

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 2022

Thèse de DOCTORAT

Domaine : Chimie Organique

Spécialité : Synthèse Organique et Produits Naturels

Présentée par : **Mme Diara DIATTA**

Pharmacochimie, Analyse structurale et Activités biologiques des métabolites de *Raphionacme vignei* et de *Neocarya macrophylla*

Soutenue publiquement le 18 février 2023 devant un jury composé de :

M. Diouma KOBOR, Professeur Titulaire, Université Assane SECK de Ziguinchor / Président de jury.

M. Issa SAMB, Maître de conférences, Université Alioune DIOP de Bambey / Rapporteur.

M. Farba B. TAMBOURA, Professeur Titulaire, Université Alioune DIOP de Bambey / Rapporteur.

M. Mbaye Diagne MBAYE, Maître de conférences, Université Assane SECK de Ziguinchor/
Rapporteur.

M. Michael RIVARD, Maître de conférences, HDR, Université Paris-Est de Créteil / Examineur.

Mme. Philomène Akoua YAO-KOUASSI, Maître de conférences, Université Félix Houphouët
BOIGNY de Cocody-Abidjan (Côte d'Ivoire) / Co-Encadrante.

Mme. Isabelle LACHAISE, Responsable de la plateformes CAP, ICMPE / Co-Encadrante.

M. Abdoulaye GASSAMA, Professeur Titulaire, Université Assane SECK Ziguinchor / Directeur de
thèse.

Remerciements

Par la grâce d'Allah, le tout puissant, j'ai réalisé cette thèse de doctorat qui s'inscrit dans le cadre d'un contrat de collaboration entre l'Université Assane SECK de Ziguinchor et l'institut de chimie moléculaire de Paris Est.

Ainsi, je remercie toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

Je loue, à cet effet, la rigueur scientifique de mon directeur de thèse, Monsieur Abdoulaye GASSAMA, Professeur titulaire au Département de Chimie de l'Université Assane SECK de Ziguinchor et me réjouis de sa disponibilité et de ses sages conseils et orientations ayant facilité l'achèvement de cette thèse de doctorat dans les délais, en dépit des vicissitudes de la vie et de la recherche scientifique.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Philomène Akoua YAO-KOUASSI, Maître de conférences à l'Université Houphouët BOIGNY (Côte d'Ivoire) qui a bienveillamment accepté de m'encadrer et au Dr. Michael RIVARD et Pr. Thierry MARTENS (Université Paris Est, Electrochimie et Synthèse Organique, ICMPE) pour m'avoir accueillie à l'ICMPE afin de faciliter la réalisation de ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame Isabelle LACHAISE (Université Paris Est, Plateforme Chromatographie Analytique et Préparative) qui m'a reçu et guidé au sein de la plateforme CAP, en me faisant bénéficier de ses chaleureuses et bienveillantes observations et suggestions.

Je remercie vivement Monsieur Guata Yoro SY (Laboratoire de Pharmacologie et Pharmacodynamie, Faculté de Médecine, de Pharmacie, et d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop) qui a dirigé la réalisation des tests d'activités biologiques.

Merci à tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner et de juger ce travail, sous la présidence de Monsieur Diouma KOBOR, par ailleurs Professeur titulaire à l'Université Assane SECK de Ziguinchor.

Mes sincères remerciements vont, en sus, à l'endroit des autres éminents membres du jury à savoir M. Mbaye Diagne MBAYE, maître de conférences à l'Université Assane SECK de Ziguinchor, M. Farba B. TAMBOURA, professeur titulaire à l'Université Alioune DIOP de Bambey, M. Issa SAMB, maître de conférences à l'Université Alioune DIOP de Bambey et Mme Anastasie MANGA, maître-assistante à l'Université Assane SECK de Ziguinchor.

Je tiens à remercier le Docteur Omar SAMBOU qui m'a constamment apporté son aide et ses conseils, dans le cadre du présent travail.

Je salue particulièrement le soutien fort appréciable de la Coopération française qui a financé mes recherches, en m'octroyant une bourse, pour réaliser cette thèse dans de meilleures conditions.

Je témoigne très amicalement ma reconnaissance aux doctorantes que j'ai eu la chance de rencontrer à l'ICMPE, en l'occurrence Rada, Tania et Fara. Merci pour votre hospitalité et votre bonne humeur.

En outre, je magnifie les aides et encouragements de la technicienne du Laboratoire de Chimie de l'Université Assane SECK de Ziguinchor, Mme Fatoumata Soumaré CAMARA et des enseignants chercheurs du département de Chimie du dit établissement, en particulier ceux de Dr. Mame Seyni SYLLA et de Pr. Chérif BALDE, Pr. Magatte CAMARA, Dr. Seydou N. DIOP, Dr. Abdou MBAYE, Dr. Papa Ali GAYE, Dr. Mamadou LO, Dr. Oumar SAMBOU et Dr. Insa BADIANE. Que tous ces universitaires cités, à titre non exhaustif, trouvent dans ces quelques lignes l'expression de ma constante reconnaissance.

Mes vifs remerciements sont adressés à tous les docteurs et doctorants du Laboratoire de chimie et physique des matériaux de l'Université Assane SECK de Ziguinchor ; parmi lesquels Moussa TOURE, Ibrahima Paka MANGA, Henry DIASSY, Albert BADIANE, Armel DIATTA, Ibrahima GOUDIABY, Aminata THIAM, Penda DEME, Eliane A MANGA, Adjil F POUYE, Monique MENDY, Malamine MANSALY.

Mention spéciale à mon époux qui m'a toujours impressionné à travers ses valeurs humaines, sa patience et sa modestie. Tu m'as toujours soutenu et encouragé et si j'en suis là aujourd'hui, c'est en partie grâce à toi. Alors, je te témoigne toute ma gratitude. Mention spéciale aussi à ma fille chérie pour ces longues années d'absence. Maman t'aime fort.

Enfin, je souhaiterais remercier mes parents, mes sœurs et frères à qui je dédie cette thèse, sans eux tout cela n'aurait pu être possible. Merci pour vos soutiens permanents et inconditionnés.

Liste des abréviations

- **AAS** : Acide Acétylsalicylique
- **ADN** : Adénosine Désoxyribose Nucléique
- **AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdien
- **AIS** : Anti-inflammatoire stéroïdien
- **C-18** : Silice greffée
- **CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- **CI₅₀** : Concentration Inhibitrice à 50%
- **CLHP** : Chromatographie Liquide Haute Performance
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **COSY** : Correlated SpectroscopY
- **COX 1.2** : Cyclo-oxygénase 1 et 2
- **d**: Doublet
- **dd** : Doublet de doublets
- **ESI** : ElectroSpray Ionization (ionisation par électrospray)
- **FID** : Fédération Internationale du Diabète
- **FNRS** : Fonds National de la Recherche Scientifique
- **FMPOS** : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
- **GRE** : Glucocorticoid response element
- **HMBC**: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
- **HSQC**: Heteronuclear Single Quantum Connectivity
- **IASP** : Intenational Association for Study of pain
- **IPP** : Isopentényl diphosphate
- **J (Hz)** : constante de couplage exprimée en Hertz
- **LPS** : Lipopolysaccharide
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **PG** : Prostaglandine
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
- **RMN ¹³C** : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone

- **RMN ^1H** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton
- **ROESY**: Rotating Overhauser Effect Spectroscopy
- **s**: Singulet
- **SiO₂** : Silice normale
- **tr** : Temps de rétention
- **UV** : Ultra-Violet
- **δH** : Déplacement chimique du proton en ppm
- **δC** : déplacement chimique du carbone en ppm

Liste des Travaux

Ce travail a fait l'objet de publications et de communications suivantes :

Communications :

-Diara DIATTA, Abdoulaye GASSAMA, isabelle Lachaise, Michael Pharmacochimie et analyse structurale des métabolites de *Néocarya macrophylla (sabine) Prance Ex F.White* (feuilles, écorce de tige, racines) et des racines de *Raphionacme vignei E.B Bruce* ». Journée des doctorants de l'université paris EST de Thiais 2018-2019.

-Diara DIATTA, Abdoulaye GASSAMA, isabelle Lachaise, Michael Pharmacochimie et analyse structurale des métabolites de *Néocarya macrophylla (sabine) Prance Ex F.White* (feuilles, écorce de tige, racines) et des racines de *Raphionacme vignei E.B Bruce* » Journée Scientifique annuelle de la SOACHIM 2019 ziguinchor, Sénégal.

-Diara DIATTA, henry diassy, Abdoulaye GASSAMA isolation et détermination structurale des métabolites de *Raphionacme vignei E.B Bruce* 2eme édition du colloque, ayant pour thème “ l'arbre fruitier sauvage dans le système dans le système agroforestier en afrique de l'ouest “ 2019.

-Diara DIATTA, Abdoulaye GASSAMA, isabelle Lachaise, Michael Pharmacochimie et analyse structurale des métabolites de *Néocarya macrophylla (sabine) Prance Ex F.White* (feuilles, écorce de tige, racines) et des racines de *Raphionacme vignei E.B Bruce* journées scientifiques du cames 2021

-Diara DIATTA, Abdoulaye GASSAMA, isabelle Lachaise, Michael Pharmacochimie et analyse structurale des métabolites de *Néocarya macrophylla (sabine) Prance Ex F.White* (feuilles, écorce de tige, racines) et des racines de *Raphionacme vignei E.B Bruce* ; doctoriales UASZ 2022.

Poster

Diara DIATTA, Abdoulaye GASSAMA, isabelle Lachaise, Michael” isolation et identification des métabolites isolés de *neocarya macrophylla*” journée des doctorants de l'université paris EST de Thiais 2019-2020

Publication

Diara Diatta, Mamadou Fodé Camara, Madièye Sène, Philomène akoua Yao-Kouassi , Firmin Sylva Barboza , Abdoulaye Gassama , Catherine Lavaud and Guata Yoro Sy” Isolation, Chemical Characterization, Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Triterpenoids from the Tubers of *Raphionacme vignei* E. A. Bruce (Apocynaceae)” *European Journal of Medicinal Plants*, **2021**, 11:1-11.

Liste des figures

Figure 1: l'espece <i>néocarya</i> (https://fr.wikipedia.org/wiki/Neocarya_macrophylla 13 juillet 2020) ..	5
Figure 2: Squelette de flavonoïdes : a/ Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane et b/ 2-phénylchromone	7
Figure 3 : Les principales classes de flavonoïdes.....	8
Figure 4 : Structure d'un tanin gallique.....	11
Figure 5: Structure d'un tanin ellagique.....	11
Figure 6 : Exemple d'un tanin condensé	12
Figure 7 : Le stigmastérol.....	13
Figure 8 : Bis-(5,7-diacetyl-catechin-4- α -rhamnopyranoside).....	14
Figure 9: Le (+)-Catechin-3'-O-rhamnopyranoside	14
Figure 10 : flavan-3-ol.....	14
Figure 11 : Photo de la matière végétale <i>Raphionacme vignei E.Bruce</i> (photo Pr Diouma Kobor en 2019).....	17
Figure 12 : exemples de terpenes	19
Figure 13 : Principales classes de triterpènes	21
Figure 14 : Réaction inflammatoire : origine et séquences d'évènements ^[104]	26
Figure 15 : Diabète de type 1	30
Figure 16 : Diabète de type 2	30
Figure 17 : CCM extrait heptane des feuilles , éluant : heptane / AcOEt (7/3)	37
Figure 18 : Chromatogramme de purification par CPC de l'extrait heptane des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> : De [0 à 150 min] élution avec 100% CH ₃ CN ; [180 à 210] élution avec 100% heptane suivie d'une l'extrusion.....	37
Figure 19 : Spectre de proton de F5	39
Figure 20 : Spectre de proton de F9	39
Figure 21 : Spectre de proton de F12	40
Figure 22 : Spectre de proton de F17	40
Figure 23 : CCM extrait AcOEt des feuilles , éluant : heptane / AcOEt (7/3), UV 365 nm.....	41

Figure 24 : Chromatogramme de purification par CPC de l'extrait AcOEt des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> . De [0 à 120 min] élution avec 100 % phase inférieure puis de [150 à 240 min] élution avec 100 % phase supérieure suivie d'une extrusion.....	41
Figure 25 : Plaque CCM récapitulative de la purification de l'extrait AcOEt par CPC (condition CCM : hep/AcOEt (7/3).....	42
Figure 26 : Chromatogramme de purification par puriflash de la fraction F[4-9] condition : cyclohexane/AcOEt :100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt.....	43
Figure 27 : Chromatogramme de purification par puriflash de la fraction F20 condition : cyclohexane/AcOEt :100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt.....	45
Figure 28 : Spectre de proton de F1	46
Figure 29 : Spectre de proton de F2	47
Figure 30 : Chromatogramme HPLC de l'extrait BuOH des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> : Conditions analytiques CH ₃ CN/H ₂ O (70/30).....	48
Figure 31 : Chromatogramme de purification de l'extrait BuOH des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> par CPC : De [0 à 120 min] élution avec 100 % de la phase supérieure puis de [130 à 180 min] élution avec 100 % de la phase inférieure suivie d'une extrusion.	48
Figure 32 : Spectre de masse de F18.....	50
Figure 33 : Spectre de carbone de F18	51
Figure 34 : Spectre HSQC de F18.....	52
Figure 35 : Spectre de proton de F18	53
Figure 36 : Couplage COSY de F18 (partie aromatique).....	54
Figure 37 : Spectre de cosy de F18 (partie aromatique).....	54
Figure 38 : Couplages COSY de F18 partie osidique	55
Figure 39 : Spectre de COSY de F18 (partie osidique).....	55
Figure 40 : Correlation HMBC de F18	57
Figure 41 : Spectre HMBC de F18 (partie aromatique).....	58
Figure 42 : Structure de Isoorientine (numérotation proposée)	58
Figure 43 : Structure Isoorientine (numérotation systématique).....	58
Figure 44 : Spectre de masse de F14.....	60
Figure 45 : Spectre de carbone de F14	61
Figure 46 : Spectre de HSQC de F14	62
Figure 47 : Spectre de proton de F14	63
Figure 48 : Couplages COSY de F14.....	63
Figure 49 : Fragment galloyle	64

Figure 50 : groupement lutéoyle	65
Figure 51 : Corrélation HMBC de F14	66
Figure 52 : Spectre HMBC de F14.....	67
Figure 53 : Structure du composé 1-O-galloyl-6-O-lutéoyl R-glucose (numérotation proposée)	68
Figure 54 : Structure du composé 1-O-galloyl-6-O-lutéoyl R-glucose (numérotation systématique)..	69
Figure 55 : Spectre de masse de F10	71
Figure 56 : Spectre de carbone de F10	73
Figure 57 : Spectre de proton de F10	74
Figure 58 : Couplage COSY de F10	74
Figure 59 : Couplage COSY de F10 (partie osidique)	75
Figure 60 : Spectre de COSY de F10	75
Figure 61 : Structure de la molécule F10 (corrélation HMBC)	77
Figure 62 : Spectre de HMBC de F10.....	78
Figure 63 : Structure de la molécule F10	79
Figure 64 : CCM extrait AcOEt des écorces , éluant : heptane / AcOEt (7/3).....	81
Figure 65 : Chromatogramme de purification par flash chromatographie de l'extrait AcOEt des écorces de <i>Neocarya macrophylla</i> : condition : cyclohexane/AcOEt :100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt.	82
Figure 66 : Spectre de carbone de F8	83
Figure 67 : spectre de proton de F8.....	84
Figure 68 : L'acide bétulinique (numérotation proposée).....	85
Figure 69 : L'acide bétulinique (numérotation systématique)	86
Figure 70 : Spectre de proton de F12	87
Figure 71 : Chromatogramme HPLC de l'extrait BuOH des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> : Conditions analytiques : CH ₃ CN/H ₂ O (2/8)	88
Figure 72 : Chromatogramme de purification de l'extrait H ₂ O des écorces de <i>Neocarya macrophylla</i> par CPC : condition d'élution : gradient – ascendant.....	88
Figure 73 : Chromatogramme de purification par chromatographie flash la fraction [40-57].....	89
Figure 74 : le spectre de masse de F2'	91
Figure 75 : le spectre de carbone de F2.....	92
Figure 76 : structure du gentianose (Corrélations HMBC)	93
Figure 77 : Variation de la glycémie chez des rats normo-glycémiques traités avec l'extrait BuOH des écorces de <i>Neocarya macrophylla</i>	95

Figure 78 :Variation de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance de glucose après traitement avec l'extrait butanol des écorces de <i>Neocarya macrophylla</i>	97
Figure 79 : Variation de la glycémie chez des rats normo-glycémiques traités avec l'extrait AcOEt..	98
Figure 80 : Variation de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance de glucose après traitement avec l'extrait AcOEt.....	100
Figure 81 : Variation de la glycémie chez des rats normo-glycémiques traités avec l'extrait aqueux	101
Figure 82 : Variation de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance de glucose après traitement avec l'extrait aqueux	103
Figure 83 : Spectre d'infrarouge du composé de DDQ4A	106
Figure 84 : Spectre de carbone du composé DDQ4A	107
Figure 85 : Spectre de proton du composé DDQ4A	108
Figure 86 : Spectre HSQC du composé DDQ4A	108
Figure 87 : Système de spin COSY ou Différents fragments COSY	109
Figure 88 : Spectre de COSY du composé DDQ4A	109
Figure 89 : Importantes corrélations HMBC du composé DDQ4A	111
Figure 90 : Spectre HMBC du composé DDQ4A	111
Figure 91 : Structure d'acétate de lupéol (numérotation systématique).....	112
Figure 92 : Spectre de carbone du composé DDQ2A	114
Figure 93 : Spectre de DEPT 135 du composé DDQ2A.....	115
Figure 94 : Structure du dodécanoate de lupéol	115
Figure 95 : Structure du lupéol.....	116
Figure 96 : Spectre d'infrarouge du composé de DDQ3A.....	117
Figure 97 : Spectre de carbone du composé DDQ3A	117
Figure 98 : Spectre de carbone du composé DDQ3A (suite).....	118
Figure 99 : Spectre de proton du composé DDQ3A	119
Figure 100 : Spectre de HSQC du composé DDQ3A	119
Figure 101 : Structure de l'acétate du béta amyryne.....	120
Figure 102 : Spectre de COSY du composé DDQ3A	120
Figure 103 : Couplage COSY du composé DDQ3A.....	121
Figure 104 : Spectre HMBC du composé DDQ3A	122
Figure 105 : Corrélation HMBC du composé DDQ3A.....	122
Figure 106 : Structure de l'acétate du béta amyryne (Numérotation proposée dans la littérature)....	123
Figure 107 : Spectre de carbone du composé DDQ1A	125
Figure 108 : Spectre de DEPT 135 du composé DDQ1A.....	126

Figure 109 : Structure du dodécanoate de béta amyryne	126
Figure 110 : Spectre de carbone du composé DDQ6B	127
Figure 111 : Spectre de carbone du composé DDQ6B (suite)	127
Figure 112 : Spectre de proton du composé DDQ6B.....	128
Figure 113 : Spectre HSQC du composé DDQ6B	128
Figure 114 : Structure du β -sitostérol (Numérotation proposée)	129
Figure 115 : Structure du β -sitostérol (Numérotation systématique)	129
Figure 116 : Activité anti-inflammatoire de DDQ2	137
Figure 117 : Activité anti-inflammatoire de DDQ3	141
Figure 118 : Activité anti-inflammatoire de DDQ4	145
Figure 119 : Activité anti-inflammatoire de DDQ5	148
Figure 120 : Activité anti-inflammatoire de DDQ6	151
Figure 121 : Activité analgésique de DDQ3, DDQ2 et DDQ4	157
Figure 122 : les régions de récolte de <i>Neocarya macrophylla</i> (Sédhiou (région) — Wikipédia (wikipedia.org)03/06/2022).....	160
Figure 123 : Diagramme d'extraction liquide-liquide des feuilles et écorces de <i>Neocarya macrophylla</i>	161
Figure 124 : CCM extrait AcOEt des feuilles , éluant : heptane / AcOEt (7/3), UV 365 nm	164
Figure 125 : Appareil de la Chromatographie gageuse (GC).....	165
Figure 126 : Appareil de la Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	166
Figure 127 : Appareil de la chromatographie liquide couplée masse	166
Figure 128 : Appareil de chromatographie flash.....	167
Figure 129 : Appareil de chromatographie de partage centrifuge.....	169
Figure 130 : spectroscopie RMN BRUKER 400MHZ	170
Figure 131 : Spectre de masse en mode négatif de DDQ1A et DDQ2A	183
Figure 132 : Spectre de masse de DDQ3A et DDQ4A	183
Figure 133 : Spectre de proton de F2'	184

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux triterpènes d'intérêt thérapeutique	23
Tableau 2 : Quelques composés triterpéniques d'origine végétale à activité analgésique et anti-inflammatoire	24
Tableau 3 : Bilan massique et rendements des extraits de <i>Neocarya macrophylla</i> (pour 100 g de poudre matière végétale)	34
Tableau 4 : Résultats du screening phytochimique de <i>Neocarya macrophylla</i>	36
Tableau 5 : CCM extrait heptane des feuilles, éluant : heptane / AcOEt (7/3).....	38
Tableau 6 : Bilan matière de purification par CPC de l'extrait AcOEt des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i>	42
Tableau 7 : Bilan matière de purification par flash chromatographie de la fraction F [4-9]	44
Tableau 8 : Bilan matière de purification par puriflash de la fraction 20	45
Tableau 9 : Bilan matière de purification de l'extrait BuOH des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> par CPC	49
Tableau 10 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé F18 dans MeOD, δ en ppm, comparé à ceux de la littérature	58
Tableau 11 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé F14 dans MeOD, δ en ppm, comparé à ceux de la littérature	69
Tableau 12 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé F10 dans MeOD, δ en ppm.....	79
Tableau 13 : Bilan de la purification par chromatographie flash de l'extrait AcOEt des écorces de <i>Neocarya macrophylla</i>	82
Tableau 14 : bilan de la purification par CPC l'extrait H ₂ O des écorces de <i>Neocarya macrophylla</i> ...	89
Tableau 15 : Bilan de la purification par chromatographie flash de la fraction [40-57].....	90
Tableau 16 : Variations du glucose sanguin chez rats normo-glycémiques après administration de la fraction butanolique de la poudre d'écorces de <i>Neocarya macrophylla</i> (30 mg/kg, per os)	94
Tableau 17 : Variations de la glycémie (g /L) lors d'un test de tolérance au glucose après prétraitement par la fraction butanolique de la poudre d'écorces de <i>Neocarya macrophylla</i> à la dose de 30 mg/kg per os	96
Tableau 18 : Variations du glucose sanguin chez rats normo-glycémiques après administration de la fraction AcOEt de la poudre des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> (100 mg/kg, per os)	98

Tableau 19 : Variations de la glycémie (g /L) lors d'un test de tolérance au glucose après prétraitement par la fraction AcOEt de la poudre des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> à la dose de 100 mg/kg per os	99
Tableau 20 : Variations de la glycémie (g /L) lors d'un test de tolérance au glucose après prétraitement par la fraction aqueuse de la poudre des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i> à la dose de 100 mg/kg per os.	102
Tableau 21 : Rendement des extraits de racine de <i>Raphionacme vignei</i>	104
Tableau 22 : Résultats des tests phytochimiques des racines de <i>Raphionacme vignei</i>	105
Tableau 23 : Les déplacements chimiques des composés de DDQ4A et ceux décrits dans la littérature.	113
Tableau 24 : Les déplacements chimiques des composés de DDQ3A et ceux décrits dans la littérature.	123
Tableau 25 : Comparaison des déplacements chimiques du composé DDQ6B avec ceux décrits dans la littérature	129
Tableau 26 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de l'eau physiologique (10 ml/kg, per os).....	132
Tableau 27 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de l'AAS (10 mg/kg per os).....	133
Tableau 28 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, per os de l'extrait DDQ2.....	134
Tableau 29 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration 3 mg/kg, per os de DDQ2	135
Tableau 30 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 10 mg/kg, per os de DDQ2	136
Tableau 31 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, per os de DDQ3	138
Tableau 32 : variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 3 mg/kg, per os de DDQ3	139
Tableau 33 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 10 mg/kg, per os de DDQ3	140
Tableau 34 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, per os de DDQ4	142
Tableau 35 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 3 mg/kg, per os de DDQ4	143

Tableau 36 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 10 mg/kg <i>per os</i> de DDQ4	144
Tableau 37 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, <i>per os</i> de DDQ5	146
Tableau 38 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 3 mg/kg, <i>per os</i> de DDQ5	147
Tableau 39 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, <i>per os</i> de DDQ6	149
Tableau 40 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 3 mg/kg, <i>per os</i> de DDQ6	150
Tableau 41 : Contorsions chez la souris après administration de l'eau physiologique 10 mL/kg, <i>per os</i>	152
Tableau 42 : Effet analgésique de l'AAS (100 mg/kg <i>per os</i>) chez la souris	153
Tableau 43 : Effet analgésique de DDQ2 (1 mg/kg, <i>per os</i>) chez la souris.....	154
Tableau 44 : Effet analgésique de DDQ2 (3 mg/kg, <i>per os</i>) chez la souris.....	154
Tableau 45 : Effet analgésique de DDQ2 (10 mg/kg, <i>per os</i>) chez la souris.....	154
Tableau 46 : Effet analgésique de DDQ3 (1 mg/kg, <i>per os</i>) chez la souris.....	155
Tableau 47 : Effet analgésique de DDQ3 (3 mg/kg, <i>per os</i>) chez la souris.....	155
Tableau 48 : Effet analgésique de DDQ4 (300 µg/kg, <i>per os</i>) chez la souris	156
Tableau 49 : Effet analgésique de DDQ4 (1 mg/kg, <i>per os</i>) chez la souris.....	156
Tableau 57 : bilan de purification par chromatographie sur flash de l'extrait acétone des racines de <i>Raphionacme vignei</i>	174

Liste des schémas

schéma 1 : Biosynthèse des flavonoïdes.....	9
schéma 2 : Biosynthèse des triterpènes	22

Table des matières

Remerciements	I
Liste des abréviations	III
Liste des Travaux	V
Liste des figures	VII
Liste des schémas	XV
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE	3
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Chapitre 1 : Étude sur <i>Neocarya macrophylla</i> : étude botanique, étude chimique et biologique antérieures.....	4
I. Étude botanique sur <i>Neocarya macrophylla</i>	4
I.1. Famille des chrysobalanaceae	4
I.2. Le genre <i>Neocarya</i>	4
I.3. Espèce <i>Neocarya macrophylla</i> sabine prance & f.white	4
I.3.1. Nom vernaculaire	4
I.3.2. Description botanique.....	5
I.3.3. Utilisation traditionnelle	5
I.3.4. Utilisation alimentaire	6
II. Études chimiques sur <i>Neocarya macrophylla</i>	6
II.1. Les polyphénols	6
II.1.1. Les flavonoïdes	7
II.1.1.1. Définition	7
II.1.1.2. Biosynthèse des flavonoïdes	8
II.1.1.3. Quelques exemples de propriétés pharmacologiques des flavonoïdes	9
II.1.1.3.1. Activité anti-inflammatoire	9
II.1.1.3.2. Activité antidiabétique	10
II.1.1.3.3. Activité anti bactérienne	10
II.1.1.3.4. Activité anti-cancéreuse	10

II.1.2. Les tanins	10
II.1.2.1. Les tanins hydrolysables.....	11
II.1.2.2. Les tanins condensés, non hydrolysables	12
II.1.2.3. Propriétés pharmacologiques des tannins.....	12
II.2. Molécules isolées de <i>Neocarya macrophylla</i>	13
III. Études biologiques antérieures sur <i>Neocarya macrophylla</i>	15
Chapitre 2 : Études sur <i>Raphionacme vignei</i> E. Bruce : études botaniques, études chimique et biologique antérieures	16
I. Études botaniques.....	16
I.1. Famille des Périplocaceae	16
I.2. Genre du <i>Raphionacme</i>	16
I.3. Espèce de <i>Raphionacme vignei</i> E. A. Bruce.....	16
I.3.1. Nom vernaculaire	16
I.3.2. Répartition géographique	17
I.3.3. Description botanique.....	17
I.3.4. Utilisation traditionnelle	17
II. Études chimiques sur <i>Raphionacme vignei</i>	17
II.1. Généralités sur les triterpènes	18
II. 1. 1. Définition et nomenclature	18
II.1.2. Origine, classification, biosynthèse et Propriétés pharmacologiques des triterpènes.....	20
II.1.2.1. Origine	20
II.1.2. 2. Classification des triterpènes et stéroïdes	20
II.1.2.3. Biosynthèse des triterpènes.....	21
II.1.2.4. Quelques exemples de Propriétés pharmacologiques des triterpènes	23
Chapitres 3 : Rappels sur l'inflammation, la douleur et le diabète.....	25
I. Généralités sur l'inflammation et la douleur	25
I.1. Généralités sur l'inflammation.....	25
I.1.1. Définition de l'inflammation	25

I.1.2. Types d'inflammation.....	26
I.1.2.1. L'inflammation aiguë.....	26
I.1.2.2. L'inflammation chronique	27
I.2. Généralités sur la douleur	27
I.2.1. Définition de la douleur.....	27
I.2.2. Douleur aiguë	27
I.2.3. Douleur chronique.....	27
I.3. Traitement actuelle de l'inflammation et la douleur	27
I.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	28
I.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	28
I.4. L'inflammation et les plantes médicinales.....	28
II. Généralités sur le diabète	29
II.1. Définition du diabète.....	29
II.2. Types de diabète	29
II.2.1. Le Diabète de type 1.....	29
II.2.1. Le Diabète de type 2.....	30
II.3. Traitement actuel du diabète.....	31
II.4. Le diabète et les plantes médicinales.....	31
DEUXIEME PARTIE	32
RESULTATS ET DISCUSSION	32
Chapitre 1 : Résultats sur l'étude phytochimique et biologique de <i>Neocarya macrophylla</i>	33
I. Résultats sur de l'étude phytochimique de <i>Neocarya macrophylla</i>	34
I.1. Résultats sur l'extraction de <i>Neocarya macrophylla</i>	34
I.2. Résultats sur le screening phytochimique des extraits de <i>Neocarya macrophylla</i>	35
I.3. Résultats de purification des extraits de <i>Neocarya macrophylla</i>	36
I.3.1. Résultats de purification par CPC des extraits des feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i>	37
I.3.1.1. Purification de l'extrait heptane	37
I.3.1.1.1. Détermination structurale de F5, F9, F12 et F17	38

I.1.3.1.2. Purification de l'extrait AcOEt	41
I.3.1.2.1. Détermination structurale de F1 et F2.....	45
I.3.1.3. Purification de l'extrait BuOH.....	47
I.3.1.3.1. Détermination structurale de F10, F14, et F18	49
I.3.1.3.1.1. Détermination structurale de F18.....	49
I.3.1.3.1.2. Détermination structurale de F14.....	59
I.3.1.3.1.3. Détermination structurale de F10.....	71
I.3.2. Résultats de purification des extraits des écorces de <i>Neocarya macrophylla</i>	81
I.3.2.1. Purification de l'extrait AcOEt	81
I.3.2.1.1. Détermination structurale F8.....	83
I.3.2.1.2. Détermination structurale de F12.....	86
I.3.2.2. Purification de l'extrait H ₂ O	87
I.3.2.2.1. Détermination structurale de F2'	90
II. Résultats sur de l'étude biologique de <i>Neocarya macrophylla</i>	93
II.1. Résultats des tests d'activité antidiabétique des extraits écorces de <i>Neocarya macrophylla</i>	93
II.1.1. Résultats des tests d'activité antidiabétique l'extrait BuOH.....	93
II.1.1.1. Chez des rats normo-glycémiques	93
II.1.1.2. Test de tolérance au glucose.....	95
II.2. Résultats des tests d'activité antidiabétique des extraits feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i>	97
II.2.1. Résultats des tests d'activité antidiabétique l'extrait AcOEt	97
II.2.1.1. Chez des rats normo-glycémiques	97
II.2.1.2. Test de tolérance au glucose.....	99
II.2.2. Les résultats des tests d'activité antidiabétique de l'extrait aqueux.....	100
II.2.2.1. Chez des rats normo-glycémiques	100
II.2.2.2. Test de tolérance au glucose.....	102
II.3. Conclusion partielle sur l'évaluation des tests d'activité antidiabétique	103
Chapitre 1 : Résultats sur l'étude phytochimique et biologique de <i>Raphionacme vignei</i>	104
I. Résultats sur l'étude phytochimique de <i>Raphionacme vignei</i>	104

I.1. Résultats sur l'extraction de <i>Raphionacme vignei</i>	104
I.2. Résultats sur le Screening phytochimique des extraits de <i>Raphionacme vignei</i>	104
II.3. Résultats de purification de l'extrait acétone des racines de <i>Raphionacme vignei</i>	105
I.3.1. Détermination structurale de DDQ1A, DDQ2A, DDQ3A, DDQ4A, DDQ5A et DDQ6A.....	105
I.3.1.1. Détermination structurale du composé DDQ4A	105
I.3.1.2. Détermination structurale des composés DDQ2A et DDQ5B	113
I.3.1.3. Détermination structurale du composé DDQ3A	116
I.3.1.4. Détermination structurale de DDQ1A.....	124
I.3.1.5. Détermination structurale de DDQ6B.....	126
II. Résultats sur l'étude biologique des racines de <i>Raphionacme vignei</i>	131
II.1. Résultats de l'activité anti-inflammatoire	131
II.1.1. Administration de l'eau physiologique (10 mL/kg, per os) et de l'acide acétylsalicylique (10 mg/kg, per os).....	131
II.1.2. Activité anti-inflammatoire des DDQ2-DDQ6	134
II.2. Résultats de l'activité analgésique	152
II.2.1. Activité analgésique du contrôle (eau physiologique) et de la référence (Acide acétylsalicylique-AAS)	152
II.2.2. Activité analgésique chez la souris de DDQ2, DDQ3, et DDQ4	153
II.3. Conclusion partielle sur l'évaluation des tests inflammatoires et analgésiques	157
Chapitre 1 : Étude phytochimique et biologique sur <i>Neocarya macrophylla</i>	160
I. Étude phytochimique sur <i>Neocarya macrophylla</i>	160
I.1. Matière végétale	160
I.2. Extraction, et Screening phytochimique et purification des différents extraits des écorces et feuilles de <i>Neocarya macrophylla</i>	160
I.2.1. Extraction des métabolites secondaires de <i>Neocarya macrophylla</i>	160
I.2.2. Screening phytochimique des différents extraits de <i>Neocarya macrophylla</i>	161
I.2.2.1. Les stérols et les polyterpènes	161
I.2.2.2. Les polyphénols	162

I.2.2.3. Flavonoïdes.....	162
I.2.2.4. Les tannins.....	162
I.2.2.5. Les substances quinoniques libres ou combinées.....	162
I.2.2.6. Les alcaloïdes.....	163
I.2.2.7. Les saponines	163
I.2.3. Présentation des équipements utilisés dans la Purification et la caractérisation des différents métabolites des extraits de <i>Neocarya macrophylla</i>	163
I.2.3.1. Matériel chromatographique analytique.....	163
I.2.3.1.1. Chromatographie sur couche mince CCM.....	163
a. Principe.....	163
b. Méthode.....	163
I.2.3.1.2 Chromatographie gazeuse (GC)	164
a. Principe.....	164
b. Méthode.....	164
I.2.3.1.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	165
a. Principe.....	165
b. Méthode.....	165
I.2.3.1.4. Chromatographie liquide couplée à la masse (LC/MS)	166
a. Principe.....	166
b. Méthode.....	166
I.2.3.2. Matériel chromatographique préparative	166
I.2.3.2.1. Chromatographie sur colonne flash.....	166
a. Principe.....	166
b. Présentation de l'équipement.....	166
c. Méthodologie d'une purification.....	167
I.2.3.2.2. Chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	167
a. Principe.....	167
b. Présentation de l'équipement CPC	168

c. Méthodologie d'une séparation	169
I.3. Spectroscopie RMN	170
a. Principe	170
b. Méthode	170
II. Étude biologique sur <i>Neocarya macrophylla</i>	170
II.1. Activité antidiabétique des extraits de <i>Neocarya macrophylla</i>	170
II.1.1. Matériel animal	170
II.1.2. Essais chez des rats normo-glycémiques.....	170
II.1.3. Essais sur un test de tolérance au glucose	171
II.1.4. Dosage du glucose	171
II.1.5. Analyse statistique	171
Chapitre 2 : Étude phytochimique et biologique des racines de <i>Raphiocme vignei</i> E. Bruce.....	172
I. Étude phytochimique sur <i>Raphiocme vignei</i>	172
I.1.Matière végétale	172
I.2. Extraction, Screening phytochimique et purification des différents extraits des racines de <i>Raphionacme vignei</i>	172
I.2.1. Extraction des métabolites secondaires de <i>Raphionacme vignei</i>	172
I.2.2. Screening phytochimique des différents extraits de <i>Raphionacme vignei</i>	173
I.2.3. Purification par chromatographie sur flash de l'extrait acétone des racines de <i>Raphiocme vignei</i>	173
I.3. Caractérisation des composés isolés l'extrait acétone de <i>Raphionacme vignei</i>	174
II. Étude biologique sur <i>Raphionacme vignei</i>	175
II.1. Matériel	175
II.1.1. Outils pharmacologiques.....	175
II.1.2. Matériel et Réactifs de laboratoire	175
II.1.3. Matériel Animal.....	176
II.2. Études pharmacologiques	176
II.2.1. Œdème de la patte de rat induit par la carraghénine	176
II.2.2. Test de Douleur à l'acide acétique	178

CONCLUSION	180
ANNEXES.....	183
RESUME	185
ABSTRACT	186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187

INTRODUCTION

L'utilisation de plante à usage médicinal est largement répandue en Afrique. Selon l'organisation mondiale de la santé, 80% de la population africaine se soignent exclusivement avec des plantes médicinales [1]. En effet, l'utilisation de ces plantes médicinales peut être due aux facteurs socio-économiques, par manque d'accès aux médicaments conventionnels, ou liée à la culture traditionnelle et ancestrale basée entièrement ou partiellement sur une médecine naturelle. On trouve ainsi de nombreuses plantes chez les guérisseurs traditionnels dans les marchés, et 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.

Depuis les dernières décennies, la communauté scientifique s'intéresse aux propriétés pharmacologiques des plantes médicinales car elles sont potentiellement source de nouveaux composés bio actifs. Actuellement, beaucoup de médicaments disponibles proviennent directement des plantes 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.[2]

Aujourd'hui, l'efficacité de la phytothérapie est prouvée et ses bienfaits incontestables pour notre santé ont permis à la médecine naturelle d'entrer dans nos habitudes quotidiennes. [3]

C'est dans cette optique que l'université Assane Seck de Ziguinchor, a mis en place un programme de recherche visant à la valorisation de la biodiversité de la flore du Sénégal, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques.

Ce travail vise à étudier l'activité anti-inflammatoire, analgésique, et antidiabétique des extraits et molécules isolées des plantes des *Neocarya macrophylla* et le *Raphiocme vignei* de la pharmacopée sénégalaise. L'impact de l'inflammation et du diabète sur les systèmes de santé est très lourd à travers les pertes humaines, aux coûts liés aux traitements, à la prise en charge et aux complications [4;5]. Les plantes *Neocarya macrophylla* et le *Raphiocme vignei* ont été sélectionnées d'une part en fonction de leurs utilisations en médecine traditionnelle respectivement dans le traitement du diabète de type 2 et l'inflammation et d'autre part de leur méconnaissance sur le plan phytochimique.

Des études phytochimiques réalisées lors de mon mémoire de master sur les racines de *Raphionacme vignei* ont permis d'isoler 6 molécules appartenant à la famille des triterpènes à savoir : le dodécanoate

de bêta amyryne, le dodécanoate de lupéol, l'acétate de bêta amyryne, l'acétate de lupéol, lupéol et le β -sitostérol. D'autre part les recherches bibliographiques réalisées sur les extraits des différentes parties de la plante *Neocacarya macrophylla* ont montré une activité antioxydante intéressante [6;7], mais à ce jour aucune étude sur les activités anti-hyperglycémiantes n'est encore réalisée.

L'objectif de ce travail est donc :

- ✓ extraire, isoler et caractériser les molécules présentes dans différentes parties de la plante,
- ✓ réaliser des tests anti-inflammatoires, analgésiques et antidiabétiques *in vivo* chez le Rat sur tous les extraits, fractions et molécules isolés afin de réaliser un bioguidage des étapes d'extractions,
- ✓ identifier parmi les différentes molécules isolées, celles présentant une bioactivité ; mettre en évidence des relations structure-activité.

Ce manuscrit débutera par une partie bibliographique présentant les généralités sur l'étude botanique, les travaux sur les principaux métabolites secondaires isolés de la famille, et les études biologiques antérieures des plantes *Neocarya macrophylla* et *Raphiocme vignei*. Les résultats sur l'étude phytochimique (les étapes d'isolement et détermination structurale) et les activités biologiques des deux plantes seront décrites dans une seconde partie. Enfin, nous présenterons dans la troisième partie les travaux expérimentaux sur l'étude phytochimique et biologique.

Ce travail de thèse, est le fruit d'une collaboration de trois laboratoires : Laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux (LCPM), Université Assane seck de Ziguinchor, l'institut de chimie et des matériaux de Paris-Est (Plateforme Chromatographie Analytique et Préparative), Université Paris Est-Créteil, France, et Laboratoire de Pharmacologie et Pharmacodynamie, Faculté de Médecine, de Pharmacie, et d'Odontologie, Université de Cheikh Anta Diop, et s'inscrit dans ce cadre de la recherche de nouveaux composés qui peuvent trouver une application thérapeutique vis-à-vis des médicaments modernes.

PREMIERE PARTIE
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Étude sur *Neocarya macrophylla* : étude botanique, étude chimique et biologique antérieures

I. Étude botanique sur *Neocarya macrophylla*

I.1. Famille des chrysobalanaceae

Le *Neocarya macrophylla* appartient à la famille des chrysobalanaceae, composée de 20 genres et plus de 500 espèces d'arbres et d'arbustes. Elle est pantropicale et figure parmi les arbres les plus répandus dans les forêts tropicales [8, 9, 10]. Elle est largement répartie le long des savanes côtières du Sénégal au Libéria, des savanes boisées du sud du Mali, du Niger et du nord du Nigéria. Les études phylogénétiques moléculaires et l'anatomie de la flore indiquent que le Chrysobalanaceae est étroitement apparenté à *Euphroniaceae*, *Dichapetalaceae* et *Trigonaceae* au sein du grand ordre *Malpighiales* et autres [11, 12, 13]. Les synapomorphies de la reproduction soutiennent la monophylie de la famille [14]. Des estimations de la divergence moléculaire ont déduit l'origine du Crétacé tardif mais les fossiles sont essentielles pour tester des hypothèses sur la diversification et l'histoire biogéographique de la famille [15, 16, 17].

I.2. Le genre *Neocarya*

Le genre *neocarya* est composé de 50 espèces et a été présente dans des régions pantropicales [18]. Il est très commun dans les sables littoraux, soumis aux vents, il reste souvent buissonnant et rabougri. Il existe à l'intérieur du Sénégal dans les sables du Cayor et dans certaines vallées humides soudaniennes également sablonneuses où le climat est marqué par une pluviométrie déficiente et mal répartie temporellement et spatialement [19].

I.3. Espèce *Neocarya macrophylla* sabine prance & f.white

I.3.1. Nom vernaculaire

La plante est connue sous plusieurs noms vernaculaires au Sénégal comme :

- En bambara : wo ;
- En français : pomme du Cayor ;
- En diola Fogny : ba, baabu ;
- En diola de Efock : buel ;
- En diola de Diembereng : nuhumtan, bain ;
- En mandjague : bunou ;
- En mandingue : tâba ;
- En peul, toucouleur : naodé, neudi ;
- En sérère : daf ;

- En socé : daf ;
- En wolof : néou

I.3.2. Description botanique

Le *neocarya macrophylla* *sabine prance & f.white* est une espèce purement ouest-africaine connue également sous le nom de *Parinaria macrophylla* *sabine prance & f.white* [20]. C'est un arbre de 8 à 10 m de hauteur et cylindrique. Ses écorces sont rugueuses à la cime arrondie et les jeunes branches sont pubescentes. Les feuilles sont alternées, de formes ovales, et arrondies ou cordées à la base au sommet de 18 sur 10 cm, avec 15 à 20 paires de nervures latérales. Les fleurs sont blanches et densément tomenteuses. La pulpe du fruit est épaisse et sucrée à maturité.



Figure 1: l'espèce *néocarya* (https://fr.wikipedia.org/wiki/Neocarya_macrophylla 13 juillet 2020)

I.3.3. Utilisation traditionnelle

- En Afrique

Le *Neocarya macrophylla* est largement utilisé en Afrique dans la médecine traditionnelle. Ses vertus thérapeutiques sont nombreuses et l'ensemble de la plante (écorces, feuilles, pulpe de fruit) est utilisé principalement sous forme de décoction dans le traitement du cancer, de la douleur, de l'inflammation [21], du diabète et de l'hypertension.

- Au Sénégal

Il est également utilisé à d'autres fins comme par exemple chez les wolofs, les racines sont chargées d'une grande puissance mystique pour délivrer les individus tourmentés par les « rabs » (esprits ancestraux) et les possédés de « dëm » (mangeurs et mangeuses d'âmes).

Dans la région de Kaolack (Sine), la décoction de la pulpe du fruit est considérée comme anti diarrhéique et les racines comme "charme protecteur" contre le mauvais sort. [19]

I.3.4. Utilisation alimentaire

L'arbre joue un rôle capital dans les systèmes de production agricole des pays en voie de développement en général et sahéliens en particulier. Son importance est particulièrement vitale dans les zones sèches d'Afrique, au sud du Sahara, où il est utilisé comme source d'alimentation tout en étant un élément régulateur des conditions agro-climatiques [22, 23]. Les fruits et les feuilles des ligneux font partie des principales sources de vitamines et des sels minéraux nécessaires à l'équilibre alimentaire des populations africaines [24 ; 25].

II. Études chimiques sur *Neocarya macrophylla*

Les recherches des compositions chimiques sur *Neocarya macrophylla* ont été relativement très peu exploitées. Une étude phytochimique préliminaire réalisée par l'équipe de A.J.Yusuf sur l'extrait méthanol d'écorce de tige de *Neocarya macrophylla* dont les molécules isolées seront décrites par la suite [26]. Le résultat de celle-ci a révélé la présence

- De métabolites primaires tels que les glucides, et les acides gras ;
- De métabolite secondaires tels que les stéroïdes et triterpènes, les composés phénoliques, et les alcaloïdes.

Nous présenterons uniquement les polyphénols tels que les flavonoïdes et les tannins qui constituent la plupart des métabolites secondaires isolés de la famille des chrysobalanaceae. [21]

II.1. Les polyphénols

Les composés phénoliques sont constitués d'un noyau aromatique comportant une ou plusieurs fonctions hydroxyles ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyl ester, glycoside,). Ils sont produits principalement par les plantes et sont probablement les composés 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 [27]. Parmi les polyphénols, nous pouvons citer : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins, les anthraquinones, les coumarines etc...

II.1.1. Les flavonoïdes

II.1.1. 1. Définition

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaines), assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets [28; 29].

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones « 2-phényl-1-benzopyrane », constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par un cycle pyranique central (figure 2). A l'heure actuelle plus de 6467 [2] flavonoïdes ont été caractérisés. Contrairement aux flavonoïdes présents dans les fleurs, qui leur confèrent leurs couleurs, les flavonoïdes présents dans les feuilles, sont masqués par la présence de chlorophylle [30]. On distingue 15 familles de composés de type flavonoïdes, dont les plus fréquentes sont les suivantes : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, auronnes et anthocyanes [34 ; 31]. Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire [32] et ils peuvent se présenter à la fois sous forme libre ou sous forme d'hétérosides qui résultent de la combinaison du groupe réducteur d'un ose avec une substance non glucidique [33]. Les flavonoïdes sont largement distribués à travers le règne végétal et animal mais aussi sont communément trouvés dans les fruits, les légumes, et les boissons [34].

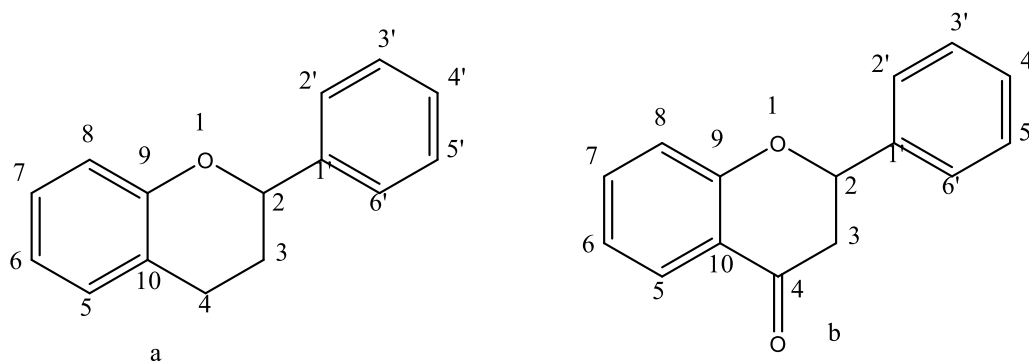


Figure 2: Squelette de flavonoïdes : a/ Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane et b/ 2-phénylchromone

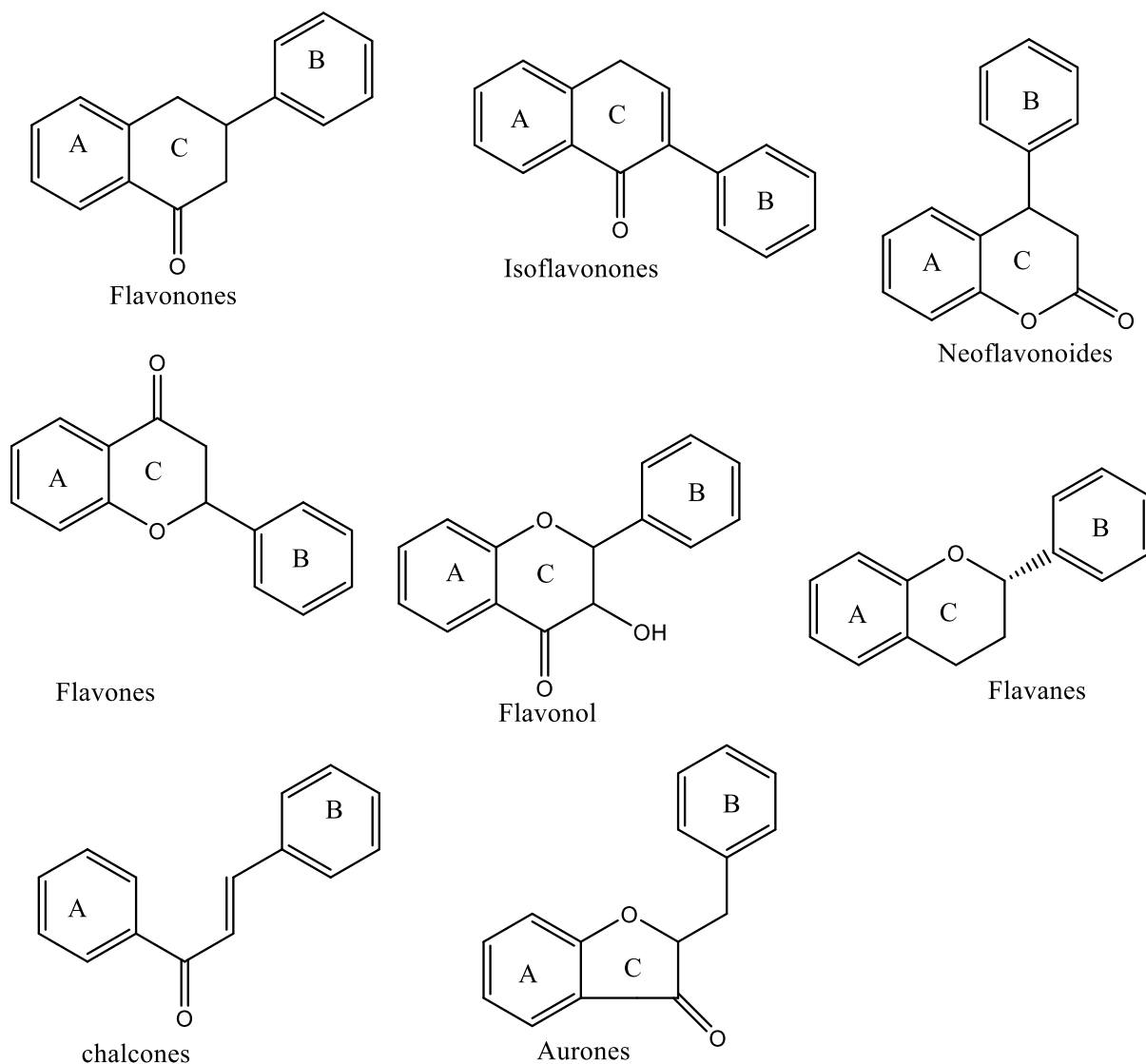


Figure 3 : Les principales classes de flavonoïdes

II.1.1.2. 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 malonylcoenzyme A (malonylCoA), 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 [35] comme représenté au schéma 1.

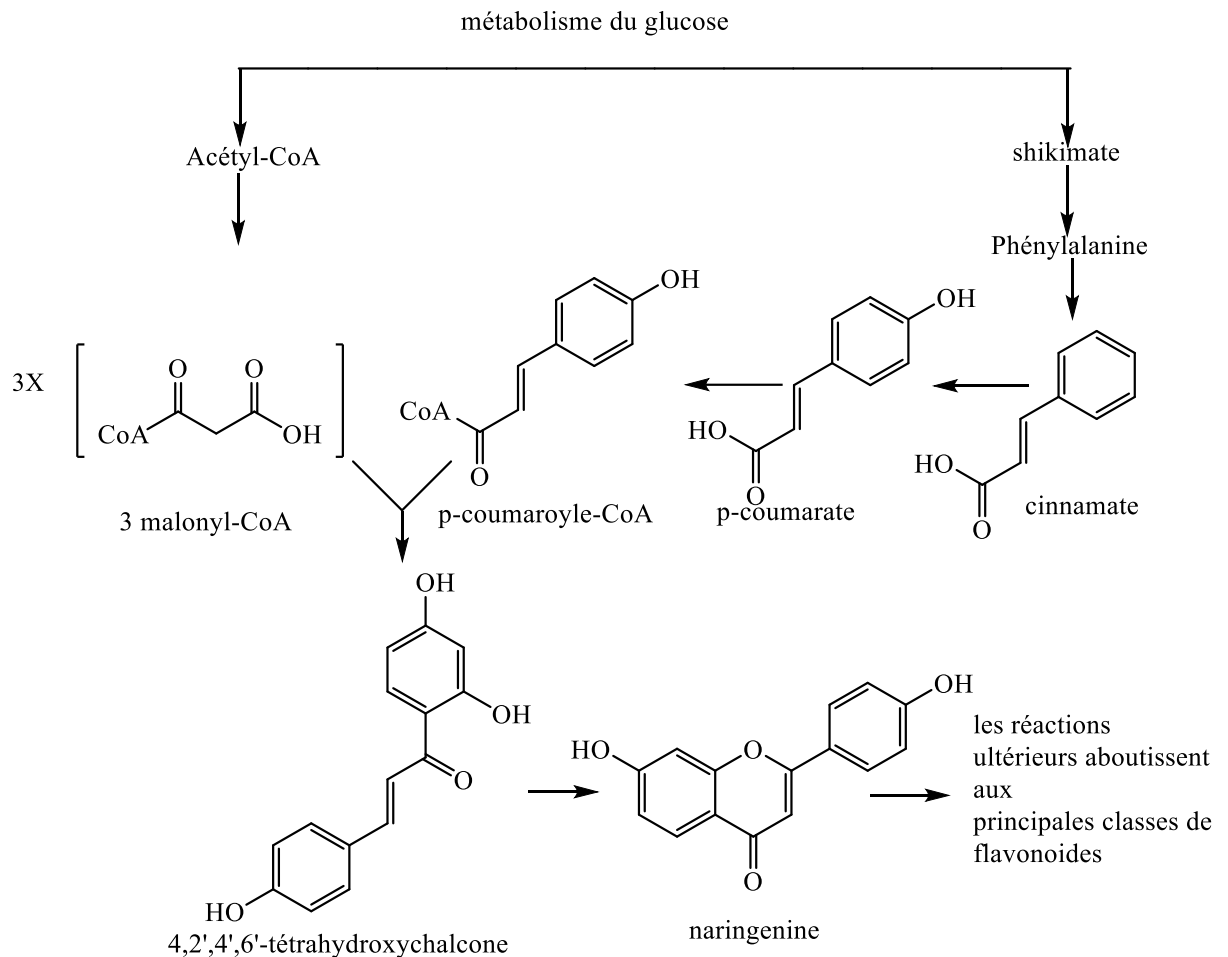


Schéma 1 : Biosynthèse des flavonoïdes

II.1.1.3. Quelques exemples de propriétés pharmacologiques des flavonoïdes

Les propriétés pharmacologiques des flavonoïdes ont été plusieurs fois démontrées. Parmi celles-ci nous pouvons citer :

II.1.1.3.1. Activité anti-inflammatoire

Plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire [36, 37, 38]. C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxigénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxigénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45]. L'héspéridine,

administrée par voie sous-cutanée (car inactive *per os*), présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat dont l'œdème a été induit aussi bien par la carragénine que par le dextran [46]. L'action pharmacologique des flavonoïdes pourrait présenter un intérêt dans le traitement des désordres allergiques en sous-régulant des mastocytes qui sont des cellules qui participent aux réactions allergiques et à l'inflammation en sécrétant des médiateurs inflammatoires comme l'histamine et des cytokines pro-inflammatoires. En effet, une étude portée sur l'astragaline, la fisetine, le kaempferol, la myricétine, la quercétine et la rutine, sur les réactions inflammatoires allergiques induites par les mastocytes a permis de constater que toutes ces molécules, hormis l'astragaline, inhibaient la sécrétion de l'histamine. Les flavonoïdes actifs dans cette étude ont également inhibé la hausse du taux de calcium intracellulaire [47].

II.1.1.3.2. Activité antidiabétique

Les flavonoïdes préviennent la cataracte diabétique car ils inhibent l'aldose réductase du cristallin [48]. En effet, la myricétine présente des effets hypoglycémiant chez les animaux diabétiques [49; 50].

Les résultats obtenus de l'étude de l'activité préventive des extraits flavonoïques montrent que certains composés phénoliques sont pourvus d'un pouvoir chémo-protecteur contre l'effet délétère et diabétogène de l'alloxane. Cet effet se manifeste par le maintien de l'équilibre redox des cellules pancréatiques malgré l'effet pro-oxydant et cyto-toxique de l'alloxane, ce qui protège ainsi les cellules β d'une cytolysse [51].

II.1.1.3.3. Activité anti bactérienne

Une étude sur l'activité antibactérienne des polyphénols extraits de la plante médicinale *Origanum glandulosum* Desf montre que tous les flavonoïdes isolés ont un effet inhibiteur sur les quatre souches à divers degrés selon la relation dose-réponse. Par ailleurs, l'inhibition de la croissance bactérienne décroît avec l'abaissement de la concentration des fractions flavonoïdes [52].

II.1.1.3.4. Activité anti-cancéreuse

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments. La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du côlon. La présence de 20% de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du côlon et y prévient l'apparition des cryptes anormales [53 ; 54].

II.1.2. Les tanins

Les tannins sont des composés phénoliques naturels, métabolites secondaires des plantes supérieures, d'une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da. Ils sont classés en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, qui diffèrent par leur structure chimique et leur origine biogénétique [55].

II.1.2.1. Les tanins hydrolysables

Ils sont définis comme des oligo- ou des polyesters entre un sucre (généralement le glucose) et un nombre variable de molécules d'un acide-phénol (l'acide gallique dans le cas des tanins dits galliques (figure 4) et l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins dits ellagiques) [59] (figure 5).

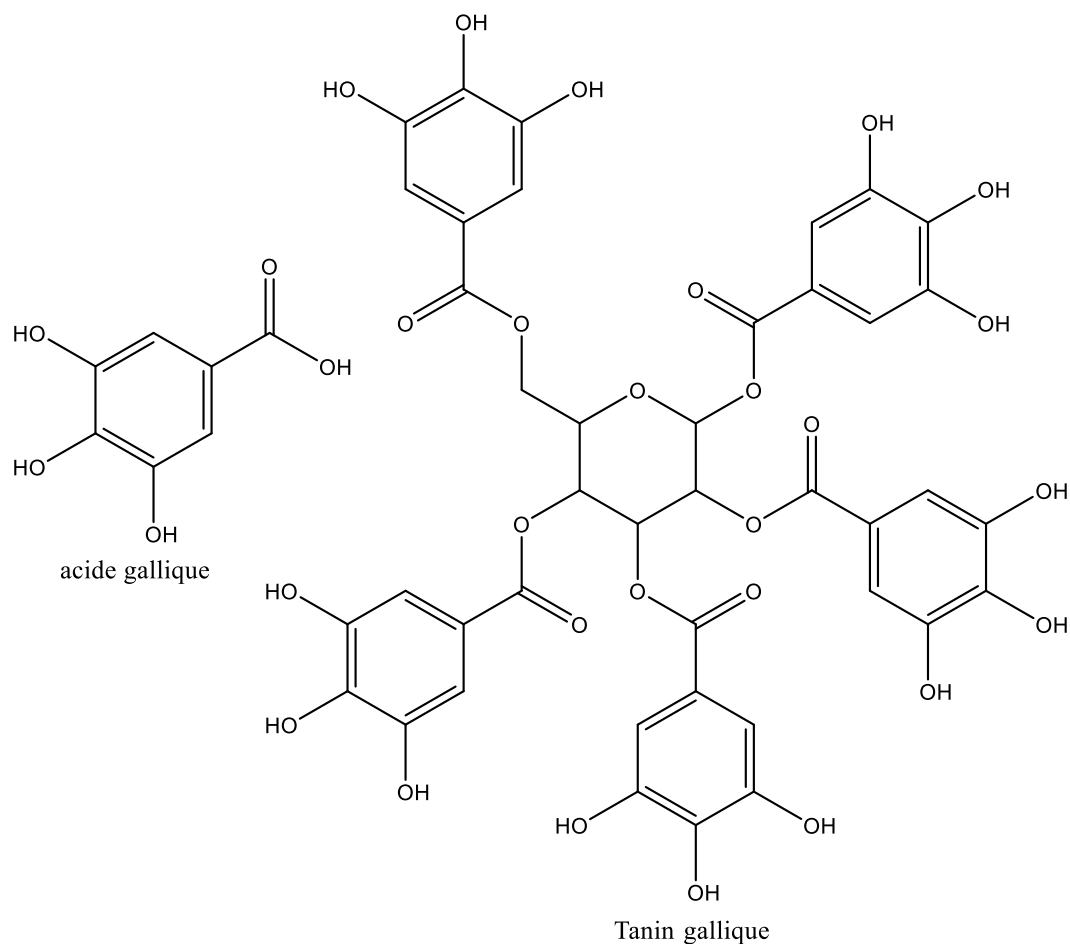


Figure 4 : Structure d'un tanin gallique

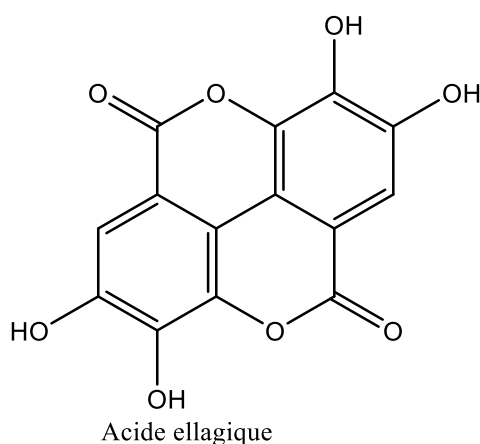


Figure 5: Structure d'un tanin ellagique

II.1.2.2. Les tanins condensés, non hydrolysables

Ce sont des dérivés non hétérosidiques, résultant de la polymérisation d'un nombre variable d'unités « flavane »^[56] (figure 6).

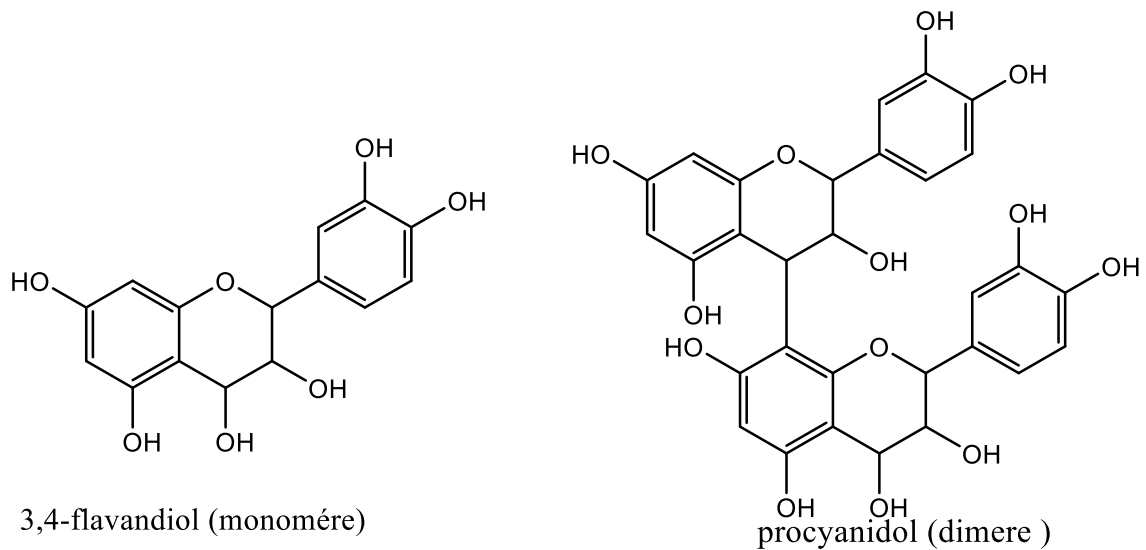


Figure 6 : Exemple d'un tanin condensé

II.1.2.3. Propriétés pharmacologiques des tanins

La plupart des capacités des tanins découlent de leur capacité à former des complexes avec les macromolécules, en particulier les protéines. Dans la littérature et les enquêtes menées révèlent que les plantes riches en tanins rentrent dans beaucoup de recettes en médecine traditionnelle pour traiter des maladies bien définies bien qu'aucune donnée expérimentale sur leur absence de toxicité n'ait été publiée ; mais l'usage populaire sur des personnes de tout âge (nouveau-né, enfant, adolescent, vieillard) sans problème majeur est intéressant de ce point de vue.

L'étude menée sur les plantes tannifères (*Anacardiaceae*, *Combretaceae*, *Fabaceae-Mimosoideae* etc.) montre des propriétés curatives contre les maladies gastriques (indigestion, diarrhée, dysenterie, ulcère, hémorroïdes), l'hypertension artérielle, les maladies vénériennes et les dermatoses^[57].

Il a été montré que le 6-*O*-galloyl-glucose isolé de *sapzum sebzerum* possède la capacité d'abaisser les pressions artérielles moyennes par le blocage de libération de noradrénaline et/ou directe vasorelaxation^[58].

