

UNIVERSITE ASSANE SECK DE ZIGUINCHOR



UFR Sciences et Technologies

ECOLE DOCTORALE SCIENCES, TECHNOLOGIES ET INGENIERIE

Laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux

Département de CHIMIE

Année 2018

Thèse de DOCTORAT

Domaine: Chimie Organique

Spécialité: Synthèse Organique et Produits Naturels

Présentée par:

Oumar SAMBOU

**Isolement, Identification et tests antibactériens des métabolites
secondaires des plantes médicinales : *Morinda geminata*
DC(Rubiaceae) et *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal (Icacinaceae)**

Soutenue publiquement le **24 octobre 2018** devant un jury composé de:

M. **Alassane DIATTA**, Professeur, Université Assane Seck Ziguinchor/ Président.

M. **Matar SECK**, Professeur, Université Cheikh Anta Diop Dakar / Rapporteur.

Mme. **Philomène Akoua YAO-KOUASSI**, Maître de conférences, l'Université Félix Houphouët
Boigny de Cocody-Abidjan (Côte d'Ivoire)/ Rapporteur.

M. **Farba B. TAMBOURA**, Maître de conférences, Université Alioune Diop de Bambey / Rapporteur.

M. **Mohamed Mahmoud CHARAHABIL**, Maître Assistant, Université Assane Seck Ziguinchor /
Examineur.

M. **Abdoulaye GASSAMA**, Maître de conférences, Université Assane Seck Ziguinchor / Directeur de thèse.

M. **Moussa KARE**, Maître Assistant, Université Alioune Diop de Bambey / Co-encadreur de thèse.

Remerciements.

Ce travail a été réalisé à l'Université Assane Seck de Ziguinchor plus précisément au Laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux (LCPM), sous la direction de Dr Abdoulaye GASSAMA, Maître de conférences CAMES. Je tiens à vous remercier vivement de m'avoir non seulement apporté vos connaissances dans l'isolement et la détermination structurale, mais plus encore pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'amitié, l'encadrement et le soutien moral que vous avez su m'apporter tout au long de ces jours de recherche. Votre disponibilité n'a connu aucune faille.

J'adresse à mon Co-encadreur: Dr Moussa KARE, Maître Assistant CAMES, mes remerciements pour la grande confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce sujet. Je vous remercie d'avoir su me transmettre votre savoir scientifique et votre goût pour la recherche. Votre gentillesse, votre respect m'ont permis de mener à bien ma thèse. Je salue votre dévouement, votre ouverture d'esprit, votre générosité et votre grande humilité. Merci pour la sympathie, la disponibilité, l'infinie bonté et le beau sourire que vous m'avez toujours manifesté.

Mes sincères remerciements vont au personnel de l'école doctorale Sciences Technologie et de l'ingénierie de l'UASZ pour leur accueil, leur soutien et leur grande disponibilité.

L'étude antibactérienne a été réalisée au laboratoire de microbiologie de l'hôpital de la paix de Ziguinchor par Dr Dame Gambe sous la direction du Professeur DIATTA. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Que ma profonde gratitude soit exprimée ici à Monsieur Michael Rivard, Thierry Martens (Université Paris Est, Electrochimie et Synthèse Organique, ICMPE), Madame Isabelle Lachaise (Université Paris Est, Plateforme Chromatographie Analytique et Préparative), Monsieur Issa SAMB (Université Alioune Diop de Bambey département de Chimie) pour la réalisation de très nombreux spectres de RMN, de Masse et d'Infrarouge ; en témoignage de ma sincère reconnaissance.

J'adresse mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance au :

Dr Philomène Akoua YAO-KOUASSI, Maître de conférences CAMES
Enseignante -chercheuse à l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan (Côte d'Ivoire) d'avoir accepté de juger ce travail malgré ses nombreuses responsabilités.

Dr Farba B. Tamboura, Maître de conférences CAMES,

Je voudrais également exprimer mes vifs remerciements à mon enseignant Dr Farba Bouyagui Tamboura, Enseignant - chercheur à l'Université Alioune Diop de Bambey intervenant durant mon cursus de formation. Sa présence en tant que membre du jury, malgré ses multiples préoccupations m'honore beaucoup.

Pr Alassane DIATTA,

Professeur Titulaire CAMES, Enseignant – chercheur à l'UFR santé de l'Université Assane Seck de Ziguinchor vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse. Votre force de caractère, votre courage, votre dynamisme, votre humanisme dans l'exercice de la profession médicale sont autant de qualité qui font de vous l'homme qui nous fallait pour présider ce travail. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire de biochimie.

Pr Matar Seck,

Professeur Titulaire CAMES, Enseignant – chercheur à la faculté de Médecine de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, pour avoir bien voulu faire partie du jury en tant que rapporteur, qu'ils reçoivent ici mes sincères remerciements.

Dr Mohamed Mahmoud CHARAHABIL

Nous avons beaucoup apprécié votre apport dans la réalisation de ce travail et nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail, malgré vos nombreuses occupations. Veuillez croire, à l'assurance de notre sincère reconnaissance.

J'adresse aussi mes remerciements à tous les enseignants du département de Chimie et plus particulièrement au Dr Magatte CAMARA, Dr Mbaye Diagne MBAYE, Dr Papa Ali GAYE et Dr Mamadou LO, Dr Abdou MBAYE, Dr Seydou DIOP, Dr Anastasie MANGA et la technicienne du laboratoire Fatoumata SOUMARE pour leur soutien et leur encouragement.

Merci à tous les thésards et stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer au laboratoire au cours de ces années de recherche : Armel DIATTA, Albert Manga BADIANE, Insa BADIANE, Mamadou Seydou BA, Mame Seyni SYLLA, Daouda Ndiaye, Charlotte Seck, Roykhatou Seck, Marie Rose MENDY, Yancouba CONTE, Malamine MANSALY, Abdoulaye DIATTA, Ibrahima GOUDIABY, Mamoudou DIALLO, Henry DISSY, Diara DIATTA... merci pour votre bonne humeur, votre sympathie et les bons moments passés ensemble.

Mes plus vifs et sincères remerciements à tous mes oncles, mes tantes, mes amis pour le soutien qu'ils m'ont accordé pendant toutes ces années.

Enfin, je ne saurais terminer cette liste sans adresser mes remerciements particuliers à Mon Père Ibrahima et à ma Mère Seynabou SAMBOU, à mes sœurs et mes frères, sans eux ce travail n'aurait jamais pu voir le jour. Je leur dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection pour toute la patience, la confiance et les sacrifices qu'ils ont consenti pour moi et dont je serai à jamais redevable. Je les remercie vivement d'avoir su me transmettre le soutien nécessaire durant mon cursus scolaire. Un grand merci à vous!

Liste des abréviations

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

RDC: République Démocratique du Congo

AQ: Anthraquinone

Syn: Synonyme

OSB: O -succinylbenzoïque

IPP: Isopentényl diphosphate

PEP: Phosphoènylpyruvate

E-4-P: érythrose 4-phosphate

MEP: Methylerythritol Phosphate

MVA: Acide Pévalonique

GAP: Glycéraldéhyde 3-phosphate

DMAPP: Diméthylallyle Pyrophosphate

DHNA: 1, 4-dihydroxy-2-naphthoic acid

HMGCoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

TCA: Tricarboxylique Acide

ATP: Adénosine Triphosphate

NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

ABTS: 2, 2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)

DI: Diamètre d'Inhibition

DMI: Diamètre Minimal d'Inhibition ()

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CMB: Concentration Minimale Bactéricide

BHT: Butyle Hydroxytoluène

TCF: Thiocyanate Ferrique

VEB: Virus Epstein Barr

COX: Cyclooxygénase

UVB: Ultraviolet B

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

RF: Rapport Frontal

CLHP: Chromatographie Liquide Haute Performance

TR: Temps de Rétention

SM: Spectrométrie de Masse
EI: Impact Electronique
ESI: ElectroSpray Ionization (ionisation par électrospray)
IC: Ionisation Chimique
Uma: Unité de masse atomique
LC/MS: Liquid Chromatography-mass spectrometry
m/z: masse / charge
IR: infrarouge
 cm^{-1} : l'inverse de la longueur d'onde
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ^{13}C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ^1H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton
 δ : déplacement chimique exprimé en ppm
ppm: Partie par million
COSY: Correlated spectroscopy
DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation
NOESY: Nuclear Overhauser Spectroscopy
DMSO: Diméthyl Sulfoxide
UICPA: Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
OA: Orange Acridine
IP: Iodure de Propidium
TMS: Tétraméthylsilane
ICMPE: Institut de Chimie et des Matériaux de Paris Est
s: singulet
d: doublet
dd: doublet de doublets
m: multiplet
t: triplet
Cyclo: Cyclohexane
TNP: Tube Non Pure
 IC_{50} : Concentration Inhibitrice médiane

Liste des figures

Figure 1: Feuilles de <i>Morinda geminata</i> Photos: (O. Sambou, 2016)	7
Figure 2: Fleurs de <i>Morinda geminata</i> DC (photo: O. Sambou 2016)	7
Figure 3: Fruits de <i>Morinda geminata</i> DC (Photo: O. Sambou 2016)	8
Figure 4: Racines de <i>Morinda geminata</i> DC (Photo O. Sambou 2016)	8
Figure 5: Distribution de <i>Morinda geminata</i> DC en Afrique (Jardin botanique)	9
Figure 6: Structure de l'antraquinone	13
Figure 7: Anthraquinone isolées du genre <i>Morinda</i>	16
Figure 8: Biosynthèse des anthraquinones	17
Figure 9: Les Classes de coumarines	18
Figure 10: Structures de coumarines isolées dans le genre <i>Morinda</i>	19
Figure 11: Biosynthèse des coumarines	19
Figure 12: Flavonoïdes isolés du genre <i>Morinda</i>	20
Figure 13: Biosynthèse des flavonoïdes.....	21
Figure 14: Structure générale des lignanes	22
Figure 15: Structures de lignanes isolés du genre <i>Morinda</i>	22
Figure 16: Schéma de biosynthèse des lignanes	23
Figure 17: Six unités d'isoprène.....	24
Figure 18: Structures de triterpènes	24
Figure 19: Biosynthèse des triterpènes	25
Figure 20: Iridoïdes isolés du genre <i>Morinda</i>	26
Figure 21: Biosynthèse des iridoïdes	27
Figure 22: Structures de sucres isolés dans le genre <i>Morinda</i>	27
Figure 23: Evolution de l'œdème dans les différents lots en fonction du temps. T0 = 30 mn ; T1 = 60 mn ; T2 = 120 mn et T3 = 180 mn.	34
Figure 24: Plante de <i>Icacina oliviformis</i> (photo de O. Sambou 2018)	35
Figure 25: Les maladies traitées par le <i>Morinda geminata</i> DC	38
Figure 26: Les différentes parties utilisées de <i>Morinda geminata</i> DC	38
Figure 27: Les modes d'utilisations de <i>Morinda geminata</i> DC.....	39
Figure 28: Spectre de masse du composé SBMg1RC (ESI).....	42
Figure 29: Spectre infrarouge du composé SBMg1RC	43
Figure 30: Spectre de carbone du composé SBMg1RC.....	45
Figure 31: Spectre de DEPT du composé SBMg1RC	46
Figure 32: Spectre de HSQC du composé SBMg1RC.....	46
Figure 33: Spectre de proton du composé SBMg1RC.....	47
Figure 34: Spectre de COSY du composé SBMg1RC.....	48
Figure 35: Corrélations COSY du composé SBMg1RC.....	48
Figure 36: Spectre HMBC du composé SBMg1RC	50
Figure 37: Corrélations HMBC du composé SBMg1RC.....	51
Figure 38: Corrélations HMBC du composé SBMg2RC.....	52
Figure 39: Spectre des composés SBMg9-4 et SBMg12-4.....	54
Figure 40: Corrélations en HMBC du composé SBMg17AC.....	55
Figure 41: Corrélations HMBC du composé SBMg3ET	56

Figure 42: Structure du composé SBMg6ET	58
Figure 43: Structure du composé SBMg11ET	59
Figure 44: Exemple de spectre RMN de matière grasse	60
Figure 45: Spectre IR du composé SBMg12FAC	61
Figure 46: Spectre RMN 13C du composé SBMg12FAC	62
Figure 47: Spectre DEPT du composé SBMg12FAC	62
Figure 48: Spectre HSQC du composé SBMg12FAC	63
Figure 49: Spectre RMN 1H du composé SBMg12FAC	64
Figure 50: Spectre et corrélations HMBC du composé SBMg12FAC	65
Figure 51: Structure du composé SBMg12FAC	66
Figure 53: Spectre infrarouge du composé F7	68
Figure 54: Spectre 13C du composé R7	68
Figure 55: Spectre DEPT du composé R7	69
Figure 56: Spectre HSQC du composé du composé R7	70
Figure 57: Spectre RMN 1H du composé R7	71
Figure 58: Spectre de COSY du composé R7	72
Figure 59: Corrélations COSY du composé R7	72
Figure 60: Spectre HMBC du composé R7	73
Figure 61: Structure du composé R7	73
Figure 62: Usages de <i>Icacina oliviformis</i>	74
Figure 63: Les maladies traitées par <i>Icacina oliviformis</i>	74
Figure 64: Les modes d'utilisation de <i>Icacina oliviformis</i>	75
Figure 65: Spectre de Masse du composé I3	76
Figure 66: Spectre de carbone 13C du composé I3	77
Figure 67: Spectre DEPT du composé I3	78
Figure 68: Spectre RMN 1H du composé I3	79
Figure 69: Spectre COSY du composé I3	79
Figure 70: Spectre HMBC du composé I3	80
Figure 71: Structure du composé I3	82
Figure 72: Spectre de masse du composé P	84
Figure 73: Carte présentant la zone d'étude	86
Figure 74: Diagramme d'extraction de la racine de <i>Morinda geminata</i>	88
Figure 75: Diagramme d'extraction de l'écorce de <i>Morinda geminata</i>	89
Figure 76: Diagramme d'extraction des graines de <i>Icacina oliviformis</i>	91
Figure 77: Test de flavonoïdes des extraits de la racine	92
Figure 78: Test d'anthraquinones	93
Figure 79: Mise en évidence des saponines	94
Figure 80: Test de présence d'irroïdes	94
Figure 81: Suivie par CCM de l'extrait cyclohexanique	96
Figure 82: Suivie chromatographie sur gel de silice de la purification de la fraction FR1	97
Figure 83: Purification par chromatographie semi-préparative sur plaque CCM	98
Figure 84: Schéma de fractionnement de l'extrait cyclohexane	98
Figure 85: Plaque CCM récapitulative du fractionnement de l'extrait cyclohexanique	99
Figure 86: Spectre HPLC de la fraction SBMg9-2AC	100
Figure 87: Schéma de purification de l'extrait acétate d'éthyle	101
Figure 88: Plaque CCM récapitulative de la purification	101

Figure 89: Spectre LC/MS de la fraction SBMg7ET.....	103
Figure 90: Diagramme de purification de la fraction FR2.....	104
Figure 91: Plaque CCM récapitulative de la purification de la fraction FR2.....	104
Figure 92: Schéma d'extraction de l'extrait méthanol de l'écorce	106
Figure 93: Plaque CCM des premiers tubes de la purification	106
Figure 94: Plaque CCM	106
Figure 95: Plaque CCM récapitulative de l'extrait CH ₂ Cl ₂	107
Figure 96: Produit (P) isolé de l'extrait éthanol.....	107
Figure 97: Anatomie bactérienne	112
Figure 98: Résultats de la coloration de Gram.....	113
Figure 99: Détermination du diamètre d'inhibition en milieu gélosé.....	115
Figure 100: Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide	115
Figure 101: Détermination de la concentration minimale bactéricide en milieu liquide	116
Figure 102: Détermination de la CMI en milieu liquide (Photo de O. SAMBOU 2017)....	124
Figure 103: Spectre de carbone du composé SBMg2RC	144
Figure 104: Spectre du proton du composé SBMg2RC	144
Figure 105: Spectre ¹³ C du composé SBMg17AC.....	145
Figure 106: Spectre DEPT 135 du composé SBMg17AC.....	145
Figure 107: Spectre HSQC du composé SBMg17AC	146
Figure 108: Spectre de proton du composé SBMg17AC.....	146
Figure 109: Spectre HMBC du composé SBMg17AC	147
Figure 110: Spectre ¹³ C du composé SBMg3ET	147
Figure 111: Spectre DEPT 135 du composé SBMg3ET.....	148
Figure 112: Spectre HSQC du composé SBMg3ET.....	148
Figure 113: Spectre du proton du composé SBMg3ET	149
Figure 114: Spectre COSY du composé SBMg3ET.....	149
Figure 115: Spectre HMBC du composé SBMg3ET7.....	150
Figure 116: Spectre ¹³ C du composé SBMg6ET	150
Figure 117: Spectre DEPT 135 du composé SBMg6ET.....	151
Figure 118: Spectre HSQC du composé SBMg6ET.....	151
Figure 119: Spectre ¹ H du composé SBMg6ET	152
Figure 120: Spectre COSY du composé SBMg6ET.....	152
Figure 121: Spectre HMBC du composé SBMg6ET.....	153
Figure 122: Spectre ¹³ C du composé SBMg11ET	153
Figure 123: Spectre DEPT 135 du composé SBMg11ET.....	154
Figure 124: Spectre HSQC du composé SBMg11ET.....	154
Figure 125: Spectre ¹ H du composé SBMg11ET	155
Figure 126: Spectre COSY du composé SBMg11ET.....	155
Figure 127: Spectre HMBC du composé SBMg11ET.....	156
Figure 128: Spectre HSQC du composé I3.....	156
Figure 129: Spectre HMBC du composé I3.....	157

Liste des tableaux

Tableau 1: Les anthraquinones isolées des espèces du genre <i>Morinda</i>	14
Tableau 2: Activité antimicrobienne des extraits de <i>M. geminata</i> :	33
Tableau 3: Activité antimicrobienne de l'extrait MeOH/H ₂ O des feuilles de <i>M. geminata</i> ...	33
Tableau 4: Volume moyen de l'œdème et pourcentage d'inhibition après 3 heures.....	34
Tableau 5: Bilan massique et rendements des extraits	40
Tableau 6: Résultats du screening phytochimique <i>Morinda geminata</i>	41
Tableau 7: Déplacements chimiques du composé SBMg1RC	51
Tableau 8: Déplacements chimiques du composé SBMg2RC	53
Tableau 9: Déplacements chimiques du composé SBMg3ET.....	57
Tableau 10: Déplacements chimiques du composé SBMg11ET.....	59
Tableau 11: Déplacements chimiques du composé SBMg12FAC.....	66
Tableau 12: Rendement des extraits de la graine de <i>Icacina oliviformis</i>	75
Tableau 13: Résultats du screening phytochimique de la graine.....	76
Tableau 14: Déplacements chimiques du composé I3.....	82
Tableau 15: Bilan de la chromatographie de l'extrait cyclohexane.....	99
Tableau 16: Bilan de la chromatographie de l'extrait acétate d'éthyle	102
Tableau 17: Bilan de la chromatographie de l'extrait éthanol.....	103
Tableau 18: Bilan de la chromatographie de l'extrait AcOEt de la feuille.....	105
Tableau 19: Bilan de la purification de l'extrait méthanol de l'écorce	106
Tableau 20: Diamètre d'inhibition des composés isolés (5 mg/mL)	118
Tableau 21: Concentration minimale inhibitrice et concentration minimale bactéricide des composés isolés.....	119
Tableau 22: Profil des bactéries testées	121
Tableau 23: Fiche enquête ethnopharmacologie sur <i>Morinda geminata</i> DC	142
Tableau 24: Fiche enquête ethnopharmacologie sur <i>Icacina oliviformis</i>	143

Table des matières

Remerciements.....	I
Liste des abréviations.....	IV
Liste des figures.....	VI
Liste des tableaux.....	IX
Table des matières.....	X
Introduction.....	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES PLANTES SELECTIONNEES	3
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. <i>Morinda geminata</i> DC.....	4
I.1. Etude botanique.....	4
I.1.1. Caractères généraux sur les <i>Rubiaceae</i>	4
I.1.1.1. Feuilles des <i>Rubiaceae</i>	4
I.1.1.2. Fruits des <i>Rubiaceae</i>	4
I.1.1.3. Fleurs des <i>Rubiaceae</i>	4
I.1.2. Genre <i>Morinda</i>	4
I.1.3. Description botanique du <i>Morinda geminata</i> DC.....	6
I.1.3.1. Taxonomie.....	6
I.1.3.2. Noms en langues nationales.....	6
I.1.3.3. Noms en langue étrangère.....	7
I.1.3.4. Feuilles de <i>M. geminata</i> DC.....	7
I.1.3.5. Fleurs de <i>M. geminata</i> DC.....	7
I.1.3.6. Fruits de <i>M. geminata</i> DC.....	8
I.1.3.7. Racines de <i>M. geminata</i> DC.....	8
I.1.3.8. Distribution géographique.....	8
I.2. Utilisations traditionnelles de <i>Morinda geminata</i> DC.....	9
I.3. Autres utilisations du genre <i>Morinda</i>	11
I.4. Composition chimique du genre <i>Morinda</i>	12
I.5.1. Polyphénols.....	12
I.5.1.1. Anthraquinones.....	13
I.5.1.1.1. Généralité sur les anthraquinones.....	13
I.5.1.1.2. Biosynthèse des anthraquinones (AQ).....	17
I.5.1.2. Coumarines.....	18
I.5.1.2.1. Généralité sur les coumarines.....	18
I.5.1.2.2. Biosynthèse des coumarines.....	19

I.5.1.3. Flavonoïdes.....	20
I.5.1.3.1. Généralités sur les flavonoïdes	20
I.5.1.3.2. Biosynthèse des flavonoïdes	21
I.5.1.4. Lignanes.....	22
I.5.1.4.1. Généralité sur les lignanes	22
I.5.1.4.2. Biosynthèse des lignanes	23
I.5.2. Terpènes et stéroles.	24
I.5.2.1. Triterpènes	24
I.5.2.1.1. Généralité sur les triterpènes.....	24
I.5.2.1.2. Biosynthèse des triterpènes.....	25
I.5.2.2. Iridoïdes	26
I.5.2.2.1. Généralité sur les iridoïdes.....	26
I.5.2.2.2. Biosynthèse des iridoïdes.....	26
I.5.3. Sucres	27
I.6. Propriétés biologiques des métabolites secondaires du genre <i>Morinda</i>	28
I.6.1. Polyphénols	28
I.6.1.1. Anthraquinones.....	28
I.6.1.2. Propriétés des coumarines	30
I.6.1.3. Propriétés des flavonoïdes	30
I.6.1.4. Propriétés des lignanes	31
I.6.2. Propriétés des terpènes et stéroles.....	31
I.6.2.1. Propriétés des triterpènes.....	31
I.6.2.2. Propriétés des iridoïdes.....	31
I.6.3. Propriétés des sucres	31
I.7. Etudes biologiques antérieures sur <i>Morinda geminata</i> DC	32
I.7.1. Activités antibactériennes	32
I.7.2. Tests antidiabétiques	34
I.7.3. Activités anti-inflammatoire	34
II. <i>Icacina oliviformis</i>	35
II.1. Etude botanique	35
II.2. Utilisations traditionnelles de <i>Icacina oliviformis</i>	36
II.3. Composition chimique des graines	36
II.4. Propriétés biologiques de <i>Icacina oliviformis</i>	37
CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSIONS	38
I. Etude phytochimique de <i>Morinda geminata</i>	38

I.1. Résultats de l'enquête ethnopharmacologique.....	38
I.2. Résultats de l'extraction.....	39
I.3. Résultats Screening des extraits.....	41
I.4. Résultats du fractionnement des extraits de <i>Morinda geminata</i>	41
I.4.1. Caractérisation structurale des composés isolés de l'extrait cyclohexanique de la racine	41
I.4.1.1. Détermination de la structure du composé SBMg1RC	42
I.4.1.2. Détermination de la structure du composé SBMg2RC	52
I.4.2. Caractérisation structurale des composés isolés de l'extrait AcOEt de la racine....	53
I.4.2.1. Détermination de la structure du composé SBMg12AC et SBMg9-4AC	53
I.4.2.2. Détermination de la structure du composé SBMg16AC	54
I.4.2.3. Détermination de la structure du composé SBMg17AC	54
I.4.3. Caractérisation structurale des composés isolés de l'extrait EtOH de la racine	55
I.4.3.1. Détermination de la structure du composé SBMg3ET.....	55
I.4.3.2. Détermination de la structure du composé SBMg6ET.....	57
I.4.3.3. Détermination de la structure du composé SBMg11ET.....	58
I.4.4. Caractérisation structurale de SBMg12FAC isolé de l'extrait AcOEt de la feuille..	60
I.4.5. Caractérisation structurale du composé R7 isolé de l'extrait méthanol de l'écorce67	
II. Etude phytochimique de la graine <i>Icacina oliviformis</i>	74
II.1. Résultats d'enquête ethnopharmacologie.....	74
II.2. Résultats extraction.....	75
II.3. Résultats Screening des extraits	75
II.4. Caractérisation structurale des composés isolés de la graine	76
II.4.1. Détermination de la structure du composé I3.....	76
II.4.2. Détermination de la structure du composé isolé (P)	83
CHAPITRE III: DETAILS EXPERIMENTAUX LIES A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES ESPECES ETUDIEES	85
I. Enquête ethnopharmacologie	85
II. Matériel utilisé.....	86
II.1. Matériel végétal	86
II.2. Matériel de laboratoire.....	86
III. Extraction.....	87
III.1. Extraction solide – liquide.....	87
III.2. Macération.....	87
III.3. Organes de la plante mis en extraction.....	87

III.3.1. Racines.....	87
III.3.2. Feuilles.....	88
III.3.3. Ecorces.....	89
III.4. Graines de <i>Icacina oliviformis</i>	90
IV. Technique de caractérisation phytochimique (screening phytochimique)	91
IV.1. Réactif de LIEBERMANN (révélateur des stérols, stéroïdes, terpènes)	92
IV.2. Réactif au chlorure ferrique (FeCl ₃) (révélateur des polyphénols).....	92
IV.3. Réaction de SHIBATA (révélateur des flavonoïdes).....	92
IV.4. Réactif au chlorure ferrique (FeCl ₃) (révélateur de tannins).....	93
IV.5. Réactif à la potasse (révélateur des anthraquinones)	93
IV.6. Réactifs de DRAGENDORFF et de BOUCHARDAT (révélateur d'alcaloïdes).....	93
IV.7. Mise en évidence des saponines.....	93
IV.8. Caractérisation des iridoïdes:	94
V. Méthodes chromatographiques	95
V.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	95
V.2. Chromatographie sur colonne	96
V.3. Chromatographie préparative sur couche mince	97
V.4. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).....	98
V.5. Isolement et purification.....	98
V.5.1. Racines de <i>M. geminata</i> DC	98
V.5.1.1. Extrait cyclohexane.....	98
V.5.1.2. Extrait Acétate d'éthyle	99
V.5.1.3. Extrait Ethanol	102
V.5.2. Les feuilles de <i>M. geminata</i> DC	104
V.5.3. Ecorce de <i>M. geminata</i> DC.....	105
V.5.4. Graines de <i>Icacina oliviformis</i>	107
V.5.4.1. Extrait dichlorométhane	107
V.5.4.2. Extrait éthanoïque	107
VI. Méthodes physicochimiques.....	108
VI.1. Spectrométrie de Masse (SM).....	108
VI.2. Spectrométrie d'infrarouge	108
VI.3. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	108
VI.3.1. Corrélations homonucléaires	108
VI.3.2. Corrélations hétéronucléaires	109
VII. Conclusion partielle.....	109

DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIOLOGIQUE DES MOLECULES ISOLEES	111
CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DU MONDE MICROBIEN.....	112
I. Historique	112
II. Définition	112
III. Anatomie.....	112
IV. Classification	113
V. Antibiotique	113
V.1.-Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.....	114
V.2. Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide.....	115
V.3. Détermination de la CMB	116
V.4. Notion de Sensibilité/ Résistance	116
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION BIOLOGIQUES DES EXTRAITS ET CEUX DES MOLECULES ISOLEES DE <i>MORINDA GEMINATA</i> DC	118
I. Résultats antibactériens des extraits	118
II. Résultats antibactériens (CMI et CMB) des composés isolés.....	118
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTAUX RELATIFS A L'ETUDE BIOLOGIQUE	121
I. Matériel:.....	121
I.1. Matériel végétal	121
I.2. Matériel bactérien	121
I.3. Milieux de Culture	121
I.4. Matériels du laboratoire	121
II. Méthodes	122
II.1. Préparation de l'extrait végétal.....	122
II.2. Étude de l'activité antibactérienne en milieu solide.....	122
II.2.1. Préparation de l'inoculum.....	122
II.2.2. Test de sensibilité.....	122
II.3. Étude de l'activité antibactérienne en milieu liquide	123
II.3.1. Préparation de l'inoculum.....	123
II.3.2. Numération de l'inoculum	123
II.3.3. Inoculation	123
II.3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	123
II.3.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	124
III. Conclusion partielle	124
Conclusion	125

Bibliographie.....	127
Annexe	142
Résumé	157

Introduction

Depuis toujours, l'homme s'est servi de la nature pour subvenir à ses besoins nutritionnels, vestimentaires mais également médicamenteux.

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire [1]. On trouve ainsi de nombreux produits chez les tradipraticiens, chez les herboristes dans les marchés, dans la rue ou encore à la source, à savoir dans les villages de l'intérieur du Sénégal. Les plantes médicinales sont utilisées entièrement ou en partie (feuille, tige, racine, écorce, fruit,...) dans des préparations galéniques diverses.

Les produits naturels ont toujours servi de ressources précieuses en termes de recherche de nouveaux composés comme conducteurs pour le développement des médicaments ayant de nombreuses applications thérapeutiques. Autrement dit, les plantes sont devenues une source principale de découverte de nouveaux principes actifs. Actuellement, beaucoup de médicaments disponibles proviennent directement des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) ou sont des dérivés de produits naturels. A titre d'exemple, on peut citer la quinine, la digitaline, la morphine, la colchicine, l'artémisinine, le taxol etc.

Malgré les remarquables progrès de la synthèse organique aux vingtième et vingt-et-unième siècles, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés proviennent directement ou indirectement des plantes [2, 3]. Pourtant, moins de la moitié des plantes ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques.

Le présent travail s'insère dans le cadre du programme de recherche de notre laboratoire, destiné à la valorisation de la biodiversité de la flore du Sénégal, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques.

La sélection des espèces est basée essentiellement sur l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle en vue d'une investigation phytochimique et biologique.

Le genre *Morinda* est utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies (paludisme, diabète, hypertension, cancer...) [4, 5]. *Ikacina oliviformis* est utilisé dans le traitement traditionnel du diabète, du paludisme et dans la prévention du rachitisme [6, 7]. Des études phytochimiques réalisées d'une part dans notre laboratoire [8] et d'autre part dans la littérature sur le tubercule et les feuilles d'*Ikacina oliviformis* ont permis d'isoler des molécules

comme l'icacénone, icacénone, β -sitostérol, stigmastérol, flavone 6- β -C-glycoside et la flavone 8- β -C-glycoside [7–9]. Par contre les graines d'*Icacina oliviformis* n'ont pas encore fait l'objet d'investigations axées sur l'isolement et la caractérisation de molécules.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de *Morinda geminata* et de *Icacina oliviformis*. Ce travail est structuré en deux grandes parties.

La première partie porte sur l'étude phytochimique des feuilles, des racines et des écorces de *Morinda geminata* et des graines d'*Icacina oliviformis*. La seconde partie porte sur l'étude de l'activité biologique des molécules isolées de *Morinda geminata* DC.

- La première partie comporte trois chapitres.

Dans le premier chapitre, nous aborderons la revue botanique et les différentes utilisations en médecine traditionnelle au criblage biologique, qui ont conduit et orienté cette étude vers le choix de ces plantes seront abordés. La revue bibliographique sur la phytochimie sera présentée dans ce même chapitre.

Dans le deuxième chapitre, les résultats et la discussion de l'étude ethnopharmacologie et phytochimique avec les étapes d'isolement et de détermination de structures seront développés. Le troisième chapitre relatara les détails expérimentaux liés à l'étude phytochimique des espèces étudiées.

- La deuxième partie est également divisée en trois chapitres.

Le premier chapitre fait un rappel bibliographique du monde microbien.

Le deuxième chapitre présente les résultats biologiques des extraits et ceux des molécules isolées de *Morinda geminata* DC.

Enfin le dernier chapitre de cette partie est consacré aux matériels et méthodes expérimentaux relatifs à l'étude biologique

PREMIERE PARTIE :
ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES PLANTES
SELECTIONNEES

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. *Morinda geminata* DC

I.1. Etude botanique

Morinda geminata est une espèce de la famille des *Rubiaceae* et du genre *Morinda*.

I.1.1. Caractères généraux sur les *Rubiaceae*

Les rubiacées sont en majorité des ligneuses : ce sont des arbustes ou de petits arbres, mais aussi des lianes, des plantes grimpantes ou des épiphytes. C'est une famille très complexe du fait de ses caractères morphologiques propres et du grand nombre de genres qu'elle comporte (environ 400) [10].

I.1.1.1. Feuilles des *Rubiaceae*

Les feuilles sont simples, opposées, décussées, et à marge entière. Entre elles il y a des stipules. Les autres "feuilles" des verticilles sont en fait les stipules transformées en feuilles. Elles sont aussi groupées en verticilles de 4 à 12.

I.1.1.2. Fruits des *Rubiaceae*

Le fruit est généralement une drupe ou une baie. Les graines sont rarement ailées.

I.1.1.3. Fleurs des *Rubiaceae*

La corolle de la fleur est soudée et tubuleuse ; les étamines sont soudées au tube de la corolle. Les fleurs sont groupées en cimes ramifiées, elles ont une symétrie radiaire et sont généralement blanches, parfois jaunes, roses ou bleues. Les fleurs sont généralement adaptées à la pollinisation par les insectes. L'ovaire est infère ce qui signifie qu'il se situe sous le calice. Les étamines, en nombre égal à celui des lobes de la corolle, sont disposées alternativement avec ces derniers [10, 11].

I.1.2. Genre *Morinda*

Le genre *Morinda* comporte environ 80 espèces décrites. Elles se présentent sous la forme d'arbres, d'arbustes et de lianes. Les caractéristiques botaniques communes à ce genre d'espèces sont décrites par « l'encyclopédie méthodique ou par ordre de matière » selon la description morphologique qui suit :

- Pas de tubercule, pas d'épine, raphides nombreuses.
- Partie végétative non fétide quand elle est broyée.
- Tronc et tige glabres et non ramifiés, branches glabres.

Première Partie : Etude phytochimique des plantes sélectionnées

- Pas de racines adventives sur les entre-nœuds, stipules interpétiolaires persistantes directement rattachées, entières, de forme elliptique ou lanceolée, glabres.
- Grandes feuilles pétiolées opposées, isophylles, lamina membraneuse à parcheminée voire à aspect de cuir tanné.
- Dimension de 12 à 25 cm de long sur 9 à 18 cm de large, forme elliptique, extrémité pointue.
- Non décurrentes et non poilues sur les bords, face supérieure glabre, inférieure glabre ou légèrement pubescente, nervures latérales proéminentes, 7 à 10 paires, pétiole de 1 à 2 cm de long glabre.
- Présence d'une inflorescence axillaire ou terminale, groupe de fleurs solitaires ou en faisceau sur un axe ramifié.
- Les inflorescences sont des cymes proches des ombelles.
- Présence ou non d'un involucre de bractées, présence de bractées et de bractéales entre les fleurs.
- Fleurs composées de quatre à six parties, actinomorphes, bisexuées ou monoséxuées, hétérostyllées ou monostyllées, sans sémaphylles, parfumées, présence d'un pédicelle glabre.
- Tube du calice très réduit (moins de deux mm), poils présents ou non, lobes courts et très développés (sup à 2 mm), égaux, glabres ou pubescents, corolle retournée (1 à 2 cm de long), extérieur du tube pubescent, partie intérieure glabre ou pubescente, lobes ovales ou arrondis, coté abaxial glabre ou pubescent, coté adaxial idem, bords non poilus.
- Les anthères sont dorsifixées, adhérentes ou semi-adhérentes au tube de la corolle. Ces anthères ont une forme linéaire, ovale ou elliptique.
- Déhiscence par des fentes longitudinales.
- Les stylles sont adhérents ou semi adhérents au tube de la corolle, térétes et sans poil. Les stigmates sont entiers, lancéolés et sans papille.
- L'ovaire à placentation axile a le plus souvent deux loges. L'ovule au nombre de un par loge est pendant.
- Les fruits charnus, nombreux sont des drupes de forme globuleuse ou ellipsoïde. Présence d'une couronne formée par des restes de calice.
- Les graines, une par loge, non anguleuses, sans ailette, sont endospermes.
- Pollen binucléé, avec au moins trois orifices.

I.1.3. Description botanique du *Morinda geminata* DC

Morinda geminata DC appartient à la famille des *Rubiaceae*. On peut la trouver sous forme d'arbuste ou d'arbres [12]. Elle peut atteindre 10 à 15 m de haut, d'aspect tourmenté, caractérisé par ses jeunes rameaux quadrangulaires

I.1.3.1. Taxonomie

Morinda geminata DC appartient par hiérarchie décroissante:

- ✓ au règne végétal (Margulis eucaryotes)
- ✓ au groupe ou domaine d'*Eukaryota* (Whittaker et Margulis eucaryotes)
- ✓ à l'embranchement des *Tracheophyta* (Cavalier-Smith)
- ✓ au sous-embranchement des *Euphyllophytina*, *Infraphylum*; *Radiatopses* (Kenrick & Crane)
- ✓ à la classe des *Magnoliopsida* (Brongniart)
- ✓ à la sous-classe des *Lamiidae* (Takhtajan ex Reveal)
- ✓ au superordre des *Gentiananae* (Thorne ex Reveal)
- ✓ au sous-ordre des *Rubiale* (Dumortier)
- ✓ à la famille des *Rubiaceae*, (A.I. De Jussieu)
- ✓ au genre *Morinda*.
- ✓ Nom botanique, *Morinda geminata* DC

I.1.3.2. Noms en langues nationales

Baïnouks: *kiloron, kiloro*.

Balantes: *ngun, guñ*.

Bambaras: *mangana, ñagana, a gnamb o-daset* (= ce que mange le chien).

Bassari: *a naba*.

Créole portugais: *bulunduba, po di blaña, po de liti*.

Diolas: *élogi* (chez les Bayottes), *anaba, wada, bompété, bu légin, bu leyum* (à Tendouk), *bu lélèv, bulokoñ, é lokoñ, kadabèl* (Fogny), *uanda*.

Mancagnes: *be nafukon, be guna*.

Mandingues: *bolokadjibo, bolokodj, batodogo* (= grosse tête),

Mandjaque: *be kuy*.

Peuls: *ngarba, wada*

Socé: *bolo kajibo* (= grosse tête).

Wolofs: *vada, vanda* [13].

I.1.3.3. Noms en langue étrangère

Anglais: *brimstone bush*.

Français: *ouanda* (nom malinké utilisé par les forestiers).

I.1.3.4. Feuilles de *M. geminata* DC

Les feuilles (10 à 20 cm de long), sont légèrement acuminées. Elles sont opposées et marquées par de nombreux points translucides, les nervures secondaires garnies au-dessus de point épars et des pétioles robustes.



Figure 1: Feuilles de Morinda geminata Photos: (O. Sambou, 2016)

I.1.3.5. Fleurs de *M. geminata* DC

Les inflorescences sont groupées en têtes globuleuses portées sur de longs et larges pédoncules souvent fasciculés par deux ou trois à la différence du *M. lucida*.

La corolle, de couleur blanc-crème, facilement caduque, laisse apparaître le style grêle aussi long que les stigmates bifides [14].



Figure 2: Fleurs de Morinda geminata DC (photo: O. Sambou 2016)

I.1.3.6. Fruits de *M. geminata* DC

Les fruits sont des capsules. Les graines sont rarement ailées. Masse ovoïde, brunâtre à maturité, d'odeur désagréable (fromage fermenté), qui tire vers celle de l'artichaut.



Figure 3: Fruits de Morinda geminata DC (Photo: O. Sambou 2016)

I.1.3.7. Racines de *M. geminata* DC

Elles sont de couleur jaune-orangé, on les utilise également pour obtenir une teinte brune.



Figure 4: Racines de Morinda geminata DC (Photo O. Sambou 2016)

I.1.3.8. Distribution géographique

Les espèces du genre *Morinda* se répartissent dans la zone tropicale du globe. Parmi les espèces que comporte ce genre, certaines sont connues pour les phytomolécules thérapeutiques qu'elles

synthétisent. Par exemple, le jus du fruit de *Morinda citrifolia* connu aux Etats unis sous l'appellation de « Tahitian Noni » est approuvé comme complément alimentaire en diététique [15].

Le *Morinda geminata* est un arbre utilisé dans les haies de Basse Guinée et sur la pente méridionale du plateau du Fouta-Djallon ainsi qu'au Sierra-Leone [16]. Il est très fréquent au sud du Mali [17] et dans toutes les régions de la Guinée, surtout dans la zone forestière et le littoral; Cet arbuste se rencontre dans les forêts secondaires ou dans les jachères. On le retrouve également en Casamance, au Sénégal surtout le long du littoral et la région Dakaroise. Il apparaît aussi en Gambie, en Sierra Leone, en Côte d'Ivoire, au Nigeria et au Cameroun.



Figure 5: Distribution de *Morinda geminata* DC en Afrique (Jardin botanique)

I.2. Utilisations traditionnelles de *Morinda geminata* DC

Le *Morinda geminata* est utilisé dans les haies de basse guinée et sur la pente méridionale du plateau du fouta-Djallon, ainsi qu'en Sierra-Leone où 14,2 % de la population l'utilise pour le traitement du paludisme [4].

La décoction des feuilles et racines additionnée au jus de *Citrus aurantifolia* est utilisée dans ce même pays pour le traitement du paludisme [18].

Chez les Bainouk de Djibonker, région de Ziguinchor, la plante est utilisée contre les dermatoses [19].

Cette plante est utilisée par les vieux colons dans des cas désespérés de fièvre bilieuse hémoglobinurique [14].

La décoction ou l'infusion obtenue à partir de 100 g de feuilles environ pour un litre d'eau est utilisée par les indigènes comme diurétique et antipaludique [14].

Première Partie : Etude phytochimique des plantes sélectionnées

Les feuilles fraîches en fumigation luttent contre le paludisme et la fièvre, elles sont aussi utilisées pour le traitement des douleurs gastriques.

La décoction des feuilles et des écorces est utilisée contre les hépatites et les rhumatismes.

L'infusion des feuilles est utilisée contre la toux, les maux de tête et comme purgatif et tonique pour la digestion.

Une potion faite à partir des feuilles macérées est utilisée pour traiter les rhumatismes. Les feuilles infusées sont données aux enfants souffrant de fièvre, mais aussi aux femmes en travail pour éliminer l'enflure et la douleur. Elle est aussi utilisée pour laver le corps après un accouchement [20].

En Afrique centrale les feuilles sont utilisées comme antiparasitaire. Au Togo l'écorce humide est utilisée comme antivenimeuse [21].

Au Congo les feuilles sont utilisées pour le traitement de la blennorragie et d'après certains guérisseurs la poudre de racines serait encore plus efficace [14].

Une association d'écorce de tronc et de feuilles avec *vitex cuneata* est utilisée pour le traitement anti-lépreux en basse Casamance [22].

L'écorce du tronc ou de tige et celle de *Holarrhena africana* en édulcoration (dans du miel) luttent contre l'ulcère gastrique [23].

La myrmécophile et l'emploi tinctorial (jaune) des racines sont bien connues. Il en découle magiquement son emploi contre la fièvre jaune (*Typhus amaryllis*) [16].

Les racines sont utilisées pour traiter l'hémorroïde au Bénin. La poudre sèche des racines est utilisée pour le traitement des plaies.

Au Sénégal la décoction des racines coupées et broyées est utilisée comme mordant de l'indigo pour la teinture artisanale du coton.

En Guinée les racines sont utilisées contre: la forme légère du paludisme, la fièvre jaune et la jaunisse [23], une décoction des racines est utilisée comme un vomitif, laxatif et une infusion de feuilles comme apaisante et rafraîchissement gastrique ou externe comme lotion pour la fièvre et maux de tête [24].

L'écorce des racines de *Morinda geminata* DC est utilisée en Côte d'Ivoire pour teindre les tissus de coton traditionnels en rouge-orange vif, et l'écorce est également ajoutée dans les bains d'indigo pour favoriser la fermentation et obtenir des couleurs bleues plus foncées.

La plante est reconnue pour ses propriétés anti-helminthique, diurétique, hypotensive, activité pharmacologique (*Ascaris lumbricoides*) [21] tinctoriale [12] et antioedemateuse. Elle est une plante insecticide car les écorces de racine ont une action sur *Ascaris lumbricoides* [25].

I.3. Autres utilisations du genre *Morinda*

Les produits naturels intrigants des espèces du genre *Morinda* ont été largement étudiés biologiquement et structurellement en abondance. Presque toutes les parties de ces plantes, telles que les racines, les écorces, les tiges, les feuilles et fruits, ont été utilisées en médecine traditionnelle comme des antibactériens, antifongiques, antitumoraux, antihelminthiques, analgésiques, anti-inflammatoires et effets de renforcement immunitaire [26–31].

Les racines, l'écorce, les tiges, les feuilles et les fruits de plusieurs espèces de *Morinda* sont utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies dont le diabète, l'hypertension et le cancer [5].

Morinda tinctoria L. (*Rubiaceae*). Une décoction des racines mélangée au poivre noir est utilisée pour le traitement de la diarrhée et de la dysenterie [32].

Morinda morindoides : la décoction des feuilles est utilisée pour le traitement du paludisme, de l'amibiase, des hémorroïdes, des vers, de la gonorrhée et de la gale ; il est également utilisé comme agent antirhumatismal. Le jus des feuilles est utilisé en application locale contre les infections cutanées [33].

Morinda lucida Benth.

Les habitants du sud du Sankuru (RDC) extraient de la racine une teinture jaune. L'écorce a des propriétés fébrifuges.

Les décoctions et infusions ou les emplâtres de racines, écorces et feuilles sont des remèdes reconnus contre différents types de fièvre, notamment la fièvre jaune, le paludisme, la trypanosomiase et les poussées de fièvre lors de l'accouchement. La plante est également employée en cas de diabète, hypertension, congestion cérébrale, dysenterie, maux d'estomac, ulcères, lèpre et blennorragie [34].

Morinda citrifolia

Différentes parties de la plante à savoir la tige, l'écorce, la racine, les feuilles et les fruits ont été utilisées en médecine traditionnelle pour traiter un large éventail de maladies, notamment l'hypertension [35], l'athérosclérose [36], les coliques et la diarrhée [37].

I.4. Composition chimique du genre *Morinda*

Dans cette partie, nous parlerons des composés anthracéniques, des triterpènes et des sucres qui constituent les catégories de métabolites secondaires isolés dans nos extraits. Néanmoins nous parlerons de certains métabolites retrouvés dans le genre *Morinda*.

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ils sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction: parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs [38]. L'homme utilise ces métabolites dans de nombreuses préparations thérapeutiques. Ces substances possèdent, parfois à faible dose, des propriétés médicamenteuses et peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques. Les molécules naturelles responsables de ces activités servent aujourd'hui de modèle de la créativité des chimistes qui tentent d'améliorer les activités ou de diminuer les effets secondaires et la toxicité. Ces composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblées en superfamilles chimiques telles que les polyphénols, les terpènes et stérols, les alcaloïdes, etc [39].

Les différentes espèces du *Morinda*, comme toutes plantes médicinales sont exploitées à partir des extraits des différents organes (feuilles, tige, racines et les fruits) de la plante en fonction de la pathologie à traiter. Les investigations phytochimiques faites sur les plantes du genre *Morinda* ont révélé des groupes chimiques caractéristiques pour chaque organe. A partir des différents extraits des organes de ces plantes, des sucres, des flavonoïdes, des iridoïdes, et des anthraquinones ont été isolés. Les anthraquinones sont en abondance au niveau des racines, les flavonoïdes et iridoïdes sont plus présents au niveau des feuilles, tiges et fruits [15]. En plus des flavonoïdes, des coumarines, des triterpénoïdes, des esters d'acides gras des saccharides et des lignanes sont également retrouvés à des quantités moins importantes dans d'autres parties de ces plantes [40-42].

I.5.1. Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires contenant des anneaux phénoliques avec ou sans d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...) dans leur structure. Ils sont produits principalement par les plantes et sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. Ils sont impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet et les agents pathogènes [43]. La grande diversité de ces micro constituants alimentaires a abouti à leur

subdivision en deux grandes catégories: flavonoïdes et non flavonoïdes, elles-mêmes subdivisées en sous catégories [44]. Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées, ...).

I.5.1.1. Anthraquinones

I.5.1.1.1. Généralité sur les anthraquinones

L'anthraquinone est un hydrocarbure aromatique polycyclique se trouvant dans la nature, il dérive de l'anthracène, il est un composé chimique obtenu à partir du goudron [45]. Les anthraquinones sont des pigments naturels importants qui sont largement distribués dans la nature [46]. Ils sont produits dans les bactéries, les champignons, lichens et plantes supérieures [47]. Dans les plantes supérieures, ils se trouvent dans plusieurs familles de plantes telles que: les *Rubiaceae*, les *Rhamnaceae*, les *Polygonaceae* et les *Leguminosae*. Ils appartiennent à la famille des anthracénosides et existent dans les plantes à l'état de génine libre ou sous forme d'hétéroside.

Ces composés sont constitués de trois cycles accolés, dont l'un des cycles est le plus souvent oxydé (Figure 6). Les cycles benzéniques peuvent porter une ou plusieurs fonctions hydroxyles, carboxyles, méthyles, méthoxyles, hydroxyméthyles et former des *O*-hétérosides avec différents sucres.

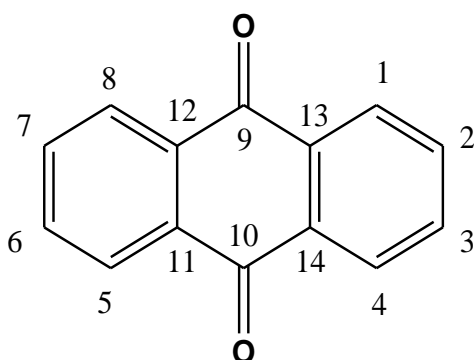


Figure 6: Structure de l'anthraquinone

Les anthraquinones sont des composés aromatiques oxydés, principalement d'origine polycétidique dérivé de la cyclisation d'une chaîne « octacétide ». Les composés polycétides proviennent de chaînes « polycetométhylène » $-(CH_2-CO)_n-$. La présence de groupes fonctionnels et leur disposition sont déterminées par la séquence de réactions d'alkylation, de

Première Partie : Etude phytochimique des plantes sélectionnées

déshydratation, d'oxydation, de condensation, d'hydroxylation et de glycosidation. Le tableau 1 présente des anthraquinones isolées du genre *Morinda*.

Tableau 1: Les anthraquinones isolées des espèces du genre *Morinda*

Composés	Partie de la plante	Plantes
2-Méthyl anthraquinone (Tectoquinone)	Racine	<i>M. officinalis</i> [48]
	Racine	<i>M. umbellate</i> [49]
2-Méthoxy anthraquinone	Racine	<i>M. officinalis</i> [50]
	Racine et écorce	<i>M. umbellate</i> [49]
2-Hydroxyméthyl anthraquinone	Racine et Rhizome	<i>M. parvifolia</i> [51]
2-Hydroxy anthraquinone	Racine et écorce	<i>M. umbellate</i> [49]
2-Formyl-1-hydroxy anthraquinone	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [29]
1-Hydroxy-2-méthyl anthraquinone	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
	Racine et écorce	<i>M. umbellate</i> [49]
2-Hydroxy-1-méthoxy anthraquinone (Alizarin-1-méthyl ether)	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
	Racine	<i>M. officinalis</i> [48]
	Racine	<i>M. officinalis</i> [50]
	Racine	<i>M. parvifolia</i> [51]
	Fruits	<i>M. citrifolia</i> [53]
1,2-Dihydroxy anthraquinone (Alizarin)	Racine et écorce	<i>M. umbellate</i> [49]
1-Hydroxy-2-méthoxy anthraquinone (Alizarin-2-méthyl ether)	Racine et écorce	<i>M. umbellata</i> [49]
1-Méthoxy-2-méthyl anthraquinone	Racine et écorce	<i>M. umbellata</i> [49]
1,2-Dioxyméthylène anthraquinone (Morindaparvin-A)	Racine et écorce	<i>M. parvifolia</i> [51]
1-Hydroxy-2-hydroxyméthyl anthraquinone (Digiferruginol)	Racine et écorce	<i>M. parvifolia</i> [51]
1-Hydroxy-3-hydroxyméthyl anthraquinone	Racine	<i>M. officinalis</i> [48]
1,3-Dihydroxy anthraquinone (Xanthopurpurin)	Racine et écorce	<i>M. umbellate</i> [26]
3-Hydroxy-2-hydroxyméthyl anthraquinone	Racine	<i>M. officinalis</i> [50]
1,3-Dihydroxy-2-méthyl anthraquinone (Rubiadin)	Racine et écorce	<i>M. citrifolia</i> [54]
	Racine	<i>M. angustifolia</i> [55]
	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
3-Hydroxy-1-méthoxy-2-méthyl anthraquinone (Rubiadin-1-méthyl)	Racine et écorce	<i>M. umbellate</i> [49]
	Racine	<i>M. citrifolia</i> [54]

Première Partie : Etude phytochimique des plantes sélectionnées

ether)	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
	Racine	<i>M. officinalis</i> [50]
1,3-Dihydroxy-2-hydroxyméthyl anthraquinone (Lucidin)	Racine	<i>M. umbellata</i> [49]
	Racine	<i>M. citrifolia</i> [54]
3-Hydroxy -2-hydroxyméthyl -1-méthoxy anthraquinone (Damnacanthol)	Racine	<i>M. umbellata</i> [49]
	Racine	<i>M. citrifolia</i> [54]
1,3-Dihydroxy-2-methoxyméthyl anthraquinone (Lucidin- ω -méthyl ether)	Racine	<i>M. angustifolia</i> [55]
	Racine	<i>M. citrifolia</i> [54]
	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
	Rhizome et Racine	<i>M. parvifolia</i> [51]
1,3-Dihydroxy-2-ethoxyméthyl anthraquinone (Lucidin- ω -ethyl ether)	Racine	<i>M. officinalis</i> [48]
	Rhizome et Racine	<i>M. parvifolia</i> [51]
1,3-Dihydroxy-2-butoxyméthyl anthraquinone (Lucidin- ω -buthyl ether)	Racine	<i>M. angustifolia</i> [55]
3-Hydroxy-1-methoxy-2-méthoxyméthyl anthraquinone	Racine	<i>M. angustifolia</i> [55]
	Racine	<i>M. citrifolia</i> [54]
2-Formyl-1,3-dihydroxy anthraquinone (Nordamnacanthol)	Racine	<i>M. citrifolia</i> [54]
	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
2-Formyl-3-hydroxy-1-méthoxy anthraquinone (Damnacanthol)	Racine	<i>M. citrifolia</i> [54]
	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
1-Hydroxy-2-hydroxyméthyl anthraquinone-3-O- β -primeveroside (Lucidin-3-O- β -primeveroside)	Racine	<i>M. angustifolia</i> [55]
1,2-Dihydroxy-3-méthyl anthraquinone	Racine	<i>M. officinalis</i> [50]
1-Hydroxy-2,3-diméthyl anthraquinone	Racine	<i>M. officinalis</i> [48]
1,3-Dihydroxy-2-methoxy anthraquinone	Fruits	<i>M. citrifolia</i> [53]
1,3-Dihydroxy anthraquinone-2-carboxylic acid (Munjistin)	Racine	<i>M. umbellata</i> [49]
1-Hydroxy-6-hydroxyméthyl anthraquinone	Racine et Rhizome	<i>M. parvifolia</i> [51]
1,6-Dihydroxy-2-méthyl anthraquinone (Soranjidiol)		<i>M. citrifolia</i> [54]
		<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [29]
1,5-Dihydroxy-2-hydroxyméthyl anthraquinone (Morindaparvin-B)	Racine et Rhizome	<i>M. parvifolia</i> [51]
	Racine et écorce	<i>M. umbellata</i> [49]
1,8-Dihydroxy-6-méthoxy-3-méthyl anthraquinone (Physcion)	Racine et écorce	<i>M. umbellata</i> [49]
	Racine	<i>M. officinalis</i> [50]

1,5,6-Trihydroxy-2-méthyl anthraquinone (Morindone)	Racine	<i>M. citrifolia</i> [54]
	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
1,6-Dihydroxy-5-méthoxy-2-méthyl anthraquinone (Morindone-5-méthyl ether)	Racine	<i>M. elliptica</i> syn. <i>M. citrifolia</i> var. <i>elliptica</i> [52]
1,3,8-Trihydroxy-2-méthoxy anthraquinone	Racine	<i>M. officinalis</i> [50]
2-Méthoxy-1,3,6-trihydroxy anthraquinone	Fruits	<i>M. citrifolia</i> [53]
1,8-Dihydroxy-2-hydroxyméthyl-5-méthoxy anthraquinone	Fruits	<i>M. citrifolia</i> [53]
1,6-Dihydroxy-5-méthoxy-2-méthyl anthraquinone	Fruits	<i>M. citrifolia</i> [53]
1,8-Dihydroxy-2-méthyl-3,7-diméthoxy anthraquinone	Racine	<i>M. angustifolia</i> [55]

Quelques exemples de structures d'anthraquinones isolées dans le genre *Morinda* sont présentés dans la figure 7 ci-dessous.

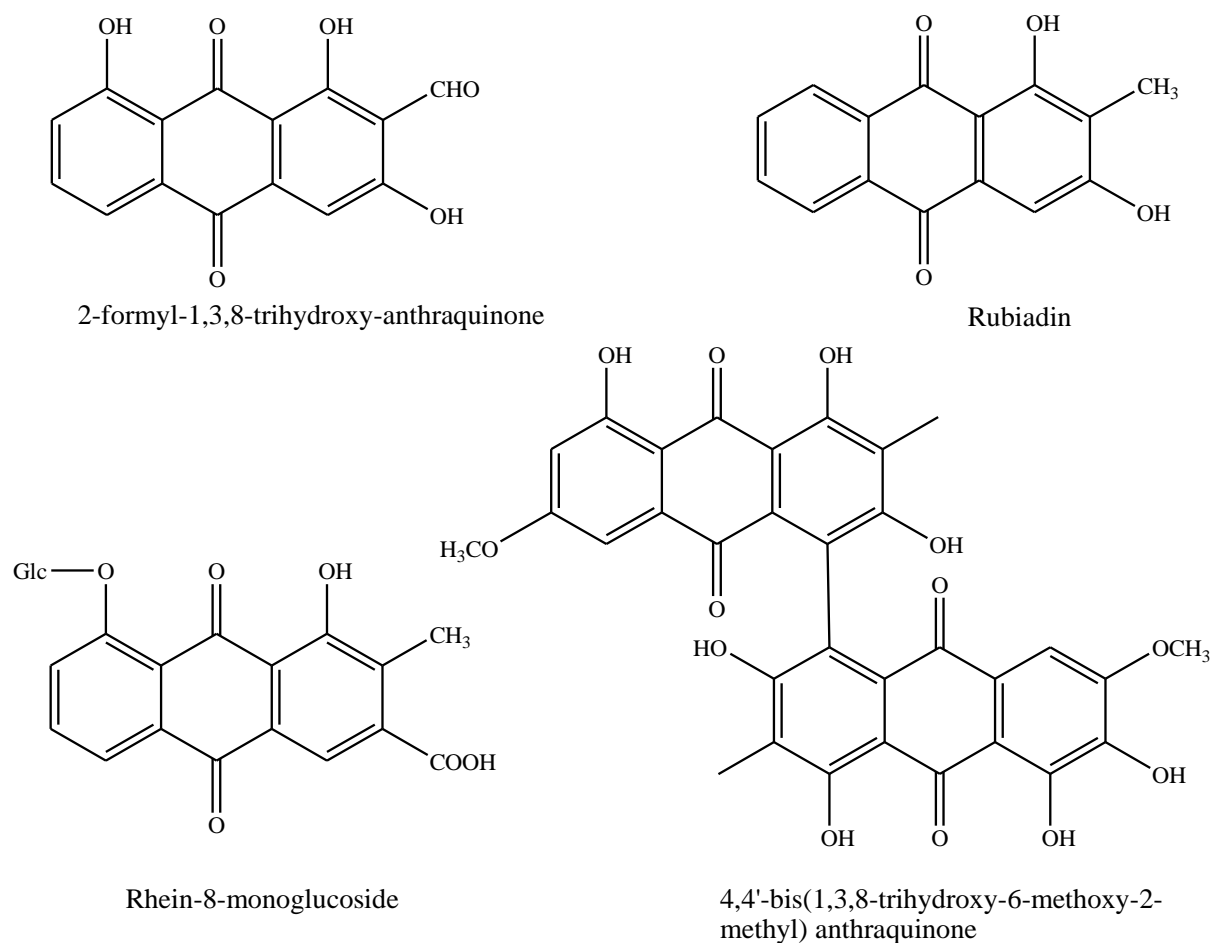


Figure 7: Anthraquinone isolées du genre *Morinda*

I.5.1.1.2. Biosynthèse des anthraquinones (AQ)

Dans la famille *Rubiaceae*, les genres *Galium*, *Morinda*, *Rubia* et *Cinchona* ont été largement utilisés pour étudier la biosynthèse des AQ. Les AQ dans les *Rubiaceae* sont considérés comme étant de type *Rubia*, à savoir anneau A et B sont biosynthétiquement dérivés de l'acide chorismique et α -ketoglutarate via o-succinylbenzoïque (OSB), tandis que le cycle C est formé à partir d'isopentényl diphosphate (IPP) via la voie terpénoïde (Figure 8) [56, 57].

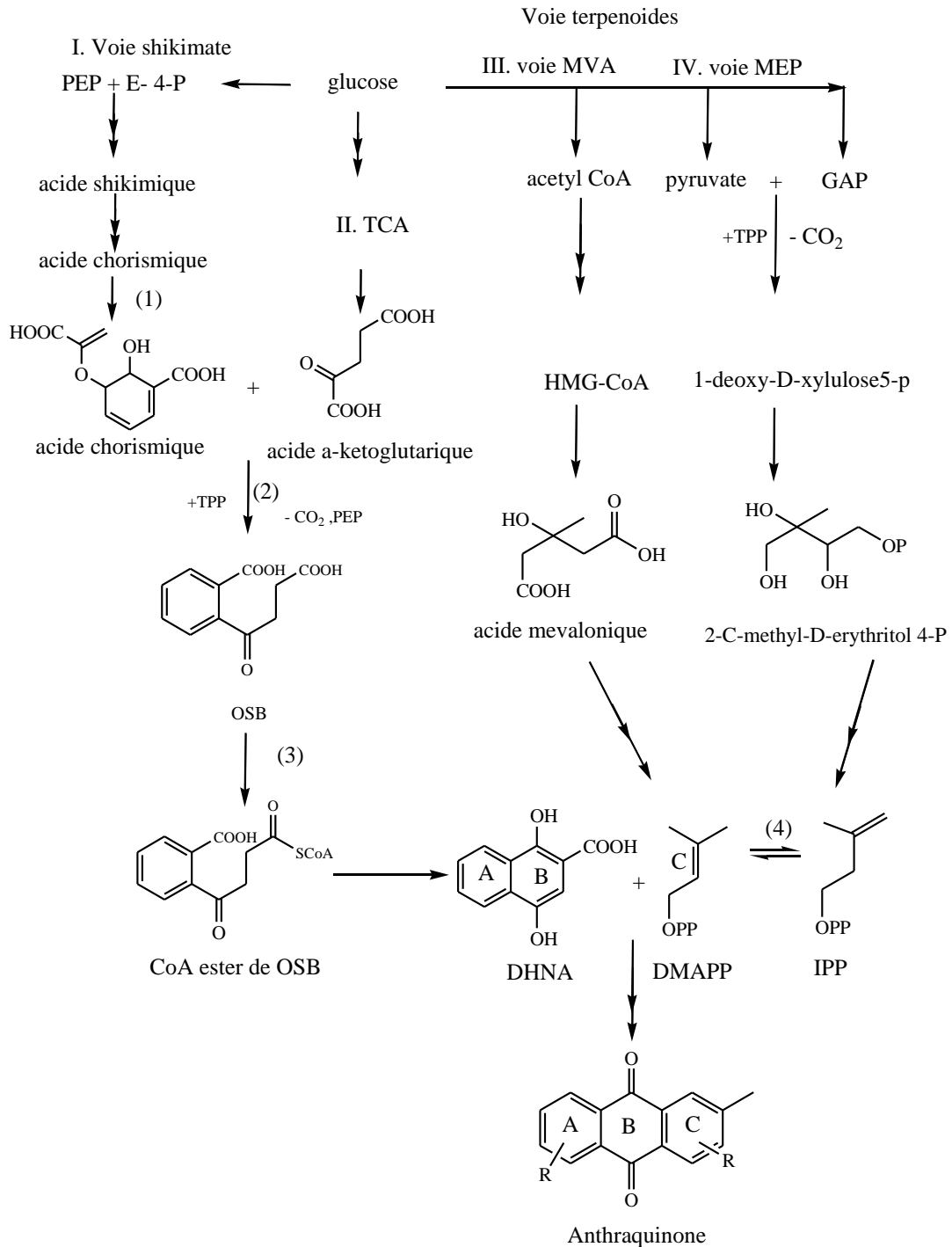


Figure 8: Biosynthèse des anthraquinones

I.5.1.2. Coumarines

I.5.1.2.1. Généralité sur les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Elles ont été isolées pour la première fois par Vogel en 1820 de *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés de plus de 800 espèces de plantes et de microorganismes. Dans les plantes, elles sont retrouvées chez les Apiacées, les Astéracées, les Fabacées, les Rosacées, les Rubiacées, les Rutacées et les Solanacées. Du point de vue structural, elles sont classées en coumarines simples (**2, 3**) avec des substituants sur le cycle du benzène, les furanocoumarines (**4**), les pyranocoumarines (**2-6**), les coumarines substituées en position 3 et/ou 4 (**5, 6**). Le dernier groupe serait celui des dimères.

