



UNIVERSITE DE STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques – ED 222



UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, de la Santé et de
l'Environnement

THÈSE en Convention de Cotutelle Internationale

présentée par :

Mamadou BALDE

Soutenue le : 31 Août 2018

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie/Chimie Physique

**Etude physico-chimique et valorisation de
composés bioactifs de *Parinari macrophylla*
Sabine (Chrysobalanaceae)**

THÈSE dirigée par :

M. Eric MARCHIONI

M. Alassane WELE

Professeur, Université de Strasbourg (France)

Professeur, Université Cheikh Anta DIOP de Dakar (Sénégal)

RAPPORTEURS :

M. Abdoulaye DIENG

M. Gora MBAYE

Professeur, Université de Thiès (Sénégal)

Professeur, Université Cheikh Anta DIOP de Dakar (Sénégal)

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mme. Diane JULIEN-DAVID

MCF, Université de Strasbourg (France)

Je dédie ce travail :

A mon père et ma mère

A mes Frères et Sœurs

A mon épouse et mes enfants

A mes Cousins et Cousines

A mes Oncles et Tantes

A mes Ami(e)s

REMERCIEMENTS

Cette thèse de doctorat s'inscrit dans le cadre d'une cotutelle internationale entre l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et l'Université de Strasbourg. Les travaux ont été réalisés en collaboration entre les Laboratoires de :

Chimie Physique, Chimie Organique, Chimie Minérale et Chimie Thérapeutique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar

Et

Chimie Analytique des Molécules Bioactives et Pharmacognosie (CAMBAP, UMR 7178, DSA, IPHC) de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg

Cette thèse a été réalisée sous la direction des Professeurs Alassane WELE et d'Éric MARCHIONI.

Je remercie toutes ces personnes qui m'ont soutenu et les structures et institutions qui ont contribué pour la réalisation de ces travaux.

Je remercie la Direction de la Recherche de France, le Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de la France au Sénégal et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique au Sénégal qui ont bien voulu financer ce travail de thèse.

J'adresse mes vifs remerciements au Pr Alassane WELE. J'ai connu en lui une personne sociale, sympathique, rigoureuse et clairvoyante. Pr WELE est tellement exigeant envers lui-même qu'il est toujours en perpétuelle recherche du travail parfait. Tu nous as toujours soutenu et encouragé. Nous savons que c'est loin d'être fini mais nous te remercions pour ta confiance et tes conseils aguerris du début jusqu'à la fin de ces travaux de thèse.

Je remercie le Pr Eric MARCHIONI pour sa confiance et de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour m'avoir soutenu tout au long de ces trois années de thèse. Tu as toujours été là pour moi et m'as écouté avec autant d'attention quel que soit la question ou le sujet malgré votre calendrier très chargé et je n'oublie pas toutes ces tracasseries avec l'administration de l'école doctorale, depuis le dépôt des dossiers jusqu'aux formalités administratives pour la soutenance. Tu m'as soutenu jusqu'au bout et tu n'avais même pas hésiter à m'affecter une partie de ton bureau pendant l'un des moments les plus difficiles de la thèse qu'est la rédaction, pour avoir de meilleures conditions de travail. Je te témoigne toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Je remercie infiniment Madame Diane JULIEN-DAVID pour sa grande disponibilité, son encadrement, ses conseils et encouragements sans faille. Et MERCI également pour ces longues heures passées ensemble pendant les derniers jours de rédaction de mon manuscrit, qui duraient dès fois jusque tard le soir.

Je remercie les membres du jury, pour nous avoir fait l'honneur et d'accepter de juger ce travail : Pr Abdoulaye DIENG, Pr Gora MBAYE, Pr Bara NDIAYE.

Je remercie les Professeurs Mbacké SEMBENE et Mounibé DIARRA, respectivement Directeurs de l'ED-SEV et de la Formation Doctorale Science du Médicament.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de mes maîtres et collègues de labo de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar les Professeurs Djibril FALL et Matar SECK, les Docteurs Idrissa NDOYE, Adama DIEDHIOU et Yoro TINE.

Je remercie particulièrement Mme Rokhaya Sylla GUEYE pour tout son soutien, ses encouragements, et toutes ces heures de cours assurées à mon absence, je t'en serai toujours reconnaissant.

A Mme FAYE Christelle Sadio qui en plus de son rôle de personne focale pour la bonne marche du service, s'est toujours investie jusqu'à la dernière énergie pour toutes les démarches administratives. Elle est aidée dans ses missions par son binôme de tous les jours et un pilier incontournable M. Ibrahima KEITA, une personne qui de par sa simplicité, son humanisme arrivera sans doute au sommet de ses ambitions. En vous deux, Je vous remercie infiniment !!! Je vous témoigne tout mon amitié !

Je remercie également Mme DAFFE, M. GUEYE, pour leurs encouragements, et leur soutien.

Je remercie les Professeurs Yérim Mbagnick DIOP, Serigne Omar SARR et Dr Rokahaya GUEYE mais aussi Mme Rose DIENE (communément appelée Tata Rose par les étudiants), Sokhna, Claire et tout le personnel du Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie du Département de Pharmacie de la FMPO pour leurs soutiens et encouragements. Mention spéciale au Pr Amadou DIOP qui m'a toujours impressionné par sa modestie, sa courtoisie, sa pertinence et toutes ses valeurs humaines. Tu m'as toujours soutenu, encouragé et orienté et si j'en suis là aujourd'hui tu en fait parti, alors je te témoigne toute ma gratitude.

Je voudrais remercier une personne discrète, humble, sympathique tant de qualités qui n'ont rien à voir avec ses qualités de chercheur avéré dans son domaine, je veux nommer le Pr Alioune Dior FALL, tu m'as toujours soutenu et encouragé et m'as aidé à faire la sélection de mes plantes d'étude.

Je donne une mention spéciale à mes amis et collègues Mbaye SENE et Mady Sy pour ces bons moments passés ensemble en Alsace. Merci pour tout !

Je remercie tous les maîtres et collègues du Département de Pharmacie pour leurs soutien et encouragements.

Je remercie également tous mes ami(e)s et mes camarades de la promo sortante de Pharmacie 2009 sans citer de noms de peur d'en oublier. Ce travail est également le vôtre.

Je voudrais associer mes sincères remerciements à mes meilleur(e)s ami(e)s Fatoumata BAH, Jeannot BASSENE et Moussa BOIRO.

Merci également au personnel du Décanat de la FMPO et à tout le personnel de l'UCAD pour leur soutien et accompagnement.

Du côté de CMBAP,

Un grand merci à Saïd pour sa rigueur scientifique et son grand apport pour le côté technique, ses conseils et ses encouragements. Ton regard critique et tes suggestions m'ont toujours été très utiles pour la suite de mes travaux.

Je ne remercierai jamais assez Ludivine, pour toutes ces longues séances de travail et surtout son sens de la méthode, sa pertinence et sa rigueur scientifique (Coucou à Célyan !!!).

Je remercie vivement Martine, Sonia, Minjie et Christophe pour leurs remarques pendant les réunions de labo et qui ont toujours été présents pour m'aider à avancer au travers de discussions toujours pertinentes.

Je tiens à remercier également le personnel de la Société TWISTAROMA, Céline et Damien pour les séances de travail et leurs encouragements et Nathalie pour sa sympathie.

Je remercie aussi Aurélie pour l'accueil et l'accompagnement pour la réalisation des tests de caractérisation phytochimiques et Mélanie pour ses corrections de la partie RMN et ses conseils.

Merci à Myriam, pour tout son soutien côté administratif et mais aussi dans la préparation des commandes !

Merci à tous les « anciens » et « actuels » doctorants de l'Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives et Pharmacognosie : Michel, Génildo, Yasmine, Randa, Kamar, Ikram, Zélie, Yé, pour la belle ambiance au labo.

A Zélie et Ye, je vous encourage et vous souhaite bonne chance pour la suite !!!

Un grand merci à mon très cher ami, Clément Huguet pour ta sympathie et tes encouragements. Je n'oublierai jamais les bons moments passés ensemble et surtout suite à la victoire de l'équipe de France pour obtenir le ticket de la finale au jardin des deux rives conduisant à l'obtention de son 2^{ème} ETOILE (***) dans l'histoire de la coupe du monde :).

Un grand merci aussi à l'ensemble du personnel du Centre Européen d'Etude du Diabète (CEED) notamment, Pr Pinget, Séverine Sigrist, Stéphanie, Karim, Elisa, Harzo, Elodie, William, Allan, Claude merci pour votre soutien et la belle ambiance ! Mention spéciale à Cynthia qui m'a initié à la culture cellulaire et qui a assuré mes dernières manip. Tu as été là du début à la fin des tests bio. Merci également pour ton amitié, ta sympathie et tes encouragements.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe Defymed !

Il est temps enfin d'adresser mes sincères remerciements à ma famille et tous mes proches qui m'ont toujours aidé et soutenu dans mes choix, notamment mes parents pour leurs prières, leurs encouragements et m'avoir offert la possibilité d'arriver jusqu'ici et plus encore de m'avoir toujours entouré de leur amour.

Je donne une mention spéciale à ma très chère épouse pour sa patience, ses encouragements et son soutien affectueux et indéfectible. Je pense également à nos charmantes filles pour leur patience lors de ses longues absences ces dernières années. Je n'ai cependant jamais douté de votre soutien, ce qui m'a toujours permis d'aller de l'avant !!!

J'espère n'avoir oublié personne, dans le cas contraire....merci...

SOMMAIRE

1	Introduction.....	10
2	Étude bibliographique.....	16
2.1	Données botaniques.....	17
2.1.1	Classification de <i>Parinari macrophylla</i> Sabine.....	17
2.1.2	Données botaniques de la famille des Chrysobalanaceae.....	17
2.1.3	Données botaniques du genre <i>Parinari</i>	18
2.1.4	Données botaniques de l'espèce <i>Parinari macrophylla</i> Sabine	18
2.2	Données phytochimiques	19
2.2.1	Métabolites secondaires de la famille des Chrysobalanaceae	19
2.2.2	Métabolites secondaires du genre <i>Parinari</i>	26
2.2.3	Métabolites secondaires de l'espèce <i>Neocarya macrophylla</i> Kernel	26
2.2.4	Généralités sur les composés phénoliques.....	27
2.2.5	Généralités sur les Flavonoïdes	30
2.2.5.1	Squelettes de base des flavonoïdes	30
2.2.5.2	Flavonoïdes et leurs rôles dans la lutte contre le stress oxydant.....	33
2.3	Utilisations de <i>Parinari macrophylla</i> Sabine.....	40
2.4	Généralités sur le diabète et le stress oxydant.....	40
2.4.1	Généralités sur le diabète.....	40
2.4.2	Généralités sur le stress oxydant.....	43
2.4.3	Diabète et stress oxydant	46
2.4.4	Systèmes de défense antioxydant	47
3	Matériels et méthodes	52
3.1	Matériels et méthode pour la sélection des meilleurs avec la microplaque de 96 puits.....	53
3.2	Matériels et méthodes pour les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et de l'extrait aqueux des écorces	53
3.2.1	Matériels	53

3.2.1.1	Solvants utilisés pour les analyses	53
3.2.1.2	Matériels et réactifs utilisés pour les essais physico-chimiques	53
3.2.1.3	Matériel et réactifs utilisés pour les tests biologiques.....	54
3.2.1.4	Matériel végétal.....	54
3.2.2	Méthodes.....	55
3.2.2.1	Méthodes physico-chimiques.....	55
3.2.2.1.1	Extraction par macération à l'eau et à l'éthanol.....	55
3.2.2.1.2	Evaluation de l'activité anti-radicalaire	57
3.2.2.1.2.1	Méthodes TEAC et ORAC en microplaques.....	57
3.2.2.1.2.1.1	Capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC)	57
3.2.2.1.2.1.2	Capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC)	58
3.2.2.1.2.1.3	Détection et mesure de l'activité anti radicalaire au niveau moléculaire par HPLC – ABTS ⁺ online.....	60
3.3	Caractérisations physico-chimiques	62
3.3.1	Réactions de précipitation.....	62
3.3.1.1	Recherche des alcaloïdes	62
3.3.1.2	Recherche de flavonoïdes	63
3.3.1.3	Recherche de tanins	63
3.3.1.4	Recherche d'antraquinones	63
3.3.1.5	Recherche de saponosides.....	63
3.3.1.6	Recherche d'hétérosides cardiotoniques	64
3.3.1.7	Recherche de stéroïdes	64
3.3.1.8	Recherche de tri-terpènes	64
3.3.1.9	Recherche de sucres réducteurs	64
3.3.2	Chromatographie planaire (CCM)	64
3.4	Identification des molécules actives.....	65
3.4.1	Analyse UHPLC-QTOF-MS	65

3.4.1.1	Description de l'appareillage	66
3.4.1.2	Généralités sur les réseaux moléculaires	69
3.4.1.3	Identification de candidats par leur masse monoisotopique	72
3.4.2	Identification par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	73
3.5	Etude de la bio-activité des extraits aqueux et éthanolique – étude <i>in vitro</i>	74
3.5.1	Culture des cellules β -pancréatiques RINm5F	74
3.5.2	Etude de l'effet des extraits sur la viabilité cellulaire – Cell Titer	74
3.5.2.1	Etude de l'effet des extraits sur un stress induit à l'HX-XO	76
3.5.2.1.1	Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress induit à l'HX-XO	76
3.5.2.1.2	Effet curatif des extraits vis-à-vis d'un stress induit à l'HX-XO.....	77
4	Résultats.....	78
4.1	Sélection des solvants d'extraction	80
4.2	Résultats obtenus pour les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et de l'extrait aqueux des écorces	89
4.2.1	Résultats des méthodes physico-chimiques.....	90
4.2.1.1	Rendements d'extraction.....	90
4.2.1.2	Evaluation de l'activité anti-radicalaire	90
4.2.1.2.1	Méthodes TEAC et ORAC.....	91
4.2.1.2.2	HPLC – ABTS ^{•+} online	93
4.2.1.3	Récupération des fractions d'intérêt par HPLC semi-préparative	97
4.2.1.4	Caractérisation phytochimique des extraits aqueux et éthanolique des feuilles et écorces	102
4.2.1.4.1	Réactions de précipitation	102
4.2.1.4.2	Chromatographie planaire (CCM)	104
4.2.1.5	Identification par approche de réseau moléculaire	108
4.2.1.6	Tentative d'identification d'autres composés par approche comparative avec des bases de données	124
4.2.1.7	Identification par Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	125

4.2.2	Potentiel anti-radicalaire des extraits aqueux et éthanolique au niveau biologique (étude <i>in vitro</i>).....	128
4.2.2.1	Effet des extraits aqueux et éthanolique sur la viabilité cellulaire.....	128
4.2.2.2	Effet protecteur des extraits sur un stress induit à l’HX-XO	130
4.2.2.3	Effet curatif des extraits sur un stress induit à l’HX-XO	132
5	Discussion	134
6	Conclusion et perspectives.....	142

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Stratégie de l'étude	15
Figure 2: Répartition géographique des Chrysobalanaceae dans le monde	18
Figure 3: <i>Parinari macrophylla</i> Sabine	19
Figure 4: Voies de biosynthèse des composés phénoliques	29
Figure 5: Principales classes de flavonoïdes	31
Figure 6: Neutralisation de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase et du peroxyde d'hydrogène par la catalase	33
Figure 7: Réaction de Fenton	34
Figure 8: Sites de chélation des ions métalliques (Me^{n+}) par la quercétine	34
Figure 9: Squelette de base d'un flavonoïde	35
Figure 10: Neutralisation d'un peroxyde par la quercétine	37
Figure 11: Neutralisation d'un lipide peroxyde par l' α -tocophérol et régénération de ce dernier par la quercétine.	38
Figure 12: Relation structure-activité des flavonoïdes	39
Figure 13: Régulation de la glycémie et actions des antidiabétiques oraux	42
Figure 14: Voies de formation des ERO	44
Figure 15: Déséquilibre à l'origine du stress oxydant	45
Figure 16: Hyperglycémie et stress oxydant	47
Figure 17: Antioxydants naturels en fonction de leurs classes chimiques	51
Figure 18: Lieu de prélèvement des échantillons	55
Figure 19: Schéma d'extraction et de fractionnement liquide – liquide	56
Figure 20: Formation du radical $ABTS^{\cdot+}$ et réaction avec les antioxydants	57
Figure 21: Spectre UV-Visible du radical $ABTS^{\cdot+}$	58
Figure 22: Principe de la méthode ORAC	58
Figure 23: Principe de mesure de l'activité antioxydante avec la méthode ORAC	59
Figure 24: Schéma du couplage HPLC - $ABTS^{\cdot+}$ online	61
Figure 25: Gradient de phase mobile	62
Figure 26: Analyse UHPLC-MS/MS – Génération de réseaux moléculaires	66
Figure 27: microTOF-Q (Bruker)	67
Figure 28: Gradient de phase mobile	67
Figure 29: Visualisation des données MS/MS par réseau moléculaire	71
Figure 30: Etapes suivies pour la génération des réseaux moléculaires	72

Figure 31: Cellules β -pancréatiques Rinm5F.....	74
Figure 32: Formation du formazan.....	76
Figure 33: Courbe d'étalonnage TEAC	91
Figure 34: Courbe d'étalonnage ORAC.....	91
Figure 35: Activité anti-radicalaire des extraits totaux et leurs fractions exprimés en μmol équivalent trolox (ET)/g d'extraits secs obtenus avec les méthodes TEAC et ORAC	92
Figure 36: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux total (Aq01F-T).	94
Figure 37: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique total des feuilles (ETOH01F-T)	95
Figure 38: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux total des écorces (Aq01Ec-T).	96
Figure 39: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de EtOH01F_1	99
Figure 40: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de Aq01FT_2	99
Figure 41: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de Aq01FT_3	100
Figure 42: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de EtOH01F_4	100
Figure 43: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de Aq01FT_5	101
Figure 44: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de PL01F_EtOH_6	101
Figure 45: Chromatogrammes BPC du mélange de polyphénols	109
Figure 46: Chromatogrammes BPC des extraits Aq01F-T, EtOH01F-T et Aq01Ec-T.....	110
Figure 47: Réseau 1 obtenu pour le jeu de données incluant les extraits et les étalons	111
Figure 48: Représentation détaillée du groupe 1 obtenu pour le réseau 1	112
Figure 49: Structures des Flavanols conduisant aux procyanidines.....	116
Figure 50: Spectres de la procyanidine B2 étalon, ion parent m/z 577 visible sur le scan MS (A), spectre MS/MS (B).....	117
Figure 51: Spectres du composé de temps de rétention 18,4 min dans l'extrait aqueux, ion parent m/z 577 visible sur le scan MS (A) et les fragments MS/MS (B).	118
Figure 52: Chromatogrammes BPC des extraits et fractions filles actives	119
Figure 53: Réseau 2 obtenu pour le jeu de données incluant les extraits totaux et les fractions filles actives.....	120
Figure 54: Représentation détaillée du groupe 1 obtenu pour le réseau 2	122
Figure 55: Structure chimique de l'acide 5-O-caféoylquinique (Acide chlorogénique).....	126
Figure 56: Structure chimique de l'hyperoside	127

Figure 57: Viabilité cellulaire à 24h sur des cellules Rinn5F	129
Figure 58: Prévention du stress HX-XO par les extraits totaux aqueux et éthanolique.....	131
Figure 59: Prévention du stress HX-XO par les fractions acétate d'éthyle.....	131
Figure 60: Traitement curatif du stress HX-XO par les extraits totaux aqueux et éthanolique	132
Figure 61: Traitement curatif du stress HX-XO par fractions acétate d'éthyle	133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux squelettes chimiques de flavonoïdes retrouvés dans la famille des Chrysobalanaceae.....	20
Tableau 2: Triterpénoïdes.....	22
Tableau 3: diterpénoïdes	24
Tableau 4: Composés isolés du genre Parinari.....	26
Tableau 5: Nomenclature en fonction de la nature des substituants	32
Tableau 6: Classement des flavonoïdes et composés phénoliques apparentés en fonction du potentiel antioxydant par TEAC (par ordre décroissant)	35
Tableau 7: Énergies de collision utilisées pour la collecte de données MS/MS	68
Tableau 8: Rendements d'extraction.....	90
Tableau 9: Fractions filles obtenues par HPLC semi-préparative en fonction du temps de rétention.....	98
Tableau 10: Résultats des tests de précipitation mettant en évidence les familles chimiques	103
Tableau 11: Résultats des tests de précipitation mettant en évidence les familles chimiques (suite).....	103
Tableau 12: Données LC-MS correspondant aux perles du groupe 1.....	114
Tableau 13: Tentative d'identification d'autres composés dans les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de Parinari macrophylla Sabine	125

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAPH : 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride	IFS : isoflavone synthase
ABAM : anti-biotique anti-mycotique	MS : spectrométrie de masse
ABTS : 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide)	MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényl tétrazolium
ADN : acide désoxyribonucléique	NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
ADP : adénosine diphosphate	NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	NEU : natural product reagent
ANS : anthocyanidine synthase	NO : monoxyde d'azote
ATCC : american type culture collection	OMS : organisation mondiale de la Santé
ATP : adénosine triphosphate	ORAC : oxygen radical absorbance capacity
CAT : catalase	PAL : phénylalanine ammonia lyase
CCM : chromatographie sur couche mince	PBS : phosphate buffer saline
CHI : chalcone flavanone isomérase	PEG : polyéthylène glycol
CHS : chalcone synthase	PFP : pentafluorophényle
CoA : coenzyme A	Q-TOF : quadripôle temps de vol
CTR : control	SGLT2 : sodium glucose co-transporteur de type 2
DAD : détecteur à barrette de diodes	RIN : rat insulinoma
DFR : dihydroflavonol réductase	RPMI : roswell park memorial institute
DPP-4 : dipeptidylpeptidase-4	RMN : résonance magnétique nucléaire
DMSO : diméthylsulfoxyde	SOD : superoxyde dismutase
EDTA : éthylènediaminetétraacétique	RSE : résonance de spin électronique
ERN : espèces réactives de l'azote	SVF : sérum de veau foetal
ERO : espèces réactives de l'oxygène	TDR : tropical diseases research
ESI : ionisation par électrospray	TEAC : trolox equivalent antioxidant capacity
F3H : flavanone 3-hydroxylase	TMS : tétraméthylsilane
GLP-1 : glucagon-like peptide-1	UHPLC : chromatographie en phase liquide à ultra haute performance
GNPS : global natural product social molecular networking	UIT : union internationale des télécommunications
GPx : glutathion peroxydase	VLE : volume limite d'exposition
HPLC : chromatographie liquide de haute performance	VME : volume moyen d'exposition
IDX-1 : islet duodenum homeobox-1	
HX-XO : hypoxanthine - xanthine oxydase	

1 Introduction

Depuis des décennies, les plantes ont été utilisées pour traiter et soigner toutes sortes de maladies. De même, les progrès biotechnologiques, biochimiques et la recherche de nouveaux produits naturels biologiquement actifs provoquent un intérêt pour les ressources naturelles, qui ne cesse de croître.

Actuellement, le nombre total d'espèces recensées est estimé entre 10 et 100 millions dont environ 300 000 espèces végétales. Seules 15 % de ces dernières ont été étudiées sur le plan phytochimique et 6 % pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2014). Cela fait des plantes un potentiel réservoir de molécules bioactives nouvelles. Dans ce contexte, la recherche de molécules bioactives d'origine naturelle constitue un des axes prioritaires identifiés par Tropical Diseases Research (TDR) (OMS, 2007).

Les métabolites secondaires obtenus des plantes médicinales peuvent être utilisés dans la prise en charge de nombreuses pathologies telles les maladies cardiovasculaires, le cancer, le stress oxydant, le diabète et ses complications (Errajaji et al., 2010; Goh et al., 1995; Kris-Etherton et al., 2002; Middleton et al., 2000; Pandey et al., 2009). Dans le cas du diabète et ses complications, l'évolution de la maladie et ses effets délétères sont plus qu'inquiétants au niveau mondial. Selon la fédération internationale du diabète, 425 millions de personnes adultes seraient atteintes de diabète dans le monde. La Fédération internationale du diabète (FID) estime que ce nombre pourrait atteindre 629 millions de personnes diabétiques en 2045 (FID, 2017). Selon l'OMS, 1,6 million de décès ont été directement causés par le diabète. En 2016, la prévalence et le taux de mortalité liés au diabète sont respectivement de 5 % et 3 % pour le Sénégal et de 8 % et 2 % pour la France. En outre, au-delà du coût de prise en charge de la maladie, celle-ci représente une charge très importante pour les familles et des pertes de productivités énormes induites pour l'économie mondiale et les économies sénégalaise et française en particulier (OMS, 2016).

Le Sénégal a été le premier pays à lancer, en 2014, une campagne « mDiabète » ciblée afin d'aider la population à surveiller et à prévenir les risques et complications liées à certaines maladies non transmissibles comme le diabète. Le programme « mDiabete » est une composante du plan national de lutte contre le diabète du Ministère de la Santé et de l'Action Sociale du Sénégal. Il fait partie de l'initiative "Be He@lthy, Be Mobile" de l'OMS. L'un des objectifs de cette plateforme est d'aider les patients diabétiques connus ou diagnostiqués à mieux gérer la maladie afin de ralentir son évolution, d'atténuer les complications et d'améliorer la qualité de vie en utilisant la téléphonie mobile, accessible à près de 90 % de la population. Il

s'agit aujourd'hui d'un service annuel qui a enregistré plus de 100 000 inscriptions en 2017. Cette action a été appuyée par l'OMS qui collabore avec l'Union internationale des télécommunications (UIT). Ainsi, il est possible pour les patients diabétiques de surveiller leur glycémie et de suivre un régime alimentaire équilibré, à l'aide de messages qui leur sont envoyés de façon régulière.

Les traitements actuels disponibles pour traiter le diabète sont constitués par l'insuline et les antidiabétiques oraux (biguanides, sulfamides hypoglycémiantes, glinides, inhibiteurs de l'absorption du glucose, de la réabsorption tubulaire du glucose et de DPP-4, analogues de GLP-1). Cependant, en Afrique, bon nombre de la population a encore recours à la médecine traditionnelle par les plantes. Selon les estimations de l'OMS (2002), plus de 80 % de la population en Afrique utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins en soins de santé (Newman et al., 2000). C'est le cas au Sénégal, pays possédant une biodiversité rare et unique, où, depuis des décennies, de nombreuses espèces végétales sont utilisées dans la prise en charge de maladies comme le diabète et qui restent cependant encore peu ou non étudiées. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'étude des plantes qui sont traditionnellement utilisées dans la prise en charge de cette pathologie au Sénégal afin de contribuer à la valorisation des ressources naturelles de ce pays. En effet, la phytothérapie antidiabétique connaît aujourd'hui un grand essor du fait de la découverte au fur et à mesure d'extraits de plantes efficaces dans la modulation de la glycémie du diabète de type 2 (Bhaskar et al., 2009; Fernandes et al., 2007; Patel et al., 2012).

Ainsi, cette étude a tout d'abord commencé par la sélection des plantes et elle a été effectuée en collaboration avec le Pr Alioune Dior FALL du Laboratoire de Pharmacognosie et botanique de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Pour cela, une enquête ethnobotanique a été réalisée auprès des guérisseurs traditionnels composés aussi bien de femmes que d'hommes avec une tranche d'âge allant de 30 à 90 ans. Ces données d'enquête ont été complétées par une étude bibliographique approfondie afin de faire un état de l'art sur les connaissances scientifiques relatives aux plantes retenues. Au total quatre plantes ont dans un premier temps été sélectionnées pour leur activité antidiabétique : *Parinari macrophylla* Sabine (Chrysobalanaceae), *Cassia Sieberiana* (Caesalpinaceae), *Dialium guineense* (Caesalpinaceae) et *Ficus gnafalocarpa* (Moraceae). Ces plantes ont été récoltées puis séchées, broyées et conditionnées dans des sachets noirs en plastique. Les 4 plantes sélectionnées ont été ensuite comparées entre elle en fonction de leurs propriétés antioxydantes. En effet, plusieurs études scientifiques ont montré l'existence un lien

entre le stress oxydant et plusieurs maladies telles que les pathologies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et ses complications (Bonfont-Rousselot, 2004; Rigalleau et al., 2007a). Dans le cas du diabète, l'impact du stress oxydant sur les cellules β -pancréatiques et sur l'action de l'insuline est de plus en plus mis en évidence. En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) perturbent la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose. Cet effet passe par une diminution du rapport ATP/ADP intracytosolique, une hyperpolarisation anormale de la membrane mitochondriale et une surexpression du complexe I de la chaîne respiratoire. Cela entraîne comme conséquence, l'apoptose des cellules β -pancréatiques et pourrait expliquer la réduction de la masse de ces cellules dans le diabète de type 2 (Guillausseau et al., 2008)

Ainsi l'activité anti-radicalaire des quatre plantes a été évaluée avec deux tests chimiques, la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) et la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Ces tests ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Analytique des Molécules Bioactives et Pharmacognosie de l'IPHC (UMR7178 – DSA - CAMBAP) situé à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Ces essais ont permis de sélectionner une plante, *Parinari macrophylla* Sabine, qui a montré une activité anti-radicalaire nettement supérieure aux trois autres. Cette plante a été retenue dans la suite des travaux.

L'objectif de ce travail est donc de contribuer à la valorisation de la biodiversité sénégalaise et plus particulièrement d'approfondir les connaissances phytochimiques d'une plante de l'espèce *Parinari macrophylla* Sabine, utilisée traditionnellement pour le traitement du diabète. La première partie de ce travail s'est portée sur le choix du solvant d'extraction. En effet, une macération dans l'eau des feuilles ou écorces de *Parinari macrophylla* (*Chrysobalanaceae*) est traditionnellement utilisée par les tradithérapeutes. Afin de rechercher un solvant plus efficace et pour se démarquer de la technique classique de sélection du solvant d'extraction reposant sur une étude bibliographique, un nouveau système constitué par une plaque de 96 puits a été mis au point permettant ainsi l'utilisation de plusieurs solvants de propriétés différentes dans le but d'extraire le maximum de composés bioactifs à partir des feuilles de *Parinari macrophylla*. La mesure de l'efficacité du solvant d'extraction a été faite par des tests physico-chimiques TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permettant d'évaluer l'activité antioxydante et biologique sur des cellules β -pancréatiques de type RINm5F (test de viabilité cellulaire).

Ensuite un screening phytochimique (réactions de précipitation, CCM) a été réalisé afin d'identifier les familles de molécules présentes dans cette plante. Puis plusieurs méthodes

chimiques et chromatographiques (TEAC, ORAC, HPLC-ABTS-online) ont été utilisées afin de déterminer les extraits et molécules anti-radicalaires. Des méthodes plus sensibles et de haute résolution ont également été employées afin d'identifier de façon précise certaines molécules présentant une activité anti-radicalaire. Il s'agit de la chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse (UHPLC-MS/MS) qui a permis de générer des réseaux moléculaires via la plateforme en ligne de Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) et a permis l'identification de composés par comparaison avec d'autres bases de données. La RMN a également été utilisée pour l'identification de certains composés. Enfin des tests biologiques ont été réalisés sur des cellules β -pancréatiques RINm5F, la viabilité cellulaire ainsi que des tests de traitements préventif et curatif après un stress induit à l'hypoxanthine/xanthine oxydase ont été testés avec les différents extraits de la plante de l'espèce *Parinari macrophylla* Sabine.

Ce document présentera dans une première partie les généralités et les travaux sur les principaux métabolites secondaires isolés de la famille, du genre et de l'espèce *Parinari macrophylla* Sabine : di- et tri-terpénoïdes, stéroïdes, flavonoïdes et dérivés des chromones. Puis la seconde partie sera consacrée à la caractérisation, la séparation, la purification et l'analyse structurale des molécules contenues dans les extraits de feuilles et d'écorces de *Parinari macrophylla* Sabine. Et pour finir, leurs effets sur la viabilité cellulaire et leurs activités antioxydantes sur un stress induit à la xanthine/xanthine oxydase sur des cellules β -pancréatiques RINm5F seront décrits.

Les principales étapes de cette étude sont schématiquement représentées à la Figure 1 ci-dessous.

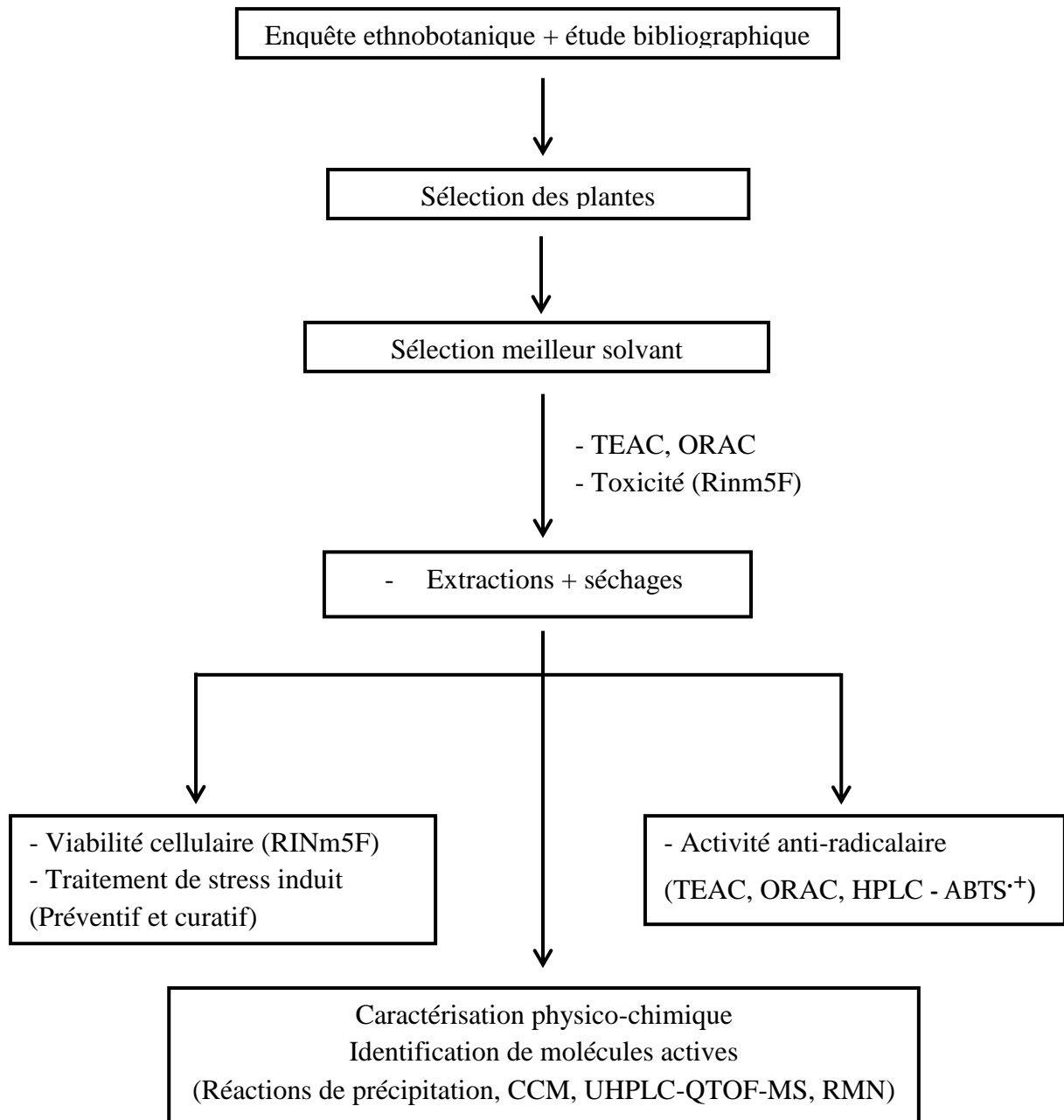


Figure 1 : Stratégie de l'étude

2 Étude bibliographique

2.1 Données botaniques

2.1.1 Classification de *Parinari macrophylla* Sabine

C'est une plante qui appartient au phylum des Tracheophyta, à la classe des Magnoliopsida, à l'ordre des Malpighiales, à la famille des Chrysobalanaceae, au genre *Parinari* et à l'espèce *Parinari macrophylla* (Sabine) Prance & F. White. Il existe plusieurs noms synonymes pour l'espèce : *Neocarya macrophylla* (Sabine) Prance & F. White, *Parinari senegalensis* Perr. ex DC., *Petrocarya macrophylla* (Sabine) Steud, *Ferolia macrophylla* (Sabine) Kuntze. Au Sénégal, la plante a plusieurs noms vernaculaires : New (Wolof), Nawdé (Peulh), Daf (sérère).

2.1.2 Données botaniques de la famille des Chrysobalanaceae

La classification taxonomique des Chrysobalanaceae a été controversée. Traditionnellement, elles ont été considérées comme très proches des Rosaceae en raison de leurs caractéristiques morphologiques. Cependant, une analyse moléculaire, a permis de les placer dans l'ordre des Malpighiales (Yakandawala et al., 2010).

La famille des Chrysobalanaceae est composée de 18 genres et environ 531 espèces d'arbres et d'arbustes répartis dans les régions tropicales et subtropicales, en particulier dans le Nouveau Monde (Figure 2) (Prance et al., 1988). De nos jours, une seule étude chimiotaxonomique a été réalisée sur 31 espèces de genre *Parinari* d'origine africaine, asiatique et néotropicale. Elle a montré une prédominance de glycosides de flavonol dérivés de la myricétine, de la quercétine et du kaempférol (Neto et al., 2013). Les taxons africains se sont divisés en deux groupes basés sur la présence ou l'absence de glycosides de myricétine. Les taxons néotropicaux, un complexe d'espèces étroitement apparentées, sont chimiquement très similaires les uns aux autres et ne renferment pas de myricétine. Les taxons asiatiques sont semblables aux néotropicaux dans leurs modèles de flavonoïdes et leur manque de glycosides de myricétine. La présence de myricétine, considérée comme un flavonoïde primitif, suggère que les espèces africaines produisant ce flavonol représentent un noyau primitif à partir duquel un groupe non myricétine a pu évoluer, donnant lieu à une expansion ultérieure des lignées phytogéographiques dépourvues de myricétine. Ainsi, cette mise en évidence de myricétine à *Parinari* (Coradin et al., 1985a) et de plusieurs genres apparentés suggère qu'elle pourrait être

un marqueur commun chez les Chrysobalanaceae (Coradin et al., 1985a). Cette hypothèse est en accord avec les propositions actuelles d'évolution géographique des Chrysobalanaceae.



Figure 2: Répartition géographique des Chrysobalanaceae dans le monde

(<http://www.mobot.org>)

2.1.3 Données botaniques du genre *Parinari*

Le genre *Parinari* est composé de 50 espèces et a été trouvé dans des régions pantropicales (Boland et al., 2006). Lorsqu'il a été décrit pour la première fois par Aublet (1775), *Parinari* comprenait deux espèces, *P. campestris* et *P. montanum*. A mesure que le genre grandissait, il était allié à d'autres genres de chrysobalanoïdes mais restait distinct en sa possession de carpelles biloculaires. Le genre a grandi avec la découverte de nouveaux taxons provenant des trois régions tropicales majeures. Jusqu'à récemment, c'était un dépôt pour tous les taxons de chrysobalanoïdes avec des carpelles biloculaires, indépendamment de leur attribution plus appropriée à des genres nouvellement reconnus (par exemple, *Exellodendron* Prance) ou d'autres genres établis (par exemple, *Couepia* Aubl., *Hirtella* L.). *Parinari* a été réexaminé, ce qui a conduit à une conception plus étroite du genre et des Chrysobalanaceae dans leur ensemble, en particulier chez les néotropiques (Prance, 1972).

2.1.4 Données botaniques de l'espèce *Parinari macrophylla* Sabine

Parinari macrophylla Sabine (Figure 3) est une espèce purement ouest-africaine connue également sous le nom de *Neocarya macrophylla* (Sabine). Ses fruits farineux sont particulièrement appréciés en Sierra Leone, mais aussi au Sénégal et au nord du Nigeria, où ils peuvent être retrouvés sur les marchés locaux. Les autres parties de la plante (feuilles, écorces,

etc) sont utilisés par les tradithérapeutes sous forme de décocté ou de macérât pour le traitement de plusieurs maladies comme le diabète et l'hypertension artérielle.



Figure 3: Parinari macrophylla Sabine
(<http://www.baobab-des-saveurs.com>)

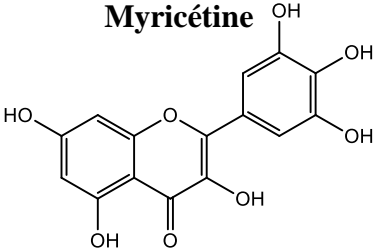
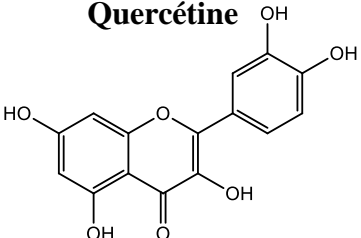
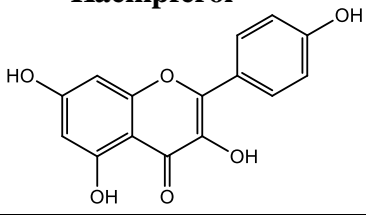
2.2 Données phytochimiques

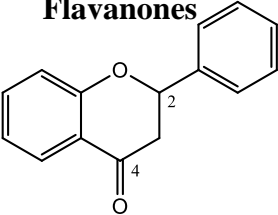
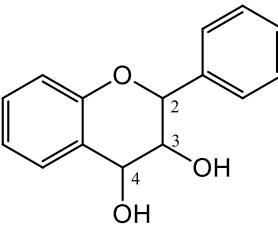
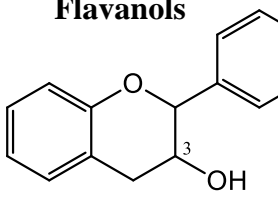
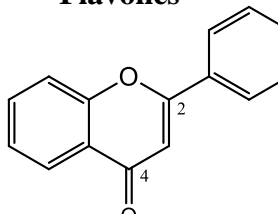
2.2.1 Métabolites secondaires de la famille des Chrysobalanaceae

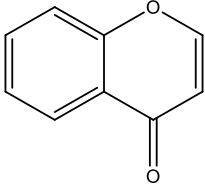
Les constituants chimiques de cette famille comprennent les flavonoïdes et des dérivés de chromones les triterpénoïdes, les diterpénoïdes et les stéroïdes. Un total de 167 métabolites secondaires ont été rapportés pour les Chrysobalanaceae. Ils ont été regroupés par familles chimiques de molécules (Coradin et al., 1985a). Dans chaque groupe chimique ou famille, une structure de base a été donnée et quelques exemples appartenant au même groupe (Tableau 1, Tableau 2 Tableau 3).

- Flavonoïdes et dérivés de chromones

Tableau 1 : Principaux squelettes chimiques de flavonoïdes retrouvés dans la famille des Chrysobalanaceae

<p>Myricétine</p> 
<p>Dérivés</p>
<p>myricétine 3-<i>O</i>-glucuronide; myricétine-3-<i>O</i>-rhamnoside (myricitrine); myricétine 3-<i>O</i>-rutinoside (Barbosa et al., 2006); myricétin-3-<i>O</i>-xylosyl- (1,2) rhamnoside; myricétin-3-<i>O</i>-glucoside; myricétin-3-<i>O</i>-galactoside; 30-méthyl-myricétin-3-<i>O</i>-rutinoside (Bilia et al., 1996b);</p>
<p>Quercétine</p> 
<p>Dérivés</p>
<p>quercétine 3-<i>O</i>-rhamnoside; quercétine-3-<i>O</i>-glucoside (Mendez et al., 1995) ; quercétine-3-<i>O</i>-galactoside (hypérine) (Mendez et al., 1995) ; quercétine-3-<i>O</i>-arabinoside (Mendez et al., 1995); rutine (Barbosa et al., 2006); quercétine-3-<i>O</i>-glucosylgalactoside; quercétine-3-tri-<i>O</i>-glucoside (Coradin et al., 1985a); quercétine-3-<i>O</i>-rhamnosyl- (1,2) rhamnoside; quercétine-3-<i>O</i>-rhamnosyl- (1,6) galactoside (Carvalho and Costa, 2009).</p>
<p>Kaempférol</p> 
<p>Dérivés</p>
<p>Kaempférol-3-<i>O</i>-xylosyl- (1,2) rhamnoside; kaempférol-3-<i>O</i>-arabinoside(Bilia et al., 1996a; Braca et al., 2002) ; kaempférol-3-<i>O</i>-rhaminoside (Bilia et al., 1996a; Braca et al., 2002) ; kaempférol-3-<i>O</i>-rutinoside (Bilia et al., 1996a; Braca et al., 2002); kaempférol-3-<i>O</i>- (6-<i>p</i>-coumaroyl) –glucoside (Braca et al., 2003); kaempférol-3,4-di-<i>O</i>-glucoside; kaempférol-3-tri-<i>O</i>-glycoside (Coradin et al., 1985a) ; kaempférol-3- L'<i>O</i>-glucoside; kaempférol (Coradin et al., 1985a); 7-<i>O</i>-méthyl-kaempférol (Castilho and Kaplan, 2011a).</p>

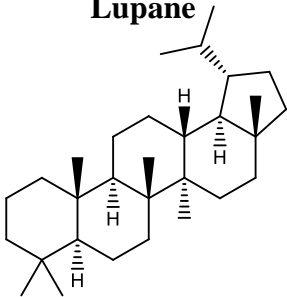
Flavanones

Dérivés
Naringénine (Sanduja et al., 1983); 8-hydroxy-40-méthyl-naringénine (Braca et al., 1999); 8-hydroxy-naringénine (Braca et al., 2002); 5,6,7,40-tétrahydroxy-flavane (isocarthamide) (Werawattanachai and Kaewamatawong, 2010).
Flavanols

Dérivés
Taxifoline-3-O-rhamnoside (Braca et al., 2002); Taxifoline-3-O-xylosylarabinoside; taxifoline-3-O-arabinoside (Coradin et al., 1985a).
Flavols

Dérivés
(+) - catéchine; (-) - épicatechine (Mendez et al., 1995).
Flavones

Dérivés
Acide 5,7-dihydroxy-40-méthyl-flavone-6-sulfonique (niruriflavone) (Carvalho et Costa, 2009); Apigénine-6,8-di-C-glucoside (vicénine 2) (Coradin et al., 1985a).

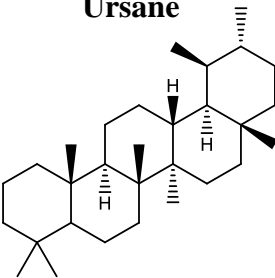
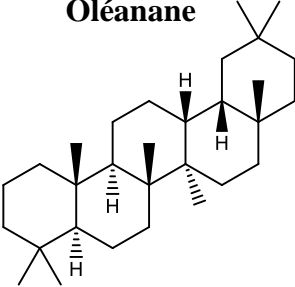
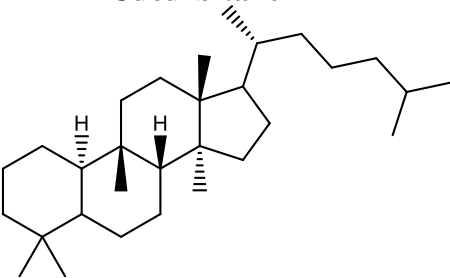
Chromone

Dérivés
<p>5-hydroxy-2,8-diméthyl-6,7-diméthoxychromone (Sanduja et al., 1983); 5,7-dihydroxy-2-dotricontanylchromone; 5,7-dihydroxy-2-nontricontanylchromone; 5,7-dihydroxy-2-tricontanylchromone; 5,7-dihydroxy-2-noneicosanylchromone (Carvalho et al., 2005).</p>

- Triterpénoïdes

Des triterpénoïdes pentacycliques ont été isolés d'espèces de la famille des Chrysobalanaceae. Ils sont disposés en fonction de leurs caractéristiques structurales : Lupane, Ursane, Oléanane et Cucurbitane (Cucurbitacine B, seul triterpène de type cucurbutane décrit pour les Chrysobalanaceae).

Tableau 2: Triterpénoïdes

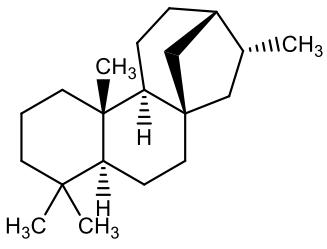
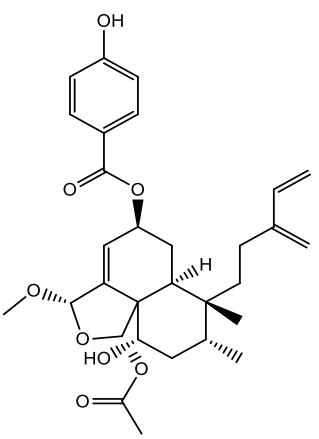
Lupane

Dérivés
<p>Lupéol; lupénone (Vargas et al., 2010); Acide bétulinique (Bilia et al., 1996a; Fernandes et al., 2007); Acide 11α-hydroxy-bétulinique (acide 6β-hydroxy-bétulinique, acide 2α-hydroxy-3β-O- (3,4-dihydroxybenzoyl ester) -lup-12-ène-28-oïque, 2α, 27-dihydroxy-3β- L'acide O- (3,4-dihydroxybenzoyl ester) -lup-12-en-28-oïque (Bilia et al., 1996a); 3β-hydroxylupa- 20, 28-olide (licanolide) (Castilho et al., 2005); Acide 2α, 3β-dihydroxyl-20-en-28-oïque (acide alphaltolique) (Braca et al., 2000); Acide 3b-O-trans-p-coumaroyl-alphaltolique; L'acide 3β-O-cis-p-coumaroyl-alphaltolique (Braca et al., 2000).</p>

<p>Ursane</p> 
<p>Dérivés</p>
<p>Acide 3β, 19α-dihydroxyurs-12-en-28-oïque (acide pomolique) (Estrada et al., 2009; Fernandes et al., 2003); Acide 3β-hydroxyurs-12-en-28-oïque (acide ursolique); acide 2α-hydroxy-ursolique (Bilia et al., 1996b); Acide 2α, 3β, 19α-trihydroxyurs-12-ène-28-oïque (acide tormentique) (Fernandes et al., 2003); Acide-28-<i>O</i>-glucosyl ester tormentique (Braca et al., 2001); Acide ursolique-3β-<i>O</i>-galactosyl- (6-<i>O</i>-4-ydroxybenzoyl) (Carvalho et Costa, 2009).</p>
<p>Oléanane</p> 
<p>Dérivé</p>
<p>Acide 3β-hydroxyolean-12-en-28-oïque (acide oléanolique); acide 3β, 19β-dihydroxyolean-12-en-28-oïque (acide spinosique) (Prakash Chaturvedula et al., 2003; Sanduja et al., 1983); acide oléanolique-3-<i>O</i>-arabinoside; ester 2α, 3β, 19α-trihydroxyolean-12-ène-28-<i>O</i>-glucosyl (arjunétine)(Bilia et al., 1996b; Braca et al., 2001); Acide 3β-<i>O</i>-trans-p-coumaroyl-maslinique; acide 3β-<i>O</i>-cis-p-coumaroyl-maslinique(Braca et al., 2000).</p>
<p>Cucurbitane</p> 
<p>Dérivé</p>
<p>Cucurbitacine B (Oberlies et al., 2001).</p>

- Diterpénoïdes

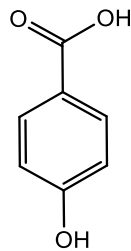
Des diterpénoïdes de type kaurane et clérodane ont été isolés de la famille des Chrysobalanaceae. Certaines espèces de Chrysobalanaceae en particulier du genre *Parinari* sont riches en diterpènes de type nor- et ent-kaurane.