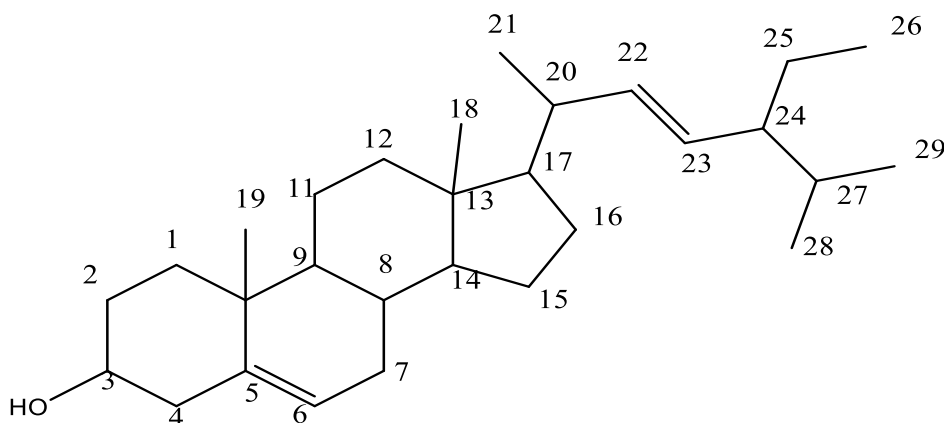
Les tanins présentent des propriétés : astringentes, antidiarrhéiques, antibactériennes, antivirales, antifongiques, et hypoglycémiantes. Certains présentent des propriétés vitaminiques P. Les tanins hydrolysables sont des piègeurs de radicaux libres et de l'ion superoxyde. En effet, des études ont montré que l'acide chebulagique et punicalagin deux tanins hydrolysables isolés de spondias ont la capacité de fonctionner comme des antiviraux à large spectre in vitro^[59; 60].

D'autre part, l'activité antibabésiens et antiplasmodiaux du composé 1-*O*-galloyl-6-*O*-lutéoyl-R-D-glucose isolé dans le *Phyllanthus niruri* a été évaluée. Le composé des valeurs IC₅₀ de 4,7 µg/mL contre *Babesia gibsoni* et 1,4 µg/mL contre *Plasmodium falciparum* in vitro. Ces constatations peuvent servir de base à une meilleure compréhension de *B. gibsoni* et *P.falciparum* - infections et contribuer au développement de nouvelles traitements efficaces contre ces parasites [61].

II.2. Molécules isolées de *Neocarya macrophylla*

Les études phytochimiques antérieures sur *Neocarya macrophylla* ont permis d'isoler plusieurs composés à savoir :

- Le stigmastérol isolé de l'extrait hexane de *Neocarya macrophylla* [62; 63]



Stigmasterol : (Stigmast-5,22-dien-3b-ol) C₂₉H₄₈O

Figure 7 : Le stigmastérol

- Des composés phénoliques tels que :

Le bis-(5,7-diacetyl-catechin-4- α -rhamnopyranoside) isolé de l'extrait acétate d'éthyle de *Neocarya macrophylla* [67]

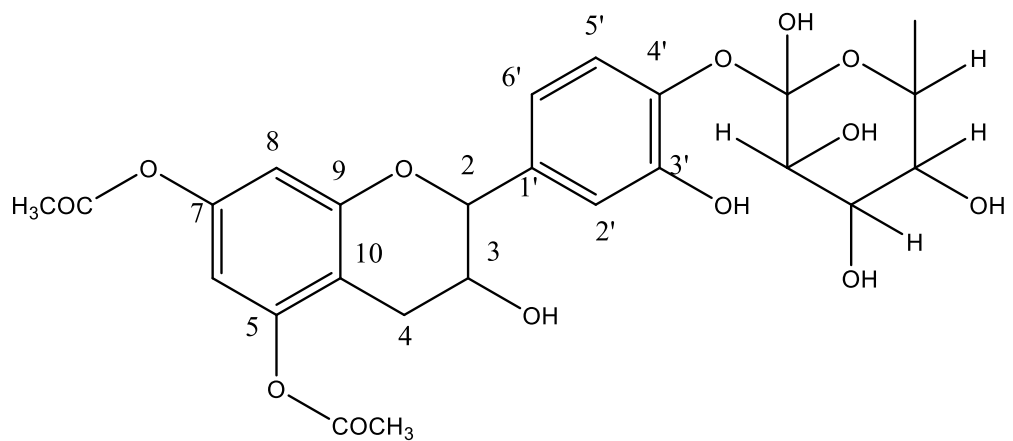


Figure 8 : Bis-(5,7-diacetyl-catechin-4- α -rhamnopyranoside)

Le (+) -Catechin-3'-O-rhamnopyranoside isolé de l'extrait de la fraction acétate d'éthyle de *Neocarya macrophylla* [64].

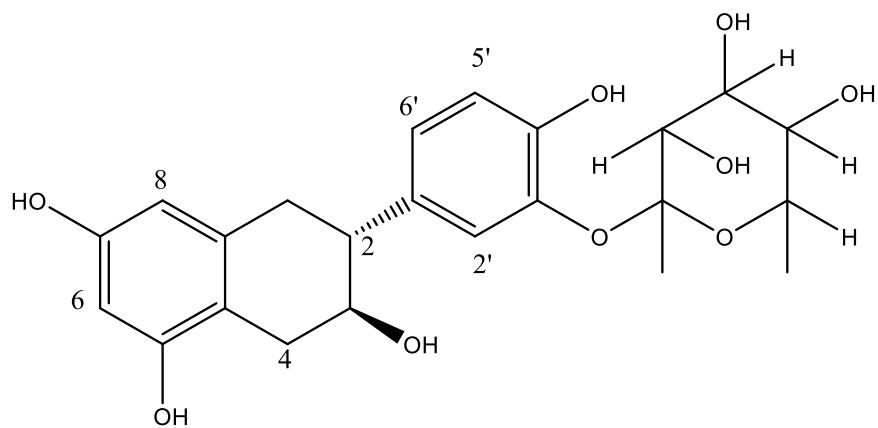


Figure 9: Le (+)-Catechin-3'-O-rhamnopyranoside

Le flavan-3-ol dans l'extrait acétate d'éthyle de *Neocarya macrophylla* [65 ; 66]

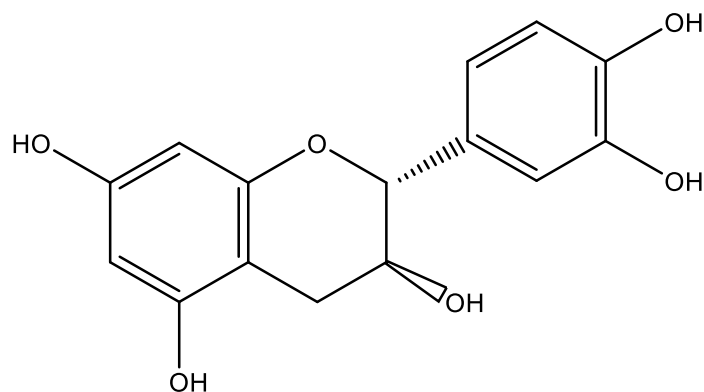


Figure 10 : flavan-3-ol

III. Études biologiques antérieures sur *Neocarya macrophylla*

Une étude sur l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanoïque d'écorce de tige de *Neocarya macrophylla* a été réalisée. La propriété antimicrobienne de l'extrait a été évaluée vis-à-vis de bactéries : *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida albicans* et *Candida krusei* en utilisant des méthodes de diffusion sur gélose. Le test de sensibilité (20 mg / ml) a montré une plage d'inhibition de 22-34 mm en présence *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Cependant aucune activité n'a été observée en présence de *Streptococcus faecalis*, *Candida krusei* et *Pseudomonas fluorescens*. La gamme des concentrations minimales inhibitrices (CMI) était de 2,5 à 5,0 mg/ml et la plage de concentration minimale bactéricide/fongicide était de 5 à 20 + 69 mg/ml par rapport aux organismes. Les résultats de cette recherche indiquent que l'extrait méthanoïque brut d'écorce de tige de *Neocarya macrophylla* contient des composants bioactifs qui ont des propriétés antifongiques et antibactériennes à large spectre [67].

Le stigmastérol isolé de l'écorce de tige de *Neocarya macrophylla* présente une activité antimicrobienne à large spectre, mettant en évidence son potentiel en tant que candidat dans le développement de médicaments antimicrobiens [68].

Les fractions à l'acétate d'éthyle et butanoïques de l'écorce de tige de *Neocarya macrophylla* possèdent des activités anti-venin, analgésiques, et anti-inflammatoires significatives liées au flavan-3-ol, et flavan-3-ol glycoside, (+) -catechin-3'-O-rhamnopyranoside. Le composé pourrait servir de fil conducteur potentiel dans le développement de nouveaux agents utilisés dans le traitement des morsures de serpent, de la douleur et des conditions inflammatoires. [69]

Par ailleurs, les travaux de A. OLOWO-OKERE et son équipe sur les extraits l'acétate d'éthyle, butanoïques et méthanoïques des feuilles de *Neocarya macrophylla* ont présenté des activités antibactériennes et antibiofilm remarquable contre le *S. aureus* et le *P. aeruginosa*. La plante peut donc ainsi être considérée comme une source potentielle de principes bioactifs dans la lutte continue contre la virulence et la résistance bactérienne [70].

Les teneurs en minéraux, en polyphénols totaux, en protéines brutes et l'activité antioxydante des fruits mûrs (*Neocarya macrophylla*) ont été évalués. Les résultats montrent que la pulpe du fruit est riche en éléments minéraux essentiels qui ont un effet positif sur la santé humaine. Les résultats soutiennent également l'utilisation du fruit comme complément pour les carences en nutriments et pour lutter contre les maladies associées à des dommages oxydatifs [71 ; 72].

Chapitre 2 : Études sur *Raphionacme vignei* E.Bruce : études botaniques, études chimique et biologique antérieures

I. Études botaniques

I.1. Famille des Périplocaceae

La famille des Periplocaceae était autrefois une sous-famille des Asclepiadaceae, mais leur statut de famille a été attribué par Schlechter (1924), Bullock (1957), et Hutchinson (1959). Les Periplocaceae comprennent un peu plus de 30 genres et environ 190 espèces présentes en Afrique, à Madagascar, en Asie et en Australie. Le *Raphionacme* est le plus grand genre avec 36 espèces et 2 sous-espèces, suivies de *Cryptolepis* R. Br. (30 espèces), *Pentopetia* Decne, *Periploca* L, *Camptocarpus* Decneet *Streptocaulon* Wight & Arn [73, 74 ; 75 ; 76]. La sous-famille comprend environ 100 espèces en Afrique et le *Raphionacme* représente environ 35% de ce total.

I.2. Genre du *Raphionacme*

Il est représenté par 36 espèces qui sont toutes endémiques en Afrique, une espèce de l'Arabie étant l'exception. Le genre est répandu sur le continent, du désert du Sahara au nord, à l'Afrique du Sud. Cependant, est complètement absente dans les régions pluviométriques hivernales de la Méditerranée au nord et le cap au sud, indiquant une affinité tropicale probable et originale. Le *Raphionacme* se trouve dans une variété de conditions, plages d'altitude (du niveau de la mer à environ 2000 m). [77]

I.3. Espèce de *Raphionacme vignei* E. A. Bruce

Peu d'espèces de *Raphionacme* sont communes et certaines, apparemment, sont si rares que seuls quelques spécimens ont été collectés. Certains ont peut-être complètement disparu de la nature en raison de la surutilisation pendant les périodes de sécheresse et de famine.

I.3.1. Nom vernaculaire

- En balante : Ndaffe
- En mandingue : Fion
- En peulh : Ndaffé
- En sérère : Diabissa

I.3.2. Répartition géographique

R. vignei est largement répandu sur l'Afrique tropicale occidentale au Bénin, au Burkina, au Cameroun, en République Centre Africaine, au Ghana, en Guinée, en Côte d'Ivoire et au Mali à des altitudes comprises entre 0 et 1500 m [78].

Au Sénégal, la plante pousse essentiellement pendant la saison des pluies de juillet-septembre) qui est abondante dans la région de Kédougou frontalière au Mali.

I.3.3. Description botanique

La plante est érigée jusqu'à 0,1 m de haut, de tubercules en forme de disque ou de fuseau, $\pm 100 \times 50$ mm. Les tiges sont aériennes, ramifiées latéralement, de 2 mm de diamètre, et solitaires jusqu'à 60 mm. Les Feuilles sont ascendantes de 2 à 3 mm de longueur. Les fleurs sont monochasies étroitement triangulaires, et de longueur de 1 à 2 mm. Les Pieds sont coronaux, dilatés, et longueur $\pm 0,5$ mm. [79]



Figure 11 : Photo de la matière végétale *Raphionacme vignei* E.Bruce (photo Pr Diouma Kobor en 2019)

I.3.4. Utilisation traditionnelle

Les tubercules de *R. vignei* sont consommés crus par les habitants locaux. L'enquête ethno pharmacologique que nous avons réalisée sur cette plante a montré que sa racine est utilisée pour la consommation locale et en médecine populaire dans le traitement de maladies telles que les maux de ventre, la diarrhée, la tension, les affections des reins et l'inflammation.

II. Études chimiques sur *Raphionacme vignei*

Nous avons réalisé auprès des guérisseurs traditionnels sur l'utilisation traditionnelle de la plante d'écrite dans le paragraphe précédent. Pour prouver scientifiquement leurs vertus, ces données d'enquête ont été complétés par une étude bibliographique sur la composition chimique de la plante. Les résultats de ces recherches ont montré que à ce jour aucune étude portant sur la composition chimique de *Raphionacme vignei* n'a été réalisé. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'isolement et à la caractérisation des molécules bioactives présentent dans la plante.

Cependant nous allons présenter les triterpènes qui constituent les métabolites secondaires isolés lors de notre étude sur *Raphionacme vignei*.

II.1. Généralités sur les triterpènes

II. 1. 1. Définition et nomenclature

Les triterpènes appartiennent à la grande famille des terpènes. Ces derniers forment un groupe de métabolites secondaires largement représentés dans le règne végétal, d'un intérêt chimique et biologique. Les terpènes constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération de molécules très volatiles contenant un nombre important d'atomes de carbone. Ils ont un caractère commun, formés d'unités isopréniques (C_5H_8). Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées, ramifiées, dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques $(C_5H_8)_n$ sous forme d'isopentényl-pyrophosphate (IPP). Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux. De ce fait, une classification rationnelle est possible. La liaison des protéines à des terpénoïdes a pour effet d'augmenter leur attachement à la membrane cellulaire. Cette modification post-traductionnelle s'appelle isoprénylation. On distingue ainsi les hémiterpènes (C_5), les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les tétraterpènes (C_{40}) et les polyterpènes (C_{5n}) [79] (figure13).

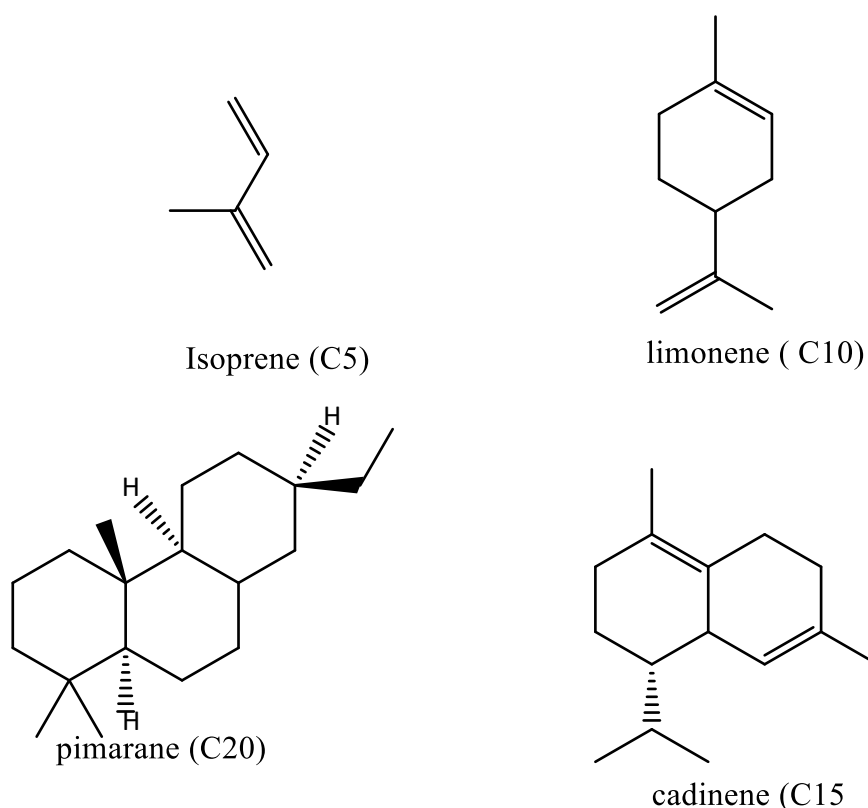


Figure 12 : Exemples de terpenes

La plupart de ces composés ont des structures polycycliques qui diffèrent les uns des autres non seulement par les groupes fonctionnels, mais aussi par la structure basique de leur squelette hydrocarboné. L'isoprène peut être considéré comme l'un des éléments de construction préféré de la nature. Le squelette de carbone des terpènes est constitué d'unités isoprène reliées entre elles ; c'est la « règle isoprénique » énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen et Bloch [80-80 81].

II.1.2. Origine, classification, biosynthèse et Propriétés pharmacologiques des triterpènes

II.1.2.1. Origine

Les triterpènes sont des alcènes d'origine végétale, animale et fongique, classés dans un groupe étendu et structurellement divers de substances naturelles, dénommées « triterpénoïdes ».

Leur structure comprend 30 atomes de carbone et ils sont constitués d'unités d'isoprène. En prenant en compte la structure, les triterpènes peuvent être divisés en linéaires ; principalement dérivés du squalène, tétracyclique et pentacyclique, contenant respectivement quatre et cinq cycles, ainsi qu'en deux et trois cycles.

II.1.2. 2. Classification des triterpènes et stéroïdes

Ce sont des composés en C₃₀, ils sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifié ou sous forme hétérosidique. Ils peuvent être :

- Des composés aliphatiques : tel que le squalène, surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable des huiles végétales (olive, lin, arachide). C'est un intermédiaire dans la biosynthèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes ;
- Composés tétracycliques tels les stéroïdes et les phytostérols ;
- Les composés pentacycliques très fréquents chez les plantes comme les α et β amyriines (Figure 13) [82 ; 83].

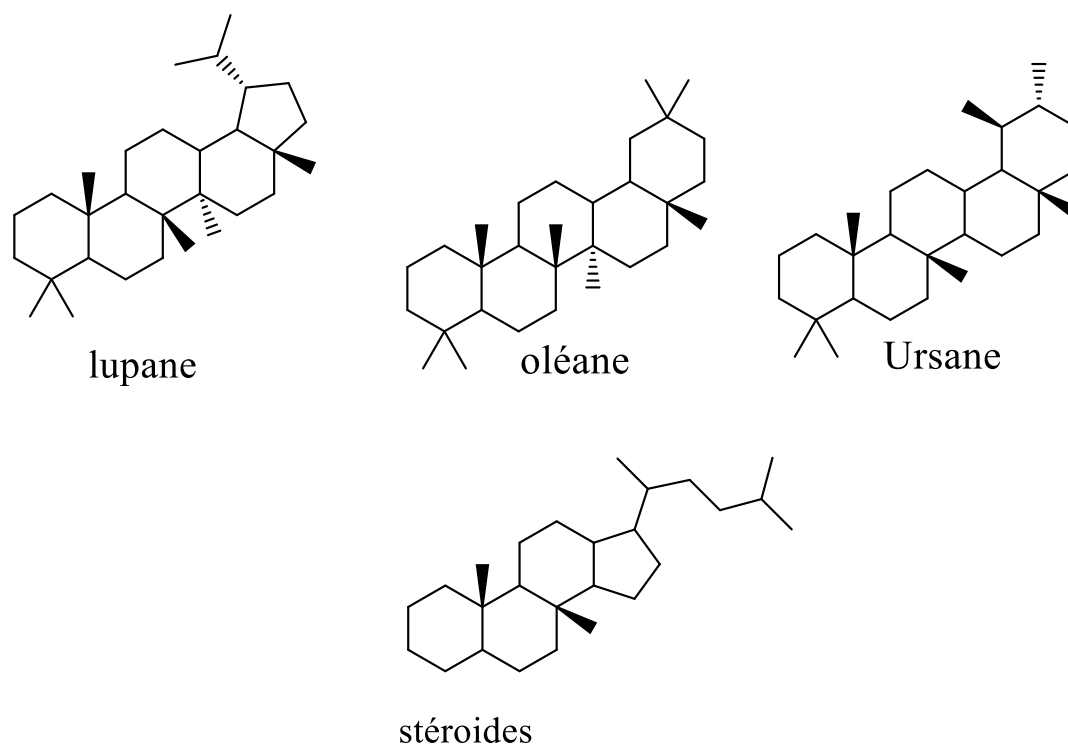


Figure 13 : Principales classes de triterpènes

II.1.2.3. Biosynthèse des triterpènes

La voie de biosynthèse des triterpènes et des stéroïls implique l'isoprénoïde, l'isopentényle, le diphosphate (IPP) et le diphosphate de diméthylallyle formant le précurseur (squalène) [84].

Cependant, plusieurs théories ont proposé trois précurseurs, à savoir le mévalonate [92], la désoxyxylulose [85] et les acides aminés [86] 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 stéroïques et pentacycliques [87, 88].

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 [89, 90].

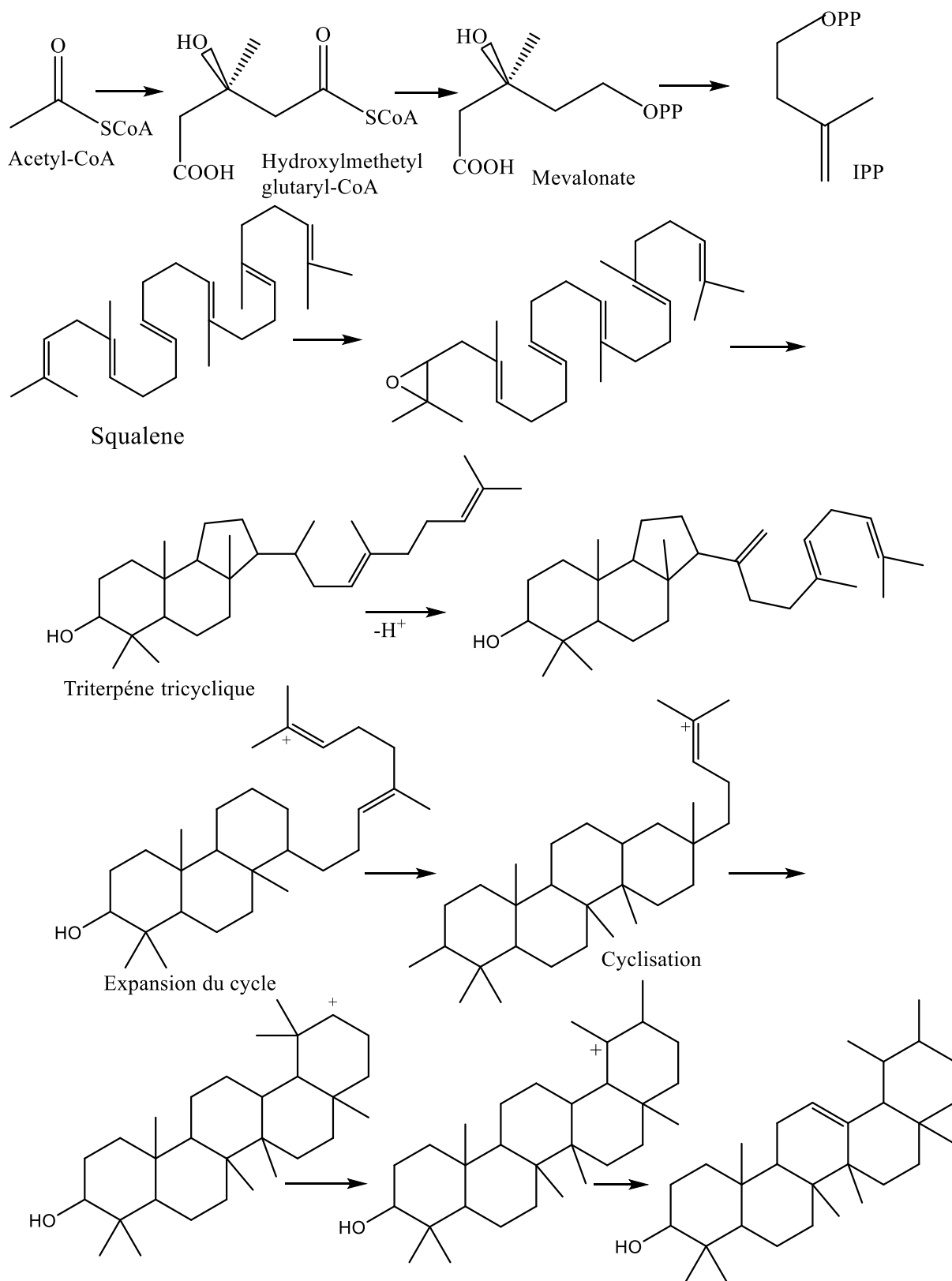


Schéma 2 : Biosynthèse des triterpènes

II.1.2.4. Quelques exemples de Propriétés pharmacologiques des triterpènes

Les triterpénoïdes sont étudiés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, hépatoprotectrice, analgésique, antimicrobienne, antimycotique, et virostatique. Du point de vue biologique, les squelettes triterpénoïdes les plus importants sont : oléanane, ursane, lupane et dammarane-euphane.

Deux nouvelles saponines furent isolées à partir de feuilles de *D. ombet*. A une dose élevée de 30 mg/kg, la fraction riche en saponines de ces feuilles a montré des activités analgésiques et anti-inflammatoires significatives [91].

Tableau 1 : Principaux triterpènes d'intérêt thérapeutique

Dénomination	Sources	Indications
Acide ursolique	<i>Arctostaphylos uva ursi</i> (Ericacée)	Anti-tumoral Hépatoprotecteur Anti-ulcéreux Anti-hypertenseur Anti-diabétique Anti-inflammatoire
Acide oléanolique	<i>Syzygium aromaticum</i> (Murtacée)	Anti-tumoral Hépatoprotecteur antioxydant Anti-diabétique Anti-inflammatoire Antipaludéen Antibactérien
Acide bétulinique	<i>Cornus florida</i>	Anti-tumoral Hépatoprotecteur Anti-diabétique Anti-inflammatoire Antipaludéen Immunomodulateur

Tableau 2 : Quelques composés triterpéniques d'origine végétale à activité analgésique et anti-inflammatoire

Plantes	Parties utilisées	Modèles <i>in vivo/ in vitro</i>	Références
<i>Caulophyllum robustum</i> Maxim	Racines et rhizomes	<i>In vitro</i>	[92]
<i>Annona senegalensis</i> Pers	Feuilles	<i>In vivo</i>	[93]
<i>Protium heptaphyllum</i>	Résine	<i>In vitro</i>	[94]
<i>Phellinus baumii</i>	Plante entière	<i>In vitro</i>	[95]
<i>Melia toosendant</i>	Ecorces	<i>In vitro</i>	[96]

De nombreuses autres propriétés de composés triterpènes ont été décrites. Il s'agit essentiellement de leur activité anticancéreuse, anti-oxydante, antivirale, antibactérienne et antifongique. Pour le cas particulier du cancer, il a été mis en évidence la capacité des triterpènes à induire une apoptose des cellules cancéreuses, de façon plus ou moins sélective. Ainsi, ils pourront servir de traitement alternatif et de prévention de nombreuses formes de tumeurs [97].

Chapitres 3 : Rappels sur l'inflammation, la douleur et le diabète

Au Sénégal les plantes *Raphionacme vignei* et *Néocarya macrophylla* sont utilisées de façon traditionnelle dans le traitement respectif de l'inflammation, de la douleur, et du diabète qui constituent aujourd'hui un véritable problème de santé publique. Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'inflammation, la douleur, diabète et le rôle des plantes médicinales dans le traitement de ces maladies

I. Généralités sur l'inflammation et la douleur

I.1. Généralités sur l'inflammation

I.1.1. Définition de l'inflammation

L'inflammation est un processus naturel et protecteur résultant d'une agression (allergie, infection, blessure...) et qui peut parfois devenir délétère et entraîner des dysfonctionnements chez le patient malade. L'inflammation est un terme générique désignant diverses réactions de défense contre des substances endogènes ou exogènes, survenant après une blessure tissulaire, une infection ou une stimulation cellulaire excessive et anormale ^[98,99,100] (voir figure 14).

La réponse inflammatoire peut être définie également comme une réaction de défense de l'organisme non spécifique dirigée contre des agents agresseurs de nature infectieuse, chimique, physique ou encore auto-immune ^[101].

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples. Elles déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation. Il peut s'agir soit :

- Agents infectieux : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons) ;
- Agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, radiation ;
- Agents chimiques : caustiques, toxines, venins ;
- Corps étrangers : endogènes ou exogènes ;
- Défaut de vascularisation (réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie) ;
- Agression dysimmunitaire avec des signes locaux (douleur, rougeur, chaleur et œdème) et/ou généraux comme la fièvre, amaigrissement, asthénie, insuffisance circulatoire ^[102 ; 103].

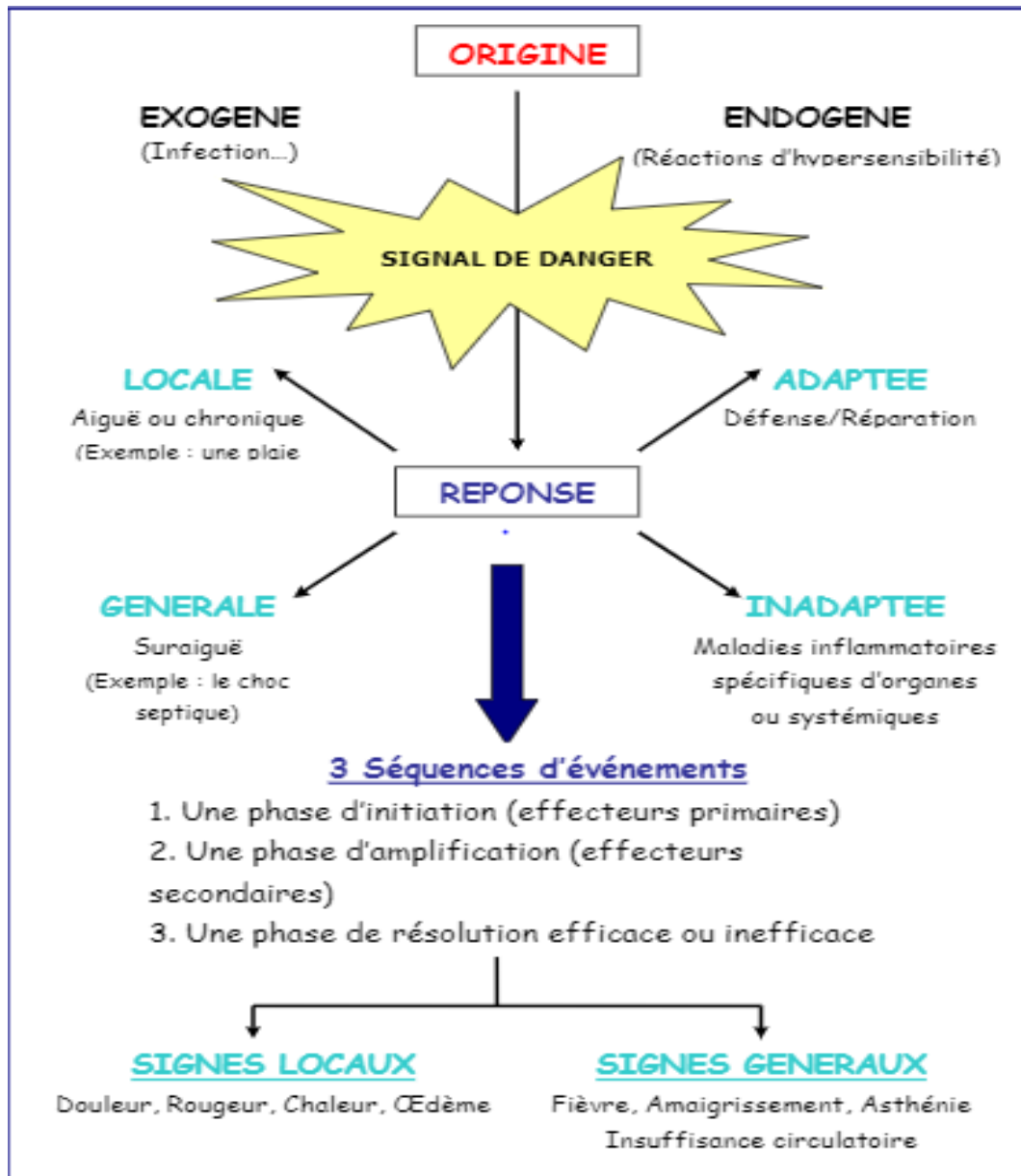


Figure 14 : Réaction inflammatoire : origine et séquences d'évènements ^[104]

I.1.2. Types d'inflammation

Il existe deux types d'inflammation : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique.

I.1.2.1. L'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une étape initiale de l'inflammation (de l'immunité innée), qui est médiée par l'activation du système immunitaire ^[104]. Elle est caractérisée par sa durée limitée dans le temps (quelques minutes à quelques jours) ^[105]. Elle peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus ^[106].

Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante.

I.1.2.2. L'inflammation chronique

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes où l'antigène ne peut être éliminé. Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années [107] et peut-être à l'origine de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite rhumatoïde, et la goûte [108].

Il s'agit donc d'une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années.

I.2. Généralités sur la douleur

I.2.1. Définition de la douleur

L'Association Internationale d'Etude de la Douleur (IASP), en 1979, définit la douleur comme « Une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en des termes évoquant une telle lésion [109].

En définissant la douleur comme étant une expérience désagréable (sensorielle et émotionnelle), l'IASP reconnaît cette double composante. Il est alors admis que des émotions accompagnent la douleur de façon systématique. Concernant le dommage tissulaire, l'IASP précise qu'il peut être « réel » ou « potentiel ». Cela veut dire que la douleur peut être liée à un dommage tissulaire réel (fracture, plaie, tumeur, brûlure), mais que ces lésions ne sont pas toujours visibles (dommage tissulaire potentiel) [110].

I.2.2. Douleur aiguë

La douleur aiguë fait suite à un traumatisme, une chirurgie ou une maladie infectieuse aiguë, le siège de la sensation douloureuse est généralement bien identifié. Elle est de durée limitée, inférieure à 3 mois et induit à un état de stress physiologique à l'origine de modifications comportementales et physiologiques protectrices. Elle ne persiste pas après la résolution de sa cause et répond généralement bien au traitement analgésique conventionnel [111 ;112].

I.2.3. Douleur chronique

Elle est d'une durée supérieure à trois ou six mois, selon les auteurs. La douleur chronique est consécutive à la persistance d'une douleur initialement qualifiée de signal d'alarme qui se modifie pour devenir un syndrome à part entière [113].

I.3. Traitement actuelle de l'inflammation et la douleur

Le traitement actuel de l'inflammation est souvent basé sur l'apport des anti-inflammatoires, non stéroïdiens (AINS) et des glucocorticoïdes. Cependant, elle se trouve impliquée dans un très grand

nombre de pathologies humaines ^[114]. La douleur accompagne ces nombreuses pathologies affectant la qualité de vie du malade surtout lorsqu'elle devient intense et de longue durée ^[115]. Les anti-inflammatoires et les analgésiques couramment utilisés appartiennent à la classe des AINS. Tous les AINS, quelles que soient leur voie d'administration, induisent des effets indésirables (troubles intestinaux, toxicité rénale...), limitant leur efficacité et utilisation à long terme en thérapie ^[116,117].

Les anti-inflammatoires sont regroupés en deux catégories : anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et non stéroïdiens (AINS).

I.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens sont représentés essentiellement par les glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes sont véhiculés par les protéines de transport que sont la transcortine et l'albumine. Ils traversent les membranes cellulaires par diffusion. Dans le cytoplasme, ils se fixent sur un récepteur spécifique qui appartient à la superfamille des récepteurs aux stéroïdes, le complexe glucocorticoïde-récepteur migre vers le noyau et va agir directement sur l'ADN en se fixant sur les séquences spécifiques appelées GRE, intervenant ainsi dans la régulation (activation ou inhibition) de la transcription des gènes cibles. ^[118 ; 119].

I.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens constituent une classe médicamenteuse majeure, prescrite pour ses propriétés antiphlogistiques, antalgiques, antipyrétiques et antiagrégantes plaquettaires. En dépit d'une diversité structurale, leur principal mécanisme est commun et consiste en l'inhibition des COX, enzymes majeures de la voie de synthèse des prostaglandines. On distingue plusieurs classes chimiques d'AINS : les dérivés salicylés (aspirine), les pyrazolés (phénylbutazone), les propioniques (ibuprofène, kétoprofène), les oxicam (piroxicam), les indoliques (indométacine), les fénamates (acide niflumique) et les coxibs (Célécoxib) ^[120]

I.4. L'inflammation et les plantes médicinales

Le nombre de composés phytochimiques trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand ^[121]. Dans les pays en voie de développement, les plantes possédant une activité anti-inflammatoire pourraient constituer une alternative dans la thérapeutique anti-inflammatoire du fait de leur meilleure accessibilité et de leur moindre toxicité en général, vis-à-vis des anti-inflammatoires classiques ^[122]. Au Sénégal, les racines de *Raphionacme vignei* sont utilisées par les guérisseurs traditionnelles et la population locale dans le traitement de plusieurs maladies tel que de l'inflammation. Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement de plusieurs réactions inflammatoires. Aujourd'hui, c'est un fait remarquable que les

substances anti-inflammatoires d'origine végétale présentent un intérêt grandissant car elles offrent des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, comme par exemple l'inexistence des effets secondaires.

II. Généralités sur le diabète

II.1. Définition du diabète

Le diabète est une maladie chronique définie comme une affection métabolique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise plus correctement celle qu'il produit : la déficience sécrétoire et les anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles (muscles et tissu adipeux) peuvent être associées. L'insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang, son action est hypoglycémisante et lors du diabète, une hyperglycémie chronique s'installe laquelle va conduire avec le temps à une atteinte grave de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins à l'origine des complications cliniques du diabète [123].

II.2. Types de diabète

Il existe essentiellement deux types de diabète :

II.2.1. Le Diabète de type 1

Le diabète de type 1, appelé aussi diabète insulino-dépendant, survient quand votre organisme ne produit plus suffisamment ou plus du tout d'insuline de façon définitive (voir figure 15). Cette hormone, fabriquée par le pancréas, permet de diminuer le taux de sucre dans le sang. Les causes exactes de son apparition ne sont pas connues ; dans la plupart des cas les cellules bêta du pancréas sont détruites par le système immunitaire et en l'état actuel des connaissances ce diabète n'est pas évitable. Environ 10% des personnes diabétiques sont de type 1, c'est une maladie auto-immune exigeant une administration quotidienne de cette dernière. Le diabète de type 1 survient généralement chez les sujets jeunes (enfants, ados, adultes jeunes) et les symptômes sont les suivants : fatigue, amaigrissement, besoin et envie d'uriner fréquentes.

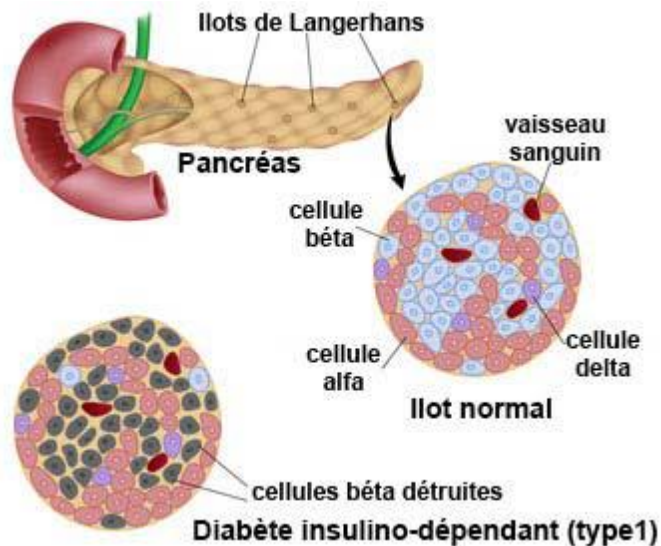


Figure 15 : Diabète de type 1^[131]

II.2.1. Le Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (anciennement appelé diabète non insulino-dépendant DNID) : c'est la forme de diabète la plus répandue représentant près de 90% des cas diagnostiqués. Ce type de diabète se manifeste communément à l'âge adulte^[124].

C'est une maladie chronique et évolutive dans le temps. Le diabète de type 2 est caractérisé par une altération de l'insulinosécrétion et des anomalies des effets de l'insuline sur ses tissus cibles (insulinosensibilité) (voir figure 16). Le diabète de type 2 apparaît le plus souvent comme une maladie polygénique (70 à 85%) à début tardif, hétérogène et multifactorielle résultant à la fois de facteur génétique de prédisposition et de facteur d'environnement^[125 ; 126].

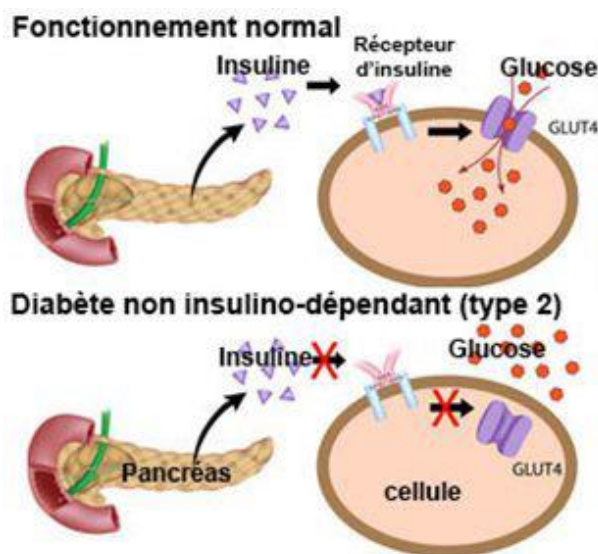


Figure 16 : Diabète de type 2^[127]

Le diabète de type 2 constitue un problème de santé publique majeur. À l'échelle mondiale, on estime que 422 millions d'adultes vivaient avec le diabète en 2014, comparé à 108 millions en 1980 ^[128]. Il semble difficile de dire avec exactitude le nombre de Sénégalais qui souffrent de la maladie du diabète, cependant les estimations les plus constantes des spécialistes ^[129] font état d'un nombre variant entre 200 000 et 300 000 individus, soit entre 2 et 3 % de la population nationale. En 2016, la prévalence et le taux de mortalité liés au diabète sont respectivement de 5 % et 3 % pour le Sénégal et 8% et 2% pour la France ^[129]. Ce premier rapport mondial de l'OMS sur le diabète souligne l'énorme ampleur du problème du diabète ainsi que la possibilité d'inverser les tendances actuelles ^[130].

II.3. Traitement actuel du diabète

Les traitements actuels du diabète représentés essentiellement par l'insuline et les hypoglycémiantes oraux visent à soigner et non guérir la maladie.

II.4. Le diabète et les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont employées pour le contrôle du diabète dans beaucoup de pays. Environ 1200 plantes, couvrant 725 genres différents et 183 familles de plantes dans le monde sont jugées bénéfiques pour les diabétiques et utilisées à travers le monde. La plupart d'entre elles auraient des propriétés hypoglycémiantes, mais la plupart du temps, ces affirmations sont isolées et peu d'entre elles ont fait l'objet d'une étude scientifique. Dans les pays en voie de développement, les plantes possédant une activité anti diabétique pourraient constituer une alternative dans le traitement de la maladie du fait de leur meilleure accessibilité et de leur moindre toxicité en général, vis-à-vis des médicaments classiques. C'est le cas de l'utilisation l'espèce *Neocarya macrophylla* pour le traitement du diabète de type 2 au Sénégal. En effet, des études ont démontré et confirmé l'activité hypoglycémique de plusieurs plantes chez différents modèles d'animaux, les mécanismes et l'activité hypoglycémique de certaines plantes ont été étudiés et élucidés. Ainsi, les plantes médicinales sont une ressource potentielle d'agents antidiabétiques même si elles ne semblent pas pouvoir produire un substitut oral efficace d'origine botanique pour l'insuline ^[130].

DEUXIEME PARTIE
RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 : Résultats sur l'étude phytochimique et biologique de *Neocarya macrophylla*

Les premières étapes de nos travaux qui concernaient les extractions et les tests phytochimiques ont été effectuées dans le laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux (LCPM) de l'Université Assane Seck de Ziguinchor (Sénégal).

Lors de nos séjours au sein de l'ICMPE, nous avons été accueillis au sein de la plateforme chromatographique analytique et préparative (CAP), pour l'isolement et la caractérisation des différents métabolites secondaires présents dans les extraits des feuilles et écorces de *Neocarya macrophylla*. Ce travail a été encadré par le docteur Isabelle LACHAISE, responsable de la plateforme CAP, sous la responsabilité de notre directeur de thèse le professeur Abdoulaye GASSAMA. Nous avons eu accès aux divers équipements analytiques de la plateforme et à deux techniques préparatives la flash chromatographie et la chromatographie de partage centrifuge (CPC).

La flash chromatographie permet de réaliser des séparations et purifications automatisées sur un support solide de type silice (phase normale) ou C₁₈ (phase inverse).

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative et industrielle largement utilisée pour la séparation de substances naturelles. La purification d'une large gamme de composés à activités biologique issus des plantes a été réalisées par CPC ; l'artémisinine, et les saponosides de *Bocopa monnieriune* plante de la pharmacopée indienne, constituent quelques exemples de grandes familles de substances naturelles purifiées par CPC^[131,132].

La CPC se différencie de l'HPLC préparative par l'absence de support solide et l'utilisation de système biphasiques liquides. Les solutés se partagent dans le système biphasique sélectionné en fonction de leur coefficient de partage K_d qui est égale à la concentration d'un soluté dans la phase supérieure sur sa concentration dans la phase inférieure.

Dans ce chapitre, l'étude phytochimique des écorces et feuilles de *Neocarya Macrophylla* sera présentée, les déterminations structurales des composés isolés à partir des différents extraits seront détaillées. Par la suite les résultats des tests d'activité diabétique sur les extraits des feuilles et écorces de *Neocarya macrophylla* seront présentés.

I. Résultats sur de l'étude phytochimique de *Neocarya macrophylla*

I.1. Résultats sur l'extraction de *Neocarya macrophylla*

Les feuilles et écorces ont été broyées et pulvérisées, Chaque poudre obtenue est macérée dans de l'éthanol. Nous nous sommes fixé un temps de macération de 24h parce que nous avons constaté qu'au-delà de cette heure nous observons une diminution du rendement de macération. Au cours de l'évaporation de l'éthanol nous avons observé à la fois dans les feuilles et écorces un aspect moussant témoin de la présence des saponines. Les rendements de macération exprimés comme la masse brute d'extrait obtenue par rapport à la masse initiale sont 13,55% pour les écorces et 11,24% pour les feuilles. Le mode opératoire utilisé pour la macération est décrit dans la partie expérimentale (chapitre 1). A partir de chaque brute écorces et feuilles obtenues, on réalise une extraction liquide – liquide par polarité croissante (heptane, CH₂Cl₂, AcOEt, BuOH) dans le but d'obtenir des groupes de molécules de mêmes polarités. Les méthodologies d'extractions sont détaillées dans la partie expérimentale (chapitre 1). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Bilan massique et rendements des extraits de *Neocarya macrophylla* (pour 100 g de poudre matière végétale)

	Solvants extraction	Masse (g)	%	Aspect
Ecorces	Heptane	0,221	1,63	Huile jaune
	CH ₂ Cl ₂	0,227	1,67	Huile jaune
	AcOEt	2,779	20,49	Poudre jaune-orangée
	BuOH	5,744	42,38	Poudre marron
	Eau *	1,53	11	Poudre brune
	Total	10,28	75,8	
Feuilles	Heptane	0,599	5,3	Pate verte
	CH ₂ Cl ₂	0,753	6,7	Pate verte
	AcOEt	1,072	9,53	Poudre verte
	BuOH	2,87	25,54	Poudre marron

	Eau*	0,775	6,9	Poudre brune
	Total	0,775	47,3	

* : Phase aqueuse après lyophilisation

- Pour les feuilles, les extraits heptane et CH₂Cl₂ se présentent sous forme pâteux de coloration verte, l'extrait AcOEt se présente sous forme de poudre verte et les extraits butanol et eau sont sous forme de poudre de couleur brune.
- Dans le cas des écorces, les extraits heptane et CH₂Cl₂ se présentent sous forme d'huile de coloration jaune et l'extrait AcOEt se présente sous forme de poudre de couleur jaune orangée. Les extraits butanol et eau se présentent sous forme de poudre de couleur brune.

Les rendements d'extraction pour chacun des extraits exprimés par la masse obtenue sur la masse de l'extrait initial (l'extrait éthanol) sont consignés dans le (tableau 3).

- Les extraits heptane et CH₂Cl₂ sont en termes de quantité les plus faibles. Par contre ils sont plus importants dans le cas des feuilles que dans les écorces (1,63% pour l'heptane et 1,67 % pour le CH₂Cl₂ dans le cas écorces et 5.3% pour l'heptane et 6,7 % pour le CH₂Cl₂ dans le cas des feuilles).
- La quantité de l'extrait AcOEt est plus importante dans le cas des écorces (20,49%) que dans le cas des feuilles (9,53 %).
- Les extraits BuOH sont en terme de quantité les plus importantes (42,38% dans le cas des écorces et 25,54% dans le cas des feuilles) ce qui laisse présager la présence d'importantes familles de molécules très polaires. Néanmoins l'extrait BuOH des écorces reste le plus important par rapport à celui des feuilles.
- La quantité d'extrait aqueux est plus importante dans le cas des écorces (11 %) que dans le cas des feuilles (6,9 %).

I.2. Résultats sur le screening phytochimique des extraits de *Neocarya macrophylla*

Des tests phytochimiques sont effectués pour mettre en évidences les différentes familles de métabolites secondaires présentes dans les extraits des feuilles et écorces de *Neocarya macrophylla* : Stérols et polyterpènes, les polyphénols, flavonoïdes, tanin, alcaloïdes, saponines, et anthraquinones. Le mode opératoire de ces tests est décrit dans la partie expérimentale et leurs résultats sont consignés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats du screening phytochimique de *Neocarya macrophylla*

Organe	Solvants	Stérols et polyterpènes	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins	Alcaloïdes	Saponines
Ecorces	Heptane	+	*	*	-	-	-
	AcOEt	+++	++	+	-	-	-
	BuOH	-	+	+	*	*	+
	Aqueux	-	++	+	-	*	+++
Feuilles	Heptane	+++	+	*	-	-	-
	AcOEt	++	+++	++	*	-	-
	BuOH	-	+++	++	++	*	++
	Aqueux	-	+++	++	+	*	+++

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; * : probabilité de présence

D'après les résultats, les écorces et les feuilles de *Neocarya macrophylla* sont riches en stérols et terpènes car on observe sa forte présence dans les extraits à l'heptane, et l'AcOEt. Nous notons aussi la présence des polyphénols, les flavonoïdes et les saponines dans les extraits AcOEt, BuOH et aqueuse. Les extraits BuOH et aqueuse des feuilles et écorces de *Neocarya macrophylla* montre aussi une probabilité de présence d'alcaloïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature [133]. La présence de ces métabolites (terpènes, polyphénols et flavonoïdes) seront confirmées par nos études d'isolement et de caractérisation.

I.3. Résultats de purification des extraits de *Neocarya macrophylla*

En raison de la pandémie, les tests biologiques des extraits de *Neocarya macrophylla* n'ont pu être phasés avec la délivrance des différents extraits obtenus. En effet ils ont été réalisés après nos séjours en France. Après le screening phytochimique des extraits de *Neocarya macrophylla*, nous avons décidé de procéder à une purification des extraits riches en métabolites secondaires tels les extraits heptane, AcOEt, BuOH et aqueux. Les différents extractions liquide- liquide ont été répétés pour pouvoir travailler sur une quantité appréciable de matière première. La méthodologie qui a été choisie c'est de faire d'abord une purification par CPC pour obtenir des enrichissements en molécules de polarité proche

puis de réaliser une purification plus fine par flash chromatographie dans le but d'isoler des molécules d'intérêts.

I.3.1. Résultats de purification par CPC des extraits des feuilles de *Neocarya macrophylla*

I.3.1.1. Purification de l'extrait heptane

Les extraits heptane ont été regroupés et la quantité sur laquelle nous avons travaillé est de 944 mg. La CCM du brut montre la présence de au moins 8 produits (figure 17). Le système biphasiques sélectionné est un mélange Arizona Z constitué heptane/CH₃CN (1/1 ; v/v). Le mode d'éluion choisi est le mode descendant la phase stationnaire est constituée par l'heptane et la phase mobile est constituée par CH₃CN. Le chromatogramme de CPC obtenu est représenté en figure 18. De [0 à 150 min] on a travaillé en mode descendant puis le sens d'éluion a été inversé (dual mode) de [180 à 210 min] suivie d'une extrusion.



Figure 17 : CCM extrait heptane des feuilles , éluant : heptane / AcOEt (7/3)

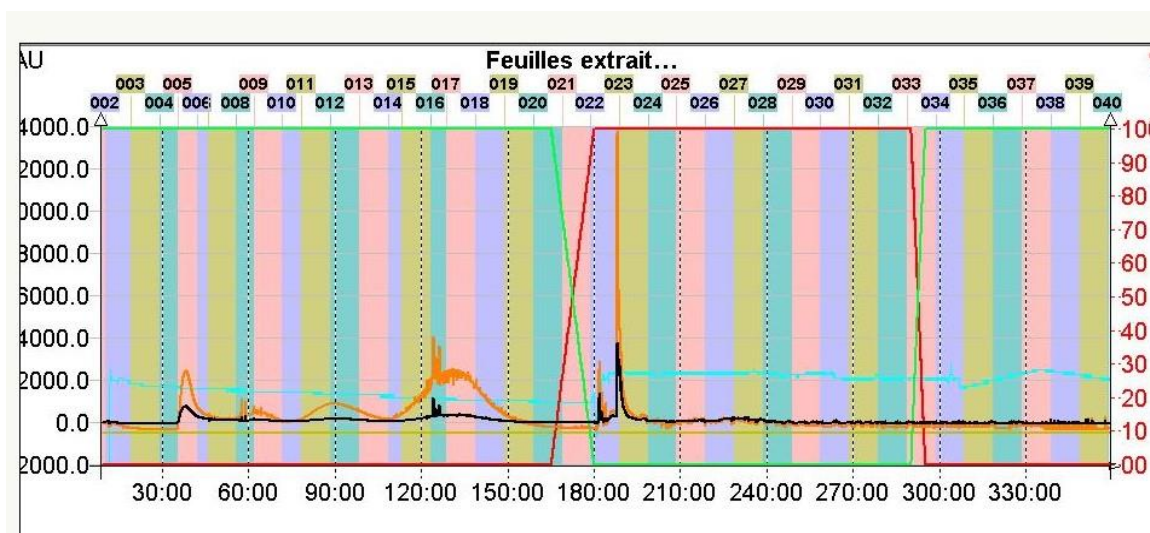


Figure 18 : Chromatogramme de purification par CPC de l'extrait heptane des feuilles de *Neocarya macrophylla* : De [0 à 150 min] éluion avec 100% CH₃CN ; [180 à 210] éluion avec 100% heptane suivie d'une l'extrusion.

Le bilan matière de la purification est représenté dans le tableau 5. En raison de la difficulté de filtration de l'extrait heptane avant l'étape d'injection explique un bilan matière faible (33.8 %).

Tableau 5 : CCM extrait heptane des feuilles , éluant : heptane / AcOEt (7/3)

Bilan matière de la purification par CPC de l'extrait heptane des feuilles de *Neocarya macrophylla*

Fractions	Masses (mg)	Produits isolés
5-6	13	F5
8-9	8	F9
11-13	42	F12
15- 18	16	F17
22	8	
23	232	
Total	319	

Sur les différentes fractions obtenues par CPC, quatre fractions **F5**, **F9**, **F12** et **F17** sont isolés sur le quelle des déterminations structurales ont été réalisés. La fraction **F23** qui est la fraction plus importante présentant des composés apolaires qui sont très peu soluble.

I.3.1.1.1. Détermination structurale de F5, F9, F12 et F17

Les plaques CCM et l'analyse des spectres RMN des protons montrent que les échantillons **F12** et **F17** ne sont pas purs mais intéressants (présence de deux produits sur chaque échantillon). Les spectres de RMN ¹H, ¹³C, et DEPT 135 enregistrés dans le CDCl₃ des composés **F5**, **F9**, **F12** et **F17** révèlent la présence de chaînes grasses dont les signaux sont observables sur les spectres de proton (vers 1.2 ppm) (Figures 19 ,20 ,21 et 22). Ainsi, l'identification de ces chaînes grasses sera possible grâce à l'analyse des spectres de masses. Ces composés ne sont analysables par chromatographie en phase gazeuse (Masse moléculaire trop élevée) ce qui rend impossible leurs analyses par GC/MS. Les analyses LC/MS des composés **F5**, **F9**, **F12** et **F17** sont sous-traité par le laboratoire BioCIS qui sont actuellement en cours, parce qu'elles impliquent l'analyse en phase normale, technique non disponible sur la plateforme CAP.

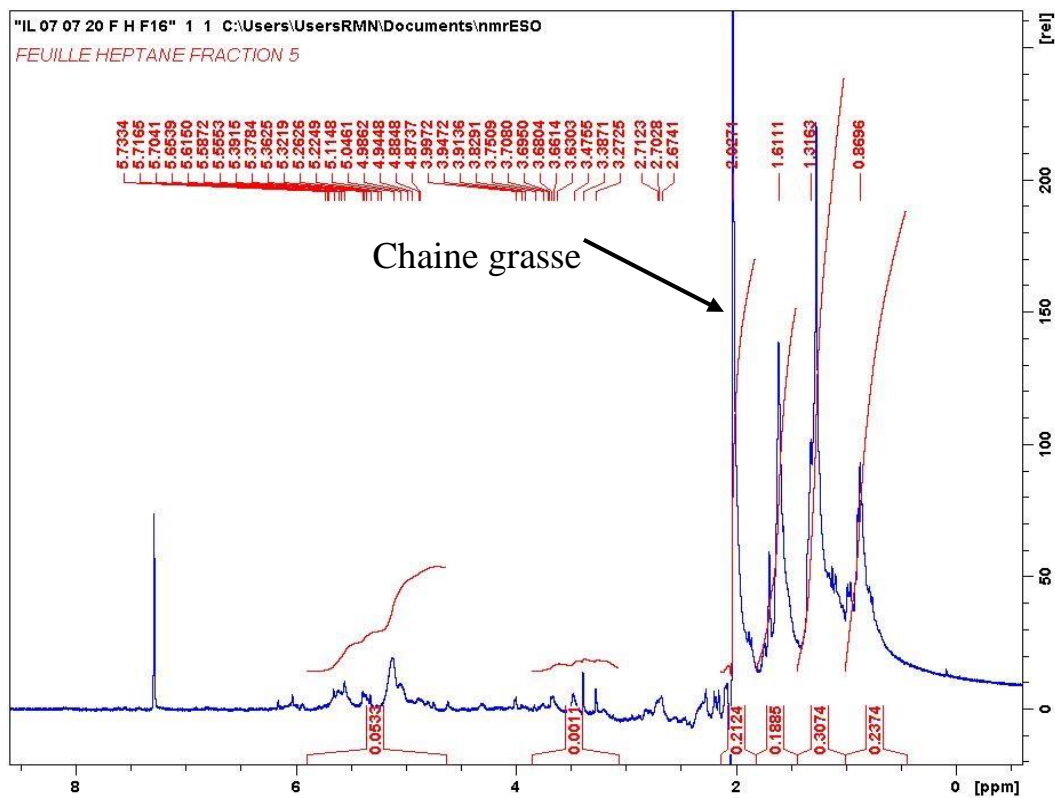


Figure 19 : Spectre de proton de F5

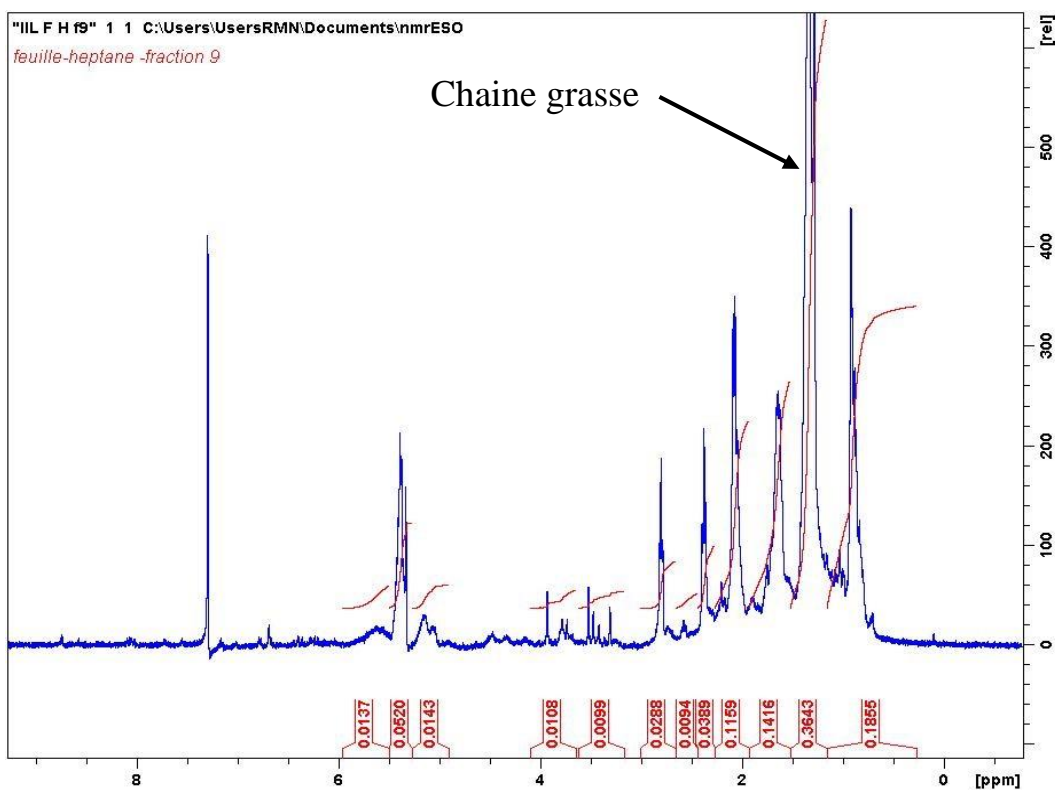


Figure 20 : Spectre de proton de F9

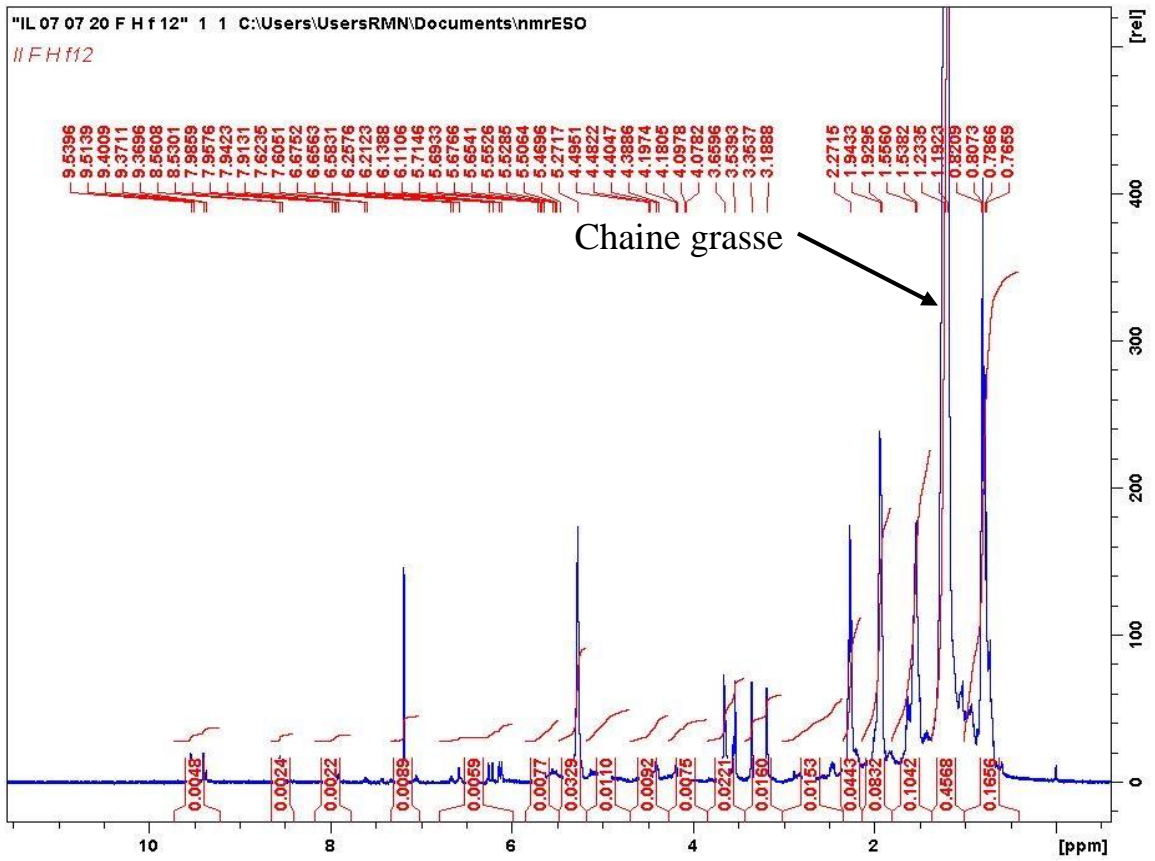


Figure 21 : Spectre de proton de F12

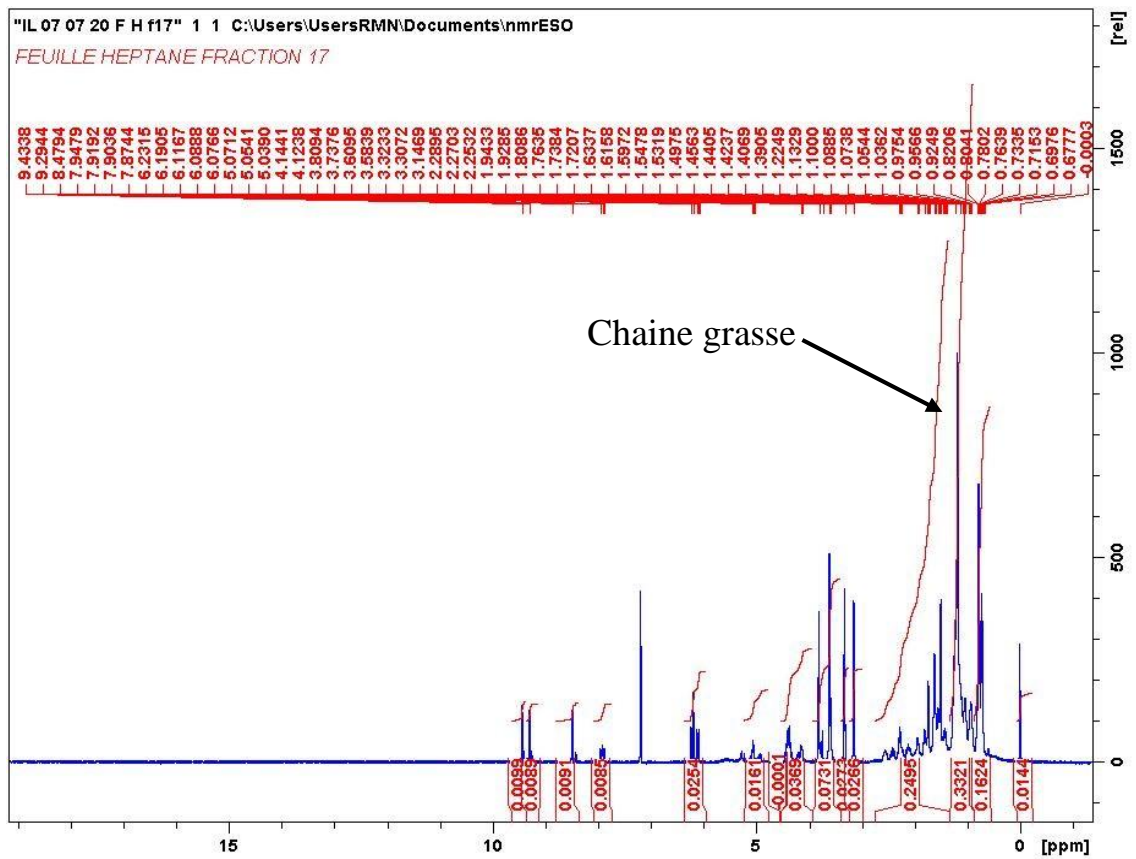


Figure 22 : Spectre de proton de F17

I.1.3.1.2. Purification de l'extrait AcOEt

La CCM du brut de l'extrait AcOEt montre la présence de plusieurs produits (figure 23). Un premier fractionnement de l'extrait brut AcOEt (892 mg) a été réalisé par CPC avec le système Arizona Y constitué heptane/AcOEt/MeOH /Eau (19/1/19/1 v/v/v/v). Le mode d'élution choisi est le mode descendant la phase stationnaire est la phase supérieure et la phase mobile est la phase inférieure. Le chromatogramme de CPC obtenu est représenté en figure 24. De [0 à 120 min] on a travaillé en mode descendant puis le sens d'élution a été inversé (dual mode) de [150 à 240 min] suivie d'une extrusion.