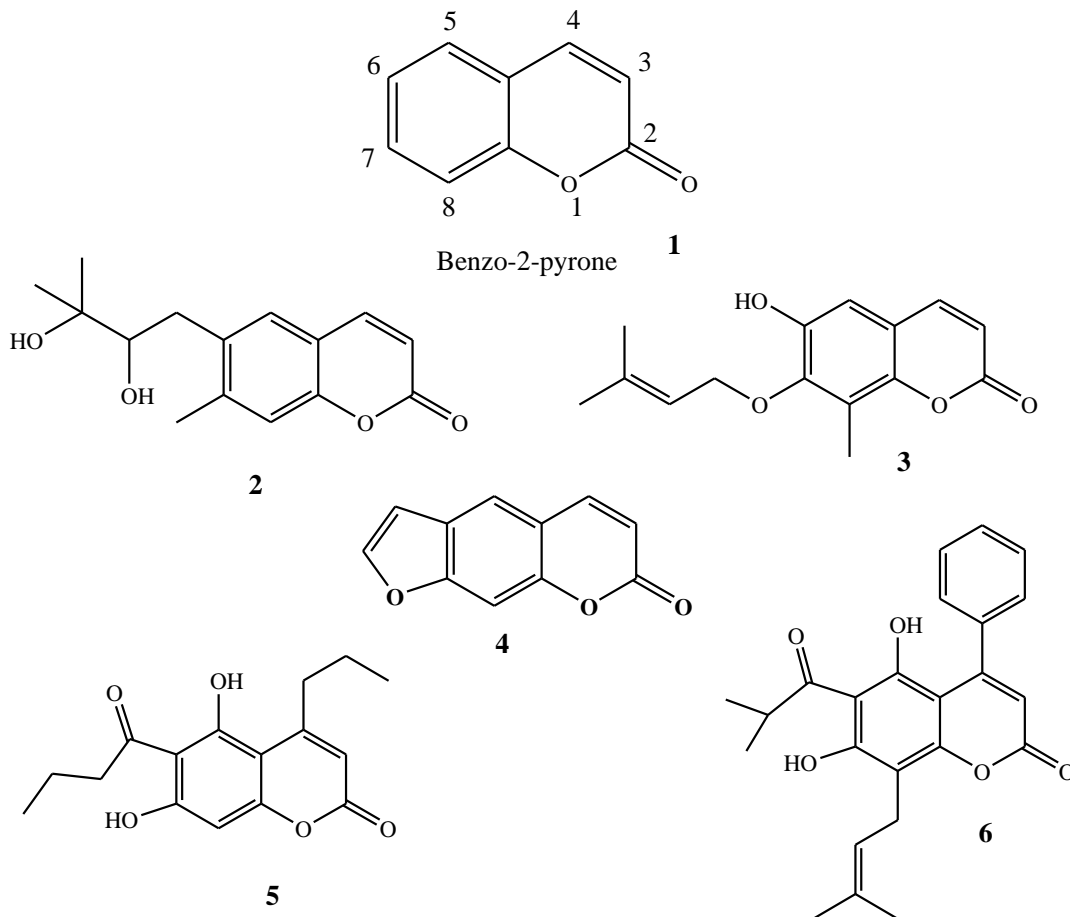


Figure 9: Les Classes de coumarines

Dans le genre *Morinda* on trouve des coumarines telles que le scopoletin, 7-hydroxycoumarine (7-HC), 4-hydroxycoumarine (4-HC) et esculetin isolés dans le *Morinda citrifolia* (noni) [58,59].

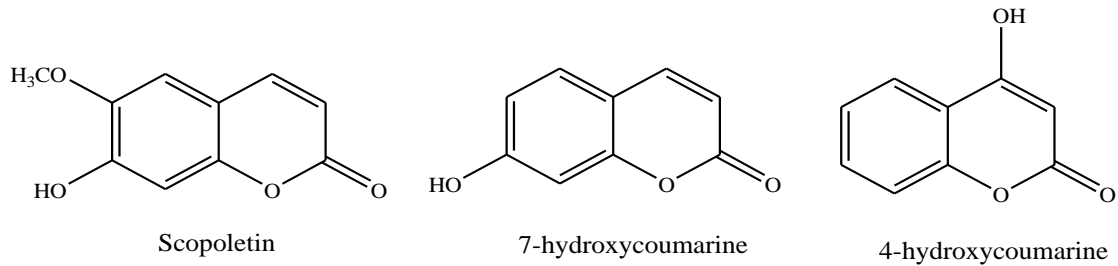


Figure 10: Structures de coumarines isolées dans le genre *Morinda*

I.5.1.2.2. Biosynthèse des coumarines

La biosynthèse de la coumarine à partir de l'acide shikimique qui a lieu dans les végétaux supérieurs est schématisée ci-dessous.

La biosynthèse des coumarines démarre à partir de l'acide shikimique qui subit une alkylation avec l'acide phosphoénolpyruvique pour donner l'acide chorismique. Après réarrangement de l'acide chorismique qui conduit à l'acide préphénique, ce dernier subit une décarboxylation et une déshydratation conduisant à l'acide phénylpyruvique. L'amination réductrice de l'acide phénylpyruvique en présence d'enzyme (transaminase) donne le phénylalanine. L'acide cinamique est obtenu suite à une élimination de NH₃ et hydroxylé en position ortho pour donner l'acide-2-coumarique. La lactonisation de l'acide-2-hydroxycoumarique donne une coumarine.

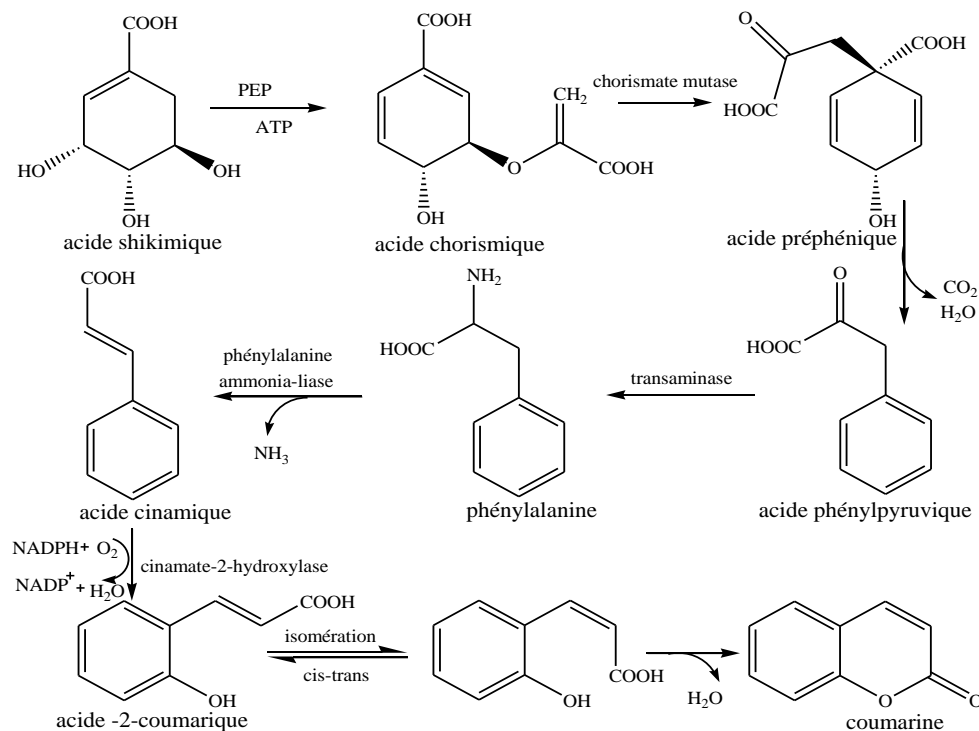


Figure 11: Biosynthèse des coumarines

I.5.1.3. Flavonoïdes

I.5.1.3.1. Généralités sur les flavonoïdes

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C.

Les flavonoïdes, dérivés du 2-phénylchromen-4-one, représentent une classe très diverse de métabolites secondaires polyphénoliques qui sont habituellement abondants dans des produits naturels d'origine végétale plus élevée, mais ont été signalés comme un cas rare de flavonols glycosides provenant des espèces de *Morinda*. Dans les feuilles de *Morinda morindoides*, plusieurs flavonoïdes ont été isolés: quercetin, kaempferol, apigenin, luteolin, quercetin-3-rhamnoside, kaempferol-3-rutinoside etc. [60]. Les flavonols glycosides polaires (Figure 12) contenant une structure flavonoïde ont été isolés à partir de feuilles de *M. citrifolia* et sont largement connus comme antioxydants naturels in vitro [61–63].

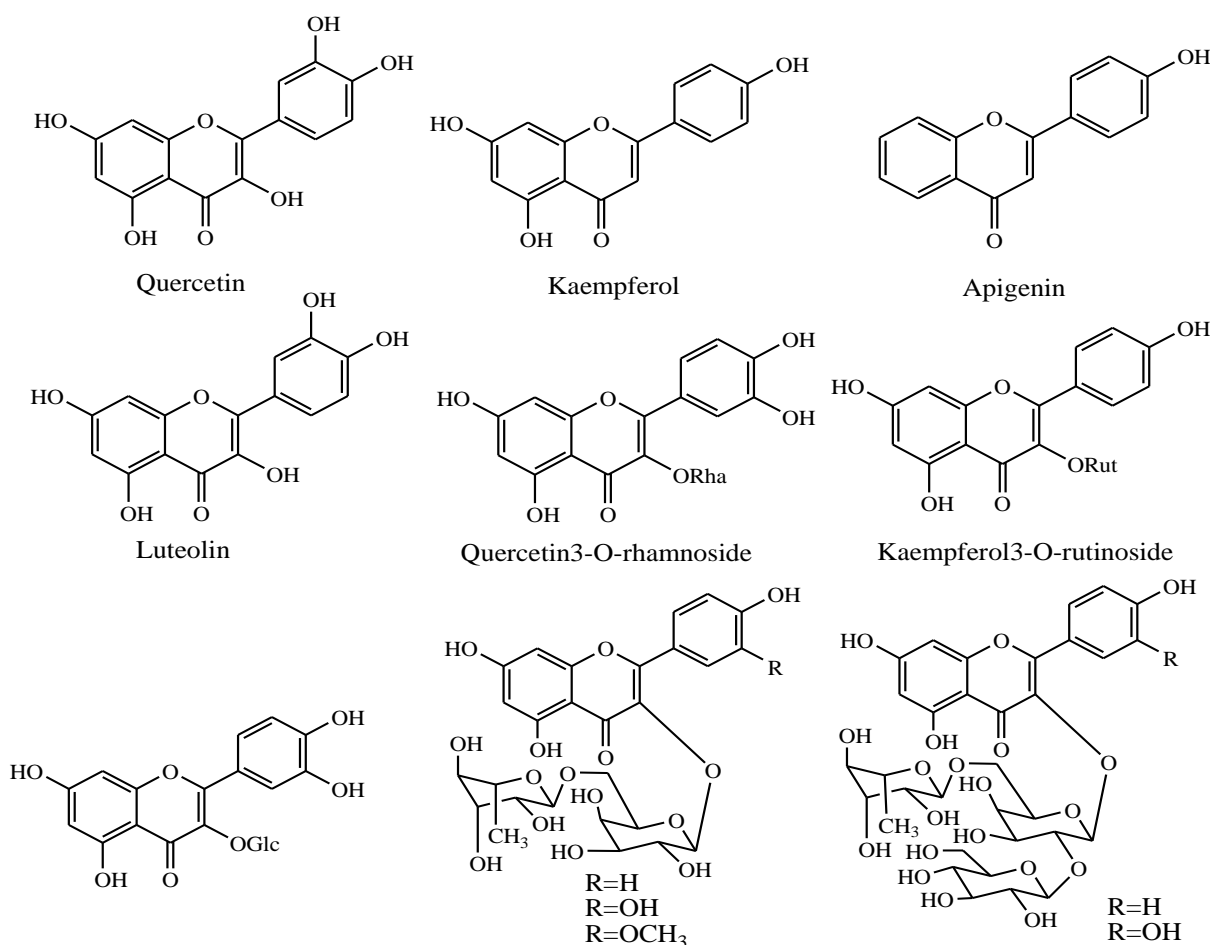


Figure 12: Flavonoïdes isolés du genre *Morinda*

I.5.1.3.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA. Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6' tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(*S*)-flavanone: la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes [64].

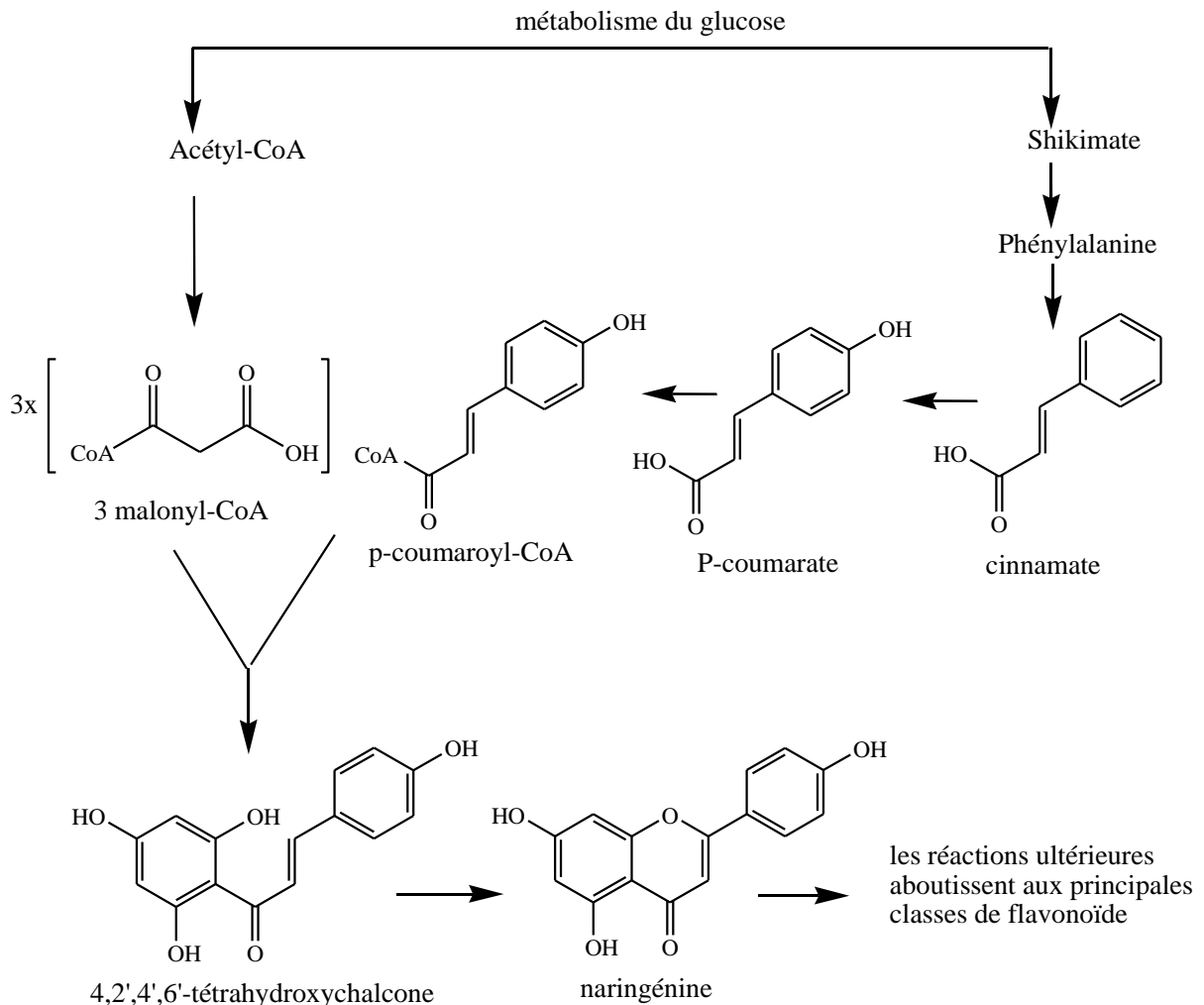


Figure 13: Biosynthèse des flavonoïdes

I.5.1.4. Lignanes

I.5.1.4.1. Généralité sur les lignanes

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type $2 \times (C_6-C_3)$; l'unité (C_6-C_3) est considérée comme un propylbenzène (Figure 14). Ils sont élaborés par les plantes par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique. Quand cette dimérisation implique une liaison oxydante par les C8 des chaînes latérales propényles de deux unités d'alcool coniférique liées, formant la liaison (C_8-C_8') , les métabolites résultants portent le nom de lignane. Le terme néolignane est employé pour définir tous les autres types de liaison. Lorsqu'il n'y a pas de liaison directe (C-C) entre les unités (C_6-C_3) , mais les carbones sont liés par un atome d'oxygène d'éther, le composé est appelé oxynéolignane. Il existe d'autres types de lignanes tels que les sesquinéolignanes (ayant trois unités (C_6-C_3)) et les dinéolignanes (contenant quatre unités de (C_6-C_3)) [65].

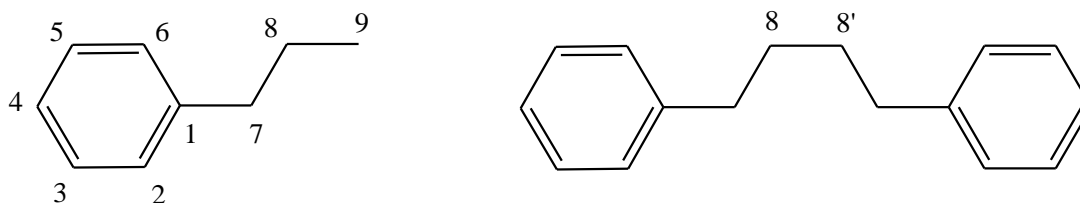


Figure 14: Structure générale des lignanes

Le genre *Morinda* renferme des lignanes. On peut citer l'acide isoaméricanoïque A [66], 3,3'-bisdiméthylpinoresinol, américanol A, américanine A, acide américanoïque A, morindoline, et isoprincepine [67] isolés dans les fruits de *Morinda citrifolia*. La figure 15 présente des structures de lignanes isolés dans le genre *Morinda*.

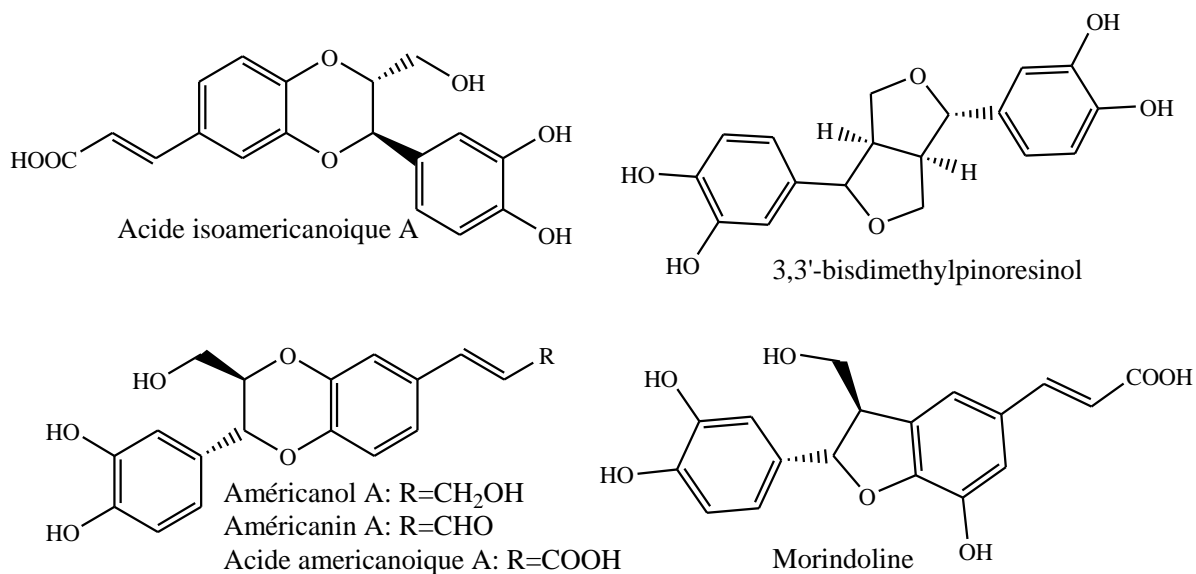


Figure 15: Structures de lignanes isolés du genre *Morinda*

I.5.1.4.2. Biosynthèse des lignanes

Les lignanes étant optiquement actifs, ils résultent d'un couplage stéréospécifique des carbones C-8. Des protéines particulières appelées « protéines dirigeantes », sans activité enzymatique et indépendantes des oxydases, elles sont probablement universelles chez les végétaux, et prennent en charge les monomères oxydes sous forme radicalaire en assurant, dans le cas présent, le couplage 8-8' (qui n'est d'ailleurs pas thermodynamiquement le plus favorable). Que deux protéines portant chacune une unité en C6-C3 sous forme radicalaire s'associent, le résultat est un rapprochement spatial dans un environnement chiral permettant la formation de la liaison carbone-carbone de façon stéréosélectivité tel que l'illustre avec la biosynthèse du (+)-pinorésinol à partir de l'alcool coniférylique (Figure 16). De façon similaire, les lignanes dépourvus d'oxygène en positions C-9 et C-9' résultent probablement d'une même logique biosynthétique. La réactivité des intermédiaires, notamment les méthodes quinones, engendrent, après l'étape fondamentale de formation de la liaison carbone-carbone entre les deux monolignols et/ou des étapes enzymatiques supplémentaires, des cyclisations et modifications supplémentaires (réductions, oxydations, lactonisations, etc).

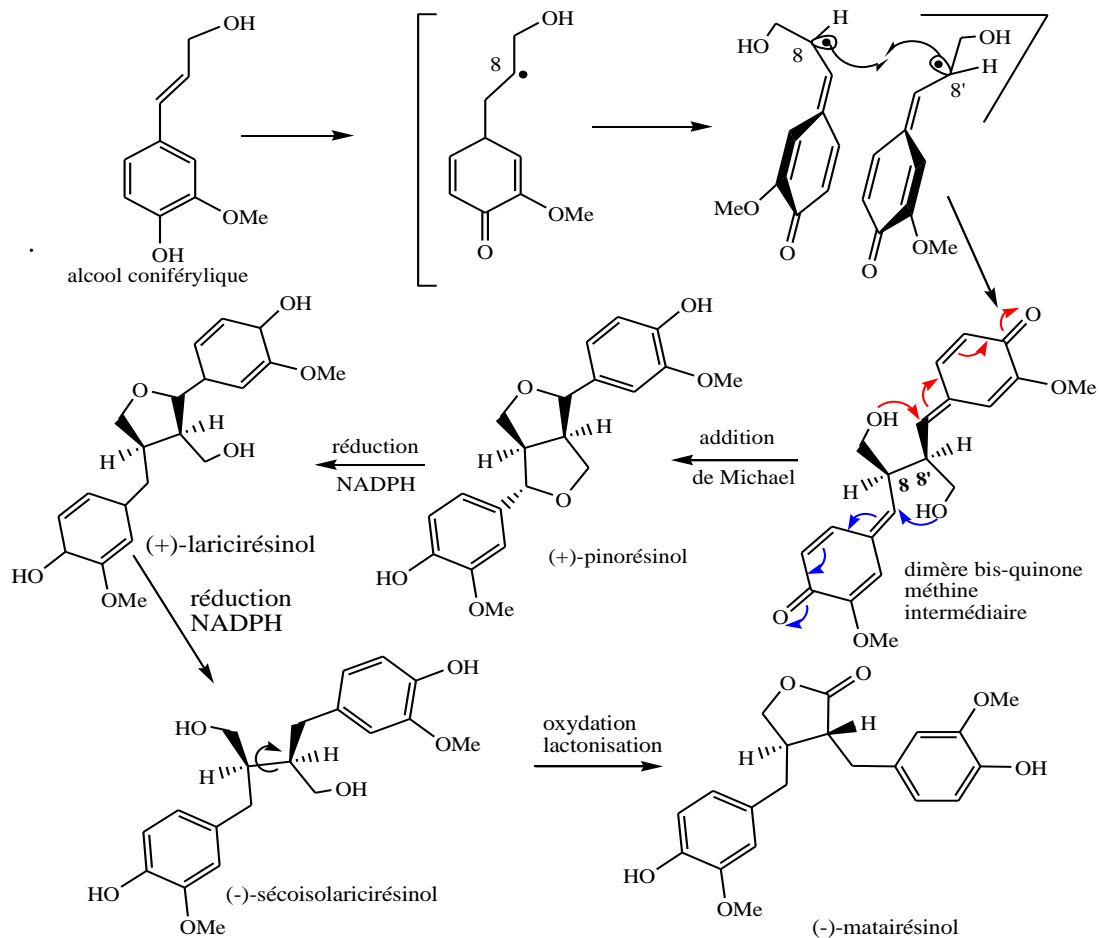


Figure 16: Schéma de biosynthèse des lignanes

I.5.2. Terpènes et stéroles.

Les terpènes sont les constituants principaux des huiles essentielles de nombreuses plantes. Ils sont volatils et constituent la résine et les essences des plantes. C'est le cas de l'essence de térébenthine isolée à partir de la résine de pin. Sur le plan structural, les terpènes sont des dérivés de l'isoprène (C_5H_8). Leur nomenclature et leur classification se font en fonction du nombre d'unités isopréniques qui constituent la molécule. On les classe en monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes et caroténoïdes.

I.5.2.1. Triterpènes

I.5.2.1.1. Généralité sur les triterpènes

Les triterpénoïdes sont des métabolites secondaires non stéroïdiens très souvent présents dans la flore terrestre, marine et dans la faune [68]. Environ 30000 composés terpéniques ont été isolés puis identifiés [69]. Le terme triterpène se réfère à trois monoterpènes et par conséquent 30 atomes de carbone groupés dans six unités d'isoprényle (Figure 17). Selon les espèces végétales, les métabolites secondaires appartenant à cette famille sont principalement stockés dans les mitochondries, les microsomes ou les chloroplastes des cellules [70].

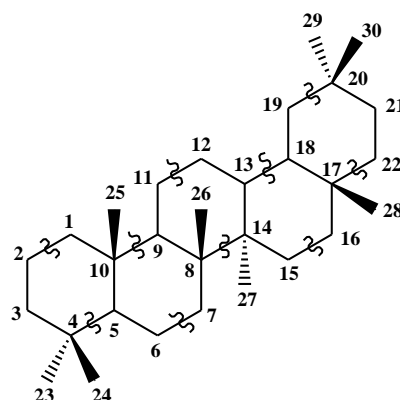


Figure 17: Six unités d'isoprényle

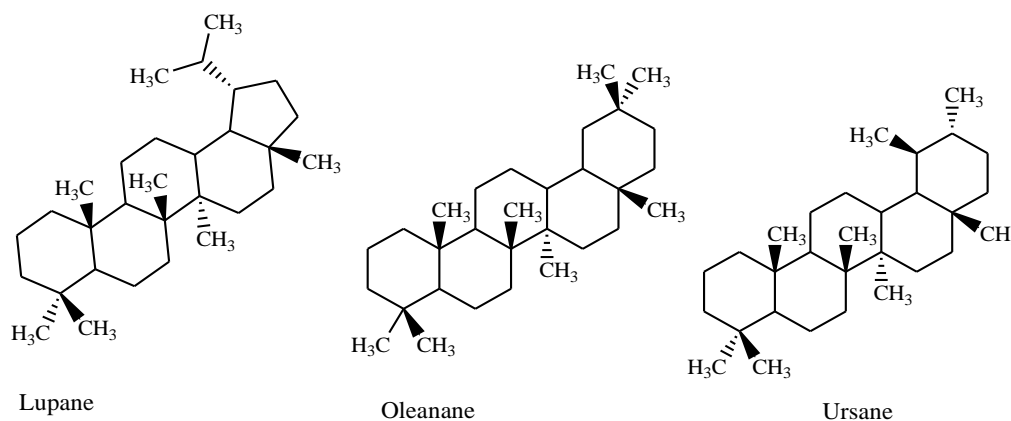


Figure 18: Structures de triterpènes

I.5.2.1.2. Biosynthèse des triterpènes

La voie de biosynthèse des triterpènes et des stérols implique l'isoprénoïde, l'isopentényle, le diphosphate (IPP) et le diphosphate de diméthylallyle formant le précurseur (squalène) [71].

Cependant, plusieurs théories ont proposé trois précurseurs, à savoir le mévalonate [71], la désoxyxylulose [72] et les acides aminés [73] pour la formation de l'IPP. Les résultats précédents obtenus de l'expérience avec des composés marqués ont révélé le mévalonate comme étant le précurseur préféré pour la biosynthèse des triterpènes stéroliques et pentacycliques [74, 75].

En outre, de nombreuses études traitant de la biosynthèse triterpénoïde chez les plantes ont suggéré l'exigence de différentes enzymes (lanostane synthase, cycloartane synthase, lupéol synthase, etc.) pour catalyser la synthèse des différents types de ces métabolites secondaires [76, 77].

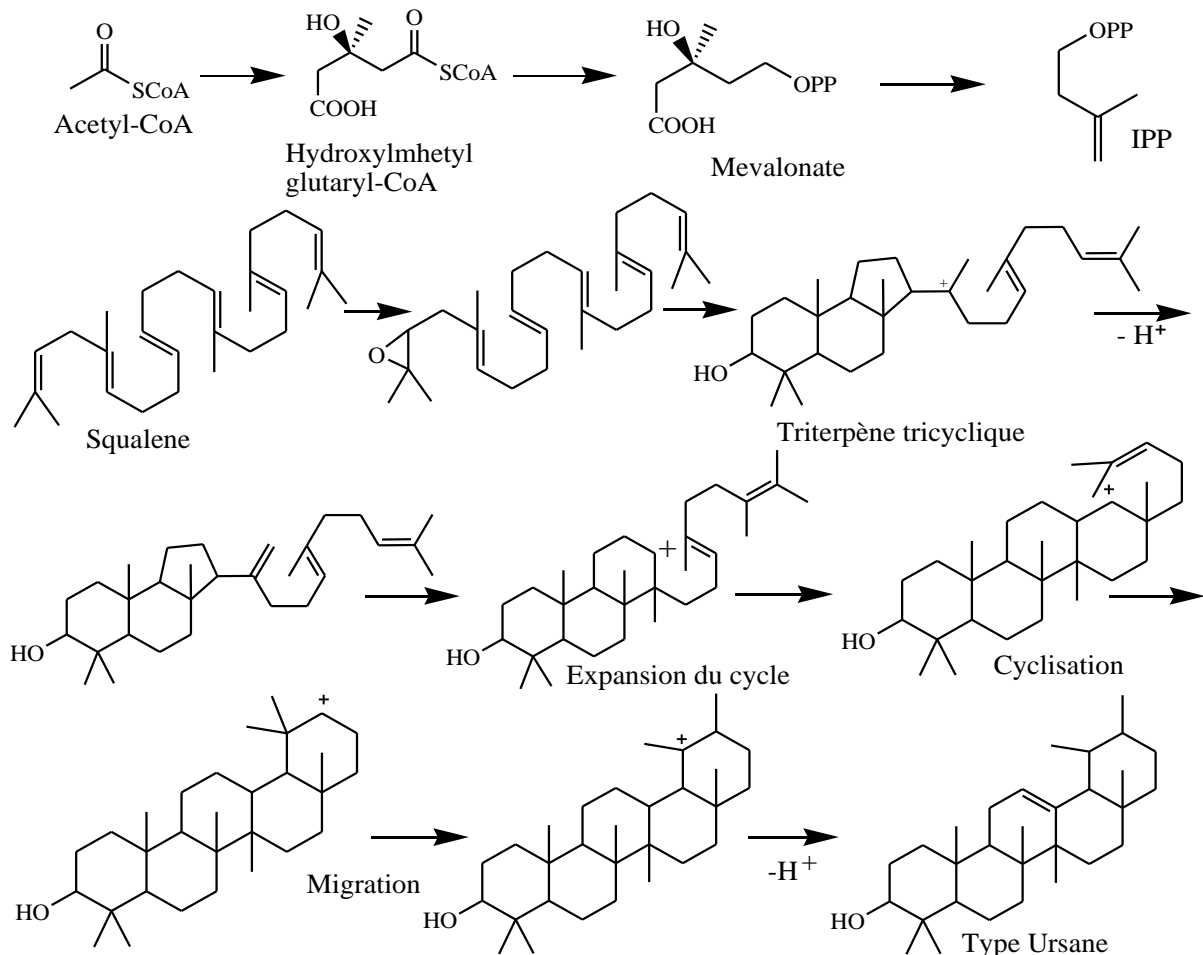


Figure 19: Biosynthèse des triterpènes

I.5.2.2. Iridoïdes

I.5.2.2.1. Généralité sur les iridoïdes

Les iridoïdes sont des composés monoterpéniques caractérisés par un squelette cyclopentapyranique nommé iridane, principalement sous forme d'hétérosides ou glycosides d'iridoïdes. Sur la base de l'analyse structurale, la majorité de ces iridoïdes contiennent des monosaccharides reliés à C-1 et soit un ester méthylique ou un acide carboxylique en C-4. La jonction en anneau fondu a été observée sous forme de géométrie cis à l'exception de l'acide 9-épi-6 α -méthoxy géniposidique (composés **3**) où il existe une géométrie trans [78]. Les feuilles de plantes du genre *Morinda* étaient trouvées comme la source la plus riche de diversité des iridoïdes de monoterpène comme indiqué sur la figure 20.

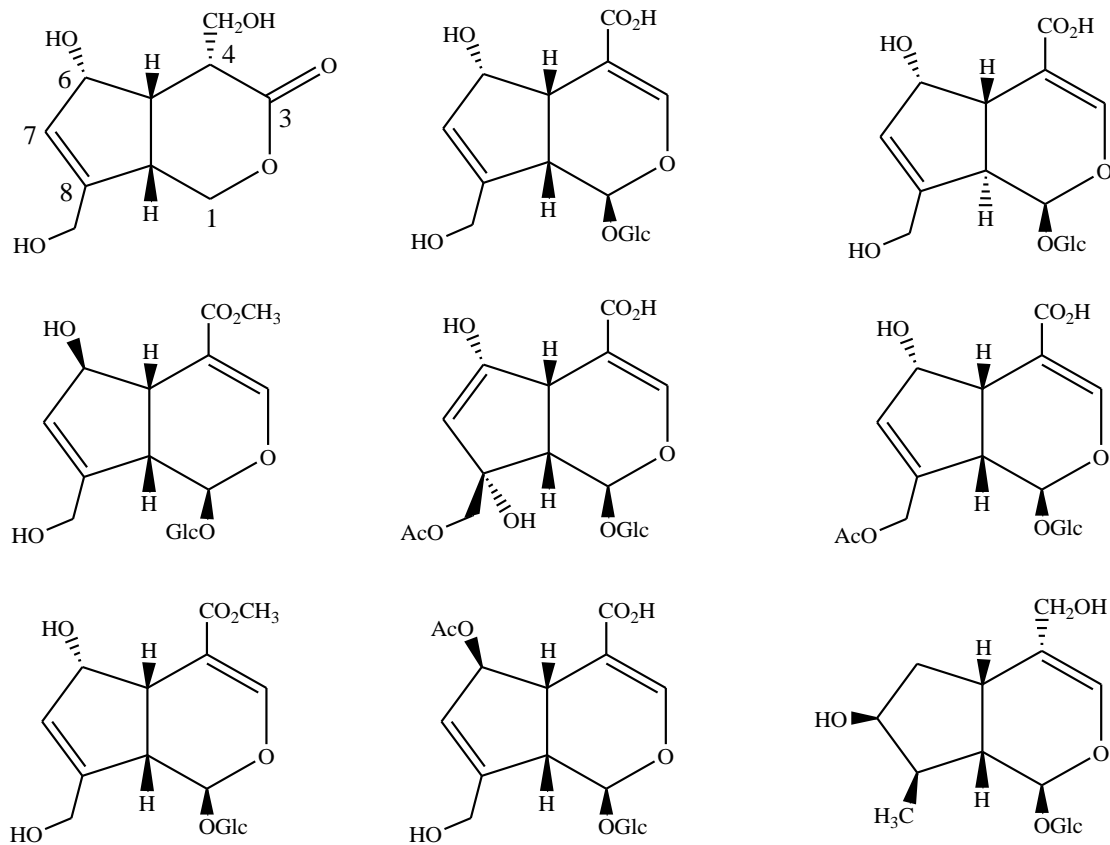


Figure 20: Iridoïdes isolés du genre *Morinda*

I.5.2.2.2. Biosynthèse des iridoïdes

L'iridoïde synthase catalyse la cyclisation qui est déclenchée par la réduction de 8-oxogéranial pour former l'énol ou l'énolate intermédiaire. L'intermédiaire est prêt à se cycliser pour former du népétalactol soit par une demande d'électrons inverse hétéro Diels-Alder (cyclase) ou une réaction de Michael [79], (Figure 21).

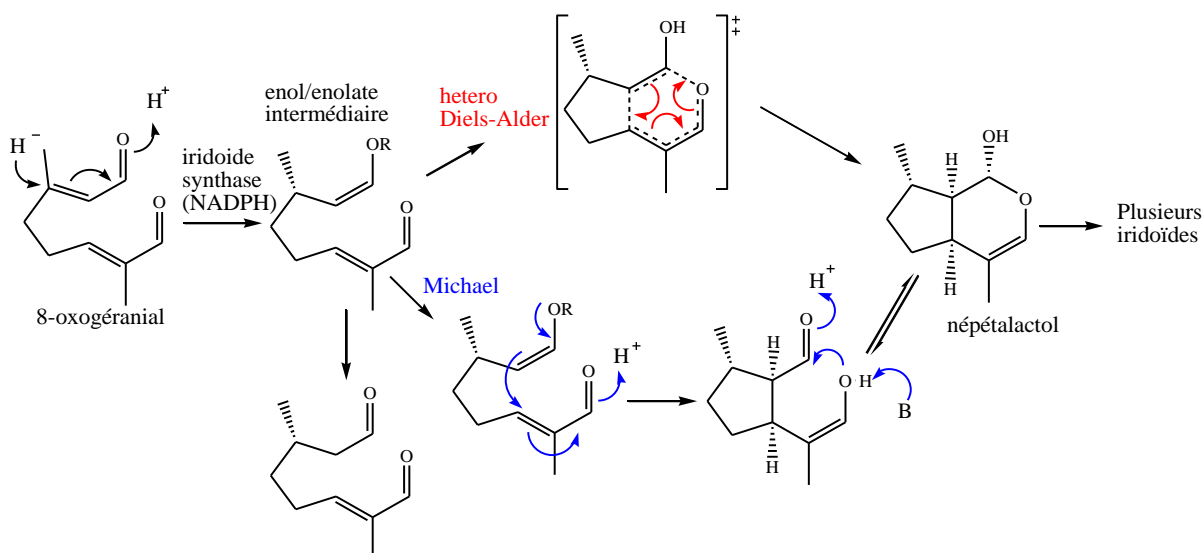


Figure 21: Biosynthèse des iridoïdes

I.5.3. Sucres

On rapporte aussi chez le genre *Morinda* la présence de sucres comme (2E)-oct-2-énoate-2-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside (**1**), (2E)-2,6-diméthyl -6-hydroxyl-oct-2,7-dienoate-2-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside (**2**), saccharumoside (**3**) et O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -Dglucopyranosides de 3-méthyl-2-buténol (**4**). Ces composés ont montré une activité modérée contre ABTS (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)) donc antioxydante à la concentration de 0,1-3,2 mg/mL [80].

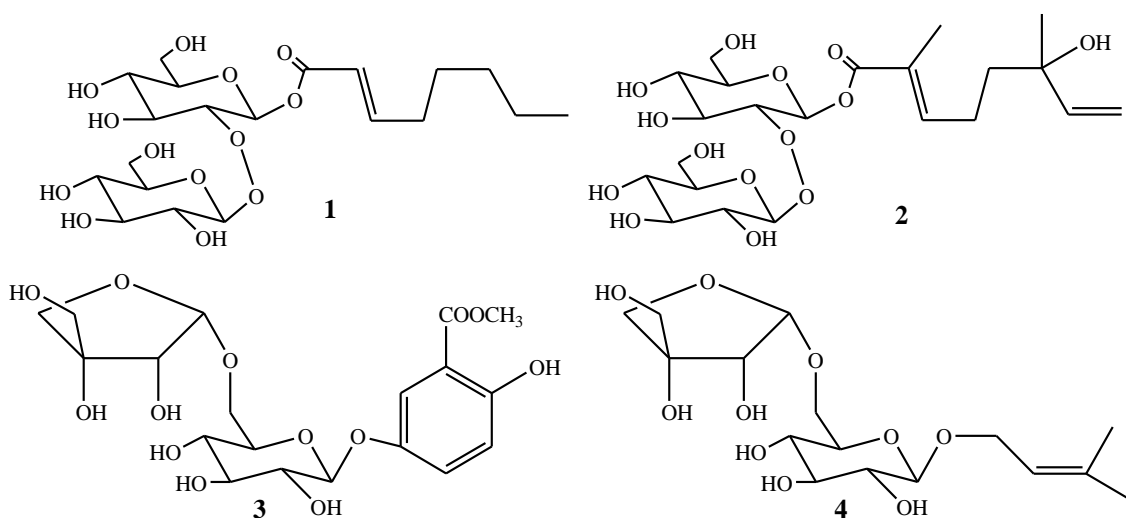


Figure 22: Structures de sucres isolés dans le genre *Morinda*

I.6. Propriétés biologiques des métabolites secondaires du genre *Morinda*

I.6.1. Polyphénols

I.6.1.1. Anthraquinones

La famille des *Rubiaceae* présente de nombreux composés anthracéniques. Ces anthraquinones ont été signalés pour leurs activités biologiques in vivo intéressant comme antimicrobiens [81], Antifongique [82], hypotenseurs, analgésiques [83], antipaludiques [81, 84] antioxydants [85], antileucémiques et mutagènes [86, 87] et hypoglycémiantes [88].

➤ **Activité antimicrobiennes**

Des études réalisées sur 11 anthraquinones isolées du *Morinda elliptica* ont montré que le nordamnacanthal, damnacanthal et alizarine-1-méthyléther, ont une forte activité antimicrobienne lorsqu'ils ont été testés contre une bactérie et trois champignons (*Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces Aspergillus ochraceus*, *A. niger* et *Candida lypolitica*). Seulement le 2-formyl-1-hydroxyanthraquinone et damnacanthal étaient actifs contre *P. aeruginosa* avec des valeurs DMI de 80 g/disque et 10 g/disque, respectivement [89]. Sur six anthraquinones isolées du *Morinda angustifolia* seulement la 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3,7-diméthoxyanthraquinone à la dose de 13 µg/disque présente une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Micrococcus luteus* avec des diamètres de zones d'inhibition de 14,0 , 12,5 et 13,0 mm respectivement [90].

Les anthraquinones isolées du *Caloplaca schaeereri* et testées ont montré une activité bactérienne contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *P. fluorescens* avec une concentration minimale inhibitrice comprise entre 20 à 320 µg/mL. Mais seul l'acide pariétinique a montré une activité contre *E. coli* avec une concentration minimale inhibitrice de 160 µg/mL. Leurs effets sont généralement plus puissants contre *B. subtilis* et *P. fluorescens*. Fallacinol était le plus puissant contre *S. aureus* avec 20 µg/mL [91].

Les composés isolés des écorces de *Tabebuia impetiginosa* ont été testés en utilisant la méthode de diffusion des disques en papier et la CMI des essais biologiques pour l'activité inhibitrice de la croissance de *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Cette activité des composés a été comparée à celle des agents anti-*Helicobacter pylori* disponibles dans le commerce, amoxicilline, le métronidazole et la tétracycline. Avec la méthode de diffusion sur disque en papier, la 2-(Hydroxyméthyl) anthraquinone a présenté une forte activité contre *Helicobacter pylori* ATCC 43504 à partir de 0,01 mg/disque. L'acide anthraquinone-2-carboxylique, et le métronidazole ont été moins efficaces en présentant une activité anti-*Helicobacter pylori*

modérée à 0,1 mg/disque. Pour la CMI des essais biologiques, la 2-(hydroxyméthyl) anthraquinone (2 µg/mL) et l'acide anthraquinone-2-carboxylique (8 µg/mL) ont été plus actifs que le métronidazole (32 µg/mL) mais moins efficace que l'amoxicilline (0,063 µg/mL) et la tétracycline (0,5 µg/mL) [92].

➤ **Activité antifongique**

Pour l'activité antifongique, damnacanthal et nordamnacanthal isolées du *Morinda elliptica* ont montré une très forte activité contre tous les champignons testés avec des valeurs de diamètre minimal d'inhibition (DMI) de 10 à 20 g/disque. Cependant Morindone, a montré une activité antifongique très forte seulement contre *Candida lipolytica* avec un diamètre minimal d'inhibition de 20 g/disque [89]. Selon une étude menée par Kanokmedhakul *et al.*, nordamnacanthal et damnacanthal isolés de *Prismatomeris fragrans* présentaient des activités antifongiques contre *Candida. albicans* avec les valeurs de CI₅₀ de 6,0 et 22,6 µg/mL respectivement [93].

La 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3,7-diméthoxyanthraquinone isolée du *Morinda angustifolia*, à la dose de 13 µg/disque, possède une activité antifongique contre *C. albicans* avec un diamètre de zone d'inhibition de 7,5 mm [90].

➤ **Activité antioxydante**

Les travaux de Jihan M. Badr ont démontré que les anthraquinones isolées du *Crucianella maritima* L présentaient de degrés d'activités antioxydantes variables [94].

L'activité antioxydante des anthraquinones isolées du *Morinda elliptica* était également mesurée par Jarsil en utilisant la méthode thiocyanate ferrique (TCF). Seule la nordamnacanthal et la morindone ont montré une activité antioxydante plus forte que α -tocophérol. Cependant, elles sont moins actives que le butyle hydroxytoluène (BHT), un puissant antioxydant synthétique. Les activités antioxydantes de l'alizarine-1-méthyléther et du lucidine- ω -méthyl éther étaient comparables à α -tocophérol [95].

➤ **Activités antitumorales**

Les anthraquinones isolées du *Morinda elliptica* ont présenté une forte activité antitumorale à la concentration de 2,0 µg/mL lorsqu'ils sont dosés en utilisant le test d'inhibition de l'activation du virus Epstein Barr (VEB) sur les cellules Raji. À la concentration de 0,4 µg/mL, seulement le nordamnacanthal a montré une forte activité antitumorale avec un taux d'inhibition de 75,0%, qui était plus forte que les composés de référence génistéine et quercétine [95].

➤ **Activités antipaludiques**

En 2009 Yanpeng Hou et *al.* ont montré que les anthraquinones isolées *Scutia myrtina* ont exhibé des activités antiplasmodiales modérées contre *Plasmodium falciparum* Dd2 et *P. falciparum*

FCM29 [96].

Le digitolutein, l'éther rubiadin 1-méthyl, le damnacanthal, et des anthraquinones extraites de l'écorce du tronc et des racines de *M. lucida* ont inhibé significativement la croissance de *P. falciparum in vitro*. Le nombre de parasites (schizontes) a diminué d'une manière dose-dépendante jusqu'à 100% d'inhibition obtenue avec 30 à 40 µg pour chaque composé testé [97].

➤ **Propriétés antituberculeuses**

Nordamnacanthal, damnacanthal, rubiadin et 1-hydroxy-2-hydroxyméthyl-3-méthoxyanthraquinone, isolés de *P. fragrans*, ont montré une activité antituberculeuse contre *Mycobacterium tuberculosis* [93].

I.6.1.2. Propriétés des coumarines

Les coumarines ont de nombreuses propriétés biochimiques et pharmacologiques. L'activité de ces molécules dépend de la structure et de la nature des substituants [98, 99]. La majorité des coumarines et leurs dérivés ont été soumis à de profondes investigations afin d'évaluer leurs effets sur la santé humaine. Les recherches ont montré qu'elles peuvent être des agents anti HIV, anti tumoraux [100] anticancéreux, antimicrobiens [101] anti inflammatoires [102], antifongiques [103], antioxydants [104] et même vasodilatateurs [105]. Le scopoletine, la 7-hydroxycoumarine (7-HC) et la 4-hydroxycoumarine (4-HC) isolés dans le *Morinda citrifolia* (noni) ont montré des propriétés antioxydantes[59, 106].

I.6.1.3. Propriétés des flavonoïdes

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses [107]. D'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. En effet certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) présentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate [108]. Ils ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) et des propriétés antivirales [109], possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires [110].

I.6.1.4. Propriétés des lignanes

Les lignanes possèdent des propriétés antioxydantes, anti hypertenseurs, antifongiques, antiprotozoaires et antivirales [111]. Les lignanes, 3,3'-bisdeméthylpinorésinol et américainine A, isolés des graines du *Morinda citrifolia* ont diminué l'activité de la tyrosinase intracellulaire et la teneur en mélanine. Ainsi, ces composés peuvent être des ingrédients utiles pour la prévention de l'hyperpigmentation [112].

Plusieurs études ont révélé l'action protectrice et préventive de ces molécules vis-à-vis de certains cancers, notamment les cancers hormono-dépendants (sein, prostate) [113]. Les travaux de Wen-Jian Liu, ont montré que les lignanes isolés des fruits du *Morinda citrifolia* ont montré des activités inhibitrices sur la production d'oxyde nitrique (NO) induite par le lipopolysaccharide (LPS) avec des valeurs de CI_{50} comprises entre 1,97 et 1,48 μM [114].

I.6.2. Propriétés des terpènes et stérols

I.6.2.1. Propriétés des triterpènes

Des études ont montrés que l'acide oléanolique et l'acide ursolique inhibaient la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* avec une CMI de 16 $\mu g/mL$ et 50 $\mu g/mL$ respectivement [115]. L'étude biologique la plus fréquente réalisée sur les triterpénoïdes des plantes médicinales africaines impliquent une cytotoxicité. D'autres bioessais comprenaient l'inhibition d'enzyme, le piégeage des radicaux libres, les activités antimicrobiennes, antinociceptives, anti-inflammatoires, molluscicides et anti-fongicide [116]. D'autres terpènes comme lupéol sont des agents thérapeutiques et chimiopréventifs pour le traitement de l'inflammation et de cancer [117].

I.6.2.2. Propriétés des iridoïdes

Les études menées sur des iridoïdes révèlent une activité anti-mélanogénèse [118], une activité de l'AP-1 induite par les UVB [119,120], une activité anticomplémentaire [119] et antipaludique contre *P. falciparum* [120].

I.6.3. Propriétés des sucres

Les monosaccharides sont la principale source d'énergie pour le métabolisme. Les glucides ne sont utilisables que sous la forme de glucose par le corps humain.

Une étude parue en 2012 dans la revue *Aging Cell* a établi un effet protecteur du glucose vis-à-vis de la neurodégénérescence [121].

Le glucose est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, mais son excès est à la base de nombreux problèmes de santé. Le diabète en est l'exemple le plus visible. Cette maladie est due à la forte présence de glucose dans le sang [122]. L'obésité est la conséquence d'un régime alimentaire trop riche en calories. Elle peut être également liée à une trop forte consommation de glucides [123].

Par ailleurs, un déficit en glucides se traduit par une faiblesse généralisée et une baisse de la tension artérielle.

I.7. Etudes biologiques antérieures sur *Morinda geminata* DC

I.7.1. Activités antibactériennes

La famille des *Rubiaceae* est caractérisée par la production de plusieurs classes de métabolites secondaires à fort potentiel pharmacologique, principalement les alcaloïdes, les terpènes, les glycosides d'acide quinovique, les flavonoïdes et les coumarines à propriétés antibactériennes [124]. Les métabolites secondaires des *Rubiaceae* ont été étudiés scientifiquement pour les activités antimicrobiennes et ces études ont montré que ces produits inhibaient la croissance de microorganismes [125–127].

Les extraits d'éther pétrole, acétone, éthanol et eau des feuilles et d'écorces de *Morinda geminata* ont été comparés avec le ciprofloxacine standard dans des bactéries: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*. Ces extraits ont montré un degré variable d'activité antimicrobienne contre un ou plusieurs micro-organismes testés. Cela a été affecté par le système de solvants et organe végétal étudiés. Généralement, les organismes testés étaient résistants aux extraits d'éther de pétrole et d'acétone. Cette faible activité antimicrobienne peut être attribuée à la capacité réduite de ces solvants pour extraire des composés phytochimiques ou la présence de pigments ou phénols, qui sont connus pour interférer avec l'activité antimicrobienne [128].

L'extrait aqueux a démontré une activité antimicrobienne faible à modérée. L'extrait d'écorces de tiges de *M. geminata* était sensible à *S. pyogenes* (61% d'inhibition). Cet extrait a présenté une activité modérée contre *S. aureus*. L'extrait brut éthanolique présentait le plus haut degré d'activité antimicrobienne. L'écorce de tige de *M. geminata* était particulièrement sensible à *S. pyogenes*, une bactérie hémolytique à Gram positif connue pour causer des maladies telles que la pharyngite, l'impétigo, la scarlatine, etc [129].

Tableau 2: Activité antimicrobienne des extraits de *M. geminata* :

		Sp (%)	Sa (%)	Ec (%)	Pv (%)
Ether pétrole	Feuilles	-	3 (11)	2 (9)	-
	Ecorce	1 (4)	2 (8)	-	-
Acétone	Feuilles	6 (20)	-	-	5 (21)
	Ecorce	5 (17)	6 (21)	3 (13)	-
Ethanol	Feuilles	17 (56)	13 (43)	7 (33)	11 (48)
	Ecorce	18 (61)	11 (37)	2 (11)	10 (44)
Eau	Feuilles	10 (33)	9 (29)	2 (11)	-
	Ecorce	18 (61)	15 (50)	2 (9)	8 (32)
ciprofloxacine	référence	30	30	21	23

Sp = *Streptococcus pyogenes*; Sa = *Staphylococcus aureus*; Ec = *Escherichia coli* et Pv = *Proteus vulgaris*, Conc = 1 mg/mL; % = pourcentage; - = non actif

P. M. Abreu a étudié en 1999 la zone d'inhibition (mm) de l'extrait MeOH/H₂O des feuilles de *Morinda geminata*. Cet extrait est actif seulement sur les *Pseudomonas aeruginosa* et *Listeria monocytogenes* avec une concentration de 1 mg/mL. Une concentration plus élevée (5 mg/mL) inhibe *Escherichia coli* et *Streptococcus pyogenes* [20].

Tableau 3: Activité antimicrobienne de l'extrait MeOH/H₂O des feuilles de *M. geminata*

	Ec	Pa	Kp	Cf	Sa	Sp	Lm	Bs	Ca	An
1 mg/mL	0	9	0	0	0	0	10	0	0	0
5 mg/mL	5	0	0	0	0	8	11	0	0	0

Ec = *Escherichia coli*; Pa = *Pseudomonas aeruginosa*; Kp = *Klebsiella pneumoniae*; Cf = *Citrobacter freundii*; Sa = *Staphylococcus aureus*; Sp = *Streptococcus pyogenes*; Lm = *Listeria monocytogenes*; Bs = *Bacillus subtilis*; Ca = *Candida albicans*; An = *Aspergillus niger*

En 1988, A. le Grand montre aussi que les feuilles de *Morinda* n'ont pas d'activité sur *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus niger* par contre à 50 mg/mL il y a inhibition sur *Bacillus subtilis* [130].

L'extrait éthanolique de feuilles séchées au soleil de *M. geminata* était actif contre *Staphylococcus Aureus* et *Aspergillus Niger* [130]. Adesogan a enquêté sur l'anti-activité métabolique de l'extrait éthanolique (80%) d'écorce de racine de *M. geminata*; un résultat positif a été indiqué contre *Ascaris Lumbricoides* [131].

L'extrait aqueux de la poudre des écorces de racines de *Morinda geminata* DC possède bien un effet bactéricide (à des concentrations ou doses de : 10 mg/mL; 10,5 mg/mL; 11,5 mg/mL) sur les souches testées (*Escherichia coli*, *Salmonella Spp*) et non aux concentrations de (7,5 mg/mL; 8,5 mg/mL; 9,5 mg/mL). L'effet bactéricide de l'extrait aqueux sec de la poudre des écorces de racines de *Morinda geminata* DC est manifesté à la concentration minimale

inhibitrice égale à 10 mg/mL. Cette concentration constitue la dose minimale capable de provoquer l'effet bactéricide sur chacune des deux souches étudiées [23].

I.7.2. Tests antidiabétiques

Les résultats des tests antidiabétiques menés sur des rats ont montrés que la solution d'extrait aqueux et solide de la poudre des écorces des racines de *Morinda geminata* DC, à la dose de 100 mg/kg et 300 mg/kg de poids corporel *per os*, n'entraîne pas d'effet hypoglycémiant chez les rats au bout de 2 heures [23].

I.7.3. Activités anti-inflammatoire

Selon Bassene, les extraits aqueux des écorces de racines de *Morinda geminata* DC possèdent une activité anti-inflammatoire comparable à celle de l'aspirine (Figure 23). Les résultats font apparaître que l'œdème podal de la pate de rat est plus important dans le lot témoin. Les traitements à l'aspirine et au *Morinda geminata* à 100 mg/kg et à 300 mg/kg ont entraîné une inhibition de l'œdème respectivement de 46, 23%, 37,49% et 44,13%, 3 heures après traitement [12].

Tableau 4: Volume moyen de l'œdème et pourcentage d'inhibition après 3 heures

Lots	vol moyen de l'œdème (ml)	% inhibition
Témoin	1,23 ± 0,39	0
Aspirine	0,94 ± 0,40 ^{ab}	57,34
<i>Morinda</i> 100	0,92 ± 0,20 ^a	60,73
<i>Morinda</i> 300	0,92 ± 0,14 ^b	57,06

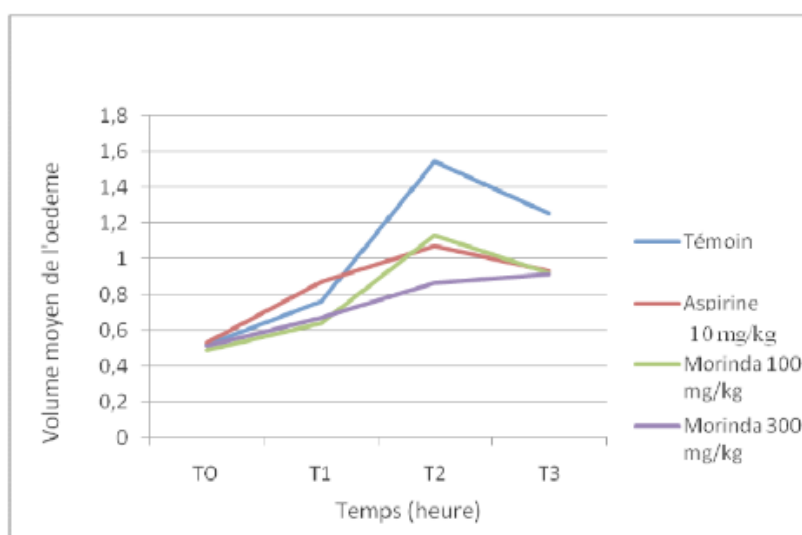


Figure 23: Evolution de l'œdème dans les différents lots en fonction du temps. T0 = 30 mn ; T1 = 60 mn ; T2 = 120 mn et T3 = 180 mn.

II. *Icacina oliviformis*

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la graine d'*Icacina oliviformis*. Les autres parties de cette plante ont été largement étudiées dans notre laboratoire (Sujet de Thèse d'Armel DIATTA (tige et racine) en cours d'étude et Thèse de Anastasie MANGA (feuilles) [132]. Ainsi, les détails bibliographiques seront limités dans notre manuscrite.

II.1. Etude botanique

Icacina oliviformis (a) appartient à la classe des dicotylédones, sous classe des dialypétales, série des disciflores, ordre des Célastrales, famille des *Icacinaceae* [133].

Fleurs blanches (b), larges de 7 mm, en panicule terminale arrondie; feuilles ovales larges de 3 à 6 cm, longues de 5 à 8 cm, sommet obtus, base courtement cunéiforme, 3 à 5 nervures latérales arquées, pétiole de 5 à 6 mm; tiges hautes de 50 à 60 cm environ, en touffes venant d'un tubercule (c) parfois très développé; fruit oblong (d), rouge à maturité, long de 2-3 cm. [134].



Figure 24: Plante de *Icacina oliviformis* (photo de O. Sambou 2018)

Noms en langues locales [134, 135]

Badiaranké : mana sé

Balante: mtazi, foya, foe, songol

Bassari: a nagan, a narham

Baynouk: ba dingali, da vogo

Coniagui: a ndagna, dagan

Créole portuguais: manganasa

Diola: furaba, butima, kuraba, futimay, u ruba, bu bambulaf, hu timo, hurubang

Foula: silla, manganaté, mankanaso

Mancagne: be nasin

Manding ma nkanaso

Mandjaque: be nasia, mankanas

Peul: mankanasé

Sérère: ba

Socé: manganaso

Wolof: ba nkanas, ndangam

II.2. Utilisations traditionnelles de *Icacina oliviformis*

Les fruits de *Icacina oliviformis* sont consommés frais en particulier par les enfants.

Les graines, en plus de la torréfaction, sont parfois séchées et pilées sous forme de farine, qui peut être stockée pour une utilisation en particulier pendant les périodes de pénurie alimentaires.

Les tubercules sont également utilisés sous forme de farine. Cette farine de *Icacina oliviformis* est couramment utilisée pour faire des pâtes ou des bouillies. Composé principalement d'amidon, la farine peut néanmoins contenir jusqu'à environ 10% de protéines, une quantité remarquable pour une racine récoltée, qui est cinq fois supérieure à celle de la farine de manioc et deux fois celle de la farine de patate, par exemple [136].

II.3. Composition chimique des graines

Analyse phytochimique de l'extrait aqueux de la racine de *I. oliviformis* a révélé la présence de composés tels que: les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponosides, les tanins, les stéroïdes terpénoïdes, les glycosides cardiaques et les anthraquinones [137].

Les résultats des analyses chimiques des graines de *Icacina oliviformis* (poiret) Raynal provenant de la république centrafricaine ont montré la composition suivante: 80,7% de

matières non azotées, 14,0% de protéines et 0,5% de lipides (poids sec). Le taux moyen d'humidité des graines vivantes est de 18,3% [138].

