



**HAL**  
open science

# Études phytochimiques de plantes médicinales djiboutiennes à effets antimicrobiens et anticancéreux

Abdirahman Elmi Fourreh

► **To cite this version:**

Abdirahman Elmi Fourreh. Études phytochimiques de plantes médicinales djiboutiennes à effets antimicrobiens et anticancéreux. Chimie analytique. Université de Lorraine; Centre d'études et de recherche de Djibouti (CERD), 2018. Français. NNT : 2018LORR0160 . tel-01948696

**HAL Id: tel-01948696**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01948696v1>**

Submitted on 7 Nov 2024

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

## **Thèse de doctorat en cotutelle**

**Entre Université de Lorraine et**

**Centre d'Etudes et de Recherches de Djibouti (CERD)**

Présentée pour obtenir le grade de

**Docteur de l'université de Lorraine**

Ecole doctorale Chimie Mécanique Matériaux Physique (C2MP)

Spécialité : Chimie

# **Etudes phytochimiques de plantes médicinales Djiboutiennes à effets antimicrobiens et anticancéreux**

Présentée le 30 novembre 2018 à Nancy

Par

**ABDIRAHMAN ELMi FOURREH**

### **Membres du Jury :**

Pr. Dominique Laurain-Mattar	Directrice de thèse	Université de Lorraine
Dr. Rosella Spina	Co-directrice	Université de Lorraine
Dr. Fatouma Mohamed	Co- directrice	CERD- Djibouti
Pr Anne-Claire Mitaine-Offer	Rapporteur	Université de Bourgogne
Pr Eloi Palé	Rapporteur	Université Ouaga1 Pr JKZ
Pr Sakina Yagi	Examinatrice	Université de Khartoum

# Remerciements

Ce travail de thèse en cotutelle résulte d'une parfaite collaboration entre les deux équipes engagées en France et à Djibouti.

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement ma directrice de thèse, le Professeur Dominique Laurain-Mattar, ainsi que ma co-directrice, le Docteur Rosella Spina, de m'avoir accueilli chaleureusement au sein du Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire L2CM. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et permis de travailler dans un cadre propice à la recherche. Je vous suis reconnaissant pour votre engagement de tous les jours, pour la réussite de ce travail doctoral.

Par ailleurs, je remercie également ma seconde co-directrice, directrice de l'Institut des Recherches Médicinales (IRM) à Djibouti, le Docteur Fatouma Mohamed de m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ces trois années.

Je remercie aussi les Professeurs Anne-Claire Mitaine-Offer et Eloi Palé d'avoir bien voulu juger ce travail. Mon sincère remerciement au Professeur Sakina Yagi pour sa gentillesse, ses précieux conseils et sa participation au jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier les personnels techniques et les ingénieurs des plateformes du L2CM : François, Pascal, Fabien, Arnaud et Stéphanie, mes collègues de l'IRM à Djibouti : Ali, Chaima, Moustapha, Saredo et Souad. Mes remerciements vont également à mes collègues, aux doctorants et aux stagiaires du L2CM venus des quatre coins du monde (France, Soudan, Burkina-Faso, Iran, Luxembourg, Malaisie...) ainsi que tous les personnels de ce laboratoire.

Mes remerciements vont aussi à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS- Gif sur Yvette) en particulier Hélène et Jérôme de la plateforme CIBI pour leur collaboration dans les tests anticancéreux.

Un énorme merci à ma femme, Mouna et à mes deux filles, Aswan et Mako, qui ont enduré l'absence d'un mari et d'un père. Un merci tout particulier à ma famille dont le soutien a été essentiel tout au long de mes études.

# SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	8
TABLE DES TABLEAUX.....	9
TABLE DES FIGURES.....	11
INTRODUCTION.....	15
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
<b>Chapitre I: Etudes botanique, phytochimique et pharmacologique des plantes sélectionnées.....</b>	<b>20</b>
1 <i>Indigofera caerulea</i> .....	20
1.1 Description botanique.....	20
1.2 Distribution et habitat.....	21
1.3 Utilisations traditionnelles et industrielles.....	22
1.4 Etudes pharmacologiques.....	22
1.4.1 Genre <i>Indigofera</i> .....	22
1.4.2 Espèce <i>Indigofera caerulea</i> .....	23
1.5 Composés isolés chez le genre <i>Indigofera</i> .....	24
2 <i>Acacia seyal</i> DEL.....	29
2.1 Description botanique.....	29
2.2 Distribution et habitat.....	30
2.3 Utilisations traditionnelles et industrielles.....	31
2.4 Etudes pharmacologiques.....	31
2.4.1 Genre <i>Acacia</i> .....	31
2.4.2 Espèce <i>Acacia seyal</i> .....	32
2.5 Composés isolés chez le genre <i>Acacia</i> .....	33
3 <i>Cymbopogon commutatus</i> .....	38
3.1 Description botanique.....	38

3.2	Distribution et Habitat .....	39
3.3	Utilisations traditionnelles .....	40
3.4	Etudes pharmacologiques des huiles essentielles .....	40
3.4.1	Genre <i>Cymbopogon</i> .....	40
3.4.2	Espèce <i>Cymbopogon commutatus</i> .....	41
3.5	Etudes chimiques des huiles essentielles du genre <i>Cymbopogon</i> .....	41
<b>Chapitre II: Chimie des métabolites spécialisés.....</b>		<b>45</b>
1	Les polyphénols .....	45
1.1	Les flavonoïdes.....	48
1.2	Les phénols et acides phénoliques.....	50
1.3	Les tanins.....	51
2	Les alcaloïdes.....	52
3	Les terpénoïdes .....	54
3.1	Monoterpènes et sesquiterpènes présents dans les huiles essentielles.....	56
3.2	Triterpènes et stéroïdes .....	56
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>		<b>57</b>
1	Matériel végétal.....	58
2	Extraction.....	58
2.1	Procédure d'extraction des fruits d' <i>Indigofera caerulea Rox</i> .....	58
2.2	Procédure d'extraction de l'écorce d' <i>Acacia seyal Del</i> .....	59
2.3	Procédure d'extraction de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon commutatus</i> .....	60
3	Techniques chromatographiques analytiques .....	61
3.1	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	61
3.2	Chromatographie liquide haute performance (HPLC) analytique.....	62
3.3	Chromatographie-Liquide avec Spectrométrie de masse (LCMS).....	63
3.4	Chromatographie sur couche mince reliée à une Spectrométrie de masse (HPTLC-MS) .....	63

3.5	Chromatographie en phase gazeuse reliée à une spectrométrie de masse (GCMS)..	64
4	Techniques de séparation par chromatographie.....	64
4.1	Chromatographie sur une plaque préparative (CCM préparative) .....	64
4.2	Chromatographie sur colonne ouverte.....	65
4.3	Chromatographie préparative CombiFlash.....	65
4.4	Chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative .....	66
5	Méthodes physico-chimiques d'identification des molécules .....	67
5.1	Spectrophotomètre ultraviolet .....	67
5.2	Spectrophotométrie infra-rouge (IR).....	67
5.3	Désorption-ionisation laser assistée par matrice-ToF (MALDI-ToF)/MS <sup>2</sup> .....	67
5.4	Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	68
6	Procédés physico-chimiques .....	68
6.1	Saponification de l'extrait hexanique d' <i>Indigofera caerulea</i> .....	68
6.2	Micro émulsion des huiles essentielles.....	69
7	Dosages biochimiques et activités biologiques.....	70
7.1	Dosage des polyphénols et des flavonoïdes .....	70
7.1.1	Quantification des polyphénols .....	70
7.1.2	Quantification des flavonoïdes.....	71
7.2	Evaluation des activités antioxydantes .....	71
7.2.1	Méthode DPPH ( 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl) .....	71
7.2.2	Méthode ABTS ( 2,2'-Azino-bis(3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulphonique).....	72
7.2.3	Méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).....	72
7.3	Evaluations des activités antimicrobiennes .....	73
7.3.1	Activité antibactérienne.....	73
7.3.2	Activité antifongique.....	74
7.4	Cytotoxicité des extraits d' <i>Indigofera caerulea</i> et d' <i>Acacia seyal</i> sur cellules saines .....	75

7.5	Cytotoxicité de l'HE de <i>Cymbopogon commutatus</i> sur cellules saines et cellules cancéreuses.....	75
7.5.1	Origines et culture cellulaires.....	75
7.5.2	Détermination de l'IC50.....	77
<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>		<b>78</b>
<b>Chapitre I: Sélection des plantes à étudier.....</b>		<b>79</b>
1	Recueil des données ethnobotaniques.....	79
2	Screening des activités biologiques .....	82
2.1	Activité antibactérienne.....	83
2.2	Activité antioxydante.....	86
<b>Chapitre II: Activités biologiques et Caractérisation phytochimique d'<i>Indigofera caerulea</i>.....</b>		<b>89</b>
1	Extraction et dosages des composés phénoliques.....	89
2	Activités biologiques des extraits de fruits d' <i>Indigofera caerulea</i> .....	90
2.1	Activité antioxydante.....	90
2.2	Activités antimicrobiennes .....	92
3	Purification des extraits montrant une activité antibactérienne .....	93
3.1	Purification de l'extrait méthanolique .....	93
3.2	Purification de l'extrait hexanique .....	95
4	Caractérisation des composés isolés des fruits de l' <i>Indigofera caerulea</i> fruits.....	96
4.1	Caractérisation des composés isolés de l'extrait méthanolique.....	96
4.1.1	Identification par couplage HPTLC-MS .....	96
4.1.2	Identification du composé A .....	98
4.1.3	Identification du composé B .....	101
4.1.4	Identification du composé C .....	103
4.1.5	Identification du composé D .....	109
4.1.6	Identification du composé E.....	111

4.2	Caractérisation des composés de l'extrait hexanique .....	114
4.2.1	Identification du 'composé F' .....	114
4.2.2	Identification du composé G .....	116
<b>Chapitre III: Caractérisation chimique de l'Acacia seyal par Bio guidage.....</b>		<b>121</b>
1	Extraction et dosage des composés phénoliques .....	121
2	Activité antioxydante .....	123
3	Fractionnement bioguidé .....	125
4	Caractérisation des composés purs .....	132
4.1	Identification du composé H.....	133
4.2	Identification du composé I .....	133
4.3	Identification du composé J.....	139
4.4	Identification du composé K.....	144
5	Caractérisation des tanins condensés .....	145
<b>Chapitre IV: Caractérisation phytochimique et activités biologiques de l'huile essentielle de Cymbopogon commutatus.....</b>		<b>149</b>
1	Etudes phytochimiques de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon commutatus</i> .....	149
2	Activités antibactériennes .....	160
3	Activité antifongique de l'HE <i>Cymbopogon commutatus</i> .....	165
4	Activité cytotoxique de l'HE <i>Cymbopogon commutatus</i> .....	166
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>174</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>178</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>		<b>198</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>		<b>201</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>		<b>209</b>
<b>RESUME .....</b>		<b>220</b>
<b>ABSTRACT.....</b>		<b>221</b>

# Abréviations

DPPH : 1,1-DiPhényl-2-PicrylHydrazyle

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

FRAP: Capacité de réduction ferrique du plasma (Ferric Reducing Ability of Plasma).

J : Constante de couplage (*RMN*)

A, B, C,... désignation des composés naturels isolés dans le présent travail

AcOEt : acétate d'éthyle

CDCl<sub>3</sub> chloroforme deutéré

CD<sub>3</sub>OD méthanol deutéré

RMN <sup>1</sup>H : résonance magnétique nucléaire du proton

RMN <sup>13</sup>C : résonance magnétique nucléaire du carbone

IR : Infra-rouge

*m/z* : masse/charge électrique

PEG : Polyéthylène glycol

HE : Huile essentielle

COX : Cyclo-oxygénase

IC<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice à 50%.

CMI : Concentration minimale d'inhibition.

UFC: Unité Formant Colonie.

# Liste des Tableaux

Tableau 1: composés isolés du genre <i>Indigofera</i> .....	25
Tableau 2 : Usages traditionnels de l' <i>Acacia seyal</i> dans le monde.....	31
Tableau 3: Exemples de composés isolés du genre <i>Acacia</i> .....	34
Tableau 4 : Analyses par GCMS de l'huile essentielle du genre <i>Cymbopogon</i> .....	42
Tableau 5 : Principales classes de polyphénols.....	47
Tableau 6 : Origines et codes d'identification des cellules testées. ....	75
Tableau 7 : Classification des plantes médicinales selon les paramètres PR, IP2 et OP. ....	81
Tableau 8 : CMI en $\mu\text{g}/\text{mL}$ des extraits de six plantes pré-sélectionnées .....	85
Tableau 9: Rendement d'extraction et teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits de fruits d' <i>Indigofera caerulea</i> . ....	89
Tableau 10 : Activité antioxydante de quatre extraits de fruits d' <i>I.caerulea</i> .....	91
Tableau 11 : Activités antibactériennes et antifongiques de quatre extraits et du composé D de fruits d' <i>Indigofera caerulea</i> exprimées en CMI $\mu\text{g}/\text{mL}$ . ....	93
Tableau 12 : Programme du gradient de solvants pour la purification de la fraction Hd. ....	95
Tableau 13: Données des spectres RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ et HMBC du composé C. ....	105
Tableau 14: Données des spectres RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé D. ....	111
Tableau 15 : Données des spectres RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé E.....	112
Tableau 16 : Résultats d'analyse GCMS des composés F1-3.....	114
Tableau 17: Teneurs en poly phénols et flavonoïdes totaux de deux extraits d' <i>A. seyal</i> .....	122
Tableau 18: Evaluations des activités antioxydantes de l'écorce de l' <i>A. seyal</i> avec la méthode FRAP.....	125
Tableau 19 : Toxicité du précipité et du filtrat de l'extrait aqueux de l'écorce <i>A. seyal</i> sur les cellules saines embryonnaires de poumon MRC-5. ....	128
Tableau 20: Activités antibactériennes des extraits (méthanol et aqueux), des fractions (F1-12) et des composés purs seuls (H-K) ou combinés d' <i>A. seyal</i> .....	131
Tableau 21 : Données $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé I .....	135
Tableau 22: Données $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé J.....	140

Tableau 23: Assignment des principaux pics du spectre MALDI-TOF des tanins d' <i>Acacia seyal</i> .....	148
Tableau 24: Origines géographiques de quatre espèces de <i>Cymbopogon</i> .....	149
Tableau 25 : Composition chimique de quatre huiles essentielles.....	155
Tableau 26: Composés majoritaires et leur Log P. ....	159
Tableau 27 : CMI (en %) de l'eau aromatique des huiles essentielles de quatre espèces de <i>Cymbopogon</i> et de trois composés majoritaires de l'HE de <i>Cymbopogon commutatus</i> . ....	162
Tableau 28 : Viabilité des cellules MRC-5 après traitement de 24 heures par l'eau aromatique des huiles essentielles.....	163
Tableau 29 : Activité antibactérienne de quatre eau aromatique d'huiles essentielles pures et en émulsion. ....	165
Tableau 30 : IC50 de la cytotoxicité de l'HE <i>C. commutatus</i> sur dix lignées cellulaires cancéreuses et deux cellules saines .....	170

# Liste des Figures

Figure 1 : Répartition dans le monde de l'espèce <i>Indigofera caerulea</i> .....	21
Figure 2: Distribution de l' <i>Acacia seyal</i> Del dans le monde.....	30
Figure 3 : Présence de <i>Cymbopogon commutatus</i> dans le monde.....	39
Figure 4 : Structures des principaux composés des huiles essentielles du <i>Cymbopogon</i> . .....	44
Figure 5 : Deux voies de biosynthèse des polyphénols.....	46
Figure 6 : structure de base d'un flavonoïde .....	48
Figure 7 : Structures de base des principales classes de flavonoïdes.....	50
Figure 8: Dérivés de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque .....	50
Figure 9 : Exemples de structures de base de deux types de tanins. ....	52
Figure 10 : Structures de plusieurs d'alcaloïdes.....	54
Figure 11 : Quelques exemples de terpénoïdes .....	55
Figure 12 : Extraction séquentielle avec des solvants de polarité croissante. ....	59
Figure 13 : Précipitation des tanins condensés.....	60
Figure 14 : système d'hydrodistillation.....	61
Figure 15 : Schématisation du système HPTLC-MS .....	63
Figure 16 : CombiFlash Rf+.....	66
Figure 17 : Illustration d'une analyse par MALD-TOF.....	68
Figure 18 : schéma structural d'un liposome de soja .....	69
Figure 19 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique .....	70
Figure 20 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	71
Figure 21 : Courbe d'étalonnage de la vitamine C pour la méthode FRAP.....	73
Figure 22 : Activités antioxydantes de six plantes avec deux méthodes : DPPH et ABTS. ....	87
Figure 23 : Processus de sélection des plantes à potentialités thérapeutiques. ....	88
Figure 24 : Schéma de purification de l'extrait méthanolique de fruits d' <i>I. caerulea</i> . ....	94
Figure 25 : Schéma de purification de l'extrait hexanique de fruits d' <i>I. caerulea</i> .....	96

Figure 26 : HPTLC-MS de l'extrait méthanolique d' <i>I. caerulea</i> fruit avec réactif de Neu à 365 nm (I) et 254 nm (II). .....	98
Figure 27 : Spectre UV et IR du composé A.....	99
Figure 28 : Spectre du proton $^1\text{H}$ du composé A dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz.....	100
Figure 29: Structure de l'Isoquercétine. ....	100
Figure 30: Spectre de masse du composé B .....	101
Figure 31: Spectre du proton $^1\text{H}$ du composé B dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	102
Figure 32: Structure du composé B (kaempférol 3-O-rutinoside). ....	103
Figure 33: Spectre de masse du composé C. ....	103
Figure 34: Spectre du proton $^1\text{H}$ du composé C dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz .....	106
Figure 35: Spectre du carbone $^{13}\text{C}$ du composé C dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 100 MHz. ....	106
Figure 36: Spectre COSY du composé C dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz .....	107
Figure 37: Spectre HSQC du composé C dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz .....	107
Figure 38: Spectre HMBC du composé C dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz .....	108
Figure 39: Zoom du spectre HMBC du composé C dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz .....	108
Figure 40: Structure du composé C= rutine. ....	109
Figure 41: Spectre IR du composé D. ....	109
Figure 42: Spectre du proton $^1\text{H}$ du composé D dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz.....	110
Figure 43: Spectre du carbone $^{13}\text{C}$ du composé D dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 100 MHz.....	110
Figure 44: Structure du composé D.....	111
Figure 45: Spectre IR du composé E.....	112
Figure 46: Spectre du proton $^1\text{H}$ du composé E dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	113
Figure 47: Spectre du carbone $^{13}\text{C}$ du composé E dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 100 MHz. ....	113
Figure 48: Structure du composé E (acide gallique). ....	114
Figure 49: Analyse GC / MS des composées F1-3 obtenus à partir de l'extrait hexanique du fruit d' <i>Indigofera caerulea</i> .....	116
Figure 50: Spectre GCMS du composé G. ....	116

Figure 51: Spectre du proton $^1\text{H}$ du composé G dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	117
Figure 52: Spectre du carbone $^{13}\text{C}$ du composé G dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 100 MHz. ....	118
Figure 53: Spectre COSY du composé G dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	118
Figure 54: Spectre HSQC du composé G dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	119
Figure 55: Spectre HBMC du composé G dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	119
Figure 56: Structure du $\beta$ -sitostérol. ....	120
Figure 57 : Pourcentages de tanins condensés dans l'extrait méthanolique (E. Meth) et dans l'extrait aqueux (E. Aq) d' <i>Acacia seyal</i> . ....	122
Figure 58: Evaluations de l'activité antioxydante de l'écorce d' <i>A. seyal</i> selon les méthodes DPPH et ABTS. ....	123
Figure 59: Corrélation linéaire entre ABTS et DPPH des IC50 des extraits méthanolique et aqueux d' <i>Acacia seyal</i> . ....	124
Figure 60: Observation microscopique de l'effet de l'extrait aqueux d' <i>Acacia seyal</i> à différentes concentrations sur MRC-5 à 24 heures. ....	126
Figure 61: Observation microscopique de l'effet de l'extrait aqueux sur MRC-5 à 24 heures, après coloration au rouge neutre. ....	127
Figure 62: Bio fractionnement des extraits de l'écorce <i>A. seyal</i> . ....	130
Figure 63: CCM préparative sur la fraction F5 sous UV. ....	131
Figure 64: Spectre de masse du composé I ....	133
Figure 65: Spectre du proton $^1\text{H}$ du composé I dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz ....	135
Figure 66: Spectre du carbone $^{13}\text{C}$ du composé I dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 100 MHz. ....	136
Figure 67: Spectre COSY du composé I dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	137
Figure 68: Spectre HSQC du composé I dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	137
Figure 69: Spectre HMBC du composé I dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz. ....	138
Figure 70: Structure de l'épicatéchine. ....	138
Figure 71: Spectre de masse du composé J. ....	139
Figure 72: Spectre du proton $^1\text{H}$ du composé J dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 400 MHz ....	140
Figure 73: Spectre du carbone $^{13}\text{C}$ du composé J dans $\text{CD}_3\text{OD}$ à 100 MHz. ....	141

Figure 74: Spectre COSY du composé J dans CD3OD à 400 MHz. ....	142
Figure 75: Spectre HSQC du composé J dans CD3OD à 400 MHz .....	143
Figure 76: Spectre HMBC du composé J dans CD3OD à 400 MHz. ....	143
Figure 77: Structure de la Catéchine. ....	144
Figure 78: Spectre de masse (positif et négatif) du composé K. ....	145
Figure 79: Structure probable du composé K (Catéchine digallique). ....	145
Figure 80: Spectre MALDI-TOF de tanins condensés des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce d' <i>Acacia seyal</i> . ....	146
Figure 81: Unités de base des structures détectées en MALDI-TOF-TOF. ....	146
Figure 82: Estérification de la catéchine avec une molécule de la matrice DHB pendant l'expérimentation avec le MALDI-TOF. ....	147
Figure 83: Répartition des constituants des quatre huiles essentielles : <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon commutatus</i> , <i>Cymbopogon nardus</i> et <i>Cymbopogon winterianus</i> .....	151
Figure 84 : Comparaison des spectres du proton 1H entre la pipéritone (1) et l'huile essentielle <i>C. commutatus</i> (2) dans CDCl <sub>3</sub> à 400 MHz. ....	151
Figure 85 : Répartition des constituants de quatre huiles essentielles pures; MTH/MTO (monoterpènes hydrocarbonés/oxygénés), STH/STO (sesquiterpènes hydrocarbonés/oxygénés) et E (esters). ....	152
Figure 86: Préparation de l'eau aromatique pour les tests antibactériens. ....	153
Figure 87 : (a) Nombre de constituants présents dans l'huile essentielle pure et dans l'eau aromatisée et (b) la quantité hydrosolubilisée en mg pour chacune de quatre huiles essentielles <i>C. citratus</i> , <i>C. commutatus</i> , <i>C. nardus</i> et <i>C. winterianus</i> .....	154
Figure 88: Activité antifongique de l'huile essentielle <i>Cymbopogon commutatus</i> et de son composé majoritaire, la pipéritone, sur deux souches fongiques : <i>Candida albicans</i> et <i>Aspergillus brasiliensis</i> . ....	166
Figure 89 : Viabilité cellulaire à différentes concentrations de l'huile essentielle <i>C. commutatus</i> . ....	168
Figure 90- Tableau 30 : IC <sub>50</sub> de la cytotoxicité de l'HE <i>C. commutatus</i> sur dix lignées cellulaires cancéreuses et deux lignées cellulaires saines . ....	170

# **Introduction**

Les plantes sont très présentes dans la prise en charge des pathologies humaines depuis des milliers d'années. Longtemps associée à des rites religieux ou à des superstitions, la phytothérapie se rationalise depuis quelques décennies en s'appuyant sur la phytochimie, la chimie des plantes, avec des moyens de screening de plus en plus sophistiqués. De plus, le savoir traditionnel transmis de générations en générations est un apport d'informations essentiel dans la recherche de nouvelles molécules bioactives. En effet près de 74 % des principes actifs d'origine végétale ont été découverts à partir des utilisations traditionnelles (Gurib-Fakim, 2006).

Par ailleurs certains médicaments, comme les antibiotiques, de par leur utilisation massive, présentent une efficacité moindre face aux agents pathogènes. De ce fait, il y a un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales qui pallient, dans certains cas, la résistance des microorganismes (Muthu *et al.*, 2006). Cette source végétale semble inépuisable en découvertes car seule une petite partie des 400 000 espèces végétales connues dans le monde a été étudiée sur les plans phytochimique et pharmacologique, sachant que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de constituants différents (Hostettmann, 1997). Moins de 10 % de ces espèces auraient été étudiées scientifiquement pour leurs propriétés pharmacologiques (Diallo, 2000).

Des médicaments ou composés très efficaces d'origine végétale existent déjà sur le marché international : le maprouneacin isolé du *Maprounea africana* est utilisé comme agent antidiabétique, le Taxol<sup>®</sup> (paclitaxel issu de *Taxus brevifolia*) est utilisé comme antitumoral notoire ou encore l'artémisinine (*Artemisia annua*) est utilisée comme agent antipaludique efficace contre toutes les souches résistantes de *Plasmodium* (Ajibesin *et al.*, 2008).

D'autres approches thérapeutiques, comme l'utilisation d'extraits de plantes standardisés, pourraient améliorer la santé dans les pays pauvres qui n'ont pas le moyen d'acheter les médicaments des grands groupes pharmaceutiques. Dans certains pays comme le Mali cette initiative est fonctionnelle et connue sous l'appellation MTA, Médicaments Traditionnels Améliorés (Nouhoum KONATE, 2005). Elles seraient aussi un moyen d'éradiquer des maladies des 'pauvres' qui ne présentent pas un grand intérêt économique pour les industries pharmaceutiques.

Djibouti est un petit pays de l'Afrique de l'Est avec 23.000 km<sup>2</sup> et à peine un million d'habitants (DISED, 2018). Le climat du pays est aride et désertique. Avec 0,16 % de terre

arable, l'agriculture est très peu pratiquée et près de 80 % de la population vit dans les zones urbaines (PAM *et al.*, 2011). La végétation sauvage est peu dense à part quelques oasis au Sud et dans les zones montagneuses au Nord du pays. La pluviométrie moyenne est faible, de l'ordre de 250 mm (Mahamoud *et al.*, 2014a). Cependant plus de 800 espèces sont répertoriées et leur adaptation dans ces conditions difficiles peut présenter un intérêt pour leurs utilisations médicinales. Et effectivement la population locale affectionne le soin par ces plantes. En effet la plante et ses additifs constituent un premier recours de traitement pour près de 80 % de la population selon l'OMS. Dans les régions rurales il n'est pas rare de trouver des trousse de plantes à la place de celles de médicaments conventionnels. Egalement dans les grandes villes les tradipraticiens, soignant essentiellement avec les plantes, se multiplient. Cependant les données scientifiques écrites sur ce sujet sont rares et les connaissances traditionnelles se transmettent à l'oral.

Les bénéfices réels de ces soins ne sont pas étudiés mais des intoxications graves sont rares. De petits accidents (diarrhées ou manifestations cutanées) sont signalés et font suite souvent à une automédication avec les plantes sans réelles connaissances de la phytothérapie. Il peut s'agir de l'utilisation d'une plante plus ou moins toxique ou d'un mauvais usage d'une plante (surdosage, mode de préparation ou d'administration non adaptés entre autres).

Autrefois il existait à la seule radio de Djibouti (RTD), une émission portant sur l'usage des plantes médicinales. Malheureusement elle est arrêtée depuis quelques années laissant sans références les adeptes de l'automédication avec les plantes.

Par ailleurs, les plantes médicinales sont fournies soit par les tradipraticiens, soit par la collecte sauvage ou dans des petits magasins spécialisés dans la capitale. Dans ces trois cas de figure, l'identité botanique et l'origine de la plante ne sont pas connues précisément. Il est courant que les gens se procurent des plantes ayant les mêmes noms locaux, à cause de leurs morphologies similaires, mais en réalité les identités botaniques sont différentes.

Pour une intégration adéquate de la phytothérapie au système de santé mais également pour prévenir le mauvais usage des plantes médicinales, le gouvernement a mis en place en 2010 un institut dédié aux études des plantes médicinales. L'institut de Recherche Médicinale (IRM), au sein du Centre d'Etudes et de Recherche de Djibouti (CERD), est le premier et le seul du pays à répertorier, identifier, analyser chimiquement et rechercher les effets pharmacologiques des plantes locales.

Depuis l'herbier national, au sein de cet institut, a fait des enquêtes ethnobotaniques au Nord et au Sud du pays (Hassan-Abdallah et al., 2013) ; (Abdoul-latif *et al.*, 2016) ; (abdoul-Latif *et al.*, 2018).

Ce projet doctoral s'inscrit dans ce cadre. En effet étant chimiste à l'IRM, je suis chargé, avec d'autres collègues, de la recherche des composés bio actifs dans les plantes médicinales endémiques à Djibouti. Ce travail présenté ici consiste à sélectionner les plantes à forts effets biologiques (en particulier activité antibactérienne) et à chercher les molécules impliquées dans ces effets. Les travaux sont menés à la fois à l'IRM (Djibouti) et à l'Université de Lorraine (France) au sein du Laboratoire Lorrain de chimie moléculaire (L2CM) anciennement laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes (SRSMC) à Nancy.

Dans ce document, la première partie porte sur les données bibliographiques des trois plantes étudiées à savoir *Indigofera caerulea*, *Acacia seyal* et *Cymbopogon commutatus*. Egalement un bref rappel sur les métabolites spécialisés est fait. Puis suit la partie Matériel et Méthodes.

Ensuite le processus et les critères de choix des plantes à étudier sont abordés.

Enfin, sont décrits les résultats des études phytochimiques et des activités biologiques des extraits ou de l'huile essentielle des trois plantes sélectionnées. Dans le cas d'*I. caerulea*, nous détaillerons les étapes de la purification et de l'identification des composé majeurs présents dans les extraits bio actifs. En revanche pour l'*A. seyal*, il s'agira d'une description du bioguidage mis en place pour identifier les composés les plus actifs. Enfin les travaux porteront sur l'activité biologique et l'identification des constituants de l'huile essentielle de *C. commutatus*.

# **Etude bibliographique**

# Chapitre I : Etudes botanique, phytochimique et pharmacologique des plantes sélectionnées

La sélection des plantes étudiées ici a été faite selon deux critères, l'un avant la collecte des plantes et le second au moment de la préparation des extraits. Le premier critère consiste en une évaluation de données ethnobotaniques, réalisées sur le terrain par l'équipe de botanistes de notre institut, couplée à une analyse des connaissances rapportées dans la littérature scientifique disponible sur les plantes incluses dans l'étude ethnobotanique. Le second critère porte sur le screening d'activité antibactérienne des extraits de ces plantes et l'étude de leur toxicité sur cellules normales. Le détail de ce travail est donné dans le chapitre I de la partie expérimentale.

Les trois plantes les plus prometteuses, selon les critères définis ci-dessus, font l'objet de ce travail doctoral. Il s'agit d'*Indigofera caerulea* Rox, *Acacia seyal* Del et *Cymbopogon commutatus*.

## 1 *Indigofera caerulea*

### 1.1 Description botanique



**Photo 1 :** *Indigofera caerulea* (02/12/2015), localité d'Abaido- région de Dikhil (Sud-Ouest de Djibouti), altitude : 575m.

**Famille :** Fabaceae

**Genre :** *Indigofera*

**Espèce :** *I. coerulea* Roxb.

**Nom commun :** Indigotier

**Noms vernaculaires :**

Gabal daye (Somalie);

Ayro beya (Afar);

Limdesma (Arabe).

*Indigofera coerulea* est une plante herbacée d'environ 1m de hauteur avec une tige légèrement anguleuse et entièrement couverte de poils (**photo 1**). La disposition des feuilles est alternée et pennée et elles sont composées de 5 à 9 folioles, oblongues et densément poilues. Les fruits sont des gousses courbées contenant de 3 à 4 graines.

## 1.2 Distribution et habitat

La présence de l'*I. coerulea* est signalée dans une large région allant du Mali (Afrique) au Sri Lanka (Asie) (**Figure 1**). Son utilisation dans l'industrie du colorant a contribué à son expansion vers l'Asie, avant l'émergence de l'indigo synthétique.

A Djibouti, il est généralement présent dans les cours d'eau du Sud du pays, largement minoritaire par rapport aux autres espèces du genre indigo (*I. articulata* et *I. oblongifolia*).



**Figure 1 :** Répartition dans le monde de l'espèce *Indigofera coerulea*

## 1.3 Utilisations traditionnelles et industrielles

Comme d'autres espèces du genre *Indigofera*, *I. caerulea* est une source de production du colorant indigo. Mais depuis la synthèse chimique de l'indigo au XIX siècle, l'extraction de l'indigo naturel est minime.

Par ailleurs cette plante est présente dans des régions où la médecine traditionnelle est très répandue. De ce fait, elle est retrouvée dans diverses préparations curatives.

A Djibouti, elle est utilisée pour désinfecter les plaies et pour soigner les infections de la peau notamment, contre la teigne. En Ethiopie, pays voisin, les feuilles et les racines séchées sont utilisées comme pansement sur les blessures. Un extrait de cette plante est également bu contre la constipation ou encore est utilisé pour laver les yeux infectés (PROTA, 2005).

Enfin les malasars, tribu vivant au Sud de l'Inde, traitent l'épilepsie, la jaunisse et la morsure de serpents avec une pâte faite à partir de la feuille d'*Indigofera caerulea* (Ragupathy *et al.*, 2008; Vanila *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2007).

## 1.4 Etudes pharmacologiques

### 1.4.1 Genre *Indigofera*

Diverses activités biologiques sont rapportées sur des extraits ou composés purs du genre *Indigofera*. D'abord un extrait méthanolique des tiges d'*Indigofera aspalathoides* Vahl a montré un effet anti inflammatoire en diminuant de 20 % la production des enzymes lysosomiales produites lors d'une manifestation inflammatoire (Bhagavan *et al.*, 2013). Egalement un extrait méthanolique de la partie aérienne d'*I. geradiana* a une activité modérée contre *Salmonella typhi* avec une CMI de 0,89 mg/mL (Nisar *et al.*, 2009). Par ailleurs un extrait hydro alcoolique d'*I. oblongifolia* présente un effet hépatoprotecteur contre une toxicité induite à travers une injection quotidienne du carbone tetrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>) chez des souris. Les souris traitées avec cet extrait ont des paramètres biochimiques peu affectés par rapport aux souris non traitées (Shahjahan *et al.*, 2005). Un extrait éthanolique de la plante entière d'*I. mysorensis* est administré à des souris résistant à l'insuline.

Une dose d'administration de 300 mg/kg de cet extrait pendant 10 jours entraîne une diminution de 63 % du glucose plasmatique (Chakrabarti *et al.*, 2006). Par ailleurs un extrait méthanolique de feuilles d'*I. cassioides* est testé pour ses propriétés anticancéreuses contre deux modèles tumoraux DLA et EAC (Dalton's Lymphoma Ascites et Ehrlich Ascites Carcinoma respectivement). Le temps de survie moyen des souris traitées est doublé (de 23 à 42 jours avec une injection d'extrait de 400 mg/kg) mais également le pourcentage de survivantes est passé de 0 sans traitement à 78 % avec traitement (Kumar *et al.*, 2011). Ce même extrait a présenté une forte activité antioxydante avec une IC50 de 13 µg/ mL, valeur proche de la celle obtenue pour la vitamine C à 9 µg/ mL (Kumar *et al.*, 2012).

Par ailleurs des composés, isolés des extraits bruts de ce genre, ont des effets pharmacologiques diversifiés. En effet l'indigoféribétone, un diterpène isolé de la tige de l'*I. longerceramose*, a une activité intéressante contre *Mycobacterium tuberculosis* (Thangadurai *et al.*, 2002). Deux fura-flavonoïdes obtenus à partir de la partie aérienne de l'*I. tinctoria* font diminuer les acides gras libres dans le plasma, des triglycérides et le cholestérol total de 25 %, 60 % et 19 % respectivement. En même temps, les lipoprotéines de haute densité (HDL), connues comme étant le bon cholestérol, augmentent de 8 % après administration de ces composés à des souris à la dose de 50 mg/ kg (Narender *et al.*, 2006). L'indigotine, un alcaloïde largement retrouvé dans les feuilles de ce genre possède un effet gastro protecteur contre une intoxication induite par une injection d'éthanol. En effet une administration préventive de 2 mg/ kg de ce composé diminue de 80 % la surface de la lésion ulcéreuse (ULA) observée chez le souris traitée. De plus les lésions au niveau de l'ADN provoquées par cette intoxication ont été partiellement limitées chez des souris qui ont reçu une injection de l'indigo (Farias-Silva *et al.*, 2007). Enfin un lignane, isolé de l'extrait méthanolique de la plante entière d'*I. hetrantha*, a entraîné une forte inhibition de la lipoxygénase avec une IC50 de 41,5 µg/ mL, valeur proche du témoin positif qui est Baicalein, à 22,6 µg/ mL (Aziz-ur-rehman *et al.*, 2005).

#### **1.4.2 Espèce *Indigofera caerulea***

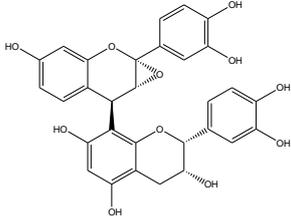
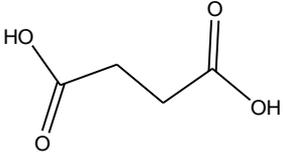
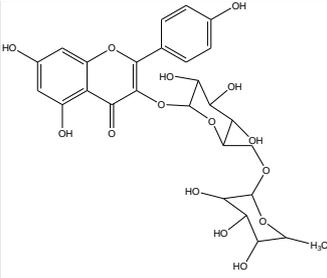
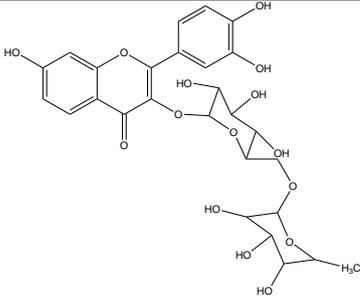
Seules trois études ont été répertoriées à ce jour sur cette espèce. Les études rapportent, toutes, l'utilisation d'extraits de feuilles d'*I. caerulea*. L'extrait hydro alcoolique des feuilles a montré un effet hépato protecteur. En effet une analyse *in vivo* d'une souris traitée avec cet extrait a montré une atténuation de l'ulcère du foie, induit par une injection de tétrachlorure

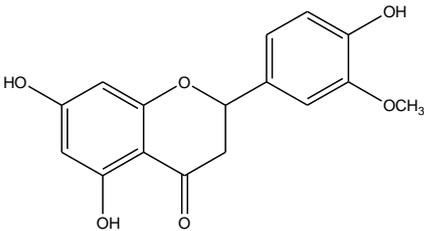
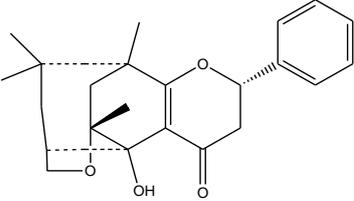
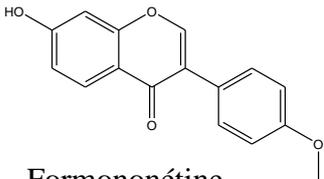
de carbone (CCl<sub>4</sub>), par rapport aux témoins. Le mécanisme d'action de cet extrait serait un blocage de l'activation de NF-κB (nuclear factor- Kappa B) (Ponmari *et al.*, 2014). Ce même extrait a une forte activité antioxydante mesurée avec la méthode DPPH avec une IC<sub>50</sub> égale à 52,5 µg/mL (Ponmari *et al.*, 2012). Enfin l'extrait hexanique de cette partie de la plante (12,5 µg/mL) a une forte activité antibactérienne contre *Salmonella typhi* et *Vibrio cholerae* avec des diamètres d'inhibition de 19 et 29 mm respectivement (Natarajan *et al.*, 2010).

## **1.5 Composés isolés chez le genre *Indigofera***

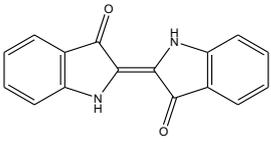
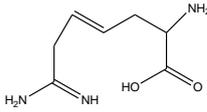
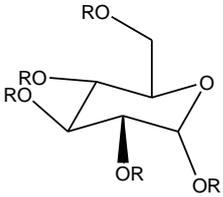
Différentes familles de molécules ont été isolées des différentes espèces d'*Indigofera* tels que des polyphénols, des composés azotés, des composés terpéniques/stéroïdiques et diverses autres molécules (**Tableau 1a, b, c et d**).

**Tableau 1a:** Polyphénols isolés du genre *Indigofera*

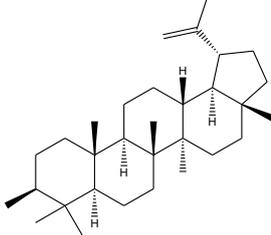
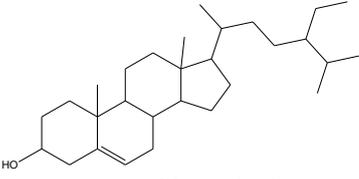
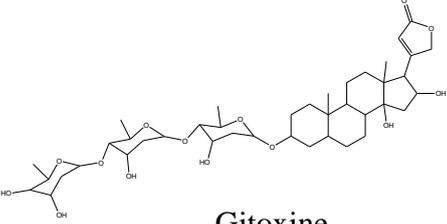
Espèce d' <i>Indigofera</i>	Molécules isolées	Références
<i>I. stachyodes</i>	 <p data-bbox="671 607 1026 685">Epoxytétrahydroxyflavane- épicatchine</p>	(Qiu <i>et al.</i> , 2013)
<i>I. endecaphylla</i>	 <p data-bbox="738 925 962 958">Acide succinique</p>	(Finnegan and Mueller, 2006)
<i>I. kirilowi</i>	 <p data-bbox="671 1272 1026 1305">Kaempférol-3-O- rutinoside</p>	(Rahman <i>et al.</i> , 2018)
<i>I. capitata</i>	 <p data-bbox="807 1686 895 1720">Rutine</p>	(Sianard <i>et al.</i> , 2012)

<p><i>I. tinctoria</i></p>	 <p>Hesperetine</p>	<p>(Narender <i>et al.</i>, 2006)</p>
<p><i>I. suffruticosa</i></p>	 <p>Louisfieserone</p>	<p>(Dominguez <i>et al.</i>, 1978)</p>
<p><i>I. pseudotinctoria</i></p>	 <p>Formononétine</p>	<p>(Wen and Liang, 2010)</p>

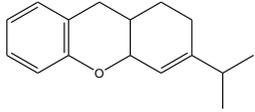
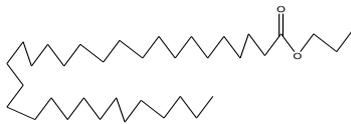
**Tableau 1b:** Composés azotés isolés du genre *Indigofera*

Espèces d' <i>Indigofera</i>	Molécules isolées	Références
<i>I. tinctoria</i>	 <p data-bbox="724 510 858 544">Indigotine</p>	(Rahman <i>et al.</i> , 2018)
<i>I. spicata</i>	 <p data-bbox="719 696 863 730">Indispicine</p>	(Hegarty and Pound, 1968)
<i>I. linnaei</i>	 <p data-bbox="663 1010 922 1043">R=COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub></p> <p data-bbox="651 1077 935 1111">Nitropropanoyl esters</p>	(Benn <i>et al.</i> , 1992)

**Tableau 1c:** Terpenoïdes/stéroïdes isolés du genre *Indigofera*

Espèces d' <i>Indigofera</i>	Molécules isolées	Références
<i>I. kirilowi</i>	 <p>Lupéol</p>	(Rahman <i>et al.</i> , 2018)
<i>I. pseudotinctoria</i>	 <p>Sitostérol</p>	(Wen and Liang, 2010)
<i>I. linnaei</i>	 <p>Gitoxine</p>	(Sandhyavali and Sivakamisundari, 2014)

**Tableau 1d:** divers composés isolés du genre *Indigofera*

Espèces d' <i>Indigofera</i>	Molécules isolées	Références
<i>I. longerracemosa</i>	 <p>Xanthène</p>	(Thangadurai <i>et al.</i> , 2001)
<i>I. heterantha</i>	 <p>Ester</p>	(Rahman <i>et al.</i> , 2014)

Chez *Indigofera caerulea*, des tests phytochimiques, effectués sur un extrait méthanolique de la feuille, mettent en évidence la présence d'alcaloïdes, de tanins, de flavonoïdes, de terpènes et de saponines (Ponmari *et al.*, 2012; Natarajan *et al.*, 2010). De même, une analyse par HPLC de cet extrait a permis de détecter, en comparaison avec des standards, la présence d'acide gallique, d'acide caféique, d'acide férulique, de rutine et de quercétine (Ponmari *et al.*, 2014). Cependant à ce jour et d'après la littérature disponible, il n'existe aucune étude qui rapporte l'isolement de composés purs chez cette espèce.

## 2 *Acacia seyal* DEL

### 2.1 Description botanique



**Photo 2 :** *Acacia seyal* (02/12/2015), localité de Day, région de Tadjourah (Nord de Djibouti), altitude 1313m

**Famille :** Fabaceae

**Genre :** *Acacia*

**Espèce :** *Acacia seyal* Del.

**Synonymes :** *Acacia fistula* et *Acacia stenocarpa*

**Nom commun :** Mimosa épineux

**Noms vernaculaires (trois langues locales):**

Jikh, fullay, waajool (Somalie);

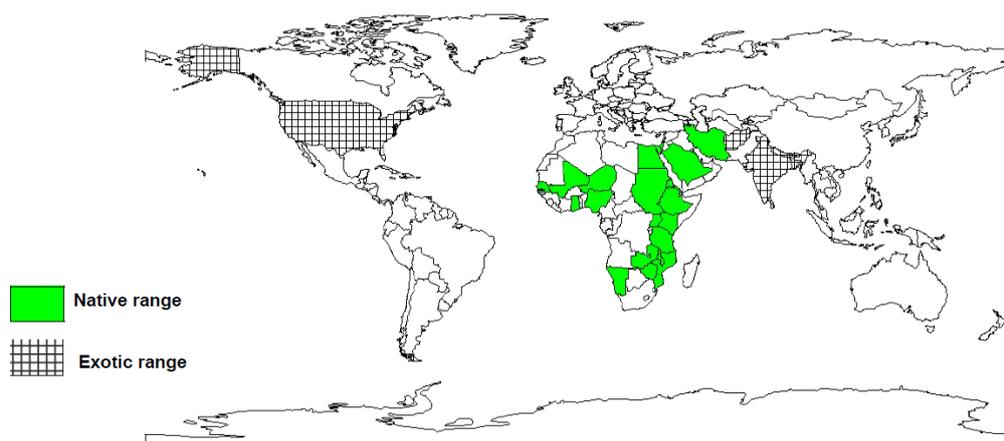
Qadgento (Afar);

Talk, talih, sayyal (Arabe).

*Acacia seyal* est un arbuste pouvant atteindre 9 m de haut avec une couronne habituellement aplatie (**photo 2**). L'écorce du tronc est poudreuse, blanche à jaune verdâtre à Djibouti ou rouge orangé au Soudan. Les épines stigmatiques atteignent 8 cm de long et sont majoritairement situées sur les tiges secondaires. Les feuilles portent 10 à 16 paires de folioles. La floraison est jaune vif avec une forte odeur épicée et son fruit est une gousse déhiscente linéaire (Orwa *et al.*, 2009).

## 2.2 Distribution et habitat

L'*A. seyal* vit quasi exclusivement dans l'Afrique tropicale, du Sénégal au Soudan et d'Égypte au Mozambique (Orwa *et al.*, 2009). C'est un arbre qui pousse dans les oueds ou cours d'eau, dans les déserts subtropicaux et tropicaux, et dans les zones forestières très sèches. Sa présence aux États Unis et en Inde est liée à une introduction humaine (**Figure 2**).



**Figure 2:** Distribution de l'*Acacia seyal* Del dans le monde (Orwa C *et al.*, 2009).

## 2.3 Utilisations traditionnelles et industrielles

Cette plante est connue, comme *Acacia senegalis*, pour sa production de gomme arabique au niveau industriel.

Localement, la population utilise presque toutes les parties de cette plante pour se soigner. Dans le **tableau 2**, sont résumés quelques usages traditionnels de l'*A. seyal* dans le monde.

**Tableau 2** : Usages traditionnels de l'*Acacia seyal* dans le monde

Parties utilisées	Maladies traitées	Références
Gomme	Constipation	(Van Wyk, 2015)
Ecorce	Fièvre, diarrhées, hémorragies, bronchites, rhumatismes, dysenterie, Lèpre, cancer, scorbut, diurétique, douleurs abdominales et stimulant nerveux	(Saeed <i>et al.</i> , 2015)
Racine	Diarrhées animales	(Gradé <i>et al.</i> , 2009)
Ecorce- Racine	Douleurs dentaires, diarrhées	(Geissler <i>et al.</i> , 2002)
Ecorce	Douleurs chroniques	(Wambugu <i>et al.</i> , 2011)
Ecorce- Racine	Antiparasitaire (anti-amibiases)	(Tabuti <i>et al.</i> , 2003)
Ecorce- fruit	Ulcères, fièvre, plaies, infections de l'œil et des dents	(Hammiche et Maiza, 2006)
Ecorce- feuille	Douleurs dentaires	(Tapsoba et Deschamps, 2006)
Ecorce- feuille	Infections dentaires et digestives	(Hassan-Abdallah <i>et al.</i> , 2013)
Ecorce	Dysenterie, infections dentaires et plaies	(Abdoul-Latif <i>et al.</i> , 2016)

## 2.4 Etudes pharmacologiques

### 2.4.1 Genre *Acacia*

Les tests pharmacologiques réalisés sur des extraits d'acacia sont multiples et variés. Un extrait à l'acétate d'éthyle de l'écorce de l'*A. ferruginea* a montré un effet de cicatrisation

d'ulcère gastrique induit par une injection d'éthanol sur des souris (Sowndhararajan and Kang, 2013). Egalement un effet hépatoprotecteur suite à une intoxication avec du paracétamol est observé après administration d'un extrait acétonique de l'écorce et des gousses sans graine d'*A. auriculiformis* sur des souris (Sathya and Siddhuraju, 2013). Des extraits avec ce même solvant de trois acacias (*A. dealbata*, *A. ferruginea* and *A. leucophloea*) ont inhibé un stress oxydatif induit par de l'eau oxygénée sur des cellules HepG2 (Sowndhararajan *et al.*, 2015). De même des composés phénoliques isolés à partir de l'écorce d'*A. nilotica* ont des effets de prévention contre la formation de malondialdéhyde hépatique (MDA) induite par une injection de N- nitrosodiéthylamine sur des souris après 45 jours de traitement (Singh *et al.*, 2009a). Une très bonne activité antioxydante de l'extrait alcoolique de l'écorce d'*Acacia confusa*, mesurée avec la méthode DPPH, est observée avec une IC50 de 5µg/ml (Tung *et al.*, 2009). Des résultats semblables sont obtenus pour l'umbelliférone, isolée de l'écorce d'*A. nilotica*, avec une IC50 égale à 35µg/mL selon la méthode DPPH (Singh *et al.*, 2010). Eldeen *et al.* (2010) ont isolé le niloticane, un diterpène extrait de l'écorce d'*A. nilotica* qui a montré une activité antibactérienne contre les bactéries de Gram-positif *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI de 4 et 8 µg /ml respectivement. De plus dans le test à la cyclooxygénase, le niloticane présente une activité avec des valeurs d'IC50 de 28 et 210 µM respectivement contre COX-1 et COX-2. Il est à noter que les valeurs d'IC50 observées avec l'indométacine (contrôle positif) sont de 3,6 µM pour la COX-1 et de 189 µM pour la COX-2. Enfin dans le test à l'acétylcholinestérase, le niloticane a montré une forte activité anti-cholinestérase avec une valeur d'IC50 de 4 µM et pour la galanthamine (témoin positif) une IC50 de 2,0 µM.

Pour cette même plante, un extrait méthanolique du fruit a montré un effet antihelminthique dose et temps-dépendant (IC50 à 512,86 et 194,98 µg/mL) chez les vers en inhibant l'éclosion des œufs et le développement des larves (Bachaya *et al.*, 2009).

Les données ethnobotaniques et les études pharmacologiques montrent que l'écorce d'acacia est la partie la plus utilisée et la plus étudiée également.

#### **2.4.2 Espèce *Acacia seyal***

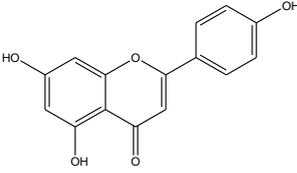
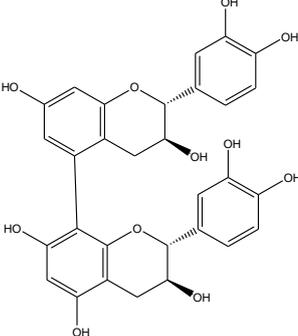
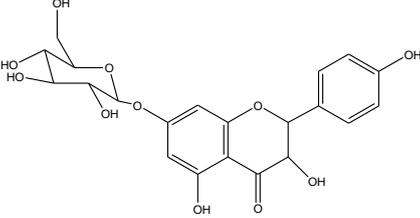
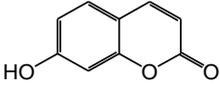
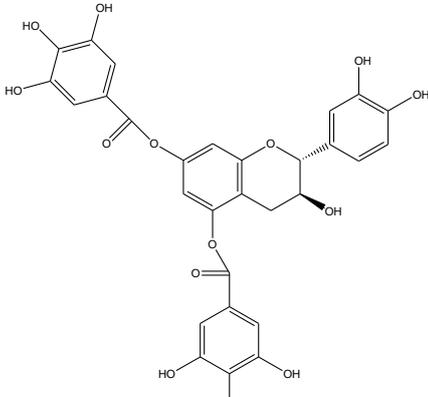
Quelques études d'activités biologiques d'extraits d'*Acacia seyal* ont été publiées mais rien n'a été rapporté sur l'activité biologique de composés isolés de cette plante. L'extrait

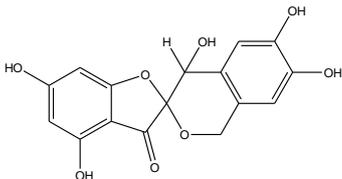
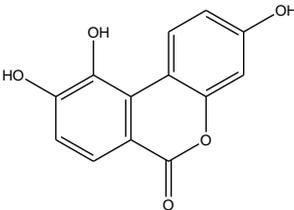
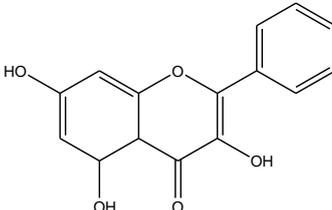
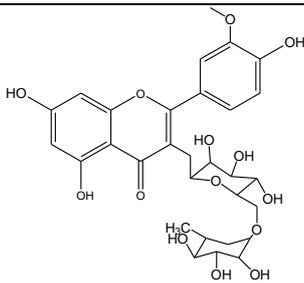
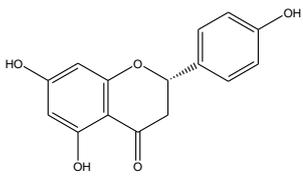
méthanolique de l'écorce d'*Acacia seyal* a montré une activité antimalarique intéressante avec une  $IC_{50} = 89 \mu\text{g/mL}$  (Muthaura *et al.*, 2015). Par ailleurs, une activité anticancéreuse a été recherchée pour cet extrait mais l'activité a été négligeable dans les conditions testées (Saeed *et al.*, 2015). Cependant des activités antimicrobiennes d'extrait éthanolique de cette plante ont montré une efficacité contre *Bacillus subtilis* (Eldeen and Van Staden, 2007) et contre *Mycobacterium aurum* (Eldeen and Van Staden, 2008). Il faut signaler une bonne inhibition de la cyclooxygénase avec ce même extrait éthanolique d'*Acacia seyal* (Eldeen and Van Staden, 2008). Enfin des extraits méthanoliques préparés à partir de feuilles et de fruits de cette plante ont montré une forte activité antioxydante avec des  $IC_{50}$  de 76 et 77  $\mu\text{g/mL}$  respectivement (Abdel-Farid *et al.*, 2014).

## **2.5 Composés isolés chez le genre *Acacia***

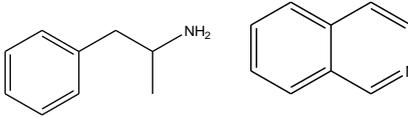
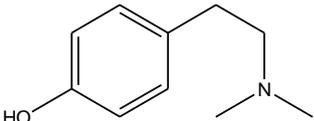
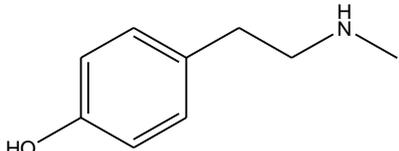
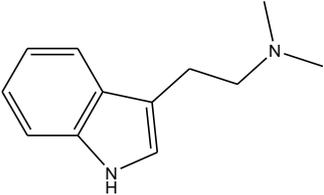
Trois familles de métabolites spécialisés ont été détectés et isolés dans le genre *Acacia*, à savoir des polyphénols, des composés azotés et des terpénoïdes/ stéroïdes (**tableaux 3a, b et c**).

**Tableau 3a:** Exemples de polyphénols isolés du genre *Acacia*

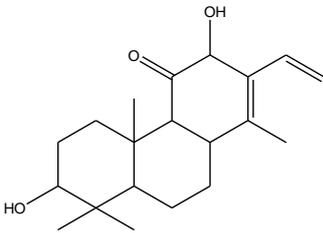
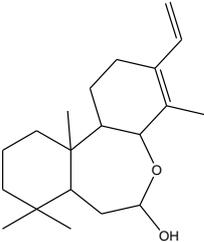
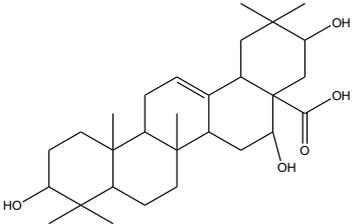
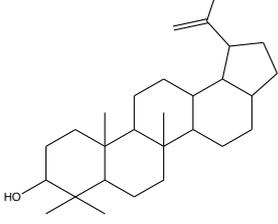
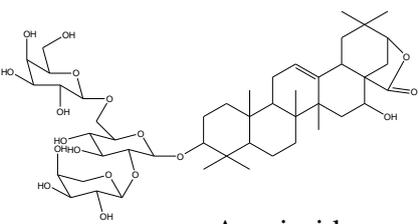
Espèce d' <i>Acacia</i>	Molécules isolées	Références
<i>A. ixiophylla</i>	 <p style="text-align: center;">Apigénine</p>	(Clark-Lewis and Dainis, 1968)
	 <p style="text-align: center;">Dicatéchine</p>	(Leela <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. nilotica</i>	 <p style="text-align: center;">Leucocyanadine</p>	(Singh <i>et al.</i> , 2009b)
	 <p style="text-align: center;">Umbelliférone</p>	(Singh <i>et al.</i> , 2010)
	 <p style="text-align: center;">Catéchine-5,7-digallate</p>	(Malan, 1991)

<p><i>A. crombei</i></p>	 <p>Crombénine</p>	<p>(Brandt <i>et al.</i>, 1972)</p>
<p><i>A. fasciculifera</i></p>	 <p>Fasciculiferol</p>	<p>(Heerden <i>et al.</i>, 1981)</p>
<p><i>A. neovernicosa</i></p>	 <p>Galangine</p>	<p>(Wollenweber and Seigler, 1982)</p>
<p><i>A. raddiana</i></p>	 <p>Isorhamnétine-3-O- rutinoside</p>	<p>(El-Mousallamy <i>et al.</i>, 1991)</p>
<p><i>A. farnesiana</i></p>	 <p>Naringénine</p>	<p>(Seigler, 2003)</p>

**Tableau 3b** : Exemples de composés azotés isolés d'*Acacia*

Espèces d' <i>Acacia</i>	Molécules isolées	Références
<i>A. berlandieri</i>	 <p>Amphétamine      Isoquinoline</p>	(Clement <i>et al.</i> , 1997)
<i>A. spirorbis</i>	 <p>Hordénine</p>	(Poupat, C and Sevenet, T, 1975)
<i>A. krausiana</i>	 <p>N-méthyltyramine</p>	(Evans <i>et al.</i> , 1979)
<i>A. nilotica</i>	 <p>Diméthyltryptamine</p>	(Camp and Norvell, 1966)

**Tableau 3c :** Exemples de composés Terpénoïques/stéroïdiques isolés du genre *Acacia*

Espèces d' <i>Acacia</i>	Molécules isolées	Références
<i>A. nilotica</i>	 <p data-bbox="730 607 863 640">Niloticane</p>	(Eldeen <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. jaquemontii</i>	 <p data-bbox="722 925 823 958">Casane</p>	(Joshi <i>et al.</i> , 1979)
<i>A. sinuata</i>	 <p data-bbox="699 1270 895 1303">Acide acacique</p>	(Anjaneyulu <i>et al.</i> , 1977)
<i>A. nilotica</i>	 <p data-bbox="746 1619 839 1653">Lupéol</p>	(Jangade <i>et al.</i> , 2014)
<i>A. auriculiformis</i>	 <p data-bbox="791 1933 935 1966">Acaciaside</p>	(Mahato <i>et al.</i> , 1989)

Chez *Acacia seyal*, la gomme est principalement constituée de galactose et d'arabinose (Flindt *et al.*, 2005). Des tests phytochimiques préliminaires ont montré la présence de coumarines, de flavonoïdes, de tanins et de saponosides dans l'extrait aqueux de l'écorce d'*A. seyal* (Jacknoon *et al.*, 2012). L'écorce de cette plante est connue pour sa forte teneur en tanins condensés (Mugedo and Waterman, 1992). Deux flavonoïdes, l'apigénine-glucopyranoside et la quercétine 3-O-rutinoside, ont été isolés du fruit (Seigler, 2003). L'huile extraite des fruits de cette plante contient 36 % et 38 % d'acides oléique et linoléique respectivement (Grindley, 1945). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a présenté de composés isolés à partir de l'écorce.

### 3 *Cymbopogon commutatus*

#### 3.1 Description botanique



**Photo 3 :** *Cymbopogon commutatus* (02/12/2015), localité d'Omar-jagga- région d'Arta (Centre de Djibouti), altitude : 571m.

**Famille :** Poaceae

**Genre :** *Cymbopogon*

**Espèce :** *Cymbopogon commutatus* (Steud.) Stapf

**Synonymes :** *Andropogon commutatus* Steud, *Cymbopogon divaricatus* Stapf, *Andropogon floccusus* Schweinf.

**Nom commun :** Citronnelle

### Noms vernaculaires :

Caws dammer (Somalie) ;

Dambahu (Afar) ;

Mhâh, hashishat el leymoon (Arabe).

*Cymbopogon commutatus* est une plante à chaume tel que le blé, de 15 à 150 cm de haut. Les feuilles ont des limbes filiformes, plats et lisses, 10-50 cm de long et 1-4 mm de large. La partie supérieure de l'inflorescence comporte 5-8 paires d'épillets linéaires et denses (photo 3). Le pédicelle le plus bas est enflé (Burkill, 1995). Cette espèce a une coloration verte terne ou rougeâtre (**Photo 3**).

### 3.2 Distribution et Habitat

L'habitat de cette plante suit le tracé du muret vert de l'Afrique allant du Sénégal à Djibouti puis se projette dans les pays du Golf jusqu'au Nord de l'Inde (**Figure 3**).



**Figure 3** : Présence de *Cymbopogon commutatus* dans le monde

### 3.3 Utilisations traditionnelles

Dans tous les pays où poussent *Cymbopogon*, il est rapporté à une utilisation médicinale locale. En Inde les feuilles de *C. pendulus* sont utilisées pour son effet antiseptique comme au Pakistan mais avec la partie aérienne du *C. parkeri* (Avoseh *et al.*, 2015). En Arabie saoudi, les feuilles de *C. schoenanthus* ont différentes usages médicinales comme antidiarrhéique et pour traiter la fièvre et la jaunisse (Al-Ghamdi *et al.*, 2007).

En Afrique, l'hypertension artérielle est traitée traditionnellement en Cameroun avec les feuilles et les fleurs du *C. giganteus* (Jirovetz *et al.*, 2007). En Egypte ce sont des decoctions à basses des feuilles de *C. proximus* qui sont utilisées pour expulser les calculs rénaux (El-Askary *et al.*, 2003). De meme au Congo les feuilles *C. densiflorus* (Steud.) Stapf traite l'asme, l'épilesie, la crampe d'estomac et douleurs (De Smet, 1996).

L'espèce *C. commutatus* est utilisée principalement pour le soin des reins en décoction seule ou avec du thé au nord comme au sud de Djibouti (Hassan-Abdallah *et al.*, 2013). Ce même type de préparation est utilisé au Pakistan pour traiter des maux de tête et de fièvre (Shah *et al.*, 2013). Enfin en Egypte l'huile essentielle du *Cymbopogon commutatus* est utilisée comme insecticide (Heiba and Rizk, 1986).

### 3.4 Etudes pharmacologiques des huiles essentielles

#### 3.4.1 Genre *Cymbopogon*

La quasi-totalité des études pharmacologiques ont été menées dans le sous continent Indien et très souvent elles portent sur l'huile essentielle de la plante. Un certain nombre de ces études publiées ces dernières années ont décrit des propriétés bioactives très variées. Une activité antibactérienne est obtenue pour l'huile essentielle de *C. densiflorus stapf* qui a des CMI entre 250 à 500 µg/mL et 500 à 1000 µg/mL pour les bactéries à Gram+ et à Gram-respectivement (Takaisi-Kikuni *et al.*, 2000). L'HE de *C. pendulus* a une forte activité antifongique contre *Microsporum audouinii*, *Trichophyton rubrum* et *Epidermophyton floccosum* qui sont inhibés à 200 µg/mL (Pandey *et al.*, 1996). Egalement l'HE de *C. winterianus* inhibe 15 souches différentes de *Candida albicans* à la concentration de 625 et 1250 µg/mL (Oliveira *et al.*, 2011). Une des activités la plus étudiée des huiles essentielles de

*Cymbopogon* est son utilisation comme insecticide. L'HE de *C. schoenanthus* présente une concentration létale de 50% avec 2,7 µg/mL contre *Callosobruchus maculatus*, un insecte dévastateur des stocks de haricots (Ketoh *et al.*, 2006). L'utilisation des huiles essentielles de ce genre peut être aussi dans un but répulsif des insectes. Par exemple une boîte contenant des aliments traités avec 0,2g d'huile essentielle par m<sup>2</sup> de *C. winterianus* est restée intacte pendant deux semaines alors que les témoins non traités ont été abimés par des insectes (Wong *et al.*, 2005). Une activité antiparasitaire est également observée pour les HE de *C. martini* et de *C. nervatus* (Nonviho *et al.*, 2010; Hatil *et al.*, 2010). D'autres effets pharmacologiques sont signalés comme un effet anti-inflammatoire pour l'HE de *C. giganteus* (Alitonou *et al.*, 2006) ; un effet anticancéreux pour l'HE de *C. citrus* (Ekpenyong *et al.*, 2014) ; un effet antiviral pour l'HE de *C. nardus* (Singh *et al.*, 2017) et un effet antipyrétique pour l'HE de *C. citratus* (Negrelle and Gomes, 2007).

### **3.4.2 Espèce *Cymbopogon commutatus***

Une étude montre la capacité répulsive de l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus* contre les moustiques, vecteurs de différents types de maladies, pendant quatre heures après application cutanée (Tyagi *et al.*, 1998).

## **3.5 Etudes chimiques des huiles essentielles du genre *Cymbopogon***

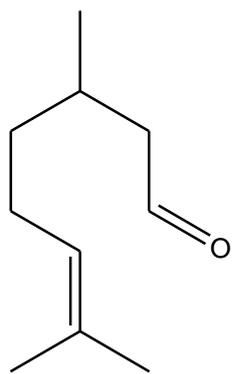
Les études chimiques des constituants des huiles essentielles du genre *Cymbopogon* sont répertoriées dans le **tableau 4** et dans la **figure 4**.