Figure 23 : CCM extrait AcOEt des feuilles , éluant : heptane / AcOEt (7/3), UV 365 nm

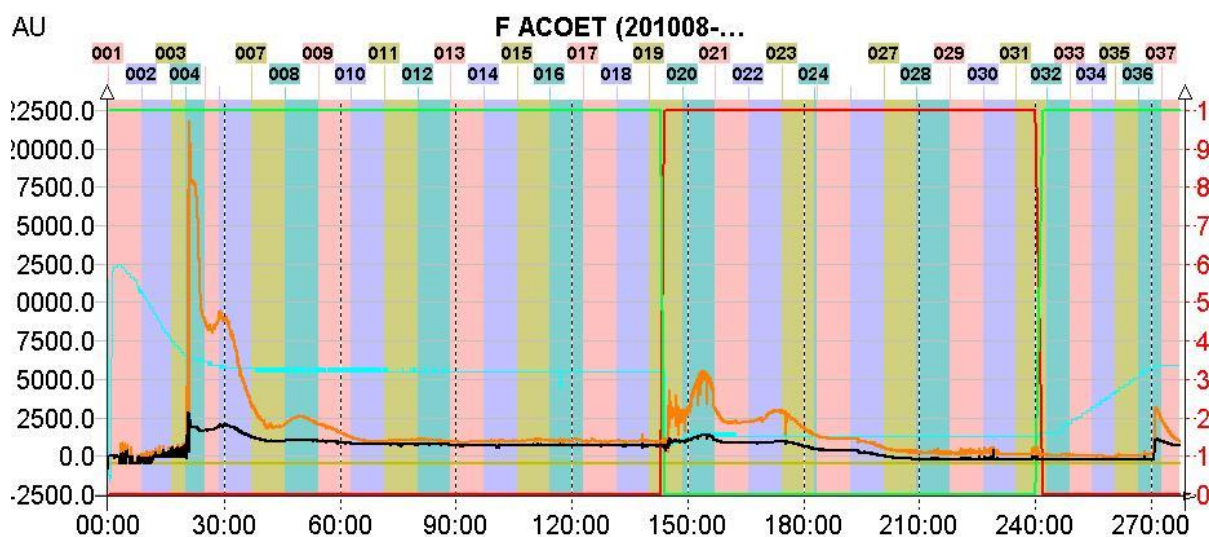


Figure 24 : Chromatogramme de purification par CPC de l'extrait AcOEt des feuilles de *Neocarya macrophylla* . De [0 à 120 min] élution avec 100 % phase inférieure puis de [150 à 240 min] élution avec 100 % phase supérieure suivie d'une extrusion.

Le bilan matière de la purification est représenté dans le tableau 6. Le rendement de la purification est de 79%. L'étape de filtration du brut avant injection est toujours difficile donc obligatoire la masse du brut sur lequel on travaille est surestimé.

Tableau 6 : Bilan matière de purification par CPC de l'extrait AcOEt des feuilles de *Neocarya macrophylla*.

Fractions	Masses (mg)	Produits isolés
4-6	256	Produits non purs
7-9	51	
10-12	35	
13	30	
14-15	18	
16	22	
17-18	14	
19	74	F1
20	74	Produits non purs
21-24	106	
25-26	31	
Total	711	

La Plaque CCM récapitulative de la purification par CPC de l'extrait AcOEt est présenté ci-dessous.

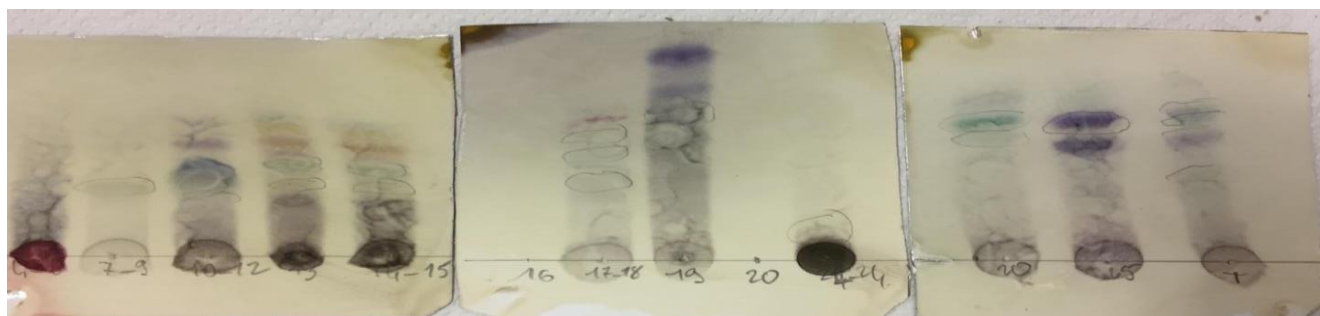


Figure 25 : Plaque CCM récapitulative de la purification de l'extrait AcOEt par CPC (condition CCM : hep/AcOEt (7/3).

Le composé **F1** est obtenu après recristallisation de la fraction F19.

La fraction **F [4-9]** est la plus importante, elle regroupe les composés plus polaires. Une flash chromatographie a été réalisée sur cette fraction dans les conditions cyclohexane/AcOEt :100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt avec un débit 15mL/min. Le Chromatogramme de purification par flash chromatographie obtenu est représenté en figure 26.

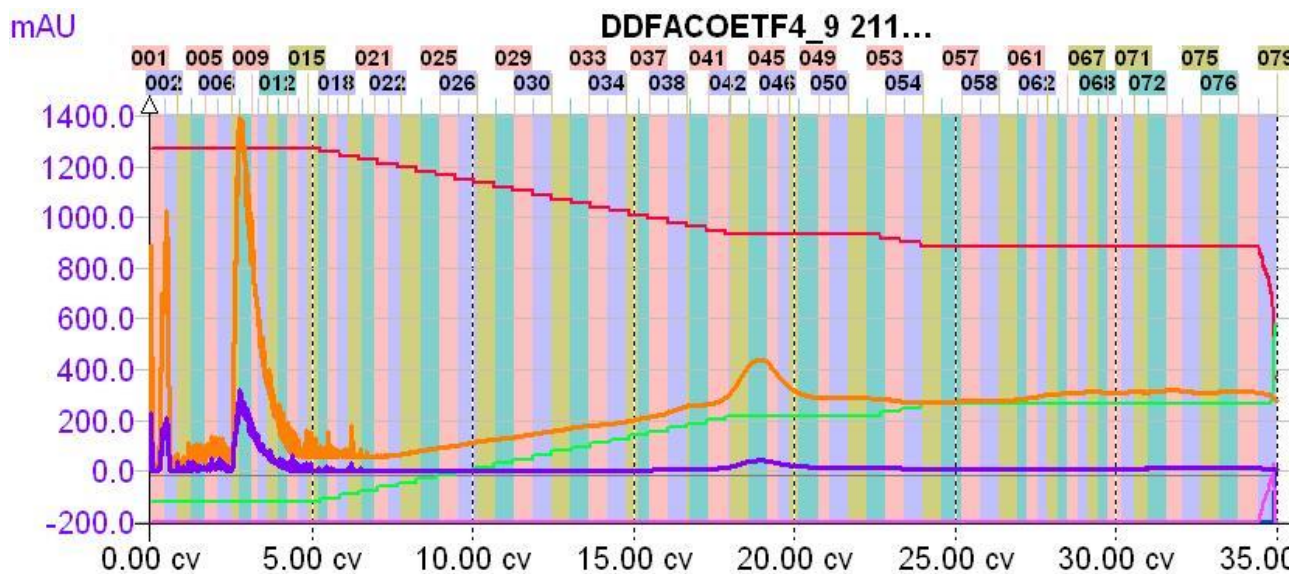


Figure 26 : Chromatogramme de purification par puriflash de la fraction F[4-9] condition : cyclohexane/AcOEt :100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt

Le bilan matière de la purification est représenté dans le tableau 7. Cette purification a entraîné un nouvel enrichissement mais pas l'isolement d'un produit pur. Le rendement de la purification est de 94%.

Tableau 7 : Bilan matière de purification par flash chromatographie de la fraction F [4-9]

Fractions	Masses (mg)
6-18	4
32-36	16
37-38	12
39-42	8
45-47	3
48	8
49-50	3
51-55	28
56-60	7
62-67	20
68-69	6
70-71	8
72-78	12
2-10	27
12-17	8
18-20	22
21-23	28
24	2
25-26	7
27-29	28
31-32	31
Total	288

La deuxième fraction la plus importante est la fraction **F [21-24]** qui correspond à des composés peu polaires présent dans l'extrait heptane. Du fait que la fraction F20 présentait des spots majoritaires de la fraction F [21-24], c'est donc plus judicieux de travailler sur la fraction **F20**. Une flash chromatographie a été réalisée sur cette fraction dans les conditions cyclohexane/AcOEt :100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt avec un débit 15mL/min. Le Chromatogramme de purification obtenu est représenté en figure 27.

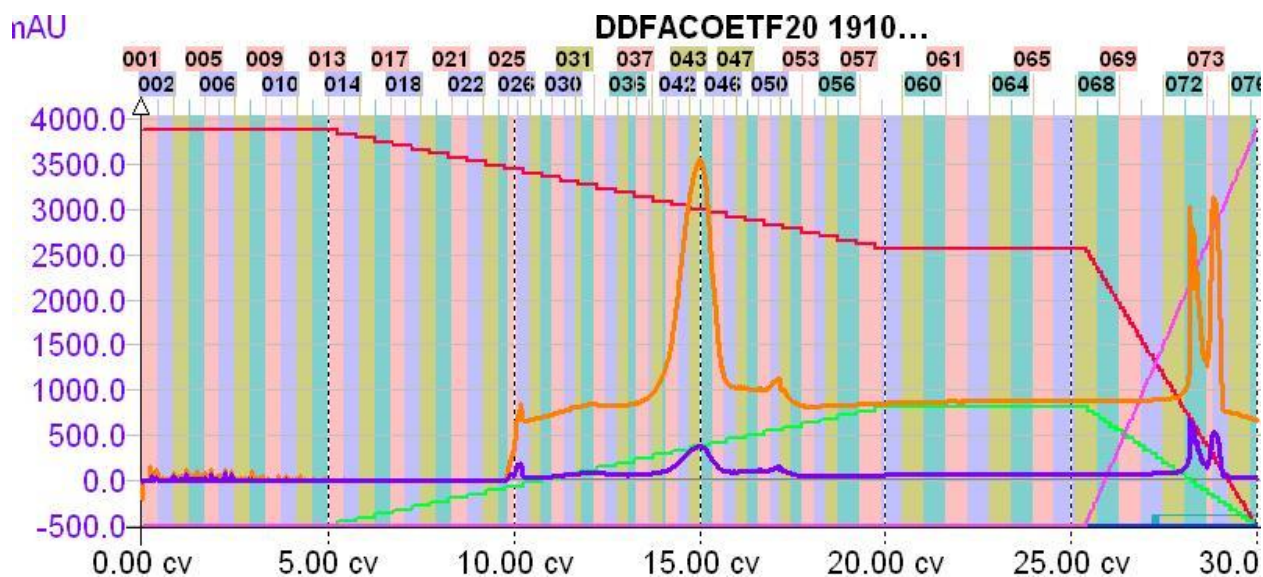


Figure 27 : Chromatogramme de purification par puriflash de la fraction F20 condition : cyclohexane/AcOEt : 100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt.

Le bilan matière de la purification est consigné dans le tableau 8. Les fractions obtenues ont été regroupées par analyses CCM qui ont permis l'isolement de **F2** avec un rendement de 86 %.

Tableau 8 : Bilan matière de purification par puriflash de la **fraction F20**

Fractions	Masses (mg)	Produits isolés
25-26	22	F2
28-29	2	
30-38	3	
39-40	6	
41-45	18	
47-49	6	
50-53	3	
71	3	
72	1	
Total	64	

I.3.1.2.1. Détermination structurale de F1 et F2

Les spectres de RMN ^1H , ^{13}C , et DEPT 135 enregistrés dans le CDCl_3 des composés **F1** et **F2** révèlent la présence des chaînes grasses dont les signaux sont observables sur les spectres de proton (Figures 28 et 29). Le spectre RMN du proton de la molécule **F2** (Figure 29) présente cinq singulets d'intensités 3H chacun attribuables à cinq méthyles 0.76 ; 0.80 ; 0.95 ; 0.98 ; 1.00 caractéristiques des triterpènes pentacycliques. Il présente également des résonances de protons isopropényles à 4.62 (1H ; s) ; 4.50 (1H ; s) ; et 1.53 (3H ; s) caractéristique d'un triterpène de type lupane. Ainsi, l'identification des

structures des molécules **F1** et **F2** sera possible grâce à l'analyse du spectre de masse qui sont toujours en cours.

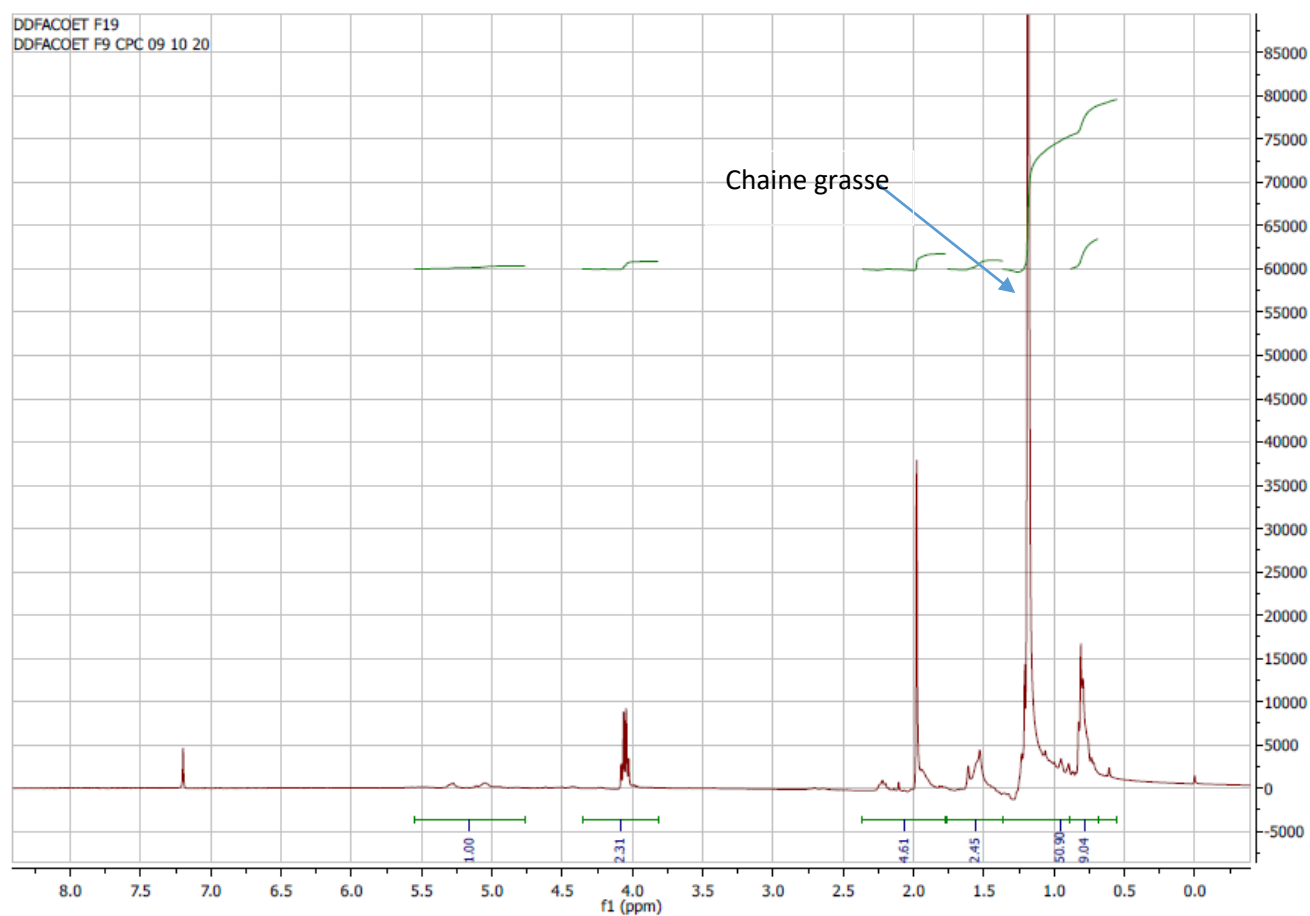


Figure 28 : Spectre de proton de F1

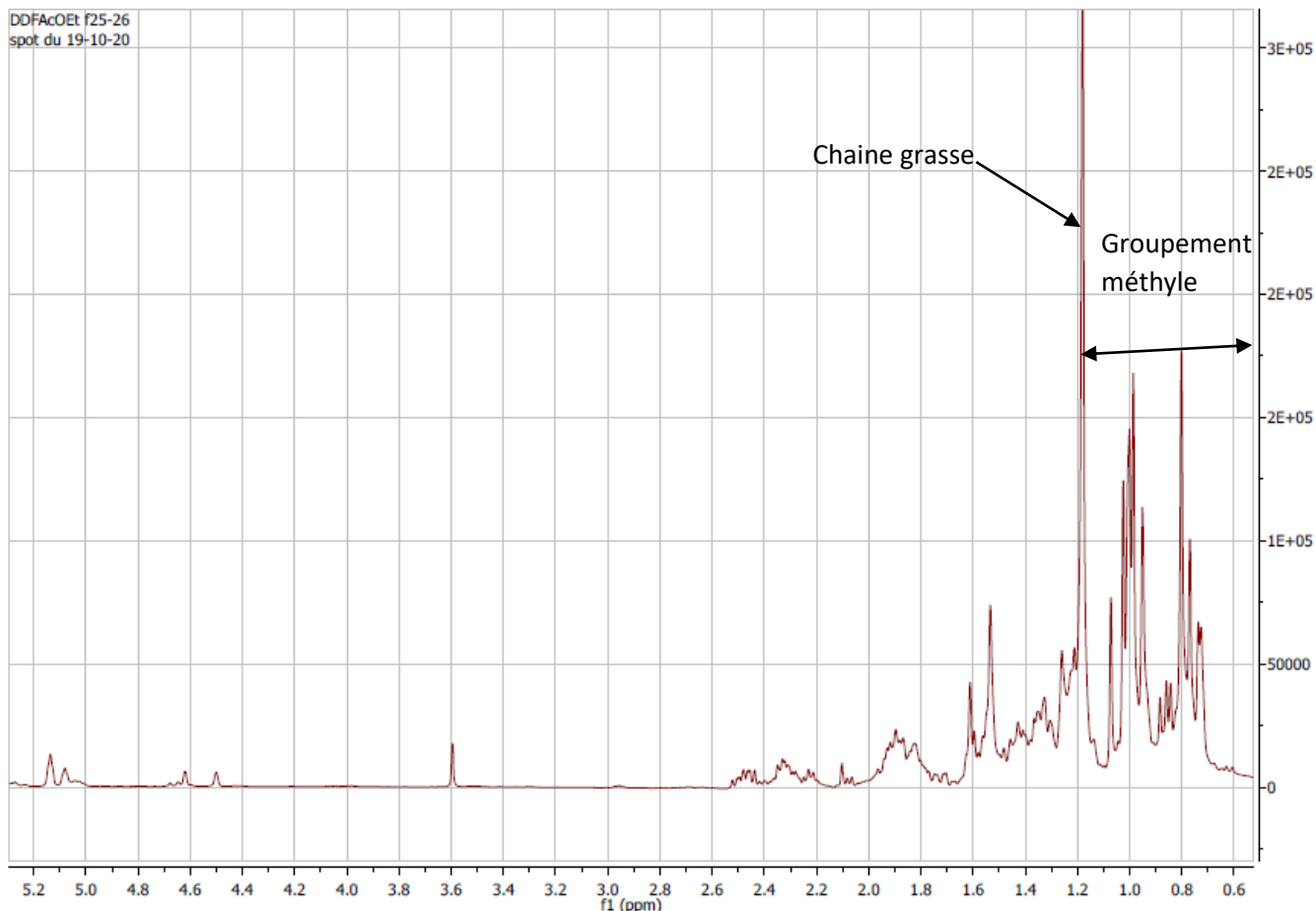


Figure 29 : Spectre de proton de F2

I.3.1.3. Purification de l'extrait BuOH

L'HPLC du brut de l'extrait butanolique des feuilles de *Neocarya macrophylla* a montré la présence d'au moins sept produits (figure 30). La masse 500 mg de l'extrait BuOH a été purifié par CPC. Le système utilisé pour cette purification correspond au mélange ternaire AcOEt, MeOH, et Eau (11,74/10/78,26 v/v/v). Le mode ascendant est choisi pour réaliser la purification la phase stationnaire est la phase inférieure et mobile est constitué par la phase supérieure. Le chromatogramme de purification est représenté en figure 31. De [0 à 120 min] on a travaillé en mode ascendant puis en mode descendant de [130 à 180 min] suivie d'une extrusion.

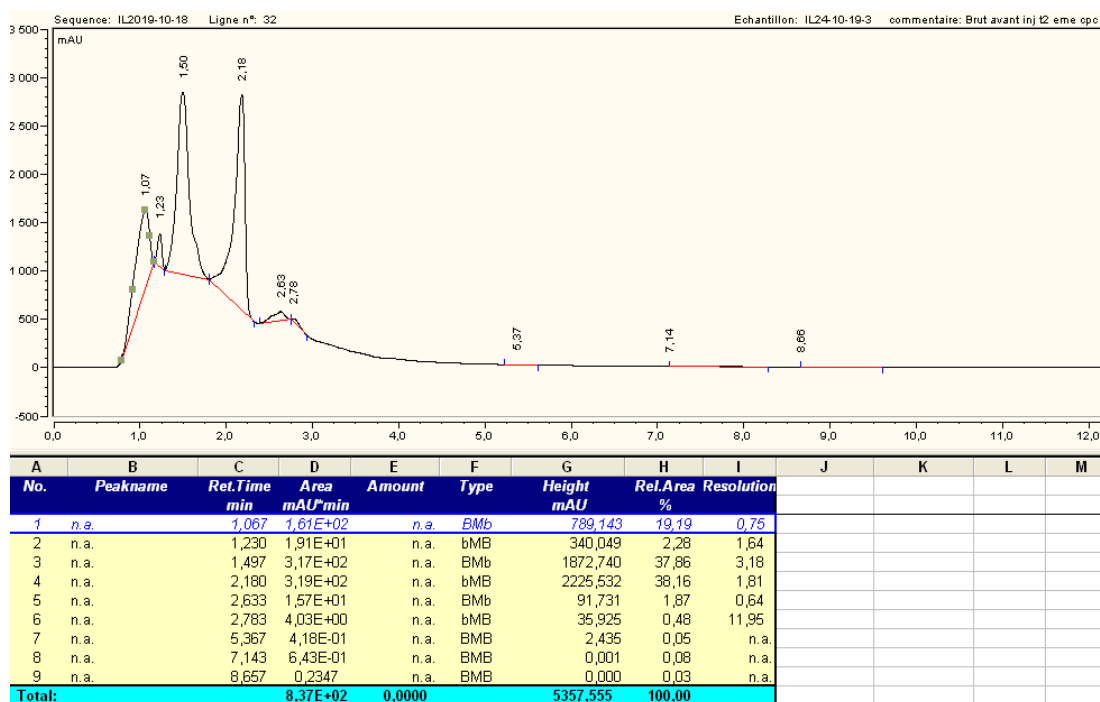


Figure 30 : Chromatogramme HPLC de l'extrait BuOH des feuilles de *Neocarya macrophylla* : Conditions analytiques CH₃CN/H₂O (70/30).

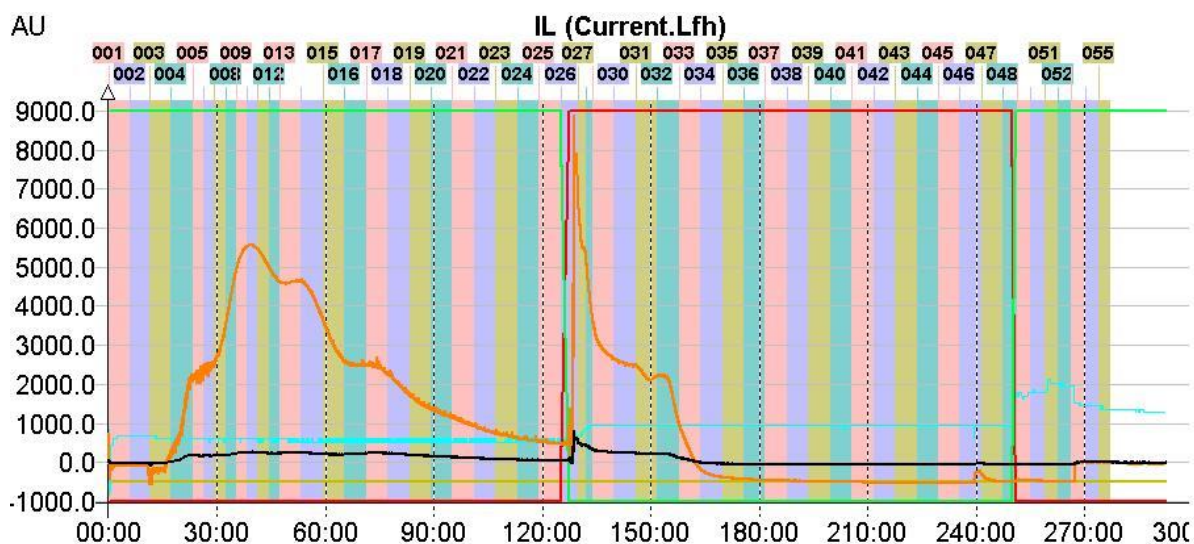


Figure 31 : Chromatogramme de purification de l'extrait BuOH des feuilles de *Neocarya macrophylla* par CPC : De [0 à 120 min] élution avec 100 % de la phase supérieure puis de [130 à 180 min] élution avec 100 % de la phase inférieure suivie d'une extrusion.

Le bilan matière de la purification est représenté dans le tableau 9. Le rendement de la purification est de 62 %. Trois produits majoritaires sont obtenus leurs puretés ont été déterminées à l'aide de HPLC analytique et la LC/MS. Trois molécules **F10**, **F14** et **F18** ont été isolées.

Tableau 9 : Bilan matière de purification de l'extrait BuOH des feuilles de *Neocarya macrophylla* par CPC

Fraction	Masse (mg)	Produits isolés
4	5	
5	5	
6	Trace	
7	7	
8	5	
9 -11	61	F10
13-14	62	F14
15	17	
17	5	
18	7	F18
25	1	
26	8	
27	28	
28	19	
30	19	
32	57	
33	5	
44	2	
Total	313	

I.3.1.3.1. Détermination structurale de F10, F14, et F18

Les trois composés isolés de l'extrait butanol des feuilles de *Neocarya macrophylla* ont été analysés par la RMN à une et deux dimensions et par la LC/MS. Ce sont des composés appartenant à la famille des polyphénols. Pour une bonne compréhension de notre démarche de caractérisation structurale, il est important de comprendre que nous avons numéroté les atomes de carbones et d'hydrogènes de manière arbitraire. Nous avons utilisé dans un premier temps le spectre de ^{13}C et nous avons numéroté les signaux des résonances par ordre de δ décroissants. Le spectre HSQC est ensuite utilisé pour donner le même numéro à un ^1H et un ^{13}C directement liés. Enfin les mêmes numéros sont reportés sur les autres spectres.

I.3.1.3.1.1. Détermination structurale de F18

✓ Analyse LC/MS de F18

L'analyse LC/MS de F18 a été réalisé avec une source d'ionisation ESI en mode négatif. Le spectre de masse montre un pic moléculaire $[\text{M}-1] = 447,1$ g/mol correspondant à la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11} = 448$ g/mol (figure 32)

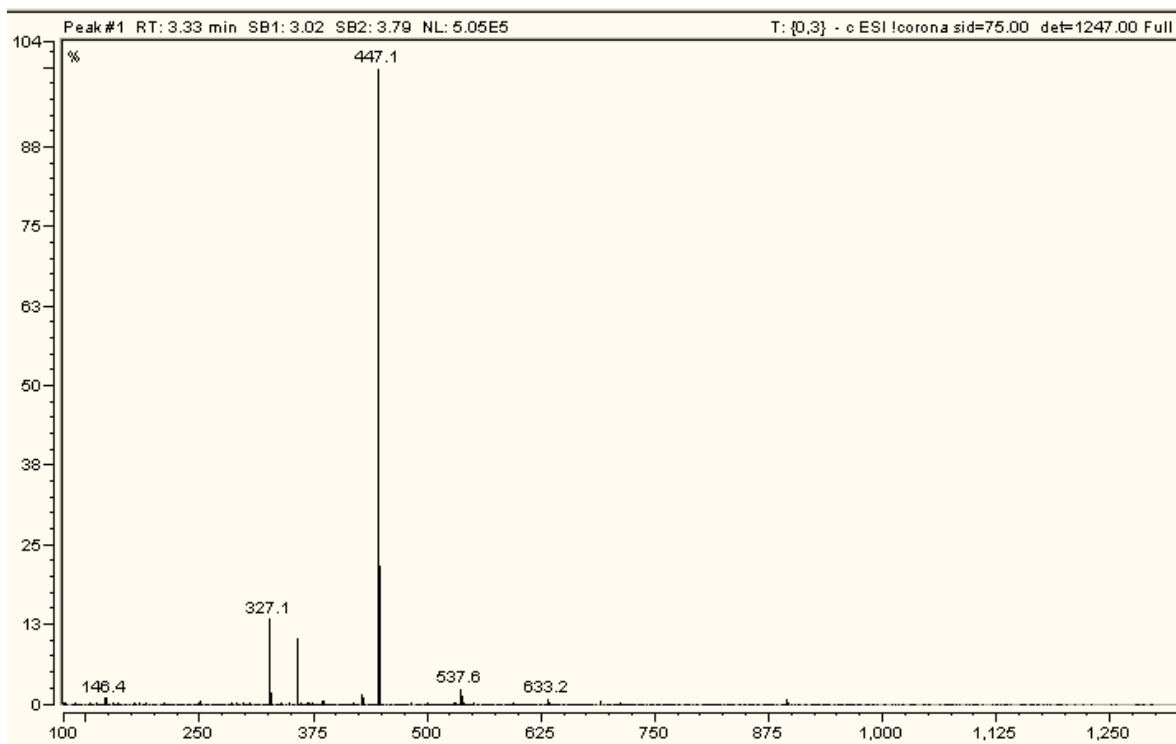


Figure 32: Spectre de masse de F18

✓ Analyse du spectre de RMN (^{13}C et DEPT-135)

Le spectre de RMN ^{13}C du composé **F18** enregistré dans le MeOD révèle la présence de 21 carbones (figure 33) parmi lesquels nous pouvons distinguer les carbones caractéristiques suivants :

- Un carbonyle C1 déblindé à 182 ppm.
- Neuf carbones quaternaires C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C12 et C13 qui sortent respectivement à 164,8, 163, 157, 149, 145,6, 144, 122,1, 107,82 et 104 ppm.
- Cinq carbones éthyléniques CH (C9, C10, C11, C14 et C15) qui respectivement à 118,9, 115,7, 112,7, 102,9 et 93,7 ppm.
- Six CH aliphatiques (C16, C17, C18, C19, C20, et C21) à 81,2 ; 78,12 ; 73,82 ; 71,16 ; 70,38 ; et à 61,45 ppm. Il faut remarquer que les valeurs des déplacements chimiques des CH et CH_2 sur le spectre du carbone et DEPT-135 nous a permis de confirmer la présence d'un sucre. Cependant, le déplacement chimique du carbone anomérique observé à 73,82 qui est habituellement entre 95 à 100 ppm nous a permis de confirmer une C-Glycosylation entre le noyau aromatique et CH anomérique.

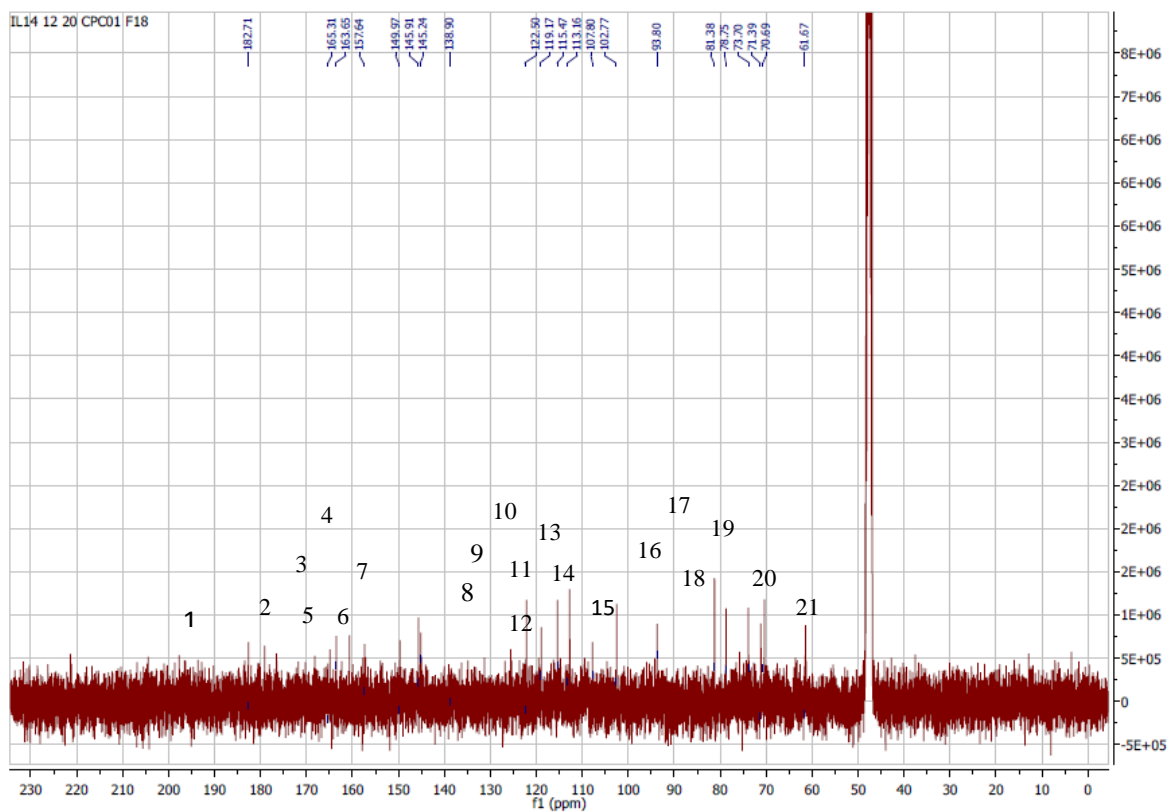


Figure 33 : Spectre de carbone de F18

✓ Analyse du spectre HSQC

Le spectre HSQC *J*-modulé montre 5 méthines aromatiques, 5 méthines aliphatiques, 1 méthylène pour le composé **F18**.

A partir des protons identifiés sur le spectre HSQC sont attribués les carbones correspondants à δ_C (en ppm) 118,9 (C-9), 115,7 (C-10), 112,7 (C-11), 102,9 (C-14) et 99,7 (C-15) de la partie aglycone et 81,2 (C-16), 78,72 (C-17), 73,82 (C-18), 71,16 (C-19), 70,38 (C-20) et 60 (C-21) de la partie osidique (figure 34).

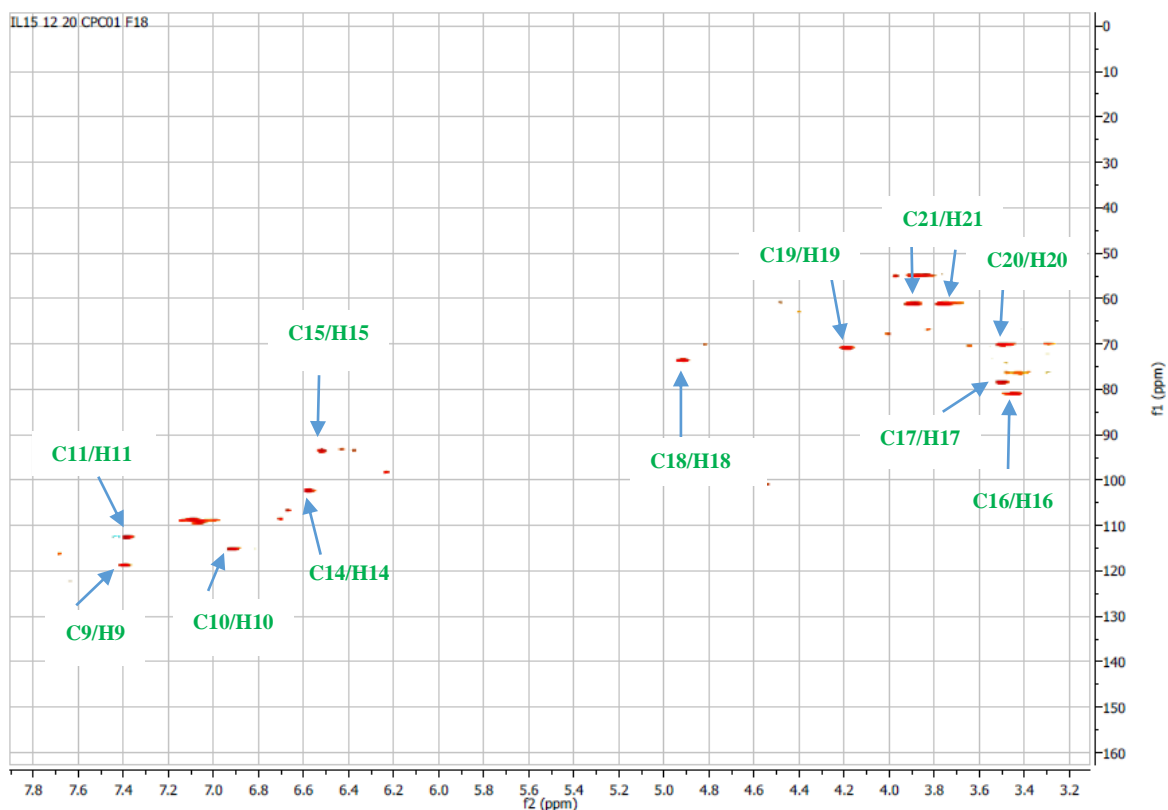


Figure 34 : Spectre HSQC de F18

✓ Spectre de proton de **F18**

Analyse du spectre de RMN ^1H : Le spectre de RMN ^1H présente pour la partie aglycone les signaux caractéristiques suivants :

- Un doublet H-9 qui sort vers 7,40 ppm ($J = 8$ Hz) dans la zone aromatique ;
- Un singulet H-11 qui sort vers 7,39 ppm dans la zone aromatique ;
- Un doublet qui résonne à 6,91 ppm ($J = 8$ Hz) dans la zone aromatique correspondant à H-10 ;
- Deux protons singulet H-14 et H-15 qui résonnent respectivement vers 6,58 et 6,52 ppm dans la zone aromatique.

En considérant ces observations, on repère les trois groupes de protons dont ceux du cycle B ortho para-trisubstitué (3 protons), et les deux protons singulets qui appartiennent à deux cycles différents A (1 proton) et C (1 proton).

Pour la partie osidique du spectre de RMN ^1H de **F18**, nous pouvons distinguer :

- Quatre protons (H-16, H-17, H-18, H-19 et H-20) à 3,44 ppm, 3,49 ppm, 3,48 ppm, 4,91 ppm suggérant la présence d'un élément électronégatif entraînant un déblindage de ces protons.

- Deux protons H-21 et H-21' à 3,76 ppm et à 3,88 ppm dans la zone des aliphatiques en α d'un élément électronégatif (figure 35).

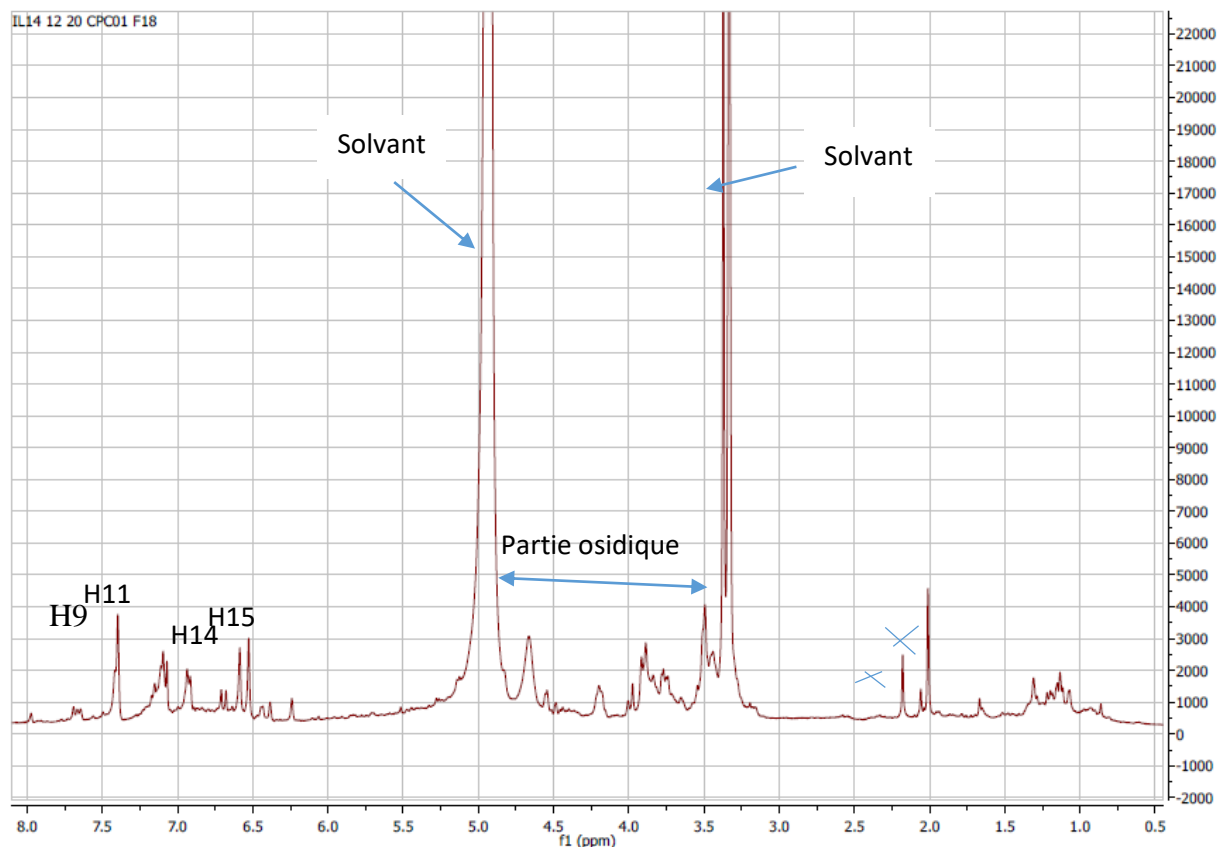


Figure 35 : Spectre de proton de F18

✓ Spectre de COSY

Sur le spectre de COSY¹H-¹H, trois groupes de protons dont ceux du cycle B ortho para-trisubstitué (H-9, H-10 et H-11), et deux protons singulets appartenant à deux cycles différents A (H-14) et C (H-15) d'un noyau flavone sont repérés. Les protons aromatiques H-9 et H-10 couplent entre eux avec une constante de couplage $^3J_{H-1H} = 8$ Hz (figure 36 et 37).

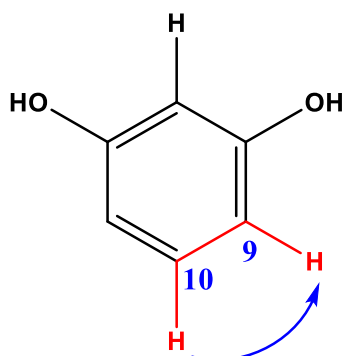


Figure 36 : Couplage COSY de F18 (partie aromatique)

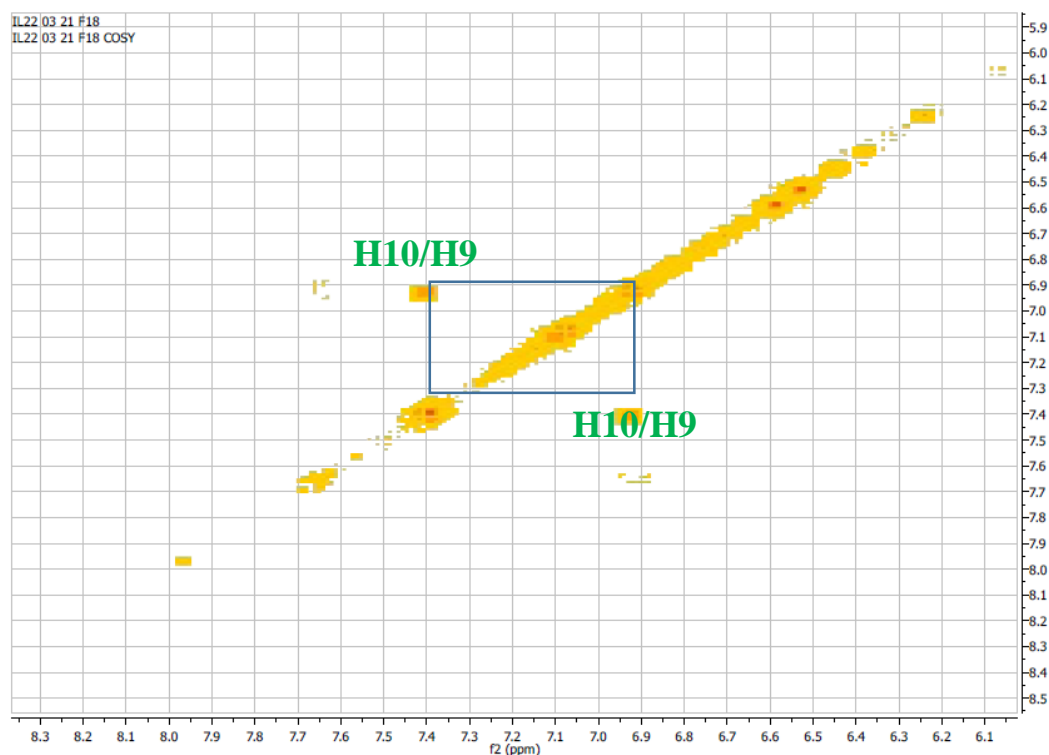


Figure 37 : Spectre de cosy de F18 (partie aromatique)

A partir du proton anomérique H-18 à δ_H 4,91 ppm, les six protons d'un glucose sont attribués à l'aide du spectre COSY. En effet, à partir du proton anomérique H-18 à δ_H 4,91 ppm, les couplages H-18 /H-19 (4,19 ppm) /H-20 (3,49 ppm) / H-17 (3.49 ppm)/ H-16 (81,2 ppm) /H-21 ppm sont repérés (figure 38 et 39).

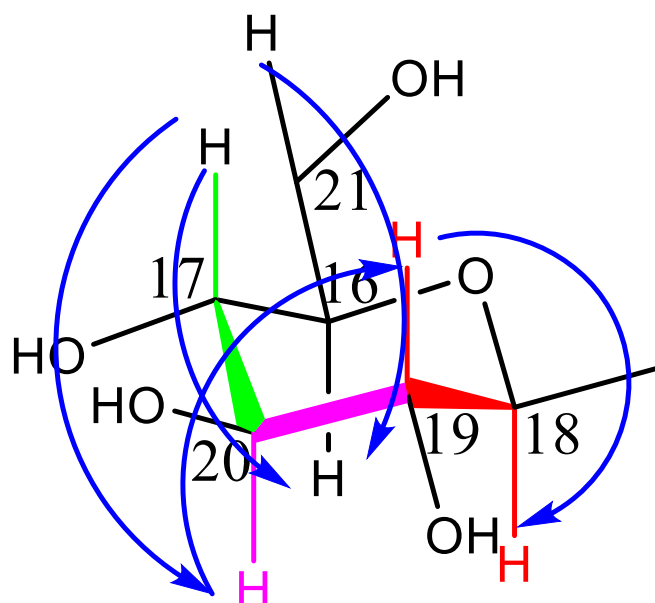


Figure 38 : Couplages COSY de F18 partie osidique

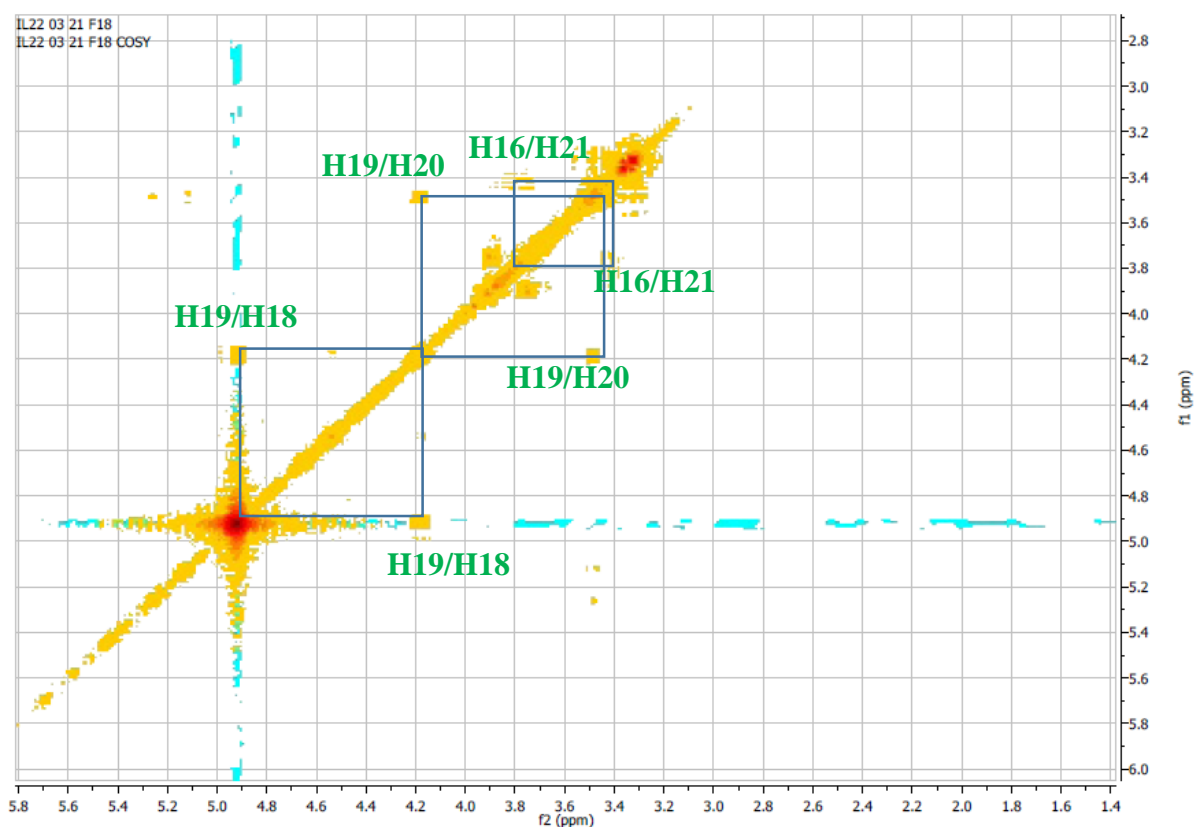


Figure 39 : Spectre de COSY de F18 (partie osidique)

✓ Analyse du spectre HMBC

Sur le spectre de HMBC (correspondant à la région aromatique), les carbones quaternaires sont attribués. On se base en particulier sur les corrélations suivantes :

- Le proton du méthine H-14 (δ_H 6,58 ppm) est repéré par ses corrélations avec les carbones C-1 (δ_C 182 ppm en particulier le plus déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène dans un état d'hybridation sp^2), C-2 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène δ_C 164,8 ppm), C-8 (δ_C 122,1 ppm) et C-13 (δ_C 103 ppm) correspondant à la corrélation du cycle C.
- Le proton du méthine H-15 (δ_H 6,52 ppm) a été attribué grâce à ses corrélations avec les carbones C-3 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène δ_C 163 ppm), C-5 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène δ_C 157 ppm), C-12 (δ_C 107,82 ppm) et C-13 (δ_C 102,909 ppm), correspond au cycle aromatique A.
- La position carbone C-6 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène δ_C 149 ppm) est repéré par ses corrélations avec les protons H-9 et H-11. La position carbone C-7 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène δ_C 145,6 ppm) est repéré par ses corrélations avec les protons H-9, H-10 et H-1. Ces corrélations correspondent à ceux du cycle aromatique B.
- La jonction bicycle A et C est obtenue grâce à la corrélation du carbone C-1 avec le proton H-15 (C-1/H-15 ; 4 liaisons) et à la corrélation du carbone C-4 avec le proton H-14 C-4/H-14 (4 liaisons).
- La jonction noyau système chromone (cycle A-C) avec le noyau aromatique B est obtenue grâce à la corrélation du carbone C-8 avec le proton H-14 (C-8/H-14 ; 4 liaisons) et à la corrélation du carbone C-2 avec le proton H-11 (C-2/H-11 ; 4J).
- Pour l'attribution de la jonction du cycle A avec le sucre, on utilise les trois corrélations C-3/H-18, C-4/H-18 et C-12/H-18 sur le spectre HMBC (figure 40 et 41).

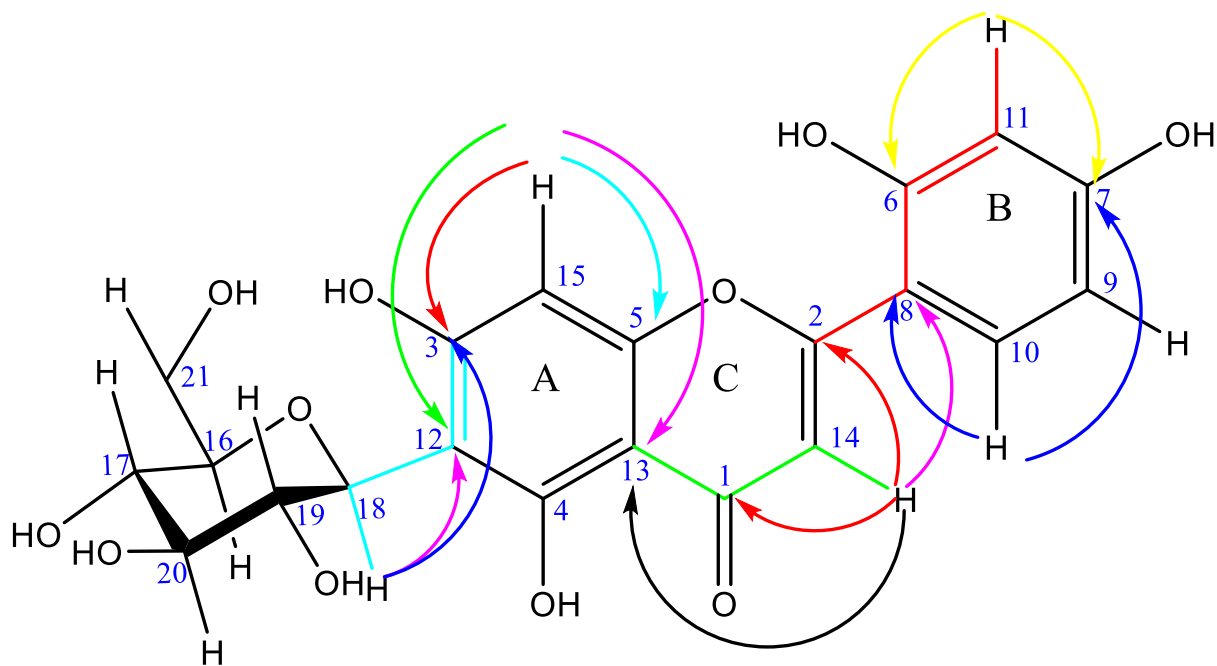


Figure 40 : Correlation HMBC de F18

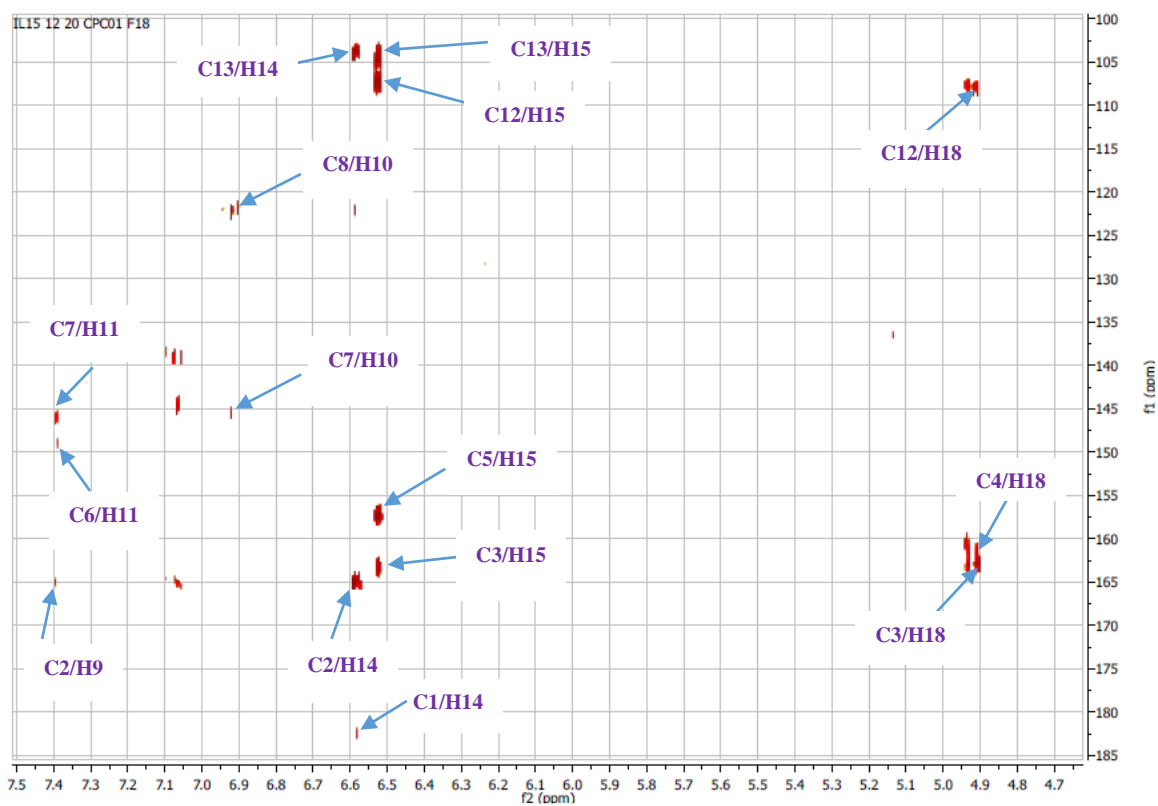


Figure 41 : Spectre HMBC de F18 (partie aromatique)

Sur la base de ces résultats, le composé **F18** est identifié comme étant le flavone 6- β -C-glycoside (**Isoorientine**) (Figure 42) déjà isolé des feuilles d'*Icacina senegalensis* Juss (Icacinaceae) par notre équipe de recherche [134]. Aucune étude biologique n'a été réalisée sur cette molécule. Cependant, des travaux antérieurs [135 ; 136], portant sur les extraits aqueux et éthanoliques de la feuille de *Icacina senegalensis* ont montré une activité anti-hyperglycémique intéressante chez des rats normo-glycémiques et sur un modèle de diabète induit par l'alloxane chez les rats.

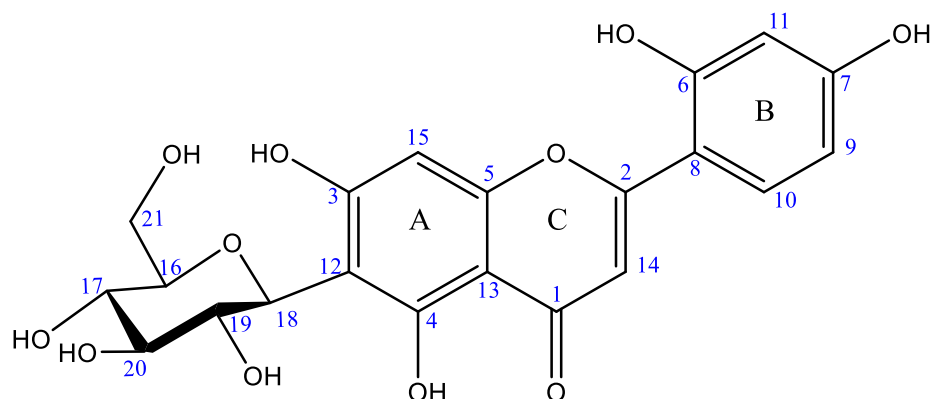


Figure 42 : Structure de Isoorientine (numérotation proposée)

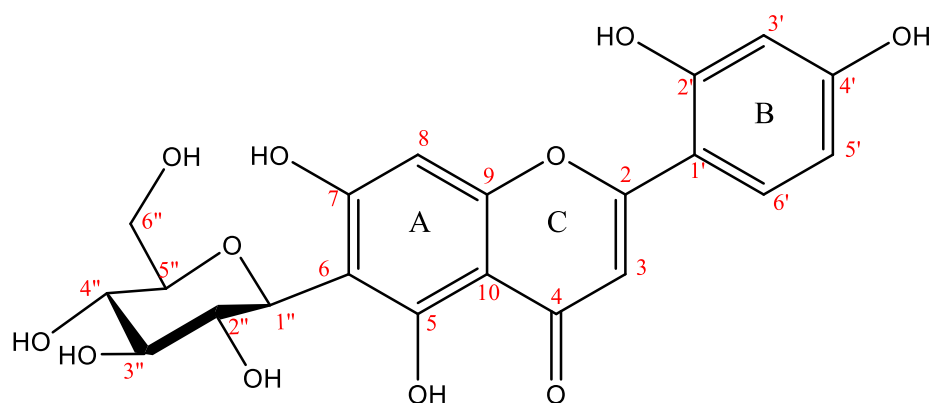


Figure 43 : Structure Isoorientine (numérotation systématique)

Tableau 10 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé F18 dans MeOD, δ en ppm, comparé à ceux de la littérature.

N°	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm.)	δ_{C} (litt.)	δ_{H} (litt.)
2	164.8		164.09	
3	102.9	6.58 s	103.25	6.57 s

4	182		182.33	
5	160.4		161.18	
6	107.82		109.32	
7	163		163.70	
8	93.7	6.52 s	93.93	6.45 s
9	157		156.64	
10	103		103.86	
1'	122.1		121.87	
2'	149		149.56	
3'	112.7	7.49 s	113.75	7.49 s
4'	145.6		146.20	
5'	118.9	7.40 dd	119.43	7.40 dd
6'	115.7	6.91d	116.50	6.92 d
1''	73.8	4.91	73.48	4.88
2''	71.1	4.19	71.09	4.22
3''	70.3	3.49	70.62	3.46-3.50
4''	78.7	3.49	79.40	3.46-3.50
5''	81.2	3.44	82.06	3.44
6''	60	3.76 ;3.88	61.98	3.75 ;3.77

I.3.1.3.1.2. Détermination structurale de F14

✓ Analyse LC/MS de **F14**

Le composé **F14** a été obtenu sous la forme d'une poudre amorphe brun foncé. Le spectre de masse ESI du composé **F14** effectué en mode négatif montre un ion pseudo-moléculaire [M-1] à m/z 633 correspondant à la formule brute C₂₇H₂₂O₁₈ avec un degré d'insaturation DI = 17 (figure 44).

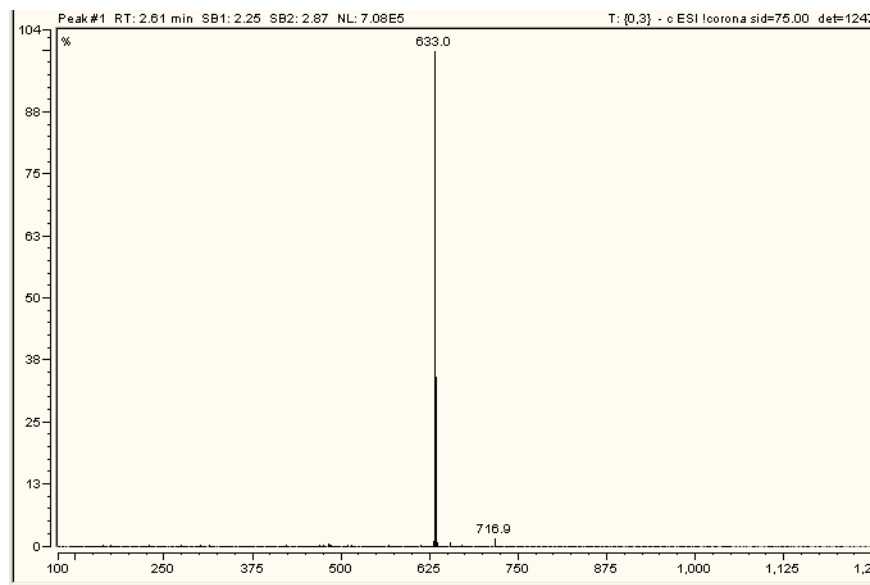


Figure 44 : Spectre de masse de F14

✓ Analyse du spectre de RMN (^{13}C et DEPT-135) de **F14** :

Le spectre de RMN ^{13}C du composé **F14** montre la présence de 27 carbones parmi lesquels nous pouvons identifier les carbones caractéristiques suivants :

- Trois carbonyles les plus déblindés C-1, C-2 et C-3 qui sortent respectivement à 168,74 ; 167,14 et à 165,31 ppm correspondant aux déplacements chimiques des carbonyles des esters ;
- Neuf carbones quaternaires aromatiques C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11 et C-12 qui sortent respectivement à 144,99 ; 144,64 ; 144,23 ; 143,93 ; 143,83 ; 139,02 ; 136,78 ; 136,28 ppm. A signaler que le carbone C-4 ; C-5 très haut en intensité compte pour deux carbones (en raison de la symétrie existante au niveau du noyau aromatique A). Les valeurs des déplacements chimiques de ces carbones aromatiques élevées dans la zone des carbones aromatiques montrent que ces derniers portent des groupements hydroxyles (-OH).
- Cinq carbones quaternaires aromatiques C-13 ; C-14 ; C-15 ; C-16 et C-17 respectivement à 124,07 ; 124,02 ; 119,18 ; 115,79 et 115,29 ppm.
- Quatre CH aromatiques (méthines) CH-18 ; CH-19 ; CH-20 et CH-21 qui sortent respectivement à 109,52 ppm (carbone très haut en intensité compte pour deux méthines) ; 108,78 et 106,88 ppm.
- Cinq CH aliphatiques CH-22, CH-23, CH-24, CH-25 et CH-26 à 93,61 ; 74,83 ; 70,29 ; 68,08 ; 63,67 ppm et à un CH_2 61,07 ppm. Il faut remarquer le déplacement chimique du carbone C-22 à 93,61 ppm correspond au déplacement chimique d'un carbone anomérique. En plus la valeur

des déplacements chimiques des CH et CH₂ sur le spectre du carbone nous permet de confirmer la présence d'un sucre (figure 45).