II.4. Propriétés biologiques de *Icacina oliviformis*

Dans notre Laboratoire en collaboration avec le Pr Emmanuel Bassène, il a été montré que les feuilles de *Icacina oliviformis* présentent des activités antidiabétiques [6, 139] et l'activité antipaludéenne de ces feuilles a été démontré par O. Sarr et *al* [7].

L'extrait aqueux de la racine de *I. oliviformis* possède des propriétés antihyperglycémiantes, antihyperlipidémiques et soulage les dommages rénaux causés par le diabète [137].

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Etude phytochimique de *Morinda geminata*

I.1. Résultats de l'enquête ethnopharmacologique

Maladies traitées

Cette plante est beaucoup utilisée dans la zone de Mlomp département de Bignona (Sénégal) par les populations pour le traitement en majorité de trois maladies: le paludisme, l'activité anti-inflammatoire et des dermatoses. Les résultats présentés dans la figure 25 montrent que 60% de la population utilisent le *Morinda geminata* pour le traitement du paludisme.

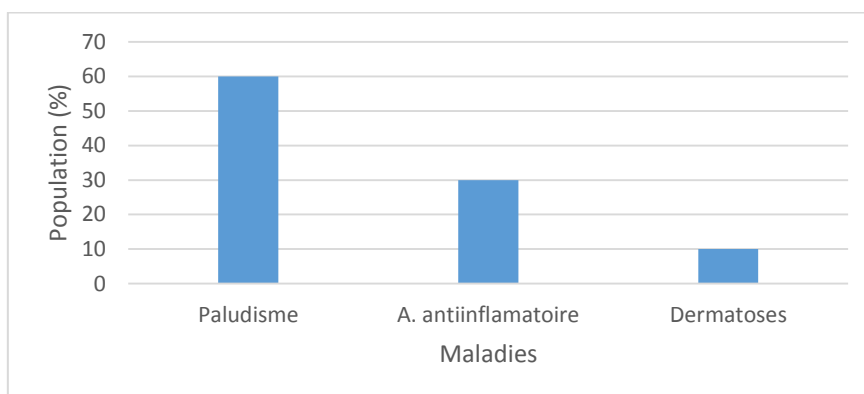


Figure 25: Les maladies traitées par le *Morinda geminata* DC

Partie utilisée

En général, seules certaines parties des plantes médicinales sont utilisées en phytothérapie. La partie utilisée d'une plante est en fonction de la plante elle-même et de la pathologie traitée. Par exemple les feuilles de *Morinda geminata* sont indiquées pour traiter le paludisme et la peau, alors que la racine est indiquée pour traiter les inflammations. La figure 26 confirme ces indications.

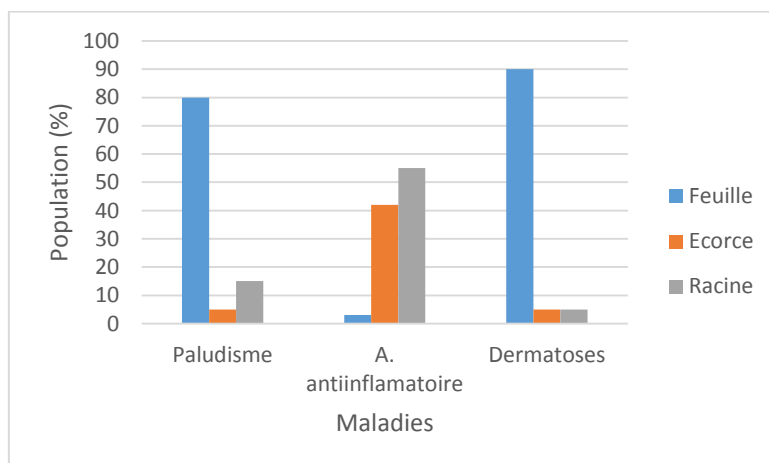


Figure 26: Les différentes parties utilisées de *Morinda geminata* DC

La figure ci-dessus montre que 80% de la population utilisent les feuilles pour le traitement du paludisme et 90% pour les dermatoses. Cette étude confirme que les feuilles sont utilisées fréquemment pour le traitement de ces deux maladies.

Mode de préparation et d'utilisation

Une plante peut être utilisée de manières différentes, selon la personne et la maladie traitée. L'enquête a montré que les principaux modes de préparation dans cette étude sont : la macération (pour le traitement du paludisme et les dermatoses), la décoction (pour les inflammations). Les préparations sont administrées par voie orale, par usage externe (bain ou rinçage) ou par fumigation (Figure 27).

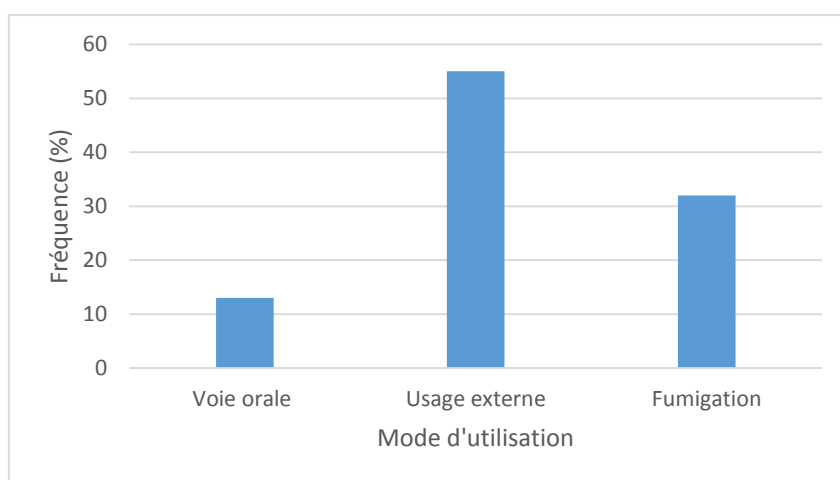


Figure 27: Les modes d'utilisations de *Morinda geminata* DC

On remarque sur cette figure que l'usage externe est plus fréquent (55%) par rapport à la fumigation (32%) et la voie orale (13%).

I.2. Résultats de l'extraction

Les drogues séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur (type Bradender OHG Duisburg). La poudre fine (300 g) ainsi obtenue après pulvérisation a été utilisée comme matière première pour les extractions. Un épuisement successif de la poudre a été réalisé par des solvants de polarité croissante (cyclohexane, acétate d'éthyle, éthanol, eau). En effet, 300 g de poudre fine des différentes parties (racines, écorces ou feuilles,) de *Morinda geminata* ont été introduits dans un ballon de 3000 mL contenant 1500 mL de cyclohexane pendant 24 h à la température ambiante. Le résidu obtenu après évaporation de l'extrait est mis dans un verre de montre et placé sous la hotte pour une évaporation complète du solvant d'extraction. Le marc issu de l'extrait cyclohexane est repris successivement dans les mêmes conditions que précédemment par 1500 mL d'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau. Les filtrats obtenus de chaque partie de

Première Partie: Etude phytochimique des plantes sélectionnées

plante donnent respectivement après évaporation un résidu cyclohexanique, acétate d'éthyle, éthanolique et aqueux (Tableau 5).

Après évaporation à sec, les extraits cyclohexaniques et acétate d'éthyle issus de la racine du *Morinda geminata* DC se présentent sous forme de poudre de couleur jaune ou jaune orangée. Les extraits éthanoliques et aqueux sont d'aspect amorphe. Au niveau des feuilles, les extraits polaires d'une part sont de couleur verte avec un aspect plus ou moins visqueux et d'autre part l'extrait acétate d'éthyle donne une poudre de couleur verte. Tous les extraits obtenus de l'écorce de cette plante sont visqueux ou amorphes. Les masses des extraits ont été données et les rendements d'extraction déterminés à partir du rapport de la masse de l'extrait sur la masse de poudre sèche utilisée. Les différents masses et rendements obtenus sont consignés dans le tableau 5.

Tableau 5: Bilan massique et rendements des extraits

Organe	Solvants	Poids fractions (g)	R (%)
Racines (300 g)	Cyclohexane	2,1495	0,7165
	Acétate d'éthyle	4,3302	1,4434
	Ethanol	10,1808	3,3936
	Eau	27,5161	9,1720
Feuilles (300g)	Cyclohexane	8,2872	4,1436
	Acétate d'éthyle	9,5502	4,7751
	Ethanol	12,5387	6,269
	Eau	25,0575	12,528
Ecorces (300g)	Ether de pétrole	1,8977	0,6325
	Acétate d'éthyle	4,0129	1,3376
	Méthanol	44,3431	14,7810
	Eau	45,0348	15,0116

Calcul du rendement

Le rendement des extraits exprimé en pourcentage, est le rapport entre le poids (**P1**) d'une fraction et le poids (**P2**) du matériel végétal utilisé, multiplié par **100**. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = P1/P2 \times 100$$

Les rendements d'extraction observés dépendent à la fois de l'organe de la plante et aussi du solvant utilisé. Quel que soit l'organe utilisé, les extraits issus des solvants polaires présentent des rendements supérieurs à ceux des solvants apolaires.

I.3. Résultats Screening des extraits

Le screening phytochimique des métabolites secondaires présents dans les extraits végétaux a été réalisé à l'aide de méthodes adoptées dans des études similaires [140]. L'analyse quantitative et phytochimique de cette plante a été déterminée comme suit: Stéroïls et terpénoïdes (réaction de Lieberman, alcaloïdes (réactifs de Bouchardat / Valsler-Mayer / Dragendorff), flavonoïdes (réactif de Shibata), tanin (réaction de Stiasny, test FeCl₃); saponines (test de moussage); anthraquinones (réactif à la potasse).

Les résultats du criblage chimique sont consignés dans le tableau 6. Ces résultats sont à l'origine de notre orientation vers une étude bioguidée, car suivant les résultats nous remarquons que les racines sont plus riches en principes actifs que les autres organes de la plante. Les réactions de caractérisation le confirment (Tableau 6).

Tableau 6: Résultats du screening phytochimique *Morinda geminata*

Organes	Solvants	Anthraquinones	Flavonoïdes	Alcaloïdes	Tannins	Polyphénols	Stéroïls et Terpènes	Saponines
Racines	Cyclo	+	-	+	-	+	+	-
	AcOEt	+	-	+	-	+	-	-
	EtOH	+	-	+	+	+	-	-
	Eau	+	-	-	+	+	-	+
Ecorces	Ether	+	-	-	-	-	-	-
	AcOEt	+	-	-	-	-	+	-
	MeOH	+	-	+	-	-	+	-
	Eau	+	+	-	-	-	+	+
Feuilles	Cyclo	-	-	-	-	-	+	-
	AcOEt	-	-	-	-	-	+	+
	EtOH	-	-	-	+	+	+	+
	Eau	-	-	-	-	-	-	+

Légende: - = Absent, + = positif

I.4. Résultats du fractionnement des extraits de *Morinda geminata*

Le fractionnement des extraits de *Morinda geminata* DC est réalisé par une colonne chromatographique sur gel de silice.

I.4.1. Caractérisation structurale des composés isolés de l'extrait cyclohexanique de la racine

L'extrait cyclohexanique de la racine de *M. geminata* a conduit à l'isolement de deux produits (SBMg1RC et SBMg2RC) sous forme de poudre.

La caractérisation structurale des composés isolés dans l'extrait cyclohexanique de la racine de *Morinda geminata* DC a été menée par analyse de la spectrométrie de masse (SM), de l'infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Le spectre de masse de chaque composé isolé a permis de confirmer leur formule brute à partir de la masse exacte et de leur spectre d'abondance isotopique. L'infrarouge a révélé les différentes fonctions présentes dans chaque composé.

La RMN a fourni le spectre 1D du ^1H et ^{13}C et les spectres à deux dimensions dont la COSY, la HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ et la HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. L'analyse de ces spectres a permis de déterminer la structure de chaque phyto-molécule isolée.

Nous exposerons la méthodologie employée en vue de la détermination structurale du composé **SBMg1RC**. Pour les autres anthraquinones isolées nous mettrons en évidence les différences observées au sein de la série au niveau des substituants.

I.4.1.1. Détermination de la structure du composé SBMg1RC

Ce composé se présente sous la forme d'une poudre jaune soluble dans le dichlorométhane.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse (électrospray) en mode négatif (ESI⁻) nous observons un ion quasimoléculaire à m/z 267 $[\text{M}-\text{H}]^-$ suggérant une masse atomique de 268 uma (Figure 28)

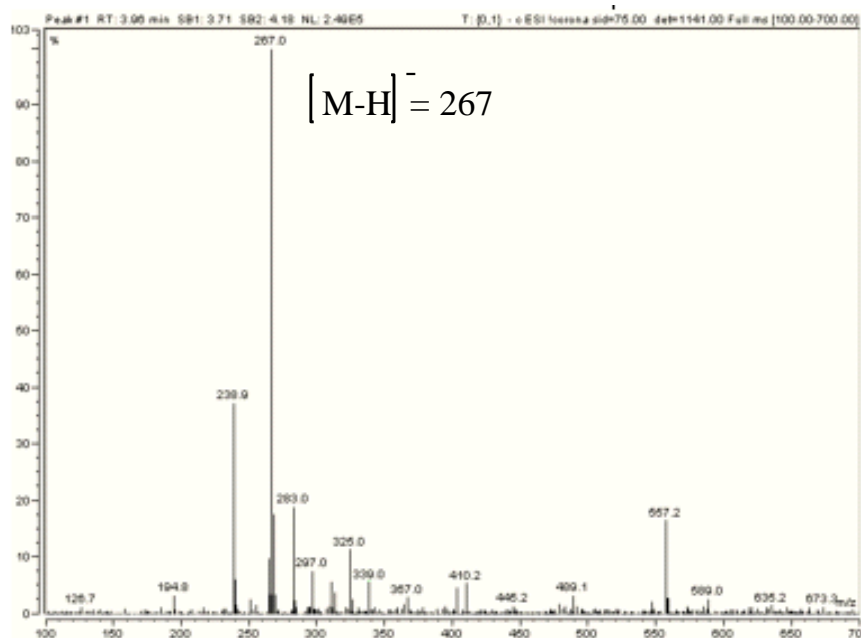


Figure 28: Spectre de masse du composé SBMg1RC (ESI)

Spectrométrie IR du composé SBMg1RC

Le spectre IR du composé SBMg1RC présente des bandes intenses à 2922, 2853, 1740, et 1630 cm^{-1} montrant la présence des CH aromatique, de carbonyle aldéhyde et cétone. On note la

également une vibration C-O à 1271 cm^{-1} et 1H aromatique isolé 784 cm^{-1} . L'absence d'une bande large vers les 3300 cm^{-1} confirme que le OH phénolique n'est pas libre mais chélaté par liaison hydrogène avec le carbonyle du noyau quinone [141].

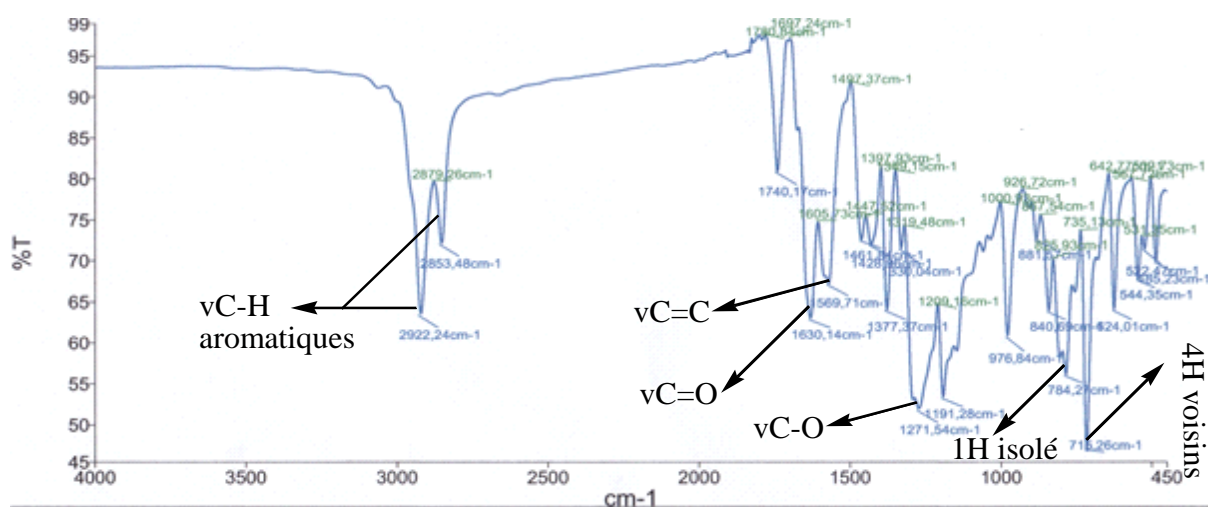


Figure 29: Spectre infrarouge du composé SBMg1RC

Spectrométrie RMN du composé SBMg1RC

Nous présentons ici la procédure adoptée pour caractériser et identifier les molécules isolées. Pour une bonne compréhension de notre démarche de caractérisation structurale, il est important de rappeler quelques éléments clés de la RMN hétéronucléaire que nous avons utilisés.

Les déplacements chimiques des ^{13}C apportent une information structurale complémentaire à ceux du ^1H . Leur corrélation au moyen des spectres HSQC (Heteronuclear Single Quantum Corrélation) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Corrélation) a considérablement facilité l'élucidation de structures complexes de molécules organiques et a amélioré la fiabilité des solutions proposées. Il est aussi possible de réaliser des corrélations entre noyaux ^1H et ^{15}N , qui peuvent apporter une aide précieuse dans l'étude d'un grand nombre de molécules d'origine naturelle ou synthétique. Les exemples décrits ici ne concerneront que les corrélations ^1H - ^{13}C . Un spectre HSQC corréle les déplacements (δ) des ^1H et des ^{13}C directement liés. Malgré la faible abondance isotopique du ^{13}C (1%), c'est l'expérience de RMN 2D hétéro nucléaire la plus sensible. Elle ne donne toutefois pas d'information sur les carbones quaternaires. Ceux-ci sont accessibles grâce à l'expérience HMBC, qui corréle les δ des ^1H et des ^{13}C séparés d'une à 3, mais possiblement plus si certaines conditions structurales telles que les systèmes aromatiques conjugués ou systèmes plans.

Une corrélation HMBC CA-HB à travers n liaisons et une corrélation HSQC CB-HB indiquent que CA et CB sont séparés par $n-1$ liaisons. En considérant que n vaut 2 ou 3, cela signifie que CA et CB sont soit liés ensemble, soit liés à un atome commun indéterminé X.

Si tous les voisins de CA ou de CB sont connus, le nombre de possibilités pour X est restreint par rapport à la situation où les listes de voisins de CA et CB ne sont pas totalement connues. Il faut donc en priorité analyser les corrélations des atomes dont les voisins sont tous connus. Un méthyle n'ayant qu'un seul voisin, l'analyse des corrélations des groupes méthyles doit s'effectuer de manière prioritaire. Ceci est d'autant plus vrai que toutes les corrélations des protons d'un groupe méthyle sont toujours visibles. L'ordre dans lequel les corrélations sont choisies, soit pour attribuer des spectres, soit pour trouver une structure, est optimal lorsqu'il n'y a qu'un nombre minimal de possibilités de déduction. Il n'est cependant pas toujours possible de réduire ce nombre à 1 pour toutes les corrélations HMBC.

Les informations fournies par un spectre COSY se traduisent aussi en relation de proximité entre protons. Si on dispose d'un spectre HSQC: Une corrélation COSY HA-HB à travers n liaisons et les corrélations HSQC CA-HA et CB-HB indiquent que CA et CB sont séparés par $n-2$ liaisons. Dans le cas où n vaut 2, le spectre HSQC permet de détecter immédiatement si les 2 noyaux ^1H (de δ différents) sont portés par le même carbone. Les corrélations à travers 3 liaisons permettent de déduire des liaisons entre atomes de carbone. Pour faciliter l'exploitation simultanée des spectres COSY, HSQC et HMBC, il peut être commode d'identifier les atomes d'hydrogène et de carbone, non pas par leur déplacement chimique mais par un numéro donné arbitrairement. On utilise dans un premier temps le spectre de ^{13}C et on numérote les résonances par ordre de δ croissants ou décroissants. Le spectre HSQC est ensuite utilisé pour donner le même numéro à un ^1H et un ^{13}C directement liés. Les spectres COSY et HMBC se réduisent alors à un ensemble de paires de numéros d'atome, chacun étant relié à une position particulière de la molécule étudiée. Une relation COSY ($n\text{A}$, $n\text{B}$) indique que CA et CB sont liés, et une relation HMBC ($n\text{A}$, $n\text{B}$) indique soit que CA et CB sont liés, soit que CA et CB sont liés au même chemin de couplage de longueur strictement supérieure à 3 liaisons).

Ce travail commence par la numérotation des signaux de résonances des δ du carbone ^{13}C (Figure 30), par ordre décroissant sur le spectre "J-modulé" (C1 pour celui résonant à 190,57 ppm, C15 pour celui à 107,93 ppm). Sur le spectre du DEPT-135 (Figure 31), les CH_2 apparaissent négatifs, les CH et CH_3 en positif. Le signal à 40,00 ppm correspond au solvant (DMSO- d_6). Cette numérotation sera reportée sur l'ensemble des projections 1D (pour ^1H , DEPT-135, ^{13}C) et 2D des spectres HSQC (Figures 32) (couplages ^1J), HMBC (Figures 36) (couplages ^nJ , $n>1$) et COSY (Figure 34).

Première Partie: Etude phytochimique des plantes sélectionnées

Le spectre RMN ¹³C du composé SBMg1RC présente 15 carbones dans la zone aromatique (Figure 30). Deux pics à 186,28 ppm et 181,18 ppm montrant la présence de deux cétones. Ces carbonyles devraient résonner vers 190 ppm comme cétones normales. Cette baisse de fréquence nous a permis de penser à l'antraquinone dont les cétones résonnent vers 180 ppm à cause de l'effet de conjugaison des noyaux aromatiques. On note aussi la présence de deux carbones C4 et C5 respectivement à 167,21 ppm et 166,55 ppm liés à un oxygène.

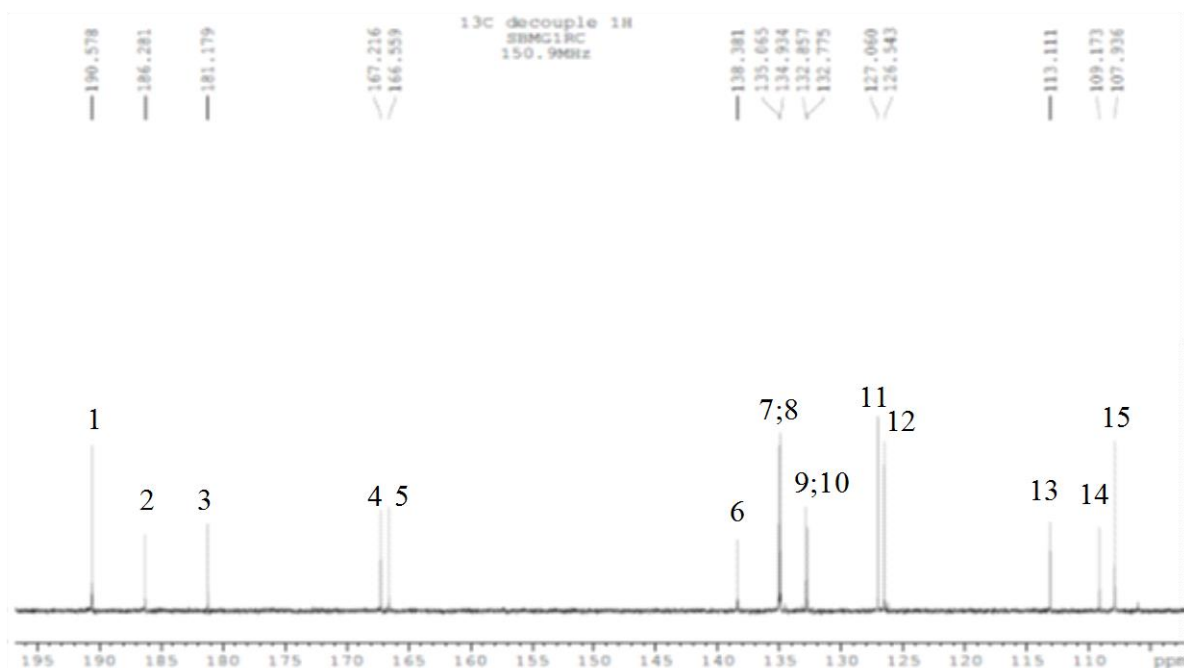


Figure 30: Spectre de carbone du composé SBMg1RC

Sur le spectre de DEPT-135 nous avons identifié 6 CH dont 5 CH dans la zone aromatique et 1 CH à 190,58 ppm qui correspond au carbonyle de la fonction aldéhyde.

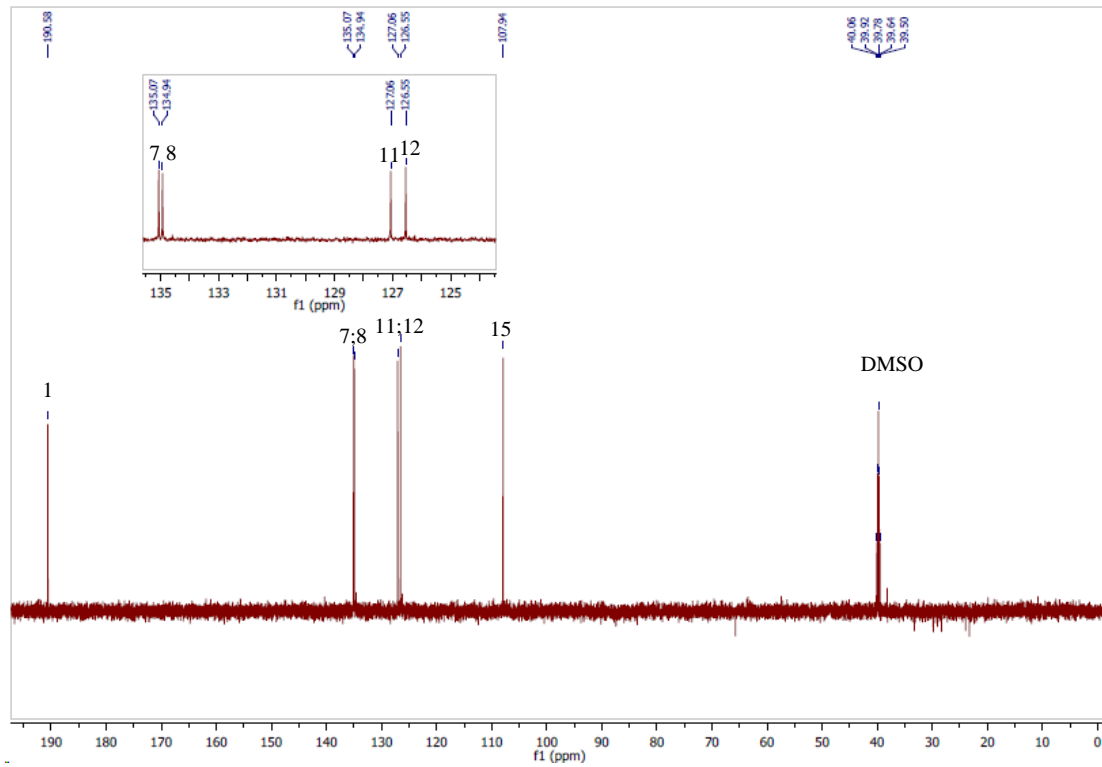


Figure 31: Spectre de DEPT du composé SBMg1RC

Les corrélations de HSQC ont permis d'identifier tous les carbones protonés: C1/H1; C7/H7; C8/H8; C11/H11; C12/H12; C15/H15.

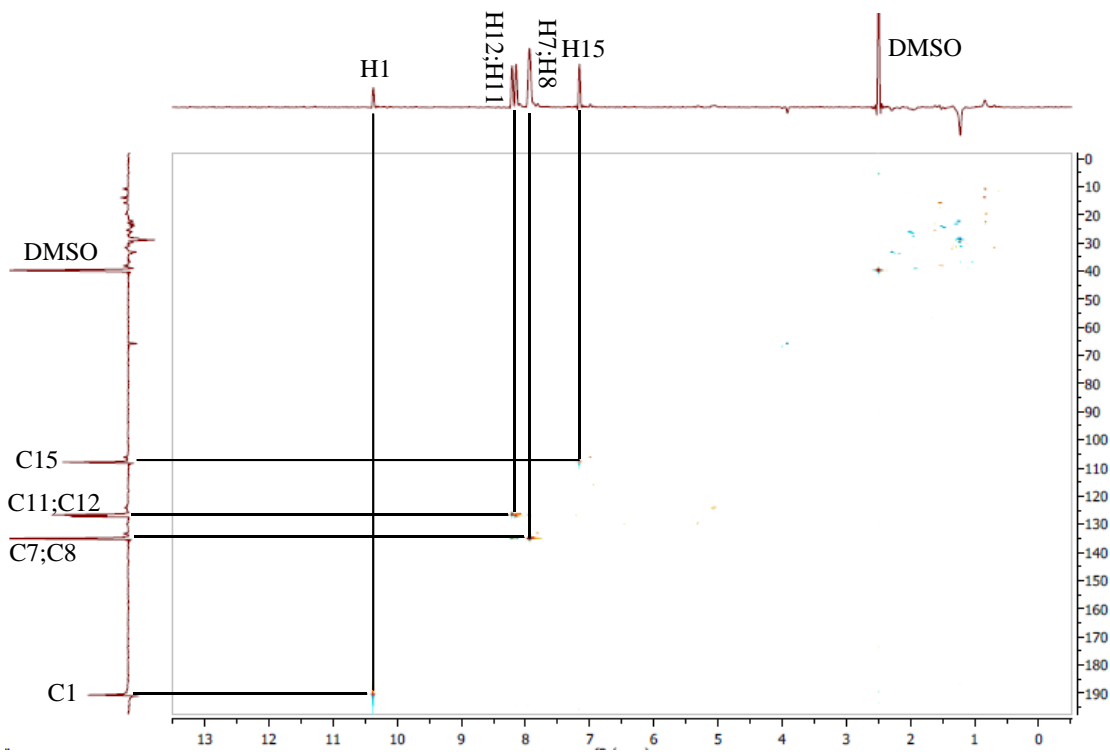


Figure 32: Spectre de HSQC du composé SBMg1RC

Le spectre RMN-¹H du composé SBMg1RC présente:

- Un large singulet à δ_H 12,46 ppm d'intensité égale à un proton attribuable au OH d'un groupement phénol
- Deux massifs à δ_H 8,14 ppm et à δ_H 8,20 ppm chacun d'intensité 1H attribuables aux protons H12 et H11 respectivement d'une anthraquinone non substituée sur le cycle A
- un massif à δ_H 7,91 ppm d'intensité 2H attribuable aux protons H7 et H8 du cycle A
- un singlet à 7,16 ppm d'intensité 1H attribuable aux protons H15 d'une anthraquinone trisubstituée sur le cycle C.

Les signaux à δ_H 2,50 et 3,41 ppm représentent le solvant DMSO avec une trace d'eau et les signaux inférieurs à 2,5 ppm sont dus aux impuretés.

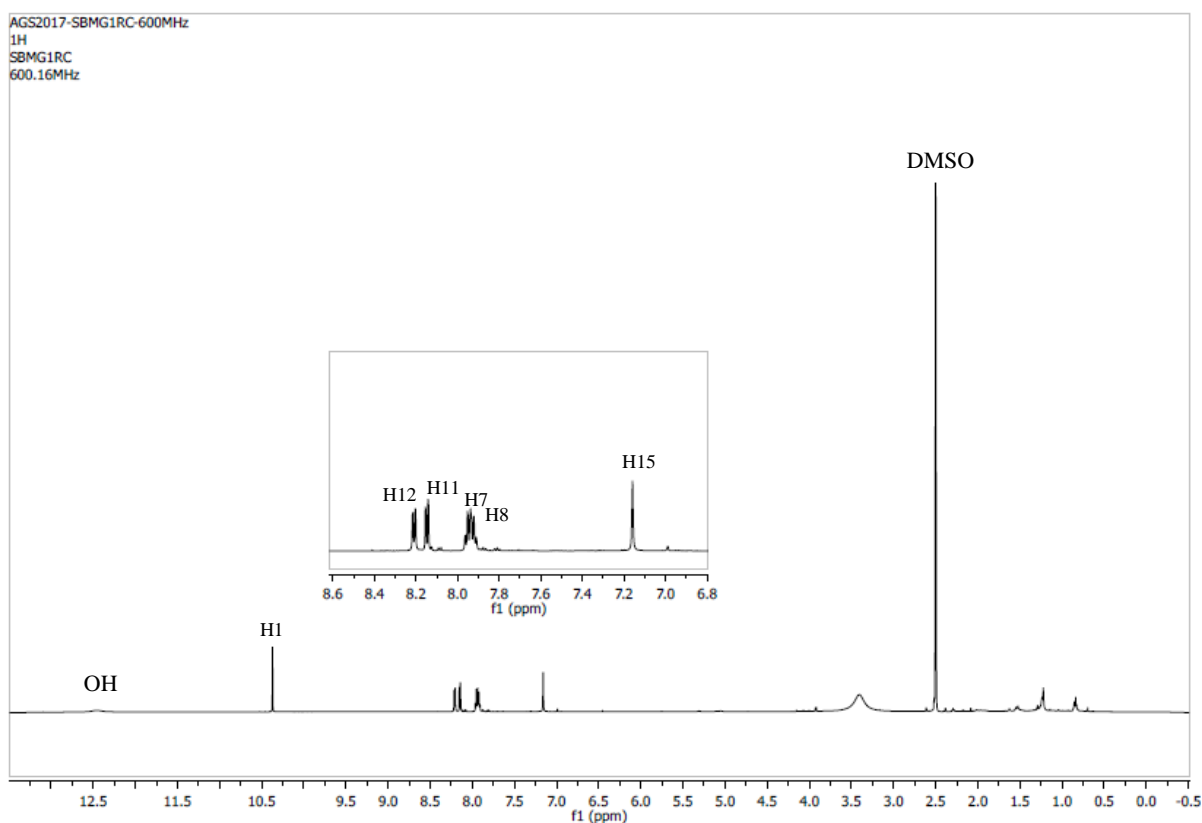


Figure 33: Spectre de proton du composé SBMg1RC

Sur le spectre de COSY ¹H-¹H (Figure 34), on repère les deux groupes de protons dont ceux du cycle A (4 protons) et le proton singulet appartenant à un cycle différent C (1 proton). L'interprétation du spectre COSY confirme bien les corrélations ³J entre H12/H7; H7/H8; H8/H11. Ainsi, on peut confirmer que les protons H7, H8, H11 et H12 appartiennent au même noyau aromatique et le singlet appartient à un autre noyau aromatique substitué.

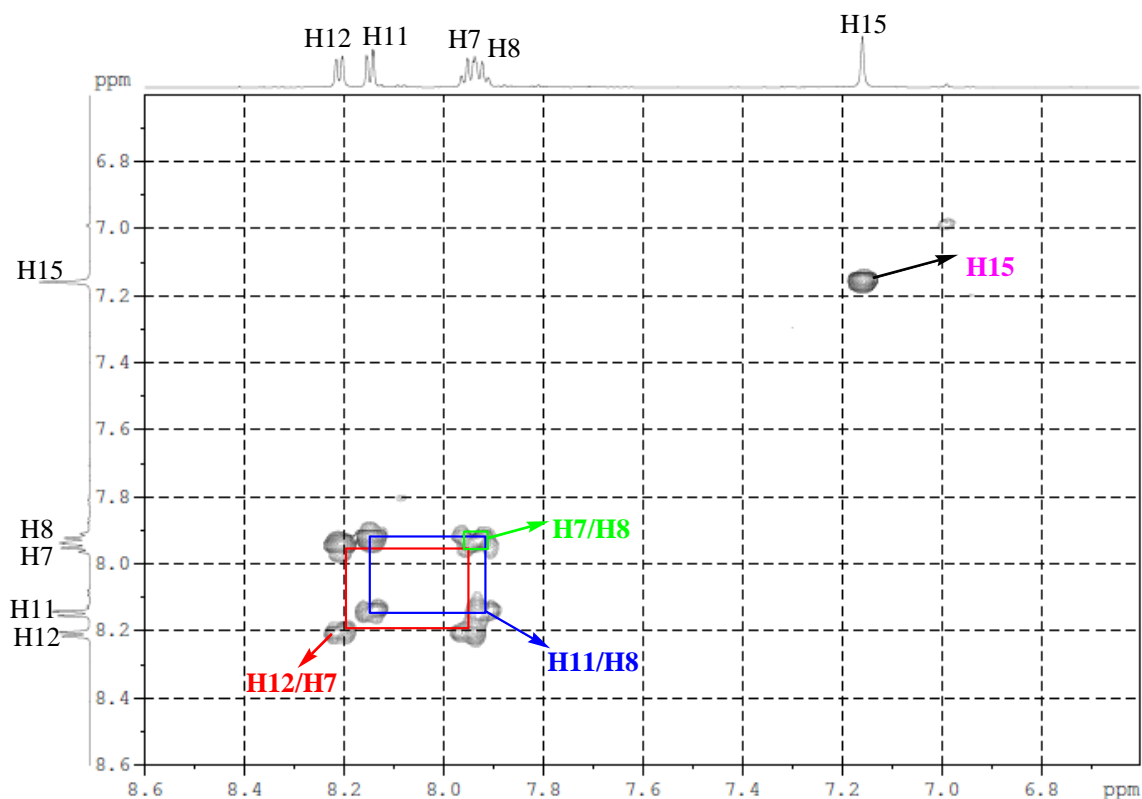


Figure 34: Spectre de COSY du composé SBMg1RC

Le composé SBMg1RC est donc une anthraquinone trisubstituée. Les motifs suivants peuvent être déduits des spectres IR, RMN-¹H et COSY.

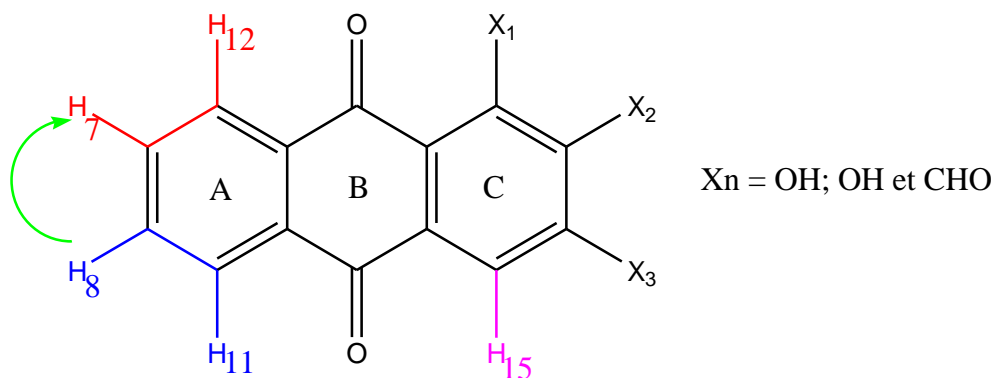


Figure 35: Corrélations COSY du composé SBMg1RC

L'étude du spectre de RMN-2D HMBC va nous permettre non seulement de positionner les substituants du cycle C mais de confirmer la jonction des trois cycles A, B et C du squelette anthraquinone.

Le spectre HMBC montre une corrélation entre le proton H1 de la fonction aldéhyde avec les carbones à δ_C 113,1 ppm (C13) en ⁴J, δ_C 167,2 ppm (C4) et δ_C 166,5 ppm (C5) en ³J. Les carbones C5 et C13 corréleront à leur tour avec le proton à δ_H 7,16 ppm (H15) en ³J. Les carbones

Première Partie: Etude phytochimique des plantes sélectionnées

C1, C4, C6, C13 et C14 corrélient à leur tour avec le proton à δ_H 7,16 ppm (H15). Ces données indiquent que les carbones C4, C5, C6, C13, C14 et C13 appartiennent au même cycle, c'est-à-dire le cycle C sur lequel est rattaché la fonction aldéhyde. De plus les carbones des deux C=O à 186,2 ppm (C2) et 181,1 ppm (C3) corrélient avec le proton H15, ce qui permet de confirmer la jonction B et C. La jonction du cycle A au cycle B est donnée par les corrélations des protons H11 et H12 avec les carbones respectifs C3 en 3J et C2 en 4J . Les corrélations des protons H7 et H12 avec le carbone C9, ainsi que celles des protons H8 et H11 avec le carbone C10 permettent de distinguer les positions des protons H7 et H8 sur le cycle A et de repérer les carbones C9 et C10.

Sur le spectre HMBC nous observons les corrélations:

C1 (le plus déblindé à cause de la fonction aldéhyde) C1/H15 (4 liaisons).

C2 (déblindé à cause de la fonction cétone) C2/H12 (3 liaisons) C2/H15 (4 liaisons).

C3 (déblindé à cause de la fonction cétone) C3/H11 (3 liaisons) C3/H15 (3 liaisons).

C4 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) C4/H1 (3 liaisons) C4/H15 (2 liaisons).

C5 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) C5/H1 (3 liaisons).

C6: C6/H15 (3 liaisons), C6/H1 non observée.

C7: C7/H11 (3 liaisons).

C8: C8/H12 (3 liaisons).

C9: C9/H7 (3 liaisons), C9/H12 non observée.

C10: C10/H8 (3 liaisons), C10/H11 non observée.

C11: C11/H7 (3 liaisons).

C12: C12/H8 (3 liaisons).

C13: C13/H1 (4 liaisons), C13/H15 (3 liaisons).

C14: C14/H15 (2 liaisons).

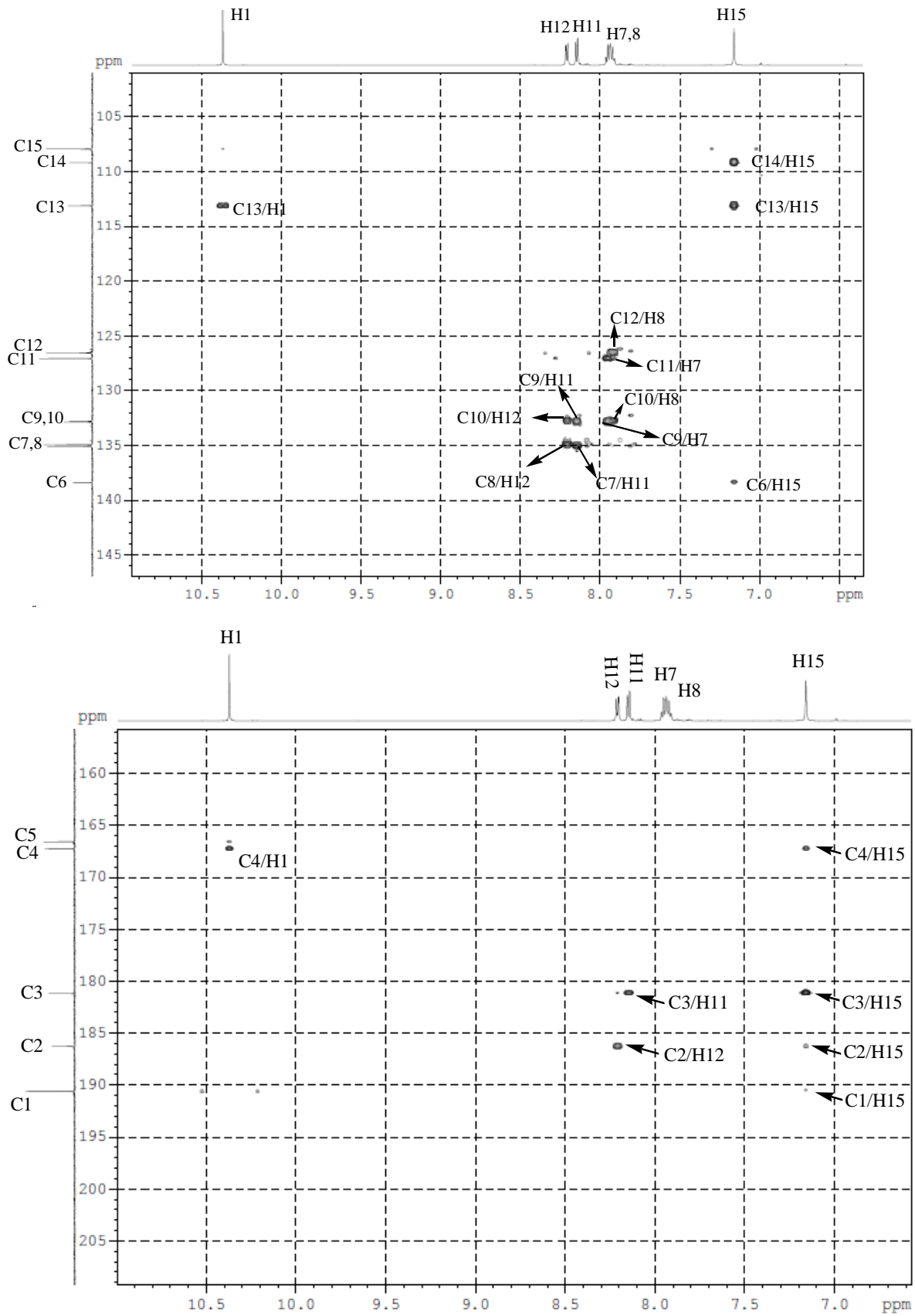


Figure 36: Spectre HMBC du composé SBMg1RC

Nous présentons deux numérotations, la première avec les corrélations en HMBC est la procédure utilisée durant la caractérisation basée sur la numérotation du spectre ^{13}C et la deuxième est la numérotation conventionnelle (IUPAC).

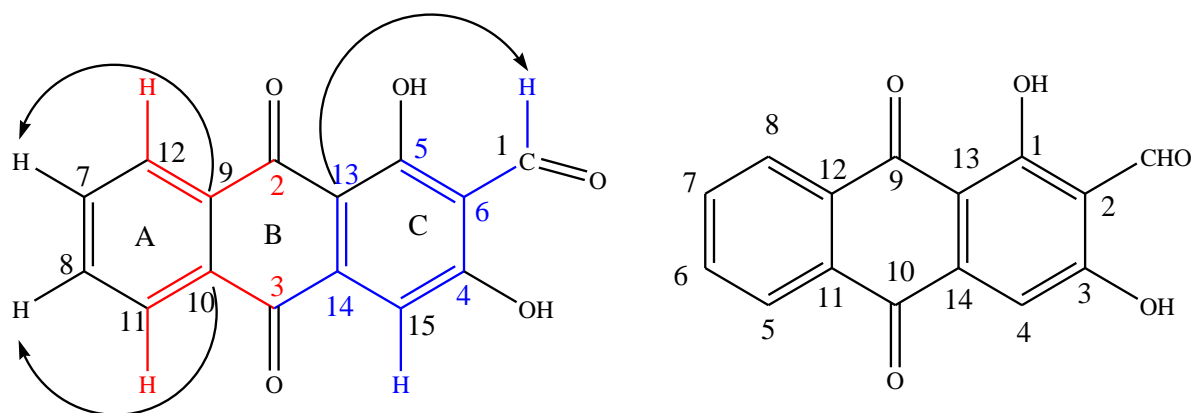


Figure 37: Corrélations HMBC du composé SBMg1RC

Le composé **SBMg1RC** est donc le 2-carbaldéhyde-1,3-dihydroxyanthraquinone (Nordamnacanthal). Les déplacements chimiques de ce composé comparés à ceux de la littérature [142] sont consignés dans le tableau 7.

Tableau 7: Déplacements chimiques du composé SBMg1RC

Position	Isolé (DMSO, 600MHz)		Littérature (Pyridine-d ₅ , 400MHz) [142]	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	166,56	-	168,33
2	-	138,38	-	113,14
3	-	167,22	-	169,27
4	7,16 (s)	107,94	7,42 (s)	109,27
5	8,20 (dd)	127,06	8,24 (dd)	127,56
6	7,93 (m)	134,93	7,68 (td)	134,78
7	7,91 (m)	135,07	7,71 (td)	134,86
8	8.14 (dd)	126,54	8,28 (dd)	127,02
9	-	186,28	-	186,71
10	-	181,18	-	181,59
11	-	132,78	-	133,63
12	-	132,86	-	133,58
13	-	113,11	-	109,36
14	-	109,17	-	139,45
15	10,37 (s)	190,58	10,57 (s)	192,99
OH	12,6 (s)			

Le nordamnacanthal a été isolé de *Morinda elliptica* [87]. Certaines études ont montré que nordamnacanthal a présenté un certain nombre de propriétés biologiques, y compris les activités antioxydantes et des effets antitumoraux [143]. Nordamnacanthal a été également signalé comme présentant d' autres activités : antivirales, antimicrobiennes et des propriétés

cytotoxiques [144]. Nordamnacanthal a causé à 50% des cellules MCF-7 et MOLT-4 une apoptose à ces concentrations de 15 $\mu\text{g/mL}$ et 70 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, en utilisant comme analyse un microscope à fluorescence après coloration avec l'orange acridine (OA) et l'iodure de propidium (IP) [145].

I.4.1.2. Détermination de la structure du composé SBMg2RC

Ce composé se présente sous la forme d'une poudre jaune soluble dans le dichlorométhane. Sur le spectre de masse (électrospray) en mode négatif (ESI⁻) nous observons un ion quasimoléculaire à m/z 281 $[\text{M}-\text{H}]^-$ suggérant une masse atomique de 282 uma, soit un CH_2 (14 uma) de plus que l'ion moléculaire de **SBMg1RC**, ce qui laisse présager de la présence d'un groupement méthylène supplémentaire. Ces données suggèrent que la structure du composé **SBMg2RC** est celle du Nordamnacanthal méthylée.

Le spectre IR du composé **SBMg2RC** présente une allure similaire à celle du composé précédent.

Le spectre de carbone ^{13}C (Figure 103 annexe) a montré un carbone supplémentaire dans la zone aliphatique par rapport à **SBMg1RC** (δ_{C} 63,73 ppm) suggérant la présence d'un groupement méthoxy. La valeur du déplacement chimique des protons méthyliques (Figure 104 annexe) et la nature du carbone déterminé par le DEPT confirment la présence d'un méthyle lié à un oxygène. L'analyse du spectre de HMBC a permis de positionner le méthoxy (OCH_3) en C4 par la corrélation C4/H16 (3 liaisons). Les autres signaux de la molécule restent presque inchangés par rapport à **SBMg1RC**. Donc le composé **SBMg2RC** peut être identifié comme étant le Damnacanthal.

Nous présentons deux numérotations, la première avec les corrélations en HMBC est la procédure utilisée durant la caractérisation basée sur la numérotation du spectre ^{13}C et la deuxième est la numérotation conventionnelle (IUPAC).

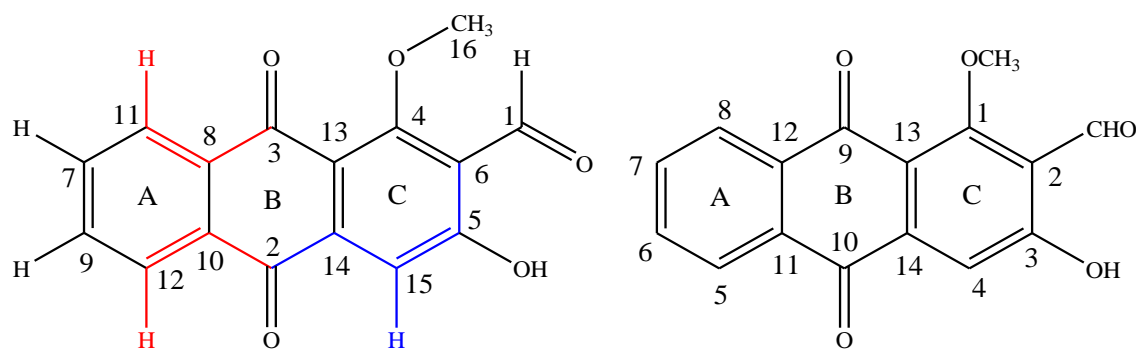


Figure 38: Corrélations HMBC du composé SBMg2RC

Tableau 8: Déplacements chimiques du composé SBMg2RC

Composé isolé (DMSO, 600MHz)			Littérature (Pyridine-d ₅ , 400MHz) [142, 146]	
Position	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
1	-	165,19	-	166,58
2	-	140,07	-	119,51
3	-	164,52	-	166,41
4	7,47 (s)	111,23	7,77	112,67
5	8,11 (dd)	126,41	8,24	126,96
6	7,91 (m)	134,99	7,64	133,67
7	7,86 (m)	133,73	7,70	134,89
8	8.15 (dd)	126,80	8,33	127,39
9	-	179,56		180,07
10	-	181,82		182,22
11	-	134,60		132,92
12	-	132,03		135,41
13	-	120,17		118,21
14	-	117,81		141,58
15	10,37 (s)	192,75	10,57	194
16	3,97 (s)	63,74	4,14	64,31

Ce composé a été isolé dans la racine *Morinda lucida Benth* et pour une quantité de 30 à 40 µg il inhibe à 100% la croissance de *Plasmodium falciparum in vitro* [147]. Il a été signalé que le Damnacanthal inhibe: l'activité sélective de la tyrosine kinase [148] la progression de cancer [149, 150] et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [151]. Le damnacanthal possède des effets antinociceptifs et anti-inflammatoires [152].

I.4.2. Caractérisation structurale des composés isolés de l'extrait AcOEt de la racine

L'extrait acétate d'éthyle (2 g) a permis d'accéder à quatre composés (SBMg12AC, SBMg9-4AC, SBMg16AC et SBMg17AC) après analyse des profils CCM et HPLC analytiques des fractions obtenus.

L'identification des composés a été possible grâce aux données spectrales: spectroscopie de masse (SM), spectroscopie infra rouge (IR), et de résonance magnétique nucléaire (RMN).

I.4.2.1. Détermination de la structure du composé SBMg12AC et SBMg9-4AC

Spectrométrie de masse

Sur les spectres de masse obtenus par ionisation chimique (IC) en mode négatif des deux composés, nous observons un ion moléculaire à m/z 281 [M-H]⁻ suggérant une masse atomique de 282 uma. Cette masse atomique correspond à la formule brute C₁₆H₁₀O₅ identique à celle du **SBMg2RC** (damnacanthal).

Spectrométrie RMN

L'analyse des spectres de RMN ^1H de **SBMg9-4AC** et **SBMg12-4AC** montrent les signaux caractéristiques d'une anthraquinone telle que le **SBMg2RC** caractérisé comme étant le damnacanthol isolé dans l'extrait cyclohexane. Sur la base de cette analyse on peut conclure que l'extrait acétate d'éthyle contient le damnacanthol car **SBMg9-4AC** = **SBMg12-4AC** = **SBMg2RC** (Spectre de protons de **SBMg2RC** Figure 104).

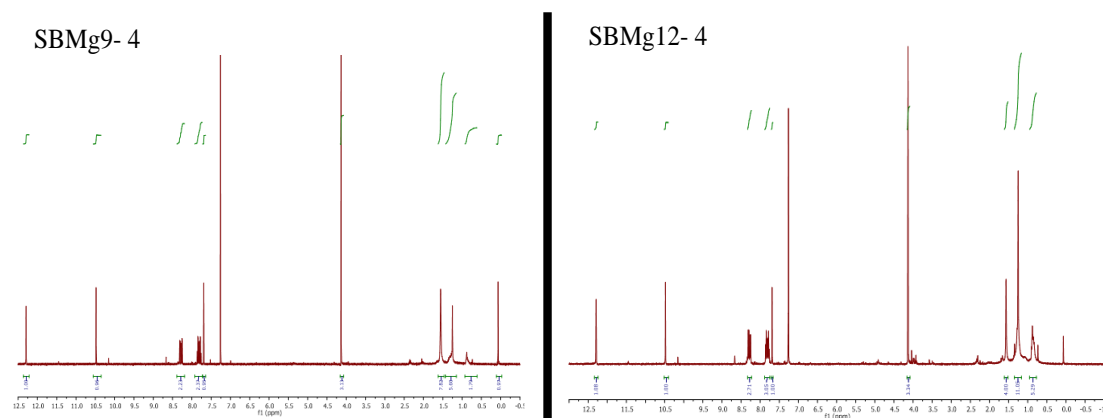


Figure 39: Spectre des composés SBMg9-4 et SBMg12-4

I.4.2.2. Détermination de la structure du composé SBMg16AC

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse obtenu par ionisation chimique (IC) en mode négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 283 $[\text{M}-\text{H}]^-$ suggérant une masse atomique de 284 uma.

Spectrométrie RMN

Le spectre de RMN- ^1H du composé SBMg16AC présente les mêmes caractéristiques que le composé SBMg11ET isolé dans la phase éthanol. La détermination structurale est détaillée dans la partie caractérisation structurale des composés isolés de l'extrait éthanolique.

I.4.2.3. Détermination de la structure du composé SBMg17AC

Spectrométrie IR

Le composé SBMg17AC présente en IR un ν C-H à 3233 cm^{-1} , ν C=O à 1711 cm^{-1} et un ν C=C à 1587 cm^{-1} .

Spectrométrie RMN

Le spectre RMN ^{13}C du composé SBMg17AC présente 4 signaux (carbones) dans la zone aromatique. Le signal à 194,72 ppm (C1) correspond à un C=O et les trois autres correspondent aux carbones aromatiques d'une anthraquinone.

Sur le spectre de DEPT nous observons deux CH à 136,80 et 123,74 ppm respectivement C3 et C4 à savoir en α et β du carbonyle. Donc les carbones non observés à 194,72 (C1) et 139,22 ppm (C2) sont des quaternaires.

Sur le spectre de HSQC nous remarquons que les carbones protonés corrélient avec un massif à 8,15 ppm, signifiant que les protons de C3 et C4 sont dans un environnement d'une molécule symétrique. Cela se confirme sur le spectre RMN- ^1H par la présence d'un seul signal (massif) dans la zone aromatique.

Sur le spectre HMBC on observe des corrélations des quatre carbones avec le même massif. A partir de ces informations, nous pouvons conclure que le composé **SBMg17AC** est une anthraquinone non substituée et symétrique. Donc on observe une partie de la molécule.

Les spectres HSQC et HMBC nous ont permis de confirmer la structure de la molécule par les corrélations et attributions des carbones. Les corrélations en HMBC sont présentées ci-dessous. Les spectres du composé **SBMg17AC** (anthracène-9,10-dione) sont joints en annexe page 145.

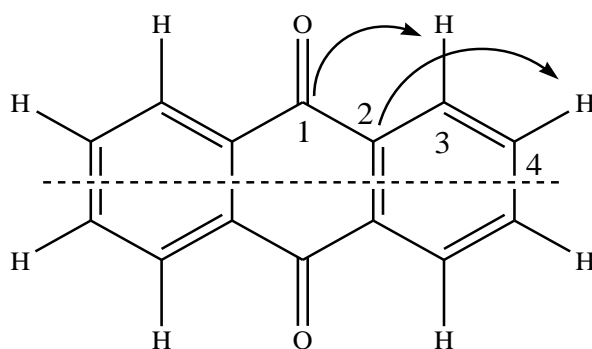


Figure 40: Corrélations en HMBC du composé **SBMg17AC**

I.4.3. Caractérisation structurale des composés isolés de l'extrait EtOH de la racine

La purification de 2 g d'extrait éthanoïque a conduit à l'isolement de trois composés (**SBMg3ET**, **SBMg6ET** et **SBMg11ET**) sous forme de poudre.

La caractérisation structurale des composés isolés dans l'extrait éthanol de la racine de *Morinda geminata* DC a été menée par analyse de la spectrométrie de masse (SM), du spectre infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

I.4.3.1. Détermination de la structure du composé **SBMg3ET**

Le composé **SBMg3ET** a été isolé sous la forme d'une poudre jaune vif avec un éluant 9/1 cyclo/AcOEt

Comme précédemment le spectre ESI-MS présente en mode négatif un ion pseudo-moléculaire $[\text{M-H}]^-$ à m/z 297 (masse calculée 298).

Sur le spectre IR du composé SBMg3ET nous observons une bande large à 3217 cm^{-1} correspondant à un groupement hydroxyle (-OH). Ce qui nous suggère la présence d'un hydroxyle non chélaté.

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé SBMg3ET révèle la présence de 17 atomes de carbones, donc 2 carbones supplémentaires par rapport au composé SBMg1RC.

Les spectres de RMN ^1H des composés SBMg1RC et SBMg3ET présentent des similitudes. Cependant, le composé SBMg3ET se singularise par la présence de trois protons aliphatiques à 4,5 ppm un singulet intégrant pour 2H, à 3,5 ppm (q, 2H) et à 1,1 ppm (t, 3H) et par l'absence de signal du proton de l'aldéhyde.

Les données RMN ^1H et ^{13}C combinées avec la 2D montrent que le quadruplet à 3,5 ppm (2H H16) a été couplé à un triplet de trois protons à 1,12 ppm impliquant un groupe -CH₂-CH₃.

Le singulet (2H) à 4,5 ppm corrèle en HMBC avec le carbone à 65,22 ppm (C-16) suggérant la présence d'un carbone oxygéné. Par conséquent le groupe -CH₂-O-CH₂-CH₃ a été déduit.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le proton H15 et le carbone C12 permettent de placer le groupement l'éthyle éther en position 12.

Nous présentons deux numérotations, la première avec les corrélations en HMBC est la procédure utilisée durant la caractérisation basée sur la numérotation du spectre ^{13}C et la deuxième est la numérotation conventionnelle (IUPAC).

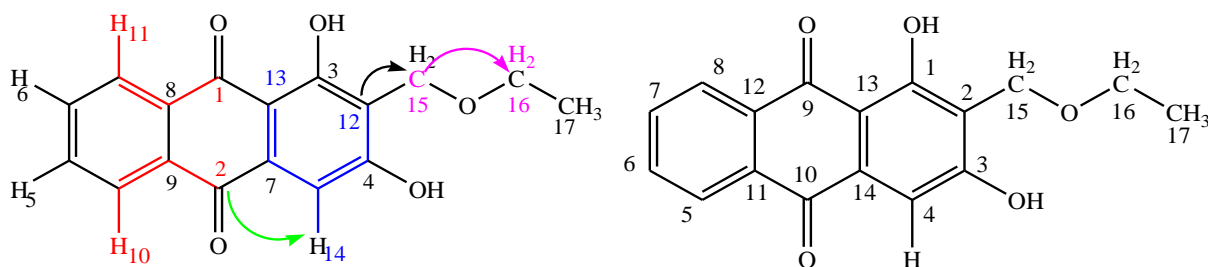


Figure 41: Corrélations HMBC du composé SBMg3ET

Les affectations de ces données sont en parfait accord avec celles de la structure du Lucidin-w-ethyl ether, comme indiqué dans la littérature [51]. Par conséquent, nous avons élucidé la structure de SBMg3ET comme étant le 2-éthyl éther -1,3-dihydroxyanthraquinone, et ses données spectrales sont consignées dans le tableau 9. Les spectres de ce composé sont joints en annexe page 147.

Tableau 9: Déplacements chimiques du composé SBMg3ET

Position	Composé isolé (DMSO, 600 MHz)		Littérature (DMSO D ₆ , 400 MHz)
	δ_H	δ_C	[153] δ_H
1	-	164,07	-
2	-	117,14	-
3	-	163,70	-
4	7,25 (s)	107,63	7,29
5	8,23 (dd)	126,47	8,19
6	7,9 (m)	134,58	7,91
7	7,9 (m)	134,75	7,91
8	8,20 (dd)	126,84	8,19
9	-	186,32	-
10	-	181,86	-
11	-	133,08	-
12	-	132,89	-
13	-	109,12	-
14	-	133,92	-
15	4,5 (s)	59,22	4,48
16	3,5 (q)	65,22	3,50
17	1,10 (t)	15,19	1,10

I.4.3.2. Détermination de la structure du composé SBMg6ET

Le composé SBMg6ET a été isolé sous forme poudre jaune avec un éluant 9/1 (cyclo/AcOEt).

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse obtenu en mode négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 253 $[M-H]^-$ suggérant une masse atomique de 254 uma. Cette masse correspond à la formule brute $C_{17}H_{14}O_5$.