**Tableau 4 :** Analyses par GCMS de l'huile essentielle du genre *Cymbopogon*.

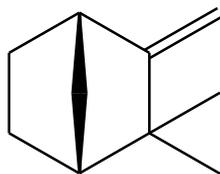
Plantes (huile essentielle)	Composés majeurs	Références
<i>C. winterianus</i>	Citronellal (55,2 %) (1)	(Timung <i>et al.</i> , 2016)
	Camphène (8 %) (2)	(Wany, A. <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. giganteus</i>	cis- <i>p</i> -mentha-1(7),8-dien-2-ol (26 %) (3)	(Jirovetz <i>et al.</i> , 2007)
	Limonène (42 %) (4)	(Bassolé <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. pendulus</i>	Elemicine (53,7 %) (5)	(Shahi <i>et al.</i> , 1997)
	Elemicine (29,4 %)	(Tyagi <i>et al.</i> , 1998)
<i>C. citratus</i>	Géranial (50 %) (6)	(Andrade <i>et al.</i> , 2009)
	Géranial (39,2 %)	(Farhang, V. <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. flexuosus</i>	Néral (33,3 %) (7)	(Matasyoh <i>et al.</i> , 2011)
	Géranyl acétate (12 %) (8)	(Chowdhury <i>et al.</i> , 2010)
	Citral (80 %)	(Ganjewala, 2009)
<i>C. martini</i>	Géranial (84,2 %)	(Dubey, V.S <i>et al.</i> , 1999)
	Géranial (65 %)	(Prashar <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. nardus</i>	Citronellal (30 %)	(Wei and Wee, 2013)
	Géranial (35,7 %)	(Nakahara <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. olivieri</i>	Pipéritone (72,8 %) (9)	(Mahboubi and Kazempour, 2012)
	Pipéritone (48,9 %)	(Sonboli <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. proximus</i>	$\alpha$ -2-carène (22,3 %) (10)	(Menut <i>et al.</i> , 2000)
	Pipéritone (72,4 %)	(Selim, 2011)
<i>C. shoenandus</i>	$\beta$ -phellandrène (13,4 %) (11)	(Khadri <i>et al.</i> , 2008)
	Limonène	(Shahi and Tava, 1993)
<i>C. parkeri</i>	Pipéritone (80,8 %)	(Bagheri <i>et al.</i> , 2007)
	Pipéritone (90 %)	(Javad <i>et al.</i> , 2006)

Le citral, mélange de deux stéréoisomères à base de géranial (60 %) et de néral (40 %), est souvent le composé principal des huiles essentielles de ce genre *Cymbopogon* (Lewinsohn *et al.*, 1998). Cependant quelques espèces possèdent d'autres composés majoritaires comme la pipéritone pour *C. parkeri*, *C. proximus* et *C. olivieri* (**Tableau 4**).

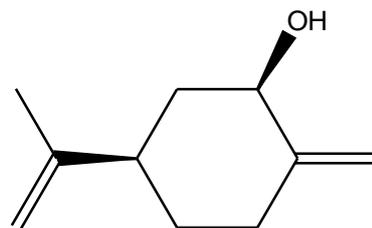
Une huile essentielle de *Cymbopogon commutatus*, utilisée comme répulsive, a été analysée par GCMS et a montré trois composés majoritaires : le géraniol (74,2 %), l'acétate de géranyl (5,7 %) et le géranial (4,6 %) (Tyagi *et al.*, 1998).



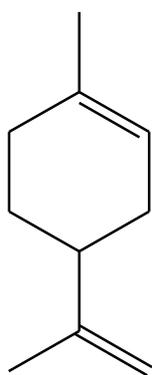
1



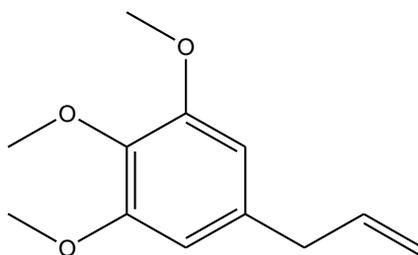
2



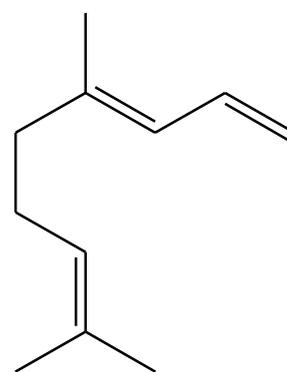
3



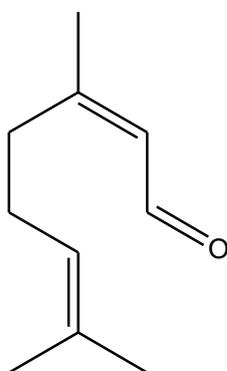
4



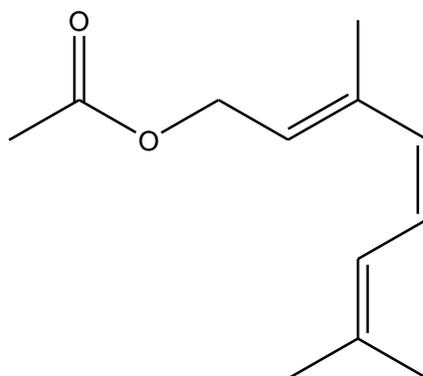
5



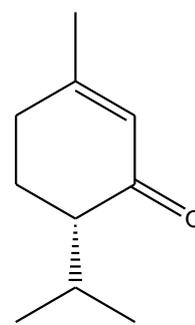
6



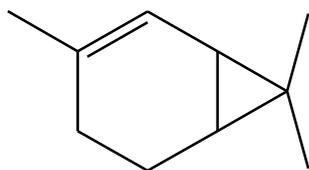
7



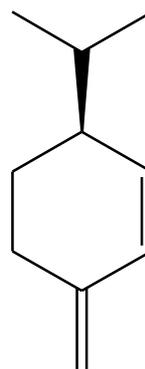
8



9



**10**



**11**

**Figure 4** : Structures des principaux composés de l'huile essentielle des *Cymbopogon*.

## Chapitre II : Chimie des métabolites spécialisés

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas directement impliquées dans les processus de croissance des organismes vivants, contrairement aux métabolites primaires. Ce concept est historiquement attribué à Kossel (Bourgaud *et al.*, 2001). Cependant leurs rôles ne sont pas secondaires dans la survie des organismes producteurs. Pour cette raison, on préfère maintenant les appeler métabolites spécialisés. Ce nom semble mieux adapté à leurs véritables actions.

La plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit et son mouvement dans l'espace est limité. Ces agressions, par des prédateurs ou des microorganismes pathogènes entre autres, peuvent compromettre la survie de la plante. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre.

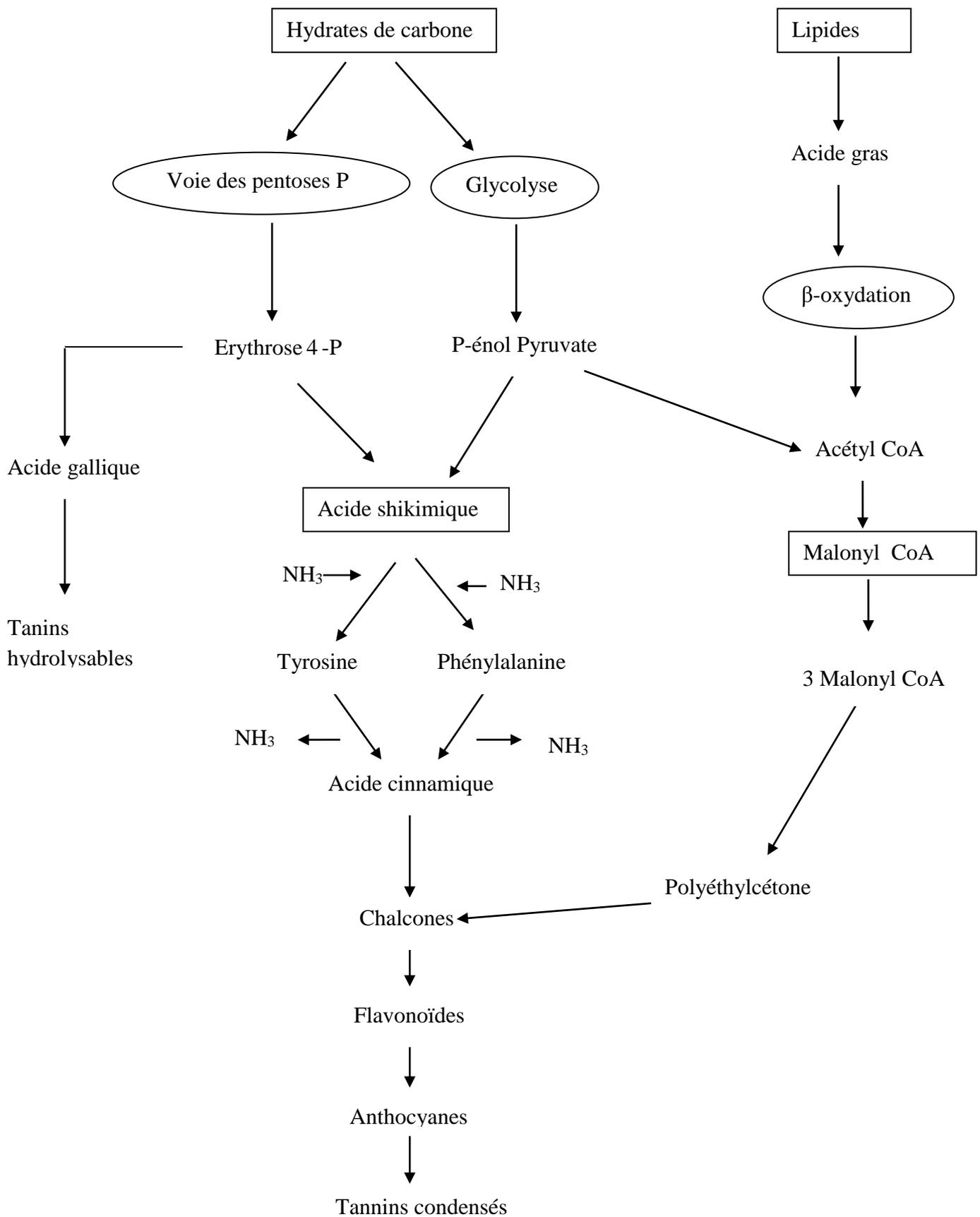
On distingue classiquement plusieurs catégories de métabolites spécialisés en fonction de leur nature biochimique et de leur origine biosynthétique. Elles peuvent être divisées en trois super grandes familles tels que les polyphénols, les composés azotés et les terpènes-stéroïdes.

### 1 Les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils sont localisés dans toute la partie de la plante. Les polyphénols sont de plus en plus présents dans la recherche médicale (KANSOLE, 2009). Ce regain d'intérêt est lié à leur rôle d'antioxydants naturels qui pourraient contribuer à la prévention et au traitement du cancer (Bishayee and Sethi, 2016), des maladies inflammatoires (Laughton *et al.*, 1991), des maladies cardiovasculaires (Frankel *et al.*, 1993) et des maladies neurodégénératives (Orgogozo *et al.*, 1997).

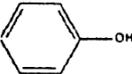
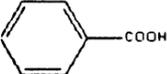
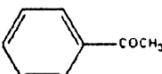
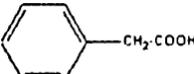
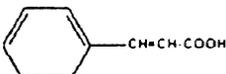
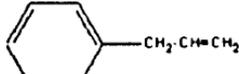
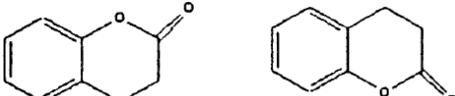
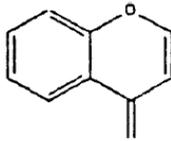
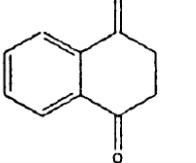
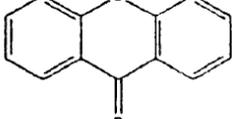
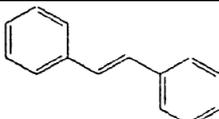
Ils sont biosynthétisés selon deux voies principales : voie du shikimate et voie de l'acétate (**Figure 5**, (Richter, 1993)).

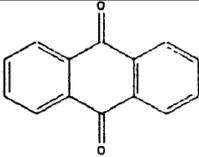
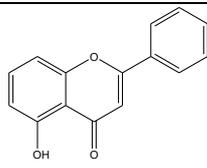
Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille; ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyl (**Tableau 5**).



**Figure 5** : Deux voies de biosynthèse des polyphénols (Richter, 1993).

**Tableau 5** : Principales classes de polyphénols (Bravo, 1998).

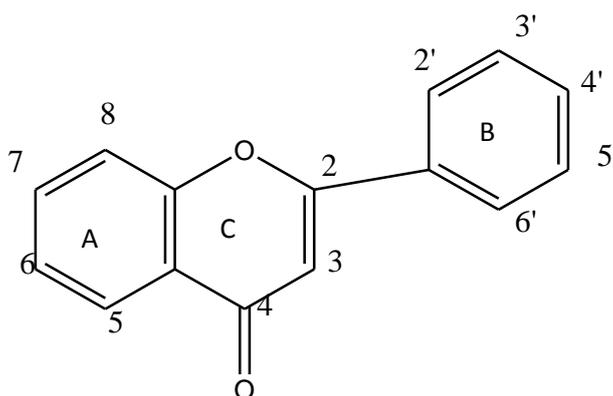
Classes	Squelette de base	Structure de base
Phénols simples	C6	
Benzoquinones	C6	
Acides phénoliques	C6-C1	
Acétophénonnes	C6-C2	
Acides Phénylacétiques	C6-C2	
Acides hydroxycinnamiques	C6-C3	
phénylpropènes	C6-C3	
Coumarines, isocoumarines	C6-C3	
Chromones	C6-C3	
Naphtoquinones	C6-C4	
Xanthones	C6-C1-C6	
Stilbènes	C6-C2-C6	

anthraquinones	C6-C2-C6	
flavonoïdes	C6-C3-C6	
Lignines	(C6-C3) <sub>n</sub>	

Les polyphénols comprennent essentiellement les flavonoïdes, les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthones (Stalikas, 2007).

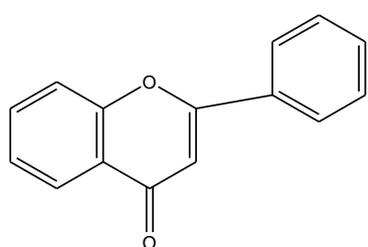
## 1.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments hydrosolubles fréquents chez les végétaux et ils sont responsables de certaines colorations des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Leur structure de base (**Figure 6**) est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) et elle est constituée de deux noyaux aromatiques reliés souvent par un hétérocycle oxygéné (Wollgast and Anklam, 2000).

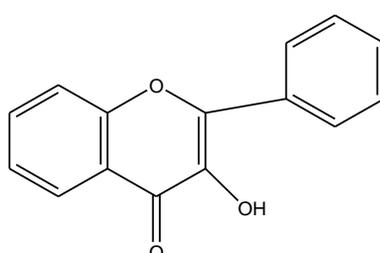


**Figure 6** : structure de base d'un flavonoïde

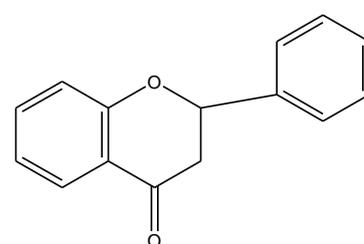
Près de 6500 flavonoïdes sont repartis en 8 sous familles (**Figure 7**, (de Rijke *et al.*, 2006)). Les flavonoïdes sont produits comme une réponse des plantes contre des stress biotiques ou abiotiques causés entre autres par une élévation de la radiation des UV-B (Strack, 1997) ; (Rosenberg Zand *et al.*, 2002) ; (Olsson *et al.*, 1998) ; (Reuber *et al.*, 1996)), par une infection causée par des microorganismes (Middleton and Teramura, 1993) ou par une attaque d'herbivores (Wang *et al.*, 1998). Les flavonoïdes participent également à la santé humaine et animale à travers l'alimentation. En effet ils possèdent des propriétés antioxydantes (Rice-Evans *et al.*, 1997) ou des actions oestrogéniques (Miksicek, 1993) ainsi qu'un éventail d'activités antimicrobiennes et pharmacologiques (E. Wollenweber, 1988) ; (Weidenbörner and Jha, 1997)).



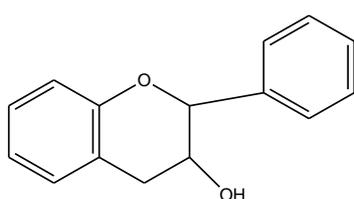
Flavones



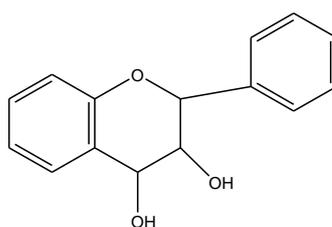
Flavonols



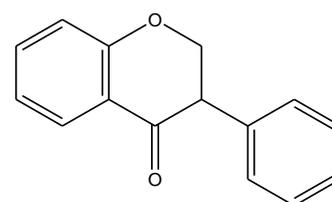
Flavanones



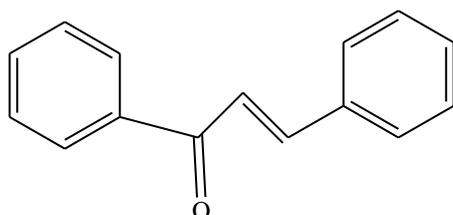
Flavanols



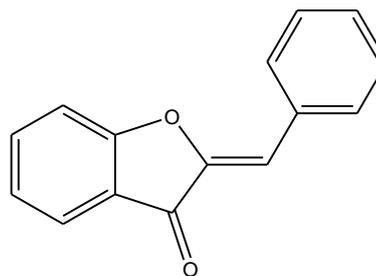
Flavandiol



Isoflavonoids



Chalcones

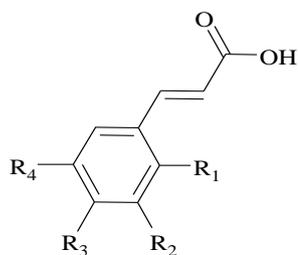


Aurones

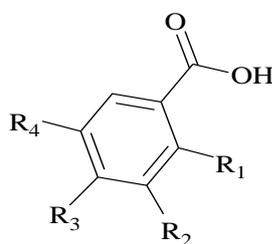
**Figure 7 :** Structures de base des principales classes de flavonoïdes.

## 1.2 Les phénols et acides phénoliques

Les phénols sont caractérisés par la présence d'une ou plusieurs unités phénoliques comportant un (ou des) noyau(x) benzénique(s). Ils sont relativement rares dans les plantes et sont associés aux acides phénoliques (Harborne, 1998). Ces composés sont des dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (**Figures 8**).



R1=R2=R3=R4= H Acide cinnamique  
 R1=OH ; R2=R3=R4= H Acide ortho coumarique  
 R1=R3=R4= H ; R2= OH Acide méta-coumarique  
 R1=R2=R4=H ; R3= OH Acide para-coumarique  
 R1=H ; R2=OCH3 ; R3=OH ;R4= H Acide férulique  
 R1=H ; R2=OCH3 ; R3=OH ;R4=OCH3 Acide sinapique  
 R1=H ; R2=OH ; R3=OH ;R4= H Acide caféique



R1=R2=R3=R4= H Acide benzoïque  
 R1=OH ; R2=R3=R4= H Acide salicylique  
 R1=R2=R4= H ; R3= OH Acide parahydroxybenzoïque  
 R1=R4=H ; R2=OCH3 ;R3= OH Acide vanilique  
 R1=R4=H ; R2=R3=OH Acide protocatéchique  
 R1=R4=H ; R2=R3=OCH3 Acide vétratrique  
 R1=H ; R2=R4=OCH3 ; R3=OH Acide syringique

**Figure 8:** Dérivés de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque.

Ils sont anti-inflammatoires, antiseptiques urinaires, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques et immunostimulants (BRUNETON, 2016).

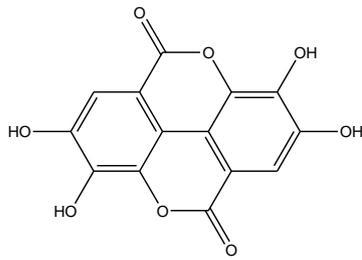
### 1.3 Les tanins

Les tanins sont très largement présents dans les plantes vasculaires et constituent une barrière contre les herbivores. Une augmentation de la production de tanins est souvent associée à un état pathologique ou état particulier (Haslam, 2007).

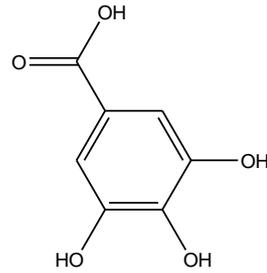
Chimiquement, il existe deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, qui sont répartis de façon inégale dans tout le règne végétal (Harborne, 1998) (**Figure 9**). En effet certains espèces, comme *Acacia seyal* ou *Mangifera indica*, ont des teneurs en tanins pouvant aller jusqu'à 12 % du poids sec de la plante alors que d'autres comme les espèces de la famille des Cucurbitaceae contiennent très peu ou pas des tanins. De plus les feuilles, les fruits et les écorces en contiennent plus que les autres parties de la plante (Sereme *et al.*, 2011).

Par ailleurs les tanins hydrolysables sont des esters du glucose et d'acides phénoliques, ce sont l'acide gallique (tanin galliques) et l'acide ellagique (tanin ellagique). En revanche les tanins condensés, appelés proanthocyanidines ou procyanidines, sont des polyphénols de masse molaire moléculaire élevée.

Les tanins sont des antioxydants bénéfiques contre les prooxydants et les toxines nuisibles. En effet les tanins balayent les radicaux libres et réduisent d'autres composés oxydés (Buettner, 1993, Halliwell and Gutteridge, 2015). Cependant, des études montrent que la qualité nutritionnelle des protéines alimentaires peut être endommagée par des tanins ((Hagerman *et al.*, 2003); (Halliwell *et al.*, 2000); (Kanner and Lapidot, 2001)).

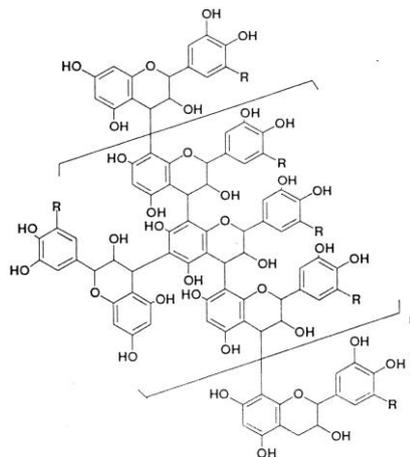


Acide ellagique



Acide gallique

A



B

**Figure 9** : Exemples de structures de base de deux types de tanins ; A : hydrolysables et B : condensés.

## 2 Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde (dérivé alcalin) est utilisé pour la première fois par W. MEISSNER au début du XIX<sup>ème</sup> siècle pour désigner des substances végétales à caractère basique contenant un atome d'azote (Hesse, 2002). A cet époque, les auteurs pensaient que les alcaloïdes étaient uniquement produits par les plantes avant que ces substances soient isolées par la suite de certains animaux (Mann *et al.*, 1994).

Il existe une très grande diversité des familles d'alcaloïdes, qui ont été classés en fonction de leurs origines biosynthétiques et de la nature des hétérocycles azotés.

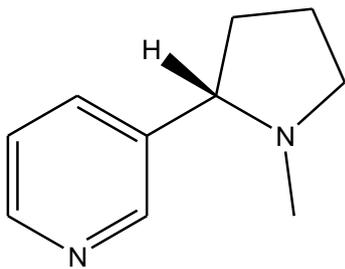
On distingue généralement :

**Les alcaloïdes vrais** sont des dérivés d'acides aminés au point de vue de la biosynthèse et possèdent au moins un hétérocycle azoté. Ce sont des substances très actives biologiquement et sont présents dans les plantes soit sous forme libres, soit sous forme d'un sel, soit comme N-oxide (quelques exemples dans la **Figure 10**).

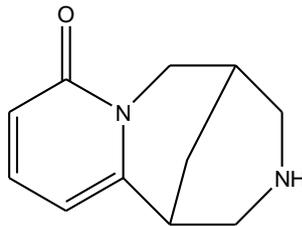
**Les pseudo-alcaloïdes** possèdent souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas issus des acides aminés (Badiaga, 2011). Ils sont dérivés soit de l'isoprénoïdes ou de l'acétate (quelques exemples dans la **Figure 10**).

**Les proto-alcaloïdes** sont élaborés *in vivo* à partir d'un acide aminé mais l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle contrairement aux deux autres familles d'alcaloïdes (quelques exemples dans la **Figure 10**).

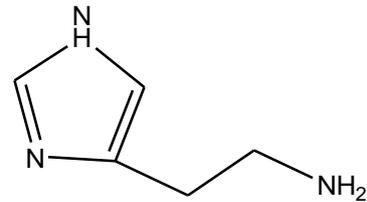
#### Alcaloïdes vrais



Nicotine

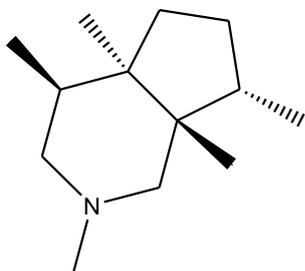


Cytisine

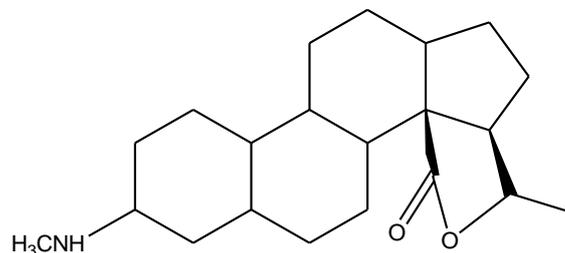


Histamine

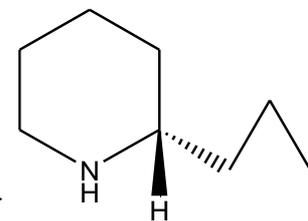
#### Pseudo-alcaloïdes



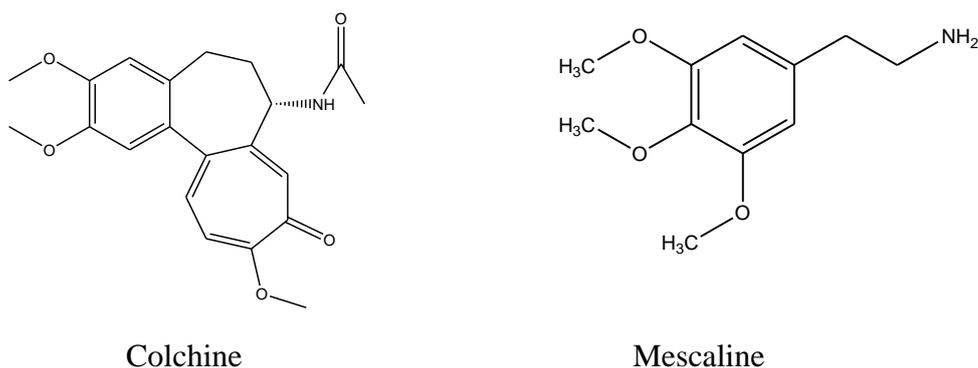
$\beta$ - skytanthine



Paravallarine



Coiine



**Figure 10** : Structures de plusieurs alcaloïdes

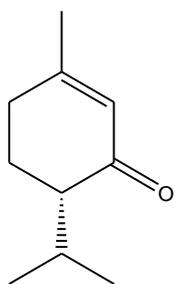
Malgré cette répartition en apparence claire, il est difficile de l'appliquer d'une manière systématique pour classer un composé azoté d'origine naturelle. En effet par exemple certains composés azotés sont exclus par convention tels que les amines simples et les bétalaïnes (BRUNETON, 2016).

### 3 Les terpénoïdes

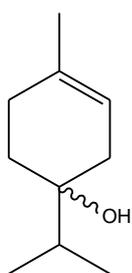
Les terpénoïdes sont constitués à base d'unités isopréniques :  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}=\text{CH}_2$ . Leur classification repose sur le nombre d'unités isopréniques :

- Deux unités (C10) → **monoterpènes**
- Trois unités (C15) → **Sesquiterpènes**
- Quatre unités (C20) → **Diterpènes**
- Six unités (C30) → **Triterpènes** et stéroïdes
- Huit unités (C40) → **Caroténoïdes**.

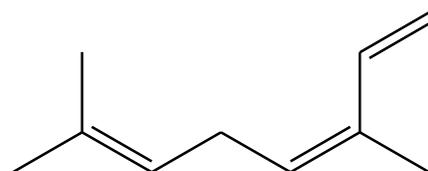
Les terpénoïdes représentent 60 % des métabolites spécialisés (Firn, 2010). Quelques exemples sont donnés dans la **Figure 11**.



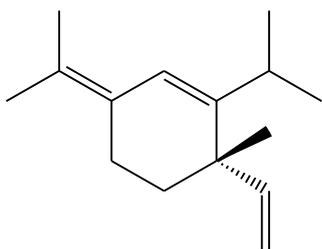
Pipéritone



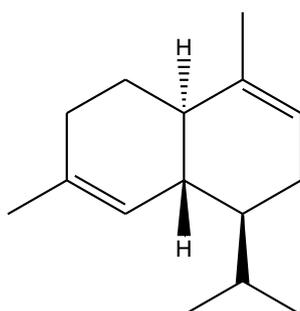
Terpinène-4-ol



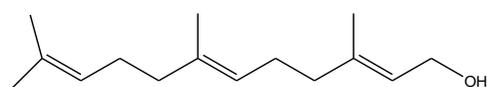
Ocimène



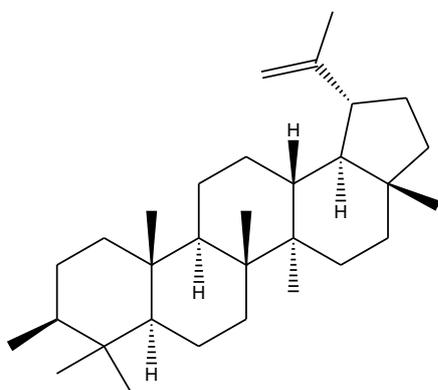
α-élémane



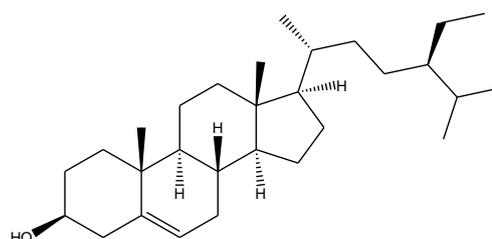
α-cadinène



Farnésol



Lupéol



β-sitostérol

**Figure 11** : Quelques exemples de terpénoïdes

### 3.1 Monoterpènes et sesquiterpènes présents dans les huiles essentielles

Selon la pharmacopée européenne (6<sup>e</sup> éd.01/2008-2008), une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage ».

Au plan chimique, l'huile essentielle est majoritairement constituée par des mono- et des sesquiterpènes, qui diffèrent par leur température d'ébullition (140-180°C et > 200°C respectivement) (Harborne, 1998).

Les huiles essentielles sont utilisées dans les domaines de la santé, de la cosmétique et de l'agro-alimentaire.

### 3.2 Triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes sont des composés comportant trente atomes de carbone issu de la cyclisation du 3S-2,3-époxydo-2,3-dihydro-squalène (Kulshreshtha *et al.*, 1972). Ils sont très souvent oxygénés sous forme d'alcools, d'aldéhydes ou d'acides carboxyliques (**Figure 11**).

Les stéroïdes se présentent comme des triterpènes tétracycliques et ayant perdu au moins trois méthyles (BRUNETON, 2016). Cependant la distinction entre les stéroïdes et les triterpènes n'est pas si simple et certains composés comme les cucurbitacines se retrouvent dans l'un ou l'autre groupe selon les auteurs.

Les activités biologiques rapportées sur les composés de cette sous famille sont dans les domaines des anticancéreux, des anti-inflammatoires, des antiulcéreux, des antimicrobiens et des antiviraux (Dzubak *et al.*, 2006).

# **Matériels et méthodes**

# 1 Matériel végétal

Trois plantes ont été étudiées dans le cadre de ce travail de recherche :

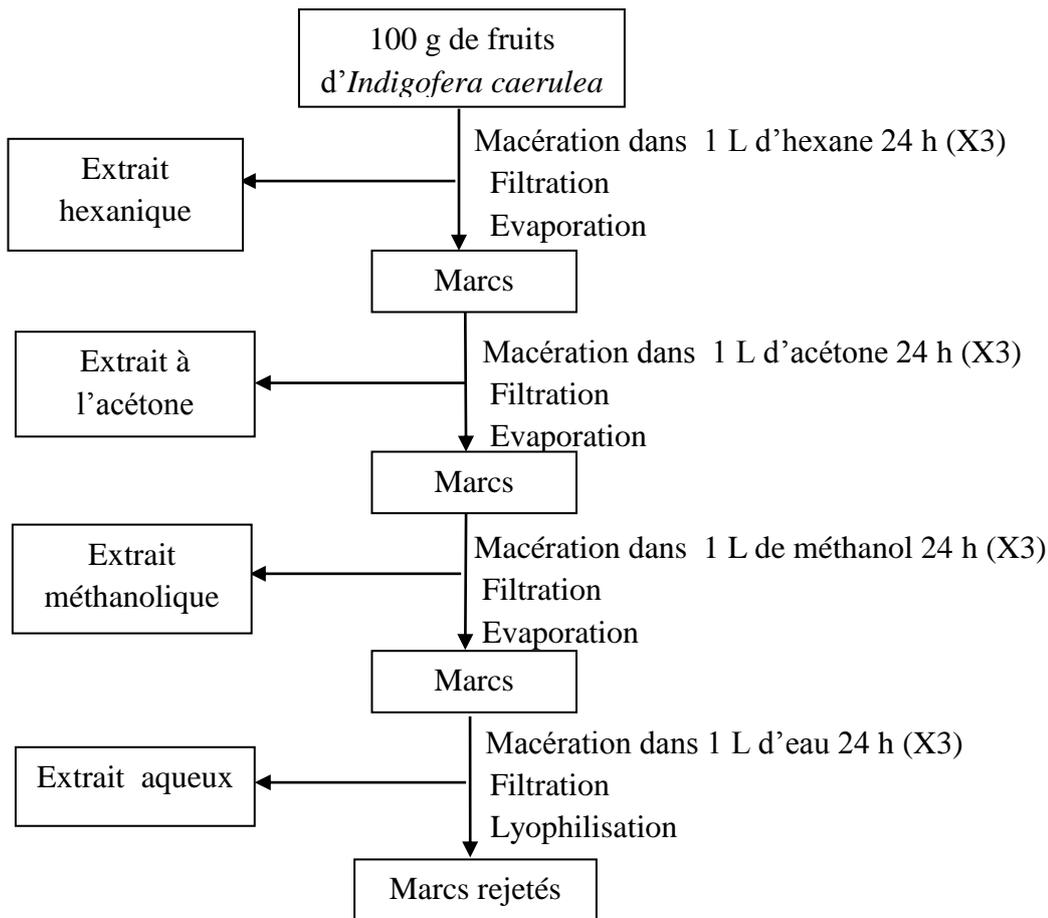
- ✓ Les fruits d'*Indigofera caerulea* ont été récoltés en 2016 dans la localité d'Abaido, région de Dikhil (Sud Ouest de Djibouti). Après l'identification botanique, un échantillon a été déposé dans l'Herbier national de Djibouti avec la référence 176/2016/Dj. Le séchage des fruits a été fait dans une étuve pour éviter leur dégradation par les insectes qui raffolent de ce fruit.
- ✓ L'écorce d'*Acacia seyal* a été récoltée en 2015 dans la localité de Day, région de Tadjourah (Nord de Djibouti) à une altitude de 1313 m. Après l'identification, un échantillon a été déposé à l'Herbier national de Djibouti avec la référence 46/2015/Dj. Le reste a été séché pendant deux semaines à l'air libre avant l'extraction.
- ✓ La partie aérienne de *Cymbopogon commutatus* a été récoltée dans le grand bara, plaine désertique au Sud de Djibouti. Après l'identification botanique, un échantillon a été déposé dans l'Herbier national de Djibouti avec la référence 210/2015/Dj. Cette plante a été extraite à l'état frais par hydrodistillation pour éviter la perte de composés volatiles.

## 2 Extraction

### 2.1 Procédure d'extraction des fruits d'*Indigofera caerulea* Rox

Les fruits de cette plante (100 g) sont broyés et extraits par des macérations successives avec des solvants de polarité croissante (hexane, acétone, méthanol et eau). La macération dans chaque solvant dure 24 h et elle est répétée trois fois successivement (**Figure 12**).

Après l'évaporation à sec des extraits organiques et la lyophilisation de l'extrait aqueux, les échantillons sont conservés dans le réfrigérateur à 4°C avant leur utilisation.



**Figure 12 :** Extraction séquentielle avec des solvants de polarité croissante.

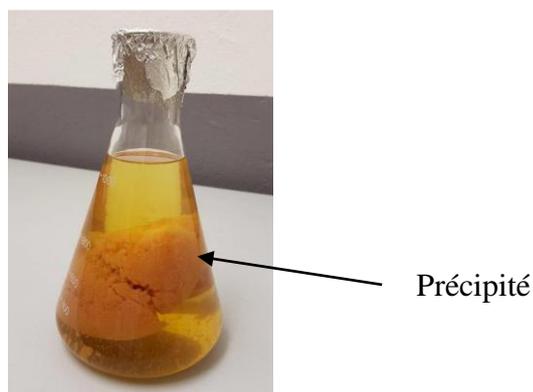
## 2.2 Procédure d'extraction de l'écorce d'*Acacia seyal* Del

La poudre de l'écorce d'*Acacia seyal* (615 g) est extraite avec 5 litres de méthanol en utilisant un appareil de Soxhlet pendant 7 heures. L'extrait est évaporé au rotavapor et la masse obtenue est de 83 g, ce qui correspond à un rendement de 13,5 %.

Parallèlement, la poudre de l'écorce d'*Acacia seyal* (200 g) est mise à macérer dans 600 mL d'eau pendant 30 heures en suivant le mode de préparation traditionnel. Le filtrat est lyophilisé et la masse obtenue est de 4,9 g, ce qui correspond à un rendement de 2,4 %.

Ces deux extraits, méthanolique et aqueux, sont riches en tanins condensés. Ils ont été précipités selon le protocole par Lhuillier (Thèse de doctorat, 2007) avec quelques modifications en utilisant le dichloromethane, moins toxique que le chloroforme (**Figure 13**).

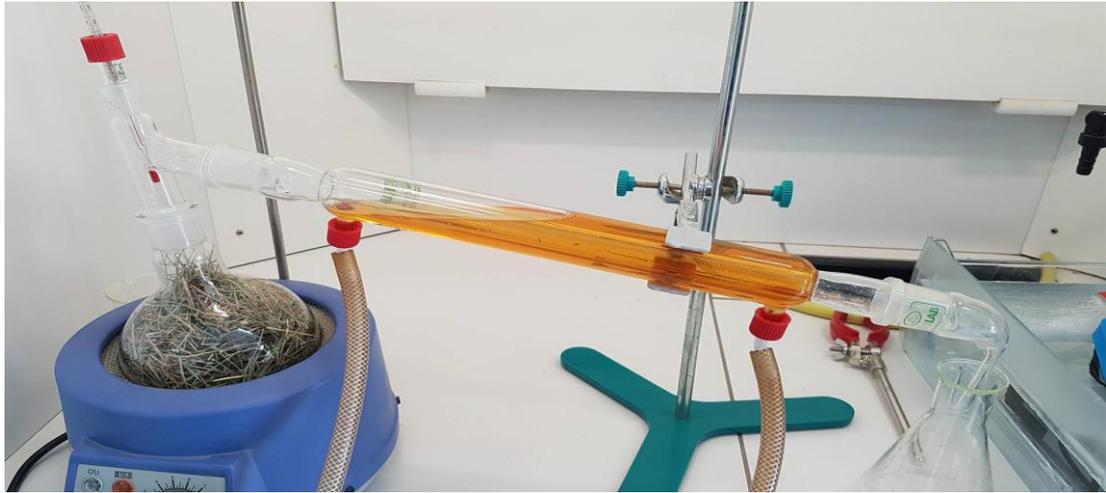
Il s'agit de dissoudre l'extrait dans du méthanol à une proportion de 80 mL du solvant alcoolique pour 3 g d'extrait sec. Puis il est ajouté du dichlorométhane dans un ratio de 8 : 92 (méthanol : dichlorométhane). Spontanément les tanins condensés précipitent. Le mélange ainsi obtenu est laissé pendant 3 heures à 4°C et puis filtré. Après évaporation, l'extrait est très appauvri au pro anthocyanidols.



**Figure 13** : Précipitation des tanins condensés

### **2.3 Procédure d'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus***

La partie aérienne de la plante fraîche *Cymbopogon commutatus* (700 g) est coupée en petits morceaux, à la main. L'extraction de l'huile essentielle se fait par hydro distillation. Cette méthode consiste à chauffer de l'eau ainsi que l'espèce végétale, à extraire, dans un ballon jusqu'à ébullition. Sous l'effet de la chaleur, les cellules végétales éclatent et libèrent l'huile essentielle, puis les vapeurs d'eau et d'huile essentielle vont s'élever pour atteindre un réfrigérant (**Figure 14**). Le distillat (eau+huile essentielle) est recueilli à la sortie de ce réfrigérant. En raison de la petite taille de notre système d'hydro distillation, 14 répétitions (utilisant 50 g de plantes pour chaque distillation) ont été nécessaires pour traiter la totalité de la plante collectée pour cette étude.



**Figure 14** : système d'hydrodistillation

### **3 Techniques chromatographiques analytiques**

#### **3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les CCM sont effectuées sur des plaques en silica gel phase normale 60 F254 (0,2mm d'épaisseur) ou silica gel C18 F254 (0,25mm).

Le développement est réalisé dans des cuves 20X20cm à deux compartiments. Les différentes phases mobiles utilisées sont :

- Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau 100 -13,5-10 v/v/v
- Acétate d'éthyle / Acide formique / Acide acétique / H<sub>2</sub>O 100-11-11-26 v/v/v
- Toluène / Acétate d'éthyle 75-15 v/v
- Eau-Methanol (avec 2 % acide formique) 10-90 à 50-50 v/v

Les réactifs de révélation utilisés sont :

- ✓ **Anisaldéhyde** : Pour préparer ce révélateur, 0,5 mL d'anisaldéhyde est mixé avec 10 mL d'acide acétique glacial suivi par l'ajout, dans l'ordre, de 85 mL de méthanol et 5 mL d'acide sulfurique concentré (Corthout *et al.*, 1999).

- ✓ **Réactif de Neu** : La plaque est pulvérisée avec 1 % d'acide amino-2-éthylidiphénylborique dans le méthanol suivi par la pulvérisation de 5 % de PEG 4000 dans l'éthanol. La plaque de CCM est chauffée à 110 °C pendant 2 minutes. La détection est faite sous UV à 365 nm où les taches de flavonoïdes donnent des fluorescences jaunes, vertes ou orange (Wagner and Bladt, 1996).
- ✓ **Réactif de Liebermann** : 10 mL d'acide sulfurique concentré et 10 mL d'anhydride acétique sont mélangés dans 100 mL d'éthanol à 95 % juste avant utilisation. Après pulvérisation de ce mélange, la plaque CCM est chauffée à 100 °C pendant 10 minutes. Les composés terpéniques ou stéroïdiques présentent une fluorescence à 366 nm (Lhuillier, 2007).

### **3.2 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) analytique**

L'analyse des extraits, des fractions semi-purifiées et des composés purs a été réalisée en utilisant un système RP-HPLC. Ce système se compose d'une pompe Lachrom type 7100, d'un injecteur avec une boucle de 30 µL et d'un détecteur à barrettes de diodes, type Merck Hitachi Lachrom 7450 piloté par un logiciel D-7000 HSM (Merck). La colonne utilisée lors de ces analyses est une colonne C18 ODS HYPERSIL 5µM 250X4.6 MM.

La phase mobile est un mélange de A : eau + 2 % d'acide formique et de B : méthanol + 2 % d'acide formique. Le pourcentage de B va de 0 % à 100 % en 20 min, puis de 20-25 min avec 100 % B et puis ramené à 0 % B à 25 min durant 5 min et enfin stabilisé à 0 % B pendant 5 min. Ce gradient est légèrement modifié selon la résolution.

Le débit est fixé à 1 mL/ min et le volume d'injection à 100 µl. Les spectres d'absorption UV-vis ont été enregistrés à 200 jusqu'à 400 nm pendant l'analyse HPLC.

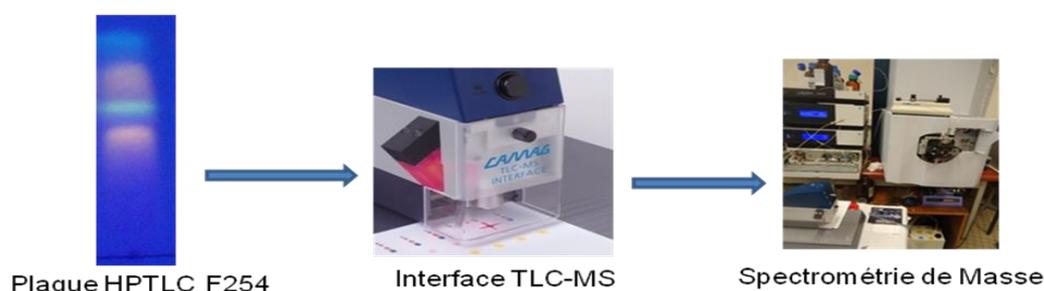
### 3.3 Chromatographie-Liquide couplée avec la Spectrométrie de masse (LCMS)

La LC est constituée d'un système U3000-Dionex microTOFLCTM – System (Bruker Daltonics), d'un injecteur avec une boucle de 1  $\mu$ L. La phase mobile est un mélange d'eau avec 2% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le programme d'éluion est un gradient linéaire de 5% à 100% de B de 5 min à 40 min et maintenu 100% de B pendant 5 min. La colonne utilisée est un ODS HYPERSIL 5 $\mu$ M 250X2.1 mm.

Les analyses MS ont été réalisées au Service Commun de Spectrométrie de Masse (Université de Lorraine), en utilisant un appareil microtof-Q<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics) fonctionnant en mode ESI (electrospray ionisation) positif et négatif, avec un capillaire réglé sur 4500v et traversé par un gaz sec (10 ml / min) à 190 ° C. L'intervalle du scan m/z est défini selon les composés recherchés.

### 3.4 Chromatographie sur couche mince couplée à la Spectrométrie de masse (HPTLC-MS)

Le système HPTLC-MS consiste à coupler les séparations effectuées par CCM avec une spectrométrie de masse qui permet de déterminer le poids moléculaire des tâches sur la plaque (Figure 15).



**Figure 15** : Schématisation du système HPTLC-MS

L'extrait méthanolique des fruits d'*Indigofera caerulea* est déposé sur une plaque silica gel 60 F254 (Merck) haute performance avec un déposeur semi-automatique (modèle Linomat 5, CAMAG) et l'élution se fait à l'aide d'un éluant adéquat. Après le séchage de la plaque, la révélation des tâches de flavonoïdes est faite sur la moitié de la plaque, à l'aide du réactif de Neu. Ensuite, à l'aide de l'interface CAMAG, les tâches de la seconde moitié de la plaque, qui n'a pas reçu de révélateur, sont prélevées et injectées dans une MS microT of-Q 98 de source ESI positive/négative. L'interface est équipée à une pompe dont l'entrée est reliée à une UPLC Pump bruker et la sortie à MS microT of-Q 98. L'acétonitrile (HPLC grade) est utilisé comme éluant et les données sont analysées par Bruker Compass DataAnalysis 4.2.

### **3.5 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS)**

Les composés de l'extrait hexanique d'*Indigofera caerulea*, de la fraction F5 de l'*Acacia seyal* Del et de l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus* ont été identifiés par GCMS.

Les échantillons sont dissous dans le dichlorométhane (1mg/mL) et puis dilués 1 : 50 (v/v) dans l'hexane. 1  $\mu$ L de cette solution est injecté dans un système GCMS SHIMADZU QP 2010. La GC est équipée d'une colonne DB-5 ms (30 m, 0,25 mm d'épaisseur). La température d'analyse est programmée ainsi : 60 °C pendant 5min puis une montée jusqu'à 320 °C pendant 36 min. L'hélium est utilisé comme phase mobile à un débit de 1.0 mL/min. Le volume d'injection est 1 $\mu$ L et la température de l'injecteur est à 250 °C. Le MS opère en mode impact électronique (EI). L'intervalle du scan  $m/z$  est compris entre 35 et 900.

L'identification des composés est basée sur une comparaison du spectre individuel de chaque composé avec les bases de données NIST08 de Shimadzu.

## **4 Techniques de séparation par chromatographie**

### **4.1 Chromatographie sur plaque préparative (CCM préparative)**

La CCM préparative est une méthode chromatographique semblable à une CCM classique, mais qui a la particularité de présenter une couche de silice d'épaisseur plus importante permettant un dépôt d'échantillon plus important.

Les plaques utilisées sont recouvertes par un gel de silice de 0,5 mm d'épaisseur sur un verre de dimension 20X20cm.

Cette technique est utilisée pour la purification de la fraction F5 issue de l'extrait méthanolique d'*Acacia seyal*.

La fraction est solubilisée dans le dichlorométhane puis déposée sur la plaque décrite ci-dessus. Le développement se fait dans une cuve contenant du toluène-acétate d'éthyle 75-15. A l'extrémité de la plaque, un dépôt identique est fait pour la révélation des tâches avec l'anisaldéhyde.

## 4.2 Chromatographie sur colonne ouverte

Des colonnes en verre sont utilisées avec deux types de phase stationnaire : Gel de silice et Sephadex LH-20. La quantité de la phase stationnaire et les dimensions des colonnes dépendent de la quantité d'échantillon à purifier.

Dans le cas des colonnes renfermant du gel de silice, deux systèmes d'éluants sont utilisés en isocratique ou en gradient: acétate d'éthyle/méthanol/eau à 100/13,5/10 et toluène-acétate d'éthyle 75-15.

Dans le cas du Sephadex le système d'éluants est celui-ci: méthanol, eau-méthanol 80/20 ou et acétone-eau 80/20.

Les fractions issues de ces colonnes sont rassemblées selon leur profil en CCM.

## 4.3 Chromatographie préparative CombiFlash

L'appareil de chromatographie préparative utilisé est un CombiFlash Rf+. Il se base sur la même méthode de fonctionnement qu'une colonne ouverte mis à part que le processus s'effectue sous haute pression (**Figure 16**).

Les colonnes utilisées sont pré-remplies à 16, 40, 80 et 120 g de gel de silice (phase normale) ou C18 (phase inverse).

Le produit à purifier est dissous avec trois à quatre fois sa masse de gel de silice dans un solvant organique et l'ensemble est évaporé. Après homogénéisation, la poudre est introduite dans le compartiment au dessus de la colonne.

Les systèmes de solvants utilisés, dans le cas de la phase normale, sont identiques à ceux utilisés avec la colonne ouverte. Cependant, dans le cas des colonnes C18, la phase mobile est le mélange : eau/méthanol/acide formique à 30/70/1 v/v/v en isocratique ou en gradient.



**Figure 16 :** CombiFlash Rf+.

#### **4.4 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative**

La chromatographie semi-préparative utilisée pour purifier les fractions semi purifiées, issues des purifications par Combiflash pour les extraits d'*Indigofera caerulea* et d'*Acacia seyal*, est de marque Gilson, équipée d'une pompe 321. Une colonne C18 ODS HYPERSIL 5 $\mu$ m, 250 X 21,2 mm constitue la phase stationnaire et le système d'éluant est un gradient de A (eau+2 % acide formique) et de B (méthanol+2 % acide formique). Chaque pic est récupéré dans un tube puis analysé par HPLC pour vérifier sa pureté.

## **5 Méthodes physico-chimiques d'identification des molécules**

### **5.1 Spectrophotomètre ultraviolet (UV)**

L'absorbance des échantillons dissout dans le méthanol a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV carry 3E, double faisceau (un faisceau pour l'échantillon et l'autre faisceau pour le témoin) dans l'intervalle de 200-800 nm.

### **5.2 Spectrophotométrie infra-rouge (IR)**

Les spectres IR à transformée de Fourier ont été enregistrés sur un spectrophotomètre FTIR Shimadzu IRAffinity-1-8400S piloté par un logiciel Labsolution IR.

### **5.3 Désorption-ionisation laser assistée par matrice-ToF (MALDI-ToF)/MS<sup>2</sup>**

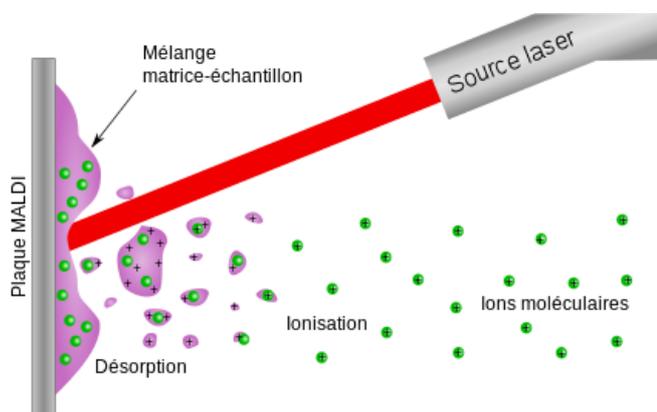
Un instrument de type MALDI-TOF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol. L'échantillon préalablement fixé sur une plaque est pulvérisé par une source de laser et les ions moléculaires ainsi formés sont analysés par l'instrument de masse (**figure 17**).

L'échantillon de tanins précipités issus d'*Acacia seyal*, a été dissous dans le méthanol (10 mg/mL). La matrice utilisée était l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB, 100 mg/mL dans un mélange 50/50 v/v eau/acétonitrile). Pour améliorer la formation des ions, l'eau contient du NaCl (1mg/mL). Un mélange de 10 µL de l'échantillon de tanins et 10 µL de la matrice DHB est préparé et ensuite 1 µL de ce mélange a été déposé sur une plaque d'acier inoxydable et séché à la température ambiante.

L'enregistrement a été fait avec un MALDI-TOF mass spectrometrie Ultraflex III, laser NdYAG 266 nm à 200 Hz.

Trois modes ont été utilisés : linéaire, phases positive et négative. Chaque spectre est obtenu après 1000 shots de laser.

Les pics majeurs ont été soumis à un fractionnement MS-MS.



**Figure 17 :** Illustration d'une analyse par MALDI-TOF (image wikipédia, 2018)

## 5.4 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III 400 MHz (respectivement 400,13 MHz et 100,61 MHz), Bruker BBFO Probe. La constante de couplage ( $J$ ) est exprimée en Hz. Les échantillons, préalablement séchés avec une pompe sous vide, ont été dissous dans 0,5 mL de solvants deutérés tels que le méthanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), le chloroforme ( $\text{CDCl}_3$ ) ou le diméthylsulfoxyde ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

## 6 Procédés physico-chimiques

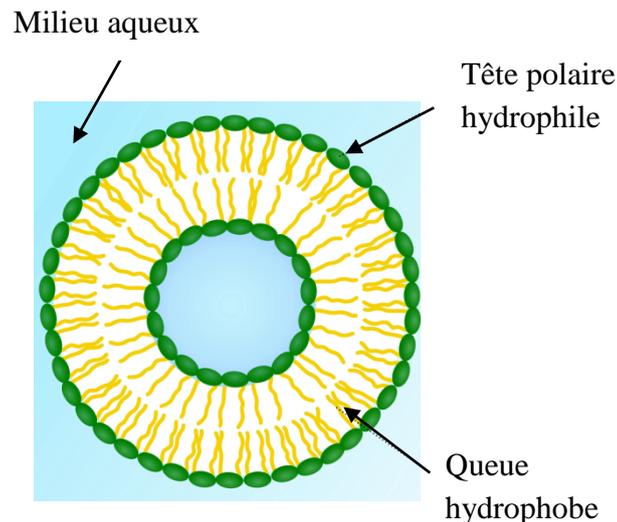
### 6.1 Saponification de l'extrait hexanique d'*Indigofera caerulea*

L'extrait hexanique est riche en acides gras. Pour les éliminer et rechercher d'autres composés dans cet extrait, un protocole décrit par Adibi a été utilisé (Abidi, 2001). Il s'agit d'agiter

l'extrait hexanique dans 1 M d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol pendant une nuit à la température ambiante. Le mélange a été dilué dans l'eau et extrait trois fois avec le dichlorométhane. Les phases dichlorométhaniques sont combinées, lavées avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Enfin l'échantillon a été séché avec du sulfate de sodium anhydre. Après évaporation à sec, le résidu insaponifiable a été soumis aux fractionnements chromatographiques.

## 6.2 Micro émulsion des huiles essentielles

Pour améliorer la solubilité de l'huile essentielle dans l'eau, nous avons utilisé la lécithine de soja (**Figure 18**). 30 mg de lécithine de soja ont été dissous dans le chloroforme puis ce dernier est évaporé de sorte à former une couche mince de lécithine au fond du ballon. Après séchage, 0,5 mL de l'huile essentielle de *Cymbopogon* et 10 mL d'eau sont ajoutés. Le mélange est soniqué pendant 30 min avec un Bandelin Sonoplus. La stabilité et l'homogénéité des micros émulsions ainsi formulées sont suivies par Zetasizer en enregistrant la répartition des dimensions dans l'échantillon.



**Figure 18** : Schéma structural d'un liposome de soja (Lasic and Barenholz, 1996).

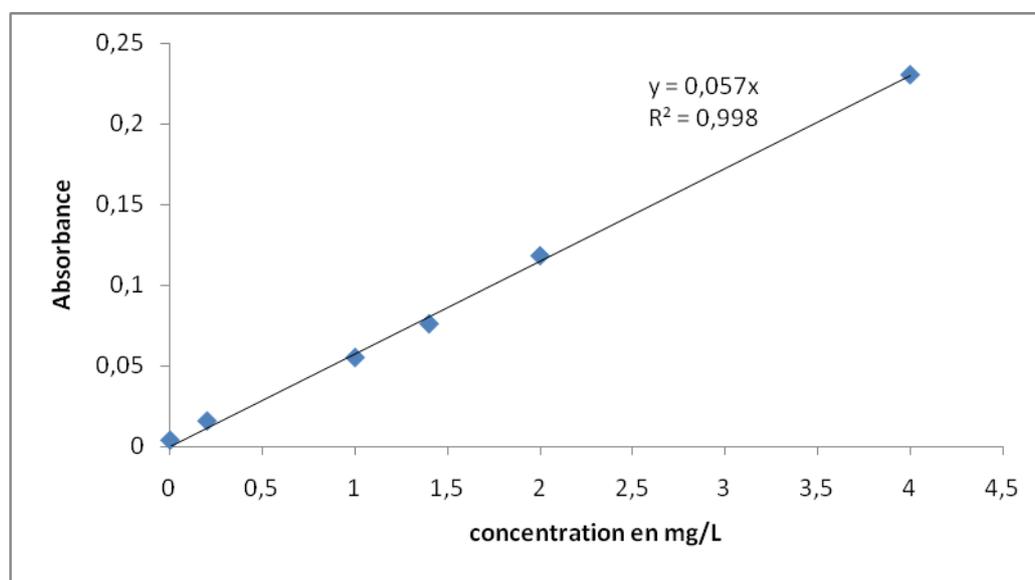
## 7 Dosages biochimiques et activités biologiques

### 7.1 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

#### 7.1.1 Quantification des polyphénols

La teneur en composés phénoliques (TPC) de tous les extraits a été évaluée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Butsat et Siriamornpun, 2010) avec quelques modifications. Brièvement, 100  $\mu\text{L}$  de la solution d'extrait (10 mg / mL de MeOH) ont été agités pendant 3 minutes avec 1 mL de réactif Folin-Ciocalteu dilué (1: 10). Ensuite, 900  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 10 % ont été ajoutés et le volume final complété à 5, 0 mL avec de l'eau distillée. Après avoir laissé le mélange reposer pendant 2 heures à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 725 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-vis.

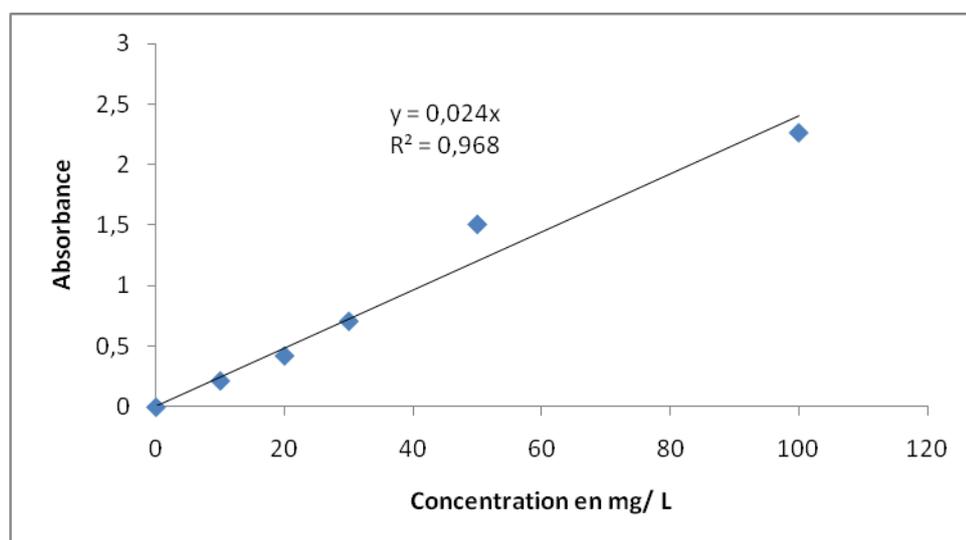
Les résultats de TPC sont estimés en utilisant une courbe standard préparée à partir de l'acide gallique (**Figure 19**) et exprimée en milligrammes d'acide gallique équivalent par gramme d'extrait (mg GAE/g d'extrait sec).



**Figure 19** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

## 7.1.2 Quantification des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée en utilisant la méthode de Dowd (1959) adaptée par Arvouet-Grand *et al.* (1994). Brièvement, une solution d'échantillon (1 mg / mL, 1 mL) a été mélangée avec le même volume de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>, 2 %) dans du méthanol. De manière similaire, un blanc a été préparé en ajoutant une solution d'échantillon (1 mL) à du méthanol (1 mL) sans AlCl<sub>3</sub>. Les absorbances de l'échantillon et du blanc ont été lues à 415 nm après une incubation de 10 minutes à température ambiante. L'absorbance du témoin a été soustraite de celle de l'échantillon. La quercétine est utilisée comme étalon de référence (**Figure 20**) et la teneur en flavonoïdes totaux a été exprimée en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg QE / g d'extrait).



**Figure 20** : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

## 7.2 Evaluation des activités antioxydantes

### 7.2.1 Méthode DPPH ( 2,2-diPhenyl-1-picrylhydrazyl)

L'activité d'antioxydante des extraits a été mesurée entre autres en utilisant un test DPPH (Huang *et al.*, 2010). La solution d'extrait (0,3 mL) a été mélangée avec une solution de 0,2 mmol / L de DPPH dans du méthanol (2,7 mL) puis agitée vigoureusement. Le mélange obtenu est laissé au repos pendant 1 heure à température ambiante avant de mesurer la valeur

d'absorbance à 517 nm. L'activité de piégeage des radicaux a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Taux d'inhibition en pourcentage} = [(A_s - A_i) / A_s] \times 100;$$

Où  $A_s$  est l'absorbance du DPPH seul, et  $A_i$  est l'absorbance du DPPH en présence de divers extraits. La vitamine C et le trolox sont utilisés comme substances de référence.

### **7.2.2 Méthode ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique))**

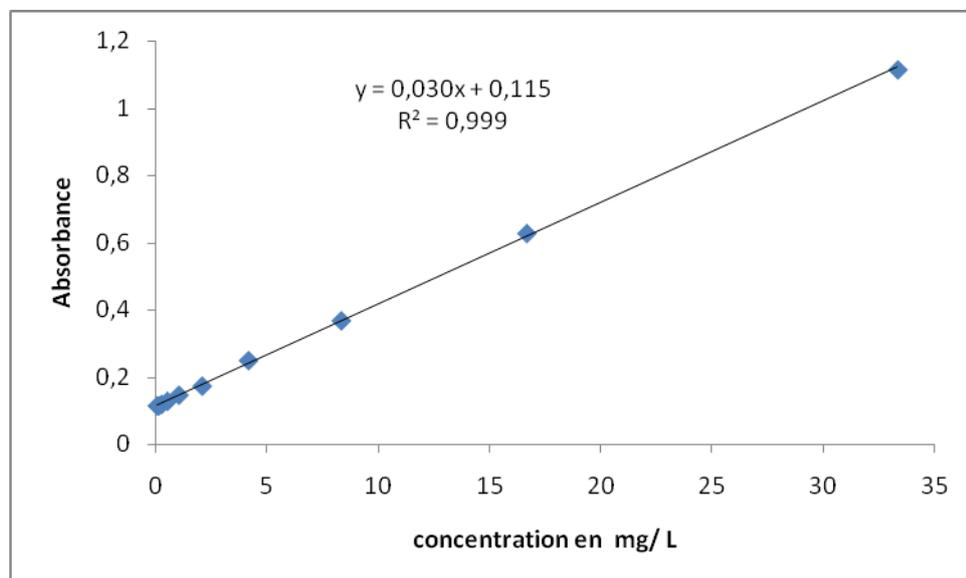
La capacité d'un extrait à piéger les radicaux libres a été déterminée selon la méthode ABTS précédemment publiée (Huang *et al.*, 2011). L'ABTS est dissous dans de l'eau déminéralisée à une concentration de 7 mmol/L, et du persulfate de potassium avec une concentration de 2,45 mmol/L a été ajouté par la suite. Le mélange réactionnel est maintenu dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 heures. Le mélange a ensuite été dilué avec de l'éthanol à 80% pour obtenir une valeur d'absorbance de 0,700 à 734 nm. Les échantillons (0,3 mL), à diverses concentrations, sont incubés avec une solution d'ABTS<sup>+</sup> (2,7 mL) dans un bain-marie à 30 ° C pendant 30 minutes à l'obscurité. Ensuite l'absorbance à 734 nm a été immédiatement enregistrée. L'activité antioxydante est calculée en utilisant l'équation mentionnée ci-dessus pour DPPH et avec les mêmes standards.

### **7.2.3 Méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)**

La méthode de FRAP consiste à évaluer le pouvoir de la réduction de fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en sel de fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) induit par un antioxydant. Cette transformation s'accompagne de la formation d'une coloration bleue.

Le test FRAP est réalisé selon Benzie et Strain (1996) avec une légère modification. Brièvement, le réactif FRAP a été préparé à partir d'un tampon acétate (pH 3,6), 10 mmol de solution TPTZ dans 40 mmol de HCl et 20 mmol de solution de chlorure de fer (III) dans des proportions de 10: 1: 1 (v / v), respectivement. Ce réactif est utilisé frais et chauffé à 37 ° C avant utilisation. Cinquante microlitres d'échantillon sont ajoutés à 1,5 mL du réactif FRAP.

L'absorbance du mélange réactionnel a ensuite été enregistrée à 593 nm après 4 min. La courbe standard est construite en utilisant une solution de vitamine C (0,065-33,3 µg / mL) et les résultats sont exprimés en µmol équivalent de vitamine C (EVC) / g de poids sec de la matière végétale (**Figure 21**).



**Figure 21** : Courbe d'étalonnage de la vitamine C pour la méthode FRAP.

## 7.3 Evaluations des activités antimicrobiennes

### 7.3.1 Activité antibactérienne

Nous avons évalué le pouvoir antibactérien des extraits des plantes sur douze souches bactériennes différentes.

Les douze bactéries sont : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Escherichia coli* ABC5, *Shigella sonnei* ABC16, *Salmonella enteric sv. Typhi* ABC17, *Staphylococcus aureus* ABC1, *Pseudomonas aeruginosa* ABC4, *Klebsiella pneumonia* ABC12, *Staphylococcus epidermidis* ABC91, *Streptococcus agalactiae* ABC6 et *Corynebacterium urealyticum* ABC145.

Dans cette évaluation d'activité antibactérienne, une concentration minimale inhibitrice (CMI) est recherchée. Cette dernière est, pour une bactérie donnée, la plus faible

concentration à laquelle la substance est capable d'inhiber la croissance de ce microorganisme.

Le mode opératoire est défini selon Fontanay *et al.* (2008). Brièvement l'inoculum a été réalisé de façon à avoir une concentration finale de  $10^5$  à  $10^6$  UFC/mL. De leur côté, les extraits ont été repris avec du DMSO afin d'obtenir des solutions mères à 1024 µg/mL et puis dilués pour obtenir une gamme de 1024 à 1 µg/mL dans les plaques de 96 puits. Un volume égal d'inoculum est ajouté dans chaque puit et incubé pendant 24h à 35°C. Les CMI ont été déterminées à l'aide d'un lecteur microplaques ELISA (lu à 540nm, Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, France).