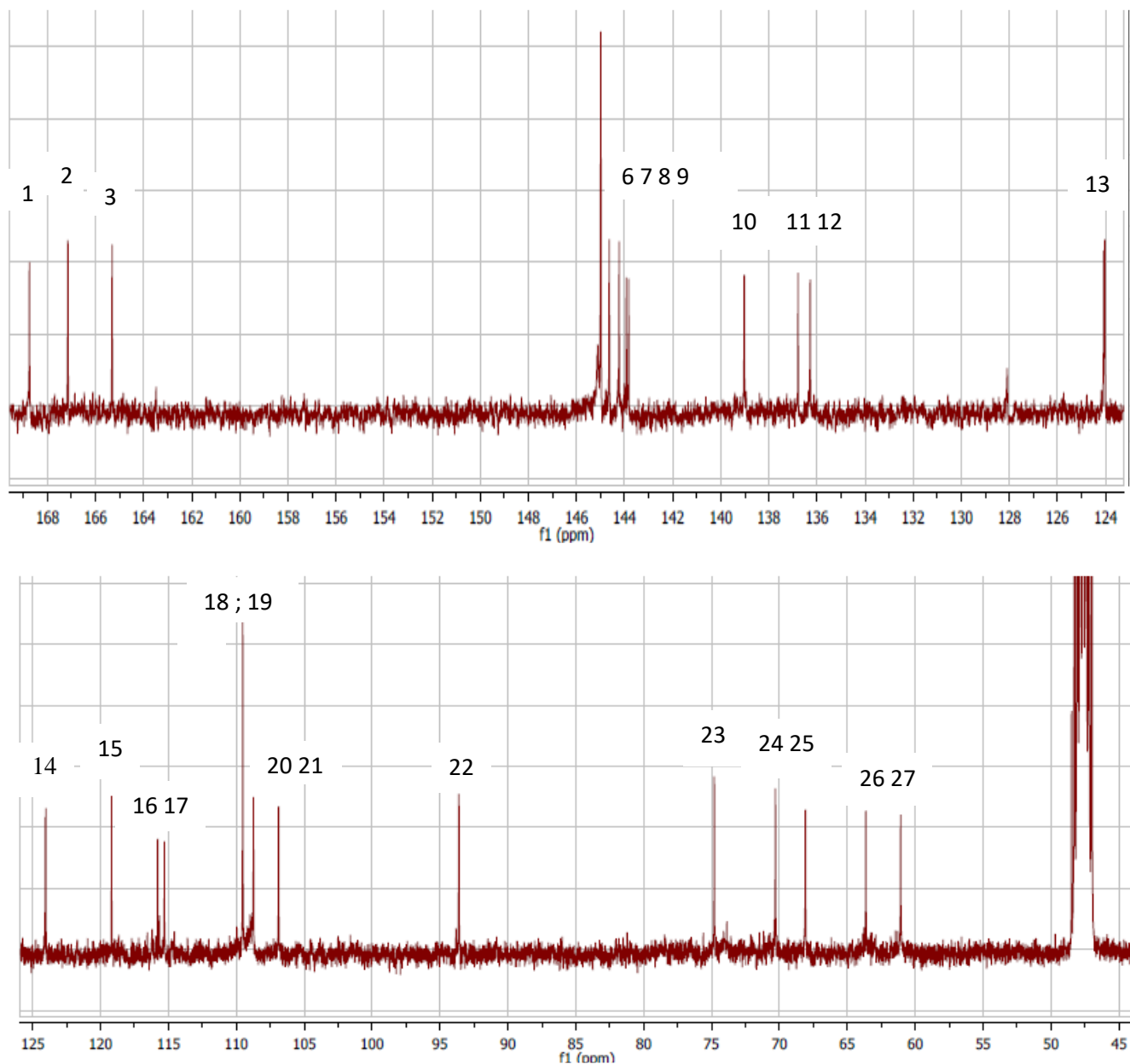


Figure 45 : Spectre de carbone de F14

✓ Analyse du spectre HSQC

Le spectre HSQC *J*-modulé montre 4 méthines aromatiques, 5 méthines aliphatiques, 1 méthylène pour le composé **F14**.

A partir des protons identifiés sur le spectre HSQC sont attribués les carbones correspondants à δ_C (en ppm) : 109,5 (C-18), 109,5 (C-19), 108,78 (C-20), et 106,88 (C-21) de la partie aromatique ; 93,61 (C-

22), 74,83 (C-23), 70,29 (C-24), 68,08 (C-25), 63,67 (C-26), 61,07 (C-27) de la partie osidique (figure 46).

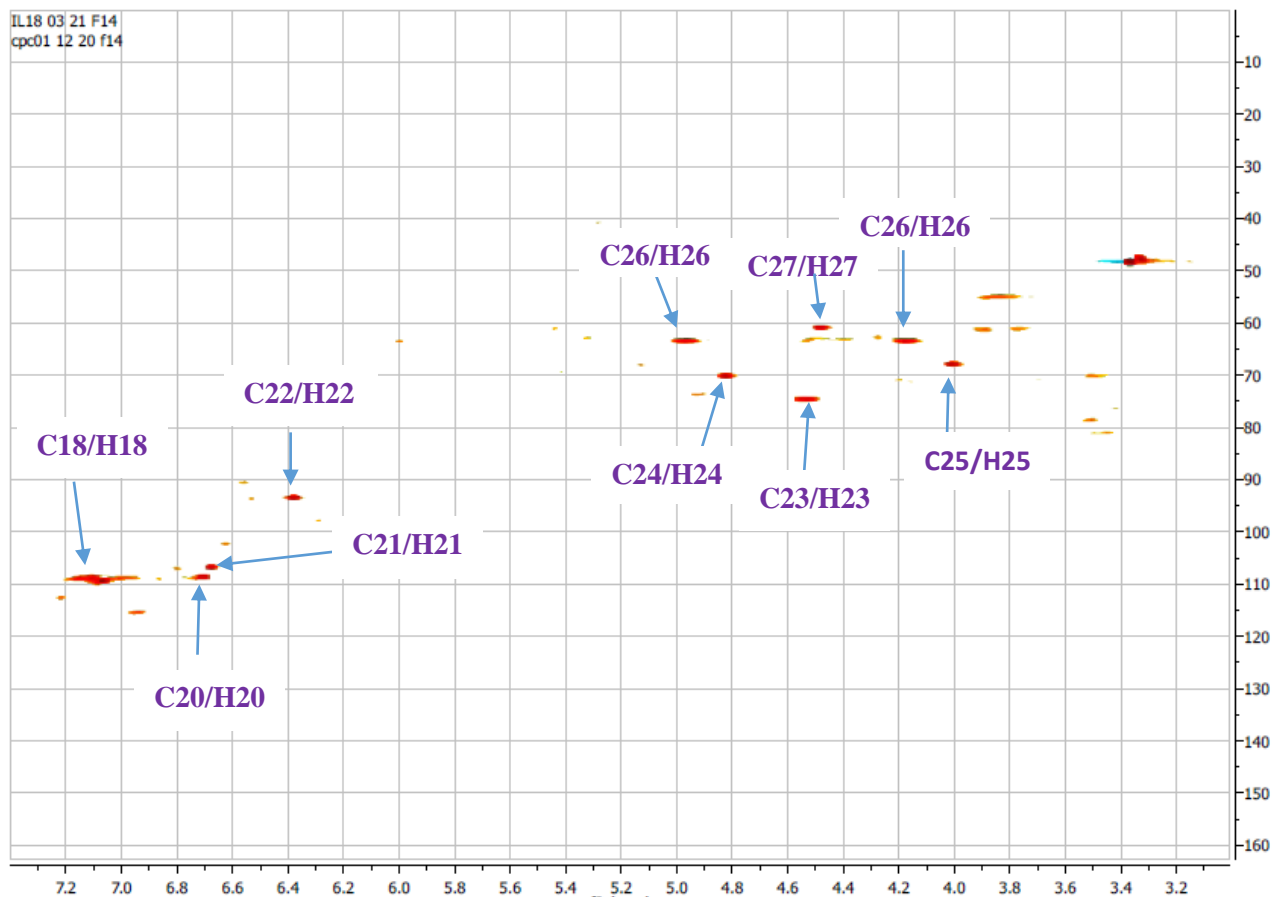


Figure 46 : Spectre de HSQC de F14

✓ Spectre de proton de F14

Le spectre de proton ^1H du composé **F14** nous permet de distinguer les protons suivants :

- Un signal singulet qui compte pour 2H en raison de la symétrie existante au niveau du noyau aromatique A à 7,07 ppm qui correspond aux deux protons H-18 et H-19 aromatiques.
- Deux signaux singulet H-20 et H-21 aromatique résonnant respectivement vers 6,70 et 6,67 ppm.
- Un signal doublet d'intensité ^1H à 6,38 ppm correspondant au proton anomérique H-22 du sucre.
- Quatre protons H-23 ; H-24 ; H-25 ; H-27 aliphatiques qui résonnent respectivement vers 4,53 ppm, 4,82 ppm, 4,00 ppm et 3,88 ppm suggèrent la présence d'un élément électronégatif entraînant un déblindage de ces protons.
- Deux protons H-27 méthyléniques à 4,17 ppm et à 4,96 ppm dans la zone des aliphatiques en α d'un élément électronégatif (figure 47).

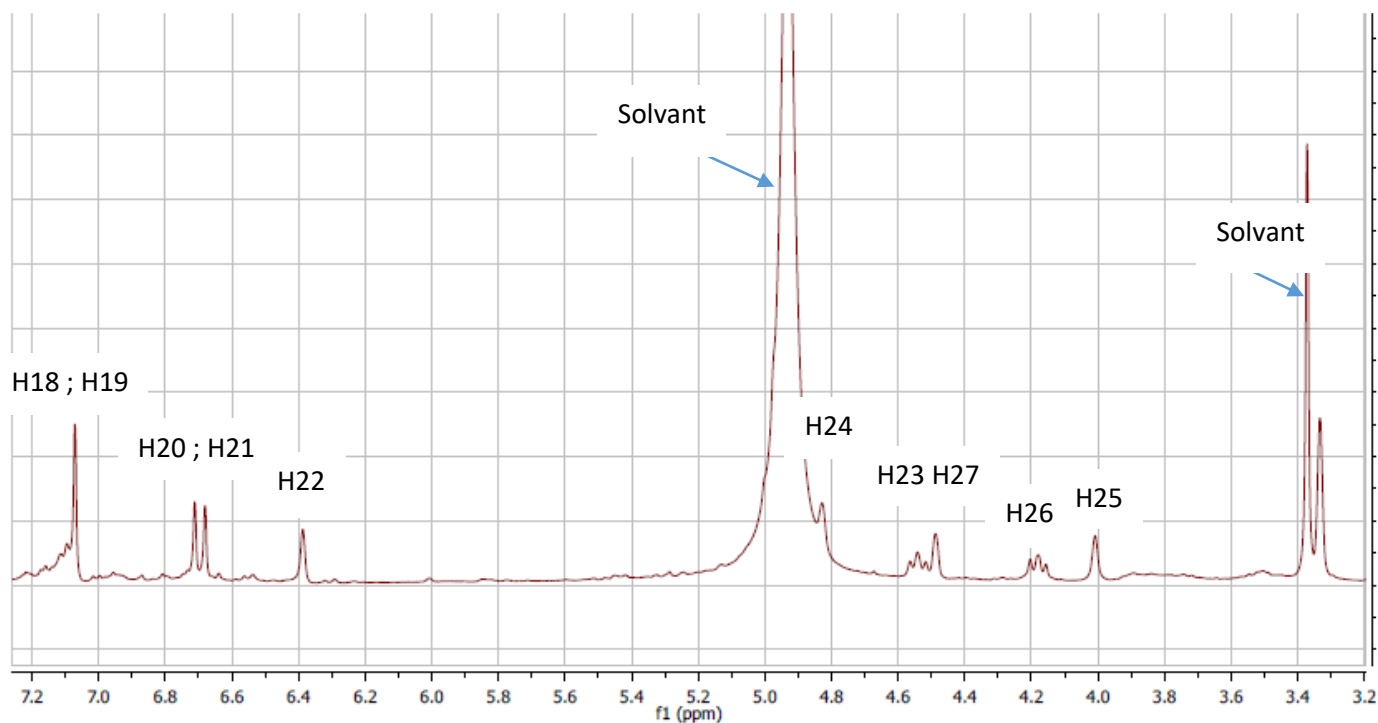


Figure 47 : Spectre de proton de F14

✓ Analyse du spectre de COSY

L'analyse du spectre de COSY nous permet de distinguer les couplages d'un système de spin de six protons couplés entre eux H-22/ H-25/ H-24/ H-27/ H-23/H-26 (figure 48).

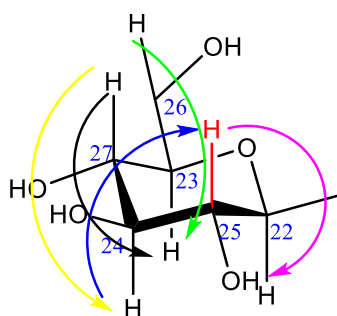


Figure 48 : Couplages COSY de F14

L'analyse détaillée des spectres RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC et COSY de F14 a révélé la présence de signaux pour trois sous-structures nommées A, B, et C, en présence d'un sucre. A ce stade, une structure du composé **F14** peut être ébauchée en tenant compte du degré d'insaturation ($\text{DI} = 17$) et des données de la RMN qui montrent 3 carbonyles et 9 doubles liaisons. Ce qui suppose la présence de 5 cycles.

✓ Analyse du spectre HMBC

Les singulets aromatiques H-18 et H-19 situés à 7,07 ppm (H-18 et H-19 sont identiques à cause de la symétrie sur le noyau A) corréleront avec cinq carbones dont un carbonyle d'ester 165,31 (C-3), trois carbones quaternaires C-4 (δ_C 144,99 ppm), C-5 (δ_C 144,99 ppm) et C-10 (δ_C 139,02 ppm) du cycle aromatique A, correspondant à un groupement galloyle (figure 49).

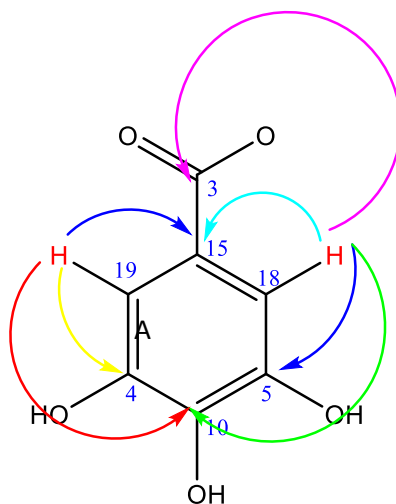


Figure 49 : Fragment galloyle

- Le proton aromatique H-21 à 6,67 ppm est repéré par ses corrélations avec le carbonyle C-1 (δ_C 168,74 ppm) et les carbones quaternaires C-6, C-12, C-16 et C-17 situés respectivement à 144,66 ; 136,28 ; 115,79 et 115,28 ppm du cycle aromatique B.
- Le proton singulet aromatique H-20 à 6,70 ppm est repéré par ses corrélations avec le carbonyle C-2 (δ_C 167,14 ppm) et les carbones quaternaires C-7, C-11 et C-16 situés respectivement à 144,23 ; 136,78 ; 115,79 et 115,28 ppm du cycle aromatique C. Le noyau aromatique C est lié au noyau aromatique B grâce aux corrélations des protons H-20 et H-21 avec le carbone quaternaire C-16 et le carbonyle C-2 subit une lactonisation avec le l'oxygène du carbone C-8 qui donne un groupement lutéoylole (figure 50).

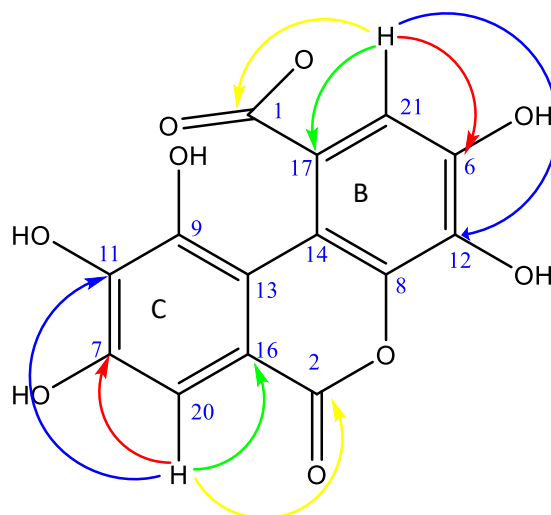


Figure 50 : groupement lutéoyle

- Le groupement galloyle A est lié au sucre par les corrélations observées entre H-22 anomérique avec C-3.
- Le noyau aromatique B noyau est lié au sucre grâce à la corrélation du carbonyle C-1 (δ_C 168,74 ppm) avec le proton H-26 du glucose (figure 51).

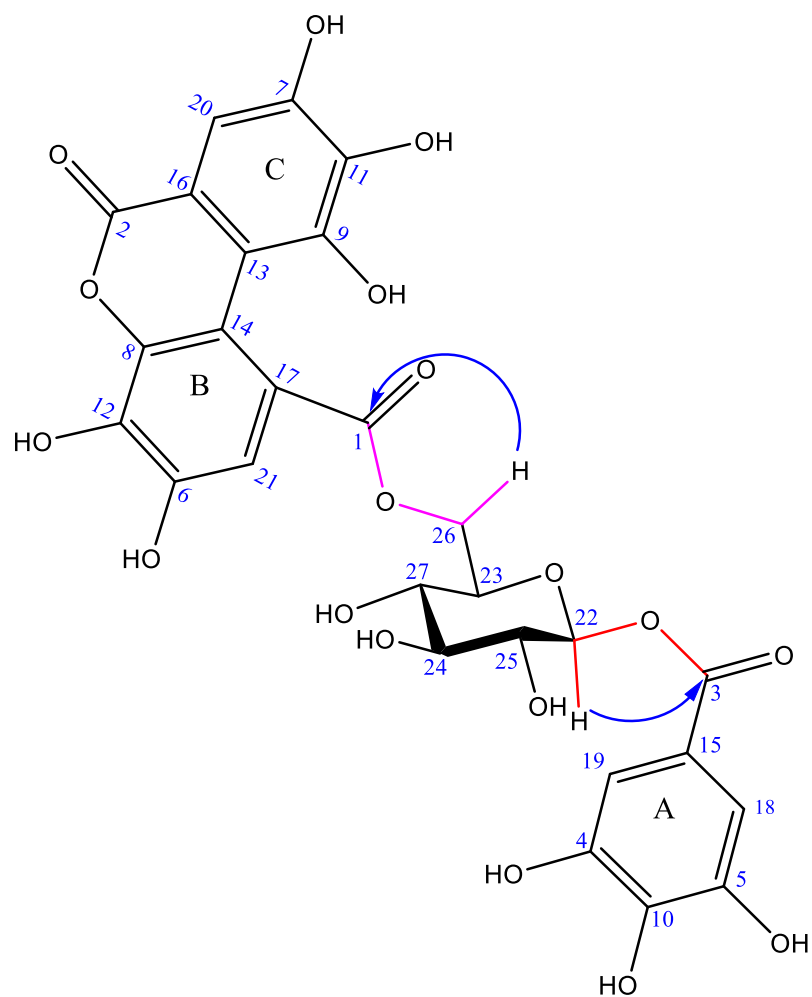


Figure 51 : Corrélation HMBC de F14

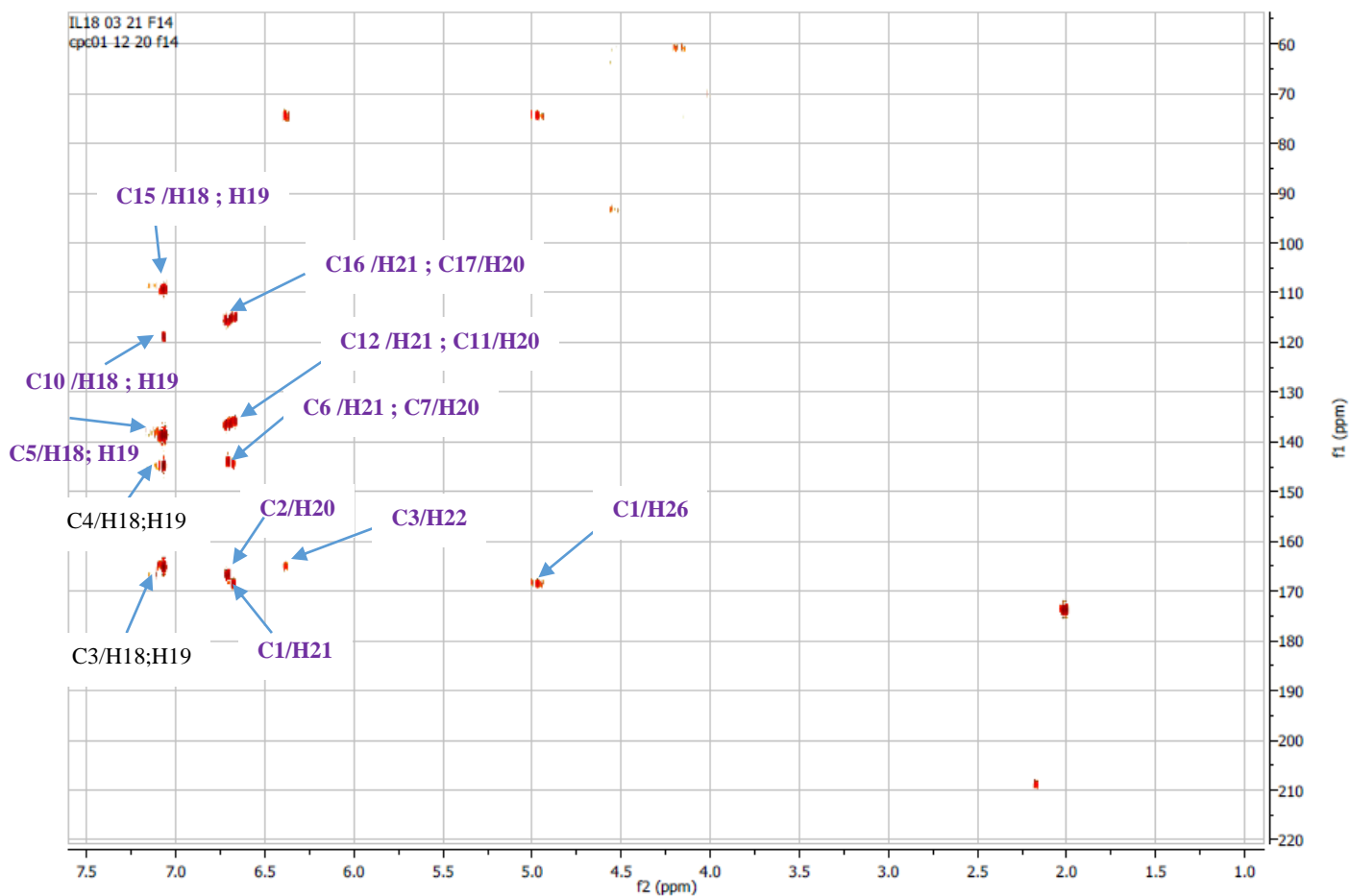


Figure 52 : Spectre HMBC de F14

Le composé **F14** est ainsi identifié comme étant le 1-*O*-galloyl-6-*O*-lutéoyl R-glucose (figure 53 et 54). Ce composé est décrit dans la littérature et isolé de la plante *Phyllanthus niruri*. L'étude biologique antérieure de cette molécule montre qu'elle présente des valeurs IC_{50} de 4,7 $\mu\text{g/ml}$ contre *Babesia gibsoni* et 1,4 $\mu\text{g/ml}$ contre *Plasmodium falciparum* in vitro. Ces constatations peuvent servir de base à une meilleure compréhension de *B. gibsoni* et *P. falciparum* infections et contribuer au développement de nouvelles traitements efficaces contre ces parasites [137].

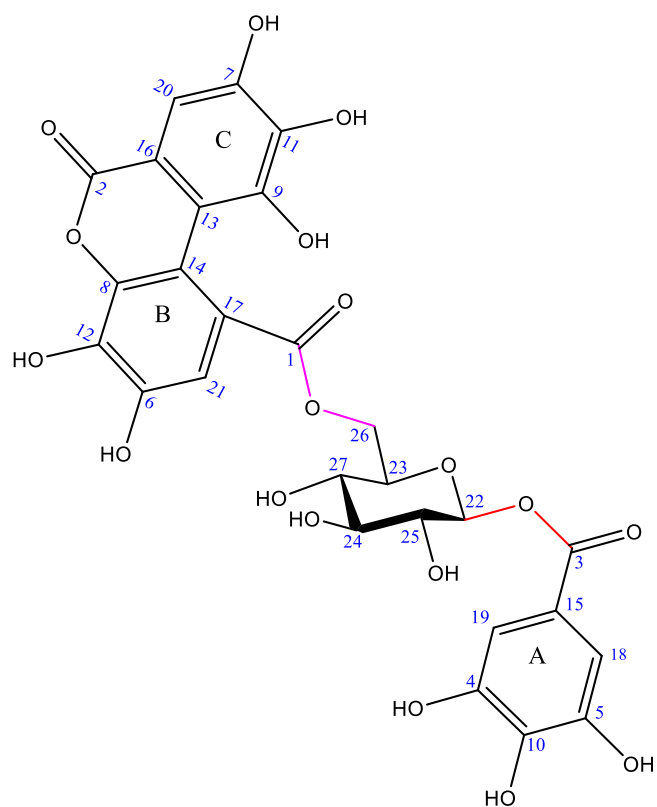


Figure 53 : Structure du composé 1-O-galloyl-6-O-lutéoyl R-glucose (numérotation proposée)

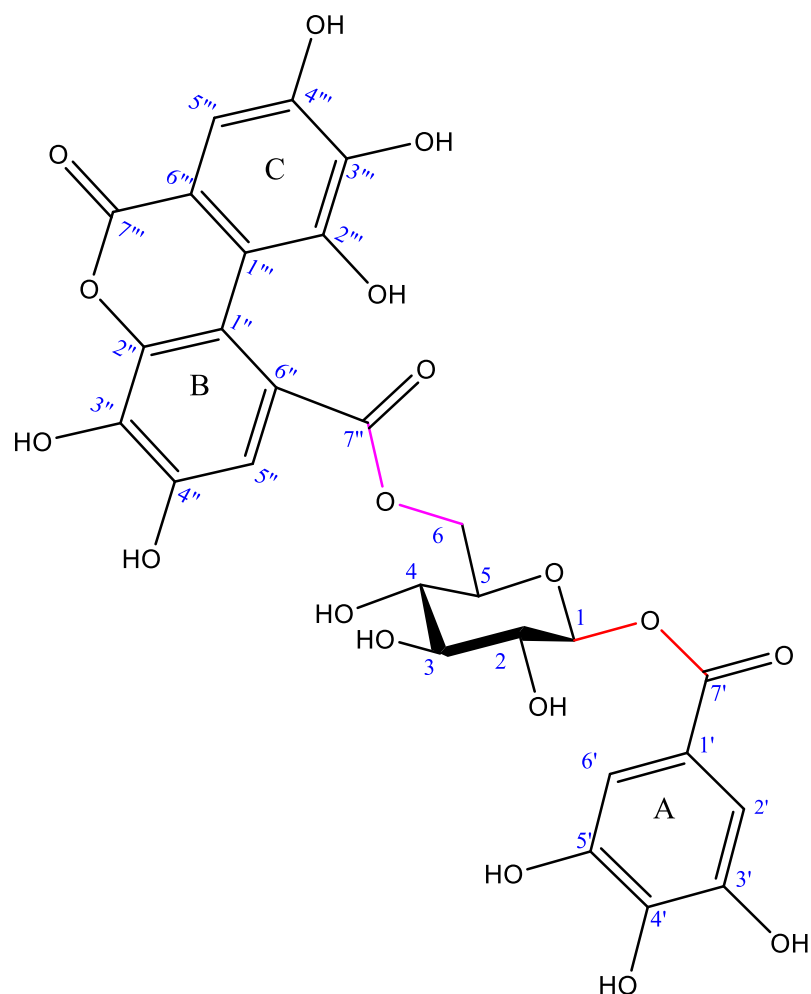


Figure 54 : Structure du composé 1-O-galloyl-6-O-lutéoyl R-glucose (numérotation systématique)

Tableau 11 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé F14 dans MeOD, δ en ppm, comparé à ceux de la littérature

N°	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm Litt)	δ_{H} (ppm Litt)
1	93.61	6.38 d	94.9	6.37 dd
2	68.08	3.98	69.3	3.99 m
3	70.29	4.82	71.5	4.81 m
4	61.07	4.48 m	62.4	4.47 m
5	74.83	4.53 m	76.1	4.53 d
6	63.67	4.18 ; 4.96 dd	64.3	4.15 ; 4.96 dd

1'	119.18		120.5	
2'	109.52	7.07 s	110.9	7.09 s
3'	144.99		146.3	
4'	139.02		140.4	
5'	144.99		146.3	
6'	109.52	7.07 s	110.9	7.06 s
7'	167.31		166.7	
1''	124.02		125.3	
2''	143.93		145.3	
3''	136.28		137.6	
4''	144.64		145.9	
5''	106.88	6.67 s	108.33	6.69 s
6''	115.27		106.7	
7''	168.74		170.1	
1'''	124.07		125.4	
2'''	143.83		145.3	
3'''	136.78		138.2	
4'''	144.23		145.5	
5'''	108.78	6.70 s	110.9	6.66 s
6'''	115.79		117.2	
7'''	167.14		168.5	

I.3.1.3.1.3. Détermination structurale de F10

✓ Analyse LC/MS de F10

Le composé **F10** a été obtenu sous la forme d'une poudre amorphe brun foncé. Le spectre de masse ESI du composé **F10** effectué en mode négatif montre un ion pseudo-moléculaire $[M-1]$ à m/z 953 correspondant à la formule brute $C_{41}H_{30}O_{27}$ avec un degré d'insaturation DI égal à 26 (figure 55).

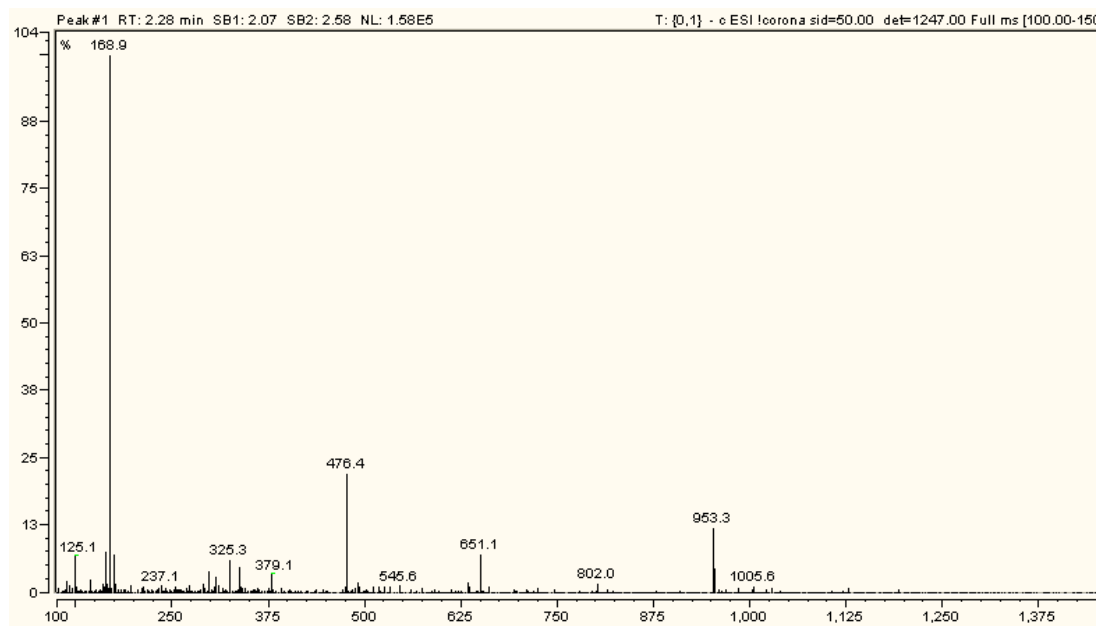


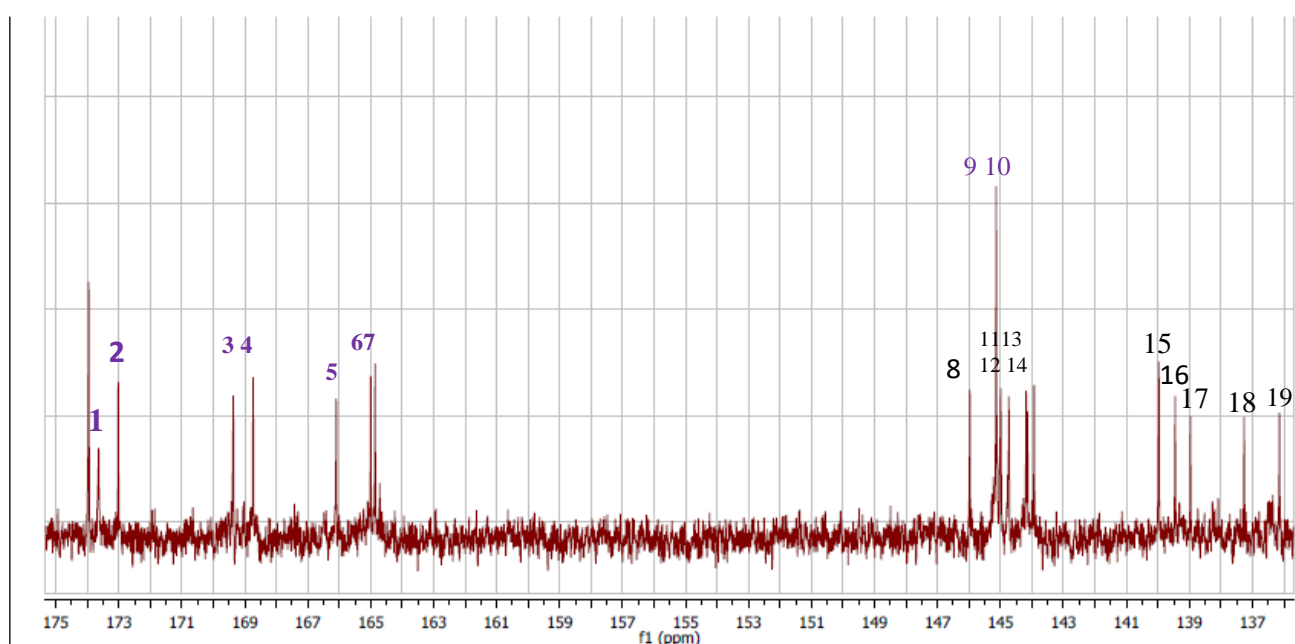
Figure 55 : Spectre de masse de F10

✓ Analyse du spectre RMN de carbone de F10

Le spectre de RMN ^{13}C du composé **F10** montre la présence de 41 carbones parmi lesquels nous pouvons identifier les carbones caractéristiques suivants :

- Sept carbonyles les plus déblindés C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 et C-7 qui sortent respectivement à 173,64 ; 173,01 ; 169,73 ; 166,09 ; 165 et 164,85 ppm correspondant aux déplacements chimiques des carbonyles des esters ;
- Douze carbones quaternaires aromatiques déblindés C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18 et C-19 qui sortent respectivement à 145,97 ; 145,17 ; 144,99 ; 144,73 ; 144,18 ; 144,14 ; 139,97 ; 139,45 ; 138,96 ; 137,26 ; 136,14 ppm. A signaler comme dans le cas de **F14** que les carbones C-9 et C-10 à haute intensité comptent pour deux carbones (en raison de la symétrie existante au niveau du noyau aromatique A). Les valeurs des déplacements chimiques de ces carbones aromatiques élevées dans la zone des carbones aromatiques montrent que ces derniers portent des groupements hydroxyles (-OH).

- Sept carbones quaternaires aromatiques C-20 ; C-21 ; C-22 ; C-23 ; C-24 ; C-26 et C-27 respectivement à 124 ; 123 ; 118,65 ; 117 ; 114,79 et 114,53 ppm.
- Cinq CH aromatiques (méthines) CH-25 ; CH-28 ; CH-29 ; CH-30 ; et CH-31 qui sortent respectivement à 116,2 ; 109,48 (carbone très haut en intensité compte pour deux méthines) ; 108,9 et 106,76 ppm.
- Huit CH aliphatiques CH-32 ; CH-33 ; CH-34 ; CH-35 ; CH-36 ; CH-38 ; CH-39 et CH-40 qui sortent respectivement à 91,1 ; 72,82 ; 69,66 ; 65,5 ; 65,36 ; 60,97 ; 40,29 ; et 38,58 ppm. Les six premiers CH déblindés sont en alpha d'un hétéroatome.
- Deux CH₂ (C-37 et C-41) aliphatiques qui sortent respectivement à 63,31 et 29,08 ppm. Le C37 déblindé est en alpha d'un hétéroatome (figure 56).



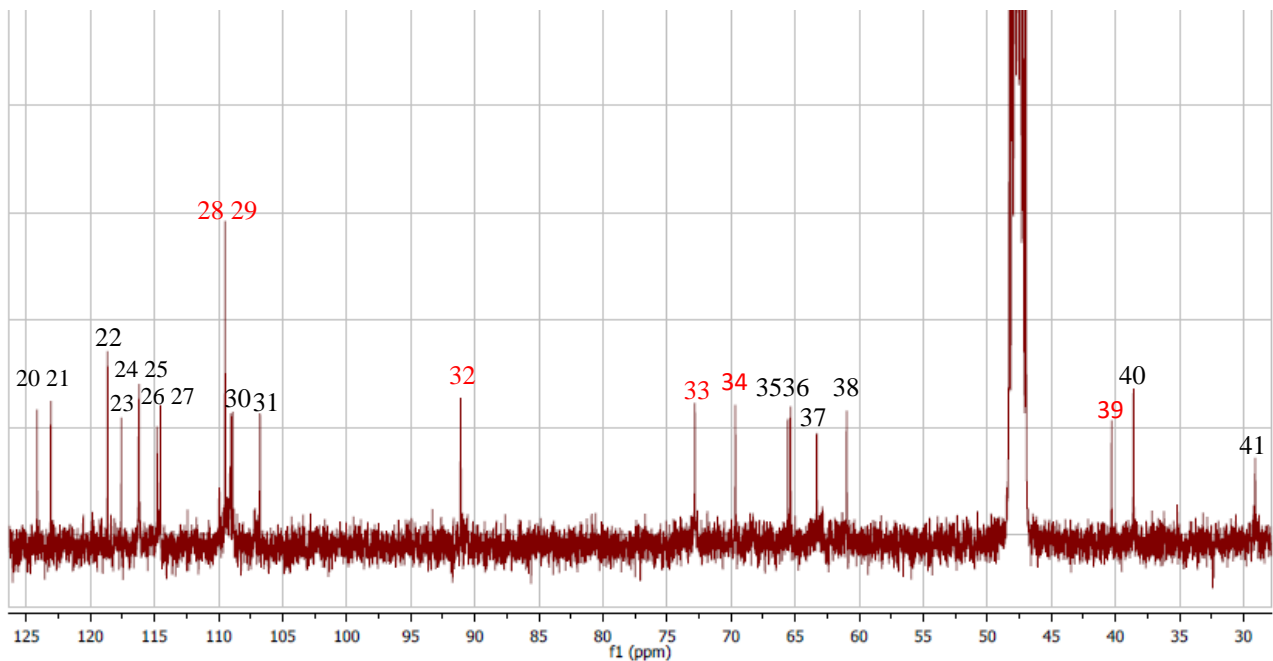


Figure 56 : Spectre de carbone de F10

✓ Analyse du spectre de proton de **F10**

Le spectre de proton de **F10** présente :

- Un singulet qui résonne vers 7,49 ppm correspondant au proton H-25.
- Un singulet qui compte pour 2H en raison de la symétrie existante au niveau du noyau aromatique A à 7,09 ppm qui correspond aux deux protons H-28 et H-29 aromatiques.
- Deux signaux singulet H-30 et H-31 aromatique résonnant respectivement vers 6,86 et 6,65 ppm.
- Un signal singulet d'intensité 1H à 6,53 ppm correspondant au proton anomérique H-32 du sucre.
- Sept protons H-33 ; H-34 ; H-35 ; H-36 ; H-38 ; H-39 et H-40 aliphatiques qui résonnent respectivement vers 4,84, 5,4, 4,82, 5,23, 5,85, 5,06 et 3,8 ppm suggèrent la présence d'un élément électro-négatif entraînant un déblindage de ces protons.
- Deux méthyléniques à 4,38 ppm et à 4,96 ppm dans la zone des aliphatiques en α d'un élément électro-négatif correspond à H-37 ;
- Deux méthyléniques qui résonnent à 2,23 ppm correspondant à H-41.

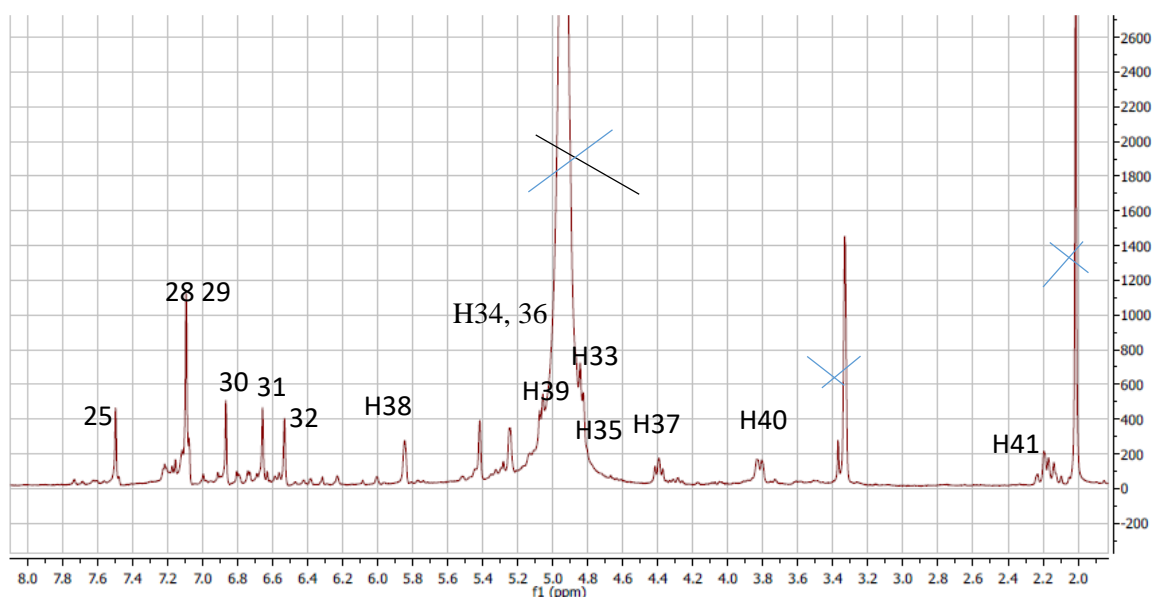


Figure 57 : Spectre de proton de F10

✓ Analyse du Spectre de COSY

A partir de ce spectre, nous identifions les couplages suivants :

- Le proton H-39 couple avec les protons H-35 et H-40 en 3J et H40 qui couple à son tour avec les protons H-41. Ces couplages nous donnent le fragment suivant (figure 58) :

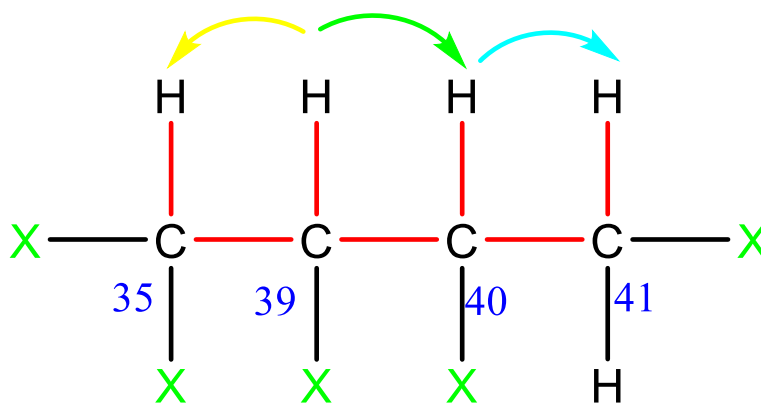


Figure 58 : Couplage COSY de F10

- L'analyse du spectre de COSY nous permet de distinguer les couplages d'un système de spin de six protons couplés entre eux H-32/ H-36/ H-34/ H-38/ H-33/H-37 (figure 59).
- Ces six couplages ainsi que le déplacement chimique du carbone CH-32 à 91,1 ppm correspond au déplacement chimique d'un carbone anomérique et la valeur des déplacements chimiques des six CH et CH₂ sur le spectre du carbone et du proton qui montent qu'ils sont en alpha d'un

oxygène, nous permet de confirmer la présence d'un sucre à six atomes de carbone. Cela nous permet donc d'obtenir le fragment suivant (figure 59) :

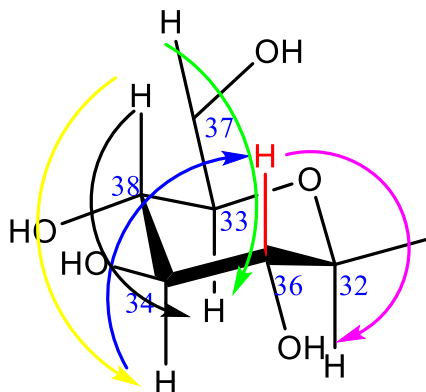


Figure 59 : Couplage COSY de F10 (partie osidique)

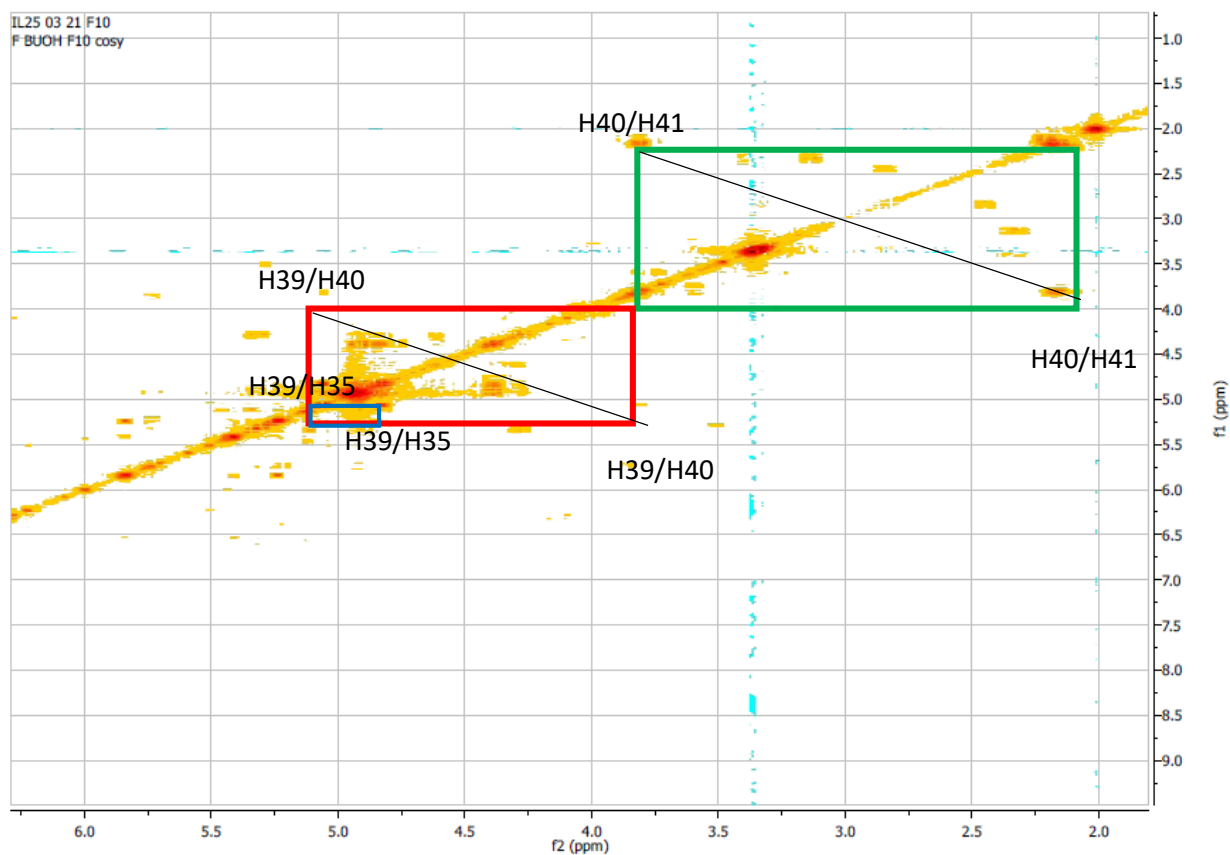


Figure 60 : Spectre de COSY de F10

✓ Analyse du spectre HMBC

Comme dans le cas **F14** l'analyse détaillée des spectres RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC et COSY de **F10** a révélé la présence de signaux pour cinq sous-structures A, B, C, D et E en présence d'un sucre. Les sous-structures A, B et C ont des caractéristiques similaires à celui de **F14**. A ce stade, nous pouvons déjà proposer des sous-structures pour le composé **F10** et en tenant compte du degré d'insaturation nécessaire $\text{DI}=26$ correspondants à 7 doubles liaisons de carbonyles et 12 doubles liaisons fournies par les spectres de la RMN, et par conséquent 7 cycles.

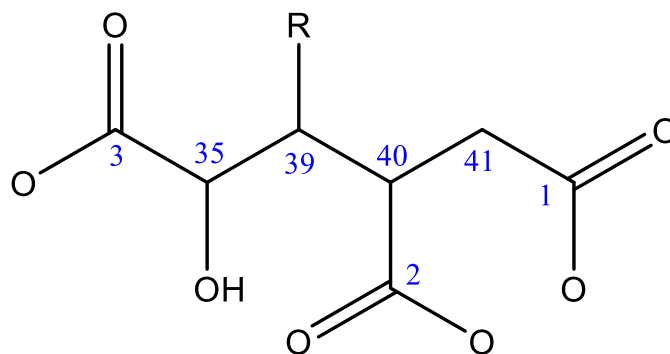
- Les singulets aromatiques H-28 et H-29 situés à 7,09 ppm sont repérés par six corrélations HMBC dont deux avec un méthine C-28 (δ_{C} 109,48 ppm, sa symétrie), C-7 (δ_{C} 165,85 ppm), C-9 (δ_{C} 145,17 ppm), C-11 (δ_{C} 144,99 ppm), C-22 (δ_{C} 118,65 ppm) et C-16 (δ_{C} 139,45 ppm) correspondants aux carbones du cycle aromatique A qui correspond ainsi à un groupement galloyle (Figure 49). La corrélation du proton anomérique H-32 avec le carbonyle C-7 permet la liaison du galloyle au sucre.
- Le proton aromatique H-25 à 7,5 ppm est repéré par ses corrélations avec le carbonyle C-6 (δ_{C} 164,96 ppm) et les carbones quaternaires C-8 (δ_{C} 145,97 ppm), C-17 (δ_{C} 138,96 ppm), et C-27 (δ_{C} 114,53 ppm) du cycle aromatique B. Ce noyau est lié au sucre grâce à la corrélation du carbonyle C6 avec le proton H-34 du glucose.
- Le proton singulet aromatique H-30 à 6,80 ppm est repéré par ses corrélations avec le carbonyle C-5 (δ_{C} 166,09 ppm), C-14 (δ_{C} 144,14 ppm), C-18 (δ_{C} 137,26 ppm), et C-24 (δ_{C} 116,2 ppm) correspondant au cycle aromatique C.
- Le cycle aromatique D est formé par Les corrélations du proton singulet aromatique H31 à 6,65 ppm avec les carbones C-4, C-12, C-19, C-23 et C-26.

Cependant, les résonances des noyaux de **F10** se distinguent facilement de **F14** : par les deux autres résonances carbonyles des esters C-1 (δ_{C} à 173,64 ppm) et C-2 (δ_{C} 173,015 ppm). De plus, le fragment CH-35, CH-39, CH-40 et CH-41 est obtenu lors de l'analyse du spectre de COSY ainsi que la présence du proton CH-31.

Dans le spectre HMBC, nous observons la corrélation entre le proton H-41 à 2,17 ppm avec le carbonyle C1 (δ_{C} 173,64 ppm) et la corrélation entre les protons H-39 et H-40 avec le carbonyle C-2 (δ_{C} 173,015 ppm). Ceci montre que les carbonyles C-1 et C-2 sont respectivement liés à C-40 et C-41. Nous observons aussi les corrélations du proton H-39 avec les carbones C-35, C-40, C-41 et un carbonyle C-3, ces corrélations permettent de justifier le fragment proposé lors de l'interprétation du spectre de

COSY. La sous-structure E ainsi obtenue est lié au cycle D par la corrélation du proton H-39 avec le carbone quaternaire aromatique C-23 (figure 62).

:



Sous-structure E

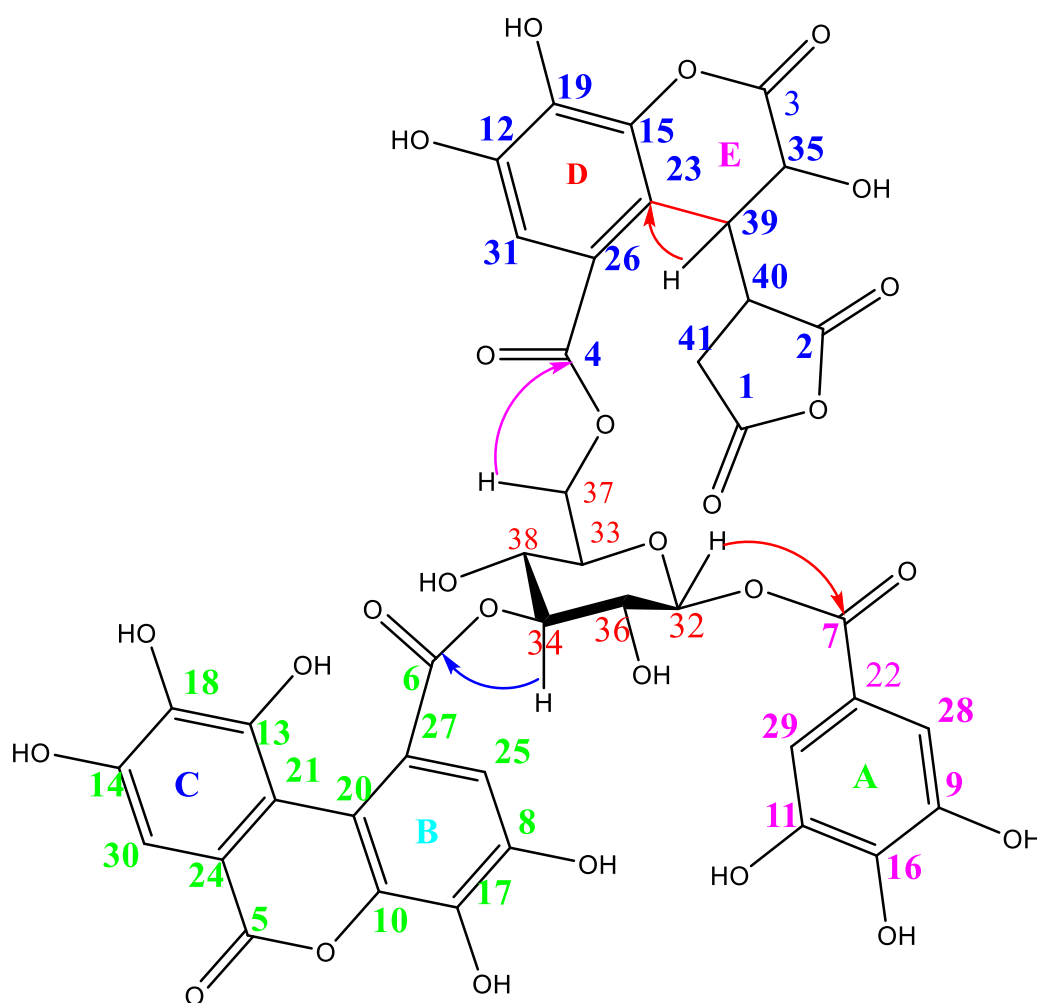


Figure 61 : Structure de la molécule F10 (corrélation HMBC)

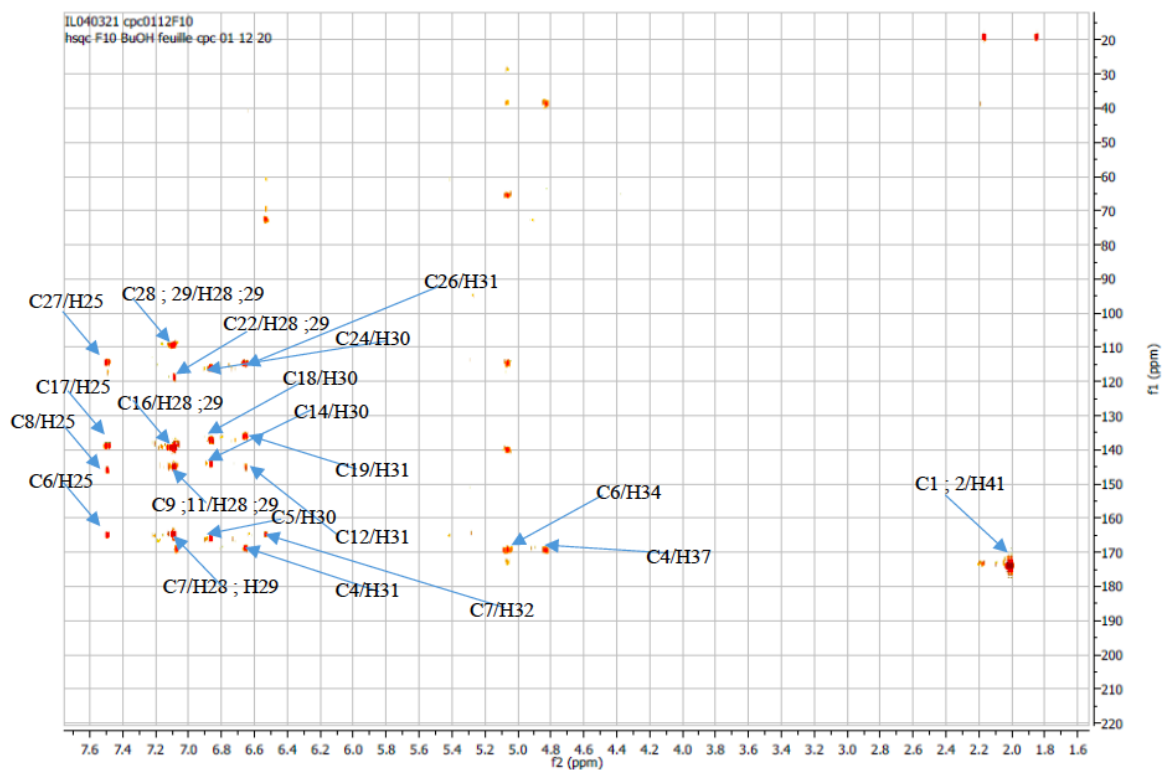


Figure 62 : Spectre de HMBC de F10

Sur la base de ces résultats, le composé **F10** est identifié comme étant un tanin gallique non **décrit dans la littérature**

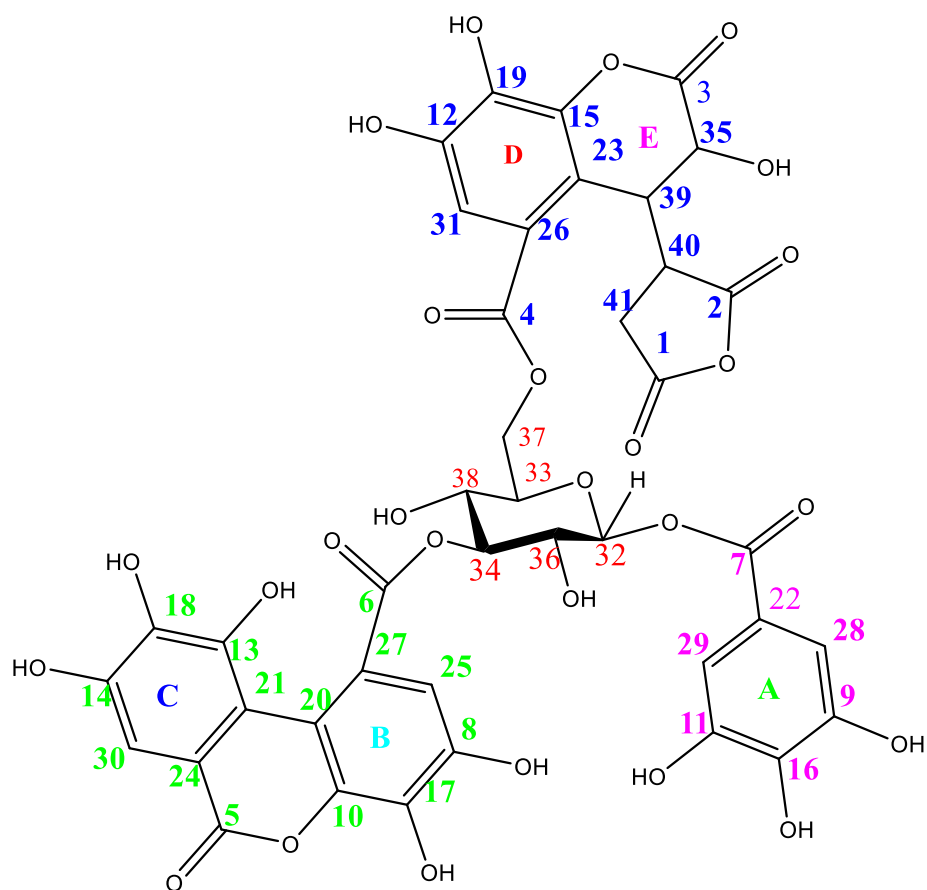


Figure 63 : Structure de la molécule F10

Tableau 12 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé F10 dans MeOD, δ en ppm

	δ_{C} (ppm)	δ (ppm)
1	173,64	
2	173,015	
3	169,36	
4	168,73	
5	166,09	
6	165	
7	164,85	
8	145,97	

9	145,17	
10	145,17	
11	144,99	
12	144,73	
13	144,18	
14	144,14	
15	139,97	
16	139,45	
17	138,96	
18	137,26	
19	136,14	
20	124	
21	123	
22	118,65	
23	117	
24	116,2	
25	116,2,	7,49 s
26	114,79	
27	114,53	
28	109,48	7,1 s
29	109,48	7,1 s
30	108,9	6,80 s
31	106,76	6,65 s

32	91,1	6,53 d
33	72,82	4,84
34	69,66	5,4
35	65,5	4,82
36	65,36	5,25
37	63,31	4,89 ; 4,38
38	60,97	5,89
39	40,29	5,06
40	38,58	3,8
41	29,08	2,23

I.3.2. Résultats de purification des extraits des écorces de *Neocarya macrophylla*

I.3.2.1. Purification de l'extrait AcOEt

La CCM de l'extrait AcOEt des écorces de *Neocarya macrophylla* est représenté dans la figure 64. La masse 440 mg de la fraction a été purifiée à l'aide de la flash chromatographie dans les conditions cyclohexane/AcOEt : 100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt avec un débit 15mL/min. le chromatogramme de la purification est représenté en figure 65.



Figure 64 : CCM extrait AcOEt des écorces , éluant : heptane / AcOEt (7/3)

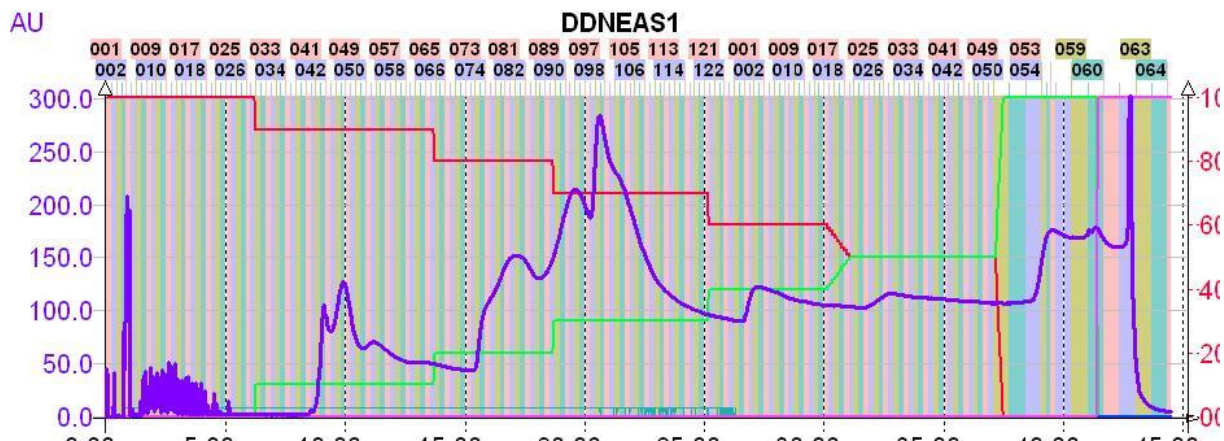


Figure 65 : Chromatogramme de purification par flash chromatographie de l'extrait AcOEt des écorces de *Neocarya macrophylla* : condition : cyclohexane/AcOEt : 100% cyclohexane, 9/1, 8/2 à 100% AcOEt.

Le bilan matière de la purification est représenté dans le tableau ci-dessous. Le rendement de la purification est de 74 %. Les fractions obtenues ont été regroupées par analyses CCM et par GC qui ont permis l'isolement de **F8 et F12'**.

