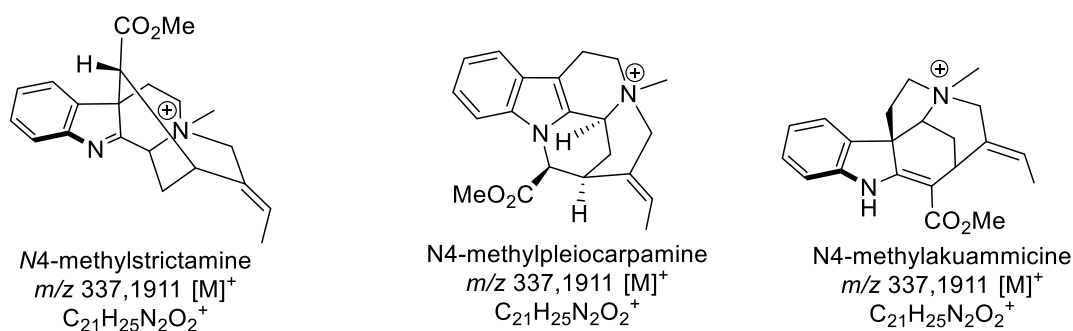


Figure 93 Molécules assimilées à la formule brute du composé 1

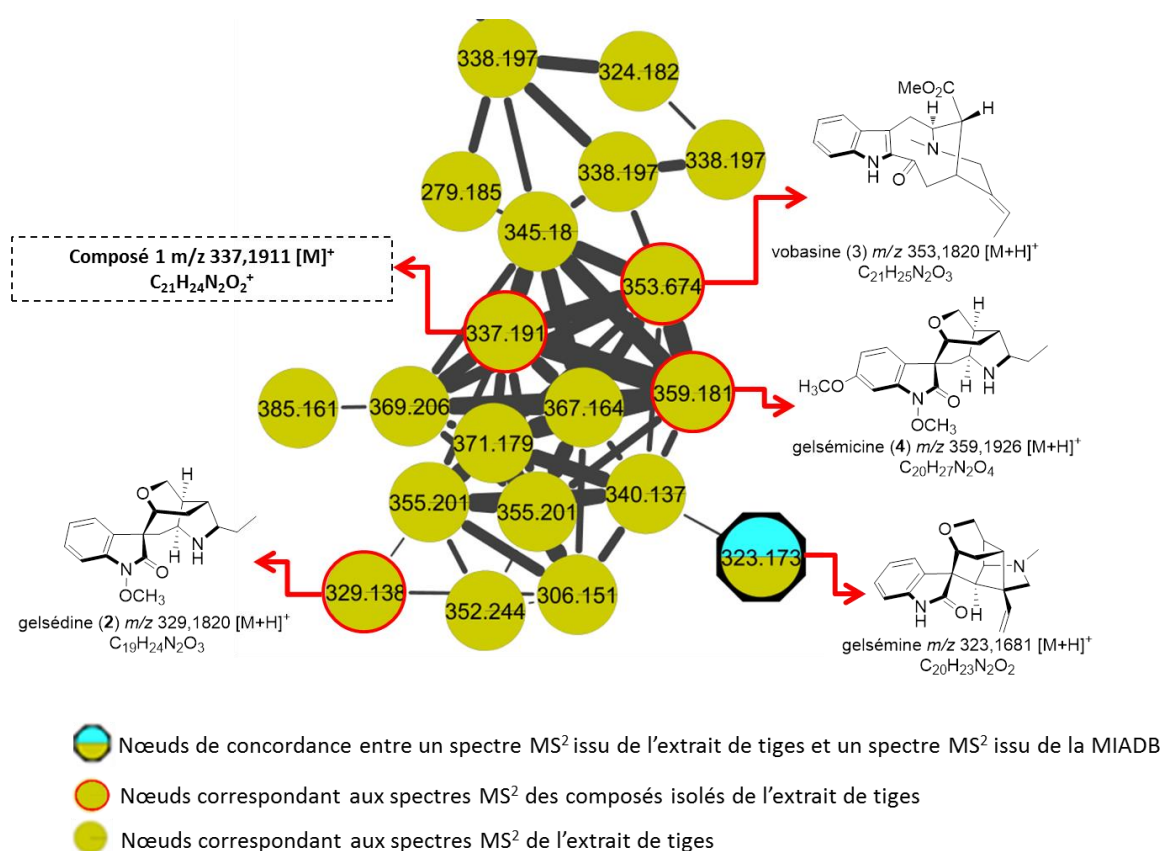


Figure 94. Annotation et agrandissement de la zone A

3.3.2. Analyse de la zone B

L'analyse du réseau de la zone B (Figure 95) a montré un nœud à $m/z = 297,196$ correspondant au spectre MS² de l'antirhine, une molécule de référence issue de la MIADB. Elle s'est appariée aux deux extraits alcaloïdiques. Sa présence éventuelle dans les deux

extraits a été confirmée par l'observation de temps de rétention similaires (Tableau 15) et l'analyse des données MS² de ces couples ions¹³⁸ (Figure 95). Dans cette zone, plusieurs nœuds appartenant à la MIADB et liés à des nœuds provenant des deux extraits alcaloïdiques ont été observés, ce qui suggère l'existence d'analogues structuraux de type ajmalicine, yohimbane, ibogane et ajmaline rappelant les structures de la sempervirine et de la strictosamide décrites dans la partie bibliographique de ce chapitre (Figure 95).

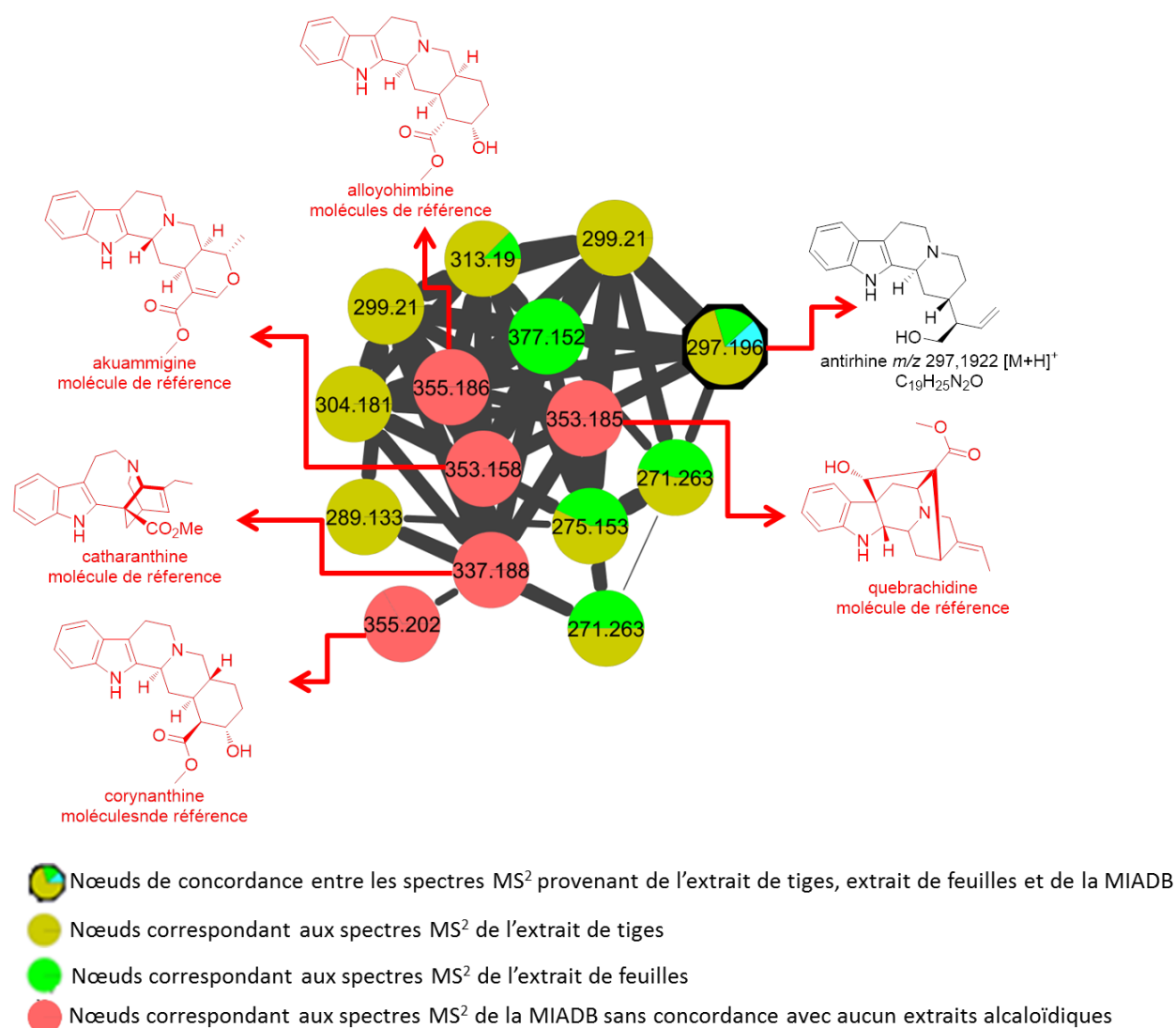


Figure 95. Agrandissement de la zone B

3.3.3. Analyse de la zone C

L'observation du réseau de la zone C (Figure 96) indique qu'elle est constituée de nœuds provenant exclusivement de l'extrait alcaloïdique des tiges. Il s'agit de la seule zone du réseau qui présente des nœuds ayant des valeurs de m/z comprises entre 600 et 750 Da, sans concordances avec la MIADB (Figure 96). Cela suggère la présence de nouveaux composés *bis*-indoliques jamais décrits dans le genre *Mostuea*. Leur isolement et leur caractérisation nous ont permis de le confirmer.

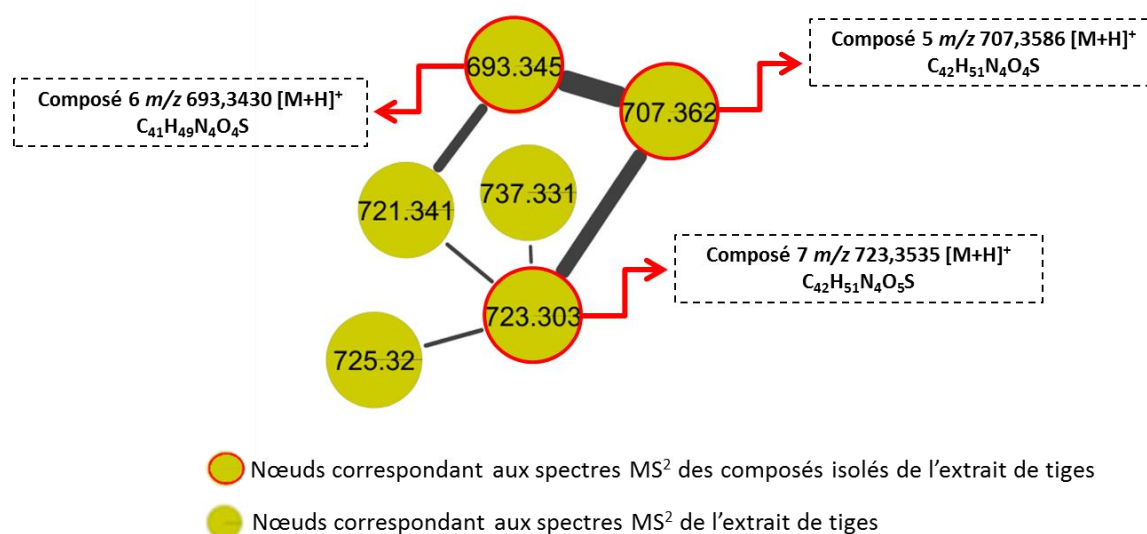


Figure 96. Agrandissement de la zone C

Pour confirmer la similitude entre les couples de spectres appariés qui ont été détectés dans le réseau, nous avons comparé les temps de rétention, les valeurs m/z et les données MS² de ces couple d'ions. Cela a conforté les niveaux de confiances attribués, selon Schymanski. (Tableau 15). Une comparaison des spectres MS² a été réalisée (voir plus loin).

Tableau 15. Nœuds appariés entre les extraits alcaloïdiques et la MIADB

Couples de spectres MS ² d'ion formé	Origines	m/z [M+H] ⁺	Temps de rétentions en min (Tr)	Niveau attribué
gelsémine	Extrait de tiges	323,1665	12,283	Niveau 1
gelsémine	Référence (MIAB)	323,1681	11,525	
antirhine	Extraits de tiges et de feuilles	297,1951	16,2536	Niveau 1
antirhine	Référence (MIAB)	297,1922	17,2941	

3.4. Détection des composés isolés dans l'extrait de tige

Pour approfondir l'étude de dérégulation de l'extrait alcaloïdique des tiges, une liste de composés a été générée à partir des données CLHP-MS², avec leurs formules brutes, leurs temps de rétention pour comparaison avec des bases de données, afin de vérifier s'ils sont potentiellement connus ou pas (Tableau 16). Les composés surlignés en jaune dans le tableau correspondent à ceux qui ont pu être isolés et caractérisés dans ce travail. Comme l'extrait alcaloïdique des feuilles n'a pas été exploité pour l'isolement, la liste des composés qui le constituent n'est pas présentée.

Tableau 16. Tableau de déréplication de l'extrait alcaloïdique de tiges de *M. brunonis*

Tr (min)	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	FB	Score (%)	Erreur (ppm)	Intens.	DNP	Reaxys	Composés identifiés
7.4	343.1644	C19H22N2O4	82.46	2.01	27658	14 hits	12 hits	
9.4	355.201	C21H26N2O3	98.01	0.86	21179	116 hits	78 hits	
9.2	345.1807	C19H24N2O4	98.57	0.71	122877	3 hits	1 hit	
9.2	343.1651	C19H22N2O4	85.52	0.36	187274	14hits	12 hits	
9.6	338.1981	C19H23N4O2	96.66	-1.48	146593	20 hits	15 hits	
10.0	313.1898	C19H24N2O2	96.86	4.03	97296	42 hits	40 hits	
10.4	373.174	C21H20N3O3	79.5	8.25	68604	24 hits	0 hit	
10.5	313.1899	C19H24N2O2	91.19	3.44	63583	42 hits	40 hits	
10.6	375.1911	C20H26N2O5	98.96	1.33	128899	2 hits	3 hits	
10.7	313.1907	C19H24N2O2	93.44	1.04	113658	42 hits	40 hits	
11.0	354.1811	C20H23N3O3	88.04	-1.52	1183759	4 hits	5 hits	
11.0	707.3621	C38H50N4O9	93.79	4.4	457082	0 hit	0 hit	
11.1	371.1794	C18H22N2O5	84	9.84	122132	0 hit	0 hit	
11.3	354.1793	C20H23N3O3	86.45	1.43	1040929	4 hits	5 hits	
11.3	707.3602	C33H50N4O5	93.52	1.42	369004	0 hit	0 hit	
11.5	354.1836	C20H23N3O3	84.29	-9.3	870029	4 hits	5 hits	
11.5	183.0917	C12H10N2	98.08	-0.35	117570	3 hits	0	
11.6	707.3636	C39H46N4O4	93.69	4.04	1032657	0 hit	0 hit	
11.7	353.1819	C21H25N2O3	85.07	9.6	205832	3 hits	2 hits	vobasine (3)
11.8	337.1906	C21H25N2O2 ⁺	98.22	1.23	1173672	4 hits	2 hits	composé 1
11.8	340.1374	C18H19N4O3	82.84	10.31	187363	0 hit	0 hit	
11.9	707.3601	C36H46N4O8	91.81	3.33	427387	0 hit	0 hit	
11.9	337.1793	C18H20N4O	96.88	-6.55	229912	0 hit	0 hit	
12.0	183.086	C7H10N4O2	78.14	8.45	1010849	2 hits	0 hit	
12.2	323.1681	C20H23N2O2	87.75	12.71	1542337	2 hits	0 hit	gelsémine
12.2	354.1796	C17H23N4O3	89.62	-5.25	188444	0 hit	0 hit	
12.2	707.3597	C42H51N4O4S	89.21	0.59	52545	0 hit	0 hit	composé 7
12.2	693.3456	C41H49N4O4S	89.81	4.13	324863	0 hit	0 hit	composé 5
12.3	183.0822	C13H10O	53.02	-9.26	120662	22 hits	4 hits	
12.4	329.1826	C20H25N2O3	90.85	-9.81	196692	2 hits	1 hit	gelsédine (2)
12.4	693.3453	C43H44N4O7	91.02	2.6	69912	0 hit	0 hit	
12.6	299.2082	C14H26N4O3	89.52	-0.95	38760	0 hit	0 hit	
12.7	359.1914	C20H27N2O2	96.98	-0.7	263890	4 hits	0 hit	gelsémicine (4)
12.9	723.3562	C44H49N4O4	91.57	2.15	103603	0 hit	0 hit	
13.0	357.179	C16H20N3O2	97.01	-2.77	353900	0 hit	0 hit	
13.1	723.3564	C42H51N4O4S	90.79	-1.91	29785	0 hit	0 hit	composé 6
13.2	297.1947	C14H24N4O3	88.66	-9.09	66718	0 hit	0 hit	

3.5. Extraction des tiges et des feuilles de *M. brunonis*

Les tiges et les feuilles de *M. brunonis* ont été séparées avant l'extraction. Ensuite, séchées et broyées, ces drogues végétales (1500 g et 801 g, respectivement) ont été extraites par la méthode classique d'obtention des alcaloïdes employée précédemment, après l'alcalinisation par l'ammoniaque. 3,639 g d'extrait alcaloïdique de tige et 0,589 g d'extrait alcaloïdique de feuille ont été obtenus (respectivement $\rho = 0,247\%$ et $\rho = 0,073\%$). On notera que lors de la dernière étude phytochimique de *M. brunonis*,¹⁹³ les parties aériennes de la plante n'ont pas été analysées séparément.

L'extrait alcaloïdique des tiges a été entièrement fractionné par chromatographie flash, en utilisant une cartouche Grace® de gel de silice 80 g, en suivant un gradient de CH₂Cl₂-MeOH (100 : 0 à 0 : 100) de polarité croissante à 60 mL / min. Onze fractions (**F.A-F.K**) ont été obtenues et rassemblées selon leurs profils en CCM.

Les fractions **F.A** (28,5 mg) et **F.B** (47,3 mg) ont été mélangées en une fraction **F.1** (75,8 mg) et soumises à une CLHP-préparative phase inverse C₁₈ Sunfire® en suivant le système de solvant MeOH/ H₂O + 0,1 % acide formique 25 : 55 à 17 mL/min pendant 20 minutes. Deux composés ont été isolés : un nouveau que nous avons nommé la 16-*epi*-17-méthylesterpanarine (**1**) (4,1 mg, $\rho = 0,0002\%$) et un connu, la vobasine (**3**)²⁰⁶ (13,3 mg, $\rho = 0,0008\%$).

Trois autres fractions, **F.D**, **F.E** et **F.F**, ont été regroupées pour donner la fraction **F.2** (135,1 mg). Dans ces fractions, on notera la présence des nœuds ayant des valeurs de *m/z* comprises entre 600 et 750 Da. La fraction **F.2** a été soumise à une seconde chromatographie flash sur une colonne Grace® de 24 g de silice avec un gradient de CH₂Cl₂-MeOH (100 : 0 à 0 : 100) à 24 mL/min. Six fractions (**F.2.1** à **F.2.6**) ont été obtenues et rassemblées en fonction de leurs profils en CCM. La fraction **F.2.2** (35,6 mg) a été purifiée par CLHP-préparative en utilisant une phase inverse C₁₈ Sunfire® en suivant le système de solvant MeOH/(H₂O + 0,1 % acide formique) 35 : 65 à 17 mL/min pendant 25 minutes conduisant à l'isolement de la gelsédine (**2**) (5,7 mg $\rho = 0,0003\%$).²⁰² La fraction **F.2.5** (65,3 mg) a été fractionnée par CLHP-préparative en utilisant une C₁₈ Sunfire® en suivant le système de solvant MeOH/(H₂O + 0,1% acide formique) 35 : 65 à 17 mL/min pendant 25 minutes, conduisant à l'obtention de 3 fractions **F.2.5.A** à **F.2.5.C**. La sous-fraction **F.2.5.B**

²⁰⁶ A. E. Nugroho, et al., *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1502-1506.

(45,4 mg) a été à son tour purifiée par CLHP préparative dans les mêmes conditions pour donner les composés **5** (3,5 mg, $\rho = 0,0002\%$) et **6** (2,4 mg, $\rho = 0,0001\%$). Les fractions **F.I** et **F.J** ont été rassemblées en une fraction **F.3** (85,9 mg) et purifiée par une CLHP-préparative en utilisant les conditions de purification de la fraction **F.2** conduisant à l'isolement du composé **7** (7,5 mg, $\rho = 0,0005\%$), et de la gelsémicine (**4**) (8,2 mg, $\rho = 0,0005\%$). Le schéma d'extraction, de fractionnement et d'isolement est présenté dans la Figure 97.

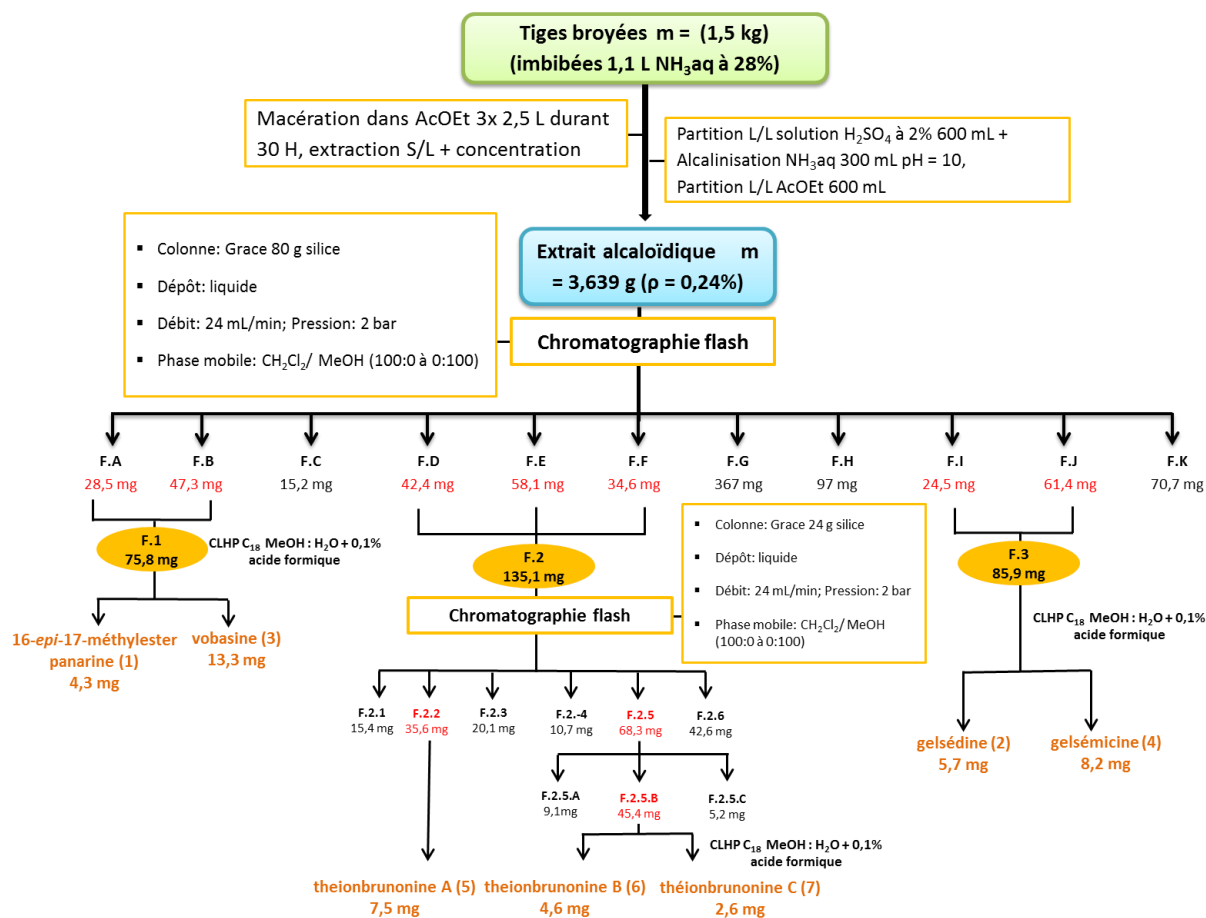
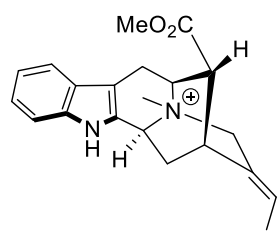
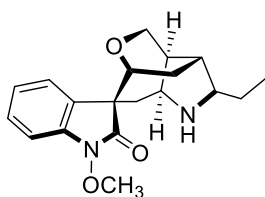


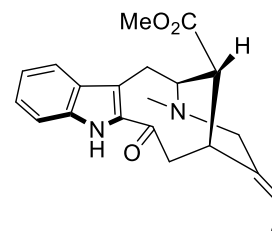
Figure 97. Schéma d'extraction et de purification des composés isolés de l'extrait alcaloïdique de tiges de *M. brunonis*



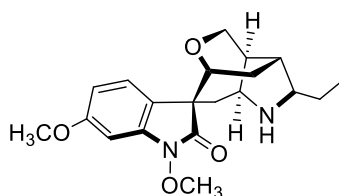
16-*epi*-17-méthylester panarine (1)
 m/z 337,1911 [M]⁺
 $C_{21}H_{25}N_2O_2^+$



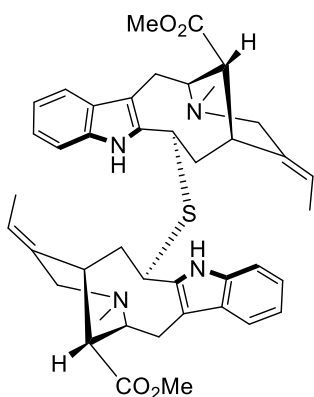
gelsédine (2) m/z 329,1820 [M+H]⁺
 $C_{19}H_{24}N_2O_3$



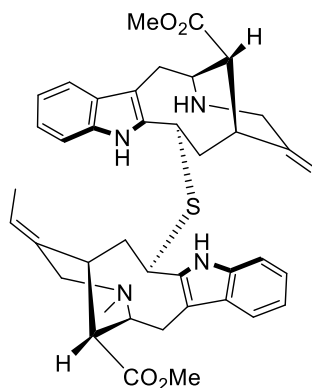
vobasine (3) m/z 353,1820 [M+H]⁺
 $C_{21}H_{25}N_2O_3$



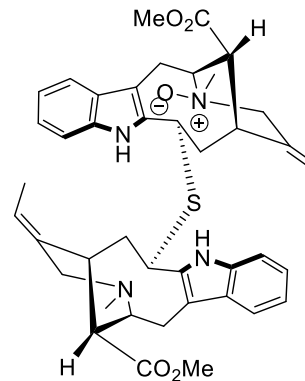
gelsémicine (4) m/z 359,1926 [M+H]⁺
 $C_{20}H_{27}N_2O_4$



theionbrunonine A (5)
 m/z 707,3586 [M+H]⁺
 $C_{42}H_{51}N_4O_4S$



theionbrunonine B (6)
 m/z 693,3430 [M+H]⁺
 $C_{41}H_{49}N_4O_4S$



theionbrunonine C (7)
 m/z 723,3535 [M+H]⁺
 $C_{42}H_{51}N_4O_5S$

Figure 98. Composés isolés de l'extrait alcaloïdique de tiges de *M. brunonis*

3.6. Caractérisation structurale des composés isolés

Sept molécules dont quatre nouvelles et trois connues ont été isolées des tiges de *M. brunonis* et caractérisées par l'analyse des données spectrales (UV, $[\alpha]_D$, DCE, HRESI-QTOF-SM+) et par l'interprétation des spectres RMN 1D et 2D.

3.6.1. 16-*epi*-17-méthylester-panarine (1)

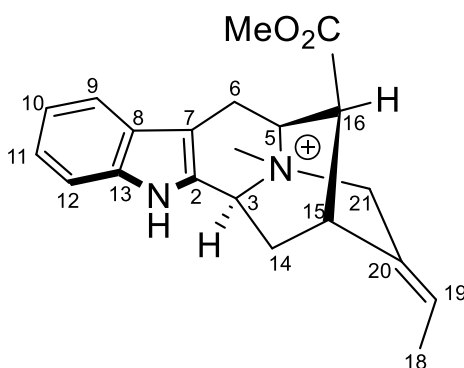


Figure 99. 16-*epi*-17-méthylester-panarine (1)

Le composé **1** a été obtenu sous la forme d'un solide amorphe marron. Son spectre de masse HRESI-QTOF-SM+ a montré un ion moléculaire à m/z $[M]^+$ 337,1879, correspondant à la formule brute $C_{21}H_{25}N_2O_2^+$ [calculée pour $C_{21}H_{25}N_2O_2^+$: 337,1911, erreur = -1,21 ppm], indiquant que ce dernier possède 11 degrés d'insaturations. Le spectre UV est caractéristique du système indolique, avec les trois bandes à 202,2, 268,8 et 293,6 nm. C'est un composé optiquement actif avec une valeur de $[\alpha]_D^{22,7} = +457$ (c 0,035, MeOH).

L'analyse des spectres RMN 1D (1H , ^{13}C) a confirmé la présence de 21 atomes de carbone comme dans la formule brute générée. L'interprétation du spectre 1H a montré quatre signaux aromatiques, deux doublets et deux triplets, respectivement à $\delta_H = 7,50$ (d, $J = 7,7$ Hz, H-9) ; $\delta_H = 7,32$ (d, $J = 8,0$ Hz, H-12) ; $\delta_H = 7,18$ (t, $J = 7,6$ Hz, H-10) ; $\delta_H = 7,12$ (t, $J = 7,4$ Hz, H-11). On remarque deux singulets correspondant aux groupements N-méthyl à $\delta_H = 2,51$ et au méthyle-ester à $\delta_H = 2,55$. Cette valeur de déplacement chimique, curieusement blindée pour un groupement méthoxy, est caractéristique de la localisation de ce dernier dans le cône d'anisotropie du noyau indole. On peut aussi noter la présence d'un quadruplet à $\delta_H = 5,58$ ($J = 7$ Hz, H-19) intégrant pour un seul proton et correspondant à un proton oléfinique,

suggérant la présence du groupement éthylidène (Figure 100).

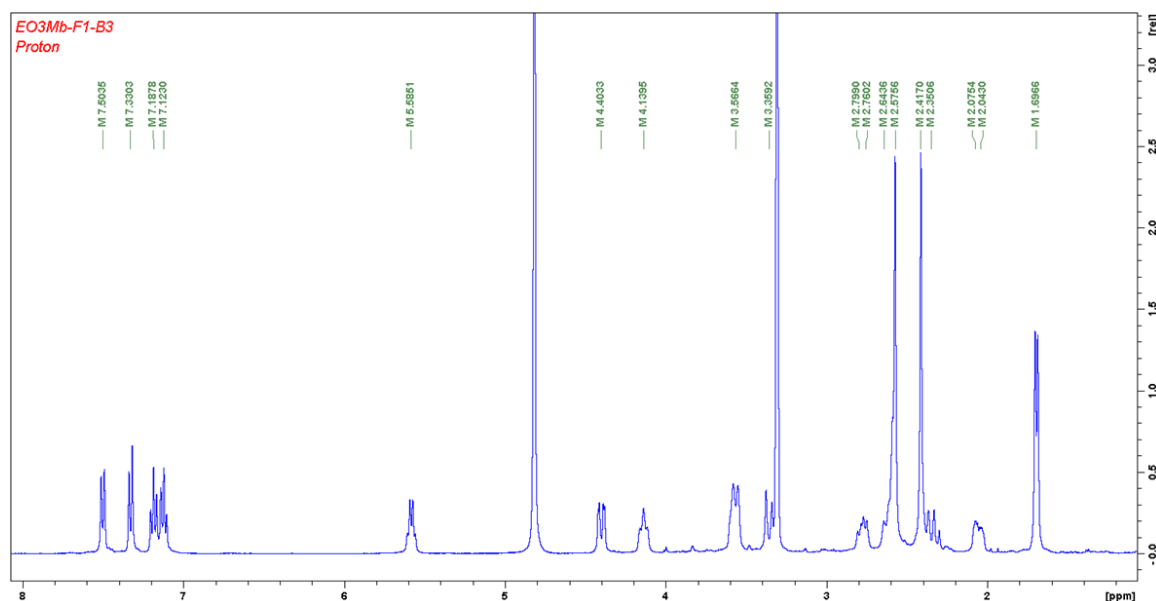


Figure 100. Spectre proton de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (**1**), MeOH d4, 400 MHz

L'étude des données RMN 1D et 2D indique que le composé **1** est très proche structuralement de la panarine,²⁰⁷ à une exception près, le spectre du composé **1** présente un signal supplémentaire correspondant à un groupement méthoxy à $\delta_H = 2.55$ ppm. L'analyse des données RMN 2D COSY et HMBC, viennent confirmer cela. En effet, les corrélations HMBC de H-16 à C-17 et du méthoxy au C-17 ont permis de positionner le groupement ester en C-16 (Figure 101).