Les contrôles positifs utilisés sont l'amoxicilline (Sigma, A8523-1G), la pénicilline G (Sigma, 13752-1G) et la ticarcilline (Sigma, T5639-1G).

### **7.3.2 Activité antifongique**

Une activité antifongique a été recherchée pour les extraits d'*Indigofera caerulea*, l'huile essentielle *Cymbopogon commutatus* et la pipéritone (composé majoritaire de l'huile essentielle de *C. commutatus*) sur quatre souches de champignons pathogènes à savoir *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, *A. niger* et *A. fumigatus*, en utilisant la méthode de dilution en bouillon pour déterminer la CMI.

L'inoculum de *C. albicans* a été préparé en mettant en suspension 5 colonies, isolées de boîtes de gélose Sabouraud, dans 5 mL d'eau distillée. Cette solution a été diluée en utilisant le milieu Roswell Park Memorial Institute sans carbonate et avec des phosphates (RPMI-1640) pour obtenir une suspension dont la concentration était égale à 0,5 unité McFarland. Les spores de l'*Aspergillus brasiliensis*, *A. niger* et *A. fumigatus* sont éliminées en ajoutant 5 mL d'eau distillée avec 0,1 % de Tween 20 à un tube d'agar incliné colonisé. La solution obtenue est prélevée puis diluée avec le même milieu RPMI-1640 que décrit ci-dessus, pour obtenir une suspension de spores contenant un nombre de spores correspondant à la gamme  $1-5 \cdot 10^5$  spores / mL (CLSI, 2008). Des dilutions en série des extraits ont été préparées dans du RPMI-1640 dans des plaques à 96 puits en partant d'une solution mère à 1024 µg/mL. Un volume égal d'inoculum fongique a été ajouté à chaque puits sur la plaque contenant 0,05 mL des dilutions de l'extrait. Chaque condition a été répétée dans 8 puits. Après une incubation de 24-

48 h à 35 ° C, les CMI ont été déterminées avec un lecteur ELISA comme décrit ci-dessus. Les résultats ont été exprimés au moyen de trois expériences indépendantes.

## 7.4 Cytotoxicité des extraits d'*Indigofera caerulea* et d'*Acacia seyal* sur cellules saines

La toxicité des extraits d'*Indigofera caerulea* et d'*Acacia seyal* sur les cellules pulmonaires saines MRC-5 a été évaluée à l'aide du test MTT (Tada *et al.*, 1986), dérivé de Mosmann (1983). Il est basé sur la réduction du MTT par la succinate déshydrogénase en cristaux de formazan dans les cellules vivantes. Dans le cas de l'extrait aqueux d'*A. seyal*, une confirmation de sa toxicité est effectuée par coloration au rouge neutre.

Le protocole utilisé est adapté de celui de Lasarow *et al.* (1992). Une observation microscopique est réalisée pour les extraits qui présentent une toxicité notable.

## 7.5 Cytotoxicité de l'HE de *Cymbopogon commutatus* sur cellules saines et cellules cancéreuses.

### 7.5.1 Origines et culture cellulaire

Les origines des lignées des cellules cancéreuses et des cellules saines humaines utilisées dans cette étude sont détaillées dans le **Tableau 6** ci-dessous:

**Tableau 6 :** Origines et codes d'identification des cellules testées.

Lignées cellulaires	Origines	Code d'identification
U87-MG	glioblastome cérébral	ECACC-93112517
MIA-Paca2	cancer du pancréas	ATCC®-CCL-247™
PC3	cancer de la prostate	ATCC®-HTB-96™
K562	leucémie	ATCC®-CCL-243™
A549	cancer du poumon	ATCC®-CRL-1435™

HCT116	cancer colorectal	ATCC®-HTB-2™
U2OS	ostéosarcome	ATCC®-CCL-171™
JIMT-T1	Cancer du sein	DSMZ-ACC 589
RT4	cancer de la vessie urinaire	ATCC®-CRL-1573™
A2780	cancer ovarien	DSMZ-ACC 589
NCI-N87	cancer gastrique	ATCC®-HTB-14™
MRC5	poumon sain	ATCC®-CRL-5822™
HEK293	rein sain	ATCC®-CCL-185™

Les lignées de cellules cancéreuses et saines ont été obtenues auprès de la société américaine Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires de l'institut Leibniz (DSMZ, Braunschweig-Allemagne) et de la collection européenne de cultures cellulaires (ECACC, Angleterre).

Les lignées cellulaires ont été cultivées conformément aux instructions du fournisseur. De ce fait le carcinome colorectal HCT-116 humain, la vessie RT4 et l'ostéosarcome osseux U2OS ont été cultivées dans 5A de Gibco McCoy (référence 26600) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 % de glutamine.

Par ailleurs, le carcinome pulmonaire A549, le carcinome ovarien A2780, la leucémie myéloïde K562, les cellules rénales embryonnaires HEK293, le carcinome gastrique NCI-N87 et les cellules de carcinome prostatique PC3 ont été cultivés dans du milieu Gibco RPMI 1640 (référence 61870) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal et de 1 % de glutamine. Le glioblastome cérébral U87-MG, le carcinome du sein JIMT-T1, le carcinome Mia-Paca2 et les cellules pulmonaires humaines MRC5 ont été cultivés dans du milieu Gibco DMEM (référence 61965) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal et 1 % de glutamine.

Les cellules ont été comptées en utilisant une Vi-cell XR (Beckman Coulter) et leur viabilité évaluée par exclusion du colorant bleu 0,25 % trypan. Elles ont été testées pour la présence de mycoplasmes avant utilisation avec le kit de détection de Mycoplasma PCR (Applied Biological Materials Inc., Canada) conformément aux instructions du fabricant et seules les cellules sans mycoplasmes ont été utilisées pour des investigations ultérieures.

## 7.5.2 Détermination de l'IC50

Les lignées cellulaires ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. La viabilité cellulaire était déterminée par un dosage luminescent selon les instructions du fabricant (Promega, Madison, WI, USA).

Pour la détermination de l'IC50, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (3 x 10<sup>3</sup> cellules / puits) contenant 100 µL de milieu de culture. Après 24 h de culture, les cellules ont été traitées avec l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus* à 8 concentrations finales différentes. Chaque concentration a été obtenue à partir de dilutions en série dans un milieu de culture à partir de la solution mère. Les cellules de contrôle ont été traitées avec le véhicule. Les expériences ont été effectuées en triple. Après 72 h d'incubation, 100 µL de réactif CellTiter Glo ont été ajoutés pendant 15 min avant l'enregistrement de la luminescence avec un lecteur de microplaque spectrophotométriques PolarStar Omega (BMG LabTech). Les courbes dose-réponse ont été tracées avec le logiciel Graph Prism et les valeurs IC50 ont été calculées en utilisant le logiciel Graph Prism à partir de courbes polynomiales.

Quatre standards sont utilisés en témoins positifs : Doxorubicine, Combretastatine A4, Vinblastine et Monométhyl Auristatine.

# **Résultats/ Discussions**

# Chapitre I : Sélection des plantes à étudier

Selon le dernier rapport sur la diversité des plantes dans le monde, près de 400.000 espèces ont été recensées et seulement 10 % des plantes ont été étudiées du point de vue chimique et pharmacologique (Willis, 2017). Malgré la sophistication des appareillages et en raison de la découverte croissante de nouvelles espèces (environ 2000 plantes par an), le ratio des plantes étudiées par rapport aux plantes connues évolue très peu les dernières décennies (J. Bruneton, 1999).

Pour donner la priorité aux plantes les plus prometteuses, le recours au savoir traditionnel est crucial. En effet par exemple aux Etats-Unis, sur 119 médicaments obtenus à partir de composés isolés des plantes, 74 % ont été mis au point à partir de leurs utilisations traditionnelles (Gurib-Fakim, 2006).

C'est la raison pour laquelle dans ce travail, nous avons sélectionné les plantes de cette étude à partir des savoirs et des utilisations traditionnels mais aussi en tenant compte des résultats préliminaires d'activités biologiques.

## 1 Recueil des données ethnobotaniques

Nous avons mené une enquête ethnobotanique dans deux régions du pays : Dikhi, Sud-Ouest et Tadjourah, Nord (abdoul-Latif *et al.*, 2018), (Abdoul-latif *et al.*, 2016) et (Hassan-Abdallah *et al.*, 2013). Ces deux régions représentent plus de 60 % de la superficie de Djibouti et possèdent les localités les plus verdoyantes, donc les plus riches en biodiversité.

Lors de ces enquêtes, 376 guérisseurs et sages des villages dans 103 localités ont été interrogés sur l'utilisation des plantes médicinales locales.

Nous nous sommes appuyés sur les données collectées pour sélectionner les plantes les plus utilisées par les guérisseurs. Parmi les différentes maladies soignées avec les plantes médicinales, nous avons privilégié les infections microbiennes. En effet ces dernières représentent plus de 65 % des consultations dans la région (INSPD, 2014).

La quantification de ces données ethnobotaniques se fait à travers trois paramètres d'évaluation :

Plants Ratio (PR): Le ratio d'une plante contre une maladie indique les meilleures plantes pour soigner une maladie donnée et le ratio se calcule ainsi :

$PR = Np/Nt \times 100$ , où  $Np$  est le nombre des guérisseurs qui ont indiqué indépendamment l'utilisation d'une espèce E pour une maladie A et  $Nt$  est le nombre d'informants qui ont mentionné une plante (espèce E ou autres) contre cette maladie A. Ce ratio est rejeté si le nombre d'informants est inférieur à 15 ( $Np < 15$ ) dans le but de ne retenir que les plantes à haut consensus communautaire (Abdoul-latif et al., 2016).

Index de performance (Ip2): Pour illustrer la sélectivité d'une plante pour une maladie spécifique, une comparaison a été faite entre les valeurs attendues P1 et celles observées P2. La différence ( $P1 - P2$ ) entre les deux proportions a été ensuite utilisée pour définir un index de performance Ip 2 qui varie de 0 à 3 selon une échelle arbitraire rationalisée (BETTI, 2004).

Ordre de préférence : Chaque informant est invité à donner les six meilleures plantes et par ordre de préférence et d'efficacité (de 1 à 6) contre une maladie.

Selon la valeur obtenue pour un paramètre, la plante est rangée dans l'une des trois catégories :

1 : fort, 2 : moyen et 3 : faible potentiel thérapeutique.

Sept maladies de la catégorie des infections microbiennes sont retenues : diphtérie, dysenterie bactérienne et parasitaire, furoncle, malaria, tuberculose et jaunisse.

Pour chaque maladie, différentes plantes sont proposées et nous les avons classées selon les trois paramètres cités précédemment (**Tableau 7**).

**Tableau 7 :** Classification des plantes médicinales selon les paramètres PR, IP2 et OP.

Maladies	Nom local de la plante	Nom scientifique	Rang		
			PR	IP2	OP
Diphthérie	malboyta	<i>Ochradenus baccatus</i> Delile.	1	1	1
	meclab	<i>Melilotus suaveolens</i> Ledeb.	3	3	3
	egebto	<i>Acacia tortilis</i> (Forssk.) Hayne.	2	2	2
	darmussa	<i>Acalypha fruticosa</i> Forssk.	3	3	3
	cedayto	<i>Grewia erythraea</i> Schweinf.	3	3	3
	galqaddo	<i>Tarchonanthus camphoratus</i> L.	ND	1	ND
Dysentérie bactérienne	qadgento	<i>Acacia seyal</i> Delile.	1	1	1
	kusra	<i>Ziziphus mauritiana</i> L.	2	3	2
	garbaaqaddoy	<i>Solanum somalense</i> Franch.	3	3	3
Jaunisse	wayboyta	<i>Terminalia brownii</i> Fresen.	1	1	1
	aytinaba	<i>Boscia coriacea</i> Pax.	2	3	2
	dambahu	<i>Cymbopogon commutatus</i>	3	2	ND
Dysentérie Parasitaire	wayboyta	<i>Terminalia brownii</i> Fresen.	3	3	3
	abursaafiqi	<i>Orthosiphon pallidus</i> Royle ex Benth.	1	2	1
	alayto	<i>Balanites rotundifolia</i> (Tiegh.) Blatt.	2	3	2
Furoncle	cedayto	<i>Grewia erythraea</i> Schweinf.	1	1	1
Malaria	alayto	<i>Balanites rotundifolia</i> (Tiegh.) Blatt.	ND	3	ND
Tuberculose	qubaabulta	<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal.	ND	3	ND
	udda	<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Delile.	ND	3	ND
	ayrobeya	<i>Indigofera caerulea</i> Gouan.	ND	1	ND

PR : Plant ratio ; IP2: index de performance et OP : Ordre de préférence.

D'après l'analyse de ces trois critères, nous avons retenu les six plantes qui ont des valeurs 1 ou 2: *Acacia seyal*, *Indigofera caerulea*, *Grewia erythraea*, *Ochradenus baccatus*, *Orthosiphon pallidus* et *Terminalia brownie*.

Après avoir fait l'étude bibliographique sur ces six plantes, nous avons exclu *Terminalia brownie* qui est très largement étudiée d'un point de vue phytochimique et pharmacologique.

Nous avons décidé d'ajouter la plante *Cymbopogon commutatus* qui est utilisée pour soigner les mêmes infections que *T. brownie*.

Cette première sélection repose donc sur des savoirs traditionnels et des données bibliographiques, elle sera affinée par des tests biologiques expérimentaux.

## **2 Screening des activités biologiques**

Il est difficile de traduire la prescription d'un guérisseur traditionnel en médecine conventionnelle. En effet généralement avec la médecine traditionnelle on traite des symptômes et pas des maladies bien identifiées. Le recours aux infirmiers(ères) travaillant dans les régions où les enquêtes ethnobotaniques ont été faites, a permis de classer les affections et de sélectionner les affections microbiennes et parasitaires.

D'une part les infections bactériennes présentent des risques de plus en plus alarmants à la santé humaine. En effet une seule classe nouvelle a été découverte au cours de ces trente dernières années (les oxazolidinones) et en raison d'utilisations massives et désordonnées de celles existantes, les bactéries développent des stratégies de résistance. La liste des bactéries alarmantes s'allongent. En 2017 selon l'organisation mondiale de la santé, 12 bactéries sont à privilégier dans la recherche et développement des nouveaux antibiotique (OMS, 2017). Ce fléau mondial peut s'avérer plus inquiétant en Afrique en raison de la faible couverture sanitaire et ses conséquences. En effet la prise en charge tardive, l'utilisation à des antibiotiques de mauvais qualité et l'automédication amplifient la propagation des résistances aux antibiotiques. Dans les régions rurales les plantes médicinales résolvent la consommation excessive des antibiotiques mais le savoir scientifique doit accompagner les connaissances traditionnelles locales.

D'autre part, le cancer est une maladie croissante dans le monde. Selon les derniers chiffres publiés par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), 18,1 millions de nouveaux cas de cancers auraient été diagnostiqués dans le monde en 2018 et 9,6 millions de personnes sont décédées d'un cancer. En 2012 avec 14,1 millions de nouveaux cas de cancer, la mortalité était de 8,2 millions (OMS, 2013). En six ans, l'incidence du cancer a augmenté

de 22 % alors que la mortalité 'n'a progressé' que de 14,5 %. Ce chiffre montre que l'amélioration de la prise en charge des patients et la prévention contre ce fléau sont nécessaires. Cependant dans les pays pauvres comme ceux de l'Afrique subsaharienne, la mortalité est plus importante par rapport aux pays à fortes structures sanitaires (ARC, 2017). La prévention contre les oxydations peut contribuer à améliorer ce chiffre négatif. En effet il est montré la responsabilité des oxydants cellulaires avec le développement des cancers (Hussain *et al.*, 2003). Contrairement aux traitements assez coûteux, la prévention par des antioxydants serait plus simple à mettre en place.

De ce fait notre screening biologique se fera sur deux activités : activité antibactérienne et activité antioxydante. Deux extractions ont été faites sur chacune des cinq plantes à savoir *Acacia seyal* (écorce), *Indigofera caerulea* (fruit), *Grewia erythraea* (tige), *Ochradenus baccadus* (partie aérienne), *Orthosiphon pallidus* (partie aérienne) : une extraction méthanolique avec le système de soxhlet et une macération à froid dans l'eau (selon la préparation des tradipraticiens). Pour la plante *Cymbopogon commutatus* (partie aérienne), plante très aromatique, nous avons extrait son huile essentielle.

## 2.1 Activité antibactérienne

Ces dernières années, il y a un grand intérêt pour la recherche de nouveaux agents antimicrobiens, en raison de l'augmentation alarmante du taux des infections avec des microorganismes résistants aux antibiotiques comme indiqué plus haut mais aussi le désengagement des firmes pharmaceutiques dans la recherche de nouveaux antibiotiques. Les plantes, comme dans le passé, peuvent contribuer à ce combat contre la résistance bactérienne.

Nos 11 extraits de plantes ont été évalués contre neuf bactéries très fréquemment incriminées dans les pathologies recensées dans l'enquête.

Différentes concentrations allant de 4 à 1024 µg/ mL ont été testées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour chaque échantillon. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le **Tableau 8** ci-dessous.



**Tableau 8 :** CMI en µg/ mL des extraits de six plantes pré-sélectionnées. M : méthanol, E : eau et H : huile essentielle.

Extraits des plantes	<i>A. seyal</i> M	<i>G. erythrea</i> M	<i>I. caerulea</i> M	<i>O. baccadus</i> M	<i>O. pallidus</i> M	<i>A. seyal</i> E	<i>G. erythrea</i> E	<i>I. caerulea</i> E	<i>O. baccadus</i> E	<i>O. pallidus</i> E	<i>C. commutatus</i> H
<b>Souches bactériennes</b>											
<i>E. coli</i> ABC5	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	<b>50</b>
<i>S. sonnei</i> ABC16	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<i>S. enterica</i> sv. <i>Typhi</i> ABC17	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<i>S. aureus</i> ABC1	<b>64</b>	> 1024	<b>128</b>	> 1024	> 1024	<b>512</b>	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	<b>100</b>
<i>P. aeruginosa</i> ABC4	<b>512</b>	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<i>K. pneumonia</i> ABC12	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<i>S. epidermidis</i> ABC91	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<i>S. agalactiae</i> ABC6	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<i>C. urealyticum</i> ABC145	<b>64</b>	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024

Trois extraits de plantes montrent une activité antibactérienne contre certaines bactéries testées : les extraits méthanoliques d'*Acacia seyal*, *Indigofera caerulea* et l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus*.

Pour l'extrait méthanolique d'*Acacia seyal*, on note une activité antibactérienne intéressante à 64 µg/ mL contre deux bactéries qui sont *Staphylococcus aureus* ABC1 et *Corynebacterium urealyticum* ABC145 et une activité moyenne contre *Pseudomonas aeruginosa* ABC4. De même l'extrait méthanolique d'*Indigofera caerulea* agit contre *Staphylococcus aureus* ABC1 avec une concentration minimale d'inhibitrice de 128 µg/ mL.

Cependant les extraits méthanoliques des trois autres plantes (*Grewia erythraea*, *Ochradenus baccadus*, *Orthosiphon pallidus*) ainsi que tous les extraits aqueux ne sont pas ou très peu actifs aux concentrations testées et contre les bactéries retenues dans cette étude.

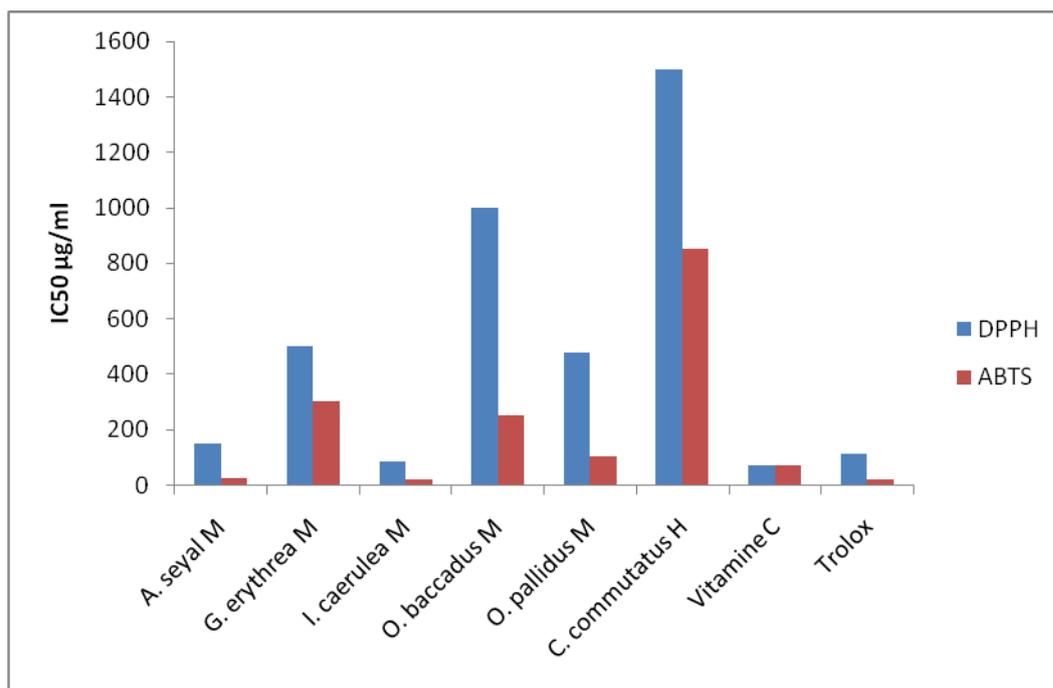
Enfin l'huile essentielle obtenue à partir de *Cymbopogon commutatus* inhibe la croissance de deux bactéries à savoir *Escherichia coli* ABC5 (gram -) et *Staphylococcus aureus* ABC1 (gram +) à 50 et 100 µg/ mL respectivement.

Il faut souligner que le choix de poursuivre l'étude approfondie de ces trois plantes (*A. seyal*, *I. caerulea* et *C. commutatus*) n'est pas forcément représentatif de la potentialité thérapeutique de toutes les plantes testées en raison du nombre de microorganismes et des modes de préparation restreints. En effet une plante inactive dans cet essai peut être intéressante contre d'autres espèces de bactéries et avec d'autres modes de préparation.

## 2.2 Activité antioxydante

Dans le processus de sélection des plantes, nous avons pris en compte l'effet antioxydant des extraits en s'appuyant sur deux méthodes d'analyse: DPPH et ABTS.

Les extraits méthanoliques d'*Acacia seyal*, *Indigofera caerulea*, *Grewia erythraea*, *Ochradenus baccadus*, *Orthosiphon pallidus* et l'huile essentielle de *C. commutatis* ont été évalués pour leur potentiel anti-radicalaire. Leurs concentrations d'inhibition à 50 % sont représentées dans la **Figure 22**.



**Figure 22 :** Activités antioxydantes de six plantes avec deux méthodes : DPPH et ABTS.

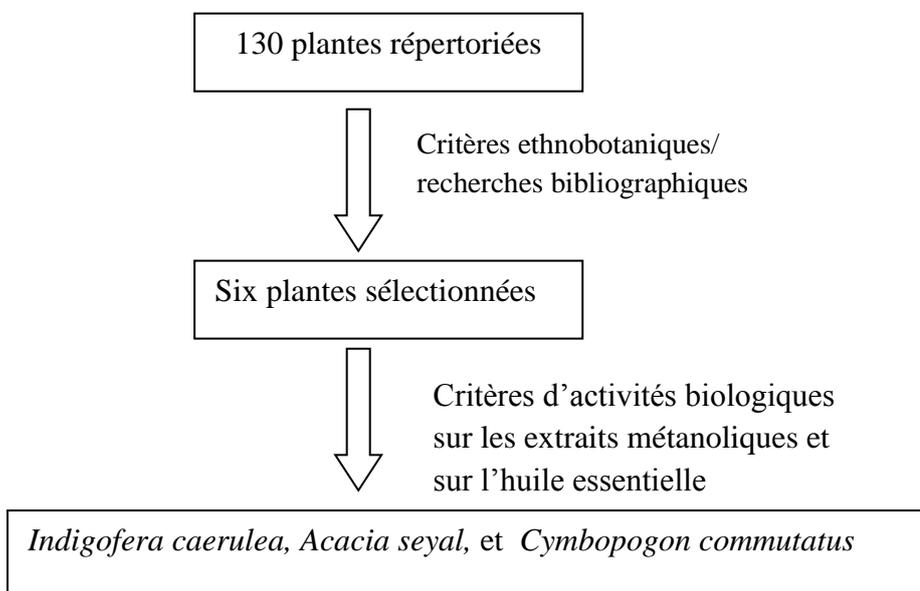
Les extraits méthanoliques des deux plantes de la famille des Fabaceae, *A. seyal* et *I. caerulea*, ont une fortement activité antioxydante. Leurs concentrations IC<sub>50</sub> selon des méthodes DPPH/ABTS sont 150±2,2/27±1,3 µg/ mL et 82±3,1/18±1,7 µg/ mL pour *A. seyal* et *I. caerulea* respectivement. Ces valeurs sont très proches de celles observées pour les témoins positifs à 70±7/70±1,5 µg/ mL et 110±2,5/18±3,3 µg/ mL pour la Vitamine C et le Trolox respectivement.

Cependant l'huile essentielle de *C. commutatus* a une faible activité antioxydante. En effet quelque soit la méthode d'évaluation, l'IC<sub>50</sub> est supérieur à 500 µg/ mL.

## Conclusion

« Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long » (Kurt Hostettmann, 1997). Il en est de même pour conduire aux médicaments conventionnels. Il est donc important de rationaliser chaque étape pour ne pas se perdre dans ce long chemin.

Nous avons utilisé dans cette sélection trois critères à savoir, les données ethnobotaniques, les données bibliographiques et les résultats des essais biologiques menés sur les extraits méthanoliques et sur l'huile essentielle. Le but était de cibler les plantes les plus prometteuses pour obtenir des activités antiinfectieuses et antioxydantes.



**Figure 23 :** Processus de sélection des plantes à potentialités thérapeutiques.

# Chapitre II : Activités biologiques et caractérisation phytochimique des fruits d'*Indigofera caerulea*.

## 1 Extraction et dosages des composés phénoliques

Les extraits de fruits d'*I. caerulea*, obtenus avec des solvants de polarité croissante (hexane, acétone, méthanol, eau), sont évaporés et les quantités d'extraits secs obtenues sont rassemblées dans le **tableau 9**. Les rendements ne sont pas influencés par la polarité des solvants. En effet l'hexane, qui est le solvant d'extraction le moins polaire, a un rendement d'extraction de 1,2 %, il est supérieur à l'acétone (0,48 %) mais moindre que le méthanol qui extrait la plus grande quantité comparativement à ces quatre solvants (4,42 %). Cependant le solvant utilisé peut influencer l'enrichissement de l'extrait en certains métabolites spécialisés tels que les polyphénols.

Les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux ont été déterminées en se basant sur les courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine respectivement (**Figures 19 et 20** dans le chapitre matériels et méthodes). Ces teneurs sont exprimées par rapport à 100 g de matière végétale de départ et sont répertoriées dans le **tableau 9**.

**Tableau 9** : Rendement d'extraction et teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits de fruits d'*Indigofera caerulea*.

Extraits	Hexane	Acétone	Méthanol	Eau
Rendements en %	1,2±0,2	0,48±0,1	4,42±0,2	3,1±0,4
Phénols totaux (mg EAG/100 g MS)*	ND	15,58 ± 3,0	818,14 ± 3,1	3,3 ± 1,7
Flavonoïdes totaux (mg EQ/100g MS)*	ND	3,84 ± 1,4	102,10 ± 2,3	ND

\* La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique (mg GAE); celle des flavonoïdes totaux en milligrammes équivalent de quercétine (mg QE). Ces résultats se rapportent à 100 grammes de matière sèche (MS).

La teneur en polyphénols totaux pour l'extrait méthanolique est à 818,14 mgEAG/100 g MS, elle est largement supérieure à celles contenues dans les extraits acétonique et aqueux : 15,58

mg et 3,1 mg EAG/100 g MS respectivement. Il en est de même pour les teneurs en flavonoïdes où l'extrait méthanolique a une teneur largement supérieure (102,1 mg EQ/ 100g MS) à celle de l'extrait acétonique (3,84 mg EQ/ 100g MS).

Le solvant d'extraction joue un rôle majeur dans la quantité de polyphénols extraits. Le méthanol est recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (Falleh *et al.*, 2008).

Par ailleurs la teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique des fruits est très proche de celle obtenue pour les feuilles de cette plante. En effet selon Ponmari *et al.* (2012), les feuilles ont une teneur en polyphénols totaux de 896 mg EAG/ 100 g MS (contre 818,1 mg EAG/ 100 g MS pour les fruits). Cependant la teneur en flavonoides des feuilles est six fois supérieure (600,1 mg EQ/ 100 g MS) à celle observée pour les fruits d'*Indigofera caerulea* qui est de 102,10 mg EQ/ 100 g MS.

## **2 Activités biologiques des extraits de fruits d'*Indigofera caerulea***

### **2.1 Activité antioxydante**

Les valeurs de l'activité antioxydante des extraits de fruits ont été déterminées selon trois méthodes distinctes à savoir DPPH, ABTS et FRAP. Les résultats sont répertoriés dans le **tableau 10**.

**Tableau 10** : Activité antioxydante de quatre extraits de fruits d'*I.caerulea*.

Extraits	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		(µM VE/ 100g MS)
	DPPH	ABTS	FRAP
Hexane	> 1000	> 1000	ND
Acétone	150 ± 3,4	20 ± 1	3,97 ± 3,6
Méthanol	97 ± 2,2	25 ± 1,3	27,83 ± 3,1
Eau	958 ± 5,3	>1000	1,33 ± 1,1
Vitamin C	70 ± 7	70 ± 1,5	
Trolox	110 ± 2,5	18 ± 3,3	

IC<sub>50</sub> : concentration inhibitrice des radicaux à 50% pour DPPH et ABTS. VE : Vitamine C Equivalent et MS : matière végétale sèche.

Les deux extraits, méthanolique et acétonique, ont de fortes activités antioxydantes comparativement aux deux standards, vitamine C et trolox (**tableau 10**).

De ce fait, l'évaluation pertinente du pouvoir antioxydant d'un extrait nécessite d'effectuer la mesure au moins avec trois méthodes différentes.

Cependant avec la méthode FRAP, l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique est nettement plus importante que celle de l'extrait acétonique : 27,83±3,1 et 3,97±0,1 mg EVC/100 g MS respectivement. Quelque soit la méthode considérée, l'extrait aqueux est faiblement antioxydant.

Par ailleurs l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique du fruit est légèrement inférieure à celle obtenue pour les feuilles de cette plante 97 et 52,5 µg/mL respectivement avec la méthode DPPH (Ponmari *et al.*, 2012). Cependant on ne peut pas conclure que les feuilles d'*Indigofera caerulea* soient plus antioxydantes que les fruits car le système d'extraction ici, épuisement avec solvant à polarité croissante, peut sous-estimer les composants extraits avec le méthanol qui est utilisé après l'extraction avec deux autres solvants (hexane et acétone). Egalement la valeur d'IC<sub>50</sub> (82 µg/mL) de l'extrait méthanolique du fruit d'*I. caerulea* (chapitre I) avec la méthode DPPH est légèrement inférieure à celle obtenue avec l'extrait méthanolique de cette même partie de la plante, (97 µg/mL). La différence étant le mode d'extraction (Soxhlet pour le chapitre précédent et par épuisement de solvant dans ce chapitre II).

## 2.2 Activités antimicrobiennes

Les quatre extraits de cette plante sont testés pour leur activité antimicrobienne contre sept souches bactériennes et trois souches de champignons pathogènes humains. Les valeurs des concentrations inhibitrices minimales (CMI) de chaque extrait vis à vis de différents micro organisme sont rassemblées dans le **tableau 11**.

Les extraits hexanique et de méthanolique inhibent la croissance de deux bactéries à Gram +, à savoir *Enterococcus faecalis* et *Staphylooccus aureus*. L'extrait méthanolique a une CMI de 128 µg/mL pour ces deux souches bactériennes. Pour l'extrait hexanique, la meilleure valeur de CMI est 128 µg/mL pour *Enterococcus faecalis* et 256 µg/mL pour *Staphylooccus aureus*. De plus cet extrait agit contre une bactérie à Gram - *Acinetobacter baumannii* avec une CMI de 256 µg/mL. On note ici une meilleure sensibilité des extraits testés contre les bactéries à Gram + que celles à Gram -. Cette différence est expliquée par la différence de structures entre les deux types de bactéries. En effet les bactéries à Gram - possèdent une membrane phospholipidique renforcée par des structures lipopolysaccharidique devant une couche de peptidoglycanes, ce qui empêche la pénétration des agents antimicrobiens (Nikaido, 1994) alors que pour les bactéries à Gram + leur membrane est constituée d'une seule couche de peptidoglycanes vulnérables (Scherrer et Gerhardt, 1971).

Il est à noter l'absence d'activité en dessous de la concentration maximale testée (256 µg/mL) pour l'extrait aqueux. Or ce dernier est utilisé dans la médecine traditionnelle. D'autres études sur le genre *Indigofera* présentent une très faible activité ou une absence d'activité des extraits aqueux (Esimone *et al.*, 1999; Kahiya et Zimudzi, 2015).

Ces résultats doivent être pris en compte et devraient conduire à la mise en place de procédés d'extraction adéquate (solvants et modes d'extraction adéquates) des plantes médicinales. Dans certains pays comme le Mali cette initiative est mise en oeuvre et elle est connue sous l'appellation MTA, Médicaments Traditionnels Améliorés (Nouhoum KONATE, 2005).

Par ailleurs il est à noter que les extraits testés ne sont pas actifs contre les trois champignons.

**Tableau 11** : Activités antibactériennes et antifongiques de quatre extraits et du composé D de fruits d'*Indigofera caerulea* exprimées en CMI µg/mL.

Extraits/ composé	Hexane	Acétone	Méthanol	Eau	Composé D
<b>Souches bactériennes</b>					
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<b>256</b>	>256	>256	>256	ND
<i>E. coli</i> ABC5	>256	>256	>256	>256	
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	>256	>256	>256	>256	
<i>K. pneumonia</i> ABC12	>256	>256	>256	>256	
<i>P. aeruginosa</i> ABC4	>256	>256	>256	>256	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<b>128</b>	>256	<b>128</b>	>256	
<i>S. aureus</i> ABC1	<b>256</b>	>256	<b>128</b>	>256	<b>64</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>256	>256	>256	>256	ND
<i>A. niger</i> ATCC 16888	>256	>256	>256	>256	
<i>A. fumigatus</i> ATCC 1022	>256	>256	>256	>256	

Les deux extraits montrant des activités antimicrobiennes intéressantes sont les extraits méthanolique et hexanique. De ce fait la purification et la caractérisation de composés purs porteront sur ces deux extraits.

### 3 Purification des extraits montrant une activité antibactérienne

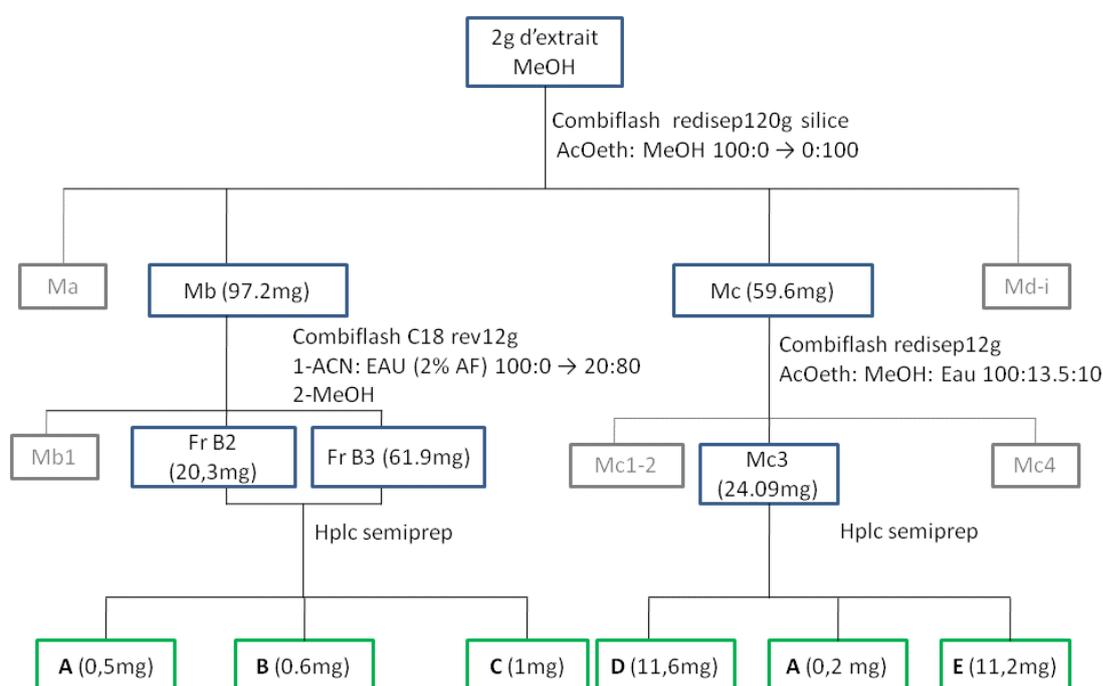
#### 3.1 Purification de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique (2 g) est soumis à un fractionnement en utilisant le Combiflash rediseq avec une colonne de 120 g de silice phase normale. Le gradient de solvants est composé d'acétate d'éthyle et de méthanol allant de 100 :0 à 0 : 100. Selon leurs profils CCM,

neuf fractions (**Figure 24**) sont obtenues (Ma à Mi) avec un rendement du fractionnement de 26,7 %.

D'abord la fraction Mb (97,2 mg) est soumise à une séparation avec le même système Combiflash. Le système d'éluion est un mélange d'acétonitrile-eau acidifiée à 2 % d'acide formique et la colonne est une C18 de 12 g. Ensuite du méthanol est utilisé pour récupérer les composés non élués. Les tubes sont rassemblés en trois sous fractions majeures (Mb1 à Mb3) avec un rendement de 84,5 %. Les fractions Mb2 et Mb3 sont enfin soumises à une séparation avec une HPLC préparative. Les composés purs **A (0,5 mg)**, **B (0,6 mg)** et **C (1 mg)** sont obtenus.

De même la fraction Mc (59,6 mg) est purifiée avec un combiflash équipé d'une colonne pré remplie redisep avec 12 g de silice phase normale. L'éluion utilisée est isocratique avec un système de solvants composé d'acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:13,5:10). Quatre sous fractions (Mc1 à Mc4) sont rassemblées. Enfin les composés de la sous fraction Mc3 sont séparés par HPLC préparative conduisant à l'obtention des composés purs **A (0,2 mg)**, **D (11,6 mg)** et **E (11,2 mg)** (**figure 24**).



**Figure 24** : Schéma de purification de l'extrait méthanolique de fruits d'*Indigofera caerulea*.

Le composé majeur (noté **composé D**) isolé de l'extrait méthanolique est testé pour son activité antibactérienne contre *Staphylooccus aureus* seulement en raison de la faible quantité obtenue. Ce composé montre une activité intéressante à 64 µg /mL contre cette souche et peut être responsable de l'action antibactérienne de cet extrait contre cette même souche.

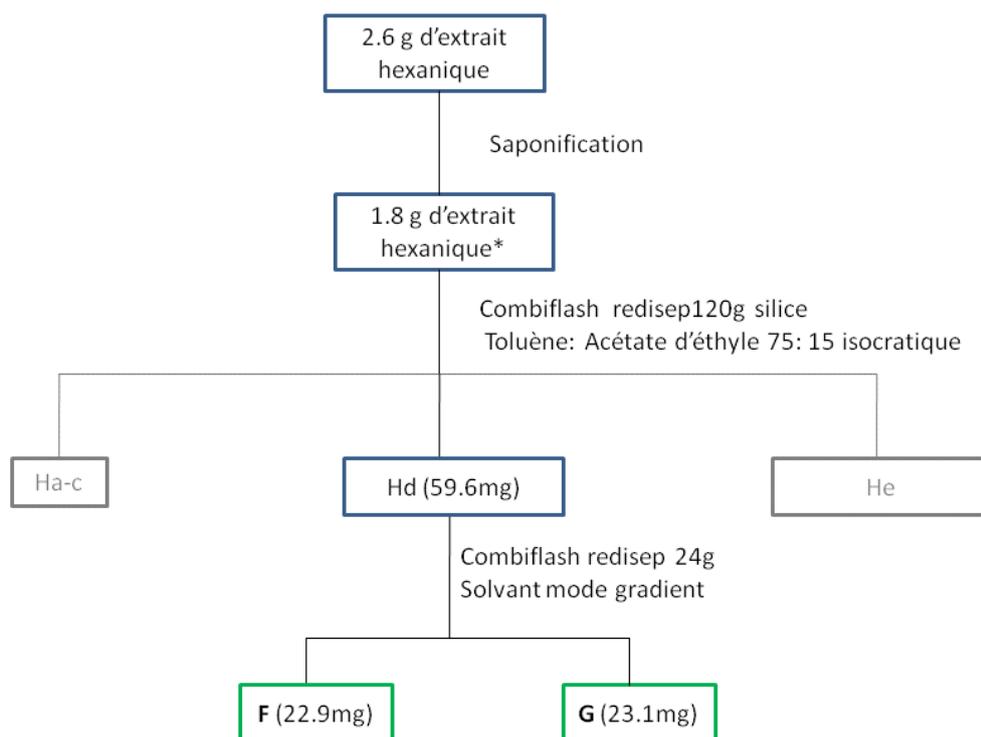
### 3.2 Purification de l'extrait hexanique

Pour augmenter la quantité de départ nous avons réalisé une nouvelle extraction et obtenu au total 2,6 g d'extrait brut. Cet extrait est riche en acide gras et une saponification est effectuée. L'extrait d'hexane non saponifiable (1,8 g) est soumis à un fractionnement avec une chromatographie combiflash et un système d'éluents en isocratique constitué de toluène et d'acétate d'éthyle 75 :15. Cinq fractions (Ha à He) sont séparées en se basant sur leurs profils CCM avec un rendement de 93 %. La fraction Hd (59,6 mg) est repurifiée dans le même système chromatographique avec un programme de gradient de solvants (**tableau 12**).

**Tableau 12** : Programme du gradient de solvants pour la purification de la fraction Hd.

Temps (min)	Système de solvants	Pourcentages
0-3	toluène	100 %
3-5	toluène-acétate d'éthyle	50-50 %
5-10	toluène-acétate d'éthyle	20-80 (variable)
10-20	toluène-acétate d'éthyle	20-80 (constant)
20-23	dichlorométhane-acétate d'éthyle	0-100 (variable)
23-30	acétate d'éthyle	100 %

La seconde étape de purification aboutit à l'obtention de deux composés purs **F** et **G** (**figure 25**).



**Figure 25** : Schéma de purification de l'extrait hexanique de fruits d'*Indigofera caerulea*. \* extrait dégraissé.

## 4 Caractérisation des composés isolés des fruits de *Indigofera caerulea*

### 4.1 Caractérisation des composés isolés de l'extrait méthanolique

#### 4.1.1 Identification par couplage HPTLC-MS

Afin de développer une méthode rapide pour l'identification des composés présents dans l'extrait méthanolique de fruits d'*I. caerulea*, la chromatographie sur couche mince couplée avec la spectrométrie de masse a été choisie.

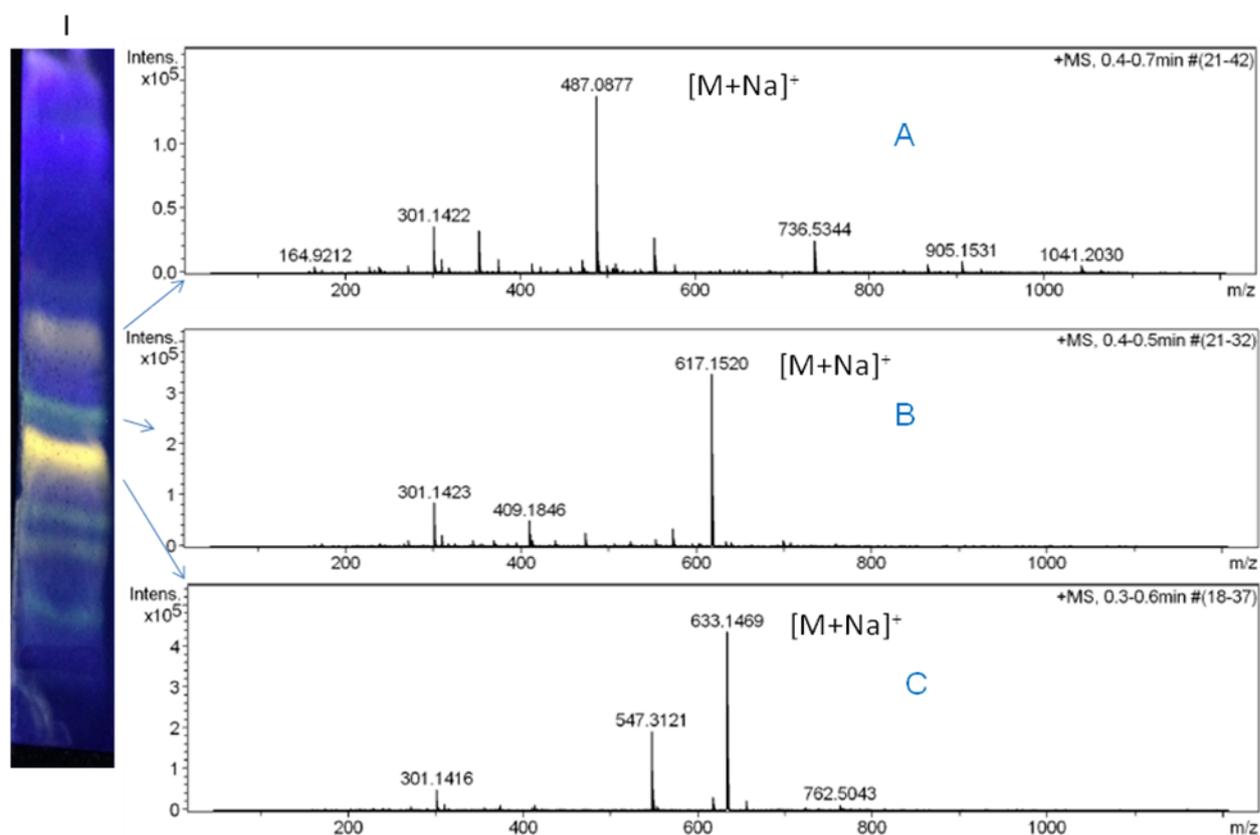
Le criblage phytochimique de l'extrait méthanolique a été réalisé avant purification par HPTLC-MS. La séparation de cinq composés (A à E) a été obtenue sur du gel de silice HPTLC 60 F254. Un développement en CCM bidimensionnelle est effectué pour confirmer la présence d'un seul composé pour chaque tache.

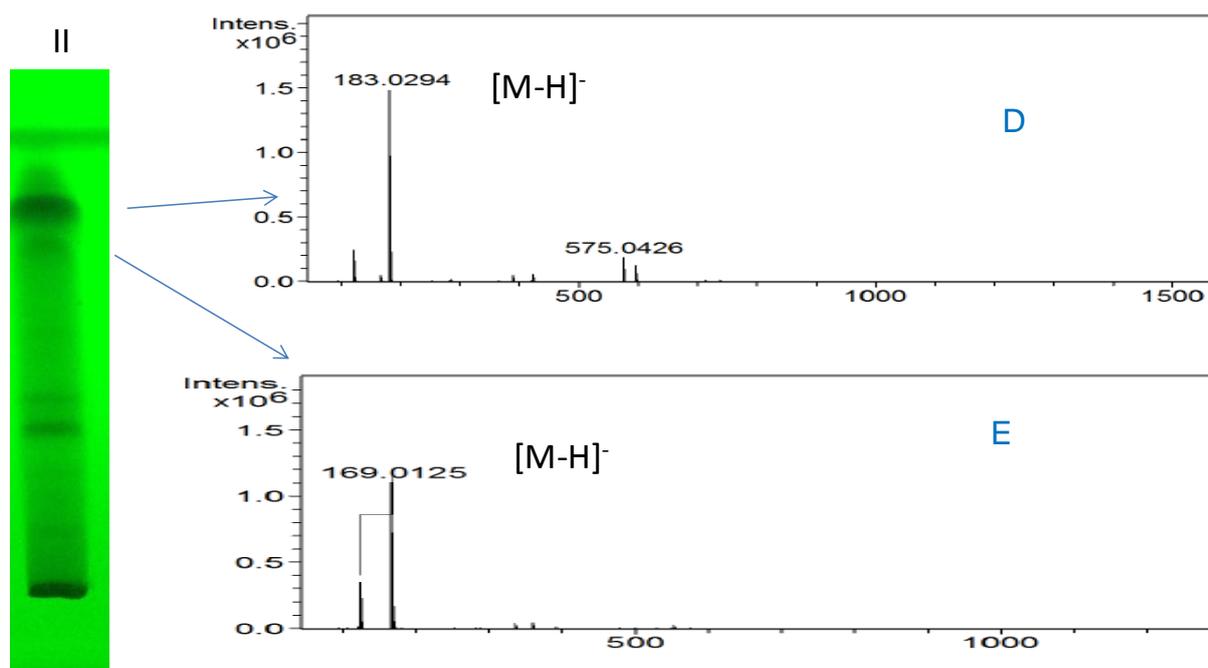
De plus nous avons comparé les composés (A à E) avec les standards disponibles au laboratoire.

Les masses mono isotopiques exactes des adduits **A**, **B**, **C** ont été déterminées avec  $m/z$  487,0877  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  617,1520  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  633,1469  $[M + Na]^+$ , respectivement, conduisant à une formule moléculaire de  $C_{21}H_{20}NaO_{12}$ ,  $C_{27}H_{30}NaO_{15}$  et  $C_{27}H_{30}NaO_{16}$ . Les taches correspondent à des flavonoïdes car ils ont des florescences jaunes ou jaune verdâtre avec le réactif de Neu à 365 nm (**figure 26**). L'analyse de leur spectre de masse permet de dire qu'il s'agirait de l'isoquercétine (**A**), du kaempférol 3-*O*-rutinoside (**B**) et de la rutine (**C**).

Les masses mono isotopiques exactes des taches **D** et **E** ont également été déterminées :  $m/z$  183,6320  $[M-H]^-$ , 170,0147  $[M-H]^-$ , conduisant respectivement à une formule moléculaire de  $C_8H_7O_5$  correspondant au méthyle gallate (**D**) et  $C_7H_5O_5$  à l'acide gallique (**E**).

L'étape suivante de notre étude consiste à isoler ces molécules ; le but est de calculer le rendement de ces composés isolés. Par ailleurs, nous avons caractérisé les composés isolés avec les analyses mono et/ou bidimensionnelles par le biais de la résonance magnétique nucléaire (RMN).





**Figure 26 :** HPTLC-MS de l'extrait méthanolique des fruits d'*I. caerulea*, révélation avec le réactif de Neu à 365 nm (I) et 254 nm (II), (Elmi *et al.*, 2018).

#### 4.1.2 Identification du composé A

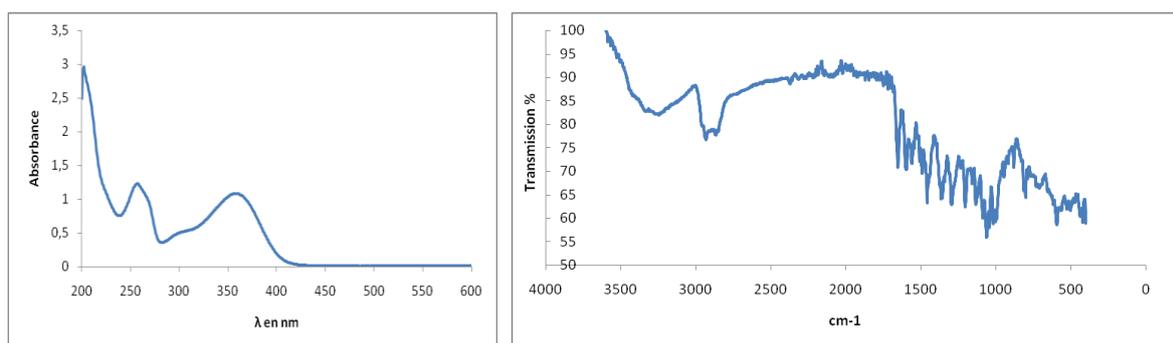
Sur la plaque de CCM, après pulvérisation du réactif de Neu, la tache du composé A est jaune fluorescente ce qui suppose son appartenance à la famille des flavonoïdes.

L'analyse réalisée par HPTLC-ESI-MS de la tache donne une masse de 487,0877  $m/z$  avec une formule brute de  $C_{21}H_{20}NaO_{12}$  (M+Na).

Après purification, nous avons obtenu 0,7 mg de poudre jaune (**composé A**).

Son spectre d'absorption UV présente deux maxima d'absorption à  $\lambda_{max}$  (méthanol) à 253 nm et 352 nm (**figure 27**). Ces deux maxima apparaissent d'une part entre 290-385 nm et 240-285 nm d'autre part, ce sont deux régions d'absorption caractéristiques des flavonols et flavones (Vrielynck, 1996).

Son spectre infrarouge est caractérisé par des bandes à 3422 ( $\nu_{OH}$ ), 2939 et 2902 ( $\nu_{C-H}$ ), 1655 ( $\nu_{C=O}$ ), 1601 et 1456 ( $\nu_{C=C}$ ), 1062 et 1053 ( $\nu_{C-O}$ ) (**figure 27**). La présence du groupe C=O renforce l'hypothèse de l'appartenance de ce composé aux deux sous familles flavonols et flavones.



**Figure 27** : Spectre UV et IR du composé A

➤ Description RMN

En raison de la faible quantité du produit isolé, seul le spectre du proton est présenté ici.

Le composé A présente les caractéristiques suivantes (**figure 28**):

- cinq signaux aromatiques 7.71 (d,  $J = 2.2$ , 1H), 7.59 (dd,  $J = 8.5, 2.2$ , 1H), 6.87 (d,  $J = 8.5$ , 1H), 6.40 (d,  $J = 2.2$ , 1H), 6.21 (d,  $J = 2.2$ , 1H)

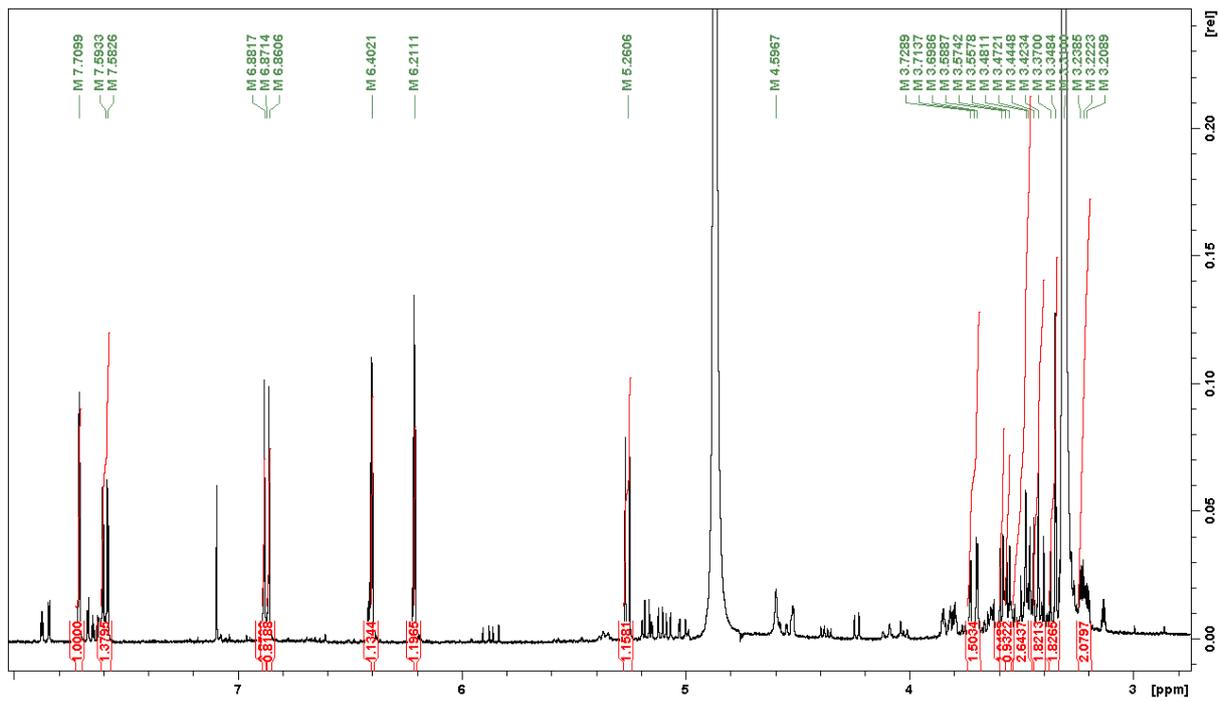
- le couplage *meta* (2.2 Hz) entre les deux doublets à 6.40 et à 6.21 ppm est spécifique des protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonoïde.

- les constantes de couplage de 2.2 Hz et 8.5 Hz sont spécifiques du système aromatique tri substitué en position 2', 5' et 6'. Les signaux sont caractéristiques du cycle B de la quercétine.

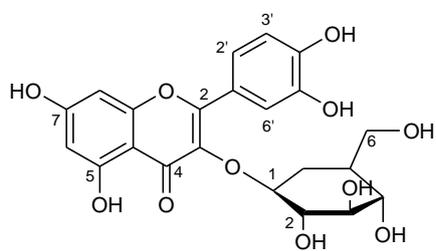
- un proton anomérique à 5.26 ppm, avec constante de couplage de 7.4 Hz est typique de la configuration beta ( $\beta$ ) de la liaison anomérique.

- cinq protons de la région des signaux du sucre, dans notre cas le glucose, 3.71 (dd,  $J = 12.0, 2.5$ , 1H), 3.57 (dd,  $J = 5.5, 12.0$ , 1H), 3.48-3.44 (m, 1H), 3.42 (t,  $J = 8.7$ , 1H) 3.37 (m, 1H) 3.24-3.21 (m, 1H).

Avec ces données et en comparaison avec la littérature (Fernandez *et al.*, 2005), nous pouvons donc identifier le composé A comme étant la quercétine-3-*O*-glucoside ou l'isoquercétine (**figure 29**).



**Figure 28 :** Spectre du proton  $^1\text{H}$  du composé A dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.



**Figure 29:** Structure de l'Isoquercétine.

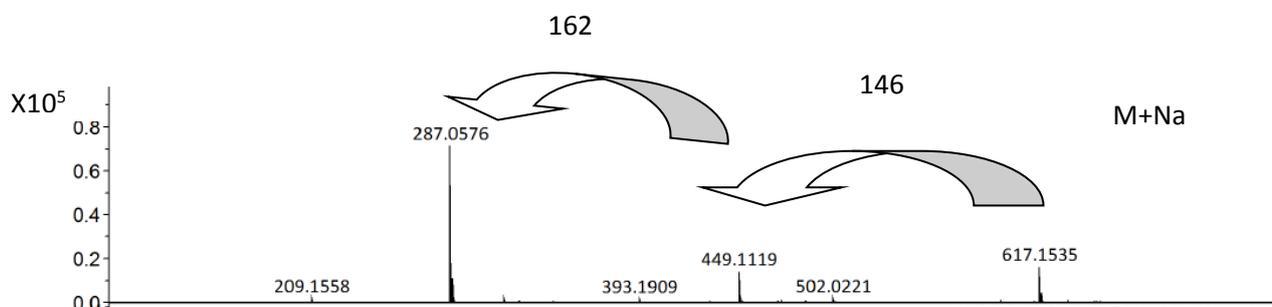
### 4.1.3 Identification du composé B

En CCM, la tache correspondant au composé B présente une fluorescence jaune verdâtre après pulvérisation du réactif de Neu.

Après isolement, nous avons obtenu 0,6 mg du composé B sous forme d'une poudre jaune.

L'analyse réalisée grâce au couplage HPTLC-MS de la tache B, donne une masse de 617.1520  $m/z$   $[M+Na]^+$  avec une formule brute de  $C_{27}H_{30}NaO_{15}$ .

Le spectre de masse indique la perte d'un rhamnose (146u) puis d'un hexose (162u) qui suppose la structure d'un flavonoïde diglycosylé et donc un aglycone de 286 u ( $M+H$  à 287u ; **figure 30**).



**Figure 30:** Spectre de masse du composé B

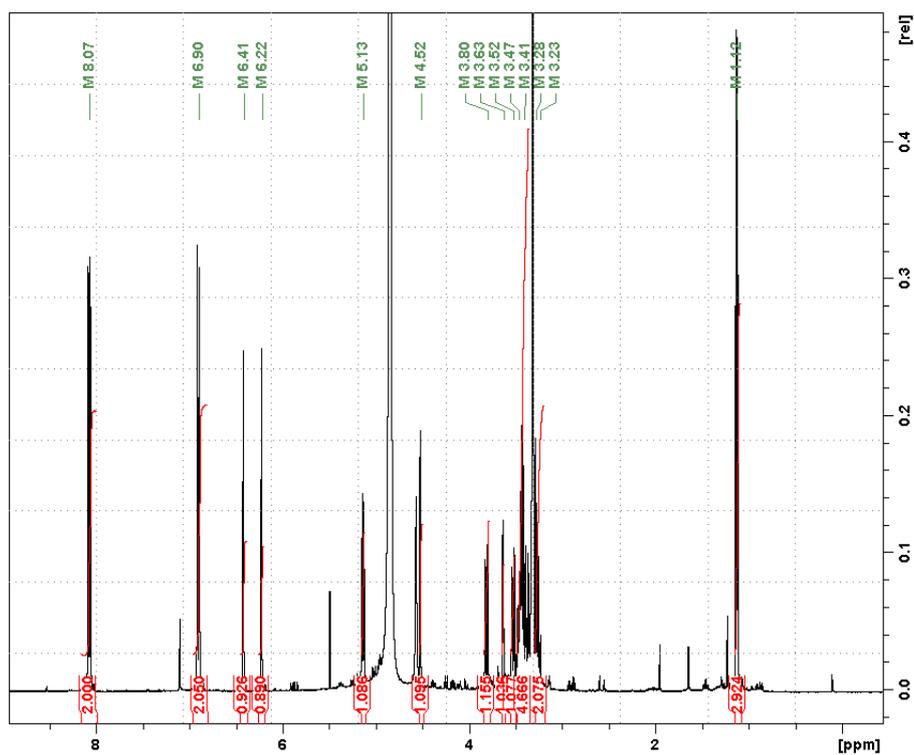
#### ➤ Description RMN

Pour confirmer la structure du composé B nous avons réalisé un spectre RMN du proton.

Le composé B présente les caractéristiques suivantes (**figure 31**):

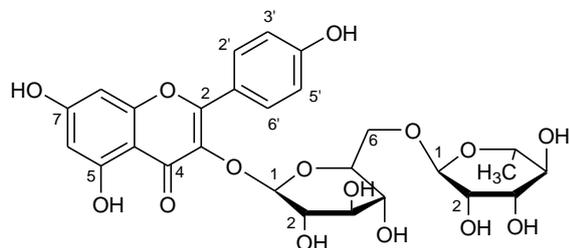
- quatre signaux aromatiques, 8.07 (d,  $J = 8.8$ , 2H), 6.89 (d,  $J = 9.0$ , 2H), 6.42 (d,  $J = 2.1$ , 1H), 6.22 (d,  $J = 2.1$ , 1H),
- le couplage *meta* (2.1 Hz) entre les deux doublets à 6.42 et à 6.22 ppm est spécifique des protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonoïde.
- nous pouvons observer les signaux caractéristiques de la génine du kaempférol avec la présence du système 2H AA' et 2H XX' dans le cycle B.

- deux protons anomériques à 5.14 et à 4.52 ppm, avec une constante de couplage respectivement de 7.4 Hz et 1.6 Hz. Nous pouvons affirmer être en présence du glucose et du rhamnose.
- La constante de couplage de 7.4 Hz du proton anomérique du glucose nous permet d'affirmer la configuration beta ( $\beta$ ) et la constante de couplage de 1,6 Hz du proton anomérique du rhamnose nous permet d'affirmer la configuration alfa ( $\alpha$ )
- Nous pouvons observer la présence de 10 protons de la partie osidique, respectivement de six protons du glucose: 3.81 (dd,  $J = 11, 1.3$ , 1H, Glu H-6a), 3.45- 3.42 (m, 1H, Glu H-2), 3.41 (m, Glu H-3), 3.36 (m,  $J = 1$ H, Glu H-6b), 3.35 (m, 1H, Glu-H-5), et quatre protons du rhamnose : 3.63 (dd,  $J = 3.4, 1.7$ , 1H, Rha H-2), 3.52 (dd,  $J = 9.2, 3.4$ , 1H, Rha H-3), 3.49-3.46 (m, Rha H-5), 3.28 (m, Rha H-4).
- La présence d'un doublet à 1,12 ppm est typique du méthyl du rhamnose.



**Figure 31:** Spectre du proton  $^1\text{H}$  du composé B dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.

Le composé B serait donc, en comparaison avec la littérature ((Wang *et al.*, 2015), le kaempférol 3- *O* -rutinoside (**figure 32**).

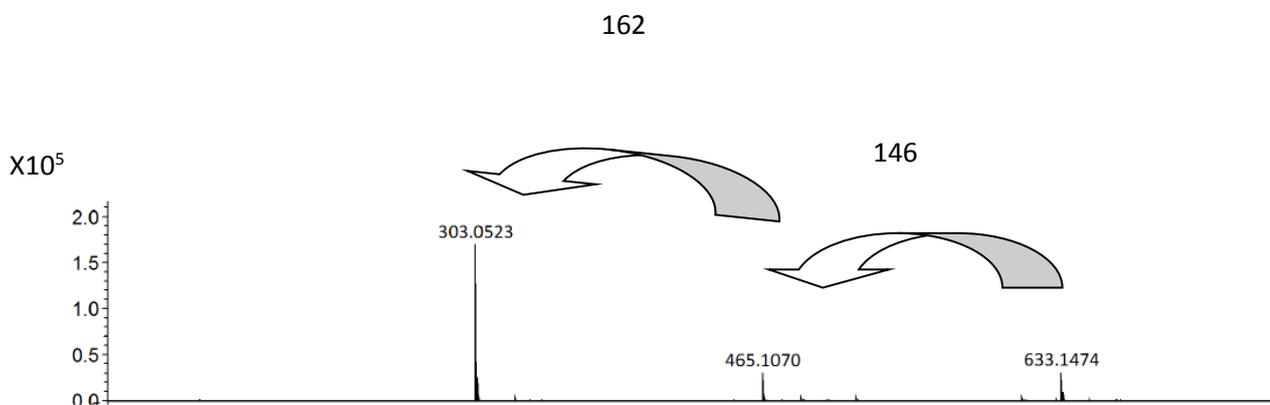


**Figure 32:** Structure du composé B (kaempférol 3- *O* -rutinoside).

#### 4.1.4 Identification du composé C

En CCM nous pouvons observer une tache jaune fluorescente, après pulvérisation, du réactif de Neu.

Le spectre de masse du composé C indique la perte d'un rhamnose (146u) puis d'un hexose (162u) qui suppose la présence d'un flavonoïde diglycosylé et donc un aglycone de 302u (M+H à 303u), différent de celui du composé B (**figure 33**).



**Figure 33:** Spectre de masse du composé C.

## ➤ Description RMN

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et des spectres de corrélation homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC et par comparaison avec des données de la littérature.

Le composé C présente les caractéristiques suivantes (**figure 34-39 ; tableau 13**):

- cinq signaux aromatiques 7.71 (d,  $J = 2.2$ , 1H), 7.59 (dd,  $J = 8.5, 2.2$ , 1H), 6.87 (d,  $J = 8.5$ , 1H), 6.40 (d,  $J = 2.2$ , 1H), 6.21 (d,  $J = 2.2$ , 1H) ;
- le couplage *meta* (2.2 Hz) entre les deux doublets à 6.40 et à 6.21 ppm est spécifique des protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonoïde.
- les constantes de couplage de 2.2 Hz et 8.5 Hz sont spécifiques du système aromatique tri substitué en position 2', 5' et 6'. Les signaux sont caractéristiques du cycle B de la quercétine.
- deux protons anomériques à 5,10 et à 4,56 ppm, avec une constante du couplage respectivement de 7,4 Hz et 1.2 Hz. Nous pouvons affirmer qu'il s'agit du glucose et du rhamnose.
- Nous pouvons observer la présence de 10 protons dans la partie osidique
- L'analyse du spectre du  $^{13}\text{C}$  permet de mettre en évidence la présence de 27 atomes de carbone.
- L'analyse du spectre HSQC permet de voir dix CH aliphatiques, un  $\text{CH}_2$  (67,2 ppm) et un méthyle  $\text{CH}_3$  (16,5 ppm).
- Les deux sucres sont liés en  $1 \rightarrow 6$  car il y a la présence de la corrélation, en HMBC, entre le proton anomérique à 4.56 ppm du rhamnose (Rha-1) et le carbone situé à  $\delta$  67.2 ppm (Glu-6)
- Le glucose est en position 3 car nous pouvons observer la corrélation HMBC entre le carbone C-3 (134.4 ppm) de l'aglycone et le proton anomérique du glucose (Glu-1, 5.10ppm).