Tableau 13 : Bilan de la purification par chromatographie flash de l'extrait AcOEt des écorces de *Neocarya macrophylla*

Fractions	Masses (en mg)	Produits isolés
28-38	2	
42-47	1	
48-49	1	
50-52	7	
53-56	1	
57-65	35	
66-77	6	
80-85	100	F8
86	19	
87-88	19	
89	11	
90-97	49	F12'
98-105	44	
106-110	1	
111-128	15	
178-185	1	
186-192	12	
Total	324	

I.3.2.1.1. Détermination structurale F8

✓ Analyse du spectre de carbone

Le spectre de carbones de **F8** montre la présence de 30 carbones parmi lesquels nous pouvons identifier les carbones caractéristiques suivants :

- Un carbonyle C1 à 179,65 ppm caractéristique d'un groupement acide ;
- Un carbone quaternaire éthylénique C2 à 150,54 ppm ;
- Un CH₂ éthylénique à 109,86 ppm ;
- Cinq quaternaires aliphatiques 56,37 ; 42,56 ; 40,80 ; 39,00 et 37,32 ppm ;
- Six CH aliphatiques à 79,13 ; 55,44 ; 50,62 ; 49,35 ; 46,99 et 38,47 ppm ;
- Dix CH₂ aliphatiques à 38,82 ; 37,15 ; 34,43 ; 32,26 ; 30,64 ; 29,82 ; 27,52 ; 25,60 ; 20,96 et 18,41 ppm ;
- 6 CH₃ aliphatiques à 28,12 ; 19,50 ; 16,28 ; 16,15 ; 15,49 et 14,82 ppm.

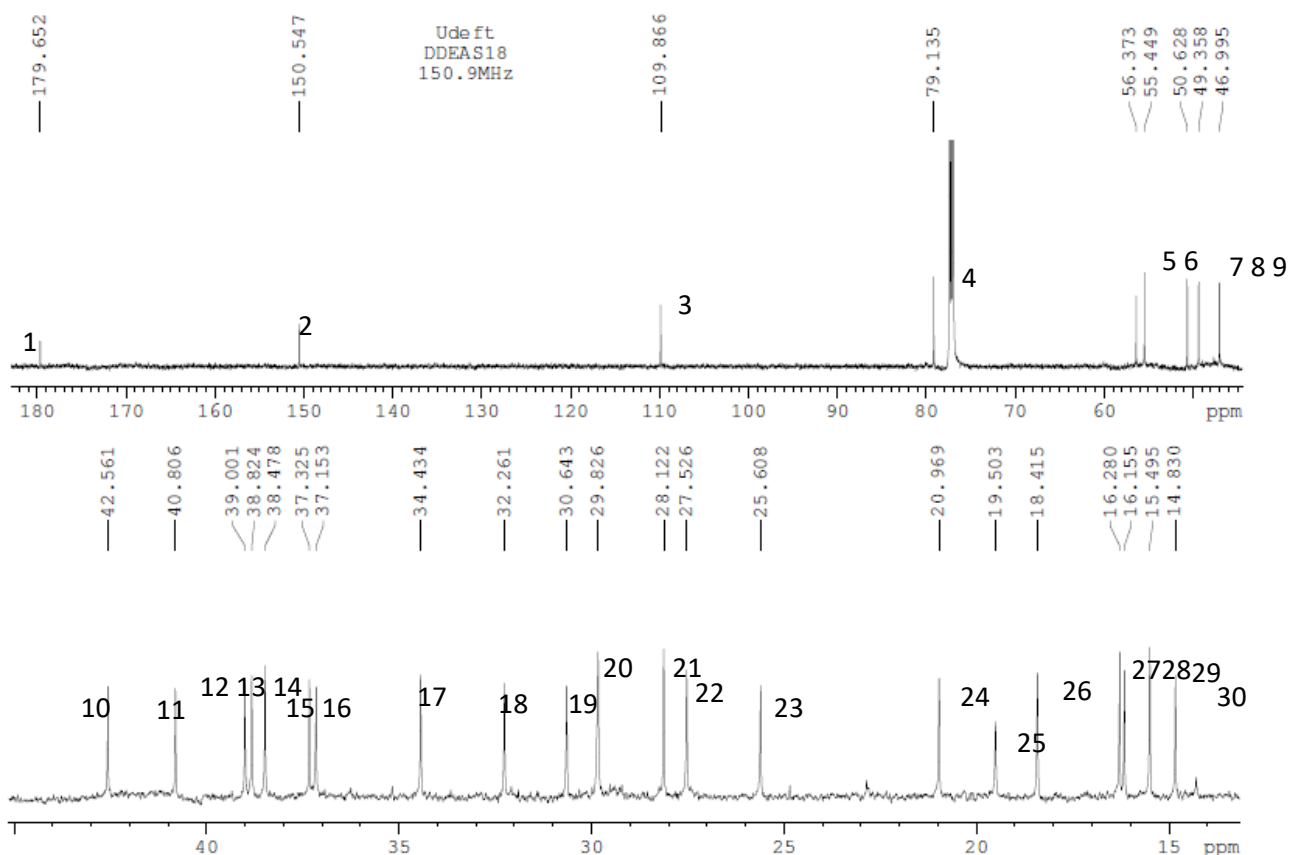


Figure 66 : Spectre de carbone de F8

✓ Analyse du spectre de carbone

Le spectre de proton de **F8** présente :

- Un doublet qui résonne à 4,75 ppm ; 4,6 ppm correspondant au proton de la double liaison exo cyclique H3 ; H3'.
- Un proton H3 qui résonne à 3,2 ppm qui est lié à un oxygène.
- 6 CH₃ qui résonnent respectivement vers 1,7 ; 0,98 ; 0,97 ; 0,92 ; 0,8 et 0,75 ppm.

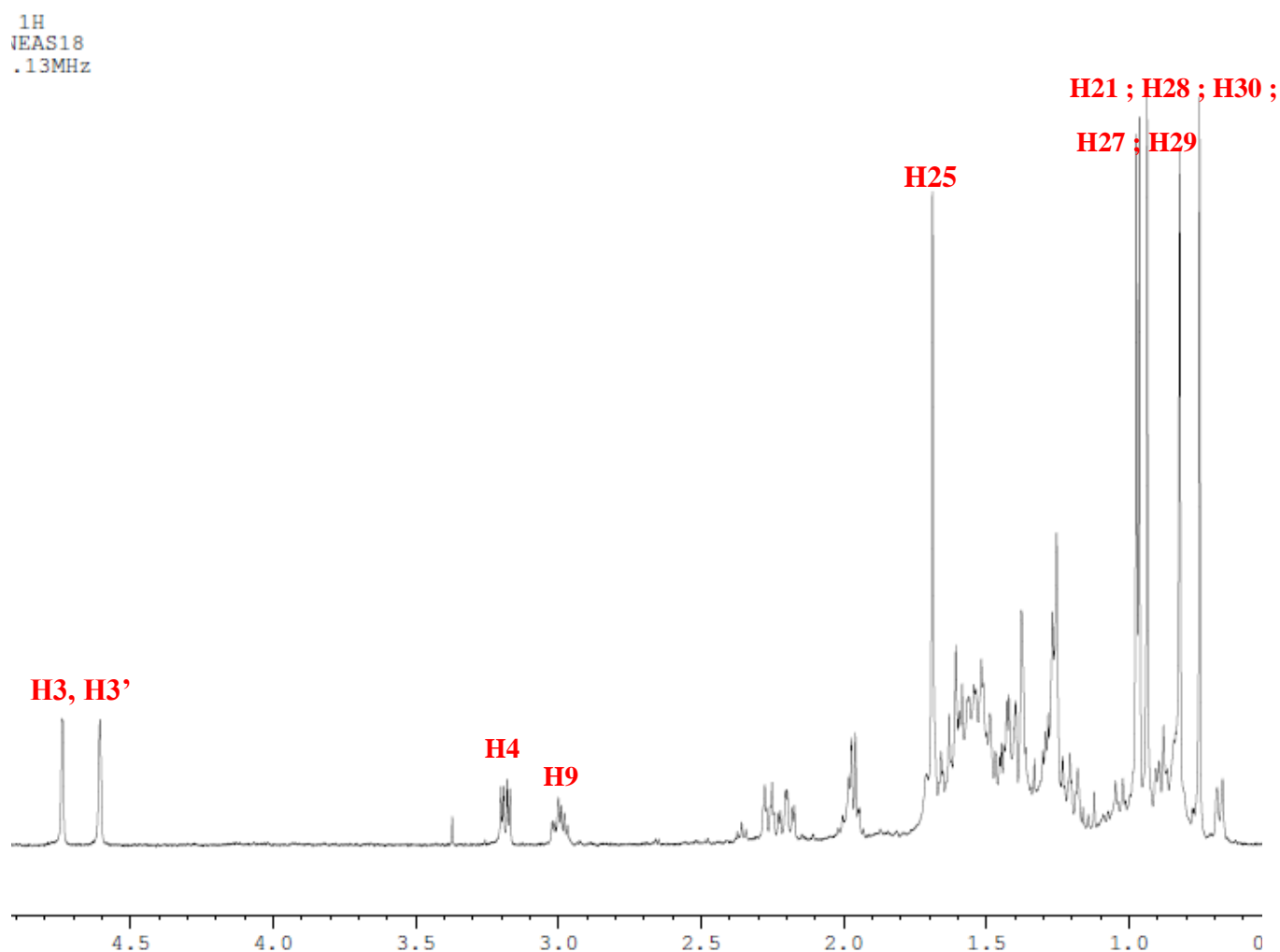


Figure 67 : spectre de proton de F8

L'analyse des spectres de DEPT, ¹³C, HSQC, ¹H conduit à 6 CH, 11 CH₂, 6 CH₃ et 7 carbones quaternaires avec une fonction acide confirmant la formule brute C₃₀H₄₈O₃ du composé. Les cinq singulets de méthyle sont caractéristiques des triterpènes pentacycliques. Le spectre de carbone confirme la présence du groupement isopropényle par l'observation des signaux du méthyle résonnant à δ_C 19,50

ppm et des deux carbones éthyléniques C-2, C-3 résonnant respectivement à δ_C 150,54 et 109,7 ppm. Ceci nous permet de suggérer une structure de triterpène type lupane.

Les spectres de RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC enregistrés dans le $CDCl_3$ du composé **F8** comparés à ceux du composé **DDQ5A**, c'est-à-dire du lupéol que nous avons isolé dans la *Raphionacme vignei*, révèlent une proche parenté structurale. La modification principale se situe en position 26 (notre numérotation) d'un groupement (COOH) (voir figure 68). Ces données sont comparées avec celles de la littérature, et le composé **F8** est identifié à l'acide bétulinique (figure 68). Cette molécule a été reconnue comme principe actif de plus de 2500 espèces végétales à travers le monde [138]. En plus de son action anti-inflammatoire [139], il a été démontré que l'acide bétulinique possède une activité antimalariale, in vitro contre des souches résistantes de *Plasmodium falciparum* et une activité anti-tumorale car elle a une cytotoxicité spécifique au mélanome humain [140; 141].

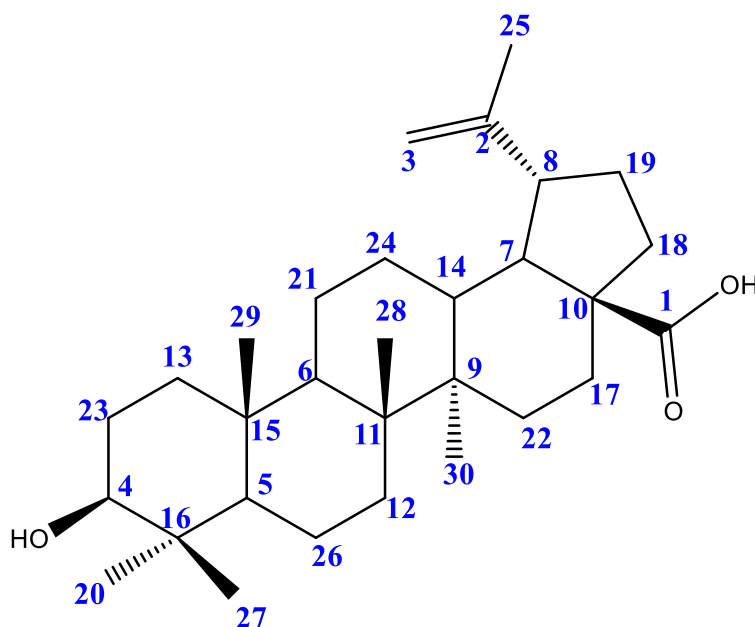


Figure 68 : L'acide bétulinique (numérotation proposée)

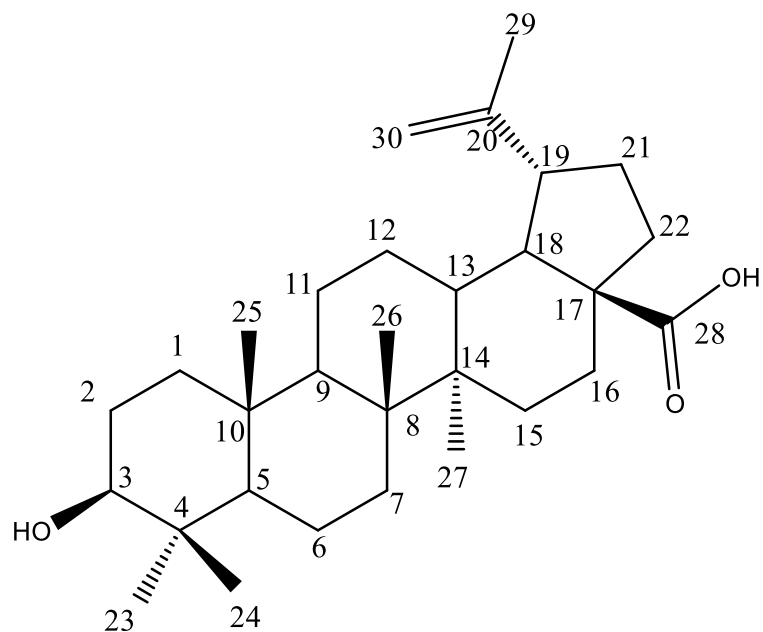


Figure 69 : L'acide bétulinique (numérotation systématique)

I.3.2.1.2. Détermination structurale de F12

Les spectres de RMN ^1H , ^{13}C , enregistrés dans le CDCl_3 des composés **F12** comparés à ceux du composé **F8**, révèlent une proche parenté structurale. La différence est que le composé **F12** montre la présence d'une chaîne grasse dont les signaux sont observables sur le spectre de proton (figure 70).

Ainsi, l'identification de cette chaîne grasse sera possible grâce à l'analyse du spectre de masse qui est toujours en cours.

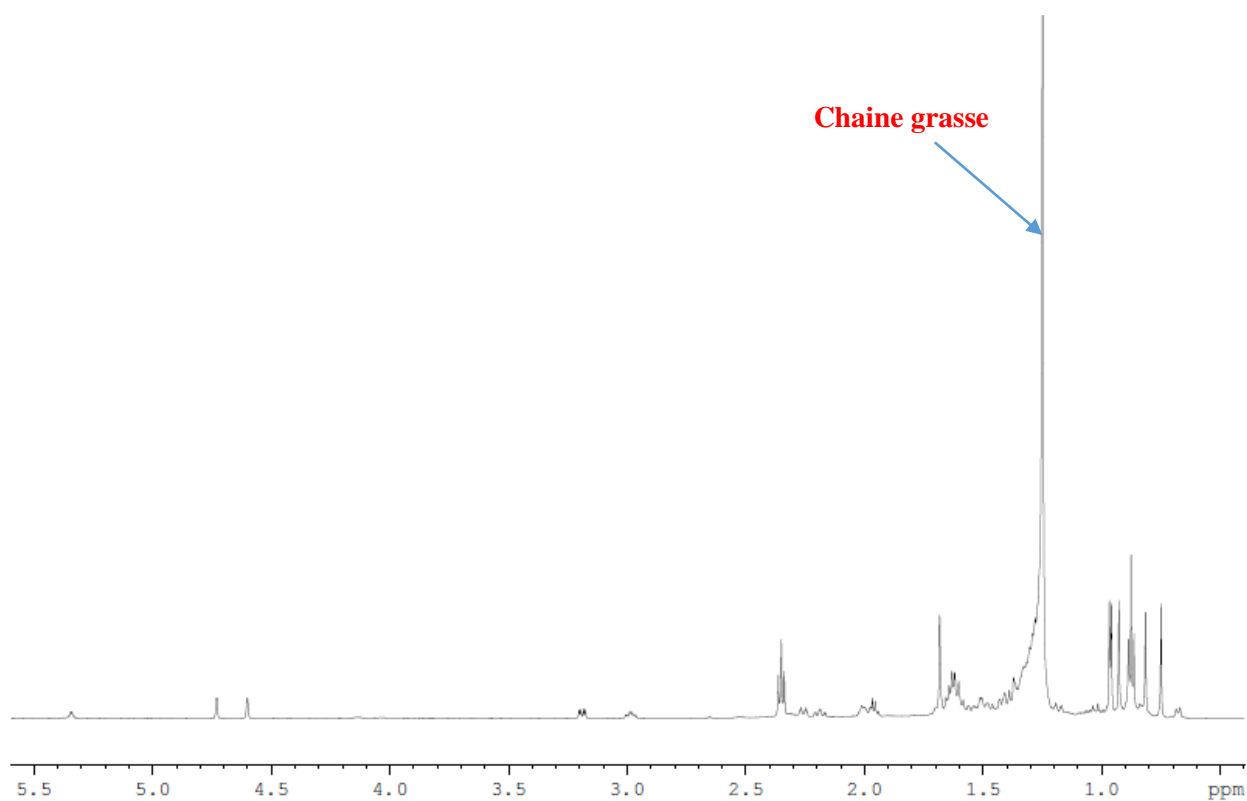


Figure 70 : Spectre de proton de F12

I.3.2.2. Purification de l'extrait H₂O

L'HPLC du brut de l'extrait aqueuse des écorces de *Neocarya macrophylla* est représenté en figure 71. Dans cette partie les systèmes AcOEt, BuOH et H₂O (77.75/16.25/6 ; v/v/v et 40.4/45.6/14 ; v/v/v) sont sélectionnés dans le mode gradient. La masse 1000 mg d'extrait H₂O est purifié. Le chromatogramme de la purification est représenté en figure 72.

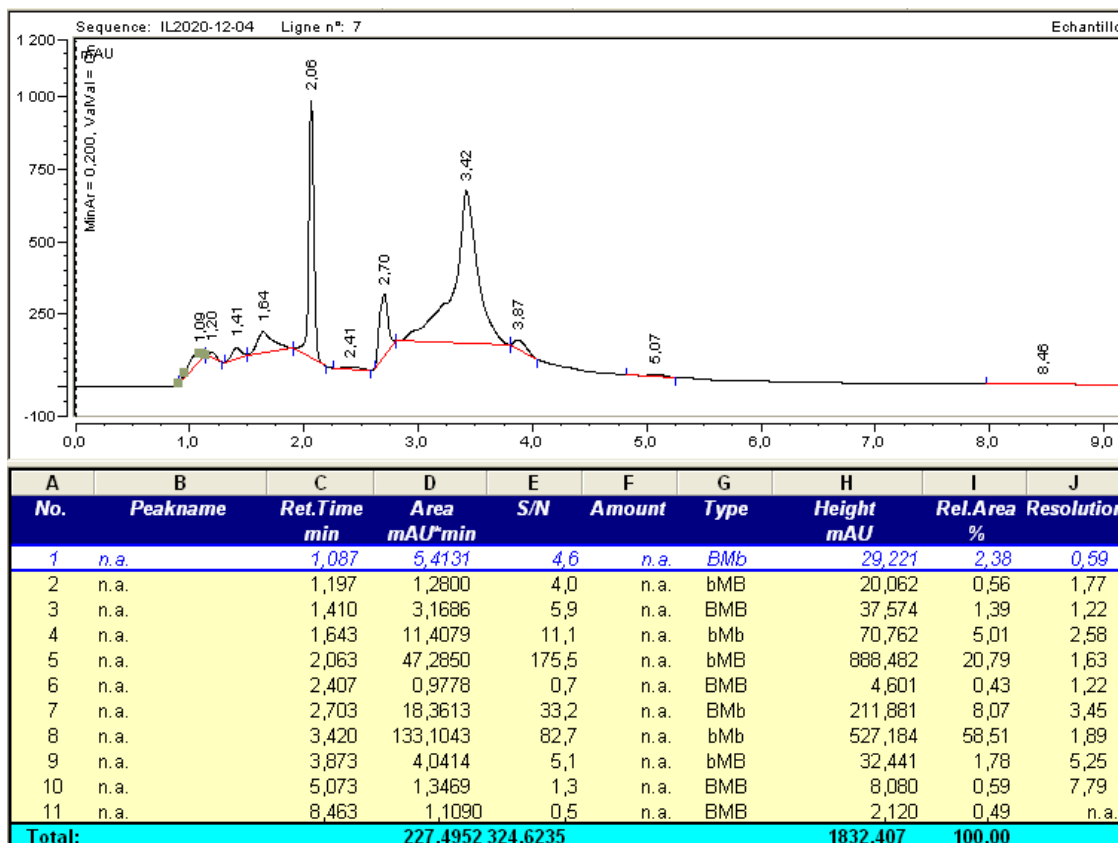


Figure 71 : Chromatogramme HPLC de l'extrait BuOH des feuilles de *Neocarya macrophylla* : Conditions analytiques : CH₃CN/H₂O (2/8)

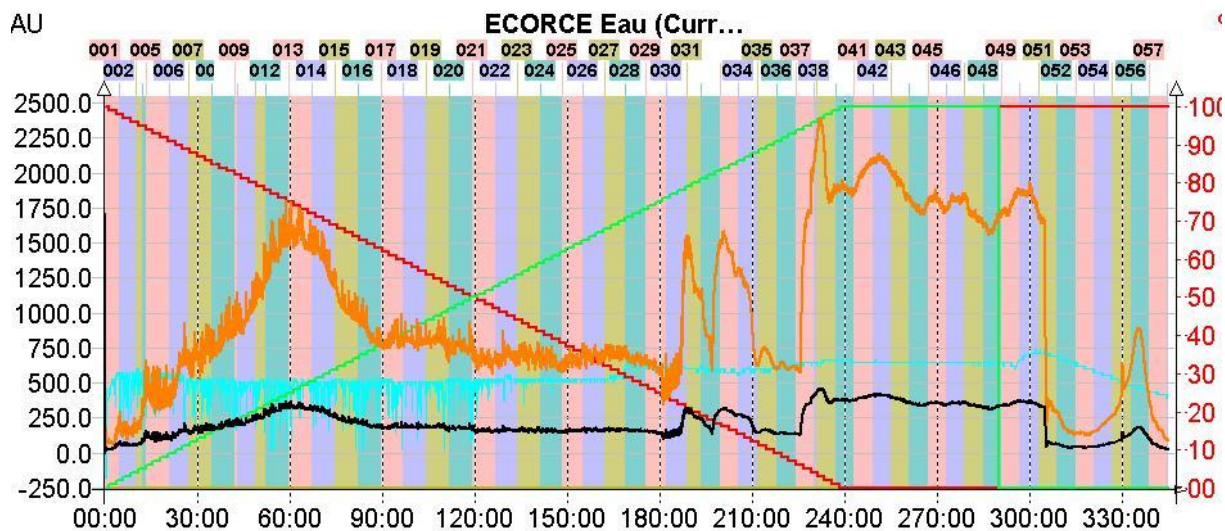


Figure 72 : Chromatogramme de purification de l'extrait H₂O des écorces de *Neocarya macrophylla* par CPC : condition d'éluion : gradient – ascendant

Le bilan de la purification est consigné dans le tableau 14. Onze fractions ont été obtenues avec un rendement de 40 %. La faiblesse du rendement de purification est due à la présence de dépôt non soluble après évaporation à sec des fractions obtenues.

Tableau 14 : bilan de la purification par CPC l'extrait H₂O des écorces de *Neocarya macrophylla*

Fractions	Masses en (mg)
6-10	6
11-15	13
16-29	67
30	3
31	5
33	9
32-34	9
35-39	7
40-51	12
52-55	6
56-57	263
Total	400

La fraction **F [40-57]** : 281mg est soumis à une flash chromatographie sur une cartouche de silice C18 40g avec les conditions suivantes : Voie A : CH₃CN/H₂O (5/95) ; voie B : CH₃CN/H₂O (30/70) Voie C : CH₃CN 100% Voie D : MeOH 100%, avec un débit de 20ml / min. Le chromatogramme de la purification est représenté en figure 73.

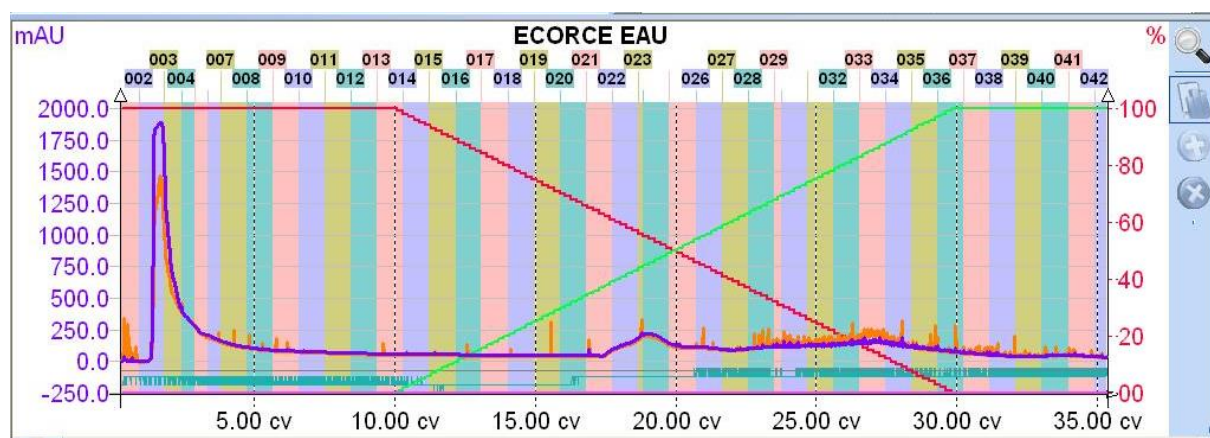


Figure 73 : Chromatogramme de purification par chromatographie flash la fraction [40-57]

Le bilan matière de la purification est consigné dans le tableau 15. Cette purification a conduit à l'isolement du composé **F2'** (Rt 1,71 ; m = 21 mg) avec un rendement de 26 %. La faiblesse du rendement de purification est due à la présence de dépôt non soluble après évaporation à sec des fractions obtenues.

Tableau 15 : Bilan de la purification par chromatographie flash de la fraction [40-57]

Fractions	Masses en (mg)	Produits isolés
2	21	F2'
3	14	
4	3	
5	2	
6-8	5	
10-11	2	
13-27		
22-27	16	
30-37	3	
40-49	4	
50-63	3	
Total	73	

I.3.2.2.1. Détermination structurale de F2'

✓ Analyse LC/MS de F2'

Le spectre de masse de la fraction **F2'** effectuée en mode positif montre un pic moléculaire $[M+Na]^+$ = 527 g/mol correspondant à la formule brute $C_{18}H_{32}O_{16}Na$ (figure 74).

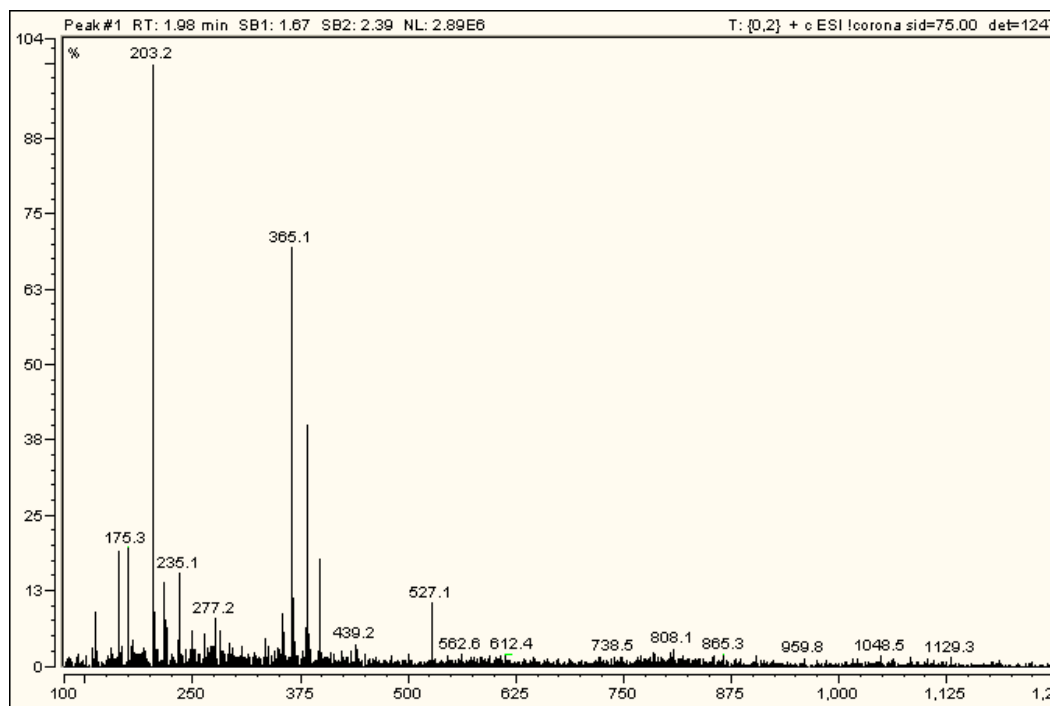


Figure 74 : le spectre de masse de F2'

✓ Analyse du spectre de RMN (^{13}C et DEPT135)

Les spectres de carbone ^{13}C et de DEPT de F2' montre la présence de 18 carbones dont :

- Un carbone quaternaire à 98 ppm ;
- 13 CH aliphatiques (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 ; C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, et C-14) à 95.73 ; 91.97 ; 80.55 ; 75.70 ; 74.13 ; 72.25 ; 72.06 ; 72.13 ; 70.98 ; 70.68 ; 69.48 ; 69.44; et 67 39 ppm.
- Quatre CH₂ aliphatiques (C-15, C-16 ; C-17 ; et C-18) à 63.59 ; 63.13 ; 62.35 ; et 60 ppm

Les valeurs des déplacements chimiques des CH et CH₂ sur le spectre du carbone et DEPT-135 et les trois carbones anomériques permettent de confirmer la présence de trois sucres (figure 75).

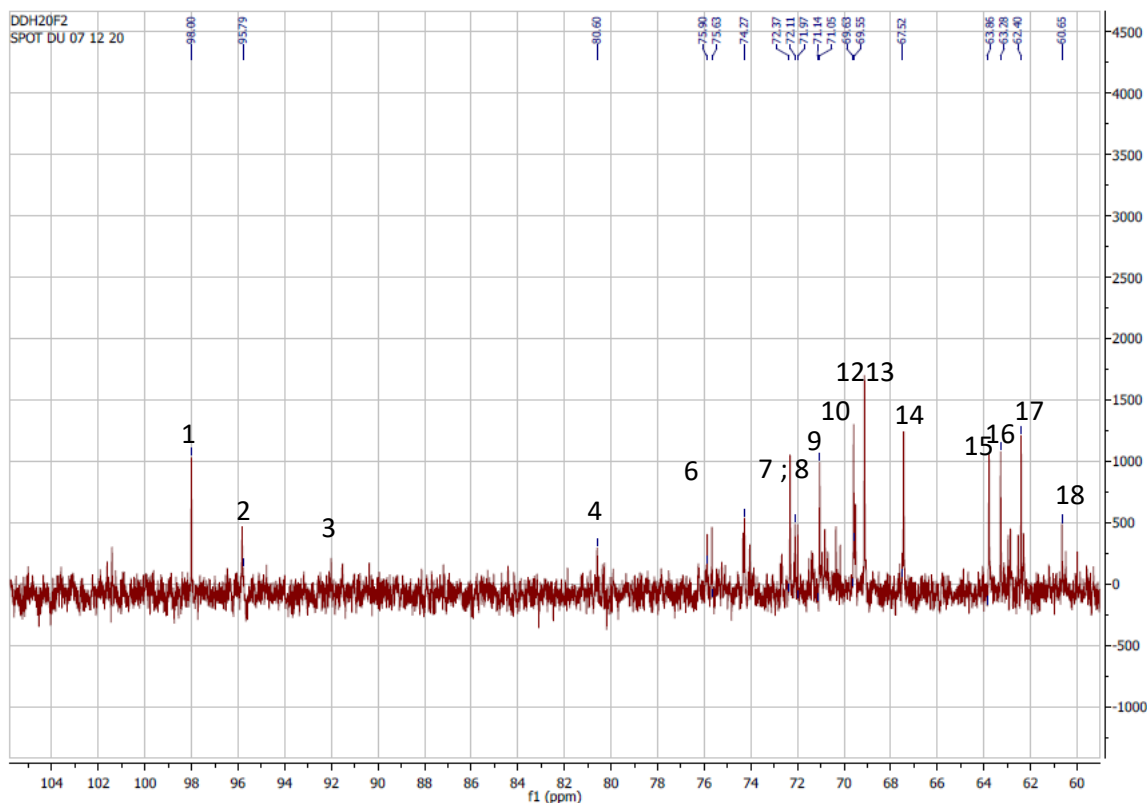


Figure 75 : le spectre de carbone de F2

✓ Spectre de proton de F2'

Le spectre RMN ^1H présente de **F2'** présente :

- Deux protons anomériques résonnant sous forme de doublets autour de 4,5 et 5,09 ppm suggèrent la présence de deux unités osidiques ;
- Des signaux entre 3,0 et 4 ppm caractéristiques de la présence d'unités osidiques ou de protons portés par des carbones oxygénés.
- ✓ Analyse du spectre de COSY
 - A partir de l'anomère H-2 repéré à 4,51 ppm, six protons osidiques à savoir H-6 ; H-7 ; H-9 ; H-11 ; et H-15 sont identifiés à l'aide du spectre COSY. Les déplacements chimiques des carbones de ce sucre, attribués à partir du spectre HSQC J-modulé sont en accord avec un glucose ;
 - En partant du proton anomérique H-3 à 5,09 ppm, l'analyse du spectre COSY permet d'attribuer tous les protons d'un glucose à savoir H-5 ; H-8 ; H-10 ; H-12 ; et H-18
 - A l'aide toujours du spectre de COSY, les cinq protons du troisième sucre sont repérés à savoir H-4 ; H-13 ; H-14 ; H-16 ; et H-17
- ✓ Analyse du spectre de HMBC

Les déplacements chimiques des carbones anomériques indiquent que ces sucres sont liés entre eux par des liaisons éther. La présence sur le spectre HMBC de corrélations entre le carbone anomère C1 du fructose et le proton H-10 du glucose et entre le H-18 du glucose et le carbone C6 du deuxième glucose confirme l'enchaînement suivant : glucose β (1-6) glucose α (1-2) β fructose. Cette molécule est connue et décrite dans la littérature il s'agit de la **gentianose** est un triholoside (oligoside) extrait de la racine de gentiane ^[142] (figure 76).

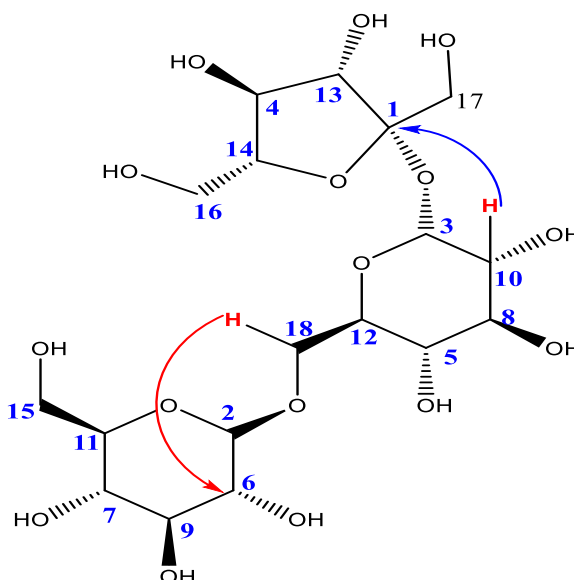


Figure 76 : structure du gentianose (Corrélations HMBC)

II. Résultats sur de l'étude biologique de *Neocarya macrophylla*

Des tests d'activité antidiabétique sont réalisés sur des rats de souche wistar. Pour chaque expérience, les rats ont été répartis en 2 lots de 5 puis mis à jeun pendant 14 heures avant l'expérience. Le premier lot est gavé avec de l'eau physiologique (contrôle) à 10 mg/kg, le deuxième lot avec l'extrait à tester à la dose de 30 mg/kg ou 100 mg/kg. Des prélèvements de sang ont été effectués toutes les heures pendant 4 heures.

II.1. Résultats des tests d'activité antidiabétique des extraits écorces de *Neocarya macrophylla*

II.1.1. Résultats des tests d'activité antidiabétique l'extrait BuOH

II.1.1.1. Chez des rats normo-glycémiques

L'administration de l'eau physiologique, à la dose de 10 mg/kg per os, n'entraîne pas une modification de la glycémie de base chez les rats normo-glycémiques au bout de 300 min d'observation ($0,99 \pm 0,03$ vs $0,98 \pm 0,05$ g/l). L'administration de l'extrait butanolique des écorces de *Neocarya macrophylla* a la dose de 30 mg/kg per os est sans effet sur la glycémie de base des rats normo-glycémiques entre T2 et T4 ($0,84 \pm 0,02$ vs $0,89 \pm 0,02$ g/L) (tableau 16 ; figure 77).

Tableau 16 : Variations du glucose sanguin chez rats normo-glycémiques après administration de la fraction butanolique de la poudre d'écorces de *Neocarya macrophylla* (30 mg/kg, per os)

Temps(h)					
Rats	T0	T1	T2	T3	T4
R1	0,97	0,83	0,86	1,14	0,97
R2	0,94	0,82	0,87	0,87	0,9
R3	0,86	0,9	0,9	0,85	0,86
R4	0,89	0,75	0,77	0,82	0,89
R5	0,74	0,82	0,8	0,78	0,83
Moyennes	0,88	0,82	0,84	0,89	0,89
ESM	0,04	0,02	0,02	0,06	0,02

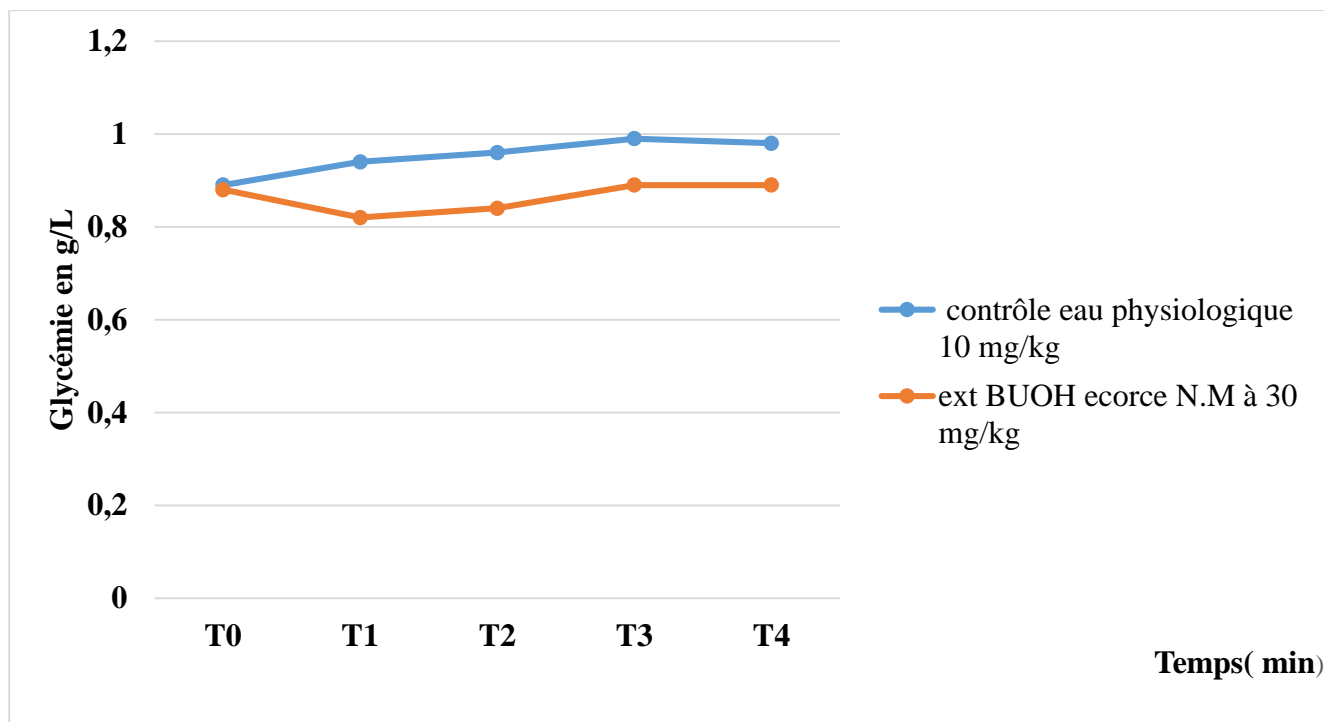


Figure 77 : Variation de la glycémie chez des rats normo-glycémiques traités avec l'extrait BuOH des écorces de *Neocarya macrophylla*

II.1.1.2. Test de tolérance au glucose

Le prétraitement par la fraction butanolique de la poudre d'écorces de *Neocarya macrophylla* à la dose de 30 mg/kg per os, entraîne un effet **anti-hyperglycémiant** au cours d'un test de tolérance au glucose. En effet on observe, pour le groupe contrôle après administration de l'eau physiologique (10 ml/kg, per os) sur un test de tolérance au glucose (4 g/kg, per os) une variation de la glycémie de ($2,02 \pm 0,02$ vs $1,95 \pm 0,03$ g/L). Cette variation est moins importante que ceux du groupe ayant subi un prétraitement à l'extrait butanolique de la poudre des écorces *Neocarya macrophylla* ($1,24 \pm 0,12$ vs $1,04 \pm 0,03$ g/L) (tableau 17 ; figure 78).

Tableau 17 : Variations de la glycémie (g /L) lors d'un test de tolérance au glucose après prétraitement par la fraction butanolique de la poudre d'écorces de *Neocarya macrophylla* à la dose de 30 mg/kg per os

Temps(mn) Rats	T-90	T0	T30	T60	T90	T120
R1	0,85	0,79	1,11	1,23	1,34	1, 13
R2	0,84	0,87	0,95	1,17	0,98	0, 97
R3	0,94	0,88	0,84	1,18	1,11	1, 01
R4	0,94	0,83	0,72	0,9	1,52	1, 03
Moyennes	0,89	0,84	0,9	1,12	1,24	1,04
ESM	0,03	0,02	0,08	0,07	0,12	0,03

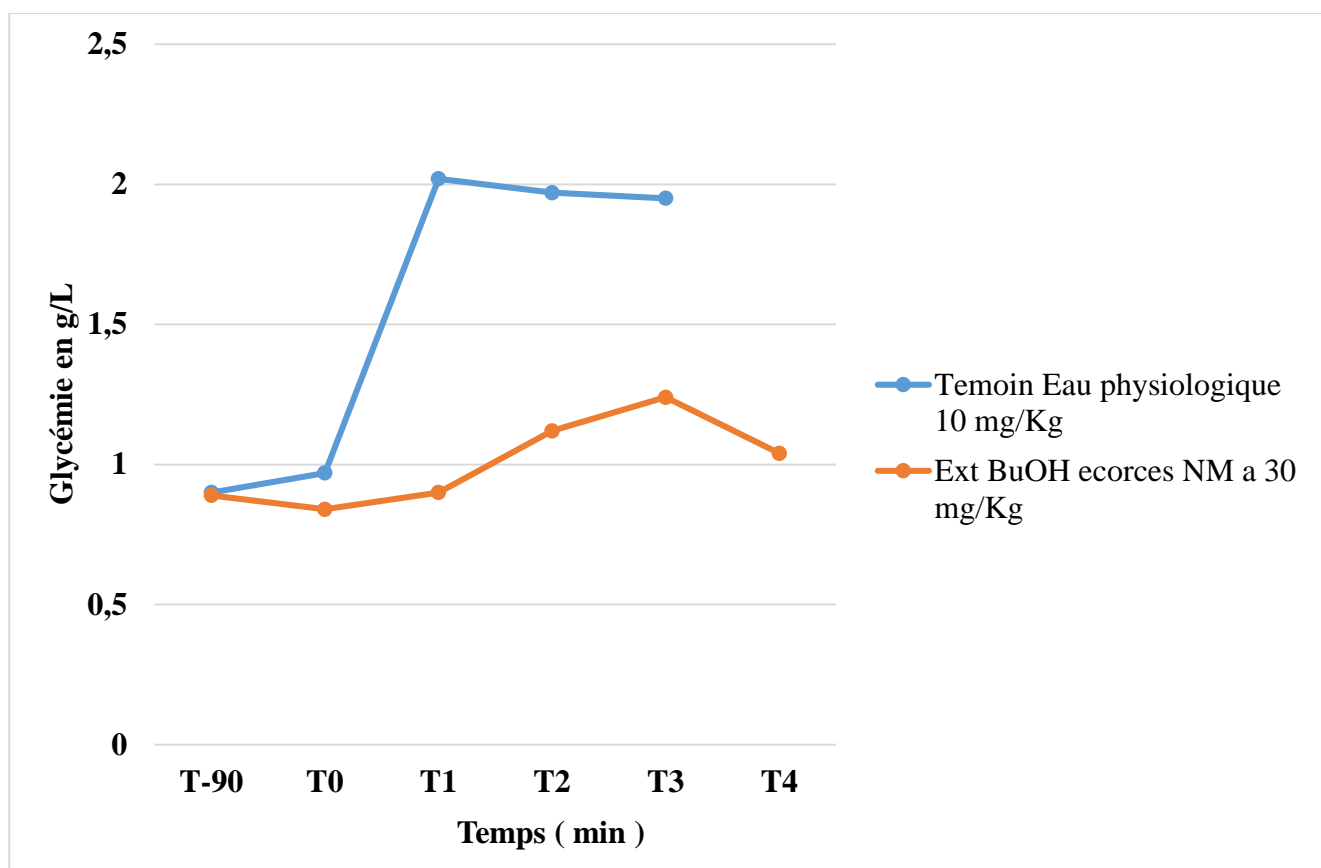


Figure 78 :Variation de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance de glucose après traitement avec l'extrait butanol des écorces de *Neocarya macrophylla*.

II.2. Résultats des tests d'activité antidiabétique des extraits feuilles de *Neocarya macrophylla*

II.2.1. Résultats des tests d'activité antidiabétique l'extrait AcOEt

II.2.1.1. Chez des rats normo-glycémiques

L'administration de l'eau physiologique, à la dose de 10 mg/kg per os, n'entraîne pas une modification de la glycémie de base chez les rats normo-glycémiques au bout de 300 min d'observation ($0,96 \pm 0,03$ vs $0,98 \pm 0,05$ g/l). L'administration de l'extrait AcOEt des feuilles de *Neocarya macrophylla* a la dose de 100 mg/kg per os est sans effet sur la glycémie de base des rats normo-glycémiques entre T0 et T4 ($0,77 \pm 0,07$ vs $0,70 \pm 0,02$ g/L) (tableau 18 ; figure 79).

Tableau 18 : Variations du glucose sanguin chez rats normo-glycémiques après administration de la fraction AcOEt de la poudre des feuilles de *Neocarya macrophylla* (100 mg/kg, per os)

Temps (h)	T0	T1h	T2h	T3h	T4h
Rats					
R1	0,98	0,81	0,89	0,80	0,74
R2	0,71	0,75	0,70	0,71	0,70
R3	0,67	0,72	0,74	0,68	0,65
R4	0,73	0,69	0,68	0,64	0,72
Moy ± esm	0,77±0,07	0,74±0,03	0,75±0,05	0,71±0,03	0,70±0,02

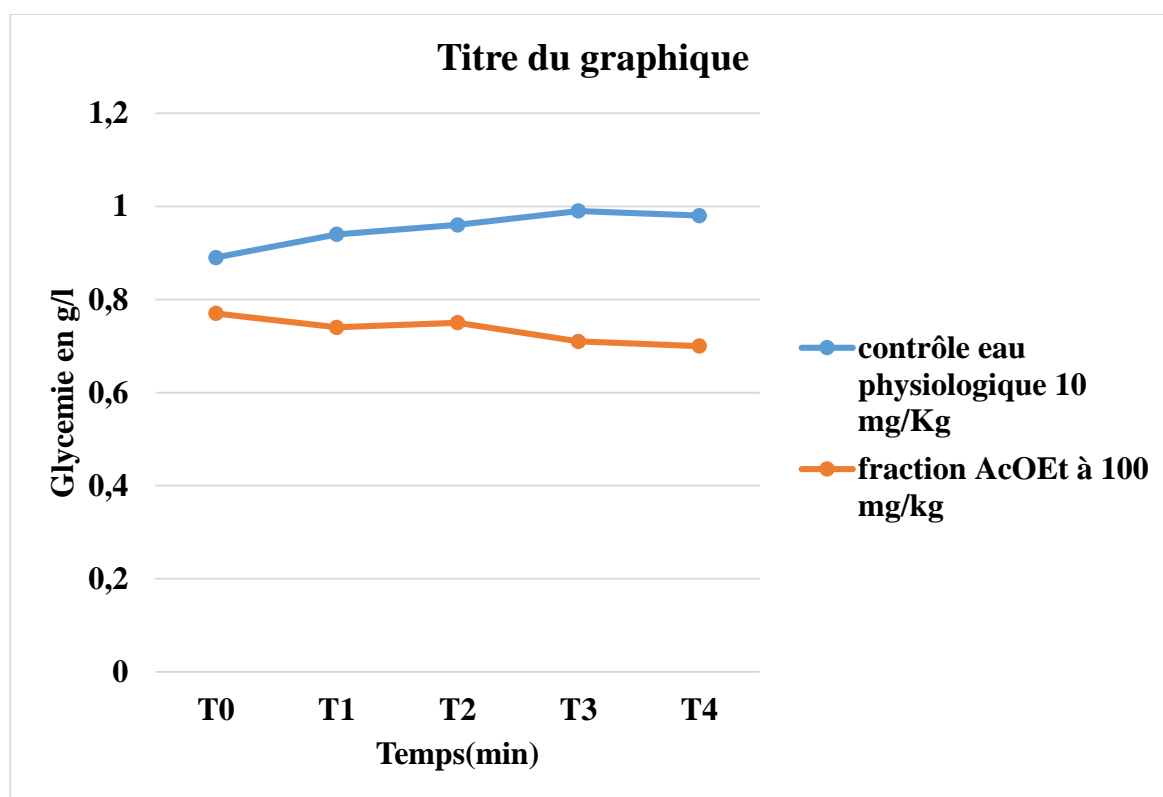


Figure 79 : Variation de la glycémie chez des rats normo-glycémiques traités avec l'extrait AcOEt

II.2.1.2. Test de tolérance au glucose

Au cours d'un test de tolérance au glucose, le prétraitement à la dose de 100 mg/kg per os par la fraction AcOEt de la poudre des feuilles de *Neocarya macrophylla*, entraîne un effet anti-hyperglycémiant. En effet on observe, pour le groupe contrôle après administration de l'eau physiologique (10 ml/kg, per os) sur un test de tolérance au glucose (4 g/kg, per os) une variation de la glycémie de ($2,02 \pm 0,02$ vs $1,95 \pm 0,03$ g). Cette variation est moins importante que ceux du groupe ayant subi un prétraitement à l'extrait AcOEt de la poudre des feuilles *Neocarya macrophylla* ($1,15 \pm 0,05$ vs $0,90 \pm 0,04$ g/L) (tableau 19 ; figure 80).

Tableau 19 : Variations de la glycémie (g /L) lors d'un test de tolérance au glucose après prétraitement par la fraction AcOEt de la poudre des feuilles de *Neocarya macrophylla* à la dose de 100 mg/kg per os.

Temps (min)	T-90	T0	T30	T60	T90	T120
Rats						
R1	0,83	0,90	1,06	1,04	1,13	1,34
R2	0,68	0,76	1,16	0,90	0,84	1,06
R3	0,78	0,71	1,29	0,88	0,81	0,87
R4	0,74	0,88	1,24	0,91	0,93	1,12
R5	0,99	0,88	1,02	0,78	0,84	0,76
Moy ± esm	0,80±0,05	0,83±0,04	1,15±0,05	0,90±0,04	0,91±0,06	1,03±0,10

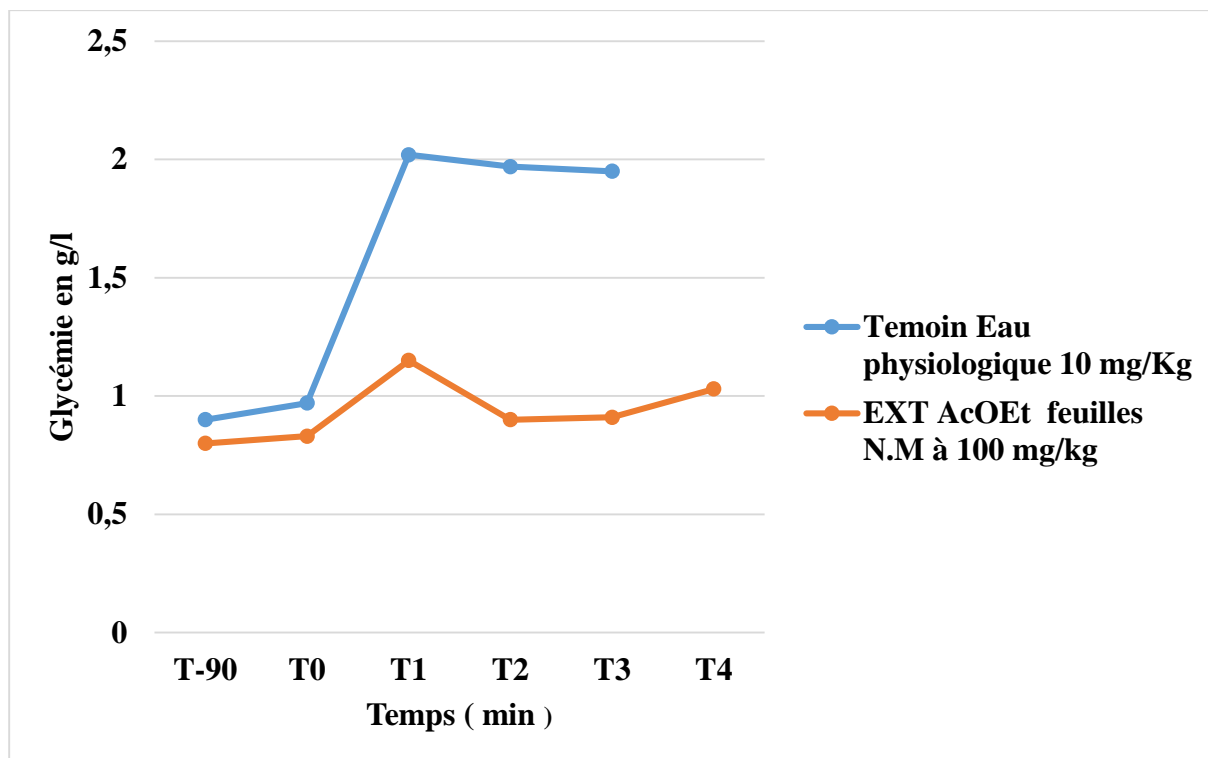


Figure 80 : Variation de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance de glucose après traitement avec l'extrait AcOEt

II.2.2. Les résultats des tests d'activité antidiabétique de l'extrait aqueux

II.2.2.1. Chez des rats normo-glycémiques

L'administration de l'eau physiologique, à la dose de 10 mg/kg per os, n'entraîne pas une modification de la glycémie de base chez les rats normo-glycémiques au bout de 300 min d'observation ($0,96 \pm 0,03$ vs $0,98 \pm 0,05$ g/l). L'administration de l'extrait aqueux des feuilles de *Neocarya macrophylla* à la dose de 100 mg/kg per os est sans effet sur la glycémie de base des rats normo-glycémiques entre T0 et T4 ($0,89 \pm 0,07$ vs $0,80 \pm 0,02$ g/L) (tableau 20 ; figure 81).

Tableau 20 : Variations du glucose sanguin chez rats normo-glycémiques après administration de la fraction aqueuse de la poudre des feuilles de *Neocarya macrophylla* (100 mg/kg, per os).

Temps (h) Rats	T0	T1	T2H	T3H	T4h
R1	0,77	0,80	0,77	0,83	0,82
R2	0,85	1,35	0,94	0,75	0,81
R3	0,72	0,67	0,99	0,95	0,75
R4	0,99	0,75	0,84	0,78	0,76
R5	1,13	0,76	0,57	0,77	0,87
Moy ± esm	0,89±0,07	0,87±0,12	0,82±0,07	0,82±0,04	0,80±0,02

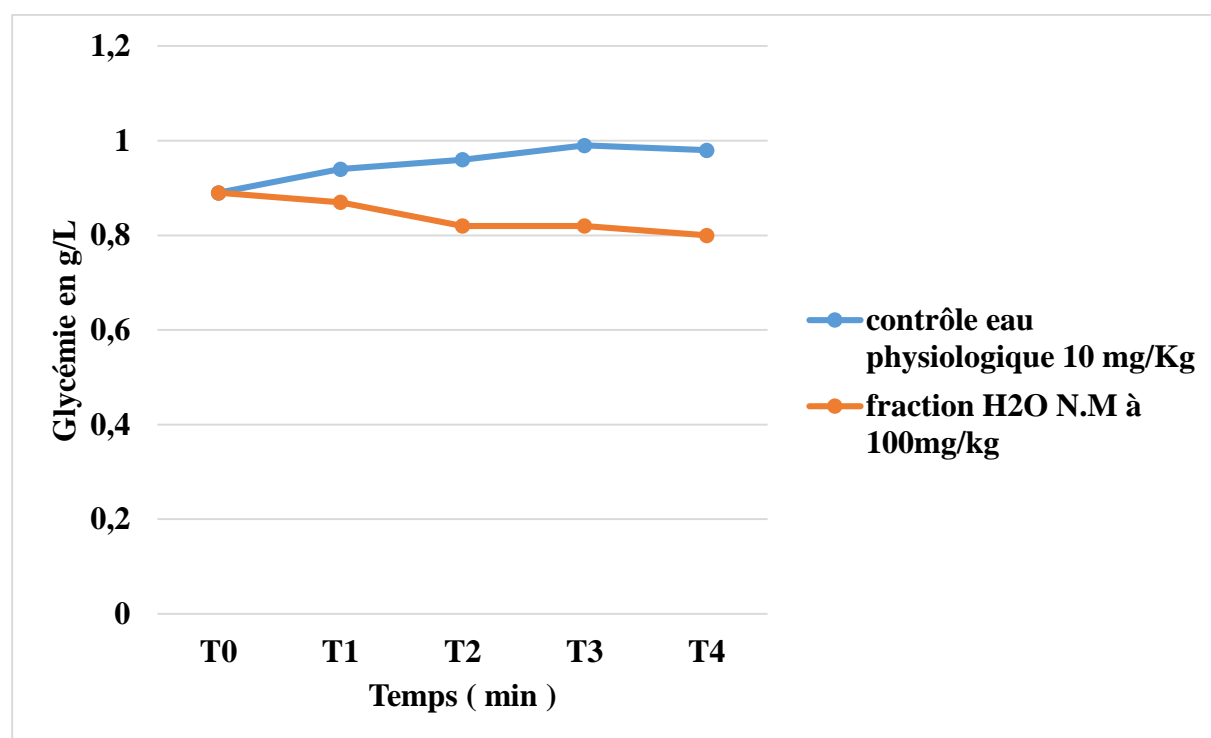


Figure 81 : Variation de la glycémie chez des rats normo-glycémiques traités avec l'extrait aqueux

II.2.2.2. Test de tolérance au glucose

Au cours d'un test de tolérance au glucose, le prétraitement à la dose de 100 mg/kg per os par la fraction aqueuse de la poudre des feuilles de *Neocarya macrophylla*, entraîne un effet anti-hyperglycémiant comme dans le cas de l'extrait AcOEt. On observe, pour le groupe contrôle après administration de l'eau physiologique (10 ml/kg, per os) sur un test de tolérance au glucose (4 g/kg, per os) une variation de la glycémie de $(2,02 \pm 0,02$ vs $1,95 \pm 0,03$ g/). Cette variation est moins importante que ceux du groupe ayant subi un prétraitement à l'extrait aqueuse de la poudre des feuilles *Neocarya macrophylla* ($1,24 \pm 0,04$ vs $1,14 \pm 0,05$ g/L).

Tableau 21 : Variations de la glycémie (g /L) lors d'un test de tolérance au glucose après prétraitement par la fraction aqueuse de la poudre des feuilles de *Neocarya macrophylla* à la dose de 100 mg/kg per os.

Temps (min)	T-90	T0	T30	T60	T90	T120
Rats						
R1	0,79	0,51	1,15	1,09	1,18	1,06
R2	0,82	0,79	1,06	1,18	1,32	1,24
R3	0,79	0,67	1,33	1,42	1,22	1,12
Moy \pm esm	0,80\pm0,01	0,66 \pm 0,08	1,18\pm0,08	1,23 \pm 0,10	1,24 \pm 0,04	1,14 \pm 0,05

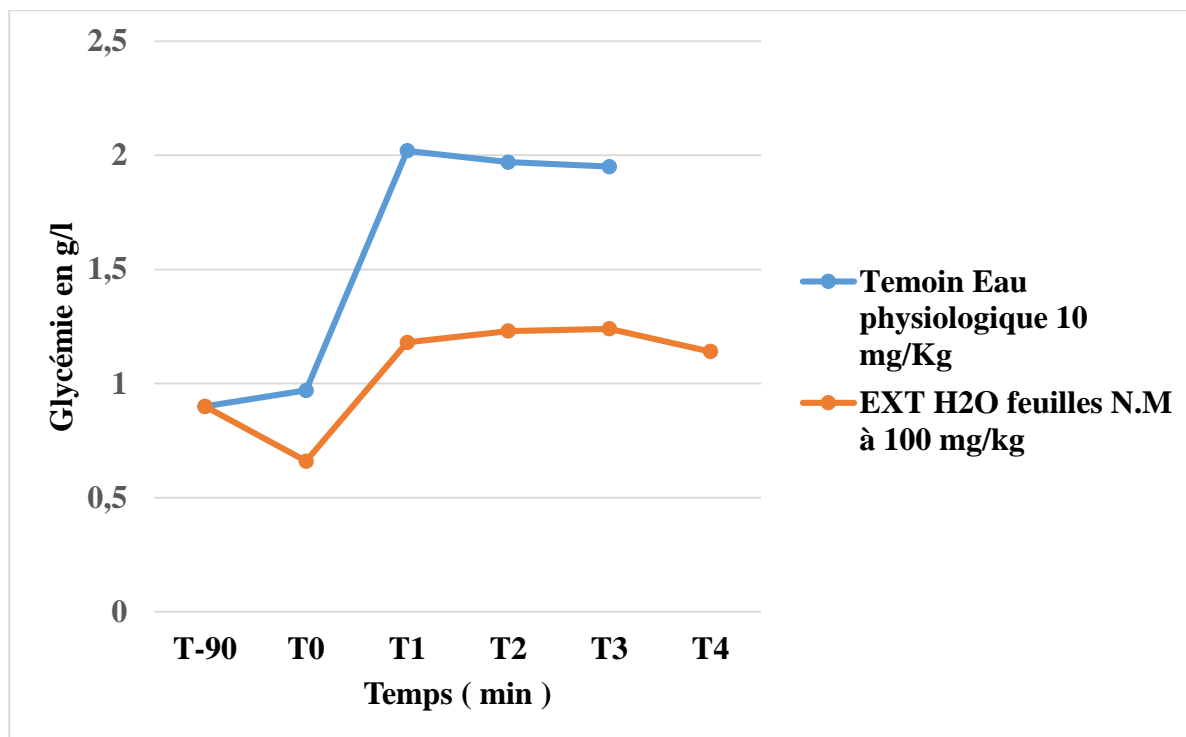


Figure 82 : Variation de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance de glucose après traitement avec l'extrait aqueux

II.3. Conclusion partielle sur l'évaluation des tests d'activité antidiabétique

Les tests de tolérance au glucose réalisés sur des rats de souche wistar ont prouvé que les extraits BuOH des écorces et les extraits AcOEt et aqueux des feuilles de *Neocarya macrophylla* ont un effet anti-hyperglycémiant. Ces tests sont précédés par un test de normoglycémie de ces mêmes extraits qui se sont avérés avoir aucun effet notable sur la glycémie de base des rats soumis à ce test.

L'activité anti-hyperglycémiant de ces extraits pourrait s'expliquer par la présence dans les extraits des polyphénols, des flavonoïdes, et des saponines qui constituent les familles de métabolites secondaire présent lors de l'évaluation des tests de screening phytochimique des extraits de *Neocarya macrophylla*.

Plusieurs études ont décrit l'effet sur le glucose sanguin d'extraits de plantes riches en flavonoïdes. En effet, la fraction acétate d'éthyle d'*E. alatus* riche en flavonoïdes aurait des propriétés stimulantes sur la libération d'insuline ^[143] ; en n'est de même de l'effet antihyperglycémiant d'un flavonol dérivé de fleurs d'*Hibiscus vitifolius* Linn, sur un test de tolérance au glucose ^[144].

Chapitre 1 : Résultats sur l'étude phytochimique et biologique de *Raphionacme vignei*

Les racines de *Raphionacme vignei* ont été récoltées au mois d'août 2016 dans la région de Kédougou (Sénégal) et séchées pendant un mois et demi à l'abri des rayons solaires à la température ambiante au Laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux (LCPM) de l'Université Assane Seck de Ziguinchor (Sénégal).

I. Résultats sur l'étude phytochimique de *Raphionacme vignei*

I.1. Résultats sur l'extraction de *Raphionacme vignei*

La drogue séchée est broyée et pulvérisée, la poudre fine (100 g) ainsi obtenue a été utilisée comme matière première pour l'extraction en utilisant des solvants de polarité croissante (Acétone, EtOH, et Eau). Les résultats des extractions solide-liquide des racines de *Raphionacme vignei* sont consignés dans le (Tableau 22). Après évaporation à sec, la fraction acétone se présente sous forme de poudre de coloration jaune et les extraits éthanol et aqueux se présentent sous forme de pâte marron. 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 22. Les meilleurs rendements ont été obtenus avec l'extraits acétone (4.74 %) et aqueux (8.99%). L'augmentation du rendement de l'extrait aqueux montre que les racines de *Raphionacme vignei* contiennent une grande partie de molécules très polaires.

Tableau 22 : Rendement des extraits de racine de *Raphionacme vignei*

EXTRAITS	MASSE (g)	RENDEMENT (%)	Couleur	Aspect
Acétone	4,74	4,74	Jaune	Solide
Ethanol	0,275	0,275	Marron	Pâteux
Eau	8,99	8,99	Marron foncé	Pâteux

I.2. Résultats sur le Screening phytochimique des extraits de *Raphionacme vignei*

Des tests phytochimiques sont effectués pour mettre en évidence les différentes familles de métabolites secondaires présentes dans l'extraits des racines de *Raphionacme vignei* (les stérols et polyterpènes, les polyphénols, flavonoïdes, tanin, alcaloïdes, saponines, et anthraquinones). Les résultats de ces tests sont

consignés dans le (tableau 23). Ils ont révélé la présence des stérols et polyterpènes dans tous les extraits puis des alcaloïdes dans les extraits éthanolique et aqueux. Nous notons aussi la présence des saponines, polyphénols, flavonoïdes dans l'extrait aqueux. Par contre, aucun extrait ne contient des tannins et des anthraquinones. La présence de ces métabolites (terpènes) sera confirmée par nos études phytochimiques d'isolement.

