



HAL
open science

Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales gabonaises : *Erismadelphus exsul* Mildbr et *Baillonella toxisperma* Pierre

Morel Essono Mintsá

► To cite this version:

Morel Essono Mintsá. Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales gabonaises : *Erismadelphus exsul* Mildbr et *Baillonella toxisperma* Pierre. Biologie cellulaire. Université de Picardie Jules Verne; Université des Sciences et Techniques de Masuku (Gabon), 2022. Français. NNT : 2022AMIE0030 . tel-04702154

HAL Id: tel-04702154

<https://theses.hal.science/tel-04702154v1>

Submitted on 19 Sep 2024

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

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



Thèse de Doctorat en Cotutelle

Mention : Biologie

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire, Biotechnologies Végétales

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)* de
l'Université de Picardie Jules Verne

et

à *l'Ecole doctorale des Sciences Fondamentales et Appliquées (EDSFA)*
de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku

par

Morel ESSONO MINTSA

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes
médicinales gabonaises : Erismadelphus exsul Mildbr et
Baillonella toxisperma Pierre***

Soutenue le 05 juillet 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M^{me}. Françoise MELLION, Pr, UPJV
M. Pierre CHAMPY, Pr, Université Paris-sud
M^{me}. Sandrine MORANDAT, MCF, HDR, UTC
M^{me}. Rozenn RAVALLEC, Pr, Université de Lille
M^{me}. Blandine, AKENDENGUE, Pr, FP-USS
M. François MESNARD, Pr, UPJV
M. Brice KUMULUNGUI, Pr, USTM

Présidente
Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse



Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier les membres du jury qui ont bien voulu évaluer ces travaux de thèse. Je remercie donc le Pr Pierre CHAMPY, Pr Sandrine MORANDAT, Pr Françoise MELLION, Pr Blandine AKENDENGUE et le Pr Rozenn RAVALLEC.

Un très grand merci à mon directeur de thèse et directeur du laboratoire BIOPI, François MÉS-NARD, qui m'a fait confiance durant ces trois dernières années et qui a toujours trouvé les mots justes pour me rassurer par rapport à l'avancement des travaux « Morel ne t'inquiète pas, tout se passe bien ». Je me souviendrais toujours de l'énergie déployée pour la réalisation de ce travail dans différents laboratoires, vos encouragements, conseils et surtout votre simplicité inégalable tout au long de ce travail, merci. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

J'adresse également mes remerciements à mon codirecteur de thèse et directeur adjoint du Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Brice KUMULUNGUI, pour la confiance qu'il m'a témoigné au cours de ce travail et surtout de l'accueil au CIRMF durant mon séjour au Gabon.

Un grand merci à Elvis OTOGO N'NANG OBIANG qui a été à l'origine de ce beau projet. Je te remercie pour ta disponibilité et ta patience tout au long de ce travail l'une des tes phrases emblématique « Morel ne t'inquiète pas on le fera ». Au de-là du cadre professionnel tu as également été présent.

Je tiens également à remercier Roland MOLINIE avec qui j'ai eu des échanges très enrichissants sur les analyses RMN et spectrométrie de masse, les conseils sur les techniques de chimie analytiques et l'aide apporté sur les différentes chromatographies.

Je souhaite également remercier Ali SIAH, Justine JACQUIN, Jerome MUCHEMBLED et toute l'équipe UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE, JUNIA, Métabolites spécialisés d'origine végétale, de l'Institut Charles Violette de Lille qui m'ont chaleureusement accueilli et aidé à réaliser les tests antifongiques.

Je remercie également Rozenn RAVALLEC et Élodie DUSSERT, UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE, de l'Institut Charge Violette de l'Université de Lille qui m'ont aidé à réaliser les tests de cytotoxicités.

Je tiens à remercier Elodie CHOQUE du laboratoire BIOPI (UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE) de m'avoir aidé sur la partie des études antioxydantes et les discussions très intéressantes sur les activités biologiques des plantes médicinales.

J'aimerais également remercier Serge PILARD et Dominique CAILLEU, ainsi que toute l'équipe de la plate-forme Analytique de l'Université de Picardie Jules Verne pour le soutien apporté sur les analyses de RMN.

Je remercie Mehdi A. BENIDDIR de l'Université Paris-Sud, pour la collaboration sur les analyses LC-MS/MS.

Je remercie vivement Ophélie FLINIAUX, qui m'a apporté un soutien remarquable sur toutes mes procédures administratives et également durant la période de crise sanitaire. Je te remercie pour les conseils et parfois les corrections apportées sur mes différentes présentations « je pense au RMFM », très grand merci à toi.

Je remercie également Jean-Xavier FONTAINE, Anthony QUERO, Romain ROULARD, Damien HERFURTH du laboratoire BIOPI, UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE pour vos conseils et l'implication pendant les analyses de purification.

Je ne saurais terminer cette séance de remerciements sans remercier mes collègues doctorant, Amar, Yannis et Aziz pour les échanges très scientifiques sur nos différents sujets de thèses, merci chers collègues. Un merci particulier également à Mathie et Charline toutes les deux stagiaires au sein du laboratoire BIOPI, avec qui j'ai partagé les moments de convivialités assez particuliers merci à vous pour le soutien moral dont j'avais parfois besoin tout au long de ce travail. Un grand merci à l'ensemble des personnes du laboratoire BIOPI, je pense à Anne CARON, Solène BASSARD ainsi que toutes les autres personnes de près ou de loin qui m'ont apporté leur soutien.

Un très grand merci à mes parents depuis le Gabon pour les conseils et la patience durant ces trois dernières années. Je pense à toutes les fois où je n'ai pas pu vous répondre au téléphone je m'excuse infiniment.

A toi maman Sidonie Andeme Assoumou, je ne sais pas de quelle façon te remercier, car sans toi je ne suis réellement rien. Tes conseils sur la persévérance et l'endurance, pour te paraphraser « Morel tu es mon enfant unique je n'ai pas un autre ailleurs, je ne vais jamais permettre que tu ne fasses rien de ta vie » Merci à toi maman.

Je tiens également à remercier ma fiancée Griffith Farnèse Awele d'avoir toujours cru en moi. Je tiens à te témoigner ma reconnaissance pour ta grande patience et surtout ton grand soutien dans ma vie.

A mon beau père Simon Eya pour l'accompagnement tout au long de mon parcours académique. Un grand merci à ma tante Gisèle Okomo Asoumou pour les conseils et les échanges fructueux tout au long de ce travail. A mes cousins et cousine, Darel Nguema, Valeska Mengue, Koffi Bekui, Kevin Nze, Yonnis Meyo, Davila Ekang, Martin Ondo Ovono, qui m'ont souvent remonté le moral malgré la distance. Enfin, je remercie tous mes Ami(e)s je pense à Axel Nguema, Daniel Medzegue, Tony Nfana, Davy Ovono, Salas Nzue, pour tous les bons moments partagés. Merci à vous ma deuxième famille.

Résumé

Le Gabon renferme une flore riche et plusieurs espèces sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce contexte, vingt-deux (22) plantes médicinales utilisées au nord du Gabon pour lutter contre les maladies microbiennes ont été récoltées à partir d'une enquête ethnopharmacologique afin d'être investiguées pour la recherche d'antimicrobiens. Parmi ces 22 plantes, deux (2) ont été étudiées *via* une stratégie de déréplication fondée sur les réseaux moléculaires (Molecular Networking) générés à partir des données CLHP-MS/MS. Il s'agit de *Erismadelphus exsul* Mildbr (*E. exsul*) et *Baillonella toxisperma* Pierre (*B. toxisperma*), appartenant respectivement aux familles des Vochysiaceae et des Sapotaceae .

A partir des écorces et des feuilles de *E. exsul*, 96 composés ont été identifiés, tandis que l'étude des écorces de *B. toxisperma* a permis d'identifier 20 composés. Tous ces composés ont été identifiés pour la première fois dans ces deux plantes grâce à notre stratégie de déréplication. Ils appartiennent tous majoritairement à dix (10) familles de composés naturels i) alcaloïdes cyclopeptidiques, ii) polyphénols (isoflavonoïdes et flavonoïdes), iii) glycérophospholipides, iv) acides aminés estérifiés, v) stéroïdes et dérivés, vi) alcaloïdes quinoléines, vii), phénylpropanolamines, viii) stilbènes, ix) lignanes, x) glycosides phénoliques.

De plus, à partir des extraits de ces plantes, les activités antioxydantes (2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazylhydrate (DPPH) et capacité de réduction ferrique (FRAP)), antimicrobiennes et cytotoxicité *in vitro* ont été évaluées. Les résultats obtenus montrent clairement un potentiel thérapeutique de ces plantes et justifient leur usage dans la médecine traditionnelle.

Mots clés : Activité antioxydante, activité antimicrobienne, cytotoxicité, déréplication, enquête ethnopharmacologique, réseau moléculaire, plantes médicinales.

Abstract

Gabon has a rich flora and several species are used in traditional medicine for their therapeutic properties. In this context, twenty two (22) medicinal plants used in northern Gabon to treat microbial diseases were collected from an ethnopharmacological survey in order to be investigated for antimicrobials. Among these 22 plants, two (2) were studied via a de-replication strategy based on molecular networking generated from HPLC-MS/MS data. These are *Erismadelphus exsul* Mildbr (*E. exsul*) and *Baillonella toxisperma* Pierre (*B. toxisperma*), belonging to the families Vochysiaceae and Sapotaceae respectively.

From the barks and leaves of *E. exsul*, 96 compounds were identified, while the study of the barks of *B. toxisperma* identified 20 compounds. All these compounds were identified for the first time in these two plants using our dereplication strategy. They all belong mainly to ten (10) families of natural compounds i) cyclopeptide alkaloids, ii) polyphenols (isoflavonoids and flavonoids), iii) glycerophospholipids, iv) esterified amino acids, v) steroids and derivatives, vi) quinoline alkaloids, vii) phenylpropanolamines, viii) stilbenes, ix) lignans, x) phenolic glycosides.

Moreover, from the extracts of these plants, the antioxidant (2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazylhydrate (DPPH) and ferric reduction capacity (FRAP)), antimicrobial and cytotoxicity activities in vitro were evaluated. The results obtained clearly show a therapeutic potential of these plants and justify their use in traditional medicine.

Keywords: Antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxicity, dereplication, ethnopharmacological survey, molecular network, medicinal plants.

Table des matières

Remerciements.....	i
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	9
Liste des sigles et abréviations.....	10
INTRODUCTION.....	13
PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
I. GENERALITE SUR LES PLANTES MEDICINALES.....	16
1. Définition d'une plante médicinale.....	16
2. Médecine traditionnelle et pharmacopée africaine : cas du Gabon.....	16
3. Ethnopharmacologie et médecine traditionnelle.....	18
4. Généralité sur les méthodes et paramètres utilisé(e)s pendant une enquête ethnopharmacologique.....	19
4.1 Collecte des données.....	19
4.2 Période et lieu de récolte.....	19
4.3 Mode de séchage et conservation des échantillons.....	20
4.4 Mode de préparation des recettes.....	20
4.5 Travail de laboratoire et perte d'activité biologique.....	20
4.6 Mode d'action des plantes médicinales.....	21
II. GENERALITE SUR LA RESISTANCE MICROBIENNE.....	22
1. Substances naturelles et la recherche d'agents antimicrobiens.....	23
2. Pouvoir antibactérien des plantes.....	24
2.1. Définition.....	24
2.2. Méthode de diffusion.....	24
2.3. Méthode de microdilution.....	25
3. Caractéristiques des souches microbiennes testées.....	26
3.1. <i>Escherichia coli</i>	27
3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
3.3. <i>Salmonella enterica</i>	28
3.4. <i>Phytophthora infestans</i>	30
3.5. <i>Zymoseptoria tritici</i>	32
III. ACTIVITES ANTIOXYDANTES.....	33
3.1. Généralité sur le test DPPH (2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl).....	35
3.2. Généralité sur le test FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).....	36
IV. GENERALITE SUR L'ETUDE DE CYTOTOXICITE.....	37
V. FAMILLES DES PLANTES ETUDIEES.....	38
5.1. Généralité sur la famille des Vochysiaceae : cas de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr.....	38

5.2.	Etudes antérieures sur les Vochysiaceae	40
5.3.	Utilisation en médecine traditionnelle	42
5.4.	Généralité sur la famille des Sapotaceae : cas de <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	43
5.5.	Etudes antérieures sur les Sapotaceae.....	45
5.6.	Etudes antérieures sur la plante <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	47
5.7.	Utilisation en médecine traditionnelle	48
VI.	METHODES ANALYTIQUES.....	49
6.1.	Spectrométrie de masse (MS).....	49
6.2.	Intérêts et limites de la spectrométrie de masse dans la recherche des biomolécules.....	51
6.3.	Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)	51
6.4.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	52
6.4.1.	Principe général	52
6.5.	Intérêts et limites de la RMN dans la recherche des biomolécules	53
VII.	DEREPLICATION ET RESEAUX MOLECULAIRES.....	54
7.1.	Avancé de la déréplication.....	55
7.2.	Réseaux Moléculaires (MN)	57
7.3.	Traitement de données LC-MS/MS	58
7.4.	Visualisation des réseaux moléculaires	60
7.5.	Interprétation des réseaux moléculaires	60
PARTIE II:	MATERIELS ET METHODES	61
I.	ENQUETES ETHNOPHARMACOLOGIQUES ET RECOLTE DES PLANTES.....	61
1.1.	Présentation de la zone d'étude.....	61
1.2.	Travail sur le terrain et récolte des plantes	62
II.	ETUDES CHIMIQUES	65
2.1.	Extraction et fractionnement.....	65
2.2.	Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	66
2.3.	Analyse HPLC Préparative	66
2.4.	Analyse HPLC-UV	67
2.5.	Analyse HPLC-MS/MS.....	67
III.	CONSTRUCTION DES RESEAUX MOLECULAIRES.....	69
3.1.	Paramètres de mise en réseau moléculaire.....	69
IV.	PARAMETRES RMN UTILISES POUR L'ACQUISITION DES DONNEES	70
4.1.	Appareillage et paramètres d'acquisition RMN	70
V.	ETUDES BIOLOGIQUES	72
5.1.	Culture cellulaire	72
5.1.1.	Cellule Caco-2	72
5.1.2.	Cellule HaCaT	72
5.2.	Etude de cytotoxicité	72

5.3.	Activités antimicrobiennes	73
5.3.1.	Préparation du milieu physiologique.....	73
5.3.2.	Préparation du milieu de culture Mueller Hinton II Agar (MH)	74
5.3.3.	Préparation du bouillon nutritif Bouillon Trypcase Soja (TSB-D).....	74
5.3.4.	Préparation de l'inoculum bactérien.....	74
5.3.5.	Préparation des extraits et fractions	74
5.3.6.	Les microorganismes utilisés	75
5.3.7.	Antibiotiques de références utilisés	75
5.3.8.	Méthode de diffusion, détermination des DZI	76
5.3.9.	Méthode de microdilution, détermination des CMI/CMB	77
5.4.1.	Activité anti-oomycète et antifongique	78
5.4.	Activité antioxydante.....	80
5.4.1.	Méthode du FRAP	80
5.4.2.	Méthode du DPPH	81
	PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION	82
I.	ENQUETES ETHNOPHARMACOLOGIQUES	82
1.1.	Données démographiques	82
1.2.	Plantes identifiées : parties utilisées et mode de préparation des recettes	82
II.	ETUDES CHIMIQUES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE <i>E. EXSUL</i> MILDBR.....	86
2.1.	Extraction	86
2.2.	Profilage des métabolites de <i>Erismadelphus exsul</i> par LC-HRMS/MS.....	87
2.3.	Ciblage et déréplication basés sur la MS/MS et le réseau moléculaire	89
2.4.	Présentation du réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de <i>E. exsul</i>	90
2.4.1.	Cluster A : Stéroïdes et dérivées de stéroïdes	91
2.4.2.	Cluster B : Glycérophospholipides	91
2.4.3.	Cluster C : Alcaloïdes cyclopeptidiques	92
2.4.4.	Cluster D : Alcaloïdes quinoléines.....	92
2.5.	Fractionnement	94
III.	ÉTUDES BIOLOGIQUES EXTRAIT ETHANOLIQUE <i>E. EXSUL</i> MILDBR.....	96
3.1.	Activité antioxydante.....	96
3.2.	Activité antibactérienne.....	97
3.3.	Activité anti-oomycète et antifongique.....	99
3.4.	Purification de l'extrait éthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i>	107
3.5.	Relation entre la Mauratine A, Mauratine F et Mauratine A N-oxyde du cluster C	109
IV.	ÉTUDES CHIMIQUES DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE DE <i>E. EXSUL</i> MILDBR	110
4.1.	Ciblage et déréplication basés sur les réseaux moléculaires.....	112
4.2.	Réseau moléculaire extrait méthanolique écorces de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	113
4.2.1.	Cluster A : Stéroïdes et dérivés de stéroïdes.....	114
4.2.2.	Cluster B : Alcaloïdes quinoléines	115
4.2.3.	Cluster C : Alcaloïdes cyclopeptidiques	116
V.	ÉTUDES BIOLOGIQUES EXTRAIT METHANOLIQUE <i>E. EXSUL</i> MILDBR	117

5.1.	Activité antibactérienne.....	117
VI.	ÉTUDES CHIMIQUES DES FEUILLES DE <i>E. EXSUL</i> MILDBR	124
6.1.	Analyse du réseau moléculaire des extraits méthanoliques et éthanoliques des feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	125
6.2.	Présentation du réseau moléculaire des extraits méthanoliques et éthanoliques des feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	126
6.3.	Analyse du cluster A	127
6.4.	Analyse du cluster B	128
6.5.	Analyse des clusters C, D et E.....	129
6.6.	Analyse de la zone de nœuds non liés	130
VII.	ÉTUDES BIOLOGIQUES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DES FEUILLES DE <i>E. EXSUL</i> MILDBR.....	135
7.1.	Activité antioxydante.....	135
7.2.	Identification des molécules antioxydantes dans l'extrait brut éthanolique	136
7.3.	Confirmation de l'identité de la vitexine	137
7.4.	Proposition de fragmentation de la vitexin	138
VIII.	CYTOTOXICITE EXTRAIT DE <i>ERISMADELPHUS EXSUL</i> MILDBR.....	139
IX.	ÉTUDES CHIMIQUES DE <i>BAILLONELLA TOXISPERMA</i> PIERRE	141
9.1.	Réseau moléculaire de <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	142
9.2.	Analyse du réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de <i>Baillonella toxisperma</i>	144
9.3.	Présentation du réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de <i>Baillonella toxisperma</i>	145
X.	ETUDES BIOLOGIQUES DE <i>BAILLONELLA TOXISPERMA</i> PIERRE	148
10.1.	Activité antibactérienne.....	148
10.2.	Activité anti-oomycète.....	150
10.3.	Analyse des fractions actives	151
XI.	CYTOTOXICITE EXTRAIT DE <i>BAILLONELLA TOXISPERMA</i> PIERRE	154
	DISCUSSION GENERALE	155
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	158
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	160
	ANNEXES	178

Liste des figures

Figure 1 : Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle du Gabon (IPHAMETRA).....	17
Figure 2 : Image d'un médicament traditionnel amélioré (MTA) «PALMILANT»	18
Figure 3 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie à Gram négatif	23
Figure 4 : Méthode de diffusion pour la détermination des diamètres de zone d'inhibition DZI	25
Figure 5 : Méthode de microdilution pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)	26
Figure 6 : Escherichia coli (observation par balayage en microscopie électronique).....	27
Figure 7 : Klebsiella pneumoniae MDR (observation par balayage en microscopie électronique).....	28
Figure 8 : Salmonella enterica (observation par balayage en microscopie électronique)	29
Figure 9 : Manifestation du mildiou de la tomate (A) et de la pomme de terre (B)	31
Figure 10 : Manifestation de la septoriose du blé : Lésion de septoriose juste sous l'épi (A) et Taches nécrotiques avec de petits points brun foncé à noirs (B)	33
Figure 11 : Illustration du stress oxydatif et les facteurs exogènes aggravant au niveau de la peau	34
Figure 12 : Réaction entre le DPPH et un antioxydant donneur de H (AH) Trolox.....	35
Figure 13 : Réaction de dosage du pouvoir antioxydant ferrique (FRAP)	36
Figure 14 : Réaction de réduction du sel monosodique WST-8 en WST-8 formazan.....	37
Figure 15 : Erismadelphus exsul Mildbr (A) et Baillonella toxisperma Pierre (B).....	38
Figure 16 : Variation de la morphologie des fleurs chez les Myrtaceae (A-C) et les Vochysiaceae (D-I)	39
Figure 17 : Distribution mondiale des Vochysiaceae en Amérique du Sud et en Afrique (A) et Phylogénie des genres de Vochysiaceae sur la base de données moléculaires (B). Le genre Korupodendron n'est pas inclus par manque de matériel pour les analyses d'ADN mais celui-ci est de toute évidence un proche parent de Erismadelphus exsul.	39
Figure 18 : Structures chimiques de quelques métabolites secondaires isolés des plantes appartenant à la famille des Vochysiaceae.....	42
Figure 19 : Morphologie des fleurs et feuilles chez les Sapotaceae : A : Niemeyera chartaceae ; B : Niemeyera anti-loga ; C : Van-royena castanosperma ; D : Pycnandra belepensis ; E : Pichonia deplanchei, F : Feuille d'herbier Baillonella toxisperma	43
Figure 20 : Distribution mondiale des Sapotaceae : Cas des Chrysophylloideae (Amérique du Sud et Australie) et Sapotoideae (Afrique et Asie) (Ericales mobot.org).....	44
Figure 21 : Distribution mondiale des Sapotaceae : Cas des Sarcospermatoideae restreintes en Asie (Ericales mobot.org)	44
Figure 22 : Aire de répartition de Baillonella toxisperma en Afrique. (1) L'aire de répartition de B. toxisperma en grisé sur la zone des forêts du bassin guinéo-congolais. (2) Les principales zones d'abondances de B. toxisperma en Afrique centrale	45
Figure 23 : Structures chimiques de quelques métabolites secondaires isolés des plantes appartenant à la famille des Sapotaceae	47
Figure 24 : Schéma global d'un spectromètre de masse présentant les sources et analyseurs disponibles pour l'analyse des biomolécules	50
Figure 25 : Schéma général de la chromatographie en phase liquide à haute performance.....	52

Figure 26 : Flux de travail schématique de déréplication/élucidation des structures dans la chimie des substances naturelles.....	56
Figure 27 : Processus de création d'un réseau moléculaire.....	57
Figure 28 : Carte du Gabon montrant en rouge la zone de récolte carte-parcs-nationaux-gabon.jpg (1689×1560) (actualitix.com)	61
Figure 29 : Procédure d'extraction et fractionnement : extraction par macération sous agitation (A) ; filtration (B) ; chromatographie sur colonne (C, D) et fractions (E)	65
Figure 30 : LINOMAT 5 CAMAG (A) et TLC VISUALIZER 2 CAMAG (B)	66
Figure 31 : Images HPLC préparative équipé d'un système LC-20AD (A) et HPLC-UV équipé d'un système LC-2010HT (B).....	67
Figure 32 : Préparation des échantillons pour les analyses HPLC-UV-MS/MS	68
Figure 33 : Schéma résumé des Analyses LC-MS/MS et la construction des réseaux moléculaires	70
Figure 34 : RMN 600 MHz plate-forme analytique UPJV (Photo prise par Morel ESSONO)	71
Figure 35 : Extraits de plante préparés à une concentration de 50 mg/mL.....	74
Figure 36 : Coulage des milieux de culture (A) et dépôt des disques sur boîte de Petri (B).....	76
Figure 37 : Activité anti-oomycète et inhibition de la croissance mycélienne	79
Figure 38 : Mécanisme réactionnel test du FRAP	80
Figure 39 : Mécanisme réactionnel test du DPPH	81
Figure 40 : Enquête ethnopharmacologique : partie de la plante utilisée (A) ; méthodes de préparations de recettes (B) ; nombre de plantes par famille (C); pourcentage de chaque famille de plante (D).....	83
Figure 41 :Schéma d'extraction (extraits méthanolique et éthanolique) de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	86
Figure 42 : Total Ion Chromatogram (TIC) de l'extrait éthanolique des écorces de tronc de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr obtenu par CLHP-UV-MS ESI(+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18. Le numéro au-dessus de chaque pic correspond au numéro de pic sur le Tableau 6.....	87
Figure 43 : Le réseau moléculaire de l'extrait brut éthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i> obtenu à l'aide de la plateforme GNPS et visualisé avec le logiciel Cytoscape 3.9.0.....	90
Figure 44 : Le réseau moléculaire de l'extrait brut éthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i> : Cluster A et B	91
Figure 45 : Fractionnement de l'extrait brut éthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i>	95
Figure 46 : Chromatographie sur couche mince (CCM) des fractions éthanoliques de <i>Erismadelphus exsul</i> . Phase mobile : dichlorométhane/méthanol (70/30). (A) UV 365 nm, (B) UV 254 nm. Chromatogramme 3D montrant en rouge les absorbances (AU) des fractions avec un profil différent et en bleu celles avec un profil similaire (C)	95
Figure 47 : Activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique brut et des fractions de l'écorce d' <i>Erismadelphus exsul</i> sur <i>Phytophthora infestans</i> (A,C,E) et <i>Zymoseptoria tritici</i> (B,D,F), respectivement trois et onze jours après l'inoculation des pathogènes dans des microplaques à 12puits.....	100
Figure 48 : Focalisation sur le cluster des ions d'intérêt antioxydants contenus dans la fraction F8.....	103
Figure 49 : Focalisation sur le cluster des ions d'intérêt antimicrobien contenus dans les fractions F1, F3 et F4	104
Figure 50 : Spectres de masse des ions [M+H] ⁺ de l'Antidesmone, la 8-Dihydroantidesmone et la 8-Deoxoantidesmone obtenus par LC-ESI-MS	105

Figure 51 : Spectres de masse des ions $[M+H]^+$ de la Mauratine F (5), la Mauratine A (6) et la Mauratine A N-oxyde (7), obtenus par LC-ESI-MS.....	106
Figure 52 : Schéma de fractionnement et purification de la sous-fraction F4 éthanolique.....	107
Figure 53 : Profil chromatographique UV à 280 nm de la mauratine A (A) et la mauratine F (B) isolé de la sous-fraction F4 éthanolique des écorces de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	108
Figure 54 : Différentes relations entre les composés du cluster C : alcaloïdes cyclopeptidiques	109
Figure 55 : Superposition des spectres RMN proton 1H de la Mauratine A (1) et la Mauratine F (2), MeOH d ₄ , RNM 600 MHz.....	109
Figure 56 : Total Ion Chromatogram (TIC) de l'extrait méthanolique des écorces de tronc de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr obtenu par CLHP-UV-MS ESI(+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18	110
Figure 57 : Réseau moléculaire de l'extrait brut méthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i> obtenu à l'aide de la plateforme GNPS et visualisé avec le logiciel Cytoscape 3.9.0.....	113
Figure 58 : Réseau moléculaire de l'extrait brut méthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i> : présentation du cluster A	114
Figure 59 : Réseau moléculaire de l'extrait brut méthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i> : présentation du cluster B	115
Figure 60 : Réseau moléculaire de l'extrait brut méthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i> : présentation du cluster C	116
Figure 61 : Activité antibactérienne : (A) Diamètre de zone d'inhibition DZI ; (B) CMI et CMB de quelques fractions de la plante <i>Erismadelphus exsul</i>	120
Figure 62 : Profil chromatographique CLHP-UV-MS de la fraction F1 méthanolique.....	120
Figure 63 : Profil chromatographique CLHP-UV-MS de la fraction F2 méthanolique.....	121
Figure 64 : Profil chromatographique CLHP-UV-MS de la fraction F3 méthanolique.....	121
Figure 65 : Profil chromatographique CLHP-UV-MS de la fraction F6 méthanolique.....	121
Figure 66 : Focalisation sur le cluster C les ions d'intérêt contenu dans les fractions F5	123
Figure 67 : Analyse par CLHP-UV-MS de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> ESI (+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18.....	124
Figure 68 : Analyse par CLHP-UV-MS de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> ESI (+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18	125
Figure 69 : Réseau moléculaire des métabolites secondaires produits par les extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> généré à partir des données LC-MS/MS. Les nœuds sont étiquetés avec les valeurs m/z correspondantes (détectées en mode positif)	126
Figure 70 : Réseau moléculaire des extraits de feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> cluster A	127
Figure 71 : Réseau moléculaire des extraits de feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> cluster B	128
Figure 72 : Agrandissement des clusters C,D et E	129
Figure 73 : Agrandissement de la partie de nœuds non liés (Selfloop)	130
Figure 74 : Focalisation sur les ions d'intérêt antioxydant contenus dans l'extrait feuille.....	136
Figure 75 : Spectre MS (A) et MS/MS (B) de la vitexine contenu dans l'extrait brut éthanol active	137
Figure 76 : Proposition de fragmentation de la vitexine dans l'extrait brut de <i>Erismadelphus exsul</i>	138
Figure 77 : Cytotoxicité des feuilles (A et C) et des écorces (B et D) de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr (EA) sur les cellules HaCaT et Caco-2.	140

Figure 78 : Schéma d'extraction et fractionnement de de <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	141
Figure 79 : Base Peak Chromatogram (BPC) de l'extrait éthanolique des écorces de tronc de <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre obtenu par CLHP-UV-MS ESI(+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18.....	142
Figure 80 : Réseau moléculaire de l'extrait brut éthanolique de <i>Baillonella toxisperma</i> obtenu à l'aide de la plateforme GNPS et visualisé avec le logiciel Cytoscape 3.9.0.....	145
Figure 81 : Réseau moléculaire de l'extrait brut éthanolique de <i>Baillonella toxisperma</i> : présentation des cluster A, B, C, D et E	146
Figure 82 : Inhibition in-vitro de la croissance mycélienne des extraits et fractions des écorces de tronc de <i>Baillonella toxisperma</i> sur <i>Phytophthora infestans</i>	150
Figure 83 : Analyses par CLHP-UV-MS de la fraction F2 éthanolique de <i>Baillonella toxisperma</i>	151
Figure 84 : Analyses par CLHP-UV-MS de la fraction F4 éthanolique de <i>Baillonella toxisperma</i>	152
Figure 85 : Spectre masse des ions [M+H] ⁺ des composés (3), (4) et (5) de la fraction F4 éthanolique	153
Figure 86 : Cytotoxicité des écorces de <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre sur les cellules HaCaT (a) et Caco-2 (b). 154	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Niveau de confiance des annotations Metabolomics Society énoncé par Blaženović	56
Tableau 2 : Fiche d'enquête ethnopharmacologique sur les plantes médicinales gabonaises utilisées dans le traitement des maladies microbiennes.....	64
Tableau 3 : Concentration et familles des antibiotiques utilisés comme contrôles	75
Tableau 4 : Dilution pour les solutions de standard	81
Tableau 5 : Plantes récoltées pendant l'enquête ethnopharmacologique	85
Tableau 6 : Composés annotés dans l'extrait éthanolique des écorces de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr grâce aux données de spectrométrie de masse	88
Tableau 7 : Composés annotés sur le réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de <i>Erismadelphus exsul</i>	93
Tableau 8 : Activité antioxydante de l'extrait brut et des fractions d' <i>Erismadelphus exsul</i>	97
Tableau 9 : Diamètre de zone d'inhibition (DZI) extrait et fractions éthanolique <i>Erismadelphus exsul</i>	98
Tableau 10 : CMI et CMB de l'extrait et fractions éthanolique <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	98
Tableau 11 : Diamètres des colonies <i>in vitro</i> (mm) obtenus à l'aide de deux expériences indépendantes pour <i>Phytophthora infestans</i> et <i>Zymoseptoria tritici</i> à différentes concentrations d'extrait brut et de huit fractions de l'écorce d' <i>Erismadelphus exsul</i>	101
Tableau 12 : Composés annotés dans l'extrait méthanolique des écorces de <i>E. exsul</i> Mildbr grâce aux données de spectrométrie de masse	111
Tableau 13 : Composés annotés sur le réseau moléculaire de l'extrait méthanolique des écorces de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	117
Tableau 14 : Diamètre de zone d'inhibition (DZI) extrait et fractions méthanolique <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	119
Tableau 15 : Concentration minimale inhibitrice et bactéricide CMI/CMB extrait et fractions méthanolique <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	119
Tableau 16 : Concentration minimale inhibitrice et bactéricide CMI/CMB extrait et fractions méthanolique <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	122
Tableau 17 : Composés annotés grâce aux réseaux moléculaires partie feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	131
Tableau 18 : Propriétés antioxydantes de l'extrait brut feuille et des fractions de <i>Erismadelphus exsul</i> Mildbr	135
Tableau 19 : Résumé des IC ₅₀ des écorces et feuilles de <i>Erismadelphus exsul</i> sur les cellules HaCaT et Caco-2	141
Tableau 20 : Composés annotés dans l'extrait éthanolique des écorces de <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre grâce aux données de spectrométrie de masse	143
Tableau 21 : Composés annotés sur le réseau moléculaire de l'extrait éthanolique des écorces de tronc de <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	147
Tableau 22 : Diamètre de zone d'inhibition extrait et fractions éthanoliques <i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	149
Tableau 23 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) extrait et fractions éthanolique de <i>B. toxisperma</i> Pierre	149
Tableau 24 : Activité anti-oomycète de <i>Baillonella toxisperma</i> sur <i>Phytophthora infestans</i>	150

Liste des sigles et abréviations

Ac Clav : Acide clavulanique
ADAP : Automated data analysis pipeline
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
AH : Antioxydants donateurs de protons
AIEC : *Escherichia coli* adhérentes invasives
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique
APEC : *Escherichia coli* pathogènes aviaires
ATCC : American type Culture Collection
AU : Absorbance Units
BLSE : Bêta-lactamase à spectre étendu
BPC : Base Peak Chromatograms
CaCo-2 : Cellules épithéliales de côlon humain immortalisés d'adénocarcinome colorectal
CC : Chromatographie sur Colonne
CCM : Chromatographie sur couche mince
CCK-8 : Cell Counting Kit-8 (Kit de comptage de cellule)
CID : Collision Induced Dissociation (dissociation induite par collision)
CIRMF : Centre International de Recherches Médicales de Franceville
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CLHP-MS : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse
CLHP-Q-TOF-MS² : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse tandem (Analyseur Quadripôle et Temps de Vol)
CMB : Concentration minimale bactéricide
CMI : Concentration minimale inhibitrice
COSY : Correlation Spectroscopy
DAD : Diode Array Detector (Détecteur UV à barrette de diodes)
DCM : Dichlorométhane
DDA : Acquisition dépendante des données
DNP : Dictionary of Natural Products
DIA : Acquisition indépendante des données
DMI : Inhibiteurs de la déméthylation
DO : Densité Optique
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DEPT-135 : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DPPH : 2,2-Diphényl 1-picrylhydrazyle
DW : Dry weight (poids sec)
DZI : Diamètre de zone d'inhibition
 δ_H : déplacement chimique du proton
 δ_C : déplacement chimique du carbone
EAEC : *Escherichia coli* entéro-aggrégatives
ECACC : European Collection of Authenticated Cell Culture
ECHEC : *Escherichia coli* entérohémorragiques
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EIEC : *Escherichia coli* entéro-invasifs
EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogènes

ESI : Ionisation par électronébuliseur (Electrospray Ionisation)
ETEC : *Escherichia coli* entérotoxigènes
eV : Electronvolt
ExPEC : *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux
FB : Formule brute
FRAP : Ferric Reducing Ability of Plasma (Pouvoir réducteur ferrique du plasma)
FIA : Flow Injection Analysis (Analyse par injection de flux)
GC : Chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography)
GHz : Giga Hertz
GNPS : Global Natural Molecular Networking
GNPS-FBMN : Global Natural Molecular Networking-Feature Based Molecular Networking
HaCaT : Cellules kératinocytes humaines
HMDB : Human Metabolome Database
HMBC : Heteronuclear multiple-bond correlation
HPLC : Chromatographie liquide haute performance (high performance liquid chromatography)
HR- MS : Haute Résolution Masse Spectrométrie
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
IBS : Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols
IC₅₀ : Concentration qui réduit ou qui inhibe 50%
InPEC : *Escherichia coli* pathogènes intestinaux
IPHAMETRA : Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle
IR : Infra-Rouge
IU : Infection Urinaire
J : Constante de couplage
MCR-1 : Colistin Resistance Gene (gène de résistance à la colistine)
MDR : Multidrug Resistant
MTA : Médicament traditionnel amélioré
MS : Mass spectrometry (spectrométrie de masse)
MS/MS ou MS² : Spectrométrie de masse en étapes
MN : Molecular Networking
nm : Nanomètre
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite)
NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)
NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme oxydée)
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NCI : National Institute of Cancer
NI : Niveau d'identification
NMEC : *Escherichia coli* associées à la méningite néonatale
MeOD : Méthanol deutéré
MH : Mueller Hinton
m/z : masse sur la charge
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PDE-4 : Phosphodiesterase-4 inhibitor
PLA2 : Phospholipase A2
ppm : Partie par million
Pi : Pourcentage d'inhibition
Psi : Pound Per square inch (Livre par pouce carré)

Q/TOF : Quadripôle/Temps de Vol
QoI : Quinone outside Inhibitor
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPM : Revolutions Per Minute
RT : Temps de Rétention
ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
SEPEC : *Escherichia coli* associées à la septicémie
SDHI : Inhibiteurs de la Succinate Déshydrogénase
STB : Septoria tritici blotch (Tache de Septoria tritici)
SVF : Serum de Veau Fœtal
TLC : Thin Layer Chromatography
TIC : Total Ion Chromatogram
ToF : Time-of-flight (analyseur à temps de vol)
TSB-D : Bouillon Trypcase Soja
u.m.a : Unité de masse atomique
UPEC : *Escherichia coli* uropathogènes
UV : Ultra-Violet
VIH : Virus de l'immunodéficience Humain
WHO : World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)
WST-8 : Water-Soluble Tetrazolium dye

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, l'être humain a souvent eu recours aux plantes médicinales pour répondre à ses besoins[1]. Il s'en sert traditionnellement pour se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture et conserver les aliments. Les premières traces écrites relatant de l'usage des plantes médicinales par l'Homme remontent à l'époque sumérienne et akkadienne en Mésopotamie, où des tablettes d'argile, datées du troisième millénaire avant J. C. décrivent l'utilisation de remèdes à base des plantes, certains servent encore aujourd'hui pour le traitement des maladies parasitaires[2]. Des textes égyptiens très anciens comme le papyrus Ebers, datant de 1500 ans avant J. C. décrivent l'usage de 850 plantes[3]. La *Materia medica* chinoise est une médecine savante largement documentée avec les premiers écrits datant d'environ 1100 avant J.C[4]. D'autres civilisations ont marqué l'Histoire de la médecine et la pharmacopée. C'est le cas des Grecs et les Romains, qui ont contribué à l'évolution de l'usage des plantes médicinales par les peuples occidentaux. Les Arabes, quant à eux, ont permis la diffusion du savoir gréco-romain à leur peuple, notamment grâce à la traduction des textes durant le Moyen-Age[5]. En Afrique, les traditions médicinales sont transmises de manière orale de génération en génération, leur genèse est également a priori très ancienne.

De nos jours, la médecine traditionnelle apporte une contribution importante à l'état de santé de nombreuses communautés, y compris les communautés des pays développés. Une reconnaissance appropriée de cette médecine constitue un élément important de politique de santé mondiale[6]. Pendant la dernière décennie, le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt dans le monde. «En Chine, 40 % environ de l'ensemble des soins de santé relève de la médecine traditionnelle. Au Chili et en Colombie, 71 % et 40 % de la population, respectivement, a recours à la médecine traditionnelle. En Inde, 65 % de la population rurale utilise les plantes médicinales au niveau des soins de santé primaires. Dans d'autres pays, les médecines traditionnelles, complémentaires et parallèles connaissent un succès croissant. Ainsi, le pourcentage de la population ayant eu recours à ces médecines au moins une fois est de 48 % en Australie, 31 % en Belgique, 70 % au Canada, 49 % en France et 42 % aux Etats-Unis d'Amérique»[7]. D'après les données fournies par l'OMS, 80% de la population mondiale traitent leurs problèmes de santé par des remèdes traditionnels, d'une part, à cause des difficultés d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne, et d'autre part, parce que les plantes ont une meilleure efficacité et sont parfois moins toxique que les médicaments de synthèse[8,9,10]. Ces dernières années, l'OMS s'est prononcée en faveur de l'intégration de la médecine traditionnelle dans les dispositifs de santé mondiale[11]. L'enjeu majeur demeure la mise en œuvre des systèmes nationaux de soins de santé, de manière appropriée, en développant des systèmes et des programmes de politique de médecine traditionnelle appropriés pour chaque pays.

En Afrique, et particulièrement au Gabon, les plantes médicinales jouent un rôle très important dans le traitement d'une grande variété de maladies y compris les maladies d'origine microbiennes[12,13,14]. En ce sens, la pharmacopée des populations gabonaises représente un potentiel considérable et près de 55% des habitants utilisent la médecine traditionnelle pour les soins de santé primaires[15].

Le Gabon est couvert de forêts tropicales primaires qui recèlent un potentiel végétal exceptionnel, qui reste à étudier et à valoriser[15],[16]. Cette valorisation d'espèces médicinales passe principalement par des études chimiques et biologiques à travers l'analyse et l'identification des constituants bioactifs. Au cours des dernières années, des avancées marquantes en chimio-informatique, centrées sur le traitement des données de spectrométrie de masse, ont considérablement modifié la chimie des substances naturelles[17]. En effet, de véritables procédures automatisées sont désormais intégrées à la pratique actuelle de cette discipline. Ces procédures englobent une suite de logiciels qui gèrent l'acquisition, l'organisation, la visualisation et l'annotation des données métabolomiques et génomiques[18],[19]. Dans ce contexte, la mise en réseau moléculaire a été largement adoptée par la communauté comme un outil polyvalent pour cartographier les données de LC-MS/MS, et plusieurs études utilisant cette méthodologie ont prouvé son efficacité[20]. Ainsi, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) et l'approche du réseau moléculaire ont été utilisées dans cette étude afin d'identifier et cibler rapidement les composants chimiques présents dans *Erismadelphus exsul* Mildbr (Vochysiaceae) et *Baillonella toxisperma* Pierre (Sapotaceae) deux plantes utilisées en médecine traditionnelle gabonaise dans le traitement des affections d'origine microbiennes.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Picardie Jules Verne (UPJV) et l'Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM). L'objectif général étant de valoriser scientifiquement l'usage de ces deux plantes en médecine traditionnelle gabonaise. Ce travail s'est effectué sur 6 sites : i) laboratoire BIOPI, UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE (UPJV) ; ii) Centre International de Recherches Médicales de Franceville Gabon (CIRMF) ; iii) laboratoire de Recherches en Biochimie (LAREBIO) de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku ; iv) Plate-forme Analytique (PFA) de l'UPJV ; v) UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE, Institut Charles Violette de l'Université de Lille et vi) au laboratoire des Métabolites Spécialisés d'origines Végétales, UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE, JUNIA de Lille.

Ce manuscrit est articulé autour de trois parties. La première partie, synthèse bibliographique. Dans cette partie, nous faisons une mise au point bibliographique décrivant les notions essentielles à la compréhension du travail (généralité sur les plantes médicinales, importance de l'ethnopharmacologie dans la sélection des plantes, activités biologiques des plantes médicinales, résistances microbiennes, familles des plantes étudiées et les méthodes analytiques

utilisées pour l'identification des métabolites). La seconde partie matériels et méthodes. Dans cette partie, seront présentées les méthodologies expérimentales utilisées notamment i) la démarche employée pour la récolte des plantes et la présentation de la zone d'étude, ii) les études chimiques (procédures d'extraction et de fractionnement, analyses chromatographiques, analyses LC-MS/MS et RMN, construction des réseaux moléculaires), iii) les études biologiques (cytotoxicité, activités antimicrobiennes et antioxydantes). La troisième partie résultats et discussion. Dans cette partie, seront présentés les résultats obtenus, une discussion générale de l'ensemble du travail et à la fin une conclusion qui résumera les principaux résultats présentés dans cette thèse et les diverses perspectives de recherches qui pourront être apportées.

PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITE SUR LES PLANTES MEDICINALES

1. Définition d'une plante médicinale

La Pharmacopée française dans sa X^{ème} édition, définit une plante médicinale comme « une drogue végétale au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses »[21]. Les plantes médicinales peuvent également avoir d'autres usages notamment l'usage alimentaire, condimentaires et hygiénique. Autrement dit, une plante médicinale est une plante dont au moins un organe, par exemple la feuille, l'écorce ou la racine, possède des propriétés curatives lorsqu'il est utilisé à une dose précise et d'une manière raisonnable. Dans le Code de la Santé Publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale d'un point de vue juridique[21]. Pourtant en France, une définition officielle est donnée par la jurisprudence : « une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et qu'elle est d'usage exclusivement médicinal ». Cela sous-entend que les plantes médicinales sont uniquement présentées pour leurs propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Dans le seul cas où ces deux conditions sont réunies, alors la plante appartient à l'usage pharmaceutique.

2. Médecine traditionnelle et pharmacopée africaine : cas du Gabon

Contrairement à la médecine moderne qui prend son sens sur l'expérimentation conduite préalablement selon une méthodologie rationnelle, avec un raisonnement et une question de recherche qu'on s'attache à vérifier, la médecine traditionnelle s'appuie, principalement, sur l'observation et des expériences plutôt personnelles, tout en prenant en compte le contexte socio-culturel et bien évidemment les convictions ethniques des peuples[22]. La médecine traditionnelle africaine est l'ensemble de connaissances tout à fait empiriques qu'ont les africains sur les propriétés des plantes médicinales[23].

Au Gabon, le savoir sur l'utilisation des plantes comporte plusieurs secrets et connaissances qui se transmettent essentiellement de père en fils, de mère en fille ou de génération en génération. Les guérisseurs ou tradipraticiens utilisent les plantes par conscience et conviction qu'elles contiennent des substances capables de soulager et guérir un certain nombre de pathologies connues[24]. Toutefois, la dimension spirituelle des pratiques médicinales n'est pas exclue dans la conception des recettes permettant de soulager rapidement les affections bénignes ou complexes. Généralement, les plantes dont disposent les tradipraticiens possèdent des propriétés pharmacologiques, bien que pour eux, ce qui donne la guérison est la force spirituelle du savoir ancestral qui leur a été enseignée. Ainsi, le guérisseur maîtrise la forêt et parvient à classer les plantes par catégories, en fonction de leurs usages : les plantes capables de soulager les troubles digestifs, celles qui guérissent les maladies cutanées, maladies microbiennes etc. En quelque sorte, ils connaissent exactement la plante qu'il faut administrer d'un symptôme à un autre.

Dans le but de transcrire la pharmacopée gabonaise et promouvoir une collaboration entre les deux médecines (traditionnelle et conventionnelle), il a été créé en 1978, au Gabon, l'Institut National de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle (IPHAMETRA) qui dispose d'un département de médecine traditionnelle dont l'activité est d'œuvrer avec les tradipraticiens afin de répertorier les plantes médicinales utilisés par les communautés gabonaises dans leurs coutumes (Figure 1) [25].



Figure 1 : Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle du Gabon (IPHAMETRA)

([Source : IPHAMETRA 2022](#))

L'IPHAMETRA intègre les tradipraticiens avec le statut de partenaire dans plusieurs équipes mixtes de recherche avec pour objectif la mise au point des MTA (médicaments traditionnels améliorés). Dans cette collaboration, les tradipraticiens fournissent aux chercheurs les noms, et la composition des produits qui leur servent dans le traitement de différentes maladies[25]. Les chercheurs, par la suite, réalisent des études ethnobotaniques, ethnopharmacologiques et des études phytochimiques, afin d'identifier les molécules ou principes actifs responsables des différentes activités biologiques mais également fournir une preuve d'innocuité de ces préparations traditionnelles. A ce jour, plusieurs MTA ont été produits par les équipes de recherches du dit institut et sont disponibles dans différentes pharmacies du Gabon. C'est le cas du «PALMILANT» un médicament présentant des propriétés antibiotiques, antalgiques, anti-inflammatoires et cicatrisantes (Figure 2). On note également l'IBOGA GEL qui lutte contre la fatigue ; l'HYDROCOMB contre les boutons de rasage et piqûres de moustiques ; le NAPODIAB contre le diabète ; l'IRONA contre la toux sèche et le CYCLICRAMP contre la crampe[26].



Figure 2 : Image d'un médicament traditionnel amélioré (MTA) «PALMILANT»

(Source :IPHAMETRA 2016)

3. Ethnopharmacologie et médecine traditionnelle

« Dos Santos J.R et Fleurentin J. (1990), définissent l'ethnopharmacologie comme étant l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale, et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier les états des organismes vivants, à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques »[27]. Autrement dit, l'ethnopharmacologie est une discipline qui s'intéresse à toutes les formes de médecines traditionnelles et les remèdes constituant les pharmacopées[28]. Dans son étymologie, le terme «ethno pharmacologie» ou «ethno pharmacognosie» viennent de «pharmakon» en grec qui signifie remède, « ethno » qui veut dire peuple, «gnôsis» connaissances et «logos» signifie science. L'ethnopharmacologie a donc pour mission de déterminer les ingrédients importants pour la préparation des remèdes ou poison vernaculaire, à comprendre les modes de préparation, analyser pour chaque ingrédient la composition chimique, afin de répertorier dans chaque préparation ou recette la substance ou le principe actif responsable de l'activité constatée et de décrire avec précision le mécanisme[29]. Au sein de l'ethnopharmacologie se regroupent plusieurs autres sciences notamment les sciences de l'Homme (anthropologie, histoire, linguistique) et les sciences de la Nature (botanique, pharmacologie, toxicologie, chimie et agronomie). De nos jours, l'ethnopharmacologie est confrontée à plusieurs défis :

- Le recensement et la compréhension des savoirs traditionnels dans le monde, plus particulièrement les pays où la tradition est orale, de peur que ce savoir ancestral ne disparaisse.

- Inventorier les plantes médicinales et d'autres produits naturels et surtout définir une bonne politique de pharmacopée traditionnelle.
- Évaluer les activités des médicaments traditionnels, les classer en fonction de leurs effets pharmacologiques.
- Valider scientifiquement l'utilisation des remèdes traditionnels particulièrement les remèdes faits à base des plantes.
- L'une des priorités majeures demeure le retour de ces informations scientifiques auprès des informateurs (tradipraticiens) pourvu que le travail de l'ethnopharmacologue permette d'intégrer la médecine traditionnelle dans le système de santé où elle est inexistante. Ainsi l'ethnopharmacologie contribue à l'avènement de solutions alternatives durables aux problèmes sanitaires des populations des pays en voie de développement.

4. Généralité sur les méthodes et paramètres utilisé(e)s pendant une enquête ethnopharmacologique

4.1 Collecte des données

La collecte des données sur le terrain est effectuée auprès des médecins traditionnels (tradipraticiens), ayant une bonne connaissance des plantes médicinales. La transmission des connaissances repose le plus souvent sur un apprentissage oral. Durant l'apprentissage et en fonction des objectifs, il est possible de cibler l'étude sur une indication thérapeutique donnée (enquête ciblée), par exemple, rechercher les plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des affections d'origine microbienne, ou faire une étude non ciblée, dans ce cas on recense toutes plantes utilisées par les tradipraticiens quelle que soit la maladie (enquête généralisée). Dans cette étude, la méthode ciblée a été choisie. Pendant la récolte, le tradipraticien vous amène dans différentes zones végétatives et durant la marche en forêt, l'usage thérapeutique (le mode de préparation des recettes, la durée du traitement, la dose, etc.) des plantes récoltées vous sont transmises oralement. Toutes ces indications sont ensuite notées sur une fiche d'enquête ethnopharmacologique.

4.2 Période et lieu de récolte

La période et le lieu de récolte sont deux paramètres très importants dans la récolte des plantes. Ces paramètres influent sur la diversité et la variabilité des constituants chimiques de la plante et jouent également un rôle important dans la synthèse des métabolites secondaires de la plante. Ce qui impacte directement sur les études phytochimiques et les propriétés pharmacologiques de la plante. En fonction du biotope d'une plante, certains paramètres peuvent évoluer, pour cela il est primordial de noter avec précision la période et le lieu de récolte d'une plante.

4.3 Mode de séchage et conservation des échantillons

Chez les plantes la composition chimique et les propriétés pharmacologiques peuvent varier en fonction de leur état (frais ou sec), leur stade de maturité (plante ou plantule) mais aussi selon la méthode de séchage utilisée [séchage naturel (au soleil, à l'ombre) ou séchage à l'aide d'un four à micro-onde par exemple]. Les conditions de conservation des plantes (luminosité, température, hygrométrie ou taux d'humidité) peuvent être à l'origine de modification de la composition chimique impliquant parfois la perte de l'activité pharmacologique de la plante.

4.4 Mode de préparation des recettes

Les médecins traditionnels utilisent le plus souvent l'eau comme solvant principal pour la préparation des recettes dont la prise se fait par voie orale[30]. A partir des plantes (fraîches, sèches, coupées ou broyées), les principes actifs solubles dans l'eau sont extraits soit par macération, infusion ou par décoction. Dans certains cas, les préparations alcooliques dans du vin de palme, vin de canne à sucre ou du whisky sont souvent vues, utilisées par inhalation, sous forme de bains de vapeur ou de fumigation. Quelques fois, les poudres sont également utilisées directement. Dans ce cas, les plantes sont séchées, pulvérisées (pulvérisation manuelle) puis administrées avec différents excipients (exemple de l'huile de noix de palme ou du miel). Pour les affections de la peau, la voie locale par utilisation des pommades est très fréquente[31]. Parfois, les bains de vapeur et frictions accompagnent le traitement par voie orale. Il existe aussi des préparations laxatives sous forme de lavement anorectal pour soulager les ballonnements de ventre.

4.5 Travail de laboratoire et perte d'activité biologique

Le plus souvent, le travail en laboratoire débute avec une sélection des plantes, puis complétée par des données chimio taxonomiques et une bonne étude bibliographique faisant le point sur les connaissances scientifiques des espèces de plantes étudiées. La conservation de l'activité pharmacologique va dépendre dans la plupart des cas de la préparation des extraits bruts. Au cours de cette préparation, il est souhaitable de rester le plus près possible des préparations traditionnelles. L'idéal étant de récupérer directement l'extrait traditionnel pendant l'enquête ethnopharmacologique. Le mode de préparation traditionnel utilise le plus souvent la décoction des plantes fraîches tandis qu'en laboratoire, les plantes sont préalablement séchées et pulvérisées. Ce qui a potentiellement un impact sur l'activité pharmacologique. En effet, en fonction du type d'extraction et la polarité du solvant d'extraction, la variabilité des principes actifs d'un extrait peut être modifiée. Le choix du solvant peut non seulement modifier la structure des principes actifs dans un extrait de plante (par des réactions d'hydrolyse, d'estérification et d'isomérisation), mais également entraîner la dégradation de certains composés conduisant ainsi, à une perte d'activité pharmacologique.

4.6 Mode d'action des plantes médicinales

Les plantes possèdent plusieurs milliers de substances chimiques actives. Dans la plupart du temps, déterminer de façon précise le mode d'action d'une plante est très difficile, si ce n'est impossible, même lorsque son effet médicinal est bien connu. Les études pharmacologiques des plantes montrent qu'elles fonctionnent comme un puzzle incomplet. Toutefois, bien qu'il soit important de connaître les classes de molécules actives dans la plante, cela n'est toujours pas suffisant, les expériences entre patient d'une part et praticien de l'autre sont souvent le guide le plus sûr pour connaître les effets thérapeutiques des plantes. La valeur curative d'une plante médicinale ne peut donc pas être limitée à la liste de ses principes actifs[32]. Dans la plupart des cas, les substances actives d'une plante médicinale agissent en synergie ce qui rend difficile la mise au point de mécanismes d'action des plantes médicinales. Lorsqu'on utilise une plante entière plutôt que ses principes isolés, l'efficacité de l'ensemble est souvent plus élevée. Un ou plusieurs principes actifs isolés ne permettent pas très souvent de retrouver l'activité biologique de l'ensemble[33].

II. GENERALITE SUR LA RESISTANCE MICROBIENNE AUX ANTIBIOTIQUES ET ANTIFONGIQUES

Les maladies infectieuses notamment celles causées par les bactéries sont l'une des principales causes de mortalité dans le monde[34], environ 17 millions de morts par an dont plus de la moitié proviennent du continent africain[35]. La découverte et l'utilisation des antibiotiques ont été à l'origine des plus grands succès de la médecine au XXème siècle aussi bien en santé humaine que vétérinaire[36]. En effet, les antibiotiques sont des médicaments utilisés pour traiter et prévenir les affections d'origine bactérienne telles que les bronchites, les pneumonies, les otites, les infections urinaires, les méningites et les infections sexuellement transmissibles. Ce sont des molécules organiques naturelles ou synthétiques efficaces contre les microorganismes et très souvent utilisées par l'Homme comme agent de défense contre les affections bactériennes[37]. Il existe plusieurs familles d'antibiotiques qui s'attaquent spécifiquement à une bactérie ou à un groupe de bactéries, à l'exemple des bêta-lactamines qui sont les plus utilisées dans le monde notamment dans les pays émergents comme le Gabon, du fait de leur large spectre d'action, leur efficacité et surtout leur faible coûts[38]. Toutefois, certains antibiotiques vont agir sur les bactéries selon qu'elle soit à Gram négatif ou à Gram positif. Cependant, l'utilisation abusive, inadéquate de ces molécules a compromis leur efficacité. Les bactéries ont, en effet, développé différents mécanismes de résistances afin de rendre inactif ou inefficace les antibiotiques (phénomène de biorésistance)[39]. Ainsi, une souche bactérienne est dite résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est nettement supérieure à celle qu'on peut atteindre *in vitro*. Autrement dit, lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité d'autres souches de la même espèce.

Pour une souche résistante, il existe une probabilité d'échec thérapeutique, quels que soient les traitements et doses d'antibiotiques[40]. D'un point de vue génétique deux types de résistances existent, d'une part, la résistance naturelle (intrinsèque : caractère présent chez toutes les souches de la même espèce) et d'autre part, la résistance acquise qui n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce naturellement sensible. La résistance acquise résulte soit d'une mutation chromosomique, soit de l'acquisition d'un ou de plusieurs gènes qui rendent la bactérie non sensible à l'antibiotique. Différents mécanismes de résistance ont été développés par les bactéries : i) la diminution de la perméabilité cellulaire, ii) modification ou altération de la cible des antibiotiques (expression des protéines liant la pénicilline PLP de moindre affinité pour l'antibiotique), iii) synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques (la cause la plus récurrente de la résistance chez les bactéries à Gram négatif est la production enzymatique des β -lactamases qui altèrent chimiquement les antibiotiques), iv) l'expression intrinsèque des pompes à efflux et la formation de biofilms (cas de *Pseudomonas aeruginosa*) (Figure 3). En plus de ces altérations, les origines des gènes de résistance des bactéries sont multiples, ces

gènes peuvent provenir des mutations chromosomiques, avec un taux variable selon l'espèce bactérienne environ une mutation pour 10^6 - 10^8 bactéries.

Ils proviennent également des échanges de matériels génétiques (plasmides, transposons) entre bactéries et surtout de la capacité de certaines espèces à accepter des gènes de résistance provenant d'autres espèces[37],[41]. Un gène permettant à des *E. Coli* de résister aux antibiotiques de dernier recours a été trouvé chez les animaux et des patients chinois, ce gène MCR-1 était porté par des plasmides[42]. Récemment, on a décrit des éléments d'ADN, les intégrons, dans lesquels les gènes de résistance existent sous forme de cassettes mobiles qui sont réarrangées par une sorte de génie génétique naturel et forment des opérons de résistance fortement exprimés. Le phénomène de résistance aux antibiotiques est un sujet préoccupant pour l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui considère la résistance aux antibiotiques comme l'une des plus graves menaces en santé humaine et vétérinaire.

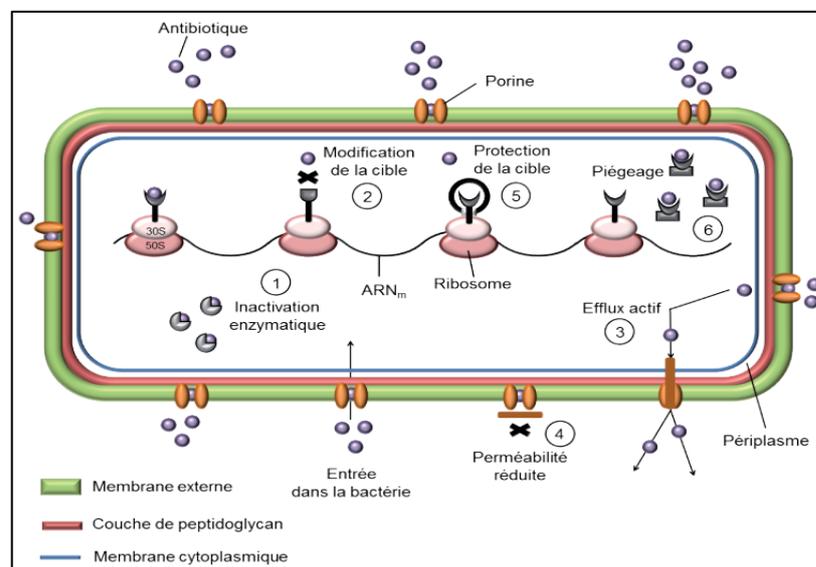


Figure 3 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie à Gram négatif

Adapté par Guardabassi et Courvalin (2006)[43]

1. Substances naturelles et la recherche d'agents antimicrobiens

Ces dernières décennies, il y a eu un grand intérêt pour la recherche et découverte de nouveaux agents antimicrobiens, suite à la recrudescence des infections dues aux micro-organismes résistants aux antibiotiques. En particulier, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de plantes ont formé la base de plusieurs applications, y compris pharmaceutiques, médicales et agroalimentaires. On estime que 25 à 50 % des médicaments actuellement disponibles sont dérivés des plantes[44]. En 2011, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a demandé une intensification de la recherche de nouveaux médicaments car la résistance aux antibiotiques augmente de façon spectaculaire, mais seules quelques nouvelles molécules sont en développement. Les plantes synthétisent plusieurs molécules dotées pour la plupart d'une

activité antibiotique pouvant donc être source de nouveaux médicaments antimicrobiens fiables et relativement sûrs à la fois pour l'homme et l'environnement [10].

2. Pouvoir antibactérien des plantes

2.1. Définition

Le pouvoir antibactérien d'un composé ou d'un extrait de plante peut se définir comme bactéricide (activité létale) ou bactériostatique (inhibition de la croissance). Certaines substances peuvent avoir les deux types de propriétés dépendamment de leur concentration, de la composition chimique et des groupements chimiques présents[45]. La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration d'une substance capable d'inhiber la croissance bactérienne[46]. La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration d'une substance capable de tuer les bactéries. La CMI et la CMB peuvent être déterminées *in vitro* en fonction de la méthode utilisée. Afin d'évaluer le pouvoir antibactérien des différentes plantes sélectionnées dans cette thèse, les méthodes de diffusion sur gélose et de microdilution sur plaque de 96 puits ont été utilisées[47].

2.2. Méthode de diffusion

Méthode généralement utilisée pour déterminer le pouvoir antibactérien d'un composé ou un extrait de plante. Elle consiste à ensemencer un inoculum (suspension bactérienne) à une concentration standardisée sur une gélose et y déposer ensuite un disque stérile de papier buvard imbibé d'une concentration définie de composé à tester. Après une incubation à température optimale pour la croissance du microorganisme sur lequel l'étude porte, la présence d'un halo clair autour du disque (diamètre de zone d'inhibition de croissance DZI), dont le diamètre est mesuré, permet d'objectiver la capacité antibactérienne d'un composé ou extrait de plante (Figure 4). Le diamètre de zone d'inhibition, correspond ainsi au gradient de concentration de la molécule lors de sa diffusion dans la gélose, cette concentration est inversement proportionnelle à la CMI[48].

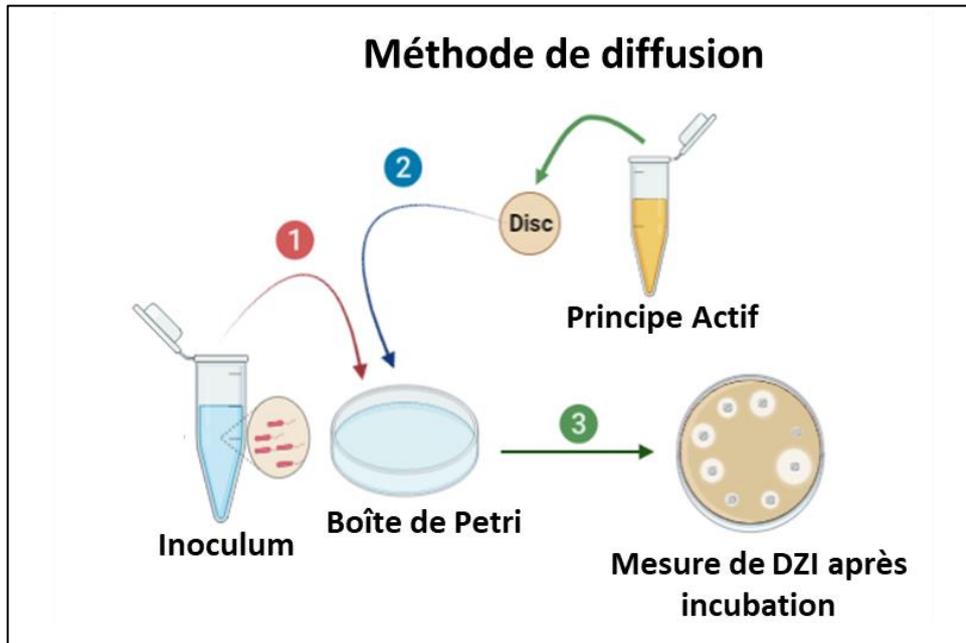


Figure 4 : Méthode de diffusion pour la détermination des diamètres de zone d'inhibition DZI
Crée par Essono Morel avec Biorender.com, 2021, <https://app.biorender.com/biorender-templates>

2.3. Méthode de microdilution

Le principe de la microdilution sur microplaque de 96 puits consiste à présenter une molécule ou un extrait de plante à différentes concentrations dans un bouillon de culture contenant une quantité de microorganismes identiques. Après incubation adaptée au microorganisme, l'efficacité de la substance, correspondant à la perte de turbidité du milieu, est vérifiée[49]. Ainsi, il est possible de déterminer la plus faible concentration d'un composé nécessaire à l'inhibition de la croissance ou la mort d'un microorganisme spécifique (Figure 5). Cette méthode standardisée permet de donner une valeur soit à la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) ou à la CMB (Concentration Minimale Bactéricide)[50]

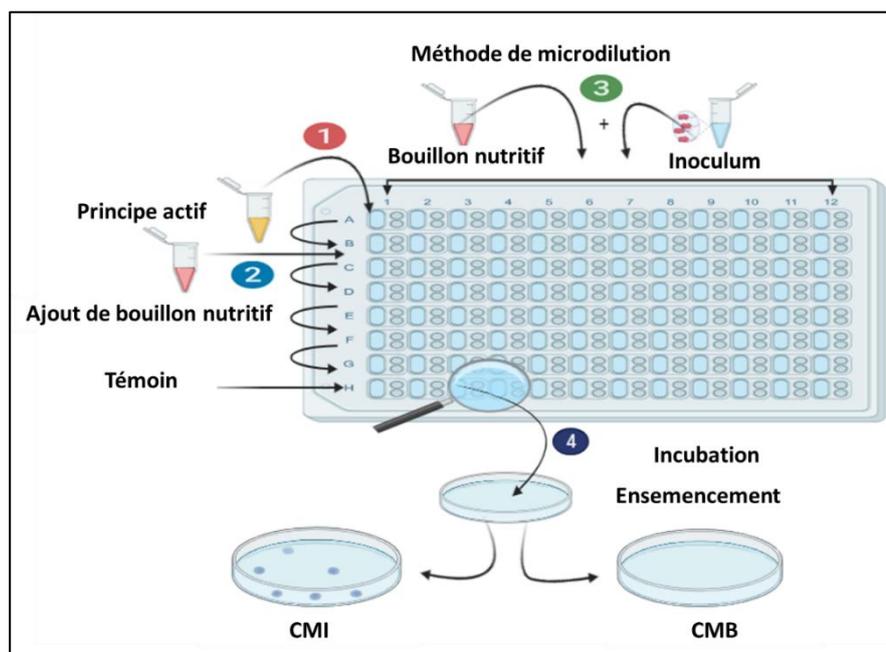


Figure 5 : Méthode de microdilution pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

Crée par Essono Morel avec Biorender.com, 2021, <https://app.biorender.com/biorender-templates>

3. Caractéristiques des souches microbiennes testées

Du fait de la résistance élevée des bactéries à Gram négatif (*Enterobacteriaceae*), nos extraits ont été testés contre cinq (5) souches bactériennes appartenant à ce groupe. Parmi ces bactéries deux souches de référence (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Escherichia coli* ATCC 8739) et trois souches multirésistantes (*Klebsiella pneumoniae* Multidrug Resistant MDR, *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* bêta lactamase à spectre élargi BLSE). Nos extraits ont également été testés sur l'ascomycète *Zymoseptoria tritici* (l'agent causal de la tache *septoria tritici* (STB) du blé) et l'oomycète *Phytophthora infestans* (responsable de la maladie dévastatrice du mildiou de la pomme de terre et de la tomate). Nous détaillerons dans la suite les caractéristiques de chaque microorganisme. Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été sélectionnées en fonction des maladies indiquées par les tradipraticiens au cours des enquêtes ethnopharmacologiques (Pneumonie, infections urinaires, maladies diarrhéiques) et les souches fongiques ont été sélectionnées pour répondre aux thématiques de recherche au sein de l'UMRt BioEcoAgro 1158 INRAE sur la septoriose du blé et le mildiou de la tomate et la pomme de terre dans le cadre d'une recherche d'antifongiques.

3.1. *Escherichia coli*

Les *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des bacilles à Gram négatif aérobie-anaérobie facultatifs, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, découverte en 1885 par Théodore Escherich. Généralement retrouvés de façon commensale dans la flore intestinale, tant chez les humains que chez certains animaux, dépourvus de virulence (Figure 6). Néanmoins, certaines souches peuvent exercer une action pathogène envers l'hôte qui les héberge[51]. Les souches pathogènes de *E. coli* sont connues des médecins comme des agents responsables des gastro-entérites infantiles ou encore de la diarrhée du voyageur, souvent d'origine hydrique. On peut classer les *E. coli* pathogènes en deux catégories, les *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) et les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)[52].

Les souches InPEC peuvent être regroupées en six (6) catégories : *E. coli* entérotoxigènes (ETEC); *E. coli* entéropathogènes (EPEC); *E. coli* entéro-invasifs (EIEC); les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC); les *E. coli* entéro-aggrégatives (EAEC) et les *E. coli* adhérentes invasives (AIEC). Les ExPECs ne sont pas assimilés aux infections quand ils se trouvent dans le tractus intestinal. Cependant, lorsqu'elles colonisent d'autres tissus hors de l'intestin, ils peuvent causer des infections[53]. Les ExPECs se regroupent en quatre (4) catégories : Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) ; les *E. coli* associés à la septicémie (SEPEC) ; les *E. coli* associés à la méningite néonatale (NMEC) et les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC).

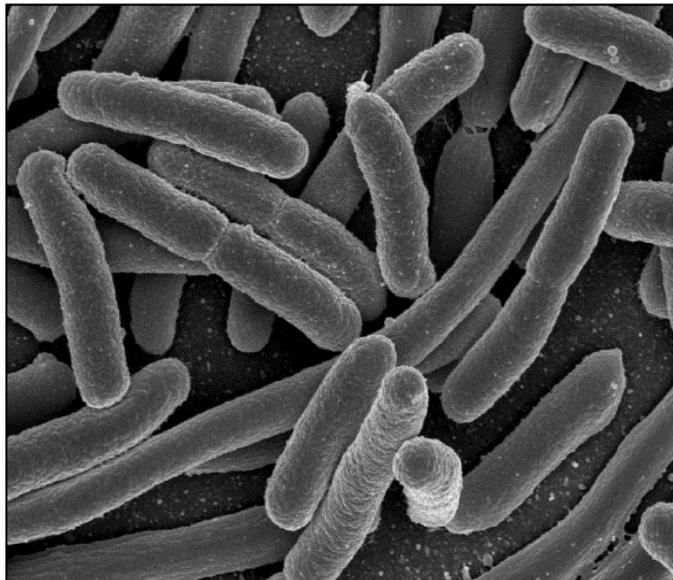


Figure 6 : *Escherichia coli* (observation par balayage en microscopie électronique)

(Source : [Futura Santé 2022](#))

3.2. *Klebsiella pneumoniae*

Les *Klebsiella pneumoniae* sont des bacilles aéro-anaérobie, non mobile, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (Figure 7). Les *Klebsiella pneumoniae* sont des bactéries à Gram négatif commensales que l'on retrouve dans les voies gastro-intestinales et respiratoires, mais

aussi sur la peau des individus sains. Elles sont également omniprésentes dans l'environnement. Il s'agit d'un pathogène opportuniste capable de provoquer une large gamme d'infections communautaires nosocomiales, telles que les infections des voies urinaires (IU), les infections des voies respiratoires, infections des plaies et des tissus mous[54].

Ces dernières années, elle est l'une des principales causes d'infections nosocomiales dans le monde, avec un taux de mortalité en augmentation, particulièrement chez les patients immunodéprimés, les nouveau-nés et les personnes âgées. *K.pneumoniae* est également impliquée de plus en plus dans les infections de types communautaires sévères telles que la pneumonie et la méningite[55].

Les souches de *K.pneumoniae* sont fréquemment résistantes aux bêta-lactamines à spectre étendu (*BLSE*), restent sensibles aux antibiotiques de la classe des carbapénèmes, dont l'imipénème et le méropénème. Cependant, en raison de l'utilisation accrue de carbapénèmes contre *K. pneumoniae*, ces organismes auraient évolué en MDR (Multi Drug Resistant). Au vu de sa large distribution et sa composition génétique, *K. pneumoniae* est devenue une menace mondiale pour la santé publique[56].

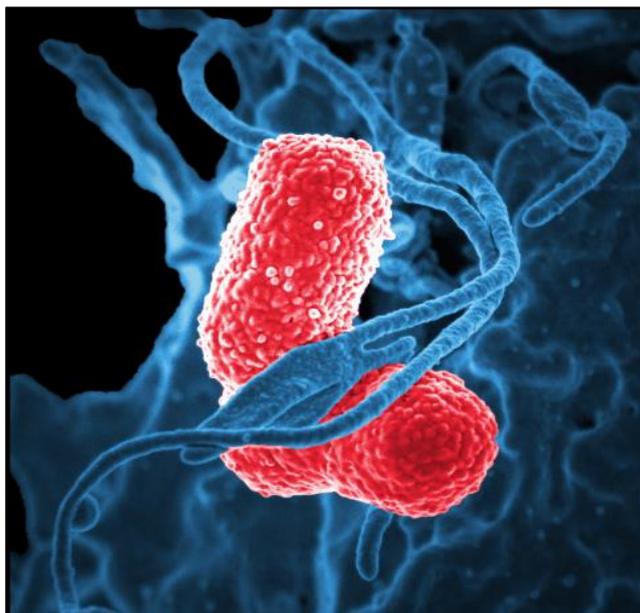


Figure 7 : *Klebsiella pneumoniae* MDR (observation par balayage en microscopie électronique)

(Source : Afis Science 2022)

3.3. *Salmonella enterica*

Les Salmonelles sont des bacilles à Gram négatif anaérobies facultatives, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, généralement mobiles et possèdent des flagelles péritriches (Figure 8). Découvertes en 1885 par Théobald Smith et nommé ainsi en l'honneur de Daniel Elmer Salmon qui dirigeait son travail[57]. Les salmonelles sont des bactéries retrouvées dans l'environnement, elles peuvent causer des infections chez une grande variété d'hôte, incluant des

animaux à sang froid (exemple : les reptiles), à sang chaud (exemple : les oiseaux) et l'humain. Ces bactéries peuvent également coloniser divers hôtes de façon asymptomatique. Le genre *Salmonella* regroupe deux espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*.

Le temps d'incubation de la bactérie est souvent très court entre 8 et 48 h. La maladie est l'aboutissement d'une réelle infection alimentaire après que les bactéries se multiplient et envahissent la muqueuse intestinale ou elles produisent une entérotoxine et une cytotoxine capables de détruire les cellules épithéliales. La maladie se manifeste par des douleurs abdominales, crampes, diarrhées et fièvres. Ces symptômes durent en moyenne 2 à 5 jours mais peuvent se prolonger pendant plusieurs semaines. Durant la phase aiguë de la maladie, un gramme de selles peut contenir jusqu'à 1 milliard de salmonelles. La plupart des patients adultes guérissent, mais la perte de liquide peut causer des complications pour les enfants et les personnes âgées. Environ 45000 cas par an sont rapportés aux Etats-Unis mais en fait, il peut y avoir de 2 à 3 millions de cas par an.