**Tableau 13:** Données des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HMBC du composé C.

Position	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	Corrélations HMBC
Agl-2	157.9	-	
Agl-3	134.4	-	
Agl-4	177.8	-	
Agl-5	161.3	-	
Agl-6	98.6	6.17 (d, J = 2.0 Hz)	
Agl-7	164.5	-	
Agl-8	93.6	6.34 (d, J = 2.0 Hz)	
Agl-9	156.9	-	
Agl-10	104.2	-	
Agl-1'	121.7	-	
Agl-2'	116.4	7.68 (d, J = 2.2 Hz)	
Agl-3'	144.3	-	
Agl-4'	148.3	-	
Agl-5'	114.7	6.88 (d, J = 8.4 Hz)	
Agl-6'	122.3	7.61 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz)	
Glu-1	103.5	5.10 (d, J = 7.4 Hz)	134.4
Glu-2	74.4	3.59-3.46 (m)	
Glu-3	76.7	3.5 (m)	
Glu-4	70.9	3.59 (dd, 9.6-3.3)	
Glu-5	75.7	3.44-3.37 (m)	
Glu-6	67.2	3.86-3.80 (m) et 3.4 (m)	
Rha-1	101.0	4.56 (d, J = 1. Hz)	67.6
Rha-2	70.7	3.7 (dd, 3.3, 1.6 Hz)	
Rha-3	70.0	3.30 (m)	
Rha-4	72.6	3.33 (m)	
Rha-5	68.3	3.48 (m)	
Rha-6	16.5	1.15 (d, J = 6.2 Hz)	

Agl = aglycone, Glu = glucose, Rha = rhamnose

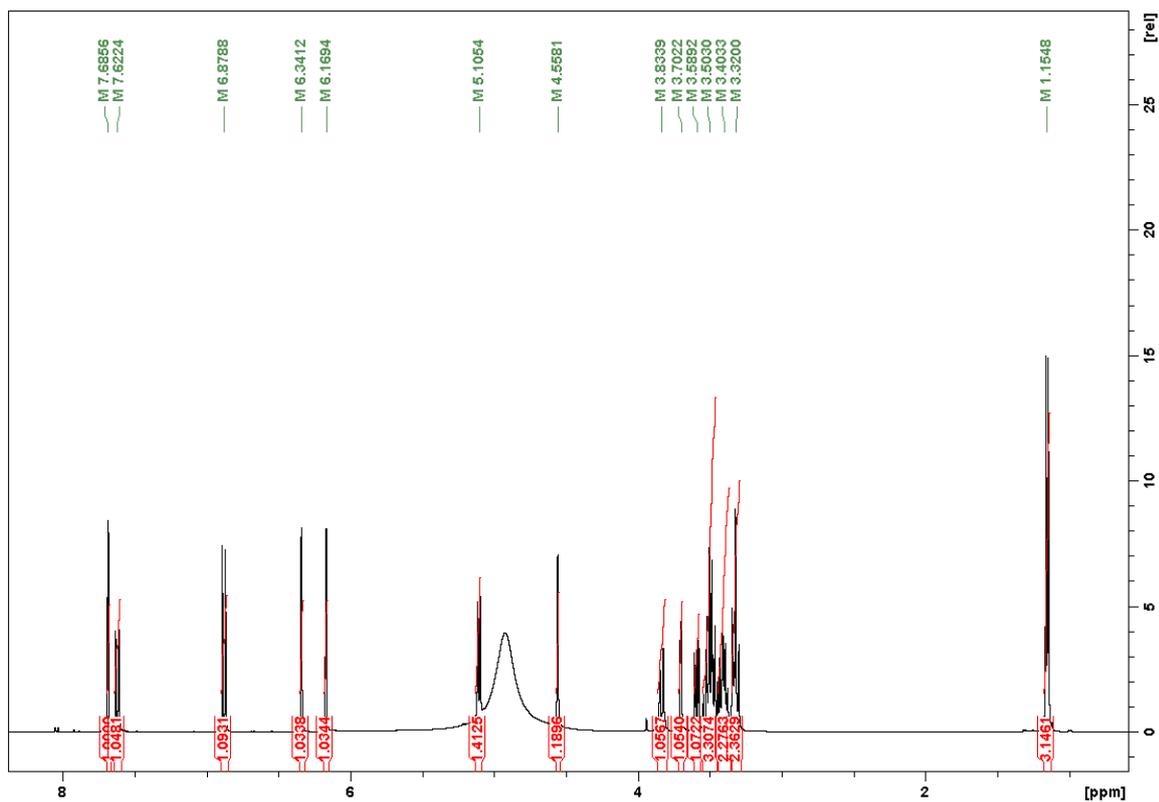


Figure 34: Spectre du proton  $^1\text{H}$  du composé C dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.

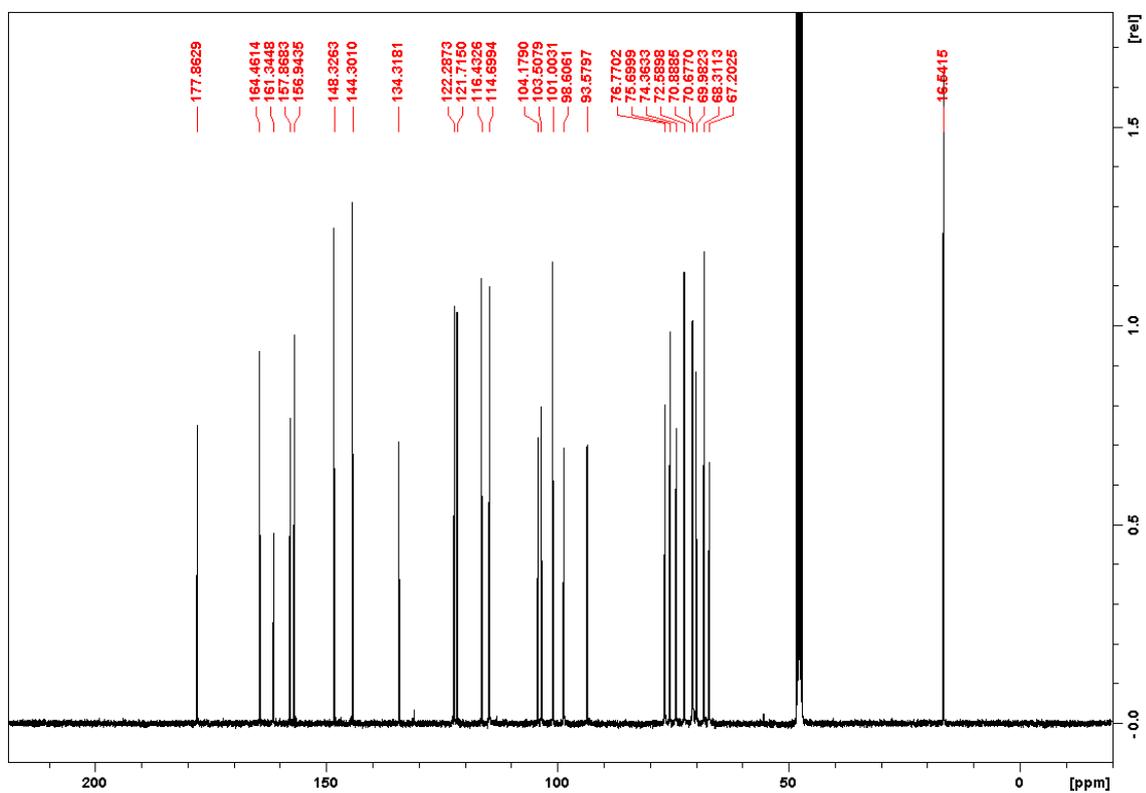
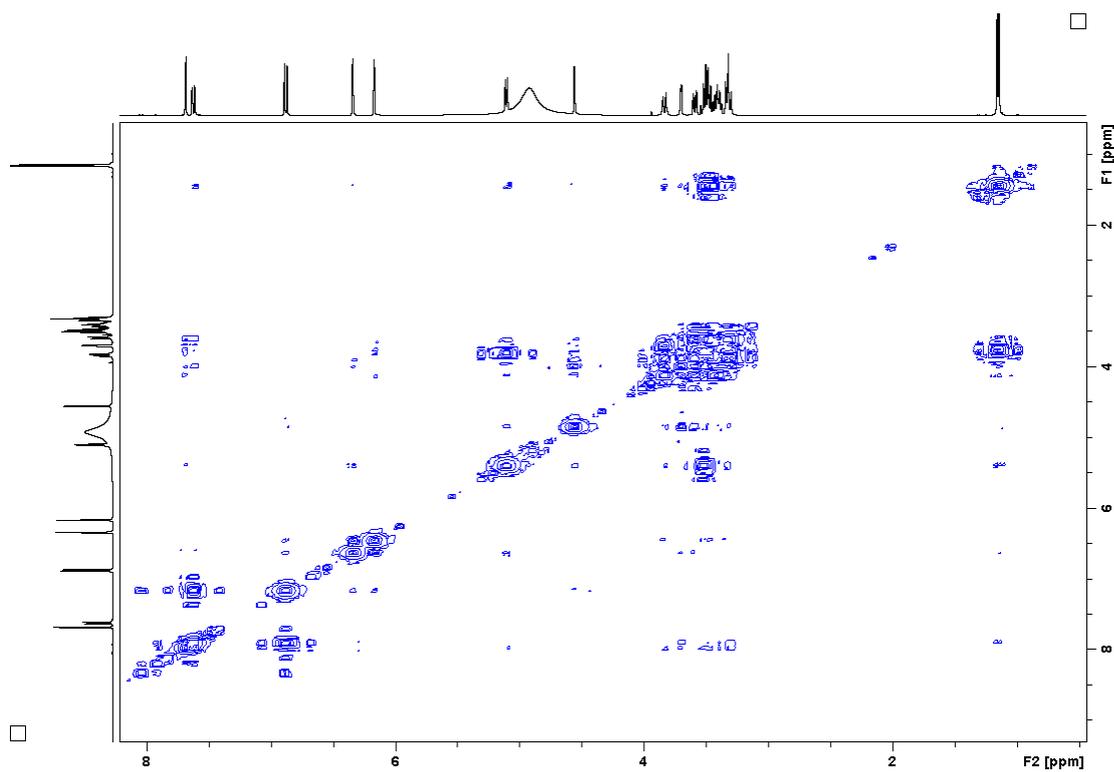
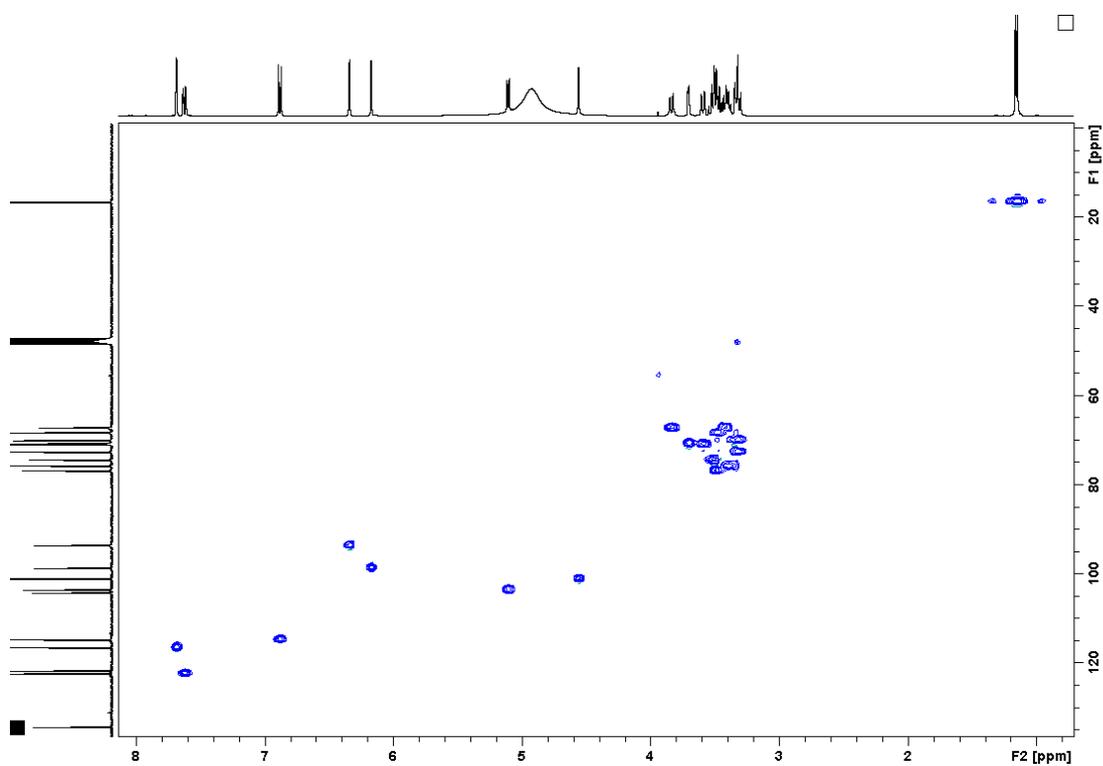


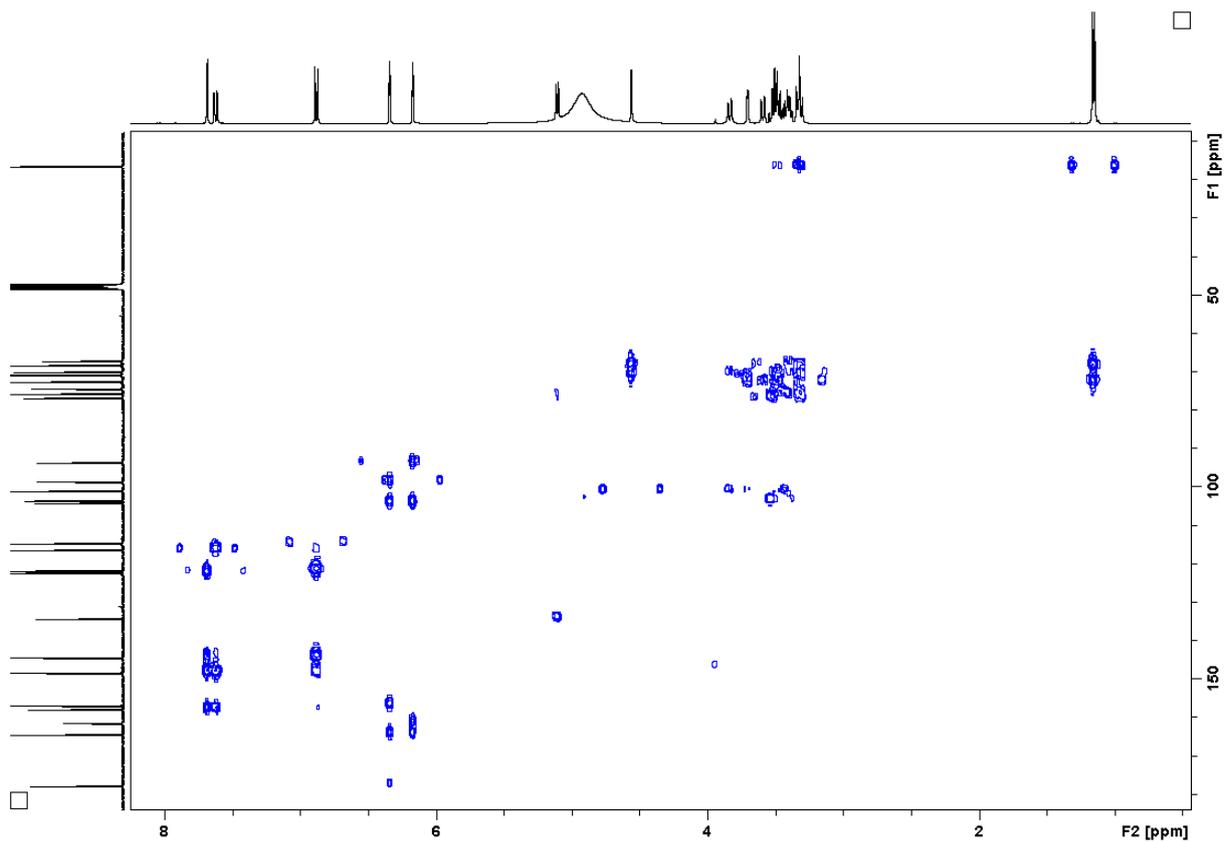
Figure 35: Spectre du carbone  $^{13}\text{C}$  du composé C dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 100 MHz.



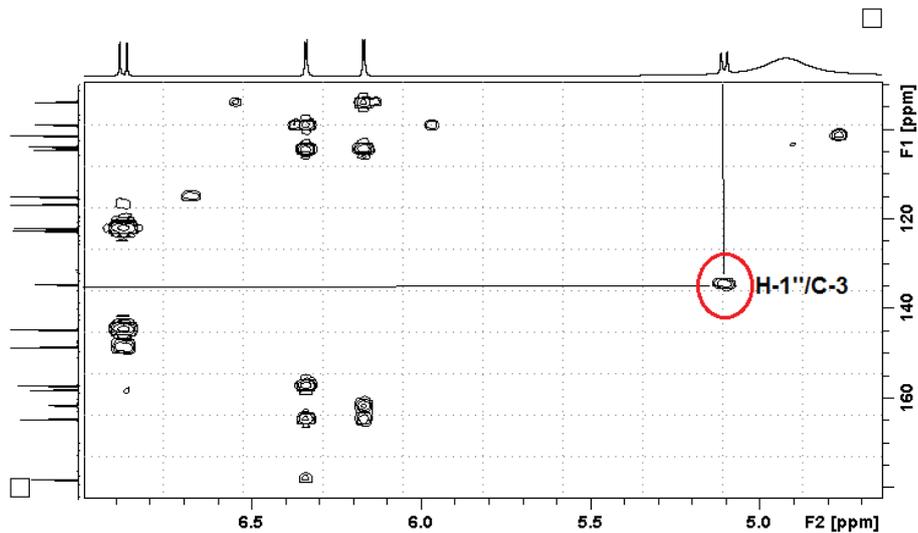
**Figure 36:** Spectre COSY du composé C dans CD<sub>3</sub>OD à 400 MHz.



**Figure 37:** Spectre HSQC du composé C dans CD<sub>3</sub>OD à 400 MHz

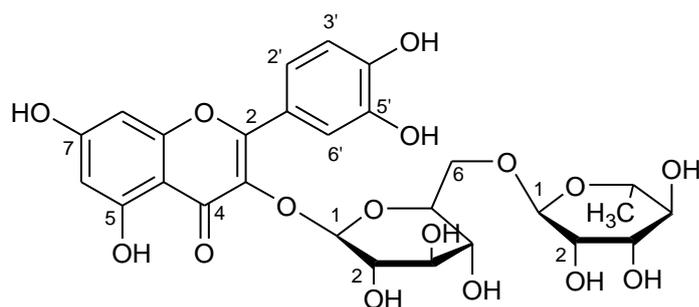


**Figure 38:** Spectre HMBC du composé C dans CD<sub>3</sub>OD à 400 MHz



**Figure 39:** Zoom du spectre HMBC du composé C dans CD<sub>3</sub>OD à 400 MHz

Les données présentées indiquent que le composé C est la rutine (**Figure 40**).



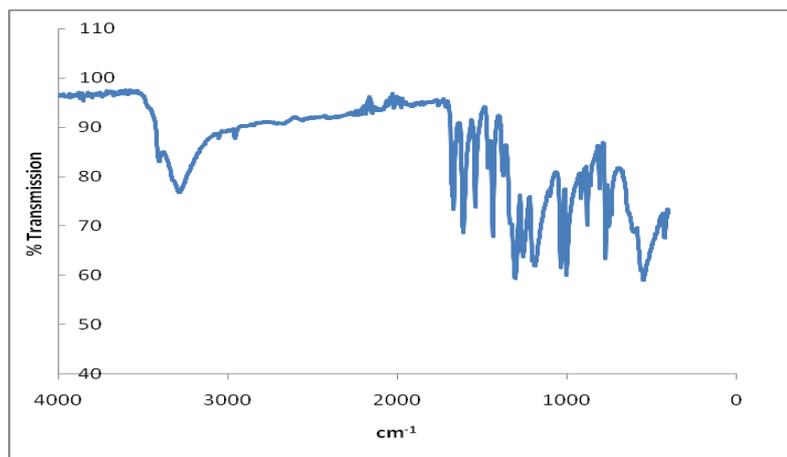
**Figure 40:** Structure du composé C, la rutine.

#### 4.1.5 Identification du composé D

Après purification, nous avons obtenu 6 mg du composé D. Il se présente comme une poudre grise- blanchâtre.

Le spectre de masse, réalisé en mode négatif, du composé D donne une masse de 183,6320u  $[M-H]^-$  avec une formule brute correspondante à  $C_8H_8O_5$ .

Par ailleurs dans son spectre IR (**figure 41**), il est possible d'observer les bandes caractéristiques tels que  $3305\text{ cm}^{-1}$  (-OH) et  $1614$  (cycle aromatique).

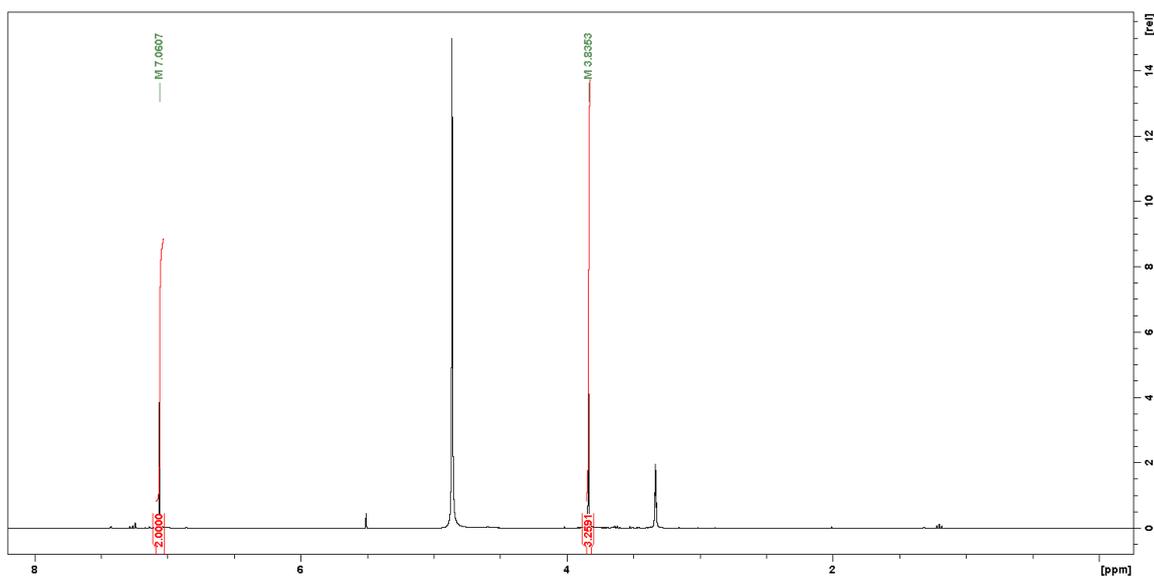


**Figure 41:** Spectre IR du composé D.

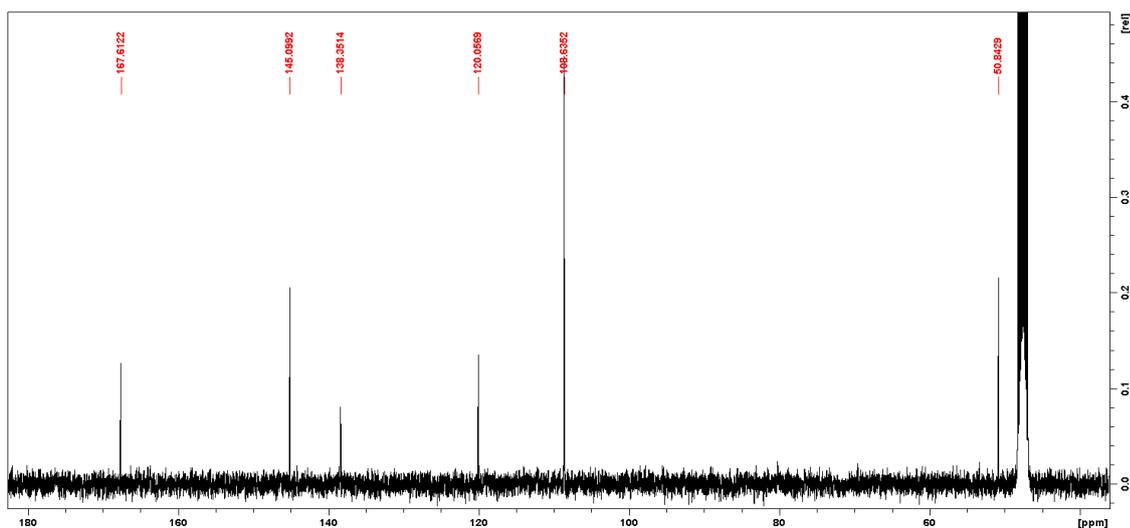
➤ Description RMN

Après examen du spectre proton du composé D, nous pouvons observer un singulet à 7.06 ppm intégrant pour deux protons et un singulet à 3.83 ppm intégrant pour trois protons, caractéristique du groupement méthoxyle (**figure 42**).

L'analyse du spectre du  $^{13}\text{C}$  permet de mettre en évidence la présence de six atomes de carbones 169.2, 146.6, 139.9, 121.6, 110.1, 52.4 (**figure 43**).



**Figure 42:** Spectre du proton  $^1\text{H}$  du composé D dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.



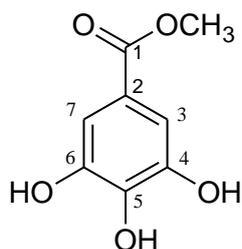
**Figure 43:** Spectre du carbone  $^{13}\text{C}$  du composé D dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 100 MHz.

Les corrélations entre les spectres  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont rassemblées dans le **tableau 14**.

**Tableau 14:** Données des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé D.

Position	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)
1	169.2	-
2	121.6	7.06 (s)
3	110.1	-
4	146.6	-
5	139.9	-
6	146.6	7.06 (s)
7	110.1	-
8	52.4	3.83 (s)

Ces données comparées à la littérature nous conduisent à identifier le composé D comme étant le méthyl gallate (**figure 44**).

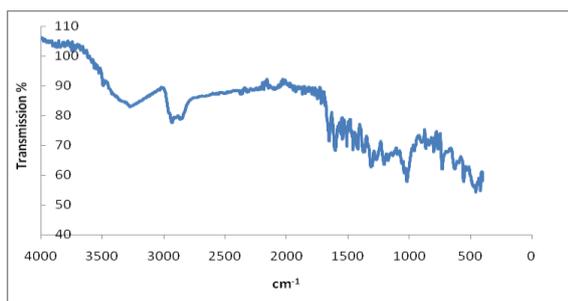


**Figure 44:** Structure du composé D.

#### 4.1.6 Identification du composé E

Le spectre de masse de ce composé a un pic M-H à 169.0125u avec une formule brute correspondante à  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$ .

Son spectre IR présente les bandes caractéristiques tels que  $3334\text{ cm}^{-1}$  (-COOH) et  $1606\text{ cm}^{-1}$  (cycle aromatique) avec d'autres bandes à  $1652$ ,  $1317$ ,  $1211$ ,  $1024$  et  $734\text{ cm}^{-1}$  (**Figure 45**).



**Figure 45:** Spectre IR du composé E.

➤ Description RMN

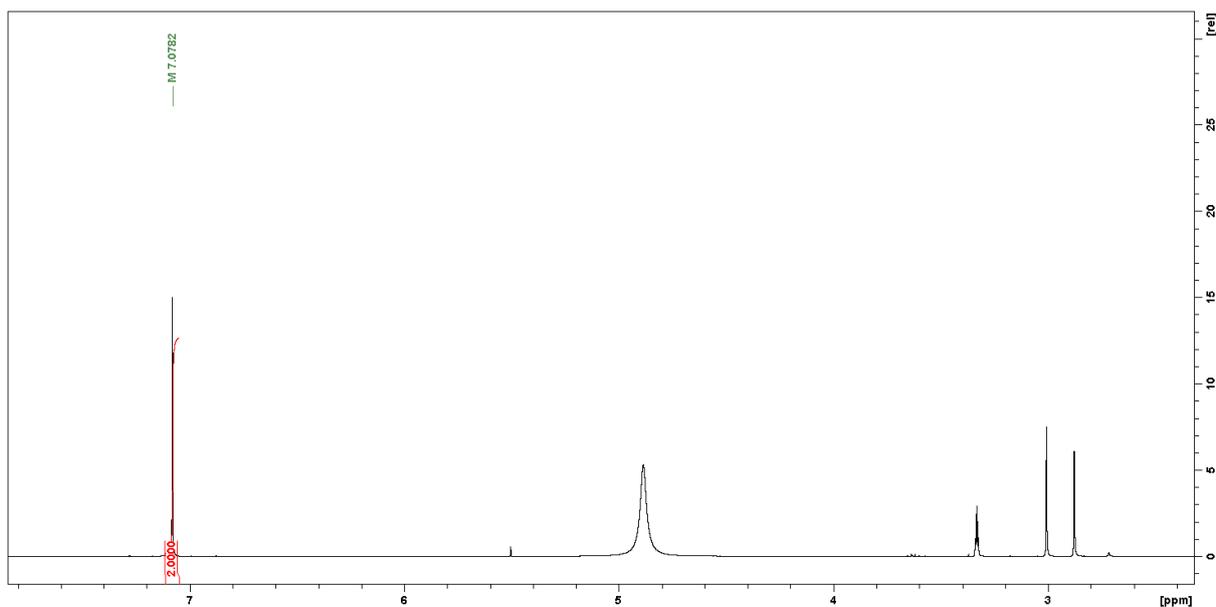
Après purification, nous avons obtenu 11,2 mg du composé E. Ce dernier se présente comme une poudre grise-blanchâtre.

Après examen du spectre du proton du composé E, nous pouvons observer un seul singulet à 7.06 ppm intégrant pour deux protons (**Figure 46**).

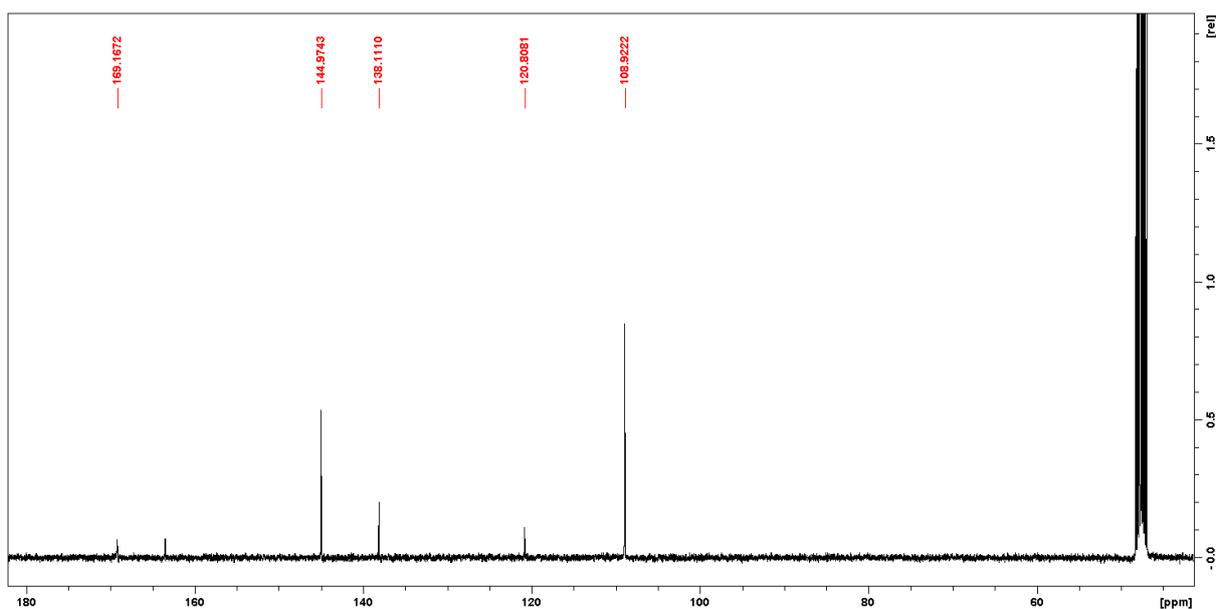
L'analyse du spectre du  $^{13}\text{C}$  permet de mettre en évidence la présence d'un acide carboxylique à 170.8 ppm et de quatre signaux aromatiques 146.5, 139.6, 122.4, 110.5 (**figure 47**). Leurs corrélations sont rassemblées dans le **tableau 15**.

**Tableau 15 :** Données des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  du composé E.

Position	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)
1	170.8	-
2	122.4	7.05 (s)
3	110.1	-
4	146.5	-
5	139.6	-
6	146.5	7.05 (s)
7	110.5	-



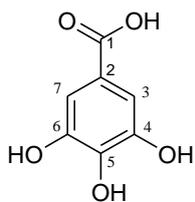
**Figure 46:** Spectre du proton  $^1\text{H}$  du composé E dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.



**Figure 47:** Spectre du proton  $^{13}\text{C}$  du composé E dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 100 MHz.

Les spectres du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  des composés D et E sont presque similaires, avec l'exception du groupement méthoxyle.

Nous pouvons conclure en affirmant que le composé E est le dérivé déméthylé, donc il s'agit de l'acide gallique (**figure 48**).



**Figure 48:** Structure du composé E (acide gallique).

## 4.2 Caractérisation des composés de l'extrait hexanique

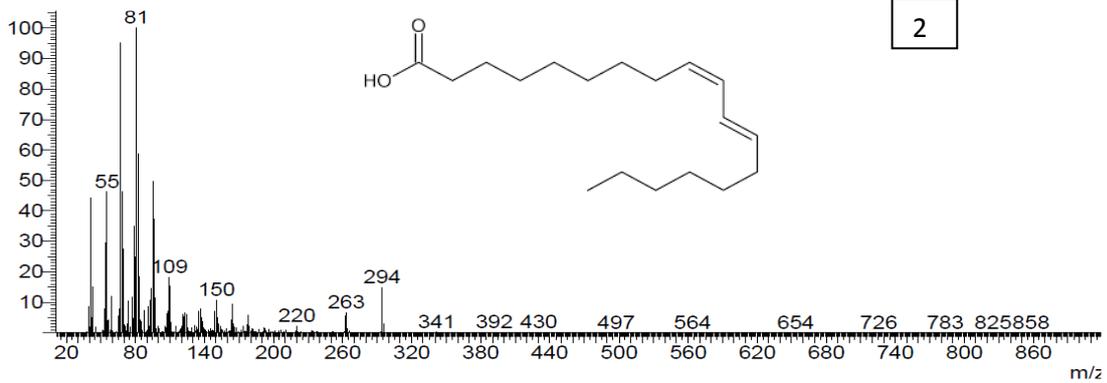
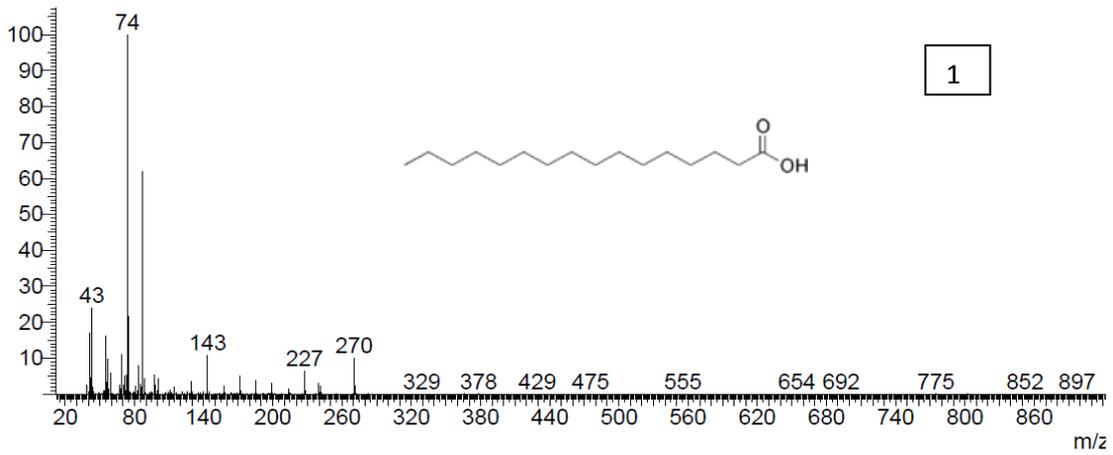
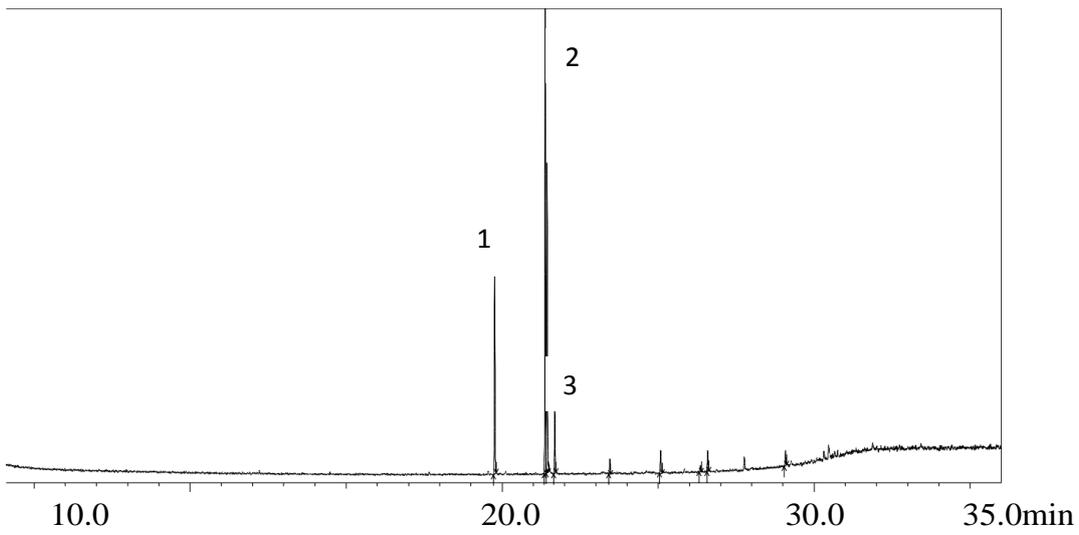
### 4.2.1 Identification du 'composé F'

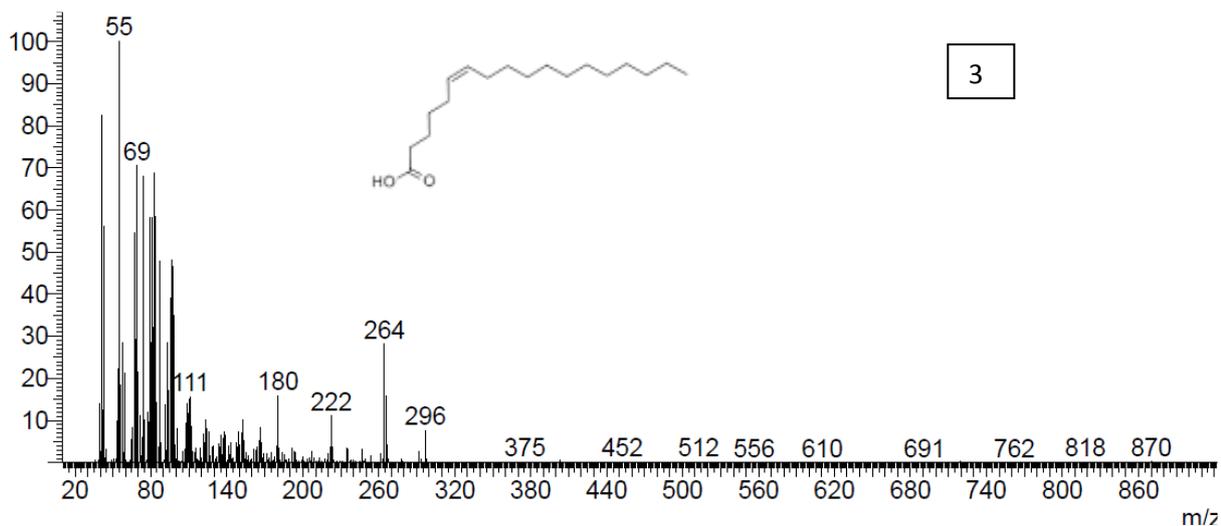
Le composé F est une poudre jaune soluble dans le chloroforme. Nous avons observé une seule tache de couleur violette, après pulvérisation avec l'anisaldéhyde. Le  $R_f$  est de 0,4 avec un système de solvant à base de toluène-acétate d'éthyle 75 :15 v/v.

Cependant son spectre GCMS présente trois pics majeurs correspondants aux acides linoléique, pétrosélinique et palmitique (**tableau 16, figure 49**).

**Tableau 16 :** Résultats d'analyse GCMS des composés F1-3.

Pics	Composés	Temps de rétention (min)	Aire (%)
1	Acide Palmitique F1	19,76	16,8
2	Acide Linoléique F2	21,38	41
3	Acide Pétrosélinique F3	21,44	27,7



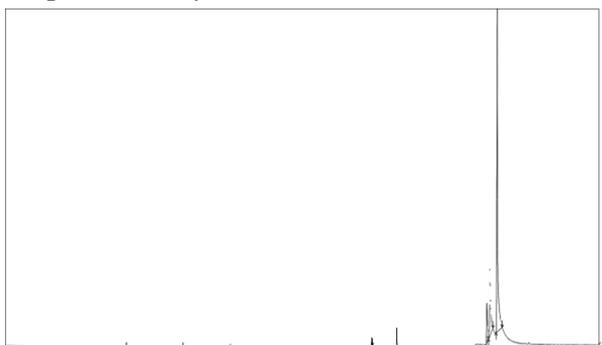


**Figure 49:** Analyse GC / MS des composés F1-3 obtenus à partir de l'extrait hexanique du fruit d'*Indigofera caerulea*.

#### 4.2.2 Identification du composé G

Le composé G est une poudre blanchâtre soluble dans le dichlorométhane et l'hexane entre autres.

Son spectre GC-MS est effectué, le chromatogramme nous montre un pic majoritaire correspondant au  $\beta$ -sitostérol.

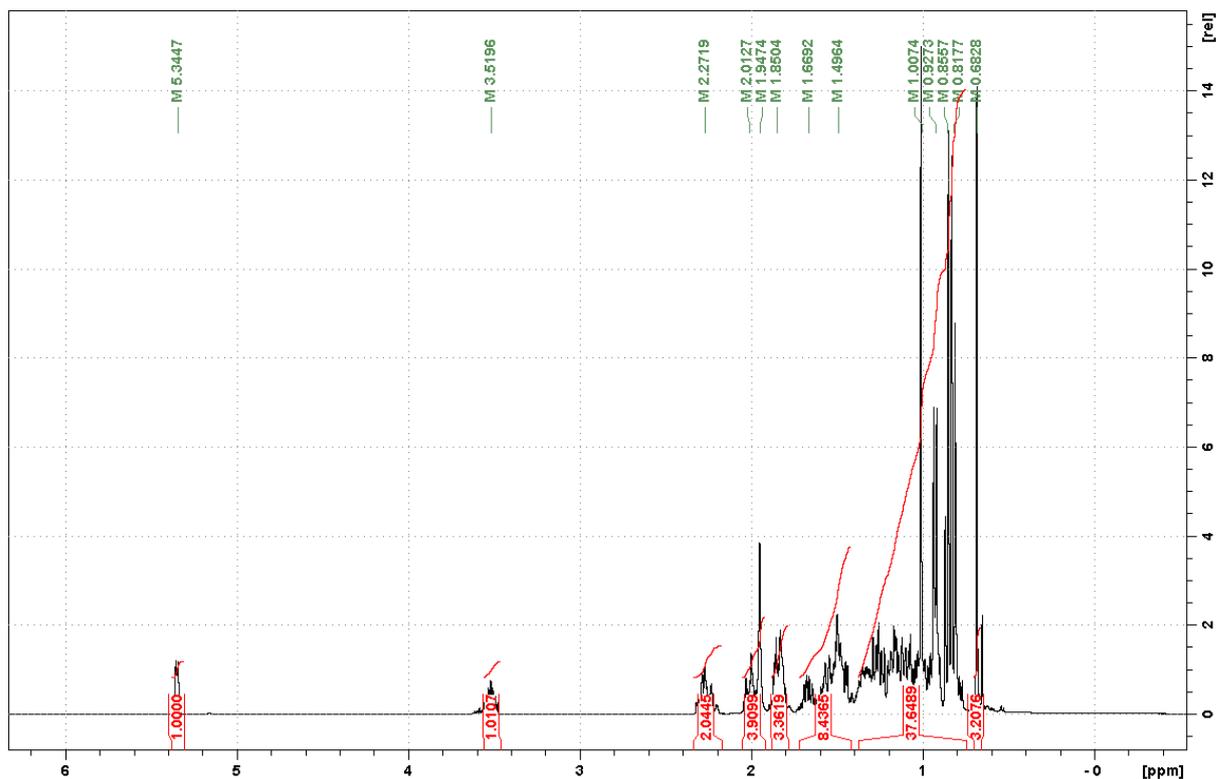


**Figure 50:** Spectre GCMS du composé G.

➤ Description RMN

Les spectres du proton  $^1\text{H}$ , du  $^{13}\text{C}$  et les corrélations du composé G (**figure 51- 55**), nous montrent :

- la présence de deux méthyls singulets à 0,68 et 1,01 pp, trois méthyls doublets à 0,81, 0,83, and 0,93 ppm, et un méthyl triplet à 0,84,
- un proton oléfinique à 5,34 ppm,
- un multiplet à 3.52 ppm typique du proton en position 3 du stérol,
- le spectre du carbon  $^{13}\text{C}$  nous montre vingt-neuf carbones à 140.8, 121.7, 71.8, 56.8, 56.1, 50.1, 45.9, 42.3, 42.3, 39.8, 37.3, 36.5, 36.2, 33.9, 31.9, 31.6, 29.2, 28.3, 26.1, 24.3, 23.1, 21.1, 19.8, 19.4, 19.1, 18.8, 12.0, 11.9
- par HSQC la présence de six  $\text{CH}_3$ , onze  $\text{CH}_2$ , dix  $\text{CH}$  sont visibles,
- il y a trois carbones quaternaires,



**Figure 51:** Spectre du carbone  $^1\text{H}$  du composé G dans  $\text{CDCl}_3$  à 400 MHz.

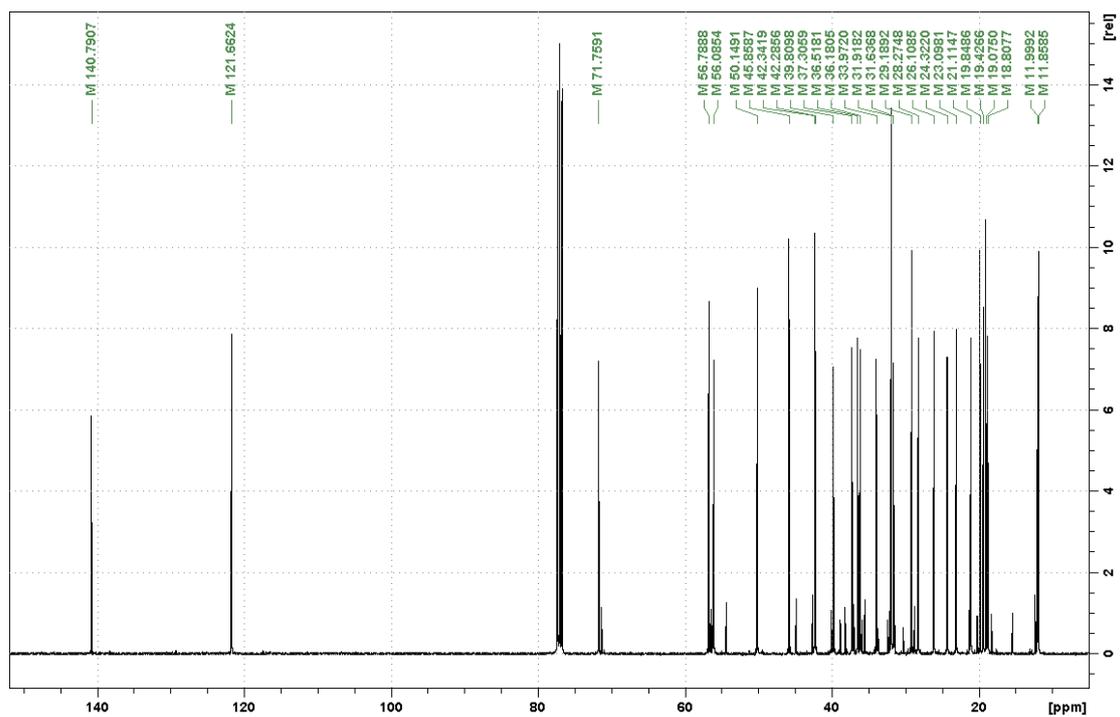


Figure 52: Spectre du carbone  $^{13}\text{C}$  du composé G dans  $\text{CDCl}_3$  à 100 MHz.

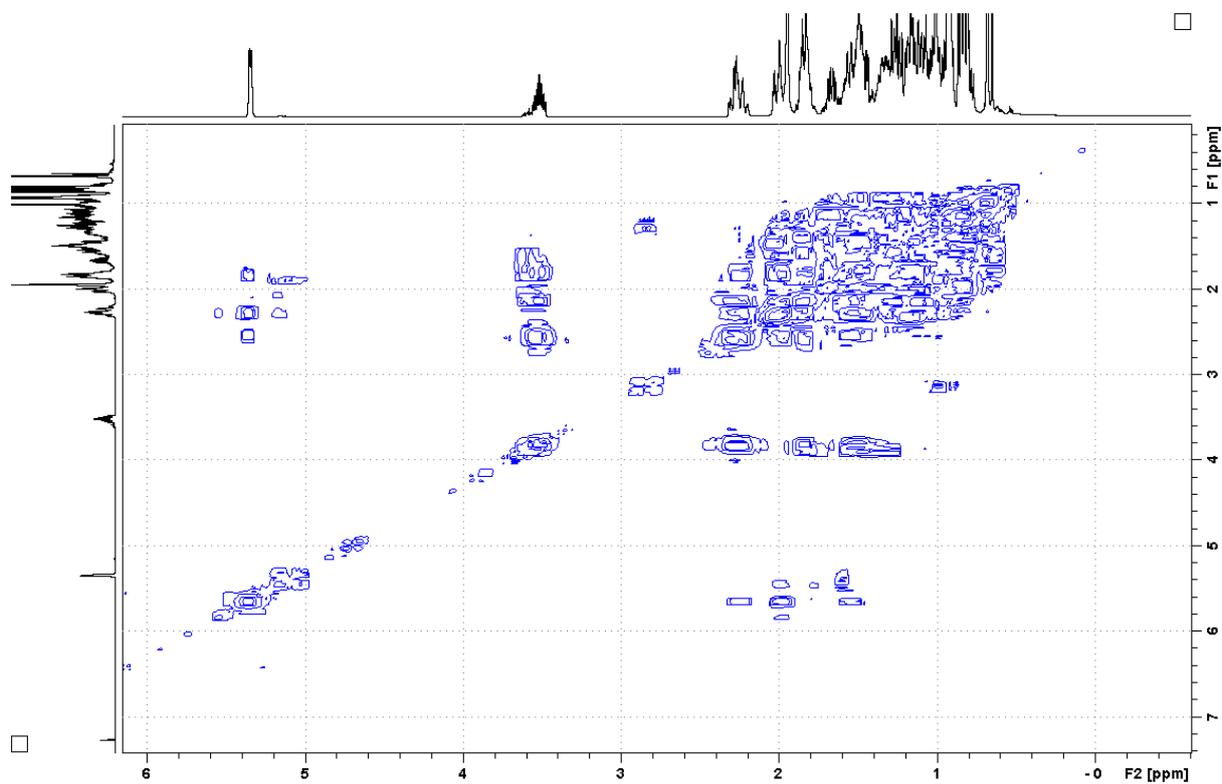
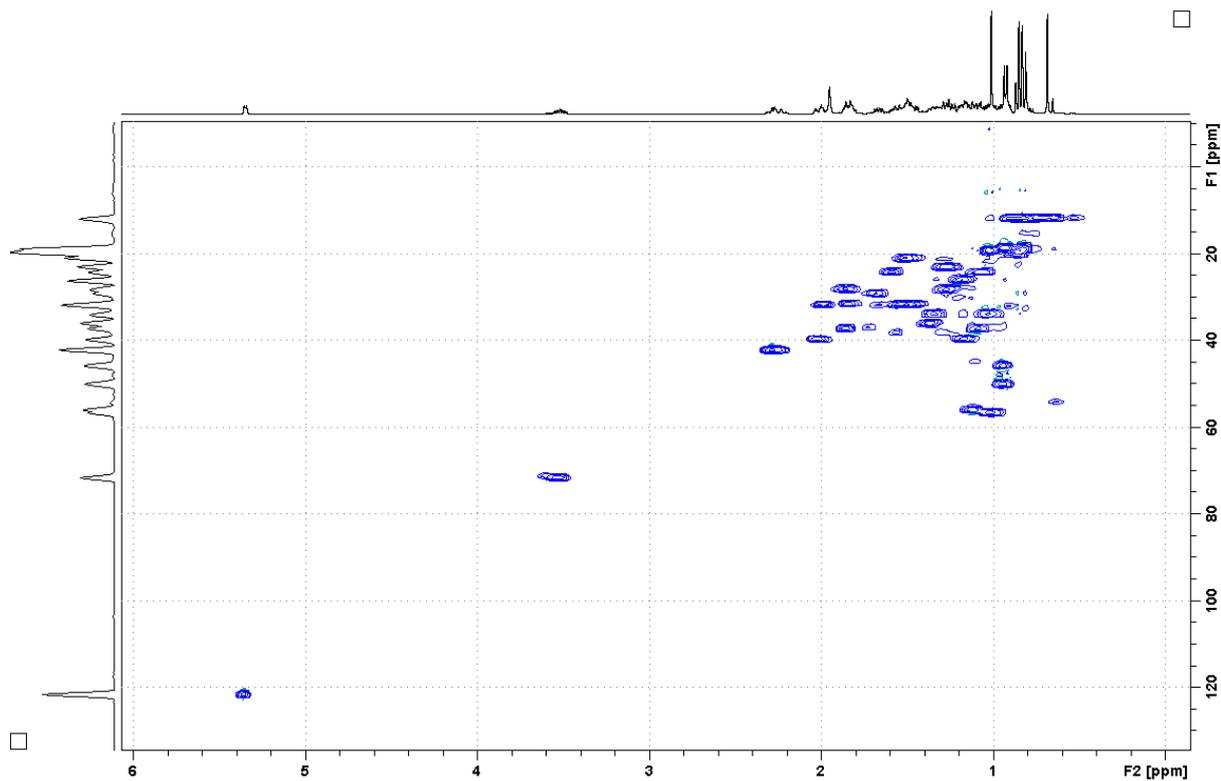
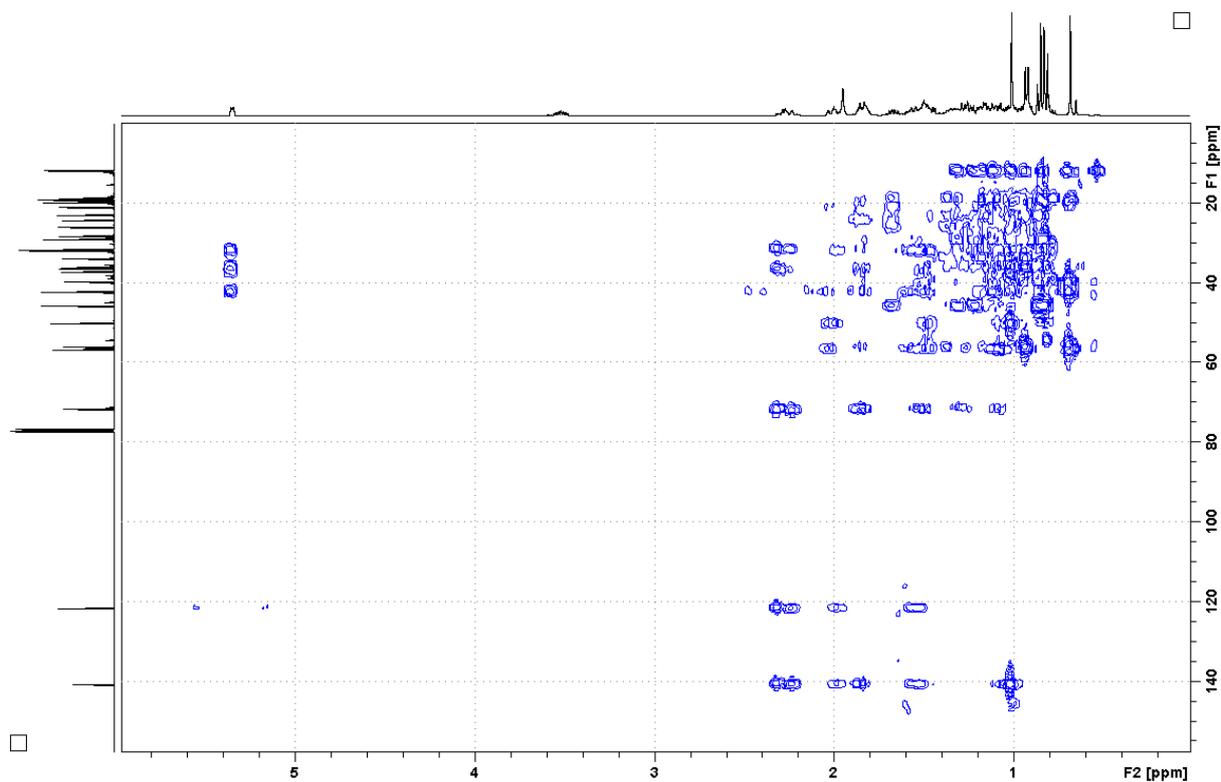


Figure 53: Spectre COSY du composé G dans  $\text{CDCl}_3$  à 400 MHz.

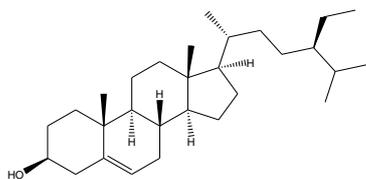


**Figure 54:** Spectre HSQC du composé G dans  $\text{CDCl}_3$  à 400 MHz.



**Figure 55:** Spectre HMBC du composé G dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.

Ces données permettent de déduire que le composé G est le  $\beta$ -sitostérol (**figure 56**).



**Figure 56:** Structure du  $\beta$ -sitostérol.

# Chapitre III : Caractérisation chimique d'*Acacia seyal* par bio-guidage

L'*Acacia seyal* est une plante connue pour sa production de gomme arabique et les études faites sur cette plante portent souvent sur ce sujet. Comme indiqué précédemment cette plante est aussi populaire pour son utilisation médicinale et de ce fait présente un intérêt scientifique pour rechercher ses constituants bio actifs. Une évaluation d'activité antioxydante est réalisée et reliée à la teneur en composés phénoliques. Nous mettons également en place un bio guidage sur deux extraits (méthanolique et aqueux) de l'écorce de cette plante. Ce bio guidage consiste à cibler les composés qui seraient à l'origine de l'effet antibactérien de cette plante.

## 1 Extraction et dosage des composés phénoliques

L'écorce d'*Acacia seyal* a été extraite selon deux méthodes (Soxhlet et macération à la température ambiante) avec deux solvants différents (méthanol et eau respectivement). Le rendement de l'extraction est de 13 % avec le méthanol et de 2,4 % avec l'eau. Il est difficile de comparer ces deux rendements car le système d'extraction diffère, Soxhlet pour le premier et macération à la température ambiante pour le second. Dans le cadre d'une utilisation traditionnelle, l'extrait aqueux est souvent avantageux du fait de sa mise en œuvre rapide, sans se soucier de l'élimination du solvant d'extraction.

Par ailleurs, les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux (TPT et TFT respectivement) ont été évaluées et rassemblées dans le **tableau 17**.

Les deux extraits, méthanolique et aqueux, ont des teneurs en polyphénols totaux de 1927,1 et 1820,5 mg GA/100 g de matière sèche (MS) respectivement. De plus leurs teneurs en flavonoïdes dans ces mêmes extraits méthanoliques et aqueux (30,9 et 13,8 mg QE/100 g MS respectivement) sont supérieures à celles observées pour des fruits connus pour leur richesse en flavonoïdes tels que les mandarines, les pamplemousses, les pommes ou les fraises (respectivement 3,22 ; 7,12 ; 2,10 et 17,53 mg QE/100g MS) (Haddad, 2005). Il est à souligné que l'extrait méthanolique a une teneur en flavonoïdes environ trois fois plus élevée que celle de l'extrait aqueux, respectivement 30,9 et 13,8 mg QE/100g MS. Cette différence

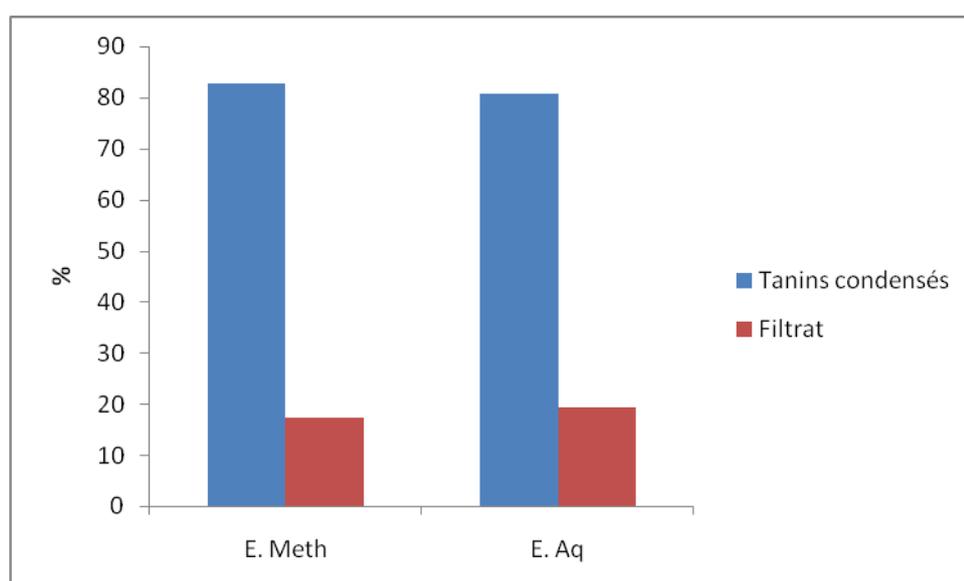
n'est pas retrouvée au niveau de la teneur en polyphénols totaux, ce qui signifie que les polyphénols extraits correspondent à des flavonoïdes d'une part et à d'autres familles de composés d'autre part.

**Tableau 17:** Teneurs en poly phénols (TPT) et flavonoïdes totaux (TFT) de deux extraits d'*A. seyal*.

Extraits	TPT (mg GA/100 g MS )*	TFT (mg QE /100 g MS)*
Methanol	1927,1±11,1	30,9±1,5
Eau	1820,5±13,6	13,8±5,3

\*TPT et TFT de deux extraits d'*A. seyal*. La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique (mg GAE); celle des flavonoïdes totaux en milligrammes équivalent de quercétine (mg QE). Ces résultats se rapportent à 100 grammes de matière sèche (MS).

Par ailleurs, les teneurs massiques en tanins condensés ont été évaluées dans les deux extraits en les précipitant comme décrit dans la section matériels et méthode. Ils sont riches en tanins condensés avec des teneurs très proches pour les deux extraits, 82,8±2,3% de l'extrait méthanolique sec et 80,7±1,1% dans l'extrait aqueux sec (**figure 57**). Le filtrat (F) obtenu est exempt de ces polymères taniques.



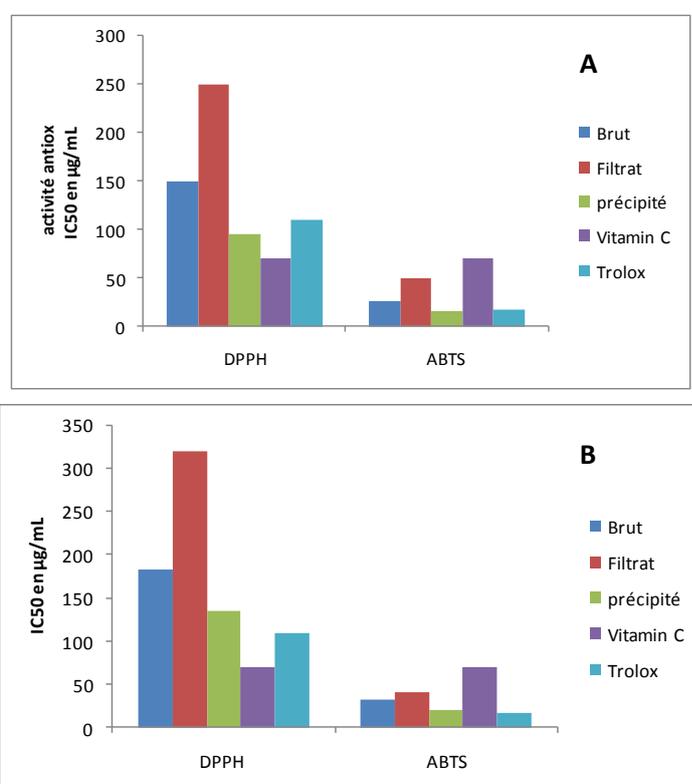
**Figure 57 :** Pourcentages de tanins condensés dans l'extrait méthanolique (E. Meth) et dans l'extrait aqueux (E. Aq) d'*Acacia seyal*.

## 2 Activité antioxydante

Les tests d'activité antioxydante portent sur l'extrait brut d'*Acacia seyal*, le filtrat et le précipité des deux extraits méthanolique et aqueux.

Trois méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ont été utilisées sur les échantillons testés à savoir DPPH, ABTS et FRAP.

Avec les méthodes DPPH et ABTS, les concentrations inhibitrices IC<sub>50</sub> des échantillons sont déterminées et leurs valeurs sont représentées dans la **figure 58**.



**Figure 58:** Evaluations de l'activité antioxydante de l'écorce d'*A. seyal* selon les méthodes DPPH/ABTS. A : extrait méthanolique et B : extrait aqueux.

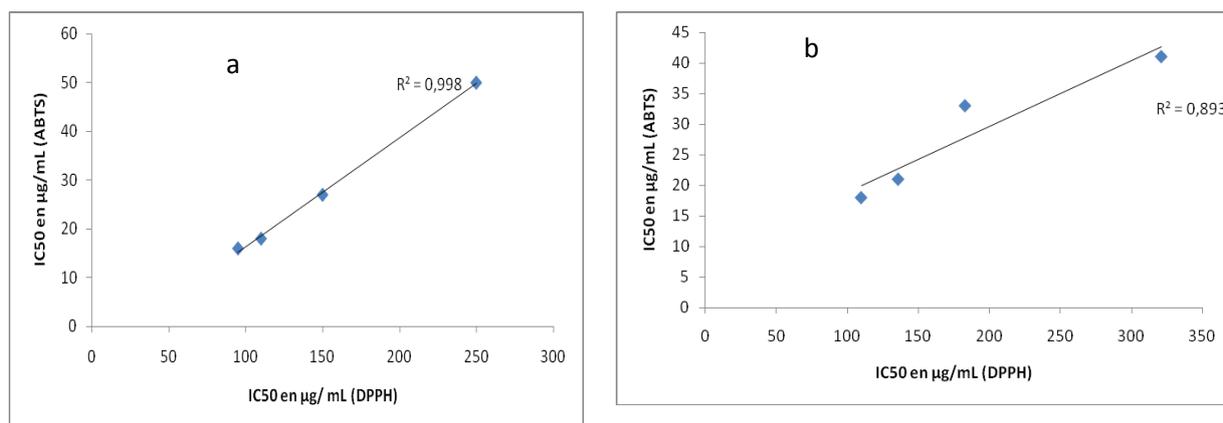
Les concentrations IC<sub>50</sub> obtenues avec les méthodes DPPH/ABTS sont  $150 \pm 2,2 / 27 \pm 1,3$  ;  $250 \pm 1,3 / 50 \pm 0,3$  et  $95 \pm 1,1 / 10 \pm 0,2$  µg/mL pour l'extrait brut de méthanol, le filtrat et le précipité respectivement. De même les IC<sub>50</sub> obtenues avec les mêmes méthodes DPPH/ABTS sont  $183 \pm 3,5 / 33 \pm 0,1$  ;  $321 \pm 5,1 / 41 \pm 0,2$  et  $136 \pm 1,1 / 21 \pm 0,1$  µg/mL pour l'extrait brut aqueux, le filtrat et le précipité respectivement.