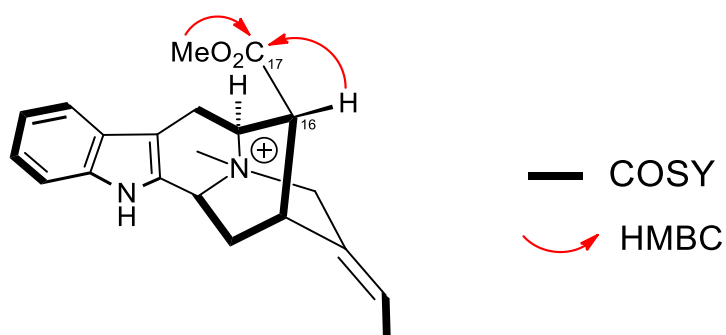


Figure 101 Corrélations HMBC et COSY de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (**1**)

²⁰⁷ H. Achenbach, et al., *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 473-476.

- Configuration relative de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (**1**)

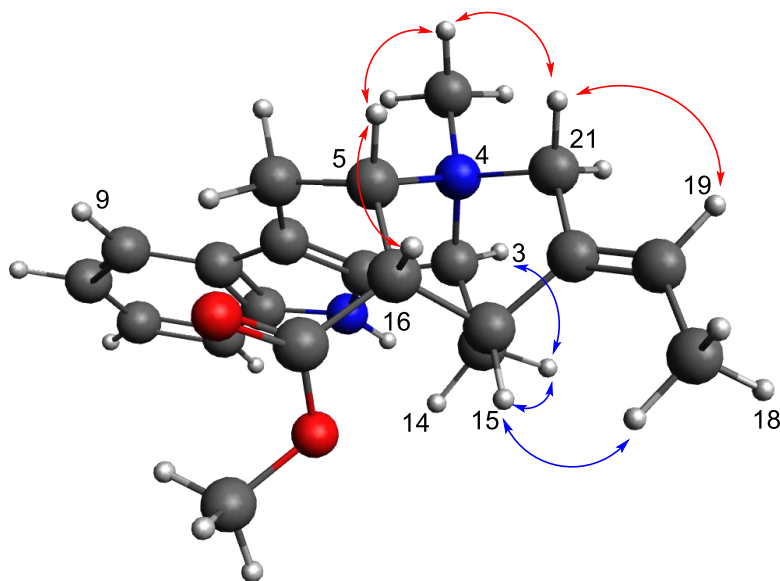


Figure 102. Corrélations NOESY du composé **1** de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (**1**)

La configuration relative du composé **1** a été déduite des corrélations observées sur le spectre NOESY. Les corrélations observées entre *N*(4)Me/H21a, H-5, et H-5/H-16, et H-21a/H-19 indiquent que ces protons sont cofaciaux. Par ailleurs, les corrélations observées entre H-14/H-3, H15 et entre H₃-18 et H-15 suggèrent que ces protons sont orientés dans la face opposée. A noter que les corrélations H-19/H-21 et H₃-18/H-15 permettent d'attribuer la configuration *E* au groupement éthylidène.

La configuration relative de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (**1**) a été déterminée comme étant 3*S**, 4*R**, 5*S**, 15*R**, 16*S**.

La détermination de la configuration absolue à l'aide du dichroïsme circulaire électronique est en cours.

3.6.2. Theionbrunonine A (5)

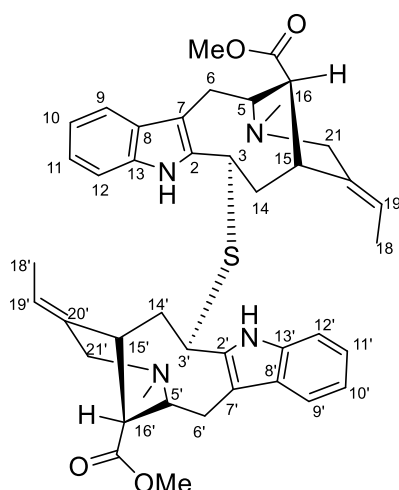


Figure 103. Structure de la theionbrunonine A (5)

Le composé **5** a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse HRESI-QTOF-SM+ a montré un ion pseudomoléculaire à m/z 707,3623, correspondant à la formule brute $C_{42}H_{51}N_4O_4S$ $[M+H]^+$ [calculée pour $C_{42}H_{51}N_4O_4S$: 707,3626, erreur = -1,21 ppm]. Le spectre UV est caractéristique du système indolique, avec trois bandes à 202,2 ; 268,8 et 293,6 nm. C'est un composé optiquement actif avec une valeur de $[\alpha]_D^{22,7} = +363$ (c 0,13, MeOH).

L'étude de déréplication à partir de la formule brute de **5** présentée dans le Tableau 16 a révélé qu'elle ne correspondait à aucun composé connu.

Cependant, nous avons quand même cherché à répertorier toutes les bis-indoles de type vobasine-vobasine décrits dans la littérature afin de les comparer au composé **5**. Nous avons trouvé qu'il n'existait aujourd'hui que 3 dimères indolomonoterpéniques de ce type. Il s'agit de la bisnicalaterine A (isolée de l'écorce de *Hunteria zeylanica* (Retz.) Gardner ex Thwaites)²⁰⁶, la vobasonidine (isolée de l'écorce de *Tabernaemontana corymbosa* Roxb. ex Wall.)²⁰⁸ et l'hazuntamine (isolée de l'écorce de *Hazunta modesta* (Baker) Pichon, synonyme de *Tabernaemontana coffeoides* Bojer ex A.DC.)²⁰⁹ (Figure 104).

²⁰⁸ T. S. Kam, et al., *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 1027-1032.

²⁰⁹ A.-M. Bui, et al., *Heterocycles* **1994**, 38, 1025-1032.

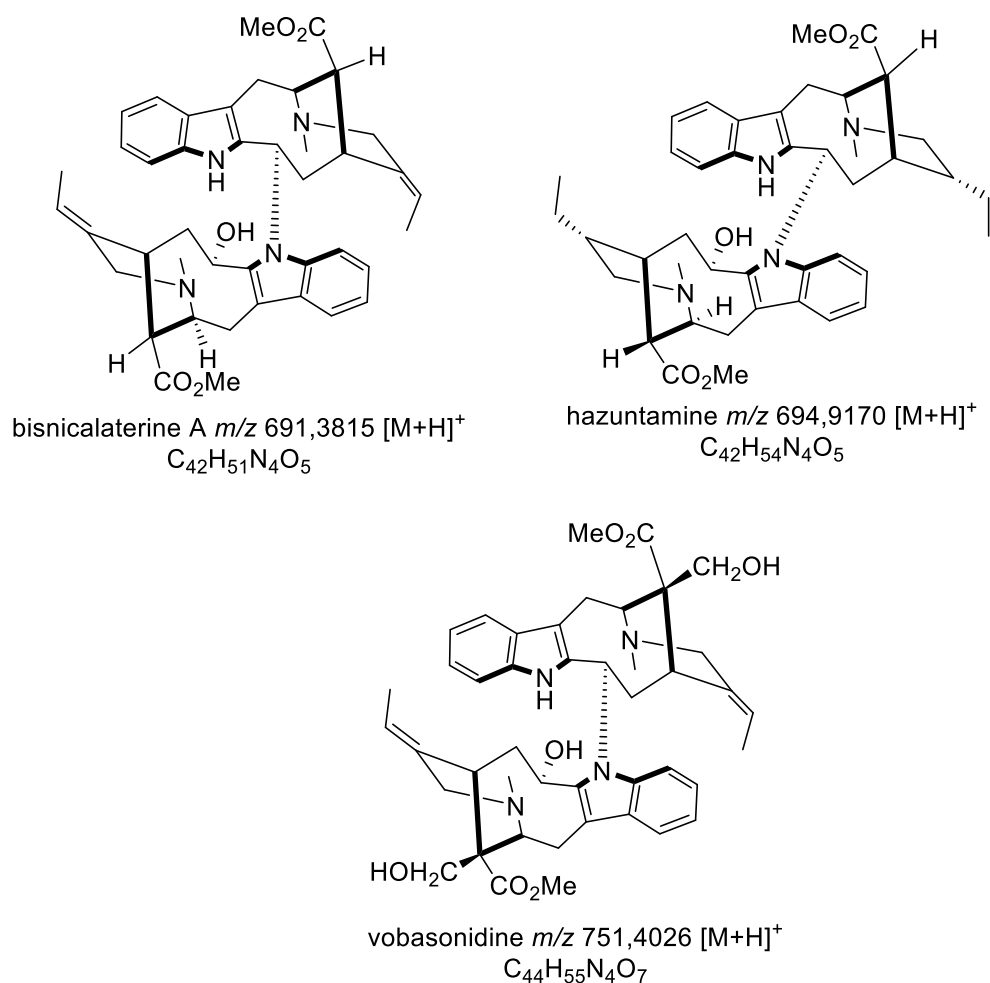


Figure 104. Bisindoles de type vobasine-vobasine

3.6.2.1. Détermination structurale de la theionbrunonine A (5)

L'analyse HRESIMS a indiqué que le composé **3** possédait 42 carbones, mais le spectre RMN ^{13}C ne présentait seulement que 21 signaux. Ces carbones ont été attribués à l'aide des corrélations HSQC comme : 3 méthyles, 3 méthylènes, 9 méthines et 6 carbones quaternaires comprenant un carbonyle. De plus, le spectre RMN 1H présentait environ la moitié des signaux de protons attendus (Figure 105). Une analyse approfondie de ces données laisse suggérer que la theionbrunonine A (**5**) pourrait être un homodimère.

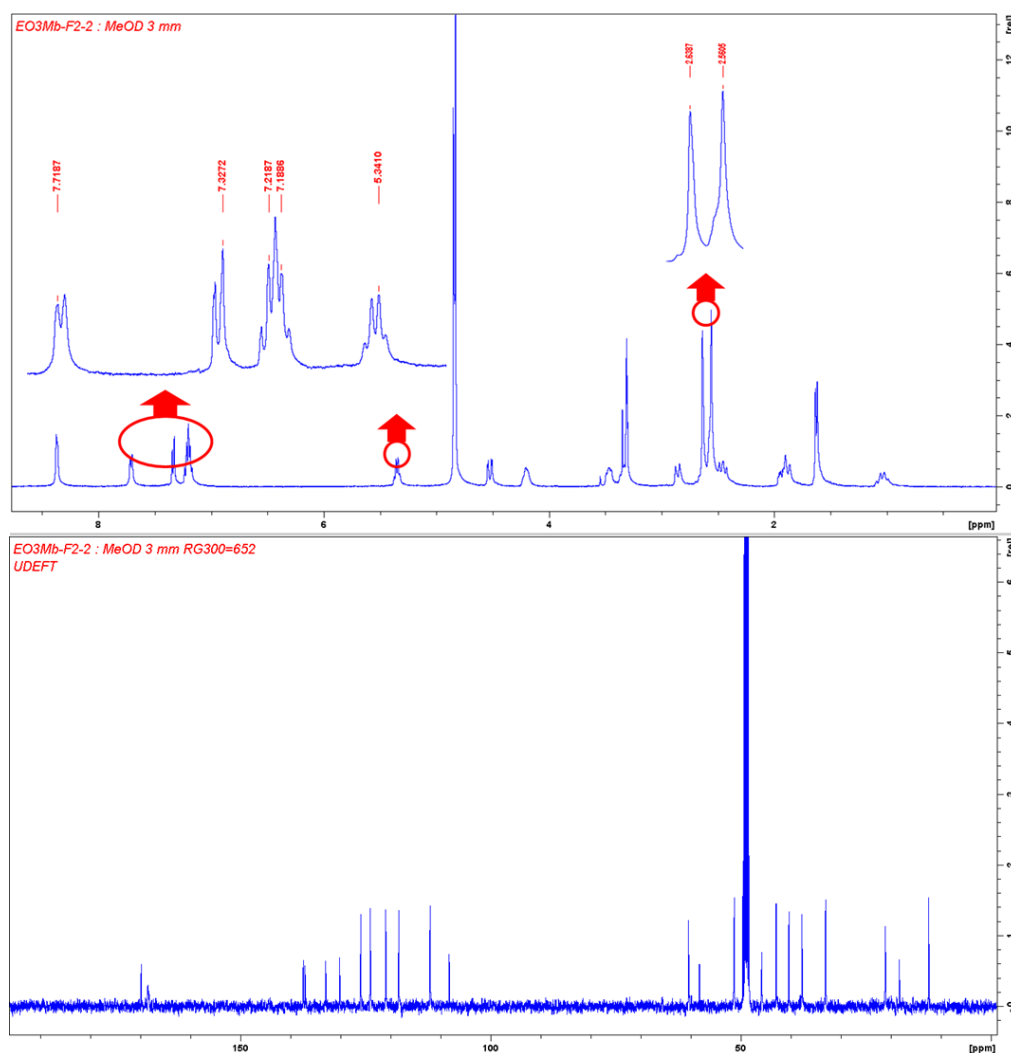


Figure 105. Spectres RMN ^1H (400, MeOH d_4) et ^{13}C (100, MeOH d_4) de la theionbrunonine A (5)

L'étude approfondie des données RMN ^1H et ^{13}C ont montré des similarités avec celles de l'unité vobasinyl retrouvée dans la bisnicalaterine A (Figure 104).²⁰⁶ Toutefois, nous pouvons noter que le proton H-3 du composé **5** présente un déplacement chimique (δ_{H} 4,40) fortement blindé par rapport au proton H-3 de la bisnicalaterine A (δ_{H} 6,51). En effet dans cette dernière, le carbone H-3 est directement lié à un atome d'azote qui assure le pontage entre les deux unités indoliques. Les deux unités vobasinyles constituant le composé **5** comptent pour une masse de 674 g/mol, indiquant 32 unités de masses en moins. Par ailleurs, l'analyse du spectre MS^2 (Figure 106) du composé **5**, enregistré en ESI (+) avec une énergie de collision à 30 eV, indique la présence d'un fragment $[\text{M}]^+$ à m/z 371,1672 possédant la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$, ainsi que la présence d'un fragment intense $[\text{M}]^+$ à

m/z 337,1811 [$C_{21}H_{25}N_2O_2^+$] montrant la perte caractéristique d'un soufre²¹⁰ et rappelant l'unité vobasinyl constitutive du composé **5**. Ces observations indiquent clairement qu'un atome de soufre lie les deux unités vobasinyles.

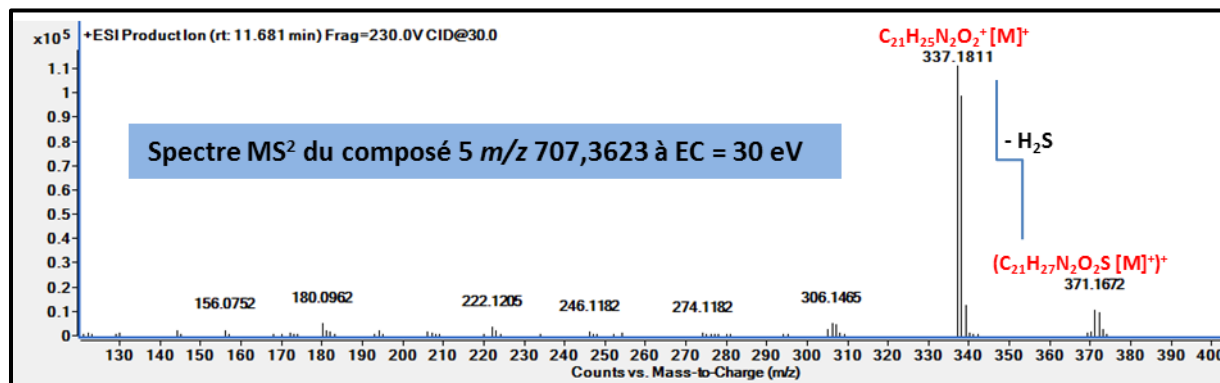


Figure 106. Spectre MS² de la theionbrunonine A (**5**) à 30 eV

Le pontage des deux unités vobasinyles de type C-3-S-C-3' a pu être confirmé grâce aux corrélations HMBC observées entre H-3/H-3' et C-3/C-3' (Figure 107). De ce fait la theionbrunonine A (**5**) correspond à un alcaloïde *bis*-indolique possédant une structure inédite dans laquelle les deux unités indoliques sont liées *via* un atome de soufre.

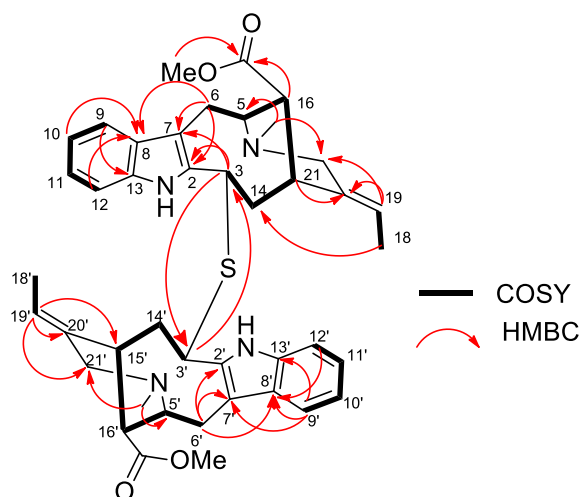


Figure 107. Corrélation RMN 2D de la theionbrunonine A (**5**)

²¹⁰ La perte du groupement H₂S est comparable à celles observées dans une étude des huîtres creuses (*Crassostrea virginica*) voir : Z. Wang, *et al.*, *Toxicon* **2004**, *43*, 455-465.

3.6.2.2. Configuration relative de la theionbrunonine A (5)

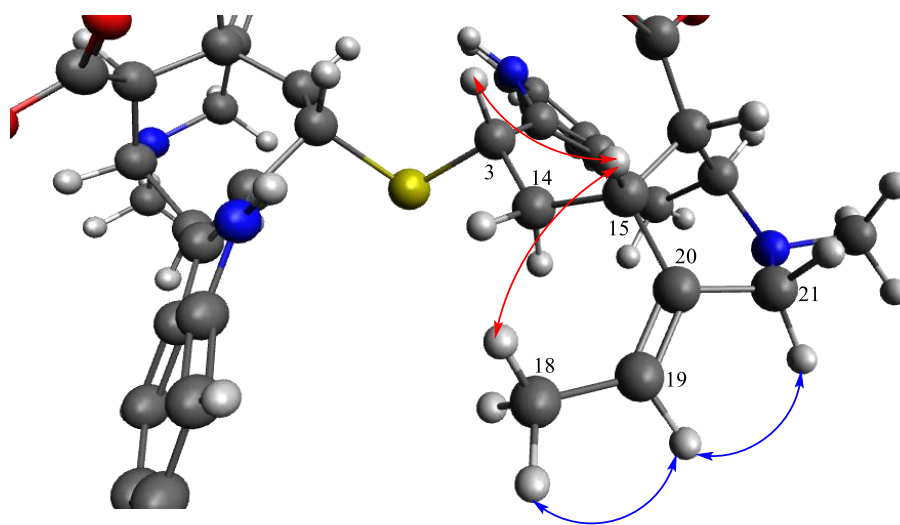


Figure 108. Corrélations NOESY de la theionbrunonine A

La configuration relative de **5** a été déterminée en utilisant les données RMN NOESY. Les corrélations NOESY observées entre les protons H-15/H-15' et H3/H-3', H-18/H-18' indiquent que ces derniers sont cofaciaux. Par ailleurs les corrélations observées entre H-19/H-19' et H-21/H-21' ont permis d'attribuer la configuration *E* aux groupements éthylidènes, comme le montre la Figure 108.

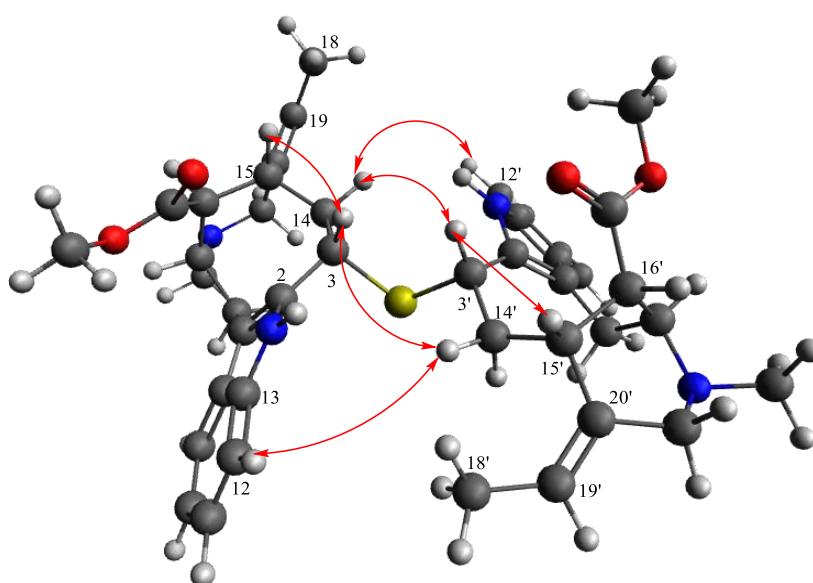


Figure 109. Corrélations NOESY de la theionbrunonine A (5)

Les déplacements chimiques des groupements méthoxy à δ_H 2,55, caractéristique de la localisation de ces derniers dans le cône d'anisotropie du noyau indole, attribuent la configuration relative S^* pour les carbones C-16 et C-16'. L'orientation β a pu être attribuée aux protons H-3 et H-3' suite à l'interprétation de la constante de couplage à $J = 13,7 ; 3,0$ Hz. Les corrélations NOESY observées entre les protons H-3/H-3' et H-15/H-15', H-14/H-14' ainsi qu'entre H-12/12' et H-14'/ H-14 nous ont permis de déterminer la conformation de la theionbrunonine A indiquée dans la Figure 109.

La configuration relative de la theionbrunonine A (**5**) a été déterminée comme étant : $3R^*$, $3'R^*$, $5S^*$, $5'S^*$, $15R^*$, $15'R^*$, $16S^*$, $16'S^*$.

3.6.3. Theionbrunonine B (**6**)

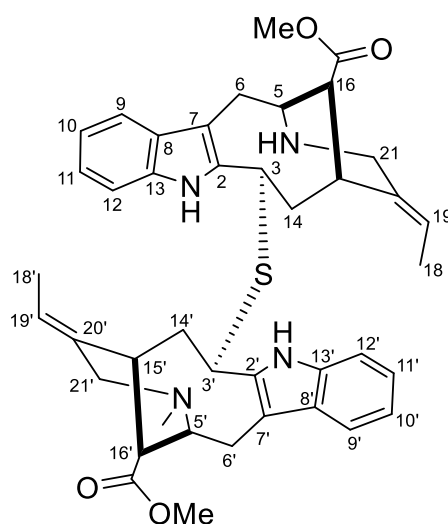


Figure 110. Structure de la theionbrunonine B (6**)**

Comme le composé **5**, le composé **6** a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse HRESI-QTOF-SM⁺ a montré un ion pseudomoléculaire à m/z 693,3586, correspondant à la formule brute $C_{41}H_{49}N_4O_4S$ [$M+H$]⁺ [calculée pour $C_{41}H_{49}N_4O_4S$: 693,3469, erreur = -2,6 ppm], indiquant 14 unités de masses en moins que le composé **5**. Le spectre UV est similaire à celui de la theionbrunonine A. Il présente une valeur de $[\alpha]_D^{22,7} = +400$ (c 0,06, MeOH), proche de celle du composé **5** décrit précédemment.

La structure de la theionbrunonine B (**6**) (Figure 110) a été déterminée grâce à l'analyse des

données RMN ^1H et ^{13}C ainsi que du spectre MS^2 (Figure 111). Elle s'est avérée très proche de celle du composé **5** (Figure 103), mais à une exception près, l'absence d'un groupement méthyle dans l'une des deux unités vobasinyl. Notons également que ces deux composés appartenaient à la même zone (zone C) sur le réseau moléculaire obtenu de l'extrait alcaloïdique des tiges (Figure 96).

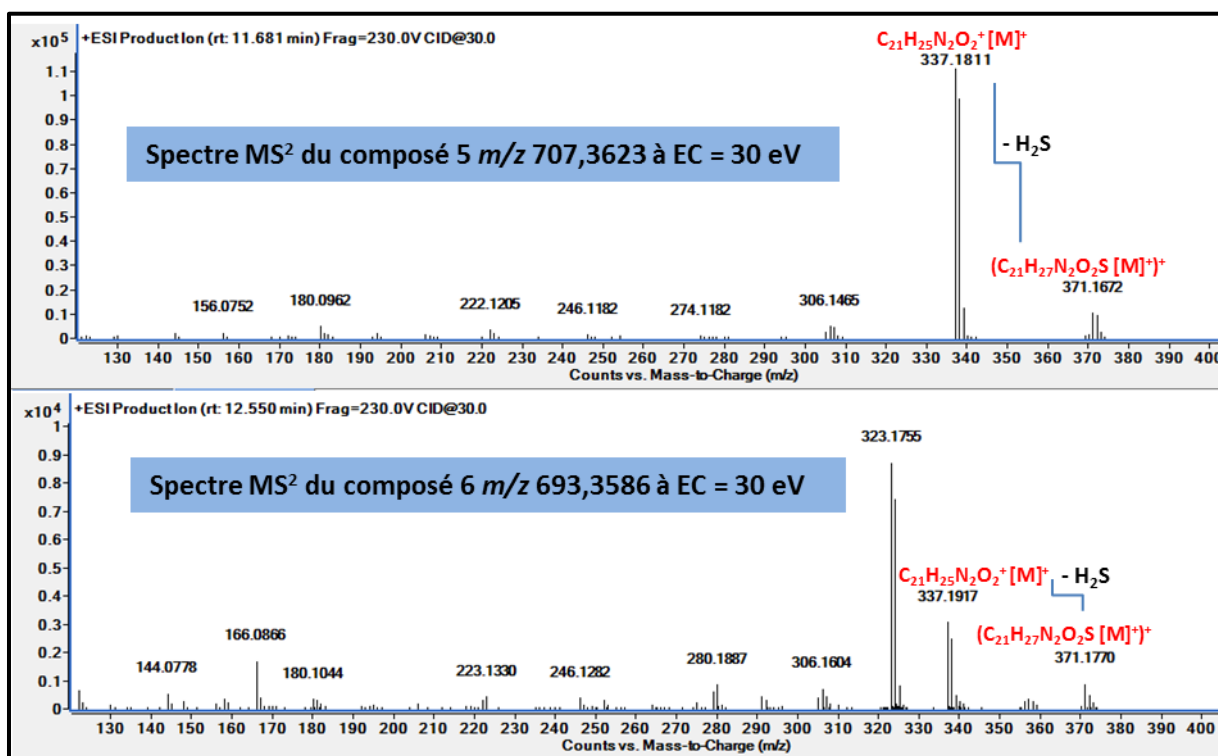


Figure 111. Comparaison des spectres MS^2 des composés **6** et **5**

L'analyse des spectres RMN ^{13}C et HSQC du composé **6**, a permis de déterminer 41 signaux carbonés correspondant à : 5 méthyles, 6 méthylènes, 18 méthines et 12 carbones quaternaires, qui sont similaires à ceux observés chez la theionbrunonine A. Toutefois on peut noter une variation de déplacements chimiques au niveau des carbones C-5 et C-21 ($\delta\text{C-5} = 53,0$ et $\delta\text{C-21} = 41,6$ ppm) liés directement à l'azote N-4. Cette variation est attribuée à la perte du groupement méthyle en N-4 du composé **6**. Par comparaison, ces mêmes carbones du composé **5** ont les déplacements chimiques suivants : $\delta\text{C-5} = 60,6$ et $\delta\text{C-21} = 51,2$ ppm (Figure 112).

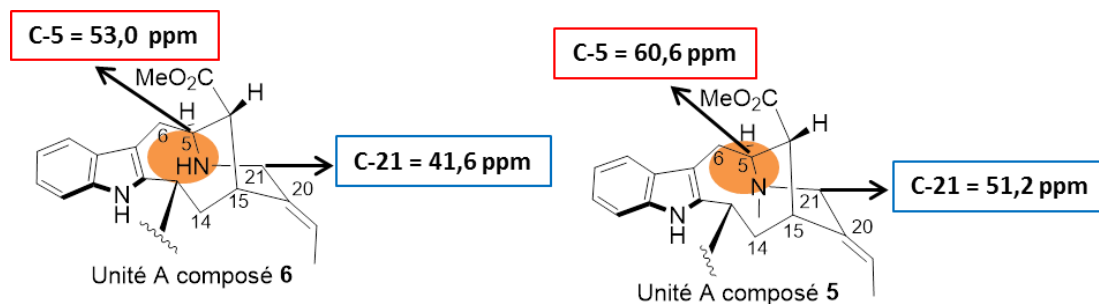


Figure 112. Comparaison des déplacements chimiques des carbones C-5 et C-21 des composés 5 et 6

La similarité structurale entre le composé **6** et le composé **5** a été confirmée par les spectres COSY et HMBC, comme le montre la figure ci-dessous.

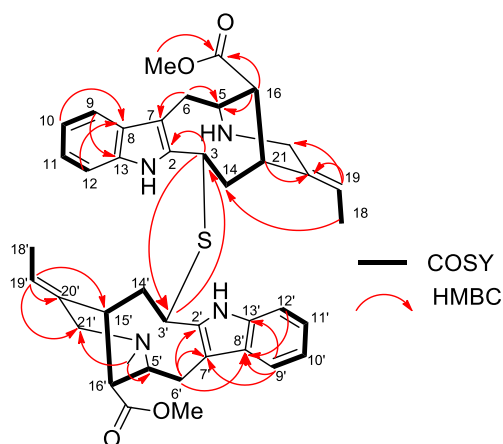


Figure 113. Corrélation COSY et HMBC de la theionbrunonine B (6)

La configuration relative de la theionbrunonine B a été définie à l'aide des corrélations ROESY. Elles sont très proches de celles de la theionbrunonine A. Par conséquent, la configuration relative du composé **6** a été déterminée comme étant : $3R^*$, $3'R^*$, $5S^*$, $5'S^*$, $15R^*$, $15'R^*$, $16S^*$, $16'S^*$. Le composé **6** correspond à la *N*-4-déméthyl-theionbrunonine A. Nous l'avons nommé theionbrunonine B.

3.6.4. Theionbrunonine C (7)

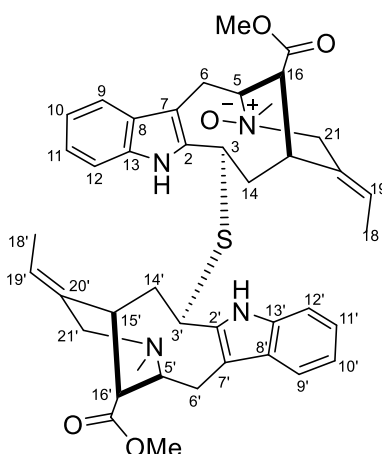


Figure 114. Structure de theionbrunonine C (7)

Le composé **7** a été obtenu sous la même forme que les composés **5** et **6**, précédemment décrits. Le réseau moléculaire généré à partir de l'extrait de tiges indique qu'ils sont connectés (Figure 96), suggérant qu'il s'agit d'analogues structuraux. Son spectre de masse HRESI-QTOF-SM+ a montré un ion pseudomoléculaire à m/z 723,3535, correspondant à la formule brute $C_{42}H_{51}N_4O_5S$ $[M]^+$ [calculée pour $C_{42}H_{51}N_4O_5S$: 723,3575, erreur = -2,6 ppm], indiquant 16 unités de masses de plus que la theionbrunonine A et 30 unités de plus que la theionbrunonine B. Le spectre UV est semblable à ceux des composés **5** et **6**. Il est optiquement actif avec une valeur de $[\alpha]_D^{22,7} = +400$ (c 0,075 ; MeOH).

L'analyse des données RMN 1H , ^{13}C , 2D ainsi que du spectre MS^2 du composé **7** ont permis d'élucider sa structure.

Les spectres de fragmentation MS^2 des composés **5**, **6** et **7** se sont avérés très similaires. On peut observer les mêmes ions fragments caractéristiques et les mêmes pertes radicalaires, notamment la perte commune à ses trois spectres d'une molécule d' H_2S (Figure 115).