Tableau 23 : Résultats des tests phytochimiques des racines de *Raphionacme vignei*

EXTRAITS TESTS	Acétone	Ethanolique	Aqueux
Stérols et polyterpènes	+	+	+
Alcaloïdes	-	+	+
Tannins	-	-	-
Saponines	-	-	+
Anthraquinones	-	-	-
Polyphénols	-	-	+
Flavonoïdes	-	-	+

Test positif : +

Test négatif : -

II.3. Résultats de purification de l'extrait acétone des racines de *Raphionacme vignei*

Un "système de chromatographie flash" en phase normale des extraits acétoniques des tubercules de *Raphionacme vignei* a conduit à l'isolement de six composés. Les produits purs ont été collectés à l'aide d'un collecteur automatique. Au total six (6) produits nommés DDQ1A ; DDQ2A ; DDQ3A ; DDQ4A ; DDQ5A et DDQ6A, appartenant à la famille des triterpènes ont été isolés.

I.3.1. Détermination structurale de DDQ1A, DDQ2A, DDQ3A, DDQ4A, DDQ5A et DDQ6A

I.3.1.1. Détermination structurale du composé DDQ4A

✓ Spectre de masse du composé **DDQ4A**

Le spectre de masse de DDQ4A présente trois pics caractéristiques à savoir : $[M + Na]$ m/z 491,7, $[2M + Na]$ m/z 960, $[3M + Na]$ m/z 1430,11 donne par déduction que $M = 468,7$ g/mol correspondant à la formule brute $C_{32}H_{52}O_2$ (voir annexe).

✓ Spectre d'infrarouge du composé **DDQ4A**

Le spectre d'infrarouge de **DDQ4A** permet de déterminer les fonctions chimiques présentes dans le composé **DDQ4A**. Dans ce spectre, nous observons une bande forte à 1730 cm^{-1} correspondant à la bande d'absorption du groupement carbonyle (C=O) d'un ester. Les d'élongation à 1643 cm^{-1} et le doublet à 1461 cm^{-1} et 1383 cm^{-1} montrent la présence d'un alcène (C=CH₂).

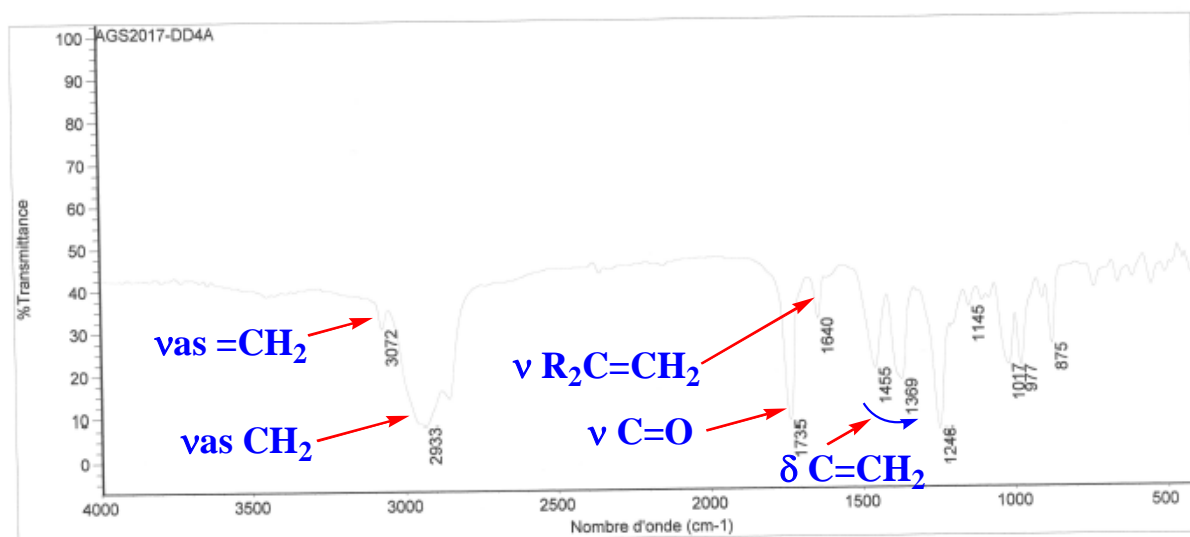


Figure 83 : Spectre d'infrarouge du composé de DDQ4A

✓ Le spectre de carbone ¹³C et le DEPT du composé DDQ4A

Les spectres du carbone ¹³C et le DEPT permettent de détecter 32 carbones parmi lesquels nous pouvons identifier :

- Un groupement carbonyle C₁ qui résonne vers 171,206 ppm correspondant au carbonyle d'un ester (RCOOR') ;
- Deux carbones C₂ et C₃ qui résonnent respectivement vers 139,7 et 124,4 ppm qui correspondent aux carbones éthyléniques ;
- Un carbone C₄ qui résonne vers 81,2 ppm détectant la présence d'un groupement RO.

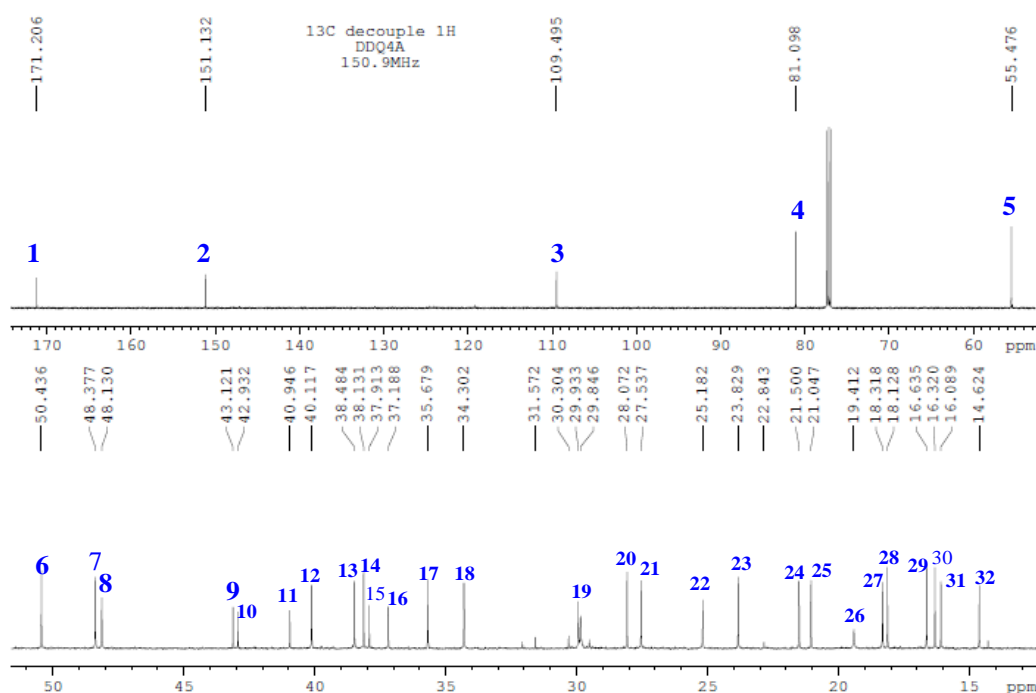


Figure 84 : Spectre de carbone du composé DDQ4A

✓ Spectres ^1H et HSQC du composé DDQ4A

L'analyse du spectre de l'HSQC (Figure 86) combinée à celle de proton ^1H (Figure 85) permet de détecter 6 CH (4, 5, 6, 7, 8 et 14), 8 CH_3 (20, 24, 26, 28, 29, 30, 31 et 32) et 11 CH_2 (3, 12, 13, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 25 et 27) de multiplicité suivante :

- Huit singulets de méthyle tertiaire : H28 (0,79 ppm), H29 (0,83 ppm), H30 (0,84 ppm), H20 (0,85 ppm), H32 (0,94 ppm), H31 (1,03 ppm), H26 (1,7 ppm) et H24 (2,05 ppm).
- Deux singulets de deux protons H3 qui résonnent respectivement à 4,58 ppm et 4,69 ppm représentant les protons de la double liaison exocyclique.
- Un doublet dédoublé H4 qui résonne à 4,49 ppm correspond à un CH lié à un oxygène (CH-O).

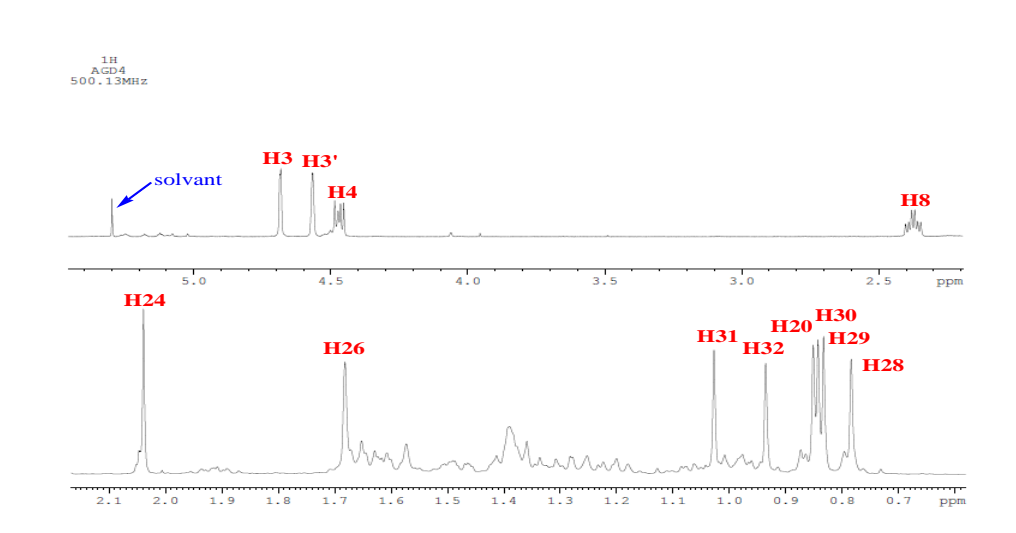


Figure 85 : Spectre de proton du composé DDQ4A

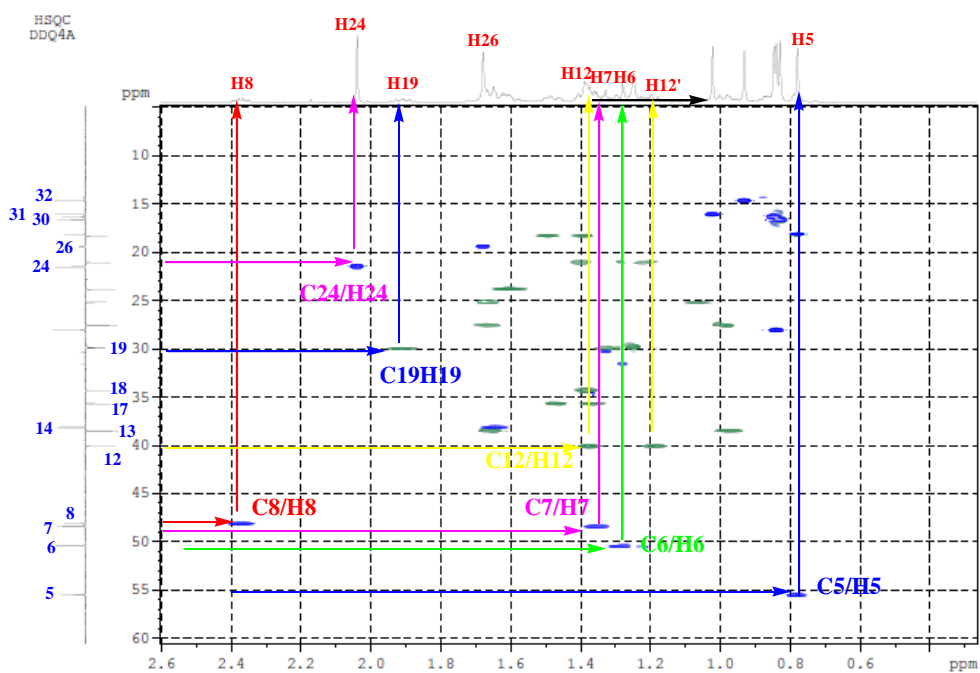


Figure 86 : Spectre HSQC du composé DDQ4A

✓ Spectre COSY du composé **DDQ4A**

Le spectre COSY donne les différents couplages entre les protons distants de 3 à 4 liaisons ($^3J_{H-H}$ et $^4J_{H-H}$), en générant plusieurs systèmes de spin. Les couplages identifiés pour le composé **DDQ4A** sont

suivants : H3/H26 ; H4/ H23/H13 ; H6/H21/H25/H14/H7/H8/ H19 /H18 ; H5/ H27/H12 ; H22 / H17
(Figure 87 et 88).

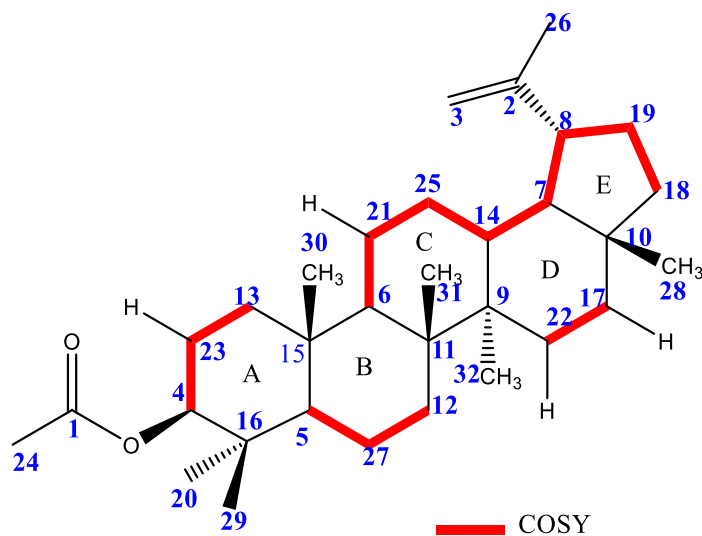


Figure 87 : Système de spin COSY ou Différents fragments COSY

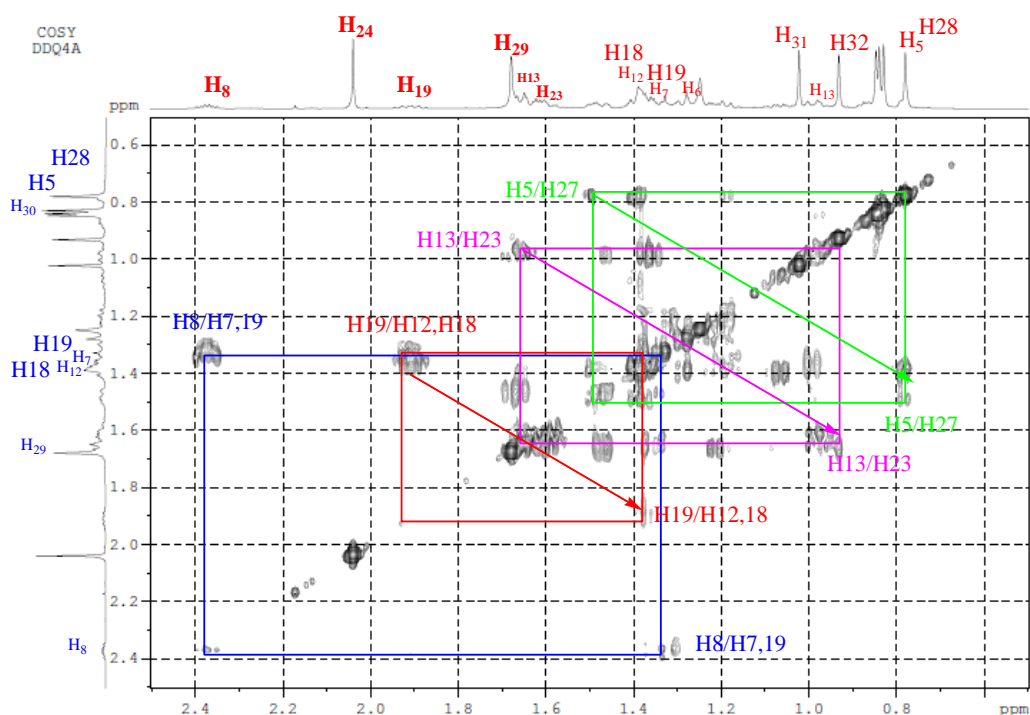


Figure 88 : Spectre de COSY du composé DDQ4A

✓ Spectre HMBC du composé **DDQ4A**

Le spectre HMBC (couplage hétéronucléaire à longue distance J_{C-H}) permet de faire la jonction entre les différents cycles en passant par les systèmes de spin et aussi d'attribuer les différents méthyles et les carbones qui les portent, ainsi que les carbones quaternaires.

En effet, sur le spectre COSY, un système de 4 protons, permet d'identifier la séquence C13-C23-C4 du cycle A. Le carbone C-16 à δ 35,2 ppm est repéré par ses corrélations HMBC avec les méthyles 20 à δ 28,1 ppm, 29 à δ 16,6 ppm d'une part, et entre les protons H-4 à δ 4,49 ppm et H-5 à δ 0,79 ppm d'autre part. Les protons du méthyle H-30 sont donnés par leurs corrélations avec les carbones C-15 et C-5, formant ainsi le cycle A.

Le cycle B, comprend la séquence COSY C-5-C-27-C-12. Les corrélations des protons H-6 et H-12 avec le carbone C-11 permettent de former le cycle B. La jonction entre le cycle A et B se justifie par les corrélations HMBC de C-6/H-30 et C-5 / H12.

Le cycle C comprend la séquence COSY C-6-C21-C-25-C-14. Les corrélations C11/ H6, H14 assurent la formation du cycle C.

Le cycle D est composé des fragments -CH-CH- des protons 14 et 7 et CH₂-CH₂ des protons 22 et 17. La jonction entre le cycle C et D est donnée par les corrélations C9/H22, H14. La corrélation C7/H17 permet de former le cycle C.

La formation du cycle E est déduite des couplages COSY de séquence C-7 -C-8-C-19-C-18 et de la corrélation HMBC du proton H7 avec le C-28 (méthyl 28). Ce dernier est repéré par sa corrélation avec le carbone 10.

Le carbone C3 corréle avec les protons H26 et H8 tandis que C2 corréle avec H7 et H19. Ces corrélations permettent de confirmer la position du groupement isopropényl sur le cycle E.

Les données ci-dessus suggèrent la présence d'un triterpène pentacyclique de type lupane.

La corrélation du carbonyle C1 avec les protons H4 et H24 confirme la présence d'un groupement acétyle en position 4. La comparaison des données spectrales du composé **DDQ4A** avec celle de la littérature indique qu'il s'agit de l'acétate de lupéol (Figure 89). Cette molécule appartenant à la famille des triterpènes a été isolée des feuilles de *Phyllanthus reticulatus* et des écorces de tige de *Artocarpus chaplasha* et de *Ficus hispida* ^[145]. Il est isolé pour la première fois dans les racines de *Raphionacme vignei* (figure 89).

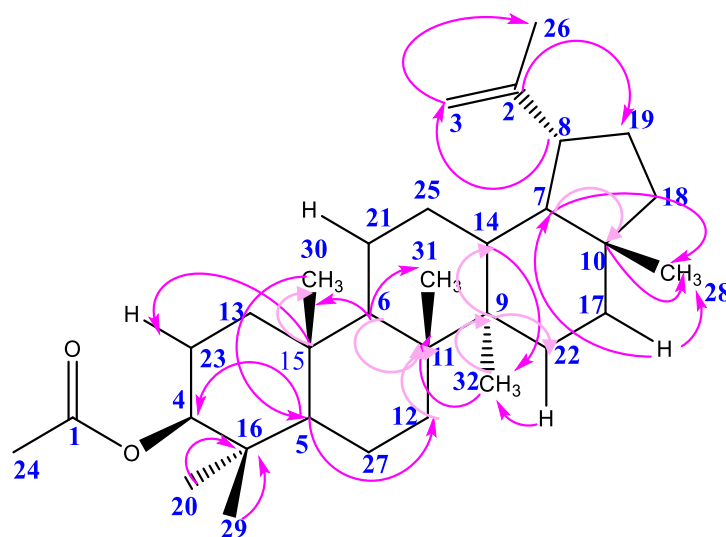


Figure 89 : Importantes corrélations HMBC du composé DDQ4A

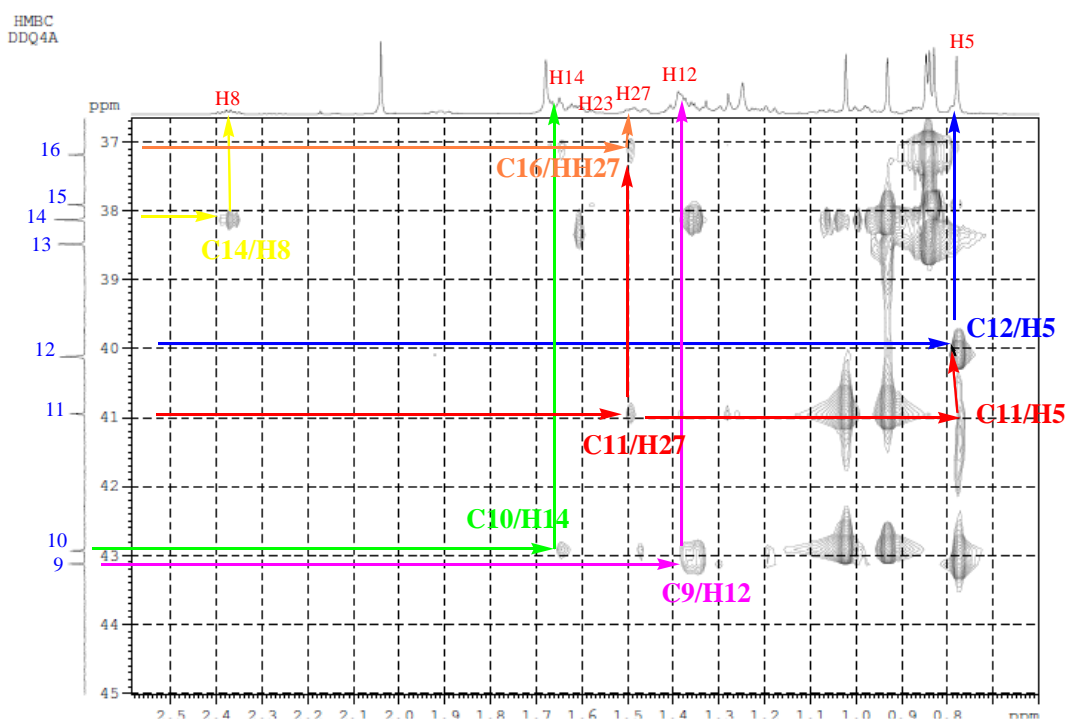


Figure 90 : Spectre HMBC du composé DDQ4A

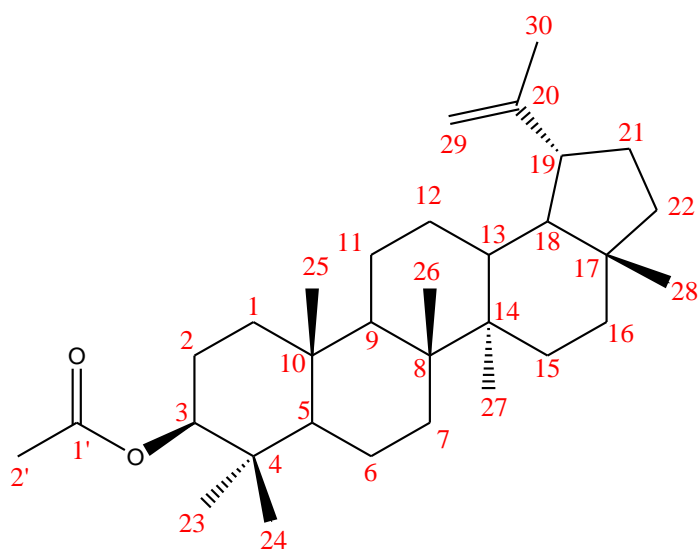


Figure 91 : Structure d'acétate de lupéol (numérotation systématique)

Le tableau ci-dessous illustre la comparaison entre les déplacements chimiques du composé **DDQ4A** avec ceux de la littérature.

Tableau 24 : Les déplacements chimiques des composés de **DDQ4A** et ceux décrits dans la littérature.

Isolé			Littérature		
N°=	ppm ¹³ C	ppm ¹ H	N°=	ppm ¹³ C	ppm ¹ H
1	171,2		1'	173,3	
2	151,1		20	151,2	
3	109,4	4,69 ; 4,58	29	109,6	4,69 ; 4,57
4	81,1	4,49	3	81,2	4,47
5	55,4	0,79	5	55,2	
6	48,3	1,3	9	50,5	
7	48,1	1,35	18	48,5	
8	42,9	2,35	19	48,2	
9	43,1		14	43,2	
10	42,9		17	43,0	
11	40,9		8	41,0	
12	40,1	1,38 ; 1,19	7	34,4	
13	38,5	1,65 ; 0,97	1	38,6	
14	38,1	1,64	13	36,02	
15	37,9		10	37,3	
16	35,2		4	38,0	
17	35,6	1,48 ; 1,37	16	35,3	
18	34,3	1,38	22	40,2	
19	29,9	1,9	21	30,0	
20	28,1	0,84	23	27,6	0,85
21	27,5	1,67 ; 1,0	11	21,1	
22	25,2	1,66 ; 1,06	15	25,3	
23	23,8	1,60	2	21,7	
24	21,5	2,05	2'	28,2	2,05
25	21,1	1,4 ; 1,21	12	24,0	
26	19,4	1,7	30	19,5	1,69
27	18,3		6	18,4	
28	18,1	0,79	28	18,2	0,94
29	16,6	0,83	24	16,7	0,84
30	16,3	0,84	25	16,4	1,63
31	16,1	0,94	26	16,2	0,83
32	14,6	0,85	27	14,7	0,79

Remarque : Les stéréochimies des carbones quaternaires C9, C10, C11, C15, C16 ainsi que celles des carbones C4 et C8 ont été confirmées par le spectre de ROESY qui permet de voir les corrélations dans l'espace (voir le spectre en annexe).

I.3.1.2. Détermination structurale des composés DDQ2A et DDQ5B

Les spectres de RMN ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC enregistrés dans le CDCl₃ et Infrarouge des composés DDQ2A et DDQ5B comparés à ceux du composé **DDQ4A**, révèlent une proche parenté

structurale. La modification principale se situe en position 4 (notre numérotation) et évoque la présence d'une chaîne grasse dont les signaux sont observables sur le spectre du ^{13}C (Figure 92 et 93) pour le composé DDQ2A et un OH pour le composé DDQ5B.

Ainsi, pour identifier cette chaîne grasse du composé DDQ2A, une analyse du spectre de masse en mode négatif a été réalisée afin de déterminer la masse de la chaîne grasse. Le spectre de masse en mode négatif permet d'observer un pic intense à 199,2 ppm (voir annexe) correspondant à la chaîne linéaire $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2^-$.

La structure la plus probable de DDQ2A est donc le dodécanoate de lupéol (Figure 94) isolé pour la première des racines de *Raphionacme vignei*. Cette molécule a été aussi isolée de *Dorstenia arifolia* [146].

Le composé DDQ5B quant à lui est identifié comme étant le lupéol (Figure 95). Ce composé connu dans la littérature est fréquemment rencontré dans plusieurs familles de végétaux dont les feuilles de *Phyllanthus reticulatus* et d'*Alstonia boonei* [157 ; 147].

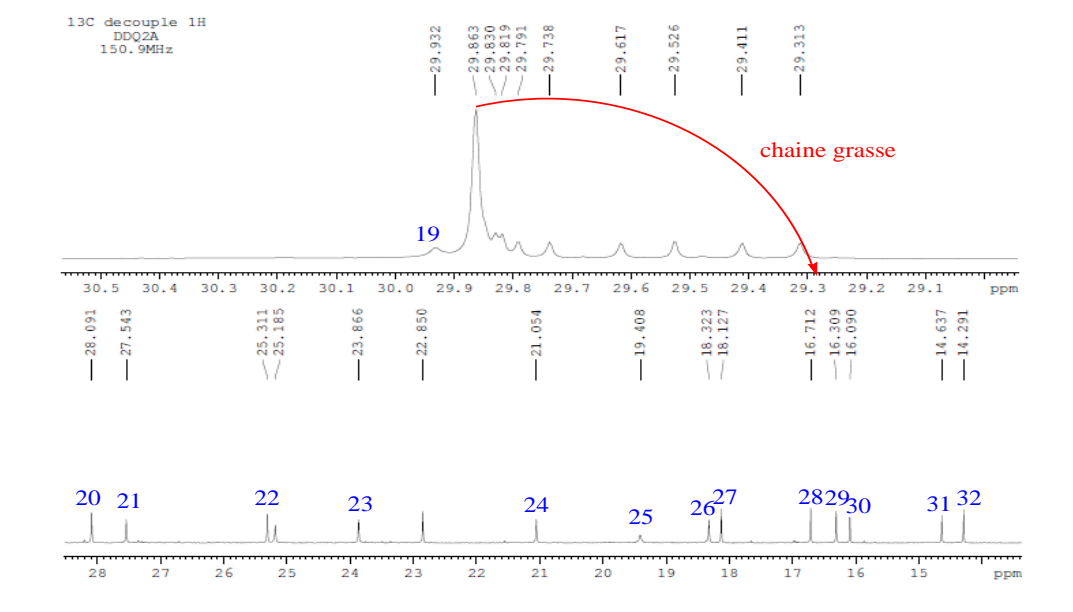


Figure 92: Spectre de carbone du composé DDQ2A

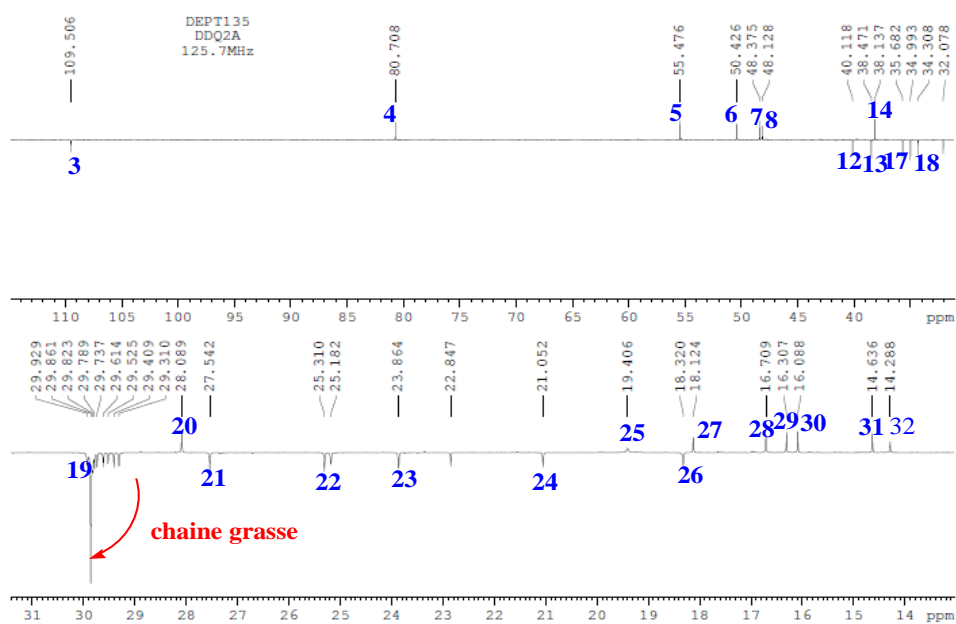


Figure 93: Spectre de DEPT 135 du composé DDQ2A

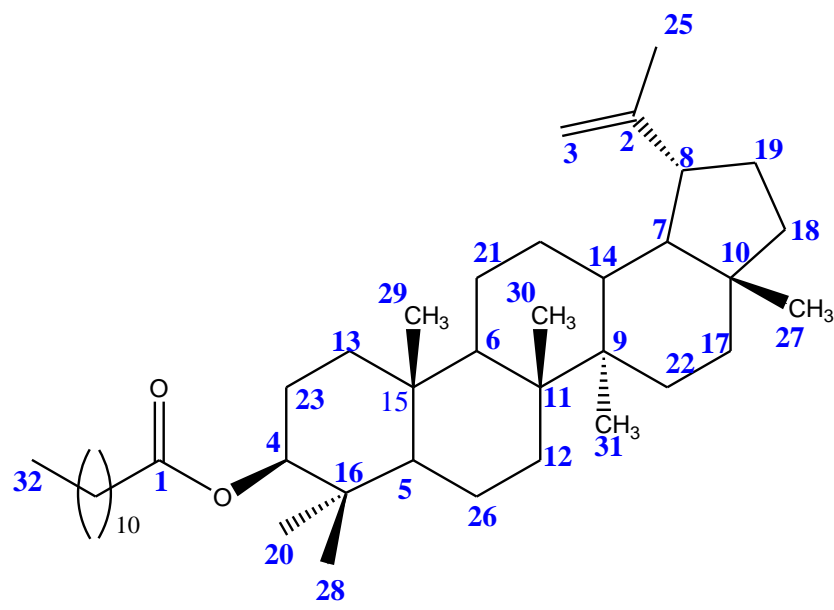


Figure 94 : Structure du dodécanoate de lupéol

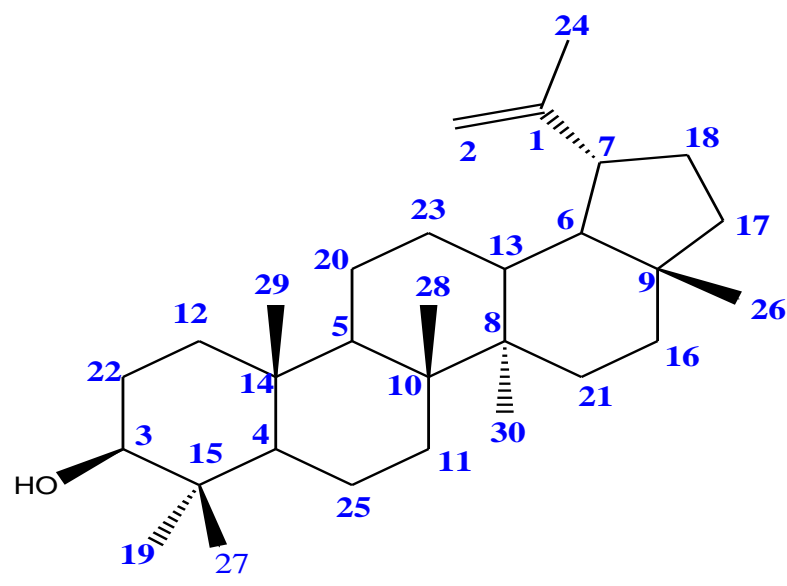


Figure 95: Structure du lupéol

I.3.1.3. Détermination structurale du composé DDQ3A

✓ Spectre de masse du composé **DDQ3A**

Le spectre de masse de DDQ4A présente trois pics caractéristiques à savoir : $[M + Na]$ m/z 491,7, $[2M + Na]$ m/z 960, $[3M + Na]$ m/z 1430,11 donne par déduction que $M = 468,7$ g/mol correspondant à la formule brute $C_{32}H_{52}O_2$ (voir annexe).

✓ Spectre d'infrarouge du composé **DDQ3A**

Dans le spectre d'infrarouge de DDQ3A, nous observons une bande forte à 1735 cm^{-1} correspondant à la bande d'absorption du groupement carbonyle (C=O) d'un ester.

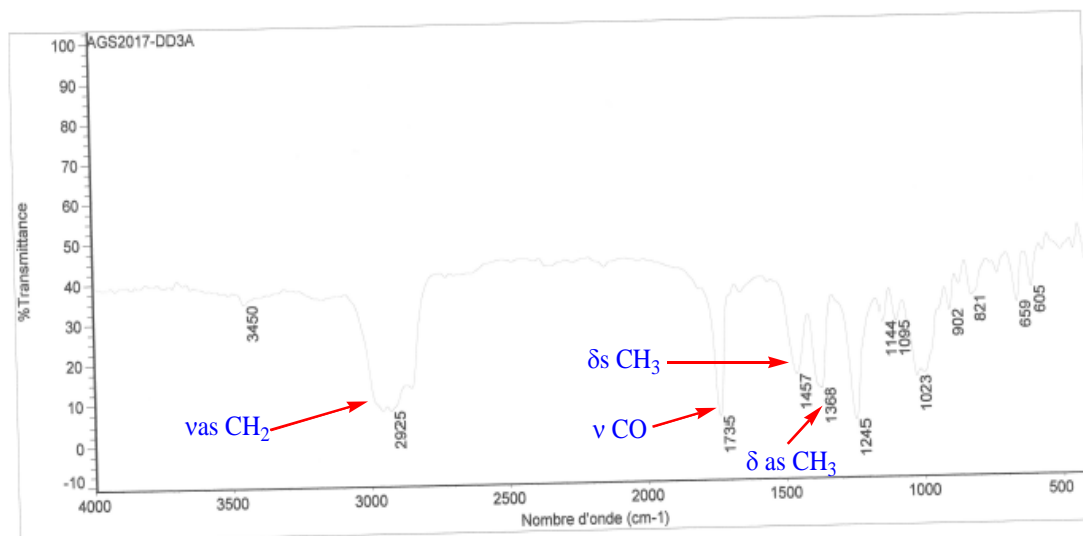


Figure 96 : Spectre d'infrarouge du composé de DDQ3A

✓ Le spectre de carbone ¹³C et le DEPT du composé DDQ3A

Le spectre du carbone ¹³C a montré 32 carbones parmi lesquels nous pouvons identifier :

- Un groupement carbonyle C₁ qui résonne à 171,188 ppm correspondant au groupement carbonyle d'un ester (RCOOR').
- Deux carbones C₂, C₃ qui résonnent respectivement à 139,743 et 124,422 ppm qui correspondent aux carbones éthyléniques.
- Un carbone qui résonne à 81,067 ppm, qui est sûrement en alpha d'un hétéroatome.

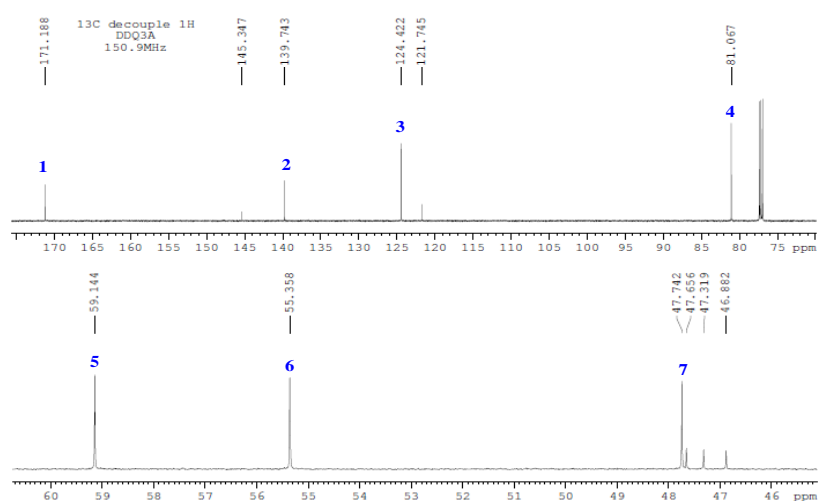


Figure 97 : Spectre de carbone du composé DDQ3A

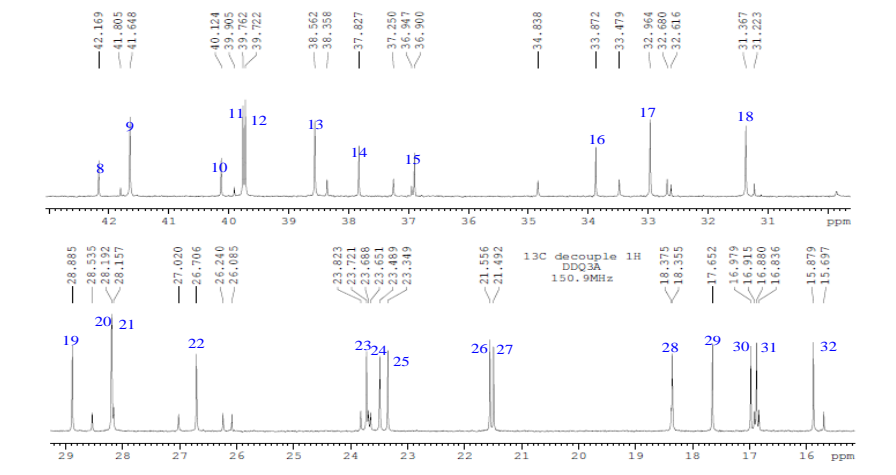


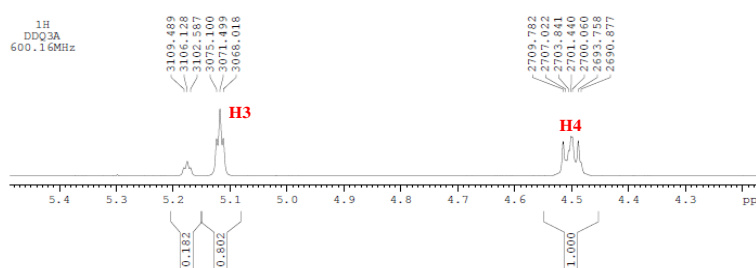
Figure 98 : Spectre de carbone du composé DDQ3A (suite)

✓ Spectres ^1H et HSQC du composé **DDQ3A**

L'analyse du spectre de l'HSQC (Figure 99) combinée à celle de proton ^1H (Figure 100) permet de détecter 7 CH (3, 4, 5, 6, 7, 11 et 12), 9 CH_3 (19, 21, 25, 26, 27, 29, 30, 31 et 32) et 9 CH_2 (9, 13, 17, 18, 20, 22, 23, 24 et 28) de multiplicités suivantes :

- Sept singulets de méthyle tertiaire (H-19, H21, H25, H26, H30, H31, H32) et deux doublets de méthyle (H27 et H29). L'un des singulets de méthyle qui résonne à 2,03 ppm (H26) indique la présence d'un groupement méthyle en alpha d'un carbonyle, ce qui a été confirmé par la présence du carbone quaternaire à 171,5 ppm (CH_3CO).
- Un proton H3 qui résonne à 5,2 ppm comme triplet représentant le proton de la double liaison endocyclique confirmé par la présence des deux carbones éthyléniques dans le spectre de carbone.
- Un proton H4 très déblindé qui résonne à 4,49 ppm comme doublet dédoublé correspond à un CH lié à un oxygène (CHO).

Sur le spectre HSQC (Figure 99), on distingue également 7 CH et 9 CH_2 .



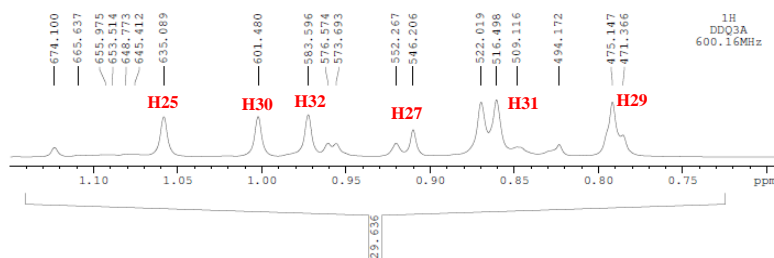


Figure 99 : Spectre de proton du composé DDQ3A

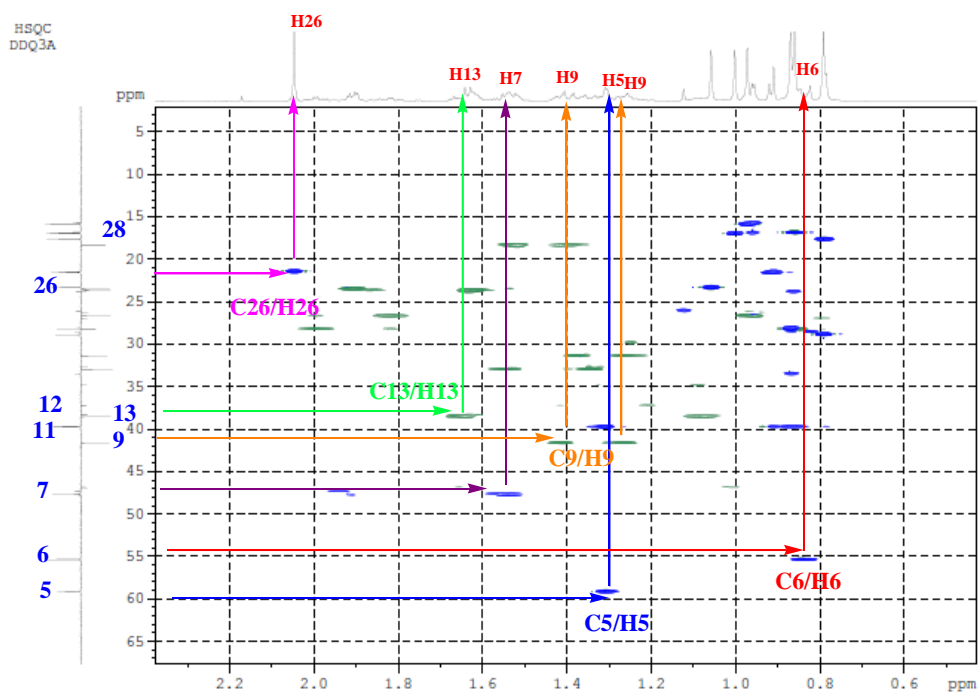


Figure 100 : Spectre de HSQC du composé DDQ3A

L'analyse des spectres de DEPT, ^{13}C , HCQC, ^1H conduit à 7 CH, 9 CH_2 , 9 CH_3 et 7 carbones quaternaires avec une fonction ester confirme la formule brute $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ du composé DDQ3A. Le composé DDQ3A ainsi identifié correspond à l'**acétate du béta amyryne** (Figure 101).

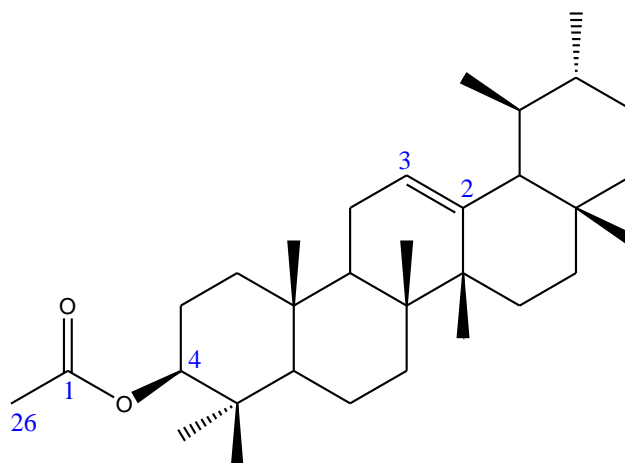


Figure 101 : Structure de l'acétate du béta amyryne

Ainsi, les attributions des protons et carbones ont été possibles grâce aux spectres ^{13}C , HSQC, COSY et HMBC.

✓ Spectre de COSY du composé DDQ3A

Les couplages identifiés pour le composé **DDQ3A** sont suivants : H3/H23/H7 ; H4/H24/H13, H6/H28/H17 ; H9/H18/H11/H29 ; H20 /H22 ; H5 /H12/H27 (figure 102 et 103).

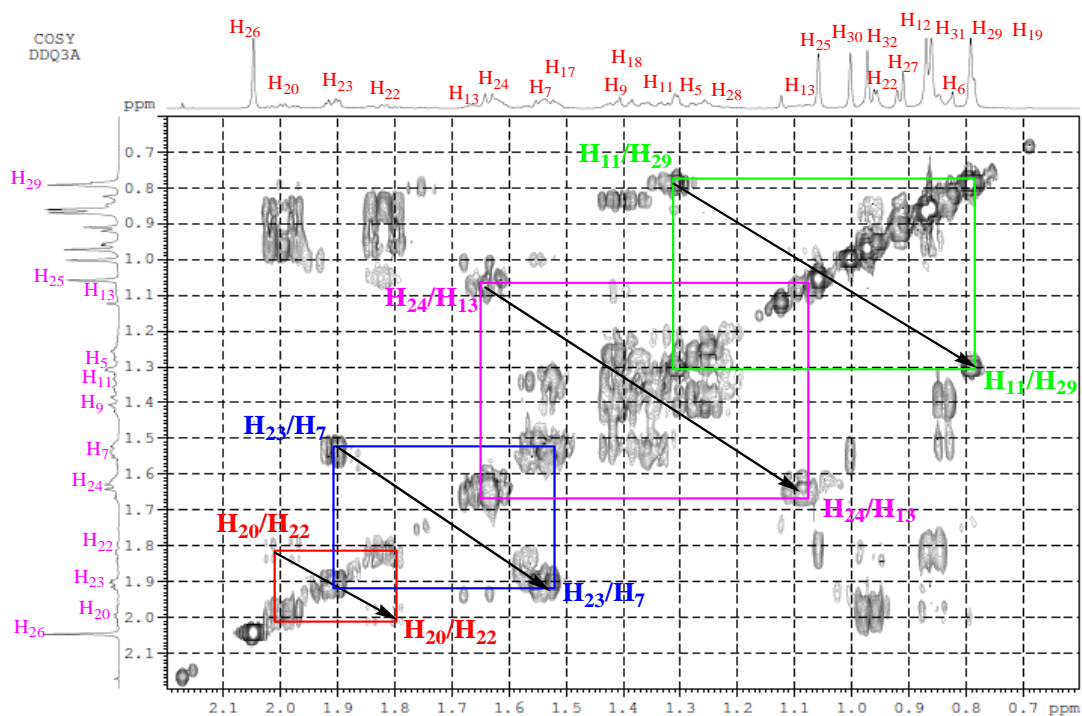


Figure 102 : Spectre de COSY du composé DDQ3A

Le spectre de COSY nous a permis de localiser dans la molécule les positions des carbones C7, C23, C24, C13, C9, C18, C11, C29, C6, C28 et C17 et par la suite localiser les positions C5, C12 et C27.

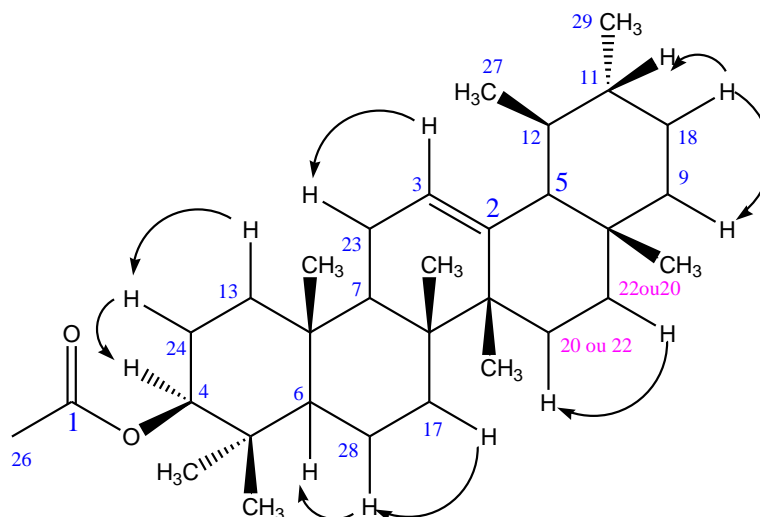


Figure 103 : Couplage COSY du composé DDQ3A

Nous passons à l'interprétation du spectre HMBC pour attribuer les positions des carbones quaternaires et les groupements méthyles et par la suite différencier les positions des carbones C20 et C22.

✓ Spectre HMBC du composé DDQ3A

A partir du spectre HMBC, nous confirmons les différents fragments proposés après l'interprétation du spectre de COSY par la corrélation des carbones C7 et C23 avec les protons H3, H13, H23 et H24 et la corrélation du carbone C13 avec les protons H4 et H23.

La position du carbone quaternaire C15 a pu être localisée par sa corrélation avec les protons H3, H7, H13, H17 et H24 et par la suite le carbone quaternaire C14 est repéré par sa corrélation avec les protons H24.

Le carbone quaternaire C10 a été attribué par sa corrélation avec les protons H7, H17, H28 et H23. Les positions des carbones quaternaires C8 et C16 sont repérées par la corrélation du carbone C8 avec les protons H3 et H7.

Les carbones C20 et C22 ont été différenciés grâce à la corrélation du carbone C10 avec les protons H22.

Les positions des groupements méthyles ont pu être localisées grâce aux corrélations suivantes :

- Les corrélations des carbones C21 et C30 avec le proton H4,
- Les corrélations des carbones C31 et C32 avec le proton H7 et le carbone C32 avec le proton H6,

- Les corrélations du carbone C25 avec les protons H22 et les protons H25 avec les carbones C8, C15 et C22,
- La corrélation du carbone C19 avec les protons H20 et H5.

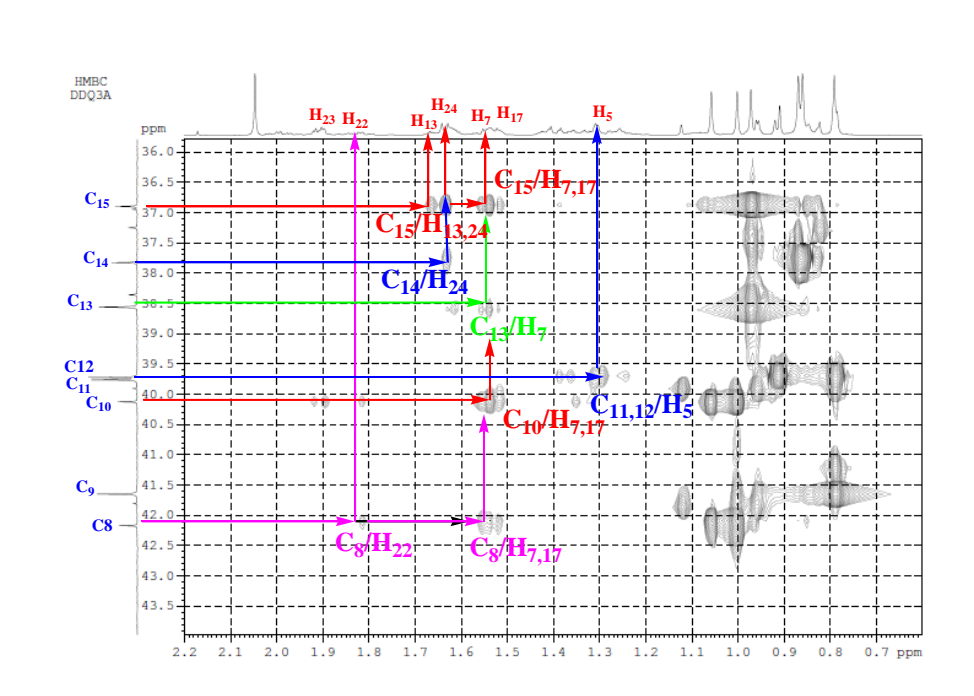


Figure 104 : Spectre HMBC du composé DDQ3A

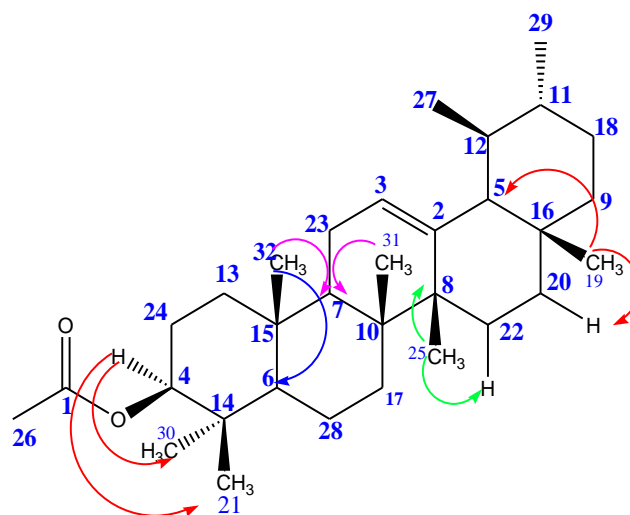


Figure 105 : Corrélation HMBC du composé DDQ3A

L'ensemble des données spectrales de RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC) de **DDQ3A** et la comparaison avec celles rapportées dans la littérature montrent que **DDQ3A est l'acétate du béta amyryne** [155]. Cette molécule appartenant à la famille des triterpènes est connue dans la littérature. Ce composé a été isolé dans : l'extrait méthanol des écorces de la tige de l'*Astonia boonei* et dans les feuilles d'*Acokanthera oblongifolia* [159, 148]. Il est isolé pour la première fois dans les racines de *Raphionacme vignei*. L'étude antérieure sur l'activité anti-inflammatoire de l'acétate du béta amyryne a été évaluée sur l'œdème de patte de souris induit par le xylène. L'acétate de beta amyryne a montré une réduction importante de l'œdème. Le composé a été isolé dans de très grande quantité et peut expliquer l'efficacité d'*Alstonia boonei* dans la gestion éthomédicale de maux de dents, de douleurs rhumatismales et d'autres problèmes de troubles inflammatoires [159] (figure 105).

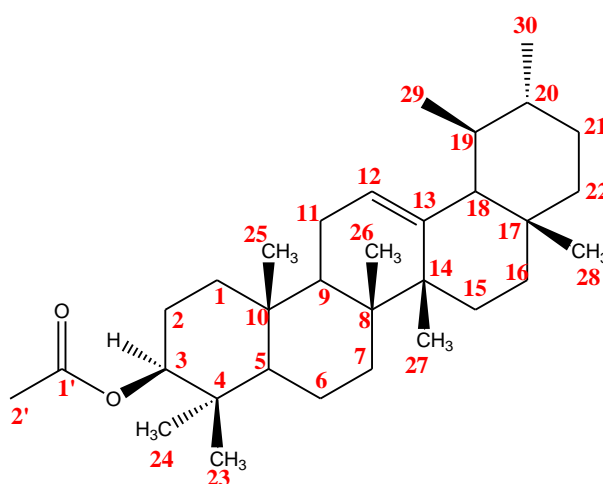


Figure 106 : Structure de l'acétate du béta amyryne (Numérotation proposée dans la littérature)

Le tableau ci-dessous illustre la comparaison entre les déplacements chimiques du composé DDQ3A avec ceux décrits dans la littérature.

Tableau 25 : Les déplacements chimiques des composés de **DDQ3A** et ceux décrits dans la littérature.

Isolé			Littérature		
N°	γ ppm ^{13}C	γ ppm ^1H	N°	γ ppm ^{13}C	γ ppm ^1H
1	171,2	-	1'	171,5	-
2	139,7	-	13	145,4	-
3	124,4	5,1	12	121,9	5,16 t
4	81,1	4,5	3	79,2	3,20 dd
5	59,1	1,3	18	47,8	1,89

6	55,3	0,84	5	55,4	0,71
7	47,5	1,54	9	47,4	1,95
8	42,2	-	14	47,9	-
9	41,6	1,41 ; 1,27	22	34,9	-
10	40,1	-	8	40,2	-
11	39,8	1,31	20	31,3	1,84
12	39,7	0,87	19	47,1	1,66
13	38,5	1,65 ; 1,07	1	38,8	1,55 ; 1,49
14	37,8	-	4	38,9	-
15	36,9	-	10	37,1	-
16	33,8	-	17	32,7	-
17	32,9	1,51 ; 1,34	7	32,8	-
18	31,3	1,37 ; 1,25	21	37,3	-
19	28,8	0,79	28	28,6	-
20	28,2	2,0	16	27,1	-
21	28,2	0,88	24	28,7	0,77 s
22	26,7	1,82 ; 0,97	15	26,3	-
23	23,7	1,9	11	23,7	-
24	23,5	1,5	2	27,4	1,52 ; 1,55
25	23,3	1,05	27	26,2	1,11 s
26	21,5	2,05	2'	21,5	2,02 s
27	21,5	0,9	29	21,2	0,85 s
28	18,3	1,2	6	18,5	1,53
29	17,6	0,8	30	18,9	0,85 s
30	16,9	1,01	23	15,7	-
31	16,9	0,86	26	17,2	0,94 s
32	16,8	0,98	25	15,8	0,92 s

I.3.1.4. Détermination structurale de DDQ1A

Les spectres de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC enregistrés dans le CDCl_3 et Infrarouge du composé DDQ1A comparés à ceux de l'acétate du béta amyryne, montrent des similitudes structurales. La modification principale se situe en position 4. Comme dans les cas précédemment décrits, la présence

d'une chaîne grasse est observée sur le spectre de masse mode négatif à m/z 199,2 (100%). Il correspond à la formule $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2^-$ confirmé par les spectres du ^{13}C et DEPT 135 (figure 107 et 108).

La structure la plus probable de DDQ1A est donc le dodécanoate de bêta amyryne (figure 109) isolé pour la première des racines de *Raphionacme vignei*. Cette molécule a été isolée de *Dorstenia arifolia* [158].

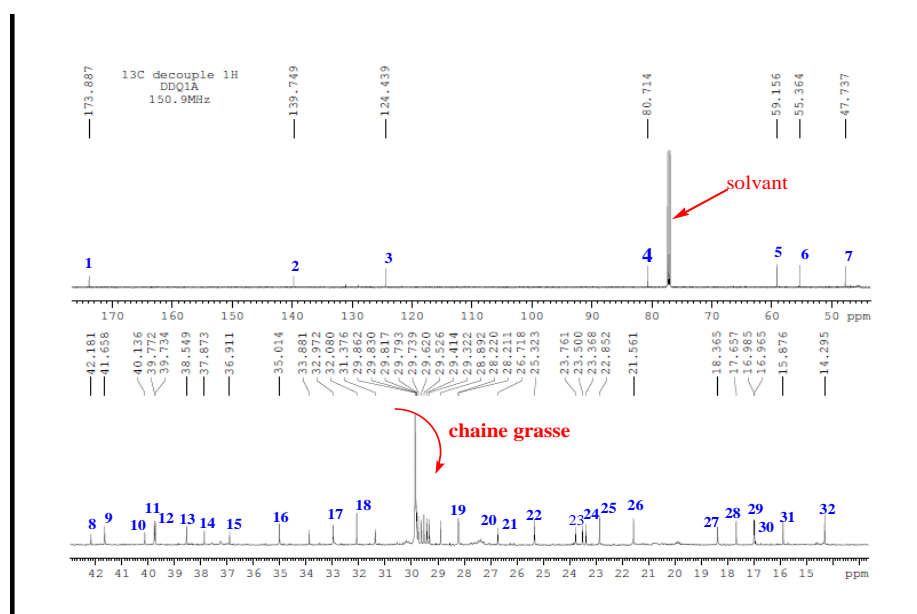


Figure 107 : Spectre de carbone du composé DDQ1A

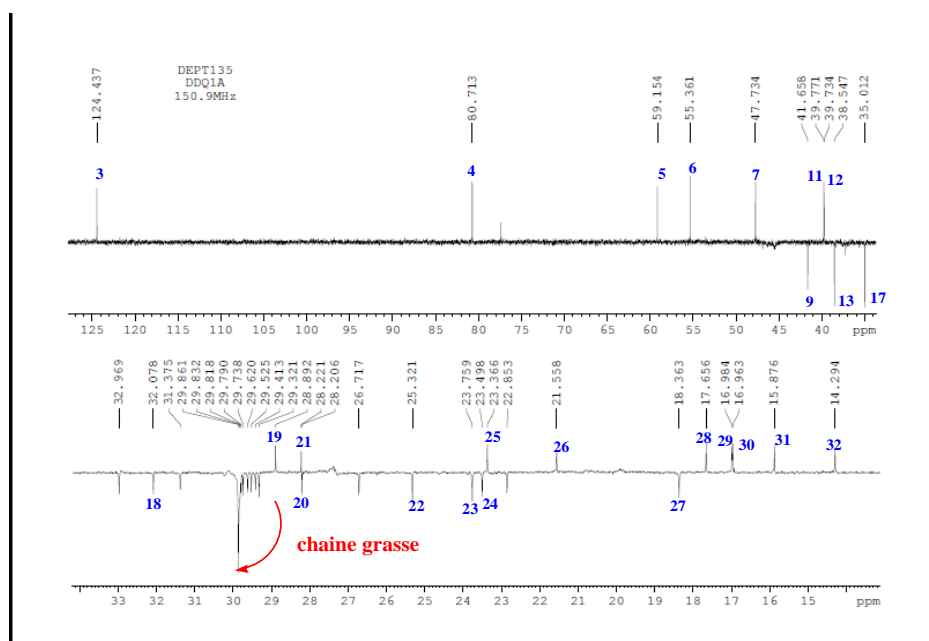


Figure 108 : Spectre de DEPT 135 du composé DDQ1A

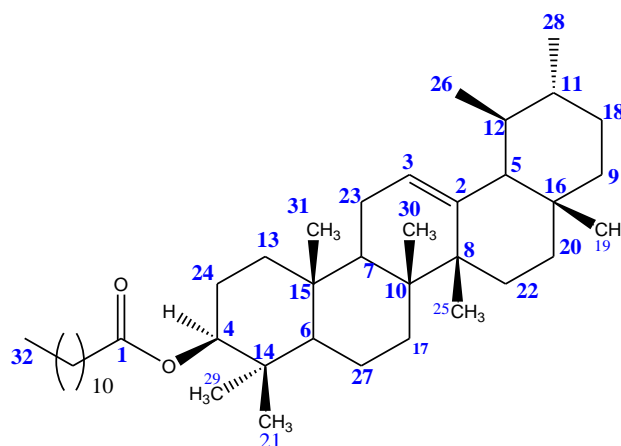


Figure 109 : Structure du dodécanoate de bêta amyryne

I.3.1.5. Détermination structurale de DDQ6B

✓ Le spectre de carbone ^{13}C et le DEPT du composé DDQ6B

Le spectre de carbone du composé DDQ6B a montré la présence de 29 carbones parmi lesquels nous pouvons identifier :

Deux carbones éthyléniques C1 et C2 qui résonnent respectivement à 140,897 et 121,868 ppm.

Un carbone très déblindé C3 qui résonne à 71,958 ppm correspondant au carbone lié à un groupement OH (Figures 110 et 111).