Nous observons que les meilleures valeurs d'inhibition des radicaux libres sont attribuées le précipité riche en tannins condensés. La vitamine C et le trolox sont utilisés comme référence positif.

Nous remarquons d'autre part, sur la **Figure 58**, une sous-estimation de la capacité antioxydante par la méthode DPPH par rapport à la méthode ABTS. Cette observation est signalée également par Arnao (2000). Cette diminution serait causée par des interférences induites à la longueur d'onde de lecture de 517 nm. Cette dernière montre le pic d'absorption du DPPH contrairement à l'ABTS qui dispose de différents domaines d'absorption. Malgré tout, cette méthode est très utilisée dans l'évaluation des activités antioxydantes.

De plus une bonne corrélation est obtenue entre ces deux tests avec  $R^2 = 0,998$  pour l'extrait méthanolique (**figure 59a**). La corrélation est moins bonne pour l'extrait aqueux avec  $R^2 = 0,89$  (**figure 59b**) du fait de la faible solubilité du DPPH dans l'eau.

Ainsi l'utilisation de la méthode DPPH peut se justifier mais doit s'accompagner d'autres méthodes pour conclure sur l'effet antioxydant d'un échantillon.



**Figure 59:** Corrélation linéaire entre ABTS et DPPH des IC50 des extraits méthanolique et aqueux d'*Acacia seyal*.

Une troisième méthode d'évaluation de l'activité antioxydante a également été utilisée, il s'agit de la méthode FRAP (**tableau 18**). Contrairement aux deux méthodes précédentes, l'activité est exprimée en quantité équivalente d'une référence positive, la vitamine C dans cette étude.

Dans les deux extraits, méthanolique et aqueux, le précipité de tanins condensés donne la meilleure activité antioxydante. Cette observation est valable aussi pour les méthodes de mesure de l'activité antioxydante précédentes (ABTS et DPPH).

Cette forte activité peut être liée au fait que le précipité est constitué quasi exclusivement de tanins condensés qui sont des polyphénols (voir paragraphe 4). En effet, le lien entre polyphénols et activité antioxydante est largement démontré dans la littérature (Koné, 2009).

**Tableau 18:** Evaluations des activités antioxydantes de l'écorce de l'*A. seyal* avec la méthode FRAP. VE : Vitamine C Equivalent et MS : matière végétale sèche.

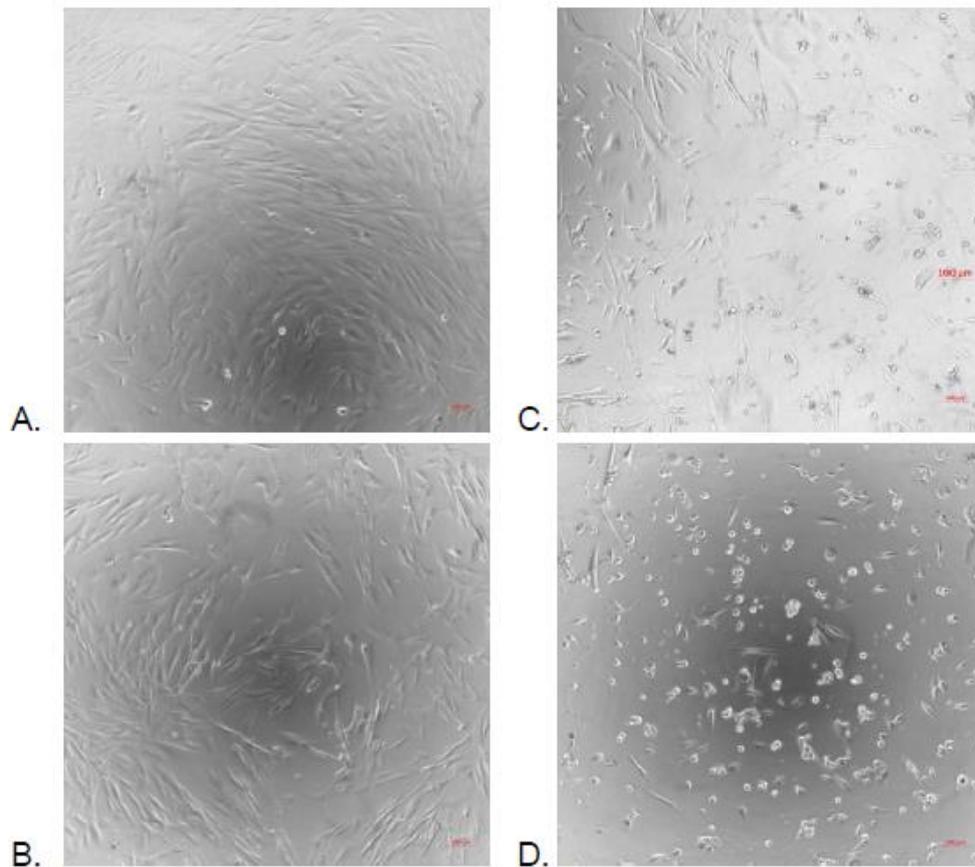
Echantillons		FRAP ( $\mu\text{g VE/ g MS}$ )
Méthanol	Brut	$45,7 \pm 6,1$
	Filtrat	$20,7 \pm 2,3$
	Précipité	$54,4 \pm 9,3$
Eau	Brut	$5,7 \pm 1,0$
	Filtrat	$3,7 \pm 1,6$
	Précipité	$6,7 \pm 1,1$

### 3 Fractionnement bioguidé

Les deux extraits, aqueux et méthanolique, ont été évalués pour leur activité antibactérienne sur neuf souches bactériennes (**tableau 19**).

Les études phytochimiques se poursuivent sur l'extrait méthanolique qui présente la meilleure activité antibactérienne avec  $64 \mu\text{g/mL}$  contre *Staphylococcus aureus* ABC1 et *Corynebacterium urealyticum* ABC145 et  $512 \mu\text{g/mL}$  contre *Pseudomonas aeruginosa* ABC4.

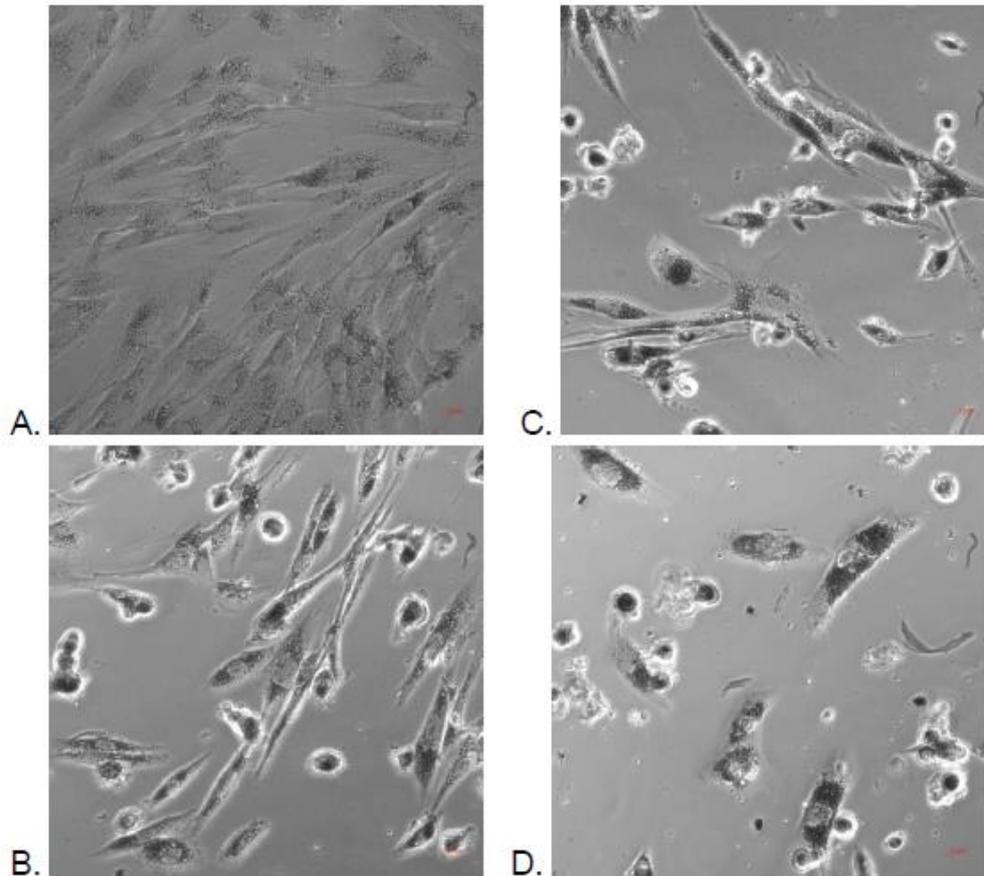
Il est à souligner que l'extrait aqueux présente une certaine toxicité contre les cellules MRC-5 embryonnaires de poumons. En effet dans les puits traités avec cet extrait la densité cellulaire diminue à l'observation microscopique (**figure 60**).



**Figure 60:** Observation microscopique de l'effet de l'extrait aqueux d'*Acacia seyal* à différentes concentrations sur les cellules MRC-5 à 24 heures. A : témoin DMSO, B : 64  $\mu\text{g/mL}$ , C : 128  $\mu\text{g/mL}$ , D : 256  $\mu\text{g/mL}$ , objectif x10.

A 128 et 256  $\mu\text{g/mL}$  d'extrait aqueux d'*A. seyal*, les cellules (**Figure 60 C-D**) n'ont plus leur morphologie caractéristique et de nombreuses cellules mortes sont observées.

Des photos prises au microscope après coloration au rouge neutre ont permis de constater une augmentation du nombre de lysosomes et une plus forte coloration (gris sur les photos puisque la caméra ne transmet pas la couleur) dans les cellules traitées comparativement aux cellules témoins (**figure 61**). Les lysosomes sont des organites qui servent à la destruction et l'évacuation des déchets cellulaires. Ces dernières se sentant agressées vont augmenter le nombre des ces "poubelles" pour se débarrasser des composés toxiques.



**Figure 61:** Observation microscopique de l'effet de l'extrait aqueux sur les cellule MRC-5 à 24 heures, après coloration au rouge neutre. A : témoin DMSO, B : 64 µg/mL, C : 128 µg/mL, D : 256 µg/mL, objectif x40.

Comme indiqué ci-dessus, l'extrait aqueux est riche en tanins condensés. La toxicité de cet extrait aqueux est peut-être liée à la haute teneur en tanins. Ces derniers sont précipités et l'extrait est séparé en deux : Précipités de tanins condensés (P) d'une part et le filtrat (F) d'autre part.

Ces deux fractions P et F ont été évaluées pour leur toxicité et une concentration entraînant 50 % de mortalité cellulaire est recherchée. La fraction P a une concentration IC<sub>50</sub> de 241,2±16,8 µg/mL et F n'est pas toxique car la viabilité cellulaire à 1024 µg/mL (plus haute concentration testée) est de 88,9 ± 5,2 % (**tableau 19**). Les tanins condensés de cet extrait aqueux pourraient donc être responsables de la toxicité cellulaire observée.

**Tableau 19** : Toxicité du précipité et du filtrat de l'extrait aqueux de l'écorce d'*A. seyal* sur les cellules saines embryonnaires de poumon MRC-5.

	IC50 (µg/mL)
Précipité	241,2±16,8
Filtrat	>1024

Traditionnellement, l'extrait aqueux est utilisé et présente donc des risques de toxicité si la consommation est régulière. Il serait bénéfique de proposer des extraits débarrassés de ces polymères taniques qui seraient à l'origine de cette toxicité.

Par ailleurs l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique est améliorée après la précipitation des tanins, passant de 64 µg/mL à 32 µg/mL contre *Staphylococcus aureus* ABC1 et *Corynebacterium urealyticum* ABC145 mais l'activité antibactérienne reste stable à 512 µg/mL contre *Pseudomonas aeruginosa* ABC4.

Dans le but d'isoler des molécules bioactives pures, le filtrat F (3,18g) est alors soumis à une séparation par combiflash en utilisant une colonne RediSep R<sub>f</sub> TELEDYNE de 120 g de silice. Le système d'éluant est constitué de toluène-acétate d'éthyle 75-15 en isocratique. Les fractions collectées sont regroupées en douze fractions (F1 à F12) après comparaison des profils CCM (**Figure 62**).

Ces fractions sont évaluées pour leur potentiel antibactérien contre les trois souches bactériennes sensibles à l'extrait de cette plante (**Tableau 20**) : *Staphylococcus aureus* ABC1, *Corynebacterium urealyticum* ABC145 et *Pseudomonas aeruginosa* ABC4.

Les fractions F5 et F12 seront sélectionnées pour la suite du fractionnement en raison de leur activité antibactérienne. En effet la fraction F5 possède des CMI égales à 128 µg/mL contre les trois souches testées. La fraction F12 a une CMI intéressante à 32 µg/mL contre *S. aureus* ABC1 et 128 µg/mL contre les deux autres souches bactériennes (*C. urealyticum* ABC145 et *P. aeruginosa* ABC4).

La fraction F5 (52,3 mg) est séparée sur une plaque CCM préparative de silice 20X20 cm avec l'éluant toluène-acétate d'éthyle 75-15 v/v (**Figure 63**). Après grattage du spot F5B, le composé **H** (6 mg) est isolé.

De même, la fraction F12 (2032 mg) est fractionnée en utilisant le système d'éluant acétate d'éthyle-méthanol-eau 100-13,5-10. La sous fraction F12-2 (234,8 mg) est soumise à une chromatographie HPLC préparative Gilson équipée d'une pompe 321 et d'une colonne C18 ODS HYPERSIL 5UM 250X21. L'élution se fait en suivant un gradient avec le solvant A (2 % v/v acide formique dans l'eau) et le solvant B (2 % v/v acide formique dans le méthanol) : t=0-10 min, 0% B ; t= 10-50min, 0 à 100 % B ; t= 50-55min, 100 % B. Trois composés **I** (18 mg), **J** (7 mg) et **K** (16 mg) ont été isolés.

Les quatre composés isolés, H, I, J et K ont été testés pour leur activité antibactérienne vis-à-vis des mêmes souches bactériennes (**tableau 20**).

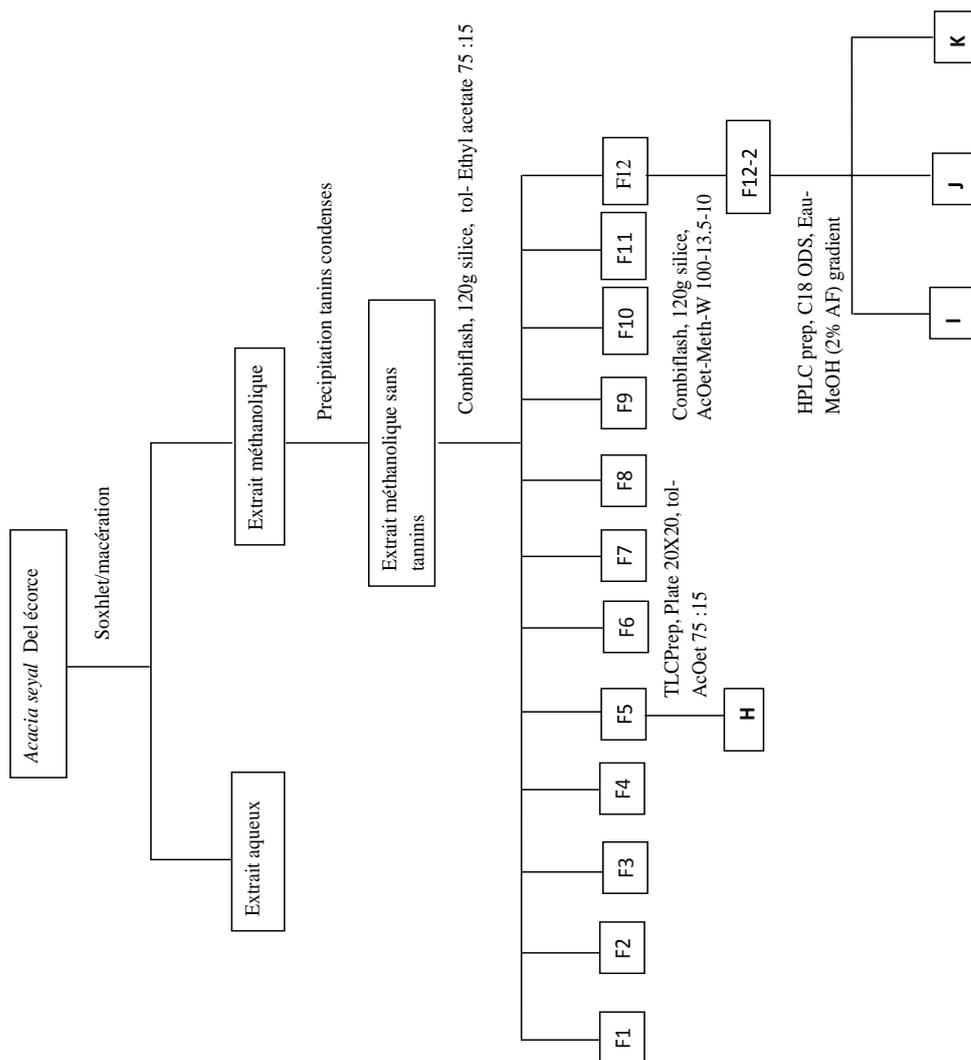
Nous avons observé une nette augmentation des concentrations minimales inhibitrices pour les composés purs, et donc une diminution des activités antibactériennes par rapport aux fractions qui les contiennent. Par exemple contre la souche *Staphylococcus aureus* ABC1, la CMI passe de 32 µg/mL pour la fraction F12 à 256 µg/mL ou plus pour les quatre composés purs. De même pour la souche *Corynebacterium urealyticum* ABC145, la diminution de l'activité est tangible en passant de 128 µg/mL pour la fraction F12 à 512 µg/mL ou plus pour les quatre composés isolés.

Quelque soit la souche bactérienne testée ici, l'activité antibactérienne est moindre pour les composés purs que pour les extraits ou les fractions. Cette diminution ou perte d'activité peut s'expliquer par le fait que l'activité d'un extrait (ou d'une fraction) est due à un ensemble de composés agissant en synergie (Engelbertz *et al.*, 2012).

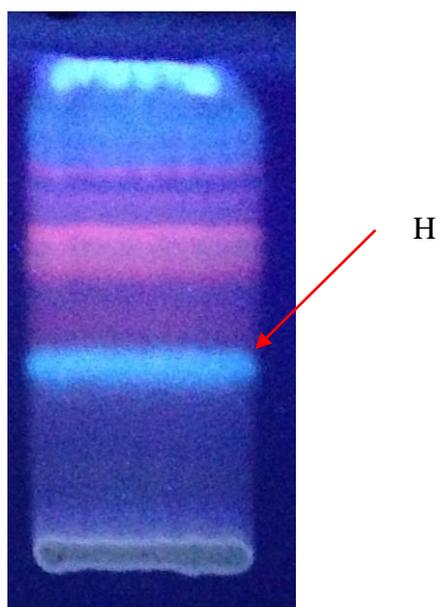
Pour vérifier cette hypothèse, un mélange des composés **H** et **K** a été réalisé pour trouver une éventuelle amélioration de leur activité antibactérienne respective. La CMI de ce mélange est de 512 µg/mL contre *Staphylococcus aureus* ABC1 et de 1024 µg/mL contre *Pseudomonas aeruginosa* ABC4 et *Corynebacterium urealyticum* ABC145. L'effet synergique n'a pas été observé.

Cependant en raison des faibles quantités isolées, nous n'avons pas pu tester d'autres combinaisons.

De même un composé actif dans un extrait (ou une fraction) peut être dégradé lors de sa purification et donc perdre son activité (Rasoanaivo *et al.*, 2011).



**Figure 62:** Bio fractionnement des extraits de l'écorce d'*A. seyal*.



**Figure 63:** CCM préparative sur la fraction F5 sous UV.

**Tableau 20:** Activités antibactériennes des extraits (méthanolique et aqueux), des fractions (F1-12) et des composés purs seuls (H-K) ou combinés d'*A. seyal*.

Souches bactériennes		<i>E.c</i>	<i>S.s</i>	<i>S.en</i>	<i>S.a</i>	<i>P.a</i>	<i>K.p</i>	<i>S.ep</i>	<i>S.ag</i>	<i>C.u</i>
extraits	Methanol	>1024	>1024	>1024	<b>64</b>	<b>512</b>	>1024	>1024	ND	<b>64</b>
	Eau	>1024	>1024	>1024	<b>512</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Fractions	F(MeOH)				<b>32</b>	<b>512</b>				<b>32</b>
	P(MeOH)				<b>512</b>	>1024				>1024
	F1				>256	>256				>256
	F2				<b>128</b>	>256				<b>256</b>
	F3				>256	>256				>256
	F4				>256	>256				>256
	<b>F5</b>				<b>128</b>	<b>128</b>				<b>128</b>
	F6				<b>256</b>	<b>256</b>				>256

	F7		<b>128</b>	<b>256</b>		>256
	F8		<b>128</b>	<b>128</b>		>256
	F9		<b>256</b>	>256		>256
	F10		>256	>256		>256
	F11		>256	<b>128</b>		<b>256</b>
	<b>F12</b>		<b>32</b>	>1024		<b>128</b>
<b>composés</b>	Composé <b>H</b>		<b>512</b>	>1024		<b>512</b>
	Composé <b>I</b>		<b>256</b>	>1024		>1024
	Composé <b>J</b>		>1024	>1024		>1024
	Composé <b>K</b>		<b>1024</b>	<b>1024</b>		<b>1024</b>
	<b>H+K</b>		<b>512</b>	<b>1024</b>		<b>1024</b>

*E.C* : *Escherichia coli* ABC5; *S.s* : *Shigella sonnei* ABC16; *S.en*: *Salmonella enteric sv. Typhi* ABC17; *S.a* : *Staphylococcus aureus* ABC1; *P. a*: *Pseudomonas aeruginosa* ABC4; *K.p*: *Klebsiella pneumonia* ABC12; *S. ep*: *Staphylococcus epidermidis* ABC91; *S. ag*: *Streptococcus agalactiae* ABC6 and *C.u*: *Corynebacterium urealyticum* ABC145.

## 4 Caractérisation des composés purs

Le criblage biologique et l'étude phytochimique réalisés sur l'écorce d'*Acacia seyal* ont permis d'isoler quatre composés bioactifs H, I, J et K.

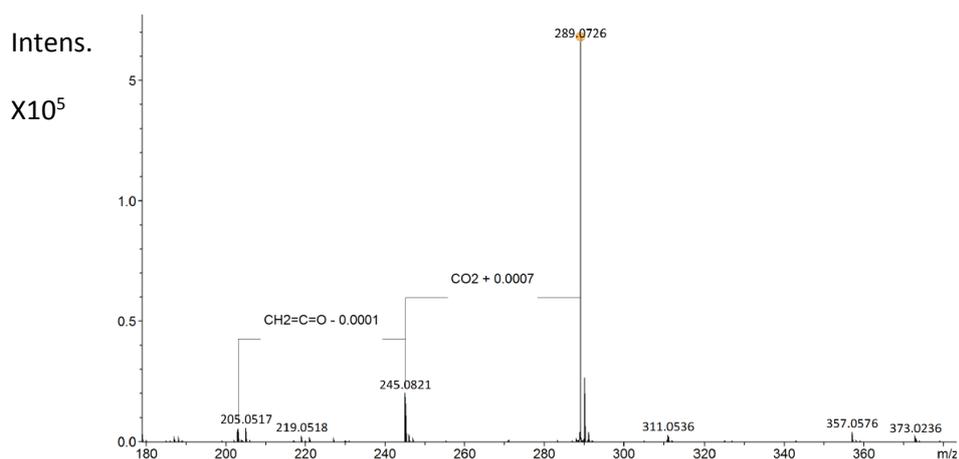
L'étude des spectres  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC et HMBC, la comparaison avec la description trouvée dans la littérature et la comparaison avec les standards disponibles au laboratoire ont permis de déterminer les structures des molécules.

## 4.1 Identification du composé H

Après analyse du spectre de masse et des spectres mono et bidimensionnels en RMN, nous pouvons affirmer que le composé H est identique au composé G (identifié comme étant le  $\beta$ -sitostérol) présent dans le fruit l'*Indigofera caerulea* et décrit dans le chapitre précédent.

## 4.2 Identification du composé I

Le spectre de masse du composé I en électrospray mode négatif (**figure 64**) possède un ion quasi moléculaire à  $m/z$  289 [M-H], conduisant à une masse molaire de 290 u.



**Figure 64:** Spectre de masse du composé I

### ➤ Description RMN

Après purification, nous avons obtenu 18 mg du composé I. Ce dernier se présente comme une poudre marron.

Après analyse du spectre du proton  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et de leurs corrélations (**Figure 65-69**) nous retrouvons :

- les signaux des protons aromatiques des cycles A et B d'un flavonoïde substitué en 5, 7, 3' et 4' : 5.96 ppm (d,  $J = 2.2$  Hz, H-6), 5.94 ppm (d,  $J = 2.3$  Hz, H-8), 6.98 ppm (d,  $J = 1.2$  Hz, H-2'), 6.76 ppm (d,  $J = 8.2$  Hz, H-5') et 6.81 ppm (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, H-6') ;

- les signaux de deux protons à 2.86 et 2.74 ppm forment deux doublets dédoublés dont l'une des constantes de couplage  $J = 16.8$  Hz est caractéristique d'un couplage géminale ;

- les protons à 2.86 et 2.74 ppm sont deux protons diastéréotopiques, comme confirmé en HSQC, et forment les doublets dédoublés de constante de couplage respectivement  $J = 4.7$  Hz et  $J = 2.7$  Hz ;

- nous pouvons observer un singulet élargi à 4.82 ppm ;

- sur le spectre COSY, nous pouvons observer que les deux protons à 2.86 ppm et 2.74 ppm couplent tous les deux avec le proton d'un groupement hydroxyle à 4.17 ppm ;

- Dans le spectre du carbone  $^{13}\text{C}$  nous observons quinze signaux, sept carbones quaternaires aromatiques ainsi que cinq CH aromatiques ;

- En comparant les spectres des flavonoïdes A, B, C (*I. caerulea*), nous ne pouvons pas observer le groupement carbonyle ;

- Le spectre HSQC nous permet d'attribuer un CH substitué par un hétéroatome (80.0 / 4.83 ppm), un groupe CHOH (67.6 / 4.17 ppm) et un groupe CH<sub>2</sub> (29.3 / 2.86 et 2.74 ppm) ;

- En HMBC nous observons des corrélations entre C-10 et les deux protons portés par C-4 et le proton à 4.17 ppm.

- Le carbone à 67.6 ppm (C-3) corrèle avec le signal à 4.82 ppm (H-2) et avec les deux protons portés par le carbone C-4.

- Une corrélation entre le carbone à 29.3 ppm (C-4) et le proton à 4.82 ppm est visible.

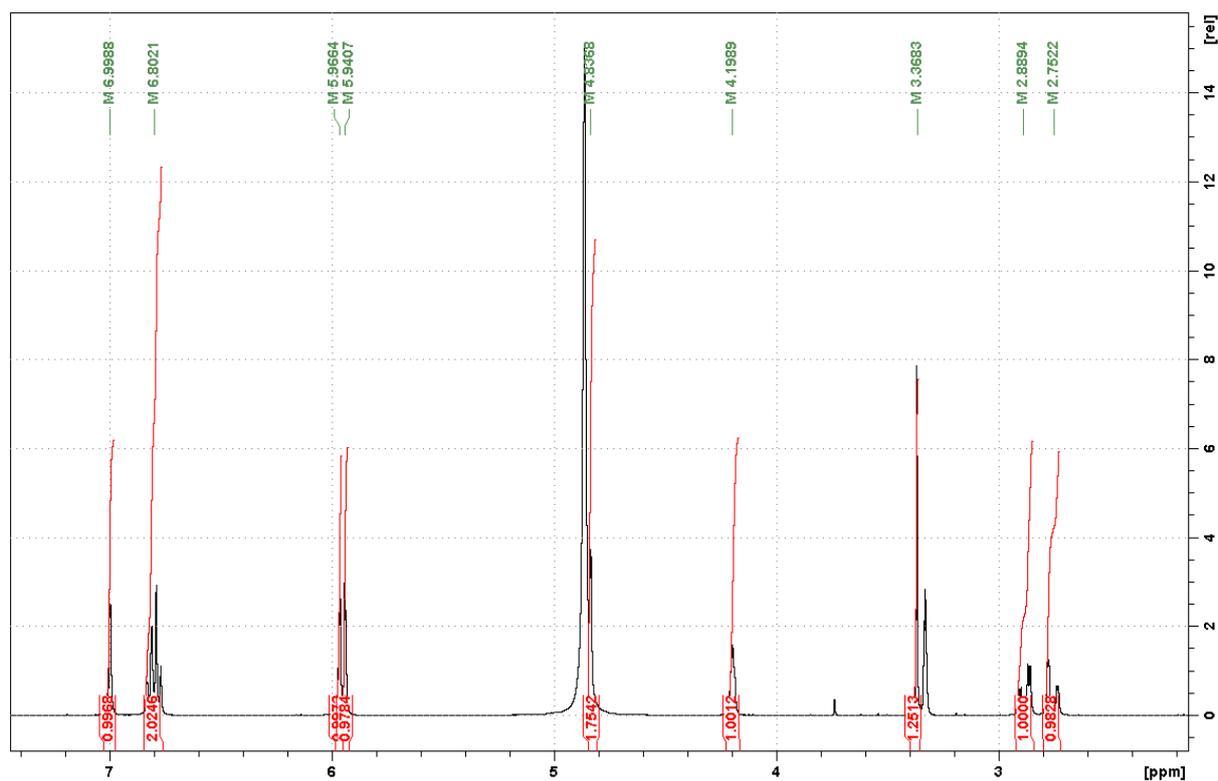
- Le carbone à 119.6 ppm (C-2') montre une corrélation avec le proton à 6.98 ppm (C-6') et avec le proton à 4.82 ppm (H-2).

- Le carbone à 115.4 (C-6') corrèle avec le proton à 6.8 ppm (H-2') et avec le proton à 4.82 ppm (H-2).

Ces données sont rassemblées dans le **tableau 21**.

**Tableau 21 :** Données  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé I.

Position	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)
2	80.0	4.82 sbr
3	67.6	4.17 m
4 (a et b)	29.3	2.86 (dd, 16.6, 4.7) 2.74 (dd, 16.5, 2.7)
5	157.7	
6	96.5	
7	158.1	
8	96.0	5.93 (dd, 10.6, 2.2)
9	157.4	
10	100.2	
1'	132.4	
2'	119.5	6.8 (dd, 8.2, 1.5)
3'	145.8	
4'	146.0	
5'	116.0	6.76 (d, 8.2)
6'	115.5	6.98 (d, 1.2)



**Figure 65:** Spectre du proton  $^1\text{H}$  du composé I dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.

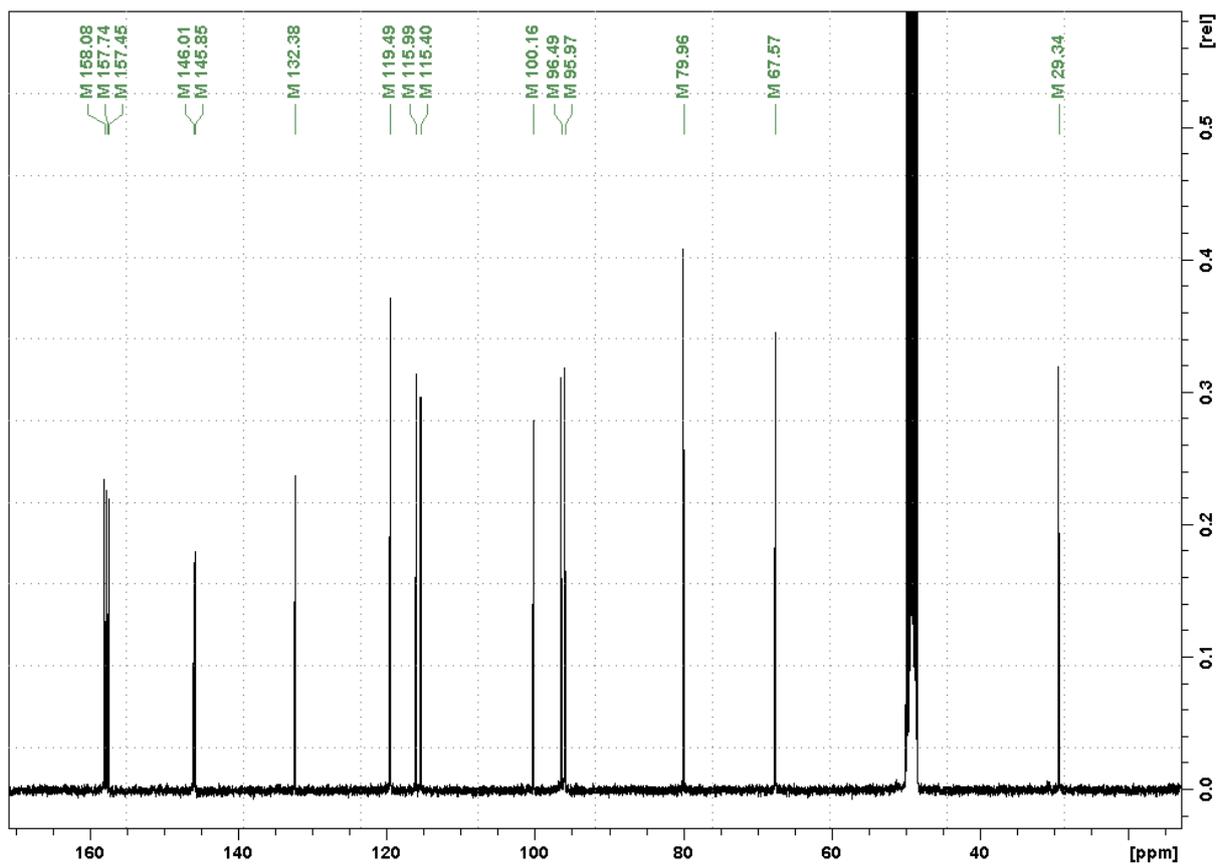
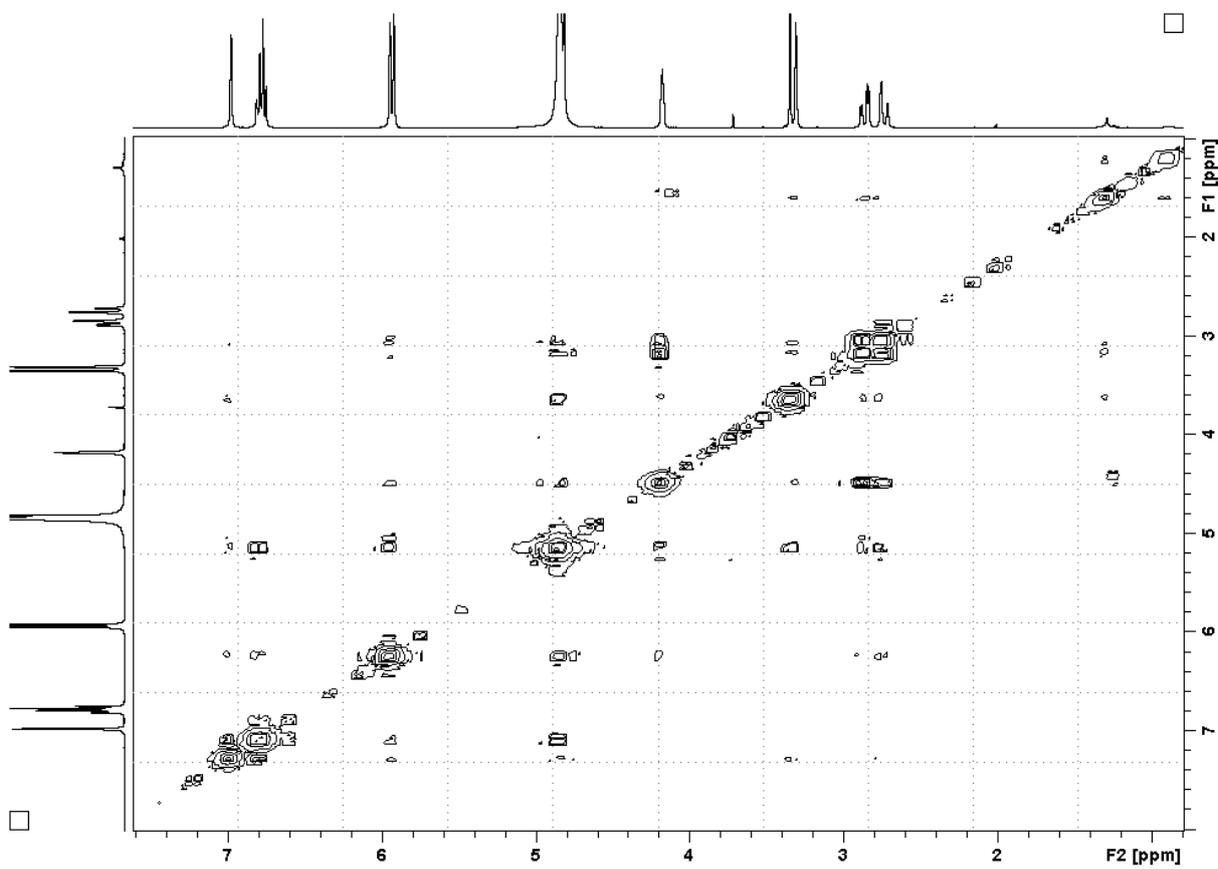
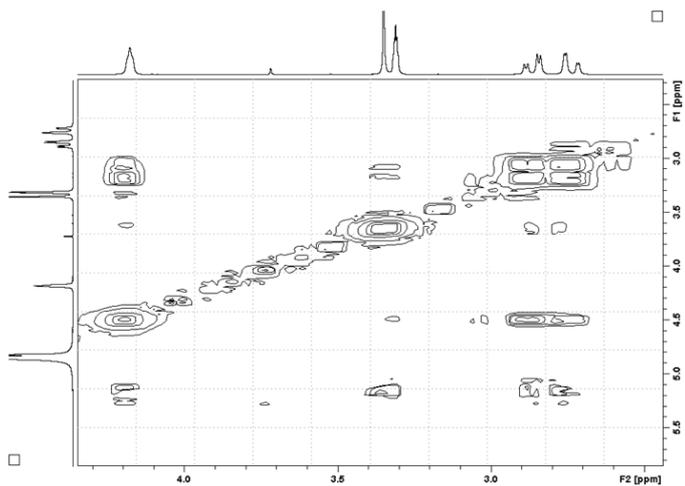
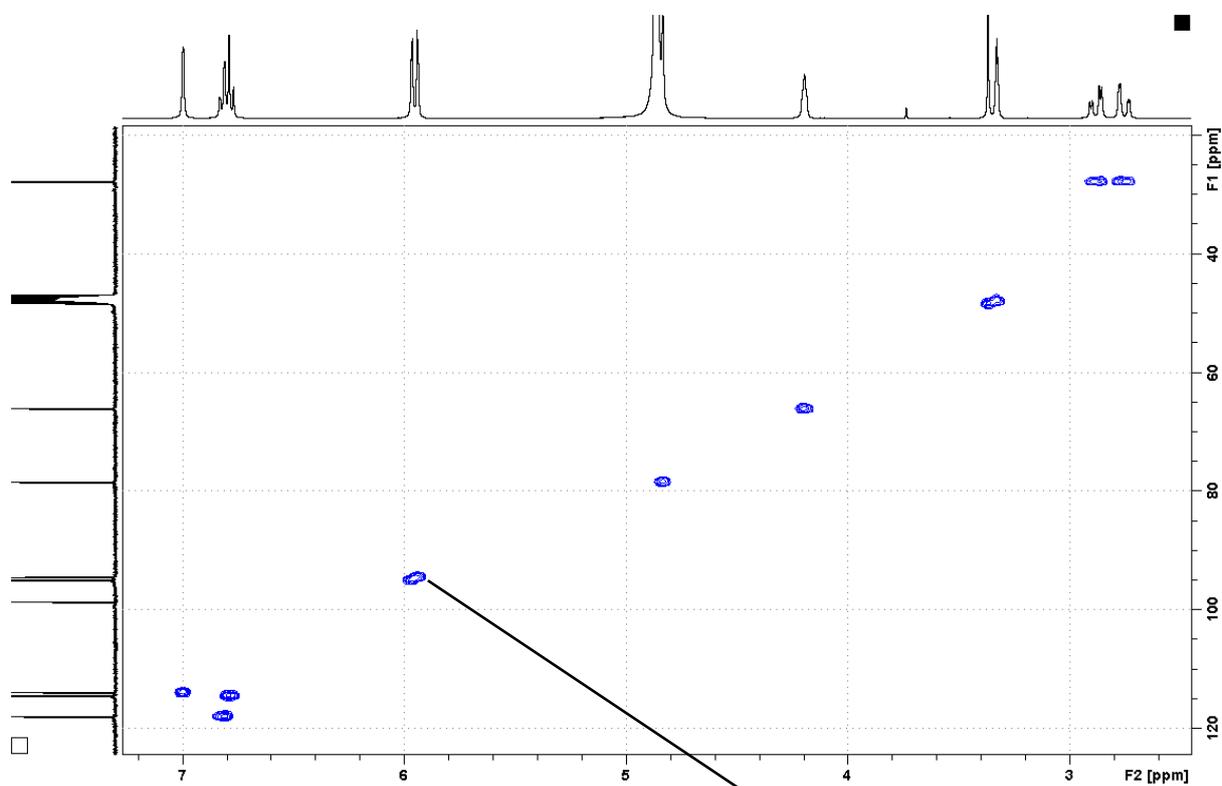


Figure 66: Spectre du carbone  $^{13}\text{C}$  du composé I dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 100 MHz.

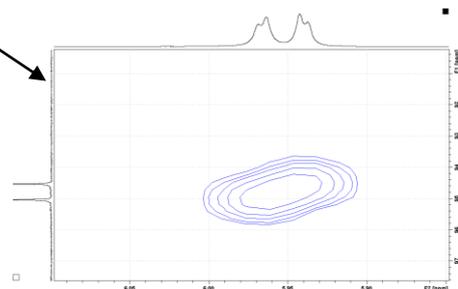


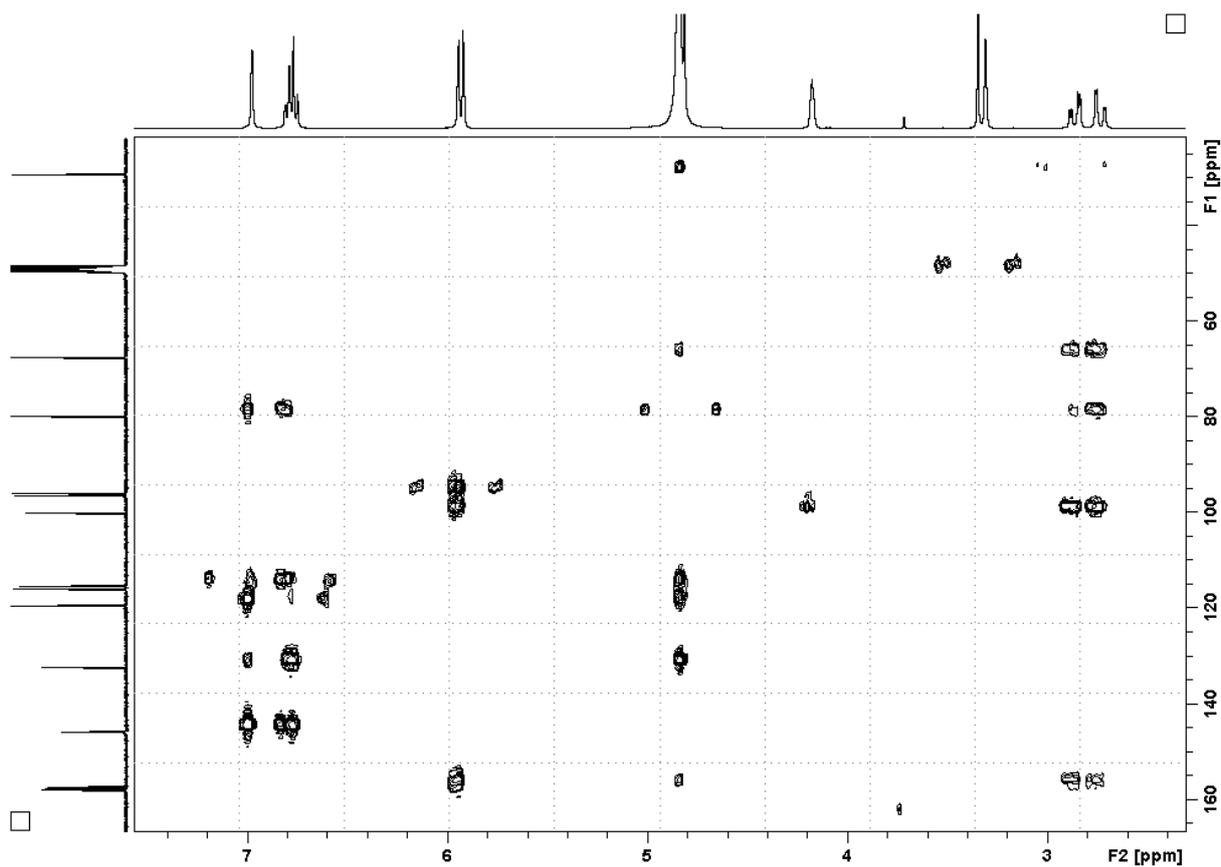


**Figure 67:** Spectre COSY du composé I dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.



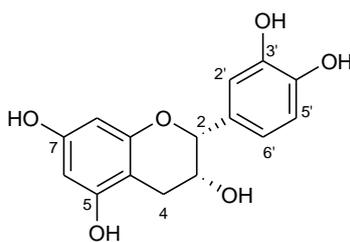
**Figure 68:** Spectre HSQC du composé I dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.





**Figure 69:** Spectre HMBC du composé I dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.

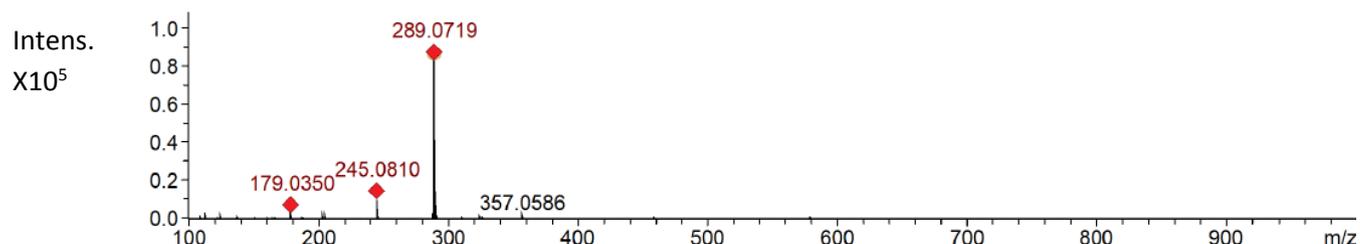
Après l'étude du spectre de masse, de l'analyse RMN, en comparaison avec les données de la littérature, nous pouvons identifier le composé **I** comme étant la (-)-épicatéchine (**figure 70**).



**Figure 70:** Structure de l'épicatéchine.

### 4.3 Identification du composé J

Le spectre de masse du composé **J** est semblable à celui du composé **I** avec un ion *quasi* moléculaire à  $m/z$  289 [M-H] (**figure 71**).



**Figure 71:** Spectre de masse du composé J.

#### ➤ Description RMN

Après purification, nous avons obtenu 7 mg du composé **J**. Ce dernier se présente comme une poudre marron.

Les spectres RMN des composées **I** et **J** sont similaires. Cependant nous pouvons remarquer des différences (**Figure 72-76**) :

- les signaux des protons aromatiques des cycles A et B d'un flavonoïde substitué en 5, 7, 3' et 4' : 5.93 ppm (d,  $J = 2.3$  Hz, H-6), 5.86 ppm (d,  $J = 2.3$  Hz, H-8), 6.72 ppm (dd,  $J = 8.2, 2.0$  Hz, H-6'), 6.76 ppm (d,  $J = 8.0$  Hz, H-5') et 6.85 ppm (d,  $J = 2.0$  Hz, H-2') ;

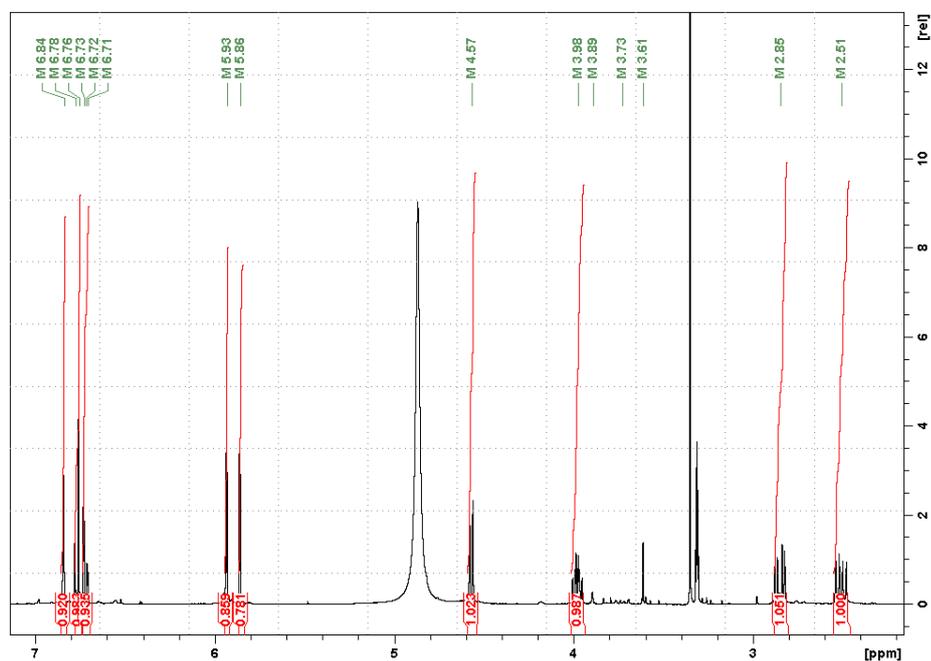
- les signaux de deux protons à 2.86 et 2.49 ppm formant des doublets dédoublés dont l'une des constantes de couplage  $J = 16.8$  Hz est caractéristique d'un couplage géminale ;

- les protons à 2.86 et 2.49 ppm sont deux protons diastéréotopiques, comme confirmé en HSQC ;

-La constante de couplage du doublet à 4.57 ppm (H-2) est de 7.6 Hz. Elle est une constante de couplage caractéristique de 2,3-*trans* flavan-3-ols.

**Tableau 22:** Données  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé J.

Position	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)
2	82.9	4.57 (d, 7.6)
3	68.9	3.97 (td, 7.8 5.6)
4 (a et b)	28.6	2.86 (dd, 16.1, 5.4) 2.49 (dd, 16.1, 8.1)
5	157.7	
6	96.4	5.93 (d, 2.3)
7	157.9	
8	95.6	5.86 (d, 2.3)
9	157.0	
10	100.9	
1'	132.3	-
2'	120.1	6.72 (dd, 8.2, 2.0)
3'	146.33	
4'	146.31	
5'	116.2	6.76 (d, 8.0)
6'	115.4	6.85 (d, 2.0)



**Figure 72:** Spectre du proton  $^1\text{H}$  du composé J dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz.

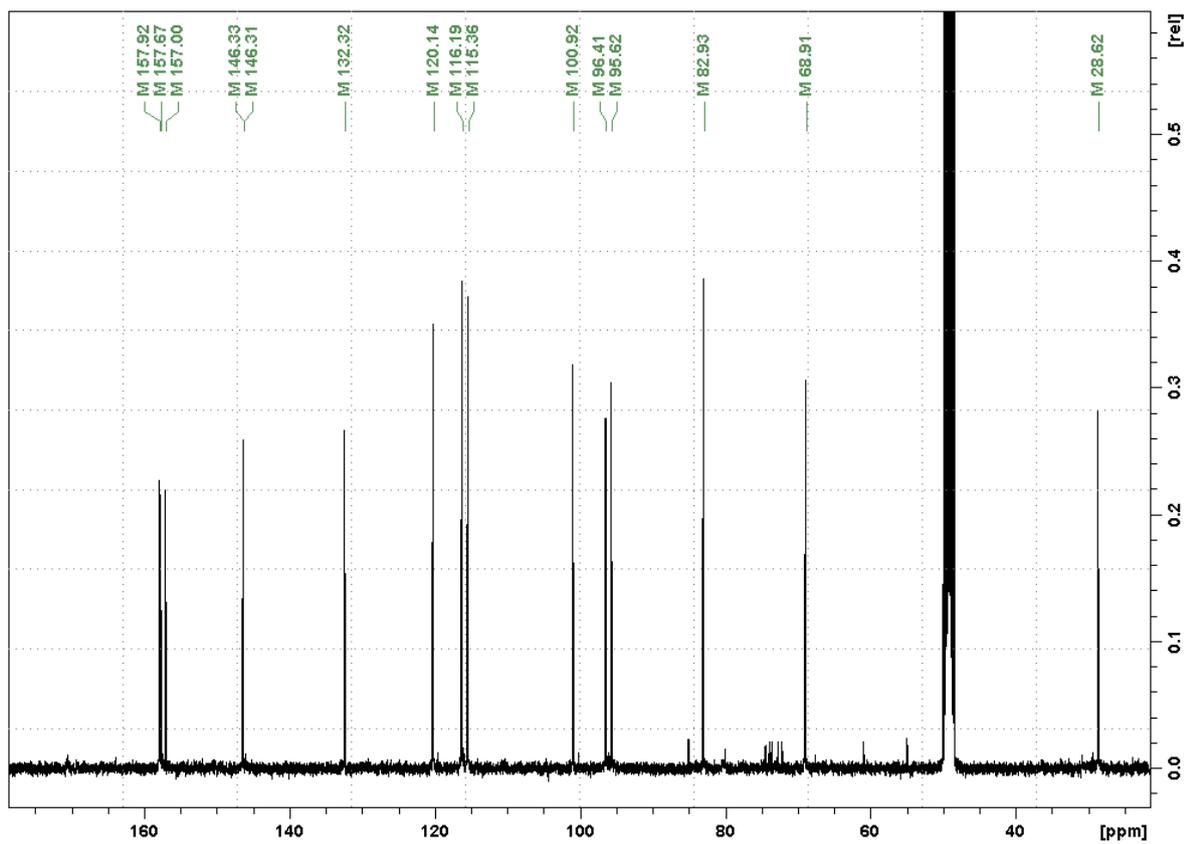
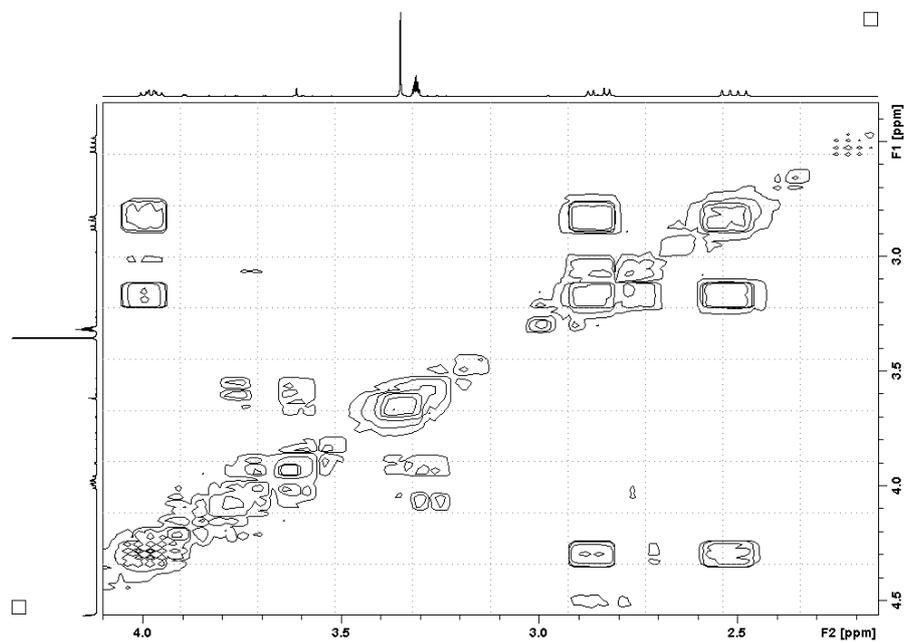
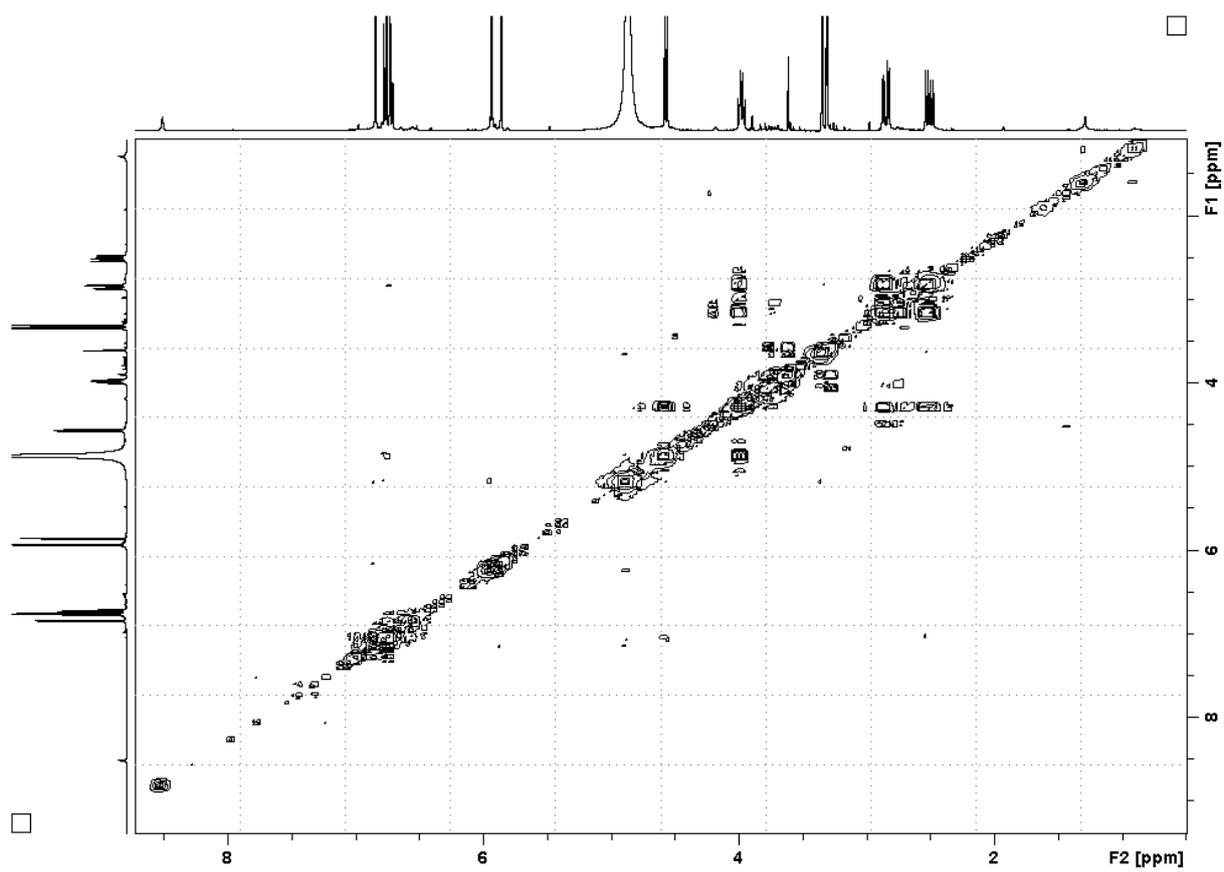
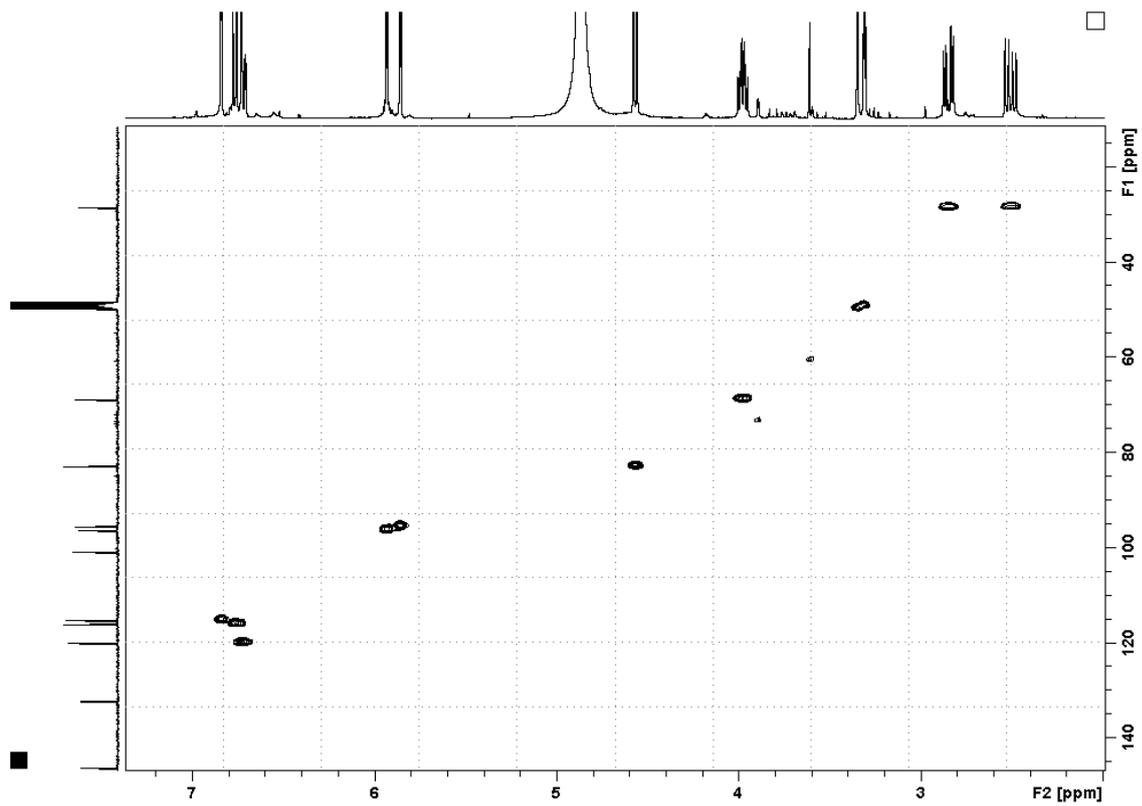


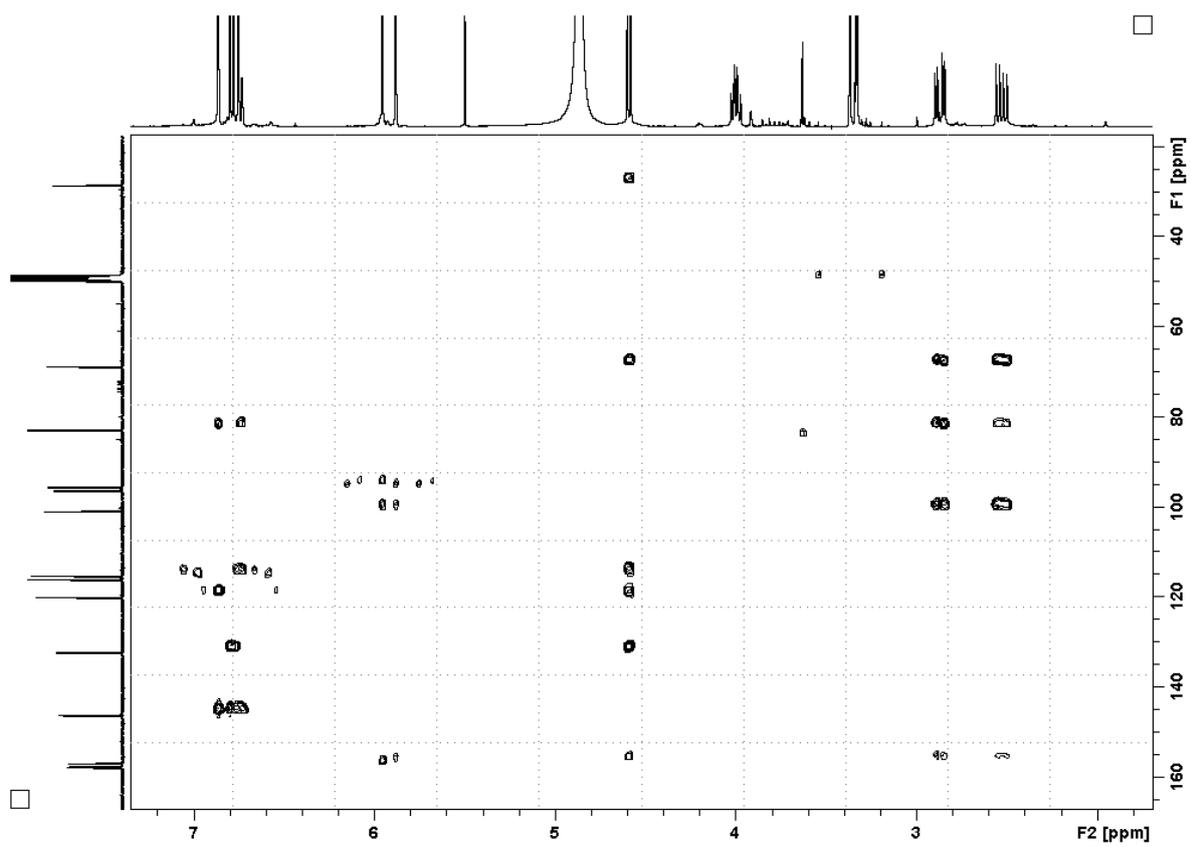
Figure 73: Spectre du carbone  $^{13}\text{C}$  du composé J dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 100 MHz.



**Figure 74:** Spectre COSY du composé J dans CD<sub>3</sub>OD à 400 MHz.

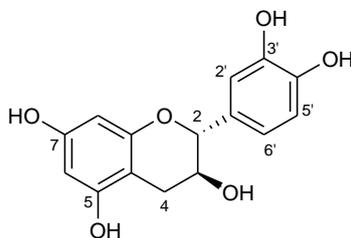


**Figure 75:** Spectre HSQC du composé J dans CD<sub>3</sub>OD à 400 MHz



**Figure 76:** Spectre HMBC du composé J dans CD<sub>3</sub>OD à 400 MHz.

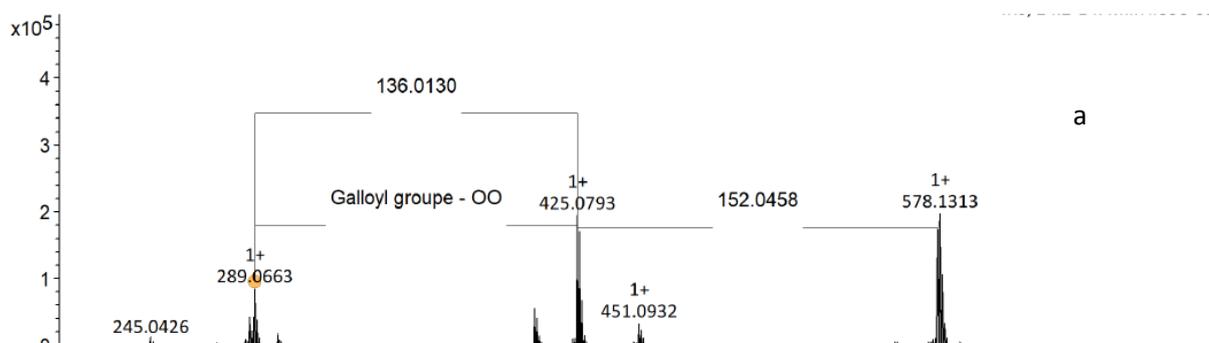
Après l'étude du spectre de masse, de l'analyse RMN (**tableau 22**), en comparaison avec les données de la littérature et le standard, nous pouvons identifier le composé **J** comme étant la catéchine (**figure 77**).