Spectrométrie IR

Sur le spectre IR nous observons une bande large à 3390 cm^{-1} correspondant à une fonction alcool. A 2920 cm^{-1} et 2851 cm^{-1} nous avons les vibrations des C-H aromatiques, 1667 cm^{-1} (C=O), 1566 cm^{-1} (C=C), 1276 cm^{-1} (C-O), 792 cm^{-1} (2H voisins) et à 710 cm^{-1} (3H voisins). L'analyse du spectre IR nous a permis de penser à une structure anthracénique. Par conséquent la caractérisation du composé a été faite par RMN avec la numérotation conventionnelle (IUPAC).

Spectrométrie RMN

La majorité des signaux du spectre RMN 1H du composé SBMg6ET est observée dans la région des aromatiques indiquant la présence des protons aromatiques. Parmi ceux-ci le spectre présente un profil typique d'une anthraquinone. De plus, deux groupements méthyles ont été observés à 1,25 ppm et à 2,31 ppm. Le signal à 13,11 ppm montre la présence d'un groupement

hydroxyle. Ces informations permettent de suggérer la structure d'une anthraquinone tri substituée.

Les corrélations de HSQC ont permis d'identifier tous les carbones aromatiques protonés: C3/H3; C4/H4; C6/H6; C7/H7; C8/H8.

Le COSY révèle deux groupes de couplage: le couplage H3/H4 montrant que ces deux protons appartiennent au même noyau aromatique (C) et le couplage H6/H7, H7/H8. La jonction des cycles est confirmée en HMBC par les corrélations C9/H8 et C10/H4. Les spectres sont en annexe page 150.

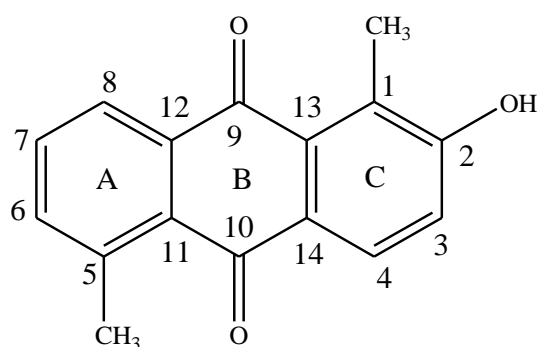


Figure 42: Structure du composé SBMg6ET

I.4.3.3. Détermination de la structure du composé SBMg11ET

Le composé **SBMg11ET** a été isolé sous forme d'une poudre verte avec un éluant 7/3 cyclo/AcOEt

Sur le spectre de masse obtenu par ionisation chimique (IC) en mode négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 283 $[M-H]^-$ suggérant une masse atomique de 284 uma, Soit 2 uma de plus que l'ion moléculaire de **SBMg2RC**. Ces données suggèrent que la structure du composé **SBMg11ET** est celle du Damnacanthol hydrogéné ou réduite en alcool.

Sur le spectre IR du composé **SBMg11ET** nous observons les mêmes vibrations que celles du composé **SBMg2RC** et une bande large supplémentaire à 3299 cm^{-1} correspondant à une fonction alcool.

Une comparaison faite sur les spectres RMN ^{13}C et RMN ^1H du composé **SBMg11ET** avec ceux du composé **SBMg2RC** montre la présence d'un dérivé de ce dernier, car nous retrouvons presque tous les signaux de **SBMg2RC** avec l'absence du singulet de la fonction aldéhyde et un singulet supplémentaire d'une fonction alcool à 4,52 ppm. Donc la fonction aldéhyde a été réduite en alcool.

Sur le spectre COSY nous repérons deux groupes de protons dont ceux du cycle A (4 protons) et un proton singulet appartenant au cycle C. Le composé **SBMg11ET** est donc une anthraquinone trisubstituée avec un groupement hydroxyle, un méthoxyle et un $-\text{CH}_2\text{-OH}$

comme substituants. Les corrélations observées sur le spectre RMN 2D HMBC ont permis de positionner le groupement hydroxyle en position 3, le groupement CH₂-OH en 10 et le groupement méthoxyle en 4 sur le cycle C (respectivement C3/OH, C10/H15 et C4/H16).

La structure du composé **SBMg11ET** est donc le 3-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)-1-méthoxyanthraquinone (Damnacanthal).

Nous présentons deux numérotations, la première avec les corrélations en HMBC est la procédure utilisée durant la caractérisation basée sur la numérotation du spectre ¹³C et la deuxième est la numérotation conventionnelle (IUPAC).

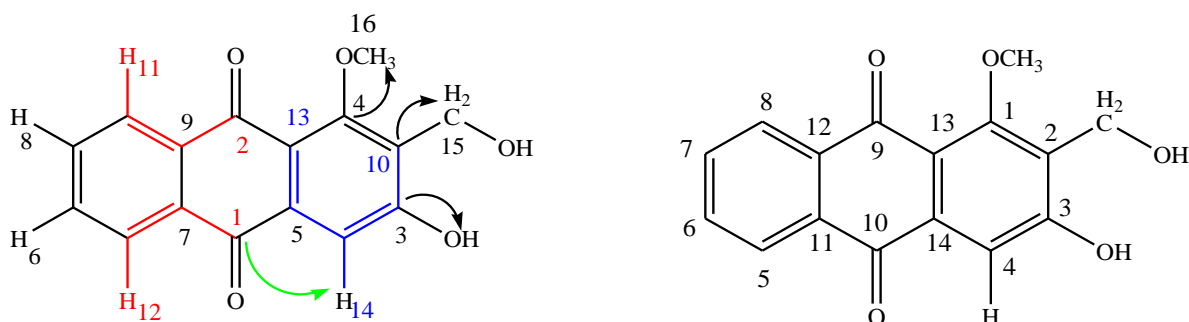


Figure 43: Structure du composé SBMg11ET

Tableau 10: Déplacements chimiques du composé SBMg11ET

Position	Isolé (DMSO, 600 MHz)		Literature [142] (DMSO-d ₆ , 400MHz)	
	δ ppm (¹ H)	δ ppm (¹³ C)	δ ppm (¹ H)	δ ppm (¹³ C)
1		161,77		161,66
2		128,90		128,80
3		162,25		162,17
4	7,5 (s)	109,87	7,52	109,80
5	8,3 (d)	126,78	8,11	126,10
6	7,72 (m)	133,50	7,83	133,36
7	7,73 (m)	134,74	7,89	134,56
8	8,2 (d)	126,22	8,16	126,57
9		180,12		179,98
10		182,68		182,56
11		132,11		132,03
12		134,64		134,60
13		117,95		117,85
14		135,48		135,37
15	3,77 (s)	62,52		62,40
16	4,52 (s)	52,20		52,15

Donnée de RMN ¹³C des anthraquinones

Les données de RMN ¹³C pour les anthraquinones naturelles ont été rapportées dans la littérature et les tentatives ont été afin de déterminer les paramètres de changement chimique induits par un substituant. Pour les anthraquinones monosubstituées, les valeurs SCS (substituent chemical shifts) étaient à peu près cohérentes avec celles du benzène monosubstitué. Cependant, les groupes hydroxyle en position péricarène entraînent un changement paramagnétique considérable du signal de C9 (C10), en raison de la liaison hydrogène. Cela résulte également en valeurs SCS assez différentes pour les deux carbones anthra, changements typiques des signaux C9 et C10 (183 ppm). Dans le cas de la liaison hydrogène à un groupe hydroxyle, il est transféré à 188 ppm et, si le lien hydrogène à deux groupes hydroxyle possible, à 192 ppm. Les signaux de méthoxyle sont habituellement observé à 56 ppm; Cependant, dans le cas d'un 1-méthoxy groupe en combinaison avec un substituant à C2 le signal méthoxy est décalé vers le bas jusqu'à 61-64 ppm, en raison d'un encombrement stérique.

I.4.4. Caractérisation structurale de SBMg12FAC isolé de l'extrait AcOEt de la feuille.

Les observations menées sur les spectres RMN ¹H nous ont permis de sélectionner le **SBMg12FAC** pour la suite des analyses. Les autres fractions se présentent sous formes d'acide gras ou d'impuretés: exemple figure 44.

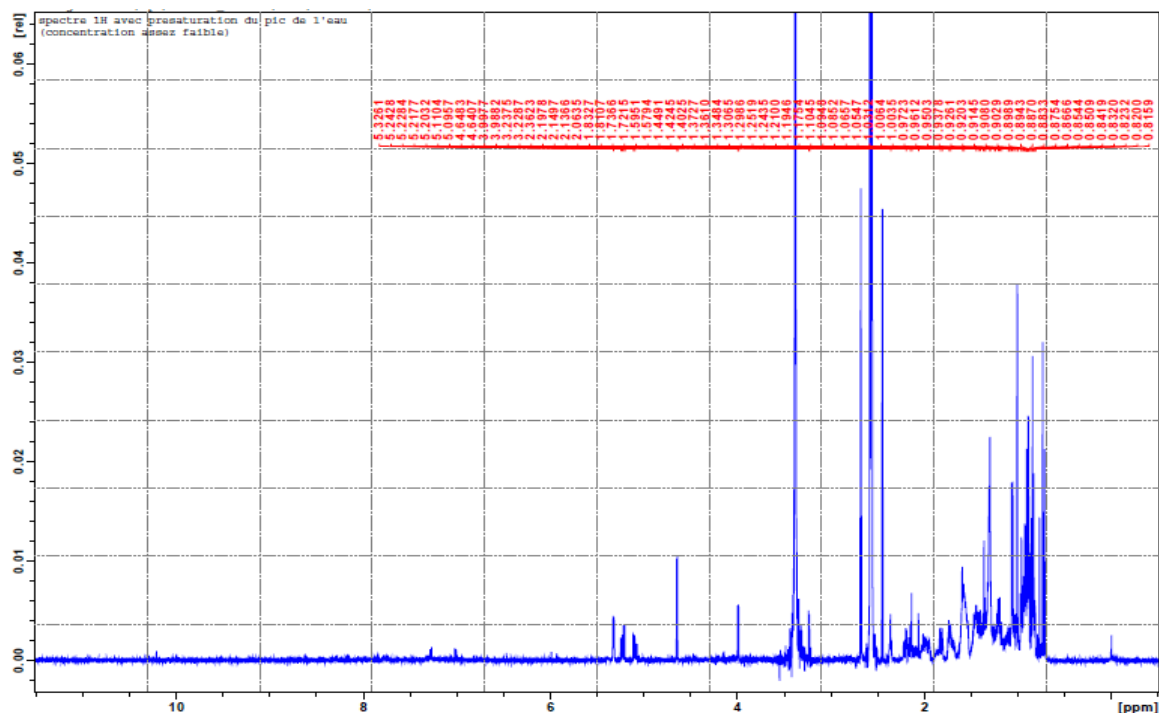


Figure 44: Exemple de spectre RMN de matière grasse

Détermination de la structure du composé SBMg12FAC

Le composé **SBMg12FAC** a été obtenu sous forme d'une poudre verdâtre, soluble dans le dichlorométhane et dans les solvants apolaires. En CCM, il présente une coloration mauve après révélation avec l'acide sulfurique (50%).

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en impact électronique (EI) en mode négatif du composé **SBMg12FAC**, nous observons l'ion moléculaire m/z 455 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_{30}H_{48}O_3$ (masse calculée 456). Le spectre EI nous apporte également des informations sur la structure de ce composé.

Sur le spectre IR nous observons:

- une bande large vers 3390 cm^{-1} correspondant à une fonction alcool libre
- une bande fine à 2927 cm^{-1} correspondant au OH de l'acide
- un pic de $\nu\text{ C=O}$ à 1688 cm^{-1}
- un pic de $\nu\text{ C=CH}$ à 1457 cm^{-1}

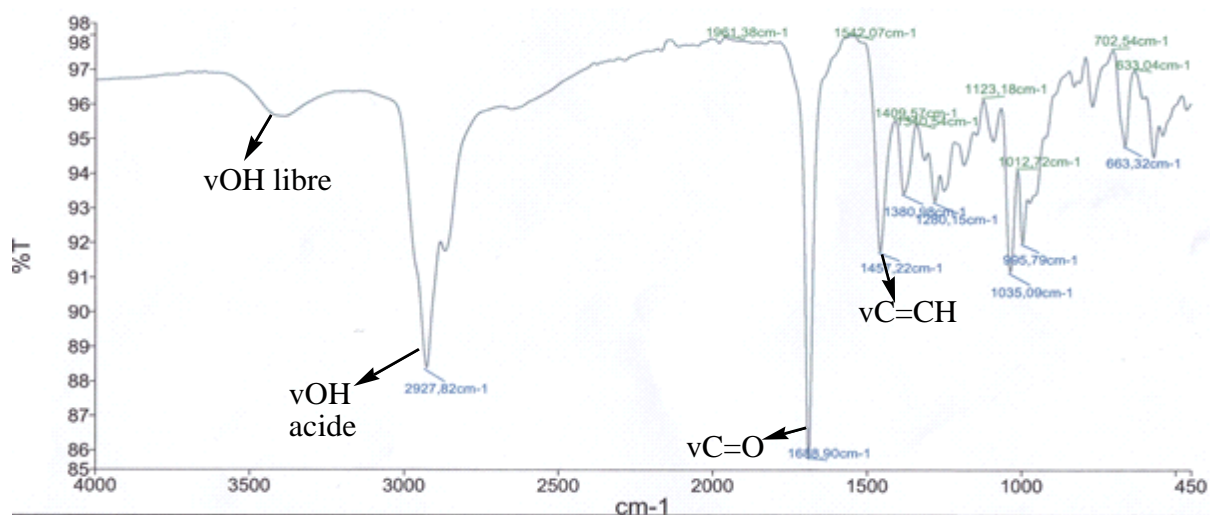


Figure 45: Spectre IR du composé SBMg12FAC

Le spectre RMN ^{13}C du composé présente 30 pics confirmant la présence d'un triterpène.

Sur ce spectre de RMN ^{13}C nous distinguons un carbone oxygéné résonnant à 76,84 ppm (C4), deux carbones éthyléniques situés à 124,59 (C3) et 138,20 (C2) ppm et un carbonyle acide situé à 178,30 ppm (C1).

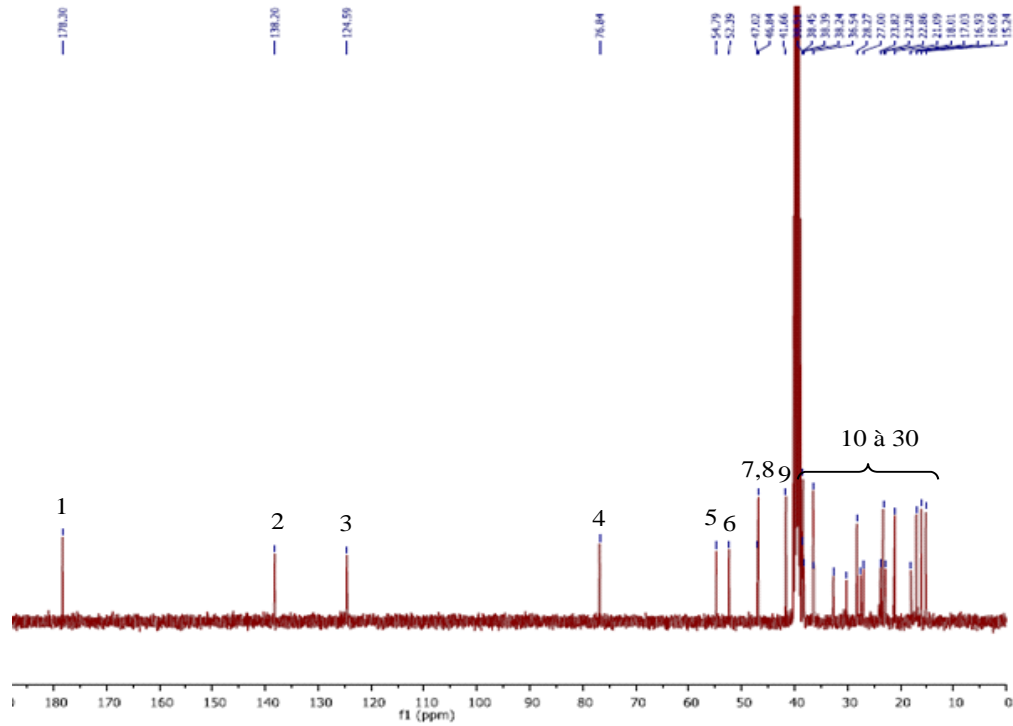


Figure 46: Spectre RMN 13C du composé SBMg12FAC

Le spectre de DEPT 135 nous a permis de déterminer la nature des carbones. Il présente sept CH₃, neuf CH₂ et sept CH. En déduire les neuf carbones manquants sont des carbones quaternaires.

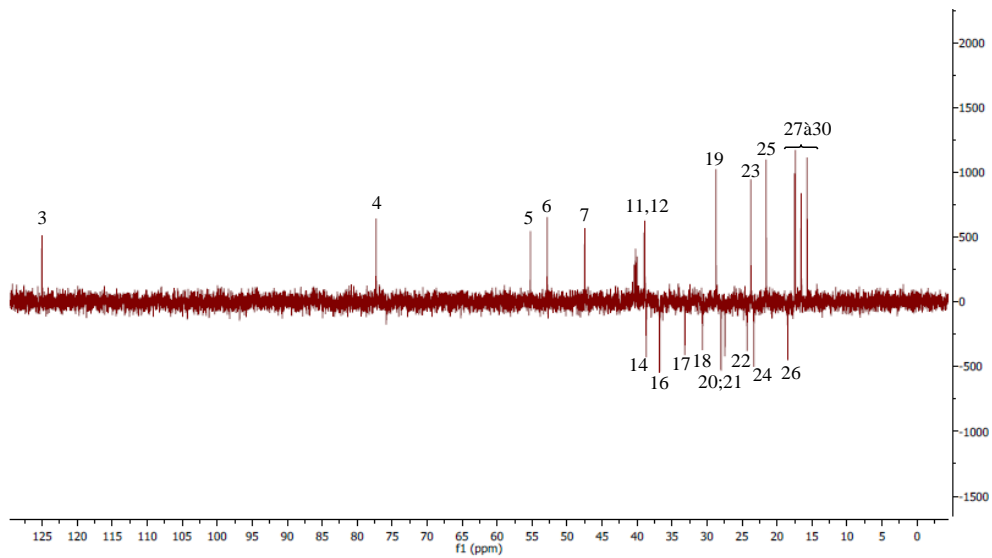


Figure 47: Spectre DEPT du composé SBMg12FAC

L'analyse du spectre HSQC nous a permis d'attribuer les protons et leurs carbones correspondants.

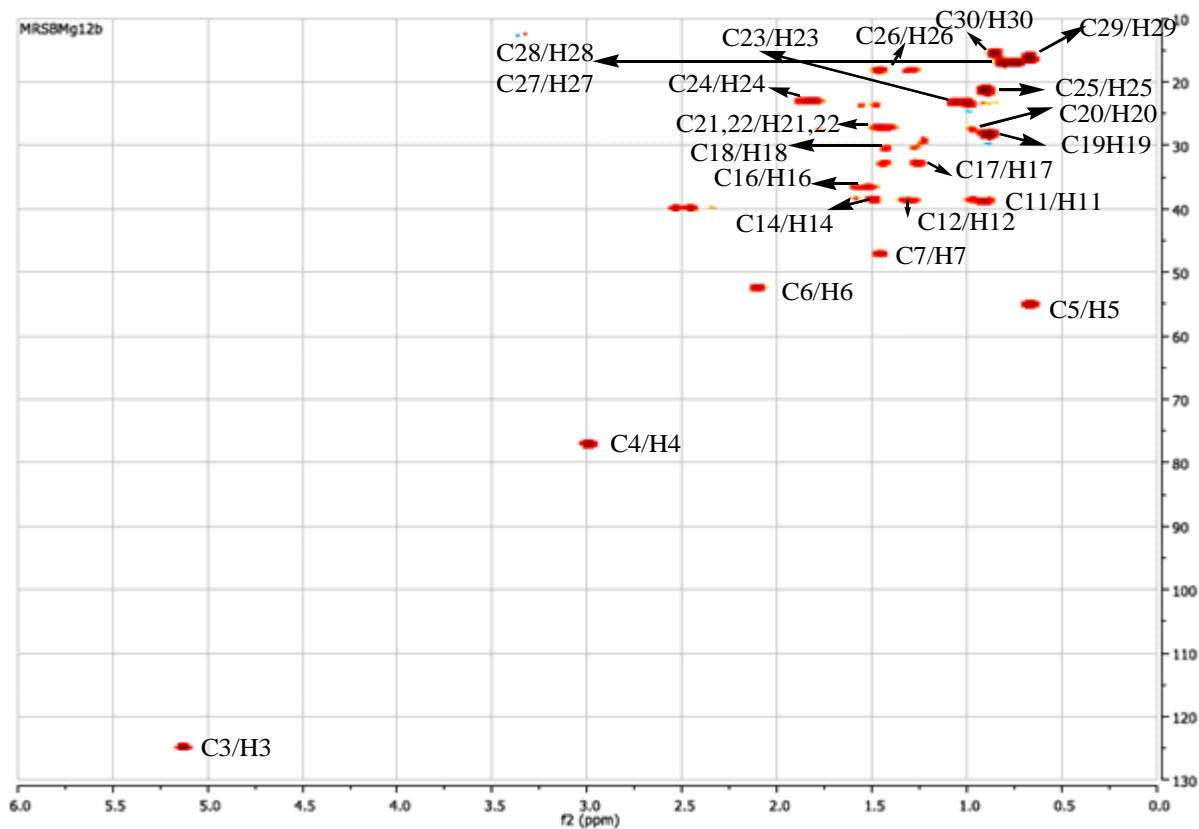


Figure 48: Spectre HSQC du composé SBMg12FAC

Le spectre de RMN ^1H du composé **SBMg12FAC** présente sept signaux de méthyles dont 5 formant des singulets (H23, H19, H30, H27, H29) et deux formant des doublets (H25, H28) confirmant la présence des sept méthyles d'un squelette tri terpénique. Nous observons également la présence du signal d'un groupement hydroxyle (OH) à δ_{H} 4,30 ppm et le signal d'un proton oléfinique à δ_{H} 5,32 ppm (H3) que nous pouvons situer en position 3 grâce au spectre de carbone. Le signal à 11,95 ppm (H1) montre la présence d'un proton acide.

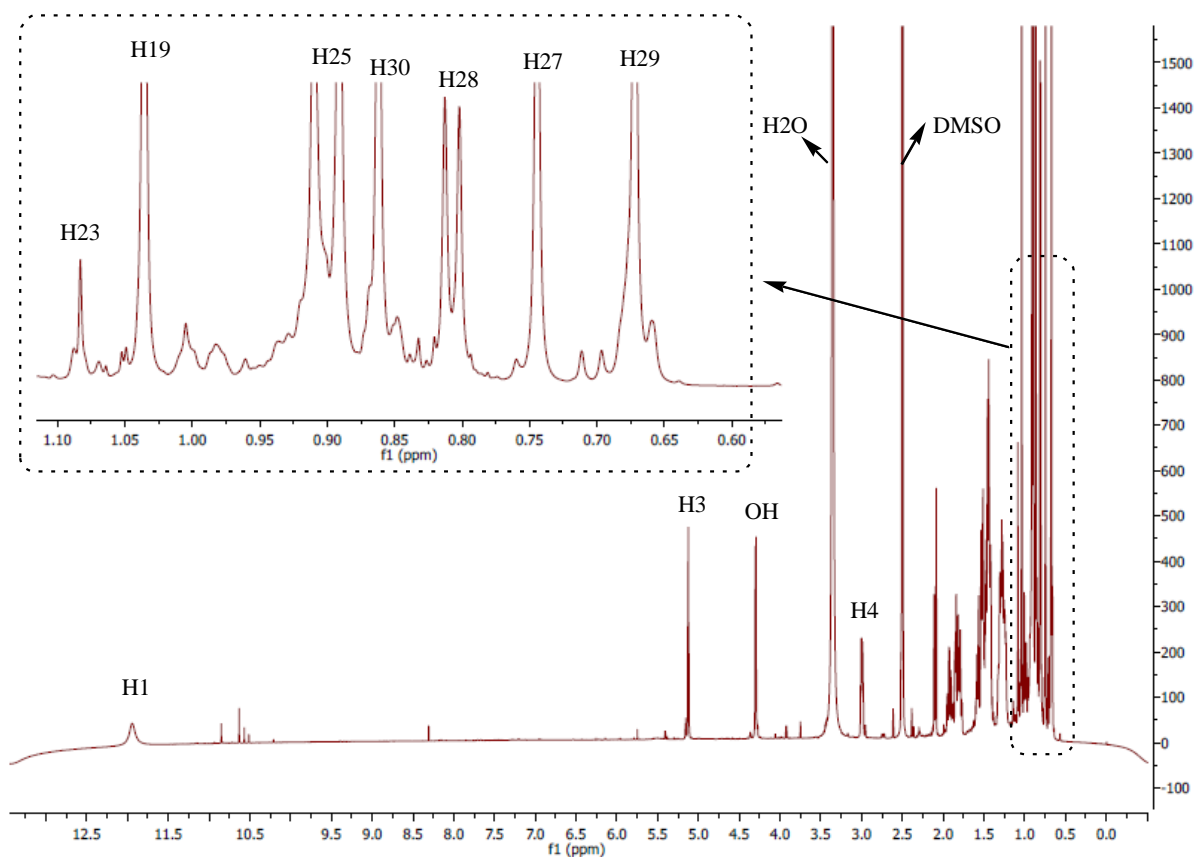


Figure 49: Spectre RMN 1H du composé SBMg12FAC

En examinant les spectres de RMN 1D nous pouvons distinguer un tri terpène ayant une structure pentacyclique de type oléanane ou ursane caractérisée par la double liaison et les sept méthyles mais le fait d'avoir deux méthyles sous forme de doublet nous suggère l'ursane comme squelette de base [154].

Le spectre de COSY montre que:

Le proton H7 situé à δ_H 1,45 ppm montre un couplage avec les protons à 1,84 ppm attribuables aux protons H24, eux-mêmes couplent avec le proton situé à 5,32 ppm identifié comme H3, ce qui permet de localiser la double liaison en C3.

Le proton H4 situé à δ_H 3,03 ppm couple avec les protons à 1,45 ppm identifiés comme H21 qui couple avec les protons du carbone C14.

Leurs déplacements chimiques listés dans le tableau 15 seront utiles pour continuer l'attribution des corrélations en HMBC. Dans ce dernier nous citons les corrélations les plus importantes (Figure 50).

Au niveau de proton H3 deux corrélations sont observées: une avec le carbone identifié C9 (δ_C 41,66) et l'autre avec le carbone C6 (δ_C 52,39 ppm).

Première Partie: Etude phytochimique des plantes sélectionnées

Le carbone C9 corrèle également avec les protons de deux méthyles H27 et H23 situés respectivement à 0,74 et 1,08 ppm et d'un proton H6 à 2,10 ppm.

Le proton H6 présente six corrélations dont cinq avec des carbones identifiés C2 (δ_c 139,6) 2 liaisons, C9 (δ_c 41,66) 3 liaisons et C11 (δ_c 38,51) 2 liaisons, C8 (δ_c 46,84) 2 liaisons, C1 (δ_c 178,30) 3 liaisons et un autre carbone éthylénique avec deux quaternaires situés à δ_c 124,59 ppm (C3) 3 liaisons.

Les protons du méthyle CH₃-29 corrèlent avec les carbones C4 (δ_c 78,84), C13 (δ_c 38,39), C5 (δ_c 54,79) et C19 (δ_c 28,27).

De même pour ceux du méthyle CH₃-25, ils corrèlent avec les carbones C15 (δ_c 36,54), et C13 et ceux du méthyle CH₃-23 corrèlent avec le carbone C2.

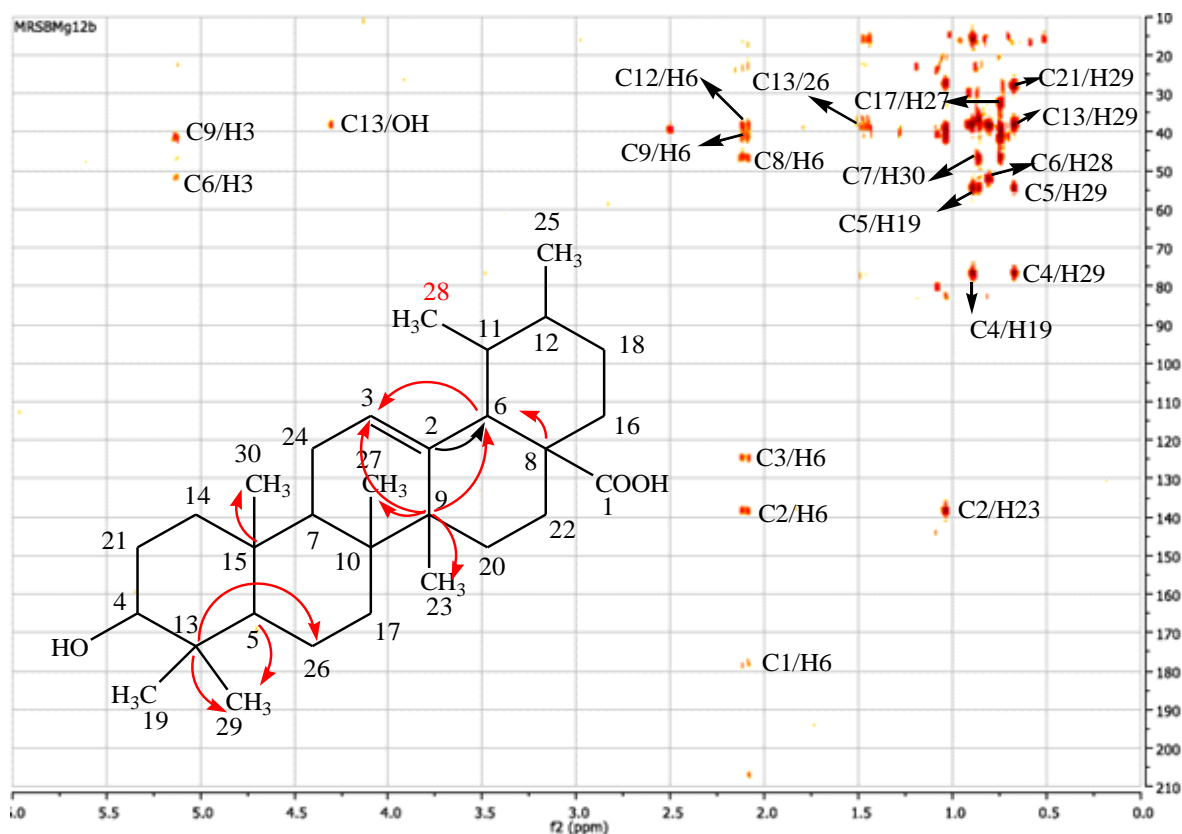


Figure 50: Spectre et corrélations HMBC du composé SBMg12FAC

Les informations fournies par le spectre ROESY permettent d'orienter l'hydroxyle en position 4 et les méthyles en position 13, 15, 10, 12.

Les corrélations observées entre les protons H4 et H29, entre les protons H29 et H30, H30 et H27 confirment l'orientation dans l'espace de ces protons.

Le spectre HMBC combiné avec celui de ROESY nous permet de lier les cycles par les corrélations suivantes: C13/H26, C9/H6, C9/H3 et la position C30 et C27 dans le même espace (ROESY).

L'ensemble de nos données spectrales de RMN et de masse comparées avec celles trouvées dans la littérature [154] nous ont permis d'identifier le composé **SBMg12FAC** (Figure 51) comme étant l'acide ursolique (3 β -hydroxyurs-12-ène-28-oïque) isolé précédemment dans les fruits de *Morinda citrifolia* [155]. Les déplacements chimiques sont présentés dans le tableau **11**. Nous présentons deux numérotations, la première avec les corrélations en HMBC est la procédure utilisée durant la caractérisation basée sur la numérotation du spectre ^{13}C et la deuxième est la numérotation conventionnelle (IUPAC).

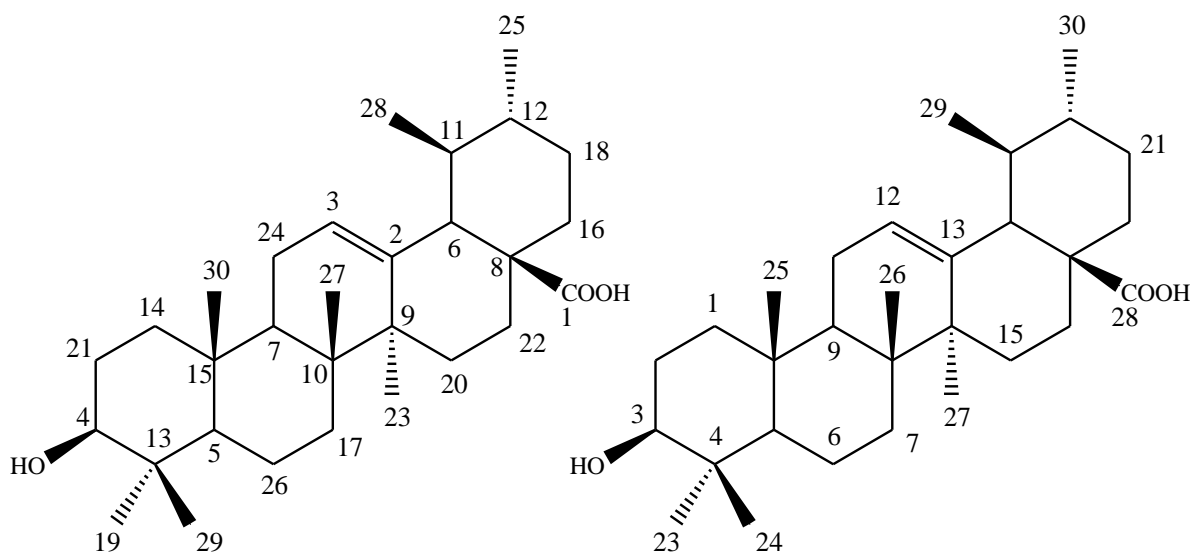


Figure 51: Structure du composé SBMg12FAC

Tableau 11: Déplacements chimiques du composé SBMg12FAC

position	Composé isolé (DMSO, 600 MHz)		Littérature (CDCl ₃ , 400 MHz)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	1,51	38,2	1,72	38,6
2	1,45	27,0	1,60	28,2
3	3,03	76,8	3,22	78,7
4	-	38,3	-	38,5
5	0,70	54,7	1,34	55,2
6	1,45	18,0	1,60	18,3
7	1,41	32,7	1,72	32,9
8	-	39,5	-	39,5
9	1,45	47,0	1,60	47,3
10	-	36,5	-	37,0
11	1,84	22,8	1,91	23,7
12	5,32	124,5	5,27	125,9

13	-	138,2	-	137,9
14	-	41,6	-	42,0
15	1,45	27,5	1,60	28,1
16	0,91	23,8	1,34	25,0
17	-	46,8	-	48,1
18	2,10	52,3	2,20	53,8
19	0,94	38,5	1,00	38,5
20	1,33	38,4	0,95	38,5
21	1,28	30,1	1,27	30,3
22	1,59	36,3	1,72	37,4
23	1,04	28,2	1,00	28,9
24	0,67	16,9	0,79	15,6
25	0,86	15,2	0,94	15,4
26	0,74	17,0	0,82	17,1
27	1,08	23,2	1,10	23,5
28	-	178,3	-	179,6
29	0,80	16,9	0,87	17,0
30	0,90	21,0	0,97	21,4

L'acide ursolique a un excellent potentiel inhibiteur en tant qu'adjuvant dans le traitement et la prévention du cancer [156]. Certains effets anti-vieillessement de l'acide ursolique avec l'évolution des principaux biomarqueurs anti-age (SIRT1, SIRT6, PGC-1 α/β et klotho) dans le cerveau, le muscle squelettique, le foie et les reins ont été identifiés par Nuredin Bakhtiari en 2017 [157]. L'acide ursolique présente également des caractéristiques antimicrobiennes contre de nombreuses souches de bactéries, le VIH, le virus VHC et protozoaires plasmodium causant le paludisme [158].

I.4.5. Caractérisation structurale du composé R7 isolé de l'extrait méthanol de l'écorce

L'extrait méthanol a conduit à l'isolement d'un seul composé R7 de couleur blanchâtre sous forme de poudre.

Le composé R7 a été isolé par une colonne chromatographie sur gel de silice avec un éluant d'acétate d'éthyle/méthanol de rapport 8/2. Cette fraction a été solubilisée avec du méthanol et laissée évaporer à la température ambiante.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse (électrospray) en mode négatif (ESI⁻) nous observons un ion quasimoléculaire à m/z 341 [M-H]⁻ suggérant une masse atomique de 342 uma correspondant à la formule brute C₁₂H₂₂O₁₁.

Spectrométrie IR

Sur le spectre IR (Figure 72) nous notons la présence d'un groupement hydroxyle à 3323 cm^{-1} par une bande large. Et vers 1000 cm^{-1} on observe une bande double intense correspondant à la vibration de $\nu_{\text{C-C-O}}$. A 909 cm^{-1} nous avons un pic correspondant à $\nu_{\text{C-O-C}}$ dans un cycle.

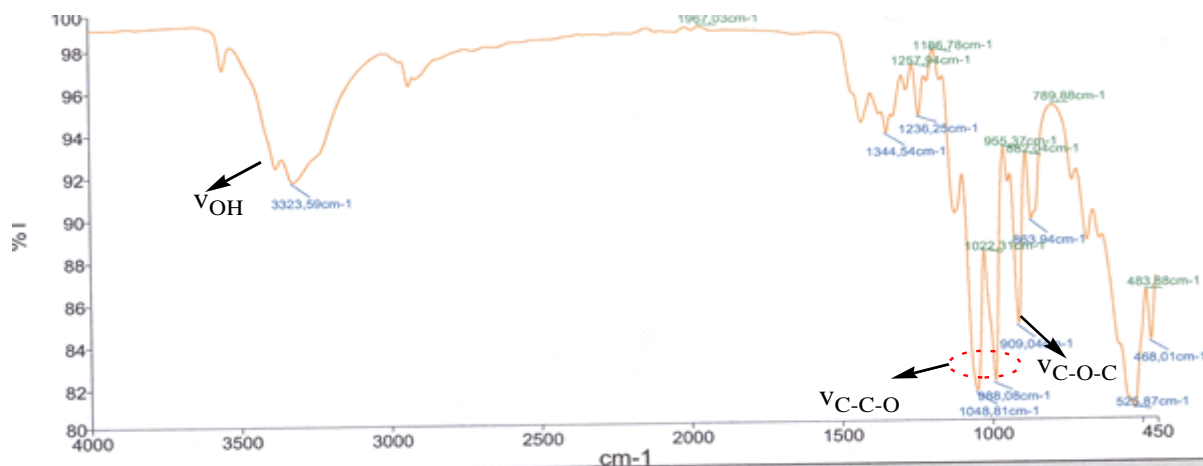


Figure 52: Spectre infrarouge du composé F7

Spectrométrie RMN

Le spectre du carbone ^{13}C montre 12 pics de carbones dont onze (11) pics observés entre 60 et 92 ppm dans la zone aliphatique et un (1) à 104,13 ppm dans la zone aromatique. Cet intervalle de déplacement chimique nous montre que ces carbones sont liés à des atomes d'oxygènes qui sont le comportement spectral en RMN du carbone d'un carbohydate.

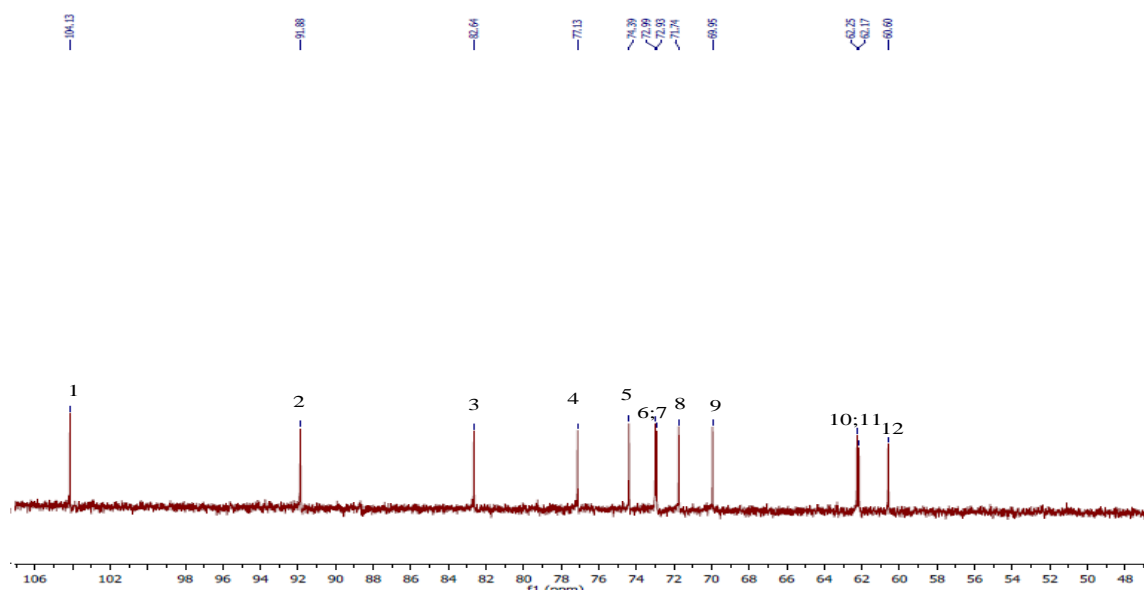


Figure 53: Spectre ^{13}C du composé R7

Sur le spectre de DEPT permettant de connaître la nature des carbones nous identifions huit CH (carbones C2 à C9) et trois -OCH₂ (C10, C11, C12).

Le carbone C1 énuméré dans le spectre de carbone n'est pas observé dans le DEPT. Donc c'est un carbone quaternaire.

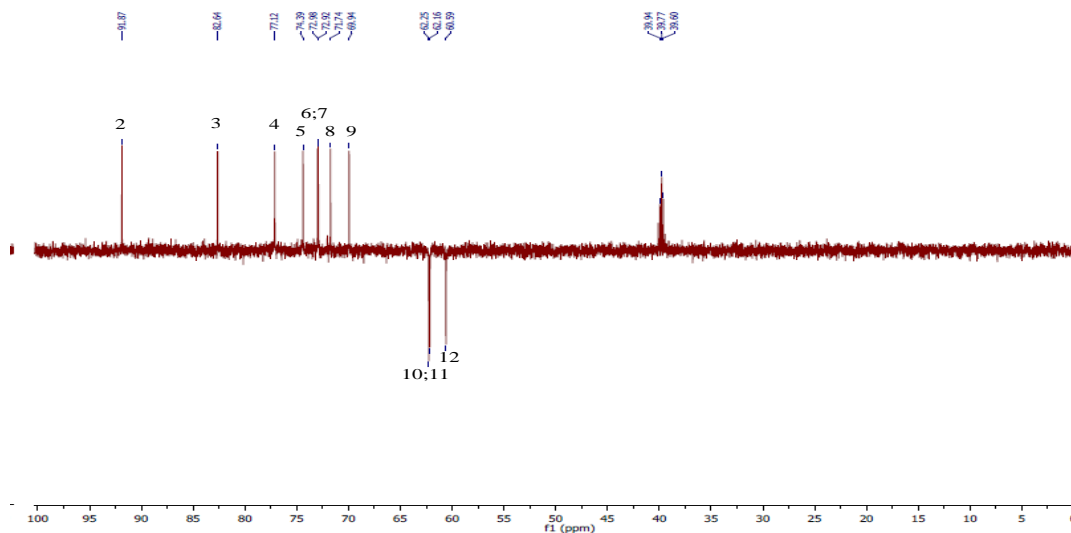


Figure 54: Spectre DEPT du composé R7

Le spectre HSQC nous a permis d'attribuer les protons à partir des carbones correspondant identifiés grâce à l'analyse du spectre de carbone.

On note aussi sur ce spectre que certains protons comme H6, H7, H10 et H12 sont confondus avec le signal du solvant utilisé (DMSO) (Figure 56).

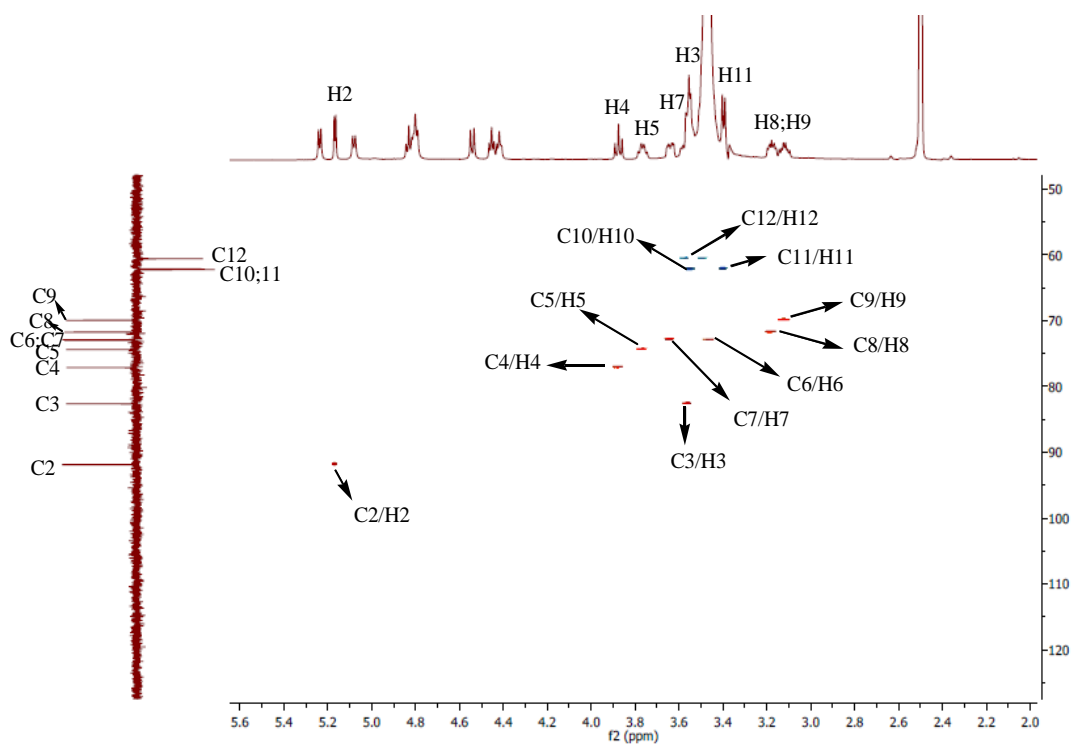


Figure 55: Spectre HSQC du composé du composé R7

L'analyse du spectre de RMN ^1H montre deux lots de protons:

Entre 4,3 ppm et 5,3 ppm correspondant aux OH d'un sucre (région des protons anomères) et entre 3 ppm et 4 ppm les protons méthyliques....

A 5,17 ppm, nous observons un proton anomérique H2 relié d'après le spectre HSQC au carbone C2. Le carbone à 91,88 ppm (C2) représente donc le carbone hémiacétalique.

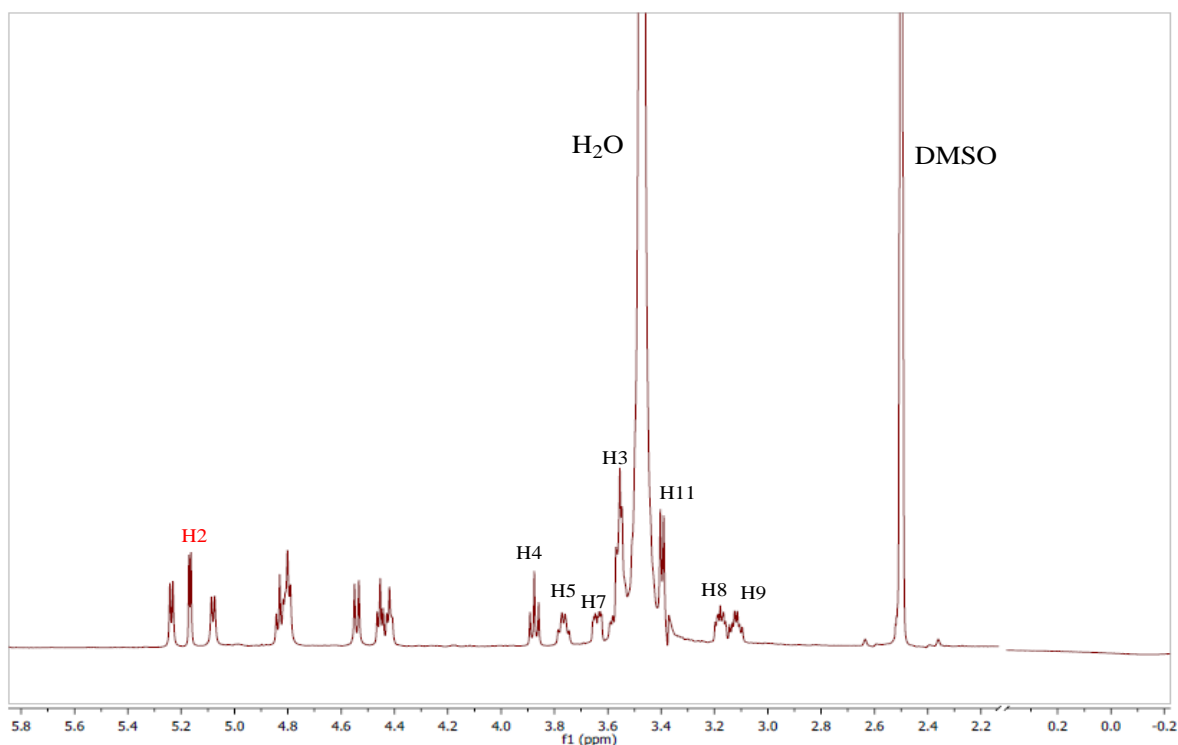


Figure 56: Spectre RMN ^1H du composé R7

Sur le spectre de COSY (Figure 58), on repère deux groupes de protons. Le premier groupe concerne le couplage H2/H8, H8/H6, H6/H9, H9/H7. On devrait observer le couplage H7/H12 mais difficile à voir, car le H12 et le DMSO sortent au même endroit. L'existence de ce couplage peut être justifiée par la corrélation C7/H12 observée sur le spectre HMBC (Figure 60). Cette succession de couplages montre que ces protons appartiennent au même cycle (**A**) suggérant la présence d'un sucre hexose (Figure 59 (**A**)). Le deuxième groupe occupe la succession de couplage H4/H5, H5/H3, H3/H10 où H10 est aussi confondu au DMSO mais confirmé par la corrélation C3/H10 en HMBC. Cela nous suggère un autre sucre tel que le furanose (Figure 59 (**B**)).

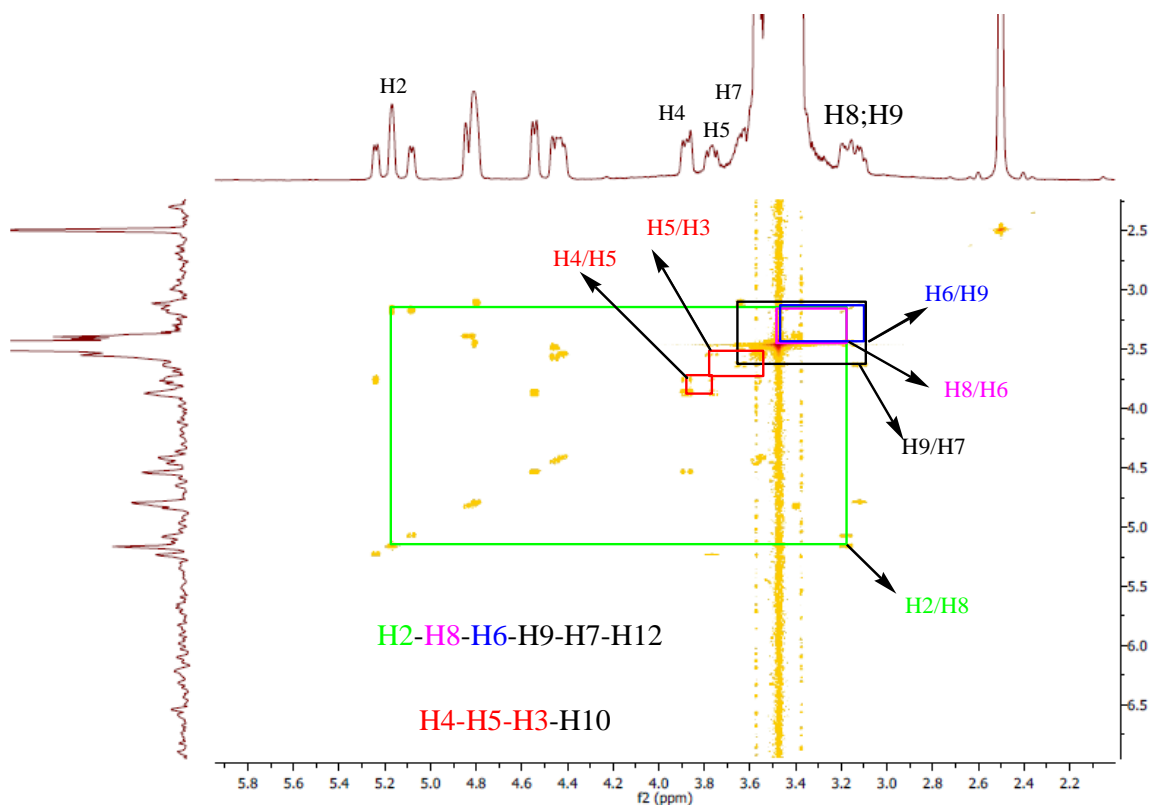


Figure 57: Spectre de COSY du composé R7

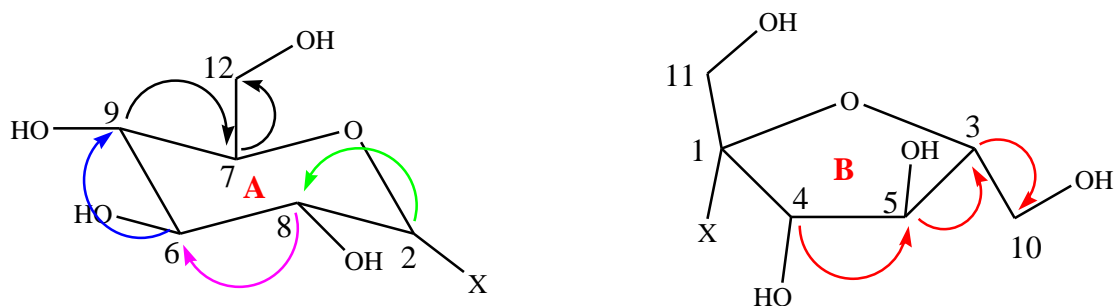


Figure 58: Corrélations COSY du composé R7

Sur le spectre HMBC nous observons les corrélations suivantes:

C7/H12 (2 liaisons), C7/H9

C8 avec un proton hydroxyle (OH)

C9 avec un proton hydroxyle (OH)

C6/H2, C6/H9 et C6 avec un proton hydroxyle (OH)

C12 avec un proton hydroxyle (OH)

Ces informations combinées avec ceux de COSY confirment la présence d'un sucre hexose (Figure 59 (A))

De plus, d'autres corrélations ont été observées:

C1/H11 (2 liaisons)

C4/H11 (3 liaisons), C4/H5 et C4 avec un proton hydroxyle

C5/H4, C5/H3, C5 avec un proton hydroxyle

C3/H10 (2 liaisons)

C10/H5, C10 avec un proton hydroxyle

Ces corrélations confirment le furanose suggéré précédemment dans l'interprétation du spectre de COSY. On note aussi une forte corrélation entre C1/H2 en HMBC, ce qui montre que le sucre hexose et le furanose sont liés.

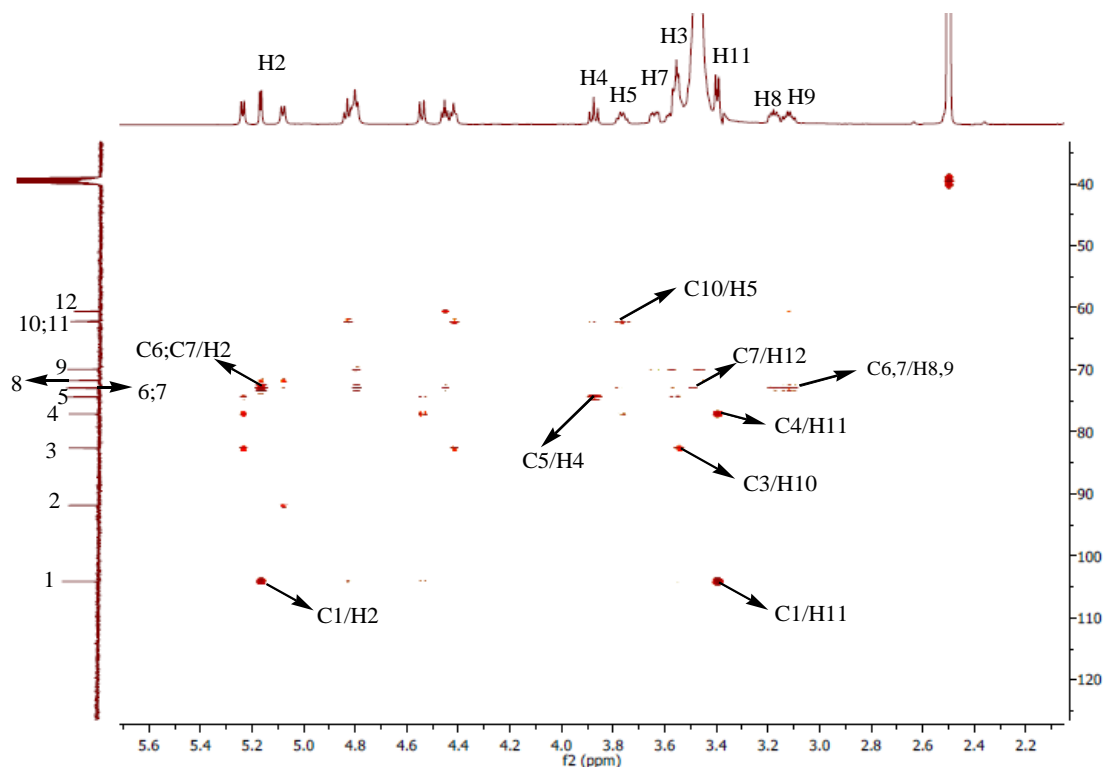


Figure 59: Spectre HMBC du composé R7

Suivant notre analyse spectrale nous pouvons déduire que le composé **R7** ne peut être que le saccharose. Nous présentons ci-dessous la structure du composé avec la numérotation utilisée durant la caractérisation basée sur la numérotation du spectre ^{13}C , et certaines corrélations en HMBC.

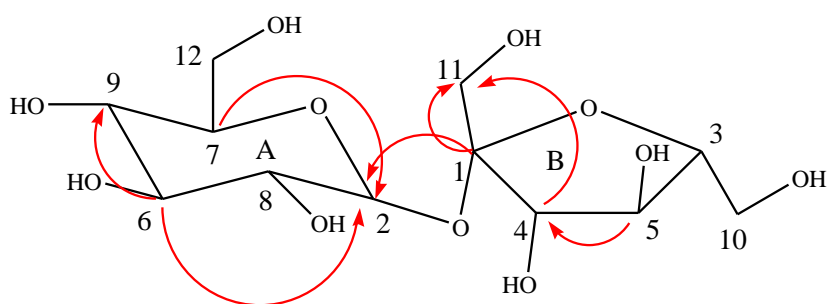


Figure 60: Structure du composé R7

Il a été signalé que lors de la consommation de saccharose, le taux de sucre dans le sang (glycémie) augmente considérablement. Il peut alors être utilisé pour se resucrer lors d'un malaise hypoglycémique. Le saccharose apporte de l'énergie à l'organisme à hauteur de 4kcal par gramme. Il est agent de saveur, de coloration, de fermentatif, de texture. Il permet d'élaborer des sirops [159, 160].

II. Etude phytochimique de la graine *Icacina oliviformis*

II.1. Résultats d'enquête ethnopharmacologie

Selon les habitants de la localité de Mlomp, cette plante est utilisée pour deux usages:

- ✓ Usage alimentaire: les fruits murs sont consommés généralement par les enfants. Les graines et les tubercules sont utilisés sous forme de farine pour produire du couscous
- ✓ Usage médicinale: il est utilisé par les guérisseurs traditionnels pour le traitement: du paludisme, le diabète, les dermatoses, la toux, les fièvres, l'hémorroïde,... (Figure 62).

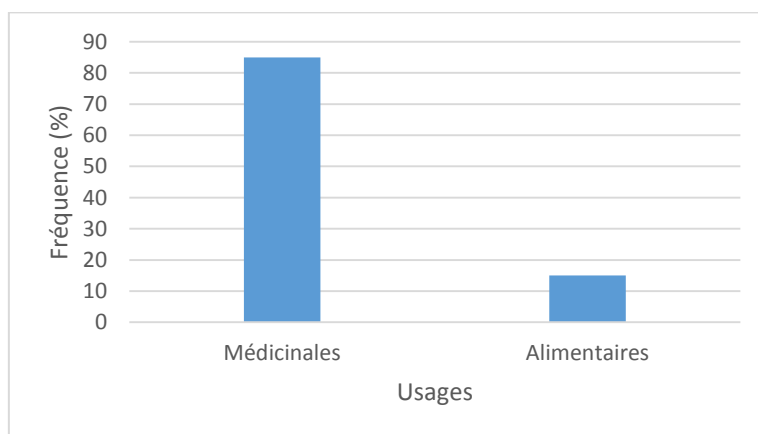


Figure 61: Usages de *Icacina oliviformis*

Nous notons dans ce diagramme que l'usage médicinal est dominant par rapport à l'usage alimentaire.

Maladies traitées

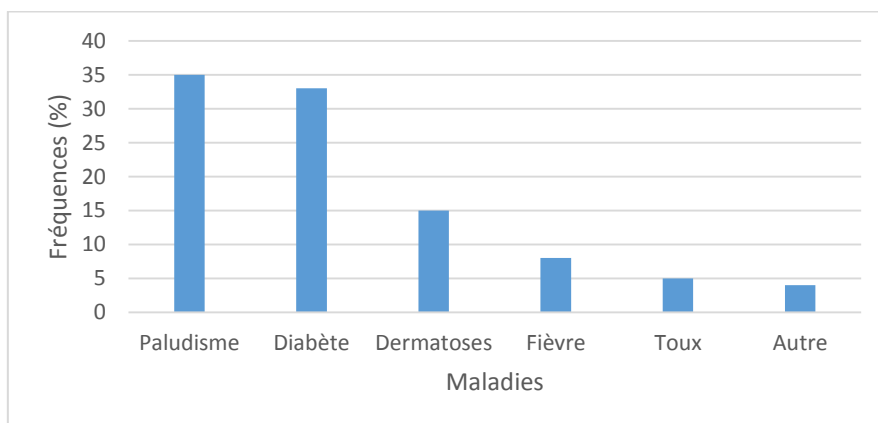


Figure 62: Les maladies traitées par *Icacina oliviformis*

La figure 63 révèle que le paludisme et le diabète sont les maladies les plus traitées par l'*Icacina oliviformis*.

Parties utilisées

Le tubercule, les feuilles, et la tige sont les parties les plus utilisées.

Mode de préparation et d'utilisation

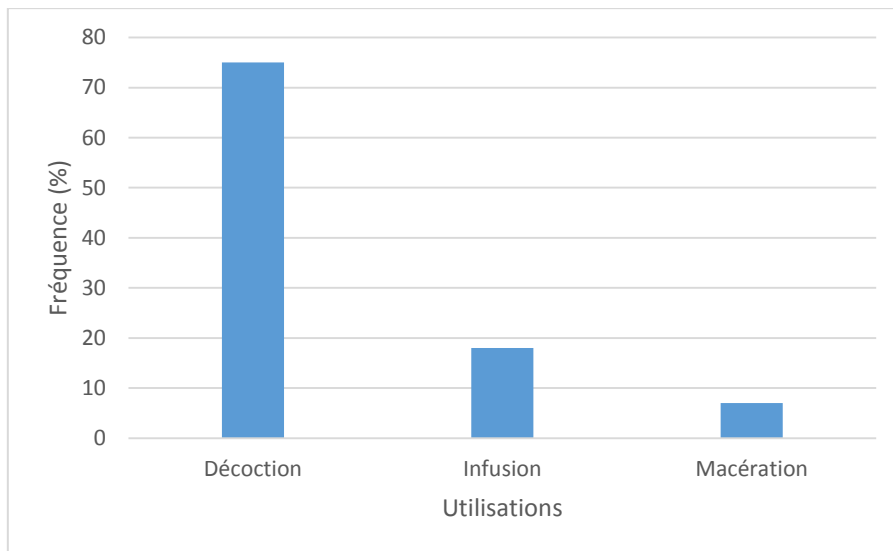


Figure 63: les modes d'utilisation de *Icacina oliviformis*

La décoction est le mode le plus utilisé dans la préparation des produits (Figure 64). Ces produits sont pour la plupart administrés par voie orale à 70 % et l'usage externe est relativement peu utilisé.