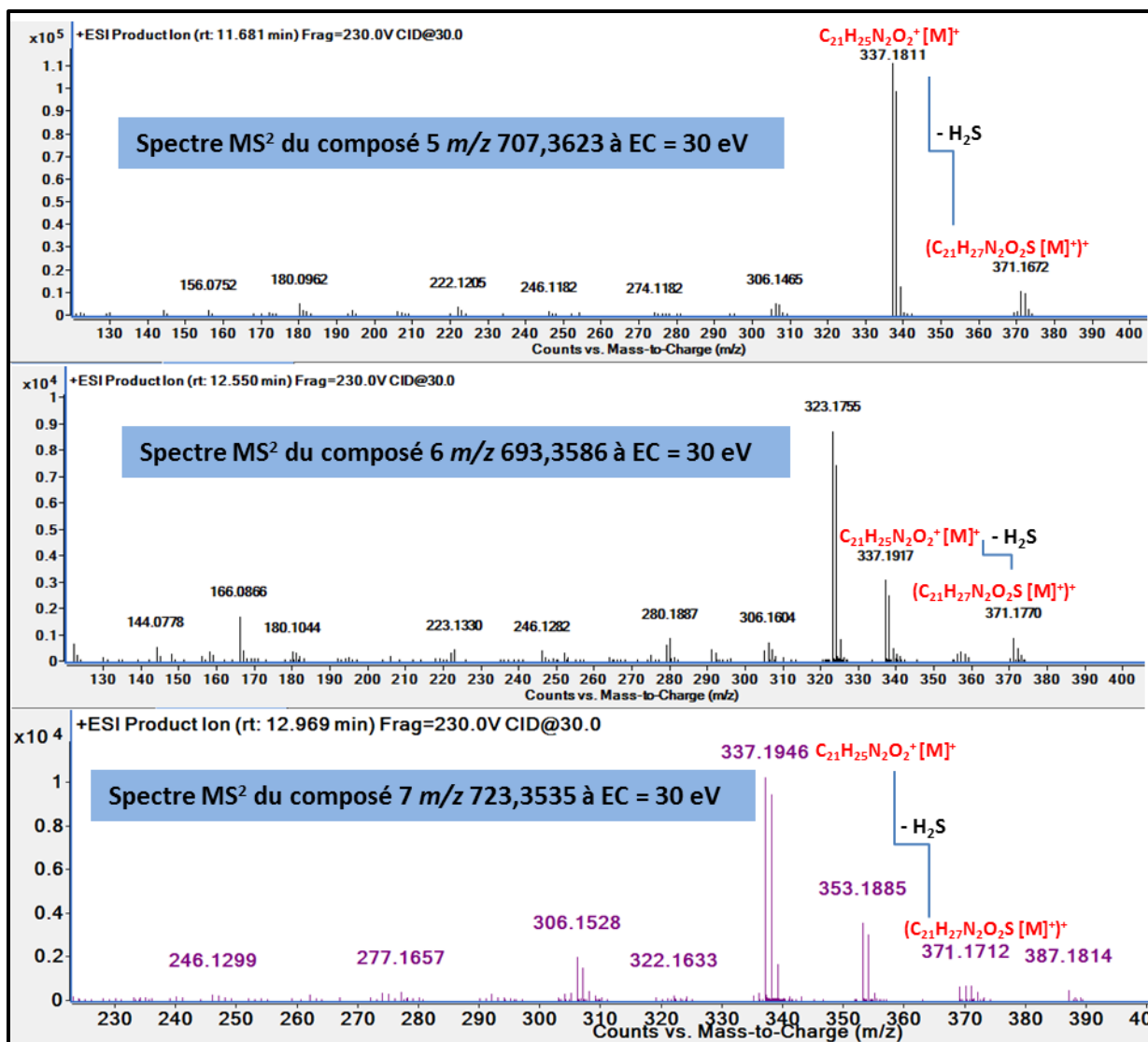


Figure 115. Comparaison des spectres MS² des composés 5, 6 et 7 pour Ec = 30 eV et m/z (100-1200)

L'analyse des spectres RMN ¹H et ¹³C a confirmé la similarité des composés 7 et 6 à une exception. La présence d'un groupement *N*-4-méthyle supplémentaire. La présence de ce groupement a été clairement identifiée grâce à la différence des déplacements chimiques observés sur les carbones directement liés à cet azote. Nous constatons ainsi que les carbones C-5 et C-21 respectivement $\delta_c-5 = 74,0$ et $\delta_c-21 = 62,1$ sont plus déblindés dans le composé 7, comparé à ceux des composés 6 et 5 (Figure 116). Ce fort déblindage est caractéristique de la présence d'un atome d'oxygène lié à l'azote *N*(4).

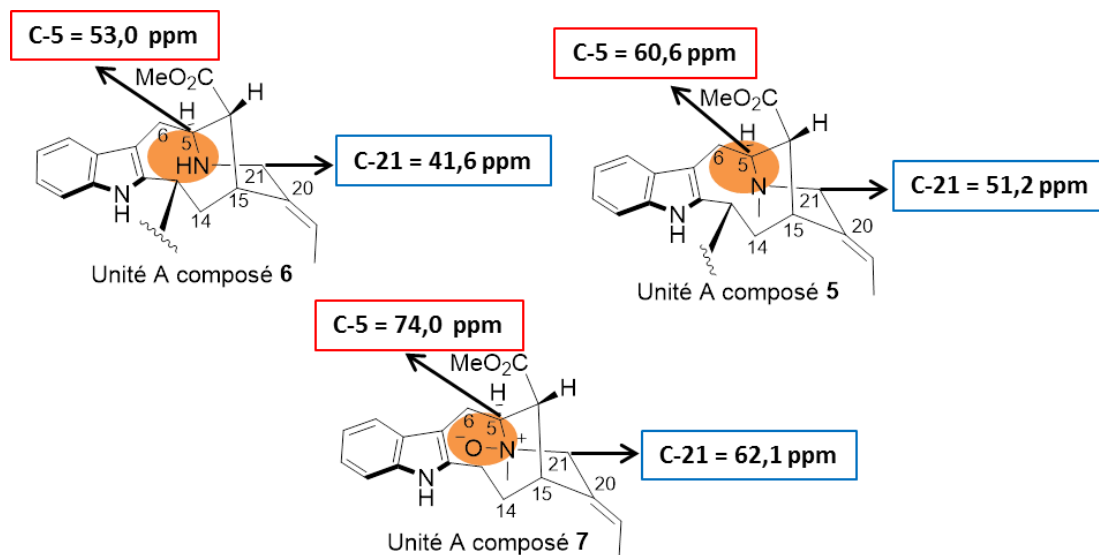


Figure 116. Comparaison des déplacements chimiques des carbones C-5 et C-21 des composés 5, 6 et 7

L'analyse des spectres (^1H - ^1H COSY, HSQC et HMBC) de la theionbrunonine C (**7**) ont révélé la même structure plane que celles des theionbrunonines A et B.

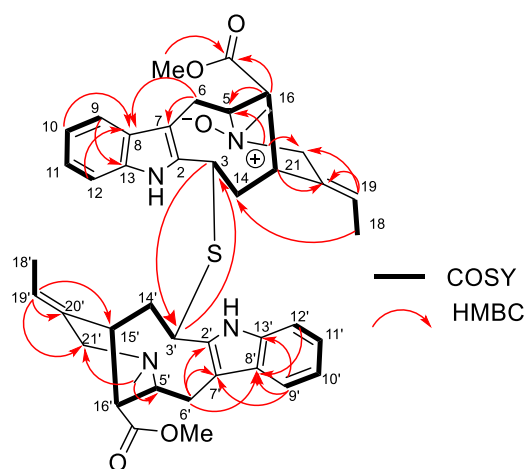


Figure 117. Corrélations COSY, HMBC de la theionbrunonine C (**7**)

L'instabilité du composé **7** n'a pas permis d'enregistrer un spectre NOESY. Par conséquent, la configuration relative de la theionbrunonine C (**7**) n'a pas pu être déterminée.

3.7. Hypothèse de biosynthèse des theionbrunonines

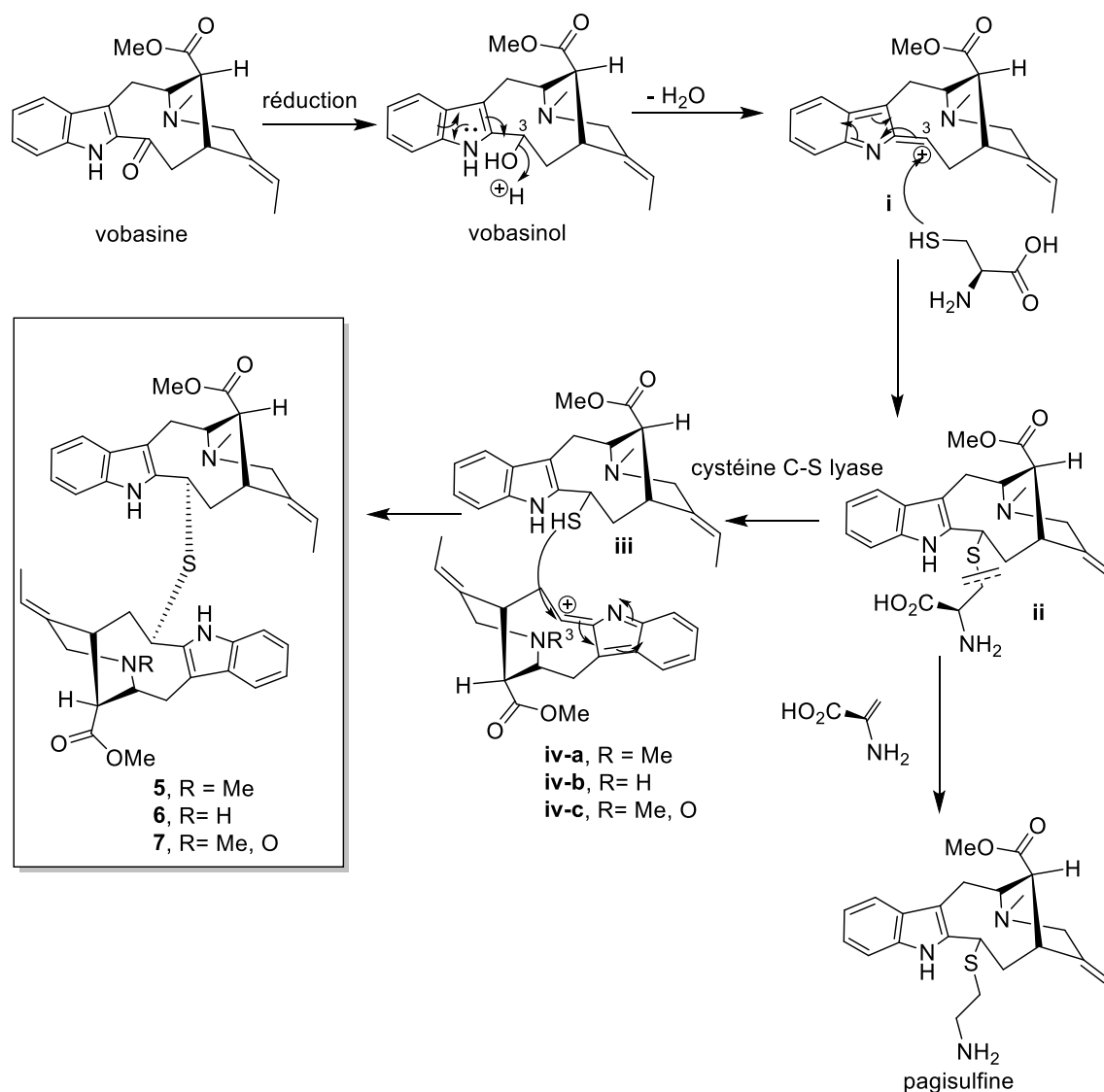


Figure 118. Hypothèse biosynthétique des theionbrunonines

L'hypothèse biosynthétique de la formation des theionbrunonines est illustrée dans la Figure 118. La séquence serait initiée par la réduction de la vobasine en vobasinol qui après protonation de l'hydroxyle en C₃ conduirait, après élimination, à l'intermédiaire i. Cet intermédiaire serait attaqué en C₃ par la L-cystéine pour donner l'intermédiaire ii. A l'issue de cette réaction, cette entité pourrait soit subir une réaction de décarboxylation pour conduire à la pagisulfine¹⁸⁶ ou alors subir l'action de la cystéine C-S lyase pour donner l'intermédiaire sulfuré iii.⁸¹ Enfin, ce dernier pourrait, à son tour, attaquer le carbone C₃ des intermédiaires iv-(a-c) pour conduire aux theionbrunonines A-C (5-7).

4. Résultats des activités biologiques

Les activités antiplasmodiale et cytotoxique des composés isolés des tiges de *M. brunonis* ont été évaluées.

4.1. Activités antiplasmodiales

Tous les composés isolés dans ce travail ont été testés *in vitro* sur une souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* (FcB1). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 17 ci-dessous. Les extraits doivent encore être testés.

Tableau 17. Résultats d'activité antiplasmodiale (FcB1) des composés isolés de *M. brunonis*

Composés	FcB1 Cl ₅₀ (µM)
16- <i>epi</i> -17-méthyl-ester panarine (1)	1,05 ± 1,02
gelsédine (2)	42,5 ± 5,1
vobasine (3)	22,5 ± 3,5
gelsémicine (4)	59,5 ± 6,3
theionbrunonine A (5)	2,5 ± 0,7
theionbrunonine B (6)	2,1 ± 0,1
theionbrunonine C (7)	6,5 ± 0,7
chloroquine	0,05 ± 0,06

A la lecture de ce tableau, on peut émettre plusieurs observations quant à l'activité antiplasmodiale des nouveaux composés isolés de *M. brunonis*.

Le composé **1** et les trois *bis*-indoles **5-7** ont montré une activité antiplasmodiale intéressante, allant de 1 à 2,5 µM. Le composé **7** quant à lui est un peu en dessous avec une Cl₅₀ de 6,5 µM.

L'ensemble des composés connus de cette plante composés **2-4** quant à eux présentent une activité *in vitro* faible vis-à-vis de *P. falciparum* (FcB1).

4.2. Activités cytotoxiques

L'activité cytotoxique des composés isolés de *Mostuea brunonis* a été évaluée sur une lignée AB 943.²¹¹

Au regard des résultats reportés dans le Tableau 18 ci-dessous, ils se sont révélés faiblement cytotoxiques.

Tableau 18. Tests cytotoxiques des 7 composés isolés de *M. brunonis*

Composés	AB 943 CI_{50} (μM)
16- <i>epi</i> -17-methylester panarine (1)	72,5
gelsédine (2)	71,5
vobasine (3)	75,5
gelsémicine (4)	> 100
theionbrunonine A (5)	37,0
theionbrunonine B (6)	53,0
theionbrunonine C (7)	78,5

²¹¹ La lignée utilisée est une culture primaire de fibroblastes de peau d'un adulte humain, il s'agit ici d'une souche non répertoriée, obtenue de l'Hôpital la Pitié-Salpêtrière et qui est employée au MNHN pour des tests de cytotoxicité. Nous n'avons pas encore obtenu la méthode de détermination.

5. Conclusion du chapitre V

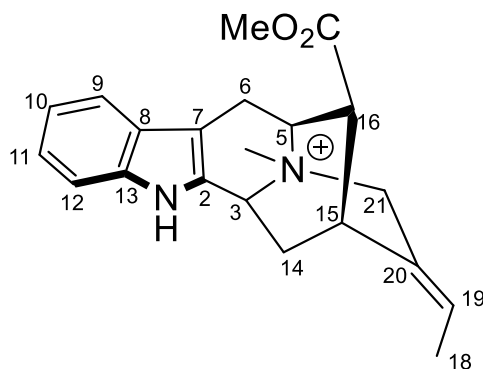
Tout comme dans les études précédentes, la MIADB a permis d'annoter efficacement le réseau moléculaire global des extraits alcaloïdiques de tiges et de feuilles de *Mostuea brunonis* Didr. Cette annotation a conduit à la détection rapide des composés connus et au ciblage des composés inconnus de la plante. On remarque l'absence de *match* avec la camphothécine, décrite initialement dans *Mostuea brunonis*. Cela est potentiellement dû au mode d'extraction, peu adapté à cette molécule et à ses analogues, peu basiques.

Grâce à cette nouvelle approche de déréplication, sept alcaloïdes indolomonoterpéniques ont été isolés, parmi lesquels quatre sont des nouveaux composés : un monomère de type sarpagine la 16-*epi*-méthylester-panarine (**1**) et trois *bis*-indoles inédits de type vobasine-vobasine liés par un atome de soufre que nous avons nommés theiobrunonine A, B et C (**5**, **6** et **7**). Trois molécules connues ont également été isolées, il s'agit de la gelsédine (**2**), la vobasine (**3**) et la gelsémicine (**4**).

L'ensemble des composés isolés ont été soumis à des évaluations biologiques portant sur la recherche d'activité antiplasmodiale (FcB1) et cytotoxique. Les 4 nouveaux composés ont montré une activité antiplasmodiale intéressante avec des CI_{50} de l'ordre du micromolaire, et ne semblent pas cytotoxiques.

6. Données spectrales des composés isolés

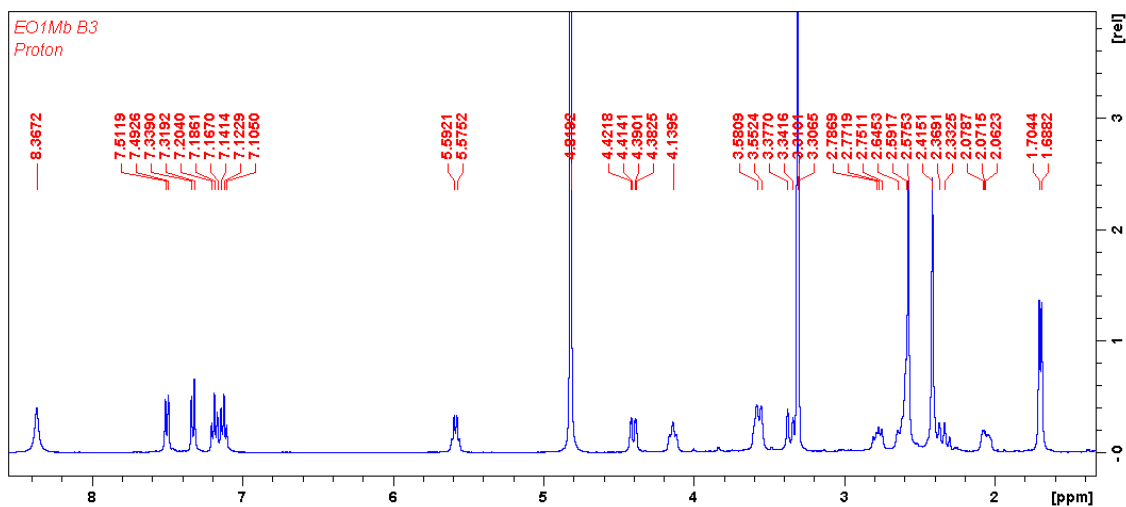
6.1. . Données spectrales de la 16-*epi*-17-méthylesterpanarine (1)



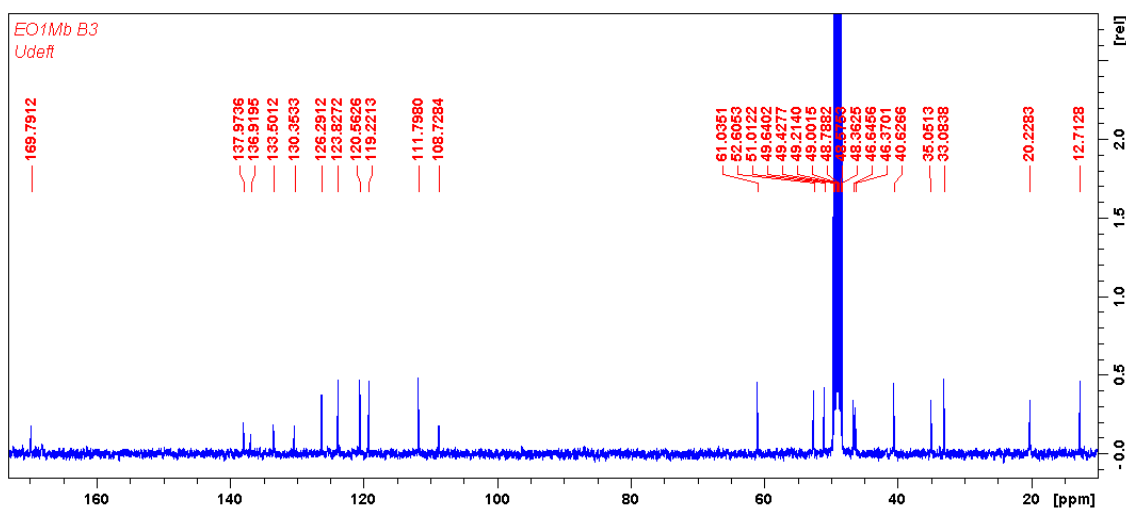
- **Aspect** : poudre marron clair
- **UV, (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$)** : 203,2 nm (7,46), 268,8 nm (3,87), 293,6 nm (3,9576)
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{22,7}$** = + 457,1 (c 0,035 ; MeOH)
- **Masse (ESI-HRMS)**: $[M]^+$ m/z = 337,1879, calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+$, m/z = 337,1911 (Diff = -1,21)

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		136.9
3	4.40 (1H, dd, 12.8, 3.0) ;	46.6
4		
5	4.13 (1H, m)	61.0
6	2.77 (1H, m) ; 2.62 (1H, m)	43.9
7		108.7
8		130.3
9	7.50 (1H, d, 7.8)	119.2
10	7.12 (1H, t 7.1)	120.5
11	7.17 (1H, t 7.6)	123.8
12	7.33 (1H, d, 7.6)	111.7
13		137.9
14	2.05 (1H, m) ; 2.35 (1H, m)	35.4
15	3.57 (1H, m)	33.0
16	2.58 (1H, m)	46.3
18	1.69 (3H, d, 6.5)	12.7
19	5.59 (1H, q, 6.2)	126.2
20		133.5
21	3.57 (1H, m), 3.35 (1H, m)	52.6
NMe	2.57 (3H, s)	40.6
COOMe	2.41 (3H, s)	51.0
<u>COOMe</u>		169.7

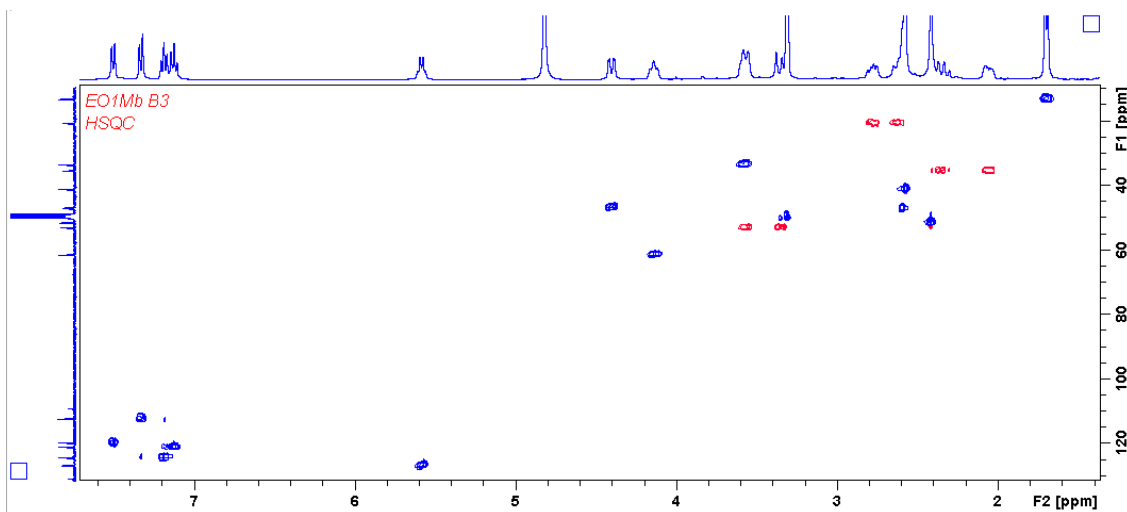
- Spectres RMN de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (1)



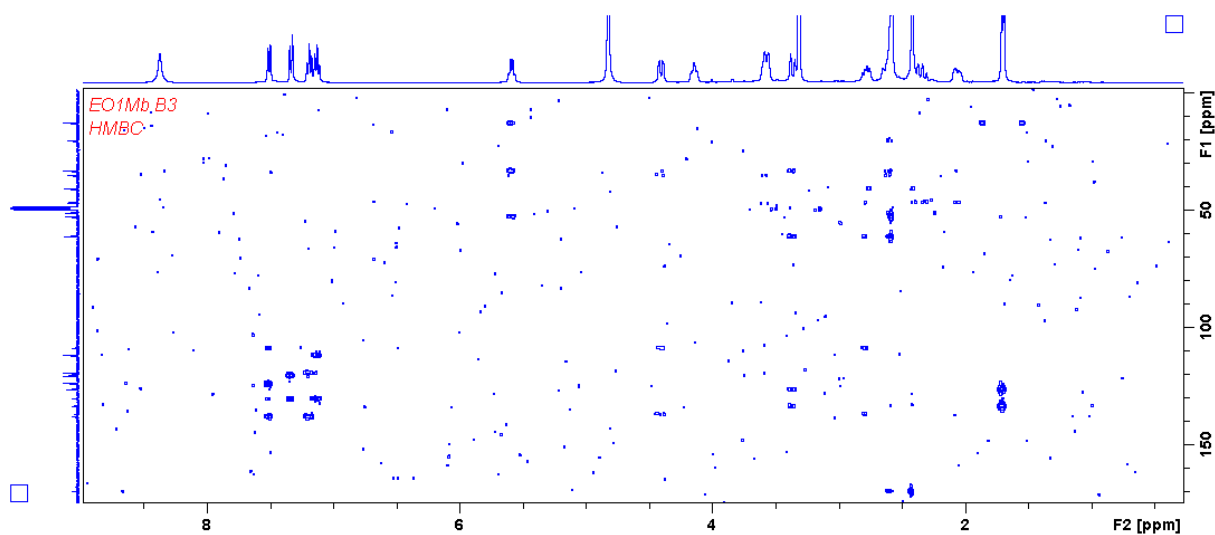
Spectre RMN ^1H de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (1) (MeOH d_4 , 400 MHz)



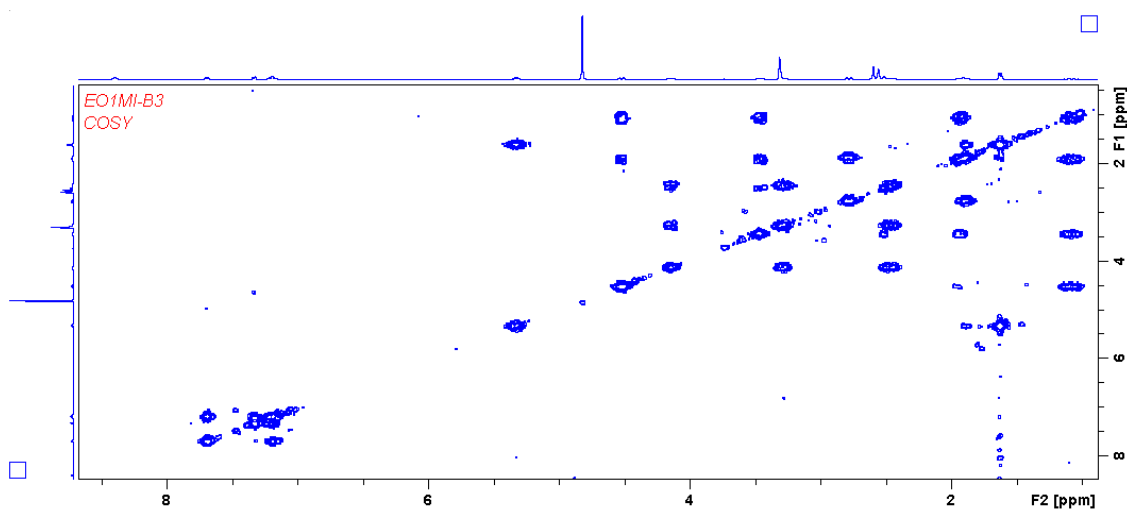
Spectre RMN ^{13}C de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (1) (MeOH d_4 , 100 MHz)



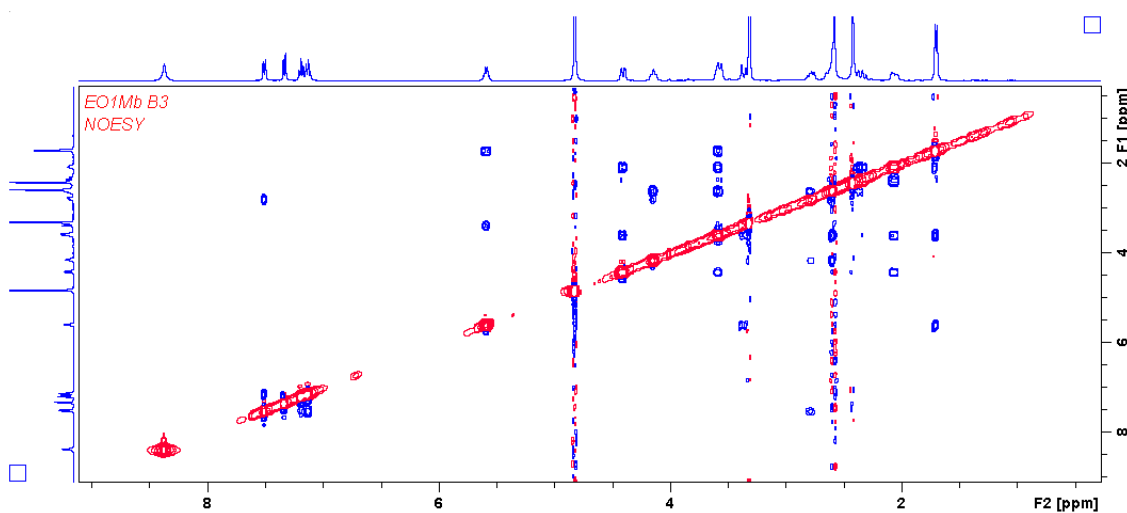
Spectre RMN HSQC de la 16-*epi*-17-méthylester-pararine (**1**) (MeOH d₄, 400 MHz)



Spectre RMN HMBC de la 16-*epi*-17-méthylester-pararine (**1**) (MeOH d₄, 400 MHz)

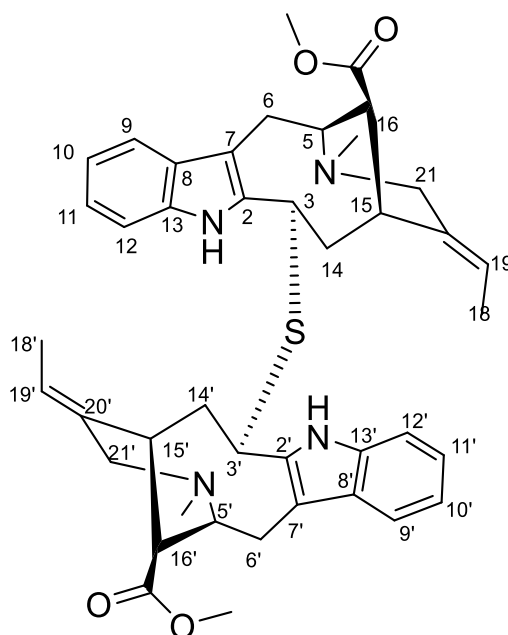


Spectre RMN COSY de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (**1**) (MeOH d₄, 400 MHz)



Spectre RMN NOESY de la 16-*epi*-17-méthylester-panarine (**1**) (MeOH d₄, 400 MHz)

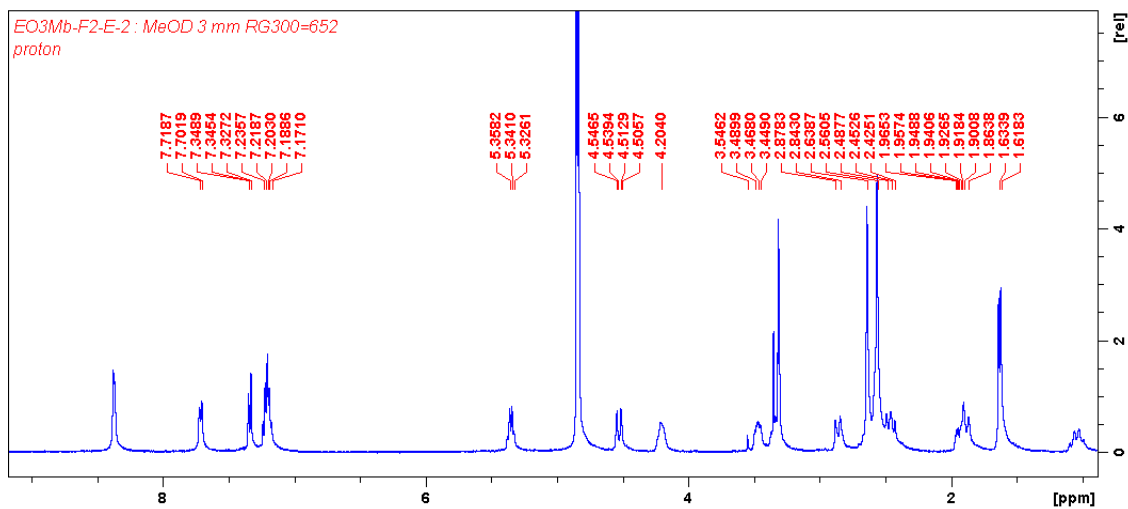
6.2. Données spectrales de la theionbrunonine A (5)