Tableau 3: Diterpénoïdes

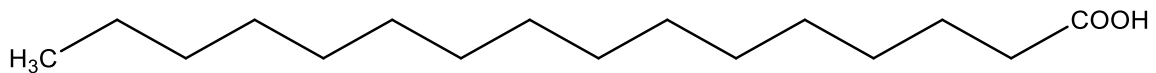
<p>Kaurane</p> 
<p>Dérivés</p>
<p>10α-hydroxy-9α-methyl-15-oxo-20-norkaur-16-en-19-oic acid γ-lactone (15-oxozoapatlin); 10α-hydroxy-13α-methoxy-9α-ethyl-15-oxo-20-nor-kaur-16-en-19-oic acid γ-lactone (13-methoxy-15-oxozoapatlin) (Beauchamp et al., 1996; Garo et al., 1997; Wu et al., 1996); 10α,13α,16α,17-tetrahydroxy-9α-methyl-15-oxo-20-nor-kauran-19-oic acid γ-lactone; 1β,16α,17-trihydroxy-ent-kaurane (Braca et al., 2005); 10α,13α,16α,17-tetrahydroxy-9α-methyl-15-oxo-20-nor-kauran-19-oic acid γ-lactone (Mattia et al., 2003); 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oic acid; 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oic acid methyl ester; 11β-hydroxy-15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oic acid methyl ester (Gustafson et al., 1991); 15-oxo-9,16-di-en-ent-kauran-19-oic acid (licamichauxiioic A); 15-oxo-9,16-di-en-ent-kauran-19-oic acid methyl ester; 15-oxo-13,16-di-en-ent-kauran-19-oic acid (licamichauxiioic B) (Chaudhuri et al., 2002).</p>
<p>Clérodane</p> 
<p>Intrapétacine A ; intrapétacine B (Oberlies et al., 2001).</p>

Autres composés des Chrysobalanaceae

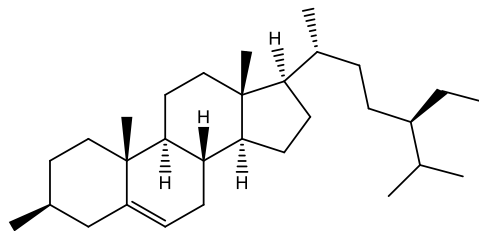
D'autres composés ont été également isolés de la famille des Chrysobalanaceae : Acide 4-hydroxybenzoïque (Werawattanachai and Kaewamatawong, 2010); Acide hexadécanoïde (acide palmitique) ; β -sitostérol (Castilho and Kaplan, 2011b, 2008); nérolidol E; α -tocophérol (Vargas et al., 2010). Ce sont des molécules ubiquitaires retrouvées dans la plupart des plantes.



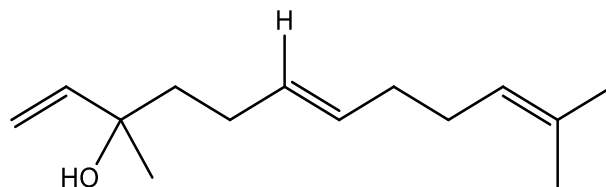
Structure chimique de l'acide 4-hydroxybenzoïque



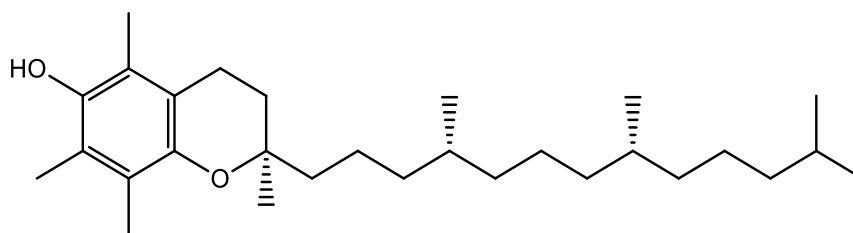
Structure chimique de l'acide palmitique



Structure chimique du β -sitostérol



Structure chimique du Nérolidol E



Structure chimique de l' α -tocophérol

2.2.2 Métabolites secondaires du genre *Parinari*

Les composés isolés du genre *Parinari* sont essentiellement constitués par des dérivés de flavonols à base de quercétine, myricétine et de kaempférol pouvant renfermer dans leurs structures chimiques des sucres (Tableau 4). C'est l'exemple de l'apigénine-6,8-di-C-glycoside qui a été isolé (Neto et al., 2013).

Tableau 4: Composés isolés du genre *Parinari*

Structures de base	Dérivés
Quercétine	Quercétine-3- <i>O</i> -arabinoside ; Quercétine-3- <i>O</i> -glucosylgalactoside ; Quercétine-3- <i>O</i> -rhamnoside; Quercétine-3- <i>O</i> -glycoside ; Quercétine-3- <i>O</i> -glycoside ; Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside ; Quercétine-3- <i>O</i> -triglycoside ; Quercétine-3- <i>O</i> -triglycoside ; Quercétine- <i>O</i> -glycoside ; Quercétine-3-tri- <i>O</i> -glucoside ; Quercétine-3- <i>O</i> -rutinoside
Kaempférol	Kaempférol-3,4-di- <i>O</i> -glycoside ; Kaempférol-3,4'-diglucoside ; Kaempférol-3- <i>O</i> -triglycoside ; Kaempférol-3- <i>O</i> -glycoside ; Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside ; Kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoside ;
Myricétine	Myricétine-3- <i>O</i> -rhamnoside ; Myricétine-3- <i>O</i> -glycoside ; Myricétine-3- <i>O</i> -galactoside.
Taxifoline	Taxifoline-3- <i>O</i> -xylosylarabinoside ; Taxifoline-3-arabinoside ;

2.2.3 Métabolites secondaires de l'espèce *Neocarya macrophylla*

Kernel

Les composés suivants ont été isolés de l'espèce *Neocarya macrophylla* Kernel (Diaby et al., 2016a) : Hexoside d'acide caféique; épicatechine-3-*O*-gallate; quercétine-*O*-

malonylhexosyl rhamnoside; Trisgalloyl (Hexahydroxydiphenoyl) glucose; acide 4,5-dicafféoylquinique; acide méthyl-3-*O*-cafféoyl-quinique; acide galloylquinique; acide dihydro-*O*-coumarique; dérivé d'acide protocatéchuique-*O*-hexoside; quercétine-pentoside-hexoside; acide 3-*O*-cafféoylquinique; dérivé d'acide coumarique; 6-*O*-caféoyl- α -glucose; Génistéine de méthyle. Cette diversité de métabolites secondaires isolés, montre l'importance de la famille des Chrysobalanaceae et en particulier *Parinari macrophylla* Sabine pouvant expliquer sa vaste utilisation en médecine traditionnelle. Ces métabolites sont essentiellement constitués de composés phénoliques.

2.2.4 Généralités sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont définis en tant que "métabolites secondaires végétaux dérivés exclusivement du phénylpropanoïde qui est lui-même un produit de la voie du shikimate, comportant au moins un cycle phénolique et dépourvus de tout groupe fonctionnel à base d'azote dans leur expression structurelle la plus fondamentale (Tsao, 2010). Ils sont également appelés biophénols car isolés à partir de tissus végétaux. Ainsi, les "biophénols" deviennent un terme d'ombrelle qui fait référence à toutes les molécules phénoliques dérivées d'origine végétale (Obied, 2013). Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, dont plus de 5000 flavonoïdes identifiés (Bravo, 1998; Harborne and Williams, 2000; Manach et al., 2004). Bien que les polyphénols soient chimiquement caractérisés comme des composés ayant des caractéristiques structurales phénoliques, ce groupe de produits naturels est très diversifié et contient plusieurs sous-groupes de composés phénoliques. Ils ont été classés selon leur origine, leur fonction biologique et leur structure chimique. De plus, la majorité des polyphénols dans les plantes existent sous forme de glycosides avec des unités de sucre différentes et des sucres acylés à différentes positions des squelettes de polyphénols. Tous ces composés permettent aux plantes de lutter entre autres contre les agressions extérieures liées à l'environnement (rayonnements UV), les insectes ravageurs par action répulsive et même une protection contre les mammifères (feuilles d'acacia toxiques pour les antilopes). La structure des composés phénoliques associant noyaux aromatiques et fonctions hydroxyles (OH) leur offre une réactivité particulière, due à la présence de doubles liaisons conjuguées. Cette structure favorise des départs et des captures d'atomes hydrogène conférant à ces molécules des propriétés antioxydantes (Vermerris et al., 2008). Les composés phénoliques sont considérés comme des métabolites de la voie du shikimate qui occupe une place centrale dans leur biosynthèse (Figure 4). Le cycle aromatique B et le cycle chromane sont considérés comme

provenant de l'acide aminé phénylalanine, lui-même un produit de la voie du shikimate, tandis que le cycle A provient de trois unités de malonyl-CoA (Tsao, 2010). Ces trois unités de malonyl-CoA sont rajoutées par des réactions séquentielles de condensation de décarboxylation, qui initient la biosynthèse des flavonoïdes. La phénylalanine ammonia lyase (PAL) est une enzyme clé de la voie des phénylpropanoïdes qui catalyse la conversion de la phénylalanine en cinnamate, ce qui conduit aux acides phénoliques qui sont des composés polyphénoliques non flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux types principaux, l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique à base de squelettes C1-C6 et C3-C6 . L'intermédiaire final, le 4-coumaroyl CoA est un métabolite carrefour dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes chez les plantes et est le précurseur direct des flavonoïdes. Il se condense ensuite avec trois molécules de malonyl-CoA pour donner la première structure de flavonoïde, la naringénine chalcone par l'enzyme chalcone synthase (CHS). La chalcone est isomérisée par la chalcone flavanone isomérase (CHI) en une flavanone. Cette flavanone constitue un intermédiaire essentiel pour toutes les classes de flavonoïdes y compris leurs sous-groupes. La chalcone est également l'intermédiaire d'obtention des isoflavones et les coumestrols sous l'action de différentes enzymes, y compris la CHI et l'isoflavone synthase (IFS). Par exemple, les (2S)-flavanones intermédiaires sont catalysées par la flavanone 3-hydroxylase (F3H) en dihydroflavonols, qui sont ensuite réduits par la dihydroflavonol réductase (DFR) en flavan-3,4-diols (leucoanthocyanines), qui sont convertis en anthocyanidines par anthocyanidine synthase (ANS). La glucosylation des flavonoïdes est catalysée par la glucosyltransférase (Tsao, 2010).

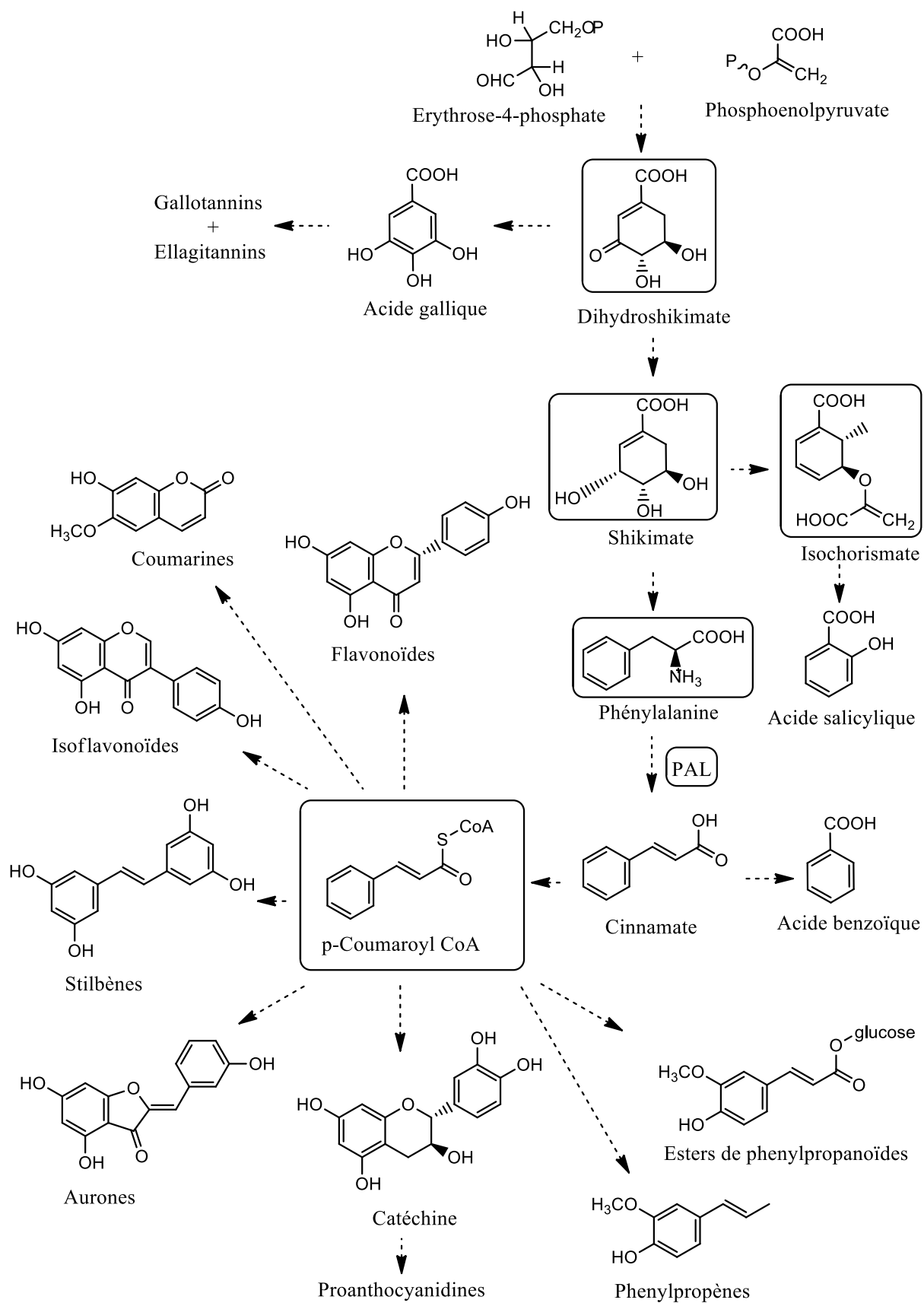


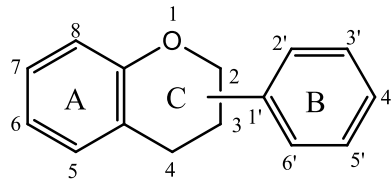
Figure 4: Voies de biosynthèse des composés phénoliques
(Vogt, 2010).

Les flavonoïdes constituant la famille la plus importante et la plus connue des composés phénoliques, une description plus détaillée a été réservée à cette classe.

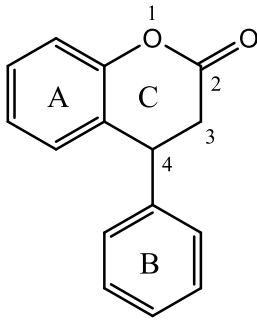
2.2.5 Généralités sur les Flavonoïdes

2.2.5.1 Squelettes de base des flavonoïdes

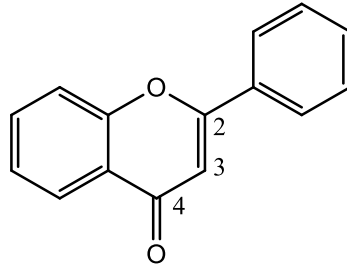
Les flavonoïdes sont des pigments phénoliques qui sont responsables de la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils sont définis par la nature de leur squelette carboné qui comprend 15 atomes de carbones répartis selon la séquence C6-C3-C6 commune à tous les flavonoïdes et dans laquelle deux cycles benzéniques A et B sont reliés par un élément à 3 atomes de carbone. La fixation du cycle B et la substitution sur l'un ou l'autre des 3 atomes de carbones de la chaîne intermédiaire, conduit schématiquement à distinguer les structures suivantes :



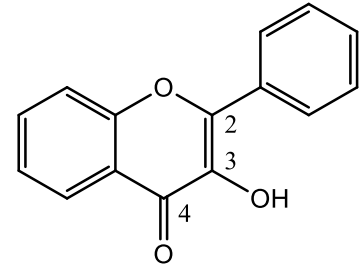
Squelette de base



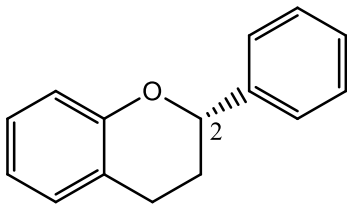
Néoflavonoïdes



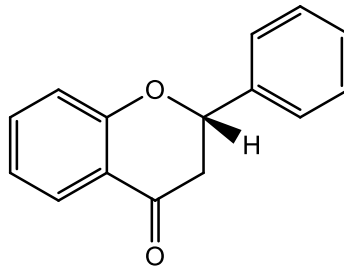
Flavones



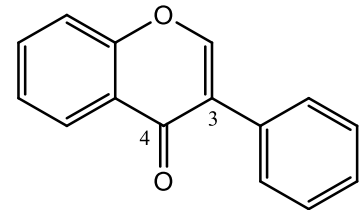
Flavonols



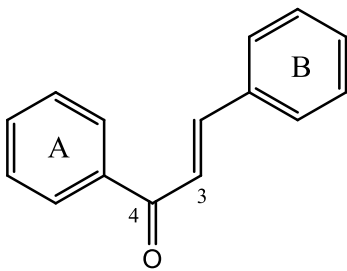
Flavanes



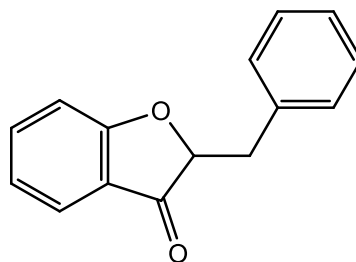
Flavanones



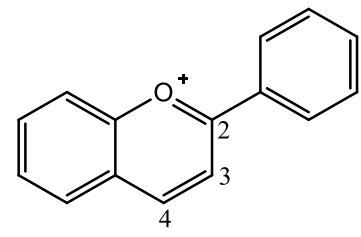
Isoflavones



Chalcones



Aurones



Anthocyanes

Figure 5: Principales classes de flavonoïdes

(Bruneton, 2009)

Les néoflavonoïdes, peu représentés, constituent une nouvelle famille découverte depuis relativement peu longtemps tandis que les isoflavonoïdes sont également une famille importante de produits naturels à côté des flavonoïdes (Courbat, 1972). Les isoflavonoïdes sont une famille plus importante de produits naturels, ils sont mieux connus et responsables de diverses activités biologiques (Courbat, 1972).

Dans les molécules glucosides oxylés de flavonoïdes naturels, le glucide est généralement fixé par l'intermédiaire d'une liaison -C-O-C- établie entre l'hydroxyle (OH) phénolique, énoïque ou alcoolique du composé phénolique et un hydroxyle (OH) de la molécule glucidique (Tableau 5). Parmi les sucres rencontrés le D-glucose est le plus fréquent, mais on rencontre aussi le L-rhamnose, le D-galactose, le L-arabinose et parfois des associations entre deux glucides comme le rhamnosidoglucose ou le diglucose. Dès lors, il est possible de remarquer qu'à un même aglycone peut correspondre plusieurs hétérosides (Tableau 5) :

Tableau 5: Nomenclature en fonction de la nature des substituants

Composés	R3	R7	R'4
Quercitrine	rhamnose	H	H
Isoquercitrine	glucose	H	H
Querciméritrine	H	glucose	H
Spiracoside	H	H	Glucose
Mératine	diglucose	H	H
Rutine	rhamnosido-glucose	H	H

Certains hétérosides naturels possédaient également le glucide fixé directement à la charpente du flavonoïde par l'intermédiaire d'une liaison -C-C- le glucide y est fixé de préférence sur le cycle A et plus particulièrement sur le carbone en 8 (Courbat, 1972). On parle alors de flavonoïdes C-glucosides.

Les flavones, flavonols, flavanones et flavanonols sont les plus communs des flavonoïdes et presque omniprésents dans tout le règne végétal. Les flavones et leurs flavonols dérivés de 3-hydroxy, y compris leurs glycosides, leurs méthoxydes et d'autres produits acylés sur les trois cycles, en font le sous-groupe le plus important parmi tous les polyphénols. Les flavonols aglycones, la quercétine et le kaempférol les plus courants, ont à eux seuls au moins 279 et 347 combinaisons glycosidiques différentes, respectivement (Tsao, 2010). Le nombre de

flavanones et de leurs dérivés 3-hydroxy (les flavanonols, également appelés dihydroflavonols) identifiés ces dernières années a considérablement augmenté. Certaines flavanones ont des motifs de substitution uniques, par exemple des flavanones prénylées, des furanoflavanones, des pyranoflavanones, des flavanones benzylées, donnant un grand nombre de dérivés substitués de ce sous-groupe. Un flavanonol bien connu est la taxifoline (Kawaii et al., 1999).

2.2.5.2 Flavonoïdes et leurs rôles dans la lutte contre le stress oxydant

Pour se défendre contre les dommages liés aux radicaux libres, l'organisme utilise les antioxydants endogènes comme la vitamine E (α -tocophérol) et certaines enzymes. Il s'agit, par exemple, de la superoxyde dismutase et de la catalase dont l'action successive aboutit à l'élimination de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). La première catalyse la transformation d' $O_2^{\cdot -}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), puis la seconde catalyse la transformation de H_2O_2 en eau et en oxygène (Figure 6). Ces enzymes permettent ainsi de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) de type $O_2^{\cdot -}$ et H_2O_2 .

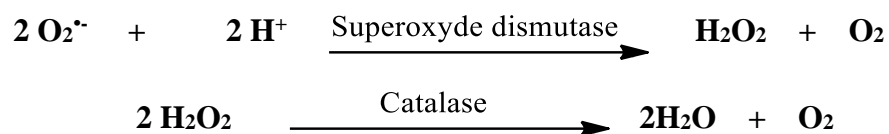


Figure 6: Neutralisation de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase et du peroxyde d'hydrogène par la catalase
(Halliwell, 1991).

Les flavonoïdes interviennent également dans la lutte contre le stress oxydant par inhibition de systèmes enzymatiques comme la xanthine oxydase (XO), les lipoxygénases (LOX) et les cyclo-oxygénases (COX).

Certains ions métalliques (Fe^{2+} , Cu^+ , Zn^{2+}) sont naturellement retrouvés dans l'organisme et y jouent un rôle essentiel dans certaines fonctions physiologiques. Cependant, ils peuvent favoriser la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour entraîner la formation de radical hydroxyl (OH^{\cdot}) très réactif comme indiqué sur cette réaction de Fenton (Figure 7).

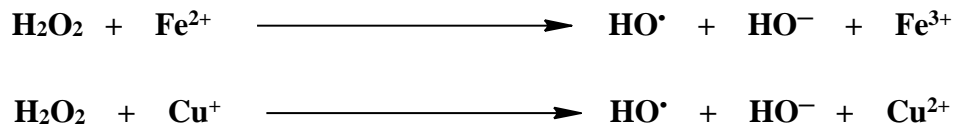


Figure 7: Réaction de Fenton

Les flavonoïdes sont capables de chélater les ions métalliques grâce à leurs doublets non liants des atomes d'oxygène. Les sites susceptibles de piéger un ion métallique doivent comporter deux atomes d'oxygènes adjacents comme la quercétine. L'ion piégé entre les deux atomes d'oxygène forme une structure annulaire stable à cinq ou six chaînons (Figure 8). Les flavonoïdes empêchent ainsi la possible interaction entre les ions métalliques et d'autres composés (H_2O_2) pour former un radical hydroxyle réactif (Cherrak et al., 2016).

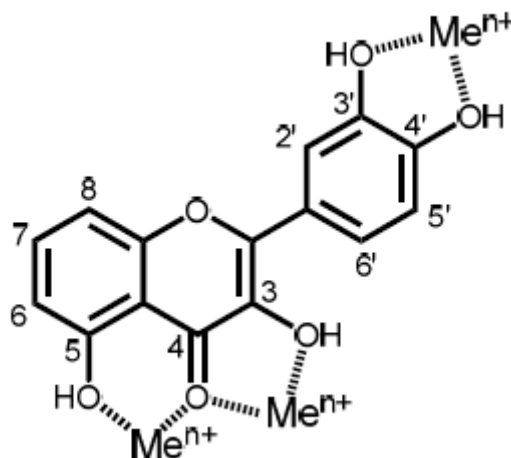


Figure 8: Sites de chélation des ions métalliques (Me^{n+}) par la quercétine
(Tiwari, 2001).

Les flavonoïdes se différenciant par la nature des substituants sur leur squelette de base (Figure 9), cette propriété de chélation des ions métalliques en dépendra également.

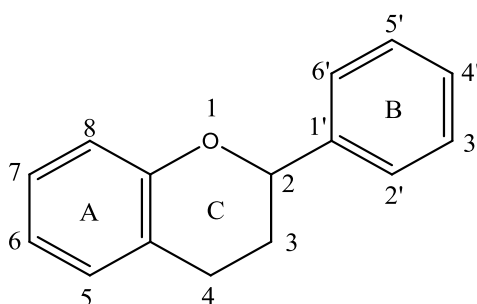
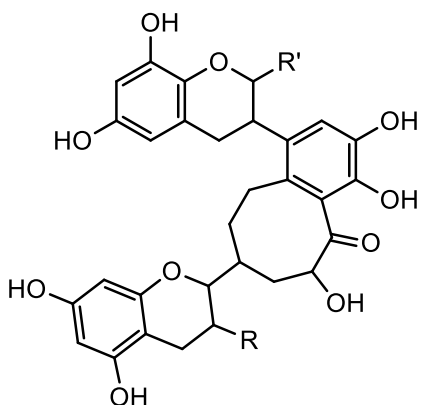
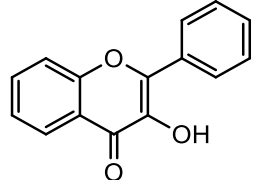
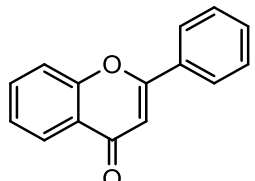
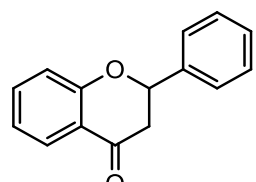
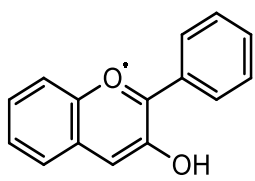


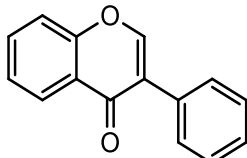
Figure 9: Squelette de base d'un flavonoïde

Les flavonoïdes et composés phénoliques apparentés ont également été classés en fonction de leur potentiel antioxydant (analysés par TEAC) en équivalent trolox et de leurs caractéristiques structurales (Tableau 6). Le nombre de groupements OH phénoliques libres excluant les groupes OH sur les sucres apporte une contribution statistiquement significative avec la méthode TEAC (Lien et al., 1999). La présence ou l'absence de la double liaison en 2,3 n'a pas montré de variation significative sur l'activité antioxydante. La nature des substituants en positions 3, 4 et 5 (4-oxo et O-dihydroxy) pourraient être à l'origine d'une activité antioxydante plus élevée (Bubols et al., 2013; Lien et al., 1999).

Tableau 6: Classement des flavonoïdes et composés phénoliques apparentés en fonction du potentiel antioxydant par TEAC (par ordre décroissant)

Composés	Squelette de base
Groupe 1 : Flavonols	
<ol style="list-style-type: none"> 1. épicatechine gallate 2. épigallocatechine gallate 3. épigallocatechine 4. épicatechine 5. taxifoline 6. catéchine 	

Groupe 2 : Aflavines	
<p>7. theaflavine 8. théaflavine-3-monogallate 9. théaflavine-3'-monogallate 10. théaflavine-3, 3'-digallate</p>	
Groupe 3 : Flavonols	
<p>11. quercétine 12. myricétine 13. morine 14. rutine 15. kaempférol</p>	
Groupe 4 : Flavones	
<p>16. lutéoline 17. lutéoline-4'-glucoside 18. apigénine 19. chrysine 20. lutéoline-3',7-diglucoside</p>	
Groupe 5 : Flavanones	
<p>21. naringénine 22. hespérétine 23. hespéridine 24. narirutine 25. dihydrokaempférol 26. ériodictyol</p>	
Groupe 6 : Anthocyanidines	
<p>27. delphinidine 28. cyanidine 29. apigénidine 30. péonidine 31. malvidine 32. pélargonidine 33. kéracyanine 34. ideain 35. œnine</p>	

Groupe 7 : Isoflavones	
36. génistéine 37. génistine 38. daidzéine 39. daidzine 40. biochanine 41. formononétine 42. ononine	

Dans la peroxydation lipidique, les flavonoïdes neutralisent les radicaux libres en cédant les protons de leurs groupements hydroxyles. C'est le cas de la quercétine dans l'exemple ci-dessous à la Figure 10.

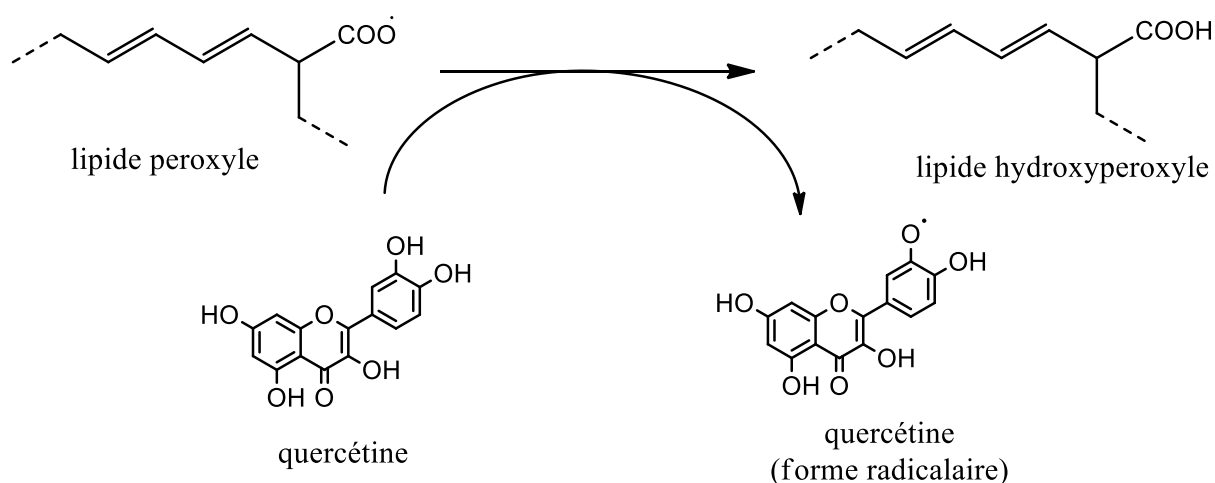


Figure 10: Neutralisation d'un peroxyde par la quercétine

Les flavonoïdes sont également capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) de manière indirecte en régénérant la vitamine E qui est le principal antioxydant endogène, connu pour son rôle dans la protection oxydative des membranes lipidiques. Elle stoppe la réaction radicalaire en chaîne en transformant les radicaux en espèces non radicalaires et en devenant elle-même un nouveau radical faiblement réactif appelé α -tocophéryle (Figure 11, étape 1). Les flavonoïdes interviennent à ce niveau en cédant un atome d'hydrogène et son électron à la vitamine E qui pourra participer de nouveau à la neutralisation d'autres espèces réactives de l'oxygène (Figure 11, étape 2) (Halliwell, 1991; Pietta, 2000).

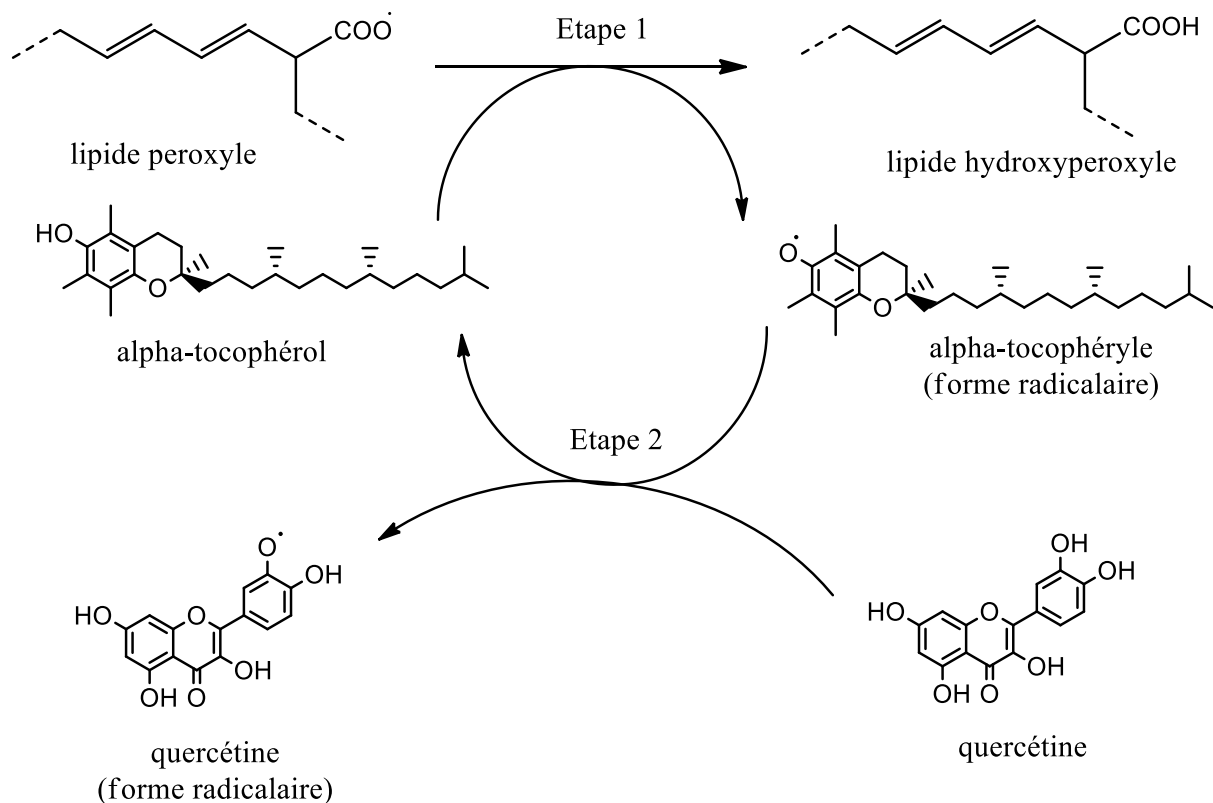


Figure 11: Neutralisation d'un lipide peroxyde par l' α -tocophérol et régénération de ce dernier par la quercétine.

Par ces divers mécanismes, les flavonoïdes contribuent directement ou indirectement à la protection des organismes vivants en évitant les attaques par les radicaux libres circulant. La capacité des flavonoïdes à neutraliser les radicaux nuisibles et à régénérer la vitamine E dépend de leur structure (Figure 12) (Rice-Evans et al., 1996). Celle-ci doit présenter des fonctions hydroxyles pouvant céder facilement un atome hydrogène aux radicaux. De plus, elle doit permettre la délocalisation de l'électron afin de stabiliser le flavonoïde radicalaire et éviter une réaction en chaîne. Les principales fonctions impliquées dans le rôle de piégeage des radicaux chez les flavonoïdes sont :

- groupements représentés en vert : la fonction catéchol qui est le principal site donneur de proton (H^+) et participe également à la délocalisation électronique par effet de résonance. Ensuite la double liaison en C2-C3 du cycle C conjuguée à la fonction carbonyle en position 4 permet la délocalisation électronique à partir du cycle B.

- fonctions représentées en bleu : les fonctions hydroxyles en positions 3 ; 5 et 7 plus la fonction carbonyle en position 4 confèrent un effet potentialisateur de l'activité antioxydante et donc une efficacité maximale.
- fonctions hydroxyles en rouge : ils portent des atomes d'hydrogène très labiles en position 3' et 4' et favorisent le potentiel antioxydant des flavonoïdes.

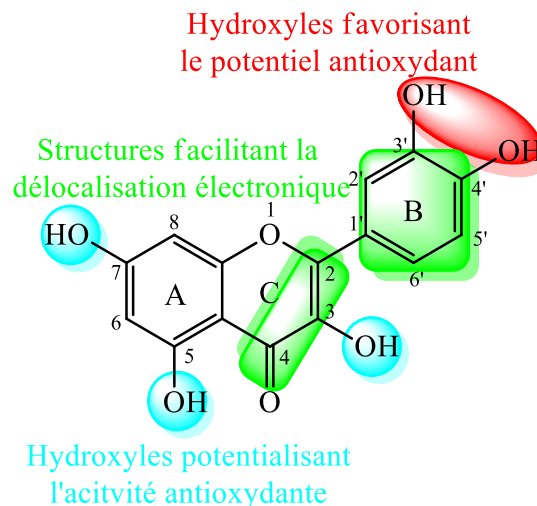


Figure 12: Relation structure-activité des flavonoïdes

(Bubols et al., 2013).

L'amélioration de l'activité antioxydante apportée par la fonction hydroxyle en position 3 a été attribuée par modélisation, dans le cas de la comparaison entre les flavonols et les flavones, à la liaison hydrogène entre le H-6' du cycle B et l'oxygène de la fonction 3-OH. Celle-ci a pour effet de fixer l'angle de torsion du cycle B avec le reste de la molécule à une valeur proche de 0°. Cela implique que les flavonols sont complètement plans, alors que pour les flavones l'angle de torsion est d'environ 20° (Figure 12). Les flavonols sont donc complètement conjugués, ce qui augmente leur capacité de piégeage des radicaux (van Acker et al., 1996). Or, comme indiqué précédemment, les flavonoïdes sont le plus souvent *O*-glycosylés en position 3. Cela a pour conséquence de bloquer la fonction hydroxyle en 3 et de réduire l'activité antioxydante. Au contraire, la glycosylation en position 7 est moins préjudiciable puisque la fonction 7-OH est peu impliquée dans l'activité antioxydante des flavonoïdes.

Plusieurs études ont montré l'existence d'un lien entre le stress oxydant et certaines maladies métaboliques comme le diabète et ses complications (Gillery, 2006).

2.3 Utilisations de *Parinari macrophylla* Sabine

Au Sénégal, c'est une plante utilisée par les guérisseurs traditionnels dans la prise en charge de plusieurs maladies telles l'hypertension artérielle, le diabète, les hémorroïdes et les diarrhées. Il s'agit de décoction ou de macération des feuilles, écorces ou racines administrées par voie orale. Le fruit et l'amande de la graine sont comestibles. La graine est également très prisée pour la production d'huile constituant une véritable activité économique.

La majorité des métabolites secondaires isolés de l'espèce *Parinari macrophylla* est constituée par des composés phénoliques. Ces derniers sont connus pour leurs activités antioxydante et antidiabétique (Ani et al., 2008; Asgar, 2013; Braca et al., 2003).

2.4 Généralités sur le diabète et le stress oxydant

2.4.1 Généralités sur le diabète

Selon l'OMS, le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang. Ainsi, deux types de diabète sont principalement connus :

- le diabète de type 1 ou insulino-dépendant, caractérisé par une production d'insuline insuffisante ;
- le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant ou encore diabète adulte, qui résulte de l'utilisation inadéquate de l'insuline par l'organisme. Il est souvent la conséquence d'un excès pondéral et de l'inactivité physique.

Il y a également le diabète dit « diabète de grossesse » ou « diabète gestationnel » qui se déclare lors d'une grossesse et qui est dû à une production d'hormones par le placenta, qui empêchent l'action régulatrice de l'insuline dans le sang.

La norme de la glycémie dans le sang est 0,70 – 1,10 g/L, pour un individu « sain ». Le diabète est défini par une glycémie > 1,26 g/L (7 mmol/L) de sang après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises, ou bien par la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associés à une glycémie (sur plasma veineux) ≥ 2 g/L (11,1

mmol/L), ou encore par une glycémie ≥ 2 g/L (11,1 mmol/L) 2 h après une charge orale de 75 g de glucose (OMS, 2016).

En 2015, le diabète a été la cause directe de 1,6 million de décès et en 2012 l'hyperglycémie avait causé 2,2 millions de décès supplémentaires(OMS, 2016). Des études prédisent que le nombre de décès dus au diabète va doubler entre 2005 et 2030. Dans le monde, le diabète de type 2 représente environ 90 % du nombre total des cas (OMS, 2016). Il est la principale cause de complications liées à l'insuffisance rénale, la cécité, les complications neurologiques, les accidents vasculaires cérébraux et l'amputation de membres inférieurs (López-Candales, 2001). Le diabète apparaît actuellement comme étant l'une des maladies les plus graves et les plus chroniques en raison d'un mauvais équilibre de l'homéostasie du glucose. En effet, après les repas, plusieurs nutriments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme sont absorbés et en particulier une grande quantité de glucides (Figure 13). Il est donc nécessaire de maintenir l'équilibre de l'homéostasie glucidique. Cette régulation de la glycémie a souvent été étudiée en fonction de la capacité des organes effecteurs à métaboliser le glucose. En effet, le pancréas, les muscles, le tissu adipeux et, le foie mettent en place une réponse biochimique adaptée à la régulation des variations de glucose sanguin qui sont notamment sous le contrôle de l'insuline et du glucagon. L'organisme met donc en jeu le système hormonal, ainsi que plusieurs organes comme le foie, le pancréas et le rein principalement pour assurer cette régulation. Lorsque les mécanismes de régulation de l'organisme s'avèrent insuffisants comme dans le cas du diabète de type 2, l'utilisation de molécules médicamenteuses s'impose. Pour cela, il existe plusieurs types de médicaments en fonction de leur mécanisme d'action (Figure 13).

Les biguanides (metformine) agissent en améliorant la sensibilité à l'insuline (augmentation de l'utilisation périphérique du glucose) et en diminuant la production hépatique du glucose.

Les inhibiteurs des α -glucosidases (acarbose, miglitol) agissent, comme leur nom l'indique, en inhibant de manière compétitive les α -glucosidases intestinales. Par ce processus, ils retardent donc l'absorption des glucides et aboutit à une réduction de la glycémie postprandiale.

Les sulfamides hypoglycémisants (gliclazide, glimepiride, glipizide, etc.) sont des molécules sécrétagogues car ils agissent toutes en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques.

Une classe récente d'antidiabétique (les glifozines) commercialisée depuis 2015 en Europe, est constituée par les inhibiteurs de la réabsorption tubulaire du glucose. C'est l'exemple du

dapagliflozine, du canagliflozine et de l'empagliflozine). Ils agissent par inhibition d'un co-transporteur de la réabsorption du glucose et de sodium (Na^+) dans le tube contourné proximal rénal nommé Sodium Glucose co-transporteur de type 2 (SGLT2). Les inhibiteurs de SGLT2 diminuent donc la réabsorption tubulaire du glucose et engendrent une glycosurie et par conséquent une baisse de la glycémie.

Les incrétines (GLP-1) sont des hormones intestinales qui agissent sur l'homéostasie glucidique en exerçant des actions directes sur le pancréas par augmentation de l'insulinosécrétion et diminution de la sécrétion de glucagon. Cela aboutit à une baisse de la glycémie postprandiale. Ils ralentissent également la vidange gastrique et la prise alimentaire par sensation de rassasiement.

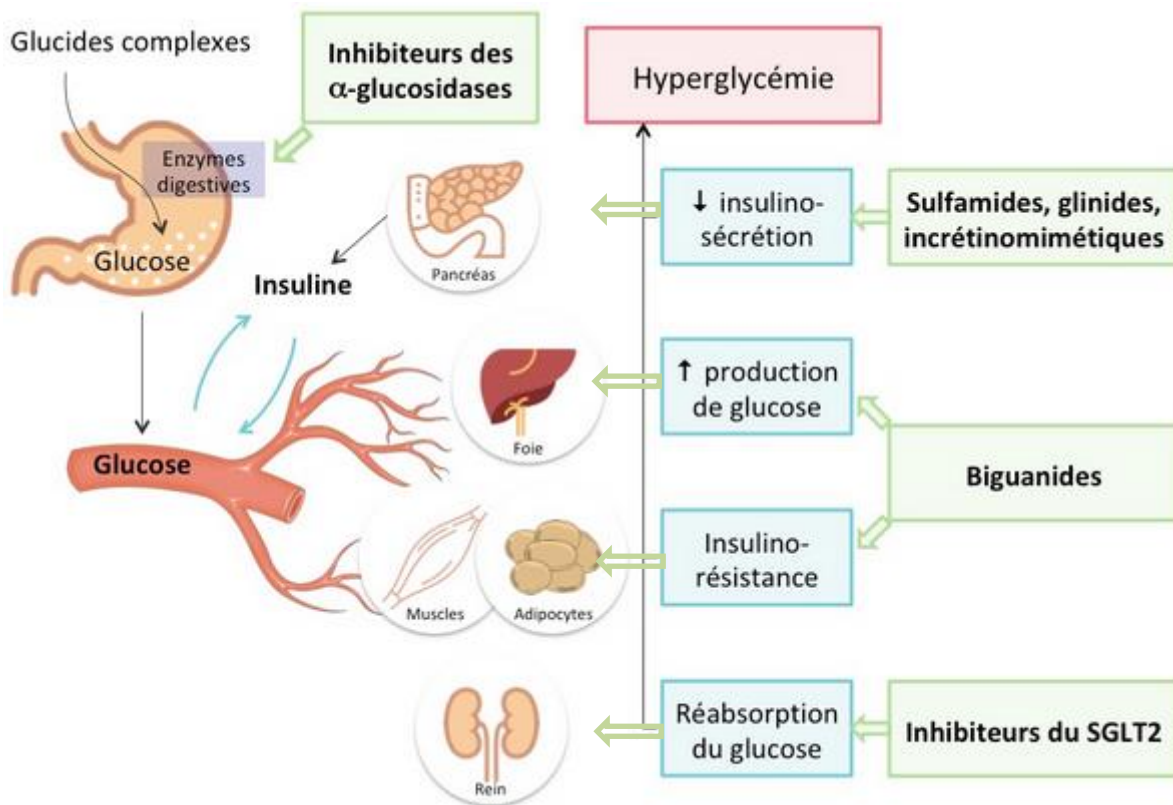


Figure 13: Régulation de la glycémie et actions des antidiabétiques oraux

(<https://pharmacomedicale.org>)

A côté de ces antidiabétiques synthétiques, les plantes continuent de jouer un rôle essentiel dans le traitement du diabète de type 2, en particulier dans les pays en développement où la plupart des gens n'ont pas accès à un traitement médicamenteux moderne. En effet, plus de 80 % des décès dus au diabète surviennent dans les pays en développement (OMS, 2016). L'utilisation de composés ou d'inhibiteurs enzymatiques à base de plantes est également

encouragée dans les pays développés, car certains effets secondaires liés à l'utilisation de produits pharmaceutiques synthétiques sont difficiles à supporter par les patients (Asgar, 2013). Pour éviter ou diminuer les effets indésirables de ces produits synthétiques actuellement utilisés, une alternative consisterait à utiliser des composés d'origine naturelle contenant par exemple des inhibiteurs d' α -amylase et d' α -glucosidase. Dans cette optique, les composés phénoliques ont été utilisés comme inhibiteurs de ces enzymes pour vaincre les maladies chroniques induites par l'hyperglycémie (Asgar, 2013). En effet, l'hyperglycémie chronique peut entraîner la glycosylation des protéines et déclencher également la génération de radicaux libres qui réagissent avec les protéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Brownlee, 2005) conduisant au stress oxydatif et augmenter les concentrations plasmatiques d'insuline et de lipides. Lors des repas, l' α -amylase pancréatique et l' α -glucosidase intestinale sont les deux enzymes impliquées dans la digestion de l'amidon en α -dextrines ou en oligosaccharides (maltose) qui sont ensuite hydrolysés en glucose avant d'être absorbés dans le duodénum et le jéjunum supérieur (Asgar, 2013). Par conséquent, une option de traitement efficace pour le diabète de type 2 serait d'inhiber l'activité de l' α -amylase pancréatique et de l' α -glucosidase intestinale. À cet égard, les inhibiteurs peuvent ainsi retarder l'absorption des glucides alimentaires et supprimer l'hyperglycémie postprandiale. En absence de contrôle, cette hyperglycémie peut entraîner la génération de radicaux libres par la chaîne respiratoire par exemple et provoquer un stress oxydant.

2.4.2 Généralités sur le stress oxydant

Les réactions biochimiques qui se produisent dans les cellules et les organites de notre corps sont la force motrice qui soutient la vie. Dans l'organisme et dans les conditions normales du métabolisme, ces réactions peuvent aboutir à la production de radicaux libres dans les mitochondries, à travers la xanthine oxydase, les peroxyosomes, la phagocytose, les processus inflammatoires, les voies d'arachidonate, l'ischémie et l'exercice physique. Ces radicaux libres sont des atomes, molécules ou ions avec des électrons non appariés dans des orbitales atomiques ou moléculaires qui sont très instables et très réactives. Ils dérivent de trois éléments: l'oxygène, l'azote et le soufre, créant ainsi des espèces réactives de l'oxygène (ERO), des espèces réactives de l'azote (ERN) et les espèces réactives du soufre (ERS) (Carocho et al., 2013). Les radicaux dérivés de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants (Liochev et al., 1994). L'oxygène moléculaire (dioxygène) a une configuration électronique unique et est lui-même un radical.

Les ERO comprennent les radicaux libres comme l'anion superoxyde, le radical hydroperoxyde, le radical hydroxyle, l'oxyde nitrique et d'autres espèces comme le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, l'acide hypochloreux et peroxydinitrite. Les différentes voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont décrites ci-dessous (Figure 14). Chaque type de réaction est indiqué par une couleur. Les flèches vertes représentent la peroxydation lipidique, les bleues les réactions de Haber-Weiss et les rouges aux réactions de Fenton. Les lettres en gras représentent des radicaux ou des molécules ayant le même comportement (H_2O_2). La SOD fait référence à l'enzyme superoxyde dismutase et la CAT à l'enzyme catalase (Flora, 2009).