II.2. Résultats extraction

Tableau 12: Rendement des extraits de la graine de *Icacina oliviformis*

Organe	Extraits	Poids fractions (g)	Rendement (%)
Graine	Ether de pétrole	3,85	1,28
	Dichlorométhane	1,50	0,5
	Ethanol	8,63	2,81
	Eau	25,47	8,49

Nous notons ici que le rendement de l'extrait dichlorométhane est inférieur au rendement de l'extrait éther. En dehors de l'extrait dichlorométhane le rendement augmente en fonction de la polarité.

II.3. Résultats Screening des extraits

Le screening phytochimique des métabolites secondaires présents dans les extraits de la graine de *Icacina oliviformis* a été réalisé à partir des méthodes citées précédemment. Le tableau 13 présente le résultat obtenu.

Tableau 13: Résultats du screening phytochimique de la graine

Organe	Solvants	Anthraquinones	Flavonoïdes	Alcaloïdes	Tannins	Polyphénols	Stéroïls et Terpènes	Saponines
Graine	Ether	-	-	-	-	-	+	-
	CH ₂ Cl ₂	-	-	-	+	+	+	-
	EtOH	-	-	-	+	+	-	+
	H ₂ O	-	-	-	+	+	-	+

Légende - = Absent, + = positif

Ces résultats montrent l'absence de métabolites secondaires tels que les anthraquinones, les flavonoïdes, les alcaloïdes. Par contre on note une forte présence de tannins et saponines dans les extraits polaires et de stéroïls et terpènes dans les extraits apolaires.

II.4. Caractérisation structurale des composés isolés de la graine

La purification des extraits dichlorométhane et éthanol de la graine nous a permis d'accéder à deux composés: un composé **I3** isolé au niveau de l'extrait dichlorométhane et un composé **P** isolé de l'extrait éthanol.

II.4.1. Détermination de la structure du composé I3

Spectrométrie de masse du composé I3

Le spectre de masse nous a permis de déterminer la composition chimique et la masse molaire moléculaire du composé I3. Ce spectre réalisé en ESI-MS mode positif livre un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 598,8 correspondant à une masse moléculaire de 576 uma. La formule brute correspondant à cette masse est C₃₅H₆₀O₆.

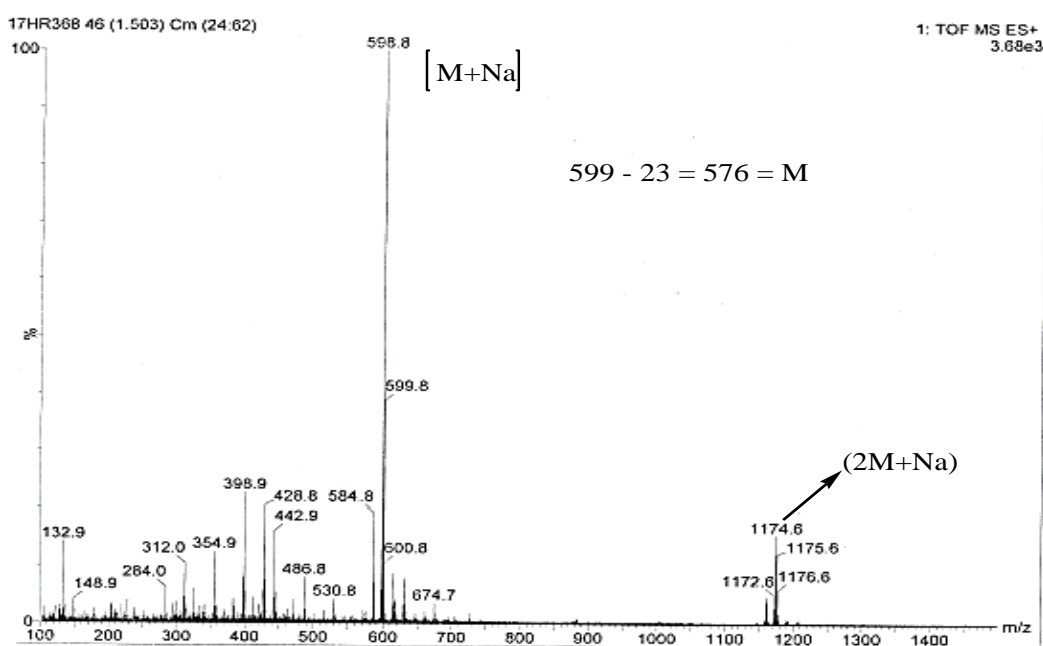


Figure 64: Spectre de Masse du composé I3

Spectrométrie RMN du composé I3

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 66) du composé I3 indique 35 signaux de carbones. La majorité de ces carbones se situe dans la zone aliphatique entre 10 et 80 ppm. Les six pics (C4, C5, C6, C7, C8, C9) qui se trouvent entre 60 et 80 ppm nous inspirent la présence de carbones liés à des atomes d'oxygènes correspondant à un carbohydrate. Pour déterminer la nature de ces carbones nous avons analysé le spectre de DEPT.

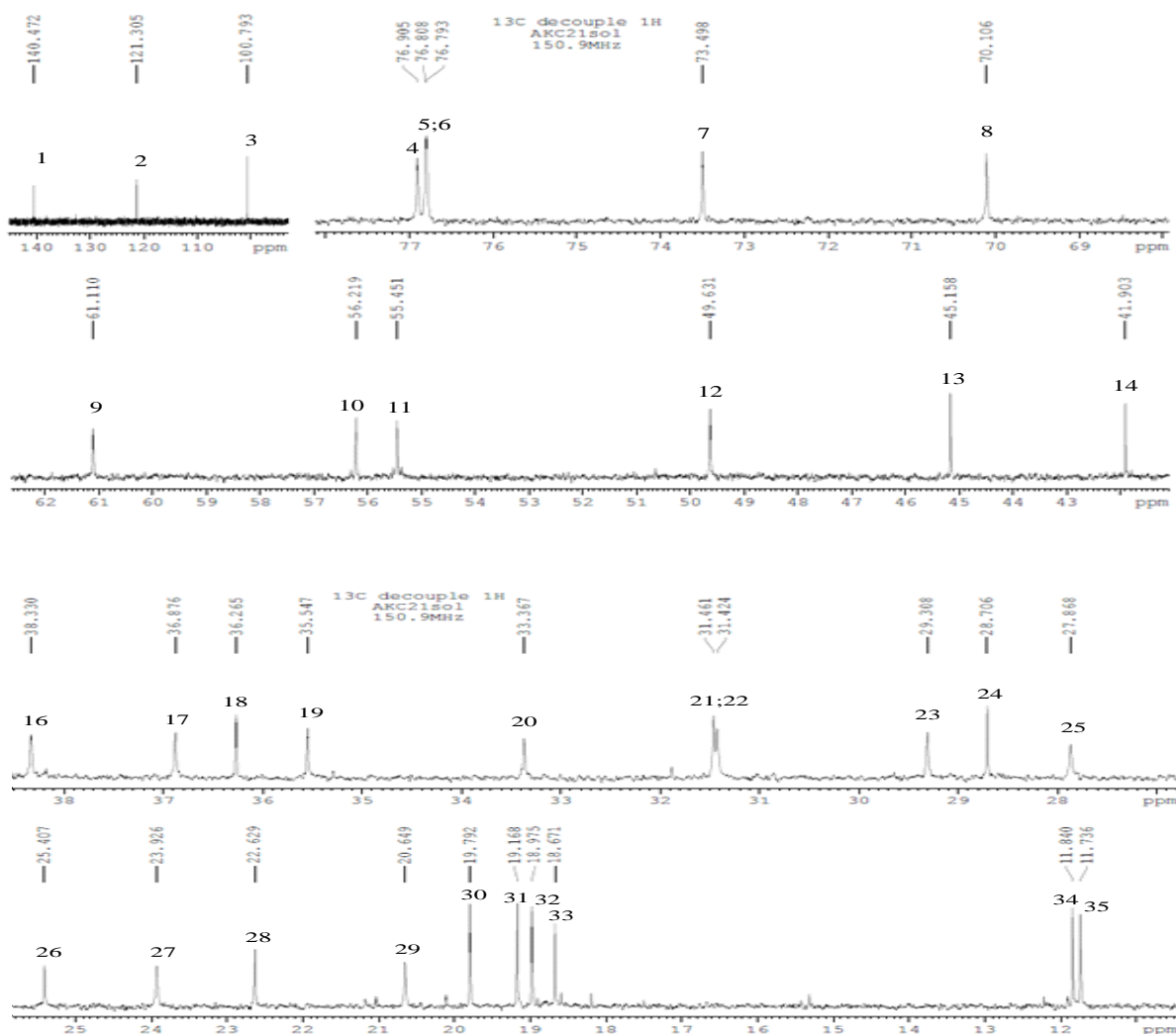


Figure 65: Spectre de carbone ^{13}C du composé I3

Sur le spectre de DEPT (Figure 67) nous observons deux types de carbones: des carbones (CH et CH_3) dirigés vers le haut et des carbones (CH_2) dirigés vers le bas. Parmi eux nous distinguons six CH_3 entre 10 et 20 ppm douze CH_2 et 14 CH . Les trois carbones C1, C14, C18 (respectivement à 140,472 ppm, 121,305 ppm, 100,793 ppm) non observés sont des carbones quaternaires.

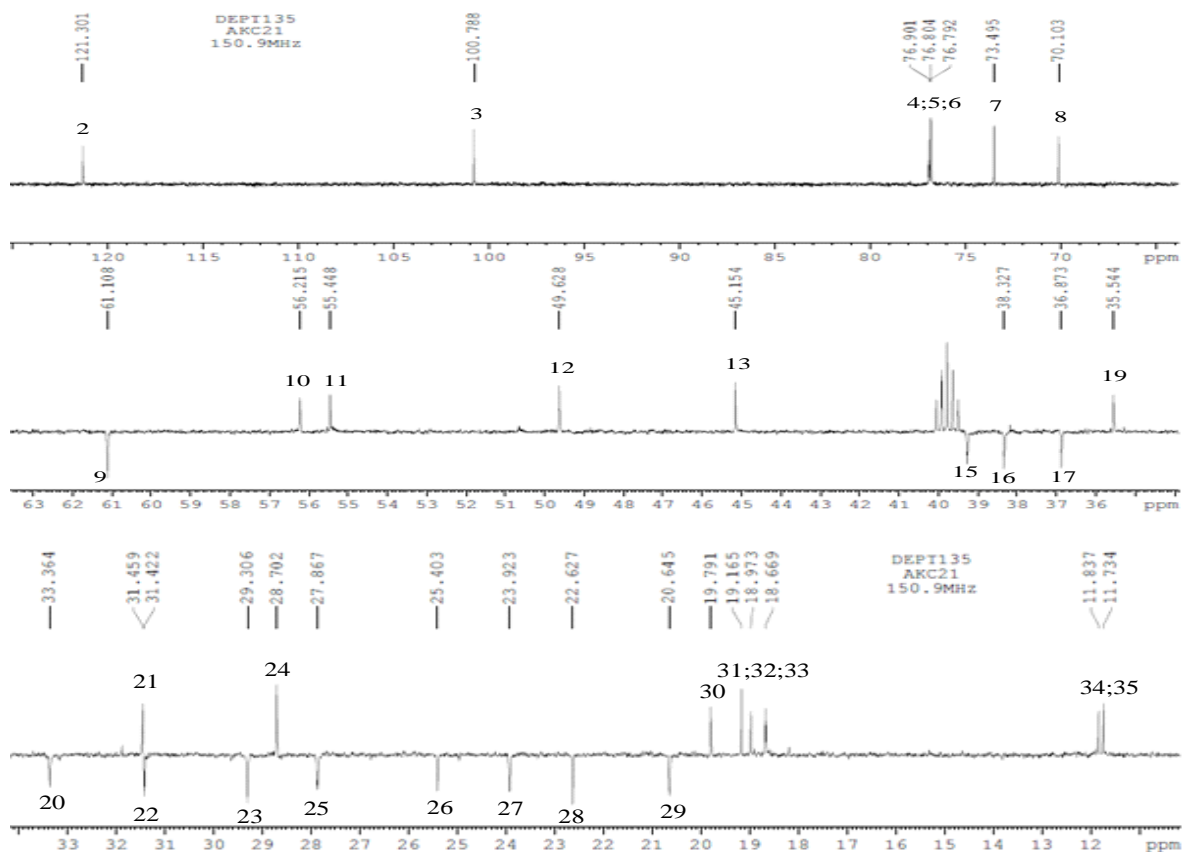


Figure 66: Spectre DEPT du composé 13

Sur le spectre HSQC (Figure 128 annexe page 156) les protons sont attribués par corrélation avec le carbone qui le porte. Entre 4,4 ppm et 5,2 ppm nous observons des signaux de protons non portés par des carbones. Donc ils sont portés par des hétéroatomes (oxygènes, car c'est la zone des sucres). A ce stade nous pouvons dire que le composé possède un fragment de sucre de type hexose (5 CHOH vers 76 ppm et 1 CH₂OH à 61,10 ppm).

Le spectre RMN ¹H du composé a montré des signaux de déplacement chimique dans l'intervalle de 0,63 à 0,97 ppm, suggérant la présence de protons méthyliques.

Un singulet observé à 0,65 ppm a été attribué à des protons méthyliques (H35).

Les signaux observés à 0,77 et 0,85 ppm ont été affectés à des protons méthyliques (H30, H32 et H34). A 0,90 ppm nous avons un doublet accordé à des protons méthyliques (H33).

Le singulet à 0,96 ppm est attribué aux protons méthyliques (H31).

D'après les spectres ¹H et HSQC (Figures (68 et 128)), H3 est le proton anomérique du sucre (doublet déblindé à 4,20 ppm). Les protons hydroxyles de la fraction de sucre ont montré une résonance à 4,43 et à 4,90 ppm.

Le signal à 5,32 ppm correspond à un proton oléfinique (H2).

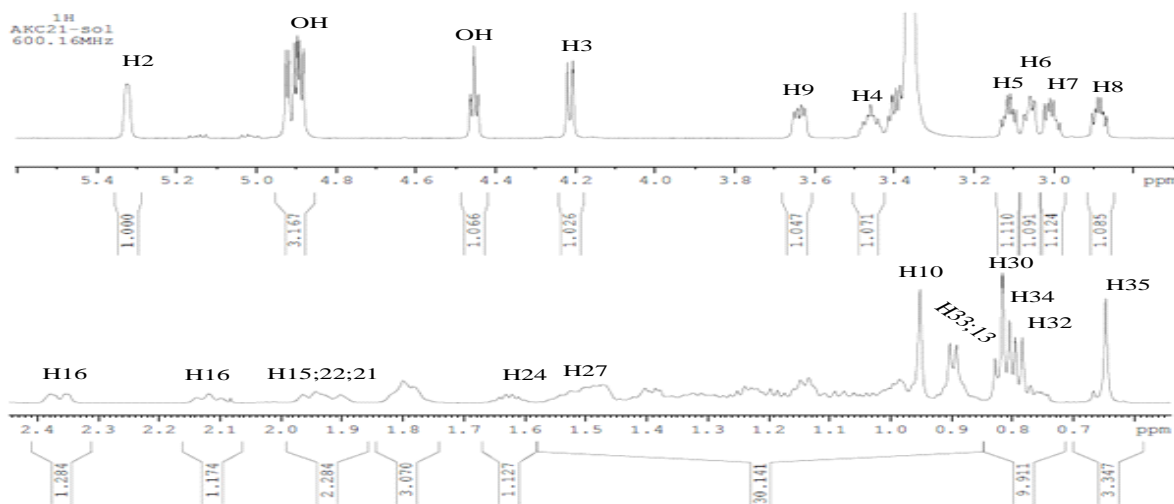


Figure 67: Spectre RMN ^1H du composé 13

Sur le spectre COSY ^1H - ^1H , on repère des groupes de protons: (H3-H7-H5-H8-H6-H9); Les (H15-H4-H23-H16; H2-H21-H22) et (H12-H29-H17; H10-H27-H25-H11-H19-H20-H26-H13-H28-H34). On note aussi les couplages H11/H25; H29/H33; H24/H32; H24/H30. Nous pouvons dire que tous les protons du même groupe appartiennent au même système de spin d'où ce qui nous permet d'avoir l'enchaînement de la structure. Le triplet de méthyl H33 (CH_3) avec le H28 (CH_2), les doublets de H32 (CH_3) et H30 (CH_3) avec H24 (CH) confirme la présence des motifs $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ et isopropyle $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ dans la molécule.

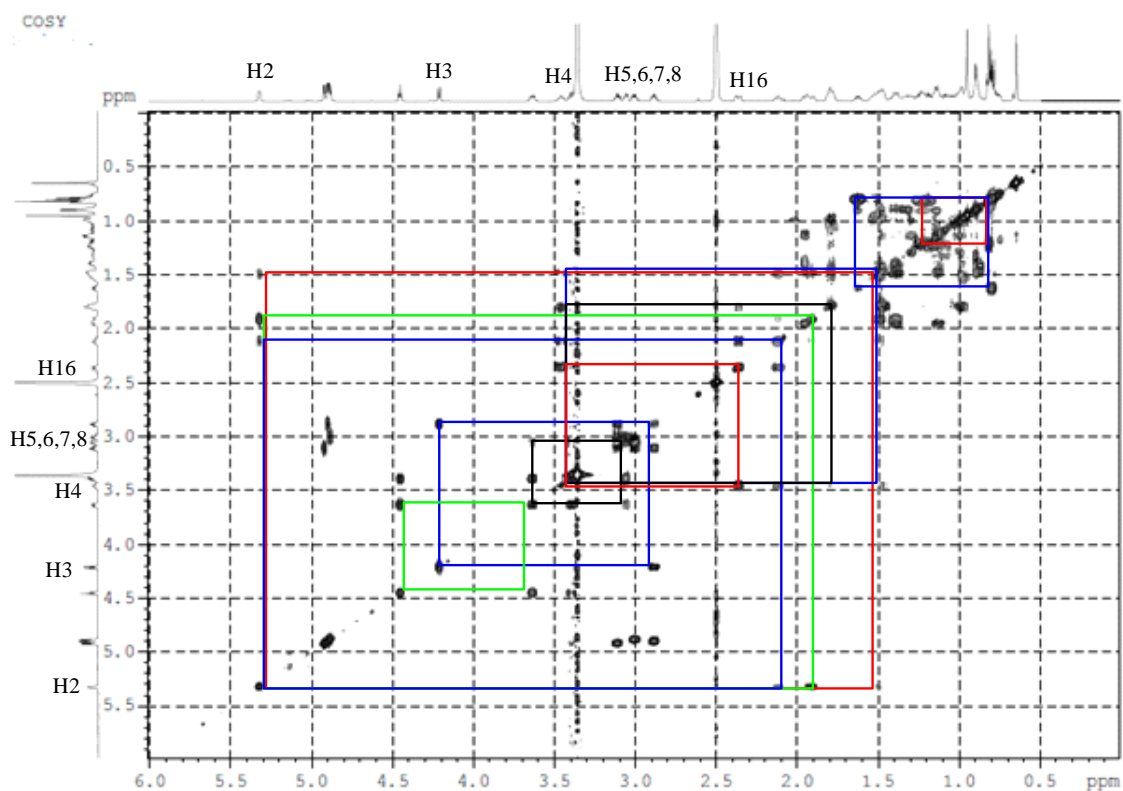


Figure 68: Spectre COSY du composé 13

Sur le spectre HMBC (Figure 70) les carbones quaternaires sont attribués et les corrélations ^{13}C - ^1H sont observés. On se base en particulier sur les corrélations suivantes:

C1 (en particulier le plus déblindé à cause de la liaison oléfinique dans un état d'hybridation sp^2) C1/H16 (3 liaisons), C1/H23 (4 liaisons), C1/H31 (3 liaisons).

C2 (déblindé à cause de la double liaison): C2/H16 (4 liaisons), C2/H15 (3 liaison).

C3 (déblindé à cause de sa substitution par deux oxygènes): C3/H4 (3 liaisons), C3/H5 (3 liaisons), C3/H7 (2 liaisons).

C4 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène): C4/H3 (3 liaisons), C4/H16 (3 liaisons).

C18: C18/H2 (3 liaisons), C18/H16 (2 liaisons), C18/H31 (2 liaisons).

C14: C14/H10 (2 liaisons), C14/H11 (2 liaisons), C14/H17 (2 liaisons), C14/H35 (2 liaisons).

C19: C19/H11 (2 liaisons), C19/H33 (2 liaisons).

C13: C13/H24 (2 liaisons), C13/H26 (2 liaisons), C13/H28 (2 liaisons), C13/H30 (3 liaisons), C13/H32 (3 liaisons), C13/H34 (3 liaisons).

Il faut noter que le spectre HMBC est scindé en deux parties: la première est la figure 70 (C1 à C9) et la deuxième (C10 à C35) est jointe en annexe.

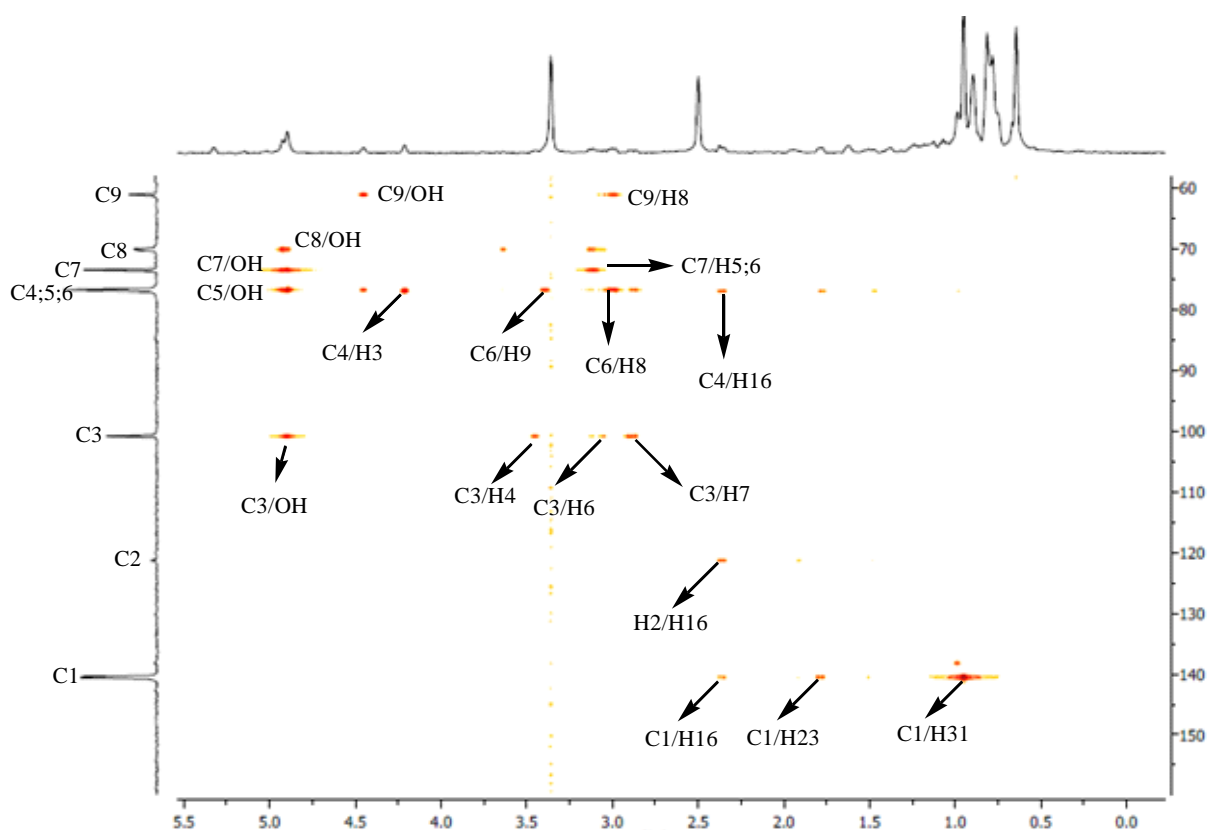


Figure 69: Spectre HMBC du composé I3

Nature du sucre

On se base en particulier sur les corrélations en HSQC suivantes: C5/OH (2 liaisons), C7/OH (2 liaisons), C8/OH (2 liaisons), C9/OH (2 liaisons), C3/OH (3 liaisons), C3/H6 (3 liaisons) et les couplages suivants le COSY: H3/H7, H7/H5, H5/H8, H8/H6, H6/H9.

L'idée de la présence d'un sucre est confirmée par les groupements CH et CH₂ attribués par le spectre DEPT 135 (Figure 67) où les CH₂ apparaissent négatifs, les CH en positif.

Il faut remarquer que la valeur des déplacements chimiques des CH et CH₂ sur le spectre du carbone a permis de confirmer la présence du sucre en particulier le glucose. De plus le carbone anomérique à 100 ppm et la constante de couplage antipériplanaire ($J=6\text{Hz}$) entre les protons H-3 (δ 4,22) et H-7 (δ 3,01), confirme que nous avons un β -glucose car la constante est comprise entre 5 et 12 Hz [161].

Nature du terpène

On utilise préférentiellement le spectre de carbone ¹³C. En dehors des carbones du sucre, le nombre de carbone restant (29 carbones) correspond à un triterpène. La présence du terpène peut être confirmée par la présence des carbones aliphatiques. Le nombre d'insaturation calculé à partir de la formule brute (spectre de masse) est égal à six (6). Si on soustrait l'insaturation du sucre et celle de l'oléfine, on obtient quatre insaturations. Ce qui correspond à un triterpène tétracyclique.

Attribution à la jonction du sucre au terpène

On utilise les corrélations suivantes: C4/H3 et C3/H4. Par comparaison avec les données de la littérature, nous avons identifié le composé I3 comme étant le β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside isolé des feuilles de *Ravenala madagascariensis* [162].

La figure ci-dessous présente deux numérotations, la première avec les corrélations en HMBC est la procédure utilisée pour la caractérisation basée sur la numérotation du spectre ¹³C et la deuxième est la numérotation conventionnelle (IUPAC).

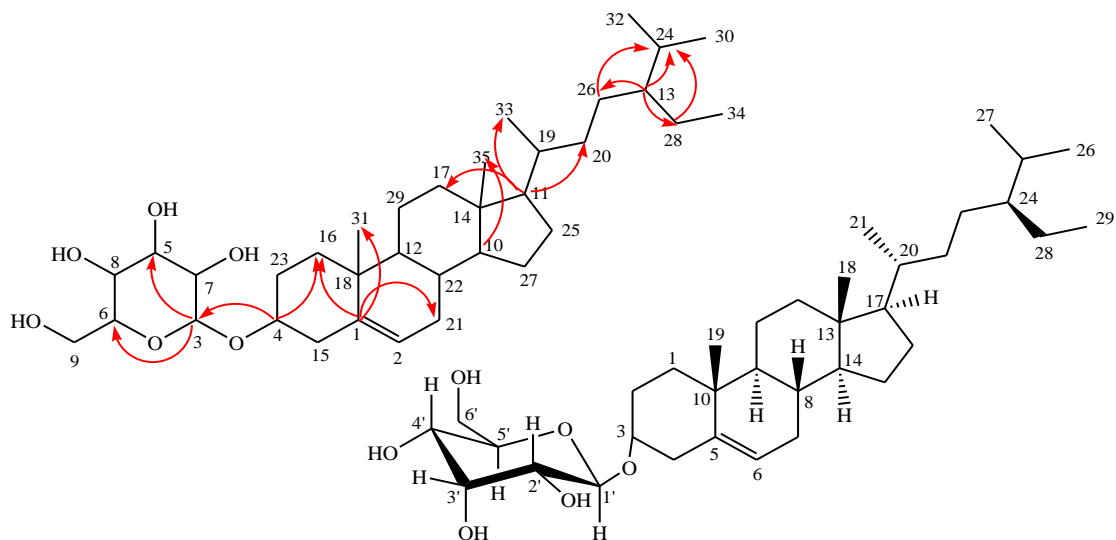


Figure 70: Structure du composé I3

Les déplacements chimiques du composé I3 sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature et sont consignés dans le tableau 14.

Tableau 14: Déplacements chimiques du composé I3

positions	Composé isolé (DMSO, 600 MHz)		Littérature (CDCl ₃ /CD ₃ OD, 500 MHz) [162]	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	2,37; 2,11 (m)	38,33	1,0 (m)	36,79
2	1,81; 1,47 (m)	29,30	1,58 (m)	29,23
3	3,45 (m)	76,90	2,98 (m)	76,85
4	1,96; 1,14 (m)	39,25	2,26 (dt)	39,28
5	-	140,47	-	140,41
6	5,32 (t)	121,30	5,35 (t)	121,20
7	1,38 ; 1,90 (m)	31,46	1,73 (ddd)	31,38
8	1,94 (m)	31,42	1,36 (m)	31,26
9	0,86 (m)	49,63	0,85 (m)	49,55
10	-	36,26	-	36,18
11	1,40 (m)	20,64	1,42 (m)	20,56
12	1,08 ; 0,98 (m)	36,87	1,52 (dd)	38,26
13	-	41,90	-	41,82
14	0,95 (m)	56,21	0,95 (m)	56,13
15	1,03; 1,52 (m)	23,92	1,05 (m)	23,83
16	1,22 (m)	27,86	1,25 (m)	27,76
17	1,09 (m)	55,45	1,20 (m)	55,38
18	0,65 (s)	11,73	0,70 (s)	11,64
19	0,95 (s)	19,16	0,94 (s)	19,07
20	1,32 (m)	35,54	1,40 (m)	35,45
21	0,90 (d)	18,67	0,95 (d)	18,58
22	1,31 (m)	33,36	1,20 (m)	33,29
23	1,15 (m)	25,40	1,25 (m)	25,36
24	0,90 (m)	45,15	0,94 (m)	45,09
25	1,62 (m)	28,70	1,68 (m)	28,64

26	0,81 (d)	19,79	0,87 (d)	19,69
27	0,78 (d)	18,97	0,88 (d)	18,89
28	1,19; 1,23 (m)	22,62	1,30 (m)	22,06
29	0,80 (t)	11,84	0,97 (t)	11,75
1'	4,22 (d)	100,79	4,20 (d)	100,73
2'	2,86 (m)	73,49	2,89 (dt)	73,42
3'	3,11 (m)	76,80	3,27 (dt)	76,86
4'	3,00 (m)	70,10	3,00 (dt)	70,04
5'	3,06 (m)	76,79	3,06 (dt)	76,72
6'	3,36; 3,64 (dd)	61,11	4,55 (dd)	62,82
2'OH	4,90 (d)	-	3,56 (d)	-
3'OH	4,90 (d)	-	3,56 (d)	-
4'OH	4,90 (d)	-	3,40 (d)	-
5'OH	4,45 (t)	-	3,60 (t)	-

De multiples activités biologiques ont été signalées sur ce composé : il stimule la prolifération des lymphocytes dans le sang humain [163], inhibe l'inflammation et l'immunosuppression dont sont victimes les athlètes après les marathons [164], entre dans les traitements de l'arthrite rhumatoïde active [165], de l'hypertrophie bénigne de la prostate [166]. Il est utilisé comme adjuvant dans le traitement de la tuberculose pulmonaire [167].

Identification en RMN des triterpènes

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des stérols et des triterpènes sont cruciaux pour la détermination de leur squelette. En général, la RMN ^{13}C est utilisée pour révéler les changements chimiques des carbones oléfiniques. Cette information est complétée par le nombre de groupes méthyle observé sur le spectre RMN ^1H . Par conséquent, pour le type d'olean-12-ène, le produit chimique les décalages de la double liaison C12 et C13 sont autour de δ 122,0 et 144,0, respectivement, alors que ceux de son isomère urs-12-ène sont autour de δ 125,0 et 139,0, respectivement, pour le même des carbones

Ces changements de carbone oléfinique diffèrent d'une classe de triterpénoïde à un autre selon leur position dans le squelette. La multiplicité des protons de l'oxyméthine à C3 est également indicatif de distinguer un triterpène et un stéroïde qui est un doublet d'un doublet autour de 3,50 ppm et un multiplet dans le dernier.

II.4.2. Détermination de la structure du composé isolé (P)

Spectroscopie de masse

Sur le spectre de masse (Figure 72) obtenu en mode négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 341 $[\text{M}-\text{H}]^-$ suggérant une masse atomique de 342 uma. Cette masse correspond à la formule brute $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$.

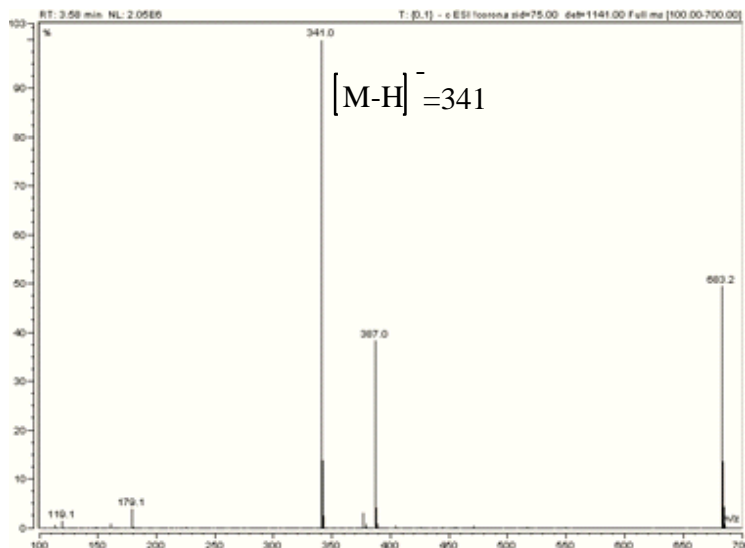


Figure 71: Spectre de masse du composé P

L'analyse combinée des spectres proton et HSQC montre 1 proton anomérique résonnant à 5,05 ppm reliés par le carbone C1 à 91,77 ppm, suggérant la présence d'une unité osidique. Le spectre du carbone ^{13}C J-modulé montre 12 pics de carbones dont un quaternaire à 104,05 ppm confirmé par le spectre de DEPT-135. Ce dernier présente trois CH_2 à 62,15 ppm, 62,06 ppm et 60,50 ppm. Ces informations typiquement similaires à ceux du composé R7 isolé dans l'écorce du *Morinda geminata* nous suggèrent la structure du saccharose (Figure 61).

CHAPITRE III: DETAILS EXPERIMENTAUX LIES A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES ESPECES ETUDIEES

I. Enquête ethnopharmacologie

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales, une enquête ethnopharmacologique a été effectuée auprès des tradipraticiens du village de Mlomp. Mlomp est une commune du département de Bignona et est à 65 Km de Ziguinchor (Figure 73). Cette commune est une localité qui a une longue tradition en phytothérapie. Les forêts assurent les besoins économiques de la population, mais aussi elles offrent une disponibilité élevée en plantes médicinales qui permettent aux habitants de se soigner. Dans cette localité ce sont les Hommes âgés qui ont plus de connaissances en phytothérapie et qui jouent le rôle primordial dans la conservation des traditions thérapeutiques à base de plantes médicinales. Les personnes interrogées sont âgées de 35 à 80 ans. Les enquêtes ont été réalisées à l'aide d'un guide d'entretien comportant des questions sur l'utilisation des plantes, les maladies traitées, les organes utilisés, les modes de préparations et administration (Tableau 23 et 24 annexe).

Pour une bonne réalisation de cette étude, une recherche bibliographique était associée à l'enquête ethnopharmacologique. Sur une trentaine (30) de personnes interrogées, 18 personnes utilisent le *M. geminata* pour le traitement du paludisme, 9 pour l'activité anti-inflammatoire et 3 pour les dermatoses. Pour traiter le paludisme 14 à 15 personnes utilisent les feuilles. Plus de la moitié des personnes qui traitent l'activité anti-inflammatoire utilisent la racine (~ 5 personnes). La majorité de ceux qui traitent les dermatoses utilisent les feuilles.

Environ 17 personnes utilisent les modes de préparation par usage externe.



Figure 72: Carte présentant la zone d'étude

Cette commune est limitée:

- ✓ Au Nord par la communauté rurale de Kartiack
- ✓ A l'Est par les communautés rurales de Diégoune et Mangagoulack
- ✓ A l'Ouest par le marigot de Diouloulou
- ✓ Au Sud par le fleuve Casamance

II. Matériel utilisé

II.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de la poudre de plante: *Morinda geminata* (racine, écorce, feuille). Les racines, écorce et les feuilles du *Morinda geminata* DC ont été récoltées en Avril 2015 à Mlomp (région de Ziguinchor, Sénégal). Ces trois organes de la plante ont été séchés à l'abri des rayons solaires et à la température ambiante (27 °C) du laboratoire LCPM (Laboratoire de Chimie Physique des Matériaux) de l'Université Assane Seck de Ziguinchor (Sénégal). Les drogues séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur (type Bradender OHG Duisburg). La poudre fine (300 g pour la racine et 200 g pour la feuille) ainsi obtenue après pulvérisation a été utilisée comme matière première pour faire les extractions.

II.2. Matériel de laboratoire

Balance électronique de précision;

Ballon, Eprouvette, Bécher, Erlenmeyer;

Papier filtre, Cotton, Entonnoir ;

Evaporateur rotatif, pompe à vide, ballon rodé ;

Etuve, Piluliers, verre de montre;

Spatule, cuve, Eau distillée; hotte, lampe UV

Solvants organiques: cyclohexane, éther de pétrole, acétate d'éthyle, dichlorométhane, éthanol, méthanol, acétone

Colonne, silice normale (0.063–0.200 mm, 70-230 mesh silica gel (Merck)), plaque CCM Kieselgel 60 F₂₅₄, Plaque CCM semi-préparative

Révélateur: solution d'acide sulfurique (50%), réactif de Dragendorf, solution ninhydrine

RMN, Masse, Infrarouge, HPLC.

III. Extraction

L'extraction est un procédé qui consiste à soustraire des substances chimiques d'un organe donné. Il existe plusieurs techniques d'extraction telles que les extractions solide-solide, solide-liquide, liquide-liquide et l'entraînement à la vapeur. Dans cette étude, nous avons procédé à l'extraction solide – liquide qui est l'un des procédés d'extraction les plus utilisés en phytochimie par macération.

III.1. Extraction solide – liquide

C'est le cas de l'extraction à partir d'un organe biologique (végétal ou animal) par un solvant. L'échantillon à extraire est le plus souvent sous forme de poudre (voir influence du degré de division). L'extraction peut se faire à chaud (soxhlet) ou à froid (macération), nous avons préféré le second procédé pour éviter des artefacts.

III.2. Macération

C'est une méthode d'extraction connue depuis la guerre de Troie (**1250 av .JC**). Cette méthode permet d'extraire la molécule d'une plante, même si elle est thermolabile. La macération consiste à homogénéiser le marc (poudre obtenue après séchage et broyage) avec différents solvants à température ambiante.

III.3. Organes de la plante mis en extraction

III.3.1. Racines

Un épuisement successif de la poudre a été réalisé par des solvants de gradient de polarité croissant (cyclohexane, acétate d'éthyle, éthanol, eau). En effet, 300 g de poudre de la racine ont été introduits dans un ballon de 3000 mL contenant 1500 mL de solvant puis le mélange a été laissé en macération pendant 24 heures. Après filtration et évaporation à sec du solvant, l'extrait cyclohexanique obtenu est nommé **FR1**. Le marc issu de cette extraction est mis à macérer dans l'acétate d'éthyle. La fraction d'acétate d'éthyle obtenue est appelée **FR2**. Le résidu obtenu est ensuite macéré dans un solvant polaire; l'éthanol pour conduire à l'extrait éthanoïque **FR3**. Enfin, le résidu est récupéré et mis à macérer dans de l'eau distillée pour donner l'extrait aqueuse **FR4**. Les macérations sont réalisées sous agitation à température ambiante. Chaque macération est répétée 2 fois pour extraire le maximum de substances. Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la Figure **74**.

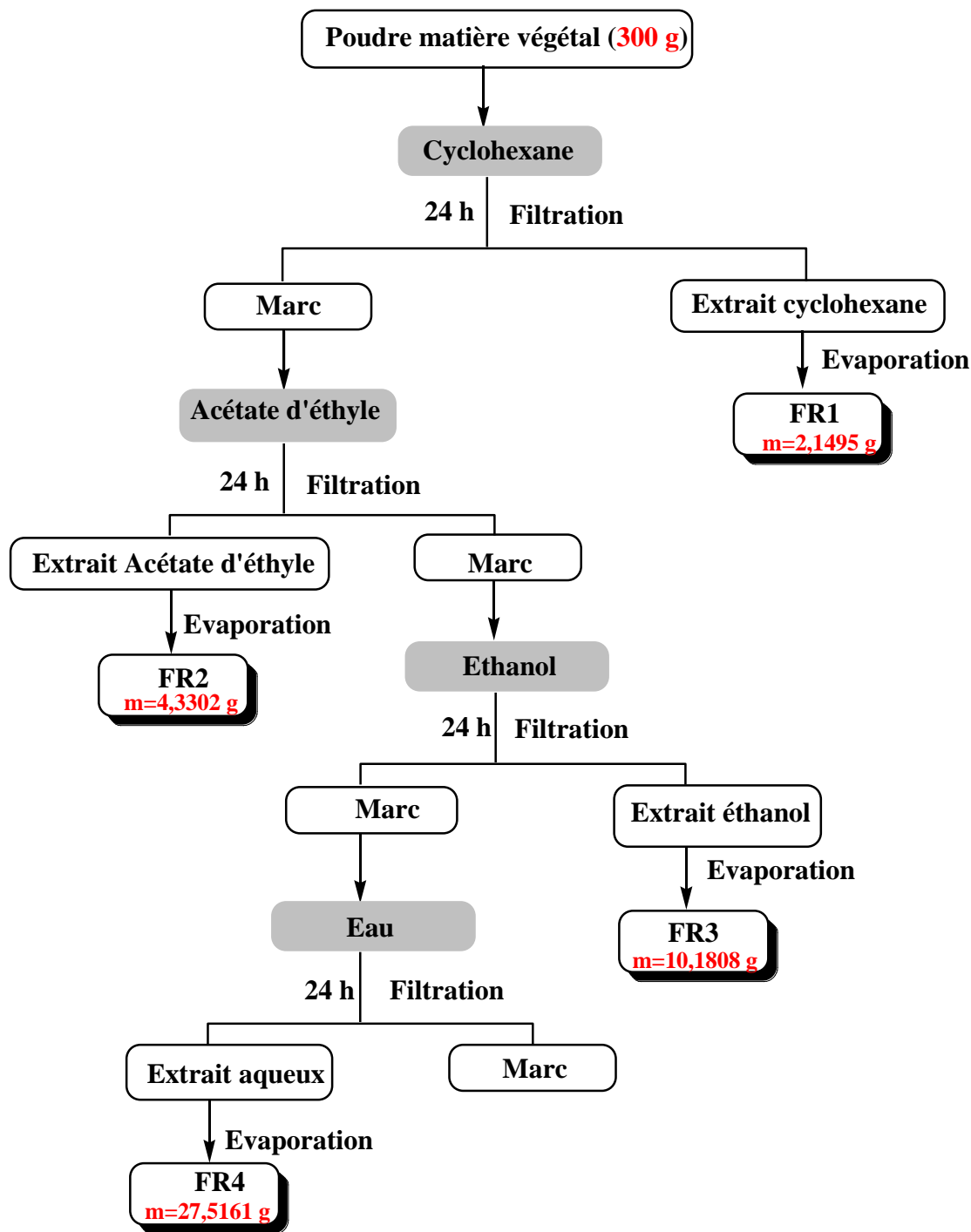


Figure 73: Diagramme d'extraction de la racine de *Morinda geminata*

Les fractions ont été soumises à une étude phytochimique plus approfondie dans ces travaux.

III.3.2. Feuilles

L'extraction de cet organe a été réalisée dans les mêmes conditions avec les mêmes solvants utilisés précédemment (cyclohexane, acétate d'éthyle, éthanol, eau). Les différentes fractions obtenues sont nommées respectivement: **FF1, FF2, FF3, FF4**.

III.3.3. Ecorces

En effet, 300 g de poudre d'écorce ont été introduits successivement dans un ballon de 3000 mL contenant 1500 mL de solvant (Ether de pétrole, acétate d'éthyle, méthanol, eau) puis le mélange a été laissé en macération pendant 24 heures. Cette procédure a été reprise pour chaque solvant après filtration. Les extraits éthers de pétrole, acétate d'éthyle, méthanolique et aqueux ont été évaporés à sec pour donner respectivement les fractions **FE1**, **FE2**, **FE3**, **FE4**. Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la Figure 75.

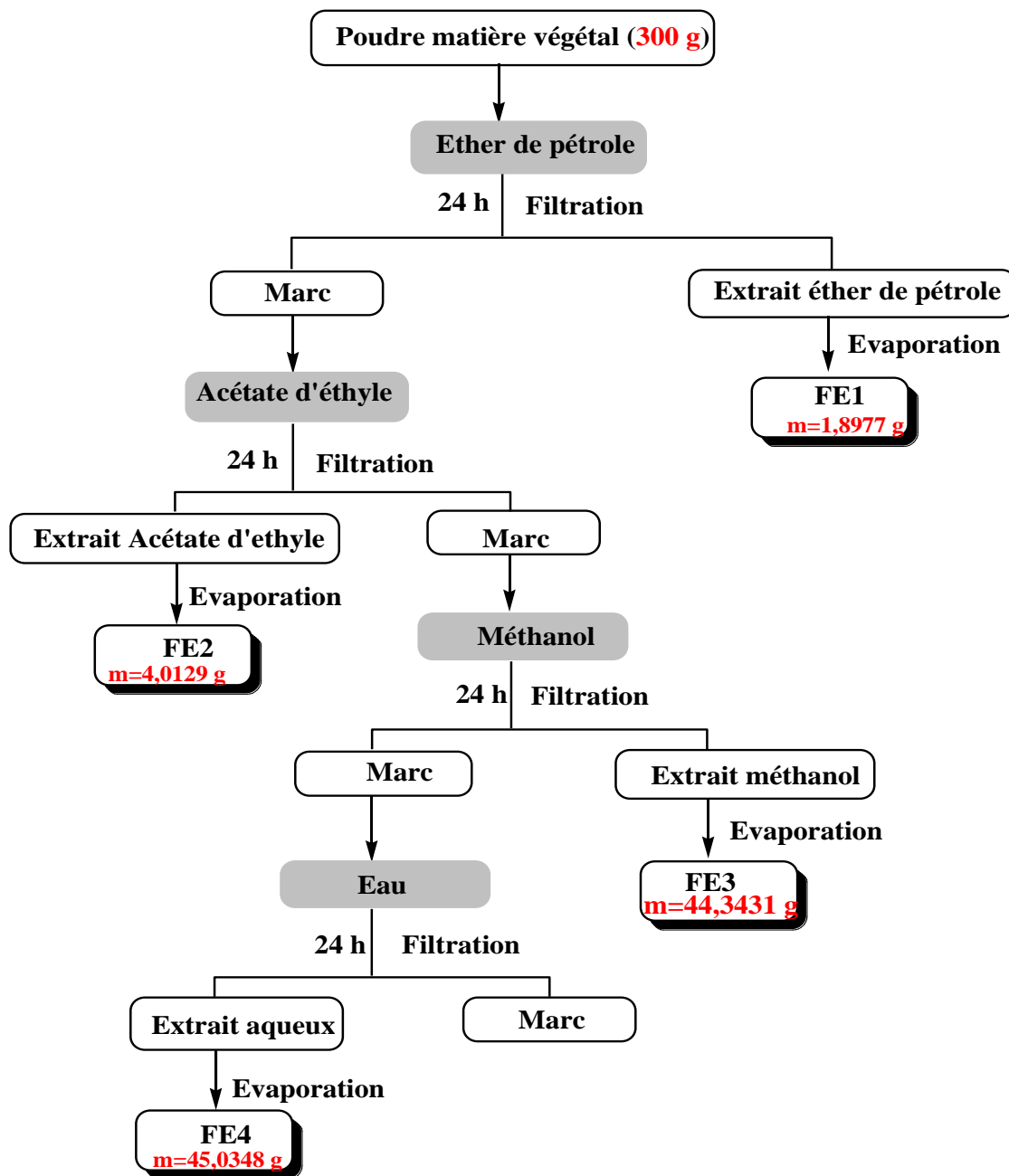


Figure 74: Diagramme d'extraction de l'écorce de *Morinda geminata*

III.4. Graines de *Icacina oliviformis*

Les graines ont été récoltées au sein de l'université Assane Seck de Ziguinchor en 2016. Le séchage a été fait à l'abri des rayons solaires et à la température ambiante du laboratoire LCPM (Laboratoire de Chimie Physique des Matériaux) de l'Université Assane Seck de Ziguinchor.

Les graines séchées et broyées (300 g) sont extraites par macération dans des solvants de polarités croissantes (éther de pétrole, dichlorométhane, éthanol, eau).

En effet, 300 g de poudre de la graine ont été introduits dans un ballon de 3000 mL contenant 1500 mL de solvant puis le mélange a été laissé en macération pendant 24 heures. Après filtration et évaporation à sec du solvant, l'extrait éther de pétrole obtenu est nommé **FI1**. Le marc issu de cette extraction est mis à macérer dans le dichlorométhane. La fraction dichlorométhane obtenue est appelée **FI2**. Le résidu obtenu est ensuite macéré dans un solvant polaire; l'éthanol pour conduire à l'extrait éthanoïque **FI3**. Enfin, le résidu est récupéré et mis à macérer dans de l'eau distillée pour donner l'extrait aqueuse **FI4**.

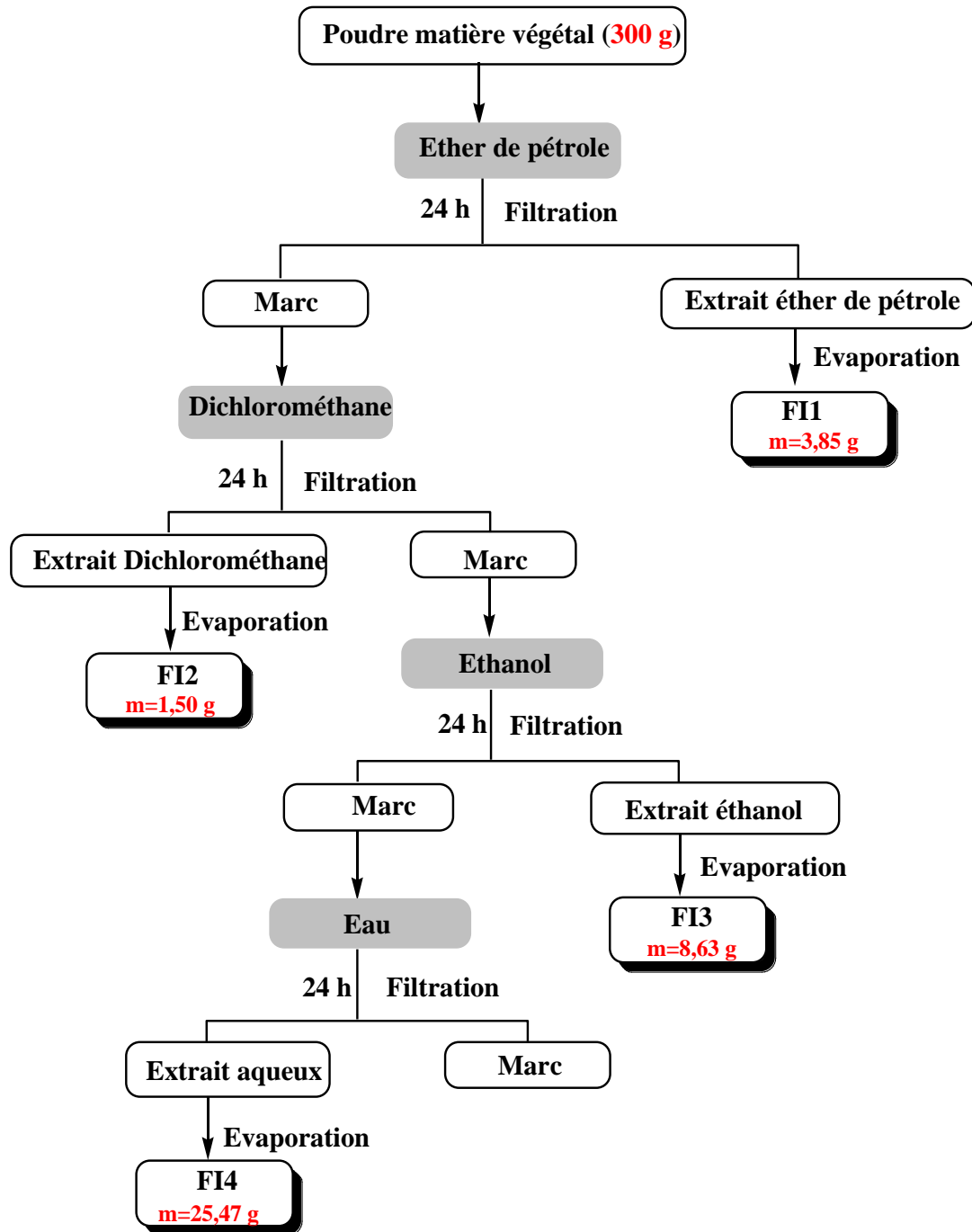


Figure 75: Diagramme d'extraction des graines de *Icacina oliviformis*

IV. Technique de caractérisation phytochimique (screening phytochimique)

Le screening phytochimique consiste à détecter de façon qualitative les principales familles de produits naturels qui peuvent se trouver dans un échantillon végétal. Dans ce travail, ce screening concerne la recherche de:

Anthraquinones, alcaloïdes, polyphénols, tanins, flavonoïdes, stérols et terpènes et saponines.

Le screening de nos échantillons a été réalisé en respectant les modes opératoires décrits dans la littérature [168–170]. Cela va sans dire que, les modes opératoires et les réactifs indiqués

pour l'identification ou la recherche des principes actifs de ces métabolites secondaires ont été scrupuleusement suivis et appliqués.

Nous nous sommes intéressés à trois (3) organes de la plante de *Morinda geminata* (les feuilles, les écorces du tronc et les racines) et un organe de *Icacina oliviformis* (graine). Notons qu'en médecine traditionnelle, beaucoup de tradipratiens utilisent les écorces de racines de *Morinda geminata* DC pour le traitement de la jaunisse, la fièvre jaune, la blennorrhagie, etc... et les feuilles pour le paludisme [14].

Les réactifs utilisés pour le présent travail sont les suivants:

IV.1. Réactif de LIEBERMANN (révélateur des stérols, stéroïdes, terpènes)

Pour mettre en évidence les stérols et les polyterpènes, le réactif de LIEBERMANN a été utilisé. En effet, Le résidu est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique. Nous avons ajouté 0,5 mL d'acide sulfurique concentré au triturât. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive [171, 172].

IV.2. Réactif au chlorure ferrique (FeCl₃) (révélateur des polyphénols)

Une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% est ajoutée dans 2 mL de chaque solution. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée. Le témoin est effectué avec la solution alcoolique d'acide gallique.

IV.3. Réaction de SHIBATA (révélateur des flavonoïdes)

Mettre 2 mL d'extrait aqueux à 10% dans un tube à essai. Ajouter 5 mL d'alcool chlorhydrique (4 mL EtOH + 1 mL HCl concentré) et 2 ou 3 copeaux de magnésium. Une coloration rose orangé ou violacée apparaissent lorsqu'il y a des flavonoïdes. La figure 77 montre le test de révélation des flavonoïdes des extraits des racines de *Morinda geminata*.



Figure 76: Test de flavonoïdes des extraits de la racine

IV.4. Réactif au chlorure ferrique (FeCl₃) (révélateur de tannins)

La réaction effectuée est l'action de chlorure ferrique (FeCl₃) 5% sur l'extrait aqueux 10%. L'apparition d'une coloration bleu noire ou verte dénote la présence de tannins.

IV.5. Réactif à la potasse (révélateur des anthraquinones)

Préparer une solution de potasse 5 g de potasse dans 100 mL d'éthanol à 95%. Après pulvérisation, une coloration rose-mauve apparaît immédiatement (Figure 78).

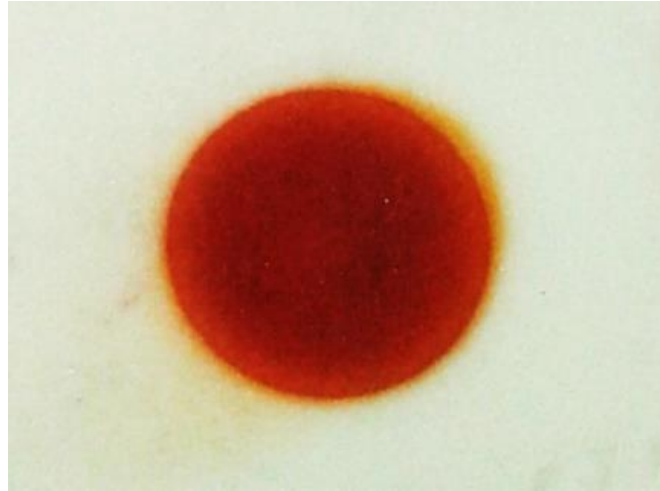


Figure 77: Test d'anthraquinones

IV.6. Réactifs de DRAGENDORFF et de BOUCHARDAT (révélateur d'alcaloïdes)

Pour mettre en évidence les alcaloïdes, les réactifs de DRAGENDORFF (réactif de l'iodo-bismuthate) et de BOUCHARDAT (réactif iodo-ioduré) ont été utilisés. En effet, l'extrait sec est repris dans 6 ml d'alcool à 60°C. L'addition de 2 gouttes du réactif de Dragendorff à la solution alcoolique provoque un précipité ou une coloration orangée. L'ajout de 2 gouttes du réactif de Bouchardat à la solution alcoolique provoque un précipité de coloration brun-rougeâtre et indique une réaction positive.

IV.7. Mise en évidence des saponines

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 10 mL de chacun des extraits aqueux dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.



Figure 78: Mise en évidence des saponines

IV.8. Caractérisation des iridoïdes:

- Noircissement naturelle des drogues après la récolte (Figure 80).
- Réaction de Trim et Hill: Solution diluée de sulfate de cuivre et d'acide chlorhydrique
Coloration différente selon l'iridoïdes: bleu (aucubine), rouge violacée (harpagide)
- Réaction à la vanilline sulfurique pour la révélation de plaques CCM



Figure 79: Test de présence d'irroïdes

V. Méthodes chromatographiques

Le principe de toute chromatographie est basée sur la différence d'affinité d'un composé entre une phase mobile (gaz ou liquide) et une phase stationnaire (silice, alumine, résine échangeuse d'ions, liquide...) sous l'influence de deux effets antagonistes:

-effet d'entraînement exercé par la phase mobile
-effet de rétention exercée par la phase stationnaire et les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont alors séparées.

➤ **Phase fixe:**

La phase fixe ou encore appelée phase stationnaire peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants, des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes.

➤ **Phase mobile:**

La phase mobile est :

- soit un gaz (ex: chromatographie en phase gazeuse): la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur.
- soit un liquide (ex: chromatographie sur papier, couche mince ou colonne): la phase mobile est appelée éluant.

Les séparations chromatographiques mettent en œuvre des techniques qui utilisent les propriétés physiques et générales des molécules dégageant ainsi plusieurs principes de séparations chromatographiques. Ces propriétés sont:

- la solubilité,
- l'adsorption (tendance à se fixer sur un solide divisé),
- la volatilité,
- la taille,
- la réactivité.

Quatre types de chromatographies sont abordés lors de notre recherche.

V.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les plaques CCM sont utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de choisir le bon éluant de séparation et aussi de vérifier la pureté des produits.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale et/ou en phase inverse sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 F254 (Merck). Le développement des plaques s'effectue

dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un solvant pur ou d'un mélange binaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par les réactifs appropriés (Figure 81).

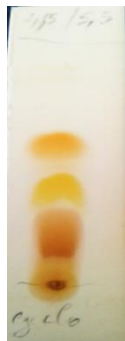


Figure 80: Suivie par CCM de l'extrait cyclohexanique

V.2. Chromatographie sur colonne

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une **phase mobile** (liquide ou gaz) le long d'une **phase stationnaire** (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

Le principe de toute chromatographie est basé sur la **différence d'affinité d'un composé entre une phase mobile (gaz ou liquide) et une phase stationnaire (silice, alumine, résine échangeuse d'ions, liquide...)**

Sous l'influence de deux effets antagonistes:

-effet d'entraînement exercé par la phase mobile

-effet de rétention exercé par la phase stationnaire, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont alors séparés.

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

Pour les chromatographies d'adsorption, la phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale 0.063–0.200 mm, 70-230 mesh silica gel (Merck). L'élution est réalisée par simple gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide.

Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

Préparation de la colonne

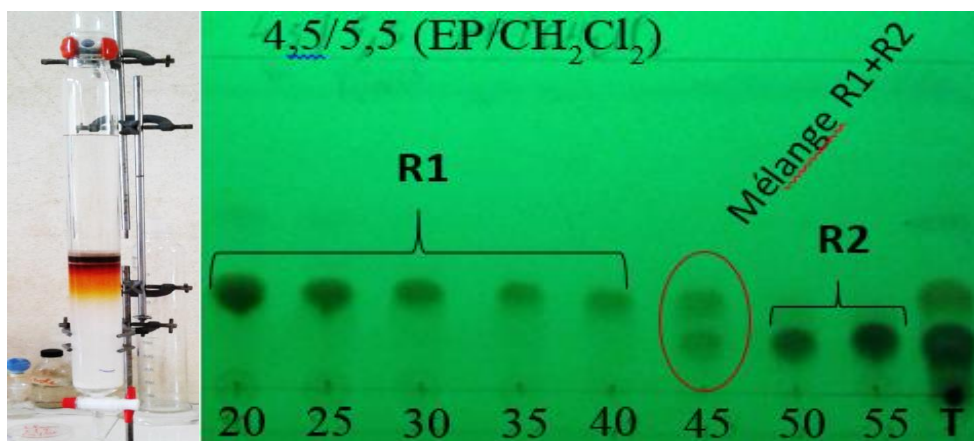
Elle est répartie en 3 phases: la phase stationnaire, la phase organique, la phase mobile.

Pour se faire une masse de l'extrait de la plante a été prélevé (produit organique). Le produit solubilisé avec un solvant approprié a été mis dans un ballon de 250 mL puis ajouté trois à quatre spatules de silice (**Geduran SI 60 granulométrie 0,040-0,063 mm de gel de silice**). Le mélange est ensuite évaporé à sec, afin d'obtenir une quantité en poudre de silice-produit organique pour faire un dépôt solide.

Une quantité de silice a été mouillée avec l'éluant préparé et est versée dans la colonne. Le solvant (volume mort) est récupéré dans un bécher à moitié de la colonne avant que l'on utilise la pompe à air pour bien tasser la silice et ensuite y ajouter du sable pour stabiliser la surface.

A l'aide d'un entonnoir, un dépôt solide du produit organique a été réalisé de sorte qu'une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne se forme. Une pipette est utilisée pour couler l'échantillon collé au bord de la colonne et de façon uniforme sans déformer la surface du produit déposé. L'éluant est ensuite versé, puis le robinet ouvert, l'échantillon est ainsi adsorbé uniformément au long de la colonne (Figure 82).

La partie organique est récupérée goutte à goutte dans des tubes à essai. Après un certain nombre de tubes remplis, des dépôts ont été effectués dans une plaque CCM. Cette plaque a été introduite dans une cuve contenant l'éluant. Après migration, des regroupements par Rf ont été effectués (Figure 82).



*Figure 81: Suivie chromatographique sur gel de silice de la purification de la fraction **FRI***

V.3. Chromatographie préparative sur couche mince

Les plaques utilisées sont des plaques de gel de silice de 2 mm sur verre (Merck 60 F254). Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant adéquat puis déposés sur la plaque. La plaque a été développée dans une cuve saturée contenant le mélange de solvants approprié (Figure 83).