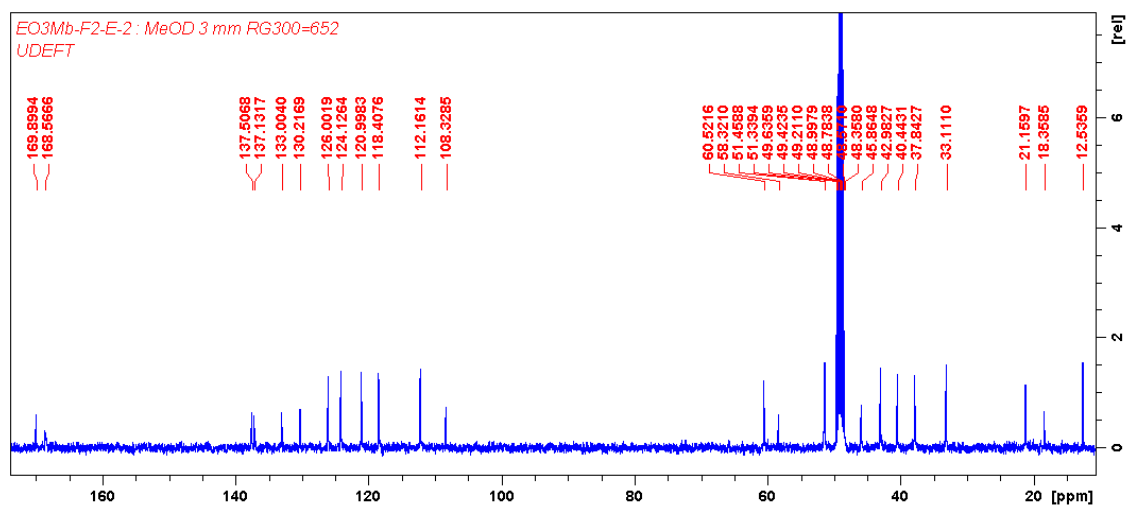
- **Aspect** : poudre blanche
- **UV, (MeOH) λ_{max} (log ϵ)** : 202,2 ; 268,8 et 293,6 nm
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{22,7}$** = + 363 (c 0,13, MeOH).
- **Masse (MS-ESIHR)**: $[M+H]^+$ m/z = 707,3623, calculée pour C₄₂H₅₁N₄O₄S: 707,3626, erreur = -1,21 ppm

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		136.1
3	4.50 (1H, dd, 13.5, 2.7)	42.9
5	4.20 (1H, m)	53.0
6	3.34 (1H, m) ; 2.45 (1H, m)	21.1
7		108.3
8		130.3
9	7.71 (1H, d, 7.2)	118.4
10	7.19 (1H, m)	120.9
11	7.24 (1H, m)	124.1
12	7.33 (1H, d, 7.3)	112.1
13		137.5
14	1.94 (1H, m) ; 1.03 (1H, m)	37.8
15	3.46 (1H, m)	33.1
16	2.56 (1H, br.s)	45.8
18	1.62 (3H, d, 6.5)	12.5
19	5.34 (1H, q 6.5)	126.0
20		133.0
21	2.85 (1H, m) ; 2.13 (1H, m)	41.6
NMe	2.63 (3H, s)	40.4
COOMe	2.56 (3H, s)	51.3
<u>COOMe</u>		169.8
2'		136.1
3'	4.50 (1H, dd, 13.5, 2.7)	42.9
5'	4.20 (1H, m)	53.0
6'	3.34 (1H, m) ; 2.45 (1H, m)	21.1
7'		108.3
8'		130.3
9'	7.71 (1H, d, 7.2)	118.4
10'	7.19 (1H, m)	120.9
11'	7.24 (1H, m)	124.1
12'	7.33 (1H, d, 7.3)	112.1
13'		137.5
14'	1.94 (1H, m) ; 1.03 (1H, m)	37.8
15'	3.46 (1H, m)	33.1
16'	2.56 (1H, br.s)	45.8
18'	1.62 (3H, d, 6.5)	12.5
19'	5.34 (1H, q 6.5)	126.0
20'		133.0
21'	2.85 (1H, m) ; 2.13 (1H, m)	41.6
NMe'	2.63 (3H, s)	40.4
COOMe'	2.56 (3H, s)	51.3
<u>COOMe'</u>		169.8

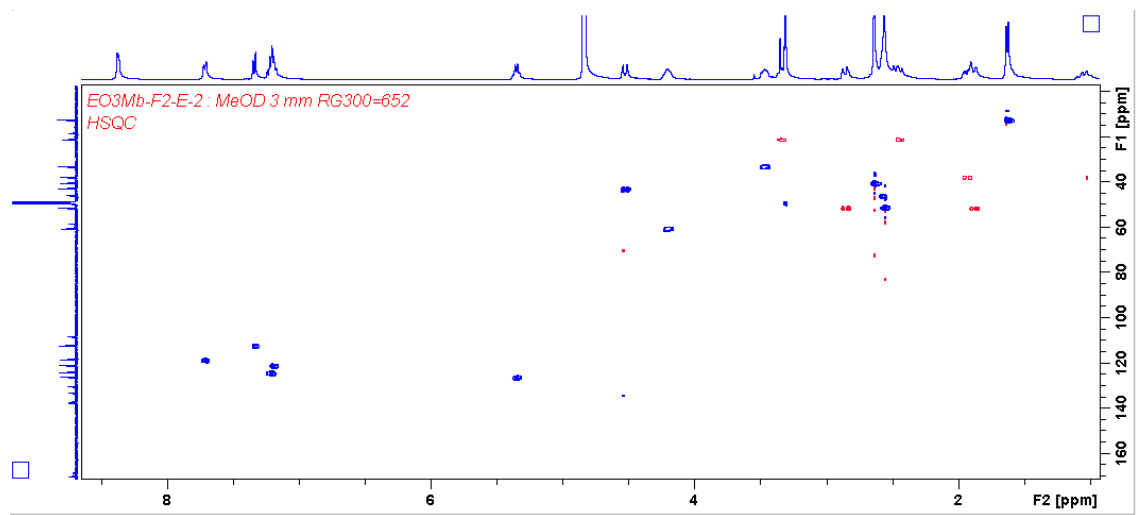
- Spectres RMN de la theionbrunonine A (5)



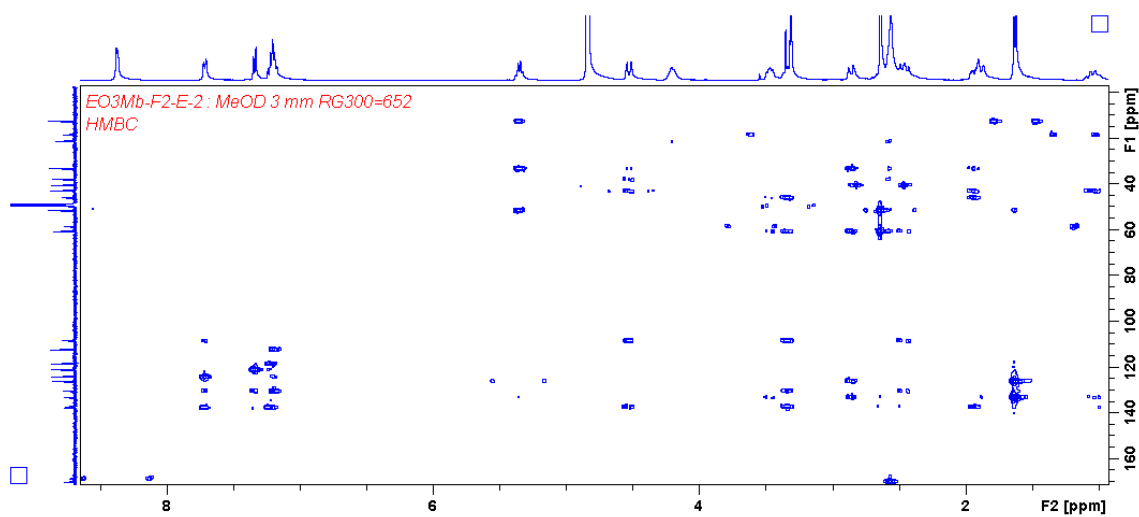
Spectre RMN ^1H de la theionbrunonine A (5) (MeOH d_4 , 400 MHz)



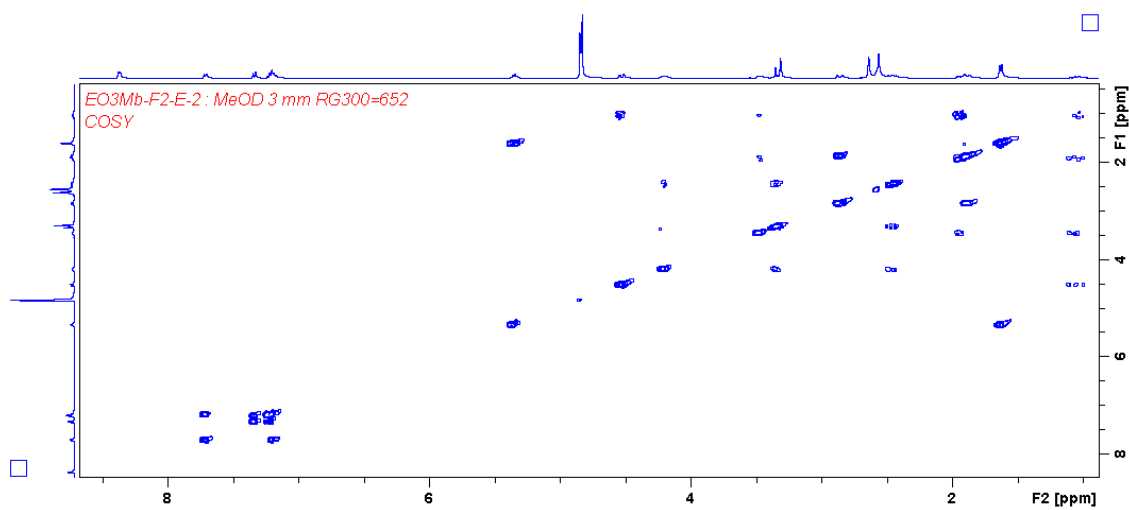
Spectre RMN ^{13}C de la theionbrunonine A (5) (MeOH d_4 , 100 MHz)



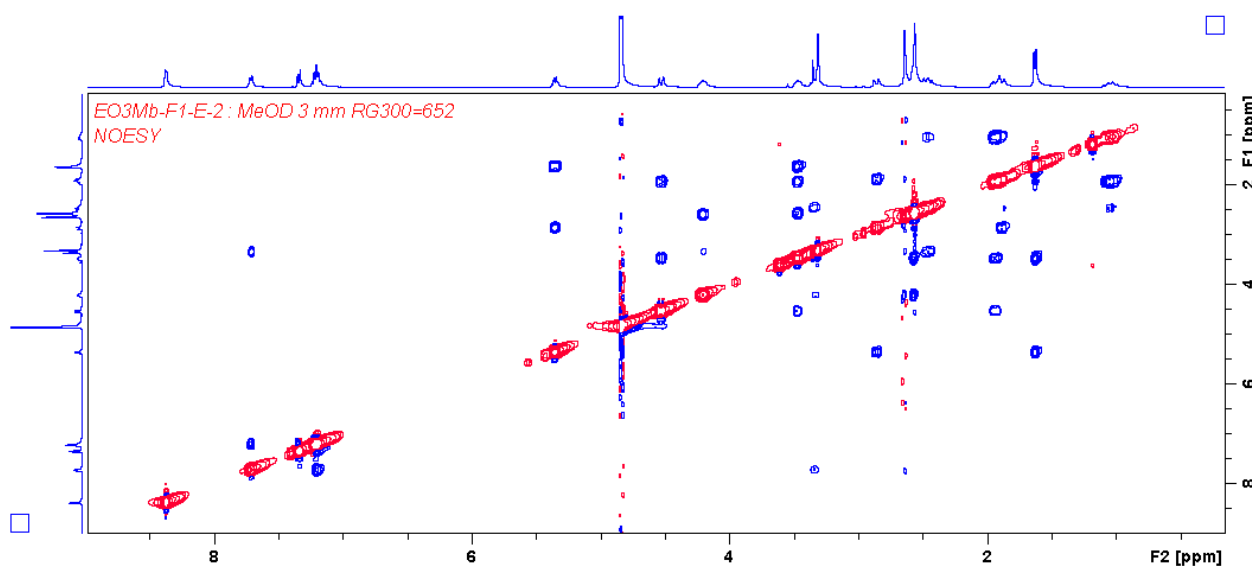
Spectre RMN HSQC de la theionbrunonine A (5) (MeOH d₄, 400 MHz)



Spectre RMN HMBC de la theionbrunonine A (5) (MeOH d₄, 400 MHz)

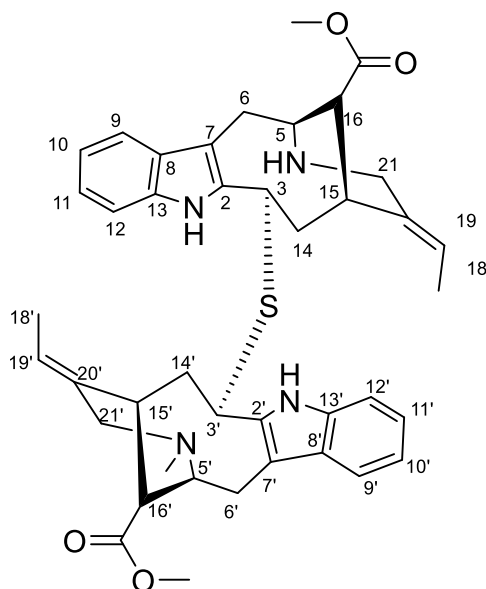


Spectre RMN COSY de la theionbrunonine A (5) (MeOH d_4 , 400 MHz)



Spectre RMN NOESY de la theionbrunonine A (5) (MeOH d_4 , 400 MHz)

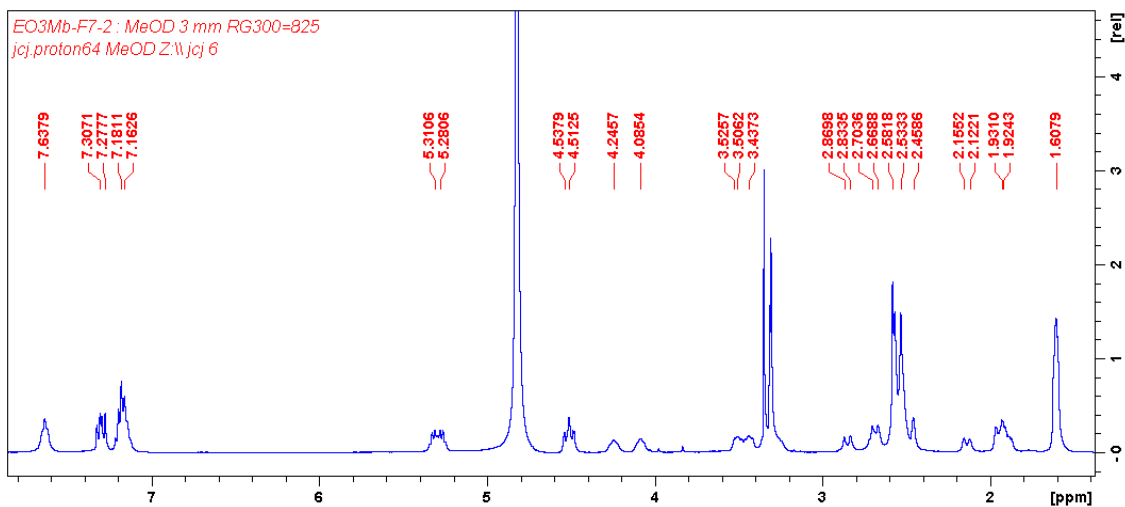
6.3. . Données spectrales de la theionbrunonine B (6)



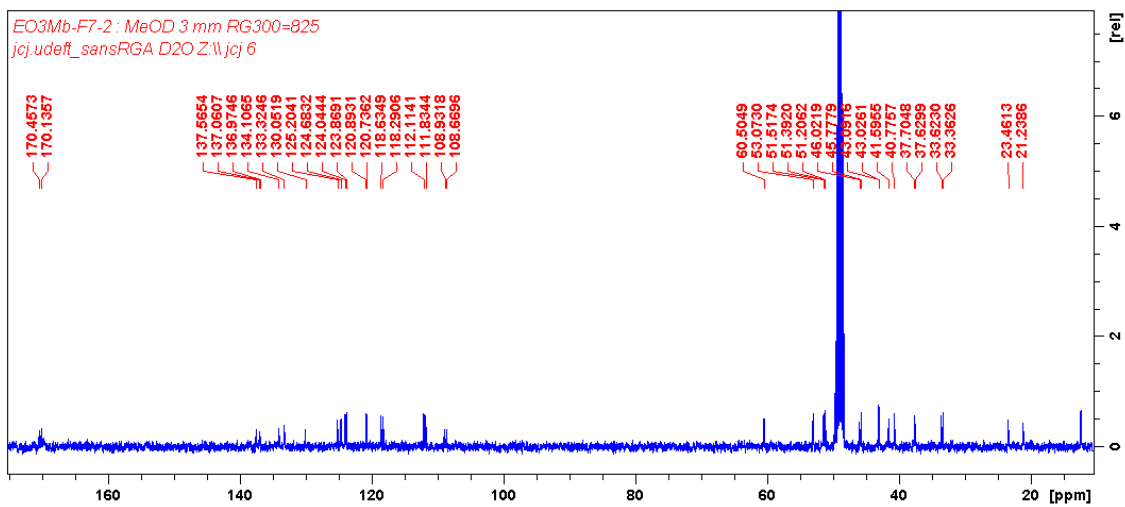
- **Aspect** : poudre blanche
- **UV, (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$)** : 202,2 ; 268,8 et 293,6 nm
- **$[\alpha]_D^{22,7}$** = + 400 (*c* 0,06 ; MeOH)
- **Masse (ESI-HRMS)**: $[M+H]^+$ m/z = 693,3586, calculée pour C₄₁H₄₉N₄O₄S $[M+H]^+$, m/z = 693,3469 (Diff = -2,6 ppm)

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		137.5
3	4.53 (1H, dd, 13.5, 2.7)	43.1
5	4.24 (1H, m)	58.3
6	3.30 (1H, m) ; 2.50 (1H, m)	21.1
7		108.3
8		130.2
9	7.63 (1H, d, 7.2)	118.4
10	7.16 (1H, m)	120.9
11	7.18 (1H, m)	124.1
12	7.30 (1H, d, 7.3)	112.1
13		137.4
14	1.92 (1H, m) ; 1.10 (1H, m)	37.8
15	3.42 (1H, m)	33.1
16	2.45 (1H, br.s)	45.7
18	1.10 (3H, d, 6.5)	12.5
19	5.31 (1H, q, 6.5)	126.0
20		133.0
21	2.85 (1H, m) ; 2.13 (1H, m)	49.4
16-COOMe	2.53 (3H, s)	51.4
16-COOMe		168.5
2'		137.1
3'	4.48 (1H, dd, 13.5, 2.7)	43.1
5'	4.08 (1H, m)	60.5
6'	3.35 (1H, m) ; 2.68 (1H, m)	18.3f
7'		108.3
8'		130.2
9'	7.63 (1H, d, 7.2)	118.4
10'	7.16 (1H, m)	120.9
11'	7.18 (1H, m)	124.1
12'	7.28 (1H, d, 7.3)	112.1
13'		137.5
14'	1.89 (1H, m) ; 1.11 (1H, m)	37.8
15'	3.50 (1H, m)	33.1
16'	2.56 (1H, br.s)	46.1
18'	1.6 (3H, q 6.5)	12.5
19'	5.28 (1H, q, 6.5)	126.0
20'		133.0
21'	2.68 (1H, m) ; 1.94 (1H, m)	49.6
NMe'	2.56 (3H, s)	40.4
16'-COOMe'	2.57 (3H, s)	51.4
16'-COOMe'		169.8

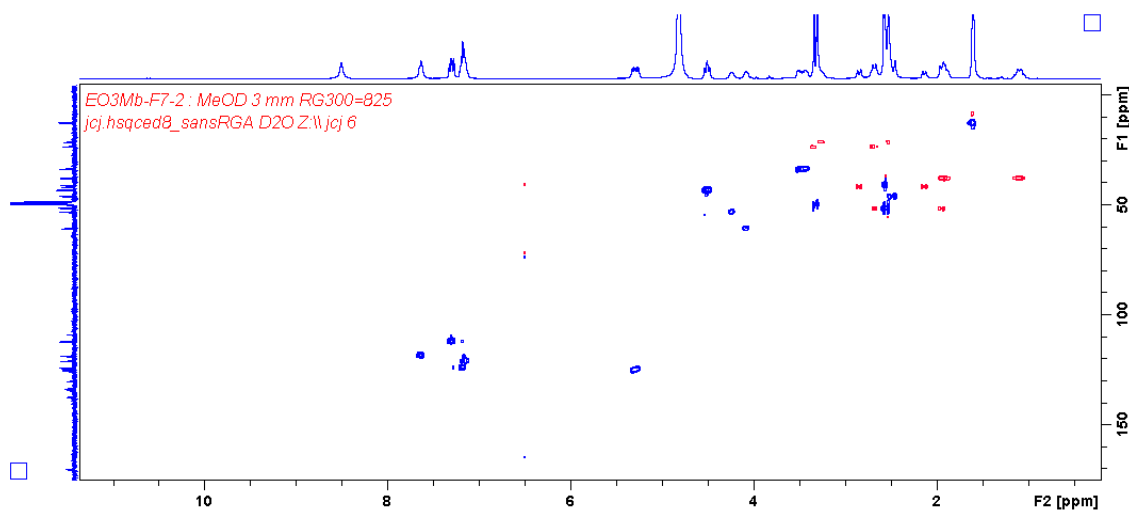
- Spectres RMN de la theionbrunonine B (6)



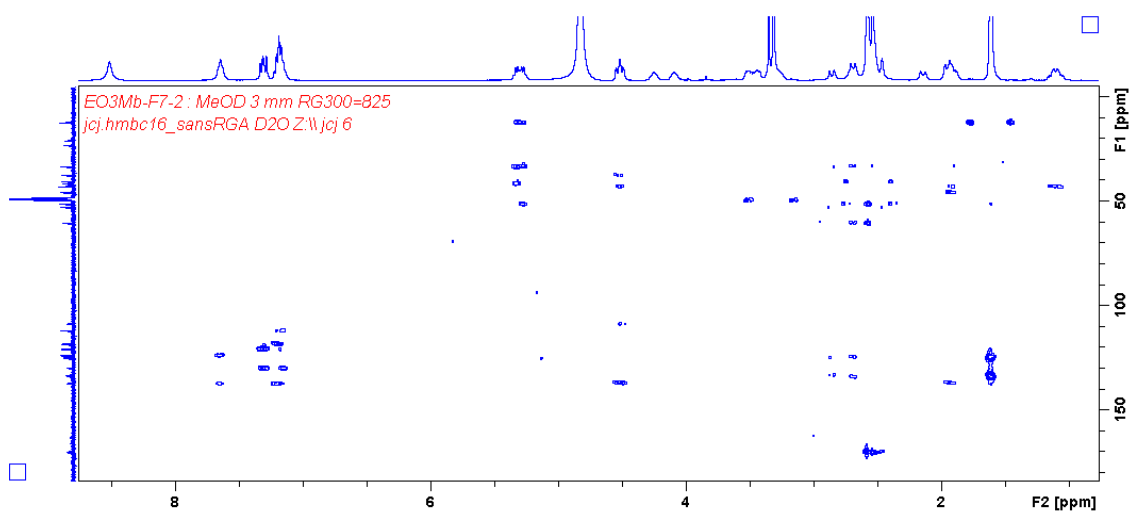
Spectre RMN ^1H de la theionbrunonine B (6) (MeOH d_4 , 400 MHz)



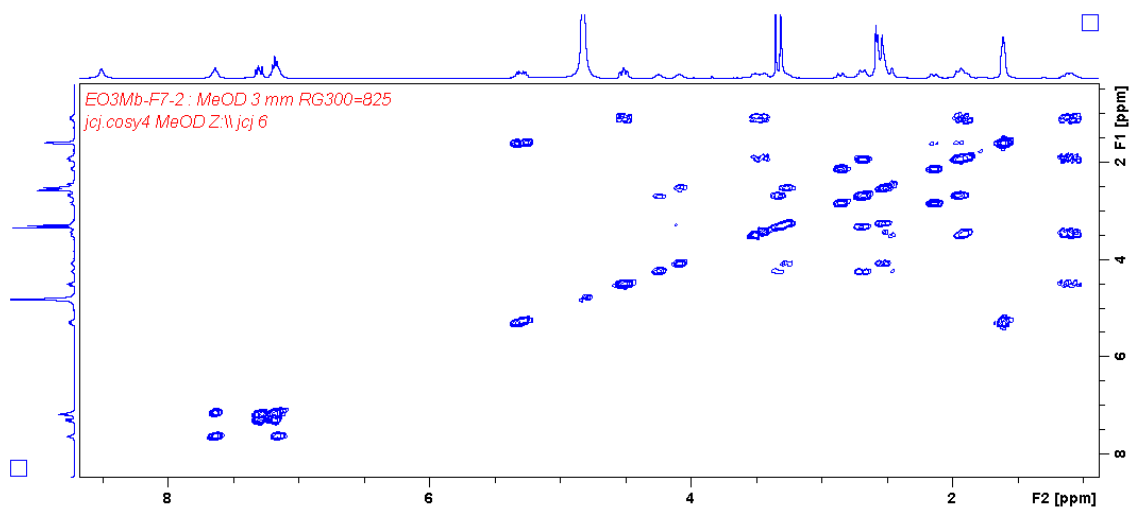
Spectre RMN ^{13}C de la theionbrunonine B (6) (MeOH d_4 , 100 MHz)



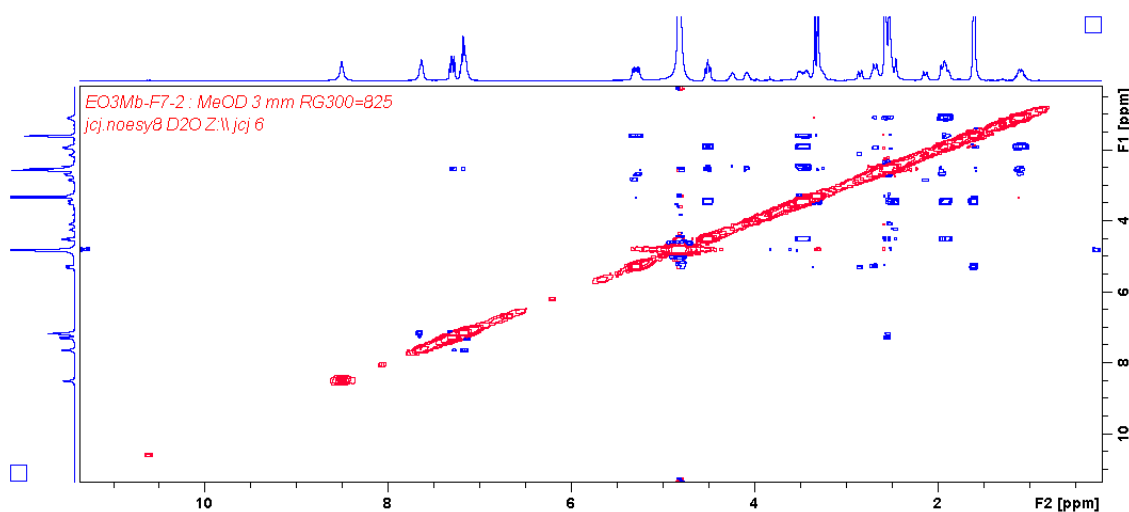
Spectre RMN HSQC de la theionbrunonine B (6) (MeOH d₄, 400 MHz)



Spectre RMN HMBC de la theionbrunonine B (6) (MeOH d₄, 400 MHz)

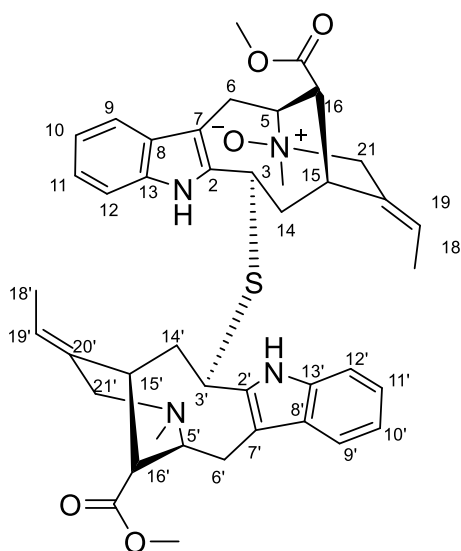


Spectre RMN COSY de la theionbrunonine B (6) (MeOH d₄, 400 MHz)



Spectre RMN NOESY de la theionbrunonine B (6) (MeOH d₄, 400 MHz)

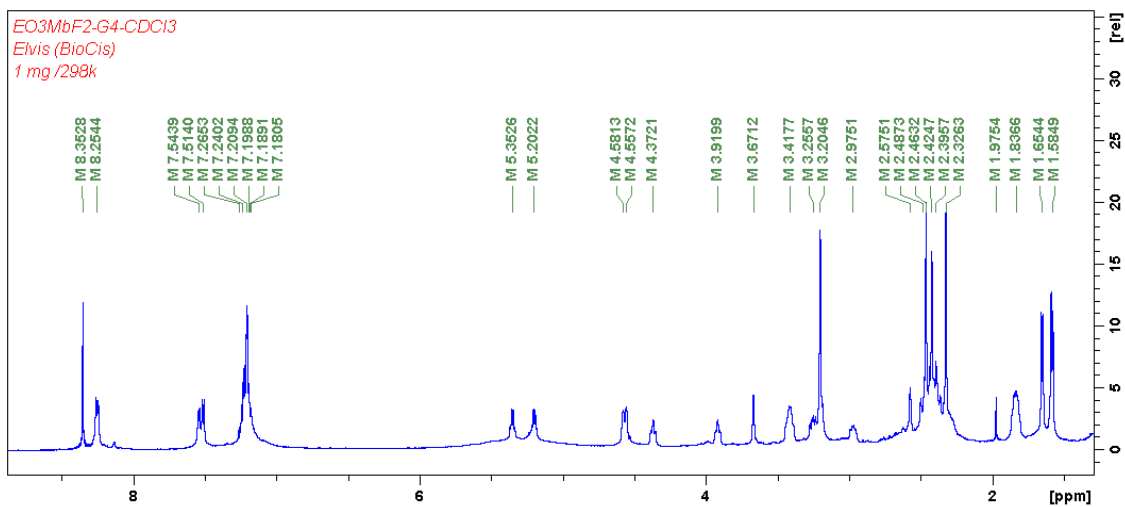
6.4. Données spectrales de la theionbrunonine C (7)



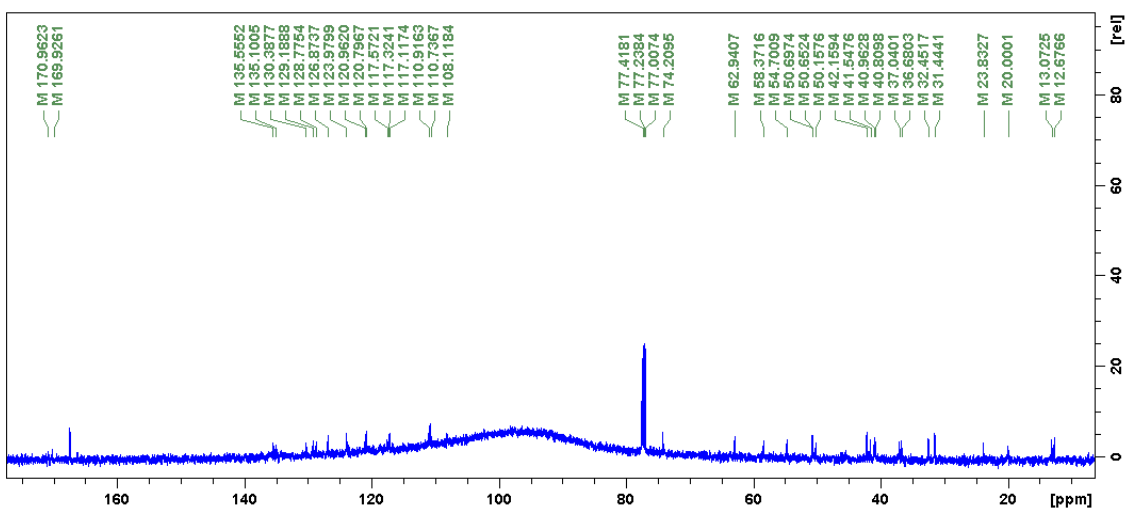
- **Aspect** : poudre blanche
- **UV, (MeOH) λ_{max} (log ϵ)** : 202,2 ; 268,8 et 293,6 nm
- **$[\alpha]_{\text{D}}^{22,7}$** = + 400 (*c* 0,075, MeOH)
- **Masse (MS-ESIHR):** $[M+H]^+$ m/z = 723,3535, calculée pour $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ $[M+H]^+$, m/z = 723,3575 (Diff = -2,6 ppm)