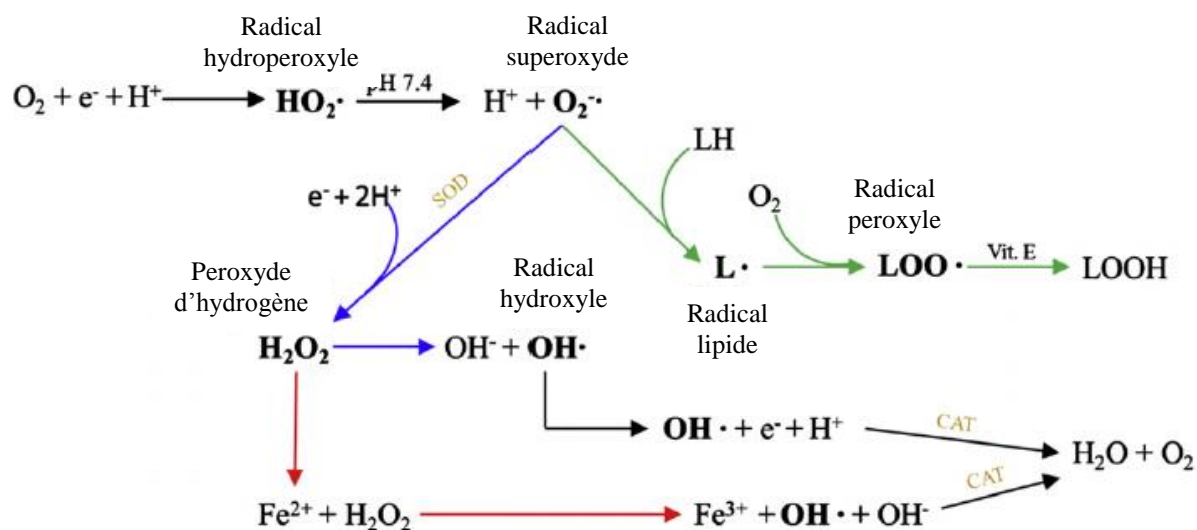


Figure 14: Voies de formation des ERO

(Carocho and Ferreira, 2013)

Les ERN dérivent de NO en réagissant avec O_2 et en formant ONOO. Les ERS sont facilement formés par la réaction des ERO avec les thiols (Lu et al., 2010).

Les ERO et ERN sont bien connues pour jouer un double rôle en tant qu'espèces à la fois délétères et bénéfiques, car elles peuvent être nuisibles ou bénéfiques pour les systèmes vivants (Valko et al., 2006). Les effets bénéfiques des ERO se produisent à des concentrations faibles / modérées par exemple dans la défense contre les agents infectieux et dans la fonction d'un certain nombre de systèmes de signalisation cellulaire. Un autre exemple bénéfique des ERO à des concentrations faibles / modérées est l'induction d'une réponse mitogène. L'effet

nocif des radicaux libres causant des dommages biologiques potentiels est appelé stress oxydatif ou nitrosatif (Kovacic et al., 2001; Ridnour et al., 2005). Les facteurs externes qui contribuent à promouvoir la production de radicaux libres sont le tabagisme, les médicaments, les polluants environnementaux, les radiations, les solvants industriels et l'ozone. Il est ironique que ces éléments, essentiels à la vie (notamment l'oxygène) aient des effets délétères sur le corps humain à travers ces espèces réactives (Lobo et al., 2010). Cela se produit dans les systèmes biologiques lorsqu'il y a une surproduction de ERO/ERN d'un côté et une déficience en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques de l'autre (Figure 15). En d'autres termes, le stress oxydatif résulte des réactions métaboliques qui utilisent l'oxygène et représente une perturbation de l'état d'équilibre des réactions pro-oxydantes / antioxydantes dans les organismes vivants. L'excès des ERO peut endommager les lipides cellulaires, les protéines ou l'acide désoxyribonucléique (ADN) inhibant leur fonction normale. Pour cette raison, le stress oxydatif a été impliqué dans un certain nombre de maladies humaines ainsi que dans le processus de vieillissement. L'équilibre délicat entre les effets bénéfiques et néfastes des radicaux libres est un aspect très important des organismes vivants et est réalisé par des mécanismes appelés «régulation redox». Ce processus de «régulation redox» protège les organismes vivants contre divers stress oxydatifs et maintient «l'homéostasie redox» en contrôlant le statut redox in vivo (Dröge, 2002; Wiernsperger, 2003).

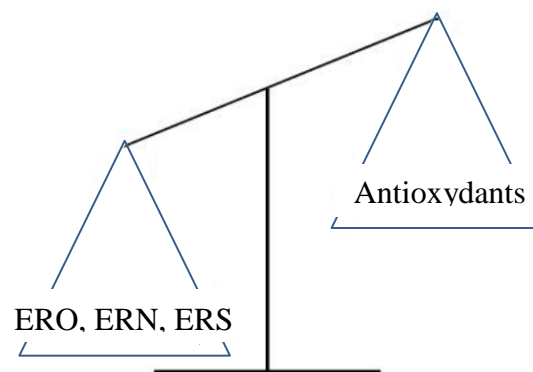


Figure 15: Déséquilibre à l'origine du stress oxydant

Les principales cibles des ERO, ERN et ERS sont les protéines, les molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) et d'acide ribonucléique (ARN), les sucres et les lipides (Carocho et al., 2013; Lu et al., 2010). Les conséquences sont multiples au niveau de l'organisme : vieillissement accéléré, développement de cancers ou responsables de complications dans les maladies cardiovasculaires, le diabète etc.

2.4.3 Diabète et stress oxydant

Plusieurs études ont prouvé l'existence d'un lien entre le stress oxydant et le diabète et ses complications. Dans des conditions d'hyperglycémie chronique, plusieurs mécanismes peuvent être responsables de la production de radicaux libres : la voie des polyols, la glycosylation non enzymatique des protéines, la chaîne respiratoire mitochondriale et d'autres mécanismes comme l'auto-oxydation du glucose et l'activation de la NADPH oxydase vasculaire (Bonfont-Rousselot, 2004), contribuent significativement à la production de radicaux libres et induire un stress oxydant (Figure 16).

Le rôle pathogène des radicaux libres sur les cellules β a souvent été évoqué car ces cellules ont des défenses limitées face au stress oxydant (Rigalleau et al., 2007b). En effet, les espèces réactives de l'oxygène perturbent la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose. Cette diminution se fait par une diminution du rapport ATP/ADP intracytosolique, une hyperpolarisation anormale de la membrane mitochondriale et une surexpression du complexe I de la chaîne respiratoire ce qui conduit à l'apoptose des cellules β et pourrait expliquer la réduction de la masse des cellules β observée dans le diabète de type 2 (Guillausseau et al., 2008). Et selon certains auteurs (Bonfont-Rousselot, 2004), ces radicaux libres pourraient être aussi à l'origine du diabète de type 1. Il semble aussi que les radicaux libres produits excessivement et insuffisamment dégradés au cours du diabète, participent dans l'instauration et l'aggravation de l'insulinorésistance par activation de voies de signalisation qui mènent à l'inhibition de la cascade de signalisation de l'insuline (Figure 16) (Barquissau et al., 2011).

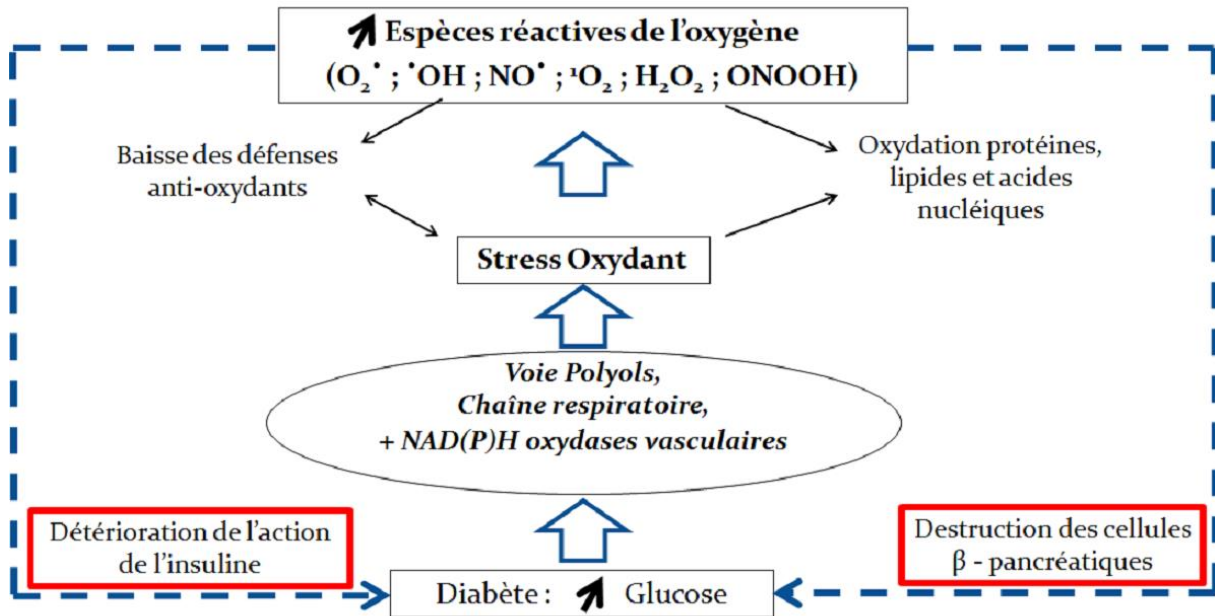


Figure 16: Hyperglycémie et stress oxydant
(Bonnefont-Rousselot, 2004)

2.4.4 Systèmes de défense antioxydant

Plusieurs définitions ont été proposées pour les antioxydants. Tout d'abord ils ont été définis comme «toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations comparée à celle d'un substrat oxydable, retarde ou inhibe considérablement l'oxydation de ce substrat» (Halliwell, 2007). Ils sont également définis comme «toute substance qui retarde, prévient ou élimine les dommages oxydatifs à une molécule cible (Halliwell, 2007; Halliwell et al., 1995). Une autre définition stipule que les antioxydants sont «toute substance qui piège directement les ERO ou agit indirectement pour réguler à la hausse les défenses antioxydantes ou inhiber la production des ERO» (Khlebnikov et al., 2007). Ainsi, un composé pourrait être considéré comme un antioxydant lorsqu'il a la capacité, après avoir piégé le radical, à former un nouveau radical qui est stable par une liaison hydrogène intramoléculaire lors d'une oxydation ultérieure (Halliwell et al., 1990). Au cours de l'évolution humaine, les défenses endogènes se sont progressivement améliorées pour maintenir un équilibre entre les radicaux libres et le stress oxydatif. L'activité antioxydante peut être efficace de diverses manières: en tant qu'inhibiteurs des réactions d'oxydation radicalaire (oxydants préventifs) en inhibant la formation de radicaux libres lipidiques; en interrompant la propagation de la réaction en chaîne d'auto-oxydation (antioxydants à rupture de chaîne); comme désactivateurs d'oxygène singulet; grâce à la synergie avec d'autres antioxydants; comme agents réducteurs qui convertissent les

hydroperoxydes en composés stables; en tant que chélateurs de métaux qui convertissent les pro-oxydants métalliques (dérivés de fer et de cuivre) en produits stables; et enfin comme inhibiteurs des enzymes pro-oxydantes (lipooxigénases).

Le système antioxydant humain comprend deux groupes principaux, les antioxydants enzymatiques et les oxydants non enzymatiques (Figure 17).

Les antioxydants enzymatiques sont divisés en défenses enzymatiques primaires et secondaires.

La défense enzymatique primaire : elle est composée de trois enzymes importantes qui empêchent la formation ou la neutralisation des radicaux libres: la glutathion peroxydase (GPx), qui donne deux électrons pour réduire les peroxydes en formant des sélénoles et élimine également les peroxydes comme substrat potentiel pour la réaction de Fenton; la catalase, qui convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire et à l'un des taux de renouvellement les plus élevés connus de l'homme, permettant à une seule molécule de catalase de convertir 6 milliards de molécules de peroxyde d'hydrogène; et finalement, la superoxyde dismutase convertit les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène comme soustraction de la catalase (Rahman et al., 2007).

La défense enzymatique secondaire : elle comprend la glutathion réductase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase. La glutathion réductase réduit le glutathion (antioxydant) de sa forme oxydée à sa forme réduite, le recyclant ainsi pour continuer à neutraliser plus de radicaux libres. Le glucose-6-phosphate régénère le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) créant un environnement réducteur (Gamble et al., 1984; Ratnam et al., 2006). Ces deux enzymes ne neutralisent pas directement les radicaux libres, mais ont des rôles de soutien aux antioxydants endogènes.

Les antioxydants endogènes sont constitués par le rétinol (vitamine A), les cofacteurs enzymatiques (Q10), les composés azotés (acide urique) et les peptides (glutathion).

La vitamine A est un caroténoïde produit dans le foie et résulte de la dégradation du β -carotène. Il est connu pour avoir un impact bénéfique sur la peau, les yeux et les organes internes. Il a également la capacité de se combiner avec les radicaux peroxydes et éviter ainsi la propagation de la peroxydation lipidique, ce qui lui confère ses propriétés antioxydantes (Lee et al., 2006; Palace et al., 1999).

La coenzyme Q10 est présente dans toutes les cellules et membranes; il joue un rôle important dans la chaîne respiratoire et dans d'autres métabolismes cellulaires. Elle agit en empêchant la formation de radicaux peroxydes lipidiques, bien qu'il ait été rapporté que cette coenzyme puisse neutraliser ces radicaux même après leur formation. Une autre fonction importante est la capacité à régénérer la vitamine E (Turunen et al., 2004).

L'acide urique est le produit final du métabolisme des bases puriques exerçant un effet antioxydant. En effet, il est connu pour empêcher la surproduction d'oxydants oxo-hémiques résultant de la réaction de l'hémoglobine avec des peroxydes. D'autre part, il empêche également la lyse des érythrocytes par peroxydation et est un puissant capteur d'oxygène singulet et de radicaux hydroxyles (Kand'ár et al., 2006).

Le glutathion est un tripeptide endogène qui protège les cellules contre les radicaux libres par don d'un atome d'hydrogène ou d'un électron. Il est également très important dans la régénération d'autres antioxydants comme l'ascorbate (Steenvoorden et al., 1997).

Malgré son efficacité remarquable, le système antioxydant endogène ne permet pas toujours d'éliminer totalement les radicaux libres et un régime alimentaire riche en antioxydant pourrait aider à maintenir les concentrations de ces radicaux libres à de faibles concentrations (Pietta, 2000). C'est le cas de l'acide ascorbique (vitamine C) présent dans de nombreux aliments et qui est efficace pour piéger l'anion radicalaire superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et l'oxyde d'azote réactif (Barros et al., 2011). Il y a également la vitamine E qui bloque la peroxydation lipidique en cédant son hydrogène phénolique aux radicaux peroxydes formant des radicaux tocophéroxylés qui, bien qu'étant également des radicaux, ne sont pas réactifs et incapables de poursuivre la réaction en chaîne. La vitamine E est le seul antioxydant majeur des lipides, soluble dans les chaînes, présent dans le plasma, les globules rouges et les tissus, ce qui lui permet de protéger l'intégrité des structures lipidiques, principalement les membranes (Burton et al., 1990). Ces deux vitamines présentent également un comportement synergique avec la régénération de la vitamine E à travers la vitamine C du radical tocophéroxy à une forme intermédiaire, rétablissant ainsi son potentiel antioxydant (Hallpner et al., 1998).

La vitamine K est un groupe de composés liposolubles, essentiel pour la conversion post-traductionnelle des glutamates liés aux protéines en carboxyglutamates dans diverses

protéines cibles. La structure 1,4-naphtoquinone de ces vitamines confère l'effet protecteur antioxydant.

En plus des vitamines, d'autres composés participent également à l'activité antioxydante. C'est le cas des flavonoïdes qui sont un groupe de composés qui partagent le même squelette de diphenylpropane en C6-C3-C6. Leur propriété antioxydante est due aux groupes hydroxyles phénoliques attachés aux structures cycliques qui peuvent agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, désactivateurs d'oxygène singulet, éliminateurs de radicaux superoxydes et même comme chélateurs de métaux. Parmi ces flavonoïdes les plus importants il y a la catéchine, la catéchine-gallate, la quercétine et le kaempférol (Procházková et al., 2011; Catherine A. Rice-Evans et al., 1996). Il y a également des acides phénoliques qui sont constitués d'acides hydroxycinnamique et hydroxybenzoïque. Ils sont omniprésents aux végétaux et parfois présents sous forme d'esters et de glycosides. Ils ont une activité antioxydante en tant que chélateurs et piègeurs de radicaux libres avec un impact spécial sur les radicaux hydroxyles et peroxydes, les anions superoxyde et les peroxy-nitrites. L'un des composés les plus étudiés et prometteurs dans le groupe hydroxybenzoïque est l'acide gallique qui est également le précurseur de nombreux tanins, tandis que l'acide cinnamique est le précurseur de tous les acides hydroxycinnamiques (Terpinc et al., 2011).

Les caroténoïdes sont un groupe de pigments naturels qui sont synthétisés par les plantes et les micro-organismes, mais pas par les animaux. Ils peuvent être séparés en deux grands groupes: les caroténoïdes appelés carotènes qui contiennent des groupes terminaux spécifiques comme le lycopène et le β -carotène; et les caroténoïdes oxygénés connus sous le nom de xanthophyles, comme la zéaxanthine et la lutéine. La principale propriété antioxydante des caroténoïdes est due à l'extinction de l'oxygène singulet qui résulte en caroténoïdes excités qui dissipent l'énergie nouvellement acquise par une série d'interactions rotationnelles et vibrationnelles avec le solvant, retournant ainsi à l'état non excité et leur permettant d'éteindre les espèces radicalaires. Les seuls radicaux libres qui détruisent complètement ces pigments sont les radicaux peroxydes.

D'autres constituants comme les minéraux, bien que présents à l'état de traces chez les animaux, ils jouent un rôle important dans leur métabolisme. Concernant l'activité antioxydante, les minéraux les plus importants sont le sélénium et le zinc. Le sélénium n'agit pas directement sur les radicaux libres mais constitue une partie indispensable de la plupart des enzymes antioxydantes (métalloenzymes, glutathion peroxydase, thioredoxine réductase) qui

n'auraient aucun effet sans elle (Tabassum et al., 2010). Le zinc également n'attaque pas directement les radicaux libres mais joue un rôle important dans la prévention de leur formation. Il est un inhibiteur des NADPH oxydases qui catalysent la production du radical oxygène singulet à partir de l'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. Il est présent dans la superoxyde dismutase, une enzyme antioxydante importante qui convertit le radical oxygène singulet en peroxyde d'hydrogène. Il induit également la production de métallothionéine qui est un piègeur du radical hydroxyle et entre aussi en compétition avec le cuivre pour se lier à la paroi cellulaire, diminuant ainsi à nouveau la production de radicaux hydroxyles (Prasad et al., 2004).

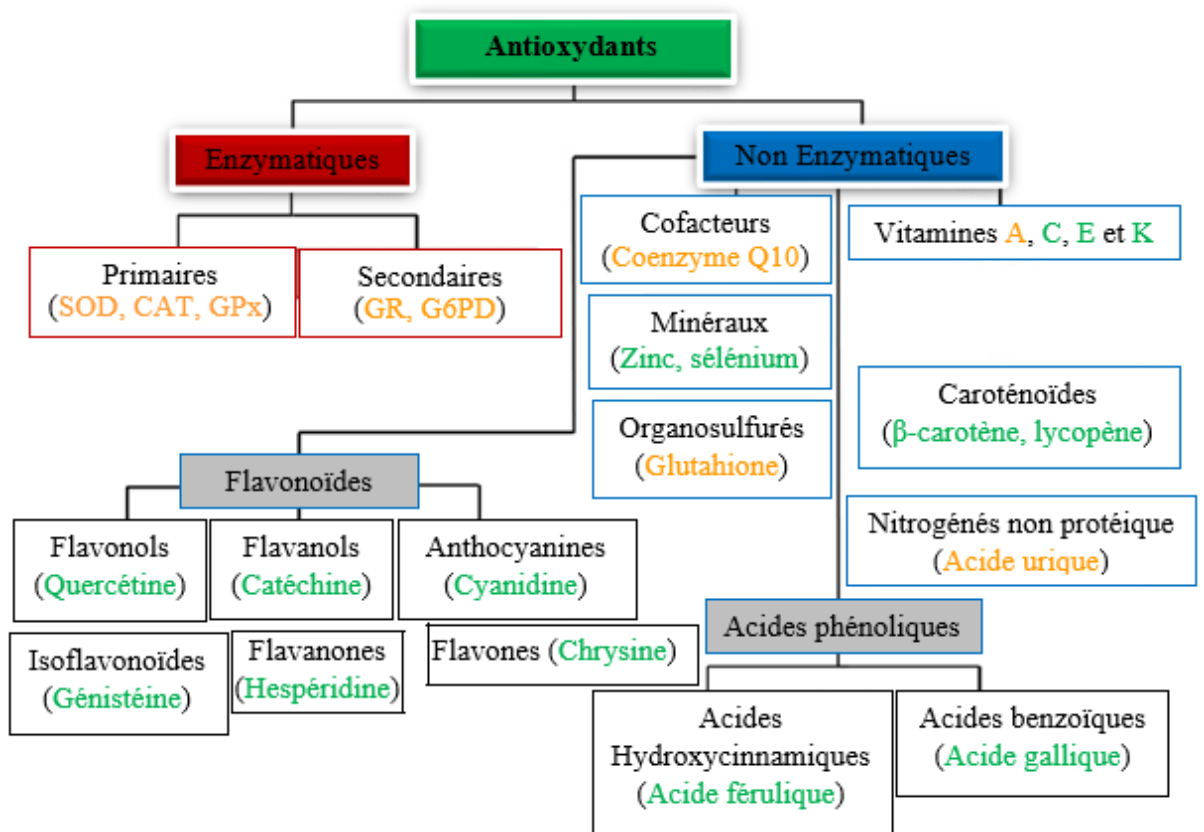


Figure 17: Antioxydants naturels en fonction de leurs classes chimiques

(Couleur verte : antioxydants exogènes ; Couleur orange : antioxydants endogènes)

(Carocho et al., 2013)

3 Matériels et méthodes

3.1 Matériels et méthode pour la sélection des meilleurs avec la microplaque de 96 puits

Dans cette partie, les solvants, les réactifs, le matériel végétal et les méthodes utilisés sont présentés dans le premier chapitre des résultats et discussions (voir publication partie résultats).

3.2 Matériels et méthodes pour les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et de l'extrait aqueux des écorces

3.2.1 Matériels

3.2.1.1 Solvants utilisés pour les analyses

Tous les solvants utilisés pour l'extraction des composés bioactifs étaient de qualité analytique. Le dichlorométhane a été acheté chez Sigma Aldrich (St Louis, USA), l'acétonitrile chez Fischer (UK), le méthanol et l'acétate d'éthyle chez VWR (France) et le n-butanol chez Carlo Erba (France).

3.2.1.2 Matériels et réactifs utilisés pour les essais physico-chimiques

Les réactifs ayant servis aux tests ont été commandés chez différents fournisseurs. Le sel d'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) diammonium (ABTS), le Trolox: acide (\pm) -6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique, le persulfate de potassium, le dichlorhydrate 2,2'-azo-bis (2-méthylpropionamide) (AAPH) et la fluorescéine ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). La solution de tampon phosphate utilisée a été préparée comme suit (PBS: chlorure de sodium 137 mM (NaCl), chlorure de potassium 2,7 mM (KCl), hydrogénophosphate disodique 10 mM dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), phosphate de potassium 1,76 mM (KH_2PO_4) dissous dans 1 L d'eau Milli-Q. Des microplaques transparentes (spectrophotométrie) ou noire (fluorimétrie) de 96 puits ont été utilisées respectivement pour les tests TEAC et ORAC.

3.2.1.3 Matériel et réactifs utilisés pour les tests biologiques

Le milieu de culture a été acheté à l'Institut Memorial Roswell Park (RPMI-1640) (Sigma, St Louis, Etats-Unis) et le sérum de veau fœtal auprès de Sigma (St Louis, États-Unis), la solution aqueuse de Cell Titer-96 de Promega et le Bleu Trypan, 0,4 % de BIO-RAD. La trypsine-EDTA (1X) 0,05 %, le PBS pH = 7,2 (1X) et la solution antibiotique-antimycotique (ABAM : pénicilline G (10000 U/mL) et d'amphotéricine B (25 µg/mL) et le tampon Phosphate-Buffered Saline (PBS) ont été achetés chez Gibco Invitrogen (Grand Island, États-Unis). La solution de trypsine EDTA à 0,05 % a été achetée chez Sigma et le lecteur de microplaque (iMark™, BIO-RAD, États-Unis). Les cellules utilisées pour les tests de toxicité étaient des cellules bêta d'une lignée tumorale d'insulinome de rat. Elles ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, États-Unis).

3.2.1.4 Matériel végétal

Les feuilles et écorces de *Parinari macrophylla* Sabine ont été récoltées manuellement à Pakour (Figure 18), dans la région de Kolda se situant dans la zone forestière sud du Sénégal qui renferme encore une grande partie de la biodiversité nationale. Les échantillons de plante ont ensuite été séchés, réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à marteaux de marque AGREX (Villafranca Padovana, Italie), puis emballés dans des sacs en plastique le tout introduit dans des sachets en matière plastique noire et conservés à température ambiante.



Figure 18: Lieu de prélèvement des échantillons

(<https://www.cbd.int>)

3.2.2 Méthodes

3.2.2.1 Méthodes physico-chimiques

3.2.2.1.1 Extraction par macération à l'eau et à l'éthanol

Une macération pendant 48 heures soit dans l'eau soit dans l'éthanol a été effectuée sur les feuilles et écorces de *Parinari macrophylla* Sabine. Puis une série d'extraction liquide - liquide a été réalisée en utilisant des solvants de polarités différentes du moins polaire au plus polaire dans le but d'obtenir des groupes de molécules en fonction des propriétés des solvants utilisés. Le protocole utilisé est résumé selon la Figure 19 ci-dessous.

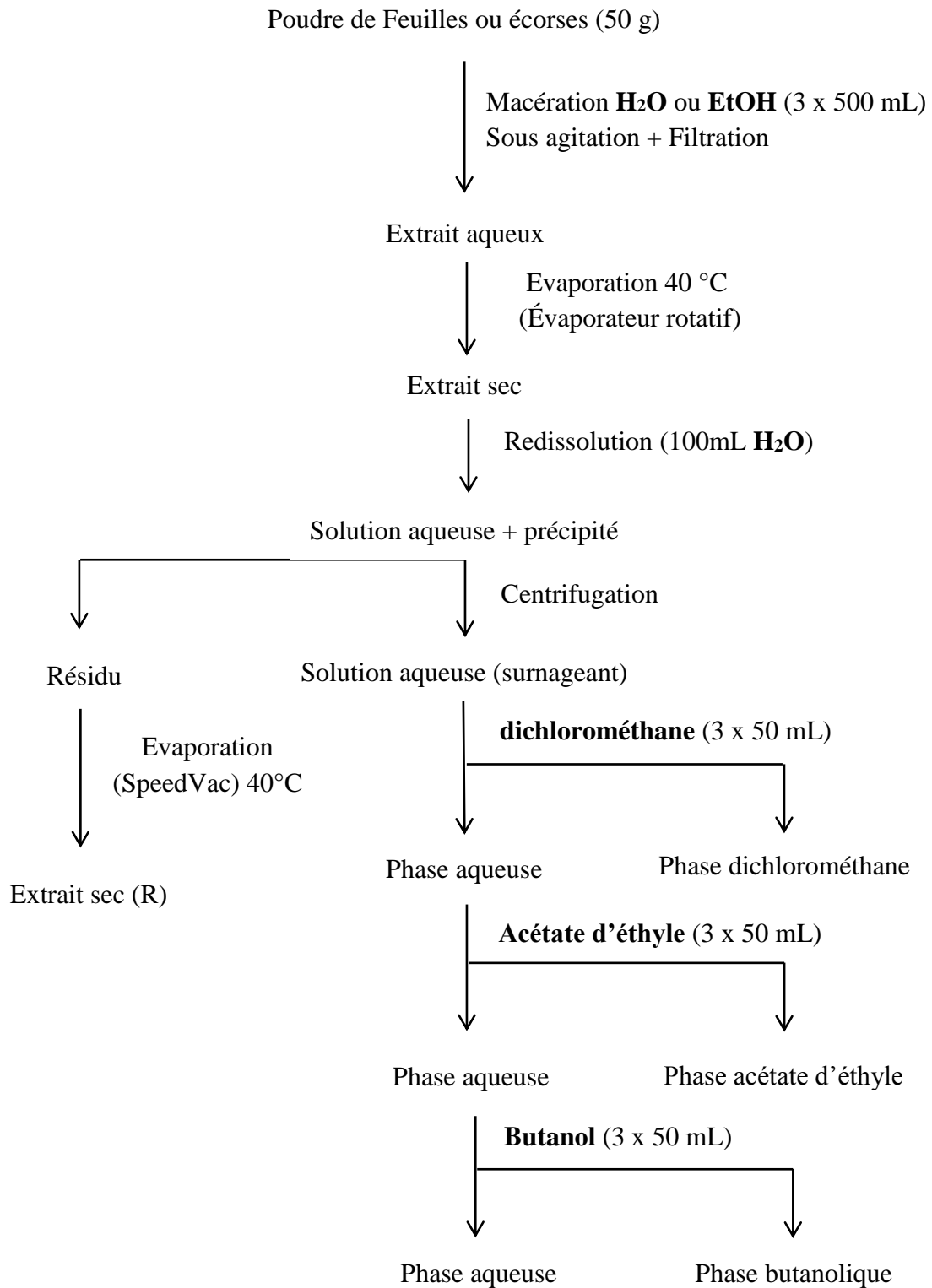


Figure 19: Schéma d'extraction et de fractionnement liquide – liquide

3.2.2.1.2 Evaluation de l'activité anti-radicalaire

3.2.2.1.2.1 Méthodes TEAC et ORAC en microplaques

3.2.2.1.2.1.1 Capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC)

Cette méthode est basée sur le transfert d'électrons (Figure 20) et utilise l'ABTS^{•+}, un radical chromophore qui est un cation bleu-vert formé lorsque l'ABTS réagit avec le persulfate de potassium (Miller et al., 1993; Rice-Evans et al., 1996). ABTS^{•+} radicalaire a des maxima d'absorption (Figure 21) aux longueurs d'onde de 412, 645, 734 et 815 nm (Re et al., 1999). En présence de composés antioxydants, le radical libre ABTS^{•+} est capturé, ce qui entraîne une perte de couleur et donc une diminution de l'absorbance mesurée quantitativement et liée à la concentration en antioxydants (Floegel et al., 2011; Leitao et al., 2012). Le trolox a été utilisé comme antioxydant de référence. Pour l'analyse quantitative, une gamme de trolox a été préparée avec les concentrations suivantes : 20, 80, 200, 300, 500 et 700 µmol/L et les extraits aux concentrations de 5, 10, 30, 50 et 80 µg/mL.

Dix µL de chaque extrait dilué ont ensuite été déposés dans chaque puit de la microplaque plus 200 µL d'ABTS^{•+} à 7 mmol/L dans du PBS. Après 10 minutes d'incubation à 37 °C, l'absorbance a été mesurée à 734 nm dans un spectrophotomètre Vario Skan (Thermo Fisher Scientific). L'expérience a été réalisée en triplicat.

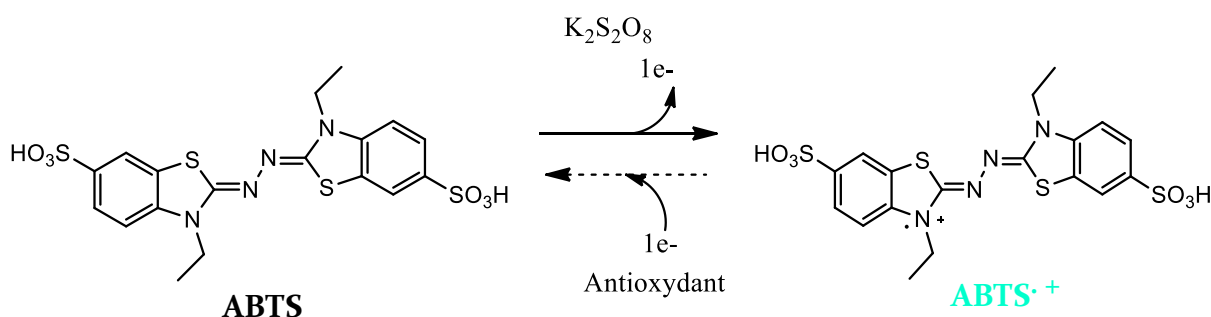


Figure 20: Formation du radical ABTS^{•+} et réaction avec les antioxydants

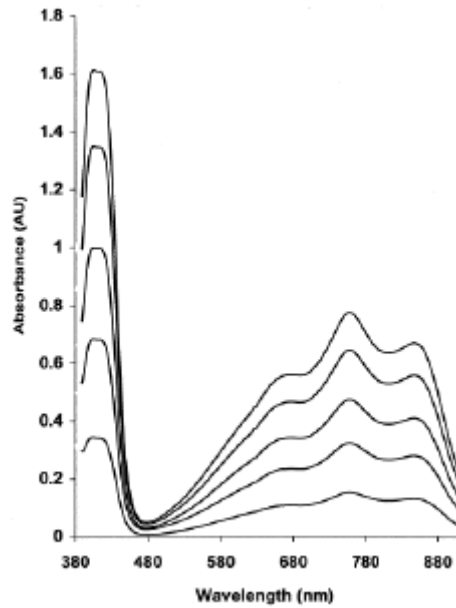


Figure 21: Spectre UV-Visible du radical ABTS^{•+}
(Re et al., 1999)

3.2.2.1.2 Capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC)

Le test ORAC repose sur l'oxydation d'une sonde fluorescente (fluorescéine) par des radicaux libres, qui sont souvent des radicaux peroxydes, mais peuvent aussi être des radicaux hydroxydes. Ces radicaux libres sont produits par un générateur de radicaux (AAPH) (Figure 22) (Cao et al., 1993; Casettari et al., 2012).

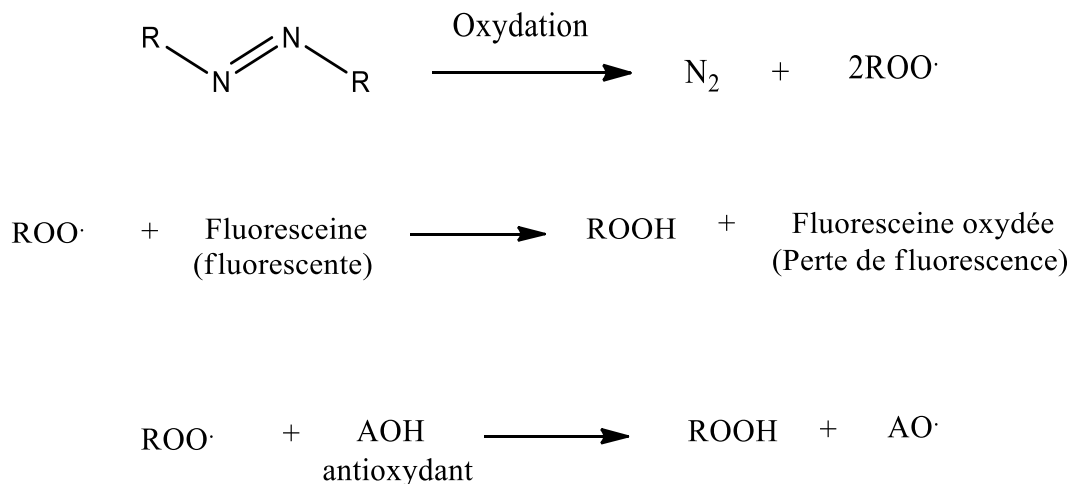


Figure 22: Principe de la méthode ORAC

Au cours de l'expérience, les radicaux libres endommagent la sonde et réduisent ainsi l'intensité de la fluorescence. Le degré de changement de l'intensité reflète la quantité de dommages causés par les radicaux libres. L'ajout d'un antioxydant permet d'absorber les radicaux libres, ce qui réduit les dommages reçus par la sonde et prolonge sa fluorescence. Pour quantifier la protection conférée par un antioxydant, une mesure de l'aire sous la courbe de l'échantillon a été réalisée et comparée à l'aire sous la courbe d'un antioxydant de référence, le trolox (Zulueta et al., 2009) (Figure 23).

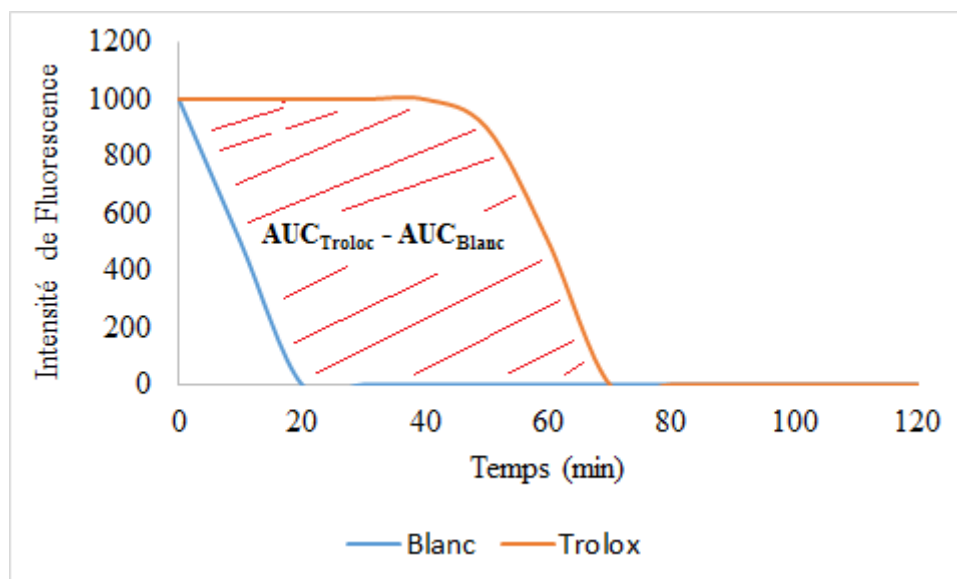


Figure 23: Principe de mesure de l'activité antioxydante avec la méthode ORAC

Cette courbe montre l'allure de la fluorescence en absence (Blanc) et en présence (trolox) d'antioxydants. En effet, la fluorescéine est oxydée en absence d'antioxydants ce qui se traduit par une extinction précoce de la fluorescence pour le blanc. La présence d'un antioxydant comme le trolox cède un atome d'hydrogène à la fluorescéine oxydée pour redonner une forme réduite fluorescente ce qui maintient la fluorescence jusqu'à la consommation totale des antioxydants dans le milieu réactionnel.

Une courbe d'étalonnage a été construite en utilisant le trolox avec les mêmes gammes qu'avec la méthode TEAC. Dix μL de chaque extrait dilué ont ensuite été déposés dans un puit de microplaque noire suivi de 150 μL de fluorescéine à $8,5 \cdot 10^{-8}$ mol/L dans de l'eau Milli-Q. Après une incubation de 10 minutes à 37 °C, l'AAPH à $153 \cdot 10^{-3}$ mol/L dans du PBS (Jiménez et al., 2008; Mohamadi et al., 2015; Samaniego Sánchez et al., 2007) a été distribué automatiquement dans les puits de la microplaque. La cinétique de fluorescence a ensuite été contrôlée toutes les 5 minutes pendant 120 minutes en utilisant un spectromètre Vario Skan

avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 530 nm, respectivement. Les résultats ont été exprimés en μmol de trolox équivalent par gramme d'extrait sec.

3.2.2.1.2.1.3 Détection et mesure de l'activité anti radicalaire au niveau moléculaire par HPLC – ABTS^{•+} online

Le système chromatographique utilisé était constitué par une chaîne HPLC Dionex. Il est composé d'un passeur automatique Dionex WPS3000FC, d'une pompe double gradient à faibles pulsations 3600 SD (Dual Gradient Pump 3600 SD), d'un détecteur à barrettes de diodes (Diode Array Detector 3000 (RS)), d'un détecteur mono-longueur d'onde 3100.

Le test repose sur le principe de la méthode TEAC selon l'enchaînement de la Figure 24. Après séparation, les composés élués ont été détournés vers un premier détecteur DAD puis vers un réacteur dans lequel une seconde pompe réglée à un débit de 0,5 mL/min fournissant une solution du cation radical ABTS^{•+} 7 mmol/L diluée à 2 % dans du PBS. Le mélange s'effectue à l'aide d'un T mélangeur et a été guidé à travers une boucle de réaction d'une longueur de 3 m et d'un diamètre intérieur de 0,25 mm.

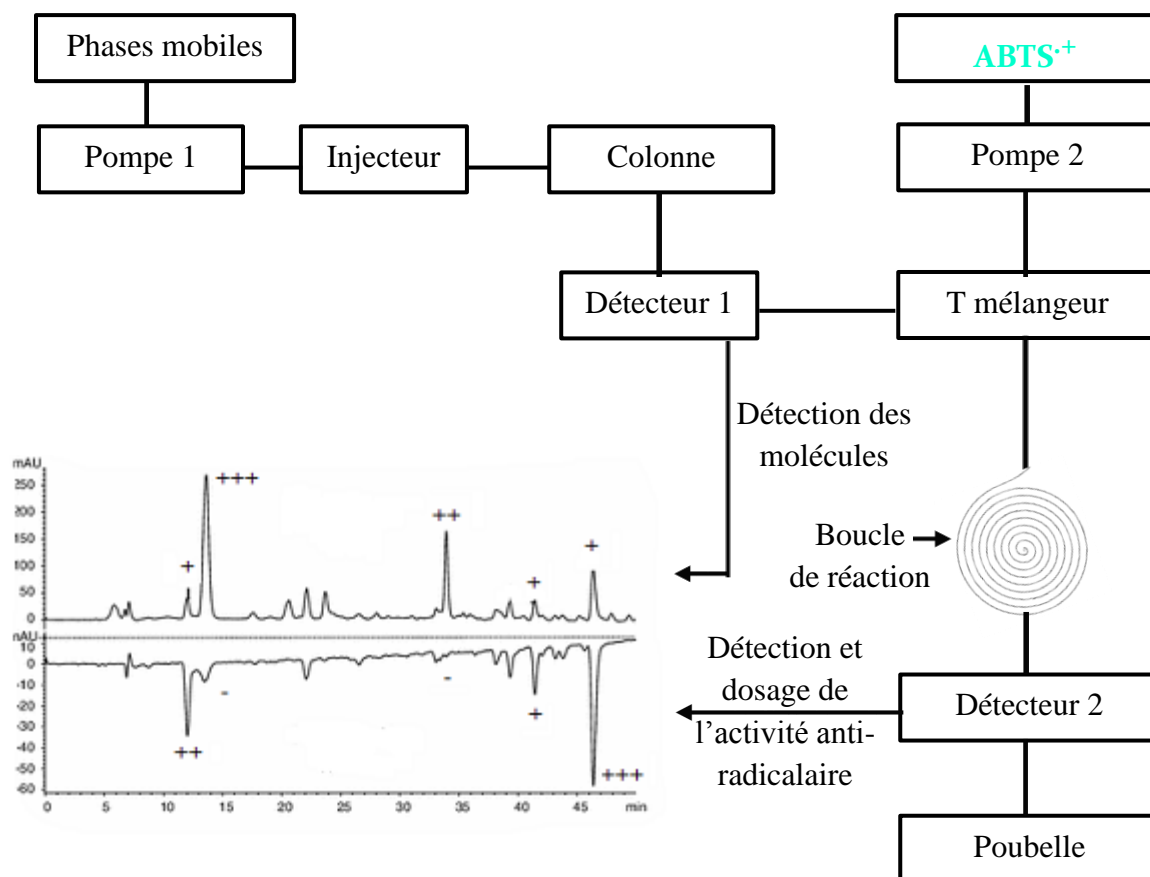


Figure 24: Schéma du couplage HPLC - ABTS⁺ online

La colonne et la boucle de réaction étaient maintenues dans un four thermostaté à 25 °C. La détection des molécules est réalisée grâce à un détecteur à barrette de diodes (DAD) et la détection de l'activité anti-radicalaire grâce à un détecteur par spectrophotométrie d'absorption moléculaire post-réaction à 412 nm. La colonne chromatographique était une ACE C18-PFP (250 x 4,6 mm, 5 µm), le débit était de 1 mL/min et le volume d'injection était de 20 µL. La phase mobile était un gradient de solvant (A) constitué d'un mélange d'eau Milli-Q additionnée de 0,1 % d'acide formique (v/v) et d'un solvant (B) constitué d'acétonitrile additionné de 0,1 % d'acide formique (Figure 25).

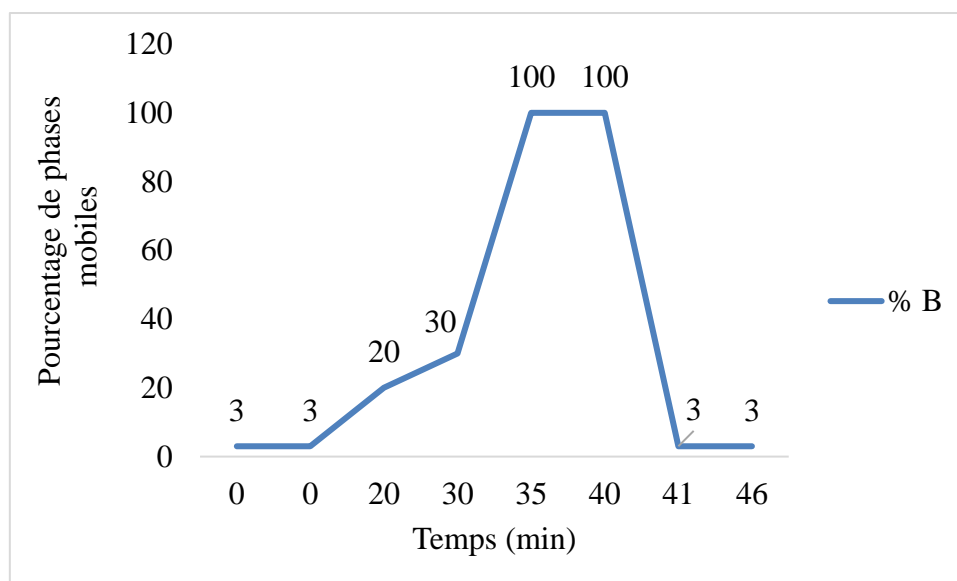


Figure 25: Gradient de phase mobile

L'exploitation des données a été réalisée grâce au logiciel Chromleon version 6.7.

Les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et l'extrait aqueux des écorces ont été dissous dans un mélange eau Milli-Q/méthanol (50 :50 ; v/v) à des concentrations comprises entre 1 et 3 mg/mL puis filtrés sur une membrane Chromafil® PET-Xtra de 0,45 µm de diamètre (Macherey-Nagel, Hoerd, France) avant d'être injectés dans le système chromatographique.

3.3 Caractérisations physico-chimiques

3.3.1 Réactions de précipitation

Les tests de précipitation ont été effectués dans des tubes à essai en verre.

Ils ont été effectués sur les extraits totaux aqueux et éthanolique des feuilles et l'extrait aqueux des écorces en se référant aux travaux de Kumar, Houta et Surmaghi avec quelques adaptations en fonction de la matrice analysée.

3.3.1.1 Recherche des alcaloïdes

A 0,2 g d'extrait, sont ajoutés 2 mL d'acide chlorhydrique 2 M puis 2 mL de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité orange indique la présence d'alcaloïdes (Houta et al., 2012).

3.3.1.2 Recherche de flavonoïdes

Réaction au chlorure ferrique ($FeCl_3$) : Les flavonoïdes, du fait de la présence de fonctions phénoliques dans leurs génines, donnent des colorations variées avec des solutions diluées de chlorure ferrique ($FeCl_3$). A 2 mL de solution d'extrait, sont ajoutés 2 à 3 gouttes d'une solution de $FeCl_3$ à 2 %, l'apparition d'une coloration verdâtre témoigne la présence de flavonoïdes.

Réaction à la cyanidine : A 2 mL de solution extractive sont ajoutés 2 mL d'alcool chlorhydrique (éthanol 96°, eau, acide chlorhydrique (HCl) concentré (2 :2 :1 ; v/v/v). Il se développe une coloration rouge-orangée puis violette confirmant la réaction de flavonoïdes (Surmaghi et al., 1992).

3.3.1.3 Recherche de tanins

Réaction de Stiasny : En présence du réactif de Stiasny, les tanins condensés précipitent. 0,2 g d'extrait sec sont additionnés à 3 mL d'acétate d'ammonium (5 M) et 3 à 4 gouttes d'une solution de $FeCl_3$ à 2 %. Une coloration bleue noire se développe confirmant ainsi la présence de tanins galliques.

- *Réaction de Bate-Smith* : 0,2 g d'extrait sec sont mis en présence d'acide chlorhydrique (1 mL), puis porté à l'ébullition pendant 5 minutes. L'apparition d'une coloration rouge brique témoigne de la présence de tanins catéchiques (Surmaghi et al., 1992).

3.3.1.4 Recherche d'antraquinones

0,2 g d'extrait ont été prélevés dans un tube à essai sec et 3 ml de chloroforme ont été ajoutés et agités pendant 5 minutes. 3 mL de solution d'ammoniaque à 10 % ont été ajoutés et soumis à agitation. Une couleur rose pourpre ou rouge dans la couche d'ammoniaque indique la présence d'antraquinones (Manoharan et al., 2013).

3.3.1.5 Recherche de saponosides

Environ 0,2 g de l'extrait ont été vigoureusement agités en présence de 3 mL d'eau distillée dans un tube à essai et chauffés jusqu'à ébullition. Le développement d'une mousse peut être prise comme preuve préliminaire de la présence de saponines (Manoharan et al., 2013).

3.3.1.6 Recherche d'hétérosides cardiotoniques

Ils ont été mis en évidence par la réaction de *Réaction de Keller-Kiliani* : En présence d'acide acétique et d'acide sulfurique (renfermant des traces de sels ferriques), les 2-désoxyriboses sont responsables de la formation d'un anneau brun à l'interface. Pour cela, 0,2 g d'extrait ont été dissous dans 1 ml d'acide acétique glacial contenant 1 goutte de solution de chlorure ferrique. Ce mélange a ensuite été recouvert avec 1 ml d'acide sulfurique concentré. Un anneau brun obtenu à l'interface indique la présence d'un désoxyribose caractéristique des glycosides cardiotoniques (Houta et al., 2012; Manoharan et al., 2013).