La silice contenant le composé a été récupérée à l'aide d'une spatule. La silice est ensuite

dispersée dans une petite quantité de solvant, puis filtrée sous vide pour permettre la récupération du composé.



Figure 82: Purification par chromatographie semi-préparative sur plaque CCM

V.4. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

D'autres composés ont été purifiés à l'aide d'une chaîne HPLC Agilent Série 1100 munie d'une pompe isocratique et d'un détecteur à indice de réfraction (RI) pilotés par le logiciel Chemstation d'Agilent.

Les analyses ont été réalisées en phase inverse avec une colonne HPLC de type Agilent Zorbax 300SB-C18 (5 μ m, 250 x 9.4 mm). Les solvants utilisés (Acétonitrile, eau filtré (0,025% acide trifluoroacétique)) sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 2 mL/min.

V.5. Isolement et purification

V.5.1. Racines de *M. geminata* DC

V.5.1.1. Extrait cyclohexane

2 g de l'extrait cyclohexanique (FR1) sont prélevés puis fractionnés grossièrement par colonne chromatographie sur gel de silice, élués par un éluant (Ether de pétrole/Dichlorométhane (4,5/5,5)). Les fractions notées SBMg0RC, SBMg1RC, SBMg1¹RC, SBMg2RC, SBMg2¹RC, SBMg3RC ont été obtenues après analyse du CCM suivi d'un regroupement des tubes à essai.

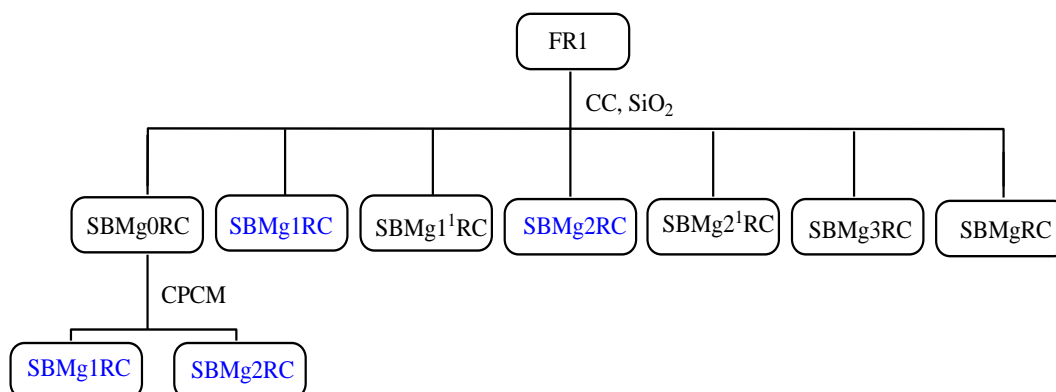


Figure 83: Schéma de fractionnement de l'extrait cyclohexane

Certaines fractions présentent une mono tache (SBMg1RC et SBMg2RC) suivant la plaque CCM et d'autre de multiples taches (Figure 85).

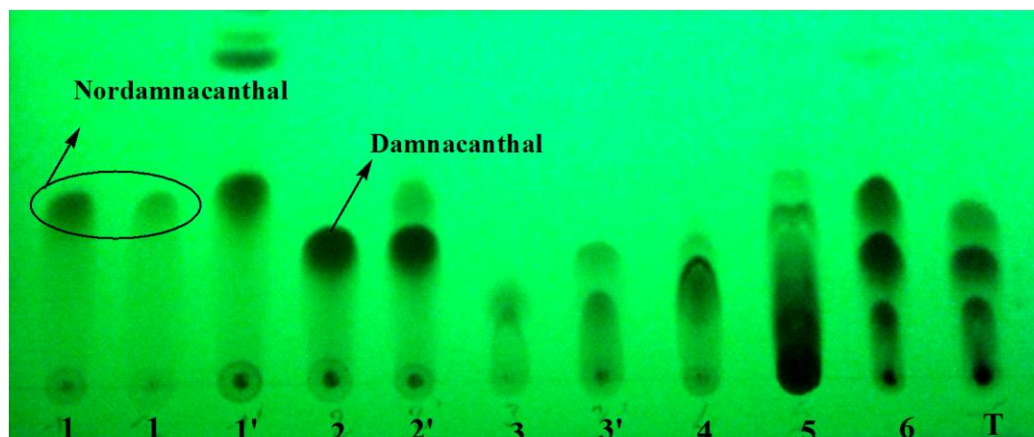


Figure 84: Plaques CCM récapitulative du fractionnement de l'extrait cyclohexanique

Ces deux fractions supposées pures (**SBMg1RC** et **SBMg2RC**) ont une masse respective de 55,3 mg et 122,7 mg. Ces masses ont été améliorées par la repurification de 37 mg du **SBMg0RC** qui est un mélange regroupement des tubes de [1-19] et [41-43] par chromatographie préparative sur couche mince. Le bilan massique de la purification est consigné dans le tableau 15.

Tableau 15: Bilan de la chromatographie de l'extrait cyclohexane

Fractions	Tubes	Masses (mg)	Rendements (%)
SBMg0RC	[1-19] et [41-43]	37	1,85
SBMg1RC	[20-40]	69,8	3,49
SBMg1 ¹ RC	[44-57]	48,7	2,435
SBMg2RC	[58-70]	137,7	6,885
SBMg2 ¹ RC	[71-95]	102	5,1
SBMg3RC	[96-104]	78,4	3,92
SBMgRC	Reste de la colonne	1463,4	73,17
Total		1937	96,85

Les fractions qui ont une seule tache ont été collectées, puis conservées pour diverses analyses (RMN, masse, IR et tests bioactives).

V.5.1.2. Extrait Acétate d'éthyle

La purification de 2 g de l'extrait acétate d'éthyle de la racine de *Morinda geminata* DC a été effectuée avec deux méthodes chromatographiques: colonne chromatographie sur gel de silice, et HPLC. Suite à la première purification, les fractions **SBMg9AC** et **SBMg12AC** ont été repurifiées à cause de multiples taches observées sur plaque CCM (Figure 88). Une sous

fraction SBMg9-2AC de SBMg9AC a été analysée par HPLC analytique. L'analyse du spectre de cette dernière montre que cette fraction contient trois composés majoritaires (Figure 86).

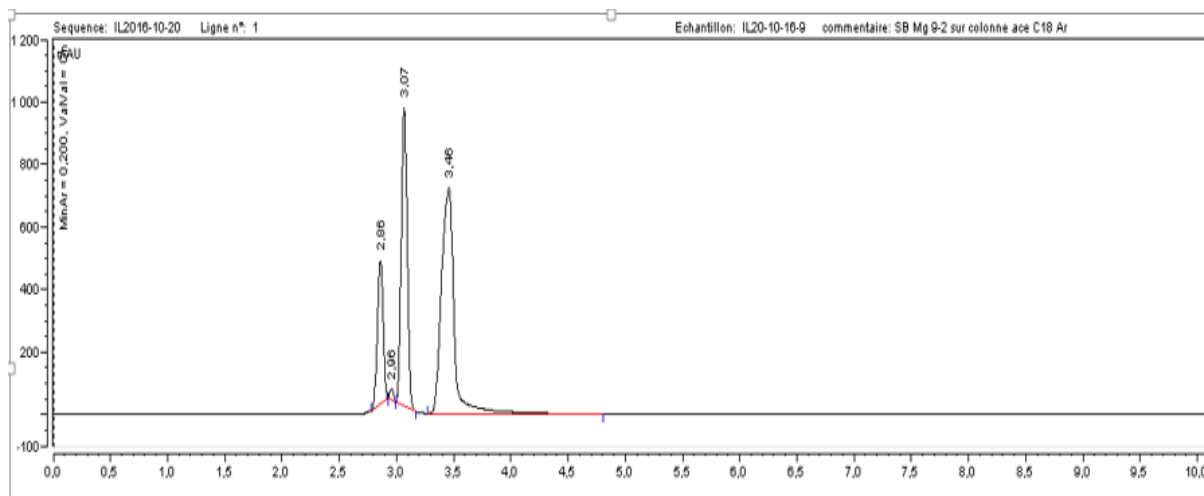


Figure 85: Spectre HPLC de la fraction SBMg9-2AC

Ces trois composés n'ont pas été identifiés car la quantité isolée n'est pas exploitable par HPLC semi-préparative. De même que la fraction **SBMg10AC** qui semble être un composé pur sur plaque CCM était composée de deux molécules suite à l'observation des spectres de RMN et HPLC analytique. La purification de l'extrait acétate d'éthyle de la racine a conduit finalement à l'isolement de quatre composés **SBMg12-4AC**, **SBMg16AC**, **SBMg17AC** et **SBMg9-4AC**. Le diagramme de la purification et les plaques récapitulatives sont présentés ci-dessous.

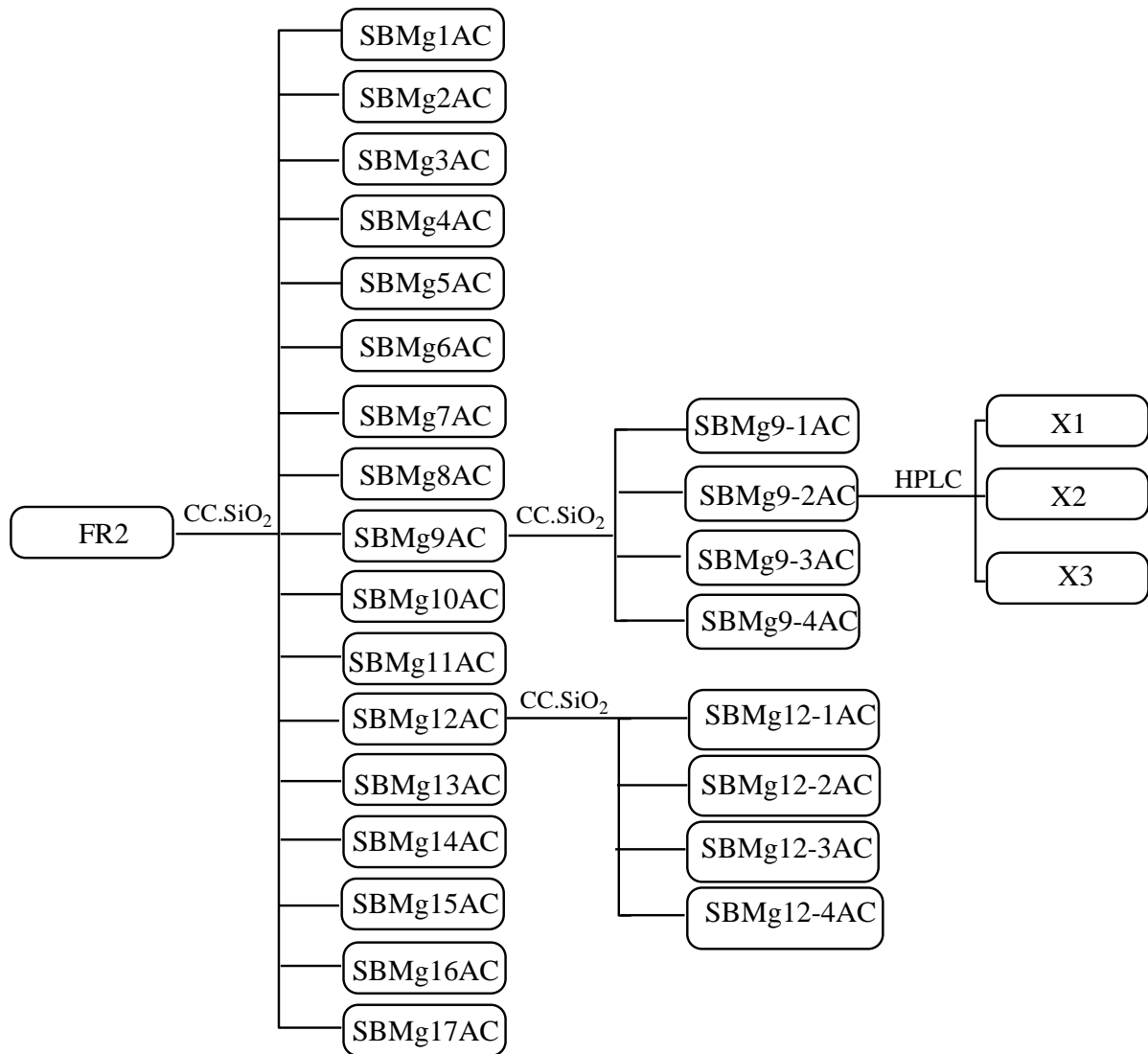


Figure 86: Schéma de purification de l'extrait acétate d'éthyle

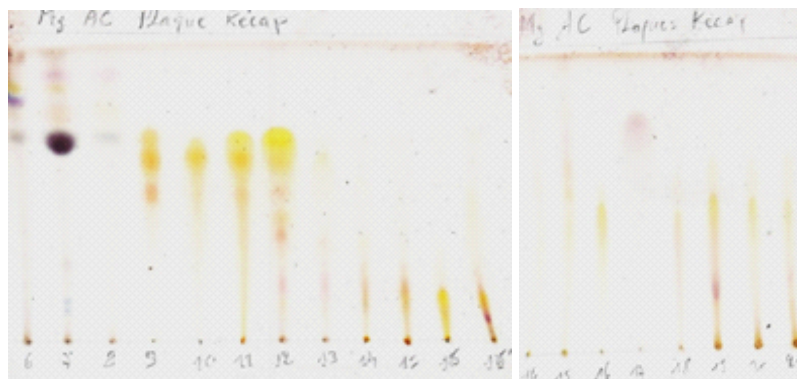


Figure 87: Plaque CCM récapitulative de la purification

Première Partie: Etude phytochimique des plantes sélectionnées

Le bilan massique, les différents regroupements et éluant sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16: Bilan de la chromatographie de l'extrait acétate d'éthyle

fractions	Regroupement	Eluant	Masse (mg)
SBMg1AC	[2-3]	9/1 cyclo/ AcOEt	55,3
SBMg2AC	[5-6]		15,6
SBMg3AC	[8-15]		8,2
SBMg4AC	[25-30]		10,9
SBMg5AC	[32-40]		21,4
SBMg6AC	[44-46]	8/2 cyclo/ AcOEt	
SBMg7AC	[49-55]		28,1
SBMg8AC	[56-59]		
SBMg9AC	[60-85]		388,6
SBMg10AC	[86-115]		186,3
SBMg11AC	[116-144]	7,5/2,5 cyclo/ AcOEt	70,6
SBMg12AC	[145-165]		42,1
SBMg13AC	[166-194]	7/3 cyclo/ AcOEt	35,7
SBMg14AC	[195-215]		32,8
SBMg15AC	[216-226]		32,4
SBMg16AC	[240-280]		84,5
SBMg17AC	[285-300]	6/4 cyclo/ AcOEt	123,6
SBMg18AC	[350-354]	9,5/0,5AcOEt /MeOH	11,6
SBMg19AC	[355- fin]		578,5

V.5.1.3. Extrait Ethanol

2 g de l'extrait éthanol FR3 est prélevé puis fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée successivement par un gradient de solvant cyclo/AcOEt, AcOEt/MeOH et enfin par le MeOH. 23 fractions sont obtenues SBMg1ET à SBMg23ET (Tableau 17).

Tableau 17: Bilan de la chromatographie de l'extrait éthanol

fractions	Tubes	Eluant	Masse (mg)
SBMg1ET	[35-38]	9/1 cyclo/AcOEt	3
SBMg2ET	[39-42]	9/1 cyclo/ AcOEt	2,6
SBMg3ET	[43-48]	9/1 cyclo/ AcOEt	11,6
SBMg4ET	[49-51]	9/1 cyclo/ AcOEt	7,2
SBMg5ET	[52-58]	9/1 cyclo/ AcOEt	14,2
SBMg6ET	[59-61]	9/1 cyclo/ AcOEt	42,2
SBMg7ET	[62-67]	9/1 cyclo/ AcOEt	115,2
SBMg8ET	[68-80]	9/1 cyclo/ AcOEt	56,5
SBMg9ET	[81-90]	9/1 cyclo/ AcOEt	6,3
SBMg10ET	[91-139]	9/1 cyclo/ AcOEt	50,6
SBMg11ET	[140-161]	7/3 cyclo/ AcOEt	66,7
SBMg12ET	[162-174]	7/3 cyclo/ AcOEt	5,4
SBMg13ET	[192-193]	8/2 AcOEt /MeOH	14
SBMg14ET	[194-195]	8/2 AcOEt /MeOH	55,4
SBMg15ET	[196-200]	8/2 AcOEt /MeOH	80,2
SBMg17ET	[207-212]	8/2 AcOEt /MeOH	173
SBMg18ET	[213-223]	8/2 AcOEt /MeOH	188,6
SBMg19ET	[224-233]	8/2 AcOEt /MeOH	84,4
SBMg20ET	[234-246]	8/2 AcOEt /MeOH	140,5
SBMg21ET	[247-252]	8/2 AcOEt /MeOH	42,6
SBMg22ET	[255-258]	8/2 AcOEt /MeOH	29,3
SBMg23ET	[261-282]	7/3 AcOEt /MeOH	28,9

Ces fractions ont été déposées sur une plaque CCM pour vérifier celles qui contiennent une tâche ou plusieurs tâches. Ainsi, sont sélectionnées les fractions qui ont les monotâches pour faire des analyses. Après analyse, ces trois composés ont été caractérisés **SBMg3ET** (11,6 mg), **SBMg6ET** (42,2 mg) et **SBMg11ET** (66,7 mg). Les premières fractions se présentent sous forme de matières grasses que nous n'avons pas exploitées car n'étant pas notre cible et d'autres sous forme de mélange. On peut citer comme exemple la fraction **SBMg7ET** qui selon LC/MS (Figure 89) présente deux composés majoritaires où l'un à un temps de rétention (TR) de 1,57mn et de masse m/z = 267 en mode négatif et l'autre TR = 2mn est de masse m/z = 253 en mode négatif.

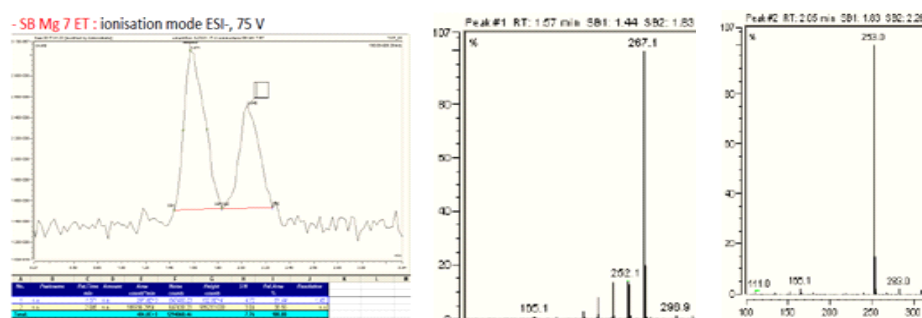


Figure 88: Spectre LC/MS de la fraction SBMg7ET

V.5.2. Les feuilles de *M. geminata* DC

Dans cet organe nous avons concentré notre étude que sur l'extrait acétate d'éthyle qui a été purifié.

La fraction acétate d'éthyle (2 g) a subi un fractionnement par chromatographie sur gel de silice éluée avec un mélange d'éther de pétrole/éther diéthylique de rapport 6/4 suivi d'un autre éluant d'éther de pétrole/acétate d'éthyle de rapport 8/2 pour donner dix-huit fractions (SBMg1FAC à SBMg18FAC). Le schéma de fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle est présenté sur la figure 90.

La figure 91 présente une plaque CCM (révélée avec H₂SO₄ à 50%) représentant la plaque récapulative du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle par colonne chromatographique sur gel de silice. Le tableau 18 présente le bilan massique de la purification.

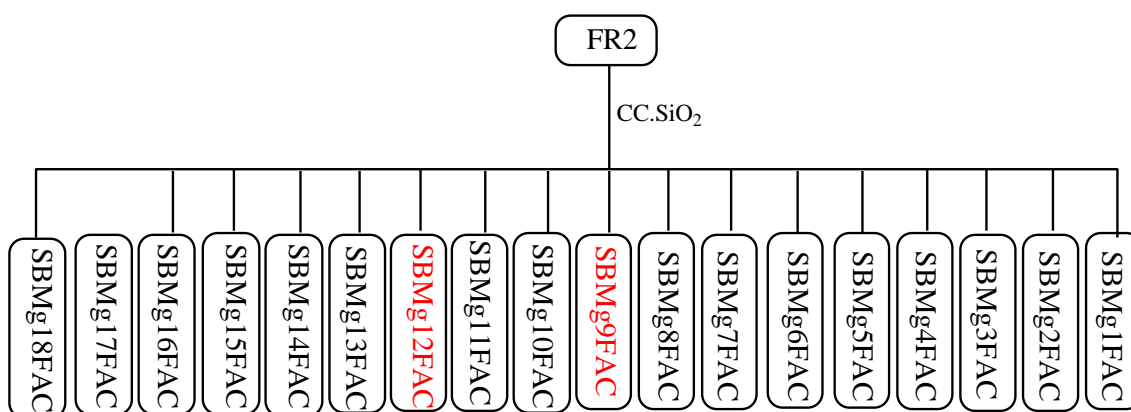


Figure 89: Diagramme de purification de la fraction FR2

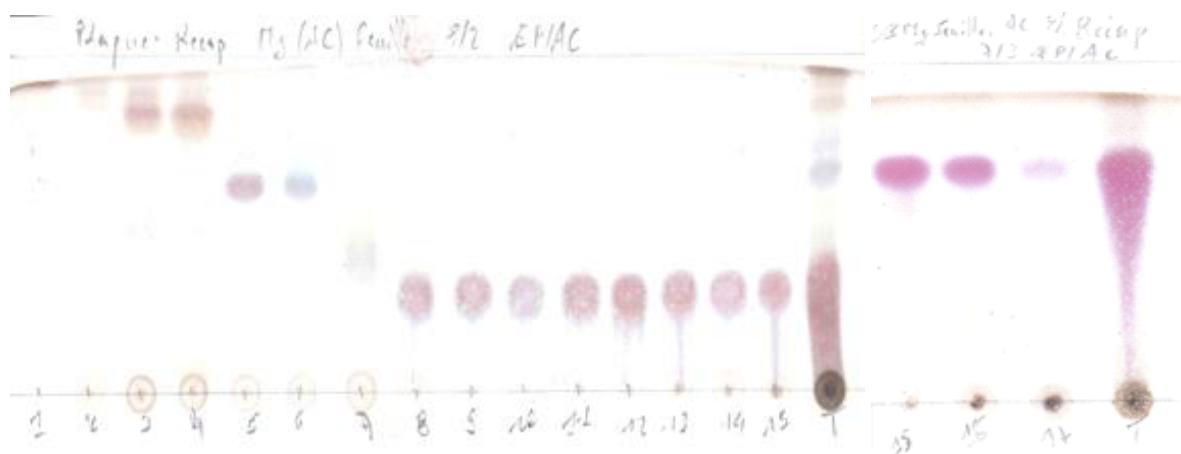


Figure 90: Plaque CCM récapulative de la purification de la fraction FR2

Tableau 18: Bilan de la chromatographie de l'extrait AcOEt de la feuille

Fractions	Tubes	Eluant	Masses
SBMg1FAC	[1-4]	EP/Et ₂ O 6/4	281,9
SBMg2FAC	[17-18]		15,5
SBMg3FAC	[19-20]		15,3
SBMg4FAC	[21-24]		16
SBMg5FAC	[33-36]	EP/AcOEt 8/2	27,4
SBMg6FAC	[37-42]		32,4
SBMg7FAC	[52-60]		43,8
SBMg8FAC	[61-81]		206,2
SBMg9FAC	[82-97]		128,8
SBMg10FAC	[98-115]		97,1
SBMg11FAC	[116-120]		19,7
SBMg12FAC	[121-125]		14,5
SBMg13FAC	[126-148]		85,4
SBMg14FAC	[149-158]		12,2
SBMg15FAC	[160-200]		80,9
SBMg16FAC	[202-235]		30,6
SBMgF17AC	[295-335]		75,1
SBMgFAC		MeOH 100%	736
TNP			

Après la plaque CCM, sept échantillons ont été sélectionnés pour faire la RMN ¹H: SBMg5FAC, SBMg6FAC, SBMg7FAC, SBMg9FAC, SBMg12FAC, SBMg15FAC, SBMg17FAC.

V.5.3. Ecorce de *M. geminata* DC

L'isolement de molécules des extraits méthanol de l'écorce de *Morinda geminata* DC s'est révélé être particulièrement difficile en raison de la présence de composés très polaires. Ce qui rend l'isolement de molécules pures extrêmement délicat. Par conséquent le travail préliminaire à l'étude des composés de cette fraction a consisté à tester de nombreuses méthodes chromatographiques en association avec divers systèmes de solvants afin de mettre au point un système de fractionnement permettant la séparation des composés de l'extrait. L'utilisation en alternance des techniques de chromatographie (colonne chromatographie sur gel de silice et plaque CCM préparative) permet en partie de remédier à ce problème mais de nombreuses phases de purification sont nécessaires. Malgré toutes les méthodes de purifications utilisées, seul le composé **R7** de masse **46,7 mg** a été isolé. L'extrait méthanol de l'écorce du *Morinda geminata* DC a été purifié comme l'indique ce diagramme ci-dessous. Le tableau **19** représente le bilan de la purification.

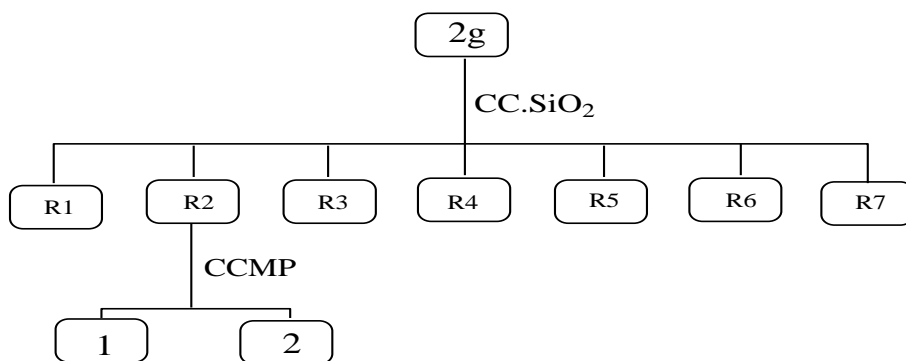


Figure 91: Schéma d'extraction de l'extrait méthanol de l'écorce

Tableau 19: Bilan de la purification de l'extrait méthanol de l'écorce

Fractions	Tubes	Eluant	Masse (mg)
R1	[1-8]	8/2 AcOEt	19,8
R2	[16-26]		98,7
R3	[27-36]		272,9
R4	[37-46]		334,5
R5	[47-50]		91,3
R6	[51-60]		6,5
R7	Récupéré dans un bûcher		46,7

L'interprétation de la plaque CCM (Figure 93) permet de supposer que le regroupement **R2** est un mélange de deux composés.



Figure 92: Plaque CCM des premiers tubes de la purification

Ce mélange a été repurifié par une plaque CCM préparative pour donner deux fractions 1 et 2 qui ne sont pas pures (sur plaque CCM (Figure 94)).

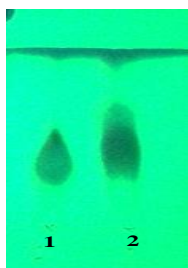


Figure 93: Plaque CCM

V.5.4. Graines de *Icacina oliviformis*

Souvent constitué de matières grasses, l'extrait éther de pétrole n'a pas été purifié. Seuls les extraits dichlorométhane et éthanol ont été purifiés.

V.5.4.1. Extrait dichlorométhane

La purification de 1,5 g de l'extrait dichlorométhane de la graine de *Icacina* a été effectuée dans une colonne chromatographique sur gel de silice. Cette purification a permis l'obtention de 6 fractions nommées **I1**, **I2**, **I3**, **I4**, **I5** et **I6**. Les quatre premières fractions ont été choisies pour faire des analyses vu leur comportement sur plaque CCM (Figure 95). Après analyse et interprétation des spectres RMN du proton, nous avons remarqué que seule la fraction **I3** est exploitable. Donc c'est la seule fraction qui a été analysée et caractérisée.

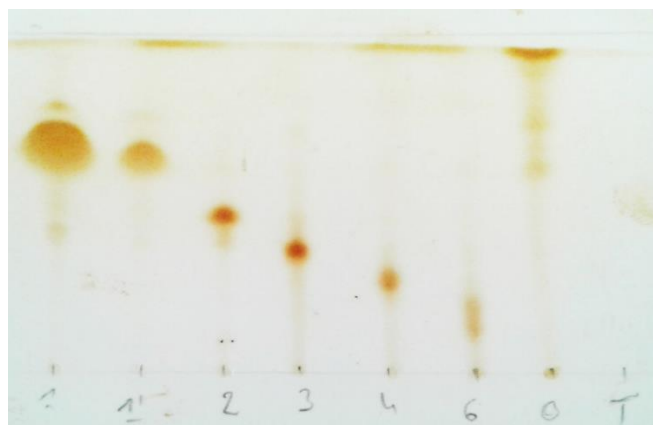


Figure 94: Plaques CCM récapitulatives de l'extrait CH_2Cl_2

V.5.4.2. Extrait éthanoïque

2 g d'extrait éthanoïque ont été utilisés pour la purification. Après solubilisation de l'extrait avec du méthanol un précipité a été observé. La phase méthanol a été filtrée à l'aide d'un entonnoir fritté. Le précipité blanchâtre (Figure 96) est récupéré et séché. Ce produit (**P**) pèse 274 mg et est soluble dans le DMSO.



Figure 95: Produit (**P**) isolé de l'extrait éthanol

VI. Méthodes physicochimiques

Le laboratoire ne disposant pas des appareils d'analyse tels que la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire, l'infrarouge. Les analyses ont été effectuées grâce à des collaborations avec le laboratoire de l'Institut de Chimie et des Matériaux de Paris Est (ICMPE) France.

VI.1. Spectrométrie de Masse (SM)

C'est une méthode analytique qui permet de déterminer la composition chimique, la structure, la masse moléculaire, ou élaborer les profils métaboliques. Les spectres de masse ESIMS (ions en mode négatif) ont été enregistrés à l'aide du micro-instrument Micromasse ESI-Q-TOF (Manchester, Royaume-Uni).

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

VI.2. Spectrométrie d'infrarouge

Les spectres infrarouge sont enregistrés sur un appareil de type PerkinElmer Spectrum Version 10.5.4.

VI.3. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés au sein de l'équipe de recherche du laboratoire ICMPE sur des appareils de type Brüker Avance 400 (fréquences de 400 (^1H) et 100 MHz (^{13}C)), ou Brüker Avance 600 avec cryosonde (fréquences de 600 (^1H) et 150 MHz (^{13}C)) selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl_3 et le DMSO-d_6 , dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

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

Les programmes de séquence impulsionnelle standard fournis par Brüker ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, NOESY, HSQC et HMBC.

VI.3.1. Corrélations homonucléaires

- **COSY** (^1H - ^1H): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- **NOESY** (^1H - ^1H): cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

VI.3.2. Corrélations hétéronucléaires

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

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

VII. Conclusion partielle

La synthèse bibliographique nous a permis de montrer qu'il y a deux types de métabolites dans les plantes médicinales : les métabolites primaires (protéines, lipides, acides gras, ...) signalés dans les graines de *Icacina* et les métabolites secondaires (les polyphénols, les terpènes, stérols, les alcaloïdes, etc...). Les anthraquinones, les flavonoïdes, les coumarines, les lignanes, les irôïdes et les triterpènes constituent la majorité des métabolites secondaires non volatils isolés du genre *Morinda*. Ces composés présentent des propriétés biologiques telles que les propriétés antibactériennes, antioxydantes, antifongiques, antivirales, antipaludiques, antituberculeuses, anticancéreuses, antiinflammatoires, antivirales, et antiallergiques.

Les connaissances bibliographiques nous ont conduits à la recherche de nouveaux composants biologiquement actif, afin de pouvoir faire une corrélation entre une structure chimique et une activité biologique in vitro et comprendre les modes d'actions thérapeutiques des plantes sélectionnées.

Dans cette partie une étude phytochimique de *Morinda geminata* a permis d'isoler 8 composés dont six anthraquinones, un triterpène et un sucre. Un screening phytochimique a révélé: dans la racine des anthraquinones en quantité élevée, des alcaloïdes, des traces de tannins, des polyphénols, des stérols et terpènes et des saponines, dans l'écorce des anthraquinones, des traces de flavonoïdes, des polyphénols, des stérols et terpènes et des saponines et dans la feuille des stérols et terpènes, des saponines en abondance, des traces de tannins et polyphénols.

L'étude phytochimique de la graine de *Icacina oliviformis* a permis d'isoler le saccharose et β -sistosérol-3-O- β -D-glucoside. Les composés isolés ont été caractérisés par IR, RMN et spectrométrie de masse.

La macération est la méthode d'extraction utilisée dans ce travail, car elle est la plus conforme à la méthode d'utilisation au niveau traditionnelle. Nos études phytochimiques ont permis de mettre en évidence la richesse en métabolites secondaires des plantes étudiés. La chromatographie sur couche mince nous a permis d'avoir une idée sur le choix de l'éluant pour

Première Partie: Etude phytochimique des plantes sélectionnées

la séparation des composés existants dans les extraits. Des composés ont été isolés grâce à une colonne chromatographique sur gel de silice ou une plaque CCM préparative.

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE BIOLOGIQUE DES MOLECULES
ISOLEES

CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DU MONDE MICROBIEN

I. Historique

En 1673, Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) fut le premier à observer les bactéries qu'il appela animalcules. En plus de la première description des globules rouges et des spermatozoïdes, ce drapier hollandais observait pour la première fois les bactéries et décrit leurs différentes formes.

II. Définition

La bactérie est un micro-organisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome, et on note éventuellement la présence de plasmides (petit morceau d'ADN circulaire). L'ensemble des bactéries forme le règne des eubactéries (Eubacteria). Certaines bactéries peuvent être pathogènes. Les bactéries sont partout et nous sommes en contact permanent avec ces micro-organismes. Lorsque l'on évoque les bactéries, on pense tout de suite aux maladies, aux infections, à la mortalité causée par ces microbes. Cependant seule une minorité des bactéries peut causer des infections et nous rendre malade. Parfois, elles sont mortelles. Les infections bactériennes peuvent être traitées avec des antibiotiques.

III. Anatomie

Les bactéries sont des êtres unicellulaires qui possèdent les éléments essentiels à la vie cellulaire. Leur taille varie de 1 à 10 μm . Le poids d'une bactérie est d'environ 10-12 μg . Elle contient 70% d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (55%), de lipides (10%), de lipopolysaccharides (3%), de peptidoglycane (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%). Elles ne sont donc visibles qu'au microscope optique ou au microscope électronique.

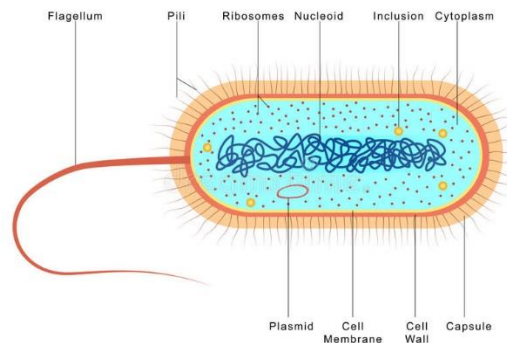


Figure 96: Anatomie bactérienne

IV. Classification

La classification des bactéries d'intérêt médical peut se faire en fonction de leur forme ou de la composition de leur paroi (faisant qu'elles résistent ou se laissent traverser par certains colorants). Ainsi on distingue:

Bactéries en forme de sphère

Elles sont appelées Cocci. En fonction de la coloration de Gram, on distingue, les cocci à Gram négatif (qui se colorent en violet) et les cocci à Gram positifs (qui se colorent en rose)

Bactéries en forme de bâtonnet

Elles sont appelées Bacilles

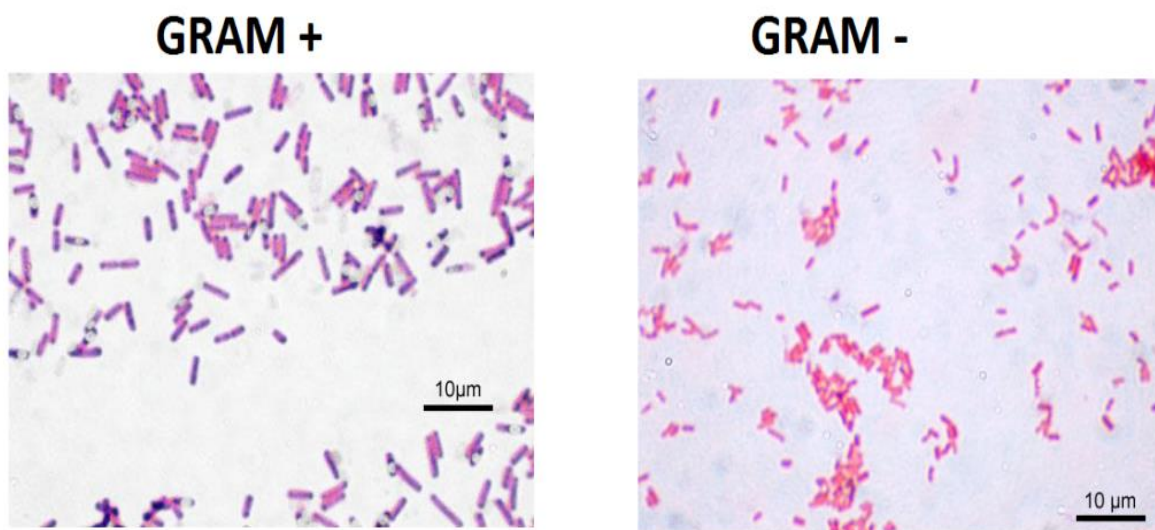


Figure 97: Résultats de la coloration de Gram

Bacilles Acido-Alcool-Résistants :

Ce sont des bactéries qui sont résistantes à l'action combinée de l'alcool et de l'acide tel que les mycobactéries (Bacille de la tuberculose) ou le bacille de la lèpre.

Bactérie de forme spiralée:

Elles sont appelées spirochètes, on peut citer les bactéries du genre Treponema, Leptospira, Borrella, Spirillum.

V. Antibiotique

Différents critères bactériologiques, sont à considérer dans le choix d'un traitement antibiotique. L'étude de l'activité des antibiotiques sur les bactéries rencontrées en pathologie constitue une étape nécessaire au choix d'une antibiothérapie. L'évaluation de cette activité nécessite une étude in vitro réalisée au laboratoire de bactériologie.

Deuxième partie : Etude biologique des molécules isolées

Les interactions bactérie/antibiotique dans le temps, en présence de concentrations croissantes d'antibiotique, peuvent se traduire soit par un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase), soit par un effet létal de l'antibiotique (bactéricidie). La bactériostase est quantifiée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la bactéricidie par la concentration minimale bactéricide (CMB), les deux concentrations étant exprimées en mg/L. La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu, après 16 à 24 heures d'incubation, de la souche bactérienne étudiée.

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique laissant après 16 à 24 heures d'incubation un pourcentage de survivants $\leq 0,01$ % (soit -4 Log_{10}) de l'inoculum de départ ($\leq 0,1$ % [soit -3 Log_{10}] chez les Anglo-Saxons). Un antibiotique est bactéricide si la CMI et la CMB sont proches. Si le rapport $\text{CMB/CMI} \geq 32$, l'antibiotique est bactériostatique, ou s'il s'agit d'un antibiotique habituellement considéré comme bactéricide, la souche est dite tolérante [173].

L'avènement des antibiotiques au début du XXe siècle a permis de faire reculer d'une manière extraordinaire la mortalité liée aux infections. En 1928 **Alexandre Flemming**, un médecin écossais, remarqua qu'un champignon, la moisissure *Penicillium notatum* (actuellement dénommé *Penicillium chrysogenum*), était capable de produire une substance qui inhibait la croissance de certaines bactéries. Ce fut le début de l'ère des antibiotiques! La **pénicilline** était découverte [174].

Cependant la prise en charge des patients atteints des maladies infectieuses est devenue une préoccupation majeure des médecins et une impasse thérapeutique en raison de la résistance aux antibiotiques à travers des adaptations génomiques et protéiques des bactéries.

Ce phénomène, qui devient de plus en plus fréquent, est qualifié par l'OMS comme un problème de santé publique [175].

La diffusion des résistances bactériennes aux antibiotiques menace l'efficacité des antibiotiques. Cependant, la consommation d'antibiotique reste fréquemment inadaptée en termes quantitatifs et qualitatifs. Avec l'émergence et la rapide propagation des bactéries résistantes, nous nous retrouvons maintenant avec de moins en moins d'antibiotiques efficaces et nous devons relancer les activités de recherche dans ce secteur [176].

V.1.-Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'une géloseensemencée avec la bactérie à étudier. L'antibiotique va diffuser dans le milieu de culture. La concentration sera élevée au bord du disque et de plus en plus faible à mesure que l'on s'en éloigne. Si la bactérie

est sensible, une zone d'inhibition (absence de croissance de la bactérie) sera visible autour du disque. Plus la bactérie est sensible, plus la zone d'inhibition sera grande. En mesurant le diamètre de la zone d'inhibition et en la comparant à des tables de référence il est ainsi possible de savoir si la bactérie est sensible ou résistante à cet antibiotique [174].

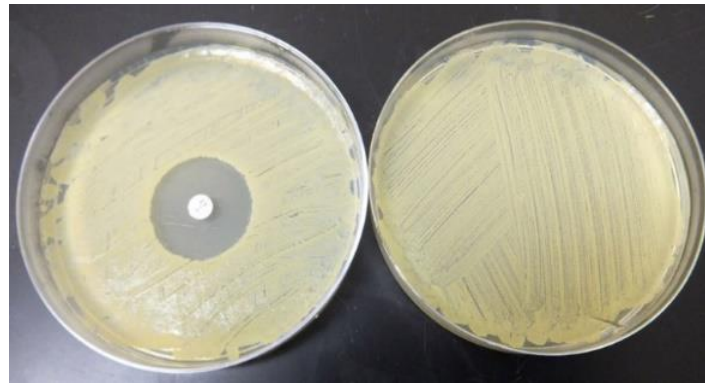


Figure 98: Détermination du diamètre d'inhibition en milieu gélosé [173]

V.2. Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

La CMI peut être déterminée par macro dilution (en tubes, avec un volume final 1 ml [souvent 2 mL]) ou par micro dilution (en microplaques de 96 puits, avec un volume final de 100 litres) en milieu liquide. Cette dernière technique constitue la méthode de référence internationale (norme ISO 20776-1) pour les bactéries aérobies non exigeantes. Une série de tubes ou de puits estensemencée avec 5 à 10^5 UFC/ml de la bactérie à étudier en bouillon Mueller-Hinton (MH) à teneur ajustée en ions Ca^{2+} (25 à 50 mg/L) et Mg^{2+} (12,5 à 25 mg/L). Ensuite, des quantités croissantes d'antibiotiques sont ajoutées de façon à réaliser une gamme de concentrations en progression géométrique de raison 2. Un tube sans antibiotique servira de témoin.

Après 16 à 24 heures d'incubation en aérobiose à environ 35° C, la CMI correspond à la concentration d'antibiotique présente dans le premier tube ou puit où il n'y a pas de culture visible [173].

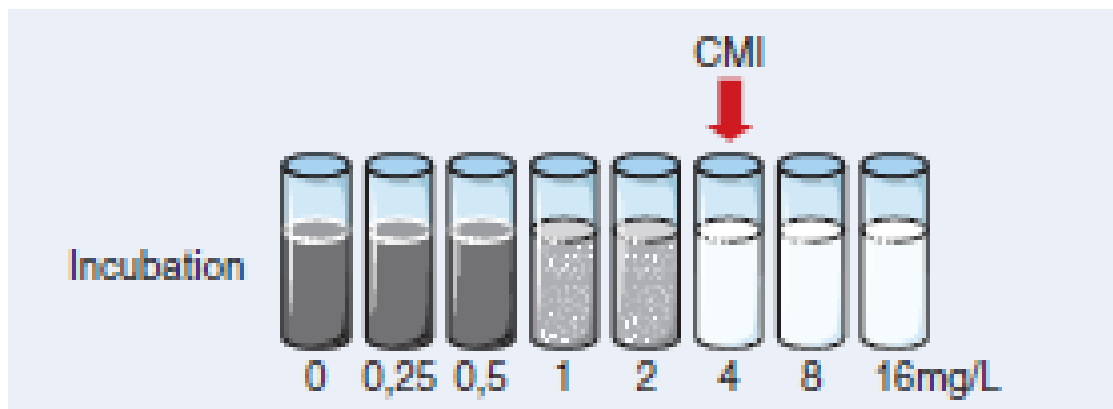


Figure 99: Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide [173]

V.3. Détermination de la CMB

Dans un premier temps, une gamme de concentrations d'antibiotique est réalisée comme pour la détermination de la CMI. Le même jour, une numération de l'inoculum de départ est effectuée en réalisant 4 dilutions successives de 10 en 10 qui seront chacune ensemencées en strie à l'aide d'une anse calibrée sur une gélose MH. Cette gélose est incubée 16 à 24 heures à environ 35° C, puis les colonies seront dénombrées et le nombre d'unités formant colonie (UFC) à la dilution au 1/10 000e correspondra à 0,01 % de l'inoculum de départ (ou à la dilution au 1/1000e soit 0,1 % chez les Anglo-Saxons). Après 16 à 24 heures à environ 35° C, tous les tubes qui ont une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI seront repiqués sur gélose MH en stries à l'aide d'une anse calibrée (même volume que pour la numération de l'inoculum de départ). Après 16 à 24 heures à environ 35° C, les colonies présentes sur chaque strie sont comptées, cette numération étant comparée à la numération de l'inoculum de départ. La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle le nombre de colonies bactériennes est inférieur ou égal au nombre de colonies présentes sur la dilution de l'inoculum de départ au 1/10 000^e (c'est-à-dire $\leq 0,01$ % de l'inoculum de départ) ou au 1/1000^e (soit $\leq 0,1$ % de l'inoculum de départ) chez les Anglo-Saxons [173].

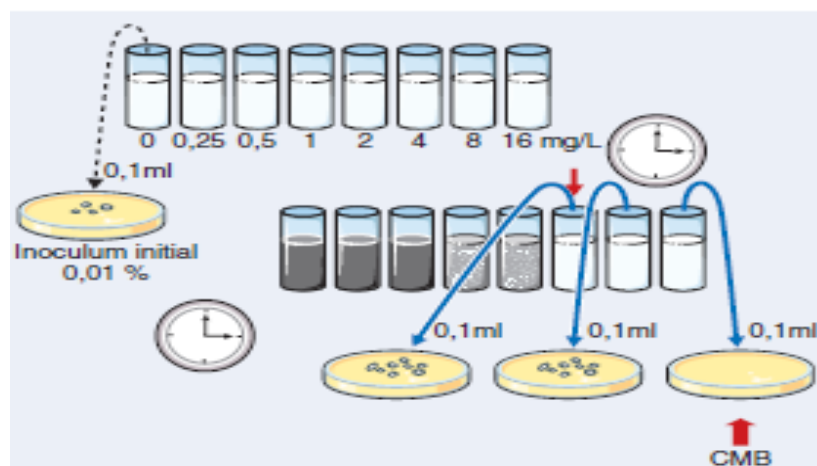


Figure 100: Détermination de la concentration minimale bactéricide en milieu liquide [173]

V.4. Notion de Sensibilité/ Résistance

La résistance des bactéries aux antibiotiques est soit naturelle, soit acquise.

Détermination des catégories S/I/R

Les valeurs critiques définies pour les concentrations et les diamètres des zones d'inhibition, ainsi que les recommandations spécifiques à certaines espèces ou à certains groupes d'antibiotiques sont publiées dans un communiqué annuel par le CA-SFM.

Deuxieme partie : Etude biologique des molécules isolées

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP).

Les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION BIOLOGIQUES DES EXTRAITS ET CEUX DES MOLECULES ISOLEES DE *MORINDA GEMINATA* DC

I. Résultats antibactériens des extraits

Après un an de stockage de nos extraits, l'activité antimicrobienne des différents extraits n'a pas été détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Les études antérieures des activités antimicrobiennes de *Morinda geminata* DC ont été menées sur des extraits des racines [23], des écorces[129] et des feuilles [128]. Malgré des activités antibactériennes mises en évidence, aucun composé (antibactérien) n'a été caractérisé à partir des organes de *Morinda geminata*. Par ailleurs cette étude ne présente pas une activité antimicrobiennes des extraits des racines, écorces et feuilles. Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés dans la littérature. Cela peut être dû à la durée de stockage de nos extraits. En revanche, nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par A. le Grand où les extraits de feuilles de *Morinda* n'ont pas d'activité sur les *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus niger* [130].

II. Résultats antibactériens (CMI et CMB) des composés isolés

L'activité antimicrobienne des composés isolés et mélange de composés est détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Il s'agit d'un test qui permet d'identifier les fractions qui présentent une activité antimicrobienne. *Staphylococcus aureus* est le plus sensible avec les composés isolés du *Morinda geminata* DC. Les diamètres d'inhibition sont présentés dans le tableau 20.

Tableau 20: Diamètre d'inhibition des composés isolés (5 mg/mL)

composés	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
SBMg1RC	14	-
SBMg2RC	16	-
SBMg9-2	14	-
SBMg10AC	17	-
SBMg16AC	14	-
SBMg17AC	10	13
SBMg3ET	09	-
SBMg6ET	13	-
SBMg7ET	19	-
SBMg11ET	10	-
SBMg12FAC	13	-

Parmi les deux souches étudiées, *Staphylococcus aureus* est le plus sensible avec les composés isolés du *Morinda geminata* DC avec un diamètre moyen compris entre 13 et 19 mm.

Deuxieme partie : Etude biologique des molécules isolées

Cependant on note quand même une très faible résistance à certains composés (SBMg3ET et SBMg11ET) avec une petite zone d'inhibition (soit un diamètre inférieur ou égale à 10). Par contre *Escherichia coli* s'est montré résistant à ces composés en dehors du composé SBMg17AC qui l'inhibe avec un diamètre de 13 mm.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice et la la concentration minimale bactéricide de chaque composé sur différents micro-organismes a été faite par la méthode en milieu liquide. Les valeurs des CMI et des CMB sont consignées dans le Tableau 21.

Tableau 21: Concentration minimale inhibitrice et concentration minimale bactéricide des composés isolés

Composés	CMI (µg/mL)		CMB (µg/mL)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
SBMg1RC	156	-	312	-
SBMg2RC	312	-	312	-
SBMg10AC	156	-	312	-
SBMg17AC	625	625	625	625
SBMg3ET	ND	ND	ND	ND
SBMg6ET	ND	ND	ND	ND
SBMg7ET	39	-	78	-
SBMg11ET	156	-	312	-
SBMg12F	1250	-	2500	-

Le rapport entre la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de chaque composé est inférieur à 32. Donc on peut conclure que ces composés sont des bactéricides. Nous notons aussi que la fraction SBMg7ET est le plus sensible avec une CMI de 39 µg/mL et une CMB de 78 µg/mL. Quant à SBMg17AC le CMI = CMB pour les deux souches. Par contre la sensibilité du composé SBMg12F n'est pas significative. La CMI et CMB des composés SBMg3ET et SBMg6ET n'ont pas été déterminées car leur rendement est faible.

Le nordamnanthal (**SBMg1RC**) et le damnacanthol (**SBMg2RC**) isolés dans *Morinda elliptica* ont montré une forte activité antimicrobienne lors de tests sur une bactérie et trois champignons. Seulement le damnacanthol étaient actifs contre *P. aeruginosa* avec une valeur de 10 mg / disque [89].

Les travaux de **L.R. Comini** et *al* ont montré que le damnacanthol et le damnacanthol isolés de *Heterophyllaea pustulata* présentent des activités antimicrobiennes sur *S. aureus* respectivement 32-64 µg/mL et > 256 µg/mL [177]. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés.

Deuxieme partie : Etude biologique des molécules isolées

Par ailleurs nos résultats ne corrélient pas avec ceux de **Xiang** (2008) démontrant que le damnacanthol n'a pas d'effet contre *S. aureus* et présente une activité faible contre *E. coli* à 13,3 µg/disc [55].

Les composés **SBMg17AC** (antracene-9,10-dione) et **SBMg12F** (acide ursolique) n'ont pas fait l'objet d'étude antimicrobienne à notre connaissance. Nous rapportons ici la première étude antibactérienne de ces composés. Parmi ces derniers, la meilleure activité a été enregistrée avec le **SBMg17AC** contre *S. aureus* et *E.oli*. Avec une concentration de 625 µg/mL, il est bactéricide contre les souches testées (Tableau 21). **SMBg12F** se présente avec la plus faible activité (1250µg/mL).

Les résultats obtenus et ceux trouvés dans la littérature des composés antimicrobiens synthétisés par *Morinda geminata* ont permis de justifier l'utilisation traditionnelle de cette plante par les populations locales pour traiter divers types d'infections microbiennes. *Morinda geminata* est une plante qui renferme des composés antimicrobiens.

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTAUX RELATIFS A L'ETUDE BIOLOGIQUE

La progression de la multi-résistance et l'absence de réelles perspectives de découverte de nouveaux antibiotiques dans les années à venir, nous ont conduit à étudier l'activité antibactérienne d'extrait de plante sur la croissance *in-vitro* de souches bactériennes.

Pour atteindre ces objectifs, nous allons utiliser les méthodes de la diffusion en milieu gélosé et en milieu liquide pour le test de la sensibilité et la détermination de la CMI et de la CMB. Ces tests seront effectués avec deux souches de référence.

I. Matériel:

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de composés isolés des extraits de racines et de feuilles de *Morinda geminata*. Cette plante a été récoltée dans la commune de Mlomp/Bignona en octobre 2016. Ces différentes parties ont été lavées et séchées à l'abri du soleil et de l'humidité ensuite broyées. La poudre obtenue est humectée dans des solvants organiques différents par gradient de polarité pendant 24 h puis filtrée et évaporée à sec. Le produit brut est fractionné à l'aide d'une colonne chromatographique.

I.2. Matériel bactérien

Constitué de deux souches de référence

Tableau 22: Profil des bactéries testées

Souches	Profil	Origines
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Sensible	référence
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Faible production de β -lactamase	référence

I.3. Milieux de Culture

Milieu de culture MH-gélose prêt à l'emploi

Milieu de culture MH-bouillon prêt à l'emploi

I.4. Matériels du laboratoire

Boîtes de pétri

Pipettes pasteur

Micropipettes

Embouts pour micropipettes

Tubes à essai
Double décimètre
Lame et lamelles
Bec Bunsen
Bouillon MH
Etuve
Gélose MH
Eau physiologique

II. Méthodes

II.1. Préparation de l'extrait végétal

10 mg du produit ont été solubilisés avec 2,5% de DMSO dans un volume de 4 mL pour une concentration de 2500 µg/mL.

II.2. Étude de l'activité antibactérienne en milieu solide

II.2.1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture visible du prélèvement, réaliser une suspension bactérienne en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de *McFarland*, ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/mL pour *Escherichia coli*. Pour ce faire, prélever plusieurs colonies de même morphologie (si possible) afin d'éviter de sélectionner un variant atypique. Mettre ces colonies en suspension dans de l'eau physiologique (solution salée d'environ 0.9% de NaCl) avec une öse stérile ou un écouvillon en coton.

La suspension bactérienne est standardisée à l'aide du témoin 0,5 *McFarland*. Pour ajuster la densité bactérienne au tube 0,5 *McFarland*, ajouter soit de l'eau physiologique soit les bactéries [178].

II.2.2. Test de sensibilité

La sensibilité des souches aux produits est réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé. Les milieux de Mueller Hinton sont ensemencés par écouvillonnage [178]. A l'aide d'un emporte-pièce stérile, des puits d'environ 6 mm de diamètre seront effectués dans la gélose. Chaque puits a reçu 80 µl de la substance à tester à la concentration 5 mg/mL. Après 30 min de diffusion à la température du laboratoire, les boîtes de Pétri sont incubées à 37° C pendant 18 à 24 h. L'apparition ou non d'une zone d'inhibition sera observée [179].

II.3. Étude de l'activité antibactérienne en milieu liquide

II.3.1. Préparation de l'inoculum

Le bouillon MH est employé lors de la méthode de dilution en milieu liquide pour les bactéries autres que celles à croissance lente selon la norme ISO 20776-1, 2006 [178].

L'inoculum bactérien sera préparé à partir de colonies de moins de 24 h en bouillon Mueller Hinton (BMH). Une colonie isolée de la culture bactérienne sera prélevée à l'aide d'une anse de platine et homogénéisée dans 10 mL du bouillon puis incubé pendant 3 à 5 h à 37° C pour avoir une pré-culture. Un volume de 0,01 mL ou 0,1 mL ou 1 mL sera prélevé respectivement pour *Pseudomonas*, les entérobactéries et les Staphylocoques et sera ajouté à 10ml de chaque BMH stérile. Cette suspension bactérienne réalisée est évaluée à environ 10⁶ bactéries/mL [180].

II.3.2. Numération de l'inoculum

La numération de l'inoculum sera réalisée par une dilution au 10ème à partir de l'inoculum pur. On aura obtenu 4 dilutions à 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴. Ces différentes dilutions ainsi que l'inoculum pur seront ensemencés à l'aide d'une anse calibrée de 10 µl par stries de 5 cm de long sur une gélose Mueller Hinton puis incubés à 37° C pendant 24h. Cette préparation constituera la boîte A [180].

II.3.3. Inoculation

Dans une série de huit tubes à hémolyse numérotées de C1 à C8, on a introduit 1mL de l'inoculum pur. Ensuite, on a ajouté dans les tubes, 1mL d'extrait végétal selon la gamme de concentration préparée. Cette répartition d'extrait végétal a été faite de sorte que 1mL d'extrait végétal de 2,5 mg/mL soit transféré dans le tube C1, le tube C2 a reçu 1 mL de 1,25 mg/mL ainsi de suite jusqu'au tube C7 qui a reçu 1mL de la solution à 3,1 mg/mL. Le tube C8 a reçu en lieu et place de l'extrait végétal, 1 mL de BMH stérile qui a servi de témoin de croissance. Du fait de la dilution volume/volume ainsi réalisée, la concentration dans les tubes a été réduite de moitié. Ces tubes ont été incubés à 37° C pendant 24 h.

II.3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des composés pour les bactéries, le double dosage de microdilution en série est utilisé. Les concentrations sont allant de 2500 µg/mL à 19 µg/mL. Les composés testés ont été ajoutés au milieu de bouillon Mueller-Hinton

stérile pour les bactéries. Les valeurs de CMI ont été prises comme la plus faible concentration de produit qui a inhibé la croissance de l'organisme après 24 h d'incubation à 37° C.

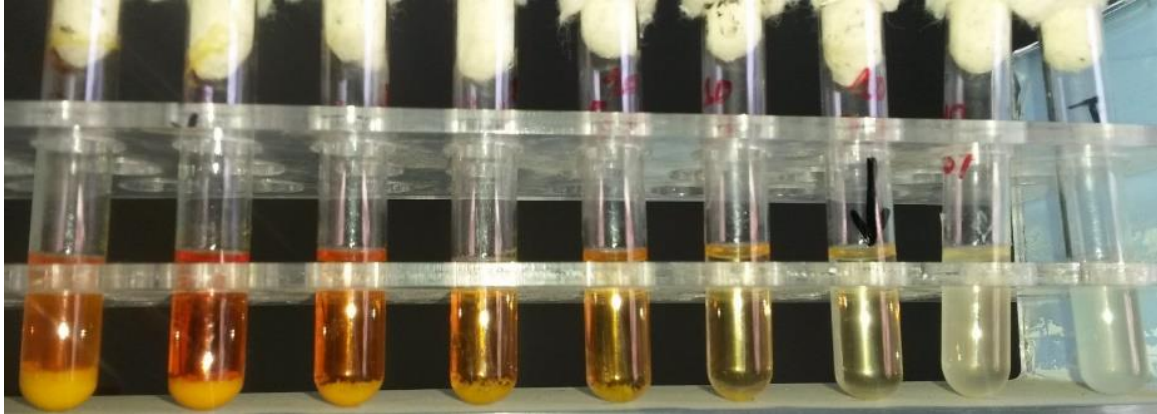


Figure 101: Détermination de la CMI en milieu liquide (Photo de O. SAMBOU 2017)

II.3.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration bactéricide minimale (CMB) a été déterminée par sous-culture du tube avec inhibition dans une plaque de gélose. La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laissera au plus 0,01% de germes survivants. A l'aide d'une anse calibrée à 10 µl, les contenus des tubes dans lesquels aucun trouble n'a été observé seront prélevés et ensemencés sur une gélose Mueller-Hinton en commençant par le tube de la CMI. L'ensemencement est fait par stries parallèles de 5 cm de long à la surface de la gélose. Après 24 h d'incubation à l'étuve à 37 °C, le nombre de colonies sur les stries a été comparé à celles de la boîte de numération de l'inoculum. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de germes présents sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10⁻⁴ correspondra à la CMB [180].

III. Conclusion partielle

Le renforcement de l'arsenal des antimicrobiens a motivé notre étude. L'activité antimicrobienne des composés isolés dans les extraits a permis de révéler que *Morinda geminata* est une source de composés antimicrobiens. Les fractions composées de mélanges de produits (SBMg10AC et SBMg7ET) ont présenté une meilleure zone d'inhibition (respectivement 17 et 19 mm). Le diamètre d'inhibition des composés isolés et caractérisés est compris entre 9 et 16 mm contre les *Staphylococcus aureus*. Seule l'antraène-9,10-dione (SBMg17AC) a inhibé les deux souches avec une CMI égale à la CMB (625 µg/mL).

Conclusion

La flore sénégalaise possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle. Parmi elles, deux plantes ont fait l'objet d'une étude phytochimique approfondie dans ce document. Cette étude s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche d'équipe du laboratoire. L'objectif est de mettre en valeur les plantes médicinales en chimie organique par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs.

En effet, la détermination de la composition chimique des extraits végétaux, l'isolement et l'identification des composés existants dans les extraits ont nécessité l'utilisation de méthodes spectroscopiques. Les résultats de l'étude phytochimique des deux plantes (*Morinda geminata* et *Icacina oliviformis*) ont été présentés.

Le screening phytochimique mené sur l'espèce *Morinda geminata* a révélé: dans la racine des anthraquinones en quantité élevée, des alcaloïdes, des traces de tannins, des polyphénols, des stérols et terpènes et des Saponines, dans l'écorce des anthraquinones, des traces de flavonoïdes, des polyphénols, des stérols et terpènes et des Saponines et dans la feuille des stérols et terpènes, des Saponines en abondance, des traces de tannins et polyphénols.

Au niveau de la graine de *Icacina oliviformis* la présence de tannins, polyphénols, stéroles et terpènes et saponines a été notée.

La mise en place des techniques chromatographiques de fractionnement des extraits a conduit à l'isolement et l'identification: de composés anthracéniques (Nordamnacanthal, damnacanthol, lucidin- ω -ethyl ether, 2-hydroxy-1,5-diméthylanthraquinone, anthraquinone (isolés dans *Morinda geminata*)), deux composés terpéniques (acide ursolique (isolé dans *Morinda geminata*) et β -sitostérol- β -D-glucoside (isolé dans *Icacina oliviformis*)) et le saccharose (isolé dans les deux plantes).

Malgré les résultats du screening phytochimique montrant la présence d'alcaloïdes, de tannins et flavonoïdes dans certains extraits aucun composé de ces familles n'a été isolé lors de cette étude.

Nous avons démontré que les composés isolés dans l'espèce *Morinda geminata* ont des activités antibactériennes; d'une part en déterminant le diamètre d'inhibition par la méthode de diffusion et d'autre part en déterminant la CMI et CMB par la méthode de dilution. La fraction SBMg7ET (mélange de deux produits non identifiés) a présenté une meilleure inhibition à une concentration de 39 $\mu\text{g/mL}$ contre *Staphylococcus aureus*. Le nordamnacanthal et le lucidin- ω -ethyl ether ont présenté une meilleure inhibition à une concentration de 156 $\mu\text{g/mL}$ contre *Staphylococcus aureus* parmi les composés identifiés. Seule l'anthracène-9,10-dione a

inhibé les deux souches avec une CMI égale à la CMB (625 µg/mL). Ces composés (anthraquinones) ont été également signalés dans la littérature qu'ils ont des propriétés biologiques.