Position	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C
2		137.1
3	4.53 (1H, dd, 13.5, 2.7)	42.2
5	4.36 (1H, m)	74.0
6	3.25 (1H, m) ; 2.38 (1H, m)	23.8
7		110.4
8		128.9
9	7.54 (1H, d, 7.2)	117.1
10	7.20 (1H, m)	120.9
11	7.18 (1H, m)	124.0
12	7.22 (1H, d, 7.3)	110.9
13		135.5
14	1.84 (1H, m) ; 1.25 (1H, m)	37.1
15	3.44 (1H, m)	32.4
16	3.68 (1H, br.s)	41.5
18	1.65 (3H, d, 6.5)	13.0
19	5.35 (1H, q, 6.5)	126.8
20		130.3
21	3.19 (1H, m) ; 2.29 (1H, m)	62.1
NMe	3.20 (3H, s)	54.6
16-COOMe	2.53 (3H, s)	50.6
16-COOMe		170.9
2'		135.1
3'	4.48 (1H, dd, 13.5, 2.7)	43.0
5'	4.08 (1H, m)	60.5
6'	3.35 (1H, m) ; 2.68 (1H, m)	23.4
7'		108.6
8'		130.3
9'	7.51 (1H, d, 7.2)	118.4
10'	7.16 (1H, m)	120.7
11'	7.18 (1H, m)	123.8
12'	7.26 (1H, d, 7.3)	112.1
13'		135.1
14'	1.89 (1H, m) ; 1.11 (1H, m)	36.6
15'	3.50 (1H, m)	31.4
16'	2.56 (1H, br.s)	42.1
18'	1.65 (3H, q 6.5)	12.6
19'	5.20 (1H, q, 6.5)	126.8
20'		129.1
21'	2.68 (1H, m) ; 1.94 (1H, m)	58.3
NMe'	2.56 (3H, s)	40.8
16'-COOMe'	2.57 (3H, s)	50.1
16'-COOMe'		169.9

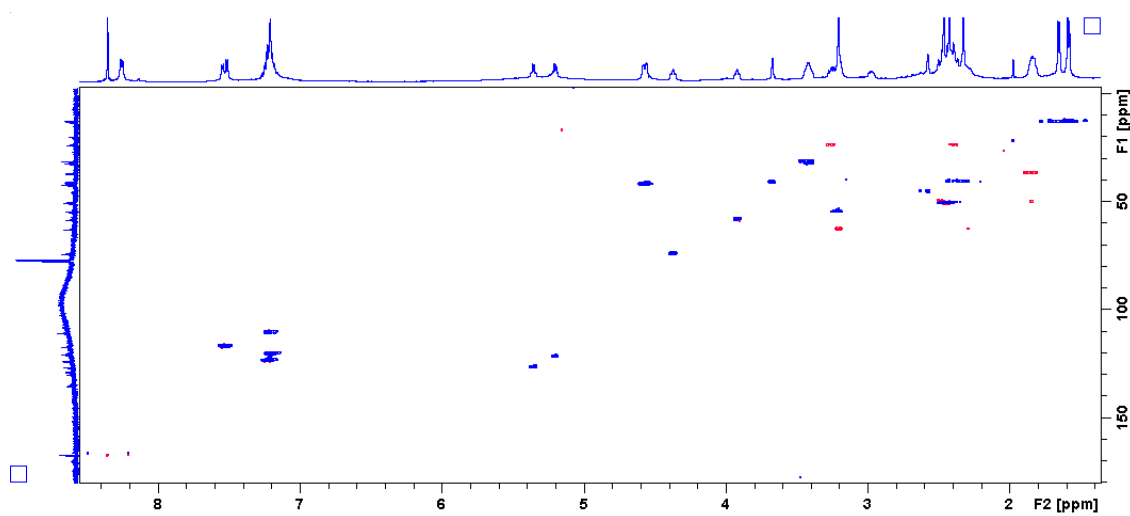
- Spectres RMN de la theionbrunonine C (7)



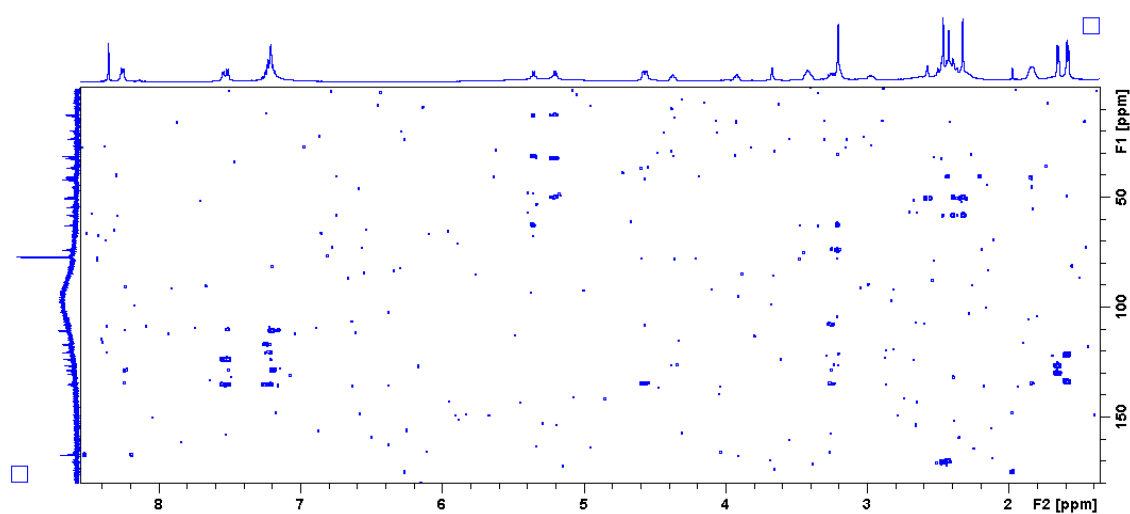
Spectre RMN ^1H de la theionbrunonine C (7) (CDCl_3 , 600 MHz)



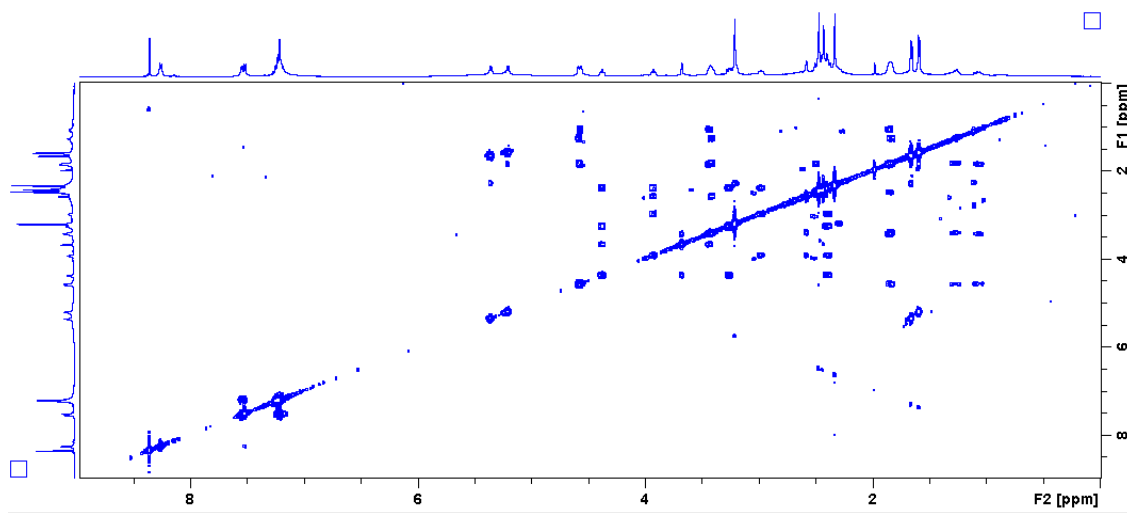
Spectre RMN ^{13}C de la theionbrunonine C (7) (CDCl_3 , 150 MHz)



Spectre RMN HSQC de la theionbrunonine C (7) (CDCl₃, 600 MHz)



Spectre RMN HMBC de la theionbrunonine C (7) (CDCl₃, 600 MHz)



Spectre RMN COSY de la theionbrunonine C (**7**) (CDCl_3 , 600 MHz)

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

La flore du Gabon est connue pour sa grande diversité, on compte environ 7000 espèces de plantes dont 11 % sont endémiques. Par contre, il y a encore trop peu d'études qui valorisent cette grande richesse des forêts tropicales de basse altitude. Au cours de cette thèse, nous avons réalisé des études phytochimiques de 11 plantes récoltées au Gabon, initialement à la recherche de composés à potentiel antipaludique, par une approche de déréplication portant sur les pics majoritaires observés en CLHP-UV-MS, en comparaison à la littérature et à des bases de données usuelles listant des produits naturels et leurs formules moléculaires brutes.

A l'issue de cette étape de déréplication, trois plantes parmi les onze ont été sélectionnées. Il s'agit de : *Pleiocarpa mutica* Benth, *Callichilia inaequalis* Stapf (Apocynaceae) et *Mostuea brunonis* Didr. (Gelsemiaceae). Le choix de ces trois espèces a été fondé essentiellement sur des critères chimiotaxonomiques : ces clades contiennent des alcaloïdes indolomonoterpéniques, qui peuvent présenter des activités antiplasmodiales. Pour l'étude préliminaire de ces espèces, afin de cibler les composés à isoler, nous avons employé la technique des réseaux moléculaires, avec une annotation réalisée à l'aide d'alcaloïdes de référence organisés sous forme d'une base de données interne au laboratoire (*Monoterpene Indole Alkaloids Database* ; MIADB). Nous avons contribué à la constitution de la MIADB. Ce travail a permis d'identifier rapidement et efficacement des composés connus contenus dans nos extraits bruts, sans avoir à les isoler. L'étude des nœuds voisins indique la présence d'analogues, pour lesquels des hypothèses structurales peuvent être émises. Faute de temps et de place, ces analyses plus spéculatives n'ont pas été présentées ici.

L'étude phytochimique de quatre extraits alcaloïdiques a conduit à l'isolement de vingt-huit alcaloïdes indolomonoterpéniques, dont quinze nouveaux, parmi lesquels 12 dimères et 3 monomères. Leur caractérisation a été réalisée à l'aide de techniques spectroscopiques (Résonance Magnétique Nucléaire, Spectrométrie de Masse, α_D , Infrarouge et dichroïsme circulaire).

Le bilan, en dehors des identifications sans isolement, est le suivant :

- *P. mutica* :

À partir de l'extrait alcaloïdique obtenu de l'écorce de tiges de *P. mutica*, le réseau moléculaire annoté par la MIADB a révélé cinq zones particulières (**A** à **D** et *selfloop*). 15

alcaloïdes indolomonoterpéniques ont été obtenus de cet extrait alcaloïdique dont 7 nouveaux et 8 connus (Figure 119). Les sept nouvelles molécules sont des *bis*-indoles, ils ont été ciblés et isolés dans les zones **C**, **D** et *selfloop* du réseau. Il s'agit de cinq dimères de type aspidofractane-aspidofractane dont quatre (**1-4**) sont décrits comme les premiers exemples d'alcaloïdes indolomonoterpéniques dimères d'aspidofractanes reliés par un pont méthylène (pléiokomenines A à D) ; le dernier (**5** ; bispléiocarpinium) présente une liaison simple C-3-C-5'. Les deux autres dimères isolés dans la zone **D** sont de type aspidofractane-éburnane et ont été caractérisés comme des analogues de la pléiomutine, il s'agit de la 6-oxopléiomutine (**6**) et de la *N*-oxydépléiomutine (**7**).

D'autre part, la pleiocarpamine que nous avons obtenue (une re-extraction a été réalisée en marge de ce travail, dans un but préparatif), a été employée au laboratoire comme point de départ pour l'hémisynthèse de la bipléiophylline, un alcaloïde dimérique complexe (voir sa structure en annexe MIADB).²¹²

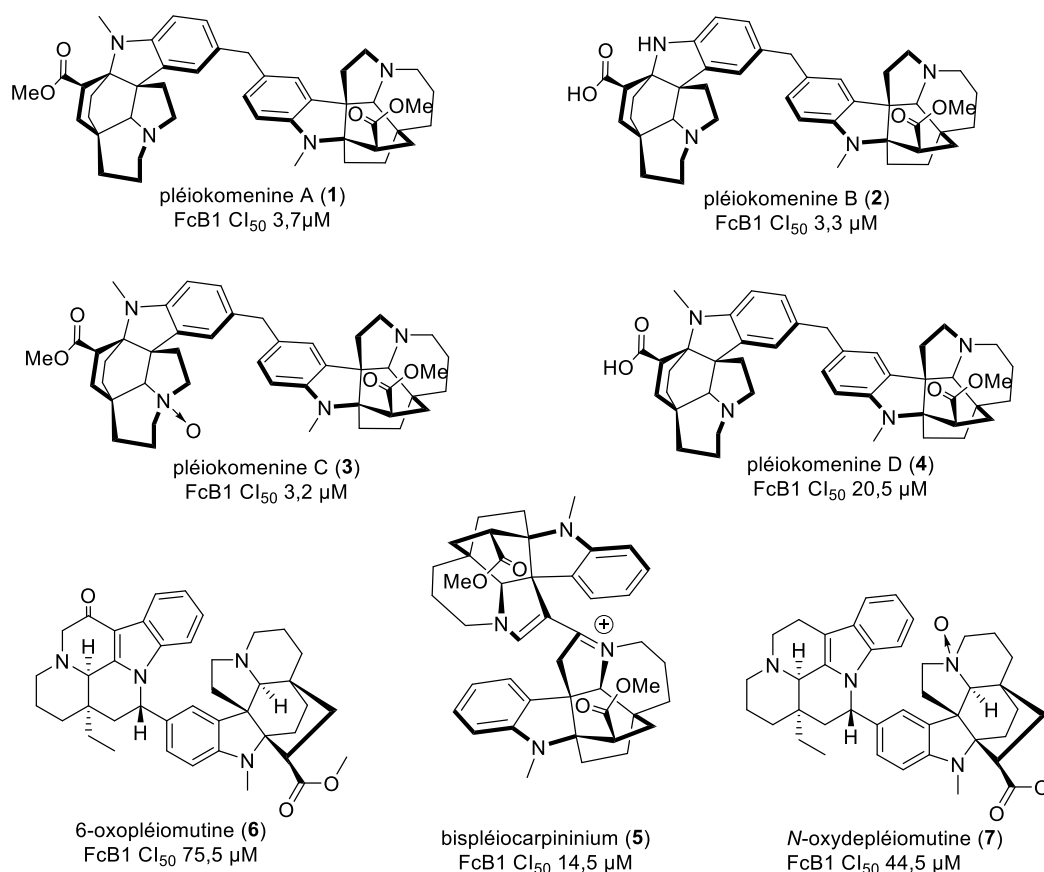


Figure 119. Structures des alcaloïdes isolées de *P. mutica*

²¹² Ce travail, réalisé par Lachkar *et al.*, sous la direction de E. Poupon, G. Vincent et L. Evanno, a été publié dans *Nature Chemistry* (*Nature Chemistry*, **2017**, 9, 793–798).

- *C. inaequalis* :

A partir de l'extrait alcaloïdique obtenu de l'écorce de tiges de *C. inaequalis*, le réseau moléculaire annoté par la MIADB a montré trois zones intéressantes (zones **A**, **B** et **C**). Au total de 5 alcaloïdes indolomonoterpéniques ont été isolés (Figure 120) dont 2 sont connus. Les 3 nouveaux composés ont été ciblés puis isolés à partir des zones **B** et **C**. Il s'agit d'abord de deux *bis*-indoles (**2-3**) de la série andrangine-tabersonine, analogues de la criophylline : l'hydroxy-criophylline (**2**) et l'hydrogénosulfate-criophylline (**3**) qui est le premier alcaloïde *bis*-indolomonoterpénique possédant un groupement sulfate. Un monomère, l'inaequalisine A (**5**), isolé ensuite, constitue le premier exemple d'alcaloïde indolomonoterpénique lié à une entité phénylpropène *via* une liaison C-C. Des analogues diversement substitués sont présents, d'après l'étude de ses voisins dans le réseau.

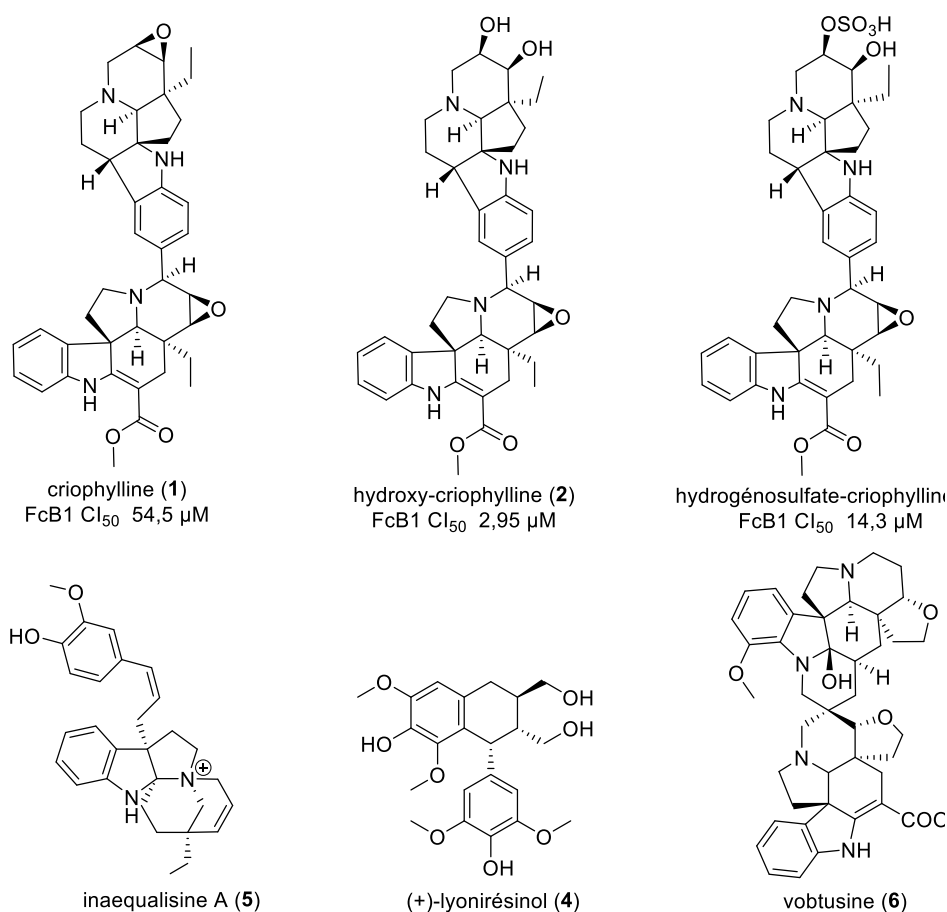


Figure 120. Structures des alcaloïdes isolées de *C. inaequalis*

- *M. brunonis* :

À partir de l'extrait alcaloïdique obtenu de l'écorce de tiges de *M. brunonis* (l'extrait de feuilles n'ayant pas été fractionné), le réseau moléculaire annoté par la MIADB a indiqué trois zones principales (**A**, **B** et **C**). Sept alcaloïdes indolomonoterpéniques ont été isolés (Figure 121). Trois de ces molécules sont connues : ce sont la gelsédine (**2**), la vobasine (**3**) et la gelsémicine (**4**). Les 4 nouveaux composés ont été isolés dans les zones **A** et **C**, il s'agit d'un monomère de type sarpagine la 16-*epi*-méthylester-panarine (**1**) et trois *bis*-indoles inédits de type vobasine-vobasine liés par un atome de soufre que nous avons nommés theionbrunonines A, B et C (**5**, **6** et **7**). Cette caractéristique est particulièrement originale, et fait écho à des composés monomériques rares substitués par un soufre non oxydé.

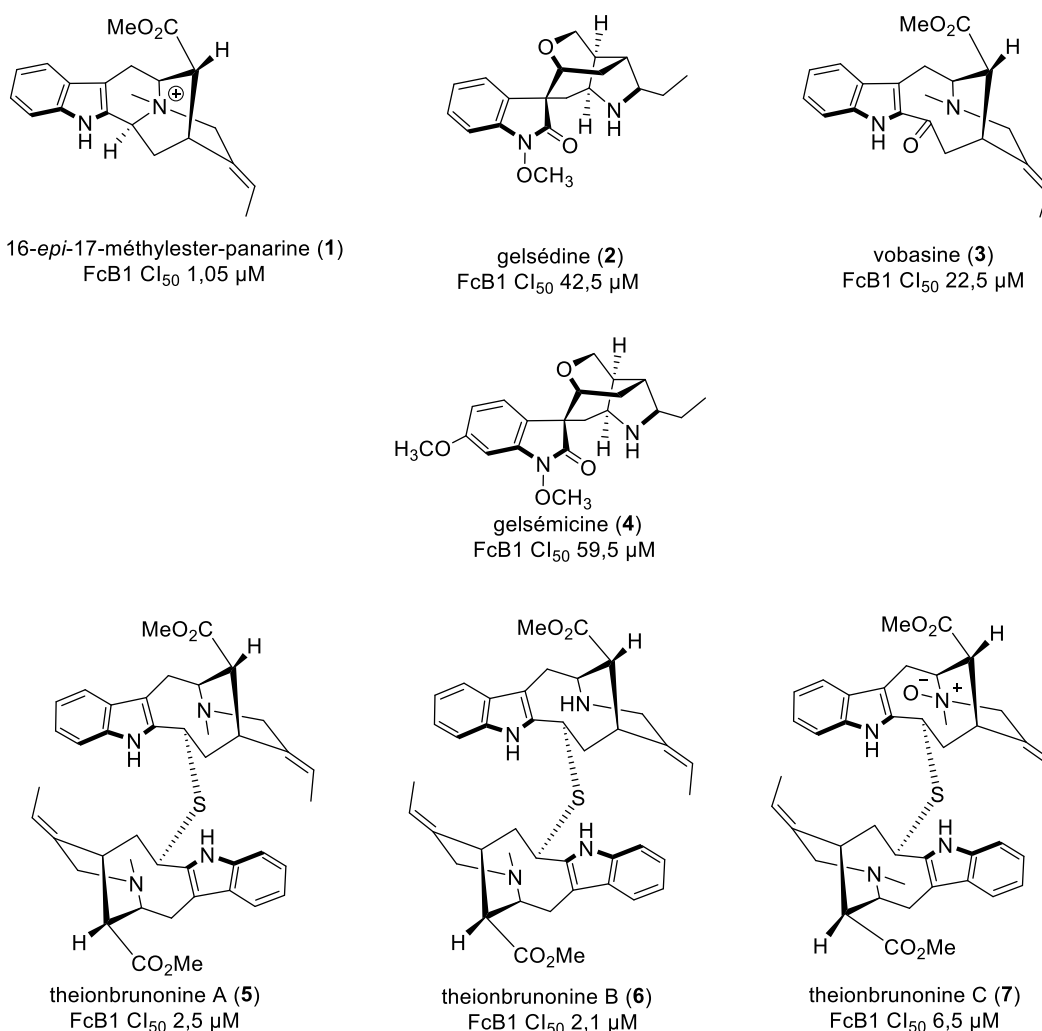


Figure 121. Structures des alcaloïdes isolées de *M. brunonis*

Des tests biologiques dans différents domaines ont été réalisés sur les extraits bruts et les 15

nouveaux composés isolés. Tous les résultats n'ont pas encore été obtenus.

Les tests de cytotoxicités réalisés sur 14 molécules isolées et sur l'extrait alcaloïdique de *Pleiocarpa mutica* contre trois lignées de cellules cancéreuses ou saines, en comparaison avec la doxorubicine, ne montrent qu'une faible cytotoxicité.

L'activité antiplasmodiale a été effectuée sur 19 molécules (13 nouvelles et 6 connues) contre la souche FcB1 de *P. falciparum*. Les résultats montrent que trois *bis*-indoles isolés de *M. brunonis* à savoir les theionbrunonines A à C, suivis des pléiokomenine A, C et D et de la hydroxy-criophylline, isolées respectivement de *P. mutica* et *C. inaequalis* ont présenté des activités intéressantes, sans cependant justifier de poursuite de leur étude, au regard de leur faible abondance. Il apparaît difficile d'effectuer des considérations de relations structure / activité au regard de l'hétérogénéité des composés obtenus.

L'activité antileishmanienne a été mesurée sur l'extrait alcaloïdique et 6 nouvelles molécules de *P. mutica*. La lignée LV9 de *Leishmania donovani* a été employée, sous forme d'amastigotes axéniques et d'amastigotes intramacrophagiques. Les CI_{50} sont de l'ordre du micromolaire. Les autres extraits et produits sont en cours d'évaluation.

En termes de perspectives, il serait intéressant d'intégrer les récents traitements de données²¹³ permettant de distinguer au sein des réseaux moléculaires les nœuds isobares tout en prenant en considération les temps de rétention. Par ailleurs, dans le but d'améliorer le ciblage des bisindoles lors de la déréplication, il serait judicieux de mettre au point un algorithme permettant de distinguer les dimères de sources des dimères vrais. En effet, on pourrait imaginer un outil permettant de corréler la présence d'un ion dichargé et d'un ion monochargé au sein d'un même spectre.

En conclusion, cette thèse a permis de valoriser la flore gabonaise par la caractérisation de molécules isolées de trois espèces récoltées dans différentes régions du pays. Elle a démontré leur intérêt comme source de nouveaux produits naturels et de composés aux activités intéressantes, pouvant probablement étayer en partie les emplois de *P. mutica*. Elle a contribué à une meilleure connaissance des capacités biosynthétiques des genres étudiés. Elle a en outre constitué une première approche de déréplication par les réseaux moléculaires au laboratoire, en démontrant l'efficacité de cette démarche pour la

²¹³ F. Olivon, et al., *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 7836-7840.

recherche de composés présentant une forte originalité structurale. D'autre part, ce travail a contribué à l'enrichissement de la MIADB. Cette thématique est actuellement poursuivie dans le cadre d'une autre thèse, et mériterait d'être appliquée à d'autres espèces des genres choisis ici, en particulier les *Mostuea*, assez mal connus. Le *Molecular networking* assisté par la MIADB saura probablement présenter un fort intérêt dans le cadre de considérations géographiques, taxonomiques et biosynthétiques.

Enfin, de nombreuses espèces de la flore gabonaise restent à caractériser d'un point de vue phytochimique, comme réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques très originales. Beaucoup des plantes employées actuellement en médecine traditionnelle au Gabon méritent une investigation (celle des plantes sélectionnées en première intention méritant d'être poursuivie), dans un cadre de recherche fondamentale ou appliquée, où les réseaux moléculaires peuvent constituer des outils utiles.

Bibliographie

Bibliographie

- <http://www.who.int/malaria/news/2015/governing-board-disbands-rbm-secretariat/en/> ; publié le 25/08/2015.
- MassBank <http://www.massbank.jp/> (11/10/2017).
- <http://www.hort.purdue.edu/ChineseMedicinals/newcrop/proceedings1990/v1-499.html> (18/10/2017).
- <http://www.nlm.nih.gov/hmd/index.html> (18/10/2017).
- <http://herbarium.naturalis.nl/gabon/> (03/11/2017).
- OMS. Aide-mémoire N°94, Novembre 2017.
- .
- DNP <http://dnp.chemnetbase.com> (18/10/2017).
- <http://apps.kew.org/herbcat/getImage.do?imageBarcode=K000028172> (03/09/2017).
- <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Apocynaceae/> (27/09/2017).
- <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Apocynaceae> (22/10/2018).
- <http://www.gbif.org/species/6701>. Répartition géographique du genre *Callichilia*. (08/09/2017).
- [who.int/iris/bitstream/10665/254892/1/ccs-gab-2016-2021-fr](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/254892/1/ccs-gab-2016-2021-fr) (18/09/2017).
- <http://www.who.int/campaigns/malaria-day/2016/fr/> (18/09/2017).
- [https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?fr=1&g=pe&p=Callichilia+barteri+\(Hook.f.\)+Stapf](https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?fr=1&g=pe&p=Callichilia+barteri+(Hook.f.)+Stapf) (25/10/2017).
- <http://www.biologydiscussion.com/angiosperm/dicotyledons/apocynaceae-characters-distribution-and-types/48288> (27/09/2017).
- <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2013/> (03/10/2017).
- http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/malaria2010_summary_keypoints_fr (20/09/2017).
- Metlin <https://metlin.scripps.edu/> (11/10/2017).
- <http://www.tela-botanica.org/apd-nn-71845-repartition> (28/09/2017).
- Reaxys <http://www.reaxys-com> (18/10/2017).
- <https://books.google.fr/books?isbn=3642540104> (28/03/2017).
- <http://imsear.hellis.org/handle/123456789/164014> (18/10/2017).
- APG II: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Bot. J. Linear Soc.*, 2003. **141**: p. 399-436.
- <https://gnps.ucsd.edu/> (24/11/2017).
- Achenbach, H. and K. Biemann, 10, 11-Dioxopleiocarpine, a new alkaloid from *pleiocarpa mutica* Benth. *Tetrahedron lett.*, 1965. **6**(36): p. 3239-3243.
- Achenbach, H. and K. Biemann, Isotuboflavine and norisotuboflavine. Two new alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica* Benth. *J. Am. Chem. Soc.*, 1965. **87**(18): p. 4177-4181.
- Achenbach, H. and K. Biemann, 10, 22-Dioxokopsane, N-Methyl-10, 22-dioxokopsane, and N-Carbomethoxy-10, 22-dioxokopsane. Three new alkaloids of *Pleiocarpa mutica* Benth. *J. Am. Chem. Soc.*, 1965. **87**(21): p. 4944-4950.
- Achenbach, H., M. Löwel, R. Waibel, M.P. Gupta, and P. Solis, 16-epi-Panarine, a new betaine-type alkaloid from *Stemmadenia minima*. *J. Nat. Prod.*, 1991. **54**(2): p. 473-476.
- Addae-Kyereme, J., S.L. Croft, H. Kendrick, and C.W. Wright, Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in-vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. *J. Ethnopharmacol.*, 2001. **76**(1): p. 99-103.
- Adjanohoun, E.J., *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Gabon*. 1984.
- Ahmad, K., Y. Hirasawa, A.E. Nugroho, A.H.A. Hadi, K. Takeya, N.F. Thomas, K. Awang, H. Morita, T.S. Ping, and M.A. Nafiah, New indole alkaloids from *Kopsia singapurensis* (Ridl.). *Open Conf. Proceedings J.*, 2013. **4**: p. 75-82.