3.3.1.7 Recherche de stéroïdes

2 ml d'anhydride acétique ont été ajoutés à 2 ml d'extrait de plante de chaque échantillon avec 2 ml d'acide sulfurique concentré. La couleur est passée du violet au bleu ou au vert dans certains échantillons indiquant la présence de stéroïdes (Manoharan et al., 2013).

3.3.1.8 Recherche de tri-terpènes

3 ml de chaque extrait ont été ajoutés à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré pour former une monocouche de coloration brun rougeâtre de l'interface (eau-chloroforme) montrant la présence de tri-terpénoïdes (Houta et al., 2012).

3.3.1.9 Recherche de sucres réducteurs

A 2 mL d'extrait, sont ajoutés 2 gouttes de réactif de Molisch et soumis à agitation. Un ajout de 2 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré sur les côtés du tube à essai, permet de développer un anneau violet rougeâtre à la jonction des deux couches (eau-réactif de Molisch) indiquant la présence de glucides (Manoharan et al., 2013).

3.3.2 Chromatographie planaire (CCM)

Les échantillons ont été préparés à une concentration de 10 mg/mL dans un mélange eau-méthanol (50 : 50 ; v/v) puis filtrés à 0,45 μ m.

Les plaques CCM utilisées sont à base de gel de silice (TLC silica gel 60F254, Merck), fixé sur un support en aluminium.

Pour optimiser la séparation des composés, plusieurs systèmes d'éluant ont été testés :

- *Toluène/acétate d'éthyle/acide formique (5 : 3 : 2)*
- *Butanol/acide acétique/eau (12 : 3 : 5)*
- *Tétrahydrofurane/toluène/acide formique/eau (8 : 4 : 1 : 0,5)*
- *Acétate d'éthyle/méthanol/eau (16 : 2 : 1)*
- *Acétate d'éthyle/méthanol/eau/acide formique (50 : 4 : 4 : 2,5)*

Ce dernier a été finalement utilisé car offrant une meilleure séparation pour les extraits étudiés. Les proportions des différents solvants sont données en volume.

Des révélateurs universels et spécifiques ont été utilisés pour la recherche de fonction structurale caractéristique. La révélation des flavonoïdes et polyphénols a été réalisée par les réactifs de NEU, PEG-400 et NEU/PEG à 366 nm, les stéroïdes et tri-terpènes par le réactif de Liebermann à 366 nm, les sucres réducteurs par le réactif de Molisch et d'autres révélateurs universels comme la vanilline et la *p*-anisaldéhyde à la lumière du jour.

3.4 Identification des molécules actives

3.4.1 Analyse UHPLC-QTOF-MS

Après séparation par UHPLC, les molécules sont introduites dans le spectromètre de masse où elles vont être ionisées (MS) puis fragmentées (MS/MS) (Figure 26). Les données obtenues ont été d'une part utilisées pour tenter d'identifier les composés contenus les extraits étudiés et d'autre part les spectres MS/MS (profils de fragmentation) ont été ensuite comparés entre eux pour générer des réseaux moléculaires après un traitement préalable des données par le logiciel mzMine. Les réseaux sont ensuite visualisés avec le logiciel Cytoscape.

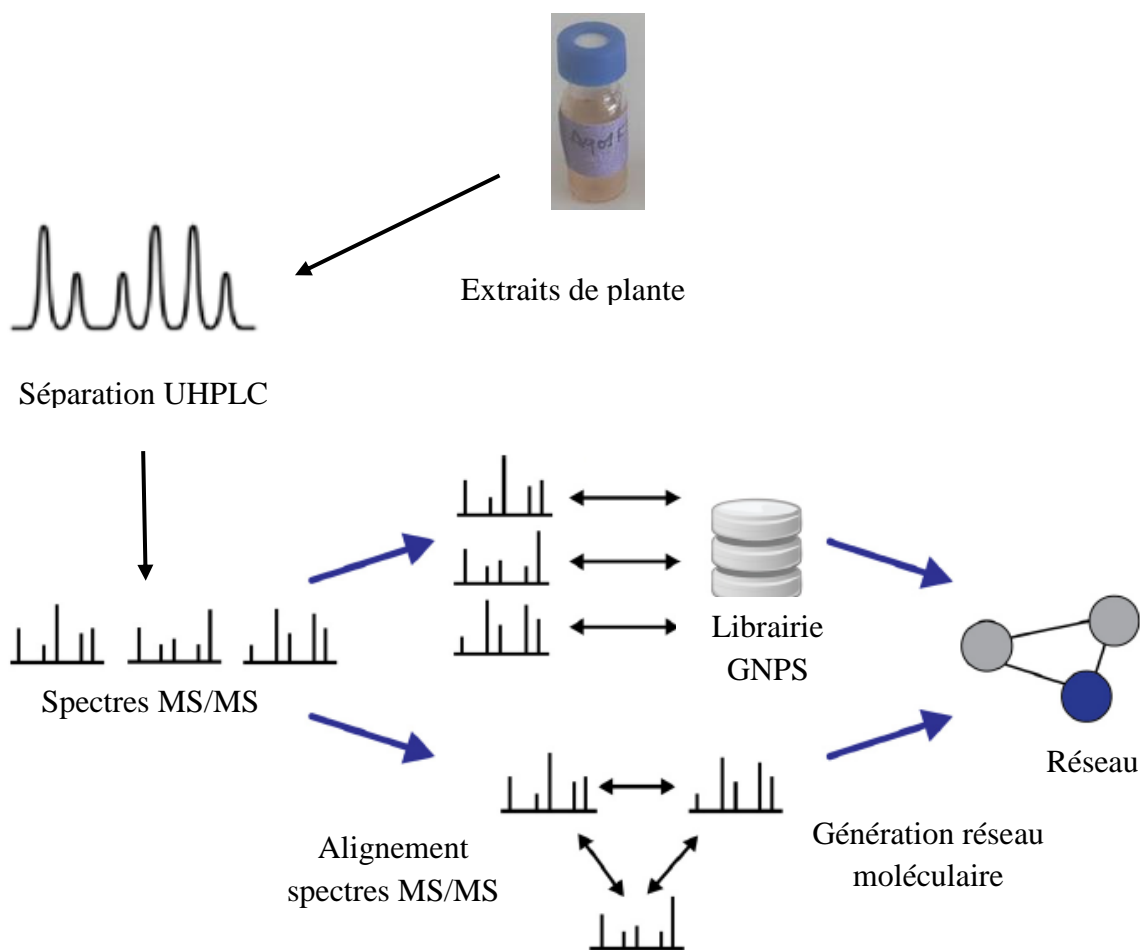


Figure 26: Analyse UHPLC-MS/MS – Génération de réseaux moléculaires
(Wang et al., 2016).

3.4.1.1 Description de l'appareillage

Un système ACQUITY UPLC-DAD Waters a été utilisé pour la séparation des composés phénoliques des feuilles de *Parinari macrophylla* Sabine, comprenant un dégazeur sous vide, un passeur automatique d'échantillons, une pompe binaire et un détecteur à barrette de diodes (DAD). Ce système est couplé à un spectromètre de masse à haute résolution de type Q-TOF (microtof-Q II™, Bruker), équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI). Les analyses ont été effectuées en UHPLC-MS puis en UHPLC-MS/MS.

Le spectromètre de masse Q-TOF est schématiquement représenté ci-dessous avec les différents compartiments suivis par l'échantillon analysé (Figure 27).

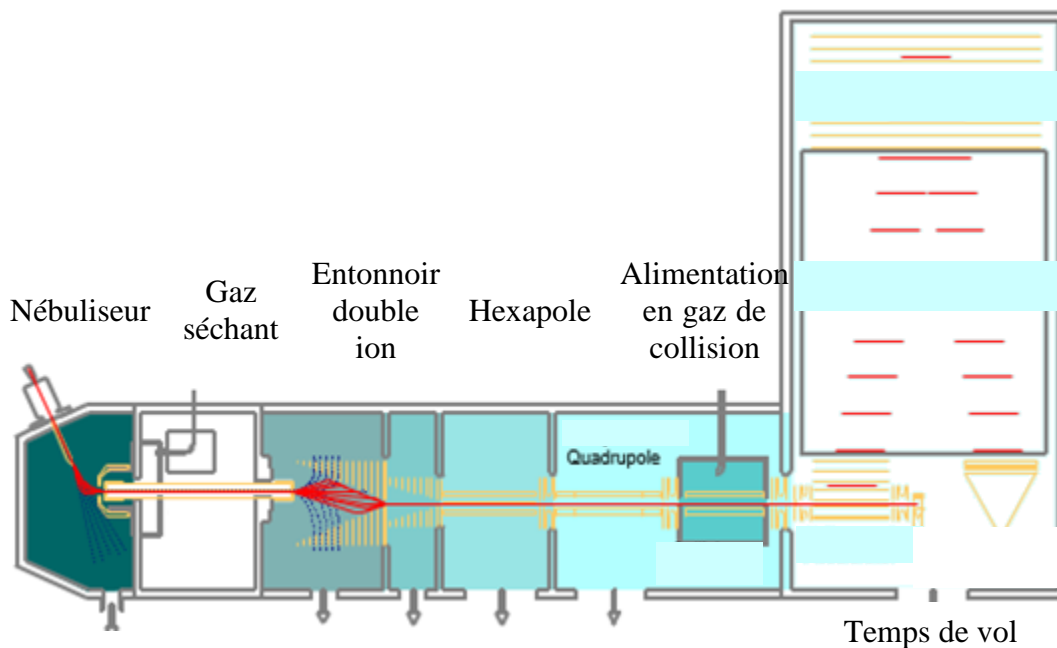


Figure 27: microTOF-Q (Bruker)

Les conditions d'analyse UHPLC utilisées sont les suivantes : la phase mobile était constituée d'un solvant (A) composé d'un mélange d'eau Milli-Q additionnée de 0,1 % d'acide formique et d'un solvant (B) constitué de l'acétonitrile additionné de 0,1 % d'acide formique. Le débit était de 0,3 mL/min et le gradient (Figure 28) de la phase mobile était le suivant :

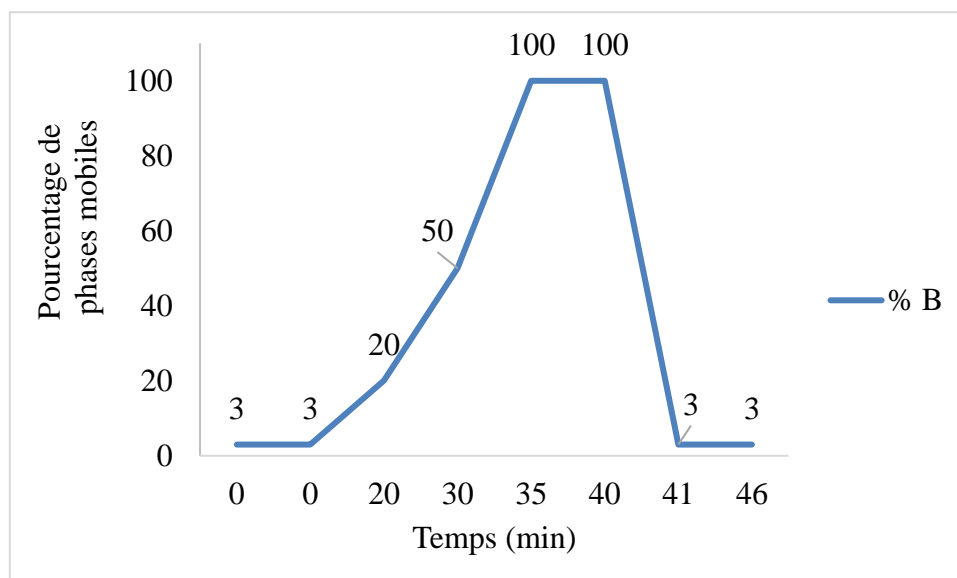


Figure 28: Gradient de phase mobile

Le volume d'injection était de 10 µL. Une colonne Nucléodur Sphinx C18 de dimensions 150 x 3 mm ; 3 µm (Macherey-nagel) a été utilisée.

Concernant la spectrométrie de masse (MS), les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation négatif, avec des spectres de masse acquis sur une gamme allant de 100 à 2000 *m/z*. Les paramètres d'ionisation fixés étaient : tension capillaire, -4000 V; température du gaz de séchage : 200 °C; débit de gaz de séchage, (N₂) : 8,5 mL/min; pression du gaz de nébulisation (N₂), 241317 Pa. Une énergie de collision de 15 eV a été appliquée au niveau de la source (ISCID) afin de favoriser la formation des ions pseudo-moléculaires. Les analyses MS/MS ont été réalisées selon le mode Auto-MS/MS. Les paramètres d'ionisation utilisés étaient les mêmes que pour les analyses MS, avec des spectres de masse acquis sur une gamme allant de 100 à 1500 *m/z*. Les valeurs d'énergie de collision ont été fixées comme indiqué sur le Tableau 7. L'azote (N₂) a été utilisé comme gaz de collision. Pour chaque cycle MS/MS, au maximum deux ions précurseurs ont été sélectionnés et l'intensité minimum des ions parents a été fixée à 2000 cts. Un calibrant externe constitué d'une solution d'étalon de masses connues (Tuning Mix) a été utilisé à chaque début d'analyse à l'aide d'une pompe à seringue directement reliée au spectromètre de masse. Les données de spectrométrie de masse ont été traitées par le logiciel Data Analysis 4.0 (Bruker). La recherche des formules brutes les plus probables a été réalisée en utilisant l'éditeur Smart Formula™ en se limitant à la présence des atomes C, H, O et N. La précision majoritairement acceptée pour la proposition des formules brutes a été établie à 4 ppm.

Tableau 7: Énergies de collision utilisées pour la collecte de données MS/MS

Masse	Largeur d'isolement	Energies de collision (eV)	Etat de charge
100	8	35	1
100	8	25	2
1000	10	45	1
1000	10	37	2
2000	15	50	1
2000	15	45	2

Des composés phénoliques étalons ont été utilisés pour aider à l'indentification des composés contenus dans les extraits de plante étudiés. Il s'agit de : la procyanidine B2, la quercétine, la rutine, la catéchine, le kaempférol, l'acide caféique, l'acide férulique, la myricétine, l'acide chlorogénique et l'acide-4-hydroxybenzoïque.

Les solutions étalons ont été préparées en raison de 1 mg/mL puis un mélange proportionnel des solutions obtenues a été effectué en raison de 200 µL chacune. Les solutions d'extraits de plantes ont été préparées à des concentrations de 5 mg/mL dans un mélange eau Milli-Q – méthanol (50/50 ; v : v).

3.4.1.2 Généralités sur les réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires sont une approche bio-informatique récente, développée par les équipes de Pieter Dorrestein et de Nuno Bandeira de l'Université de Californie, San Diego aux Etats Unis en 2012. La mise en réseau se fait via une plateforme à libre accès permettant à la communauté scientifique l'interprétation des données MS/MS et le partage d'informations, accessible sur le site Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) <https://gnps.ucsd.edu/>. Cette approche est fondée sur la spectrométrie de masse et est bien adaptée pour servir de plate-forme de profilage métabolique ou dans l'analyse de mélanges complexes (Fang et al., 2014; Watrous et al., 2012). En outre, la spectrométrie de masse est très sensible, et bien qu'aucune technique d'ionisation ne soit universelle, l'utilisation d'un mode d'ionisation par électrospray (ESI) permet une ionisation efficace pour un large éventail de classes structurales, permettant son application dans l'analyse de composés naturels. La mise en réseau moléculaire permet de visualiser des molécules apparentées par analogie structurale même lorsque les spectres eux-mêmes ne correspondent à aucun composé connu. Elle commence par la collecte des spectres MS (Figure 29, étape 1), à partir desquels les ions parents sont sélectionnés pour la fragmentation MS/MS (Figure 29, étape 2). Comme les spectres MS/MS sont liés à la structure chimique des métabolites fragmentés, les données sur la fragmentation des ions secondaires sont directement liées à la structure moléculaire, car les liaisons chimiques se rompent en fonction de la force de liaison, de la déformation d'une molécule et de la capacité d'un fragment à stabiliser la charge (Allard et al., 2016; Boudreau et al., 2015). Ainsi, le réseau moléculaire compare tous les spectres MS/MS d'un mélange complexe, d'un extrait donné ou d'un ensemble d'extraits et les regroupe en fonction de leur similarité par l'établissement d'un score de cosinus (Allard et al., 2017; Watrous et al., 2012). Les schémas de fragmentation sont donc intimement liés à la structure moléculaire, mais indépendants des autres paramètres pour évaluer la similarité des composés, tels que la masse des ions parents, le profil isotopique ou le temps de rétention des analyses LC-MS. L'algorithme Spectral Networking utilisé pour générer les réseaux normalise l'intensité des ions fragments, utilise chacun comme un axe indépendant pour construire un vecteur multidimensionnel pour

chaque spectre, et finalement compare la similarité de ces vecteurs en utilisant le score de cosinus (Boudreau et al., 2015; Duncan et al., 2015). En effet, les spectres MS/MS de chaque ion parent représentés sous forme de vecteurs multidimensionnels sont moyennés pour donner une résultante qui est le vecteur moyen. Ensuite ces vecteurs moyens sont comparés entre eux et leur degré de similarité désigne le score de cosinus (Figure 29, étape 3). Ce score de cosinus varie de 0 à 1, où 1 indique des spectres identiques et 0 signifie aucune similitude entre les spectres. Il est ensuite utilisé pour tracer les relations (réseau moléculaire) entre ions parents (Figure 29, étape 4) (Boudreau et al., 2015; Olivon et al., 2017; Quinn et al., 2017). Ainsi, sur le réseau, chaque ion parent associé à son spectre MS/MS est schématisé sous la forme d'un « rond » qu'on nommera perle et le score de cosinus est matérialisé par l'épaisseur des traits reliant les perles pour montrer leur degré de similitude. Les perles peuvent être annotées par des données complémentaires (m/z de l'ion parent, aire des pics, temps de rétention, type d'échantillon etc.) qui peuvent être reflétées par la taille ou la couleur des perles (Garg et al., 2015; Nothias-Scaglia et al., 2015; Wang et al., 2016).

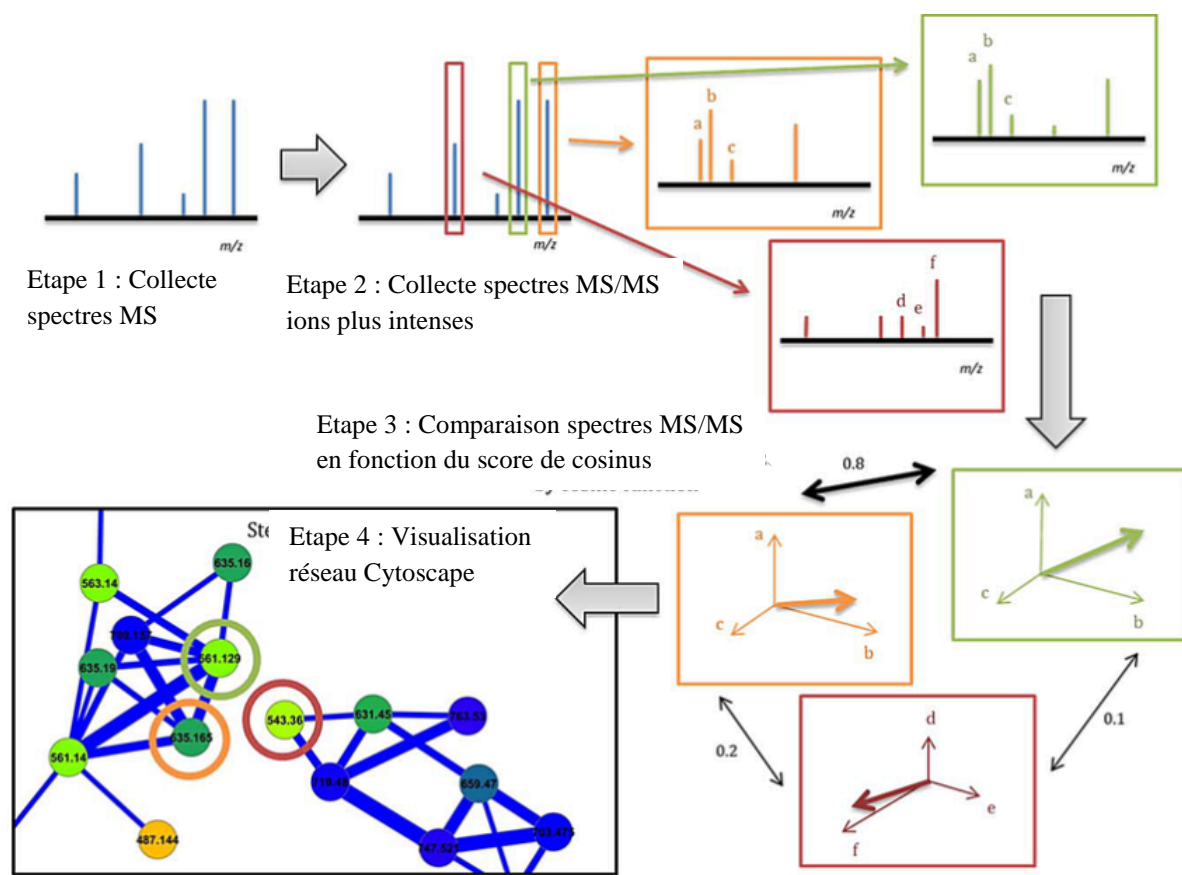


Figure 29: Visualisation des données MS/MS par réseau moléculaire
(Boudreau et al., 2015).

La génération des réseaux moléculaire comprend plusieurs étapes. Les fichiers de données brutes UHPLC-MS/MS ont été tout d'abord convertis au format mzXML en utilisant le logiciel Bruker CompassXport, version 3.0.16.1 (105). Ensuite un prétraitement des données a été réalisé avec le logiciel mzMine avant de les exporter sur la plate-forme GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Les réseaux moléculaires ont été générés en utilisant les paramètres suivants : tolérance sur la masse de l'ion parent = 1,0 Da, tolérance sur la masse des ions fragments = 0,5 Da, nombre minimum de fragments communs = 4 et score de cosinus minimum = 0,6. Enfin, la visualisation des réseaux moléculaires a été réalisée dans Cytoscape version 3.6.0. Les différentes étapes du processus développé pour le traitement des données sont répertoriées dans la Figure 30:

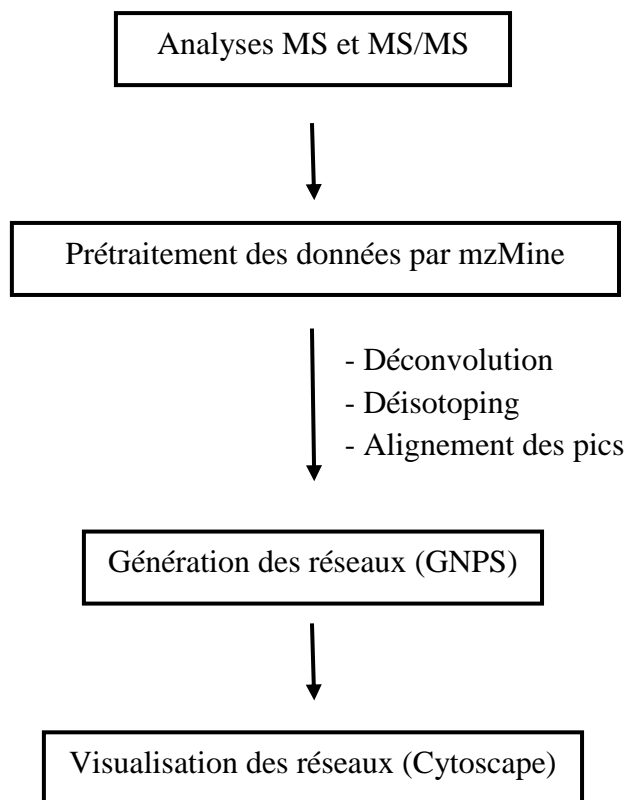


Figure 30: Etapes suivies pour la génération des réseaux moléculaires

3.4.1.3 Identification de candidats par leur masse monoisotopique

Les fichiers de données brutes UHPLC-MS/MS ont également été convertis au format mzml. Ils ont alors été téléchargés sur la plateforme XCMS online puis analysés en choisissant l'approche "single", en rentrant les paramètres "UHPLC/Bruker mode négatif". A l'issue du traitement de données, les chromatogrammes de chaque échantillon sont alignés suivant l'algorithme du logiciel. Les résultats de cette analyse sont sous forme d'un fichier excel contenant les temps de rétention, les rapports m/z et les surfaces de pics intégrés pour l'ensemble des échantillons. En disposant ainsi du m/z de chaque pic, il est possible de proposer un ou plusieurs candidats en les cherchant dans des bases de données contenant les masses monoisotopiques de molécules organiques. La recherche de candidats se fait en principe en rentrant le m/z des pics d'intérêt un à un et en appliquant une tolérance (généralement de 10 à 30 ppm) sur le site Metlin par exemple.

Pour améliorer la rapidité d'analyse, le fichier généré est directement traité sur excel via un ensemble de fonctions, les rapports m/z sont recherchés dans une base de données de masses monoisotopiques créée par TWISTAROMA, en appliquant également une tolérance (ici 15ppm). Avec cette approche il est possible de ne rechercher que dans un sous-ensemble de molécules (comme par exemple des molécules présentes dans la plante d'intérêt). Lorsqu'il existe une masse monoisotopique proche du m/z recherché alors on obtient un candidat putatif. Avec cette approche nous avons balayé l'ensemble des pics générés et identifiés parmi plus de 70 000 masses monoisotopiques des candidats putatifs.

3.4.2 Identification par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses RMN ont été réalisées sur des spectromètres de 400 MHz ou 500 MHz Bruker Avance. Les mesures ont été effectuées à 500,130 MHz pour ^1H et 125,758 MHz pour ^{13}C . Le spectromètre est équipé d'une cryosonde duale $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (5mm cryoprobe DCH $^{13}\text{C}/^1\text{H}/\text{D}$ z-grad). La calibration a été effectuée par rapport au tétraméthylsilane (TMS ; $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$). Les séquences utilisées sont celles de la bibliothèque Bruker. Les échantillons ont été dissous dans du méthanol ou DMSO deutéré. Les résultats sont présentés de la manière suivante : les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et sont organisés du plus grand au plus petit pour le proton et le carbone, la multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes : d (doublet), dd (doublet dédoublé), le nombre de protons, les constantes de couplage sont exprimés en Hz et indiquent la position du proton sur le squelette carboné.

3.5 Etude de la bio-activité des extraits aqueux et éthanolique – étude *in vitro*

Les tests biologiques ont été réalisés sur des cellules β -pancréatiques d'une lignée cancéreuse d'insulinome de rat clone m5F (

Figure 31). Ce sont des cellules adhérentes qui se présentent sous forme d'amas de cellules au fond des flasques (boîtes de culture). Ci-dessous sont présentées des cellules Rinn5F après observation au microscope avec des objectifs (x 5) à gauche et (x 10) à droite.

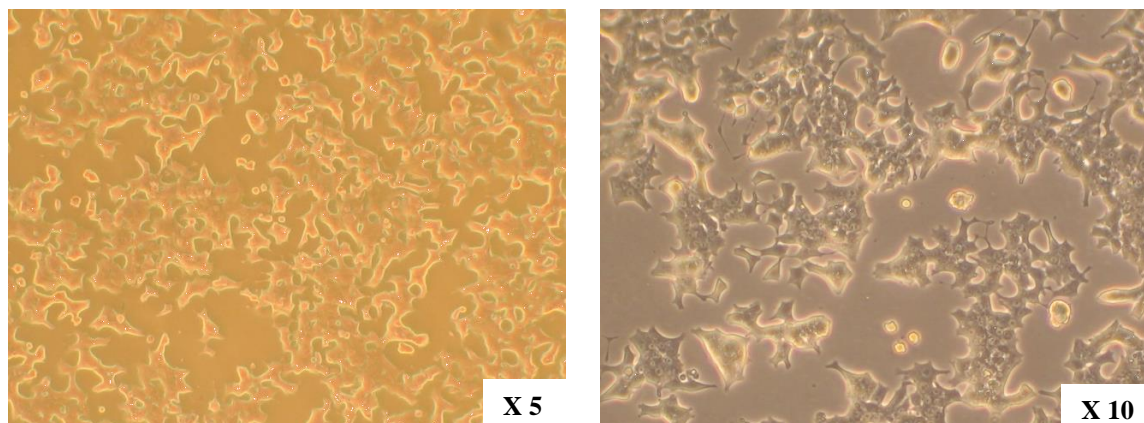


Figure 31: Cellules β -pancréatiques Rinn5F

3.5.1 Culture des cellules β -pancréatiques RINm5F

Les cellules sont cultivées dans un milieu RPMI-1640 complet en atmosphère contrôlée à 5 % CO_2 et thermostaté à 37 °C. Le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 heures, et à l'approche de la confluence (80 – 90 %), les cellules sont repiquées au moyen de la trypsine EDTA à 0,05 %.

3.5.2 Etude de l'effet des extraits sur la viabilité cellulaire – Cell Titer

La toxicité des extraits totaux aqueux et éthanoliques ainsi que les fractions acétate d'éthyle et butanolique a été évaluée sur une lignée cellulaire sécrétrice d'insuline selon la méthode décrite par Auberval et légèrement modifiée par Belhadj et al. (AUBERVAL et al.,

2015; Belhadj et al., 2018). Les cellules des passages 30 à 43 ont été utilisées. Les cellules ont été cultivées dans un milieu complet et dans une atmosphère contrôlée à 37 °C et 5 % de CO₂. A la confluence (80 – 90 %), les cellules ont été traitées avec de la trypsine EDTA à 0,05 % (Sigma) puis ensemencées dans des plaques stériles à 96 puits en raison de 3000 cellules par puit. Le milieu a été changé tous les deux jours. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 24 heures dans un milieu sans sérum. Puis les cellules ont été incubées avec les extraits dissous dans du milieu de culture à des concentrations de 5 à 200 µg/mL pendant 1 heure et 24 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. La viabilité cellulaire a été déterminée en mesurant l'activité mitochondriale avec le test de prolifération des cellules en solution de Cell Titer 96® AQueous One. Après traitement, les solutions d'extraits ont été éliminées et les puits lavés au moyen de PBS 1X. 20 µL de bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium (MTT) et 100 µL de milieu de culture ont été rajoutés dans chaque puit. Les cellules ayant subi un traitement ou non sont à mesure de réduire le MTT en un composé coloré, le formazan, qui est soluble dans le milieu de culture. Cette réaction est rendue possible grâce à la présence de cofacteurs réduits NADPH et NADH produits par des déshydrogénases dans les cellules métaboliquement actives et donc vivantes (Figure 32). Le développement de la couleur est proportionnel au nombre de cellules viables. Les cellules ont été incubées de nouveau pendant 2 h à 37 °C dans 5 % de CO₂ et l'absorbance a été mesurée à 490 nm en utilisant le lecteur de microplaque. Les résultats sont présentés en pourcentage (%) de viabilité par rapport au contrôle négatif (cellules traitées dans les mêmes conditions mais uniquement avec le milieu de culture). Les données de toxicité des extrait sont été moyennées ± SEM avec trois réplicats (n = 3).

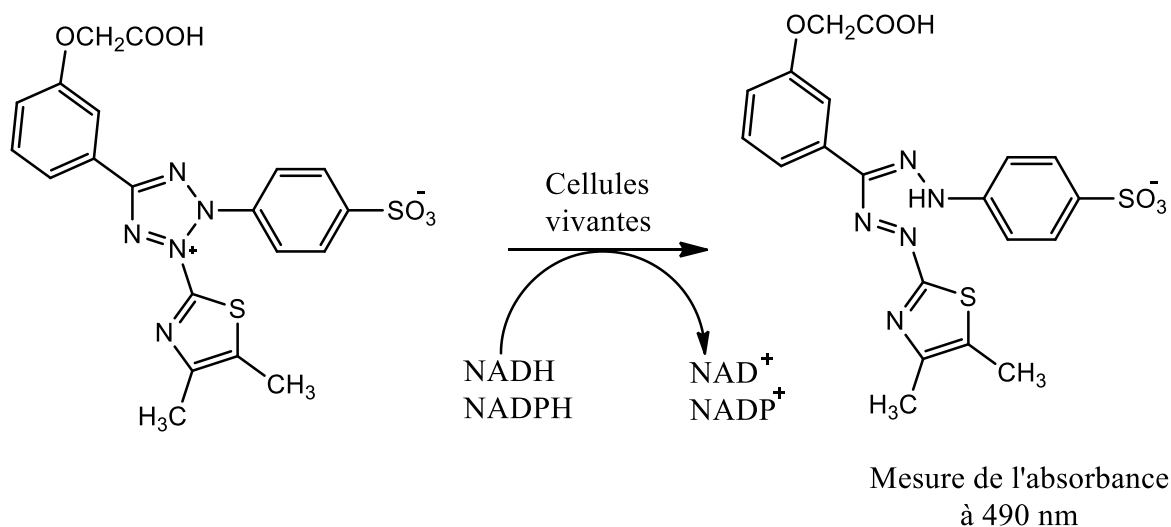


Figure 32: Formation du formazan

3.5.2.1 Etude de l'effet des extraits sur un stress induit à l'HX-XO

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques stériles de 96 puits en raison de 10^5 cellules par puit dans 200 μL de milieu de culture complet et cultivées pendant 24 h à 37 °C et 5 % de CO_2 . Ensuite le milieu de culture complet a été éliminé. Les cellules ont été à nouveaux incubées dans du milieu sans sérum pendant 24 h. Le mélange hypoxanthine (HX : 0,5 mM) et xanthine oxydase (XO : 1 UI/mL) a été préparé dans des proportions 5 : 1 respectivement. Les solutions d'extraits et les concentrations de travail ont été préparées par dissolution et dilution avec du milieu de culture sans sérum. L'épigallocatechine, l'antioxydant de référence, a été préparée dans du milieu de culture sans sérum à 500 $\mu\text{g/mL}$. Pour la détermination de la viabilité, les cellules ont été incubées avec 20 μL de Cell Titer et 100 μL de milieu de culture sans sérum pendant 1 h 45 min avant de faire la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 490 nm.

3.5.2.1.1 Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress induit à l'HX-XO

Le test consiste à incuber les cellules dans du milieu de culture sans sérum contenant 5 ; 10 ; 15 et 25 $\mu\text{g/mL}$ d'extraits (100 μL) pendant 24 h et ensuite induire un stress à l'hypoxanthine/xanthine oxydase (100 μL) pendant 30 min. Lorsque les extraits possèdent des

propriétés protectrices antioxydantes, les cellules résisteront mieux aux dommages liés au stress qui leur a été appliqué.

3.5.2.1.2 Effet curatif des extraits vis-à-vis d'un stress induit à l'HX-XO

Le test consiste à induire tout d'abord un stress à l'hypoxanthine/xanthine oxydase (100 μ L) pendant 30 min et ensuite incuber avec les extraits de plante à des concentrations de 5 ; 10 ; 15 et 25 μ g/mL (100 μ L) pendant 24 h. Dans ce cas lorsque les extraits possèdent des propriétés antioxydantes curatives, les cellules ayant subi des dommages (stress oxydant) devraient voir leur situation se rétablir.

4 Résultats

Les résultats seront présentés en deux volets :

- le premier sera constitué par la publication portant sur la sélection des meilleurs solvants qui ont permis d'extraire plus de composés actifs dans cette étude ;
- le deuxième décrira les résultats obtenus pour les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et de l'extrait aqueux des écorces de *Parinari macrophylla* Sabine.

4.1 Sélection des solvants d'extraction








Influence of the physicochemical parameters of solvents in the extraction of bioactive compounds from *Parinari macrophylla* Sabine (Chrysobalanaceae)

European Journal of chemistry

Mamadou Baldé, Saïd Ennahar, Stéphanie Dal, Séverine Sigrist, Alassane Wélé, Eric Marchioni and Diane Julien-David.


[View Journal Online](#)
[View Article Online](#)

Influence of the physicochemical parameters of solvents in the extraction of bioactive compounds from *Parinari macrophylla* Sabine (*Chrysobalanaceae*)

Mamadou Baldé ^{1,2}, Saïd Ennahar ¹, Stéphanie Dal ³, Séverine Sigrist ³, Alassane Wélé ², Eric Marchioni ¹ and Diane Julien-David ^{1,*}

¹ Laboratory of Analytical Chemistry of Bio-Active Molecules and Pharmacognosy, Hubert Curien Multidisciplinary Institute, UMR 7178, University of Strasbourg, CNRS, 74, Route du Rhin, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

mamadou.balde@etu.unistra.fr (M.B.), emahar@unistra.fr (S.E.), eric.marchioni@unistra.fr (E.M.), diane.julien-david@unistra.fr (D.J.D.)

² Laboratory of Physical Chemistry, Mineral Chemistry, Organic Chemistry and Therapeutic Chemistry, Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology, Cheikh Anta Diop University (UCAD), BP 5005, Dakar, Senegal
aalassane.welc@ucad.edu.sn (A.W.)

³ UMR DIATHEC, EA 7294, Federation of Translational Medicine of Strasbourg (FMTS), University of Strasbourg, Rene Leriche Boulevard, 67200 Strasbourg, France
dalstephaniepro67@gmail.com (S.D.), s.sigrist@defymed.com (S.S.)

* Corresponding author at: Laboratory of Analytical Chemistry of Bio-Active Molecules and Pharmacognosy, Hubert Curien Multidisciplinary Institute, UMR 7178, University of Strasbourg, CNRS, 74, Route du Rhin, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

Tel: +33.3.68854326 Fax: +33.3.68854325 e-mail: diane.julien-david@unistra.fr (D. Julien-David).

RESEARCH ARTICLE

ABSTRACT



doi:10.5155/eurjchem.9.3.161-167.1723

Received: 23 April 2018

Received in revised form: 31 May 2018

Accepted: 02 June 2018

Published online: 30 September 2018

Printed: 30 September 2018

KEYWORDS

TEAC
 ORAC
 Plants
 Extraction
 Cell viability
 Solvent effects

The extraction of bioactive compounds from medicinal plants requires methods which are as diverse as the chemical nature of the compounds themselves. In this study, a 96-well microplate was used where solvent mixtures spanning wide ranges of selectivity and polarity were tested with the objective of extracting a broad range bioactive compounds from plant material. Microplate wells were filled with plant material and the solvents and their mixtures were added. The obtained extracts were assessed in terms of their total antioxidant activity, oxygen radical absorbance capacity and effects on cell viability. An aqueous extract, generally used by traditional therapists, was also included in the study. The results showed that the extracts using methanol with acetic acid (0.1%, v:v), chloroform/ethanol, butanol/DMF, butanol/acetonitrile, ethylene glycol with acetic acid (0.1%, v:v), MTBE/DMSO, ethylene glycol, pentane/ethanol (v:v), ethanol, DMF, DMF with acetic acid (0.1%, v:v), DMSO, DMSO with acetic acid (0.1%, v:v) and THF had a higher antioxidant activity than the aqueous extract. Extracts with greater antioxidant activity than the aqueous extract were obtained largely from solvent mixtures with the exception of ethanol, DMF, DMSO and THF. The antioxidant activity obtained in TEAC varied between 1474.1±4.4 and 3183.0±16.0 µmol TE/g dry extract respectively for aqueous and THF extracts; in ORAC between 1727.7±8.4 and 2683.5±11.7 µmol TE/g dry extract for aqueous and DMSO acetic acid 1%, respectively, with mean ±SEM. In TEAC the THF extract had the highest antioxidant potential with 3183.0±16.0 µmol TE / g dry extract. The DMSO acetic acid (0.1%, v:v) extract had the highest antioxidant potential in ORAC with 2683.5±11.7 µmol TE / g dry extract. Cell viability test using β-pancreatic cells showed that only the acidified methanol extract was toxic after one hour of incubation. After 24 hours, cell viability was less than 70% for extracts using butanol/acetonitrile, MTBE/DMF, acidified methanol, pentane/ethanol and acidified DMSO.

Cite this: *Eur. J. Chem.* 2018, 9(3), 161-167

Journal website: www.eurjchem.com

1. Introduction

The bioactive compounds present in natural plants belong to several chemical groups and are of very diverse natures [1]. Their extraction requires solvents where they can dissolve and then be recovered by physicochemical techniques such as filtration, evaporation, precipitation, etc. Choosing the right extraction solvent is therefore fundamental in order to extract the compounds of interest selectively and in high amounts. This in turn has a direct impact on the outcome of the biological activity assays [2-4].

Most studies use the conventional approach of targeting a chemical group of compounds by using solvents where they are likely to dissolve [5]. Often, a single solvent or solvent mixture is used based on published data without taking into account the specificities of the biological matrices and the diversity of the bioactive compounds they contain. Polar compounds such as polyphenols are extracted by polar solvents or mixtures of polar solvents [6]. This may lead to less efficient extractions in terms of selectivity and yield or even to missing specific molecules. Testing various solvent combinations with arrays of intermediate polarities and selectivities

would allow a more guided choice of extraction conditions with regard to the targeted bioactive molecules.

In the present study, a new system was set up which consists of a 96 well microplate in which several solvents and their mixtures were used to extract a diversity of bioactive compounds. The solvents were selected according to their physicochemical parameters (selectivity, polarity, boiling point, pH, viscosity, dipole moment, etc.) [7-11].

To evaluate the biological activity of the extracts, several methods can be used, including antioxidant, antiparasitic and cytotoxic tests [12-15]. In this study, the extraction efficiency of the different solvents is evaluated by the determination of antioxidant and cytotoxic activities. Anti-oxidant activities were measured using physico-chemical tests: Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and the toxicity of the extracts was evaluated using biological tests on RINm5F cells (cell viability test). This extraction solvent selection system was tested on a Senegalese plant, *Parinari macrophylla*, used by traditional therapists for its anti-diabetic properties. The results obtained were compared with those of the aqueous extract, a solvent conventionally used.

2. Experimental

2.1. Solvents used for extraction

All solvents used in this study were of analytical grade. Ethylene glycol, benzyl alcohol, ethanol, 4-methyl-2-pentanone, dichloromethane, ammonium hydroxide, acetic acid and isoctane were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, USA).

Dimethylformamide (DMF) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Prolabo (France). Acetonitrile, chloroform, cyclohexane were purchased from Fischer (UK). Tetrahydrofuran (THF), methanol, *n*-heptane, pentane, hexadecane, ethyl acetate were purchased from VWR (France). Isopropanol and *n*-butanol were purchased from Carlo Erba (France). Heptanol, methyl *tert*-butyl ether (MTBE), *n*-octanol, 4-methyl-2-pentanol, and xylene were purchased from Merck (Germany). Diethyl ether, petroleum ether were purchased from SdS (France). Toluene, methyl ethyl ketone (MEK) were purchased from Fluka (France) and triethylamine was purchased from ACROS (Belgique).

2.2. Reagents for physical and chemical tests

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Trolox: (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, potassium persulfate, 2,2'-azo-bis(2-methylpropanimidine) dihydrochloride (AAPH), and fluorescein were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

The phosphate buffer solution used was prepared as follows (PBS: 137 mM sodium chloride (NaCl), 2.7 mM potassium chloride (KCl), 10 mM di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (Na₂HPO₄·2H₂O), 1.76 mM potassium phosphate (KH₂PO₄) dissolved in 1 L of Milli-Q water.

2.3. Material and reagents for biological tests

The Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) and fetal calf serum were purchased from Sigma (St Louis, USA), the Cell Titer-96 aqueous solution from Omega and Trypan Blue Dye, 0.4% from BIO-RAD. Trypsin-EDTA (1X) 0.05%, PBS pH = 7.2 (1X) and the antibiotic-antimycotic solution were purchased from Gibco Invitrogen (Grand Island, USA). The cells used for the toxicity tests were beta cells of a

rat insulinoma tumor line. They were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA).

2.4. Plant material

The leaves of *Parinari macrophylla* were harvested manually in Pakour, in the Kolda region of southern Senegal. They were dried, reduced to powder in an AGREX hammer mill, packed in dark plastic bags and kept at room temperature.

2.5. Extraction procedure

Microplate wells were filled with plant material (leaves powder) and excess was removed by shaving. The average mass per well was 25±0.3 mg. Then, the contents were transferred into a deep well microplate consisting of 96 2-mL wells (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Solvents and their mixtures (1.5 mL) were then added according to the layout shown in Table 1, followed by the addition of 1.5 mL of each solvent or solvent mixture. Extraction was performed by maceration and the microplates were subjected to automatic stirring at 150 rpm for 48 hours (Bioblock Scientific Shaker, 74402). Then, vacuum filtration was carried out using an AcroPrep™ 96 Filter microplate with 40 µm pore size (Pall, Saint-Germain-en-Laye, France). Then, dry evaporation was performed at SpeedVac SDP121P concentrator (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and whose enclosure was heated to 40 °C to remove all solvents. Since wells contained solvents with various boiling points, water was gradually added to wells with easily evaporable solvents to avoid drying and caramelization. Finally, the extracts were redissolved in 1 mL of DMSO, which constituted the stock solutions for chemical tests. For biological tests, the extracts were dissolved in RPMI-1640 medium.

2.6. Evaluation of the antioxidant activity

2.6.1. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

This method is based on electron transfer and uses ABTS^{•+}, a chromophore radical which is a blue-green cation formed when ABTS reacts with potassium persulfate [16,17]. ABTS^{•+} has absorption maxima at wavelengths of 412, 645, 734 and 815 nm [18]. In the presence of antioxidant compounds, ABTS^{•+} free radical is captured, which leads to a loss of color and therefore a reduction in the measured absorbance quantitatively linked to the concentration of antioxidants [19-22]. Trolox was used as a reference for quantitative assessment and calibration was done using a range of concentration in Milli-Q water (20, 80, 200, 500 and 900 µmol/L). DMSO, used to redissolve extracts, served as a negative control. Prior to testing, extracts' stock solutions were diluted in Milli-Q water with 3% DMSO (v:v). Ten µL of each diluted extract were then deposited in a microplate well followed by 200 µL of ABTS^{•+} at 7 mmol/L in PBS. After 10 minute incubation at 37 °C, absorbance at 734 nm was read in a Vario Skan spectrophotometer (ThermoFisher scientific). Experiment were carried out in triplicate.

2.6.2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

The ORAC test relies on the oxidation of a fluorescent probe (fluorescein) by free radicals, which are often peroxy radicals, but may also be hydroxyl radicals. These free radicals are produced by a radical generator (AAPH) [23,24]. During the experiment, the free radicals damage the probe and thus reduce the intensity of the fluorescence.

Table 1. Microplate layout used for multiple-solvent extraction.

	1	2	3	4	5	6
A	Water	Water / Acetic acid 1% v:v	Water / NH ₄ OH 0.05 M	Methanol	Heptanol / DMSO	Heptanol / Methanol
B	DMSO	DMSO / Acetic acid 1% v:v	DMSO / NH ₄ OH 0.05 M	Methanol / Acetic acid 1% v:v	MTBE / DMSO	MTBE / Methanol
C	Ethylene glycol	Ethylene glycol / Acetic acid 1% v:v	Ethylene glycol / NH ₄ OH 0.05 M	Methanol / NH ₄ OH 0.05 M	Ethyl acetate / DMSO	Ethyl acetate / Methanol
D	DMF	DMF / Acetic acid 1% v:v	DMF / NH ₄ OH 0.05 M	Isopropanol	MEK / DMSO	MEK / Methanol
E	Acetonitrile	Acetonitrile / Acetic acid 1% v:v	Acetonitrile / NH ₄ OH 0.05 M	Isopropanol / Acetic acid 1% v:v	Dichloromethane / DMSO	Dichloromethane / Methanol
F	THF	THF / Acetic acid 1% v:v	THF / NH ₄ OH 0.05 M	Isopropanol / NH ₄ OH 0.05 M	Toluene / DMSO	Toluene / Methanol
G	Benzyl alcohol	Benzyl alcohol / Acetic acid 1% v:v	Benzyl alcohol / NH ₄ OH 0.05 M	Butanol / Acetonitrile	Butanol / DMSO	Butanol / Methanol
H	Ethanol	Ethanol / Acetic acid 1% v:v	Ethanol / NH ₄ OH 0.05 M	Chloroforme / Acetonitrile	Chloroforme / DMSO	Chloroforme / Methanol
	7	8	9	10	11	12
A	Heptanol / DMF	Heptanol	n-Octanol	Diethyl ether	Triethylamine	Petroleum ether
B	MTBE / DMF	MTBE	2-Methyle propanol	2-Methyle pentanol	Methyl-1-butanol	Methyle pentanone
C	Ethyl acetate / DMF	Ethyl acetate	Xylene / THF	Xylene / Ethanol	Xylene / Isopropanol	Xylene
D	MEK / DMF	MEK	Cyclohexane / THF	Cyclohexane / Ethanol	Cyclohexane / Isopropanol	Cyclohexane
E	Dichloromethane / DMF	Dichloromethane	Isooctanol / THF	Isooctanol / Ethanol	Isooctanol / Isopropanol	Isooctane
F	Toluene / DMF	Toluene	Heptane / THF	Heptane / Ethanol	Heptane / Isopropanol	Heptane
G	Butanol / DMF	n-Butanol	Pentane / THF	Pentane / Ethanol	Pentane / Isopropanol	Pentane
H	Chloroforme / DMF	Chloroforme	Chloroforme / THF	Chloroforme / Ethanol	Chloroforme / Isopropanol	Hexadecane

The degree of change in intensity reflects the amount of damage caused by free radicals. The addition of an antioxidant makes it possible to absorb the free radicals, which reduces the damage received by the probe and prolongs its fluorescence. To quantify the protection conferred by an antioxidant, a measurement of the area under the curve of the sample was made and compared to the area under the curve [25] of trolox as a reference antioxidant. A calibration curve was constructed using different concentrations of trolox in Milli-Q Water (20, 80, 200; 500 and 900 $\mu\text{mol/L}$). Prior to testing, extracts' stock solutions were diluted in Milli-Q water with 3% DMSO (v:v). Ten μL of each diluted extract were then deposited in a microplate well followed by 150 μL of fluorescein 8.5×10^{-8} mol/L in Milli-Q water. After a 10-minute incubation at 37 °C, AAPH at 153×10^{-3} mol/L in PBS [26-28] was automatically distributed in the microplate wells. The fluorescence kinetics was then monitored every 5 min for 120 min using a Vario Skan spectrophotometer with excitation and emission wavelengths of 485 nm and 530 nm, respectively. Experiment were carried out in triplicate. TEAC and ORAC results were expressed in μmol of equivalent trolox per gram of dry extract.