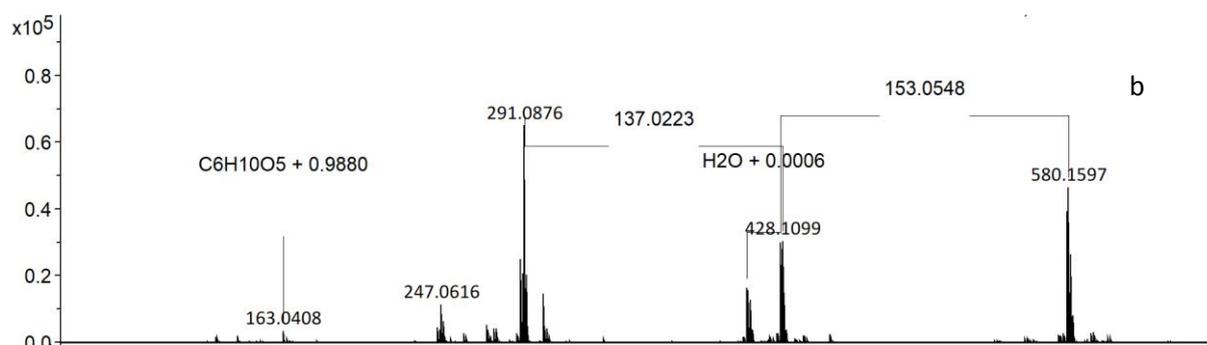


**Figure 77:** Structure de la Catéchine (composé J).

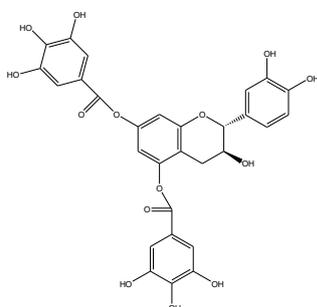
#### 4.4 Identification du composé K

Les spectres de masse en mode négatif et positif, du composé **K** (**figure 78**) montrent dans les deux cas la perte des groupes galloyl. En effet les deux pertes enregistrées sont 152,0484u puis 136,0130u et 153,0548u et 137,0223u respectivement pour le mode négatif et positif. Les fragments obtenus (291,0876 ou 289,0663) correspondent à la masse de l'épicatéchine/ catéchine décrite plus haut. L'analyse des spectres massiques et la comparaison avec la littérature, indiquent que le composé K serait la catéchine digallique (**figure 79**).





**Figure 78:** Spectre de masse (négatif (a) et positif (b)) du composé K.



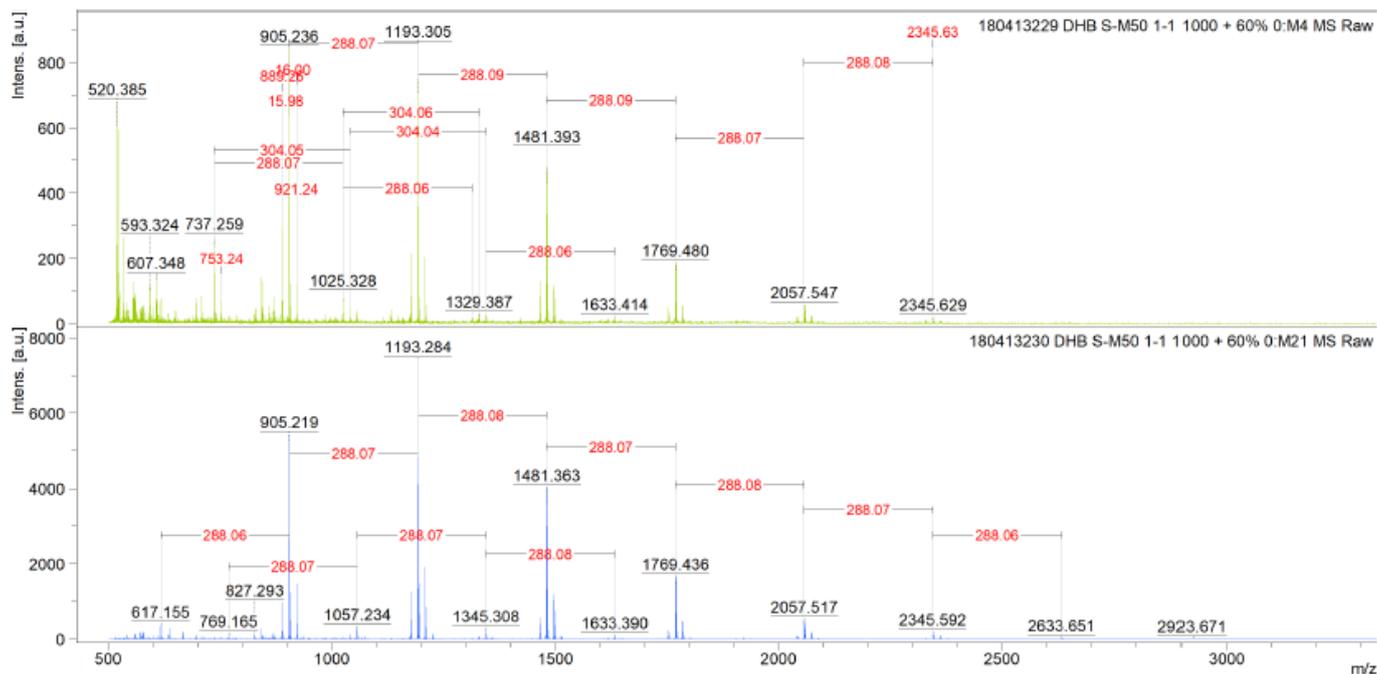
**Figure 79:** Structure probable du composé K (catéchine digallique).

## 5 Caractérisation des tanins condensés

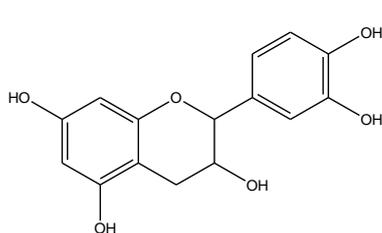
Les deux extraits sont riches en tanins condensés avec des teneurs très proches,  $82,8 \pm 2,3$  % pour l'extrait méthanolique et  $80,7 \pm 1,1$  % pour l'extrait aqueux. Leur analyse est faite avec un MALDI-TOF-TOF.

Les pics s'étalent de 737,3 à 2345,6 Da pour l'extrait méthanolique et de 617 à 2345,6 Da pour l'extrait aqueux (**figure 80 et tableau 23**). Deux unités de répétition sont repérées avec des masses moléculaires de 290 et 306 Da. Ces masses correspondraient aux épi/galocatechine et épi/catéchine (**figure 81**).

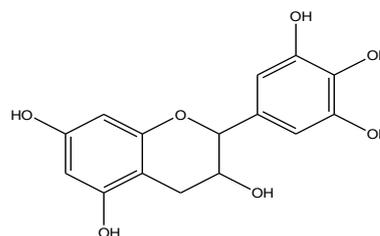
Comment 2



**Figure 80:** Spectre MALDI-TOF de tanins condensés des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce d'*Acacia seyal*.



Catéchine Mw= 290,3



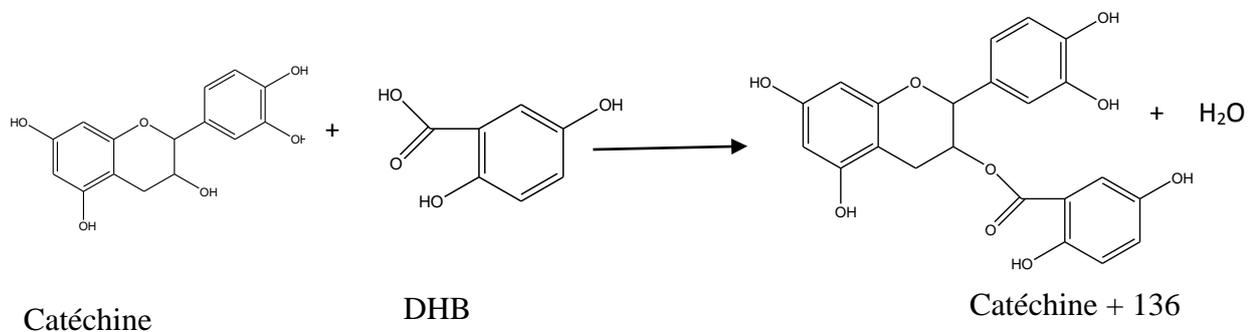
Gallo catéchine Mw= 306,3

**Figure 81:** Unités de base des structures détectées en MALDI-TOF-TOF dans les extraits d'écorce d'*Acacia seyal*.

Deux types d'enchainements sont identifiés pour les tanins condensés de l'extrait méthanolique (S1 et S2) et deux pour ceux de l'extrait aqueux (S3 et S4) (**tableau 23**).

Dans la série S1 de l'extrait méthanolique, les pics correspondent à des combinaisons de ces deux monomères, catéchine et gallo-catéchine, ajoutés de 136 Da. Il est rapporté qu'une estérification peut avoir lieu entre la catéchine et un acide dihydroxybenzoïque (Ucar *et al.*, 2013). Cependant la présence d'un ester dans le précipité n'est pas observée avec l'IR de l'échantillon (absence de pics caractéristique entre 1650 à 1750  $\text{cm}^{-1}$  et autour de 2900 ; **figure A annexe 1**). Cette estérification pourrait avoir lieu lors de l'analyse MALDI-TOF,

entre la catéchine et la matrice DBH (2,5 dihydroxybenzoïque) qui est un acide carboxylique (Duval et Avérous, 2016) comme indiqué dans la **figure 82**.



**Figure 82:** Estérification de la catéchine avec une molécule de la matrice DHB pendant l'expérimentation avec le MALDI-TOF (Duval et Avérous, 2016).

**Tableau 23:** Assignment des principaux pics du spectre MALDI-TOF des tanins d'*Acacia seyal*. DP : Degré de polymérisation. \* estérification lors de l'analyse.

Série	[M+Na] expérimentale	[M+Na] théorique	gallo catéchine	Catéchine (Cat)	Acide gallique	Cat+136*	DP	
			304,058303	288,063388	152,010956	136,016		
M é T h a n o l	S1	737,3	737,1		2		1	2
	S1	1025,3	1025,2		3		1	3
	S1	1329,4	1329,3	1	3		1	4
	S1	1633,4	1633,3	2	3		1	5
	S2	889,3	889,2		3			3
	S2	905,2	905,2	1	2			3
	S2	921,2	921,2	2	1			3
	S2	1193,0	1193,3	1	3			4
	S2	1481,4	1481,3	1	4			5
	S2	1769,5	1769,4	1	5			6
	S2	2057,5	2057,4	1	6			7
	S2	2345,6	2345,6	1	7			8
E a u	S3	617,2	617,1	1	1	0		2
	S3	905,2	905,2	1	2	0		3
	S3	1193,3	1193,3	1	3			4
	S3	1481,4	1481,3	1	4	0		5
	S3	1769,4	1769,4	1	5	0		6
	S3	2057,5	2057,4	1	6	0		7
	S3	2345,6	2345,5	1	7			8
	S3	2633,6	2633,6	1	8	0		9
	S4	769,2	769,1	1	1	1		2
	S4	1057,2	1057,2	1	2	1		3
	S4	1345,3	1345,3	1	3	1		4
	S4	1633,4	1633,3	1	4	1		5

# Chapitre IV : Caractérisation phytochimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus*

La partie aérienne de *Cymbopogon commutatus* renferme de l'huile essentielle avec un rendement de 1,1 % (8 mL ont été obtenus). Après séchage avec le sulfate de cuivre et filtration, l'huile essentielle est conservée dans le réfrigérateur jusqu'aux analyses chimiques et biologiques.

## 1 Etudes phytochimiques de l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus*.

Le genre *Cymbopogon* est très connu en Aromathérapie pour ses effets antibactériens. Nous avons cherché à analyser les composés et à évaluer le potentiel antibactérien de l'HE de *C. commutatus* et de faire des comparaisons avec trois autres huiles essentielles commerciales du genre *Cymbopogon* : *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* et *Cymbopogon winterianus* (tableau 24).

**Tableau 24:** Origines géographiques de quatre espèces de *Cymbopogon*.

Noms scientifiques des HE	Origines
<i>Cymbopogon citratus</i> (CC)	Guatemala
<i>Cymbopogon commutatus</i> (CM)	Djibouti
<i>Cymbopogon nardus</i> (CN)	Sri lanka
<i>Cymbopogon winterianus</i> (CW)	Indonésie

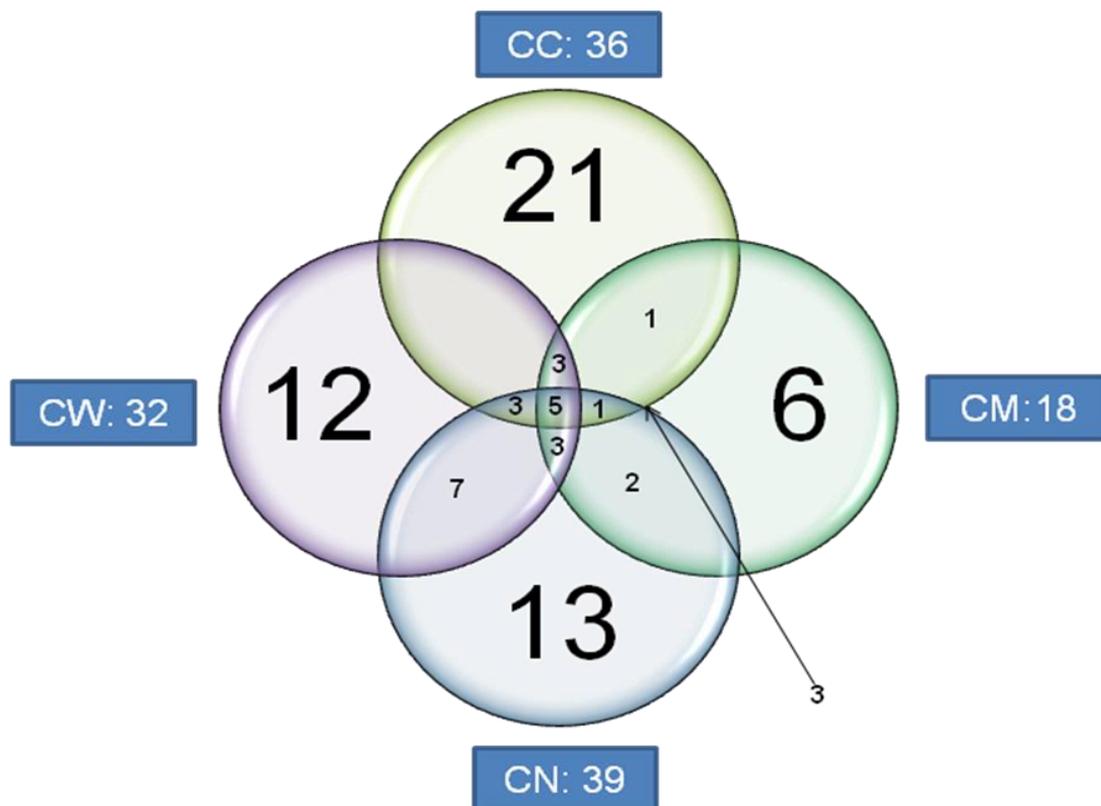
L'analyse des différents constituants de ces quatre huiles essentielles est effectuée en utilisant la GCMS. Avec 39 composés ( $\geq 0,1\%$ ) l'HE de *Cymbopogon nardus* est l'HE la plus riche en composés et celle de *Cymbopogon commutatus* la moins riche avec 18 composés différents (tableau 25). Cinq composés sont communs aux quatre huiles essentielles à savoir (+)-(R)-Limonène, géraniol, géraniol acétate, alpha et gamma élémène. De son côté, *Cymbopogon*

*citrat* possède 36 composés dont 58 % ne sont communs à aucune de trois autres huiles essentielles alors que cette part spécifique n'est que de 31 % pour *Cymbopogon commutatus* (**Figure 83**). L'HE de cette dernière espèce dispose d'un composé largement majoritaire, la pipéritone à 73,9 %. Sa présence prédominante est confirmée avec l'enregistrement RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de l'huile essentielle de *C. commutatus* d'une part et du standard pipéritone d'autre part (**Annexe 1- Figure B-E**).

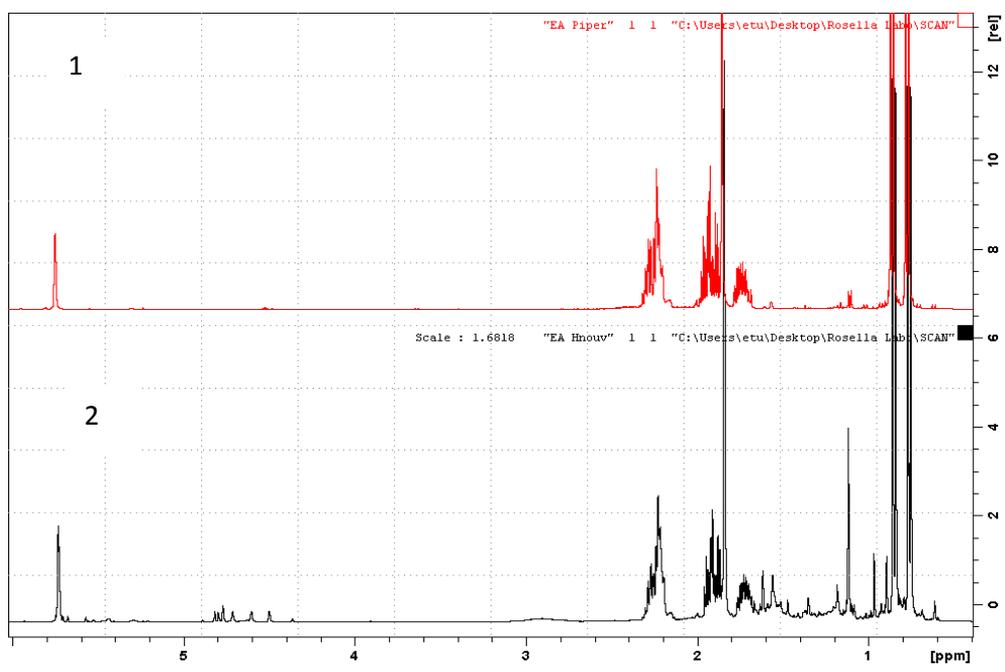
La comparaison entre les deux spectres nous montre :

- la présence de 2 doublets à 0.85 ppm et 0.74 ppm avec une constante de couplage de 7 Hz, typique du groupement isopropyl.
- le multiplet du proton de la double liaison à 5.73 ppm
- Dans le spectre du  $^{13}\text{C}$  nous pouvons trouver dix signaux : 201.3, 161.3, 126.8, 51.6, 30.4, 25.9, 24.1, 23.0, 20.7, 18.6.
- la présence de 2 doublets à 0.85 ppm et 0.74 ppm avec une constante de couplage de 7 Hz, typique du groupement isopropyl.
- le multiplet du proton de la double liaison à 5.73 ppm
- Dans le spectre du  $^{13}\text{C}$  nous pouvons trouver dix signaux : 201.3, 161.3, 126.8, 51.6, 30.4, 25.9, 24.1, 23.0, 20.7, 18.6.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  de l'huile essentielle et le standard se callent totalement montrant la prédominance de ce composé (**figure 84**).

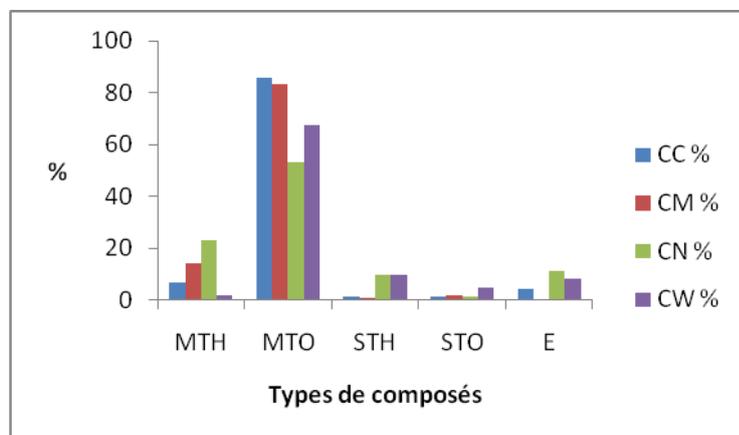


**Figure 83:** Répartition des constituants des quatre huiles essentielles : *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon commutatus*, *Cymbopogon nardus* et *Cymbopogon winterianus*.



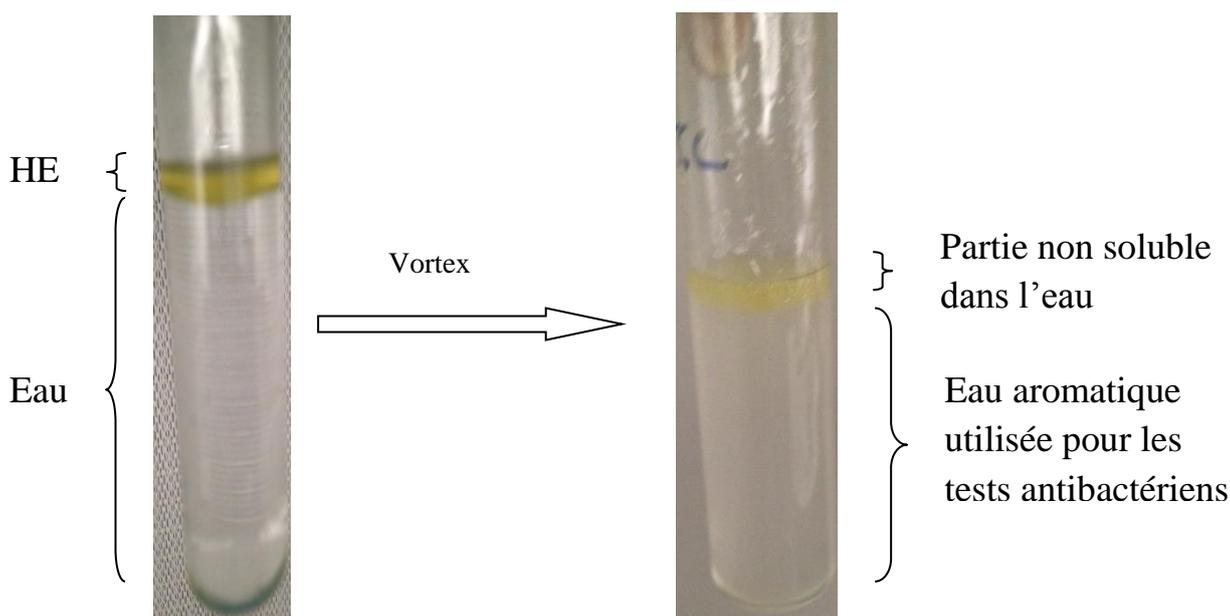
**Figure 84 :** Comparaison des spectres du proton  $^1\text{H}$  entre la piperitone (1) et de l'huile essentielle *C. commutatus* (2) dans  $\text{CDCl}_3$  à 400 MHz.

Par ailleurs la principale famille de composés, quelque soit l'HE, est celle des monoterpènes oxygénés (**Figure 85**). Cette famille représente 85,6 %, 83,2 %, 53,2 % et 67,7 % des constituants de *C. citratus*, *C. commutatus*, *C. nardus* et *C. winterianus* respectivement.



**Figure 85** : Répartition des constituants des quatre huiles essentielles pures; MTH/MTO (monoterpènes hydrocarbonés/oxygénés), STH/STO (sesquiterpènes hydrocarbonés/oxygénés) et E (esters).

Lors de l'évaluation des activités antibactériennes, les huiles essentielles ne se solubilisent pas entièrement dans le milieu de culture qui est majoritairement constitué d'eau. Il est crucial de ce fait de connaître les composés solubilisés dans l'eau. Nous avons décidé d'agiter fortement l'HE avec de l'eau à l'aide d'un vortex, ce qui aboutit à l'obtention de deux phases : une eau aromatique placée sous la couche d'HE (**Figure 86**). Une faible quantité de composés hydrophiles de l'HE se dissout dans l'eau et la partie hydrophobe de l'HE reste dans la phase supérieure. La partie inférieure, l'eau aromatique, est utilisée pour réaliser les tests d'activité antibactérienne et la couche supérieure non soluble dans l'eau est enlevée pour éviter une asphyxie des souches bactériennes.

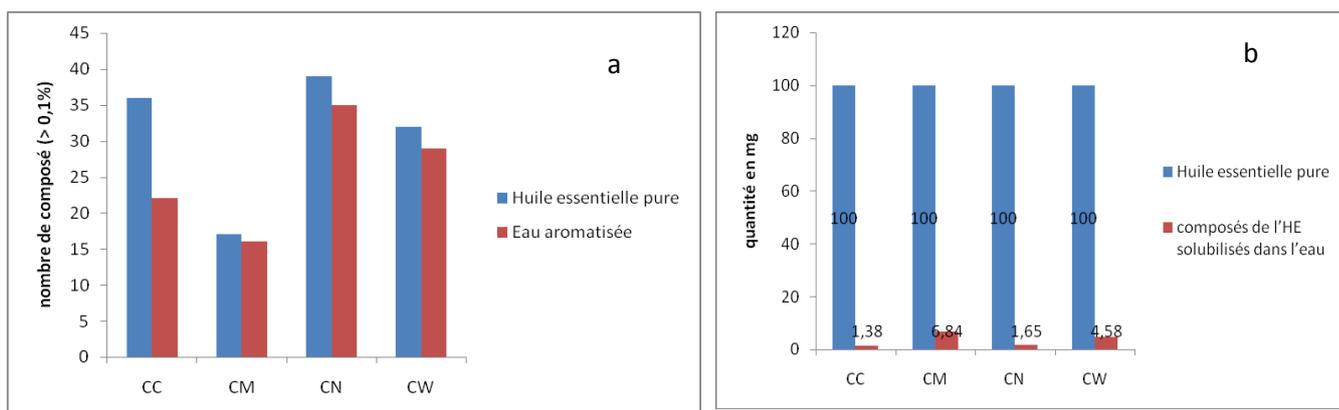


**Figure 86:** Préparation de l'eau aromatique pour les tests antibactériens.

Ces deux phases, eau aromatique et partie non soluble dans l'eau, sont analysées en GCMS (**tableau 25**). Les constituants hydrosolubles présents dans l'eau aromatique sont séparés par une extraction liquide-liquide en utilisant de l'heptane.

D'un point de vue qualitatif, l'analyse de l'eau aromatique des quatre HE montre la présence de nombreux constituants qui sont communs aux HE pures. En effet dans l'eau aromatique de *C.commutatus*, *C. nardus* et *C. winterianus* nous retrouvons respectivement 17, 35 et 29 composés sachant que les HE pures correspondantes renferment respectivement 18, 39 et 32 composés (**figure 87a**). Seule l'eau aromatisée de *Cymbopogon citratus* possède beaucoup moins de constituants (22) par rapport à son HE pure (36).

Cependant d'un point de vue quantitatif, la quantité de composés extraits dans l'eau aromatique est faible comparativement à la quantité HE pure mise en œuvre. Sur 100 mg d'huile essentielle pure, on obtient  $1,38 \pm 0,2$  mg,  $6,84 \pm 1,1$  mg ;  $1,65 \pm 0,3$  mg et  $4,58 \pm 0,3$  mg résidu de l'eau aromatique pour *C. citratus*, *C. commutatus*, *C. nardus* et *C. winterianus* respectivement (**figure 87b**). Il est à remarquer que l'HE de *C. commutatus* présente la plus grande quantité de composés hydrosolubles ( $6,84 \pm 1,1$  mg) comparativement aux autres HE.



**Figure 87 :** (a) Nombre de constituants présents dans l'huile essentielle pure et dans l'eau aromatique et (b) la quantité hydrosolubilisée en mg pour chacune de quatre huiles essentielles *C. citratus* (CC), *C. commutatus* (CM), *C. nardus* (CN) et *C. winterianus* (CW).

**Tableau 25** : Composition chimique de quatre huiles essentielles.

RT (min)	Composés	CC			CM			CN			CW		
		P%	H %	NH %	P%	H%	NH%	P%	H%	NH %	P%	H %	NH %
4,13	tricyclene							1		1,1			
4,42	Pinene							2,2		2,08			
4,9	Camphene							7,8		7,39			
6,04	sulcatone	0,7	0,8	0,6									
6,12	beta myrcene							0,6		0,82			
6,33	(+)-2-Carene				11,1	0,9	14						
7,13	(+)-(R)-Limonene	6,7	0,7	6,99	2,7	5,6	3,6	8,6	1,7	8,42	2,1	1,28	2,16
7,34	beta tans-ocimene	0,1		0,14				1,5	0,3	1,65			
7,59	ocimene							0,8	0,16	0,87			
8,19	4-Nonanone	1	0,58	1,04									
8,44	alpha terpinolene							0,6	0,44	0,63			
8,78	beta.-Linalool	1,2	1,67	1,2				0,6	1,4	0,68	0,4	0,81	0,5
8,88	myrtanal	0,1		0,12									
9,26	(E)-p-2-Menthen-1-ol				1,7	5,1	2,1						
9,54	alpha.-Pineneoxide	0,2	0,21	0,16									
9,62	(Z)-p-2-Menthen-1-ol				0,9	3,3	1,3						
9,73	p-Menth-8-en-3-ol							0,2	2,11	0,59	1,5	3,02	1,38
9,74	Carane, 4,5-epoxy-, trans	0,2	0,18	0,19									
9,82	Citronellal	1,1	0,21	0,35				3,7	2,52	3,76	30,8	25,61	29,99
9,92	(-)-Isopulegol	0,5	0,22	0,5							0,6	0,72	0,53
9,99	3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 1,3,4-trimethyl-	0,5	0,22	0,5									
10,11	camphenol							0,3	0,98	0,13			
10,17	endo-borneol							7,3	15,29	6,67			
10,33	Carane, 4,5-epoxy-, trans	1,1	1,04	1,06									

10,33	terpinen-4-ol							1,1	3,17	1,03			
10,54	3,5-Octadiene, (Z,Z)-	0,1											
10,58	Isopinocampheol	0,3	0,8	0,28									
10,59	alpha.-Terpineol				2,1	14	2,8	1,6	5,02	1,55			
10,79	decanal	0,2	0,24	0,23									
10,81	Palmitaldehyde										0,1		
10,83	trans-Piperitol				0,6	2,4	0,9						
11,09	Geranyl nitrile	0,1		0,13									
11,11	Citronellol							4	3,8	4,19	11,4	12,14	11,64
11,32	neral										0,3	0,51	0,28
11,37	beta citral	32,5	38,6	33,02									
11,51	geraniol	5,8	6,75	4,94	0,3	1	0,2	21,5	28	18,49	20,4	22,31	19,84
11,6	piperitone	0,1	0,54	0,32	73,9		62						
11,8	alpha citral							0,4	1	0,49	0,6	0,9	0,63
11,85	gamma cadinene	39,9	43,4	41,32									
12,03	Borneol acetate							0,7	0,42	0,77			
12,03	Oxide limonene	0,2		0,18									
12,24	geraniol formate	0,1						0,4	0,27	0,36			
12,88	p-Menthane-3,8-diol										0,1	0,96	0,1
12,97	Citronellol acetate							1,6	0,81	1,6	3,5	3,28	3,63
12,98	Citronellyl 2-butenate	0,2											
13,05	isoeugenol										0,4		0,43
13,11	Nerol acetate	0,1											
13,38	Geraniol acetate	3,9	2,4	3,69	0,2	1,8	0,3	6,5	3,31	6,14	4,8	4,55	4,99
13,44	8-Isopropenyl-1,5-dimethyl-cyclodeca-1,5-diene										0,2	0,16	0,17
13,54	elemene	0,2			0,4	2	0,5	1,1	0,51	1,09	4,2	3,66	4,31
13,72	eugenolmethyl							0,6	0,9	0,58			

13,97	aromadendrene				0,2	1,4	0,3	1,7	0,75	1,61	0,2	0,19	0,23
13,97	cis caryophyllene	1,3	0,78	1,27									
14,11	beta cubebene										0,1		
14,13	alpha.-Bergamotene	0,1		0,12				0,8	0,4	0,84			
14,37	transisoeugenol	0,3	0,18	0,21									
14,45	cis-2-Isopropylbicyclo[4.3.0]non-3-en-8-one							0,6	0,51	0,6			
14,46	alpha.-Caryophyllene										0,1	0,13	
14,7	gamma.-Cadinene										0,2	0,24	0,24
14,79	alpha cubebene							1,4	1,2	1,39	1,1	0,77	1,11
14,86	alpha farnesene							3,8	1,78	3,89			
14,98	Isoeugenol methyl ether							9,8	10,7	9,01			
15	alpha cadinene										0,8	0,7	0,76
15,19	gamma.-Cadinene							0,3	0,24	0,46	0,6	0,59	0,63
15,24	cadinene	0,1						0,9	0,45	0,91	2,3	1,96	2,3
15,25	Cadina-3,9-diene				0,2	1,2	0,3						
15,3	Citronellyl butyrate							0,3	0,17	0,37			
15,48	alpha cadinene										0,2	0,13	0,13
15,62	b elemol	0,3		0,11	3,7	19	5	1,5	1	1,56	7,9	7,4	8,06
15,68	Geraniol butyrate							1,9	1	1,98			
15,98	Germacrene D-4-ol										1,1	0,87	1,18
16,07	Caryophyllene oxide	1,1	0,64	1,06	0,2	1,6	0,4	0,3	0,19	0,38			
16,17	Tricyclo[3.1.0.0(2,4)]hexane, 3,6-diethyl-3,6-dimethyl-, trans-							0,6	0,3	0,71			
16,39	lavandulol										0,2	0,2	0,23
16,4	alpha.-Pineneepoxide	0,1											
16,56	1. 6-Eudesmen-4-ol				0,4	3,1	0,5						
16,65	gamma.-Eudesmol				0,3	4,1	0,4	0,3	0,14	0,28	0,6	0,63	0,66

16,78	alpha.-Cadinol										1	0,98	1,01
16,92	alpha.-Eudesmol						1	0,6	1,07	2,2	2,14	2,2	
16,93	10-epi-elemol	0,1		1	11	1,5							
17,55	Farnesol									0,1	0,13	0,13	
18,12	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	0,1											
21,4	trans-Farnesol	0,1											

CC : *Cymbopogon citratus*, CM : *Cymbopogon commutatus*, CN : *Cymbopogon nardus* et CW : *Cymbopogon winterianus*. P : huile essentielle pure ; H : partie hydrosoluble de l'HE et NH : partie non hydro.

Un paramètre qui rend compte de l'affinité de solubilisation d'un composé dans l'eau est le coefficient de partage de ce composé entre l'eau et un autre solvant S non miscible. Ce coefficient appelé Log P s'obtient par le logarithme du rapport des concentrations du composé dans le solvant S et dans l'eau ( $\log C_s/C_{eau}$ ). La valeur de ce paramètre permet d'indiquer l'intensité d'hydrophobie ou d'hydrophilie de ce composé. En effet plus la valeur de Log P est positive, plus  $C_s > C_{eau}$  et donc plus le composé est hydrophobe. En revanche plus la valeur de ce Log P est négative, plus  $C_s < C_{eau}$  et donc plus le composé est hydrophile. Les données de Log P de la plupart des composés sont disponibles dans la littérature (Kim et al., 2016).

Dans le cas des huiles essentielles qui sont constituées d'un mélange de composés majoritairement terpéniques, nous prenons en compte les composés majoritaires (**tableau 26**). Le Log P de ces composés majoritaires est positif, ces composés sont donc hydrophobes.

Dans le **tableau 26**, on remarque que la valeur de Log P la plus élevée est obtenue pour le  $\gamma$  cadinene (6,3), c'est le principal composé de l'HE de *Cymbopogon citratus*. A l'inverse, la plus faible valeur de Log P est la pipéritone, composé majeur de l'HE de *Cymbopogon commutatus*. Ces données expliquent les résultats obtenus pour la quantité de composés hydrosolubles dans chaque huile essentielle. En effet la quantité hydrosoluble de l'HE de CM est la plus élevée avec  $6,84 \pm 1,1$  mg alors que la partie hydrosoluble est la plus faible pour l'HE de CC avec  $1,38 \pm 0,2$  mg.

**Tableau 26:** Composés majoritaires et leur Log P.

Huiles essentielles	Composés majoritaires (%)	Log P
<i>Cymbopogon citratus</i>	beta.-Citral 32,5	3,45
	gamma cadinene 39,9	6,3
<i>Cymbopogon commutatus</i>	Pipéritone 73,9	2,85
<i>Cymbopogon nardus</i>	Géranol 21,5	3,2
	Isoeugenolmethylether 9,8	3,5
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Citronellal 30,8	3,5
	Geraniol 20,4	3,6

## 2 Activités antibactériennes

La concentration inhibitrice minimale (CMI) de ces quatre huiles essentielles a été évaluée sur des souches bactériennes pathogènes. Actuellement, il n'existe aucune réglementation ou recommandation d'évaluation *in vitro* des activités antibactériennes des HE (Fontanay et al., 2015). Le non solubilité des huiles essentielles dans le milieu de culture des bactéries, principalement constitué d'eau, entrave une bonne évaluation de l'activité antibactérienne. Ce problème est soulevé dans la littérature et certains auteurs utilisent des dispersons d'HE. Nous avons testé différents agents de dispersion de l'HE dans l'eau (DMSO, Tween 80, PEG 200 et 400, éthanol, tampon phosphate). Seuls le DMSO et l'éthanol donnent des suspensions stables et non opaques de l'HE dans l'eau. Mais le pourcentage de ces deux agents de dispersions (éthanol et DMSO) nécessaires pour la solubilisation des huiles essentielles dans les milieux de culture dépassent 20 %. Ce qui induit soit une mauvaise interprétation de l'activité réelle (l'activité bactéricide du solvant est non négligeable) soit une toxicité des formulations obtenues.

Il est à souligner que notre recherche s'appuie sur des utilisations traditionnelles où aucun usage d'émulsionnant n'est rapporté. De ce fait, nous avons décidé d'agiter fortement l'HE avec de l'eau à l'aide d'un vortex, ce qui aboutit à l'obtention de deux phases : une eau aromatique placée sous la couche d'HE (**figure 86**). Comme nous l'avons montré ci-dessus, une faible quantité de composés hydrophiles de l'HE se dissout dans l'eau et la partie hydrophobe de l'HE reste dans la phase supérieure.

Dans un premier temps l'eau aromatique obtenue avec les différentes huiles essentielles, est utilisée pour réaliser les tests d'activité antibactérienne. L'eau aromatique des quatre espèces de *Cymbopogon* sont testées sur sept souches bactériennes dont deux à Gram + (*Staphylococcus aureus* ABC1 et *Enterococcus faecalis* ABC3) et cinq à Gram – (*Pseudomonas aeruginosa* ABC 4, *Escherichia coli* ABC5, *Klebsiella pneumoniae* ABC12, *Acinetobacter baumannii* ABC14, *Enterobacter cloacae* ABC45). Par ailleurs, quatre composés majoritaires de l'HE de *Cymbopogon commutatus* à savoir le (±)-(R)-limonène, le géraniol, le terpinéol et la pipéritone, sont testés pour leur pouvoir antibactérien sur ces mêmes bactéries (**tableau 27**).

L'eau aromatique de *Cymbopogon commutatus* et de *Cymbopogon nardus* agissent contre cinq souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* ABC1, *Enterococcus faecalis* ABC3, *Pseudomonas aeruginosa* ABC 4, *Escherichia coli* ABC5 et *Acinetobacter baumannii* ABC14), l'eau aromatique de *Cymbopogon winterianus* est active contre trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* ABC1, *Escherichia coli* ABC5 et *Acinetobacter baumannii* ABC14) et enfin l'eau aromatique de *Cymbopogon citratus* n'a présenté une activité antibactérienne significative que sur deux bactéries (*Staphylococcus aureus* ABC1 et *Escherichia coli* ABC5). Il faut noter que ces eaux aromatiques n'ont pas une action antibactérienne en lien avec les bactéries à Gram + ou à Gram -, contrairement aux extraits des plantes qui sont plutôt actifs contre les bactéries à Gram + (Helander et al., 1998).

La pipéritone, composé très largement majoritaire (73,9 %) de l'HE de *Cymbopogon commutatus* est active contre *Staphylococcus aureus* ABC1 et *Pseudomonas aeruginosa* ABC 4 avec des CMI de 0,04 % et 1,25 % respectivement. Par ailleurs le géraniol agit sur toutes les bactéries sensibles à l'HE de *Cymbopogon commutatus*. Cependant le limonène ( $\pm$ ), à la concentration maximale de 5 %, n'a présenté aucune activité antibactérienne sur l'ensemble des souches bactériennes testées. Bien que les activités antibactériennes des composés majeurs de cette HE de *C. commutatus* soient démontrées, il est difficile d'identifier le ou les principes actifs responsables de l'activité antibactérienne de l'HE. En effet l'activité d'un composé, seul ou présent dans un mélange de composés tel qu'une huile essentielle, n'est pas identique en raison des actions de synergie observée dans un mélange. De plus, certains composés, minoritaires, peuvent avoir une activité majeure dans l'action biologique comparativement aux composés majoritaires.

**Tableau 27** : CMI (en %) de l'eau aromatique des huiles essentielles de quatre espèces de *Cymbopogon* et de **quatre composés** majoritaires de l'HE de *Cymbopogon commutatus*.

Souches	Gram	CC	CM	CN	CW	G	L+	L-	P	T
<i>Staphylococcus aureus</i> ABC1	+	2,50%	2,50%	2,50%	0,30%	0.63%	>5%	>5%	0.04 %	>5%
<i>Enterococcus faecalis</i> ABC3	+	>2,5%	5%	5%	>5%	0.63%	>5%	>5%	>5%	5 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ABC 4	-	>5%	2,50%	5%	>5%	0.31%	>5%	>5%	1.25 %	5 %
<i>Escherichia coli</i> ABC5	-	2,50%	1,25%	1,25%	2,50%	0.63%	>5%	>5%	>5%	5 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ABC12	-	>2,5%	>5%	> 5%	> 5%	> 5%	>5%	>5%	>5%	5 %
<i>Acinetobacter baumannii</i> ABC14	-	>2,5%	1,25%	5%	2,50%	0.31%	>5%	>5%	>5%	5 %
<i>Enterobactercloacae</i> ABC45	-	>2,5%		>5%	>5%	2.5%	>5%	>5%	>5%	5 %

CC : *Cymbopogon citratus*, CM : *Cymbopogon commutatus*, CN : *Cymbopogon nardus* CW : *Cymbopogon winterianus*. Géraniol (G), (+)-(R)-Limonène (L<sup>+</sup>), (-)-(R)-Limonène (L<sup>-</sup>), pipéritone (P) et terpinéol (T).

De manière à évaluer la cytotoxicité de ces huiles essentielles, une évaluation de la toxicité de l'eau aromatique des quatre huiles essentielles est réalisée sur des cellules pulmonaires MRC-5 en utilisant des concentrations correspondantes aux CMI obtenues pour les tests antibactériens (**tableau 28**). La toxicité est très forte pour l'eau aromatique de l'HE de CM (1.25 %) et CW (0.3 %) avec des pourcentages de cellules vivantes MRC-5 de 1,79 % et 7,03 % respectivement. En revanche les concentrations les plus élevées de l'eau aromatique de CC à 5 % et de CN à 2,5 % ont une plus faible toxicité sur les cellules MRC-5. En effet les pourcentages de cellules vivantes après traitement avec l'eau aromatique de CC et de CN sont 72,7 % et 34,31 % respectivement. Nous observons donc que plus une eau aromatique d'une huile essentielle est active (et donc une CMI faible) plus elle présente une forte cytotoxicité (pourcentage faible de cellules survivantes).

**Tableau 28 :** Viabilité des cellules MRC-5 après traitement de 24 heures par l'eau aromatique des huiles essentielles.

Huiles essentielles	Concentrations (%)	Viabilité cellulaire (%)
<i>Cymbopogon citratus</i>	2,5	66,74
<i>Cymbopogon commutatus</i>	1,25	1,79
<i>Cymbopogon nardus</i>	2,5	34,31
<i>Cymbopogon winterianus</i>	0,3	7,03

Comme nous l'avons vu plus haut, les tests antibactériens sont réalisés avec la partie hydrosoluble des huiles essentielles, et donc les CMI observées ne sont pas représentatives de l'ensemble des composés présents dans les huiles essentielles, surtout d'un point de vue quantitatif. La quantité massique hydrosoluble du *Cymbopogon citratus* est à 1,38 mg pour 100 mg d'HE pure, c'est la plus faible (**figure 87b**). Cette observation peut être reliée à son activité moindre par rapport aux trois autres huiles essentielles. En revanche dans le cas de l'HE *Cymbopogon commutatus*, qui a la plus grande quantité massique hydrosoluble à 6,84 mg pour 100 mg d'HE pure, elle agit contre cinq souches bactériennes sur sept testées. La seconde plus haute quantité hydrosoluble est obtenue pour *Cymbopogon winterianus* présente 4,58 mg pour 100mg d'HE pure et possède la plus faible CMI de ces bios essais avec 0,3% contre *Staphylococcus aureus* ABC1.

En conclusion, on remarque que l'eau aromatique qui présente la plus grande concentration en composés hydrosolubles, présente la meilleure activité antibactérienne. Dans cette étude c'est l'eau aromatique de l'HE de *C. commutatus* qui est bactéricide sur un plus grand nombre de souches bactériennes.

Pour améliorer la quantité de composés hydrosolubles retrouvés dans l'eau aromatique des HE, nous avons remplacé l'eau aromatique par une émulsion obtenue en utilisant un liposome naturel, la lécithine de soja.

Une émulsion constituée de 0,3 % de lécithine de soja et de 5 % d'HE est ajoutée dans un milieu de culture pour bactéries. Nous avons vérifié que cette émulsion est stable pendant les tests biologiques. De plus, nous avons vérifié que le liposome seul ne présente ni une activité antibactérienne ni une toxicité (**tableau 29**).

Dans tous les cas de figure, nous observons une diminution très importante des CMI pour les émulsions des quatre HE et donc une meilleure activité antibactérienne comparativement à l'eau aromatique de ces HE (**tableau 29**).

L'activité antibactérienne de la micro-émulsion de *Cymbopogon citratus* est observée pour six souches bactériennes (seule *K. pneumoniae* est insensible) et varie entre 0,04 % pour *S. aureus* et 0,08 % pour *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. baumannii* et *E. cloacae*. Les CMI de l'eau aromatique de l'HE ont diminué de 31 (passant de 2,5 à 0,08 %) à 62 fois (passant de 2,5 à 0,04 %) pour l'émulsion correspondante. De plus, on remarque que le nombre de souches bactériennes sensibles est de deux avec l'eau aromatique et elle est de six avec l'émulsion de l'HE de *Cymbopogon citratus*.

Trois à quatre souches bactériennes sont insensibles en présence des émulsions de l'HE de *Cymbopogon commutatus*, *Cymbopogon nardus* et *Cymbopogon winterianus*. Cependant pour toutes les HE testées, les CMI des émulsions sont nettement plus faibles que celles des eaux aromatiques. Cette efficacité améliorée ne viendrait pas du liposome (inactif jusqu'à 25 %) mais du fait que la totalité des composés présents dans l'HE, hydrophiles et hydrophobes, sont solubilisés dans le milieu de culture.

**Tableau 29** : Activité antibactérienne de quatre eau aromatiques d'huiles essentielles pures et en émulsion.

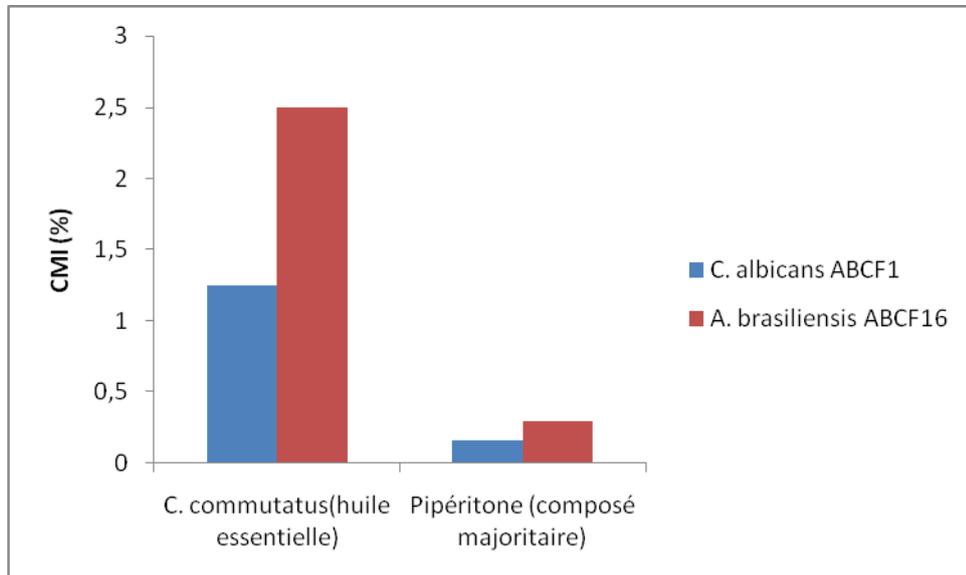
Souches	liposome	CC	L+CC	CM	L+CM	CN	L+CN	CW	L+CW
<i>Staphylococcus aureus</i> ABC1	>25 %	2,50 %	0,04 %	2,50 %	0,08 %	2,50 %	0,08 %	0,30 %	0,02 %
<i>Enterococcusfaecalis</i> ABC3	>25 %	>2,5 %	0,08 %	5 %	>0,63 %	5 %	>0,63 %	>5 %	0,04 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ABC4	>25 %	>5 %	0,08 %	2,50 %	0,31 %	5 %	0,16 %	>5 %	0,08 %
<i>Escherichia coli</i> ABC5	>25 %	2,50 %	0,08 %	1,25 %	0,31 %	1,25 %	>0,63 %	2,50 %	0,08 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ABC12	>25 %	>2,5 %	>0,63 %	>5 %	>0,63 %	> 5 %	>0,63 %	> 5 %	>0,63 %
<i>Acinetobacter baumannii</i> ABC14	>25 %	>2,5 %	0,08 %	1,25 %	0,16 %	5 %	0,04 %	2,50 %	>0,63 %
<i>Enterobacter cloacae</i> ABC45	>25 %	>2,5 %	0,08 %		>0,63 %	>5 %	>0,63 %	>5 %	>0,63 %

CM : *Cymbopogon commutatus*. CC : *Cymbopogon citratus*, CM : *Cymbopogon commutatus*, CN : *Cymbopogon nardus* CW : *Cymbopogon winterianus*. . L : Liposome.

### 3 Activité antifongique de l'HE *Cymbopogon commutatus*

L'activité antifongique de l'eau aromatique de *Cymbopogon commutatus* et de son composé majoritaire, la pipéritone (73,9 %), a été évaluée sur deux souches fongiques pathogènes : *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Les CMI obtenues sont respectivement de 1,25 % et 2,5 % pour l'huile essentielle et 0,16 % et 0,3 % pour la pipéritone (**figure 88**). La pipéritone serait donc impliquée dans l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus* et montre un effet antifongique plus puissant que l'HE qui renferme une multitude de composés. Un résultat similaire a été obtenu pour la pipéritone à la

concentration de 0,6 mg/mL qui a totalement inhibé la croissance de l'*Aspergillus flavus* (Cárdenas-Ortega et al., 2005). De même la pipéritone a présenté des IC50 à 2 et 1,5 µg/mL contre *Penicillium citrinum* et *Mucora rouxii* respectivement (Saleh et al., 2006).

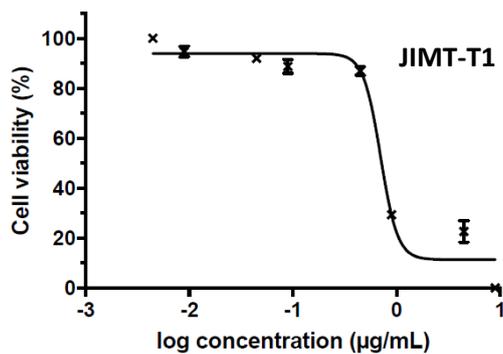
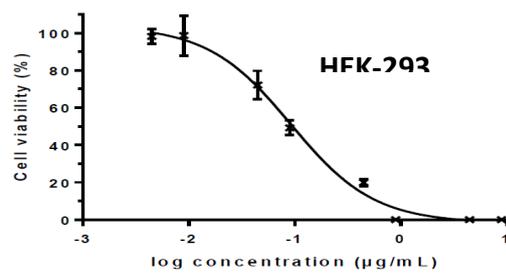
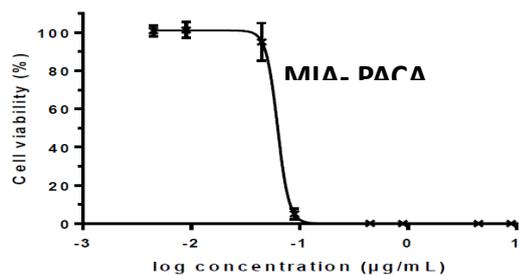
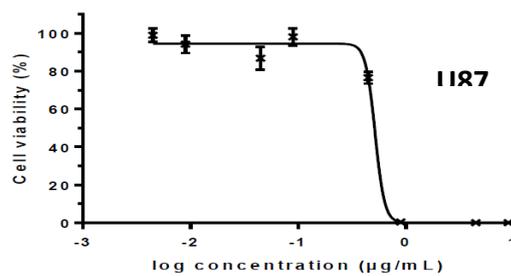
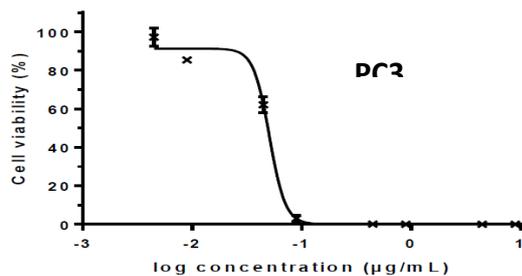
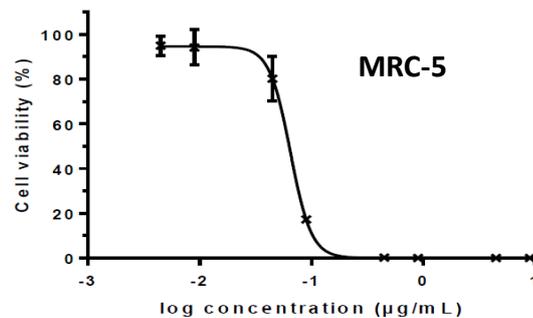
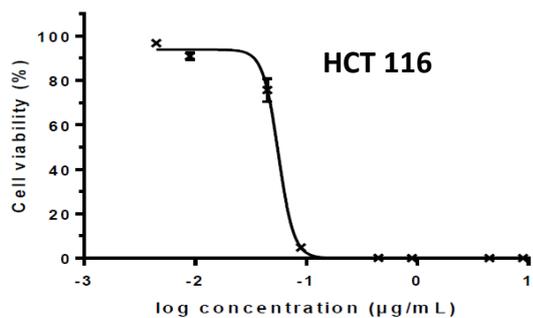
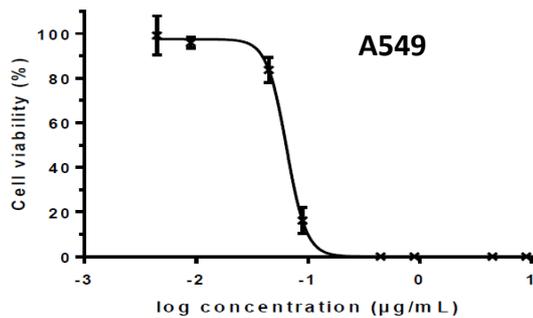
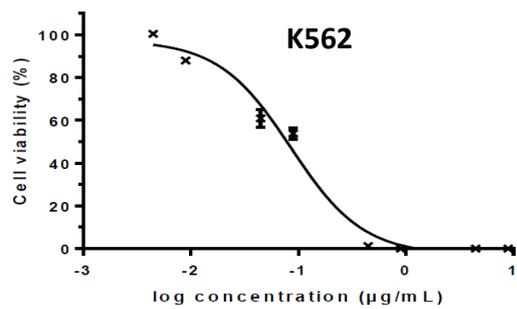


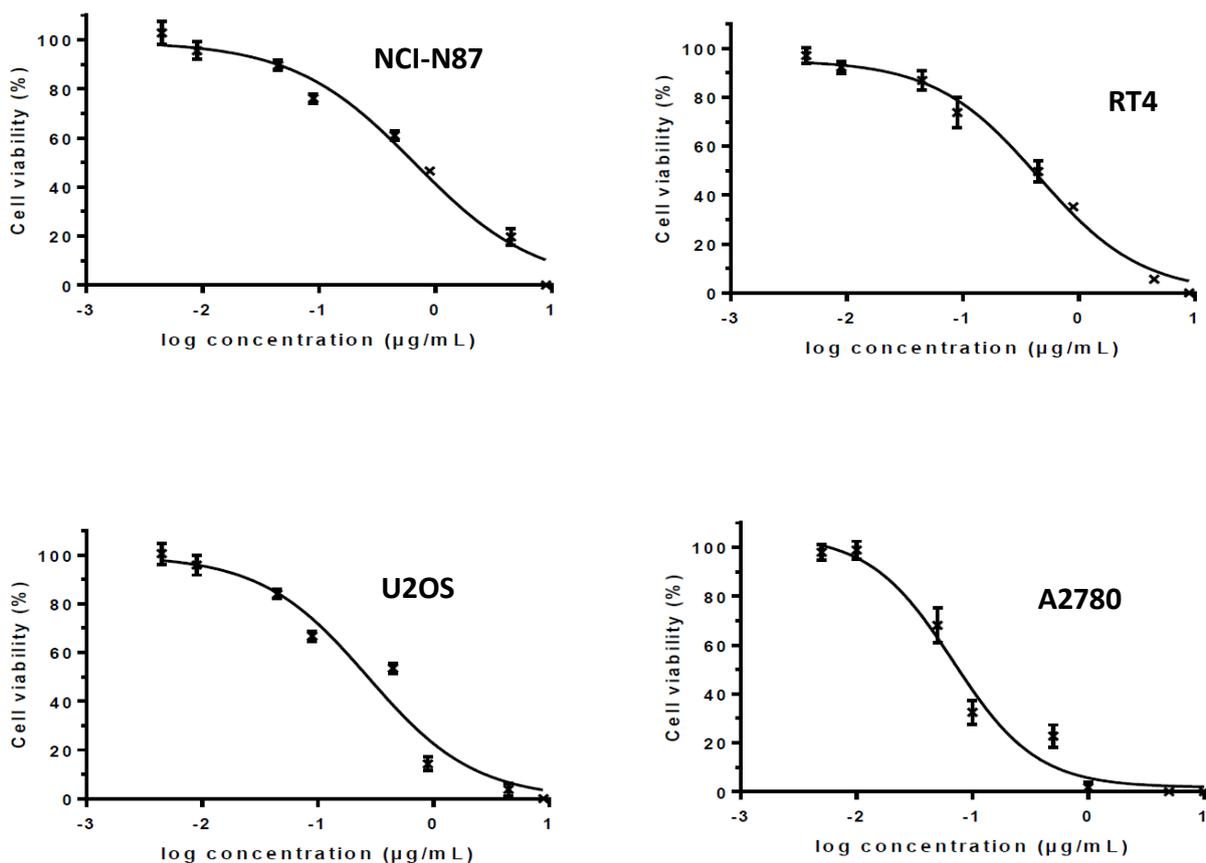
**Figure 88:** Activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus* et de son composé majoritaire, la pipéritone, sur deux souches fongiques : *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.

#### 4 Activité cytotoxique de l'HE *Cymbopogon commutatus*

Le cancer est, selon l'OMS, la deuxième cause de mortalité dans le monde en 2015 et les plantes peuvent constituer un vivier inépuisable de biomolécules originales. Des composés d'origine végétale ont déjà montré leur efficacité contre cette pathologie comme le paclitaxel, commercialisé sous le nom de Taxol®, issu de *Taxusbrevifolia*.

La cytotoxicité de l'HE du *Cymbopogon commutatus* est évaluée sur dix lignées cellulaires cancéreuses et deux lignées cellulaires saines en utilisant différentes concentrations allant de 10 à 0.005µg/mL. La viabilité cellulaire est déterminée à différentes concentrations d'huile essentielle (**figure 89**). Les concentrations IC50 pour chaque lignée cellulaire sont rassemblées dans la **figure 50-tableau 30**. Quatre médicaments anticancéreux sont utilisés en témoins positifs.

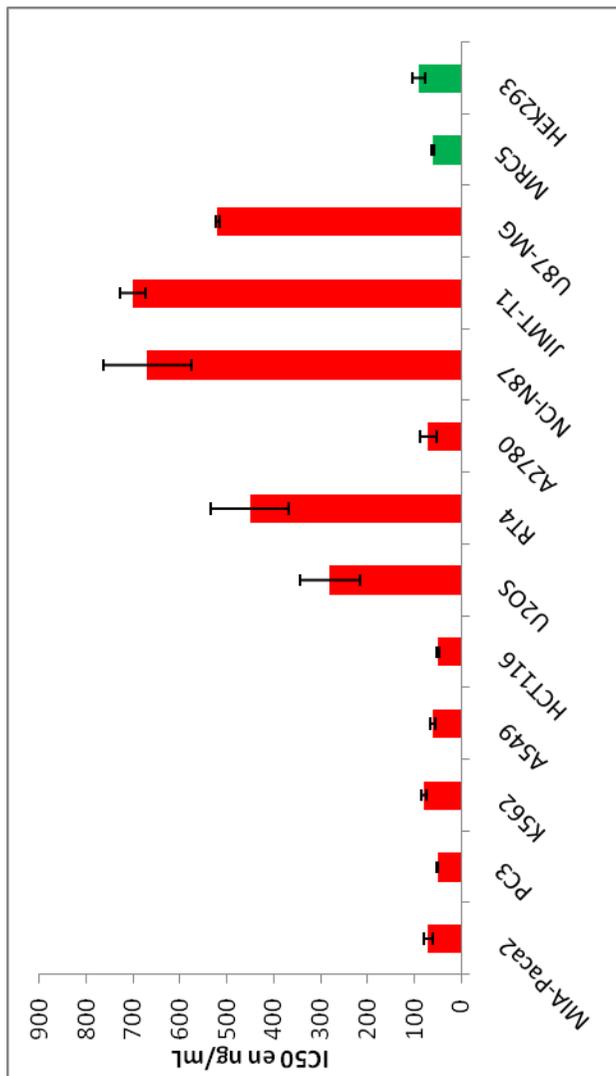




**Figure 89 :** Viabilité cellulaire à différentes concentrations de l’huile essentielle *C. commutatus*. Lignées cellulaires cancéreuses: U87-MG, glioblastome cérébral ; MIA-Paca2, cancer du pancréas ; PC3, cancer de la prostate ; K562, leucémie; A549, cancer du poumon ; HCT116, cancer colorectal ; U2OS, ostéosarcome ; RT4, cancer de la vessie urinaire ; A2780, cancer ovarien ; NCI-N87, cancer gastrique ; JIMT-T1, cancer du sein et deux lignées cellulaires humaines saines : MRC-5, poumon sain et HEK293, pein sain.

Les résultats montrent que cette huile essentielle est toxique au niveau de toutes les cellules cancéreuses testées. Les concentrations IC<sub>50</sub> obtenues sont très faibles allant de 0,05 pour PC3 et HCT116 à 0,67 µg/ mL pour NCI-N87 (**figure 50- Tableau 30**), montrant donc une forte activité anticancéreuse de l’huile essentielle de *Cymbopogon commutatus* comparativement aux médicaments du commerciale (Doxorubicine, Combrestatine A4, Vinblastine et Monomethyl Auristatine). La cytotoxicité de cette huile essentielle se manifeste au niveau des cellules cancéreuses de divers organes, comme les cellules malignes d’origine ovarienne A2780 (IC<sub>50</sub>= 0,07µg/ mL), d’origine nerveuse U87-MG (IC<sub>50</sub>= 0,52µg/ mL), d’origine osseuse U2OS (IC<sub>50</sub>= 0,28µg/mL), d’origine sanguine K562 (IC<sub>50</sub>= 0,08 µg/mL) et de la vessie (IC<sub>50</sub>= 0,45µg/mL).

Il est à souligner que cette plante se développe dans des environnements hostiles, tant sur le plan pluviométrique avec moins de 400 mm d'eau par an (Mahamoud *et al.*, 2014b) que des hautes températures qui sévissent dans ce grand désert de Djibouti, appelé Bara, ou près de la zone volcanique du Lac Assal. La rareté de la végétation dans cette région, poussent les animaux à consommer cette plante aromatique présentant une très forte odeur. D'ailleurs son nom local (caws dameer en Somalie) veut dire « paille des ânes » ou « paille de faible qualité ». Pour leur survie, les plantes confrontées aux herbivores, d'une part et aux conditions environnementales difficiles d'autre part, développent la synthèse de composés bioactifs à faibles concentrations (de Almeida *et al.*, 2005).



lignées cellulaires	IC50 (ng/ml)					
	<i>C. Commutatus</i>	Pipéritone	Doxorubicine*	Combretatine*	Vinblastine*	Monométhylauristaline*
HEK293	90±13	80±8				
MIA-Paca2	70±10					4,36±0,2
K562	80±5			5±0,3	20±0,12	3,12±0,2
MRC5	60±2	120±25	39,8±1,2			
A549	60±5	190±3	56,6±0,84	20±0,1		0,46±0,05
HCT116	50±3	240±40		2±0,1	35±0,84	2,07±0,02
U2OS	280±64	80±8				
RT4	450±83	130±2	36,29±1,2			0,5±0,01
A2780	70±17	45±1				0,45±0,01
NCI-N87	670±94	2350±180				1,65±0,07
U87-MG	520±4	440±60	99,6±2,3	9±0,5	2±0,04	0,21±0,03
PC3	50±1	220±30	2,09±0,03			0,36±0,03
JIMT-T1	790±110	790±110				

**Figure 90- Tableau 30 :** IC50 de la cytotoxicité de l'HE *C. commutatus* sur dix lignées cellulaires cancéreuses: U87-MG, glioblastome cérébral ; MIA-Paca2, cancer du pancréas ; PC3, cancer de la prostate ; K562, leucémie ; JIMT-T1, cancer du sein ; A549, cancer du poumon ; HCT116,

cancer colorectal ; U2OS, ostéosarcome ; RT4, cancer de la vessie urinaire ; A2780, cancer ovarien ; NCI-N87, cancer gastrique ; MRC5 ; et deux lignées cellulaires humaines saines : MRC-5, poumon sain et HEK293, rein sain. \*Médicaments anticancéreux et \*\* composé majeur de l'HE de *Cymbopogon commutatus*.

Avec la concentration de 0,07 µg/mL de cette huile essentielle, 50 % des cellules cancéreuses MIA-Paca2 du cancer du pancréas sont détruites (**figure 90**). Ce résultat, montrant une activité de l'HE de *C. commutatus* contre l'un des cancers les plus agressifs, est encourageant et va dans le sens des données obtenues avec l'huile essentielle de *Boswellia sacra*. En effet une fraction de cette huile essentielle, riche en acide boswellique (30,1mg/mL) avec une dilution de 1/1200, a diminué de 50 % la viabilité des cellules cancéreuses MIA-Paca2(Ni *et al.*, 2012). Un autre type de cellules cancéreuses du pancréas, DU-145, est rentré en apoptose en réponse à un traitement avec l'huile essentielle de *Cymbopogon flexuosus* avec une IC50 de 41,4 µg/mL (Sharma *et al.*, 2009). Dans cette même étude, les cellules cancéreuses du poumon, A549, sont réduites de 50 % à 49,7 µg/ mL d'HE de *C. flexuosus* alors que la valeur est seulement de 0,06 µg/mL pour l'HE de *C. commutatus*. On note une grande différence d'activité entre les huiles essentielles de ces deux espèces du même genre, l'HE de *C. commutatus* étant plus puissante que l'HE de *C. flexuosus* pour diminuer la viabilité des cellules A549. L'action de la vapeur de l'huile essentielle de *Litsea cubeba* sur l'apoptose des cellules A549 est expliquée par une désactivation de la sérine / thréonine protéine kinase, élément essentiel de la survie et de la propagation des cellules cancéreuses (Seal *et al.*, 2012). Dans le cas de l'huile essentielle d'*Artemisia indica*, une réponse dose-dépendance de la croissance cellulaire du composé majoritaire, artemisia cétone est observée contre les cellules A549 (Rashid *et al.*, 2013).