- Akendengué, B., Medicinal plants used by the Fang traditional healers in Equatorial Guinea. *J. Ethnopharmacol.*, 1992. **37**(2): p. 165-173.
- Akendengué, B. and A. Louis, Medicinal plants used by the Masango people in Gabon. *J. Ethnopharmacol.*, 1994. **41**(3): p. 193-200.
- Allard, P.-M., T. Péresse, J. Bisson, K. Gindro, L. Marcourt, V.C. Pham, F. Roussi, M. Litaudon, and J.-L. Wolfender, Integration of molecular networking and *in-silico* MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Anal. Chem.*, 2016. **88**(6): p. 3317-3323.
- Allinger, N.L., Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. Am. Chem. Soc.*, 1977. **99**(25): p. 8127-8134.
- Ambroise-Thomas, P., Génomique, biologie moléculaire et paludisme: quelles avancées médicales? *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 2004. **97**(3): p. 155-160.
- Assob, J.C., H.L. Kamga, D.S. Nsagha, A.L. Njunda, P.F. Nde, E.A. Asongalem, A.J. Njouendou, B. Sandjon, and V.B. Penlap, Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon traditional medicine. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2011. **11**(1): p. 70.
- Attaran, M., E. Pasqualotto, T. Falcone, J.M. Goldberg, K.F. Miller, A. Agarwal, and R.K. Sharma, The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int. J. Fertil. WOM. Med.*, 2000. **45**(5): p. 314-320.
- Aubouy, A., M. Bakary, A. Keundjian, B. Mbomat, J.R. Makita, F. Migot-Nabias, M. Cot, J. Le Bras, and P. Deloron, Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2003. **47**(1): p. 231-237.
- Becke, A.D., Becke's three parameter hybrid method using the LYP correlation functional. *J. Chem. Phys.*, 1993. **98**: p. 5648-5652.
- Belgers, M., M. Leenaars, J. Homberg, M. Ritskes-Hoitinga, A. Schellekens, and C. Hooijmans, Ibogaine and addiction in the animal model, a systematic review and meta-analysis. *Transl. Psychiatry*, 2016. **6**(5): p. e826.
- Benayad, S., M.A. Beniddir, L. Evanno, and E. Poupon, Biomimetic assembly of leucoridine A. *Eur. J. Org. Chem.*, 2015. **2015**(9): p. 1894-1898.
- Beniddir, M.A., M.-T. Martin, M.-E.T.H. Dau, P. Rasoanaivo, F. Guéritte, and M. Litaudon, Bisindole alkaloid artifacts from *Gonioma malagasy*. *Tetrahedron Lett.*, 2013. **54**(17): p. 2115-2119.
- Bert, M., G. Baudouin, F. Tillequin, and M. Koch, Pagisulfine—The first sulfur-containing indole-monoterpene alkaloid. *Heterocycles*, 1986. **24**(6): p. 1567-1570.
- Bertrand, S., Y. Guitton, and C. Roullier, Successes and pitfalls in automated dereplication strategy using liquid chromatography coupled to mass spectrometry data: A CASMI 2016 experience. *Phytochemistry Lett.*, 2017. **21**: p. 297-305.
- Betti, J.L., D.M. Iponga, O.D. Yongo, D.O. Mbomio, C.M. Yobo, and A. Ngoy, Ethnobotanical study of medicinal plants of the Ipassa-Makokou Biosphere Reserve, Gabon: Plants used for treating malaria. *J. Med. Plant. Res.*, 2013. **7**(31): p. 2300-2318.
- Blasco, B., D. Leroy, and D.A. Fidock, Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat. Med.*, 2017. **23**(8): p. 917-928.
- Booker, A., D. Johnston, and M. Heinrich, Value chains of herbal medicines—Research needs and key challenges in the context of ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, 2012. **140**(3): p. 624-633.
- Borchardt, J.K., The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. *Drug News Perspect.*, 2002. **15**(3): p. 187-192.
- Bouslimani, A., L.M. Sanchez, N. Garg, and P.C. Dorrestein, Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Nat. Prod. Rep.*, 2014. **31**(6): p. 718-729.
- Bouyou-Akotet, M.K., D.P. Mawili-Mboumba, E. Kendjo, M. Mabika-Mamfoumbi, E.B. Ngoungou, A. Dzeing-Ella, M. Pemba-Mihindou, E. Ibinga, E. Efame-Eya, and T. Planche, Evidence of decline

- of malaria in the general hospital of Libreville, Gabon from 2000 to 2008. *Malaria J.*, 2009. **8**(1): p. 300.
- Breman, J.G., The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001. **64**(1_suppl): p. 1-11.
- Brink, M. and G. Belay, Plant resources of tropical Africa No. 1: Cereals and pulses. *Plant resources of tropical Africa No. 1: Cereals and pulses.*, 2006.
- Bruhn, T., Y. Hemberger, A. Schaumlöffel, and G. Bringmann, University of Wuerzburg, Germany. *SpecDis Version*, 2010. **1**: p. 51.
- Bruneton, J., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (5^e Ed.)*. 2016: Lavoisier.
- Bruneton, J., A. Bouquet, and A. Cavé, Alcaloides des feuilles du *Crioceras dipladeniiflorus*. *Phytochemistry*, 1974. **13**(9): p. 1963-1967.
- Brunken, U., M. Schmidt, S. Dressler, T. Janssen, A. Thiombiano, and G. Zizka, West African plants-A photo guide. *Forschungsinstitut Senckenberg*, 2008.
- Buchi, G., R. Manning, and F. Hochstein, Structure and synthesis of flavocarpine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1962. **84**(17): p. 3393-3397.
- Buckingham, J., K.H. Baggaley, A.D. Roberts, and L.F. Szabo, *Dictionary of Alkaloids, with CD-ROM*. 2010: CRC press.
- Bui, A.-M., B.C. Das, E. Guittet, and V. Stoven, Structure and stereochemistry of hazuntamine, a new bisindole alkaloid from *Hazunta modesta* var. *methuenii* subvar. *methuenii*. *Heterocycles*, 1994. **38**(5): p. 1025-1032.
- Buta, J.G. and M.J. Novak, Isolation of camptothecin and 10-methoxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* by gel permeation chromatography. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 1978. **17**(2): p. 160-161.
- Butler, M.S., F. Fontaine, and M.A. Cooper, Natural product libraries: assembly, maintenance, and screening. *Planta Med.*, 2014. **80**(14): p. 1161-1170.
- Cabral, R.S.A., P.-M. Allard, L. Marcourt, M.C.u.M. Young, E.F. Queiroz, and J.-L. Wolfender, Targeted isolation of indolopyridoquinazoline alkaloids from *Conchocarpus fontanesianus* based on molecular networks. *J. Nat. Prod.*, 2016. **79**(9): p. 2270-2278.
- Cavé, A., J. Bruneton, A. Ahond, A.-M. Bui, H.-P. Husson, C. Kan, G. Lukacs, and P. Potier, Structure analysis by ¹³C RMN spectroscopy of criophylline, a new dimeric indole alkaloid. *Tetrahedron Lett.*, 1973. **14**(51): p. 5081-5084.
- Chan, E.W.C., S.K. Wong, and H.T. Chan, Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties: a review of ten genera. *J. Integr. Med.*, 2016. **14**(4): p. 269-284.
- Chang, G., W.C. Guida, and W.C. Still, An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989. **111**(12): p. 4379-4386.
- Chase, M., M. Christenhusz, M. Fay, J. Byng, W. Judd, D. Soltis, D. Mabberley, A. Sennikov, P. Soltis, and P. Stevens, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linnean Soc.*, 2016. **181**(1): p. 1-20.
- Chase, M.W., NIST-JANAF thermochemical tables for oxygen fluorides. *J. Chem. Phys. Ref. Data*, 1996. **25**(2): p. 551-603.
- Chevalier, A., *Revue internationale de Botanique Appliquée et d'Agriculture tropicale*. *JATBA*, 1946. **26**(279): p. 1-2.
- Clark, R., *The Kew Tropical plant families identification handbook*. 2014. 60-61.
- Coates, C.J., Malaria: a mosquito transformed. *Nature*, 2000. **405**(6789): p. 900-902.
- DA, M., Avancées thérapeutiques contre le paludisme en 2003. *Méd. Trop.*, 2003. **63**(3): p. 267-270.
- Dai, J.-R., Y.F. Hallock, J.H. Cardellina, and M.R. Boyd, 20-O-β-Glucopyranosyl camptothecin from *Mostuea brunonis*: A potential camptothecin pro-drug with improved solubility. *J. Nat. Prod.*, 1999. **62**(10): p. 1427-1429.
- de Koning-Ward, T.F., P.R. Gilson, and B.S. Crabb, Advances in molecular genetic systems in malaria. *Nature Rev. Microbiol.*, 2015. **13**(6): p. 373-387.
- De Luca, V., V. Salim, A. Thamm, S.A. Masada, and F. Yu, Making iridoids/secoiridoids and

- monoterpenoid indole alkaloids: progress on pathway elucidation. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 2014. **19**: p. 35-42.
- De Smet, P.A., Some ethnopharmacological notes on African hallucinogens. *J. Ethnopharmacol.*, 1996. **50**(3): p. 141-146.
- Delaveau, P., *Plantes agressives et poisons végétaux*. 1974: Horizons de France.
- Desjardins, R.E., C. Canfield, J. Haynes, and J. Chulay, Quantitative assessment of antimalarial activity *in-vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chmother.*, 1979. **16**(6): p. 710-718.
- Dewick, P.M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Ed. 2009. 187-310.
- Dupont, F. and J. Guignard, *Abrégés de pharmacie. Botanique, les familles de plantes*. (15^e Ed.). 2012: Elsevier Masson: Paris.
- Ekanem, O., J. Weisfeld, L.A. Salako, B.L. Nahlen, E. Ezedinachi, O. Walker, J.G. Breman, O. Laoye, and K. Hedberg, Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine in Nigerian children. *Bull. World Health Organ.*, 1990. **68**(1): p. 45-52.
- Elderfield, R.C. and R.E. Gilman, Alkaloids of *Alstonia muelleriana*. *Phytochemistry*, 1972. **11**(1): p. 339-343.
- Éles, J., G. Kalaus, L. Szabo, A. Levai, I. Greiner, M. Kajtar-Peredy, P. Szabo, and C. Szantay, Synthesis of vinca alkaloids and related compounds 98. Oxidation with dimethyldioxirane of compounds containing the aspidosperman and quebrachamine ring system. A simple synthesis of (7S, 20S)-(+)-rhazidigenine and (2R, 7S, 20S)-(+)-rhazidine. *J. Heterocycl. Chem.*, 2002. **39**(4): p. 767-771.
- Endress, M., Apocynaceae: Brown and now. *Telopea*, 2004. **10**(2): p. 525-541.
- Endress, M.E., S. Liede-Schumann, and U. Meve, An updated classification for Apocynaceae. *Phytotaxa*, 2014. **159**(3): p. 175-194.
- Engwerda, C.R., G. Minigo, F.H. Amante, and J.S. McCarthy, Experimentally induced blood stage malaria infection as a tool for clinical research. *Trends Parasitol.*, 2012. **28**(11): p. 515-521.
- Erharuyi, O., A. Falodun, and P. Langer, Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Picralima nitida* (Apocynaceae) in tropical diseases: A review. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2014. **7**(1): p. 1-8.
- Evans, W., *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 16th Ed. 1996: London.
- Fox Ramos, A.E., C. Alcover, L. Evanno, A. Maciuk, M. Litaudon, C. Duplais, G. Bernadat, J.-F.o. Gallard, J.-C. Jullian, and E. Mouray, Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*. *J. Nat. Prod.*, 2017. **80**(4): p. 1007-1014.
- Frisch, M.J., 09, Revision A. 02. *Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT*, 2009.
- Gaillard, T., *Identification et validation de marqueurs moléculaires de la résistance de Plasmodium falciparum à la doxycycline*. 2015, Aix-Marseille.
- Gan, C.-Y., Y.-Y. Low, W.T. Robinson, K. Komiyama, and T.-S. Kam, Aspidospermatan–aspidospermatan and eburnane-sarpagine bisindole alkaloids from *Leuconotis*. *Phytochemistry*, 2010. **71**(11): p. 1365-1370.
- Gunatilaka, A.L., H.C. Fernando, M.M. Qureshi, and S. Balasubramaniam, Neisosposinine: A new oxindole alkaloid from *Neisosperma oppositifolia* [Apocynaceae]. *Heterocycles*, 1989. **28**(2): p. 999-1005.
- Hart, N., S. Johns, and J. Lambertson, Tertiary alkaloids of *Alstonia spectabilis* and *Alstonia glabriflora* (Apocynaceae). *Austr. J. Chem.*, 1972. **25**(12): p. 2739-2741.
- Hedberg, I., O. Hedberg, P.J. Madat, K.E. Mshigeni, E. Mshiu, and G. Samuelsson, Inventory of plants used in traditional medicine in Tanzania. II. Plants of the families Dilleniaceae—Opiliaceae. *J. Ethnopharmacol.*, 1983. **9**(1): p. 105-127.
- Henri, B.B., Approches sur la contribution des médicaments traditionnels améliorés dans les soins de santé primaires: étude des cas. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 2004. **13**: p. 35-48.
- Hirasawa, Y., S. Miyama, T. Hosoya, K. Koyama, A. Rahman, I. Kusumawati, N.C. Zaini, and H. Morita,

- Alasmontamine A, a first tetrakis monoterpene indole alkaloid from *Tabernaemontana elegans*. *Org. Lett.*, 2009. **11**(24): p. 5718-5721.
- Itoh, A., Y. Ikuta, T. Tanahashi, and N. Nagakura, Two Alangium alkaloids from *Alangium I amarckii*. *J. Nat. Prod.*, 2000. **63**(5): p. 723-725.
- Jeong, E.J., J.H. Cho, S.H. Sung, S.Y. Kim, and Y.C. Kim, Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 macrophage cells by lignans isolated from *Euonymus alatus* leaves and twigs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011. **21**(8): p. 2283-2286.
- Jiao, Z. and J. Li, Phylogeny of intercontinental disjunct Gelsemiaceae inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Syst. Botany*, 2007. **32**(3): p. 617-627.
- Jin, G.-L., Y.-P. Su, M. Liu, Y. Xu, J. Yang, K.-J. Liao, and C.-X. Yu, Medicinal plants of the genus *Gelsemium* (Gelsemiaceae, Gentianales)—a review of their phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use. *J. Ethnopharmacol.*, 2014. **152**(1): p. 33-52.
- Jonckheere, F., *Le papyrus médical Chester Beatty*. Vol. 2. 1947: Fondation égyptologique reine Élisabeth.
- Kam, T.-S., H. Iek, and Y.-M. Choo, Alkaloids from the stem-bark of *Alstonia macrophylla*. *Phytochemistry*, 1999. **51**(6): p. 839-844.
- Kam, T.S. and K.M. Sim, Vobasonidine and vobatricine, novel bisindole alkaloids from a Malayan *Tabernaemontana*. *Helv. Chim. Acta*, 2002. **85**(4): p. 1027-1032.
- Kiang, A. and B. Douglas, A Phytochemical Survey Part I Alkaloids. *Malayan Pharm. J.*, 1957. **6**: p. 138.
- Kitajima, M., T. Nakamura, N. Kogure, M. Ogawa, Y. Mitsuno, K. Ono, S. Yano, N. Aimi, and H. Takayama, Isolation of gelsedine-type indole alkaloids from *Gelsemium elegans* and evaluation of the cytotoxic activity of gelsemium alkaloids for A431 epidermoid carcinoma cells. *J. Nat. Prod.*, 2007. **70**(1): p. 142-142.
- Kitajima, M., T. Nakamura, N. Kogure, M. Ogawa, Y. Mitsuno, K. Ono, S. Yano, N. Aimi, and H. Takayama, Isolation of gelsedine-type indole alkaloids from *Gelsemium elegans* and evaluation of the cytotoxic activity of gelsemium alkaloids for A431 epidermoid carcinoma cells. *J. Nat. Prod.*, 2006. **69**(4): p. 715-718.
- Klayman, D.L., Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 1985. **228**: p. 1049-1056.
- Klayman, D.L., A.J. Lin, N. Acton, J.P. Scovill, J.M. Hoch, W.K. Milhous, A.D. Theoharides, and A.S. Dobek, Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *J. Nat. Prod.*, 1984. **47**(4): p. 715-717.
- Klein-Júnior, L.C., S. Cretton, P.-M. Allard, G.g. Genta-Jouve, C.S. Passos, J. Salton, P. Bertelli, M. Pupier, D. Jeannerat, and Y.V. Heyden, Targeted Isolation of Monoterpene Indole Alkaloids from *Palicourea sessilis*. *J. Nat. Prod.*, 2017: p. sous presse.
- Komlaga, G., C. Agyare, R.A. Dickson, M.L.K. Mensah, K. Annan, P.M. Loiseau, and P. Champy, Medicinal plants and finished marketed herbal products used in the treatment of malaria in the Ashanti region, Ghana. *J. Ethnopharmacol.*, 2015. **172**: p. 333-346.
- Kruegel, A.C. and O. Grundmann, The medicinal chemistry and neuropharmacology of kratom: A preliminary discussion of a promising medicinal plant and analysis of its potential for abuse. *Neuropharmacol.*, 2017. sous presse.
- Kump, W. and H. Schmid, Über die alkaloides von *Pleiocarpa mutica* Benth. *Helv. Chim. Acta*, 1961. **44**(6): p. 1503-1516.
- Kunesch, N., Y. Rolland, J. Poisson, P. Majumder, N. Raychaudhuri, R. Majumder, A. Chatterjee, V.C. Agwada, J. Naranjo, and M. Hesse, Structure d'alcaloïdes indoliques doubles d'un type nouveau. *Helv. Chim. Acta*, 1977. **60**(8): p. 2854-2859.
- Lachkar, D., N. Denizot, G. Bernadat, K. Ahamada, M.A. Beniddir, V. Dumontet, J.-F. Gallard, R. Guillot, K. Leblanc, and E.O. N'ngang, Unified biomimetic assembly of voacalpine A and bipleiophylline via divergent oxidative couplings. *Nature Chemistry*, 2017. **9**: p. 793-798.
- Lamidi, M., C. Eyele Mve Mba, L. Nze-Ekekang, and G. Balansard, Plantes antipaludiques: enquêtes auprès de tradipraticiens dans trois régions du Gabon. . *Actes du 4^e Congrès Européen*

- d'Ethnopharmacologie*, 2002: IRD Ed.
- Lamien-Meda, A., M. Kiendrebeogo, M. Compaoré, R.N. Meda, M. Bacher, K. Koenig, T. Pacher, H.-P. Fuehrer, H. Noedl, and M. Willcox, Quality assessment and antiplasmodial activity of West African *Cochlospermum* species. *Phytochemistry*, 2015. **119**: p. 51-61.
- Le Bras, M. and D. Malvy, Le paludisme à l'heure du «Roll Back Malaria». *Med. Trop.*, 2004. **64**, : p. 576-578.
- Lee, C., W. Yang, and R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 1988. **37**(2): p. 785-789.
- Lekana-Douki, J.B., J.B. Bongui, S.L.O. Liabagui, S.E.Z. Edou, R. Zatra, U. Bisvigou, P. Druilhe, J. Lebib, F.S.T. Ndouo, and M. Kombila, *In-vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of nine plants traditionally used in Gabon. *J. Ethnopharmacol.*, 2011. **133**(3): p. 1103-1108.
- Lekana-Douki, J.B., S.T.-N. Fousseyni, and D. Bhattacharya, Etude comparative de la toxicité des extraits de deux espèces de *Alstonia* (Apocynaceae) utilisées traditionnellement au Gabon pour soigner le paludisme. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 2016. **17**(2): p. 19-22.
- Liu, J.C., The alkaloids of chinese gelsemium, kou w en, *Gelsemium elegans*. BTH. *China" Journal*, 1931. **5**(4): p. 345-352.
- Lovell, F., R. Pepinsky, and A. Wilson, X-ray analysis of the structure of gelsemine hydrohalides. *Tetrahedron Lett.*, 1959. **1**(4): p. 1-5.
- Maghendji-Nzondo, S., H. Nzoughe, G.J. Lemamy, L.C. Kouna, I. Pegha-Moukandja, F. Lekoulou, B. Mbatchi, F. Toure-Ndouo, and J.B. Lekana-Douki, Prevalence of malaria, prevention measures, and main clinical features in febrile children admitted to the Franceville Regional Hospital, Gabon. *Parasite*, 2016. **23**.
- Makita-Ikouaya, E., J.-M. Milleliri, and J.-P. Rudant, Place de la médecine traditionnelle dans le système de soins des villes d'Afrique subsaharienne: le cas de Libreville au Gabon. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 2010. **20**(4): p. 179-188.
- Mao, W., P. Daligaux, N. Lazar, T. Ha-Duong, C. Cavé, H. van Tilbeurgh, P.M. Loiseau, and S. Pomel, Biochemical analysis of leishmanial and human GDP-Mannose Pyrophosphorylases and selection of inhibitors as new leads. *Sci Rep.*, 2017. **7**: p. 751.
- Marra, F., J.R. Salzman, and M.H. Ensom, Atovaquone–proguanil for prophylaxis and treatment of malaria. *Ann. Pharmacother.*, 2003. **37**(9): p. 1266-1275.
- Mawili-Mboumba, D.P., M.K. Bouyou-Akotet, and M. Kombila, Parental administration of unprescribed antimalarial drugs to treat febrile children in Gabon. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 2012. **21**(3): p. 127-131.
- Mbouangouere, R., P. Tane, D. Ngamga, P. Djemgou, M. Choudhary, and B. Ngadjui, Piptaderol from *Piptadenia africana*. *AJTCAM*, 2008. **4**(3): p. 294-298.
- Millet, P., Quel avenir pour les antipaludiques?: Paludisme. *Rev. Prat*, 2005. **55**(8): p. 875-879.
- Minodier, P., G. Noël, P. Blanc, N. Tsaregorodtseva, K. Retornaz, and J. Garnier, La chimioprophylaxie antipaludéenne de l'enfant voyageur. *Arch. Ped.*, 2005. **12**(1): p. 53-58.
- Mohamadi, F., N.G. Richards, W.C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, and W.C. Still, MacroModel—an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J. Comput. Chem.*, 1990. **11**(4): p. 440-467.
- Morton, J.F., *Atlas of medicinal plants of Middle America: Bahamas to Yucatan*. 1981: Charles C. Thomas. Pub Ltd.
- Mosihuzzaman, M. and M.I. Choudhary, Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 2008. **80**(10): p. 2195-2230.
- Nazar, N., D.J. Goyder, J.J. Clarkson, T. Mahmood, and M.W. Chase, The taxonomy and systematics of Apocynaceae: where we stand in 2012. *Bot. J. Linn. Soc.*, 2013. **171**(3): p. 482-490.
- Ndong, J.M.M., C. Atteke, A. Aubouy, M. Bakary, J. Lébib, and P. Deloron, *In-vitro* activity of chloroquine, quinine, mefloquine and halofantrine against Gabonese isolates of *Plasmodium*

- falciparum*. *Tropical Medicine & International Health*, 2003. **8**(1): p. 25-29.
- Noté, O.P., A.L. Tapondjou, A.-C. Mitaine-offer, T. Miyamoto, D.E. Pegnyemb, and M.-A. Lacaille-Dubois, Triterpenoid saponins from *Piptadeniastrum africanum* (Hook. f.) Brenan. *Phytochem Lett*, 2013. **6**(4): p. 505-510.
- Nothias-Scaglia, L.-F., M. Esposito, J. Costa, J. Paolini, D. Touboul, and M. Litaudon, Les réseaux moléculaires, une approche bio-informatique globale pour interpréter les données de spectrométrie de masse tandem. *Spectra Analyse*, 2015. **307**: p. 73-78.
- Nsimba, B., V. Guiyedi, M. Mabika-Mamfoumbi, J.R. Mourou-Mbina, E. Ngoungou, M. Bouyou-Akotet, R. Loembet, R. Durand, J. Le Bras, and M. Kombila, Sulphadoxine/pyrimethamine versus amodiaquine for treating uncomplicated childhood malaria in Gabon: a randomized trial to guide national policy. *Malar. J.*, 2008. **7**(1): p. 31.
- Nugroho, A.E., Y. Hirasawa, N. Kawahara, Y. Goda, K. Awang, A.H.A. Hadi, and H. Morita, Bisnicalaterine A, a Vobasine– Vobasine bisindole alkaloid from *Hunteria zeylanica*. *J. Nat. Prod.*, 2009. **72**(8): p. 1502-1506.
- Nyunai, N. and N. Njifutié, *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand and H. Durand. [Internet] Record from PROTA4U. Schmelzer, GH and Gurib-Fakim, A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen. 2006.
- Nzila, A., The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006. **57**(6): p. 1043-1054.
- O'Connor, S.E. and J.J. Maresh, Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.*, 2006. **23**(4): p. 532-547.
- Olivier, D., S. Van Vuuren, and A. Moteetee, *Annickia affinis* and *A. chlorantha* (Enantia chlorantha)—a review of two closely related medicinal plants from tropical Africa. *J. Ethnopharmacol.*, 2015. **176**: p. 438-462.
- Olivon, F., G. Grelier, F. Roussi, M. Litaudon, and D. Touboul, MZmine 2 data-preprocessing to enhance Molecular Networking reliability. *Anal. Chem.*, 2017. **89**(15): p. 7836-7840.
- Omino, E., *A contribution to the leaf anatomy and taxonomy of Apocynaceae in Africa. The leaf anatomy of Apocynaceae in East Africa; A monograph of Pleiocarpinae (Series of revisions of Apocynaceae XLI)*. 1996.
- Omoyeni, O.A., A.A. Hussein, E. Iwuoha, and I.R. Green, A review of the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the *Pleiocarpa* genus. *Phytochem. Rev.*, 2017. **16**(1): p. 97-115.
- OMS, *World malaria report 2009*. Geneva: World Health Organization View Article Google Scholar. 2010.
- OMS, *The world health report 2006: working together for health*. 2006: world Health Organization.
- OMS, *Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023*. Genève, Organisation mondiale de la santé. 2013.
- OMS, *Rapport sur le paludisme dans le monde 2015: résumé*. 2016.
- OMS, *WHO traditional medicine strategy 2002-2005*, World Health Organization. 2002.
- Onanga, M., *Alcaloïdes du Mostuea brunonis (Loganiacées): isolement, structure, synthèse*. 1983, Thèse Université Paris Sud.
- Onguéné, P.A., F. Ntie-Kang, L.L. Lifongo, J.C. Ndom, W. Sippl, and L.M.a. Mbaze, The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants. Part I: A pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. *Malar. J.*, 2013. **12**(1): p. 449.
- Orabueze, C., S. Adesegun, D. Ota, and H. Coker, Evaluation of analgesic activities of methanolic extract of *Callichilia stenosepala* root bark. *Planta Med.*, 2014. **80**(10): p. PP18.
- Orabueze, C.I., S. Adesegun, H. Coker, S. Ogonnia, and D. Ota, Antimalarial activity of root bark extract and fractions of *callichilia stenopetala* Stapf (Apocynaceae) against *Plasmodium berghei* in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 2016. **11**(2): p. 1-9.
- Otogo N'Nang Obiang, E., G.g. Genta-Jouve, J.-F.o. Gallard, B. Kumulungui, E. Mouray, P. Grellier, L. Evanno, E. Poupon, P. Champy, and M.A. Beniddir, Pleiokomenines A and B: Dimeric

- aspidofractinine alkaloids tethered with a methylene group. *Org. Lett.*, 2017. **19**: p. 6180-6183.
- Pachaly, P., A. Kroll-Horstmann, and K. Sin, Angelicastigmin, a new eserine alkaloid from *Angelica polymorpha*. *Pharmazie*, 2000. **55**(10): p. 777-778.
- Poisson, J., M. Plat, H. Budzikiewicz, L. Durham, and C. Djerassi, Alcaloides du *callichilia subsessilis* stapf.—II: Structure partielle de la vobtusine. *Tetrahedron*, 1966. **22**(3): p. 1075-1094.
- Polak, E. and G. Ribiere, Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées. *Rev. Fr. Inf. Rech. Oper.*, 1969. **3**(16): p. 35-43.
- Prance, G.T., Richard Evans Schultes (12 January 1915–10 April 2001): A Tribute. *Econ. Bot.*, 2001. **55**(3): p. 347-362.
- Qi, Z. and E. Kelley, The WHO traditional medicine strategy 2014–2023: a perspective. *Science*, 2014. **346**(6216): p. S5-S6.
- Qureshi, A. and D.J. Faulkner, Haplosamates A and B: new steroidal sulfamate esters from two haplosclerid sponges. *Tetrahedron*, 1999. **55**(28): p. 8323-8330.
- Rahman, A.-u., S. Khanum, Y. Badar, K. Fatima, and Y. Ahmad, N-Methyl Strictamine—A new alkaloid from the leaves of *Rhazya stricta*. *Z. Naturforsch. B Chem. Sci.*, 1987. **42**(1): p. 91-93.
- Ramesha, B., H. Suma, U. Senthilkumar, V. Priti, G. Ravikanth, R. Vasudeva, T.S. Kumar, K. Ganeshiah, and R.U. Shaanker, New plant sources of the anti-cancer alkaloid, camptothecine from the Icacinaceae taxa, India. *Phytomedicine*, 2013. **20**(6): p. 521-527.
- Ramharter, M., W. Wernsdorfer, and P. Kremsner, *In-vitro* activity of quinolines against *Plasmodium falciparum* in Gabon. *Acta tropica*, 2004. **90**(1): p. 55-60.
- Raponda-Walker, A. and R. Sillans, *Les plantes utiles du Gabon*. Quarterly Journal of Crude Drug Research. Vol. 1. 1961. 27-27.
- Refugio-Rodriguez, N.F. and R.G. Olmstead, Phylogeny of Lamiidae. *Am. J. Bot.*, 2014. **101**(2): p. 287-299.
- Renner, U., Vobasin und Voacryptin, zwei neue Alkaloide aus *Voacanga africana* Stapf. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1959. **15**(5): p. 185-186.
- Saar, Y., A. Ransford, E. Waldman, S. Mazareb, S. Amin-Spector, J. Plumblee, S.J. Turco, and D. Zilberstein, Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1998. **95**(1): p. 9-20.
- Said, I.M., L.B. Din, N.I. Yusoff, C.W. Wright, Y. Cai, and J.D. Phillipson, A new alkaloid from the roots of *Alstonia angustifolia*. *J. Nat. Prod.*, 1992. **55**(9): p. 1323-1324.
- Saslis-Lagoudakis, C.H., V. Savolainen, E.M. Williamson, F. Forest, S.J. Wagstaff, S.R. Baral, M.F. Watson, C.A. Pendry, and J.A. Hawkins, Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. PNAS*, 2012. **109**(39): p. 15835-15840.
- Schmelzer, G.H. and A. Gurib-Fakim, *Plant resources of tropical Africa*. Medicinal plants. Vol. 1. 2008.
- Schmidt, U., R.J. Hajjar, and J.K. Gwathmey, The force—interval relationship in human myocardium. *J. Card. Fail.*, 1995. **1**(4): p. 311-321.
- Schun, Y. and G.A. Cordell, Cytotoxic steroids of *Gelsemium sempervirens*. *J. Nat. Prod.*, 1987. **50**(2): p. 195-198.
- Schun, Y., G.A. Cordell, and M. Garland, 21-oxogelsevirine, a new alkaloid from *Gelsemium rankinii*. *J. Nat. Prod.*, 1986. **49**(3): p. 483-487.
- Schymanski, E.L., J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H.P. Singer, and J. Hollender, Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.*, 2014. **48**(4): p. 2097-2098.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 2003. **13**(11): p. 2498-2504.
- Shaw, D., L. Graeme, D. Pierre, W. Elizabeth, and C. Kelvin, Pharmacovigilance of herbal medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 2012. **140**(3): p. 513-518.
- Simões, A.O., M.E. Endress, and E. Conti, Systematics and character evolution of *Tabernaemontaneae*

- (Apocynaceae, Rauvolfioideae) based on molecular and morphological evidence. *Taxon*, 2010. **59**(3): p. 772-790.
- Singh, B., L.K. Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S.S. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas, and D.J. Conway, A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 2004. **363**(9414): p. 1017-1024.
- Stein, S.E. and D.R. Scott, Optimization and testing of mass spectral library search algorithms for compound identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1994. **5**(9): p. 859-866.
- Still, W.C., A. Tempczyk, R.C. Hawley, and T. Hendrickson, Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990. **112**(16): p. 6127-6129.
- Struwe, L., V.A. Albert, and B. Bremer, Cladistics and family level classification of the Gentianales. *Cladistics*, 1994. **10**(2): p. 175-206.
- Struwe, L., V.L. Soza, S. Manickam, and R.G. Olmstead, Gelsemiaceae (Gentianales) expanded to include the enigmatic Asian genus *Pteleocarpa*. *Bot. J. Linn. Soc.*, 2014. **175**(4): p. 482-496.
- Sulyok, M., T. Rückle, A. Roth, R.E. Mürbeth, S. Chalou, N. Kerr, S.S. Samec, N. Gobeau, C.L. Calle, and J. Ibáñez, DSM265 for *Plasmodium falciparum* chemoprophylaxis: a randomised, double blinded, phase 1 trial with controlled human malaria infection. *Lancet Infect Dis*, 2017. **17**(6): p. 636-644.
- Tatsis, E.C., I. Carqueijeiro, T.D. de Bernonville, J. Franke, T.-T.T. Dang, A. Oudin, A. Lanoue, F. Lafontaine, A.K. Stavrinides, and M. Clastre, A three enzyme system to generate the *Strychnos* alkaloid scaffold from a central biosynthetic intermediate. *Nat. Commun.*, 2017. **8**(1): p. 316.
- Thomas, D.W., H. Achenbach, and K. Biemann, 15-(14'-eburnamyl) pleiocarpinine (pleiomutine). A new dimeric indole alkaloid from *Pleiocarpa mutica* Benth. *J. Am. Chem. Soc.*, 1966. **88**(7): p. 1537-1544.
- Towns, A.M., D. Quiroz, L. Guinee, H. de Boer, and T. van Andel, Volume, value and floristic diversity of Gabon's medicinal plant markets. *J. Ethnopharmacol.*, 2014. **155**(2): p. 1184-1193.
- Tsabang, N., P.V.T. Fokou, L.R.Y. Tchokouaha, B. Noguem, I. Bakarnga-Via, M.S.D. Nguépi, B.A. Nkongmeneck, and F.F. Boyom, Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *J. Ethnopharmacol.*, 2012. **139**(1): p. 171-180.
- Tsao, D.P.N., J. Rosecrans, J. Defeo, and H. Youngken, A note on the biological activity of root extracts from *Pleiocarpa mutica* Benth.(Apocynaceae). *Econ. Bot.*, 1961. **15**(1): p. 99-103.
- Van Wyk, B.-E., A review of commercially important African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 2015. **176**: p. 118-134.
- Wang, L., J.-F. Wang, X. Mao, L. Jiao, and X.-J. Wang, Gelsedine-type oxindole alkaloids from *Gelsemium elegans* and the evaluation of their cytotoxic activity. *Fitoterapia*, 2017. **120**: p. 131-135.
- Wang, M., J.J. Carver, V.V. Phelan, L.M. Sanchez, N. Garg, Y. Peng, D.D. Nguyen, J. Watrous, C.A. Kapon, and T. Luzzatto-Knaan, Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.*, 2016. **34**(8): p. 828-837.
- Wang, Z., S.M. Plakas, K.R. El Said, E.L. Jester, H.R. Granade, and R.W. Dickey, LC/MS analysis of brevetoxin metabolites in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Toxicon*, 2004. **43**(4): p. 455-465.
- Wells, T.N., Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? *Malar. J.*, 2011. **10**(1): p. S3.
- Wells, T.N., R.H. Van Huijsduijnen, and W.C. Van Voorhis, Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015. **14**(6): p. 424-442.
- Willcox, M., Improved traditional phytomedicines in current use for the clinical treatment of malaria. *Planta Med*, 2011. **77**(06): p. 662-671.
- Willcox, M., F. Benoit-Vical, D. Fowler, G. Bourdy, G. Burford, S. Giani, R. Graziose, P. Houghton, M.