Cette étude a permis de valoriser les activités décrites sur cette plante car, elle vient de confirmer les propriétés ethnopharmacologiques décrites par son utilisation en médecine traditionnelle. Ce travail a été sanctionné par un article international indexé et abstracté: *Mediterranean Journal of Chemistry*, **2017**, 6(5), 191-195, <http://dx.doi.org/10.13171/mjc65/01710131601>.

Au terme de l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons proposer quelques perspectives :

Afin de compléter ce travail, une purification des fractions polaires, devrait être réalisée.

Il serait intéressant de poursuivre l'évaluation des activités biologiques des composés isolés sur d'autres souches bactériennes.

Des tests biologiques antipaludiques devront être réalisés pour les différents métabolites secondaires isolés.

Par ailleurs, une fois les activités biologiques des composés seront connues, il serait intéressant :

- D'étudier la toxicité des composés isolés
- De développer des voies de synthèse ou d'hémi-synthèse afin d'obtenir une quantité importante de principes actifs
- De faire des couplages avec d'autres composés pour augmenter l'efficacité de leurs activités biologiques.

Bibliographie

- [1] OMS, « Promotion du rôle de la médecine traditionnelle dans le système de santé », *Bureau Régional de l'Afrique Hararé*, **2001**, 19.
- [2] D. J. Newman, G. M. Cragg, et K. M. Snader, « The influence of natural products upon drug discovery », *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, 17 (3), 215–234.
- [3] J. B. Calixto, « Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view », *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 100, (1), 131–134.
- [4] S. Ranasinghe, R. Ansumana, J. M. Lamin, A. S. Bockarie, U. Bangura, J. A. Stenger, K. S. Jacobsen, « Herbs and herbal combinations used to treat suspected malaria in Bo, Sierra Leone », *J. Ethnopharmacol.*, **2015**, 166, 200-204.
- [5] K. Kamiya, « New Anthraquinone and Iridoid from the Fruits of *Morinda citrifolia* », *Chem Pharm Bull*, **2005**, 53 (12), 1597-1599.
- [6] M. N'diaye, W. Diatta, G.Y. Sy, A.D. Fall, B. Faye, E. Bassene, « Activité antihyperglycémiant de l'extrait éthanolique de feuilles d'*Icacina senegalensis* juss (Icacinaceae) », *Médecine Afr. Noire*, **2008** (5509), 441-445.
- [7] S. O. Sarr, S. Perrotey, I. Fall, S. Ennaahar, M. Zhao, Y. M. Diop, E. Candolfi and E. Marchioni, « *Icacina senegalensis* (Icacinaceae), traditionally used for the treatment of malaria, inhibits in vitro *Plasmodium falciparum* growth without host cell toxicity », *Malar. J.* **2011**, 10 (1), 85.
- [8] A. Manga, A. Gassama, Y. G. Sy, E. Bassene, et C. Lavaud, « Structural determination of new flavones C-glycosides and trans (S, E)-(-) clovamide isolated *Icacina senegalensis* Juss leaves (Icacinaceae) », *J Soc Ouest-Afr Chim*, **2013**, 35, 15–27.
- [9] H. Soicke, K. Görler, et H. Waring, « Terpenic constituents from *Icacina senegalensis* », *Planta Med.*, **1991**, 57 (01), 86–87.
- [10] E. Robbrecht, « Tropical woody Rubiaceae », *Opera Bot. Belg.* **1988**, 1, 1-271.
- [11] Chen Tao, « Rubiaceae », *Flora_of_China*, **2014**, 19, 57-368.
- [12] B. Boolamou, A. Lapo, K. Camara, M. Assane, E. Bassene, et A. Samb, « Activité anti-inflammatoire du décocté aqueux des écorces de racines de *Morinda geminata*; DC (Rubiaceae) », *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **2015**, 8 (4), 1871.
- [13] J. Berhaut, « Flore illustrée du Sénégal », *Clairafrique, Dakar, Thome I-IX.*, **1988**. 1770.
- [14] A. Chevalier, « Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale », *Rev. Int. Bot. Appliquée Agric. Trop.*, **1947**, 27 (299), 407-428.

- [15] W. Phakhodee, « Distribution of naturally occurring anthraquinones, iridoids and flavonoids from *Morinda* genus: chemistry and biological activity », *Walailak J. Sci. Technol. WJST*, **2012**, 9 (3), 173–188.
- [16] P. Roland, « Le Caractère magique originel des haies vives et de leurs constituants (Europe et Afrique occidentale) », *J. Agric. Trop. Bot. Appliquée*, **1965**, 12 (6-8) 253-291.
- [17] P. B. Laurent Granjon, « Forêts de failles et forêts galeries au sud du Mali : deux voies pour la pérennité des refuges guinéens en zone soudanienne ». **2008**.
- [18] M. I. C. Aikins, H. Pickering, et B. M. Greenwood, « Attitudes to malaria, traditional practices and bednets (mosquito nets) as vector control measures: a comparative », *J. Trop. Med. Hyg.*, **1994**, 97, 81–86.
- [19] C. D. Diatta, M. Gueye, et L. E. Akpo, « Les plantes médicinales utilisées contre les dermatoses dans la pharmacopée Baïnouk de Djibonker, région de Ziguinchor (Sénégal). », *J. Appl. Biosci.*, **2013**, 70, (1), 5599–5607.
- [20] P. M. Abreu, E. S. Martins, O. Kayser, K. U. Bindeseil, K. Siems, A. Seemann, J. Frevert., « Antimicrobial, antitumor and antileishmania screening », *Phytomedicine*, **1999**, 6 (3), 187–195.
- [21] M. A. Diniz « *Morinda geminata* DC (Rubiaceae) », *Flore illustrée du Sénégal*, **1991**
- [22] J. Kerharo, J.G. Adam, « La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques », *Ed. Vigot Frères*, **1974**, 1012.
- [23] N. Boolamou, « Etude phytochimique et pharmacologique des extraits d'écorces de racines de *morinda geminata* dc rubiaceae, de la pharmacopée traditionnelle de la république de guinée », UCAD, Dakar, **2014**.
- [24] B. Vasileva, « Plantes médicinales de Guinée », *Conakry République Guinée Mosc. Univ. Mosc. Russ.*, **1969**.
- [25] B. Oliver-Bever, « Medicinal plants in tropical West Africa III. Anti-infection therapy with higher plants », *J. Ethnopharmacol.*, **1983** 9 (1), 1–83.
- [26] A. D. Pawlus, B.-N. Su, W. J. Keller, et A. D. Kinghorn, « An Anthraquinone with Potent Quinone Reductase-Inducing Activity and Other Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) », *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68 (12), 1720–1722.
- [27] T. Ruksilp, J. Sichaem, S. Khumkratok, P. Siripong, et S. Tip-pyang, « Anthraquinones and an iridoid glycoside from the roots of *Morinda pandurifolia* », *Biochem. Syst. Ecol.*, **2011**, 39 (4), 888–892.

- [28] Y. Deng, Y.-W. Chin, H. Chai, W. J. Keller, et A. D. Kinghorn, « Anthraquinones with Quinone Reductase-Inducing Activity and Benzophenones from *Morinda citrifolia* (Noni) Roots », *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70 (12), 2049-2052.
- [29] L. N. Jasril, L. Y. Mooi, M. A. Abdullah, M. A. Sukari, et A. M. Ali, « Antitumor promoting and antioxidant activities of anthraquinones isolated from the cell suspension culture of *Morinda elliptica* », *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol*, **2003**, 11 (1), 3–7.
- [30] L. Lv, H. Chen, C.-T. Ho, et S. Sang, « Chemical components of the roots of Noni (*Morinda citrifolia*) and their cytotoxic effects », *Fitoterapia*, **2011**, 82 (4), 704-708.
- [31] M.-Y. Wang, B. West C. Jensen, « *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research », *Acta Pharmacol. Sin.*, **2002**, 23 (12) 1127–1141.
- [32] Alagesaboopathi, « Ethnomedicinal plants and their utilization by villagers in kumaragiri hills of salem district of tamilnadu, india », *Afr J Tradit.*, **2009**, 6 (3), 222-227.
- [33] K. Cimanga T. De Bruyne, J. P. Hu, P. Cos, S. Apers, L. Pietons, « Constituents from *Morinda morindoides* leaves as inhibitors of xanthine oxidase and scavengers of superoxide anions », *Pharm. Pharmacol. Commun.*, **1999**, 5 (6), 419–424.
- [34] R. R. B. Leakey, « Useful Plants of Ghana: West African uses of wild and cultivated plants. By AbbiwD. K.. London: Intermediate Technology Publications **1990**, 337, paperback\pounds 9.95, hardback\pounds 30.00. », *Exp. Agric.*, **1991**, 27 (3), 341–341.
- [35] A. Hirazumi et E. Furusawa, « An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia*(noni) with antitumour activity », *Phytother. Res.*, **1999**, 13 (5) 380–387.
- [36] M.-Y. Wang, B.J. West, C.J. Jensen, D. Nowiccki, C. Su, A. K. Polu, G. E. Anderson., « *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research », *Acta Pharmacol. Sin.*, **2002**, 23 (12), 1127–1141.
- [37] A. R. Dixon, H. McMillen, et N. L. Etkin, « Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) », *Econ. Bot.*, **1999**, 53, (1), 51–68.
- [38] S. krief, « Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de », muséum national d'histoire naturelle, **2003**.

- [39] F. Bourgaud, « Les questions et travaux de recherche nécessaires au développement de la filière; exemple de l'apport des sciences cognitives à la production/valorisation des métabolites secondaires d'intérêt », **2013**.
- [40] O. Potterat et M. Hamburger, « *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit - Phytochemistry, Pharmacology, Safety », *Planta Med.*, **2007**, 73 (3), 191-199.
- [41] A. D. Pawlus et A. D. Kinghorn, « Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni)* », *J. Pharm. Pharmacol.*, **2007**, 59 (12), 1587-1609.
- [42] R. S. RanvirGD, B. V. Ballurkar, et G. R. Gangane, « Physicochemical and phytochemical evaluations on noni (*Morinda citrifolia* linn.) Fruit powder and extracts », *Adv Anim Vet Sci*, **2017**, 5 (4), 160–166.
- [43] A. de Athayde Moncorvo Collado, F. G. Dupuy, R. D. Morero, et C. Minahk, « Cholesterol induces surface localization of polyphenols in model membranes thus enhancing vesicle stability against lysozyme, but reduces protection of distant double bonds from reactive-oxygen species », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **2016**, 1858 (7), 1479-1487.
- [44] A. Crozier, I. B. Jaganath, et M. N. Clifford, « Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health », *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, 26 (8), 1001–1043.
- [45] V. Mohanlall, P. Steenkamp and B. Odhav, « Isolation and characterization of anthraquinone derivatives from *Ceratotheca triloba* (Bernh.) » *J. Med. Plants Res.*, **2011**, 5 (14), 3132-3141.
- [46] P. Aobchey, S. Sriyam, W. Praharnriporab, S. Lhieochaiphant, et S. Phutrakul, « Production of red pigment from the root of *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. by root cell culture », *CMU J*, **2002**, 1, 66–78.
- [47] R. A. Muzychkina, « Natural Anthraquinones, Biological and Physicochemical Properties », *Phasis Mosc.*, **1998**.
- [48] M. Yoshikawa, S. Yamaguchi, H. Nishisaka, J. Yamahara, et N. Murakami, « Chemical constituents of Chinese natural medicine, *Morindae Radix*, the dried roots of *Morinda officinalis* How: structures of morindolide and morofficinaloside », *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1995**, 43 (9), 1462–1465.
- [49] A. R. Burnett et R. H. Thomson, « Anthraquinones in *Morinda umbellata* L », *Phytochemistry*, **1968**, 7 (8), 1421–1422.

- [50] Y.-B. Wu, C. J. Zheng, L. P. Qin, L. Sun, T. Han., « Antiosteoporotic activity of anthraquinones from *Morinda officinalis* on osteoblasts and osteoclasts », *Molecules*, **2009**, 14 (1) 573–583.
- [51] P. Chang et K.-H. Lee, « Cytotoxic antileukemic anthraquinones from *Morinda parvifolia* », *Phytochemistry*, **1984**, 23 (8), 1733–1736.
- [52] N. H. Ismail, A. M. Ali, N. Aimi, M. Kitajima, H. Takayama, et N. H. Lajis, « Anthraquinones from *Morinda elliptica* », *Phytochemistry*, **1997**, 45 (8), 1723–1725.
- [53] A. D. Pawlus, B.-N. Su, W. J. Keller, et A. D. Kinghorn, « An Anthraquinone with Potent Quinone Reductase-Inducing Activity and Other Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) », *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68 (12) 1720–1722.
- [54] K. Kamiya, W. Hamabe, S. Tokuyama, K. Hirano, T. Satake, Y. K. Yonezama, H. Yoshida, « Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B-and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation », *Food Chem.*, **2010**, 118, (3), 725–730.
- [55] W. Xiang, Q.-S. Song, H.-J. Zhang, et S.-P. Guo, « Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia* », *Fitoterapia*, **2008**, 79 (7), 501–504.
- [56] Leistner E, « Biosynthesis of Plant Quinones », *Conn EE Ed Biochem. Plants Acad. Press Lond.*, **1981**, 7, 403-423.
- [57] KH Neumann, W. Barz, E. Reinhard, E. Prim « Biosynthesis of chorismate-derived quinones in plant cell cultures. », *Second. Metab. Plant Cell Cult. Springer-Verl. Berl. N. Y.*, **1985**, 215-224.
- [58] E. Dussossoy, P. Brat, E. Bony, F. Boudard, P. Poucheret, C. Merto, J. Giamis, A. Michel, « Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.) », *J. Ethnopharmacol.*, **2011**, 133 (1), 108-115.
- [59] R. Ikeda, M. Wada, T. Nishigaki, et K. Nakashima, « Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species », *Food Chem.*, **2009**, 113 (4), 1169-1172.
- [60] R. K. Cimanga, K. Kambu, L. Tona, N. Hermons, S. Apers, J. Totté, L. Pieters, A. J. Ylietinc, « Cytotoxicity and in vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* to *Morinda morindoides* leaf extracts and its isolated constituents », *J. Ethnopharmacol*, **2006**, 107 (1), 83-90.
- [61] T. Akihisa, K. Matsumoto, H. Tokuda, K. Yasukawa, K. I. Seino, K. Nakamoto, H? Kuninago, T. Suzuki, Y. Kimura, « Anti-inflammatory and potential cancer

- chemopreventive constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) », *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70 (5), 754–757.
- [62] B.-N. Su, A. D. Pawlus, H.-A. Jung, W. J. Keller, J. L. McLaughlin, et A. D. Kinghorn, « Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity », *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68 (4), 592-595.
- [63] S. Sang, X. Cheng, N. Zhu, R. E. Stark, V. Badmaev, G. Ghai, R. T. Rosen, C. T. Ho, « Flavonol Glycosides and Novel Iridoid Glycoside from the Leaves of *Morinda citrifolia* », *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (9), 4478-4481.
- [64] W. Heller and G. Forkmann, « Biosynthesis of Flavonoids », *J B Harb.*, **1993**, 499-535.
- [65] G. P. Moss, « Nomenclature of lignans and neolignans », *Appl. Chem.*, **2000**, 72 (8) 1493–1523.
- [66] C. F. Lin, C. L. Ni, Y. L. Huang, S. J. Sheu, et C. C. Chen, « Lignans and anthraquinones from the fruits of *Morinda citrifolia* », *Nat. Prod. Res.*, **2007**, 21 (13), 1199-1204.
- [67] K. Kamiya, Y. Tanaka, H. Endang, M. Umar, et T. Satake, « Chemical Constituents of *Morinda citrifolia* Fruits Inhibit Copper-Induced Low-Density Lipoprotein Oxidation », *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52 (19), 5843-5848.
- [68] S. B. Mahato, A. K. Nandy, et G. Roy, « Triterpenoids », *Phytochemistry*, **1992**, 31 (7), 2199–2249.
- [69] P. Dzubak, M. Hajduch, D. Vydra, A. Hustova, M. Kvasnica, D. Biedermann, L. Markova, M. Urban. J. Sarek, « Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications », *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, 23 (3), 394.
- [70] W. D. Nes et E. Heftmann, « A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components », *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44 (4), 377–400.
- [71] GD. Brown, « The biosynthesis of steroids and triterpenoids », *Nat Prod Rep*, **1998**, 15 (6), 653-696.
- [72] M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, « Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate », *Biochemistry (Mosc.)*, **1993**, 295 (2), 517-24.
- [73] T. Suga, K. Tange, K. Iccho, T. Hirata, « Biosynthesis of triterpenoids from amino acids in *Pisum sativum*, the distribution of the radioactivity in squalene biosynthesized from radioisotopically labelled L-leucine and L-valine », *Phytochemistry*, **1980**, 19 (1), 67-70.

- [74] MR. Trojanowska, AE. Osbourn, MJ. Daniels, DR. Threlfall, « Biosynthesis of avenacins and phytosterols in roots of *Avena sativa* cv. imagine », *Phytochemistry*, **2000**, 54 (2), 153-64.
- [75] T. Akashi, T. Furuno, T. Takahashi, S. Ayabe, « Biosynthesis of triterpenoids in cultured cells and regenerated and wild plants organs of *Taraxacum officinale* », *Phytochemistry*, **1994** 36 (2), 303-308.
- [76] M. Morita, M. Shibuya, T. Kushiro, K. Masuda, Y. Ebizuka. « Molecular cloning and functional expression of triterpene synthase from pea (*Pisum sativum*). New α -amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase », *Eur J Biochem*, **2000**, 267 (12), 3453-60.
- [77] K. Haralampidis, M. Trojanowska, AE. Osbourn, « Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants », *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **2002**, 75, 31-49.
- [78] S. Sang, G. Liu, K. He, N. Zhu, Z. Dong and Q. Zheng, « New unusual iridoids from the leaves of noni (*Morinda citrifolia* L.) show inhibitory effect on ultraviolet B-induced transcriptional activator protein-1 (AP-1) activity », *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11 (12), 2499-2502.
- [79] S. Lindner, F. Geu-Flores, S. Bräse, N. H. Sherden, et S. E. O'Connor, « Conversion of Substrate Analogs Suggests a Michael Cyclization in Iridoid Biosynthesis », *Chem. Biol.*, **2014**, 21 (11), 1452-1456.
- [80] Z. Hong-Cai, Y. Wang, Y. Chun-Miao, Y. Dong-Hua, C. Ping-Ping, et L. Shu-Min, « Two new saccharide fatty acid esters from the fruit of *Morinda citrifolia* L. and their ABTS radical scavenging activities », *Rec. Nat. Prod.*, **2014**, 8 (1), 25.
- [81] A. A. Sittie, E. lemmich, C. E. Olsen, L. Hviid, A. Kharazmi, « Structure-activity studies: in vitro antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida* », *Planta Med.*, **1999**, 65 (03), 259–261.
- [82] G. Rath, M. Ndonzao, et K. Hostettmann, « Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida* », *Int. J. Pharmacogn.*, **1995**, 33 (2), 107-114.
- [83] C. Younos, A. Rolland, J. Fleurentin, M.-C. Lanhers, R. Misslin, et F. Mortier, « Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia* », *Planta Med.*, **1990**, 56 (05), 430–434.
- [84] K. Koumaglo, M. Gbeassor, O. Nikabu, C. De Souza, et W. Werner, « Effects of three compounds extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum* », *Planta Med.*, **1992**, 58 (06), 533–534.

- [85] Y. B. Tripathi, M. Sharma, et M. Manickam, « Rubiadin, a new antioxidant from *Rubia cordifolia* », *Indian J. Biochem. Biophys.*, **1997**, 34 (3), 302-306.
- [86] P. Chang et C. Chen, « Isolation and characterization of antitumor anthraquinones from *Morinda umbellata* », *Chin Pharm JTaipei*, **1995**, 47 347–353.
- [87] N. H. Ismail, A. M. Ali, N. Aimi, M. Kitajima, H. Takayama, et N. H. Lajis, « Anthraquinones from *Morinda elliptica* », *Phytochemistry*, **1997**, 45 (8), 1723–1725.
- [88] K. Kamiya, W. Hamabe, S. Harada, R. Murakami, S. Tokuyama, T. Satake, « Chemical Constituents of *Morinda citrifolia* Roots Exhibit Hypoglycemic Effects in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice », *Biol Pharm*, **2008**, 31, 935—938.
- [89] A. M. Ali, N.S. Ismail, M.M. Mackeen, L. S. Yazan, S. M. Mohamed, A.S.H. Ho and N. H. Lajis, « Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elliptica* », *Pharm. Biol.*, **2000**, 38 (4), 298–301.
- [90] W. Xiang, Q.-S. Song, H.-J. Zhang, et S.-P. Guo, « Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia* », *Fitoterapia*, **2008**, 79 (7-8), 501-504.
- [91] N. Manojlovic, « Antimicrobial activity of extract and anthraquinones from *Caloplaca schaeferi* », *The Lichenologist*, **2002**, 34 (1), 83-85.
- [92] B.-S. Park, H-K. Lee, S-E. Lee, X-L. Piao, G. R. Takeoka « Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori* », *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, 105 (1-2), 255-262.
- [93] K. Kanokmedhakul, S. Kanokmedhakul, et R. Phatchana, « Biological activity of Anthraquinones and Triterpenoids from *Prismatomeris fragrans* », *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 100 (3), 284-288.
- [94] J. M. Badr et others, « Antioxidant and antimicrobial constituents of *Crucianella maritima* L », *Nat. Prod. Sci.*, **2008**, 14 (4), 227–232.
- [95] L. N. Jasril, L. Y. Mooi, M. A. Abdullah, M. A. Sukari, et A. M. Ali, « Antitumor promoting and antioxidant activities of anthraquinones isolated from the cell suspension culture of *Morinda elliptica* », *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol*, **2003**, 11 (1), 3–7.
- [96] Y. Hou, S. Cao, P.J. Brodie, M. W. Callmander, F. Ratovason, E. A. Rokotobe, « Antiproliferative and antimalarial anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar forest », *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17 (7), 2871-2876.
- [97] K. Koumaglo, M. Gbeassor, O. Nikabu, C. De Souza, et W. Werner, « Effects of three compounds extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum* », *Planta Med.*, **1992**, 58 (06), 533–534.

- [98] K. C. Fylaktakidou, D. J. Hadjipavlou-Litina, K. E. Litinas, et D. N. Nicolaides, « Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities », *Curr. Pharm. Des.*, **2004**, 10 (30), 3813–3833.
- [99] P. C.-M. Mao, J.-F. Mouscadet, H. Leh, C. Auclair, et L.-Y. Hsu, « Chemical modification of coumarin dimer and HIV-1 integrase inhibitory activity », *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2002**, 50 (12), 1634–1637.
- [100] Y. Miyake, A. Murakami, Y. Sugiyama, M. Isobe, K. Koshimizu, et H. Ohigashi, « Identification of Coumarins from Lemon Fruit (*Citrus limon*) as Inhibitors of in Vitro Tumor Promotion and Superoxide and Nitric Oxide Generation », *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47 (8), 3151-3157.
- [101] K. V. Sashidhara, A. Kumar, M. Kumar, A. Srivastava, et A. Puri, « Synthesis and antihyperlipidemic activity of novel coumarin bisindole derivatives », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20 (22), 6504–6507.
- [102] M. Curini, F. Epifano, F. Maltese, M. C. Marcotullio, S. P. Gonzales, et J. C. Rodriguez, « Synthesis of collinin, an antiviral coumarin », *Aust. J. Chem.*, **2003**, 56 (1), 59–60.
- [103] A. M. El-Agrody, M. S. Abd El-Latif, N. A. El-Hady, A. H. Fakery, et A. H. Bedair, « Heteroaromatization with 4-Hydroxycoumarin Part II: Synthesis of Some New Pyrano [2, 3-d] pyrimidines, [1, 2, 4] triazolo [1, 5-c] pyrimidines and Pyrimido [1, 6-b]-[1, 2, 4] triazine Derivatives », *Molecules*, **2001**, 6 (6), 519–527.
- [104] J. Yu, L. Wang, R. L. Walzem, E. G. Miller, L. M. Pike, et B. S. Patil, « Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins », *J. Agric. Food Chem.*, **2005** (53), 6, 2009–2014.
- [105] M. Campos-Toimil, F. Orallo, L. Santana, et E. Uriarte, « Synthesis and vasorelaxant activity of new coumarin and furocoumarin derivatives », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12 (5), 783–786.
- [106] N. M. Kim, J. Kim, H. Y. Chung, et J. S. Choi, « Isolation of luteolin 7-O-rutinoside and esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts of *Artemisia montana* », *Arch. Pharm. Res.*, **2000**, 23 (3), 237–239.
- [107] F. Depeint, J. M. Gee, G. Williamson, et I. T. Johnson, « Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities », *Proc. Nutr. Soc.*, **2002**, 61 (1), 97–103.
- [108] K. Brusselmans, R. Vrolix, G. Verhoeven, et J. V. Swinnen, « Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase Activity », *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, (7)5636-5645.

- [109] A. R. Tapas, D. M. Sakarkar, et R. B. Kakde, « Flavonoids as nutraceuticals: a review », *Trop. J. Pharm. Res.*, **2008**, 7 (3), 1089–1099.
- [110] H. P. Kim, K. H. Son, H. W. Chang, et S. S. Kang, « Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms », *J. Pharmacol. Sci.*, **2004**, 96 (3), 229–245.
- [111] K. Prasad, « Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone », *Int. J. Angiol.*, **2000**, 9, (04) 220–225.
- [112] M. Masuda, K. Itoh, K. Marata. S. Naruto, A. Uwaya, F. Isami et H. Matsuda, « Inhibitory effects of *Morinda citrifolia* extract and its constituents on melanogenesis in murine B16 melanoma cells », *Biol. Pharm. Bull.*, **2012**, 35 (1), 78–83.
- [113] F. Lamblin, C. Hano, O. Fliniaux, et F. Mesnard, M.-A. Fliniaux, É. Lainé, « Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers », *Med. Sci.*, **2008**, 24 (5), 511-520.
- [114] W.-J. Liu, Y.-J. Chen, D.-N. Chen, Y.-P. Wu, Y.-J. Gao, J. Li, W.-J. Zhong et L. Jiang « A new pair of enantiomeric lignans from the fruits of *Morinda citrifolia* and their absolute configuration », *Nat. Prod. Res.* **2018**, 32, 1-6.
- [115] C. L. Cantrell, S. G. Franzblau, et N. H. Fischer, « Antimycobacterial plant terpenoids », *Planta Med.*, **2001**, 67 (08) 685–694.
- [116] L. P. Sandjo et V. Kuete, « Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa », in *Medicinal Plant Research in Africa*, Elsevier, **2013**, 135-202.
- [117] M. Saleem, « Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene », *Cancer Lett.*, **2009**, 285 (2), 109-115.
- [118] T. Akihisa, K.-I. Sieno, E. Kaneko, K. Watanabe, S. Tochizawa, M. Fukatsu, N. Banna, K. Metori, et Y. Kimura, « Melanogenesis inhibitory activities of iridoid-, hemiterpene-, and fatty acid-glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) », *J. Oleo Sci.*, **2010**, 59 (1), 49–57.
- [119] K. Cimanga, N. Hermans, S. Apers, S. V. Miert, H. V. D. Heuvel, M. Claeys, L. Pieters et A. Vtietinck, « Complement-Inhibiting Iridoids from *Morinda morindoides* », *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66 (1), 97-102.
- [120] S. Tamura, B. K. Kubata, Syamsurizal, S. Itagaki. T. Horii, M. K. Taba et N. Murakami, « New anti-malarial phenylpropanoid conjugated iridoids from *Morinda morindoides* », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20 (5), 1520-1523.

- [121] A. Tauffenberger, A. Vaccaro, A. Aulas, C. V. Velde, et J. A. Parker, « Glucose delays age-dependent proteotoxicity: Glucose is neuroprotective », *Aging Cell*, **2012**, 11 (5), 856-866.
- [122] G. Danaei, C. M. Lawes, S. Vander Hoorn, C. J. Murray, et M. Ezzati, « Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment », *The Lancet*, **2006**, 368 (9548), 1651–1659.
- [123] L. S. Augustin, C. W. C. Kendall, D. J. A. Jenkins, W. C. Willett, A. Astrup. AW. Barclay, « Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An international scientific consensus summit from the international carbohydrate quality consortium (ICQC) », *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **2015**, 25, (9), 795–815.
- [124] M. Heitzmann, C. C. Neto, E. Winiarz et Aj. Vaisberg, « Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of (Rubiaceae) », *Phytochemistry*, **2005**, 66 (1), 5-29.
- [125] K. D. Choudhury, M. D. Choudhury, et M. Baruah, « Antibacterial activity of some plants belonging to the family Rubiaceae: a review », *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. **2012**, 1 (3), 1170–1192.
- [126] R. Usha, S. Sashidharan, et M. Palaniswamy, « Antimicrobial Activity of a Rarely Known Species, *Morinda citrifolia* L. », *Ethnobot. Leaflet*, **2010**, 2010 (3), 7.
- [127] T. M. da Silva Moraes, M. H. de Aroujo, N. R. Bernardes, D. B. de Oliveria et E. B. Lasuns Kaia., « Antimycobacterial activity and alkaloid prospection of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest », *Planta Med.*, **2011**, 77 (09), 964–970.
- [128] J. H. Doughari, « Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn », *Trop. J. Pharm. Res.*, **2006**, 5 (2), 597–603.
- [129] L. Koroma et B. N. Ita, « Phytochemical compounds and antimicrobial activity of three medicinal plants (*Alchornea hirtella*, *Morinda geminata* and *Craterispermum laurinum*) from Sierra », *Afr. J. Biotechnol.*, **2009**, 8, n° 22.
- [130] A. Le Grand, PA. Wondergem, R. Verpoorte, JL. Pousset, « Anti-infectious phytotherapies of the tree savannah of Senegal. », *J Ethnopharm*, **1988**, 22 (1), 25-31.
- [131] EK. Adesogan, « Antimetazoal activity of ethanolic extract of root bark of *Morinda geminata* », *Phytochem*, **1973**, 18 (1), 175-176.

- [132] A. MANGA, « Valorisation médicinale d'une plante des jachères, *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal (Icacinaceae) : études chimiques et pharmacologiques », UCAD, **2013**.
- [133] R. D. Eklu-Natey, A. Balet, et A. M. R. Ahyi, *Pharmacopée africaine: dictionnaire et monographies multilingues du potentiel médicinal des plantes africaines: Afrique de l'Ouest*. Éditions d'en-bas, **2012**.
- [134] J. Berhaut , « Flore illustrée du Sénégal », *Edition Clairafrique Dakar*, **1976**, 334-335.
- [135] J. Kerharo et J. G. Adam, « Plantes médicinales et toxiques des Peul et des Toucouleur du Sénégal », *J. Agric. Trop. Bot. Appliquée*, **1964**, 11 (12) 543-599.
- [136] *Lost Crops of Africa: Volume III: Fruits*. Washington, D.C.: National Academies Press, **2008**.
- [137] G. Akuodor, P. Udia, A. Basse, K. Chilaka, et O. Okezie, « Antihyperglycemic and antihyperlipidemic properties of aqueous root extract of *Icacina senegalensis* in alloxan induced diabetic rats », *J. Acute Dis.*, **2014**, 3 (2), 99-103.
- [138] J. M. Fay, « *Icacina oliviformis* (Icacinaceae): A close look at an underexploited food plant. II. Analyses of Food Products », *Econ. Bot.*, **1991**, 45 (1), 16–26.
- [139] A. Manga, A. Gassama, « Etude pharmacologique de fractions antidiabetique des feuilles d'*icacina oliviformis* (poiret) Raynal », *Médecine Afr. Noire*, **2013**, 60 (12), 508-512.
- [140] A. P. Bidié, B. B. N'guessan, A. F. Yapo, J. D. N'guessan, et A. J. Djaman, « Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. », *Sci. Nat.*, **2011**, 8 (1-2), 1–12.
- [141] M. Akhtar, S. Zareen, S. K. Yeap, W. Y. Ho, K. M. Lo, A. Hasan et N. B. Alithen, « Total Synthesis, Cytotoxic Effects of Damnacanthal, Nordamnacanthal and Related Anthraquinone Analogues », *Molecules*, **2013**, 18 (8), 10042-10055.
- [142] K. Kamiya W. Hamabe, S. Tokuyama, K. Hirano, T. Stake, « Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation », *Food Chem.*, **2010**, 118 (3), 725-730.
- [143] L. N. Jasril, L. Y. Mooi, M. A. Abdullah, M. A. Sukari, et A. M. Ali, « Antitumor promoting and antioxidant activities of anthraquinones isolated from the cell suspension culture of *Morinda elliptica* », *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol*, **2003**, 11 (1), 3–7.
- [144] A. M. Ali, N. Ismail, M. M. Mackeen, L.S. Yazan, S. M. Mohamed, A. S. Ho, « Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elliptica* », *Pharm. Biol.*, **2000**, 38 (4), 298–301.

- [145] L. S. Yazan, N. Ishak, et N. H. Lajis, « BCL-2 was downregulated in G2/M-arrest breast cancer cells MCF-7-treated with Nordamnacanthal », *J Pharm Sci Res*, **2010**, 2, 197–207.
- [146] Z. Zhou, S.-H. Jiang, D.-Y. Zhu, L.-Z. Lin, et G. A. Cordell, « Anthraquinones from *Knoxia valerianoides* », *Phytochemistry*, **1994**, 36 (3), 765–768.
- [147] K. Koumaglo, M. Gbeassor, O. Nikabu, C. De Souza, et W. Werner, « Effects of three compounds extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum* », *Planta Med.*, **1992**, 58 (06), 533–534.
- [148] C. R. Faltynek, J. S. Chroeder, P. Mauvais, D. Miller, S. Wang, D. Murph, « Damnacanthal is a highly potent, selective inhibitor of p56lck tyrosine kinase activity », *Biochemistry (Mosc.)*, **1995**, 34 (38), 12404–12410.
- [149] T. Hiramatsu, M. Imoto, T. Koyano, et K. Umezawa, « Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthal from *Morinda citrifolia* », *Cancer Lett.*, **1993**, 73 (2-3), 161–166.
- [150] E. M. Palsson, M. Popoff, M. Thelestam, et L. A. O'Neill, « Divergent roles for Ras and Rap in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase by interleukin-1 », *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275 (11), 7818–7825.
- [151] M. Kamata, R. P. Wu, D. S. An, J. P. Saxe, R. Damoiseaux, M. E. Phelps, J. Huang et I. S. Y. Chen, « Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 348 (3), 1101-1106.
- [152] F.-L. Lin, J.-L. Hsu, C.-H. Chou, W.-J. Wu, C.-I. Chang, et H.-J. Liu, « Activation of p38 MAPK by damnacanthal mediates apoptosis in SKHep 1 cells through the DR5/TRAIL and TNFR1/TNF- α and p53 pathways », *Eur. J. Pharmacol.*, **2011**, 650 (1), 120-129.
- [153] Z. Zhou, S.-H. Jiang, D.-Y. Zhu, L.-Z. Lin, et G. A. Cordell, « Anthraquinones from *Knoxia valerianoides* », *Phytochemistry*, **1994**, 36 (3), 765–768.
- [154] D. Martins, L. L. Carrinon, D. F. Ramos, K. S. Salomé, P. E. A. da Silva, A. Bansan and Nunez., « Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) », *BioMed Res. Int.*, **2013**, 2013, 1-7.
- [155] O. Potterat et M. Hamburger, « *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit - Phytochemistry, Pharmacology, Safety », *Planta Med.*, **2007**, 73 (3), 191-199.

- [156] L. Hassan, A. Pinon, Y. Limami, J. Seeman, C. F. Dugas, F. Martin, B. Badran, « Resistance to ursolic acid-induced apoptosis through involvement of melanogenesis and COX-2/PGE2 pathways in human M4Beu melanoma cancer cells », *Exp. Cell Res.*, **2016**, 345 (1), 60-69.
- [157] N. Bakhtiari, E. Moslemee-Jalalvand, et J. Kazemi, « Ursolic acid: a versatile triterpenoid compound in regulating the aging », *Physiol. Pharmacol.*, **2017**, 21 (1), 15–24.
- [158] Ł. Woźniak, S. Skąpska, et K. Marszałek, « Ursolic Acid—A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities », *Molecules*, **2015**, 20 (12), 20614-20641.
- [159] M. Jean, « Histoire du sucre », *Paris Éditions Desjonquères*, **1989**.
- [160] J. Meyer, *Histoire du sucre*. Desjonquères Editions, **2013**.
- [161] H. Ramiarantsoa, B. K. Attioua, M. A. Kouamé, et L. A. Djakouré, « Le O-β-D-glucoside du β-sitostérol Isolé des Feuilles de *Ravenala madagascariensis*. », **2008**, 5.
- [162] T. Peshin et H. Kar, « Isolation and Characterization of β-Sitosterol-3-O-β-D-glucoside from the Extract of the Flowers of *Viola odorata* », *Br. J. Pharm. Res.*, **2017**, 16 (4), 1-8.
- [163] P. J. D. Bouic, S. Etsebeth, R. W. Liebenberg, C. F. Albrecht, K. Pegel, et P. P. Van Jaarsveld, « Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination », *Int. J. Immunopharmacol.*, **1996**, 18 (12), 693-700.
- [164] P. J. D. Bouic, A. Clark, J. Lamprecht, M. Freestone. E. J. Pool, R. W. Liebenberg, « The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation », **1999**.
- [165] I. Louw, A. Halland, P. J. D. Bouic, M. W. Freestone, et J. H. Lamprecht, « A pilot study of the clinical effects of a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside in active rheumatoid arthritis (RA). », **2002**.
- [166] R. R. Berges, J. Windeler, H. J. Trampisch, T. H. Senge, et β-S. S. Group, « Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia », *The Lancet*, **1995**, 345 (8964), 1529–1532.
- [167] P. R. Donald, J. H. Lamprecht, M. Freestone, C. F. Albrecht, « A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis », *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **1997**, 1 (6), 518–522.

- [168] F. Ronchetti, G. Russo, E. Bombardelli, et A. Bonati, « A new alkaloid from rauwolfia vomitoria », *Phytochemistry*, **1971**, 10 (6), 1385–1388.
- [169] Y.-A. Bekro, J. A. Mamyrbekova, B. B. Boua, F. T. Bi, et E. E. Ehile, « Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae) », *Sci. Nat.*, **2007**, 4 (2), 217–225.
- [170] H. Wagner et S. Bladt, *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media, **1996**.
- [171] I. M. Said, M. W. Samsudin, Z. Zuriati, N. I. Yosoff, « A phytochemical survey of Ulu Kinchin, Pahang, Malaysia. », *Malay. Nat. J.*, **1990**, 43 (4), 260-266.
- [172] J. Harborne, « Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis, JB Harborne », *Chapman Lond. GB*, **1973**.
- [173] F. Denis, M.-C. Ploy, C. Martin, et V. Cattoir, « Bactériologie médicale, techniques usuelles », **2016**, 531-540.
- [174] K. Perron, P. Linder, « Bioutils ». **2017-2007**.
- [175] C.-E. Lemaoui, H. Layaida, A. Badi, et N. Foudi, « Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques », *J. Anti-Infect.*, **2017**, 19 (1), 12-19.
- [176] G. Tebano et C. Pulcini, « Bon usage des antibiotiques dans les établissements de santé : comment avancer ? », *J. Anti-Infect.*, **2016**, 18 (3), 98-105.
- [177] L. R. Comini, S. N. Montoya, P. L. Páez, G. A. Argüello, I. Albesa, et J. L. Cabrera, « Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae) », *J. Photochem. Photobiol. B*, **2011**, 102 (2), 108–114.
- [178] R. Bonnet, J-P. Bru, F. Caron, et C. Cattoen, V. Cattoir, H. Chardon, « Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie ». **2016**.
- [179] F. Bssaibis, N. Gmira, et M. Meziane, « Activite antibacterienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter », *Rev. Microbiol. Ind. Santé Environ.*, **2009**, 3, 44–55.
- [180] A. A. Toty, N. Guessennd, C. Bahi, A. K. M. KRA, D. A. Tokore, et M. Dosso, « Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes », *Bull. Société R. Sci. Liège*, **2013**.

Annexe

Tableau 23: Fiche enquête ethnopharmacologie sur *Morinda geminata* DC

Noms Prénoms	sexe	Agés (ans)	Maladie traitée	Partie utilisée	Mode de préparation	Mode d'utilisation
Alassane DIEDHIOU	M	51	Paludisme	Feuilles	Macération	Voie orale
Vieux DIATTA	M	43	Paludisme	Feuilles	Macération	Usage externe
Mariama COLY	F	60	A. Anti- inflammatoire	Ecorce	Décoction	Usage externe
Yaya SAMBOU	M	71	Dermatoses	Feuille	Macération	Usage externe
Idrissa MANE	M	80	Paludisme	Feuilles	Macération	Fumigation
Fatou DIEME	F	72	A. Anti- inflammatoire	Racine	Décoction	Usage externe
Doucouré SAMBOU	M	65	Paludisme	Feuilles	Macération	Fumigation
Lalla SAMBOU	F	59	A. Anti- inflammatoire	Racines	Décoction	Usage externe
Kounta SAMBOU	M	54	A. Anti- inflammatoire	Ecorce	Décoction	Usage externe
Fabacary COLY	M	40	Paludisme	Feuilles	Macération	Voie orale
Bourama SADIO	M	38	Paludisme	Ecorce	Macération	Fumigation
Ousmane BADJI	M	75	A. Anti- inflammatoire	Racines	Décoction	Usage externe
Sadibou SAMBOU	M	61	A. Anti- inflammatoire	Feuilles + Ecorce	Décoction	Usage externe
Sitapha SAMBOU	M	79	Paludisme	Feuilles	Macération	Fumigation
Malick SAMBOU	M	78	A. Anti- inflammatoire	Racines	Décoction	Usage externe
Sidy DIEME	M	80	Dermatoses	Feuilles	Macération	Usage externe
Insa DIATTA	M	76	Paludisme	Feuilles	Macération	Usage externe
Sana BADJI	M	79	Paludisme	Feuilles	Macération	Usage externe
Ansoumana K. SAMBOU	M	80	A. Anti- inflammatoire	Racines	Décoction	Usage externe
Mamadou COLY	M	35	Paludisme	Feuilles	Macération	Fumigation
Aliou Diamba DIEDHIOU	M	76	Paludisme	Feuilles	Macération	Usage externe
Sadia SAMBOU	M	80	Paludisme	Racine	Macération	Fumigation
Samo DIATTA	M	45	Paludisme	Feuilles	Macération	Usage externe
Siré Sonko	F	78	Paludisme	Racine	Macération	Fumigation
Diariétou	F	74	Paludisme	Feuilles	Macération	Voie orale

Sécouna COLY	M	77	Paludisme	Feuilles	Macération	Usage externe
Abdou SAMBOU	M	79	Paludisme	Feuilles	Macération	Fumigation
Matar SAMBOU	M	80	A. Anti-inflammatoire	Ecorce	Décoction	Usage externe
Aissatou SAMBOU	F	69	Paludisme	Racine	Macération	Fumigation
Bintou MANE	F	72	Dermatoses	Feuilles + Racine+Ecorce	Macération	Usage externe

Tableau 24: Fiche enquête ethnopharmacologie sur *Icacina oliviformis*

Noms Prénoms	sexe	Agés (ans)	Usages	Maladies traitées	Mode de préparation	Mode d'utilisation
Alassane DIEDHIOU	M	51	Médicinale	Paludisme	Décoction	Voie orale
Vieux DIATTA	M	43	Médicinale	Paludisme	Décoction	Voie orale
Mariama COLY	F	60	Médicinale	Toux + autres	Décoction	Voie orale
Yaya SAMBOU	M	71	Médicinale	Paludisme	Décoction	Voie orale
Idrissa MANE	M	80	Médicinale	Diabète	Infusion	Voie orale
Fatou DIEME	F	72	Alimentaire			
Doucouré SAMBOU	M	65	Médicinale	Diabète	Décoction	Voie orale
Lalla SAMBOU	F	59	Médicinale	Dermatoses	Macération	Voie orale
Kounta SAMBOU	M	54	Médicinale	Diabète	Décoction	Voie orale
Fabacary COLY	M	40	Médicinale	Paludisme	Décoction	Voie orale
Bourama SADIO	M	38	Médicinale	Diabète	Décoction	Voie orale
Ousmane BADJI	M	75	Médicinale	Diabète	Infusion	Voie orale
Sadibou SAMBOU	M	61	Médicinale	Dermatoses	Macération	Voie orale
Sitapha SAMBOU	M	79	Médicinale	Fièvre	Décoction	Voie orale
Malick SAMBOU	M	78	Médicinale	Paludisme	Décoction	Voie orale
Sidy DIEME	M	80	Alimentaire			
Insa DIATTA	M	76	Médicinale	Dermatoses	Macération	Voie orale
Sana BADJI	M	79	Médicinale	Fièvre	Décoction	Voie orale
Ansoumana K. SAMBOU	M	80	Médicinale	Diabète	Infusion	Voie orale
Mamadou COLY	M	35	Médicinale	Paludisme	Infusion	Voie orale
Aliou Diamba DIEDHIOU	M	76	Alimentaire			
Sadia SAMBOU	M	80	Médicinale	Toux	Décoction	Voie orale
Samo DIATTA	M	45	Médicinale	Dermatoses	Décoction	Voie orale
Siré Sonko	F	78	Médicinale + Alimentaire	Paludisme	Décoction	Voie orale
Diariétou	F	74	Médicinale	Autre	Décoction	Voie orale
Sécouna COLY	M	77	Médicinale	Paludisme	Décoction	Voie orale
Abdou SAMBOU	M	79	Médicinale	Paludisme	Décoction	Voie orale
Matar SAMBOU	M	80	Médicinale	Diabète	Infusion	Voie orale
Aissatou SAMBOU	F	69	Alimentaire			
Bintou MANE	F	72	Médicinale	Diabète	Décoction	Voie orale