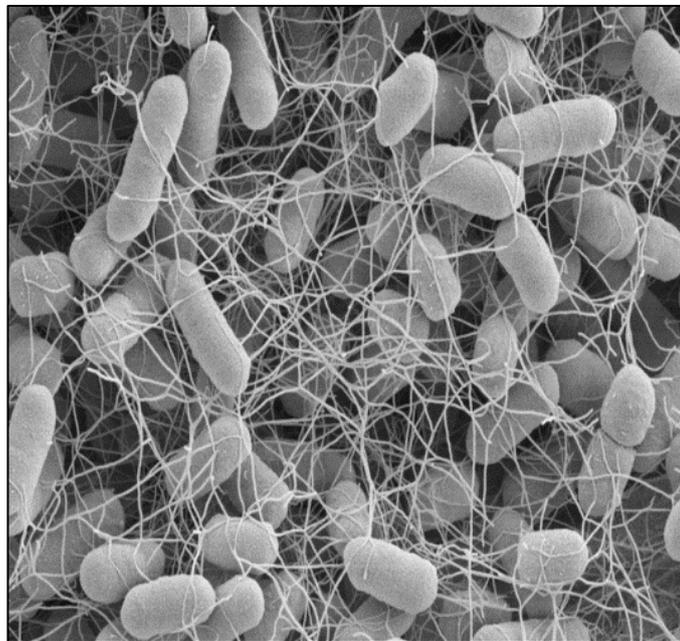


Figure 8 : *Salmonella enterica* (observation par balayage en microscopie électronique)

([Source : Robert Koch Institut 2022](#))

3.4. *Phytophthora infestans*

La recherche de nouveaux anti-oomycète d'origine naturelle constitue un axe de recherche important dans le monde. Malgré les nombreuses méthodes et techniques en chimie de synthèse dans la découverte des antifongiques, les plantes demeurent la solution de lutte efficace contre les phytopathogènes. Contrairement au nombre important d'antibiotiques disponibles, la gamme d'antifongiques reste très limitée pour lutter contre de nombreux agents phytopathogènes tel que *Phytophthora infestans*, un oomycète responsable de la maladie dévastatrice du mildiou pomme de terre et de la tomate (Figure 9)[58],[59]. Actuellement, trois groupes de phytosanitaires capables de pénétrer et de se diffuser dans les tissus de la plante sont utilisés contre *Phytophthora*. Ces trois groupes sont : les phosphonates, les phénylamides et les QoI « quinone outside inhibitor ».

La diffusion de certains de ces produits se fait uniquement des racines vers les feuilles, tandis que d'autres se font dans les deux sens. Ces produits chimiques sont utilisés pour traiter les parties aériennes (feuilles), les graines et parfois le sol contre les pourritures racinaires[60],[61]. Les QoI sont les fongicides systémiques qui agissent contre plusieurs champignons et oomycètes, dont *Phytophthora*. Le plus souvent, ils sont utilisés pour le contrôle des infections foliaires.

Les phénylamides regroupent plusieurs produits tels que le métalaxyl, l'oxadixyl et le ménénoxam[62]. Ce groupe de produits chimiques est efficace contre les oomycètes tels que *Phytophthora* et *Pythium*. Il inhibe en effet la croissance du mycélium et la formation des spores, et peuvent avoir un effet transitoire dans le contrôle de *Phytophthora*[63]. En effet, ces produits ne tuent pas l'oomycète, mais ralentissent plutôt son développement en empêchant sa croissance sur les tissus de la plante. Cependant, une fois le produit phytosanitaire dégradé, *Phytophthora* reprend son développement à l'intérieure de la plante[64]. De même, l'utilisation fréquente et répétitive de ces molécules demeure dangereuse non seulement pour la santé humaine mais aussi pour l'environnement, à cela s'ajoute le phénomène de résistance. La nécessité de développer des solutions alternatives permettant de contrôler les oomycètes est donc envisageable et surtout nécessaire.

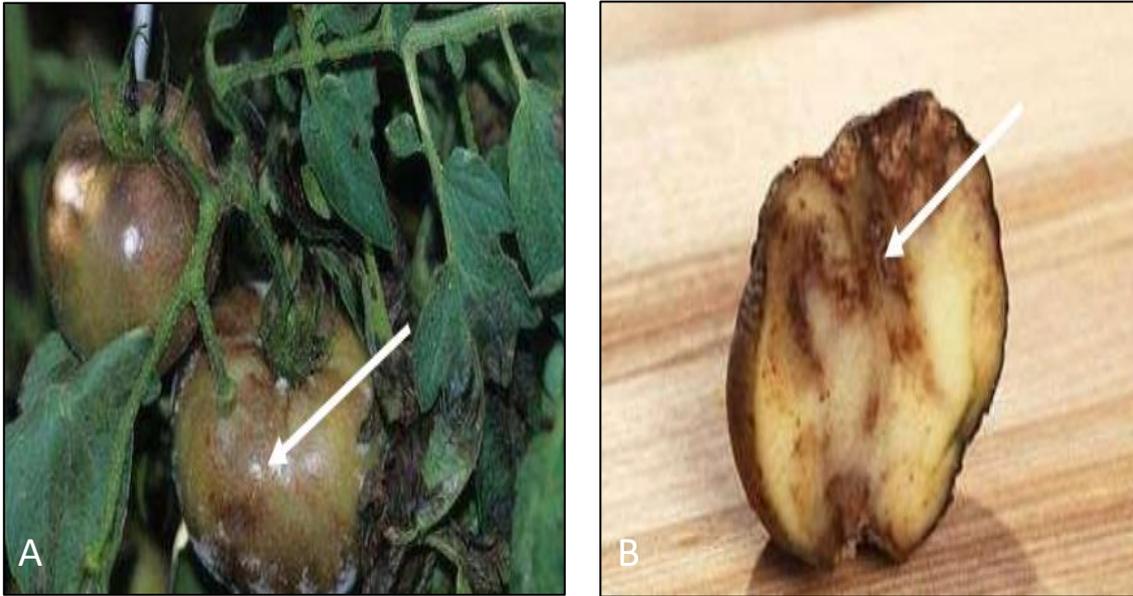


Figure 9 : Manifestation du mildiou de la tomate (A) et de la pomme de terre (B)
(Source : Kerroum Fatima 2019)[65]

3.5. *Zymoseptoria tritici*

L'ascomycète *Zymoseptoria tritici* est l'agent causal de la tache septoria tritici (STB), l'un des agents pathogènes foliaires les plus dévastateurs du blé dans le monde et en Europe[66],[67]. La nuisibilité moyenne à l'échelle du territoire français est de 17 q/ha, cette valeur varie selon l'année et les régions[68]. Certaines conditions telles que l'absence de traitement et la forte pression fongique impactent fortement sur le rendement soit une diminution de 50 q/ha[69]. L'impact sur le rendement de production dépend à la fois de l'intensité de l'épidémie et du stade de croissance du blé lors de la contamination. La maladie débute par l'apparition des taches chlorotiques au niveau du limbe foliaire. Ces taches rondes évoluent entre le 9^e et le 10^{ème} jour après l'infection du champignon et se manifestent sous forme de lésions nécrosées qui contiennent des fructifications brunes ou noires visibles à l'œil nu : les pycnides (Figure 10). Pour faire face à ce problème, les agriculteurs utilisent depuis les années 1960 des fongicides tels que les inhibiteurs des quinones extérieures (QoI), les antimétabolites, les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS) et les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI). Ces fongicides appliqués de façon préventive et curative présentent la particularité d'être systémiques et dotés d'une faible écotoxicité. Actuellement, l'efficacité de ces fongicides aux champs est fortement atténuée puisque *Z. tritici* dispose un fort potentiel adaptatif. En effet, des résistances aux fongicides de type QoI ont été rapportées au Royaume-Uni et en Irlande en 2002, environ 5 ans après leur introduction comme moyen de lutte[70].

La résistance à ces fongicides est associée à une mutation au niveau du gène codant pour le cytochrome b. Aujourd'hui, les populations françaises de *Z. tritici*, en particulier celles de la partie nord de la France, sont totalement résistantes à ces fongicides[71]. Plus récemment, en raison des résistances accrues au sein des populations de *Z. tritici*, le contrôle de cet agent pathogène repose sur les fongicides inhibiteurs de la déméthylation (DMI) de classe IBS et SDHI. Toutefois, les effets néfastes des pesticides sur la santé humaine et l'environnement demeurent préoccupants, et ne laissent pas le choix à plusieurs pays que celui de revoir leurs politiques quant à l'utilisation de ces produits. Ainsi, l'Union européenne exige aux états membres une réduction drastique de l'utilisation des pesticides dans un proche avenir afin de limiter leurs risques[72]. L'interdiction ou l'indisponibilité de certains pesticides, programmées dans l'avenir, orientent vers la recherche de nouvelles molécules d'origines naturelles comme moyens de lutte alternatifs.

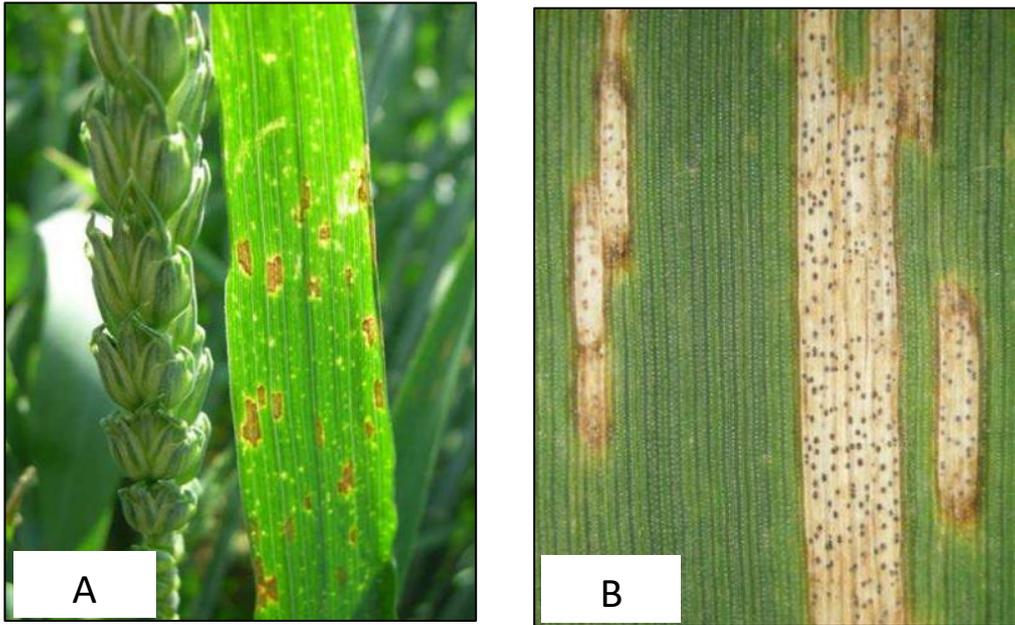


Figure 10 : Manifestation de la septoriose du blé : Lésion de septoriose juste sous l'épi (A) et Taches nécrotiques avec de petits points brun foncé à noirs (B)
(Source : Gigot, 2013)[73]

III. ACTIVITES ANTIOXYDANTES

L'activité antioxydante est importante pour protéger l'organisme contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui jouent un rôle important dans l'oxydation des protéines, des lipides, de l'ADN et des carbohydrates dans les tissus, causant ainsi des maladies dégénératives/chroniques, y compris le cancer, le diabète et plusieurs maladies cardiovasculaires[74],[75]. Les ROS sont des espèces très toxiques pour l'organisme mais essentielles pour la régulation de plusieurs voies de signalisation au niveau cellulaire. Leur concentration est régulée par le maintien d'un équilibre entre leur production, pendant la réduction de l'oxygène dans le métabolisme cellulaire normal, et leur élimination par les systèmes antioxydants endogènes[76].

Le stress oxydatif est un des mécanismes majeurs impliqué dans le vieillissement cutané et les affections dermatologiques[77]. L'exposition fréquente à certains facteurs environnementaux tels que les rayons UV, peuvent entraîner l'altération des tissus conjonctifs par formation excessive de ROS et impacte certains processus biologiques au niveau cellulaire (activité de certains enzymes), induisant ainsi des problèmes graves de la peau (Figure 11)[78].

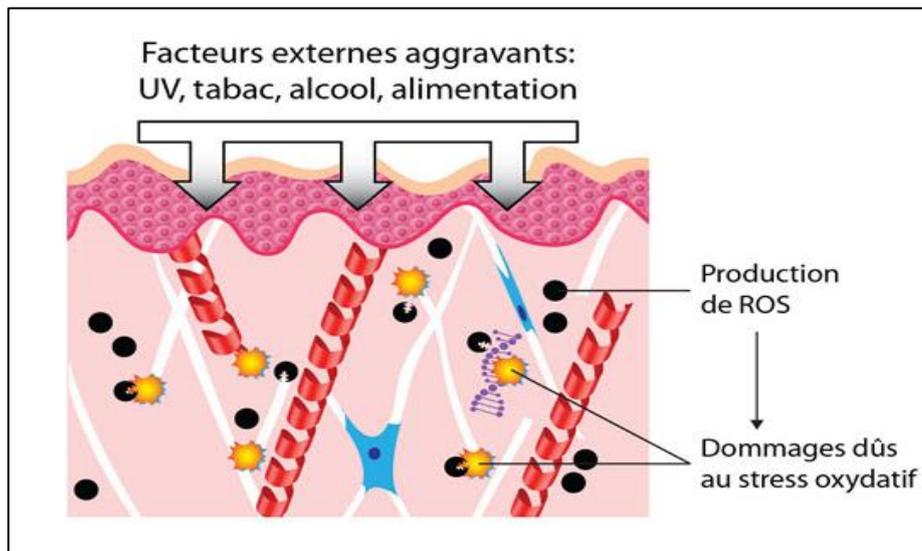


Figure 11 : Illustration du stress oxydatif et les facteurs exogènes aggravant au niveau de la peau
(Source : [Pharm'Aging, 2019](#))[79]

D'une manière générale, dans les systèmes biologiques, un antioxydant est une substance qui en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (ROS) retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. Les antioxydants présentent donc un grand intérêt pour diverses applications en santé humaine car ils préviennent les dommages cutanés et ralentissent le vieillissement précoce. Ils peuvent prévenir les effets des radicaux libres en les neutralisant ou en favorisant leur décomposition. D'où l'importance de trouver des antioxydants naturels tels que ceux provenant des plantes (caroténoïdes, polyphénols et alcaloïdes)[80]. Leur rôle d'antioxydants naturels leur confère un intérêt positif en santé humaine. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et de la nature diverse d'antioxydants, plusieurs tests antioxydants ont été nécessaires pour évaluer le potentiel antioxydant de nos différents extraits et fractions.

Dans le cadre de cette thèse, deux méthodes colorimétrique simples d'évaluations de l'activité antioxydante ont été réalisées : le test DPPH (2,2 Diphényle-1-Picryl-Hydrazyle) et le test FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power).

3.1. Généralité sur le test DPPH (2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl)

Méthode basée sur la mesure de la capacité de piégeage des antioxydants vers le radical stable non naturel DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Cette capacité peut être évaluée par spectroscopie de résonance de spin électronique sur la base du fait que le signal du DPPH est inversement lié à la concentration d'antioxydants testée pendant la réaction. Toutefois, la méthode la plus utilisée est celle du test de coloration d'une solution de DPPH dans le méthanol ou l'éthanol. Le DPPH est un radical libre stable, avec une couleur violette lorsqu'il est en solution. Il présente également une absorbance caractéristique entre 512 et 517 nm. Après l'ajout d'un antioxydant (AH) ou d'une espèce radicalaire (R), la solution radical DPPH se réduit en l'hydrazine correspondante (couleur jaune-verte) et entraîne une décoloration. La décroissance de coloration est mesurée et permet de déterminer l'IC₅₀ qui correspond à la concentration pour laquelle la moitié (50%) d'antioxydants présents réagit avec le DPPH (Figure 12). Les résultats peuvent également être exprimés en construisant une gamme étalon avec le Trolox ou la Vitamine C puis reporter l'absorbance des échantillons sur la courbe d'étalonnage. Ce qui permet d'exprimer le résultat en milligramme (mg) d'équivalent de Trolox par gramme (g) de matière sèche. Une méthode développée en 1995 par Brand-Williams et *al.*, a été utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

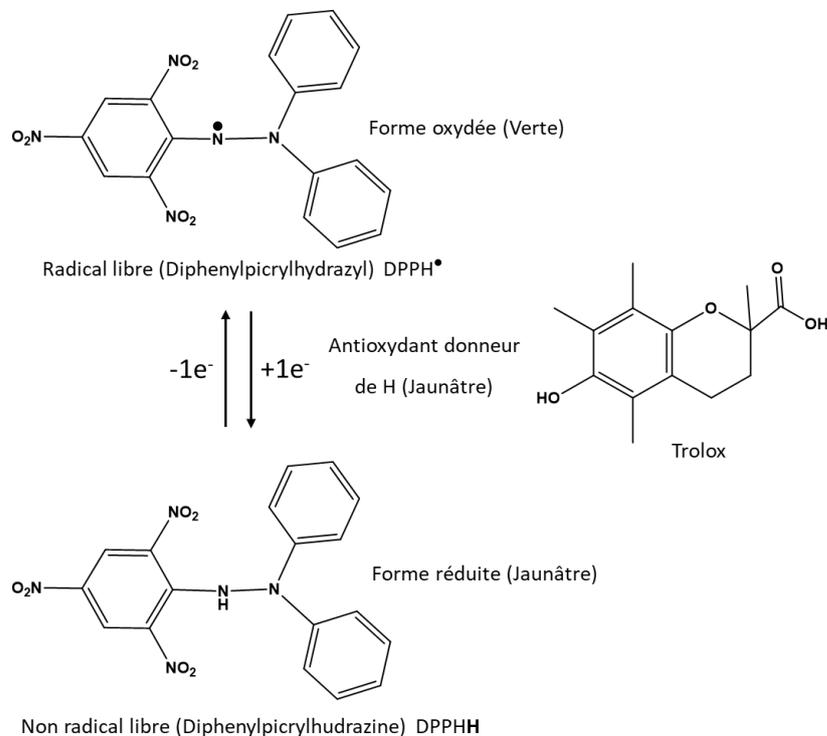


Figure 12 : Réaction entre le DPPH et un antioxydant donneur de H (AH) Trolox

3.2. Généralité sur le test FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Comme l'indique son nom, le test FRAP a été développé pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Ce test est actuellement utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des substances présentes dans un extrait[81]. En effet, les ions ferriques participent à la formation d'un radical hydroxyle par réaction de Fenton (réaction d'oxydation entre le peroxyde d'hydrogène et le fer ferreux) . Les ions ferreux, à un pH faible, forment un complexe avec le 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue dont l'absorbance maximale est 594 nm (Figure 13). La formation de ce complexe indiquera ainsi, un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un extrait ou d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 593 nm du mélange réactionnel contenant une concentration connue en ions ferreux. La capacité antioxydante des extraits est le plus souvent déterminée à partir d'une IC_{50} qui est la concentration d'antioxydants (dans un extrait ou échantillon) nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux libres.

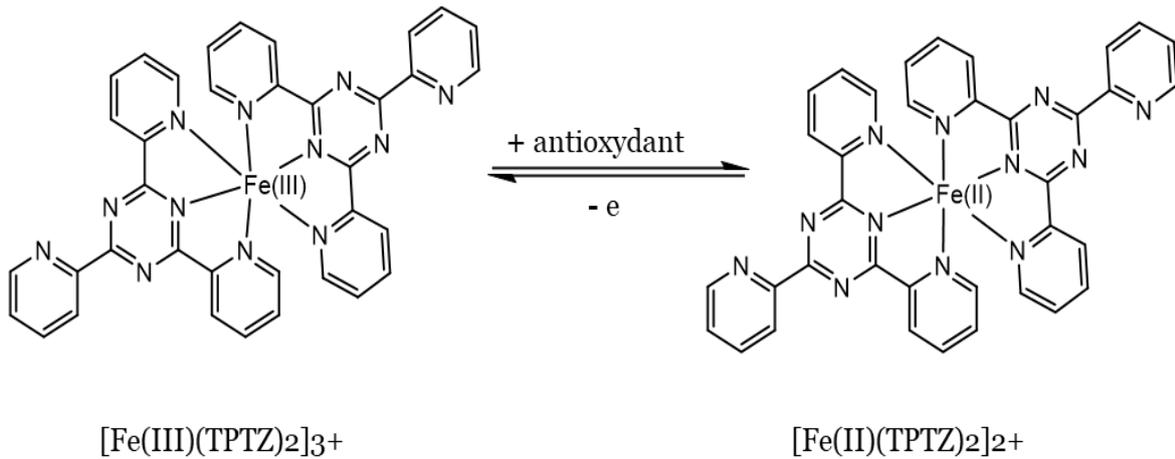


Figure 13 : Réaction de dosage du pouvoir antioxydant ferrique (FRAP)

IV. GENERALITE SUR L'ETUDE DE CYTOTOXICITE

Le test de cytotoxicité utilisé est un test colorimétrique largement reconnu comme étant une méthode fiable permettant d'évaluer la viabilité cellulaire. Ce test consiste à observer la réduction du sel monosodique WST-8 (2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium en WST-8 formazan de couleur orange sous l'action catalytique des déshydrogénases qui sont des enzymes cellulaire (Figure 13). La quantité de colorant formazan générée par l'activité des déshydrogénases dans les cellules est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Une lecture de l'absorbance à 450 nm permet de quantifier le pourcentage de cellules vivantes. Dans cette thèse, le test de cytotoxicité à été réalisé sur deux lignées cellulaires humaines : les cellules épithéliales de côlon humain immortalisés Caco-2 et les cellules kératinocytes humaines HaCaT. Plusieurs concentrations de l'extrait sont le plus souvent testées et les résultats obtenus (exprimés en pourcentage de cellules \pm SEM erreur standard sur la moyenne) sont comparés au contrôle négatif (cellules non traitées) en utilisant les tests de statistiques (Kruskal-Wallis).

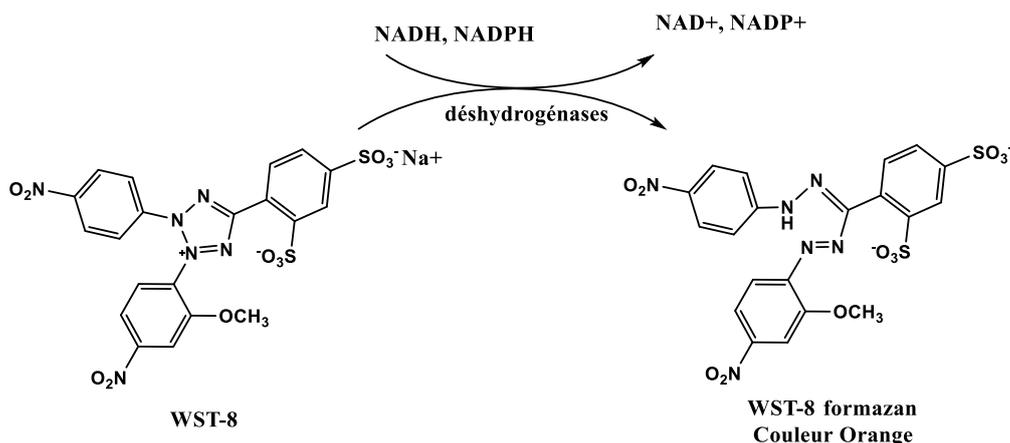


Figure 14 : Réaction de réduction du sel monosodique WST-8 en WST-8 formazan

V. FAMILLES DES PLANTES ETUDIÉES

Notre travail a porté sur deux familles de plante : Vochysiaceae (*Erismadelphus exsul* Mildbr) et Sapotaceae (*Baillonella toxisperma* Pierre). Dans cette partie, il sera présenté les caractères généraux de ces familles. Les principaux critères de sélection des plantes sont : la fréquence d'utilisation des plantes par les tradipraticiens au cours des enquêtes ethnopharmacologiques et le nombre d'études limitées en phytochimie.

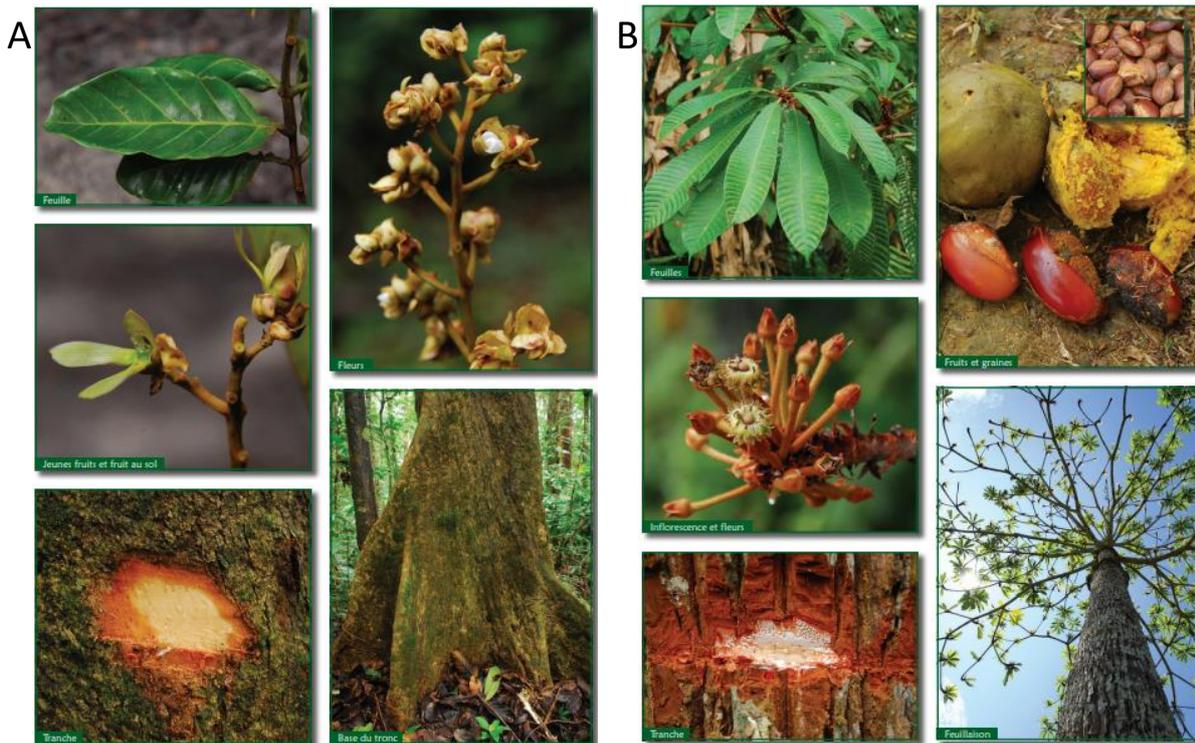


Figure 15 : *Erismadelphus exsul* Mildbr (A) et *Baillonella toxisperma* Pierre (B)
(Source : Arbres Utiles du Gabon, Q. Meunier, C. Moumbogou, J.-L. Doucet, 2015) [82]

5.1. Généralité sur la famille des Vochysiaceae : cas de *Erismadelphus exsul* Mildbr

Les Vochysiaceae font partie d'un petit groupe de douze familles de plantes comprenant 2 tribus, 6 genres et 200 espèces[82], seulement 2 proviennent du continent Africain *Erismadelphus* (deux espèces décrites) et *Korupodendron* (une seule espèce décrite)[83]. La famille des Vochysiaceae se distingue par des fleurs inhabituelles possédant une seule grande étamine fertile et très souvent avec un ou cinq pétales (Figure 16)[84]. C'est une famille importante dans la formation végétale néotropicale[85]. Les Vochysiaceae sont généralement distribués en Amérique tropicale (Mexique et Brésil) mais également en Afrique tropicale de l'Ouest et du Centre : Gabon, Congo, Cameroun et Guinée-Équatoriale (Figure 17A)[86]. Cette famille appartient à l'ordre de Myrtales (Myrtaceae), sous-classe des Rosidae (Angiosperme Dicotylédone), généralement divisée en deux tribus : la tribu Erismeae et celle des Vochysieae. La présence de la lignée africaine nichée dans le clade sud-américain met clairement en évidence les relations phylogénétiques moléculaires entre ces deux lignées (Figure 17B)[87]. Certains

membres de la famille des Vochysiaceae ont une valeur économique : *Vochysia tetraphylla*, par exemple, possède un bois utilisé en ébénisterie. Au Brésil, le bois de *V. hondurensis* sert à la construction de bateaux et de poteaux pour les clôtures. Les graines de *Erisma calcaramum* fournissent une graisse employée pour la fabrication de savons et de bougies[88].

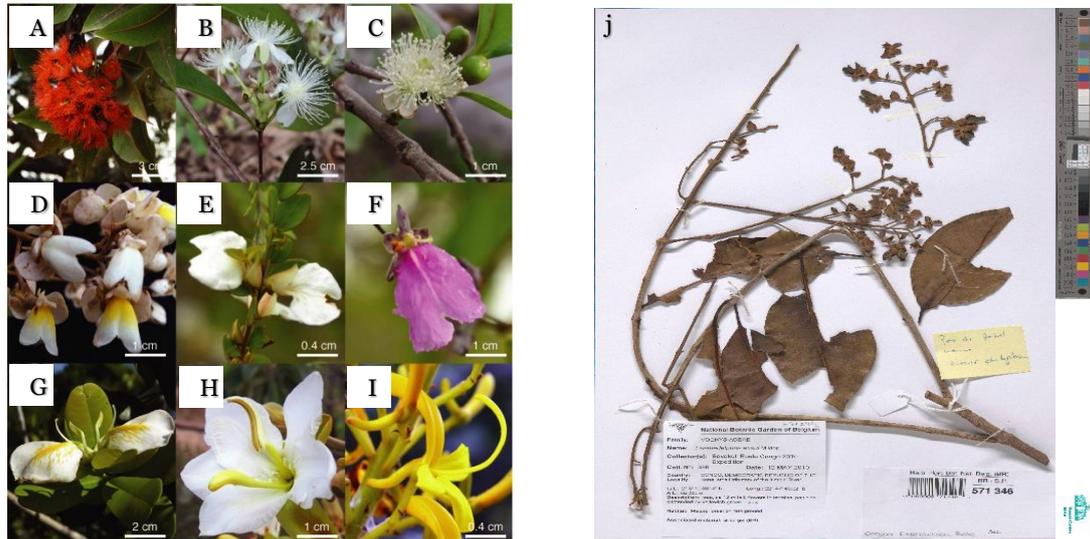


Figure 16 : Variation de la morphologie des fleurs chez les Myrtaceae (A-C) et les Vochysiaceae (D-I) (Source : Gonçalves et al., 2020) [90]; (J) [Feuille d'herbier *Erismadelphus exsul* Mildbr](#)

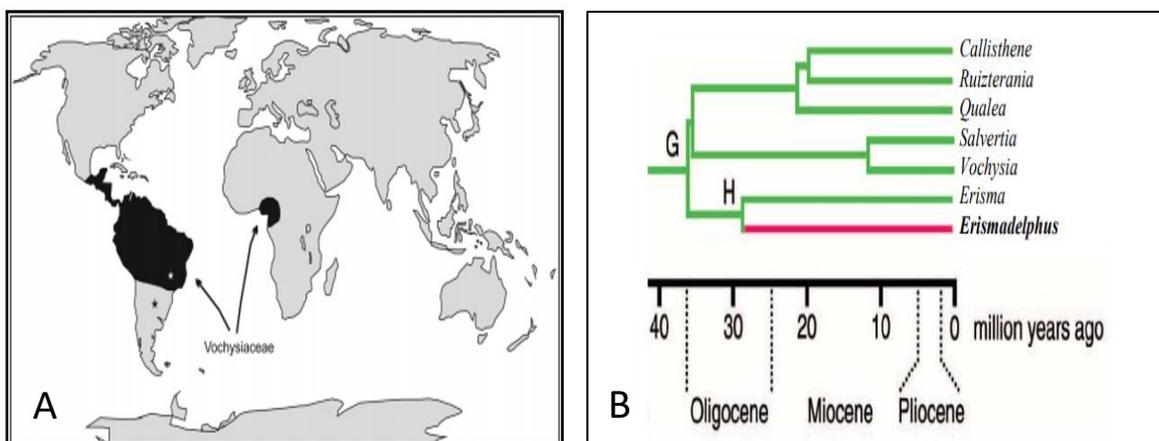


Figure 17 : Distribution mondiale des Vochysiaceae en Amérique du Sud et en Afrique (A) et Phylogénie des genres de Vochysiaceae sur la base de données moléculaires (B). Le genre *Korupodendron* n'est pas inclus par manque de matériel pour les analyses d'ADN mais celui-ci est de toute évidence un proche parent de *Erismadelphus exsul*.

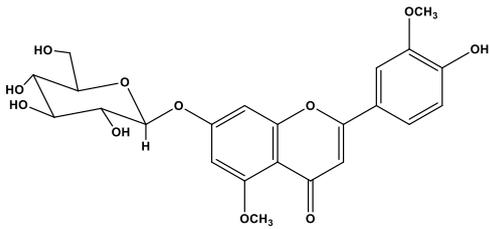
(Source : Moya et al., 2015 (A) [86] ; Sytsma et al., 2004 (B) [87])

5.2. Etudes antérieures sur les Vochysiaceae

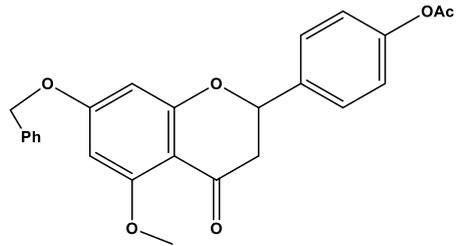
Dans le cadre de nos travaux, l'unique espèce collectée de cette famille est *Erismadelphus exsul*, dont les écorces sont utilisées en médecine traditionnelle gabonaise dans le traitement des infections urinaires, des bronchites, des pneumonies et les maladies opportunistes du VIH[89]. *Erismadelphus exsul* n'a jamais été décrit auparavant d'un point de vue biologique ou phytochimique. Néanmoins, quelques études ont été faites sur d'autres plantes appartenant à la famille des Vochysiaceae : En 2005, les études de Weniger et *al.*, ont montré que plusieurs espèces du genre *Vochysia* sont utilisées par les communautés traditionnelles Sud américaine pour soulager les affections liées à l'inflammation, telles que les plaies cutanées, l'asthme et les congestions pulmonaires.

À l'issue de ces travaux, sept dérivés triterpéniques dont certains présentent une légère activité inhibitrice sur le lysozyme PDE4, ont été isolés de l'écorce de tige de *Vochysia pacifica*[90]. Carnevale Neto et *al.*,(2011) ont montré dans une revue que de nombreuses espèces de Vochysiaceae, en particulier les genres *Qualea* et *Vochysia*, sont largement utilisés chez les médecins traditionnels pour traiter plusieurs maladies, ils renferment plusieurs constituants chimiques : les énoïdes triterpéniques, les stéroïdes, les polyphénols (flavonoïdes) et certains dérivés de l'acide ellagique qui sont certainement responsables des activités biologiques observées dans cette famille de plantes[91] (Figure 18).

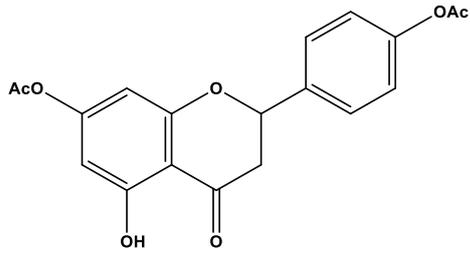
Au Brésil, les travaux de Dornelo et *al.*, ont montré que certains hyphomycètes (champignons) pouvaient vivre en association avec les plantes de la famille des Vochysiaceae : 32 espèces de champignons ont été recensées parmi lesquelles 25 Ascomycètes : 10 espèces ont été retrouvées sur *Qualea*, 12 sur *Vochysia* et 2 sur *Salvertia*[92]. Franco et *al.*, (2019) ont également montré la capacité antioxydante et anti-glycation des extraits de plantes de la famille des Vochysiaceae[93].



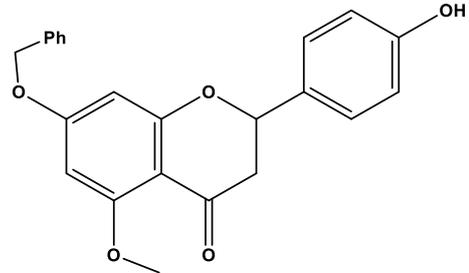
2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-methoxy-7-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-4H-chromen-4-one



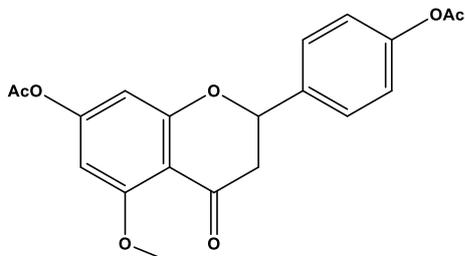
4-(7-(benzyloxy)-5-methoxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl acetate



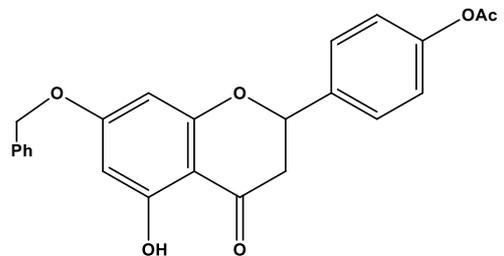
4-(7-acetoxy-5-hydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl acetate



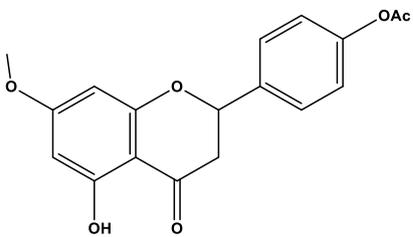
7-(benzyloxy)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-methoxychroman-4-one



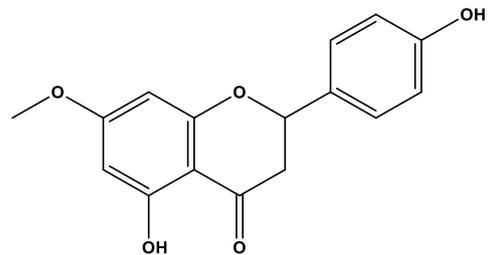
4-(7-acetoxy-5-methoxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl acetate



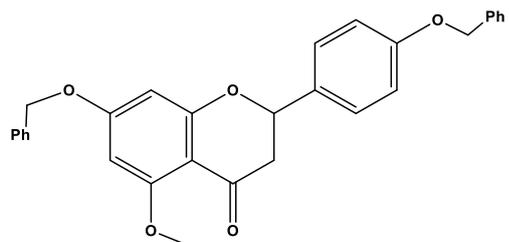
4-(7-(benzyloxy)-5-hydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl acetate



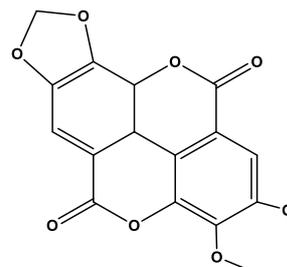
4-(5-hydroxy-7-methoxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl acetate



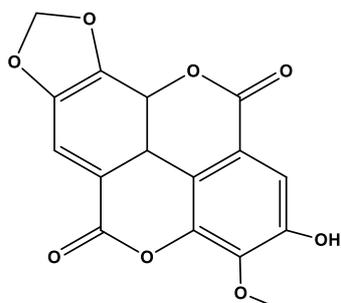
5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxychroman-4-one



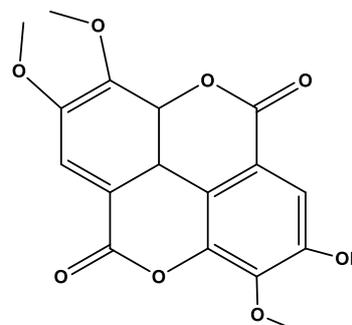
7-(benzyloxy)-2-(4-(benzyloxy)phenyl)-5-methoxychroman-4-one



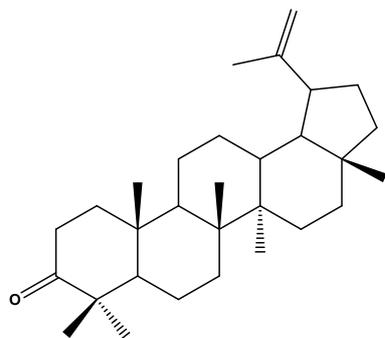
3',4'-di-O-methyl-3,4-O-methylidene ellagic acid



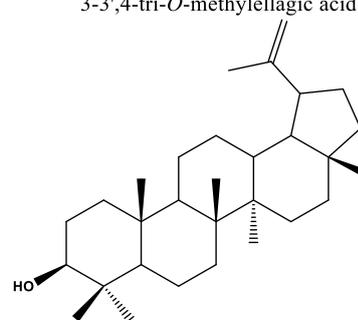
3'-methyl-3,4-O-methylidene ellagic acid



3-3',4-tri-O-methylellagic acid



Lupenone



Lupeol

Figure 18 : Structures chimiques de quelques métabolites secondaires isolés des plantes appartenant à la famille des Vochysiaceae

(Source : Carnevale Neto et *al.*, 2011)[94]

5.3. Utilisation en médecine traditionnelle

Erismadelphus exsul Mildbr est une plante médicinale Gabonaise connue par les populations locales (Fang) sous le nom « Essang Afane ». Ses feuilles sont prises en décoction pour traiter le paludisme. On peut également appliquer les feuilles sous forme de pommade pour le traitement des maladies de la peau (mycoses, lésions cutanées, teignes). On l'associe parfois à d'autres plantes pour soulager d'autres maladies. C'est une plante rare mais bien connue par des tradipraticiens pour ses multiples vertus.

5.4. Généralité sur la famille des Sapotaceae : cas de *Baillonella toxisperma* Pierre

Les Sapotaceae sont une famille de plantes importantes des forêts tropicales d’Afrique, d’Australie et d’Amérique du Sud. C’est l’une des huit espèces de la famille d’angiospermes les plus riches, elle est constituée d’arbres et d’arbustes, compte environ 1250 espèces et 58 genres[95]. Les membres de cette famille sont facilement identifiés par la présence de latex blanc sur leur base, les feuilles simples et entières, les fleurs en fascicules sont formées d’un calice unisériel de 4 à 6 sépales imbriqués (Figure 19)[96].

La systématique de cette famille est compliquée, les Sapotacées appartiennent à l’ordre des Ericales et trois lignées majeures sont officiellement reconnues comme sous-familles parmi lesquelles : Chrysophylloideae (Amérique du Sud et Australie), Sapotoideae (Afrique et Asie) (Figure 20) et la sous-famille des Sarcospermatoideae restreintes en Asie (Figure 21)[97].



Figure 19 : Morphologie des fleurs et feuilles chez les Sapotaceae : A : *Niemeyera chartacea* ; B : *Niemeyera anti-loga* ; C : *Van-royena castanosperma* ; D : *Pycnandra belepensis* ; E : *Pichonia deplanchei*, [F : Feuille d'herbier *Baillonella toxisperma*](#)

(Source : Swenson et *al.*, 2011)[96]

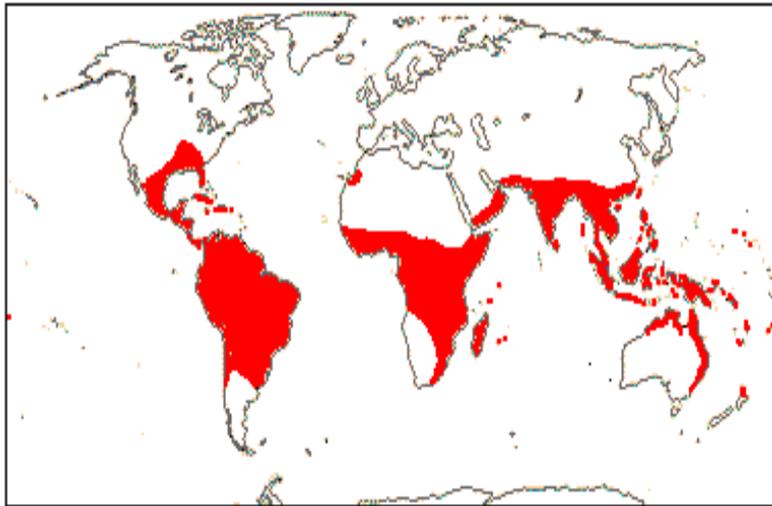


Figure 20 : Distribution mondiale des Sapotaceae : Cas des Chrysophylloideae (Amérique du Sud et Australie) et Sapotoideae (Afrique et Asie) ([Ericales mobot.org](http://Ericales.mobot.org))

(Source : Pennington et al., 2004)[97]

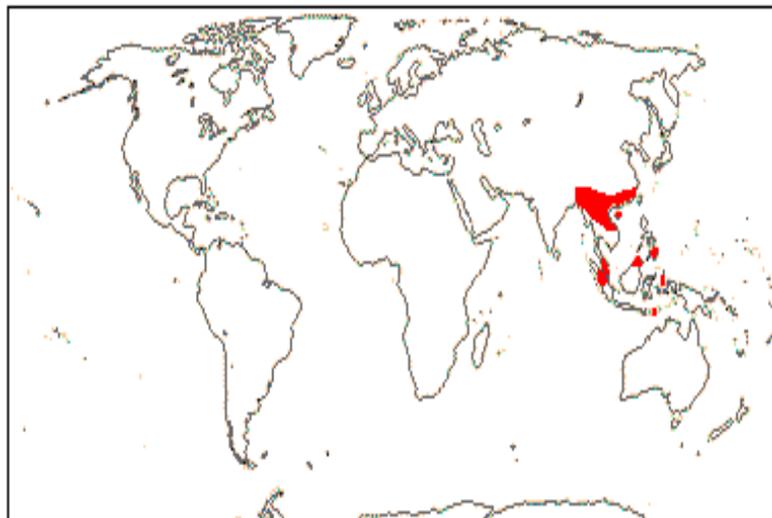


Figure 21 : Distribution mondiale des Sapotaceae : Cas des Sarcospermatoidae restreintes en Asie ([Ericales mobot.org](http://Ericales.mobot.org))

(Source : Pennington et al., 2004)[97]

Elles se divisent en deux grandes lignées évolutives correspondant aux tribus : un grand clade est composé des tribus Isonandreae, Mimosupeae, Sideroxyleae et le deuxième grand clade composé des tribus Chrysophylleae et Omphalocarpeae[98]. Plusieurs espèces de cette famille produisent des fruits comestibles et une sève blanche en forme de latex, leur valeur économique est inestimable.

Baillonella toxisperma Pierre communément appelé moabi au Cameroun, adzap en Guinée Equatoriale et au Gabon est rencontrée à l'état sauvage dans les forêts d'Afrique intertropicale. Elle s'étend sur une surface couvrant le Sud du Nigéria, le Sud du Cameroun, la République démocratique du Congo dans la région du Mayombe, l'Angola, la Guinée Équatoriale et le Gabon[99] (Figure 22). Cette essence des forêts du bassin du Congo dont le Gabon fait partie peut atteindre des tailles de 60 m de hauteur et 5 m de diamètre, très grand arbre et assurément l'un des plus majestueux de la forêt gabonaise[100]. Naturellement durable, elle est réputée pour son bois brun-rosé et l'huile extraite de ses fruits[101], lui conférant de multiples utilisations aussi bien en médecine traditionnelle qu'en menuiserie. Au niveau écologique, c'est une espèce caducifoliée, semi-héliophile, non grégaire, des forêts sempervirentes et semi-décidues, généralement retrouvée dans les forêts secondaires matures[102].

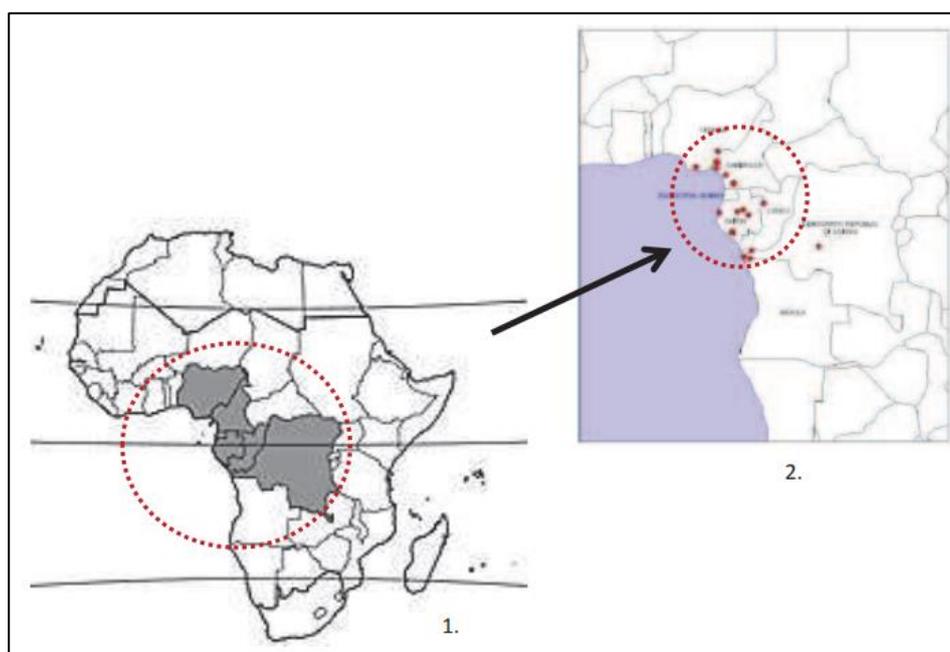


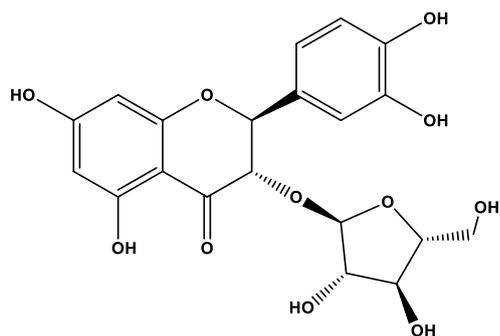
Figure 22 : Aire de répartition de *Baillonella toxisperma* en Afrique. (1) L'aire de répartition de *B. toxisperma* en grisé sur la zone des forêts du bassin guinéo-congolais. (2) Les principales zones d'abondances de *B. toxisperma* en Afrique centrale

(Source : Ndiade-Bourobou et *al.*, 2011)[103]

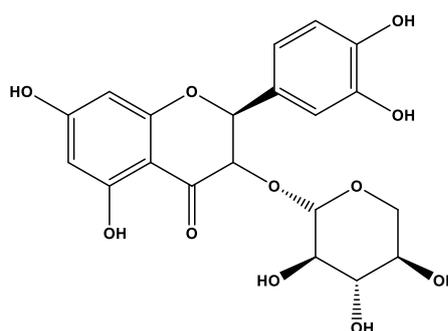
5.5. Etudes antérieures sur les Sapotaceae

Les études antérieures faites sur les plantes appartenant à cette famille montrent une très grande richesse en métabolites secondaires doués d'activités biologiques intéressantes. En 2011, Tapondjou et *al.*, ont montré une forte activité antioxydante des saponines triterpénoïdes isolées de l'écorce de *Butyrospermum parkii* une Sapotaceae utilisée en médecine traditionnelle camerounaise dans le traitement de la gale, les ulcères, les plaies et raideur nasale[104]. De même Baky et *al.*,(2016), dans une revue, montrent la richesse en composés phénoliques des Sapotacées ce qui leur confèrent plusieurs activités biologiques notamment les activités

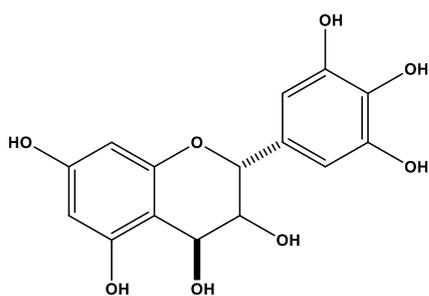
antioxydantes, antibactériennes, anticancéreuses et anti-inflammatoires[105]. Nyemb et *al.*, (2018) ont isolé un nouveau cerebroside dans le bois des racines de *Vitellaria paradoxa* une Sapotaceae utilisée en médecine traditionnelle camerounaise dans le traitement du cancer du sein et plusieurs autres affections d'origine microbienne justifiant ainsi l'importance de travailler sur les plantes appartenant à cette famille[106] (Figure 23). En Tanzanie, les études de Chhabra et *al.*, décrivent succinctement l'usage en médecine traditionnelle des plantes appartenant à la famille des Sapotaceae[107].



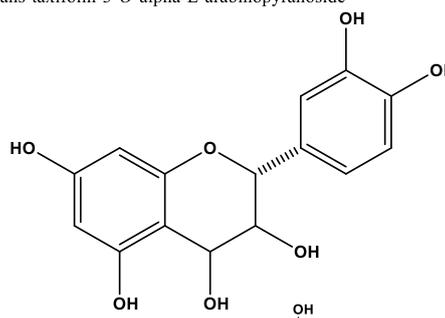
Taxifolin-3-*O*-alpha-L-arabinofuranoside



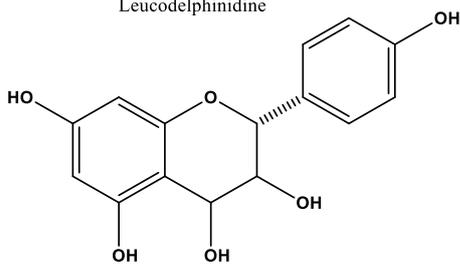
Trans-taxifolin-3-*O*-alpha-L-arabinopyranoside



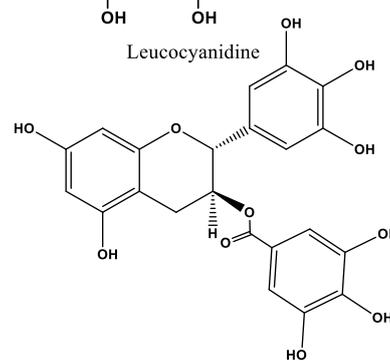
Leucodelphinidine



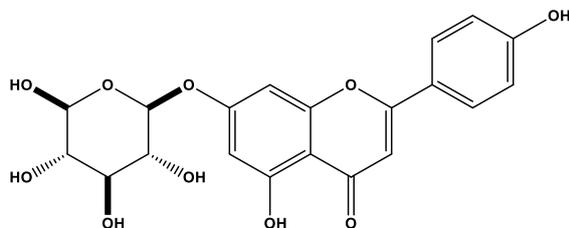
Leucocyanidine



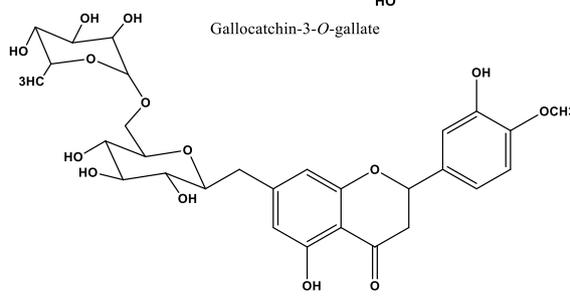
Leucoperalgonine



Gallocatchin-3-*O*-gallate



Apigenin-7-*O*-alpha-L-rhamnoside



Hesperidin

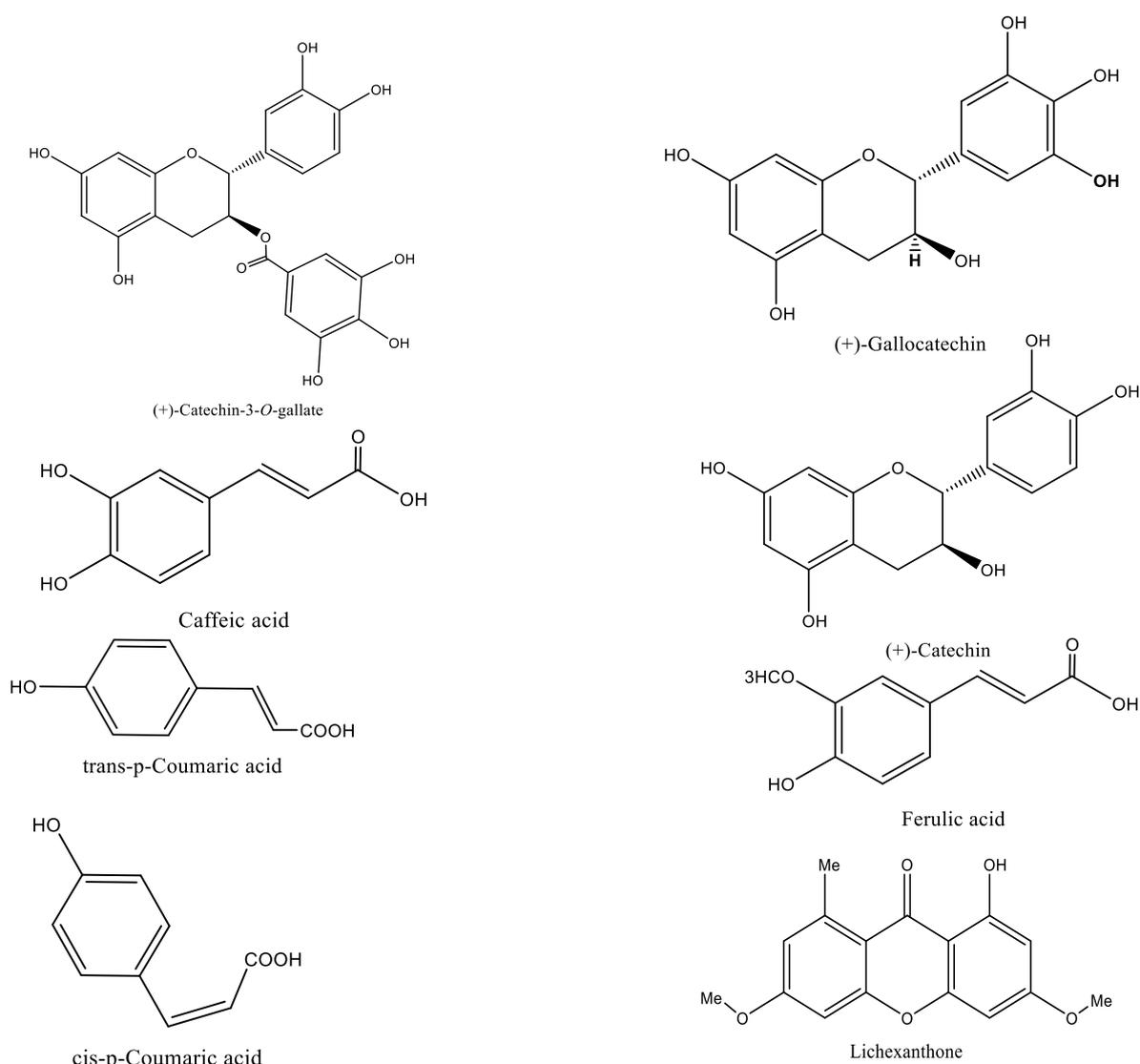


Figure 23 : Structures chimiques de quelques métabolites secondaires isolés des plantes appartenant à la famille des Sapotaceae

(Source : Nyemb et al., 2018) [106]

5.6. Etudes antérieures sur la plante *Baillonella toxisperma* Pierre

Depuis les années 2000, cette plante a fait l'objet de plusieurs études. Les études de Saha et al.,(2013) ont montré une forte activité antioxydante du bois de la plante[108]. S.Riwom et al.,(2015) ont également montré que la plante possède des activités antifongiques et antibactériennes[109],[110]. *Baillonella toxisperma* améliore également les performances sexuelles et le dysfonctionnement reproductif induit par le stress[111]. Plusieurs études biologiques des écorces, fruits et feuilles de *B. toxisperma* ont été faites mais très peu de travaux ont été publiés sur les composés responsables des activités biologiques de la plante. L'une des rares études ayant isolé un composé (3-hydroxy uridine un inhibiteur de la croissance des plantes) est celle effectuée par Hajime et collaborateurs en 1989[112]. Cependant plusieurs autres études ont montré de bonnes activités antibactériennes[110], antifongiques, antioxydantes[109], [113] et bien d'autres activités liées aux performances sexuelles[111].

5.7. Utilisation en médecine traditionnelle

Baillonella toxisperma est traditionnellement utilisée dans plusieurs pays africains où on le retrouve. En pharmacopée camerounaise, la décoction des extraits aqueux de son écorce est utilisée dans le traitement des hémorroïdes, les infections sexuellement transmissibles, la diarrhée, le paludisme, les mycoses vaginales, les anémies, l'infertilité masculine[111], les troubles gastro-intestinaux et broncho-pulmonaires[108]. Au Gabon, cette plante est utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs pathologies, notamment les douleurs rhumatismales, les infections fongiques, les plaies, les teignes et le paludisme. Elle est également utilisée comme additif dans d'autres remèdes[114]. Le résidu de son amande est réputé nocif pour la volaille et la décoction de l'écorce est un puissant remède contre les maux des reins[102]

VI. METHODES ANALYTIQUES

Pour établir le profil des métabolites présents dans les extraits végétaux, les méthodes analytiques choisies doivent être en mesure de détecter un large éventail de métabolites, avec une sensibilité, une résolution et une reproductibilité élevées. En outre, une telle méthode devrait fournir des informations non seulement sur la composition élémentaire mais également sur la structure pour l'identification des métabolites. Comme il n'existe actuellement aucune méthode analytique unique pouvant fournir toutes les informations nécessaires, deux approches principales sont utilisées : la Spectrométrie de Masse (MS)[115],[116] et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)[117]. Au vu de la grande diversité chimique des extraits de plantes et le fait qu'ils contiennent souvent de nombreuses structures isomériques, les métabolites sont souvent séparés par une technique séparative avant leur détection. À cet égard, les méthodes de chromatographie couplées à la spectrométrie de masse, telles que la chromatographie en phase liquide LC-MS[118] et la chromatographie en phase gazeuse GC-MS[119], sont largement utilisées.

6.1. Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse est une méthode analytique puissante et polyvalente qui permet d'obtenir des informations sur l'identité d'un composé inconnu, sa masse moléculaire, sa composition élémentaire et, dans de nombreux cas, sa structure chimique[120]. Elle consiste à détecter et identifier différentes espèces chimiques d'intérêt par la mesure du rapport masse/charge (m/z). Les molécules présentes dans l'échantillon à analyser doivent être sous forme d'ions pour pouvoir être détectées. Le spectromètre de masse est un instrument qui comprend généralement trois parties placées en série et qui permettent successivement, après introduction de l'échantillon, l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon (source), l'accélération des ions formés, la séparation de ces ions en fonction de leur rapport masse sur charge m/z (analyseur) et enfin la détection (détecteur)[121] (Figure 24).

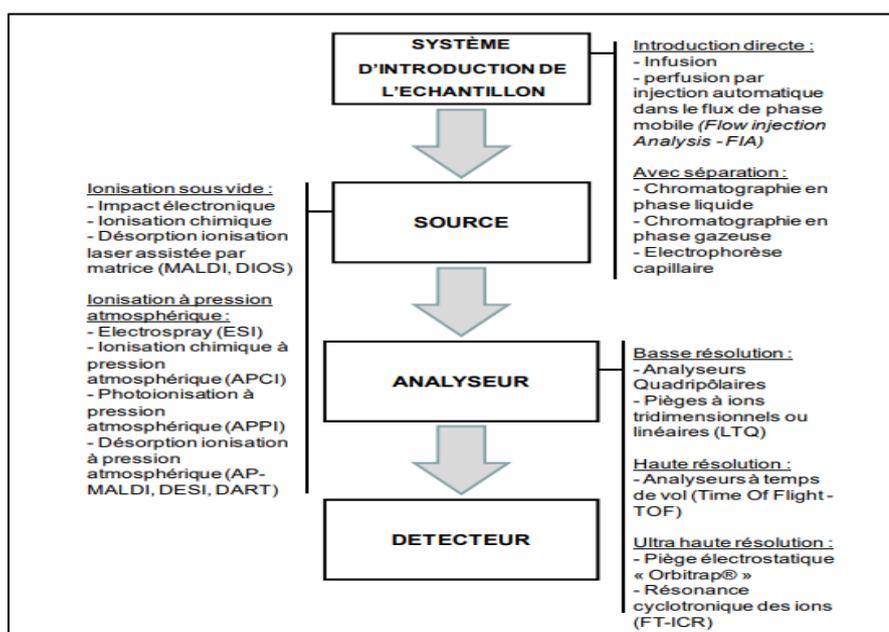


Figure 24 : Schéma global d'un spectromètre de masse présentant les sources et analyseurs disponibles pour l'analyse des biomolécules

(Source : Roux, 2011) [122]

Différents types de sources et d'analyseurs peuvent être utilisés en fonction de la nature de l'échantillon et du type d'analyse à effectuer. Le détecteur est le plus souvent dépendant du type d'analyseur utilisé, chaque analyseur possède des caractéristiques qui lui sont propres. Dans le cadre de ces travaux, les données ont été acquises grâce à un spectromètre de masse tandem quadripôle-temps de vol (Q-ToF). Dans ce système, les ions produits par la source d'ionisation pénètrent dans un premier quadripôle permettant de sélectionner les ions d'intérêt pour leur fragmentation en MS/MS. Le champ électrique de ce quadripôle stabilise la trajectoire des ions possédant un rapport m/z déterminé. Ces ions pénètrent ensuite dans un second quadripôle, jouant le rôle de cellule de collision, où ils sont décomposés en fragments à la suite de leur collision (collision-induced dissociation-CID) avec un gaz inerte (azote ou argon). Les ions fragments sont dirigés au niveau du dernier compartiment du spectromètre de masse, le ToF. Au niveau du ToF, avant d'arriver au détecteur, les ions parcourent une distance en un temps proportionnel à la racine carrée de leur rapport m/z qui peut ainsi être calculé. Les principales méthodes utilisées pour optimiser la quantité d'informations lors des analyses sont l'acquisition dépendante des données (DDA) et l'acquisition indépendante des données (DIA) [122],[123].

6.2. Intérêts et limites de la spectrométrie de masse dans la recherche des biomolécules

La spectrométrie de masse offre deux intérêts principaux dans la recherche des biomolécules. Elle possède une grande sensibilité, et permet la détection des composés à des concentrations de l'ordre du nanomolaire contrairement à d'autres techniques d'identification comme la RMN[124], qui a une limite de détection de métabolites ayant une concentration de l'ordre du micromolaire[125]. Cette sensibilité de la spectrométrie de masse permet de détecter un nombre plus important de métabolites dans un échantillon biologique. Un autre avantage de la spectrométrie de masse est la vitesse d'acquisition d'un spectre de masse qui varie entre une dizaine de millisecondes et quelques secondes, tandis que celle de la RMN est de l'ordre d'une minute pour la RMN 1D et de l'ordre du quart d'heure pour la RMN 2D[126]. Cette vitesse est importante dans le couplage de la spectrométrie de masse à d'autres techniques de séparation. Depuis quelques années, l'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution est devenue courante. Ces techniques permettent la génération de données qui conduisent à la détermination des formules brutes de composés[127]. La principale limite de la spectrométrie de masse est qu'elle nécessite l'ionisation des molécules. De ce fait, les composés non ionisables ne pourront pas être détectés par cette technique. De plus, il est difficile de contrôler l'étape d'ionisation lors d'une analyse par spectrométrie de masse, ce qui rend cette technique moins reproductible que la RMN et limite notamment les comparaisons de données obtenues entre différents laboratoires.

6.3. Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

La chromatographie en phase liquide à haute performance plus connue sous l'abréviation anglaise HPLC pour High Performance Liquid Chromatography est une méthode analytique de séparation basée sur l'hydrophobicité des molécules dans un mélange complexe de composés. A partir d'un éluant liquide sous une pression d'environ 70 bar (appelé aussi phase mobile), les échantillons à analyser sont poussés dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins (Figure 25). Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Au niveau de la colonne, les différents composés de l'échantillon sont séparés les uns après les autres en fonction de leur affinité à l'égard des deux phases (stationnaire et mobile). A la sortie de la colonne, les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.).

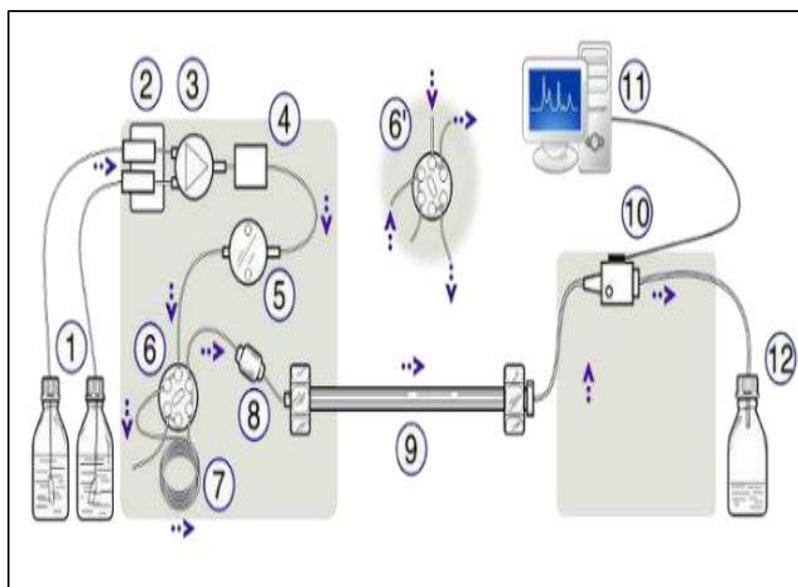


Figure 25 : Schéma général de la chromatographie en phase liquide à haute performance
(Source : Ayoub Bensakhria et *al.*, 2016)[129]

1-Réservoirs des solvants ; 2 – Dégazeur ; 3 - Valve de gradient d'élution ; 4 - Doseur de phase mobile (ou éluant) ; 5 - Pompe à haute pression ; 6 - Vanne d'injection en position "inject" ; 6' - Vanne d'injection en position "load" ; 7 - Boucle d'injection de l'échantillon ; 8 – Précolonne (éventuelle) ; 9 - Colonne analytique ; 10 – Détecteur ; 11 - Acquisition du signal ; 12 - Décharge déchets.

6.4. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

6.4.1. Principe général

Historiquement, la RMN fut l'une des premières techniques utilisée pour l'analyse des métabolites[128],[129]. C'est une méthode d'analyse basée sur les propriétés physiques des atomes qui possèdent un moment magnétique non nul. Pour les recherches en substances organiques, il s'agit essentiellement du proton ^1H , ^{13}C , du ^{15}N et du ^{31}P . Tous ces atomes possèdent un nombre de spin de $1/2$. Quand ils sont placés dans un champ magnétique intense, ces spins s'alignent parallèlement ou anti parallèlement par rapport au champ magnétique. Si on leur applique une impulsion de radiofréquence, les spins basculent dans une direction perpendiculaire au champ magnétique. Après excitation, le système revient à sa position initiale d'équilibre, ce qui induit ainsi un champ de radiofréquence qui est ensuite enregistré. La transformée de Fourier va permettre la conversion de la fréquence enregistrée en spectre qui pourra être interprété. Dans la recherche des substances naturelles, la RMN du proton ^1H est la plus utilisée car étant la plus sensible. Cela s'explique d'une part, du fait de l'abondance universelle d'atomes d'hydrogène dans les biomolécules et d'autre part du fait que l'isotope ^1H représente 99,98 % des atomes d'hydrogène[130]. La RMN du ^{31}P est également utilisée de manière fréquente dans les études qui s'intéressent à l'état énergétique des cellules car il s'agit de l'unique forme de

phosphore présente à l'état naturel[131]. La RMN du ^{13}C et de ^{15}N sont très peu sensibles du fait de la faible abondance de ces isotopes stables respectivement 1 et 0,37 %.

6.5. Intérêts et limites de la RMN dans la recherche des biomolécules

La RMN est une technique d'analyse non destructive, rapide, simple, reproductible, quantitative, moins fastidieuse dans la préparation des échantillons, et génère des spectres contenant plusieurs informations structurales sur les métabolites étudiés.

C'est une technique très enrichissante et informative conduisant à l'identification des métabolites présents dans un échantillon biologique donné. Toutefois, l'abondance et la complexité des métabolites présents dans un échantillon peuvent poser des problèmes comme le chevauchement des signaux sur le spectre obtenu. Ce qui va considérablement réduire le nombre de métabolites pouvant être identifiés. Pour contourner cette difficulté, les acquisitions de RMN à une et deux dimensions sont développées et utilisées en métabolomique :

La RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)

- RMN proton (^1H) le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que les différents types d'hydrogène présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.
- RMN carbone (^{13}C) (DEPT-135 et JMOD) : Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sur un spectre. Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaires (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires. La différence majeure entre le DEPT 135 et le JMOD, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le JMOD alors qu'ils ne le sont pas avec le DEPT.

La RMN bidimensionnelles (RMN – 2D) permet une meilleure résolution des signaux facilitant ainsi l'identification de plusieurs métabolites dans un mélange complexe. Il peut s'agir de méthodes :

Hétéronucléaire :

HSQC ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

- HMBC ($^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons[132].

Homonucléaires :

- COSY ($^1H-^1H$) : cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents[133].
- NOESY ($^1H-^1H$) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons d'une même molécule[134].

Il y a aussi la spectroscopie J-Résolue (1H JRES) qui communique des informations sur les valeurs de couplages entre noyaux d'une même espèce (homonucléaires) ou d'espèces différentes. La RMN 2D est devenue l'outil de choix pour l'élucidation structurale des métabolites. Un autre avantage majeur de la RMN est le fait qu'elle soit quantitative. Ce qui est particulièrement vrai pour la RMN 1D où l'intensité des signaux est relative à la concentration molaire du métabolite. Pour obtenir des informations sur la concentration absolue, il suffit d'ajouter un standard de concentration connue[135]. Comme autre avantage de la RMN, nous avons la reproductibilité, entre différents instruments et entre différents utilisateurs[136]. Ce qui rend faciles et utiles les études inter-plateformes lorsque le nombre d'échantillons à analyser est très considérable. Cependant, l'une des limites de la RMN demeure son manque de sensibilité par rapport à la spectrométrie de masse[116].

Pour cette raison, la majorité des études en RMN sont focalisées à rechercher des biomarqueurs plutôt que d'identifier complètement le métabolome. Des avancées technologiques en cours devraient conduire à l'amélioration considérable de la sensibilité des instruments, par exemple, l'utilisation d'aimants à très hauts champs qui permettent d'atteindre des fréquences de résonance supérieures à 1 GHz, et l'utilisation de cryo-sondes et bobines superconductrices à haute température[137], ou par la mise en place des techniques d'hyperpolarisation[138].

VII. DEREPLICATION ET RESEAUX MOLECULAIRES

La déréplication est une approche de profilage pour l'identification rapide de composés présents dans un extrait afin de mettre en évidence les molécules connues et déjà décrites dans la littérature. Par l'identification rapide des composés déjà connus, la déréplication permet aux chercheurs de se focaliser sur les composés inconnus qui peuvent potentiellement avoir un intérêt biologique[139]. L'analyse physico-chimique est un moyen d'y parvenir en reliant l'espace des échantillons physiques à celui des données analytiques. Une relation directe entre ces dernières et l'espace des structures moléculaires est nécessaire afin de relier les composés identifiés à leur structure moléculaire. La déréplication consiste donc en l'acquisition de données analytiques et leur comparaison à celle déjà publiées.

7.1. Avancé de la déréplication

Depuis plusieurs décennies, les méthodes déréplicatives ont considérablement évoluées. Elles ont été utilisées dans plusieurs procédés allant de l'identification de composés majeurs dans un extrait au profilage chimique complet. Ces avancés ont été possibles en partie grâce aux progrès réalisés dans les techniques d'acquisition pour le profilage des métabolites dans les matrices biologiques complexes dans les domaines de la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire en termes de sensibilité, de résolution et de débit, mais aussi, plus récemment, à l'introduction de méthodes *in silico* et chimiométriques[140]. Il a été reconnu que les méthodes traditionnelles d'analyse ne plongeaient que légèrement dans le réservoir complet de molécules présentes dans des mélanges complexes, en y laissant une très grande quantité de molécules[141]. Le flux de travail (workflow) schématique de déréplication et d'élucidation des structures en chimie des substances naturelles est présenté à la Figure 26[142]. Le plus important reste la liaison des échantillons (extraits, fractions ou composés purs) et les structures moléculaires qu'ils contiennent. Parfois les échantillons sont obtenus par différentes méthodes d'extraction qui conduisent à des mélanges complexes de composés ayant des propriétés physico-chimiques données selon la nature du solvant et la technique d'extraction utilisée. Les fractions et les composés purs sont obtenus après une ou plusieurs étapes chromatographiques préparatoires. L'élucidation structurale est réalisée par combinaison de méthodes spectroscopiques (RMN) et spectrométriques (MS). Il arrive d'utiliser des méthodes supplémentaires telles que la LC-UV, la diffraction des rayons X pour les extraits ou fractions. La détermination de la structure moléculaire résulte de l'interprétation des données par deux stratégies différentes : l'élucidation de novo (qui fait principalement recourt à des stratégies manuelles) et la déréplication (qui est généralement assistée par ordinateur). L'ensemble de ces deux stratégies permettra l'annotation des métabolites. En métabolomique, il existe cinq niveaux différents pour l'identification des composés résumé dans le Tableau 1[143].