2.7. Cell viability test

The effect of extracts was evaluated on insulin secreting cell lines according to the method described by Auberval and slightly modified by Belhadji *et al.* [29,30]. Briefly, a rat insulinoma cell line (RINm5f beta) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells from passages 30-43 were used. The cells were grown in a controlled atmosphere at 37 °C under a 5% CO₂ in Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Sigma, St Louis, Etats-Unis) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 1% antibiotic-antimycotic (ABAM; Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA). RINm5f beta cells were trypsinized using 0.05% trypsin ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich) at 80% confluence and loaded in a 96-well plate (Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) at a concentration of 3000 cells per

well. The medium was changed every two days. Then, cells were incubated for 24 hours in serum-free medium. The cells were then incubated with the extracts for 1 hour, 24 hours at 37 °C and 5% CO₂. Viability of RINm5f beta cells was determined by measuring the mitochondrial activity with the Cell Titer 96@ Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA). After treatment, 20 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 100 μL of culture medium was added. Cells were incubated for 2 h at 37 °C in 5% CO₂, and the absorbance was measured at 490 nm using the microplate reader (iMarkTM, Biorad Laboratories Inc, USA). The color development was proportional to the number of viable cells. The results are presented in percentage (%) viability with respect to the negative control (cells treated in the same condition but only with culture medium). The toxicity data of the selected organic extracts were averaged \pm SEM with three replicates (n = 3), and each replicate had six well repetitions. The data were then analyzed by One way-ANOVA analysis (p < 0.05) with Graph Pad Prism, version 6.01.

3. Results

The aqueous extract was considered as a reference for the selection of other extracts. Indeed, it is water that is generally used by traditional healers.

3.1. TEAC and ORAC results

The TEAC and ORAC results of the 96 extracts were sorted according to their antioxidant activity and divided into three groups (Figures 1-3) for a more convenient graphical representation.

In this study, for the fifteen extracts that were more active, the free radical scavenging potential was in the following order in TEAC method: water < chloroform/ethanol < butanol/DMF < ethylene glycol acetic acid 1 % (v:v) < butanol/acetoneitrile < MTBE/DMF < methanol acetic acid 1 %

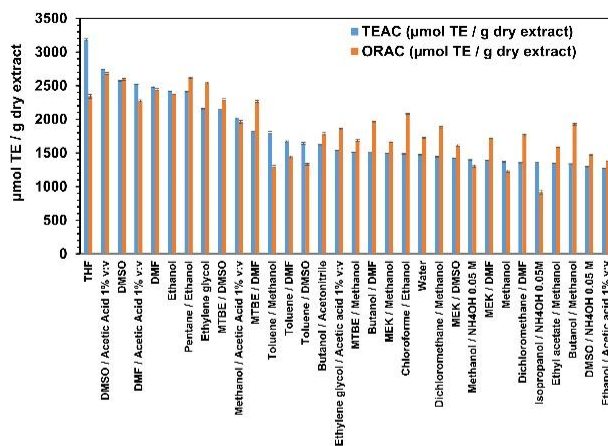


Figure 1. TEAC and ORAC results for extracts with high antioxidant activity.

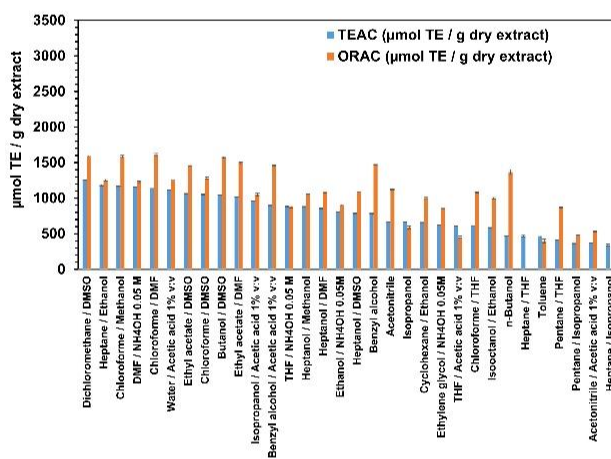


Figure 2. TEAC and ORAC results for extracts with moderate antioxidant activity.

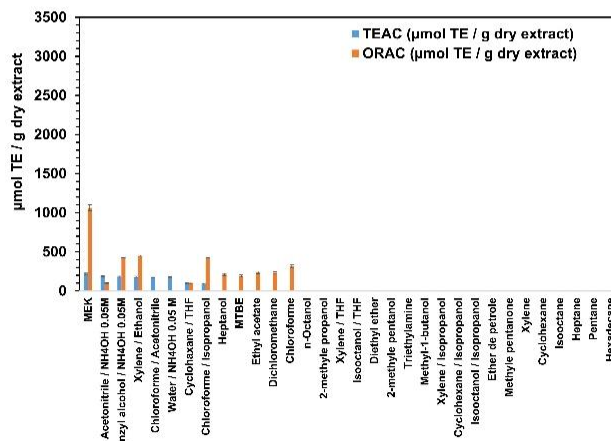


Figure 3. TEAC and ORAC results for extracts with low or no antioxidant activity.

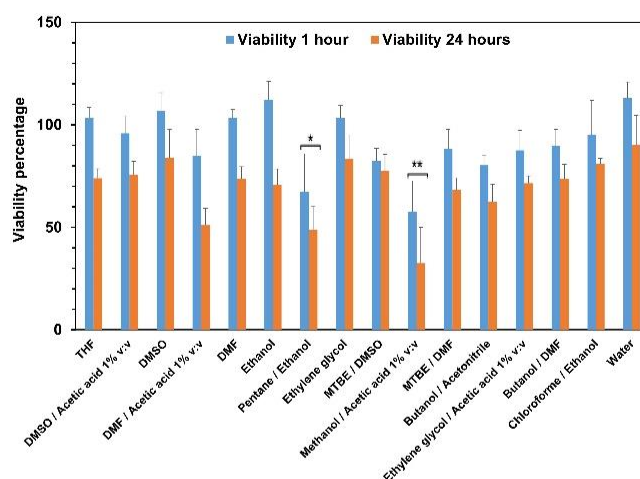


Figure 4. Viability percentage at 1 hour and 24 hours.

(v:v) < MTBE/DMSO < ethylene glycol < pentane/ethanol < ethanol < DMF < DMF 1% acetic acid < DMSO < DMSO acetic acid 1% (v:v) < THF. In ORAC method free radical potential scavenging potential order was: Water < butanol/acetonitrile < ethylene glycol acetic acid 1% (v:v) < methanol acetic acid 1% (v:v) < butanol/DMF < chloroform/ethanol < MTBE/DMF < DMF acetic acid 1% (v:v) < MTBE/DMSO < THF < ethanol < DMF < ethylene glycol < DMSO < pentane/ethanol < DMSO acetic acid 1% (v:v). Table 2 below shows organic extracts whose antioxidant activity was greater to that of the aqueous extract.

With the TEAC and ORAC methods, only fifteen extracts had greater antioxidant activity than the aqueous extract. The most active extracts in TEAC were the same as in ORAC but with different radical scavenging activities depending on the method used. The highest antioxidant potential for radical scavenging was obtained with the THF extract in TEAC with 3183.0 ± 16.0 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract and the acidified DMSO extract in ORAC with 2683.5 ± 11.7 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract. The extracts obtained with solvent mixtures showed higher activity than those obtained using individual solvents except with ethanol, DMF, DMSO and THF. The antioxidant activity obtained in TEAC varied between 1474.1 ± 4.4 and 3183.0 ± 16.0 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract; in ORAC between 1727.7 ± 8.4 and 2683.5 ± 11.7 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract.

3.2. Cell viability results

Cell viability tests were performed only on organic extracts having a higher antioxidant activity compared to the aqueous extract. Toxicity tests were carried out on beta-pancreatic RIN5mF cells over 1 hour and 24 hours, which represents short and long term effects. The percentage of viability was calculated relative to the control cells incubated in RPMI-1640 culture medium alone. The results are shown in Figure 4.

After one hour of incubation, extracts did not show toxicity except that obtained from acidified methanol. The extracts obtained from the following solvent mixtures: butanol/acetonitrile; MTBE/DMF; methanol/acetic acid 0.1% (v:v); pentane/ethanol and DMF/acetic acid 1% (v:v) resulted in a lower viability at 70% after 24 hours of incubation. The results obtained with extracts using methanol acetic acid 1% (v:v) and pentane/ethanol were statistically different from the control (aqueous extract), which showed no effect on cell viability.

4. Discussion

Selecting the appropriate solvent for the extraction of bioactive compounds from medicinal plants is a critical step in a bio-guided purification process. Indeed, there is generally a cocktail of compounds in the plants and, consequently, the selection of the solvent also means the selection of the products to be extracted. This has a direct impact on the observed biological activities. In the present study, several solvents and their mixtures were therefore used to extract as many compounds as possible. All tests were performed on 96-well microplates (Corning® Costar® 96-Well microplates, USA). The efficiency of the extraction solvent was evaluated by its activity potential obtained by physicochemical (TEAC, ORAC) and biological tests (cell viability).

Thus, of the 96 extracts obtained, only fifteen had greater antioxidant activity than that of the aqueous extract. In this study, they were generally extracts obtained from solvent mixtures belonging to different classes. Indeed, the use of solvent mixtures makes it possible to obtain solvents of intermediate polarities and thus to promote the extraction of several active compounds.

This can be explained by solvents selectivity, widening of the polarity range which allow a better solvation of the bioactive natural compounds. The same observation was made in the study of the polyphenols of *Lathyrus maritimus L* [31]. However, the extracts obtained from ethanol, DMF, DMSO and THF proved to be more active than certain extracts of solvent mixtures such as THF with an antioxidant potential up to 3183.0 ± 16.0 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract in TEAC and 2683.5 ± 11.7 $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract in ORAC for DMSO acetic acid 0.1% (v:v).

Among the extracts having more antioxidant activity, were those obtained with polar aprotic solvents, hydrogen bonding solvents, electron pair donor solvents and mixtures of polar aprotic solvents and hydrogen bond donors. Aprotic solvents, due to their heteroatoms, have dipole moments that give rise to opposite mesomeric charges and favor intermolecular interactions. This is the case of DMF, DMSO and THF which gave higher antioxidant activities in this study. The use of this solvents type had also been proven in a study on black tea where DMF or her mixtures with another solvents also extracted more antioxidant compounds [32]. In this study, THF extract was more active in TEAC and that obtained with DMSO acetic acid 1% (v:v) was more active in ORAC (Table 2).

Table 2. TEAC and ORAC organic extracts compared to aqueous extract.

Extracts	TEAC ($\mu\text{mol TE/g dry extract}$) \pm SEM	ORAC ($\mu\text{mol TE/g dry extract}$) \pm SEM
THF	3183.0 \pm 16.0	2344.5 \pm 29.8
DMSO / Acetic acid 1% (v:v)	2747.8 \pm 1.5	2683.5 \pm 11.7
DMSO	2570.7 \pm 7.0	2595.1 \pm 12.8
DMF / Acetic acid 1% (v:v)	2525.0 \pm 4.0	2277.0 \pm 15.5
DMF	2488.2 \pm 9.9	2441.9 \pm 15.2
Ethanol	2416.2 \pm 3.1	2373.6 \pm 5.7
Pentane / Ethanol	2404.1 \pm 9.6	2619.0 \pm 9.4
Ethylene glycol	2158.7 \pm 5.6	2541.4 \pm 13.0
MTBE / DMSO	2143.8 \pm 1.1	2292.5 \pm 15.6
Methanol / Acetic acid 1% (v:v)	2016.2 \pm 6.1	1962.9 \pm 23.1
MTBE / DMF	1816.2 \pm 2.4	2266.2 \pm 16.7
Butanol / Acetonitrile	1622.8 \pm 3.3	1784.5 \pm 28.3
Ethylene glycol / Acetic acid 1% (v:v)	1537.0 \pm 2.7	1857.4 \pm 11.3
Butanol / DMF	1504.6 \pm 2.6	1967.4 \pm 6.5
Chloroforme / Ethanol	1487.0 \pm 5.2	2080.9 \pm 6.9
Water	1474.1 \pm 4.4	1727.7 \pm 8.4

In the case of ethanol, these results were in agreement with those of the study of the antioxidant potential of *Limnophila aromatica* roots [33]. Some discrepancies were noted between the TEAC and ORAC results. This can be explained by the different mechanisms of action of the two methods. Indeed, the TEAC method is direct and involves an electron transfer whereas the ORAC method is indirect and involves a proton transfer. Similar variations were observed in the berry study [34].

In several studies, ethanol had also proven to be a very good solvent for the extraction of polyphenols [35,36]. Cell viability tests showed that the extracts whose obtained with methanol acetic acid 1% (v:v) and pentane/ethanol were statistically different from the control (aqueous extract). This could be explained by the possible presence of toxic compounds, extractable specifically by these solvents. Fortunately, the aqueous extract showed no decline in viability, which confirms the wide traditional use of this plant in Senegal.

The antioxidant activity obtained and the toxicity tests made it possible to select the solvents to be used for the extractions of the active compounds in order to be able to test them on biological models. However, further studies are needed for the isolation and identification of antioxidant compounds and in vivo studies are also needed for a better understanding of their mechanism of action.

5. Conclusion

This study allowed the implementation of a new simple, fast and efficient method of selecting the appropriate solvent for the extraction of bioactive compounds from medicinal plants. It was shown that solvent mixtures are more efficient at extracting bioactive compounds than their corresponding individual solvents with the exception of ethanol, DMF, DMSO and THF. The proposed method should be extended to the study of other parts of plant and could be a method of choice to select the most effective solvent for extracting the active compounds.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Ministry of Higher Education and Research of Senegal, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Strasbourg University, the European Center for the Study of Diabetes in Strasbourg and the French Government for their material and financial support.

Disclosure statement

Conflict of interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions: All authors contributed equally to this work.

Ethical approval: All ethical guidelines have been adhered.

Sample availability: Samples of the compounds are available from the author.

ORCID

Mamadou Baldé

<http://orcid.org/0000-0002-9917-9957>

Saïd Ennahar

<http://orcid.org/0000-0001-8987-7703>

Stéphanie Dal

<http://orcid.org/0000-0003-0870-6430>

Séverine Sigrist

<http://orcid.org/0000-0002-5766-2596>

Alassane Wélé

<http://orcid.org/0000-0002-7511-0832>

Eric Marchioni

<http://orcid.org/0000-0002-4002-642X>

Diane Julien-David

<http://orcid.org/0000-0002-0780-4947>

References

- [1]. Flores, G.; Wu, S. B.; Negrin, A.; Kennelly, E. J. *Food Chem.* **2015**, *170*, 327-335.
- [2]. Gungor, S. S. U.; Ozay, S. G.; Ilcim, A.; Kokdil, G. *Eur. J. Chem.* **2013**, *4(1)*, 7-9.
- [3]. Taher, M. A. H.; Dawood, D. H.; Sanad, M. I.; Hassan, R. A. *Eur. J. Chem.* **2016**, *7(4)*, 397-404.
- [4]. Sultana, B.; Anwar, F.; Ashraf, M. *Molecules* **2009**, *14(6)*, 2167-2180.
- [5]. Hoon, L. Y.; Choo, C.; Watawana, M. I.; Jayawardena, N.; Waisundara, V. Y. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 1014-1021.
- [6]. Atta, E. M.; Hashem, A. I.; Ahmed, A. M.; Elqosy, S. M.; Jaspars, M.; El-Sharkaw, E. R. *Eur. J. Chem.* **2011**, *2(4)*, 535-538.
- [7]. Gramatica, P.; Navas, N.; Todeschini, R. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1999**, *18(7)*, 461-471.
- [8]. Barwick, V. J. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1997**, *16(6)*, 293-309.
- [9]. Fu, C.; Khaledi, M. G. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216(10)*, 1891-1900.
- [10]. Lanty, P. de. *Corps Gras Lipides* **2005**, *12(4)*, 299-301.
- [11]. Johnson, A. R.; Vitha, M. F. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218(4)*, 556-586.
- [12]. Salawu, S. O.; Akindahunsi, A. A.; Sanni, D. M.; Decorti, G.; Cvorovic, J.; Tramer, F.; Passamonti, S.; Mulinacci, N. *Afr. J. Food Sci.* **2011**, *5(4)*, 267-275.
- [13]. Wolfe, K. L.; Liu, R. H. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55(22)*, 8896-8907.
- [14]. Chen, Y.; Wang, J.; Ou, Y.; Chen, H.; Xiao, S.; Liu, G.; Cao, Y.; Huang, Q. *J. Funct. Foods* **2014**, *7*, 737-745.
- [15]. El-Rehem, F. A. E. -R. A. A.; Ali, R. F. M. *Eur. J. Chem.* **2013**, *4(3)*, 185-190.
- [16]. Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1993**, *84(4)*, 407-412.
- [17]. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20(7)*, 933-956.
- [18]. Re, R.; Pellegri, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26(9)*, 1231-1237.
- [19]. Floegel, A.; Kim, D. O.; Chung, S. J.; Koo, S. I.; Chun, O. K. J. *Food Compos. Anal.* **2011**, *24(7)*, 1043-1048.

- [20]. Zhao, P.; Duan, L.; Guo, L.; Dou, L.; Dong, X.; Zhou, P.; Li, P.; Liu, E. H. *Food Chem.* **2015**, *173*, 54-60.
- [21]. Ramos, A. S.; Souza, R. O. S.; Boletí, A. P. de A.; Bruginiski, E. R. D.; Lima, E. S.; Campos, F. R.; Machado, M. B. *Food Res. Int.* **2015**, *75*, 315-327.
- [22]. Leitao, C.; Marchioni, E.; Bergaentzle, M.; Zhao, M.; Didierjean, L.; Miesch, L.; Holder, E.; Miesch, M.; Ennahar, S. *J. Cereal Sci.* **2012**, *55*(3), 318-322.
- [23]. Casettari, L.; Gennari, L.; Angelino, D.; Ninfali, P.; Castagnino, E. *Food Hydrocoll.* **2012**, *28*(2), 243-247.
- [24]. Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*(3), 303-311.
- [25]. Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frigola, A. *Food Chem.* **2009**, *114*(1), 310-316.
- [26]. Samaniego Sanchez, C.; Troncoso Gonzalez, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C.; Quesada Granados, J. J.; Lopez Garcia de la Serrana, H.; Lopez Martinez, M. C. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *593*(1), 103-107.
- [27]. Mohamadi, S.; Zhao, M.; Amrani, A.; Marchioni, E.; Zama, D.; Benayache, F.; Benayache, S. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *76*, 910-919.
- [28]. Jimenez, J. P.; Serrano, J.; Taberero, M.; Arranz, S.; Diaz-Rubio, M. E.; Garcia-Diz, L.; Goni, I.; Saura-Calixto, F. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif.* **2008**, *24*(7-8), 646-653.
- [29]. Belhadj, S.; Hentati, O.; Hamdaoui, G.; Fakhreddine, K.; Maillard, E.; Dal, S.; Sigrist, S. *Nutrients* **2018**, *10*, 384, 1-17.
- [30]. Auberval, N.; Dal, S.; Bietiger, W.; Seyfritz, E.; Peluso, J.; Muller, C. D.; Zhao, M.; Marchioni, E.; Pinget, M.; Jeandidier, N.; et al. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 859048, 1-11.
- [31]. Chavan, U. D.; Shahidi, F.; Naczki, M. *Food Chem.* **2001**, *75*(4), 509-512.
- [32]. Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y. *Food Chem.* **2006**, *99*, 835-841.
- [33]. Do, Q. D.; Angkawijaya, A. E.; Tran-Nguyen, P. L.; Huynh, L. H.; Soetaredjo, F. E.; Ismadji, S.; Ju, Y. H. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*(3), 296-302.
- [34]. Boeing, J. S.; Barizao, E. O.; F Silva, B. C.; Montanher, P. F.; de Cinque Almeida, V.; Visentainer, J. V. *Chem. Cent. J.* **2014**, *8*(1), 48, 1-9.
- [35]. Yu, J.; Ahmedna, M.; Goktepe, I. *Food Chem.* **2005**, *90*(1), 199-206.
- [36]. Dutra, R. C.; Leite, M. N.; Barbosa, N. R. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*(4), 606-614.



Copyright © 2018 by Authors. This work is published and licensed by Atlanta Publishing House LLC, Atlanta, GA, USA. The full terms of this license are available at <http://www.eurjchem.com/index.php/eurjchem/pages/view/terms> and incorporate the Creative Commons Attribution-Non Commercial (CC BY NC) (International, v4.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>). By accessing the work, you hereby accept the Terms. This is an open access article distributed under the terms and conditions of the CC BY NC License, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited without any further permission from Atlanta Publishing House LLC (European Journal of Chemistry). No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms. Permissions for commercial use of this work beyond the scope of the License (<http://www.eurjchem.com/index.php/eurjchem/pages/view/terms>) are administered by Atlanta Publishing House LLC (European Journal of Chemistry).

Afin de rechercher un solvant plus efficace et pour se démarquer de la technique classique de sélection du solvant d'extraction reposant sur une étude bibliographique, un nouveau système constitué par une plaque de 96 puits a été mis au point permettant ainsi l'utilisation de plusieurs solvants de propriétés différentes dans le but d'extraire le maximum de composés bioactifs à partir des feuilles de *Parinari macrophylla*. La mesure de l'efficacité du solvant d'extraction a été faite par des tests physico-chimiques TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permettant d'évaluer l'activité antioxydante et biologique sur des cellules β -pancréatiques de type RINm5F (test de viabilité cellulaire).

La première étape de nos travaux, consistait à mettre en place une méthode de sélection du solvant permettant d'extraire le plus de composés actifs. Ainsi un nouveau système constitué d'une plaque de 96 puits a été mis au point permettant ainsi l'utilisation de plusieurs solvants de propriétés différentes dans le but d'extraire le maximum de composés bioactifs à partir des feuilles de *Parinari macrophylla* Sabine.

A l'issue des tests TEAC, ORAC et de viabilité cellulaire réalisés sur les extraits obtenus de la microplaque, plusieurs paramètres ont été retenus pour faire un premier tri basé sur le pouvoir anti-radicalaire des extraits comparé à l'extrait aqueux, traditionnellement utilisé et leur effet sur la viabilité cellulaire. Seuls les extraits ayant une activité anti-radicalaire en TEAC et ORAC supérieure ou égale à celle de l'extrait aqueux, considéré comme référence et une viabilité cellulaire supérieure ou égale à 70 %, valeur estimée acceptable pour éviter une perte de viabilité irréversible des cellules β -pancréatiques ont été sélectionnés. Puis un deuxième tri basé sur les paramètres spécifiques de chaque solvant notamment sa facilité d'élimination pour éviter la destruction des composés thermolabiles, sa toxicité en concentration résiduelle (volume limite d'exposition (VLE) et son volume moyen d'exposition (VME)) a été réalisé.

D'après les résultats, les solvants sélectionnés étaient finalement l'eau et l'éthanol. Ils ont été utilisés pour faire une extraction de quantités suffisantes d'extraits à partir des feuilles et écorces de *Parinari macrophylla* Sabine pour pouvoir faire les tests d'évaluation de l'activité anti-radicalaire, de caractérisation, d'isolement, d'identification structurale et les tests biologiques.

4.2 Résultats obtenus pour les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et de l'extrait aqueux des écorces

Dans ce chapitre, après présentation des rendements d'extraction, une approche progressive en fonction de la finesse de la méthode a été adoptée pour localiser les composés actifs sur les extraits aqueux et éthanolique totaux et les fractions filles (fractions obtenues par HPLC semi-préparative) en vue de leur identification. La démarche comprend les étapes suivantes :

- Evaluation de l'activité anti-radicalaire totale par TEAC, ORAC et HPLC – ABTS^{•+} online qui permet également de mettre en évidence l'activité anti-radicalaire au niveau moléculaire ;
- Caractérisation phytochimique par des réactions de précipitation et la CCM ;
- Identification par réseau moléculaire, approche comparative avec des bases de données et par résonance magnétique nucléaire.

Par la suite, des tests biologiques notamment de viabilité cellulaire et de traitement d'un stress induit à l'hypoxanthine/xanthine oxydase ont également été effectués sur les extraits totaux aqueux et éthanolique et sur les fractions acétate d'éthyle et butanolique obtenues avec la séparation liquide-liquide.

4.2.1 Résultats des méthodes physico-chimiques

4.2.1.1 Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction tenant compte de l'extraction liquide-liquide respectivement du dichlorométhane (Dichlo), acétate d'éthyle (Ac. Eth) et du butanol sont présentés sur le Tableau 8. Le résidu est l'extrait obtenu par précipitation lors de la redissolution pour les extractions liquide-liquide. L'extrait noté Aqueux Ep est celui épuisé successivement par les différents solvants.

Tableau 8: Rendements d'extraction

Extraits totaux	Fractions					Rendement Total (%)
	Résidu	Dichlo	Ac. Eth	BuOH	Aqueux Ep	
Aq01F	2,36	1,90	2,01	19,06	5,57	30,90
EtOH01F	7,35	1,33	3,06	18,47	3,83	34,04
Aq01Ec	3,90	2,16	2,72	15,65	2,39	26,82

Aq01Ec-T : extrait aqueux total des écorces ; **EtOH01F-T** : extrait éthanolique total des feuilles ; **Aq01F-T** : extrait aqueux total des feuilles.

Une plus grande quantité de produits a été récupérée avec les fractions butanoliques. Les meilleurs rendements ont été obtenus avec les extraits de feuilles 34,04 % et 30,90 % respectivement pour l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux par rapport à l'extrait d'écorces (26,82 %). Cela constituerait un avantage pour la protection de la plante car l'utilisation des écorces pourrait porter atteinte à son intégrité, entraîner sa mort et sa disparition de l'écosystème sénégalais.

4.2.1.2 Évaluation de l'activité anti-radicalaire

Les méthodes TEAC et ORAC utilisant une microplaque ont été utilisées pour évaluer l'activité anti-radicalaire totale et un système de couplage HPLC – ABTS^{•+} online pour faire simultanément la séparation et la mise en évidence de l'activité anti-radicalaire totale et au niveau moléculaire.

4.2.1.2.1 Méthodes TEAC et ORAC

L'évaluation du potentiel antioxydant des extraits totaux a été effectuée par les méthodes TEAC et ORAC avec les gammes d'étalonnage de trolox ci-dessous (Figure 33 et Figure 34) :

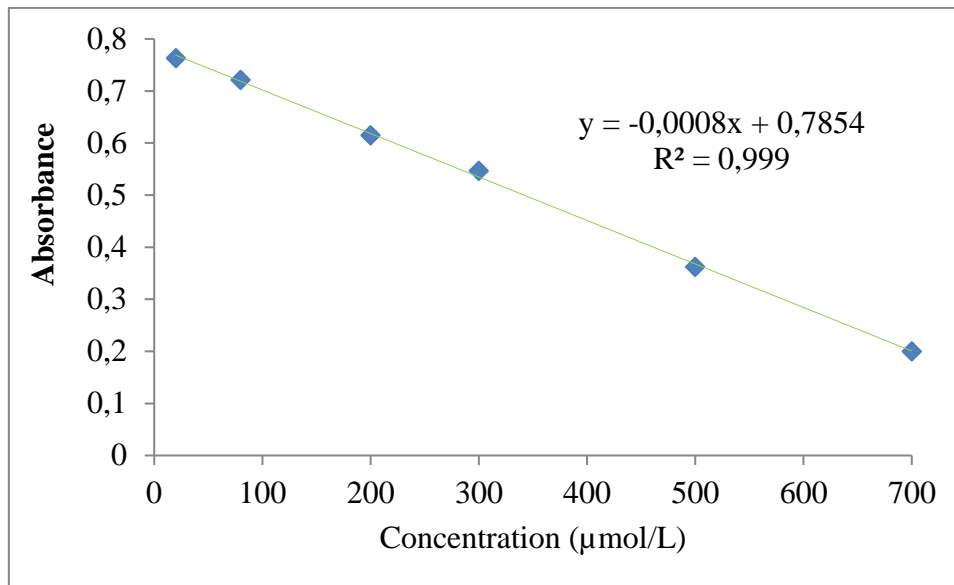


Figure 33: Courbe d'étalonnage TEAC

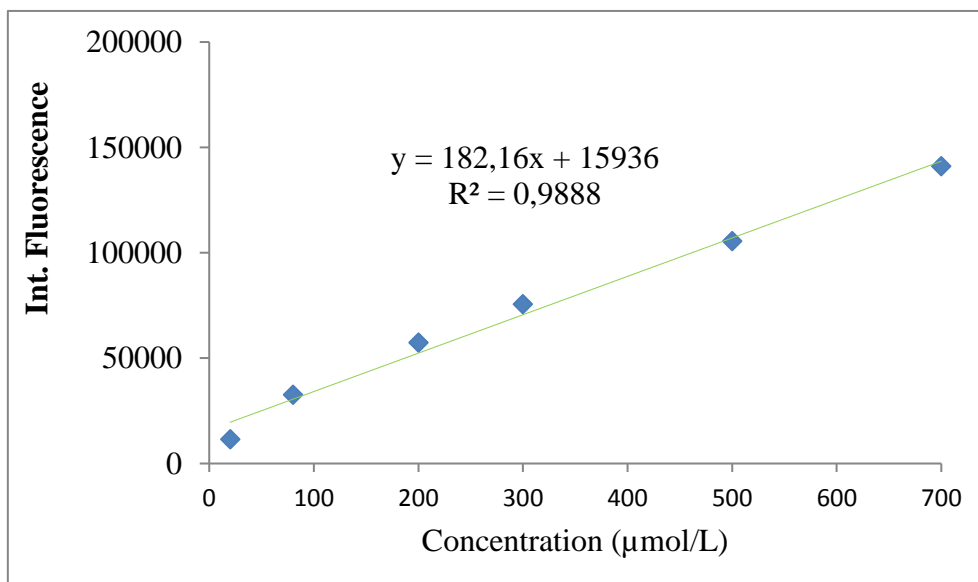


Figure 34: Courbe d'étalonnage ORAC

Les résultats de la détermination de l'activité anti-radicalaire par TEAC et ORAC des extraits aqueux, éthanolique et leurs fractions sont présentés sur la Figure 35.

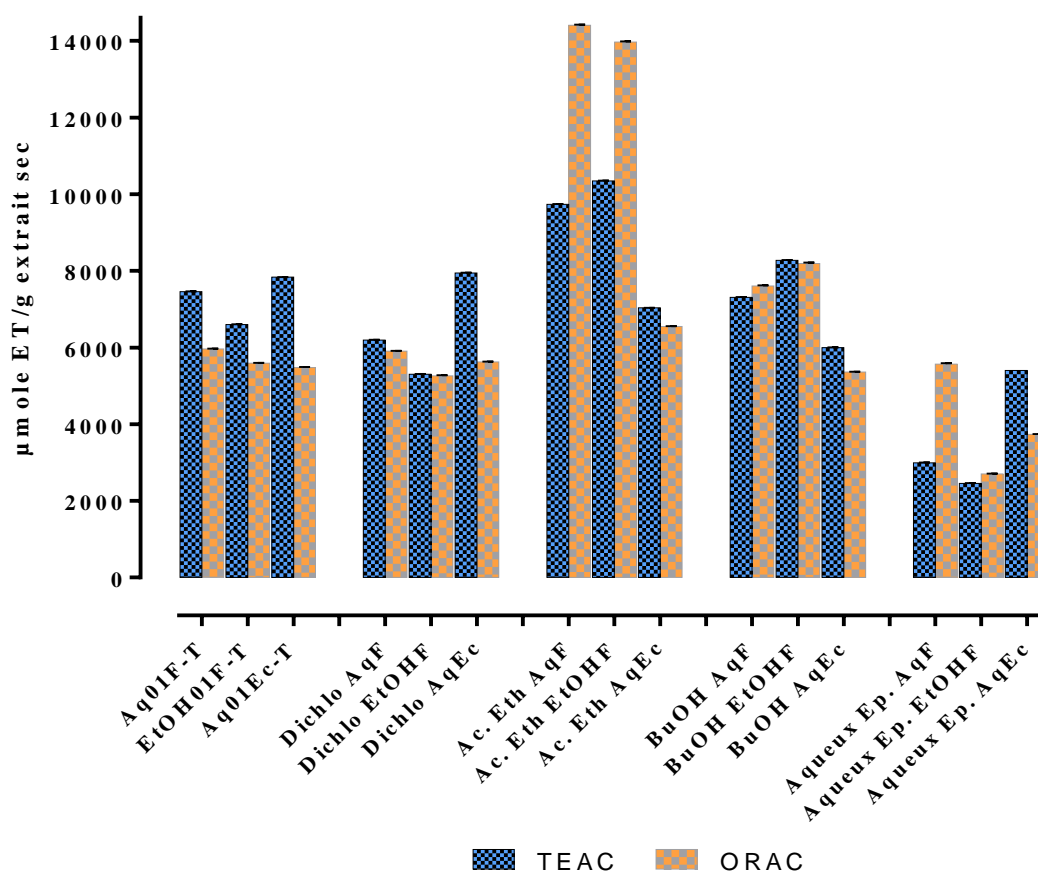


Figure 35: Activité anti-radicalaire des extraits totaux et leurs fractions exprimés en μmol équivalent trolox (ET)/g d'extraits secs obtenus avec les méthodes TEAC et ORAC

Aq01F-T : extrait aqueux total des feuilles ; **EtOH01F-T** : extrait éthanolique total des feuilles ; **Aq01Ec-T** : extrait aqueux total des écorces ; **Dichlo AqF** : fraction dichlorométhane issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Dichlo EtOHF** : fraction dichlorométhane issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **Dichlo AqEc** : fraction dichlorométhane issue de l'extrait aqueux total des écorces ; **Ac. Eth AqF** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Ac. Eth EtOHF** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **Ac. Eth AqEc** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux total des écorces ; **BuOH AqF** : fraction butanolique issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **BuOH EtOHF** : fraction butanolique issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **BuOH Aq01Ec** : fraction butanolique issue de l'extrait aqueux total des écorces ; **Aqueux Ep. AqF** : fraction aqueuse épuisée issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Aqueux Ep. EtOHF** : fraction aqueuse épuisée issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **Aqueux Ep. AqEc** : fraction aqueuse épuisée issue de l'extrait aqueux total des écorces.

Concernant les extraits totaux, les résultats montrent une activité anti-radicalaire plus importante en TEAC avec l'extrait Aq01EC-T ($7832,83 \pm 7 \mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec) et une activité plus importante en ORAC pour l'extrait Aq01F-T ($5961,40 \pm 14 \mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec). Ainsi, comparé à l'éthanol, l'eau a permis d'extraire plus de composés actifs.

La détermination de l'activité anti-radicalaire a également été effectuée sur les fractions obtenues par extraction liquide-liquide appliquée sur les extraits totaux aqueux et éthanolique dans le but de regrouper les composés actifs en fonction de leur polarité et faciliter leur éventuel isolement. D'après les résultats, les fractions obtenues avec l'acétate d'éthyle ont été les plus actives. Celle obtenue à partir de l'extrait aqueux des feuilles (Aq01F-T) s'est toujours révélée plus active avec des valeurs en TEAC de $9732,66 \pm 12$ et en ORAC de $14403,51 \pm 19 \mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec. Cependant l'extraction liquide-liquide a permis de concentrer plus de composés actifs dans la fraction issue de l'extrait éthanolique (EtOH01F-T) (TEAC : $10346,81 \pm 4$; ORAC : $13971,27 \pm 18 \mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec) par rapport à la fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux des écorces (Aq01Ec-T) (TEAC : $7035,11 \pm 4$; ORAC : $6548,07 \pm 11 \mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec) qui avait une activité plus importante dans les extraits totaux. Les fractions les plus actives sont celles obtenues avec les solvants les plus polaires notamment l'acétate d'éthyle et le butanol. La fraction au dichlorométhane a également présenté une activité supérieure par rapport à la fraction aqueuse épuisée, ce qui veut dire qu'il y aurait probablement d'autres composés peu polaires qui auraient une activité anti-radicalaire notable. La faible activité de la fraction aqueuse pourrait s'expliquer par son épuisement lors du fractionnement liquide – liquide par les différents solvants.

4.2.1.2.2 HPLC – ABTS⁺ online

Les analyses ont été effectuées en utilisant une méthode mise au point au laboratoire par Leitao et al. (2012) modifiée pour permettre d'obtenir des résolutions chromatographiques satisfaisantes pour les trois matrices analysées. Un antioxydant de référence, le trolox a été rajouté dans les échantillons pour la quantification de l'activité anti-radicalaire en équivalent trolox par gramme d'extrait sec. Les chromatogrammes de séparation des composés et de la détection de l'activité anti-radicalaire ont été présentés sur les Figure 36, Figure 37 et Figure 38.

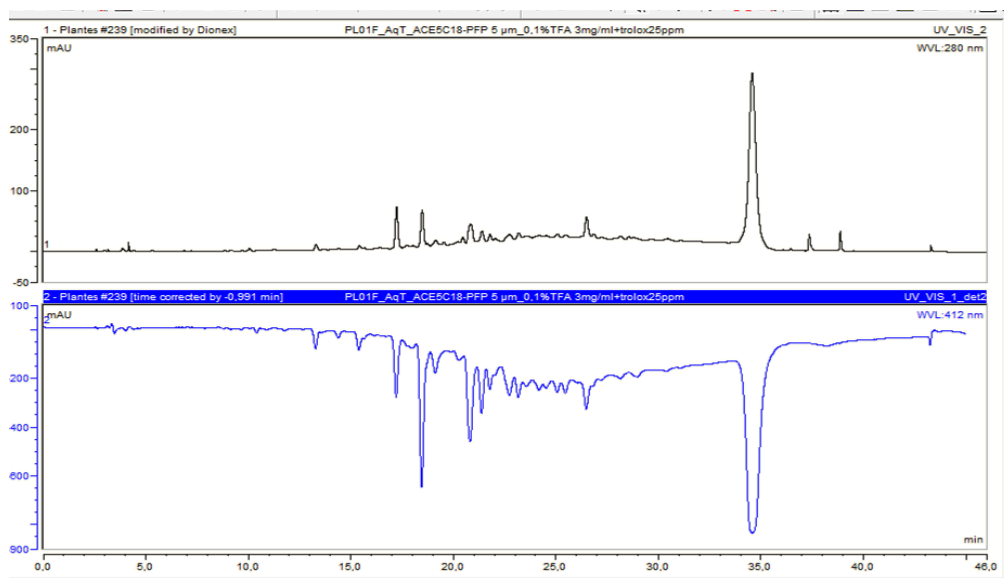


Figure 36: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux total (Aq01F-T).

L'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux total a été évaluée à 9210,88 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec. Les principaux pics responsables de l'activité ont été mis en évidence et leurs temps de rétention sont : 17,2 ; 18,4 ; 19,1 ; 20,8 ; 21,3 ; 21,7 ; 22,7 ; 23,1 ; 23,5 ; 24,1 et 26,5 min. L'activité est principalement portée par deux pics de temps de rétention 18,4 min et 20,8 min. Ils représentent 17,80 % et 14,04 % $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec respectivement de l'activité anti-radicalaire totale de l'extrait aqueux des feuilles. Le dernier pic sur le chromatogramme et le plus intense est celui du trolox utilisé pour la quantification.

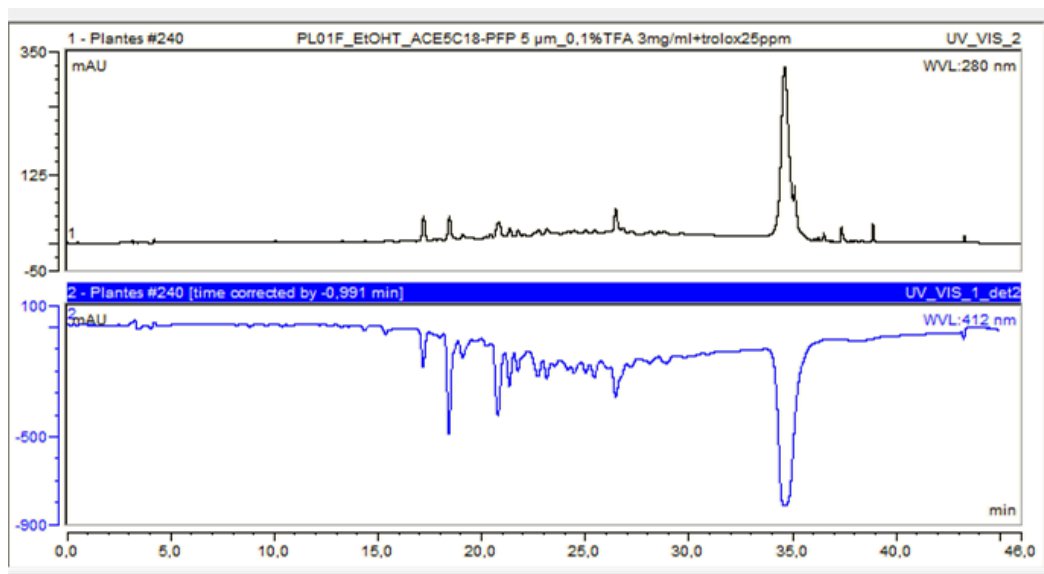


Figure 37: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique total des feuilles (ETOH01F-T)

L'activité anti-radicalaire totale de l'extrait éthanolique des feuilles a été estimée à 9205,97 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec. Les principaux pics porteurs de cette activité ont des temps de rétention : 17,2 ; 18,4 ; 19,1 ; 20,8 ; 21,3 ; 21,7 ; 22,7 ; 23,1 ; 23,5 ; 24,1 ; 24,5 ; 25,0 ; 25,4 et 26,4 min. Les pics de temps de rétention 18,4 min et 20,8 min sont principalement responsables de l'activité car ils représentent 12,53 % et 12,16 % respectivement $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec de l'activité anti-radicalaire totale de l'extrait éthanolique des feuilles. Le dernier pic et le plus intense est celui du trolox utilisé pour la quantification.

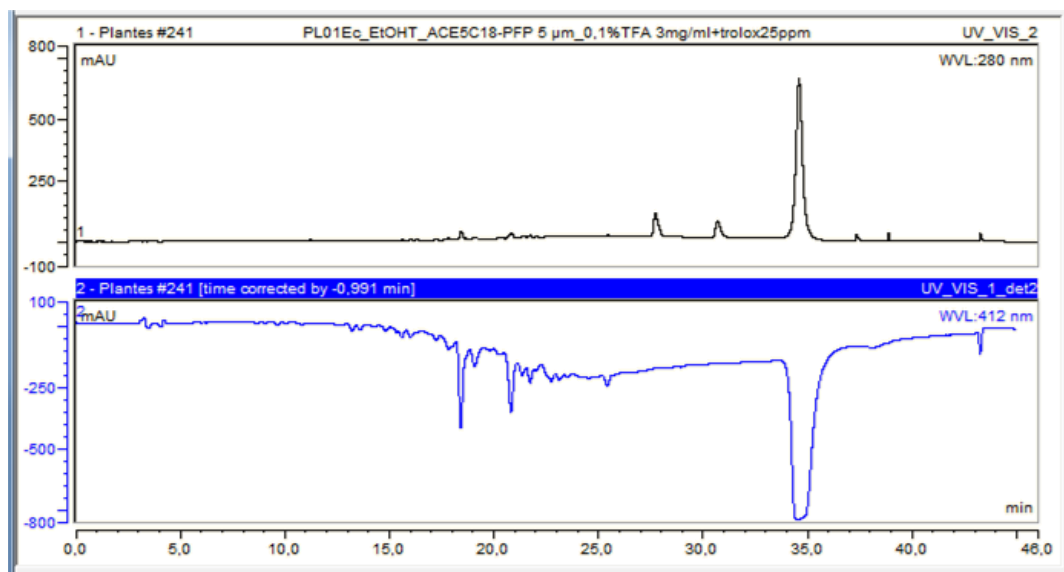


Figure 38: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux total des écorces (Aq01Ec-T).

L'activité anti-radicalaire totale de l'extrait aqueux des écorces de *Parinari macrophylla* Sabine a été évaluée à 3158,92 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec. Les principaux pics responsable de l'activité sont de temps de rétention : 17,8 ; 18,4 ; 19,1 ; 20,8 ; 21,3 ; 21,7 et 22,7 min. Cette activité est principalement portée par les pics de temps de rétention 18,4 et 20,8 min soient 22,95 % et 15,63 % respectivement $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec de l'activité anti-radicalaire totale de l'extrait des écorces. Le dernier pic et le plus intense est celui du trolox utilisé pour la quantification.

L'activité anti-radicalaire totale dans les feuilles est supérieure à celle des écorces. Elle a été évaluée à 9210,88 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec pour l'extrait aqueux feuilles, à 9205,97 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec pour l'extrait éthanolique des feuilles et à 3158,92 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec pour l'extrait aqueux des écorces.

Certains pics les plus actifs ont été retrouvés dans les trois extraits parmi lesquels les deux les plus actifs de chacun des extraits, de rétention 18,4 min et 20,8 min. Les autres pics communs aux trois extraits sont de temps de rétention 19,1 ; 21,3 ; 21,7 et 22,7 min. Cela supposerait la présence éventuelle des mêmes types de composés ou des isomères.

Il existe également une forte similitude dans les chromatogrammes des extraits aqueux et éthanolique des feuilles. Plusieurs pics de temps de rétention 17,2 ; 18,4 ; 19,1 ; 20,8 ; 21,3 ; 21,7 ; 22,7 ; 23,1 ; 23,5 et 24,1 min ont été retrouvés dans les deux extraits. Cela supposerait

que l'eau et l'éthanol ont permis d'extraire les mêmes types de composés avec des activités anti-radicalaires voisines 9210,88 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec pour l'extrait aqueux et 9205,97 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec pour l'extrait éthanolique.

Certains pics restent spécifiques de chaque extrait. L'extrait aqueux présente un pic à 26,5 min avec un pourcentage anti-radicalaire de 4,50 % $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec. L'extrait éthanolique présente des pics à 25,0 ; 25,4 et 26,4 min avec des pourcentages anti-radicalaires de 3,53 ; 4,55 et 8,92 % $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec respectivement. Un autre pic propre à l'extrait aqueux des écorces de temps de rétention 17,8 min et représentant 3,36 % de l'activité totale a été mis en évidence.

Ainsi, des fractionnements en fonction de leur potentiel anti-radicalaire et des tests de caractérisation phytochimique ont été réalisés en vue d'une identification structurale.

4.2.1.3 Récupération des fractions d'intérêt par HPLC semi-préparative

Plusieurs fractions ont été récupérées en fonction de leurs temps de rétention. La sélection des composés d'intérêts a été effectuée sur la base de leur activité anti-radicalaire obtenue par HPLC – ABTS^{•+} online. Par cette méthode, plusieurs fractions appelées fractions filles (

Tableau 9) pour les différencier de celles obtenues par la séparation liquide-liquide, ont été collectées à partir des extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *Parinari macrophylla* Sabine. D'après les données chromatographiques, certains pics majoritaires présentaient les mêmes caractéristiques notamment leurs temps de rétention et les maxima d'absorption. Les fractions filles qui se ressemblent ont été regroupées et nommées par le code d'extrait suivi d'un chiffre.

Tableau 9: Fractions filles obtenues par HPLC semi-préparative en fonction du temps de rétention

Fractions	Extrait d'origine
EtOH01F_1	fraction issue de l'extrait éthanolique total des feuilles
Aq01FT_2	fraction issue de l'extrait aqueux total des feuilles
Aq01FT_3	fraction issue de l'extrait aqueux total des feuilles
EtOH01F_4	fraction issue de l'extrait éthanolique total des feuilles
Aq01FT_5	fraction issue de l'extrait aqueux total des feuilles
EtOH01F_6	fraction issue de l'extrait aqueux total des feuilles

Une évaluation de l'activité anti-radicalaire des fractions filles obtenues a également été effectuée par la méthode HPLC – ABTS^{•+} online et les résultats sont présentés sur les Figure 39, Figure 40,

Figure 41 Figure 42 Figure 43 Figure 44.