La cytotoxicité de l'HE de *Cymbopogon commutatus* est également forte avec les cellules PC3 et HCT116 issues respectivement du cancer de la prostate et du cancer colorectal humain. L'HE de feuilles de *Solanum elaeagnifolium* qui détruit 97 % des cellules PC3 à 100 µg/mL (Essien *et al.*, 2012), l'HE de *Salvia libanotica* qui est cytotoxique pour les cellules HCT116 (Itani *et al.*, 2008) et notre HE ont en commun un composé majoritaire, l' $\alpha$ -terpinéol, qui pourrait être impliqué dans ces fortes activités cytotoxiques. Généralement l'activité anti cancéreuse des huiles essentielles est attribuée aux composés de faible poids moléculaire comme l' $\alpha$ -terpinéol (Basappa *et al.*, 2015).

Le composé majoritaire de cette HE, la pipéritone, présente des fortes toxicités allant de 45 ng/ mL contre les souches A2780 à 2350 ng/ mL contre les souches NCI-N87.

Cependant l'utilisation en l'état de cette huile essentielle, comme la population à Djibouti le fait, est fortement déconseillée en raison d'une forte toxicité contre des cellules non

cancéreuses MRC5 ( $IC_{50} = 0,06 \pm 0,002 \mu\text{g/ mL}$ ) et HEK293 ( $IC_{50} = 0,09 \pm 0,013 \mu\text{g/ mL}$ ), respectivement d'origine pulmonaire et rénale. Un fractionnement pourrait être envisagé pour obtenir des fractions présentant une toxicité plus faible contre les cellules saines.

# **Conclusion et perspectives**

Ce travail doctoral a porté sur la bio analyse de plantes médicinales Djiboutiennes. Ces dernières ont été sélectionnées sur des critères ethnobotaniques appliqués sur les plantes utilisées contre les infections microbiennes à Djibouti. La découverte d'une molécule active aboutissant à un médicament est longue et l'apport des savoirs traditionnels pour cibler certaines plantes n'est pas négligeable. La sélection se basant sur ces données a retenu six plantes qui ont ensuite subi un screening biologique notamment antibactérien et anti oxydant. Leurs activités antibactériennes ont été évaluées sur neuf souches bactériennes et leur pouvoir antiradicalaire a été estimé par deux méthodes DPPH et ABTS.

Trois plantes sont finalement retenues : *Acacia seyal*, *Indigofera caerulea* et *Cymbopogon commutatus*.

La recherche des composés de l'*Acacia seyal* a été effectuée au moyen d'un bio guidage. Deux extraits (aqueux et méthanolique) de l'écorce de cette plante ont été évalués pour leurs activités antibactériennes. L'extrait méthanolique donne la meilleure activité avec une CMI de 64 µg/ mL pour *Staphylococcus aureus* et *Corynebacterium urealyticum* et n'a pas montré de cytotoxicité contrairement à l'extrait aqueux. De ce fait une purification est effectuée sur l'extrait méthanolique. A chaque étape de ce processus, une évaluation d'activité est réalisée afin de privilégier les fractions les plus actives. Quatre composés de type tanique et stéroïdique sont isolés (épicatechine, catéchine, catéchine digallique et β-sitostérol). L'activité antibactérienne des composés purs n'est pas aussi intéressante que celle des fractions qui les contenaient. L'action en synergie des différents composés ou des composés mineurs difficilement isolables peut expliquer la faible activité des composés seuls isolés. D'autre part cet extrait méthanolique a une forte activité antioxydante et cela est relié à une teneur en polyphénols élevée : 1927, 1 mg équivalent d'acide gallique pour 100 g de matière sèche. De plus l'écorce de cette plante est riche en tanins condensés, l'analyse de leurs constituants montre la présence des polymères de catéchines et des gallo catéchines allant jusqu'à un degré de polymérisation de 9.

Par ailleurs, quatre extraits (hexanique, acétonique, méthanolique et aqueux) du fruit de l'*Indigofera caerulea* ont été testés pour leurs activités antibactérienne et anti oxydante. Les extraits hexanique et méthanolique ont une activité antibactérienne et seul l'extrait méthanolique présente une forte activité antioxydante. Une purification puis une caractérisation des composés majeurs de ces deux extraits ont été réalisées. Six composés de types polyphénolique et stéroïdique sont isolés (méthyl gallate, acide gallique, rutine,

isoquercétine, kaempférol-3- rutinoside et  $\beta$ -sitostérol). Le méthyl gallate est actif contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Enfin l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus* est évaluée sur sept souches bactériennes, deux souches fongiques et dix souches cancéreuses. Cette huile essentielle a une cytotoxicité très élevée contre toutes les cellules évaluées. Les IC50 sont de 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour PC3 et HCT116 (cellules cancéreuses de la prostate et colorectale) et de 0,67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour NCI-N87 (cellule cancéreuse gastrique). Une activité antifongique est observée pour deux souches de champignons pathogènes à savoir *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Une activité antibactérienne moyenne est obtenue pour cette huile essentielle. Après l'évaluation quantitative des composés hydrosolubles de l'HE, la partie solubilisée dans le milieu de culture ne représente que 6,84 % de l'huile essentielle. Une comparaison des activités antibactérienne et cytotoxique est faite avec trois autres huiles essentielles du genre *Cymbopogon* (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* et *Cymbopogon winterianus*). L'huile essentielle *Cymbopogon commutatus* est le plus actif contre les souches de bactéries testées.

Dans le but de solubiliser l'ensemble des composés hydrophyles et hydrophobes des huiles essentielles, nous avons réalisé une micro émulsion en utilisant la lécithine de soja. Les concentrations minimales inhibitrices ont fortement diminué passant par exemple de 2,5 % contre *S. aureus* pour l'eau aromatique de l'HE de *C. commutatus* à 0,08 % pour l'émulsion correspondante. Le liposome seul n'ayant pas montré d'activité antibactérienne, cette augmentation de l'activité antibactérienne serait liée à une solubilisation totale des composés de l'huile essentielle dans le milieu de culture.

Cette huile essentielle contient 73,9 % de pipéritone (monoterpène). Ce dernier est actif seulement contre deux souches bactériennes sur les cinq que l'huile essentielle peut inhiber. Malgré la prédominance d'un composé, ici la pipéritone, ce résultat confirme l'action en synergie des constituants d'une huile essentielle.

Les trois plantes étudiées ont montré des activités antimicrobiennes et nos résultats confirment leurs utilisations traditionnelles. En plus, nous avons montré qu'elles possèdent d'autres activités biologiques : anti oxydante et anti cancéreuse. Cette étude permet d'orienter leurs utilisations contre les souches qui leurs sont sensibles et d'apporter des indications pour les modes de préparation. En effet les extraits aqueux traditionnellement préparés ne sont pas

souvent les mieux adaptés. Et la mise en place des médicaments traditionnels améliorés (MTA) contribuerait à une meilleure efficacité thérapeutique des plantes médicinales pour la population locale. Dans le cas de l'HE de *Cymbopogon commutatus*, une forte toxicité est observée pour les cellules saines. A Djibouti où cette plante aromatique est très utilisée en decoction ou infusion, une quantification de l'huile essentielle présente dans ces boissons serait une priorité. En effet si des quantités non négligeables d'HE sont retrouvées, des recommandations seraient à apporter sur la bonne utilisation de ces infusions, décoctions pendant une période limitée.

## Références bibliographiques

- Abdel-Farid, I.B., Sheded, M.G., Mohamed, E.A., 2014. Metabolomic profiling and antioxidant activity of some Acacia species. *Saudi J. Biol. Sci.* 21, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.03.005>
- abdoul-Latif, ali, Fourreh, 2018. *Plantes médicinales de la République de Djibouti*, éditions universités européennes. ed.
- Abdoul-latif, F.M., Osman, D.A., Fourreh, A.E., Abdallah, A.H., Merito, A., Hassan, S., Asfaw, Z., Kelbessa, E., 2016. CANDIDATE MEDICINAL PLANT SPECIES OF DJIBOUTIAN PHARMACOPEIA FOR TESTING PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES ON COMMON MICROBIAL DISEASES. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8, 78. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i10.5788>
- Abdoul-Latif, M., Djaltou, A.O., Osman, Elmi Fourreh, A., Hassan-Abdallah, A., Merito, A., Hassan, S., ASFAW, Z., Kelbessa, E., 2016. Candidate medicinal plant species of Djiboutian pharmacopeia for testing pharmacological activities on common microbial diseases. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i10.5788>
- Abidi, S.L., 2001. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J. Chromatogr. A, Gas and Liquid Chromatography of Non-Saponifiable Lipids. Part I* 935, 173–201. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00946-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00946-3)
- Ajibesin, K.K., Ekpo, B.A., Bala, D.N., Essien, E.E., Adesanya, S.A., 2008. Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 115, 387–408. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.021>
- Al-Ghamdi, S.S., Al-Ghamdi, A.A., Shammah, A.A., 2007. Inhibition of Calcium Oxalate Nephrotoxicity with *Cymbopogon Schoenanthus* (Al-Ethkher) [WWW Document]. <https://doi.org/info:doi/10.2174/187231207783221420>
- Alitonou, G.A., Avlessi, F., Sohounhloue, D.K., Agnanié, H., Bessière, J.-M., Menut, C., 2006. Investigations on the essential oil of *Cymbopogon giganteus* from Benin for its potential use as an anti-inflammatory agent. *Int. J. Aromather.* 16, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijat.2006.01.001>
- Andrade, E.H.A., Zoghbi, M. das G.B., Lima, M. da P., 2009. Chemical Composition of the Essential Oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Cultivated in North of Brazil. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 12, 41–45. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643689>

- Anjaneyulu, A.S.R., Bapuji, M., Rao, M.G., Row, L.R., Sastry, S., Sree, P.C.S.A., Subrahmanyam, C., 1977. SAPOGENINS OF ACACIA CONCINNA DC.- PART I. STEREOCHEMISTRY OF ACACIC ACID LACTONE. Chem. Informationsdienst 8. <https://doi.org/10.1002/chin.197731303>
- ARC, 2017. Le cancer en chiffres | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer [WWW Document]. URL <https://www.fondation-arc.org/le-cancer-en-chiffres> (accessed 9.30.18).
- Arnao, M.B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends Food Sci. Technol. 11, 419–421. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9)
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P., 1994. [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. J. Pharm. Belg. 49, 462–468.
- Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B., Oyedeji, A., 2015. Cymbopogon Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. Molecules 20, 7438–7453. <https://doi.org/10.3390/molecules20057438>
- Aziz-ur-rehman, Malik, A., Riaz, N., Ahmad, H., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I., 2005. Lipoxygenase Inhibiting Constituents from *Indigofera hetrantha*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 53, 263–266. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.263>
- Bachaya, H.A., Iqbal, Z., Khan, M.N., Sindhu, Z.-D., Jabbar, A., 2009. Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against Trichostrongylid nematodes of sheep. J. Ethnopharmacol. 123, 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.043>
- Badiaga, M., 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Clermont-Ferrand 2.
- Bagheri, R., Mohamadi, S., Abkar, A., Fazlollahi, A., 2007. Essential oil compositions of *Cymbopogon parkeri* STAPF from Iran. Pak. J. Biol. Sci. PJBS 10, 3485–3486.
- Basappa, G., Kumar, V., Sarojini, B.K., Poornima, D.V., Gajula, H., Sannabommaji, T.K., Rajashekar, J., 2015. Chemical composition, biological properties of *Anisomeles indica* Kuntze essential oil. Ind. Crops Prod. 77, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.041>
- Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L.C., Ilboudo, A.J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in

- combination. *Phytomedicine* 18, 1070–1074.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009>
- Benn, M., Mcewan, D., Pass, M.A., Majak, W., 1992. Three nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera linnaei*. *Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry* 31, 2393–2395. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83284-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83284-6)
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- BETTI, J.L., 2004. AN ETHNOBOTANICAL STUDY OF MEDICINAL PLANTS AMONG THE BAKA PYGMIES IN THE DJA BIOSPHERE RESERVE, CAMEROON. *Afr. Study Monogr.* 25, 27.
- Bhagavan, N.B., Arunachalam, S., Dhasarathan, P., Kannan, N.D., 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Indigofera aspalathoides* Vahl in Swiss albino mice. *J. Pharm. Res.* 6, 350–354. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.02.018>
- Bishayee, A., Sethi, G., 2016. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. *Semin. Cancer Biol.* 40–41, 1–3.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.08.006>
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Brandt, E.V., Ferreira, D., Roux, D.G., 1972. Structure and synthesis of crombenin, a natural spirocoumaranone. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 0, 392–393.  
<https://doi.org/10.1039/C39720000392>
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56, 317–333.
- BRUNETON, jean, 2016. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (5e ed.). Lavoisier.
- Buettner, G.R., 1993. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation,  $\alpha$ -Tocopherol, and Ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535–543.  
<https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>
- Burkill, H.M., 1995. *The useful plants of West Tropical Africa. Vol 3: Families J-L. Useful Plants West Trop. Afr. Vol 3 Fam. J-L.*

- Butsat, S., Siriamornpun, S., 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chem.* 119, 606–613.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.001>
- Camp, B.J., Norvell, M.J., 1966. The phenylethylamine alkaloids of native range plants. *Econ. Bot.* 20, 274–278. <https://doi.org/10.1007/BF02904278>
- Cárdenas-Ortega, N.C., Zavala-Sánchez, M.A., Aguirre-Rivera, J.R., Pérez-González, C., Pérez-Gutiérrez, S., 2005. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4347–4349.  
<https://doi.org/10.1021/jf040372h>
- Chakrabarti, R., Damarla, R.K.B., Mullangi, R., Sharma, V.M., Vikramadithyan, R.K., Rajagopalan, R., 2006. Insulin sensitizing property of *Indigofera mysorensis* extract. *J. Ethnopharmacol.* 105, 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.010>
- Chowdhury, S.R., Tandon, P.K., Chowdhury, A.R., 2010. Chemical Composition of the Essential Oil of *Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats. Growing in Kumaon Region. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 13, 588–593.  
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643867>
- Clark-Lewis, J.W., Dainis, I., 1968. Flavan derivatives. XX. A new glycoside and other extractives from *Acacia ixiophylla*: Rhamnitrin (rhamnetin 3 $\alpha$ -L-rhamnoside). *Aust. J. Chem.* 21, 425–437. <https://doi.org/10.1071/ch9680425>
- Clement, B.A., Goff, C.M., Forbes, T.D.A., 1997. Toxic amines and alkaloids from *Acacia berlandieri*. *Phytochemistry* 46, 249–254. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00240-9)
- CLSI, 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A3. 3rd Ed Clin. Lab. Stand. Inst.
- Corthout, J., Naessens, T., Apers, S., Vlietinck, A.J., 1999. Quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng* roots and ginseng preparations by thin layer chromatography–densitometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21, 187–192.
- de Almeida, C.F.C.B.R., de Lima e Silva, T.C., de Amorim, E.L.C., Maia, M.B. de S., de Albuquerque, U.P., 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *J. Arid Environ.* 62, 127–142. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.09.020>

- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A* 1112, 31–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>
- De Smet, P.A.G.M., 1996. Some ethnopharmacological notes on African hallucinogens. *J. Ethnopharmacol.* 50, 141–146. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01337-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01337-7)
- Désorption-ionisation laser assistée par matrice, 2018. . Wikipédia.
- Diallo, D., 2000. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). Université de Lausanne, Faculté des sciences.
- Dominguez, X.A., Martinez, C., Calero, A., Hinojosa, M., Zamudio, A., Zabel, V., Smith, W.B., Watson, W.H., 1978. Louisfieserone, an unusual flavanone derivative from *Indigofera suffruticosa*, Mill. *Tetrahedron Lett.* 19, 429–432.
- Dowd, L.E., 1959. Spectrophotometric Determination of Quercetin. *Anal. Chem.* 31, 1184–1187. <https://doi.org/10.1021/ac60151a033>
- Dubey, V.S, Mallavarapu, G.R, Luthra, R., 1999. Changes in the essential oil content and its composition during palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia*) inflorescence development. *Flavour Fragr J* 309–314.
- Duval, A., Avérous, L., 2016. Characterization and Physicochemical Properties of Condensed Tannins from *Acacia catechu*. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1751–1760. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05671>
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J., 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* 23, 394–411. <https://doi.org/10.1039/B515312N>
- E. Wollenweber, 1988. Biochemical, Cellular and Medicinal Properties, in: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*. New York, NY, USA, p. 45.
- Ekpenyong, E., E. Akpan, E., E. Daniel, N., 2014. Phytochemical Constituents, Therapeutic Applications and Toxicological Profile of *Cymbopogon citratus* Stapf (DC) Leaf Extract. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 133–141.
- El-Askary, H., Meselhy, M., Galal, A., El-Askary, H.I., Meselhy, M.R., Galal, A.M., 2003. Sesquiterpenes from *Cymbopogon proximus*. *Molecules* 8, 670–677. <https://doi.org/10.3390/80900670>

- Eldeen, I.M.S., Van Heerden, F.R., Van Staden, J., 2010. In vitro biological activities of niloticane, a new bioactive cassane diterpene from the bark of *Acacia nilotica* subsp. *kraussiana*. *J. Ethnopharmacol.* 128, 555–560.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.057>
- Eldeen, I.M.S., Van Staden, J., 2008. Cyclooxygenase inhibition and antimycobacterial effects of extracts from Sudanese medicinal plants. *South Afr. J. Bot.* 74, 225–229.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.11.009>
- Eldeen, I.M.S., Van Staden, J., 2007. In vitro pharmacological investigation of extracts from some trees used in Sudanese traditional medicine. *South Afr. J. Bot.* 73, 435–440.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.03.009>
- Elmi, A., Spina, R., Abdoul-Latif, F., Yagi, S., Fontanay, S., Risler, A., Duval, R.E., Laurain-Mattar, D., 2018. Rapid screening for bioactive natural compounds in *Indigofera caerulea* Rox fruits. *Ind. Crops Prod.* 125, 123–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.089>
- El-Mousallamy, A.M.D., Barakat, H.H., Souleman, A.M.A., Awadallah, S., 1991. Polyphenols of *Acacia Raddiana*. *Phytochemistry* 30, 3767–3768.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80106-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80106-B)
- Engelbertz, J., Lechtenberg, M., Studt, L., Hensel, A., Verspohl, E.J., 2012. Bioassay-guided fractionation of a thymol-deprived hydrophilic thyme extract and its antispasmodic effect. *J. Ethnopharmacol.* 141, 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.025>
- Esimone, C.O., Adikwu, M.U., Muko, K.N., 1999. Antimicrobial properties of *Indigofera dendroides* leaves. *Fitoterapia* 70, 517–520. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00072-6)
- Essien, E.E., Ogunwande, I.A., Setzer, W.N., Ekundayo, O., 2012. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxicity studies on *S. erianthum* and *S. macranthum* essential oils. *Pharm. Biol.* 50, 474–480. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.614623>
- Evans, C.S., Bell, E.A., Johnson, E.S., 1979. N-methyltyramine, a biologically active amine in *Acacia* seeds. *Phytochemistry* 18, 2022–2023. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82727-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82727-2)
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biol.* 331, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.02.008>

- Farhang, V., Amini, J., Javadi, T, Nazemi, J, Ebadollahi, A., 2012. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. against three *Phytophthora* species. *Greener J Biol Sci* 12, 37–41.
- Farias-Silva, E., Cola, M., Calvo, T.R., Barbastefano, V., Ferreira, A.L., Michelattol, D.D., Alves De Almeida, A.C., Hiruma-Lima, C.A., Vilegas, W., Brito, A., 2007. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. *Web Sci.* <https://doi.org/10.1055/s-2007-981613>
- Fernandez, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M.-R., Jankowski, C., Campos, M.G., 2005. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 522, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.08.046>
- Finnegan, R.A., Mueller, W.H., 2006. Chemical examination of a toxic extract of *Indigofera endecaphylla*. The endecaphyllins. *J. Pharm. Sci.* 54, 1136–1144. <https://doi.org/10.1002/jps.2600540809>
- Firm, R., 2010. *Nature's Chemicals: The Natural Products that Shaped Our World*. OUP Oxford.
- Flindt, C., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Williams, P.A., 2005. Studies on acacia exudate gums. Part V. Structural features of *Acacia seyal*. *Food Hydrocoll.* 19, 687–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.09.006>
- Fontanay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C., Duval, R.E., 2008. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J. Ethnopharmacol.* 120, 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.001>
- Fontanay, S., Mougenot, M.-E., E, D., Raphaël, 2015. Evaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale.* <https://doi.org/10.4267/2042/56635>
- Frankel, E.N., German, J.B., Kinsella, J.E., Parks, E., Kanner, J., 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8843 341, 454–457. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90206-V](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90206-V)
- Ganjewala, D., 2009. *Cymbopogon* essential oils: chemical compositions and bioactivities. *Int. J. Essent. Oil Ther.* 3, 56–65.
- Geissler, P.W., Harris, S.A., Prince, R.J., Olsen, A., Odhiambo, R.A., Oketch-Rabah, H., Madiaga, P.A., Andersen, A., Mølgaard, P., 2002. Medicinal plants used by Luo

- mothers and children in Bondo district, Kenya. *J. Ethnopharmacol.* 83, 39–54.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00191-5)
- Gradé, J.T., Tabuti, J.R.S., Van Damme, P., 2009. Ethnoveterinary knowledge in pastoral Karamoja, Uganda. *J. Ethnopharmacol.* 122, 273–293.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.005>
- Grindley, D.N., 1945. Investigation of the seed oils of some Sudan Mimosaceae. *J Soc Chem Ind* 64, 152.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27, 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Haddad, 2005. Détermination del'activité antioxydante de quelques fruits - Google Scholar. Université de Béjaia.
- Hagerman, A.E., Dean, R.T., Davies, M.J., 2003. Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 414, 115–120.  
[https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00158-9)
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M., 2000. The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? *Free Radic. Res.* 33, 819–830.  
<https://doi.org/10.1080/10715760000301341>
- Hammiche, V., Maiza, K., 2006. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* 105, 358–367.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.028>
- Harborne, A.J., 1998. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer Science & Business Media.
- Haslam, E., 2007. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry, Highlights in the Evolution of Phytochemistry: 50 Years of the Phytochemical Society of Europe* 68, 2713–2721. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.009>
- Hassan-Abdallah, A., Merito, A., Hassan, S., Aboubaker, D., Djama, M., Asfaw, Z., Kelbessa, E., 2013. Medicinal plants and their uses by the people in the Region of Randa, Djibouti. *J. Ethnopharmacol.* 148, 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.033>
- Hatil, H.E.-K., Rehab Omer EL-Nour, Sami Ahmed Khalid, 2010. Molluscicidal Activity of the Essential Oils of *Cymbopogon nervatus* Leaves and *Boswellia papyrifera* Resins. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 139–142.

- Heerden, F.R. van, Brandt, E.V., Ferreira, D., Roux, D.G., 1981. Metabolites from the purple heartwoods of the mimosoideae. Part 4. *Acacia fasciculifera* F. Muell ex. Benth: fasciculiferin, fasciculiferol, and the synthesis of 7-aryl- and 7-flavanyl-peltogynoids. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 0, 2483–2490. <https://doi.org/10.1039/P19810002483>
- Hegarty, M.P., Pound, A.W., 1968. Indospicine, a New Hepatotoxic Amino-acid from *Indigofera spicata*. *Nature* 217, 354–355. <https://doi.org/10.1038/217354a0>
- Heiba, H.I. [ه.ا. حلمي], Rizk, A.M., 1986. Constituents Of *Cymbopogon* Species. نبات مكونات السيمبوجون.
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., von Wright, A., 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Hesse, M., 2002. Alkaloids: nature's curse or blessing? Wiley-VCH.
- Hostettmann, K., 1997. Tout savoir sur le pouvoir des plantes sources de médicaments. Favre.
- Huang, B., Ban, X., He, J., Tong, J., Tian, J., Wang, Y., 2010. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves. *Food Chem.* 120, 873–878. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.020>
- Huang, B., Ke, H., He, J., Ban, X., Zeng, H., Wang, Y., 2011. Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo. *Food Chem. Toxicol.* 49, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.015>
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C., 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 276–285. <https://doi.org/10.1038/nrc1046>
- Itani, W.S., El-Banna, S.H., Hassan, S.B., Larsson, R.L., Bazarbachi, A., Gali-Muhtasib, H.U., 2008. Anti colon cancer components from Lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: Mechanistic basis. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1765–1773.
- J. Bruneton, 1999. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales 3e édition - Jean Bruneton.
- Jacknoon, A.A., Elhefian, E.A., Mohammed, A.M., Hamdi, O.A.A., Yahaya, A.H., 2012. A preliminary qualitative study of two common *Acacia* species in Sudan. *J. Chem.* 9, 851–856.
- Jangade, N.M., Nagargoje, P.B., PJ, S., 2014. Isolation, Phytochemical and Biological Evaluation of *Acacia Nilotica* (L) Willd. Leaf Extract. *Int J Pharmacog Phytochem Res* 6, 179–182.

- Javad, H., S.m, F.T., Mansour, G., Peyman, S., B, H.E., 2006. A PHYTOCHEMICAL STUDY OF CYMBOPOGON PARKERI STAPP. ESSENTIAL OIL, AND ITS BIOLOGICAL ACTIVITY AGAINST SOME PHYTOPATHOGENIC FUNGI 37, 425–431.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Eller, G., Ngassoum, M.B., Maponmetsem, P.M., 2007. Composition and Antimicrobial Activity of *Cymbopogon giganteus* (Hochst.) Chiov. Essential Flower, Leaf and Stem Oils from Cameroon. *J. Essent. Oil Res.* 19, 485–489. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699959>
- Joshi, K.C., Bansal, R.K., Sharma, T., Murray, R.D.H., Forbes, I.T., Cameron, A.F., Maltz, A., 1979. Two novel cassane diterpenoids from *Acacia jacquemontii*. *Tetrahedron* 35, 1449–1453. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(79\)85042-5](https://doi.org/10.1016/0040-4020(79)85042-5)
- Kahiya, C., Zimudzi, C., 2015. Phytochemical, antimicrobial and cytotoxic evaluation of *Indigofera serpentinicola*. *Bangladesh J. Pharmacol.* 10, 166–172. <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i1.21467>
- Kanner, J., Lapidot, T., 2001. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1388–1395. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00718-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00718-3)
- KANSOLE, M.M.R., 2009. ETUDE ETHNOBOTANIQUE, PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE QUELQUES LAMIACEAE DU BURKINA FASO : CAS DE LEUCAS MARTINICENSIS (Jacquin) R. Brown, HOSLUNDIA OPPOSITA Vahl ET ORTHOSIPHON PALLIDUS Royle ex Benth.
- Ketoh, G.K., Koumaglo, H.K., Glitho, I.A., Huignard, J., 2006. Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia* 77, 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.031>
- Khadri, A., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Neffati, M., Smiti, S., Araújo, M.E.M., 2008. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and <sup>13</sup>C NMR. *Food Chem.* 109, 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.070>
- Kim, S., Thiessen, P.A., Bolton, E.E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B.A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., Bryant, S.H., 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 44, D1202–1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>

- Koné, D., 2009. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes : extraction, identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Metz.
- Kulshreshtha, M.J., Kulshreshtha, D.K., Rastogi, R.P., 1972. The triterpenoids. *Phytochemistry* 11, 2369–2381. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88503-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88503-9)
- Kumar, P.P., Ayyanar, M., Ignacimuthu, S., 2007. Medicinal plants used by Malasar tribes of Coimbatore district, Tamil Nadu. *IJTK Vol64 Oct. 2007*.
- Kumar, R.S., Raj Kapoor, B., Perumal, P., 2012. Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. using various in vitro assay models. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 256–261. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60019-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60019-7)
- Kumar, R.S., Raj Kapoor, B., Perumal, P., 2011. In vitro and in vivo anticancer activity of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4, 379–385.
- Kurt Hostettmann, 1997. Tout savoir sur le pouvoir des plantes, sources de médicaments - [WWW Document]. Société Fr. Ethnopharmacol. URL <http://www.ethnopharmacologia.org/bibliotheque-ethnopharmacologie/tout-savoir-sur-le-pouvoir-des-plantes-sources-de-medicaments/> (accessed 5.13.18).
- Lasarow, R.M., Isseroff, R.R., Gomez, E.C., 1992. Quantitative In Vitro Assessment of Phototoxicity by a Fibroblast-Neutral Red Assay. *J. Invest. Dermatol.* 98, 725–729. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12499927>
- Lasic, D.D., Barenholz, Y., 1996. An overview of liposome scaled-up production and quality Control. *Handb. Nonmedical Appl. Liposomes Des. Microreactors* P 23.
- Laughton, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., Hoult, J.R.S., Halliwell, B., 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1673–1681. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90501-U](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90501-U)
- Leela, V., Kokila, L., Lavanya, R., Saraswathy, A., Brindha, P., 2010. Determination of gallic acid in *Acacia nilotica* Linn. by HPTLC. *Int. J. Pharm. Technol.* 2, 285–292.
- Lewinsohn, E., Dudai, N., Tadmor, Y., Katzir, I., Ravid, U., Putievsky, E., Joel, D.M., 1998. Histochemical Localization of Citral Accumulation in Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). *Ann. Bot.* 81, 35–39. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0525>
- Lhuillier, A., 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae),

- Tambourissa trichophylla Baker (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker (Myrsinaceae). (PhD Thesis).
- Mahamoud, A., Nour Ayeh, M., Saad, O., Camberlin, P., Gemenne, F., De Longueville, F., Ozer, P., 2014a. Importance des récentes variations pluviométriques à Djibouti et besoins de quantification de leurs impacts.
- Mahamoud, A., Nour Ayeh, M., Saad, O., Camberlin, P., Gemenne, F., De Longueville, F., Ozer, P., 2014b. Importance des récentes variations pluviométriques à Djibouti et besoins de quantification de leurs impacts.
- Mahato, S.B., Pal, B.C., Price, K.R., 1989. Structure of acaciaside, a triterpenoid trisaccharide from *Acacia auriculiformis*. *Phytochemistry* 28, 207–210.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)85039-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)85039-3)
- Mahboubi, M., Kazempour, N., 2012. Biochemical Activities of Iranian *Cymbopogon olivieri* (Boiss) Bor. Essential Oil. *Indian J. Pharm. Sci.* 74, 356–360.  
<https://doi.org/10.4103/0250-474X.107071>
- Malan, E., 1991. Derivatives of (+)-catechin-5-gallate from the bark of *Acacia nilotica*. *Phytochemistry* 30, 2737–2739. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85134-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85134-L)
- Mann, J., Davidson, S., Hobbs, J., Banthorpe, D., Harborne, J., 1994. *Natural Products*, 1st edition. ed. Prentice Hall, Harlow, Essex, England : New York.
- Matasyoh, J.C., Wagara, I.N., Nakavuma, J.L., Kiburai, erson M., 2011. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *Afr. J. Food Sci.* 5, 138–142.
- Menut, C., Bessi re, J.M., Samat , D., Djibo, A.K., Buchbauer, G., Schopper, B., 2000. Aromatic Plants of Tropical West Africa. XI. Chemical Composition, Antioxidant and Antiradical Properties of the Essential Oils of Three *Cymbopogon* Species from Burkina Faso. *J. Essent. Oil Res.* 12, 207–212.  
<https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699499>
- Middleton, E.M., Teramura, A.H., 1993. The Role of Flavonol Glycosides and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. *Plant Physiol.* 103, 741–752.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.3.741>
- Miksicek, R.J., 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.* 44, 37–43.

- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.  
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mugedo, J.Z.A., Waterman, P.G., 1992. Sources of tannin: Alternatives to wattle (*Acacia mearnsii*) among indigenous Kenyan species. *Econ. Bot.* 46, 55–63. <https://doi.org/10.1007/BF02985254>
- Muthaura, C.N., Keriko, J.M., Mutai, C., Yenesew, A., Gathirwa, J.W., Irungu, B.N., Nyangacha, R., Mungai, G.M., Derese, S., 2015. Antiplasmodial potential of traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. *J. Ethnopharmacol.* 170, 148–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.024>
- Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., Ignacimuthu, S., 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* 2, 43. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-43>
- Nakahara, K., Alzoreky, N.S., Yoshihashi, T., Nguyen, H.T.T., Trakoontivakorn, G., 2013. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *Jpn. Agric. Res. Q. JARQ* 37, 249–252.  
<https://doi.org/10.6090/jarq.37.249>
- Narender, T., Khaliq, T., Puri, A., chander, R., 2006. Antidyslipidemic activity of furanoflavonoids isolated from *Indigofera tinctoria*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3411–3414. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.04.001>
- Natarajan, D., Ramachandran, A., Srinivasan, K., Mohanasundari, C., 2010. Screening for antibacterial, phytochemical and pharmacognostical properties of *Indigofera caerulea* Roxb. *J. Med. Plants Res.* 4, 1561–1565.
- Negrelle, R.R.B., Gomes, E.C., 2007. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. *Rev Bras Pl Med* 9, 80–92.
- Ni, X., Suhail, M.M., Yang, Q., Cao, A., Fung, K.-M., Postier, R.G., Woolley, C., Young, G., Zhang, J., Lin, H.-K., 2012. Frankincense essential oil prepared from hydrodistillation of *Boswellia sacra* gum resins induces human pancreatic cancer cell death in cultures and in a xenograft murine model. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 253.  
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-253>
- Nikaido, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264, 382–388. <https://doi.org/10.1126/science.8153625>

- Nisar, M., Tariq, S.A., Marwat, I.K., Shah, M.R., Khan, I.A., 2009. Antibacterial, antifungal, insecticidal, cytotoxicity and phytotoxicity studies on *Indigofera gerardiana*. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 24, 224–229. <https://doi.org/10.1080/14756360802051313>
- Nonviho, G., Wotto, V.D., Noudogbessi, J.-P., Avlessi, F., Akogbeto, M., Sohounhloué, D.C., 2010. Insecticidal activities of essential oils extracted from three species of poaceae on *Anopheles gambiae* spp, major vector of malaria. St Cerc St CICBIA 11, 411–420.
- Nouhoum KONATE, 2005. ETUDE DE LA CONSOMMATION DES MEDICAMENTS TRADITIONNELS AMELIORES DANS LE CERCLE DE KADIOLO (thèse). Bamako uiversity, Mali, Mali.
- Oliveira, W.A. de, Pereira, F. de O., Luna, G.C.D.G. de, Lima, I.O., Wanderley, P.A., Lima, R.B. de, Lima, E. de O., 2011. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor against *Candida albicans*. Braz. J. Microbiol. 42, 433–441. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200004>
- Olsson, L.C., Veit, M., Weissenböck, G., Bornman, J.F., 1998. Differential flavonoid response to enhanced uv-b radiation in brassica napus. Phytochemistry 49, 1021–1028. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00062-4)
- OMS, 2017. L’OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d’avoir de nouveaux antibiotiques [WWW Document]. World Health Organ. URL <http://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed 9.30.18).
- OMS, 2013. Dernières statistiques mondiales sur le cancer.
- Orgogozo, J.M., Dartigues, J.F., Lafont, S., Letenneur, L., Commenges, D., Salamon, R., Renaud, S., Breteler, M., 1997. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. Rev. Neurol. (Paris) 153, 185–192.
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R H, Simons A, 2009. Agroforestry database: a tree species reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre (ICRAF), Nairobi, Kenya.
- PAM, P.A.M., Touchette, M.M., Dinucci, M.A., Chicoine, M.G., Gordon, M.M., 2011. Programme Alimentaire Mondial des Nations Unies Siège: Via CG Viola 68, Parco de’Medici, 00148, Rome, Italy.
- Pandey, M.C., Sharma, J.R., Dikshit, A., 1996. Antifungal Evaluation of the Essential Oil of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex Steud.) Wats. cv. Praman. Flavour Fragr. J. 11, 257–

260. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199607\)11:4<257::AID-FFJ576>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199607)11:4<257::AID-FFJ576>3.0.CO;2-5)
- Ponmari, G., Annamalai, A., Gopalakrishnan, V.K., Lakshmi, P.T.V., Guruvayoorappan, C., 2014. NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory cytokines mediated protective effect of *Indigofera caerulea* Roxb. on CCl<sub>4</sub> induced liver damage in rats. *Int. Immunopharmacol.* 23, 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.10.021>
- Ponmari, P., Arunachalam, A., Velan, L.P.T., 2012. Evaluation of phytochemical constituents and antioxidant activities of successive solvent extracts of leaves of *Indigofera caerulea* Roxb using various in vitro antioxidant assay systems. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2, S118–S123. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60136-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60136-4)
- Poupat, C., Sevenet, T., 1975. Cinnamoylhistamine et hordenine, alcaloides d'Acacia spirorbis. *Phytochemistry* 1881–1882.
- Prashar, A., Hili, P., Veness, R.G., Evans, C.S., 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* 63, 569–575. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00226-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00226-7)
- PROTA, 2005. ressources végétales de l'afrique tropicale. PROTA.
- Qiu, L., Liang, Y., Tang, G.-H., Yuan, C.-M., Zhang, Y., Hao, X.-Y., Hao, X.-J., He, H.-P., 2013. Two new flavonols, including one flavan dimer, from the roots of *Indigofera stachyodes*. *Phytochem. Lett.* 6, 368–371. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.04.010>
- Ragupathy, S., Steven, N.G., Maruthakkutti, M., Velusamy, B., Ul-Huda, M.M., 2008. Consensus of the “Malasars” traditional aboriginal knowledge of medicinal plants in the Velliangiri holy hills, India. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-4-8>
- Rahman, T.U., Uddin, G., Khattak, K.F., Liaqat, W., Mohammad, G., Choudhary, M.I., Wadood, A., Ahmad, A., 2014. Isolation and characterization of a novel ester from seeds of *Indigofera heterantha* (Wall). *J. Nat. Prod.* 7.
- Rahman, T.U., Zeb, M.A., Liaqat, W., Sajid, M., Hussain, S., Choudhary, M.I., Baldemir, A., Demirci, B., Paksoy, M.Y., İlğün, S., 2018. Phytochemistry and Pharmacology of Genus *Indigofera*: A Review. *Rec. Nat. Prod.* 12, 1.
- Rashid, S., Rather, M.A., Shah, W.A., Bhat, B.A., 2013. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food Chem.* 138, 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.102>

- Rasoanaivo, P., Wright, C.W., Willcox, M.L., Gilbert, B., 2011. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar. J.* 10, S4. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S4>
- Reuber, S., Bornman, J.F., Weissenböck, G., 1996. A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. *Plant Cell Environ.* 19, 593–601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00393.x>
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Richter, G., 1993. *Metabolisme des vegetaux: physiologie et biochimie.*
- Rosenberg Zand, R.S., Jenkins, D.J.A., Diamandis, E.P., 2002. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 777, 219–232.
- Saeed, M.E.M., Abdelgadir, H., Sugimoto, Y., Khalid, H.E., Efferth, T., 2015. Cytotoxicity of 35 medicinal plants from Sudan towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* 174, 644–658. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.005>
- Saleh, M.A., Belal, M.H., el-Baroty, G., 2006. Fungicidal activity of *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae). *J. Environ. Sci. Health B* 41, 237–244. <https://doi.org/10.1080/03601230500354774>
- Sandhyavali, M. S, Sivakamisundari, P, 2014. PHYTOCHEMICAL STUDIES ON THE AERIAL PARTS OF INDIGOFERA LINNAEI. *Pharmacophore* 84.
- Sathya, A., Siddhuraju, P., 2013. Protective effect of bark and empty pod extracts from *Acacia auriculiformis* against paracetamol intoxicated liver injury and alloxan induced type II diabetes. *Food Chem. Toxicol.* 56, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.031>
- Scherrer, R., Gerhardt, P., 1971. Molecular Sieving by the *Bacillus megaterium* Cell Wall and Protoplast. *J. Bacteriol.* 107, 718–735.
- Seal, S., Chatterjee, P., Bhattacharya, Sushmita, Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Mukherjee, S., Bhattacharya, Shelley, Bhuyan, M., Bhattacharyya, P.R., Baishya, G., Barua, N.C., Baruah, P.K., Rao, P.G., Bhattacharya, Samir, 2012. Vapor of Volatile Oils from *Litsea cubeba* Seed Induces Apoptosis and Causes Cell Cycle Arrest in Lung Cancer Cells. *PLOS ONE* 7, e47014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047014>
- Seigler, D.S., 2003. Phytochemistry of *Acacia*—sensu lato. *Biochem. Syst. Ecol., Proceedings of the Phytochemistry and Legume/Animal Interaction Symposia held at the 4th*

- International Legume Conference in Canberra, Australia, 2-6 July 2001 31, 845–873.  
[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00082-6)
- Selim, S.A., 2011. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of the Egyptian lemongrass *Cymbopogon proximus* Stapf. *Grasas Aceites* 62, 55–61. <https://doi.org/10.3989/gya.033810>
- Sereme, A., Milogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., Nacro, M., 2011. Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée Médecine Tradit. Afr.* 15.
- Shah, A., Marwat, S.K., Gohar, F., Khan, A., Bhatti, K.H., Amin, M., Din, N.U., Ahmad, M., Zafar, M., 2013. Ethnobotanical study of medicinal plants of semi-tribal area of Makerwal & Gulla Khel (lying between Khyber Pakhtunkhwa and Punjab Provinces), Pakistan. *Am. J. Plant Sci.* 4, 98.
- Shahi, A.K., Sharma, S.N., Tava, A., 1997. Composition of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex Steud) Wats, an Elemicin-rich Oil Grass Grown in Jammu Region of India. *J. Essent. Oil Res.* 9, 561–563. <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9700777>
- Shahi, A.K., Tava, A., 1993. Essential Oil Composition of Three *Cymbopogon* Species of Indian Thar Desert. *J. Essent. Oil Res.* 5, 639–643.  
<https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698297>
- Shahjahan, M., Vani, G., Devi, C.S.S., 2005. Protective Effect of *Indigofera oblongifolia* in CCl<sub>4</sub>-Induced Hepatotoxicity. *J. Med. Food* 8, 261–265.  
<https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.261>
- Sharma, P.R., Mondhe, D.M., Muthiah, S., Pal, H.C., Shahi, A.K., Saxena, A.K., Qazi, G.N., 2009. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chem. Biol. Interact.* 179, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.12.004>
- Sianard, F.D., Banzouzi, J.T., Champy, P., Tchissambou, L., 2012. Contribution à l'étude chimique d'une Fabaceae : *Indigofera capitata* Kostchy. *Pharmacopée Médecine Tradit. Afr.* 16.
- Singh, B.N., Singh, B.R., Sarma, B.K., Singh, H.B., 2009a. Potential chemoprevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by polyphenolics from *Acacia nilotica* bark. *Chem. Biol. Interact.* 181, 20–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.05.007>
- Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Sarma, B.K., Singh, H.B., 2009b. Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L. *Food Chem. Toxicol.* 47, 778–786. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.009>

- Singh, P., Bajpai, V., Kumar, S., Srivastava, M., Kumar, B., 2017. Metabolic profiling and discrimination of *Cymbopogon* species using direct analysis real time mass spectrometry and principal component analysis. *J. Med. Plants* 5, 384–391.
- Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., Arora, S., 2010. Umbelliferone – An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Food Chem.* 120, 825–830. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.022>
- Sonboli, A., Mirjalili, M.H., Yousefzadi, M., 2010. Antimicrobial Activity and Composition of the Essential Oil of *Cymbopogon Olivieri* (Boiss.) Bor from Iran. *Iran. J. Pharm. Res.* 0, 65–68.
- Sowndhararajan, K., Hong, S., Jhoo, J.-W., Kim, S., Chin, N.L., 2015. Effect of acetone extract from stem bark of *Acacia* species (*A. dealbata*, *A. ferruginea* and *A. leucophloea*) on antioxidant enzymes status in hydrogen peroxide-induced HepG2 cells. *Saudi J. Biol. Sci.*, Special issue on Molecular Biology and Biophysics of Eukaryotic Cells and Special issue on Biological Aspects of Global Health Issues 22, 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.010>
- Sowndhararajan, K., Kang, S.C., 2013. Protective effect of ethyl acetate fraction of *Acacia ferruginea* DC. against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol.* 148, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.007>
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30, 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Strack, D., 1997. 10 - Phenolic Metabolism, in: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 387–416. <https://doi.org/10.1016/B978-012214674-9/50011-4>
- Tabuti, J.R.S., Lye, K.A., Dhillon, S.S., 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *J. Ethnopharmacol.* 88, 19–44. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00161-2)
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K., 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 93, 157–165. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90183-3)
- Takaisi-Kikuni, N.B., Tshilanda, D., Babady, B., 2000. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. *Fitoterapia* 71, 69–71. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00097-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00097-0)

- Tapsoba, H., Deschamps, J.-P., 2006. Use of medicinal plants for the treatment of oral diseases in Burkina Faso. *J. Ethnopharmacol.* 104, 68–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.047>
- Thangadurai, D., Ramesh, N., Viswanathan, M.B., Prasad, D.X., 2001. A novel xanthene from *Indigofera longiracemosa* stem. *Fitoterapia* 72, 92–94.  
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00236-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00236-7)
- Thangadurai, D., Viswanathan, M.B., Ramesh, N., 2002. Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from *Indigofera longiracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity. *Pharm.* 57, 714–715.
- Timung, R., Barik, C.R., Purohit, S., Goud, V.V., 2016. Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study. *Ind. Crops Prod.* 94, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.021>
- Tung, Y.-T., Wu, J.-H., Huang, C.-Y., Kuo, Y.-H., Chang, S.-T., 2009. Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. *Bioresour. Technol.* 100, 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.001>
- Tyagi, B.K., Shahi, A.K., Kaul, B.L., 1998. Evaluation of repellent activities of *Cymbopogon* essential oils against mosquito vectors of Malaria, Filariasis and Dengue Fever in India. *Phytomedicine* 5, 324–329. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80073-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80073-1)
- Ucar, M.B., Ucar, G., Pizzi, A., Gonultas, O., 2013. Characterization of *Pinus brutia* bark tannin by MALDI-TOF MS and <sup>13</sup>C NMR. *Ind. Crops Prod.* 49, 697–704.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.010>
- Van Wyk, B.-E., 2015. A review of commercially important African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 176, 118–134. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.031>
- Vanila, D., Ghanthikumar, S., Manickam, V., 2008. Ethnomedicinal Uses of Plants in the Plains Area of the Tirunelveli-District, Tamilnanu, India. *Ethnobot. Leafl.* 2008.
- Vrielynck, L., 1996. Structures et propriétés spectroscopiques de la flavone, de la 3 hydroxy- et de la 5 hydroxy-flavone : étude des liaisons hydrogène intra- et inter-moléculaires. Lille 1.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.* Springer Science & Business Media.
- Wambugu, S.N., Mathiu, P.M., Gakuya, D.W., Kanui, T.I., Kabasa, J.D., Kiama, S.G., 2011. Medicinal plants used in the management of chronic joint pains in Machakos and

- Makueni counties, Kenya. *J. Ethnopharmacol.* 137, 945–955.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.038>
- Wang, C.-Y., Huang, H.-Y., Kuo, K.-L., Hsieh, Y.-Z., 1998. Analysis of *Puerariae radix* and its medicinal preparations by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 802, 225–231. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01070-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01070-4)
- Wang, Y., Tang, C., Zhang, H., 2015. Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl<sub>4</sub>-induced oxidative liver injury in mice. *J. Food Drug Anal.* 23, 310–317.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.002>
- Wany, A., Jha, S., Nigam, V.K, Pandey, D.V, 2013. Chemical analysis and therapeutic uses of citronella oil from *Cymbopogon winterianus*: A short review. *Int J Adv Res* 1, 504–521.
- Wei, L.S., Wee, W., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iran. J. Microbiol.* 5, 147–152.
- Weidenbörner, M., Jha, H.C., 1997. Antifungal spectrum of flavone and flavanone tested against 34 different fungi. *Mycol. Res.* 101, 733–736.  
<https://doi.org/10.1017/S0953756296003322>
- Wen, E., Liang, H., 2010. [Chemical constituents of *Indigofera pseudotinctoria*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J. Chin. Mater. Medica* 35, 2708–2711.
- Willis, K.J., 2017. State of the World's Plants [WWW Document]. State Worlds Plants. URL <https://stateoftheworldsplants.com> (accessed 5.11.18).
- Wollenweber, E., Seigler, D.S., 1982. Flavonoids from the exudate of *Acacia neovernicosa*. *Phytochemistry* 21, 1063–1066. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82416-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82416-4)
- Wollgast, J., Anklam, E., 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* 33, 423–447.
- Wong, K.K.Y., Signal, F.A., Champion, S.H., Motion, R.L., 2005. Citronella as an Insect Repellent in Food Packaging. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4633–4636.  
<https://doi.org/10.1021/jf050096m>

# Annexe 1

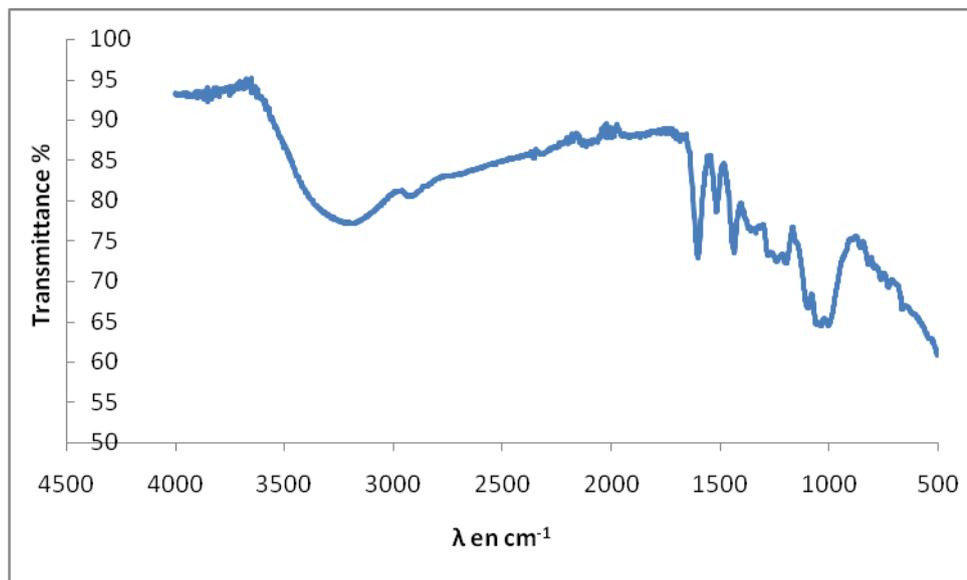


Figure A : Spectre IR des tannins condensés de l'extrait méthanolique.

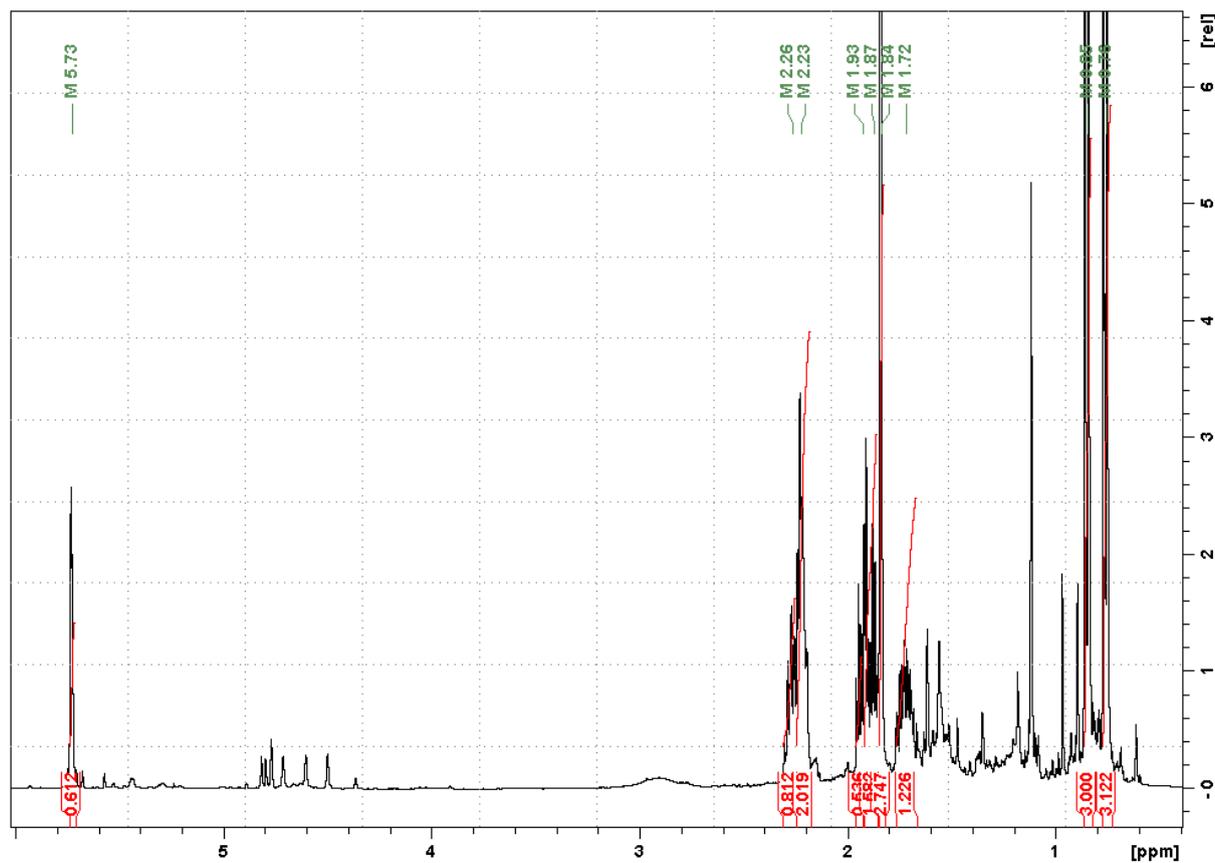
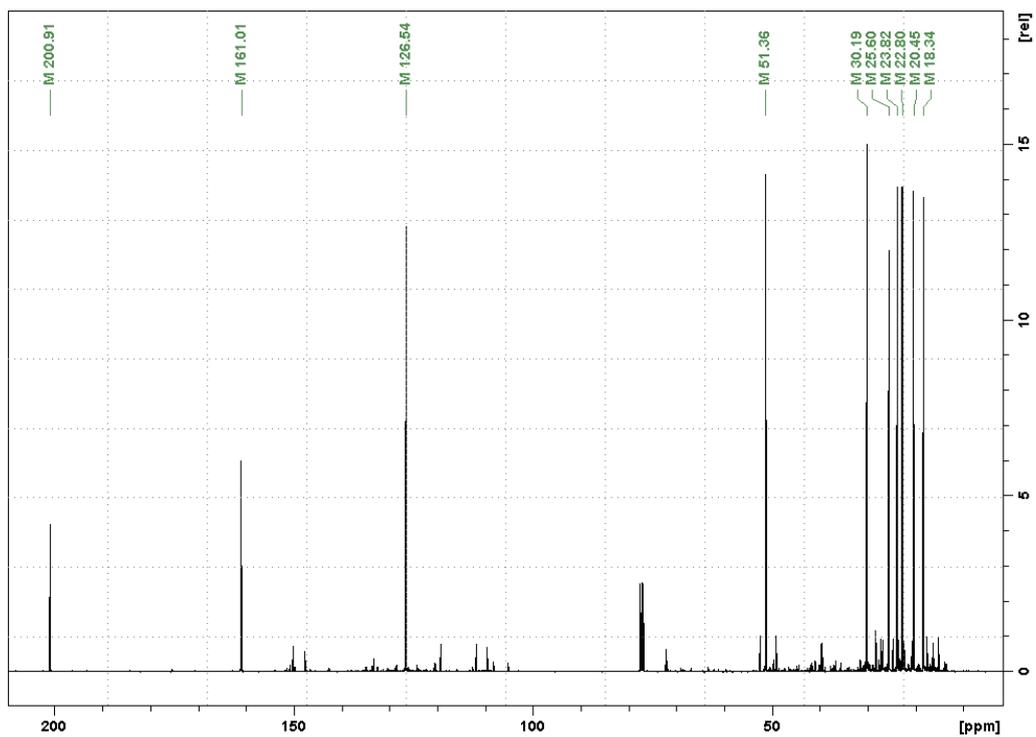
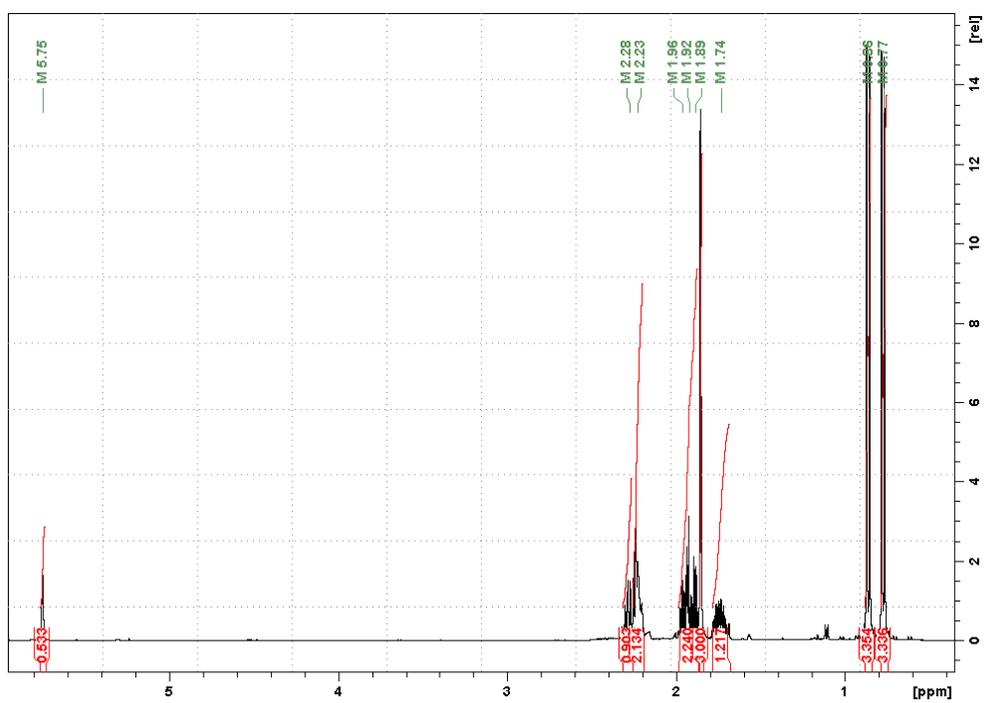


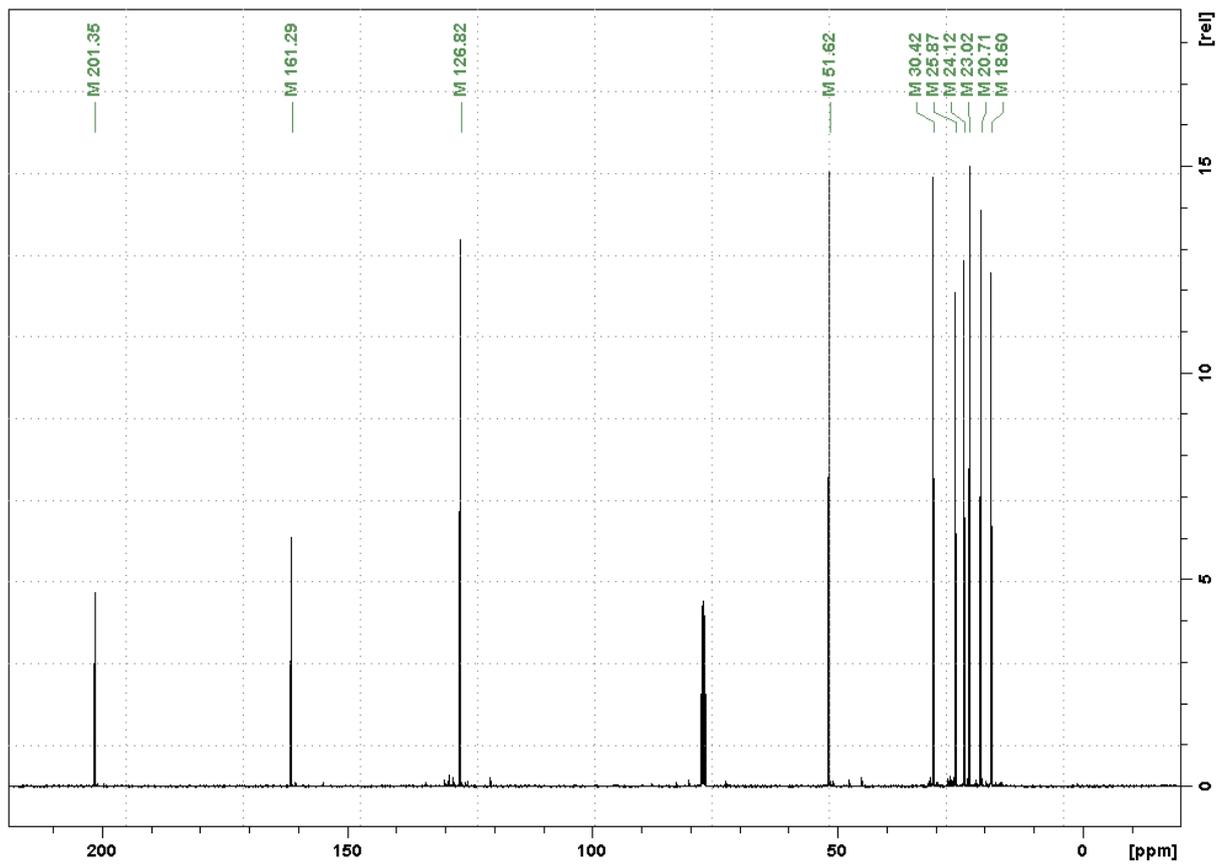
Figure B : Spectre du proton  $^1\text{H}$  l'huile essentielle *C. commutatus* dans  $\text{CDCl}_3$  à 400 MHz



**Figure C :** Spectre du carbone <sup>13</sup>C l'huile essentielle *C. commutatus* dans CDCl<sub>3</sub> à 100 MHz



**Figure D :** Spectre du proton <sup>1</sup>H de la piperitone dans CDCl<sub>3</sub> à 400 MHz



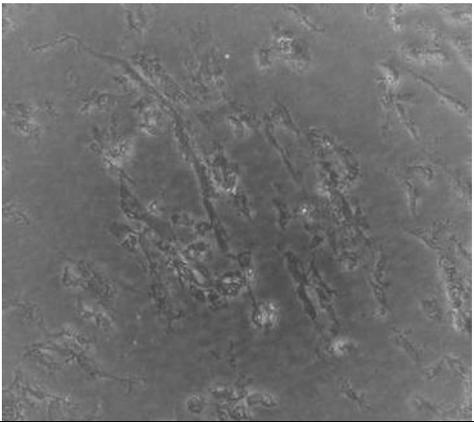
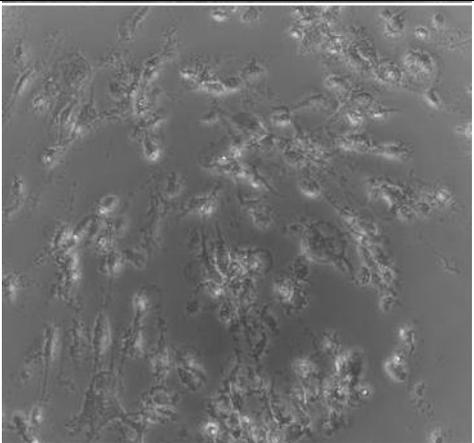
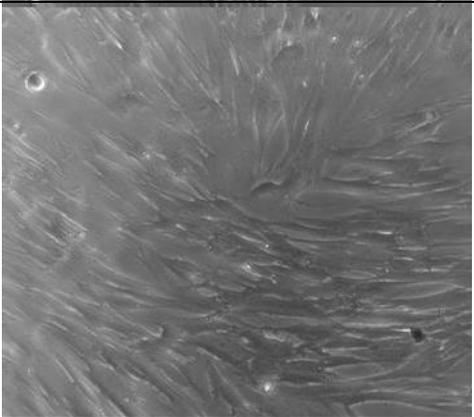
**Figure E :** Spectre du carbone  $^{13}\text{C}$  de la piperitone dans  $\text{CDCl}_3$  à 100 MHz.

## Annexe 2

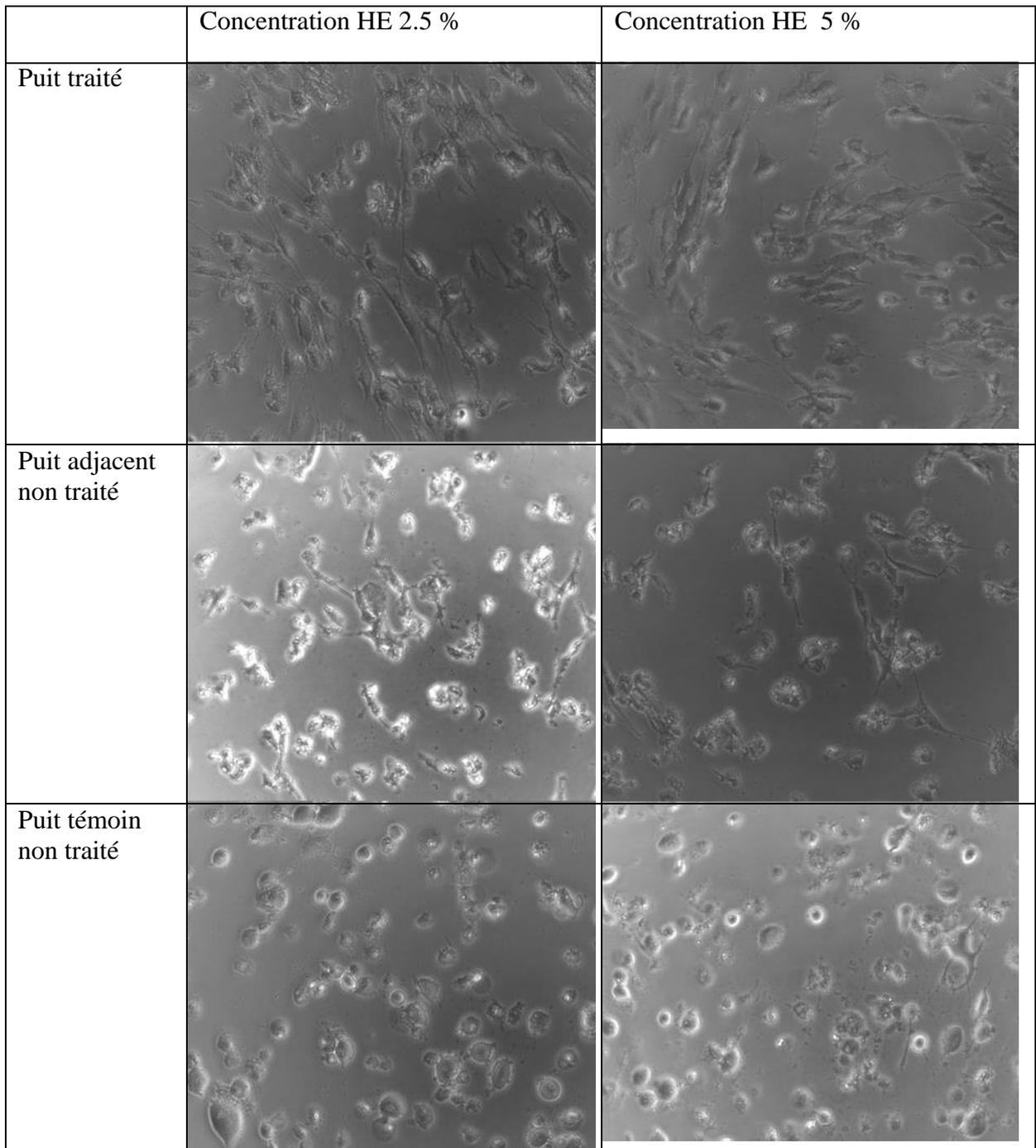
**Compte-rendu des tests de toxicité des huiles essentielles du genre *cymbopogon* (CC, CM, CN et CW) et trois de leurs composés majoritaires (Limonènes (+ et -) et Géraniol).**

L'expérience a été reproduite avec l'analyse de la viabilité évaluée à la fois par observation microscopique et par coloration des cellules au cristal violet.