- Randrianarivehojosa, and P. Rasoanaivo, Do ethnobotanical and laboratory data predict clinical safety and efficacy of anti-malarial plants? *Malar. J.*, 2011. **10**(1): p. S7.
- Willcox, M., G. Bodeker, P. Rasoanaivo, and J. Addae-Kyereme, *Traditional medicinal plants and malaria*. 2004: CRC Press.
- Willcox, M.L., S. Burton, R. Oyweka, R. Namyalo, S. Challand, and K. Lindsey, Evaluation and pharmacovigilance of projects promoting cultivation and local use of *Artemisia annua* for malaria. *Malar. J.*, 2011. **10**(1): p. 84.
- Wright, C.W., Recent developments in research on terrestrial plants used for the treatment of malaria. *Nat. Prod. Rep.*, 2010. **27**(7): p. 961-968.
- Wu, Y., M. Kitajima, N. Kogure, Y. Wang, R. Zhang, and H. Takayama, Kopsiyunnanines F and isocondylocarpines: new tubotaiwine-type alkaloids from Yunnan *Kopsia arborea*. *J Nat Med*, 2009. **63**(3): p. 283-289.
- Yang, J.Y., L.M. Sanchez, C.M. Rath, X. Liu, P.D. Boudreau, N. Bruns, E. Glukhov, A. Wodtke, R. De Felicio, and A. Fenner, Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.*, 2013. **76**(9): p. 1686-1699.
- Yang, Y.L., F.R. Chang, and Y.C. Wu, Annosqualine: a Novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa*. *Helv. Chim. Acta*, 2004. **87**(6): p. 1392-1399.
- Zeches, M., G. Lukacs, G.M.L. Le Men-Olivier, and M.-M. Debray, Bisindole alkaloids of *Pandaca caducifolia*. *J. Nat. Prod.*, 1982. **45**(6): p. 707-713.
- Zhu, G.-Y., X.-J. Yao, L. Liu, L.-P. Bai, and Z.-H. Jiang, Alistonitrine A, a caged monoterpene indole alkaloid from *Alstonia scholaris*. *Org. Lett.*, 2014. **16**(4): p. 1080-1083.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Plantes récoltées – synonymies, numéros d'herbier.

Récoltes initiales :

Les numéros d'herbier correspondent à l'enregistrement à l'herbier national du Gabon (Libreville). Les noms d'espèces ont été vérifiés en octobre 2017, sur le site « *The Plant List* ».

- ***Annickia chlorantha* (Oliv.) Setten et Maas (Annonaceae)** (accepté) ;

– Synonymes :

Enantia chlorantha Oliv. ;

Enantia chlorantha var. *soyauxii* Engl. & Diels ;

Enantia chlorantha var. *soyauxii* Engler & Diels ;

Xylopia otunga Exell.

→ Numéro d'herbier : E.O.N. n°0005.

- ***Dichaetanthera africana* Jacq.-Fél. (Melastomataceae)** (accepté) ;

– Synonyme : *Sakersia africana* Hook. f. ;

→ Numéro d'herbier : E.O.N. n°0002

- ***Diodia sarmentosa* Sw.** (Rubiaceae ; nom d'enregistrement de l'échantillon dans l'herbier national du Gabon) ;

– Nom accepté : *Diodella sarmentosa* (Sw.) Bacigalupo & Cabral ex Borhidi ;

– Synonymes :

Diodia auriculosa Bertol. ;

Diodia breviseta Benth. ;

Diodia littoralis Peyr. ;

Diodia pilosa Schumach. & Thonn. ;

Diodia riparia Sagot ex K.Schum. ;

Diodia sarmentosa var. *bisepala* Bremek. ;

Spermacoce pilosa (Schumach. & Thonn.) DC. ;

Spermacoce radula Spreng. [Illégitime] ;

Spermacoce spinosa Kölpin [Illégitime] ;

Spermacoce suffruticosa L. ;

→ Numéro d'herbier : E.O.N. N°0001.

- ***Emilia lisowskiana* C.Jeffrey** (Asteraceae) (accepté) ;

→ Numéro d'herbier : E.O.N. n°0003

- ***Harungana madagascariensis* Lam Ex Poir** (Hypericaceae) (accepté)

– Synonymes :

Arungana paniculata Pers. ;

Haemocarpus paniculatus Spreng. (non résolu) ;

Haronga madagascariensis (Lam. ex Poir.) Choisy ;

Haronga paniculata Lodd. ex Steud. ;

Haronga paniculata f. *oblongifolia* Engl. ;

Haronga paniculata var. *oblongifolia* Engler ex De Wild. ;

Haronga pubescens Steud. ;

Harungana paniculata (Pers.) Lodd. ex Steud. ;

Harungana paniculata Pers. ;

Harungana pubescens Poir. (non résolu) ;

Psorospermum leonense Turcz. (non résolu) ;

→ Numéro d'herbier : E.O.N. n°0007.

- ***Piptadeniastrum africana* Hook.F.Brenav** (Fabaceae ; nom d'enregistrement de l'échantillon dans l'herbier national du Gabon) ;

– Nom accepté : *Piptadeniastrum africanum* (Hook.f.) Brenan ;

– Synonyme : *Piptadeniastrum africanum* var. *africanum* [sans précision de descripteur] ;

→ Numéro d'herbier : E.O.N. n°0006.

- ***Pseudospondias* sp.** (Anacardiaceae) – espèce non déterminée ;

→ Numéro d'herbier : E.O.N. n°0004.

- ***Zanthoxylum macrophyllum* Nutt.** (Rutaceae ; nom d'enregistrement de l'échantillon dans l'herbier national du Gabon) ;

– Nom accepté : *Zanthoxylum clava-herculis* L. ;

– Synonymes :

Pseudopetalon glandulosum Raf. ;

Pseudopetalon tricarpum (Michx.) Raf. ;

Zanthoxylum aromaticum Willd. ;

Zanthoxylum hidalgense Lundell ;

Zanthoxylum macrophyllum Nutt. ;

Zanthoxylum tricarpum Michx. ;

→ Numéro d'herbier : E.O.N. n°0009.

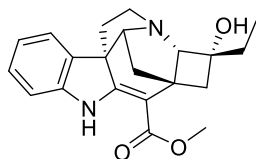
Synonymies pour *Mostuea brunonis* :

Leptocladus thomsonii Oliv. ; *Mostuea angustifolia* Wernham ; *M. buchholzii* Engl. ; *M. buchholzii* var. *angustifolia* Pellegr. ; *M. camporum* Gilg ; *M. densiflora* Gilg ; *M. dinklagei* Gilg ; *M. duchesnei* De Wild. ; *M. erythrophylla* Gilg ; *M. fuchsiifolia* Baker ; *M. gilletii* De Wild. ; *M. gossweileri* Cavaco ; *M. gracilipes* Mildbr. ; *M. grandiflora* Gilg ex Engl. ; *M. longipetiolata* Gilg ; *M. lujae* De Wild. & T. Durand ; *M. lundensis* Cavaco ; *M. madagascariensis* Baill. ; *M. megaphylla* R.D. Good ; *M. orientalis* Baker ; *M. penduliflora* Gilg ; *M. pervilleana* Baill. ; *M. rubrinervis* Engl. ; *M. schumanniana* Gilg ; *M. thomsonii* (Oliv.) Benth. ; *M. ulugurensis* Gilg ; *M. vankerkhovenii* De Wild. ; *M. zenkeri* Gilg.

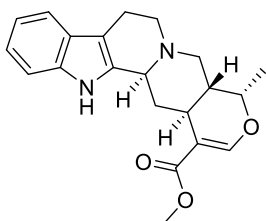
(source : *The Plant List*, 10/2017)

Annexe 2. Molécules de référence de la MIADB

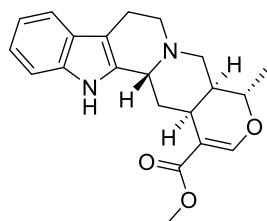
Cette liste correspond à la MIADB à la fin de ce travail (10/2017).



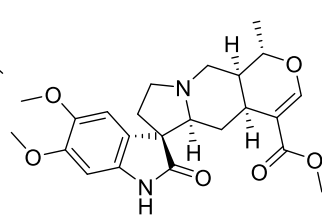
Pandine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



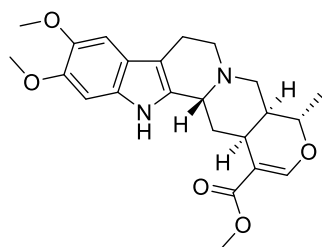
Raubasine
Skeleton: Ajmalicine
Origin: Extraction



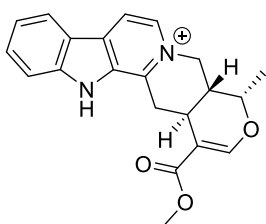
Akuammigine
Skeleton: Ajmalicine
Origin: Extraction



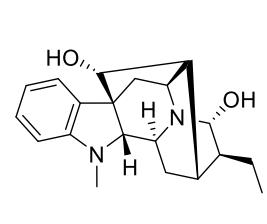
Carapanaubine
Skeleton: Ajmalicine
Origin: Extraction



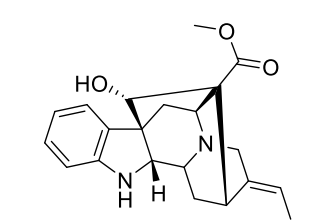
Reserpiline
Skeleton: Ajmalicine
Origin: Extraction



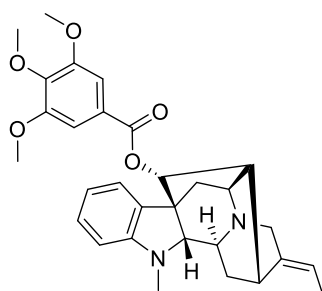
Serpentine
Skeleton: Ajmalicine
Origin: Extraction



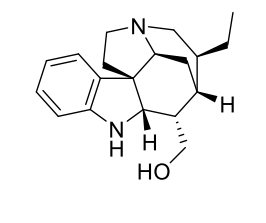
Ajmaline
Skeleton: Ajmaline
Origin: Extraction



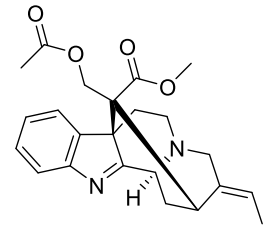
Quebrachidine
Skeleton: Ajmaline
Origin: Extraction



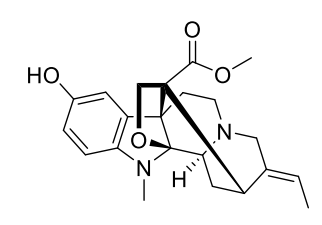
Rauvomitine
Skeleton: Ajmaline
Origin: Extraction



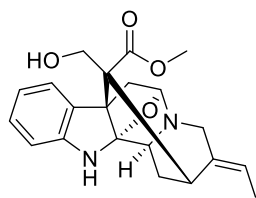
Geissoschizoline
Skeleton: Akuammicine
Origin: Extraction



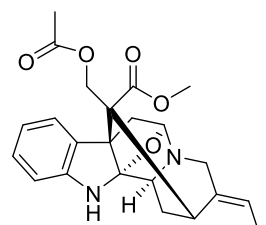
Akuammiline
Skeleton: Akuammiline
Origin: Extraction



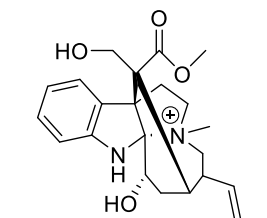
Akuamine
Skeleton: Akuammiline
Origin: Extraction



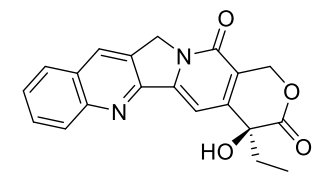
Burnamine
Skeleton: Akuammiline
Origin: Extraction



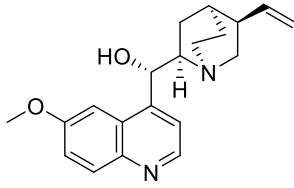
Picraline
Skeleton: Akuammiline
Origin: Extraction



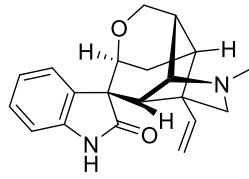
Echitamine
Skeleton: Akuammiline
Origin: Extraction



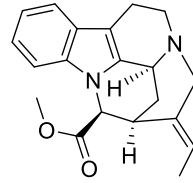
Camptothecin
Skeleton: Camptothecin
Origin: Commercial



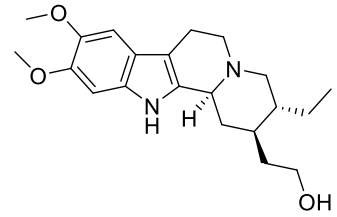
Quinidine
Skelette: Cinchona
Origin: Extraction



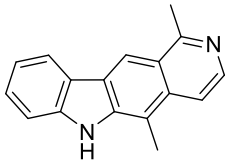
Gelsemine
Skelette: Gelsemium
Origin: Extraction



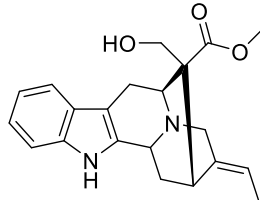
Pleioarpamine
Skelette: Pleiocarpaman
Origin: Extraction



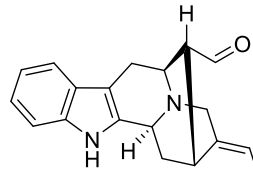
Ochroprosinine
Skelette: Corynanthean
Origin: Extraction



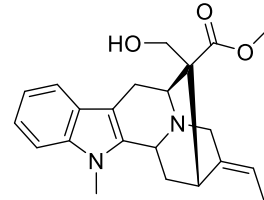
Olivacine
Skelette: Pyridocarbazole
Origin: Extraction



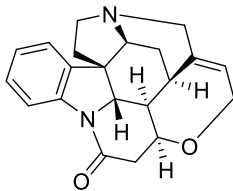
Polyneuridine
Skelette: Sarpagine
Origin: Synthesis



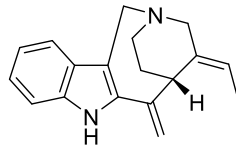
Vellosimine
Skelette: Sarpagine
Origin: Extraction



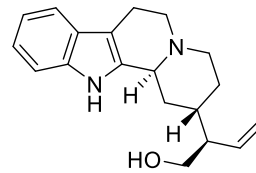
Voachalotie
Skelette: Sarpagine
Origin: Extraction



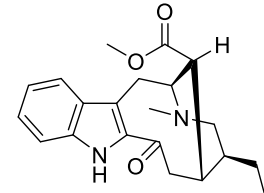
Strychnine
Skelette: Strychnidine
Origin: Extraction



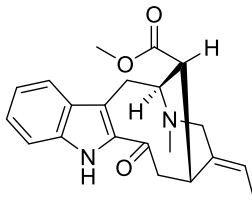
Apparicine
Skelette: Vallesaman
Origin: Extraction



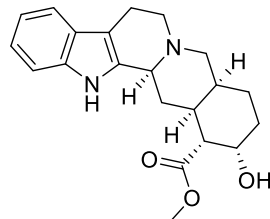
Antirhine
Skelette: Vallesiachotaman
Origin: Extraction



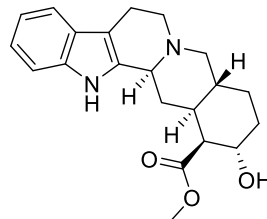
Tabernaemontanine
Skelette: Vobasine
Origin: Extraction



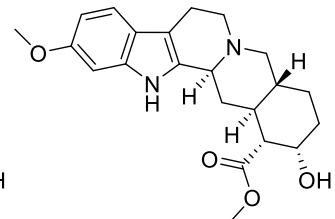
Vobasine
Skelette: Vobasine
Origin: Extraction



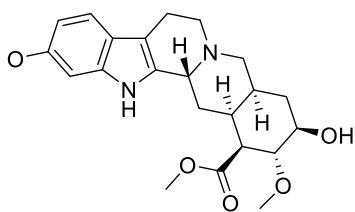
Alloyohimbine
Skelette: Yohimbinoide
Origin: Extraction



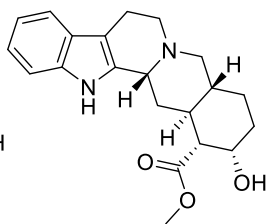
Corynanthine
Skelette: Yohimbinoide
Origin: Extraction



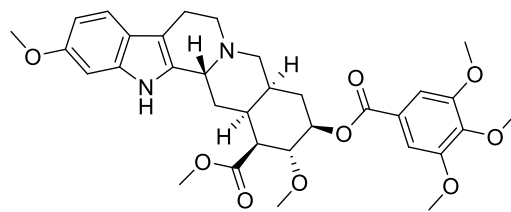
11-methoxyyohimbine
Skelette: Yohimbinoide
Origin: Extraction



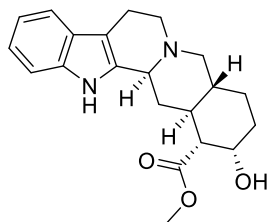
Methyl reserpate
Skeleton: Yohimbinoid
Origin: Extraction



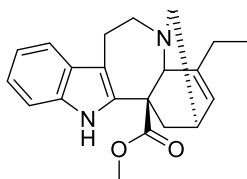
Pseudoyohimbine
Skeleton: Yohimbinoid
Origin: Extraction



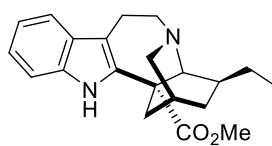
Reserpine
Skeleton: Yohimbinoid
Origin: Extraction



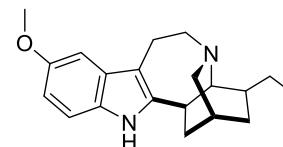
Yohimbine
Skeleton: Yohimbinoid
Origin: Extraction



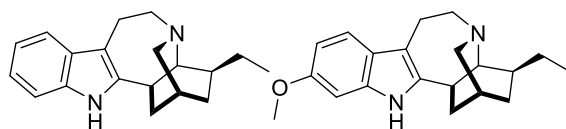
Catharanthine
Skeleton: Iboga
Origin: Extraction



(-)-Coronaridine
Skeleton: Iboga
Origin: Extraction

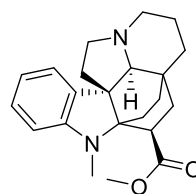


Ibogaie
Skeleton: Iboga
Origin: Extraction

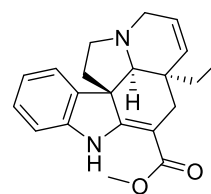


Ibogamine
Skeleton: Iboga
Origin: Extraction

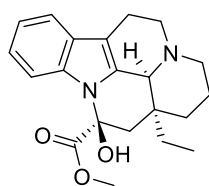
(-)-Tabernanthine
Skeleton: Iboga
Origin: Extraction



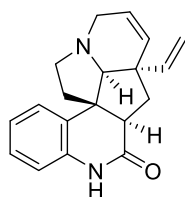
Pleiocarpinine
Skeleton: Aspidofractine
Origin: Extraction



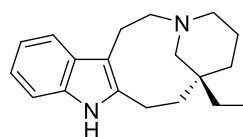
(-)-Tabersonine
Skeleton: Aspidosperma
Origin: Extraction



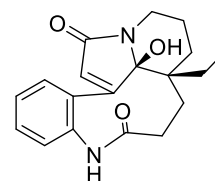
Vincamine
Skeleton: Eburna
Origin: Extraction



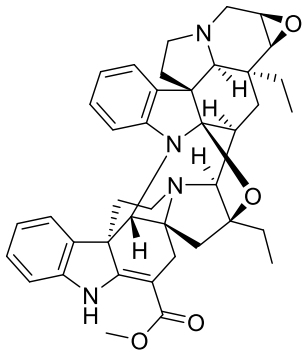
3-Epimeloscine
Skeleton: Melodinus
Origin: Extraction



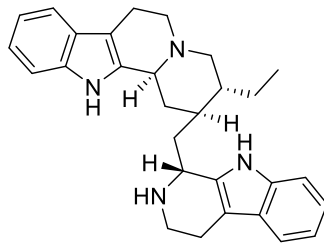
Quebrachamine
Skeleton: Quebrachamine
Origin: Extraction



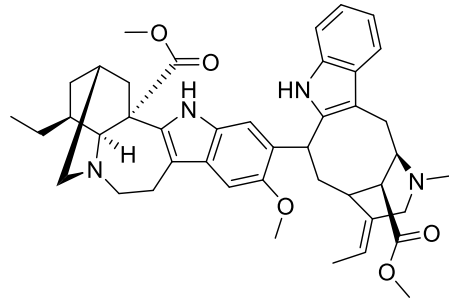
(-)-Leuconolam
Skeleton: Rhazinilam
Origin: Extraction



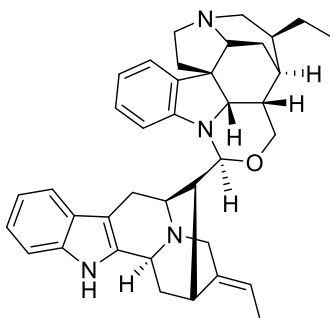
Ervafole
Skeleton: Aspidosperma-
Pseudoaspidosperma
Origin: Extraction



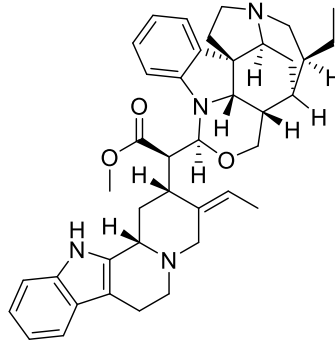
Ochrolifuanine A
Skeleton: Corynanthe-Triptamine
Origin: Extraction



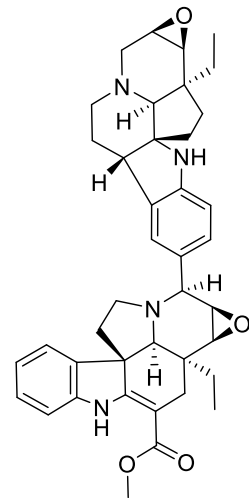
Voacamine
Skeleton: Iboga-Vobasine
Origin: Extraction



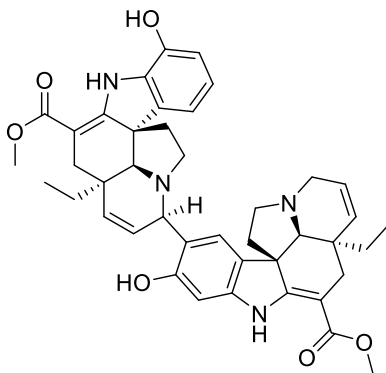
Geissolosimine
Skeleton: Corynanthe-Strychnos
Origin: Extraction



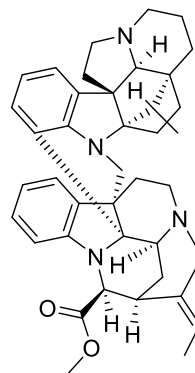
Geissospermine
Skeleton: Corynanthe-Strychnos
Origin: Extraction



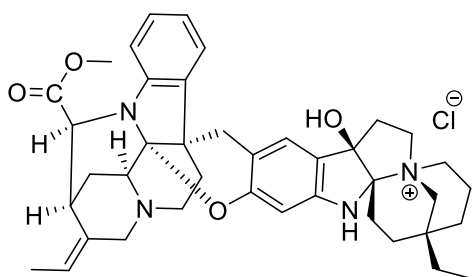
Criophylline
Skeleton: Andrangine-
Tabersonine
Origin: Extraction



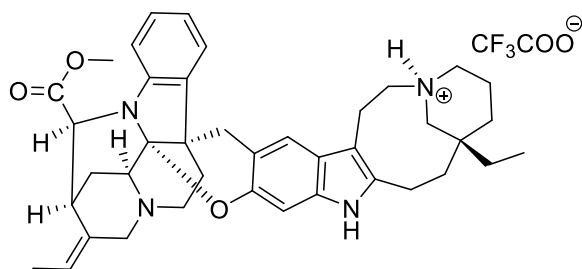
Melosuavine E
Skeleton: Aspidosperma-Aspidosperma
Origin: Extraction



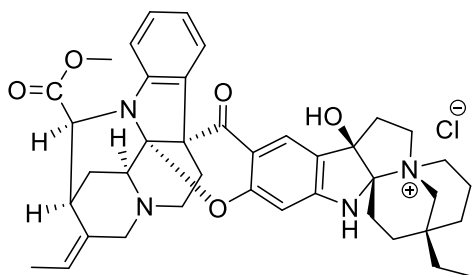
Pleiomutinine
Skeleton: Miscellaneous
Origin: Extraction



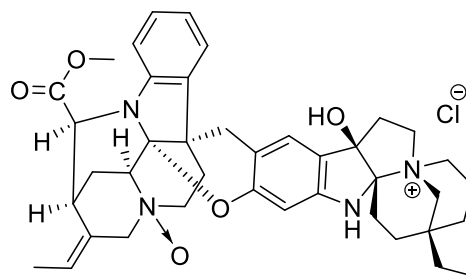
Goniomedine A
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



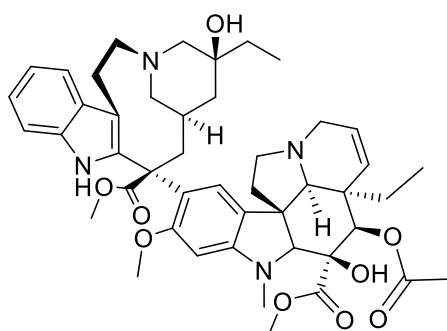
Goniomedine B
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



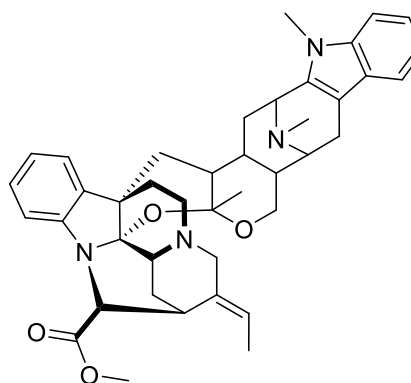
Goniomedine C
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



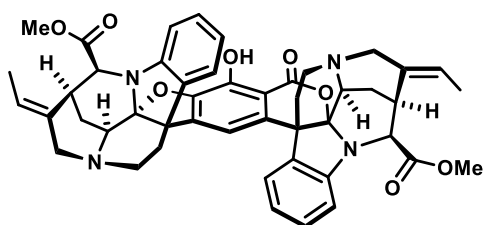
Goniomedine D
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



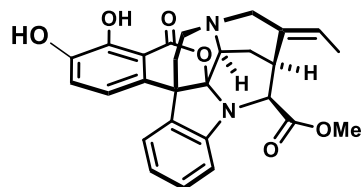
Vinblastine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



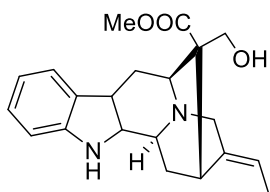
Villalstonine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



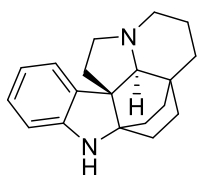
Bipleiophylline
Skeleton: Unknown
Origin: Synthesis



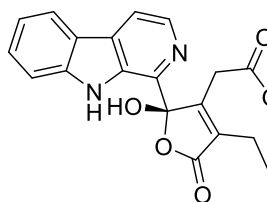
Voacalgine
Skeleton: Unknown
Origin: Synthesis



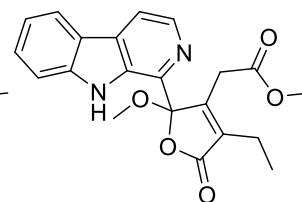
Akuamidine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



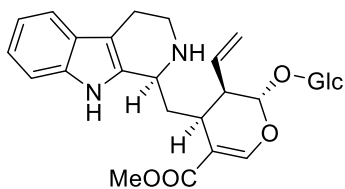
Aspidofractinine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



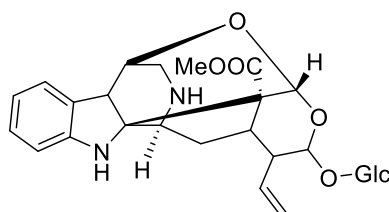
Geissolaevine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



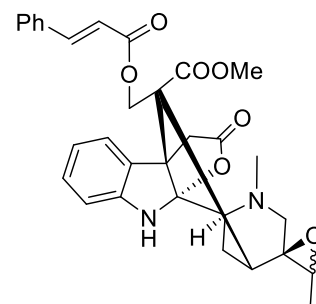
O-methylgeissolaevine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



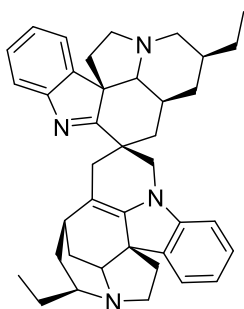
Strictosidine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



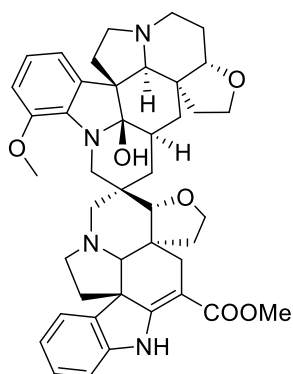
Cymoside
Skeleton: Unknown
Origin: Synthesis



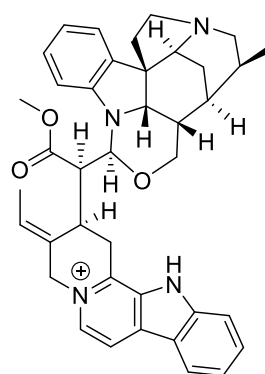
Lanciferine
Skeleton: Unknown
Origin: Synthesis



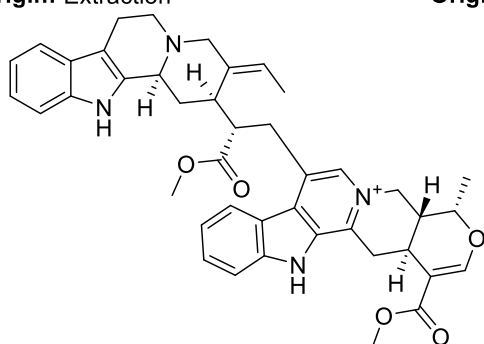
Leucoridine A
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



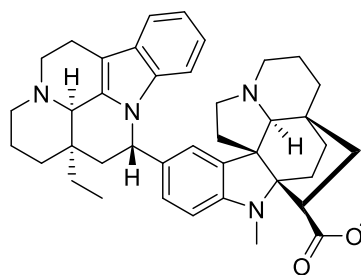
Vobtusine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



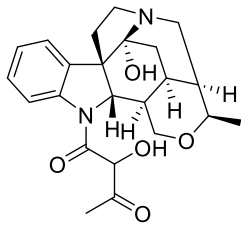
Tetradehydrogeissospermine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



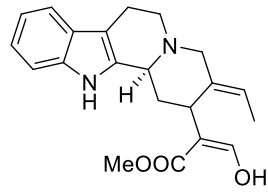
Serpentinine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



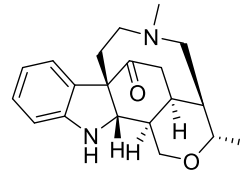
Pleiomutine
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction



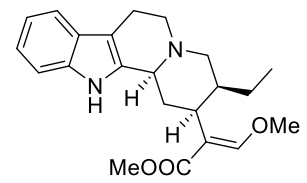
Acetyl-splendoline
Skeleton: Akuammicine
Origin: Extraction



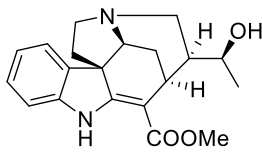
Geissoschizine
Skeleton: Corynanthean
Origin: Extraction



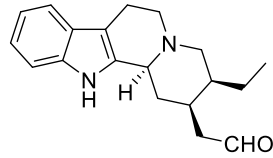
Desacetyl-isosplendoline
Skeleton: Akuammicine
Origin: Extraction



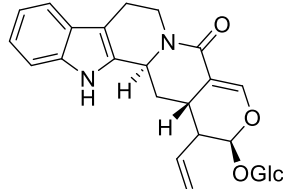
Corynantheidine
Skeleton: Corynanthean
Origin: Extraction