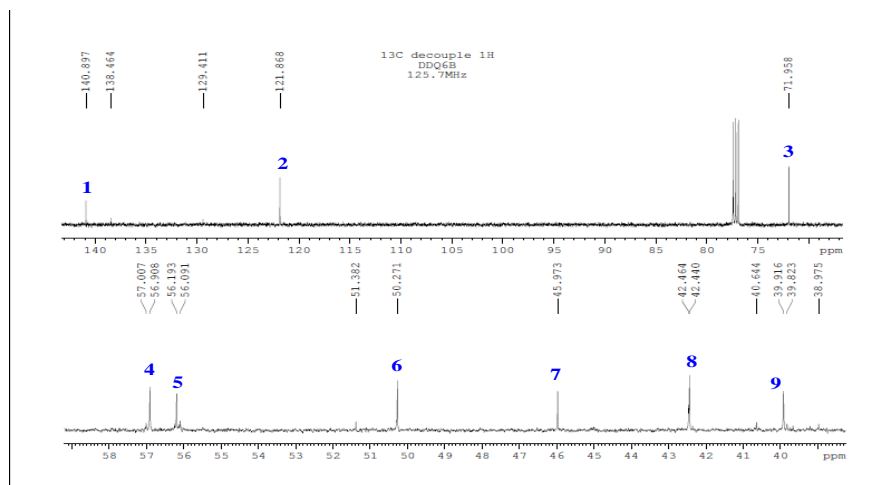


Figure 110 : Spectre de carbone du composé DDQ6B

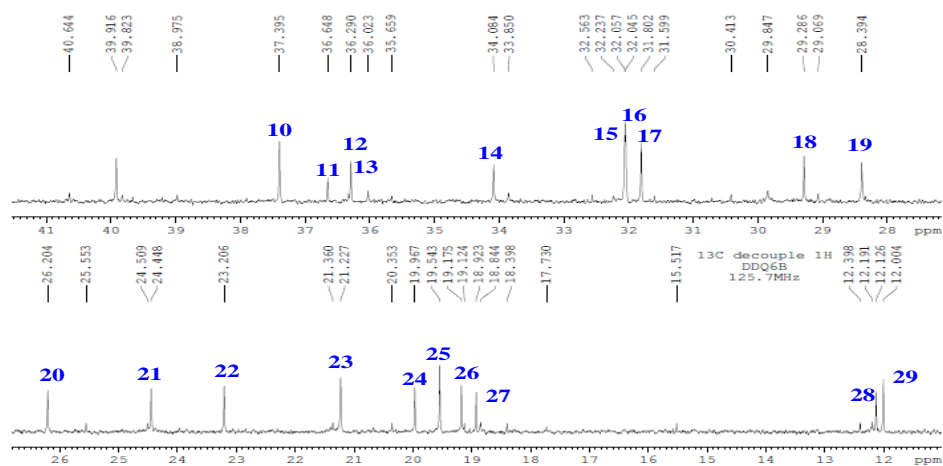


Figure 111 : Spectre de carbone du composé DDQ6B (suite)

✓ Spectres ^1H et HSQC du composé DDQ6B

L'analyse du spectre de l'HSQC (Figure 113) combinée à celle de proton ^1H (Figure 112) permet de détecter 9 CH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 16 et 18), 6 CH_3 (24, 25, 26, 27, 28 et 29), 11 CH_2 (9, 10, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22 et 23) de multiplicités suivantes :

- Un proton H2 qui résonne à 5,3 ppm en triplet correspond au CH éthylénique,
- Un proton H3 qui résonne à 3,5 ppm correspondant au CH lié à un oxygène,
- Deux groupements méthyles qui résonnent respectivement à 1 et 0,66 ppm en singulets.

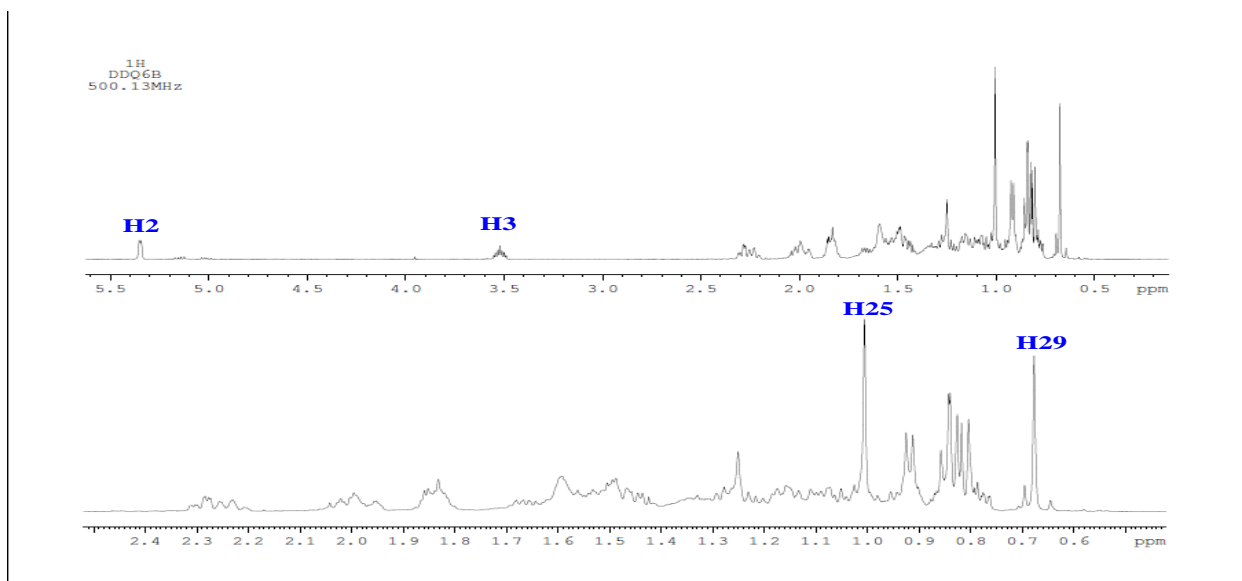


Figure 112 : Spectre de proton du composé DDQ6B

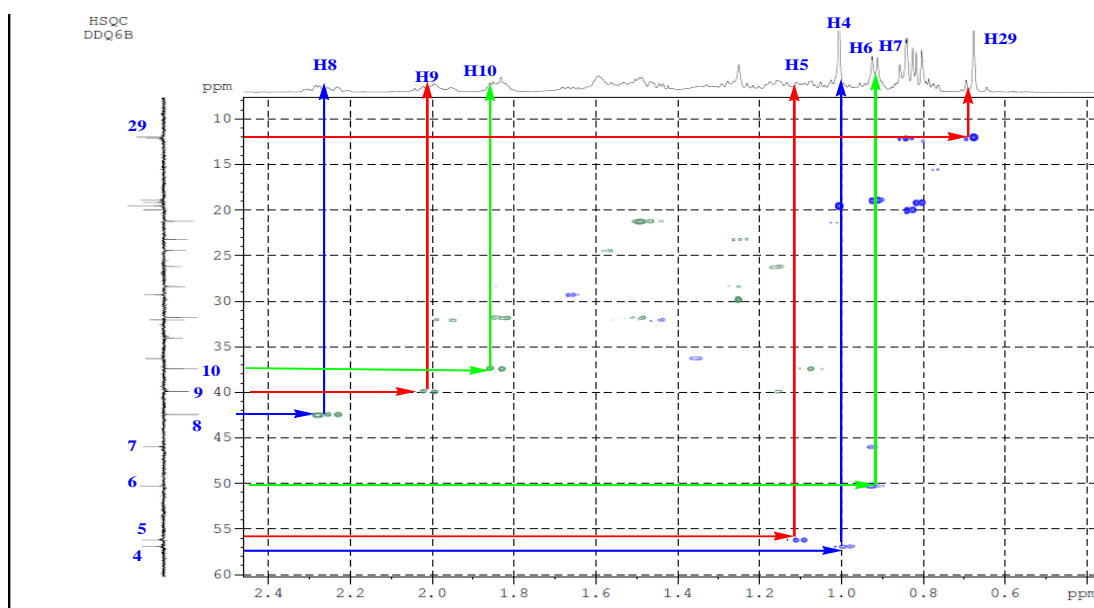


Figure 113 : Spectre HSQC du composé DDQ6B

L'analyse des spectres de DEPT, ^{13}C , du proton, HSQC, COSY, HMBC de **DDQ6B** correspond au composé de formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$. Ce composé est attribuable au β -sitostérol (figure 114) dont les valeurs des déplacements chimiques sont en accord avec la littérature ^[149]. Il a été isolé pour une première fois dans la plante *Raphionacme vignei*. Le β -sitostérol présente différents intérêts pour la santé. Il peut contribuer :

-Dans la réduction du taux de cholestérol sanguin, et à prévenir de nombreuses cardiovasculaire ;

- Dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate ;
- Dans l'inhibition de la croissance tumorale des cellules cancéreuse ^[150].

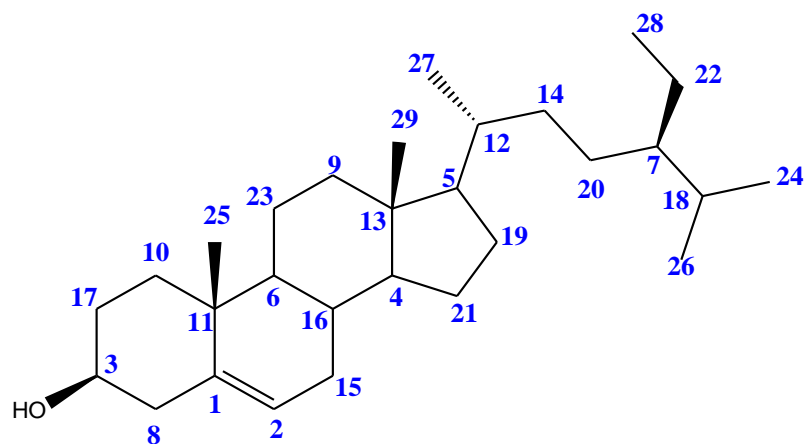


Figure 114 : Structure du β -sitostérol (Numérotation proposée)

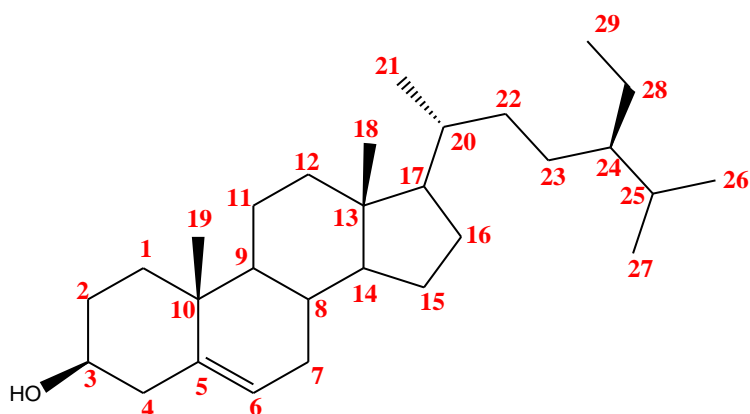


Figure 115 : Structure du β -sitostérol (Numérotation systématique)

Le tableau ci-dessous illustre la comparaison entre les déplacements chimiques du composé **DDQ6B** avec ceux décrits dans la littérature.

Tableau 26 : Comparaison des déplacements chimiques du composé DDQ6B avec ceux décrits dans la littérature

Isolé			Littérature		
N°	γ ppm ^{13}C	γ ppm ^1H	N°	γ ppm ^{13}C	γ ppm ^1H
1	140,9	Cq	5	140,8	
2	121,8	CH 5,35	6	121,7	CH 5,358 s

3	71,9	CH 3,5	3	71,8	CH 3,52 m
4	57,0	CH 1,0	14	56,8	
5	56,2	CH 1,3	17	56	
6	50,3	CH 0,81	9	51,2	
7	45,9	CH 0,81	24	45,9	
8	42,4	CH ₂ 2,3	4	42,2	
9	39,9	CH ₂ 2,0	12	39,8	
10	37,4	CH ₂ 1 ,88	1	37,3	
11	36,648	Cq	10	36,3	
12	36,3	CH 1,33	20	36,2	
13	36,0	Cq	13	42,4	
14	34,1	CH ₂	22	33,9	
15	32,1	CH ₂ 1,98	7	31,9	
16	32,1	CH 1,45	8	31,9	
17	31,6	CH ₂ 1,5	2	31,6	
18	29,3	CH	25	29,2	
19	28,3	CH ₂	16	28,3	
20	26,2	CH ₂	23	26,1	
21	24,5	CH ₂	15	24,3	
22	23,2	CH ₂	28	23,1	
23	21,3	CH ₂	11	21,1	
24	19,9	CH ₃	26	19,8	CH ₃ 0,814 d
25	19,5	CH ₃	19	19,4	CH ₃ 1,01 s
26	18,9	CH ₃	27	19,3	CH ₃ 0,833 s
27	18,8	CH ₃	21	18,8	CH ₃ 0,92 d
28	12,2	CH ₃	29	12,2	CH ₃ 0,845 t
29	12,0	CH ₃	18	11,9	CH ₃ 0,680 s

II. Résultats sur l'étude biologique des racines de *Raphionacme vignei*

II.1. Résultats de l'activité anti-inflammatoire

II.1.1. Administration de l'eau physiologique (10 mL/kg, per os) et de l'acide acétylsalicylique (10 mg/kg, per os)

L'administration de 100 μ L d'une solution de carraghénine à 1% dans le coussinet plantaire de la patte gauche du rat, induit un œdème inflammatoire, se traduit par une augmentation de l'épaisseur de la patte. Le pourcentage de variations de l'épaisseur de la patte est de $34,39 \pm 8,81\%$; $67,77 \pm 6,79\%$ et $92,72 \pm 6,05\%$ (n= 5), respectivement aux temps T1h, T3h et T5h après administration de la carraghénine (Tableau 27).

Tableau 27 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de l'eau physiologique (10 ml/kg, *per os*)

N° Rat	Poids (g)	E ₀ (mm)	E _{1h} (mm)	%AUG ₁	E _{2h} (mm)	%AUG ₂	E _{3h} (mm)	%AUG ₃	E _{4h} (mm)	%AUG ₄	E _{5h} (mm)	%AUG ₅
R1	236	4,54	5,38	18,50	6,74	48,46	7,3	60,79	7,99	75,99	8,48	86,78
R2	190	4,23	6,7	58,39	7,13	68,56	7,37	74,23	8,58	102,84	8,52	101,42
R3	222	4,27	5,87	37,47	6,29	47,31	7,13	66,98	8,21	92,27	8,37	96,02
R4	245	4,83	5,35	10,77	6,59	36,44	7,15	48,03	8,24	70,60	8,33	72,46
R5	155	3,48	5,11	46,84	5,66	62,64	6,57	88,79	7,17	106,03	7,2	106,90
Moyenne				34,39		52,68		67,77		89,55		92,72
ESM				8,81		5,75		6,79		7,07		6,05

-Prévention de l'œdème inflammatoire de la patte de rat après administration de l'acide acétylsalicylique (AAS)

Une administration de 10 mg/kg *per os* de l'AAS prévient de façon significative le développement de l'œdème inflammatoire induit par la carraghénine. La variation de l'œdème inflammatoire de la patte est $21,79 \pm 2,27\%$; $33,77 \pm 7,08\%$; $30,96 \pm 7,25\%$, respectivement aux temps T1h, T3h et T5h (Tableau 28).

Tableau 28 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de l'AAS (10 mg/kg *per os*)

N° Rat	Poids (g)	E ₀ (mm)	E _{1h} (mm)	%AUG ₁	E _{2h} (mm)	%AUG ₂	E _{3h} (mm)	%AUG ₃	E _{4h} (mm)	%AUG ₄	E _{5h} (mm)	%AUG ₅
R1	165	4,68	5,47	16,88	5,13	9,62	5,09	8,76	4,96	5,98	4,81	2,78
R2	199	4,28	5,07	18,46	5,23	22,20	6,16	43,93	5,84	36,45	5,98	39,72
R3	175	4,07	5,00	22,85	5,25	28,99	5,31	30,47	5,56	36,61	5,44	33,66
R4	160	4,13	4,99	20,82	5,49	32,93	5,61	35,84	5,78	39,95	5,59	35,35
R5	153	3,81	4,95	29,92	5,27	38,32	5,71	49,87	5,5	44,36	5,46	43,31
Moyenne				21,79		26,41		33,77		32,67		30,96
ESM				2,27		4,95		7,08		6,82		7,25

II.1.2. Activité anti-inflammatoire des DDQ2-DDQ6

✓ Administration *per os* de DDQ2 (1, 3 et 10 mg/kg)

A la dose de 1 mg/kg *per os* DDQ2 prévient de façon significative l'œdème inflammatoire à la carraghénine. En effet, les variations de l'épaisseur de la patte sont $30,62 \pm 3,80\%$; $33,68 \pm 3,38\%$ et $45,02 \pm 4,87\%$ respectivement aux temps T1h, T3h et T5h. Entre 1 et 3 mg/kg, la prévention de l'œdème inflammatoire est dépendante de la dose. 10 mg/kg, on note une tendance vers une baisse de l'activité antiinflammatoire (Tableau 29, 30 et 31, Figure 116).

Tableau 29 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, *per os* de l'extrait DDQ2

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	155	3,87	5,48	41,60	5,10	31,78	5,50	42,12	5,22	34,88	5,88	51,94
R2	170	4,01	5,44	35,66	5,09	26,93	5,19	29,43	5,72	42,64	5,74	43,14
R3	160	4,17	5,05	21,10	5,45	30,70	5,18	24,22	5,49	31,65	5,46	30,94
R4	130	3,93	4,85	23,41	5,14	30,79	5,19	32,06	5,49	39,69	5,50	39,95
R5	130	3,77	4,95	31,30	5,26	39,52	5,30	40,58	5,86	55,44	6,00	59,15
M %AUG				30,62		31,94		33,68		40,86		45,02
SEM				3,80		2,07		3,38		4,11		4,87

Tableau 30 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration 3 mg/kg, *per os* de DDQ2

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	150	4,33	4,90	13,16	5,30	22,40	5,39	24,48	5,88	35,80	5,72	32,10
R2	143	4,14	4,94	19,32	5,33	28,74	5,32	28,50	5,42	30,92	5,76	39,13
R3	170	4,32	4,96	14,81	5,30	22,69	5,38	24,54	5,33	23,38	5,61	29,86
R4	154	4,51	4,63	2,66	5,41	19,96	5,47	21,29	5,93	31,49	6,81	51,00
R5	178	4,56	5,24	14,91	5,30	16,23	5,56	21,93	5,76	26,32	6,30	38,16
M %AUG				12,98		22,00		24,15		29,58		38,05
SEM				2,77		2,04		1,27		2,16		3,68

Tableau 31 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 10 mg/kg, *per os* de DDQ2

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	125	4,08	5,08	24,51	4,55	11,52	4,60	12,75	4,72	15,69	5,19	27,21
R2	158	4,14	5,22	26,09	5,39	30,19	5,32	28,50	5,97	44,20	5,57	34,54
R3	170	4,01	6,08	51,62	6,57	63,84	6,75	68,33	7,09	76,81	7,03	75,31
R4	199	4,24	5,43	28,07	5,94	40,09	5,85	37,97	6,49	53,07	6,22	46,70
R5	125	3,65	4,45	21,92	5,61	53,70	5,49	50,41	6,21	70,14	5,39	47,67
M %AUG				30,44		39,87		39,59		51,98		46,29
SEM				5,39		9,12		9,46		10,78		8,21

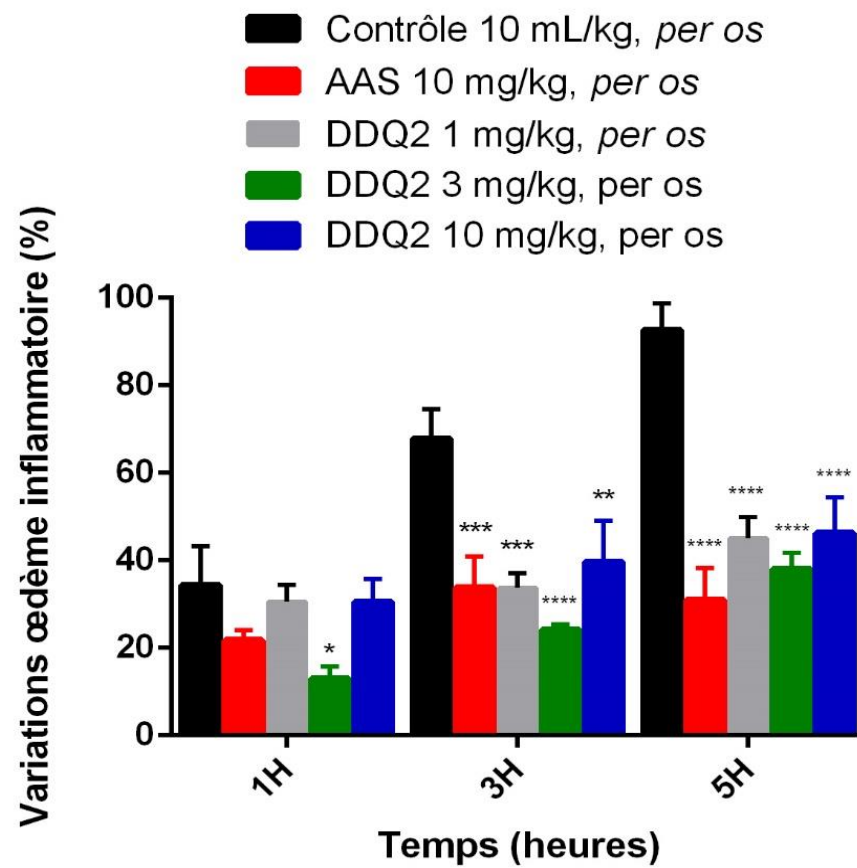


Figure 116 : Activité anti-inflammatoire de DDQ2

✓ **Administration per os de DDQ3 (1, 3 et 10 mg/kg per os)**

DDQ3 prévient de façon dépendante de la dose de l'œdème inflammatoire à la caraghénine, entre 1 et 3 mg/kg, *per os*. Au bout de 5 heures, les variations de l'œdème sont respectivement, $55,87 \pm 6,62\%$ et $35,73 \pm 3,59\%$ vs $92,72 \pm 6,62\%$ dans le groupe contrôle. Toutefois, la prévention de l'œdème inflammatoire est moins importante à la dose de 10 mg/kg, *per os*. A cette dose, la variation de l'œdème inflammatoire est de $50,47 \pm 4,74\%$ (Tableau 32, 33 et 34, Figure 117).

Tableau 32 : Variations de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, *per os* de DDQ3

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	135	3,72	4,97	33,60	5,34	43,55	5,24	40,86	5,55	49,19	5,55	49,19
R2	170	3,19	4,82	51,10	5,11	60,19	5,79	81,50	5,59	75,24	5,75	80,25
R3	135	3,82	4,51	18,06	4,18	9,42	5,02	31,41	5,32	39,27	5,46	42,93
R4	135	3,20	4,38	36,88	4,49	40,31	4,94	54,38	5,07	58,44	4,74	48,13
R5	150	3,45	4,69	35,94	4,65	34,78	5,16	49,57	5,66	64,06	5,48	58,84
M % AUG				35,12		37,65		51,54		57,24		55,87
SEM				5,25		8,23		8,45		6,16		6,62

Tableau 33 : variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 3 mg/kg, *per os* de DDQ3

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	145	4,07	5,10	25,31	4,74	16,46	4,54	11,55	4,97	22,11	5,00	22,85
R2	152	4,44	4,67	5,18	5,00	12,61	4,90	10,36	5,40	21,62	5,98	34,68
R3	150	4,16	4,38	5,29	4,55	9,37	4,98	19,71	5,69	36,78	5,81	39,66
R4	163	4,36	4,83	10,78	5,43	24,54	4,83	10,78	5,61	28,67	6,29	44,27
R5	163	4,17	4,78	14,63	5,01	20,14	4,79	14,87	5,32	27,58	5,72	37,17
M %AUG				12,24		16,63		13,45		27,35		35,73
SEM				3,72		2,68		1,75		2,75		3,59

Tableau 34 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 10 mg/kg, *per os* de DDQ3

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	137	4,08	4,77	16,91	5,15	26,23	5,30	29,90	5,94	45,59	5,50	34,80
R2	145	4,18	5,11	22,25	6,14	46,89	6,19	48,09	6,42	53,59	6,61	58,13
R3	157	4,00	4,99	24,75	6,32	58,00	6,33	58,25	6,27	56,75	6,40	60,00
R4	146	4,19	5,2	24,11	5,94	41,77	5,87	40,10	6,02	43,68	6,49	54,89
R5	120	4,02	4,84	20,40	5,23	30,10	5,39	34,08	5,35	33,08	5,81	44,53
M %AUG				21,68		40,60		42,08		46,54		50,47
SEM				1,41		5,75		5,07		4,15		4,74

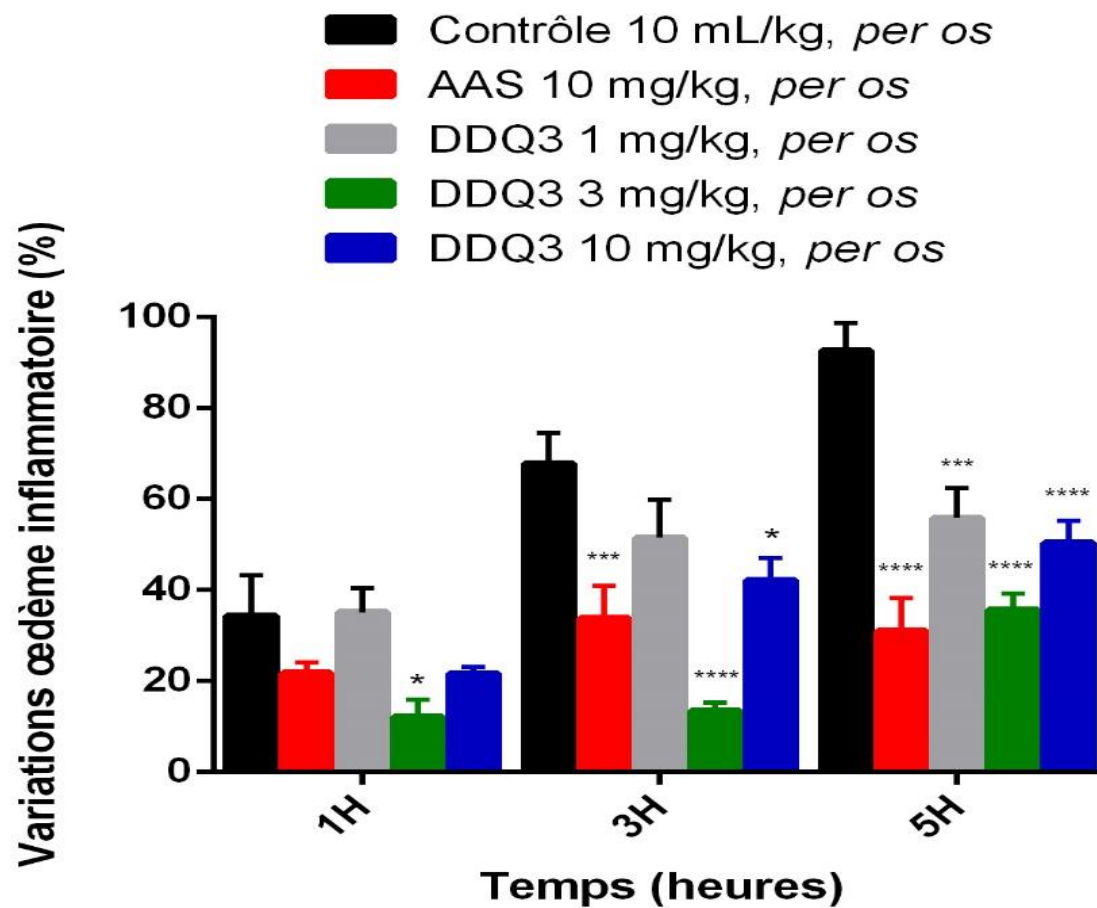


Figure 117 : Activité anti-inflammatoire de DDQ3

✓ **Administration *per os* de DDQ4 (1, 3 et 10 mg/kg)**

DDQ4 induit une prévention de l'œdème inflammatoire de la façon dépendante de la dose. En effet, aux doses de 1, 3 et 10 mg/kg, *per os*, les variations de l'œdème inflammatoire sont respectivement $70,74 \pm 9,14\%$, $39,91 \pm 3,15\%$ et $35,30 \pm 4,71\%$ vs (Tableau 35, 36 et 37, Figure 118).

Tableau 35 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, *per os* de DDQ4

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	120	3,33	4,76	42,94	5,08	52,55	4,77	43,24	4,99	49,85	4,95	48,65
R2	140	3,20	5,10	59,38	5,57	74,06	6,01	87,81	6,24	95,00	6,24	95,00
R3	195	4,87	5,20	6,78	5,88	20,74	6,64	36,34	6,84	40,45	7,43	52,57
R4	130	3,45	5,26	52,46	5,92	71,59	5,61	62,61	6,28	82,03	6,45	86,96
R5	135	3,26	5,16	58,28	5,41	65,95	5,44	66,87	5,43	66,56	5,56	70,55
M %AUG				43,97		56,98		59,38		66,78		70,74
SEM				9,74		9,80		9,13		10,02		9,14

Tableau 36 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 3 mg/kg, *per os* de DDQ4

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	155	4,49	5,52	22,94	5,93	32,07	5,80	29,18	6,04	34,52	6,38	42,09
R2	195	4,52	5,48	21,24	5,25	16,15	5,90	30,53	5,83	28,98	5,87	29,87
R3	155	4,07	5,42	33,17	5,92	45,45	5,94	45,95	6,02	47,91	5,95	46,19
R4	175	4,15	5,55	33,73	5,68	36,87	6,02	45,06	6,52	57,11	6,05	45,78
R5	190	4,63	5,75	24,19	5,88	27,00	6,15	32,83	6,57	41,90	6,28	35,64
M %AUG				27,05		31,51		36,71		42,08		39,91
SEM				2,65		4,90		3,64		4,94		3,15

Tableau 37 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 10 mg/kg *per os* de DDQ4

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	146	4,24	5,46	28,77	5,22	23,11	5,49	29,48	6,21	46,46	6,23	46,93
R2	160	4,41	5,43	23,13	4,83	9,52	5,24	18,82	5,93	34,47	5,92	34,24
R3	159	4,11	5,15	25,30	4,84	17,76	4,86	18,25	5,04	22,63	5,00	21,65
R4	120	3,57	4,61	29,13	4,72	32,21	4,19	17,37	5,33	49,30	4,94	38,38
M %AUG				29,08		27,04		25,63		42,64		35,30
SEM				2,74		7,37		5,15		6,48		4,71

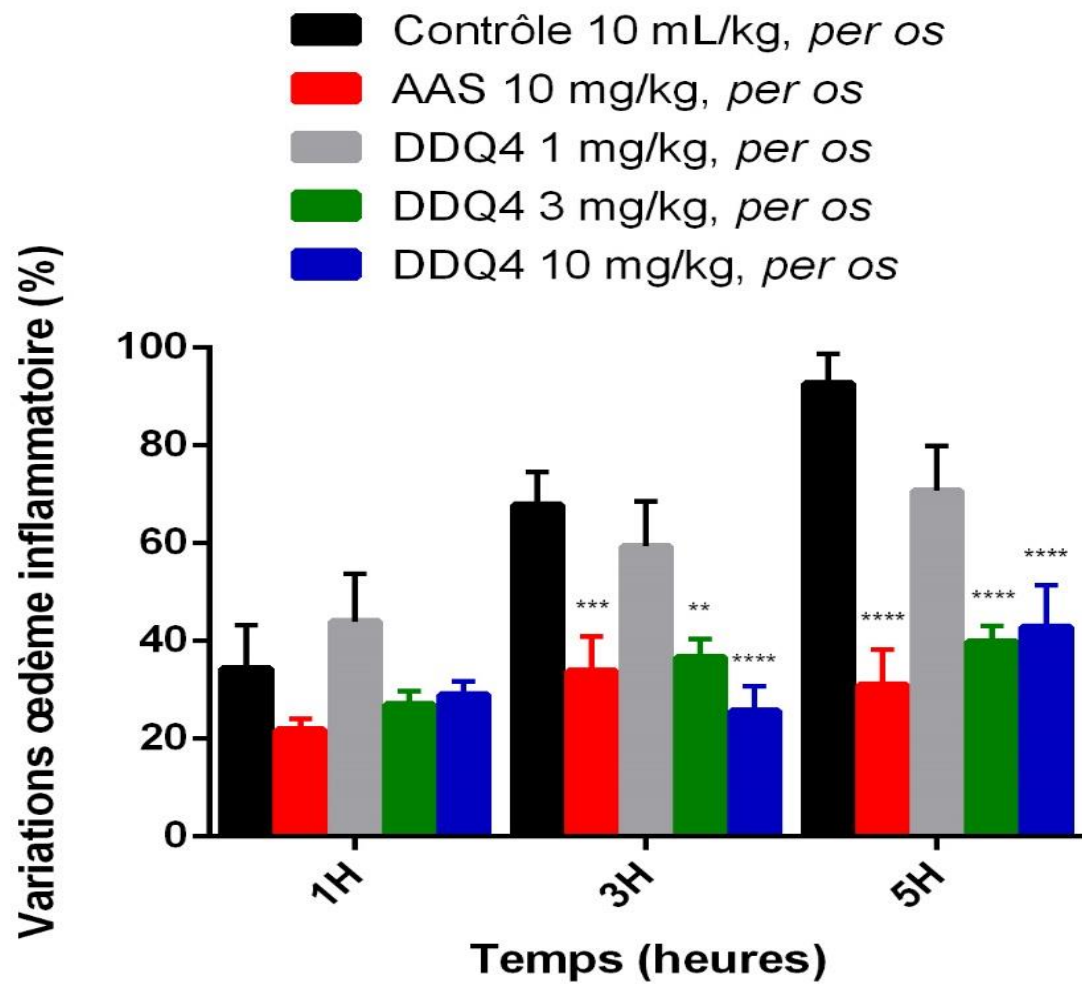


Figure 118 : Activité anti-inflammatoire de DDQ4

✓ **Administration per os de DDQ5 et DDQ6 (1 et 3 mg/kg)**

L'activité anti-inflammatoire de DDQ5, *per os* est moins importante que celles précédemment observées avec DDQ2, DDQ3 et DDQ4. A 1 et 3 mg/kg, les variations de l'œdème inflammatoire sont respectivement $52,35 \pm 6,22\%$ et $42,18 \pm 3,41\%$ (Tableau 38 et 39, Figure 119).

Tableau 38 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, *per os* de DDQ5

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	168	4,68	5,15	10,04	6,31	34,83	6,12	30,77	6,43	37,39	6,17	31,84
R2	188	4,45	5,76	29,44	6,09	36,85	6,31	41,80	6,45	44,94	6,97	56,63
R3	187	4,52	5,62	24,34	6,62	46,46	6,70	48,23	7,02	55,31	7,66	69,47
R4	142	4,41	5,56	26,08	5,69	29,02	5,85	32,65	6,55	48,53	6,90	56,46
R5	149	4,31	5,66	31,32	6,49	50,58	5,27	22,27	5,79	34,34	6,35	47,33
M %AUG				24,24		39,55		35,14		44,10		52,35
SEM				3,76		3,94		4,51		3,78		6,22

Tableau 39 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 3 mg/kg, *per os* de DDQ5

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	200	4,81	5,46	13,51	5,75	19,54	6,02	25,16	6,44	33,89	6,76	40,54
R2	195	4,59	5,74	25,05	5,47	19,17	5,95	29,63	6,38	39,00	6,44	40,31
R3	160	4,53	5,52	21,85	5,69	25,61	5,86	29,36	5,98	32,01	6,35	40,18
R4	160	4,66	5,28	13,30	5,70	22,32	6,02	29,18	6,67	43,13	6,28	34,76
R5	170	4,21	5,29	25,65	5,83	38,48	6,08	44,42	6,58	56,29	6,53	55,11
M %AUG				19,88		25,02		31,55		40,86		42,18
SEM				2,72		3,56		3,32		4,32		3,41

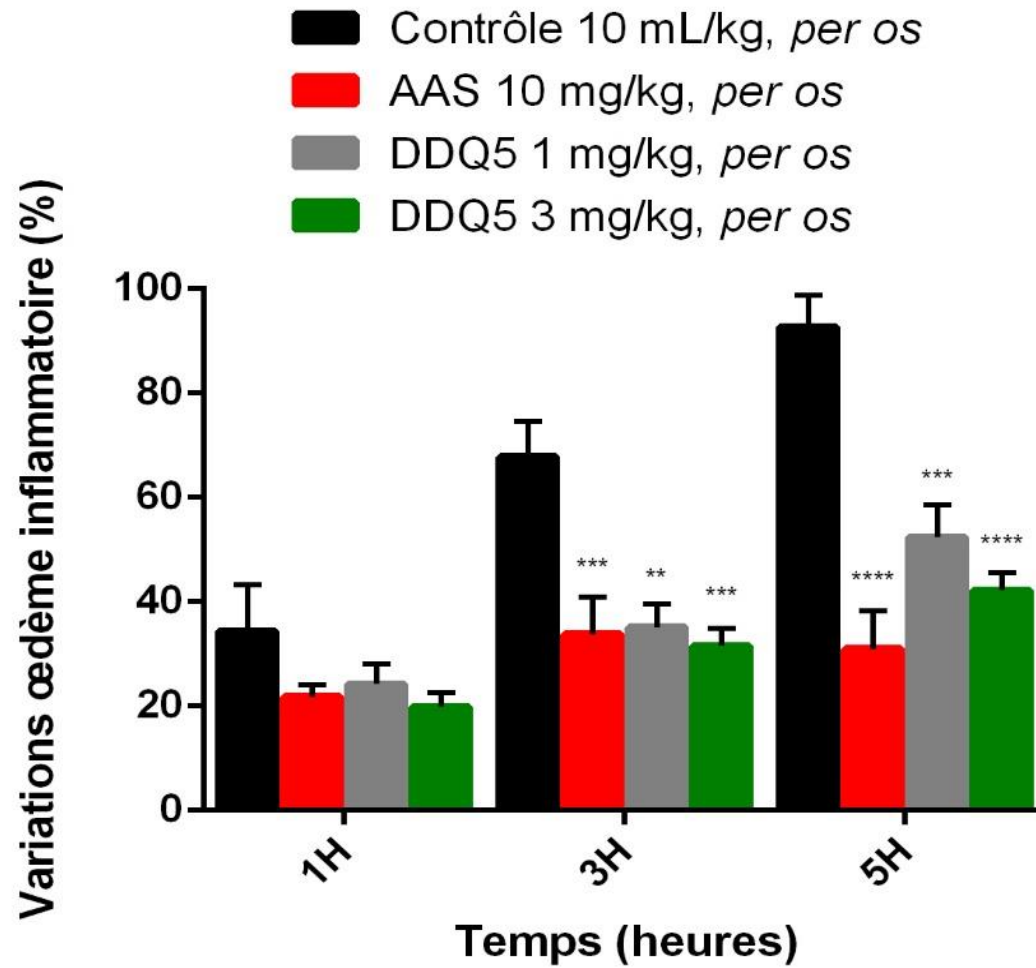


Figure 119 : Activité anti-inflammatoire de DDQ5

✓ **Administration per os de DDQ6 (1 et 3 mg/kg)**

Les résultats similaires ont été observés avec DDQ6. Les variations de l'œdème inflammatoire à 1 et 3 mg/kg sont respectivement $43,22 \pm 5,73\%$ et $41,96 \pm 4,64\%$ (Tableau 40 et 41, Figure 120).

Tableau 40 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 1 mg/kg, *per os* de DDQ6

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	128	4,18	4,48	7,18	4,91	17,46	5,20	24,40	5,41	29,43	5,25	25,60
R2	137	4,31	5,45	26,45	5,68	31,79	5,90	36,89	6,49	50,58	6,28	45,71
R3	150	4,29	5,15	20,05	5,19	20,98	5,87	36,83	6,41	49,42	6,92	61,31
R4	175	4,62	5,78	25,11	5,88	27,27	6,16	33,33	6,25	35,28	6,65	43,94
R5	120	4,22	5,17	22,51	5,48	29,86	5,89	39,57	5,72	35,55	5,89	39,57
M %AUG				20,26		25,47		34,21		40,05		43,22
SEM				3,45		2,71		2,64		4,21		5,73

Tableau 41 : Variation de l'œdème aigu de la patte de rat après administration de 3 mg/kg, *per os* de DDQ6

N°	Poids (g)	D0 (mm)	D1h (mm)	%AUG1	D2h (mm)	%AUG2	D3h (mm)	%AUG3	D4h (mm)	%AUG4	D5h (mm)	%AUG5
R1	135	4,28	4,83	12,85	5,58	30,37	5,75	34,35	5,90	37,85	6,14	43,46
R2	130	4,31	5,47	26,91	5,71	32,48	6,24	44,78	6,62	53,60	6,69	55,22
R3	120	4,20	4,85	15,48	4,91	16,90	5,25	25,00	6,00	42,86	6,00	42,86
R4	145	4,22	4,70	11,37	5,12	21,33	5,96	41,23	5,91	40,05	6,00	42,18
R5	120	4,18	4,56	9,09	5,27	26,08	5,68	35,89	5,92	41,63	5,27	26,08
M %AUG				15,14		25,43		36,25		43,20		41,96
SEM				3,12		2,86		3,38		2,73		4,64

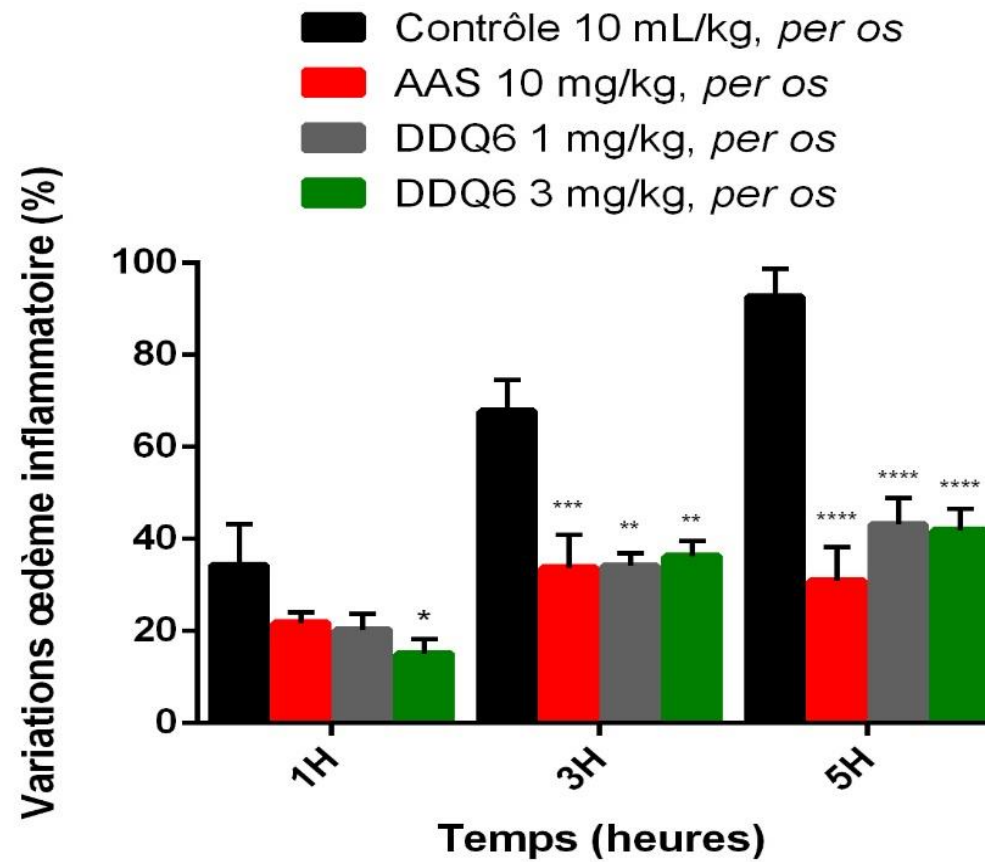


Figure 120 : Activité anti-inflammatoire de DDQ6

II.2. Résultats de l'activité analgésique

II.2.1. Activité analgésique du contrôle (eau physiologique) et de la référence (Acide acétylsalicylique-AAS)

-Induction de la douleur après administration *per os* de l'eau physiologique

L'injection intrapéritonéale (ip) d'une solution d'acide acétique à 3%, après gavage des souris avec de l'eau physiologique (10 mL/kg, *per os*), induit une douleur qui se traduit par des contorsions. Le nombre de contorsions est de $78,25 \pm 4,5$ (Tableau 42).

Tableau 42 : Contorsions chez la souris après administration de l'eau physiologique 10 mL/kg, *per os*

N° Souris	Poids (g)	Temps de latence (mn)	Nbre de contorsions
S1	20	7,00	69,00
S2	21	7,00	82,00
S3	23	6,00	89,00
S4	21	5,00	73,00
S5	23	8,00	50,00
Moyenne		6,60	72,60
ESM		0,51	6,64

-Prévention de la douleur après administration *per os* de l'acide acétylsalicylique (AAS)

L'acide acétylsalicylique (AAS) (100 mg/kg, *per os*) prévient la douleur induite par l'acide acétique. Le nombre de contorsions est significativement différent de celui du contrôle $26,80 \pm 4,66$ versus $72,60 \pm 6,64$ ($P < 0,001$, $n= 5$) (Tableau 43).

Tableau 43 : Effet analgésique de l'AAS (100 mg/kg *per os*) chez la souris

N° Souris	Poids (g)	Temps de latence (mn)	Nbre de contorsions
S1	20	7,00	12,00
S2	20	7,00	21,00
S3	21	9,00	34,00
S4	20	5,00	38,00
S5	20	5,00	29,00
Moyenne		6,60	26,80
ESM		1,67	4,66

II.2.2. Activité analgésique chez la souris de DDQ2, DDQ3, et DDQ4

- **Prévention de la douleur induite par l'acide acétique après administration de DDQ2 (1 et 3 mg/kg, *per os*)**

L'injection ip d'acide acétique à 3% après traitement par DDQ2 (1 et 3 mg/kg, *per os*) s'associe à une prévention de la douleur. En effet, à la dose de 1 et 3 mg/kg, le nombre de contorsions est respectivement de $30 \pm 5,43$ et $40,25 \pm 3,75$ versus $78,25 \pm 4,50$ dans le groupe contrôle ($P < 0,001$, $n=4$) (Tableaux 44, 45 et 46, Figure 121).

Tableau 44 : Effet analgésique de DDQ2 (1 mg/kg, *per os*) chez la souris

N° Souris	Poids (g)	Temps de latence (mn)	Nbre de contorsions
S1	22	9,00	45,00
S2	25	10,00	19,00
S3	24	12,00	28,00
S4	25	11,00	28,00
Moyenne		10,50	30,00
ESM		0,65	5,43

Tableau 45 : Effet analgésique de DDQ2 (3 mg/kg, *per os*) chez la souris

N° Souris	Poids (g)	Temps de latence (mn)	Nbre de contorsions
S1	30	6,00	32,00
S2	43	7,00	38,00
S3	32	7,00	41,00
S4	35	5,00	50,00
Moyenne		6,25	40,25
ESM		0,48	3,75

Tableau 46 : Effet analgésique de DDQ2 (10 mg/kg, *per os*) chez la souris

N° Souris	Poids	Temps de latence ()	Nbre de contorsion
S1	29	9,00	28,00
S2	31	10,00	3,00
S3	30	6,00	71,00
S4	30	8,00	39,00
Moyenne		8,25	35,25
SEM		0,85	14,10

- **Prévention de la douleur induite par l'acide acétique après administration de DDQ3 (1 et 3 mg/kg, *per os*)**

La prévention des contorsions après traitement par DDQ3 (1 et 3 mg/kg, *per os*) est moins importante que celle observée avec DDQ2 dans les mêmes conditions. La prévention des contorsions reste toutefois significative vis-à-vis du groupe contrôle.

Tableau 47 : Effet analgésique de DDQ3 (1 mg/kg, *per os*) chez la souris

N° Souris	Poids (g)	Temps de latence (mn)	Nbre de contorsions
S1	21	6,00	34,00
S2	20	7,00	53,00
S3	21	8,00	63,00
S4	20	8,00	45,00
Moyenne		7,25	48,75
SEM		0,41	5,32

Tableau 48 : Effet analgésique de DDQ3 (3 mg/kg, *per os*) chez la souris.

N° Souris	Poids (g)	Temps de latence (mn)	Nbre de contorsions
S1	22	6,00	51,00
S2	24	9,00	51,00
S3	24	7,00	41,00
S4	23	6,00	51,00
Moyenne		7,00	48,50
SEM		0,71	2,50

- **Prévention de la douleur induite par l'acide acétique après administration de DDQ4 (300 µg/kg et 1 mg/kg *per os*)**

DDQ4 prévient de façon dépendante de la dose les contorsions induites chez la souris par l'acide acétique. En effet, à la dose de 300µg/kg et 1 mg/kg *per os*, le nombre de contorsions est respectivement $53,75 \pm 7,26$ et $28,25 \pm 5,48$ (Tableaux 49 et 50, Figure 121).

Tableau 49 : Effet analgésique de DDQ4 (300 µg/kg, *per os*) chez la souris

N° Souris	Poids (g)	Temps de latence (mn)	Nbre de contorsions
S1	22	7,00	32,00
S2	21	4,00	62,00
S3	24	9,00	61,00
S4	20	6,00	60,00
Moyenne		6,50	53,75
SEM		1,04	7,26

Tableau 50 : Effet analgésique de DDQ4 (1 mg/kg, *per os*) chez la souris

N° Souris	Poids (g)	Temps latence (mn)	Nbre de contorsions
S1	28	6,00	10,00
S2	28	6,00	29,00
S3	33	18,00	10,00
S4	34	5,00	64,00
Moyenne		8,75	28,25
ESM		3,46	5,48

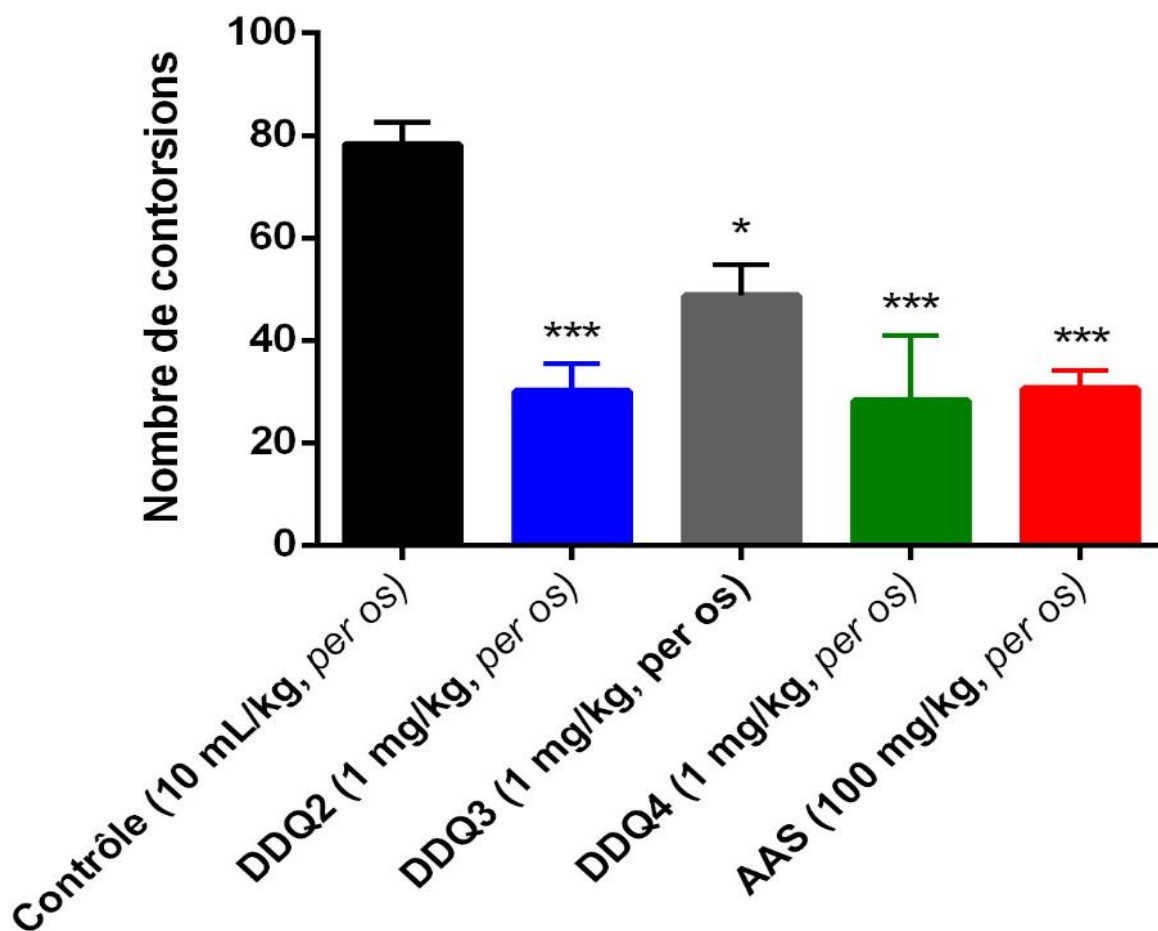


Figure 121 : Activité analgésique de DDQ3, DDQ2 et DDQ4

II.3. Conclusion partielle sur l'évaluation des tests inflammatoires et analgésiques

Dans la présente étude, nous nous sommes exclusivement basés sur les molécules triterpénoïdes isolés de *Raphionacme vignei*. Ils ont été soumis à l'évaluation de leur activité analgésique et anti-inflammatoire respectivement sur les souris et les rats albinos.

En effet, dans cette étude, la procédure expérimentale est constituée de l'expérimentation à la carraghénine à 1% pour l'induction d'œdème inflammatoire et l'induction de douleur à l'acide acétique 3% qui sont couramment utilisées lors de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des drogues végétales. Dans les conditions de l'expérience, l'effet n'est considéré comme intéressant que si l'évolution de l'œdème n'excède pas 50% [151].

Nous constatons qu'à 1 heure, l'œdème inflammatoire n'est pas remarquable. Ce qui trouve son explication du fait que la carraghénine (agent phlogogène) est un mucopolysaccharide sulfaté provenant d'une Rhodophyceae qui provoque l'inflammation typiquement liée à l'activation de

la cyclooxygénase [162]. Cette inflammation est biphasique. En effet, il est connu que chez l'animal la carraghénine, dans la première phase provoque la synthèse de médiateurs chimiques tels que l'histamine, la sérotonine... qui entretiennent l'inflammation. Dans la seconde phase cette molécule induit la synthèse des prostaglandines, des protéases et des lysosomes. Cette dernière étape est sensible aux antagonistes de synthèse des prostaglandines et aux anti-inflammatoires naturels ou de synthèse, tels que les glucocorticoïdes [163].

L'œdème inflammatoire de la patte de rat induit par la carraghénine est associé à trois (3) phases distinctes, la première phase est précoce, médiée par la dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine et de sérotonine (1 h), la seconde phase (60 à 150 mn) se caractérise par : la libération de la bradykinine (douleur), et une production ultérieure d'écosanoides en phase tardive (3 à 5 h) [152].

Des composés triterpéniques de *Cauliophyllum robustum* seraient associés à une activité anti-inflammatoire via l'inhibition de iNOS et de TNF-kB stimulés par LPS sur les cellules RAW264.7 [153].

De même, une autre étude des composés phénoliques des métabolites de *Phellinus baumii*, un champignon comestible contenant des stéroïdes (proches des triterpènes) a montré une activité anti-inflammatoire sur NO, CO-2 et TNF-kB [154].

TROISIEME PARTIE
TRAVAUX EXPERIMENTAUX AUX ETUDES
PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE

Chapitre 1 : Étude phytochimique et biologique sur *Neocarya macrophylla*

I. Étude phytochimique sur *Neocarya macrophylla*

I.1. Matière végétale

Les feuilles, écorces et racines de *Neocarya macrophylla* ont été récoltées au mois de janvier 2018 dans la région de Sédhiou (Sénégal). Les différentes parties de la plante ont été séchées pendant un mois et demi à l'abri des rayons solaires à la température ambiante du Laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux (LCPM) de l'Université Assane Seck de Ziguinchor (Sénégal). Après broyage et pulvérisation, les poudres fines (100 g pour chaque matière végétal) ainsi obtenues ont été utilisées comme matière première pour les extractions.



Figure 122 : les régions de récolte de *Neocarya macrophylla* ([Sédhiou \(région\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9dhiou_(r%C3%A9gion)) — [Wikipédia \(wikipedia.org\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9dhiou_(r%C3%A9gion))03/06/2022)

I.2. Extraction, et Screening phytochimique et purification des différents extraits des écorces et feuilles de *Neocarya macrophylla*

I.2.1. Extraction des métabolites secondaires de *Neocarya macrophylla*

100 g de poudre des feuilles ou d'écorces de *Neocarya macrophylla* sont placées dans un ballon de 1 litre puis solubilisé avec 700 ml d'éthanol. Le mélange est maintenu sous agitation

vigoureuse à l'aide d'un barreau aimanté pendant 24 h. Le brut obtenu après filtration sur Buchner et évaporation à sec est pesé. Une série d'extractions liquide – liquide a été réalisée à l'aide d'une ampoule à décanté en utilisant 3 fois 100 ml des solvants de polarité croissante (heptane, CH₂Cl₂, AcOEt, et BuOH). Chaque extrait est évaporé à sec, la phase aqueuse quant à elle lyophilisée. Le diagramme d'extraction est schématisé en figure 123.

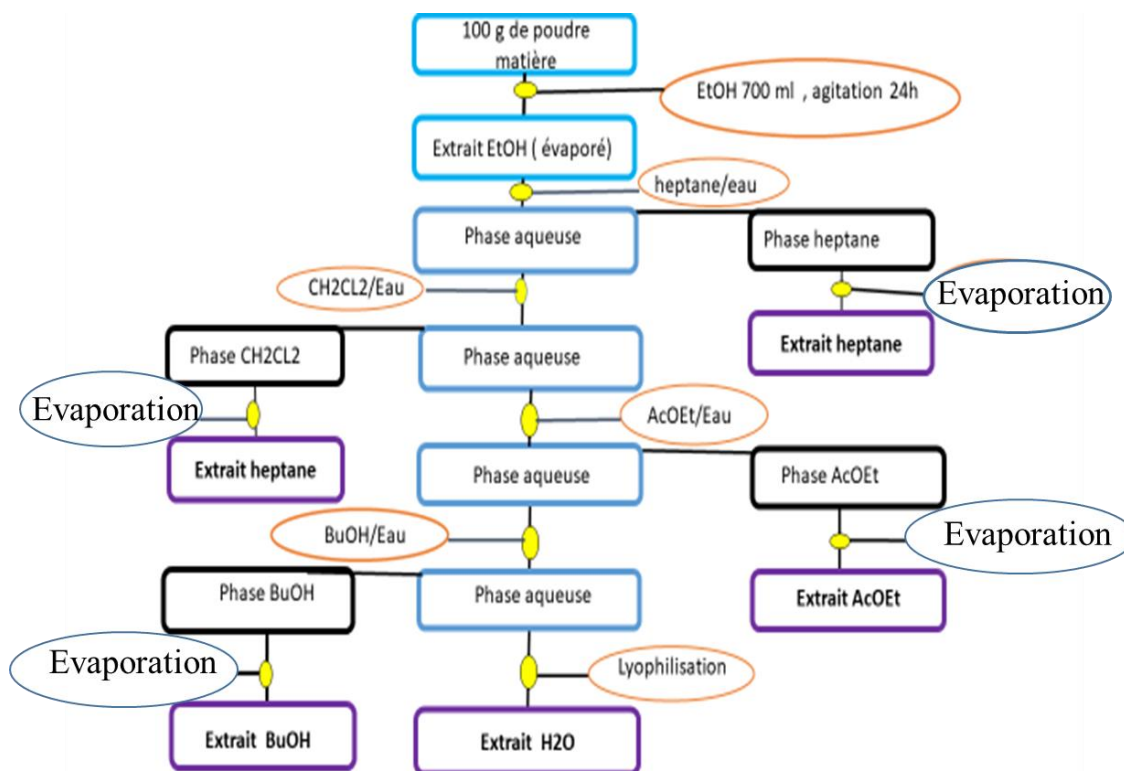


Figure 123 : Diagramme d'extraction liquide-liquide des feuilles et écorces de *Neocarya macrophylla*

I.2.2. Screening phytochimique des différents extraits de *Neocarya macrophylla*

Après obtention des divers extraits, un screening phytochimique des extraits a été effectué pour déterminer de façon qualitative les différentes familles de produits naturels présents dans les extraits obtenus. Ainsi, ce screening permet d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique des extraits. Les tests screening que nous avons réalisé au laboratoire concernent : les stérols et triterpènes, les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins, les substances quinoniques libres ou combinées, les alcaloïdes, les saponines en utilisant les modes opératoires décrits dans la littérature [155 ; 156].

I.2.2.1. Les stérols et les polyterpènes

Pour mettre en évidence les stérols et les polyterpènes, nous avons utilisé le réactif de Lieberman qui utilise un mélange de 1 ml d'anhydride acétique et d'acide sulfurique en

proportion 1/0,5. L'extrait à analyser est ajouté au réactif de Lieberman et chauffé pour permettre sa dissolution. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive et confirme la présence de stéroïdes et de polyterpènes. Cet essai a été effectué avec une solution chloroformique témoin de cholestérol ou de sitostérol.

I.2.2.2. Les polyphénols

Pour mettre en évidence les polyphénols, la réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) est utilisée. Ainsi, à 2 mL de chaque solution d'extrait est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. 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.

I.2.2.3. Flavonoïdes

Pour mettre en évidence les flavonoïdes, la réaction dite "la cyanidine" a été utilisée mettant en jeu une solution d'HCl dans l'éthanol (alcool chlorhydrique et des copeaux de magnésium). Deux (2) mL de chaque extrait ont été évaporés et le résidu a été repris dans 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose, orangée ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes. Une solution alcoolique de quercétine a été utilisée pour servir de témoin.

I.2.2.4. Les tannins

- Les tanins catéchiques sont identifiés par le réactif de STIASNY (Formol 30%, HCl concentré : 1/0,5). Chaque extrait (5 mL) a été évaporé à sec. Après ajout de 15 mL du réactif de STIASNY au résidu, le mélange a été maintenu au bain-marie à 80 °C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons caractérise les tanins catéchiques.

- Les tannins galliques sont identifiés par ajout de FeCl_3 . En effet, nous avons filtré la solution précédente. Le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl_3 à 2% provoque l'apparition d'une coloration bleu noir intense dénotant la présence de tanins galliques. Une solution alcoolique d'acide gallique ou de catéchine est utilisée pour servir de témoin.

I.2.2.5. Les substances quinoniques libres ou combinées

Pour mettre en évidence les substances quinoniques libres ou combinées, nous avons utilisé le réactif de BORNTRAEGER (d'acide chlorhydrique au 1/5 ; le chloroforme et l'ammoniac dilué 2 fois). En effet, deux (2) mL de chacun des extraits ont été évaporés à sec. Le résidu est trituré

dans 5 mL d'acide chlorhydrique au 1/5. Le triturât est porté ensuite au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 20 mL de chloroforme. L'ammoniac dilué 2 fois (0,5 mL) a été ajouté à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violet constituait le signe de la présence de quinones.

I.2.2.6. Les alcaloïdes

Pour mettre en évidence les alcaloïdes, les réactifs de DRAGENDORFF (réactif de l'iodobismuthate) et de BOUCHARDAT (réactif iodoioduré) ont été utilisés. En effet, six (6) mL de chaque solution ont été évaporés à sec. Le résidu 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 indiquait une réaction positive.

I.2.2.7. Les 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 (s) puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm, indique la présence de saponosides.

I.2.3. Présentation des équipements utilisés dans la Purification et la caractérisation des différents métabolites des extraits de *Neocarya macrophylla*

I.2.3.1. Matériel chromatographique analytique

I.2.3.1.1. Chromatographie sur couche mince CCM

a. Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique simple permettant de visualiser la composition d'un mélange. La précision du nombre de composé présent dans un mélange dépend de leur différence d'affinité avec la phase stationnaire (silice) et la phase mobile (éluant) choisie.

b. Méthode

La chromatographie sur couche mince consiste d'abord à dissoudre l'échantillon dans un solvant approprié puis de le déposer à l'aide d'un capillaire de la solution à 1 cm du bord inférieur de la plaque. Les plaques utilisées en CCM sont essentiellement des plaques de silice sur support en aluminium en phase normale ou C18, Silicagel 60 F254, 250 µm (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées par une phase mobile. L'observation des CCM s'effectue sous UV (254 et/ou 365 nm) ou en lumière visible à l'aide

d'un révélateur approprié. Les révélateurs utilisés au laboratoire sont : l'acide sulfurique à 50% dans l'eau ou la vanilline (figure 124).

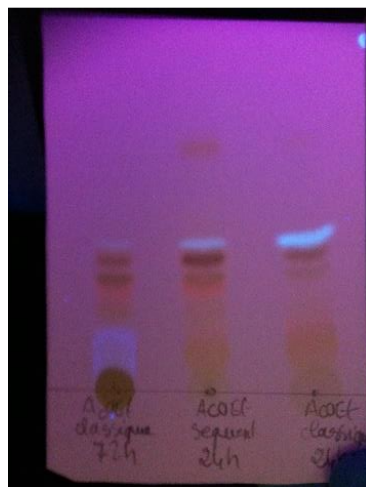


Figure 124 : CCM extrait AcOEt des feuilles , éluant : heptane / AcOEt (7/3), UV 365 nm

I.2.3.1.2 Chromatographie gazeuse (GC)

a. Principe

La chromatographie gazeuse est un procédé de séparation de composés présents dans un mélange. L'analyse de solutés liquides impose de pouvoir les vaporiser par chauffage, ils doivent donc être thermostables et suffisamment volatiles.

b. Méthode

L'équipement sur lequel les analyses ont été réalisées est Fisher Thermoscientific, type de colonne :DIB 5% phenyl, Plage de température 50-250°C, température du détecteur : 250°C, température de l'injecteur :250°C. La solution contenant le mélange de composés dissouts est injectée dans l'instrument dans lequel il est vaporisé, puis il se mêle à un flux gazeux (hélium) qui transporte l'échantillon jusqu'au colonne. Les molécules présentes dans l'échantillon sont séparées selon leur volatilité, et leur affinité avec la phase stationnaire qui tapisse l'intérieur de la colonne. Ils sortent de la colonne (éluant) à un temps caractéristique appelé temps de rétention. Enfin, le détecteur mesure la quantité de chaque composé en sortie de colonne (figure 125).

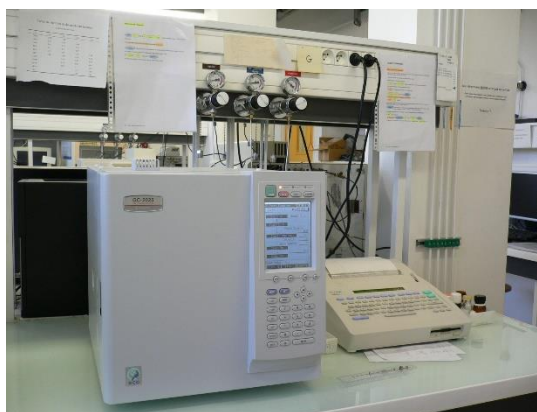


Figure 125 : Appareil de la Chromatographie gazeuse (GC)

I.2.3.1.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

a. Principe

Les chaînes HPLC analytiques présentes sur la plateforme CAP nous ont permis de visualiser la répartition des constituants des phases sup/inf lors du choix des systèmes biphasiques avant la séparation CPC dans le cas des extraits polaires. Elle est utilisée pour quantifier le degré de pureté d'un échantillon ou les regroupements des différentes fractions obtenues après purification par chromatographie sur flash ou par méthode CPC.

b. Méthode

L'équipement HPLC est ULTIMATE3 000 de chez Dionex. Le type de colonne que nous avons tout au long de nos analyses est Synchronis C18 (Thermoscientific), dimension colonne (mm) : 150 x 4,6, 3 μ m, le volume est de 5 μ L pour chaque injection et la température du four est fixée à 40 °C, le détecteur DAD : 190-400 nm, un débit 0,8 ml/min en mode gradient ou isocratique. Les phases mobiles utilisées sont des combinaisons miscibles d'eau et acétonitrile (voie B : CH₃CN, voie C : H₂O). (figure 126)

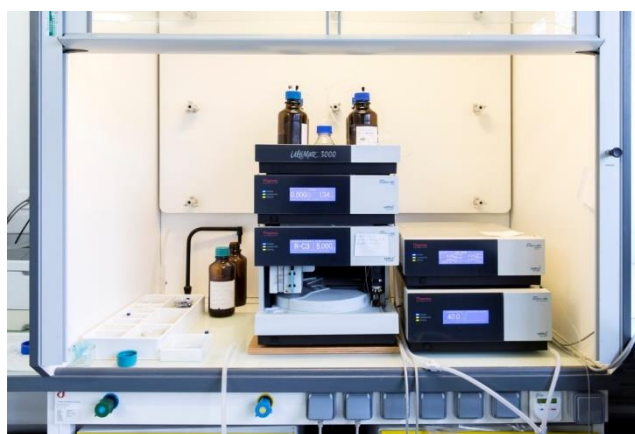


Figure 126 : Appareil de la Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

I.2.3.1.4. Chromatographie liquide couplée à la masse (LC/MS)

a. Principe

La chromatographie liquide couplée à la masse permet la séparation et l'identification des masses moléculaires composés présents dans le mélange.

b. Méthode

L'appareillage de la chromatographie liquide couplée masse ultime 3000MSQ+ THERMOSCIENTIFIC d'un analyseur à simple quadripôle ; d'un détecteur UV et masse ; d'une gamme de masse de 100-2000 g/mol et d'une source d'ionisation disponibles : ESI et APCI avec possibilité d'introduction directe (figure 127).