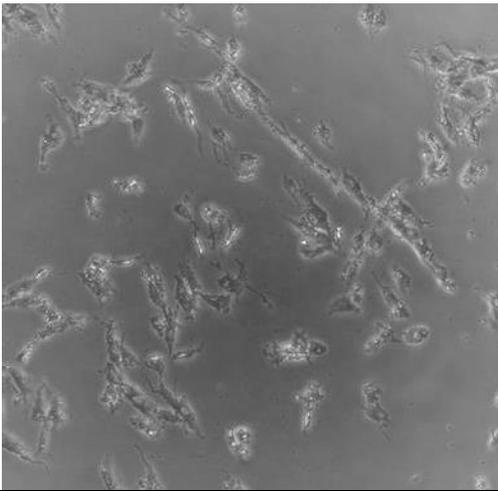
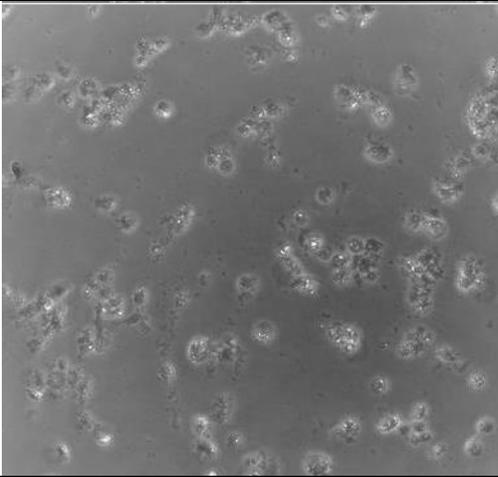
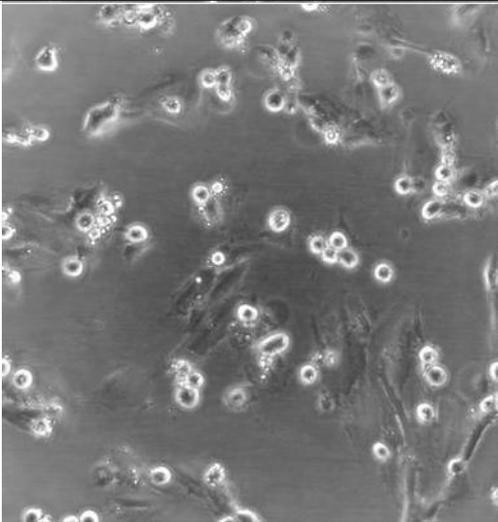
- Les huiles semblent avoir été déplacées par volatilité vers les puits voisins ;
- Les témoins de cellules non traitées des colonnes voisines ont aussi été atteints par l'effet toxique des quatre huiles essentielles ;
- Dans le cas de l'huile CC et CN l'observation et les images tendent à montrer qu'il y a eu plus de mort cellulaire dans les puits voisins que dans les puits traités ou bien une cause différente de mort.

	Concentration HE à 1.25 %
Puit traité	
Puit adjacent non traité	
Puit témoin non traité	

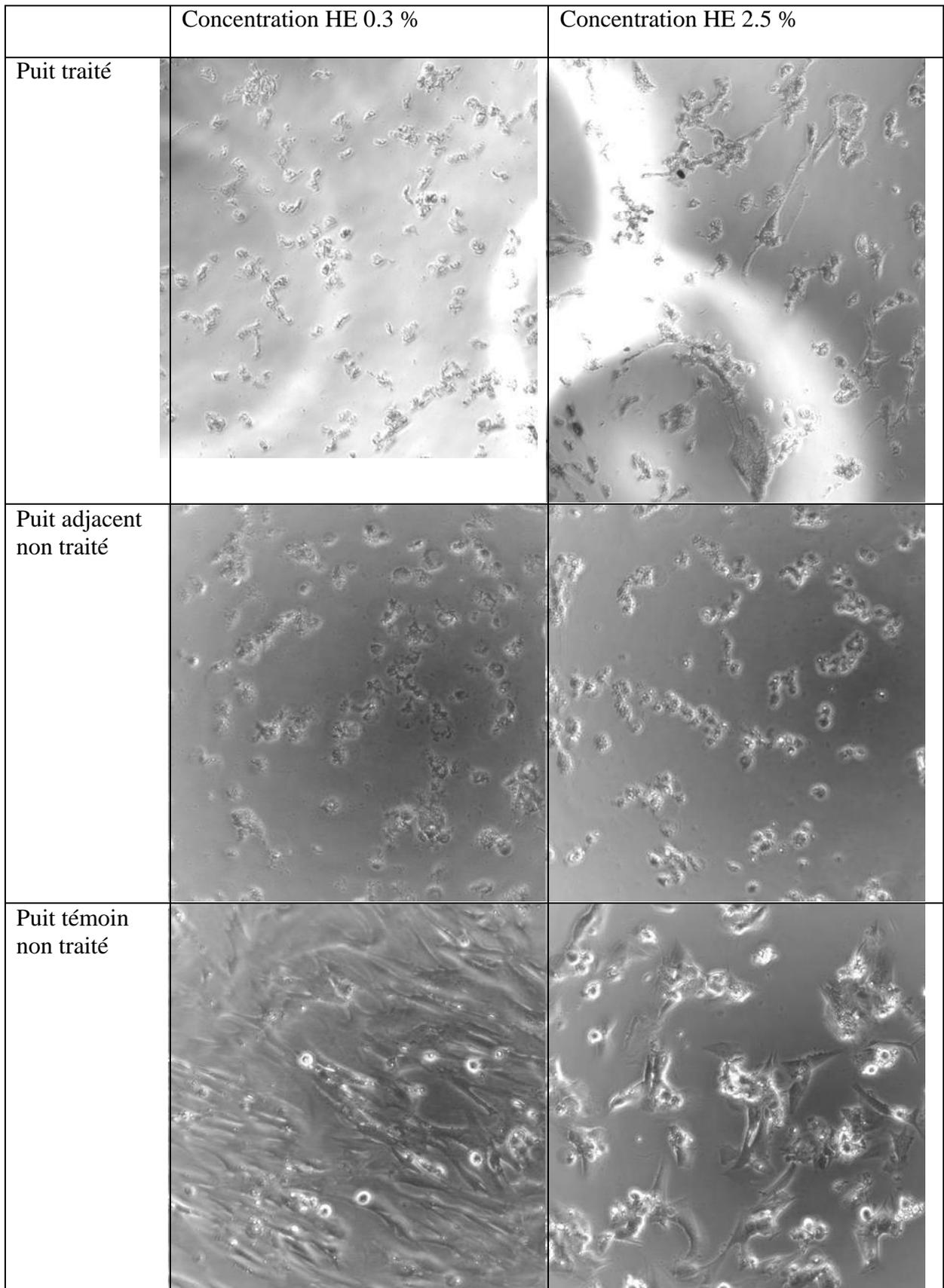
**Figure F.** Cellules MRC5 après 24 heures de traitement par l'huile essentielle *Cymbopogon commutatus* et observées au microscope (objectif x10).



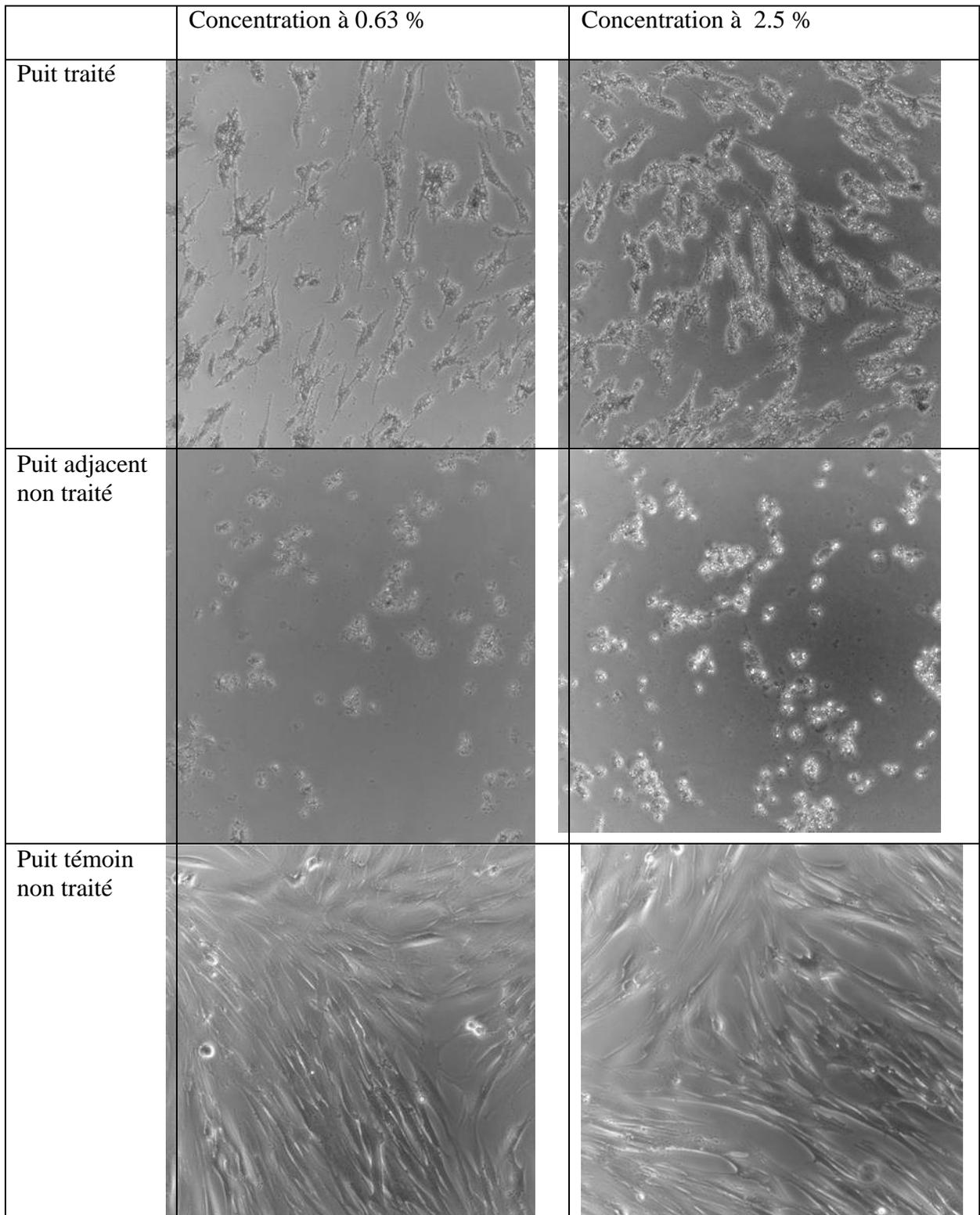
**Figure G.** Cellules MRC5 après 24 heures de traitement par l'huile essentielle *Cymbopogon citratus* et observées au microscope (objectif x10).

	Concentration HE 2.5 %
Puit traité	
Puit adjacent non traité	
Puit témoin non traité	

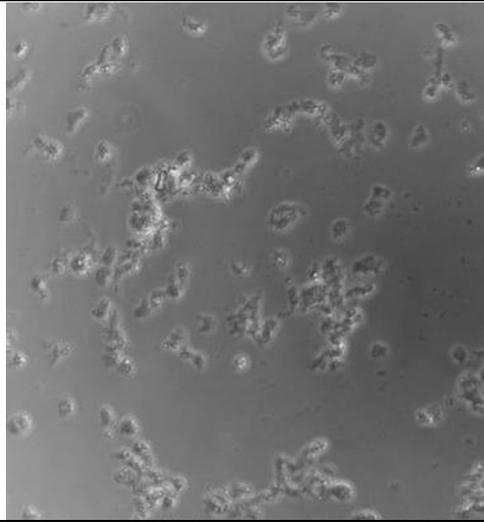
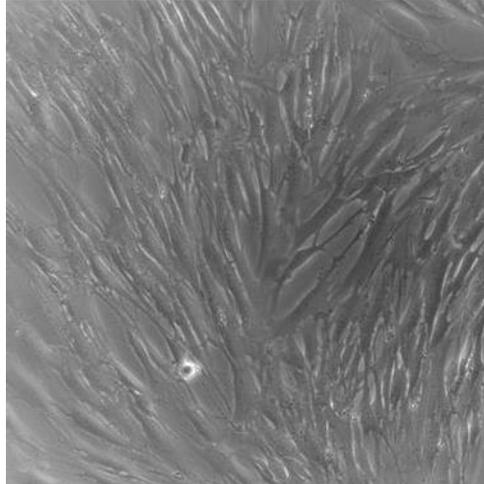
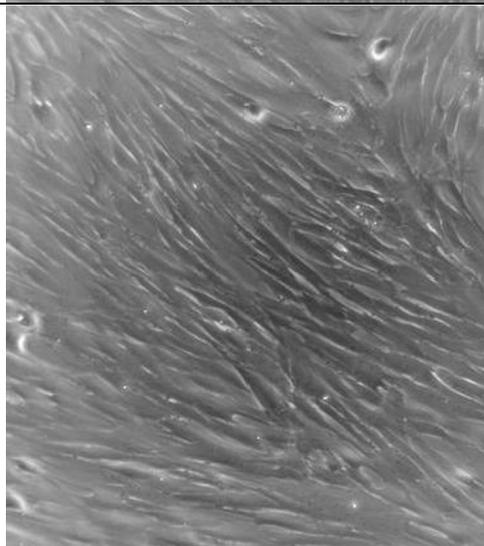
**Figure H.** Cellules MRC5 après 24 heures de traitement par l'huile essentielle *Cymbopogon nardus* et observées au microscope (objectif x10).



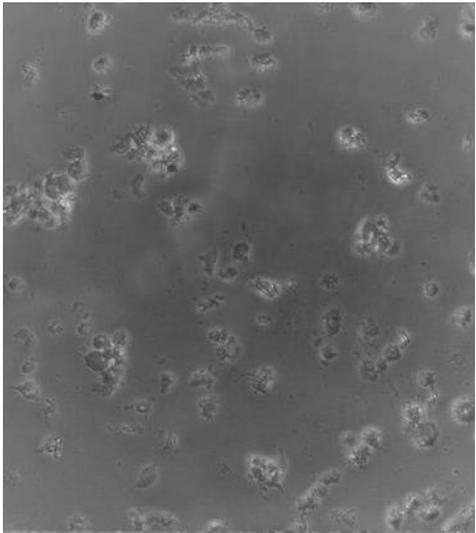
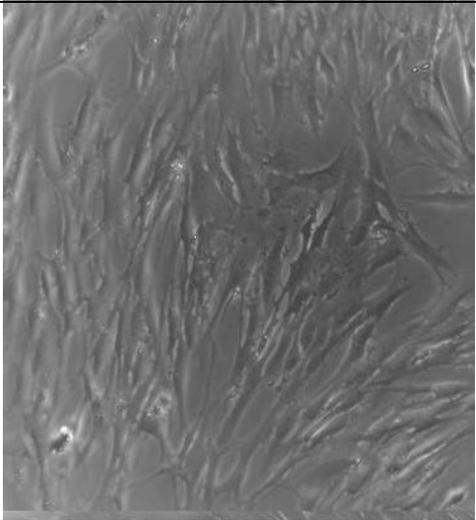
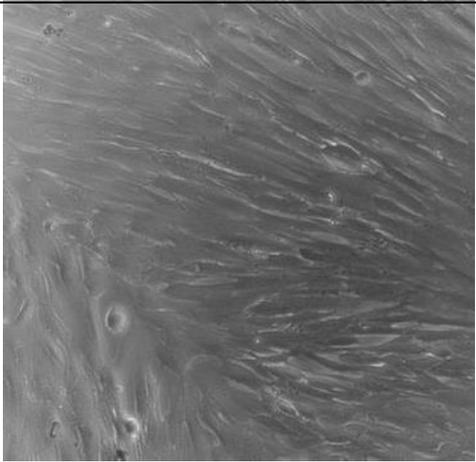
**Figure I.** Cellules MRC5 après 24 heures de traitement par l'huile essentielle *Cymbopogon Winterianus* et observées au microscope (objectif x10).



**Figure J.** Cellules MRC5 après 24 heures de traitement par Géraniol et observées au microscope (objectif x10).

	Concentration HE 5 %
Puit traité	
Puit adjacent non traité	
Puit témoin non traité	

**Figure K.** Cellules MRC5 après 24 heures de traitement par  $\alpha$ -R-Limonène (L-) et observées au microscope (objectif x10).

	Concentration HE 5 %
Puit traité	
Puit adjacent non traité	
Puit témoin non traité	

**Figure L.** Cellules MRC5 après 24 heures de traitement par +R-Limonène (L+) et observées au microscope (objectif x10).

# Publications

## Articles

- 1- **A.Elmi**, R. Spina, F. Abdoul-Latif, S. Yagi, S. Fontanay, A. Risler, R.E Duval & D. Laurain-Mattar (2018). **Rapid screening for bioactive natural compounds in *Indigofera caerulea* Rox Fruits**. *Industrial crops and products*, 125, 123-130.
- 2- F. Abdoul-Latif, D. Osman, **A. Elmi**, A. Hassan-Abdallah, A. Merito, S. Hassan, Z. Asfaw, E. Kelbessa, **Candidate Medicinal Plant Species Of Djiboutian Pharmacopeia For Testing Pharmacological Activities On Common Microbial Diseases**, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 8, Issue 10, 2016.

(Article hors these)

- 3- F. Abdoul-latif, Somda MK, Fourreh AE, Okieh AA, Said CN, Mérito A and Yagi S., (2017), **Evaluation of Microbiological Quality of Raw Milk from Farmers and Dairy Producers in Six Districts of Djibouti**, *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*, Volume 2 • Issue 3 • 1000124

## Livre

Fatouma Mohamed, Ali Mérito Et Abdirahman Elmi 2018. *Plantes Médicinales De La République De Djibouti Editions Universitaires Europeennes* , Volume 1 Et 188 Pages,

## Communications orales

- 1- **A. Elmi**, S. Rosella, F. Mohamed, D. Laurain-Mattar. **Biological activity and identification of major compounds of fruit of *Indigofera caerulea***, The 17th NAPRECA Symposium on Natural Products, August 13-16, 2017, Addis Ababa, Ethiopia.
- 2- **A. Elmi**, S. Rosella, F. Mohamed, D. Laurain-Mattar ‘**Sélection de plantes djiboutiennes à effets antimicrobiens - Etude phytochimique d’*Indigofera caerulea* Gouam**’, 2<sup>ème</sup> édition Phytoday 24 Juin 2016 à Nancy.
- 3- **A. Elmi**, S. Rosella, F. Mohamed, A. Mérito, A. Risler, P. Lemièrè & D. Laurain-Mattar ‘**Antibactériel, antioxidant activity and cytotoxicity of *Acacia seyal* Del extracts, fractions and isolated compounds**’, Journée de l’école doctorale SESAMMES Juin 2018 à Nancy

- 4- **A. Elmi**, F. Abdoul-Latif, D. Osman, , A. Hassan-Abdallah, A. Merito, S. Hassan, Z. Asfaw, E. Kelbessa, ‘**Enquête ethnobotanique à Djibouti- Méthodologies de sélection de plantes antimicrobiennes**’, 7<sup>ème</sup> rencontre réseaux MétaSP 12-13 Janvier 2017 à Strasbourg.
  
- 5- **A. Elmi**, A. Merito, F. Abdoul-Latif: **Conservation et valorisation des ressources végétales de Djibouti : Cas des plantes médicinales et algues brunes**, Réunion de concertation sur le Protocole de Nagoya 23-25 Aout 2016 à Acacia hotel, Djibouti.

### **Posters/ Flash présentation**

**A.Elmi**, R.Spina, F.Abdoul-Latif, S.Yagi, S.Fontanay, P. Lemiere, A.Risler, R. E. Duval, D. Laurain-Mattar, **Activités biologiques et études phytochimiques de fruits d’*Indigofera caerulea*Rox(Fabaceae)**, 3<sup>ème</sup> symposium AFERP-STOLON, 18-20 juillet 2018, Rennes.

**A.Elmi** , C. Nidar, R. Spina, R.E. Duval, S. Fontanay, F. Mohamed, D. Laurain-Mattar , **Caractérisation de deux flavonoïdes du fruit d’*Indigofera caerulea* et son activité antimicrobienne**’, 5<sup>ème</sup> rencontre réseaux MétaSP 21-22 Janvier 2016 à Nancy.

**A. Elmi** , A. Hassan-Abdallah , A.Merito, S. Hassan , D.Aboubaker , M.Djama , Z. Asfaw , E. Kelbessa: ‘**Medicinal plants and their uses by the people in the Region of Randa, Djibouti**’, Resilience, Research and Innovation summit 26-27 October 2015, Djibouti.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops &amp; Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)

## Rapid screening for bioactive natural compounds in *Indigofera caerulea* Rox fruits

Abdirahman Elmi<sup>a,b</sup>, Rosella Spina<sup>a</sup>, Fatouma Abdoul-Latif<sup>b</sup>, Sakina Yagi<sup>c</sup>, Stéphane Fontanay<sup>d</sup>, Arnaud Risler<sup>d</sup>, Raphaël E. Duval<sup>a,d</sup>, Dominique Laurain-Mattar<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Lorraine, CNRS, L2CM, F-54000 Nancy, France

<sup>b</sup> Institut de Recherches Médicinales, IRM-CERD, route de l'aéroport, Djibouti

<sup>c</sup> Botany Department, Faculty of Science, University of Khartoum, P.O. Box 321, Khartoum, Sudan

<sup>d</sup> ABC Platform<sup>†</sup>, Faculté de Pharmacie, F-54001, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Indigofera caerulea*  
Antibacterial activity  
DPPH radical scavenging  
ABTS  
FRAP  
Bioactive compounds  
HTPLC-MS

### ABSTRACT

Leaves and fruits of *Indigofera caerulea*, an endemic plant from Djibouti, are used in the traditional medicine to treat infectious diseases. However, there are no documented scientific reports on phytochemistry and antimicrobial properties of the fruit of this species. For the first time, the chemical compounds and the evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of *Indigofera caerulea* Rox fruits were investigated. The hexane and methanolic extracts showed a significant activity against both *Staphylococcus aureus* with a Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of 256 and 128 µg/mL, respectively, and *Enterococcus faecalis* with a MIC of 128 µg/mL for the two extracts. The methanolic and acetone extracts showed effective free radical scavenging activities in 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assays, while only the methanolic extract revealed the best ferric-reducing/antioxidant power (FRAP). The highest amount of both total polyphenolic content and total flavonoid content were detected in the methanolic extract (818.14 mg gallic acid equivalents (GAE)/g and 102.10 mg quercetin equivalents (QE)/g, respectively). About the phytochemistry of this extract, two phenolic compounds and three flavonoids were identified rapidly by HPTLC-MS, confirmed by NMR and quantified. Also, chlorogenic acid, caffeic acid and benzoic acid were identified by HPLC. Methyl gallate, the major compound isolated from the methanolic extract, showed antibacterial activity against *S. aureus* (MIC: 64 µg/mL). Twelve compounds were identified in hexane extract where fatty acids comprised 95.1% and steroids 3.5%. Thus, *I. caerulea* fruits could serve as a bio-based material for antioxidants and antibacterial compounds.

### 1. Introduction

Infectious diseases have long been recognized as one of the most important health problems in developing countries and remain an important clinical problem even in developed countries. Additionally, antibiotic resistance has become a public health threat of increasing magnitude worldwide (Wellington et al., 2013). The World Health Organization (WHO) presented a list of Critically Important Antimicrobials (CIA) for human medicine and published a global action plan to tackle this problem (WHO, 2015).

In Djibouti, poorly developed prevention system and resistance to drugs are the two main factors aggravating microbial infections. This is related to the high prevalence of infectious diseases, probably caused by poverty and the general unhygienic conditions (Abdoul-Latif et al.,

2016). Communities in different regions of Djibouti use traditional medicine for the treatment of various infectious diseases. For example, ethnobotanical study focusing on the medicinal plants used in Randa region showed that 18 plant species, including *Indigofera caerulea*, were reported for the treatment of common microbial diseases (Abdoul-Latif et al., 2016).

*Indigofera* is the third largest genus in Fabaceae, with 75% of the species restricted to Africa (Schrire, 2013). *Indigofera caerulea* is widely used in Djibouti for treating infection of wounds, tuberculosis and diphtheria (Hassan-Abdallah et al., 2013). This plant is also used in Somali region as antimalarial plant, the leaves are pounded, boiled and drunk (Mesfin et al., 2012). Pharmacological and phytochemical studies on the genus *Indigofera* are generally carried out on leaves (Dahot, 1999; Esimone et al., 1999; Kumar et al., 2012; Palani et al., 2009).

\* Corresponding author at: Université de Lorraine, CNRS, L2CM, BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

E-mail address: [dominique.mattar@univ-lorraine.fr](mailto:dominique.mattar@univ-lorraine.fr) (D. Laurain-Mattar).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.089>

Received 24 April 2018; Received in revised form 27 August 2018; Accepted 31 August 2018  
0926-6690/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Although the fruits of *Indigofera caerulea* are used in traditional medicine (Burkill, 1994; Hassan-Abdallah et al., 2013) there is no documented scientific reports on phytochemistry and anti-microbial properties of the fruit of this species.

The search for bioactive compounds with antioxidant activity has increased recently as they play an important therapeutic role in human disease (Gelain et al., 2012) and in the industrial application (Schrire, 2013). In addition, knowledge of the chemical constituents of plants is desirable not only for the discovery of therapeutic agents, but also because such information may be important in identifying new sources of substances of economic value such as precursors for the synthesis of complex chemical substances. This study was therefore undertaken to evaluate the antimicrobial and antioxidant properties of fruit extracts of *I. caerulea* and to determine their phytochemical constituents.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant collection

Fruits of *I. caerulea* were collected in 2015 from Dikhil region, South-West of Djibouti. The plant was identified by the Prof. Maha Kordofani, Department of Botany, Faculty of Sciences, from the University of Khartoum (Sudan). A voucher specimen n° 176/HND/2015 was deposited in the National Herbarium of Djibouti.

### 2.2. Chemicals

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), vitamin C, Trolox, iron (II) sulfate (FeSO<sub>4</sub>), iron (III) chloride (FeCl<sub>3</sub>), Folin-Ciocalteu reagent (FC reagent), hydrochloric acid (HCl), sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), trichloroacetic acid (TCA), dimethyl sulfoxide (DMSO), potassium persulfate, sodium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide (NaOH), CD<sub>3</sub>OD, gallic acid, chlorogenic acid, benzoic acid, methyl gallate, rutin, isoquercetin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin were purchased from Sigma Aldrich or Acros organics (part of Thermo Fischer).

### 2.3. Microorganisms

For antibacterial assay, the following bacteria have been used: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Yagi et al., 2012), *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922. All bacterial strains were grown on media as reported by Fontanay et al. (2008).

For antifungal assay, the following fungi have been used: *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16888 and *Aspergillus fumigatus* ATCC 1022. All fungal strains were grown on media as reported by Tittikpina et al. (2017).

Microbial strains susceptibility testing was performed during the time course experiments, using appropriate clinical reference agents (i.e. antibiotics and antifungals). All microbial strains were kindly provided by the ABC Platform<sup>®</sup> Bugs Bank.

### 2.4. Plant extracts

Four types of extracts (n-hexane, acetone, methanol and water) were prepared. Fruits were dried and dried material was ground to a fine powder and stored at ambient temperature prior to extraction. Hexane extract was prepared by simple maceration of 100 g of powdered fruits in n-hexane (1 L × 2) maintained at ambient temperature for 24 h. The extract was filtered on filter paper and the macerate then extracted successively with acetone (1 L × 2), methanol (1 L × 2) and water (1 L × 2). The various organic extracts were evaporated under reduced pressure to yield 1.2 g, 0.48 g, 4.42 g residues respectively. The

water extract was lyophilized (3.1 g). All extracts were stored at –20 °C prior to analysis.

### 2.5. Antimicrobial activity

#### 2.5.1. Antibacterial assay

To evaluate the antibacterial activities of hexane, acetone, methanolic and water extracts of *I. caerulea* fruits and of methyl gallate (compound 2), the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined using the broth dilution method and following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). The procedure is described by Fontanay et al. (2008). Suspensions were prepared by suspending one isolated colony from Mueller Hinton plates in 5 mL of Mueller Hinton Broth. After 24 h of growth, suspensions were diluted in distilled water to obtain a final inoculum of  $5 \times 10^5$ – $5 \times 10^6$  CFU/mL. An equal volume of bacterial inoculum was added to each well on the microtiter plate containing 0.05 mL of the serial extract/compound dilutions.

#### 2.5.2. Antifungal assay

Antifungal activity of hexane, acetone, methanolic and water extracts of *I. caerulea* fruits was realized against *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*, using the broth dilution method to determine the MIC (Tittikpina et al., 2017). A suspension of spores containing a number of spores belonging to the range 1– $5.10^5$  spores/mL was prepared. An equal volume of fungal inoculum was added to each well on the microtiter plate containing 0.05 mL of the serial extract dilutions.

### 2.6. Determination of antioxidant activities

DPPH free radical-scavenging, ABTS, and FRAP were used to evaluate the antioxidant activity. DPPH assay was determined according to the technique previously described by Huang et al. (2010) and Yagi et al. (2013). The coefficients of determination are  $r^2 = 0.962$  for methanolic extract; 0.934 for acetone extract; 0.911 for vitamin C and 0.946 for Trolox. The ability of the extract to scavenge ABTS radical was determined according to a published method (Huang et al., 2011; Yagi et al., 2013). The coefficients of determination are  $r^2 = 0.944$  for methanol; 0.944 for acetone; 0.801 for vitamin C and 0.939 for Trolox. The FRAP assay was carried out according to the procedure of Benzie and Strain (1996). The standard curve was constructed using vitamin C solution (0.065–33.3 µg/mL) and the results were expressed as µmol EVC/g dry weight of plant material. All the measurements were taken in triplicate and the mean values were calculated.

### 2.7. Determination of total polyphenol content

The total polyphenol content (TPC) of all extracts was evaluated using the method reported by Butsat and Siriamornpun (2010). The results of TPC were estimated using a standard curve prepared using gallic acid and expressed as meq GAE/100 g dry matter.

### 2.8. Determination of total flavonoids

The total flavonoid content in all plant extracts was determined using the Dowd method (1959) as adapted by Arvouet-Grand et al. (1994). The reference standard is quercetin and the results were expressed as meq QE/100 g dry matter.

### 2.9. HPTLC-Mass spectrometry

HPTLC plates silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), 20 × 10 cm, were pre-washed by developing in methanol followed by drying on the TLC Plate Heater at 100 °C for 15 min. Twenty µL of fruit methanolic extract (10 mg/mL) were sprayed with LINOMAT 5 (CAMAG<sup>®</sup>). The mobile

**Table 1**  
Antibacterial and antifungal activities of four extracts of *Indigofera caerulea* fruits and compound 2 (methyl gallate).

Extracts	Bacterial strains							Fungal strains		
	A.b	E.c	E.cl	K.p	P.a	E.f	S.a	C.a	A.n	A.f
Hexane	256	> 256	> 256	> 256	> 256	128	256	> 256	> 256	> 256
Acetone	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Methanol	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	128	128	> 256	> 256	> 256
Water	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
MG (compound 2)	ND	ND	ND	ND	ND	> 256	64	ND	ND	ND

MICs values (concentration that inhibits 100% of bacterial growth) are representative of three independent determinations and are expressed as  $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 3$ ). MG: Methyl gallate, A.b: *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, E.c: *Escherichia coli* ATCC 25922, E.cl: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, K.p: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, E.f: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, S.a: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, C.a: *Candida albicans* ATCC 10231, A.n: *Aspergillus niger* ATCC 16888 and A.f: *Aspergillus fumigatus* ATCC 1022. ND: not determined.

phase contained: ethyl acetate – methanol – water 100:13.5:10 v/v/v. Elution of the target zone was performed with methanol using the TLC-MS Interface (CAMAG<sup>®</sup>) and analyzed on-line with a Bruker Daltonics micrOTOF-Q<sup>™</sup> mass spectrometer in ESI positive and negative mode.

### 2.10. HPLC analysis

The analysis of the methanolic extract was performed using an RP-HPLC system. This system consisted of a Lachrom pump type 7100, an injector with a 30- $\mu\text{L}$  loop, and a diode array detector, type Merck Hitachi Lachrom 7450 piloted by D-7000 HSM (Merck) software. The column used was a C18 ODS HYPERSIL 5  $\mu\text{m}$  250  $\times$  4.6 MM column.

The mobile phase was a mixture of A: water + 2% formic acid and B: methanol + 2% formic acid, with the percentage of B ramped from 0% to 100% in 20 min, 20–25 min on 100% B and then changed back to 0% at 25 min for 5 min and finally rest at 0% B for 5 min.

The flow rate was 1 mL/min and injection volume was 20  $\mu\text{L}$  for methanol extract (1 mg/mL) and 5  $\mu\text{L}$  for standards (1 mg/mL). UV–vis absorption spectra were recorded from 200 to 400 nm during the HPLC analysis. Chlorogenic acid, gallic acid, benzoic acid, caffeic acid, methyl gallate, rutin, isoquercetin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin were used as external standards. Compounds present in the methanolic extract were identified by comparing chromatographic peak with the retention time of individual standards.

### 2.11. Isolation and characterization of pure compounds in methanolic extract

The methanolic extract (2.0 g) was subjected to column chromatography on Combiflash R<sub>f</sub> TELEDYNE Isco. Using RediSep R<sub>f</sub> TELEDYNE column with pre packed cartridges and using ethyl acetate:methanol gradient mixtures. A total of four fractions (A–D) were collected. Fractions B (97.2 mg) and C (59.6 mg) were subjected to repeated flash chromatography using gradient mixtures of acetonitrile: water for fraction B and ethyl acetate:methanol for fraction C to obtain respectively three fractions B1–B3 and C1–C3. Fractions B2 (29.3 mg) and C2 (24.09 mg) were subjected separately to preparative chromatography Gilson equipped pump 321 and using C18 ODS HYPERSIL 5UM 250  $\times$  21.2 MM column with gradient mixtures of methanol with 2% formic acid and water to obtain compounds 1 (11.2 mg) and 3 (0.6 mg) from B2 and 2 (11.6 mg), 4 (0.7 mg) and 5 (1 mg) from C2.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer (40,013 MHz and 10,061 MHz respectively), Bruker BBFO Probe. The coupling constant (*J*) is expressed in Hz.

### 2.12. GC–MS identification

Analyses of the hexane extract were performed using QP2010-Shimadzu equipment operating in the EI mode at 70 eV. An SLB5 column DB-5 ms (30 m, 0.25 mm film thickness) was employed with a

36 min temperature program of 60–320 at 10 °C/min followed by a 10 min hold at 320 °C. The injector temperature was 250 °C, the flow rate of the carrier gas (helium) was 1 mL/min, and the split ratio was 1:50. The interval of the scan *m/z* was between 35 and 900 and the identification of the compounds is based on an individual spectrum comparison of each compound in the Shimadzu NIST08 data.

## 3. Results and discussion

Before the identification and the isolation of single compounds from *I. caerulea* fruits, bioactivities of crude extracts (hexane, acetone, methanolic and water) were determined using antimicrobial and antioxidant activities and total polyphenol content.

### 3.1. Biological activities of crude extracts

#### 3.1.1. Antimicrobial activity

The results of the antibacterial and antifungal screenings (MIC values) for hexane, acetone, methanolic and water extracts of *I. caerulea* fruits are presented in Table 1. Only the hexane and methanolic extracts showed a significant activity against *S. aureus* with MIC values of 256 and 128  $\mu\text{g/mL}$  respectively and against *E. faecalis* with MIC value of 128  $\mu\text{g/mL}$  for both extracts. Interestingly, the hexane extract showed a significant activity against the Gram-negative bacteria *A. baumannii* (256  $\mu\text{g/mL}$ ). The water and acetone extracts were devoid of any antibacterial activity against all bacterial strains tested. In addition, all fruit extracts were devoid of fungal activity against all fungal strains tested. Several studies have shown that the water extract of various species of *Indigofera* were devoid of antibacterial activities (Esimone et al., 1999; Kahiya and Zimudzi, 2015; Poondi, 2011; Uddin et al., 2011). The water extract of *I. caerulea* fruits is commonly used in Djibouti ethnomedicine for the treatment of various infectious diseases (Hassan-Abdallah et al., 2013). Result of water extract in this study does not mean that it is not effective in traditional medicine because this procedure of extraction is different to the traditional preparation. In fact, herbalists generally use higher concentration of herbal drugs and decoction process as a classic method of extraction which could be effective to release active ingredients (Liu et al., 2017).

#### 3.1.2. Antioxidant activity

Hexane, acetone, methanolic and water extracts from *I. caerulea* fruit were investigated to determine their in vitro antioxidant activity using the DPPH, ABTS and FRAP assays and results are presented in Table 2. In the DPPH test, the methanolic extract showed the highest scavenging activity with an IC<sub>50</sub> value of 97  $\pm$  2.2  $\mu\text{g/mL}$  followed by the acetone extract (IC<sub>50</sub> value of 150  $\pm$  3.4  $\mu\text{g/mL}$ ). The scavenging activity of extracts to ABTS radical revealed that the acetone extract displayed the highest scavenging activity with an IC<sub>50</sub> value of 20  $\pm$  1  $\mu\text{g/mL}$  followed by the methanolic extract (IC<sub>50</sub> value of 25  $\pm$  1.3  $\mu\text{g/mL}$ ). The methanolic extract revealed the best FRAP

**Table 2**  
Antioxidant activity of extracts from *Indigofera caerulea* fruits.

Samples	Antioxidant activity		
	IC <sub>50</sub> (µg/mL) DPPH	ABTS	(µM EVC/ g DW) FRAP
Hexane	> 1000	> 1000	ND
Acetone	150 ± 3.4	20 ± 1	3.97 ± 3.6
Methanol	97 ± 2.2	25 ± 1.3	27.83 ± 3.1
Water	958 ± 5.3	> 1000	1.33 ± 1.1
Vitamin C	70 ± 7	70 ± 1.5	–
Trolox	110 ± 2.5	18 ± 3.3	–

ND: not determined. Values are representative of three independent determinations. DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), FRAP: ferric-reducing/antioxidant power.

capacity (27.83 ± 3.1) while the acetone extract showed weak activity (3.97 ± 3.6). The water and hexane extracts showed weak or no antioxidant activity in the three assays. Moreover, the ABTS radicals scavenging ability of methanolic and acetone extracts was considerably higher than that of vitamin C, in addition, the acetone extract displayed ABTS radicals scavenging activity closer to that of the control Trolox. It is known that the ABTS and the DPPH radicals show several important differences in their response to antioxidants in relation with the interferences, at different wavelengths, caused by plant-derived materials (Amao, 2000). Previous study which was carried out only on the leaf showed that the methanolic extract had notable radical scavenging activities (Ponmari et al., 2012).

### 3.1.3. Total polyphenol and total flavonoid contents

The total polyphenolic content of hexane, acetone, methanolic and water extracts of *I. caerulea* fruit was determined. The highest amount was detected in the methanolic (818.14 mg GAE/ 100 g dry matter) and acetone (15.58 mg GAE/100 g dry matter) extracts respectively while the water and hexane extracts showed small or undetectable amount (Table 3). Results of total flavonoid content of the four extracts also revealed that the methanolic extract (102.10 mg QE/100 g dry matter) have the highest level of flavonoid content while the acetone extract (3.84 mg QE/100 g dry matter) displayed low flavonoid content and it was not detected in both the hexane and aqueous extracts (Table 3). Comparing these results with previous studies, it was clear that the fruit contained higher phenolic content than the leaf of this species (Ponmari et al., 2012) and other *Indigofera* sp. like *I. tinctoria* (Anusuya and Manian, 2013) and *I. cassioides* (Kumar et al., 2012).

## 3.2. Identification of natural compounds

### 3.2.1. Rapid screening for chemical constituents in methanolic extract

Based on the antibacterial and antioxidant activities as well as its high total phenolic and flavonoid contents, the rapid phytochemical screening of the methanolic extract was performed by on line coupling between thin-layer chromatography and mass spectrometry (HPTLC-MS). The rapid separation of five compounds (a–e) was obtained on HPTLC silica gel 60 F<sub>254</sub> (Fig. 1). The exact monoisotopic mass of the

sodium adduct of the molecules a–c were determined with  $m/z$  487.0877 [M+Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  617.1520 [M+Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  633.1469 [M+Na]<sup>+</sup>, respectively, leading to a molecular formula of C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>NaO<sub>12</sub>, C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>NaO<sub>15</sub>, C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>NaO<sub>16</sub>. These already known natural compounds are isoquercetin (a), kaempferol 3-O-rutinoside (b) and rutin (c). Also the exact monoisotopic mass of the molecules d and e were determined with  $m/z$  183.6320 [M–H]<sup>–</sup>, 170.0147 [M–H]<sup>–</sup>, respectively, leading to a molecular formula of C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub> corresponding to methyl gallate and C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub> corresponding to gallic acid.

In addition, the methanolic extract was subjected to RP-HPLC. Seven compounds were identified by comparison of the retention time with authentic standard compounds as chlorogenic acid (CG), gallic acid (GA), methyl gallate (MG), caffeic acid (CF), benzoic acid (BA), isoquercetin (IQ) and rutin (RU) (Fig. 2). Furthermore, the methanolic extract was subjected to column chromatography and the five compounds identified by HPTLC-MS were isolated. Their structures were determined by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry as following:

(1) **Gallic acid** was obtained as white-grey solid (11.2 mg); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) 7.05 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) 170.8 (C-1), 146.5 (C-4, C-6), 139.6 (C-5), 122.4 (C-2), 110.5 (C-3, C-7); HRESIMS (negative mode)  $m/z$  169.0125 [M–H]<sup>–</sup> (calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, 169.0142).

(2) **Methyl gallate** was obtained as white-grey powder (11.6 mg). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) 6.96 (s, 2H, H-2, H-6), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) 169.2 (C-1), 146.6 (C-4, C-6), 139.9 (C-5), 121.6 (C-2), 110.1 (C-3, C-7), 52.4 (OCH<sub>3</sub>); HRESIMS (negative mode)  $m/z$  183.0294 [M–H]<sup>–</sup> (calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>, 183.0288).

(3) **Kaempferol 3-O-rutinoside** was obtained as yellow powder (0.6 mg). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) 8.07 (d,  $J$  = 8.8, 2H, H-2', H-6'), 6.89 (d,  $J$  = 9.0, 2H, H-3', H-5'), 6.42 (d,  $J$  = 2.1, 1H, H-8), 6.22 (d,  $J$  = 2.1, 1H, H-6), 5.14 (d,  $J$  = 7.4, 1H, Glu H-1), 4.52 (d,  $J$  = 1.6, 1H, Rha H-1), 3.81 (dd,  $J$  = 11, 1.3, 1H, Glu H-6a), 3.63 (dd,  $J$  = 3.4, 1.7, 1H, Rha H-2), 3.52 (dd,  $J$  = 9.2, 3.4, 1H, Rha H-3), 3.49–3.46 (m, Rha H-5), 3.45–3.42 (m, 1H, Glu H-2) 3.42–3.40 (m, Glu H-3), 3.38–3.36 (m, 1H, Glu H-6b), 3.35–3.33 (m, 1H, Glu H-5) 3.28–3.26 (m, Rha H-4), 3.25–3.23 (m, Glu H-4) 1.12 (d,  $J$  = 6.2, 3H); HRESIMS (positive mode)  $m/z$  617.1520 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>NaO<sub>15</sub>, 617.1482).

(4) **Isoquercetin** was obtained as yellow powder (0.7 mg); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) 7.71 (d,  $J$  = 2.2, 1H, H-2'), 7.59 (dd,  $J$  = 8.5, 2.2, 1H, H-6'), 6.87 (d,  $J$  = 8.5, 1H, H-5'), 6.40 (d,  $J$  = 2.2, 1H, H-8), 6.21 (d,  $J$  = 2.2, 1H, H-6), 5.26 (d,  $J$  = 7.4, 1H, Glu H-1), 3.71 (dd,  $J$  = 12.0, 2.5, 1H, Glu H-6a), 3.57 (dd,  $J$  = 5.5, 12.0, 1H, Glu H-6b), 3.48–3.44 (m, 1H, Glu H-2), 3.42 (t,  $J$  = 8.7, 1H, Glu H-3), 3.37–3.35 (m, 1H, Glu H-4), 3.24–3.21 (m, 1H, Glu H-5),

HRESIMS (positive mode)  $m/z$  487.0878 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>NaO<sub>12</sub>, 487.0847).

(5) **Rutin** was obtained as yellow powder (1 mg), HRESIMS (positive mode)  $m/z$  633.1469 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>NaO<sub>16</sub>, 633.1432). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra were compared in literature and confirmed as rutin (Forino et al., 2016).

Then the concentration of these compounds in the fruit extracts was

**Table 3**  
Phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of *Indigofera caerulea* fruit acetone and methanolic extracts.

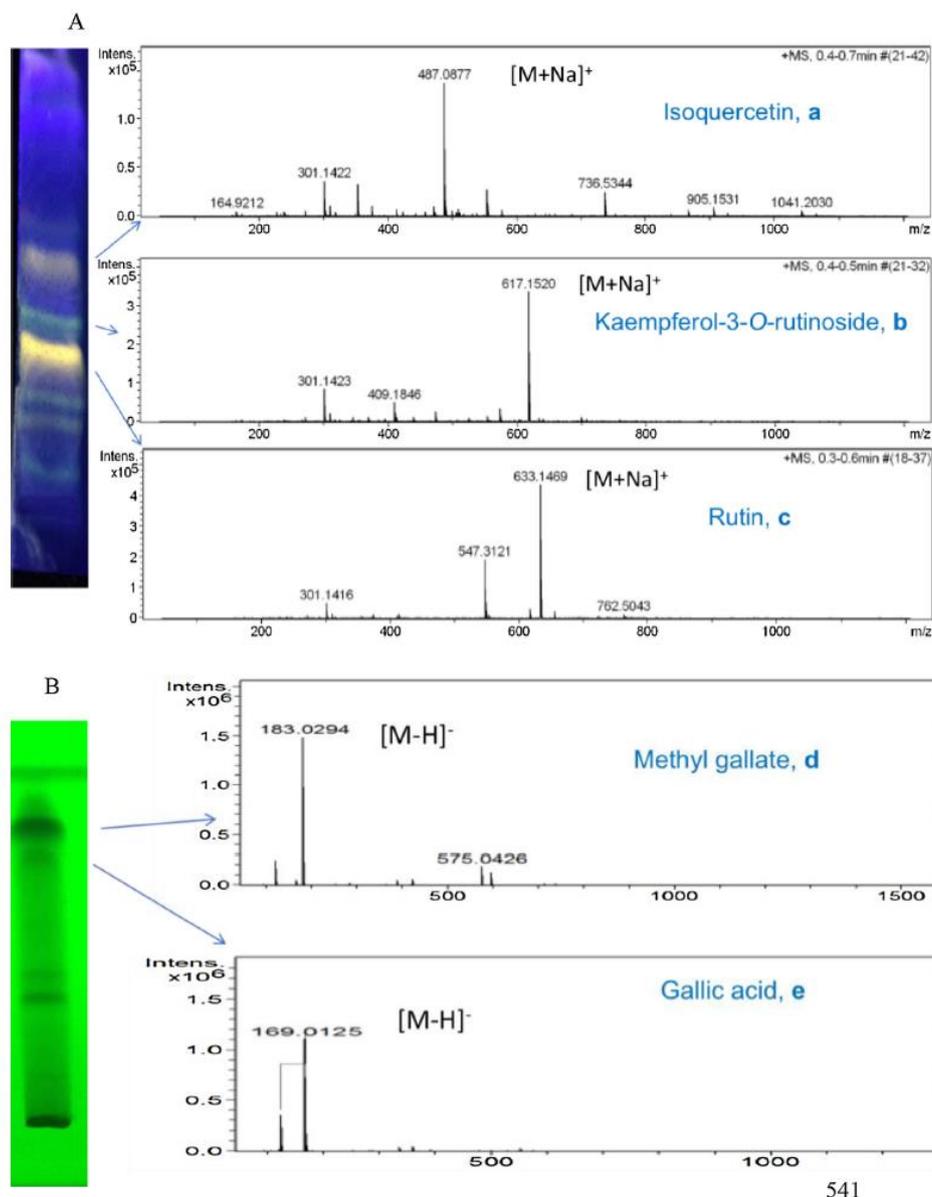
Phenolics	Hexane extract	Acetone extract	Methanolic extract	Water extract
Total polyphenols <sup>a</sup>	ND	15.58 ± 3.0	818.14 ± 3.1	3.3 ± 1.7
Total flavonoids <sup>b</sup>	ND	3.84 ± 1.4	102.10 ± 2.3	ND

(n = 3).

ND: not determined.

<sup>a</sup> Expressed as mg gallic acid/100 g of extract.

<sup>b</sup> Expressed as mg quercetin/100 g of extract.



**Fig. 1.** HPTLC fingerprints of the methanolic extract of *I. caerulea* fruits under UV 365 nm and Neu reagent (A) and under UV 365 nm only (B). Elution of the target zones by the TLC-MS Interface and following HRESIMS analysis: mass spectra of isoquercetin (a,  $m/z$  487.0877, [M+Na]<sup>+</sup>), kaempferol-3-O-rutinoside (b,  $m/z$  617.1520, [M+Na]<sup>+</sup>), rutin (c,  $m/z$  633.1469, [M+Na]<sup>+</sup>), methyl gallate (d,  $m/z$  183.0294, [M-H]<sup>-</sup>) and gallic acid (e,  $m/z$  169.0125, [M-H]<sup>-</sup>).

determined as gallic acid, **1** ( $2.2 \times 10^{-2}\%$ ); methyl gallate, **2** ( $2.4 \times 10^{-2}\%$ ); kaempferol-3-rutinoside, **3** ( $1.2 \times 10^{-3}\%$ ); isoquercetin, **4** ( $1.4 \times 10^{-3}\%$ ) and rutin, **5** ( $2 \times 10^{-3}\%$ ) (Fig. 3). The content of two phenolic compounds (1-2) are higher than those of three flavonoids (3-5) and could be related to a total phenolic content eight times higher compared with the total flavonoids content (Table 3). From these results it could be suggested that the antioxidant activity of the fruits of *I. caerulea* could be attributed in part to their gallic acid, methyl gallate, rutin, quercetin and isoquercetin content, which were

known to possess strong antioxidant capacity (Latté and Kolodziej, 2004; Yen et al., 2002).

Moreover, it is well known in the literature that flavonoids could be responsible for the antibacterial activity (Xie et al., 2015). Methyl gallate which was the major compound isolated from the methanolic extract was found to possess antibacterial activity against *S. aureus* with MIC 64  $\mu\text{g/mL}$  (Table 1). Thus, it could be suggested that methyl gallate in addition to rutin and isoquercetin which were also reported to exert antibacterial activity (Wang et al., 2013), could be totally or partially

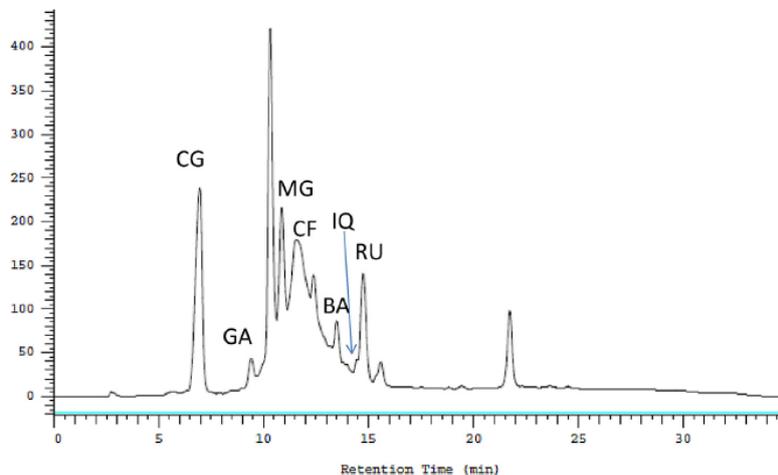


Fig. 2. Chromatogram of methanolic extract; chlorogenic acid (CG), gallic acid (GA), methyl gallate (MG), caffeic acid (CF), benzoic acid (BA), isoquercetin (IQ) and rutin (RU).

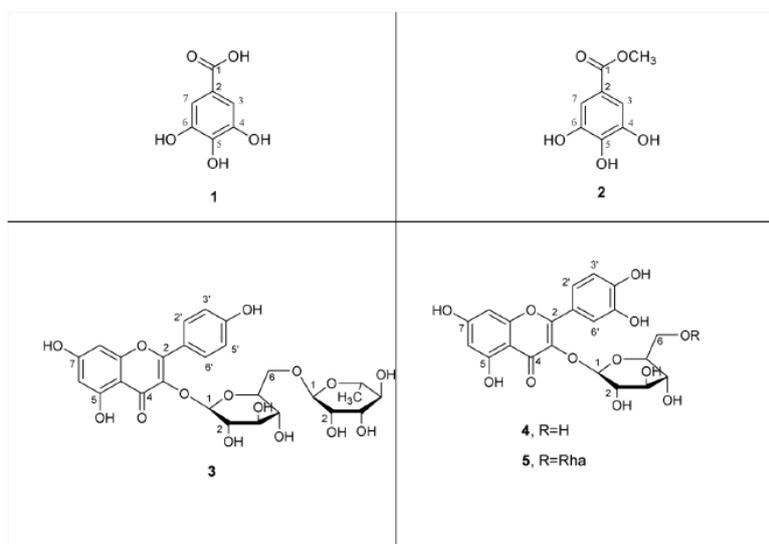


Fig. 3. Chemical structures of compounds isolated from *Indigofera caerulea* fruits: gallic acid (1), methyl gallate (2), kaempferol-3-O-rutinoside (3), isoquercetin (4) and rutin (5).

responsible for the observed antibacterial activity of *I. caerulea* fruits. It is worth mentioning that this is the first detailed phytochemical study in the fruits of *I. caerulea*. Only leaf methanolic extracts were analyzed and the presence of ferulic acid and quercetin was determined by HPLC analysis (Ponmari et al., 2014).

### 3.2.2. Chemical profile of hexane extract

According to the interesting antibacterial activity of hexane extract against *A. baumannii*, *S. aureus* and *E. faecalis* it was subjected to GC/MS analysis. Twelve compounds were identified where fatty acids comprised 95.1% and steroids 3.5% (Table 4). Long-chain unsaturated fatty acids, such as linoleic acid, palmitoleic acid, oleic acid, linolenic acid and arachidonic acid were found to possess antibacterial activity

(Zheng et al., 2005). These compounds inhibited bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI), an essential component of bacterial fatty acid synthesis.  $\beta$ -sitosterol which was also identified in the hexane extract, was reported to display antimicrobial activity against several Gram-positive bacteria (Sen et al., 2012).

## 4. Conclusion

It is the first time that detailed phytochemical study in the fruits of *I. caerulea* was reported. Phytochemical analysis on fruit extracts of this plant revealed that the fruits are rich in phenolic compounds which could be responsible for the observed antioxidant activity. The isolated methyl gallate was proven to show antibacterial activity against *S.*

resistance/publications/global-action-plan/en/.  
Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., Ren, L., 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Curr. Med. Chem.* 22, 132–149.  
Yagi, S., Chrétien, F., Duval, R.E., Fontanay, S., Maldini, M., Piacente, S., Henry, M., Chapleur, Y., Laurain-Mattar, D., 2012. Antibacterial activity, cytotoxicity and chemical constituents of *Hydnora johannis* roots. *S. Afr. J. Bot.* 78, 228–234.  
Yagi, S., Drouart, N., Bourgaud, F., Henry, M., Chapleur, Y., Laurain-Mattar, D., 2013.

Antioxydant and antiglycation properties of *Hydnora johannis* roots. *S. Afr. J. Bot.* 84, 124–127.  
Yen, G.-C., Duh, P.-D., Tsai, H.-L., 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* 79, 307–313.  
Zheng, C.J., Yoo, J.-S., Lee, T.-G., Cho, H.-Y., Kim, Y.-H., Kim, W.-G., 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 579, 5157–5162.



Fatouma Mohamed Abdoul-latif  
Ali Merito Ali  
Abdirahman Elmi Fourreh

## Plantes médicinales de la République de Djibouti

Abdirahman Elmi<sup>1,2</sup>, Rosella Spina<sup>1</sup>, Fatouma Abdoul-Latif<sup>2</sup>, Sakina Yagi<sup>3</sup>, Stéphane Fontanay<sup>1</sup>, Pascal Lemiere<sup>1</sup>, Arnaud Rislér<sup>1</sup>, Raphaël E. Duval<sup>1</sup>, Dominique Laurain-Mattar<sup>1</sup>.  
Mail: [abdirahman.elmi-fourreh@univ-lorraine.fr](mailto:abdirahman.elmi-fourreh@univ-lorraine.fr)

<sup>1</sup>Université de Lorraine, CNRS, L2CM, UMR-7053 F-54000 Nancy, France <sup>2</sup>Institut de Recherches Médicinales, IRM-CERD, route de l'aéroport, Djibouti <sup>3</sup>Botany Department, Faculty of Science, University of Khartoum, P.O. Box 321, Khartoum, Sudan.

## Introduction

*Indigofera caerulea* Rox (Fabaceae) est une plante médicinale utilisée en Afrique de l'Est (A. Hassan-Abdallah *et al.*, 2013). Malgré sa forte popularité en médecine traditionnelle locale, aucune étude phytochimique ni pharmacologique portant sur le fruit de cette plante n'est disponible.

Dans ce travail, nous évaluons les activités antimicrobiennes et antioxydantes de fruits de cette plante et nous caractérisons les composés majeurs des extraits les plus actifs biologiquement.



*Indigofera caerulea* (Plancher N0. 176/IRM) Fruits d'*I. caerulea* séchés

## Matériels & Méthodes

Les fruits d'*Indigofera caerulea* ont été collectés dans la région de Dikhil, Sud-Ouest de Djibouti, en octobre 2013 et séchés sur place.

L'extraction est réalisée avec des solvants successifs de polarité croissante: hexane, acétone (AC), méthanol (ME) et eau.

L'activité antimicrobienne des quatre extraits a été évaluée sur sept bactéries et trois champignons en déterminant une concentration minimale inhibitrice (CMI).

L'activité antioxydante est évaluée selon trois méthodes: DPPH, ABTS et FRAP.

L'identification des composés phénoliques est réalisée à l'aide de la technique de chromatographie sur couche mince haute résolution couplée à la masse (HPTLC-MS) et les données sont confirmées par comparaison des spectres HPLC avec des standards.

L'extrait hexanique est analysé par GC-MS.

## Conclusion

L'extrait méthanolique possède une activité antibactérienne significative et une forte activité antioxydante.

L'étude phytochimique de cet extrait révèle une teneur élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Par ailleurs, ce fruit renferme aussi des acides gras et des stérols (extrait hexanique).

Nous cherchons à isoler et à identifier les composés minoritaires des extraits méthanolique et hexaniques.

## Résultats

### Résultats de l'activité biologique

Tab. 1: Détermination de la CMI des fruits d'*Indigofera caerulea* (collaboration avec S. Fontanay<sup>2</sup> et R.E. Duval<sup>3</sup>)

Pathogènes	Concentration Minimale Inhibitrice CMI (µg/ml.) des extraits			
	Hexane	Acétone	Méthanol	eau
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606	256	>256	>256	>256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>256	>256	>256	>256
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	>256	>256	>256	>256
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	128	>256	128	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	>256	>256	>256	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>256	>256	>256	>256
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	256	>256	128	>256
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>256	>256	>256	>256
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16888	>256	>256	>256	>256
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 1022	>256	>256	>256	>256

Tab. 2: Activité antioxydante selon les méthodes DPPH, ABTS et FRAP -Teneurs en polyphénols totaux (TPC) et en flavonoïdes (TFC) des extraits de fruits d'*Indigofera caerulea*

	DPPH IC50 (µg/mL)	ABTS IC50 (µg/mL)	FRAP µmol Evc/g d'extrait sec	TPC (mg EAG/g d'extrait sec)	TFC (mg EQ/g d'extrait sec)
ME	97±2,2	25±1,3	625±3,1	185,1±3,1	23,1±2,3
AC	150±3,4	20±1	828±3,6	32,46±3,0	8±1,4
Vc*	70±7	70±1,5	-	-	-
Tx*	110±2,5	18±3,3	-	-	-

\* Standards Vc: vitamin C Tx: Trolox

Les extraits méthanolique et hexanique montrent une activité antibactérienne significative à la fois sur *S. aureus* et *E. faecalis* (tab.1).

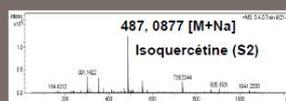
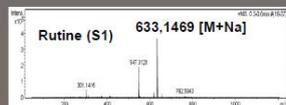
Seul l'extrait hexanique possède une activité contre *A. baumannii*.

Une forte activité antioxydante est observée pour les extraits méthanolique, elle est liée à des teneurs élevées en polyphénols totaux (185 mg EAG/g) et en flavonoïdes (23,1 mg EQ/g).

Une activité antioxydante est observée aussi avec l'extrait à l'acétone. Cependant les teneurs en flavonoïdes (8 mg EQ/g) et en polyphénols totaux (32,46 mg EAG/g) sont moins importantes que dans l'extrait méthanolique. D'autres molécules seraient donc responsables de l'activité antioxydante.

La recherche des composés majeurs a été menée sur les extraits méthanolique et hexanique les plus actifs.

### HPTLC-MS

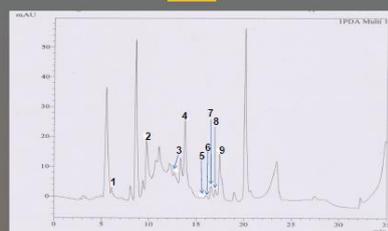


Échantillon: 10 µg d'extrait méthanolique de fruits  
Plaque HPTLC: silica gel 60 F 254  
Système d'éluant: Acétate d'éthyle/Méthanol/eau 100/13,5/10 v/v/v

Méthyl gallate isolé de cet extrait à une CMI= 64 µg/ml contre *S. aureus*.  
Dans la littérature, il a été rapporté que la rutine (F. Albouchi *et al.*, 2013) et l'isoquercétine (L. Wang *et al.*, 2013) possèdent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*.  
Ces poly phénols présents dans l'extrait méthanolique seraient responsables de son activité antibactérienne.

Dans l'extrait hexanique, l'activité antibactérienne peut être liée à sa richesse en composés stéroïdiques et en acides gras (tab. 3). En effet l'acide arachidique et acide palmitique ont une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (C. Ji Zheng *et al.*, 2005).

### HPLC



Chromatogramme HPLC d'un extrait méthanolique, détection à 254nm; acide gallique (1); acide chlorogénique (2); acide benzoïque (3); méthyl gallate (4); rutine (5); isoquercétine (6); quercétine (7); kaempférol (8); isorhamnétine (9).

### GC-MS de l'extrait hexanique

Tab.3: Composés présents dans l'extrait hexanique.

Fig GC n°	Temps de rétention (min)	% total (aire)	Composés identifiés
1	18.15	0.4	Isopentadecanoate, Methyl
2	20.27	12.9	Acide palmitique
3	21.58	1.4	2,2'-(1,10-dioxanediylbis(oxy))bis[isotetrahydro-2H-Pyran]
4	21.91	49.1	Acide linolélaïdique, methyl ester
5	21.98	18	Chlorure d'acide linoléique
6	22.01	1.1	10-Octadécanoic acid, methyl ester
7	22.20	5.1	Stearic acid, methyl ester
8	23.08	2.1	Acide arachidique
9	25.45	0.5	Non identifié
10	25.59	2.8	Acide béhénique, Methyl ester
11	28.36	0.5	Non identifié
12	27.11	2.5	Acide lignocéique
13	30.66	0.7	Cholest-22,24-dien-5-ol
14	31.04	2.8	beta-Sitosterol

## Références

- 1) A. Hassan-Abdallah, A. Mérito, S. Hassan, D. Aoubaker, M. Djama, Z. Asfaw, E. Kelbessaw, *Journal of Ethnopharmacology* 148 (2013) 701-713;
- 2) L. Wang X. Yanga, P. Qina, F. Shanc, G. Rena, *Industrial Crops and Products* 49 (2013) 312-317;
- 3) F. Albouchi, I. Hassen, H. Casabianca, K. Hosni, *South African Journal of Botany* 87 (2013),164-174;
- 4) C. Ji Zheng, J. Yoo, T. Lee, H. Cho, Y. Kim and W. Kim, *FEBS Letters* 579 (2005) 5157-5162.



## Résumé de la thèse

Ce travail a porté sur la bio-analyse de plantes médicinales Djiboutiennes. Ces dernières ont été sélectionnées sur des critères ethnobotaniques appliqués sur les plantes utilisées traditionnellement contre les infections microbiennes. Cette sélection a retenu six plantes qui ont ensuite subi un screening antibactérien et anti oxydant. Les résultats de ce screening ont conduit à étudier trois plantes: *Acacia seyal*, *Indigofera caerulea* et *Cymbopogon commutatus*. La recherche des composés de l'*Acacia seyal* est effectuée au moyen d'un bio-guidage. Deux extraits, aqueux et méthanolique, de l'écorce de cette plante sont évalués pour leur activité antibactérienne. Quatre composés sont isolés et caractérisés (épicatechine, catéchine, catéchine digallique et  $\beta$ -sitostérol) et testés pour leurs activités. Par ailleurs quatre extraits (hexanique, acétonique, méthanolique et aqueux) du fruit d'*Indigofera caerulea* ont été testés pour leurs activités antibactérienne et anti oxydante. Les extraits hexanique et méthanolique sont les plus actifs. Six composés sont isolés de ces extraits (méthyl gallate, acide gallique, rutine, isoquercétine, kaempférol-3- rutinoside et  $\beta$ -sitostérol). Le méthyl gallate inhibe *staphylococcus aureus* avec une CMI de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Enfin l'activité de l'huile essentielle de *Cymbopogon commutatus* est testée sur sept souches bactériennes, deux souches fongiques et onze types de cellules cancéreuses. Sur ces dernières, elle présente une forte cytotoxicité avec des IC50 allant de 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sur PC3 et HCT116 (cellules cancéreuses de la prostate et colorectales) et à 0,67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sur NCI-N87 (cellule cancéreuse gastrique). De façon surprenante, une activité antibactérienne moyenne est observée. L'analyse GCMS de la partie solubilisée dans le milieu de culture a montré que seuls les composés hydrophiles étaient présents. La formulation d'une micro émulsion a été mise au point et les IC50 ont diminué jusqu'à une centaine de fois. Nous avons montré que cette huile essentielle renferme plus de 73,9 % de pipéritone (monoterpène).

En conclusion, ces trois plantes ont montré des activités antimicrobiennes, et les travaux confirment leurs utilisations traditionnelles. En plus, nous avons montré qu'elles possèdent d'autres activités biologiques (anti oxydante et anti cancéreuse). Ces résultats devront contribuer à la mise en place d'une pharmacopée traditionnelle et à des formulations de 'médicaments traditionnels améliorés' (MTA).

**Mots clés :** Plantes médicinales Djiboutiennes, phytochimie, antimicrobiens, anticancéreux.

## Abstract

This research focused on the bio-analysis of Djiboutian medicinal plants. These latter were selected on ethnobotanical criteria applied to the plants traditionally used against microbial infections. This selection retained six plants which were then subjected to a biological screening including antibacterial and anti-oxidant activities. Three plants were finally study: *Acacia seyal*, *Indigofera caerulea* and *Cymbopogon commutatus*.

The search of compound in *Acacia seyal* was carried out by means of bio-guidance. Two extracts, aqueous and methanolic, of the bark of this plant were evaluated for their antibacterial activity. Four compounds were isolated, characterized (epicatechin, catechin, digallic catechin and  $\beta$ -sitosterol) and tested for their activity. Also four extracts (hexanic, acetonic, methanolic and aqueous) of the fruit of *Indigofera caerulea* were tested for their antibacterial and antioxidant activities. The Hexanic and methanolic extracts were the most active. Six compounds were isolated from these extracts (methyl gallate, gallic acid, rutin, isoquercetin, kaempferol-3-rutinoside and  $\beta$ -sitosterol). Methyl gallate inhibited *Staphylococcus aureus* with a MIC of 64  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Finally, the activity of the essential oil of *Cymbopogon commutatus* was evaluated on seven bacterial strains, two fungal strains and eleven types of cancer cells. On the latter, it exhibits a high cytotoxicity with IC50s ranging from 0.05  $\mu\text{g} / \text{mL}$  on PC3 and HCT116 (prostate and colorectal cancer cells) to 0.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on NCI-N87 (gastric cancer cell). Surprisingly, an antibacterial activity not so high was observed. GCMS analysis of the solubilized part in the culture medium showed that only the hydrophilic compounds were present. The formulation of a microemulsion was performed and the IC50 decreased to a hundred times. We have found that this essential oil contained more than 73.9 % piperitone (monoterpene).

In conclusion, these three plants showed antimicrobial activities and the work confirms their traditional uses. In addition, we have shown that they have other biological activities (anti-oxidant and anti-cancer). These results should contribute to the establishment of a traditional pharmacopoeia and formulations of 'improved traditional medicines' (MTAs).

**Keywords:** Djiboutian medicinal plants, phytochemistry, antimicrobials, anticancer.