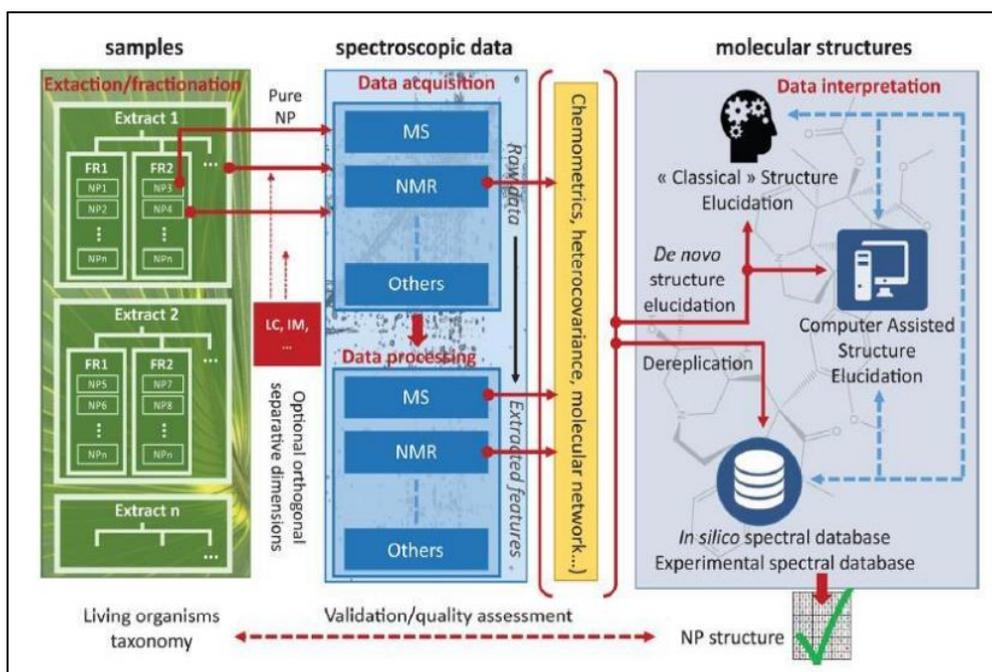


Figure 26 : Flux de travail schématique de déréplication/élucidation des structures dans la chimie des substances naturelles

Énoncé par J-L. Wolfender et *al.*, (2019)[142]

Tableau 1 : Niveau de confiance des annotations Metabolomics Society énoncé par Blaženović et *al.*, 2018[145]

Niveau de confiance	Description	Exigences minimales en matière de données
Niveau 0	Structure 3D non ambiguë : composé pur isolé, y compris la stéréochimie complète	Suivre les directives du produit naturel, détermination de la structure 3D
Niveau 1	Structure 2D confiante : utilise une correspondance standard de référence ou une élucidation complète de la structure 2D	Au moins deux techniques orthogonales définissant la structure 2D en toute confiance, telles que MS/MS et RT
Niveau 2	Structure probable : appariée aux données de la littérature ou aux bases de données par des preuves diagnostiques	Au moins deux éléments d'information orthogonaux, y compris des éléments de preuves qui excluent tous les autres candidats
Niveau 3	Structure ou classe possible : Structure la plus probable, isomères possibles, classe de la substance ou correspondance de sous-structure	Un ou plusieurs candidats possibles, nécessite au moins une information à l'appui du candidat proposé
Niveau 4	Caractéristique inconnue	Présence dans l'échantillon

7.2. Réseaux Moléculaires (MN)

La technique des réseaux moléculaires (MN) a été développée par les groupes de recherche de Pieter C. Dorrestein et Nuno Bandejas de l'Université de Californie à San Diego. La plateforme internet d'analyse et de partage de données MS/MS 'Global Natural Products Social Molecular Networking' GNPS a été mise en ligne en janvier 2014. Le réseau moléculaire représente l'outil le plus largement utilisé pour regrouper les molécules en familles moléculaires sur la base de leurs similitudes spectrales MS/MS, c'est-à-dire que plus deux spectres MS/MS partagent les ions ou de pertes neutres, plus ils sont similaires. Les réseaux moléculaires sont basés sur la fonction « cosinus » qui i) examine les pics partagés entre deux spectres à l'intérieur d'un seuil défini par l'utilisateur, ii) considère l'intensité des ions fragments et iii) considère la différence entre les deux masses parentales en déplaçant les ions fragments à l'intérieur de cette différence et en vérifiant les correspondances entre les ions fragments (Figure 27 A)[144]. Après la vectorisation de tous les spectres MS/MS, ces derniers sont comparés aux spectres des bases de données expérimentales du serveur GNPS (Figure 27 B)[145]. Chaque spectre est représenté par un nœud (« nodes »), étiqueté par la masse de l'ion précurseur. Les nœuds sont connectés par des lignes (« edge » en anglais) dont l'épaisseur est proportionnelle au degré de similitude entre les spectres, suivant un score de similitude « cosine score », de valeur compris entre 0 (totalement différent : liaison fine) et 1 (complètement identique : liaison épaisse) (Figure 27 C). Les nœuds dont les spectres de masses sont semblables seront ainsi regroupés au sein de groupe (Cluster) plus ou moins grands (Figure 27 D). Les spectres n'ayant aucune correspondance avec d'autres spectres apparaissent de manière isolée, nœuds reliés à eux-mêmes (« Selfloop » en anglais).

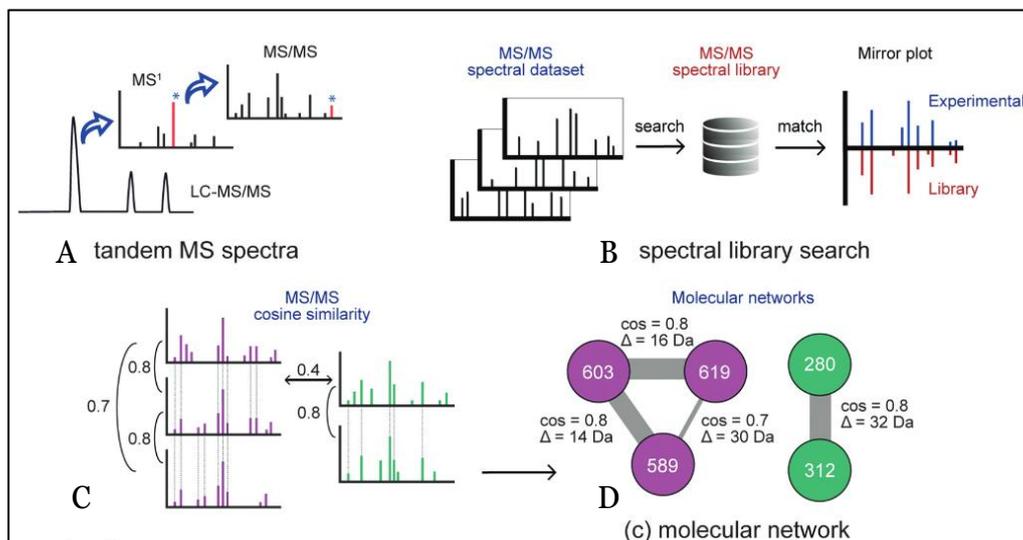


Figure 27 : Processus de création d'un réseau moléculaire

Présenté par Hooft et *al.*, (2020)[18]

7.3. Traitement de données LC-MS/MS

Quelle que soit la technique analytique utilisée, le traitement des données obtenues par des outils bio-informatiques a pour objectif d'extraire d'une façon automatique les signaux analytiquement pertinents présents dans les données brutes. Pour cela, la plupart des logiciels disponibles gratuitement en ligne pour le prétraitement des données MS exige que les données soient sous un format libre (mzXML, mzML, mgf, text et netCDF). La première étape avant le prétraitement est donc la conversion de données vers un format libre. Cette conversion peut être effectuée à l'aide du logiciel MSConvert[146] qui prend en charge la majorité des formats de type «.raw» pour le logiciel MassLynx (Waters) et «.d» pour le logiciel MassHunter (Agilent). Le traitement des données implique plusieurs étapes : la détection des pics (peak picking), la déconvolution, l'appariement des pics (peak matching) et l'alignement des pics entre les différents échantillons[147]. L'étape de détection des pics peut inclure la correction de la ligne de base et la réduction du bruit de fond. La déconvolution est importante dans le traitement des pics chevauchants et les fragments provenant du même métabolite. Avant l'alignement, les pics sont groupés en fonction du temps de rétention (RT) et le rapport m/z . Le plus souvent les pics sont alignés en fonction du temps de rétention issus des données chromatographiques[148]. La détection des pics est une étape critique du prétraitement de données MS. La méthode de traitement doit être suffisamment souple pour tenir compte de la variation de données obtenues avec différents instruments à l'exemple de la résolution (chromatographique et masse), la forme de pics ou le bruit de fond. La détection des pics se fait en plusieurs étapes avec le logiciel MZmine 2, toutes les étapes doivent être optimisées par l'opérateur[149] i) le module « masse détection » génère une liste de masses (ions) pour chaque scan dans le fichier brut de données, plusieurs algorithmes sont fournis pour cette étape. Le choix de l'algorithme optimal dépend des caractéristiques des données brutes (résolution de masse, précision de masse, forme du pic et le bruit de fond). Dans le cas où les données brutes sont centroidées, un seul algorithme (centroid mass detector) peut être utilisé. Il détecte tous les signaux au-dessus d'un niveau de bruit donné comme étant des pics, ii) le module « ADAP (Automated Data Analysis Pipeline) chromatogram builder » qui relie les m/z de même valeurs détectés sur plusieurs scans consécutifs[150], iii) la construction de EIC (Extracted Ion Chromatograms) se fait par l'algorithme en connectant les pics les plus intenses car ils ont tendance à être plus précis. Un chromatogramme couvrant un intervalle de temps minimal pour chaque m/z est donc construit à l'issue de cette étape, et iv) chaque chromatogramme est ensuite déconvolué en pics chromatographiques individuels.

C'est une étape qui permet de séparer les isomères de même m/z en fonction du temps de rétention. À l'issue de la déconvolution, le module « isotopic peak grouper » regroupe les pics ayant un modèle isotopique similaire. Pour chaque configuration isotopique trouvée, l'information sur la charge et le rapport isotopique est sauvegardée, le reste des pics isotopiques supplémentaires est retiré de la liste des pics, seul l'isotope le plus intense est conservé. En considérant plusieurs échantillons, une étape d'alignement dont le but est de faire correspondre les pics similaires ou communs aux différentes listes de pics, est nécessaire. La fonction ou l'algorithme « joint aligne » aligne les pics détectés dans les différents échantillons à l'aide d'un score de correspondance. Ce score est calculé en fonction de la masse et du temps de rétention de chaque pic. L'inconvénient pour cet algorithme est qu'il est incapable de prendre en compte les déviations linéaires des temps de rétention entre échantillons[151]. Une détection incomplète des pics ou une erreur dans l'alignement des différents pics peut entraîner le manque de plusieurs pics. Le module « gap-filling » comble toutes ses lacunes dans la liste des pics lorsque cela est possible en fonction des paramètres définis par l'utilisateur. Les paramètres les plus importants sont « tolérance m/z » et « tolérance RT » qui définissent l'intervalle dans lequel l'algorithme doit trouver le nouveau pic. Les fichiers .mgf et _quant CSV obtenus peuvent directement être soumis dans les bases de données en ligne comme le GNPS. Une identification des pics peut également être effectuée en comparant les données MS[152] à des bases de données personnalisées de m/z et RT ou en se connectant directement à des ressources en ligne depuis l'interface MZmine 2. Les étapes de traitement des données obtenues en LC-MS sont plus complexes que celles des données obtenues en RMN. Cela est dû aux techniques de séparation qui amènent une dimension supplémentaire, une augmentation de bruit de fond, d'artefacts et une redondance d'information. Les techniques de séparation engendrent des décalages de pics temporels qui correspondent à des variations de temps de rétention.

7.4. Visualisation des réseaux moléculaires

La visualisation des données sur les familles moléculaires peut être effectuée en ligne sur la plate-forme du GNPS, alors que la visualisation du réseau moléculaire et ses familles moléculaires se fait via l'outil Cytoscape, accessible librement sur internet, a été utilisée pour la visualisation des résultats[153]. Dans Cytoscape, les paramètres du réseau peuvent être réglés pour faciliter l'interprétation des données, comme l'épaisseur des arrêtes qui peut être proportionnelle au score cosine, la taille des nœuds qui peut être corrélée à l'intensité des ions précurseurs, ou la couleur des nœuds souvent utilisée pour mieux représenter plusieurs métadonnées associées à l'échantillon d'intérêt.

7.5. Interprétation des réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires sont fondés sur l'hypothèse selon laquelle les molécules apparentées produisent des schémas de fragmentation similaires en spectrométrie de masse MS/MS, partant de cette hypothèse, la mise en réseau moléculaire produit une carte de similarités spectrale permettant de visualiser l'ensemble des molécules structurellement apparentées au sein d'un même cluster et les molécules structurellement différentes réparties dans des clusters différents. Le principal intérêt des réseaux moléculaires est qu'ils peuvent être utilisés pour l'exploitation de nombreux spectres MS/MS sans connaissance préalable de la composition chimique des échantillons. De plus, le GNPS peut effectuer de façon automatique des recherches dans plusieurs bases de données spectrales pour annoter les fragments de molécules si leurs spectres MS/MS sont répertoriés dans les bibliothèques spectrales publiques (MassBank[154], Metlin[155], Respect[156] et GNPS) qui hébergent les données MS/MS de plus de 22 644 composés individuels[157]. L'interprétation des réseaux peut se faire de deux manières i) premièrement on peut organiser les données sans connaissance préalable sur leur composition chimique ou ii) faire une annotation moléculaire sur une molécule connue et déduire les structures des molécules connectées, autrement dit faire une l'annotation des molécules inconnues à partir d'une molécule connue.

PARTIE II: MATERIELS ET METHODES

I. ENQUETES ETHNOPHARMACOLOGIQUES ET RECOLTE DES PLANTES

Ce travail a été axé sur la sélection et la récolte d'espèces de plantes avec intérêt thérapeutique dans le traitement des affections microbiennes, l'objectif étant de réaliser des études chimiques et biologiques sur ces espèces de plantes. Nous nous sommes appuyés sur les symptômes des maladies causées par les microorganismes (bactéries, virus et champignons) pour lesquelles les tradipraticiens ont la connaissance. Il était question de recenser les plantes n'ayant pas fait l'objet d'une étude dans le domaine des substances naturelles ou pour lesquelles il n'y avait pas assez de données dans la littérature.

1.1. Présentation de la zone d'étude

Le Gabon est un petit pays d'Afrique centrale marqué par une forêt qui couvre les 85 % (près de 230 000 km²) de son territoire national[158]. Il est limité au Nord-Est par le Cameroun, au Nord-Ouest par la Guinée équatoriale et à l'Est par le Congo-Brazzaville. Le Gabon fait partie du bassin du Congo, deuxième plus grand massif forestier du monde après l'Amazonie[159]. A l'heure actuelle, la forêt gabonaise est probablement la plus riche en espèces végétales avec près de 20 % d'espèces endémiques[160]. Le Gabon totalise 13 parcs nationaux et 9 provinces sur une superficie de 267 667 km² (Figure 28). L'étude a eu lieu dans la province du Woleu-Ntem (Nord du Gabon) précisément dans les villes d'Oyem capitale provinciale (2°36'0" N, 12°4'0" E) et Bitam (0°43'0" N, 11°37'60" E). La flore gabonaise est caractérisée par un climat équatorial (chaud, humide et pluvieux) avec des précipitations annuelles qui varient entre 1 500 et 2 500 mm.



Figure 28 : Carte du Gabon montrant en rouge la zone de récolte [carte-parcs-nationaux-gabon.jpg \(1689×1560\)](http://carte-parcs-nationaux-gabon.jpg) (actualitix.com)

1.2. Travail sur le terrain et récolte des plantes

Les enquêtes ethnopharmacologiques ont été réalisées entre août 2018 et janvier 2019 dans les villages de Nvane Esabeigne (32 Km de Bitam) et d'Akam Essatouk (15 Km d'Oyem). Les informations ont été recueillies auprès de 20 tradipraticiens (14 hommes et 6 femmes) ayant accepté de partager leurs connaissances sur les plantes antimicrobiennes et les maladies apparentées. Les personnes interrogées ont été identifiées grâce aux dirigeants locaux du comité des tradipraticiens de ladite province. Les enquêteurs ont rempli un questionnaire préétabli (Tableau 2). Notre guide d'entretien comportait des questions sur le nom local de la plante, l'organe utilisé, la méthode de préparation et d'administration des recettes, l'état d'utilisation (frais ou sec), la maladie traitée (il est important de souligner le fait que les guérisseurs se focalisent beaucoup plus sur les symptômes : fièvre, toux, diarrhée etc.. qui sont une résultante parfois directe de la maladie et non de l'étiologie biologique tel que l'agent infectieux responsable de la maladie), la durée du traitement, l'âge et le niveau d'instruction de l'informateur. Les plantes ont été sélectionnées grâce à leur fréquence d'utilisation car dans une étude ethnopharmacologique, la fréquence à laquelle une plante est mentionnée dans le traitement d'une maladie peut être un bon indicateur de son efficacité.

Les échantillons frais des plantes ont été récoltés avec des sécateurs, étiquetés et transportés dans un sac plastique anti-ultraviolets. Une planche d'herbier a été confectionnée depuis le lieu de récolte des plantes et l'identification des plantes a été faite à l'herbier national du Gabon IPHAMETRA (Institut National de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle) par M. Raoul NIANGADOUMA. Suite à l'analyse des résultats, 22 plantes ont été récoltées dans leur milieu naturel. Un accord avec le point-focal de la convention sur la biodiversité a été signé avant le démarrage de ce travail.

Parmi ces 22 plantes, il y a quatre (4) dont l'identification est en cours. Les noms acceptés ([site The Plant List, 2022](#)) et les noms sous lesquels ces plantes ont été enregistrées dans l'herbier figurent ci-dessous :

- Ecorces et feuilles de *Erismadelphus exsul* Mildbr. (Vochysiaceae)
- Ecorces et feuilles de *Baillonella toxisperma* (Sapotaceae)
- Ecorces et feuilles de *Morinda lucida* Benth. (Rubiaceae)
- Ecorces et feuilles de *Petersianthus macrocarpus* (P.Beauv.) Liben (Lecythidaceae)
- Ecorces et feuilles de *Entandrophragma cylindricum* (Sprague) Sprague (Meliaceae)
- Ecorces de *Ongokea gore* (Hua) Pierre (Olacaceae)
- Ecorces et feuilles de *Trichoscypha acuminata* Engl.(Anacardiaceae)
- Ecorces de *Pentaclethra macrophylla* Benth.(Mimosaceae)

- Ecorces de *Omphalocarpum elatum* Miers (Sapotaceae)
- Ecorces de *Pycnanthus angolensis* (Welw.) Warb.(Myristicaceae)
- Ecorces de *Erythrophleum ivorense* A.Chev.(Leguminosae)
- Ecorces de *Parkia bicolor* A.Chev.(Leguminosae)
- Ecorces de *Chlorophora excelsa* (Welw.) Benth. est un synonyme de *Milicia excelsa* (Welw.) C.C.Berg (Moraceae)
- Ecorces et feuilles de *Guibourtia tessmannii* (Harms) J.Leonard (Fabaceae)
- Ecorces de *Bobgunnia fistuloides* (Harms) J.H.Kirkbr. & Wiersema (Leguminosae)
- Ecorces de *Pachyelasma tessmannii* (Harms) Harms (Leguminosae)
- Ecorces de *Cylicodiscus gabunensis* Harms (Mimosaceae)
- Ecorces de *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn.(Malvaceae)

Tableau 2 : Fiche d'enquête ethnopharmacologique sur les plantes médicinales gabonaises utilisées dans le traitement des maladies microbiennes

Date :				N° de la fiche :	
Nom du village :				Département :	
INFORMATEUR					
Noms et Prénoms :				Sexe :	
Groupe ethnique :		Niveau d'instruction :		Profession :	
IDENTIFICATION DE LA PLANTE					
Nom courant :		Nom scientifique :		Nom vernaculaire :	
Signification du nom vernaculaire :		Caractères de reconnaissance :		N° d'herbier : N° de photo :	
TYPE DE MALADIE					
Salmonellose	Pneumonie	Chlamydia	Mycoses génitales	Intoxication alimentaire	Ulcère
Tuberculose	Syphilis	Herpès génital	Légionellose	Méningite	Hépatites virales
Ulcères	Autres				
Signes de reconnaissance					
PARTIE(S) DE LA PLANTE UTILISEE(S)					
Feuilles :	Fruits :	Graine :	Noyau :	Fleur :	Bourgeon :
Tige :	Racine :	Ecorce de tige :	Ecorce de racine :	Exsudats :	Plante entière :
MODALITE(S) DE RECOLTE					
Ramasser	Arracher	Entailler	Gratter	Couper	Ecorcher
ETAT DE DEVELOPPEMENT					
Plantule	Juvenile	Adulte (Mature)	Individu sénescant	Individu mort	
PERIODE(S) ET DATE(S) DE RECOLTE					
Aube	Matin	Midi	Après-midi	Crépuscule	Soir
Quelconque					
LIEU(X) DE RECOLTE					
Coordonnées GPS		Plantations	Campement	Bord de piste	Sous-bois
Forêt 1 ^{ère}	Forêt 2 nd	Forêt exploitée	Bord de cours d'eau	Aquatique	
MODE(S) DE PREPARATION					
Friture :	Cru :	Cuit :	Infusion :	Macération :	Décoction : Autres :
MODE(S) ET VOIE(S) D'ADMINISTRATION					
Boisson :	Bain :	Lavement :	Inhalation :	Friction :	Emplâtre :
Massage :	Fumigation :	Autres :			
POSOLOGIE ET DUREE DE TRAITEMENT					
Cuillère(s)	Verre(s)	Bouteille(s)	Jour(s)	Semaine(s)	Mois
MODES DE CONSERVATION					
Fumage		Séchage		Autres	
COMMERCIALISATION					
OUI			NON		
OBSERVATIONS PARTICULIERES					

II. ETUDES CHIMIQUES

2.1. Extraction et fractionnement

Les écorces fraîches du tronc ont été recueillies pendant l'enquête ethnopharmacologique. Les échantillons obtenus ont été séchés à l'ombre puis réduits en poudre. A partir de cette poudre, une extraction par macération sous agitation a été faite pendant 24 h avec du méthanol à 80% ou l'éthanol à 70%. Chaque échantillon (400 g) a été mélangé avec 1500 ml de solvant, le mélange a été agité pendant 24 h, l'extrait obtenu a été filtré et pressurisé à 40°C (Figure 29 A, B et C). L'extrait brut (3,64 g) a été dissous dans 12 mL de solvant (8 ml dichlorométhane et 4 ml de méthanol à 80%), puis centrifugé pendant 10 min à 4600 rpm. Le surnageant a été concentré à nouveau par un évaporateur rotatif (BUCHI R-210), le tout est fractionné par chromatographie sur colonne, en utilisant un système de solvant CH_2Cl_2 -MeOH (100 : 0 à 0 : 100) de polarité croissante. La séparation par chromatographie sur colonne a permis d'obtenir des fractions (Figure 29 E).



Figure 29 : Procédure d'extraction et fractionnement : extraction par macération sous agitation (A) ; filtration (B) ; chromatographie sur colonne (C, D) et fractions (E)

2.2. Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les fractions obtenues en chromatographie sur colonne ont été regroupées grâce aux CCM. Une concentration de 5 mg/mL est déposée sur une plaque CCM en phase normale 60 F₂₅₄ (20 × 10 cm) à l'aide du déposeur automatique LINOMAT 5 (CAMAG, Muttenz, Suisse). Un dépôt de 20 µL a été effectué en série pour chaque fraction. La migration a été réalisée avec un système d'éluant dichlorométhane/méthanol (70/30) sur une distance de 55 mm (Figure 30 A). Les plaques CCM développées ont été visualisées sous UV 254 et 366 nm en utilisant le visualiseur CAMAG 'TLC VISUALIZER 2' et les photos ont été prises avec le logiciel Vision CATS (Figure 30 B).

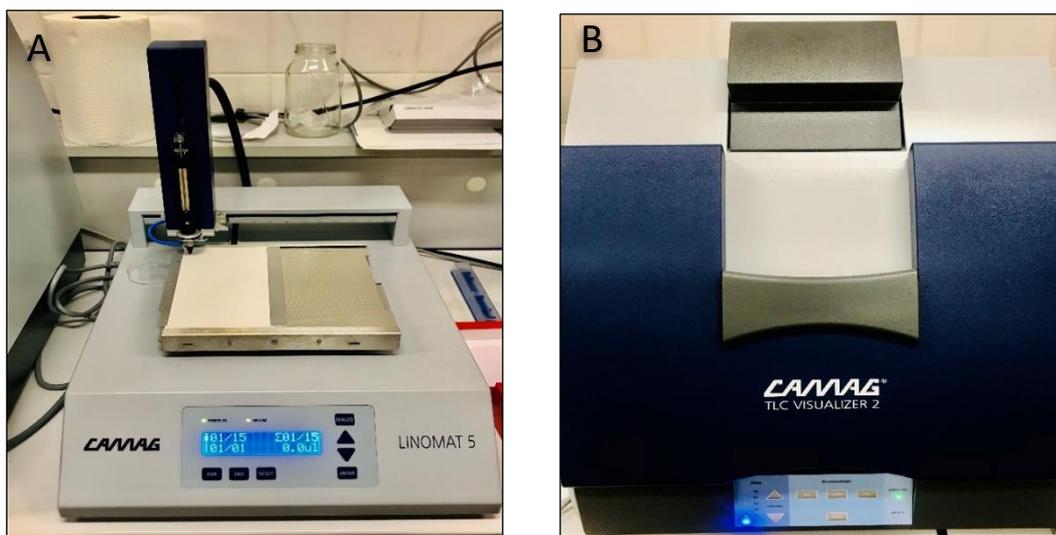


Figure 30 : LINOMAT 5 CAMAG (A) et TLC VISUALIZER 2 CAMAG (B)

2.3. Analyse HPLC Préparative

Parmi les fractions obtenues en CCM, la fraction F4 a été purifiée par chromatographie liquide haute performance préparative (HPLC préparative) pour obtenir les composés 1 et 2. Ils ont été solubilisés dans du méthanol puis filtrés sur filtres PTFE (13 mm ; 0,22 µm) (Cloup, Champagne-sur-Marne, France). L'HPLC préparative a été réalisée sur un système LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'un échantillonneur automatique Shimadzu SIL-10AP (Figure 30 A). La colonne de séparation était une colonne SUPELCOSIL ABZ+PLUS (25 cm × 22,1 cm ; 5 µm) (Sigma, St. Louis, Missouri, États-Unis). L'élution a été effectuée avec un débit de phase mobile de 17 mL/min constituée d'un mélange d'eau ultra-pure (H₂O) contenant 0,1 % d'acide formique (HCOOH) (A) et de méthanol (MeOH) (B), le programme a commencé à t = 0 min avec un ratio (A :B) 90 : 10, puis à t = 20 min 45 : 55, à t = 35 min 88 : 12 et à t = 45 min 0 : 100. Après purification, et séchage, 2 mg du composé 1 et 1,6 mg du composé 2 ont été obtenus.

2.4. Analyse HPLC-UV

La pureté des composés a été analysée par HPLC -UV sur un système LC-2010HT (Shimadzu, Kyoto, Japon) (Figure 31 B). Une colonne SUPELCOSIL ABZ+PLUS (25 cm × 4.6 mm ; 5 µm) a été utilisée pour vérifier la pureté, avec de l'eau ultra-pure (H₂O) contenant 0,1 % d'acide formique (HCOOH) et du méthanol avec 0,1% d'acide formique à un débit de 0,8 mL/min. Le gradient de la phase mobile était le même que celui utilisé pour la HPLC préparative.

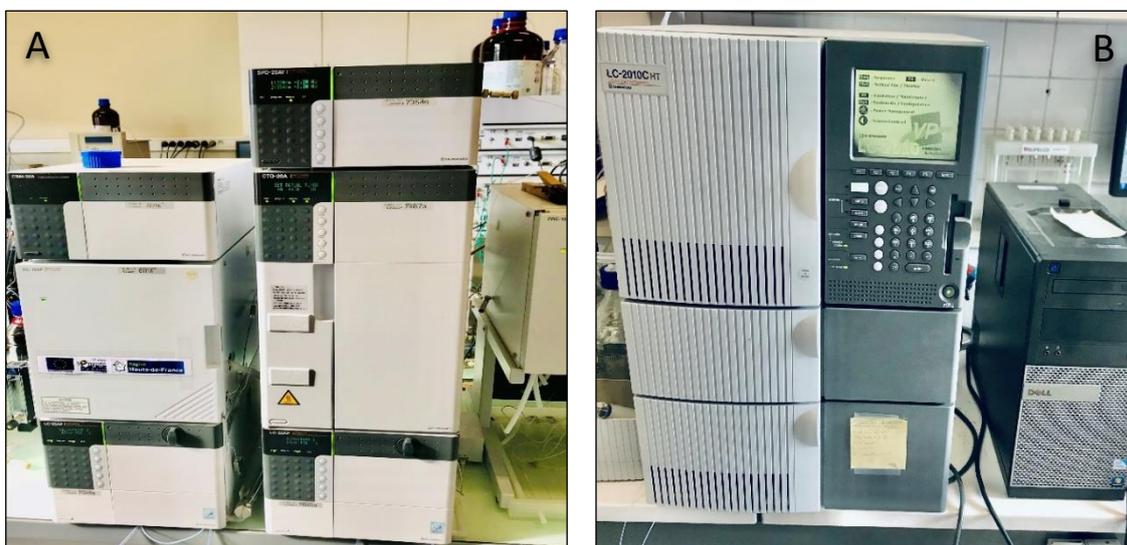


Figure 31 : Images HPLC préparative équipé d'un système LC-20AD (A) et HPLC-UV équipé d'un système LC-2010HT (B)

2.5. Analyse HPLC-MS/MS

La démarche de travail a été fondée sur l'utilisation du couplage chromatographie liquide haute performance HPLC et la spectrométrie de masse Q-ToF hybride Agilent 6530 (Agilent Technologies, Massy, France). Les extraits ont été préparés à une concentration de 1,5 mg/mL puis analysés en HPLC-UV-MS/MS avec un volume d'injection de 5 µL (Figure 32). La séparation a été réalisée par chromatographie à polarité de phases inverses, avec une colonne analytique Sunfire® C18 (150 × 2,1 mm, diamètre de particule de 5 µm). Un gradient d'élution standard a été employé avec les phases mobiles A : 0,1% d'acide formique (HCOOH) dans l'eau ultra-pure (H₂O) et B : 100% de méthanol (MeOH). Les deux solvants ont été élués à un débit de 0,25 mL/min en utilisant un gradient d'élution standard : MeOH : H₂O + 0,1% HCOOH (5:95 à 100:0 en 40 min). La détection est assurée avec un détecteur UV à barrettes de diodes branchées en série avec un spectromètre de masse Agilent 6530 AccurateMass, équipé d'une source électrospray (ESI) et d'un analyseur de type quadropole/temps de vol (Q/TOF). Les mesures de *m/z* sont effectuées entre 100 et 1200.

La source ESI est compatible avec des analytes présentant des gammes de polarités variées. Elles sont adaptées à plusieurs familles de composés notamment les polyphénols et les alcaloïdes. Elle est utilisée en mode positif et négatif, en raison de la nature des extraits et de notre intérêt à isoler différents types de composés, qui peuvent donc être observés en $[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$. Les paramètres d'ionisation ont été réglés comme suit : température du capillaire à 320°C, tension de la source à 3500 V, débit du gaz de gaine à 10 L/min, potentiel de fragmentation 180 V, pression du nébuliseur 35 psi. La vanne de dérivation a été réglée sur les déchets pendant les 3 premières minutes.

L'analyseur offre une précision satisfaisante sur les mesures (< 5 ppm) avec une résolution également satisfaisante (11 000 à m/z 922), les mesures de haute résolution (HR-MS) assurent une certitude importante sur les formules brutes calculées. La fragmentation est réalisée en mode automatique (AutoMS) « Top3 » : les 3 ions les plus intenses sont fragmentés, avec une exclusion de 40 secondes après trois répétitions, les ions parents sélectionnés sont fragmentés à une énergie de collision fixée à 45 eV et une fenêtre d'isolement de 1,3 u.m.a[19]. Solution d'étalonnage, contenant deux masses de référence interne (Purine, m/z 121,050873, et HP-921 [hexakis-(1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxy) Phosphazene], $C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$, m/z 922,0098). Un critère permanent de liste d'exclusion MS/MS a été défini pour éviter le sur-échantillonnage du calibre interne. Des mesures de haute résolution (HR-MS) assurent une certitude importante sur les formules brutes calculées pour les ions parents et pour les fragments observés, cette qualité de données est nécessaire à l'approche par molecular networking employée dans la suite.



Figure 32 : Préparation des échantillons pour les analyses HPLC-UV-MS/MS

III. CONSTRUCTION DES RESEAUX MOLECULAIRES

3.1. Paramètres de mise en réseau moléculaire

Les fichiers de données MS² ont été convertis du format de données standard .d (Agilent) au format .mzXML à l'aide du logiciel MSConvert, qui fait partie du logiciel ProteoWizard[161]. Tous les formats .mzXML ont ensuite été traités à l'aide de MZmine 2 v32[162]. La détection de masse a été réalisée en maintenant le niveau de bruit à 3,0 E3. Le constructeur de chromatogrammes ADAP a été utilisé en taille minimale de groupe de balayages de 4, un seuil d'intensité de groupe de 3000, une intensité minimale de 4000 et une tolérance m/z de 0,01 Da (ou 20 ppm)[150]. L'algorithme de déconvolution ADAP a été utilisé avec les paramètres standards suivants : Seuil S/N = 8, hauteur minimale des caractéristiques = 3000, seuil de coefficient/zone = 8, plage de durée des pics 0,02 - 2 min, plage d'ondelettes RT 0,02 - 1,2. Les scans MS² ont été appariés en utilisant une plage de tolérance m/z de 0,03 Da et une plage de tolérance RT de 1,0 min. Les isotopes ont été regroupés en utilisant l'algorithme isotopic peaks grouper avec une tolérance m/z de 0,005 Da (ou 15 ppm) et une tolérance RT de 0,3 min. L'alignement des pics a été effectué à l'aide du module join aligner (tolérance m/z = 0,005 Da (ou 15 ppm), poids pour m/z = 2, poids pour RT = 2,0, tolérance RT absolue 0,3 min). La liste des pics a été remplie de lacunes avec le même module de remplissage de lacunes pour la plage RT et m/z (tolérance m/z de 0,005 Da (ou 15 ppm)). Ensuite, le fichier de données spectrales .mgf et son fichier de métadonnées .csv correspondant ont été exportés en utilisant l'option intégrée dédiée "Export to GNPS-FBMN".

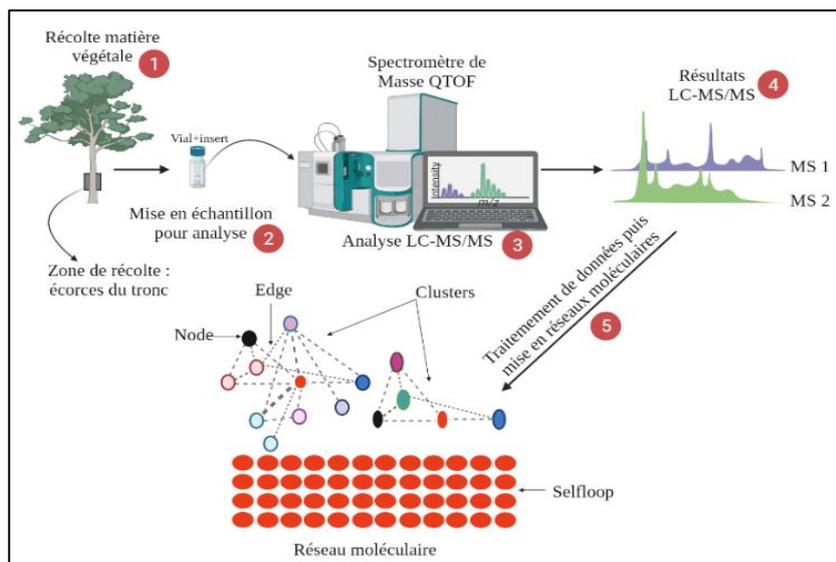


Figure 33 : Schéma résumé des Analyses LC-MS/MS et la construction des réseaux moléculaires
Créé par Essono Morel avec Biorender.com, 2021, <https://app.biorender.com/biorender-templates>

IV. PARAMETRES RMN UTILISES POUR L'ACQUISITION DES DONNEES

4.1. Appareillage et paramètres d'acquisition RMN

L'analyse des composés isolés des extraits de plante, a été réalisée grâce à un spectromètre RMN Bruker Avance III 600 MHz (système magnétique 14.09T), équipé d'une sonde TXI (^1H , ^{13}C , ^{15}N) de 5 mm z-gradient et d'un passeur d'échantillons SampleXpress (Figure 34). L'appareil fonctionne à une fréquence de 600,16 MHz pour le ^1H et 150,03 MHz pour le ^{13}C . Le passage des échantillons est contrôlé par un logiciel IconNMR. Dans la sonde les échantillons sont stabilisés à la température de 300 K, cette stabilisation est faite 5 min avant l'acquisition. L'homogénéisation du champ magnétique (shim) est optimisée pour chaque échantillon grâce à la procédure automatisée Topshim 1D. Le signal du méthanol MeOD est utilisé comme le signal de « lock » pour le champ magnétique.

Pour obtenir des spectres intéressants pour l'identification des métabolites, six séquences d'impulsions ont été utilisées sur les différents composés. Les séquences d'impulsions utilisées pour les différentes analyses sont : ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, et la NOESY. Toutes les séquences d'acquisitions 1D et 2D ont été faites dans l'objectif d'identifier les différents composés purifiés. Les différents spectres RMN ont été acquis et visualisés à l'aide du logiciel Topspin version v 3.5 – Bruker.



Figure 34 : RMN 600 MHz plate-forme analytique UPJV (Photo prise par Morel ESSONO)

V. ETUDES BIOLOGIQUES

5.1. Culture cellulaire

5.1.1. Cellule Caco-2

Les cellules épithéliales de côlon humain Caco-2 (n° d'accès 86010202, lot 16H030, European collection of authenticated cell cultures (ECACC), Salisbury, Royaume-Uni) sont cultivées en monocouches en milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, PanBiotech GmbH), supplémentées par du SVF inactivé (10 %, Gibco, Thermo Fisher Scientific), de la pénicilline (100 U.mL⁻¹)/streptomycine (0,1 mg.mL⁻¹, PanBiotech GmbH) et de la L-glutamine (2 mM, PanBiotech GmbH), à 37 °C et en atmosphère contenant 5 % de CO₂ (CO₂ Incubator, Thermo Scientific, Marietta, USA). Les milieux de culture sont changés tous les trois jours et les cellules sont repiquées à raison de 1,5.10⁶ cellules par flasque lorsque les monocouches atteignent une confluence de 90 %, par traitement à la trypsine-EDTA (PanBiotech GmbH).

5.1.2. Cellule HaCaT

Les cellules HaCaT (kératinocytes humains immortalisées) (n°300493, Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Allemagne) sont cultivées en milieu DMEM faiblement concentré en calcium (0,03 mM) et supplémentées par 10 % de sérum de veau foetal (SVF) sans calcium, de la pénicilline (100 U.mL⁻¹)/streptomycine (0,1 mg.mL⁻¹, PanBiotech GmbH) et de la L-glutamine (2 mM, PanBiotech GmbH). Les cellules sont cultivées en incubateur (CO₂ Incubator, Thermo Scientific, Marietta, USA) dans des flasques T75 à 37 °C et 5 % de CO₂. Elles sont passées 2 fois par semaine (ensemencement à une densité de 10 000 cellules par cm²).

5.2. Etude de cytotoxicité

Le CCK-8 (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) permet des analyses colorimétriques sensibles pour la détermination du nombre de cellules viables dans les analyses de prolifération cellulaire et de cytotoxicité. Le 2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfo-phényl)-2H-tétrazolium, sel monosodique (WST-8) est réduit au niveau intracellulaire, en présence des transporteurs d'électrons (NADH₂ ou NADPH₂) et grâce à l'action catalytique des déshydrogénases cellulaires, pour donner un produit de couleur orange (formazan), soluble dans le milieu de culture. La quantité de colorant formazan générée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Le Kit-8 (CCK-8) a été utilisé afin d'analyser la cytotoxicité des échantillons sur les cellules Caco-2 et sur les cellules HaCaT. Les cellules sont ensemencées en plaque de 96 puits à la densité de $2 \cdot 10^4$ cellules.cm⁻² et $1,2 \cdot 10^4$ cellules.cm⁻² pour les Caco-2 et les HaCaT, respectivement. Après 4 jours de culture pour les HaCaT et 6 jours de culture pour les Caco-2, les échantillons sont dilués en milieu DMEM (à concentrations croissantes allant de 0,01 à 2 mg.mL⁻¹) et mis en contact des cellules pour 24 h à 37 °C (CO₂ Incubator, Thermo Scientific, Marietta, USA), à raison de 100 µL/puits. Le WST-8 est ensuite ajouté à la concentration finale de 5 % pour 2 h, à 37 °C à l'abri de la lumière. La concentration en WST-8 réduit (formazan) est mesurée à la longueur d'onde de 450 nm à l'aide du spectrophotomètre SpectraMax® iD3 (Molecular Devices, San José, États-Unis) contre des « blancs ou contres dosage » contenant l'ensemble des réactifs pour chaque condition, excepté les cellules. Les résultats sont présentés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin (DMEM 2 % DMSO).

La viabilité cellulaire a été calculée par rapport au pourcentage de cellules vivantes du contrôle DMSO sur le logiciel Graph Pad Prism 9.3.0 (463) en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Viabilité cellulaire} = \frac{\text{DO moyenne des cellules traitées}}{\text{DO moyenne des cellules contrôles DMSO}}$$

5.3. Activités antimicrobiennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été obtenues au Centre Interdisciplinaire de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) au Gabon dans le laboratoire de bactériologie, tandis que les souches fongiques *Zymoseptoria tritici* et *Phytophthora infestans* ont été obtenues au Laboratoire des Métabolites spécialisés d'origine végétales JUNIA de Lille. Les souches bactériennes comme *Klebsiella MDR* (Multi Drug Resistant) et *Escherichia Coli BLSE* (bêta-lactamase spectre élargi) sont issues de la faune sauvage plus spécifiquement des chauves-souris, et *Salmonella enterica* a été isolée cliniquement chez des patients souffrant des maladies diarrhéiques.

5.3.1. Préparation du milieu physiologique

Une masse de chlorure de sodium (4,6 g) a été dissoute dans 500 mL d'eau distillée et le mélange a été homogénéisé puis mis au micro-onde jusqu'à la dissolution totale des cristaux de NaCl.

5.3.2. Préparation du milieu de culture Mueller Hinton II Agar (MH)

Dans un flacon de 1 L, 38 g du milieu Mueller-Hinton II Agar (MH) ont été introduits, puis 1 L d'eau distillée a été ajouté. Le mélange est chauffé en agitant, puis porté à ébullition pendant 1 min et autoclavé pendant 1h30 min à 121°C tout en évitant un surchauffement. La gélose de MH est coulée dans des boîtes de Petri de 9 cm de façon à obtenir une épaisseur de 4 mm, les boîtes ont été séchées à l'étuve avant emploi pendant 1 heure.

5.3.3. Préparation du bouillon nutritif Bouillon Trypcase Soja (TSB-D)

Dans un flacon de 1 L, 30 g de poudre du bouillon trypcase soja (TSB-D) ont été introduits, puis 1 L d'eau déminéralisée a été ajouté. Le mélange est soigneusement chauffé pendant 1 min jusqu'à dissolution complète. Le bouillon a été réparti dans les tubes puis autoclavé pendant 15 min à 120 °C.

5.3.4. Préparation de l'inoculum bactérien

Les bactéries ont été cultivées dans le bouillon trypcase soja (TSB-D) pendant 18 à 20 h pour qu'elles soient en phase exponentielle de croissance. Chaque culture a ensuite été suspendue dans une solution saline de chlorure de sodium (NaCl 0,9 %) à une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de l'échelle de Mac Farland. Cette suspension dont la DO à 625 nm doit être entre 0,08 et 0,10 correspond environ de $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/mL, et servira d'inoculum pour la suite[163].

5.3.5. Préparation des extraits et fractions

Dans un tube à essais contenant 50 mg d'extrait brut, 1 mL de DMSO à 30% a été introduit à l'aide d'une micropipette le tout pour une concentration de 50 mg/mL, le mélange est homogénéisé jusqu'à dissolution totale de l'extrait dans le solvant (Figure 35).



Figure 35 : Extraits de plante préparés à une concentration de 50 mg/mL

5.3.6. Les microorganismes utilisés

Pour cette étude, trois bactéries à Gram négatif pathogènes pour l'Homme (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739, *Klebsiella* MDR, *E. coli* ESBL, *Salmonella enterica*), un ascomycète (*Zymoseptoria tritici*) et un oomycète (*Phytophthora infestans*) ont été utilisées. Les bactéries pathogènes utilisées dans ce travail ont été obtenues à partir de la souchothèque du Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Gabon, tandis que *Zymoseptoria tritici* et *Phytophthora infestans* ont été obtenues de la souchothèque du laboratoire ISA Yncrea de Lille, France.

5.3.7. Antibiotiques de références utilisés

Pour cette étude six (6) antibiotiques de référence ont été utilisés notamment l'Amoxicilline, la Fosfomycine, la Gentamicine, la Tétracycline, la Ticarcilline et la Céfoxitine+ Acide clavulanique (inhibiteur des bêta-lactamases). Les concentrations et familles de ces différents antibiotiques sont indiquées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Concentration et familles des antibiotiques utilisés comme contrôles

Antibiotiques	Concentration	Famille
Amoxicilline	25 µg/mL	Bêta-lactamines
Fosfomycine	200 µg/mL	Acides phosphoniques
Gentamicine	10 µg/mL	Aminosides
Tétracycline	75 µg/mL	Cyclines
Ticarcilline	75 µg/mL	Bêta-lactamines
Céfoxitine + Ac Clav	40 µg/mL	Bêta-lactamines + inhibiteur de bêta-lactamases

5.3.8. Méthode de diffusion, détermination des DZI

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits (méthanoliques et éthanoliques) et des fractions a été réalisée par la méthode des disques de diffusions de Kirby-Bauer avec de légères modifications[164]. Une gélose Muller-Hinton (MH) a été coulée dans les boîtes de Petri de 90 mm de diamètre (Figure 36 A). Une fois la surface est refroidie et endurcie, elle a été ensemencée par inondation avec 1 mL d'inoculum bactérien et ensuite étalée sur toute la surface de la boîte au moyen d'une pipette Pasteur. Le surplus de suspension bactérien a été éliminé de la boîte de Petri. La gélose imbibée d'inoculum a été placée à l'étuve pendant 20-30 min à 37 °C pour la faire sécher et favoriser une meilleure diffusion du principe actif. Une fois la gélose sèche, des disques de papier buvard de 6 mm de diamètre imbibés de 20 μ L du principe actif ont été introduits dans les boîtes de Petri (Figure 36 B). Puis, ces dernières ont été incubées à 37 °C à l'étuve pendant 18 à 20 h selon les conditions de croissance de chaque microorganisme. Une zone ou halo claire est présente autour du disque si le principe actif inhibe la croissance bactérienne. Les tests ont été réalisés en triplicata.



Figure 36 : Coulage des milieux de culture (A) et dépôt des disques sur boîte de Petri (B)

5.3.9. Méthode de microdilution, détermination des CMI/CMB

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents principes actifs a été réalisée par la méthode de microdilution sur des plaques stériles de 96 puits. Les microplaques sont divisées en 96 puits schématisés sous forme de tableau de 8 lignes (A à H) et 12 colonnes (1 à 12), les quadrillages représentent les puits. A l'aide d'une concentration mère de 10 mg/mL (10 mg de principe actif dans un volume de 1 mL DMSO), différents points de gammes ont été réalisés. 100 µL de bouillon nutritif ont été ajoutés dans tous les puits excepté le premier puits, ensuite 200 µL du principe actif sont introduits au niveau du 1^{er} puits uniquement (puits A) suivi d'une dilution en cascade jusqu'au puits G, le puits H sert de contrôle. Les volumes successifs de 90 µL de bouillon nutritif et 10 µL d'inoculum bactérien préalablement préparé ont été ajoutés dans l'ensemble des puits de façon à obtenir une concentration finale de 5 mg/mL au niveau du premier puits, ensuite une dilution en cascade a été effectuée. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. La CMI est déterminée par la plus petite concentration de principe actif donnant une inhibition de la croissance bactérienne à l'œil nu. La CMB est déterminée à partir de la CMI. Les puits ne présentant aucune croissance visible à l'œil nu après incubation sont vidés et les contenus sont repiqués sur gélose coulée dans les boîtes de Petri de 9 cm de diamètre. La lecture est faite après incubation à 37 °C pendant 24 heures. La plus petite concentration qui ne laisse que 0,01 % de bactéries survivantes après un temps d'exposition à l'antibiotique de 12 à 18 heures correspond à la CMB. L'activité antimicrobienne des principes actifs en fonction de la zone d'inhibition (DZI) a été interprétée comme suit : DZI < 8 mm : non sensible ; 8 mm ≤ DZI ≤ 14 mm : sensible ; 15 mm ≤ DZI ≤ 19 mm : très sensible ; DZI ≥ 20 mm : extrêmement sensible. Selon Berche et collaborateurs, une substance antibactérienne est dite bactéricide lorsque le rapport CMB/CMI est compris entre (1 et 2), et bactériostatique lorsque ce rapport varie entre (4 et 16) [164],[165].

5.4.1. Activité anti-oomycète et antifongique

- Activité anti-oomycète : *Phytophthora infestans*

L'activité anti-oomycète de l'extrait brut et des fractions a été évaluée selon la méthode décrite par Banso et *al.*, 1999 avec de légères modifications[166]. Le milieu V8 a été préparé par autoclavage à 121 °C et refroidi à 45 °C. Ensuite, l'extrait brut et les fractions ont été préparés à une concentration de 100 mg.mL⁻¹ dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et ensuite ajoutés au milieu pour avoir une gamme de six concentrations (1000, 500, 250, 125, 62,5, et 31,5 mg.L⁻¹). Deux millilitres de chaque mélange ont été versés dans des microplaques stériles à 12 puits et laissés se solidifier. Trois répétitions (n = 3) par extrait ont été effectuées. L'inoculum de pastilles mycéliennes de 4 mm de diamètre a été prélevé dans une culture de *P. infestans* âgée de 10 jours à l'aide d'un tire-bouchon stérilisé, puis placé au centre de chaque puits sur la microplaque. Les plaques ont été incubées à 18 ± 1 °C pendant trois jours et la croissance de la souche de *P. infestans* a été mesurée pour chaque modalité (témoin, témoin DMSO, extraits et fractions). Le pourcentage d'inhibition a été obtenu à l'aide de la formule suivante : $P_i (\%) = [(D_m - d_m) / D_m] \times 100$; D_m = moyenne de D1+D2+D3 [longueur des filaments (mm) de la croissance mycélienne dans le témoin DMSO], et d_m = moyenne de d1+d2+d3 [longueur des filaments (mm) de la croissance mycélienne avec l'extrait]. P_i = pourcentage de réduction de la croissance mycélienne.

- Activité antifongique : *Zymoseptoria tritici*

L'activité antifongique de l'extrait brut et des fractions contre *Z. tritici* a été évaluée dans des microplaques à 12 puits contenant un milieu PDA amendé ou non avec les composés à 1000, 500, 250, 125, 62,5 et 31,5 mg.L⁻¹, selon le protocole décrit précédemment par Platel et *al.* (2021)[167]. La croissance fongique a été enregistrée onze jours après l'inoculation des microplaques avec la suspension de spores fongiques, en mesurant le diamètre perpendiculaire de chaque colonie fongique. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la même formule que celle utilisée ci-dessus pour *P. infestans*. Les courbes dose-réponse pour *P. infestans* et *Z. tritici* ont été réalisées sur le logiciel Graph Pad Prism version 9 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Les tests biologiques pour les deux agents pathogènes ont été réalisés deux fois dans deux expériences indépendantes avec une portée de trois répétitions biologiques.

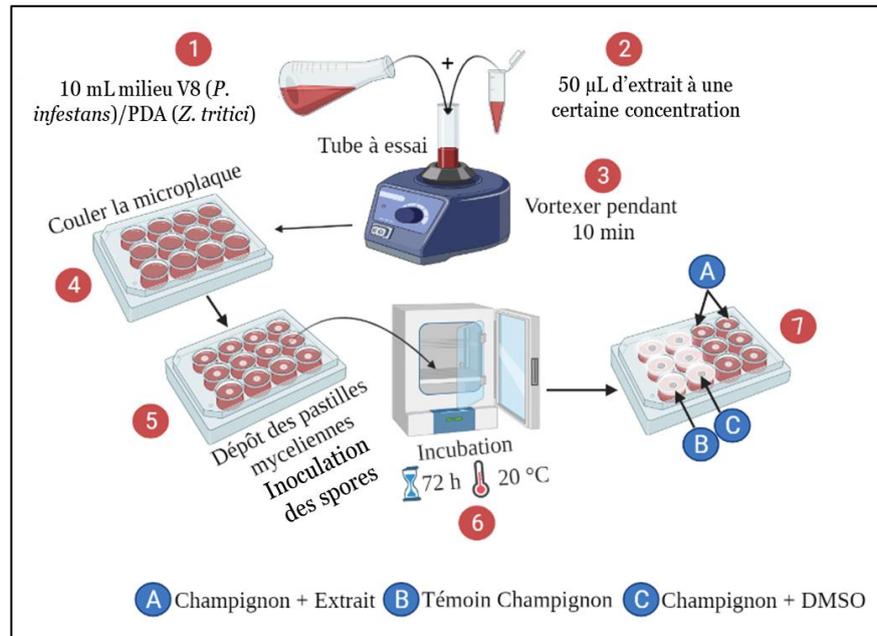


Figure 37 : Activité anti-oomycète et inhibition de la croissance mycélienne
 Créé par Essono Morel avec Biorender.com, 2021, <https://app.biorender.com/biorender-templates>

5.4. Activité antioxydante

5.4.1. Méthode du FRAP

Le test du pouvoir réducteur ferrique (FRAP) a été réalisé selon la méthode de Benzie et Souche avec de légères modifications[81],[168]. Le réactif FRAP de travail a été produit en mélangeant un tampon acétate 300 mM (pH 3,6), une solution de TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 10 mM et du FeCl_3 20 mM dans un rapport 10:1:1 juste avant utilisation. Le Trolox (Sigma-Aldrich) a été utilisé comme standard. Des solutions mères de 750 μM de Trolox (diluée dans de l'éthanol) et 100 mg/L de vitamine C (diluée dans l'eau ultra-pure) ont été préparées. Puis des dilutions sérielles ont été réalisées pour obtenir une gamme de 50 μM à 375 μM . Ensuite, 950 μL de solution FRAP ont été combinés avec 50 μL (préparée à une concentration de 5 mg/mL) de chaque dilution standard ou échantillon dilué de façon appropriée (dilution au demi). Chaque échantillon a été réalisé en triplicat et incubé à 37 °C pendant 30 minutes. L'absorbance a été lue à 593 nm en utilisant un spectrophotomètre UV (Anthelie Advanced, SECONAM).

- Composition tampon acétate : 0,298 g d'acétate de sodium + 4,3 mL d'acide acétique glacial et porté à 250 mL avec de l'eau distillée.
- Solution de TPTZ : 0,312 g de TPTZ avec 0,4 mL de HCl 37% et portée à 100 mL avec de l'eau distillée.

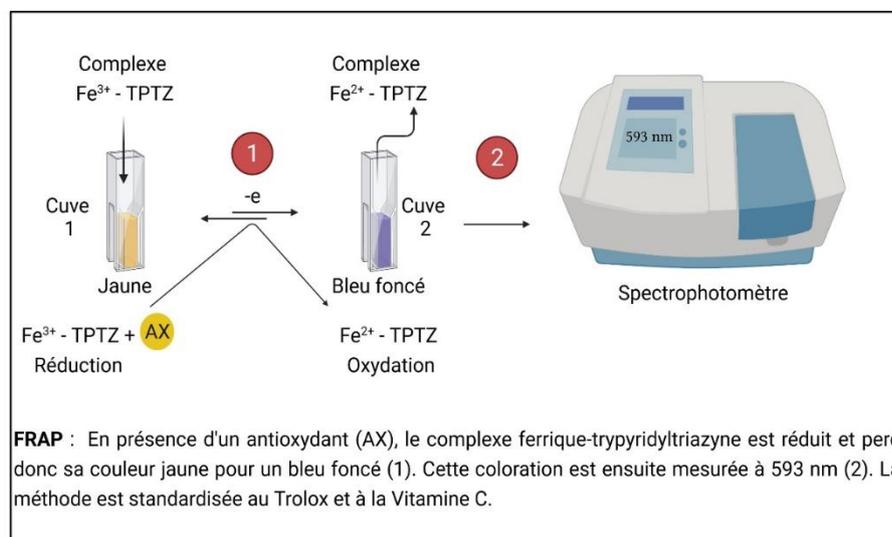


Figure 38 : Mécanisme réactionnel test du FRAP

Créé par Essono Morel avec Biorender.com, 2021, <https://app.biorender.com/biorender-templates>

5.4.2. Méthode du DPPH

Le test de piégeage des radicaux libres DPPH a été adapté de Brand-Williams et *al.*, (1995)[169],[170]. Des solutions mères de 100 μM de DPPH et 1 mM de Trolox diluées dans de l'éthanol ont été préparées. Puis des dilutions en série ont été effectuées pour obtenir une gamme de 5 μM à 25 μM . Ensuite, 1950 μL de solution DPPH ont été combinés avec 50 μL de chaque dilution standard ou échantillon (concentration 5 mg/mL) dilué de façon appropriée. Chaque échantillon a été testé trois fois en double et incubé à température ambiante pendant 20 minutes. L'absorbance a été lue à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV (Anthelie Advanced, SECONAM). Essais biologiques des extraits et des fractions.

Tableau 4 : Dilution pour les solutions de standard

	Blanc	1/200	1/80	1/50	1/40
Standard	0 μL	10 μL	25 μL	40 μL	50 μL
Solvant	50 μL	40 μL	25 μL	10 μL	0 μL
Solution DPPH	1950 μL				

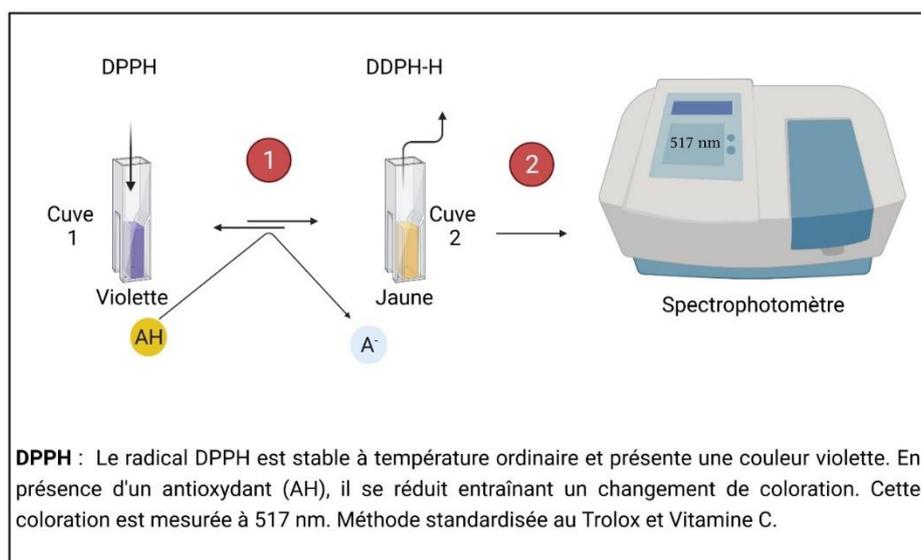


Figure 39 : Mécanisme réactionnel test du DPPH

Créé par Essono Morel avec Biorender.com, 2021, <https://app.biorender.com/biorender-templates>

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

I. ENQUETES ETHNOPHARMACOLOGIQUES

1.1. Données démographiques

Au total, 20 guérisseurs traditionnels (ethnie Fang du nord du Gabon) ont participé à l'enquête. Tous ont déjà eu à traiter au moins un (1) et jusqu'à quarante (40) patients atteints de maladies d'origine microbiennes (gastro-intestinales, infections urinaires, infections vaginales, tuberculose etc.). Cette enquête indique que les hommes étaient plus nombreux que les femmes (60% contre 40%). La tranche d'âge la plus représentative de ces tradipraticiens était de 40 à 50 ans. En ce qui concerne le niveau d'instruction, près de la moitié des guérisseurs ont terminé leurs études primaires. En fonction de leurs expériences les guérisseurs ont été classés en deux catégories : les plus expérimentés avec plus de 20 ans d'expériences (25%) et ceux ayant moins de 10 ans d'expériences (75%).

1.2. Plantes identifiées : parties utilisées et mode de préparation des recettes

L'exploitation des données de l'enquête a permis d'identifier 18 espèces utilisées en médecine traditionnelle par les populations Fang (groupe ethnique Nord du Gabon) dans le traitement des maladies microbiennes. Un total de 22 plantes (Tableau 5 A et B) a été collecté, parmi lesquelles 4 plantes non identifiées (18,18%) et 18 identifiées (81,82%). Ces espèces de plante se sont regroupées en 12 familles, dont la plus représentative est la famille des Fabaceae (3 occurrences), suivie successivement par les familles des Sapotaceae, Caesalpinaceae et Mimosaceae (2 occurrences chacune) (Figure 40 A). De manière générale, l'écorce représente l'organe végétal le plus utilisé (59,10%), en raison de sa facilité de collecte par les populations villageoises (Figure 40 B). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Ngoua Meye et *al.*, (2019) qui ont montré dans leur étude ethnopharmacologique réalisée au Nord du Gabon que les écorces sont l'organe végétal le plus utilisée dans les recettes traditionnelles[12]. Scientifiquement, l'écorce, les fruits et les feuilles sont le meilleur siège des métabolites responsables des propriétés curatives des plantes[171],[172]. La décoction est la méthode de préparation la plus utilisée et reste le moyen le plus rapide pour extraire les principes actifs[89],[173]. Dans cette étude, la décoction a été utilisée à 54,55% contre 22,71% de macération, les autres méthodes de préparation représentant 22,73% (Figure 40 C). L'eau a été utilisée comme solvant d'extraction pour préparer les recettes contre les maladies microbiennes. La voie orale a été le principal mode d'administration des recettes suivi des bains de siège, les autres voies étant minoritaires. Les résultats obtenus à partir des enquêtes effectuées ont permis de déterminer les principales utilisations des organes de plusieurs plantes médicinales dans les périphéries des villes d'Oyem et de Bitam. Parmi les 22 plantes collectées, la fréquence d'utilisation de *Erismadelphus exsul* et *Baillonella toxisperma* était de 45% et 50% respectivement (Tableau 5 A). Compte tenu de cette fréquence d'utilisation et l'absence d'étude des deux plantes a conduit à leur sélection pour des études phytochimiques et biologiques, l'intérêt étant non seulement de justifier leurs usages

en médecine traditionnelle gabonaise mais également d'identifier les molécules associées à leurs propriétés biologiques.

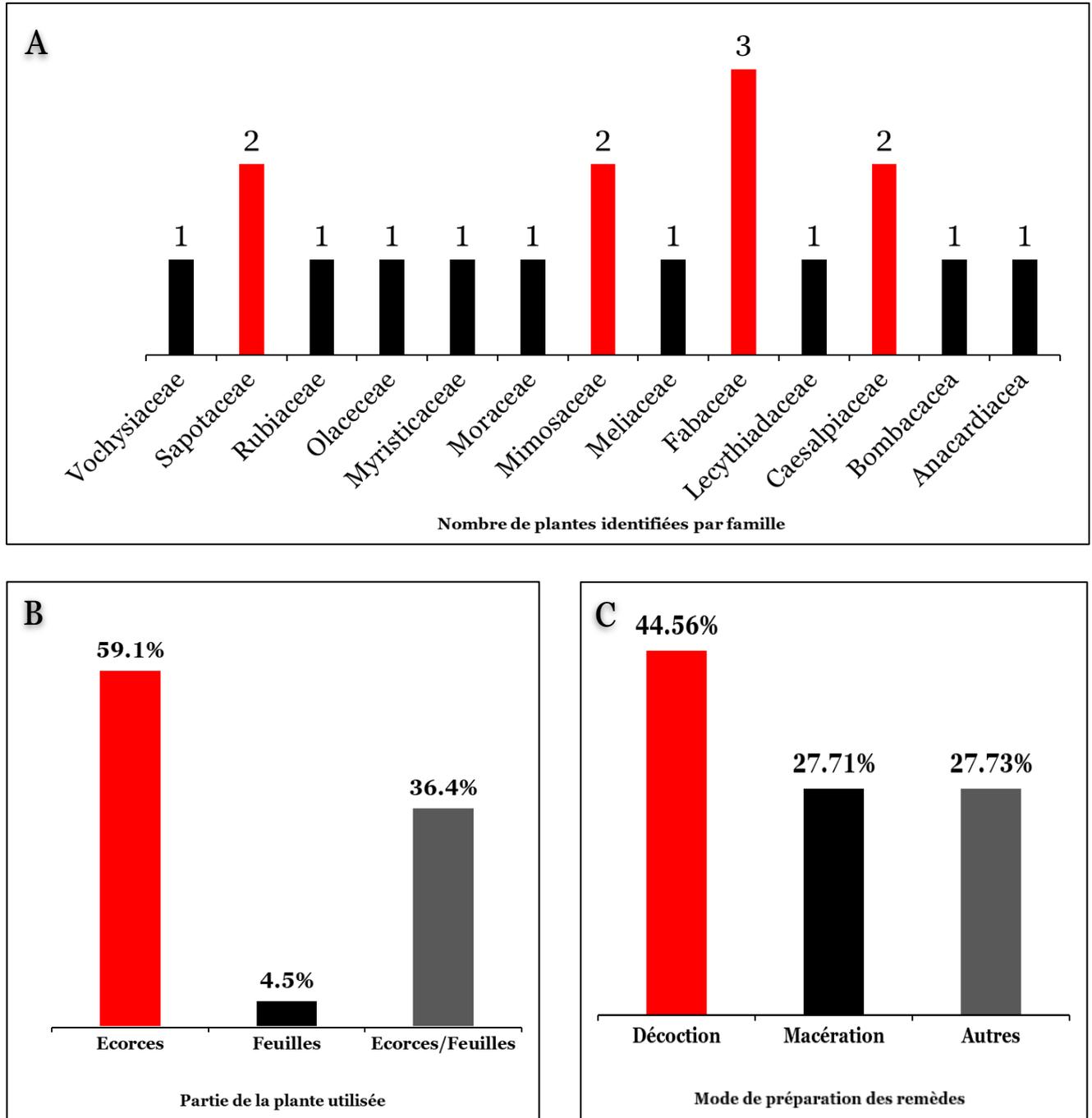


Figure 40 : Enquête ethnopharmacologique : nombre de plantes par famille (A) ; partie de la plante utilisée (B) ; méthodes de préparations de remèdes (C).

Tableau 5 A : Fréquence de d'utilisation des plantes au cours des enquêtes ethnopharmacologiques

N° herbier	Plantes identifiées	Nombre de tradipraticiens utilisant les plantes	Pourcentage d'utilisation de la plante par les tradipraticiens
M.E.M-001	<i>Erismadelphus exsul</i>	9/20	45 %
M.E.M-002	<i>Baillonella toxisperma</i>	10/20	50 %
M.E.M-003	<i>Morinda lucida</i>	5/20	25 %
M.E.M-004	<i>Petersianthus macrocarpus</i>	3/20	15 %
M.E.M-005	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	1/20	5 %
M.E.M-006	<i>Trichoscypha acuminata</i>	5/20	25 %
M.E.M-007	<i>Pentaclethra macrophylla</i>	2/20	10 %
M.E.M-008	<i>Omphalocarpum elatum</i>	8/20	40 %
M.E.M-009	<i>Pycnanthus angolensis</i>	2/20	10 %
M.E.M-010	<i>Erythrophleum ivorensis</i>	7/20	35 %
M.E.M-011	<i>Parkia bicolor</i>	2/20	10 %
M.E.M-012	<i>Chlorophora exceisa</i>	4/20	20 %
M.E.M-013	<i>Guibourtia tessmannii</i>	8/20	40 %
M.E.M-014	<i>Bobgunnia fistuloides</i>	4/20	20 %
M.E.M-015	<i>Pachyelasma tessmannii</i>	1/20	5 %
M.E.M-016	<i>Cylicodiscus gabonensis</i>	5/20	25 %
M.E.M-017	<i>Ceiba pentandra</i>	1/20	5 %

Tableau 5 B : Plantes récoltées pendant l'enquête ethnopharmacologique

Nom botanique des plantes	Familles des plantes	Nom vernaculaire a	Partie utilisée	Mode de préparation	Traitements (Posologies)	Maladies traitées
<i>Erismadelphus exsul</i>	Vochysiaceae	Essang afane	E/F	D	Boire chaud trois fois par jour pendant une semaine et manger les jeunes feuilles pendant le traitement ou utiliser sous forme de pommade pour les maladies de la peau	Infections des voies urinaires, mycoses, bronchites, pneumonies, maladies sexuellement transmissibles et maladies opportunistes du VIH
<i>Baillonella toxisperma</i>	Sapotaceae	Adzap	E/F	D	Prenez une boisson chaude trois fois par jour pendant cinq jours.	maladies inflammatoires, Infections vaginales, douleurs lombaires et gastro-intestinales, hémorroïdes interne, infections pulmonaires
<i>Morinda lucida</i>	Rubiaceae	Akeng	E/F	D	Boire un demi-verre deux fois par jour pendant une semaine.	Pneumonie, ulcère gastrique,
<i>Petersianthus macrocarpus</i>	Lecythidaceae	Abing	E/F	D	Prendre une boisson chaude pendant deux jours	Toux, tuberculose, maladies sexuellement transmissibles
<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Meliaceae	Assiéé	E/F	D	Boire un demi-verre deux fois par jour	Douleurs d'estomac, douleurs abdominales,
<i>Ongoeka gore</i>	Olacaceae	Angeukk	E	D	Boire régulièrement des boissons chaudes	Constipation, érythème fessier, rhumatismes
<i>Trichoscypha acuminata</i>	Anacardiaceae	Amvout	E/F	D	Boire trois verres par jour pendant une semaine	Infertilité masculine, dysenterie
<i>Pentaclethra macrophylla</i>	Mimosaceae	Ebeigne	E	D	Prenez trois cuillères à soupe quatre fois par jour pendant une semaine et demie.	La rate, la blennorragie
Non identifiée	Non identifiée	Mebamane	E	D	Prendre trois verres une fois par jour pendant trois jours et manger l'écorce en poudre.	Antipoison très puissant
<i>Omphalocarpum elatum</i>	Sapotaceae	Mebeigne-megône	E	M	Boire un demi-verre quatre fois par jour pendant quatre jours.	Infertilité masculine, diarrhée chronique, perte de poids chez les enfants
<i>Pycnanthus angolensis</i>	Myristicaceae	Eteng	E	I	Boire un demi-verre deux fois par jour pendant les deux premières semaines de la grossesse.	Purifie le lait maternel, antibiotique puissant contre les maladies sexuelles
<i>Erythrophleum ivorense</i>	Caesalpinaceae	Elone	E	D	Appliquer un bain	Affections cutanées et ulcères
Non identifiée	Non identifiée	Ngône	E	M	Prendre un bain deux fois par jour pendant une semaine	Odeur corporelle et problèmes de peau
<i>Parkia bicolor</i>	Leguminosae	Essang	E	I	Asseoir le patient dans un bain tiède jusqu'à ce que la maladie disparaisse	Hémorroïdes
<i>Chlorophora exceisa</i>	Moraceae	Abang ele'e	E	M	Inhalation de trois gouttes par jour, puis purge et massage du patient	Chlamydia, syphilis, douleurs thoraciques
<i>Guibourtia tessmannii</i>	Fabaceae	Oveng	E/F	I	Boire deux verres par jour jusqu'à la fin de l'infection, traitement maximal de deux semaines.	Antibiotiques pour le traitement de la syphilis, des faiblesses sexuelles et des maladies sexuellement transmissibles
Non identifiée	Non identifiée	Abèè	E/F	P	Purger et faire boire aux patients deux doses trois fois par jour pendant une semaine et demie.	Infertilité féminine et blocage des trompes de Fallope chez la femme
<i>Bobgunnia fistuloides</i>	Leguminosae	Akok - ele'e	E	M	Faire asseoir le patient dans un bain chaud jusqu'à la guérison complète.	Hémorroïdes
Non identifiée	Non identifiée	Akora - ele'e	E/F	M	Baigner le patient, utiliser également comme bain de bouche pour les abcès dentaires.	Odeur corporelle et buccale due à des bactéries
<i>Pachyelasma tessmannii</i>	Leguminosae	Mekogho	E	D		Antipoison et faiblesse sexuelle
<i>Cylicodiscus gabonensis</i>	Mimosaceae	Edum	E	P	Boire après un empoisonnement	Infections fongiques, teigne, levures
<i>Ceiba pentandra</i>	Bombacaceae	Doum	E	D	Boire deux verres tièdes pendant vos règles	Trompes bouchées

a = Fang; **E/F** = Écorces ou Feuilles; **E** = Écorces; **F** = Feuilles; **D** = Décoction; **M** = Macération, **MD** = Macération et Décoction, **I** = Infusion, **P** = Poudre.

La compréhension de l'activité biologique d'une plante ou un extrait de plante repose, pour la plupart des temps, sur le criblage et la caractérisation des molécules qui lui confèrent ses propriétés biologiques. Jusqu'à présent, l'étape de criblage et identification des composés bioactifs d'un extrait de plante était souvent très longue et fastidieuse, puisqu'elle consistait à purifier, tester et identifier individuellement plusieurs composés d'un extrait riche en molécules. C'est pourquoi de nouvelles approches plus simples et rapides se développent actuellement dans le but de rendre moins fastidieux la recherche des molécules d'intérêt biologique. Ainsi, dans cette étude nous avons combiné les informations de déréplication par les réseaux moléculaires et la spectrométrie de masse dans le but de mettre en évidence les composés bioactifs impliqués dans divers activités biologiques (antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et la cytotoxicité).

II. ETUDES CHIMIQUES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE *E. EXSUL* MILDBR

2.1. Extraction

Une extraction par macération des écorces séchées et broyées (1100 g de poudre) d'*Erismadelphus exsul* a été faite dans 1500 mL de solvant selon le type d'extrait méthanolique (MeOH) ou éthanolique (EtOH) pendant 24h sous agitation (374 tours/min), l'extrait obtenu a été filtré puis concentré par un évaporateur rotatif et ensuite séché sous hotte (Figure 41).

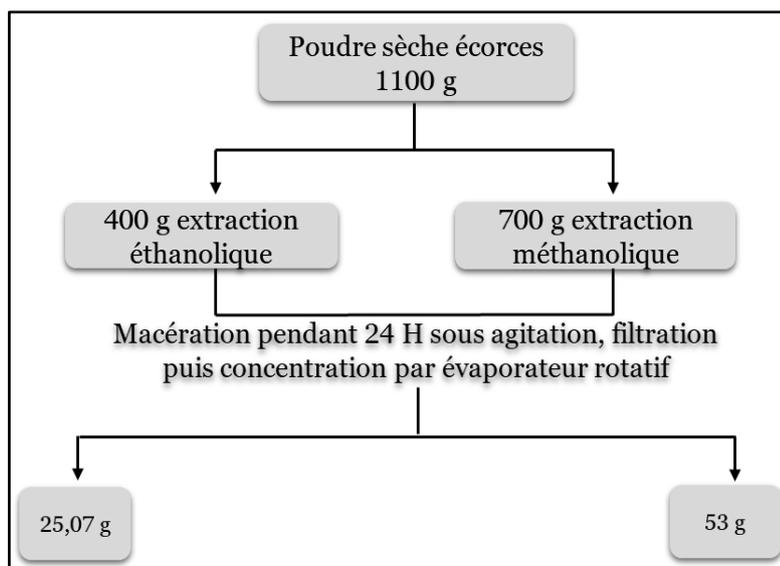


Figure 41 :Schéma d'extraction, méthanol et éthanol des écorces de tronc de *Erismadelphus exsul* Mildbr

2.2. Profilage des métabolites de *Erismadelphus exsul* par LC-HRMS/MS

L'analyse LC-HRMS/MS de l'extrait brut éthanolique de *Erismadelphus exsul* a été réalisée en mode d'ionisation positif en utilisant une acquisition dépendante des données. Ensuite, un auto-MS² a été effectuée dans lequel les ions MS¹ les plus prédominants sont sélectionnés pour la fragmentation MS². Une inspection manuelle des spectres MS/MS résultants a conduit à l'identification présumée (putative) des constituants chimiques de l'extrait brut éthanolique, les composés annotés sont énumérés dans le Tableau 6. Ce chromatogramme TIC offre une première information sur les molécules de l'échantillon (Figure 42).