Figure 127 : Appareil de la chromatographie liquide couplée masse

I.2.3.2. Matériel chromatographique préparative

I.2.3.2.1. Chromatographie sur colonne flash

a. Principe

La chromatographie sur colonne flash permet de réaliser des séparations et purifications automatisées. Elle est basée sur l'interaction entre les composés que l'on souhaite séparer avec la phase stationnaire et la phase mobile. C'est une technique rapide et facile ce qui apporte à l'utilisateur un gain de temps, une économie de solvant et une meilleure reproductibilité.

b. Présentation de l'équipement

L'appareil utilisé pour la chromatographie sur colonne flash est un équipement Interchim avec un système de pompage à gradient quaternaire avec une pompe à double piston, Débit jusqu'à 250 ml/ min ; Pression max 35 bars ; Détecteur UV 200 à 600 nm ; Injection de 0,1 à 12 g de

brut à purifier. La phase stationnaire est contenue dans des colonnes de différents diamètres contenant de la silice normale (chromatographie en phase normale) ou greffée C-18 (chromatographie en phase inverse) (figure 128).

c. Méthodologie d'une purification

Le brut à purifier est injecté par dépôts solide ou liquide. Le choix des éluants est déterminé par CCM pour avoir une bonne séparation des composants du brut



Figure 128 : Appareil de chromatographie flash

I.2.3.2.2. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

a. Principe

La chromatographie de partage centrifuge CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative et industrielle. Elle se différencie de HPLC préparative par l'absence de support solide et par l'utilisation de systèmes biphasiques pour la purification de tous types de molécules polaires, non polaires, organiques et inorganiques en solution [170,171]. Le système biphasique est constitué de deux phases liquides non miscibles préparées par mélange de deux ou plusieurs solvants. L'une de ces phases dites stationnaire est maintenue par gravitation ou force centrifuge, la seconde dite mobile, percole à travers. La colonne CPC est constituée d'un empilement de disques sur lesquels sont gravés des cellules reliées par des capillaires.

La séparation des solutés présents dans un mélange repose sur leur coefficient de partage (K_d) dans le système biphasique sélectionné.

L'absence de support solide confère à la CPC de nombreux avantages :

- Une capacité de charge importante car la phase stationnaire est majoritaire ;
- L'absence de perte ou de dégradation d'échantillon car pas de phase stationnaire solide ;
- Un large choix de système biphasique ;
- Une diminution de la consommation en solvants et une même colonne pour tous types d'application ;

Il existe différents modes d'élution de la phase mobile en CPC :

- Mode descendant : la phase mobile est la phase inférieure et la phase stationnaire est la phase supérieure d'un système de solvants biphasiques.
- Mode ascendant : la phase mobile est la phase supérieure et la phase stationnaire est la phase inférieure d'un système de solvants biphasiques.

L'élution peut se faire aussi en mode isocratique ou en mode gradient comme en chromatographie classique. La CPC présente deux modes d'élution spécifiques : l'élution extrusion qui permet de récupérer les composés les plus retenus et qui assure la récupération totale de l'échantillon injecté, le dual mode qui permet d'alterner les phases stationnaire et mobile en cours de séparation.

b. Présentation de l'équipement CPC

Les séparations CPC ont été réalisées sur un appareil Armen Instrument équipé d'une colonne CPC de 250 ml, d'une pompe binaire (Pression max : 100 bars), d'une boucle d'injection de 10 mL, d'un détecteur UV-visible scan 200 à 600 nm, d'un collecteur de fractions. La vitesse de rotation de la colonne maximale est de 3600 tours/min (Figure 129).



Figure 129 : Appareil de chromatographie de partage centrifuge

c. Méthodologie d'une séparation

- Choix du système biphasiques

Le choix du système solvant est l'étape cruciale, il doit permettre le partage des molécules d'intérêt dans les deux phases du système biphasiques sélectionné

Usuellement par ajout de 2 mg de brut dans les différents systèmes biphasiques sélectionnés, la coloration des phases supérieures et inférieures est observée. Des CCM sont réalisées sur chacune des phases supérieure et inférieure pour permettre de visualiser la répartition des constituants dans chacune des phases.

- Séparation par CPC

Les phases supérieures et inférieures du système biphasiques sélectionné sont préparées par décantation à l'aide d'une ampoule à décanter. L'extrait à purifier est solubilisé dans 10 ml du système biphasiques, puis filtré à l'aide d'un filtre seringue de type Uptidisc GFX multicouche 25 mm, 0.45 μ m. La colonne CPC est remplie pendant 10 min à 100% à l'aide de la phase stationnaire dans le mode descendant ou ascendant sélectionné, avec un débit de 30 ml/min, à une vitesse de 500 tours/min. La phase mobile est pompée à travers la phase stationnaire jusqu'à l'équilibration du système avec un débit de 8ml/min à 1600 tours/min, pendant 10 min. L'extrait à purifier est injecté dans la colonne via la boucle d'injection puis élué et fractionné avec un débit de 3 ou 5 ml/min.

I.3. Spectroscopie RMN

a. Principe

Nos différents échantillons obtenus après purification ont été analysés par spectroscopie RMN, qui constitue actuellement la technique la plus puissante et la plus générale d'analyse structurale des composés organiques.

b. Méthode

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, et HMBC ont été enregistrés à 400 MHz sur un spectromètre Bruker de 400MHz ultra blindé piloté par une console Avance II et équipé d'un passeur d'échantillons à 60 positions. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données sont exploités. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl_3 , MeOD et D_2O dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre (figure 130).

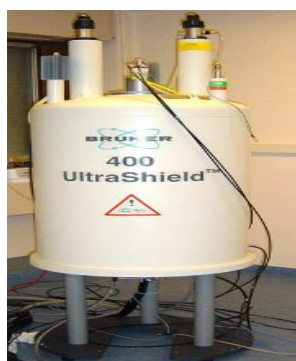


Figure 130 : spectroscopie RMN BRUKER 400MHZ

II. Étude biologique sur *Neocarya macrophylla*

II.1. Activité antidiabétique des extraits de *Neocarya macrophylla*

II.1.1. Matériel animal

Des rats de souche wistar de poids moyen compris entre 127 et 170 g ont été utilisés. Les rats sont issus de l'élevage de l'animalerie du Service de Pharmacologie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie (FMPO) de l'UCAD.

II.1.2. Essais chez des rats normo-glycémiques

Les rats ont été répartis en 2 lots de 5 puis mis à jeun pendant 14 heures avant l'expérience. Des prélèvements de sang ont été effectués sur les rats avant administration des produits. Les

rats ont été ensuite gavés comme suit : le premier lot avec de l'eau physiologique (contrôle) à 10 mg/kg, le deuxième lot avec l'extrait à tester à la dose de 30 mg/kg. Des prélèvements de sang ont été effectués toutes les heures pendant 4 heures.

II.1.3. Essais sur un test de tolérance au glucose

Les rats ont été répartis en 2 lots de 5 puis mis à jeun pendant 14 heures avant l'expérience. Le premier prélèvement sanguin a été effectué 90 min avant gavage (T-90) pour déterminer la glycémie de base. Immédiatement après, les rats ont été gavés avec de l'eau physiologique (10 mg/kg), ou de l'extrait à tester (30 mg/kg). Un deuxième prélèvement sanguin a été effectué à T0, suivi de l'administration per os d'une solution de glucose (4 g/kg). D'autres prélèvements de sang ont été effectués toutes les 30 min pendant 120 min.

II.1.4. Dosage du glucose

Le dosage a été réalisé à l'aide d'un glucomètre de type "système Free Style papillon vision".

II.1.5. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous la forme d'une moyenne \pm erreur standard à la moyenne. Ils ont été comparés à l'aide du test « t » de Student. La différence entre deux moyennes a été considérée comme significative lorsque $p < 0,05$, $n = 5$ est le nombre d'expériences dans chaque groupe.

Chapitre 2 : Étude phytochimique et biologique des racines de *Raphiocme vignei* E. Bruce

I. Étude phytochimique sur *Raphiocme vignei*

I.1. Matière végétale

Les racines de *Raphionacme vignei* ont été récoltées au mois d'août 2016 dans la région de Kédougou (Sénégal) (figure120). Les racines de *Raphionacme vignei* ont été séchées pendant un mois et demi à l'abri des rayons solaires à la température ambiante (27 °C) au Laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux (LCPM) de l'Université Assane Seck de Ziguinchor (Sénégal). La drogue séchée est broyée à l'aide d'un broyeur (type Bradender OHG Duisburg). La poudre fine (100 g) ainsi obtenue après pulvérisation a été utilisée comme matière première pour l'extraction.



Figure 120 : Les régions de récolte de *Raphionacme vignei* ([Kédougou \(région\) Wikipédia \(wikipedia.org\) 03/06/2022](https://fr.wikipedia.org/wiki/K%C3%A9dougou_(r%C3%A9gion)))

I.2. Extraction, Screening phytochimique et purification des différents extraits des racines de *Raphionacme vignei*

I.2.1. Extraction des métabolites secondaires de *Raphionacme vignei*

100 g de poudre de racines de *Raphionacme vignei* sont homogénéisés avec 1500 mL de différents solvants respectifs acétone, éthanol, eau dans un ballon de 3000 mL. Le mélange a été laissé au repos pendant 24 h puis filtré et évaporé. Chaque opération a été reprise 2 fois de suite pour augmenter le rendement. Le protocole utilisé est résumé dans la figure ci-dessous.

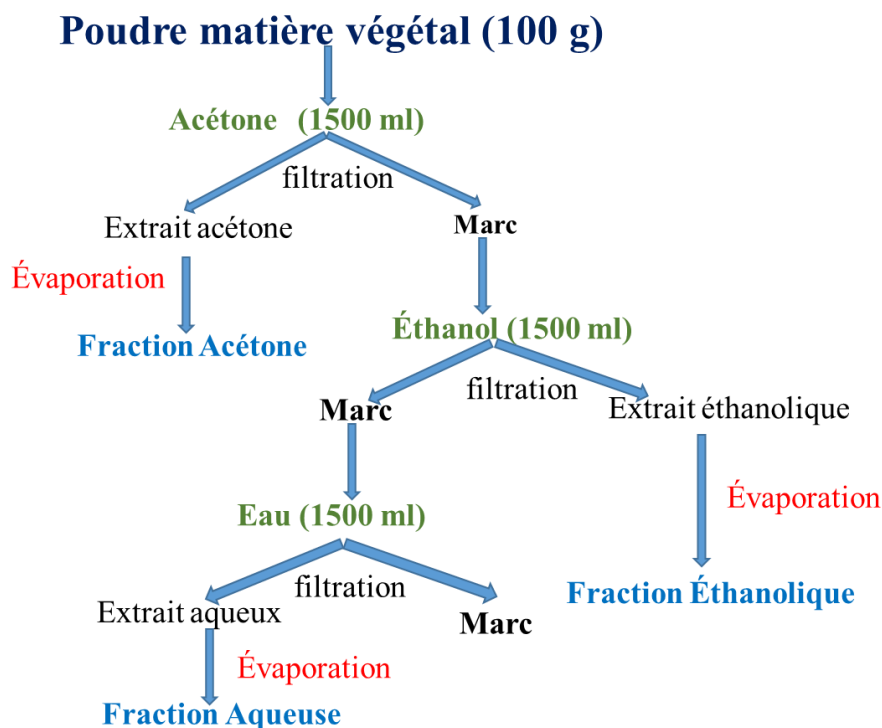


Figure 121 : Diagramme d'extraction liquide- solide des racines de *Raphionacme vignei* .

I.2.2. Screening phytochimique des différents extraits de *Raphionacme vignei*

Un screening phytochimique des extraits a été effectué pour déterminer les différentes familles de produits naturels présents dans les extraits de *Raphionacme vignei* en utilisant la même procédure que précédemment (partie expérimentale chapitre 1).

I.2.3. Purification par chromatographie sur flash de l'extrait acétone des racines de *Raphionacme vignei*

Une masse de 1,5 g de résidu sec de l'extrait acétonique a été purifié à l'aide d'un REVELERIS "Système Flash de Chromatographie" (colonne Reveleris Silica 80 g phase normale débit : 60 ml/min, équilibrage : 6,3 mn, temps de rétention : 62,5 mn), détection de pente : moyen 'seuil ELSD : 100 mV, UV seuil : 0,2 AU (longueur d'onde UV1 : 254 nm, Longueur d'onde UV2 : 254 nm, longueur d'onde UV2 215 nm), mode de collecte : collecte des pics (volume par tube : 25 ml, 25 ml non corrigé, injection type : sec) ; Moteur ELSD : isopropanol (solvant A : Ether Petroleum (EP), solvant B : appareil de type avec un système à gradient de solvant : 100% EP (10 mn), 90-10% EP/CH₂Cl₂ (10 mn), 70-30% EP/CH₂Cl₂ (10 mn), 10-90% EP/CH₂Cl₂ (10 mn), 20-80% EP/CH₂Cl₂ (10 min), 100 % CH₂Cl₂ (5 min) et 100 % MeOH (5 min) lavage a conduit à l'isolement de six composés. Les produits purs ont été collectés à l'aide d'un collecteur automatique. Au total six (6) produits nommés DDQ1A ; DDQ2A ; DDQ3A ; DDQ4A ; DDQ5A et DDQ6A, appartenant à la famille des triterpènes ont été isolés.

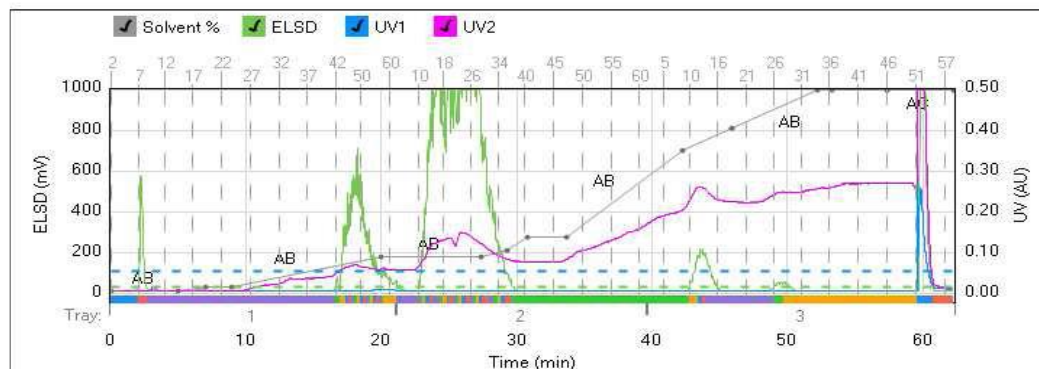


Figure 122 : Chromatographie sur flash de l'extrait acétone de *Raphiocme vignei*

Tableau 51 : bilan de purification par chromatographie sur flash de l'extrait acétone des racines de *Raphionacme vignei*.

Fractions	Masses (mg)	Produits isolés
90-109	47,4	DDQ1A
145-177	45,7	DDQ2A
182-202	96	DDQ3A
238-280	34,6	DDQ4A
300-337	23,2	DDQ5A
397-476	6,8	DDQ6A

I.3. Caractérisation des composés isolés l'extrait acétone de *Raphionacme vignei*

-Les spectres RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III sonde TCI DRX-600, fonctionnant à 600 MHz pour ^1H et 150MHz pour ^{13}C . Les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

-Les spectres de masse à basse résolution et ESIMS (mode à ions positifs et négatif) ont été enregistrés en utilisant le micro-instrument Micromass de l'ICMR. Les échantillons sont solubilisés dans le MeOH légèrement acidifié (0,01 % d'acide formique). L'injection se fait grâce à une seringue de 500 μL , avec un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

-Les spectres IR sont réalisés à l'aide d'un appareil Nicolet® Impact 410 FTIR. Une quantité de 2 mg de composé est mélangée à du KBr pulvérulent anhydre, puis la poudre est pressée pour former une pastille.

II. Étude biologique sur *Raphionacme vignei*

II.1. Matériel

II.1.1. Outils pharmacologiques

Les différentes molécules isolées de *Raphionacme vignei* : DDQ2 ; DDQ3 ; DDQ4 ; DDQ5 et DDQ6 (Figure 123).



Figure 123 : Molécules de structures triterpéniques testées

II.1.2. Matériel et Réactifs de laboratoire

- Le matériel utilisé comprend : Balance électronique de précision, type ORMA model bc (poids maximal : 100 g) ; Balance monoplateau de type Mettler model 2476 (poids maximal : 2000 g) ; Eprouvettes (10 et 1000 mL), bécher (100 et 400 mL) ; Pinces et spatules ; Pied à coulisses – digital (0 à 150 mm) ; Mortiers et pilons.
- Réactifs de laboratoire : Acide acétique à 3% dans l'eau physiologique ; Solution de carraghénine à 1% dans l'eau physiologique ; Eau distillée ; Huile de Tween 80

II.1.3. Matériel Animal

Le matériel animal utilisé pour les activités anti-inflammatoire et analgésique, est constitué de rats mâles et femelles de souche Wistar de poids moyen compris entre 120 – 200 g (Figure 126). L'étude de l'activité analgésique a été réalisée chez des souris albinos mâles et femelles de poids moyen de 41,06 g (Figure 127). Les rats sont issus de l'élevage de l'animalerie du Service de Pharmacologie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie (FMPO). Les souris proviennent de l'Institut Pasteur de Dakar.

II.2. Études pharmacologiques

II.2.1. Œdème de la patte de rat induit par la carraghénine

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vivo*, par la méthode de l'œdème de la patte de rat induit par la carraghénine 1% [157]. Les rats ont été repartis en lots de 5 ; à raison d'un lot par dose administrée. Ils ont été ensuite mis à jeun 15 heures avant l'expérimentation.

- Contrôle : Eau physiologique (10 mL/kg, *per os*)
- Acide acétylsalicylique (1 mg/kg *per os* et 10 mg/kg)
- DDQ2 (1 mg/kg, 3 mg/kg et 10 mg/kg, *per os*)
- DDQ3 (1 mg/kg, 3 mg/kg et 10 mg/kg, *per os*)
- DDQ4 (1 mg/kg, 3 mg/kg et 10 mg/kg, *per os*)
- DDQ5 (1 mg/kg, 3 mg/kg, *per os*)
- DDQ6 (1 mg/kg, 3 mg/kg, *per os*)

Pour chaque rat, l'épaisseur de la patte postérieure gauche a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisses digital, avant l'administration des différents traitements par gavage (Figure 124).



Figure 124 : Pied à coulisses Digital Caliper (150 mm)

Une injection de 100 μ L d'une solution de carraghénine à 1% dans le coussinet plantaire de la patte postérieure gauche du rat a été effectuée 1 h après gavage du produit à tester. Les

épaisseurs obtenues, ont été mesurées toutes les heures pendant 5 heures à l'aide d'un pied à coulisses (Figure 125).

+



Figure 125 : Prise de l'épaisseur de l'œdème inflammatoire chez le rat à l'aide du pied à coulisses

L'importance de l'œdème a été appréciée par la détermination de la moyenne du pourcentage d'augmentation (% AUG) de l'épaisseur de la patte de rat suivant la formule :

$$\text{AUG \%} = \frac{EP_h - EP_0}{EP_0} \times 100$$

Avec : **EP_h** = épaisseur de la patte de rat au temps T.

EP₀ = épaisseur initiale de la patte de rat

- **Description du pied à coulisse digital**

Le pied à coulisse est un appareil qui permet de mesurer l'épaisseur de la patte de rat. Il est composé essentiellement d'une règle fixe graduée, munie d'une tête comportant une face plate correspondant à la position de référence 0, et un curseur, muni d'une tête présentant une surface plate en opposition avec la face de référence.

La lecture dimensionnelle s'effectue à l'aide d'un afficheur à cristaux liquides, monté sur la partie coulissante des pieds à coulisses numériques. Ce type de technologie permet une mise à zéro (référence) du curseur pour n'importe quelle localisation des becs mobiles, et permet un enregistrement informatique *via* une prise RS-232 pour la réalisation éventuelle de contrôle statistique.

II.2.2. Test de Douleur à l'acide acétique

L'activité analgésique a été évaluée *in vivo* chez la souris, avec le modèle de douleur à l'acide acétique à 3%^[158]. Les souris ont été réparties en lots. Elles ont été ensuite mises à jeun 15 heures avant l'expérimentation. Les différentes solutions ont été administrées (n= 4).

- ✓ Contrôle : Eau physiologique (10 ml/kg, *per os*)
- ✓ Acide acétylsalicylique (1mg/kg, 3 mg/kg et 10 mg/kg, *per os*)
- ✓ DDQ2 (1 mg/kg et 3 mg/kg, *per os*)
- ✓ DDQ3 (1 mg/kg et 3 mg/kg, *per os*)
- ✓ DDQ4 (1 mg/kg, 3 mg/kg et 10 mg/kg, *per os*)

Une injection intrapéritonéale d'une solution d'acide acétique à 3% à la dose de 10 mL/kg a été effectuée une heure après gavage du produit à tester (Figure 126).



Figure 126 : Administration ip de l'acide acétique (3%) induisant la douleur dorso-abdominale chez la souris

La sensibilité à la douleur a été évaluée par le nombre de contorsions décompté pendant 30 min après l'apparition de la première réaction.



Figure 127 : Etirements des souris sous l'effet de la douleur abdominale induite par l'acide .acétique.

CONCLUSION

L'objectif principal de cette étude était d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de *Neocarya macrophylla* et de *Raphionacme vignei*.

Au cours de cette étude, nous avons effectué un screening phytochimique afin d'identifier la nature des principaux métabolites secondaires présents. Ainsi, nous avons identifié la présence d'alcaloïdes, de stérols et de polyterpènes, de flavonoïdes, de polyphénols et de saponines dans différents extraits de *Neocarya macrophylla* et de *Raphionacme vignei*.

Après le screening phytochimique, nous avons procédé à la séparation des différents constituants phytochimiques de la plante par des méthodes chromatographiques (chromatographie de partage centrifuge et la chromatographie flash) qui aboutissent à l'isolement de six composés DDQ1A, DDQ2A, DDQ3A, DDQ4A, DDQ5A, DDQ6A dans le cas de *Raphionacme vignei* et 12 composés : F5, F9, F12, F17, F1, F2, F18, F14, F10, F2', F8, et F12' dans le cas de *Neocarya macrophylla*. Ces composés sont par la suite identifiés par des méthodes spectroscopiques de la RMN mono et bidimensionnelle, homo et hétéronucléaires classiques, de spectrométrie de masse et de l'infrarouge (IR). Ces données ont été comparées avec celles de la littérature. Les composés isolés, dont un (1) nouveaux, sont classés de la façon suivante :

- Sept triterpènes de la famille des lupanes
- Sept molécules présentant des chaînes grasses non identifiées
- Un flavonoïde lié à un sucre ;
- Deux tanins galliques dont un nouveau
- Un trisaccharide ;

Les molécules (DDQ2A, DDQ3A, DDQ4A, DDQ5A, et DDQ6A) isolés de *Raphionacme vignei* ont été testées sur des modèles animaux pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire à la carraghénine 1 % chez le rat et de l'activité analgésique à l'acide acétique chez la souris.

A l'issue de l'expérimentation, il s'est avéré que toutes les structures triterpénoïdes testées, à savoir de DDQ2 à DDQ6, possèdent une activité anti-inflammatoire dépendante de la dose entre 1 à 3 mg/kg avec cependant une légère prépondérance des DDQ2, DDQ3 et DDQ4. Le pouvoir

anti-inflammatoire de ces molécules semble identique à celui de l'acide acétylsalicylique (AAS) et nettement supérieur au contrôle, solution saline isotonique (SSI).

DDQ2, DDQ3 et DDQ4 qui ont présenté de meilleurs profils anti-inflammatoires, ont également présenté des effets inhibiteurs sur la douleur induite par l'acide acétique. Cet effet est dépendant de la dose entre 300 µg et 1 mg/kg. Ce qui est nettement proche du pouvoir analgésique de l'AAS.

A retenir que ce sont les DDQ2 et DDQ4, qui possèdent les meilleurs profils à la fois du point de vue analgésique qu'anti-inflammatoire.

L'activité antidiabétique de l'extrait BuOH des écorces et les extraits AcOEt et aqueuse des feuilles de *Neocarya macrophylla* a été réalisée. Les tests de tolérance au glucose réalisés sur des rats de souche wistar ont prouvé que les trois extraits étaient actifs. Ces extraits ont fait l'objet préalable de test normo-glycémique et n'ont montré aucun effet notable sur la glycémie de base des rats.

Les résultats préliminaires sur l'extrait aqueux des écorces de *Neocarya macrophylla* ont montré que l'extrait est hypoglycémiant chez des rats normo-glycémiques et anti-hyperglycémiant sur un test de tolérance au glucose.

Un essai sur le diabète de type 2 permettra de confirmer ces activités. Par conséquent, cette étude fournit une base moléculaire pour comprendre l'utilisation de ces plantes dans la médecine traditionnelle sénégalaise.

Les résultats de l'étude de *Raphionacme vignei* sont valorisé par un article.

Perspectives :

- Poursuivre ce travail par l'isolement et la caractérisation des molécules présentes dans les extraits actifs de *Neocarya macrophylla* ;
- Confirmer les résultats de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueuse des écorces et l'extrait BuOH des feuilles de *Neocarya macrophylla* dans une deuxième série d'expériences ;
- Évaluer l'activité antidiabétique de toutes les molécules isolées ;
- Soumettre les extraits et molécules actifs à un test antidiabétique chez des rats diabétiques de type 2 ;
- Poursuivre la purification des extraits EtOH et aqueux de *Raphionacme vignei* ;

- L'évaluer de l'activité analgésique des triterpènes isolés de *Raphionacme vinei* sur la douleur d'origine centrale ;
- La recherche de modifications chimiques (hemisynthèse) des structures principales afin de potentialiser leurs activités biologiques.

ANNEXES

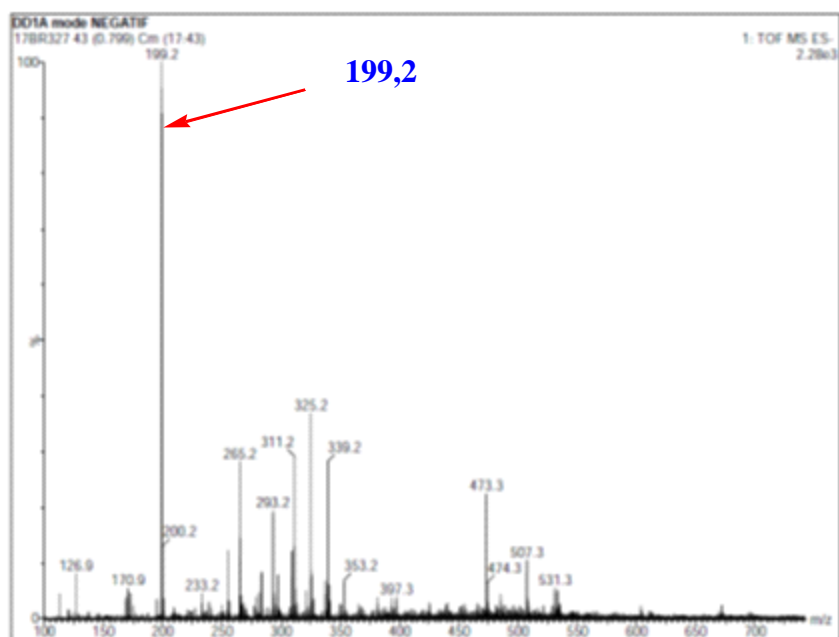


Figure 131 : Spectre de masse en mode négatif de DDQ1A et DDQ2A

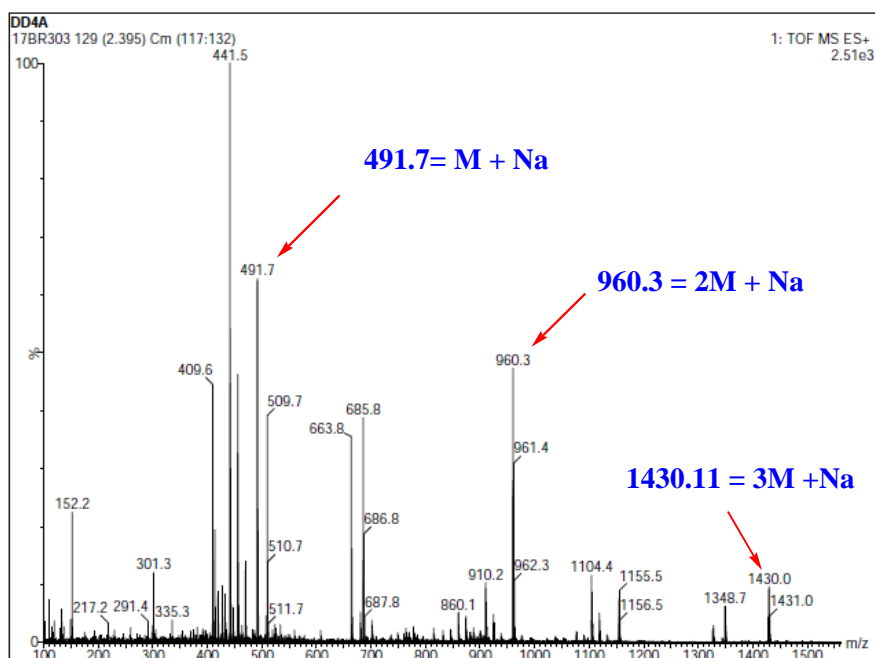


Figure 132 : Spectre de masse de DDQ3A et DDQ4A

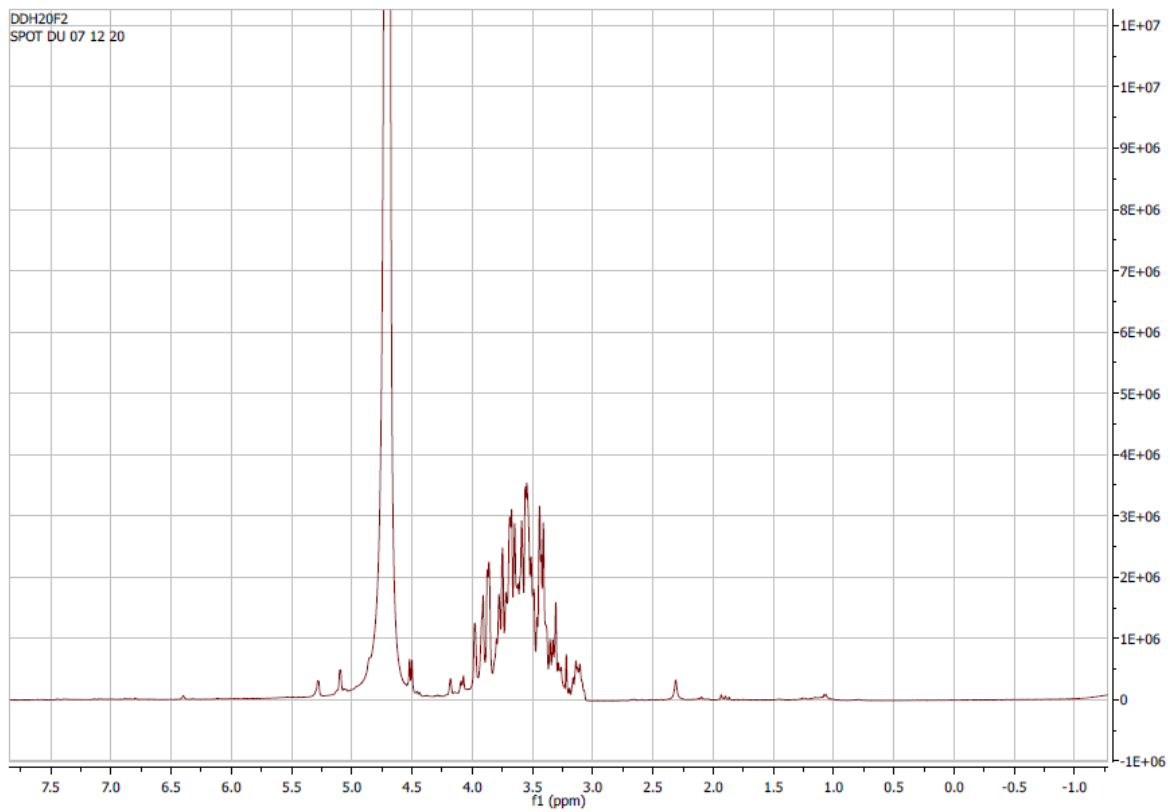


Figure 133 : Spectre de proton de F2'

RESUME

Notre étude est portée sur Les plantes médicinales *Raphionacme vignei*, et *Néocarya macrophylla* qui sont utilisées de façon traditionnelle au Sénégal pour le traitement du diabète de type II et l'inflammation. Dans un premier temps, des screening phytochimiques ont été effectués sur les différents extraits obtenus lors de l'extraction par gradient de polarités croissantes. Ces tests phytochimiques ont révélé la présence des composés phénoliques de flavonoïdes, saponines, d'alcaloïdes, de stérols et de polyterpènes.

Les études phytochimiques ont permis d'isoler six composés nommés : DDQ1A, DDQ2A, DDQ3A, DDQ4A, DDQ5B et DDQ6B dans le cas de *Raphionacme vignei* et 12 composés : F5, F9, F12, F17, F1, F2, F18, F14, F10, F2', F8, et F12' dans le cas de *Neocarya macrophylla*. Les composés isolés ont été caractérisés par les spectroscopies RMN (1D, 2D), IR et masse. La présente étude constitue la première analyse phytochimique des racines de la plante de *Raphionacme vignei*.

Les tests antidiabétiques réalisés sur des rats de souches wistar se sont révélés actifs pour les extraits BuOH et aqueux des écorces et les extraits AcOEt et aqueux des feuilles de *Neocarya macrophylla*.

Les molécules (DDQ2A, DDQ3A, DDQ4A, DDQ5A, et DDQ6A) isolés de *Raphionacme vignei* ont été testées sur des modèles animaux pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire chez le rat et l'activité analgésique chez la souris. A l'issue de l'expérimentation, il s'est avéré que toutes les structures triterpénoïdes testées, à savoir de DDQ2 à DDQ6, possèdent une activité anti-inflammatoire. Les composés DDQ2, DDQ3 et DDQ4 ont présenté de meilleurs profils anti-inflammatoires, et des effets inhibiteurs sur la douleur induite par l'acide acétique.

Mots clés : *Neocarya macrophylla*, *Raphionacme vignei*, RMN, IR, Masse, flavonoïdes, tritèpenes, antidiabétique, anti-inflammatoire et analgésique.

ABSTRACT

Our study is based on the medicinal plants *Raphionacme vignei*, and *Neocarya macrophylla* which are traditionally used in Senegal for the treatment of type II diabetes and inflammation. First, phytochemical screening was performed on the different extracts obtained during the extraction by gradient of increasing polarities. These phytochemical tests revealed the presence of phenolic compounds of flavonoids, saponins, alkaloids, sterols and polyterpenes-

Phytochemical studies isolated six compounds named: DDQ1A, DDQ2A, DDQ3A, DDQ4A, DDQ5B and DDQ6B in the case of *Raphionacme vignei* and 12 compounds: F5, F9, F12, F17, F1, F2, F18, F14, F10, F2', F8, and F12' in the case of *Neocarya macrophylla*. The isolated compounds were characterized by NMR (1D, 2D), IR, and mass spectroscopies. This study constitutes the first phytochemical analysis of the roots of the *Raphiocme vignei* plant.

Antidiabetic tests carried out on wistar rats were found to be active for BuOH and aqueous extracts of the bark and AcOEt and aqueous extracts of the leaves of *Neocarya macrophylla*.

The molecules (DDQ2A, DDQ3A, DDQ4A, DDQ5A, and DDQ6A) isolated from *Raphionacme vignei* were tested on animal models for the evaluation of anti-inflammatory activity in rats and analgesic activity in mice. At the end of the experimentation, it was found that all the tested triterpenoid structures, namely DDQ2 to DDQ6, possess anti-inflammatory activity. Compounds DDQ2, DDQ3 and DDQ4 showed better anti-inflammatory profiles, and inhibitory effects on acetic acid-induced pain.

Keywords: *Neocarya macrophylla*, *Raphionacme vignei*, NMR, IR, Mass, flavonoids, tritpenes, antidiabetic, anti-inflammatory and analgesic.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] : M. Arbonnier, Arbres. Arbustes et Lianes des Zones Sèches d’Afrique de l’Ouest, *CIRAD-MNHN. Paris*, **2002**, 576.
- [2] : O. Sambou « Isolement, Identification et tests antibactériens des métabolites secondaires des plantes médicinales : *Morinda geminata* DC (Rubiaceae) et *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal (Icacinaceae) » UASZ, Ziguinchor, **2018**.
- [3] : R. D. Diop, M. S. Mbaye, I. Diop, C. Bassene, O. Sarr, A. A. Camara, M. T. A. Sy, K. Noba, Usages médicinales des plantes par la population riveraine du conservatoire botanique Michel Adanson de Mbour (Sénégal), *Journal of Animal & Plant Sciences*, **2019** , 40(3) : 6690-6711.
- [4] :R. Aichour, N. Benzidane, L. Arrar, N. Charef, A. Baghiani, Hepatoprotective and antiinflammatory activities of Algerian *Capparis spinosa*. L. *Annual Research & Review in Biology*, **2018**, 25(3) : 1-12.
- [5] : A. Diatta « Phytochimie, analyse structurale et activités biologiques des métabolites secondaires de *Icacina oliviformis* (poiret) Raynal (Icacinaceae) et de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) » UASZ, Ziguinchor, **2018**.
- [6] : T. Amza, I. Amadou, K. Zhu, H. Zhou, Effect of extraction and isolation on physicochemical and functional properties of an underutilized seed protein: Gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*), *international Food Research journal*, **2011**, 44 : 2843-2850.
- [7] : D. Kone, B. Diop, D. Diallo, A. Djilani, A. Dicko, Identification, Quantitative Determination, and Antioxidant Properties of Polyphenols of Some Malian Medicinal Plant Parts Used in Folk Medicine , *Macro to Nano Spectroscopy* , **2012**.
- [8] : G.T. Prance, F. White, The genera of Chrysobalanaceae: A study inpractical and theoretical taxonomy and its relevance to evolutionary biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B, Biological Sciences*, **1988**, 320: 1-184.
- [9] : A. H. Gentry, Four neotropical rainforests, *Yale University Press, New Haven, Connecticut, USA*, **1993**.

-
- [10] : R. J. Burnham, K. R. Johnson, South American palaeobotany and The origins of neotropical rainforests, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B, Biological Sciences*, **2004**, 359 : 1595-1610.
- [11] : D. E. Soltis , S. A. Smith , N. Cellinese , K. J. Wurdack , D. C. Tank , S. F. Brockington , N. F. Refulio-Rodriguez , et al , Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa, *American Journal of Botany*, **2011**, 98 : 704 -730.
- [12] : Z. Xi, B. R. Ruhfel, H. Schaefer, A. M. Amorim, M. Sugumaran, K. J. Wurdack, P. K. Endress, et al, Phylogenomics and a posteriori data partitioning resolve the Cretaceous angiosperm radiation Malpighiales, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **2012**, 109 : 17519 -17524 .
- [13] : P. K. Endress, C. C. Davis, M. L. Matthews, Advances in the floral structural characterization of the major subclades of Malpighiales, one of The largest orders of flowering plants, *Annals of Botany*, **2013**, 111: 969 -985
- [14] : D. Yakandawala , C. M. Morton , G. T. Prance , Phylogenetic relationships of the Chrysobalanaceae inferred from chloroplast, nuclear, and morphological data, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **2010**, 97 : 259-281
- [15] : C. C. Davis, C. O. Webb, K. J. Wurdack , C. A. Jaramillo , M. J. Donoghue , Explosive radiation of Malpighiales supports a Mid-Cretaceous origin of modern tropical rain forests, *American Naturalist*, **2005**, 165 :36-65
- [16] : H. Wang, M. J. Moore, P. S. Soltis, C. D. Bell, S. F. Brockington , R. Alexandre , C. C. Davis, Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests , *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* , **2009** , 106 : 3853-3858 .
- [17] : L. Bardon, J. Chamagne , K. G. Dexter , C. A. Sothers , G. T. Prance , J. Chave , Origin and evolution of Chrysobalanaceae: Insights into the evolution of plants in the Neotropics, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **2013** ,171 : 19-37
- [18] : J. Kerharo, J.G. Adam, La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques, *Paris Vigot*. **1974**.
- [19] : F.D. Ndiaye, contribution à l'étude chimique et biochimique des graines de *balanites aegyptiaca* (l) del (*simarubaceae*) et de *parinari macrophylla sabine* (*rosaceae*) , **1997** , UCAD.
- [20] : M. Balde, Etude physico-chimique et valorisation de composé bioactifs de *Parinari macrophylla sabine* (*chrysobalanaceae*), **2018** , UCAD.
- [21] : A. A. Warra, R. A. Umar, I. Sani, M. K. Gafar, A. Nasiru, A Ado, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2013**, 1(2) : 20-25.

-
- [22] : A.M. Kouyaté, Vandamme P, Diawara H, Évaluation de la production en fruits de *Detariummi crocarpum Guill. & Perr* au Mali. *Fruits*, **2006**, 61: 267-272.
- [23] : R. K, Taehee, A. Pastuszyn, D.J. Vanderjagt, R. S. Glew, M. Millson M, R. H. Glew, The nutritional composition of *Boscia senegalensis* (Anza, Dilo) in the Republic of Niger, *Journal Food Composition*, **1997**, 10:73-81.
- [24] : M. R. Jeanne, G. Sita, Les plantes ligneuses spontanées à usages culinaires au Burkina Faso. *Berichte des Sonderforschungsbereichs*, **1996**, 125-133.
- [25] : S. Boudraa, L. Hambaba, S. Zidani, H. Boudraa, Composition minérale et vitaminique des fruits de cinq espèces sous exploitées en Algérie : *Celtis australis L.*, *Crataegus azarolus L.*, *Crataegus monogyna Jacq.*, *Elaeagnus angustifolia L.* et *Zizyphus lotus L.* *Fruits*, **2010**, 65: 75-84.
- [26] : A. J. Yusuf, M. I. Abdullahi, A. K. Haruna, A. M. Musa, M. S. Abdullahi, Z. Y. Y. Ibrahim, M. E. Halilu, O. J. Odiba, Phytochemical and antimicrobial evaluations of the methanol stem bark extract of *Neocarya macropylla*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2015**, 7(1) : 477-481.
- [27] : P. S. Callaghan, A. Siriwardana, M.R. Hassett , P.D Roepe, *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (PfCRT) isoforms PH1 and PH2 perturb vacuolar physiology, *Malar Journal*, **2016**, 15 :186.
- [28] : J. Bruneton, Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. Technique et documentation. *Lavoisier 3ème édition*, **1999**.
- [29] : K. Rajnerayanama, M. Reddy, M.R. Charluvadi, D.R. Krishna, Bioflavonoids: Classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential , *Indian Journal of Pharmacology* , **2001**, 33:2-16.
- [30] : J. B. Harborne , C.A.Williams , Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **2000**, 55 : 481-504.
- [31] : A. Kuresh, A. Youdim, P. Jeremy, E. Spencer, S. Hangen , S. Rice, C. Evans, Dietary flavonoids as potential neuroprotectants , *Biologie Chemical* , **2002**, 383: 503-519.
- [32] : A. Julies, M. Christin, Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety, *Annual Review of Nutrition*, **2002** , 22: 19-44.
- [33] : R. Gerhard, Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie, *Lavoisier Tec and Doc*, **1993**, 333-339.

-
- [34] : L. L. Miguel, Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin, *Medicinal Chemistry*, **2009**, 9 (1), 31-59.
- [35] : W. Heller , G. Forkmann, « Biosynthesis of Flavonoids », *Journal Boulos Harb.*, **1993**, 499-535
- [36] : C. Delporte, N. Backhouse, S. Erazo, Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*, *Journal. Ethnopharmacology*, **2005**, 99 (1): 119-24
- [37] : L.E. Pelzer, T. Guardia, A.O. Juarez, et al, Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids, *Farmaco*, **1998**, 53(6) : 421-4.
- [38] : F. Sánchez de Medina, B.Vera , J. Gálvez , et al , Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat, *Life Science*, **2002** , 70 (26) : 3097-108.
- [39] :E. A. Asongalem, H.S.Foyet, J. Ngogang, et al , Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*, *Journal Ethnopharmacology* , **2004**.
- [40] : T. Cruz, J. Gálvez, M. A. Ocete, et al, Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats, *Life Science*, **1998**, 62 (7) : 687-95.
- [41] : B. Friesenecker, A. G. Tsai, M. Intaglietta, Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg, *International Journal Microcirc Clin Exp*, **1995**, 15: 17-21.
- [42] : E. J. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides, The effects of Plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacology Review*, **2000**, 52: 673-751.
- [43] : L.E. Pelzer, T. Guardia, A.O. Juarez, et al, Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco*, **1998** ,53 (6): 421-4.
- [44] : F. Sánchez de Medina, B. Vera, J. Gálvez, et al, Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat, *Life Science*, **2002**, 70 (26) : 3097-108.
- [45] : H. Yongmoon , *Ginkgo* terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation, *International Immunopharmacology* , **2005** , 5 (6): 1049-56.
- [46] : H.H. Park, S. Lee, H.Y. Son, S. B. Park, M.S. Kim, E.J. Choi, T.S. Singh, J.H. Ha, M.G. Lee, J.E. Kim, M.C. Hyun, T.K. Kwon, Y.H. Kim, S.H. Kim, Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells, *Archive. Pharmacology. Resarch*, **2008**, 31(10) :1303-11.

-
- [47] : P.S. Chaudhry, J. Cabrera, H.R. Juliani, et al, Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin, *Biochemical Pharmacology*, **1983**, 32 (13): 1995-8.
- [48] : M. Shimizu, T. Ito, S. Terashima, et al, Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids. *Phytochemistry*, **1984**, 23 (9): 1885-8
- [49] : K.C. Ong, H.E. Khoo, Biological effects of myricetin. *General Pharmacology*, **1997**, 29 (2): 121-6
- [50] : K.C. Ong, H.E. Khoo, Links effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats, *Life Science*, **2000**, 67 (14): 1695-705
- [51] : M. Kebièche¹, Z. Lakroun¹ , Z. Mraïhi, R. Soulimani, Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique, *Phytothérapie* **2011** , 9:274-282
- [52] : A. Basli, M. Chibane, K. Madani, N. Oukil, Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, **2012**, (10) :2-9
- [53] : P.G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *Journal of Natural Production*, **2000**, 63 (7):1035-42.
- [54] : T. Tomofuji, D. Ekuni, K. Irie, T. Azuma, Y. Endo, N. Tamaki, T. Sanbe , J . Murakami, T. Yamamoto, M. Morita, Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis, *Journal. Periodontol*, **2009**, 80 (11) : 1799-808.
- [55] : Jean-Blain C. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Review Médecine Vétérinaire*, **1998**, 149 : 911-920.
- [56] : M.T. Ben Moussa , Département de pharmacie Batna Laboratoire de pharmacognosie (3 ème année) les tanins.
- [57] : A. Sereme, J. Millogo-rasolodimby, S. Guinko, M. Nacro , proprietes therapeutiques des plantes a tanins du burkina faso *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines*, **2008** , 15 : 41 – 49.
- [58] : F. Hsu, Y. Lee, J. Cheng, antihypertensive activity of -o-galloyl-d-glucose, a phenolic glycoside from *sapzum sebzferum*, *Republic of China Journal of Natural*, **1994**, 57 (2) : 308-312.
- [59] : L. Lin, T. Chen , S. Lin , C. Chung , T. Lin , G. Wang , R. Anderson, C. Lin, C. Richardson, broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry, *BMC Microbiology* , **2013**, 13:187.

-
- [60] : C. Jean-Blain, Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins, *Review Médecine Vétérinaire*, **1998**, 149, 911- 920.
- [61] : H.M. Subeki, T. Kosaku, Y. Masahiro, Y. Osamu, M. Yoshimitsu, K. Ken , K. Sumiko, C. Trimurningsih, Y. Teruhiko , Anti-babesial and Anti-plasmodial Compounds from *Phyllanthus niruri*, *Journal of National Production*, **2005**, 68 : 537-539
- [62] : A.J. Yusuf, M. I. Abdullahi, G. A. Aleku, I.A.A. Ibrahim, C. O. Alebiosu, M. Yahaya, H. W. Adamu, A. Sanusi, M. M. Mailafiya, H. Abubakar ,Antimicrobial activity of stigmasterol from the stem bark of *Neocarya macrophylla*, *Journal of Medicinal Plants for Economic Development*, **2018**, 2(1) : 38.
- [63] : A.J. Yusuf, M.I. Abdullahi, A.K. Haruna, A.Y. Idris, A.M. Musa, Isolation and Characterization of Stigmasterol and Bis-(5, 7-diacetyl-catechin-4'- α -rhamnopyranoside) from the Stem bark of *Neocarya macrophylla* (*Sabine*) Prance (Chrysobalanaceae), *Nigerian Journal of Basic and Applied Science* , **2015**, 23(1) : 15-22.
- [64] : A . J. Yusuf, M.I. Abdullahi, A.M. Musa, A.K. Haruna, V. Mzozoyana, H. Abubakar H, Bioactive (+) -Catechin-3'-O-rhamnopyranoside from *Neocarya macrophylla* (*Sabine*) Prance (Chrysobalanaceae), *Egyptian journal of basic and applied sciences*, **2019**, 6(1): 124–136
- [65] : A.J. Yusuf, M.I. Abdullahi a, A.M. Musa b , A.K. Haruna b , V. Mzozoyana c , A .A . Biambo, H. Abubakar, A bioactive flavan-3-ol from the stem bark of *Neocarya macrophylla*, *Scientific African* 7, **2020**, e00273.
- [66] : A. J. Yusuf, M. I. Abdullahi, A. M. Musa, A. K. Haruna, V. Mzozoyana, A. Sanusi Isolation of Epicatechin from the Stem Bark of *Neocarya macrophylla* (*Sabine*) Prance (Chrysobalanaceae), *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, **2019**, 27(2): 101-107
- [67] : A. J. Yusuf, M. I. Abdullahi, A. K. Haruna, A. M. Musa, M. S. Abdullahi, Z. Y. Y. Ibrahim, M. E. Halilu, O.J. Odiba, Phytochemical and antimicrobial evaluations of the methanol stem bark extract of *Neocarya macropylla* , *Journal Chemical Pharmacology Resarch.*, **2015**, 7(1) :477-481.
- [68] : A. J. Yusuf, M. I. Abdullahi, G. A. Aleku, I. A.A. Ibrahim, C. O. Alebiosu, M. Yahaya, H. W. Adamu, A. Sanusi, M. M. Mailafiya, H. Abubakar, Antimicrobial activity of stigmasterol from the stem bark of *Neocarya macrophylla*, *Journal of Medicinal Plants for Economic Development*, **2018**, 2(1) : 38.
- [69] : C. Delporte, N. Backhouse, S. Erazo, Analgesic-antiinflammatory properties of *proustia pyrifolia*, *Journal Ethnopharmacology* , **2005**, 99 (1): 119-24.

-
- [70] : A. O. Okere, A. J. Yusuf, A.B. Shuaibu, M. I. Abdullahi, G. A. Aleku, T. Nuhu, H.Y. Ngokore, I.A. Ogunyinka, Antibacterial and anti-biofilm activities of *Neocarya macrophylla*, Against clinical bacterial isolates nigerian . *Journal. pharmacology*, **2018**, 14 (1): 111-119.
- [71] : S. Muhammad, K.J. Umar, N.A. Sani, M. A. Sokoto, Analysis of Nutrients, Total Polyphenols and Antioxidant Activity of Gingerbread Plum *Neocarya Macrophylla* Fruits from Sokoto, *International. Journal. Pure Application. Science. Technologie.*, **2015**, 29(1): 20-25.
- [72] : M. Diaby, T. Amza, G. Onivogui, X.Q. Zou, Q.Z. Jin, Physicochemical and antioxidant characteristics of gingerbread plum *Neocarya macrophylla* kernel oils, *Grasas y aceites*, **2016**, 67 (1) : 117
- [73] : H.J.T. Venter, R.L. Verhoeven, *Raphionacme moyalicus* (Periplocaceae) a new species from Kenya. *South African Journal of Botany*, **1997**, 63.
- [74] : J. Klackenberg, Taxonomy and phylogeny of the genus *Camptocarpus* s.l. (Periplocoideae, Asclepiadaceae). *Botanische Jahrbücher für Systematik*, **1998**, 120: 45-85.
- [75] : J. Klackenberg, Revision of the Malagasy genera *Pentopetia* and *Iscnolepis*, *Candollea* , **1999**, 54 : 257-339.
- [76] : J. Klackenberg, *Pentopetia viridis* Klack & Meve (Apocynaceae, Periplocoideae), a new species from Madagascar, *Candollea*, **2007**, 62 : 211-214.
- [77] : H.J.T. Venter , *South African Journal of Botany* , **2009**,75 : 292-350.
- [78] : E.A. Bruce, *Raphionacme vignei* in tropical African plants. *Kew Bulletin*, **1937**, 477.
- [79] : J. Da Silva, Development, physicochemical characterization and in vitro anti-inflammatory activity of solid dispersions of α,β amyirin isolated from . *Molecules*, **2017**.
- [80] : E. Bassène, Initiation à la recherche sur les substances naturelles. UCAD,Sénégal, **2012**, 144:35.
- [81] : L. YU, *Module en Biomedical science*, **2014**.
- [82] : J . Richard, Protection du rein contre la toxicité des anti-inflammatoire non stéroïdiens par les inhibiteurs calciques. *Archives ouvertes*, **2015**
- [83] : G.D. Brown, The biosynthesis of steroids and triterpenoids , *Natural Production Rep*, **1998**, 15 (6) : 653-696.
- [84] : 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.

-
- [85] : 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.
- [86] :M.R.Trojanowska, A.E. Osbourn, M.J. Daniels, D.R. Threlfall, Biosynthesis of avenacins and phytosterols in roots of *Avena sativa* cv. Imagine, *Phytochemistry*, **2000**, 54 (2) : 153-64.
- [87] : 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.
- [88] : 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, *European Journal Biochemistry*, **2000**, 267 (12): 3453-60.
- [89] : K. Haralampidis, M. Trojanowska, AE. Osbourn, « Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants », *Adv Biochemistry Eng Biotechnol*, **2002**, 75, 31-49.
- [90] : S.L. D . Lee, Anti-inflammatory phenolic metabolites from the edible fungus *phellinus baumii* in LPS-stimulated RAW264.7 CELLS. *Molecules*, **2017** : 22(10).
- [91] : M. Chudzik, I. Korzonek-Szlacheta., W. Krol, Triterpenes as potentially cytotoxic compounds, *Molecules*, **2015** , 25 : 1610.
- [92] : B. Hua, Anti-inflammatory triterpenoids from the *Caulophyllum robustum* Maximin LPS-stimulated RAW264.7 cells , *molecules*, **2018**.
- [93] : G. Beddos, Isolement et caractérisation des saponosides de trois plantes de la famille des araliaceae et dracaenaceae et evaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales, *Archives-ouvertes*, **2013**.
- [94] : M. Chudzik, I. Korzonek-Szlacheta, W Krol, Triterpenes as potentially cytotoxic compounds, *Molecules*, **2015**, 25-1610.
- [95] : L.H . Prin, *Réaction inflammatoire* **2006**.
- [96] : K.G. Ramesha Thimmappa, Triterpene synthesis in plants, *Annual Review Further*, **2014**,1-35.
- [97] : M. E. Mbaye, Activité anti-inflammatoire de la graine de *Carapa procera* (Melinaceae), *Review CAMES- Science Structure la matière*, **2013**.

[98] : N. Levoïn, Métabolites réactifs des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Bases structurales de leurs interactions avec les cibles protéiques impliquées dans les processus inflammatoires, **2002**.

[99] : J. M. MC. Rousselet, Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3), **2005**.

[100] : C.Gaubert, *Sciences et Avenir*, **2018**.

[101] : L.Watterlot, *Analyse des effets de souches probiotiques*, **2010**.

[102] : Collège Français des pathologies, La réaction inflammatoire, *Les inflammations*,**2012**.

[103] : L.H. Prin, *Réaction inflammatoire*, **2006** .

[104] : W. W. Lin, Karin M, A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer, *Journal of Clinical Investigation*, **2007**, 117 :1175-1183.

[105] : D. A. Dorward, C.D. Lucas, Rossi Haslett C, Dhaliwal K, Imaging inflammation , Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution, *Pharmacology & Therapeutics*, **2012**, 135 : 182-199.

[106] : B. Weill, F. Batteux, Immunopathologie et réactions inflammatoires, *Eds, De Boeck Supérieur,Paris*, **2003** , 12-23.

[107] : J.A. Rankin, Biological mediators of acute inflammation. *Advanced Practice in Acute and Critical Care*, **2004**, 15(1): 3 -17.

[108] : N.U. Das, Molecular Basis of Health and Disease, *Springer, New Work* , **2011**, 15-100.

[109] : H. Picard, Intoxication aiguë par chlorhydrate de tramadol, *Archives-ouvertes*, **2018**, 1-110.

[110] : R.H. Hans-Peter Wirtha, Les AINS et les inhibiteurs de la COX-2, *Forum Medecine Suisse* **2006**, 7:1-7.

[111] : J.C. Sol, P. Chaynes, Y . Lazoethes , Douleurs : Bases anatomiques, physiologiques et psychologiques , **2000** , 27:3-20.

[112] : M. Faure, Evaluation et soulagement de la douleur chez les ruminants: intérêt d'une approche multiparamétrique. *Archives-ouvertes*. **2019**,356: 35-48.

[113] :J. MAZOYER, Sédation temporaire, sédation terminale et usage des Opiacés: problèmes éthiques associés au traitement de la douleur en soins palliatifs, *Toulouse*,**2016** .

[114] : G.M. Abbate, P. Sacerdote, G. Amodeo, A. Mangamo, I. Levrini , Experimentally induced pulpal lesion and substance P expression effects of ketoprofen, a preliminary study. *International Journal Dent*, **2016**, 1-6.

-
- [115] : O. Gureje, Comorbidity of pain and anxiety disorders. *Curr Psy Rep* **2008** ,10 :318-322.
- [116] : M.C. Allison, A.G. Howatson, C.J. Torrance, F.D. Lee, R.I. Russel, Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *New English Journal Medecine*, **1992** , 327(11) :749-754.
- [117] : T.D. Walsh, Prevention of opioids side effects, *Journal Pain Symptom Manage*, **1990** ,5 (6) :362-367.
- [118] : P. Bongrand, Physiologie des cellules monocytaïres, macrophagiques et dendritiques, *Archives-ouvertes*, **2014**, 48.
- [119] : J . MAZOYER, Sédation temporaire, sédation terminale et usage des Opiacés: problèmes éthiques associés au traitement de la douleur en soins palliatifs, *Toulouse*, **2016**.
- [120] : H. Peter Wirtha, Les AINS et les inhibiteurs de la COX-2 *Forum Medecine Suisse*, **2006** , 7: 1-7.
- [121] : H. Amina . Hamoudi, F. zohra, Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethium graveolens*, *Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*, **2015**.
- [122] : N.M. Khalil, S. Sperotto, M.P. Manfron, Anti-inflammatory activity and acute toxicity of *Dodonaea viscosa*, *Fitoterapia*, **2006**, 77: 478-80.
- [123] : OMS, Thème de santé : le diabète ; *Aide-mémoire n° 312* , **2013**.
- [124] : P. Drouin, J. F. Blickle, B. Charbonnel, E. Eschwege, P.J. Guillausseau, J.M. Daninos, N. Balarac, J.P. Sauvanet, Diagnostic et classification du diabète sucré, Les nouveaux critères, *Diabète et Métabolisme* , **1999** , 25(1) :72-83.
- [125] : S. Halimi, G. Rostoker, J. J. Altman, C. Attali C, Traitement médicamenteux du diabète de type 2, Agence françaises de sécurité des produits de santé, *Recommandation de bonne pratique*, **1999**, 13-19.
- [126] : C.G. Östenson, The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiol.Scand*, **2001**, 171 : 241-247.
- [127] : M. ADASY , le diabète , **2001**
- [128] : Organisation mondiale de la Santé (OMS), Rapport mondial sur le diabète, avril **2016**.
- [129] : Nourou Diop, *Journal. Sud quotidien*, 11 avril **2008**.
- [130] : OMS (Organisation mondiale de la Santé), Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle, **2000**.

[131] : G.AUDO, C. LEQUEMENER, Armen instrument application : artemisinin purification from the leaves of artémisia

[132]: A. MACIUK « Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : application à l'isolement de substance naturelles » université de reims champagne-ardenne, **2005**.

[133] : A. S. Bayero, , Y. Datti , M.M. Shuaibu, A.M. Nafisatu, A.A. Asma'u, M.A. Dikko, A.H. Zakari, M. Yusuf, M, Phytochemical Screening and Antibacterial activity of the Root Bark Extracts of *Neocarya macrophylla*, *ChemSearch Journal*, **2019**,10(2): 41-45

[134] : A. Manga, A. Gassama, G.Y. Sy , E. Bassene, C . Lavaud, Structural determination of news flavones C-glycosides and trans (S, E)- (-) clovamide isolated *Icacina senegalensis* Juss leaves (Icacinaceae), *Journal Société Ouest-Africaine de Chimie*, **2013**, 035 :15-27.

[135] : M. N'Diaye, Contribution à l'étude de la fraction active antidiabétique de *l'icacina senegalensis juss (icacinaceae)*, *DEA, Chimie Production Naturelle, Fac Sciences et Technologie*, **2004**, n°16.

[136] : M. N'Diaye, W. Diatta, G.Y. Sy, A. D. Fall, B. Faye, E. Bassene, *Médecine d'Afrique Noire*, **2007**, 54(4) : 236-240.

[137] : Subeki, H. Matsuura, K. Takahashi, M. Yamasaki, O. Yamato, Y. Maede, Ken Katakura, Sumiko Kobayashi, T. Chairul, and T. Yoshihara, Anti-babesial and Anti-plasmodial Compounds from *Phyllanthus niruri*, *Journal of Naturelle Production*, **2005**, 68: 537-539.

[138] : I . Baglin, A. C. Mitaine-Offer, M. Nour, K. Tan, C. Cave, M.A. Lacaille-Dubois, A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2003**, 3: 159-165.

[139] : H. Safayhi, E.R . Sailer, Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes, *Planta Medicinal*, **1997**, 6: 487-493.

[140] : G. Bringmann, w. Saeb , L. A. Assi, G. François, A.S.S. Narayanan, K. Peters, E.M. Peters, Betulinic acid isolation from *Triphvophvllum peltatum* and *Ancistrocladus hevneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester, *Planta Medicinal*, **1997**, 63, 255-257.

[141] : E . Pisha, H. Chai, I. S. Lee, T. E. Chagwedera, N. Farnsworth, G.A. Cordell, C.W.W. Beecher, H.H. S Fong, A.D. Kinghorn, D.M. Brown, M.C. Wani, M.E. Wall, T.J. Hieken, D.

Gupta, J.M. Pezzuto, Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, *Nature Medicine*, **1995**, 1(10), 1046-1051.

[142] : H. Hepworth, *Chemical Synthesis : Studies in the Investigation of Natural Organic Products*, Londres, *READ BOOKS*, **1924**, (réimpr. 2007), 272 p. « Chapitre III - The Carbohydrates », p. 7

[143] : X. K. Fang, Y. Gao, H.Y. Yang, S.M. Lang, Q.J. Wang, B.Y. Yu, D.N. Zhu, Alleviating effects of active fraction of *Euonyus alatus* abundant in flavonoids on diabetic mice, *American Journal of Chinese Medicine*, **2008**, 36: 125-140.

[144] : V. Ragunathan, N. Sulochana, A new flavonol bioside from the flower of *Hibiscus vitifolius* Linn and its hypoglycaemic activity, *Journal of the Indian Chemical Society*, **1994**, 71: 705-706.

[145] : A.K. Jamal, W. A. Yacoob, L.B. Din, A chemical study on *phyllanthus réticulatus*, *Journal of Physical Science*, **2008**, 19 (2): 1478-1486.

[146] : C.E. Fingolo, T.S. Santos, M.D.M .Vianna Filho , M.A.C. Kaplan, Triterpene Esters Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae), *Molécules*, **2013** , 18: 4247-4256.

[147] : N.N. OKoye , D.L. Ajaghau, H.N. Okene , E.E. Ilodigwe , S.C. Nworu , F.B. OKoye, beta-amyrin and alpha- amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti- inflammatory activity, *Journal of homepage*, **2014**, 52 (11): 1478-1486.

[148]: A.H. Rasmia, M.H. Emad, A.I. Nabawya, M.N. Naglaa, Triterpènes and Cytotoxic Activity of *Acokanthera oblongifolia* Hochst, *Journal of Pharmaceutical Biologie and Chemical Sciences*, **2015**, 6(1): 1677-1687.

[149] : U.U. Pateh, A.K. Haruna, M. Garba, I . Iliya, I. M. Sule, M.S. Abubakar, A.A. Ambi, isolation of stigmasterol, β -sitosterol and 2 - hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the *Rhizomes of stylochiton lancifolius puer and Kotchy. Nig*, *Journal of Pharmaceutical Science*, **2008**, (7): 19-25.

[150] : S. Saeidnia , A. Manayi , A. R. Gohari , M. Abdollahi, Anti-babesial and Anti-plasmodial Compounds from *Phyllanthus niruri* European, *Journal of Medicinal Plants*, **2014**, 4(5): 590-609.

[151]: J.E. Messadi, Etude critique des méthodes quantitatives de l'inflammation expérimentale application pharmacologique, *Thèse pharmacie, Tunis*, **1962**.

-
- [152]: J. Massimo di rosa, Biological properties of carrageenan, *Journal of pharm* *Pharmaceutical*, **1972**, 24 : 89-102.
- [153]: X. Q. Bin-Hua, Anti-inflammatory triterpenoids from the *Caulophyllum robustum* Maximin LPS-stimulated RAW264.7 cells, *Molecules*, **2018**, 1.
- [154]: S. Lee , Anti-inflammatory phenolic metabolites from the edible fungus *phellinus baumii* in LPS-stimulated RAW264.7 CELLS, *Molecules*, **2017**, 22(10).
- [155]: F. Ronchetti, G. Russo, E. Bombardelli, et A. Bonati, A new alkaloid from *rauwolfia vomitoria* , *Phytochemistry*, **1971**, 10(60) : 1385–1388.
- [156]: 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 (Caesalpiniaceae), **2007**, *Sciences Naturelles*, 4(2) : 217–225.
- [157]: C.A. Winter, Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs, *Proceedings of the society for experimental Bioliogy and Medicine*, **1962**, 544-547.
- [158] : R. Koster , Aetic acid for analgesic screening proceeding, **1959**,18: 41.