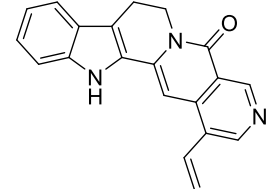
Echitamidine
Skeleton: Akuammicine
Origin: Extraction



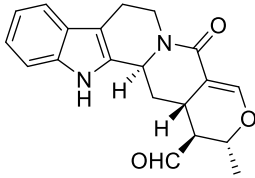
Corynantheidal
Skeleton: Corynanthean
Origin: Extraction



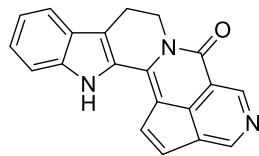
Strictosamide
Skeleton: Strictosidine
Origin: Extraction



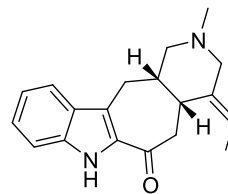
Angustine
Skeleton: Strictosidine
Origin: Extraction



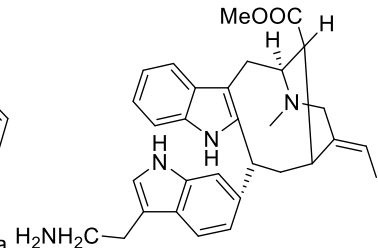
Naucleidinal
Skeleton: Ajmalicine
Origin: Extraction



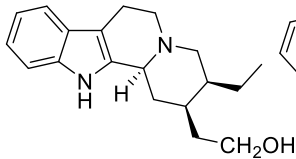
Naulafine
Skeleton: Strictosidine
Origin: Extraction



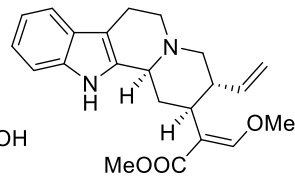
Methuenine
Skeleton: Ervatamia
Origin: Extraction



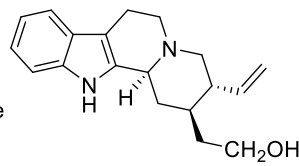
Ceridimine
Skeleton: Vobasine
Origin: Extraction



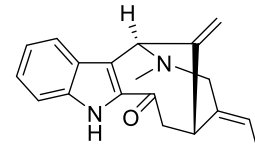
Corynantheidol
Skeleton: Corynanthean
Origin: Extraction



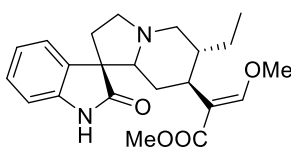
Corynantheine
Skeleton: Corynanthean
Origin: Extraction



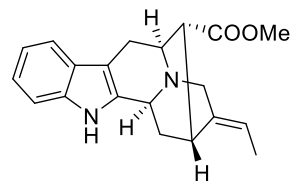
Corynantheol
Skeleton: Corynanthean
Origin: Extraction



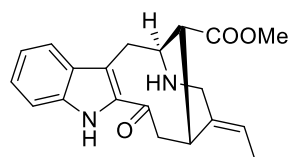
Ervitsine
Skeleton: Sarpagine
Origin: Extraction



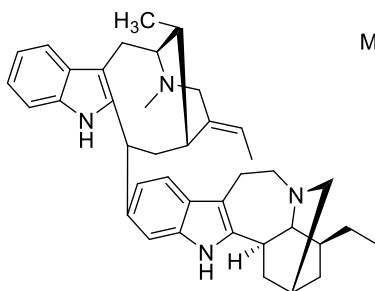
Rhyncophylline
(Mitrinermine)
Skeleton: Corynanthean
Origin: Extraction



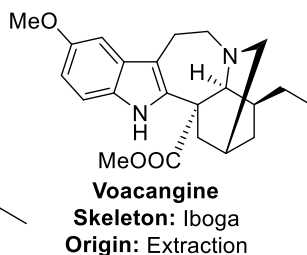
Pericyclivine
Skeleton: Sarpagine
Origin: Extraction



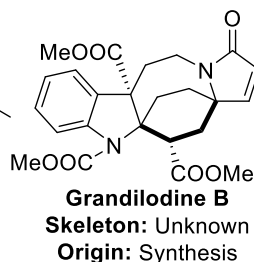
Perivine
Skeleton: Vobasine
Origin: Extraction



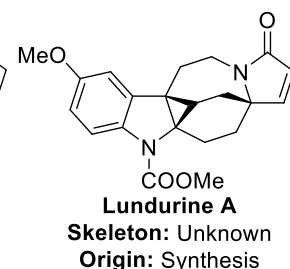
Tabernamine
Skeleton: Vobasine
Origin: Extraction



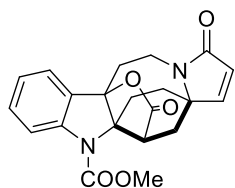
Voacangine
Skeleton: Iboga
Origin: Extraction



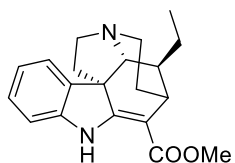
Grandilodine B
Skeleton: Unknown
Origin: Synthesis



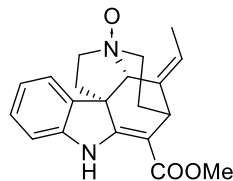
Lundurine A
Skeleton: Unknown
Origin: Synthesis



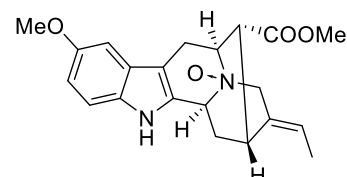
Grandilodine C
Skeleton: Unknown
Origin: Synthesis



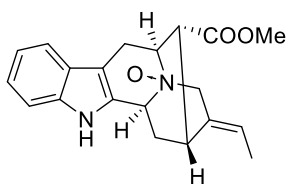
Tubotaiwine
Skeleton: Condylocarpan
Origin: Extraction



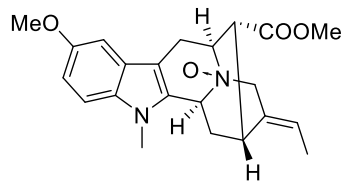
Condylocarpine N-oxide
Skeleton: Condylocarpan
Origin: Extraction



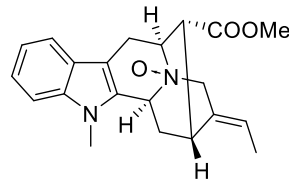
10-methoxypericyclivine N-oxide
Skeleton: Sarpagine
Origin: Extraction



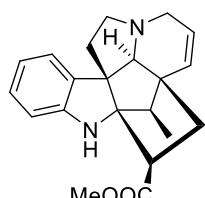
Pericyclivine N-oxide
Skeleton: Sarpagine
Origin: Extraction



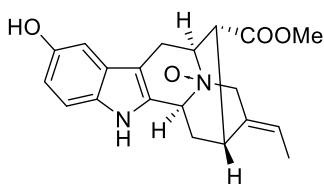
N-methyl-10-methoxypericyclivine N-oxide
Skeleton: Sarpagine
Origin: Extraction



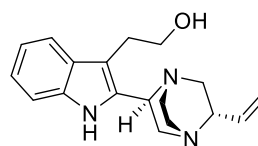
N-methylpericyclivine N-oxide
Skeleton: Sarpagine
Origin: Extraction



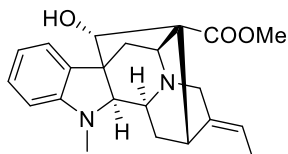
Vindolinine
Skeleton: Vindolinine
Origin: Extraction



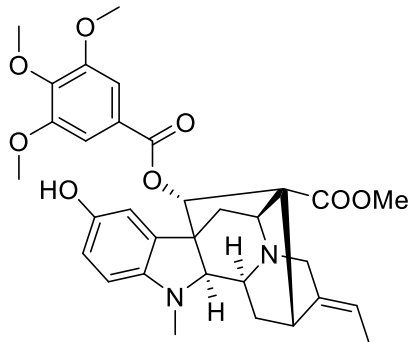
10-hydroxypericyclivine N-oxide
Skeleton: Sarpagine
Origin: Extraction



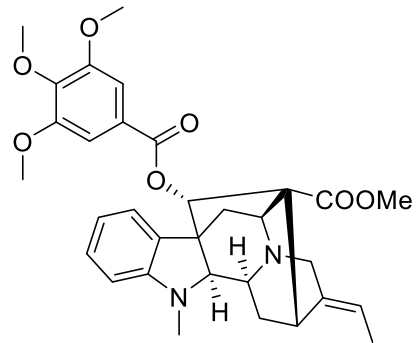
Cinchonamine
Skeleton: Cinchona
Origin: Extraction



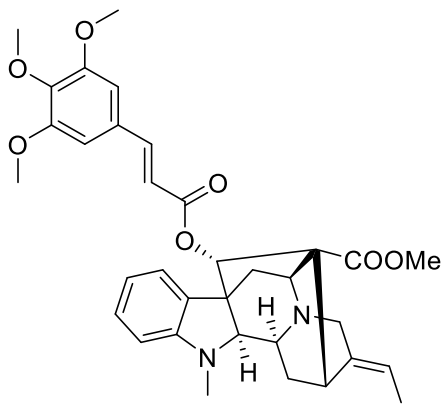
Vincamajine
Skeleton: Ajmaline
Origin: Extraction



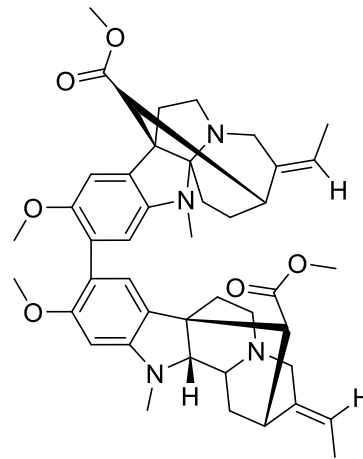
O-3,4,5-trimethoxybenzoyl-OH-vincamajine
Skeleton: Ajmaline
Origin: Extraction



O-3,4,5-trimethoxybenzoylvincamajine
Skeleton: Ajmaline
Origin: Extraction



3,4,5-trimethoxycinnamate-vincamajine
Skeleton: Ajmaline
Origin: Extraction



Desoxycabufiline
Skeleton: Unknown
Origin: Extraction

Annexe 3. Calculs théoriques et génération des courbes de dichroïsme circulaire

Les conformères ont été générés par la méthode de recherche aléatoire Monte-Carlo.²¹⁴ L'optimisation de la géométrie des conformères se fait par mécanique moléculaire avec la méthode Polak-Ribière Conjugated Gradient (PRCG)²¹⁵ et le champ de force MM2²¹⁶ dans l'eau par GB/SA.²¹⁷ Les calculs de mécanique moléculaire se font sur le logiciel MacroModel (V5.5).²¹⁸ Les calculs de mécanique quantique menés sur les conformères sélectionnés se font par la méthode TDDFT au niveau B3LYP/6-31 G(d,p).^{219,220} Ces calculs sont effectués sur le logiciel Gaussian 09¹⁵⁹

La génération des courbes de DC s'est fait sur le logiciel SpecDis (V 1.51).¹⁶⁰

²¹⁴ G. Chang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379-4386.

²¹⁵ E. Polak, *et al.*, *Rev. Fr. Inf. Rech. Oper* **1969**, *3*, 35-43.

²¹⁶ N. L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127-8134.

²¹⁷ W. C. Still, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.

²¹⁸ F. Mohamadi, *et al.*, *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440-467.

²¹⁹ C. Lee, *et al.*, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.

²²⁰ A. D. Becke, *J. Chem. Phys* **1993**, *98*, 5648-5652.

Annexe 4. Tests biologiques : matériel et méthodes.

Pour l'ensemble des tests biologiques, les échantillons ont été dissouts dans le DMSO. Les résultats sont issus de triplicats indépendants et sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type (S.D., *standard deviation*).

1. Évaluation de l'activité antiplasmodiale

– Culture *in vitro* de la phase intraérythrocytaire de *P.falciparum*

La souche FcB1 du *P.falciparum* provenant de Colombie et résistante à la chloroquine, est maintenue en culture sur hématies humaines O+ à un hémocrite de 4 % sous une atmosphère de 91 % de N₂, 3 % de CO₂, 6 % d'O₂, à 37 °C, selon la méthode mise au point par Trager et Jensen.

Les globules rouges, de préférence du groupe O, doivent être utilisés dans les trois semaines consécutives au prélèvement. Les hématies sont lavées deux fois (centrifugation à 800 g, 5 min. à T° ambiante) dans du milieu de culture sans sérum juste avant leur utilisation.

Il n'est pas conseillé de laver les hématies et de les stocker à 4 °C car celles-ci deviennent très rapidement inefficaces à supporter la croissance du parasite (perte d'ATP notamment).

Le milieu de culture utilisé est du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contenant 25 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) ajusté à pH 7,5, 27,5 mM d' NaHCO₃, 11 mM de glucose. Si nécessaire, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine sont ajoutés au milieu. Enfin, 5 à 8 % (v/v) de sérum humain décomplémenté (30 min. à 56 °C) sont additionnés ; le tout est filtré en condition stérile et peut être conservé une à deux semaines à 4 °C. Pour les faibles parasitémies, le milieu est changé quotidiennement par aspiration et plusieurs fois par jour pour des parasitémies supérieures à 5 %. Les cultures à parasitémie élevée sont diluées avec de nouvelles hématies préalablement lavées par centrifugation (600 g, 5 min) avec le milieu de culture. La parasitémie est estimée sur frottis sanguin colorés au Diff Quick® (Baxter, France) par comptage d'au moins 1000 hématies.

Cette coloration repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres sur l'affinité des éléments cellulaires pour les colorants acides ou basiques. L'éosine, un colorant acide, va se fixer sur les éléments cellulaires basiques, ou éosinophiles, dans ce cas, le cytoplasme des hématies et du parasite (coloré en rose). Le bleu de méthylène, un colorant basique, va se fixer sur les éléments cellulaires acides, ou basophiles, tel que l'ADN. Les hématies des mammifères étant anucléées, la coloration au bleu de méthylène va se concentrer sur les éléments cellulaires du parasite au sein des hématies infectées.

Évaluation *in vitro* de l'activité antipaludique de molécules ou d'extraits en plaque multipuits
L'activité antipaludique est évaluée selon la méthode de Desjardin²²¹ incorporation d'hypoxanthine tritiée dans l'ADN parasite. Les hématies humaines étant anucléées, cette incorporation est le reflet de l'activité antiparasitaire des molécules testées.

Une culture asynchrone du *P.falciparum* est mise en présence de concentrations successives décroissantes de la drogue testée, en plaque 96 puits (dans le cas d'extraits bruts, l'activité est généralement évaluée pour une concentration fixe de 10 µg/mL). Le volume total de chaque puits est de 200 µL :

100 µL de produit diluée dans du milieu de culture à une concentration deux fois supérieures à la concentration finale désirée (gamme de concentration 200 µM à 0,1 µM). 100 µL de suspension d'hématies parasitées dans du milieu de culture (1 % de parasitémie, 2 % d'hématocrite).

Les plaques sont incubées à 37 °C sous jarre dont l'atmosphère a été appauvrie en O₂, pendant 24 heures. 25 µL d'hypoxanthine tritiée (20 µCi/mL) sont ensuite distribués dans chaque puits et les plaques incubées dans les mêmes conditions pour une période supplémentaire de 24 heures. Les plaques sont ensuite congelées et décongelées pour lyser les cellules. L'ADN des différents puits est alors récupéré et déposé sur filtrés en fibres de verre au moyen d'un collecteur automatique. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les essais sont réalisés en triplicata.

On détermine alors la CI₅₀ (concentration inhibant 50 % de la croissance parasite) pour chaque produit testé à partir d'une courbe dont la fonction est :

$f(\text{taux de radioactivité}) = -\log(\text{concentration du produit})$.

²²¹ R. E. Desjardins, *et al.*, *Antimicrob. Agents Chmother.* **1979**, *16*, 710-718.

2. Évaluation de l'activité antileishmanienne

L'évaluation de l'activité antileishmanienne a été effectuée à la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Paris-Sud, au laboratoire « chimiothérapie antiparasitaire » de BioCIS (Pr. Philippe LOISEAU), par le Dr. Sébastien POMEL.

Les formes promastigotes de la souche LV9 de *Leishmania donovani* (MHOM/ET/67/HU3) ont été cultivées dans le milieu M-199 (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) supplémenté avec 10 % de sérum bovin foetal inactivé (Invitrogen, Eragny, France), 40 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique ; VWR, Paisley, Ecosse), 100 μ M d'adénosine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) et 0,5 mg/mL d'hémine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) en présence de 50 μ g/mL de gentamicine, à 26 °C sous atmosphère à 5 % de CO₂.

Les conditions de culture des formes amastigotes axéniques de *L. donovani* sont adaptées des travaux de Saar *et al.* (1998).²²² Les parasites sont obtenus à partir des promastigotes en fin de phase de croissance logarithmique, dilués à 10⁶/mL dans du milieu M199 complet acidifié à pH 5,5 et cultivées à 37°C (5% CO₂).

Les macrophages péritonéaux ont été récoltés à partir de souris femelles CD1 (Charles River, Cléon, France) trois jours après une injection péritonéale de 1,5 mL d'une solution de thioglycolate de Sodium (Biomérieux) [les cellules RAW 264.7 peuvent aussi être employées]. Ils sont ensuite, distribués dans des *chamber slides* à 8 puits (LabTek Ltd.) à une densité de 5.10⁴ par puits (400 μ L par puits) dans du RPMI 1640 contenant 10 % de hi-FCS (sérum de veau foetal inactivé à la chaleur – 40 °C), 25 mM d'HEPES et 2 mM de L-glutamine (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Quatre heures plus tard, les macrophages sont étalés puis lavés pour éliminer les fibroblastes. Après une période d'incubation de 24 heures, les macrophages ont été infectés par les formes promastigotes de *L. donovani* LV9 en phase stationnaire à raison de 10 parasites par macrophages pour obtenir 87 % de macrophages infectés et 10³ formes amastigotes par macrophages. Après 18 heures, les formes promastigotes libres sont éliminées et les formes amastigotes intramacrophagiques sont traitées avec différentes concentrations des produits à tester, dans des plaques 96 puits. Le milieu de culture est renouvelé au bout de 48 heures et un nouveau milieu (100 μ L) contenant les substances à tester est ajouté (dilution dans de milieu M199 complet, 0,1 % de

²²² Y. Saar, *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *95*, 9-20.

DMSO maximum ; dilutions sériées au demi).

Pour les formes axéniques, après 72 h d'incubation à 37°C (5 % CO₂), 20 µL de résazurine (7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one, 450 µM) sont ajoutés. Le temps d'incubation est ensuite de 24 h. Dans les cellules vivantes, la résazurine est réduite en résorufine. La conversion est mesurée à 570 nm (résorufine) et à 600 nm (résazurine) avec un lecteur de plaques (Lab systems Multiskan MS). Les CI₅₀ sont déterminées par une analyse de régression linéaire et exprimées en µM pour les molécules pures. Chaque expérience a été réalisée en triplicata.

Pour les formes intramacrophagiques, la culture est réalisée à 10⁴ cellules par puit. A 48 h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par un tampon de lyse *DirectPCR Lysis Reagent* (100 µL ; Euromedex, Souffelweyersheim, France). Trois cycles congélation / décongélation sont réalisés. Une solution de protéinase K (50 µg/mL) est ajoutée avant une incubation finale à 55 °C pendant 1 nuit. 10 µL de chaque puit sont additionnés de 40 µL de réactif *DirectPCR Lysis* contenant le marqueur d'acides nucléiques Sybr Green I (0,05 % ; Invitrogen). La fluorescence de l'ADN est mesurée avec un lecteur DNA Mastercycler® realplex (Eppendorf, Montesson, France). Les CI₅₀ sont déterminées par une analyse de régression linéaire et exprimées en µM pour les molécules pures. Ces protocoles sont ceux mis au point par Mao *et al.* (2017).²²³

La miltefosine est été utilisée comme témoin positif.

²²³ W. Mao, *et al.*, *Sci Rep.* **2017**, *7*, 751.

3. Évaluation de l'activité cytotoxique

Les activités cytotoxiques sur les lignées HUVEC, A549, HEP-G2, ont été mesurées après 48 h d'incubation avec les produits à tester (dilués dans le DMSO, 0,1 % final), en comparaison avec la doxorubicine (chlorhydrate, 5 μ M). Les composés purs ont été testés à la concentration finale de 10 μ M ; les extraits, à 10 μ g/mL. Dans chaque série d'expérience, 3 puits reçoivent l'échantillon à la concentration présentée ci-dessus. Les tests sont effectués en triplicats.

Les cellules ont été cultivées en plaques 96 puits (TPP, Zurich, Suisse) dans 200 μ L de milieu de culture par puits. Les milieux de culture et les concentrations de cellules sont :

cellules HUVEC : $1,25 \times 10^5$ cellules/mL ; milieu F-12K – DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), avec 2 mM de glutamine et 10 % de sérum de veau fœtal ;

cellules A549 : 1.105 cellules/cm² (monocouche, à confluence) ; milieu RPMI1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), avec 2 mM de glutamine, 10 % de sérum de veau fœtal ;

cellules HEP-G2 : 25000-40000 cellules/cm² (monocouche, à confluence) ; milieu RPMI1640 avec 2 mM de glutamine, 10 % de sérum de veau fœtal.

Après l'incubation, 20 μ L de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) à 5 mg/mL dans le PBS (*Phosphate Buffer Saline* ; tampon phosphate) ont été ajoutés. Après 2 h, le milieu a été remplacé par du DMSO (200 μ L) (American Chemical Society grade, BioBasic Inc, Paris, France) afin de dissoudre les cristaux de formazan formés, de couleur mauve. La lecture a été réalisée à 570 nm avec un lecteur de plaques UV/visible (LAB Systems Original Multiscan MS, Helsinki, Finlande). L'absorbance (densité optique) est témoin de l'activité de l'activité réductrice des cellules (activité succinate-déshydrogénase mitochondriale) et par extension de leur viabilité. La survie est exprimée en pourcentage de la densité optique par rapport à des puits témoins non traités sur les mêmes plaques.

Les milieux de culture, les additifs et les réactifs sont issus de chez Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France), sauf mention contraire. Les tests ont été réalisés par Mme DENIS, à l'UMR8612 (Institut Galien Paris-Sud, UFR pharmacie, Châtenay-Malabry).

Annexe 5 Bilan des communications

Communication par affiche et « flash communication » orale, manifestation internationale :

ULLA European University Consortium for Pharmaceutical Sciences summer school 2017,

Louvain, Belgique, 8-15 juillet 2017 :

- **Otogo N'ngang E.**, Cauchie G., Gallard J.-F., Grellier P., Evanno L., Kumulungui B., Champy P., Beniddir M.A. Inaequalisines A and B, unprecedented monoterpene indole alkaloids from *Callichilia inaequalis* revealed by a molecular networking-based dereplication approach.

Communications par affiche, congrès international :

Joint Natural Products Conference (ASP, PSE, GA, AFERP) 2016, Copenhague, Danemark, 24-28 juillet 2016 ; avec actes de congrès publiés.

- Beniddir M., Fox-Ramos A., **Otogo N'ngang E.**, Alcover C., Maciuk A., Poupon E., Evanno L., Champy P. Out of fashion plants at the "big data" era: Illuminating the overlooked Apocynaceae alkaloids chemical space by Molecular Networking.
- **Otogo N'ngang E.**, Evanno L., Leblanc K., Grellier P., Kumulungui B., Poupon E., Beniddir M.A., Champy P. A new dimeric monoterpene indole alkaloid from the stem bark of *Pleiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae).

Communications par affiche, congrès nationaux :

Symposium Substances Naturelles ICSN-UPSACLAY (15^e Symposium ICSN), Gif-sur-Yvette, 29-30 juin 2017 :

- **Otogo N'ngang E.** Ahlgren S., Kumulungui B., Beniddir M.A., Champy P. Targeted Isolation of *Gelsemium* alkaloids from *Mostuea brunonis* using molecular networking.
→ **Prix du meilleur poster.**

Journée de la recherche de l'UFR pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, 7 décembre 2016 :

- **Otogo N'ngang E.**, Evanno L., Beniddir M., Champy P. Un nouvel alcaloïde indolomonoterpénique isolé de *Pleiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae).

XVI^e Journée de l'École Doctorale « Innovation Thérapeutique, du Fondamental à l'Appliqué », Châtenay-Malabry, 17 Juin 2016 :

- **Otogo N'ngang E.**, Evanno L., Leblanc K., Grellier P., Kumulungui B., Poupon E., Beniddir M.A., Champy P. New dimeric monoterpene indole alkaloid from the stem bark of *Pleiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae).

Journée de la recherche de l'UFR pharmacie, Université Paris-Sud, 20 novembre 2015 :

- **Otogo N'ngang E.**, Evanno L., Beniddir M., Champy P. Nouvel alcaloïde indolomonoterpénique isolé de *Pleiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae).

Actes de congrès :

Joint Natural Products Conference (ASP, PSE, GA, AFERP) 2016, Copenhague, Danemark, 24-28 juillet 2016.

Beniddir M., Fox-Ramos A., **Otogo N'ngang E.**, Alcover C., Maciuk A., Poupon E., Evanno L., Champy P. Out of fashion plants at the "big data" era: Illuminating the overlooked Apocynaceae alkaloids chemical space by Molecular Networking. *Planta Medica*, **2016**, 82(S01) ; DOI: 10.1055/s-0036-1596218.

Otogo N'ngang E., Evanno L., Leblanc K., Grellier P., Kumulungui B., Poupon E., Beniddir M.A., Champy P. A new dimeric monoterpene indole alkaloid from the stem bark of *Pleiocarpa mutica* Benth. (Apocynaceae). *Planta Medica*, **2016**, 82(S01) ; DOI: 10.1055/s-0036-1596379.

Articles :

Lachkar D., Denizot N., Bernadat G., Ahamada K., Beniddir M.A., Dumontet V., Gallard J.-F., Guillot R. , Leblanc K., **Otogo N'ngang E.**, Turpin V., Kouklovsky C., Poupon E., Evanno L., Vincent G. Unified biomimetic assembly of voacalgine A and bipleiophylline via divergent oxidative couplings. *Nature Chemistry*, **2017**, 9, 793–798 ; DOI:10.1038/nchem.2735.

Otogo N'ngang E., Genta-Jouve G., Gallard J.-F., Kumulungui B., Mouray E., Grellier P., Evanno L., Poupon E., Champy P., Beniddir M.A. Pleiokomenines A and B: Dimeric aspidofractinine alkaloids tethered with a methylene group. *Organic Letters*, **2017**, 19(22), 6180–6183. DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03098.

Annexe 6. fiche d'enquête ethnopharmacologique sur les plantes médicinales utilisées au Gabon

FICHE D'ENQUETE ETHNOPHARMACOLOGIQUE SUR LES PLANTES MEDICINALES UTILISEES AU GABON

Date..... N° de la fi che.....
 Nom du village Département

INFORMATEUR

Noms et Prénoms..... Sexe : M F
 Groupe ethnique..... Niveau d'instruction..... Profession.....

IDENTIFICATION DE LA PLANTE

Nom courant..... Nom scientifique Nom vernaculaire
 Signification du nom vernaculaire.....
 Caractères de reconnaissance N° d'herbier. N° de photo.....

PARTIE(S) DE LA PLANTE UTILISEE(S)

Feuilles..... Fruits..... Graine..... Noyau..... Fleur..... Bourgeon..... Tige.....
 Racine..... Ecorce de tige..... Ecorce de racine.....
 Exsudats..... Plante entière.....

MODALITE(S) DE RECOLTE

Ramasser..... Arracher..... Secouer..... Gratter..... Couper
 Ecorcher..... Entailler.....

ETAT DE DEVELOPPEMENT

Plantule..... Juvénile..... Adulte (Mature)..... Individu sénescant.....
 Individu mort.....

PERIODE(S) ET DATE(S) DE RECOLTE

Aube..... Matin..... Midi..... Après-midi.....
 Crépuscule..... Soir Quelconque

LIEU(X) DE RECOLTE

Coordonnées GPS..... Plantations..... Campement..... Bord de piste.....
 Chablis..... Sous-bois..... Forêt primaire..... Forêt secondaire.....
 Forêt exploitée..... Bord de cours d'eau Aquatique.....

MODE(S) DE PREPARATION

Nature..... Cru..... Cuit..... Marmelade Macération
 Bouillie..... Friture..... Boisson Autres.....

MODE(S) ET VOIE(S) D'ADMINISTRATION

Boisson..... Bain..... Lavement..... Inhalation..... Scarification.....
 Emplâtre..... Massage..... Friction..... Fumigation..... Autres.....

POSOLOGIE ET DUREE DE TRAITEMENT

Cuillère(s)..... Verre(s)..... Bouteille(s).....
 Jour(s)..... semaine(s)..... mois.....

MODES DE CONSERVATION

Fumage..... Séchage..... Autres.....

COMMERCIALISATION

OUI NON

OBSERVATIONS PARTICULIERES

.....

**Titre : Étude chimique et biologique de Gentianales gabonaises d'intérêt antipaludique, à alcaloïdes indolomonoterpéniques**

Mots clés : Alcaloïdes indolomonoterpéniques, Apocynaceae, CLHP-MS/MS, Gelsemiaceae, Réseaux moléculaires, Paludisme

Résumé : L'étude chimique de 11 plantes du Gabon, dont certaines utilisées en médecine traditionnelle, a été réalisée pour la recherche de composés antiplasmodiaux de structures nouvelles. Deux Apocynaceae (*Pleiocarpa mutica* Benth., *Callichilia inaequalis* Stapf) et une Gelsemiaceae (*Mostuea brunonis* Didr.) ont été plus spécifiquement étudiées, via une stratégie de déréplication fondée sur des réseaux moléculaires générés à partir de données CLHP-MS/MS (*Molecular Networking*) et annotés avec une base de données d'alcaloïdes indolomonoterpéniques mise au point au laboratoire (MIADB). Cette investigation a guidé un travail de fractionnement et d'isolement, qui a permis l'obtention d'alcaloïdes indolomonoterpéniques très originaux, en termes de décorations ou de modes d'assemblage.

Des écorces de tiges de *P. mutica*, 7 dimères indolomonoterpéniques non décrits dans la littérature ont été obtenus : 5 sont des *bis*-aspidofractanes dont 4 sont reliés par un pont

méthylène (pléiokomenines A-D) ; deux sont des dimères du type aspidofractane-éburnamine, analogues de la pléiomutine.

Les tiges et les racines de *C. inaequalis* ont livré 2 bis-indoles nouveaux, analogues de la criophylline, dont le premier porteur d'un sulfate dans cette classe d'alcaloïdes, ainsi que l'inaequalisine A, premier indolomonoterpène monomérique lié à un reste phénylpropène via une liaison C-C.

L'étude des tiges et des feuilles de *M. brunonis* a conduit à l'isolement de quatre nouveaux composés : un monomère de type sarpagine (16-*epi*-méthylester-panarine) et 3 dimères *bis*-vobasines inédits à pont sulfide (théionbrunonines A-C). Des molécules connues, mais pas toujours identifiées dans les genres étudiés, ont également été isolées. Plusieurs de ces composés nouveaux présentent une activité antiplasmodiale de l'ordre du μM *in vitro* sur une souche de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante.

Title : Chemical and biological study of Gabonese Gentianales with antoplasmodial interest, bearing monoterpene indole alkaloids

Keywords: Apocynaceae, Gelesemiaceae, HPLC-MS/MS, Indole monoterpene alkaloids, Malaria, Molecular networking

Abstract: The chemical study of 11 Gabonese plant species, some being used in traditional medicine, was performed in search of antiplasmodial compounds with new structures. Two Apocynaceae (*Pleiocarpa mutica* Benth., *Callichilia inaequalis* Stapf) and a Gelsemiaceae (*Mostuea brunonis* Didr.) were more specifically investigated, using LC-MS/MS data in a dereplicative approach based on the "molecular networking" strategy, with an annotation performed using an "in-house" monoterpene indole alkaloids database (MIADB). This approach was used to guide the isolation of original alkaloids, in terms of substitution patterns or of linkage. From the stem bark of *P. mutica*, 7 previously undescribed *bis*-indoles were obtained: five are *bis*-aspidofractanes, four of them being linked by a methylene bridge (pleiokomenines A-D); Two are aspidofractane-eburnane dimers analogous to pleiomutine.

The twigs and roots of *C. inaequalis* yielded 2 new bis-indoles analogous to criophylline, among which one is the first natural sulfate-bearing indole monoterpene. Inaequalisine A, the first monomeric indole monoterpene linked to a phenylpropene moiety by a C-C linkage was also obtained.

The study of the twigs and leaves of *M. brunonis* lead to 4 new compounds: A monomeric sarpagine (16-*epi*-methylester-panarine) and 3 unknown *bis*-vobasines which constituting monomers are linked by a sulfide bridge (theionbrunonines A-C).

Known compounds were also isolated, some of which were previously undescribed in the genera studied here. Several of the new molecules exhibited antiplasmodial *in vitro* activity in the micromolar range against a chloroquine-resistant strain of *P. falciparum*.