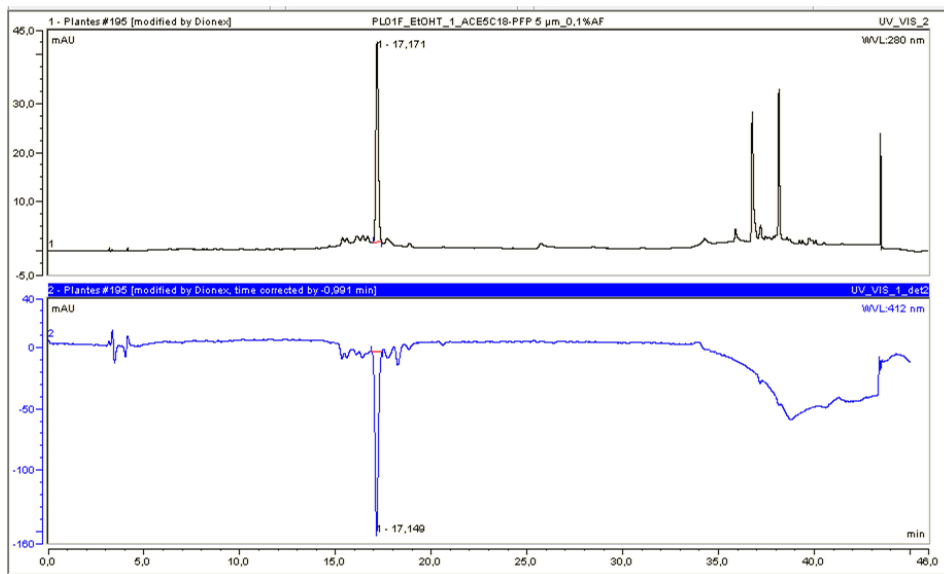


Figure 39: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de EtOH01F_1

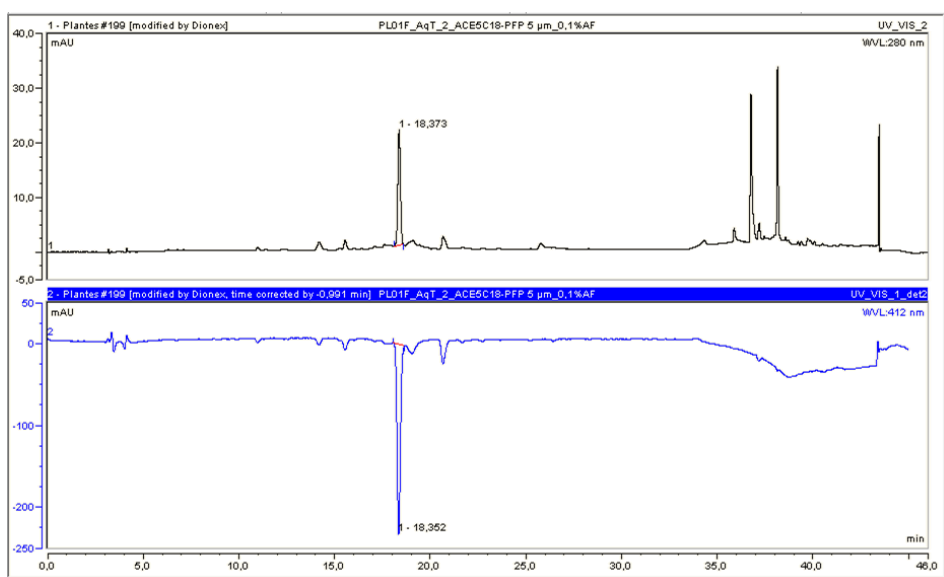


Figure 40: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de Aq01FT_2

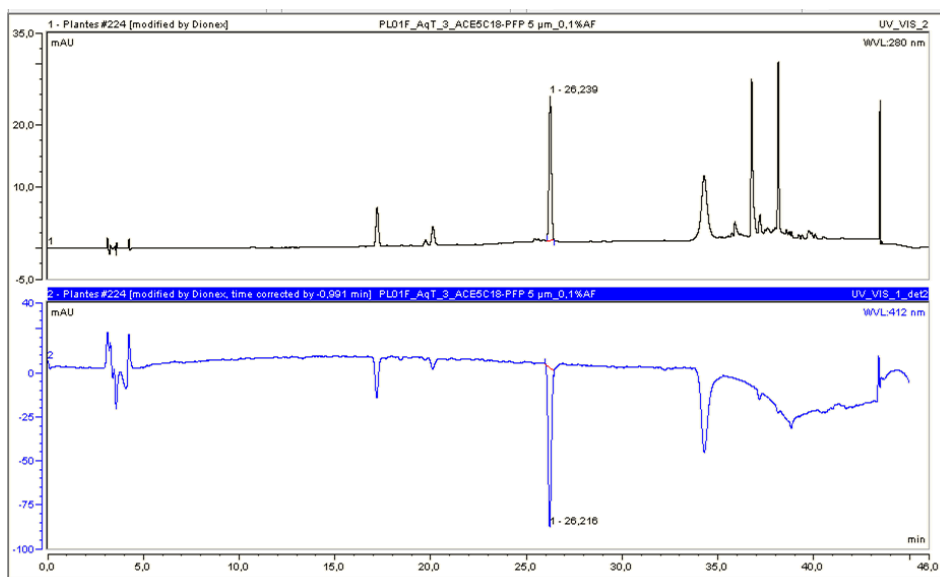


Figure 41: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de Aq01FT_3

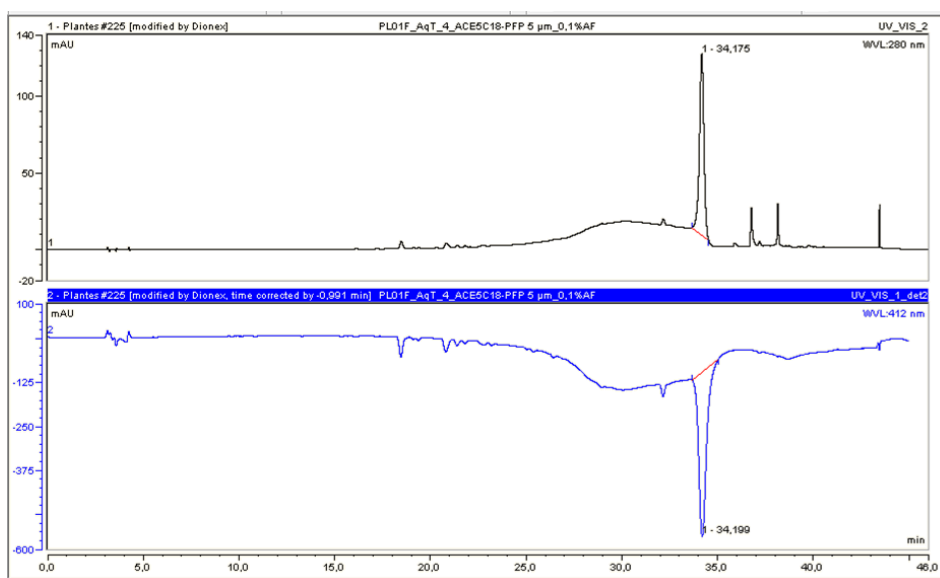


Figure 42: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de EtOH01F_4

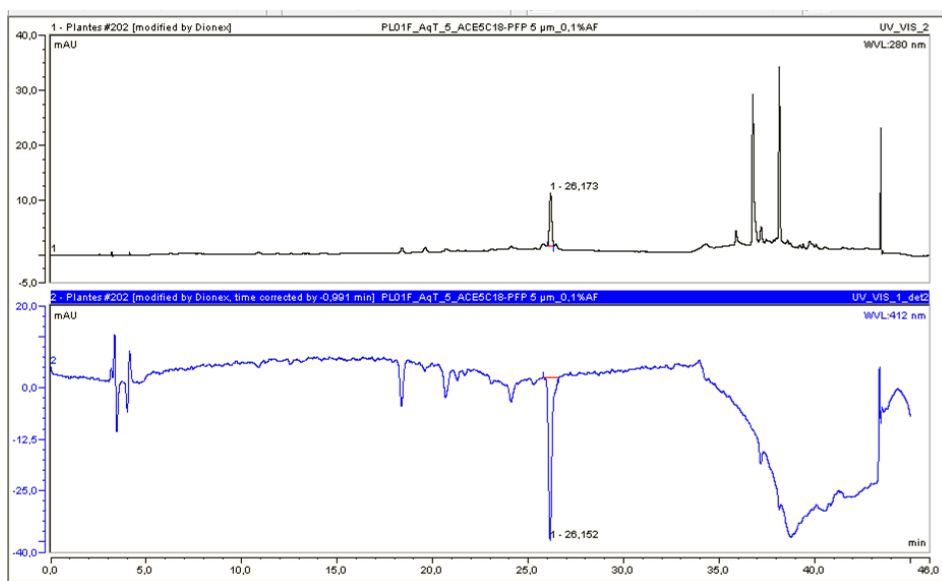


Figure 43: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de Aq01FT_5

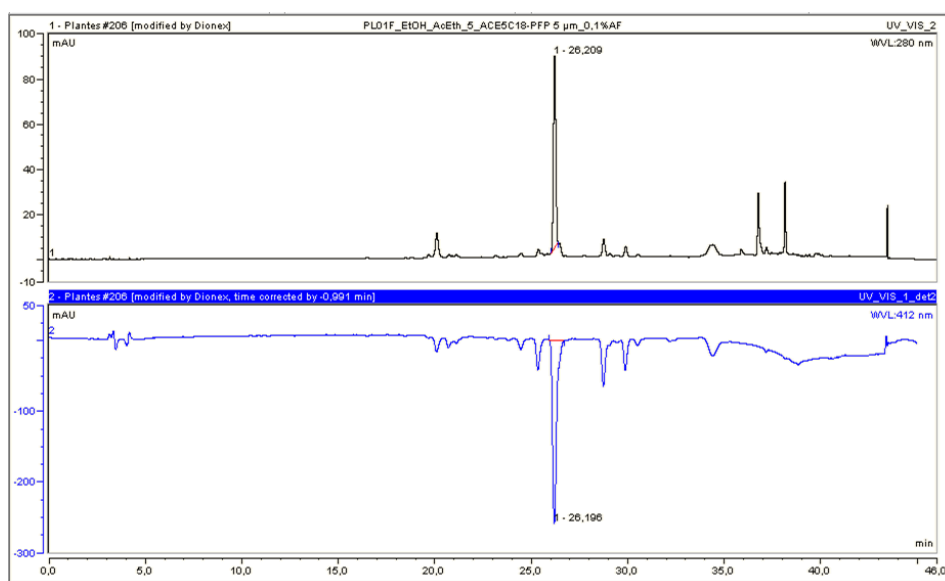


Figure 44: Chromatogramme et détection de l'activité anti-radicalaire de PL01F_EtOH_6

Toutes les fractions filles obtenues présentaient une activité anti-radicalaire portée essentiellement par le produit majoritaire. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour tenter d'identifier les composés contenus dans ces fractions filles.

4.2.1.4 Caractérisation phytochimique des extraits aqueux et éthanolique des feuilles et écorces

4.2.1.4.1 Réactions de précipitation

Une caractérisation phytochimique par des réactions de précipitation dans des tubes à essais a été effectuée pour mettre en évidence les différentes familles chimiques présentes dans les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et écorces de *Parinari macrophylla* Sabine. Les résultats des tests de précipitation des composés sous l'action de réactifs spécifiques, sont présentés dans les Tableau 10Tableau 11.

Tableau 10: Résultats des tests de précipitation mettant en évidence les familles chimiques

	Alcaloïdes		Flavonoïdes		Tanins	
	Dragendorff	FeCl ₃	Cyanidine	Stiasny	Bate-Smith	
Extrait aqueux feuilles	+	+++	+	+++		-
Extrait éthanolique feuilles	+	+++	+	+++		+
Extrait aqueux écorces	+	++	++	+++		+

Les signes + et – indiquent l'intensité de la coloration et la probabilité de présence.

Tableau 11: Résultats des tests de précipitation mettant en évidence les familles chimiques (suite)

	Anthraquinones	Saponosides	Hétérosides cardiotoniques	Stéroïdes	Tri-terpènes
Extrait aqueux	+++	++	+	++	++
Extrait éthanolique	+++	++	+	++	++
Extrait aqueux écorces	+++	++	+	++	+

Les signes + et – indiquent l'intensité de la coloration et la probabilité de présence.

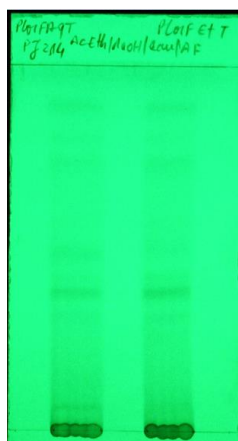
Il s'agit de tests qualitatifs permettant de mettre en évidence des squelettes de base caractéristiques de certaines familles de composés. Selon le test et le type de composé à mettre en évidence, différentes colorations témoignant sa présence ou son absence, sont observées avec des intensités variables suivant sa teneur dans l'échantillon analysé. D'après ces résultats, les extraits de feuilles et d'écorces de *Parinari macrophylla* Sabine sont essentiellement riches en composés phénoliques notamment des flavonoïdes, tanins et anthraquinones.

4.2.1.4.2 Chromatographie planaire (CCM)

Les tests CCM ont révélé la présence de flavonoïdes, tanins, anthraquinones, tri-terpènes, stérols, sucres réducteurs dans les extraits aqueux et éthanolique des feuilles (Aq01F-T, EtOH01F-T) et de l'extrait aqueux des écorces (Aq01Ec-T) de *Parinari macrophylla* Sabine.

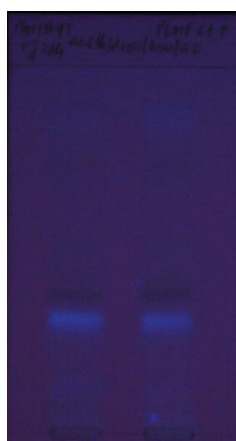
La révélation des flavonoïdes et polyphénols a été réalisée par les réactifs de NEU et de PEG à 366 nm, les stérols et tri-terpènes par le réactif de Liebermann à 366 nm, les sucres réducteurs par le réactif de Molisch et des révélateurs universels comme la vanilline et la *p*-anisaldéhyde à la lumière du jour. Les résultats (photographie des plaques) obtenues avec les différents tests mis en œuvre sont présentés ci-dessous avec les révélateurs respectifs.

- Révélation à la vanilline (polyvalent)



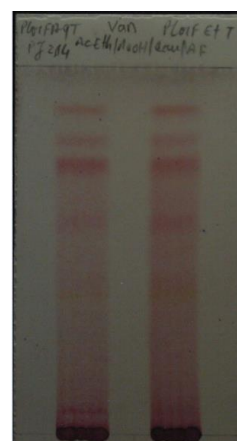
Aq01F-T / EtOH01F-T

Lumière du jour
après migration



Aq01F-T / EtOH01F-T

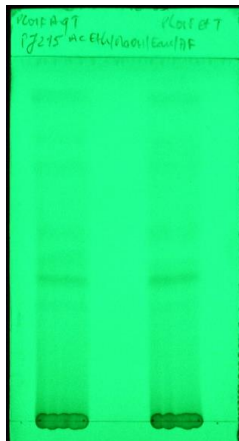
366 nm
Avant révélation



Aq01F-T / EtOH01F-T

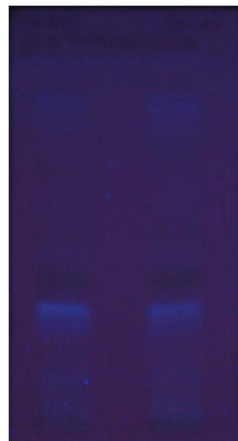
366 nm après
révélation à la vanilline

- **Révélation à la *p*-anisaldéhyde (polyvalent)**



Aq01F-T / EtOH01F-T

Lumière du jour
après migration



Aq01F-T / EtOH01F-T

366 nm
avant révélation

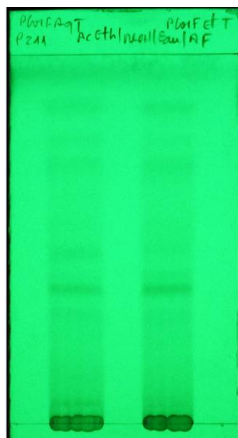


Aq01F-T / EtOH01F-T

366 nm
après révélation
à la *p*-anisaldéhyde

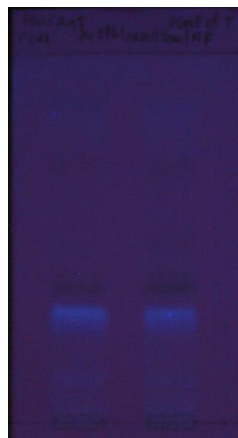
Les taches visibles sur les plaques révèlent la présence de plusieurs composés dans les extraits aqueux et éthanolique des feuilles. Ce sont des révélateurs universels utilisés pour mettre en évidence un large éventail de composés chimiques.

- **Révélateur au NEU/PEG (Flavonoïdes)**



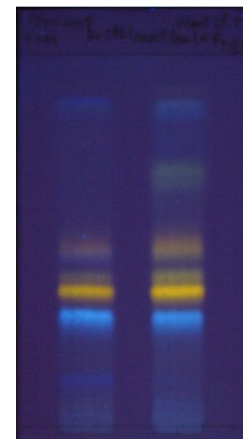
Aq01F-T / EtOH01F-T

Lumière du jour
après migration



Aq01F-T / EtOH01F-T

366 nm
avant révélation

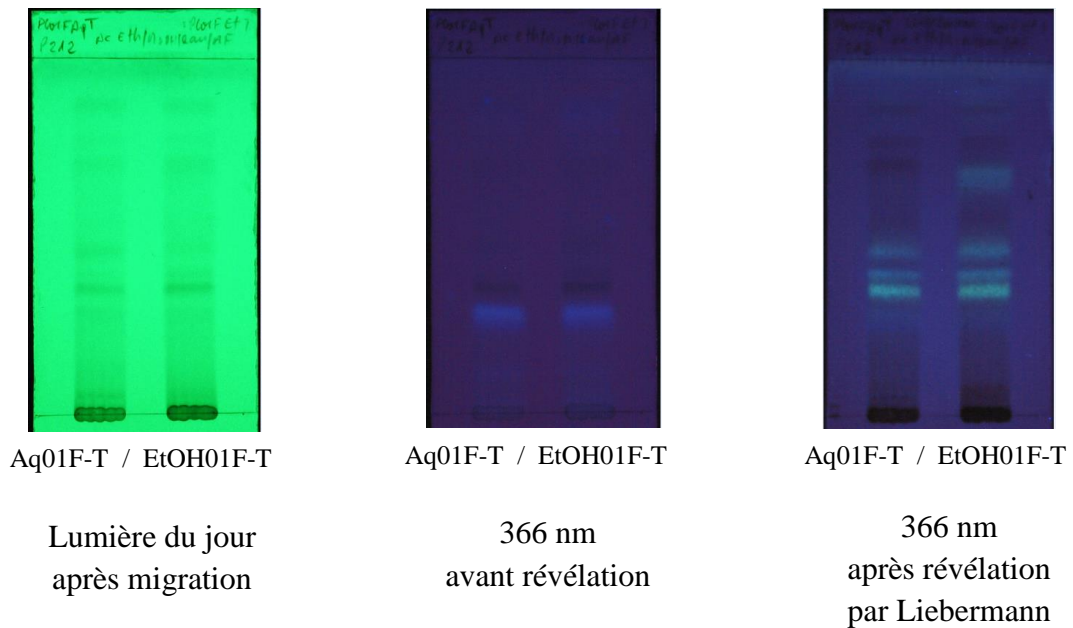


Aq01F-T / EtOH01F-T

366 nm
après révélation
par NEU/PEG

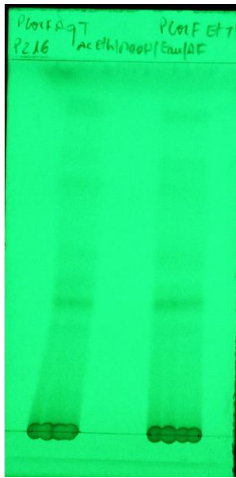
Les flavonoïdes donnent plusieurs couleurs du rouge au bleu en passant par le jaune, le vert, etc. en fonction de leurs caractéristiques structurales. C'est le cas des flavonoïdes ou flavones qui donnent des taches rouges ou oranges, les acides phénoliques des taches vertes.

- **Révélation par le réactif de Liebermann (stérols, tri-terpènes)**



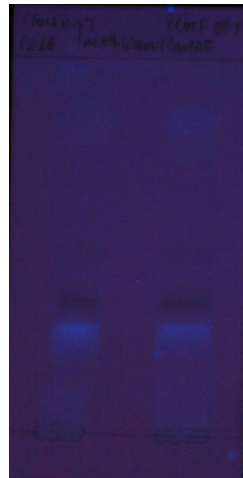
La présence de taches fluorescentes révèle la présence de stérols et de tri-terpènes.

- Révélation par le réactif de Molisch (sucres)



Aq01F-T / EtOH01F-T

Lumière du jour
après migration



Aq01F-T / EtOH01F-T

366 nm
avant révélation

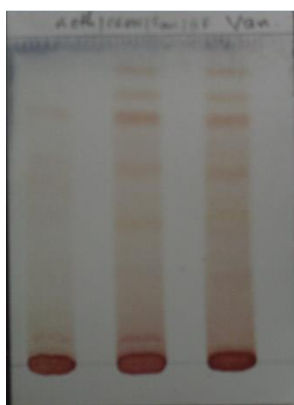


Aq01F-T / EtOH01F-T

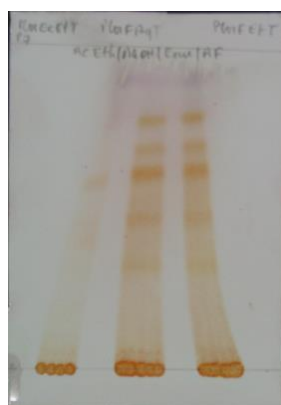
366 nm
après révélation
par Molisch

La révélation par le réactif de Molisch met en évidence des tâches marron à la zone de dépôt, ce qui susciterait la présence de sucres réducteurs.

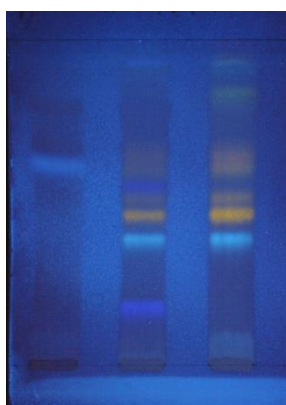
Les images de plaques suivantes permettent de donner une idée sur la différence de composition qualitative entre les extraits aqueux et éthanolique des feuilles (Aq01F-T, EtOH01F-T) et de l'extrait aqueux des écorces (Aq01Ec-T) de *Parinari macrophylla* Sabine.



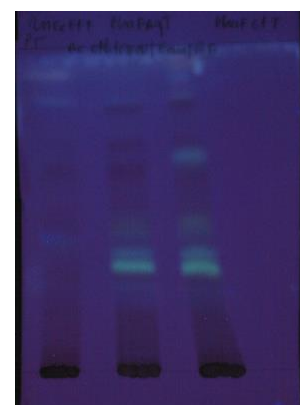
p-anisaldéhyde



vaniline



NEU/PEG



Liebermann

Dépôt 1 : extrait aqueux des écorces (Aq01Ec-T) ; dépôt 2 : extrait aqueux des feuilles (Aq01F-T) ;
dépôt 3 : extrait éthanolique des feuilles (EtOH01F-T).

Les résultats des tests de précipitation et la CCM ont permis une mise en évidence qualitative des groupes de composés présents dans les extraits aqueux et éthanolique des feuilles et écorces de *Parinari macrophylla* Sabine. Ces tests ont également permis d'observer une différence de composition entre les extraits de feuilles et d'écorces. Les feuilles semblent contenir plus de composés que les écorces ce qui permettrait d'envisager de façon sereine une exploitation des feuilles plutôt que celle des écorces. Cette dernière solution imposerait un contrôle très strict de l'exploitation de la ressource naturelle faute de quoi, elle conduirait inévitablement à la destruction de l'espèce végétale et sa disparition de l'écosystème sénégalais. Maintenant que les tests de caractérisation phytochimiques ont révélé la présence majoritaire de composés phénoliques, des méthodes d'identification ont été mises en œuvre pour déterminer quelles molécules sont présentes dans les extraits.

4.2.1.5 Identification par approche de réseau moléculaire

L'analyse par UHPLC-MS/MS d'un mélange d'étalons de polyphénols a été effectuée en parallèle des extraits totaux de plante en vue d'aider à l'identification des composés. Les résultats de la séparation LC-MS sont présentés sur le chromatogramme BPC (Base Peak Chromatogram) en (Figure 45Figure 46). Ensuite, une comparaison des chromatogrammes des extraits de plantes et des étalons de polyphénols a permis de repérer un pic commun, de temps de rétention 18,4 min, de m/z 577 et de formule brute $[M-H]^-$ $C_{30}H_{25}O_{12}$ correspondant à la procyanidine B2.

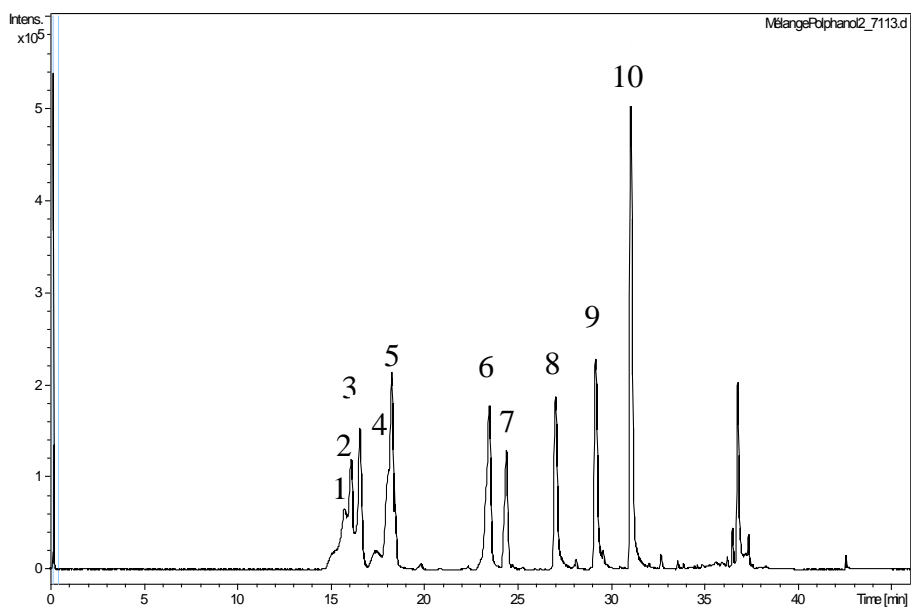


Figure 45: Chromatogrammes BPC du mélange de polyphénols

1- Acide-4-hydroxybenzoïque (15,7 min) ; 2- Acide chlorogénique (16,0 min) ; 3- Catéchine (16,5 min) ; 4- Acide caféïque (18,2 min) ; 5- Procyanidine B2 (18,4 min) ; 6- Rutine (23,4 min) ; 7- Acide férulique (24,3 min) ; 8- Myricétine (27,0 min) ; 9- Quercétine (29,1 min) ; 10- Kaempférol (31,0 min).

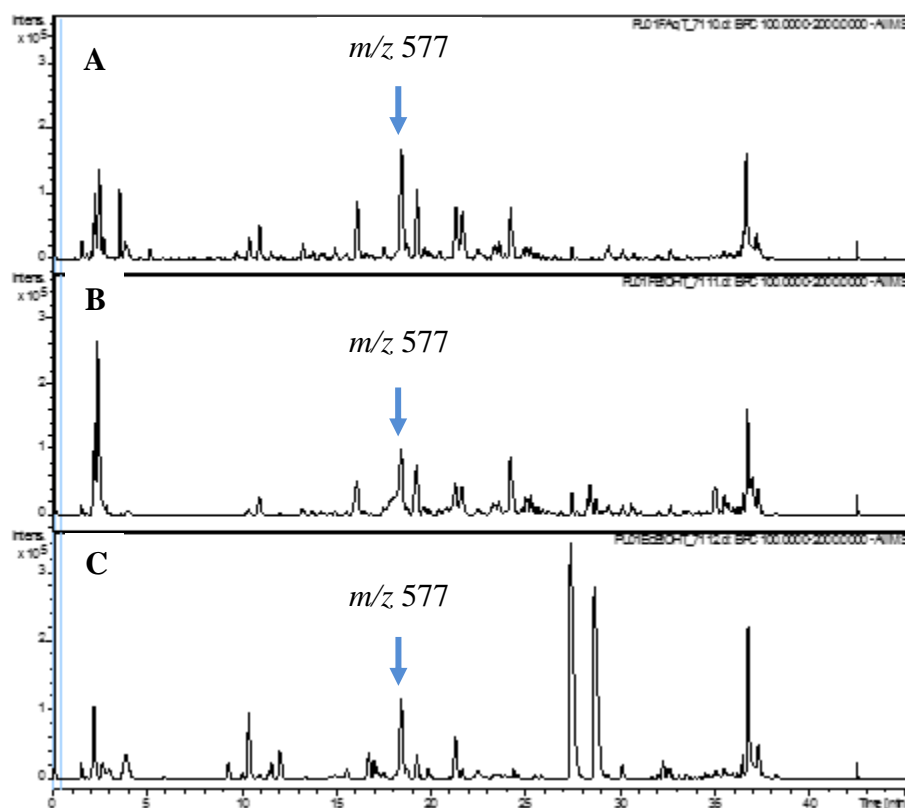


Figure 46: Chromatogrammes BPC des extraits Aq01F-T, EtOH01F-T et Aq01Ec-T

A : Extrait aqueux total des feuilles (**Aq01F-T**) ; **B :** Extrait éthanolique total des feuilles (**EtOH01F-T**) ; **C :** Extrait aqueux total des écorces (**Aq01Ec-T**).

L'ensemble des données MS et MS/MS des extraits et des étalons ont ensuite été utilisés pour la génération de réseaux moléculaires pour tenter d'identifier les composés par l'approche de similarité spectrale.

Une première approche consistait à comparer la composition chimique des extraits par rapport à des étalons phénoliques. Cela a abouti à l'obtention du réseau 1 qui comprend 217 perles au total (Figure 47). Dans ce réseau, il existe plusieurs groupes qui sont disposés en fonction de leurs similarités spectrales. On distingue les groupes 1, 2, 3, 4, 5, 6 et le groupe 7 représenté par des perles individuelles ou liées par deux qui n'ont aucune ressemblance avec les autres groupes (Figure 47).

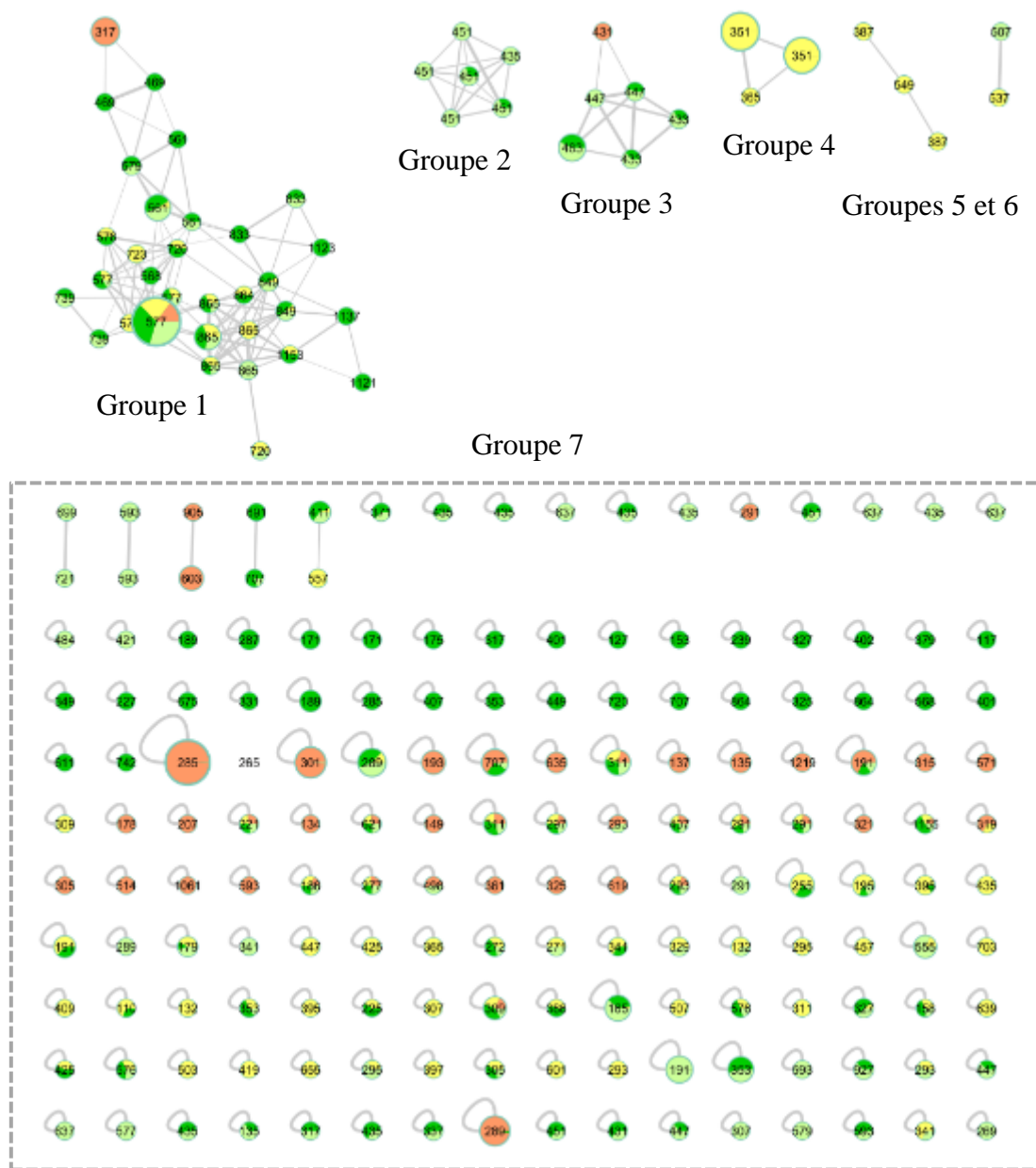


Figure 47: Réseau 1 obtenu pour le jeu de données incluant les extraits et les étalons

Dans ce réseau 1, chaque perle représente un pic chromatographique. Etant donnée la complexité des échantillons, l'interprétation du réseau a été limitée au groupe 1 (Figure 48), celui-ci étant le plus informatif car il regroupe le plus de perles.

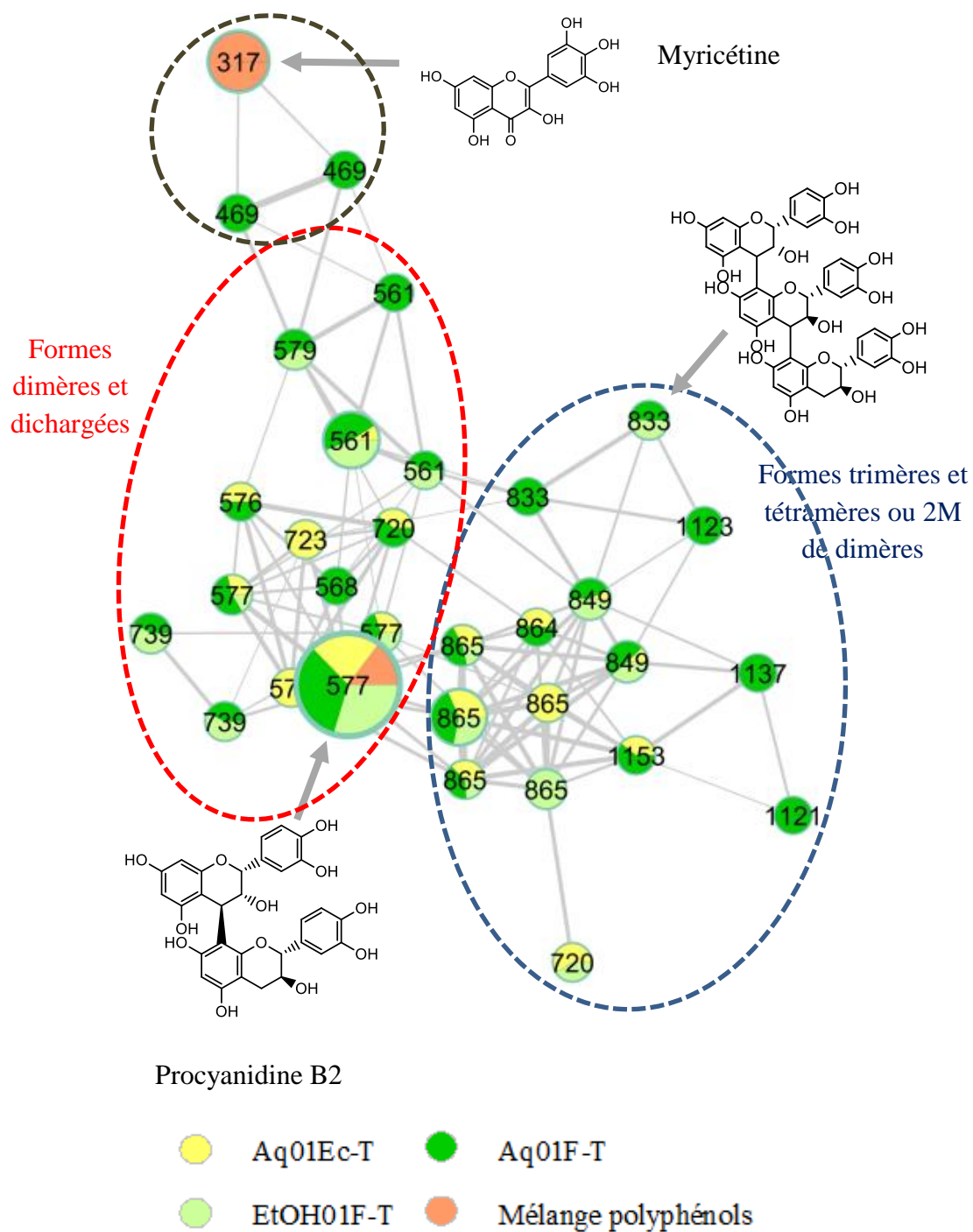


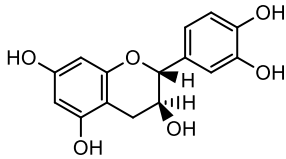
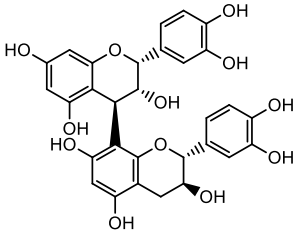
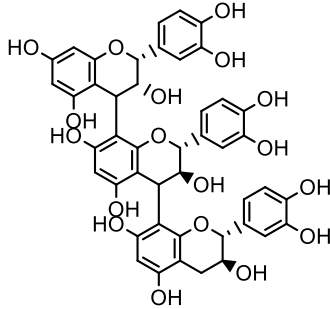
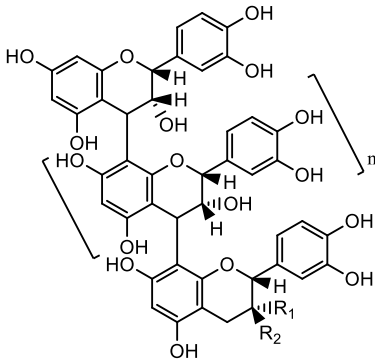
Figure 48: Représentation détaillée du groupe 1 obtenu pour le réseau 1

Aq01Ec-T : extrait aqueux total des écorces ; **EtOH01F-T** : extrait éthanolique total des feuilles ; **Aq01F-T** : extrait aqueux total des

Sur la représentation détaillée du groupe 1, chaque perle représente donc un composé avec sa masse arrondie à un nombre entier et chaque couleur (code couleur) représente un échantillon. La présence simultanée de plusieurs couleurs sur une perle indique alors que le composé est présent dans les différents échantillons. La taille des perles est fonction de l'aire des pics des composés.

Pour une meilleure interprétation, les données chromatographiques (TR), de masse (m/z , formules brutes), le type de composés et des exemples de structures possibles sont présentées sur le Tableau 12.

Tableau 12: Données LC-MS correspondant aux perles du groupe 1

TR (min)	<i>m/z</i>	Formules Brutes	Type de composés	Exemples de structures possibles
27,0	317	C ₁₅ H ₉ O ₈	myricétine	
25,8	561	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₁	Dimères	
21,6	561	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₁		
18,4	577	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂		
14,8	577	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂		
17,4	577	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂		
24,3	577	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂		
19,2	579	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂		
23,8	833	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₆	Trimères	
24,8	833	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₆		
23,2	849	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₇		
23,5	849	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₇		
17,1	865	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈		
19,2	576	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	Tétramères ou 2M de dimères	
21,6	1123	C ₆₀ H ₅₁ O ₂₂		
22,0	568	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₃		
23,8	1137	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₃		

Tétramère : R1 = H, R2 = OH et n = 2

Les temps de rétention des perles du groupe 1 (réseau 1) sont compris entre 14 et 27 min. L'interprétation du réseau 1 est donc limitée ici aux pics chromatographiques présents dans cet intervalle de temps de rétention. Au vu des formules brutes proposées pour les perles

présentes sur le groupe 1, plusieurs types de composés se distinguent. Un sous-groupe est constitué par la myricétine et deux composés de m/z 469 ayant des schémas de fragmentation similaires (encerclé en gris). Sur le groupe 1, un premier type de perles permet d'obtenir des propositions de formules brutes à 30 atomes de carbone. Cela correspond à des procyanidines sous forme de dimères (encerclé en rouge). Parmi celles-ci, on retrouve la plus grosse perle du réseau de m/z 577 et qui est présente dans les trois extraits analysés et dans le mélange des étalons de polyphénols (4 couleurs). Il s'agit donc de la procyanidine B2. Les autres perles correspondent visiblement à des procyanidines (encerclé en bleu). En effet, ces derniers également appelés tanins condensés ou catéchiques contenant 2 à 7 unités monomères sont largement retrouvés dans le règne végétal (Tsao, 2010). Les monomères à l'origine des tanins condensés possèdent une structure 2-phénylchromane, plus couramment appelée unité flavane, qui correspond à un squelette de quinze atomes de carbones organisés en C6-C3-C6 (Figure 49). Les principales unités monomères sont la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine (Figure 49). Ils peuvent se condenser et former des procyanidines dimères, oligomères et polymères (Figure 49).

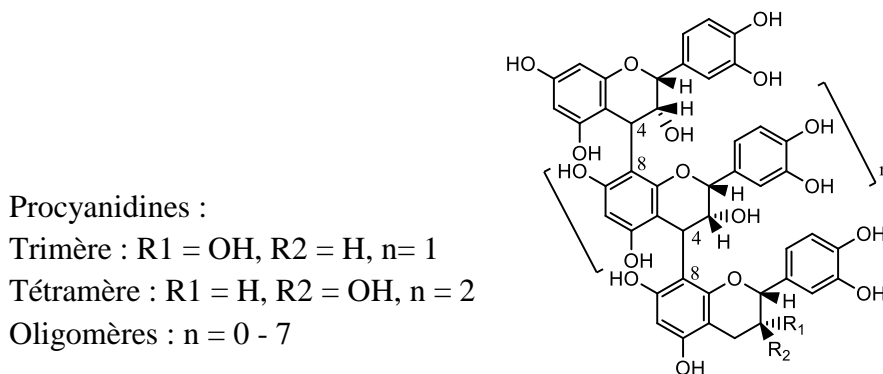
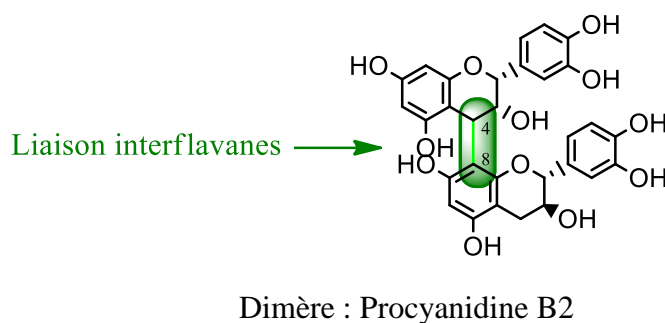
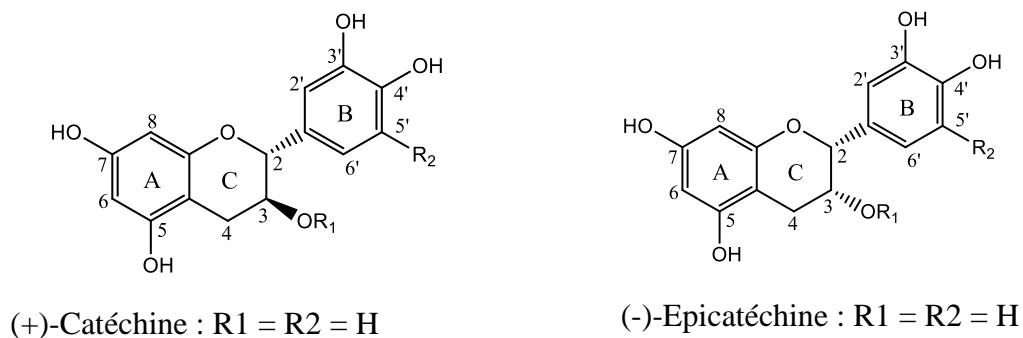


Figure 49: Structures des Flavanols conduisant aux procyanidines

En outre, une comparaison des spectres MS/MS de la procyanidine étalon avec le pic correspondant dans l'extrait aqueux a permis de voir que les deux produits se fragmentent exactement de la même manière (Figure 50Figure 51). Ces deux spectres de fragmentation confirment que le pic de temps de rétention 18,4 min de m/z 577 et de formule brute $[M-H]^- C_{30}H_{25}O_{12}$ dans les extraits correspond bien à la procyanidine B2 ou à un isomère qui aurait le même temps de rétention et le même schéma de fragmentation.

Celle-ci présente également une forte similarité spectrale avec les perles correspondant à d'autres dimères de m/z 561 ; 577 ; 579. La perle de temps de rétention 15,5 min, m/z 723 et de

formule brute $[M-H]^- C_{36}H_{35}O_{16}$ correspondrait à un dimère glycosylé résultant de la liaison avec un sucre en C6 aboutissant à la formation d'un composé en C36. Deux perles de masse paire (m/z 568 et 576) sont également présentes. Il s'agit ici d'ions dichargés qui sont issus de molécules suffisamment grandes pouvant porter deux charges sans encombrement stérique. On observe ensuite des perles de m/z 833, 849, 865 dont les formules brutes présentent 45 atomes de carbones. Elles correspondraient donc à des procyanidines sous forme de trimères (trois sous-unités à 15 atomes de carbone) et des perles de m/z 1123, 1137. Ces dernières pourraient soit correspondre à des tétramères possédant 60 atomes de carbones, soit provenir de la formation d'amas de type 2M formés en source lors de l'ionisation. Ces amas correspondraient donc à deux molécules dimères identiques (2 fois 30 atomes de carbone). D'autres perles de m/z 469 ; 720 ; 723 ; 739 et 1153 n'avaient pas fournies assez d'informations pour une meilleure interprétation. Il pourrait s'agir d'analogues structuraux des procyanidines se fragmentant de la même manière.

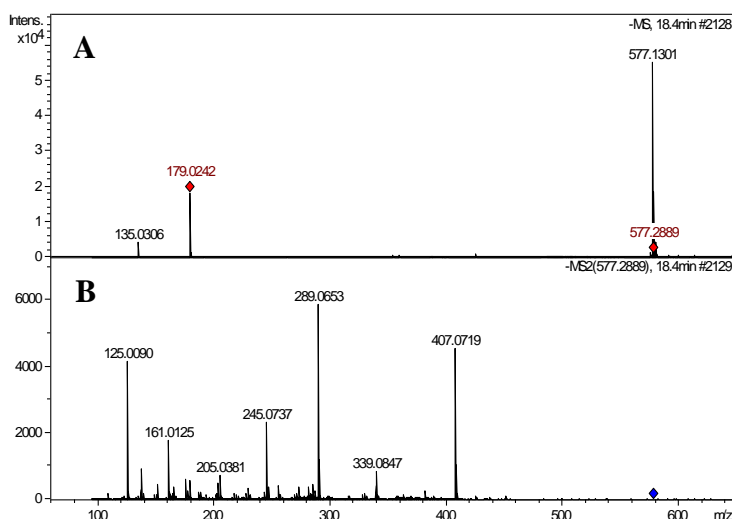


Figure 50: Spectres de la procyanidine B2 étalon, ion parent m/z 577 visible sur le scan MS (A), spectre MS/MS (B)

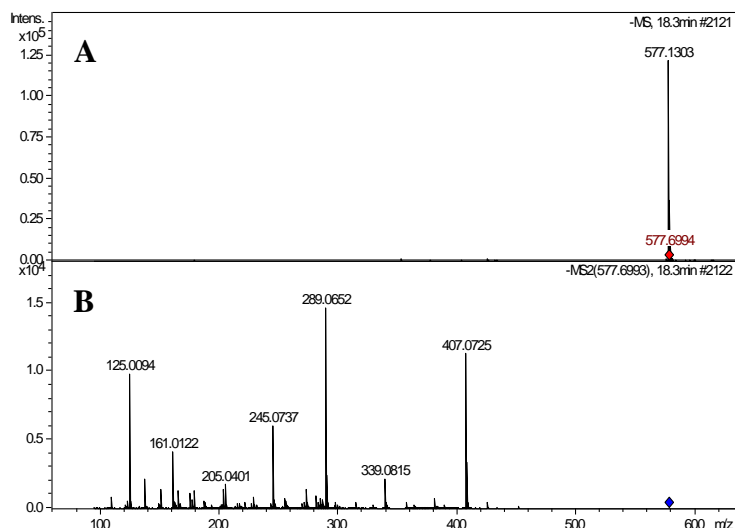


Figure 51: Spectres du composé de temps de rétention 18,4 min dans l'extrait aqueux, ion parent m/z 577 visible sur le scan MS (A) et les fragments MS/MS (B).

Maintenant que nous avons une idée de la composition des extraits totaux grâce au réseau 1 (groupe 1), une seconde approche consistait alors à voir si des perles communes se retrouvaient entre extraits totaux et fractions filles actives, pour aider à leur identification. En effet, des fractions filles ont été obtenues à partir des extraits totaux aqueux et éthanolique des feuilles de *Parinari macrophylla* Sabine et dont l'activité anti-radicalaire a été prouvée par la méthode HPLC – ABTS^{•+} online. Pour cela, les analyses des fractions filles actives ont été rajoutées au set de données des extraits totaux et leurs chromatogrammes BPC sont présentés sur la Figure 52.

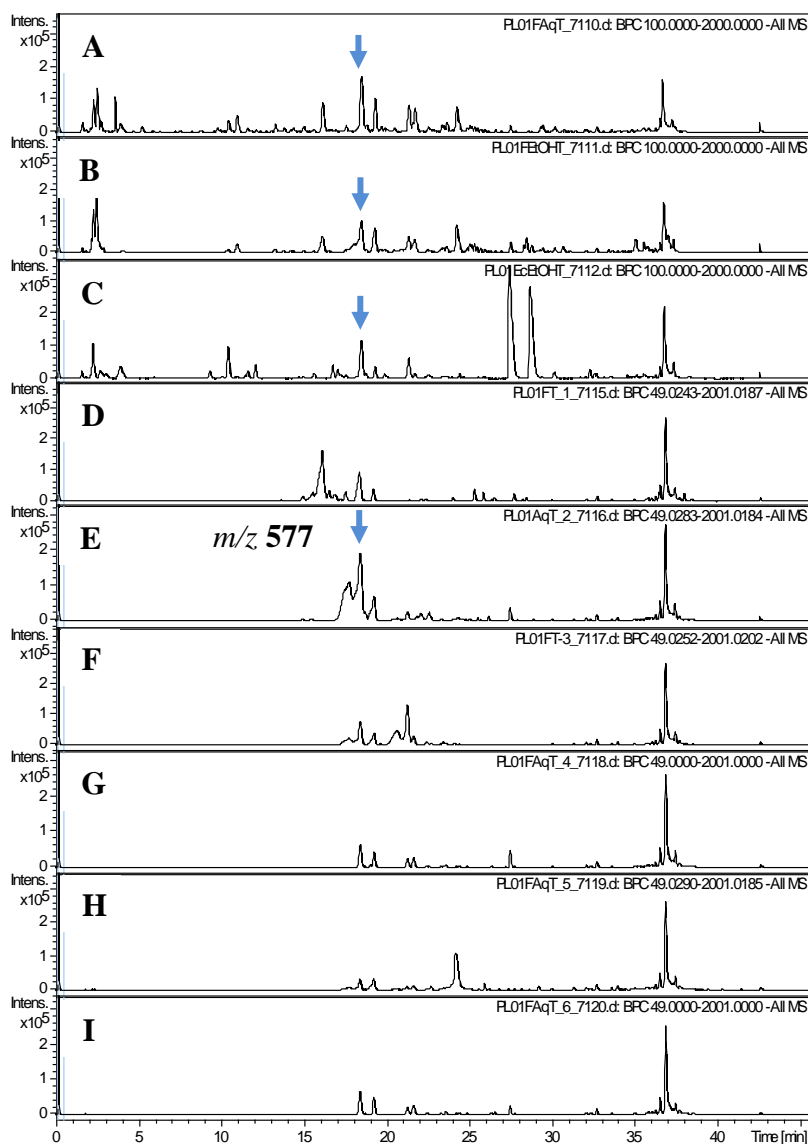


Figure 52: Chromatogrammes BPC des extraits et fractions filles actives

A : Aq01F-T : extrait aqueux total des feuilles ; **B : EtOH01F-T** : extrait éthanolique total des feuilles ; **C : Aq01Ec-T** : extrait aqueux total des écorces ; **D : EtOH01F_1** : fraction 1 issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **E : Aq01FT_2** : fraction 2 issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **F : Aq01FT_3** : fraction 3 issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **G : EtOH01F_4** : fraction 4 issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **H : Aq01FT_5** : fraction 5 issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **I : Aq01FT_6** : fraction 6 issue de l'extrait aqueux

Sur les BPC des fractions filles, les molécules détectées ont des temps de rétention (TR) compris majoritairement entre 14 et 29 minutes. Cela correspond au TR des perles observées précédemment sur le groupe 1 du réseau 1. Le même pic de temps de rétention 18,4 min

correspondant à la procyanidine B2 a été détecté dans les différentes fractions actives. Il est majoritairement présent dans la fraction fille notée Aq01T_2.