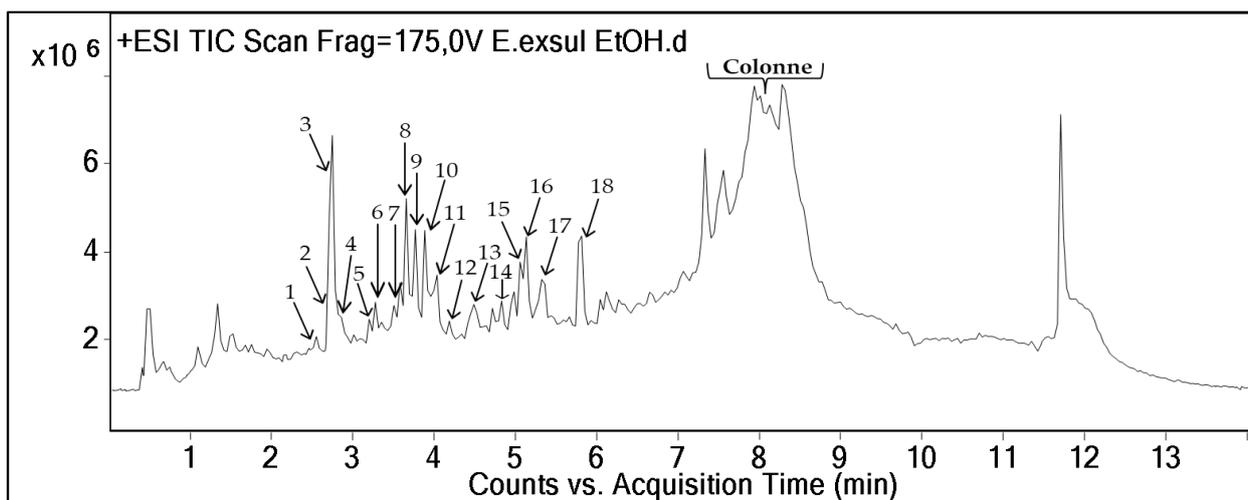


Figure 42 : Total Ion Chromatogram (TIC) de l'extrait éthanolique des écorces de tronc de *Erismadelphus exsul* Mildbr obtenu par CLHP-UV-MS ESI(+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18. Le numéro au-dessus de chaque pic correspond au numéro de pic sur le Tableau 6.

L'analyse du chromatogramme permet la détection de plusieurs pics avec une large gamme de polarité, puisque les composés sont élués entre 5 et 100 % de solvant organique. Cette première étape d'identification des métabolites consiste à déterminer la composition élémentaire des molécules sélectionnées en exploitant les données de mesure de masse exacte et les fragments produits par chaque ion détecté. Une étape rendue possible grâce à la spectrométrie de masse haute résolution. Les formules moléculaires possibles pour chaque pic sélectionné ont été recherchées dans les bases de données publiques suivantes : KNApSACk, Dictionary of Natural Products (<https://dnp.chemnetbase.com/>)[174],[175], Reaxys[176], Scifinder (<https://scifinder-n.cas.org>), HMDB, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>), et ChEBI afin de caractériser les produits naturels connus. Comme le montre le Tableau 6 dix-huit (18) composés ont été annotés de cette façon. Ces métabolites ont été signalés comme appartenant principalement à huit (8) familles de composés naturels : alcaloïdes cyclopeptidiques, alcaloïdes quinoléines, polyphénols (isoflavonoïdes et flavonoïdes), acides aminés estérifiés, et les stéroïdes et dérivés de stéroïdes (terpénoïdes).

Tableau 6 : Composés identifiés dans l'extrait éthanolique des écorces de *Erismadelphus exsul* Mildbr grâce aux données de spectrométrie de masse

Pics	RT (min)	m/z [M+H] ⁺	Formules moléculaires [M]	MS ²	Annotation des ions	Niveau d'identification
1	2,571	477,2497	C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₄	477,24; 460,74; 359,33; 265,95; 186,09; 120,08	Inconnu	4
2	2,742	592,3115	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₆	592,31; 477,24; 378,18; 174,09; 134,06; 120,08	Mauritine A N-oxycide	3
3	2,780	576,3170	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₅	576,31; 477,24; 378,18; 174,09; 134,06; 120,08	Mauritine A	3
4	2,808	562,3011	C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₅	562,30; 477,24; 378,18; 174,09; 134,06; 120,08	Mauritine F	3
5	3,088	433,1133	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	283,06; 313,07; 121,02; 165,01;	Vitexin	3
6	3,206	599,3305	C ₃₀ H ₃₈ N ₁₂ O ₂	336,21; 458,27	Inconnu	4
7	3,282	313,0862	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	315,08; 244,37; 272,80; 312,92; 103,07	Aflatoxin B2	3
8	3,282	579,1709	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579,17; 152,01; 285,07; 460,87;	Rhoifolin	3
9	3,661	439,3573	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	393,35; 339,15; 313,07	Ganodermenonol	3
10	3,774	453,3367	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	329,10; 64,23	Kulactone	3
11	4,646	322,238	C ₁₉ H ₃₁ NO ₃	322,23; 163,063; 288,198	8-Dihydroantidesmone	3
12	4,987	306,2432	C ₁₉ H ₃₁ NO ₂	290,98; 296,48; 178,086; 163,063	8-Deoxoantidesmone	3
13	5,138	398,2654	C ₂₀ H ₃₅ N ₃ O ₅	306,24; 194,11	Inconnu	4
14	5,365	320,2225	C ₁₉ H ₂₉ NO ₃	278,24; 220,59; 222,11; 234,13; 163,063	Antidesmone	3
15	5,782	256,1330	C ₁₆ H ₁₇ NO ₂		Inconnu	4
16	5,061	445,2120	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	283,09; 398,26; 194,11	Asperglaucide	3
17	5,782	507,2280	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₄	327,23; 256,13	Asperphenamate	3
18	6,123	317,1960	C ₁₆ H ₂₈ O ₆	-	2-Bornanol (1S, 2R) -O-D-glucopyranoside	3

2.3. Ciblage et déréduplication basés sur la MS/MS et le réseau moléculaire

Nous avons effectué l'analyse de l'extrait brut éthanolique d'*E. exsul* en utilisant l'approche du réseau moléculaire (MN) combinée à la LC-MS/MS proposée par le site Web du GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Tous les spectres HRESIMS/MS obtenus ont été prétraités *via* le logiciel MZmine2, la peaklist obtenue a été exportée aux formats .mgf et _quant.csv. Les spectres MS/MS ont ensuite été recherchés en mode batch automatisé dans les bibliothèques spectrales hébergées par la plateforme du GNPS et les résultats ont été annotés dans le cadre de cette stratégie de déréduplication. Afin d'affiner les informations structurelles du réseau moléculaire, une annotation de structure *in silico* de GNPS Library Search a été incorporée au réseau à l'aide du flux de travail MolNetEnhancer (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/molnetenhancer/>)[177]. Ces informations sont accessibles à partir de ce lien : <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=95e871215203454497369b0e2ba8bb19>. Le réseau moléculaire obtenu présente 585 ions précurseurs, 346 zones de nœuds non liés et 8 clusters (nœuds ≥ 3) visualisés dans Cytoscape 3.9.0[178] (Figure 43). L'exploration des contributions relatives des aires de pic aux nœuds du réseau a révélé que les composés ont été regroupés sur la base de similitudes structurelles et que quatre clusters principaux ont émergé : le cluster A correspondant aux stéroïdes et dérivés, le cluster B regroupant les glycérophospholipides, et les clusters C et D regroupant respectivement les alcaloïdes cyclopeptidiques et quinoléines. Le cluster C est composé de sept nœuds dont trois ont les m/z de 576,318 ; 562,302 et 592,313 correspondant respectivement à trois alcaloïdes cyclopeptidiques : la Mauratine A, la Mauratine F et la Mauratine A *N*-oxyde[179]. L'annotation putative de ces derniers s'appuie sur la présence des ions fragments caractéristiques à m/z 378,182 et m/z 476,988[180],[179]. Par ailleurs, le cluster D révèle trois composés de la famille des alcaloïdes quinoléines, il s'agit de l'Antidesmone (m/z 320,222 ; $C_{19}H_{29}NO_3$), la 8-Deoxoantidesmone (m/z 306,243 ; $C_{19}H_{31}NO_2$), et la 8-Dihydroantidesmone (m/z 322,238 ; $C_{19}H_{31}NO_3$). En effet, les mêmes composés (cluster D) ont été décrits par Buske *et al.*, (2002)[181] confirmant en quelque sorte l'identité de ces composés dans l'extrait brut de *Erismadelphus exsul*. Enfin, les polyphénols tels que, la Formononetine (m/z 269,08 ; $C_{16}H_{12}O_8$); la Rhoifolin (m/z 579,17 ; $C_{26}H_{28}O_{15}$); des glycérophospholipides à l'exemple de la 1,2-Dilinoléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (m/z 784,59 ; $C_{44}H_{80}NO_8P$) et des terpénoïdes (Stéroïdes) tels que le Sarmenoside B (m/z 663,46 ; $C_{34}H_{48}O_{13}$) ont également été identifiés.

2.4. Présentation du réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de *E. exsul*

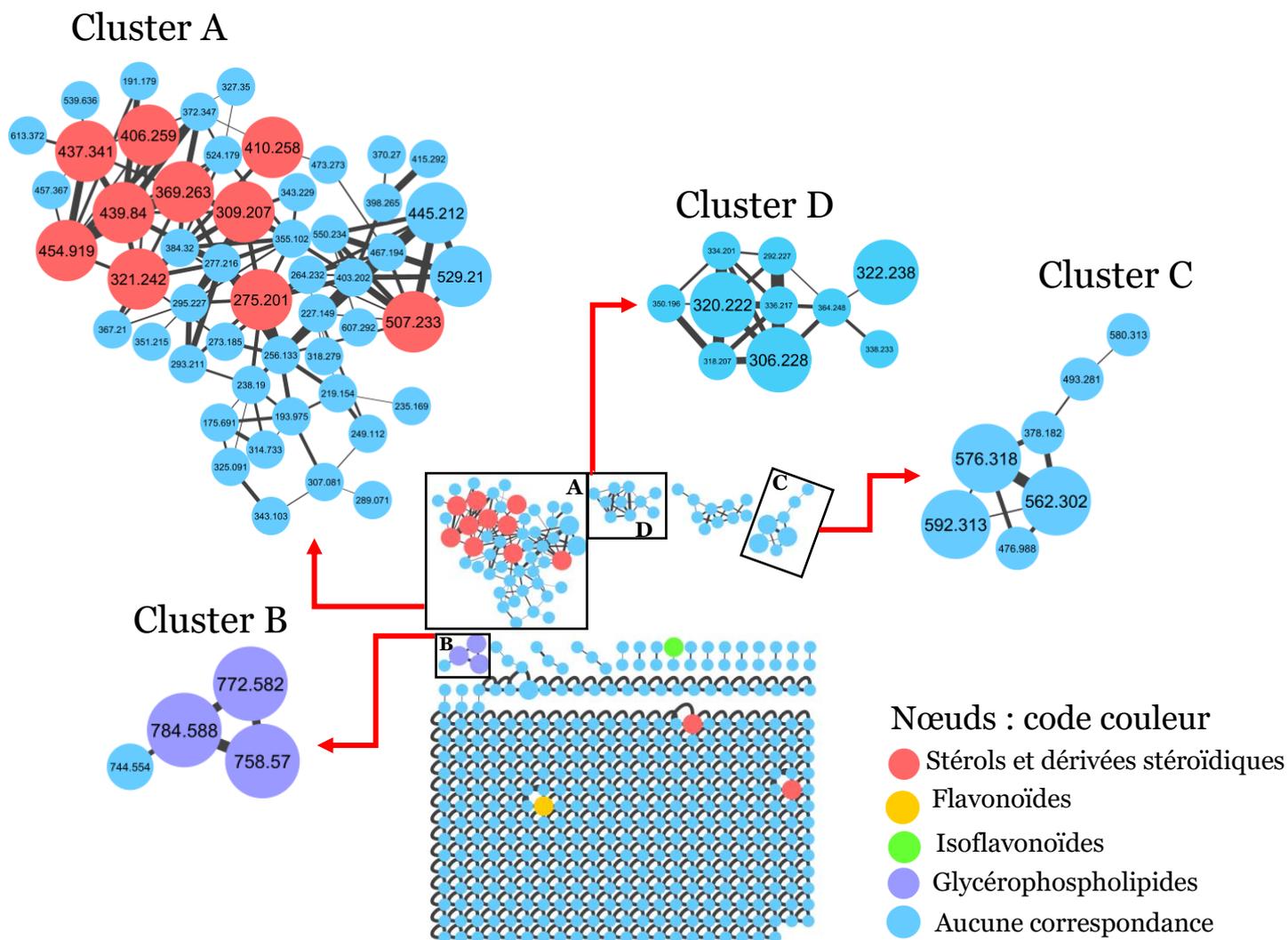
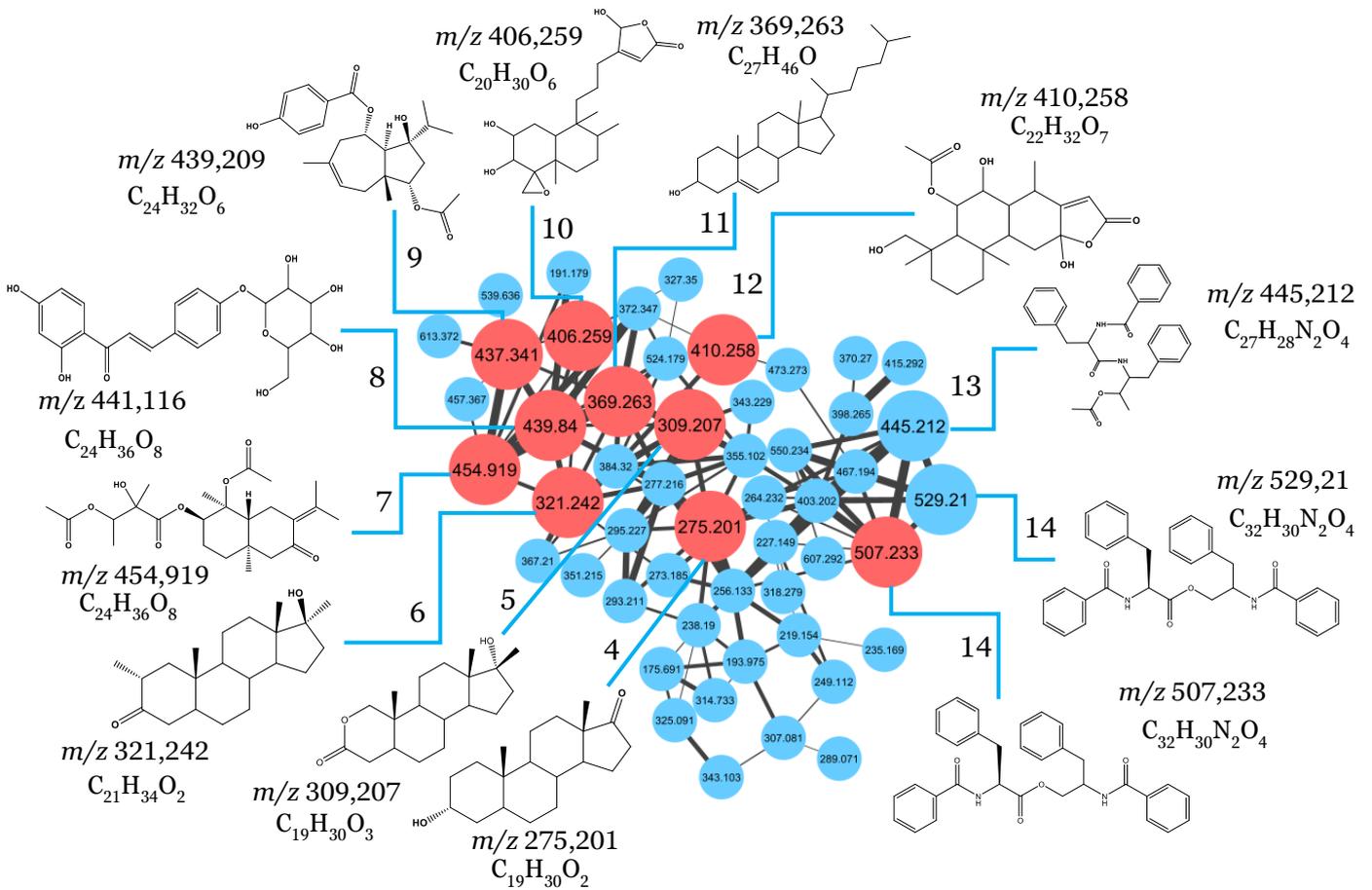


Figure 43 : Le réseau moléculaire de l'extrait brut éthanolique de *Erismadelphus exsul* obtenu à l'aide de la plateforme GNPS et visualisé avec le logiciel Cytoscape 3.9.0

2.4.1. Cluster A : Stérols et dérivés stéroïdiques



2.4.2. Cluster B : Glycérophospholipides

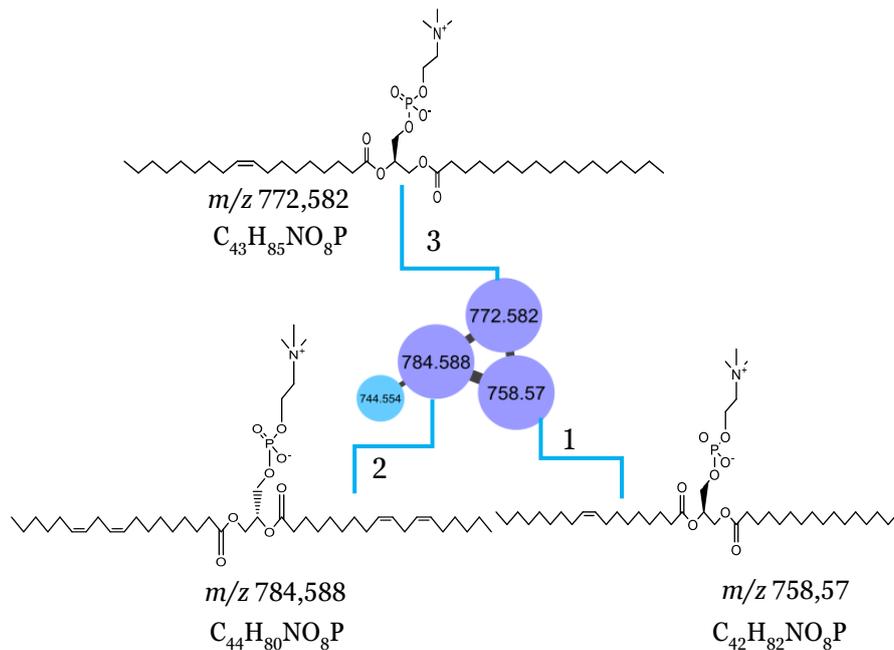
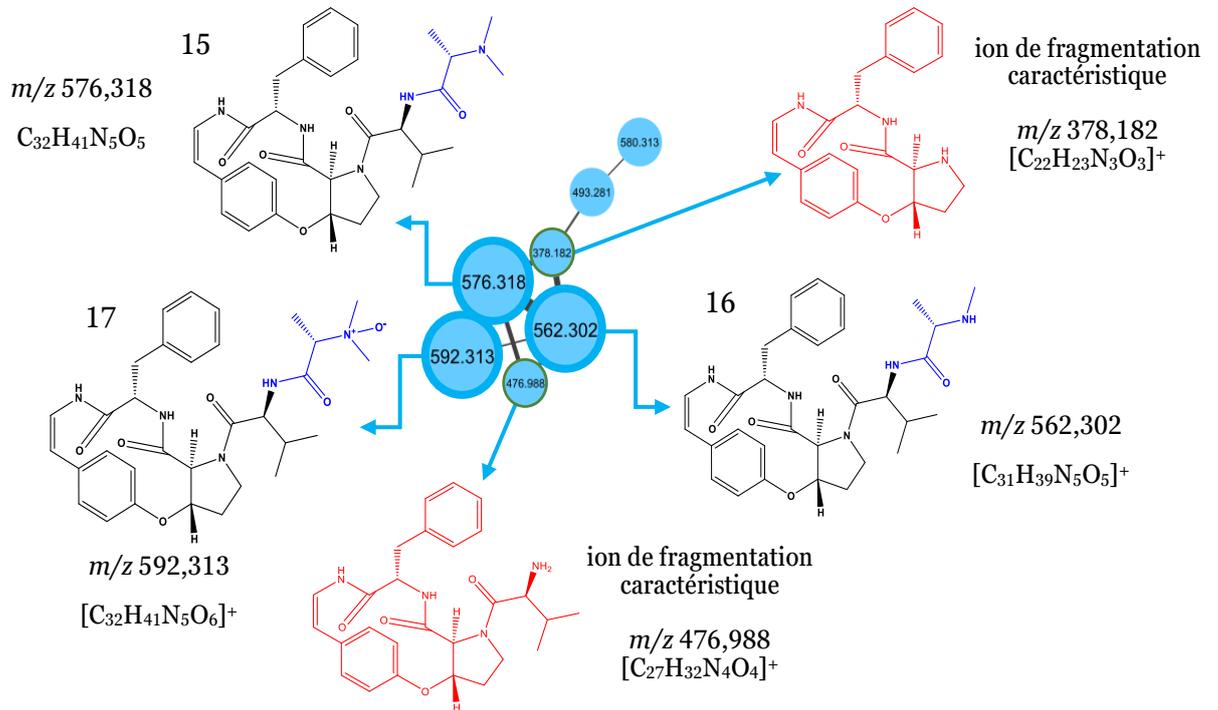
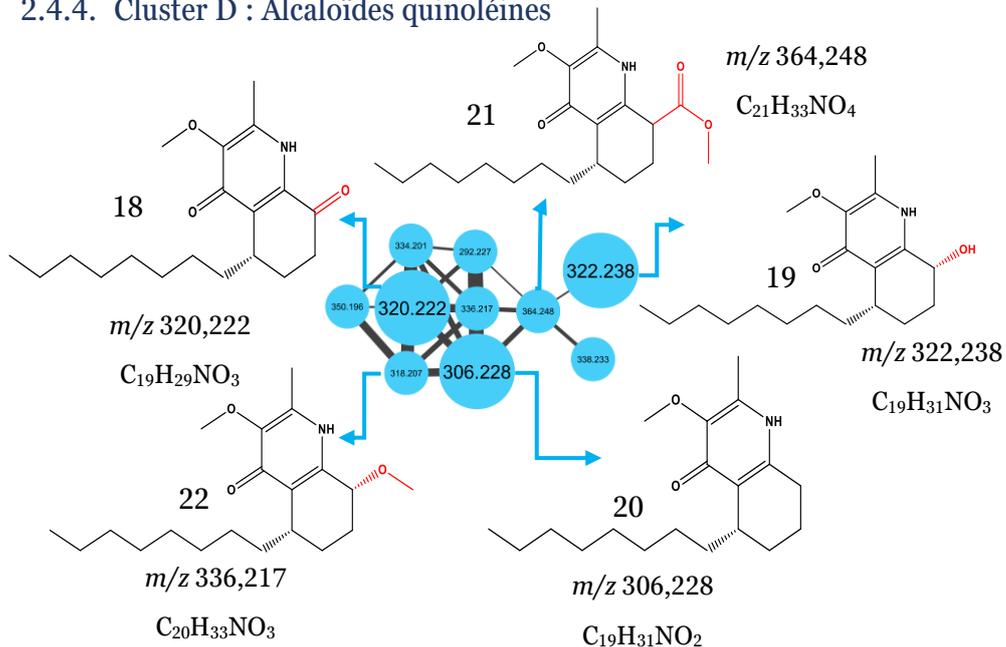


Figure 44 : Le réseau moléculaire de l'extrait brut éthanolique de *Erismadelphus exsul* : Cluster A et B

2.4.3. Cluster C : Alcaloïdes cyclopeptiques



2.4.4. Cluster D : Alcaloïdes quinoléines



La **Figure 43** montre les structures des composés annotés sur le réseau moléculaire (1) 1-Palmitoyl-2-linoléoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ; (2) 1,2-Dilinéoloyl-sn-glycero-3-phosphocholine ; (3) 1-Heptadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine ; (4) Androstenediol ; (5) Epioxandrolone ; (6) Methasterone ; (7) [(1S,2R,4aR,8aR)-1-acetyloxy-1,4a-dimethyl-6-oxo-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,8,8a-hexahydronaphthalen-2-yl]-3-acetyloxy-2-hydroxy-2-methylbutanoate ; (8) Isoliquiritin, (9) [(1S,3R,3aS,4S,8aR)-1-acetyloxy-3-hydroxy-6,8a-dimethyl-3-propan-2-yl-1,2,3a,4,5,8-hexahydroazulen-4-yl] 4-hydroxybenzoate ; (10) 3-[2-(6,7-Dihydroxy-1,2,4a-trimethylspiro[3,4,6,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalene-5,2'-oxirane]-1-yl)ethyl]-2-hydroxy-2H-furan-5-one ; (11) Cholestérol ; (12) [6,10a-dihydroxy-4-(hydroxyméthyl)-4,7,11b-triméthyl-9-oxo-1,2,3,4a,5,6,6a,7,11,11a-decahydronaphtho[2,1-f][1]benzofuran-5-yl] acetate ; (13) Asperglaucide ; (14) Asperphenamate ; (15) Mauritine A ; (16) Mauritine F ; (17) Mauritine A N-oxyle, (18) Antidesmone ; (19) 8-Dihydroantidesmone ; (20) 8-Deoxoantidesmone ; (21) 8-O-Ac Antidesmone ; (22) 8-Méthoxyandesmone.

Le réseau moléculaire (RM) basé sur une étude de fragmentation, a permis l'identification putative de 17 métabolites parmi lesquelles, 13 composés apparaissent dans la zone de nœuds liés (Tableau 7) et les 4 autres dans les zones de nœuds non liés. Le RM a également permis de soutenir et de confirmer les conclusions obtenues à partir de l'interprétation des données MS/MS.

Tableau 7 : Composés annotés sur le réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de *Erismadelphus exsul*

<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Formules moléculaires	Types Adduits	Cosine score	Composés annotés par le GNPS
758,570	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺	0,92	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
784,588	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺	0,77	1,2-Dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
772,582	C ₄₃ H ₈₅ NO ₈ P	[M+H] ⁺	0,70	1-Heptadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
275,201	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	0,73	Androstenediol
309,207	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	[M+H] ⁺	0,76	Epioxandrolone
321,242	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	[M+H] ⁺	0,73	Methasteron
454,919	C ₂₄ H ₃₆ O ₈	[M+H] ⁺	0,71	[(1S,2R,4aR,8aR)-1-Acetyloxy-1,4a-dimethyl-6-oxo-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,8,8a-hexahydronaphthalen-2-yl]-3-acetyloxy-2-hydroxy-2-methylbutanoate
441,116	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+Na] ⁺	0,78	Isoliquiritin
439,209	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	[M+Na] ⁺	0,73	[1S,3R,3aS,4S,8aR)-1-Acetyloxy-3-hydroxy-6,8a-dimethyl-3-propan-2-yl-1,2,3a,4,5,8-hexahydroazulen-4-yl]4-hydroxybenzoate
406,259	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	[M+K] ⁺	0,81	3-[2-(6,7-Dihydroxy-1,2,4a-trimethylspiro[3,4,6,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalene-5,2'-oxirane]-1-yl)ethyl]-2-hydroxy-2H-furan-5-one
369,263	C ₂₇ H ₄₆ O	[M+H-H ₂ O] ⁺	0,82	Cholestérol
410,258	C ₂₂ H ₃₂ O ₇	[M+H] ⁺	0,74	[6,10a-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-4,7,11b-trimethyl-9-oxo-1,2,3,4a,5,6,6a,7,11,11a-decahydronaphtho[2,1-f][1]benzofuran-5-yl]acetate
507,23	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	0,83	Asperphenamate
269,08	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	0,87	Formononetin
413,38	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	[M+H] ⁺	0,83	3-Oxocholest-4-en-26-oic acid
579,17	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	[M+H] ⁺	0,76	Rhoifolin
663,46	C ₃₄ H ₄₈ O ₁₃	[M+H] ⁺	0,73	Sarmentoside B

Avant d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats, rappelons le fait que les études antérieures sur les plantes appartenant à la famille des *Vochysiaceae* dont *Erismadelphus exsul* fait partie montre que les familles moléculaires responsables des activités biologiques (antibactérienne, antifongiques, antioxydantes) sont les polyphénols (flavonoïdes et isoflavonoïdes), les énoïdes triterpéniques, les stéroïdes, les dérivés d'acides ellagique et les alcaloïdes [91]. D'un point de vue chimio taxonomique, on peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle les activités biologiques dans les extraits d'*Erismadelphus exsul* sont liées aux molécules appartenant à ces familles. Il serait donc possible de rechercher dans l'extrait les composés décrits dans la littérature et qui pourraient être présumés responsables des activités biologiques de la plante en identifiant chaque pic du chromatogramme de la Figure 42.

2.5. Fractionnement

Afin de simplifier la recherche des molécules bioactives, l'extrait brut EtOH (3,64 g) a été fractionné par chromatographie flash sur une cartouche Reveleris® Grace Silica PF-50SIHC-F0080 de 80 g en utilisant un gradient de CH₂Cl₂ augmentant les proportions MeOH (100:0 à 0:100). Le débit a été fixé à 60 mL/min (Figure 45). La séparation par chromatographie flash a donné des fractions basées sur leurs profils chromatographiques, les fractions de nature similaire ont été regroupées par chromatographie sur couche mince TLC (Figure 46). Suite à ce regroupement, les fractions F1, F2 ; F3 et F4 (310,3 mg) ont été combinées puis refractionnées par chromatographie flash sur une cartouche Reveleris® Grace Silica PF-50SIHC-F0080 en utilisant un gradient de CH₂Cl₂ avec des proportions croissantes de MeOH (100:0 à 0:100) pour obtenir 4 sous-fractions selon leurs profils TLC.

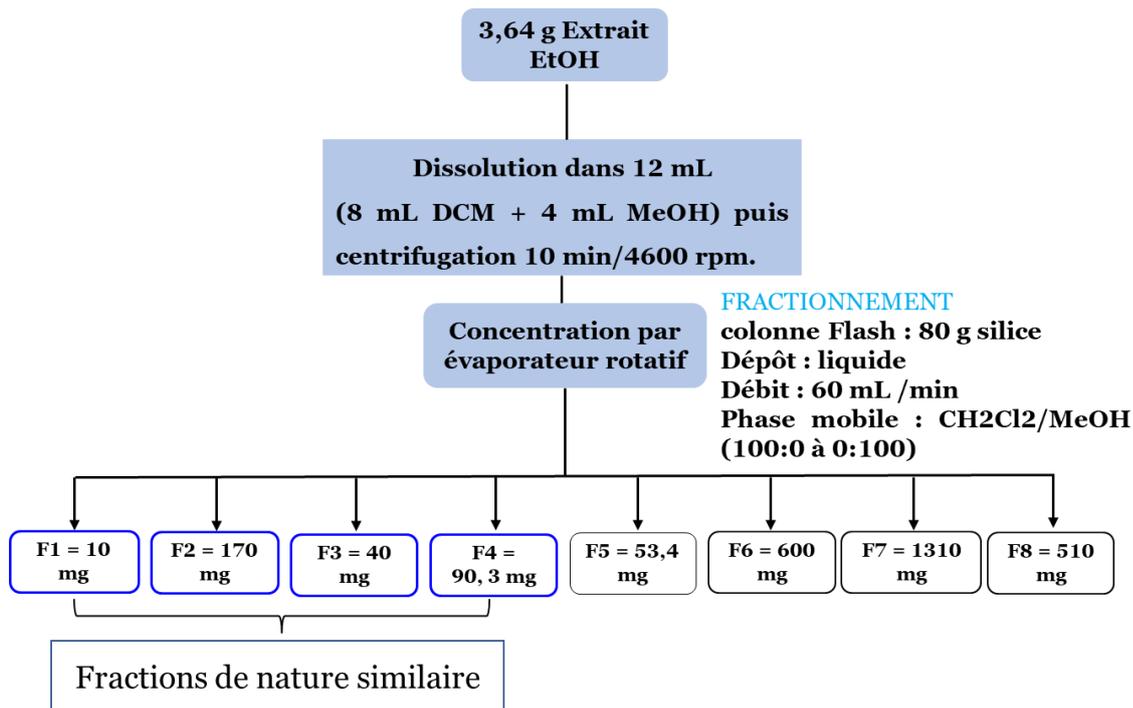


Figure 45 : Fractionnement de l'extrait brut éthanolique de *Erismadelphus exsul*

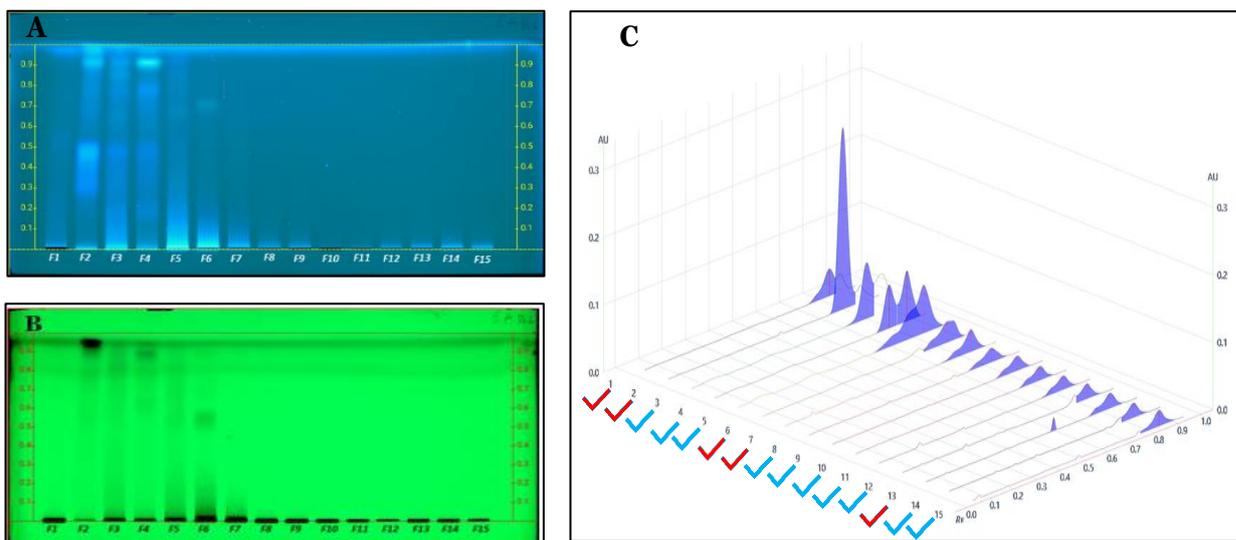


Figure 46 : Chromatographie sur couche mince (CCM) des fractions éthanoliques de *Erismadelphus exsul*. Phase mobile : dichlorométhane/méthanol (70/30). (A) UV 365 nm, (B) UV 254 nm. Chromatogramme 3D montrant en rouge les absorbances (AU) des fractions avec un profil différent et en bleu celles avec un profil similaire (C)

III. ÉTUDES BIOLOGIQUES EXTRAIT ETHANOLIQUE *E. EXSUL* MILDBR

3.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait et les fractions éthanoliques d'*Erismadelphus exsul* a été évaluée par les méthodes DPPH et FRAP en utilisant le Trolox comme standard et l'acide ascorbique pour comparaison. Les deux méthodologies réagissent à différents mécanismes antioxydants : piégeage des radicaux libres pour le DPPH et réduction du fer pour le FRAP. En ce qui concerne les résultats du Tableau 8, la première conclusion globale est que l'extrait et les fractions obtenus à partir d'*Erismadelphus exsul* montrent une meilleure réactivité au FRAP qu'au DPPH. Les fractions sont 2 à 4 fois plus antioxydantes que l'acide ascorbique en réagissant au FRAP alors qu'elles sont 2 à 9 fois moins antioxydantes que cette référence en réagissant au DPPH. Ces résultats sont en accord avec la manière dont les écorces d'*Erismadelphus exsul* sont utilisées en médecine traditionnelle. En effet, l'ingestion sous forme de tisane pourrait permettre une meilleure assimilation des métabolites et donc leur passage dans le système sanguin (où se trouve le fer) qu'un autre type d'utilisation traditionnelle comme le cataplasme (où l'activité de piégeage des radicaux sera plus efficace). En se focalisant sur l'extrait brut, la réactivité aux deux tests peut paraître surprenante. Concernant le FRAP, la propriété antioxydante de l'extrait brut est équivalente à celle des fractions F4 à F8, et 4 fois plus antioxydante que l'acide ascorbique. Ceci pourrait s'expliquer par une sorte d'effet de seuil ou par la présence dans ces fractions du même métabolite qui réagit au FRAP. En ce qui concerne le DPPH, la propriété antioxydante de l'extrait brut est 20 fois plus faible que celle des fractions F4 à F8, et 50 fois moins antioxydante que l'acide ascorbique. Ce résultat peut être interprété de trois manières : (i) un effet antagoniste des métabolites présents dans l'extrait brut (séparés dans les fractions concernant l'activité de piégeage des radicaux libres) ; (ii) la présence dans l'extrait brut d'un composé inhibant l'activité de piégeage des radicaux libres (composés absent de la fraction 5 à la fraction 8) ; (iii) et moins probablement, il ne peut être exclu que la quantité et/ou la proportion de chaque métabolite dans l'extrait brut conduise à cette faible activité antioxydante. Il a été largement démontré que les polyphénols présentent des activités antioxydantes, la présence donc de plusieurs groupes de polyphénols incluant les flavonoïdes et les isoflavonoïdes dans l'extrait brut et les fractions d'*Erismadelphus exsul* pourrait expliquer les activités antioxydantes observées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par R.R Franco et *al.*, qui ont montré de fortes activités antioxydantes de plusieurs plantes appartenant à la famille des *Vochysiaceae*[182]. En fait, les résultats obtenus avec *E.exsul* sont encore plus intéressants car toutes les activités observées par Franco et ses collègues (2019) sont inférieures à la capacité antioxydante de l'acide ascorbique concernant le test FRAP, alors que l'extrait et les fractions obtenus à partir d'*Erismadelphus exsul* sont 4 fois plus antioxydants que l'acide ascorbique, ce qui suggère un intérêt putatif pour une valorisation industrielle comme un potentiel nutraceutique.

Tableau 8 : Activité antioxydante de l'extrait brut et des fractions d'*Erismadelphus exsul*

Extrait et fractions	FRAP ($\mu\text{M TE/g DW}$)	DPPH ($\mu\text{M TE/g DW}$)
EE EtOH	2173,40 \pm 13,92	29,04 \pm 6,01
EE EtOH F1	234,37 \pm 12,21	42,47 \pm 4,19
EE EtOH F2	1959,24 \pm 7,33	39,58 \pm 1,95
EE EtOH F3	1369,14 \pm 83,57	145,51 \pm 6,69
EE EtOH F4	2173,40 \pm 7,33	253,67 \pm 50,50
EE EtOH F5	2246,52 \pm 44,42	498,03 \pm 23,17
EE EtOH F6	2307,54 \pm 48,40	464,62 \pm 8,57
EE EtOH F7	2187,22 \pm 85,49	574,03 \pm 7,94
EE EtOH F8	2329,42 \pm 47,90	565,51 \pm 9,29
Acide Ascorbique	631,99 \pm 39,08	1261,79 \pm 150,68

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard (Ecart-type) ; EE = *Erismadelphus exsul* ; Et = éthanolique ; DW = poids sec, TE = Trolox-Equivalent.

3.2. Activité antibactérienne

Une évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait brut éthanolique et ses fractions a été effectuée. Pour cela, les méthodes de diffusion sur disque (détermination des diamètres de zone d'inhibition DZI) et microdilution (détermination des concentration minimale inhibitrice CMI et concentration minimale bactéricide CMB) ont été utilisées. L'activité antimicrobienne de toutes les fractions a été comparée aux témoins et à l'extrait brut dans l'objectif de cibler les fractions actives. Le Tableaux 9 montre les différents diamètres d'inhibition (DZI) obtenus. La toute première interprétation à faire est que l'extrait brut et les fractions F4 et F6 ont invariablement donné les meilleurs résultats avec une activité antimicrobienne relativement plus élevée. Les fractions F2, F3 et F5 ont montré une activité moins intéressante que celle des fractions F4 et F6. La fraction F1 n'a été active que sur la souche *Salmonella enterica* (DZI 24 \pm 0,47) et F7 uniquement sur *Klebsiella pneumoniae* MDR (DZI 13 \pm 0,00). Cette activité sélective des fraction F1 et F7, laisse dire qu'il existe des molécules spécifiques dans ces fractions auxquelles seul *S. enterica* et *K. pneumoniae* MDR sont sensibles. La fraction F4 montre les diamètres d'inhibition les plus élevés sur *K. p* MDR (DZI 22,67 \pm 0,47) ; *E. coli* ATCC25922 (DZI 20 \pm 1,41) et *E. coli* ATCC8739 (DZI 18 \pm 0,94), tandis que la fraction F6 a été plus active sur *K. p* MDR (DZI 14,67 \pm 0,47) et *S. enterica* (DZI 14,33 \pm 0,94). Afin de pousser nos analyses et déterminer le mode d'action (bactéricide ou bactériostatique) des échantillons testés, les rapports CMB/CMI ont été calculés. Les résultats obtenus ont été interprétés comme suivant : quand le rapport CMB/CMI est compris entre 1 et 2, l'extrait ou la fraction est bactéricide, et lorsque ce rapport est compris entre 4 et 16 l'extrait est considéré comme étant bactériostatique[164].

Partant de ce principe, les résultats du Tableau 10 montrent que la fraction F4 est bactéricide sur la plupart des souches testées, tandis que la fraction F6 a un effet bactériostatique sur la plupart des souches. Ainsi, l'analyse et l'interprétation de ces résultats indique que les composés antibactériens de l'extrait *Erismadelphus exsul* sont principalement élués dans la fraction F4.

Tableau 9 : Diamètre de zone d'inhibition (DZI) extrait et fractions éthanolique *Erismadelphus exsul*

Extrait/Fractions	Diamètre d'inhibition DZI (mm)				
	Souches bactériennes				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>K. p</i> MDR	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i> ESBL
EE EtOH	11,67 ± 0,47	21,33 ± 0,47	12,33 ± 0,47	13,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47
EE EtOH F1	Na	Na	Na	24,67 ± 0,47	Na
EE EtOH F2	10 ± 0,00	11 ± 0,00	13,33 ± 0,47	12 ± 0,00	9 ± 0,00
EE EtOH F3	11 ± 0,00	11,33 ± 0,47	9 ± 0,00	9,33 ± 0,47	9,33 ± 0,94
EE EtOH F4	20 ± 1,41	18 ± 0,94	22,67 ± 0,47	9 ± 0,00	10 ± 0,00
EE EtOH F5	10 ± 0,82	Na	11,33 ± 0,94	13 ± 0,00	12,67 ± 0,47
EE EtOH F6	13 ± 0,82	Na	14,67 ± 0,47	14,33 ± 0,94	Na
EE EtOH F7	Na	Na	13 ± 0,00	Na	Na
EE EtOH F8	Na	Na	Na	Na	9 ± 0,00
Ticarcilline	19,33 ± 0,47	21,33 ± 0,47	20 ± 0,00	20 ± 0,00	Na
Gentamicine	30 ± 0,00	23 ± 0,00	21 ± 0,00	22,33 ± 0,47	22 ± 0,00
Fosfomycine	Na	Na	Na	Na	Na
Amoxicilline	Na	Na	Na	Na	Na
Tétracycline	Na	Na	12 ± 0,00	Na	Na
Céfoxitine + Ac clav	10 ± 0,00	23 ± 0,00	14 ± 0,00	Na	12,33 ± 0,47
DMSO 30%	Na	Na	Na	Na	Na

EE = *Erismadelphus exsul* ; **E. coli** = *Escherichia coli* ; **K. p MDR** = *Klebsiella pneumoniae* multi-drogue résistant ; **S. enterica** = *Salmonella enterica* ; **E. coli ESBL** = *Escherichia coli* bêta-lactamase spectre élargi ; **EtOH** = Ethanologique ; **F** = Fraction ; **Na** = non actif.

Tableau 10 : Valeur des CMI et CMB de l'extrait et fractions éthanolique *Erismadelphus exsul* Mildbr

Extrait / fractions	CMI et CMB (mg/mL)									
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i> ATCC 8739		<i>K. p</i> MDR		<i>S. enterica</i>		<i>E. coli</i> ESBL	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
EE EtOH	1,25	5	1,25	2,5	0,62	5	0,62	5	1,25	2,5
EE EtOH F1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	1,25	1,25	Nt	Nt
EE EtOH F2	1,25	5	1,25	5	0,62	2,5	0,62	2,5	2,5	5
EE EtOH F3	2,5	5	2,5	>5	5	>5	2,5	>5	2,5	5
EE EtOH F4	1,25	2,5	0,62	1,25	1,25	2,5	1,25	2,5	0,62	2,5
EE EtOH F5	2,5	>5	Nt	Nt	2,5	>5	1,25	2,5	1,25	2,5
EE EtOH F6	0,31	1,25	0,62	2,50	0,62	1,25	0,31	2,5	0,31	1,25
EE EtOH F7	Nt	Nt	Nt	Nt	2,5	5	Nt	Nt	Nt	Nt
EE EtOH F8	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	5	>5

EE = *Erismadelphus exsul* ; **E. coli** = *Escherichia coli* ; **K. p MDR** = *Klebsiella pneumoniae* multi-drogue résistant ; **S. enterica** = *Salmonella enterica* ; **E. coli ESBL** = *Escherichia coli* bêta-lactamase spectre élargi ; **EtOH** = Ethanologique ; **F** = Fraction ; **Nt** = non testé

3.3. Activité anti-oomycète et antifongique

L'activité antimicrobienne *in vitro* de l'écorce d'*E. exsul* a été mesurée à la fois sur *Phytophthora infestans*, un oomycète responsable du mildiou sur de nombreuses *Solanaceae* comme la tomate et la pomme de terre, et sur *Zymoseptoria tritici*, un champignon responsable de la tache de *Septoria tritici* sur le blé. Deux expériences indépendantes avec trois répétitions biologiques ont été réalisées pour chaque pathogène et les deux expériences ont donné des résultats similaires (Tableau 11). Dans l'ensemble, des modèles d'activité antimicrobienne proches ont été observés pour toutes les fractions et l'extrait brut sur chaque agent pathogène (Figure 47). Les courbes dose-réponse ont révélé que toutes les fractions, ainsi que l'extrait brut, inhibent la croissance mycélienne de *P. infestans*, en particulier à la plus forte concentration testée de 1000 mg.L⁻¹ (Figure 47 A, C). La fraction la plus active était la F3, avec une inhibition de 100 % de la croissance mycélienne à 1000 mg.L⁻¹ (Figure 47 E). En ce qui concerne *Z. tritici*, les fractions et l'extrait brut ont montré des activités antimicrobiennes globalement plus faibles par rapport à celles obtenues pour *P. infestans* (Figure 47 B, D). Aucune fraction n'a été capable d'inhiber totalement la croissance fongique, même à la plus forte concentration testée (Figure 47 F). Il est intéressant de noter que F3, la fraction la plus efficace à 1000 mg.L⁻¹ sur *P. infestans*, était également la plus active à cette concentration sur *Z. tritici* (Figure 47 E, F). Cependant, F1, l'une des fractions les plus actives sur *P. infestans*, ne présentait aucune activité sur *Z. tritici* (Figure 47 C, D, E, F). La différence d'activité mise en évidence entre les deux phytopathogènes ciblés peut s'expliquer par le fait que les composés responsables de l'activité anti-oomycète sont présents en plus forte concentration dans les fractions obtenues par rapport à ceux responsables de l'activité antifongique. D'autre part, cette différence d'activité entre *P. infestans* et *Z. tritici* pourrait être expliquée par la physiologie et la composition de la paroi des deux espèces. En effet, la composition de la paroi joue un rôle physiologique majeur dans les échanges entre le milieu intra et extracellulaire. Chez les champignons, la présence de chitine, de glucanes et d'autres polymères, favorise le maintien de la flexibilité de la paroi, empêchant ainsi certaines molécules de pénétrer dans la cellule et d'atteindre leur cible cellulaire[183]. Ceci peut expliquer en partie la moindre activité des molécules présentes dans l'extrait et les fractions d'*E. exsul* sur *Z. tritici*. Bien que plusieurs travaux antérieurs aient montré des activités antimicrobiennes significatives d'une large gamme d'extraits botaniques contre les deux pathogènes[184],[185], il s'agit du premier rapport mettant en évidence l'activité antimicrobienne de l'extrait d'*E. exsul* contre *P. infestans* et *Z. tritici*.

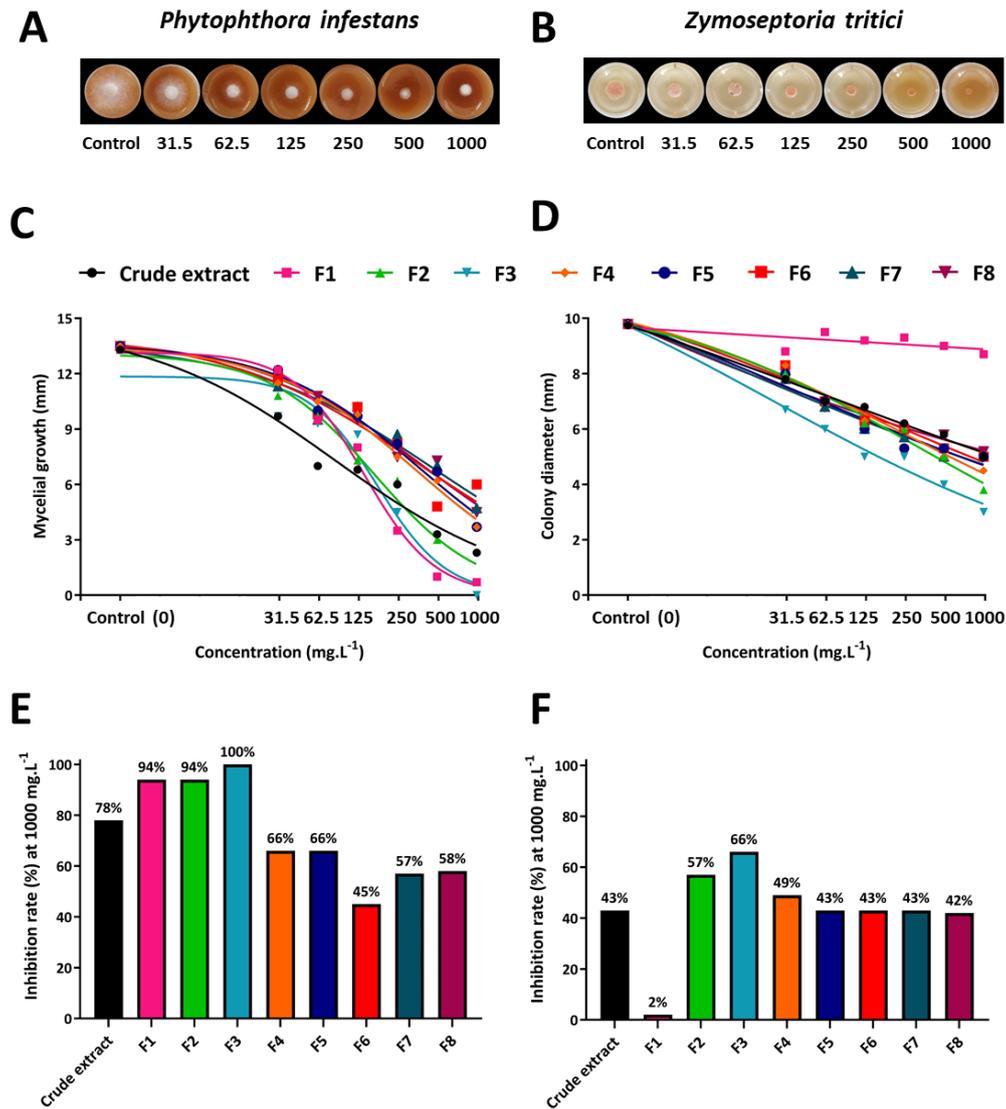


Figure 47 : Activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique brut et des fractions de l'écorce d'*Erismadelphus exsul* sur *Phytophthora infestans* (A,C,E) et *Zymoseptoria tritici* (B,D,F), respectivement trois et onze jours après l'inoculation des pathogènes dans des microplaques à 12puits.

A, B, illustration de la croissance *in vitro* de *P. infestans* (A) et *Z. tritici* (B) obtenue sur des milieux V8 et PDA, respectivement, amendés ou non avec différentes concentrations de la fraction F3. C,D, Courbes dose-réponse obtenues pour *P. infestans* (C) et *Z. tritici* (D) en utilisant l'extrait brut et les fractions à différentes concentrations. E,F, Pourcentage d'inhibitions obtenues pour *P. infestans* (E) et *Z. tritici* (F) en utilisant l'extrait brut et les fractions à la plus forte concentration testée 1000 mg.L⁻¹. La graduation de l'axe X dans les deux sous-figures C et D est présentée en Log2 des concentrations testées

Tableau 11 : Diamètres des colonies *in vitro* (mm) obtenus à l'aide de deux expériences indépendantes pour *Phytophthora infestans* et *Zymoseptoria tritici* à différentes concentrations d'extrait brut et de huit fractions de l'écorce d'*Erismadelphus exsul*.

	Concentration (mg.L ⁻¹)													
	0		31,5		62,5		125		250		500		1000	
	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2
<i>Phytophthora infestans</i>														
DMSO	13,3 (0,2)	13,3 (0,3)	13,5 (1,3)	13,5 (0,5)	13,2 (0,3)	13,2 (1,3)	12,7 (1,0)	12,8 (1,2)	11,7 (2,4)	12,3 (1,5)	10,3 (3,0)	10,2 (2,0)	10,8 (2,1)	10,0 (1,8)
Extrait brut	13,3 (0,2)	13,3 (0,3)	9,7 (2,8)	9,5 (2,2)	7,0 (3,0)	7,2 (1,3)	6,8 (2,3)	7,5 (1,5)	6,0 (2,5)	4,8 (1,2)	3,3 (1,9)	2,2 (3,8)	2,3 (4,0)	2,3 (4,0)
F1	13,3 (0,2)	13,3 (0,3)	12,2 (1,0)	12,0 (1,0)	9,5 (1,8)	10,7 (2,3)	8,0 (1,8)	8,0 (3,6)	3,5 (2,8)	6,7 (2,4)	1,0 (1,7)	1,0 (1,7)	0,7 (1,2)	0,7 (1,2)
F2	13,3 (0,2)	13,3 (0,3)	10,8 (2,8)	11,7 (1,8)	9,7 (2,8)	9,0 (3,1)	7,3 (2,5)	7,8 (2,8)	6,2 (2,8)	7,5 (2,6)	3,0 (3,6)	2,0 (3,5)	0,7 (1,2)	1,3 (1,5)
F3	13,3 (0,2)	13,3 (0,3)	9,7 (2,9)	10,0 (1,7)	9,3 (1,8)	7,8 (1,5)	8,7 (2,4)	7,0 (0,5)	4,5 (1,5)	4,2 (4,0)	1,0 (1,7)	1,8 (3,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
F4	13,5 (1,1)	14,3 (0,4)	11,5 (3,9)	12,0 (1,0)	10,5 (3,0)	10,5 (1,3)	9,8 (2,9)	8,7 (0,6)	7,5 (2,5)	8,3 (1,6)	6,2 (1,0)	4,5 (1,5)	3,7 (3,3)	1,0 (0,0)
F5	13,5 (1,1)	14,3 (0,4)	12,2 (1,9)	11,8 (1,0)	10,0 (2,6)	10,8 (0,6)	9,7 (0,23)	9,8 (2,0)	8,2 (1,4)	9,3 (2,4)	0,67 (1,2)	7,7 (1,6)	3,7 (3,5)	2,3 (2,3)
F6	13,5 (1,1)	14,3 (0,4)	11,7 (3,6)	13,2 (3,5)	9,8 (2,1)	12,3 (3,8)	10,2 (2,3)	11,8 (1,0)	8,2 (3,3)	10,5 (1,3)	4,8 (3,5)	9,2 (0,8)	6,0 (3,8)	4,5 (1,3)
F7	13,5 (1,1)	14,3 (0,4)	11,3 (2,9)	13,8 (0,8)	9,5 (4,0)	12,0 (1,8)	10,2 (3,3)	12,2 (1,0)	8,7 (3,3)	10,0 (1,7)	7,0 (5,3)	7,2 (2,0)	4,7 (4,1)	3,8 (3,5)
F8	13,5 (1,1)	14,3 (0,4)	11,8 (2,9)	12,7 (1,9)	10,8 (4,2)	11,8 (1,0)	9,5 (3,3)	11,2 (1,4)	7,5 (3,9)	9,5 (1,8)	7,3 (2,0)	7,8 (2,5)	4,5 (4,0)	6,7 (1,5)
<i>Zymoseptoria tritici</i>														
DMSO	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	9,0 (0,0)	9,5 (0,7)	9,3 (0,6)	9,2 (0,3)	9,8 (0,3)	9,2 (0,3)	9,3 (0,3)	9,3 (0,3)	9,5 (0,5)	8,8 (0,3)	8,8 (0,6)	9,5 (0,7)
Extrait brut	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	7,8 (0,3)	7,7 (0,3)	7,0 (0,0)	7,5 (0,0)	6,8 (0,3)	6,8 (0,3)	6,2 (0,3)	6,2 (0,3)	5,8 (0,4)	5,7 (0,3)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)
F1	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	8,8 (0,3)	10,0 (0,0)	9,5 (0,5)	9,0 (0,0)	9,2 (0,3)	9,5 (0,5)	9,3 (0,3)	9,2 (0,3)	9,0 (0,0)	8,8 (0,3)	8,7 (0,3)	8,7 (0,6)
F2	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	8,0 (0,0)	8,2 (0,3)	7,0 (0,0)	6,7 (0,6)	6,2 (0,3)	6,8 (0,3)	6,0 (0,0)	6,0 (0,0)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)	3,8 (0,3)	5,0 (0,0)
F3	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	6,7 (0,3)	7,0 (0,0)	6,0 (0,0)	6,0 (0,0)	5,0 (0,0)	5,3 (0,6)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)	4,0 (0,0)	4,0 (0,0)	3,0 (0,0)	3,5 (0,0)
F4	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	8,3 (0,3)	7,0 (0,0)	7,0 (0,0)	6,0 (0,0)	6,3 (0,3)	5,7 (0,6)	6,0 (0,0)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)	4,0 (0,0)	4,5 (0,5)	3,3 (0,3)
F5	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	8,0 (0,0)	7,3 (0,6)	7,0 (0,0)	6,8 (0,3)	6,0 (0,0)	6,0 (0,0)	5,3 (0,6)	5,7 (0,6)	5,3 (0,3)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)	4,7 (0,3)
F6	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	8,3 (0,6)	8,0 (0,0)	7,0 (0,0)	6,8 (0,3)	6,3 (0,3)	6,0 (0,0)	6,0 (0,0)	6,0 (0,0)	5,3 (0,6)	5,3 (0,6)	5,0 (0,0)	4,5 (0,5)
F7	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	7,8 (0,3)	6,2 (0,8)	6,8 (0,3)	7,2 (0,3)	6,0 (0,0)	6,0 (0,0)	5,7 (0,3)	5,3 (0,6)	5,0 (0,0)	4,8 (0,3)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)
F8	9,8 (0,5)	9,9 (0,2)	7,8 (0,3)	7,5 (0,5)	6,8 (0,3)	7,0 (0,0)	6,3 (0,3)	6,0 (0,0)	6,0 (0,0)	6,0 (0,0)	5,8 (0,3)	5,7 (0,3)	5,2 (0,3)	5,8 (0,3)

Rep 1 : Répétition 1 ; **Rep2** : Répétition 2

Les valeurs en gras indiquent les moyennes des diamètres des colonies *in vitro* mesurés trois et onze jours après l'inoculation en microplaque avec *P. infestans* et *Z. tritici*, respectivement, tandis que les valeurs entre parenthèses indiquent les écarts types correspondants obtenus avec trois répétitions biologiques pour chaque concentration testée.

3.4. Déréplication des fractions actives

Dans le but d'identifier les composés antioxydants, antifongiques et antibactériens d'*Erismadelphus exsul*, toutes les fractions actives ont été analysées par spectrométrie de masse. Les principaux ions obtenus sur le spectre de masse ont pu être reportés sur le réseau moléculaire de l'extrait brut afin d'identifier les molécules contenues dans les fractions actives. L'analyse des fractions F8 (antioxydante), F1, F3 et F4 (antimicrobiennes) a montré plusieurs couples d'ions, voir les Figures 48 et 49. Les formules brutes des ions d'intérêt ont ensuite été obtenues à l'aide du logiciel Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00. et donner les propositions suivantes :

- Pour la fraction F8 (antioxydante) : i) m/z 269,080 [$C_{16}H_{12}O_4^+$], ii) m/z 313,107 [$C_{17}H_{12}O_6^+$], iii) m/z 299,091 [$C_{17}H_{14}O_5^+$], iv) 285,112 [$C_{16}H_{12}O_4^+$], v) 579,170 [$C_{27}H_{30}O_{14}^+$], correspondent respectivement à la Formononetine, l'Aflatoxine B2, la 5-hydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one, la Biochanine A et la Rhoifoline.
- Pour la fraction F3 (antimicrobienne) : i) m/z 576,318 [$C_{32}H_{41}N_5O_5^+$], ii) m/z 562,3026 [$C_{31}H_{39}N_5O_5^+$], iii) m/z 592, 313 [$C_{32}H_{41}N_5O_6^+$], correspondent respectivement à la Mauratine A, la Mauratine F et la Mauratine A N-oxyde.
- Pour la fraction F1 (antimicrobienne) : i) m/z 306,243 [$C_{19}H_{31}NO_2^+$], ii) m/z 322,238 [$C_{19}H_{31}NO_3^+$], iii) m/z 320,223 [$C_{19}H_{29}NO_3^+$], qui correspondent respectivement à la 8-deoxoantidesmone, la 8-dihydroantidesmone et l'antidesmone.
- Pour la fraction F4 (antibactérienne) : i) m/z 322,238 [$C_{19}H_{31}NO_3^+$], ii) m/z 576,318 [$C_{32}H_{41}N_5O_5^+$], iii) m/z 592, 313 [$C_{32}H_{41}N_5O_6^+$] et 562,302 [$C_{31}H_{39}N_5O_5^+$], correspondent respectivement à la 8-dihydroantidesmone, la mauratine A, la mauratine A N-Oxyde et la mauratine F.

Afin d'affiner l'identification des composés, les ions d'intérêt ont été localisés sur le réseau moléculaire et les composés actifs ont été détectés sur les clusters C et D (Alcaloïdes cyclopeptidiques et quinoléines pour les activités anti-oomycète et antibactériennes) et la Zone A (Isoflavonoïdes et Flavonoïdes pour les activités antioxydantes) comme le montre les Figures 48 et 49.

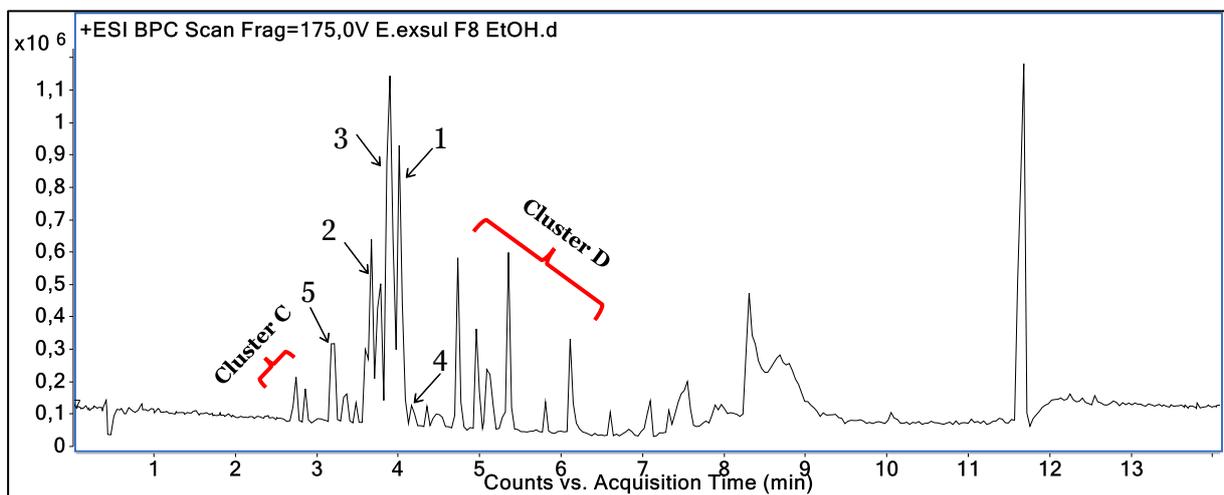
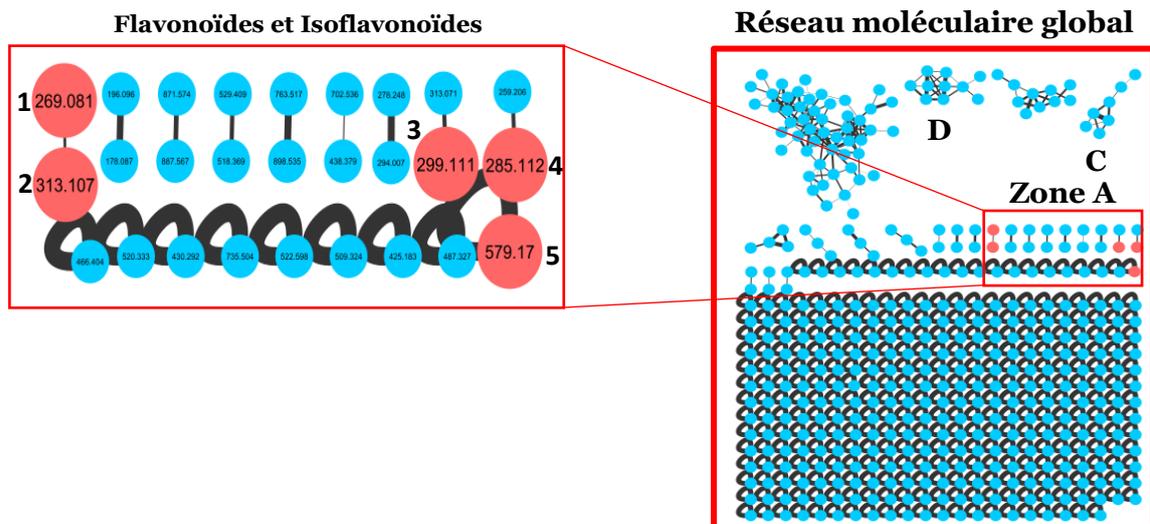


Figure 48 : Focalisation sur le cluster des ions d'intérêt antioxydants contenus dans la fraction F8

Il est bien connu dans la littérature que les composés phénoliques (flavonoïdes et isoflavonoïdes) ont une grande capacité de piégeage des radicaux libres et de chélation des métaux de transition comme le fer. Ils sont le plus souvent responsables de l'activité antioxydante dans les plantes[186]. La forte activité antioxydante de la fraction F8 peut donc être liée à la présence de plusieurs flavonoïdes et isoflavonoïdes [la formononetine (**1**), la biochanine A (**4**) et la rhoifoline (**5**)]. En effet, de nombreuses études ont montré la forte activité antioxydante de la formononetine[187],[188], la rhoifoline[189],[183] et la biochanine A.

Alcaloïdes (Cyclopeptidique C et Quinoléine D)

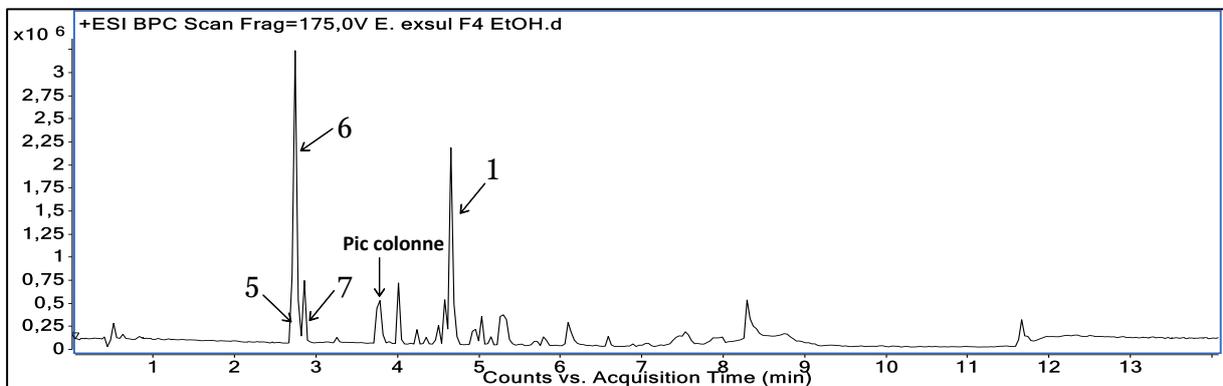
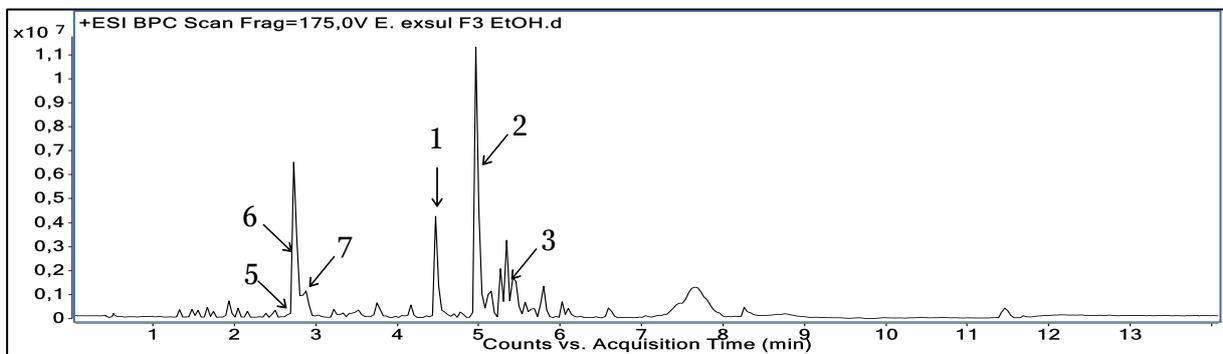
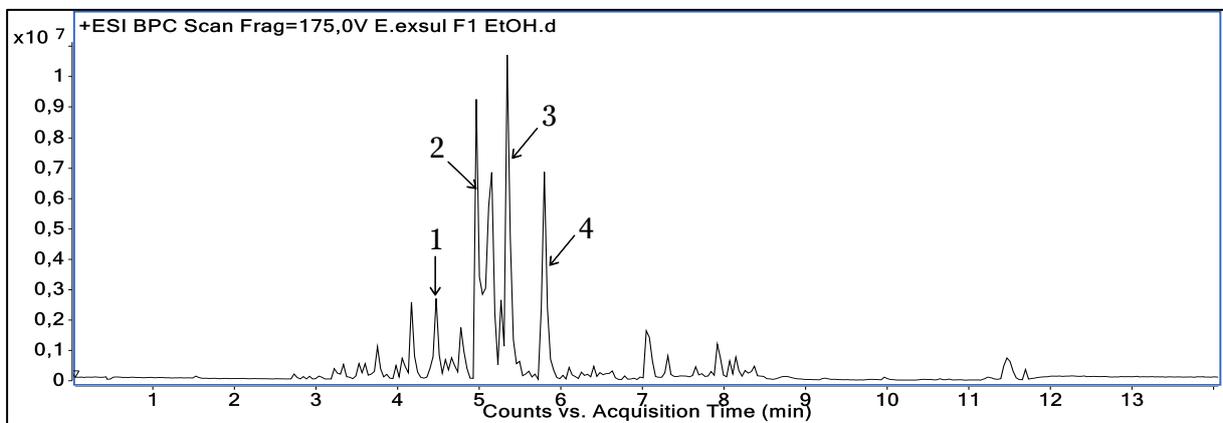
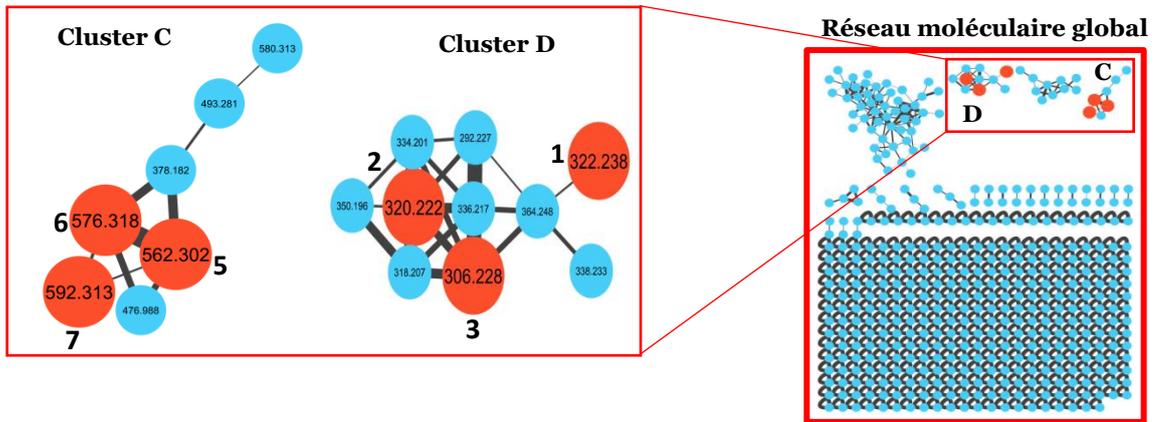


Figure 49 : Focalisation sur le cluster des ions d'intérêt antimicrobien contenus dans les fractions F1, F3 et F4

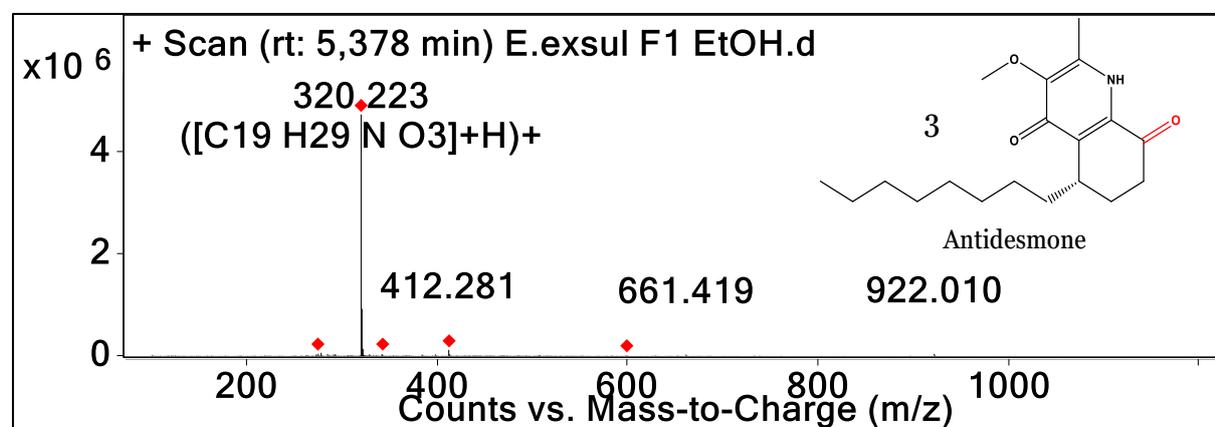
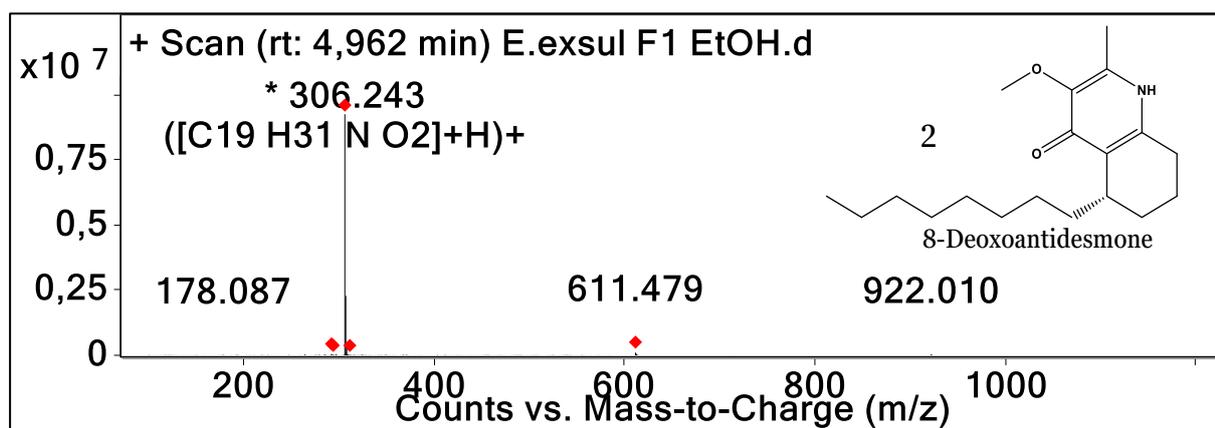
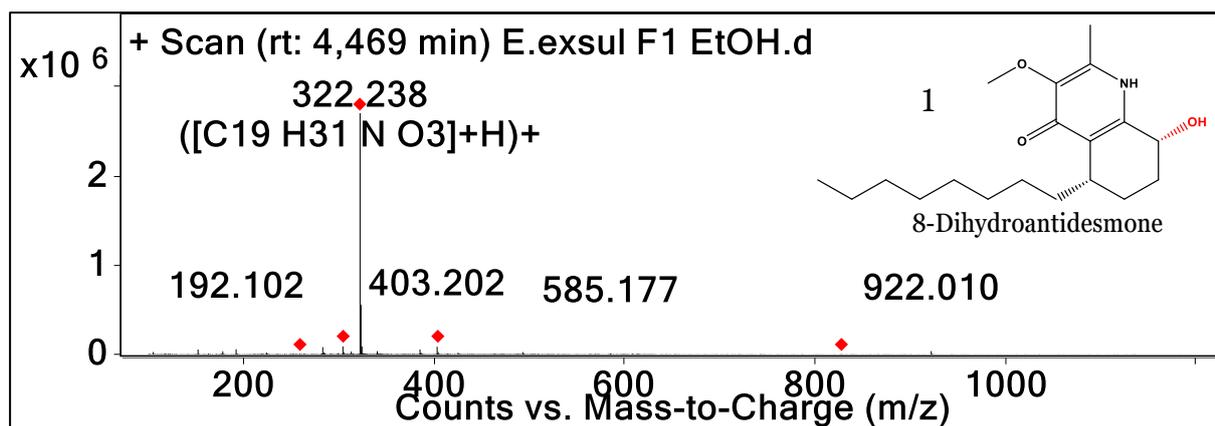


Figure 50 : Spectres de masse des ions [M+H]⁺ de l'Antidesmone, la 8-Dihydroantidesmone et la 8-Deoxoantidesmone obtenus par LC-ESI-MS

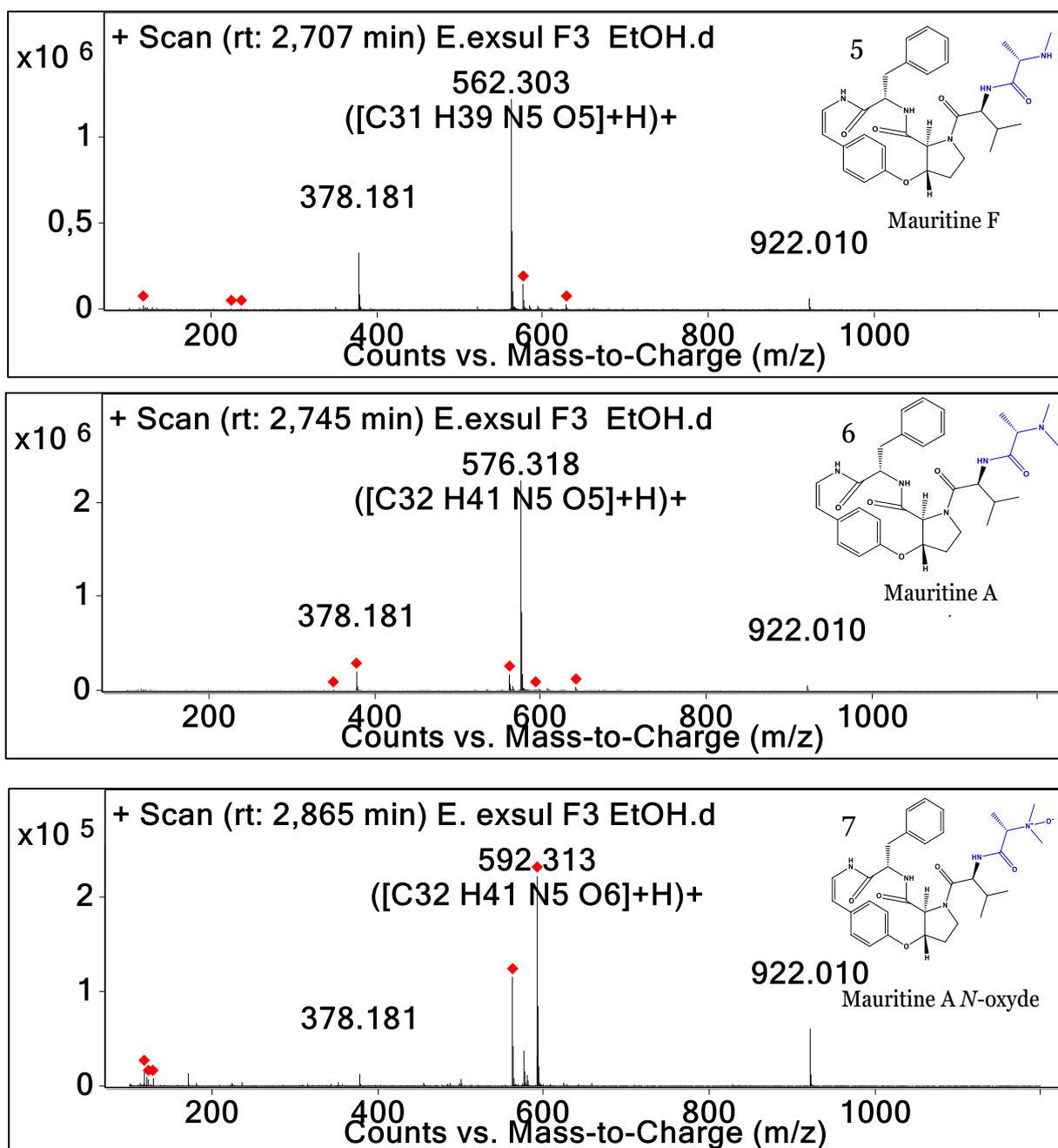


Figure 51 : Spectres de masse des ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la Mauritine F (5), la Mauritine A (6) et la Mauritine A N-oxyle (7), obtenus par LC-ESI-MS

Les fractions F1, F3 et F4 montrent la présence de deux familles d'alcaloïdes (cyclopeptidiques et quinoléines) Figure 50 et 51. De façon générale, les alcaloïdes jouent un rôle important dans les structures biologiques, ils sont reconnus pour leur pouvoir antimicrobien élevé[190]. Ces alcaloïdes très majoritairement présents dans les fractions pourraient être en partie responsables de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de *Erismadelphus exsul*.