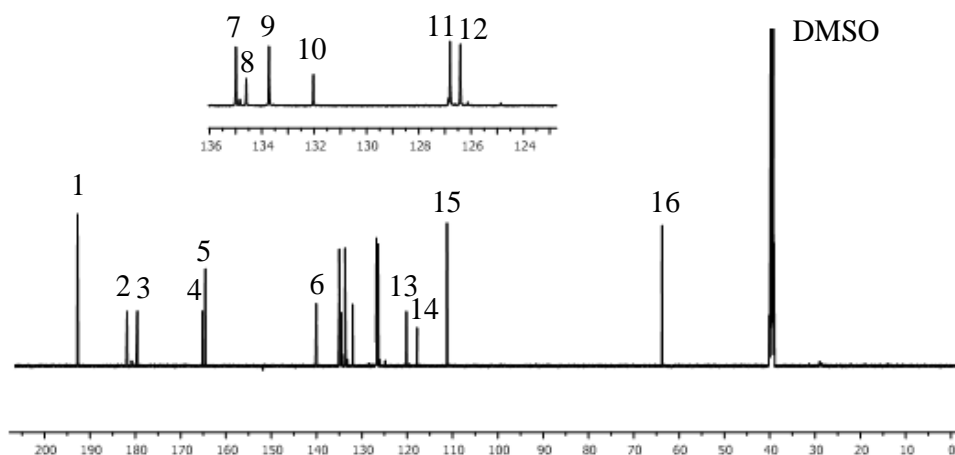


Figure 102: Spectre de carbone du composé SBMg2RC

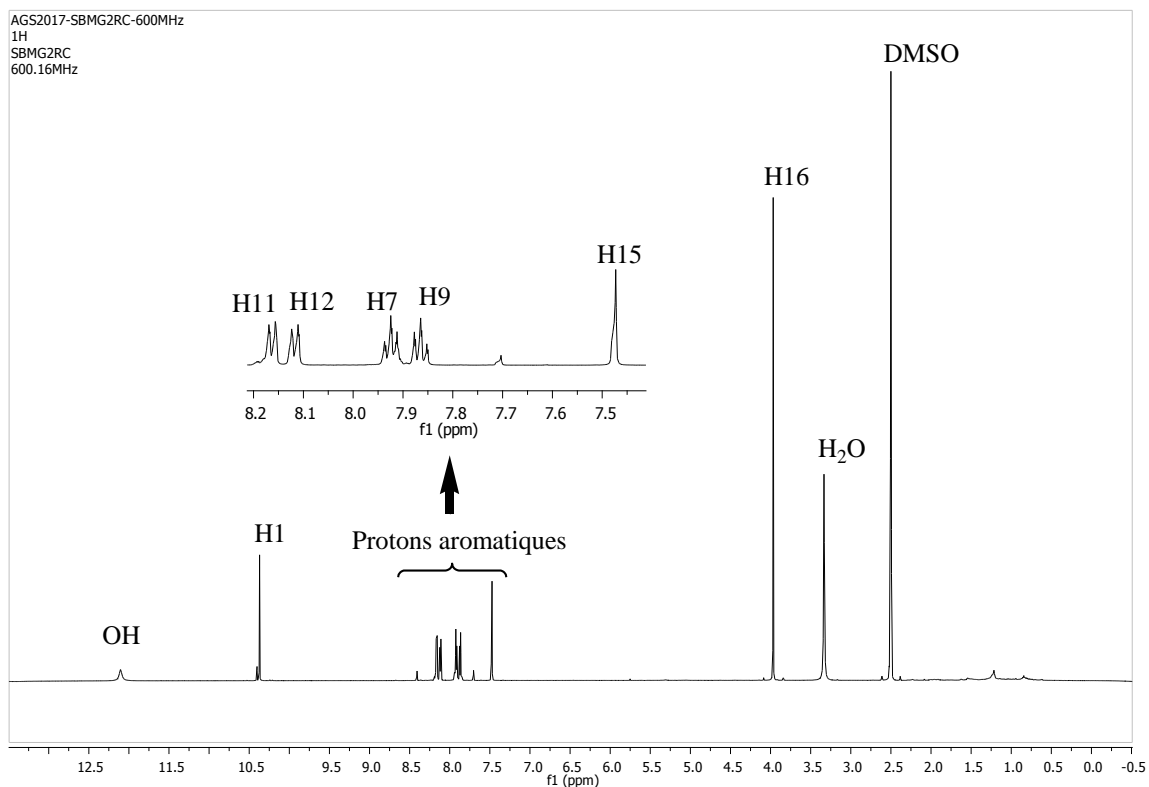


Figure 103: Spectre du proton du composé SBMg2RC

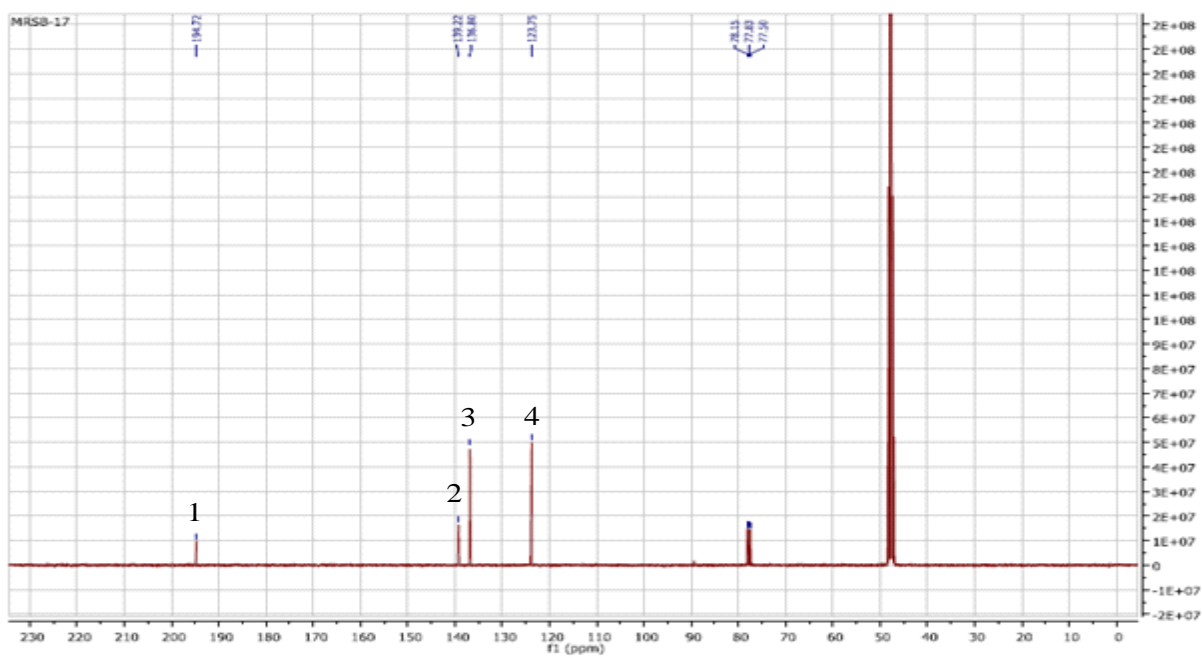


Figure 104: Spectre ^{13}C du composé SBMg17AC

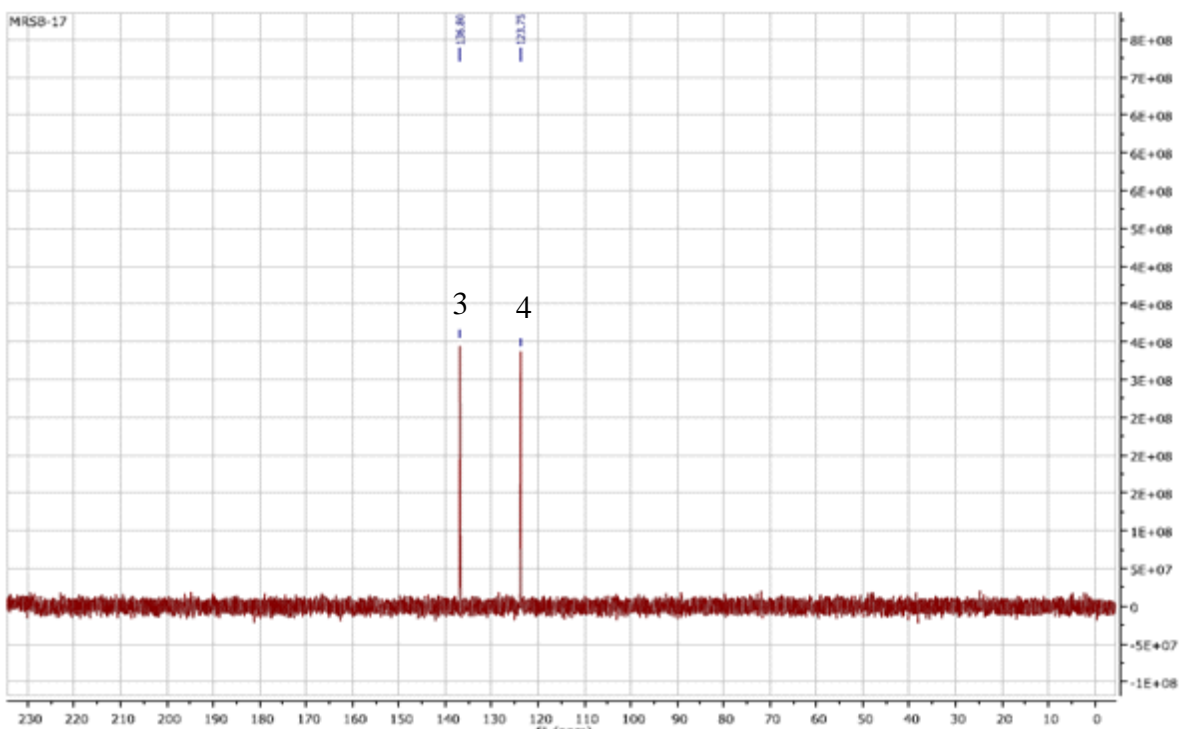


Figure 105: Spectre DEPT 135 du composé SBMg17AC

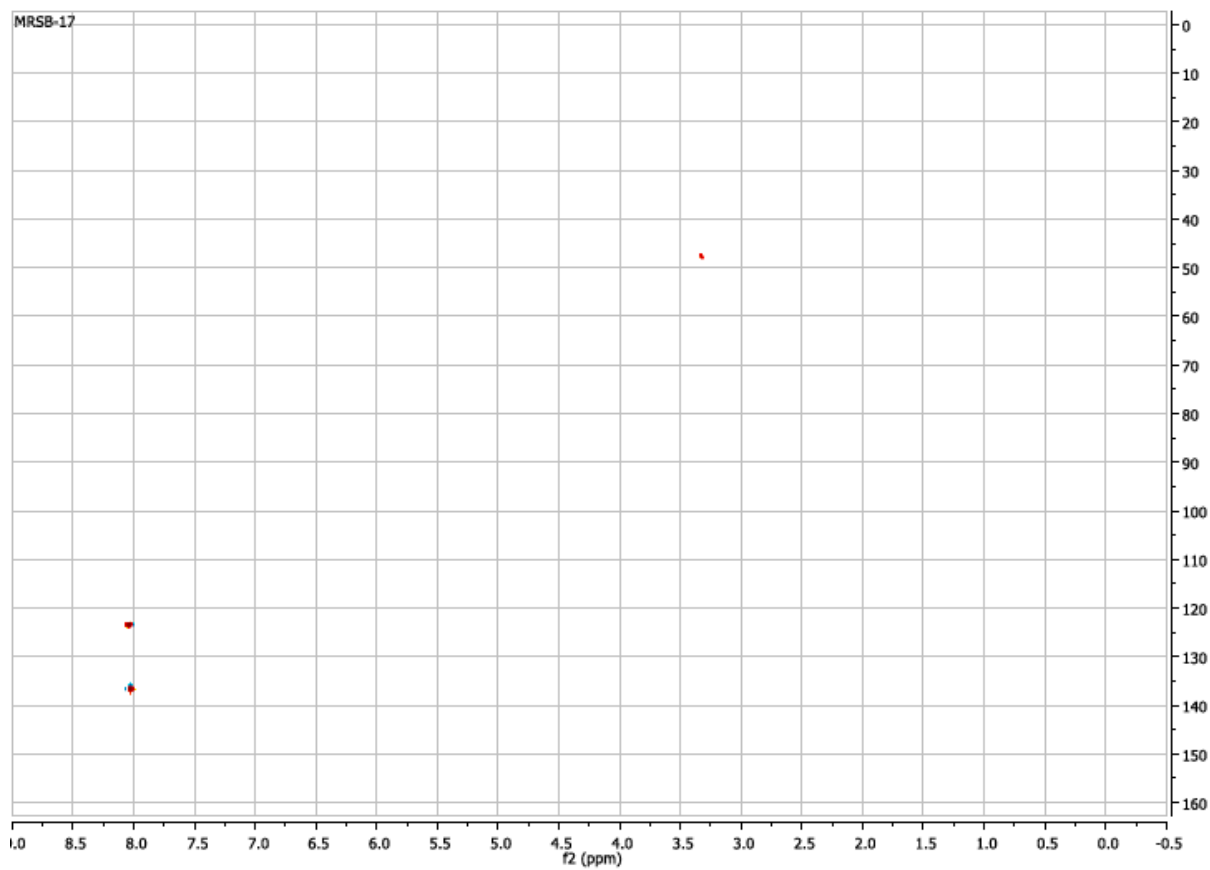


Figure 106: Spectre HSQC du composé SBMg17AC

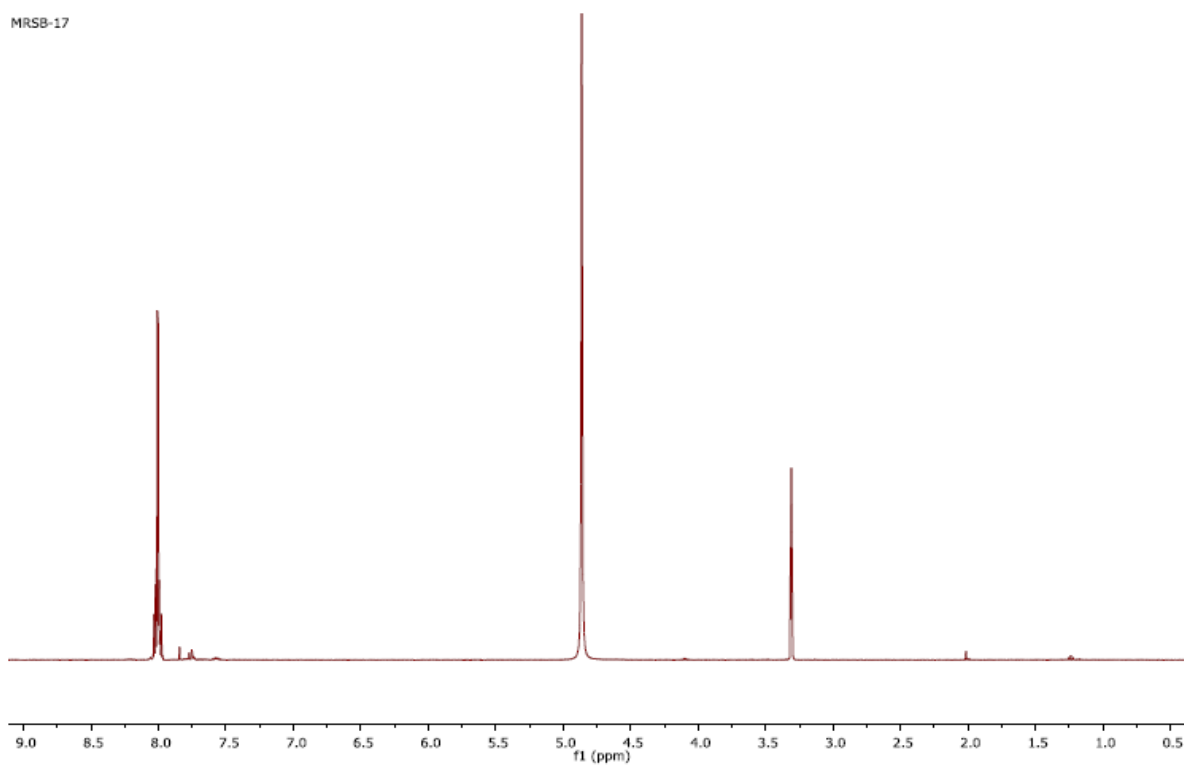


Figure 107: Spectre de proton du composé SBMg17AC

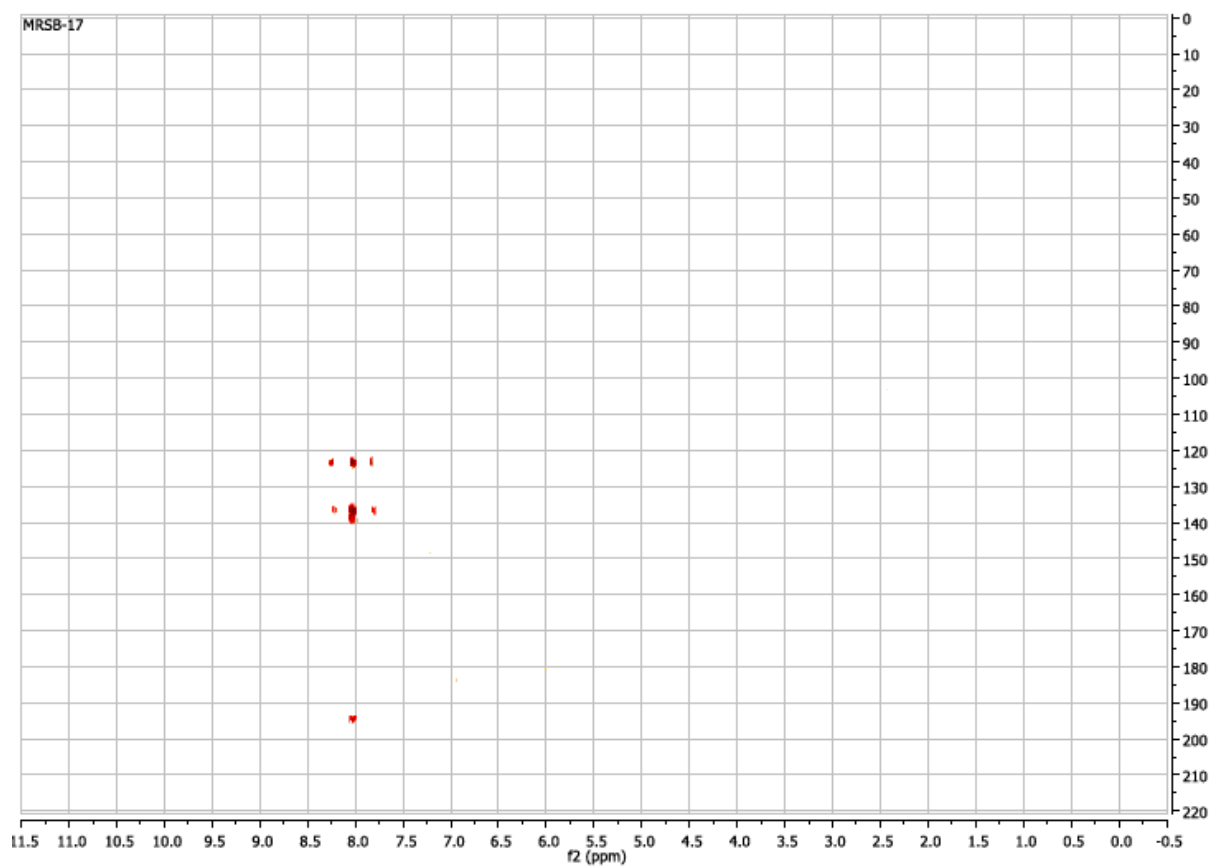


Figure 108: Spectre HMBC du composé SBMg17AC

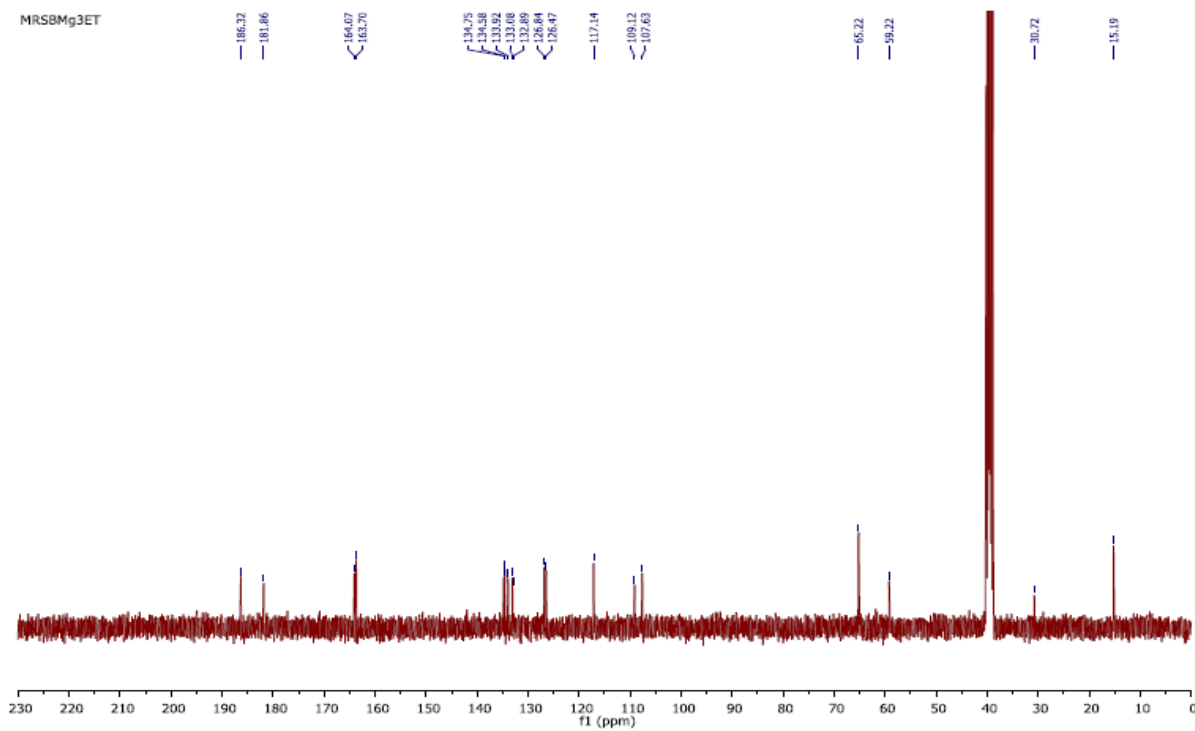


Figure 109: Spectre ^{13}C du composé SBMg3ET

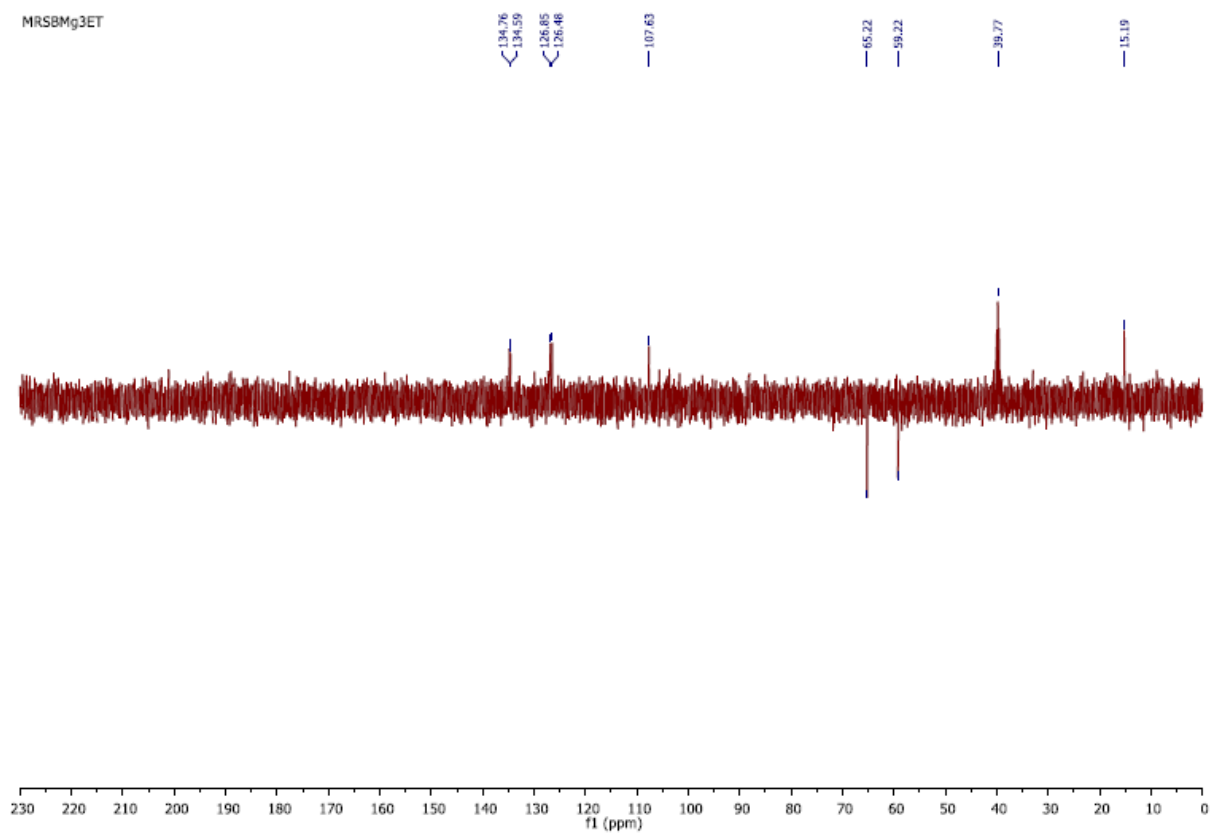


Figure 110: Spectre DEPT 135 du composé SBMg3ET

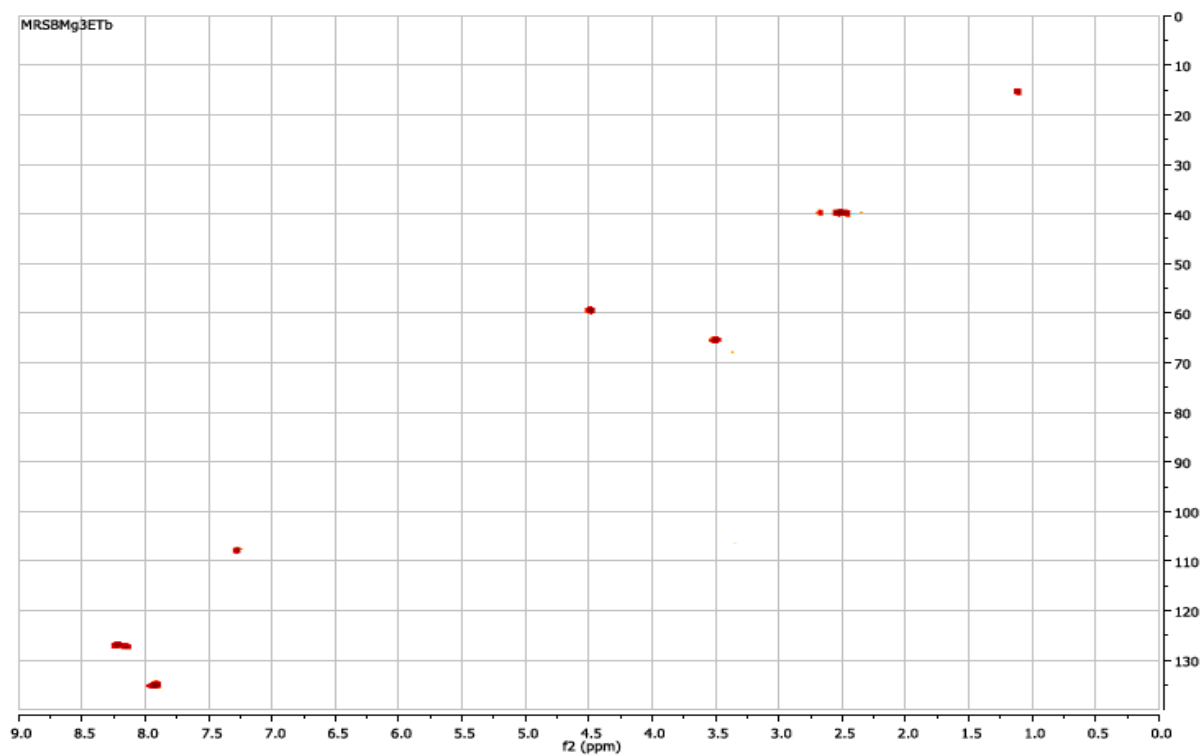


Figure 111: Spectre HSQC du composé SBMg3ET

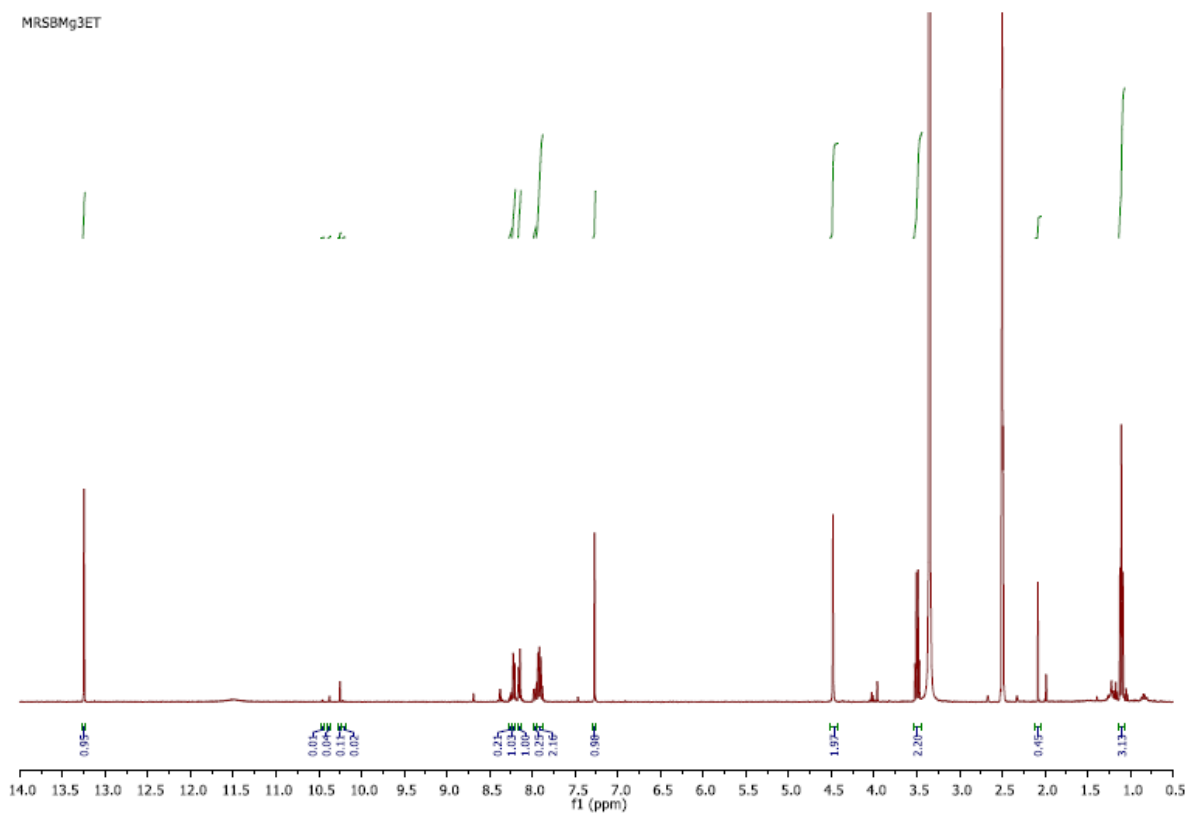


Figure 112: Spectre du proton du composé SBMg3ET

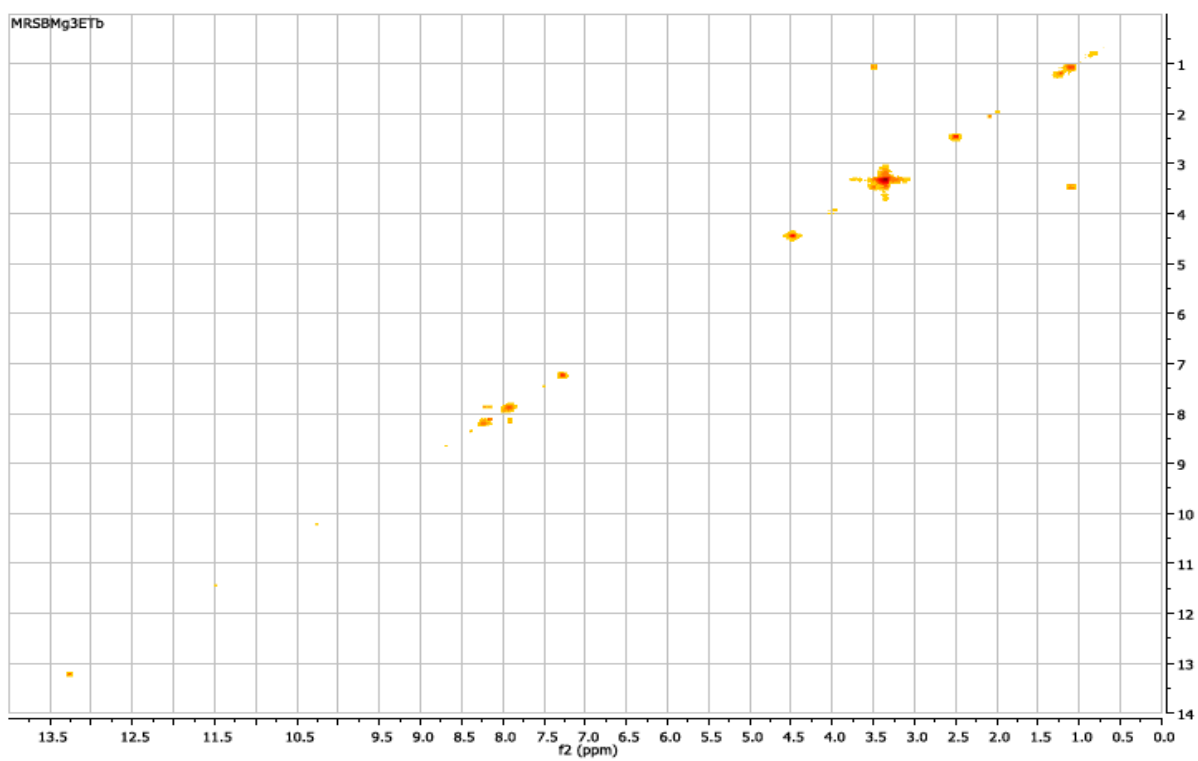


Figure 113: Spectre COSY du composé SBMg3ET

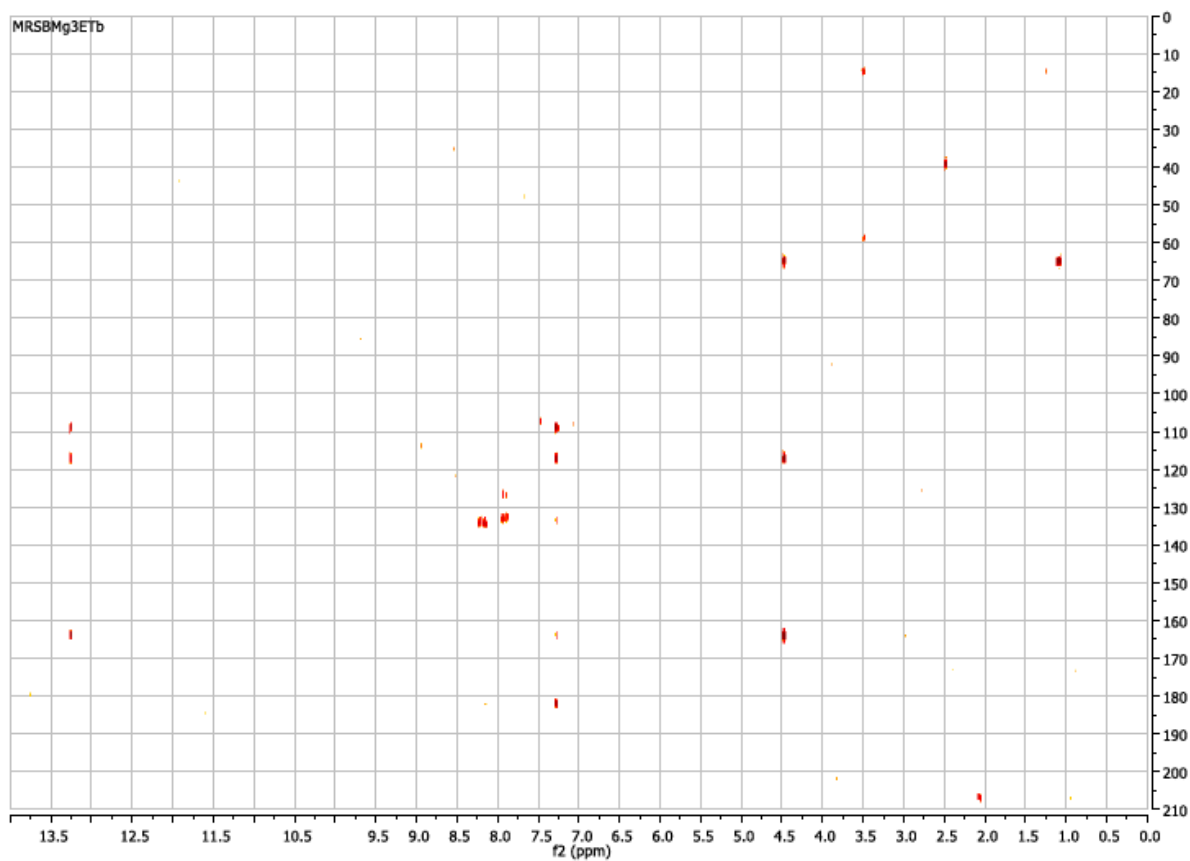


Figure 114: Spectre HMBC du composé SBMg3ET7

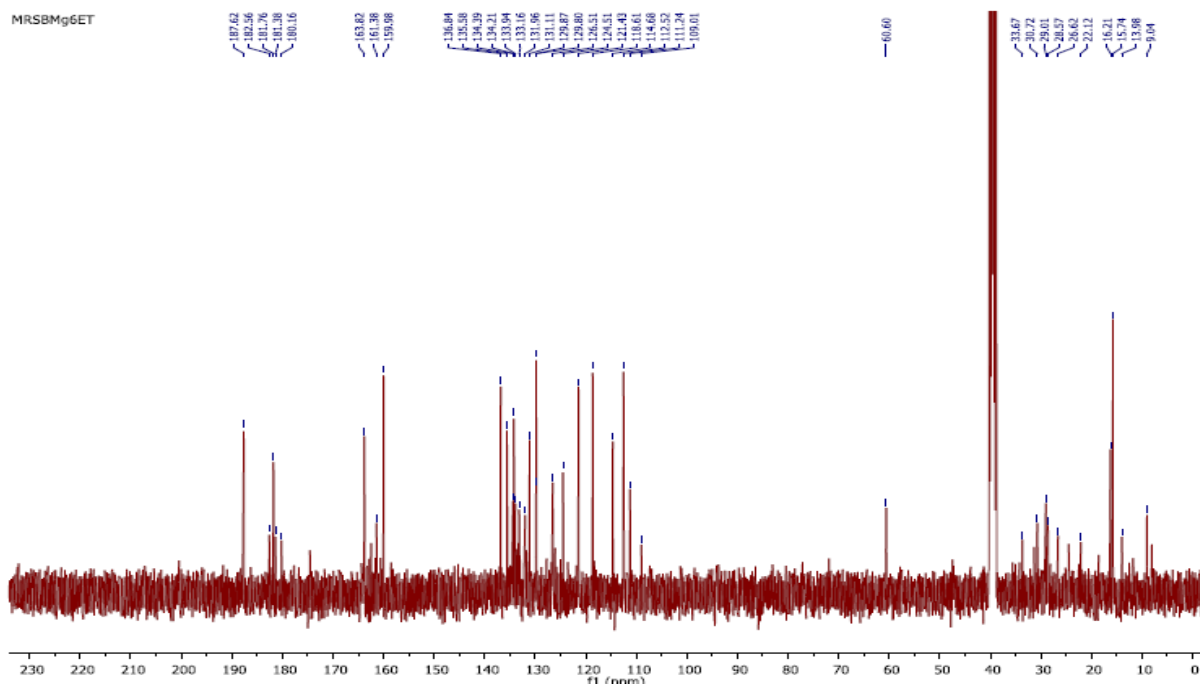


Figure 115: Spectre ^{13}C du composé SBMg6ET

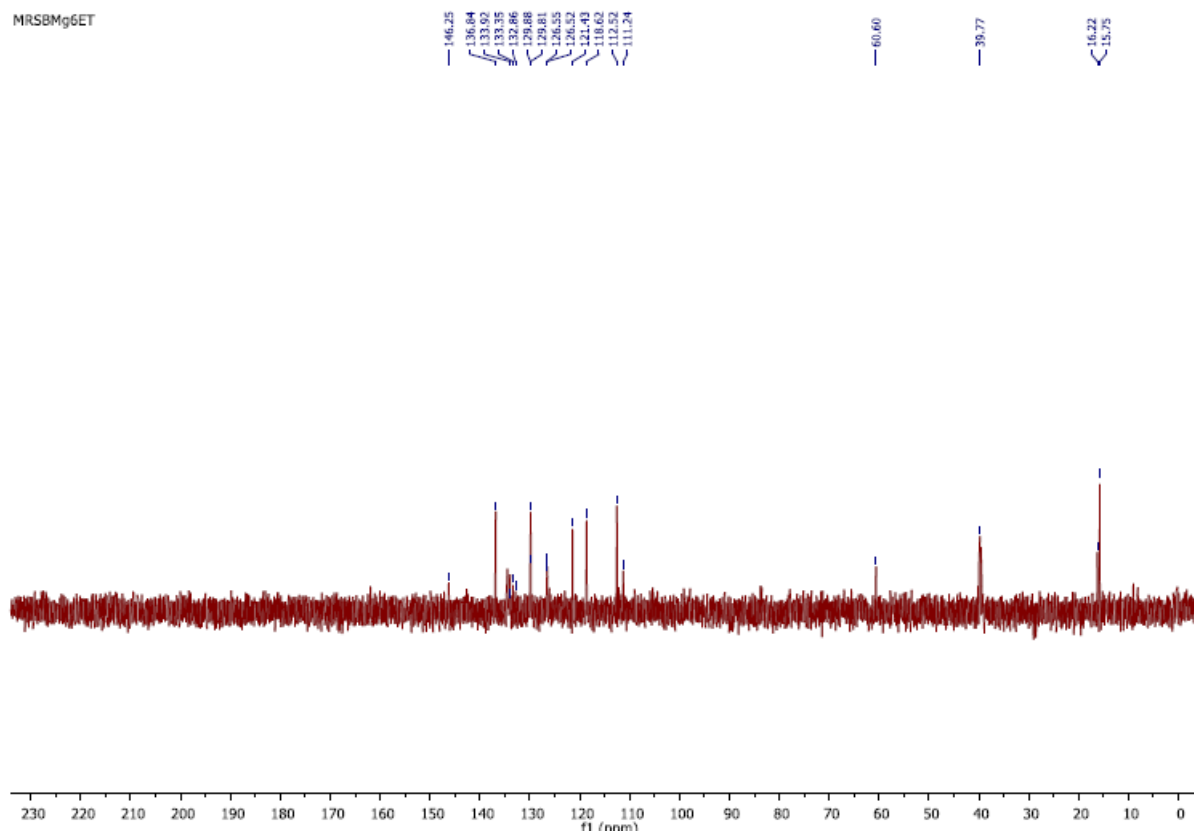


Figure 116: Spectre DEPT 135 du composé SBMg6ET

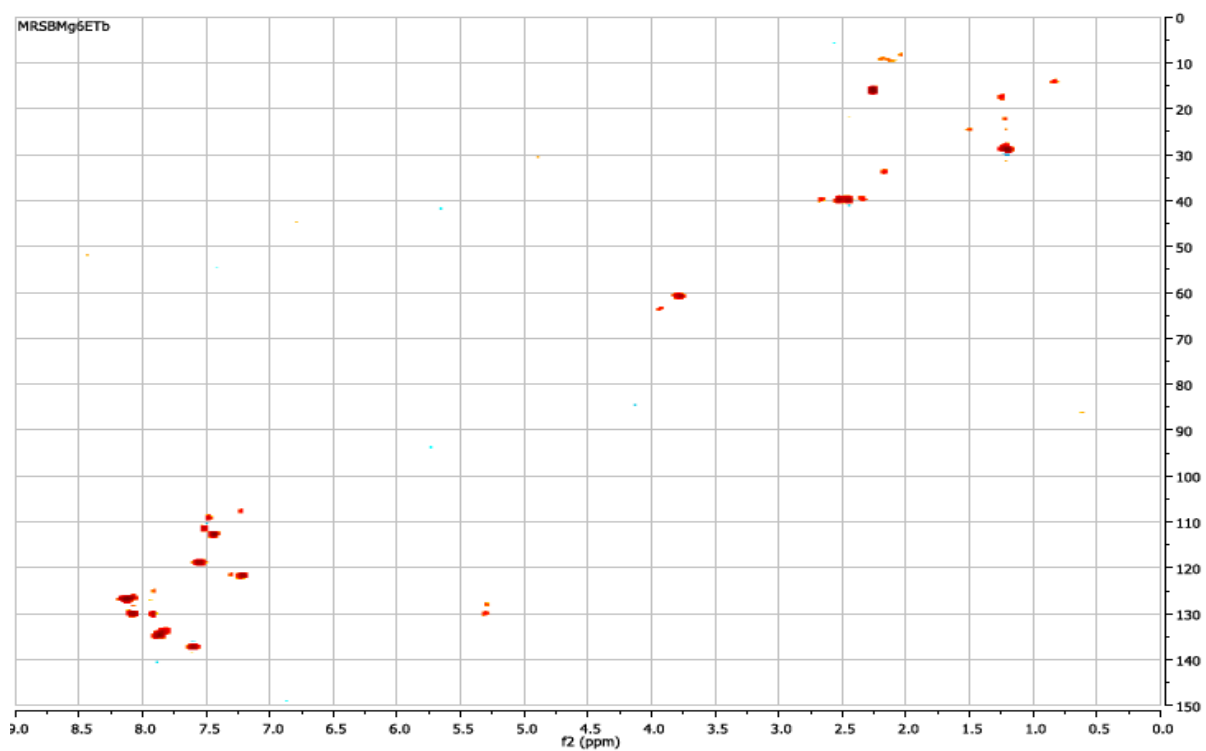


Figure 117: Spectre HSQC du composé SBMg6ET

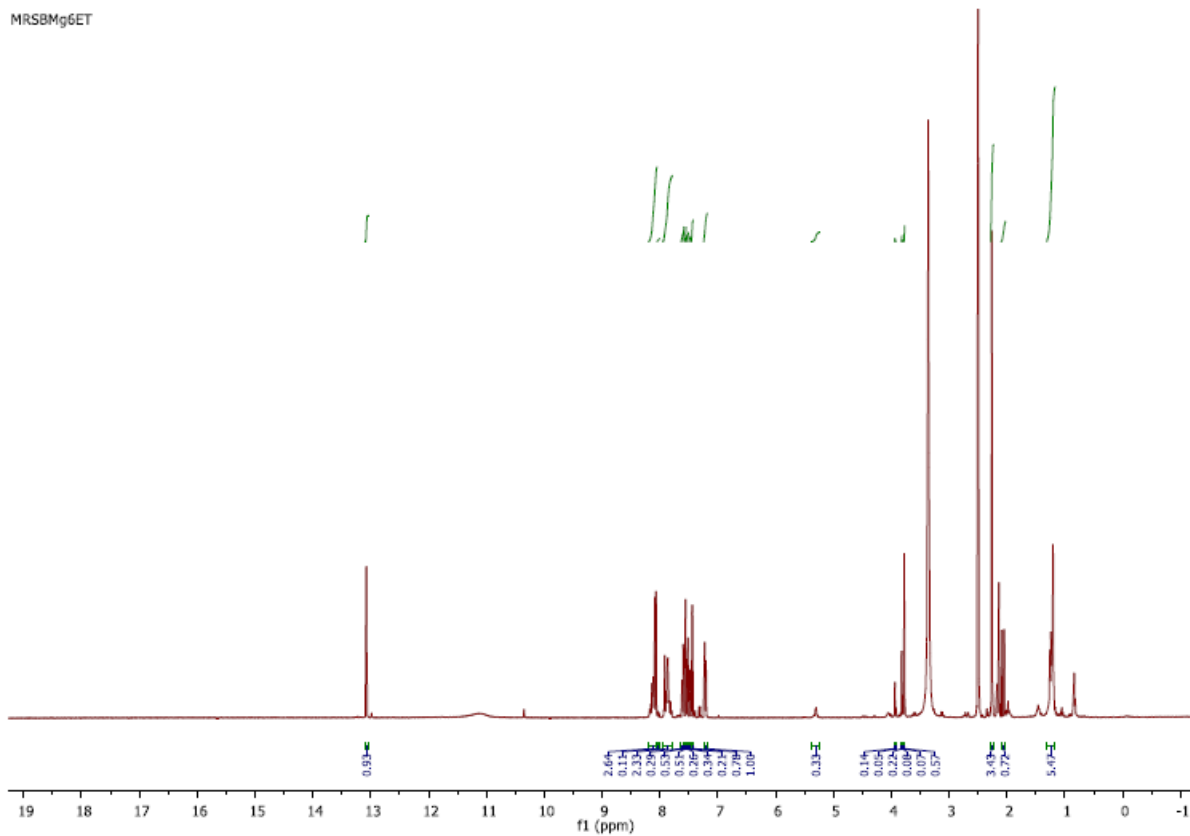


Figure 118: Spectre ^1H du composé SBMg6ET

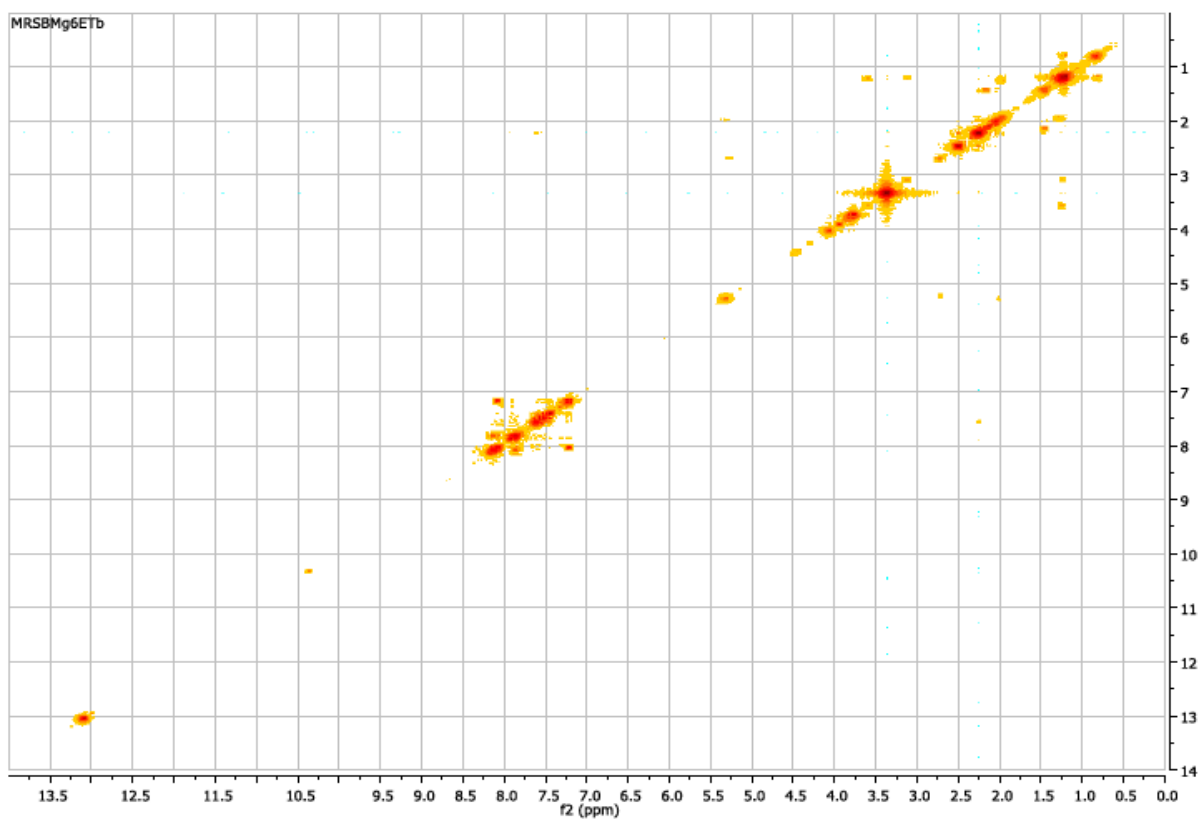


Figure 119: Spectre COSY du composé SBMg6ET

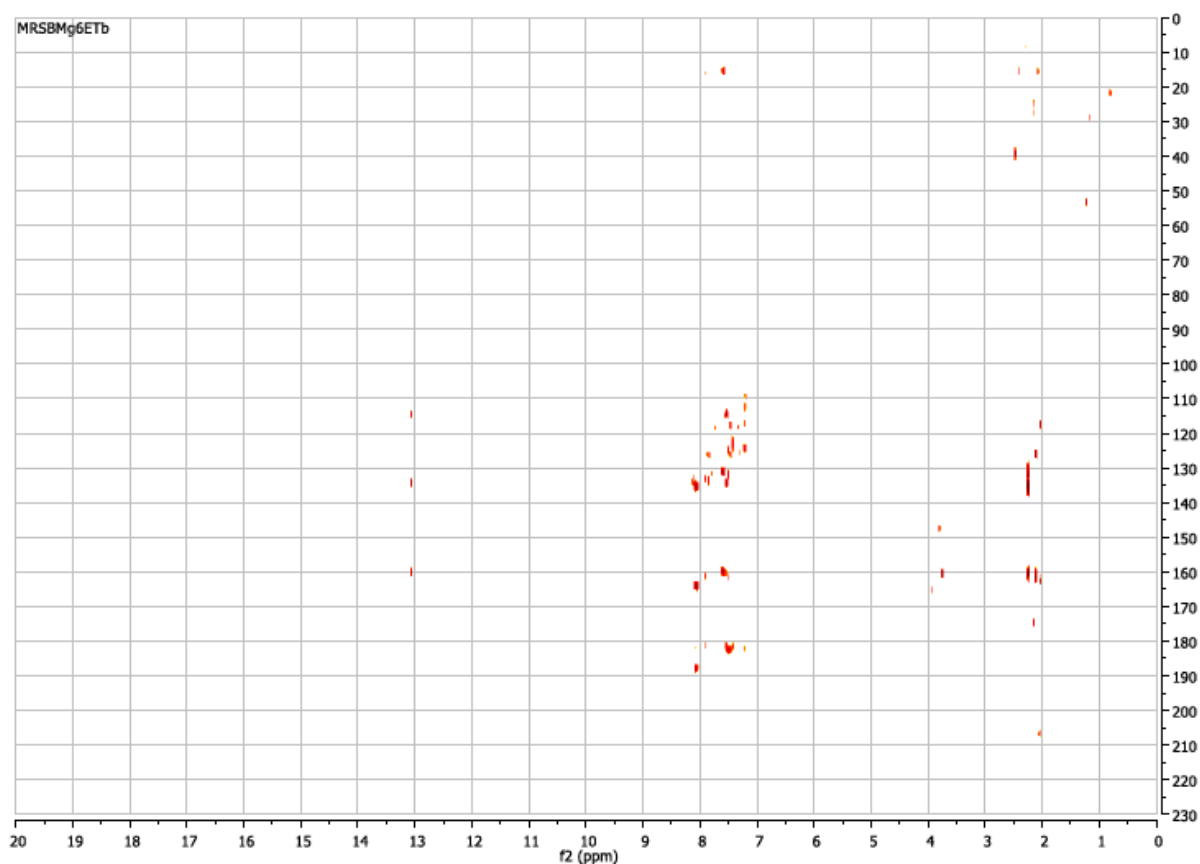


Figure 120: Spectre HMBC du composé SBMg6ET

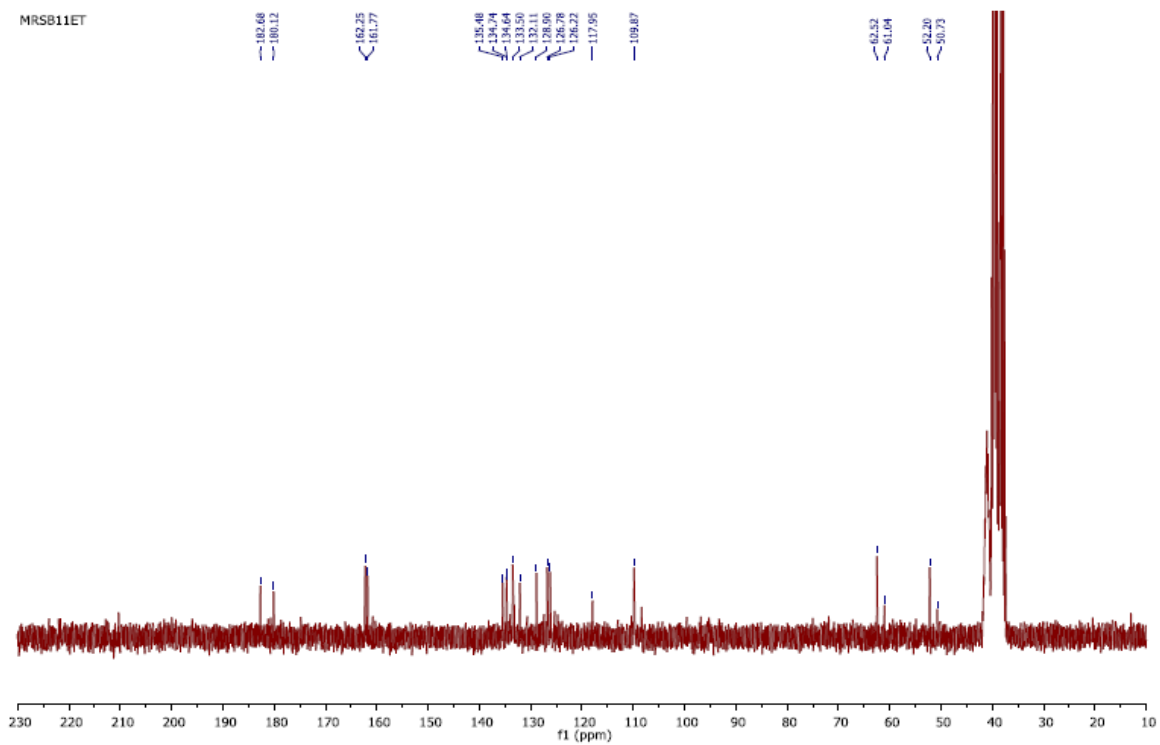


Figure 121: Spectre ^{13}C du composé SBMg11ET

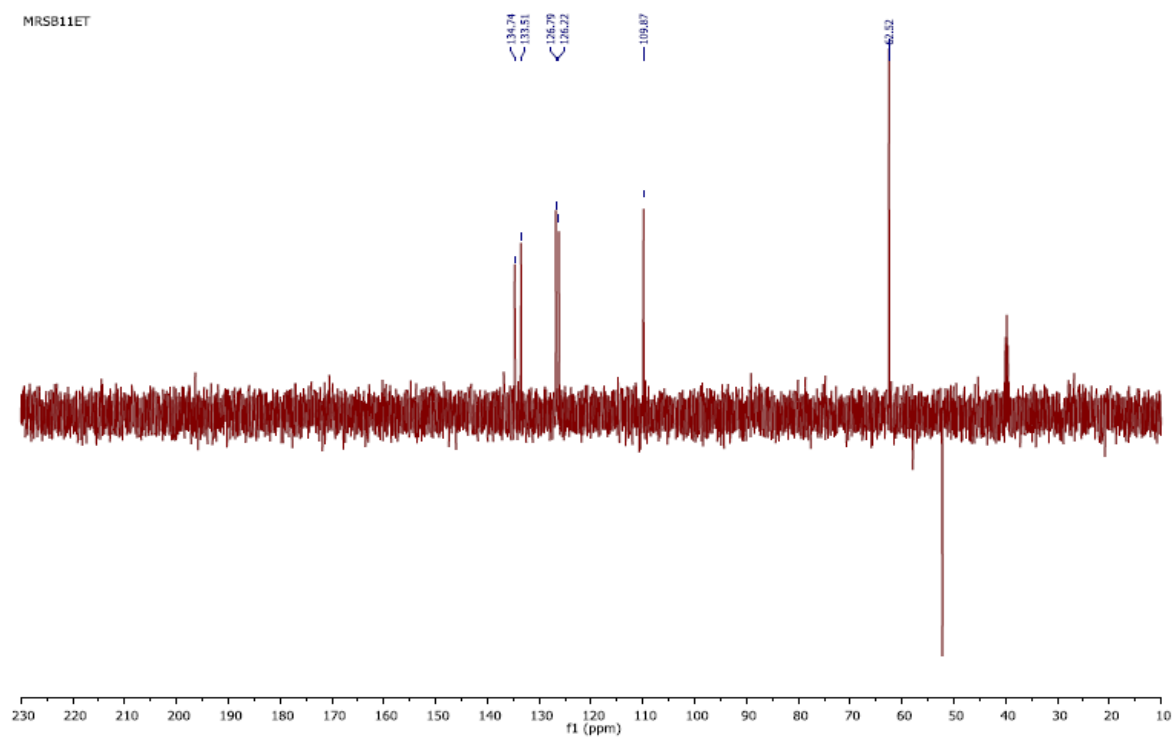


Figure 122: Spectre DEPT 135 du composé SBMg11ET

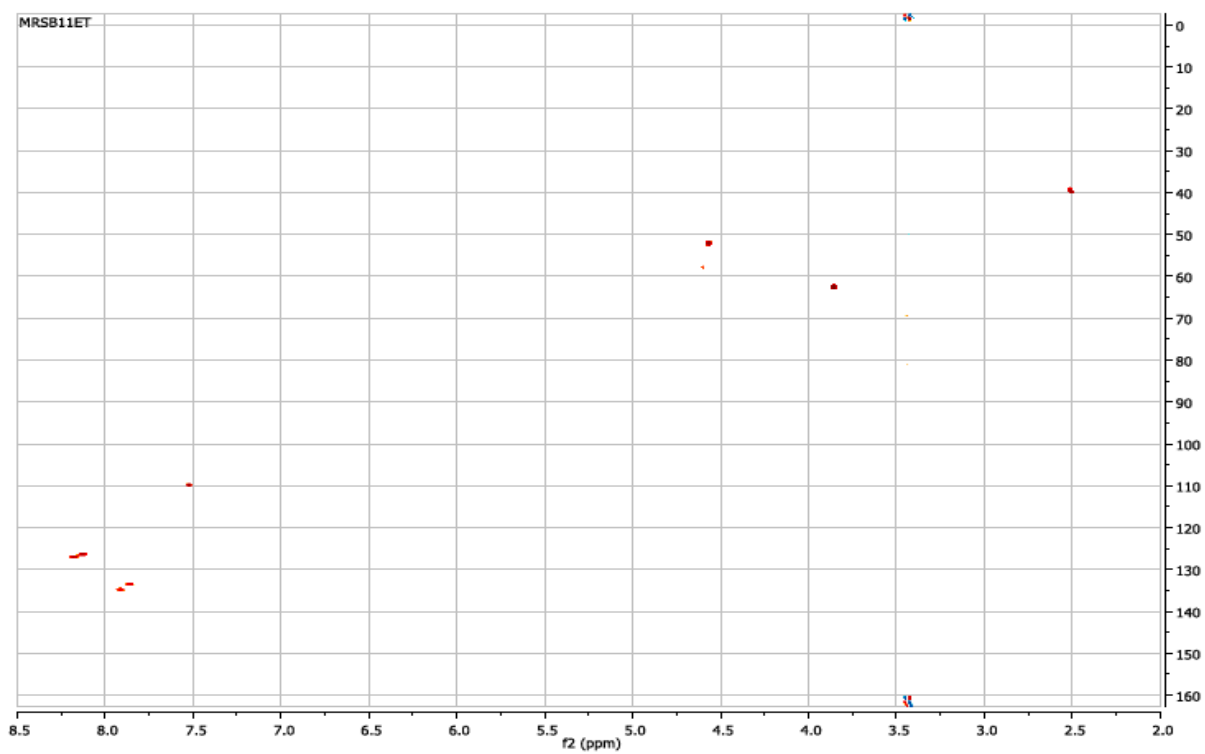


Figure 123: Spectre HSQC du composé SBMg11ET

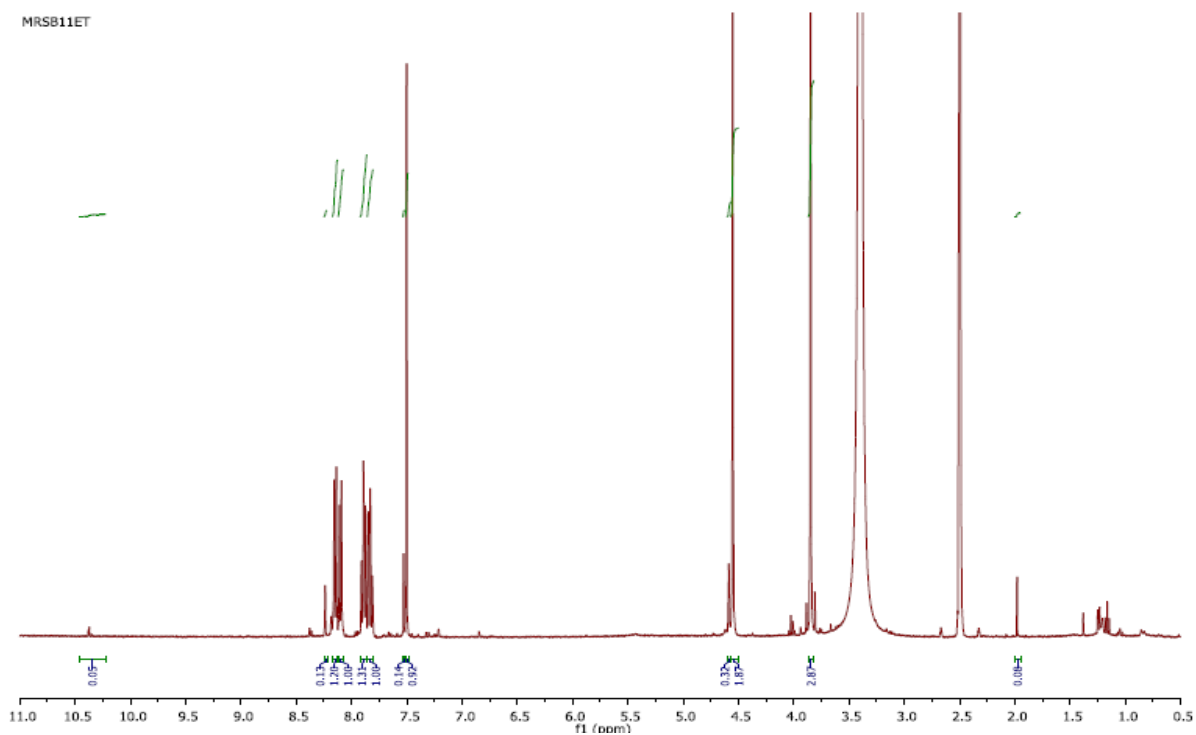


Figure 124: Spectre ^1H du composé SBMg11ET

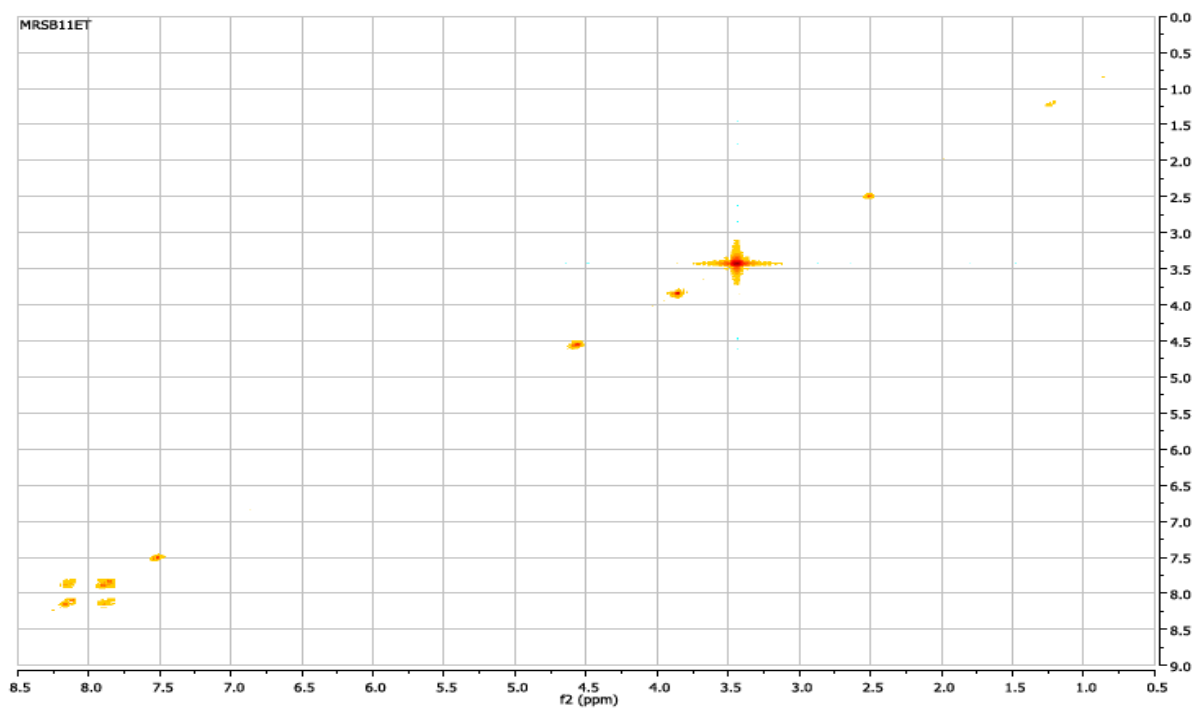


Figure 125: Spectre COSY du composé SBMg11ET

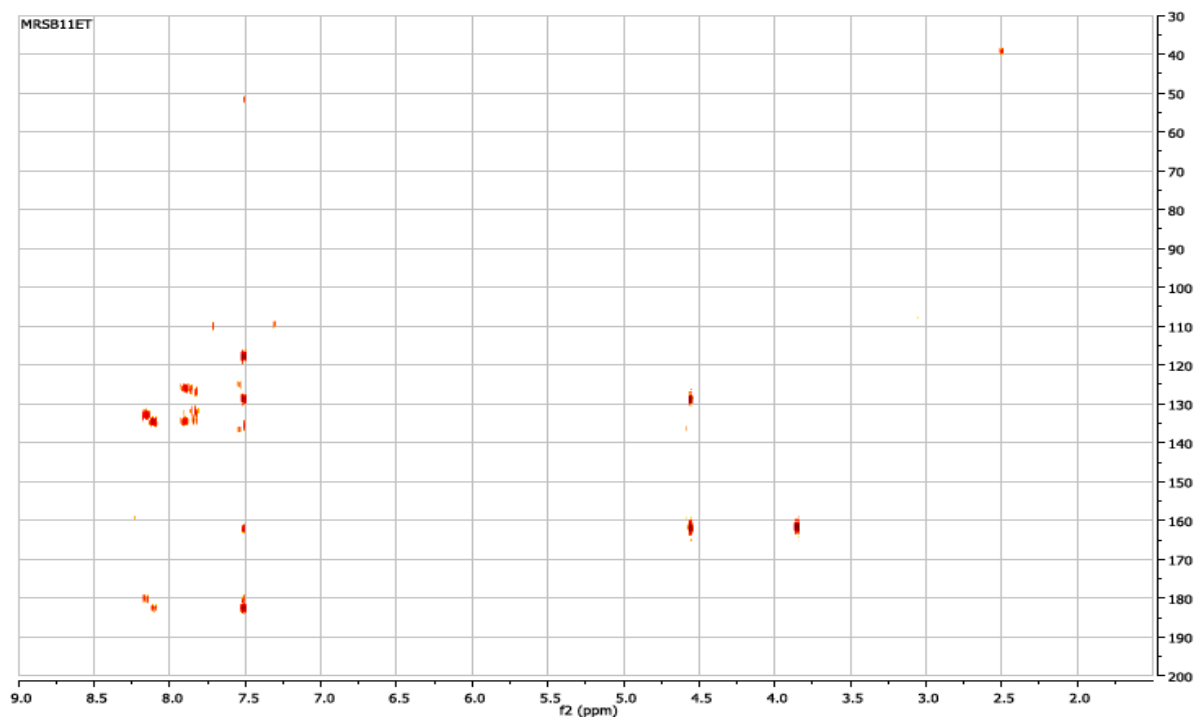


Figure 126: Spectre HMBC du composé SBMg11ET

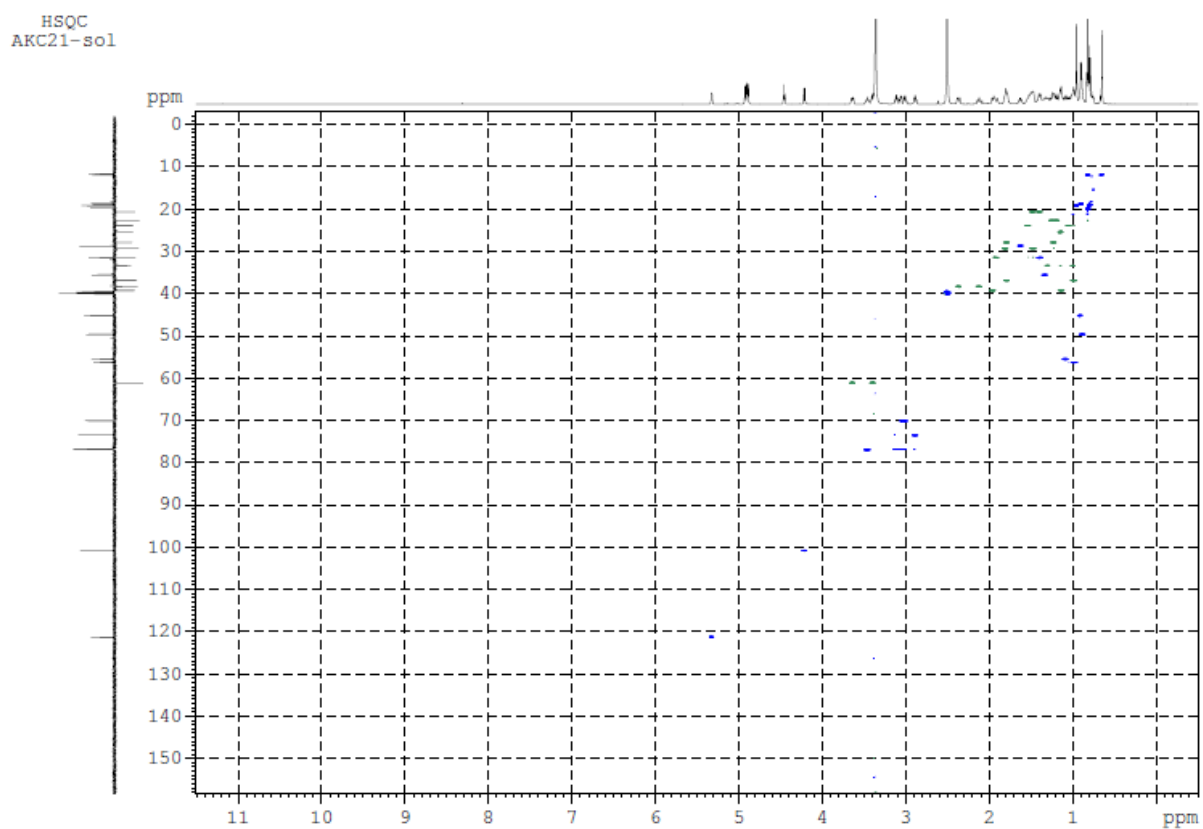


Figure 127: Spectre HSQC du composé I3

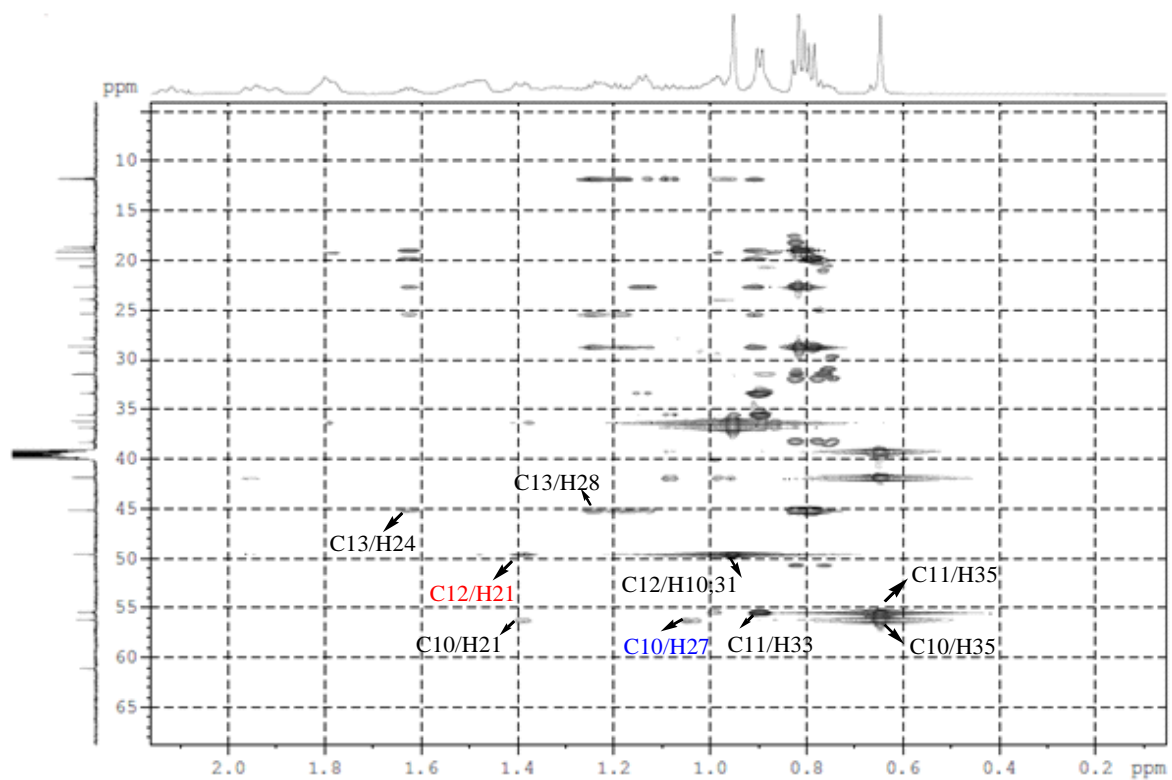


Figure 128: Spectre HMBC du composé 13

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes utilisées en médecine traditionnelle: *Morinda geminata* DC et *Icacina oliviformis*. Les tests phytochimiques ont révélé la présence en quantité élevée de composés anthracéniques dans la racine et terpéniques dans la feuille de *Morinda geminata*. La présence des polyphénols et terpènes ont été mis en évidence dans la graine de *Icacina oliviformis*

Dans cette étude nous avons isolés des molécules de la famille: des anthraquinones (Nordamnacanthal, Damnacanthal, Damnacanthol, Lucidin- ω -ethyl ether, 2-hydroxy-1,5-diméthylanthraquinone, Anthraquinone), des triterpéniques (acide ursolique) et des sucres (saccharose) dans *Morinda geminata* puis étudiés leurs activités antibactériennes sur deux souches (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia Coli*) en déterminant le diamètre d'inhibition, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). Deux composés: nordamnacanthal et lucidin- ω -ethyl ether ont présenté une meilleure inhibition à une concentration de 156 $\mu\text{g/mL}$ contre *Staphylococcus aureus*. Seule l'anthracène-9,10-dione a inhibé les deux souches avec une CMI égale à la CMB (625 $\mu\text{g/mL}$). Un triterpène (β -sitostérol- β -D-glucoside) et un sucre (saccharose) ont été aussi isolés dans la graine de *Icacina oliviformis*. Les structures de ces composés ont été caractérisées par analyse des spectres: RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, et ROESY), spectroscopie de masse (SM) et infrarouge (IR).

La présente étude constitue le premier examen phytochimique de *Morinda geminata* DC et la graine de *Icacina oliviformis*.

Mots clés: *Morinda geminata* DC, *Icacina oliviformis* RMN (1D, 2D), IR, Masse, Anthraquinones, Triterpènes, Antimicrobiens

Abstract

The aim of this work is to investigate at phytochemical study of two plants using in traditional medicine: *Morinda geminata* DC and *Icacina oliviformis*. Phytochemical test of *Morinda geminata* showed a high rate anthracene compound in the roots and terpene compound in the flowers.

The presence of polyphenols and terpenes have been founded in the seed of *Icacina oliviformis*. In this study, we have isolated some molecule groups from: anthraquinone (Nordamnacanthal, Damnacanthal, Damnacanthol, Lucidin- ω -ethyl ether, 2-hydroxy-1,5-diméthylanthraquinone, Anthraquinone), triterpene (acide ursolique), suger (saccharose) in *Morinda geminata* then

study their antibacterial activity in two strain (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia Coli*) by determining the inhibition diameter, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). Two compounds: nordamnacanthal and lucidin- ω -ethyl ether have presented a best inhibition. They reach 156 $\mu\text{g/mL}$ at concentration versus *Staphylococcus aureus*. Only anthracene-9,10-dione have inhibited both strain with MIC equal to MBC (625 $\mu\text{g/mL}$). Triterpene (β -sitostérol- β -D-glucoside) and suger (saccharose) have been isolated in the seed of *Icacina oliviformis*. The structures of these compounds have been characterized by spectral analysis: RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, et ROESY), mass spectroscopy (SM) and infrared (IR).

This study is the first phytochemical exam of *Morinda geminata* DC and seed of *Icacina oliviformis*.

Key words: *Morinda geminata* DC, *Icacina oliviformis* NMR (1D, 2D), IR, Mass, Anthraquinones, Triterpenes, Antimicrobials