Les données MS/MS ont été utilisées de la même manière que précédemment pour générer le réseau 2 comportant 260 perles. Il comprend également plusieurs groupes qui sont disposés en fonction de leurs similarités spectrales. On distingue les groupes 1, 2, 3, 4, 5 et 6, et ce dernier regroupe les perles individuelles ou liées par deux qui n'ont aucune ressemblance avec les autres groupes (Figure 53).

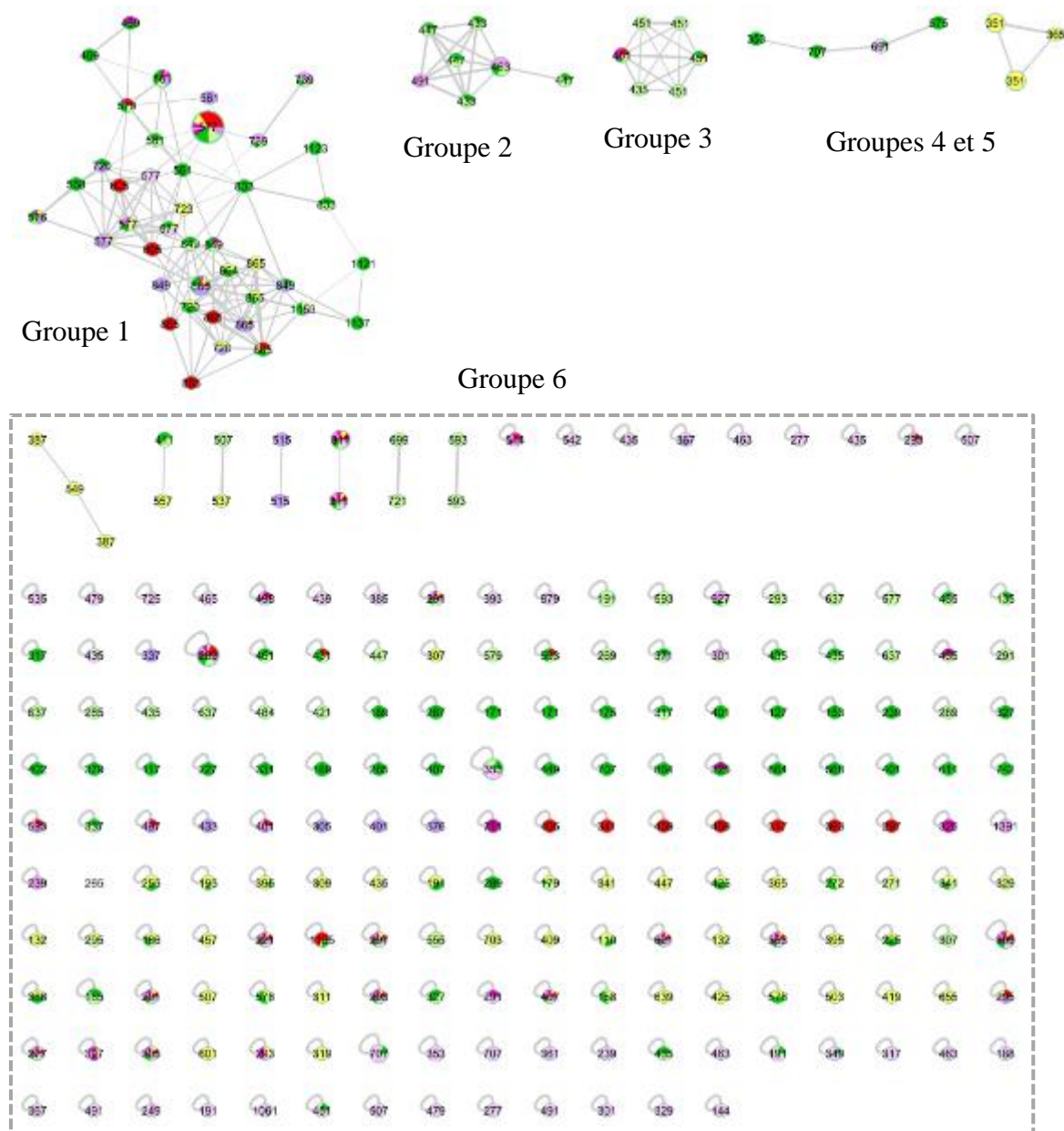


Figure 53: Réseau 2 obtenu pour le jeu de données incluant les extraits totaux et les fractions filles actives

Dans ce réseau 2 également, seul le groupe 1 (Figure 54) regroupant le plus de perles a été considéré pour une interprétation plus approfondie.

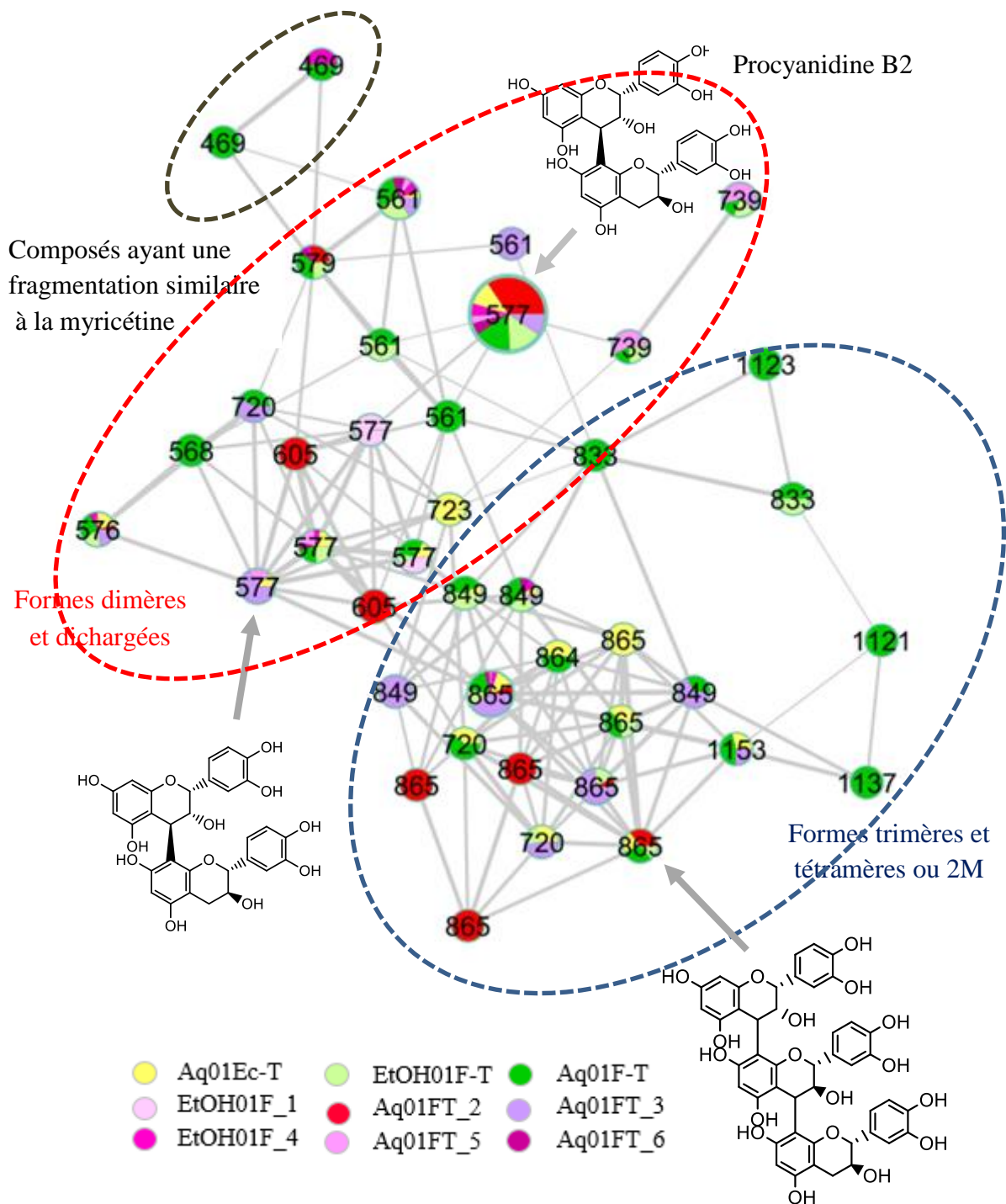


Figure 54: Représentation détaillée du groupe 1 obtenu pour le réseau 2

Aq01F-T : extrait aqueux total des feuilles ; **EtOH01F-T** : extrait éthanolique total des feuilles ; **Aq01Ec-T** : extrait aqueux total des écorces ; **EtOH01F_4** : fraction 4 issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **EtOH01F_1** : fraction 1 issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **Aq01FT_2** : fraction 2 issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Aq01FT_3** : fraction 3 issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Aq01FT_5** : fraction 5 issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Aq01FT_6** : fraction 6 issue de l'extrait aqueux total des feuilles.

Le groupe 1 du réseau 2 montre une répartition similaire des sous-groupes évoqués dans le groupe 1 du réseau 1 où il y avait un sous-groupe représenté par les composés se fragmentant de la même manière que la myricétine, le sous-groupe constitué par les formes dimères et dichargés et le sous-groupe des trimères, tétramères ou 2M de dimères. Le même code couleur des extraits totaux du réseau 1 a été conservé et les fractions filles portent des teintes rose, violet et rouge. Ainsi, les composés présents dans les fractions filles ayant montré une activité anti-radicalaires correspondent aux perles de m/z 469 pour le sous-groupe ayant une similarité spectrale avec la myricétine (encerclé en gris), 561 ; 576 ; 577 ; 579 ; 605 ; 720 et 739 (encerclé en rouge) pour le sous-groupe correspondant aux dimères et aux ions dichargés de tétramères, 849 ; 865 ; 1153 pour le 3^{ème} sous-groupe correspondant aux trimères et aux tétramères ou 2M (encerclé en bleu). Ces résultats concordent avec les données de la littérature selon lesquelles les procyanidines possèdent un fort pouvoir antioxydant qui varie avec la polymérisation des molécules de catéchine et augmente d'un monomère à un trimère, puis une tendance inverse pour les composés contenant plus de trois unités monomères (Plumb et al., 1998). Ces résultats concordent avec ceux de notre étude où les perles contenant les couleurs des fractions filles actives sont majoritairement constituées par les formes dimères et trimères. Les monomères (+)-catéchine et (-)-épicatéchine ont une activité antioxydante identique, suggérant que la stéréochimie de l'anneau pyranique C (Figure 49, page 116) n'influence pas de façon significative l'activité antioxydante des monomères (Gaulejac et al., 1999).

D'après la littérature, l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles libres, donneurs potentiels d'atomes d'hydrogène, semble augmenter l'activité antioxydante. Une molécule de glucose attachée à la molécule de catéchine à la position 3-hydroxyle dans le cycle C réduit la capacité des hydroxyles du cycle B (Figure 49, page 116) à donner leurs atomes d'hydrogène et par conséquent réduit son effet anti-radicalaire (Williamson et al., 1996). Donc l'effet antioxydant des procyanidines ne dépendrait pas uniquement de la capacité à donner un atome hydrogène via les hydroxyles phénoliques (Plumb et al., 1998). Cependant, une potentialisation de l'activité antioxydante a été notée pour les dimères de procyanidine contenant la liaison interflavane C4-C8 et C4-C6 (Figure 49, page 116). Cela pourrait s'expliquer par la conformation distincte que ces procyanidines peuvent adopter (Da Silva Porto et al., 2003).

L'approche d'identification de composés naturels par réseau moléculaire est une méthode récente, sophistiquée relativement simple et rapide qui permet de dégager des pistes

potentielles d'identification structurale. Elle permet de se démarquer de certaines étapes classiques d'isolement et de purification qui peuvent être longues et coûteuses. Dans cette étude, cette approche a été utilisée pour la première fois au laboratoire et elle a permis de mettre en évidence le type de composés présents dans les extraits de feuilles et d'écorces de *Parinari macrophylla* sabine analysés. Dans les groupes de réseaux explorés, les composés majoritairement présents sont de la famille des procyanidines. Grâce aux réseaux, il a également été possible d'identifier les formes les plus actives des procyanidines dans les trois extraits et qui seraient responsables de l'activité anti-radicalaire.

Cependant, l'approche développée ici comporte plusieurs étapes de prétraitement de données qui pourraient constituer des filtres pour certains métabolites qui par conséquent ne seront pas visualisés sur le réseau et ne seront pas pris en compte dans les interprétations. Et des limites subsistent encore pour les familles de composés n'ayant pas de schémas de fragmentation communs.

4.2.1.6 Tentative d'identification d'autres composés par approche comparative avec des bases de données

Une analyse par spectrométrie de masse à haute résolution en mode négatif a été réalisée pour tenter d'identifier les composés contenus dans les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *Parinari macrophylla* Sabine qui semblent être plus riches en composés chimiques que les écorces. Les rapports m/z des ions ont été utilisés pour faire une comparaison par rapport à la base de données de masse monoisotopique créée par TWISTAROMA, mais aussi en comparant les rapports m/z obtenus par rapport à ceux rapportés dans la littérature ((Brito et al., 2014; Chen et al., 2011; Francescato et al., 2013; Karaçelik et al., 2015; Lin et al., 2012). En outre, une étude bibliographique sur les composés antérieurement isolés de la famille, du genre et de l'espèce *Neocarya macrophylla* Kernel a été également effectuée (Coradin et al., 1985a; Diaby et al., 2016a) pour comparer ces résultats par rapport aux propositions de la base de données. L'analyse de ces informations a permis d'identifier provisoirement les composés répertoriés sur le Tableau 13 avec le groupe 1 qui contient les composés communs aux deux extraits, le groupe 2 qui contient les composés uniquement présents dans l'extrait aqueux et le groupe 3 qui contient le composé uniquement présent dans l'extrait éthanolique.

Tableau 13: Tentative d'identification d'autres composés dans les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *Parinari macrophylla* Sabine

TR (min)	m/z [M-H] ⁻	Proposition d'identification
Groupe 1		
5,8	289	Catéchine ou Epicatéchine
6,8	341	6- <i>O</i> -Caffeoyl- α -glucose ou isomère
8,1	463	Quercétine 3- <i>O</i> -glucoside ou Hyperoside ou Quercétine-3- <i>O</i> -glucosylgalactoside ou Myricétine-3- <i>O</i> -rhamnoside ou Isoquercétine
27,9	315	Acide protocatéchique 4-glucoside ou isomère
Groupe 2		
6,2	367	Méthyle 3- <i>O</i> -caffeoyl-quinique ou isomère
10,1	301	Quercétine ou isomère
19,1	447	Kaempférol 3- <i>O</i> -glucoside ou isomère
Groupe 3		
6,8	341	Acide caféique hexoside

Certains produits sont communs aux deux extraits (groupe 1) et d'autres sont spécifiques à l'extrait aqueux (groupe 2) et l'extrait éthanolique (groupe 3).

Il s'agit d'acides phénoliques et principalement de flavonoïdes. Notre étude a permis de mettre en évidence la forte prédominance de la famille des procyanidines dans les extraits analysés. C'est la première fois que cette famille de composés a été décrite pour *Parinari macrophylla* Sabine. Pour connaître la nature des composés majoritaires présents dans les fractions filles, elles ont également été analysées par résonance magnétique nucléaire.

4.2.1.7 Identification par Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Dans les fractions filles 1 et 6 de l'extrait éthanolique des feuilles (EtOH01F_1 et EtOH01F_6), deux composés ont pu être identifiés par résonance magnétique nucléaire : l'acide chlorogénique et l'hyperoside (Figure 55 Figure 56). Les mêmes composés étaient retrouvés dans les fractions filles de l'extrait aqueux des feuilles. Les résultats sont présentés dans l'ordre suivant : nombre d'hydrogène, le couplage, la valeur de la constante de couplage et la position sur le squelette carboné. Les déplacements chimiques sont organisés du plus grand au plus petit pour le proton et le carbone.

Acide chlorogénique (1) : ESI-HRMS (-) : m/z 353,0851 ; formule brute : $C_{16}H_{18}O_9$;
 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm) : 7,52 (1H, d, $J = 16,4$ Hz, H-7'), 7,02 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), 6,92 (1H, dd ; $J = 8,1$; 2,1 Hz, H-6'), 6,75 (1H, d ; $J = 8,1$ Hz, H-5'), 6,24 (1H, d ; $J = 16,4$ Hz, H-8'), 5,30 (1H, ddd ; $J = 9,5$; 9 ; 4,5 Hz, H-5), 4,14 (1H, m, H-3), 3,71 (1H, dd ; $J = 8,5$; 3 Hz, H-4), 2,20 (1H, m, H-6_a), 2,15 (1H, dd ; $J = 14$; 2,5 Hz, H-2_a), 2,06 (1H, m, H-6_b), 2,03 (1H, m, H-2_b) ; ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm) : 174,11 (C-7), 167,63 (C-9'), 148,45 (C-4'), 145,63 (C-7'), 144,92 (C-3'), 126,19 (C-1'), 121, 61 (C-6'), 114,83 (C-5'), 113,58 (C-2'), 113,59 (C-8'), 75,56 (C-1), 71,74 (C-4), 70,16 (C-5), 69,63 (C-3), 37,52 (C-6), 37,02 (C-2).

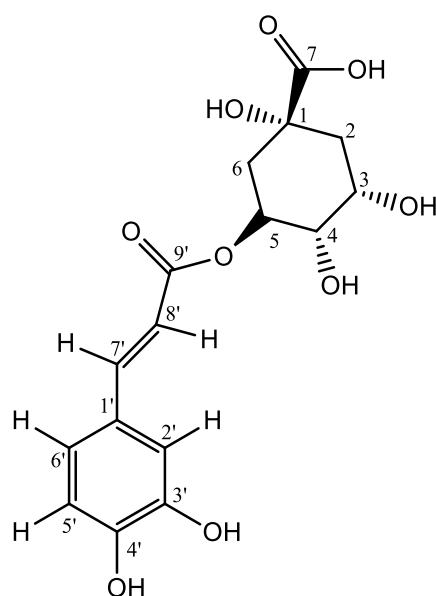


Figure 55: Structure chimique de l'acide 5-O-caféoylquinique (Acide chlorogénique)
 (Hansen et al., 1999; Tatsis et al., 2007)

Hyperoside (6) : ESI-HRMS (-) : m/z 463,0852 ; formule brute : $C_{21}H_{20}O_{12}$; 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ_H (ppm) : aglycone : 7,66 (1H, d, $J = 8,5$; 2,3 Hz, H-6'), 7,53 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H-2'), 6,80 (1H, d ; $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,36 (1H, d ; $J = 2$ Hz, H-8), 6,16 (1H, d ; $J = 2$ Hz, H-6), sucre : 5,36 (1H, d ; $J = 7,8$ Hz, H-1''), 3,64 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-3''), 3,46 (1H, dd ; $J = 10,00$; 6,00 Hz, H-6''_a), 3,36 (1H, d, $J = 3,5$ Hz H-3''), 3,35 (1H, dd ; $J = 12$; 9,5 Hz, H-2''), 3,31 (1H, dd, $J = 12$; 6,00 Hz, H-5''), 3,26 (1H, dd, $J = 10$; 5,5 Hz H-6''_b) ; ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ_C (ppm) : aglycone : 177,80 (C-4), 166,49 (C-7), 161,68 (C-5), 156,93 (C-9), 156,19 (C-2), 148,62 (C-4'), 144, 92 (C-3'), 133,71 (C-3), 122,44 (C-6'), 122,37 (C-1'), 116,38 (C-2'), 115,71 (C-5'), 103,62 (C-10), 99,45 (C-6), 94,13 (C-8) ; sucre : 102,32 (C-1''), 77,06 (C-5''), 73,60 (C-3''), 71,74 (C-2''), 68,39 (C-4''), 60, 18 (C-6'').

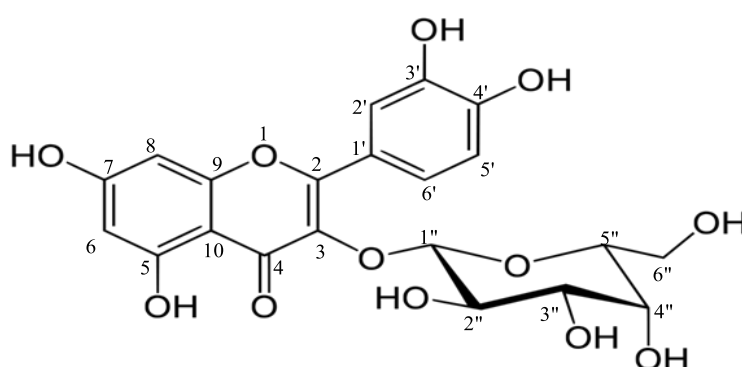


Figure 56: Structure chimique de l'hyperoside
(Agrawal, 1992; Hansen et al., 1999)

L'acide chlorogénique et l'hyperoside ont été déjà isolés et décrits dans la littérature (Agrawal, 1992; Hansen et al., 1999; Tatsis et al., 2007) mais à notre connaissance, c'est la première fois que l'hyperoside a été mis en évidence dans *Parinari macrophylla* Sabine.

Les structures moléculaires des produits majoritaires dans les quatre autres fractions filles n'ont pas pu être déterminées car les quantités extraites n'étaient pas suffisantes en regard de la sensibilité de la RMN.

4.2.2 Potentiel anti-radicalaire des extraits aqueux et éthanolique au niveau biologique (étude *in vitro*)

Dans un but de valider le potentiel anti-radicalaire des extraits de plante, démontré par des approches chimiques, une étude *in vitro* sur un modèle cellulaire d'insulinome de rat RINm5F a été réalisée.

4.2.2.1 Effet des extraits aqueux et éthanolique sur la viabilité cellulaire

Pour la suite des travaux, seuls les extraits les plus actifs en TEAC et ORAC ont été retenus pour les essais biologiques. Pour ces tests biologiques, seuls les extraits obtenus des feuilles ayant présentées une activité anti-radicalaire plus élevée en TEAC et ORAC par rapport aux écorces, ont été testés. Il s'agit des extraits totaux aqueux et éthanolique et de leurs fractions acétate d'éthyle. Pour cela, plusieurs concentrations ont été testées pour évaluer la toxicité des extraits sur les cellules Rinm5F (Figure 57) afin de choisir les doses de traitement qui n'induisent pas de mort cellulaire tout en laissant apparaître les éventuels bienfaits délivrés par les extraits étudiés.

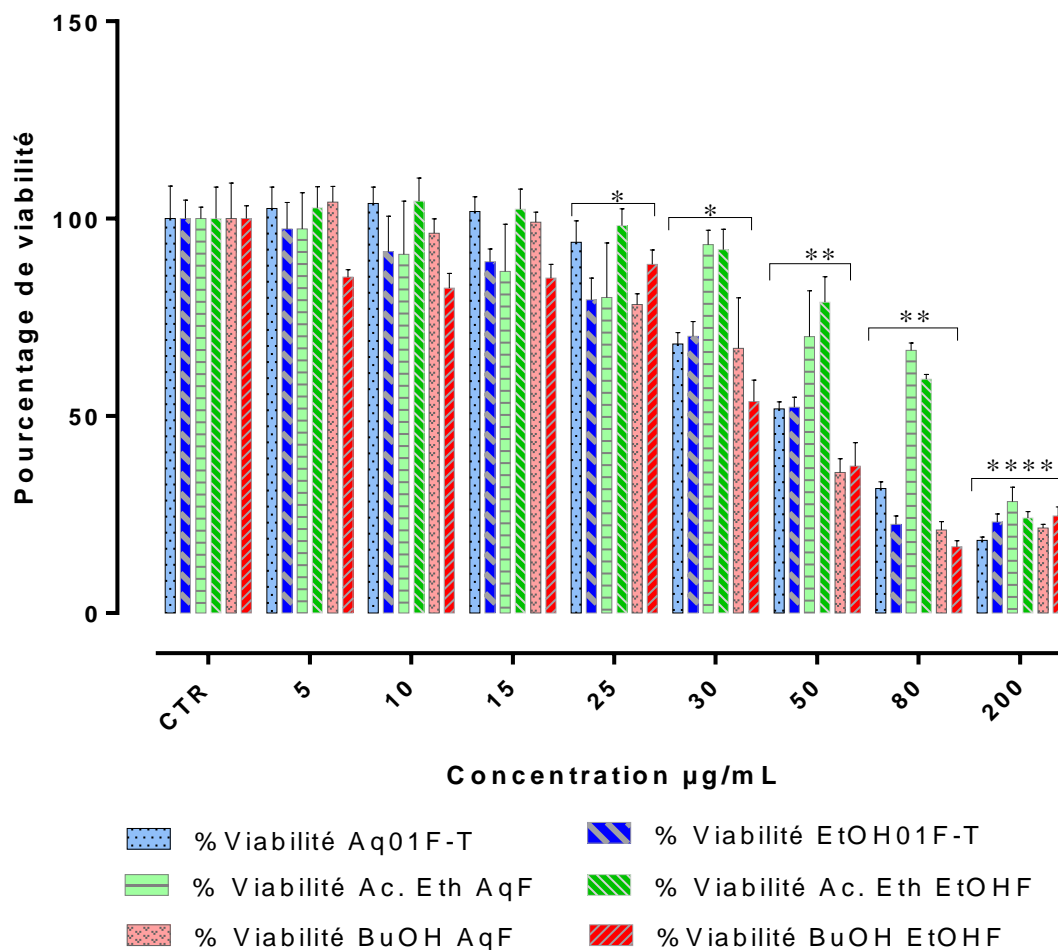


Figure 57: Viabilité cellulaire à 24h sur des cellules Rinn5F

Aq01F-T : extrait aqueux total des feuilles ; **EtOH01F-T** : extrait éthanolique total des feuilles ; **Ac. Eth AqF** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Ac. Eth EtOHF** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **BuOH AqF** : fraction butanolique issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **BuOH EtOHF** : fraction butanolique issue de l'extrait éthanolique total des feuilles.

Les résultats sont présentés en pourcentage (%) de viabilité par rapport au contrôle négatif (cellules traitées dans les mêmes conditions mais uniquement avec le milieu de culture). Les données ont révélés une toxicité significative à partir de 25 µg/mL d'extraits par rapport aux contrôles négatifs (l'extrait butanolique présente une toxicité dès 5 µg/mL). Une comparaison des pourcentages de viabilité a été effectuée à cette dose. L'extrait éthanolique

total a été plus toxique que l'extrait aqueux total avec des pourcentages de viabilité respectifs de $79,4 \pm 5,5$ % et $94,0 \pm 5,5$ %. Les fractions acétate d'éthyle issues de l'extrait éthanolique total et de l'extrait aqueux total ont présenté des viabilités de $98,3 \pm 4,2$ % et $80,0 \pm 13,8$ % respectivement. La fraction butanolique issue de l'extrait éthanolique totale a entraîné une baisse de viabilité plus notable $78,3 \pm 2,7$ %. Ainsi le fractionnement liquide-liquide aurait permis de concentrer dans la phase butanolique les composés toxiques et par conséquent, cette fraction n'a pas été testée pour son effet protecteur d'un stress induit à l'hypoxanthine/xanthine oxydase. A l'issue de cette étape, la dose maximale fixée pour étudier l'effet protecteur des extraits a été $25 \mu\text{g/mL}$. Les études biologiques ont été réalisées à des concentrations de 5, 10, 15 et $25 \mu\text{g/mL}$. Seuls les résultats à $5 \mu\text{g/mL}$ ont été présentés car cette concentration a permis d'obtenir des résultats significatifs sur le stress à l'HX-XO.

4.2.2.2 Effet protecteur des extraits sur un stress induit à l'HX-XO

Les cellules Rnm5F ont été préalablement incubées avec les extraits de plantes à $5 \mu\text{g/mL}$ pendant 24h. Ensuite un stress à l'HX-XO a été induit suivi d'une incubation de 30 min avant de déterminer la viabilité cellulaire à l'aide du réactif de Cell Titer. Les résultats ont été exprimés en pourcentage (%) de viabilité par rapport au contrôle négatif (Figure 58Figure 59) puis les résultats (% de viabilité) ont été comparés par rapports aux cellules n'ayant pas été préalablement incubées en présence d'extraits de plante.

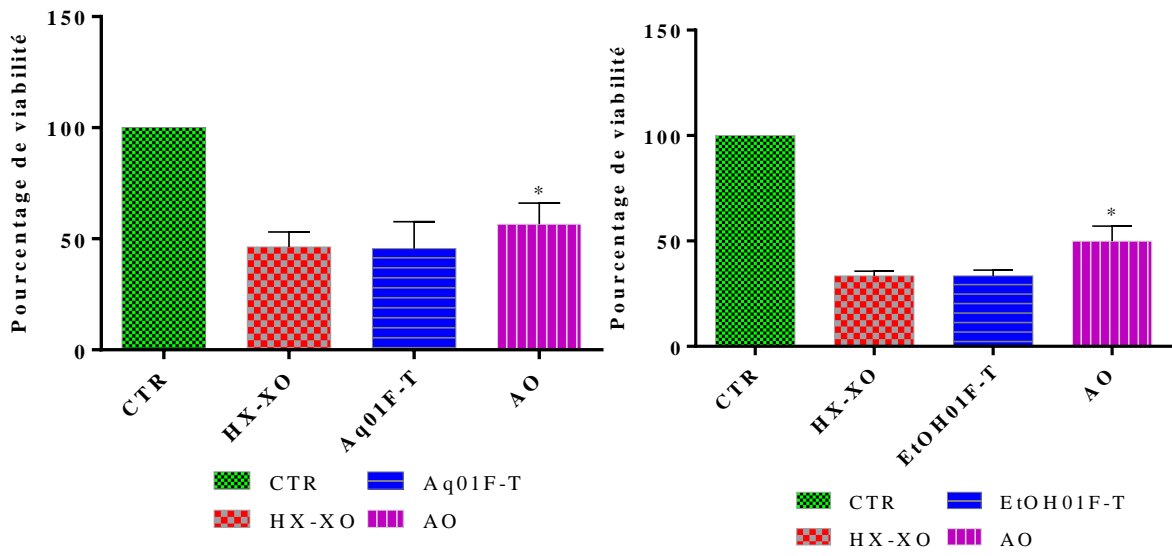


Figure 58: Prévention du stress HX-XO par les extraits totaux aqueux et éthanolique

CTR : control ; **HX-XO** : Hypoxanthine/Xanthine oxydase **Aq01F-T** : extrait aqueux total des feuilles ; **EtOH01F-T** : extrait éthanolique total des feuilles ; **AO** : antioxydant (Epigallocatechine).

Seul l'antioxydant de référence (épigallocatechine) a procuré un effet préventif du stress oxydant statistiquement significatif sur les cellules Rnm5F.

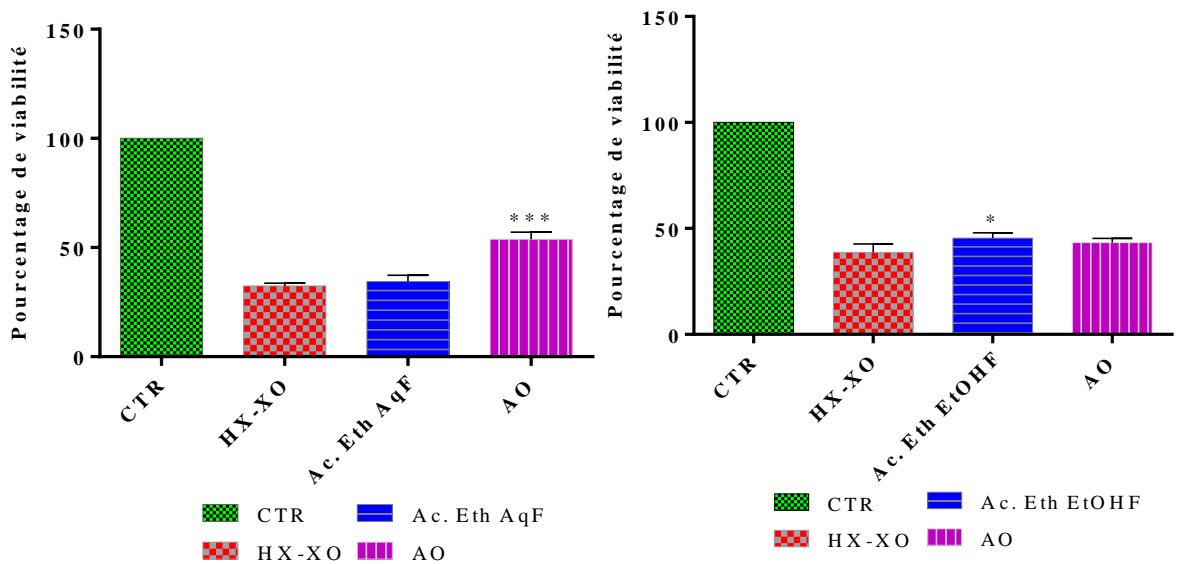


Figure 59: Prévention du stress HX-XO par les fractions acétate d'éthyle

CTR : control ; **HX-XO** : Hypoxanthine/Xanthine oxydase ; **Ac. Eth AqF** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Ac. Eth EtOHF** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **AO** : antioxydant (Epigallocatechine).

La fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux total n'a présenté aucun effet. Par contre, la fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait éthanolique total a procuré un effet préventif du stress oxydant sur les cellules Rinn5F.

4.2.2.3 Effet curatif des extraits sur un stress induit à l'HX-XO

Les cellules Rinn5F ont été stressées avec de l'hypoxanthine/xanthine oxydase pendant 30 min puis incubées avec les extraits de plantes à 5 µg/mL pendant 24 h avant de déterminer la viabilité cellulaire à l'aide du réactif de Cell Titer (Figure 60/figure 61).

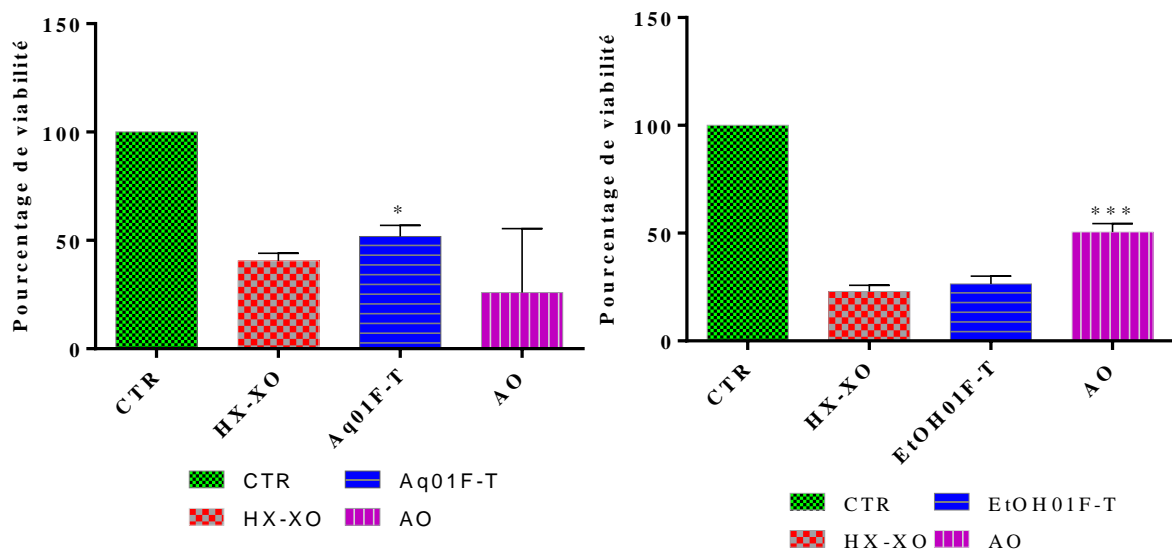


Figure 60: Traitement curatif du stress HX-XO par les extraits totaux aqueux et éthanolique

CTR : control ; HX-XO : Hypoxanthine/Xanthine oxydase Aq01F-T : extrait aqueux total des feuilles ; EtOH01F-T : extrait éthanolique total des feuilles ; AO : antioxydant (Epigallocatechine).

L'extrait aqueux total a conféré un effet protecteur du stress oxydant induit par HX-XO après 24 h de traitement, contrairement à l'extrait éthanolique total.

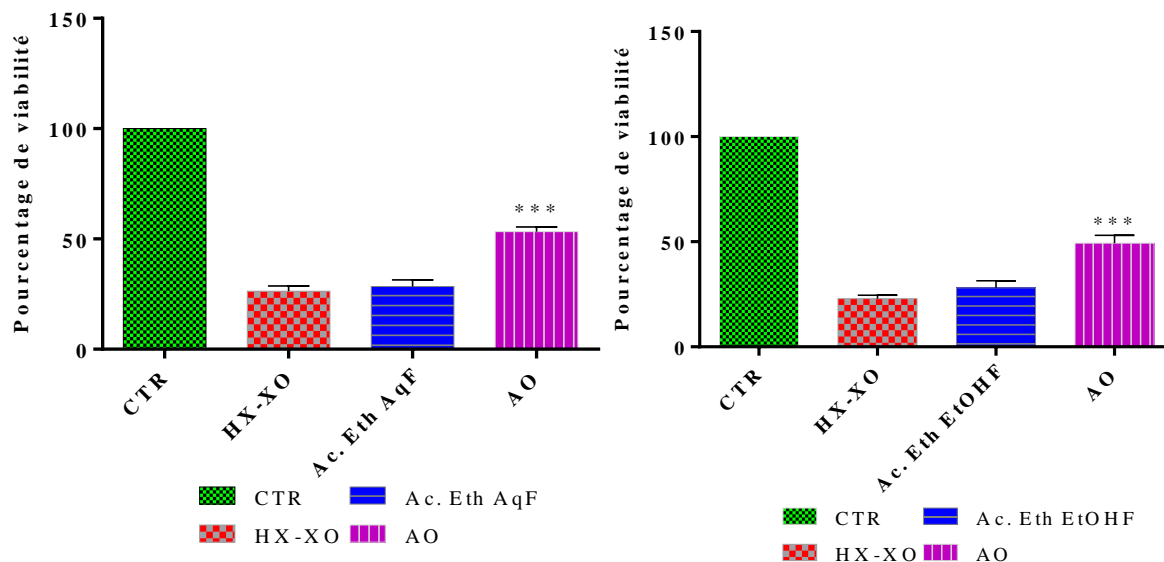


Figure 61: Traitement curatif du stress HX-XO par fractions acétate d'éthyle

CTR : control ; **HX-XO** : Hypoxanthine/Xanthine oxydase ; **Ac. Eth AqF** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux total des feuilles ; **Ac. Eth EtOHF** : fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait éthanolique total des feuilles ; **AO** : antioxydant (Epigallocatechine).

Aucune des fractions acétate d'éthyle des deux extraits n'a montré un effet protecteur du stress HX-XO contrairement à l'antioxydant de référence.

Seul l'extrait aqueux des feuilles a présenté un effet protecteur curatif à 5 µg/mL sur les cellules Rinm5F suite à un stress induit à l'HX-XO. La fraction Acétate d'éthyle obtenue de l'extrait éthanolique a permis de mettre en évidence un effet protecteur, à une concentration de 5 µg/mL, vis-à-vis d'un stress induit à l'HX-XO.

5 Discussion

Les plantes médicinales ont depuis longtemps été utilisées pour prévenir ou traiter plusieurs pathologies telles que le diabète, l'hypertension artérielle, le stress oxydant, le cancer, les maladies inflammatoires ou encore parasitaires (VALNET, 2010).

Dans le cas du diabète et en cas d'hyperglycémie, il y a activation de plusieurs voies (voies des polyols, chaîne respiratoire, NAD(P)H oxydases, xanthine oxydase, NO synthase) aboutissant à la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'apparition d'un stress oxydant. Cette teneur élevée des ERO peut avoir des conséquences à plusieurs niveaux principalement le pancréas, le foie, les reins et les muscles. Les effets sont une insulino-résistance et une perturbation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, une destruction des cellules β -pancréatiques et une hyper-filtration glomérulaire, l'une des caractéristiques de la néphropathie diabétique (Baynes et al., 1999; Ceriello et al., 2000).

Les travaux ont tout d'abord porté sur l'évaluation de l'activité anti-radicalaire totale et au niveau moléculaire des extraits de plantes par plusieurs méthodes : TEAC, ORAC et HPLC – ABTS^{•+} online afin de déterminer les extraits ou fractions actives et de mettre en œuvre des méthodes d'identification structurale des composés d'intérêt. Les résultats montrent une activité anti-radicalaire plus importante pour les extraits aqueux et éthanolique des feuilles par rapport à l'extrait aqueux des écorces. L'extrait aqueux des feuilles a présenté : 7459 ; 5961 et 9211 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec en TEAC, ORAC et HPLC – ABTS^{•+} online respectivement. L'extrait éthanolique des feuilles a présenté : 6599 ; 5593 et 9206 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec en TEAC, ORAC et HPLC – ABTS^{•+} online respectivement. L'extrait aqueux des écorces a présenté : 7832 ; 5477 et 3159 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait sec en TEAC, ORAC et HPLC – ABTS^{•+} online respectivement. Concernant les fractions obtenues par la séparation liquide – liquide, la fraction acétate d'éthyle avait une activité anti-radicalaire plus importante par rapports aux fractions butanolique et dichlorométhanique. Les valeurs TEAC et ORAC obtenues avec les extraits aqueux et éthanolique des feuilles sont inférieures à celle obtenues par la méthode HPLC – ABTS^{•+} online qui prend en compte l'activité anti-radicalaire individuelle de chaque pic du chromatogramme. Cela pourrait s'expliquer par des effets synergiques ou antagonistes entre composés, qui ont été rapportés pour certains polyphénols (Hidalgo et al., 2010; Peyrat-Maillard et al., 2003). C'est le cas des effets synergiques observés entre l'acide rosmarinique et la quercétine ou encore l'héspéridine et l'acide chlorogénique. Des effets antagonistes ont également été observés entre la (+)-catéchine et l'acide caféique ou encore entre l'acide caféique et la quercétine (Peyrat-Maillard et al., 2003). D'autres composés phénoliques peuvent tout

simplement avoir des effets additifs comme la myricétine et la quercétine (Freeman et al., 2010). La similarité structurale des molécules peut rendre inefficace l'interaction et le don d'électrons les uns avec les autres, ce qui donnerait un effet additif.

En outre, la différence de composition des milieux réactionnels entre les méthodes TEAC, ORAC, HPLC – ABTS^{•+} online et de cinétique de réaction, pourrait influencer l'activité anti-radicalaire. En effet, la méthode HPLC – ABTS^{•+} online implique un mélange entre la phase mobile (eau, acétonitrile, acide formique) et le radical cationique ABTS^{•+} tamponné, alors que les méthodes en microplaques se déroulent dans le tampon seul. Les méthodes en microplaques qui durent de 10 min (TEAC) à 2 h (ORAC), permettent de rendre compte de réactions lentes voire très lentes qui ne sont pas observées avec la méthode HPLC – ABTS^{•+} online (0,8 min). En toute logique la cinétique des activités mesurées en plaques devraient être supérieures à celles qui sont observées en HPLC – ABTS^{•+} online, qui ne prend en compte que les molécules actives présentant une cinétique de réaction rapide. C'est en effet le cas pour l'extrait aqueux des écorces. Par contre, il se trouve que nos résultats montrent le contraire pour les extraits aqueux et éthanolique des feuilles, ce qui tente à prouver qu'il existe dans ce milieu réactionnel des phénomènes d'antagonismes forts.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire au niveau moléculaire par HPLC – ABTS^{•+} online a permis de mettre en évidence les principaux composés responsables de l'activité. Certains de ces composés sont communs aux trois extraits. D'autres qui contribuent également à cette activité sont spécifiques à chaque extrait.

Pour l'identification des composés d'intérêt, nous sommes partis de méthodes générales pour aller vers des méthodes à haute résolution. Des tests de caractérisation phytochimique reposant sur des réactions de précipitation et la CCM ont permis de mettre en évidence essentiellement des composés phénoliques, notamment des flavonoïdes, tanins et anthraquinones. D'autres types de composés ont également été révélés par la CCM tels que des saponines, des alcaloïdes, des stérols, des sucres réducteurs, des hétérosides cardiotoniques et des tri-terpènes.

Les familles chimiques présentes dans les extraits ayant été identifiées, la chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (UHPLC-QTOF-MS) a permis de déterminer les masses moléculaires monoisotopiques des composés présents dans les extraits. Les données obtenues ont servi à la génération de réseaux

moléculaires via la plateforme GNPS et basés sur la similarité spectrale des composés. Les données ont également été traitées via la plateforme XCMS avant de rechercher les rapports m/z les plus probables sur la base de données de Metlin. Cette recherche a été affinée à l'aide de la base de données de la société TWISTAROMA (Illkirch, France). L'identification fine des composés a été réalisée par RMN.

Les réseaux moléculaires générés à partir des données MS/MS du mélange de polyphénols et des extraits ont permis d'identifier la procyanidine B2. En effet, les pics correspondants (TR : 18,4 min ; m/z : 577 ; formule brute $[M-H]^- C_{30}H_{25}O_{12}$) sont retrouvés aussi bien dans le mélange de polyphénols que dans les trois extraits. En outre, le composé correspondant à ce pic se fragmente exactement de la même manière, ce qui permet de conclure qu'il s'agit bien de la procyanidine B2. Cette approche par réseau moléculaire a également permis de montrer la présence d'autres composés de la famille des procyanidines sous forme dimères, trimères et tétramères formées d'unités de catéchine ou d'épicatéchine par des liaisons interflavanes C4-C8.

D'autres composés constitués par des acides phénoliques et principalement des flavonoïdes ont pu être identifiés grâce à l'utilisation de la plateforme CXMS online et des bases de données de Metlin et de TWISTAROMA. Il s'agit de :

- catéchine ou épicatéchine ;
- 6-*O*-caffeoyl- α -glucose ou isomère ;
- quercétine-3-*O*-glucoside ou hyperoside ou quercétine-3-*O*-glucosylgalactoside ou myricétine-3-*O*-rhamnoside ou isoquercétine ;
- acide protocatéchique-4-glucoside ou isomère ;
- méthyle-3-*O*-caffeoyl-quinique ou isomère ;
- quercétine ou isomère ;
- kaempférol-3-*O*-glucoside ou isomère ;
- l'acide caféique hexoside.

Des analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisées pour déterminer quel isomère ou molécule apparentée était présente. Ainsi, par cette méthode, deux molécules ont pu être identifiées dans les feuilles de *Parinari macrophylla* Sabine: l'acide chlorogénique et l'hyperoside.

La présence de ce cocktail de molécules actives dans les extraits de *Parinari macrophylla* Sabine semble expliquer sa large utilisation dans la prise en charge de plusieurs pathologies au Sénégal comme le diabète.

D'après la littérature, les catéchines et leurs dérivées, en plus de leur activité antioxydante, sont de forts inhibiteurs des enzymes digestives (Indrianingsih et al, 2016; Kumar et al., 2011). Ils agissent à plusieurs niveaux tels que l'estomac le pancréas et l'intestin où ils inhibent la maltase intestinale (Bhandari et al., 2008; He et al., 2007) impliquée dans le métabolisme du maltose par exemple. Ces enzymes digestives comme l' α -amylase et l' α -glucosidase sont impliquées dans la métabolisation des hydrates de carbone tel que l'amidon, et participe à l'augmentation de la glycémie post-prandiale. Une des approches thérapeutiques pour le traitement du diabète de type 2 serait alors de retarder l'absorption du glucose par inhibition de ces enzymes (Lebovitz, 1997; Schmidt et al., 1977). Il a également été rapporté que les composés phénoliques comme la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, l'épigallocatechine gallate, les gallates de catéchine et trimères et tétramères de catéchine se sont révélés être inhibiteurs de l' α -glucosidase et de l'amylase pancréatique, ce qui permettrait également de moduler l'hyperglycémie post-prandiale chez les diabétiques (Ani et al., 2008; Shobana et al., 2009). Le potentiel d'inhibition est fonction du nombre de groupements hydroxyles des composés phénoliques (Tadera et al., 2006). Des études ont même rapporté que la quercétine, le kaempférol et la lutéoline agissaient comme des inhibiteurs de l' α -amylase humaine, ce qui fait de ces molécules des candidats prometteurs pour contrôler la digestion de l'amidon (Lo Piparo et al., 2008).

Dans notre étude, les procyanidines mises en évidence pour la première fois dans *Parinari macrophylla* Sabine et dont l'effet inhibiteur a été prouvé sur l' α -amylase, pourraient également contribuer de manière considérable à baisser l'hyperglycémie post-prandiale (Grussu et al., 2011). En outre, il a été décrit que les formes dimères, trimères et tétramères des procyanidines comme la cinnamtannine A2 augmentaient spécifiquement les niveaux de sécrétion de glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (intestin) et d'insuline (pancréas) qui s'opposent à l'installation d'une hyperglycémie (Yamashita et al., 2013). D'autres études ont également montré que les procyanidines étaient beaucoup plus actives sur les amylases salivaire et pancréatique que sur l' α -glucosidase intestinale (McDougall et al., 2005). Il a été démontré *in vivo* que les procyanidines réduisaient les triglycérides plasmatiques en inhibant l'absorption des lipides alimentaires, ce qui constituerait un avantage pour les diabétiques obèses afin de

réduire leur masse corporelle et éviter des risques de développer des maladies cardiovasculaires associées (Buchholz et al., 2016; Quesada et al., 2009).