3.5. Purification de l'extrait éthanolique de *Erismadelphus exsul*

Les fractions F1, F2, F3 et F4 semblaient contenir les composés les plus actifs. Par conséquent, les efforts d'isolement ont été dirigés vers deux d'entre eux (m/z 576,318 et m/z 562,302). Ils ont été ciblés par un isolement masse (MS) guidé par HPLC-préparative. La fraction F4 a été fractionnée par chromatographie Flash. Les sous-fractions obtenues (25,1 mg) ont été purifiées par HPLC préparative en utilisant un gradient de MeOH-H₂O et ont donné deux composés : la mauritine A solide amorphe blanc, correspondant au composé 1 (2 mg) et la mauritine F avec un aspect solide amorphe jaunâtre composé 2 (1,6 mg). La Figure 52 montre le schéma de fractionnement et purification de la sous-fraction 4.

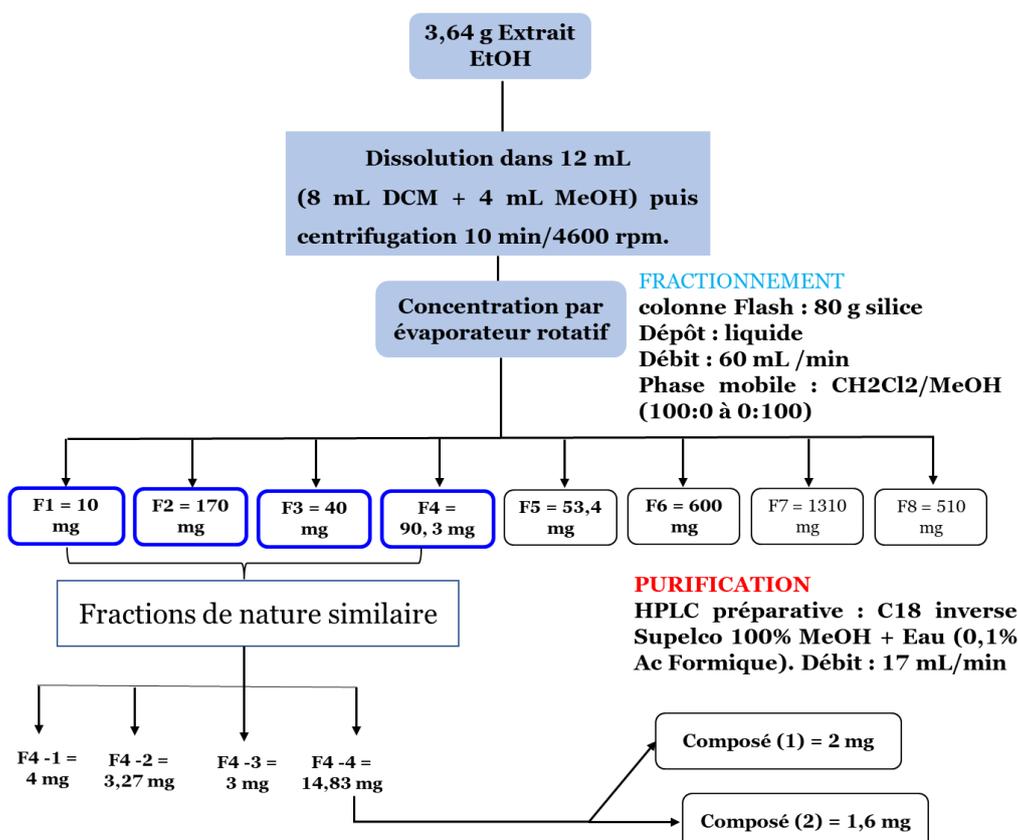


Figure 52 : Schéma de fractionnement et purification de la sous-fraction F4 éthanolique

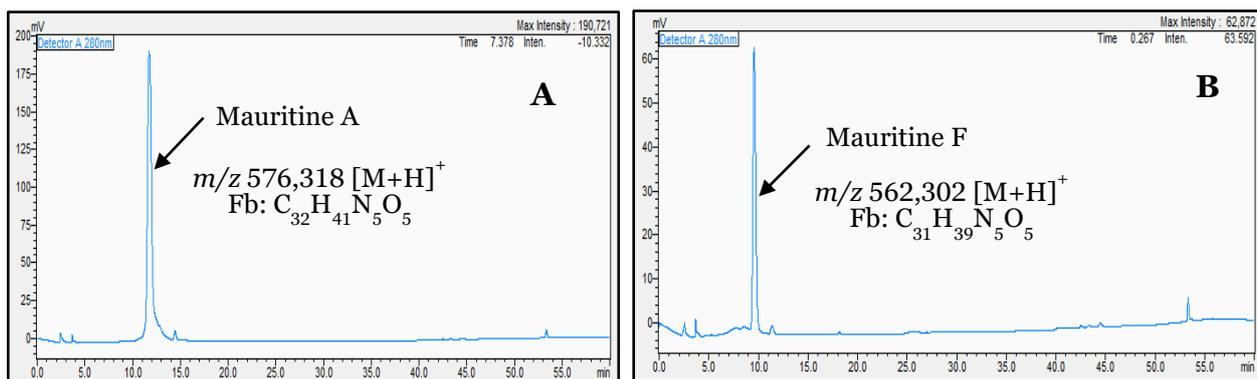


Figure 53 : Profil chromatographique UV à 280 nm de la mauritine A (A) et la mauritine F (B) isolé de la sous-fraction F4 éthanolique des écorces de *Erismadelphus exsul* Mildbr

Parmi les alcaloïdes cyclopeptidiques, nous notons la Mauritine A (composé 1), la Mauritine F (composé 2) et la Mauritine A *N*-oxyde, à m/z 576,3188 $[M+H]^+$, m/z 562,3024 $[M+H]^+$ et m/z 592,3140 $[M+H]^+$, respectivement. Les composés 1, 2 et 3 ont été précédemment isolés par Han et *al.*, [179] dans l'écorce de *Ziziphus apetala*. L'analyse des masses exactes des trois alcaloïdes a montré une différence de masse de -14 Da entre la Mauritine A et la Mauritine F indiquant une perte de méthylène (CH_2) par la Mauritine A et une différence de +16 Da entre la Mauritine A et la Mauritine A *N*-oxyde suggérant un oxygène de plus que la Mauritine A (Figure 53). En outre, les trois composés partagent les mêmes ions de fragments MS/MS 103,05 $[M+H]^+$; 120,08 $[M+H]^+$; 134,04 $[M+H]^+$ et 174,09 $[M+H]^+$, précédemment décrits par Kapadia et *al.*, [180]. D'après la littérature, la plupart des alcaloïdes cyclopeptidiques ne diffèrent que par leurs substituants en position asymétrique C34, formant ainsi des paires épimériques, et les deux épimères peuvent se transformer l'un en l'autre, la position C34 peut être configurée en (*R*) ou (*S*) [179]. Les données MS et MS/MS disponibles ne permettent pas de connaître avec certitude les paires d'épimères présentes dans l'extrait EtOH de *E. exsul*. Sur la base des données chimio-taxonomiques, la distribution des alcaloïdes cyclopeptidiques montre qu'ils sont principalement présents au niveau des Rhamnaceae (Genre *Ziziphus*) [191], Malvaceae (Genre *Melochia*) [192], [193], et Euphorbiaceae (Genre *Antidesmone*) [194], tous des Angiospermes (Dicotylédones) évoluant dans la sous-classe des Rosidae, y compris Vochysiaceae (Genre *Erismadelphus*). Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur cette famille de molécules, nous avons déployé des efforts d'isolement vers les masses d'alcaloïdes cyclopeptidiques basés sur le suivi des fractions par LC-DAD-MS. Deux composés (m/z 576,3188 $[M+H]^+$ et 562,3024 $[M+H]^+$) ont été ciblés et isolés pour une élucidation structurale par interprétation des données RMN proton 1H . L'obtention de très petites quantités des deux composés purs ne nous a pas permis d'avoir des données RMN 2D plus claires. Nous nous sommes toutefois limités à l'interprétation des données de RMN 1H , comme le montre la Figure 55.

3.6. Relation entre la Mauritine A, Mauritine F et Mauritine A N-oxyde du cluster C

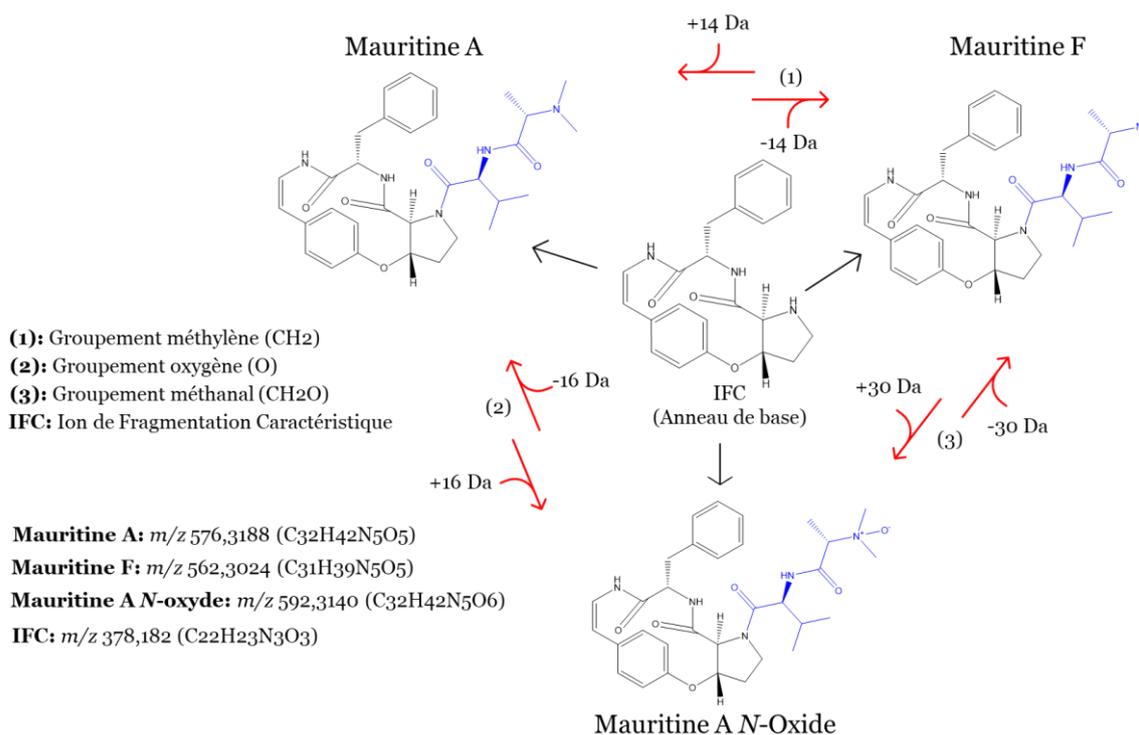


Figure 54 : Différentes relations entre les composés du cluster C : alcaloïdes cyclopeptidiques

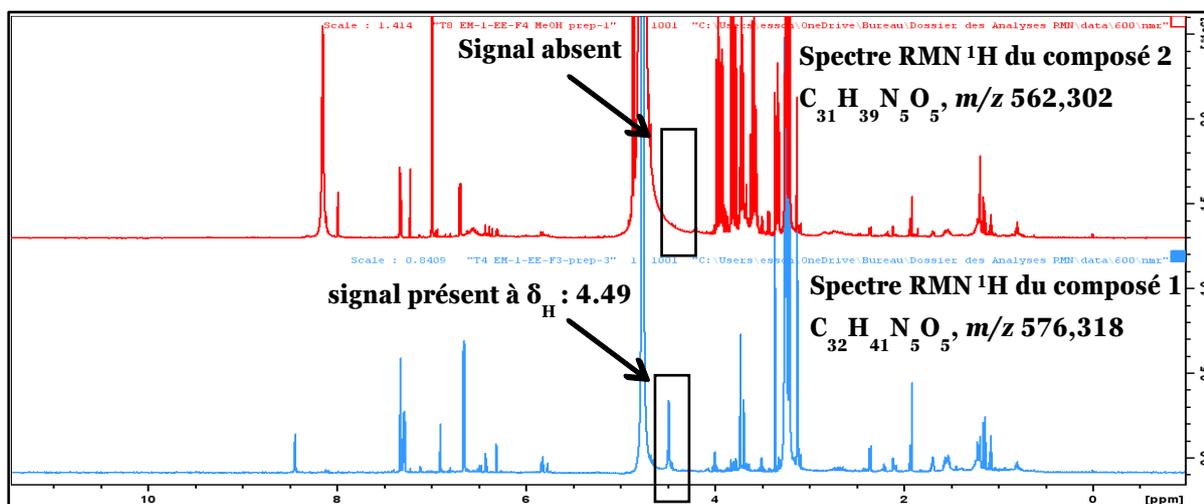


Figure 55 : Superposition des spectres RMN proton ¹H de la Mauritine A (1) et la Mauritine F (2), MeOH d₄, RNM 600 MHz

La superposition des deux spectres RMN ¹H montre que les deux composés sont analogues et très similaires, à l'exception du signal correspondant au déplacement chimique δ_H : 4,49 ppm présent dans le spectre ¹H de la Mauritine A et absent chez la Mauritine F.

IV. ÉTUDES CHIMIQUES DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE DE *E. EXSUL* MILDBR

Le TIC (Total Ion Chromatogram) de l'extrait méthanolique d'*Erismadelphus exsul* obtenu par CLHP-UV-MS en mode d'ionisation (+) ESI est présenté sur la Figure 56. Celui-ci montre une première empreinte moléculaire de l'extrait brut avec 19 pics.

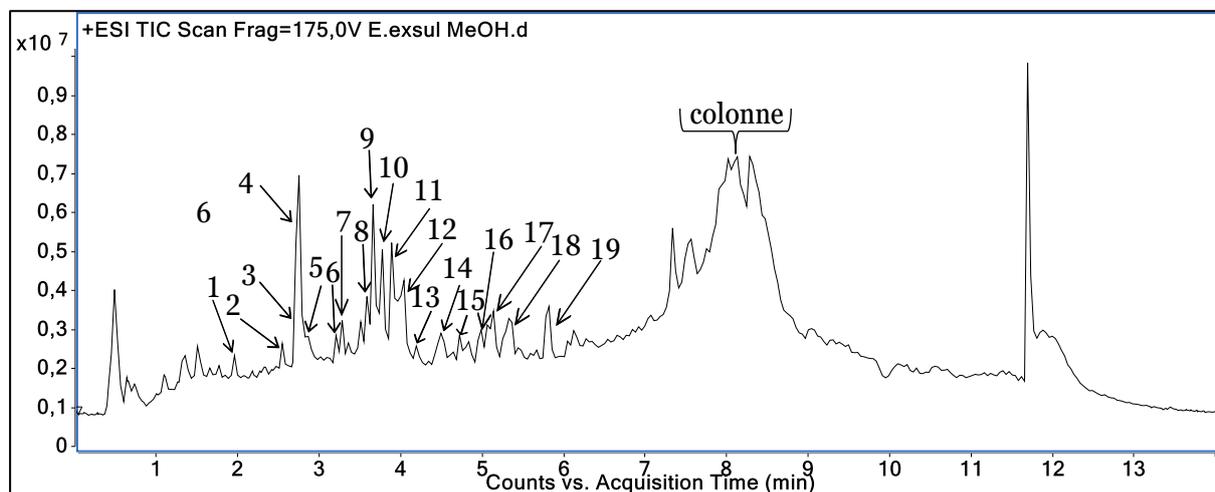


Figure 56 : Total Ion Chromatogram (TIC) de l'extrait méthanolique des écorces de tronc de *Erismadelphus exsul* Mildbr obtenu par CLHP-UV-MS ESI(+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18

Une étape d'annotation des métabolites détectés en LC-MS/MS dans l'extrait brut méthanolique des écorces de *Erismadelphus exsul* a également été effectuée. Tout comme l'extrait brut éthanolique, le chromatogramme (TIC) de l'extrait méthanolique montre un pic majoritaire correspondant à la Mauratine A (4).

Tableau 12 : Composés identifiés dans l'extrait méthanolique des écorces de *E. exsul* Mildbr grâce aux données de spectrométrie de masse

Pics	RT (min)	m/z [M+H] ⁺	Formules moléculaires [M]	MS ²	Annotation des ions	Niveau d'identification
1	1,960	321,0970	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	321,09; 241,42; 223,16	Phebaclavin D	4
2	2,571	477,2497	C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₄	477,24; 460,74; 359,33; 265,95; 186,09; 120,08	Inconnu#	4
3	2,742	592,3115	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₆	592,31; 423,02; 378,18; 174,09; 134,06; 120,08	Mauritine A N-ox- yde*#	3
4	2,780	576,3170	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₅	576,31; 544,71; 350,18; 174,09; 134,06; 120,08	Mauritine A*#	3
5	2,808	562,3011	C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₅	562,30; 520,27; 411,37; 174,09; 134,06; 120,08	Mauritine F*#	3
6	3,088	433,1133	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	283,06; 313,07; 121,02; 165,01;	Vitexin#	4
7	3,206	599,3305	C ₃₀ H ₃₈ N ₁₂ O ₂	336,21; 458,27	Inconnu#	4
8	3,282	313,0862	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	315,08; 244,37; 272,80; 312,92; 103,07	Aflatoxine B2#	4
9	3,282	579,1709	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579,17; 152,01; 285,07; 460,87;	Rhoifoline#	4
10	3,661	439,3573	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	393,35; 339,15; 313,07	Ganodermenonol#	4
11	3,774	453,3367	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	329,10; 64,23	Kulactone#	4
12	4,646	322,238	C ₁₉ H ₃₁ NO ₃	322,23; 163,063; 288,198	8-Dihydroan- tidesmone*#	3
13	4,987	306,2432	C ₁₉ H ₃₁ NO ₂	290,98 ; 296,48 ; 178,086 ; 163,063	8-Deoxoan- tidesmone*#	3
14	5,138	398,2654	C ₂₀ H ₃₅ N ₃ O ₅	306,24 ; 194,11	Inconnu#	4
15	5,365	320,2225	C ₁₉ H ₂₉ NO ₃	278,24; 220,59; 222,11; 234,13; 163,063	Antidesmone*#	3
16	5,782	256,1330	C ₁₆ H ₁₇ NO ₂		Inconnu#	4
17	5,061	445,2120	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	283,09; 398,26; 194,11	Asperglaucide*#	3
18	5,782	507,2280	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₄	327,23; 256,13	Asperphena- mate*#	3
19	6,123	317,1960	C ₁₆ H ₂₈ O ₆		2-Bornanol (1S, 2R) -O-D- glucopyranoside#	4

* Composés doublement annotés : spectrométrie de masse et réseaux moléculaires ; # Composé présent dans les deux types d'extraction (MeOH et EtOH)

4.1. Ciblage et déréplication basés sur les réseaux moléculaires

Les données obtenues dans l'analyse par CLHP-MS² en mode d'ionisation positif de l'extrait méthanolique d'écorce de tronc de *Erismadelphus exsul* ont été traitées par la technique des réseaux moléculaires. La carte moléculaire obtenue à la Figure 57 a été générée à partir de 741 spectres individuels, formant 597 nœuds. Ce réseau est composé d'un cluster principal (cluster A) regroupant un nombre important de nœuds, et douze autres clusters dont la plupart ont été décrits dans l'extrait brut éthanolique (cluster B et C). Au total, 18 composés ont été annotés dans l'extrait méthanolique de *Erismadelphus exsul*. L'analyse du cluster A montre plusieurs couples d'ions (nœuds) appartenant à la famille des terpénoïdes. La plupart de ces composés sont présents dans l'extrait éthanolique. Nous avons pu détecter la plupart des composés de l'extrait éthanoliques les flavonoïdes (formononetine, aflatoxine B₂, 5-hydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one, biochanine A et rhoifoline), les alcaloïdes cyclopeptidiques (mauristine A et mauristine F) et les alcaloïdes quinoléines (antidesmone, 8-doexoantidesmone et 8-dihydroantidesmone). Par rapport à l'extrait éthanolique, l'extrait méthanolique montre une redondance d'information au niveau du clusters A. Cette redondance d'informations peut s'expliquer par une fragmentation en source des ions précurseurs ou moléculaires. En effet, lorsque les ions moléculaires se fragmentent en source, aboutissant à plusieurs ions fragments aptes à s'introduire dans la cellule de collision pour être fragmentés, les molécules sont représentées par plusieurs nœuds générant ainsi une redondance d'informations. Plus le nombre de précurseurs est important, plus la quantité d'information est élevée. A l'inverse, si le nombre de précurseurs est trop faible, certaines molécules pourront ne pas être fragmentées en MS/MS ce qui se traduit par une perte d'information.

On peut également constater dans l'extrait méthanolique que les clusters B et C (alcaloïdes cyclopeptidiques et quinoléines) possèdent un nombre de nœuds important par rapport à l'extrait éthanolique. L'une des explications est la spécificité d'extraction (polarité des solvants). En effet, en fonction du solvant d'extraction, le nombre de molécules détectées peut être plus exhaustif. Globalement, les deux méthodes d'extraction permettent de mieux détecter les molécules du cluster A. Par contre, l'extrait méthanolique n'a pas permis de détecter la Mauristine A *N*-oxide (m/z 592,31) au niveau du cluster C par contre présente dans l'extrait éthanolique.

4.2. Réseau moléculaire extrait méthanolique écorces de *Erismadelphus exsul* Mildbr

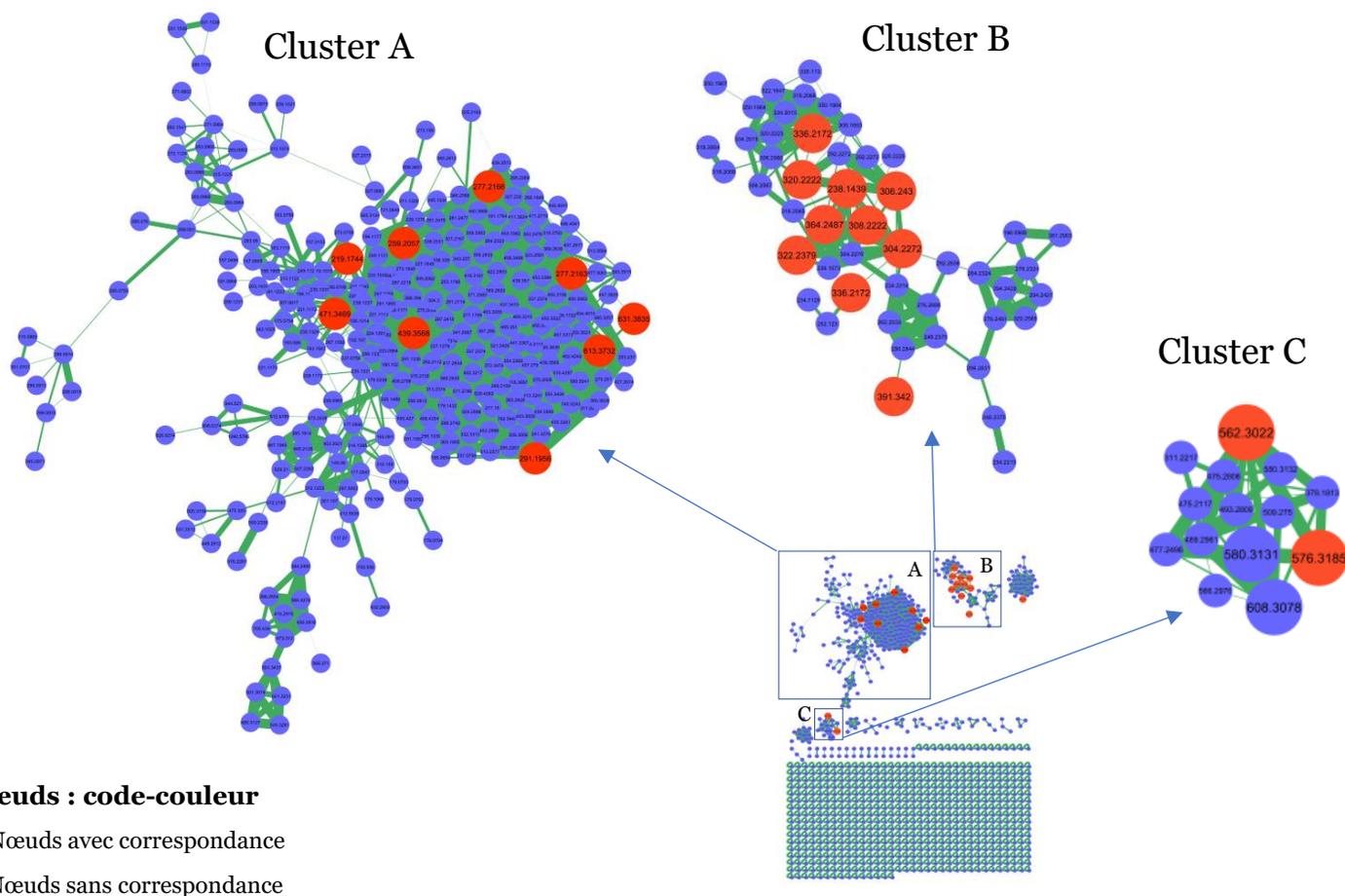


Figure 57 : Réseau moléculaire de l'extrait brut méthanolique de *Erismadelphus exsul* obtenu à l'aide de la plateforme GNPS et visualisé avec le logiciel Cytoscape 3.9.0

4.2.1. Cluster A : Stérols et dérivés de stéroïdes

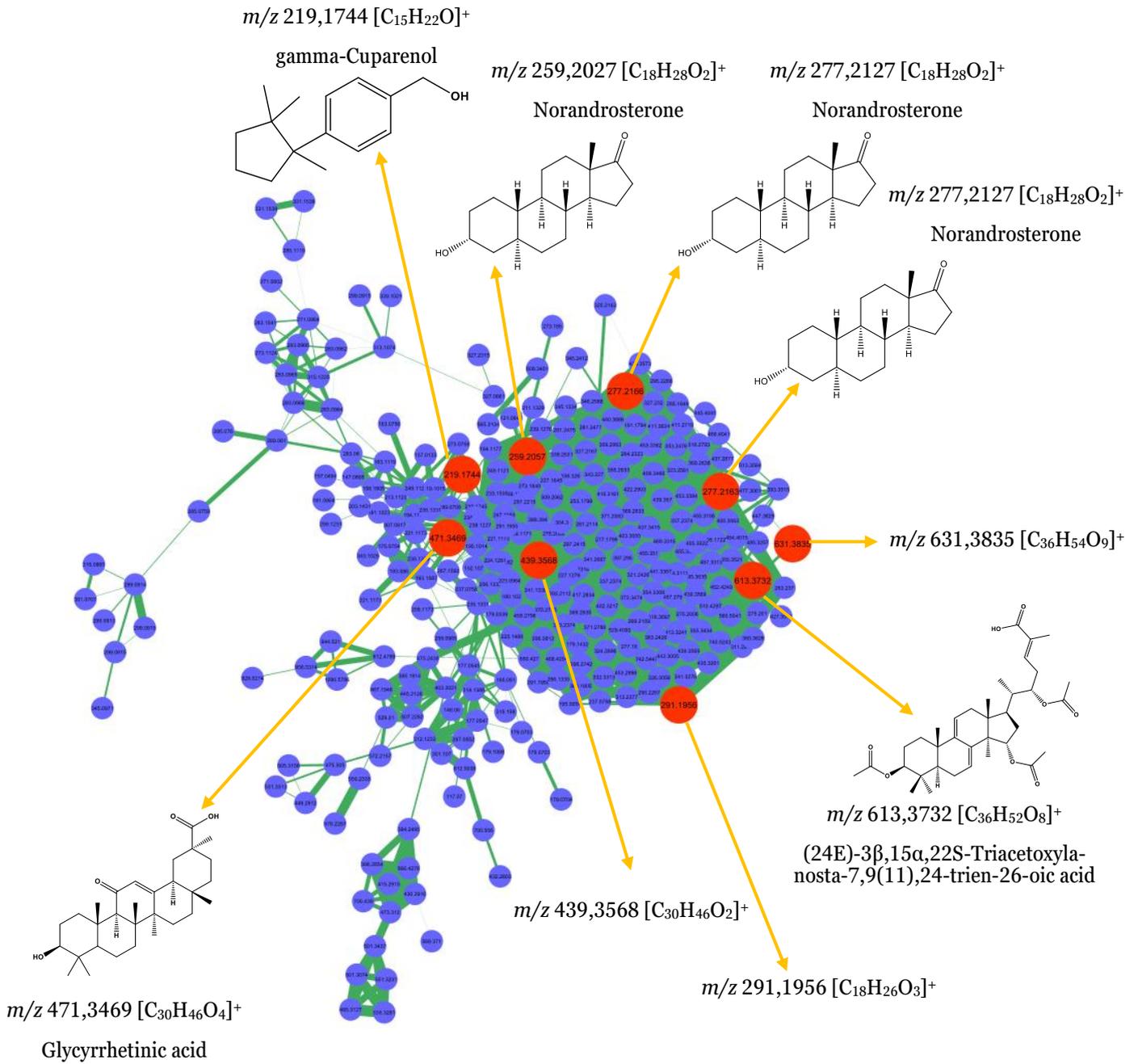


Figure 58 : Réseau moléculaire de l'extrait brut méthanolique de *Erismadelphus exsul* : présentation du cluster A

4.2.2. Cluster B : Alcaloïdes quinoléines

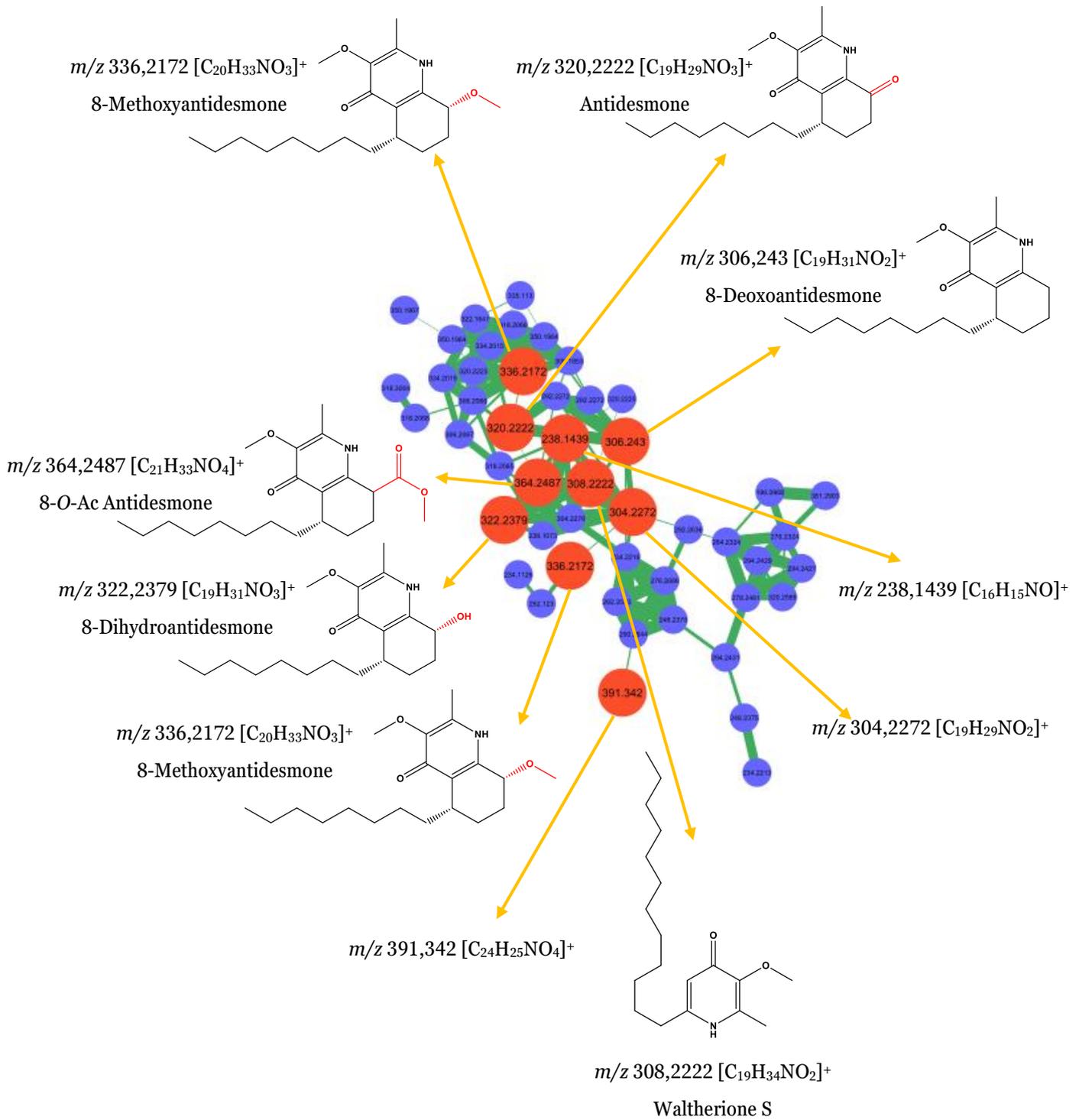


Figure 59 : Réseau moléculaire de l'extrait brut méthanolique de *Erismadelphus exsul* : présentation du cluster B

4.2.3. Cluster C : Alcaloïdes cyclopeptidiques

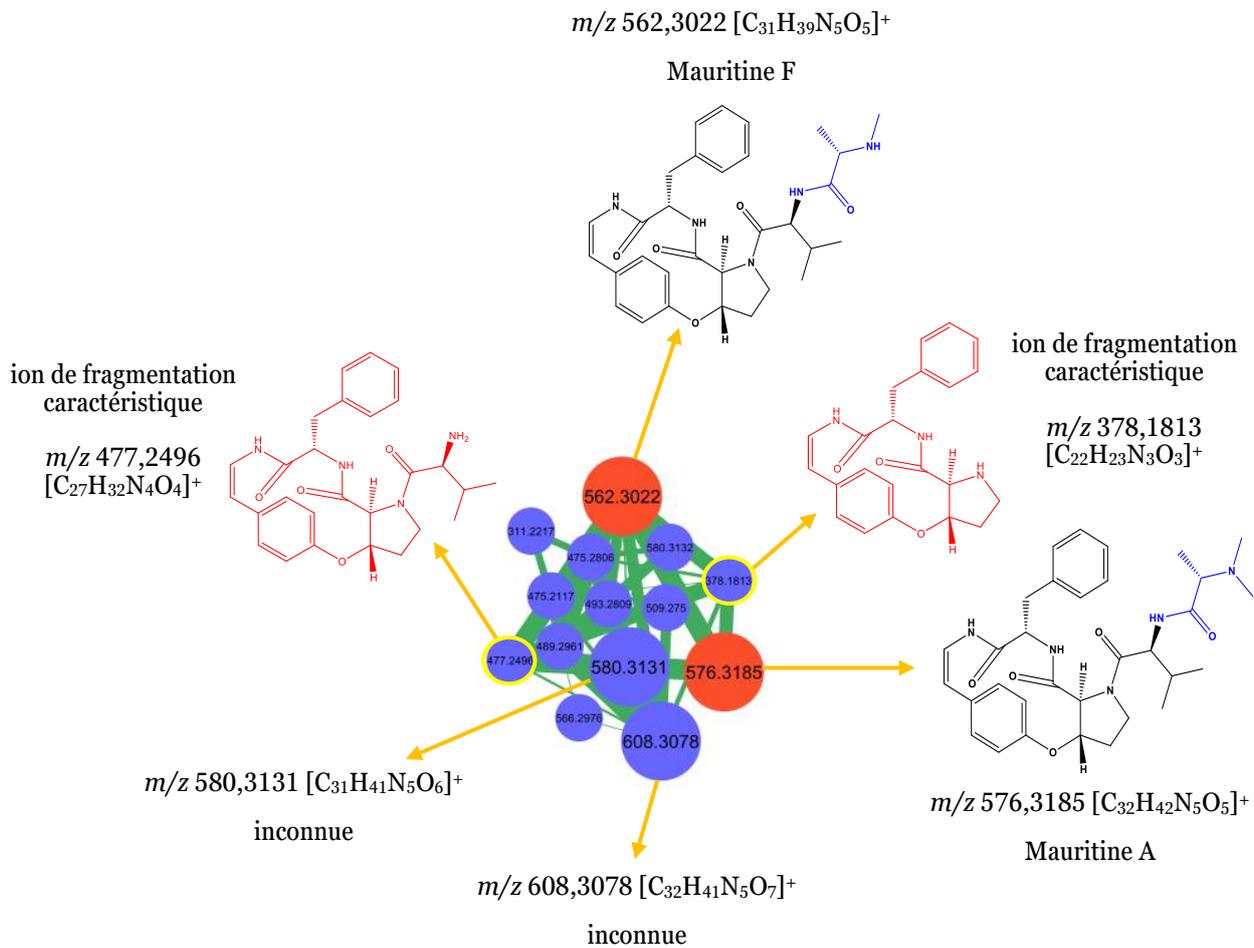


Figure 60 : Réseau moléculaire de l'extrait brut méthanolique de *Erismadelphus exsul* : présentation du cluster C

Tableau 13 : Composés annotés sur le réseau moléculaire de l'extrait méthanolique des écorces de *Erisma-delphus exsul* Mildbr

<i>m/z</i> mesuré [M+H] ⁺	<i>m/z</i> calculé [M+H] ⁺	Types Adduits	Formules brutes	Annotations	Score cosine	Nombre matches GNPS	Temps de rétention RT (min)
415,2118	414,203	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	Gelomulide N	0,73	7	5,23
471,3469	470,680	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	18α-Glycyrrhetic acide	0,84	45	3,82
269,0809	269,08	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	Formononetine [#]	0,78	59	4,1
277,2162	276,401	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	19-Norandrosterone	0,84	47	6,03
259,2059	259,21	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	19-Norandrosterone	0,94	17	4,48
403,2023	402,491	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	Aurantiamide	0,97	5	4,43
507,228	507,20	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₄	Asperphenamate [#]	0,99	5	5,79
529,2097	529,19	[M+Na] ⁺	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₄	Asperphenamate [#]	0,97	7	5,80
445,2123	445,502	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	Asperglaucide [#]	0,97	49	5,06
207,0654	206,063	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	7,8-Dimethoxycoumarin	0,76	4	2,64
314,1387	313,139	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	Moupinamide [#]	0,71	9	3,07
291,1956	290,406	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	H-92-Oxabolone	0,85	56	4,5
471,347	470,70	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₀ O ₄	Zizyberanalic acide	0,7	45	3,85
387,1803	386,40	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	Tofogliflozine	0,7	4	4,7
439,3568	438,70	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	Ganoderol A	0,9	3	4,74
631,3835	630,80	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₄₅ O ₉	Ganoderic acide	0,77	20	3,59
219,1744	218,33	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O	Gamma-Cuparenol	0,81	13	4,52

[#]Composé présent dans les deux types d'extraction (MeOH et EtOH)

V. ÉTUDES BIOLOGIQUES EXTRAIT METHANOLIQUE *E. EXSUL* MILDBR

5.1. Activité antibactérienne

La chromatographie sur colonne a été utilisée pour fractionner les extraits bruts. Un total de 8 fractions a été recueilli et ensuite soumis à l'analyse LC-MS/MS et aux activités biologiques. La bioactivité des extraits bruts et des fractions a ensuite été étudiée à l'aide de tests de diffusion sur disque et de microdilution pour déterminer la CMI et la CMB. Ceci a été confirmé par l'apparition des diamètres des zones d'inhibition (DZI) autour des disques (Tableau 14). Les antibiotiques standards (Ticarcilline, Gentamicine, Fosfomycine, Amoxicilline, Tétracycline et Céfoxitine + Ac Clav) ont montré des zones d'inhibition comprises entre $10 \pm 0,00$ et $30 \pm 0,00$ mm sur toutes les souches bactériennes étudiées. À la concentration d'essai de 50 mg/ml, l'extrait brut méthanolique a présenté le plus faible diamètre d'inhibition (DZI) sur *Klebsiella pneumoniae* MDR ($12,33 \pm 0,42$ mm) et le plus grand DZI sur *E. coli* ATCC 8739 ($20 \pm 0,82$ mm). Parmi les différentes fractions, les F5 et F1 ont respectivement enregistré un DZI plus élevé sur les souches *E. coli* BLSE ($28,33 \pm 0,47$ mm) et *Klebsiella pneumoniae* MDR ($25,67 \pm 1,70$ mm). Par comparaison avec les résultats obtenus sur l'extrait brut éthanolique, l'extrait méthanolique est légèrement plus actif sur la plupart des souches bactériennes.

Cela peut s'expliquer du fait que les composés actifs de l'écorce sont plus concentrés dans l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait éthanolique. Globalement, ces résultats indiquent que la polarité du solvant joue un rôle important dans l'extraction des principes actifs et par conséquent impact sur l'activité biologique[195]. Sur la base de l'activité antimicrobienne préalable, les valeurs des CMI et des CMB sont présentées dans le Tableau 15. Les CMI de l'extrait et les fractions sont comprises entre 0,312 et 5 mg/mL et les CMB entre 1,25 et 5 mg/mL. L'extrait brut est plus actif sur *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* et *E. coli ESBL* avec une valeur CMI de 1,25 mg/mL et une valeur CMB de 2,5 mg/mL. Les fractions F5 et F7 ont été les plus actives sur toutes les souches avec une CMI de 0,312 mg/mL et CMB de 1,25 mg/mL. Sur cette base, la fraction F5 est bactéricide sur toutes les souches avec un rapport CMB/CMI compris entre 1 et 2. L'extrait brut également est bactéricide sur la plupart des souches à l'exception de *Klebsiella pneumoniae* MDR. Dans l'ensemble, l'extrait et les fractions ont montré des niveaux variables d'activité antimicrobienne contre les microorganismes évalués.

Tableau 14 : Diamètre de zone d'inhibition (DZI) extrait et fractions méthanolique *Erismadelphus exsul* Mildbr

Extrait/Fractions	Diamètre d'inhibition DZI (mm)				
	Souches bactériennes				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>K.p</i> MDR	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i> ESBL
EE MeOH	18 ± 1,41	20 ± 0,82	12,33 ± 0,47	19,33 ± 0,47	16,33 ± 0,47
EE MeOH F1	Na	12 ± 0,00	12,33 ± 0,47	10,33 ± 0,47	25,67 ± 1,70
EE MeOH F2	16,33 ± 0,47	11,67 ± 0,47	11,33 ± 0,82	9,33 ± 0,94	14,33 ± 0,94
EE MeOH F3	9,33 ± 0,94	Na	8 ± 0,00	Na	Na
EE MeOH F4	10 ± 0,00	Na	11,33 ± 0,47	Na	Na
EE MeOH F5	17,33 ± 0,47	15,67 ± 1,70	25 ± 0,82	13,67 ± 0,47	28,33 ± 0,47
EE MeOH F6	16,67 ± 1,70	12,33 ± 0,47	10 ± 0,00	Na	9,33 ± 0,47
EE MeOH F7	Na	13 ± 0,00	Na	9,67 ± 1,70	13 ± 0,00
EE MeOH F8	13 ± 0,00	Na	Na	Na	Na
Ticarcilline	19,33 ± 0,47	21,33 ± 0,47	20 ± 0,00	20 ± 0,00	Na
Gentamicine	30 ± 0,00	23 ± 0,00	21 ± 0,00	22,33 ± 0,47	22 ± 0,00
Fosfomycine	Na	Na	Na	Na	Na
Amoxicilline	Na	Na	Na	Na	Na
Tétracycline	Na	Na	12 ± 0,00	Na	Na
Céfoxitine + Ac clav	10 ± 0,00	23 ± 0,00	14 ± 0,00	Na	12,33 ± 0,47
DMSO 30%	Na	Na	Na	Na	Na

EE = *Erismadelphus exsul* ; **E. coli** = *Escherichia coli* ; **K.p MDR** = *Klebsiella pneumoniae* multi-drogue résistant ; **S. enterica** = *Salmonella enterica* ; **E. coli ESBL** = *Escherichia coli* bêta-lactamase spectre élargi ; **MeOH** = Méthanolique ; **F** = Fraction **Na** = non actif

Tableau 15 : Concentration minimale inhibitrice et bactéricide CMI/CMB extrait et fractions méthanolique *Erismadelphus exsul* Mildbr

Extrait fractions	CMI et CMB (mg/mL)									
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i> ATCC 8739		<i>K.p</i> MDR		<i>S. enterica</i>		<i>E. coli</i> ESBL	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
EE MeOH	1,25	2,5	1,25	2,5	0,62	5	1,25	2,5	1,25	2,5
EE MeOH F1	Nt	Nt	2,5	5	0,62	5	1,25	2,5	1,25	1,25
EE MeOH F2	1,25	2,5	0,62	2,5	0,62	5	0,31	5	0,62	2,5
EE MeOH F3	2,5	>5	Nt	Nt	2,5	>5	Nt	Nt	Nt	Nt
EE MeOH F4	2,5	>5	Nt	Nt	2,5	>5	Nt	Nt	Nt	Nt
EE MeOH F5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
EE MeOH F6	1,25	2,5	0,62	2,5	2,5	5	Nt	Nt	2,5	>5
EE MeOH F7	Nt	Nt	1,25	2,5	Nt	Nt	2,5	>5	2,5	5
EE MeOH F8	0,62	5	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt

EE = *Erismadelphus exsul* ; **E. coli** = *Escherichia coli* ; **K.p MDR** = *Klebsiella pneumoniae* multi-drogue résistant ; **S. enterica** = *Salmonella enterica* ; **E. coli ESBL** = *Escherichia coli* bêta-lactamase Spectre élargi ; **MeOH** = Méthanolique ; **F** = Fraction ; **Nt** = non testé.

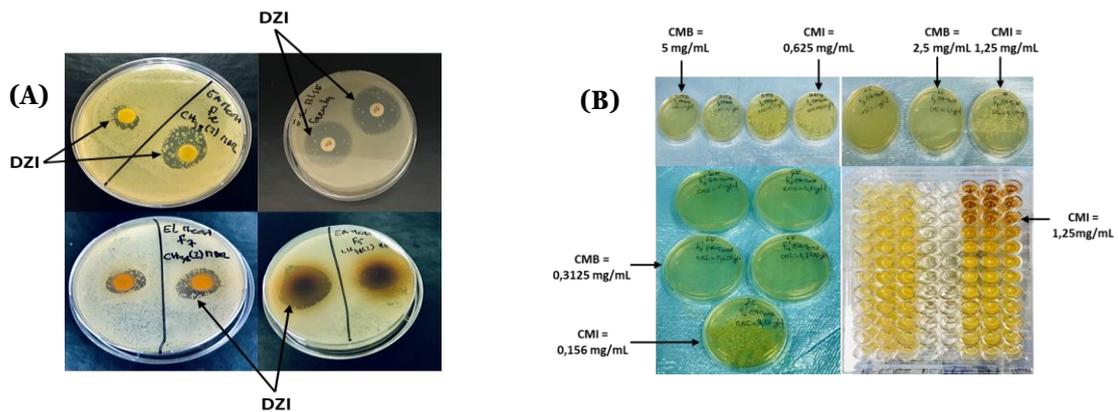


Figure 61 : Activité antibactérienne : (A) Diamètre de zone d'inhibition DZI ; (B) CMI et CMB de quelques fractions de la plante *Erismadelphus exsul*

Les fractions les plus actives ont été analysées par spectrométrie de masse, et les principaux ions obtenus ont été reportés sur le réseau moléculaire de l'extrait brut afin d'identifier les molécules responsables des différentes activités antibactériennes des fractions.

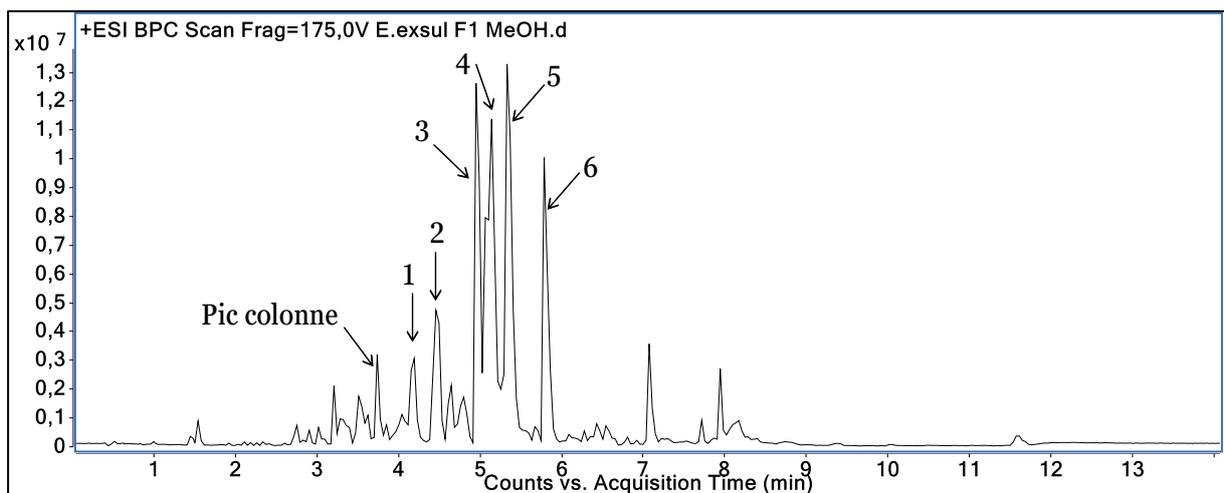


Figure 62 : Profil chromatographique CLHP-UV-MS de la fraction F1 méthanolique

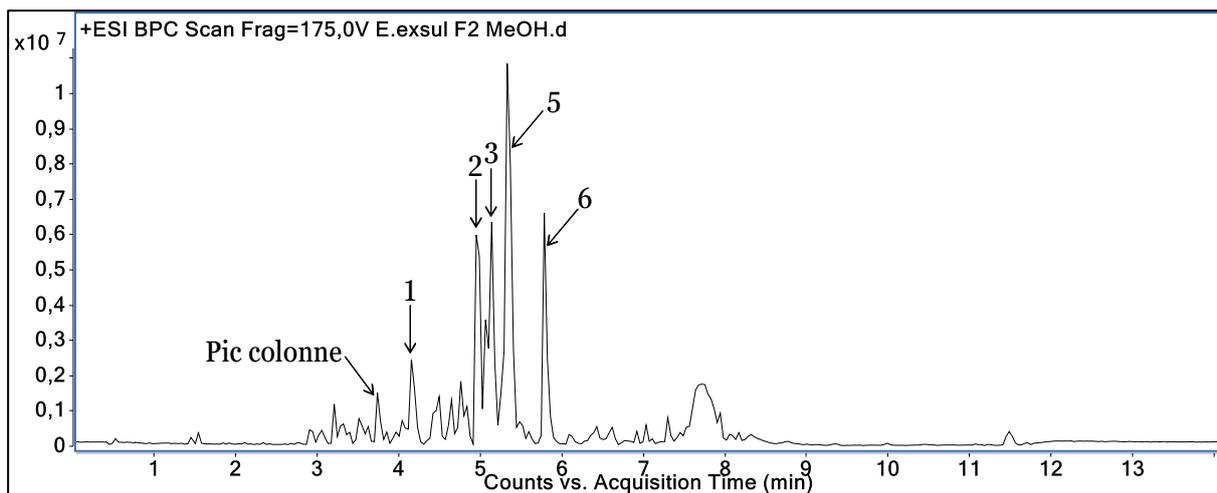


Figure 63 : Profil chromatographique CLHP-UV-MS de la fraction F2 méthanolique

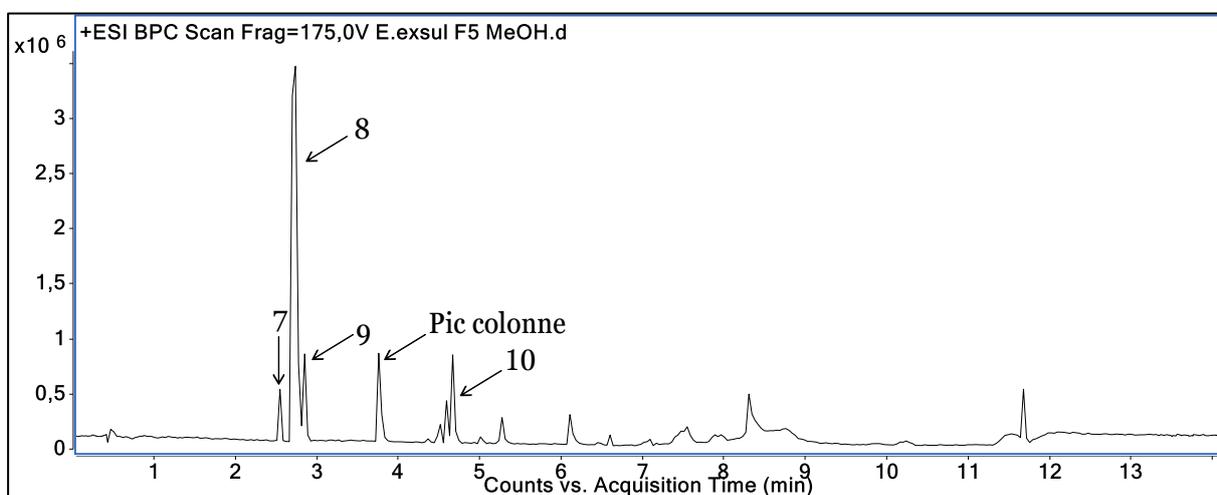


Figure 64 : Profil chromatographique CLHP-UV-MS de la fraction F3 méthanolique

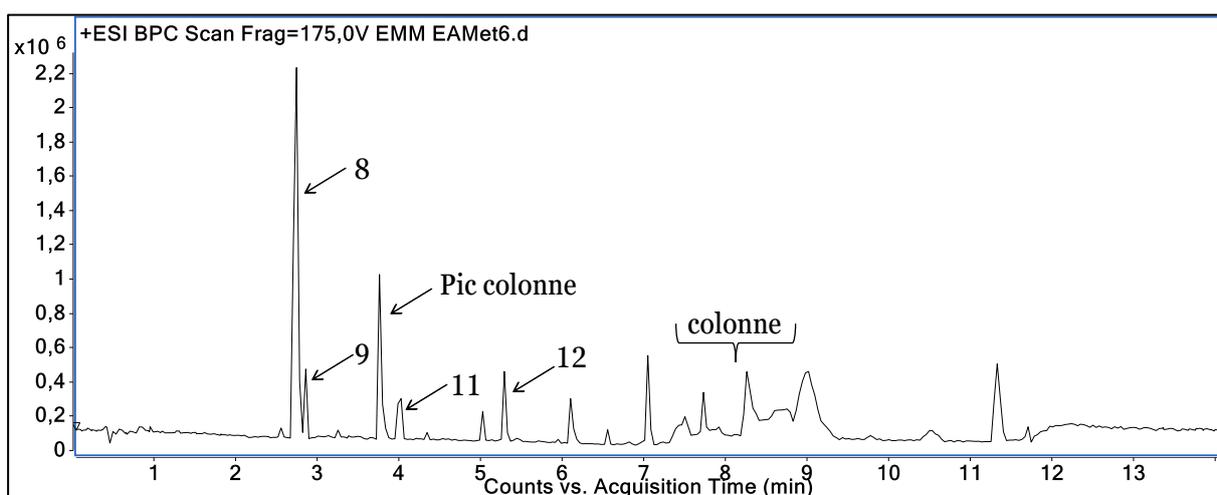


Figure 65 : Profil chromatographique CLHP-UV-MS de la fraction F6 méthanolique

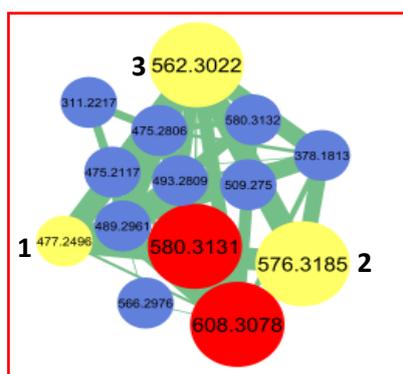
Les métabolites détectés dans les fractions méthanoliques actives ont été annotés sur le Tableau 16, une étape rendue possible grâce à la spectrométrie de masse haute résolution.

Tableau 16 : Composés annotés à partir des fractions actives de l'extrait méthanolique des écorces de *Erismadelphus exsul* Mildbr

Pics	RT (min)	Données MS	Données MS/MS	Formule brute [M]	Proposition de structure	Famille moléculaire	Nœud dans le réseau moléculaire
1	4,19	297,0916	223,12; 215,03; 226,98	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	5-hydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one	flavonoïdes 7-O-méthylés	Cluster A
2	4,49	322,2382	322,23; 163,063; 288,198	C ₁₉ H ₃₁ NO ₃	8-Dihydroantidesmone	Alcaloïde quinoléine	Cluster B
3	4,99	306,2434	290,98; 178,08; 163,06	C ₁₉ H ₃₁ NO ₂	Antidesmone	Alcaloïde quinoléine	Cluster B
4	5,14	398,2660	307,05; 325,03; 280,77	C ₂₀ H ₃₅ N ₃ O ₅	N-cyclohexyl-2-[(2S,5R,6R)-6-(hydroxymethyl)-5-[[2-(4-morpholinyl)-1-oxoethyl]amino]-2-oxanyl]acetamide	Amides d'alpha-aminoacides	Selfloop
5	5,36	320,2232	278,24; 220,59; 163,063	C ₁₉ H ₂₉ NO ₃	8-Deoxoandrodesmone	Alcaloïde quinoléine	Cluster B
6	5,82	507,228	236,47; 360,64; 469,80	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₄	Asperphenamate	Oligopeptides	Cluster A
7	2,55	477,2496	120,66; 134,03; 174,38	C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₄	-	-	Cluster D
8	2,74	576,3185	120,08; 481,04; 520,07	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₅	Mauritine A	Alcaloïde cyclopeptidique	Cluster D
9	2,75	592,3115	120,08; 336,74; 345,72	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₆	Mauritine A N-oxyle	Alcaloïde cyclopeptidique	Cluster D
10	4,67	355,3434	123,11; 130,12; 139,71	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	Ervatamine	Alcaloïdes indole	Selfloop
11	3,76	490,3171	119,22; 121,09; 155,09	C ₂₈ H ₄₃ NO ₆	Borreline	macrolide polycétide	Selfloop
12	4,82	474,3220	-	C ₂₉ H ₃₉ N ₅ O	-	-	Selfloop

Après avoir annotés toutes les fractions actives, nous nous sommes intéressés à la fraction F5 la plus active. L'analyse de la fraction F5 a montré la présence de trois couples d'ions. Ces ions semblent appartenir majoritairement à la famille des alcaloïdes cyclopeptidiques identifiée dans le cluster C comme le montre la Figure 66.

Cluster C : Alcaloïdes cyclopeptidiques



Réseau moléculaire global

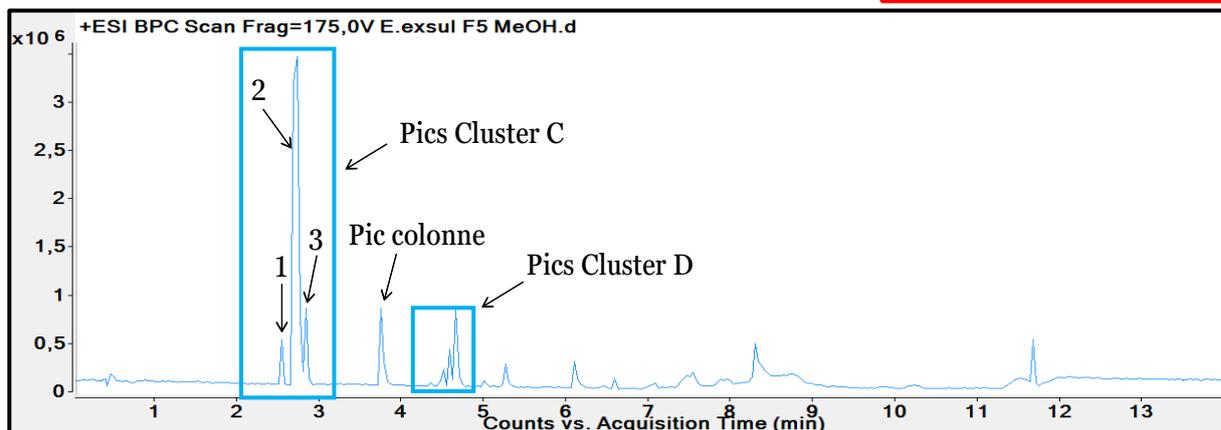
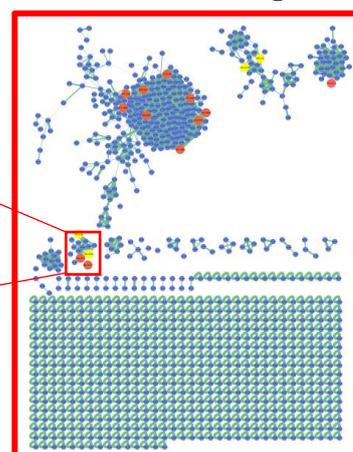


Figure 66 : Focalisation sur le cluster C les ions d'intérêt contenu dans les fractions F5

Les résultats obtenus sur l'extrait méthanolique sont en accord avec ceux obtenus sur la partie éthanolique. En effet, nous avons précédemment montré que l'activité antifongique et antibactérienne de l'extrait éthanolique était en partie liée à la présence de ces alcaloïdes (voir Figure 49 extrait éthanolique F1, F3 et F4). On peut facilement remarquer que les composés de la fraction F6 éthanolique sont en faible quantité dans la fraction F5 méthanolique qui présente toujours une bonne activité, ces deux composés ne semblent donc pas être directement responsables de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut d'*Erismadelphus exsul*. En revanche, nous pouvons attribuer cette activité aux composés 1, 2 et 3.

VI. ÉTUDES CHIMIQUES DES FEUILLES DE *E. EXSUL* MILDBR

Nous avons obtenu deux extraits (méthanolique et éthanolique) à partir des feuilles de *Erismadelphus exsul*. Ces derniers ont été analysés par CLHP-MS/MS (Figure 66 et 67).

Le chromatogramme obtenu à partir de l'extrait méthanolique montre un pic (m/z 375,199 [$C_{18}H_{30}O_8 + H$]⁺) majoritaire correspondant à composé connu : la Cinatine, un inhibiteur de la Phospholipase A2 (PLA2) isolé de *Circinotrichum falcatisporum*[196]. Et un autre pic m/z 593,1872 [$C_{28}H_{32}O_{14} + H$]⁺, semble correspondre à la Fortunelline un flavonoïde glycosylé présentant de bonnes activités antioxydantes[197],[198]. Toutefois, ces composés n'ont jamais été décrits auparavant dans la plante *Erismadelphus exsul* Mildbr.

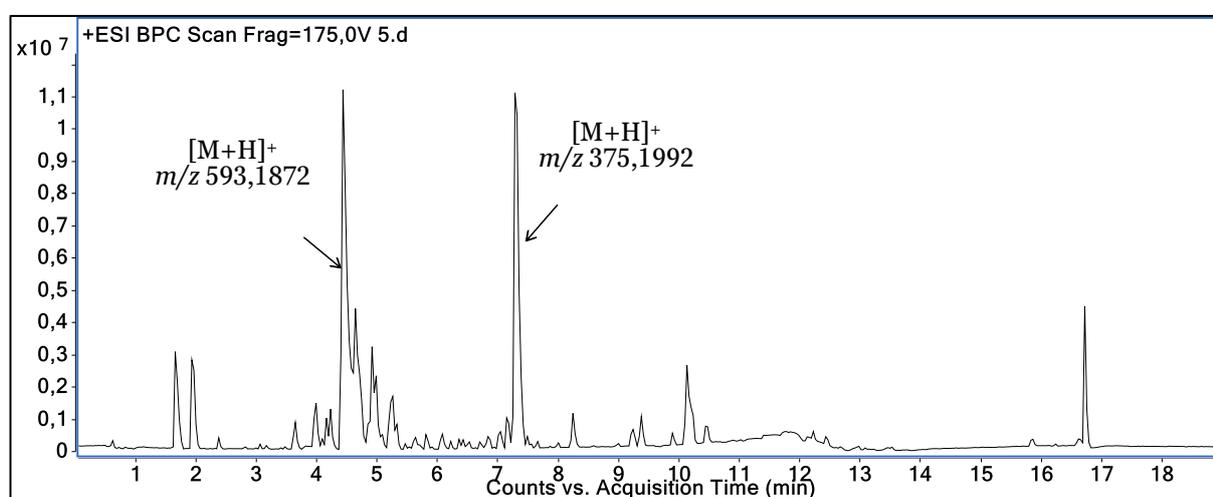


Figure 67 : Analyse par CLHP-UV-MS de l'extrait méthanolique des feuilles de *Erismadelphus exsul* ESI (+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18

Le chromatogramme obtenu à partir de l'extrait éthanolique montre deux pics majoritaires (Figure 68). Un pic avec m/z 433,114 [$C_{21}H_{20}O_{10} + H$]⁺ correspondant à la vitexine et un autre pic m/z 375,199 [$C_{18}H_{30}O_8 + H$]⁺ déjà décrit dans l'extrait méthanolique comme étant la Cinatrine.

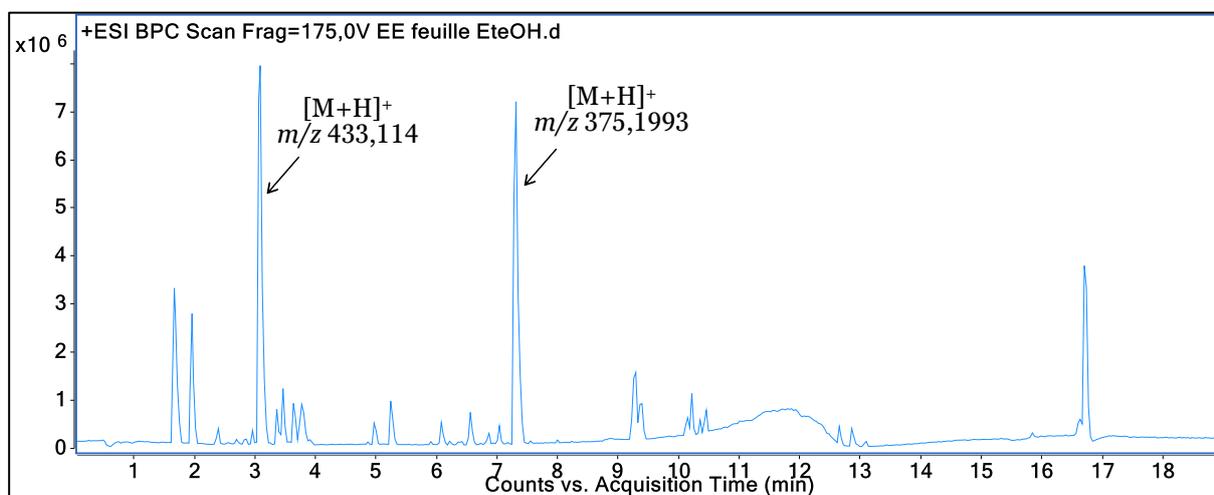


Figure 68 : Analyse par CLHP-UV-MS de l'extrait éthanolique des feuilles de *Erismadelphus exsul* ESI (+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18

6.1. Analyse du réseau moléculaire des extraits méthanoliques et éthanoliques des feuilles de *Erismadelphus exsul* Mildbr

Le réseau moléculaire obtenu à partir des données CLHP-SM² en mode d'ionisation positif des extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de *Erismadelphus exsul* Mildbr a été généré à partir de 1770 spectres individuels MS², organisés en 1356 nœuds, formant 5 clusters (zone de nœuds connectés entre eux) et plusieurs selfloop (zone de nœuds non liés). Parmi les cinq (5) clusters, 3 clusters (A, B et D) nous ont particulièrement intéressés car regroupant des nœuds apparentés facilitant non seulement l'identification putative de plusieurs composés mais également les différentes familles de composés (clusters). Les nœuds en rouge correspondent aux spectres MS² des composés présents dans l'extrait brut méthanolique et les nœuds en bleu correspondent aux spectres MS² de l'extrait éthanolique (Figure 69). Un totale de 26 composés ont été identifiés putativement dans les extraits de feuilles de la plante *Erismadelphus exsul* Mildbr. Parmi les composés identifiés, 21 apparaissent dans les nœuds non liés (selfloop), indiqués sur le réseau moléculaire, et les cinq (5) autres apparaissent dans les zones de nœuds liées (clusters A, B, et D).

6.2. Présentation du réseau moléculaire des extraits méthanoliques et éthanoliques des feuilles de *Erismadelphus exsul* Mildbr

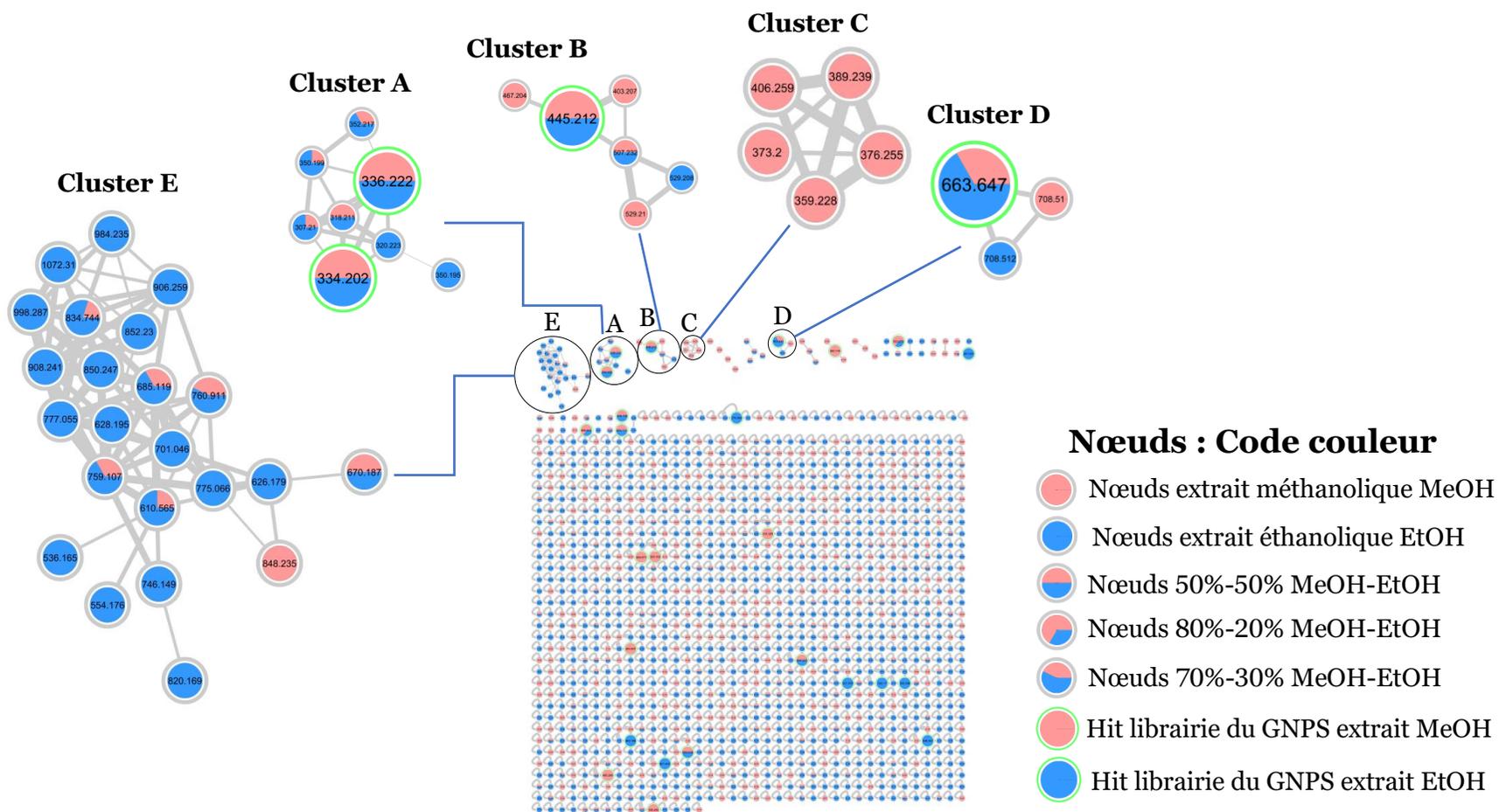


Figure 69 : Réseau moléculaire des métabolites secondaires produits par les extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de *Erismadelphus exsul* Mildbr généré à partir des données LC-MS/MS. Les nœuds sont étiquetés avec les valeurs m/z correspondantes (détectées en mode positif)

6.3. Analyse du cluster A

L'analyse de la zone A (cluster A) a montré deux couples d'ions (nœuds) qui se sont appariés avec les bases de données du GNPS (The Global Natural Product Social Molecular Networking). Ces deux spectres MS² associés n'ont jamais été décrits dans le genre *Erismadelphus*. Le fait que ces composés soient présents dans les deux types d'extractions (méthanolique et éthanolique) indique en quelque sorte une identification quasi sûre des fragments m/z 336,222 [$C_{17}H_{14}O_6 + Na$]⁺, composé 1 et m/z 334,202 [$C_{14}H_{14}Cl_2O_5 + H$]⁺, composé 2, respectivement annoté comme l'acide salvianolique F et la 3-(3,3-dichloro-2-hydroxypropyl)-6,8-diméthoxyisochromen-1-one (Figure 70). Les acides salvianoliques sont reconnus non seulement pour leurs activités antioxydantes mais également leur efficacité contre les fibroses, cancers, et maladies cardio-vasculaires[199],[200]. Le cluster A révèle également d'autres fragments notamment le fragment m/z 352,217 [$C_{16}H_{31}O_8 + H$]⁺ correspondant à un pic observé au temps de rétention RT= 3,37 min dans l'extrait brut méthanolique, et le fragment m/z 350,199 [$C_{16}H_{29}O_8 + H$]⁺; RT = 3,54 min, majoritairement présent dans l'extrait éthanolique (Tableau 17).