D'une manière générale, les polyphénols du fait de leur structure chimique possédant des doubles liaisons conjuguées et des fonctions hydroxyles, sont capables de piéger certaines espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition (Fe^{2+} et Cu^{2+}), catalyseurs d'oxydation. Il a donc été suggéré qu'ils diminuent le stress oxydant, susceptible de créer des dommages moléculaires et cellulaires et d'induire diverses pathologies (cancers, diabète de type 2, maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives). Ils sont aussi capables de diminuer d'autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires impliqués dans le syndrome métabolique (hyperglycémie, hyperlipidémie, insulino-résistance et hypertension artérielle) (Matsuzawa, 2006).

D'autres composés phénoliques comme l'acide chlorogénique, également mis en évidence dans notre étude, peuvent agir sur les organes périphériques comme les muscles (augmentation de la consommation de glucose) mais aussi au niveau du foie (néoglucogénèse, glycogénogénèse) et de l'intestin (inhibition des amylases), contribuant à la régulation de la glycémie (Ong et al., 2013, 2012). L'acide chlorogénique a également été isolé de la graine de *Neocarya macrophylla* Kernel (Diaby et al., 2016b). Ses effets antidiabétiques ont été prouvés dans l'étude de Ong et al. (Ong et al., 2013). Son effet antioxydant a été également élucidé dans notre étude par HPLC – ABTS⁺ online, ce qui constitue également un avantage dans la prévention du stress oxydant et ses complications chez les diabétiques. Des études réalisées sur des souris ont rapporté que l'acide chlorogénique stimule intensément l'absorption du glucose dans les muscles squelettiques, inhibe la synthèse des acides gras dans les hépatocytes et diminue le taux d'acides gras libres circulants, ce qui conduit à une diminution des taux de triglycérides et de cholestérol. En effet, dans l'obésité et le diabète de type 2, les flux d'acides gras libres sont chroniquement augmentés pouvant entraîner plusieurs complications telles que la stéatose hépatique, l'insulino-résistance, la diminution du glucose musculaire squelettique et l'augmentation de la production hépatique de glucose (Kovacs et al., 2005; Roden et al., 1999). Il a également été décrit que l'acide chlorogénique pouvait augmenter la production de l'hormone incréline glucagon-like peptide-1 (GLP-1), probablement en raison d'un effet inhibiteur sur l'absorption du glucose. En effet, le GLP-1 agit sur les cellules bêta, via des mécanismes dépendants de l' adénosine monophosphate cyclique (AMPc), pour favoriser la synthèse et l'activité du facteur de transcription Islet duodenum homeobox-1 (IDX-1), crucial

pour maintenir la réactivité des cellules bêta suite à une augmentation du glucose plasmatique. L'IDX-1 serait également impliqué dans la régulation des gènes des hormones d'îlots et dans la différenciation cellulaire du pancréas endocrinien et du duodénum.

Chez les sujets diabétiques de type 2, combinant des taux élevés de glucose et d'acides gras, il y a un dysfonctionnement des cellules β , appelé glucolipotoxicité. Cette dernière entraîne donc une diminution de la sécrétion d'insuline, une altération de l'expression des gènes de l'insuline et la mort des cellules β par apoptose (McCarty, 2005; Poitout et al., 2010; Poitout et al., 2008). L'acide chlorogénique pourrait donc compenser l'impact négatif de la surexposition chronique aux acides gras libres et sur la fonction des cellules β chez les sujets insulino-résistants en surpoids. L'impact putatif de l'acide chlorogénique sur l'absorption du glucose peut refléter la capacité de ce composé à inhiber la glucose-6-phosphate translocase 1, connue pour jouer un rôle dans le transport du glucose intestinal (McCarty, 2005).

Un autre composé identifié lors de notre étude a été l'hyperoside. D'après nos connaissances, elle n'avait pas encore été mise en évidence dans *Parinari macrophylla* Sabine, mais elle a été déjà isolée du genre *Parinari* (Coradin et al., 1985b). Dans la littérature, il a été décrit que l'hyperoside possédait plusieurs activités : anti-inflammatoires, cardio-protectrices, antidiabétiques, anticancéreuses, hépatoprotecteurs, antioxydantes etc. (Piao et al., 2008; Raza et al., 2017). L'activité antidiabétique de l'hyperoside est due à l'inhibition de l' α -glucosidase conduisant à la diminution de l'absorption du glucose et à la baisse de l'hyperglycémie post-prandiale (Islam et al., 2013). Chez les diabétiques non contrôlés, il y a souvent des risques de développer une néphropathie diabétique, l'une des complications du diabète de type 2 (Zhang et al., 2016). Une étude réalisée sur des souris avait montré que l'hyperoside améliorait efficacement la fonction et les caractéristiques physiologiques rénales mais aussi la glomérulosclérose (Tripathi et al., 2013). Il a été suggéré que le processus inflammatoire vasculaire induit par un taux élevé de glucose dans les cellules endothéliales humaines et des souris, joue un rôle clé dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose, une complication majeure du diabète sucré. En effet, il a été rapporté que l'hyperglycémie induisait une perméabilité vasculaire nettement accrue et la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces effets ont été atténués d'une manière remarquable par un prétraitement avec l'hyperoside. Cela suppose qu'un prétraitement avec l'hyperoside pourrait être un avantage dans la prévention de diverses complications diabétiques et de l'athérosclérose (Ku et al., 2014). De même, des effets cytoprotecteurs de l'hyperoside contre les dommages cellulaires induits

par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été élucidé. En effet, des méthodes utilisant la spectrométrie de fluorescence ou encore la cytométrie en flux ont permis de mettre en évidence l'activité anti-radicalaire de l'hyperoside vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaires. Des expériences ont également permis de montrer la capacité de l'hyperoside à piéger les radicaux hydroxyles générés par la réaction de Fenton ($FeSO_4 + H_2O_2$) dans un système sans cellule, détecté par spectrométrie de résonance de spin électronique (RSE). Une étude réalisée sur des hamsters chinois, clone V79-4, avait montré que l'hyperoside inhibait l'apoptose induite par H_2O_2 dans les fibroblastes pulmonaires. L'hyperoside empêchait également la peroxydation des lipides induite par H_2O_2 ainsi que la protéine carbonyle. De plus, l'hyperoside a augmenté les activités de catalase et de glutathion peroxydase. En résumé, l'hyperoside posséderait des propriétés cytoprotectrices contre le stress oxydatif en piégeant les ERO intracellulaires et en augmentant l'activité enzymatique antioxydante (Piao et al., 2008).

6 Conclusion et perspectives

Le diabète est une affection chronique plurifactorielle en progression dans le monde. Pour contrôler l'hyperglycémie, en parallèle des antidiabétiques oraux, de nombreux remèdes traditionnels ont été proposés, parmi lesquels les plantes médicinales occupent une place importante (Bruneton, 2009; Errajaji et al., 2010).

Le traitement actuel du diabète de type 2 est efficace dans la baisse de la glycémie, cependant le contrôle adéquat quotidien de la glycémie est très difficile à atteindre dans la plupart des cas, ce qui conduit à long terme à l'émergence de complications telles que la rétinopathie, la néphropathie, l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, les amputations de membres etc (Raccach, 2004).

En Afrique et au Sénégal en particulier, les plantes médicinales constituent une véritable alternative des traitements de diverses pathologies chroniques. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 80 % de la population des pays en développement, en raison du manque de moyens et des difficultés d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire. Malgré les remarquables progrès de la chimie de synthèse du XXI^{ème} siècle, plus de 38 % des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes (Moretti et al., 2007; Newman et al., 2000; Whiting et al., 2011). En outre, ces médicaments antidiabétiques oraux présentent un coût élevé et sont difficile d'accès pour la population rurale, en particulier dans les pays en développement. Les médicaments à base de plantes médicinales, traditionnellement utilisées pour traiter le diabète, constituent une alternative précieuse pour la prise en charge du diabète de type 2.

Le stress oxydant est lié à de nombreuses pathologies, par exemple l'athérosclérose, les cancers, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et rhumatismales (Berlett et al., 1997; Grimaldi et al., 2008; Uttara et al., 2009). Dans le diabète de type 2, il résulte de la génération de radicaux libres par les réactions d'auto-oxydation des sucres et des adduits de sucre aux protéines et par l'auto-oxydation des lipides insaturés dans les protéines plasmatiques et membranaires. Les radicaux libres, comme les espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont produits physiologiquement en continu par les microorganismes aérobies notamment lors de la chaîne respiratoire et de la phagocytose. Elles peuvent aussi être le résultat de facteurs environnementaux comme les rayonnements UV, la pollution, le tabac, l'alcool ainsi que certains médicaments et produits phytopharmaceutiques. Cependant, cette production des ERO est contrôlée par des enzymes à activité antioxydante qui sont naturellement présentes dans

notre corps : la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. L'équilibre entre les ERO et ces antioxydants est fragile et un déséquilibre peut emmener à un stress oxydant. Ainsi, en cas d'hyperglycémie, il y a activation de plusieurs voies (voies des polyols, chaîne respiratoire, NAD(P)H oxydases, xanthine oxydase, NO synthase) aboutissant à la surproduction des ERO et à l'apparition d'un stress oxydant (Rolo et al., 2006). Les radicaux libres sont en général très instables et vont donc réagir rapidement avec les molécules biologiques qui se trouvent à leur proximité. Par conséquent, ils sont capables d'interagir avec les lipides, l'ADN, les protéines ainsi que sur le système immunitaire par l'intermédiaire des cellules phagocytaires ou des médiateurs de l'inflammation comme les cytokines pro-inflammatoires. Cette présence concomitante entre hyperglycémie et stress oxydant fait que la recherche d'antioxydants naturels s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de trouver des extraits et/ou composés antioxydants pouvant être utilisés dans la prise en charge du diabète de type 2 et de prévenir ses complications. En effet, les antioxydants sont principalement apportés par les végétaux et on y retrouve notamment les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes), les vitamines (vitamines E, C et A) ainsi que les oligoéléments (cuivre, zinc, manganèse et sélénium).

Le but de ce travail était de contribuer à la valorisation de la biodiversité sénégalaise et plus particulièrement d'approfondir les connaissances phytochimiques de *Parinari macrophylla* Sabine et de montrer en quoi ses constituants chimiques pourraient apporter dans la prise en charge du stress oxydant souvent associé au diabète de type 2 et de ses complications. Pour cela, plusieurs méthodes d'évaluation de l'activité anti-radicalaire ont été utilisées.

L'activité anti-radicalaire totale et moléculaire des feuilles et écorces de *Parinari macrophylla* Sabine a été mise en évidence par les méthodes TEAC, ORAC et HPLC - ABTS⁺ online. Cette activité pourrait essentiellement être portée par les composés phénoliques. En effet, les tests phytochimiques ont permis de montrer de manière qualitative la présence de plusieurs groupes chimiques tels que des flavonoïdes, des tanins, des anthraquinones essentiellement. De plus des saponosides, des hétérosides cardiotoniques, des tri-terpènes et des alcaloïdes ont été retrouvés dans cette plante.

Pour l'identification des composés actifs, l'approche de réseau moléculaire, a été utilisée pour la première fois au laboratoire et elle a permis de mettre en évidence les familles chimiques présentes dans les extraits de feuilles et d'écorces de *Parinari macrophylla* Sabine. Dans les groupes de réseaux explorés, les composés majoritairement présents sont de la famille des

procyanidines. Grâce aux réseaux, il a également été possible d'identifier les formes les plus actives (forme dimère) des procyanidines dans les trois extraits et qui seraient principalement responsables de l'activité anti-radicalaire.

D'après les résultats de cette étude, *Parinari macrophylla* Sabine pourrait être une alternative de prise en charge du diabète de type 2 grâce à l'hyperoside, l'acide chlorogénique, la procyanidine B2 et les autres composés phénoliques supposés présents dans les extraits de cette plante. En effet, ces composés sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires. Cela suggère qu'ils pourraient exercer un effet protecteur contre les maladies chroniques induites par l'hyperglycémie y compris le diabète de type 2 et l'obésité grâce à leurs effets antioxydant et inhibiteurs sur les enzymes digestives responsables du métabolisme du glucose. La présence de ces composés dans les feuilles de *Parinari macrophylla* Sabine, permet une disponibilité et une prise en charge régulière du diabète de type 2 et de ses complications au Sénégal. L'utilisation de cette plante par les tradithérapeutes Sénégalais semble à ce titre tout à fait justifiée.

Cependant l'étude *in vitro* réalisée sur un modèle cellulaire RINm5F a montré une faible activité anti-radicalaire des extraits de plante et même du contrôle positif utilisé suite à un traitement d'un stress induit à l'hypoxanthine/xanthine oxydase. Ces données ont permis de montrer que ce phytomédicament traditionnel, ne trouve pas son efficacité dans la prévention du stress induit à l'HX-XO sur les cellules Rinm5F et cela dans la gamme de concentration étudiée (5 – 25 µg/mL). Par contre il existe de nombreux autres dysfonctionnements métaboliques par exemple au niveau de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), des systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), de la libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) et de l'oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines) (Beaudeau et al., 2006; Pincemail et al., 2002). Il existe donc plusieurs mécanismes de lutte contre le stress oxydant en fonction du système de génération de radicaux (ERO, ERN) mis en jeu. Il conviendrait de tester les extraits sur d'autres modèles cellulaires de stress et sur des animaux de laboratoire pour déterminer leurs voies d'action dans la prise en charge du diabète.

Références bibliographiques

- Agrawal, P.K., 1992. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry* 31, 3307–3330. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83678-R](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83678-R)
- Allard, P.-M., Genta-Jouve, G., Wolfender, J.-L., 2017. Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. *Current Opinion in Chemical Biology, Omics* 36, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.022>
- Allard, P.-M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V.C., Roussi, F., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., 2016. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Anal. Chem.* 88, 3317–3323. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04804>
- Ani, V., Naidu, K.A., 2008. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cumin *Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. *Eur Food Res Technol* 226, 897–903. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0612-1>
- Asgar, M.A., 2013. Anti-Diabetic Potential of Phenolic Compounds: A Review. *International Journal of Food Properties* 16, 91–103. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.595864>
- AUBERVAL, N., DAL, S., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peluso, J., Muller, C.D., Zhao, M., Marchioni, E., Pinget, M., Jeandidier, N., Maillard, E., Schini-Kerth, V.B., Sigrist, S., 2015. Oxidative stress type influences the properties of antioxidants containing polyphenols in RINm5F beta cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 859048.
- Barbosa, W.L.R., Peres, A., Gallori, S., Vincieri, F.F., 2006. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 333–337. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300009>
- Barquissau, V., Morio, B., 2011. Physiopathologie de l'insulinorésistance dans le muscle squelettique et implication des fonctions mitochondriales. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 25, 114–130. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2011.07.003>

- Barros, A.I.R.N.A., Nunes, F.M., Gonçalves, B., Bennett, R.N., Silva, A.P., 2011. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* 128, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.013>
- Baynes, J.W., Thorpe, S.R., 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48, 1–9. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.1.1>
- Beauchamp, P.S., Bottini, A.T., Caselles, M.C., Dev, V., Hope, H., Larter, M., Lee, G., Mathela, C.S., Melkani, A.B., Millar, P.D., Miyatake, M., Pant, A.K., Raffel, R.J., Sharma, V.K., Wyatt, D., 1996. Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga parviflora*. *Phytochemistry* 43, 827–834. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00207-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00207-5)
- Beaudeux, J.-L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., Peynet, J., 2006. Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 21, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2006.02.001>
- Belhadj, S., Hentati, O., Hamdaoui, G., Fakhreddine, K., Maillard, E., Dal, S., Sigrist, S., 2018. Beneficial Effect of Jojoba Seed Extracts on Hyperglycemia-Induced Oxidative Stress in RINm5f Beta Cells. *Nutrients* 10, 384. <https://doi.org/10.3390/nu10030384>
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>
- Bhandari, M.R., Jong-Anurakkun, N., Hong, G., Kawabata, J., 2008. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry* 106, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.077>
- Bhaskar, V., Ajay, S., 2009. Antihyperglycemic and antihyperlipidaemic activities of root extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br on streptozotocin induced diabetic rats. *Jordan Journal of Biological Sciences* 2, 177–180.
- Bilia, A.R., Ciampi, L., Mendez, J., Morelli, I., 1996a. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 71, 199–204. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(96\)00009-X](https://doi.org/10.1016/0031-6865(96)00009-X)

- Bilia, A.R., Mendez, J., Morelli, I., 1996b. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 71, 191–197. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(96\)00010-6](https://doi.org/10.1016/0031-6865(96)00010-6)
- Boland, D.J., Brooker, M.I.H., McDonald, M.W., Chippendale, G.M., 2006. *Forest Trees of Australia*. Csiro Publishing.
- Bonnefont-Rousselot, D., 2004. The Role of Antioxidant Micronutrients in the Prevention of Diabetic Complications. *Mol Diag Ther* 3, 41–52. <https://doi.org/10.2165/00024677-200403010-00005>
- Boudreau, P.D., Monroe, E.A., Mehrotra, S., Desfor, S., Korobeynikov, A., Sherman, D.H., Murray, T.F., Gerwick, L., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H., 2015. Expanding the Described Metabolome of the Marine Cyanobacterium *Moorea producens* JHB through Orthogonal Natural Products Workflows. *PLOS ONE* 10, e0133297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133297>
- Braca, A., Abdel-Razik, A.F., Mendez, J., Morelli, I., 2005. A new kaurane diterpene dimer from *Parinari campestris*. *Fitoterapia* 76, 614–619. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.05.005>
- Braca, A., De Tommasi, N., Mendez, J., Morelli, I., Pizza, C., 1999. Three flavonoids from *Licania heteromorpha*. *Phytochemistry* 51, 1121–1124. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00763-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00763-8)
- Braca, A., Morelli, I., Mendez, J., Battinelli, L., Braghiroli, L., Mazzanti, G., 2000. Antimicrobial Triterpenoids from *Licania heteromorpha*. *Planta Med* 66, 768–769. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9601>
- Braca, A., Politi, M., Sanogo, R., Sanou, H., Morelli, I., Pizza, C., De Tommasi, N., 2003. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Wild and Cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6689–6695. <https://doi.org/10.1021/jf030374m>
- Braca, A., Sortino, C., Mendez, J., Morelli, I., 2001. Triterpenes from *Licania licaniaeflora*. *Fitoterapia* 72, 585–587. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00321-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00321-X)

- Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., Mendez, J., 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 379–381. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00413-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00413-5)
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev* 56, 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Brito, A., Ramirez, J.E., Areche, C., Sepúlveda, B., Simirgiotis, M.J., 2014. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. *Molecules* 19, 17400–17421. <https://doi.org/10.3390/molecules191117400>
- Brownlee, M., 2005. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes* 54, 1615–1625. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
- Bruneton, B., 2009. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e ed.), 4th ed. Lavoisier.
- Bubols, G.B., Vianna, D. da R., Medina-Reimon, A., von Poser, G., Lamuela-Raventos, R.M., Eifler-Lima, V.L., Garcia, S.C., 2013. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Rev Med Chem* 13, 318–334.
- Buchholz, T., Melzig, M.F., 2016. Medicinal Plants Traditionally Used for Treatment of Obesity and Diabetes Mellitus – Screening for Pancreatic Lipase and α -Amylase Inhibition. *Phytotherapy Research* 30, 260–266. <https://doi.org/10.1002/ptr.5525>
- Burton, G.W., Traber, M.G., 1990. Vitamin E: Antioxidant Activity, Biokinetics, and Bioavailability. *Annual Review of Nutrition* 10, 357–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.10.070190.002041>
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14, 303–311. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R)

- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Carvalho, M.G. de, Costa, P.M. da, 2009. Other constituents isolated from *Licania arianeae* (Chrysobalanaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 290–293. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200018>
- Carvalho, M.G.D., Cândido, L.F.D.O., Costa, P.M.D., Rumjanek, V.M., 2005. Chromones from *Licania arianeae* (Chrysobalanaceae). *Natural Product Research* 19, 7–12. <https://doi.org/10.1080/14786410410001730265>
- Casettari, L., Gennari, L., Angelino, D., Ninfali, P., Castagnino, E., 2012. ORAC of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids* 28, 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.005>
- Castilho, R.O., de Oliveira, R.R., Kaplan, M.A.C., 2005. Licanolide, a new triterpene lactone from *Licania tomentosa*. *Fitoterapia* 76, 562–566. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.04.018>
- Castilho, R.O., Kaplan, M. a. C., 2011a. Phytochemical study and antimicrobial activity of *Chrysobalanus icaco*. *Chem Nat Compd* 47, 436. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9953-x>
- Castilho, R.O., Kaplan, M. a. C., 2011b. Phytochemical study and antimicrobial activity of *Chrysobalanus icaco*. *Chem Nat Compd* 47, 436. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9953-x>
- Castilho, R.O., Kaplan, M.A.C., 2008. Chemical constituents of *Licania tomentosa* Benth. (Chrysobalanaceae). *Química Nova* 31, 66–69. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000100014>
- Ceriello, A., Morocutti, A., Mercuri, F., Quagliari, L., Moro, M., Damante, G., Viberti, G.C., 2000. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 49, 2170–2177. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.12.2170>

- Chaudhuri, S., Badisa, R.B., Pilarinou, E., Walker, E., 2002. Licamichauxiioic-A and -B Acids - Two Ent-Kaurene Diterpenoids from *Licania Michauxii*. *Natural Product Letters* 16, 39–45. <https://doi.org/10.1080/1057563029001/4836>
- Chen, H.-J., Inbaraj, B.S., Chen, B.-H., 2011. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 260–285. <https://doi.org/10.3390/ijms13010260>
- Cherrak, S.A., Mokhtari-Soulimane, N., Berroukeche, F., Bensenane, B., Cherbonnel, A., Merzouk, H., Elhabiri, M., 2016. In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165575>
- Coradin, L., Giannasi, D.E., Prance, G.T., 1985a. Chemosystematic studies in the chrysobalanaceae. I. Flavonoids in *Parinari*. *Brittonia* 37, 169–178. <https://doi.org/10.2307/2806097>
- Coradin, L., Giannasi, D.E., Prance, G.T., 1985b. Chemosystematic Studies in the Chrysobalanaceae. I. Flavonoids in *Parinari*. *Brittonia* 37, 169–178. <https://doi.org/10.2307/2806097>
- Courbat, P., 1972. Quelques généralités sur les composés flavonoïdes. *JVR* 9, 135–161. <https://doi.org/10.1159/000157928>
- Da Silva Porto, P.A.L., Laranjinha, J.A.N., de Freitas, V.A.P., 2003. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 66, 947–954. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00458-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00458-1)
- Diaby, M., Amza, T., Gbago, O., Zou, X., Wang, X., Jin, Q.-Z., 2016a. Chemical composition, antinutritional evaluation and phenolic compounds in gingerread plum (*Neocarya Macrophylla*) kernel. *European Academic Research* 4, 4602–4626.
- Diaby, M., Amza, T., Gbago, O., Zou, X., Wang, X., Jin, Q.-Z., 2016b. Chemical composition, antinutritional evaluation and phenolic compounds in gingerread plum (*Neocarya Macrophylla*) kernel. *European Academic Research* 4, 4602–4626.

- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Duncan, K.R., Crüsemann, M., Lechner, A., Sarkar, A., Li, J., Ziemert, N., Wang, M., Bandeira, N., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Jensen, P.R., 2015. Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from *Salinispora* Species. *Chemistry & Biology* 22, 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.03.010>
- Errajraji, A., Ouhdouch, F., El-Anssari, N., 2010. Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète de type 2 au Maroc: Use of medicinal plants for type 2 diabetes treatment, in Morocco. *Médecine des Maladies Métaboliques* 4, 301–304. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(10\)70064-X](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(10)70064-X)
- Estrada, A.C., Syrovets, T., Pitterle, K., Lunov, O., Buchele, B., Schimana-Pfeifer, J., Schmidt, T., Morad, S.A.F., Simmet, T., 2009. Tirucallic Acids Are Novel Pleckstrin Homology Domain-Dependent Akt Inhibitors Inducing Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Mol Pharmacol* mol.109.060475. <https://doi.org/10.1124/mol.109.060475>
- Fang, J., Dorrestein, P.C., 2014. Emerging mass spectrometry techniques for the direct analysis of microbial colonies. *Current Opinion in Microbiology, Ecology and industrial microbiology • Special Section: Novel technologies in microbiology* 19, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.014>
- Fernandes, J., Castilho, R.O., da Costa, M.R., Wagner-Souza, K., Coelho Kaplan, M.A., Gattass, C.R., 2003. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Letters* 190, 165–169. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00593-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00593-1)
- Fernandes, N.P., Lagishetty, C.V., Panda, V.S., Naik, S.R., 2007. An experimental evaluation of the antidiabetic and antilipidemic properties of a standardized *Momordica charantia* fruit extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 7, 29. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-7-29>

- FID, 2017. IDF - diabete atlas - 2017 [WWW Document]. URL <http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html> (accessed 7.11.18).
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S.I., Chun, O.K., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Flora, S.J., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloids exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2, 191–206.
- Francescato, L.N., Debenedetti, S.L., Schwanz, T.G., Bassani, V.L., Henriques, A.T., 2013. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC–ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. *Talanta* 105, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.072>
- Freeman, B.L., Eggett, D.L., Parker, T.L., 2010. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *J. Food Sci.* 75, C570-576. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01717.x>
- Gamble, P.E., Burke, J.J., 1984. Effect of Water Stress on the Chloroplast Antioxidant System: I. Alterations in Glutathione Reductase Activity. *Plant Physiology* 76, 615–621. <https://doi.org/10.1104/pp.76.3.615>
- Garg, N., Kapon, C.A., Lim, Y.W., Koyama, N., Vermeij, M.J.A., Conrad, D., Rohwer, F., Dorrestein, P.C., 2015. Mass spectral similarity for untargeted metabolomics data analysis of complex mixtures. *International Journal of Mass Spectrometry, Special Issue: MS 1960 to Now* 377, 719–727. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.06.005>
- Garo, E., Maillard, M., Hostettmann, K., Stedekti-Evans, H., Mavi, S., 1997. Absolute Configuration of a Diterpene Lactone from *Parinari capensis*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 538–544. <https://doi.org/10.1002/hlca.19970800218>

- Gaulejac, N.S.-C. de, Vivas, N., Freitas, V. de, Bourgeois, G., 1999. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 1081–1090. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199906\)79:8<1081::AID-JSFA330>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199906)79:8<1081::AID-JSFA330>3.0.CO;2-G)
- Gillery, P., 2006. Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré. *Annales de Biologie Clinique* 64, 309–314.
- Goh, S.H., Mok, J.S.L., Soepadmo, E., 1995. *Malaysian medicinal plants for the treatment of cardiovascular diseases*. Pelanduk Publications, Malaysia.
- Grimaldi, A., Heurtier, A., 2008. ÉPIDÉMIOLOGIE DES COMPLICATIONS CARDIOVASCULAIRES DU DIABÈTE. */data/revues/12623636/0025SUP3/12/* 25, 12. <https://doi.org/DM-08-1999-25-SUP3-1262-3636-101019-ART57>
- Grussu, D., Stewart, D., McDougall, G.J., 2011. Berry Polyphenols Inhibit α -Amylase in Vitro: Identifying Active Components in Rowanberry and Raspberry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2324–2331. <https://doi.org/10.1021/jf1045359>
- Guillausseau, P.-J., Meas, T., Virally, M., Laloi-Michelin, M., Médeau, V., Kevorkian, J.-P., 2008. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism, Incretins: a new approach* 34, S43–S48. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(08\)73394-9](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(08)73394-9)
- Gustafson, K.R., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Cardellina, J.H., McMahan, J.B., Gulakowski, R.J., Cragg, G.M., Cox, P.A., Brinen, L.S., Clardy, J., Boyd, M.R., 1991. HIV inhibitory natural products. 3. Diterpenes from *homalantus acuminatus* and *chrysobalanus icaco*. *Tetrahedron* 47, 4547–4554.
- Halliwell, B., 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res* 73, 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.10.004>
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine, Oxidants And Antioxidants: Pathophysiologic Determinants and Therapeutic Agents* 91, S14–S22. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90279-7)

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18, 125–126. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)91457-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)91457-3)
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview, in: *Methods in Enzymology, Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*. Academic Press, pp. 1–85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)
- Halpner, A.D., Handelman, G.J., Harris, J.M., Belmont, C.A., Blumberg, J.B., 1998. Protection by Vitamin C of Loss of Vitamin E in Cultured Rat Hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 359, 305–309. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0914>
- Hansen, S.H., Jensen, A.G., Cornett, C., Bjørnsdottir, I., Taylor, S., Wright, B., Wilson, I.D., 1999. High-Performance Liquid Chromatography On-Line Coupled to High-Field NMR and Mass Spectrometry for Structure Elucidation of Constituents of *Hypericum perforatum* L. *Anal. Chem.* 71, 5235–5241. <https://doi.org/10.1021/ac990598x>
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- He, Q., Lv, Y., Yao, K., 2007. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry* 101, 1178–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.020>
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., de Pascual-Teresa, S., 2010. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry* 121, 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.097>
- Houta, Chouaeb, H., Neffati, M., Amri, H., 2012. CRIBLAGE CHIMIQUE PRELIMINAIRE DES PROTEINES ET CAROTENOIDES PRESENTS DANS UN CRITHMUM MARITIMUM CULTIVE EN TUNISIE 77–82.
- Indrianingsih, A.W., Tachibana, S., 2016. Bioactive constituents from the leaves of *Quercus phillyraeoides* A. Gray for α -glucosidase inhibitor activity with concurrent antioxidant activity. *Food Science and Human Wellness* 5, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.02.004>

- Islam, M.N., Jung, H.A., Sohn, H.S., Kim, H.M., Choi, J.S., 2013. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. Arch. Pharm. Res. 36, 542–552. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0069-7>
- Jiménez, J.P., Serrano, J., Taberero, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M.E., García-Diz, L., Goñi, I., Saura-Calixto, F., 2008. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. Nutrition 24, 646–653. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.03.012>
- Kand'ár, R., Žáková, P., Mužáková, V., 2006. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. Clinica Chimica Acta 365, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.09.002>
- Karaçelik, A.A., Küçük, M., İskefiyeli, Z., Aydemir, S., De Smet, S., Miserez, B., Sandra, P., 2015. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI–MS methods. Food Chemistry 175, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.085>
- Kawai, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., 1999. Quantitation of Flavonoid Constituents in Citrus Fruits. J. Agric. Food Chem. 47, 3565–3571. <https://doi.org/10.1021/jf990153+>
- Khlebnikov, A.I., Schepetkin, I.A., Domina, N.G., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T., 2007. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15, 1749–1770. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.037>
- Kovacic, P., Jacintho, J.D., 2001. Mechanisms of Carcinogenesis Focus on Oxidative Stress and Electron Transfer [WWW Document]. <https://doi.org/info:doi/10.2174/0929867013373084>
- Kovacs, P., Stumvoll, M., 2005. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, Adipose Tissue as an Endocrine Organ 19, 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.07.003>

- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine* 113, 71–88. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)00995-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)00995-0)
- Ku, S.-K., Kwak, S., Kwon, O.-J., Bae, J.-S., 2014. Hyperoside Inhibits High-Glucose-Induced Vascular Inflammation *In Vitro* and *In Vivo*. *Inflammation* 37, 1389–1400. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9863-8>
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O., 2011. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn Rev* 5, 19–29. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79096>
- Lebovitz, H.E., 1997. ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORS. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 26, 539–551. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70266-8](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70266-8)
- Lee, J.E., Giovannucci, E., Smith-Warner, S.A., Spiegelman, D., Willett, W.C., Curhan, G.C., 2006. Intakes of Fruits, Vegetables, Vitamins A, C, and E, and Carotenoids and Risk of Renal Cell Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 2445–2452. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0553>
- Leitao, C., Marchioni, E., Bergaentzlé, M., Zhao, M., Didierjean, L., Miesch, L., Holder, E., Miesch, M., Ennahar, S., 2012. Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *Journal of Cereal Science* 55, 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.01.002>
- Lien, E.J., Ren, S., Bui, H.-H., Wang, R., 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 285–294. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00190-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00190-7)

- Lin, L.-Z., Harnly, J.M., 2012. Quantitation of Flavanols, Proanthocyanidins, Isoflavones, Flavanones, Dihydrochalcones, Stilbenes, Benzoic Acid Derivatives Using Ultraviolet Absorbance after Identification by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5832–5840. <https://doi.org/10.1021/jf3006905>
- Liochev, S.I., Fridovich, I., 1994. The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 29–33.
- Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., Chou, C.J., 2008. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human α -Amylase. *J. Med. Chem.* 51, 3555–3561. <https://doi.org/10.1021/jm800115x>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4, 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- López-Candales, A., 2001. Metabolic syndrome X: a comprehensive review of the pathophysiology and recommended therapy. *J Med* 32, 283–300.
- Lu, C.-C., Yang, J.-S., Huang, A.-C., Hsia, T.-C., Chou, S.-T., Kuo, C.-L., Lu, H.-F., Lee, T.-H., Wood, W.G., Chung, J.-G., 2010. Chrysophanol induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 54, 967–976. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900265>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Manoharan, S.K., Sivagnanam, D.S.K., Ram Krishna Rao, M., Anbuselvi, S., 2013. Preliminary phytochemical analysis of *Dodonaea viscosa* leaves. *Asian J. Plant Sci. Res.* 3, 43–46.
- Matsuzawa, Y., 2006. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Letters* 580, 2917–2921. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.028>

- Mattia, C.A., Braca, A., De Tommasi, N., Puliti, R., 2003. A new norkaurane- γ -lactone from *Parinari sprucei*. *Acta Cryst C*, *Acta Cryst Sect C*, *Acta Crystallogr C*, *Acta Crystallogr Sect C*, *Acta Crystallogr C Cryst Struct Commun*, *Acta Crystallogr Sect C Cryst Struct Commun* 59, o644–o646. <https://doi.org/10.1107/S0108270103019814>
- McCarty, M.F., 2005. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Medical Hypotheses* 64, 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.03.037>
- McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., 2005. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -Amylase and α -Glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2760–2766. <https://doi.org/10.1021/jf0489926>
- Mendez, J., Bilia, A.R., Morelli, I., 1995. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70, 223–226. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00027-7](https://doi.org/10.1016/0031-6865(95)00027-7)
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673–751.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407–412.
- Mohamadi, S., Zhao, M., Amrani, A., Marchioni, E., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S., 2015. On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. *Industrial Crops & Products Complete*, 910–919. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.048>
- Moretti, C., Aubertin, C., 2007. Stratégies des firmes pharmaceutiques : la bioprospection en question, in: Aubertin, C., Pinton, F., Boisvert, V. (Eds.), *Les marchés de la biodiversité*. IRD, Paris, pp. 27–54.
- Neto, F.C., Pilon, A.C., Bolzani, V. da S., Castro-Gamboa, I., 2013. Chrysobalanaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. *Phytochem Rev* 12, 121–146. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9259-z>

- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 17, 215–234.
- Nothias-Scaglia, L.-F., Esposito, M., Costa, J., Paolini, J., Touboul, D., Litaudon, M., 2015. Molecular networks, a bioinformatic tool for tandem mass spectrometry data interpretation. *Spectra Analyse* 307, 73–78.
- Oberlies, N.H., Burgess, J.P., Navarro, H.A., Pinos, R.E., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Wani, M.C., Wall, M.E., 2001. Bioactive Constituents of the Roots of *Licania intrapetiolaris*. *J. Nat. Prod.* 64, 497–501. <https://doi.org/10.1021/np0005006>
- Obied, H.K., 2013. Biography of biophenols: past, present and future. *Functional Foods in Health and Disease* 3, 230–241.
- Olivon, F., Roussi, F., Litaudon, M., Touboul, D., 2017. Optimized experimental workflow for tandem mass spectrometry molecular networking in metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 409, 5767–5778. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0523-3>
- OMS, 2016. WHO | Rapport Mondial Diabète, 2016 [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/diabetes/country-profiles/en/> (accessed 7.11.18).
- OMS, 2007. TDR | Tropical Diseases Research, Plan 2008-2013 [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/tdr/publications/about-tdr/business-plans/tdr-businessplan08-13/en/> (accessed 7.11.18).
- Ong, K.W., Hsu, A., Tan, B.K.H., 2013. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology* 85, 1341–1351. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.008>
- Ong, K.W., Hsu, A., Tan, B.K.H., 2012. Chlorogenic Acid Stimulates Glucose Transport in Skeletal Muscle via AMPK Activation: A Contributor to the Beneficial Effects of Coffee on Diabetes. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032718>
- Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q., Singal, P.K., 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 746–761. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00266-4)

- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2, 270–278.
- Patel, D., Prasad, S., Kumar, R., Hemalatha, S., 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac J Trop Biomed* 2, 320–330. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60032-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60032-X)
- Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., Berset, C., 2003. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *J Amer Oil Chem Soc* 80, 1007. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0812-z>
- Piao, M.J., Kang, K.A., Zhang, R., Ko, D.O., Wang, Z.H., You, H.J., Kim, H.S., Kim, J.S., Kang, S.S., Hyun, J.W., 2008. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780, 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.012>
- Pietta, P.-G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.-O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16, 233–239. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(02\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(02)00166-8)
- Plumb, G.W., Pascual-Teresa, S.D., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., Williamson, G., 1998. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research* 29, 351–358. <https://doi.org/10.1080/10715769800300391>
- Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., Fontés, G., 2010. Glucolipototoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.08.006>
- Poitout, V., Robertson, R.P., 2008. Glucolipototoxicity: Fuel Excess and β -Cell Dysfunction. *Endocr Rev* 29, 351–366. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0023>

- Prakash Chaturvedula, V.S., Schilling, J.K., Johnson, R.K., Kingston, D.G.I., 2003. New Cytotoxic Lupane Triterpenoids from the Twigs of *Coussarea paniculata*. *J. Nat. Prod.* 66, 419–422. <https://doi.org/10.1021/np0204848>
- Prance, G.T., 1972. Ethnobotanical Notes from Amazonian Brazil. *Economic Botany* 26, 221–237.
- Prance, G.T., White, F., Letouzey, R., 1988. The genera of Chrysobalanaceae: a study in practical and theoretical taxonomy and its relevance to evolutionary biology. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 320, 1–184. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0071>
- Prasad, A.S., Bao, B., Beck, F.W.J., Kucuk, O., Sarkar, F.H., 2004. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1182–1190. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.007>
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Quesada, H., Bas, J.M. del, Pajuelo, D., Díaz, S., Fernandez-Larrea, J., Pinent, M., Arola, L., Salvadó, M.J., Bladé, C., 2009. Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *International Journal of Obesity* 33, 1007–1012. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.136>
- Quinn, R.A., Nothias, L.-F., Vining, O., Meehan, M., Esquenazi, E., Dorrestein, P.C., 2017. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. *Trends in Pharmacological Sciences* 38, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.011>
- Racah, D., 2004. Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC - Endocrinologie* 1, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.emcend.2003.10.003>
- Rahman, M.S., Sadhu, S.K., Hasan, C.M., 2007. Preliminary antinociceptive, antioxidant and cytotoxic activities of *Leucas aspera* root. *Fitoterapia* 78, 552–555. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.06.018>

- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113, 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015>
- Raza, A., Xu, X., Sun, H., Tang, J., Ouyang, Z., 2017. Pharmacological activities and pharmacokinetic study of hyperoside: A short review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 16, 483. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i2.30>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rice-Evans, Catherine A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., Roberts, D.D., Wink, D.A., 2005. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *PNAS* 102, 13147–13152. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502979102>
- Rigalleau, V., Lasseur, C., Raffaitin, C., Beauvieux, M.-C., Barthe, N., Chauveau, P., Combe, C., Gin, H., 2007a. Normoalbuminuric renal-insufficient diabetic patients: a lower-risk group. *Diabetes Care* 30, 2034–2039. <https://doi.org/10.2337/dc07-0140>
- Rigalleau, V., Lasseur, C., Raffaitin, C., Beauvieux, M.-C., Barthe, N., Chauveau, P., Combe, C., Gin, H., 2007b. Normoalbuminuric Renal-Insufficient Diabetic Patients: A lower-risk group. *Diabetes Care* 30, 2034–2039. <https://doi.org/10.2337/dc07-0140>
- Roden, M., Krssak, M., Stingl, H., Gruber, S., Hofer, A., Fürnsinn, C., Moser, E., Waldhäusl, W., 1999. Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes* 48, 358–364. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.2.358>

- Rolo, A.P., Palmeira, C.M., 2006. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.003>
- Samaniego Sánchez, C., Troncoso González, A.M., García-Parrilla, M.C., Quesada Granados, J.J., López García de la Serrana, H., López Martínez, M.C., 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta* 593, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.037>
- Sanduja, R., Alam, M., Euler, K.L., 1983. Constituents of *Couepia paraensis*. *J. Nat. Prod.* 46, 149–149. <https://doi.org/10.1021/np50025a019>
- Schmidt, D.D., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Wingender, W., Truscheit, E., Schäfer, D., 1977. α -Glucosidase inhibitors. *Naturwissenschaften* 64, 535–536. <https://doi.org/10.1007/BF00483561>
- Shobana, S., Sreerama, Y.N., Malleshi, N.G., 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry* 115, 1268–1273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.042>
- Steenvoorden, D.P.T., Henegouwen, G.M.J.B. van, 1997. Cysteine Derivatives Protect Against UV-Induced Reactive Intermediates in Human Keratinocytes: The Role of Glutathione Synthesis. *Photochemistry and Photobiology* 66, 665–671. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03204.x>
- Surmaghi, M.H.S., Amin, Y.A.G., Mahmoodi, Z., 1992. Survey of Iranian Plants For Saponins Alkaloids Flavonoids And Tannins. IV [WWW Document]. URL <https://www.ingentaconnect.com/content/doi/15608115/1992/00000002/f0020002/art00001> (accessed 6.7.18).
- Tabassum, A., Bristow, R.G., Venkateswaran, V., 2010. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? *Cancer Treatment Reviews* 36, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.12.008>

- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T., 2006. Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol, Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52, 149–153. <https://doi.org/10.3177/jnsv.52.149>
- Tatsis, E.C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A.N., Vervoort, J., Gerothanassis, I.P., 2007. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* 68, 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.026>
- Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrih, N.P., Abramovič, H., 2011. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry* 128, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.077>
- Tiwari, A.K., 2001. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science* 81, 1179–1187.
- Tripathi, Y.B., Yadav, D., 2013. Diabetic Nephropathy: Causes and Managements [WWW Document]. <https://doi.org/info:doi/10.2174/187221413804660971>
- Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Turunen, M., Olsson, J., Dallner, G., 2004. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1660, 171–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.11.012>
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R., 2009. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol* 7, 65–74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- VALNET, J., 2010. La phytothérapie : se soigner par les plantes, Le livre de poche. ed.

- van Acker, S.A.B.E., de Groot, M.J., van den Berg, D.-J., Tromp, M.N.J.L., Donn -Op den Kelder, G., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996. A Quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1305–1312. <https://doi.org/10.1021/tx9600964>
- Vargas, C.E., Mendes, M.F., Azevedo, D.A., Pessoa, F.L.P., Uller, A.C., 2010. Extraction of the essential oil of abajeru (*Chrysobalanus icaco*) using supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids* 54, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.12.007>
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2008. *Phenolic Compound Biochemistry*, 2006 edition. ed. Springer, Berlin.
- Verpoorte, R., 2014. La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologie, in: Fleurentin, J., Mazars, G., Pelt, J.-M. (Eds.), *Des Sources Du Savoir Aux Médicaments Du Futur*, Hors Collection. IRD  ditions, Marseille, pp. 263–274.
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* 3, 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Wang, M., J. Carver, J., Phelan, V., Sanchez, L., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D., Watrous, J., Kaponov, C., Luzzatto Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A., J. Meehan, M., Liu, W.-T., Cr semann, M., Boudreau, P., Esquenazi, E., Sandoval-Calder n, M., Bandeira, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* 34, 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B.S., Yang, J.Y., Kersten, R.D., van der Voort, M., Pogliano, K., Gross, H., Raaijmakers, J.M., Moore, B.S., Laskin, J., Bandeira, N., Dorrestein, P.C., 2012. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E1743-1752. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203689109>
- Werawattanachai, N., Kaewamatawong, R., 2010. Chemical constituents from *Parinari anamense*. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 836–838. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.06.007>

- Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., Shaw, J., 2011. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 94, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>
- Wiernsperger, N.F., 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* 29, 579–585.
- Williamson, G., Plumb, G.W., Uda, Y., Price, K.R., Rhodes, M.J.C., 1996. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells. *Carcinogenesis* 17, 2385–2387. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.11.2385>
- Wu, Y.-C., Hung, Y.-C., Chang, F.-R., Cosentino, M., Wang, H.-K., Lee, K.-H., 1996. Identification of ent-16 β ,17-Dihydroxykauran-19-oic Acid as an Anti-HIV Principle and Isolation of the New Diterpenoids Annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *J. Nat. Prod.* 59, 635–637. <https://doi.org/10.1021/np960416j>
- Yakandawala, D., Morton, C.M., Prance, G.T., 2010. Phylogenetic Relationships of the Chrysobalanaceae Inferred from Chloroplast, Nuclear, and Morphological Data. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97, 259–281. <https://doi.org/10.3417/2007175>
- Yamashita, Y., Okabe, M., Natsume, M., Ashida, H., 2013. Cinnamtannin A2, a Tetrameric Procyanidin, Increases GLP-1 and Insulin Secretion in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77, 888–891. <https://doi.org/10.1271/bbb.130095>
- Zhang, L., He, S., Yang, F., Yu, H., Xie, W., Dai, Q., Zhang, D., Liu, X., Zhou, S., Zhang, K., 2016. Hyperoside ameliorates glomerulosclerosis in diabetic nephropathy by downregulating miR-21. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94, 1249–1256. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0066>
- Zulueta, A., Esteve, M.J., Frígola, A., 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

Publication:

- 1- Mamadou Baldé, Saïd Ennahar, Stéphanie Dal, Séverine Sigrist, Alassane Wélé, Eric Marchioni and Diane Julien-David. Influence of the physicochemical parameters of solvents in the extraction of bioactive compounds from *Parinari macrophylla* Sabine (Chrysobalanaceae). *European Journal of Chemistry* 9 (3) (2018) 161-167.

Posters:

- 2- Mamadou Baldé, Ludivine Riffault-Valois, Diane Julien-David, Sonia Lordel-Madeleine, Alassane Wélé, Eric Marchioni. Analysis of Total Plant Extracts by Tandem Mass Spectrometry (MS / MS): Search for Compounds by Spectral Similarity Using Databases. *32nd International Symposium on Chromatography ISC 2018, Cannes-Mandelieu, France, from September 23 – 27, 2018.*
- 3- Baldé Mamadou, Diane JD, Guèye RS, Tine Y, Diédhiou A, Ndoeye I, Fall AD, Seck M, Fall D, Marchioni E, Wélé A. Évaluation de l'activité anti-oxydante de *Parinari macrophylla* (Chrysobalanaceae). *XVIII^{èmes} journées médicales, pharmaceutiques, odontologiques et vétérinaires de Dakar - 10 au 13 avril 2017, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie – Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Sénégal.*
- 4- Baldé Mamadou

Valorization of bioactive compounds present in plants used in the treatment of diabetes in Senegal. *Doctoriales® d'Alsace 2017, du 15 au 19 mai 2017 à la Maison du Kleebach, Munster, France.*
- 5- Mamadou Baldé, Diane Julien-David, Saïd Ennahar, Stéphanie Dal, Alassane Wélé, Eric Marchioni. Extraction de composés bioactifs à partir de plantes médicinales : méthode de sélection des solvants. *PHYTODAY 2017, Réseau des phytochimistes de la région Grand Est, 3^{ème} édition, 23 juin 2017, Reims, France.*

Etude physico-chimique et valorisation de composés bioactifs de *Parinari macrophylla* Sabine (Chrysobalanaceae)

Résumé

Le diabète de type 2 est souvent associé à un stress oxydant pouvant entraîner plusieurs complications métaboliques. Au Sénégal, en plus du traitement médicamenteux, les plantes médicinales restent encore très utilisées dans la prise en charge de cette pathologie. Le but de ce travail a été de contribuer à la valorisation de la biodiversité sénégalaise et plus particulièrement d'approfondir les connaissances phytochimiques de *Parinari macrophylla* Sabine, utilisée traditionnellement pour le traitement du diabète. Pour cela, l'activité anti-radicalaire totale et au niveau moléculaire des feuilles et écorces a été déterminée par les méthodes TEAC, ORAC et HPLC - ABTS⁺⁺ online. De plus un screening phytochimique (réactions de précipitation, CCM) a été réalisé et a permis de mettre en évidence plusieurs groupes chimiques de composés tels que des flavonoïdes, des tanins, des terpènes, des anthracènes, des saponosides, des hétérosides cardiotoniques et des alcaloïdes. Pour l'identification des composés actifs, la RMN et l'approche par réseau moléculaire (UHPLC-MS), ont permis d'identifier l'acide chlorogénique, l'hyperoside, la procyanidine B2 et d'autres procyanidines. L'étude *in vitro* réalisée sur un modèle cellulaire RINm5F a montré une faible activité anti-radicalaire des extraits de plante vis-à-vis d'un stress induit à l'HX-XO. Toutefois les composés identifiés dans cette étude sont connus pour leurs effets antioxydants et inhibiteurs sur les enzymes digestives responsables du métabolisme du glucose. Cela pourrait justifier l'utilisation de cette plante dans le traitement du diabète de type 2 par les tradithérapeutes Sénégalais.

Mots clés : *Parinari macrophylla* Sabine, diabète, antioxydants, UHPLC-MS, Réseaux moléculaires

Abstract

Type 2 diabetes is often associated with oxidative stress that can lead to several metabolic complications. In Senegal, in addition to drug treatment, medicinal plants are still widely used in the treatment of this pathology.

The aim of this work was to contribute to the enhancement of Senegalese biodiversity and more particularly to improve the phytochemical properties of *Parinari macrophylla* Sabine, traditionally used for the treatment of diabetes. For this, the total antiradical activity and at the molecular level of leaves and bark has been determined by the TEAC, ORAC and HPLC - ABTS⁺⁺ online methods. In addition, a phytochemical screening (precipitation reactions, CCM) was carried out and revealed several chemical groups of compounds such as flavonoids, tannins, terpenes, anthracenes, saponosides, cardiotonic heterosides and alkaloids. For the identification of active compounds, NMR and the molecular network approach (UHPLC-MS), identified chlorogenic acid, hyperoside, procyanidin B2 and other procyanidins. The *in vitro* study carried out on a RINm5F cellular model showed a low anti-radical activity of plant extracts against HX-XO-induced stress. However, the compounds identified in this study are known for their antioxidant and inhibitory effects on digestive enzymes responsible for glucose metabolism. This could justify the use of this plant in the treatment of type 2 diabetes by Senegalese traditional therapists.

Keywords: *Parinari macrophylla* Sabine, diabetes, antioxidants, UHPLC-MS, Molecular networks