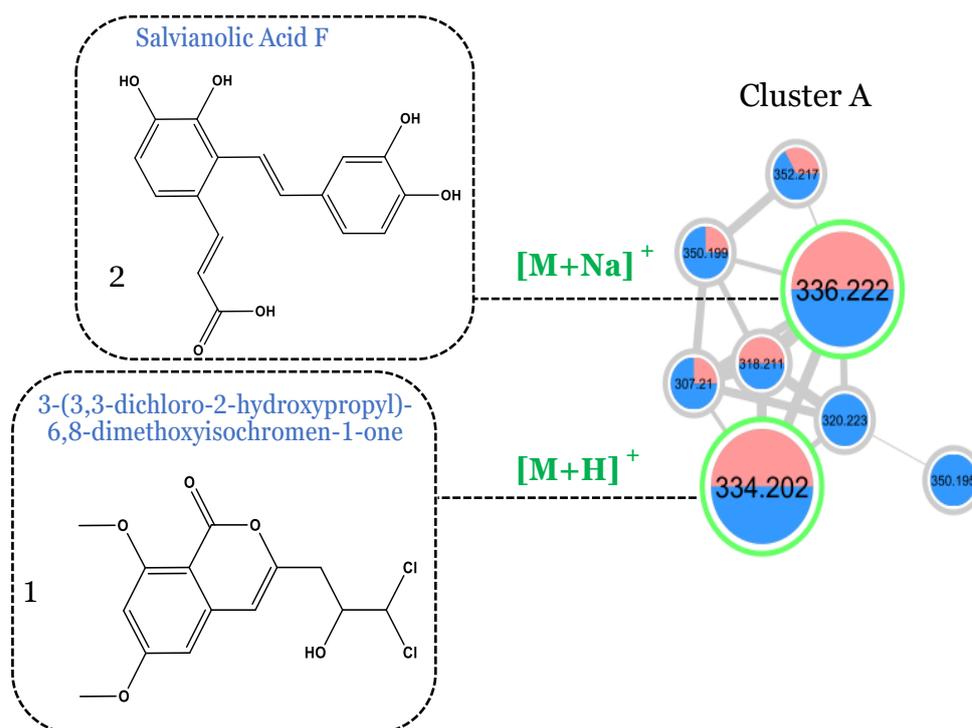


Figure 70 : Réseau moléculaire des extraits de feuilles de *Erismadelphus exsul* cluster A

6.4. Analyse du cluster B

L'analyse de la zone B (cluster B) a montré un nœud à m/z 445,212 [$C_{27}H_{28}N_2O_4 + H$]⁺, correspondant au spectre MS² de l'Asperglaucide. Ce composé s'est apparié dans les deux types d'extraits (Figure 71). Dans cette zone, nous avons également répertorié deux autres nœuds correspondant au spectre MS² de l'Asperphenamate à m/z 507,232 [$C_{32}H_{30}N_2O_4 + H$]⁺ et l'Aurantiamide m/z 403,207 [$C_{25}H_{26}N_2O_3 + H$]⁺. Le même cluster a déjà été décrit dans l'écorce (voir réseau écorce), confirmant ainsi la présence de ces composés dans la plante. Deux autres nœuds apparentés à ce composé (Asperphenamate) ont été détectés avec des m/z de 529,208 [$C_{32}H_{30}N_2O_4 + Na$]⁺ dans l'extrait éthanolique et m/z 529,21 [$C_{32}H_{30}N_2O_4 + Na$]⁺ dans l'extrait méthanolique. On observe également un nœud m/z 467,204 non apparié exclusivement présent dans l'extrait méthanolique. L'absence de ce fragment d'ion dans les bases de données laisse penser qu'il est potentiellement un nouveau composé.

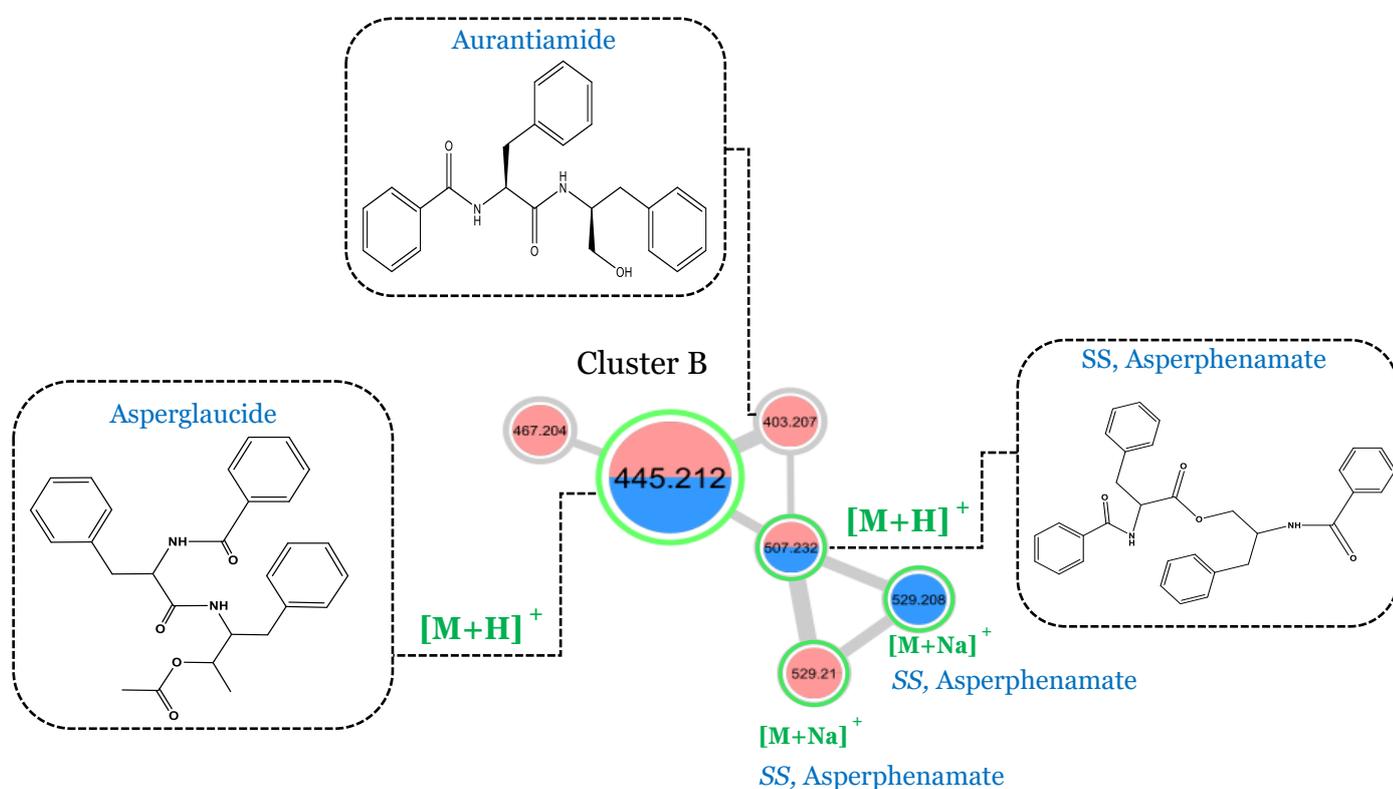


Figure 71 : Réseau moléculaire des extraits de feuilles de *Erismadelphus exsul* cluster B

6.5. Analyse des clusters C, D et E

L'analyse de la zone D (cluster D), montre un seul nœud apparié m/z 663,64 [$C_{34}H_{48}O_{13} + H$]⁺, provenant majoritairement de l'extrait éthanolique (75%). Ce fragment correspond au spectre MS² de la Sarmentoside B, un stéroïdes glycoside isolé de la plante *Strophanthus sarmentosus*[201], [202]. Toutefois, une purification et identification plus poussée du composé sont nécessaires pour la confirmation de son identité. L'analyse des Clusters C et E montre qu'aucun nœud provenant des deux extraits (éthanolique et méthanolique) ne s'est apparié aux substances de références des bases de données du GNPS (Figure 72). L'observation des clusters C et E a montré que les nœuds du cluster C correspondent aux composés qui proviennent exclusivement de l'extrait méthanolique, tandis que ceux du cluster E proviennent majoritairement de l'extrait éthanolique. La comparaison des formules brutes (cluster C) aux bases de données n'a donné aucun résultat excepté le nœud m/z 359,228 [$C_{21}H_{18}N_4O_2 + H$]⁺ qui correspond à la fumiquinazoline F un antitumorale naturellement produit par *Aspergillus fumigatus*[203] (Tableau 17). L'absence de correspondance de ces nœuds dans les différentes bases de données laisse croire que ce sont donc potentiellement de nouveaux composés et de bons candidats pour l'isolement.

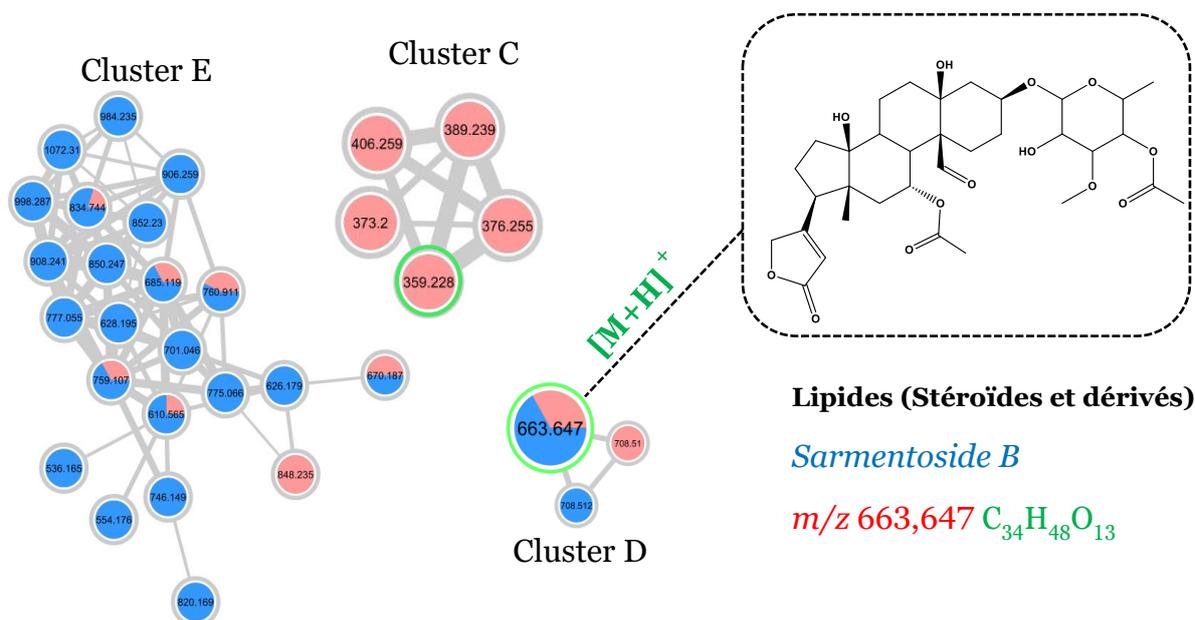


Figure 72 : Agrandissement des clusters C,D et E

6.6. Analyse de la zone de nœuds non liés

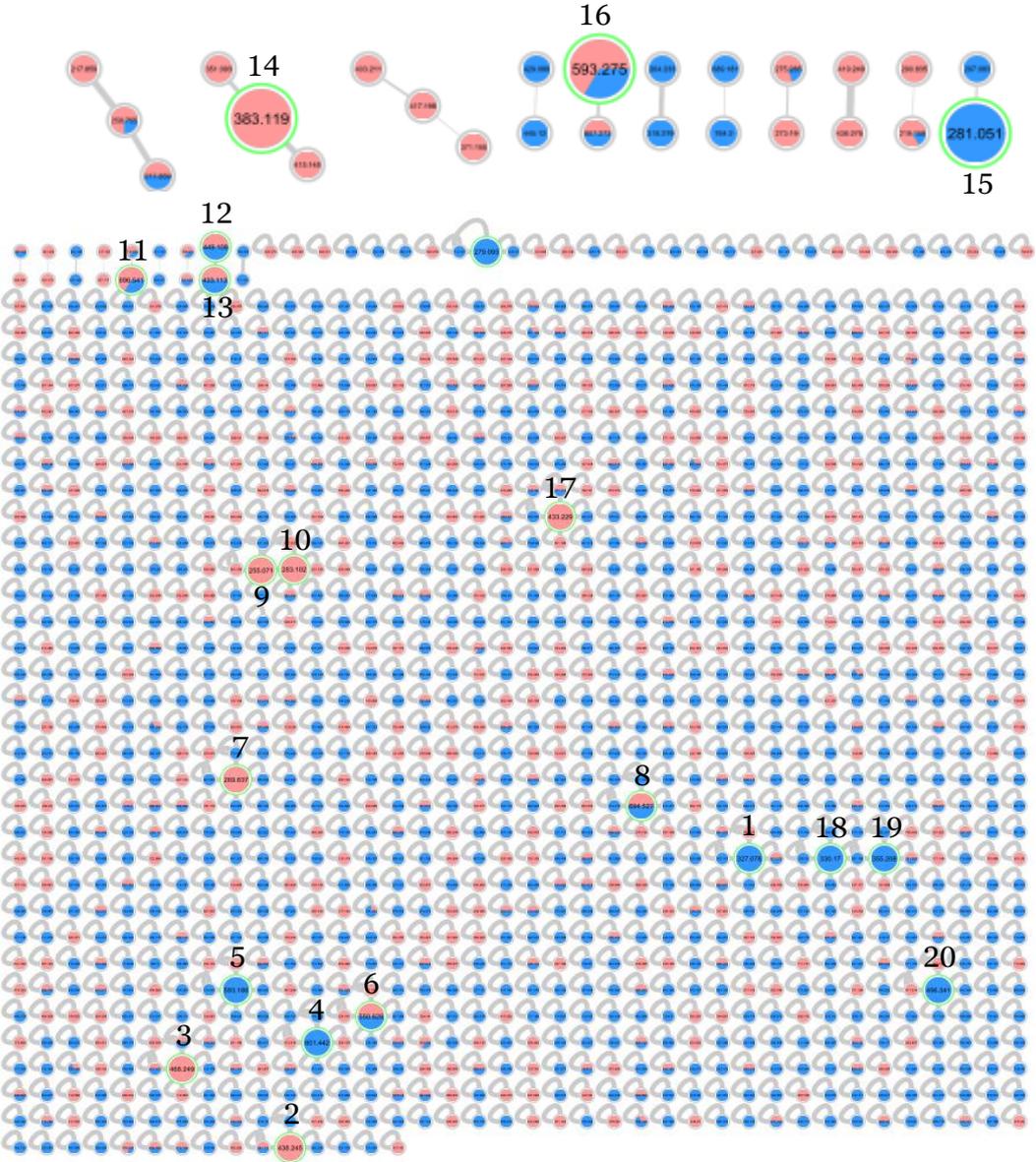
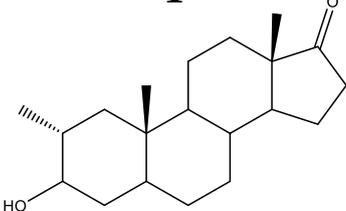
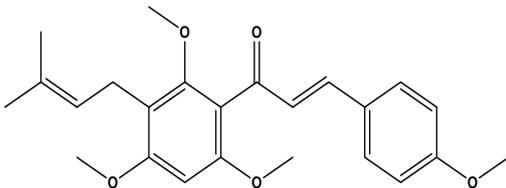
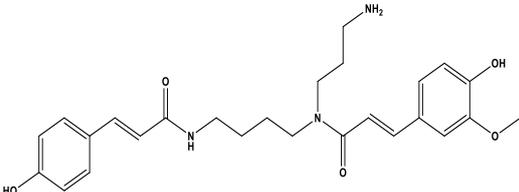
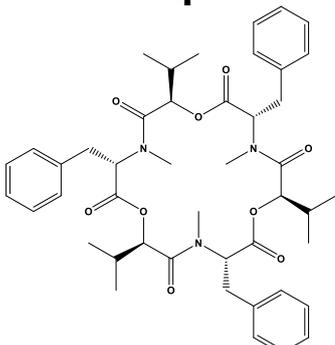
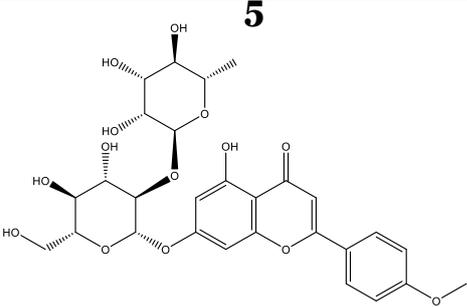
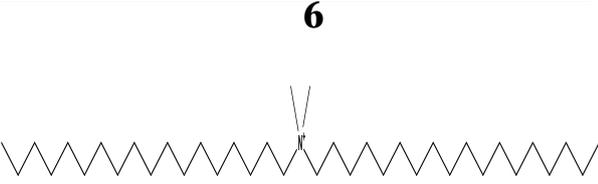
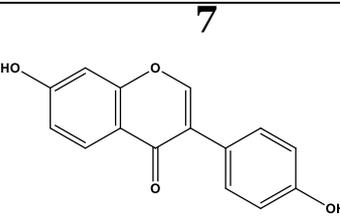
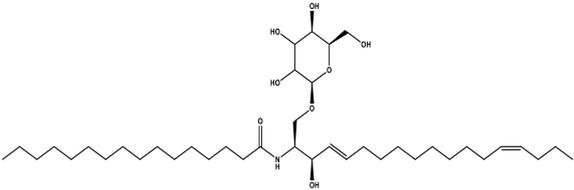
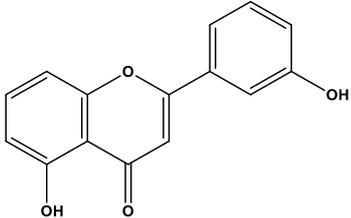


Figure 73 : Agrandissement de la partie de nœuds non liés (Selfloop)

Les numéros des nœuds non liés des composés identifiés putativement dans les extraits méthanoliques et éthanoliques de feuilles de *Erismadelphus exsul* Mildbr sont indiqués dans le tableau suivants avec les valeurs *m/z* correspondantes, les noms, les formules brutes et les structures chimiques.

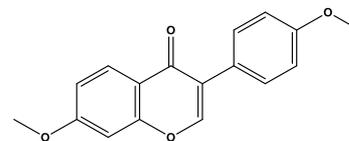
Tableau 17 : Composés annotés grâce aux réseaux moléculaires partie feuilles de *Erismadelphus exsul* Mildbr

Nom	Classe/Famille	<i>m/z</i> et formules brutes	Structures et numéros
Drostanolone	Stéroïdes et dérivés de stéroïdes (Stéroïdes androstanes)	[M+Na] ⁺ 327,229 C₂₀H₃₂O₂	1 
(E)-3-(4-methoxyphenyl)-1-[2,4,6-trimethoxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]prop-2-en-1-one	Flavonoïdes (Chalcones)	[M+ACN+H] ⁺ 438,245 C₂₄H₂₈O₅	2 
Spermidine-p-coumaroyl-feruloyl	Acides Aminés , peptides et analogues hydrocinnamique (Spermidine)	[M+H] ⁺ 469,24 C₂₆H₃₃N₃O₅	3 
Beauvericine	Acides aminés et peptides (Peptides cycliques)	[M+NH ₄] ⁺ 801,445 C₄₅H₅₇N₃O₉	4 

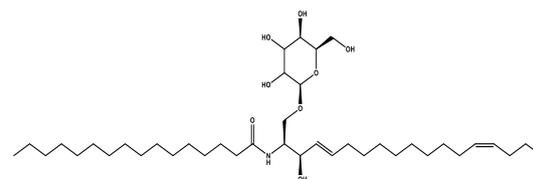
Fortunelline	Glycosides flavonoïdes (Flavonols)	[M+H] ⁺ 593,1861 C₂₈H₃₂O₁₄	<p style="text-align: center;">5</p> 
Cation diméthyl dioctadécylammonium	Analogues lipides cationiques	[M+H] ⁺ 550,64 C₃₈H₈₀N⁺	<p style="text-align: center;">6</p> 
Formononetine	Isoflavonoïdes (Isoflavones)	[M+H] ⁺ 269,081 C₁₆H₁₂O₄	<p style="text-align: center;">7</p> 
GalCer (d18:2/16:2)	Céramides et dérivés	[M+H] ⁺ 693,518 C₄₀H₇₅NO₈	<p style="text-align: center;">8</p> 
5,3'-Dihydroxyflavone	Flavonoïdes (Flavones)	[M+H] ⁺ 255,071 C₁₅H₁₀O₄	<p style="text-align: center;">9</p> 

10

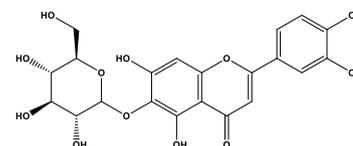
7-méthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-4H-chromen-4-one	Isoflavonoïdes	[M+H] ⁺
	(Isoflavones)	283,102
C₁₇H₁₄O₄		

**11**

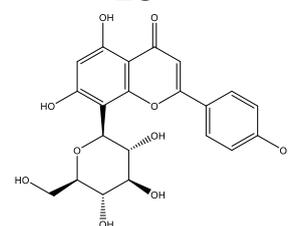
GalCer (d18:2/16:2)	Céramides et dérivés	[M+H] ⁺
		693,518
C₄₀H₇₅NO₈		

**12**

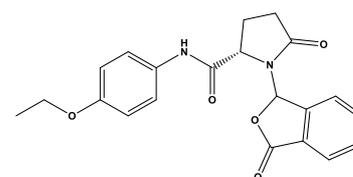
Isoorientine	Flavonoïdes	[M+H] ⁺
	(Flavones)	449,108
C₂₁H₂₀O₁₁		

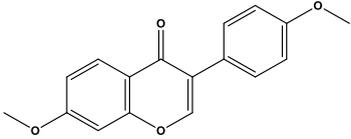
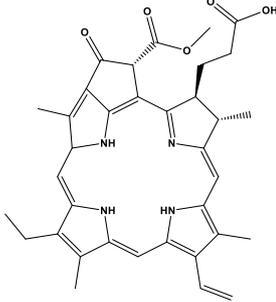
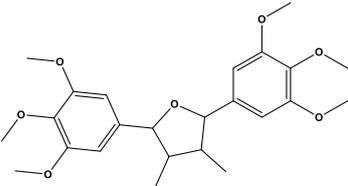
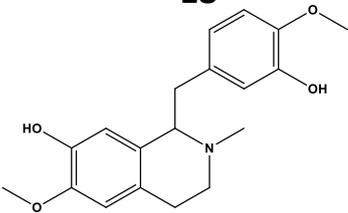
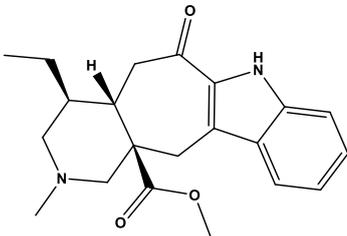
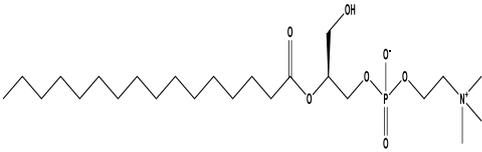
**13**

Vitexine	Flavonoïdes	[M+H] ⁺
	(Flavones)	433,113
C₂₁H₂₀O₁₀		

**14**

(2S)-N-(4-ethoxyphényl)-5-oxo-1-(3-oxo-1H-2-benzofuran-1-yl)pyrrolidine-2-carboxamide	Acides aminés, peptides et analogues	[M+H] ⁺
		381,145
C₂₁H₂₀N₂O₅		



15			
7-méthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-4H-chromen-4-one	Isoflavonoïdes (Isoflavones)	[M+H] ⁺ 282,089 C₁₇H₁₄O₄	
16			
Pheophorbide A	Alcaloïdes du tryptophane (Alcaloïdes du type carbazole)	[M+H] ⁺ 593,269 C₃₅H₃₆N₄O₅	
17			
3,4-diméthyl-2,5-bis(3,4,5-triméthoxyphényl)oxolane	Lignanes (Lignanes furanoïdes)	[M+H] ⁺ 433,222 C₂₄H₃₂O₇	
18			
Réticuline	Alcaloïdes de la tyrosine (Alcaloïdes de l'isoquinoléine)	[M+H] ⁺ 330,17 C₁₉H₂₃NO₄	
19			
Ervatamine	Alcaloïdes du tryptophane	[M+H] ⁺ 355,202 C₂₁H₂₆N₂O₃	
20			
2-Palmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine	Lysoglycérophospholipides	[M+H] ⁺ 495,332 C₂₄H₅₁NO₇P	

#double identification : spectrométrie de masse et réseaux moléculaire

VII. ÉTUDES BIOLOGIQUES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DES FEUILLES DE *E. EXSUL* MILDBR

7.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits exprimés en TE/g DW (Trolox Equivalent par gramme de poids sec) des extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage de Trolox. Comme précédemment décrit dans la partie écorce, l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Erismadelphus exsul* a été évaluée par les méthodes DPPH et FRAP en utilisant le Trolox comme standard et l'acide ascorbique pour comparaison. Les résultats du Tableau 18 montrent que l'extrait brut a une bonne capacité de réduction du fer, son activité antioxydante est meilleure que celle de l'acide ascorbique pour le test FRAP. Par ailleurs, sa capacité de piégeage des radicaux libres est faible (test DPPH). Cela signifie que les composés présents dans l'extrait forment assez facilement un complexe métallique, l'une des raisons pourrait être la présence des structures spécifiques comme celles des flavonoïdes connus comme antioxydant qui favorisent un transfert d'électrons (test FRAP) plutôt qu'un transfert d'hydrogène (test DPPH)[204]. Ces résultats viennent renforcer ceux obtenus dans la partie écorce. En effet, il a été montré dans l'écorce que la plante réagissait mieux au test FRAP qu'au test DPPH, ce qui est en accord avec son usage en médecine traditionnelle. En effet, tout comme les écorces les feuilles d'*Erismadelphus exsul* sont utilisées sous forme de tisane facilitant ainsi l'assimilation des métabolites dans le système sanguin où se trouve le fer. En comparaison avec l'écorce, les feuilles sont nettement moins antioxydantes (2 à 4 fois moins antioxydantes). Cette différence d'activité s'explique partiellement par l'interférence probable exercée par les alcaloïdes dans la partie écorce.

Tableau 18 : Propriétés antioxydantes de l'extrait brut feuille et des fractions de *Erismadelphus exsul* Mildbr

Extrait et fractions	FRAP ($\mu\text{M TE/g DW}$)	DPPH ($\mu\text{M TE/g DW}$)
EE EtOH	1023,09 \pm 11,53	40,65 \pm 1,31
EE EtOH F1	200,28 \pm 9,15	48,54 \pm 2,79
EE EtOH F2	112,82 \pm 4,55	46,18 \pm 6,34
EE EtOH F3	231,15 \pm 72,77	180,43 \pm 24,03
EE EtOH F4	510,08 \pm 2,65	123,88 \pm 39,61
EE EtOH F5	482,72 \pm 31,27	209,05 \pm 5,57
EE EtOH F6	18,61 \pm 24,33	Nt
EE EtOH F7	20,38 \pm 62,13	Nt
EE EtOH F8	Nt	Nt
Acide Ascorbique	631,99 \pm 39,08	1261,79 \pm 15,68

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard (S.D.) ; **EE** = *Erismadelphus exsul* ; **EtOH** = éthanolique ; **DW** = poids sec ; **TE** = Trolox-Equivalent et **Nt** = non testé

7.2. Identification des molécules antioxydantes dans l'extrait brut éthanolique

Le chromatogramme obtenu à partir de l'extrait brut éthanolique montre deux pics majoritaires, parmi lesquelles la cinatrine et la vitexine, cette dernière est reconnue pour ses fortes activités antioxydantes et sa meilleure réactivité au test FRAP par rapport au test DPPH[205]. Afin de lier l'activité antioxydante de l'extrait brut aux composés détectés grâce aux réseaux moléculaires, nous avons examiné tous les composés de la classe des flavonoïdes et isoflavonoïdes supposés être responsables de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique feuille de *E.exsul*. Au total, 6 composés nous ont particulièrement intéressés parmi lesquels : i) m/z 449,106 ($C_{21}H_{20}O_{11}^+$, isoorientine) ; ii) m/z 433,113 ($C_{21}H_{20}O_{10}^+$, vitexine) ; iii) m/z 593,186 ($C_{28}H_{32}O_{14}^+$, fortunelline) ; iv) m/z 269,637 ($C_{16}H_{12}O_4^+$, formononetin) ; v) m/z 255,071 ($C_{15}H_{10}O_4^+$, 5,3'- dihydroxyflavone) et vi) m/z 283,102 ($C_{17}H_{14}O_4^+$, 7-methoxy-3-(4-methoxyphenyl-4H-chromen-4-one). Parmi les composés présentés à la Figure 74, on peut remarquer que seul la fortunelline, l'isoorientexine et la vitexine sont présents dans l'extrait éthanolique, les trois autres composés sont uniquement présents dans l'extrait méthanolique, ils ne peuvent donc pas être liés à cette activité antioxydante. Il reste donc 3 candidats potentiels, parmi les trois candidats, seul la vitexine se retrouve majoritairement dans l'extrait brut éthanolique. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle la vitexine est en parti responsable de l'activité antioxydante de l'extrait brut éthanolique de la plante *Erismadelphus exsul*.

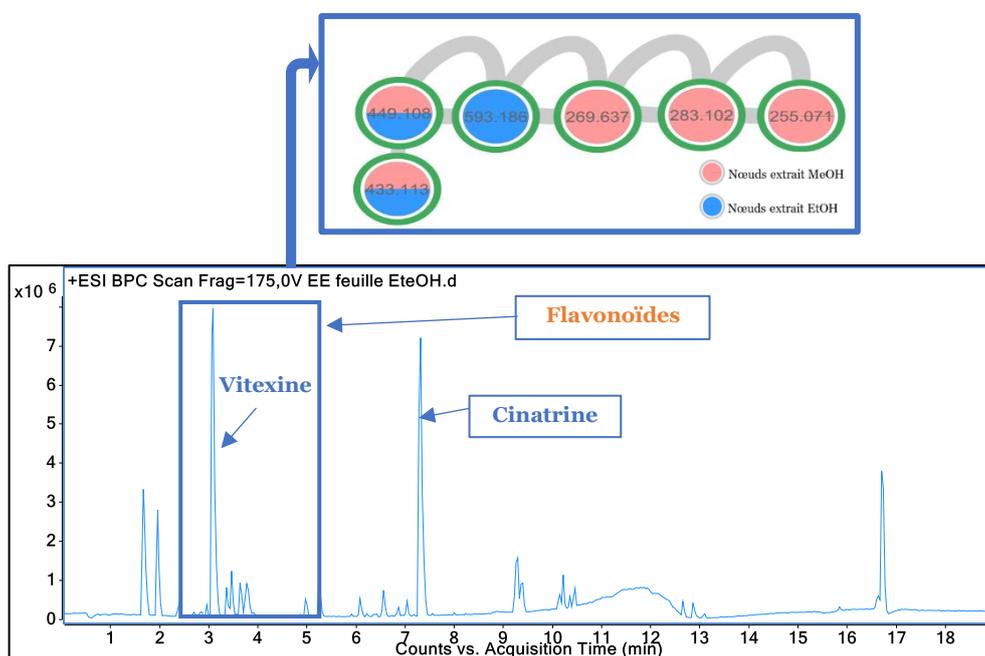


Figure 74 : Focalisation sur les ions d'intérêt antioxydant contenus dans l'extrait feuille

7.3. Confirmation de l'identité de la vitexine

Dans le but de confirmer l'identité de la vitexine, une étude manuelle des spectres a été effectuée. Le spectre MS/MS de la Figure 75 montre 4 fragments d'ions basiques de la vitexine dû à la fracture du cycle glycosylique: i) m/z 283,06 [$C_{16}H_{10}O_5^+$]; ii) m/z 121,02 [$C_4H_8O_4^+$]; iii) m/z 165,01 [$C_6H_{13}O_5^+$]. On peut également voir sur la Figure 75 des ions impairs générés par la rupture homolytique du cycle glycosylique de la vitexine[206]. La majorité de ces fragments ont été décrits dans la littérature[207],[208]. Toutefois, ce composé n'a jamais été décrit dans la plante *Erismadelphus exsul*.

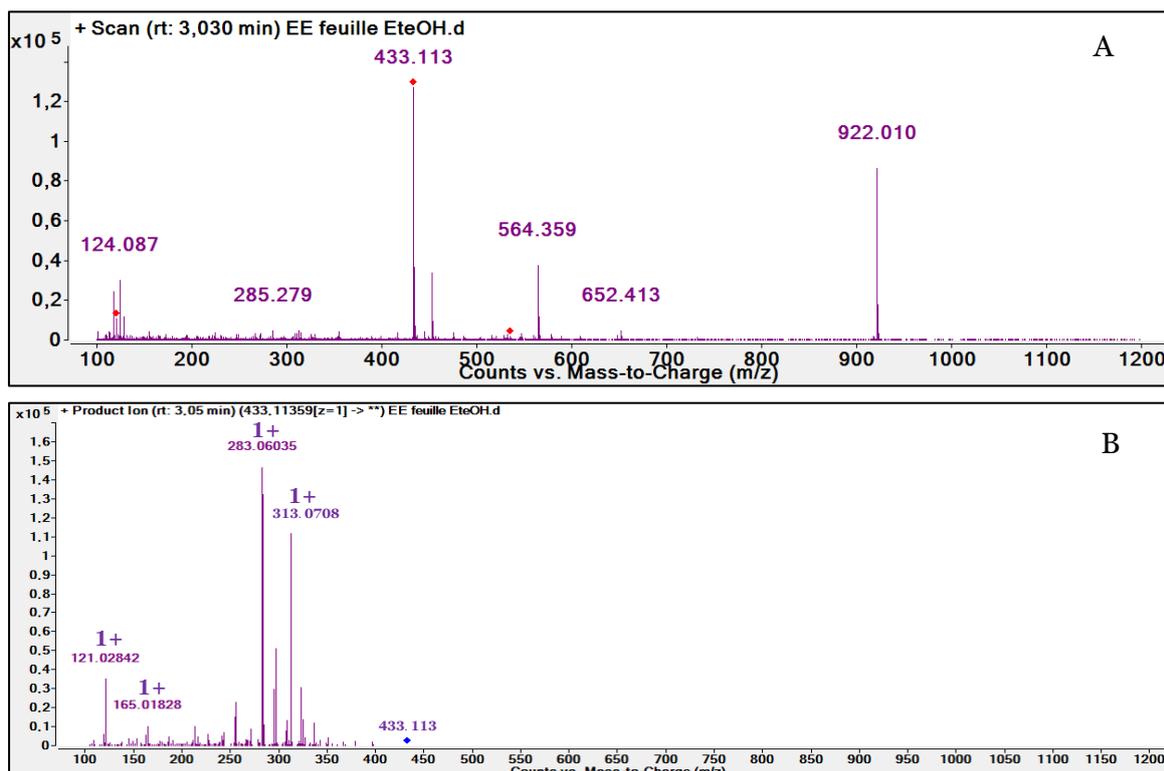


Figure 75 : Spectre MS (A) et MS/MS (B) de la vitexine contenu dans l'extrait brut éthanol active

7.4. Proposition de fragmentation de la vitexine

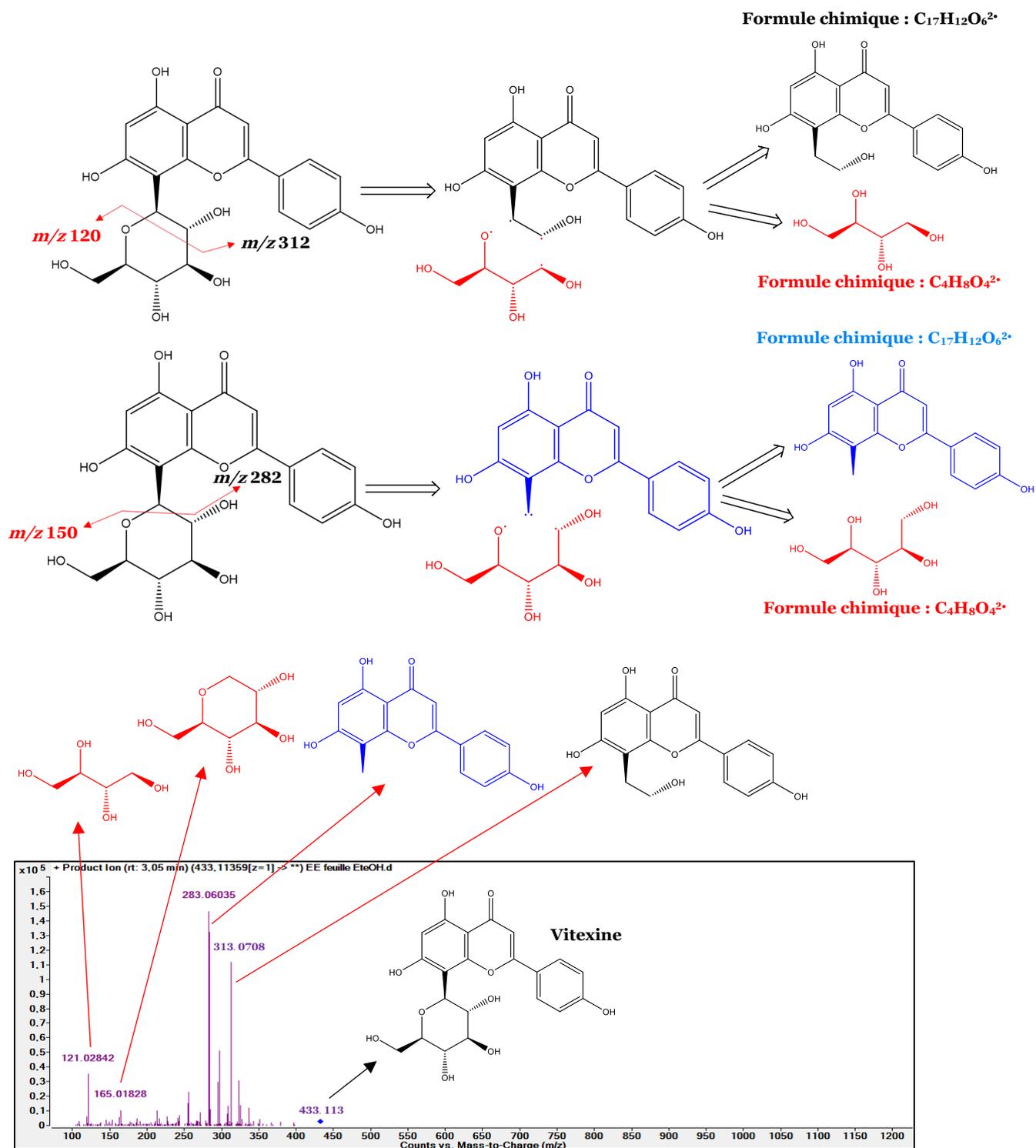


Figure 76 : Proposition de fragmentation de la vitexine dans l'extrait brut de *Erismadelphus exsul*

VIII. CYTOTOXICITE EXTRAIT ETHANOLIQUE DE *ERISMADELPHUS EXSUL* MILDBR

Les tests de cytotoxicité permettent de déterminer si l'échantillon testé inhibe la croissance globale de cellules cancéreuses et des cellules saines. Pour cela, en fonction de l'usage traditionnel de chaque organe de la plante (feuilles et écorces), deux lignées cellulaires ont été sélectionnées. Dans le cadre d'une utilisation des feuilles sous forme de pommade pour les maladies microbiennes de la peau, il était impératif de tester son activité sur les cellules saines des kératocytes humains (HaCaT, cellules de l'épiderme). Nous avons également choisi les cellules épithéliales du cancer du côlon humain (Caco-2) pour tester l'activité antiproliférative de l'écorce étant donné son utilisation sous forme de tisane. L'activité cytotoxique a été effectuée à différentes concentrations d'extrait allant de 10 à 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La valeur IC_{50} (concentration qui réduit 50% de la croissance cellulaire globale après incubation en présence de l'extrait) est déterminée à partir du pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin. Les résultats montrent que l'extrait de feuille n'a aucune activité cytotoxique sur les cellules saines HaCaT après 24h d'exposition (IC_{50} 184,01 \pm 24,64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figure 77 A). Cependant, les écorces montrent une activité cytotoxique modérée sur les cellules cancéreuses du côlon avec un IC_{50} de 76,35 \pm 6,28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 77 B). Ces résultats sont en accord avec les pratiques de médecine traditionnelle. En effet, dans le cadre d'une utilisation directe des feuilles sur la peau, il est important de montrer l'absence de cytotoxicité sur la croissance des cellules de l'épiderme. Au vu de ces résultats assez intéressants, il était nécessaire de comprendre le comportement de chacune des parties de la plante sur les deux lignées cellulaires. Ainsi, nous avons évalué l'activité cytotoxique des écorces sur les cellules saines HaCaT et celle des feuilles sur les cellules cancéreuses du côlon Caco-2. Les résultats obtenus montrent que les feuilles n'ont aucune activité cytotoxique sur les cellules cancéreuse du côlon (IC_{50} 221,73 \pm 40,34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) tandis que les écorces inhibent considérablement la prolifération des cellules de l'épiderme avec un IC_{50} 35,51 \pm 3,63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 77 C et D). Ces résultats suggèrent que certains composés présents au niveau de l'écorce exercent une activité cytotoxique contre les cellules de l'épiderme. En faisant une étude comparative des principales familles de molécules présentes dans les deux parties de la plante, seules les alcaloïdes cyclopeptidiques et quinoléines sont absents dans les feuilles. A partir de cette observation, nous pouvons assez facilement comprendre que l'activité antiproliférative modérée de la plante est due à la présence de ces alcaloïdes au niveau des écorces. Les résultats obtenus sur l'étude de cytotoxicité sont conformes à l'utilisation traditionnelle de la plante. Toutefois, l'étude étant réalisée sur deux lignées cellulaires, nous ne pouvons donc pas conclure d'une activité cytotoxique car le NCI (National Institute of Cancer) des États-Unis, recommande de réaliser les tests de cytotoxicité sur une soixantaine de lignées cellulaires avant de déclarer un extrait ou les composés testés actifs[209].

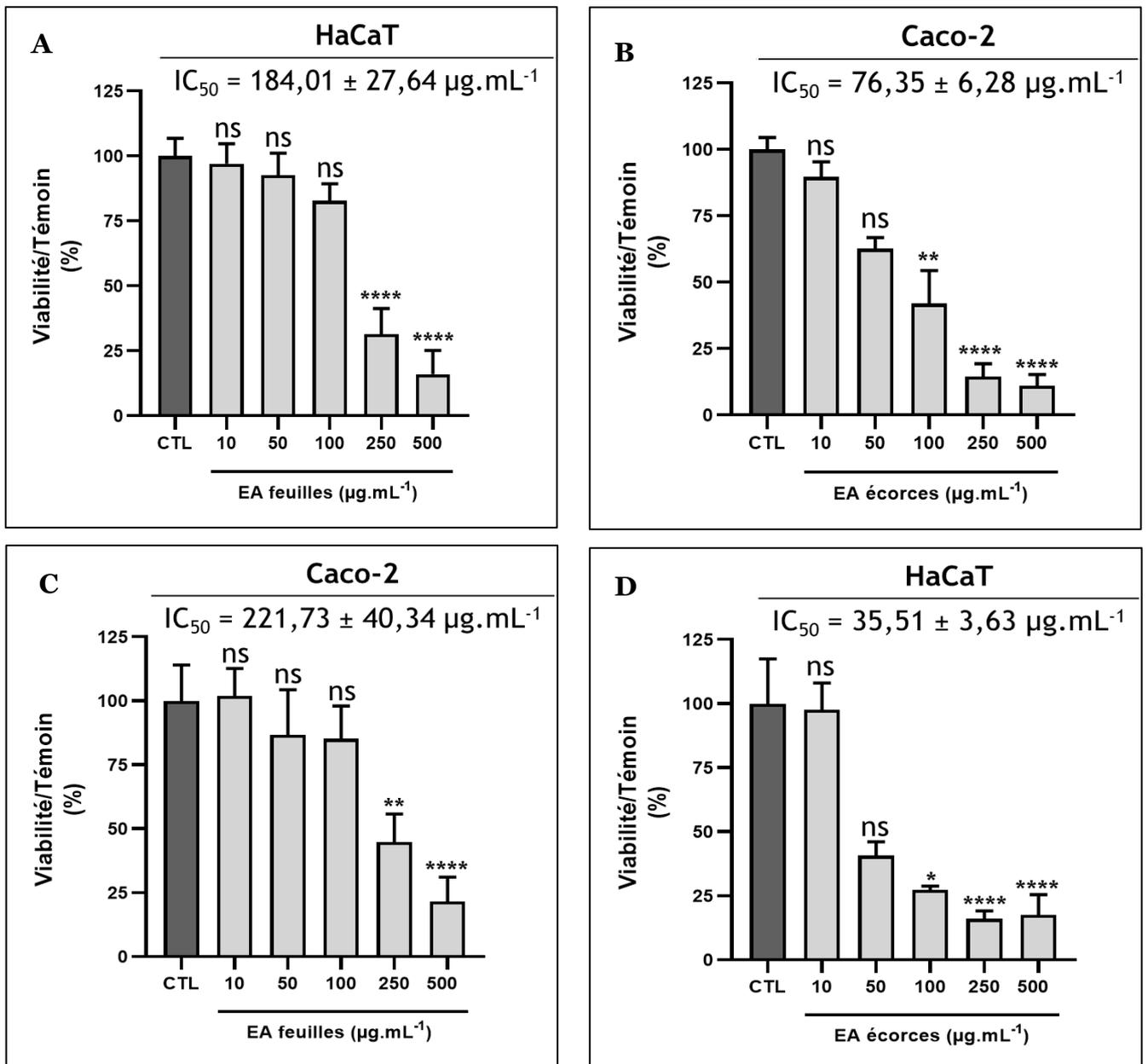


Figure 77 : Cytotoxicité des feuilles (A et C) et des écorces (B et D) de *Erismadelphus exsul* Mildbr (EA) sur les cellules HaCaT et Caco-2.

Les tests statistiques ont été réalisée par lecture du test de Kruskal-Wallis, test a posteriori de Dunn's (ns $p > 0,9999$; * $p = 0,0304$; ** $p = 0,0029$; **** $p < 0,0001$). Les différences sont observées par rapport au contrôle (CTL).

Tableau 19 : Résumé des IC₅₀ des écorces et feuilles de *Erismadelphus exsul* sur les cellules HaCaT et Caco-2

Cellules	Echantillons	Rep1	Rep2	Rep3	Moyenne	Ecart-type
HaCaT	<i>E.exsul</i> écorce	32,9	39,98	39,66	35,51	3,63
	<i>E.exsul</i> feuilles	162,68	215,24	174,12	184,01	27,64
Caco-2	<i>E.exsul</i> écorce	73,24	72,22	83,58	76,35	6,28
	<i>E.exsul</i> feuilles	218,27	263,69	183,23	221,73	40,34

Rep1 : répétition 1 ; **Rep2** : répétition 2 ; **Rep3** : répétition 3

IX. ÉTUDES CHIMIQUES DE *BAILLONELLA TOXISPERMA* PIERRE

Une extraction par macération des écorces de tronc séchés et broyés (400 g de poudre) de *Baillonella toxisperma* Pierre a été faite dans 1500 mL d'éthanol (70 %) pendant 24 h sous agitation (374 tours/min), l'extrait obtenu a été filtré puis concentré par un évaporateur rotatif et ensuite séché sous hotte (Figure 78). L'extrait (12,70 g) obtenu a été dissout dans 24 mL de solvant (16 mL DCM + 8 mL MeOH) puis centrifugé pendant 10 min à 4600 RPM. Le surnageant est à nouveau concentré par un évaporateur rotatif puis fractionné par chromatographie sur colonne, en utilisant 80 g de silice avec un système de solvant CH₂Cl₂-MeOH (100 : 0 à 0 : 100) de polarité croissante. Douze fractions ont été obtenues puis un rassemblement par CCM pour obtenir au final huit fractions allant de F1 à F8.

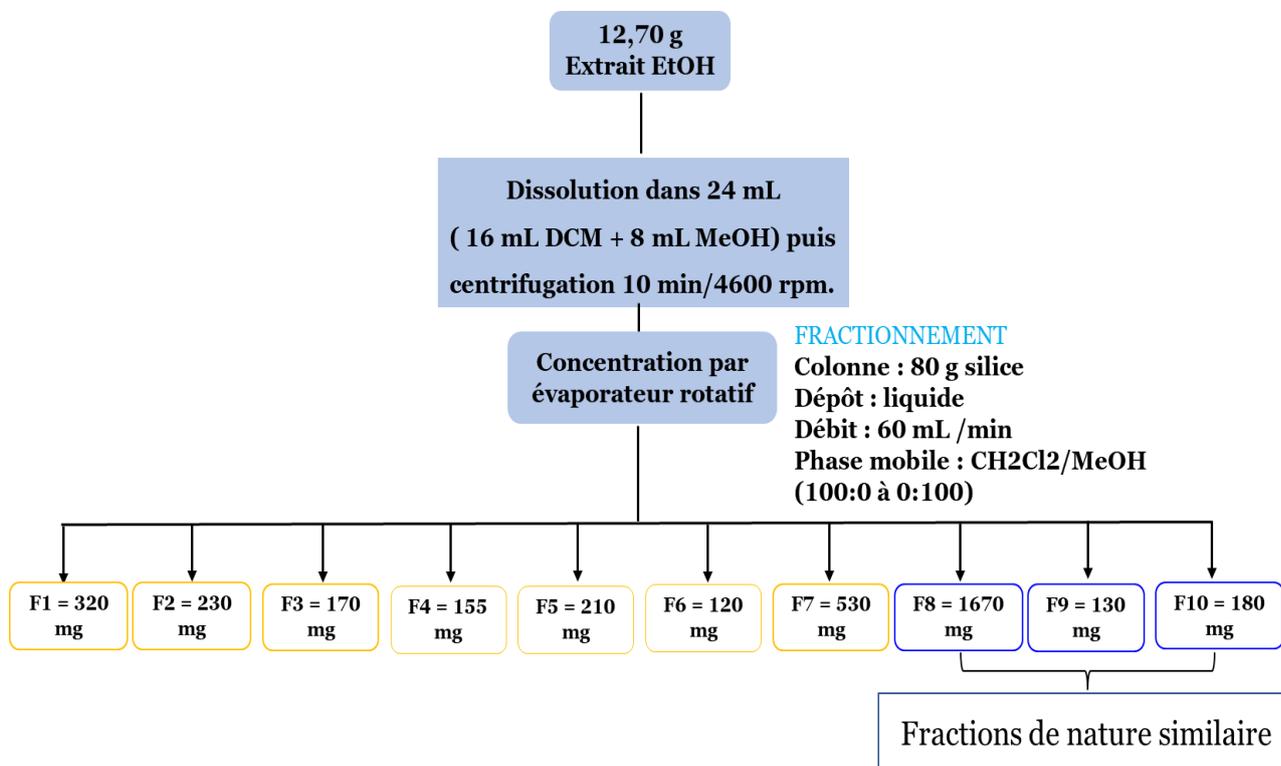


Figure 78 : Schéma d'extraction et fractionnement de de *Baillonella toxisperma* Pierre

9.1. Réseau moléculaire de *Baillonella toxisperma* Pierre

Le BPC (Base Peak Chromatogram) de l'extrait éthanolique de *Baillonella toxisperma* obtenu par CLHP-UV-MS en mode d'ionisation (+) ESI est présenté dans la Figure 79. Cette analyse permet de visualiser la majorité des pics chromatographiques sur une large gamme de polarité (5 et 100% de solvant organique).

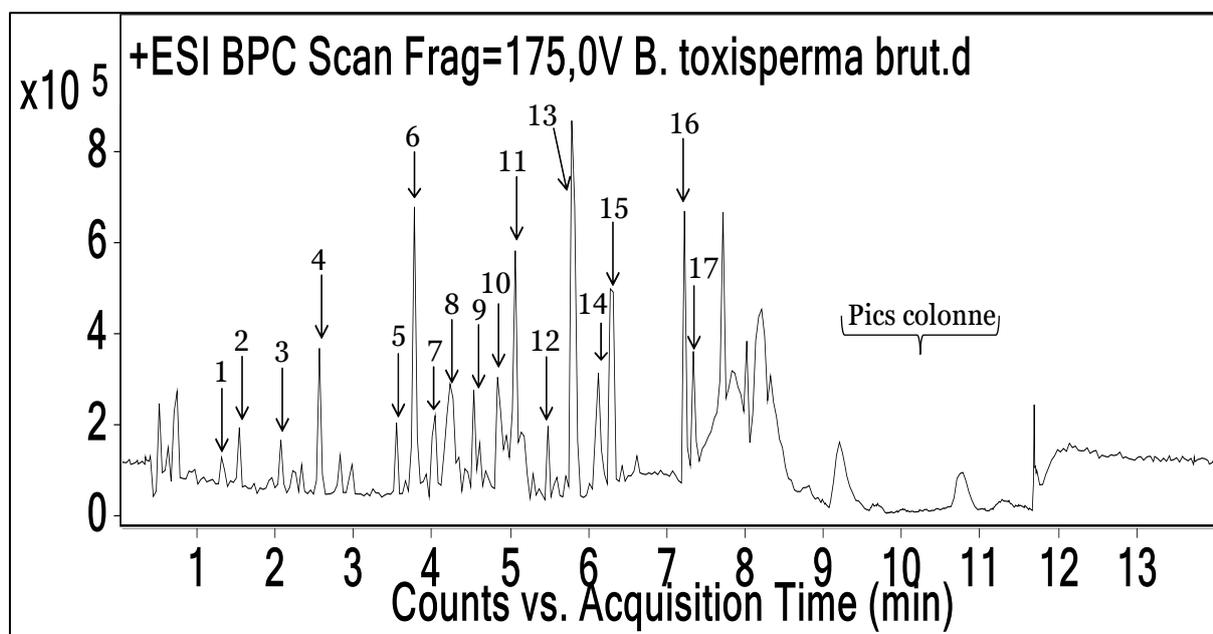


Figure 79 : Base Peak Chromatogram (BPC) de l'extrait éthanolique des écorces de tronc de *Baillonella toxisperma* Pierre obtenu par CLHP-UV-MS ESI(+), m/z 100-1200, élution sur colonne Sunfire® C18

Tout comme précédemment décrit sur *Erismadelphus exsul* Mildbr, une étape d'identification des métabolites présents dans l'extrait brut éthanolique des écorces de tronc de *Baillonella toxisperma* a été effectuée en utilisant une double identification (LC-MS/MS et réseaux moléculaires). Ces deux étapes d'identification nous permettent de déterminer non seulement la composition élémentaire des molécules présentes dans la plante mais aussi d'avoir une vue d'ensemble des familles de molécules regroupées dans la plante. Ces deux étapes sont rendues possibles en exploitant les données de spectrométrie de masse haute résolution. Les jeux de données sont ensuite annotés avec les masses précises théoriques des composés contenus dans les bases de données publiques déjà décrites plus haut. Comme le montre le Tableau 20, un total de 17 composés ont été annotés de manière putative. Ces métabolites ont été signalés comme appartenant à cinq (5) familles de composés naturels : les phénylpropanolamines, les flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes et les glycosides phénoliques

Tableau 20 : Composés annotés dans l'extrait éthanolique des écorces de *Baillonella toxisperma* Pierre grâce aux données de spectrométrie de masse

Pics	Rt (min)	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Formules moléculaires [M]	MS ²	Annotation des ions	Niveau d'identification
1	1,450	307,081	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	307,081; 165,070	Epigallocatechol	3
2	1,701	185,081	C ₉ H ₁₂ O ₄	185,081; 123,007	Inconnue	4
3	1,710	496,203	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃	496,203; 295,097; 327,123	Kelampayoside A	3
4	1,938	459,092	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	459,092; 165,069	Epigallocatechine gallate	3
5	2,038	291,086	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291,086; 165,069	Epicatéchine	3
6	2,547	212,119	C ₁₃ H ₁₃ N ₃	212,119; 119,060; 186,603; 195,092	N,N Diphénylguanidine	3
7	2,851	229,086	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	229,086; 165,070	Resveratrol	3
8	3,382	357,133	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	357,133; 295,097; 327,123	β-Conidendrine	3
8	3,427	259,097	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	259,097; 152,062	3,5-O-diméthyl resveratrol	3
9	3,800	243,102	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	243,102; 165,069	Methyl resveratrol	3
10	3,935	420,186	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	-	Isorhapontin	3
11	4,307	316,285	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	-	Inconnue	4
12	5,898	453,337	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	453,337; 305,159; 213,165	Inconnue	4
13	6,371	194,117	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	194,117; 163,210	Inconnue	4
14	7,489	238,123	C ₁₆ H ₁₅ NO	-	Inconnue	4
15	7,827	452,322	C ₂₂ H ₄₅ NO ₈	452,322; 294,700; 155,070	Inconnue	4
16	8,436	301,141	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₃	-	Inconnue	4
17	8,999	375,199	C ₂₂ H ₃₀ O ₃ S	375,199; 343,173; 179,052	Inconnue	4

9.2. Analyse du réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de *Baillonella toxisperma*

Le réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de *B. toxisperma* visualisé à l'aide du logiciel Cytoscape 3.9.0 (Figures 80). Ce réseau moléculaire contient un grand cluster et 11 petits clusters (nombre de nœuds $n \geq 3$) qui peuvent être reliés en familles ou groupes moléculaires et certains composés représentatifs des différentes familles moléculaires ont déjà été décrites dans la littérature pour des plantes appartenant à la famille des Sapotaceae dont *B. toxisperma* fait partie[105]. Tout comme l'exploitation manuelle des données MS/MS, ces résultats mettent en évidence la présence de 5 grandes familles moléculaires dans l'extrait *B. toxisperma* : les phénylpropanolamines (cluster A), les flavonoïdes (cluster B), les stilbènes (Cluster C), les lignanes (cluster D), et les glycosides phénoliques (cluster E). Conformément aux résultats du réseau moléculaire, les phénylpropanolamines semblent être la plus grande famille avec de nombreux nœuds associés. Les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes sont également bien représentés dans cet extrait éthanolique avec un groupe assez important (nombre de nœuds $n \geq 5$), tandis que les glycosides phénoliques sont moins nombreux. Plusieurs composés du cluster A ont été fragmentés en source, les ions fragments ont été fragmentés par la suite en MS/MS ce qui explique la redondance d'informations générée sur ce cluster avec plusieurs nœuds. En effet, puisque les ions fragments générés en source ont des spectres MS/MS très similaires au spectre MS/MS de l'ion parent, par conséquent, ils ont été liés avec un haut degré de similitude (Tableau 21). Les autres clusters quant à eux, n'ont pas été fragmentés en source, c'est la raison pour laquelle ils contiennent des nœuds qui représentent uniquement les ions moléculaires sans redondance d'informations.

9.3. Présentation du réseau moléculaire de l'extrait éthanolique de *Baillonella toxisperma*

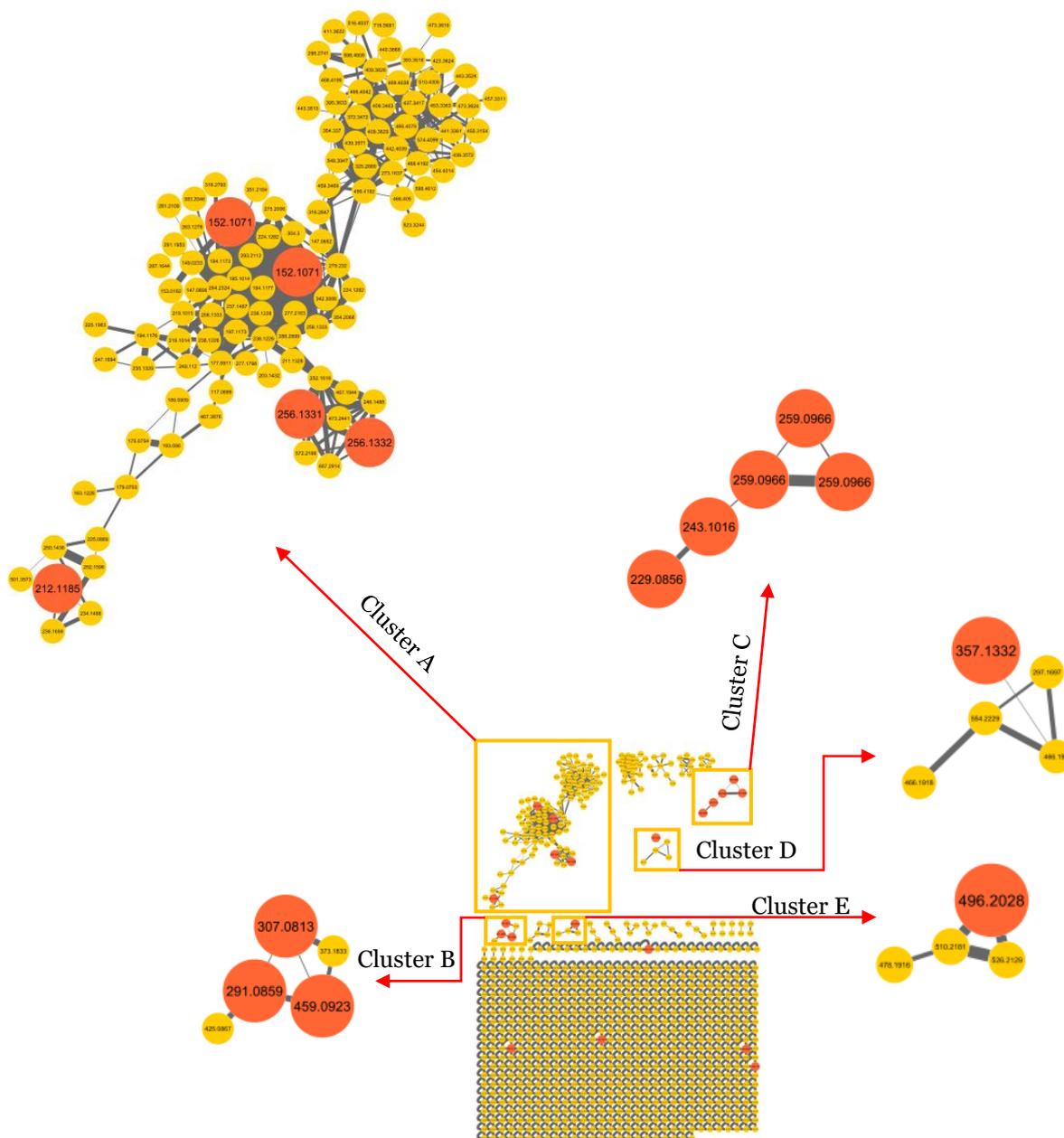


Figure 80 : Réseau moléculaire de l'extrait brut éthanolique de *Baillonella toxisperma* obtenu à l'aide de la plateforme GNPS et visualisé avec le logiciel Cytoscape 3.9.0

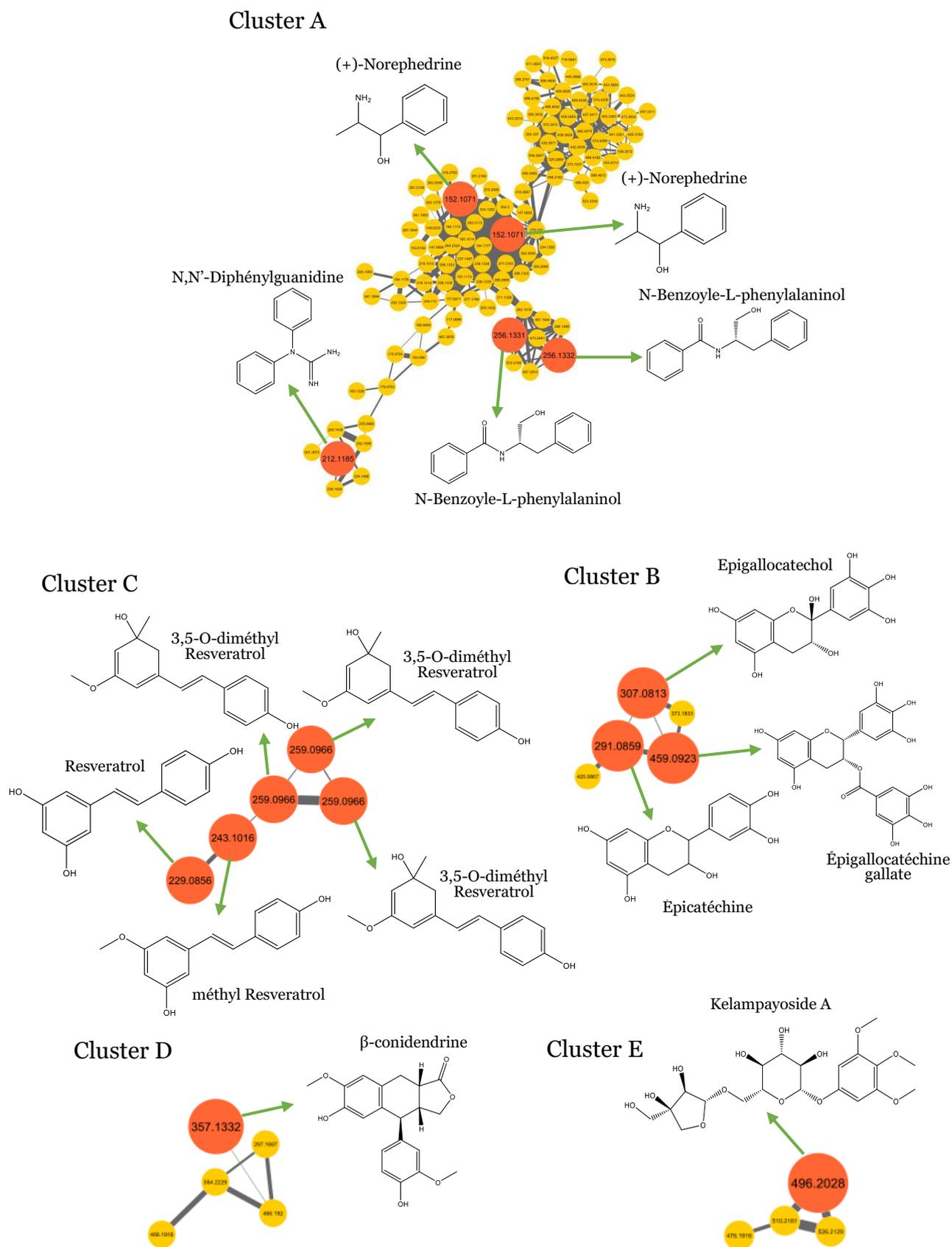


Figure 81 : Réseau moléculaire de l'extrait brut éthanolique de *Baillonella toxisperma* : présentation des cluster A, B, C, D et E

Tableau 21 : Composés annotés sur le réseau moléculaire de l'extrait éthanolique des écorces de tronc de *Bail-
lonella toxisperma* Pierre

<i>m/z</i> mesuré [M+H]⁺	<i>m/z</i> calculé [M+H]⁺	Types Adduits	Formules brutes	Annotations GNPS	Score cosine	Matches GNPS	Cluster GNPS
307,0813	306,269	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	Epigallocatechol	0,74	5	Cluster B
291,0859	290,270	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(+)-Epicatechine	0,88	8	Cluster B
459,0923	458,3730	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	Epigallocatechine gallate	0,78	37	Cluster B
496,2028	478,489	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃	Kelampayoside A	0,83	12	Cluster E
357,1332	356,3692	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	Bêta-Conidendrine	0,79	4	Cluster D
259,0966	258,319	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ O ₃	3,5-O-diméthyl-Resvétratrol	0,76	46	Cluster C
243,1016	242,270	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	méthyl Resvétratrol	0,72	14	Cluster C
229,0856	228,247	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	Resvétratrol	0,97	21	Cluster C
212,1185	211,267	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₃ N ₃	N,N'-Diphénylguanidine	0,91	5	Cluster A
152,1071	151,2056	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₃ NO	(+)-Norephedrine	0,94	4	Cluster A
256,1332	255,315	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₇ NO ₂	<i>N</i> -Benzoyle-L-phenylalaninol	0,93	4	Cluster A
652,1147	634,4528	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	Corilagin	0,96	7	Selfloop
255,0652	254,240	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	4',7-Dihydroxyflavone	0,81	6	Selfloop
438,1760	420,410	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	Isorhapontin	0,77	18	Selfloop
285,0751	284,2658	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Biochanin A	0,80	31	Selfloop

X. ETUDES BIOLOGIQUES DE *BAILLONELLA TOXISPERMA* PIERRE

10.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de *Baillonella toxisperma* a été évaluée sur cinq souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25992, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* multi drug resistant, *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* bêta-lactamase à spectre élargie) à Gram négatif. Les tests de sensibilités des extraits de plantes vis-à-vis de ces microorganismes nous ont permis de déterminer les diamètres d'inhibition de l'extrait brut et les fractions. Les résultats sur les zones d'inhibition sont consignés dans le Tableau 22. Aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des disques imprégnés de DMSO 30%. Ces résultats indiquent que les zones d'inhibitions sont variables d'une souche bactérienne à une autre et d'un extrait ou une fraction à un(e) autre. En considérant l'extrait brut, nous avons les diamètres d'inhibition qui varient de $14 \pm 0,47$ à $22 \pm 0,82$ mm. Les meilleurs diamètres sont obtenus sur les souches *Klebsiella pneumoniae* MDR (DZI $20 \pm 0,00$ mm) et *Escherichia coli* BLSE (DZI $22 \pm 0,82$ mm). Par ailleurs, les plus faibles diamètres d'inhibition ont été enregistrés sur *Salmonella enterica* (DZI $14 \pm 0,47$) et *Escherichia coli* ATCC 25992 (DZI $15 \pm 0,00$). Les tests effectués sur les fractions, montre les diamètres d'inhibition qui varient entre $9 \pm 0,00$ mm (*Escherichia coli* ATCC 25992) et $21,33 \pm 0,47$ mm (*Klebsiella pneumoniae* MDR). Seule la souche *Escherichia coli* ATCC 25992 a été sensible à l'ensemble des fractions et à l'extrait brut. La fraction F7 n'a enregistré aucun diamètre d'inhibition sur les souches *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Escherichia coli* BLSE. Les fractions F2 et F4 ont incontestablement enregistré des meilleurs diamètres d'inhibition sur la majorité des souches. Ce qui signifie que les composés antibactériens de l'extrait éthanolique de *Baillonella toxisperma* sont principalement élués dans les fractions F2 et F4. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) consignées dans le Tableau 23, varient respectivement entre 0,31 et 5 mg/mL et 2,5 et 5 mg/mL. Dans l'objectif de déterminer le mode d'action bactéricide ou bactériostatique des échantillons testés, les rapports CMB/CMI ont été calculés. Les résultats obtenus ont été interprétés comme suivant : quand le rapport CMB/CMI est compris entre 1 et 2, l'extrait ou la fraction est bactéricide, et lorsque ce rapport est compris entre 4 et 16 l'extrait est considéré comme étant bactériostatique[164]. Partant sur cette base, les résultats du Tableau 23 montrent que la fraction F2 est bactéricide sur *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25992 et *Salmonella enterica* (rapport CMB/CMI = 2) et bactériostatique sur *Klebsiella pneumoniae* MDR et *Escherichia coli* BLSE (rapport CMB/CMI = 4). La fraction F4 quant à elle, montre une action bactéricide sur toutes les souches (rapport CMB/CMI = 2).

Tableau 22 : Diamètre de zone d'inhibition extrait et fractions éthanoliques *Baillonella toxisperma* Pierre

Extrait/Fractions	Diamètre d'inhibition DZI (mm)				
	Souches bactériennes				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>K.p</i> MDR	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i> BLSE
Bt EtOH	15 ± 0,00	16 ± 0,47	20 ± 0,00	14 ± 0,47	22 ± 0,82
Bt EtOH F1	12 ± 0,00	13 ± 0,00	10 ± 0,00	Na	9,33 ± 0,47
Bt EtOH F2	13,33 ± 0,94	14,67 ± 0,47	21,33 ± 0,47	16 ± 0,82	19,67 ± 0,47
Bt EtOH F3	11 ± 0,82	11,33 ± 0,94	10,33 ± 0,47	Na	11,33 ± 0,94
Bt EtOH F4	20 ± 0,82	12,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	18 ± 0,47	11,67 ± 0,47
Bt EtOH F5	9 ± 0,00	10,33 ± 0,47	10,67 ± 0,47	11 ± 0,00	10 ± 0,82
Bt EtOH F6	10 ± 0,00	Na	9 ± 0,00	10,679 ± 0,47	Na
Bt EtOH F7	9 ± 0,00	Na	Na	10 ± 0,00	Na
Ticarcilline	19,33 ± 0,47	21,33 ± 0,47	20 ± 0,00	20 ± 0,00	Na
Gentamicine	30 ± 0,00	23 ± 0,00	21 ± 0,00	22,33 ± 0,47	22 ± 0,00
Fosfomycine	Na	Na	Na	Na	Na
Amoxicilline	Na	Na	Na	Na	Na
Tétracycline	Na	Na	12 ± 0,00	Na	Na
Céfoxitine + Ac clav	10 ± 0,00	23 ± 0,00	14 ± 0,00	Na	12,33 ± 0,47
DMSO 30%	Na	Na	Na	Na	Na

Bt = *Baillonella toxisperma* ; **E. coli** = *Escherichia coli* ; **K.p MDR** = *Klebsiella pneumoniae* multi-drogue résistant ; **S. enterica** = *Salmonella enterica* ; **E. coli ESBL** = *Escherichia coli* bêta-lactamase Spectre élargie ; **EtOH** = éthanolique ; **F** = Fraction **Na** = non actif

Tableau 23 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) extrait et fractions éthanolique de *B. toxisperma* Pierre

Extrait et fractions	CMI et CMB (mg/mL)									
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i> ATCC 8739		<i>K.p</i> MDR		<i>S. enterica</i>		<i>E. coli</i> ESBL	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Bt EtOH	0,62	2,5	1,25	5	1,25	5	1,25	5	1,25	5
Bt EtOH F1	1,25	> 5	1,25	5	0,31	2,5	Nt	Nt	2,5	> 5
Bt EtOH F2	1,25	2,5	0,62	1,25	1,25	5	1,25	2,5	1,25	5
Bt EtOH F3	2,5	5	1,25	5	1,25	5	> 5	> 5	2,5	5
Bt EtOH F4	2,5	5	1,25	2,5	1,25	2,5	2,5	5	1,25	2,5
Bt EtOH F5	5	> 5	2,5	> 5	0,62	5	5	> 5	5	> 5
Bt EtOH F6	1,25	> 5	Nt	Nt	5	> 5	2,5	5	Nt	Nt
Bt EtOH F7	5	> 5	Nt	Nt	Nt	Nt	2,5	> 5	Nt	Nt

Bt = *Baillonella toxisperma* ; **E. coli** = *Escherichia coli* ; **K.p MDR** = *Klebsiella pneumoniae* multi-drogue résistant ; **S. enterica** = *Salmonella enterica* ; **E. coli ESBL** = *Escherichia coli* bêta-lactamase Spectre élargie ; **EtOH** = éthanolique ; **F** = Fraction ; **Nt** = non testé

10.2. Activité anti-oomycète

L'activité anti-oomycète *in vitro* de l'écorce de *Baillonella toxisperma* a été mesurée sur *Phytophthora infestans*. Le Tableau 24 montre une meilleure activité anti-oomycète des fractions F1 et F4 par rapport à l'extrait brut. La fraction F4 a eu une meilleure inhibition de la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans* soit 74% contre 60% pour l'extrait brut. S'agissant des autres fractions testées, l'inhibition la moins importante a été obtenue sur la fraction F3 (40%). Les résultats similaires ont été observés sur l'activité antibactérienne. En effet, l'activité antifongique de la fraction F4 est largement supérieure à celle des autres fractions sur la majorité des souches testées. Ce résultat suggère que les composés antifongiques de *B. toxisperma* se trouvent majoritairement dans la fraction F4. Les résultats obtenus sont aussi intéressants que ceux obtenus par Essama et *al.*, (2015) qui ont montré les fortes activités antifongiques de *Baillonella toxisperma* sur les levures cliniques[210].

Tableau 24 : Activité anti-oomycète de *Baillonella toxisperma* sur *Phytophthora infestans*

Concentration 0,5 mg/mL									
	Rep 1		Rep2		Rep3		M ± E	Cr	% Inhibition
<i>P. infestans</i>	1,9	1,8	2	2	1,9	2	1,93 ± 0,08	1,53	
DMSO	1,7	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8	1,82 ± 0,08	1,42	
Extrait brut	0,9	1	1	0,9	0,9	1,1	0,97 ± 0,03	0,57	60%
F1	0,9	0,9	0,8	0,7	1	1	0,88 ± 0,13	0,48	66%
F2	1,2	1	1,1	0,9	1,1	0,8	1,02 ± 0,08	0,62	56%
F3	1,3	1,1	1,2	1,2	1,5	1,2	1,25 ± 0,09	0,85	40%
F4	1	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,77 ± 0,08	0,37	74%

Rep 1 : répétition 1 ; **Rep 2** : répétition 2 ; **Rep 3** : répétition 3 ; **M±E** : moyenne-écart type ; **Cr** : croissance

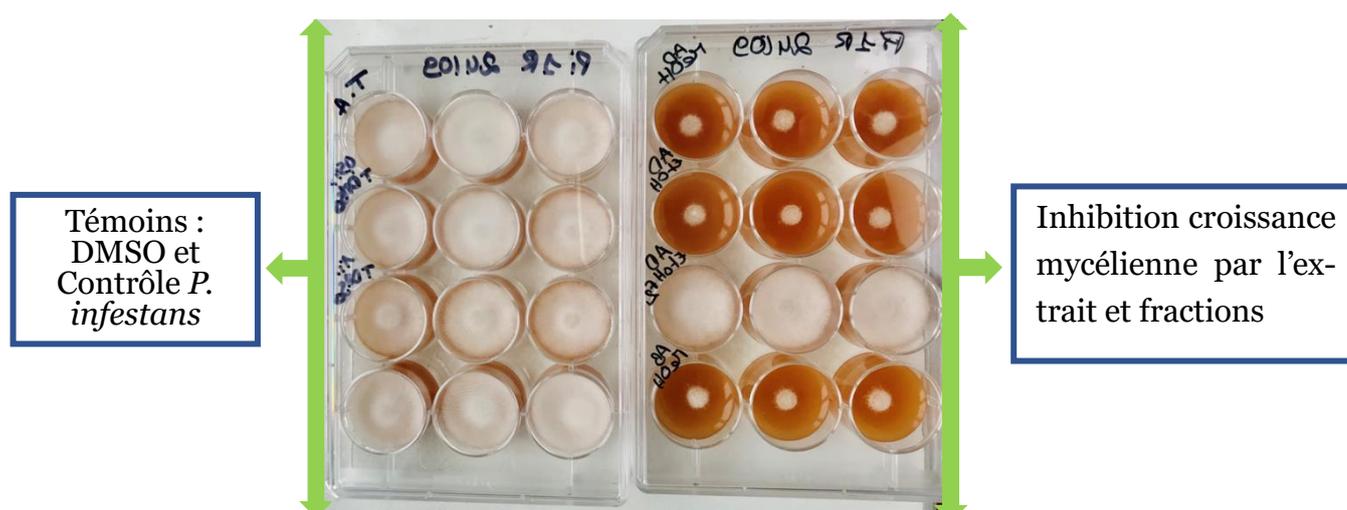


Figure 82 : Inhibition *in-vitro* de la croissance mycélienne des extraits et fractions des écorces de tronc de *Baillonella toxisperma* sur *Phytophthora infestans*

10.3. Analyse des fractions actives

Les fractions les plus actives (F2 et F4) ont été analysées par spectrométrie de masse. A l'issue de cette analyse, les fractions F2 et F4 ont montrées plusieurs paires d'ions. La fraction F2 montre un composé majoritaire m/z 361,092 [$C_{18}H_{16}O_8^+$] à un temps de rétention RT = 2,647 min, qui correspond à l'Acide Rosmarinique (Figure 83 A). La Figure 83 B montre une forte absorbance à 280 nm caractéristiques des polyphénols.

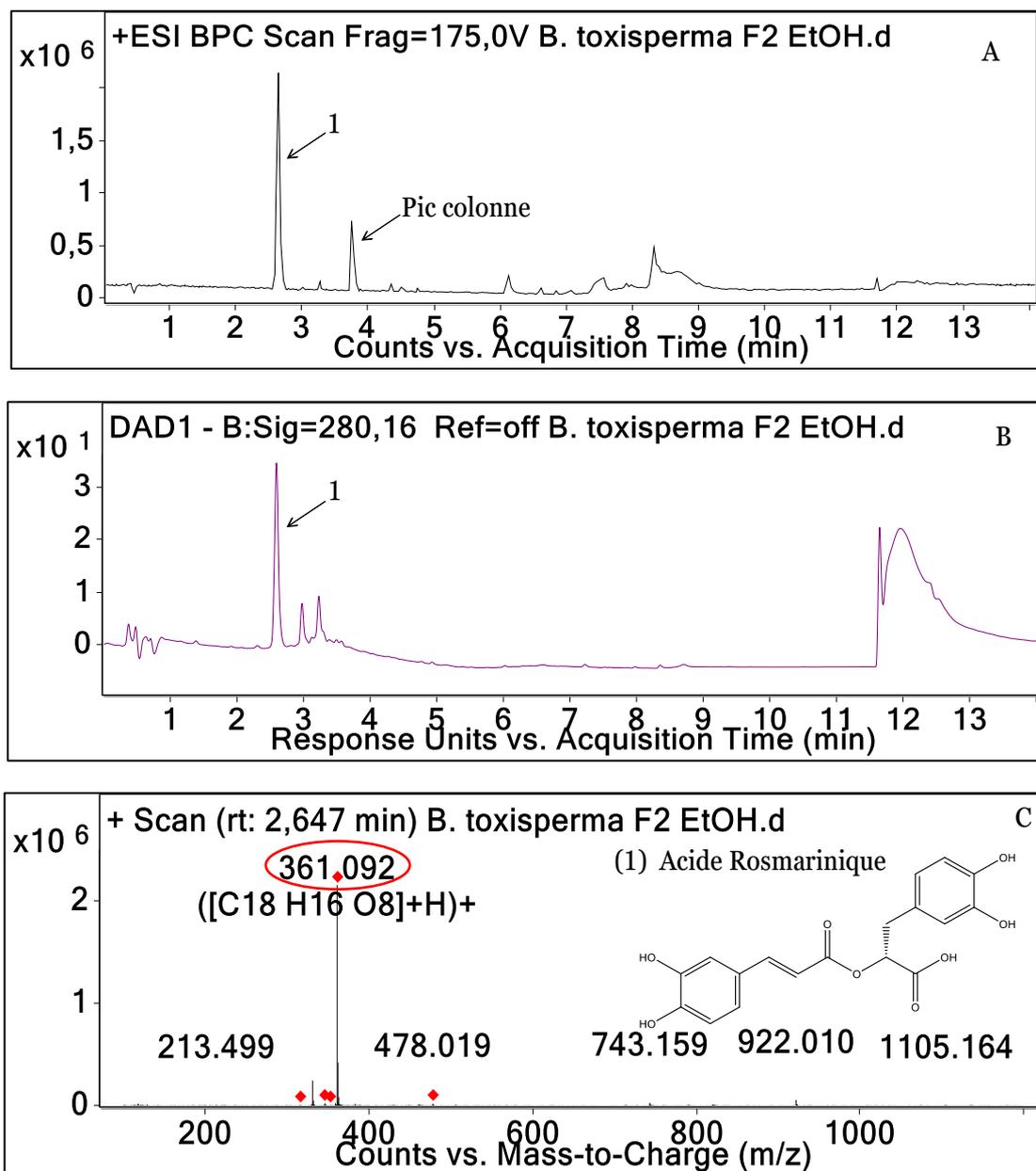


Figure 83 : Analyses par CLHP-UV-MS de la fraction F2 éthanolique de *Baillonella toxisperma*
ESI (+), m/z 100-1200, UV : λ 280 nm, élution sur colonne Sunfire® C18

La fraction F4 a montré 4 pics majoritaires : m/z 375,108 [$C_{19}H_{18}O_8^+$] ; m/z 345,097 [$C_{18}H_{16}O_7^+$] ; 359,113 [$C_{19}H_{18}O_7^+$] et m/z 299,092 [$C_{17}H_{14}O_5^+$], qui correspondent respectivement à l'ester méthylique de l'acide Rosmarinique, 3,7,4',7-tetraméthylether et l'Afrormosine.

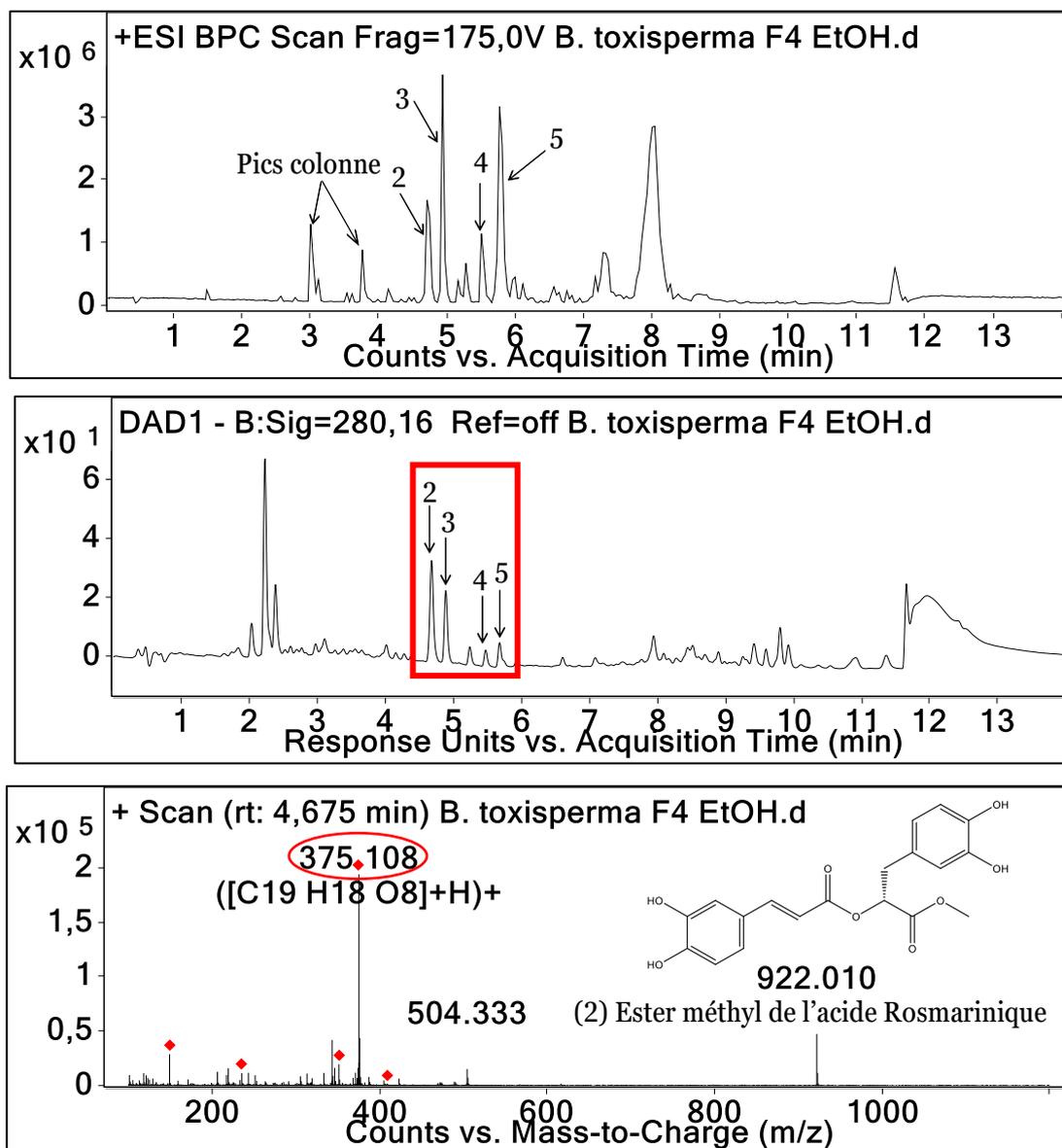


Figure 84 : Analyses par CLHP-UV-MS de la fraction F4 éthanolique de *Baillonella toxisperma*

ESI (+), m/z 100-1200, UV : λ 280 nm, élution sur colonne Sunfire® C18

La présence de tous ces composés phénoliques dans les fractions F2 et F4 pourrait en effet justifier les fortes activités antibactériennes et antifongiques de la plante *Baillonella toxisperma*. En effet, les études antérieures sur la plante montrent que les polyphénols, phénols, tannin et flavonoïdes sont responsables des activités antifongiques et antibactériennes de *Baillonella toxisperma*[210].

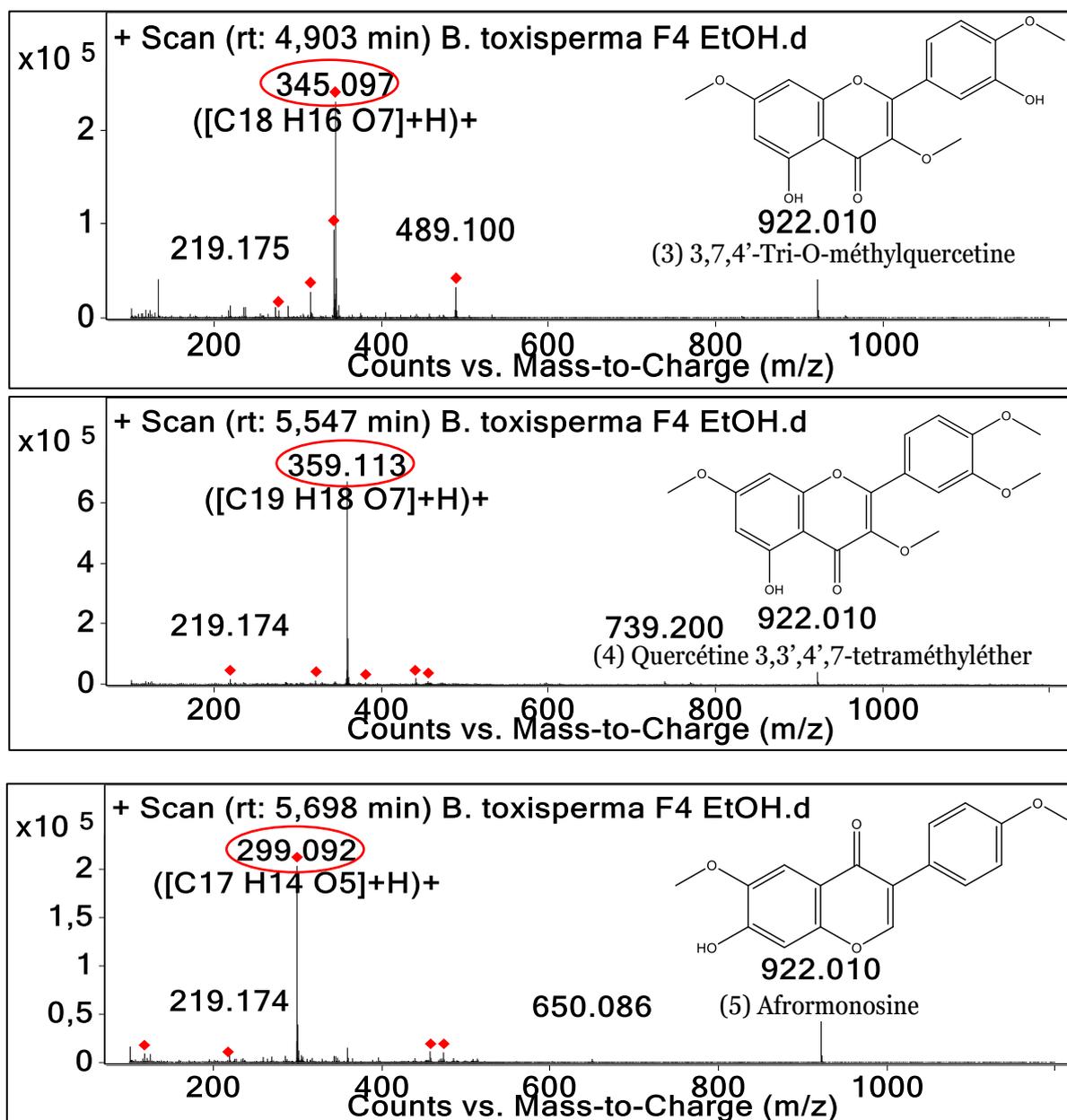


Figure 85 : Spectre masse des ions $[M+H]^+$ des composés (3), (4) et (5) de la fraction F4 éthanolique
 ESI (+), m/z 100-1200, UV : λ 280 nm, élution sur colonne Sunfire® C18

XI. CYTOTOXICITE EXTRAIT DE *BAILLONELLA TOXISPERMA* PIERRE

Cette activité a pour but d'évaluer l'effet des écorces de *Baillonella toxisperma* sur la prolifération cellulaire globale de deux lignées de cellules : HaCaT et Caco-2. L'activité cytotoxique a été effectuée à des concentrations différentes d'extrait allant de 10 à 500 µg/mL. La valeur des IC₅₀ est déterminée à partir du pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin. Les résultats montrent que jusqu'à 50 µg/mL, l'extrait de *B. toxisperma* est bien toléré par les deux lignées cellulaires. Par ailleurs, à partir de 100 µg/mL, on observe une certaine toxicité sur les deux modèles de cellules. En se basant sur les différents IC₅₀, les cellules HaCaT semblent plus sensibles que les cellules Caco-2 avec des IC₅₀ respectifs de 21,78 µg/mL et 40,54 µg/mL. Ces résultats semblent très logiques non seulement au vu de l'usage traditionnel de *B. toxisperma* mais aussi par rapport aux différents groupements chimiques rencontrés dans l'extrait brut[211].

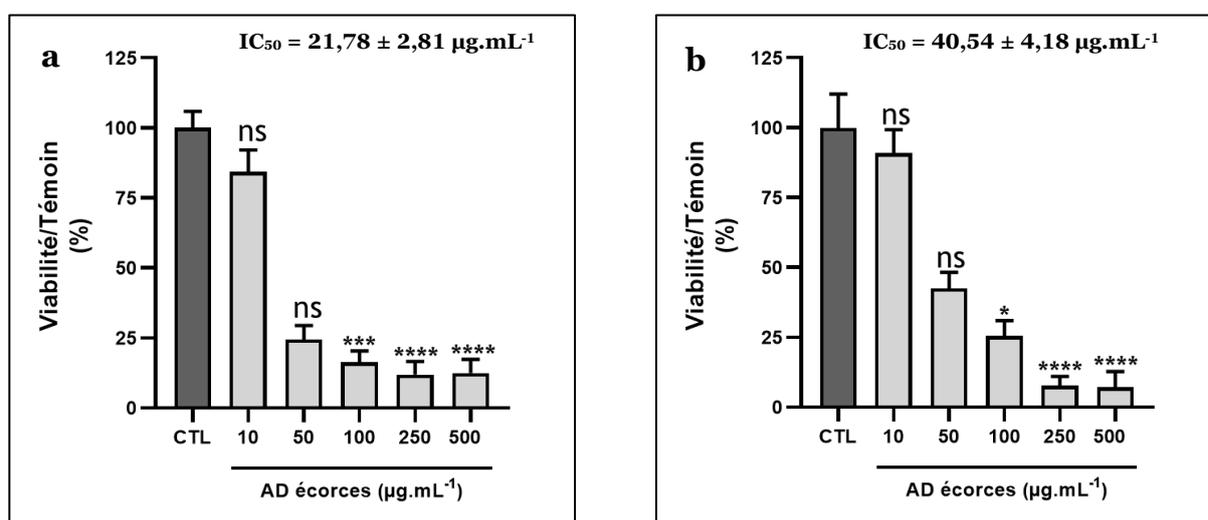


Figure 86 : Cytotoxicité des écorces de *Baillonella toxisperma* Pierre sur les cellules HaCaT (a) et Caco-2 (b). Les tests statistiques ont été réalisés par lecture du test de Kruskal-Wallis, test a posteriori de Dunn's (ns $p > 0,9999$; * $p = 0,0304$; *** $p = 0,0007$; **** $p < 0,0001$). Les différences sont observées par rapport au contrôle (CTL)

DISCUSSION GENERALE

Les plantes produisent les métabolites secondaires qui vont avoir des fonctions spécifiques telles que la protection de la plante contre les pathogènes et prédateurs, l'allélopathie (compétition plante-plante), la symbiose plante-microbe au niveau racinaire et peuvent également servir d'attractif pour les pollinisateurs. Toutefois, ces composés possèdent plusieurs propriétés biologiques qui suscitent l'intérêt des chercheurs notamment dans la découverte de nouvelles molécules actives contre plusieurs pathologies en santé humaine, animale et végétale.

Le premier objectif de ce travail était de recenser les plantes utilisées en médecine traditionnelle gabonaise dans le traitement des maladies microbiennes, dans le but de valoriser et de valider scientifiquement l'usage de ces plantes par les populations locales. Pour cela, une enquête ethnopharmacologique a été entreprise auprès d'une vingtaine de tradipraticiens. En effet, la sélection des plantes sur la base des données ethnopharmacologiques augmente le pourcentage d'aboutir à un extrait beaucoup plus actif. Nos études de terrain ont permis de récolter 22 plantes, parmi lesquelles 18 ont été identifiées soit 81,82%. Parmi les plantes identifiées, *Erismadelphus exsul* Mildbr et *Baillonella toxisperma* Pierre ont été sélectionnées pour les études phytochimiques. Le choix des plantes repose essentiellement sur deux critères : la fréquence de citation de la plante pendant l'enquête et le nombre d'études limitées sur la plante.

Le deuxième objectif était de caractériser de façon plus ciblée les composés responsables des activités biologiques des plantes sélectionnées. Pour y arriver, une approche combinée de spectrométrie de masse LC-MS/MS et les réseaux moléculaires a été utilisée. La première étape étant l'extraction des composés bioactifs de la plante. Pour cette étape d'extraction cruciale, l'idéal était de récupérer directement l'extrait traditionnel ou de travailler dans les mêmes conditions que les tradipraticiens afin d'avoir approximativement des résultats comparables. Compte tenu du manque de solvants couramment utilisés pour la préparation des recettes traditionnelles (vins de palme, vin de canne à sucre, huile de palme et whisky) nous avons opté pour des extractions alcooliques (méthanolique et éthanolique) qui se rapprochaient plus ou moins des conditions traditionnelles. Après avoir fait le choix des solvants, il était nécessaire de choisir une méthode d'extraction et d'optimiser certains paramètres comme la granulométrie du broyat, la durée d'extraction ainsi que la vitesse d'agitation qui impactent sur le rendement d'extraction. La macération (extraction à froid) a été choisie comme méthode d'extraction, l'avantage de cette méthode est qu'elle limite la perte et l'altération des espèces chimiques organiques fragiles qui à température élevée peuvent se dégrader. En effet, en fonction du type d'extraction et la polarité du solvant d'extraction, la variabilité des principes actifs peut être modifiée ainsi que l'activité pharmacologique. Une fois l'extraction faite, les extraits obtenus ont été analysés en spectrométrie de masse. Ce qui a permis d'identifier de manière putative 116 composés dont 96 au niveau des écorces et les feuilles d'*Erismadelphus exsul* et 20 composés au niveau des écorces de *Baillonella toxisperma*. Les réseaux moléculaires conçus au

moyen des spectres MS/MS des extraits bruts ont été effectués non seulement pour confirmer l'identité des molécules détectées en spectrométrie de masse mais aussi, de répertorier et visualiser les principales familles moléculaires présentes dans chaque plante.

Pour la plante *Erismadelphus exsul*, les métabolites identifiés appartiennent majoritairement à huit (8) familles de composés naturels i) alcaloïdes cyclopeptidiques, ii) polyphénols (isoflavonoïdes et flavonoïdes), iii) glycérophospholipides, iv) acides aminés estérifiés, v) stéroïdes et dérivés et vi) alcaloïdes quinoléines. Sur les deux types d'organes, une certaine homogénéité a été observée quant à la présence de certaines familles de molécules. La grande différence entre les deux organes est la présence d'alcaloïdes cyclopeptidiques et quinoléines au niveau des écorces. En effet, seules ces deux familles de molécules n'ont pas été retrouvées au niveau des feuilles. Une explication concrète n'a été trouvée quant à cette différence majeure entre les deux organes. Néanmoins, de nombreuses études ont montrées que les alcaloïdes sont produits comme métabolites secondaires en réponse au stress environnemental ou pour assurer un mécanisme de défense aux agressions provoquant des maladies chez les végétaux.

Parallèlement, les résultats des écorces de *Baillonella toxisperma* montrent qu'elles produisent majoritairement les composés phénoliques comme le resvératrol et ses dérivés. Au vu de l'utilisation traditionnelle de cette plante, ces résultats paraissent plutôt conformes. En effet, les composés phénoliques sont connus pour leurs multiples propriétés : anti-âge, antimicrobiennes, antioxydantes, anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et anti-carcinogènes[212].

Le troisième objectif de cette thèse était d'identifier les composés responsables des activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits d'*Erismadelphus exsul* et *Baillonella toxisperma*. Pour cela, les extraits complexes (extraits bruts) ont été simplifiés en fractions grâce à la chromatographie sur colonne. Les fractions obtenues ont été évaluées simultanément sur cinq souches bactériennes à Gram négatif et deux souches fongiques. Les résultats du premier screening montrent des activités antimicrobiennes et antioxydantes.

Pour la plante *Erismadelphus exsul*

Les résultats des activités antimicrobiennes montrent que les fractions F2, F3, F4 et F5 inhibent aussi bien la croissance bactérienne que fongique. L'objectif étant de chercher les molécules impliquées dans ces activités, les fractions les plus actives ont été analysées par spectrométrie de masse et les molécules d'intérêt ont été identifiées et ciblées grâce à l'approche des réseaux moléculaires. Ainsi, il a été montré que les alcaloïdes cyclopeptidiques (Mauritine A, Mauritine F et Mauritine A N-oxyde) et quinoléines (8-Deoxoantidesmone, 8-Dihydroantidesmone, Antidesmone) sont en partie responsables de l'activité antimicrobienne des écorces d'*Erismadelphus exsul*. Ceci concorde avec plusieurs études qui ont montré l'activité antimicrobienne des alcaloïdes cyclopeptidiques. Parmi celles-ci, Tuenter et ses collègues ont montré

que les alcaloïdes cyclopeptidiques possèdent de fortes activités antimicrobiennes, en particulier contre certains champignons, mycobactéries ou protozoaires, avec des indices de sélectivité favorables et en l'absence d'une cytotoxicité évidente[213]. Tout comme décrit pour l'activité antimicrobienne, l'activité antioxydante de l'extrait brut et des fractions (feuilles, écorces) éthanoliques a été évaluée par les méthodes DPPH et FRAP en utilisant le Trolox comme standard et l'acide ascorbique pour comparaison. Les deux méthodologies réagissent à différents mécanismes antioxydants, notamment le piégeage des radicaux libres pour le DPPH et la réduction du fer pour le FRAP. Au niveau des écorces, l'extrait brut et les fractions obtenues ont montré une meilleure réactivité au FRAP qu'au DPPH. La fraction F8 était quatre fois plus antioxydante que l'acide ascorbique lors de la réaction au FRAP, alors qu'elle était deux fois moins antioxydante que cette référence lors de la réaction au DPPH. Contrairement aux écorces, l'extrait brut feuilles était plus antioxydant que les fractions. Tout comme l'écorce, les feuilles présentent une meilleure réaction au test FRAP par rapport au test du DPPH. Cela signifie que les composés présents dans les extraits et fractions d'*Erismadelphus exsul* forment assez facilement un complexe métallique. En effet, la présence des structures spécifiques comme celles des flavonoïdes favorisent le transfert d'électrons (test FRAP) plutôt qu'un transfert d'hydrogène (test DPPH). Plusieurs études dans la littérature montrent que les composés phénoliques (flavonoïdes et isoflavonoïdes) ont une grande capacité de piégeage des radicaux libres et de chélation des métaux de transition comme le fer[186]. La forte réactivité des extraits d'*Erismadelphus exsul* au test FRAP peut être liée à la présence de plusieurs flavonoïdes et isoflavonoïdes tels que la Formononetine, la Biochanine A, la Rhoifoline et la Vitexine.

Pour la plante *Baillonella toxisperma*

Les résultats des activités antimicrobiennes montrent que les fractions F2 et F4 inhibent fortement la croissance bactérienne et fongique. Cette forte activité antimicrobienne est due à la présence majoritaires des polyphénols dans ces fractions. En effet, l'étude des fractions actives a révélée la présence de plusieurs polyphénols tels que la quercétine et l'acide rosmarinique. Les fortes activités antioxydantes et antimicrobiennes pourraient expliquer l'utilisation traditionnelle de *Baillonella toxisperma* et *Erismadelphus exsul*.

Néanmoins, il était primordial de prouver leur innocuité. Ainsi, une étude de cytotoxicité aussi bien des feuilles que des écorces a été faite. Les résultats des études de cytotoxicité montrent que les feuilles d'*Erismadelphus exsul* ne présentent aucune cytotoxicité sur les cellules saines de la peau. Ces résultats sont en accord avec leur usage traditionnel. En effet, les feuilles de *E. exsul* sont utilisées sous forme de pommade dans le cas des maladies de la peau (mycoses). Contrairement aux feuilles, les écorces de *E. exsul* inhibent non seulement la prolifération des cellules cancéreuses du côlon mais aussi les cellules kératinocytes humaines. Tout comme les écorces de *E. exsul*, les extraits de *B. toxisperma* inhibent fortement la prolifération des cellules cancéreuses.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail s'est intéressé d'une part, à recenser et à identifier les plantes à travers une enquête ethnopharmacologique, d'autre part à réaliser les études chimiques et biologiques permettant d'évaluer les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes *in vitro* et la cytotoxicité des extraits de plantes du Gabon. L'enquête ethnopharmacologique réalisée auprès des tradipraticiens a permis de récolter vingt-deux (22) plantes médicinales utilisées au nord du Gabon pour lutter contre les maladies microbiennes. Cette enquête a relevé les différentes parties des plantes (écorces, feuilles et racines) utilisées dans la préparation des recettes médicinales (macération, décoction, infusion, fumigation et pommade) pour la lutte antimicrobienne. Parmi les 22 plantes récoltées, nous avons poursuivi notre travail en sélectionnant *Erismadelphus exsul* et *Baillonella toxisperma*. Ainsi, à travers une approche combinée de spectrométrie de masse et de réseaux moléculaires, nous avons identifié les principales familles de molécules majoritairement présentes dans les deux plantes. Cette approche a également permis de cibler et identifier i) deux familles d'alcaloïdes (cyclopeptidiques et quinoléines), responsables de l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques et méthanoliques des écorces de *Erismadelphus exsul*, ii) un groupe de polyphénols (isoflavonoïdes et flavonoïdes) procurant à l'extrait éthanolique écorce et feuille de *E. exsul* un pouvoir antioxydant, iii) un groupe de polyphénols avec des similarités structurales conférant à l'extrait de *Baillonella toxisperma* un pouvoir antimicrobien. Dans le but de vérifier l'innocuité de ces plantes largement utilisées par les populations locales, les études préliminaires de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisées en fonction de l'usage traditionnel de chaque organe. Les résultats montrent que i) les feuilles d'*Erismadelphus exsul* ne présentent aucune cytotoxicité sur les cellules saines de l'épiderme (HaCaT), ii) par ailleurs, les écorces présentent une cytotoxicité modérée aussi bien sur les cellules cancéreuses du colon Caco-2 que sur les cellules kératinocytes humaines, iii) les écorces de *Baillonella toxisperma* présentent également une cytotoxicité modérée sur les deux lignées cellulaires.

La conclusion de cette étude permet de dégager un certain nombre de perspectives faisant suite à ce travail. L'étude s'est limitée uniquement sur deux plantes, cela s'avère insuffisant quand on sait qu'il existe très peu de données phytochimiques sur de nombreuses plantes médicinales gabonaises. Il y a donc nécessité de mener des études déréplicatives *via* les réseaux moléculaires afin d'avoir un répertoire de données sur un spectre élargi de plantes gabonaises. Toutefois, concernant les deux plantes qui ont fait l'objet de cette étude, il serait envisagé de purifier les composés bioactifs identifiés afin de confirmer leurs structures en RMN et tester leurs activités biologiques dans le but de confirmer qu'elles sont bien responsables des activités des extraits d'*Erismadelphus exsul* et *Baillonella toxisperma*. Finaliser la caractérisation RMN 1D et 2D des molécules qui ont été purifiées. Il serait aussi intéressant de tester les activités anti-inflammatoires et antiplasmodiales des deux plantes au vu de leur diversité chimique. Et aussi envisager une culture *in vitro* de la plante *Baillonella toxisperma* productrice de resvératrol et dérivés une molécule particulièrement intéressante dans les projets et thématiques développés chez BIOPI.

Bibliographie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Valorisation de Quelques Plantes Médecinales [Médicinales] Issues de La Flore Tunisienne : Extraction Par CO₂ Supercritique - PDF Free Download Available online: <https://docplayer.fr/221709840-Valorisation-de-quelques-plantes-medecinales-medicinales-issues-de-la-flore-tunisienne-extraction-par-co2-supercritique.html> (accessed on 2 May 2022).
2. Borchardt, J.K. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. *Drug News Perspect* **2002**, *15*, 187–192, doi:10.1358/dnp.2002.15.3.840015.
3. Le papyrus médical Chester Beatty JONCKHEERE Frans Egypt, Series | Barnebys Available online: https://www.barnebys.fr/ventes/objet/le-papyrus-medical-chester-beatty-jonckheere-frans-egypt-series-xxo_XLlZBn (accessed on 1 May 2022).
4. Chinese Medicinals Available online: <https://hort.purdue.edu/new-crop/proceedings1990/V1-499.html> (accessed on 1 May 2022).
5. N’Nang, E.O. Étude chimique et biologique de Gentianales gabonaises d’intérêt antipaludique, à alcaloïdes indolomonoterpéniques. 326.
6. OMC | Propriété Intellectuelle - Répondre Aux Besoins Spéciaux Des Pays Les Moins Avancés Dans Le Domaine de La Propriété Intellectuelle Available online: https://www.wto.org/french/tratop_f/trips_f/trilatweb_f/ch2d_trilat_web_13_f.htm (accessed on 19 September 2021).
7. Assemblée mondiale de la Santé, 56 *Médecine traditionnelle : Rapport du Secrétariat*; Organisation mondiale de la Santé, 2003;
8. Novais, M.H.; Santos, I.; Mendes, S.; Gomes, C. Studies on Pharmaceutical Ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *93*, 183–195, doi:10.1016/j.jep.2004.02.015.
9. Arbain, D.; Saputri, G.A.; Syahputra, G.S.; Widiyastuti, Y.; Susanti, D.; Taher, M. Genus Pterocarpus: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, Biological Activities, and Clinical Evidence. *Journal of Ethnopharmacology* **2021**, *278*, 114316, doi:10.1016/j.jep.2021.114316.
10. Al-Rifai, A.; Aqel, A.; Al-Warhi, T.; Wabaidur, S.M.; Al-Othman, Z.A.; Badjah-Hadj-Ahmed, A.Y. Antibacterial, Antioxidant Activity of Ethanolic Plant Extracts of Some *Convolvulus* Species and Their DART-ToF-MS Profiling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2017**, *2017*, 1–9, doi:10.1155/2017/5694305.
11. World Health Organization. Programme on Traditional Medicine *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*; World Health Organization, 2000;
12. Ngoua-Meye-Misso, R.-L.; Sima-Obiang, C.; Ndong, J.D.L.C.; Ndong-Atome, G.-R.; Ondo, J.P.; Ovono Abessolo, F.; Obame-Engonga, L.-C. Medicinal Plants Used in Management of Cancer and Other Related Diseases in Woleu-Ntem Province, Gabon.

- European Journal of Integrative Medicine* **2019**, *29*, 100924, doi:10.1016/j.eujim.2019.05.010.
13. Obiang, C.; Ngoua Meyé Misso, R.; Ndong Atome, G.; Ondo, J.; Obame Engonga, L.; Emvo, E. Phytochemical Analyses, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Stem Bark Extracts of *Distemonanthus Benthamianus* H. Baill. and Fruit Extracts of *Solanum Torvum* Sw. from Gabon. *Asian Pac J Trop Biomed* **2019**, *9*, 209, doi:10.4103/2221-1691.259001.
 14. Bading Taika, B.; Bouckandou, M.; Souza, A.; Bourobou Bourobou, H.P.; MacKenzie, L.S.; Lione, L. An Overview of Anti-Diabetic Plants Used in Gabon: Pharmacology and Toxicology. *Journal of Ethnopharmacology* **2018**, *216*, 203–228, doi:10.1016/j.jep.2017.12.036.
 15. Towns, A.M.; Ruyschaert, S.; van Vliet, E.; van Andel, T. Evidence in Support of the Role of Disturbance Vegetation for Women’s Health and Childcare in Western Africa. *J Ethnobiology Ethnomedicine* **2014**, *10*, 42, doi:10.1186/1746-4269-10-42.
 16. Towns, A.M.; Quiroz, D.; Guinée, L.; de Boer, H.; van Andel, T. Volume, Value and Floristic Diversity of Gabon’s Medicinal Plant Markets. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *155*, 1184–1193, doi:10.1016/j.jep.2014.06.052.
 17. Beniddir, M.A.; Kang, K.B.; Genta-Jouve, G.; Huber, F.; Rogers, S.; Hooft, J.J.J. van der Advances in Decomposing Complex Metabolite Mixtures Using Substructure- and Network-Based Computational Metabolomics Approaches. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, *38*, 1967–1993, doi:10.1039/D1NP00023C.
 18. Hooft, J.J.J. van der; Mohimani, H.; Bauermeister, A.; Dorrestein, P.C.; Duncan, K.R.; Medema, M.H. Linking Genomics and Metabolomics to Chart Specialized Metabolic Diversity. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 3297–3314, doi:10.1039/D0CS00162G.
 19. Otogo N’Nang, E.; Bernadat, G.; Mouray, E.; Kumulungui, B.; Grellier, P.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M.A. Theionbrunonines A and B: Dimeric Vobasine Alkaloids Tethered by a Thioether Bridge from *Mostuea Brunonis*. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6596–6600, doi:10.1021/acs.orglett.8b02961.
 20. Yang, J.Y.; Sanchez, L.M.; Rath, C.M.; Liu, X.; Boudreau, P.D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; de Felicio, R.; Fenner, A.; et al. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J Nat Prod* **2013**, *76*, 1686–1699, doi:10.1021/np400413s.
 21. Chabrier, J.-Y. *Plantes médicinales et formes d’utilisation en phytothérapie*. 184.
 22. Le Breton, D. S. Kalis, Médecine traditionnelle, religion et divination chez les Seereer Siin du Sénégal. La connaissance de la nuit. *Homme* **1998**, *38*, 295–296.
 23. Sawadogo, M.; Thill, G. *Pratiques interculturelles en médecine et santé humaine: Phytomédicaments d’origine africaine : de la recherche à la production pour un développement durable Avec les actes du symposium PRELUDE, Ouidah, Bénin, 27-31 mars 1995*; Presses universitaires de Namur, 1996; ISBN 978-2-87037-220-3.

24. Mvone-Ndong, S.-P.E. Médecine Traditionnelle Entre Rationalité et Spiritualité : Réflexion Éthique et Épistémologique Sur l'approche Africaine de La Médecine : Le Cas Du Gabon. These de doctorat, Lyon 3, 2005.
25. Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelle (IPHAMETRA) Available online: <http://iphametra.org/> (accessed on 14 January 2022).
26. MEDECINE TRADITIONNELLE AU GABON, une Interview de Maxime KAMGA F. - CROISSANCEPLUS Available online: <http://croissanceplus.canalblog.com/archives/2013/03/05/26578174.html> (accessed on 14 January 2022).
27. Touwaide, A. Méthodologie de l'ethnopharmacologie : Jacques Fleurentin (éd.), Pierre Cabalion (éd.), Guy Mazars(éd.), et al. Ethnopharmacologie. Sources, méthodes, objectifs... *Revue d'Histoire de la Pharmacie* **1993**, *81*, 239–240.
28. Leslibraires.fr *Des sources du savoir aux médicaments du futur,... - Congrès européen d'ethnopharmacologie - IRD Éditions*;
29. Nguyen Pouplin, J. Plantes Antipaludiques Du Vietnam : Étude Ethnopharmacologique et Chimique. These de doctorat, Paris, Muséum national d'histoire naturelle, 2007.
30. Sophie, A.A.; Mathouet, H.; Souza, A.; Bivigoua, F.; Mba, C.; Lamidi, M. Quelques Plantes Utilisées En Médecine Traditionnelle Pour Le Traitement de La Stérilité Chez Des Femmes Au Gabon. *Ethnopharmacologia* **2009**, *43*, 52.
31. Rakotomanana, H. Etude des propriétés pharmacologiques du Vahona. 123.
32. Mansoura, D.; Kouidi, A. Contribution à l'étude de l'effet biologique des polysaccharides hydrosoluble d'*Ammodaucus leucotrichus* Coss et Dur. **2020**.
33. Vigneau, C. *Plantes Médicinales: Thérapeutique-Toxicité*; Masson, 1985;
34. Hoffman, P.S. Antibacterial Discovery: 21st Century Challenges. *Antibiotics* **2020**, *9*, 213, doi:10.3390/antibiotics9050213.
35. Sanogo, Y.; Guessennd, N.K.; Tra Bi, H.F.; Kouadio, N.J.; Konan, F.K.; Bamba, M.; Danho, N.; Bakayoko, A.; Yao, K.; Dosso, M. Evaluation in Vitro de l'activité Des Écorces de Tige de *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. et Perr. (Combretaceae) Sur Des Bactéries Responsables de Maladies Courantes En Afrique et Criblage Phytochimique. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **2016**.
36. Abdallah, E. Plants: An Alternative Source for Antimicrobials. *J App Pharm Sci* **2011**, *1*.
37. AlSheikh, H.M.A.; Sultan, I.; Kumar, V.; Rather, I.A.; Al-Sheikh, H.; Tasleem Jan, A.; Haq, Q.M.R. Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. *Antibiotics (Basel)* **2020**, *9*, E480, doi:10.3390/antibiotics9080480.
38. Toty, A.A.; Guessennd, N.; Bahi, C.; Kra, A.; Tokore, D.A.; Dosso, M. Évaluation In-Vitro de l'activité Antibactérienne de l'extrait Aqueux de l'écorce de Tronc de *Harungana Madagascariensis* Sur La Croissance de Souches Multi-Résistantes. *undefined* **2013**.

39. Frieri, M.; Kumar, K.; Boutin, A. Antibiotic Resistance. *J Infect Public Health* **2017**, *10*, 369–378, doi:10.1016/j.jiph.2016.08.007.
40. Masson, E. Détection des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : avantages, limites Available online: <https://www.em-consulte.com/article/77640/detection-des-enterobacteries-productrices-de-beta> (accessed on 17 December 2021).
41. Kooli, I.; Kadri, Y.; Abdallah, H.B.; Mhalla, S.; Haddad, O.; Noomen, S.; Mastouri, M. Épidémiologie des bactéries multi-résistantes dans une unité néonatale tunisienne. *Journal de pédiatrie et de puériculture* **2014**, *5*, 236–242, doi:10.1016/j.jpp.2014.06.001.
42. Bonomo, R.A.; Szabo, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in Acinetobacter Species and Pseudomonas Aeruginosa. *Clin Infect Dis* **2006**, *43 Suppl 2*, S49-56, doi:10.1086/504477.
43. 2012_156_2_04.Pdf.
44. Abedini, A.; Roumy, V.; Mahieux, S.; Biabiany, M.; Standaert-Vitse, A.; Rivière, C.; Sahpaz, S.; Bailleul, F.; Neut, C.; Hennebelle, T. Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis Atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**, *2013*, 1–11, doi:10.1155/2013/604536.
45. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2016**, *6*, 71–79, doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
46. Lambert, R.J.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.J. A Study of the Minimum Inhibitory Concentration and Mode of Action of Oregano Essential Oil, Thymol and Carvacrol. *J Appl Microbiol* **2001**, *91*, 453–462, doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.
47. Jorgensen, J.; Turnidge, J. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods*. ; 2015.
48. Golus, J.; Sawicki, R.; Widelski, J.; Ginalska, G. The Agar Microdilution Method - a New Method for Antimicrobial Susceptibility Testing for Essential Oils and Plant Extracts. *J Appl Microbiol* **2016**, *121*, 1291–1299, doi:10.1111/jam.13253.
49. Jehl, F.; Chabaud, A.; Grillon, A. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? *Journal des Anti-Infectieux* **2015**, *17*, 125–139, doi:10.1016/j.antinf.2015.08.003.
50. Kuper, K.M.; Boles, D.M.; Mohr, J.F.; Wanger, A. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **2009**, *29*, 1326–1343, doi:10.1592/phco.29.11.1326.
51. Vernozy-Rozand, C. Clinique, pathogénie et épidémiologie des infections à Escherichia coli producteurs de Shiga toxines (STEC). *Bul. de l'Ac. Vét. de France* **2004**, *5*, doi:10.4267/2042/47695.

52. Maris, S. Caractérisation de souches d'Escherichia coli pathogènes urinaires provenant de Guadeloupe: portrait de la diversité des facteurs de virulences présents. masters, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique: Québec, 2016.
53. Johnson, J.R.; Russo, T.A. Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli: "The Other Bad E Coli." *J Lab Clin Med* **2002**, *139*, 155–162, doi:10.1067/mlc.2002.121550.
54. Herridge, W.P.; Shibu, P.; O'Shea, J.; Brook, T.C.; Hoyles, L. Bacteriophages of Klebsiella Spp., Their Diversity and Potential Therapeutic Uses. *J Med Microbiol* **2020**, *69*, 176–194, doi:10.1099/jmm.0.001141.
55. Shon, A.S.; Bajwa, R.P.S.; Russo, T.A. Hypervirulent (Hypermucoviscous) Klebsiella Pneumoniae: A New and Dangerous Breed. *Virulence* **2013**, *4*, 107–118, doi:10.4161/viru.22718.
56. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: Early Implementation 2020 - PAHO/WHO | Pan American Health Organization Available online: <https://www.paho.org/en/documents/global-antimicrobial-resistance-and-use-surveillance-system-glass-report-early> (accessed on 6 December 2021).
57. Diehl, M.S.; Atindehou, K.K.; Téré, H.; Betschart, B. Prospect for Anthelmintic Plants in the Ivory Coast Using Ethnobotanical Criteria. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *95*, 277–284, doi:10.1016/j.jep.2004.07.012.
58. Fry, W. Phytophthora Infestans: The Plant (and R Gene) Destroyer. *Molecular Plant Pathology* **2008**, *9*, 385–402, doi:https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x.
59. Tian, M.; Win, J.; Song, J.; van der Hoorn, R.; van der Knaap, E.; Kamoun, S. A Phytophthora Infestans Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiology* **2007**, *143*, 364–377, doi:10.1104/pp.106.090050.
60. Hirooka, T.; Ishii, H. Chemical Control of Plant Diseases. *Journal of General Plant Pathology* **2013**, doi:10.1007/s10327-013-0470-6.
61. Phytophthora Root Rot: Silent Killer • In Harmony Sustainable Landscapes. *In Harmony* 2015.
62. Hu, J.H.; Hong, C.X.; Stromberg, E.L.; Moorman, G.W. Mefenoxam Sensitivity and Fitness Analysis of Phytophthora Nicotianae Isolates from Nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology* **2008**, *57*, 728–736, doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01831.x.
63. Modern Crop Protection Compounds, 3rd Edition | Wiley Available online: <https://www.wiley.com/en-us/Modern+Crop+Protection+Compounds%2C+3rd+Edition-p-9783527340897> (accessed on 22 March 2022).
64. Diagnosis and Control of Phytophthora Diseases Available online: <https://pnwhandbooks.org/plantdisease/pathogen-articles/common/oomycetes/diagnosis-control-phytophthora-diseases> (accessed on 22 March 2022).
65. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella Available online: <https://theses.univ-oran1.dz/these.php?id=TH4997> (accessed on 13 May 2022).

66. Heick, T.M.; Justesen, A.F.; Jørgensen, L.N. Resistance of Wheat Pathogen *Zymoseptoria Tritici* to DMI and QoI Fungicides in the Nordic-Baltic Region - a Status. *Eur J Plant Pathol* **2017**, *149*, 669–682, doi:10.1007/s10658-017-1216-7.
67. Fones, H.; Gurr, S. The Impact of *Septoria Tritici* Blotch Disease on Wheat: An EU Perspective. *Fungal Genet Biol* **2015**, *79*, 3–7, doi:10.1016/j.fgb.2015.04.004.
68. Provence_languedoc_integral127293548548804122.Pdf.
69. Shaw, M.W.; Bearchell, S.J.; Fitt, B.D.L.; Fraaije, B.A. Long-Term Relationships between Environment and Abundance in Wheat of *Phaeosphaeria Nodorum* and *Mycosphaerella Graminicola*. *New Phytol* **2008**, *177*, 229–238, doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02236.x.
70. McCartney, C.; Mercer, P.C.; Cooke, L.R.; Fraaije, B.A. Effects of a Strobilurin-Based Spray Programme on Disease Control, Green Leaf Area, Yield and Development of Fungicide-Resistance in *Mycosphaerella Graminicola* in Northern Ireland. *Crop Protection* **2007**, *26*, 1272–1280, doi:10.1016/j.cropro.2006.10.027.
71. Cheval, P.; Siah, A.; Bomble, M.; Popper, A.D.; Reignault, P.; Halama, P. Evolution of QoI Resistance of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria Tritici* in Northern France. *Crop Protection* **2017**, *C*, 131–133, doi:10.1016/j.cropro.2016.10.017.
72. Walters, D.R.; Ratsep, J.; Havis, N.D. Controlling Crop Diseases Using Induced Resistance: Challenges for the Future. *Journal of Experimental Botany* **2013**, *64*, 1263–1280, doi:10.1093/jxb/ert026.
73. Gigot, C. Potentialités des associations de variétés pour limiter la progression épidémique de la septoriose du blé: rôle des mécanismes de dispersion des spores par la pluie dans un couvert végétal hétérogène. 159.
74. Reiter, R.J. Functional Pleiotropy of the Neurohormone Melatonin: Antioxidant Protection and Neuroendocrine Regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology* **1995**, *16*, 383–415, doi:10.1006/frne.1995.1014.
75. Kyriakou, S.; Tragkola, V.; Plioukas, M.; Anestopoulos, I.; Chatzopoulou, P.S.; Sarrou, E.; Trafalis, D.T.; Deligiorgi, M.V.; Franco, R.; Pappa, A.; et al. Chemical and Biological Characterization of the Anticancer Potency of *Salvia Fruticosa* in a Model of Human Malignant Melanoma. *Plants* **2021**, *10*, 2472, doi:10.3390/plants10112472.
76. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouysegou, L. ChemInform Abstract: Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2011**, *50*, 586–621, doi:10.1002/anie.201000044.
77. Garrison, M.; Dayan, N. Formulating Cosmetics with Natural Oils, Fats, Butters, and Waxes. In *Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products*; John Wiley & Sons, Ltd, 2011; pp. 213–238 ISBN 978-1-118-05680-6.
78. Ribeiro, A.S.; Estanqueiro, M.; Oliveira, M.B.; Sousa Lobo, J.M. Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products. *Cosmetics* **2015**, *2*, 48–65, doi:10.3390/cosmetics2020048.

79. Pharm'Aging Radicaux libres, stress oxydatif et vieillissement cutané. *Pharm'Aging* 2019.
80. Ghosh, P.K.; Gaba, A. Phyto-Extracts in Wound Healing. *J Pharm Pharm Sci* **2013**, *16*, 760–820, doi:10.18433/j3831v.
81. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **1996**, *239*, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292.
82. Mayworm, M.A.S.; Salatino, A. Distribution of Seed Fatty Acids and the Taxonomy of Vochysiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **2002**, *30*, 961–972, doi:10.1016/S0305-1978(02)00039-X.
83. Senterre, B.; Obiang, D. Nouvelles Découvertes à Propos Des Vochysiaceae Africaines: *Erisma delphus* Mildbr. et *Korupodendron* Litt & Cheek. *Taxonomania* **2005**, *17*, 3–18.
84. Gonçalves, D.J.P.; Shimizu, G.H.; Ortiz, E.M.; Jansen, R.K.; Simpson, B.B. Historical Biogeography of Vochysiaceae Reveals an Unexpected Perspective of Plant Evolution in the Neotropics. *American Journal of Botany* **2020**, *107*, 1004–1020, doi:https://doi.org/10.1002/ajb2.1502.
85. Sajo, M.G.; Rudall, P.J. Leaf and Stem Anatomy of Vochysiaceae in Relation to Subfamilial and Suprafamilial Systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2002**, *138*, 339–364, doi:10.1046/j.1095-8339.2002.00025.x.
86. Moya, E.; Brea, M. A New Record of Fossil Wood of Vochysiaceae from the Late Pleistocene (Arroyo Feliciano Formation), Argentina, South America. *Rev. bras. paleontol.* **2015**, *18*, 83–90, doi:10.4072/rbp.2015.1.05.
87. Sytsma, K.J.; Litt, A.; Zjhra, M.L.; Chris Pires, J.; Nepokroeff, M.; Conti, E.; Walker, J.; Wilson, P.G. Clades, Clocks, and Continents: Historical and Biogeographical Analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and Relatives in the Southern Hemisphere. *International Journal of Plant Sciences* **2004**, *165*, S85–S105, doi:10.1086/421066.
88. A. St-Hil Plantes et botanique: Famille des Vochysiaceae Available online: <https://www.plantes-botanique.org/> (accessed on 22 April 2021).
89. Feuya Tchouya, G.R.; Souza, A.; Tchouankeu, J.C.; Yala, J.-F.; Boukandou, M.; Foundikou, H.; Nguema Obiang, G.D.; Fekam Boyom, F.; Mabika Mabika, R.; Zeuko 'o Menkem, E.; et al. Ethnopharmacological Surveys and Pharmacological Studies of Plants Used in Traditional Medicine in the Treatment of HIV/AIDS Opportunistic Diseases in Gabon. *Journal of Ethnopharmacology* **2015**, *162*, 306–316, doi:10.1016/j.jep.2014.12.052.
90. Weniger, B.; Lobstein, A.; Um, B.-H.; Vonthron-Sénéchau, C.; Anton, R.; Usuga, N.J.; Basaran, H.; Lugnier, C. Bioactive Triterpenoids from *Vochysia Pacifica* Interact with Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isozyme PDE4. *Phytotherapy Research* **2005**, *19*, 75–77, doi:https://doi.org/10.1002/ptr.1613.

91. Carnevale Neto, F.; Pilon, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V. da S.; Castro-Gamboa, I. Vochysiaceae: Secondary Metabolites, Ethnopharmacology and Pharmacological Potential. *Phytochem Rev* **2011**, *10*, 413, doi:10.1007/s11101-011-9213-5.
92. Dornelo-Silva, D.; Dianese, J.C. Hyphomycetes on the Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado. *Mycologia* **2003**, *95*, 1239–1251, doi:10.1080/15572536.2004.11833032.
93. Franco, R.R.; Justino, A.B.; Martins, M.M.; Silva, C.G.; Campana, P.R.V.; Lopes, J.C.D.; De Almeida, V.L.; Espindola, F.S. Phytoscreening of Vochysiaceae Species: Molecular Identification by HPLC-ESI-MS/MS and Evaluating of Their Antioxidant Activity and Inhibitory Potential against Human α -Amylase and Protein Glycation. *Bioorganic Chemistry* **2019**, *91*, 103122, doi:10.1016/j.bioorg.2019.103122.
94. Carnevale Neto, F.; Pilon, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V. da S.; Castro-Gamboa, I. Vochysiaceae: Secondary Metabolites, Ethnopharmacology and Pharmacological Potential. *Phytochem Rev* **2011**, *10*, 413–429, doi:10.1007/s11101-011-9213-5.
95. Swenson, U.; Richardson, J.E.; Bartish, I.V. Multi-Gene Phylogeny of the Pantropical Subfamily Chrysophylloideae (Sapotaceae): Evidence of Generic Polyphyly and Extensive Morphological Homoplasy. *Cladistics* **2008**, *24*, 1006–1031, doi:https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00235.x.
96. Swenson, U.; Nylinder, S.; Munzinger, J. Towards a Natural Classification of Sapotaceae Subfamily Chrysophylloideae in Oceania and Southeast Asia Based on Nuclear Sequence Data. *TAXON* **2013**, *62*, 746–770, doi:https://doi.org/10.12705/624.11.
97. Pennington, T.D. Sapotaceae. In *Flowering Plants · Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales*; Kubitzki, K., Ed.; la série de livres The Families and Genera of Vascular Plants; Springer: Berlin, Heidelberg, 2004; pp. 390–421 ISBN 978-3-662-07257-8.
98. Swenson, U.; Anderberg, A.A. Phylogeny, Character Evolution, and Classification of Sapotaceae (Ericales). *Cladistics* **2005**, *21*, 101–130, doi:https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2005.00056.x.
99. Segers, A. Détermination des visiteurs floraux de trois essences ligneuses à haute valeur commerciale : *Baillonella Toxisperma* Pierre, *Azelia Bipindensis* Harms et *Erythrophleum Suaveolens* (Guill. & Perr.) Brenan. 72.
100. Meunier, Q.; Moumbogou, C.; Doucet, J.-L. Les arbres utiles du Gabon. **2015**.
101. Moabi (*Baillonella Toxisperma* Pierre) : Arbre à Usage Multiple de Forêt Dense Humide Du Cameroun. © 2011 International Formulae Group. All rights reserved.
102. Raponda-walker, A.; Sillans, R. Les Plantes Utiles Du Gabon. *Quarterly Journal of Crude Drug Research* **1961**, *1*, 27–27, doi:10.3109/13880206109066644.
103. Ndiade-Bourobou, D. Dynamique spatiale et temporelle de la diversité génétique d'une espèce rare en Afrique Centrale : *Baillonella toxisperma* Pierre (le Moabi). thesis, UM2, 2011.

104. Tapon djou, L.A.; Nyaa, L.B.T.; Tane, P.; Ricciutelli, M.; Quassinti, L.; Bramucci, M.; Lupidi, G.; Ponou, B.K.; Barboni, L. Cytotoxic and Antioxidant Triterpene Saponins from *Butyrospermum Parkii* (Sapotaceae). *Carbohydrate Research* **2011**, *346*, 2699–2704, doi:10.1016/j.carres.2011.09.014.
105. Baky, M.H.; Kamal, A.M.; Elgindi, M.R.; Haggag, E.G. A Review on Phenolic Compounds from Family Sapotaceae. **8**.
106. Nyemb, J.N.; Tchinda, A.T.; Talla, E.; Nanga, E.B.; Ngoudjou, D.T.; Henoumont, C.; Laurent, S.; Iqbal, J.; Mbafor, J.T. Vitellaroside, A New Cerebroside from *Vitellaria Paradoxa* (Sapotaceae) and Its Bioactivities. *Nat Prod Chem Res* **2018**, *06*, doi:10.4172/2475-7675.1000306.
107. Chhabra, S.C.; Mahunnah, R.L.A.; Mshiu, E.N. Plants Used in Traditional Medicine in Eastern Tanzania. VI. Angiosperms (Sapotaceae to Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **1993**, *39*, 83–103, doi:10.1016/0378-8741(93)90024-Y.
108. Saha, J.-B.T.; Abia, D.; Dumarçay, S.; Ndikontar, M.K.; Gérardin, P.; Ngamveng Noah, J.; Perrin, D. Antioxidant Activities, Total Phenolic Contents and Chemical Compositions of Extracts from Four Cameroonian Woods: Padouk (*Pterocarpus Soyauxii* Taubb), Tali (*Erythrophleum Suaveolens*), Moabi (*Baillonella Toxisperma*), and Movingui (*Distemonanthus Benthamianus*). *Industrial Crops and Products* **2013**, *41*, 71–77, doi:10.1016/j.indcrop.2012.04.012.
109. S, H.R.E.; M, A.N.; C, N.F.; S, P.B.T.; F, X.E. In Vitro Evaluation of the Antifungal Activity of Extracts of *Baillonella Toxisperma* (Pierre), a Sapotaceae, on the Growth of Some Human Pathogenic Yeasts. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *9*, 299–306, doi:10.5897/AJPP2014.4243.
110. M, F.; S, P.B.T.; D, E.P.; F, X.E.; Rosin eacute a, A. de P.; Ana, A. eacute a T.B.; S iacute lvia, R.S.M.; Margarete, A.F.S.; C eacute lia, A. de M.; Hil aacute rio, C.M.; et al. In Vitro Antibacterial Activity of *Baillonella Toxisperma* (Pierre) Extracts against *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella Typhi*, *Proteus Mirabilis* and *Bacillus Cereus* F3748. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2015**, *9*, 2088–2094, doi:10.5897/AJMR2015.7656.
111. Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé1, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon; Simo, R.V.; Ateba, S.B.; Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé1, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon; Zingué, S.; Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé1, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon; Department of Life and Earth Sciences, Higher Teachers' Training College, University of Maroua, P.O. Box 55 Maroua, Cameroon; Pieme, C.A.; Department of Biochemistry and Physiological Sciences, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé 1, P.O. Box 1364 Yaoundé, Cameroon; Njamen, D.; et al. *Baillonella Toxisperma* Improves Sexual Performance and Protects against Stress-Induced Reproductive Dysfunction in Male Wistar Rats. *J Phytopharmacol* **2019**, *8*, 117–123, doi:10.31254/phyto.2019.8306.

112. Ohigashi, H.; Kaji, M.; Sakaki, M.; Koshimizu, K. 3-Hydroxyuridine, an Allelopathic Factor of an African Tree, *Baillonella Toxisperma*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1365–1368, doi:10.1016/S0031-9422(00)97747-1.
113. S, H.; Nyegue, M.; C, N.; S, P.; F, X. *In-Vitro* Effects of Almond Oil, Barks and Leaves Extracts of *Baillonella Toxisperma* (Pierre) against *Trichophyton Soudanense* and *Trichophyton Rubrum*. *Journal of Medicinal Plants Research* **2015**, *9*, 892–899, doi:10.5897/JMPR2015.5908.
114. Ndiade-Bourobou, D.; Vaillant, A.; Favreau, B.; Gayrin, E.; Bouvet, J.M. Isolation and Characterization of 15 Nuclear Microsatellite Markers for *Baillonella Toxisperma* Pierre (Sapotaceae), a Low-Density Tree Species of Central Africa. *Molecular Ecology Resources* **2009**, *9*, 1135–1138, doi:https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02543.x.
115. Dettmer, K.; Aronov, P.A.; Hammock, B.D. Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **2007**, *26*, 51–78, doi:10.1002/mas.20108.
116. Dunn, W.B.; Erban, A.; Weber, R.J.M.; Creek, D.J.; Brown, M.; Breitling, R.; Hankemeier, T.; Goodacre, R.; Neumann, S.; Kopka, J.; et al. Mass Appeal: Metabolite Identification in Mass Spectrometry-Focused Untargeted Metabolomics. *Metabolomics* **2013**, *9*, S44–S66, doi:10.1007/s11306-012-0434-4.
117. Leiss, K.A.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R.; Klinkhamer, P.G.L. An Overview of NMR-Based Metabolomics to Identify Secondary Plant Compounds Involved in Host Plant Resistance. *Phytochem Rev* **2011**, *10*, 205–216, doi:10.1007/s11101-010-9175-z.
118. De Vos, R.C.H.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J.J.B.; Bino, R.J.; Hall, R.D. Untargeted Large-Scale Plant Metabolomics Using Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 778–791, doi:10.1038/nprot.2007.95.
119. Lisee, J.; Schauer, N.; Kopka, J.; Willmitzer, L.; Fernie, A.R. Gas Chromatography Mass Spectrometry–Based Metabolite Profiling in Plants. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 387–396, doi:10.1038/nprot.2006.59.
120. Skoog, D.A.; West, D.M. *Chimie analytique*; De Boeck Supérieur, 2015; ISBN 978-2-8041-9071-2.
121. Menet, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires* **2011**, *2011*, 41–53, doi:10.1016/S1773-035X(11)71211-4.
122. Allwood, J.W.; Goodacre, R. An Introduction to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Instrumentation Applied in Plant Metabolomic Analyses. *Phytochem Anal* **2010**, *21*, 33–47, doi:10.1002/pca.1187.
123. Kind, T.; Tsugawa, H.; Cajka, T.; Ma, Y.; Lai, Z.; Mehta, S.S.; Wohlgemuth, G.; Barupal, D.K.; Showalter, M.R.; Arita, M.; et al. Identification of Small Molecules Using Accurate Mass MS/MS Search. *Mass Spectrom Rev* **2018**, *37*, 513–532, doi:10.1002/mas.21535.
124. Scalbert, A.; Brennan, L.; Manach, C.; Andres-Lacueva, C.; Dragsted, L.O.; Draper, J.; Rappaport, S.M.; van der Hooft, J.J.J.; Wishart, D.S. The Food Metabolome: A Window

- over Dietary Exposure. *Am J Clin Nutr* **2014**, *99*, 1286–1308, doi:10.3945/ajcn.113.076133.
125. Simmler, C.; Napolitano, J.G.; McAlpine, J.B.; Chen, S.-N.; Pauli, G.F. Universal Quantitative NMR Analysis of Complex Natural Samples. *Curr Opin Biotechnol* **2014**, *25*, 51–59, doi:10.1016/j.copbio.2013.08.004.
126. Guennec, A.L.; Giraudeau, P.; Caldarelli, S. Evaluation of Fast 2D NMR for Metabolomics. *Anal Chem* **2014**, *86*, 5946–5954, doi:10.1021/ac500966e.
127. Xia, J.; Psychogios, N.; Young, N.; Wishart, D.S. MetaboAnalyst: A Web Server for Metabolomic Data Analysis and Interpretation. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, W652–660, doi:10.1093/nar/gkp356.
128. Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E. “Metabonomics”: Understanding the Metabolic Responses of Living Systems to Pathophysiological Stimuli via Multivariate Statistical Analysis of Biological NMR Spectroscopic Data. *Xenobiotica* **1999**, *29*, 1181–1189, doi:10.1080/004982599238047.
129. Neild, G.H.; Foxall, P.J.; Lindon, J.C.; Holmes, E.C.; Nicholson, J.K. Uroscopy in the 21st Century: High-Field NMR Spectroscopy. *Nephrology Dialysis Transplantation* **1997**, *12*, 404–417, doi:10.1093/ndt/12.3.404.
130. Lane, A.N.; Fan, T.W.-M. NMR-Based Stable Isotope Resolved Metabolomics in Systems Biochemistry. *Arch Biochem Biophys* **2017**, *628*, 123–131, doi:10.1016/j.abb.2017.02.009.
131. Liu, J.; Litt, L.; Segal, M.R.; Kelly, M.J.S.; Yoshihara, H.A.I.; James, T.L. Outcome-Related Metabolomic Patterns from $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ NMR after Mild Hypothermia Treatments of Oxygen-Glucose Deprivation in a Neonatal Brain Slice Model of Asphyxia. *J Cereb Blood Flow Metab* **2011**, *31*, 547–559, doi:10.1038/jcbfm.2010.125.
132. Bingol, K.; Brüsweiler, R. NMR/MS Translator for the Enhanced Simultaneous Analysis of Metabolomics Mixtures by NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry: Application to Human Urine. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 2642–2648, doi:10.1021/acs.jproteome.5b00184.
133. Huang, T.; Chen, P.; Liu, B.; Li, X.; Lv, X.; Hu, K. NPid: An Automatic Approach to Rapid Identification of Known Natural Products in the Crude Extract of Crabapple Based on 2D ^1H – ^{13}C Heteronuclear Correlation Spectra of the Extract Mixture. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 10996–11006, doi:10.1021/acs.analchem.9b05363.
134. Bingol, K.; Brusweiler-Li, L.; Li, D.-W.; Brüsweiler, R. Customized Metabolomics Database for the Analysis of NMR ^1H - ^1H TOCSY and ^{13}C - ^1H HSQC-TOCSY Spectra of Complex Mixtures. *Anal Chem* **2014**, *86*, 5494–5501, doi:10.1021/ac500979g.
135. Markley, J.L.; Brüsweiler, R.; Edison, A.S.; Eghbalnia, H.R.; Powers, R.; Raftery, D.; Wishart, D.S. The Future of NMR-Based Metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* **2017**, *43*, 34–40, doi:10.1016/j.copbio.2016.08.001.
136. Bingol, K.; Brusweiler-Li, L.; Yu, C.; Somogyi, A.; Zhang, F.; Brüsweiler, R. Metabolomics beyond Spectroscopic Databases: A Combined MS/NMR Strategy for the

- Rapid Identification of New Metabolites in Complex Mixtures. *Anal Chem* **2015**, *87*, 3864–3870, doi:10.1021/ac504633z.
137. Ramaswamy, V.; Hooker, J.W.; Withers, R.S.; Nast, R.E.; Brey, W.W.; Edison, A.S. Development of a ¹³C-Optimized 1.5-Mm High Temperature Superconducting NMR Probe. *J Magn Reson* **2013**, *235*, 58–65, doi:10.1016/j.jmr.2013.07.012.
138. Ardenkjaer-Larsen, J.H.; Fridlund, B.; Gram, A.; Hansson, G.; Hansson, L.; Lerche, M.H.; Servin, R.; Thaning, M.; Golman, K. Increase in Signal-to-Noise Ratio of > 10,000 Times in Liquid-State NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 10158–10163, doi:10.1073/pnas.1733835100.
139. Lang, G.; Mayhudin, N.A.; Mitova, M.I.; Sun, L.; van der Sar, S.; Blunt, J.W.; Cole, A.L.J.; Ellis, G.; Laatsch, H.; Munro, M.H.G. Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1595–1599, doi:10.1021/np8002222.
140. Nguyen, D.H.; Nguyen, C.H.; Mamitsuka, H. Recent Advances and Prospects of Computational Methods for Metabolite Identification: A Review with Emphasis on Machine Learning Approaches. *Brief Bioinform* **2019**, *20*, 2028–2043, doi:10.1093/bib/bby066.
141. da Silva, R.R.; Dorrestein, P.C.; Quinn, R.A. Illuminating the Dark Matter in Metabolomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 12549–12550, doi:10.1073/pnas.1516878112.
142. Wolfender, J.-L.; Nuzillard, J.-M.; van der Hooft, J.J.J.; Renault, J.-H.; Bertrand, S. Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography–High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 704–742, doi:10.1021/acs.analchem.8b05112.
143. Blaženović, I.; Kind, T.; Ji, J.; Fiehn, O. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. *Metabolites* **2018**, *8*, E31, doi:10.3390/metabo8020031.
144. Quinn, R.A.; Nothias, L.-F.; Vining, O.; Meehan, M.; Esquenazi, E.; Dorrestein, P.C. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38*, 143–154, doi:10.1016/j.tips.2016.10.011.
145. Wang, M.; Jarmusch, A.K.; Vargas, F.; Aksenov, A.A.; Gauglitz, J.M.; Weldon, K.; Petras, D.; Silva, R. da; Quinn, R.; Melnik, A.V.; et al. *MASST: A Web-Based Basic Mass Spectrometry Search Tool for Molecules to Search Public Data*; Bioinformatics, 2019;
146. Chambers, M.C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D.L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; et al. A Cross-Platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. *Nat Biotechnol* **2012**, *30*, 918–920, doi:10.1038/nbt.2377.
147. Want, E.; Masson, P. Processing and Analysis of GC/LC-MS-Based Metabolomics Data. *Methods Mol Biol* **2011**, *708*, 277–298, doi:10.1007/978-1-61737-985-7_17.

148. Zhou, B.; Xiao, J.F.; Tuli, L.; Resson, H.W. LC-MS-Based Metabolomics. *Mol Biosyst* **2012**, *8*, 470–481, doi:10.1039/c1mb05350g.
149. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry-Based Molecular Profile Data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395, doi:10.1186/1471-2105-11-395.
150. Myers, O.D.; Sumner, S.J.; Li, S.; Barnes, S.; Du, X. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Anal Chem* **2017**, *89*, 8696–8703, doi:10.1021/acs.analchem.7b00947.
151. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry-Based Molecular Profile Data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395, doi:10.1186/1471-2105-11-395.
152. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504, doi:10.1101/gr.1239303.
153. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504, doi:10.1101/gr.1239303.
154. Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; et al. MassBank: A Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for Life Sciences. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45*, 703–714, doi:10.1002/jms.1777.
155. https://Metlin.Scripps.Edu/Landing_page.Php?Pgcontent=mainPage.
156. ReSpec: ReSpec Database for Phytochemicals in WMBEdmands/CompMS2Miner: An Automatable Metabolite Identification, Visualization and Data-Sharing R Package for High-Resolution LC-MS Datasets Available online: <https://rdr.io/github/WMBEdmands/compMS2Miner/man/ReSpec.html> (accessed on 23 February 2022).
157. Fox Ramos, A.; Alcover, C.; Evanno, L.; Maciuk, A.; Litaudon, M.; DUPLAIS, C.; Bernadat, G.; Gallard, J.-F.; Jullian, C.; Mouray, E.; et al. Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*. *Journal of Natural Products* **2017**, *80*, 1007–1014, doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01013.
158. Djéki, J. Espace, territoire et communications au Gabon : analyse des dysfonctionnements des voies de communication en zone équatoriale. *NETCOM : Réseaux, communication et territoires / Networks and communication studies* **1997**, *11*, 300–312, doi:10.3406/netco.1997.1356.

159. Droissart, V. Etude Taxonomique et Biogéographique Des Plantes Endémiques d'Afrique Centrale Atlantique : Le Cas Des Orchidaceae, 2009.
160. Wilks, C. *La conservation des écosystèmes forestiers du Gabon*; IUCN, 1990; ISBN 978-2-88032-988-4.
161. Chambers, M.C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D.L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; et al. A Cross-Platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. *Nat Biotechnol* **2012**, *30*, 918–920, doi:10.1038/nbt.2377.
162. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry-Based Molecular Profile Data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395, doi:10.1186/1471-2105-11-395.
163. Aabed, K.; Mohammed, A.E.; Benabdelkamel, H.; Masood, A.; Alfadda, A.A.; Alanazi, I.O.; Alnehmi, E.A. Antimicrobial Mechanism and Identification of the Proteins Mediated by Extracts from *Asphaltum Punjabinum* and *Myrtus Communis*. *ACS Omega* **2020**, *5*, 31019–31035, doi:10.1021/acsomega.0c04047.
164. Obiang, C.S.; Misso, R.L.N.M.; Atome, G.R.N.; Obame, R.B.M.; Ondo, J.P.; Engonga, L.C.O.; Emvo, E.N. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Study of Extracts of *Guibourtia Tessmanii* (Harms) J. Léonard from Gabon. *Clinical Phytoscience* **2021**, *7*, 45, doi:10.1186/s40816-021-00278-0.
165. BERCHE, (P.); BERCHE (P.); GAILLARD (J.L.); SIMONET (M.) *Bactériologie : Les Bactéries Des Infections Humaines.*; Flammarion : Médecine-Sciences: Paris, 1991;
166. Banso, A.; Adeyemo, S.O.; Jeremiah, P. Antimicrobial Properties of *Vernonia Amygdalina* Extract. *Journal of Applied Science and Management* **1999**, *3*, 9–11.
167. Platel, R.; Chaveriat, L.; Le Guenic, S.; Pipeleers, R.; Magnin-Robert, M.; Randoux, B.; Trapet, P.; Lequart, V.; Joly, N.; Halama, P.; et al. Importance of the C12 Carbon Chain in the Biological Activity of Rhamnolipids Conferring Protection in Wheat against *Zymoseptoria Tritici*. *Molecules* **2021**, *26*, 40, doi:10.3390/molecules26010040.
168. Griffin, S.P.; Bhagooli, R. Measuring Antioxidant Potential in Corals Using the FRAP Assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2004**, *302*, 201–211, doi:10.1016/j.jembe.2003.10.008.
169. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **1995**, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
170. Aljohny, B.O.; Rauf, A.; Anwar, Y.; Naz, S.; Wadood, A. Antibacterial, Antifungal, Antioxidant, and Docking Studies of Potential Dinaphthodiospyrols from *Diospyros Lotus* Linn Roots. *ACS Omega* **2021**, *6*, 5878–5885, doi:10.1021/acsomega.0c06297.
171. Al-Adhroey, A.H.; Al-Abhar, Y.M.; Noman, N.M.; Al-Mekhlafi, H.M. Ethnopharmacological Survey of Herbal Remedies Used for Treating Malaria in Yemen. *Journal of Herbal Medicine* **2020**, *21*, 100332, doi:10.1016/j.hermed.2020.100332.

172. Hachi, M.; Hachi, T.; Belahbib, N.; Dahmani, J.; Zidane, L. [*Contribution to the Study and Floristic Ethnobotany Flora Medicinal Use at the City of Khenifra (Morocco)*];
173. Tjeck, O.P.; Souza, A.; Mickala, P.; Lepengue, A.N.; M'Batchi, B. Bio-Efficacy of Medicinal Plants Used for the Management of Diabetes Mellitus in Gabon: An Ethnopharmacological Approach. *J Intercult Ethnopharmacol* **2017**, *6*, 206–217, doi:10.5455/jice.20170414055506.
174. *Dictionary of Natural Products*; Buckingham, J., Ed.; 1st ed.; Chapman & Hall: London ; New York, 1994; ISBN 978-0-412-46620-5.
175. *Dictionary of Alkaloids with CD-ROM*; Buckingham, J., Baggaley, K.H., Roberts, A.D., Szabo, L.F., Eds.; 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2010; ISBN 978-0-429-14537-7.
176. Goodman, J. Computer Software Review: Reaxys. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2897–2898, doi:10.1021/ci900437n.
177. Ernst, M.; Kang, K.B.; Caraballo-Rodríguez, A.M.; Nothias, L.-F.; Wandy, J.; Chen, C.; Wang, M.; Rogers, S.; Medema, M.H.; Dorrestein, P.C.; et al. MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. *Metabolites* **2019**, *9*, 144, doi:10.3390/metabo9070144.
178. Shannon, P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research* **2003**, *13*, 2498–2504, doi:10.1101/gr.1239303.
179. Han, J.; Ji, C.-J.; He, W.-J.; Shen, Y.; Leng, Y.; Xu, W.-Y.; Fan, J.-T.; Zeng, G.-Z.; Kong, L.-D.; Tan, N.-H. Cyclopeptide Alkaloids from *Ziziphus Apetala*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2571–2575, doi:10.1021/np200755t.
180. Kapadia, G.J.; Shukla, Y.N.; Morton, J.F.; Lloyd, H.A. New Cyclopeptide Alkaloids from *Melochia Tomentosa*. *Phytochemistry* **1977**.
181. Buske, A.; Schmidt, J.; Hoffmann, P. Chemotaxonomy of the Tribe Antidesmeae (Euphorbiaceae): Antidesmone and Related Compounds. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 489–496, doi:10.1016/S0031-9422(02)00117-6.
182. Franco, R.R. Phytoscreening of Vochysiaceae Species_ Molecular Identification by HPLC-ESI-MS/MS and Evaluating of Their Antioxidant Activity and Inhibitory Potential against Human α -Amylase and Protein Glycation. *Bioorganic Chemistry* **2019**, *11*.
183. Elagbar, Z.A.; Shakya, A.K.; Barhoumi, L.M.; Al-Jaber, H.I. Phytochemical Diversity and Pharmacological Properties of *Rhus Coriaria*. *Chemistry & Biodiversity* **2020**, *17*, e1900561, doi:https://doi.org/10.1002/cbdv.201900561.
184. Najdabbasi, N.; Mirmajlessi, S.M.; Dewitte, K.; Landschoot, S.; Mänd, M.; Audenaert, K.; Ameye, M.; Haesaert, G. Biocidal Activity of Plant-Derived Compounds against *Phytophthora Infestans*: An Alternative Approach to Late Blight Management. *Crop Protection* **2020**, *138*, 105315, doi:10.1016/j.cropro.2020.105315.
185. Bocquet, L.; Rivière, C.; Dermont, C.; Samaille, J.; Hilbert, J.-L.; Halama, P.; Siah, A.; Sahpaz, S. Antifungal Activity of Hop Extracts and Compounds against the Wheat

- Pathogen Zymoseptoria Tritici. *Industrial Crops and Products* **2018**, *122*, 290–297, doi:10.1016/j.indcrop.2018.05.061.
186. Mu, H.; Bai, Y.-H.; Wang, S.-T.; Zhu, Z.-M.; Zhang, Y.-W. Research on Antioxidant Effects and Estrogenic Effect of Formononetin from Trifolium Pratense (Red Clover). *Phytomedicine* **2009**, *16*, 314–319, doi:10.1016/j.phymed.2008.07.005.
 187. Ong, S.K.L.; Shanmugam, M.K.; Fan, L.; Fraser, S.E.; Arfuso, F.; Ahn, K.S.; Sethi, G.; Bishayee, A. Focus on Formononetin: Anticancer Potential and Molecular Targets. *Cancers* **2019**, *11*, 611, doi:10.3390/cancers11050611.
 188. Machado Dutra, J.; Espitia, P.J.P.; Andrade Batista, R. Formononetin: Biological Effects and Uses - A Review. *Food Chem* **2021**, *359*, 129975, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129975.
 189. Peng, S.; Hu, C.; Liu, X.; Lei, L.; He, G.; Xiong, C.; Wu, W. Rhoifolin Regulates Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokine Levels in Freund's Adjuvant-Induced Rheumatoid Arthritis via Inhibition of NF-KB. *Braz J Med Biol Res* **2020**, *53*, doi:10.1590/1414-431X20209489.
 190. Scazzocchio, F.; Cometa, M.F.; Tomassini, L.; Palmery, M. Antibacterial Activity of Hydrastis Canadensis Extract and Its Major Isolated Alkaloids. *Planta Med* **2001**, *67*, 561–564, doi:10.1055/s-2001-16493.
 191. El Maaiden, E.; El Kharrassi, Y.; Qarah, N.A.S.; Essamadi, A.K.; Moustaid, K.; Nasser, B. Genus Ziziphus: A Comprehensive Review on Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Properties. *J Ethnopharmacol* **2020**, *259*, 112950, doi:10.1016/j.jep.2020.112950.
 192. Kapadia, G.J.; Shukla, Y.N.; Basak, S.P.; Sokoloski, E.A.; Fales, H.M. The Melosatins—a Novel Class of Alkaloids from Melochia Tomentosa11Part 13 in the Series, Potential Carcinogens. For Part 12 See Ref. 2. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2441–2447, doi:10.1016/0040-4020(80)80221-3.
 193. Bhakuni, R.S.; Shukla, Y.N.; Thakur, R.S. Cyclopeptide Alkaloids from Melochia Corchorifolia. *Phytochemistry* **1986**, *26*, 324–325, doi:10.1016/S0031-9422(00)81541-1.
 194. Arbain, D.; Taylor, W.C. Cyclopeptide Alkaloids from Antidesma Montana. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1263–1266, doi:10.1016/0031-9422(93)85062-V.
 195. Buzgaia, N.; Awin, T.; Elabbar, F.; Abdusalam, K.; Lee, S.Y.; Rukayadi, Y.; Abas, F.; Shaari, K. Antibacterial Activity of Arbutus Pavarii Pamp against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) and UHPLC-MS/MS Profile of the Bioactive Fraction. *Plants* **2020**, *9*, 1539, doi:10.3390/plants9111539.
 196. Itazaki, H.; Nagashima, K.; Kawamura, Y.; Matsumoto, K.; Nakai, H.; Terui, Y. CINATRINS, A NOVEL FAMILY OF PHOSPHOLIPASE A2 INHIBITORS I. TAXONOMY AND FERMENTATION OF THE PRODUCING CULTURE; ISOLATION AND STRUCTURES OF CINATRINS. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 38–49, doi:10.7164/antibiotics.45.38.

197. Lou, S.-N.; Lai, Y.-C.; Hsu, Y.-S.; Ho, C.-T. Phenolic Content, Antioxidant Activity and Effective Compounds of Kumquat Extracted by Different Solvents. *Food Chem* **2016**, *197*, 1–6, doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.096.
198. Sadek, E.S.; Makris, D.P.; Kefalas, P. Polyphenolic Composition and Antioxidant Characteristics of Kumquat (*Fortunella Margarita*) Peel Fractions. *Plant Foods Hum Nutr* **2009**, *64*, 297, doi:10.1007/s11130-009-0140-1.
199. Ma, L.; Tang, L.; Yi, Q. Salvianolic Acids: Potential Source of Natural Drugs for the Treatment of Fibrosis Disease and Cancer. *Frontiers in Pharmacology* **2019**, *10*, 97, doi:10.3389/fphar.2019.00097.
200. Wang, Q.; Hu, Z.; Li, X.; Wang, A.; Wu, H.; Liu, J.; Cao, S.; Liu, Q. Salviachinensines A–F, Antiproliferative Phenolic Derivatives from the Chinese Medicinal Plant *Salvia Chinensis*. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 2531–2538, doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00638.
201. Wibowo, J.T.; Kellermann, M.Y.; Versluis, D.; Putra, M.Y.; Murniasih, T.; Mohr, K.I.; Wink, J.; Engelmann, M.; Praditya, D.F.; Steinmann, E.; et al. Biotechnological Potential of Bacteria Isolated from the Sea Cucumber *Holothuria Leucospilota* and *Stichopus Vastus* from Lampung, Indonesia. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 635, doi:10.3390/md17110635.
202. Callow, R.K.; Taylor, D. a. H. 429. The Cardio-Active Glycosides of *Strophanthus Sarmentosus* P.DC. “Sarmentoside B” and Its Relation to an Original Sarmentobioside. *J. Chem. Soc.* **1952**, 2299–2304, doi:10.1039/JR9520002299.
203. Ames, B.D.; Liu, X.; Walsh, C.T. Enzymatic Processing of Fumiquinazoline F: A Tandem Oxidative-Acylation Strategy for the Generation of Multicyclic Scaffolds in Fungal Indole Alkaloid Biosynthesis. *Biochemistry* **2010**, *49*, 8564–8576, doi:10.1021/bi1012029.
204. Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florêncio, M.H.; Jennings, K.R. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for Their Antioxidant Activity. *Free Radic Res* **2002**, *36*, 1199–1208, doi:10.1080/1071576021000016463.
205. Li, H.; Cao, D.; Yi, J.; Cao, J.; Jiang, W. Identification of the Flavonoids in Mungbean (*Phaseolus Radiatus* L.) Soup and Their Antioxidant Activities. *Food Chemistry* **2012**, *135*, 2942–2946, doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.048.
206. Li, K.; Gao, C.; Li, W. [Study on fragmentation of vitexin and isorhamnetin-3-O-beta-D-rutinoside using electrospray quadrupole time of flight mass spectrometry]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2011**, *36*, 180–184.
207. McCullagh, M.; Pereira, C.A.M.; Yariwake, J.H. Use of Ion Mobility Mass Spectrometry to Enhance Cumulative Analytical Specificity and Separation to Profile 6-C/8-C-Glycosylflavone Critical Isomer Pairs and Known-Unknowns in Medicinal Plants. *Phytochem Anal* **2019**, *30*, 424–436, doi:10.1002/pca.2825.
208. Yan, C.; Liu, H.; Lin, L. Simultaneous Determination of Vitexin and Isoviteixin in Rat Plasma after Oral Administration of *Santalum Album* L. Leaves Extract by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Biomed Chromatogr* **2013**, *27*, 228–232, doi:10.1002/bmc.2780.

209. Zghaib, Z. Etude des effets cytotoxique et antitubuline des imidazoquinoxalines: Etude du mécanisme d'action par une analyse transcriptomique. 213.
210. Essama*, S.H.R.; Nyegue, M.A.; Foe, C.N.; Tamo, S.P.B.; Etoa, F.X. In Vitro Evaluation of the Antifungal Activity of Extracts of *Baillonella Toxisperma* (Pierre), a Sapotaceae, on the Growth of Some Human Pathogenic Yeasts. *AJPP* **2015**, *9*, 299–306, doi:10.5897/AJPP2014.4243.
211. Podolak, I.; Galanty, A.; Sobolewska, D. Saponins as Cytotoxic Agents: A Review. *Phytochem Rev* **2010**, *9*, 425–474, doi:10.1007/s11101-010-9183-z.
212. Kumla, J.; Suwannarach, N.; Tanruean, K.; Lumyong, S. Comparative Evaluation of Chemical Composition, Phenolic Compounds, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tropical Black Bolete Mushroom Using Different Preservation Methods. *Foods* **2021**, *10*, 781, doi:10.3390/foods10040781.
213. Panseeta, P.; Lomchoey, K.; Prabpai, S.; Kongsaree, P.; Suksamrarn, A.; Ruchirawat, S.; Suksamrarn, S. Antiplasmodial and Antimycobacterial Cyclopeptide Alkaloids from the Root of *Ziziphus Mauritiana*. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 909–915, doi:10.1016/j.phytochem.2011.03.003.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : activité antioxydante

A partir de la courbe standard/gamme étalon, puis grâce à la moyenne de la DO de l'échantillon, on peut déterminer les concentrations équivalentes de l'échantillon en Vitamine C ou en Trolox.

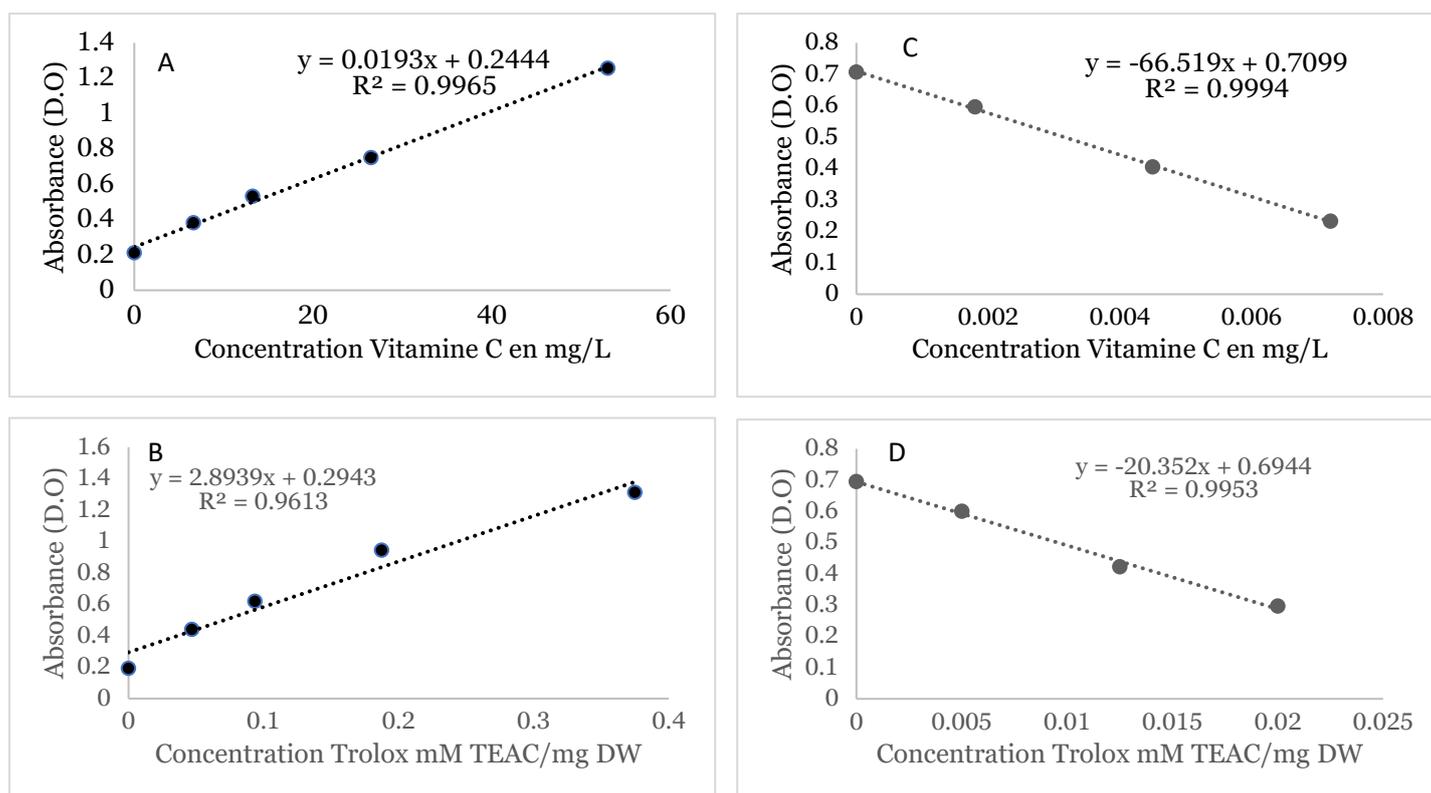


Figure 1 : Equation de régression ayant servi au calcul de la capacité antioxydante de *Erismadelphus exsul* pour les tests du FRAP et DPPH. En A et B test du FRAP standardisé à la Vitamine C et au Trolox. En C et D test DPPH standardisé à la Vitamine C et au Trolox.

Tableau 1 : DO extrait et fraction écorce *Erismadelphus exsul* test DPPH-Vitamine C

<i>Erismadelphus exsul</i> -Ecorces					
Fractions/Extrait	Dilution	DO1	DO2	DO3	Moyenne DO
EE-EtOH	10	0,528	0,53	0,582	0,547
EE- EtOH -F1	10	0,454	0,487	0,494	0,478
EE- EtOH -F2	5	0,285	0,314	0,276	0,292
EE- EtOH -F3	50	0,541	0,544	0,554	0,546
EE- EtOH -F4	100	0,589	0,569	0,538	0,565
EE- EtOH -F5	100	0,451	0,444	0,428	0,441
EE- EtOH -F6	100	0,463	0,456	0,455	0,458
EE- EtOH -F7	100	0,405	0,412	0,403	0,407
EE- EtOH -F8	100	0,406	0,403	0,398	0,402

Tableau 2 : DO extrait et fraction écorce *Erismadelphus exsul* test FRAP-Vitamine C

<i>Erismadelphus exsul</i> -Ecorces					
Fractions/Extrait	Dilution	DO1	DO2	DO3	Moyenne DO
EE- EtOH	100	0,895	1,211	0,952	1,02
EE- EtOH -F1	50	0,425	0,335	0,29	0,35
EE- EtOH -F2	100	1,07	0,86	0,863	0,93
EE- EtOH -F3	100	0,718	0,682	0,672	0,69
EE- EtOH -F4	100	0,873	0,922	0,925	0,91
EE- EtOH -F5	100	0,93	0,954	0,95	0,94
EE- EtOH -F6	100	0,978	0,958	0,951	0,96
EE- EtOH -F7	100	0,984	0,957	0,965	0,97
EE- EtOH -F8	100	0,91	0,845	1,007	0,92

Tableau 3 : DO extrait et fraction feuilles *Erismadelphus exsul* test FRAP-Vitamine C

<i>Erismadelphus exsul</i> Feuilles					
Fractions/Extrait	Dilution	DO1	DO2	DO3	Moyenne DO
EE-EtOH	50	0,966	1,005	0,95	0,97
EE-EtOH -F1	5	1,043	1,072	1,365	1,16
EE-EtOH -F2	5	0,948	1,07	1,078	1,03
EE-EtOH -F3	10	0,974	0,98	1,027	0,99
EE-EtOH -F4	20	0,967	0,97	1,12	1,02
EE-EtOH -F5	20	0,95	1,06	0,987	1,00
EE-EtOH -F6	1	0,786	0,845	0,834	0,82
EE-EtOH -F7	1	0,962	1,004	0,925	0,96

Tableau 4 : DO extrait et fraction feuilles *Erismadelphus exsul* test FRAP-Trolox

<i>Erismadelphus exsul</i> -Ecorces					
Fractions/Extrait	Dilution	DO1	DO2	DO3	Moyenne DO
EE-EtOH	100	0,895	1,211	0,952	1,019
EE-EtOH -F1	50	0,425	0,335	0,29	0,350
EE-EtOH -F2	100	1,07	0,86	0,863	0,931
EE-EtOH -F3	100	0,718	0,682	0,672	0,691
EE-EtOH -F4	100	0,873	0,922	0,925	0,907
EE-EtOH -F5	100	0,93	0,954	0,95	0,945
EE-EtOH -F6	100	0,978	0,958	0,951	0,962
EE-EtOH -F7	100	0,984	0,957	0,965	0,969
EE-EtOH -F8	100	0,91	0,845	1,007	0,921

Tableau 5 : DO extrait et fraction feuilles *Erismadelphus exsul* test FRAP-Trolox

<i>Erismadelphus exsul</i> Feuilles					
Fractions/Extrait	Dilution	DO1	DO2	DO3	Moyenne DO
EE-EtOH	50	0,966	1,005	0,95	0,974
EE-EtOH -F1	5	1,043	1,072	1,365	1,160
EE-EtOH -F2	5	0,948	1,07	1,078	1,032
EE-EtOH -F3	10	0,974	0,98	1,027	0,994
EE-EtOH -F4	20	0,967	0,97	1,12	1,019
EE-EtOH -F5	20	0,95	1,06	0,987	0,999
EE-EtOH -F6	1	0,786	0,845	0,834	0,822
EE-EtOH -F7	1	0,962	1,004	0,925	0,964

Tableau 6 : DO extrait et fraction feuilles *Erismadelphus exsul* test DPPH-Vitamine C

<i>Erismadelphus exsul</i> Feuilles					
Fractions/Extrait	Dilution	DO1	DO2	DO3	Moyenne DO
EE-EtOH	10	0,468	0,461	0,464	0,464
EE-EtOH -F1	10	0,455	0,458	0,455	0,456
EE-EtOH -F2	5	0,261	0,27	0,249	0,26
EE-EtOH -F3	50	0,504	0,493	0,505	0,501
EE-EtOH -F4	50	0,548	0,559	0,601	0,569
EE-EtOH -F5	50	0,48	0,488	0,474	0,481
EE-EtOH -F6	50	0,44	0,46	0,461	0,454
EE-EtOH -F7	50	0,523	0,512	0,523	0,519

Annexe 2 : activité cytotoxique sur les cellules Caco-2 et HaCaT

Les tests de cytotoxicité des extraits éthanoliques ont été réalisés sur quatre plantes (4) : *Eris-madelphus exsul*, *Baillonella toxisperma*, *Erythrophleum ivorensis*, *Guibourtia tessmannii*. Les données brutes obtenues sont présentées sur les tableaux ci-dessus :

Tableau 1 : Données brutes écorces *Erismadelphus exsul* sur les cellules Caco-2

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
104.181013	88.6866699	60.9444171	41.6133792	11.0673881	15.0516478
98.1308411	95.3271028	65.076242	34.5302509	11.0673881	13.1333005
97.6881456	95.1795376	64.6335465	39.9901623	17.8553861	6.19773733
108.512548	86.5048943	61.6198965	52.028522	6.12242009	6.16846963
95.4630948	89.0645768	60.2760738	46.3079439	13.4001121	5.20319282
96.0243576	79.3497859	71.3917197	12.6783659	11.8821723	10.3537731
102.564935	90.2922078	56.2987013	50.1623377	16.461039	15.1948052
101.883117	84.6428571	60.974026	52.3051948	20.4545455	12.4675325
95.5519481	97.2077922	63.0194805	48.1168831	21.2337662	15.5844156

Tableau 2 : tests statistiques *Erismadelphus exsul* écorces sur cellules Caco-2 (Kruskal-Wallis)

Dunn's multiple comparison test	Mean Rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	8,333	No	ns	>0,9999	A-B
CTL vs. 50	17,67	No	ns	0,2581	A-C
CTL vs. 100	27,67	Yes	**	0,0029	A-D
CTL vs. 250	38,00	Yes	****	<0,0001	A-E
CTL vs. 500	41,33	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	9,333	No	ns	>0,9999	B-C
10 vs. 100	19,33	No	ns	0,1370	B-D
10 vs. 250	29,67	Yes	***	0,0009	B-E
10 vs. 500	33,00	Yes	***	0,0001	B-F
50 vs. 100	10,00	No	ns	>0,9999	C-D
50 vs. 250	20,33	No	ns	0,0917	C-E
50 vs. 500	23,67	Yes	*	0,0212	C-F
100 vs. 250	10,33	No	ns	>0,9999	D-E
100 vs. 500	13,67	No	ns	0,9803	D-F
250 vs. 500	3,333	No	ns	>0,9999	E-F

Tableau 3 : Extrait brut écorce *Erismadelphus exsul* sur les cellules HaCaT

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
87.3881204	92.7583401	38.4052075	27.908869	10.3336046	22.0504475
106.102522	94.4670464	38.3238405	28.6411717	16.7615948	18.9585028
106.509357	88.445891	43.2872254	27.5020342	17.0056957	4.39381611
78.3966245	102.447257	32.9113924	28.0168776	15.7805907	26.3291139
90.1265823	107.004219	38.8185654	26.1603376	20.5063291	27.3417722
131.476793	104.978903	43.8818565	24.0506329	19.4092827	22.5316456
91.4739884	80.7080925	35.4046243	26.300578	14.1618497	14.8843931
120.736994	91.9797688	50.7947977	28.3236994	16.9075145	11.9942197
87.7890173	114.884393	44.3641618	28.7572254	13.150289	9.46531792

Tableau 4 : tests statistiques *Erismadelphus exsul* écorces sur cellules HaCaT (Kruskal-Wallis)

Dunn's multiple comparison test	Mean Rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	-0,5556	No	ns	>0,9999	A-B
CTL vs. 50	13,22	No	ns	>0,9999	A-C
CTL vs. 100	22,89	Yes	*	0,0304	A-D
CTL vs. 250	36,44	Yes	****	<0,0001	A-E
CTL vs. 500	34,33	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	13,78	No	ns	0,9480	B-C
10 vs. 100	23,44	Yes	*	0,0236	B-D
10 vs. 250	37,00	Yes	****	<0,0001	B-E
10 vs. 500	34,89	Yes	****	<0,0001	B-F
50 vs. 100	9,667	No	ns	>0,9999	C-D
50 vs. 250	23,22	Yes	*	0,0261	C-E
50 vs. 500	21,11	No	ns	0,0663	C-F
100 vs. 250	13,56	No	ns	>0,9999	D-E
100 vs. 500	11,44	No	ns	>0,9999	D-F
250 vs. 500	-2,111	No	ns	>0,9999	E-F

Tableau 5 : Extrait brut feuilles *Erismadelphus exsul* sur les cellules Caco-2

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
95.1027547	104.678618	88.2815916	85.0021863	42.8946218	35.024049
103.366856	101.530389	95.7586358	95.3651071	39.6152164	33.9746393
101.530389	104.809794	94.5780498	93.7909926	50.3716659	29.3834718
72.5872789	100.759049	60.0176113	97.918111	36.5552839	16.5602473
110.358018	102.542116	109.787748	99.5767279	63.5124354	9.54025344
117.054703	76.0774682	110.390982	85.0299683	58.9059086	10.732618
84.9647391	107.64457	69.9858956	64.4851904	31.0578279	14.471086
103.413258	115.51481	78.448519	69.4781382	34.7813822	21.5796897
111.622003	104.174894	73.6248237	75.6558533	45.6981664	22.2566996

Tableau 6 : tests statistiques *Erismadelphus exsul* feuilles sur cellules Caco-2 (Kruskal-Wallis)

Dunn's multiple comparison test	Mean Rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	-2,000	No	ns	>0,9999	A-B
CTL vs. 50	8,611	No	ns	>0,9999	A-C
CTL vs. 100	11,28	No	ns	>0,9999	A-D
CTL vs. 250	27,17	Yes	**	0,0037	A-E
CTL vs. 500	35,61	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	10,61	No	ns	>0,9999	B-C
10 vs. 100	13,28	No	ns	>0,9999	B-D
10 vs. 250	29,17	Yes	**	0,0013	B-E
10 vs. 500	37,61	Yes	****	<0,0001	B-F
50 vs. 100	2,667	No	ns	>0,9999	C-D
50 vs. 250	18,56	No	ns	0,1852	C-E
50 vs. 500	27,00	Yes	**	0,0041	C-F
100 vs. 250	15,89	No	ns	0,4823	D-E
100 vs. 500	24,33	Yes	*	0,0155	D-F
250 vs. 500	8,444	No	ns	>0,9999	E-F

Tableau 7 : Extrait brut feuilles *Erismadelphus exsul* sur les cellules HaCaT

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
90.6925881	94.1919806	94.3377886	79.1737546	26.9015796	17.6427704
106.148238	97.545565	73.0498177	74.945322	27.8493317	19.8298906
103.159174	102.940462	95.8687728	72.6123937	23.4021871	18.1530984
103.202847	98.7544484	102.846975	85.1423488	41.8149466	21.4412811
101.245552	88.8790036	88.1672598	85.8540925	41.2811388	24.3772242
95.5516014	96.6192171	98.7544484	87.366548	48.8434164	27.9359431
109.867593	95.1854694	91.0268003	88.8108583	22.8424793	3.02787321
89.5232643	112.686014	95.8580795	91.6847889	28.0558846	9.32855246
100.609143	86.5210173	93.6275488	79.1077149	21.9667349	2.49045673

Tableau 8 : tests statistiques *Erismadelphus exsul* feuilles sur cellules HaCaT (ANOVA)

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	2,964	-8,461 to 14,39	No	ns	0,9713	A-B
CTL vs. 50	7,385	-4,040 to 18,81	No	ns	0,4039	A-C
CTL vs. 100	17,26	5,831 to 28,68	Yes	***	0,0006	A-D
CTL vs. 250	68,56	57,14 to 79,99	Yes	****	<0,0001	A-E
CTL vs. 500	83,97	72,55 to 95,40	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	4,421	-7,005 to 15,85	No	ns	0,8585	B-C
10 vs. 100	14,29	2,867 to 25,72	Yes	**	0,0067	B-D
10 vs. 250	65,60	54,17 to 77,02	Yes	****	<0,0001	B-E
10 vs. 500	81,01	69,59 to 92,44	Yes	****	<0,0001	B-F
50 vs. 100	9,871	-1,554 to 21,30	No	ns	0,1263	C-D
50 vs. 250	61,18	49,75 to 72,60	Yes	****	<0,0001	C-E
50 vs. 500	76,59	65,16 to 88,02	Yes	****	<0,0001	C-F
100 vs. 250	51,30	39,88 to 62,73	Yes	****	<0,0001	D-E
100 vs. 500	66,72	55,29 to 78,14	Yes	****	<0,0001	D-F
250 vs. 500	15,41	3,989 to 26,84	Yes	**	0,0028	E-F

Tableau 9 : Extrait brut écorce *Baillonella toxisperma* sur les cellules Caco-2

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
98.7103906	86.440678	45.431098	20.3389831	3.31613854	10.3905674
102.358143	90.1989683	45.0994842	24.3183493	7.29550479	11.0537951
98.9314665	94.6204864	50.7369197	25.8658806	6.74281503	3.97936625
85.2319713	79.2173058	42.8439143	22.2333957	4.85455399	0
91.3874227	100.519643	36.370126	21.4634569	6.90805468	0.99034113
123.380606	80.7461202	45.7075425	19.3145175	14.9726283	0.61213843
87.4037573	85.9254697	32.2451494	32.3375423	6.92947336	12.750231
100.52356	100.246381	39.0822298	28.2722513	8.8697259	12.473052
112.072682	100.153988	45.8269172	35.2017247	9.33169079	12.1034801

Tableau 10 : tests statistiques écorces de *Baillonella toxisperma* sur cellules Caco-2 (Kruskal-Wallis)

Dunn's multiple comparison test	Mean Rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	4,111	No	ns	>0,9999	A-B
CTL vs. 50	15,78	No	ns	0,5007	A-C
CTL vs. 100	24,33	Yes	*	0,0155	A-D
CTL vs. 250	38,11	Yes	****	<0,0001	A-E
CTL vs. 500	38,00	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	11,67	No	ns	>0,9999	B-C
10 vs. 100	20,22	No	ns	0,0959	B-D
10 vs. 250	34,00	Yes	****	<0,0001	B-E
10 vs. 500	33,89	Yes	****	<0,0001	B-F
50 vs. 100	8,556	No	ns	>0,9999	C-D
50 vs. 250	22,33	Yes	*	0,0390	C-E
50 vs. 500	22,22	Yes	*	0,0410	C-F
100 vs. 250	13,78	No	ns	0,9480	D-E
100 vs. 500	13,67	No	ns	0,9803	D-F
250 vs. 500	-0,1111	No	ns	>0,9999	E-F

Tableau 11 : Extrait brut écorce *Baillonella toxisperma* sur les cellules HaCaT

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
100.777832	90.0583374	23.6266407	17.6470588	12.7613029	13.4175984
98.6631016	84.4433641	24.5746232	18.1575109	14.2197375	12.2508508
100.559067	92.610598	31.7938746	17.2824502	13.8551288	12.5425377
89.7073922	81.7761807	22.9466119	20.0975359	16.0164271	16.9404517
105.030801	86.8583162	24.6406571	16.4014374	15.4774127	16.1704312
105.261807	78.0030801	32.6488706	22.4845996	16.5554415	20.25154
91.2787298	93.4047968	19.4233065	12.844888	4.05322453	5.90172214
104.516779	83.5385895	17.7839692	12.4084604	4.97064008	6.60065478
104.204491	68.5110841	22.1190059	9.61589995	9.68308887	8.39502301

Tableau 12 : tests statistiques écorces de *Baillonella toxisperma* sur cellules HaCaT (Kruskal-Wallis)

Dunn's multiple comparison test	Mean Rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	7,889	No	ns	>0,9999	A-B
CTL vs. 50	18,33	No	ns	0,2015	A-C
CTL vs. 100	30,22	Yes	***	0,0007	A-D
CTL vs. 250	38,00	Yes	****	<0,0001	A-E
CTL vs. 500	37,22	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	10,44	No	ns	>0,9999	B-C
10 vs. 100	22,33	Yes	*	0,0390	B-D
10 vs. 250	30,11	Yes	***	0,0007	B-E
10 vs. 500	29,33	Yes	**	0,0011	B-F
50 vs. 100	11,89	No	ns	>0,9999	C-D
50 vs. 250	19,67	No	ns	0,1201	C-E
50 vs. 500	18,89	No	ns	0,1630	C-F
100 vs. 250	7,778	No	ns	>0,9999	D-E
100 vs. 500	7,000	No	ns	>0,9999	D-F
250 vs. 500	-0,7778	No	ns	>0,9999	E-F

Tableau 13 : Extrait brut écorce *Erythrophleum ivorensis* sur les cellules Caco-2

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
96.6216216	115.202703	107.31982	107.77027	36.1486486	13.8513514
96.509009	112.837838	103.828829	98.7612613	45.3828829	8.44594595
106.869369	107.995495	109.009009	101.238739	45.6081081	16.6666667
85.4437986	136.224363	101.183366	117.887085	1.65547884	0
81.6897747	152.497912	113.794038	109.83386	18.6520033	0
132.866427	121.228945	142.503733	91.3603777	31.3605039	0
92.124945	116.937967	92.7848658	102.155741	17.157941	19.1377035
100.8359	115.222173	91.8609767	105.58733	29.9604048	18.2138143
107.039155	97.4043115	100.703916	97.1403432	36.0316762	20.9854817

Tableau 14 : tests statistiques écorces de *Erythrophleum ivorensis* sur cellules Caco-2 (Kruskal-Wallis)

Dunn's multiple comparison test	Mean Rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	-15,56	No	ns	0,5390	A-B
CTL vs. 50	-5,778	No	ns	>0,9999	A-C
CTL vs. 100	-4,667	No	ns	>0,9999	A-D
CTL vs. 250	17,22	No	ns	0,3032	A-E
CTL vs. 500	23,78	Yes	*	0,0202	A-F
10 vs. 50	9,778	No	ns	>0,9999	B-C
10 vs. 100	10,89	No	ns	>0,9999	B-D
10 vs. 250	32,78	Yes	***	0,0001	B-E
10 vs. 500	39,33	Yes	****	<0,0001	B-F
50 vs. 100	1,111	No	ns	>0,9999	C-D
50 vs. 250	23,00	Yes	*	0,0289	C-E
50 vs. 500	29,56	Yes	**	0,0010	C-F
100 vs. 250	21,89	Yes	*	0,0474	D-E
100 vs. 500	28,44	Yes	**	0,0019	D-F
250 vs. 500	6,556	No	ns	>0,9999	E-F

Tableau 15 : Extrait brut écorce *Erythrophleum ivorensis* sur les cellules HaCaT

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
89.4482091	46.0793804	45.1113262	33.6882865	21.2971926	17.4249758
104.065828	50.6292352	59.4385286	37.9477251	13.1655373	23.1364956
106.485963	49.9515973	57.4056147	35.0435624	11.1326234	17.1345595
98.871734	44.804038	34.5605701	31.175772	22.5356295	17.9928741
103.859857	43.3788599	31.888361	21.7339667	22.4465558	14.9643705
97.2684086	46.5855107	33.0463183	26.4548694	19.9524941	25.0296912
95.191524	52.1597392	35.0448248	27.9543602	12.0619397	12.9584352
91.5240424	50.7742461	39.7718011	23.797881	15.4849226	9.45395273
113.284434	55.0937245	42.8687857	32.8443358	12.3879381	13.5289324

Tableau 16 : tests statistiques écorces de *Erythrophleum ivorensis* sur cellules HaCaT (ANOVA)

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	51,17	42,06 to 60,28	Yes	****	<0,0001	A-B
CTL vs. 50	57,87	48,76 to 66,99	Yes	****	<0,0001	A-C
CTL vs. 100	69,93	60,82 to 79,04	Yes	****	<0,0001	A-D
CTL vs. 250	83,28	74,17 to 92,39	Yes	****	<0,0001	A-E
CTL vs. 500	83,15	74,04 to 92,27	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	6,702	-2,411 to 15,82	No	ns	0,2647	B-C
10 vs. 100	18,76	9,644 to 27,87	Yes	****	<0,0001	B-D
10 vs. 250	32,11	23,00 to 41,22	Yes	****	<0,0001	B-E
10 vs. 500	31,98	22,87 to 41,09	Yes	****	<0,0001	B-F
50 vs. 100	12,06	2,942 to 21,17	Yes	**	0,0035	C-D
50 vs. 250	25,41	16,29 to 34,52	Yes	****	<0,0001	C-E
50 vs. 500	25,28	16,17 to 34,39	Yes	****	<0,0001	C-F
100 vs. 250	13,35	4,240 to 22,47	Yes	***	0,0010	D-E
100 vs. 500	13,22	4,111 to 22,34	Yes	**	0,0011	D-F
250 vs. 500	-0,1288	-9,242 to 8,984	No	ns	>0,9999	E-F

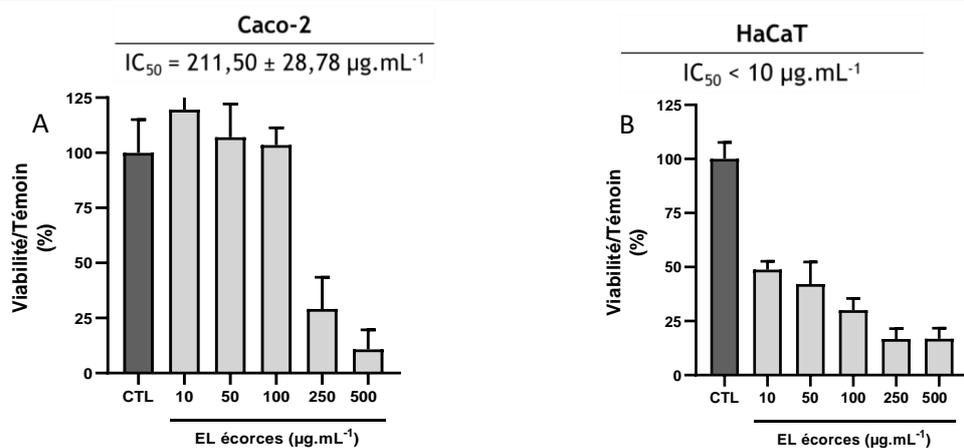


Figure 2 : Cytotoxicité des écorces de *Erythrophleum ivorensis* sur les cellules Caco-2 (A) et HaCaT (B)

Tableau 17 : Extrait brut écorce *Guibourtia tessmannii* sur les cellules Caco-2

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
94.1449482	106.890396	81.0781864	80.7568725	45.0910389	21.3138165
103.24884	99.7143877	84.9339522	78.9360943	57.9435916	7.49732238
102.606212	106.569082	95.9657265	77.5437344	58.2649054	12.4241342
82.7683118	106.130075	120.210355	72.9459016	25.9954817	10.7652003
98.9897041	97.8285316	112.684425	118.556142	29.5226697	9.47063743
118.241984	90.9189477	131.851282	85.9711773	48.8917661	6.53130862
100.923191	87.5184638	87.0753323	73.0059084	34.8966027	23.042836
99.0398818	107.127031	85.745938	87.4076809	46.0856721	23.3751846
100.036928	100.369276	80.6499261	92.1713442	43.7592319	21.6026588

Tableau 18 : tests statistiques écorces de *Guibourtia tessmannii* sur cellules Caco-2 (Kruskal-Wallis)

Dunn's multiple comparison test	Mean Rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	-1,333	No	ns	>0,9999	A-B
CTL vs. 50	4,000	No	ns	>0,9999	A-C
CTL vs. 100	12,22	No	ns	>0,9999	A-D
CTL vs. 250	26,22	Yes	**	0,0061	A-E
CTL vs. 500	35,22	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	5,333	No	ns	>0,9999	B-C
10 vs. 100	13,56	No	ns	>0,9999	B-D
10 vs. 250	27,56	Yes	**	0,0030	B-E
10 vs. 500	36,56	Yes	****	<0,0001	B-F
50 vs. 100	8,222	No	ns	>0,9999	C-D
50 vs. 250	22,22	Yes	*	0,0410	C-E
50 vs. 500	31,22	Yes	***	0,0004	C-F
100 vs. 250	14,00	No	ns	0,8859	D-E
100 vs. 500	23,00	Yes	*	0,0289	D-F
250 vs. 500	9,000	No	ns	>0,9999	E-F

Tableau 8 : Extrait brut écorce *Guibourtia tessmannii* sur les cellules HaCaT

CTL	10 µg.mL ⁻¹	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹
100.744544	99.6662388	69.4736842	72.7086008	22.7214377	19.8716303
97.5096277	101.052632	84.1078306	80.4878049	26.1874198	16.5596919
101.745828	91.1938383	99.0500642	69.2426187	24.8780488	19.1784339
96.1638032	89.8799718	66.0861379	70.6048482	21.5344787	21.1814545
95.9519887	104.495175	68.5573076	75.6883973	25.8413744	16.2391151
107.884208	107.319369	79.5716639	73.2878324	24.4292775	15.1094375
96.5268554	102.436502	89.5684875	67.3304921	21.3240031	13.1604477
98.7080228	99.2731098	93.6779214	73.2872342	19.3839339	11.5709558
104.765122	98.0299327	87.5626274	70.4164597	21.8943216	13.1273684

Tableau 18 : tests statistiques écorces de *Guibourtia tessmannii* sur cellules HaCaT (Kruskal-Wallis)

Dunn's multiple comparison test	Mean Rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
CTL vs. 10	-0,3333	No	ns	>0,9999	A-B
CTL vs. 50	14,44	No	ns	0,7718	A-C
CTL vs. 100	19,00	No	ns	0,1561	A-D
CTL vs. 250	31,00	Yes	***	0,0004	A-E
CTL vs. 500	39,56	Yes	****	<0,0001	A-F
10 vs. 50	14,78	No	ns	0,6945	B-C
10 vs. 100	19,33	No	ns	0,1370	B-D
10 vs. 250	31,33	Yes	***	0,0004	B-E
10 vs. 500	39,89	Yes	****	<0,0001	B-F
50 vs. 100	4,556	No	ns	>0,9999	C-D
50 vs. 250	16,56	No	ns	0,3839	C-E
50 vs. 500	25,11	Yes	*	0,0106	C-F
100 vs. 250	12,00	No	ns	>0,9999	D-E
100 vs. 500	20,56	No	ns	0,0836	D-F
250 vs. 500	8,556	No	ns	>0,9999	E-F

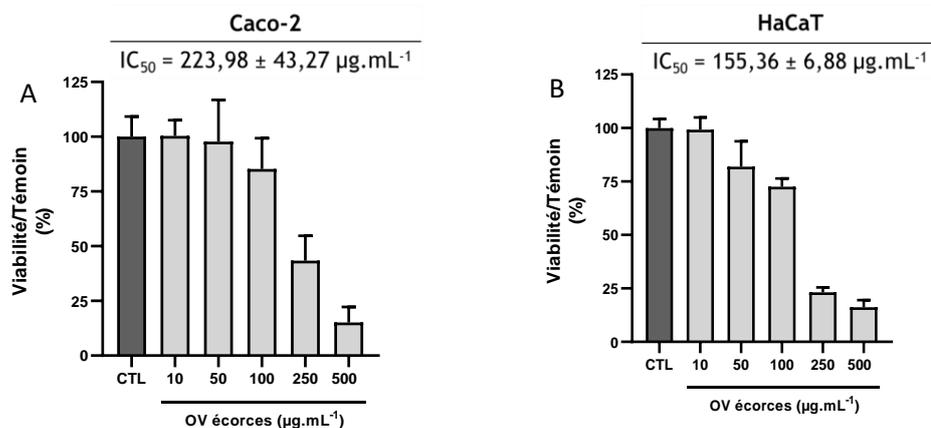


Figure 3 : Cytotoxicité des écorces de *Guibourtia tessmannii* sur les cellules Caco-2 (A) et HaCaT (B)

Annexe 3 : Activité antimicrobienne *Guibourtia tessmannii*

Tableau 19 : Activité antibactérienne de *Guibourtia tessmannii* « Diamètres d'inhibition DZI »

Extraits/Fractions/ATB <i>Guibourtia tessmannii</i>	Zone d'inhibition (mm)					
	Bactéries/Levures					
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR	<i>Salmonella enterica</i>	<i>E. coli</i> BLSE	<i>Candida albicans</i>
OV MeOH ^a	18,67 ± 0,47	21,33 ± 0,47	14 ± 0,82	19 ± 0,82	31 ± 0,82	17,33 ± 0,47
OV MeOH F1 ^a	Na	Na	Na	8 ± 0,00	Na	8 ± 0,00
OV MeOH F2 ^a	10 ± 0,00	13 ± 0,00	Na	11 ± 0,00	Na	9 ± 0,00
OV MeOH F3 ^a	Na	Na	9,33 ± 0,47	Na	Na	Na
OV MeOH F4 ^a	19,33 ± 0,47	Na	10 ± 0,00	14 ± 0,82	Na	Na
OV MeOH F5 ^a	11 ± 0,82	Na	12,33 ± 0,47	9,33 ± 0,47	11,33 ± 0,94	Na
OV MeOH F6 ^a	Na	Na	10,33 ± 0,47	Na	Na	Na
Amoxicilline	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Fosfomycine	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Gentamycine	30 ± 0,00	23 ± 0,00	21 ± 0,00	22,33 ± 0,47	22 ± 0,00	20,33 ± 0,47
Tétracycline	Na	Na	12 ± 0,00	Na	Na	Na
Ticaraciline	19,33 ± 0,47	21,33 ± 0,47	20 ± 0,00	20 ± 0,00	Na	Na
Céfoxime+Ac Clav	10 ± 0,00	23 ± 0,00	14 ± 0,00	Na	12,33 ± 0,47	Na
Témoin DMSO 30%	Na	Na	Na	Na	Na	Na

Na = Not active ; a = Concentration testé 50mg/ml ; OV = *Guibourtia tessmannii* ; MeOH = extrait méthanolique ; EtOH = Extrait éthanologique

Tableau 20 : Activité antibactérienne de *Guibourtia tessmannii* « Concentration minimale bactéricide et bactériostatique CMI/CMB »

Extraits/fractions <i>Guibourtia tessmannii</i>	CMI/CMB en mg/ml											
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i> ATCC 8739		<i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR		<i>Salmonella enterica</i>		<i>E. coli</i> BLSE		<i>Candida albicans</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
OV MeOH ^a	0,625	5	0,62	5	0,3125	5	1,25	5	0,3125	5	0,625	5
OV MeOH F1 ^a	1,25	5	1,25	5	1,25	2,5	0,3125	2,5	1,25	5	0,3125	5
OV MeOH F3 ^a	0,625	2,5	1,25	5	1,25	5	0,3125	2,5	0,625	5	1,25	2,5
OV MeOH F5 ^a	1,25	2,5	2,5	> 5	1,25	5	2,5	> 5	0,625	2,5	2,5	2,5
OV MeOH F6 ^a	0,625	> 5	0,31	> 5	2,5	> 5	1,25	> 5	1,25	2,5	2,5	> 5
DMSO 30%	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na

Annexe 4 : Etudes chimiques *Guibourtia tessmannii* (Oveng)

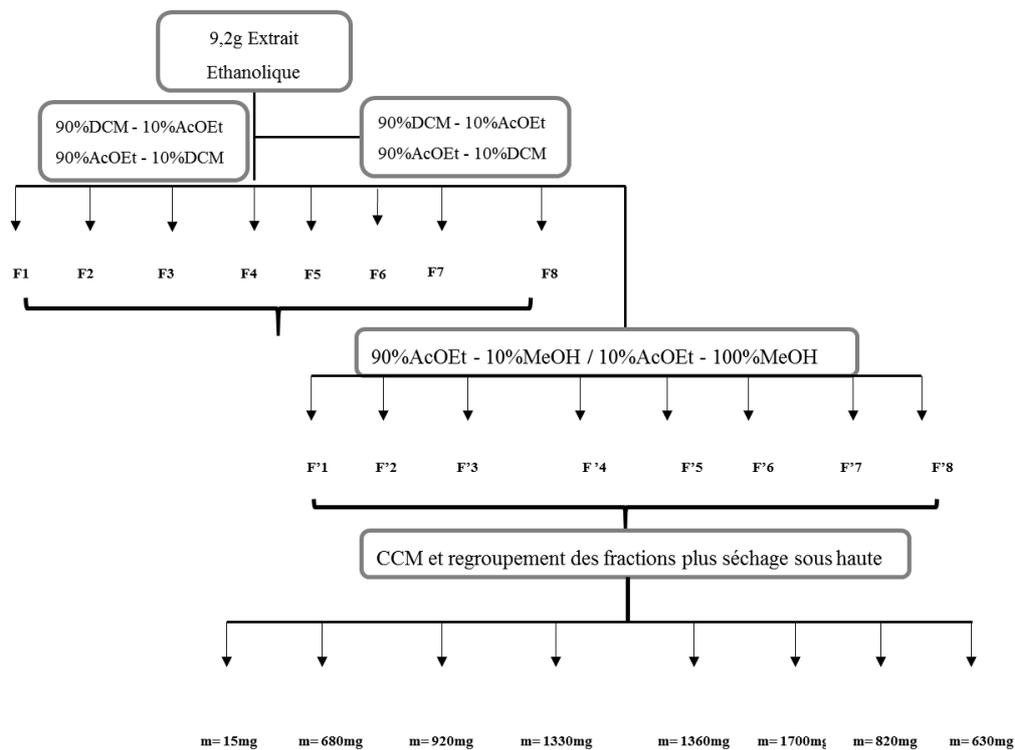


Figure 4 : Schéma extraction et fractionnement de *Guibourtia tessmannii*

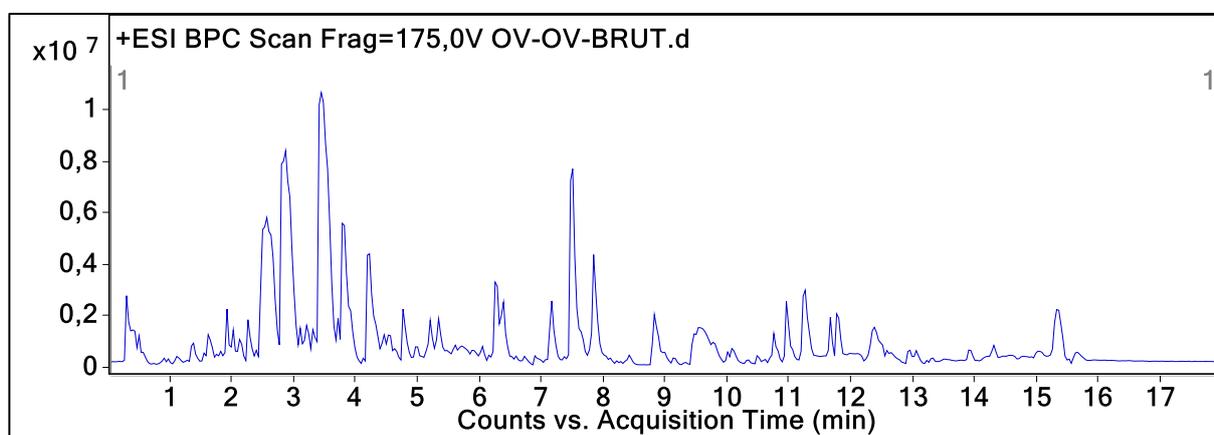


Figure 5 : Analyses par CLHP-UV-MS de l'extrait brut éthanologique de *Guibourtia tessmannii*
ESI (+), m/z 100-1200, UV : λ 280 nm, élution sur colonne Sunfire® C18

Tableau 21 : Déréplication extrait brut *Guibourtia tessmannii*

Fb [M+H]	m/z	Score (%)	RT (min)	Diff (ppm)	Nom	Source
C ₁₄ H ₁₈ O ₈	315,1074	94,74	1,352	-0,27	Cuneataside A	Sargentodoxa cuneata
C ₂₂ H ₃₁ NO ₁₀	470,2021	99,89	1,352	-0,03	Nd	Nd
C ₉ H ₁₂ O ₄	185,0810	99,94	1,623	-0,19	2-Alkyl-4-(hydroxymethyl) -3-furancarboxylic acids	Streptomyces coelicolor
C ₂₀ H ₂₂ O ₈	391,1389	99,38	1,623	-0,34	Abruquinone	Abrus precatorius
C ₉ H ₁₂ O ₄	185,0810	98,43	1,927	-2,21	2-Alkyl-4-(hydroxymethyl) -3-furancarboxylic acids	Streptomyces coelicolor
C ₁₄ H ₁₆ N ₇ O ₃	331,1390	96,33	1,927	-0,85	Nd	Nd
C ₇ H ₆ O ₃	139,0392	98,85	2,029	-1,81	2,3-Dihydroxybenzaldehyde	Nd
C ₁₇ H ₁₂ N ₄ O ₂	305,1024	96,17	2,029	2,81	Alloxazine	Nd
C ₂₁ H ₂₀ N ₇ O ₆	467,1551	95,57	2,029	-0,63	Nd	Nd
C ₁₄ H ₁₂ O ₄	245,0811	99,17	2,130	-1,11	8-Acetyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinone ; Et ether	Polygonum cuspidatum
C ₂₆ H ₂₀ N ₇ O ₆	448,1758	99,19	2,130	-0,78	Nd	Nd
C ₁₄ H ₁₆ O ₄	249,1124	98,22	2,265	-0,88	2-Alkyl-5,7-dihydroxy-4 benzopyran-4-ones	Nd
C ₁₄ H ₁₂ O ₃	229,0865	98,28	2,570	-2,52	Angenomalin	Nd
C ₂₀ H ₂₂ O ₈	391,1392	98,53	2,570	-1,11	Abruquinone 8-Methoxy	Abrus precatorius
C ₁₆ H ₁₄ O ₄	259,0969	98,64	2,875	-1,37	Nd	Nd
C ₂₀ H ₁₈ N ₇ O ₄	421,1493	97,73	2,875	-0,37	Nd	Nd
C ₁₅ H ₁₄ O ₃	243,1020	99,14	3,450	-1,42	1-(3,4-Dihydroxyphenyl) -2-(3-hydroxyphenyl) ethylene	Nd
C ₂₀ H ₁₈ N ₇ O ₃	405,1545	97,82	3,450	-0,68	Nd	Nd
C ₂₅ H ₂₂ N ₁₄ O ₃	567,2073	93,30	3,450	-0,29	Nd	Nd
C ₁₆ H ₁₆ O ₃	257,1175	98,68	4,195	-0,81	14-Abeo-1,3,5,9-furanoeremophilatetraene-9,13-diol	Senecio canescens
C ₂₂ H ₂₆ O ₇	403,1755	97,78	4,195	-0,80	14-Abeo-5,9-furanoeremophiladiene-2,9,14-triol	Senecio lydenburgensis
C ₂₉ H ₃₂ N ₄ O ₈	565,2289	98,44	4,195	0,78	Saframycin A ; 25-Alcohol (1)	Rhodococcus amidophilus
C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301,0710	96,70	4,466	-0,88	2-Acetyl-8-hydroxynaphtho[2,3-furan-4,9-] dione	Tabebuia ochracea
C ₁₆ H ₃₇ N ₇ O ₁₅	568,2389	43,60	4,466	4,05	Nd	Nd
C ₂₆ H ₄₅ NO ₁₀	532,3114	92,56	5,346	-0,35	Nd	Nd
C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	318,3002	98,91	6,056	0,13	2-Amino-15-methyl-1,3,4-heptadecanetriol	Nd
C ₂₉ H ₄₄ NO ₄	457,3311	89,85	6,056	0,51	Nd	Nd
C ₂₉ H ₄₄ ClN	289,2532	47,54	6,293	0,16	Nd	Nd
C ₁₉ H ₁₆ N ₄	301,1438	96,50	7,173	3,09	Nd	Nd
C ₃₀ H ₄₇ O ₇	520,3401	98,46	7,173	-1,04	Nd	Nd
C ₁₆ H ₁₅ NO	238,1228	99,54	7,478	-0,74	Nd	Nd
C ₃₃ H ₅₅ N ₁₂ O ₅	698,4325	98,70	7,478	1,11	Nd	Nd
C ₁₇ H ₁₈ O ₃	271,1333	99,26	7,850	-1,31	14-Abeo-1,3,5,9-furanoeremophilatetraene-9,14-diol	Senecio coronatus
C ₂₂ H ₄₅ N ₂ O ₄	452,3220	99,24	7,850	-0,42	Nd	Nd
C ₂₀ H ₃₂ O ₃	321,2425	95,63	8,831	0,16	18(4-3) -Abeo-15-hydroxy-1,7-cembradiene-4,10-dione	Nd
C ₃₀ H ₄₆ O ₃	455,3521	99,20	8,831	-0,41	18(13-12)-Abeo-3-hydroxylanosta-7,12(18),24-trien-26-oic acid	Nd
C ₃₉ H ₅₄ O ₇	635,3946	99,08	8,831	-0,48	Dichapetalin C ; 11,12-Dihydro	Dichapetalum madagascariense
C ₂₈ H ₃₅ O ₅	452,2559	99,65	10,761	-0,27	Nd	Nd
C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	593,2757	97,92	10,761	0,21	Chlorocruoroporphyrin ; Di-Me ester	Nd
C ₁₆ H ₃₅ NO	258,2794	86,06	11,269	-1,18	Nd	Nd
C ₂₈ H ₄₈ N ₄	441,3945	98,66	11,269	1,64	Nd	Nd
C ₃₈ H ₆₄ N ₇ O ₅	699,5033	97,72	11,269	1,12	Nd	Nd
C ₂₀ H ₃₆ N ₆ O ₆	457,2773	97,56	11,675	-1,08	Nd	Nd
C ₃₃ H ₅₂ N ₆ O ₆	629,4027	97,97	11,810	-0,96	Nd	Nd

Annexe 5 : Analyses RMN des composés purifiés

Analyses RMN composé isolé de *Guibourtia tessmannii* (en cours d'élucidation)

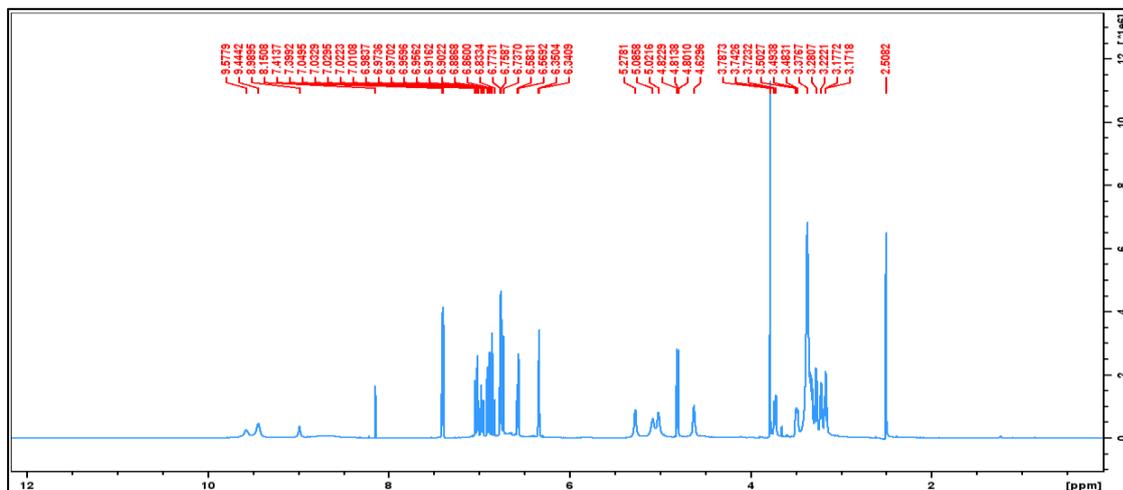


Figure 6: Spectre RMN ^1H composé G1 (MeOH d4, 600 MHz)

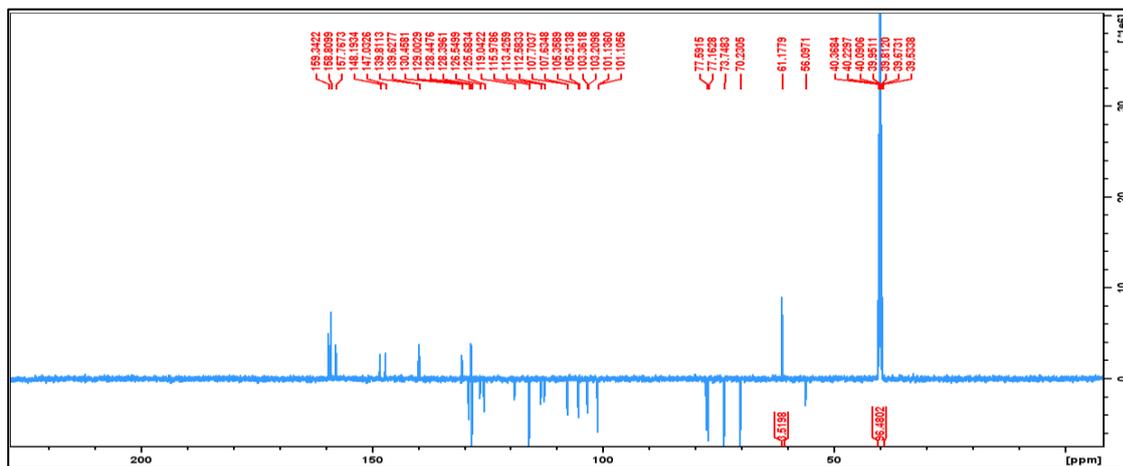


Figure 7: Spectre RMN ^{13}C composé G1 (MeOH d4, 600 MHz)

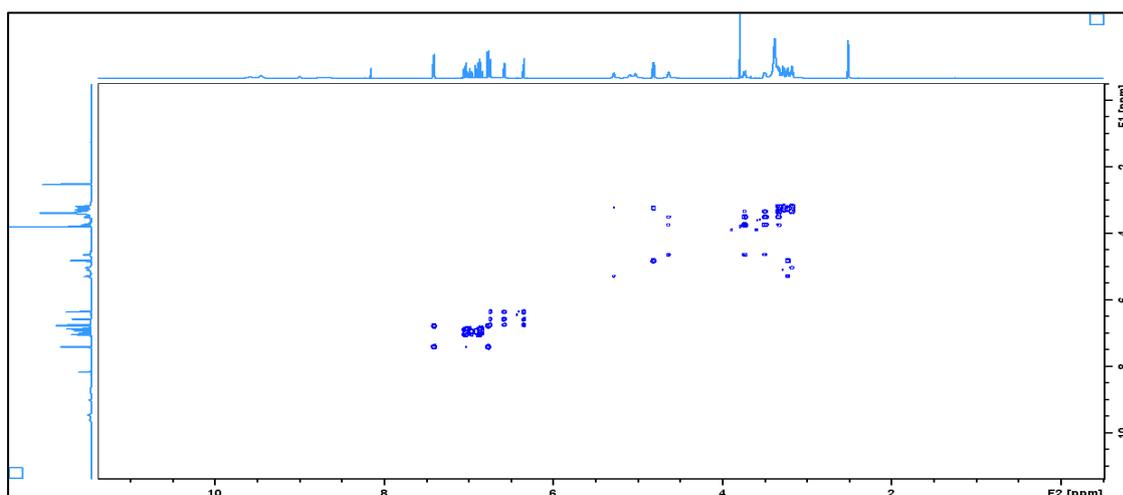


Figure 8: Spectre RMN COSY composé G1 (MeOH d4, 600 MHz)

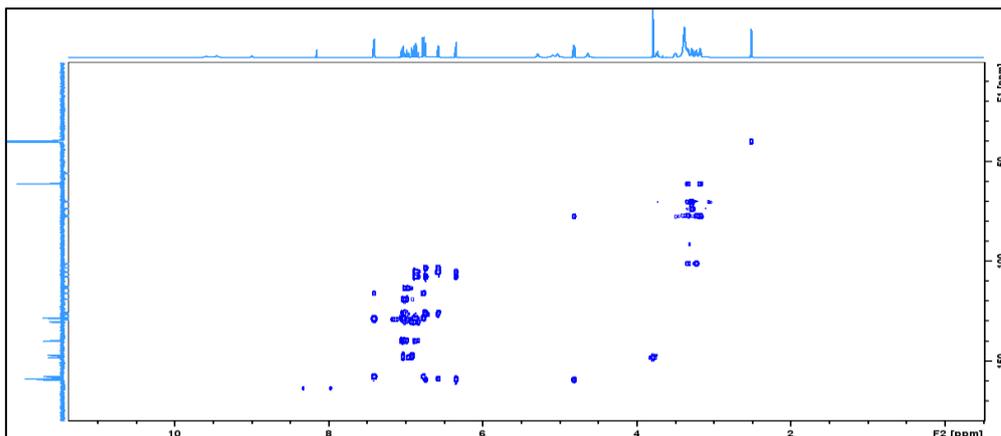


Figure 9: Spectre RMN HMBC composé G1 (MeOH d4, 600 MHz)

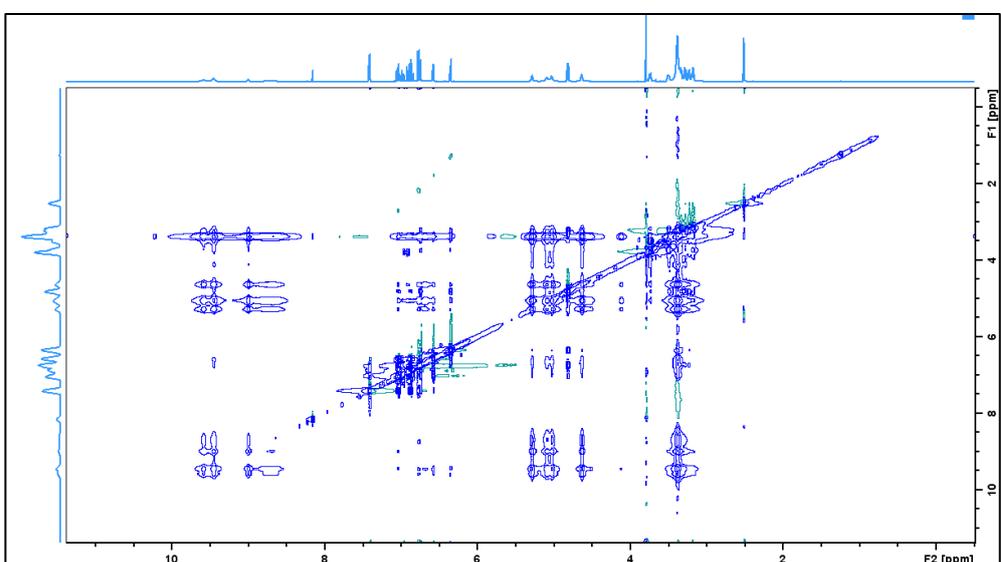


Figure 10: Spectre RMN NOESY composé G1 (MeOH d4, 600 MHz)

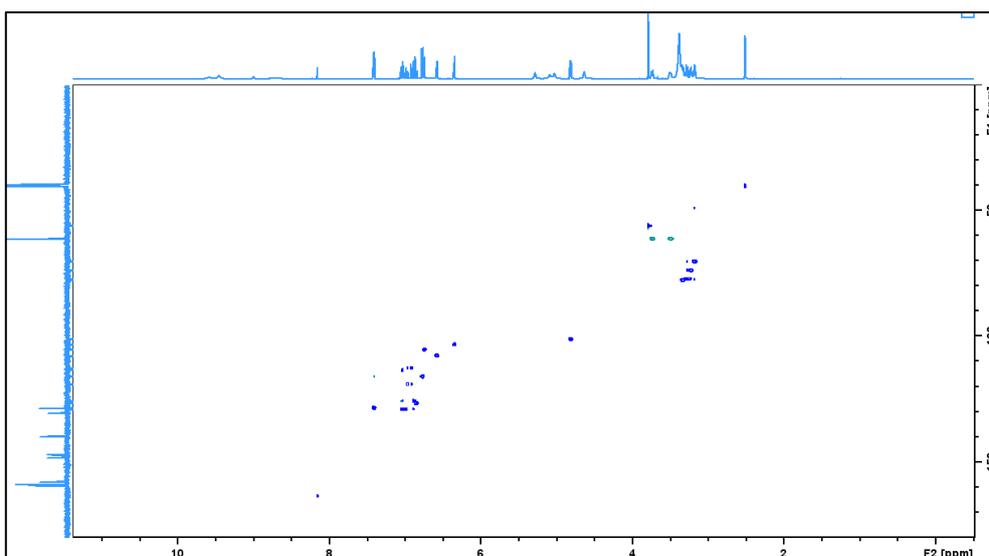


Figure 11 : Spectre RMN HSQC composé G1 (MeOH d4, 600 MHz)

Composé isolé de l'extrait éthanolique des feuilles de *Erismadelphus exsul* (en cours d'élucidation)

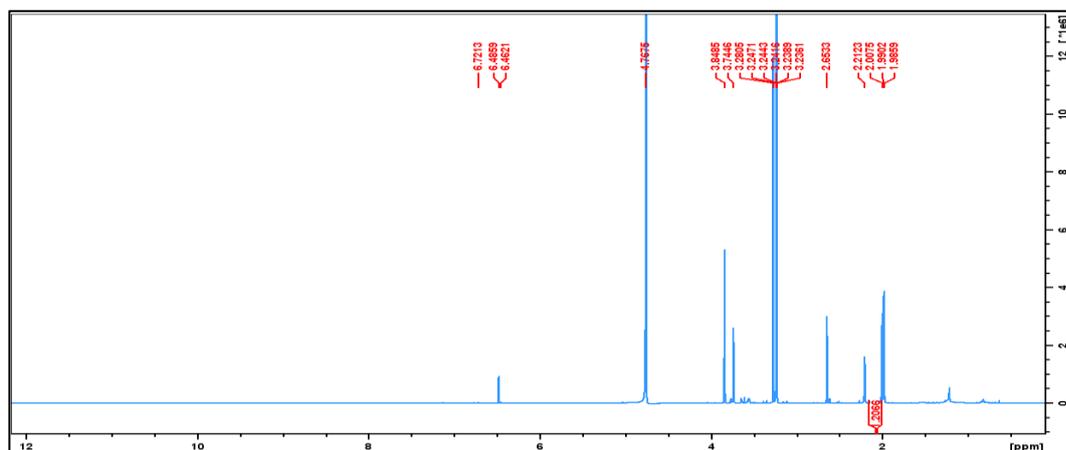


Figure 12 : Spectre RMN ^1H composé EE1 (MeOH d4, 600 MHz)

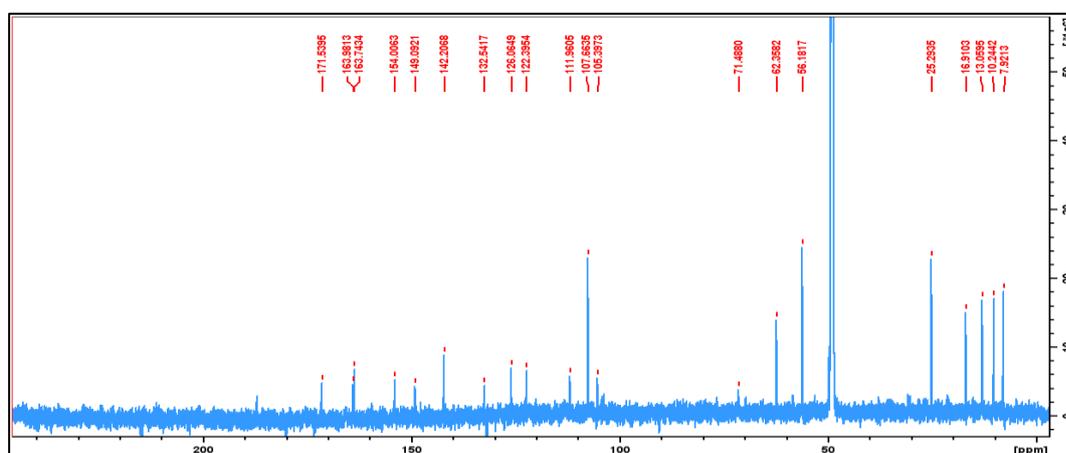


Figure 13 : Spectre RMN ^{13}C composé EE1 (MeOH d4, 600 MHz)

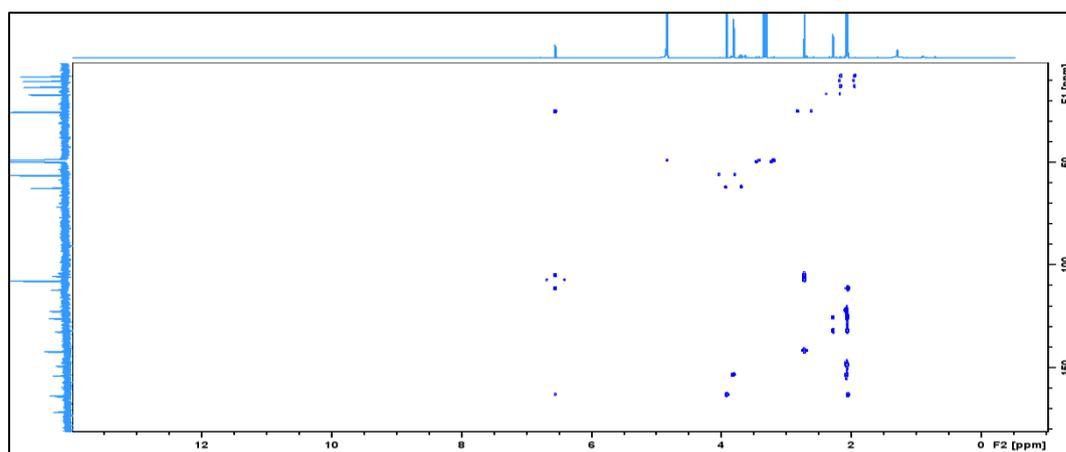


Figure 14 : Spectre RMN HMBC composé EE1 (MeOH d4, 600 MHz)

Communications orales

Congrès quatorzième journées scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique 2021 (RFMF) ‘Phytochemical characterization of *Erismadelphus exsul* Mildbr barks by LC-MS/MS and NMR and associated biological activities’.

Colloque Journées Jeunes Chercheurs Condorcet 2022 (JC2) ‘Caractérisation phytochimiques des feuilles de *Erismadelphus exsul* et activités biologiques associées’

Dixième journées scientifiques UMRT BioEcoAgro 1158 INRAE ‘Etudes phytochimiques et activités antimicrobiennes de *Erismadelphus exsul* Mildbr

Communication par affiche

Congrès du quatorzième journées scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique 2021 (RFMF) ‘Phytochemical characterization of *Erismadelphus exsul* Mildbr barks by LC-MS/MS and NMR and associated biological activities’

Publication

‘Combined LC-MS/MS and molecular networking approach reveals antioxidant and antimicrobial compounds from *Erismadelphus exsul* bark’ Morel Essono Mintsa, Elvis Otogo N’ngang, Élodie Choque, Ali Siah, Justine Jacquin, Jerome Muchembled, Roland Moli-nié, Romain Roulard, Dominique Cailleu, Mehdi A Beniddir, Cédric Sima Obiang, Joseph-Pri-vat Ondo, Brice Kumulungui and François Mesnard. **Article accepté pour publication dans la revue Plants chez MDPI.**